

**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: Микросателлитный анализ.

Студентка гр. 301

Салова В.В.

Преподаватель

Антон Александрович
Замарин

Волгоград
2021

АННОТАЦИЯ

Цель: ознакомление с микросателлитным анализом.

Мы рассмотрим, что является микросателлитными локусами, если разница между такими локусами и аллелями, какими свойствами, обеспечивающие удобство использования в исследованиях, они обладают, их структуру. А также в каких сферах находят применение микросателлитного анализа.

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	4
1.	Что является микросателлитами	5
1.1.	Свойства микросателлитных локусов	6
2.	Микросателлитные аллели и их определение в геноме человека	8
2.1	Выявление микросателлитных фрагментов	9
3.	Применение микросателлитного анализа.	12
3.1.	Применение в судебно-медицинской экспертизе.	12
3.2.	Применение в медицине.	13
4.	Причина отсутствия единой номенклатуры микросателлитных локусов.	14
5.	Сложность структуры микросателлитных локусов.	15
	Заключение	17
	Список литературы	18

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность.

Микросателлиты являются широко распространёнными молекулярными маркерами в генетических и геномных исследованиях. Они используются в определении генетического разнообразия, родства, принадлежности к конкретной популяции, для исследования гибридизации. Применяются также для поиска гомологов. Микросателлиты стали удобными и предпочтительными маркерами и нашли самое широкое применение при оценке генетического разнообразия сельскохозяйственных видов растений и животных.

1. Что является микросателлитами.

Микросателлиты – особый класс ДНК маркеров. Они представляют собой фрагменты ДНК с большим количеством – до сотни и даже выше – tandemно повторяющихся идентичных «мотивов», обычно называемых «повторами»: короткими последовательностями из нескольких (как обычно принято считать – от одной до шести) пар нуклеотидов. Микросателлиты высокополиморфны, с десятками аллелей в каждом локусе и высокими темпами мутирования. Аллели микросателлитного локуса отличаются друг от друга длиной, в основном числом повторов.

Их обнаруживают в результате секвенирования фрагментов геномов, полных геномов отдельных видов, маркерных экспрессирующихся последовательностей, (так называемых EST, expressed sequence tag). Информация, полученная в ходе исследований геномов, передается исследователями в молекулярно-биологические базы данных, такие как EMBL, DDBJ или GenBank, откуда ее можно получать и использовать для разработки молекулярных маркеров.

Небольшие размеры микросателлитных локусов позволяют применить метод полимеразной цепной реакции в целях генотипирования и обеспечить высокую воспроизводимость результатов в различных лабораториях.

Для типирования микросателлитов требуется небольшое количество ДНК, которую можно экстрагировать даже из сильно деградированного биологического материала.

Микросателлиты, неотъемлемая часть генома прокариот и эукариот, были обнаружены в геноме всех известных растений и животных. Они были выявлены в геноме человека, позже были описаны у мыши, свиней,

крупного рогатого скота и отдельных растений. Сейчас накоплен огромный фактический материал о распространении и структуре микросателлитов в геноме прокариот и эукариот. Микросателлиты сейчас используются для изучения как природных популяций, так и популяций сельскохозяйственных животных и растений.

У человека они распределены по всему геному, что позволяет использовать их, как и мононуклеотидные полиморфизмы (SNP), для анализа ассоциаций, сцепления и картирования генов, в качестве маркеров наследственных заболеваний. Значительный полиморфизм микросателлитов обеспечивает возможность с высокой вероятностью идентифицировать личность и выявить биологическое родство. Высокие темпы мутирования в этих локусах приводят к накоплению популяционно-специфических мутаций, что позволяет проводить детальный анализ популяционной структуры.

1.1.Свойства микросателлитных локусов.

Свойства микросателлитных локусов, позволяющие им быть удобными маркерами в исследованиях:

1. Данный тип локусов в очень большом количестве рассеян по геному;
2. Эти локусы в основном локализованы в некодирующих регионах генома и, следовательно, должны быть селективно нейтральны. Это общее правило, видимо, имеет и исключения в случае тесного сцепления с адаптивно значимыми генами. Хотя точные функции микросателлитов неизвестны, ряд фактов говорит о том, что они могут служить кодирующими или регуляторными элементами.
3. Для этих локусов характерна быстрая эволюция. Скорость спонтанного мутирования микросателлитных локусов составляет около $10^2 - 10^4$ на

локус за поколение, что гораздо больше, чем у аллозимных генов(около 10^5 - 10^6 . Поэтому, если дивергенция по аллозимным генам обусловлена только дрейфом, то по микросателлитным локусам и дрейфом, и мутациями. Гетерозиготность по микросателлитам встречается разный уровень полиморфизма, хотя, как правило также выше аллозимного.

4. Микросателлиты обладают менделевским кодоминантным наследованием.

5. Микросателлиты одинаковы у близких видов, что позволяет использовать одни и те же праймеры и сходные протоколы анализа.

6. Для анализа микросателлитов требуется очень малое количество крови или какой-либо ткани организма, поэтому возможно прижизненное взятие образцов (у рыб, например, пригодны также высохшая чешуя, отолиты).

7. Возможен автоматизированный анализ микросателлитов.

2. Микросателлитные аллели и их определение в геноме человека.

Микросателлиты буквально рассыпаны по геному человека: число их достигает нескольких десятков тысяч. В качестве примера на рис. 1 представлено распределение охарактеризованных микросателлитных локусов по хромосоме 15 человека; из него видно, что микросателлиты встречаются во всех сегментах хромосомы. К настоящему времени у человека исследовано около десятка тысяч микросателлитных локусов.

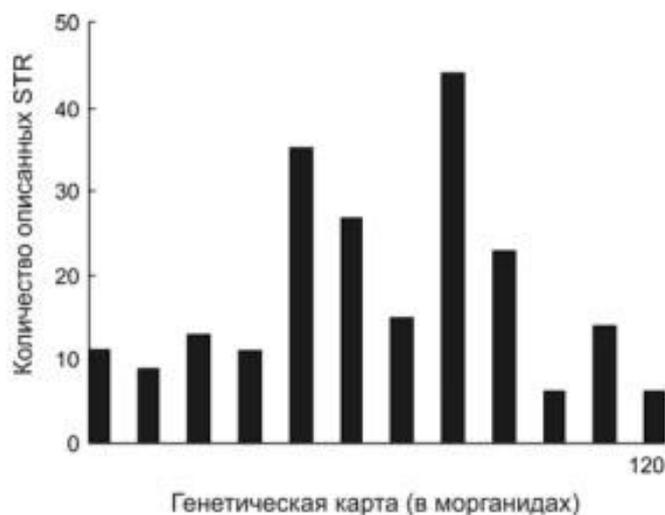


Рис. 1. Распределение описанных микросателлитных локусов в хромосоме 15 (по данным Marshfield La). Генетическая карта построена по средней частоте рекомбинации у обоих полов.

В зависимости от длины повтора микросателлиты классифицируют на локусы с моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, и гексануклеотидными повторами.

Например, с-протоонкоген вируса саркомы кошки *fes/fps*, локализованный в хромосоме 15 человека, содержит тетрануклеотидные повторы АТТТ в одном из интронов этого гена. Они и определяют микросателлитный локус, обозначаемый как FES/FPS (рис. 2). Микросателлитные локусы

высокополиморфны – т. е. для каждого из них имеется много аллелей. Например, в популяциях обнаружено до десятка аллелей локуса FES/FPS (с числом повторов от 7 до 15) и нередко локусы с гораздо бóльшим числом аллелей (рис. 3).

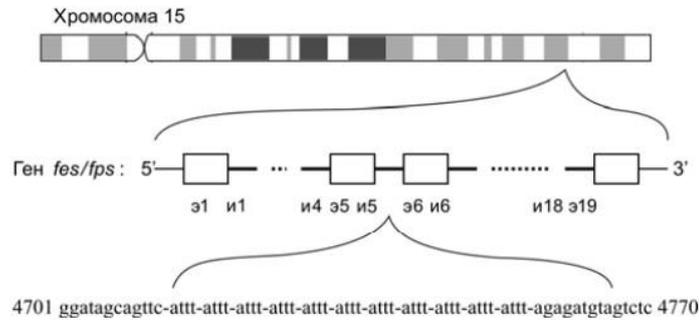


Рис. 2. Микросателлитный локус *FES/FPS*.

Локус *FES/FPS*, состоящий из серии тетра nukлеотидных повторов АТТТ, содержится в интроне с-протоонкогена *fes/fps*. На рисунке дана нуклеотидная последовательность между позициями 4701 и 4770, где располагаются повторы АТТТ (полная длина гена *fes/fps* превышает 12 тыс. пар нуклеотидов). Данный *FES/FPS*-аллель имеет 11 повторов.



Рис. 3. Число аллелей в аутосомных микросателлитных локусах с ди-, три- и тетра nukлеотидными повторами, обнаруженных в выборке более чем 1 тыс. индивидов из 52 этнических групп основных регионов мира (Zhitovskiy *et al.*, 2003). Видно, что подавляющее число локусов имеют 8 и более аллелей. Локусы с динуклеотидными повторами в среднем более вариабельны, чем локусы с более длинными мотивами.

2.1. Выявление микросателлитных фрагментов

Микросателлитные фрагменты выявляют методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), обеспечивающим многократное увеличение числа копий (амплификацию) данного фрагмента ДНК. Амплификация достигается в ходе циклического (30–40 циклов) комплементарного достраивания ДНК-матрицы с помощью термостабильной Taq-полимеразы. Цикличность

обеспечивается программируемыми термостатами (амплификаторами) с автоматической сменой температур режимов плавления ДНК и ее репликации. Синтез данного фрагмента ДНК инициируется ДНК-затравками в виде пары праймеров – синтетических олигонуклеотидов, комплементарных нуклеотидным последовательностям на границах исследуемого фрагмента. Поскольку микросателлитные аллели короткие и вместе с праймерами обычно не превышают 200–300 п.н., то даже сильно деградированный биологический материал может содержать полноразмерные интактные копии исследуемого фрагмента ДНК, обеспечивая высокую вероятность их успешной амплификации.

Именно по этой причине ПЦР небольших участков ДНК, в том числе микросателлитов, оказался особенно важным для судебно-медицинских исследований и для анализа древних костных остатков (правда, более успешным в этих случаях пока является анализ митохондриальной ДНК (мтДНК) из-за высокой копийности молекул мтДНК в митохондриях). Для исследуемого микросателлитного локуса подбирают такую пару праймеров, чтобы комплементарные им концевые (фланкирующие) участки ДНК были высокоспецифичны – отсутствовали в других участках генома человека или других организмов, способных «засорить» исследуемую ДНК, – и обеспечивали надежность амплификации. Для этого они должны быть достаточной длины (20–30 п.н.), их 3'-концы не должны быть комплементарными друг другу и не должны содержать C/G-трактов. Кроме того, они должны быть сбалансированными по содержанию нуклеотидов для равенства температур плавления ДНК. В качестве примера на рис. 4 показана одна из используемых пар праймеров для локуса FES/FPS. Были разработаны эффективные методы анализа микросателлитов с использованием праймеров, меченных флуоресцентными красителями, с последующей детекцией продуктов реакции с помощью автоматических секвенаторов ДНК.

[4621] 5'... TTGGCCTGGAGCAGCTGGAAGATGGAGTGGCTGTTA ATTCATGTAGGGAAGGCTGTGGGA
AGAAGAGGTTTAGGAGACAAGGATAGCAGTTCATTTATTTATTTATTTATTTATTT
ATTTATTTATTTATTTAGAGATGTAGTCTC ATTCCTTCGCCAGGCTGGAG TGCAGTGGCG ...3' [4800]

Рис. 4. Фрагмент ДНК, содержащий АТТТ-повторы локуса *FES/FPS* и фланкирующие участки.
На рисунке показан фрагмент между позициями 4621 и 4800 с-протоонкогена *fes/fps* (см. рис. 1). 11 тетра-нуклеотидных повторов АТТТ выделены жирным шрифтом. Участки для одной из используемых пар праймеров подчеркнуты.

Участок ДНК с определенной геномной локализацией, содержащий короткие тандемные повторы, называют **микросателлитным локусом (или микросателлитом)**, часто STR-локусом (или просто STR – от английского Short Tandem Repeats), или же SSR – Simple Sequence Repeats. **Аллель STR-локуса** – это окаймленный данной парой праймеров фрагмент ДНК, содержащий определенное число исследуемых повторов. Поскольку выбор праймеров во многом произволен, то термины «локус» и «аллель» здесь имеют чисто символический характер, указывая лишь на то, что этот локус содержит участок ДНК с исследуемыми повторами. Можно выбрать иную пару праймеров, окаймляющую этот же фрагмент ДНК с повторами, – и это будет тот же STR-локус, если целью исследования является выявление числа или нуклеотидного содержания тех же самых повторов в данном участке ДНК. При этом соответствующие аллели, выявляемые разными парами праймеров, отличаются друг от друга на одно и то же число нуклеотидов, определяемое только различием в положении концевых участков амплифицируемых фрагментов ДНК. Независимо от того, определяют ли разные пары праймеров бóльшие или меньшие амплифицированные фрагменты ДНК, важно, чтобы эти фрагменты содержали весь участок с исследуемыми повторами, которые и являются основной характеристикой микросателлитного локуса. Поэтому формула локуса обычно указывает на структуру повторов и их число. Так, формула STR-локуса *FES/ FPS* записывается как [АТТТ] n , где n – число повторов; аллель в этом локусе (приведенный на рис. 2), обозначается как [АТТТ] $_{11}$ – в нем содержится 11 повторов АТТТ.

3. Применение микросателлитного анализа.

Данный метод анализа имеет широкое применение в различных сферах. Он используются в различных генетических исследованиях. Имеет широкое применение при оценке генетического разнообразия сельскохозяйственных видов растений и животных, в судебно-медицинской экспертизе, а также в медицине.

3.1. Применение в судебно-медицинской экспертизе.

В особо важных случаях – например, в судебно-медицинской экспертизе – генотипирование (т. е. выявление аллелей STR-локуса у исследуемых индивидов) проводят по двум или даже трем парам праймеров. Делают это потому, что не исключена мутация в районе праймера (либо новая, возникшая у данного индивида, либо возникшая раньше и достигшая определенной частоты в популяции), ассоциированная с определенным аллелем, при этом амплификация этого аллеля невозможна – он ведет себя как необнаруживаемый «нуль-аллель». Указанием на присутствие такой мутации у индивида является его гомозиготность по данному аутосомному микросателлитному локусу, которая оказывается в таком случае ложной, поскольку «нуль-аллель» не амплифицируется. Как правило, микросателлиты высокополиморфны и потому подавляющее большинство людей гетерозиготны по ним; лишь небольшой процент индивидов – реальные гомозиготы, имеющие идентичные по нуклеотидному составу аллели в обоих гомологичных микросателлитных локусах. Использование другой пары праймеров, не включающей эту мутацию, позволяет провести ПЦР и определить реальный генотип индивида по данному микросателлитному локусу. Конечно, микросателлитные локусы гаплоидных тканей и органов или гемизиготной части генома (например, Y-хромосомы) не показывают гетерозиготного генотипа, хотя нульаллели могут встречаться и по ним; в этом случае они легко обнаруживаются по

отсутствию продукта амплификации. Разработаны так называемые мультиплексные реакции, позволяющие проводить одновременную амплификацию и фрагментный анализ по нескольким локусам; они различимы на фореграмме окраской и положением, обеспечиваемыми флуоресцентными праймерами и неперекрывающейся вариацией размеров аллелей разных локусов.

3.2. Применение в медицине.

Микросателлиты редко встречаются внутри генов, но если все-таки это происходит, то в результате чаще всего возникает заболевание. Например, хорея Гентингтона, вызывающая поражение центральной нервной системы. Поражение обусловлено дисфункцией белка гентингтина вследствие увеличения в нем полиглутаминовой зоны. Это связано с ростом копийности триплетных повторов CAG до 40 -100 в гене, который в норме имеет менее 30 повторов. Другое заболевание – фрагильный Хсиндром – обусловлено возрастанием числа CGGповторов: от нормы, менее 50, до многих сотен копий у больных

Увеличение числа повторяющихся элементов микросателлитов, локализованных в экзонах, в нетранслируемых или регуляторных участках генов, может быть причиной развития некоторых заболеваний у человека. К числу таких заболеваний относятся: болезнь Хантингтона, спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди, спиноцеребеллярная атаксия, синдром ломкой X-хромосомы, атаксия Фридрейха, миотоническая дистрофия 1-го и 2-го типов.

4. Причина отсутствия единой номенклатуры микросателлитных локусов.

Номенклатура микросателлитных локусов не имеет единого стандарта. Название STR локуса может быть связано с тем геном, в котором он находится (например, FES/FPS), а может отражать хромосомную локализацию и определенный номер (например, D11S1986 в хромосоме 11 и DYS392 в Y-хромосоме). Даже обозначение повтора может быть разным: иметь различные варианты перестановок или указывать на разные комплементарные цепи ДНК. Например, на рис. 3 видно, что, поскольку участок с тетра nukлеотидными повторами окаймлен нуклеотидами А, повторы в локусе FES/FPS могут быть обозначены не только как АТТТ, но и как ТТТА, а исходя из нуклеотидной последовательности комплементарной цепи – еще и как АААТ или ТААА.

5. Сложность структуры микросателлитных локусов.

Структура микросателлитных аллелей может быть разной сложности и иметь вариации как по участку с повторами, так и во фланкирующих последовательностях. Например, все аллели локуса FES/FPS имеют только так называемые совершенные, или простые повторы: их регулярность ничем не прерывается. В то же время в этом конкретном локусе встречаются вариации, которые отличаются от стандартных аллелей заменой нуклеотида А на нуклеотид С в одной из позиций 5'-фланкирующего района и выявляются прямым секвенированием или рестрикционным анализом. Локус HUMTH01 (первый интрон гена тирозингидроксилазы) имеет большинство аллелей с простыми повторами [AATG]_n, но некоторые его аллели имеют более сложную структуру, как, например, [AATG]₅ATG [AATG]₃ или [AATG]₆ATG[AATG]₄. Эти аллели содержат между основными тетрануклеотидными повторами тринуклеотид ATG, видимо, путем делеции возникшей из основного повтора. Вариации в структуре повторов в этом локусе могут образоваться и за счёт замены, встраивания или выпадения отдельного нуклеотида, например, в аллеле [AATG] [AACT][AATG]₈ATG[AATG]₃ участок ATG образовался из повтора AATG вследствие потери нуклеотида А. Наконец, встречаются сложные аллели, составленные из двух и более типов повторов. Например, один из аллелей локуса vWF, используемого в судебно-генетических исследованиях, имеет подобную сложную структуру: [TCTA]₂[TCTG]₄ [TCTA]₃TCCA[TCTA]₃. Такие сложные локусы нередко разбивают на части, соответствующие своим группам повторов, которые затем анализируют отдельно с использованием как окаймляющих, так и внутренних праймеров (рис. 5)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ознакомились с микросателлитным анализом.

Выявили, что является микросателлитными локусы являются особыми маркерами ДНК, обладающими более тонкой структурой, по сравнению с аллозимными. Микросателлитными локусы или аллели обладают сложной структурой, не имеют номенклатуры. Данный метод анализа имеет широкое применение в различных сферах. Его применяют в сельском хозяйстве, эволюционной и популяционной генетике, а также в судебно-медицинской экспертизе и медицине.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЧЕЛОВЕКА И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ: / Л.А. Животовский – Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, 2006
2. https://ozlib.com/966936/agro/printsip_metoda_identifikatsii_pomoschyu_markerov
3. https://studbooks.net/1290336/meditsina/mikrosatellitnyy_analiz