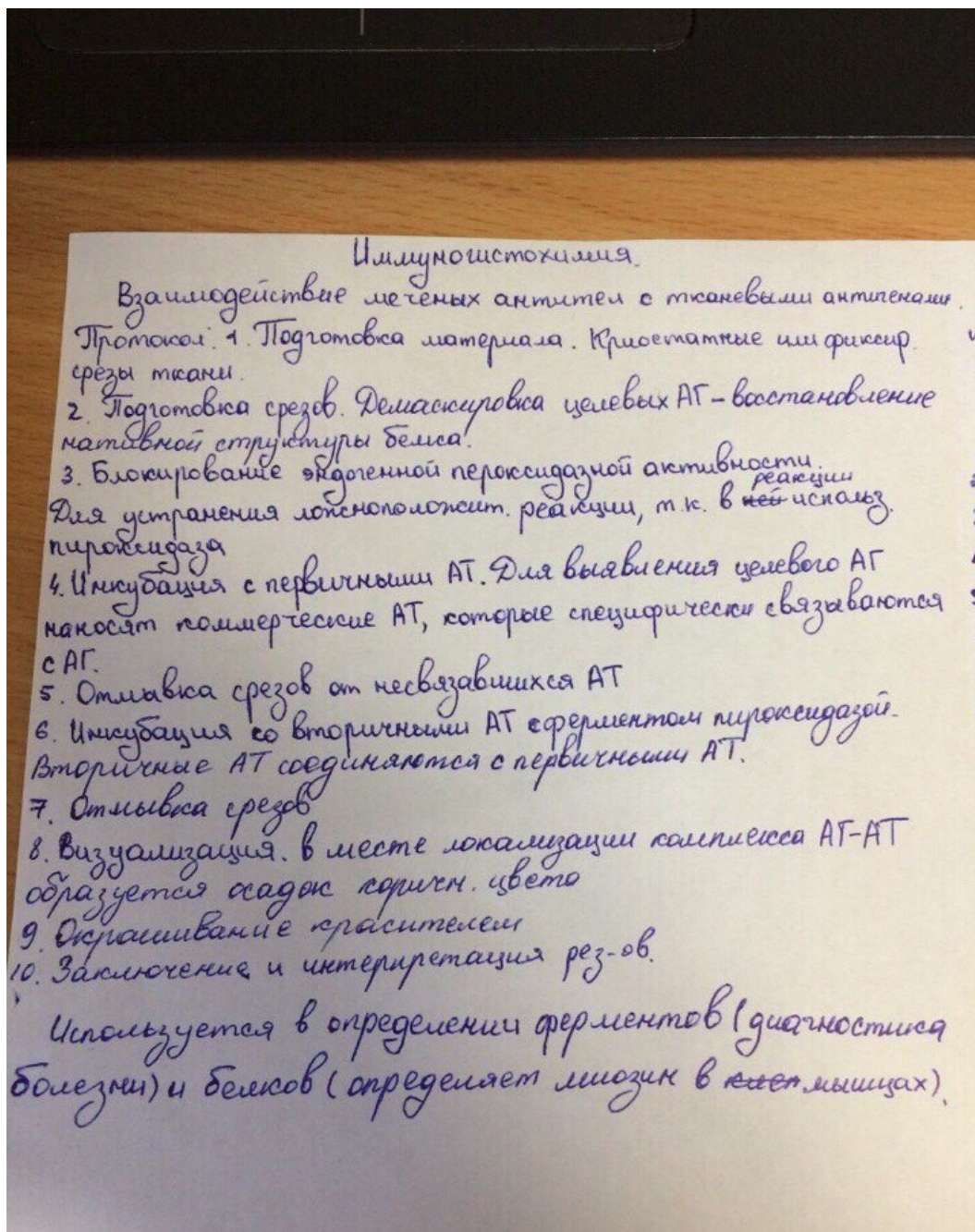


1. Иммуногистохимический (иммунофлуоресцентный метод)

Принцип метода:

Основой ИГХ-метода является иммунологическая реакция антигена и антитела. ИГХ-методы позволяют локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые антигены, основываясь на их связывании с антителами.



Материал:

На практике для ИГХ готовят криостатные срезы из замороженной ткани или парафиновые срезы из фиксированной формалином и пропитанной парафином ткани.

Применение:

- идентификация клеток различных типов по их уникальным маркерным признакам;
- изучение синтетических и секреторных процессов;
- выявление гормонов и рецепторов к ним.

2. Хромосомная гибридизация *in situ*

Принцип метода:

В основе метода лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации по правилу Уотсона-Крика (А-Т и G-C), т.е. к комплементарному спариванию нуклеотидов искомой ДНК (или РНК) с зондом, имеющим специфическую последовательность оснований. В состав зонда во время синтеза олигонуклеотида вводят специальную метку (радиоактивные изотопы, флуоресцеины, биотин), позволяющую обнаружить образующиеся двухцепочечные комплексы. Гибридизация нуклеиновой кислоты-мишени с комплементарной ДНК (ДНК-зонд) или комплементарной РНК (РНК-зонд) даёт возможность ответить на вопрос, присутствует или нет в ткани ген-мишень, происходит или нет экспрессия этого гена и установить уровень, на котором она может меняться — транскрипция ДНК, сплайсинг РНК, трансляция.

Протокол:

- 1) Подготовка биопсийного материала нацелена на сохранение как морфологической целостности ткани, так и ДНК- или РНК-мишеней. Готовят криостатные срезы из замороженной ткани или парафиновые срезы.
- 2) Демаскировка нуклеиновых кислот. Протеиназу К применяют наиболее часто для демаскировки вирусной ДНК, а пепсин-НС1 более подходит для анализа РНК и геномной ДНК.
- 3) Выбор зонда. Для выявления генетических мутаций в хромосомах применяется ДНК-зонд — фрагменты одноцепочечной ДНК длиной около 20 нуклеотидов, конъюгированные с биотином (метку поставили).
- 4) Денатурация. Перед гибридизацией, нити двуцепочечной молекулы ДНК необходимо разделить друг от друга. Это достигается путём нагревания срезов до +95С — +98 С.
- 5) Гибридизация с ДНК-зондом проводится при +37С в течение 2-3 ч, т.е. комплементарное спаривание.
- 6) Отмывка срезов после гибридизации проводится для удаления ДНК-зонда, не связавшегося с ДНК-мишенью.
- 7) Визуализация реакции. В результате гистохимической реакции (выявление активности фермента) в месте реакции гибридизации образуется нерастворимый преципитат для детекции зонда.
- 8) Окрашивание препарата гистологическими красителями. Для получения полной морфологической картины ткани.
- 9) Заключение препарата. Срезы промывают и заключают в водорастворимые среды.
- 10) Интерпретация результатов. Микропрепараты изучают под световым микроскопом.

Применение:

-визуализация дифференциальной экспрессии генов в эмбриогенезе

-выявление генов опухолевых клеток

-выявление мутированных генов при наследственных заболеваниях

Генное зондирование позволяет выявить специфические нуклеотидные последовательности ДНК и РНК в исследуемом объекте (биологическая жидкость, биопсия, гистологический срез, мазок).

Материал:

На практике готовятся криостатные срезы из замороженной ткани или парафиновые срезы из фиксированной формалином и пропитанной парафином ткани.

3. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) в диагностике хромосомных болезней

Принцип метода:

В основе FISH-метода лежит реакция гибридизации между искусственно созданным ДНК-зондом и комплементарной ему нуклеотидной последовательностью ядерной ДНК. Молекула ДНК представляет собой две спирально соединенные нуклеотидные цепи, а гибридизация возможна только в том случае, если цепи разойдутся. Чтобы разъединить нуклеотидные цепи ДНК прибегают к денатурации. После денатурации ДНК-зонд гибридизуется с комплементарной ему нуклеотидной последовательностью и может быть обнаружен при помощи флуоресцентного микроскопа.

Протокол:

- Денатурация двухцепочечной ДНК зонда и ДНК мишени до одноцепочечных под воздействием высокой температуры или химических агентов
- Гибридизация ДНК-зонда с ДНК-мишенью по принципу комплементарности с образованием двухцепочечной гибридной молекулы
- Постгибридизационная отмывка для удаления негибридизовавшегося ДНК-зонда
- Анализ гибридизационных сигналов в люминесцентном микроскопе.

Применение:

Позволяет выявлять индивидуальные хромосомы или их отдельные участки на препаратах метафазных хромосом или интерфазных ядрах на основе комплементарного взаимодействия ДНК-зонда, конъюгированного с флуоресцентной меткой (флуорохромом) и искомого участка на хромосоме.

Материал:

Кровь, костный мозг, биопсия опухоли, плацента, эмбриональные ткани или амниотическая жидкость.

4. GTG-картирование

Принцип:

Суть данной цитогенетической диагностики состоит в выявлении специфической поперечной G-исчерченности в индивидуальных хромосомах, что позволяет идентифицировать хромосомы, обнаруживать геномные аномалии, выявлять небольшие хромосомные aberrации: делеции, инверсии, инсерции, транслокации, ломкие места и более сложные перестройки. В основе дифференциального окрашивания каждого бэнда является его специфический нуклеотидный и белковый состав, отражающий структурную организацию и функциональную активность ДНК (репликация, репарация, транскрипция и рекомбинация).

Протокол:

1. Материалом для исследования чаще всего служит венозная кровь, взятая стерильно с раствором гепарина в качестве антикоагулянта. Для сохранения клеток живыми и способными к размножению, необходимо соблюдать температурный режим, при котором осуществляется временное хранение и транспортировка крови. Оптимальной является температура 4-6°C.
2. Культивирование лимфоцитов. Лимфоциты, выделенные из исследуемого образца периферической крови, 72 часа культивируют в питательной среде с сывороткой телячьей крови и фитогемагглютинином, стимулирующим пролиферацию Т-лимфоцитов.
3. Приготовление препарата метафазных пластинок. За 1,5-2 часа до фиксации в культуру лимфоцитов добавляют раствор колхицина, препятствующего полимеризации тубулина и блокирующего образование нитей веретена деления. Это приводит к накоплению в культуре клеток, находящихся в стадии метафазы. Последующая обработка лимфоцитов гипотоническим солевым (KCl) раствором, за счёт разницы осмотического давления внутри и снаружи клеток, приводит к их набуханию и к разрыву межхромосомных связей. В результате чего, хромосомы в метафазных пластинках отделяются друг от друга на видимое в световом микроскопе расстояние. Для сохранения структуры хромосом лимфоциты фиксируют в смеси этанола (метанола) и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 (фиксатор Карнуа). Далее путём центрифугирования лимфоциты отделяют от фиксатора и наносят на предметное стекло. Для получения качественных, хорошо распластанных метафазных пластинок, капли суспензии наносят с высоты 20 см, затем быстро проносят над пламенем горелки (для фиксации клеток на предметном стекле).
4. GTG-окрашивание включает предварительную обработку препарата трипсином. Изменение структуры хромосомы трипсином препятствует соединению красителя Гимза в G-негативных участках хромосомы и усиливает в G-позитивных.
5. Микроскопирование и составление кариограммы.

Реагенты: Лимфоциты, телячья кровь, фитогемагглютин, колхицин, этанол, уксусная кислота

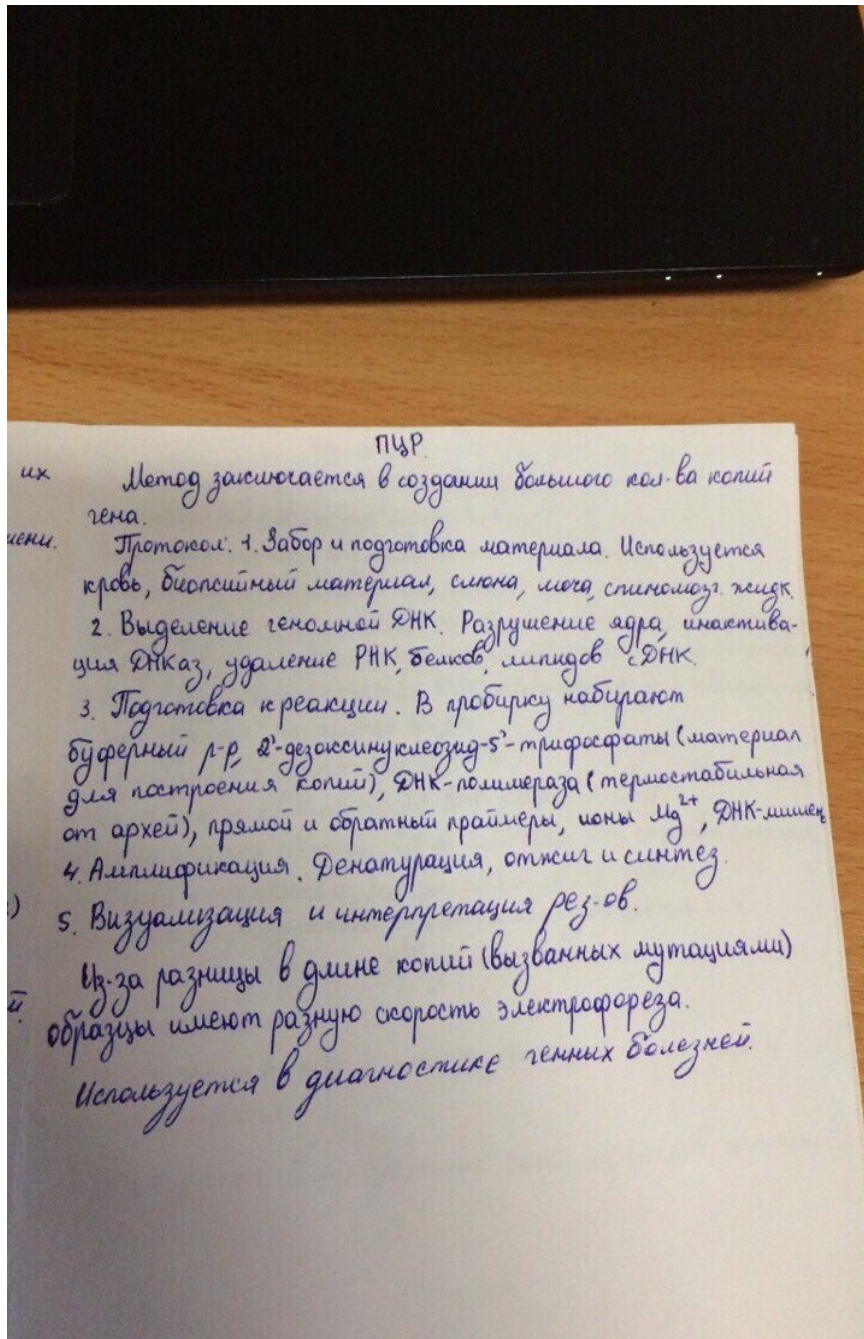
Применение:

Позволяет идентифицировать хромосомы, обнаруживать геномные аномалии, выявлять небольшие хромосомные aberrации: делеции, инверсии, инсерции, транслокации, ломкие места и более сложные перестройки.

5. Полимеразная цепная реакция.

Принцип:

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (in vitro). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. С помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов. Это значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки.



Применение:

Позволяет добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

Протокол ПЦР:

- 1) Забор и подготовка материала для исследования, направлен на максимальное сохранение целостности геномной ДНК. Используют кровь, биоптаты. До анализа полученный материал хранится до анализа в холодильниках при температуре от -20 до -80°C.
- 2) Выделение геномной ДНК заключается в разрушении оболочки ядра, инактивации ДНКаз (ферментов, разрушающих молекулу ДНК).
- 3) Подготовка к реакции осуществляется на льду или в специализированных контейнерах. Перед началом работы размораживают все компоненты реакции, кроме ДНК-полимеразы, и помещают их на лёд для временного хранения. В пробирки помещают компоненты реакции:
 - 1) буферный раствор с ионами магния (фермент);
 - 2) 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (являются строительным материалом при построении цепи ДНК);
 - 3) ДНК-полимераза (осуществляет матричный синтез нуклеиновых кислот);
 - 4) прямой и обратный праймеры (короткие олигонуклеотиды, комплементарные ДНК-мишени);
 - 5) ДНК- мишень (анализируемый образец геномной ДНК)Всё помещают в амплификатор.
- 4) Амплификация фрагмента ДНК осуществляется в амплификаторе. В ходе реакции происходит многократное повторение этапов: денатурации, отжига и элонгации.
- 5) Визуализация и интерпретация результатов. После окончания ПЦР-амплификации, полученные образцы ДНК подвергают гель-электрофорезу, чтобы они разделились.

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

ДНК-матрица

Два праймера

Термостабильная ДНК

Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты

Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.

Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции

В настоящее время большинство протоколов прямой ДНК-диагностики базируется на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР позволяет обнаружить в пробе всего одну молекулу ДНК. Принцип метода основан на многократном увеличении числа копий искомого участка ДНК, достаточного для достоверной визуализации. Амплификацию (умножение) нуклеотидной последовательности ДНК катализирует ДНК-полимераза. Процесс репликации искомого фрагмента ДНК обуславливают генспецифические праймеры — ДНК-олигонуклеотиды, каждый из которых комплементарен одной из двух цепей молекулы ДНК. Праймеры служат затравками для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи ДНК. Длина амплифицируемого участка синтезируемой ДНК ограничена праймерами. При этом каждая вновь синтезированная цепь ДНК (амплификон) служит матрицей для синтеза новой цепи комплементарной ДНК. Для получения достаточного количества копий искомого фрагмента ДНК требуется от 20 до 30 циклов ПЦР, характеризующихся увеличением числа копий специфического фрагмента ДНК. Каждый цикл реакции включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах.

1 этап (денатурация). Нагревание ДНК до 95 °С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.

2 этап (отжиг). Гибридизация праймеров при 55-60 °С с комплементарными последовательностями на противоположных цепях ДНК (на левой и правой границах амплифицируемого фрагмента). Короче, две одноцепочечные спариваются и образуют двухцепочечную.

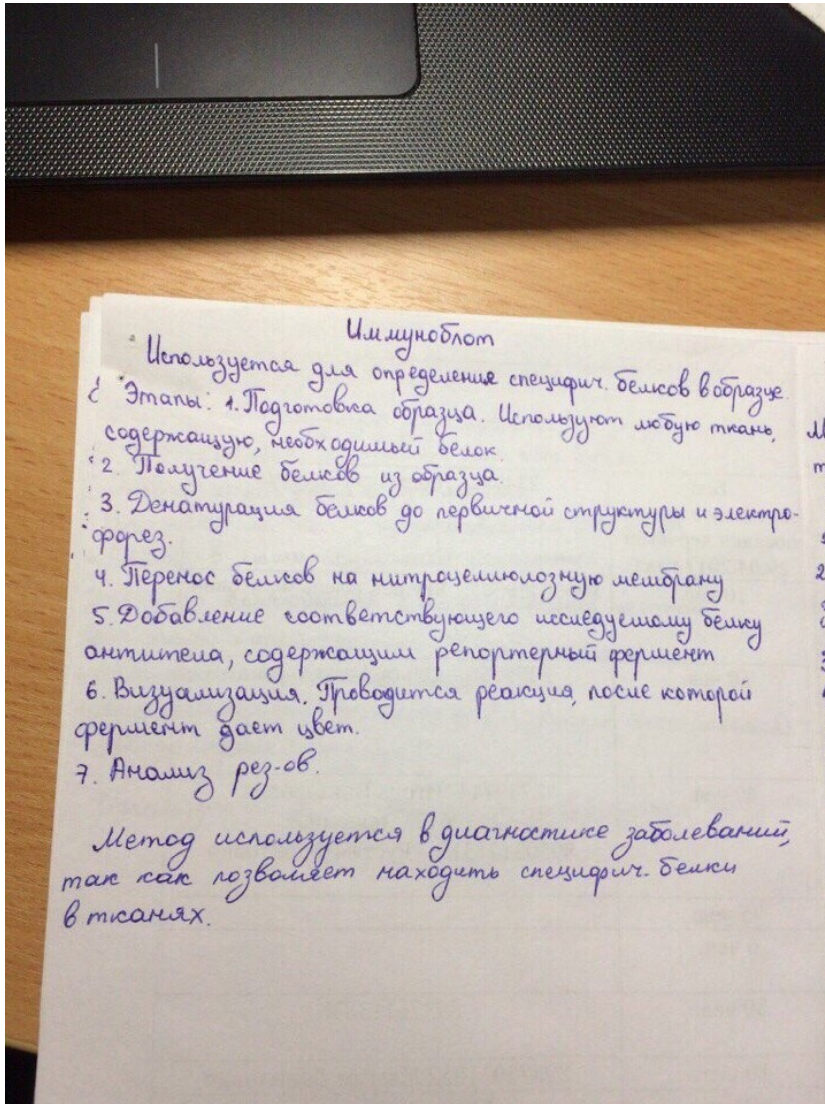
3 этап (элонгация). При температуре 68-72 °С праймеры в присутствии ДНК-полимеразы служат затравками для синтеза комплементарной цепи на ДНК-матрице, начинающийся от места гибридизации праймера и происходящий в направлении 5'→3'. В последующих циклах вновь синтезируемые молекулы ДНК становятся, в свою очередь, матрицей для аналогичного синтеза новых копий. Поскольку синтез каждой из 2 антипараллельных цепей ДНК начинается от места гибридизации праймера, эти места и становятся границами синтезируемого участка. По сути, метод ПЦР как бы «имитирует» на ограниченном участке гена естественный процесс репликации ДНК

В общем, самое главное- происходит создание множества копий ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Она прикрепляется к праймеру. Это, как я понял, что и РНК-полимераза с промотором. И потом с каждой копии синтезируется новая копия. Сначала ДНК раскручивается, потом гибридизируется, синтез идёт. А праймеры ограничивают синтезируемый участок.

6. Иммуноблот (Вестерн-блоттинг)

Принцип:

Иммуноблот- аналитический метод, используемый для определения специфичных белков в образце. На первом этапе использует электрофорез белков в полиакриламидном геле для разделения денатурированных полипептидов по длине. Далее белки переносят на нитроцеллюлозную мембрану, затем детектируют с использованием антител, специфичных к заданному белку.



Применение:

- исследование сыворотки крови на присутствие антител к ВИЧ
- выявление трансгенных организмов
- скрининг клеток на присутствие клонированных вставок
- выявление опухолевых клеток
- выявление генных мутаций
- выявление вирусной днк в образце

Материал:

Биоматериал(кровь, биопсия) до анализа хранится в холодильнике, для исключения разрушения молекул днк.

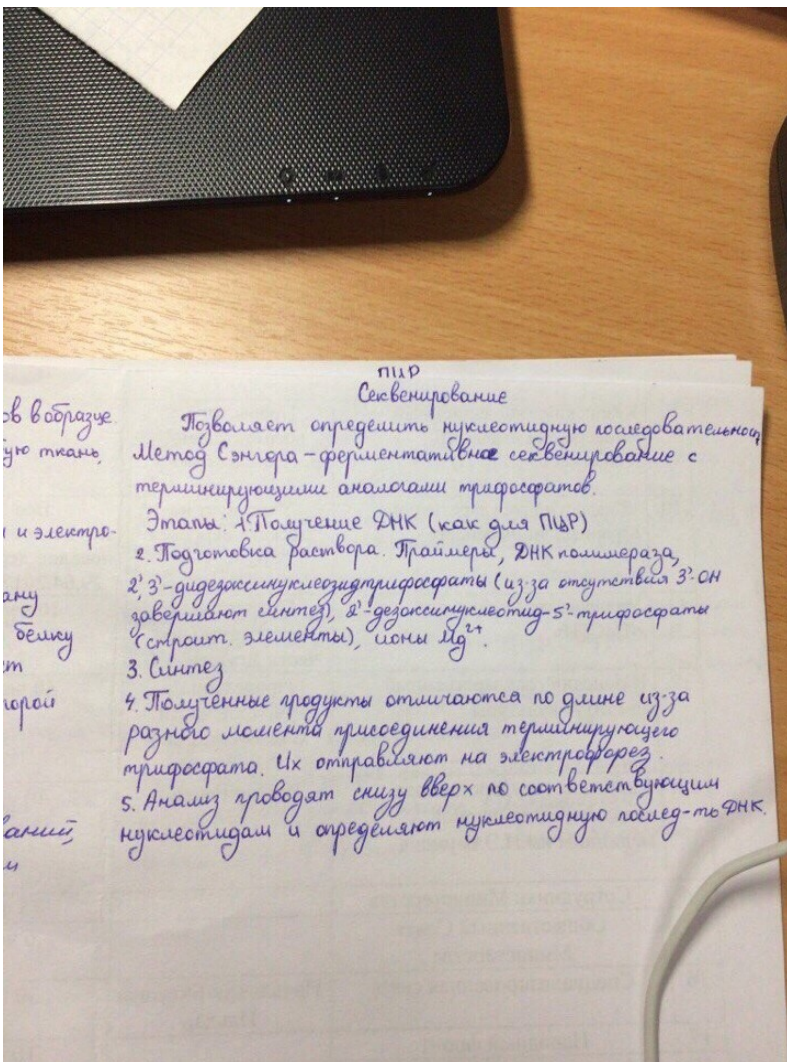
7. Секвенирование ДНК. Принцип метода Сенгера

Принцип:

Метод основан на процессе ферментативного копирования комплементарной цепи ДНК по существующей матрице.

Протокол:

- 1) Забор и подготовка материала такая же, как в ПЦР
- 2) Выделение геномной ДНК такое же
- 3) Компоненты, которые помещают в амплификатор, такие же, только ещё флуоресцентно меченые терминирующие нуклеотиды. Для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК выполняют четыре независимые реакции копирования с добавлением определенного типа терминатора. Т.е. идёт амплификация, копии ДНК синтезируются, а потом бабах и терминатор, синтез прекращается, происходит разделение на фрагменты.
- 4) Денатурация при 95°C с образованием меченых одноцепочечных фрагментов.
- 5) Проводят гель-электрофорез, и фрагменты отделяются друг от друга от электр.тока.
- 6) Детектирование, т.е. образуется четыре разноцветных последовательности. Этот метод применяется для расшифровки генома.



Материал:

На практике в качестве источника образца используют клеточный (кровь), биопсийный материал, различные микроорганизмы, искусственные генетические системы (плазмидные вектора). Отобранный материал хранят до анализа в холодильнике для исключения возможности деградации молекул ДНК.

Применение:

К настоящему времени в мире идентифицировано множество генов, ответственных за болезни человека, в том числе болезнь Альцгеймера, болезнь Гоше и др. Структуры этих генов расшифрованы, и сами они клонированы. Это позволяет проводить эффективную раннюю и даже пренатальную диагностику и лечение.

8. Саузерн-блот

Принцип:

В основе метода Саузерн-блоттинга лежит принципиальная возможность переноса электрофоретически разделённых фрагментов ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозную мембрану и гибридизации нуклеотидов искомой ДНК с олигонуклеотидным ДНК-зондом. Сформировавшийся комплекс позволяет ответить на вопрос: присутствует или нет в исследуемом образце искомый участок молекулы ДНК.

Протокол:

- 1) Забор и подготовка материала для исследования направлены на максимальное сохранение целостности геномной ДНК в забранном для анализа биоматериале (кровь, биопсия). До анализа биологический материал хранится в холодильной камере при температуре от 20 до -80 оС, либо в жидком азоте при -195,75 оС, при этом стоит избегать повторных циклов оттаивания и замораживания для исключения разрушения молекул ДНК.
- 2) Выделение геномной ДНК включает разрушение ядерной оболочки клеток, инактивацию эндогенных ДНКаз (ферментов, расщепляющих молекулу ДНК), деградацию молекул РНК, очистку от белковых и липидных примесей.
- 3) Разрезание (расщепление) молекул ДНК на фрагменты выполняют с помощью специальных ферментов — рестриктаз.
- 4) Разделение фрагментов ДНК в зависимости от их размера (длины) и формы выполняют методом электрофореза в 1% агарозном геле. Процесс разделения основан на способности молекул ДНК мигрировать в толще агарозного геля под действием приложенного электрического поля. Вследствие того, что гель несёт отрицательный заряд, то все фрагменты ДНК движутся от катода — по направлению к положительно заряженному аноду.
- 5) Перенос фрагментов ДНК на мембранный фильтр (блоттинг). Нитроцеллюлозную (или нейлоновую) мембрану (+) помещают сверху агарозного геля (-). Для успешного переноса необходим плотный контакт геля и мембраны.
- 6) Выбор ДНК-зонда. Для детекции целевого фрагмента ДНК используют короткие фрагменты ДНК, строго комплементарные последовательности ДНК-мишени и содержащие специфическую метку (радиоактивные изотопы, флуоресцеины, биотин и др.).
- 7) Денатурация проводится с целью получения одноцепочечных молекул ДНК, способных комплементарно взаимодействовать между собой. Денатурацию фрагментов геномной ДНК в мембране выполняют с помощью щёлочи, а ДНК-зонда — путем нагревания до 95-98 оС.
- 8) Гибридизация. Одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот по правилу Уотсона-Крика (исследуемая ДНК и ДНК-зонд) комплементарно спариваются между собой, образуя двухцепочечные.
- 9) Отмывка выполняют для удаления не связавшихся молекул ДНК-зондов.
- 10) Визуализацию образованных дуплексов проводят с помощью метода, соответствующего выбранной метке. Маркированные участки на мембране соответствуют расположению меченых (искомых) фрагментов ДНК.

Применение:

- скрининг клеток на присутствие рекомбинантных (клонированных) вставок;
- выявление трансгенных растений и животных;
- выявление маркерных генов опухолевых клеток;
- выявление различных хромосомных перестроек, точечных генных мутаций;
- выявление вирусной ДНК в исследуемом образце (кровь, слюна спинномозговая жидкость и др.);

Материал:

Биоматериал(кровь, биопсия) до анализа хранится в холодильнике, для исключения разрушения молекул днк.

9. Косвенный ДНК-анализ

Принцип:

Это метод ДНК-диагностики основанный на анализе сцепления с исследуемым геном определенного полиморфного локуса (маркера), с помощью которого можно производить маркировку как мутантных, так и нормальных аллелей и проанализировать их передачу в поколениях. Для косвенной ДНК диагностики необходимо знать точную локализацию гена, т. е. ген должен быть достаточно точно картирован. Сущность заключается в анализе наследования полиморфных генетических маркеров сцепленных с геном болезни.