

ТЕМАТИЧЕСКИЙ БЛОК №2

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Важнейшей задачей медицинской генетики является изучение строения и функционирования материальных носителей наследственной информации - хромосом человека в норме и патологии. Изучением хромосом на всех уровнях их организации занимается наука *цитогенетика*.

1882 год считается годом открытия хромосом, а их первооткрывателем чаще всего называют немецкого анатома В. Флеминга, хотя описания структур, которые были позже названы немецким гистологом В. Вальдейером (1888 г.) хромосомами были сделаны в научных работах И.Д. Чистякова (1873 г.), Э. Страсбургера (1875 г.), О. Бючли (1876 г.) и др. Первоначально термин «хромосома» (дословно «окрашенное тело») обозначал нитевидные структуры, видимые в микроскоп, которые хорошо воспринимали основные красители. Переоткрытие законов Менделя в 1900 году, изучение поведения хромосом в процессе мейоза и при оплодотворении способствовало выдвиганию гипотезы о роли хромосом как единицы «наследственности» (Т. Бовери 1902 г., У. Сеттон 1902-1903 гг.). Позже, в 20-х годах XX века, данная гипотеза получила экспериментальное подтверждение благодаря ученым Т. Моргану, К. Бриджесу, А. Стертеванту, Г. Меллеру, результатом исследований которых стало создание хромосомной теории наследственности. Помимо подтверждения факта, что хромосомы являются материальными носителями наследственности, в частности, было установлено, что для каждого биологического вида характерно постоянное определенное число хромосом, отличающихся друг от друга количественными и качественными признаками, которые в совокупности составляют *кариотип* (термин предложен Л.Н. Делоне в 1922г.).

На протяжении долгого времени считалось, что кариотип человека состоит из 48 хромосом (Т.С. Пейнтер, 1922г.). В 1956 г. шведские цитологи Дж. Тио и А. Леван, применив усовершенствованную цитологическую технику, на материале культуры фибробластов легочной ткани 4 человеческих эмбрионов установили, что количество хромосом в кариотипе человека равно 46. Эти данные были подтверждены в том же

году работой английских цитологов - С. Фордом и Дж. Хамертоном. Оба события стали началом бурного развития цитогенетики человека.

Цитогенетические методы

Цитогенетический метод занимает важное место среди многих методов изучения наследственности человека. С его использованием были открыты все хромосомные болезни человека. Данный метод позволяет провести анализ кариотипа в норме и патологии, изучить закономерности мутационного и эволюционного процессов.

Изучение кариотипа человека проводят в культуре лимфоцитов периферической крови, кожных фибробластов, клеток костного мозга, а также половых клеток. Для анализа кариотипа плода могут быть использованы клетки ворсин хориона (9-11 неделя внутриутробного развития), а в более позднем сроке возможно исследование клеток плода, выделенных из амниотической жидкости, пуповинной крови и плаценты. В большинстве случаев для цитогенетического анализа у человека в постнатальном периоде используются лимфоциты периферической крови, так как эти клетки являются наиболее доступными с точки зрения их получения. Для исследования кариотипа человека достаточно получить образец периферической крови в количестве 1-2 мл.

Цитогенетический анализ состоит из трех последовательных этапов:

1. Культивирование клеток
2. Окраска препарата
3. Микроскопический анализ препарата

Культивирование клеток. Образец полученной крови для начала помещают в питательную солевую среду с добавлением фитогемагглютинина, для стимуляции процесса деления клеток. В процессе митоза хромосомы достигают максимальной спирализации в метафазе, соответственно именно на данном этапе хромосомы максимально доступны для изучения. Для остановки митотического деления за полтора часа до окончания культивирования в культуру вводят колхицин, который разрушает клеточное веретено в результате чего процесс деления останавливается на

стадии метафазы. Продолжительность культивирования составляет 72 ч. После его окончания клетки с питательной средой центрифугируют и помещают в гипотонический раствор хлорида калия или цитрата натрия, что приводит к разрыву ядерной оболочки и межхромосомных связей и свободному перемещению хромосом в цитоплазме. Далее клетки фиксируют смесью метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1, после чего полученную клеточную суспензию раскапывают на охлажденные влажные предметные стекла и высушивают на воздухе (рис. 24).

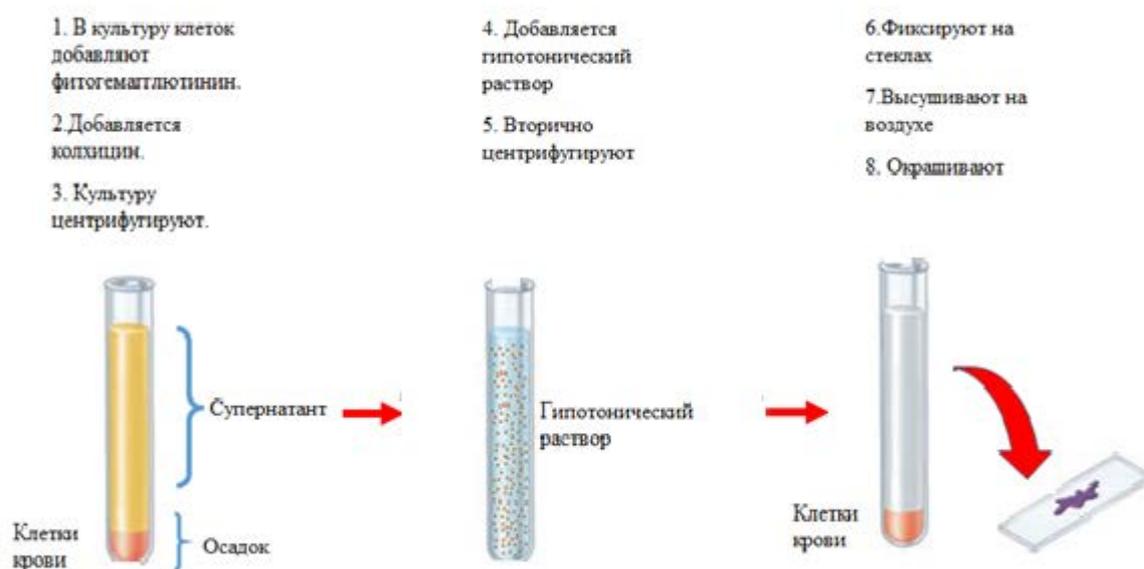


Рис. 24. Этапы подготовки клеток к кариотипированию.

Окраска препаратов. В зависимости от целей исследования используются различные методики окрашивания¹.

Рутинный метод окрашивания хромосом применяют для определения количества хромосом (количественных аномалий кариотипа) в препарате а также специфического сайта ломкости при синдроме fragile X-хромосомы. Краситель Гимзы, используемый при этой окраске равномерно прокрашивает хромосомы по всей длине, что дает возможность определить их количество, а так же идентифицировать хромосомы по форме и соотносительному размеру (рис. 25). С

¹ Большой вклад в разработку дифференциального способа окраски хромосом внесли Т. Касперсон, отечественные исследователи А.Ф. Захаров, Н.А. Еголина, Ю.В. Селезнев.

помощью этой методики было идентифицировано большинство хромосомных аномалий (синдромов), характеризующихся изменением количества хромосом.

Методики дифференциальной окраски (рис. 25).

Использование рутинного метода окраски не позволяет выявлять структурные перестройки хромосом. В этих случаях применяют методы дифференциальной окраски, в результате которой хромосомы приобретают уникальную для каждой хромосомы поперечную исчерченность – чередование темных и светлых полос различной толщины, обусловленную неодинаковой окраской участков по длине хромосомы. Изучение полученных хромосом позволяет выявлять структурные перестройки. Различная окраска хромосом на их протяжении объясняется различным количеством А—Т- и G—С-пар оснований, асинхронностью репликации различных участков ДНК, а также особенностями строения нуклеосом. Самым простым и эффективным методом дифференциального окрашивания является *G-метод* (от англ. *Giemsa* – Гимза). В этом случае, предварительно обработанные раствором трипсина хромосомы, также окрашиваются красителем Гимзы, что приводит к появлению специфичного для каждой хромосомы рисунка поперечной исчерченности. Другие методы окраски используются реже вследствие их сложности или узкой специфичности.

R-метод (от англ. *reverse* – обратная) позволяет получить исчерченность хромосом, противоположную таковой, которая имеет место при окраске G-методом (эухроматиновые участки являются темноокрашенными, а гетерохроматиновые – светлыми).

C-метод (от англ. *constitutive heterochromatin* – конститутивный гетерохроматин) позволяет идентифицировать центромерные и околоцентромерные районы хромосом, содержащие структурный гетерохроматин (1, 9, 16 и Y-хромосома).

Q-метод (от англ. *quinacrine* – акрихин) предполагает использование флюорохромных красителей (акрихин, акрихин-иприт, квинакрин и другие), что позволяет выявлять ярко светящиеся районы 3, 4, 13-15, 21, 22 и Y-хромосом.

T-окраска (от англ. *telomere* – теломера) – применяется для выявления теломерных районов хромосом в коротких и длинных плечах.

NOR- или *Ag-окраска* (от англ. *Nucleolar Organizer Region* – Ядрышко-Образующие Районы – ЯОР) или *Ag-окраска* (серебрение) – применяется для выявления ядрышкообразующих районов, расположенных в коротких плечах всех 5 пар акроцентрических хромосом человека (13, 14, 15, 21 и 22), с помощью окрашивания солями серебра.



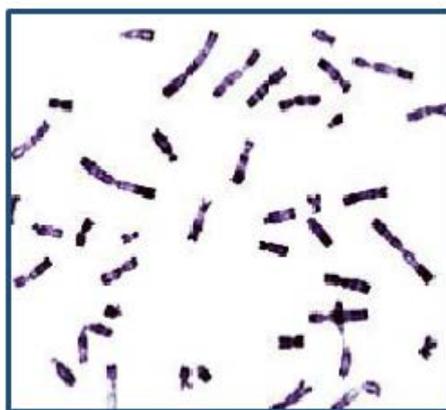
Рутинный метод



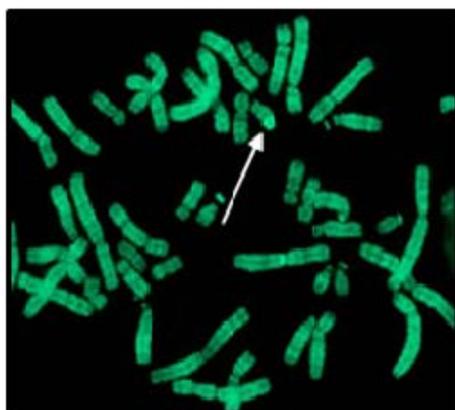
C-метод



Q-метод



R-метод



Q-метод



NOR- или Ag-окраска

Рис. 25. Методики дифференциальной окраски хромосом.

Микроскопирование препаратов метафазных хромосом. В медико-генетической практике используется световая микроскопия (главным образом в проходящем свете), в том числе люминесцентная микроскопия. Для достоверного выявления хромосомных аномалий необходимо проанализировать не менее 30 метафазных пластинок. Микроскопическая техника в цитогенетических лабораториях оснащена камерами, с помощью которых можно фотографировать хромосомы. Достижения последних лет в области технологий позволили цитогенетикам получать микроскопические изображения на экране компьютера, что значительно облегчило процесс кариотипирования (рис. 26).



Рис. 26. Световая микроскопия препарата с выводением на видеоэкран.

Описанный метод приготовления препарата называется *метафазным*, так как изучаемые хромосомы находятся на этой стадии деления в максимально конденсированном состоянии. Для детального анализа определенного района хромосомы, метафазные хромосомы не используются по причине их сильной конденсированности, и, как следствие, недоступности для исследования. В этом случае клетку фиксируют на стадии прометафазы, то есть когда хромосома уже редуцировалась, но еще не достигла максимальной стадии конденсации. Данная методика является более трудоемкой, так как прометафазные хромосомы еще очень длинные и практически не разъединены поэтому очень сложно найти участок, пригодный для анализа. Этот метод называют *прометафазным*, или *методом высокоразрешающей цитогенетики*. Цитогенетики в своей повседневной работе

сравнивают образцы со стандартами, полученными при изучении нормальных кариотипов человека.

В 1960 году в Денвере (США) была проведена первая Международная научная конференция цитогенетиков, по итогам которой были разработаны принципы классификации хромосом человека. В зависимости от морфологической характеристики, учитывающей размеры, форму и положение центромеры, соотношению длины плеч, наличию спутников, все хромосомы были поделены на 7 групп (табл. 2):

Таблица 2

Денверская классификация хромосом и их характеристика

Группа	№ хромосомы	Положение центромеры	Центриольный индекс (%)	Примечания
А	1	Самая большая метацентрическая	48-49	На длинном плече может быть вторичная перетяжка
	2	Самая большая субметацентрическая	38-40	
	3	Большая метацентрическая	45-46	На 20% короче первой
В	4,5	Крупные субметацентрическая	24-30	
С	6-12, X	Средние субметацентрические	27-35	На 9-ой часто вторичная перетяжка
Д	13-15	Средние акроцентрические	≈ 15	На всех вторичные перетяжки
Е	16	Маленькая метацентрическая	40	В 10% случаев встречается вторичная перетяжка
	17	Маленькая субметацентрическая	34	
	18	Маленькая субметацентрическая	26	
Ф	19-20	Самые маленькие метацентрические	36-46	
Г	21-22, Y	Самые маленькие акроцентрические	≈13-33	На 21-й и 22-й вторичные перетяжки

Недостатком Денверской классификации являлось то, что будучи разработанной на основе метода равномерно окрашенных хромосом, разграничение гомологичных пар внутри группы хромосом встречало зачастую непреодолимые трудности.

На основе новых методов дифференциальной окраски в 1971 году в Париже были разработаны карты линейной дифференцированности хромосом человека и предложена система их обозначения. Согласно установленным правилам короткое и длинное плечо хромосомы обозначаются соответственно латинскими буквами р и q. От центromеры к теломере в каждом плече по маркерам выделяют районы, обозначаемые арабскими цифрами. В пределах районов идентифицируют сегменты — постоянные участки, отличающиеся по интенсификации окраски (рис. 27). Они также обозначаются арабскими цифрами. Так, символ 1р22 означает 2-й сегмент 2-го района короткого плеча хромосомы 1.

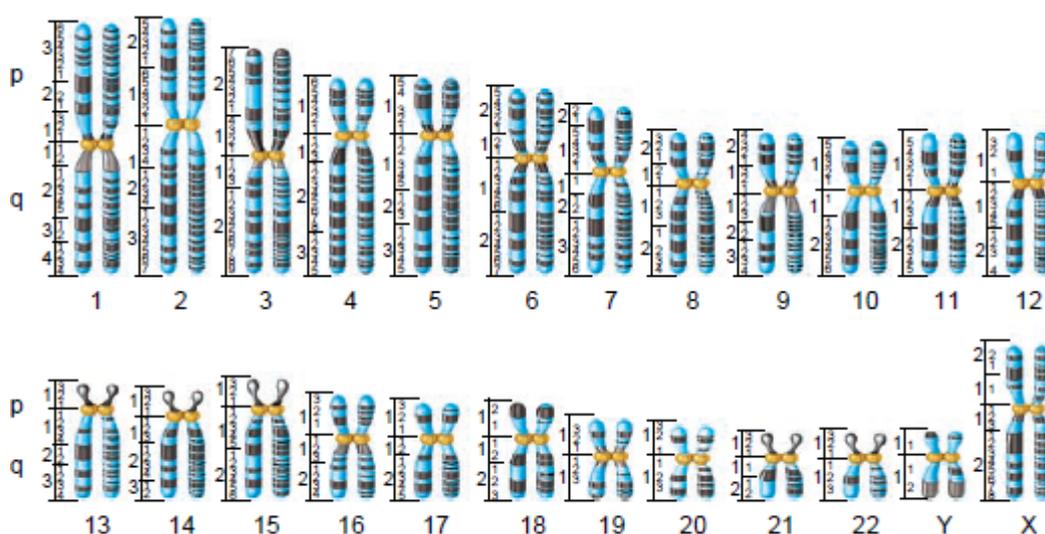


Рис. 27. Схематическое изображение расположения локусов в хромосомах человека при их дифференциальной окраске

По мере внедрения в цитогенетику новых методов классификация хромосом неоднократно дополнялась и в 1978 г. была разработана «Международная система номенклатуры хромосом человека». Классификации дорабатывалась и в последующие годы (1981, 1985, 1991, 1995, 2004). В 2005 г. вышла в новой редакции под названием «Международная система для цитогенетической номенклатуры человека».

Молекулярно-цитогенетические методы

Одним из высокоинформативных методов изучения хромосом является метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, или так называемый FISH-метод (от англ. *fluorescent in situ hybridization*). Метод позволяет идентифицировать индивидуальные хромосомы, отдельные гены, а также расшифровывать сложные межхромосомные перестройки.

FISH-метод состоит из нескольких этапов (рис. 28).

1. Изготовление зонда. Для этого синтезируется однонитевая ДНК комплементарная изучаемой хромосоме или ее участку, к которой присоединяется биотин (или дигоксигенин).

2. При обработке щелочью на микроскопическом препарате *in situ* хромосомная ДНК денатурируется (разрываются связи между двумя нитями ДНК).

3. Препарат обрабатывают зондом. Последний присоединяется к хромосоме, так как последовательность оснований ДНК зонда и соответствующий участок хромосомы взаимно комплементарны. В этом участке происходит ренатурация ДНК.

4. Препарат обрабатывают веществом, которое способно избирательно присоединиться к биотину (или дигоксигенину). Для биотина это стрептовидин. К этим веществам могут быть присоединены в один или два этапа флуоресцентные красители (родамин - красный цвет или флуоресцеина изотиоцианат - зеленый цвет и другие флюорохромы).

5. С помощью люминесцентного микроскопа окрашенные хромосомы можно увидеть на фоне неокрашенных.

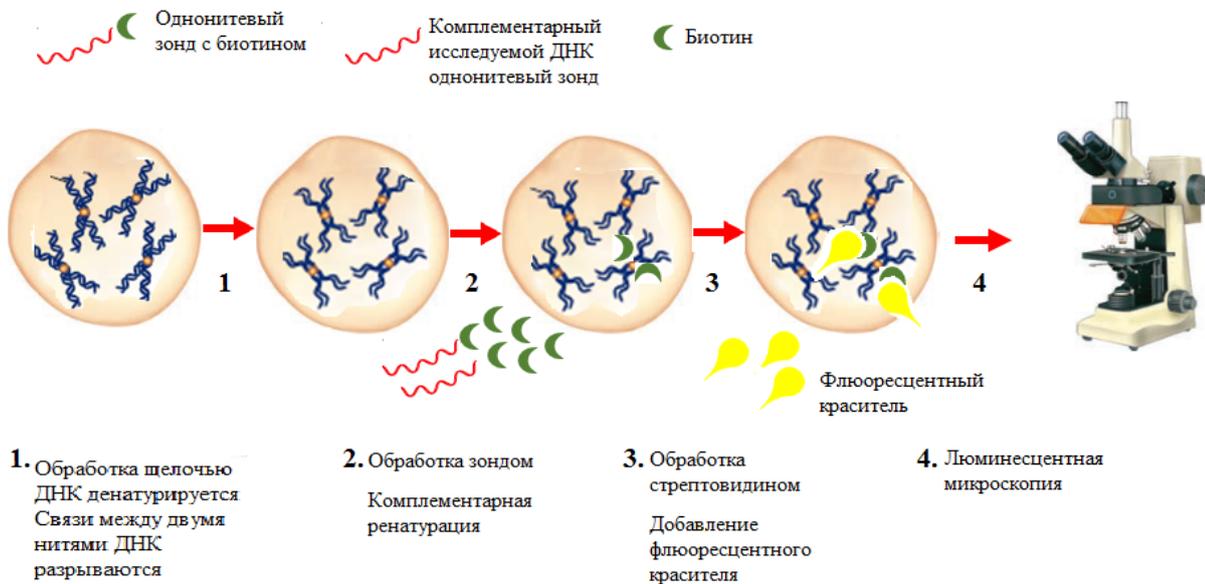


Рис. 28. Этапы флюоресцентной гибридизации *in situ*

В клинической цитогенетике чаще всего применяется двух- и трехцветная флюоресцентная FISH гибридизация *in situ* (рис. 29).

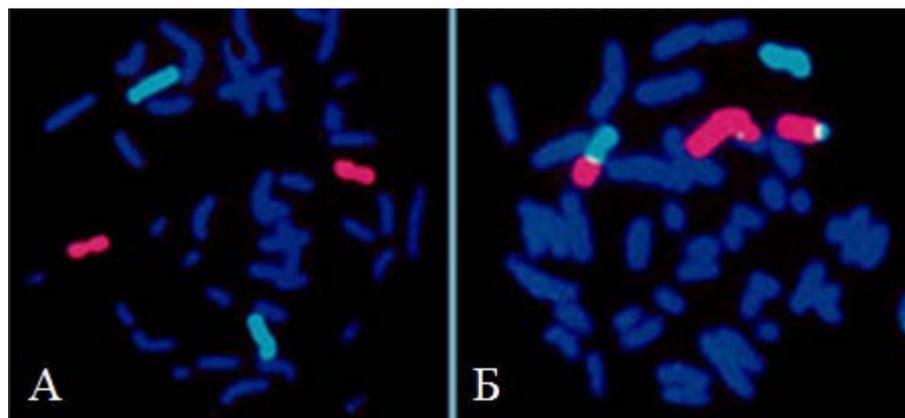


Рис. 29. Хромосомы окрашенные по методике 2-х цветной флюоресцентной гибридизации (FISH) *in situ*: А – норма, Б – реципрокная транслокация. (На микрофотографии 7 хромосома окрашена в голубой цвет, 12 хромосома – в красный)

На рисунке приведена двойная гибридизация, однако современные технические возможности позволяют увеличить число цветов.

FISH метод широко применяется в картировании генома, идентификации хромосомных аномалий, при проведении пренатальной и постнатальной диагностики. Метод используется также в клинической цитогенетике, онкогенетике, гематологии и пр.

Нормальный кариотип человека

Кариотип человека в норме состоит из 23-х пар хромосом, которые располагают под номерами в порядке убывания их линейных размеров (рис. 30). Аутосомы (все хромосомы кроме половых) образуют одинаковый набор у обоих полов. Мужской набор половых хромосом XY, женский – XX. Кариотип нормального мужчины – 46, XY, нормальной женщины 46, XX. Y-хромосома состоит преимущественно из гетерохроматина. Небольшая по длине эухроматиновая часть содержит 397 генов. В клетках женского организма происходит инактивация одной из X-хромосом для компенсации дозы генов. X-хромосома содержит 1606 генов, при этом в ней остается небольшая неинактивированная часть, содержащая примерно четверть генов, что уравнивает дозу работающих генов у обоих полов (примерно 400 генов половых хромосом представлено двумя копиями).

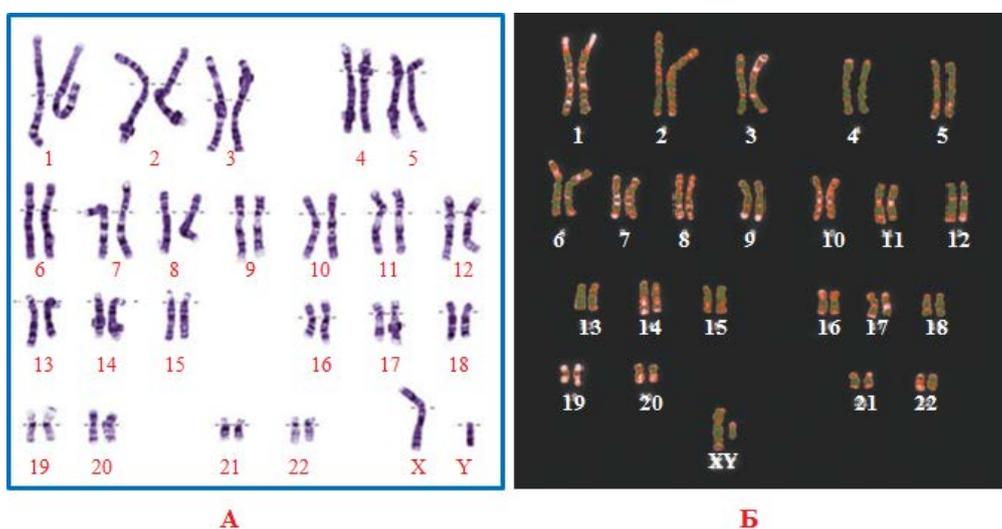


Рис. 30. Нормальный кариотип человека (мужчина): А – G-метод окрашивания, Б – multi FISH окрашивание.

Согласно общепринятой международной номенклатуре кариотип записывается следующим образом: вначале записывают общее число хромосом, затем – половые хромосомы. При нормальном кариотипе этим и ограничиваются, при наличии хромосомных нарушений их описывают при помощи специальных обозначений.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Молекулярно-генетические методы предназначены для выявления вариаций в структуре участка ДНК вплоть до расшифровки первичной последовательности оснований. В основе этих методов лежат манипуляции с ДНК и РНК.

В медицинской генетике молекулярно-генетические методы исследования используются для диагностики мутаций, их ассоциации с наследственными заболеваниями, а также выявления гетерозиготных и гомозиготных носителей мутаций.

Преимуществом ДНК-диагностики является использование унифицированного набора методов, практически не зависящего от целей проводимого исследования. Это методы выделения ДНК, ПЦР, электрофорез, рестрикция ДНК, гибридизация со специфическими ДНК-зондами и секвенирование. Таким образом, в пределах одной лаборатории можно заниматься ДНК-диагностикой широкого спектра заболеваний.

Основные этапы молекулярно-генетических методов

Получение образцов ДНК (или РНК).

Источником *геномной ДНК* могут быть любые ядродержащие клетки, однако чаще всего используются лейкоциты периферической крови, культуры фибробластов, клетки ворсин хориона, амниотические клетки. Для одного анализа требуется в среднем 1 мл крови, 5-10 мг культуры клеток и т.д. Такое количество биоматериала позволяет получить от нескольких нанограммов до нескольких микрограммов ДНК.

У человека ДНК чаще всего выделяют из лейкоцитов периферической крови. Последовательность этапов выделения ДНК выглядит следующим образом: забор крови из вены (1- 5 мл крови в присутствии антикоагулянтов) – отстаивание и отбор слоя, обогащенного лейкоцитами – добавление детергентов для разрушения мембраны клеток – мягкое центрифугирование для осаждения ядер на дно пробирки – удаление надосадочной жидкости (супернатанта) – добавление детергентов для разрушения мембраны ядер – выход ДНК в раствор. На следующем этапе необходимо отделить фракцию высокомолекулярных ДНК от низкомолекулярных соединений (фрагменты белков, липиды, углеводы и пр.) путем экстракции фенолом, после которой раствор, содержащий ДНК отбирают, подвергают очистке, а затем осаждают с помощью добавления в раствор этанола. В результате проведенных манипуляций

ДНК выпадает в осадок в виде аморфного образования. В таком состоянии ее можно длительно хранить при низких температурах.

Полимеразная цепная реакция. ПЦР - это метод амплификации (умножения) ДНК *in vitro*². Метод позволяет за несколько часов размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в миллион раз и более. Для проведения ПЦР необходимо знать нуклеотидную последовательность амплифицируемого фрагмента. В соответствии с нуклеотидной последовательностью концов 5' и 3' исследуемого участка синтезируется два олигонуклеотидных праймера (затравки) длиной 20-30 нуклеотидов. Процесс амплификации состоит в повторяющихся циклах. Каждый цикл включает 3 стадии:

- ✓ температурная денатурация ДНК (разделение двухцепочечной ДНК на одноцепочечные молекулы);
- ✓ отжиг – присоединение праймеров к комплементарным последовательностям одноцепочечных молекул;
- ✓ синтез полинуклеотидных цепей на одноцепочечных молекулах в границах присоединенных праймеров с помощью полимеразы.

Рестрикция ДНК на фрагменты. Осуществляется рестриктазами (эндонуклеазами), которые способны разрывать двухцепочечную ДНК в пределах строго определенных для каждого фрагмента последовательностей нуклеотидов протяженностью 4-6 пар оснований (редко больше).

Электрофорез фрагментов ДНК обеспечивает разделение этих фрагментов при их распределении на поверхности полиакриламидного геля. Фрагменты ДНК движутся в геле, помещенном в постоянное электрическое поле, от отрицательного полюса к положительному в зависимости от размеров (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется в электрическом поле). После окончания электрофореза каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в виде дискретной полосы в конкретном месте геля. Длину каждого

² Первооткрыватель этого метода Керри Мулис за свое изобретение был удостоен Нобелевской премии в 1993 году.

фрагмента можно определить путем сравнения пройденного фрагментом расстояния с расстоянием, пройденным стандартным образцом ДНК с известными размерами.

Визуализация и идентификация фрагментов ДНК в геле становятся либо конечным этапом диагностики, либо элементом дальнейшего анализа.

Визуализация фрагментов ДНК после ПЦР осуществляется сравнительно легко. После окончания ПЦР проводят электрофорез в агарозном геле, после чего гель обрабатывают этидия бромидом, который связывается с ДНК. При ультрафиолетовом облучении поверхности геля выявляется свечение в красной области спектра.

Разработаны и другие методы окраски ПЦР-фрагментов. В некоторых вариантах методов возможна автоматическая регистрация результатов.

Идентификацию конкретных фрагментов в геле среди геномной ДНК провести труднее. Из-за больших размеров генома человека после рестрикции образуется так много рестриктных фрагментов, что агарозный гель после электрофореза и окраски этидия бромидом в ультрафиолетовых лучах выглядит более или менее равномерно окрашенным. Специфические фрагменты ДНК выявляют путем *блот-гибридизации по Саузерну*.

Блот-гибридизации по Саузерну

Эта методика состоит из следующих этапов (рис. 41):

1. После окончания электрофореза гель помещают в раствор основания (щелочи), в котором двухцепочечные фрагменты ДНК теряют связи и становятся одноцепочечными.

2. Перенос ДНК с геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр производится в буферном растворе. Непосредственно на поверхность геля кладут фильтр и стопку фильтровальной бумаги. В результате капиллярного эффекта создается ток буфера, перпендикулярный плоскости геля. Вымываемая из геля ДНК задерживается фильтром и практически полностью оказывается на его поверхности.

После переноса одноцепочечные нити фиксируют на фильтре. Расположение фрагментов на фильтре точно соответствует их расположению в геле.

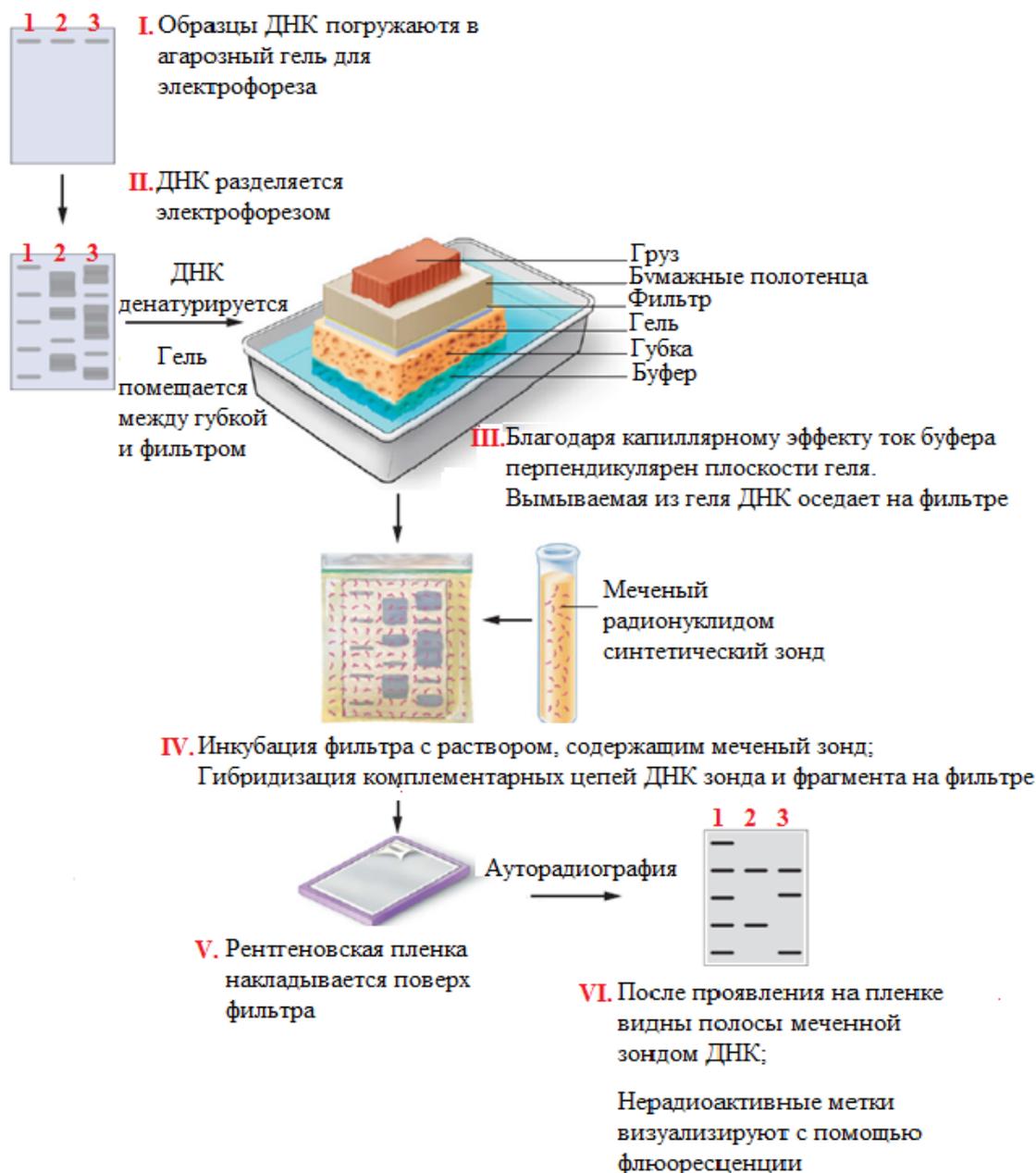


Рис. 41. Блот-гибридизации по Саузерну.

3. Для того чтобы визуально выявить нужные фрагменты (фиксированная на фильтре ДНК не видна), проводят гибридизацию со специфическим по нуклеотидной последовательности меченым радионуклидом или флюоресцентной меткой олигонуклеотидным синтетическим зондом (такой зонд состоит из 16-30 пар оснований) либо клонированным фрагментом ДНК. Нуклеотидная

последовательность зонда должна быть полностью или частично комплементарна изучаемому участку геномной ДНК.

4. При инкубации фильтра с раствором, содержащим меченый зонд, происходит гибридизация комплементарных цепей ДНК зонда и фрагмента на фильтре. Неспецифически связанные молекулы зонда отмываются с помощью специальной процедуры. Радиоактивно меченные участки выявляют путем экспонирования фильтра с рентгеновской пленкой (ауторадиография). После проявления на пленке видны полосы меченой зондом ДНК. Нерадиоактивные метки визуализируют с помощью флюоресценции или опосредованно с помощью антител.

Заключительным этапом анализа мутаций является их *секвенирование*, т.е. определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК.

Метод секвенирования. Любые типы мутаций можно обнаружить путем прямого секвенирования мутантной кДНК или отдельных экзонов. Первичный поиск нарушений в кодирующих областях гена часто осуществляют именно таким образом. Для некоторых генов, имеющих небольшие размеры, прямое секвенирование с успехом применяется как основной метод сканирования мутаций. В настоящее время для секвенирования широко используется *дидезоксинуклеотидный метод* разработанный Ф. Сэнгером в 1977 г.

До начала секвенирования производят ПЦР-амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, с использованием в качестве предшественников молекулы дидезоксинуклеозид трифосфатов (ддНТФ). При этом методе секвенирования происходит гибридизация синтетического праймера (17–25 п.н.), инициирующего синтез цепи, комплементарной матрице, со специфическим участком одной из цепей секвенируемого фрагмента.

В одной пробирке дидезоксинуклеотиды метят четырьмя разными флуоресцентными красителями и проводят ПЦР. Затем во время электрофореза в полиакриламидном геле луч лазера в определенном месте геля возбуждает

флуоресценцию красителей, и детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель (рис. 42).

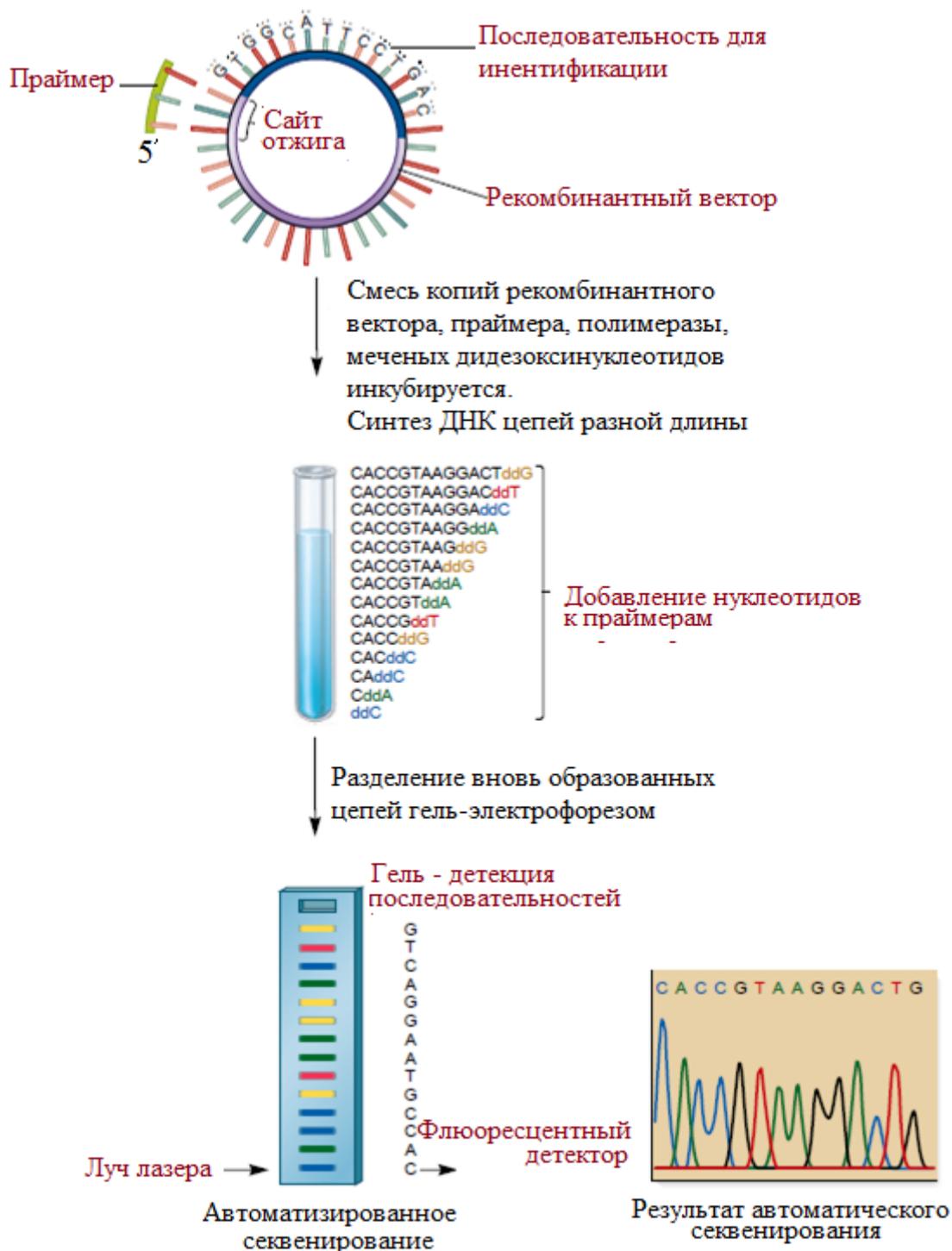


Рис. 42. Этапы секвенирования.

Принципиально различают прямую и косвенную ДНК-диагностику моногенных наследственных болезней.

Прямые методы ДНК-диагностики

Прямые методы используются при условии, что ген заболевания клонирован, известна его экзон-интронная организация или нуклеотидная последовательность полноразмерной комплементарной ДНК. При прямой диагностике предметом анализа являются мутации гена.

Если мутации известны, то можно их выявлять либо с помощью ферментов-рестриктаз, которые распознают строго определенные нуклеотидные последовательности, либо на основе ДНК-гибридизации. К числу таких методов относятся следующие:

Рестрикционный анализ. Его суть состоит в том, что рестрикционные эндонуклеазы (бактериальные ферменты) разрезают двойную нить ДНК в определенных последовательностях из 4-8 нуклеотидов. Разрезание мутантной ДНК дает участки, отличающиеся по длине от нормальных участков, что и выявляется на электрофореграмме. Если в состав сайта рестрикции входит полиморфный нуклеотид, эту мутацию можно выявить абсолютно достоверно. Если полиморфные нуклеотиды лежат в неузнаваемых рестриктазой участках, то метод рестрикционного анализа неприменим.

Аллельспецифичная ПЦР используется для выявления точковых мутаций, небольших делеций и инсерций в исследуемых генах. ПЦР позволяет многократно увеличить уникальную последовательность ДНК, а затем проанализировать ее на предмет мутации. С помощью специфических олигонуклеотидных праймеров проводят амплификацию кодирующих участков геномной ДНК.

Наряду с двумя разобранными выше прямыми методами детекции известных мутаций широко применяется ПЦР в реальном времени.

Если характер мутации неизвестен, а клиническая картина заболевания позволяет предположить, в каких генах могла произойти мутация, то в лабораторной диагностике применяются следующие методы *мутационного скрининга*: анализ перестроек ДНК-блотингом по Саузерну; анализ полиморфизма конформации одноцепочечной ДНК; гетеродуплексный анализ; электрофорез двухцепочечной ДНК в градиенте денатуранта и др.

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) - метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК - основан на регистрации различий в электрофоретической подвижности однонитевых ДНК, одинаковых по величине, но различающихся вследствие нуклеотидных замен по пространственной организации молекул (рис. 8. 18). Конформация небольших однонитевых ДНК зависит от нуклеотидной последовательности, поэтому замена даже одного нуклеотида приводит к изменению пространственной структуры. Метод включает амплификацию фрагментов ДНК размером до 300 п.н., денатурацию продуктов ПЦР и высокоразрешающий электрофорез в полиакриламидном геле.

HA (Heteroduplex Analysis) - гетеродуплексный анализ позволяет выявлять мутации, находящиеся в гетерозиготном состоянии, а также инсерции и делеции. Принцип этого метода заключается в следующем. При амплификации фрагментов генов гетерозигот, последующей денатурации и медленной ренатурации полученных продуктов ПЦР в амплификационной смеси наряду с двумя типами гомодуплексов образуются гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепями. Такие гетеродуплексные молекулы отличаются по электрофоретической подвижности от гомодуплексов из-за конформационных особенностей в местах несовпадения нуклеотидов, поскольку электрофоретическая подвижность гетеродуплексов значительно ниже, чем гомодуплексов. Эти различия обнаруживаются при электрофорезе в обычном полиакриламидном геле.

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) - денатурирующий градиентный гель-электрофорез. ДНК-дуплексы подвергаются миграции в геле с градиентом денатурирующих условий (можно использовать и температурный градиент). Миграция продолжается до тех пор, пока ДНК-дуплексы не достигают в геле точки плавления и не разделяются, после чего миграция фрагментов останавливается. Однонуклеотидные различия в нормальной и тестируемой ДНК выявляются по различной электрофоретической подвижности в геле. Высокая чувствительность метода (95%) достигается благодаря специфическим праймерам с так называемым GC-зажимом, представленным чередованием гуанина и цитозина в пределах до 20 нуклеотидов. В результате температура плавления продукта амплификации сильно увеличивается, что повышает эффективность определения

мутации. Однако праймеры с GC-зажимом достаточно дороги, поэтому применение метода ограничено.

Использование прямых методов ДНК-диагностики целесообразно для таких заболеваний как муковисцидоз, фенилкетонурия, хорея Гентингтона и ряда других.

Преимущества:

- ✓ практически 100%, точность диагностики;
- ✓ отсутствие необходимости ДНК-анализа всех членов ядерной семьи;
- ✓ возможность выявления гетерозиготного носительства патологических мутаций у родителей умершего больного и его родственников, что особенно актуально для аутосомно-рецессивных заболеваний.

Недостатки:

- ✓ требуется знание точной локализации патологического гена в геноме, его экзон-интронной структуры и спектра его мутаций (такая информация на сегодняшний день доступна далеко не для всех моногенных болезней человека.

Косвенные методы ДНК-диагностики

Косвенные методы ДНК-диагностики применяют в том случае, если ген, повреждение в котором приводит к заболеванию, не идентифицирован, а лишь локализован на определенной хромосоме, или когда методы прямой ДНК-диагностики не дают результата, (например, при значительной протяженности и сложной молекулярной организации гена, а также широком спектре патологических мутаций в нем).

Косвенные методы ДНК-диагностики основаны на анализе сегрегации в семье аллелей *полиморфных маркеров*, находящихся в том же хромосомном регионе или тесно сцепленных с локусом заболевания. Полиморфные маркеры, используемые для косвенной ДНК-диагностики, представляют собой точковые замены, делеции/инсерции, повторы, полиморфизм которых обусловлен различным количеством элементов в блоке. Наиболее удобными для косвенной ДНК-диагностики признаны *микросателлитные* (мономер до 5 п.н.) и *минисателлитные* (мономер повтора состоит из 5 – 60 п.н.) полиморфные маркеры, широко

распространенные в геноме человека. Для большинства известных в настоящее время полиморфных сайтов такого типа был строго показан менделевский характер наследования. Наиболее типичными среди микросателлитов являются динуклеотидные повторы, а самым распространенным из них - «СА»- повтор. Показано, что кластеры «СА»-повторов встречаются в геноме в среднем каждые 30 тысяч нуклеотидных пар. Во многих кластерах присутствует от 10 до 30 динуклеотидных повторов и типичное количество аллелей составляет 4 - 8, что обеспечивает высокую информативность маркера.

Технические приемы в косвенной диагностике те же самые, что и в прямой (получение ДНК, рестрикция, электрофорез и т.д.). к этому добавляется математический анализ сцепления признаков.

Преимущества:

- ✓ не требуют знания структуры гена и спектра мутаций в нем, необходимо только иметь сведения о его локализации;
- ✓ информативны практически для всех обратившихся семей, поскольку всегда есть возможность среди полиморфных маркеров, сцепленных с локусом заболевания, найти информативный для данной семьи.

Недостатки:

- ✓ нет 100%-ной точности;
- ✓ необходимость семейного анализа и обязательную уверенность в клиническом диагнозе;
- ✓ могут быть применены только для монолокусных заболеваний и неэффективны для моногенных полилокусных болезней.