Министерство образования Российской Федерации

Новосибирский Государственный Университет

Факультет Естественных Наук

Кафедра молекулярной биологии

**Отчёт**

**по большому биохимическому практикуму:**

Руководитель: к.б.н. Дрёмов С.В.

Выполнила: студентка 4 курса гр.14411

Каманова Е.П.

Новосибирск 2017 г.

Содержание

**Введение**

В первую очередь, причина возникновения митохондриальных расстройств кроется в деффектах системы окислительного фосфорилирования, вследствии мутаций в митохондриальном геноме. Отличительная особенность митохондриальных заболеваний человека состоит в их фенотипической многоликости (предопределяется соотношением нормальных и мутировавших мтДНК) и в существовании гетероплазмии - смесь двух или более генотипов) ([Мазунин И.О.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=622662), 2010). Различные ткани и органы зависят от митохондриальной активности в разной степени, следовательно, будут обладать различным уровнем гетероплазмии митохондриальной ДНК для нарушения энергетического обмени и дисфункции определенного органа или ткани. Нервные и мышечные элементы наиболее подвержены последствиям изменений в работе митохондрий (Литвинова Н.А.,2014).

Наследственная оптическая нейропатия зрительного нерва Лебера(LHON) - наследственное митохондриальное заболевание, приводящее к серьезным нарушениям зрения. Причина возникновения LHON - мутации в митохондриальном геноме, одна из которых приводит к замене аминокислот в участке кодирующием одну из субьединиц NADH - убихинон (первый комплекс электрон транспортной цепи) (Kirches E., 2011). LHON наследуется исключительно по материнской линии и проявляется безболезненной потерей центрального зрения вследствие дегенерации ганглионарных нейронов сетчатки. Анализ уровня гетероплазмии в зрительном нерве относительно других тканей одного организма может доказать тканеспецифичность отдельных мутаций.

На сегодняшний день для диагностирования митохондриальных заболеваний можно использовать секвенаторы нового поколения, дающие результаты с высокой точностью

Цель данной курсовой работы – анализ полногеномного секвенирования митохондриальных ДНК людей, страдающих наследственной оптической нейропатией зрительного нерва Лебера, для выявления тканеспецифичных мутаций.

Задчи:

1. Выделение ДНК из образцов крови людей, страдающий наследственной оптической нейропатией зрительного нерва Лебера.
2. Провести ПЦР для наработки митохондриальной ДНК
3. Осуществить биоинфрматический анализ, для выявления тканеспецифичных мутаций

**Методы**

В ходе работы применялись следующие методы молекулярного анализа:

1. Выделение ДНК

Выделение ДНК из лейкоцитарного слоя образца крови донора проводили при помощи набора для выделения ДНК из цельной крови человека на магнитных частицах (SileksMagNA-G), согласно указаниям производителя. Принцип используемого в наборе метода основан на обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц.

Протокол выделения ДНК включал в себя следующие стадии:

* В образец крови (100мкл) добавляли 120 мкл буфера START, хорошо перемешивали и инкубировали 5 мин
* В отдельной̆ чистой̆ пробирке смешивали следующие компоненты: 240 мкл хорошо перемешанного буфера Lysis&Binding и 7 мкл хорошо перемешанных магнитных частиц (SileksMagNA-G для выделения ДНК). Тщательно перемешивали эту смесь.
* Добавляли приготовленную суспензию магнитных частиц в пробирку с образцом. Инкубировали в течение 3 минут при комнатной̆ температуре. Во время инкубации несколько раз перемешивали содержимое пробирки.
* Помещали пробирку в магнитных штатив для сбора частиц, удаляли супернатант.
* Перемещали пробирку в немагнитный штатив, ресуспендировали магнитные частицы в 300 мкл хорошо перемешанного буфера Wash 1 и тщательно перемешивали до получения гомогенной суспензии. Перенесли полученную суспензию в 1.5 мл пробирку для дальнейшего выделения.
* Помещали пробирку в магнитный штатив для сбора частиц, удалите супернатант
* Повторяли пункт 5 и 6 три раза с буферами Wash 1, Wash 2 и Final Wash соответственно.
* Инкубировали пробирку в термостате при 60 °C в течение 5 минут, чтобы высушить осадок частиц.
* Добавляли 50мкл буфера Elution. Тщательно ресуспендировали частицы до получения гомогенной суспензии и инкубировали в термостате при 60°C в течение 5 минут.
* Поместили пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Перенесли ДНК-содержащий̆ супернатант в чистую пробирку.

1. Полимеразная цепная реакция

Реакцию проводили в 24 мкл следующего состава: 10.25 мкл Н2О, 1.75 мкл MgCl2(25мМ), 5.00 PCR Buffer 5x KAPA, 10 мМ дНТФ, 2.5 мкл праймера mtL (10мМ), 2.5 мкл праймера mtH (10мМ) (пары праймеров указаны в таблице 1), 2.5 ед. KAPA-полимеразы, 1 мкл ДНК.

Таблица 2. Список олигонуклеотидов, использовавшихся в роли праймеров для проведения ПЦР.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| название | Последовательноть (5’ → 3’) | Размер, п. н. |
| mtL13389 | TCCATCATCCACAACCTTAAC | 1170 |
| mtH14559 | GATTGTTAGCGGTGTGGTCG |
| mtL5828 | GAAAATCACCTCGGAGCTGG | 925 |
| mtH6753 | TGTGCTCACACGATAAACCC |
| mtL6563 | ACCTCAACACCACCTTCTTC | 934 |
| mtH7497 | TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC |
| mtL4322 | ATAATAGGAGCTTAAACCCCC | 871 |
| mtH5193 | GTGTTAGTCATGTTAGCTTG |

Реакция ПЦР осуществлялась в амплификаторе (Bio-Rad C1000™ thermal cyclers) со следующим температурным профилем:

* Первичная денатурация – 94 °С – 3 мин
* Цикличная денатурация – 94 °С – 0.25 мин
* Отжиг праймеров – 60 °С – 0.15 мин

35 циклов

* Элонгация – 68 °С – 11. 50 мин
* Финальная элонгация – 72 °С – 11.50 мин
* Хранение – 12 °С – ∞

1. Гель-электрофорез

Визуализацию результатов ПЦР осуществляли при помощи гель-электрофореза в агарозном геле. В агарозный гель (1% раствор агарозы в TAE-буфере (40 мM Трис- ацетат (pH7.6), 1 мM ЭДТА)) для визуализации фрагментов ДНК добавляли бромистый этидий до концентраций 0.5 мкг/мл. Затем гель заливали в камеры для горизонтального электрофореза. При нанесении на гель каждую пробу предварительно смешивали с 2 мкл буфера для загрузки в гель (60% глицерин, 0.6% бромфеноловый синий).

1. Определение концентрации ДНК

Измерения концентрации ДНК проводились с помощью спектрофотометра (NanoDrop Lite spectrophotometer).

1. Секвенирование проводилось на платфореме Illumina HiSeq.

Методы биоинформатического анализа

Оценка сырых коротких прочтения Illumina была осуществленна программой FastQC. Адаптерные последовательности удалены при помощи AdapterRemoval v2.2.1 (Schubert et al., 2016). Отфильтрованные короткие прочтения были картированы на референсную последовательность Reconstructed Sapiens Reference Sequence (RSRS) (Behar et al., 2012) при помощи BWA-MEM v0.7.15 (Li, 2013). Консенсусные последовательности и координаты мутаций ДНК получали при помощи GATK 3.8-0 (McKenna et al. 2010).

**Результаты**

В ходе проделанной работе, были выделены ДНК, полученные от 25 пациентов, страдающих наследственной оптической нейропатией зрительного нерва Лебера

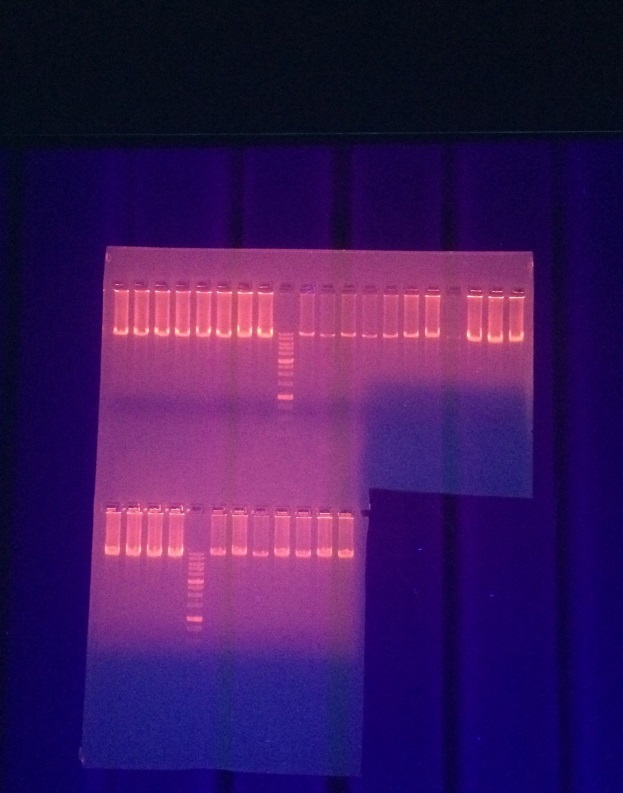


Рисунок 1. Продукты ПЦР митохондриальной последовательности