

# HLA systém

***HLA (Human Leukocyte Antigens ) =  
Hlavní histokompatibilní systém  
člověka (MHC)***

# Historie

- ❖ HLA systém je soubor vázaných genů na krátkém raménku chromozomu 6
- ❖ MHC geny nejdříve rozpoznány u myší na základě pokusů s transplantacemi tumorů u myší (1930-1940)
- ❖ 70. léta - již známy 3 lokusy I. třídy HLA-A, -B, -C
  - HLA antigeny definovány sérologickými a buněčnými technikami
  - účast HLA molekul v imunitní odpovědi
- ❖ 1974- fenomén HLA restrikce (T lymfocyty rozpoznávají cizorodý antigen pouze v komplexu s HLA molekulami I. nebo II. třídy)
- ❖ 80. léta- objev lokusů II. třídy HLA-DR, -DQ, -DP
- ❖ 90. léta- objev tzv. neklasických antigenů lokusů HLA-E, -F, -G, -H, -J, -K, -X
  - zavedeny techniky HLA typizace na úrovni DNA

# Struktura HLA systému

- ❖ Nejkomplexnější a nejpolymorfnější systém, každý člověk nese unikátní sestavu HLA alel, výjimka – monozygotní dvojčata
- ❖ lokalizace na krátkém raménku 6. chromozomu ( 4100 kb, více než 200 genů )
- ❖ geny uspořádány do 3 oblastí: **HLA I., II., III. třída**

## **HLA I. třída (transplantační, klasické antigeny)**

- ❖ I. třída obsahuje geny **HLA –A, -B, -C** pro těžký řetězec  $\alpha$  HLA molekul
- ❖ povrchové glykoproteiny, exprimovány na téměř všech buňkách
- ❖ neklasické geny HLA-E, -F, -G (glykoproteiny - omezený výskyt)
- ❖ pseudogeny

## HLA II. třída

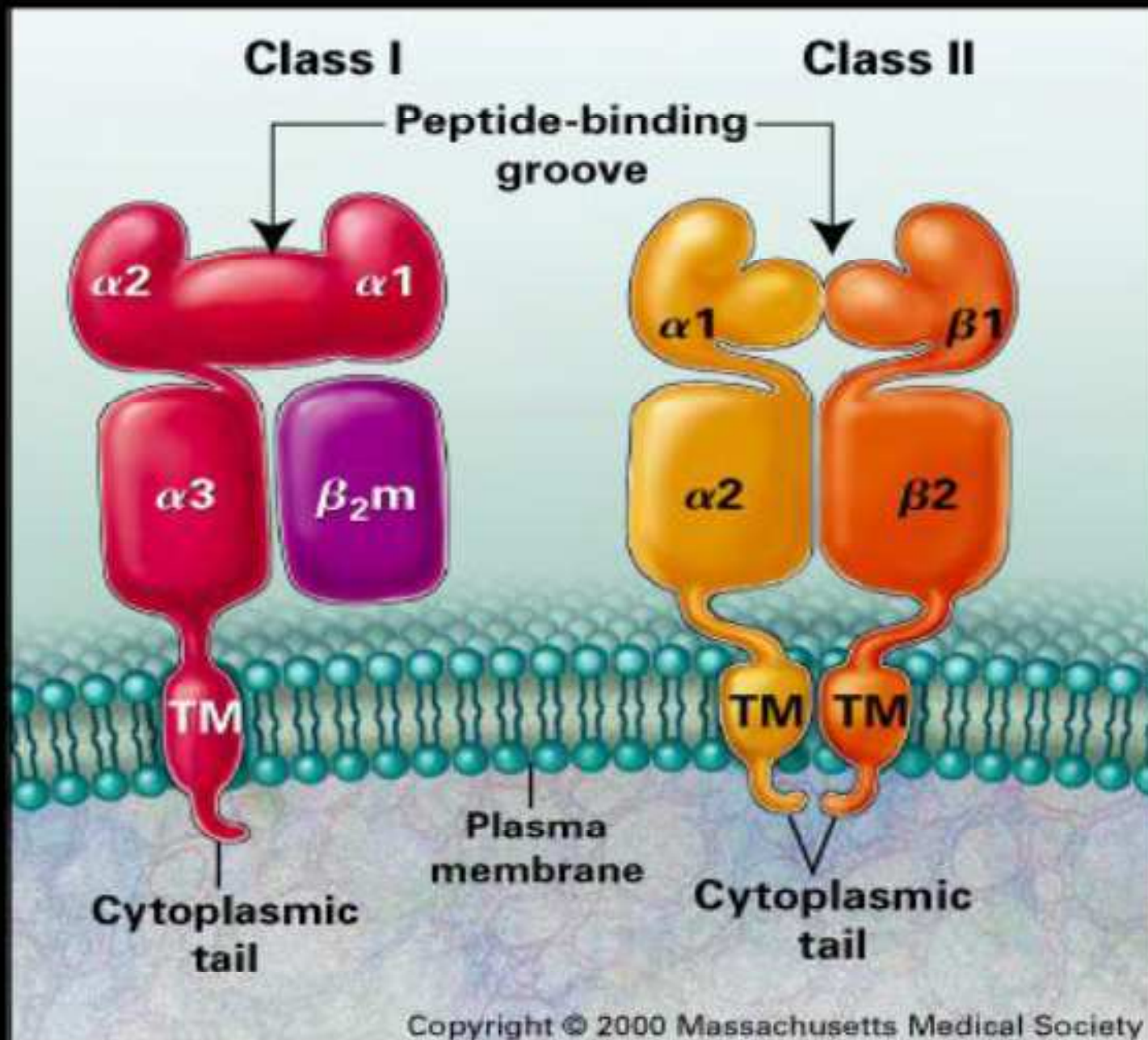
- ❖ geny pro  $-\alpha$  a  $-\beta$  řetězec HLA molekul – **DR, -DQ, -DP**
- ❖ glykoproteiny exprimovány na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk (buňky imunitního systému)
- ❖ **HLA-DM, -DO** geny – produkty výskyt v endozomech (naložení cizorodého peptidu na HLA molekulu II. třídy)
- ❖ geny **LMP2, LMP7** - proteiny, které štěpí cizorodé částice na menší peptidy
- ❖ geny **TAP1, TAP2**- zahrnutý do procesu transportu peptidů do ER

## HLA III. třída

- ❖ strukturálně a funkčně odlišné proteiny
- ❖ složky komplement C4, C2, faktor B, 21-hydroxylasa, TNF, heat shock protein Hsp 70

## Struktura HLA molekul

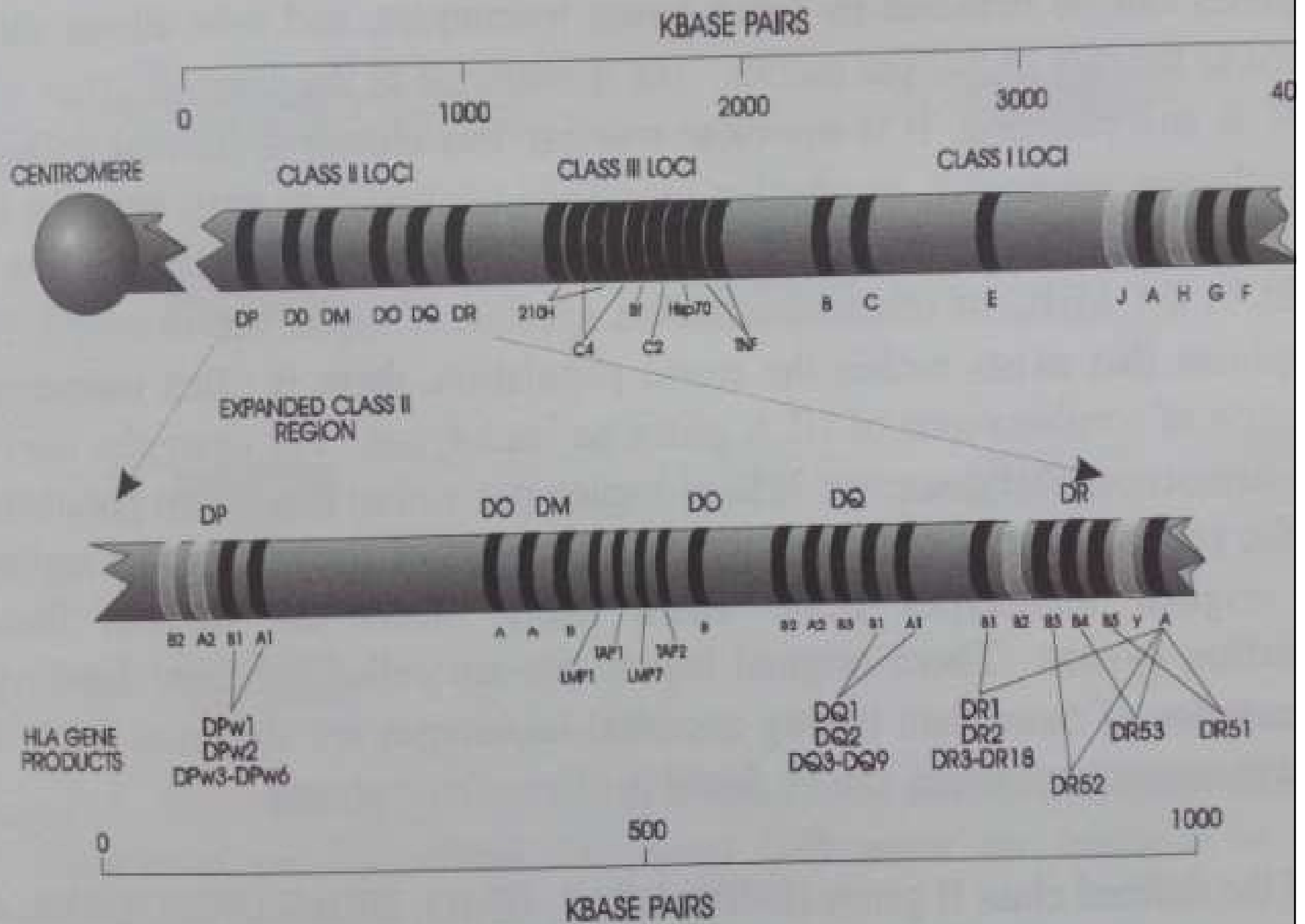
- ❖ HLA molekuly I. a II. třídy jsou glykoproteiny složené ze 2 různých proteinových řetězců (heterodimery)
- ❖ **HLA molekuly I. třídy** mají těžký  $\alpha$ - řetězec nekovalentně vázaný s  $\beta$ 2-mikroglobulinem (gen pro lehký řetězec  $\beta$ 2- mikroglobulin lokalizován na chr. 15)
- ❖  $\alpha$ - řetězec vytváří 3 domény  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3
- ❖  $\alpha$ 1 a  $\alpha$ 2 vytváří vazebný žlábek pro cizorodý peptid
- ❖ **HLA molekuly II. třídy** se skládají ze 2 glykoproteinových transmembránových řetězců  $\alpha$ ,  $\beta$
- ❖ Každý řetězec je složen do 2 domén -  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2
- ❖  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 vytváří vazebný žlábek pro cizorodý peptid



Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.



The New England Journal of Medicine



## Polymorfismus HLA - počet alel stále roste

Lokus	Počet alel	Proteiny
HLA-A	6921	4156
HLA-B	8181	5090
HLA-C	6779	3927
HLA-E	271	110
HLA-F	45	6
HLA-G	88	26
HLA-DRB1	3018	2063
HLA-DQB1	2033	1324
HLA-DPB1	1862	1180

<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>

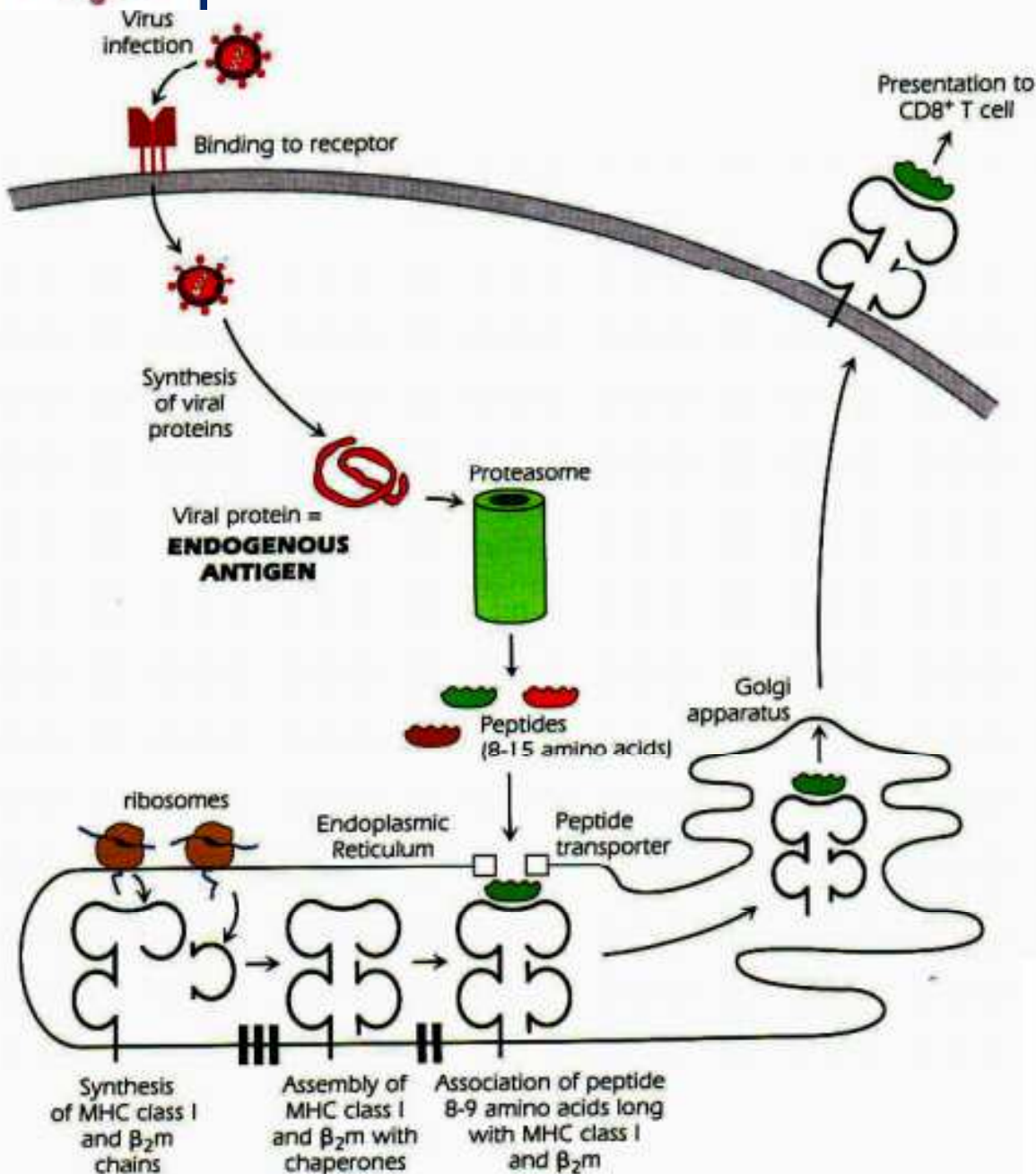


# Funkce HLA systému

- ❖ Primární role imunitního systému je rozpoznat a eliminovat nebezpečné cizí agens, imunitní systém musí **rozlišovat mezi „vlastními“ a „cizími“ antigeny**
- ❖ Hlavní funkcí HLA molekul je předkládat (prezentovat) cizí antigeny buňkám imunitního systému, především T lymfocytům
- ❖ Tato prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce a tím obrany proti napadení mikroorganismy
- ❖ fenomén **HLA restrikce** - buněčné receptory T lymfocytů (TCR) rozpoznávají cizí peptidy pouze vázané v peptidovém žlábků HLA molekuly I. nebo II. třídy
- ❖ 2 způsoby prezentace antigenů T lymfocytům – endogenní (HLA I. tř.)  
- exogenní (HLA II. tř.)

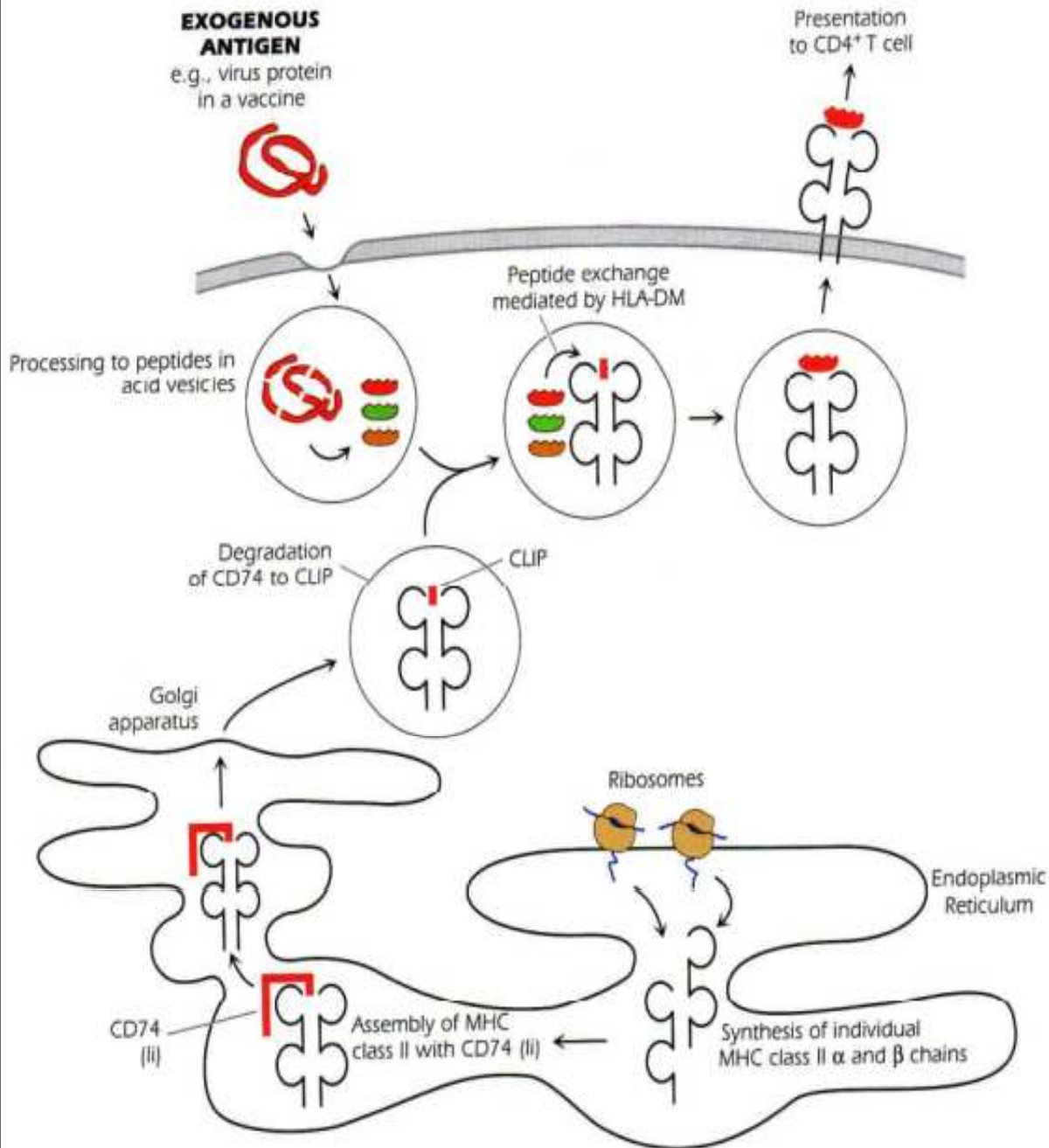


# Peptidy prezentované pomocí HLA I. tř. – endogenní zdroj



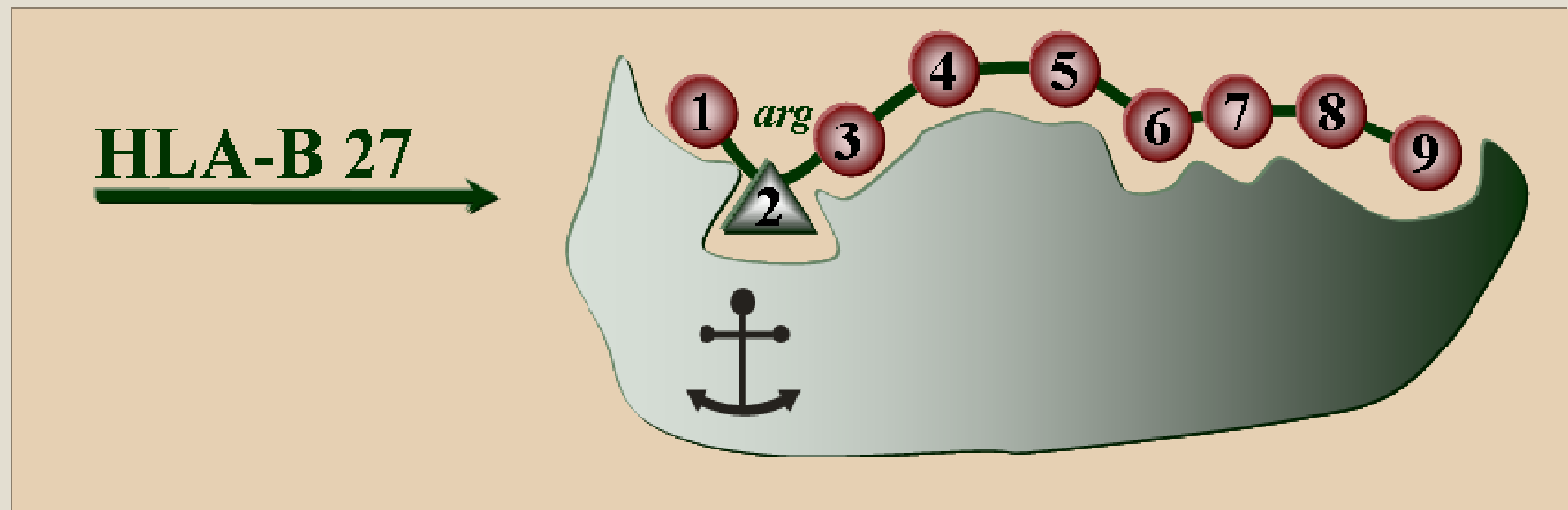
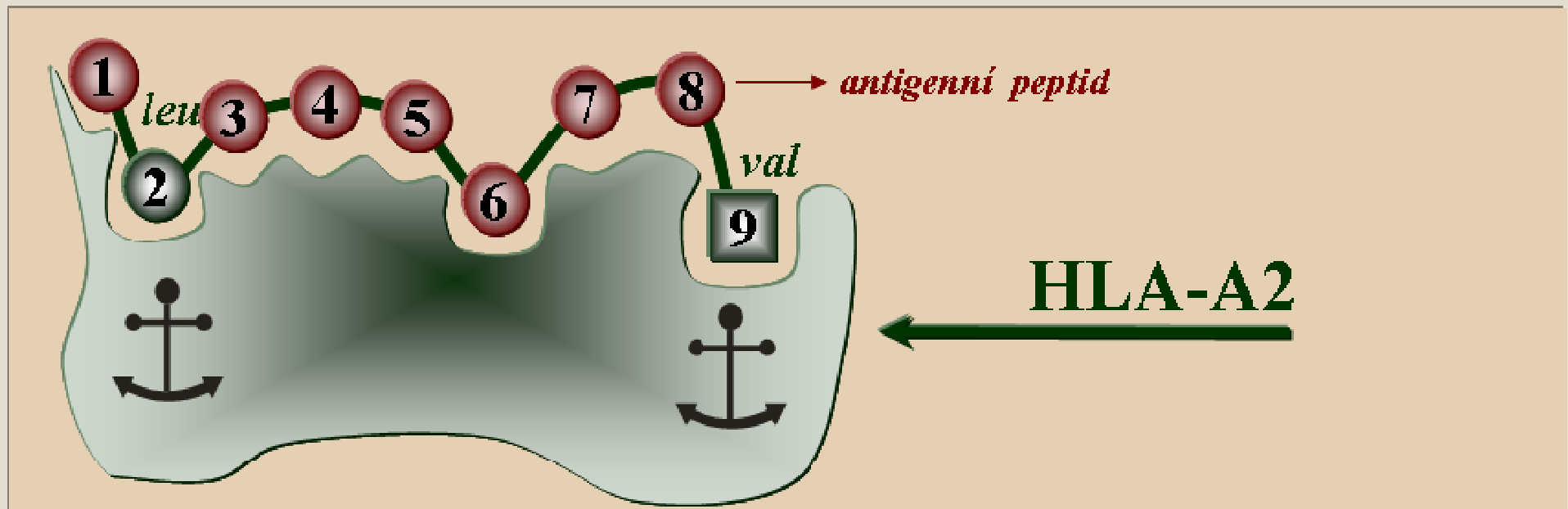
1. HLA molekuly I. třídy
2. Syntéza virových proteinů na ribosomech
3. Ubiquitin – označení proteinů k likvidaci
4. Proteasom = proteinový komplex k rozštěpení nepotřebných a poškozených proteinů
5. TAP1/TAP2 – transport peptidů do endoplasmatického retikula
6. Naložení peptidu na molekulu HLA I a transport na povrch buňky
7. **Cizorodý peptid + HLA I. tř. →  $CD8^+$  (Tc lymfocyty) - zabití napadených buněk**

# Peptidy prezentované pomocí HLA II. tř. – exogenní zdroj



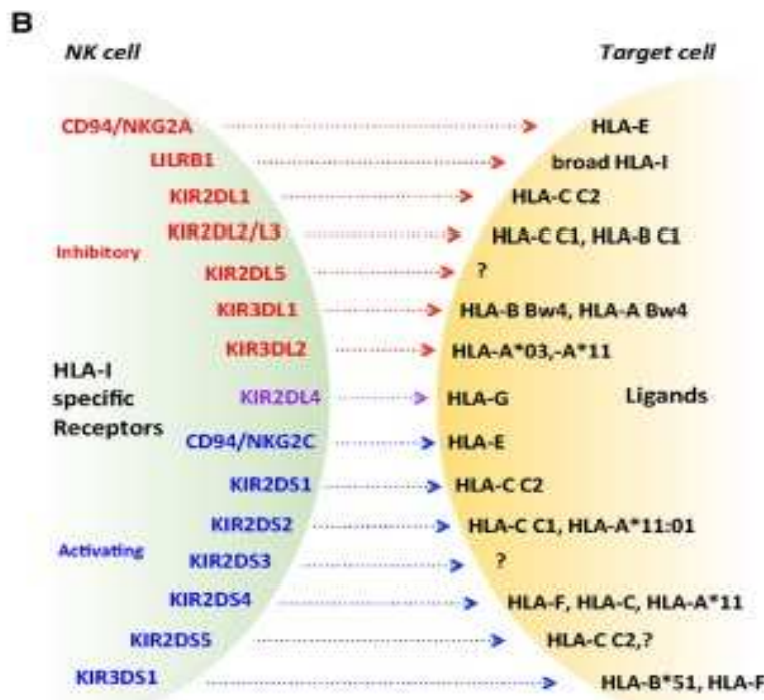
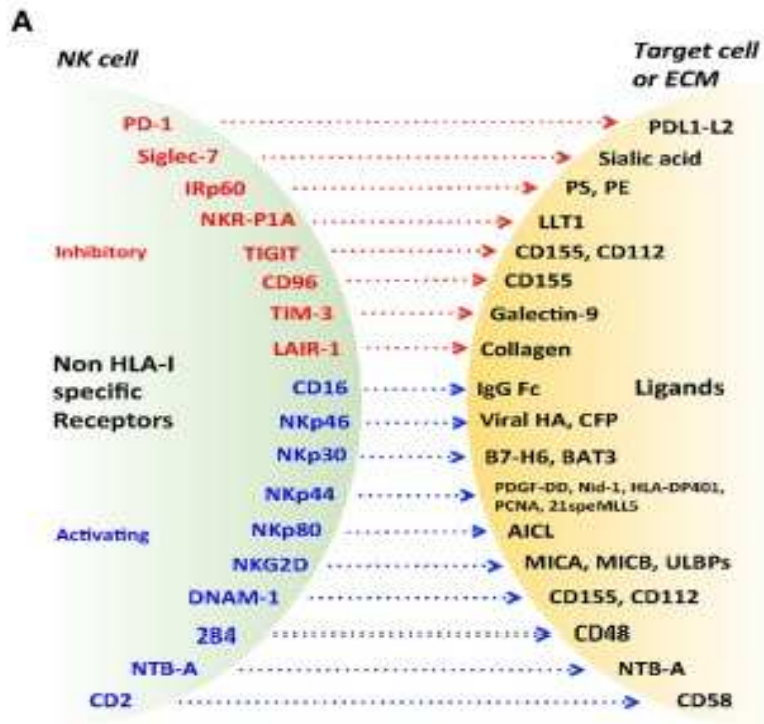
1. HLA molekuly II. třídy, vesikulární systém buňky
2. Exogenní antigeny jsou pohlcené (endocytóza, endozóm) - bakterie, paraziti - **exogenní zdroj**
3. ENDOSOMY, LYSOSOMY - proteolytické štěpení (katepsiny, endopeptidázy)
4. ENDOPLASMATICKÉ RETIKULUM -  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec MHC II + invariantní řetězec (Ii, CD74) (zabraňuje obsazení vazebných míst vlastními peptidy)  $\Rightarrow$  CLIP (CLASS II associated Invariant Chain Peptide)
5. Endosom fúzuje s lysosomem (odstranění CLIP a záměna za antigenní fragment pomocí molekuly DM)
6. Transport na povrch buňky
7. **Cizorodý peptid + HLA II. tř.  $\rightarrow$  CD4<sup>+</sup>** (Th lymfocyty) - CD4<sup>+</sup> Th1 – zánětlivá odpověď - aktivace makrofágů k zabití patogenu CD4<sup>+</sup> Th2 - protilátková odpověď, aktivace B buněk k produkci protilátek

# VAZBA ANTIGENNÍCH PEPTIDŮ NA MOLEKULY HLA I



## HLA molekuly jsou ligandy pro receptory NK buněk

- ❖ NK buňky (přirození zabíječi), obrana proti infekcím
- ❖ NK buňky mají na povrchu **HLA specifické aktivační a inhibiční receptory**, kterými je regulována aktivita NK buněk
- ❖ HLA molekuly aktivují nebo blokují aktivitu NK buněk
- ❖ T lymfocyty rozpoznávají přítomnost HLA molekul (vlastní x cizí)
- ❖ NK buňky rozpoznávají absenci HLA molekul na povrchu buňky (nádorové b., virem infikované b.)



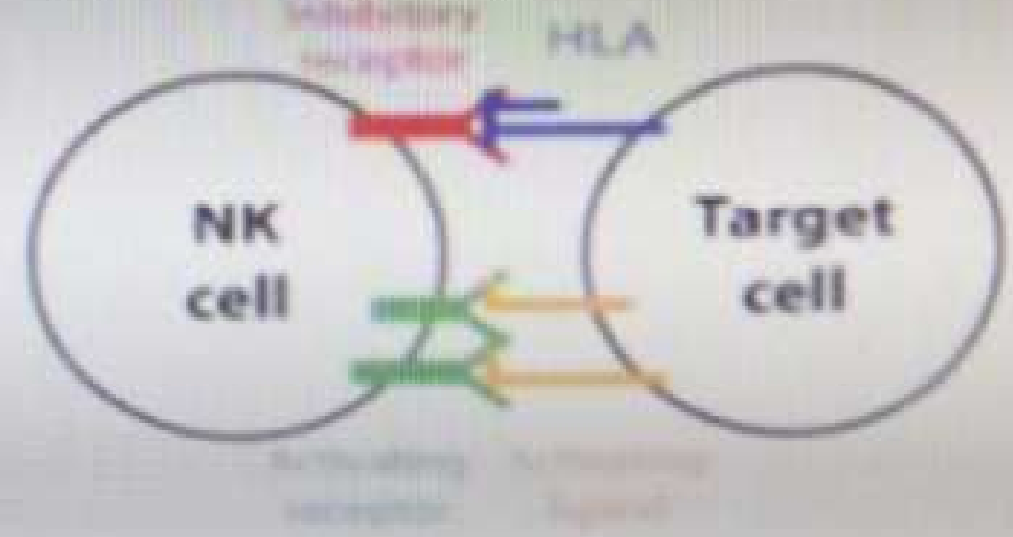
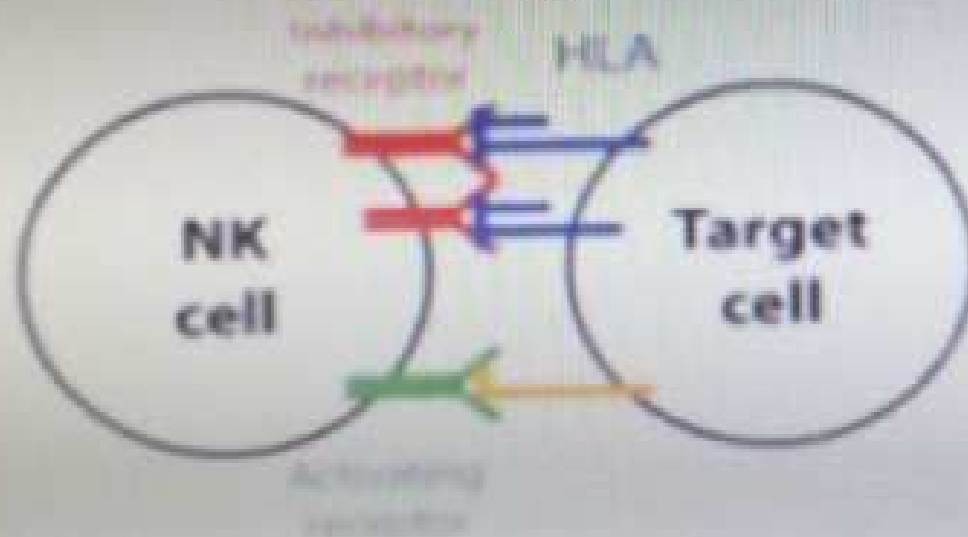
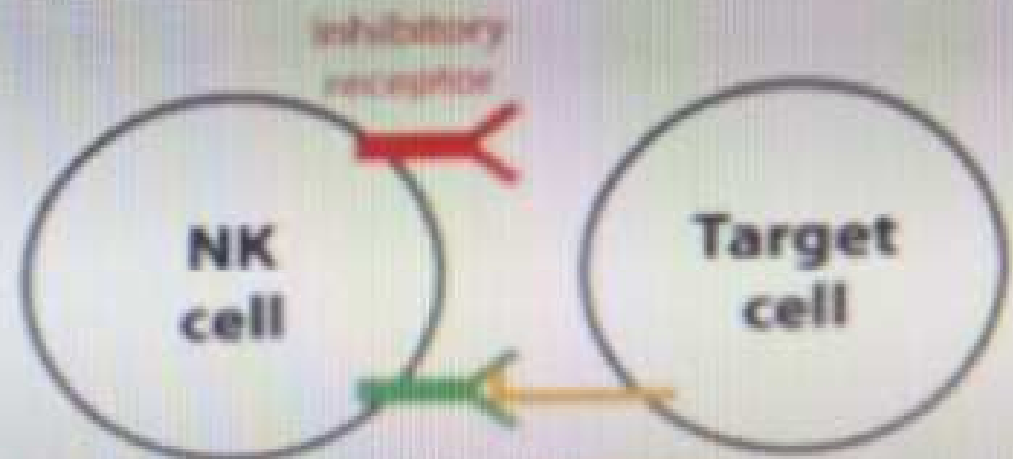
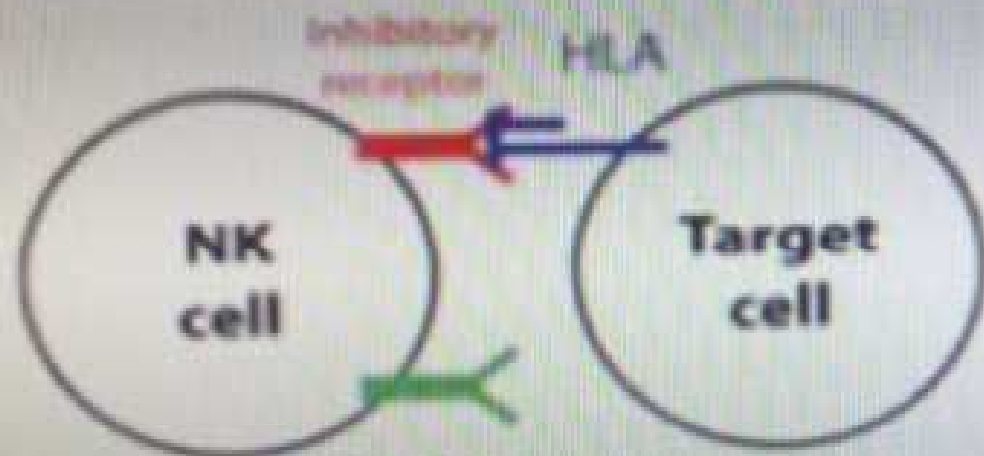
# Aktivační a inhibiční receptory NK buněk

Zdroj:  
 Quatrini L, Della Chiesa M, Sivori S, Mingari MC, Pende D, Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. Eur J Immunol. 2021 Jul;51(7):1566-1579. doi: 10.1002/eji.202049028. Epub 2021 May 10. PMID: 33899224; PMCID: PMC9292411.

# Regulace aktivity NK buněk

NO LYSIS

LYSIS



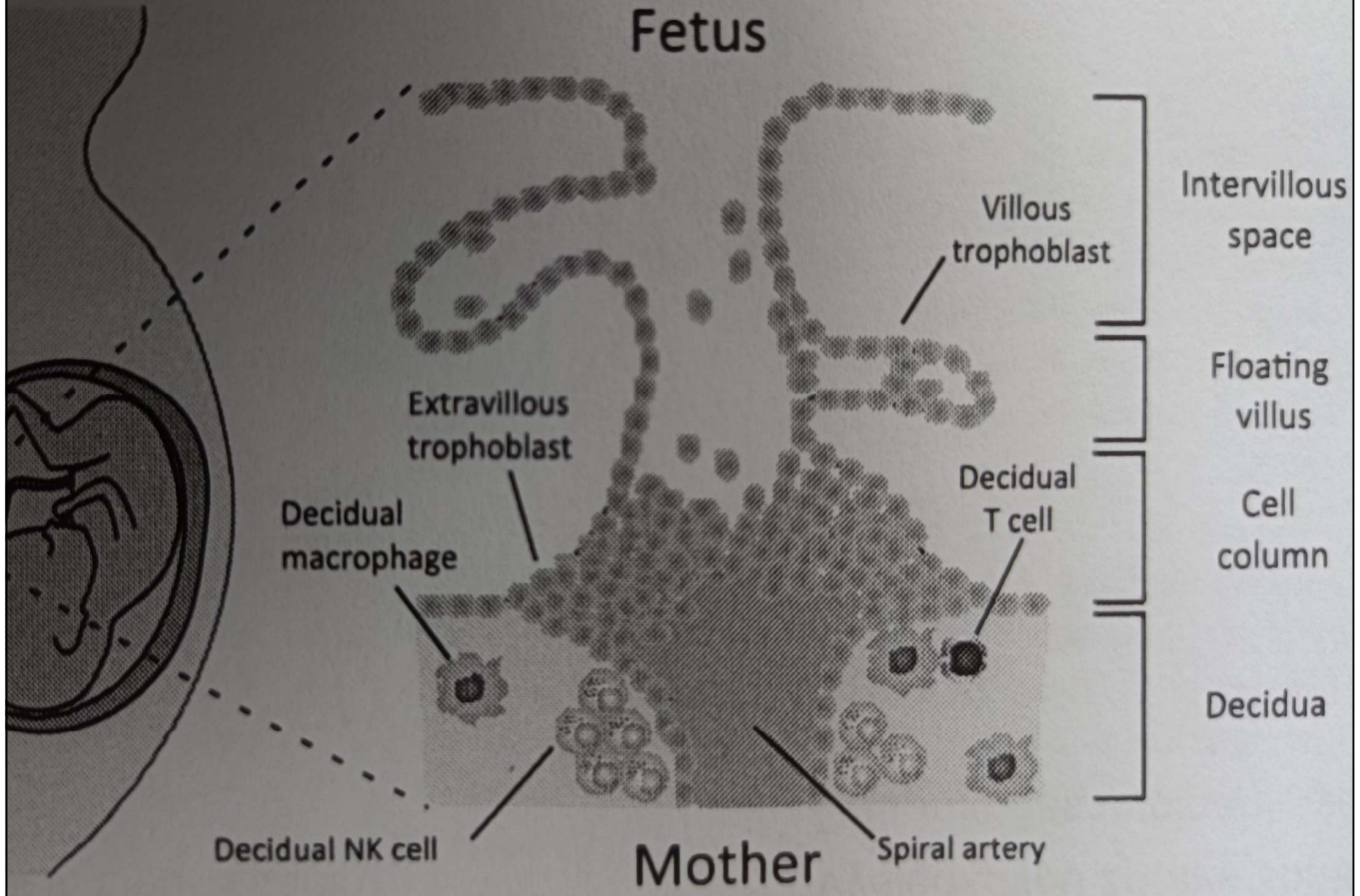
## Ochrana fetálního allograftu

- ❖ Plod v těle matky je z poloviny cizí štěp
- ❖ Klasické HLA produkty I. třídy –A, -B, nejsou exprimovány na buňkách trofoblastu → T lymfocyty jsou k plodu ignorantní
- ❖ na trofoblastu jsou syntetizovány HLA-C a neklasické molekuly HLA-E, -F,-G → inhibice cytotoxické aktivity mateřských buněk, angiogeneze, vaskulární remodelizace
- ❖ Závěr: Neklasické HLA molekuly hrají speciální biologickou roli = ochrana vyvíjejícího se fetu před mateřskými T a NK buňkami, hrají roli při potlačení imunitní odpovědi matky proti plodu – navození tolerance

## Úloha HLA molekul v transplantologii

- ❖ HLA molekuly jsou silné aloantigeny indukující rejekci štěpu





# Trophoblast

Fetal Side



A. Normal HLA Tissue Distribution



T Cell  
Activation

Fetal Side



B. No HLA Class I Molecules



NK Cell  
Activation

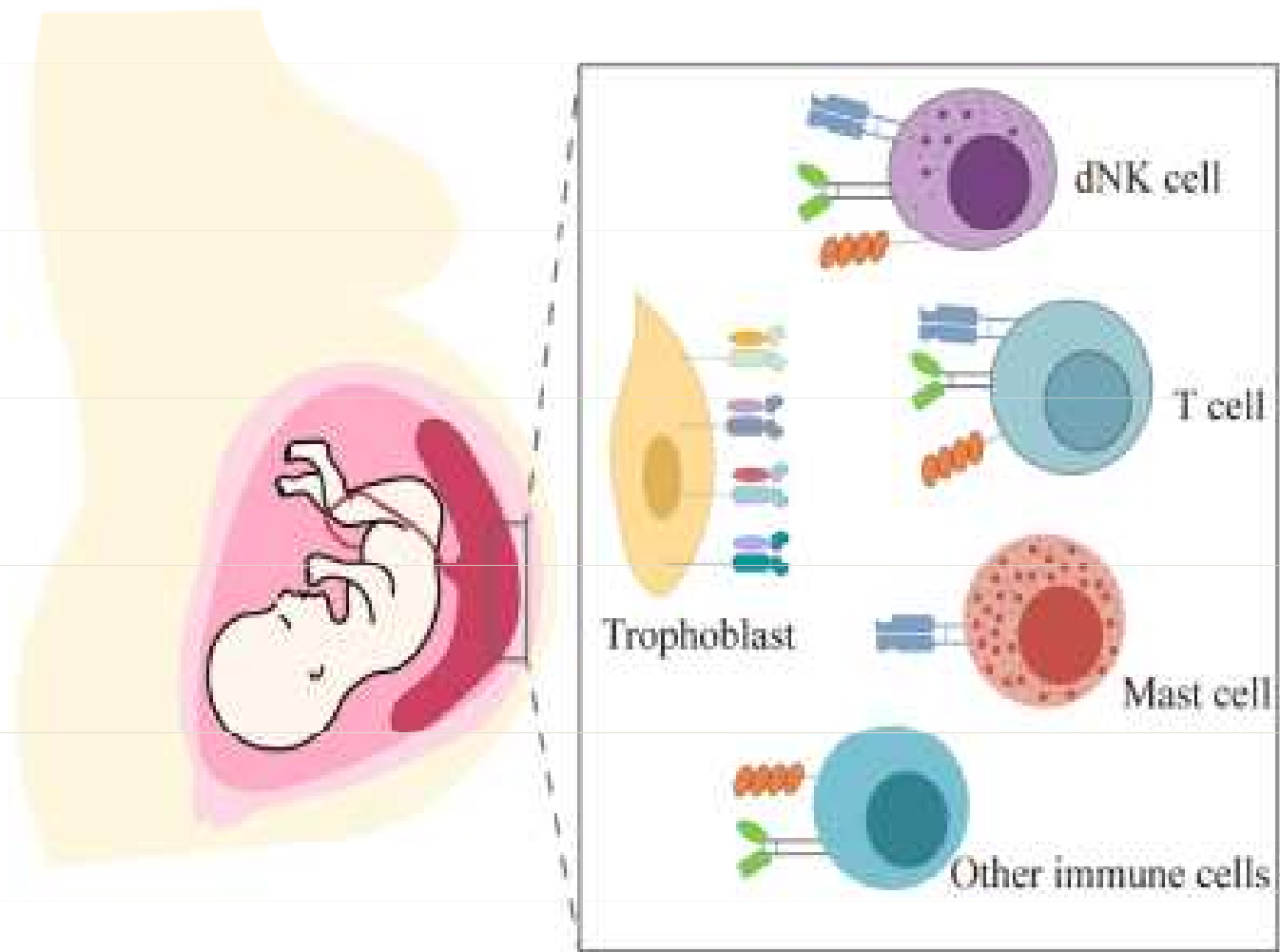
Fetal Side



C. Specialized HLA Class I (HLA-E, -G)



No T or NK Cell  
Activation



Inhibice cytotoxické aktivity buněk

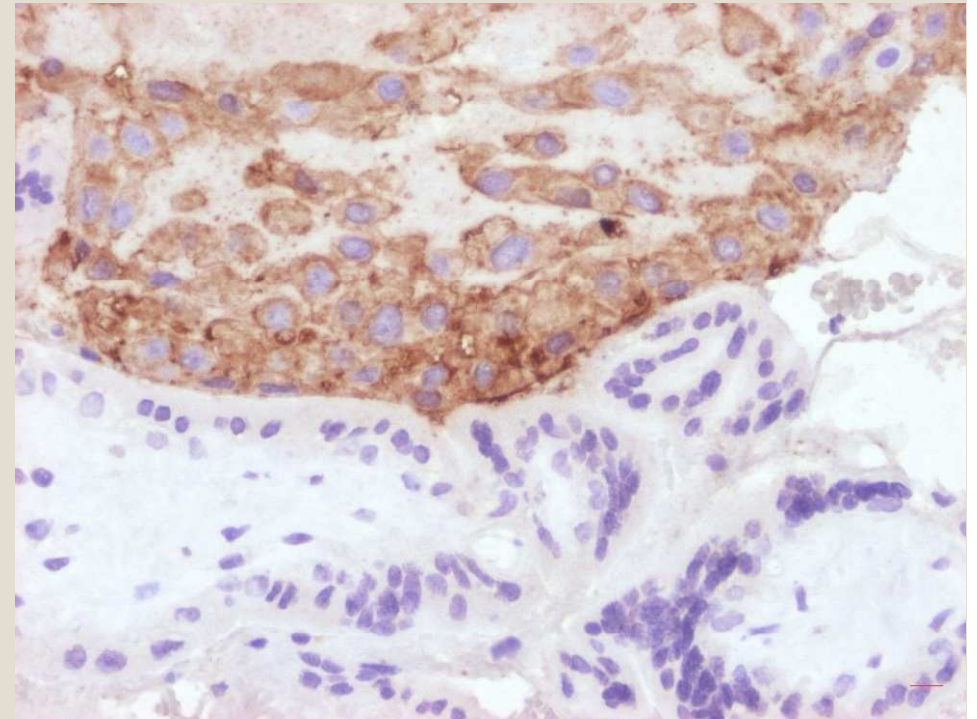
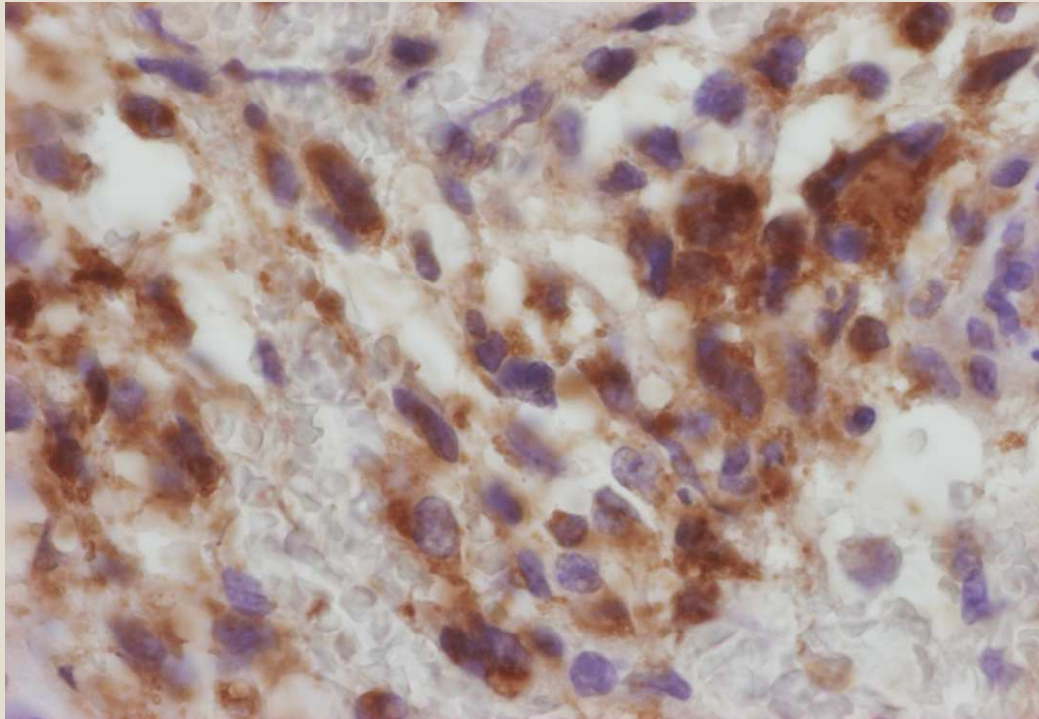
Sekrece cytokinů a chemokinů

Podpora přestavby placentárních cév

Stimulace placentární invaze trofoblastu

Glioblastoma neoplastic cells– HLA –E, 400x

Placental trophoblast cells – HLA – E, G



## Exprese HLA molekul

- ❖ HLA I. tř. - všechny jaderné buňky
- ❖ erytrocyty - mladé erytrocyty - atypický antigenní systém **Bga, Bgb, Bgc**
  - zralé erytrocyty nemají HLA antigeny
- ❖ plazma – solubilní HLA antigeny
- ❖ trombocyty – HLA I. třídy
  
- ❖ HLA II. tř. – omezený výskyt: B lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky
  
- ❖ exprese HLA antigenů I. a II. třídy může být zvýšena během zánětu, nově indukována na určitých buňkách, na kterých se normálně neexprimují (myocyty, hepatocyty ).
- ❖ zvýšená nebo nová exprese HLA antigenů je iniciována interferony
  
- ❖ nová exprese HLA antigenů pravděpodobně hraje majoritní roli v patogenezi rejekce transplantovaného štěpu
  
- ❖ snížená exprese HLA molekul - nádorové buňky, virem infikované buňky

typ buňky, tkáň	exprese	
	HLA I	HLA II
<b>BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU</b>		
<b>dendritické buňky</b>	+++	+
<b>makrofágy</b>	+++	++
<b>T lymfocyty</b>	+++	+
<b>B lymfocyty</b>	+++	+++
<b>JINÉ JADERNÉ BUŇKY</b>		
<b>neutrofilní granulocyty</b>	+++	-
<b>eosinofilní granulocyty</b>	+++	-
<b>epitelové buňky</b>	+++	-
<b>hepatocyty</b>	+	-
<b>nervové buňky</b>	+	-
<b>buňky ledvin</b>	+	-
<b>NEJADERNÉ BUŇKY</b>		
<b>trombocyty</b>	++	-
<b>erytrocyty</b>	-	-

Tab.1.: Odlišnosti v expresi molekul HLA I. a II. třídy na různých buněčných typech  
( J. Krejsek a O. Kopecký, Klinická imunologie, str. 125, 2004)

## Srovnání vlastností a funkce HLA I a HLA II

Charakteristika	HLA I	HLA II
Struktura	$\alpha$ řetězec + $\beta$ 2m	$\alpha$ a $\beta$ řetězce
Domény	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a $\alpha$ 3 + $\beta$ 2m	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a $\beta$ 1, $\beta$ 2
Buněčná exprese	téměř všechny jad.buňky	APC (B buňky, dendritické buňky, makrofágy)
Peptidy vázající místo	uzavřené, váže 8-9 amk tvořené doménami $\alpha$ 1 a $\alpha$ 2	otevřené, váže 12-17amk tvořené doménami $\alpha$ 1 a $\beta$ 1
Peptidy	endogenní antigeny	exogenní antigeny
Peptidy prezentované	CD8+T buňkám	CD4+T buňkám

## Dědičnost HLA systému

- ❖ geny vázané X geny volně kombinovatelné
  - ❖ HLA geny jsou vázané → děděny „**en bloc**“ od rodičů jako **haplotyp**
  - ❖ HLA geny exprimovány kodominantně – dvě alely v každém HLA lokusu
  - ❖ **crossing-over** v HLA oblasti během meiotického dělení = výměna genetického materiálu mezi homologickými chromozómy → rekombinantní sestavy alel (1%)
  - ❖ frekvence rekombinace je závislá na vzdálenosti mezi geny
  - ❖ **vazebná nerovnováha** ( linkage disequilibrium ) - běžná v HLA systému
    - určité kombinace alel se vyskytují častěji, než by se očekávalo na základě genových frekvencí
    - určité kombinace HLA alel asi poskytují v některých populacích určitou selekční výhodu
- Př.: **HLA- A1 a HLA-B8** s genovými frekvencemi **0,16 a 0,1** v populaci. Očekávaná frekvence výskytu haplotypu **HLA –A1, B8** v populaci by měla být  **$0,16 \times 0,1 \times 100\% = 1,6\%$** . V některých kavkazských populacích frekvence tohoto haplotypu zdaleka přesahuje očekávanou frekvenci ( **8%** )



# Nejčastější haplotypy v různých etnických skupinách

## African

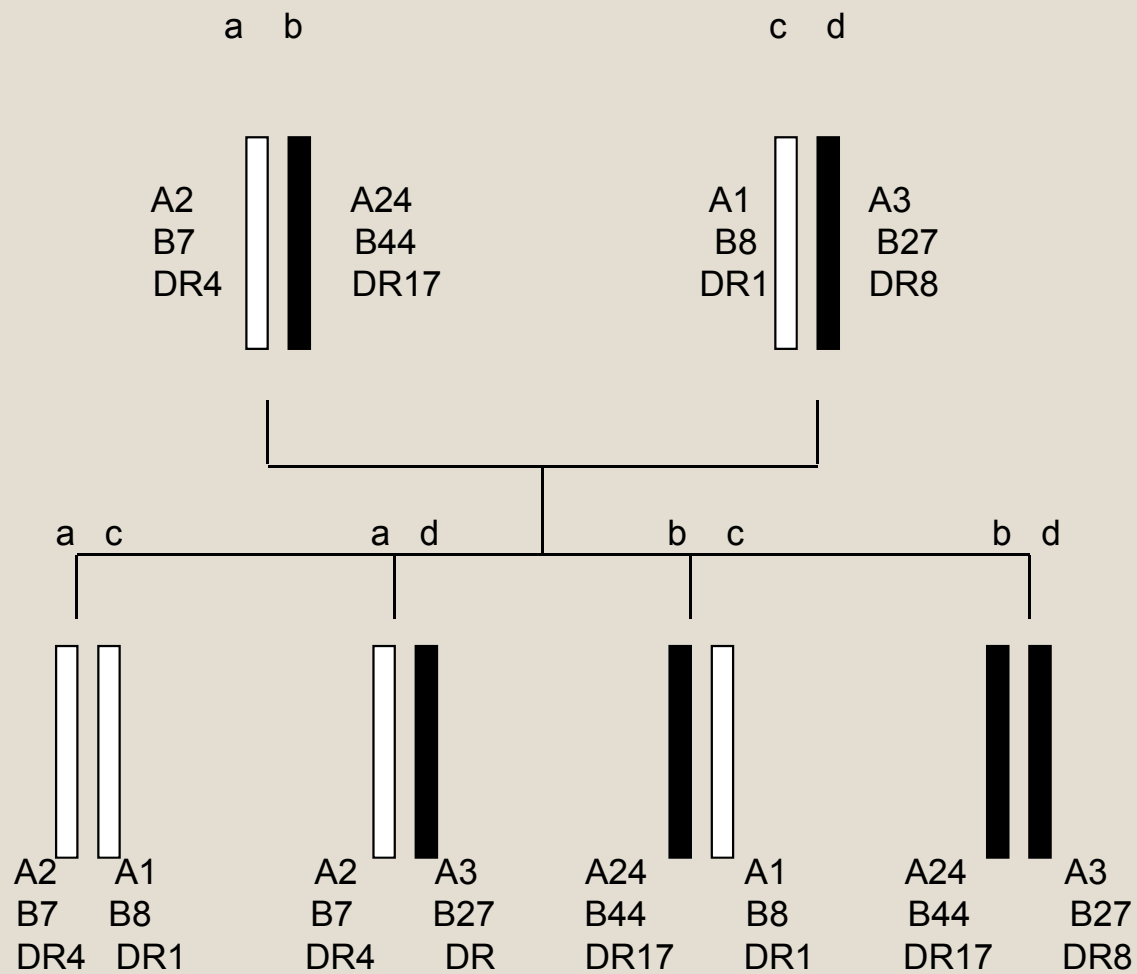
## Asian

## Caucasian

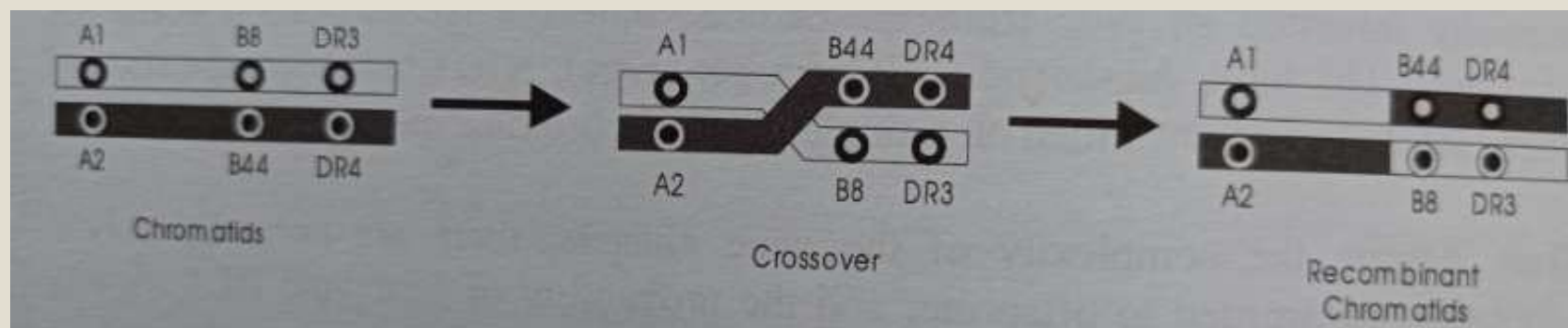
Haplotype (freq.%)

1.	A30,B42,DR3 (1,67)	A33,B58,DR3 (1,58)	<b>A1,B8,DR3 (5,18)</b>
2.	A1,B8,DR3 (1,25)	A33,B44,DR6 (1,46)	<b>A3,B7,DR2 (2,63)</b>
3.	A3,B7,DR2 (0,76)	A24,B52,DR2 (1,38)	<b>A2,B44,DR4 (2,15)</b>
4.	A2,B44,DR4 (0,65)	A2,B46,DR9 (1,35)	<b>A2,B7,DR2 (1,8)</b>
5.	A33,B53,DR8 (0,63)	A33,B47,DR7 (1,34)	<b>A29,B44,DR7 (1,47)</b>

# Dědičnost HLA haplotypů



# Vznik rekombinantních HLA haplotypů – crossing over



HLA-A1; B8; DR3

HLA-A2; B44; DR4

A1; B44; DR4

A2; B8; DR3

rekombinantní haplotypy

## HLA asociovaná onemocnění

- ❖ 1967 – první zprávy o asociaci HLA systému s onemocněním u člověka
- ❖ 1973 – objevena asociace **HLA-B27 s ankylozující spondylitidou** (m. Bechtěrev)
- ❖ u více než 50-ti onemocnění byla prokázána statisticky významná HLA asociace
- ❖ HLA asociované choroby jsou nemaligní chronická onemocnění
- ❖ převážně autoimunitní onemocnění
- ❖ většina chorob je multifaktoriálních ( geny+ environmentální složka)
- ❖ spouštěčem často environmentálním faktory (mikroorganismy, stres)

## Některé příklady asociace HLA alel s chorobou:

Birdshot retinopathy	-A29	RR=200
Ankylosing spondylitis	-B27	81,8
Narcolepsy	-DQB1*06:02	100
Psoriasis vulgaris	-B13, Cw6	4,5    7,2
Celiac disease	- DQB1*02, DQA1*05 (DQ2.5) - DQB1*03:02, DQA1*03:01 (DQ8)	13,3
Type I diabetes mellitus	- DQB1*02, DQA1*05 - DQB1*03:02, DQA1*03:01	10
Multiple sclerosis	-DQ6	4
Rheumatoid arthritis	-DR4	4

## ANKYLOSING SPONDYLITIS (AS, M. BECHTĚREV)

- ❖ asociace s HLA-B27
- ❖ zánětlivá forma artritidy, postižení ve větší míře mladí muži
- ❖ postižení začíná obvykle v dolní části páteře, kde zánět napadá kloubní spojení mezi páneví a páteří , nemoc se může postupně šířit nahoru a dolů ke kyčelním a kolenním kloubům.
- ❖ dlouhodobý průběh onemocnění, může končit velmi vážnými deformitami
- ❖ ostatní choroby asociované s HLA-B27 – Reiterova choroba (revmatické onem., často vyvolávají chlamydie, trojice obtíží: neinf.zánět kloubů, moč.trubice a spojivek)
- ❖ Anterior uveitis (přední uveitida - zánět duhovky, řasnatého tělíska)

## TYPE I DIABETES MELLITUS ( IDDM )

- ❖ silná asociace s DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 a DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 v kavkazské populaci
- ❖ protektivní účinek vůči IDDM je asociován s DQB1\*06:02 (DQA1\*01:02/DQB1\*06:02 )
- ❖ IDDM se vyvíjí postupně, dlouhá subklinická etapa spojená s postupujícím poškozením beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, které tvoří inzulin
- ❖ klinický projev – zničeno asi 90% buněk
- ❖ za rozvoj onemocnění zodpovědno více faktorů – geny a negenetická složka ( infekce enteroviry = polioviry, coxsackieviry A, B, echoviry )
- ❖ většina nákaz virem je asymptomatická

# CELIAC DISEASE (CD)

Predispoziční haplotypy

**-DRB1\*03- DQA1\*05:01- DQB1\*02:01 (DQ2.5)**

**-DRB1\*07- DQA1\*02:01- DQB1\*02:02 (DQ2.2)**

**-DRB1\*04 -DQA1\*03:01-DQB1\*03:02 (DQ8)**



- ❖ geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění
- ❖ intolerance glutenu (lepek), trávicí soustava pacienta není schopna trávit potraviny obsahující lepek
- ❖ chronický zánět sliznice tenkého střeva, prevalence v ČR 1 : 200-250 obyv.
- ❖ pro vývoj onemocnění nutné 3 podmínky:
  - genetické předpoklady
  - konzumace stravy obsahující lepek
  - spouštěč onemocnění (stres, trauma, virová infekce)
- ❖ dlouhodobé průjemy, únava, bolesti kostí, břicha, svalů, u dětí také problémy se zuby, růstem a vývojem
- ❖ léčba – celoživotní dodržování bezlepkové diety



## MULTIPLE SCLEROSIS (MS)

- ❖ slabší asociace s HLA alelami DRB1\*15:01, DQB1\*06:02 a DQA1\*01:02
- ❖ vliv faktory genetické i negenetické (vliv prostředí, neznámé imunologické procesy)
- ❖ chronické zánětlivé demyelinizující onemocnění centrálného nervového systému s nejasnou etiologií a patogenezi

## NARKOLEPSIE

- ❖ neurologické **onemocnění**, v ČR 2500-5000 osob
- ❖ hypersomie – zvýšená denní spavost někdy doprovázená kataplexií (ochabnutí kosterního svalstva)
- ❖ pravděpodobně autoimunitní onemocnění s dědičným sklonem nastartované vnějším faktorem (streptokoková infekce) namířené proti hypocretinovým neuronům, které mají budivou funkci

# HLA nomenklatura

## 1. Serologická definice HLA antigenů – maximálně 2 znaky

- ❖ antigeny základní – např. A9, A10, B51, B40, Cw3, DR2, DQ3....
- ❖ antigeny splitové (subtypy) - sdílejí společné sérologicky definované epitopy

např. A10 → A25, 26, 34

B40 → B60, 61

Cw3 → Cw9, 10

DR2 → DR15, 16

DQ3 → DQ7, 8, 9

- ❖ antigeny obecné – DR51, DR52, DR53

**HLA** = Hlavní histokompatibilní komplex člověka

**A, B, C, DR, DQ, DP**.....lokusy

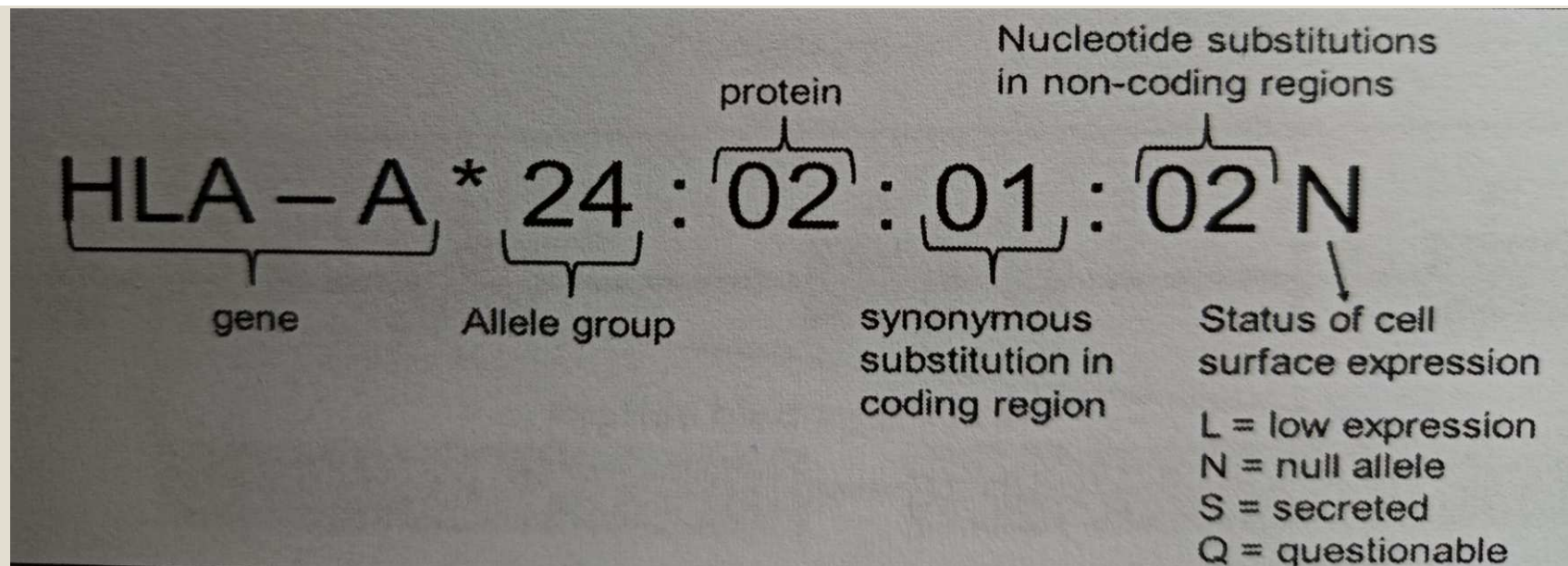
**číslo (A1, Cw3)** = označení specifity molekuly (antigenu)

## **2. Molekulárně-genetická definice HLA alel**

používá znaky dvou a vícemístné

**HLA-A\*02, \*31, B\*08, \*44, C\*02, \*12, DRB1\*04, \*13, DQB1\*03, \*08**  
- úroveň „low resolution“

**HLA-A\*01:01, \*02:02, B\*07:01, \*35:01, C\*02:02, \*03:03, DRB1\*04:01,  
\*13:05, DQB1\*03:04, \*03:05**  
- úroveň „high resolution“



Někdy více jak 4 znaky:

**C\*02:02:01**, **\*02:02:02**.....alely se liší v nukleotidové substituci na úrovni DNA, ne v aminokyselinové sekvenci na úrovni polypeptidu (tichá mutace)

**A\*24:02:01:01** 7. a 8. pozice – polymorfismus v nekódující oblasti

**A\*24:02:01:02L** „ low expressed“ allele

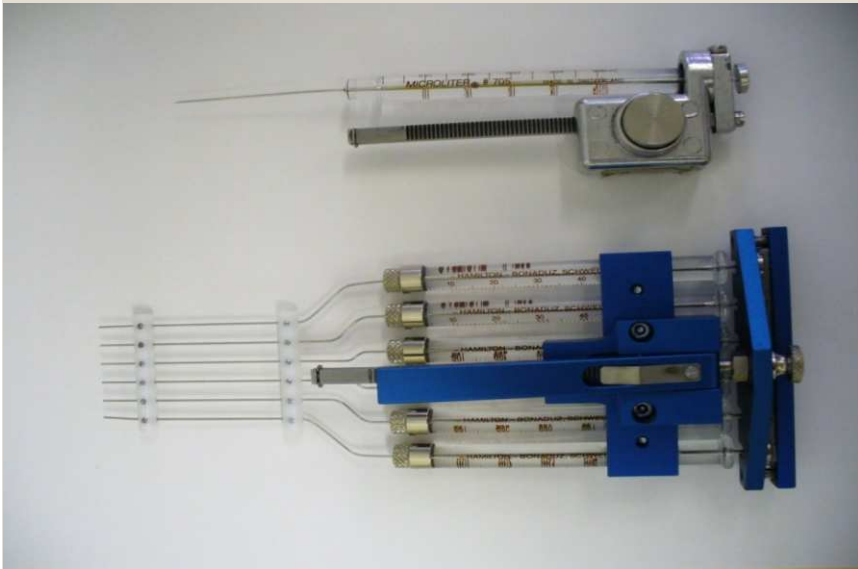
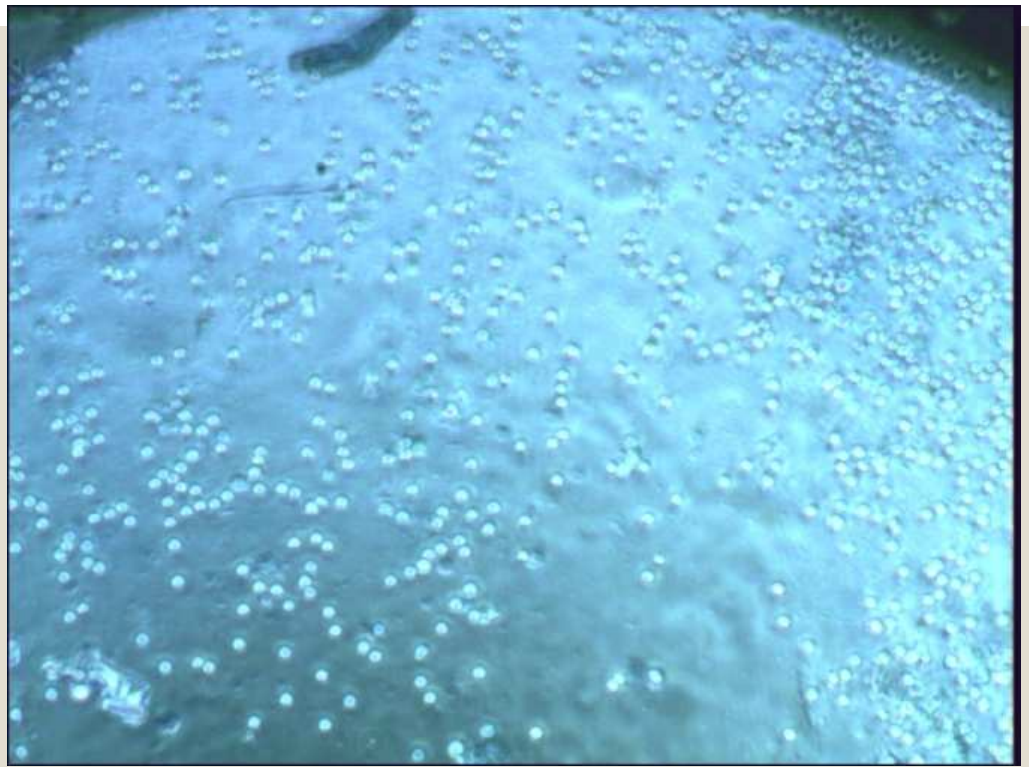
**B\*51:11N** „ null“ allele

# Metody typizace HLA antigenů

## 1. serologické metody

### **Complement –Dependent Cytotoxicity Assay ( CDC) = Lymfocytotoxický test ( LCT )**

- ❖ lymfocyty typovaného jedince jsou nejdříve inkubovány se specifickými antiséry, která jsou rozkapána na mikrotitračních plotnách
- ❖ přidáno králičí sérum jako zdroj komplementu
- ❖ vazba protilátky se specifickým HLA antigenem na membráně lymfocytu aktivuje komplement, který poškozují buněčnou membránu
- ❖ vitální barvení ( trypanová modř, eosin ), mrtvé buňky se obarví
- ❖ mikroskopické hodnocení, hodnotí se procento obarvených ( mrtvých ) buněk, síla reakce -, 2, 4, 6, 8

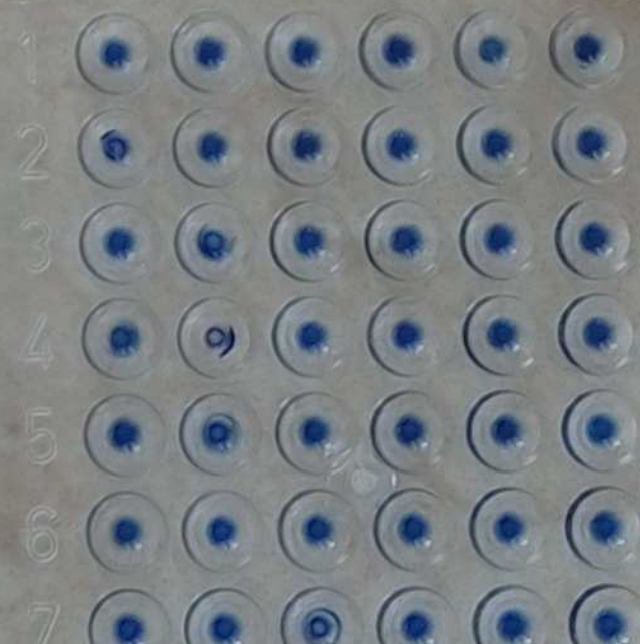




S2505/15



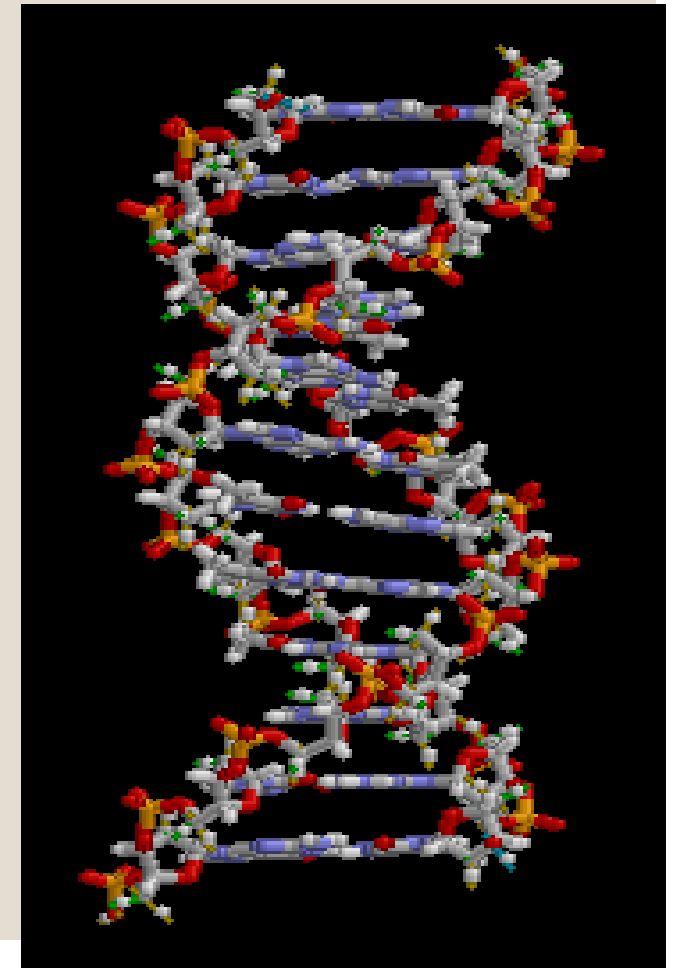
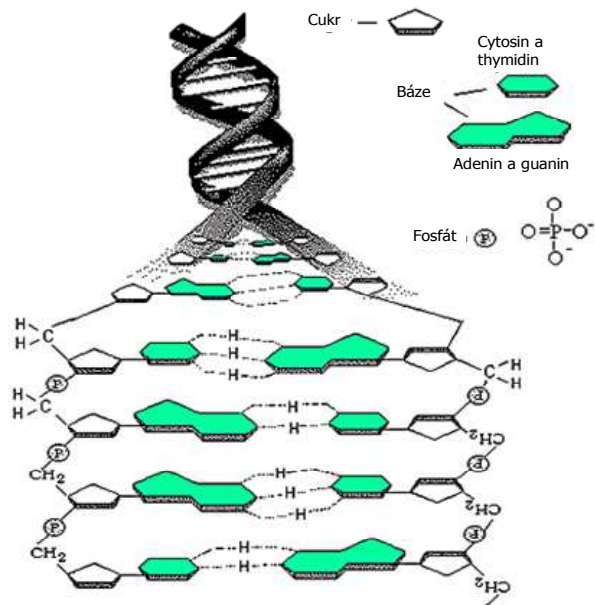
S2505/15



## 2. molekulárně - genetické metody

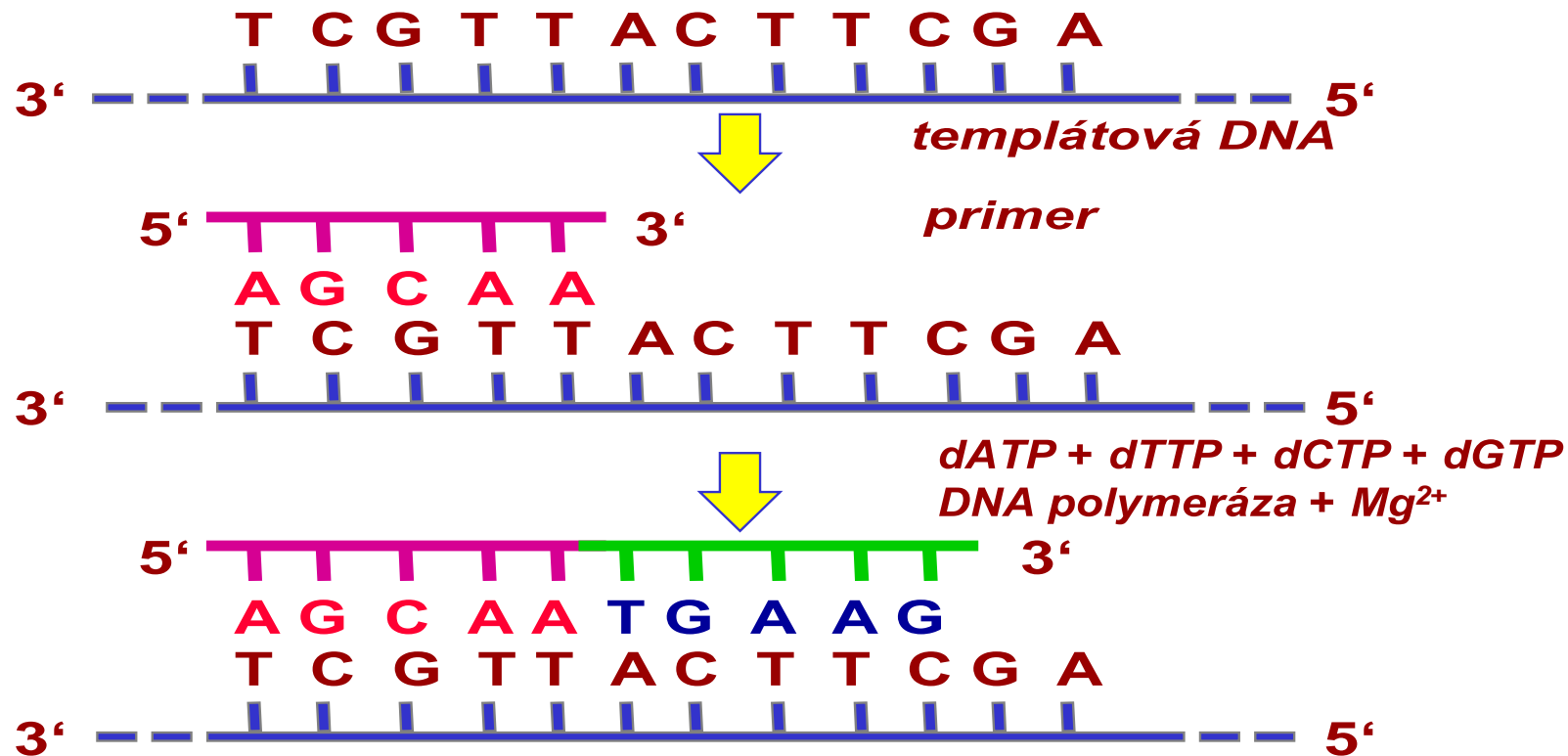
- ❖ PCR – polymerázová řetězová reakce
- ❖ izolace DNA ( plná krev, bukání stěry, krevní skvrny, vlasové folikuly, parafínové tkáňové bloky)
- ❖ amplifikace DNA ( PCR )
- ❖ detekce PCR produktu

Počet kopií DNA -  $2^n$   
n – počet cyklů (30 – 35)





# PCR - elongace primerů



## HLA typizace pomocí PCR metod

PCR – SSP( sequence – specific priming)

PCR – SSO ( sequence – specific oligonukleotide probes )

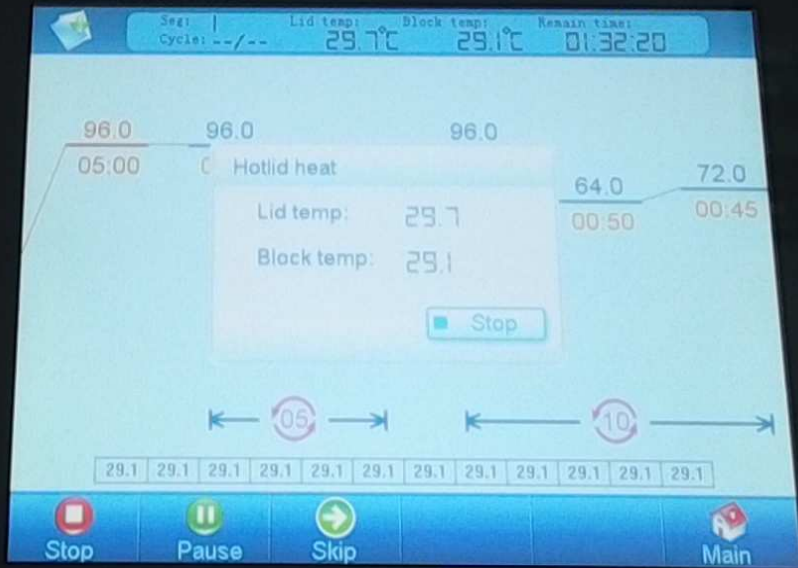
PCR – SBT ( sequence based typing )

Real-Time PCR

NGS – sekvenování nové generace

HOT SURFACE!

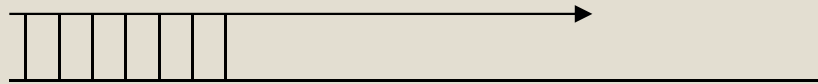
HOT SURFACE!



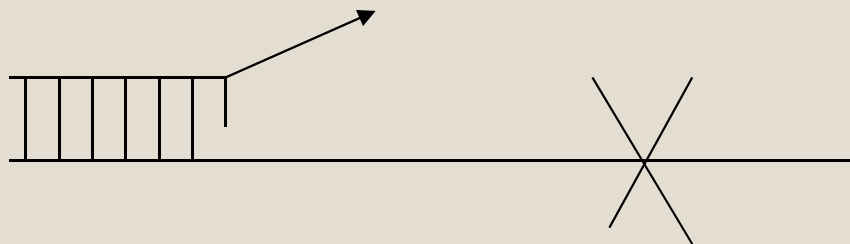
## 1. PCR – SSP

- ❖ alelově a skupinově specifické primery určují jednu alelu nebo skupinu alel
- ❖ tolik primerových párů, aby mohly být amplifikovány a detekovány všechny známé alely daného lokusu
- ❖ PCR – SSP může být užita pro „low resolution“ nebo „high resolution“
- ❖ HLA typizace „low resolution“ pro lokusy -A, -B, -DR, -DQ vyžaduje 95 – 100 primerových párů
- ❖ v každé amplifikační směsi interní kontrola amplifikace
- ❖ kontrola kontaminace – zkumavka obsahuje všechny reagenty pro PCR kromě templátové DNA
- ❖ Detekce elektroforeticky, amplicony s menší molekulovou hmotností migrují v gelu rychleji než amplicony s vyšší molekulovou hmotností
- ❖ vizualizace – obarvení gelu fluorescenční barvou, která se inkorporuje do DNA, expozice gelu UV světlem na transiluminátoru
- ❖ fotodokumentace

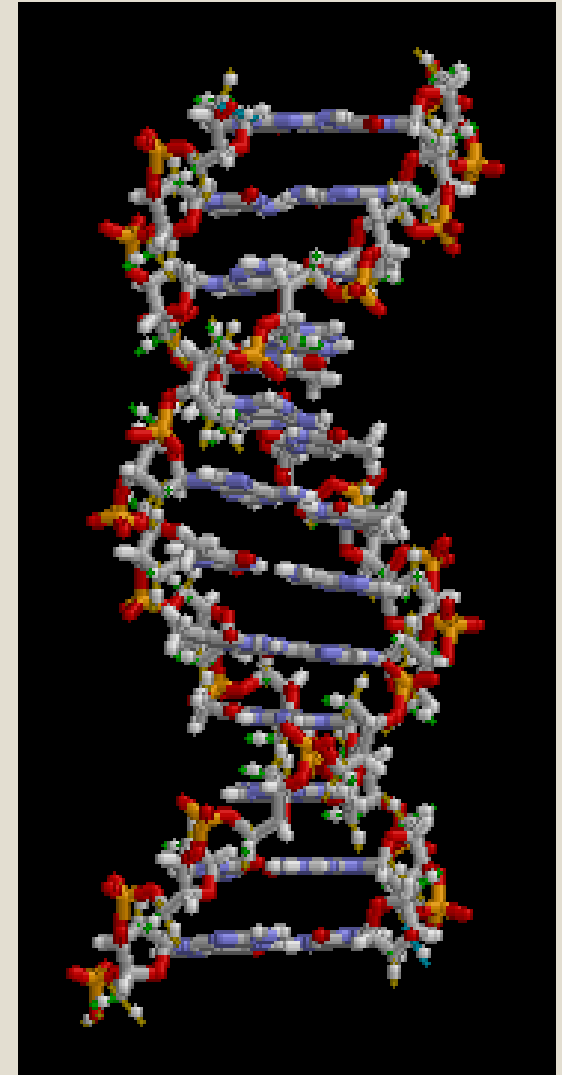
# Princip SSP-PCR

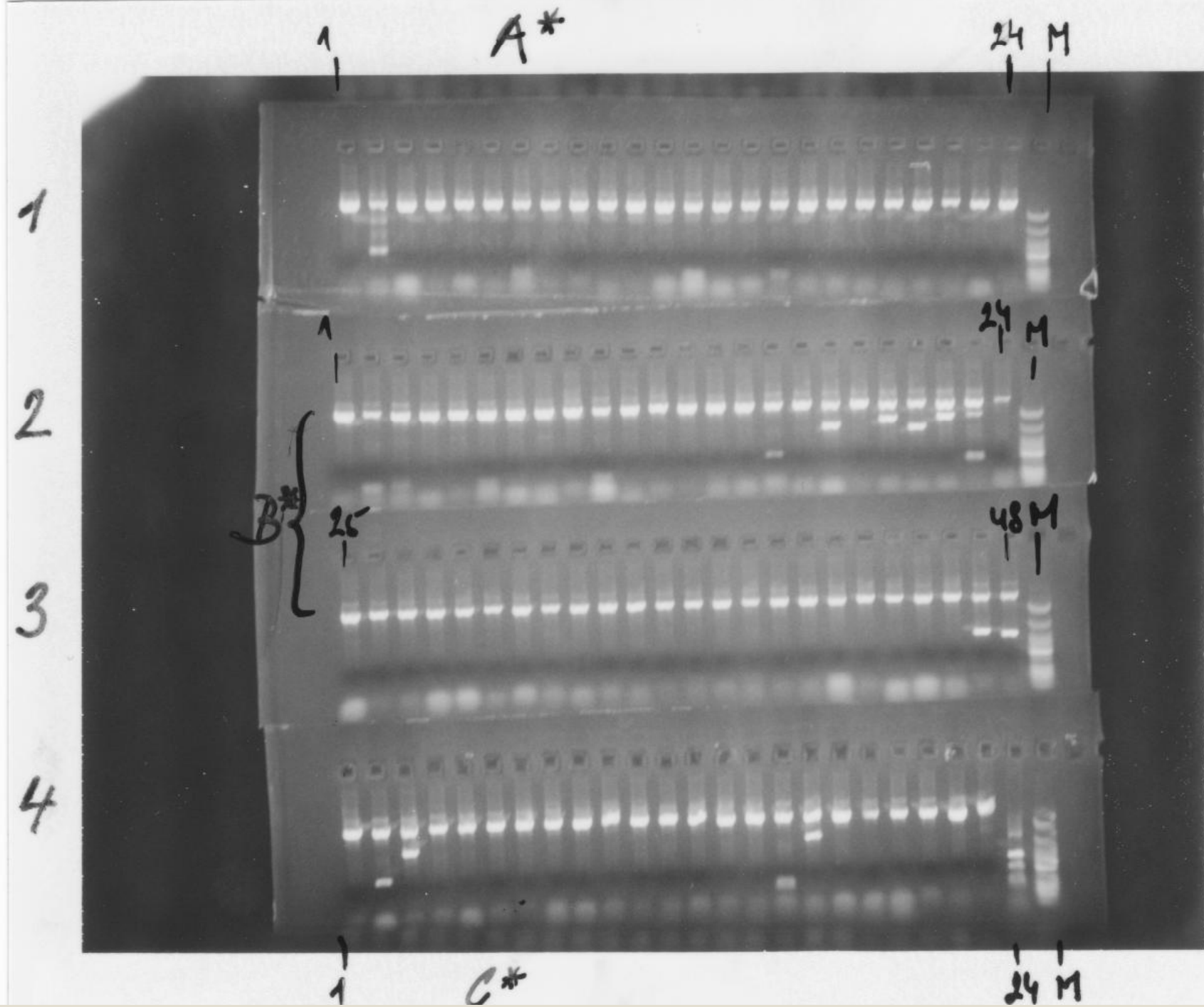


úplná shoda – amplifikace proběhne



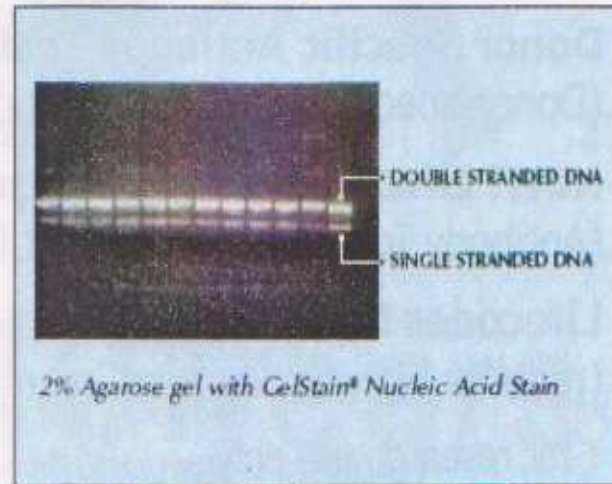
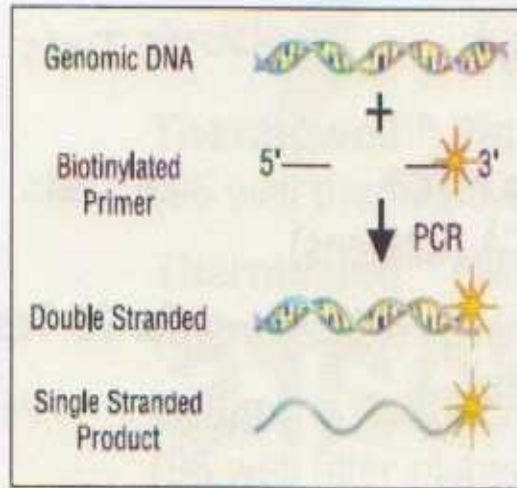
neshoda – amplifikace neproběhne



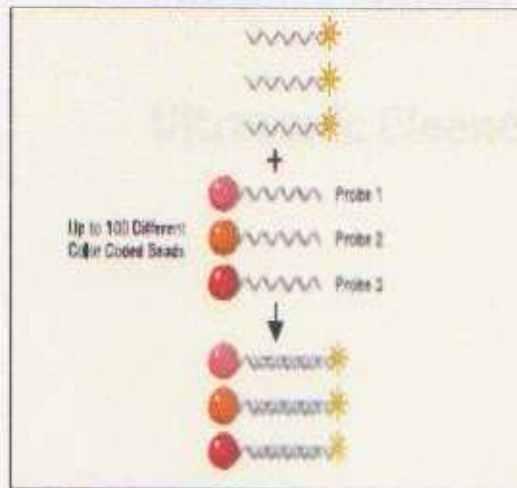


## 2. PCR-SSO typizace na analyzátoru Luminex

(for 100 typings)



1. Amplify with biotinylated primers



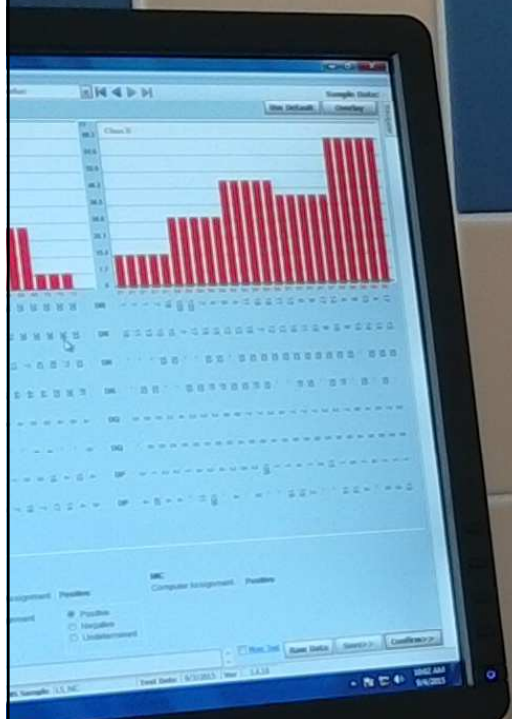
2. Hybridize with beads



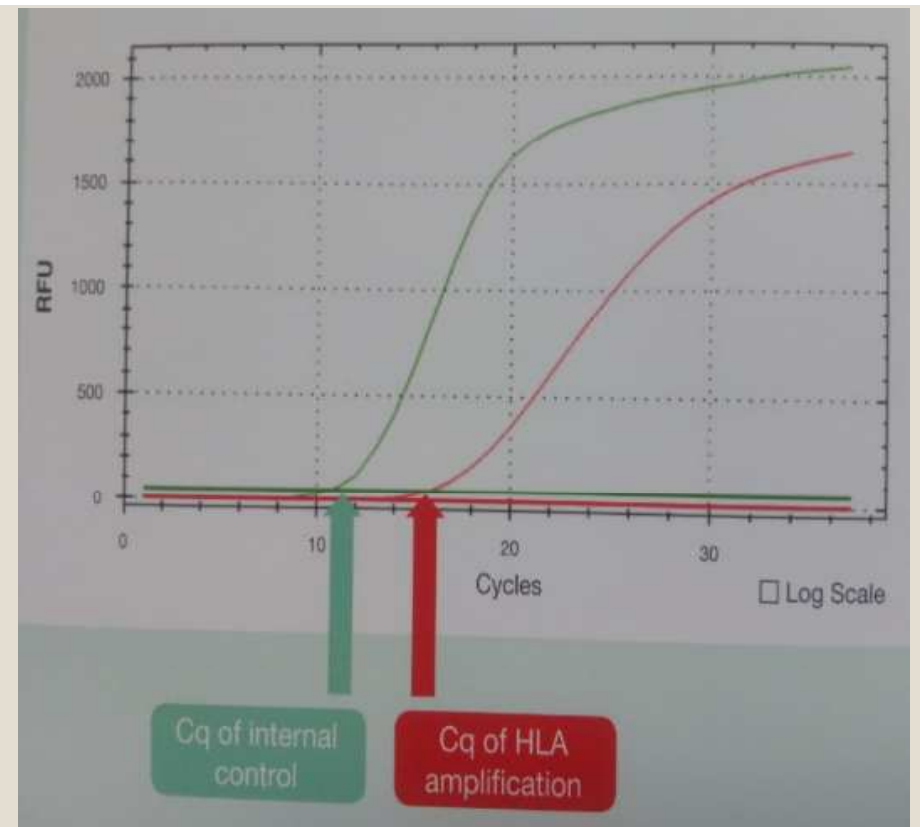
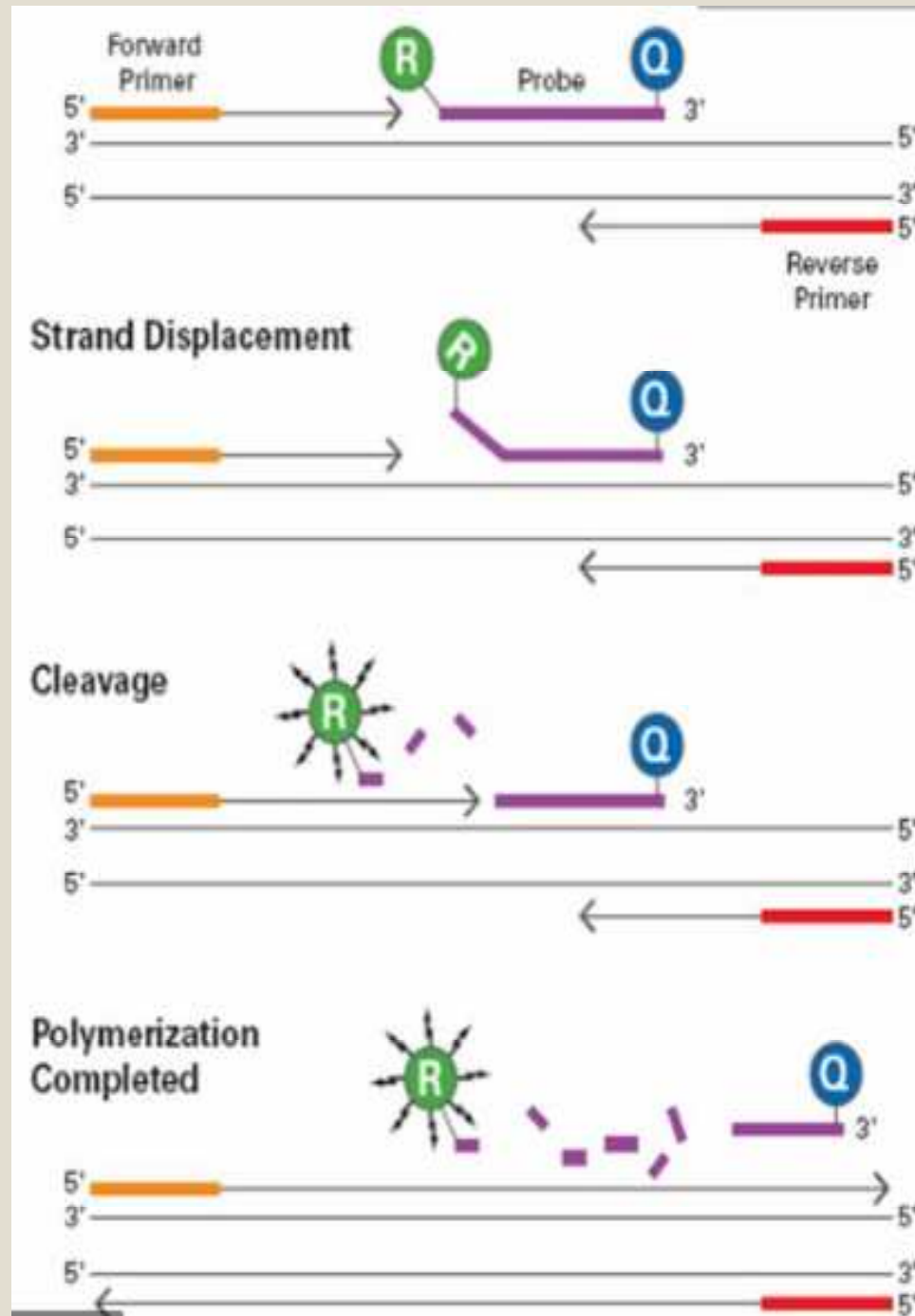
3. Label with SA-PE



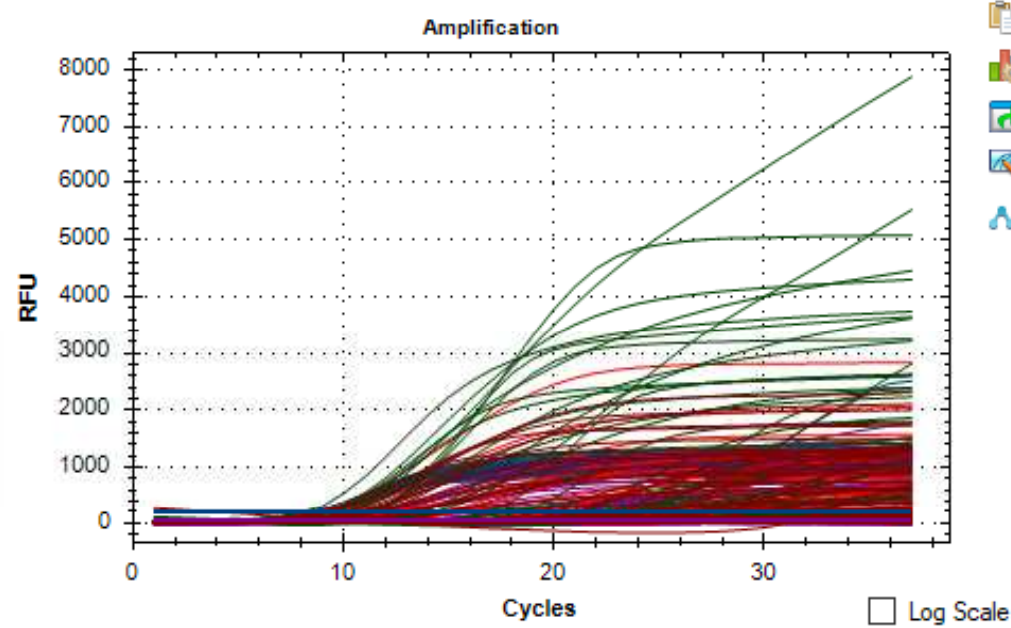
4. Analyze in the fluoroanalyzer



### 3. Real-Time PCR







No wells designated as Sample Type standard.

FAM  HEX  Texas Red  Cy5  Quasar 705

Step Number: 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
D11	HEX		Unkn		N/A
D12	HEX		Unkn		N/A
E01	HEX		Unkn		N/A
E02	HEX		Unkn		N/A
E03	HEX		Unkn		N/A
E04	HEX		Unkn		N/A
E05	HEX		Unkn		N/A
E06	HEX		Unkn		N/A
E07	HEX		Unkn		30.90
E08	HEX		Unkn		N/A
E09	HEX		Unkn		N/A
E10	HEX		Unkn		22.71
E11	HEX		Unkn		0.27

## 4. PCR – SBT

- ❖ použití ddNTPs ( dideoxy nucleotide triphosphates, chybí 3'-OH skupina ), které fungují jako terminátory PCR reakce
- ❖ ddNTPs značeny 4 různými fluorescenčními barvivy, PCR probíhá v 1 zkumavce a elfo v 1 linii
- ❖ sekvenátor – probíhá kapilární elektroforéza, produkty rozdělovány podle velikosti (rozdíly v délce o 1 nukleotid)
- ❖ laserový paprsek snímá koncový fluorescenčně značený ddNTP
- ❖ interpretace výsledků pomocí softwaru

## 5. NGS = sekvenování nové generace

- ❖ příprava genové knihovny
- ❖ sekvenování
- ❖ analýza



~ 3.5 hr



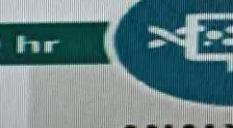
~ 6.5 hr



~ 2 hr



~ 9 hr



### AMPLIFICATION

NXType™ amplification

### LIBRARY PREPARATION

Barcode library creation

### TEMPLATE PREPARATION

Isothermal clonal amplification onto Ion Sphere Particles™

### SEQUENCING

Load Ion™ chip and run PGM™

### ANALYSIS

TypeStream™ Software analyzes automatically

Day 1

Day 2

Day 3

## Full workflow < 3 days

#### Competitive Advantages

Turn-key Solution

Multiplexed primer design (reduces library prep)

Short PCR Time (~ 1.5 hours)

Suitable for Low to High throughput (≤ 48 samples / run)

Auto-analysis with TypeStream software plug-in

Sample-to-Results < 3 Days

#### Unique

Workflow



Library Prep



Library Prep

Workflow

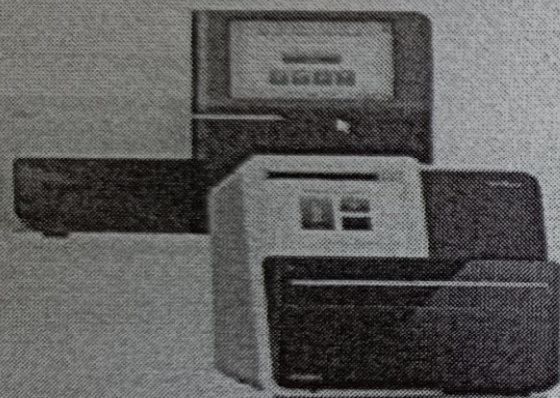
Analysis



Workflow

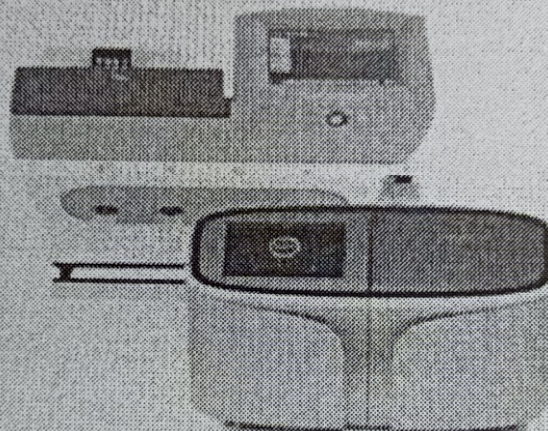


### Illumina MiSeq



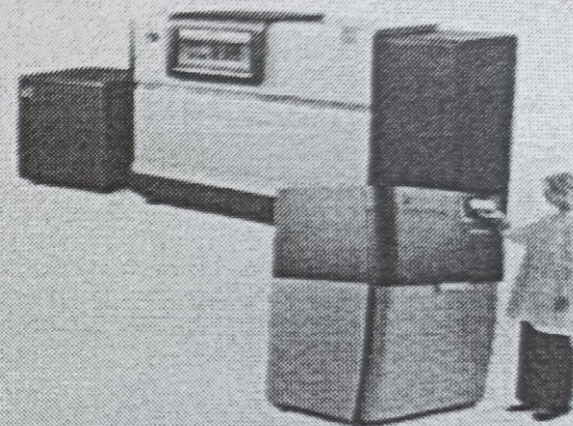
MiniSeq

### Ion Torrent PGM



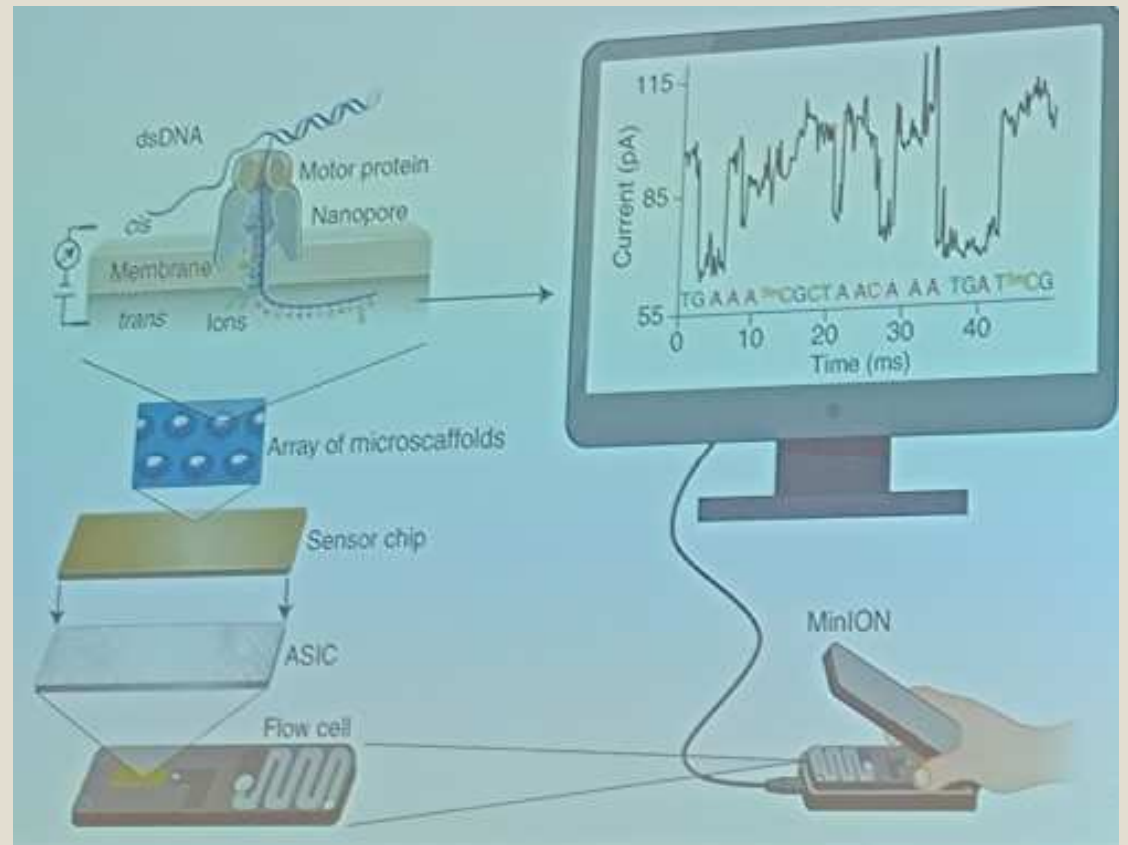
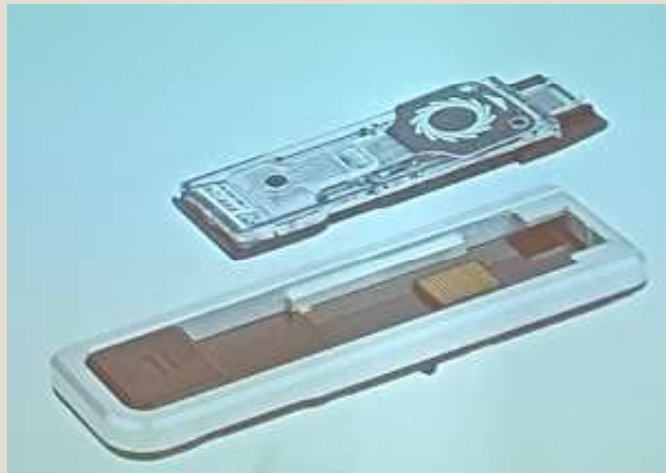
S5

### Pacific Biosciences RSII

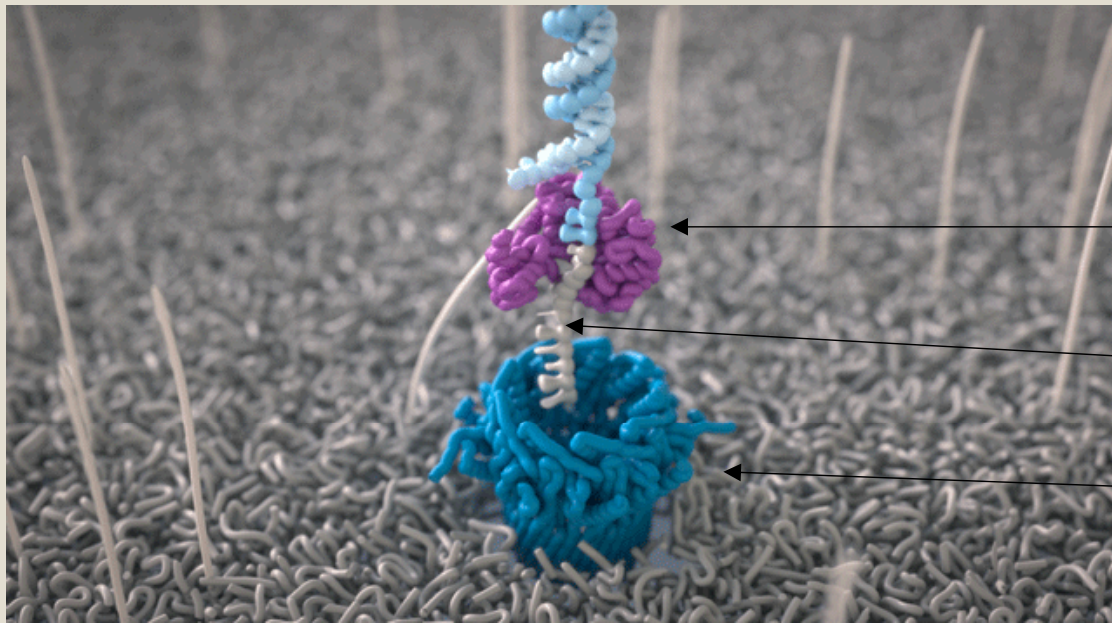


Sequel

# Nanotype technology



gDNA – single tube amplification – quantitation DNA – barcoding – pooling and purification – add sequencing adapters – flow cell check – flow cell priming – mixing library with sequencing buffer and loading beads – library loading - sequencing



Motor protein

Adapter sequence

Nanopore

