



LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY
Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN Brno
Centrum molekulární biologie a genové terapie



Moderní metody analýzy genomu

Aplikace I

21.4. 2011

Boris Tichý



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Aplikace nových technologií

Analýza DNA

Celogenomový screening

Sekvence

SNP

Strukturní aberace, početní aberace

Cílený screening

Sekvence

SNP

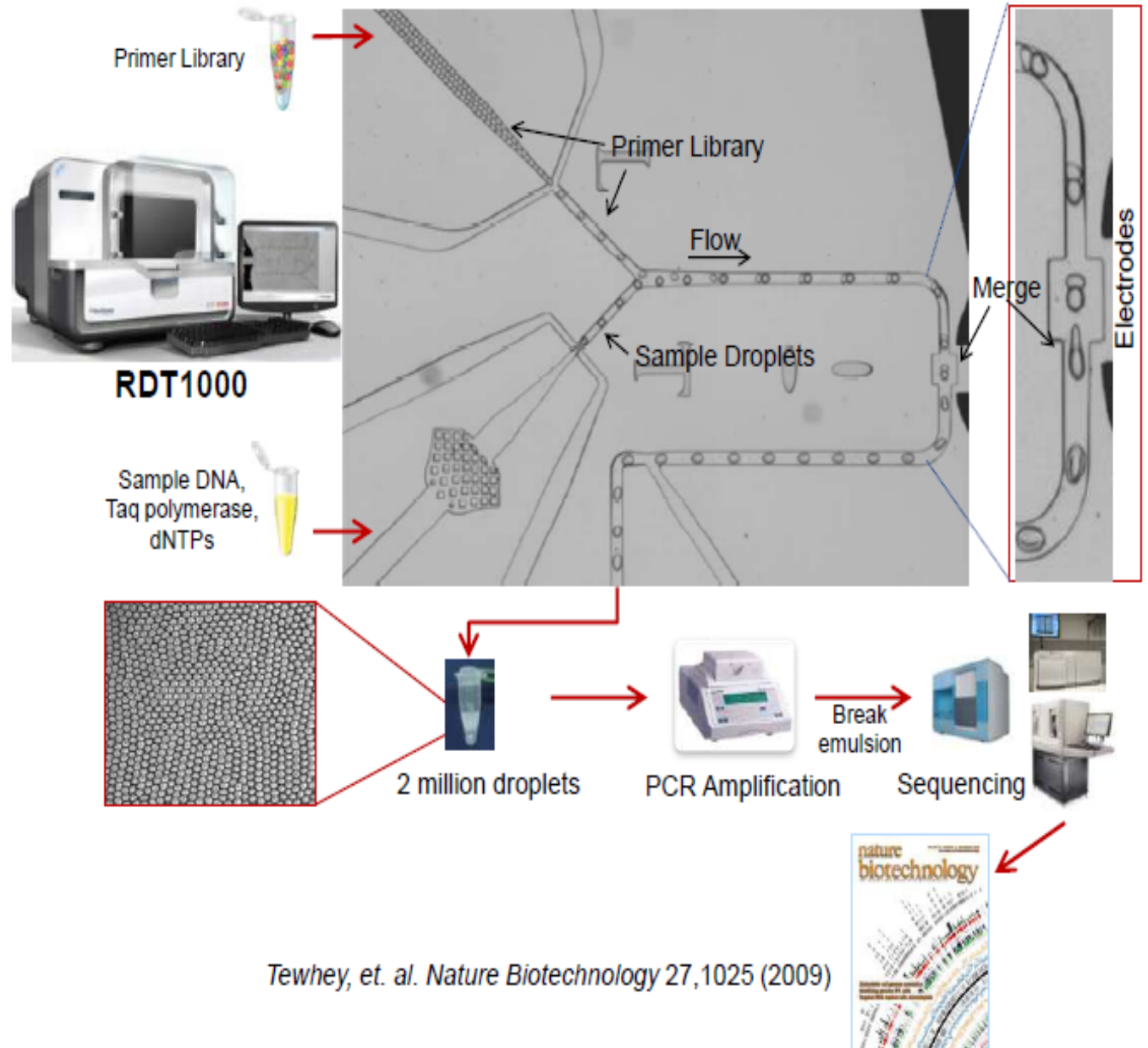
Cílený screening

Target enrichment

Hybridizace
na čipu
v roztoku

PCR
běžná
mikrofluidní

Targeted Sequencing Workflow Using the RDT1000



Tewhey, et. al. Nature Biotechnology 27,1025 (2009)

Exome sequencing

Všechny exprimované geny

Většinou včetně nekódujících

Hybridizace (v roztoku)

Gene enrichment

Jeden gen – např. dědičné poruchy

PCR, hybridizace

multiplexing

Skupiny genů – např. multifaktoriální nemoci, nádory

PCR, hybridizace

Úseky genomu – strukturní aberace

hybridizace

Deep sequencing

Germinální mutace/SNP

Heterozygot – 1:1

Mozaika – variabilní

Somatické

Různý poměr zdravých/postižených buněk

Jednotlivé subpopulace postižených buněk (např. nádorových)

=> Deep sequencing

Sekvenování s vysokým pokrytím

! max. senzitivita dána chybovostí enzymů

CMBGT - plány

a) dědičné poruchy

Často velmi dlouhé geny

(např. Duchenova muskulární dystrofie – dystrofin – 79 exonů, 2,4Mb, 14kb mRNA)

=> >150 sekvencí (forward + reverse)

=> 150*3€/pacient

GS Junior

75.000 reads => 500 reads/amplikon => 4-5 vzorků/běh

1.500€/běh

MiSeq

Kapacita ~1 mld. bazí =~ 3 mil. reads

Dystrofin – 14.000 bazí => ~150 reads po 100 bazích

=> 100x pokrytí → 15.000 reads

=> 200 vzorků/běh

1-2.000€/běh + náklady na enrichment !(150 – 1.000€/vzorek)!

Více genů – stejná situace

CMBGT - plány

b) leukemie/lymfomy

“kontaminace” vzorku nenádorovými (zdravými) buňkami

klonální evoluce nádoru

somatické mutace

=> hledáme metodiku pro *de novo* detekci mutací s citlivostí pod 1% buněk s aberací

=> resequencing microarray

=> deep sequencing

CMBGT - plány

b) leukemie/lymfomy

resequencing microarray

krátké oligonukleotidy (25 bazí)

udávaná citlivost až 1 %

9 genů, 120 miRNA (~ 40 kb sekvence)

110 long-range PCR

potřeba analyzovat desítky vzorků ← optimalizace algoritmu

neanalyzovatelné úseky (GC, homopolymery,...)

variabilní sezitivita

falešné pozitivní/negativní nálezy – problematické ověření

CMBGT - plány

b) leukemie/lymfomy

Deep sequencing

Sekvenování s vysokým pokrytím

Enrichment?

Hybridizace

PCR

Long-range PCR, multiplex PCR

Vyhodnocení

Vhodný SW

Statistický model?