

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра биохимии и микробиологии

**ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ДИСЦИПЛИНЕ  
«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА  
И БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА»**

Методические указания

Составитель Е.В.Бибарцева

Рекомендовано к изданию редакционно-издательским советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» для обучающихся по образовательной программе высшего образования по специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

Оренбург  
2021

УДК 575.1  
ББК 28.04  
Л 38

Рецензент - доцент, кандидат биологических наук, Н.А. Романенко

Л 38      **Лабораторные работы по дисциплине «Молекулярная генетика и болезни человека»:** методические указания / составитель Е.В. Бибарцева; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2021. – 28 с.

Данные методические указания содержат лабораторные занятия по дисциплине «Молекулярная генетика и болезни человека» вариативной части. Раздела дисциплины по выбору по образовательной программе высшего образования по специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика, в соответствии с требованиями рабочей программы.

УДК 575.1  
ББК 28.04

© Бибарцева Е.В,  
составление 2021  
© ОГУ, 2021

## Содержание

Введение.....	4
1 Лабораторная работа №1 (4 часа). Микроскопия. Разделение клеток и их культивирование. Фракционирование клеточного содержимого .....	6
2 Лабораторная работа №2 (2 часа). Выделение геномной ДНК из лука .....	7
3 Лабораторная работа №3 (4 часа). Сущность генеалогического метода. Построение генеалогического древа. Основные положения. Определение основных типов наследования .....	10
4 Лабораторная работа №4 (2 часа). Обзор методов ДНК-диагностики наследственных болезней .....	16
5 Лабораторная работа №5 (2 часа). Сущность метода дерматоглифики. Дактилоскопия как метод изучения генетики .....	20
6 Лабораторная работа №6 (2 часа). Цитогенетические методы изучения генетики человека. Сущность. Денверская номенклатура. Парижская номенклатура. Определение X-полового хроматина. Определение Y-полового хроматина. Кариотипирование .....	23
Список использованных источников.....	28

## Введение

Дисциплина «Молекулярная генетика и болезни человека» изучается студентами очной формы обучения в 8 семестре по специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика.

Целью освоения дисциплины: является получение базовых знаний о механизмах хранения, передачи и реализации наследственной информации на молекулярном уровне, а также основных молекулярно-биологических процессах.

Задачи:

- развить на современном уровне знания по молекулярным и цитологическим основам наследственности;

- получить знания по диагностике хромосомных болезней, болезней с наследственным предрасположением; изучение биохимическим методам диагностики хромосомных болезней;

- изучить молекулярно-генетические методы диагностики наследственных болезней.

В результате изучения дисциплины студент должен:

Знать:

- современное состояние исследуемой области знаний;

- перспективы развития исследуемого направления;

- вектор развития смежных направлений исследования

- ключевые исследования в сфере деятельности;

- альтернативные методы и направления исследований

- приборную и методологическую базу по специализации;

Уметь:

- применять экспериментальные и расчетные методы изучения состояния веществ в различных образцах;

- пользоваться научной, справочной и нормативной литературой по физико-химическим методам анализа и смежным направлениям;

- оценивать правильность, точность и надежность результатов

- планировать целенаправленную деятельность;
- проводить анализ полученных результатов.

Владеть:

- навыками работы со специализированным программным обеспечением;
- навыками обработки масс-спектрометрических данных;
- навыками работы со специфическими базами данных;
- приемами работы на современном аналитическом оборудовании;
- навыками обслуживания приборов.

Трудоемкость дисциплины для очной формы обучения составляет 144 академических часов, из них 18 часов лекций, 16 часов лабораторных работ и 107,5 часа отведены на самостоятельное изучение дисциплины. Во время выполнения лабораторных работ у студентов формируется способность находить и использовать информацию, накопленную в базах данных по структуре геномов, белков и другой биологической информации, владением основными биоинформатическими средствами анализа геномной, структурной и иной биологической информации (ПК-1). В настоящих методических указаниях для проведения лабораторных работ по дисциплине «Молекулярная генетика и болезни человека» изложены основные теоретические положения и описана методика проведения лабораторных работ в области биомедицины.

## **1 Лабораторная работа №1 (4 часа). Микроскопия. Разделение клеток и их культивирование. Фракционирование клеточного содержимого**

Пигменты определенным образом встроены в мембраны тилакоидов. При получении вытяжки пигментов из фотосинтетического аппарата растений происходит разрушение пигмент-белковых комплексов, а свободные пигменты растворяются в органических растворителях. Процедура извлечения пигментов фотосинтетического аппарата состоит в механическом разрушении клеточных структур (гомогенизация тканей растений), например, путем растирания их с кварцевым песком и использования органических растворителей, хорошо отделяющих пигменты от их липопротеинового носителя. При этом следует соблюдать меры предосторожности. Для предотвращения фотохимической деструкции процесс выделения производится в затененном помещении, а для снижения активностей ионов  $H^+$  и гидролитических ферментов, выделяющихся из вакуолей, в среду выделения добавляются буферы или немного мела.

Материалы и оборудование: Листья растений; ацетон; этиловый спирт; кварцевый песок; фарфоровая ступка с пестиком; мел; фильтр Шотта (№ 3 или № 4); колба Бунзена; насос Камовского; пробирки (3 шт.); колбы; стаканы химические; цилиндры мерные; шпатель; бумага фильтровальная.

Ход работы Взвесьте 0,5–1 г растительного материала. Измельченный растительный материал поместите в ступку и добавьте туда немного мела, кварцевого песка и 3–4 мл ацетона или этанола. Разотрите смесь, а гомогенат поместите в воронку фильтра Шотта, соединенную с колбой Бунзена и насосом Камовского. Добавьте туда же еще 4–5 мл растворителя (ацетона или этанола). Произведите фильтрацию гомогената до полного осушения. Осушенный гомогенат перенесите в ступку, добавьте немного растворителя, снова разотрите и отфильтруйте, как описано выше. Процедуру повторите несколько раз до полного извлечения пигментов. В этом случае растворитель, стекающий в колбу Бунзена, будет бесцветным. Полученная таким образом вытяжка содержит хлорофиллы и

каротиноиды и будет использована для выполнения дальнейших лабораторных работ.

Задание: Определите объем вытяжки. Рассмотрите вытяжку на свету, а также с помощью спектроскопа. Сделайте заключение о ее цвете и особенностях изменения спектра осветителя. Результаты занесите в таблицу.

Масса растительного материала, г	Объем вытяжки, мл	Цвет вытяжки	Особенности спектра

Вопросы к лабораторной работе:

- 1 Назовите две группы фотосинтетических пигментов высших растений. Их роль.
- 2 Для чего производится гомогенизация растительного материала при извлечении пигментов?
- 3 Какие пигменты фотосинтетического аппарата считаются вспомогательными?
- 4 Почему для извлечения пигментов фотосинтетического аппарата используются слабополярные растворители?

## **2 Лабораторная работа №2 (2 часа). Выделение геномной ДНК из лука**

При выделении ДНК из тканей растений важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок. Высвобождение высокомолекулярной ДНК из клеток – это только часть задачи, поскольку растительные экстракты содержат большие количества белков, полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от ДНК. Ткани растений обычно разрушают механическим растиранием в присутствии детергентов, растворяющих

мембраны клеток, и хелатирующих агентов, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счёт связывания двухвалентных катионов.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы: 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом); 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа; 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы.

Приборы: весы, ножницы, ступка для растирания, мензурка, центрифуга, центрифужные пробирки, химический стакан (50-100 мл), деревянная палочка с насечками.

Реактивы: лук, буферный раствор (120 мл  $H_2O$ , 1,5 г  $NaCl$ , 5  $NaHCO_3$ , 5 мл жидкого средства для мытья посуды), изопропиловый спирт охлажденный в морозилке (либо этиловый спирт).

Ход работы:

1. Половину лука измельчите до состояния кашицы любым удобным для Вас способом.

2. 5 мл полученного пюре перенесите в стаканчик и добавьте 10 мл буферного раствора.

3. Полученную смесь энергично перемешивайте в течение не менее 2 минут.

4. Содержимое стаканчика разлейте в центрифужные пробирки. Центрифугируйте 5 минут при 1 тыс. об/мин.

5. Надосадочную жидкость (не менее 5 мл), слейте в чистую пробирку.

6. Аккуратно нанесите 10 мл охлажденного изопропилового (этилового) спирта на стенку слегка наклоненной пробирки. Позвольте спирту медленно стечь по стенке. Если вы все сделали правильно, спирт, плотность которого меньше плотности буфера, останется на поверхности раствора.

7. Поместите тонкую стеклянную или деревянную палочку, например карандаш, в раствор таким образом, чтобы ее кончик оказался непосредственно под границей между буфером и спиртом, и очень осторожно в течение 1 мин поворачивайте попеременно в разные стороны. При этом наиболее длинные фрагменты ДНК накрутятся на палочку. Затем вытащите палочку – спирт заставит ДНК прилипнуть к концу палочки, и вы увидите на нем прозрачный вязкий осадок рисунок 1.



Рисунок 1- Геномная ДНК, намотанная на железную петлю

Не надо брать много материала, так как это приведет к замедлению процесса его охлаждения. В случае головки лука, достаточно взять, примерно 1 см<sup>3</sup> ткани; фильтр из бумажной салфетки может забиться. В таком случае ее надо осторожно вытащить из воронки (чтобы положить вместо нее новую салфетку); этап обработки тканей в ступке имеет ключевое значение, так как именно при этом процессе происходит разрушение структуры клеточной стенки. Чем интенсивнее и тщательнее проведем этот этап, тем больше ДНК выделится из ткани; необходимо обеспечить реальное охлаждение материала, т.е. уровень льда должен соответствовать уровню жидкости в стаканчике; хороший результат дает вода с плавающими в ней кусочками льда, которую периодически надо помешивать; этиловый спирт должен быть максимально холодным, теплый этиловый спирт не приводит к эффективному выпадению ДНК в осадок, поэтому необходимо его предварительное охлаждение во льду; процесс осаждения ДНК надо проводить аккуратно, чтоб случайно не вызвать деградацию; всю процедуру надо проводить

быстро. Затягивание процесса приведет к деградации ДНК, заметить которую будет очень сложно.

Оформление опыта: полученные результаты опыта записать в тетрадь и сделать вывод.

Вопросы к лабораторной работе

1 Назовите способы выделения ДНК из различных клеток.

2 Назовите этапы выделения ДНК из растительных клеток.

3 Какие могут возникнуть трудности при выделении ДНК из растительных клеток, с чем это связано.

### **3 Лабораторная работа № 3 (4 часа). Сущность генеалогического метода. Построение генеалогического древа. Основные положения. Определение основных типов наследования**

Клинико-генеалогический метод является важнейшим, хотя и старейшим методом клинической генетики. Именно с него начинается клинико-генетическое исследование, которое включает изучение патологических признаков у пробанда, его больных и здоровых родственников. Метод относительно прост и доступен, сущность его заключается в составлении и анализе родословных, что позволяет определить наследственный и ненаследственный характер заболевания (признака), его моногенный или полигенный вариант наследования. Условные обозначения при составлении родословной (рисунок 2)

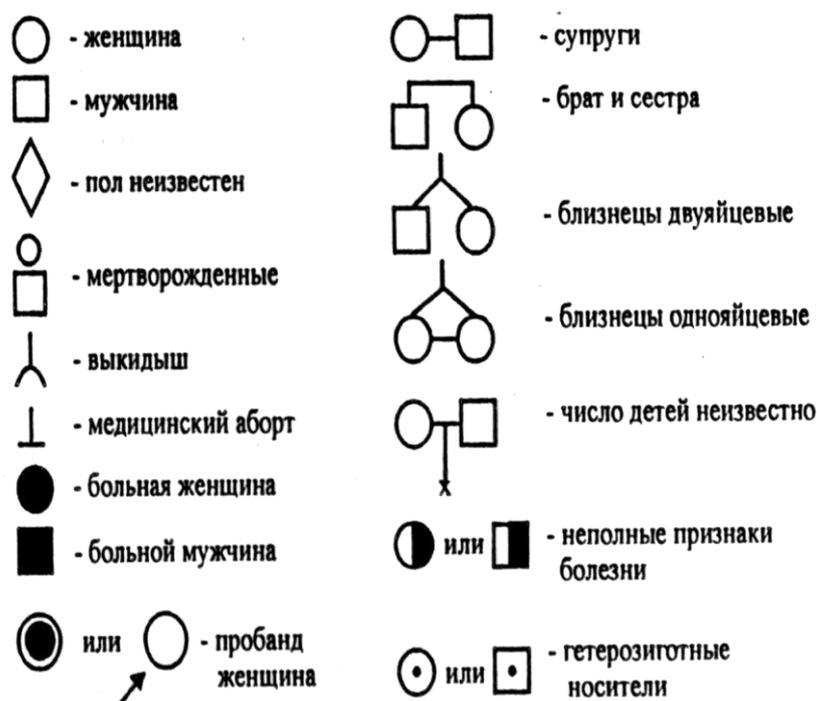


Рисунок 2 – Основные условные обозначения, применяемые при составлении родословной

### Алгоритм составления родословной

1. Соберите информацию о родственниках вашей семьи, включая некровных (место каждого в генеалогическом древе, наличие заболеваний, для умерших родственников – возраст и причина смерти).

2. С помощью условных обозначений составьте генеалогическое древо, соблюдая правила:

- отображайте родных сибсов в семье слева направо в порядке рождения
- отображайте членов одного поколения четко в одной горизонтали независимо от возраста
- отображайте поколения в семье, начиная с самого старшего сверху вниз

Пронумеруйте поколения римскими цифрами, начиная с самого старшего, отображая нумерацию слева от схемы родословной.

Пронумеруйте членов каждого поколения арабскими цифрами слева направо, начиная с 1 в каждом поколении, независимо от степени родства рядом стоящих родственников.

Отметьте себя в качестве пробанда соответствующим условным обозначением.

Отметьте наличие заболеваний в семье, проставляя в значке больного родственника соответствующее условное обозначение (например ГБ – гипертоническая болезнь). Условные обозначения могут быть произвольными, но обязательно присутствие сноски под родословной, разъясняющей ваши условные обозначения.

Отметьте умерших родственников, используя соответствующие условные обозначения (рисунок 3).

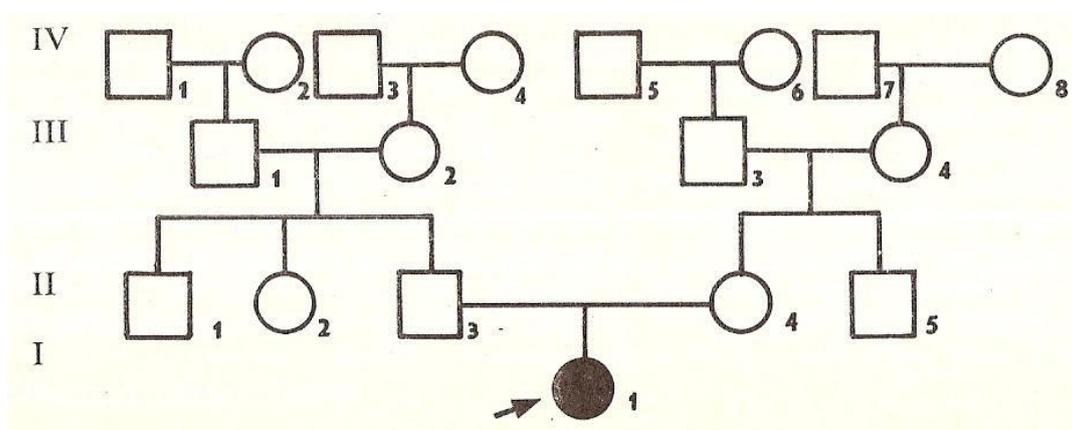


Рисунок 3 - Пример составления родословной

Составьте легенду для умерших родственников, указывая возраст смерти и причину смерти, приложив ее к родословной. В случае отсутствия информации по возрасту и причинам смерти указать – неизвестно.

Оценив характер и частоту заболеваний в семье, причины смерти умерших родственников, дайте прогноз для пробанда в плане риска возникновения наиболее вероятным заболеваний в виде заключения по родословной

У людей известны следующие основные типы наследования:

- 1) аутосомно-доминантное наследование;
- 2) аутосомно-рецессивное наследование;
- 3) доминантное сцепленное с X-хромосомой наследование;
- 4) рецессивное сцепленное с X-хромосомой наследование;
- 5) сцепленное с Y-хромосомой, или голандрическое наследование.

Рекомендации по определению типа наследования признака

Для определения типа наследования признака рекомендуют придерживаться следующей последовательности действий:

1) Определите, доминантным или рецессивным является изучаемый признак.

Если люди с изучаемым признаком встречаются в родословной редко, не в каждом поколении, и если признак встречается у человека, родители которого не имеют изучаемого признака, то можно думать, что изучаемый признак является рецессивным.

Если, наоборот, люди с изучаемым признаком встречаются в родословной часто, в каждом поколении, и если дети с таким признаком рождаются в тех семьях, где хотя бы один из родителей имеет данный признак, то можно думать, что изучаемый признак является доминантным.

2) Определите, в аутосоме или в половой хромосоме находится ген, обуславливающий формирование изучаемого признака.

Если особи разного пола, имеющие изучаемый признак, встречаются приблизительно с одинаковой частотой, например, одинаково часто или одинаково редко, то можно думать, что изучаемый признак является аутосомным, то есть обуславливающий его ген расположен в аутосоме.

Если особи разного пола, имеющие изучаемый признак, встречаются с разной частотой вплоть до отсутствия признака у представителей одного пола, то можно думать, что изучаемый признак сцеплен с полом: обуславливающий его ген расположен в половой хромосоме. Анализ передачи такого гена из поколения в поколение позволяет определить, в какой именно половой хромосоме – X или Y - расположен этот ген.

3) Если ген находится в половой хромосоме, то определите: в какой именно половой хромосоме – X или Y – находится ген, обуславливающий формирование изучаемого признака.

При этом возможны следующие варианты:

а) Если признак встречается только у особей мужского пола и передается только от отца сыну, то можно думать, что изучаемый ген находится в Y-хромосоме.

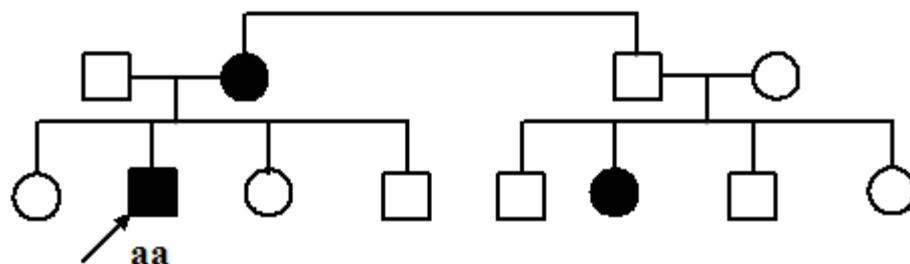
б) Если в конкретной родословной рецессивный признак встречается только у особей мужского пола, у отцов которых данный признак отсутствует, но имеется у дедов или прадедов по материнской линии, то можно думать, что рецессивный аллель, обуславливающий развитие изучаемого признака, расположен в X-хромосоме.

в) Если среди особей с признаком особи женского пола встречаются приблизительно в два раза чаще, чем особи мужского пола, и у мужчины с доминантным признаком все дочери тоже имеют этот признак, а у всех его сыновей этот признак отсутствует, то можно думать, что доминантный аллель, обуславливающий развитие изучаемого признака, расположен в X-хромосоме.

4) Установив тип наследования изучаемого признака, проверьте: обладает ли анализируемая родословная теми признаками, которые характерны для выбранного вами типа наследования. Затем убедитесь, что родословная не обладает комплексом признаков, характерных для других типов наследования.

Пример. Условие задачи.

Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Пробанд болен, и его родословная имеет следующий вид:



Жена пробанда здорова и не содержит в своем генотипе патологических аллелей. Чему равна вероятность рождения у пробанда здорового ребенка?

Решение:

Генная запись скрещивания:

P: ♀ AA - ♂ aa

здоровая больной

○○ G: A a

F<sub>1</sub> Aa

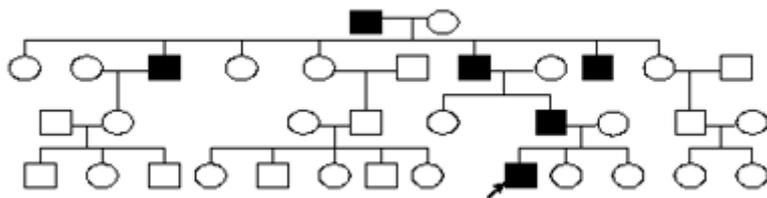
100% здоровые

Ответ: Вероятность рождения у пробанда здорового ребенка равна 100%.

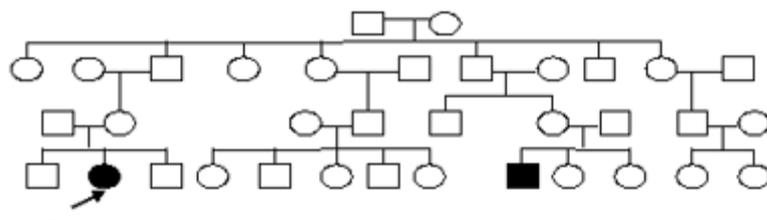
Задания для самостоятельной работы

Определите тип наследования, генотип пробанда в следующих родословных.

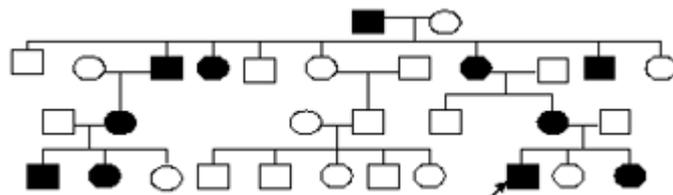
Родословная 1.



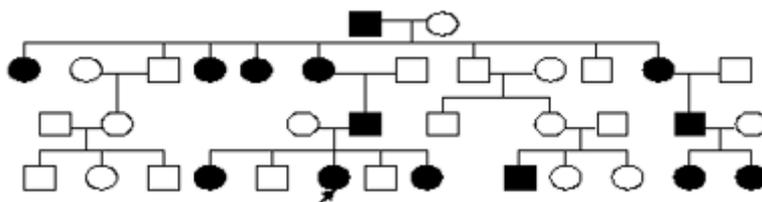
Родословная 2.



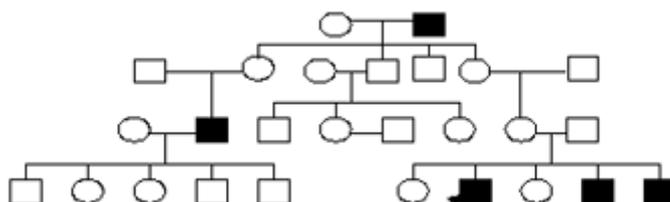
Родословная 3.



Родословная 4.



Родословная 5.



Вопросы к лабораторной работе:

- 1 Сущность генеалогического метода.
- 2 Назовите основные типы наследования.
- 3 Алгоритм составления родословной.

#### **4 Лабораторная работа №4 (2 часа). Обзор методов ДНК-диагностики наследственных болезней**

С помощью *прямых методов* выявляются нарушения в первичной нуклеотидной последовательности ДНК (мутации и их типы). Прямые методы отличаются точностью, достигающей почти 100 %. Однако на практике указанные методы могут применяться при определенных условиях:

- 1) известной цитогенетической локализации гена, ответственного за развитие наследственного заболевания,
- 2) должен быть клонированным ген заболевания и известна его нуклеотидная последовательность.

Целью прямой диагностики является идентификация мутантных аллелей (нарушения в первичной нуклеотидной последовательности ДНК, мутации и их типы).

Недостатком метода прямой ДНК-диагностики является необходимость знания точной локализации гена и спектра его мутаций.

Методы прямой ДНК-диагностики показаны для таких заболеваний, как фенилкетонурия (мутация R408W), муковисцидоз - (наиболее частая мутация delF508), хорея Гентингтона (экспансия тринуклеотидных повторов-СТG-повторы) и др. Однако к настоящему времени гены многих заболеваний не картированы, неизвестна их экзонно-интронная организация, и многие наследственные болезни отличаются выраженной генетической гетерогенностью, что не позволяет в полной мере использовать прямые методы ДНК-диагностики. Поэтому информативность

метода прямой ДНК-диагностики широко варьирует. В связи с этим используются косвенные методы молекулярно-генетической диагностики наследственных болезней.

Косвенные методы ДНК-диагностики основаны 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, т.е. среди родственников обследуемого лица. Это особенно важно при решении вопроса о пренатальной (дородовой) диагностике наследственного заболевания. При использовании косвенных методов ДНК-диагностики следует помнить — чем теснее сцепление между маркерным локусом и мутантным геном, тем точнее диагноз. Чтобы свести до минимума ошибку диагностики, необходимо по возможности использовать внутригенные маркеры или использовать два маркерных локуса, фланкирующих мутантный аллель.

Таким образом, косвенная ДНК-диагностика проводится в следующих случаях:

- 1) когда ген не идентифицирован, а лишь картирован на определенной хромосоме,
- 2) когда методы прямой ДНК-диагностики не дают результата (например, в силу большой протяженности гена или широком спектре мутационных изменений,
- 3) при сложной экзонно-интронной организации гена.

Для диагностики требуется обследование как можно большего числа родственников (в первую очередь родители—дети), чтобы проследить путь передачи маркеров потомству. Это повышает информативность выбранного маркера.

Блот-гибридизация - высокочувствительный метод, позволяющий обнаружить последовательность ДНК в количестве нескольких пикограмм. Общие принципы этой диагностики включают:

1-й этап. Забор крови из вены и выделение ДНК из клеток крови; накопление определенных фрагментов, которые предполагается анализировать с помощью полимеразной цепной реакции.

Для ДНК-диагностики наследственного заболевания не требуется исследовать всю выделенную ДНК, а достаточно изучения небольшого фрагмента генома. Однако для этого необходимо иметь большое количество копий таких фрагментов. Для получения этого количества проводится амплификация (умножение) фрагментов за счет полимеразной цепной реакции (ПЦР; РСП-реакция). Разработка методики данной реакции произвела революцию в молекулярной ДНК-диагностике наследственных болезней, так как позволила за короткое время (несколько часов) получить более 1 млн копий выделенного фрагмента ДНК.

Единственным условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности амплифицируемого фрагмента.

2-й этап - рестрикция (разрезание) ДНК на фрагменты. Это осуществляется с помощью особых ферментов рестриктаз, которые разрезают ДНК в строго определенном месте. В результате образуется набор фрагментов ДНК различной длины.

3-й этап - электрофорез фрагментов ДНК на агарозном геле (или полиакриламидном геле). Поскольку фрагменты разной длины и молекулярного веса, их движение по гелю будет неодинаковым - более тяжелые будут двигаться медленнее, чем более легкие. Распределение фрагментов на геле будет в виде полос, форма и размеры которых сравниваются со стандартными образцами ДНК, размеры которых известны.

4-й этап. Поскольку полосы визуально не определяются, возникает необходимость их визуализации и идентификации. С этой целью после окончания электрофореза гель обрабатывается красителем (чаще этидия бромидом, но могут использоваться и другие), который связывается с ДНК. При ультрафиолетовом облучении поверхности геля он начинает светиться красным цветом. Разработаны методы автоматической регистрации этого процесса.

Визуализация представляет собой более сложный процесс идентификации конкретных фрагментов в геле среди всей геномной ДНК и выявления специфических фрагментов ДНК с помощью метода блот-гибридизации по Саузерну. Для этого проводится денатурация ДНК с помощью щелочи, результатом является расщепление двухцепочечной ДНК на две одноцепочечные молекулы. Далее ДНК переносится на так называемый «фильтр» (из нитроцеллюлозы или нейлона), который помещается на гелевую поверхность и под влиянием буферного раствора одноцепочечные фрагменты ДНК вымываются из геля и фиксируются на фильтре. Расположение фрагментов ДНК на фильтре точно соответствует их расположению на геле. Поскольку фиксированная ДНК не видна, проводится ее визуализация. Это достигается за счет гибридизации фрагментов со специфическим по нуклеотидной последовательности меченым радионуклидом или флюоресцентной меткой олигонуклеотидным синтетическим зондом (зонд состоит из 16-30 пар оснований), который иногда называется клонированным фрагментом ДНК. Если нуклеотидная последовательность комплементарна изучаемому фрагменту на фильтре, то гибридизация осуществляется, а неспецифически связанные молекулы зонда отмываются с помощью специальной процедуры. Радиоактивно меченые участки выявляют путем помещения фильтра на рентгеновскую пленку, на которой после проявления видны полосы меченой зондом ДНК (авторадиография). Нерadioактивные метки визуализируются с помощью флюоресценции или опосредованно с помощью антител.

Вопросы к лабораторной работе:

- 1 Сущность *прямых методов* выявления нарушений в первичной нуклеотидной последовательности ДНК.
- 2 Что такое блот-гибридизация?
- 3 Показания к проведению косвенной ДНК-диагностики.
- 4 Этапы проведения ПЦР-диагностики.

## **5 Лабораторная работа №5 (2 часа). Сущность метода дерматоглифики. Дактилоскопия как метод изучения генетики**

Дерматоглифика – это изучение рельефа кожи на пальцах, ладонях и подошвенных поверхностях стоп, который образован эпидермальными выступами – гребнями, которые образуют сложные узоры.

Ф. Гальтон предложил классификацию этих узоров, позволившую использовать этот метод для идентификации личности в криминалистике.

Разделы дерматоглифики:

- дактилоскопия – изучение узоров на подушечках пальцев
- пальмоскопия – изучение рисунка на ладонях
- плантоскопия – изучение дерматоглифики подошвенной поверхности стопы

Генетическая дактилоскопия (ДНК-дактилоскопия) – система научных методов биологической идентификации организмов на основе уникальности последовательности чередования нуклеотидов в цепочке ДНК каждого живого существа (за исключением однояйцовых близнецов).

Методический подход, получивший название «обратная генетика» и оказавшийся очень полезным при изучении наследственных заболеваний, в настоящее время взят на вооружение широким кругом исследователей. За последние годы наши представления о мышечной дистрофии Дюшенна, муковисцидозе и ретинобластоме значительно расширились. В настоящее время стоит вопрос о локализации и молекулярной характеристике генов, ответственных за эти болезни.

Изучение большинства наследственных заболеваний шло именно таким путем. В некоторых случаях хромосомная локализация интересующего гена устанавливается достаточно легко. Это бывает, если у индивидов с абберрантным фенотипом наблюдаются устойчивые аномалии в определенной области хромосомы. К сожалению, для большинства наследственных заболеваний такая благоприятная в

плане диагностики ситуация не характерна и для локализации гена необходимо проводить анализ генетического сцепления.

Применение ПДРФ в анализе сцепления стало обычной процедурой и значительно ускорило процесс картирования. Однако этот подход имеет и некоторые недостатки. В большинстве случаев ПДРФ представляет собой всего лишь диморфизм, и соответствующие локусы не могут поэтому характеризоваться более чем 50%-ной гетерозиготностью. Для того чтобы данное скрещивание дало какую-нибудь информацию о сцеплении, по крайней мере один из родителей должен быть гетерозиготным как по интересующей, так и по маркерной области.

Таким образом, большая часть семей, подвергнутых анализу на сцепление с применением ПДРФ, окажется совершенно неинформативной. Это пример неэффективного использования информационных ресурсов родословной. Как инструмент в анализе сцепления метод геномных отпечатков нашел применение в случаях тех заболеваний, биохимическая природа которых пока неизвестна или когда приуроченность к подозреваемому гену была исключена. Поскольку не существует простого метода определения, какая из полос «отпечатка» генома данного индивида представляет ту или иную полосу в картине другого индивида, обычная процедура получения данных о сцеплении по нескольким малым родословным невозможна. Сложность гибридизационных картин не позволяет достоверно проследить наследование аллельных пар, но в рамках большой родословной и, конечно же, в группе sibсов отдельный фрагмент данного размера может рассматриваться для простоты предварительного анализа как отдельный локус. По этой причине наличие одной большой родословной является обязательным требованием для традиционного сегрегационного анализа полос в геномном «отпечатке». Такие родословные редко когда можно получить для рецессивно наследуемых нарушений, однако для доминантных заболеваний – это реально.

Для сегрегационного анализа полос в «отпечатках» в силу допущенного упрощения, сделанного в отношении их аллелизма, классический метод правдоподобия не может быть применен. В данном случае допустима лишь оценка

шансов на сцепление. Таким образом, метод следует рассматривать как быстрый предварительный анализ на сцепление. Если результат окажется обнадеживающим, т.е. если в отпечатках будет найдена полоса, наличие которой для данной родословной коррелирует с экспрессией аномального фенотипа, то эту полосу следует выделить и клонировать. Таким путем можно получить локус-специфичный зонд и с его помощью проанализировать другие родословные с целью подтвердить или отвергнуть наличие сцепления.

Недостаток больших родословных для рецессивно наследуемых признаков, конечно, ограничивает применение метода геномной дактилоскопии, но не исключает полезность его использования для анализа рецессивных болезней. Если при близкородственном скрещивании больные дети имеют общую для их геномных отпечатков полосу в удвоенном количестве, а здоровые дети наследуют одинарную дозу или вовсе не имеют этой полосы, то тем самым подтверждается гипотеза о физическом сцеплении между участком, ответственным за признак, и данной полосой. Условившись об аллелизме, можно подсчитать шансы на сцепление, но, как уже отмечалось, для подтверждения или опровержения наличия сцепления фрагмент необходимо клонировать.

Вопросы к лабораторной работе:

- 1 Характеристика основных разделов дерматоглифики.
- 2 Особенности пальцевой дерматоглифики в случаях аномалий врожденного ограничения физического и умственного развития при синдроме Дауна и олигофрении.
- 3 Сегрегационный анализ.

## **6 Лабораторная работа №6 (2 часа). Цитогенетические методы изучения генетики человека. Сущность. Денверская номенклатура. Парижская номенклатура. Определение X-полового хроматина. Определение Y-полового хроматина. Кариотипирование**

Цитогенетические (кариотипические, кариотипические) методы используются, в первую очередь, при изучении кариотипов отдельных индивидов.

Изучают строения отдельных хромосом, а также особенностей набора хромосом клеток человека в норме и патологии. Удобным объектом для этого служат лимфоциты, клетки эпителия щеки и другие клетки, которые легко получать, культивировать и подвергать кариологическому анализу. Это важный метод определения пола и хромосомных наследственных заболеваний человека.

Основой цитогенетического метода является изучение морфологии отдельных хромосом клеток человека. Современный этап познания строения хромосом характеризуется созданием молекулярных моделей этих важнейших структур ядра, изучением роли отдельных компонентов хромосом в хранении и передаче наследственной информации.

Цитогенетические методы используются и для описания интерфазных клеток. Например, по наличию или отсутствию полового хроматина (тельца Барра, представляющих собой инактивированные X-хромосомы) можно не только определять пол индивидов, но и выявлять некоторые генетические заболевания, связанные с изменением числа X-хромосом.

Метод позволяет идентифицировать кариотип (особенность строения и число хромосом), путем записи кариограммы. Цитогенетическое исследование проводится у пробанда, его родителей, родственников или плода при подозрении на хромосомный синдром либо другое хромосомное нарушение.

В медицинской генетике имеют значение два основных типа кариотипирования:

- 1) изучение кариотипа пациентов
- 2) пренатальное кариотипирование - исследование хромосом плода

В период деления клеток на стадии метафазы хромосомы имеют более четкую структуру и доступны для изучения. Диплоидный набор человека состоит из 46 хромосом:

22 пар аутомосом и одной пары половых хромосом (XX — у женщин, XY — у мужчин). Обычно исследуют лейкоциты периферической крови человека, которые помещают в специальную питательную среду, где они делятся. Затем готовят препараты и анализируют число и строение хромосом. Разработка специальных методов окраски значительно упростила распознавание всех хромосом человека, а в совокупности с генеалогическим методом и методами клеточной и генной инженерии дала возможность соотносить гены с конкретными участками хромосом. Комплексное применение этих методов лежит в основе составления карт хромосом человека.

Цитологический контроль необходим для диагностики хромосомных болезней, связанных с анеуплоидией и хромосомными мутациями. Наиболее часто встречаются болезнь Дауна (трисомия по 21-й хромосоме), синдром Клайнфельтера (47 XXY), синдром Шершевского — Тернера (45 XO) и др. Потеря участка одной из гомологичных хромосом 21-й пары приводит к заболеванию крови — хроническому миелолейкозу.

Выявление многих наследственных заболеваний возможно еще до рождения ребенка. Метод пренатальной диагностики заключается в получении околоплодной жидкости, где находятся клетки плода, и в последующем биохимическом и цитологическом определении возможных наследственных аномалий. Это позволяет поставить диагноз на ранних сроках беременности и принять решение о ее продолжении или прерывании.

### **Экспресс-метод исследования X-полового хроматина в ядрах эпителия слизистой оболочки полости рта**

Перед взятием соскоба пациента просят обкусать зубами слизистую оболочку щеки и внутреннюю поверхность щеки протереть марлевой салфеткой. Эта

процедура необходима для удаления разрушенных клеток, где половой хроматин не выявляется. При помощи шпателя или предметного стекла, предварительно обработанного спиртом, проводят легкий соскоб слизистой оболочки щеки. Беловатый налет наносят тонким слоем на обезжиренное предметное стекло. Препарат окрашивают краской ацет-орсеин (уксусная кислота фиксирует клетки, орсеин хорошо окрашивает ядерные структуры), покрывают покровным стеклом, представляя краске равномерно распределяться по мазку. Большим пальцем придавливают покровное стекло к предметному, предварительно положив на покровное стекло фильтровальную бумагу. Препарат рассматривают под микроскопом (90×). В поле зрения видны эпителиальные клетки слизистой оболочки полости рта с хорошо окрашенными ядрами. В ядрах половой хроматин располагается около внутренней ядерной оболочки в виде полулуния, зубчика, треугольника. Половой хроматин следует учитывать в клетках с неповрежденным ядром. Подсчет полового хроматина ведут на 100 клеток. В 100 соматических клетках здоровых женщин X-половой хроматин выявляется в 40-60% ядер.

Определение X- и Y-хроматина часто называют методом экспресс-диагностики пола. Исследуют клетки слизистой оболочки ротовой полости, вагинального эпителия или волосяной луковицы. В ядрах клеток женщин в диплоидном наборе присутствуют две хромосомы X, одна из которых полностью инактивирована (спирализована, плотно упакована) уже на ранних этапах эмбрионального развития и видна в виде глыбки гетерохроматина, прикрепленного к оболочке ядра. Инактивированная хромосома X называется половым хроматином или тельцем Барра. Для выявления полового X-хроматина (тельца Барра) в ядрах клеток мазки окрашивают ацетарсеином и препараты просматривают с помощью обычного светового микроскопа. В норме у женщин обнаруживают одну глыбку X-хроматина, а у мужчин её нет.

Для выявления мужского Y-полового хроматина (F-тельце) мазки окрашивают акрихином и просматривают с помощью люминисцентного микроскопа. Y-хроматин выявляют в виде сильно светящейся точки, по величине и интенсивности свечения

отличающейся от остальных хромоцентров. Он обнаруживается в ядрах клеток мужского организма.

Отсутствие тельца Барра у женщин свидетельствует о хромосомном заболевании — синдроме Шершевского-Тернера (кариотип 45, X0). Присутствие у мужчин тельца Барра свидетельствует о синдроме Кляйнфельтера (кариотип 47, ХХУ).

Определение Х- и Y-хроматина — скрининговый метод, окончательный диагноз хромосомной болезни ставят только после исследования кариотипа.

Просмотр демонстрационного препарата «Кариотип человека» в цитогенетической лаборатории.

При увеличении Х90 в поле зрения видны лейкоциты, которые имеют округлую форму, компактное округлой формы темноокрашенное ядро, окруженное широким ободком светлоголубой цитоплазмы. Среди них найдите хромосомы, лежащие вне клеток в виде скопления — метафазная пластинка. Найдите метацентрические, субметацентрические и акроцентрические хромосомы.

### **Анализ кариотипа у больных с хромосомными болезнями (по фотографиям)**

№ 1. трисомия по 13 хромосоме (синдром Патау). Кариотип 47, +13.

№ 2. трисомия по 18 хромосоме (синдром Эдвардса). Кариотип 47, +18.

№ 3. трисомия по 21 хромосоме (болезнь Дауна). Кариотип 47, +21.

№ 4. делеция короткого плеча одной из хромосом 5 пары (синдром «кошачьего крика»). Кариотип 46, 5p-

№ 5. полисомия Х-хромосомы у женщин. Кариотип: 47, ХХХ или 48, ХХХХ

№ 6. полисомия Х-хромосомы у мужчин (синдром Кляйнфельтера). Кариотип: 47, ХХУ, 48, ХХХУ –

№ 7. моносомия по Х-хромосоме (синдром Шершевского – Тернера). Кариотип: 45, Х0.

Разобрать механизм возникновения транслокационной формы болезни Дауна (кариотип 46, 15<sup>+21</sup>).

Вопросы к лабораторной работе:

1 Назовите этапы цитогенетического анализа.

2 Принципы метода флюоресцентной гибридизации *in situ*.

3 Классификация хромосом человека по Денверской и Парижской классификации хромосом, запись кариотипа человека в норме и патологии.

4 Основные методы биохимического анализа, применяемые в генетике человека.

5 Задачи и этапы медико-генетического консультирования.

## Список использованных источников

1 Алехина, Г. П. Методы исследования генетики человека : учеб. пособие / Г. П. Алехина, М. С. Малахова; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Оренбург : Университет, 2012. - 210 с. : ил. - Библиогр.: с. 157. - ISBN 978-5-4417-0041-2

2 Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика : учебное пособие / И.Ф. Жимулев ; отв. ред. Е.С. Беляева, А.П. Акифьев. - Изд. 4-е, стереотип. 3-му. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2007. - 480 с. - ISBN 5-379-00375-3; 978-5-379-00375-3

3 Завалеева, С. М. Цитология и гистология: учеб. пособие / С. М. Завалеева; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Оренбург : Университет, 2012. - 217 с. : ил., фот. - ISBN 978-5-4417-0039-9.

4 Курчанов, Н.А. Генетика человека с основами общей генетики: руководство для самоподготовки / Н.А. Курчанов. - Санкт-Петербург : СпецЛит, 2010. - 64 с. : ил., табл., схем. - ISBN 978-5-299-00434-2

5 Медицинская биология и общая генетика : учебник / Р.Г. Заяц, В.Э. Бутвиловский, В.В. Давыдов, И.В. Рачковская. - 2-е изд., испр. - Минск : Вышэйшая школа, 2012. - 496 с. : ил., табл., схем. - ISBN 978-985-06-2182-5 ;

6 Рогожин, В. В. Практикум по биологической химии: учеб.-метод. пособие / В. В. Рогожин . - СПб. : Лань, 2006. - 256 с. : ил.. - Библиогр. в конце гл. - ISBN 5-8114-0679-7.