Методы медицинской генетики

Прикладная биоинформатика: NGS-технологии и Omics-анализ

Место медицинской генетики в науке

Генетика – наука о наследственности и изменчивости.

Раздел генетики, посвящённый патологии человека, относится к **медицинской генетике**.

Медицинская генетика изучает роль генетических составляющих в этиологии и патогенезе различных заболевания человека.

Какие заболевания охватывает медицинская генетика?

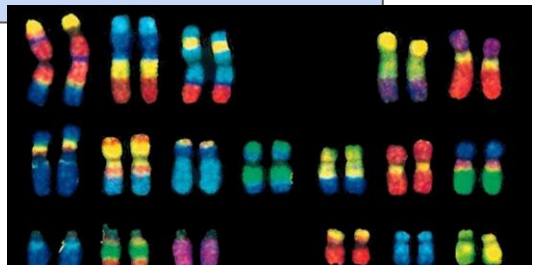
Предмет изучения

Наследственные заболевания

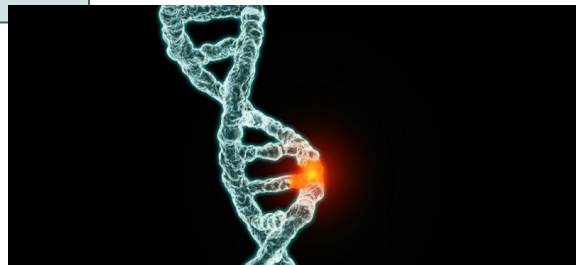
Мультифакториальные заболевания



Хромосомные

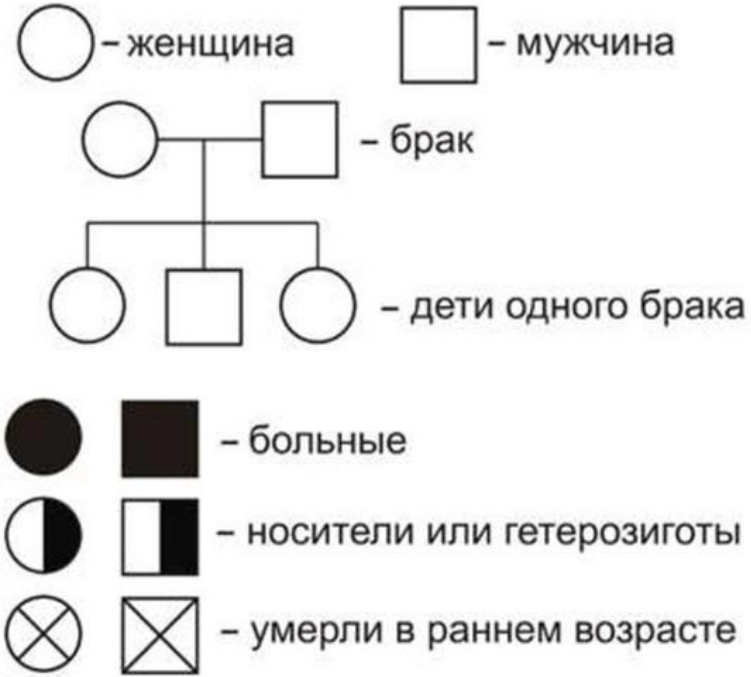


Генные



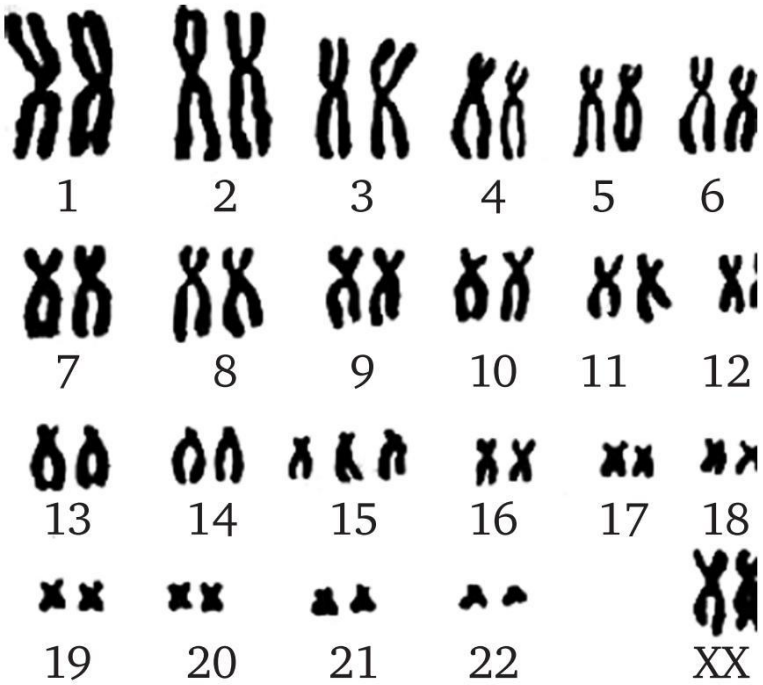
Методы медицинской генетики

1. Генеалогический - составление и анализ родословных;



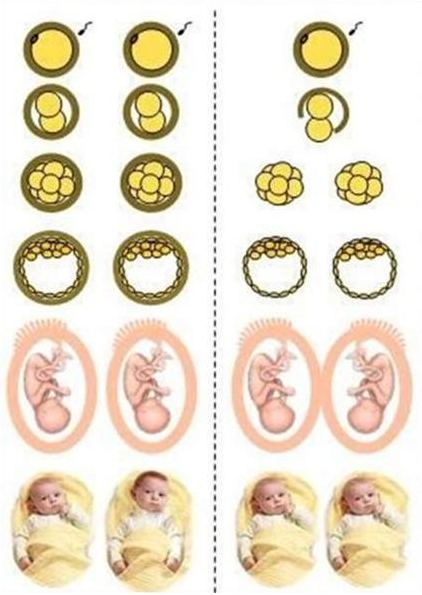
Методы медицинской генетики

1. Генеалогический - составление и анализ родословных;
2. Цитогенетический - изучение кариотипа;



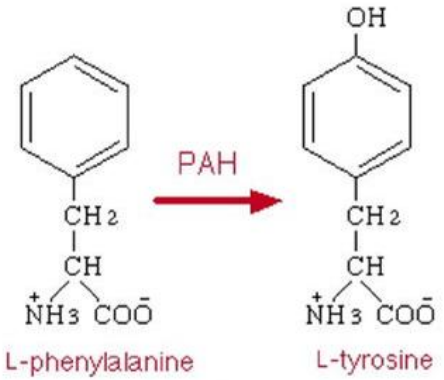
Методы медицинской генетики

1. Генеалогический - составление и анализ родословных;
2. Цитогенетический - изучение кариотипа;
3. Близнецовый - изучение наследования признаков у 1- и 2-яйцевых близнецов;



Методы медицинской генетики

1. Генеалогический - составление и анализ родословных;
2. Цитогенетический - изучение кариотипа;
3. Близнецовый - изучение наследования признаков у 1- и 2-яйцевых близнецов;
4. Биохимический - изучение обмена веществ;



The enzyme phenylalanine hydroxylase converts the amino acid phenylalanine to tyrosine.

Методы медицинской генетики

1. Генеалогический - составление и анализ родословных;
2. Цитогенетический - изучение кариотипа;
3. Близнецовый - изучение наследования признаков у 1- и 2-яйцевых близнецов;
4. Биохимический - изучение обмена веществ;
5. Популяционно-статистический - определение частот встречаемости аллелей;
6. Моделирование (in silico, in vitro, in vivo);
7. Молекулярно-генетические - исследование молекул для определения генотипа.

Мутация? Полиморфизм? Вариант?

Любое отличие изучаемого генома от референсного называют его **вариантом**.

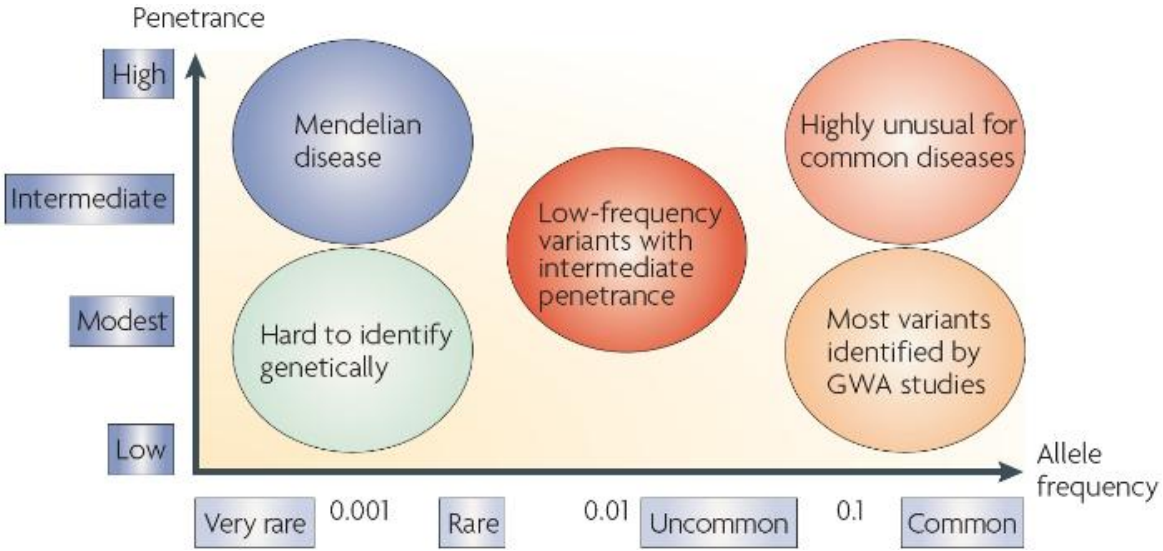
Полиморфизм - вариант, встречающийся в популяции с частотой не менее 1%. Наличие полиморфизма не гарантирует наличие заболевания у обследуемого, но полиморфизмы могут вносить свой вклад в развитие некоторых мультифакториальных болезней.

В настоящее время термин полиморфизм уходит в прошлое.

Мутация - вариант, не являющийся полиморфизмом, который вызвать заболевание.

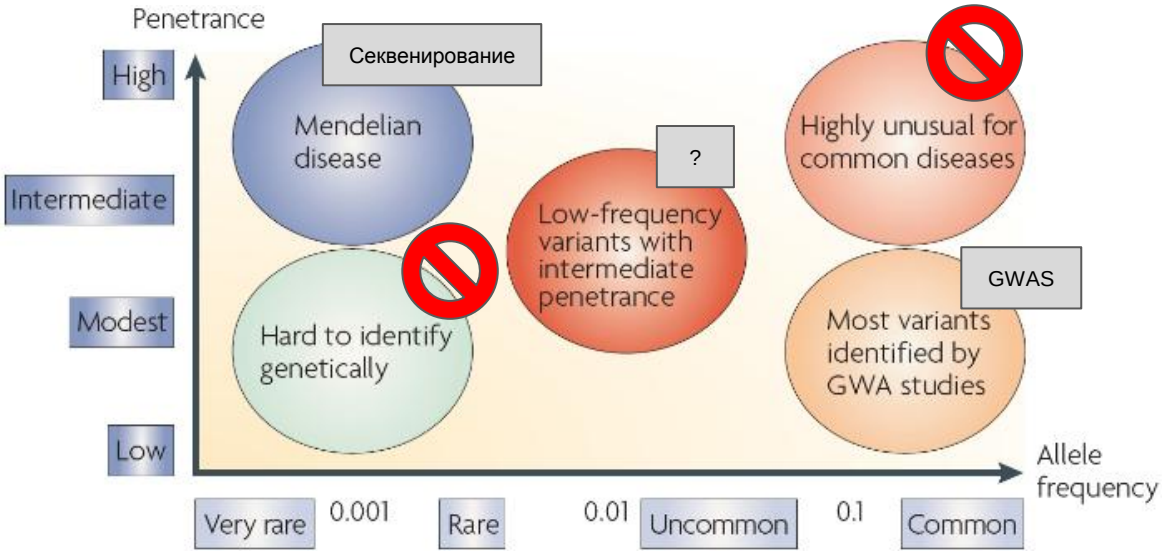
Частота вариантов в популяции

Пенетрантность – количественный показатель фенотипической изменчивости проявления гена.



Частота вариантов в популяции

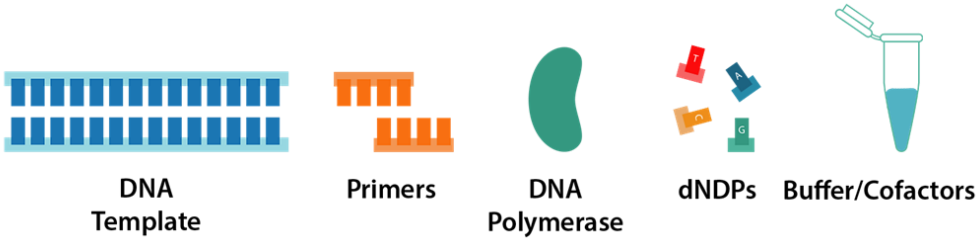
Пенетрантность – количественный показатель фенотипической изменчивости проявления гена.



Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

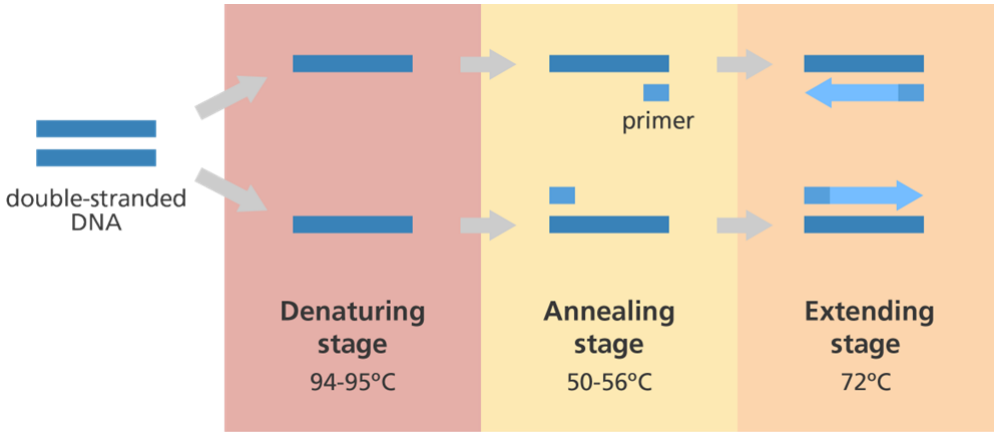
ПЦР - это экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения определённых фрагментов нуклеиновой кислоты. ПЦР стоит в основе множества методик молекулярной диагностики, включая секвенирование. Основные компоненты:

1. Праймеры (15-30 п.о., комплементарны противоположным концам цепей искомого участка);
2. Термостабильная полимераза;
3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ);
4. Буфер;
5. Анализируемый образец.



Этапы ПЦР

1. Денатурация (разрыв водородных связей между цепями);
2. Отжиг (присоединение праймеров к мишени);
3. Элонгация (полимераза достраивает цепи ДНК с 3’-конца при помощи дНТФ).

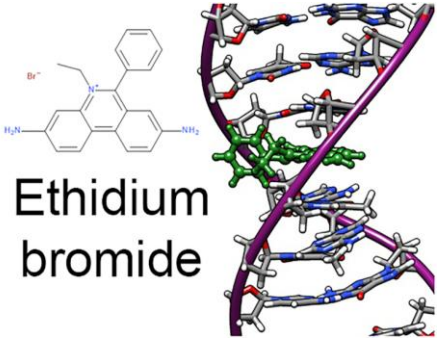


Подбор праймеров

1. Длина праймера 18-22 п.о. (короче - страдает специфичность, длиннее - приходится делать температуру отжига слишком низкой);
2. Температура плавления праймеров должна мало отличаться, в пределах 52-65°C (температура отжига должна быть чуть ниже);
3. Доля GC 40-60% (в случае дальнейшего секвенирования - качество прочтения страдает; по три водородные связи);
4. Вторичные структуры (шпильки, димеры) не должны образовываться (желательно).

Для дизайна праймеров используют Primer3/NCBI Primer Designing Tool.

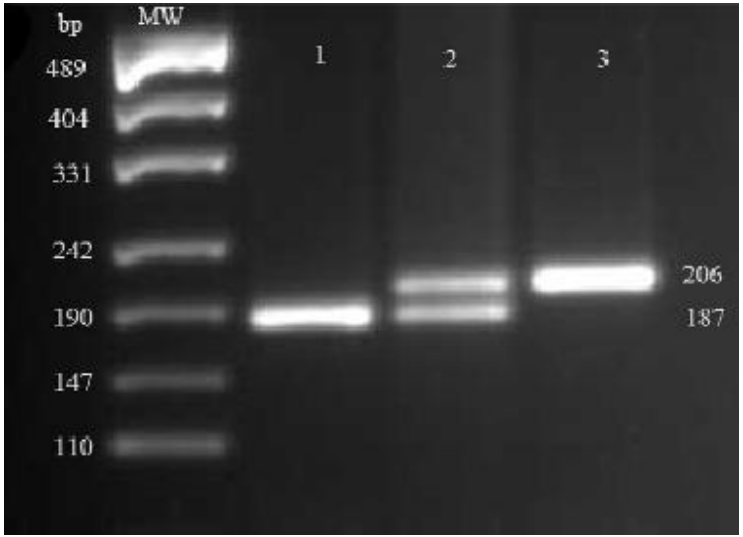
Детекция результатов. Электрофорез



В случае, когда нам важен размер продукта (анализ STR-регионов, детекция инделей), применяют электрофорез ПЦР-продуктов.

Использование рестриктаз (RFLP-анализ) позволяет применять электрофорез для обнаружения точечных замен: сайт узнавания рестрикции изменяется и либо присутствует при WT, а при варианте – нет, либо наоборот.

Аналог – фрагментный анализ (тогда один из праймеров должен быть с флуорофором).



Детекция результатов. Флуоресцентные методы

Флуоресцентные методы детекции основаны на использовании флуорохромов – молекул, обладающих способностью к свечению в результате поглощения световой энергии.

Детекция производится:

- После амплификации (ПЦР с анализом результатов по конечной точке);
- В процессе амплификации (ПЦР в режиме реального времени, RT-PCR).

Детекция результатов. Интеркалирующие красители

Интеркалирующие красители (SYBR Green) способны обратимо встраиваться между комплементарными парами нуклеотидов. Флуоресцируют только встроившиеся молекулы.

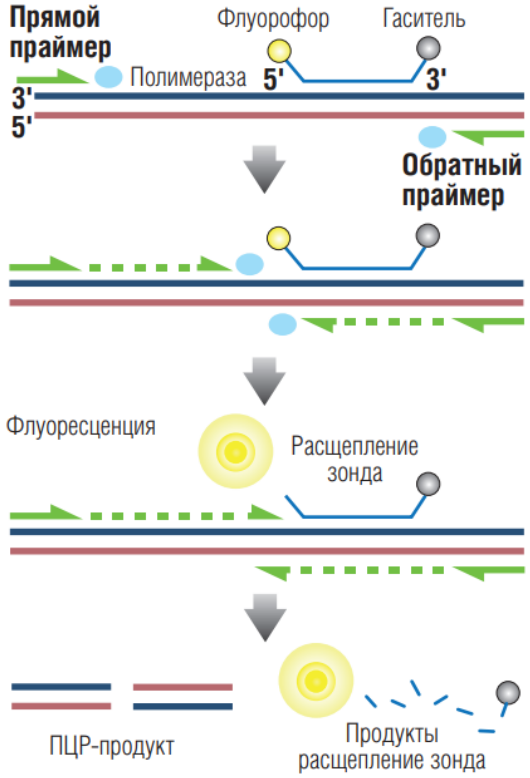
Плюс: дешевизна красителей, не требуется зонд.

Минус: способность неспецифично связываться с любой двухцепочечной ДНК в реакционной смеси, ингибирование Taq-полимеразы.



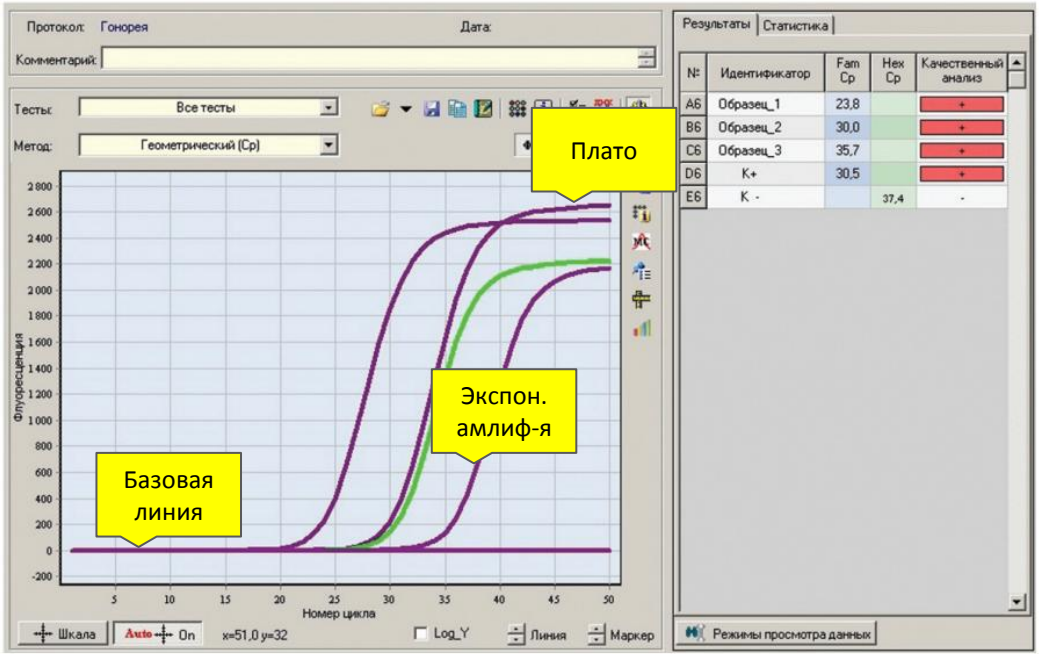
Детекция результатов. Гибридизационные зонды

Решение проблемы – использование гибридизационных зондов, которые основаны на принципе FRET (fluorescence resonance energy transfer): молекула флуорофора, находясь вблизи гасителя, не флуоресцирует, а передаёт энергию ему. Зонд конструируется так, что в процессе ПЦР он отжигается между прямым и обратным праймерами, и при синтезе ДНК продуктов он расщепляется полимеразой, флуорофор удаляется от гасителя и начинает светиться.



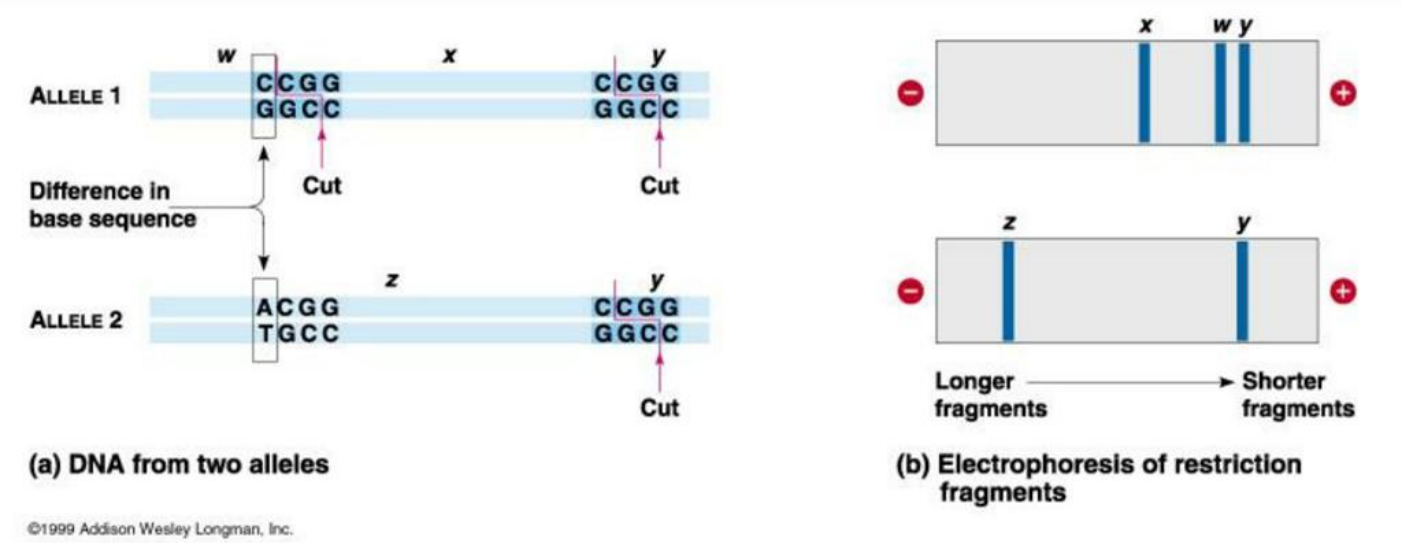
Детекция результатов. RT-PCR

RT-PCR позволяет оценивать результаты ПЦР качественно (при наличии положительного контроля) и количественно (при наличии стандартизированных проб с известной копийностью – содержащимся количеством копий таргетной последовательности).



Детекция результатов. RFLP analysis

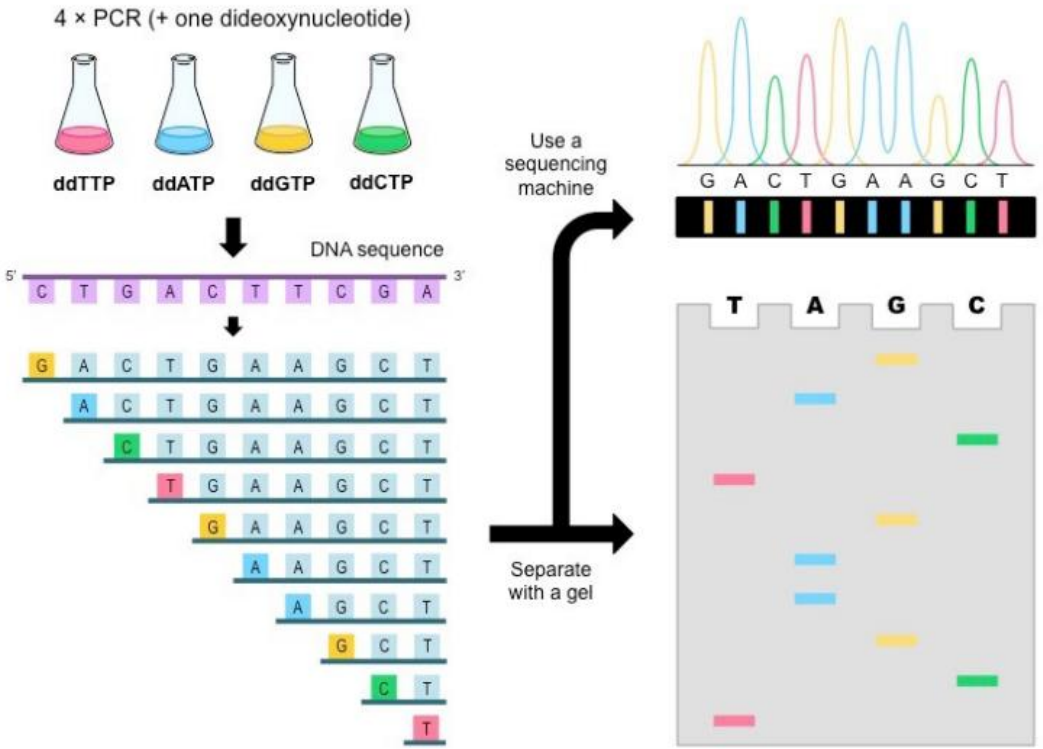
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism analysis, позволяет определять наличие SNP в исследуемой ДНК при помощи специфических рестриктаз. В случае наличия/отсутствия определённой SNP может появляться сайт рестрикции.



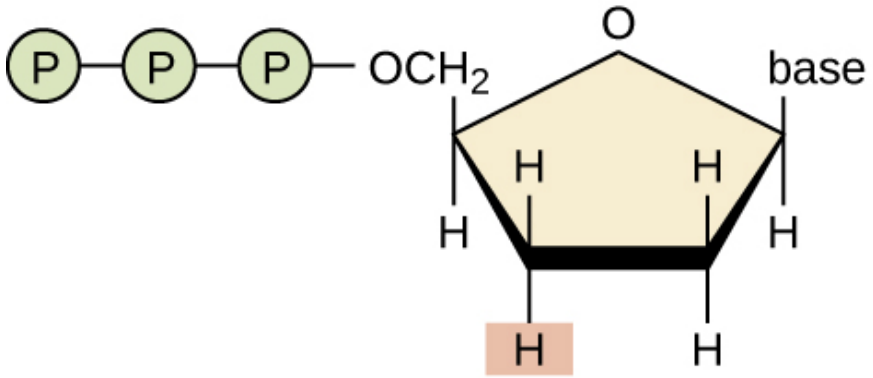
Секвенирование первого поколения

Реакция происходит в 4 “пробирках” в присутствии:

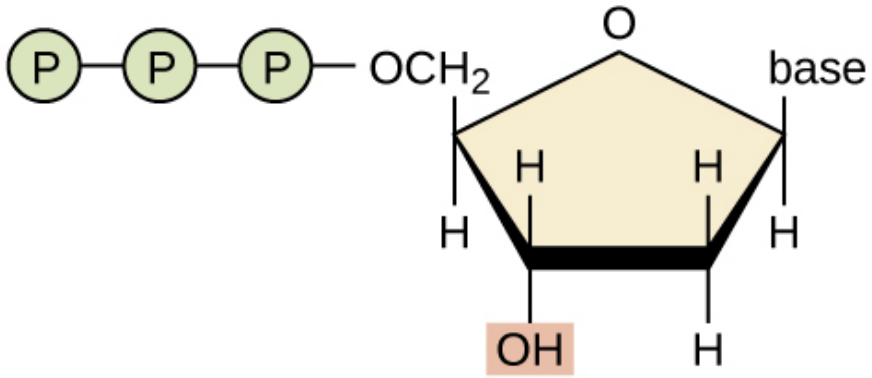
- ДНК-полимеразы,
- дНТФ (строительные блоки, все нуклеотиды),
- ди-дНТФ (блокируют синтез, в каждой пробирке - только один тип нуклеотидов).



Дезоксинуклеотиды и дидезоксинуклеотиды



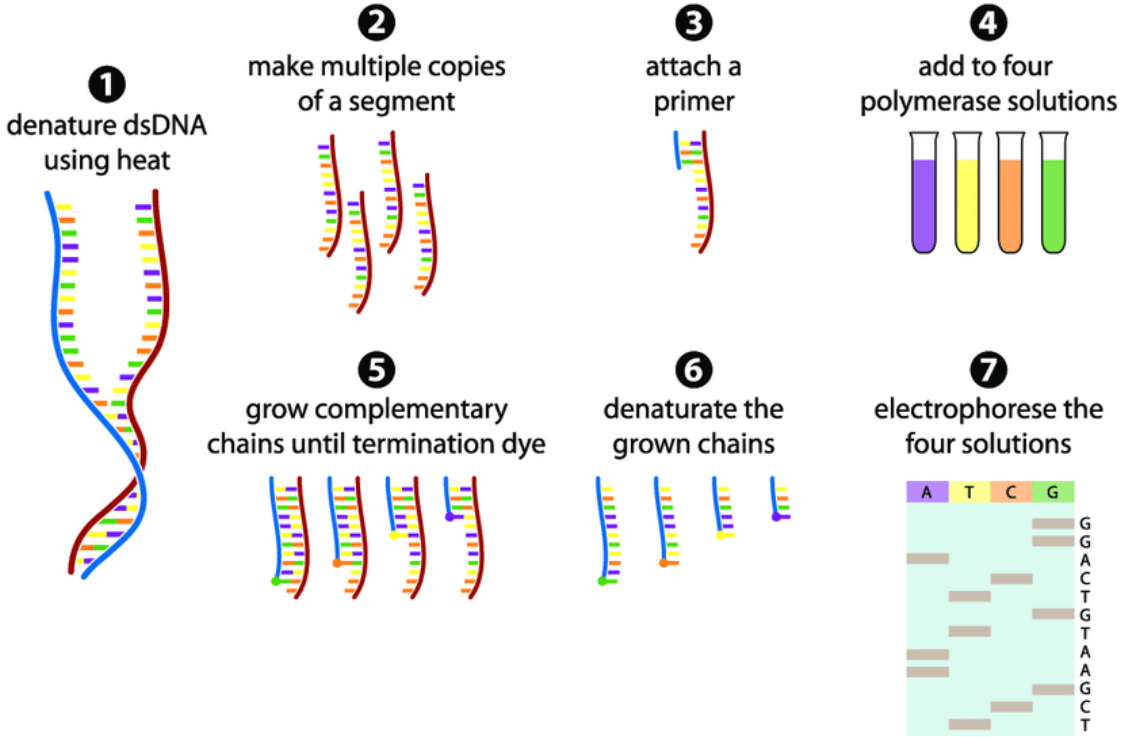
dideoxynucleotide (ddNTP)



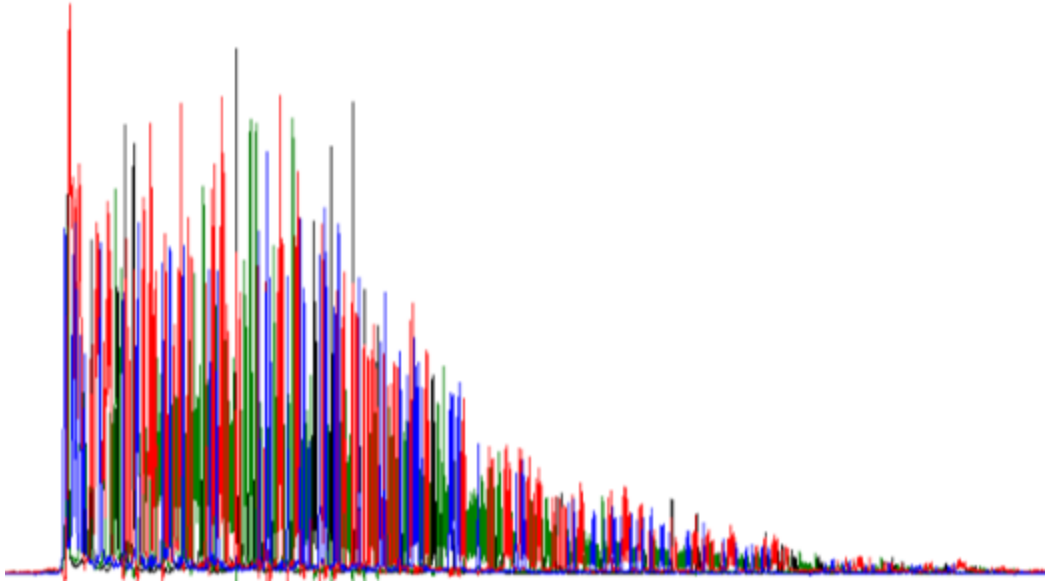
deoxynucleotide (dNTP)

Секвенирование первого поколения

Реакция происходит в 4 “пробирках”, в каждой из которых она останавливается на определённом нуклеотиде. Чем длиннее достроенная цепь, тем вероятнее остановка синтеза. Поэтому к “концу” прочтения сигнал угасает. <1000 нуклеотидов!



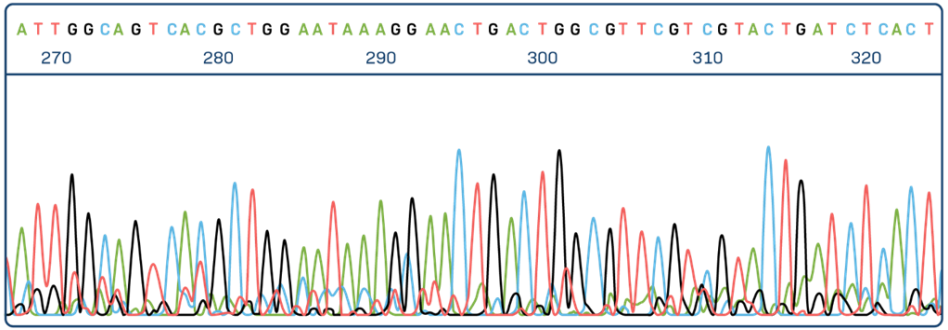
Угасание сигнала



Baseline noise – шум

Шум может усиливаться к концу прочтения из-за ошибок полимеразы.

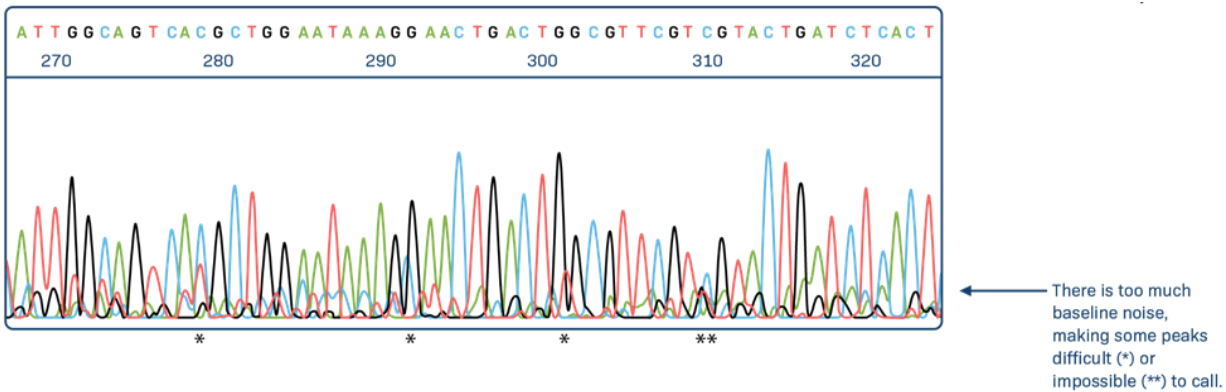
Иногда шум может привести к тому, что истинные пики с мононуклеотидными заменами прочитать невозможно. Попробуйте найти мутации!



Baseline noise – шум

Шум может усиливаться к концу прочтения из-за ошибок полимеразы.

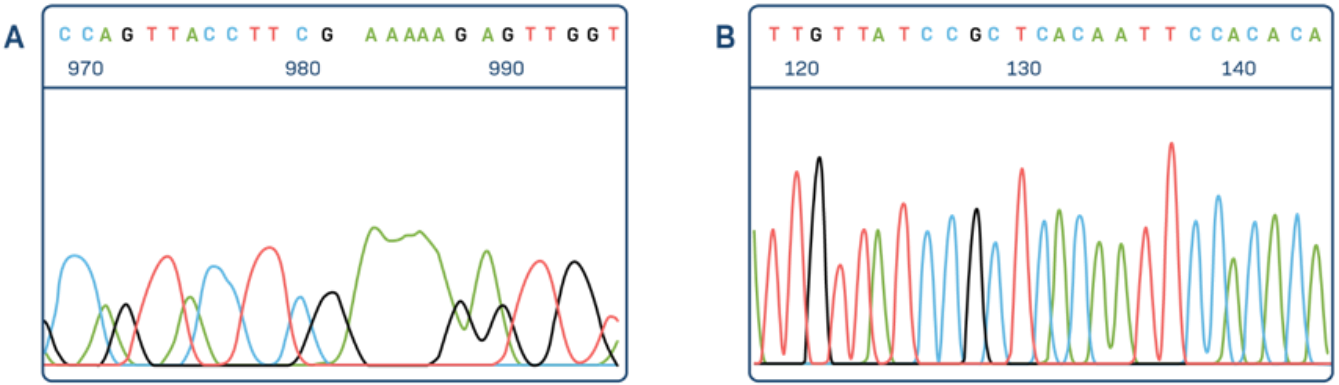
Иногда шум может привести к тому, что истинные пики с мононуклеотидными заменами прочитать невозможно. Попробуйте найти мутации!



Низкое разрешение

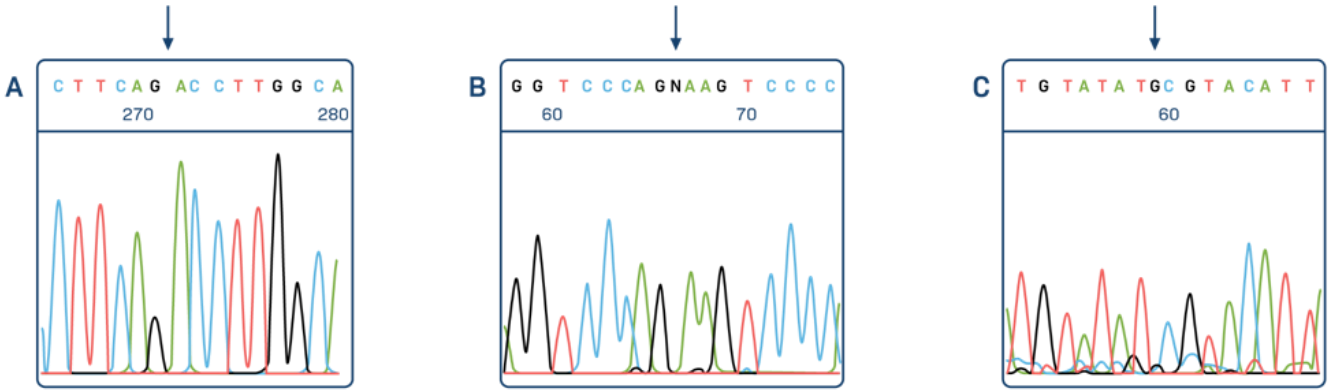
Объединённые и смещённые пики наблюдаются при низком разрешении секвенирования. Наблюдается ближе к концу прочтения.

Из-за артефактов следует ограничивать длину прочтений 800-ми нуклеотидами!



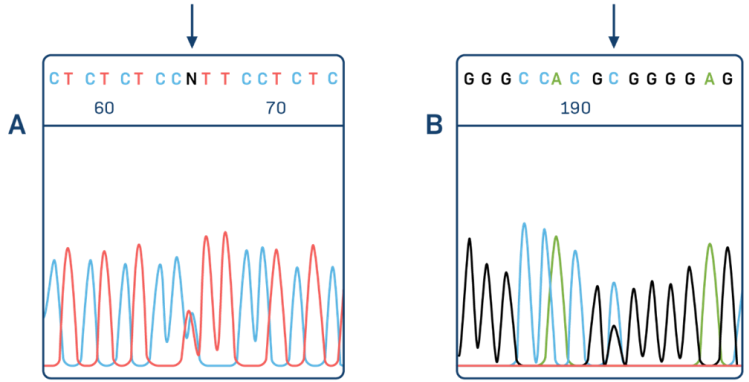
Miscalling

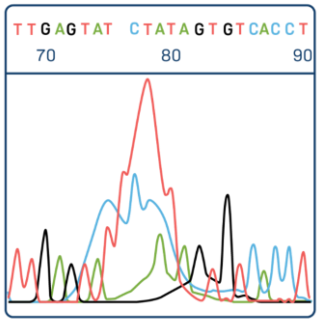
Использование автоматических коллеров облегчает работу, но также может приводить к ошибкам. Типично динуклеотид G-A прочитывается так, что между G и A наблюдается увеличенный интервал. Иногда это ни к чему не приводит (рис. A), однако, в некоторых случаях к чтению пропуска (N, рис. B) или ошибочному чтению пика, относящегося к шуму (G, рис. C).



Miscalling

Кроме того, автоматические коллеры могут не распознать гетерозиготные мутации. В таком случае могут обнаруживаться неопознанные нуклеотиды (N, рис. A) или один из двух аллелей (C, рис. B).

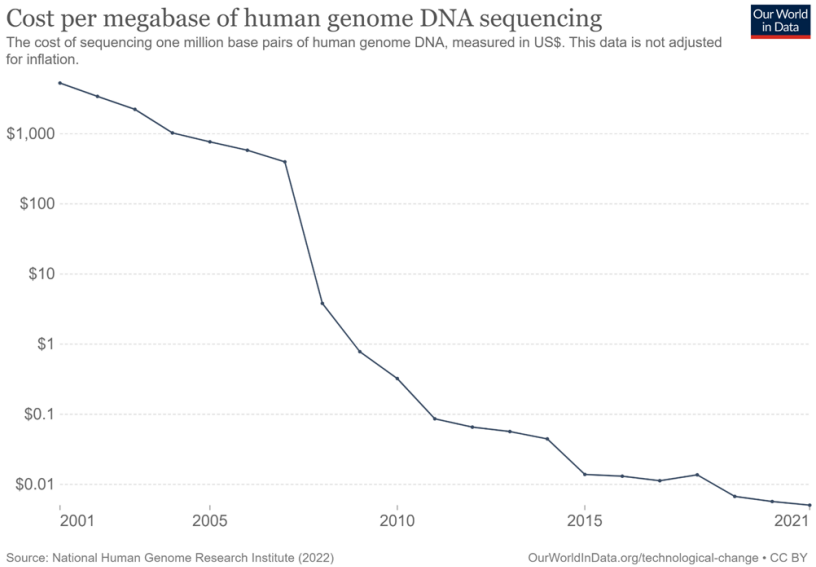




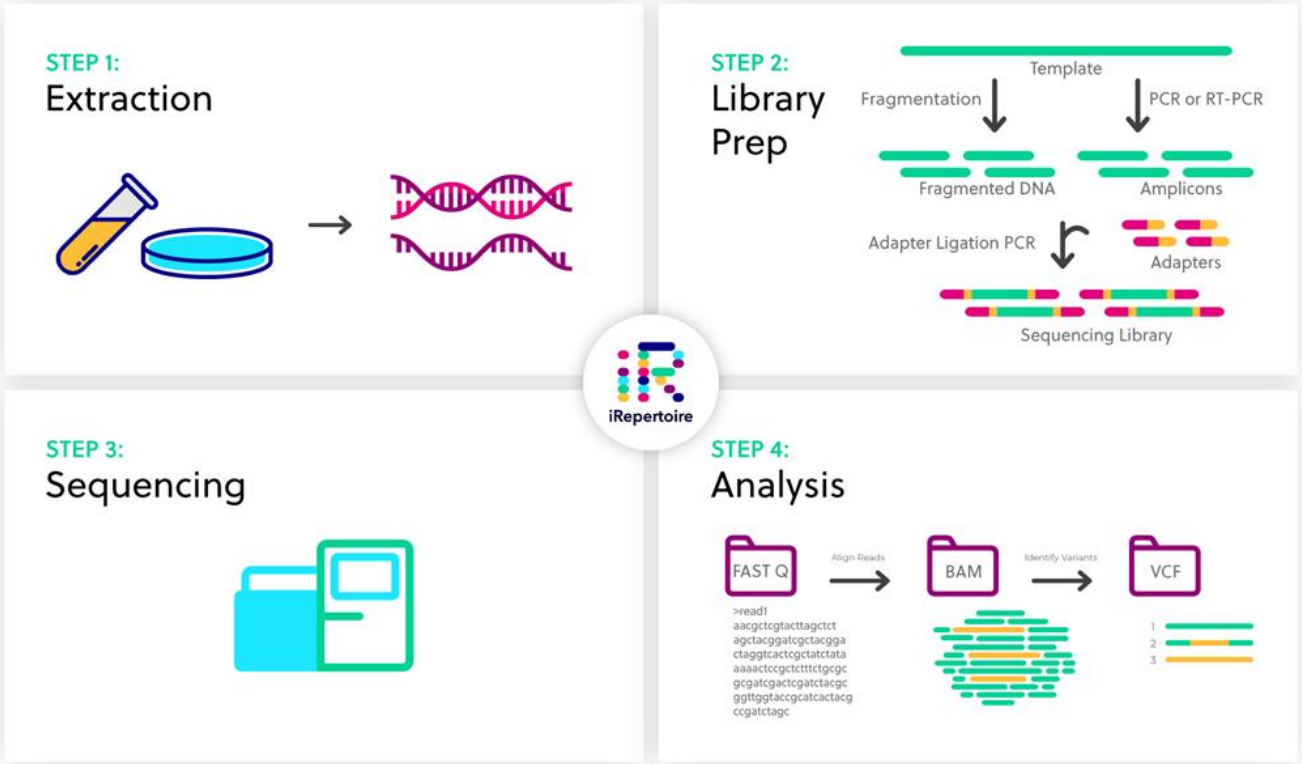
Кроме того, могут наблюдаться неспецифические иррегулярные пики, которые скрывают за собой истинные. Иногда это приводит к неправильному коллингу или к невозможности прочтения хроматограммы.

Секвенирование второго поколения

- Риды (прочтения) длиной в сотни нуклеотидов;
- Миллионы и миллиарды ридов считывается в течение одного анализа;
- Для анализа необходимы часы/дни;
- Стоимость секвенирования мегабазы сравнительно низка;
- Существуют различные технологии NGS, каждая из них характеризуется своей спецификой и характерными ошибками.

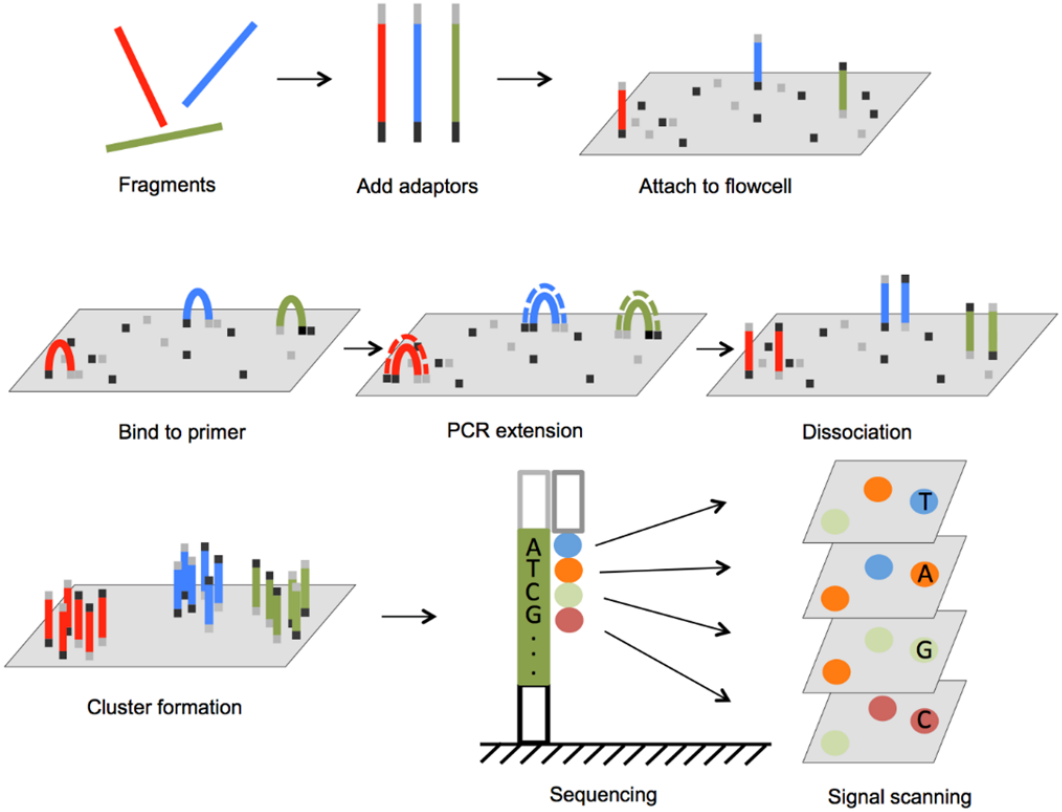


Секвенирование второго поколения



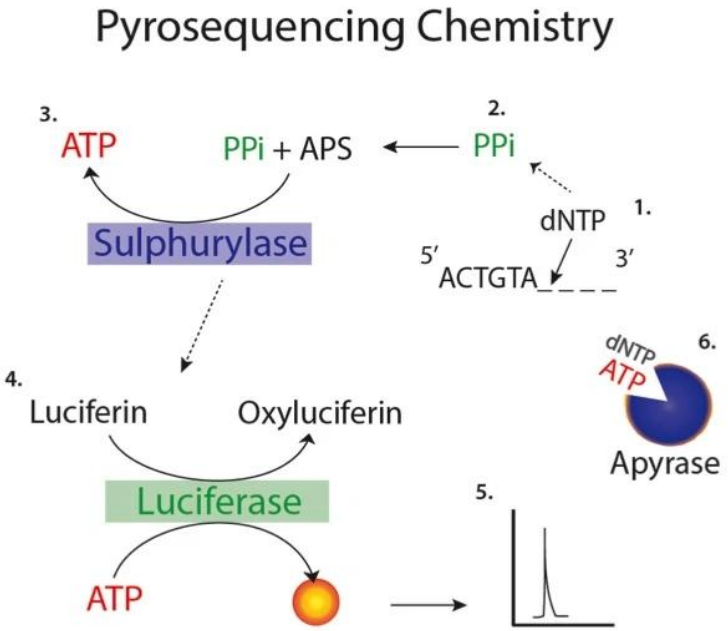
Технология Illumina: циклическая обратимая терминация

- Bridge amplification: обычные дНТФ, в конце все обратные цепи смываются;
- Sequencing by synthesis: меченый дНТФ блокирует дальнейший синтез; за один раунд присоединяется только один тип дНТФ; лазер => свечение; в начале следующего раунда блок синтеза устраняется (флюорофор смывается).



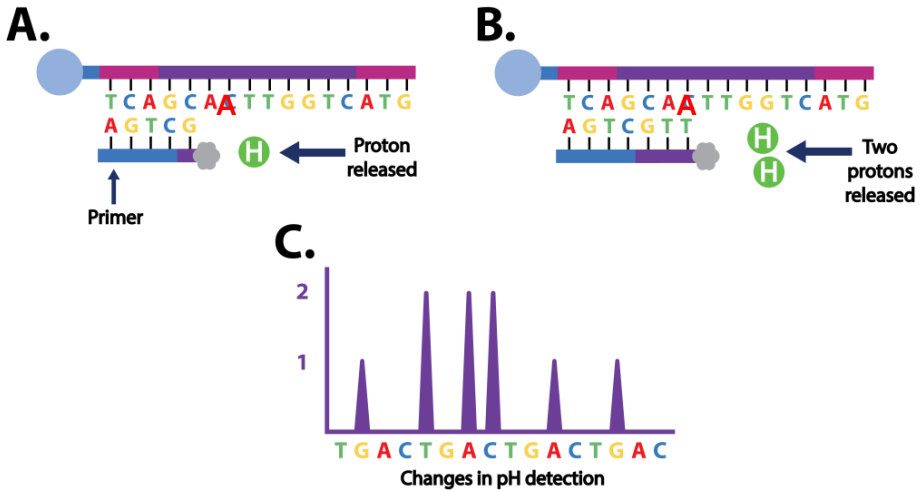
Пиросеквенирование

- ДНК-мишень закрепляется в ячейке объёмом 1 пиколитр (10^{-12}).
- За один раунд содержимое ячейки вымывается, добавляется один тип дНТФ.
- В присутствии ферментов ДНК полимеразы, АТФ-сульфурилазы, люциферазы и апиразы, а также субстратов аденозин-5’-фосфосульфата и люциферина.
- Данная система обеспечивает формирование пирофосфата (PPi), эквимолярного присоединяемому количеству дНТФ.



Ion Torrent

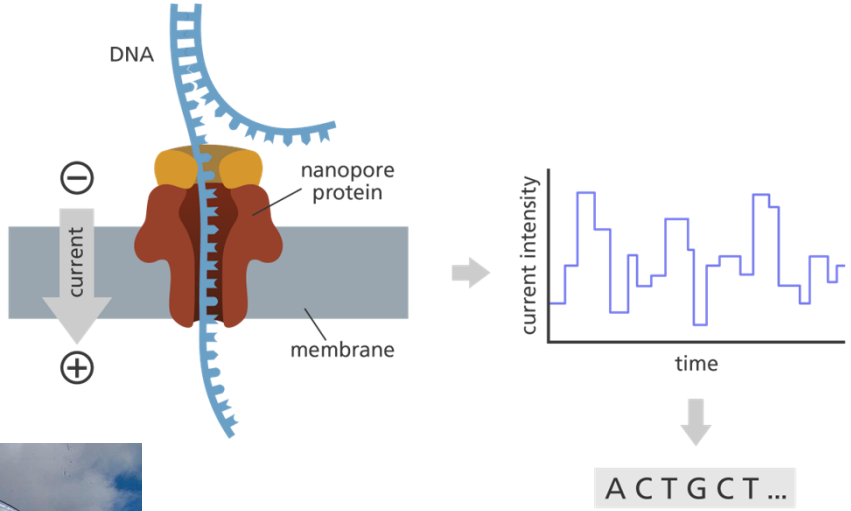
- ДНК-полимераза при присоединении дНТФ выпускает протон;
- pH-метры детектируют это и выдают сигнал, пропорциональный количеству присоединённых нуклеотидов.



Секвенирование третьего поколения

Секвенирование третьего поколения - секвенирование молекул целиком.

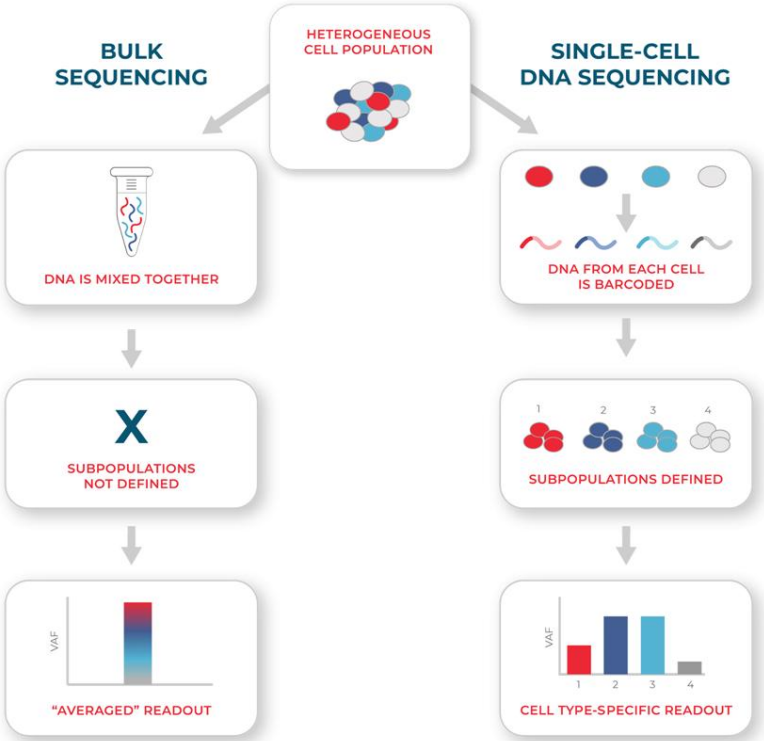
Модифицированные нуклеотиды, урацил в составе РНК можно секвенировать при помощи этих методик.





Single Cell

При заболеваниях, которые вызваны соматическими мутациями, могут формироваться несколько различных клонов и субклонов – совокупностей пролиферирующих клеток с одинаковым генотипом. Например, это актуально при новообразованиях.



Single Cell

Это достигается путём внесения клеток в шарики с индивидуальными баркодами. Большое разнообразие баркодов позволяет отличить молекулы ДНК, пришедшие от разных клеток.

