**Методы исследования генома животных и человека**

**Геном**

Геном — совокупность наследственного материала, заключенного в клетке организма. Геном содержит биологическую информацию, необходимую для построения и поддержания организма. Большинство геномов, в том числе геном человека и геномы всех остальных клеточных форм жизни, построены из ДНК, однако некоторые вирусы имеют геномы из РНК.

Хромосо́мы — [нуклеопротеидные](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%BE%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%B8%D0%B4%D1%8B) структуры в [ядре](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%BE%D0%B5_%D1%8F%D0%B4%D1%80%D0%BE) [эукариотической](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%83%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%82%D1%8B%22%20%5Co%20%22%D0%AD%D1%83%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%82%D1%8B) [клетки](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B0), в которых сосредоточена бо́льшая часть [наследственной](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D0%BB%D0%B5%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%8C) информации и которые предназначены для её хранения, реализации и передачи.

Геном человека состоит из 23 пар хромосом (в сумме 46 хромосом), где каждая хромосома содержит сотни генов, разделённых межгенным пространством: 22 пары аутосомных хромосом, а также пара половых хромосом X и Y. У человека мужской пол является гетерогаметным и определяется наличием Y хромосомы. Нормальные диплоидные клетки имеют 46 хромосом.

Различают клетки гаплоидные (с одинарным набором непарных хромосом), диплоидные (с парными хромосомами), полиплоидные и анеуплоидные (когда удвоение или утрата — нуллисомия, моносомия или трисомия — охватывает не весь геном, а лишь ограниченное число хромосом). Полиплоидию не следует путать с увеличением количества ядер в клетке и увеличением числа молекул ДНК в хромосоме.

**Гены**

Ген  — структурная и функциональная единица [наследственности](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D0%BB%D0%B5%D0%B4%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%8C) живых [организмов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9E%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B7%D0%BC)

Количество генов в геноме человека составляет около 28.000. Число генов человека ненамного превосходит число генов у более простых организмов, например, круглого червя или мухи. Так происходит из-за того, что в человеческом геноме широко представлен альтернативный сплайсинг. Альтернативный сплайсинг позволяет получить несколько различных белковых цепочек с одного гена. Большинство человеческих генов имеют множественные экзоны и интроны, которые часто оказываются значительно более длинными, чем граничные экзоны в гене. Гены неравномерно распределены по хромосомам. Каждая хромосома содержит богатые и бедные генами участки. Эти участки коррелируют с хромосомными бендами (полосы поперёк хромосомы, которые видно в микроскоп) и с CG-богатыми участками. В настоящий момент значимость такого неравномерного распределения генов не вполне изучена.

**Регуляторные последовательности**

В человеческом геноме найдено множество различных последовательностей, отвечающих за регуляцию гена. Под регуляцией понимается контроль построения матричной РНК по участку молекулы ДНК. Обычно это короткие последовательности, находящиеся либо рядом с геном, либо внутри гена. Иногда они находятся на значительном расстоянии от гена (энхансеры). Систематизация этих последовательностей, понимание механизмов работы, а также вопросы взаимной регуляции группы генов группой соответствующих ферментов на текущий момент находятся только на начальной стадии изучения. Взаимная регуляция групп генов описывается с помощью сетей регуляции генов. Изучение этих вопросов находится на стыке нескольких дисциплин: прикладной математики, высокопроизводительных вычислений и молекулярной биологии. Знания появляются из сравнений геномов различных организмов и благодаря достижениям в области организации искусственной транскрипции гена в лабораторных условиях.

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

Генетический анализ – совокупность методов исследования наследственных свойств организма, определяемых его генотипом. Анализ элементов генотипа – групп сцепления, генов и внутригенных структур – осуществляется обычно по фенотипу. Генетический анализ является по существу анализом признаков, контролируемых генотипом.

В зависимости от задач и особенностей изучаемого объекта генетический анализ проводят на популяционном, организменном, клеточном и молекулярном уровнях. К основным методам генетического анализа относятся: гибридологический, близнецовый, биохимический, цитогенетический, молекулярно-генетический, популяционно-статистический и др.

Наиболее удобные для генетических исследований биологические объекты (муха дрозофила, горох, дрожжи, бактерии и др.) имеют целый ряд особенностей, которые позволяют проводить гибридизацию и последующий анализ потомства: скрещивание в искусственных условиях, достаточно высокая плодовитость, быстрая смена поколений, небольшое число групп сцепления в геноме, незначительные изменения признаков под влиянием окружающей среды.

**ГИБРИДОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД**

Гибридологический метод – это анализ характера наследования признаков с помощью системы скрещиваний, суть которых состоит в получении гибридов и анализе их потомков в ряду поколений (анализ расщепления).

Особенности метода:

1. Подбор исходных родительский пар (гомозиготы с четкими альтернативными признаками);
2. Получение гибридов и последующее их скрещивание между собой;
3. Количественный учет потомков, различающихся по отдельным признакам в ряду последовательных поколений 9результаты скрещивания оцениваются статистически – математический анализ).

**ПРИНЦИПЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

Методы диагностики медицинской генетики, в том числе и лабораторные, широко применяются с 50-х годов XX века. Это связано с прогрессом клинической биохимии, цитологии, цитохимии, иммунологии гематологии.

В настоящее время в медицинской генетике используется целый ряд специальных методов исследования. Они позволяют установить роль наследственных факторов в возникновении заболевания, изучить его этиологию и патогенез, разработать способы диагностики и профилактики отягощенной наследственной патологии.

Наследственные болезни многочисленны и многообразны, большинство из них встречаются крайне редко. Поэтому специалист должен знать общие принципы диагностики наследственных болезней.

Человек представляет собой довольно трудный объект для исследования.

Биологические особенности человека:

1. Позднее половое созревание (12-15 лет)
2. Медленная смена поколений (20-25 лет)
3. Моноплодная беременность (исключение – близнецы)
4. Продолжительный срок беременности
5. Особенности кариотипа (большое число групп сцепления – 24 у мужчин, 23 у женщин) и генотипа (около 30 тысяч структурных генов, гетерозиготность по многим генам)
6. Большое количество разнообразных мутаций
7. Фенотипический полиморфизм

Социально-этические особенности:

1. Малочисленное потомство у одной пары родителей
2. Недопустимость направленных искусственных скрещиваний в интересах исследователя
3. Невозможность создания одинаковых условий жизни для всех людей

При диагностике наследственных болезней нужно помнить, что на первый взгляд ненаследственное заболевание может быть осложнением или скрытой патологией. Например, хроническая пневмония может быть проявлением муковисцидоза.

Чтобы не пропустить наследственное заболевание, нужно придерживаться следующего порядка:

1. Специфические признаки наследственных болезней – нарушение роста, скелета, пропорций отдельных частей тела. Важный элемент их выявления – антропометрия.
2. Очевидные признаки – врожденные или изолированные пороки развития.
3. Признаки нарушения эмбрионального развития – микроаномалии.
4. Дополнительные признаки – нарушение течения беременности, малая подвижность плода, мало- и многоводие, внутриутробная задержка развития плода.

**ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД**

Генеалогический метод (метод составления родословных) позволяет проследить наследование признаков (нормальных и патологических ) в ряду поколений с указанием родственных связей между членами родословной. Он включает в себя два этапа:

1. Составление родословной на основании сведений, полученных от пробанда, с использованием специальных символов (обозначения Юста);
2. Анализ родословной (определение типа наследования, генотипов всех членов родословной, прогнозирование проявления признака у потомства).

Родословные имеют характерный вид. Который определяется особенностями типа наследования: аутосомное и сцепленное с полом, доминантное и рецессивное. Каждый тип наследования имеет свои специфические особенности.

Анализ основан на генетических закономерностях моногенного наследования менделирующих признаков. Менделирующий признак альтернативен, дискретен, детерминирован наличием своего аллеля, прослеживается по поколениям и подчиняется законам расщепления.

Генеалогический метод является эквивалентом гибридологического, который модифицирован в соответствии с социальными и биологическими особенностями человека. Он используется в медико-генетическом консультировании, для определения сцепленного наследования, пенетрантности генов и т.д.

**БЛИЗНЕЦОВЫЙ МЕТОД**

Метод заключается в изучении наследования признаков в парах монозиготных и дизиготных близнецов.

При использовании близнецового метода проводится сравнение:

1) монозиготных (однояйцевых) близнецов — МБ с дизиготными (разнояйцевыми) близнецами — ДБ;

2) партнеров в монозиготных парах между собой;

3) данных анализа близнецовой выборки с общей популяцией.

Близнецовый метод используется для выяснения:

1. Относительной роли генотипа и среды в развитии фенотипических особенностей человека;
2. Пенетрантности (проявляемости) и экспрессивности (степени выраженности) гена, отвечающего за тот или иной признак;
3. Нормы реакции отдельных признаков, т.е. модификационной изменчивости.

Для определения роли наследственности и среды в развитии признаков исследуют отдельно группы МЗ и ДЗ близнецов и определяют процент конкордантных пар (**конкордантность** – идентичность, наличие одного и того же признака в паре близнецов) по отдельным признакам, а затем вычисляют коэффициент наследуемости Н в процентах или долях единицы по формуле немецкого генетика Хольцингера.

При Н ˃0,7 преобладает действие наследственных факторов.

При Н ˂0,5 преобладает средовой фактор.

При Н=0,5-0,7 равноценное действие среды и генотипа.

**Наследуемость (в долях единицы) некоторых признаков человека**

|  |  |
| --- | --- |
| Признак | Наследуемость |
| Телосложение  | 0,81 |
| Вес  | 0,78 |
| Рост в положении сидя  | 0,76 |
| IQ по Бине (коэффициент интеллекта) | 0,68 |
| Вербальные способности | 0,68 |
| Орфографические способности | 0,53 |
| Скорость постукивания ногой | 0,50 |
| Способности к истории и литературе | 0,45 |
| Способности к естественным наукам | 0,34 |
| Арифметические способности | 0,12 |

**ДЕРМАТОГЛИФИЧЕСКИЙ МЕТОД**

Дерматоглифика – раздел морфологии, изучающий папиллярные линии и узоры.

Предмет исследования – гребневая кожа, имеющаяся на ладонных и подошвенных поверхностях кистей рук и стоп. Принято считать, что в формировании рисунков кожи на ладонях и стопах принимают участие все гены человека. Признаки дерматоглифики наследуются по полигенному типу. В этом случае не соблюдается принцип «один ген – один признак», каждый признак гребневой кожи контролируется группой генов. Причем каждый ген может участвовать в нескольких разных группах для контроля разных признаков. Поэтому каждый ген так или иначе проявляет свои особенности в рисунках гребневой кожи.

Диагностика заболеваний по кожным узорам основана на выявлении у данного пациента признаков дерматоглифики, наиболее часто встречающихся у людей, страдающих данной патологией. Таким способом можно определить зиготность близнецов, идентифицировать личность, определить отцовство, а также выявить около 100 наследственных заболеваний.

**ПОПУЛЯЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД**

Чтобы посмотреть, как изменяются частоты генотипов и генов в последующих поколениях, используется закон Харди-Вайнберга. В бесконечно большой популяции диплоидных организмов частоты генов остаются неизменными из поколения в поколение. Генотипы удовлетворяют соотношению, имеющему вид пропорции:

PMM : PMN : PNN = p2 : 2pq : q2

Буква P обозначает частоту встречаемости соответствующего генотипа; p и q – частоты встречаемости генов M и N в генофонде популяции.

С помощью закона Харди-Вайнберга можно вычислить частоту встречаемости как гомозигот, так и гетерозигот в популяции. Это становится важным, когда заболевание у человека обусловлено редким рецессивным геном. Как известно, редкие аллели присутствуют в популяции главным образом в гетерозиготном состоянии.

В медицинской генетике популяционно-статистический метод используется при изучении наследственных болезней населения, частоты нормальных и патологических генов, генотипов и фенотипов в популяциях различных местностей, стран и городов. Кроме того, этот метод изучает закономерности распространения наследственных болезней в разных по строению популяциях и возможность прогнозировать их частоту в последующих поколениях.

**ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД**

Иммуногенетический метод включает в себя серологические реакции, иммуноэлектрофорез и др. Их используют для изучения групп крови человека, белков и ферментов сыворотки крови и тканей. С его помощью можно установить иммунологическую несовместимость, выявить иммунодефицит, мозаицизм близнецов и др.

Один из наиболее информативных методов оценки степени взаимной иммунологической несовместимости является реакция смешанной культуры лимфоцитов. Ее суть заключается в том, что иммунокомпетентные клетки реципиента распознают клетки донора с помощью системы HLA («human leucocyte antigens», а в дословном переводе - «человеческие лейкоцитарные антигены»). Это  комплекс генов, обеспечивающих генетический контроль иммунного ответа и взаимодействие между собой клеток, которые реализуют этот ответ.

С помощью молекулярно-генетических методик ежегодно открываются новые аллели генов HLA. Для определения совместимости пациента и донора кроветворных клеток по системе HLA используется дорогостоящий молекулярно-генетический метод, как наиболее точный и надежный, позволяющий исключить какие-либо лабораторные ошибки и обеспечить наибольшую совместимость. Обязательно учитывается этническая принадлежность пациента. Широко применяются компьютеризированные методы генетической обработки данных. Все это способствует повышению ранней диагностической и особенно прогностической значимости иммуногенетических методов исследования.

Широко внедряется в практику методология биочиповых исследований. На фрагменты ДНК наносятся специальные меченые зонды, они в дальнейшем фиксируются лабораторными роботами (чип-райтерами) на стеклянные или бумажные подложки. Затем их сканируют специальными устройствами (чип-ридерами) при лазерном облучении. Так получается аллельный портрет фрагмента генома человека. Эта методика позволяет получить полную информацию о различных генетических системах, кодирующих структуру иммунологически значимых белков.

Иммуногенетические методы применяются также и для лечения бесплодных браков.

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

 Применяются в медико-генетических консультациях.

Позволяют выявить:

1. Этиологию болезни – выявление мутации у обследуемого индивида.
2. Первую ступень патогенеза – первичный продукт патологического гена.
3. Вторичные изменения патогенеза – регистрация изменений обмена в процессе реализации мутантного первичного продукта или его отсутствии.

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД**

— микроскопическое изучение структуры хромосом. Позволяет выявить числовые и структурные изменения. Для исследования кариотипа человека используют культуру клеток периферической крови – лимфоцитов, а также костного мозга и фибробластов. Для исследования кариотипа плода используют клетки ворсин хориона и клетки, выделенные из амниотической жидкости.

Исследование кариотипа человека проводят с помощью образца периферической крови (1-2 мл). Оно включает в себя 3 этапа:

1. Культивирование клеток
2. Окраска препарата
3. Микроскопический анализ препарата

Методы цитогенетического исследования бывают прямые и непрямые. Объект исследования при любом способе – хромосомы в стадии метафазы митоза.

Прямые методы используются в основном для изучения клеток костного мозга и опухолевых клеток. После стернальной пункции клетки помещают в питательную среду, добавляют колхицин, который останавливает деление клеток на стадии метафазы. Клетки инкубируют 2-3 часа при 27°С, затем готовят препараты хромосом.

При непрямом методе проводится культивирование клеток. После забора образец крови помещают в питательную среду, добавляют фитогемагглютинин, стимулирующий процесс деления клеток. Помещают культуру в термостат при 37°с на 72 часа. За 2 часа до окончания добавляют колхицин.

Окраска препаратов осуществляется простыми, дифференциальными и флюоресцентными методами.



Простая окраска позволяет распределить хромосомы по группам, определить их количество.

Дифференциальное окрашивание позволяет выявить особенности структуры хромосом. Для обозначения вида окраски используется система трехбуквенного обозначения, включающая основной метод окраски, вариант предварительной обработки препарата хромосом и название красителя (GTG, RHG, QFQ и т.д.). Структуры, выявляющиеся по длине хромосом в соответствии с типом окраски, называют Q-, G-, C-, R-сегментами.

Способы:

1. **G-окраска** (от англ. Giemsa – Гимза) выявляется благодаря предварительной обработке хромосомных препаратов слабым раствором протеолитического фермента трипсина и последующей окраске красителем Гимзы. При этом наблюдается полосатая исчерченность хромосом, где темные полосы в некоторой степени соответствуют гетерохроматиновым районам, а светлые – эухроматиновым. G-окраска имеет свою кодировку (GTG) по международной цитогенетической номенклатуре.
2. **Q-окраска** (от англ. Quinacrine – акрихин) выявляется на хромосомах в виде чередования ярко- и темнофлюоресцирующих полос с помощью флуоресцентной микроскопии хромосомных препаратов, окрашенных такими флюорохромами (флуоресцентными красителями) как производные акридина – акрихин дигидрохлорид (атебрин) или акрихин-иприт. Эти красители обладают способностью присоединяться к ДНК путем интеркаляции или с помощью внешних ионных сил. Q-окраска имеет свою кодировку (QFQ) по международной цитогенетической номенклатуре.

По числу, величине и расположению выявляющихся сегментов рисунок G-окраски аналогичен рисунку при Q-окраске, где темно окрашенные G-сегменты соответствуют флюоресцирующим Q-сегментам. Различия состоят в том, что:

а) несветящиеся гетерохроматиновые центромерные сегменты в хромосомах 1 и 16 хорошо прокрашиваются красителем Гимзы;

б) ярко флюоресцирующие при Q-окраске сегменты 3, 4, 13 – 15, 21, 22 и Y-хромосом не выделяются особой интенсивностью при G-окраске. На G-окрашенных метафазных хромосомах выделяется около 320 сегментов на гаплоидный геном.

1. **R-окраска** (от англ. Reverse – обратная) отличается противоположностью рисунка G-окраске. Темноокрашенными здесь являются эухроматиновые участки хромосом, а светлыми – гетерохроматиновые. Существует несколько модификаций метода R-окраски, и каждый из них имеет кодировку по международной цитогенетической номенклатуре. Наиболее приемлемой является обработка препаратов Ba(OH)2 с прогреванием их при 60°С и последующей отмывкой в дистиллированной воде и окрашиванием раствором красителя Гимзы. Кодировка R-окраски, полученной таким способом, – RHG.
2. **С-окраска** (от англ. Constitutive heterohromatin – конститутивный гетерохроматин) выявляется в виде вариабельных по величине темноокрашенных сегментов конститутивного гетерохроматина в прицентромерных районах хромосом, в то время как эухроматиновые участки хромосом прокрашиваются очень бледно. Методы получения С-окраски могут варьировать, но важным условием является предварительная обработка препаратов щелочью с последующей двухчасовой инкубацией препарата в двукратном стандартном солевом растворе при 65 °С. В качестве щелочных растворов обычно применяют гидрат окиси бария или натрия. Окраску препаратов производят красителем Гимзы. С-окраска имеет свою кодировку (GBG) по международной цитогенетической номенклатуре.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД**

Появляются новые высокоинформативные методы изучения хромосом человека. Главный из них на сегодняшний день – флюоресцентная гибридизация (FISH-метод). Этот метод дает возможность проводить гибридизацию метафазных хромосом с различными ДНК-зондами, мечеными флюоресцирующими веществами. Зонды – это клонированные последовательности или выделенные участки ДНК.

Чаще используют ДНК центромерных или перицентромерных районов.

Метод позволяет выявить различные типы структурных хромосомных перестроек, а также провести точный генетический анализ: точки разрывов при транслокациях, делециях, инверсиях и т.д. При необходимости можно использовать большое число ДНК-зондов и таким образом прокрасить хромосому почти целиком. Такая модификация FISH-метода называется супрессорная гибридизация.

FISH-метод может применяться для диагностики анеуплоидий в интерфазных ядрах. В онкогенетике используется метод сравнительной геномной гибридизации, когда ДНК пациента сравнивается с контрольными препаратами хромосом. В пренатальной диагностике используют ДНК-зонды, меченые разными цветами, это позволяет более быстро и эффективно провести анализ количественных и структурных перестроек.

**БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД (ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ)**

Играет важнейшую роль в диагностике наследственных болезней. Он позволяет проводить доклиническую диагностику, подтверждать диагноз, если клиническая картина атипична, выявлять гетерозиготных носителей, дифференцировать разные формы болезней и начинать лечение на ранних стадиях заболевания.

Массовые просеивающие и селективные диагностические программы используют в медико-генетическом консультировании для первичной диагностики риска рождения больного ребенка. Показания: возраст предполагаемых родителей (35 лет женщине и 45 и выше у мужчин), наличие наследственной патологии в семье, повторные произвольные аборты, мультифакториальные заболевания – сахарный диабет, эпилепсия; определение в крови беременных женщин концентрации α-фетопротеина. Широко внедряется диагностика гетерозиготного носительства в практику; в настоящее время можно определить около 200 гетерозиготных состояний.

Используются современные биохимические методы: электрофорез, хроматография, спектроскопия. А также применяются современные высокоточные технологии: жидкостная хроматография, масс-спектроскопия, магнитно-резонансная спектрометрия, тонкослойная хроматография мочи и крови, газовая хроматография, бомбардировка быстрыми нейтронами. Для исследования берутся ферменты, белки, различные метаболиты (нормальные или измененные) в крови, моче, изменение количества которых наблюдается при некоторых энзимопатиях.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

В эту группу входят методы ДНК-диагностики. С их помощью можно изучать структуру участков ДНК-гена или участка хромосомы, диагностировать многие заболевания. Основа метода – научные данные о строении молекул ДНК и РНК, генах, закономерностях наследования признаков.

В основе анализа ДНК лежат два момента:

1. Последовательность аминокислот в ДНК каждого человека индивидуальна (кроме однояйцевых близнецов и клонов);
2. Во всех соматических клетках организма ДНК совершенно одинакова.

**Прямая ДНК-диагностика**

Применяется, когда известен ген, ответственный за возникновение наследственного заболевания, и основные типы его мутаций. Это высокоточный метод (100%). Используется при таких заболеваниях, как муковисцидоз, фенилкетонурия, хорея Гентингтона и др.

Один из методов ДНК-диагностики – ПЦР – полимеразная цепная реакция. Позволяет обнаружить и многократно копировать (амплифицировать) короткие участки ДНК. Метод как бы имитирует на определенном участке гена естественный процесс репликации ДНК. Для проведения реакции нужно точно знать нуклеотидную последовательность этого фрагмента ДНК. ПЦР включает в себя несколько этапов:

1. Денатурация двойной спирали ДНК-матрицы при t 95°С.
2. Гибридизация (отжиг) одноцепочечной ДНК-матрицы и праймеров при t 45-60°С. При этом праймеры распознают комплементарные участки ДНК.
3. Образование новых цепей при t 65-72°С с участием ДНК-полимеразы, т.е. гибридизация. При этом количество исследуемого гена удваивается.

Затем ДНК опять нагревают, и процесс повторяется снова. Происходит множественное копирование одноцепочечных молекул. Число таких циклов составляет от 25 до 40. Процесс идет в автоматическом режиме на специальных программируемых приборах.

В дальнейшем исследуются конкретные особенности амплифицированного гена. Можно четко определить патологические участки гена.

**Косвенная ДНК-диагностика**

Используется для диагностики таких наследственных болезней, ген которых либо неизвестен, либо находится на определенном узком участке определенной хромосомы, но типичные патологические изменения для него еще не установлены. Фрагменты ДНК больного сравниваются с таковыми у его родственников. Методы эти трудоемки, требуют длительного времени, дорогостоящи. Для их проведения нужны несколько членов семьи из 2-3 поколений. Неприменимы для спонтанных случаев заболевания. Достоверность их ниже. Преимущество – возможность диагностировать практически все наследственные заболевания, вызванные изменением гена.

**Другие методы молекулярной генетики:**

1. Метод секвенирования – определение нуклеотидной последовательности ДНК. Таким методом полностью определена последовательность нуклеотидов генов глобина, инсулина, гормона роста, пролактина и др.
2. Метод получения праймеров, соответствующих известным генам.
3. Метод гибридизации нуклеиновых кислот.
4. Метод клонирования ДНК.
5. Метод получения рекомбинантных молекул ДНК.
6. Метод получения белков с помощью рекомбинантных молекул ДНК.
7. Создание библиотеки генов – полного набора (коллекции) клонированных фрагментов ДНК, полученных в результате рестрикции тотальной ДНК.

Методы молекулярной генетики позволяют:

—идентифицировать мутации в гене. Пример выявления мутантного гена – диагностика серповидно-клеточной анемии.

—выявить моногенное наследственное заболевание путем определения нуклеотидной последовательности генов (гемофилия) и выявления мутантных генов (фенилкетонурия).

—определять индивидуальную изменчивость ДНК человека – идентификацию личности.

—выделять и синтезировать гены (один из этапов генной инженерии).

**МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ**

Основной целью медико-генетического консультирования (МГК) является предупреждение рождения ребенка с тяжелыми наследственными заболеваниями. МГК может проводиться на разных этапах онтогенеза: плод, ребенок, взрослый.

—обследование вступающих в брак;

—обследование беременных (пренатальная диагностика с использованием инвазивных и неинвазивных методов обследования), выявление гетерозиготных родителей;

—обследование ребенка после рождения.

Наиболее эффективным является **проспективное** консультирование – риск рождения больного ребенка определяется до наступления беременности или в ранние ее сроки. Показания: кровное родство родителей, отягощенная наследственность, воздействие вредных факторов на родителей до наступления беременности. **Ретроспективное** консультирование проводится после рождения больного ребенка относительно здоровья будущих детей.

**Генетические исследования до наступления беременности**

Генетик на консультации собирает данные о состоянии здоровья супругов, проводит их осмотр. Он также тщательно изучает родословную, генеалогическое древо с описанием родственных связей, состояние здоровья родственников. При этом он задает вопросы об их возрасте и заболеваниях, причинах смерти и возрасте смерти. Генетик опрашивает, анкетирует. Как правило, сбор анамнеза начинается с бабушки и дедушки по материнской линии. Специалист учитывает все  бесплодные браки, выкидыши, аборты для диагностики пороков развития плода. При желании можно пройти исследование хромосомного набора будущих родителей. У них берут кровь, выделяют из нее лимфоциты, стимулируют их в пробирке, чтобы они начали делиться, обрабатывают колхицином для остановки процесса деления клеток на стадии метафазы, когда видны хромосомы. Генетик исследует под микроскопом 11–13 клеток на предмет выявления изменений хромосомного набора.

**Генетические исследования во время беременности**

Во время беременности один из главных методов выявления нарушений в развитии –внутриутробное обследование – его проводят ультразвуком – либо биохимические исследования.

При УЗИ плод сканируют, этот метод абсолютно безвреден и безопасен.

При проведении биохимических исследований — у беременной берется кровь, определяют биохимические маркеры. Вышеперечисленные манипуляции называют неинвазивными методами.  Инвазивные, в отличие от вышеназванных, предполагают медицинское «вторжение» в полость матки: таким образом специалисты берут материал для исследования, чтобы наиболее точно определить кариотип плода. Это такие методы, как биопсия хориона, амниоцентез, плацентоцентез и кордоцентез. Забор клеток проводят из плаценты,  околоплодных вод, крови из пуповины плода. Это опасный метод исследования, поэтому проводят его только по строгим медицинским показаниям. Например, если мать носитель гена гемофилии, а пол будущего ребенка — мужской. Инвазивные методы исследований проводятся только под ультразвуковым контролем и в дневном стационаре, поскольку после них женщина еще пару часов должна находиться под медицинским контролем.  Забор клеток из плаценты – биопсия хориона. Ее проводят на 9-12 неделях. Производят пункцию передней брюшной стенки. Процедура недлительная, результат готов на 3-4 день. Вероятность выкидыша после проведения процедуры – 2%. Зато при выявлении генных патологий возможно прервать беременность на ранних сроках.  Взятие амниотической жидкости — амниоцентез — производится на 16-24 неделе. Это самый безопасный из инвазивных методов. Процент осложнений после него – 1%. А вот результата придется ждать очень долго, поскольку специалисты будут «растить» клетки, а на это потребуется время.  Пункция пуповины плода, забор пуповинной крови – кордоцентез – проводят на поздних сроках, 22-25 неделя. Очень точный метод исследования, срок анализа – до 5 дней.  Неинвазивные методы проводятся всем беременным женщинам, для инвазивных необходимы веские показания.