



# **ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ**

# **Использование методов молекулярной биологии в медицине**

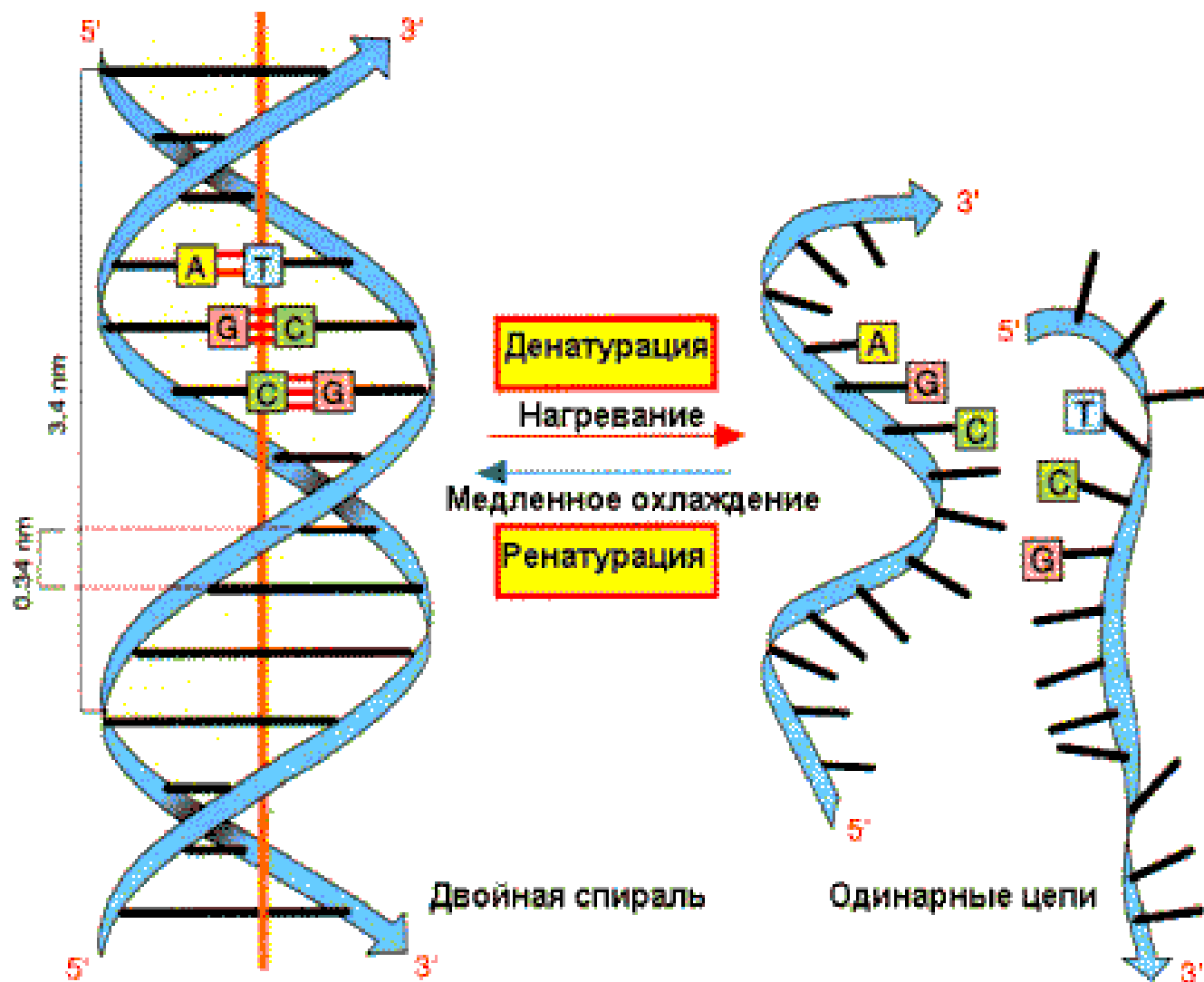
- **Диагностика заболеваний**
- **Генная терапия**
- **Получение лекарственных  
препаратов**

# Этапы исследований:

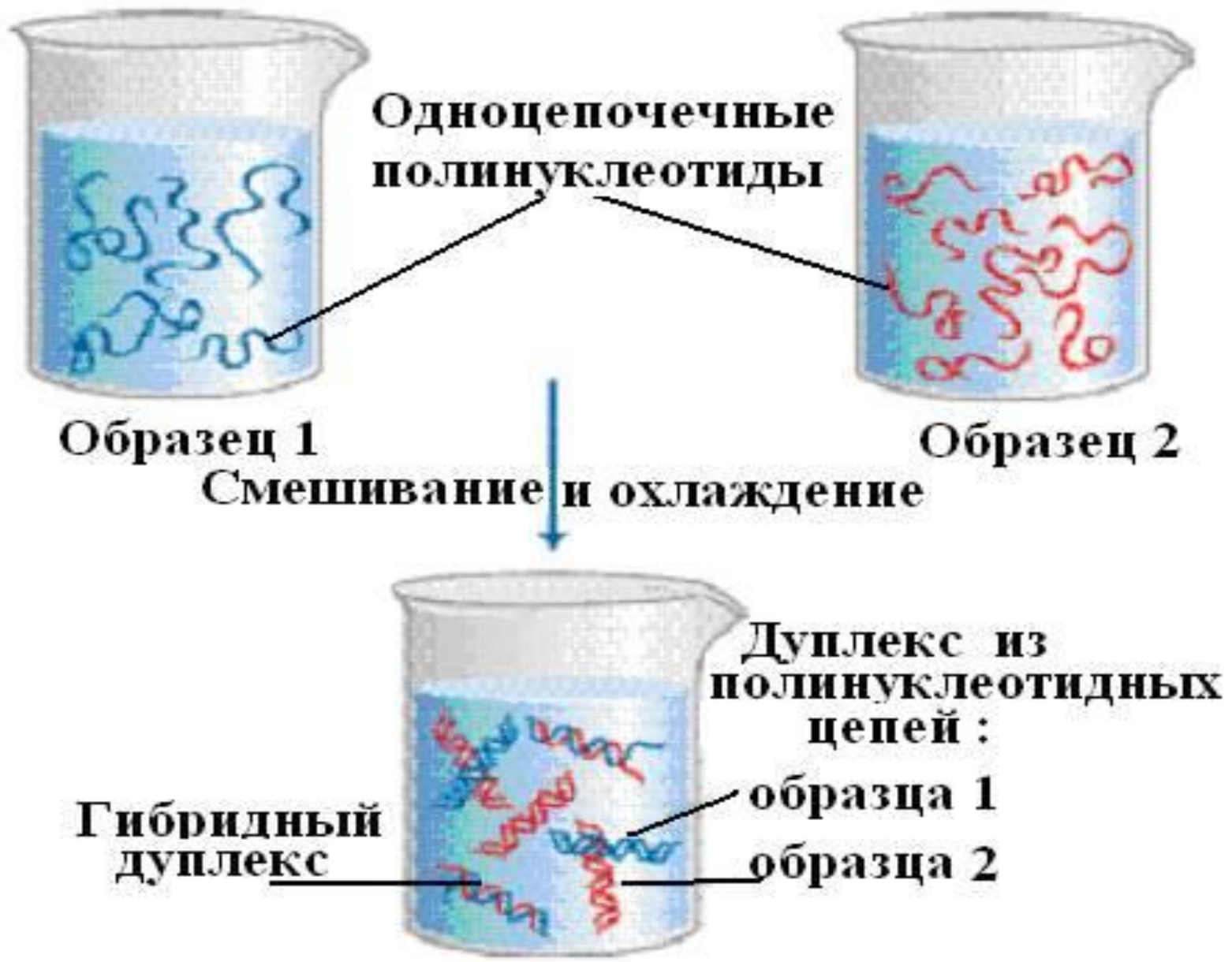
- **Выделение макромолекул (ДНК, РНК, белки)**
  - **Фрагментирование (для ДНК)**
- **Секвенирование**
  - **Идентификация специфических последовательностей**

# **Ферменты и базовые методы, используемые в молекулярной биологии**

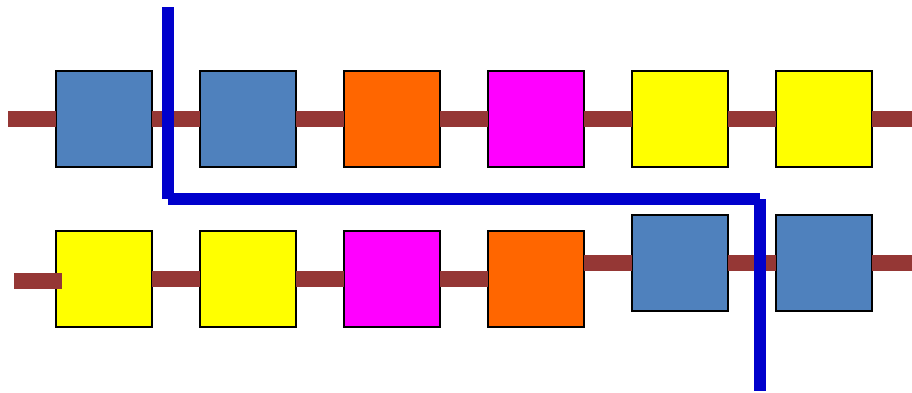
# Денатурация ДНК



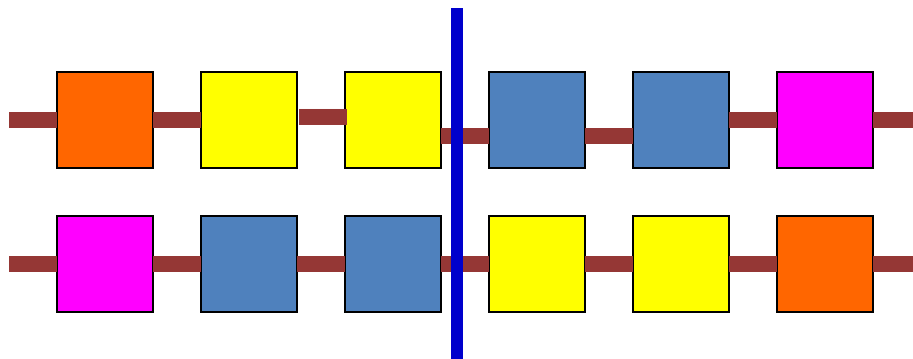
# Гибридизация нуклеиновых кислот



# Рестриктазы - инструмент для разрезания НК

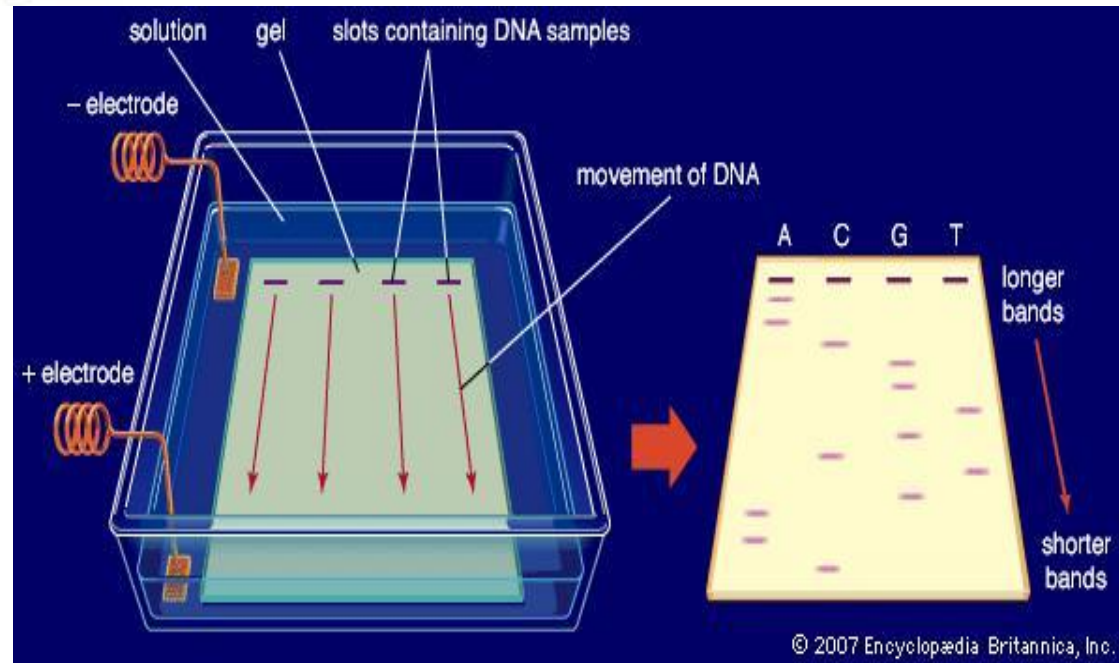
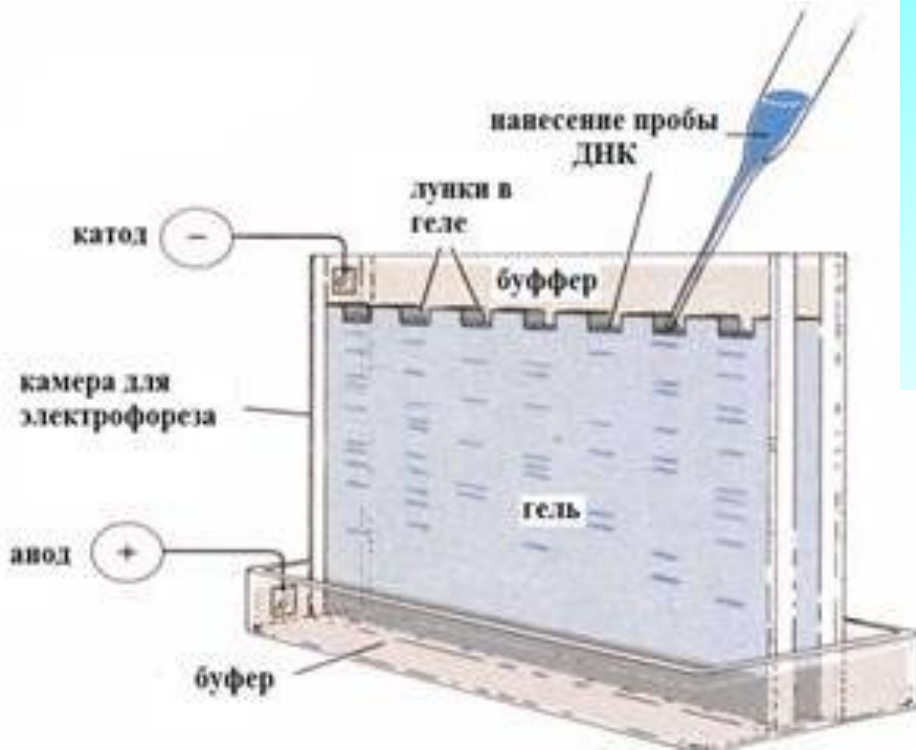


Расщепление с  
образованием  
«ЛИПКИХ» концов



Расщепление с  
образованием  
«ТУПЫХ» концов

# Разделение фрагментов НК с помощью электрофореза





# **ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ ( П Ц Р )**

**1983 г. Карри Мюллис**

**метод амплификации  
ДНК или ее фрагментов *in vitro***

## Состав реакционной смеси

Исследуемая ДНК

ДНК-зависимая-ДНК-полимераза

Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты  
(dNTP)

ДНК-затравки (праймеры)

Буферный раствор с  $MgCl_2$

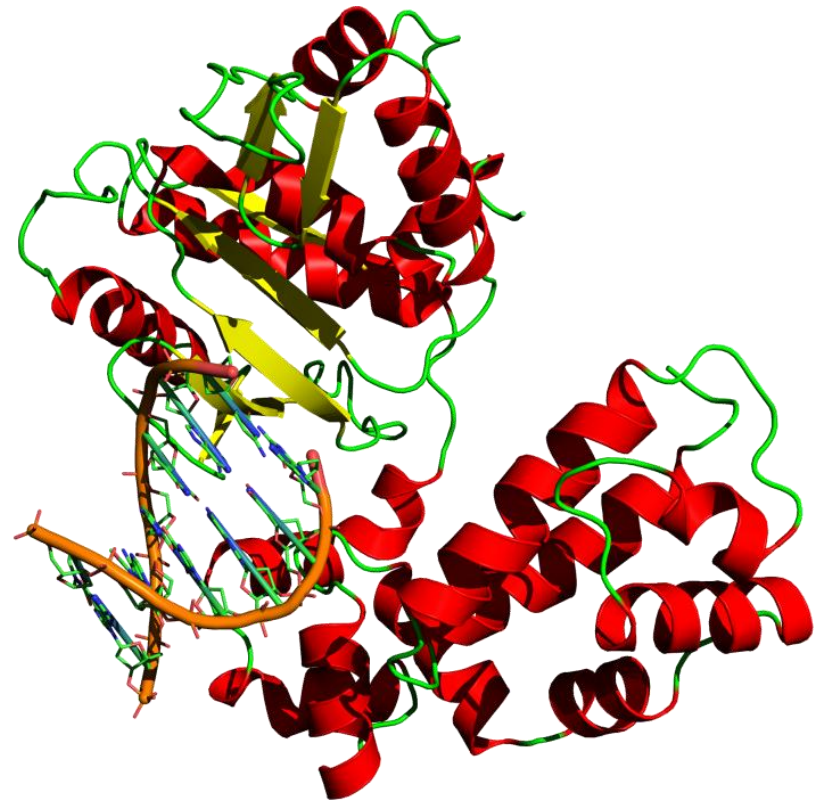
Интеркалирующий краситель  
(обычно SYBR Green)

или

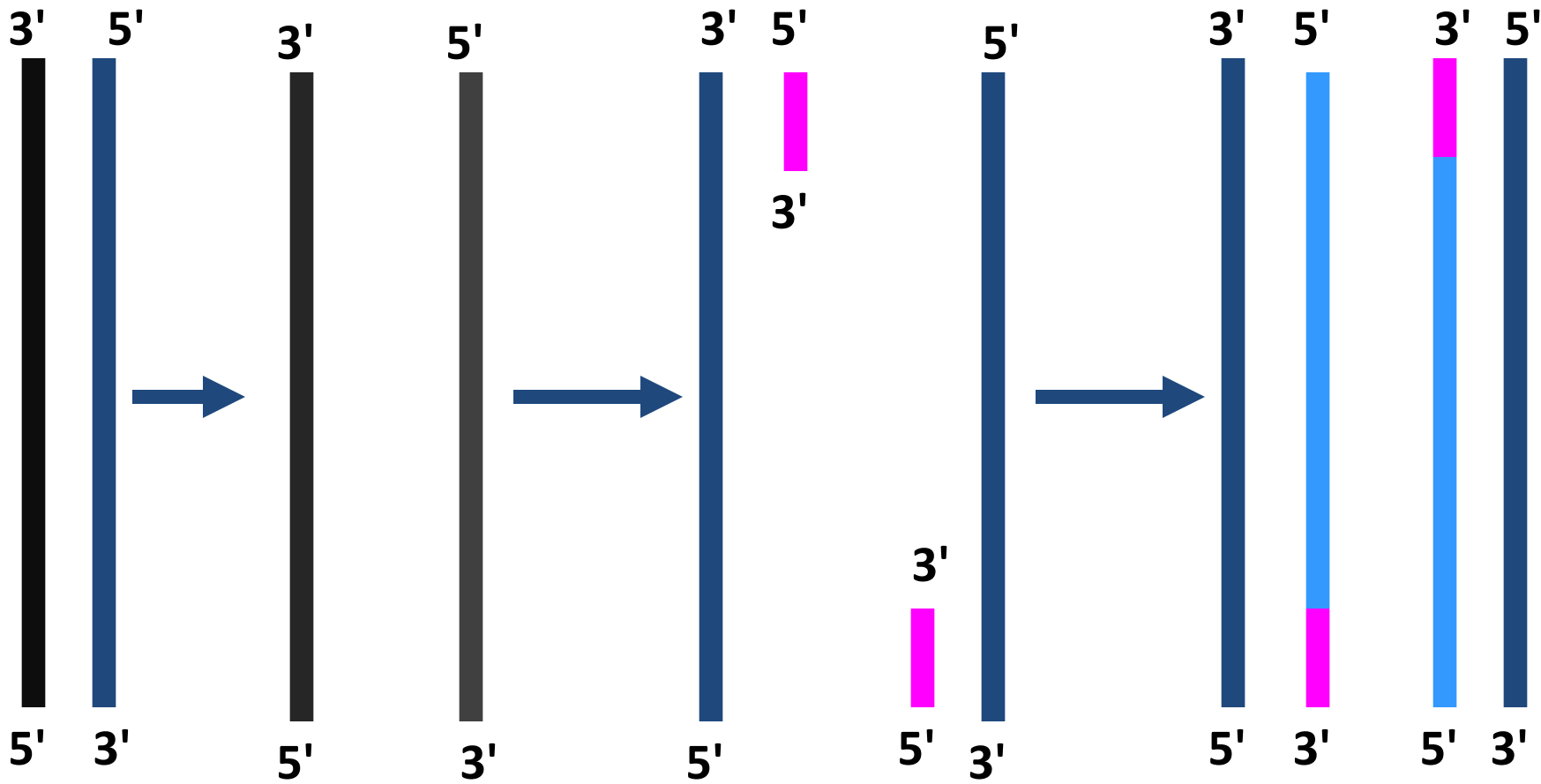
Флуоресцентно меченные  
ДНК-зонды

## Тaq-полимераза

термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus*.



# ПЦР

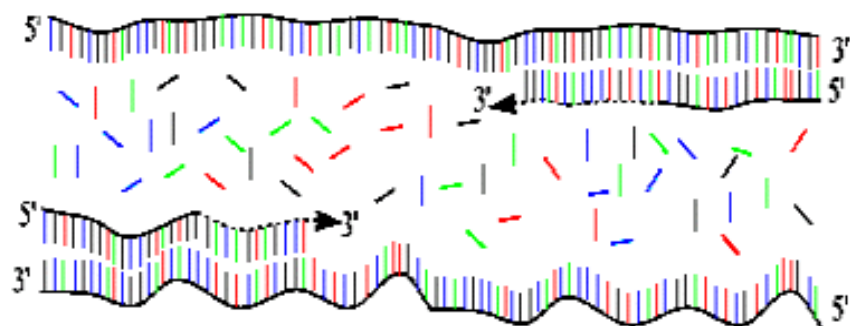
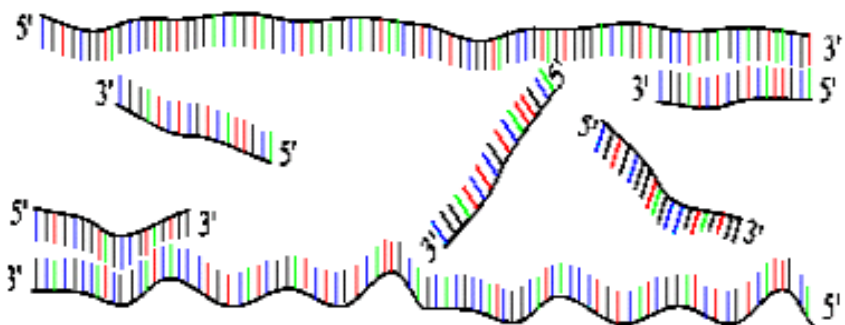
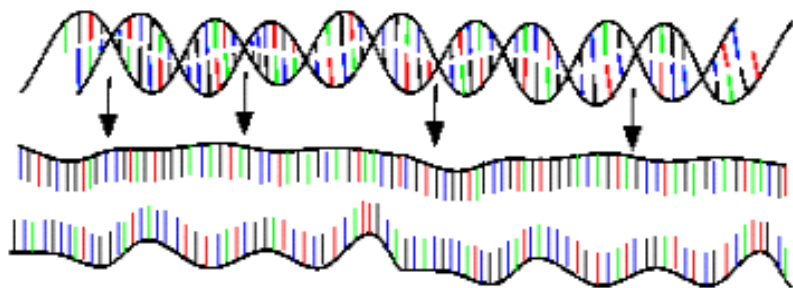


**Денатурация**

**Гибридизация**

**Полимеризация**

# Этапы ПЦР



93-96 °C

1-10  
минут

«Горячий старт» -  
активация  
полимеразы,  
размешивание  
компонентов

93-96 °C

5-15  
секунд

Разрушение  
водородных связей  
между цепями ДНК  
(денатурация)

40-75 °C

30  
секунд

Гибридизация  
праймеров на ДНК  
(отжиг праймеров)

60-75 °C

0-15  
секунд

Синтез  
комплементарных  
цепей ДНК  
(элонгация)

# Виды ПЦР

- ПЦР с обратной транскрипцией
- ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР)
- Иммуно-ПЦР

**Реакция может проводиться в нескольких вариантах:**

- ПЦР с горячим стартом
- Ступенчатая ПЦР
- «Холодная» ПЦР
- ПЦР длинных фрагментов
- Мультиплексная ПЦР
- Асимметричная ПЦР
- Метил специфичная ПЦР
- Вложенная ПЦР
- ПЦР *in situ*
- Капельно-цифровая ПЦР

# Применение ПЦР

## Клиническая медицина

- обнаружение бактериальных, вирусных, грибковых инфекций; диагностика лейкемии, лейкомы и других видов неоплазий по наличию точечных мутаций и генетических маркеров;
- диагностика наследственных заболеваний;
- выявление генетически обусловленных особенностей метаболизма для индивидуального подбора лекарственных препаратов в персонализированной медицине;
- типирование тканей в трансплантологии;
- обнаружение хромосомных перестроек в половых клетках до оплодотворения.

## Судебная медицина и криминалистика

- установление личности по ДНК;
- установление родства;
- расследование причин необъяснимой смерти («молекулярная аутопсия»).

## Генная инженерия

- амплификация ДНК;
- секвенирование ДНК;
- мутагенез;
- создание гибридизационных зондов для различных видов блот-анализа;
- анализ экспрессии генов



# Оборудование для ПЦР



Swift™ MiniPro  
Thermal Cycler



Swift™ Spectrum 48  
Real Time Thermal Cycler



Aeris™ Aeris  
Thermal Cycler



Swift™ Spectrum 96  
Real Time Thermal Cycler



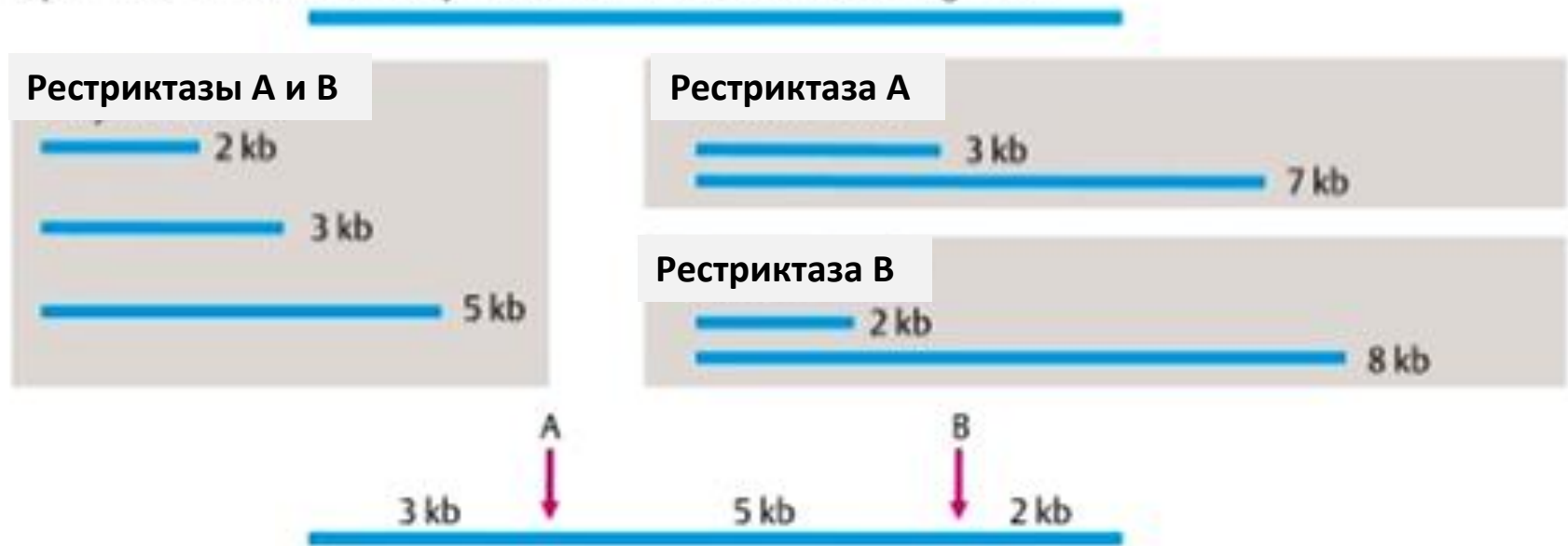
ProvoCell™ Microplate  
Shaker/Incubator

**Рестрикционный анализ  
и  
геномная дактилоскопия**



# Рестрикционные карты

Действие двух разных рестриктаз (А и В) на фрагмент ДНК

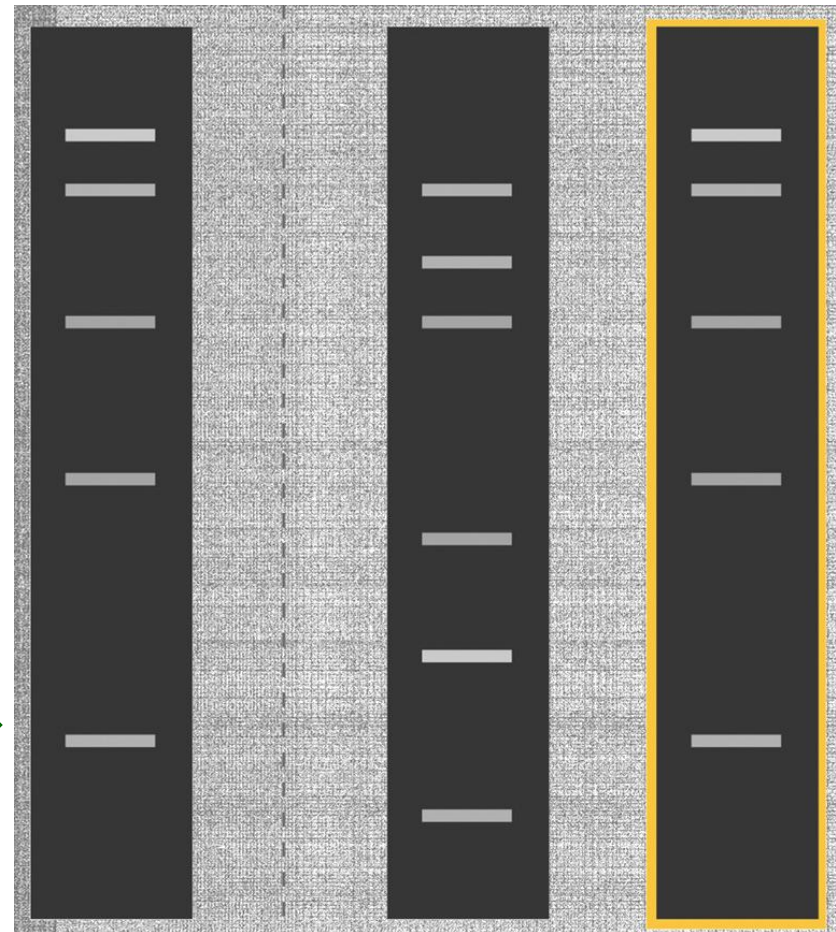
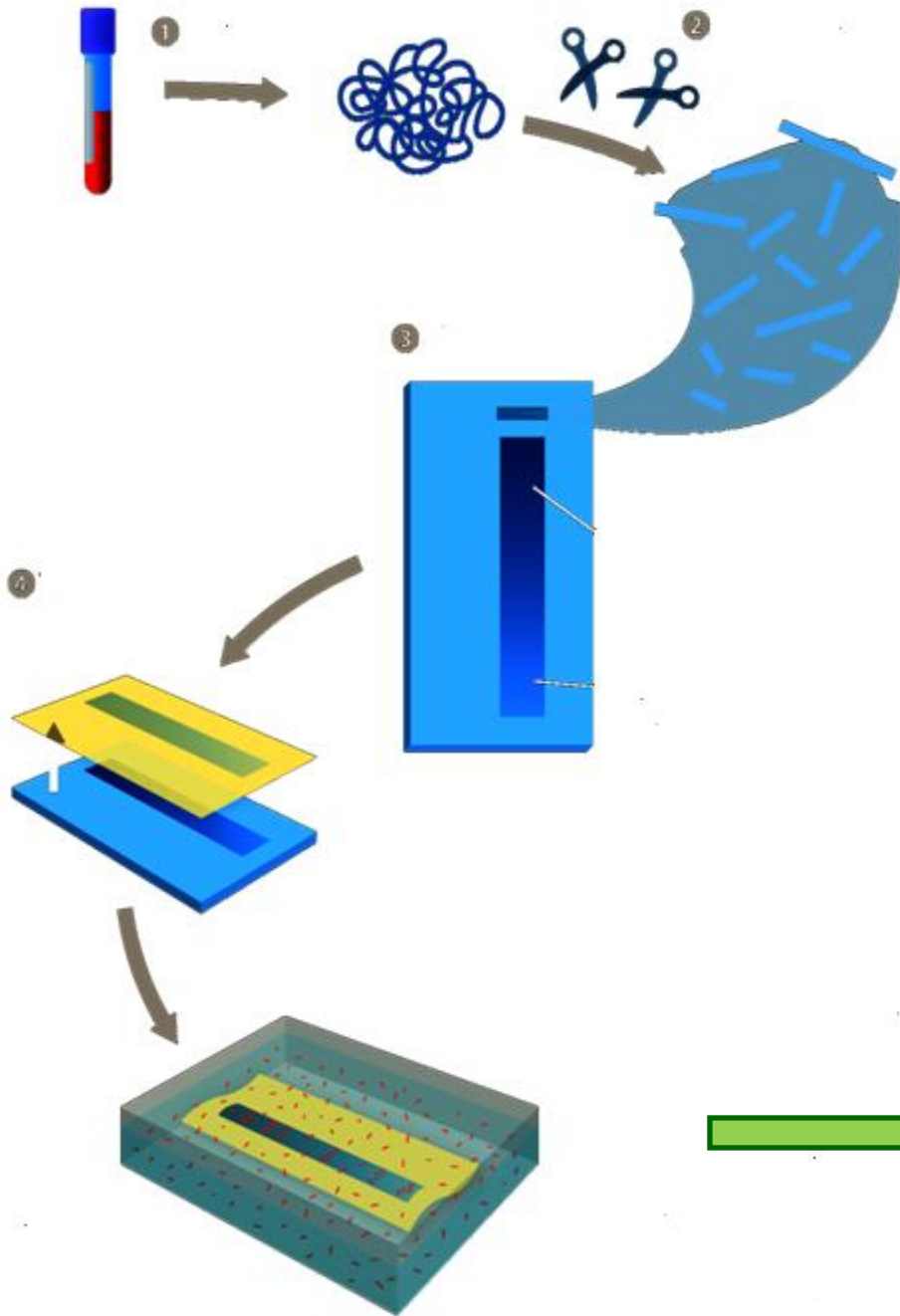


Определение положения сайтов рестрикции



Пример рестрикционной карты

# Генная дактилоскопия (метод «отпечатков пальцев» ДНК или ДНК-фингерпринт)

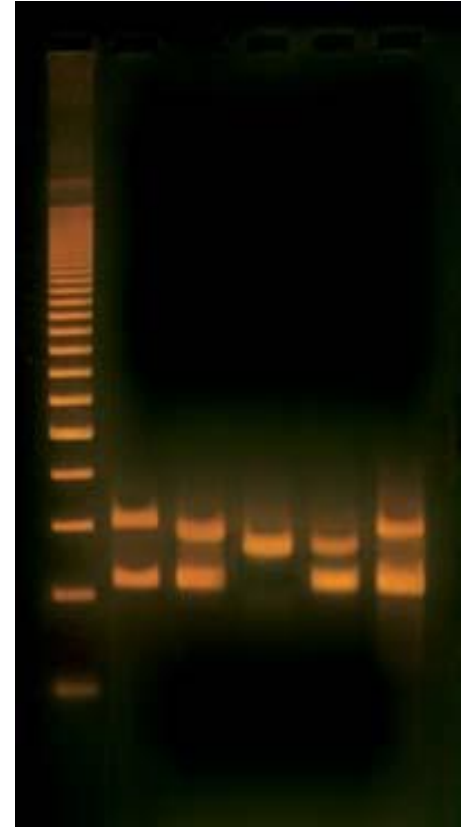
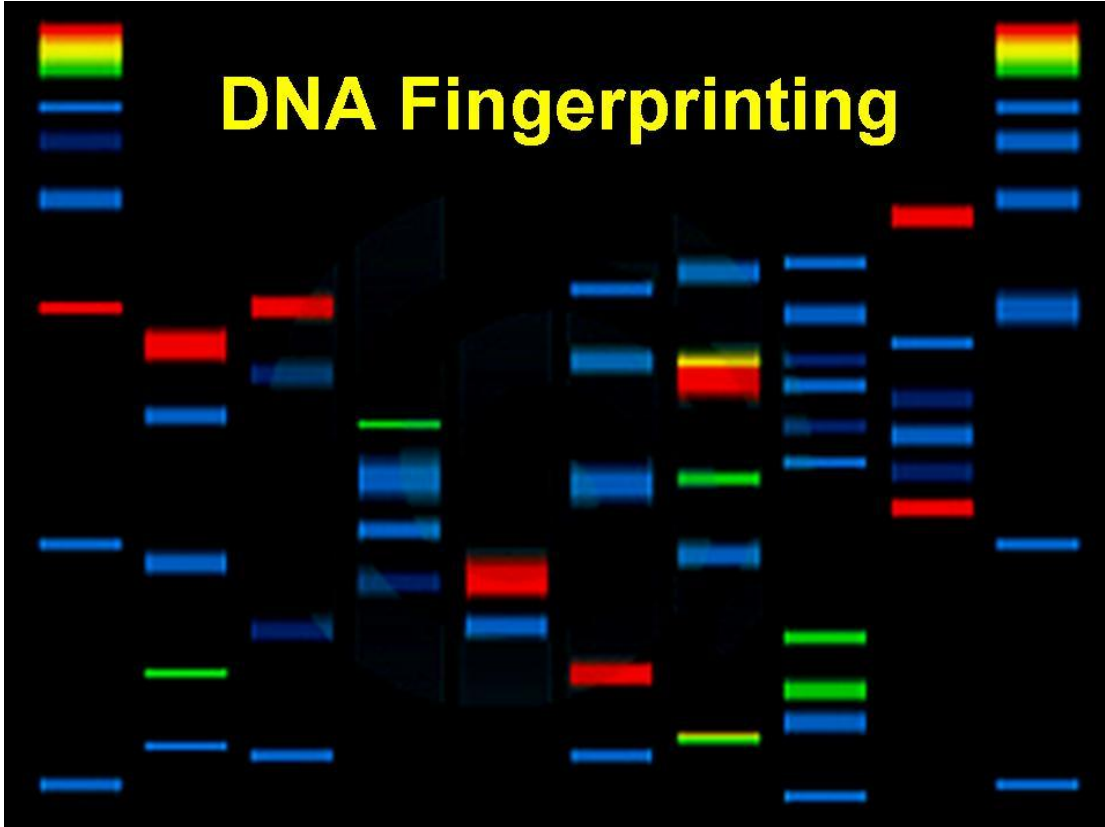


**Результаты электрофореза  
ДНК-фрагментов,  
амплифицированных с  
помощью ПЦР.**

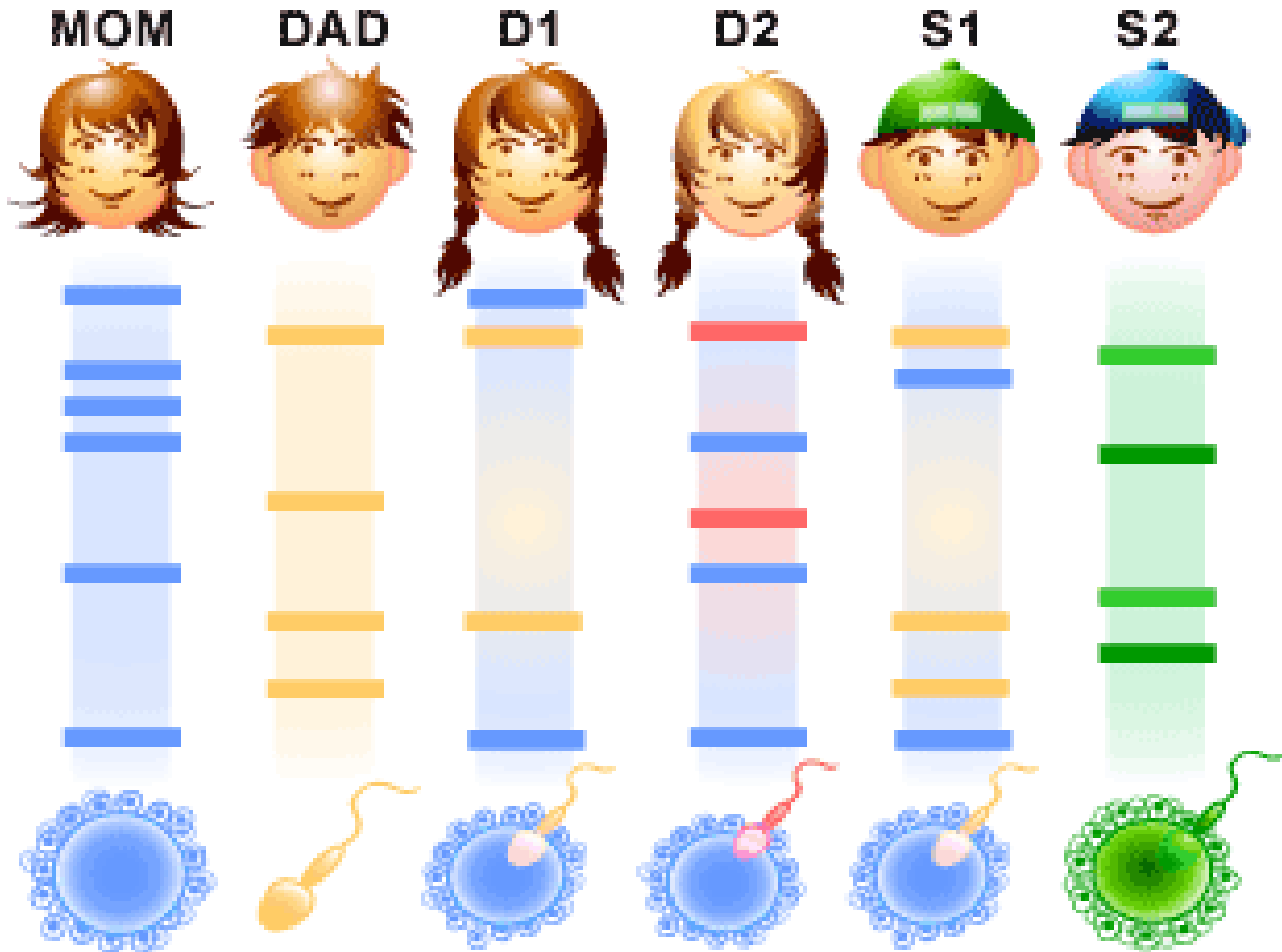
**(1) Отец. (2) Ребенок. (3) Мать.  
Ребенок унаследовал  
некоторые особенности  
генетического отпечатка обоих  
родителей, что дало новый,  
уникальный отпечаток.**



# DNA Fingerprinting

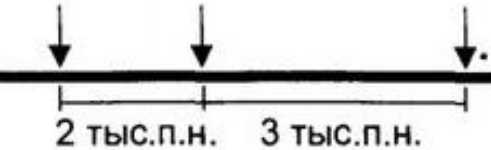


# ДНК-фингерпринт в определении родства

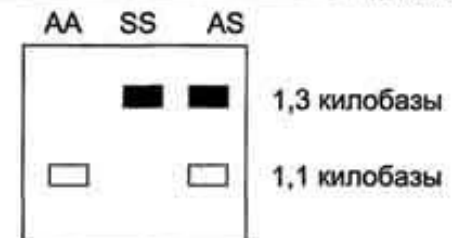
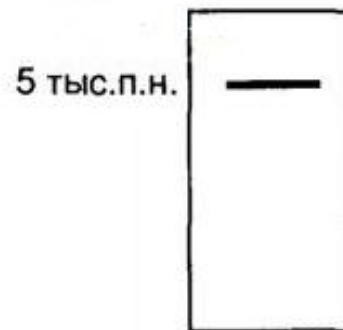
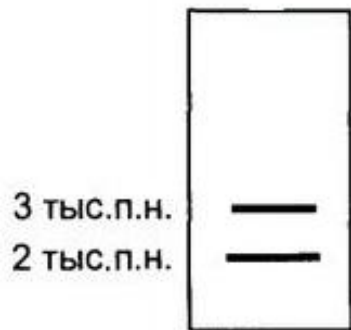
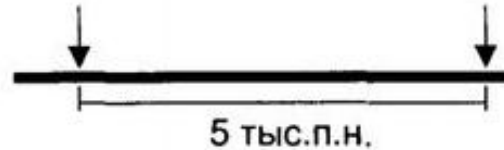


# ПДФФ-анализ

Сайты рестрикции в норме



Исчезновение сайта рестрикции в результате мутации



Радиоавтограмма после гибридизации с зондом к β-глобину

# Идентификация специфических последовательностей

Используется принцип комплементарности и технология гибридизации

## БЛОТ-АНАЛИЗ

Саузерн-  
(ДНК)

Нозерн-  
(РНК)

Вестерн-  
(белок)



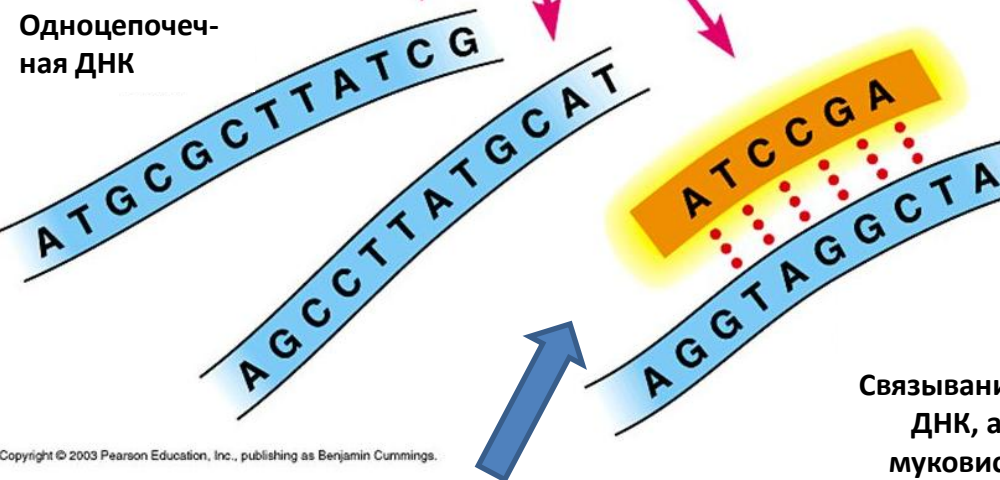
# Молекулярные зонды

Радиоактивный зонд  
(фрагмент ДНК)

АТССГА

Добавление зонда к одноцепочечной ДНК

Одноцепочечная ДНК



Связывание зонда с ДНК указывает на присутствие определенного гена (или последовательности нуклеотидов)

Copyright © 2003 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

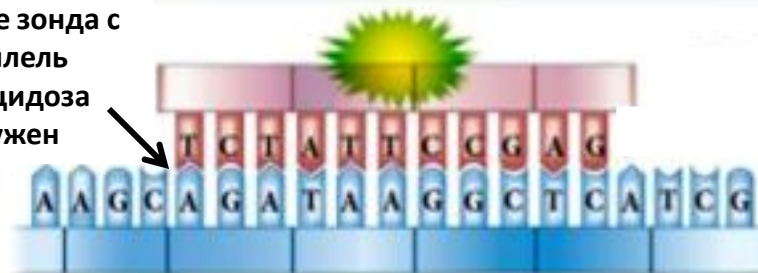
Флуоресцентная метка



Зонд, комплементарный аллелю муковисцидоза

Последовательность № 1

Связывание зонда с ДНК, аллель муковисцидоза обнаружен



Последовательность № 2

Отсутствие связывания, аллель муковисцидоза НЕ обнаружен





# Метод блот-гибридации (Саузерн-блот) (Э. Саузерн, 1975 г.)



# Секвенирование ДНК

**метод Сэнжера**

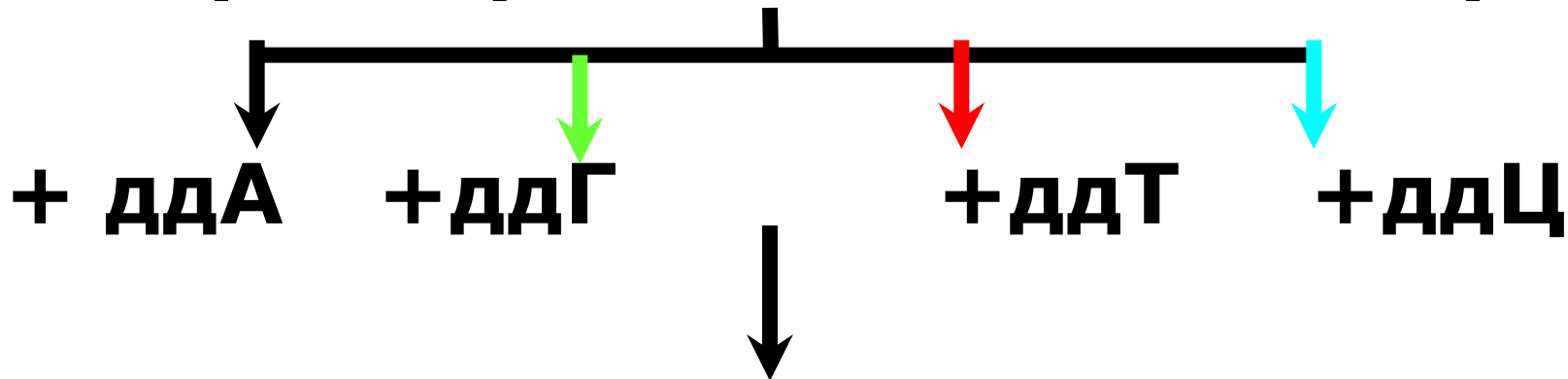
**или**

**дидезоксисеквенирование**

**(в реакционную смесь добавляют**

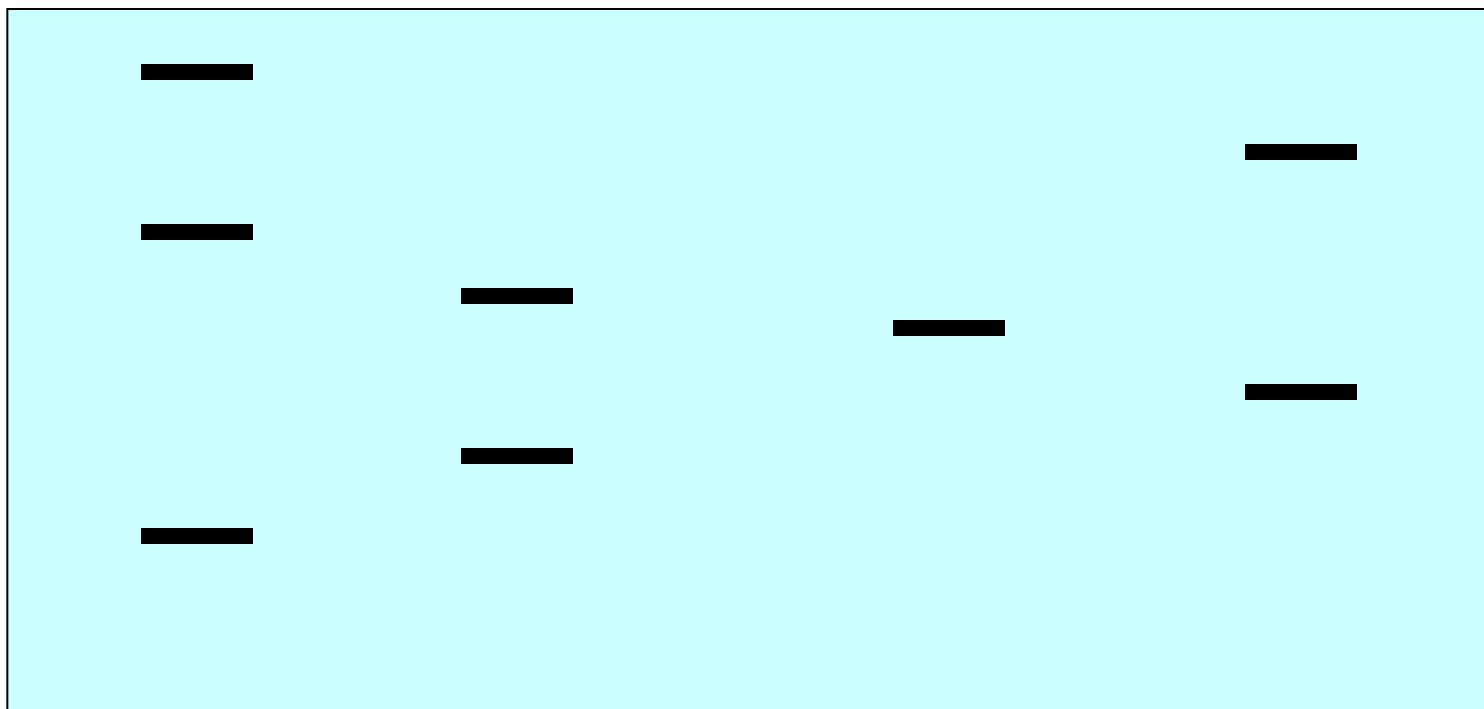
**ДИдезоксинуклеотиды)**

# ДНК, праймер, дНТФ, ДНК-полимераза



## набор фрагментов ДНК

разделение их с помощью гель-электрофореза

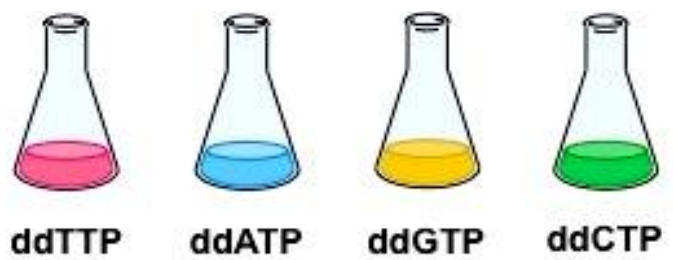


# Секвенирование ДНК

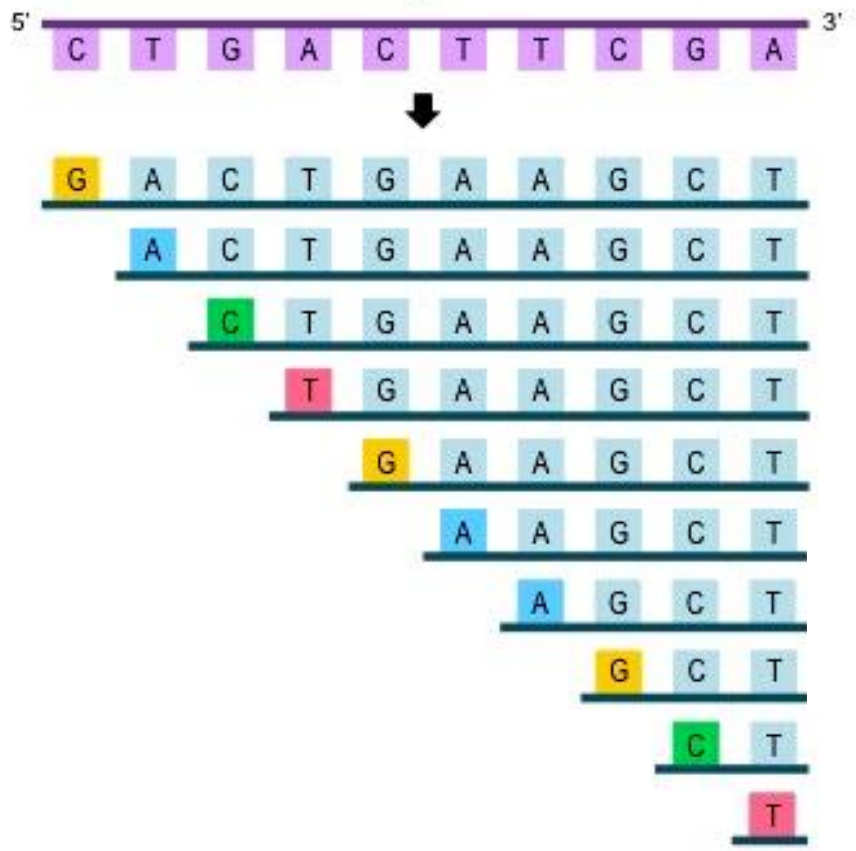


# Секвенирование ДНК

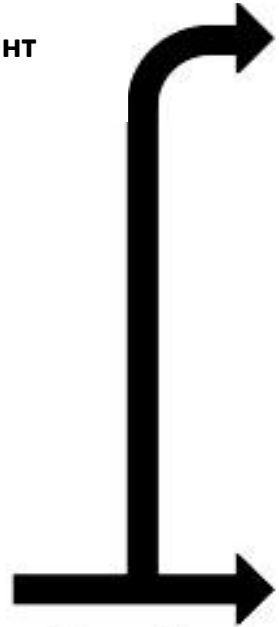
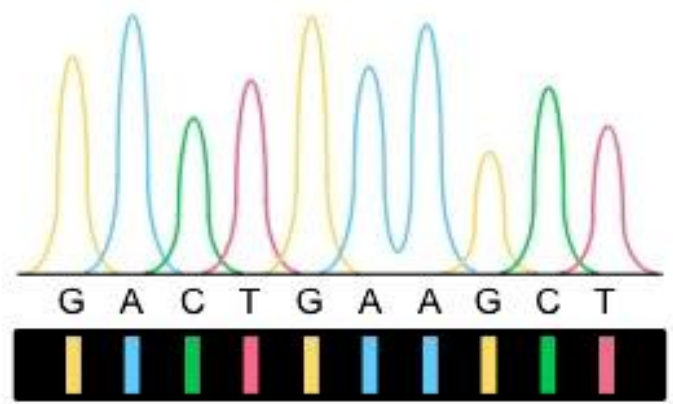
4 смеси для ПЦР, в которые добавлено по 1 виду дидезоксинуклеотидов



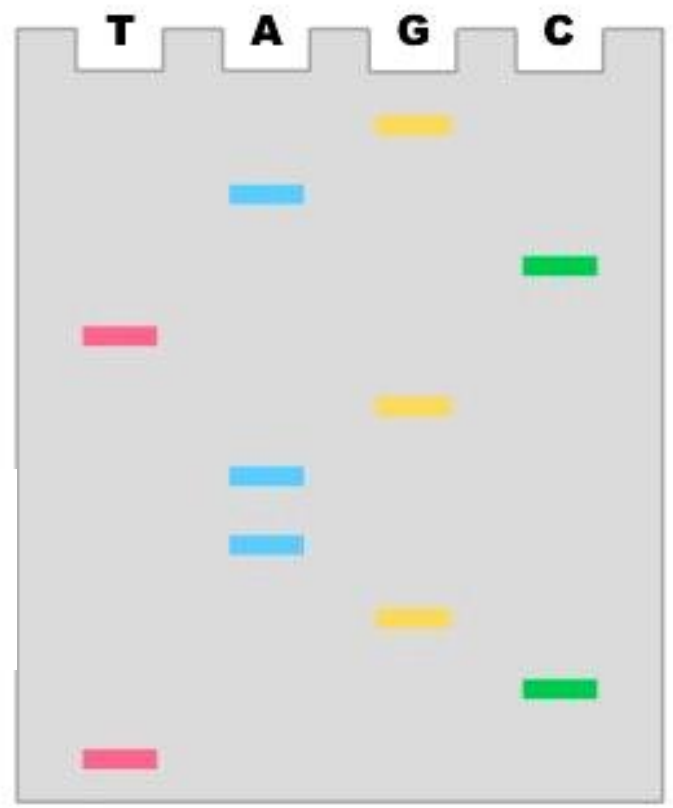
Секвенируемый фрагмент ДНК



Считывание последовательности с помощью секвенатора



Разделение фрагментов с помощью гель-электрофореза





# Секвенирование ДНК



**Гель, содержащий продукты ПЦР, меченые  
флуоресцентной меткой**  
(каждая полоса – это отдельный образец, где каждый  
цвет соответствует определенному нуклеотиду)

# ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

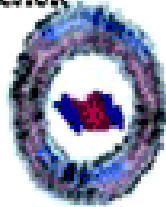
## Генная терапия *in vivo*

### Невирусные векторы

Конъюгаты ДНК-белок

Липосомы

Электропорация

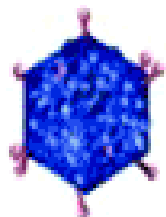


### Вирусные векторы

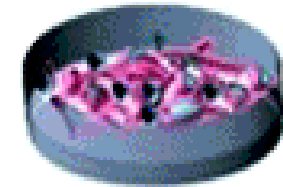
Аденовирусы

Ретровирусы

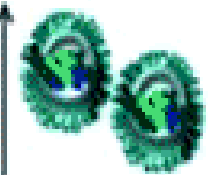
AAV



## Генная терапия *ex vivo*

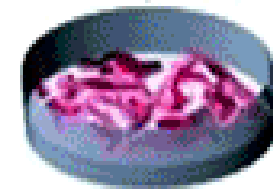


Культивирование клеток

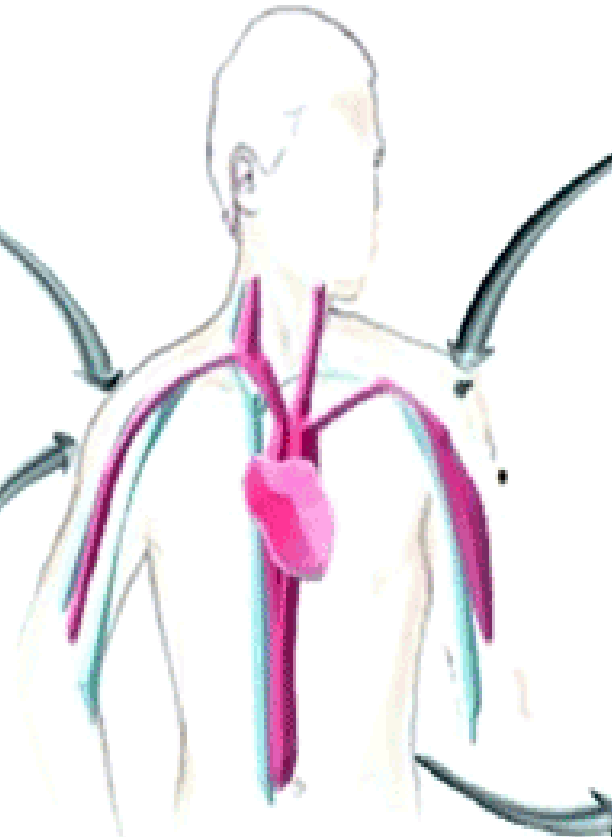


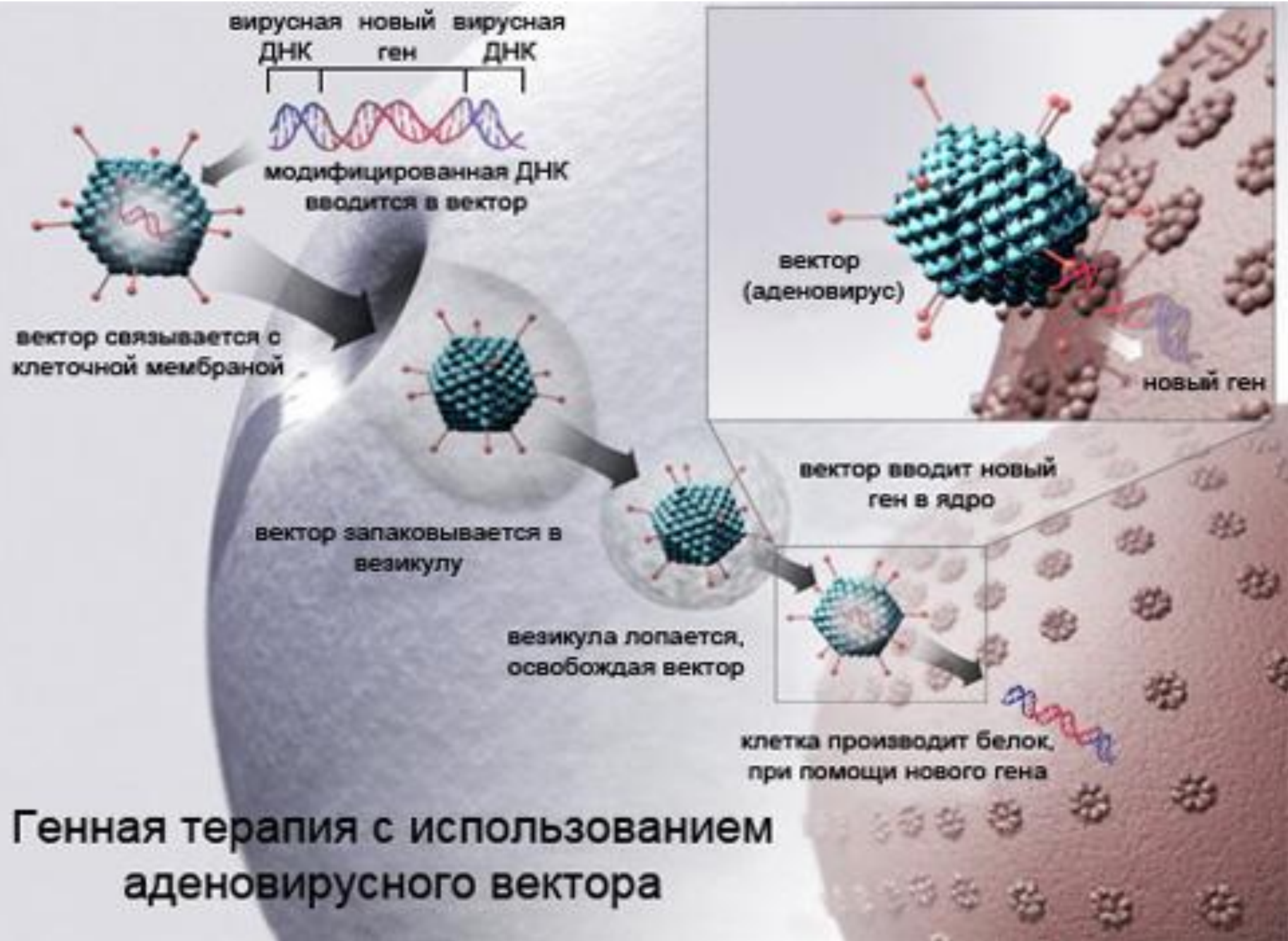
Трансдукция

введение  
генетического  
материала  
в клетки



Изоляция клеток

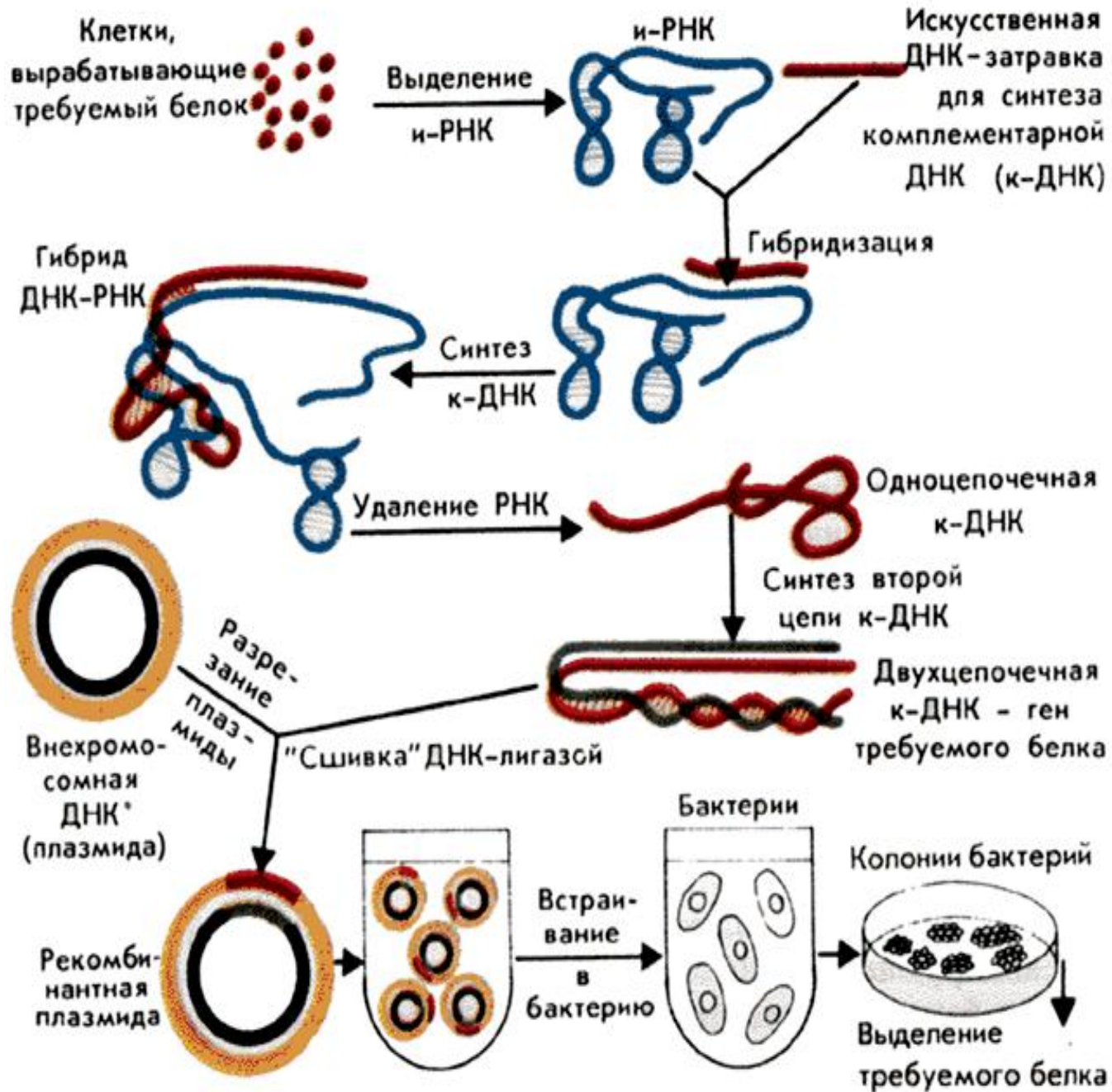




**Генная терапия с использованием аденовирусного вектора**



# Генная инженерия

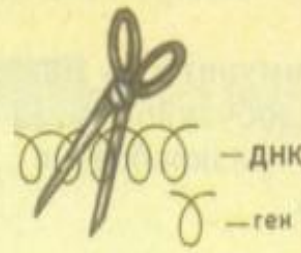


# Генная инженерия

1. Выделение ДНК



2. Вырезание гена



3. Размножение гена



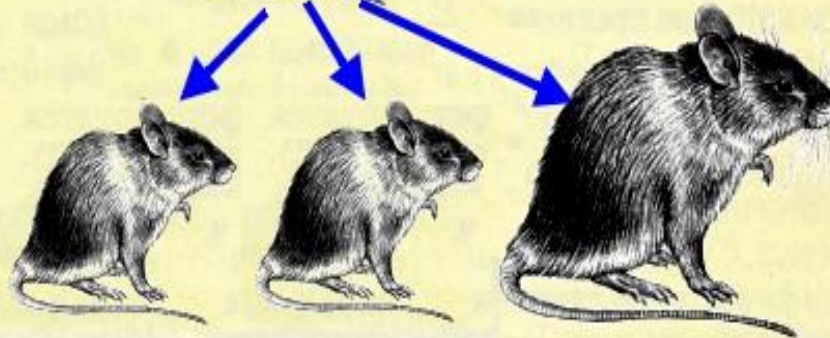
4. Введение раствора с ДНК в оплодотворенную яйцеклетку



5. Яйцеклетку трансплантируют приемной матери, где она продолжает развитие



6. В потомстве появляется трансгенная гигантская мышь, если введен ген гормона роста





# Генная инженерия

