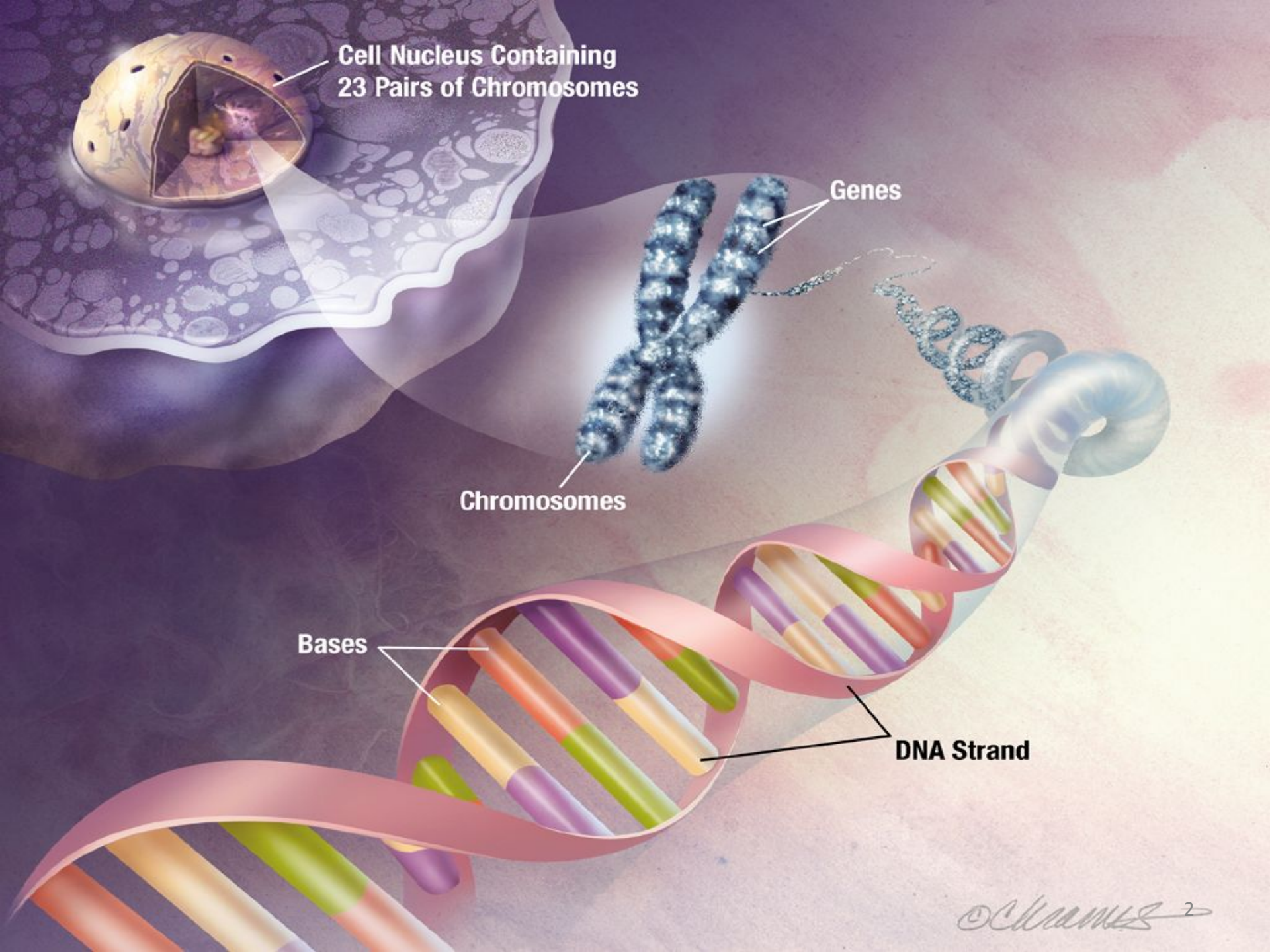


Wet Lab

Смирнов Арсений
Пензенцева Евгения





Cell Nucleus Containing
23 Pairs of Chromosomes

Genes

Chromosomes

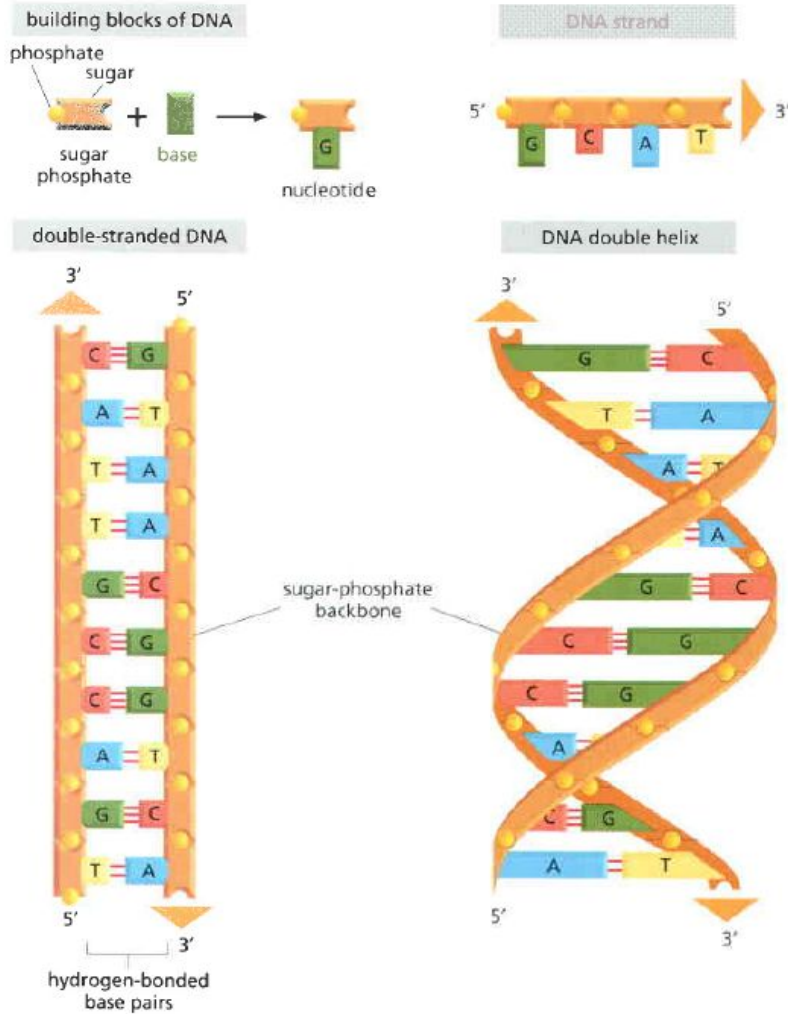
Bases

DNA Strand

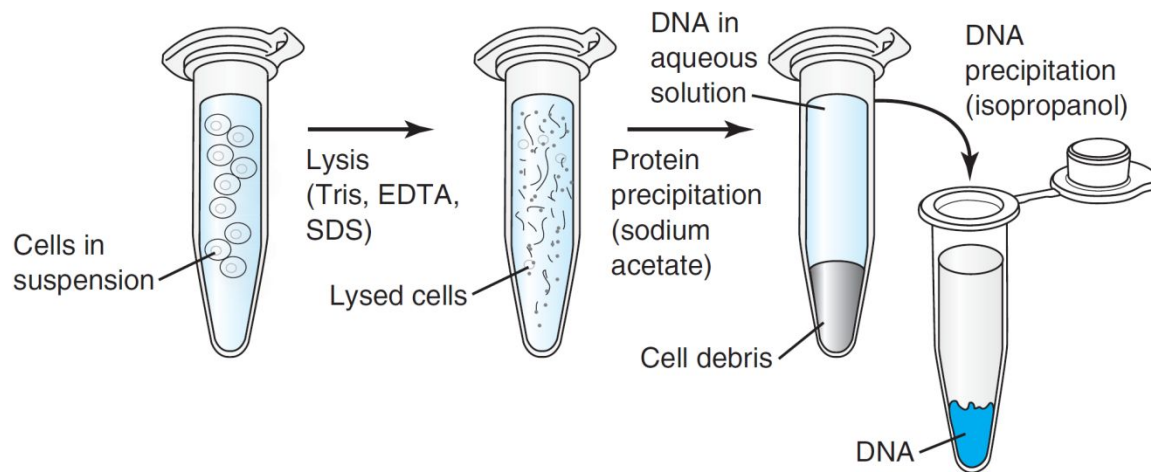
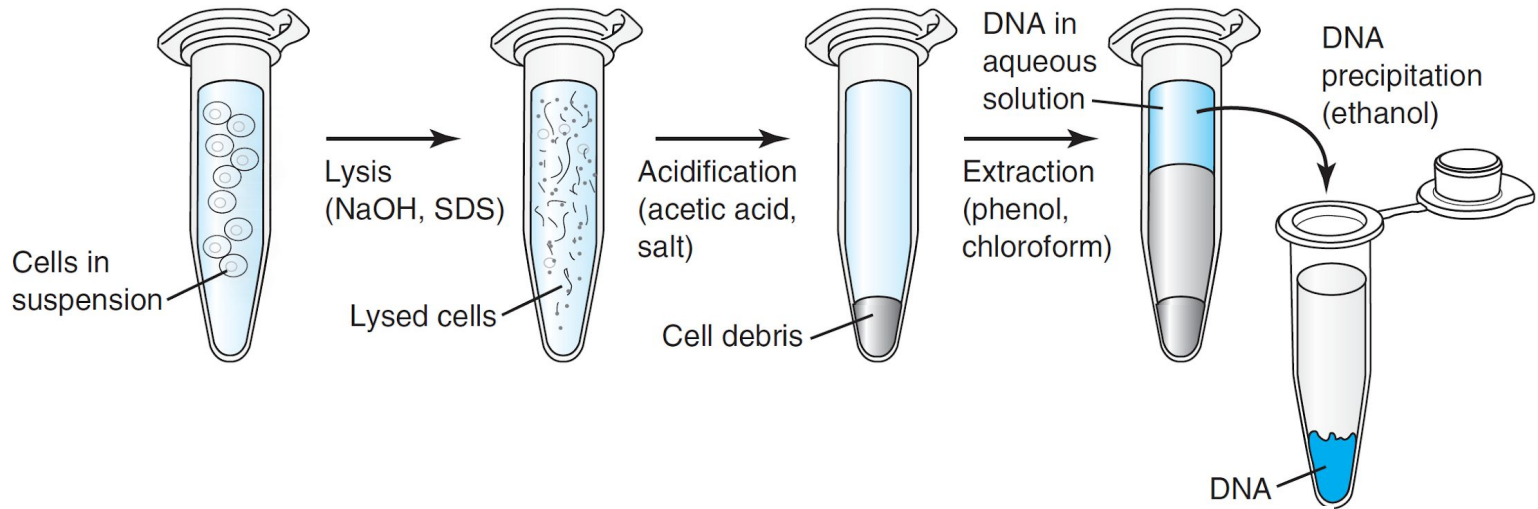
©Chambers 2

ДНК

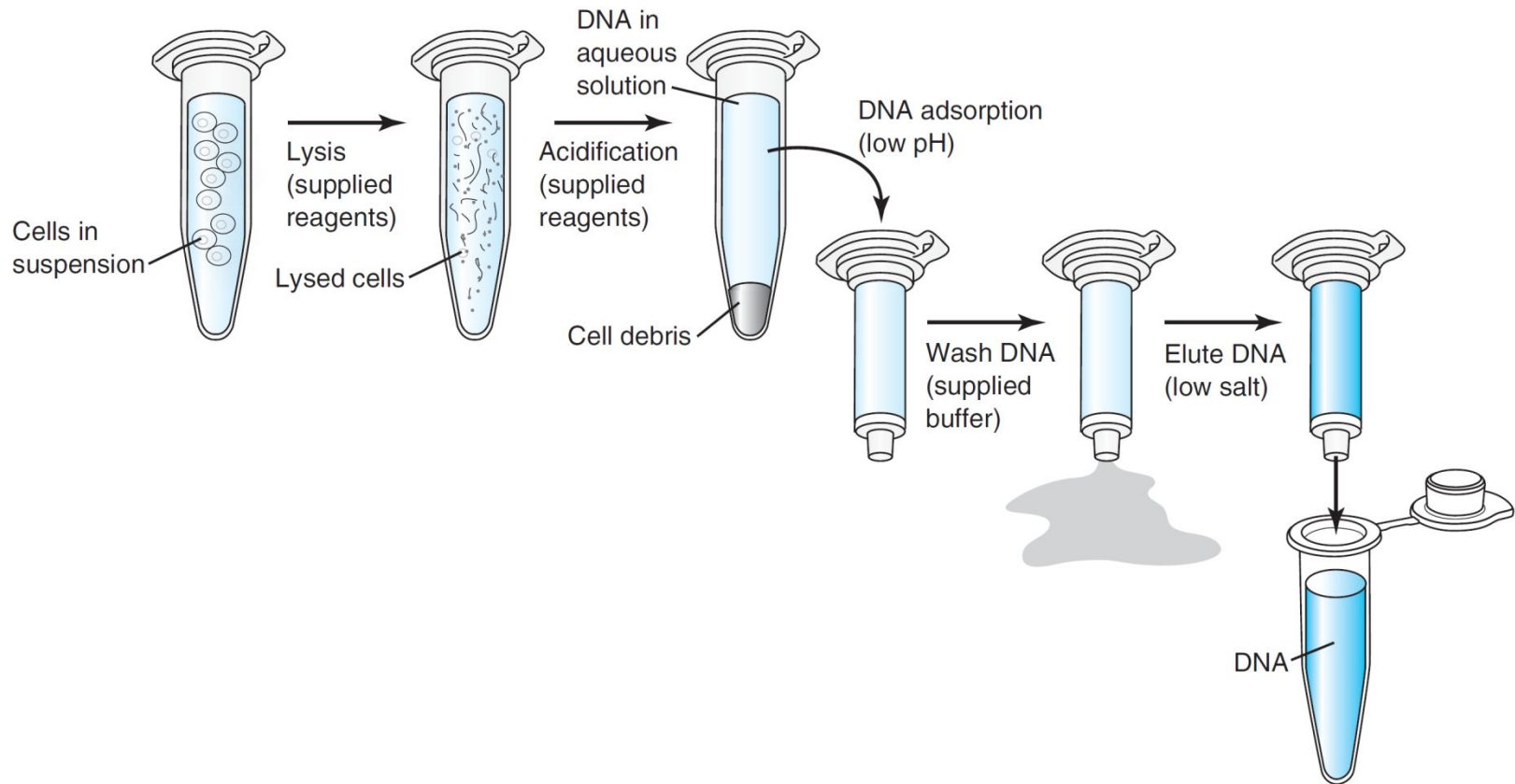
(4 нуклеотида: А, Т, G, С)



Выделение ДНК



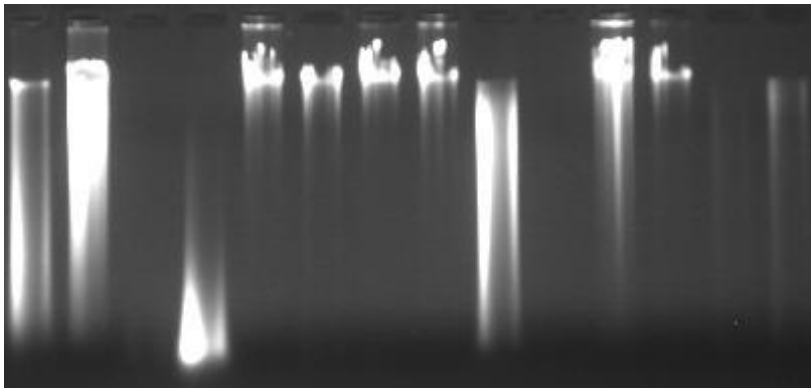
Выделение ДНК



Оценка качества и количества ДНК

- Электрофорез
- Спектрофотометрия
- Флуорометрия

элетрофорез



спектрофотометрия

$$C[\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times K$$

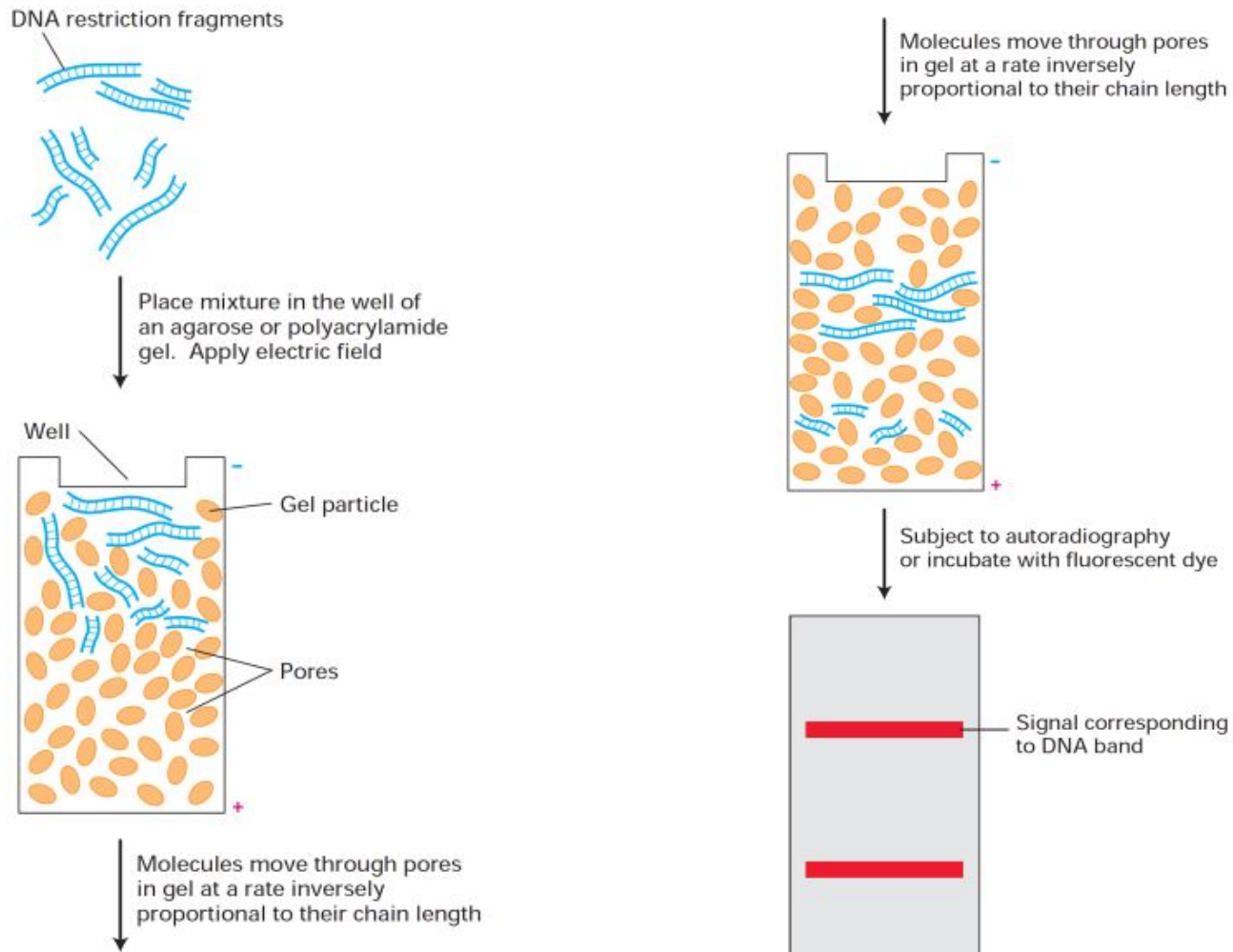
$$K (\text{dsDNA}) = 50$$

$$K (\text{ssDNA}) = 37$$

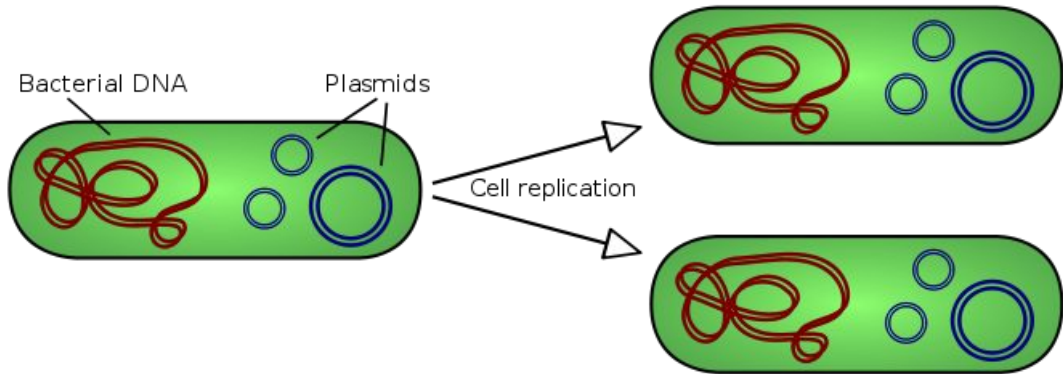
$$K (\text{ssRNA}) = 40$$

$$A_{260} / A_{280} = 1,8-1,9 \text{ – чистая ДНК}$$

Электрофорез

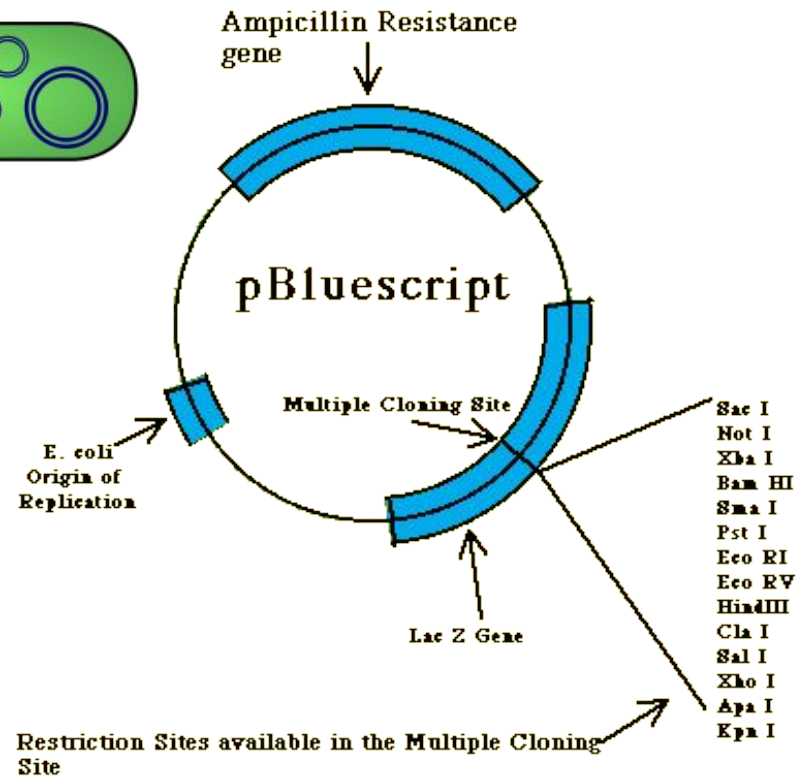


Плазмиды

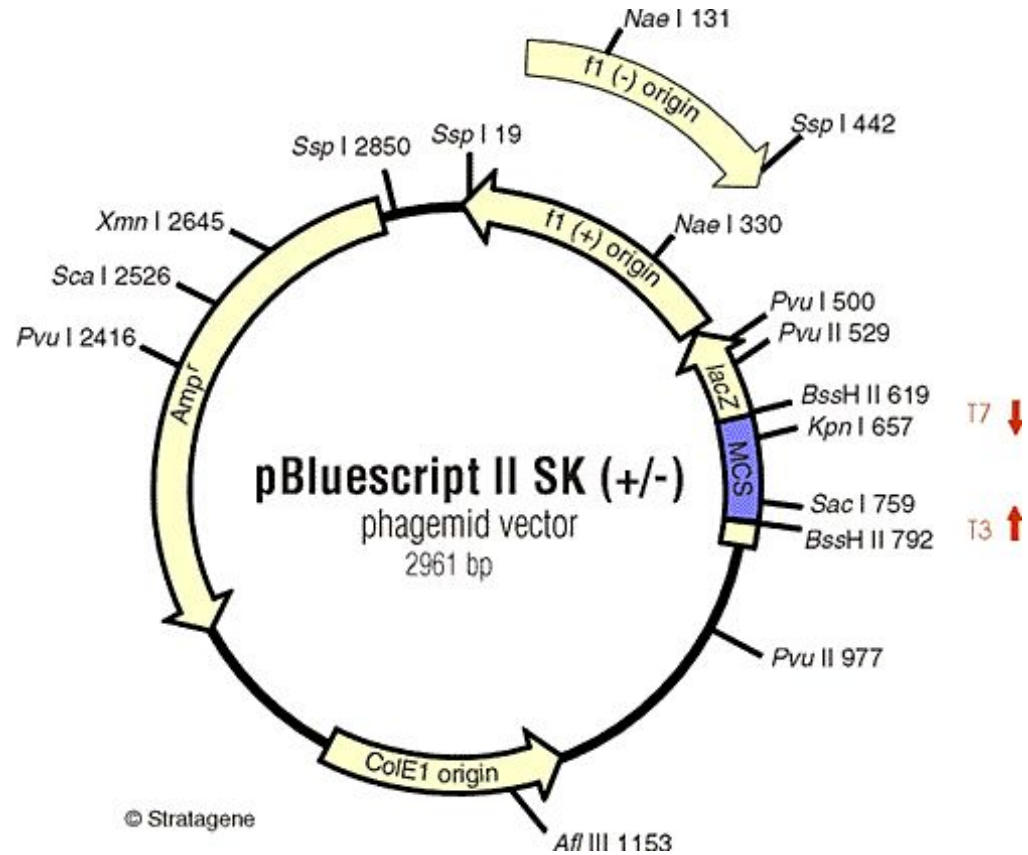


Состав вектора:

- Ориджин репликации
- Селективный маркёр
- Полилинкер



pBluescript II SK (+)



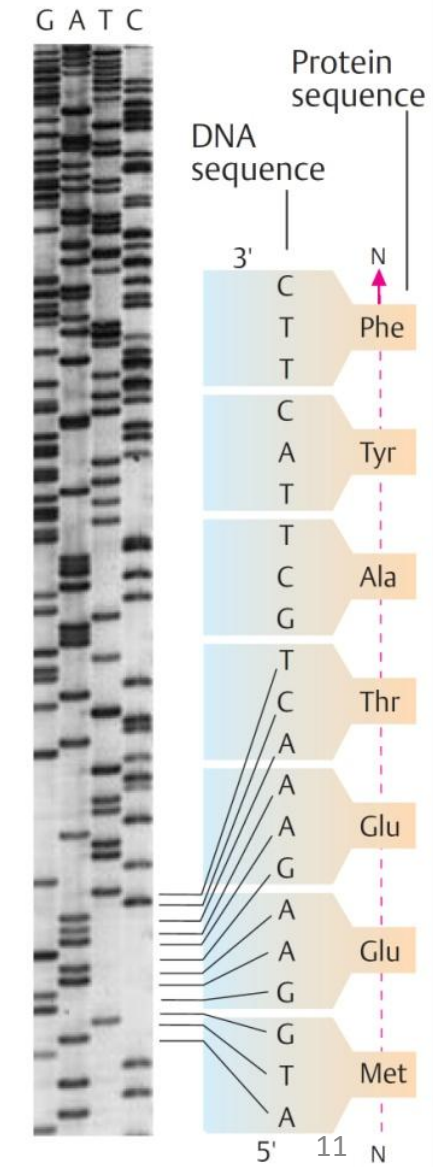
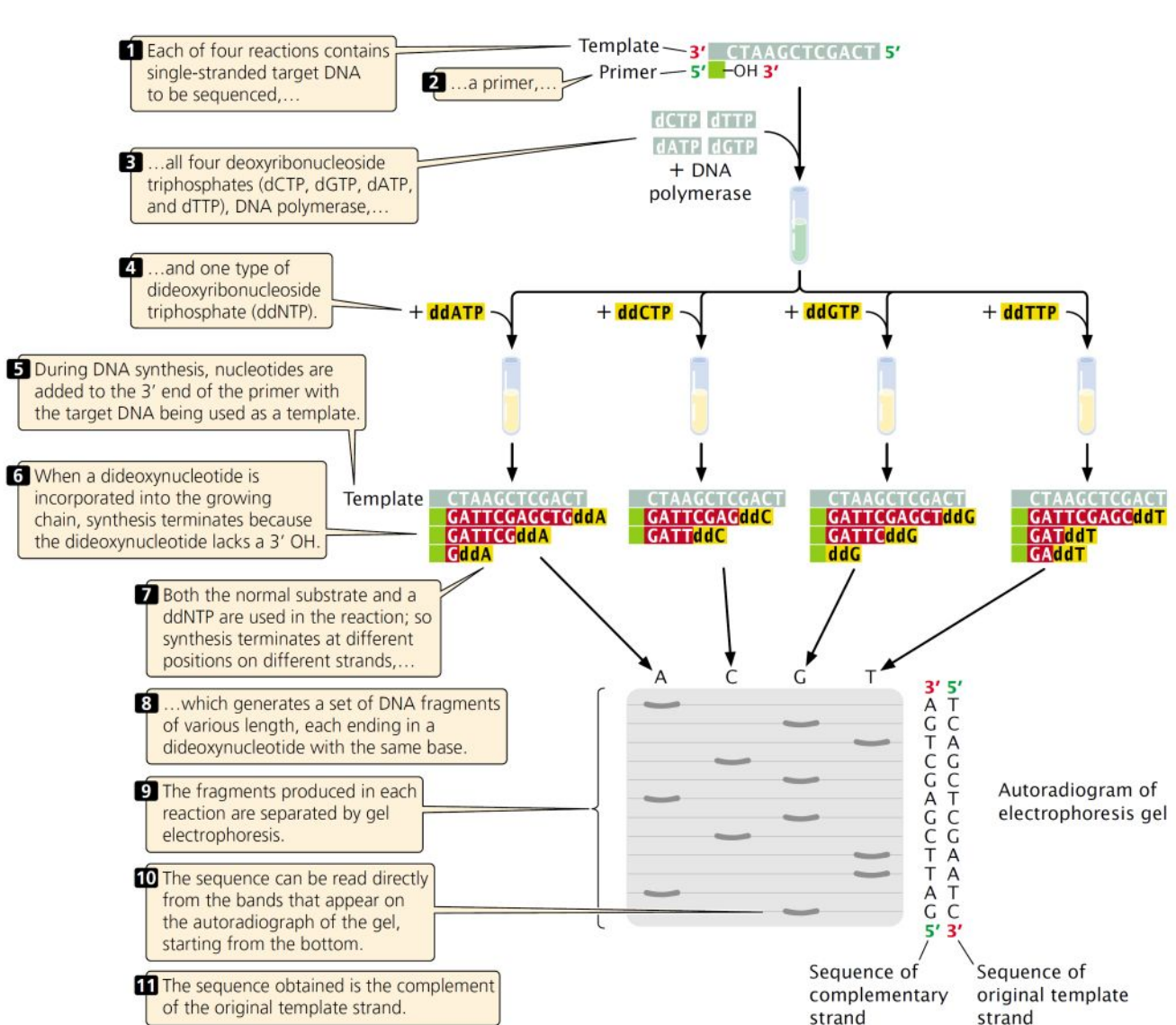
Севенирование ДНК

- прочтение последовательности

Классические методы:

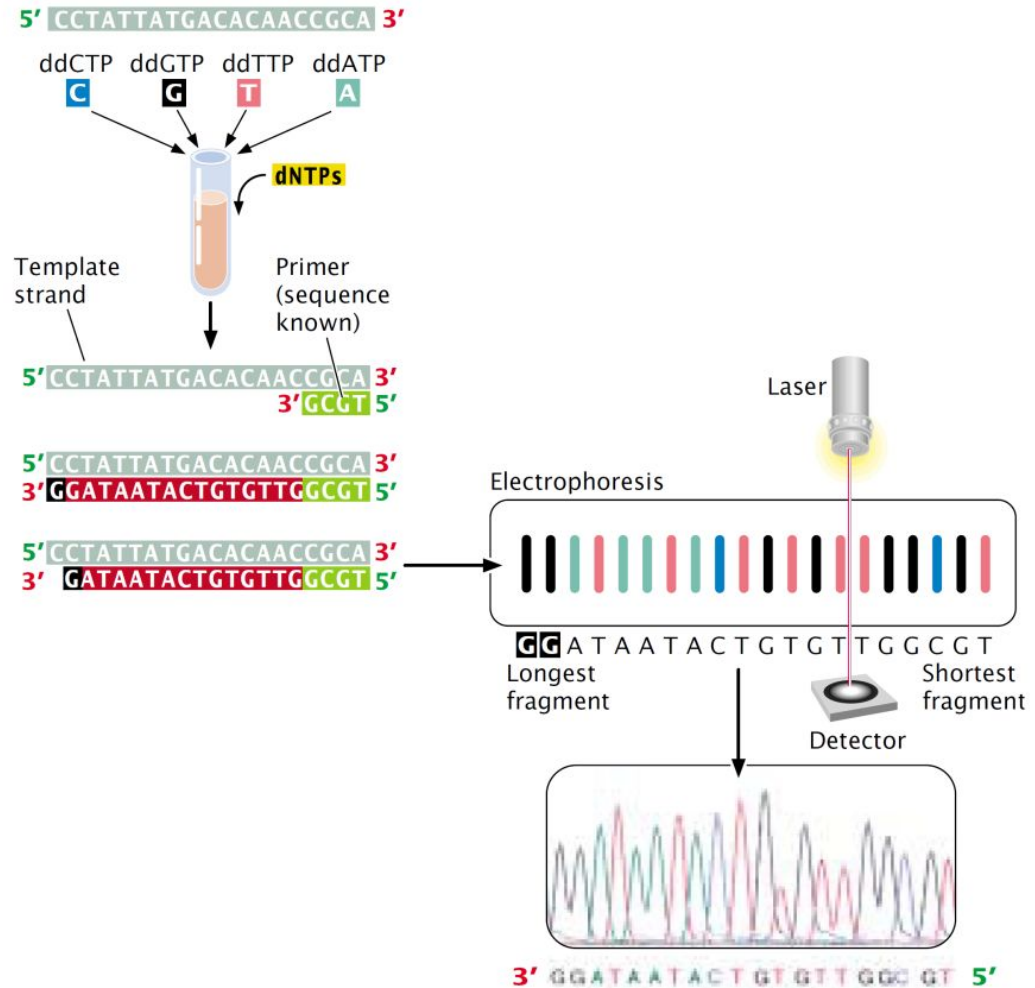
- Максам-Гилберт (химическое)
- Сэнгер (энзиматическое)

Секвенирование (Сэнгер)



Автоматическое секвенирование

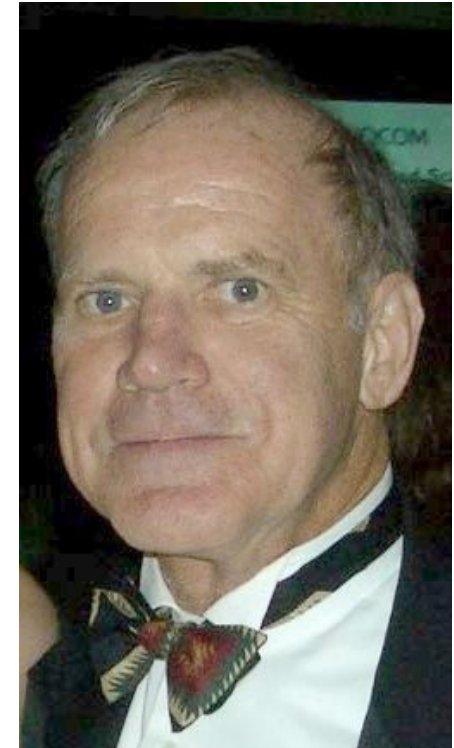
- 1 A single-stranded DNA fragment whose base sequence is to be determined (the template) is isolated.
- 2 Each of the four ddNTPs is tagged with a fluorescent dye, and the Sanger sequencing reaction is carried out.
- 3 The fragments that end in the same base have the same colored dye attached.
- 4 The products are denatured, and the DNA fragments produced by the four reactions are mixed and loaded into a single well on an electrophoresis gel. The fragments migrate through the gel according to size,...
- 5 ...and the fluorescent dye on the DNA is detected by using a laser beam and detector.
- 6 Each fragment appears as a peak on the computer printout; the color of the peak indicates which base the peak represents.
- 7 The sequence information is read directly into the computer, which converts it into the complementary—target—sequence.



Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

– метод, позволяющий избирательно синтезировать большие количества определённых фрагментов ДНК

- «Полимеразная» - используется фермент ДНК-полимераза
- «Цепная» - состоит из повторяющихся циклов, количество ДНК с каждым циклом увеличивается в геометрической прогрессии

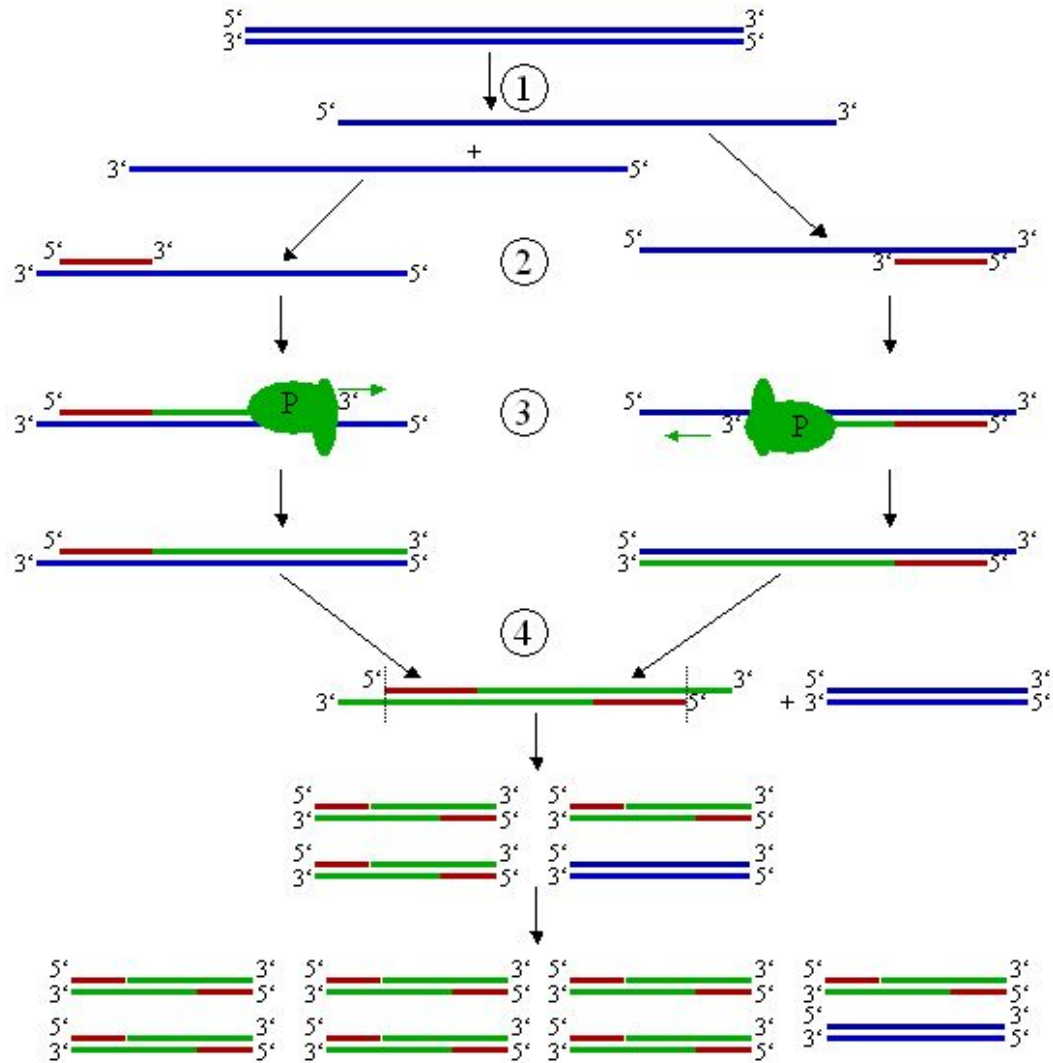


1983 г, Кэри Муллис

Компоненты ПЦР

	Праймеры	Определяют амплифицируемый участок	
	dNTP	«Строительный материал»	
Буфе	р	KCl	Моновалентные катион необходим для оптимальной гибридизации праймеров
		Tris	Поддержание оптимального для ферментативной реакции pH
		MgCl ₂	Бивалентный катион необходим для работы фермента
	Полимераза	Осуществляет синтез ДНК	
	Матрица	Анализируемый образец ДНК	

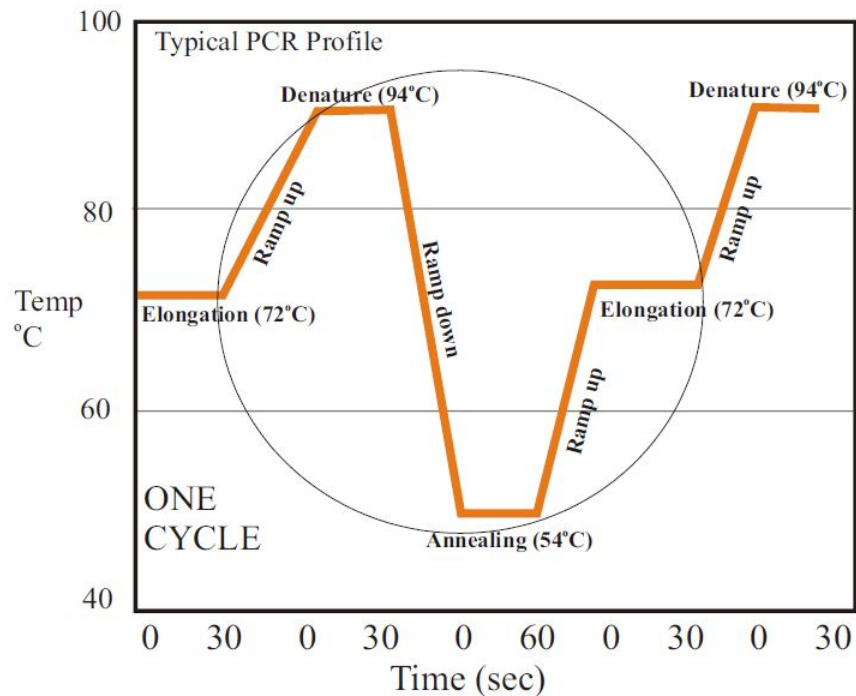
Суть ПЦР



Этапы ПЦР

25-50 циклов

Предварительная денатурация	~95°C	1-10 мин
Денатурация	~95°C	10-60 сек
Отжиг	50-70°C	10-60 сек
Элонгация	68-72°C	10-180 сек
Финальная элонгация	68-72°C	7-10 мин



Амплификаторы



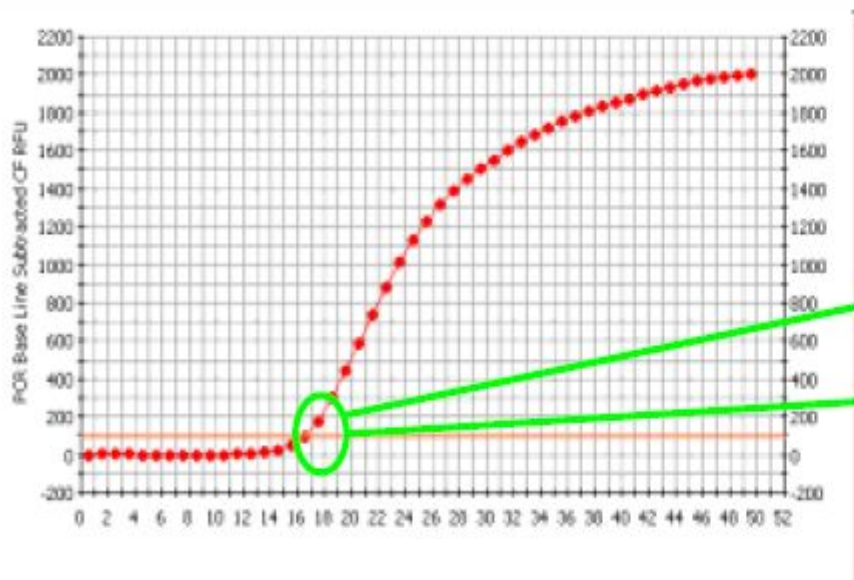
Термостатирование:

- твёрдый термоблок (элемент Пельтье)
- жидкость
- ПОТОК ВОЗДУХА

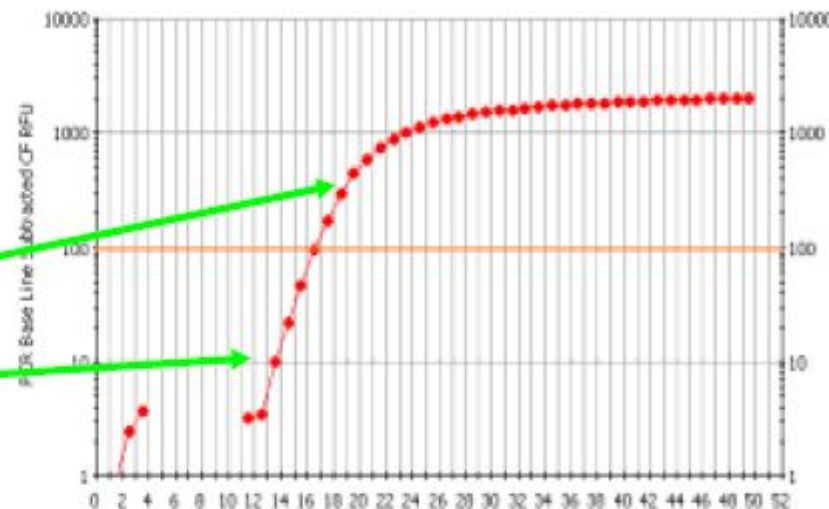
ПЦР в реальном времени (Real-time PCR)

- одновременная амплификация и измерение количества продукта
- наличие флюоресцентного красителя в смеси
- наличие оптического блока в амплификаторе

линейный



lg



Системы детекции

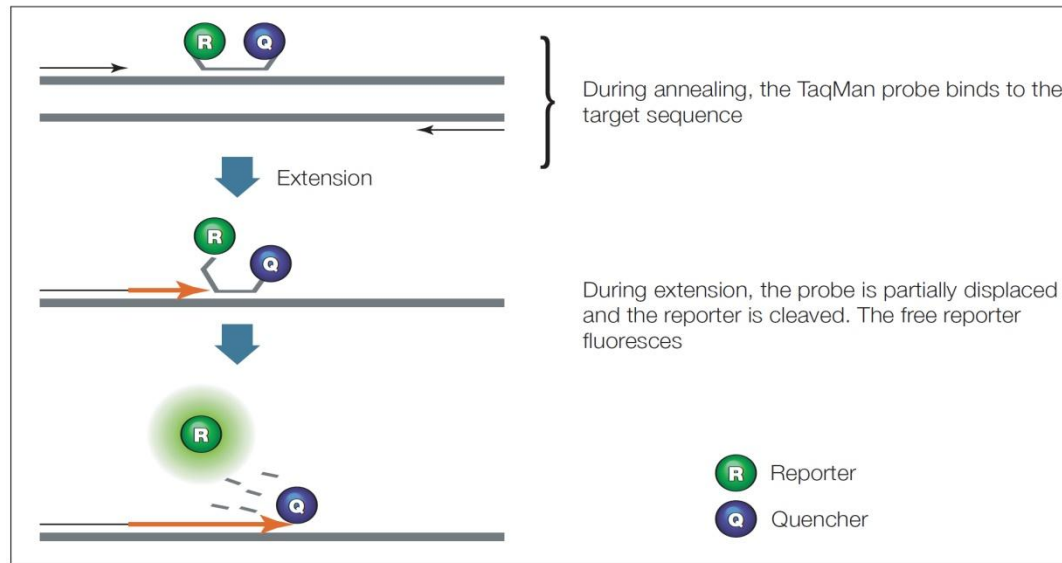
1. Неспецифичные

- интеркалирующие красители (SYBR Green и др.)

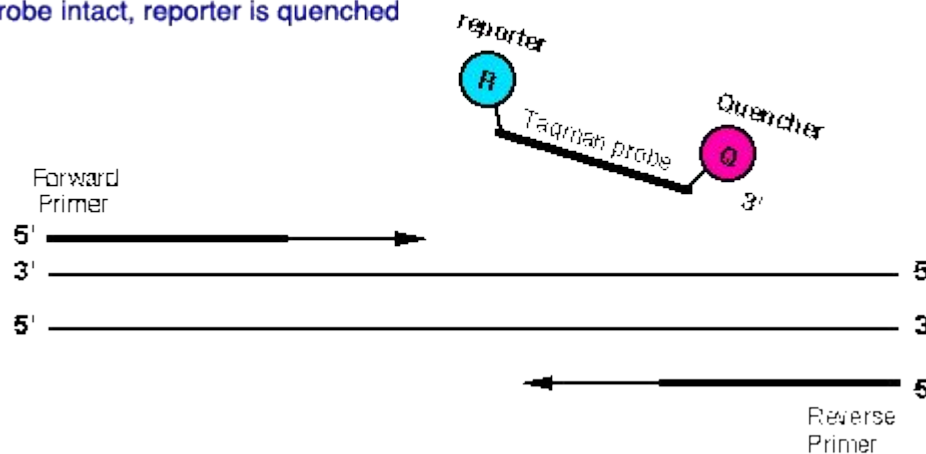
2. Специфичные

- линейные разрушаемые пробы (TaqMan)
- «молекулярные маячки» (beacons)
- примыкающие пробы

Линейные разрушаемые пробы (TaqMan = Taq-polymerase + Pac-Man)



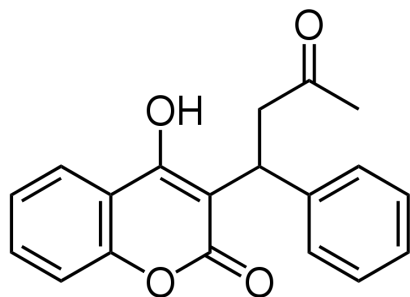
Probe intact, reporter is quenched



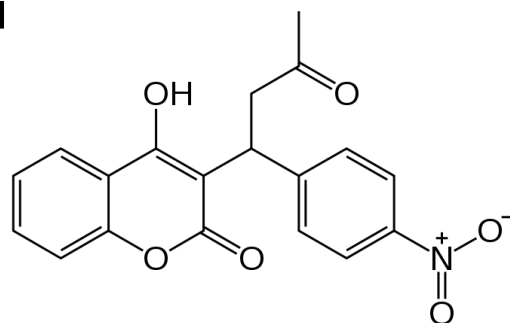
Фармакогенетика препаратов для лечения тромбозов

Непрямые антикоагулянты:

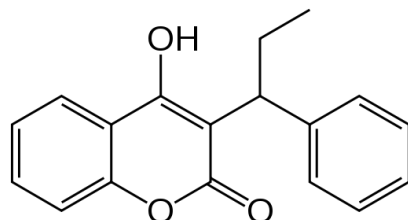
варфарин



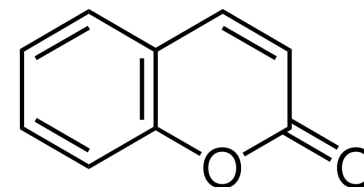
аценокумарол



фенпрокумон



кумарин



Заболевания, при которых назначают непрямые антикоагулянты:

- Венозные тромбозы
- Легочная тромбоэмболия
- Тромбоэмболические осложнения, связанные с мерцательной аритмией и трансплантацией сердечных клапанов
- Инфаркт миокарда: снижение риска смерти, повторного инфаркта миокарда и случаев тромбоэмболических осложнений

Нежелательные лекарственные реакции (НЛР) – кровотечения.

МНО (международное нормализованное отношение).

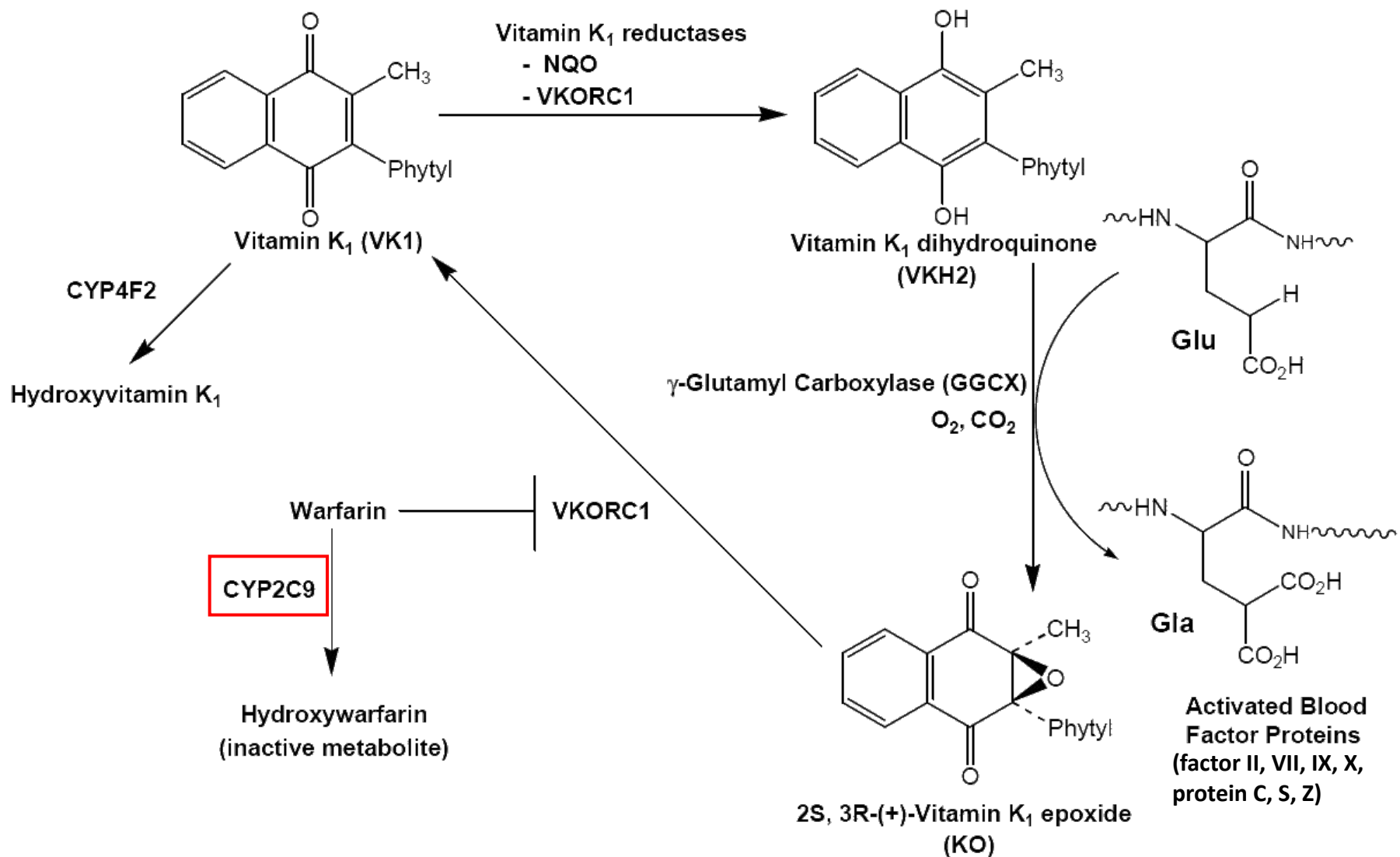
При применении варфарина частота кровотечений достигает 25%.

Факторы риска кровотечений при применении непрямых антикоагулянтов:

- Сопутствующие заболевания
- Применение других препаратов
- Нарушение дозировки
- **Индивидуальная чувствительность**

Непрямые антикоагулянты – антагонисты витамина K_1

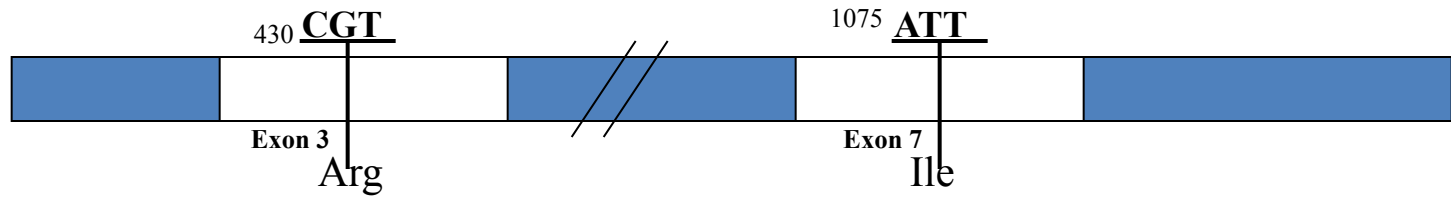
Метаболизм витамина K₁



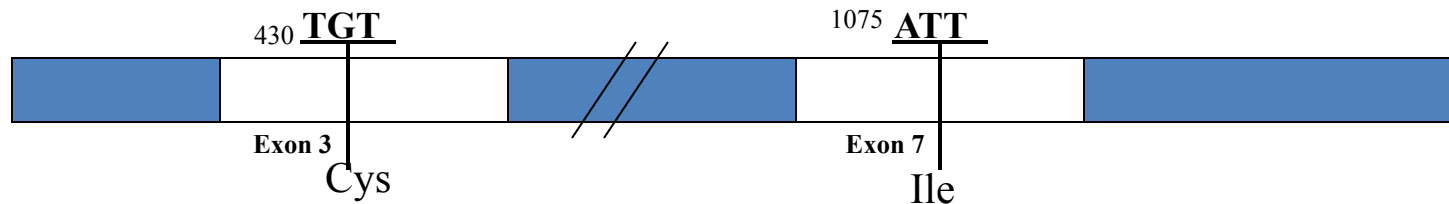
Полиморфизм гена *CYP2C9*

Аллельные варианты гена:

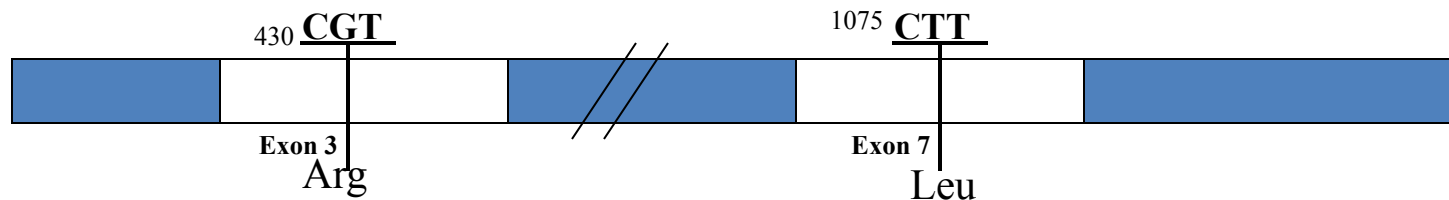
– *CYP2C9**1 – **нормальная** каталитическая активность



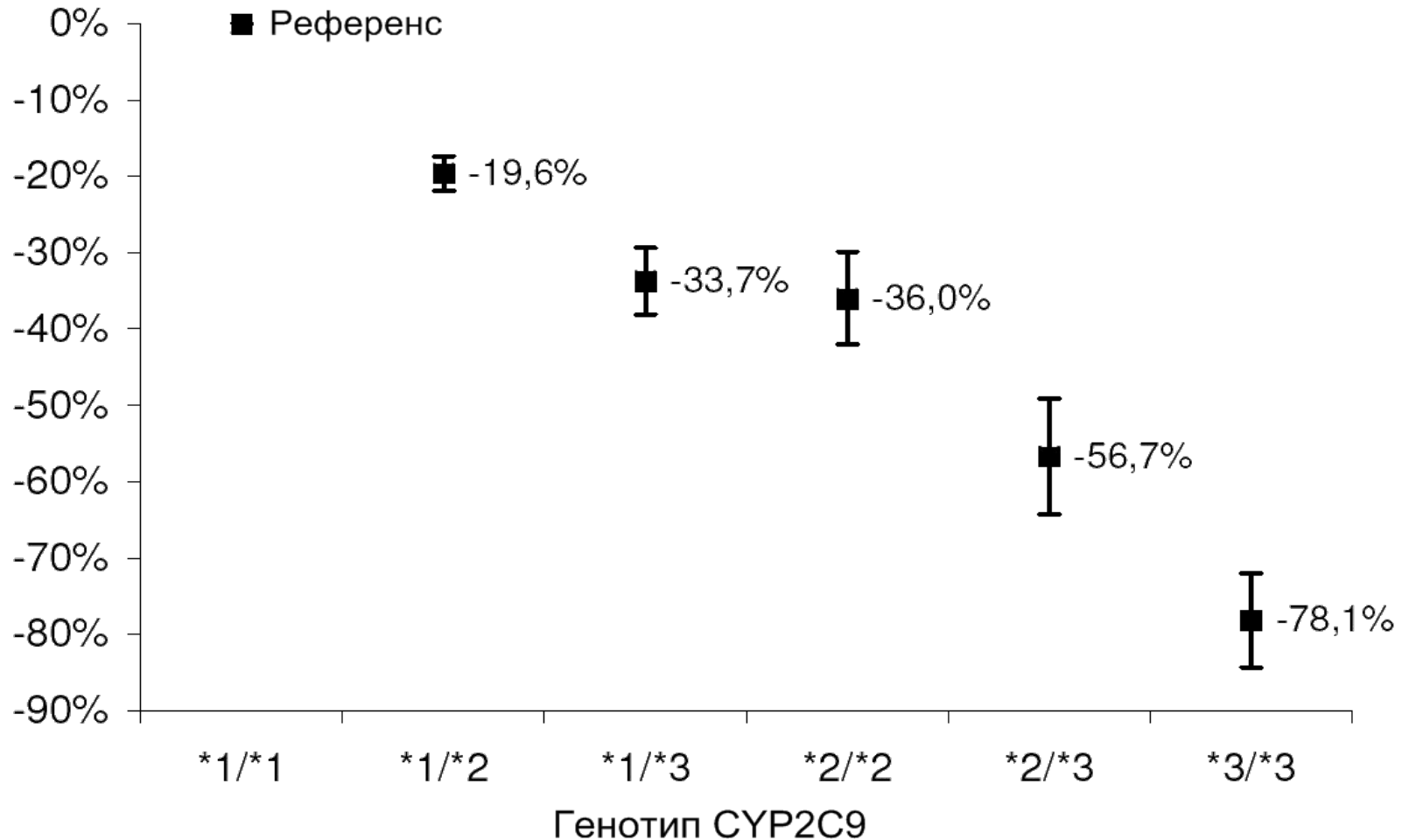
– *CYP2C9**2 (Arg144Cys) - **пониженная** каталитическая активность



– *CYP2C9**3 (Ile359Leu) – **выраженная пониженная** каталитическая активность



Снижение дозы варфарина в зависимости от генотипа CYP2C9 (Lindh et al., 2009)



Частоты аллелей в европейской популяции:
CYP2C9*2 – 10%, CYP2C9*3 – 6%