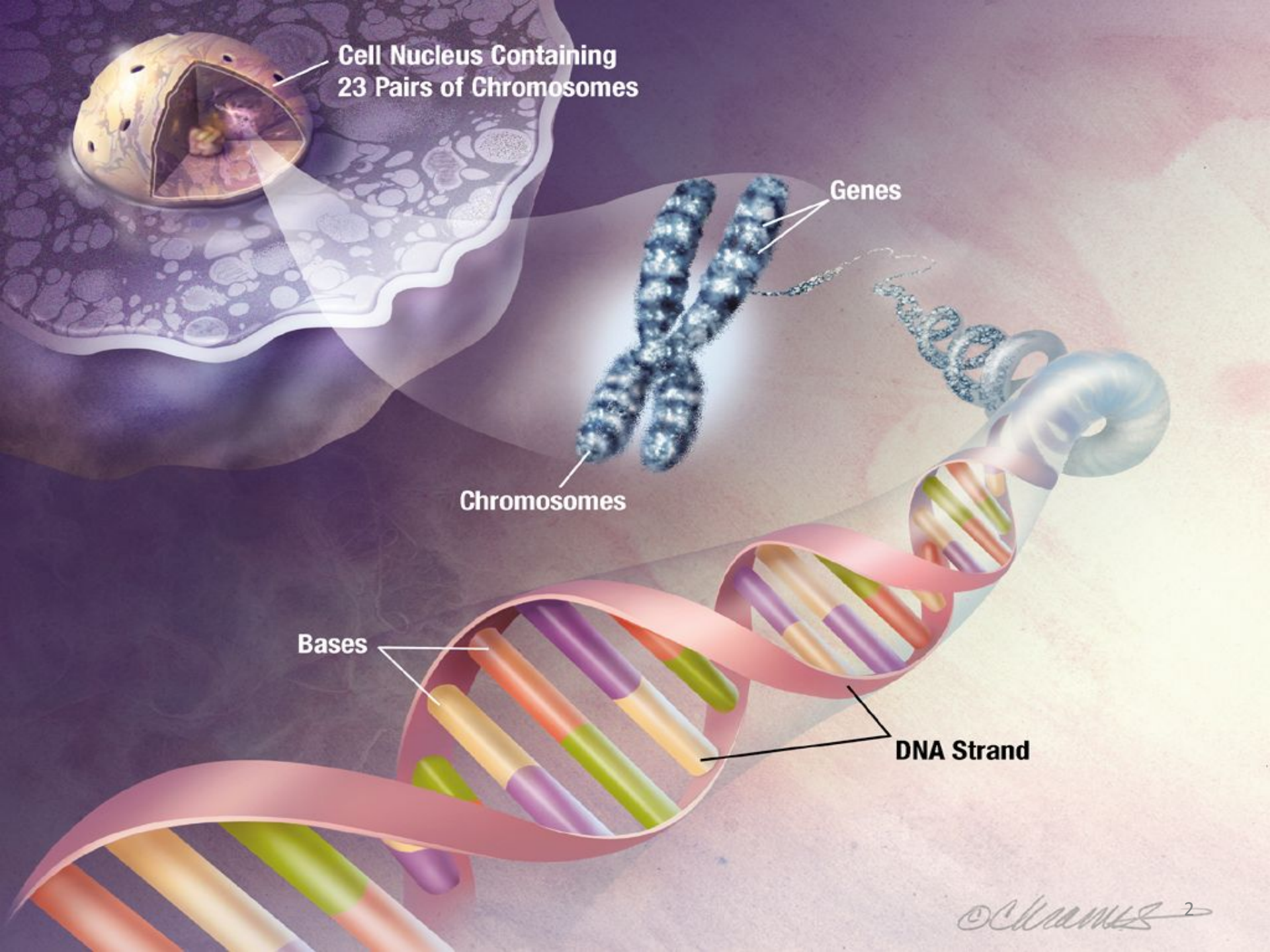
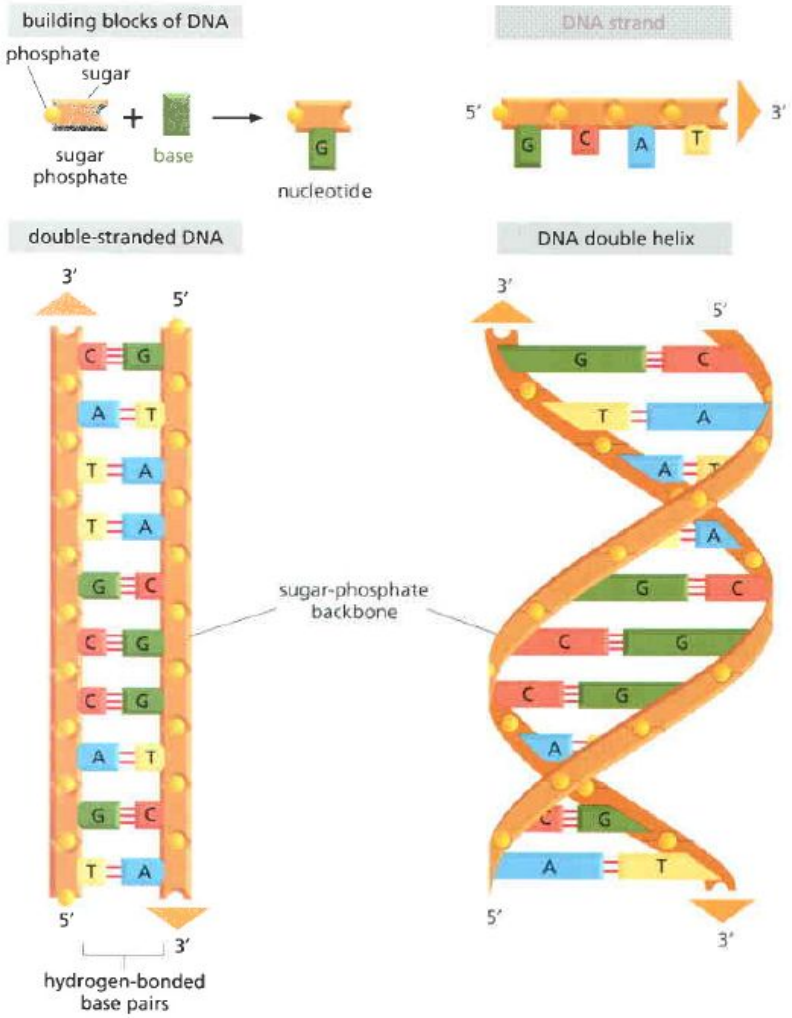
Wet Lab

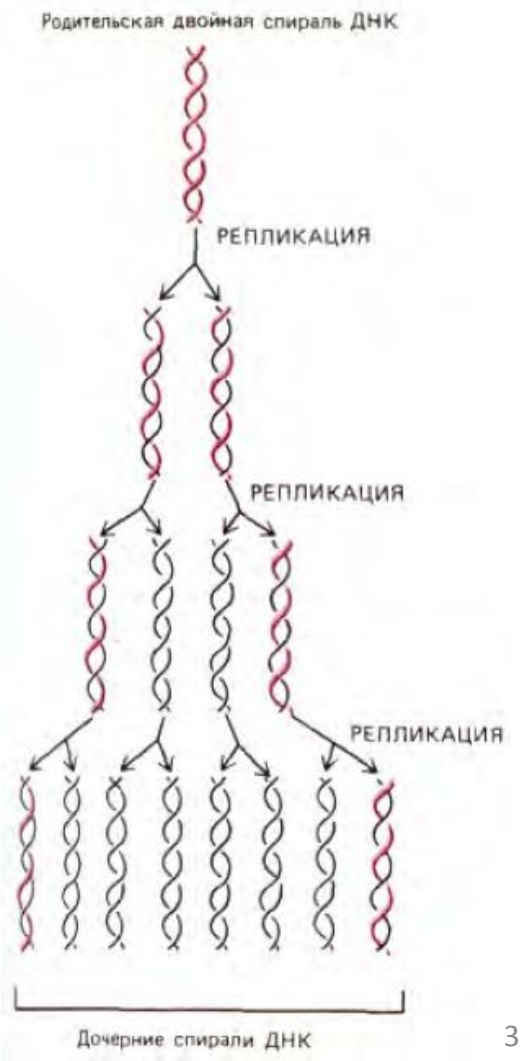
Смирнов Арсений
Пензенцева Евгения

ГРУППА КОМПАНИЙ
АЛКОР БИО

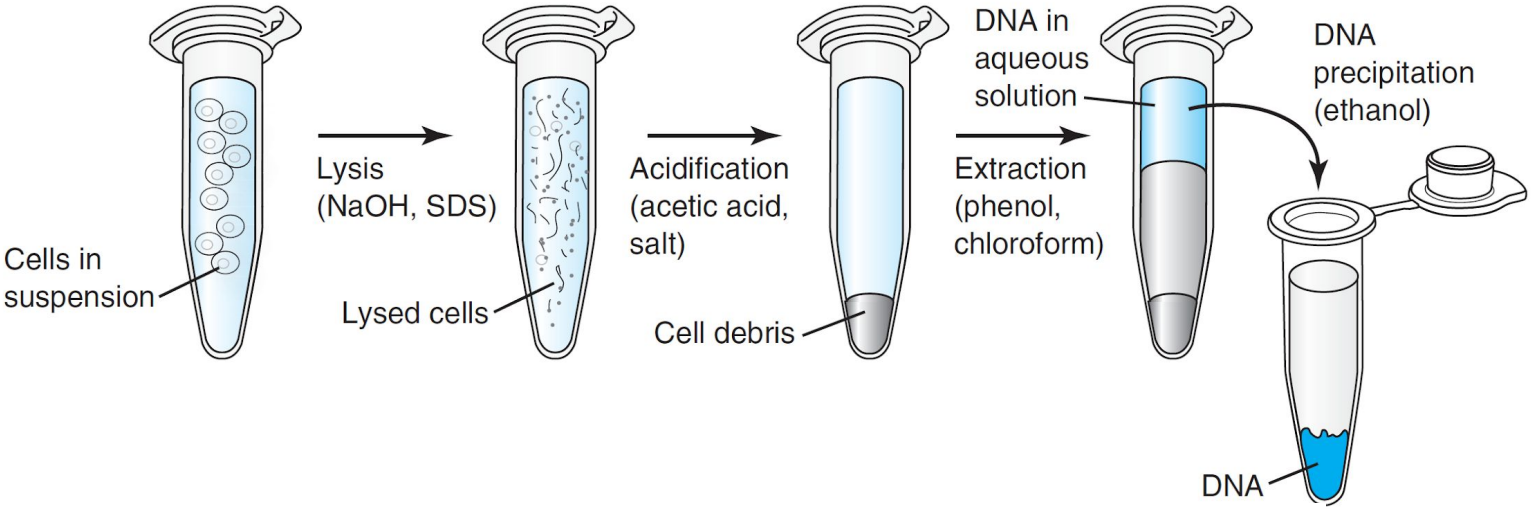

Cell Nucleus Containing
23 Pairs of Chromosomes
Genes
Chromosomes
Bases
DNA Strand

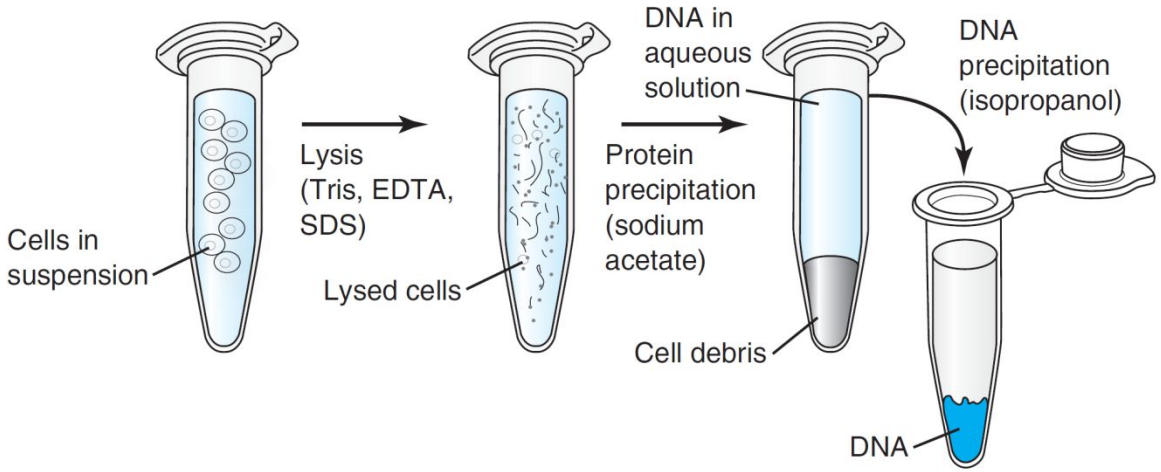
ДНК
(4 нуклеотида: A, T, G, C)



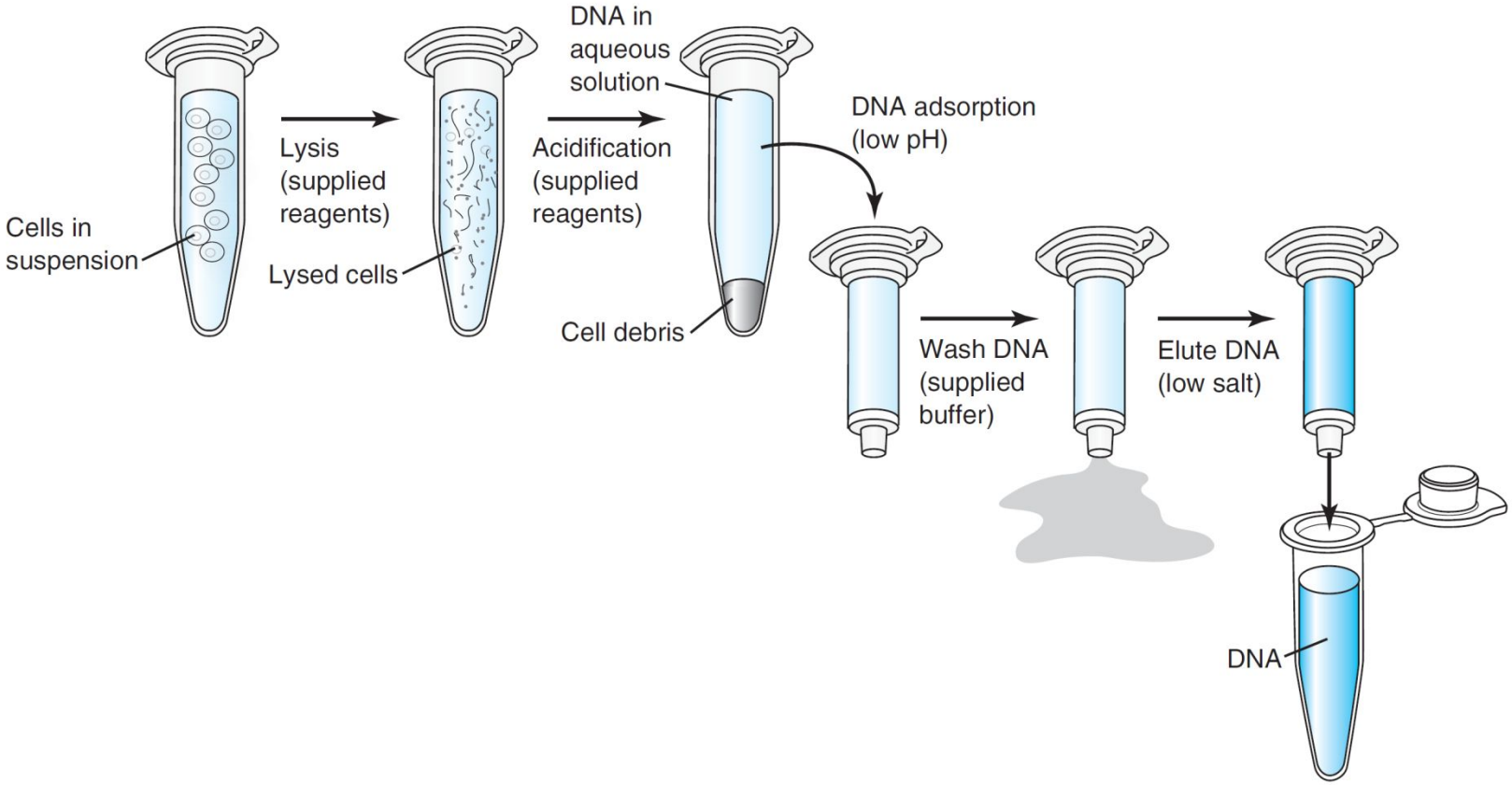


Выделение ДНК





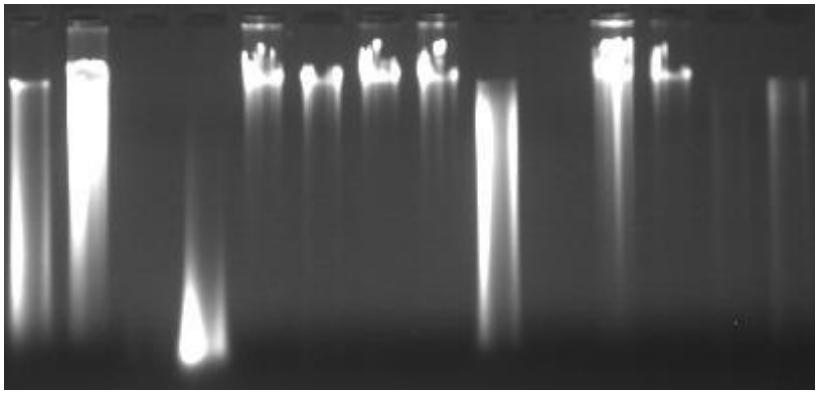
Выделение ДНК



Оценка качества и количества ДНК

- Электрофорез
- Спектрофотометрия
- Флуорометрия

элетрофорез



спектрофотометрия

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

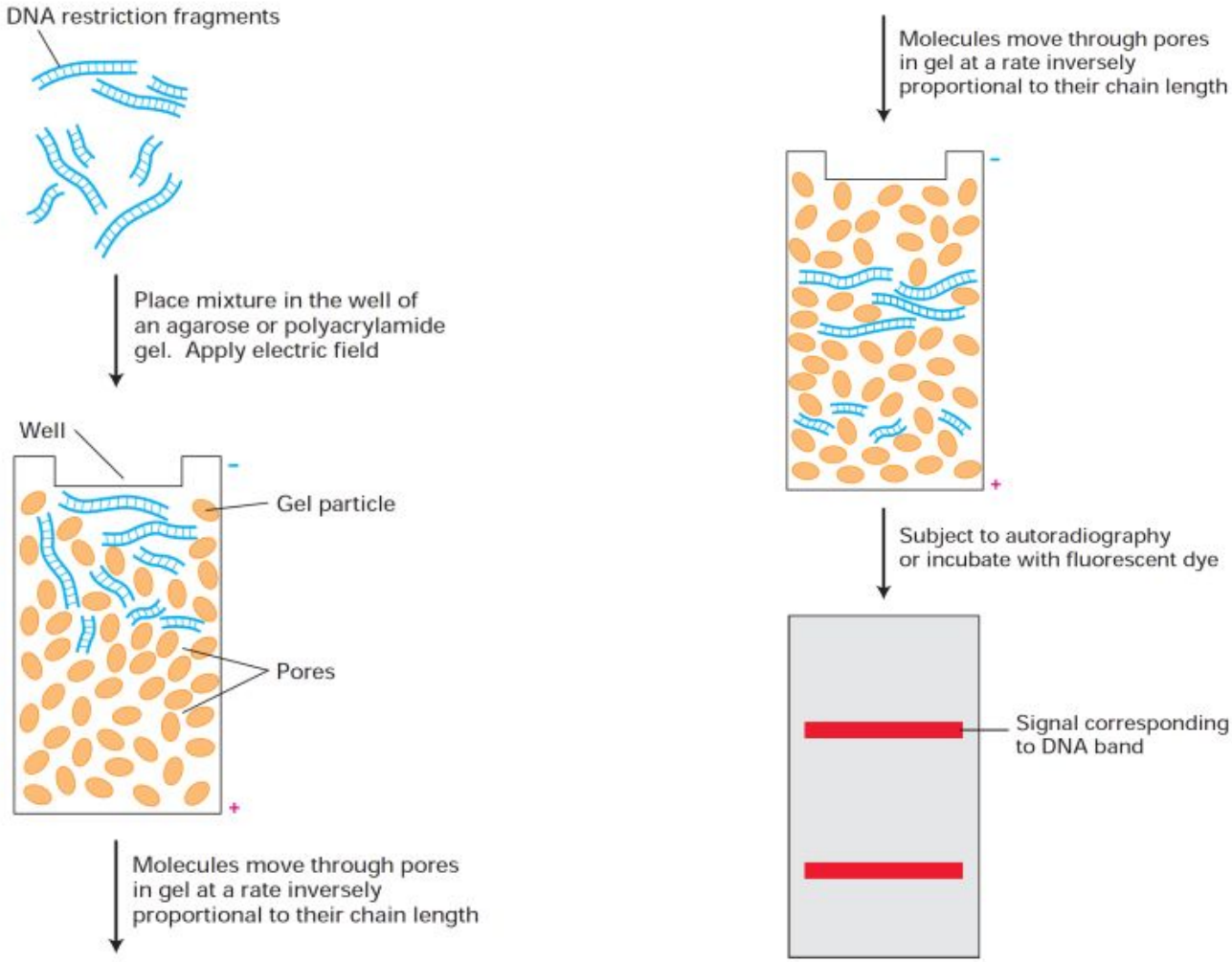
K (dsDNA) = 50

K (ssDNA) = 37

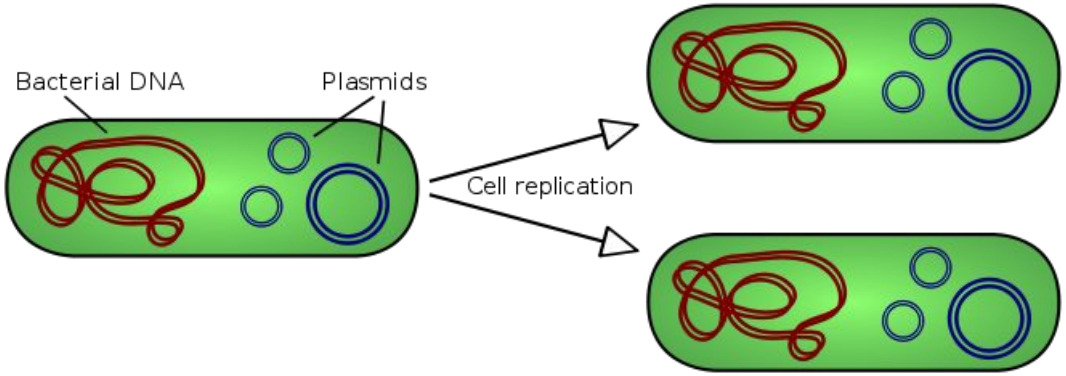
K (ssRNA) = 40

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

Электрофорез

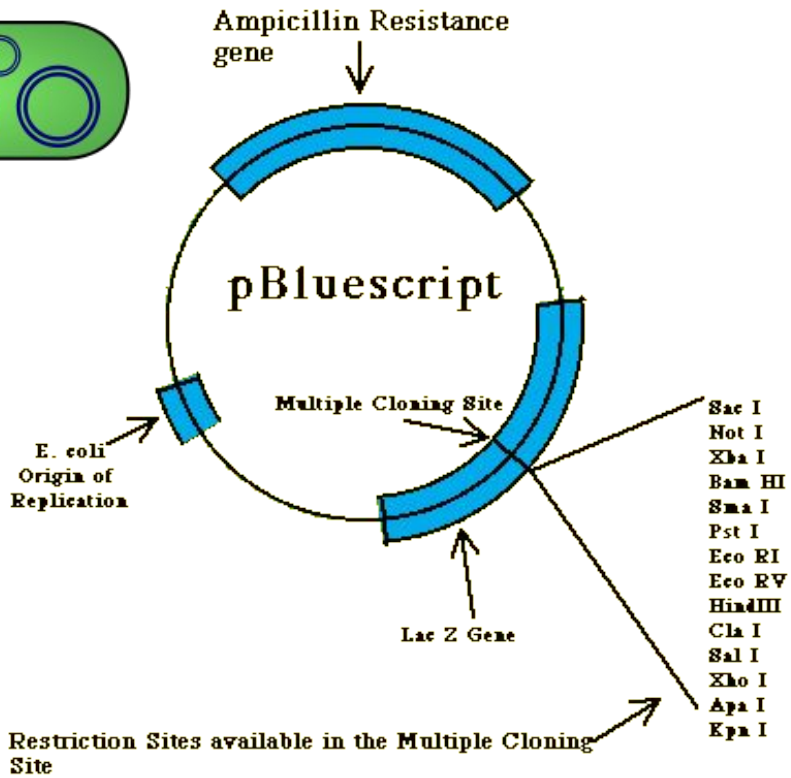


Плазмиды

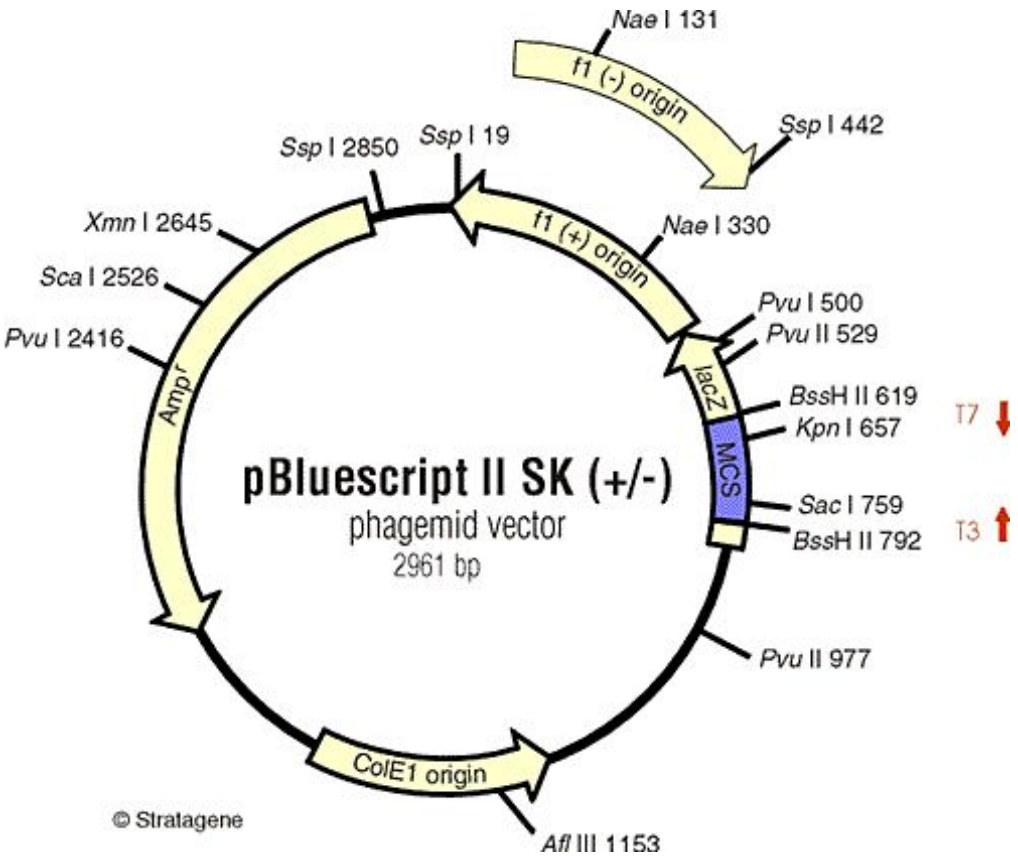


Состав вектора:

- Ориджин репликации
- Селективный маркёр
- Полилинкер



pBluescript II SK (+)

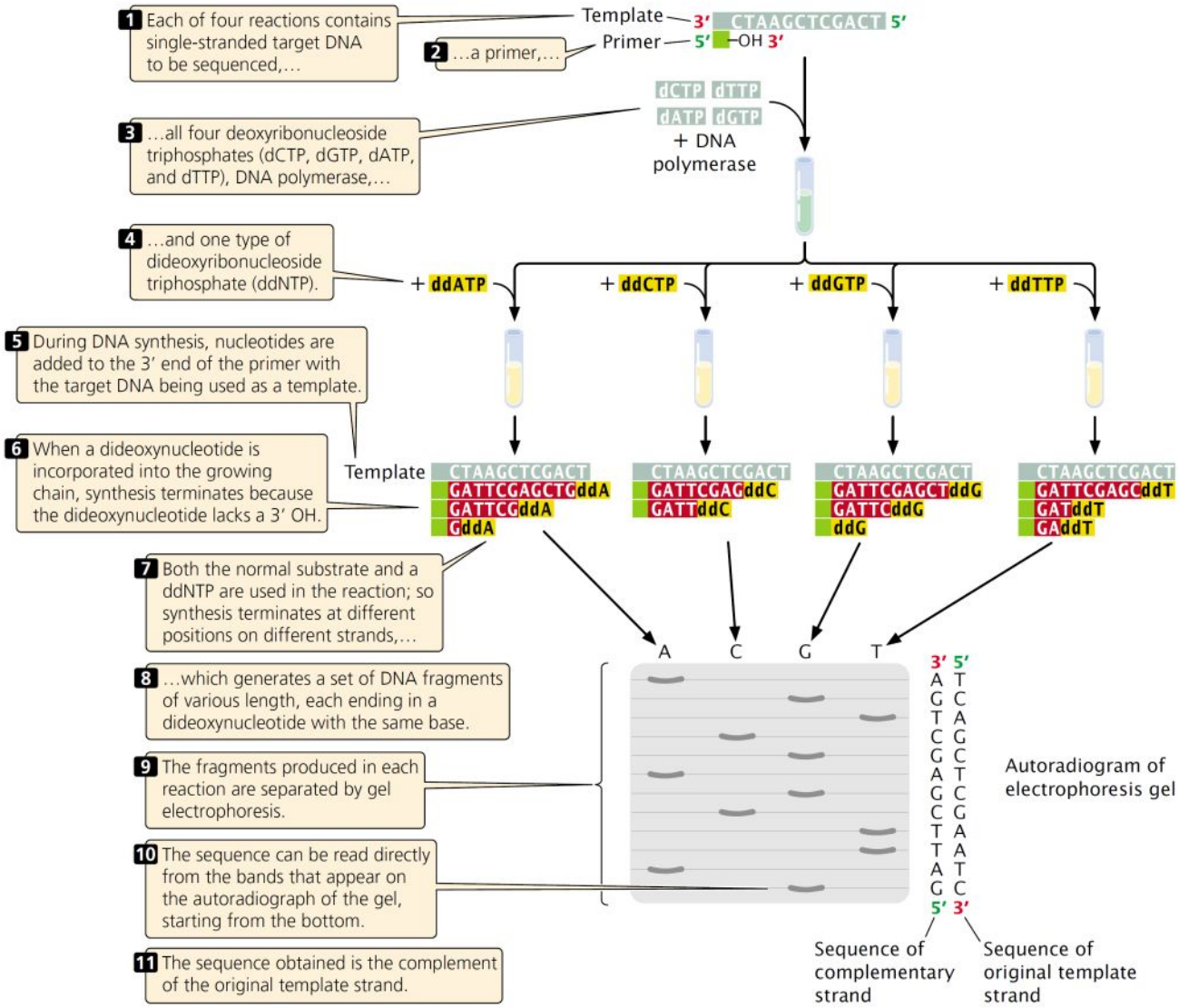


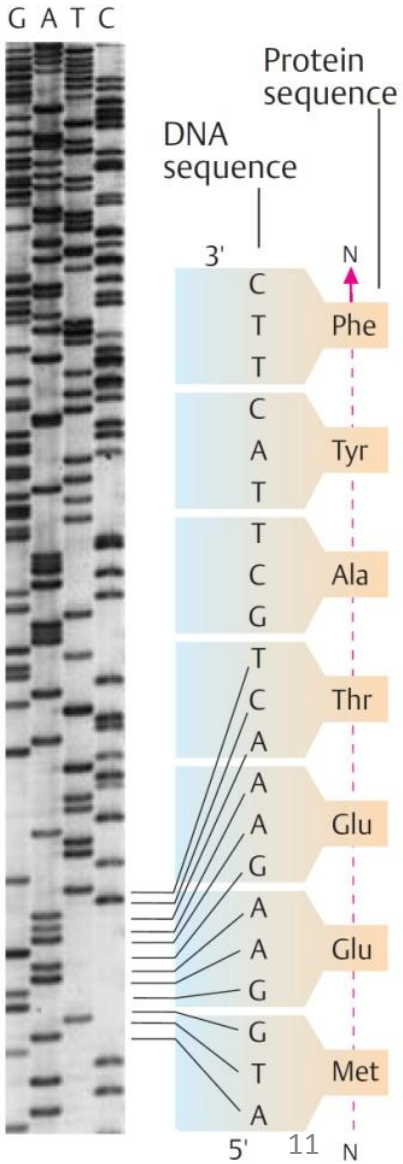
Севенирование ДНК
- прочтение последовательности

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.

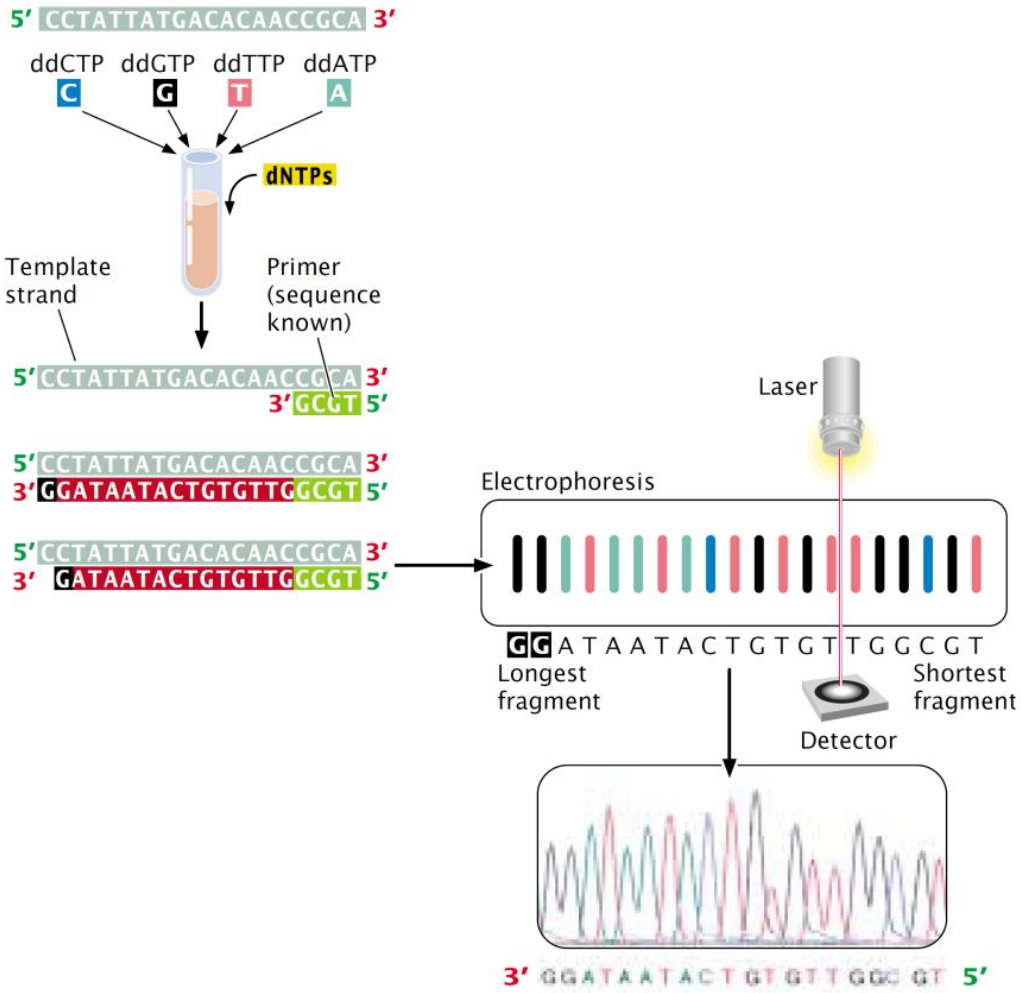
3 The fragments that end in the same base have the same colored dye attached.

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.

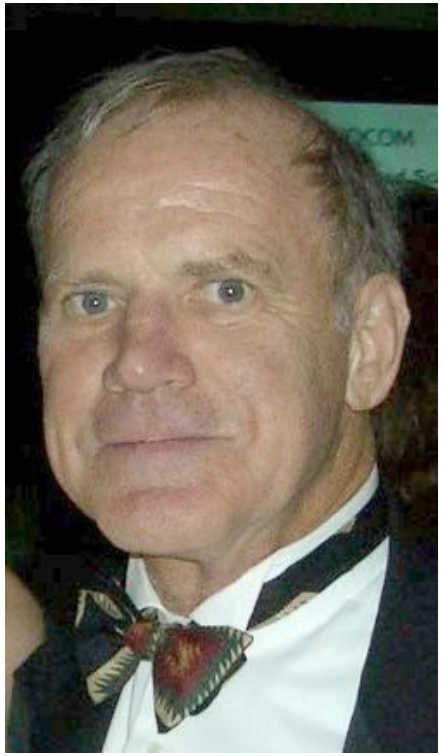
7 The sequence information is read directly into the computer, which converts it into the complementary—target—sequence.



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

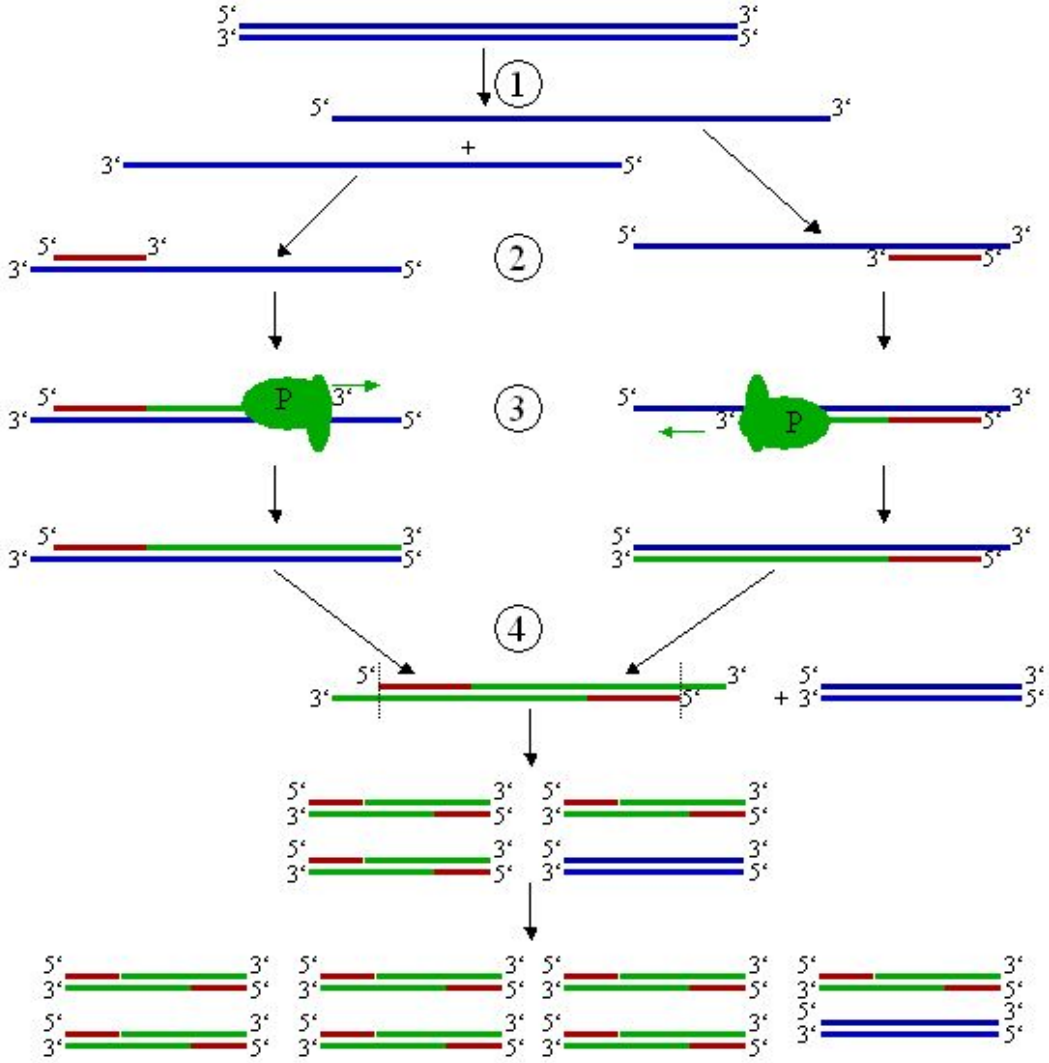


1983 г, Кэри Муллис

Компоненты ПЦР

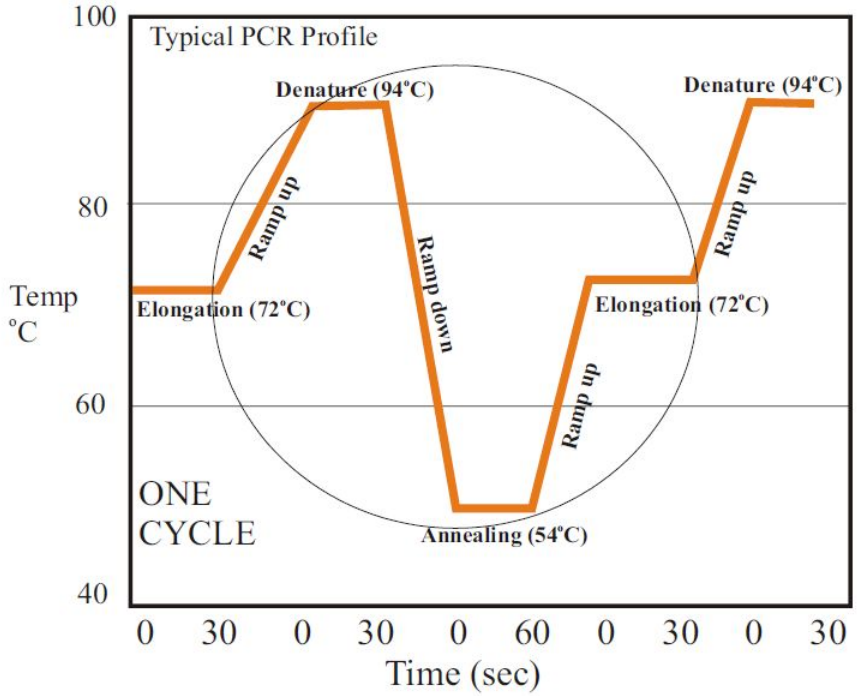
	Праймеры	Определяют амплифицируемый участок
	dNTP	«Строительный материал»
Буфер	KCl	Моновалентные катион необходим для оптимальной гибридизации праймеров
	Tris	Поддержание оптимального для ферментативной реакции pH
	$MgCl_2$	Бивалентный катион необходим для работы фермента
	Полимераза	Осуществляет синтез ДНК
	Матрица	Анализируемый образец ДНК

Суть ПЦР



Этапы ПЦР

	Предварительная денатурация	~95^{0}C	1-10 мин
	Денатурация	~95^{0}C	10-60 сек
25-50 циклов	Отжиг	50-70^{0}C	10-60 сек
	Элонгация	68-72^{0}C	10-180 сек
	Финальная элонгация	68-72^{0}C	7-10 мин



Амплификаторы

Термостатирование:

- твёрдый термоблок (элемент Пельтье)
- жидкость
- поток воздуха

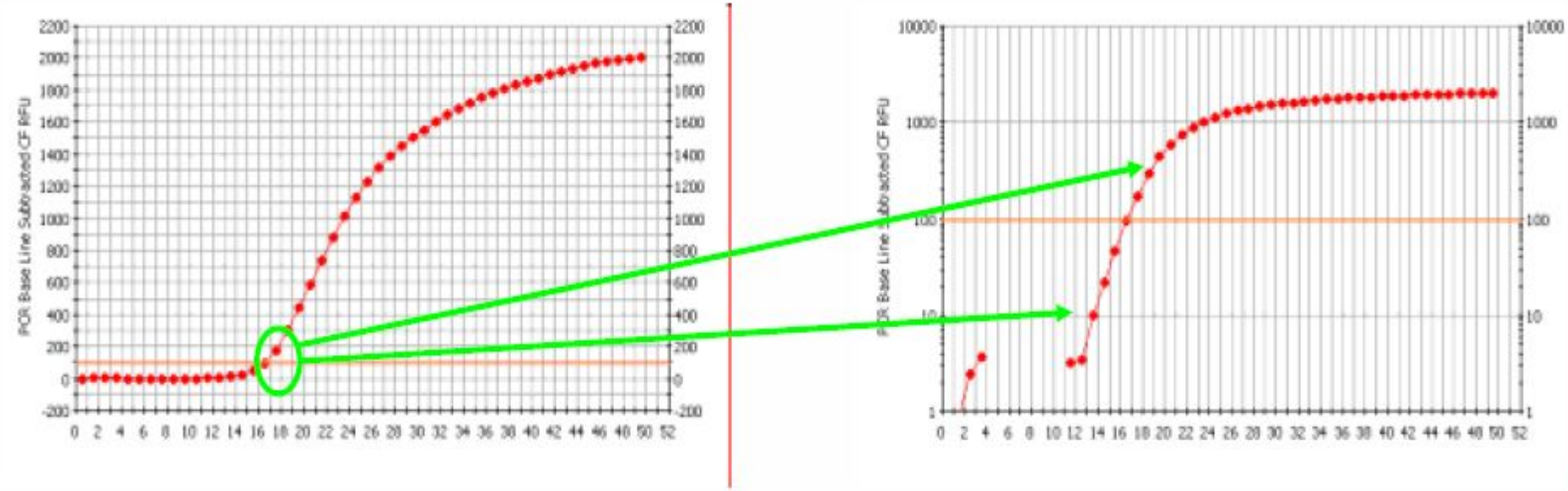
ПЦР в реальном времени

(Real-time PCR)

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

линейный

lg

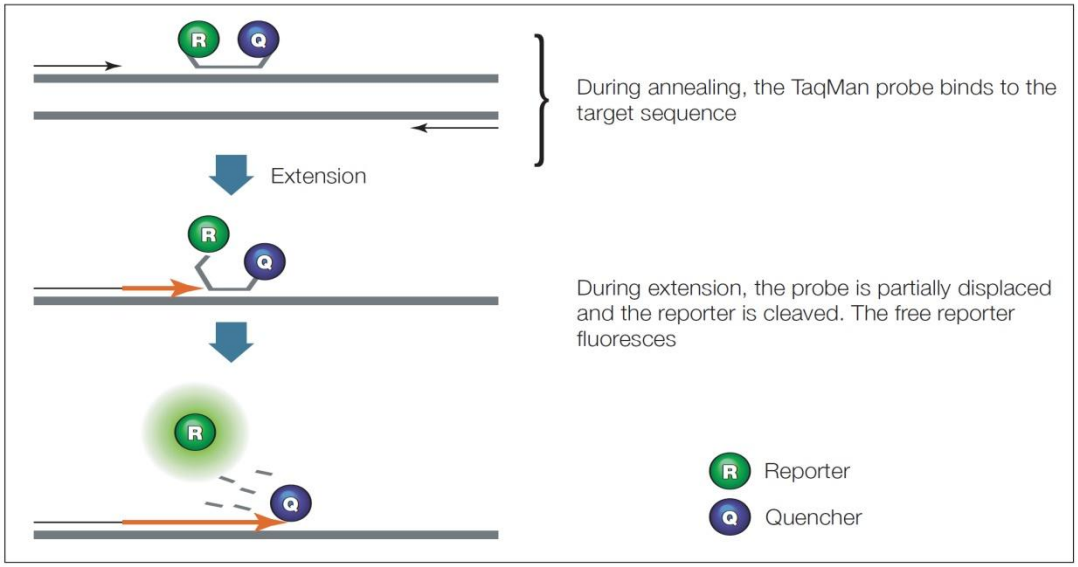


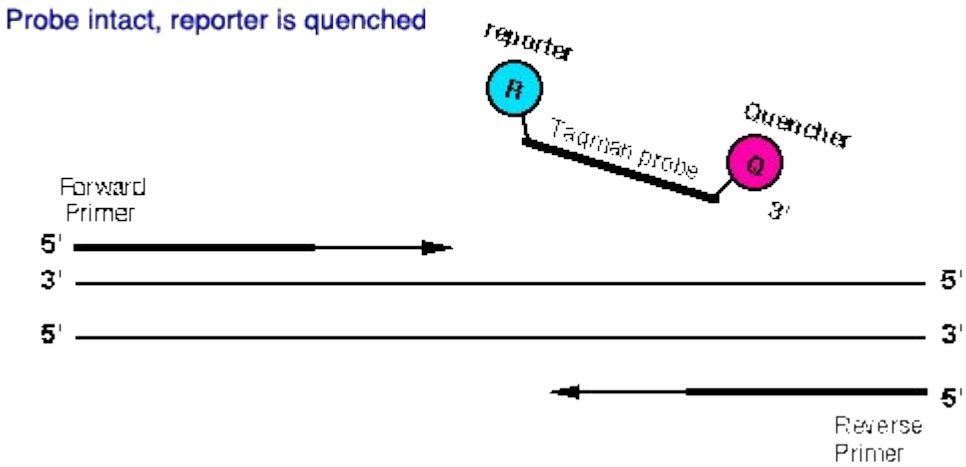
Системы детекции

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)

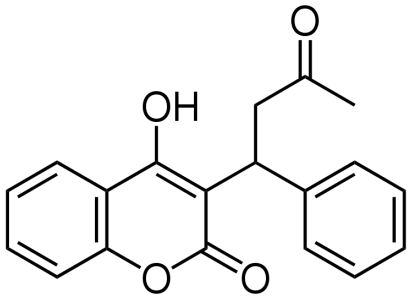




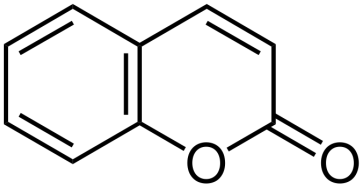
Фармакогенетика препаратов для лечения тромбозов

Непрямые антикоагулянты:

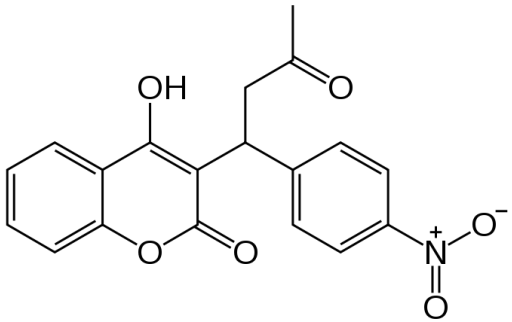
варфарин



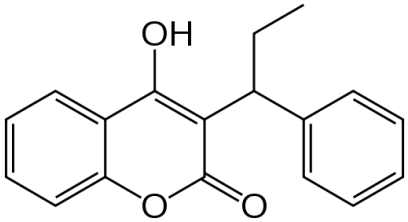
кумарин



аценокумарол



фенпрокумон



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).

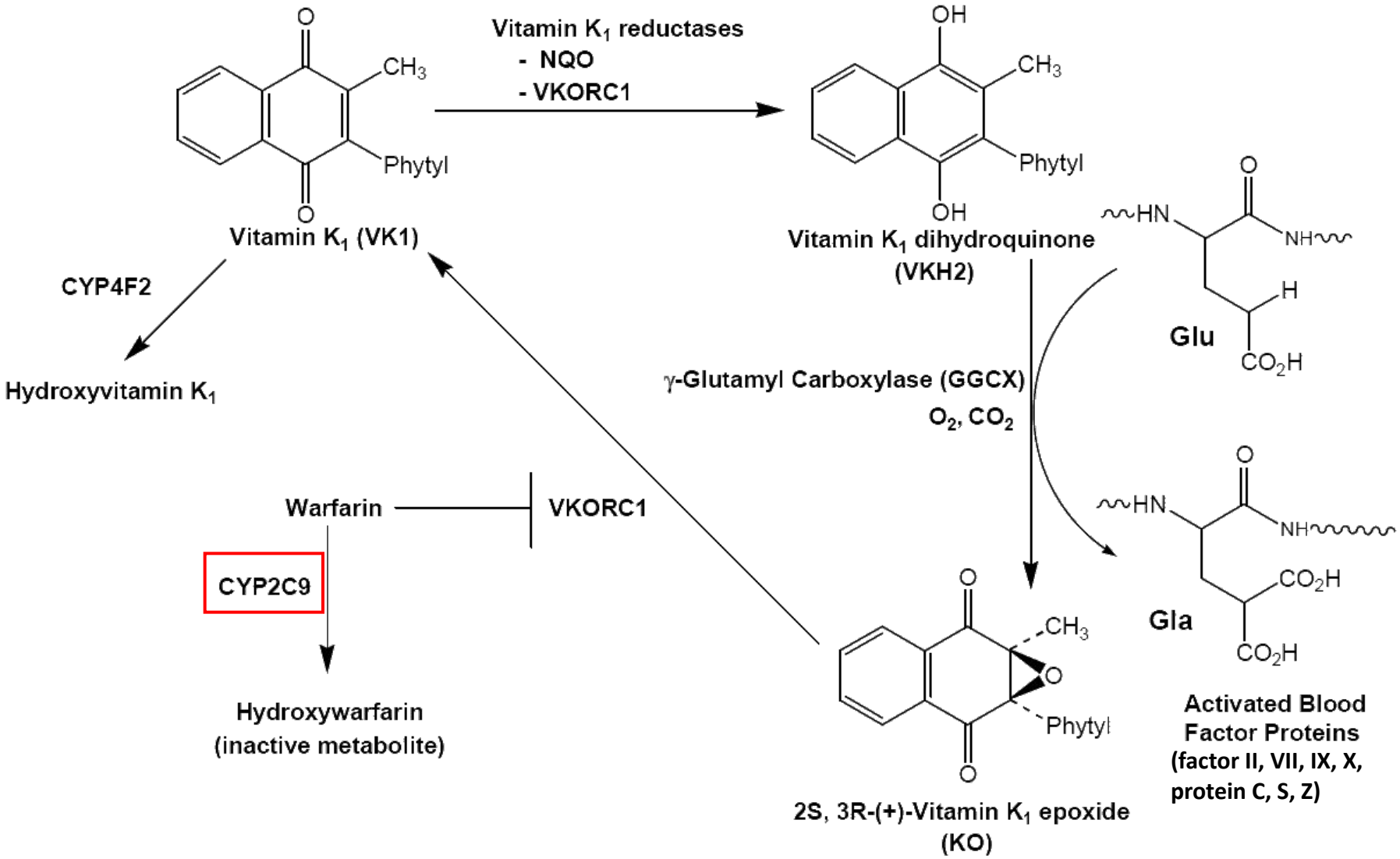
При применении варфарина частота кровотечений достигает 25%.

Факторы риска кровотечений при применении непрямых антикоагулянтов:

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

Непрямые антикоагулянты – антагонисты витамина K_1

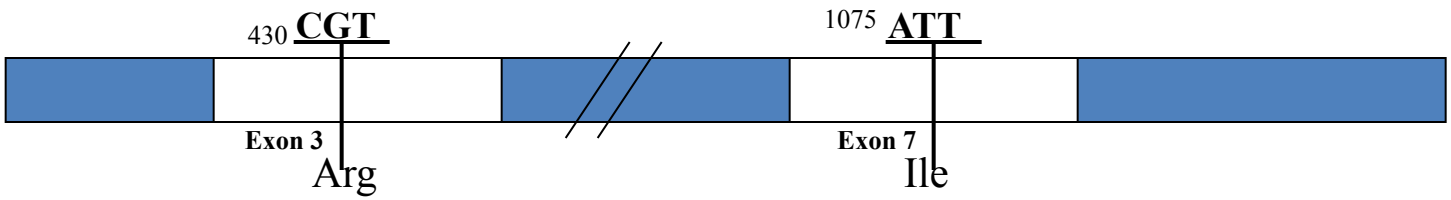
Метаболизм витамина K_1



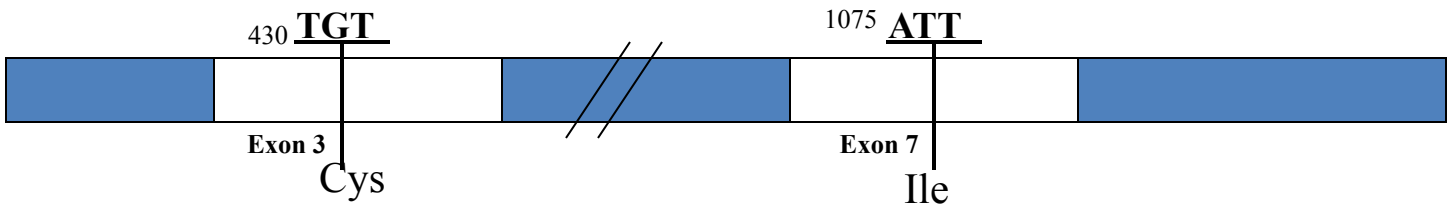
Полиморфизм гена *CYP2C9*

Аллельные варианты гена:

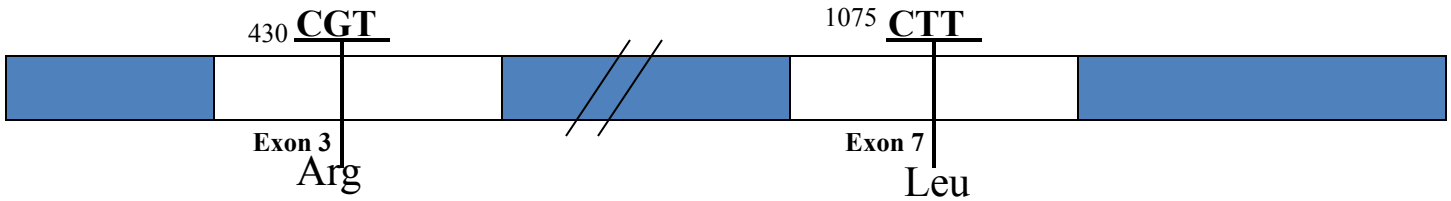
– **CYP2C9*1** – **нормальная** каталитическая активность



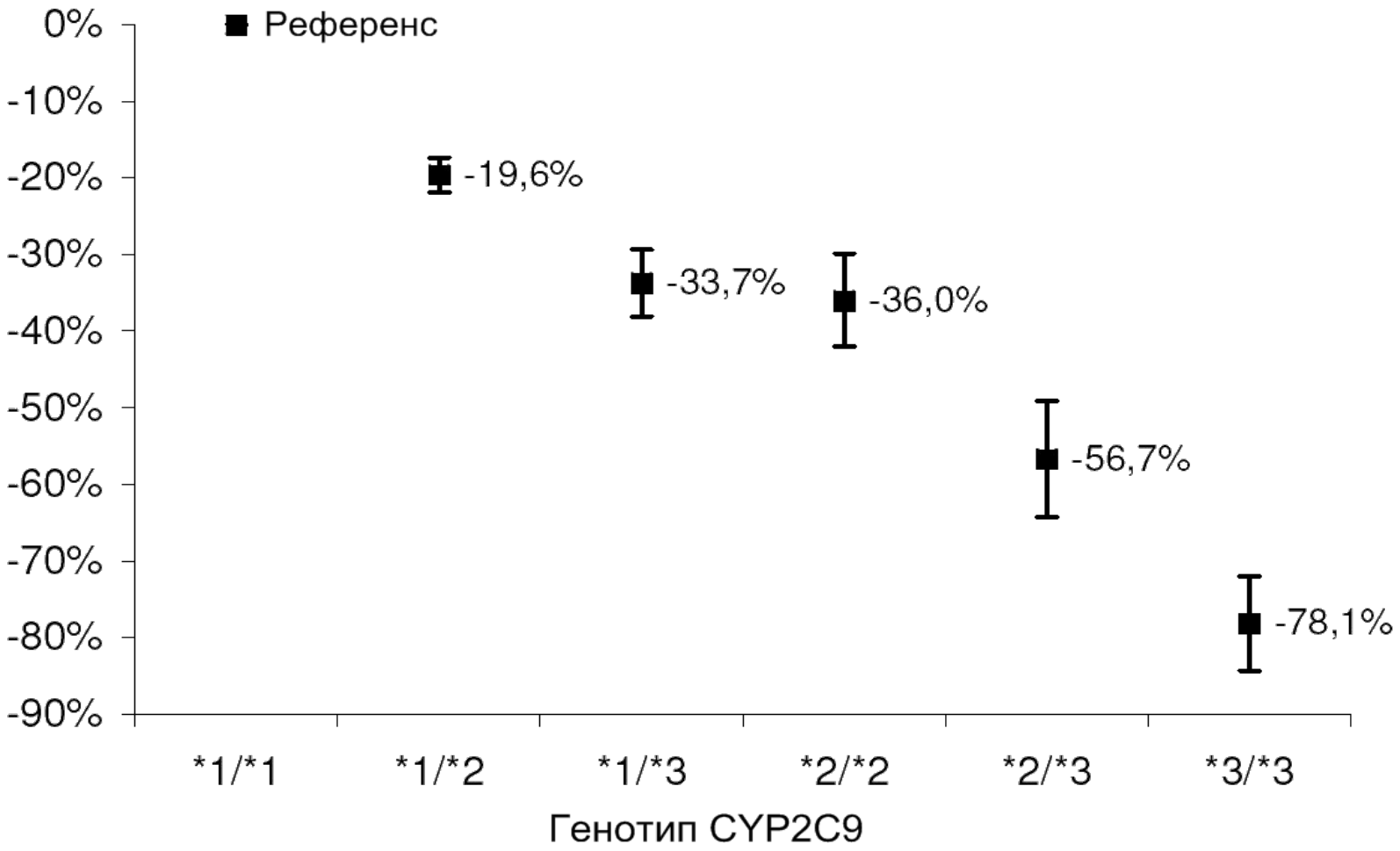
– **CYP2C9*2** (Arg144Cys) - **пониженная** каталитическая активность



– **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%