

Запорізький державний медичний університет
Кафедра клінічної лабораторної діагностики

Основні аналітичні технології
та оснащення сучасної
клінічної лабораторії. ДНК-
діагностика

Молекулярно-генетичні методи дослідження

- ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція)
- Гібридизація *in situ*
- Секвенування

Полімеразна ланцюгова реакція - це витончений метод, що імітує природну реплікацію ДНК і дозволяє виявити єдину специфічну молекулу ДНК у присутності мільйонів інших молекул.

Відкриття методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стало однією з найбільш визначних подій в області молекулярної біології за останні десятиліття. Це дозволило підняти медичну діагностику на якісно новий рівень.

Компоненти реакційної суміші

Праймери - штучно синтезовані олігонуклеотиди, що мають, як правило, розмір від 15 до 30 п. н., ідентичні відповідним ділянкам ДНК-мішені. Вони відіграють ключову роль в утворенні продуктів реакції ампліфікації. Правильно підібрані праймери забезпечують специфічність та чутливість тест-системи.

Taq-полімераза - термостабільний фермент, що забезпечує добудову 3'-кінця другого ланцюга ДНК за принципом комплементарності.

Суміш дезоксинуклеозидтрифосфатів

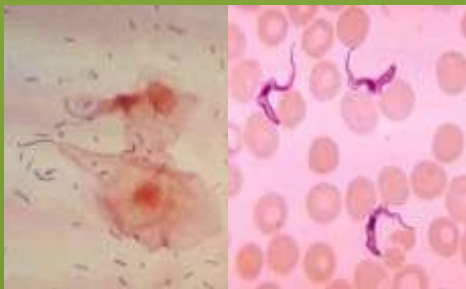
Буфер

Аналізований зразок

Порівняння методів детекції збудника

Світлова мікроскопія

- Ряд мікроорганізмів не візуалізується
- Схожість морфотипів
- Суб'єктивність оцінки
- Вимагає високої кваліфікації лікаря-лаборанта



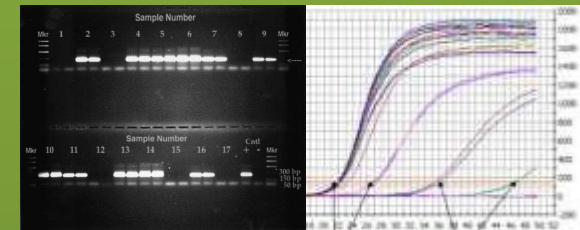
Бакпосів

- Труднощі транспортування та зберігання матеріалу до дослідження
- Ряд мікроорганізмів важко або неможливо культивувати
- У процесі росту втрачається співвідношення мікроорганізмів
- Низька швидкість – тривалий і трудомісткий у виконанні

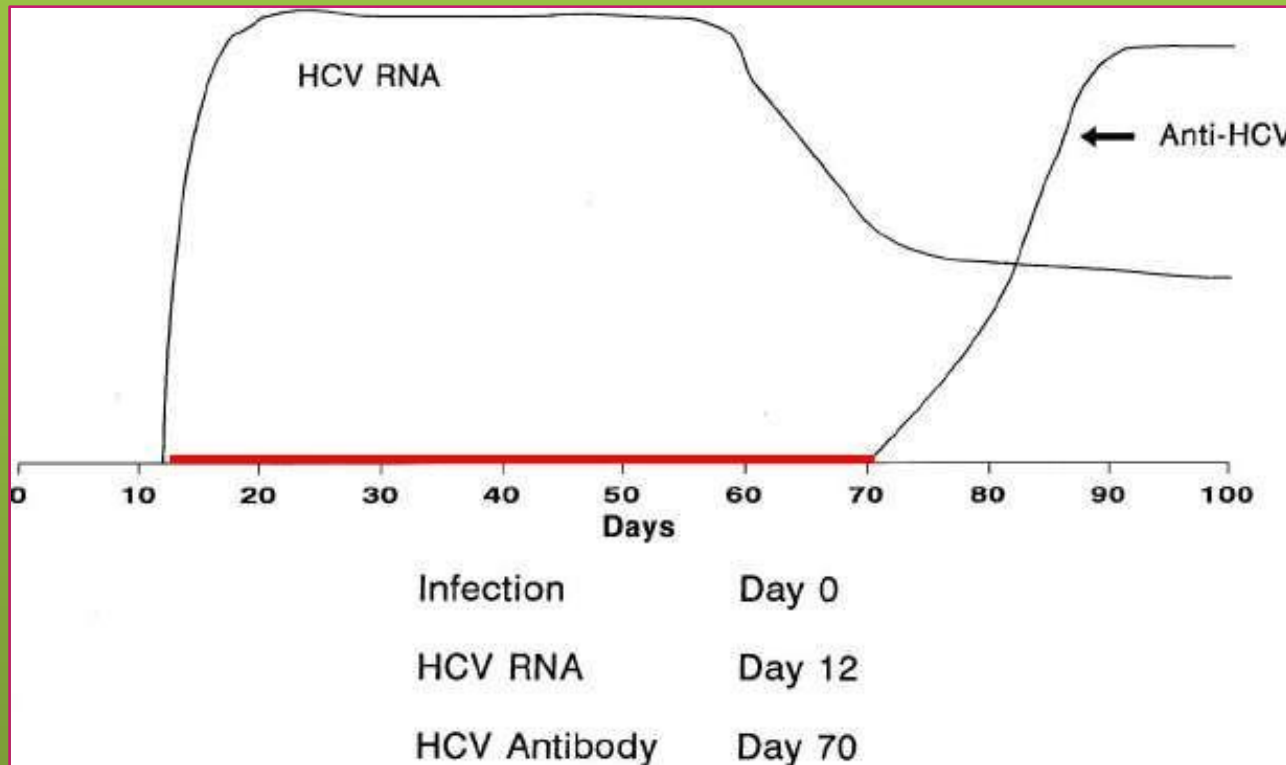


ПЛР

- Легкість забору і транспортування матеріалу
- Висока швидкість
- Об'єктивність результату
- Скринінг – ТАК або НІ
- Можливість кількісної оцінки
- Динамічні спостереження



Клінічний приклад: серологічний профіль характерний для гострого вірусного гепатиту С



Виявлення генетичного матеріалу (РНК) збудника можливо в значно більш ранні терміни, ніж виявлення антитіл до білків збудника

Винахід ПЛР

- Кері Мюлліс (Kary Mullis)
в 1983 р.

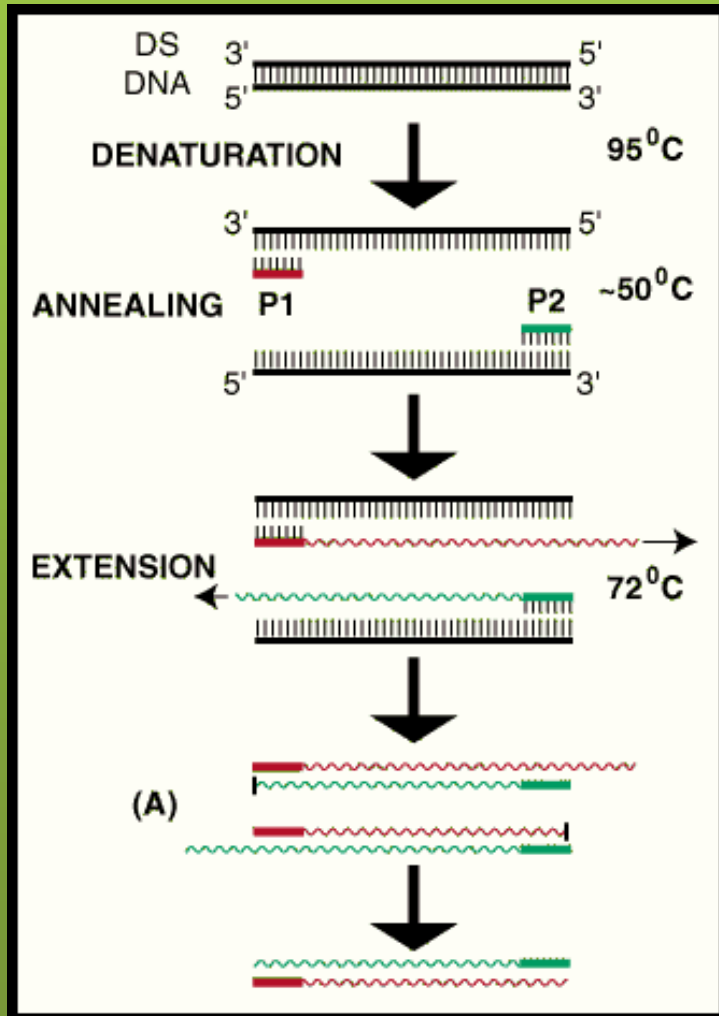


- Перша публікація
в 1985 р.
- Нобелівська премія з
хмії в 1993 р.



**Process for Amplifying Nucleic Acid Sequences
Polymerase Chain Reacton
Patent Number(s) 4,683,202**

Принцип методу ПЛР (стадії полімеразної ланцюгової реакції)



- Денатурація ланцюга ДНК

- Відпалом
(приєднання праймерів)

- Подовження ланцюга
(елонгація, добудова
компліментарного ланцюга)

Ампліфікатор = термоциклер –
прилад для проведення
ампліфікації нуклеїнових кислот.
Володіє можливістю швидко
змінювати температуру
реакційної суміші (для
циклічного переходу від однієї
стадії ПЛР до іншої)



Необхідні компоненти реакційної суміші для ПЛР

- Таq-полімераза
- Праймери
- Дезоксірибонуклеотидтрифосфати (dNTP)
- Іони Mg^{2+}
- Мінеральне масло
- Дослідження ДНК



Клінічний приклад (продовження)

.Невідповідність! - Для проведення ПЛР може використовуватися тільки ДНК (генетичний матеріал вірусу гепатиту С представлений РНК).

.Шляхи вирішення: Використання ферменту зворотної транскриптази для отримання комплементарної РНК збудника ланцюга ДНК

Досліджуваний матеріал (джерела отримання ДНК)

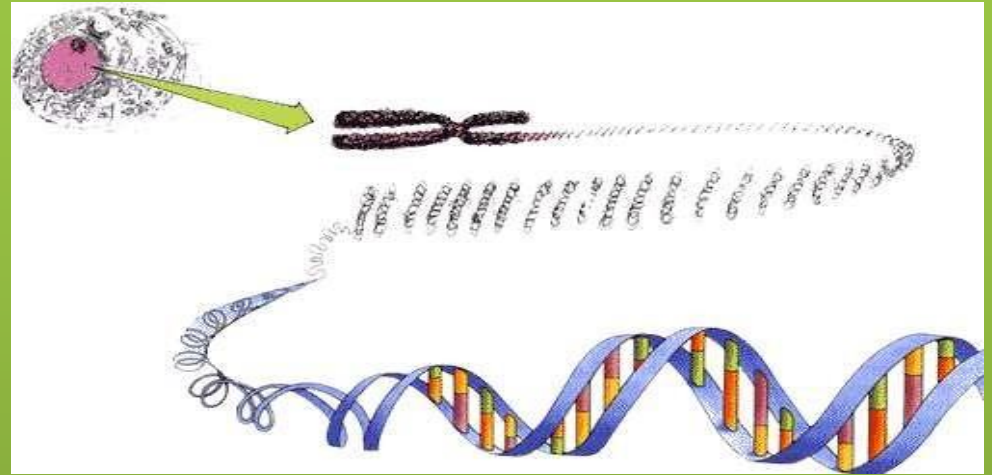
Мікроорганізмів, збудників інфекцій

- зішкреби епітеліальних клітин,
- кров,
- плазма,
- сироватка,
- плевральна та спинномозкова рідини,
- сеча,
- мокротиння,
- слина.

Людини

- зішреби епітеліальних клітин,
- біоптати,
- лейкоцити крові

Методи виділення нуклеїнових кислот (НК)



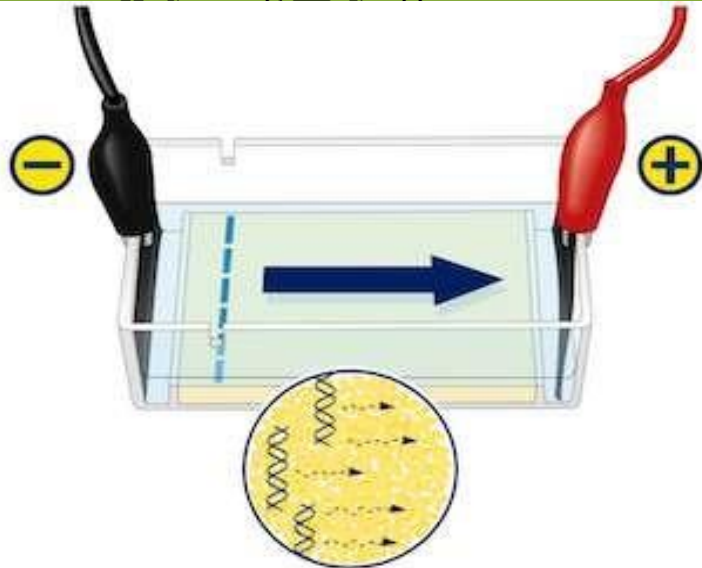
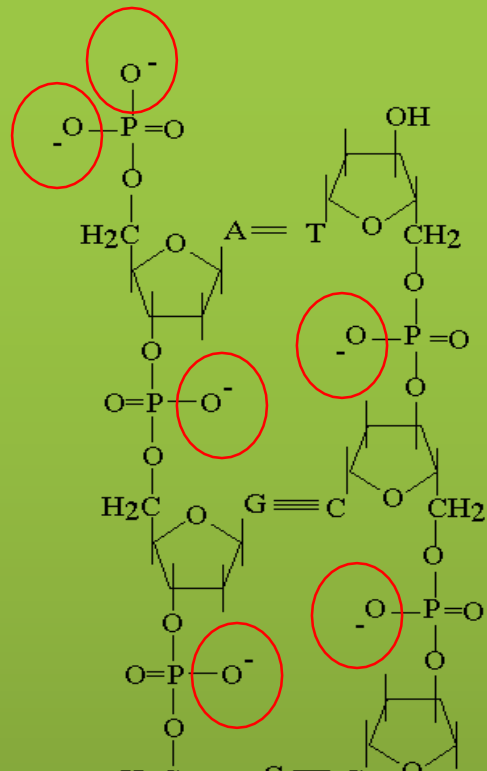
Етапи пробопідготовки (пре-ПЛР):

лізис клітин → ізоляція НК → відмивання (звільнення від інгібіторів) → елюція (переведення НК в розчин)

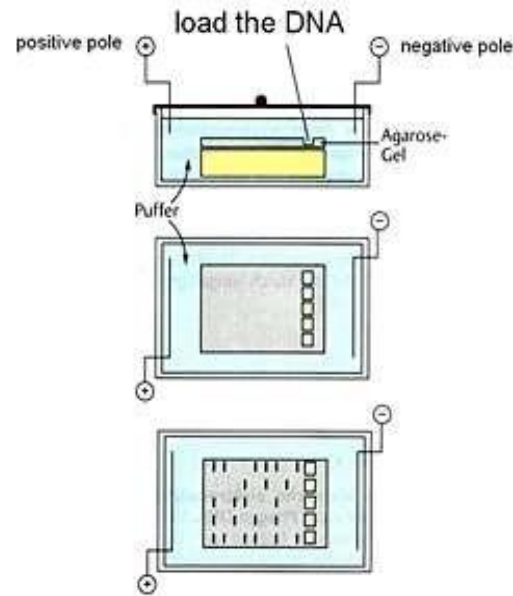
Якісна детекція збудника

- Електрофорез (в агарозному/акриламідному гелі)
- FLASH (детекція флуоресцентного сигналу)

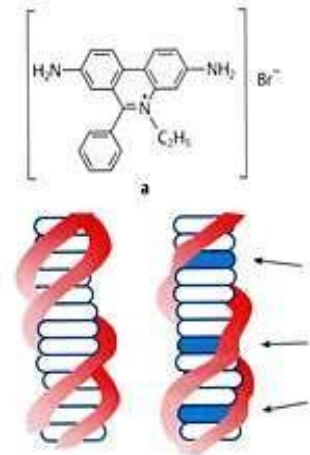
Принцип електрофоретичної детекції ДНК



Gel electrophoresis separates DNA according to their size



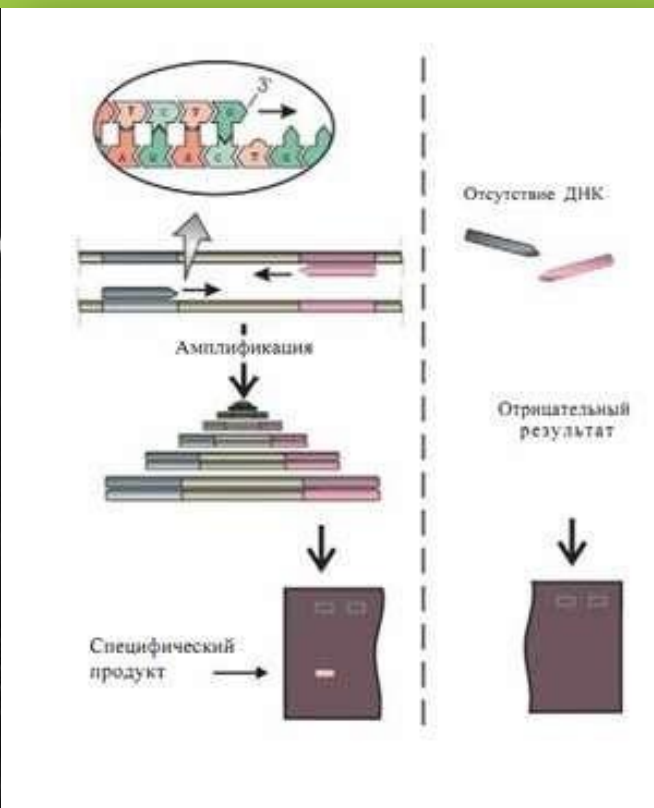
I. DNA is negatively charged and moves to the positive pole.



II. Staining of DNA with DNA binding dye : Ethidium bromide

Молекула ДНК має виражений негативний заряд, для візуалізації забарвлюється флуоресцентним барвником

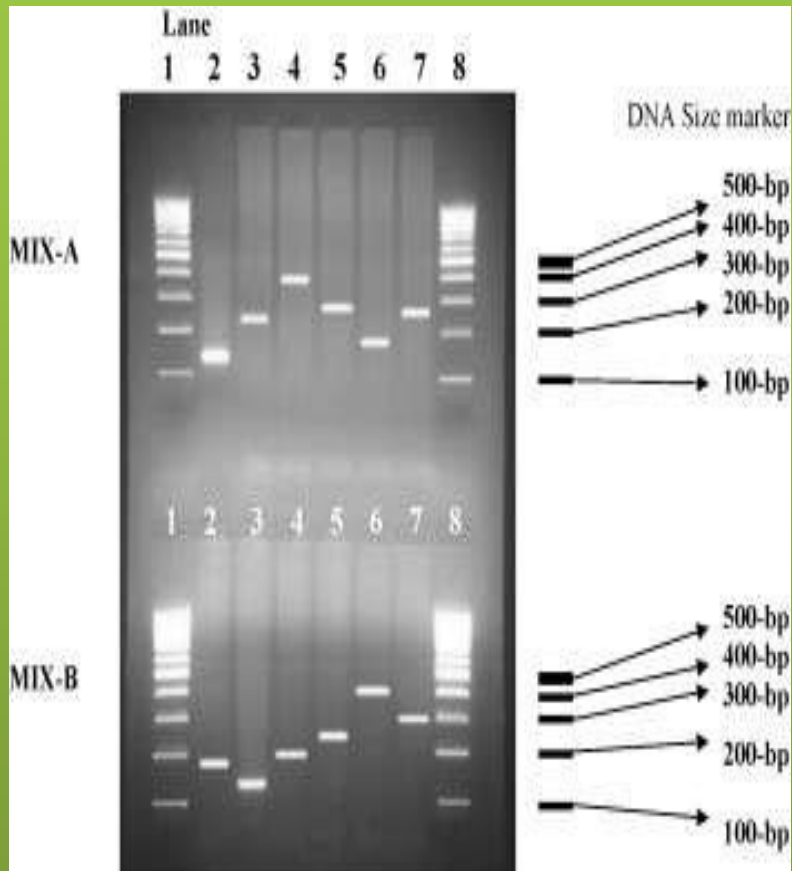
Результат електрофоретичної детекції HCV



Світлі смуги –
ампліфікована ДНК
збудника

Miffin T.E. Robotic automation performs a nested RT-PCR analysis for HCV without introducing sample contamination. Clin Chim Acta. 2000 Jan 5;290(2):199-211.

Завдання 2. Генотипування HCV (електрофоретична детекція)



Idrees M. Development of an improved genotyping assay for the detection of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Pakistan.

J Virol Methods. 2008 Jun;150(1-2):50-6.

| Генотип HCV | Кількість пар основ в ампліконі (п. о. або b.p.) |
|-------------|--|
| 1a | 129 |
| 3c | 197 |
| 1b | 233 |
| 3a | 258 |
| 4 | 288 |
| 1c | 391 |

В реакції використано кілька пар праймерів, кожна – для певного генотипу HCV. У підсумку виявлені амплікони різної довжини, кожен з яких відповідає виявленню певного генотипу

Варіанти контамінації продуктами ампліфікації

1. Контамінація специфічними продуктами ампліфікації

Хибно-позитивні результати

2. Контамінація неспецифічними продуктами ампліфікації



Додаткові
смуги



Хибно-позитивні
результати

Шмери



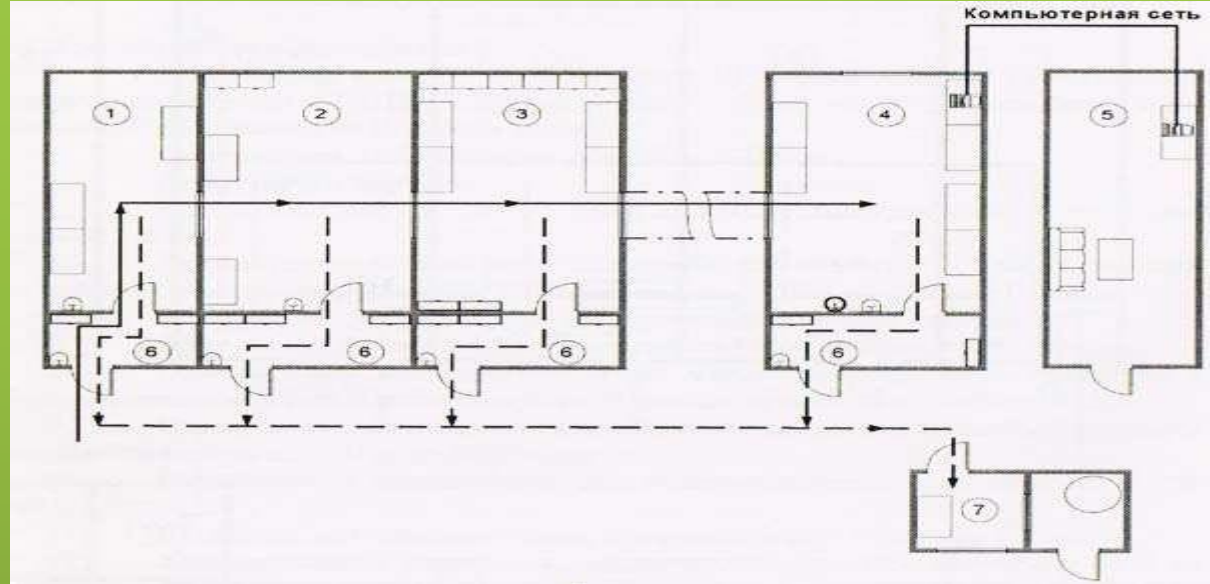
Хибно-негативні
результати

Димери праймерів



Схема ПЛР лабораторії

Особливі вимоги до організації ПЛР-лабораторії необхідні для запобігання контамінації зразків продуктами ПЛР



1. Зона прийому, розбору і первинної обробки матеріалу;
2. Зона підготовки проб і виділення НК;
3. Проведення реакції ампліфікації і облік її результатів при використанні гібридизаційно-флуоресцентного методу детекції;
4. Облік результатів реакції ампліфікації нуклеїнових кислот методом електрофорезу;
5. Кімната аналізу результатів;
6. Предбокс;
7. Кімната знезараження матеріалу

ГІФА – гібридизаційний імуноферментний аналіз

варіант аналізу «по кінцевій точці»

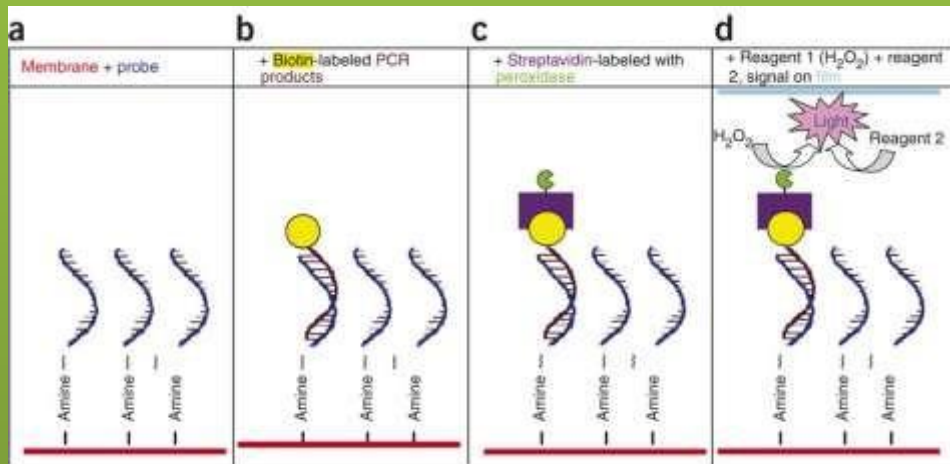
ампліфікація (праймери містять біотин)



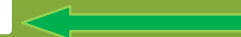
перенесення реакційної суміші в лунки імунологічного планшета



гібридизація ампліконів в лунках з іммобілізованим зондом



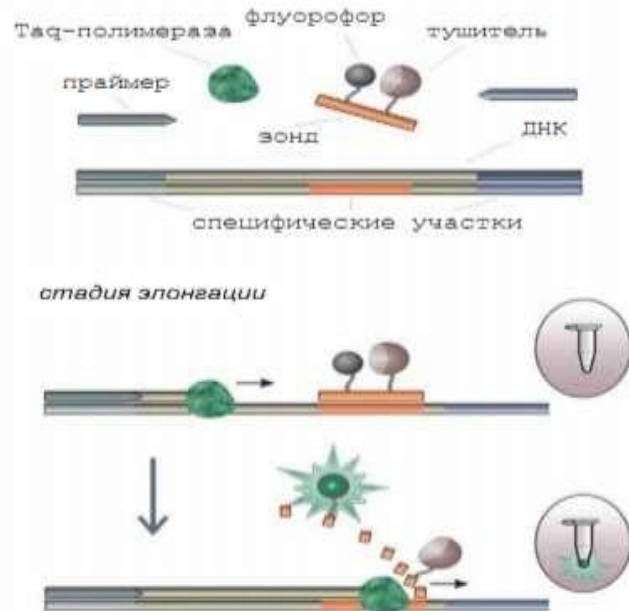
визначення OD



Відмивка реакція з кон'югатом

Недоліки – важкість у використанні, неможливість кількісного аналізу, необхідність відкривання пробірок з ампліконом, ризик контамінації

FLASH-ПЛР

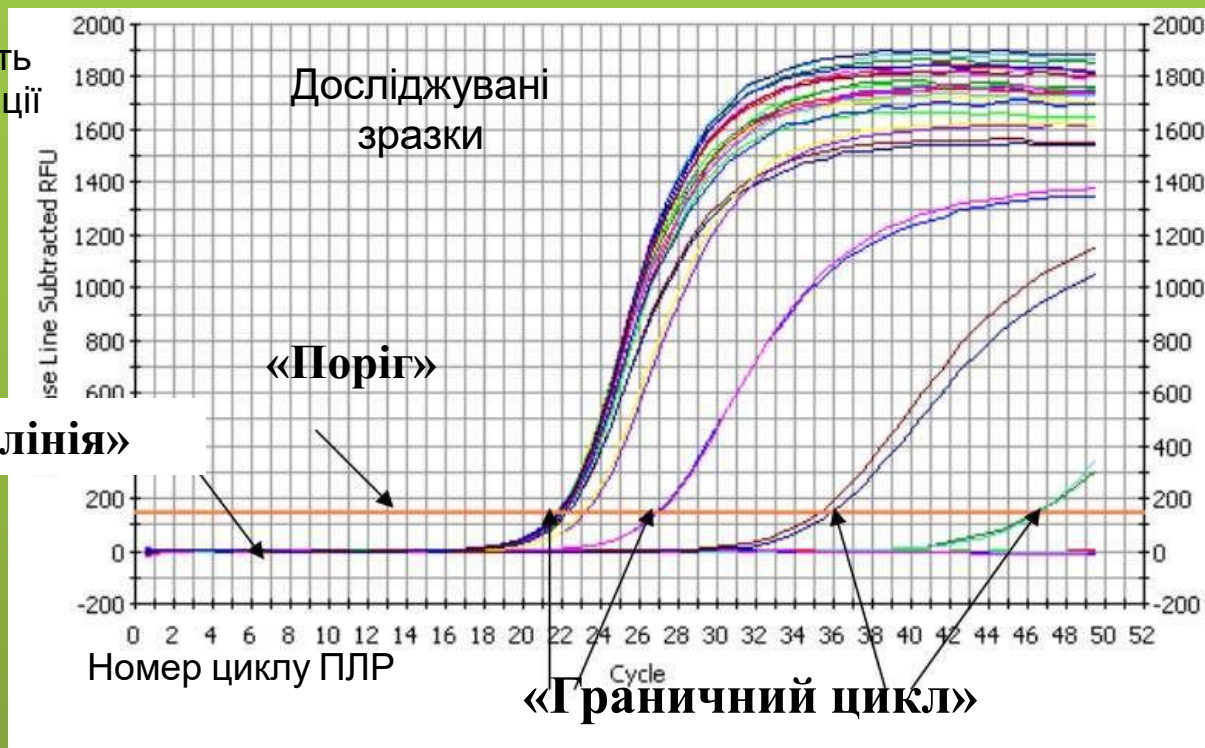


Детекція у форматі FLASH

- Варіант детекції «по кінцевій точці»
- Аналітичний сигнал – приріст флуоресценції після закінчення реакції
- Висока ймовірність помилкових результатів через непередбачені стрибки флуоресценції
- Неможливість оцінки артефактів детекції
- Неможливість визначення початкової кількості копій нуклеїнової кислоти в зразку – неможливість кількісного аналізу

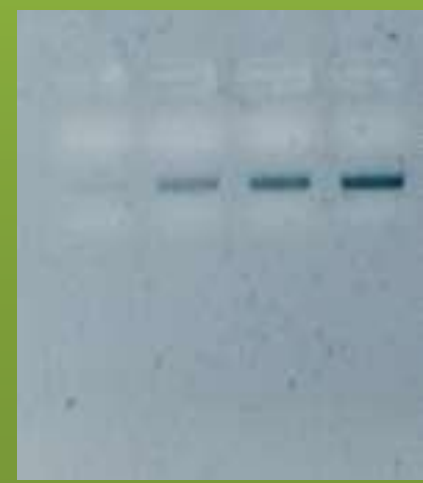
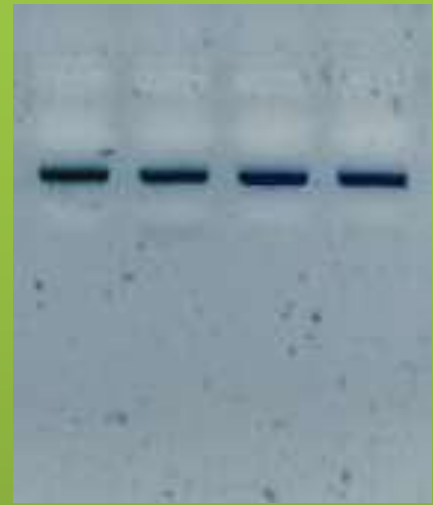
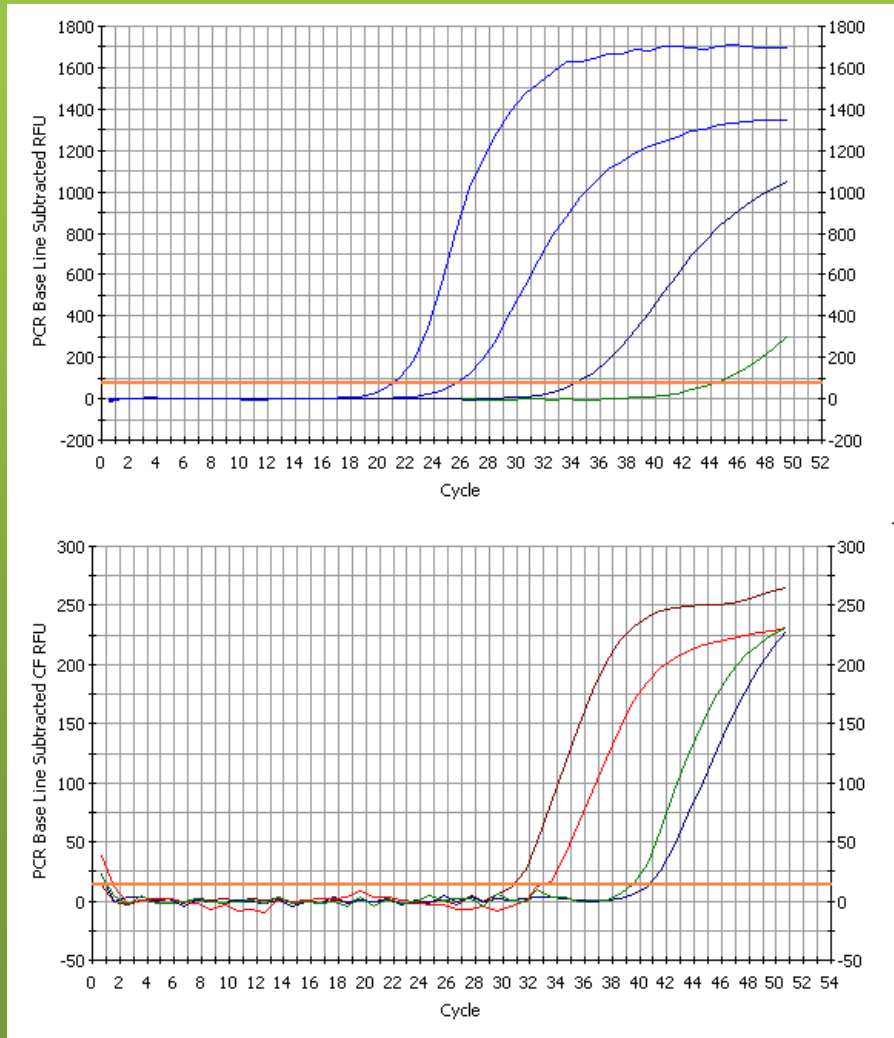
Real-time ПЛР

Інтенсивність
флуоресценції



- Накопичення флуоресцентного сигналу прямо пропорційно накопиченню фрагментів ДНК
- Реєстрація флуоресцентного сигналу на кожному циклі ампліфікації
- Визначення порогового циклу – цикл ПЛР, на якому значення інтенсивності флуоресценції перевищили «базову лінію» - чим більше кількість копій ДНК у зразку, тим раніше буде перетнута ця лінія

Відсутність зв'язку між початковою концентрацією ДНК і кінцевою концентрацією продукту



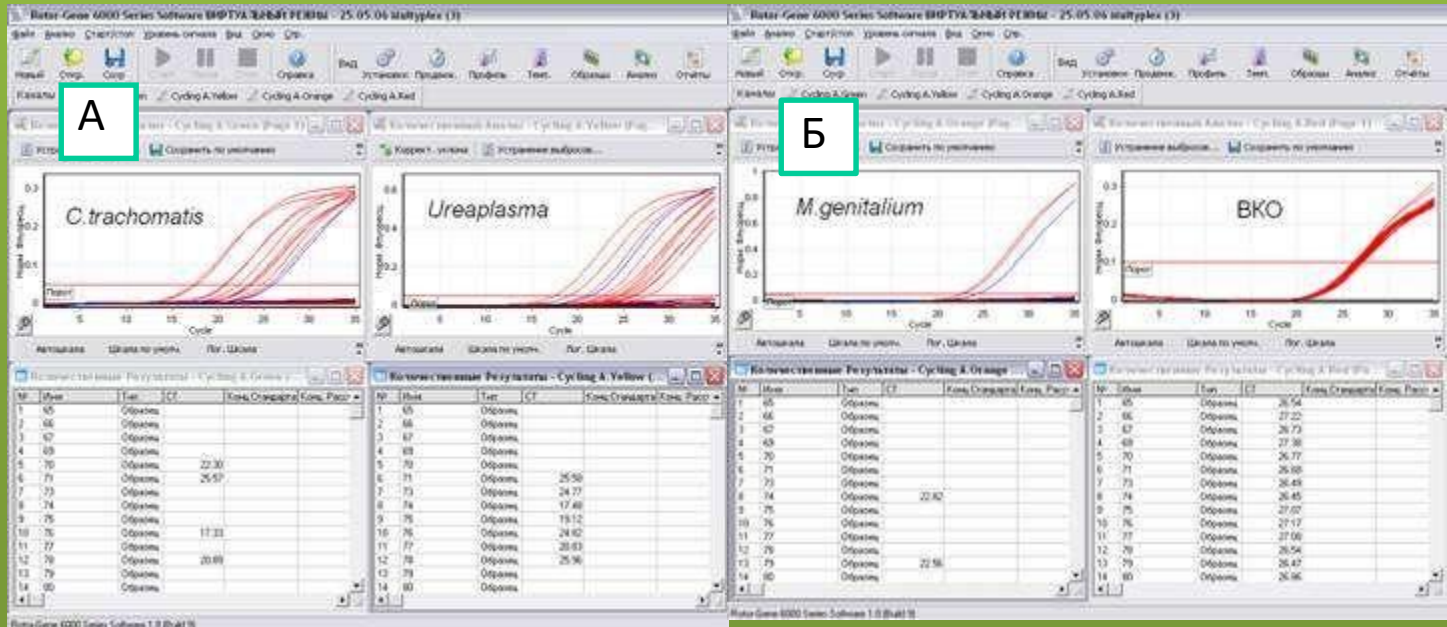
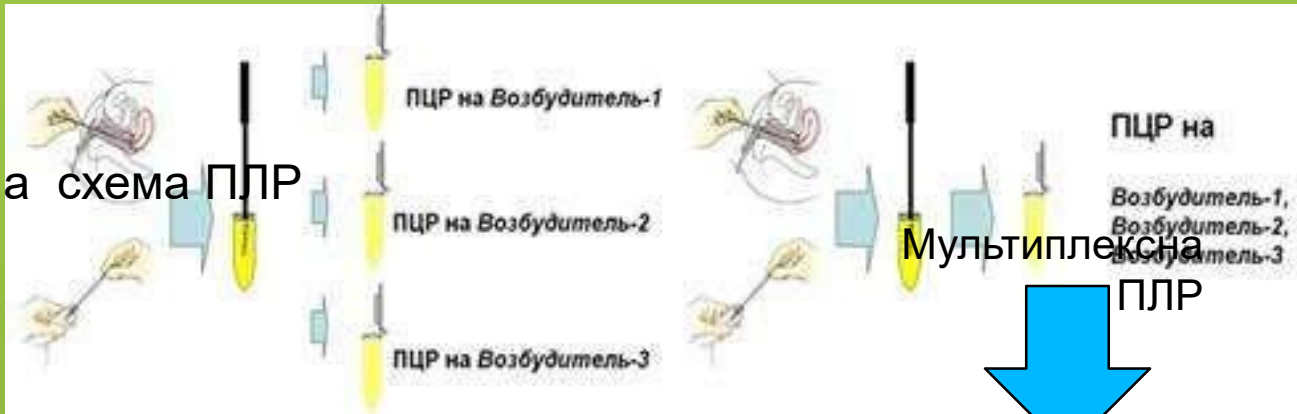
Кількісне визначення ДНК при електрофорезі в гелі неможливо!

Прилади для Real-time ПЛР



Мультиплексна ПЛР

Стандартна схема ПЛР



Канали: А- Green та Yellow, Б - Orange та Red

Використання мультиплексу-ПЛР в режимі реального часу для діагностики ІПСШ

Зіставлення форматів ПЛР

По кінцевій точці (після закінчення реакції)

У реальному часі (після кожного циклу)

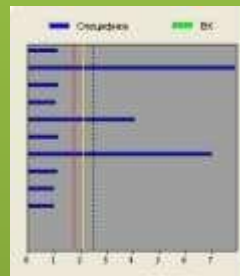
Електрофорез



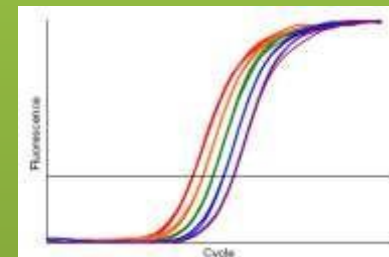
ГФА



FLASH



Реал-тайм



Типи контролів в ПЛР-діагностиці

- Виробничій
- Внутрішньолабораторний
- + Спеціальні контролі:
 - Маркери довжин фрагментів ДНК
 - Контроль фону
 - Контроль взяття матеріалу (КВМ)
- Зовнішній контроль роботи лабораторії

Сфери застосування ПЛР у медицині

- Виявлення збудників
- Визначення SNP
- Визначення статусу метилювання
- Транскриптоміка
- Ідентифікація особистості
- Визначення ГМО в продуктах харчування

Поліморфізм

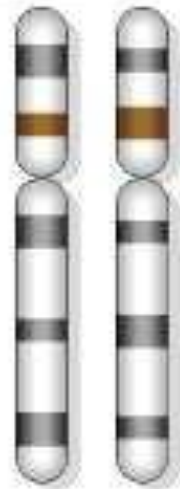
- Найбільш часта структурна зміна ДНК–
однонуклеотидна поліморфна заміна – Single
Nucleotide Polymorphism (SNP)
- Якщо зміна структури гена зустрічається з
частотою $>1\%$ в популяції, такий варіант гена
називають поліморфним
- Частота $<1\%$ - мутація

Гетеро - і гомозіготне носійство алелей

Allele for blue eyes (recessive)
Allele for brown eyes (dominant)



Individual A:
heterozygous



Individual B:
homozygous



Individual C:
homozygous
recessive

Точкові мутації (SNP) часто кардинально змінюють властивості білків коруючих геном в якому відбулася заміна.

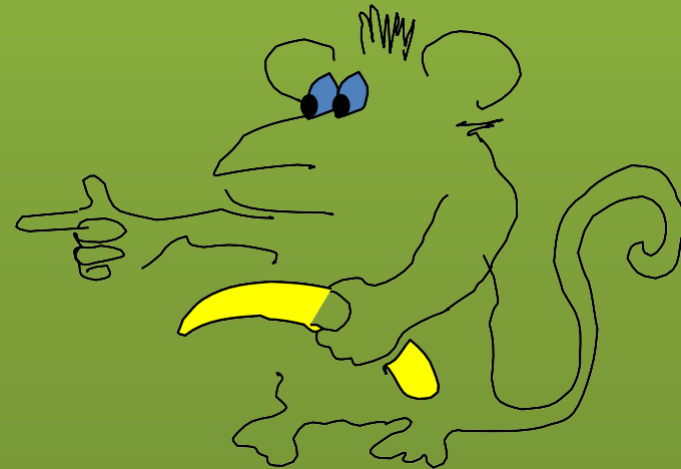
норма

..AGC T GG..



мутація

..AGC G GG..



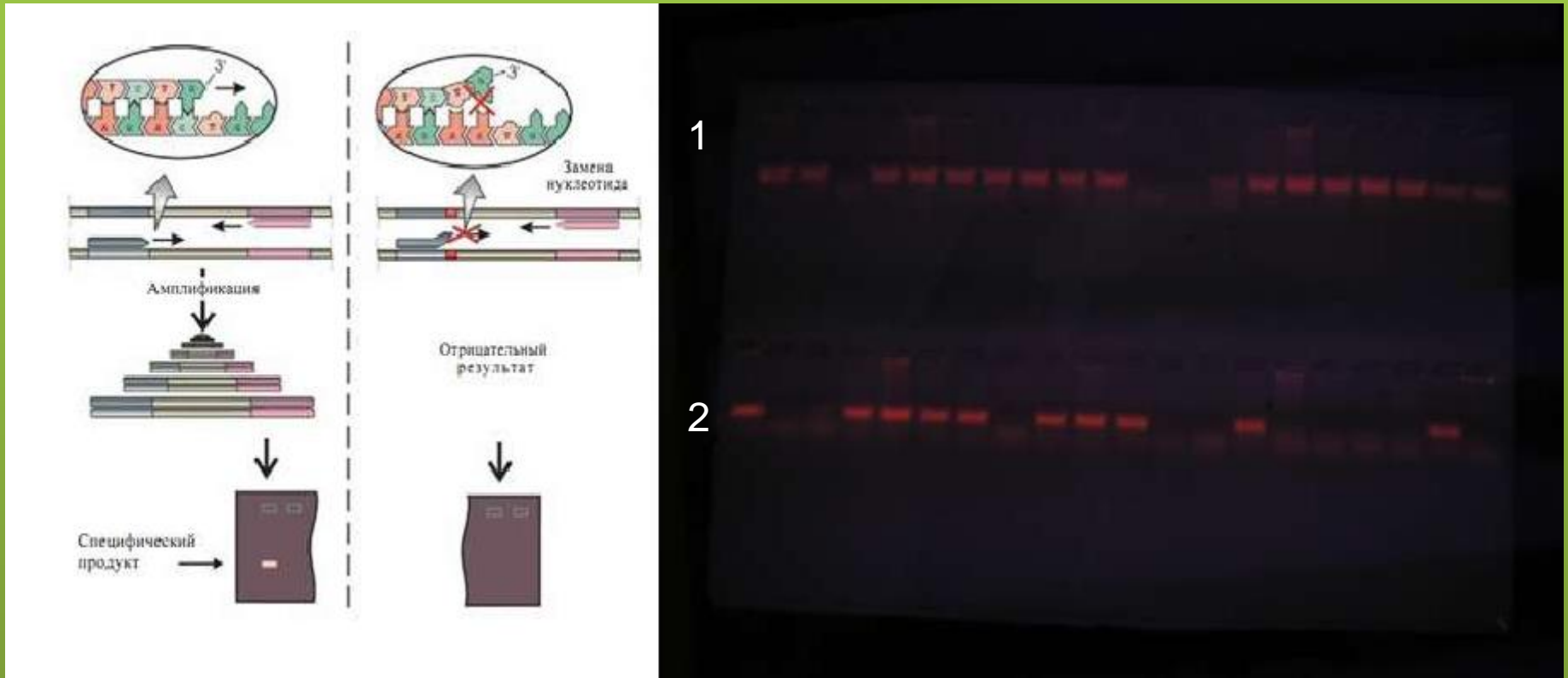
Мультифакторіальні захворювання, кількість відомих поліморфних алелей

- Онкологічні захворювання > 5700
- Нейродегенеративні захворювання > 1800
- Серцево-судинні захворювання > 1700
- Захворювання обміну речовин > 1400
- Гіперчутливість або резистентність до лікарських препаратів > 900

Фармакогеномика

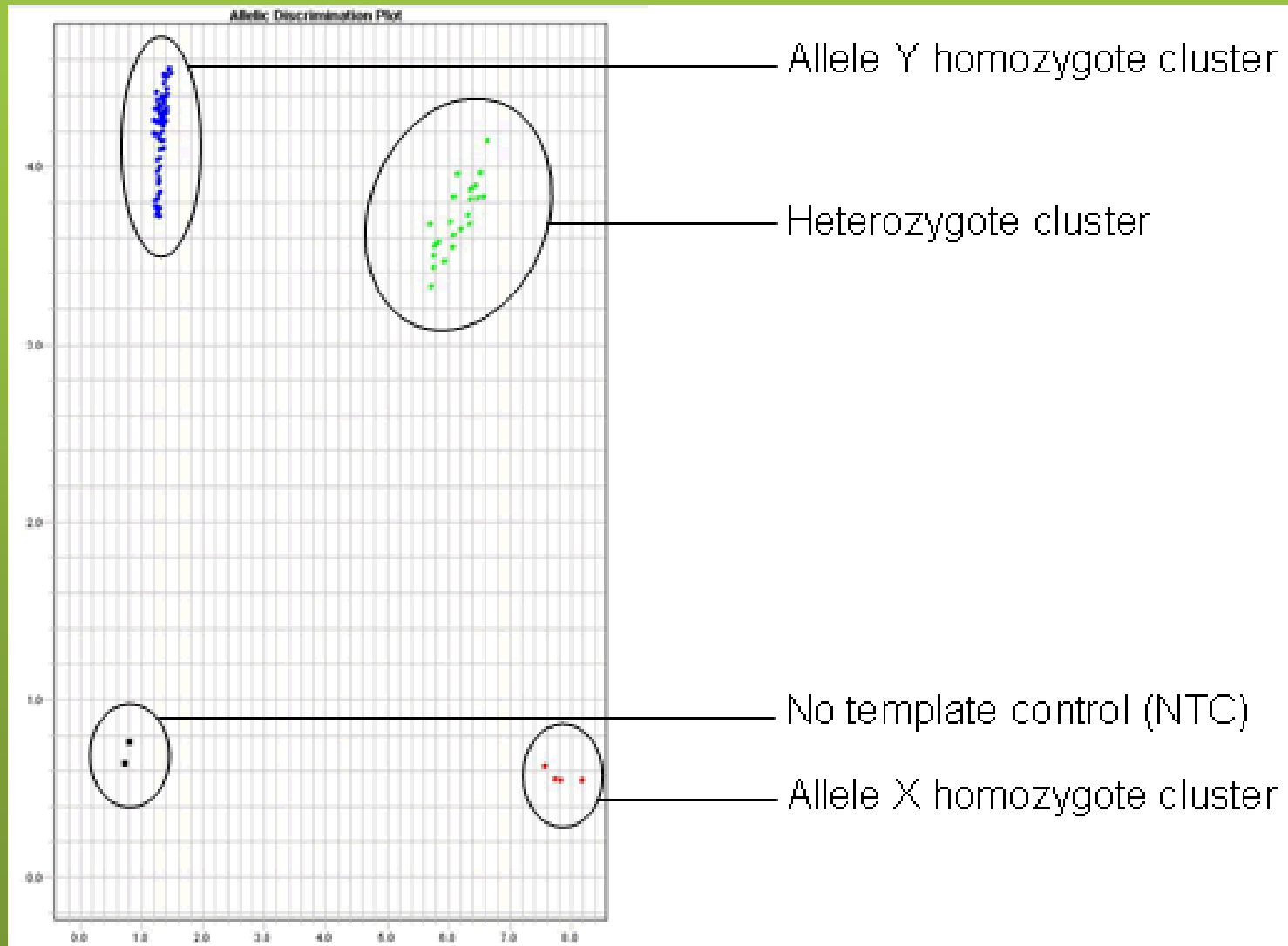
| Фенотип Алель | Зміна активності фермента | Ліки | Зміна відповіді |
|---|---|--|--|
| «Повільні» Алельні Варіанти CYP2C9*2 CYP2C9*3 | Зниження активності метаболізуючого ферменту | Непрямі антикоагулянти | Кровотеча |
| | | НПЗЗ | Кишкові кровотечі |
| | | Гипоглікемічні | Гіпоглікемія |
| | | Блокатори ангіотензинових рецепторів Лозартан Ірбесартан | Ослаблення ефекту Посилення ефекту |

Алель специфічна ПЛР



Детекція поліморфного алелю MTHFR C677T
1 – ПЛР з праймером для детекції алелю 677C
2 – ПЛР з праймером для детекції алелю 677T

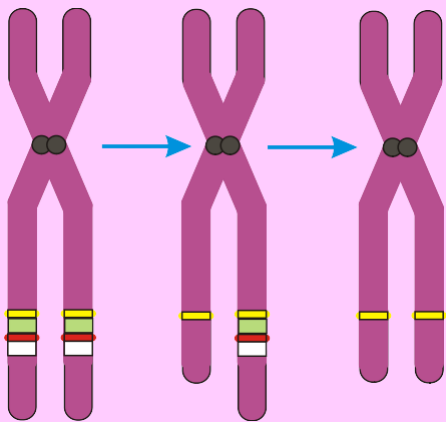
Real-time ПЛР для діагностики генетичного поліморфізму



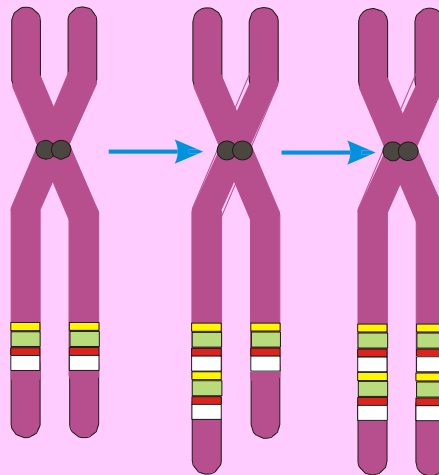
Інші методи
молекулярно-генетичних
досліджень в клінічній практиці

Хромосомні (структурні) аберації

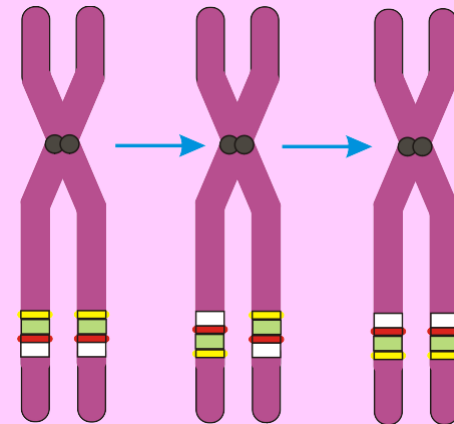
Делеції



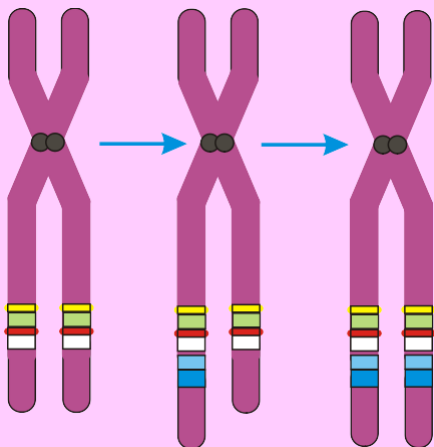
Дуплікації



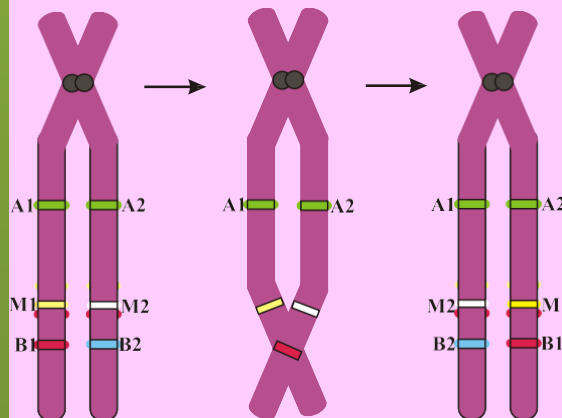
Інверсії



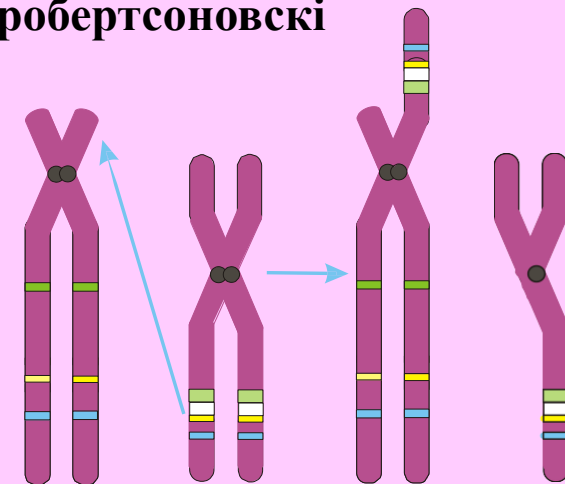
Інсерції

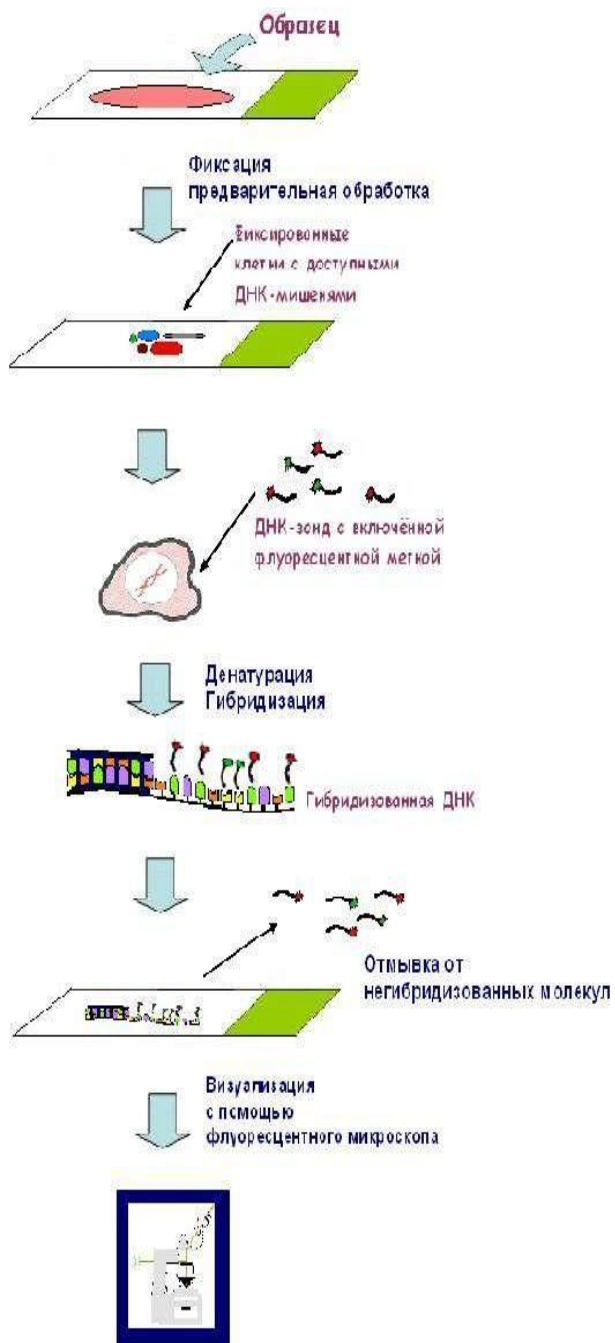


Реципрокні транслокації



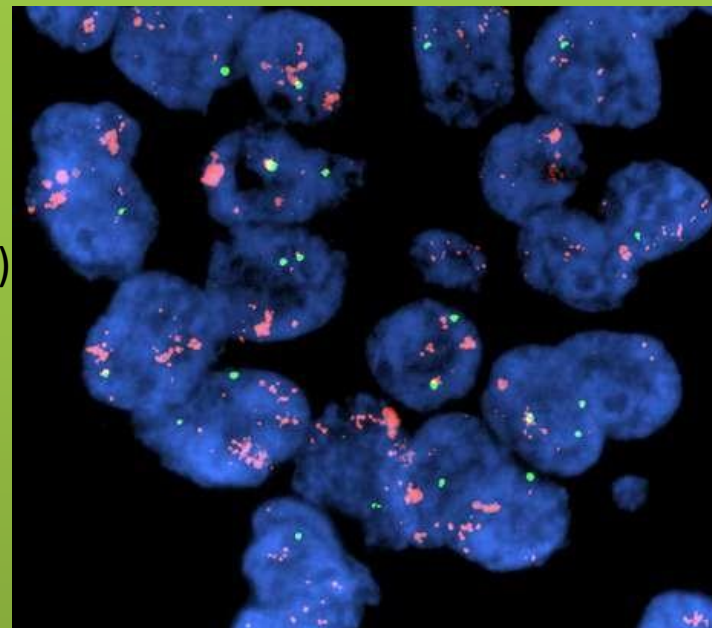
Транслокації робертсоновскі



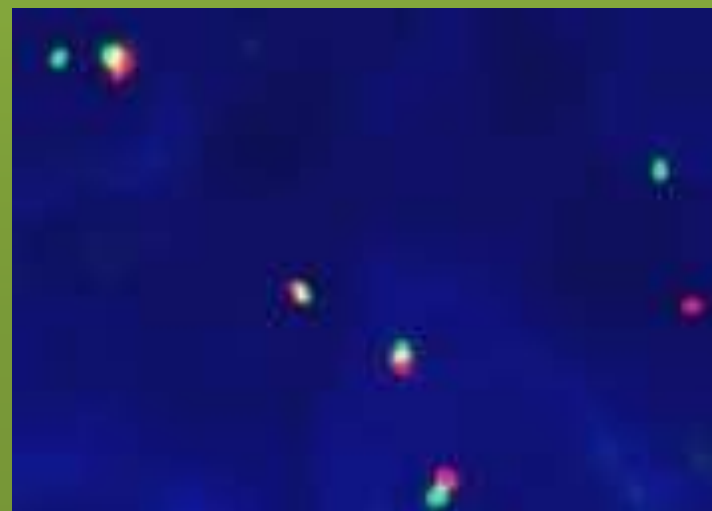


Флуоресцентна гібридизація in situ (FISH)

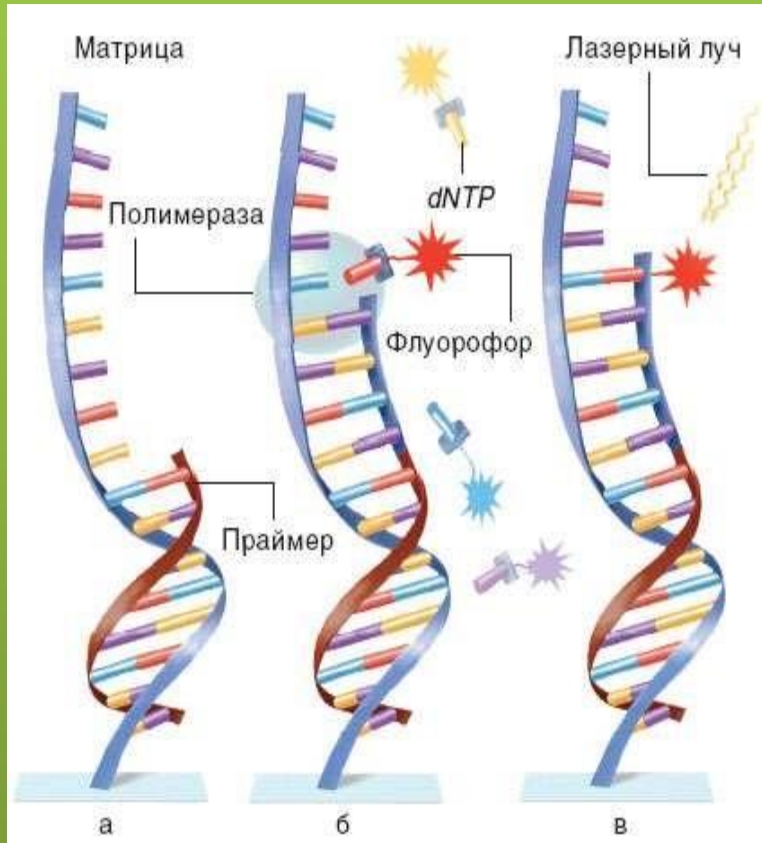
Рак
молочної залози
(ампліфікація HER2)



Міксоїдна
ліпосаркома



Секвенування



Задача: визначити невідому послідовність нуклеотидів.

Застосування :
Ідентифікація невідомого збудника
Пошук мутацій в геномі

BRCA1 – мутації асоційовані з розвитком раку молочної залози

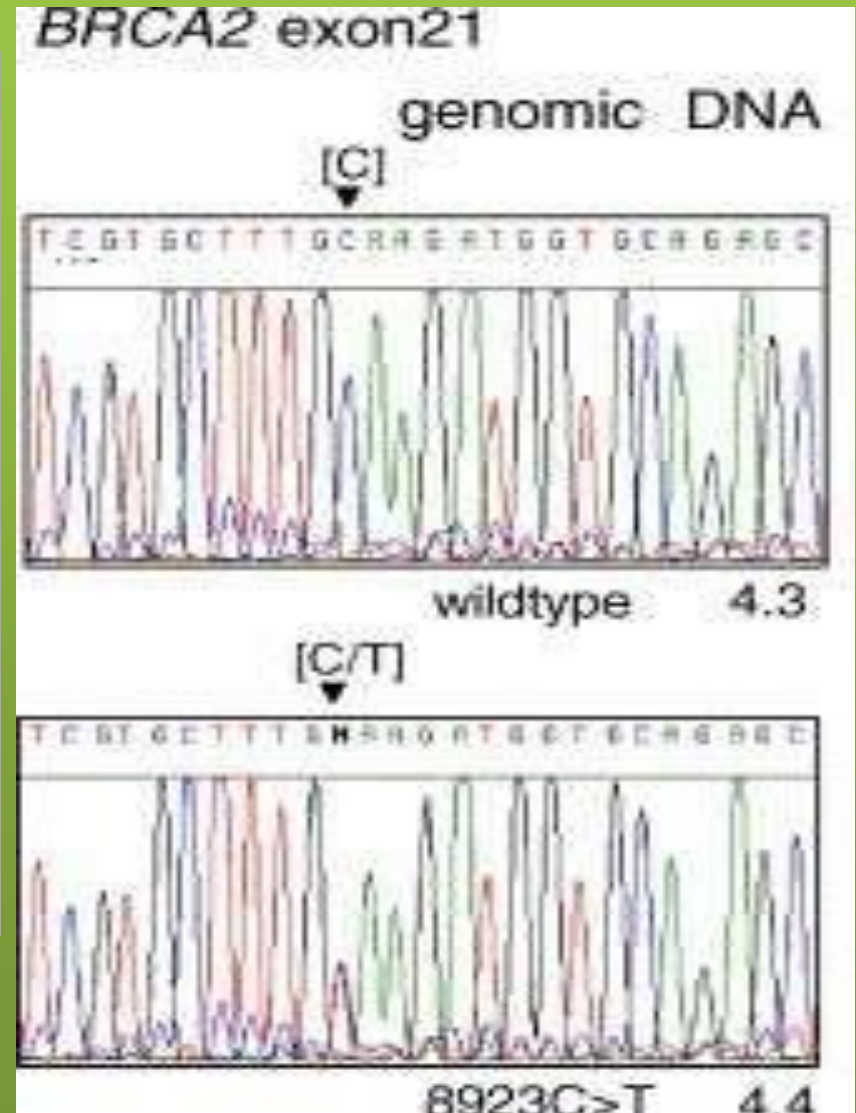
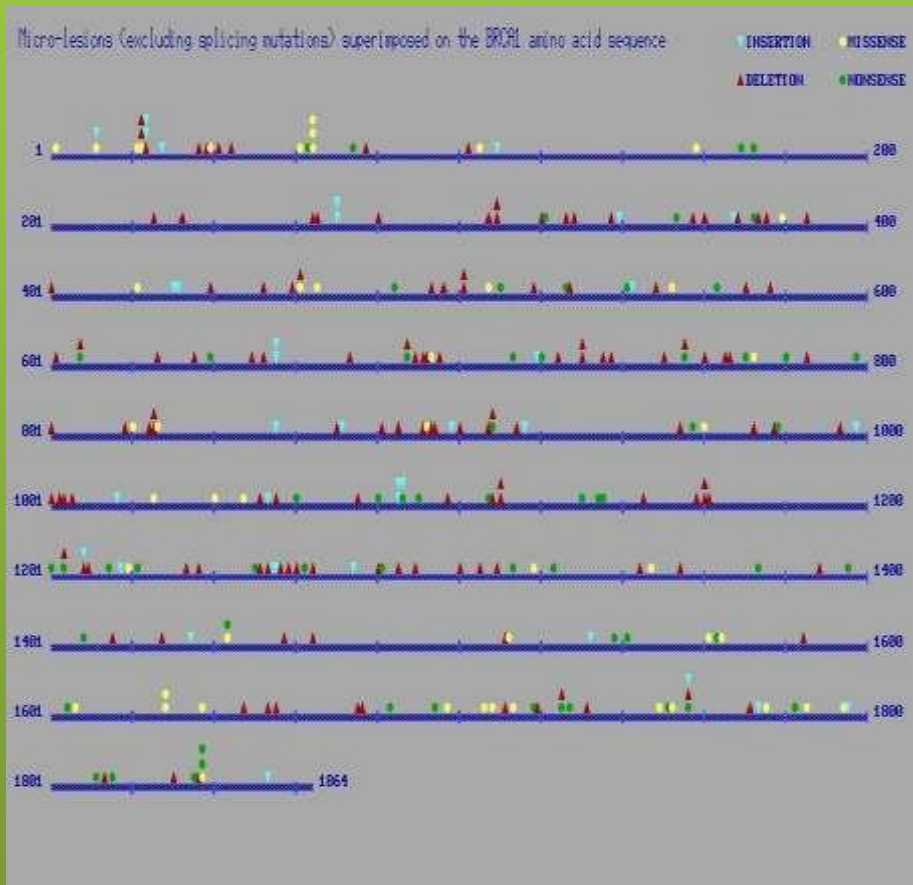


Схема можливої локалізації мутацій у гені BRCA 1

Дякую за увагу!