

Методы молекулярно-генетической диагностики



Введение: что такое молекулярно-генетическая диагностика?

Метод лабораторного исследования, направленный на выявление изменений в структуре ДНК, РНК или белков, связанных с наследственными заболеваниями, инфекциями, онкологией и другими патологиями.

Основные технологии:

ПЦР (полимеразная цепная реакция);

Секвенирование ДНК (NGS, Sanger) – для анализа генома, поиска мутаций.

FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) – для выявления хромосомных аномалий.

Микрочипы – для массового скрининга генетических вариаций.

Цели диагностики:

- Ранняя диагностика заболеваний;
- Выявление мутаций;
- Персонализированная медицина;
- Пренатальная и неонатальная диагностика.

Объектами исследования могут быть:

- Геномная ДНК;
- мРНК;
- Митохондриальная ДНК;
- Белки.

Классификация методов:



ПЦР (полимеразная цепная реакция)

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — высокоточный метод молекулярно-генетической диагностики, который позволяет выявить у человека различные инфекционные и наследственные заболевания, как в острой и хронической стадии, так и задолго до того, как заболевание может себя проявить.
- Метод ПЦР — абсолютно специфичен и выполненный правильно не может дать ложноположительный результат. То есть, если инфекции нет, то анализ никогда не покажет, что она есть. Поэтому сейчас очень часто для утверждения диагноза дополнительно сдают анализ ПЦР, чтобы определить возбудителя и его природу.

Разновидности ПЦР

- RT-ПЦР
- qPCR (количественная)
- Multiplex PCR
- Digital PCR

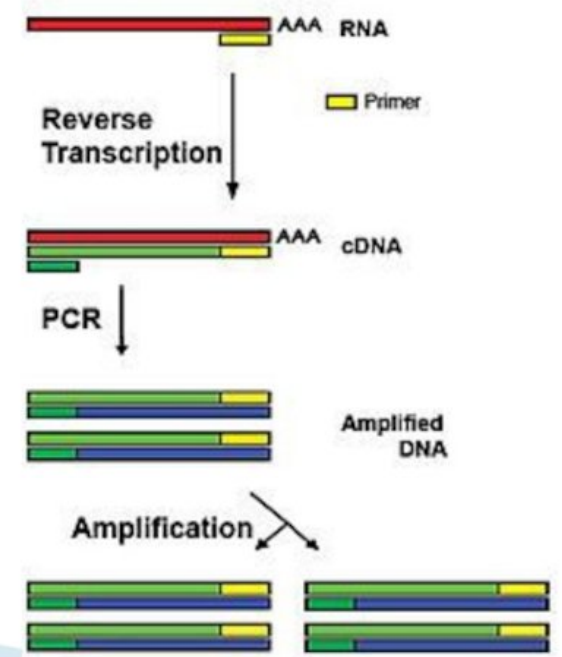


RT-ПЦР

- • Используется для РНК
- • Обратная транскриптаза
- • Диагностика вирусов

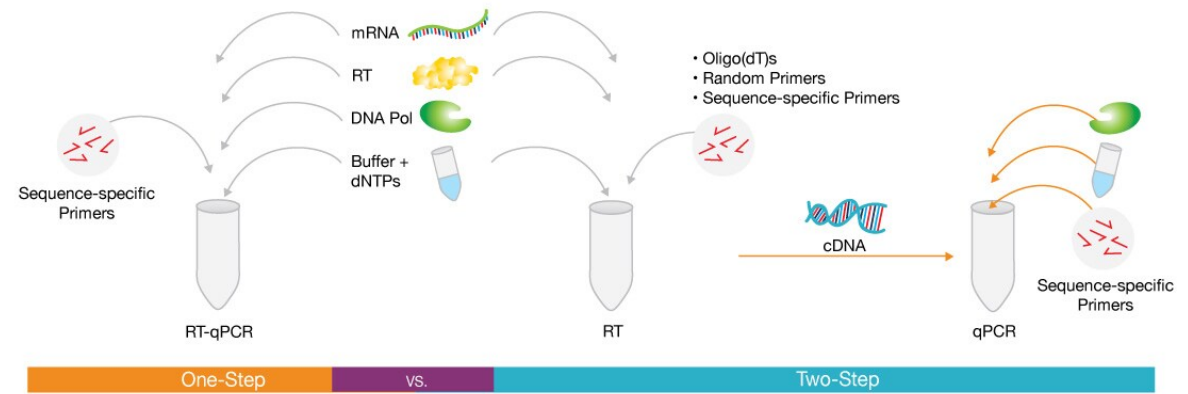
ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

- Метод заключается в последовательном сочетании **обратной транскрипции** (синтез одноцепочечной ДНК на матрице РНК) и **полимеразной цепной реакции**
- Этим методом часто определяют экспрессию генов



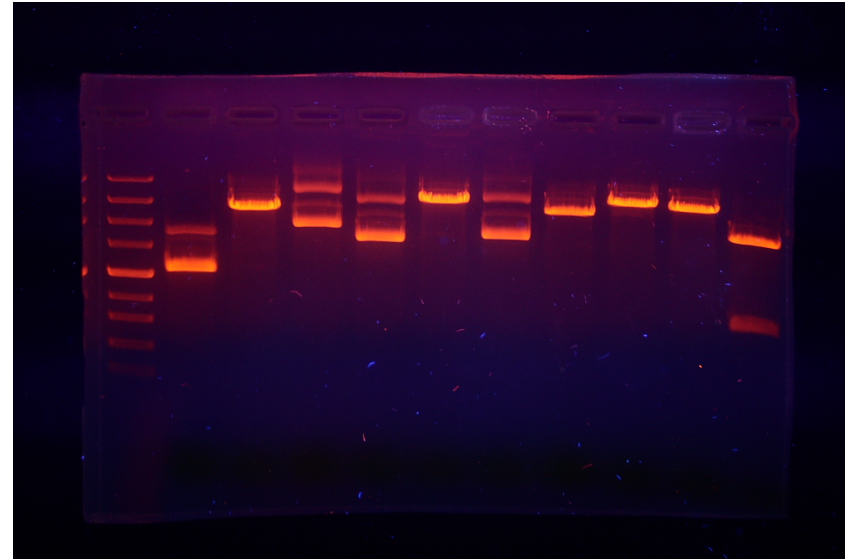
qPCR (реальное время)

- Одновременное усиление и измерение
- Количественная оценка вирусной нагрузки



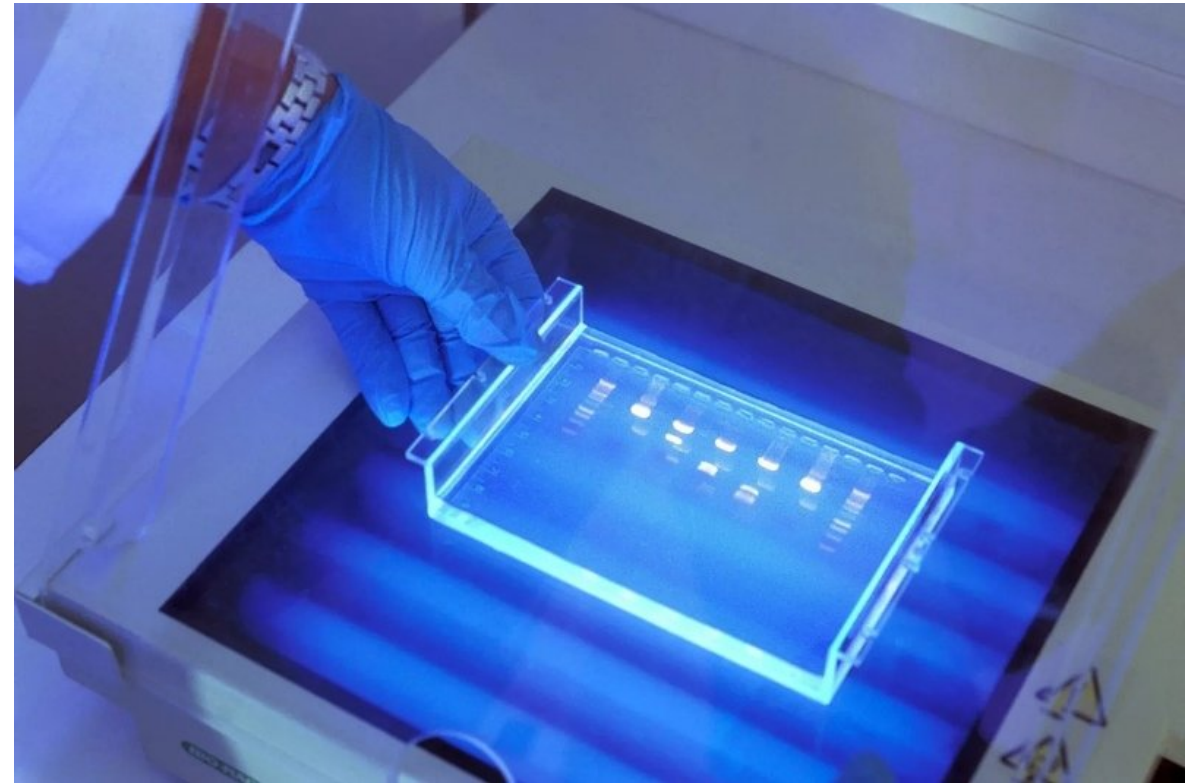
Электорофорез

- • Разделение фрагментов ДНК
- • Анализ ПЦР
- • Используются красители



Метод блоттинга

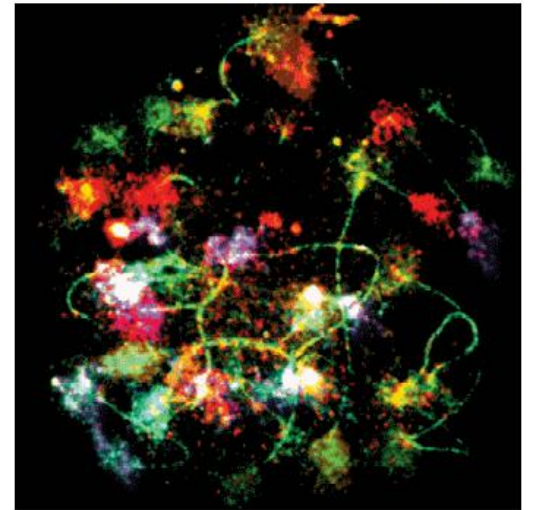
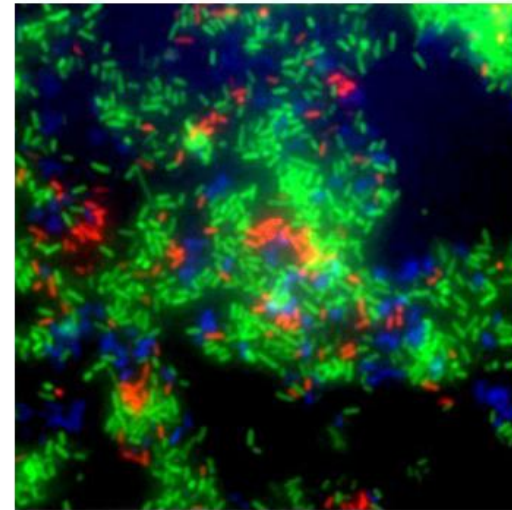
- • Саузерн-блоттинг (ДНК)
- • Нозерн-блоттинг (РНК)
- • Вестерн-блоттинг (белки)



FISH

- • Флуоресцентная гибридизация
- • Пренатальная диагностика
- • Онкогенетика

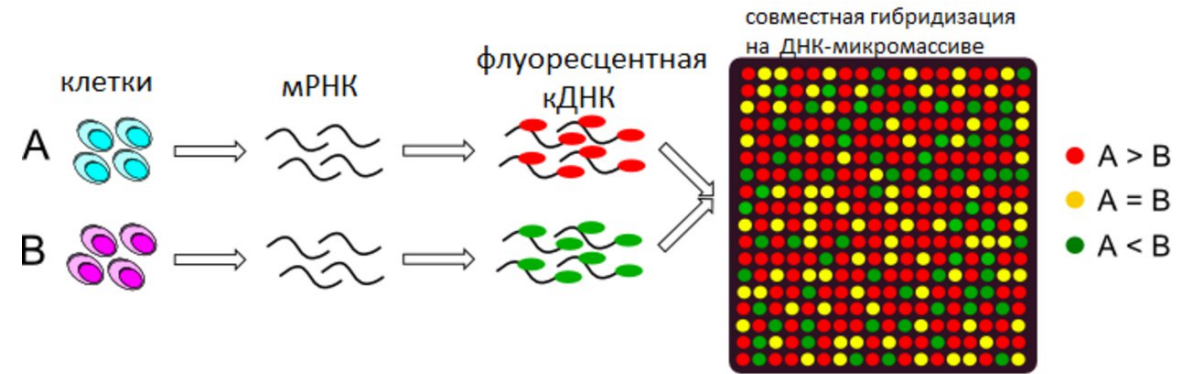
FISH (ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU)



Трехцветный и многоцветный FISH

Микромассивы

- • ДНК-чипы
- • Одновременный анализ тысяч генов
- • Геномное профилирование

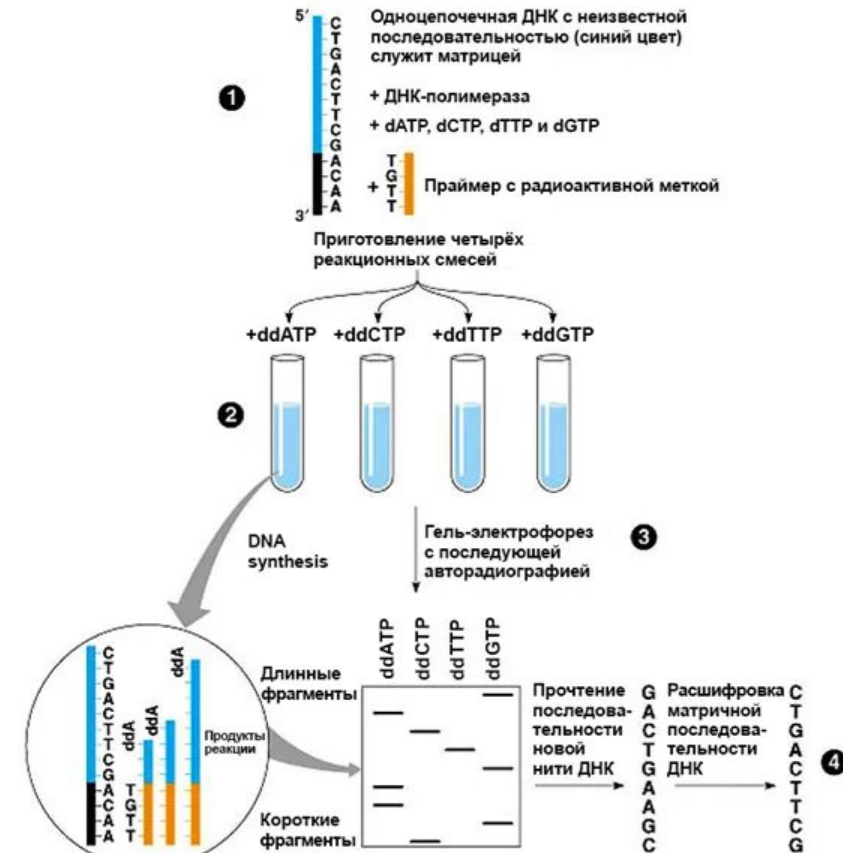


Секвенирование ДНК

Секвенирование нуклеиновых кислот — это процесс определения последовательности нуклеотидов в цепочке ДНК.

Основными задачами генетического анализа являются:

- обнаружение неизвестных ранее последовательностей нуклеиновых кислот, например, геномов нового типа;
- распознавание уникальных особенностей конкретного образца среди обобщённой последовательности (ресеквенирование);
- исследование генетического разнообразия, в том числе однонуклеотидных замен (SNP-типирование);
- определение эпигенетических модификаций, например, профиля метилирования;
- изучение профиля экспрессии отдельно взятых клеток секвенированием кДНК, полученной из тотальной мРНК клетки.

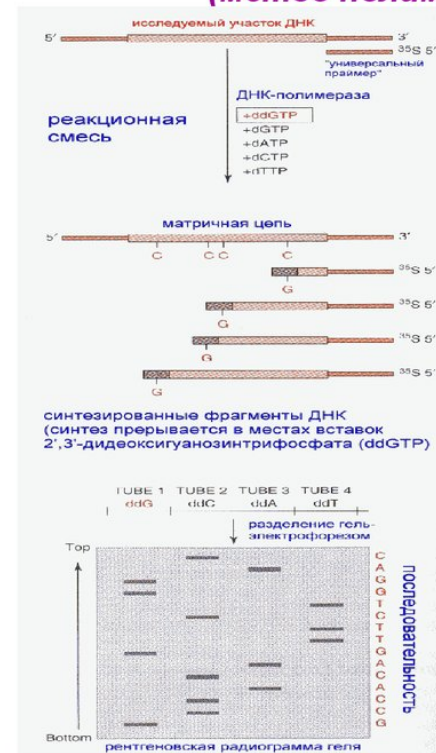


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Метод Сэнгера

- • Золотой стандарт
- • Верификация мутаций
- • Невысокая пропускная способность

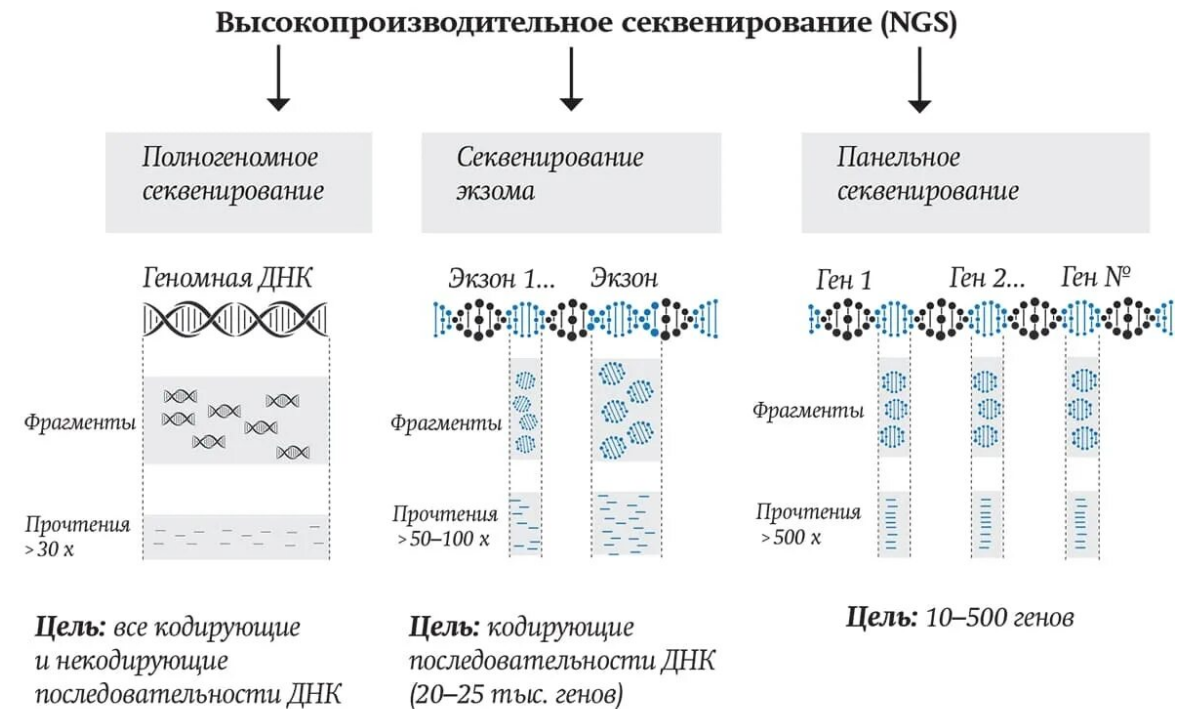
Секвенирование ДНК по Сэнгеру (метод полимеразного копирования)



- I. Прежде всего фрагмент ДНК клонируют в *фаге M13*, из которого легко выделяют *однонитевую ДНК*.
- II. Ее гибридизуют с короткой ДНК, называемой *праймером*, которая связывается с 3'-концом однонитевой ДНК.
- III. Затем к полученной матрице добавляют *четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата дНТФ (dNTP)*:
 - *дАТФ (dATP)*,
 - *дГТФ (dGTP)*,
 - *дТТФ (dTTP)*,
 - *дЦТФ (dCTP)*.

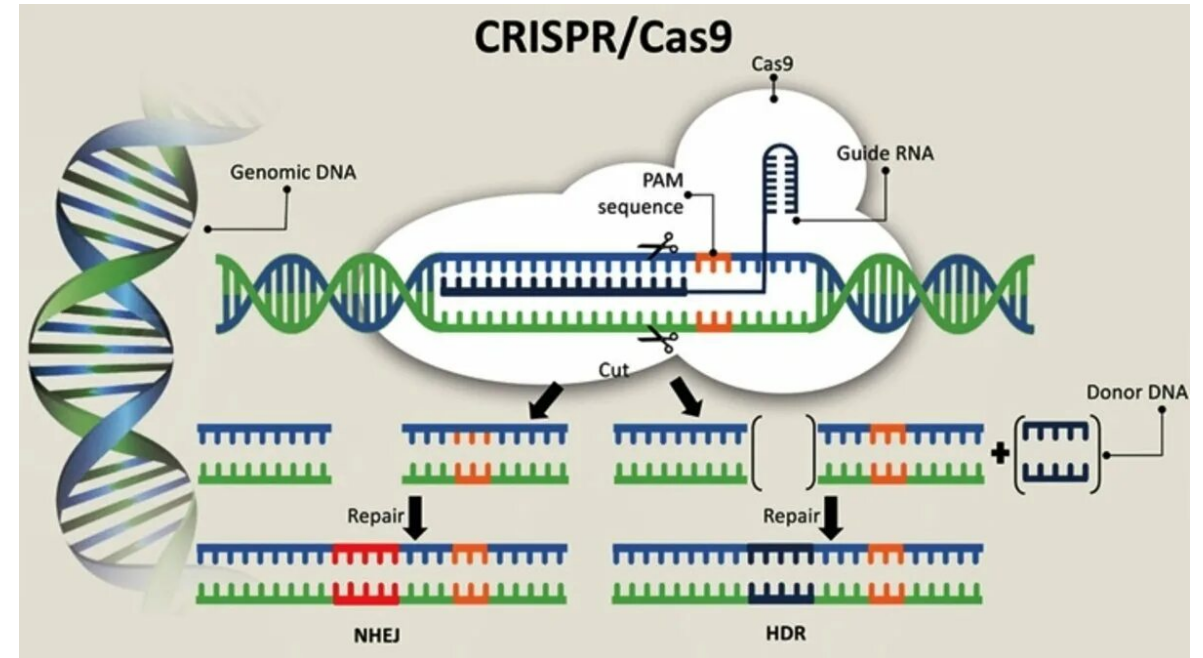
NGS

- • Высокопроизводительное секвенирование
- • Анализ экзона/генома
- • Диагностика редких заболеваний



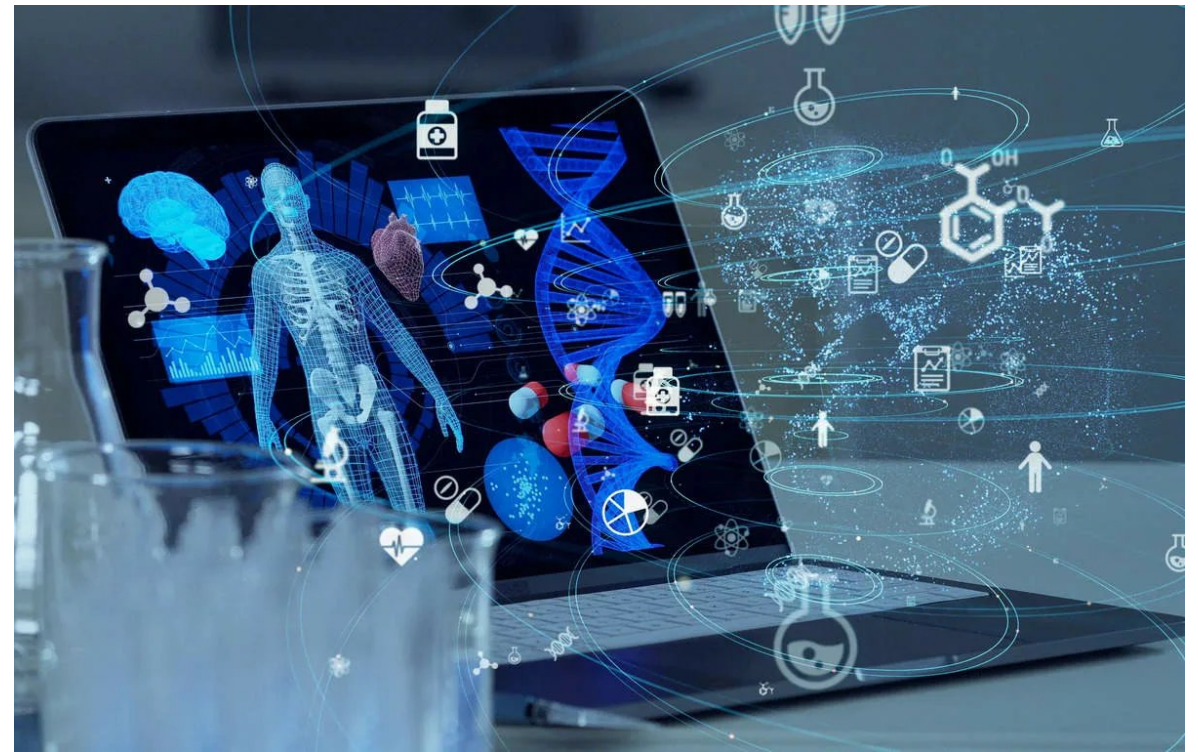
CRISPR/Cas

- • Редактирование генома
- • Диагностические системы
SHERLOCK/DETECTR



Биоинформатика

- • Анализ больших данных
- • Идентификация мутаций
- • ClinVar, dbSNP



Пренатальная диагностика

- • Инвазивные: амниоцентез
- • Неинвазивные: анализ крови матери



Неонатальный скрининг

- • Проводится в роддомах
- • Метаболические заболевания
- • ПЦР, масс-спектрометрия



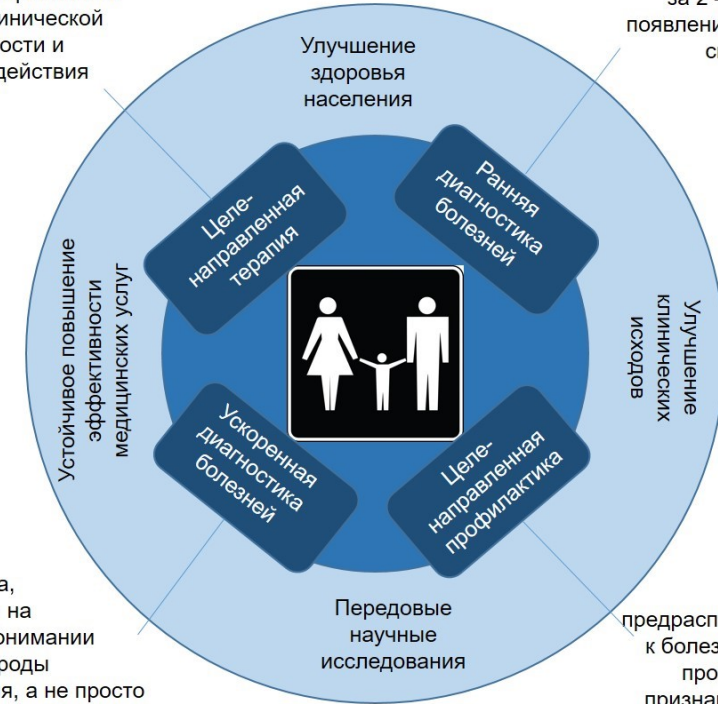
Персонализированная медицина

- • Подбор терапии по геному
- • Примеры: BRCA1/2, EGFR

ВОЗМОЖНОСТИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Рациональное лечение болезней на основе персонализированного анализа клинической эффективности и побочного действия лекарств

Болезни диагностируются за 2 – 8 лет до появления первых симптомов



Диагностика, основанная на глубоком понимании причин природы заболевания, а не просто комплекса симптомов

Маркеры предрасположенности к болезням и других прогностических признаков будущего течения болезни



Заключение

Ключевой инструмент современной медицины
Изменяет подход к диагностике и терапии