ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

Пән атауы: Геномика және молекулалық диагностика

Дәріс 13

Инфекциялық ауруларды ПТР арқылы анықтаудың принципі. Тұқым қуалайтын ауруларды молекулалық диагностикалау кезеңдері

Лектор: б.ғ.к., Алтыбаева Н.А.

Дәрістің мақсаты: Инфекциялық ауруларды полимеразалық тізбекті реакция арқылы анықтаудың молекулалық-биологиялық принциптерін, диагностикалық ерекшеліктерін және тұқым қуалайтын ауруларды молекулалық диагностикалаудың негізгі кезеңдерін ғылыми тұрғыдан түсіндіру. Сонымен қатар генетикалық зерттеу әдістерінің аналитикалық мүмкіндіктерін және нәтижелерін клиникалық интерпретациялау қағидаларын меңгерту.

Оқыту нәтижелері

Дәрісті меңгергеннен кейін магистрант:

- Инфекциялық аурулардың молекулалық диагностикасының негізгі принциптерін түсіндіре
- алады. Полимеразалық тізбекті реакцияның молекулалық механизмдерін сипаттай алады.
- Классикалық ПТР, qPCR, RT-PCR және мультиплекстік ПТР әдістерін ажырата алады.
- Инфекциялық қоздырғыштарды анықтаудың преаналитикалық және аналитикалық кезеңдерін түсіндіре алады.
- Тұқым қуалайтын ауруларды молекулалық диагностикалау алгоритмін құрастыраалады.
- Генетикалық варианттарды анықтайтын зерттеу технологияларын салыстыра алады.
- Генетикалық варианттардың патогендік маңызын бағалау принциптерін түсіндіре алады.

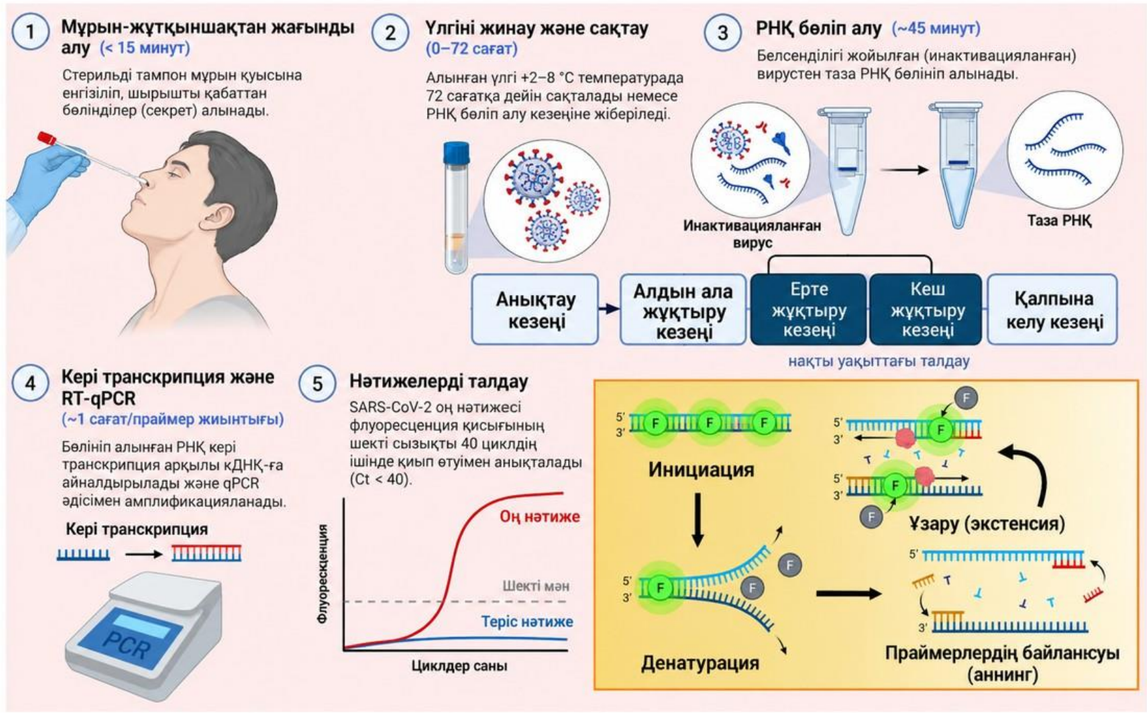
Дәрістің жоспары

1. Инфекциялық ауруларды анықтауда полимеразалық тізбекті реакцияның молекулалық принциптері және диагностикалық маңызы.
2. ПТР технологиясының түрлері, инфекциялық қоздырғыштардың генетикалық материалын анықтау кезеңдері және нәтижелерді интерпретациялау.
3. Тұқым қуалайтын ауруларды молекулалық диагностикалау алгоритмі, генетикалық варианттарды анықтау және олардың клиникалық маңызын бағалау.

Кіріспе

Инфекциялық аурулардың молекулалық диагностикасы патогендердің генетикалық материалын анықтауға негізделген заманауи зертханалық зерттеу бағыты болып табылады. Бұл әдістер бактериялардың, вирустардың және басқа инфекциялық қоздырғыштардың ДНҚ немесе РНҚ молекулаларын зерттеуге мүмкіндік береді. Молекулалық технологиялар инфекциялық процестердің этиологиясын анықтауда маңызды орын алады.

Дәстүрлі микробиологиялық әдістермен салыстырғанда нуклеин қышқылдарын амплификациялау технологиялары кейбір қоздырғыштарды қысқа мерзімде анықтауға мүмкіндік береді. Молекулалық диагностиканың негізгі артықшылықтарына жоғары аналитикалық сезімталдық пен ерекшелік жатады.



Инфекциялық ауруларды диагностикалауда полимеразалық тізбекті реакция кеңінен қолданылатын технологиялардың бірі болып саналады. Бұл әдіс қоздырғыштарды анықтау, эпидемиологиялық бақылау және инфекциялық аурулардың молекулалық ерекшеліктерін зерттеу үшін маңызды.

Полимеразалық тізбекті реакцияның молекулалық принципі

ПТР

Полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) – ДНҚ молекуласының белгілі бір бөлігін ферментативті жолмен көп мөлшерде амплификациялауға негізделген молекулалық әдіс.

Принципі

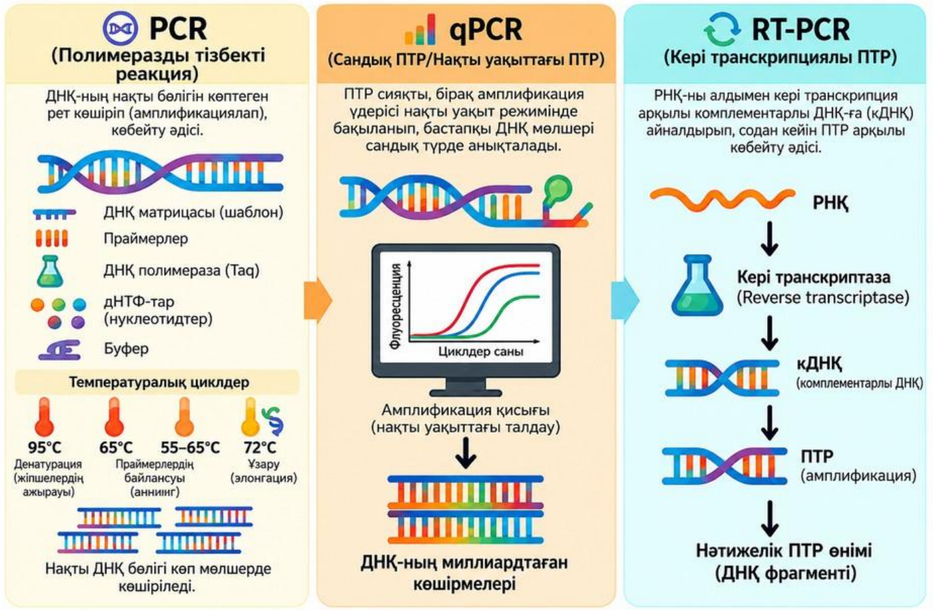
- *Реакцияның негізгі принципі мақсатты ДНҚ тізбегінің көшірмелер санын температуралық циклдер арқылы арттыру болып табылады.*
- *ПТР процесі денатурация, праймерлердің байланысуы және элонгация кезеңдерінен тұрады. Денатурация кезінде жоғары температура әсерінен ДНҚ-ның қос тізбегі ажырайды.*

Элонгация

- *Праймерлердің байланысу кезеңінде арнайы олигонуклеотидтер мақсатты генетикалық аймақтарға комплементарлық принцип бойынша байланысады.*
- *Элонгация барысында термотұрақты ДНҚ-полимераза жаңа ДНҚ тізбектерін синтездейді.*

- Температуралық циклдердің қайталануы мақсатты генетикалық материалдың экспоненциалды көбеюіне мүмкіндік береді.
- ПТР әдісі инфекциялық қоздырғыштарға тән нуклеотидтік тізбектерді анықтаудың негізгі молекулалық технологияларының бірі болып табылады.

Инфекциялық ауруларды анықтауда қолданылатын ПТР түрлері



Инфекциялық аурулардың молекулалық диагностикасында ПТР технологиясының бірнеше түрі қолданылады.

- **Классикалық ПТР** мақсатты ДНҚ фрагменттерін амплификациялауға және реакция өнімдерін кейінгі талдау арқылы анықтауға негізделеді.
- **Нақты уақыттағы ПТР** немесе qPCR амплификация процесін флуоресценттік сигналдар арқылы бақылауға мүмкіндік береді.
- **Кері транскрипциялы ПТР** РНҚ геномы бар вирустарды анықтау үшін қолданылады. Бұл әдісте вирустық РНҚ бастапқыда комплементарлық ДНҚ молекуласына айналдырылады.
- **Мультиплекстік ПТР** бір реакция барысында бірнеше инфекциялық қоздырғышқа тән генетикалық тізбектерді қатар анықтай алады.
- **Цифрлық ПТР** нуклеин қышқылдарының төмен концентрацияларын сандық бағалауға мүмкіндік береді.

ПТР түрін таңдау инфекциялық қоздырғыштың биологиялық ерекшелігіне және зерттеудің диагностикалық мақсатына байланысты жүргізіледі.

Инфекциялық ауруларды ПТР арқылы диагностикалау кезеңдері

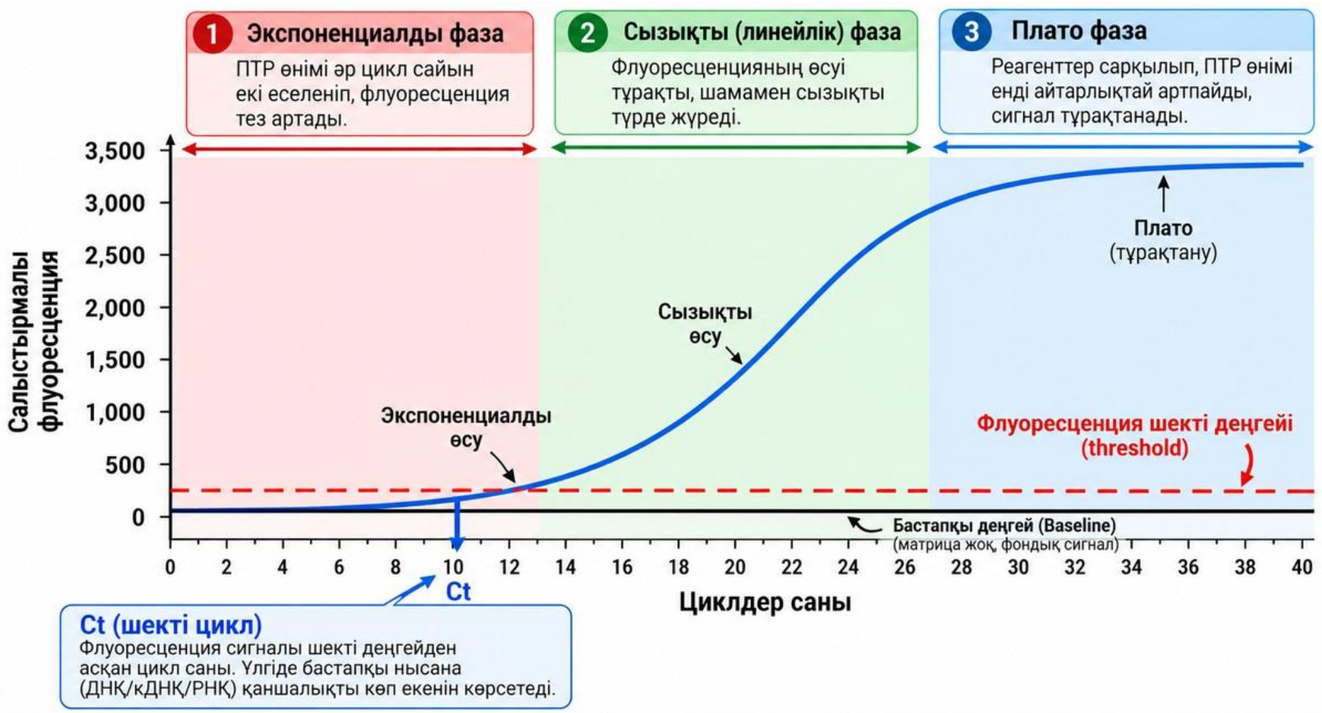


Инфекциялық ауруларды ПТР арқылы диагностикалау бірнеше өзара байланысты зертханалық кезеңдерден тұрады. Алғашқы кезеңде клиникалық көрсеткіштерге сәйкес биологиялық материалдың қажетті түрі таңдалады.

Зерттеу үлгілері ретінде **қан, сілекей, мұрын-жұтқыншақ жағындысы және басқа биологиялық материалдар** қолданылуы мүмкін. Келесі кезеңде үлгіден қоздырғыштың ДНҚ немесе РНҚ молекулалары бөліп алынады. Алынған нуклеин қышқылдарының сапасы зерттеу нәтижелерінің сенімділігіне әсер етеді.

Дайындалған үлгі арнайы праймерлер мен ферменттер қатысында амплификациядан өтеді. Амплификация нәтижелері қолданылған технологияға сәйкес флуоресценттік сигнал немесе басқа аналитикалық көрсеткіш арқылы тіркеледі. Соңғы кезеңде нәтижелер бақылау үлгілерімен салыстырылып, клиникалық және зертханалық мәліметтер негізінде интерпретацияланады.

Нақты уақыттағы ПТР және инфекциялық биомаркерлер



Нақты уақыттағы полимеразалық тізбекті реакция инфекциялық қоздырғыштардың нуклеин қышқылдарын анықтауда кеңінен қолданылатын молекулалық технология болып табылады. Әдіс ДНҚ амплификациясының әрбір циклиндегі флуоресценттік сигналдың өзгерісін тіркеуге негізделеді.

Флуоресценттік сигнал **арнайы бояғыштар немесе нуклеотидтік реттілікке спецификалық зондтар арқылы** қалыптасады. Реакция барысында алынған амплификациялық қисық мақсатты генетикалық материалдың болуын бағалауға мүмкіндік береді.

Ct немесе Cq көрсеткіші флуоресценттік сигналдың белгіленген шектік деңгейден асатын циклін сипаттайды. Бұл көрсеткішке бастапқы нуклеин қышқылының мөлшерімен қатар реакция тиімділігі және басқа аналитикалық факторлар әсер етеді.

ПТР нәтижесінің оң болуы қоздырғыштың генетикалық материалы анықталғанын білдіреді, бірақ оның міндетті түрде тіршілікке қабілетті екенін дәлелдемейді.

ПТР диагностикасының артықшылықтары мен шектеулері

Полимеразалық тізбекті реакция инфекциялық ауруларды диагностикалауда жоғары аналитикалық сезімталдығымен және ерекшелігімен сипатталады. Бұл технология биологиялық материалдағы нуклеин қышқылдарының аз мөлшерін анықтауға мүмкіндік береді.

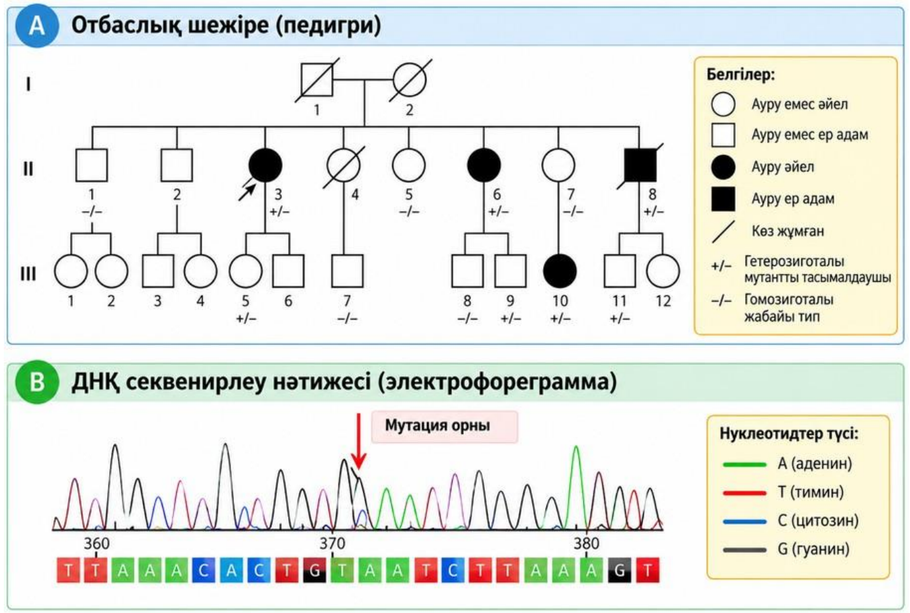
Артықшылықтар

- ПТР әдісі кейбір микроорганизмдерді өсіру қиын немесе ұзақ уақытты қажет ететін жағдайларда ерекше маңызды.
- Молекулалық зерттеулердің нәтижелері инфекциялық аурулардың этиологиясын анықтауға көмектеседі. Д

Кемшіліктері

- Зертханалық контаминация жалған оң нәтижелердің қалыптасуына себеп болуы мүмкін
- . Нуклеин қышқылдарының деградациясы, реакция ингибиторлары және қоздырғыш геномындағы өзгерістер жалған теріс нәтижелерге әкелуі ықтимал.

Тұқым қуалайтын аурулардың молекулалық диагностикасы



Тұқым қуалайтын аурулар генетикалық материалдағы патогенді өзгерістермен байланысты дамитын патологиялық жағдайлардың маңызды тобын құрайды. Мұндай аурулар **гендік, хромосомалық және күрделі геномдық өзгерістер нәтижесінде** қалыптасуы мүмкін. Молекулалық диагностика тұқым қуалайтын патологиялардың генетикалық себептерін анықтауға бағытталған.

- **Моногендік аурулар** көбіне белгілі бір гендегі патогенді варианттардың әсерімен сипатталады.
- **Күрделі мультифакторлық аурулардың** дамуына көптеген генетикалық және қоршаған орта факторлары бірлесіп ықпал етеді.

Тұқым қуалайтын ауруларды зерттеу барысында генеалогиялық, **цитогенетикалық және молекулалық-генетикалық әдістер** қолданылады. Генетикалық диагностиканың негізгі мақсаты аурумен байланысты молекулалық өзгерісті анықтау және оның клиникалық маңызын бағалау болып табылады.

Тұқым қуалайтын ауруларды диагностикалаудың клиникалық кезеңі

Тұқым қуалайтын ауруларды молекулалық диагностикалау **клиникалық және генеалогиялық** мәліметтерді жинаудан басталады.

1. Алғашқы кезеңде пациенттің негізгі симптомдары, фенотиптік ерекшеліктері және аурудың даму тарихы зерттеледі.
2. Отбасылық анамнезді талдау патологияның ықтимал тұқым қуалау типін анықтауға мүмкіндік береді.
3. Генеалогиялық әдіс арқылы бірнеше ұрпақтағы аурудың таралу ерекшеліктері бағаланады. *Аутосомды-доминантты, аутосомды-рецессивті және Х-хромосомамен тіркескен тұқым қуалау үлгілері* салыстырылады.
4. Клиникалық фенотиптің ерекшеліктері ықтимал генетикалық синдромдарды анықтауға көмектеседі.
5. Алынған мәліметтер негізінде молекулалық зерттеудің мақсаты және қажетті диагностикалық технология таңдалады. Бұл кезең молекулалық диагностика нәтижелерінің клиникалық интерпретациясын ғылыми негіздеуге мүмкіндік береді.

Қорытынды

Инфекциялық және тұқым қуалайтын аурулардың молекулалық диагностикасы заманауи медициналық генетика мен зертханалық диагностиканың маңызды бағыттары болып табылады. Полимеразалық тізбекті реакция инфекциялық қоздырғыштардың генетикалық материалын жоғары аналитикалық сезімталдықпен анықтауға мүмкіндік береді. Нақты уақыттағы және кері транскрипциялы ПТР технологиялары әртүрлі патогендердің молекулалық ерекшеліктерін зерттеу үшін қолданылады.

Тұқым қуалайтын ауруларды диагностикалау клиникалық бағалау, биологиялық материал алу, нуклеин қышқылдарын зерттеу және генетикалық нәтижелерді интерпретациялау кезеңдерінен тұрады. Сэнгер секвенирлеуі мен жаңа буын секвенирлеу технологиялары генетикалық варианттарды анықтаудың негізгі әдістері болып саналады.

Генетикалық өзгерістердің клиникалық маңызы молекулалық, популяциялық және фенотиптік мәліметтер негізінде бағаланады. Молекулалық диагностика нәтижелерінің сенімділігі зертханалық сапаны бақылауға және ғылыми негізделген интерпретацияға байланысты болады.

Өзін-өзі тексеруге арналған сұрақтар

1. ПТР әдісінің негізгі молекулалық принципі қандай?
2. ПТР реакциясының үш негізгі кезеңін сипаттаңыз.
3. qPCR мен классикалық ПТР-дың айырмашылығы неде?
4. Инфекциялық ауруларды диагностикалауда жалған оң және жалған теріс нәтижелер қандай себептерден пайда болады?
5. Тұқым қуалайтын ауруларды молекулалық диагностикалау қандай кезеңдерден тұрады?
6. Генетикалық зерттеу үшін биологиялық материалды таңдау қандай факторларға тәуелді?
7. Сэнгер секвенирлеуі мен NGS технологиялары қандай жағдайларда қолданылады?
8. Генетикалық варианттардың клиникалық маңызы қалай анықталады?

Пайдаланылған әдебиеттер

1. Нотова, С. В. Лабораторные методы исследования в биохимии и молекулярной биологии : учебное пособие / С. В. Нотова, С. В. Лебедев, Е. А. Сизова, Т. В. Казакова, О. В. Маршинская. – Оренбург : ОГУ, 2019.
2. Молекулярная и прикладная генетика : сборник научных трудов / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск : Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2022. – Т. 33.
3. Колясникова, Н. Л. Проблемы генетической безопасности : учебное пособие / Н. Л. Колясникова ; Пермский государственный аграрно-технологический университет им. акад. Д. Н. Прянишникова. – Пермь : ИПЦ «Прокростъ», 2019.