

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-биологический факультет

Кафедра Молекулярной биологии и генетики

РЕФЕРАТ

по дисциплине «Методы и объекты генетического анализа»

Тема:

«Генетический анализ на клеточном уровне, его особенности и разрешающая способность.»

Студентка гр. 301 _____ Ржевская А.Э.

Преподаватель _____ Замарин А.А.

Волгоград – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение.	3
2. Генетический анализ	4
3. Генетический анализ на клеточном уровне.	6
4. Цитогенетический анализ.	7
5. Окрашивание хромосом в гематологии	9
6. Клиническое значение цитогенетических исследований.	12
7. Молекулярно-генетические анализы.	14
8. Заключение	16
9. Список литературных источников	17

1. Введение.

Под генетическим анализом понимают расшифровку ДНК человека с последующей интерпретацией результатов. Анализ генома позволяет выявить предрасположенность к различным заболеваниям, носительство генетической патологии, отцовство, материнство, происхождение человека (его популяционную группу) и даже возможную реакцию на различные лекарственные препараты. При некоторых заболеваниях генетические анализы можно проводить в динамике, то есть повторные исследования ДНК помогают в диагностике и выборе тактики дальнейшего лечения.

2. Генетический анализ

Генетический анализ (греч. *genetikos* относящийся к происхождению; *analysis* разложение, расчленение) — совокупность методов изучения наследственных свойств организмов. Анализ характера наследования признаков в ряду поколений организмов позволяет получить данные о составе, строении и функционировании наследственного аппарата клеток.

С помощью Генетического анализа решаются два основных типа задач:

1) анализ природы наблюдаемого наследственного различия в признаках между двумя особями (группами особей, популяциями, породами, видами), выявление числа лежащих в основе данного различия генов, изучение свойств этих генов, их сцепления с другими генами, их локализация на хромосомной карте;

2) возможно полное описание генотипа особи (популяции, вида).

Первым и обязательным этапом Генетического анализа является выяснение природы (наследственная или ненаследственная) выбранного для Г. а. признака. В генетике животных, растений и микроорганизмов этот вопрос решается путем планомерного близко-родственного разведения или вегетативного размножения анализируемых организмов в ряде поколений. В генетике человека, где планомерное скрещивание невозможно, наследственная природа интересующего признака доказывается его семейной приуроченностью, а также высокой степенью совпадения у монозиготных близнецов. Доказать наследственную природу исследуемого признака, или, точнее, определить долю наследственного компонента в его возникновении бывает довольно трудно. Это обусловлено прежде всего тем, что связь между генами и контролируемыми ими признаками зависит в большинстве случаев от

совокупного влияния генотипической, внутренней и окружающей среды организма. Другим фактором, влияющим на надежность заключения о наследственной природе исследуемого признака, является чувствительность метода, с помощью которого данный признак изучается, т. к. диапазон наследственных различий простирается от ультраструктурных и мелких биохимических изменений в отдельных компонентах клеток до морфологической и физиологической особенностей организмов. Поэтому в данном анализе используют методы различных биологических и медицинских дисциплин. Общим для генетического анализа любых признаков является изучение закономерностей их проявления в потомстве различающихся по исследуемым признакам форм, т. е. гибридологический анализ.

3. Генетический анализ на клеточном уровне.

Данный анализ проводится в том случае, когда соответствующие наследственные признаки проявляются в отдельных клетках. Типичным примером может служить тетрадный анализ у высших растений, грибов и водорослей, когда продукты распределения гомологичных хромосом в мейозе отдельных мейоцитов (пыльца или споры) могут быть идентифицированы как по происхождению от общего мейоцита, так и по сопутствующим морфологическим, биохимическим или иным признакам. Важное значение имеет и цитогенетический анализ, при котором исследуемым наследственным признаком является строение хромосом. Его возможности резко возросли в связи с открытием методов дифференциальной окраски хромосом по длине, позволяющих идентифицировать не только каждую из пар хромосом, но также их отдельные участки. Обусловленность многих наследственных болезней человека нарушением не самих генов, а их числа и расположения в хромосомах показывает актуальность развития цитогенетического анализа. Генетический анализ на клеточном уровне может быть осуществлен и в культурах соматических клеток, для которых разработаны приемы эффективной гибридизации, без чего невозможен анализ закономерностей передачи клеточных признаков дочерним клеткам. В генетике человека гибридизация соматических клеток в культуре должна стать ценным приемом при анализе наследования признаков, прежде всего биохимических и иммунологических.

Так же важен и молекулярно-генетические анализы

В отличие от цитогенетического анализа данный метод позволяет выявить изменения в геноме на уровне генов, включая самые короткие.

4. Цитогенетический анализ.

Цитогенетическое исследование — это микроскопический анализ хромосом, результаты которого весьма важны для постановки диагноза, классификации, лечения и научного исследования заболеваний системы крови, прежде всего — онкогематологических. Значение цитогенетических методов для диагноза и лечения определяется доступностью опухолевых клеток для кариотипирования и их гетерогенностью, а с научной точки зрения — возможностью изучения изменений в структуре и функции генетических локусов, ассоциированных со злокачественной трансформацией. Морфология хромосом сильно варьирует во время клеточного цикла. Для микроскопического анализа хромосомы должны быть визуализированы как дискретные структуры. Наилучшим образом это достигается на стадии прометафазы митоза, когда каждая хромосома видна как две идентичные хроматиды, и особенно на стадии метафазы, когда хромосомы максимально конденсированы и располагаются в одной плоскости в центре клетки отдельно одна от другой. Нормальные клетки человека содержат 22 пары аутомосом и одну пару половых хромосом: две X-хромосомы у женщин и по одной копии половых хромосом (X и Y) у мужчин.

Для цитогенетического анализа лейкозов, миелодиспластических синдромов и хронических миелопролиферативных заболеваний исследуют клетки костного мозга. При невозможности их получения может быть исследована кровь (если она содержит бласты). Цитогенетический анализ лимфом выполняется в клетках ткани лимфатического узла. Культивирование клеток из опухоли повышает митотический индекс (пропорцию клеток, находящихся в фазе митоза) и способствует пролиферации злокачественных клеток. Сравнительное кариотипирование нормальных клеток проводят в Т-лимфоцитах периферической крови,

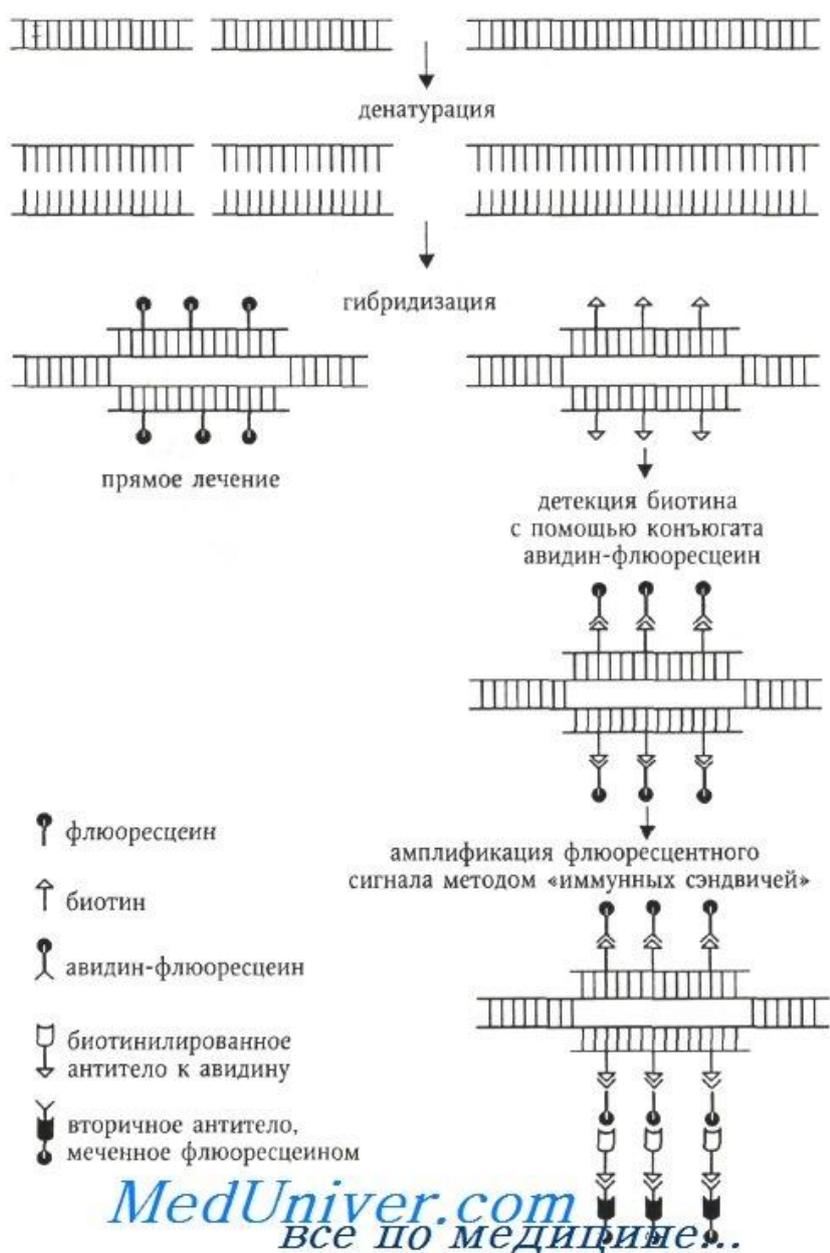
которые предварительно культивируют в среде с митогеном растительного происхождения — фитогемагглютинином.

5. Окрашивание хромосом в гематологии (раздел медицины, изучающий кровь, органы кроветворения и заболевания крови).

В конце 1960-х годов была разработана методология дифференциального окрашивания метафазных хромосом, а в 1971 г. создана номенклатура хромосомных сегментов, позволяющая точно описывать хромосомные аномалии. Позднее были внедрены методики окрашивания менее конденсированных и, соответственно, более длинных профазных и прометафазных хромосом, которые обладают более высоким разрешением, так как позволяют визуализацию 500-2000 сегментов (метафазное окрашивание визуализирует только 300 сегментов).

Достаточно большое количество профазных и прометафазных клеток для анализа получают путем синхронизации клеточного цикла, культивируя клетки в среде, содержащей антимиетаболит (например, метотрексат), который ингибирует синтез ДНК. Подавление синтеза ДНК останавливает клеточный цикл в интерфазе. Затем клетки переносят в среду без метотрексата, обогащенную тимидином, где они одновременно входят в фазу митоза. Обработка клеточной культуры колхицином останавливает митоз одновременно во всех клетках на стадии профазы или прометафазы. Первая стойкая хромосомная аномалия при злокачественной опухоли человека была выявлена в 1960 г. у больных хроническим миелолейкозом и получила название филадельфийской хромосомы (Ph), по имени города, в котором было сделано это открытие. Применение технологии хромосомного окрашивания позволило выявить множество хромосомных аномалий, большая часть которых встречается при онкогематологических заболеваниях. Некоторые красители окрашивают различные участки хромосом с переменной интенсивностью в зависимости от структуры хроматина в этих участках, их нуклеотидного и белкового состава. В результате такого окрашивания получают уникальный паттерн чередования светлых и темных поперечных полос, специфичный для каждой хромосомы. В настоящее время существуют несколько видов

дифференциального окрашивания хромосом. При Q-окрашивании акрихин-ипритом (quinacrine) или акрихиндигидрохлоридом выявляется особый тип флюоресценции каждой хромосомы с образованием Q-исчерченности (Q-banding) — поперечных флюоресцентных полос, называемых Q-полосами (Q.-bands). Это позволяет идентифицировать отдельные хромосомы. Анализ Q-полос выполняют с помощью флюоресцентного микроскопа.



При окрашивании по Гимзе (G-banding) хромосомы приобретают вид серии темных и светлых полос или бэндов (bands). G-окрашивание

применяется чаще, чем Q-окрашивание, так как анализ выполняется с помощью светового микроскопа, а G-полосы, в отличие от Q-полос, не выцветают со временем. Наиболее широко применяется методика, называемая GTG-окрашиванием (G bands by trypsin using Giemsa), с предварительной обработкой трипсином. R-бэндинг (обработка хромосом горячим спиртовым раствором перед окрашиванием по Гимзе) выявляет полосы, которые обратны G-полосам и называются R-полосами (reverse of G bands). Помимо Q-, G- и R-окрашивания, позволяющих выявлять полосы вдоль всей длины хромосомы, существуют методики, специализированные для исследования отдельных хромосомных структур, в том числе конститутивного гетерохроматина (С-окрашивание — от англ. constitutive), теломерного района (Т-окрашивание) и района ядрышкового организатора (NOR-окрашивание — от англ. nucleolus organizing region). Размеры и положение С-полос уникальны для каждой хромосомы, но преимущественно они включают центромерный район и используются при исследовании хромосомных транслокаций, вовлекающих центромерные районы хромосом.

6. Клиническое значение цитогенетических исследований.

Диагноз. Потомство клетки с приобретенной цитогенетической аномалией может иметь пролиферативное преимущество и давать начало клону — клеточной популяции, происходящей от одной клетки-предшественницы. Обнаружение клональных хромосомных аномалий способствует постановке диагноза клонального поражения костного мозга. Например, цитогенетический анализ позволяет установить диагноз миелодиспластического синдрома у пациентов с умеренной цитопенией или при наличии в аспирате костного мозга минимально выраженных качественных нарушений гемопоэза. Присутствие специфических хромосомных аномалий помогает выделить подгруппы пациентов, которым требуется специфическая терапия. Например, транслокация $t(15;17)(q22;q11-21)$ подтверждает диагноз острого промиелоцитарного лейкоза (ОМЛ — М3), в комплексном лечении которого используется ретиноевая кислота. Прогноз. Результаты цитогенетического анализа имеют не только диагностическое, но и прогностическое значение. Например, обнаружение множественных хромосомных аномалий у больных острыми лейкозами до начала лечения является прогностически неблагоприятным и служит основанием для выполнения трансплантации костного мозга или стволовых клеток периферической крови в первой полной ремиссии. Контроль результатов лечения. Цитогенетический анализ костного мозга пациентов после проведенного лечения помогает контролировать степень элиминации опухолевого клона и, следовательно, полноту ремиссии. Выявление хромосомных аномалий, характерных для опухолевых клеток данного пациента, является ранним признаком, свидетельствующим о приближающемся рецидиве. Цитогенетический анализ имеет большое значение в диагностике и лечении гематологических заболеваний, которое все возрастает по мере совершенствования

методологии и накопления знаний об этиологической и патогенетической роли хромосомных аномалий в развитии этих болезней.

7. Молекулярно-генетические анализы.

В отличие от цитогенетического анализа данный метод позволяет выявить изменения в геноме на уровне генов, включая самые короткие.

Таким образом можно обнаружить точечные мутации, затрагивающие отдельные нуклеотидные последовательности ДНК, не видимые при микроскопической визуализации хромосом. С помощью молекулярно-генетического анализа также обнаруживаются делеции – отсутствие отдельных участков в хромосоме. Исследование проводят с помощью различных методик.

Наиболее популярные из них:

ПЦР, или полимеразная цепная реакция. С ее помощью можно выявить ничтожное количество нетипичных структур в ДНК и РНК. Для выделения нужного участка используется генетический детектор – высокочувствительная искусственно синтезированная матрица ДНК, которая является эталонной. На ее базе происходит многократное копирование проблемного участка. После того, как образец увеличился в миллионы раз, приступают к его визуализации и анализу на основе имеющейся последовательности.

Метод обладает высокой чувствительностью – 99% и специфичностью. Применяется для выявления урогенитальных инфекций, гепатита, ВИЧ, боррелиоза, энцефалита и многих других. Эффективен даже в тех случаях, когда заболевание не успело клинически проявиться;

FISH, или метод флуоресцентной гибридизации. Преимущество данного метода перед остальными – возможность исследовать геном непосредственно в образце биоматериала, без дополнительного культивирования молекул. Проводить анализ можно как в фазе деления, так и в интерфазе, когда хромосомы полностью раскручены и деструктурированы.

Принцип метода – введение нуклеотидной последовательности, комплементарной специфическому участку ДНК. Такое средство помогает

найти искомое повреждение с точностью до 100%, а специальная флуоресцентная метка на введенной молекуле позволяет обнаружить присоединение и идентифицировать геномный дефект;

Микрочипирование. В отличие от FISH, флуоресцентная метка ставится на выделенной из ядра ДНК, или РНК. Специфический участок молекулы после клонирования присоединяют к биологическому чипу, который представляет собой пластинку с упорядоченно размещенными молекулами ДНК или белков. Преимущество метода в том, что с его помощью можно исследовать функциональность большого числа диагностически значимых генов в одном образце. Метод эффективен для определения инфекции любой природы, аллергенов, различных биологических веществ даже в самых ничтожных концентрациях. Не применяется в России.

8. Заключение.

На данный момент генетический анализ-это довольно распространенный анализ, который включает в себя к примеру цитогенетический анализ, где изменения в геноме человека можно идентифицировать уже на уровне хромосом или молекулярно-генетический анализ, который в отличии от цитогенетического анализа данный метод позволяет выявить изменения в геноме на уровне генов, включая самые короткие.

9. Список литературных источников:

<https://vseglisty.ru/analizy/geneticeskij-analiz-na-predraspolozennost-k-boleznam-cto-eto-komu-delaut-cena.html>

<https://www.cironline.ru/articles/92407/>

https://meduniver.com/Medical/gematologia/citogeneticheskie_issledovania_v_gematologii.html

<https://www.mrtexpert.ru/articles/983>

<https://kpfu.ru/portal/docs/F1196490575/posobie.po.genanalizu.pdf>

https://бмэ.орг/index.php/ГЕНЕТИЧЕСКИЙ_АНАЛИЗ