

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**

ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ

МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Кафедра молекулярной биологии и генетики

РЕФЕРАТ

по дисциплине «Методы и объекты генетического анализа»

ТЕМА: Получение и характеристика исходного материала для
цитогенетических исследований.

Студентка гр. 301

Салова В.В.

Преподаватель

Антон Александрович
Замарин

Волгоград
2021

АННОТАЦИЯ

Цель: ознакомление с цитогенетическим методом.

Мы рассмотрим, порядок проведения цитогенетического исследования, что можно использовать как исходный материал, различные методы окраски, а также что можно выявить при данном методе.

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	4
1.	Цитогенетический метод	5
2.	Культивирование клеток	7
3.	Окраска препаратов	10
4.	Микроскопирование препаратов метафазных хромосом	13
	Заключение	18
	Список литературы	19

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность.

Среди многих методов изучения наследственной патологии человека цитогенетический метод занимает важное место. С помощью цитогенетического исследования в генетике человека можно провести анализ кариотипа в норме и патологии, изучить закономерности мутационного и эволюционного процессов. Все хромосомные болезни у человека были открыты с помощью цитогенетического метода.

1. Цитогенетический метод.

Цитогенетика – важнейший раздел практической медицины. Этот метод применяется для диагностики хромосомных болезней, составления генетических карт хромосом, изучения мутационного процесса.

Цитологический метод используют для изучения нормального кариотипа человека, а также при диагностике наследственных заболеваний, связанных с геномными и хромосомными мутациями.

К наиболее распространенным хромосомным болезням относятся:

- синдром Дауна (трисомия 21), ЧВ=1 на 700 новорожденных;
- синдром Клайнфельтера (полисомия X у мальчиков), ЧВ=1:500– 700 новорожденных мальчиков;
- полисомия X у девочек, ЧВ=1:1000 новорожденных девочек;
- полисомия Y, ЧВ=1:1000 новорожденных мальчиков;
- синдром Шерешевского-Тернера (Моносомия X), ЧВ=1:1500 новорожденных девочек;
- синдром Патау (трисомия 13), ЧВ=1:5000 новорожденных;
- синдром Эдвардса (трисомия 18), ЧВ=1:5000–1:7000 новорожденных;
- синдром Прадера-Вилли (делеция 15q11.2 отцовской хромосомы) 1:10000;
- синдром Ангельмана (делеция 15q11.2 хромосомы матери) 1:10000;
- синдром Беквита-Видемана (импринтинг/делеция 11p15) 1:12000;
- синдром Лежена или кошачьего крика (5p-) 1:45000;
- синдром Вольфа-Хиршхорна (4p-) 1:50000;
- синдром де Груши (18p-) 1:60000; – синдром Орбели (13q-) 1:100000.

Основой метода является микроскопическое изучение хромосом человека. Этот метод широко используется с начала 20-х годов XX в. для изучения

морфологии и подсчета хромосом человека, культивируя лейкоциты для получения метафазных пластинок. С развитием медицинской генетики и совершенствованием микроскопической техники был разработан целый ряд новых технологий, основанных на принципах гибридизации нуклеиновых кислот на препарате, применение которых позволило в значительной степени увеличить эффективность выявления хромосомных аномалий, а в ряде случаев можно заменить цитогенетический анализ определенным молекулярно-цитогенетическим. Использование соответствующего молекулярно-цитогенетического метода зависит от разрешающей способности технологии. Биомедицинское направление, целью которого явилось изучение хромосом с помощью последних достижений в области молекулярной биологии, сформировалось как наука и получило название молекулярная цитогенетика.

Цитогенетический анализ включает три основных этапа:

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

2. Культивирование клеток.

Анализ кариотипа человека проводят в культуре лимфоцитов периферической крови, кожных фибробластов, клеток костного мозга, а также половых клеток. Наиболее доступны для исследований лимфоциты периферической крови, которые, в большинстве случаев и служат объектом цитогенетического анализа у человека в постнатальном периоде. Для исследования кариотипа человека достаточно получить образец периферической крови в количестве 1–2 мл.

Для анализа кариотипа плода могут быть использованы клетки ворсин хориона (9–11 неделя внутриутробного развития), в более позднем сроке цитогенетическому исследованию подвергают клетки плода, выделенные из амниотической жидкости, пуповинной крови и плаценты.

Культивирование клеток.

После забора образец крови помещают в питательную солевую среду с добавлением фитогемагглютинина, стимулирующего процесс деления клеток. Для увеличения количества метафазных клеток за полтора часа до окончания культивирования в культуру вводят колхицин, который разрушает клеточное веретено, и процесс деления останавливается на стадии метафазы. Обычно 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. После фиксируют клетки смесью метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1, после чего клеточную суспензию раскапывают на охлажденные влажные предметные стекла и высушивают на воздухе.



Могут исследовать также биоптаты — для получения клеток используют инвазивные методы исследования плода:

- 1) амниоцентез — пункция амниотической полости для получения околоплодных вод (10–20 мл). Срок проведения — с 12 по 19 неделю;
- 2) биопсия хориона — аспирация ворсин хориона (зародышевая часть плаценты) — с 10 по 14 недель;
- 3) плацентоцентез — аспирация ворсин хориона в более поздние сроки — после 15 недель;
- 4) кордоцентез — пункция сосудов пуповины для получения крови плода — в сроки с 20 недели (оптимально с 20 по 22);

- 5) биопсия тканей плода — во II триместре беременности;
- б) кардиоцентез — пункция внутриспеченочной пуповины плода.

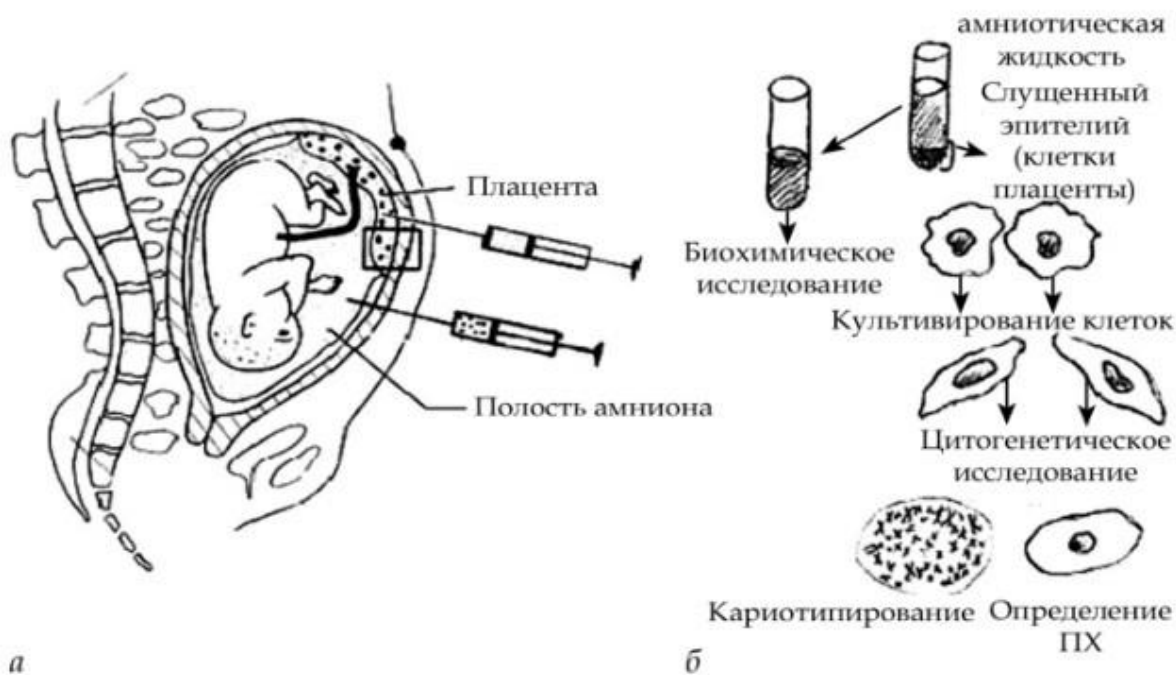


Рис. 57. Амниоцентез и биопсия плаценты: *a* — получение амниотической жидкости с клетками эмбриона (плода) или клеток плаценты; *б* — исследование материала биохимическими и цитогенетическими методами

3. Окраска препаратов.

В зависимости от целей исследования, то есть от того, какой именно тип перестроек необходимо выявить, можно использовать различные виды окрашивания .

Рутинный метод окрашивания хромосом применяют для *определения количества хромосом (количественных аномалий кариотипа) в препарате, а также специфического сайта ломкости при синдроме хрупкой Х-хромосомы.* При этой окраске используют краситель Гимзы, который равномерно прокрашивает хромосомы по всей длине, что дает возможность определить их количество, а также идентифицировать хромосомы по форме и соотносительному размеру. Этот метод окраски успешно применялся до 70-х годов прошлого века и позволил выявить этиологию большинства хромосомных синдромов, характеризующихся изменением количества хромосом.

Методики дифференциальной окраски. Использование рутинного метода окраски не позволяет выявлять структурные перестройки хромосом. В этих случаях применяют специальные методы, так называемой, дифференциальной окраски, в результате которой хромосомы приобретают поперечную исчерченность, обусловленную неодинаковой окраской участков по длине хромосомы. Расположение и толщина темных и светлых полос строго индивидуальны для каждой хромосомы, что позволяет проводить их точную идентификацию и выявлять структурные перестройки. Для объяснения возникновения различно окрашенных полос на хромосомах выдвигается несколько гипотез: различия в количественном содержании А–Т- и G–С-пар оснований, особенности строения нуклеосом, а также асинхронность репликации различных участков ДНК.

Наибольшее распространение получил простой и эффективный **G-метод** (от англ. Giemsa – Гимза) дифференциального окрашивания. В этом случае для окрашивания хромосом также используют краситель Гимзы, однако хромосомы предварительно обрабатывают раствором трипсина. Процедура окрашивания занимает от 5 до 10 минут и приводит к появлению специфичного для каждой хромосомы рисунка поперечной исчерченности. Идентификацию хромосом обеспечивает чередование темно и светло окрашенных полос. Показано, что количество полос в метафазных и прометафазных пластинках существенно различается: в метафазных пластинках их число достигает 400, а в прометафазных – от 800 до 1000.

Другие методы окраски используются реже вследствие их сложности или узкой специфичности.

R-метод (от англ. reverse – обратная) обуславливает сегментацию хромосом, противоположную той, которая имеет место при окраске G-методом (темноокрашенными здесь являются эухроматиновые участки хромосом, а светлыми – гетерохроматиновые).

C-метод (от англ. constitutive heterochromatin – конститутивный гетерохроматин) дифференциальной окраски позволяет анализировать лишь центромерные и околоцентромерные районы хромосом, в которых содержится структурный гетерохроматин (1, 9, 16 и Y-хромосома).

Q-метод (от англ. quinacrine – акрихин) предполагает использование флюорохромов (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.



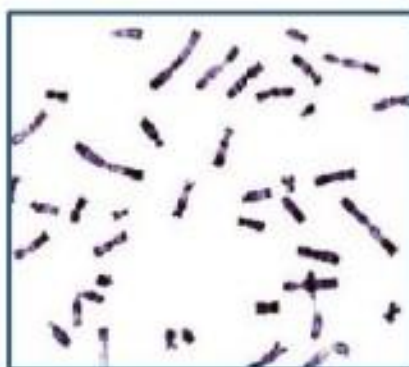
Рутинный метод



C-метод



G-метод



R-метод



Q-метод



NOR- или Ag-окраска

4. Микроскопирование препаратов метафазных хромосом.

В медико-генетической практике используется световая микроскопия (главным образом в проходящем свете), в том числе люминесцентная микроскопия. Для адекватного 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

Описанный метод приготовления препарата называется метафазным, так как изучаемые хромосомы находятся на этой стадии деления в максимально конденсированном состоянии. Если необходим детальный анализ определенного района хромосомы, сильно конденсированные хромосомы на стадии метафазы непригодны для анализа. Клетку нужно зафиксировать на стадии, предшествующей метафазе, когда хромосома редуцировалась, но еще не полностью конденсировалась – это стадия прометафазы. Хотя хромосомы на стадии прометафазы плохо разъединены (они еще очень длинные) и в препарате много наложений одной хромосомы на другую, все же в отдельных клетках можно найти участок, пригодный для анализа. Этот метод (или подход), в отличие от метафазного метода, называют прометафазным, или методом высокоразрешающей цитогенетики. Суть модификации метода состоит в прекращении процесса спирализации и конденсации хромосом в профазе с помощью препаратов, которые вводят в культуру клеток за несколько часов до фиксации.

Цитогенетики в своей повседневной работе сравнивают образцы со стандартами, полученными при изучении нормальных кариотипов

человека. Хромосомный набор человека ($2n=46$, $n=23$) содержит 22 пары аутосом и 1 пару половых хромосом. Аутосомы распределены по группам и пронумерованы. Половые хромосомы не относятся ни к одной из групп и не имеют номера. В зависимости от расположения центromеры различают три типа строения хромосом:

- 1) метацентрические — плечи равной или почти равной длины, центromера располагается посередине или почти посередине;
- 2) субметацентрические — плечи неравной длины;
- 3) акроцентрические — одно из плеч хромосомы имеет очень малые размеры и почти не видно на кариограмме.

Спутничные хромосомы содержат вторичную перетяжку в коротком плече. Y-хромосома — мелкая акроцентрическая, X-хромосома — средняя субметацентрическая.

В 1960 г. в Денвере (США) была проведена первая Международная научная конференция цитогенетиков, которая выработала принципы классификации хромосом человека. В зависимости от морфологической характеристики, учитывающей размеры, форму и положение центromеры, соотношению длины плеч, наличие спутников, все хромосомы были поделены на 7 групп.

Распределение аутосом человека на группы.

Группа	Номер хромосомы	Положение центromеры	Центриольный индекс, %	Примечания
A	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 субметацентрические	24-30	
С	6-12, X	средние субметацентрические	27-35	На 9-й 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	Маленькие	34	
	18	субметацентрические	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 избирательной (дифференциальной) окраски в 1971 г. в Париже были разработаны карты линейной дифференцированности хромосом человека и предложена система их обозначения. Латинскими буквами p и q обозначаются соответственно короткое и длинное плечо хромосомы. От центromеры к теломере по имеющимся отчетливым морфологическим указателям (маркерам) в каждом плече выделяют районы, обозначаемые арабскими цифрами. В пределах районов идентифицируют сегменты – регулярные участки, отличающиеся по интенсификации окраски (рис. 27). Они также обозначаются арабскими цифрами. Так, символ 1p22 означает 2-й сегмент 2-го района короткого плеча хромосомы 1.

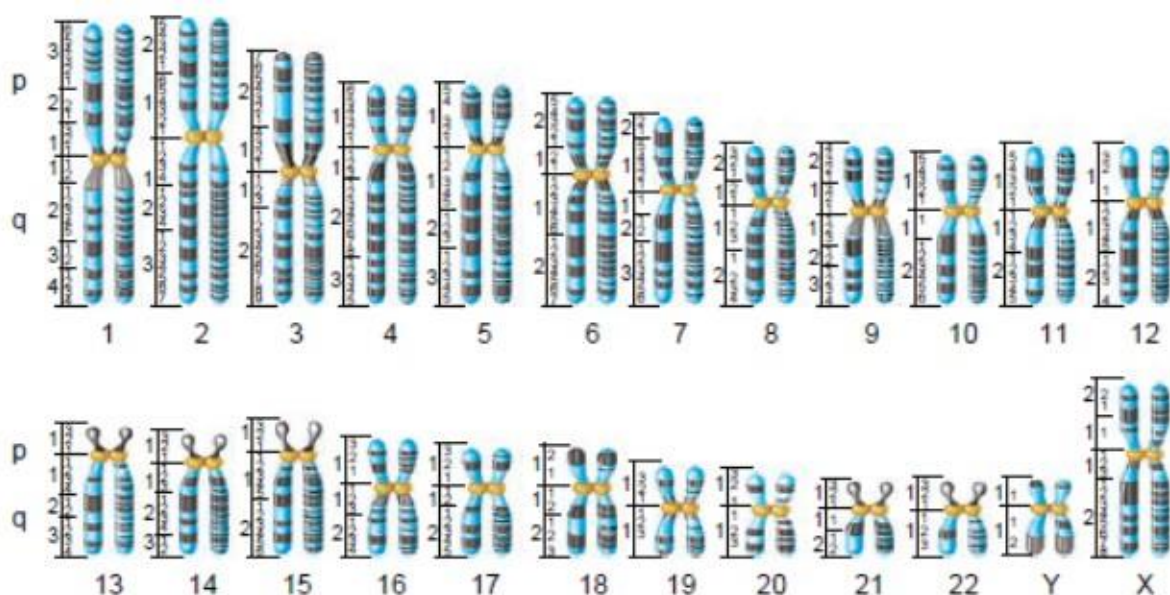


Рис. 27. Схематическое изображение расположения локусов в хромосомах человека при их дифференциальной окраске

По мере внедрения в цитогенетику новых методов классификация хромосом неоднократно дополнялась и в 1978 г. была разработана

«Международная система номенклатуры хромосом человека». Классификация 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».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ознакомились с цитогенетическим методом.

Таким образом, выявили, что исходным материалом является клетки человека, получаемые из разных тканей, — лимфоциты периферической крови, клетки костного мозга, фибробласты, клетки опухолей и эмбриональных тканей и др. Основными этапами являются: культивирование клеток, окраска препарата и микроскопический анализ. А также то, что помощью цитогенетического исследования можно провести анализ кариотипа в норме и патологии, изучить закономерности мутационного и эволюционного процессов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Основы генетики человека : учебное пособие / Г. Л. Снигур, Т. Н. Щербакова, Э. Ю. Сахарова. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2017. – 120 с.
2. Методы исследования в медицинской генетике: учебное пособие / Р.Н. Мустафин, И.Р. Гилязова, Я.Р. Тимашева, Э.К. Хуснутдинова. — Уфа: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2020. — 115 с.
3. Цитогенетический метод. Биохимический метод. Популяционно-статистический метод. Иммуногенетический метод. Методы пренатальной диагностики: методическая разработка для преподавателя лекционного занятия № 6/ Сизова В.В.- Москва: Изд-во ГБПОУ МО «Московский областной медицинский колледж № 1», 2018
4. [https://biomed.szgmu.ru/SZGMU_SITE/M_Genetics/Cytogenetic method for the study of human heridity.html](https://biomed.szgmu.ru/SZGMU_SITE/M_Genetics/Cytogenetic_method_for_the_study_of_human_heridity.html)