**Тема: Методы генотипирования.**

**Цель:** Ознакомиться с тероретическими основами основных методов генотипирования.

**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. Методы молекулярного типирования на основе рестрикции.
2. Методы молекулярного типирования на основе ПЦР
3. Методы молекулярного типирования на основе секвенирования.

**Краткое содержание занятия:**

1. ПДРФ (англ. RFLP, полиморфизм длины рестрикционных фрагментов).

Исторически один из самых первых методов генотипирования. Суть заключается в подборе рестриктазы (фермент, расщепляющий ДНК вблизи строго характерной для него последовательности нуклеотидов), которая узнавала бы последовательность с одним аллелем и не узнавала бы с другим. В результате после амплификации, рестрикции и электрофореза на геле наблюдаются полосы разных длин, комбинации которых соответствуют различным генотипам. В методе McSNP предпринята попытка автоматизировать процесс генотипирования с помощью анализа кривых плавления продуктов рестрикции, но широкого распространения этот подход не получил.

Достоинства: Очень дешев - цена зависит только от цены рестриктазы, не требует высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования, всем необходимым оснащена любая ПЦР-лаборатория, занимающаяся, например, диагностикой инфекций, возможно генотипирование единичных образцов ДНК.

Недостатки: Достаточно долгое время анализа - более 6-8 часов до получения результата, низкая производительность, отсутствие возможности автоматизации.

Коммерческая доступность: Отечественными фирмами продаются наборы как и для уже давно известных полиморфных маркеров, так и для новых полиморфизмов.

Оборудование: Стандартное оборудование ПЦР-лаборатории.

Область применения: Типирование средних по размеру выборок (до нескольких сотен образцов), до 10-20 полиморфных маркеров.

Стоимость расходных материалов: 10-60 руб. на пробу на один полиморфный маркер.

2. ПДАФ (англ. AFLP, полиморфизм длины амплификационных фрагментов).

Аналогичен RFLP, но применяется для повторов и полиморфизмов типа insertion/deletion. Достоинства и недостатки те же.

Коммерческая доступность: Отечественными фирмами продаются наборы как и для уже давно известных медикам полиморфных маркеров, так и для новых полиморфизмов. Широко используется в наборах для идентификации личности.

3. Аллель-специфичная амплификация с детекцией результатов электрофорезом (allele-specific PCR).

Объединяет в себе множество подходов, но основная идея всех методов основана на том, что полимераза с разной эффективностью обрабатывает полностью спаренный и неспаренный нуклеотид на 3`-конце праймера. В идеале стараются добиться полного подавления амплификации неспецифического фрагмента. К настоящему времени разработано множество методик аллель-специфичной ПЦР и из очень капризного метода начала 90-х она превратилась в удобный для применения инструмент. Современная аллель-специфичная ПЦР целиком базируется на Штоффель-фрагменте Taq-полимеразы (Stoffel fragment, укороченный вариант Taq-полимерзы с отсутствующей 5`->3` экзонуклеазной активностью или аналоги), который крайне чувствителен к неспаренным нуклеотидам и достаточно избирательно амплифицирует только с полностью комплементарных праймеров. Следует с осторожностью относиться к аллель-специфичным наборам, созданным на основе обычной полимеразы в целях удешевления производства.

Достоинства: Не требует высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования, подходит для генотипирования единичных образцов ДНК, возможна автоматизация.

Недостатки: Не все реактивы можно легко купить в России, достаточно капризный метод при отработке и наладке, возможны ошибки генотипирования в результате ложноположительных срабатываний.

Коммерческая доступность: Отечественными фирмами продаются наборы в основном для HLA-типирования.

Оборудование: Стандартное оборудование ПЦР-лаборатории.

Область применения: Типирование средних по размеру выборок (до нескольких сотен образцов), до 30-50 полиморфных маркеров.

Стоимость расходных материалов: 10-20 руб. на пробу на один полиморфный маркер.

4. Аллель-специфичная амплификация с детекцией результатов амплификатором в реальном времени (allele-specific real-time PCR, RT-ARMS PCR).

Преимуществом использования амплификатора в реальном времени является отсутствие этапа электрофореза и снижение вероятности контаминации, а также уменьшение времени анализа. В отличии от FLASH-детекции данный метод не ограничен наличием в составе програмного обеспечения амплификаторов модулей для детекции по конечной точке (Allelic Discrimination) и подходит практически для всех моделей амплификторов в реальном времени.

Достоинства: Не требует высокой квалификации персонала, подходит для генотипирования единичных образцов ДНК, возможна автоматизация.

Недостатки: Не все реактивы можно легко купить в России, достаточно капризный метод при отработке и наладке, для детекции мутаций может дополнительно потребоваться разработка "стандартных" генотипов.

Коммерческая доступность: Наборы для детекции мутаций различных фирм.

Оборудование: Стандартное оборудование ПЦР-лаборатории, реал-тайм амплификатор (от 20 тыс. евро).

Область применения: Типирование средних по размеру выборок (до нескольких сотен образцов), до 30-50 полиморфных маркеров.

Стоимость расходных материалов: 10-200 руб. на пробу на один полиморфный маркер.

5. Аллель-специфичные зонды (allele-specific hybridization), наборы ABI TaqMan, наборы с FLASH-детекцией.

Основаны на способности полимеразы разрушать встречающиеся комплементарные олигонуклеотидные зонды (5`->3` экзонуклеазная активность). Зонд содержит флуоресцентный краситель на 5`-конце и тушитель флуоресценции на 3`-конце. Полностью комплементарный зонд (один аллель) расщепляется полимеразой, краситель высвобождается и сигнал флуоресценции, соответствующий этому аллелю, растет. Дуплекс с зондом с одним неспаренным нуклеотидом (второй аллель) имеет меньшую температуру плавления и не разрушается, а отщепляется полимеразой целиком. По отношению уровней флуоресценции от обоих зондов судят о наличии в пробе одного или другого аллеля. Основная разница между наборами разных производителей – в методах увеличения различия в температурах плавления, что определяет качество дискриминации аллелей, и улучшения соотношения сигнал/шум, что определят чувствительность.

Достоинства: Не требует высокой квалификации персонала, обладает высокой производительностью, возможна автоматизация.

Недостатки: Большой срок поставки зарубежных наборов, сложности с генотипированием единичных образцов (возрастает стоимость).

Коммерческая доступность: Наборы TaqMan® SNP Genotyping Assays от Applied Biosystems, наборы с FLASH-детекцией, наборы AmpliFlash

Оборудование: Стандартное оборудование ПЦР-лаборатории, ПЦР-детектор "Джин" (для малых выборок, 2000 евро) или реал-тайм амплификатор (для больших выборок, от 20 тыс. евро).

Область применения: Типирование средних и больших по размеру выборок (до нескольких десятков тысяч образцов), до 100-200 полиморфных маркеров.

Стоимость расходных материалов: 10-60 руб. на пробу на один полиморфный маркер.

6. Элонгация праймера (single-base primer extension, SBE), наборы ABI SNaPShot, MassARRAY iPLEX, минисиквенирование на биочипах, Luminex 100, Perkin-Elmer FP-TDI и др.

Основан на присоединении дидизоксинуклеотида, комплементарного позиции SNP, к 3`-концу праймера и последующей детекции продукта присоединения различными методами – капиллярным электрофорезом (SNaPShot), масс-спектрометрией (MassARRAY), ДНК-микрочипами и т.д. Решение на базе проточной цитофлуорометрии (Luminex 100) отличается не только чрезвычайно высокой производительностью, но и чрезвыйчайно высокой ценой (более 100 тыс. евро).

Достоинства: Подходит для анализа единичных образцов по большому количеству полиморфных маркеров для диагностических целей, возможна автоматизация.

Недостатки: Требуется высокая квалификация персонала, дорогостоящее оборудование, большой срок поставки зарубежных наборов, большое время анализа одного образца (до суток в случае биочипов).

Коммерческая доступность: Наборы SNaPshot® Multiplex System от Applied Biosystems, MassARRAY® iPLEX от Sequenom, многочисленные решения на базе биологических микрочипов.

Оборудование: Стандартное оборудование ПЦР-лаборатории, секвенатор (от 100 тыс. евро), масс-спектрометр (от 200 тыс. евро), сканеры биочипов (от 50 тыс. евро).

Область применения: Типирование малых по размеру выборок (до нескольких десятков образцов, исключая Luminex 100 - до десятков тысяч образцов), до 10-100 полиморфных маркеров (зависит от реализации), диагностика.

Стоимость расходных материалов: 20-200 руб. на пробу на один полиморфный маркер.

7. Лигирование олигонуклеотидных зондов (oligonucleotide ligation assay), наборы ABI SNPlex.

При проведении этих реакций специфические ДНК- или РНК- последовательности исследуют путем использования их в качестве матрицы для ковалентного связывания двух пар олигонуклеотидных зондов. ДНК-зонды для лигирования подбирают таким образом, чтобы они были полностью комплементарны нормальному фрагменту ДНК в области локализации мутации, причем сама нуклеотидная замена должна находиться на стыке двух праймеров. Обычно в один из зондов вводят флуоресцентную метку, а другой метят биотином. После гибридизации при строго стандартных условиях синтезированные олигонуклеотидные последовательности сшивают ДНК-лигазами из термофильных микроорганизмов. Такие ферменты работают при высоких температурах и сохраняют свою активность в условиях, необходимых для проведения денатурации молекул ДНК. При наличии мутации в тестируемой молекуле ДНК на конце одного из зондов образуется сайт некомплементарного спаривания, непосредственно примыкающий к месту лигирования. Наличие терминального неспаренного основания в смежно расположенных последовательностях ДНК-зондов резко снижает скорость лигирования, и при определенных условиях проведения реакции сшивки между зондами в этом случае не происходит. Метод включает несколько последовательных циклов гибридизации, лигирования и денатурации. Начиная со второго цикла, матричной ДНК для гибридизации зондов наряду с тестируемой пробой служат также дотированные последовательности. В дальнейшем проводят электрофоретический/каппилярный анализ меченых однонитевых фрагментов ДНК.

Достоинства: Подходит для анализа единичных образцов по большому количеству полиморфных маркеров для диагностических целей, возможна автоматизация.

Недостатки: Требуется высокая квалификация персонала, дорогостоящее оборудование, большой срок поставки зарубежных наборов, большое время анализа одного образца.

Коммерческая доступность: Наборы SNPlex™ Genotyping System от Applied Biosystems.

Оборудование: Стандартное оборудование ПЦР-лаборатории, секвенатор (от 100 тыс. евро).

Область применения: Типирование малых по размеру выборок (до нескольких десятков образцов, до 50-500 полиморфных маркеров, диагностика.

Стоимость расходных материалов: 10-50 руб. на пробу на один полиморфный маркер.

8. Гибридизация олигонуклеотидных зондов (Hyb Probes).

Был создан для приборов LightCycler, но получил распространение и для других систем из-за своей простоты и дешевизны. Основан на тримолекулярном взаимодействии ДНК и двух зондов в области нуклеотидной замены и различий в кривых плавления.

Достоинства: Простота дизайна, возможна автоматизация.

Недостатки: Требуется поддержка необходимых режимов в амплификаторе.

Коммерческая доступность: Метод развивает "ДНК-технология".

Оборудование: Стандартное оборудование ПЦР-лаборатории, реал-тайм амплификатор (от 20 тыс. евро).

Область применения: Диагностика.

Стоимость расходных материалов: 10-50 руб. на пробу на один полиморфный маркер.

**Краткое содержание темы.**

ПДРФ (англ. RFLP, полиморфизм длины рестрикционных фрагментов).

Исторически один из самых первых методов генотипирования. Суть заключается в подборе рестриктазы (фермент, расщепляющий ДНК вблизи строго характерной для него последовательности нуклеотидов), которая узнавала бы последовательность с одним аллелем и не узнавала бы с другим. В результате после амплификации, рестрикции и электрофореза на геле наблюдаются полосы разных длин, комбинации которых соответствуют различным генотипам. В методе McSNP предпринята попытка автоматизировать процесс генотипирования с помощью анализа кривых плавления продуктов рестрикции, но широкого распространения этот подход не получил.

Достоинства: Очень дешев - цена зависит только от цены рестриктазы, не требует высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования, всем необходимым оснащена любая ПЦР-лаборатория, занимающаяся, например, диагностикой инфекций, возможно генотипирование единичных образцов ДНК.

Недостатки: Достаточно долгое время анализа - более 6-8 часов до получения результата, низкая производительность, отсутствие возможности автоматизации.

Коммерческая доступность: Отечественными фирмами продаются наборы как и для уже давно известных полиморфных маркеров, так и для новых полиморфизмов.

Оборудование: Стандартное оборудование ПЦР-лаборатории.

Область применения: Типирование средних по размеру выборок (до нескольких сотен образцов), до 10-20 полиморфных маркеров.

Стоимость расходных материалов: 10-60 руб. на пробу на один полиморфный маркер.

ПДАФ (англ. AFLP, полиморфизм длины амплификационных фрагментов).

Аналогичен RFLP, но применяется для повторов и полиморфизмов типа insertion/deletion. Достоинства и недостатки те же.

Коммерческая доступность: Отечественными фирмами продаются наборы как и для уже давно известных медикам полиморфных маркеров, так и для новых полиморфизмов. Широко используется в наборах для идентификации личности.

MLST (англ. Multilocus sequence typing, мультилокусное секвенирование-типирование) — это метод генетического типирования организмов, основанный на определении последовательности нуклеотидов определённого набора их генов (локусов). Впервые этот метод был предложен в 1998 году для быстрого и надёжного типирования патогенных бактерий, однако может успешно применяться в отношении любых гаплоидных организмов. Кроме того, на сегодняшний день метод был адаптирован и для типирования диплоидных организмов.

Принцип метода

Метод основан на установлении нуклеотидной последовательности небольших фрагментов (около 500 пар нуклеотидов) ряда генов и последующем сравнении соответствующих последовательностей у разных организмов. При мультилокусном секвенировании чаще всего анализируют так называемые гены домашнего хозяйства, которые являются необходимыми для протекания реакций основного метаболизма, а значит присутствуют у всех организмов. Эти гены в силу своей исключительной важности для жизнеспособности организма характеризуются относительно низкой скоростью накопления мутаций, многие из которых при этом являются селективно нейтральными. В связи с этим сравнение нуклеотидных последовательностей таких генов позволяет относительно легко устанавливать степень филогенетического родства между популяциями и систематизировать их. Количество локусов, анализируемое в каждом конкретном исследовании, может быть разным, но чаще всего составляет 7—8. Такое количество обеспечивает достаточную разрешающую способность метода и при этом не не требует слишком больших затрат труда, времени и средств на анализ.

Технически мультилокусное секвенирование состоит из нескольких этапов. После сбора образцов микроорганизмов, которые должны быть проанализированы, из них выделяют ДНК и амплифицируют участки определённых генов методом полимеразной цепной реакции с использованием подходящих праймеров. Затем последовательность нуклеотидов амплифицированных участков анализируют с помощью автоматических секвенаторов. Полученные данные с помощью специальных программ сравнивают с имеющимися в базах данных и делают выводы о статусе конкретных генов в изучаемых популяциях. В дальнейшем эти данные используют для эпидемиологических и популяционных исследований.

VNTR — (англ. Variable Number Tandem Repeat), метод получил название ДНК фингерпринта. Тандемные повторы широко распространены в разных геномах и высокополиморфны. В результате высокой вариабельности этих участков ДНК ПДРФ-анализ с зондами к микро- и минисателитным последовательностям позволяет получать мультилокусные спектры с высоким разрешением на популяционном уровне. Благодаря очень высокому уровню полиморфизма этот подход в настоящее время является хорошим инструментом для анализа внутри- и межпопуляционной изменчивости и определения генетических расстояний между группами организмов. VNTR-аллельные варианты имеют кодоминантный характер наследования