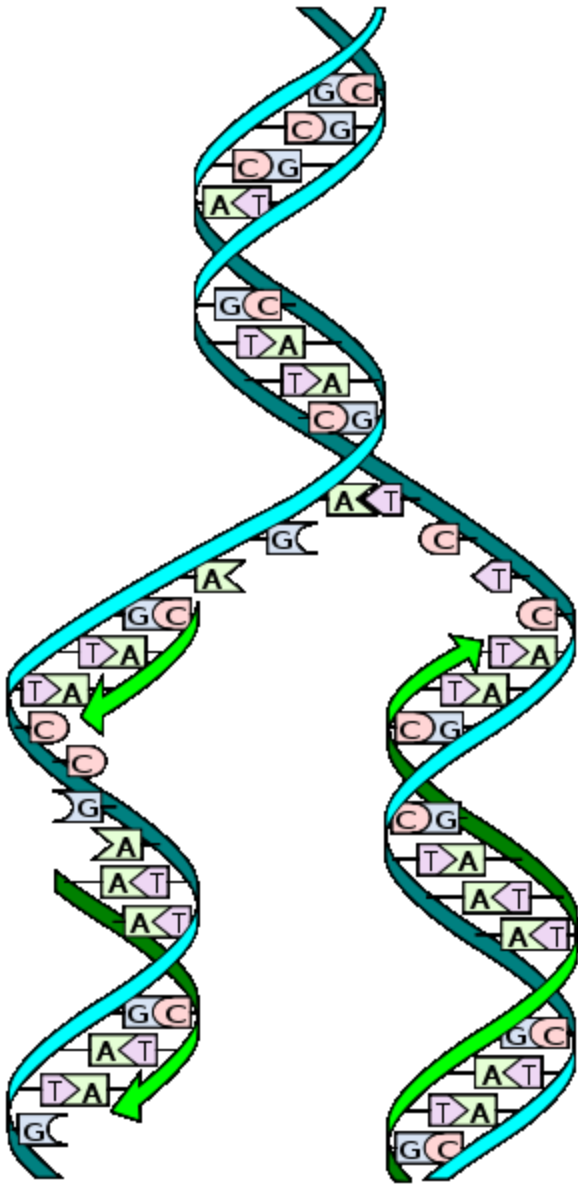


Molekulárně-biologické techniky

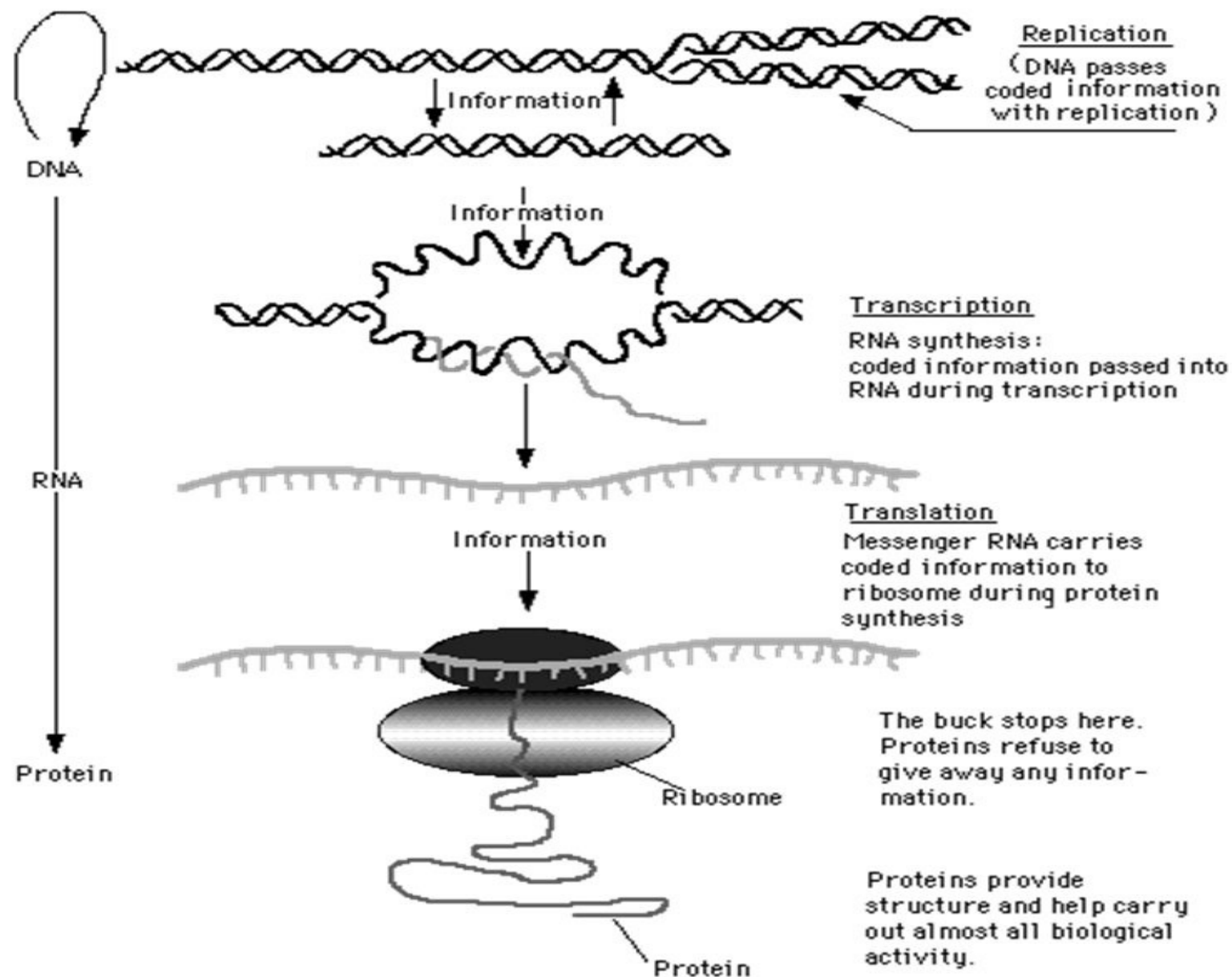
MUDr. Dana Bučková, Ph.D.



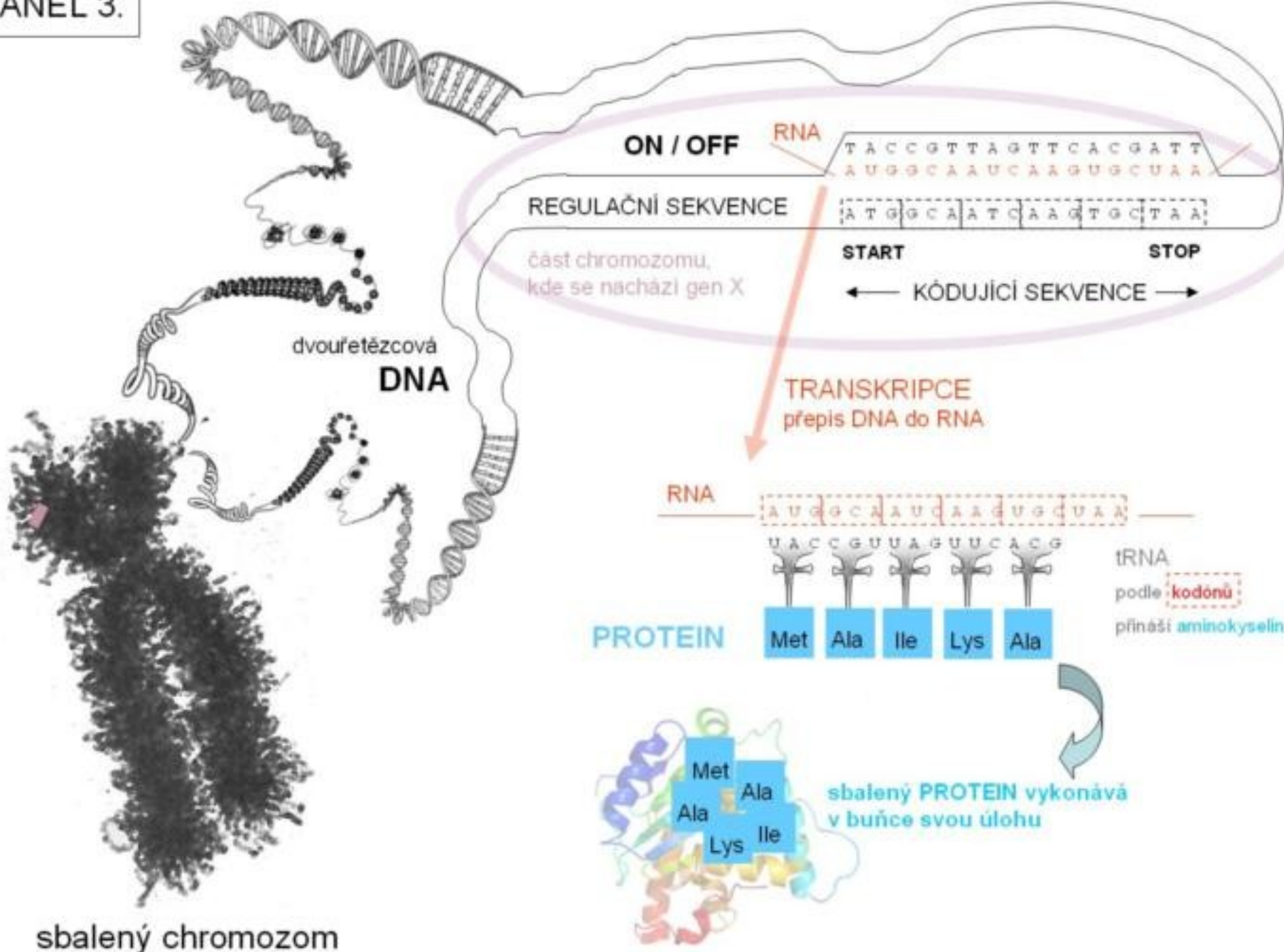
Molekulární biologie

- vědní disciplína zabývající se studiem buněčných biologických procesů na jejich molekulární úrovni
- věnuje se popisu biologických makromolekul a jejich vzájemným funkčním vztahům
- pozornost je především věnována funkci makromolekul podílejících se na dědičnosti organismů, tedy DNA, RNA a proteinům:
$$\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{protein}$$
- integruje ve svém přístupu hlediska biologická, chemická, fyzikální i genetická

The Central Dogma of Molecular Biology



PANEL 3.



sbalený chromozom

sbalený PROTEIN vykonává v buňce svou úlohu

Využití molekulárně biologických metod

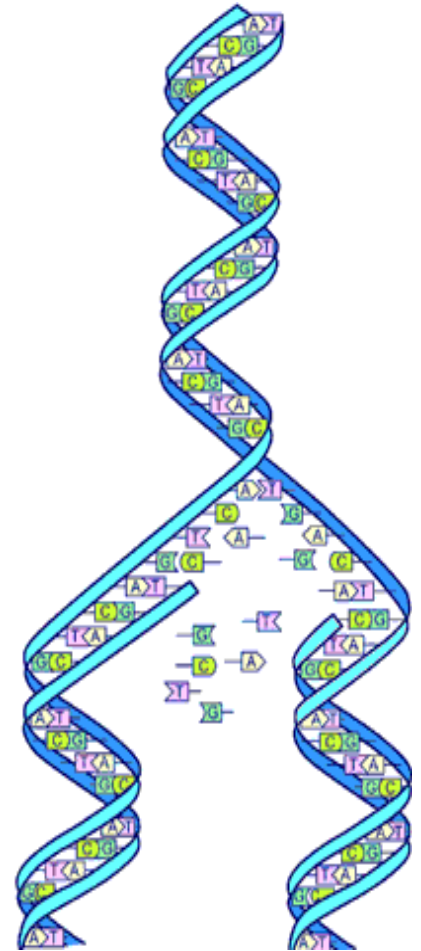
- **genetika** - detekce dědičných chorob (fenylketonurie, cystická fibróza aj.)
- **farmakogenetika** (glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, N-acetyltransferáza)
- **genetické inženýrství** - konstrukce genotypů metodami molekulární biochemie
- **přímý průkaz patogenních mikroorganismů** (CMV, HBV, HCV, borrelie atd.)
- **kriminalistika** (identifikace pachatelů i obětí)
- **výzkum** (hledání zodpovědných genů)

Techniky

- izolace DNA (RNA)
- hybridizační techniky
- mapování a sekvenování genomu
- amplifikační techniky (pomocí PCR)
- metody identifikace polymorfizmů
- genová exprese mRNA
- Real-time RT-PCR
- reverzní transkripce



Izolace DNA (RNA)



Fenol-chloroformová extrakce nukleových kyselin

- přidána směs fenolu, chloroformu, izoamylalkoholu
- fenol sráží proteiny, izoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu
- vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny
- potřebujeme-li čistou DNA, musí být RNA odstraněna působením RNázy

Adsorpce na silikát

- DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí (např. NaI) adheruje na silikátový (skleněný) povrch
- DNA lze pak z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru

Izolace DNA dle Sambrooka (1989)

- 5ml venózní krve do 0,3 ml 0,5M EDTA, + dest. voda (do 20 ml), zmražení na -20°C min na 48 hod
- rozmražení ve vlažné vodě cca 20 min, centrifugace 10 min při 5000(4°C), opak. promytí dest. vodou a fyziolog. roztokem, opět centrifugace 10 min při 5000(4°C), k promytému sedimentu 0,5 ml fyziolog. roztoku, přidá se FASANO (5M NaCl, 0,5M EDTA, 1M TRIS, 10% sodium dodecylsulfát) a 20 μg proteinázy K, inkubace při 37°C do druhého dne,
- 1,4 ml 5M NaCl a 1,4 ml chloroformu, centrifugace 15 min při 8000(4°C), horní vrstva se odpipetuje a přidá se k ní 4 ml ledového izopropylalkoholu
- vysrážená vlákna DNA se namotají na skleněný háček, opláchnou 70% etanolem a osuší 5 min na vzduchu, pak se rozpustí ve 250 μl TE pufru a nechá se 24 hod při pokojové teplotě za občasného míchání
- zásobní roztok DNA se uchovává při teplotě -20°C

Extrahuj si DNA doma

Připravte si: kousek ovoce (kiwi, rajče, jahodu...) , malou uzavíratelnou skleničku, uzavíratelný plastový sáček, filtrační papír (kávový filtr, papírový kapesník), líh (95% etanol), jar na nádobí (šampón), sůl, destilovanou vodu, nálevku a misku

Ovoce očistíme a vložíme do plastového sáčku, který dobře uzavřeme. Nyní ovoce v sáčku důkladně rozmačkáme, výsledek by měl být co nejtekutější a homogenní.

Zvlášť v misce smícháme 1 kávovou lžičku Jaru (nebo šampónu) a 3 polévkové lžíce destilované vody a špetku soli (slabou čtvrtku lžičky), tak aby se nám to moc nezpěnilo.

Vzniklý roztok přilijeme do sáčku s ovocem a pokračujeme v mačkání ovoce. Můžeme si pomoci tužkou, kterou budeme po sáčku přejíždět jako válečkem na těsto.

Filtrační papír vložíme do nálevky, kterou postavíme do skleničky.

Rozmačkané ovoce vlijeme do nálevky. Počkáme, až se nám ovoce přefiltruje a filtrační papír se zbytkem ovoce vyhodíme.

Do skleničky přidáme trojnásobné množství ledově studeného lihu a skleničku uzavřeme.

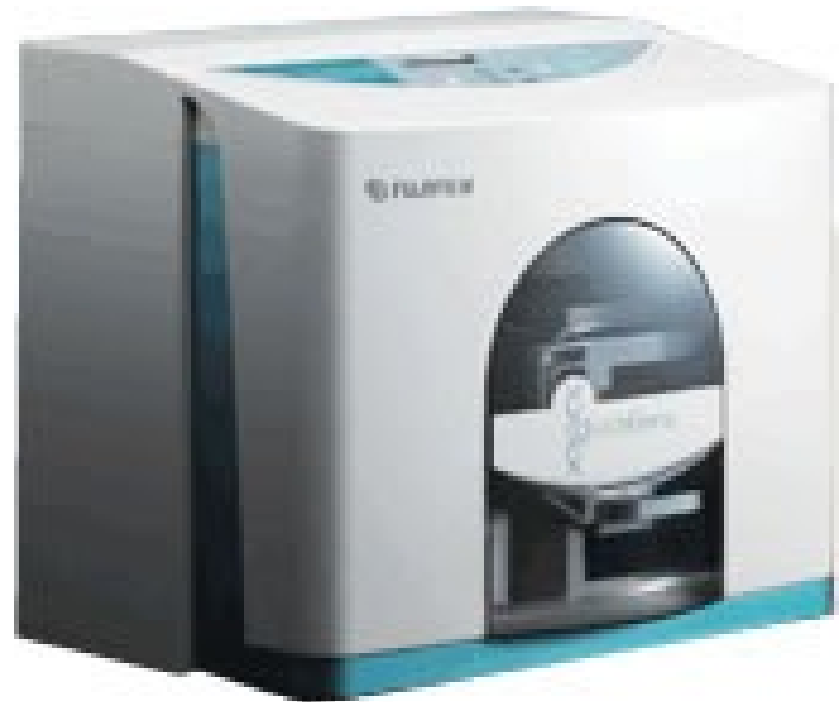
Pozorujte, jak ve skleničce kondenzuje DNA. Kondenzace trvá několik minut. Jednotlivé vlákna můžeme namotávat na špejli.



QuickGene – 810 (FUJIFILM)

- systém pro izolaci DNA/RNA
- vysoká výtěžnost, reprodukovatelnost a bezkonkurenční čas trvání izolace
- vysoká kvalita a čistota, vhodná pro PCR a kvantitativní real-time PCR, blotování, SNP, genotypizaci, sekvenování, klonování...

....cena 280.000 bez DPH + kity



Processing time (8 samples)

DNA Isolation

SAMPLE	TIME
WHOLE BLOOD	6 min
TISSUE	13 min

PLASMID DNA Isolation

SAMPLE	TIME
PLASMID	6 min

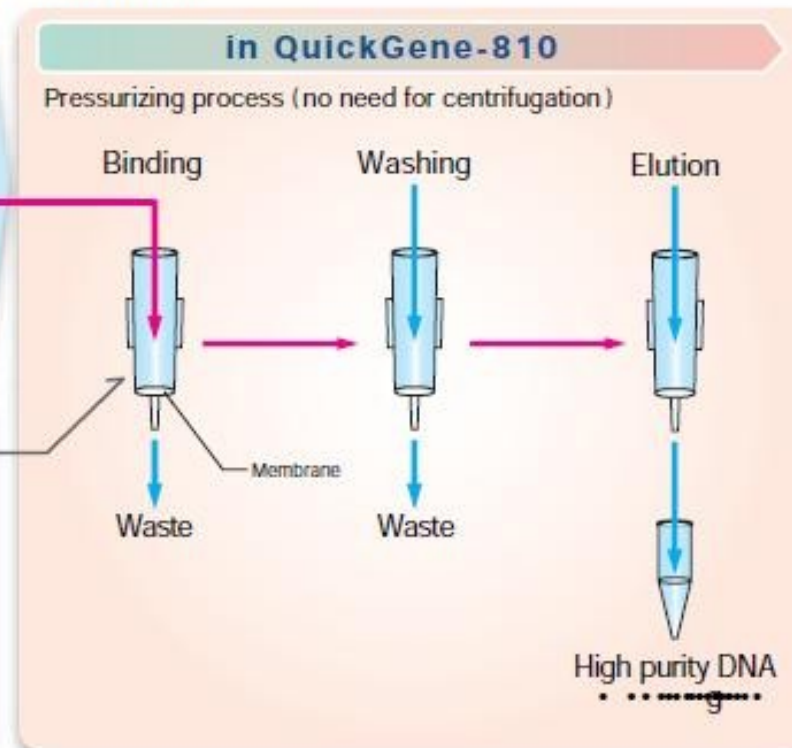
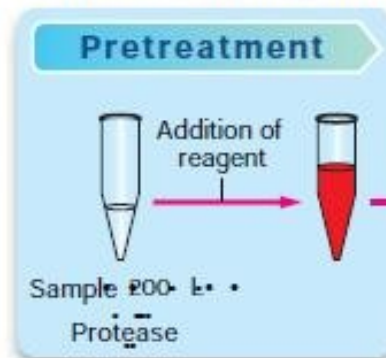
RNA Isolation

SAMPLE	TIME
TISSUE	15 min
CULTURED CELL (adherent / floating)	13 min
CULTURED CELL (6/10cm dish)	16 min
BLOOD CELL	20 min

High purity and high yield without centrifugation

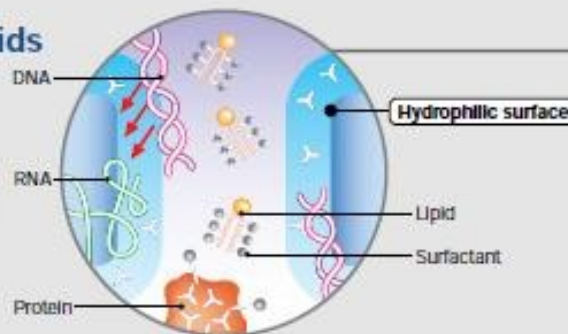
Three pressurizing stages – binding, washing and elution – occur automatically in the unit. Because of the outstanding adsorptive and desorptive properties of the membrane, high-purity nucleic acid can be obtained easily at low pressure without any complex processes such as centrifugation.

Isolation of DNA from whole blood



Adsorption of nucleic acids

Owing to their hydrophilic properties, nucleic acids get adsorbed onto the membrane, while proteins and lipids, which are comparatively hydrophobic, tend to seep out of the membrane.



MagNA Pure Compact Systém (Roche)

- izolace DNA, RNA
- 1-8 vzorků během 30 min.
- cartridge s reagensii a magnetickými kuličkami
- předinstalované protokoly ovládané dotykem
- minimalizace záměny a kontaminace
- kontrola kvality, archivace



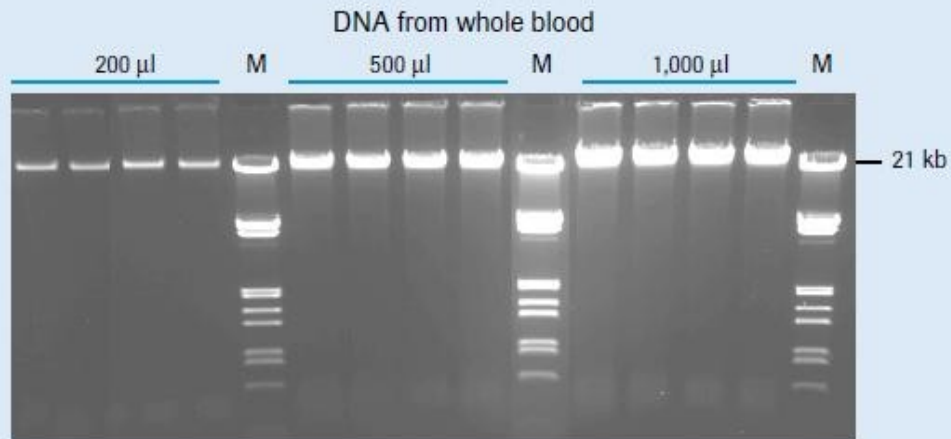


Figure 2: DNA Integrity. DNA was isolated from 200 µl, 500 µl and 1,000 µl of blood in fourfold replicates, respectively, and analyzed on a 0.8% agarose gel. Comparison with DNA Molecular Weight Marker III (M) revealed a molecular weight of >20 kb.

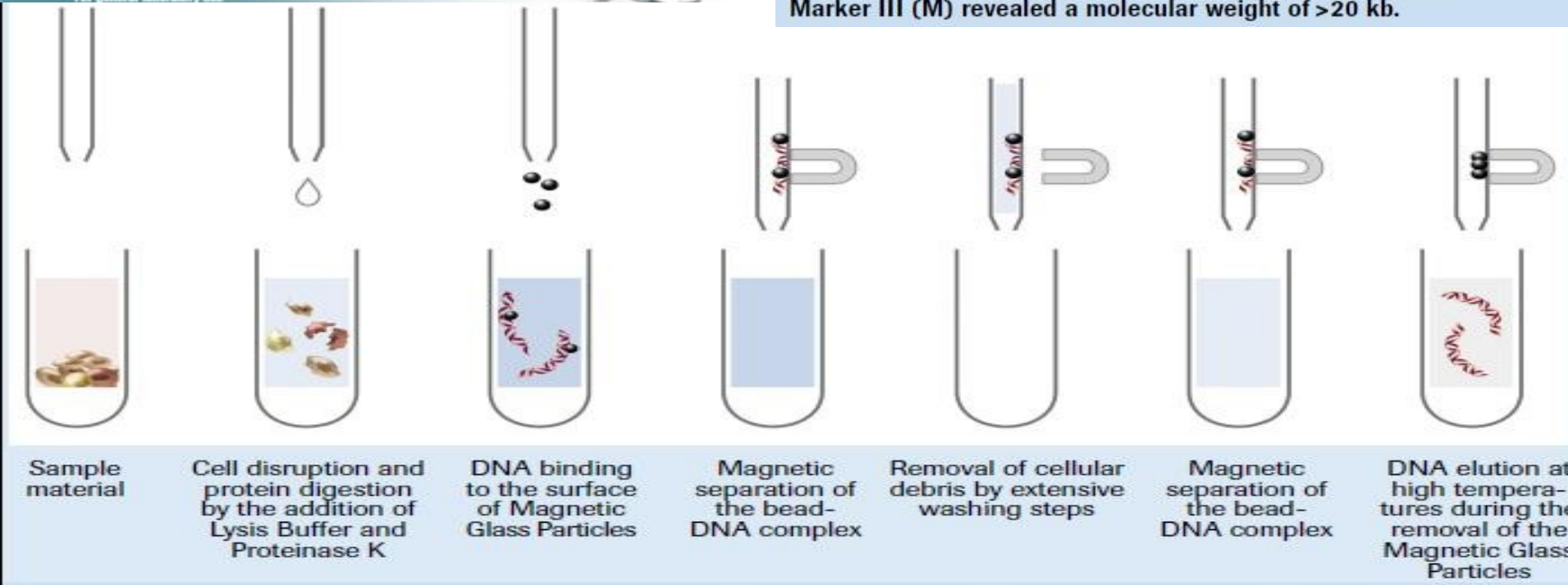
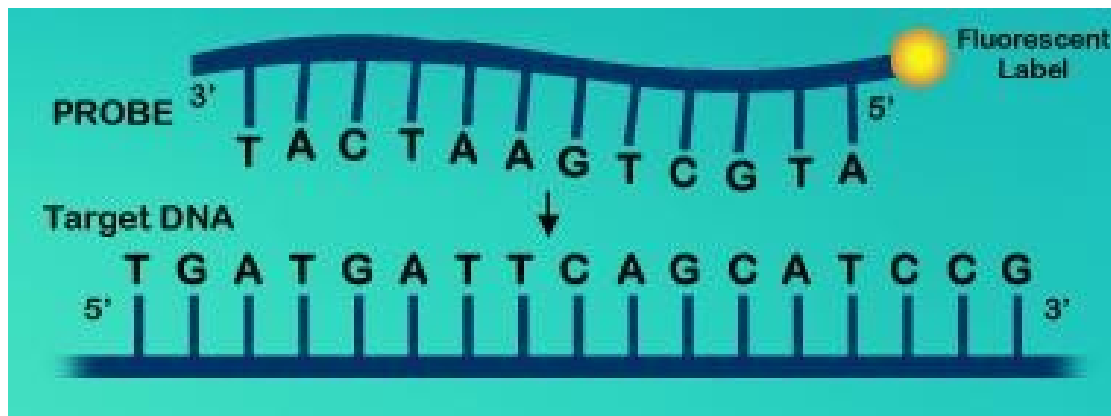


Figure 1: Principle of nucleic acid isolation performed automatically by the MagNA Pure Compact Instrument

Hybridizační techniky



Hybridizační techniky

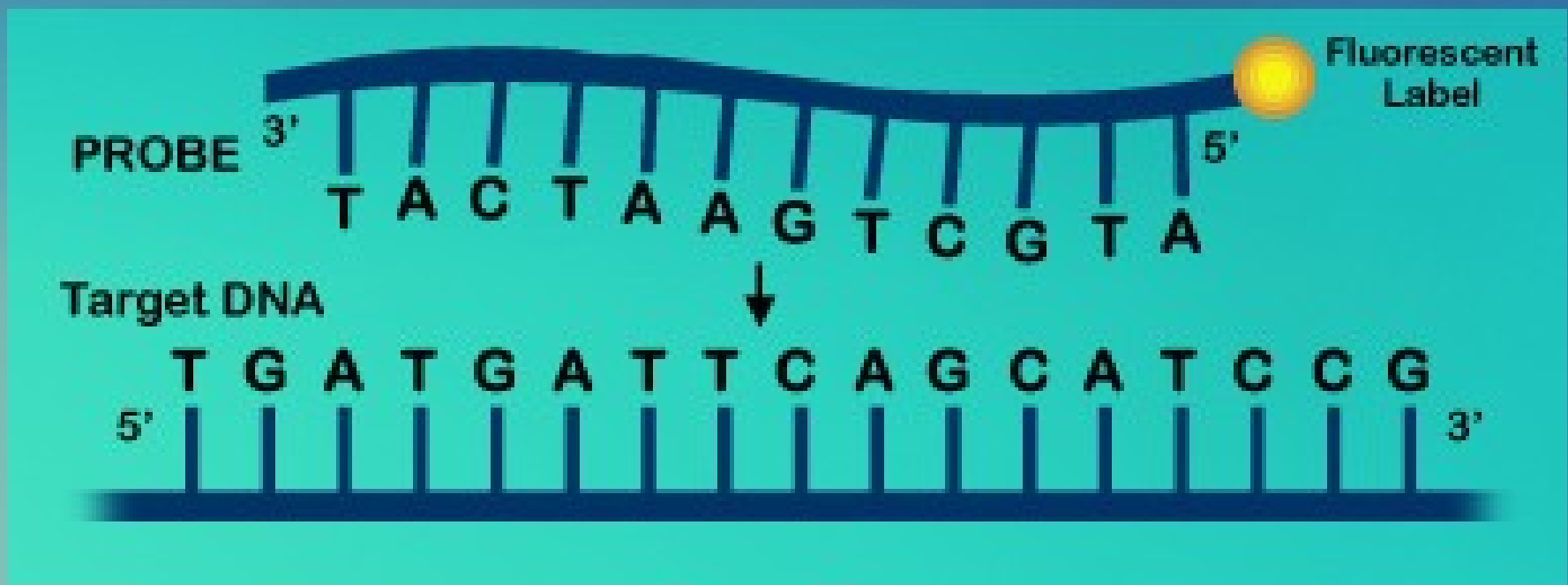
- spojování dvou jednořetězcových molekul nukleových kyselin za tvorby hybridu:
DNA x DNA, DNA x RNA, RNA x RNA
- obě vlákna jsou v roztoku nebo je jedna hybridizující složka vázána na nosič
- hybridizace NK zakotvených na filtrech (nitrocelulózoové a nylonové) se značenou sondou
- sondu označujeme molekulu nukleové kyseliny, kterou použijeme k vyhledání určité sekvence ve vzorku testované DNA nebo RNA

Podmínky pro hybridizaci

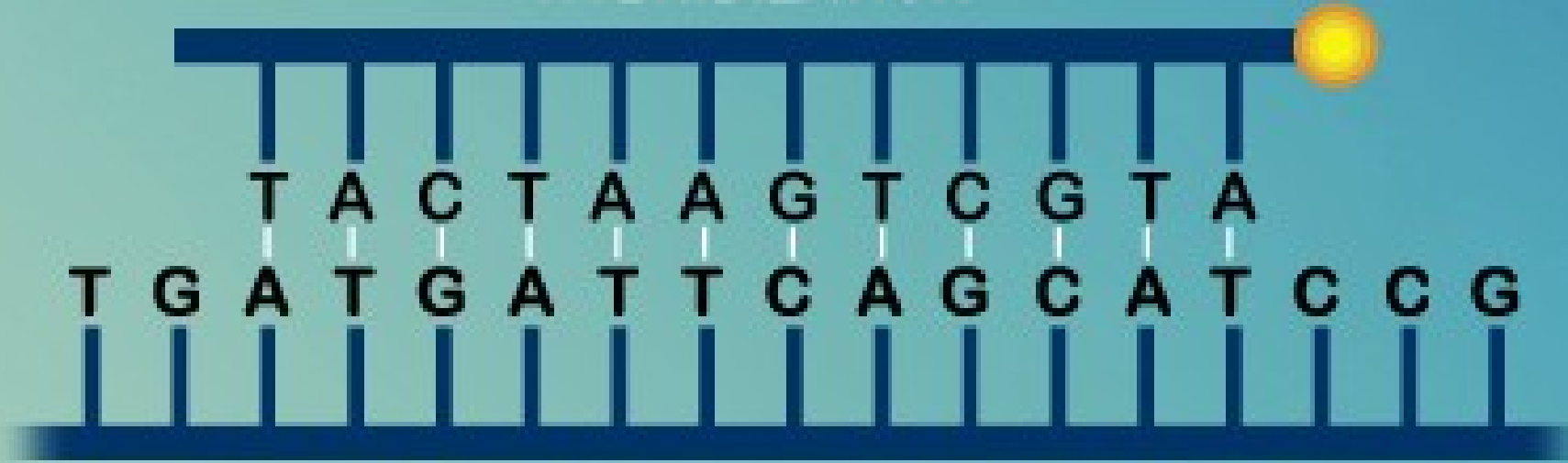
- pouze jednovláknové molekuly
- důležitá je teplota a koncentrace iontů
- teplota a koncentrace iontů příliš nízká => hybridizace i mezi molekulami, které nejsou přesně komplementární



- teplota tání – závisí na délce molekuly a na poměru G-C párů (3 H můstky) a A-T párů (2 H můstky)



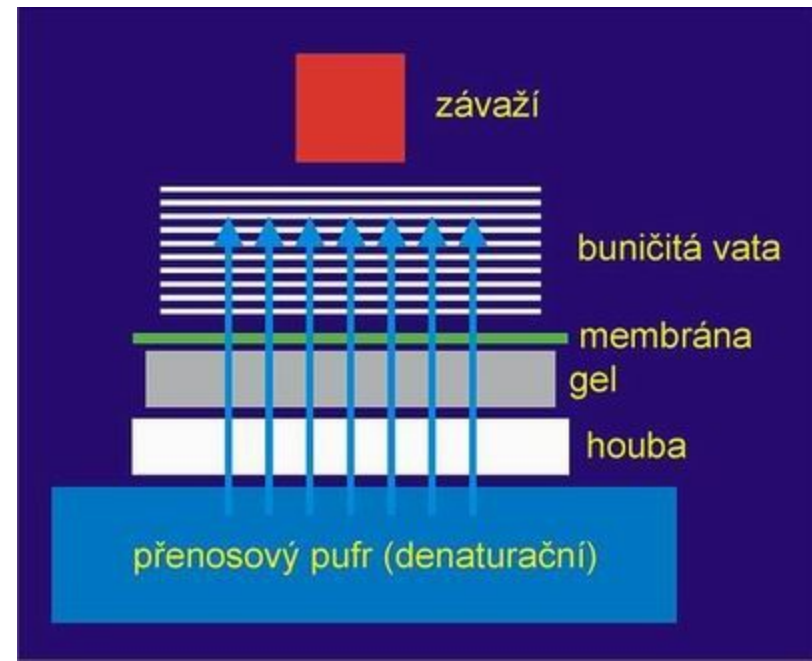
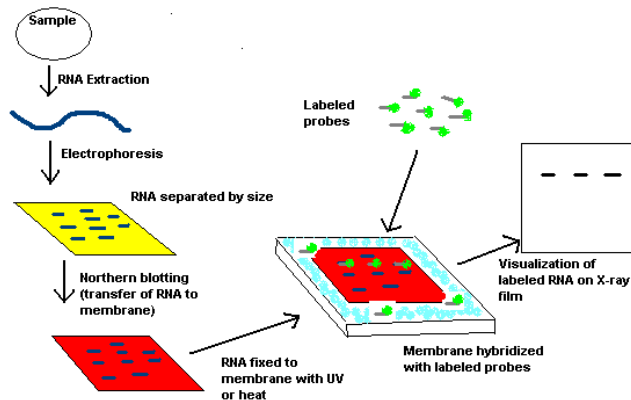
HYBRIDIZATION



Southernův blotting

základní princip metody:

- štěpení celkové DNA na fragmenty pomocí restričních endonukleáz
- elektroforetické rozdělení fragmentů dle délky
- přenos fragmentů na membránu (nylon, nitrocelulóza)
- denaturace DNA
- hybridizace se značenou sondou
- rtg film, expozice





Typy blottingu

- Southern blotting = přenos ssDNA



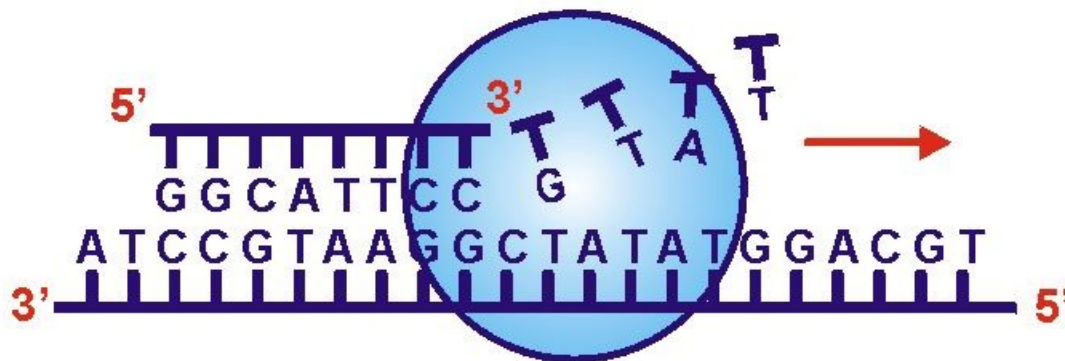
- Northern blotting = přenos RNA



- Western blotting = přenos proteinů



Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)



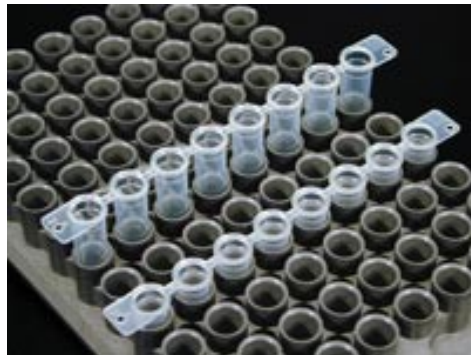
PCR (polymerase chain reaction)

- umožňuje zmnožit (amplifikovat) zvolený úsek DNA teoreticky i z jedné molekuly na měřitelné jednotky (ng a μg)
- namnožit úsek DNA můžeme jen tehdy, když známe pořadí nukleotidů na obou koncích tohoto úseku → primery (20-30 bází)
- byla užita Taq polymeráza, izolovaná z druhu bakterie *Thermus aquaticus* (teplé prameny v Yellow-stone National Park) a její teplotní optimum je $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, dnes se běžně užívá rekombinantní Taq polymeráza

Master mix



- umožňuje provádění PCR
- musí obsahovat pufr, nukleotidy (dNTP), primery, polymerázu a H_2O (pro PCR), Mg^{2+}
- DNA pak doplníme do každé zkumavky zvlášť
- mikrozkušavka PCR 0,2 ml s víčkem



Průběh PCR

- 1. krok: DENATURACE** (denaturation)
 - při 94-95°C, 15 sec až 1 min
- 2. krok: VAZBA PRIMERŮ** (annealing)
 - obvykle 50-55°C, desítky sec až minuta
- 3. krok: AMPLIFIKACE** (extension)
 - obvykle 70-74°C, malé 20-45 sec, velké (desítky kb) až 15 min

Přístroje thermocycler (termocykler, cykler) již od 99.000 bez DPH

-174C/G polymorfizmus v IL-6

- 9,4 μl H₂O pro PCR
- 1,5 μl Tris-HCl pufru
- 1,5 μl MgCl₂
- 0,6 μl od každého primeru (P1, P2)
- 0,3 μl dNTP
- 0,1 μl Taq polymerázy
- 2,0 μl DNA

Celkový objem 16 μl

- denaturace DNA 95°C/2min
- 35 cyklů: denaturace 94°C/45s, anealing 55°C/25s, extenze 72°C/45s
- finální extenze 72°C/5min
- chlazení





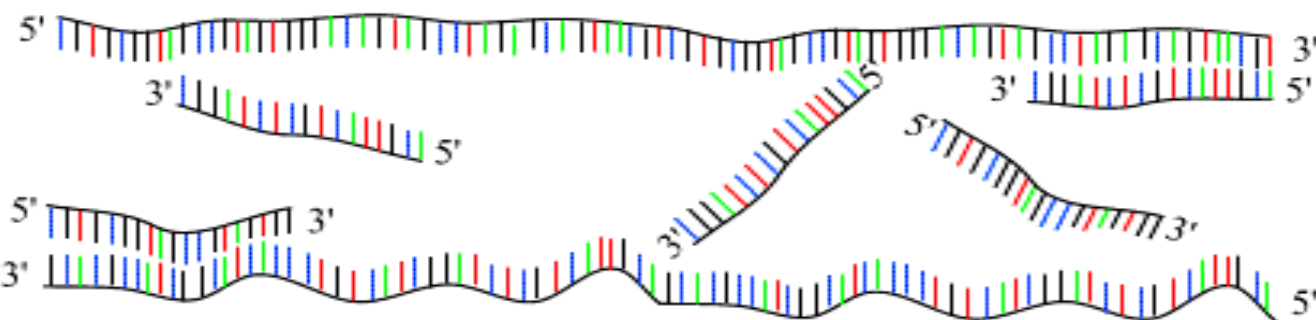
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

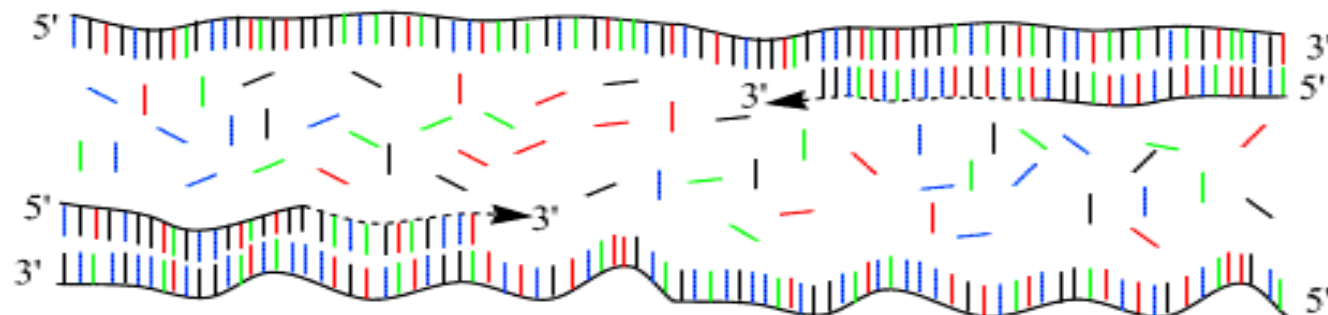
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

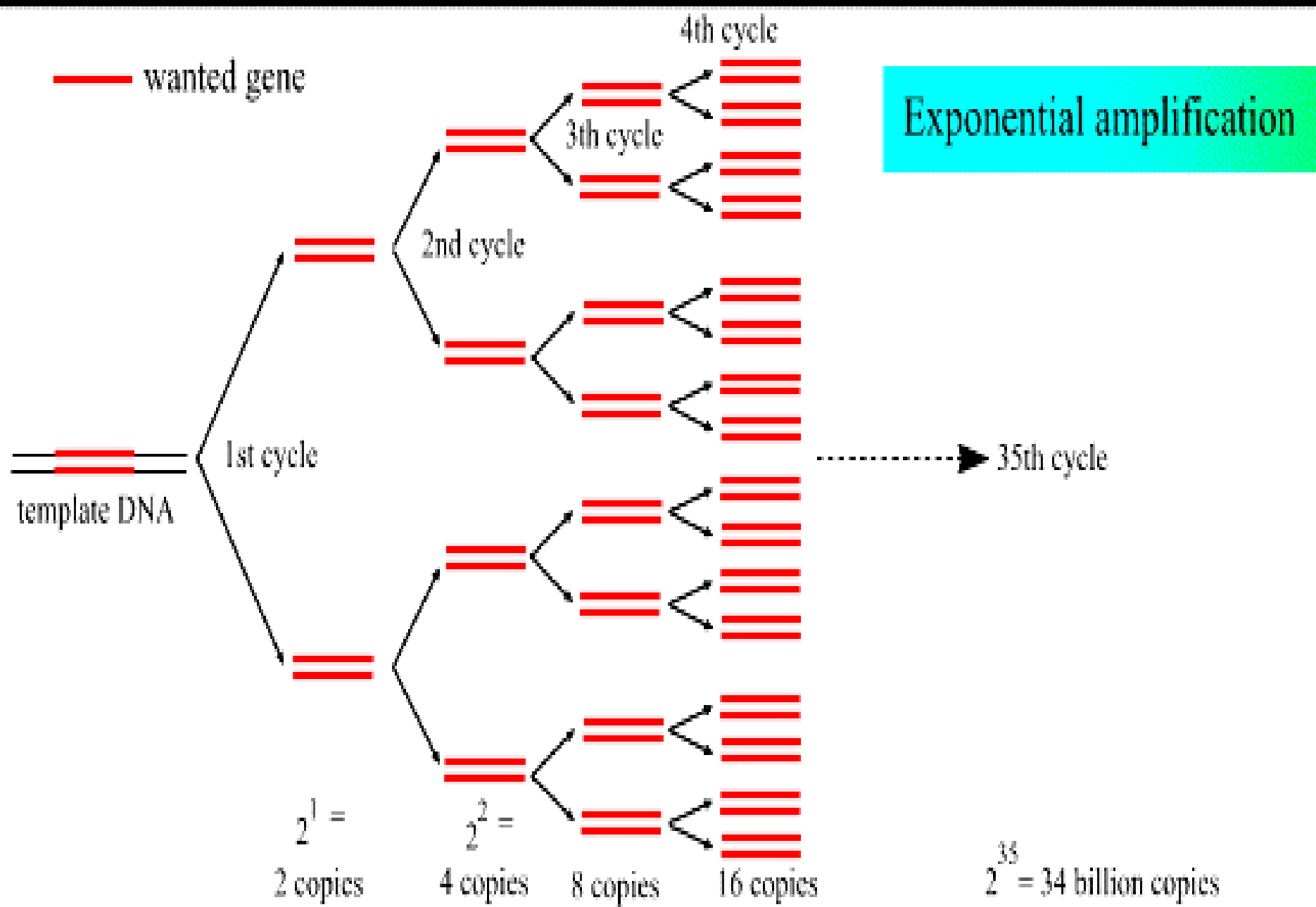
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

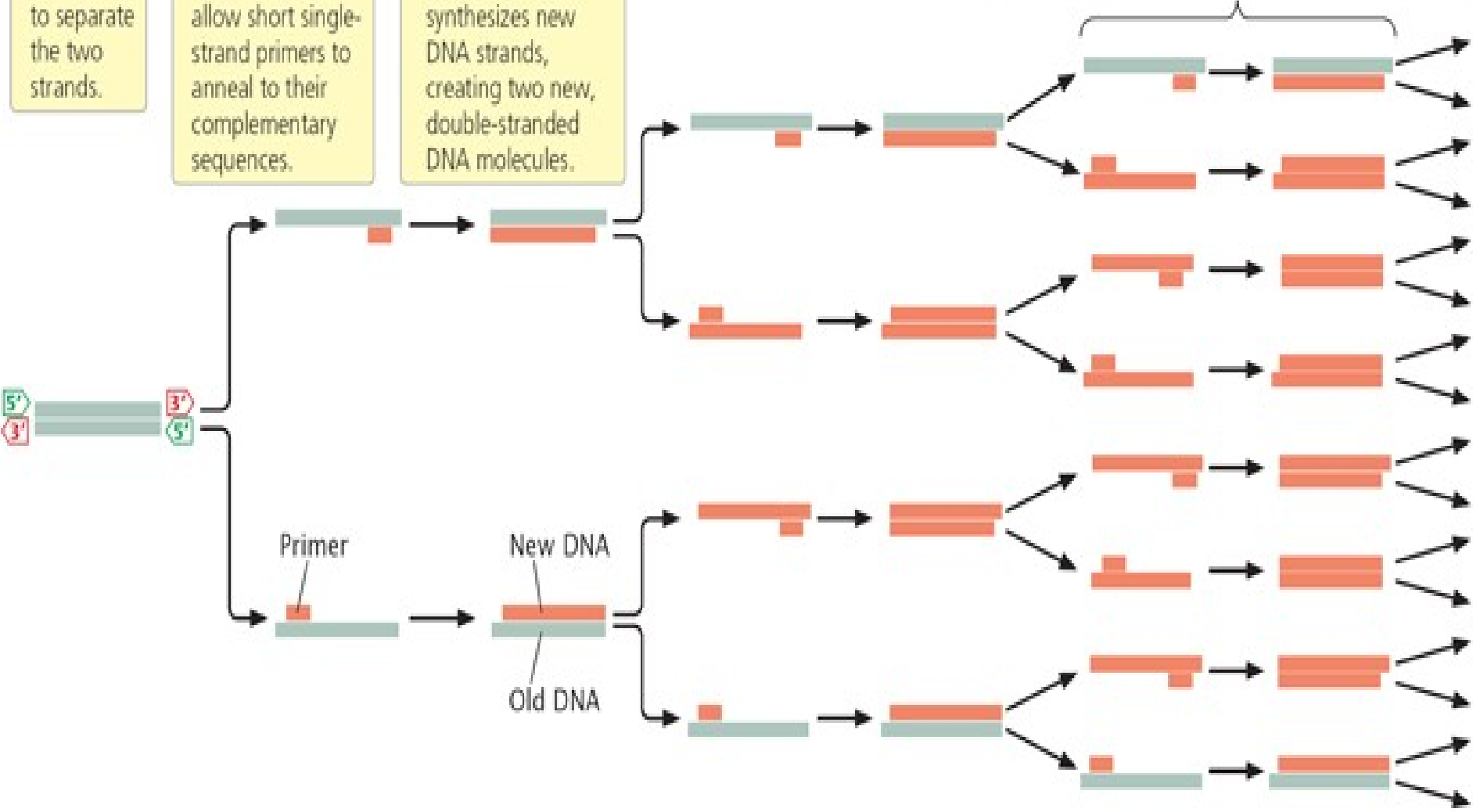


1 DNA is heated to 90°-100°C to separate the two strands.

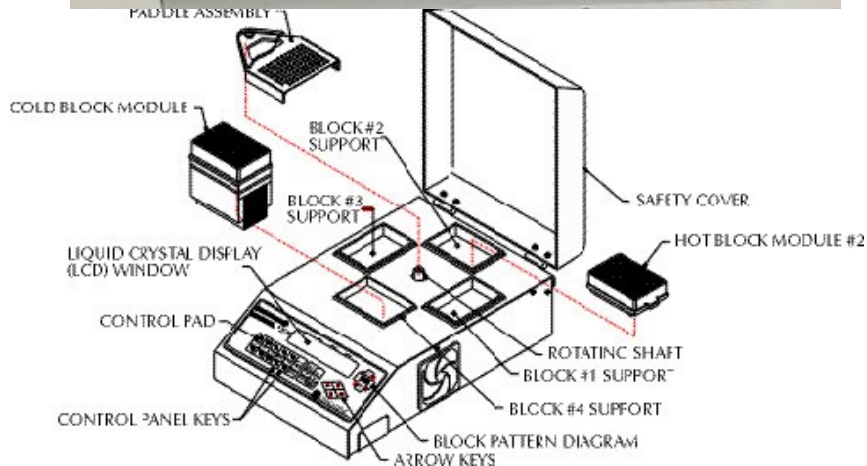
2 The DNA is quickly cooled to 30°-65°C to allow short single-strand primers to anneal to their complementary sequences.

3 The solution is heated to 60°-70°C; DNA polymerase synthesizes new DNA strands, creating two new, double-stranded DNA molecules.

The entire cycle is repeated. Each time the cycle is repeated, the amount of target DNA doubles.









LightCycler® 2.0 Instrument



- slouží k provádění rychlé PCR detekci v reálném čase
- ke kvantifikaci cílové NA a dále k následné analýze amplifikované NA pomocí křivky tání
- v biologickém výzkumu, při analýze potravin, v soudních a dalších laboratorních disciplínách



Vzduchový ohřev
a chlazení pro rychlou
teplotní změnu

Vyhřívací spirála

Krokový motor
umísťující vzorky
do dráhy optiky

Tepelná
komora

Větrák

Motor větráku

Uzavřená kapilára 20 μ l nebo
100 μ l s vynikajícím poměrem
povrchu k objemu

Karusel
o kapacitě
32 vzorků

Fotohybridy

Šestikanálový fotometr

Světelný zdroj (LED)

Krokový motor k polohování
fotometru

Detekční jednotka

Excitační jednotka

Svazek vláken

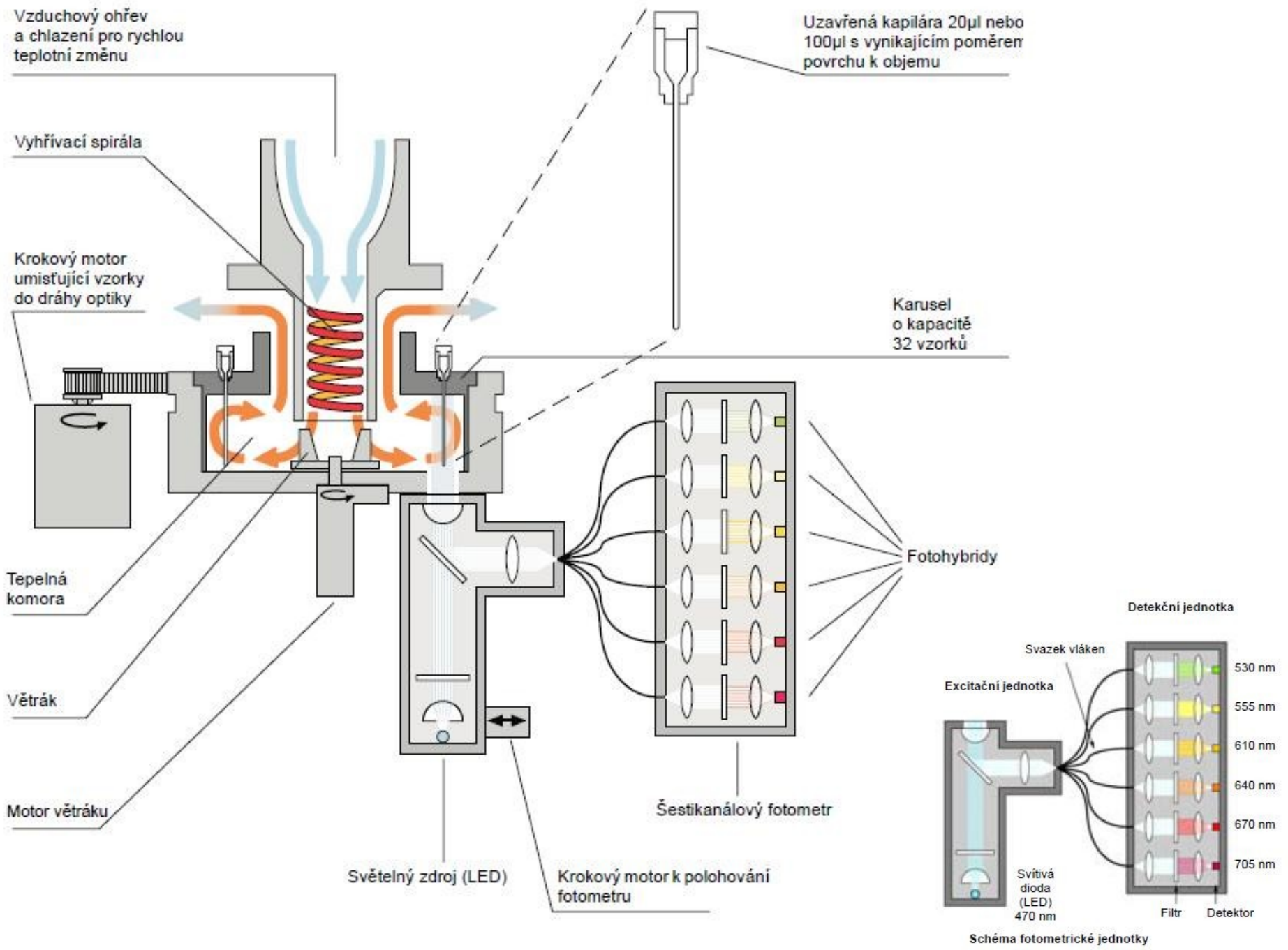
Svitivá dioda
(LED)
470 nm

Filtr

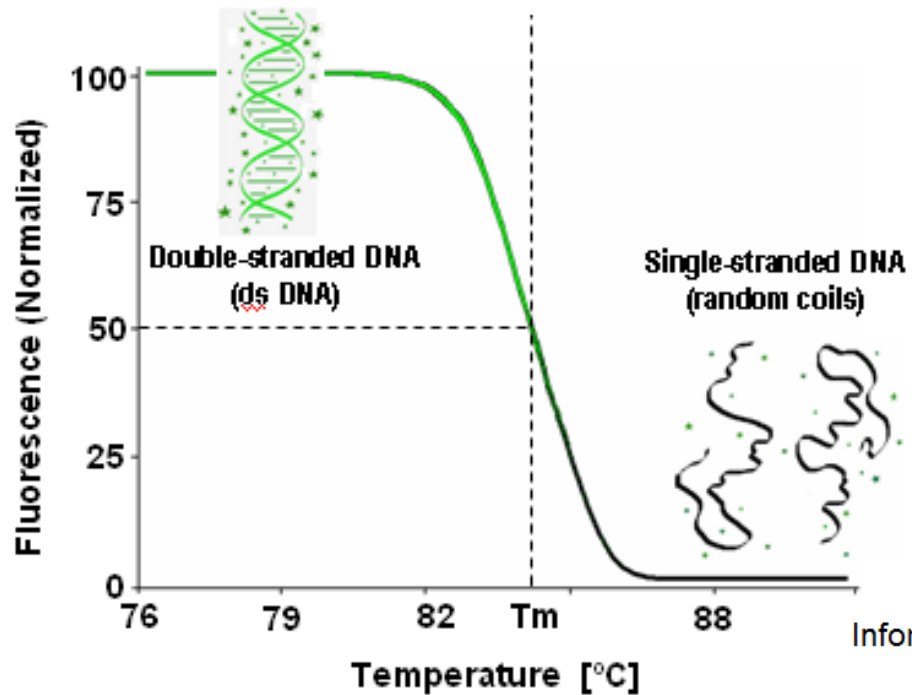
Detektor

- 530 nm
- 555 nm
- 610 nm
- 640 nm
- 670 nm
- 705 nm

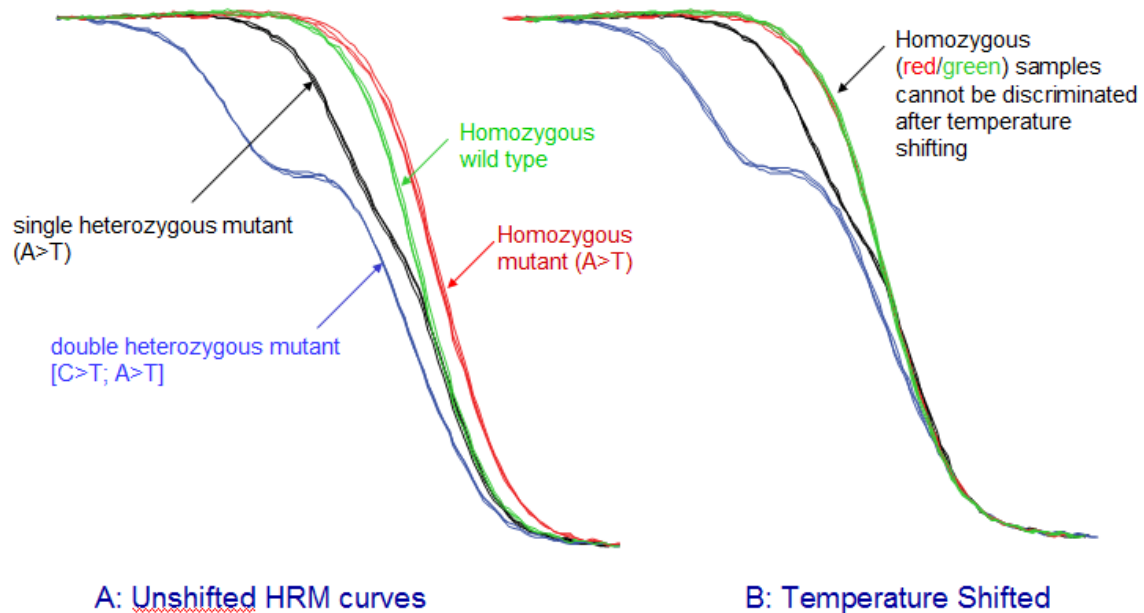
Schéma fotometrické jednotky



B. Normalized Melting Curves

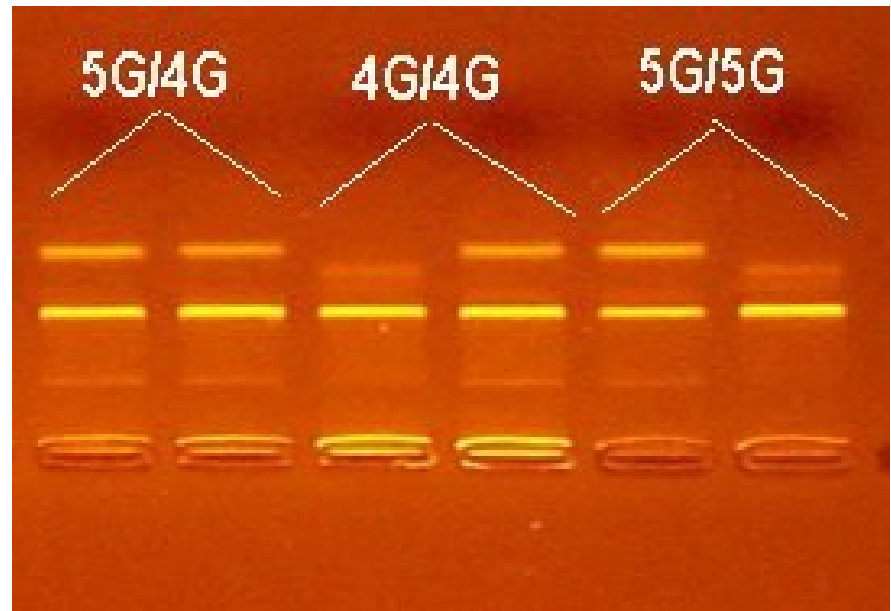


Information loss due to Temperature Shifting normalization



Alelicky specifická PCR

- detekce bodových mutací, malých delecí
- alelicky specifické oligonukleotidy
- 3 primery, 2 alternativní verze jednoho konce (mutovaná/nemutovaná), druhý konec stabilní
- mutace je kryta primerem





extrakce DNA



amplifikace DNA se sekvenčně-specifickými primery



shoda

neshoda

amplifikace
probíhá

amplifikace
neprobíhá



DETEKCE



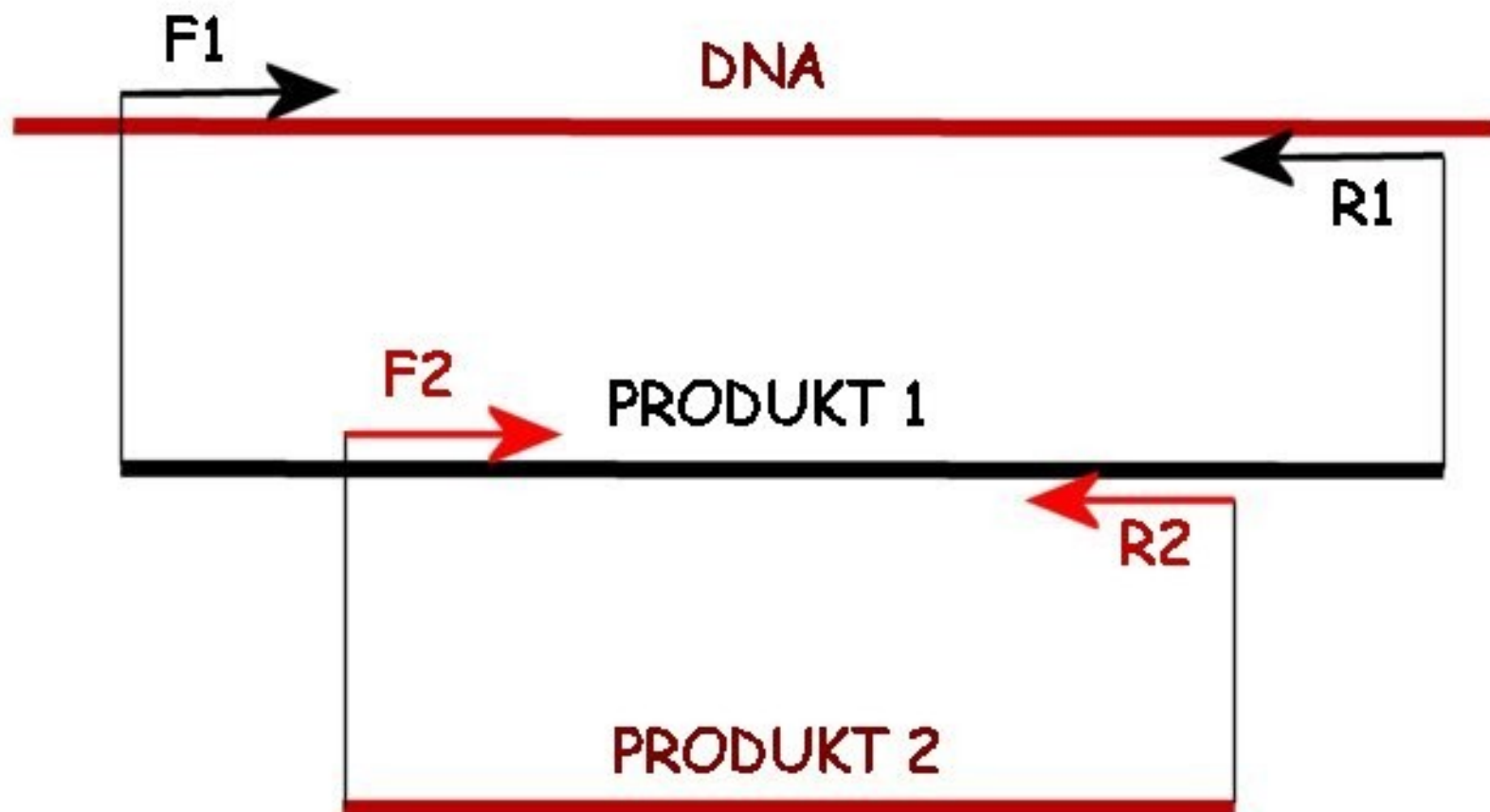
vnitřní
kontrola

specifický
produkt



interpretace

Nested PCR



Analýza PCR produktu

- Hybridizace
- Sekvenování
- RFLP
(Restriction Fragment Length Polymorphism)
- RT-PCR (Real Time RT-PCR)
RNA => cDNA

Cobas Amplicor®

- provádí amplifikace a detekce v jednom integrovaném systému
- výsledky k dispozici během 4 - 6 hodin
- HCV, HBV, HIV, CMV, *C.trachomatis*,
N.gonorrhoeae, *M.tuberculosis*

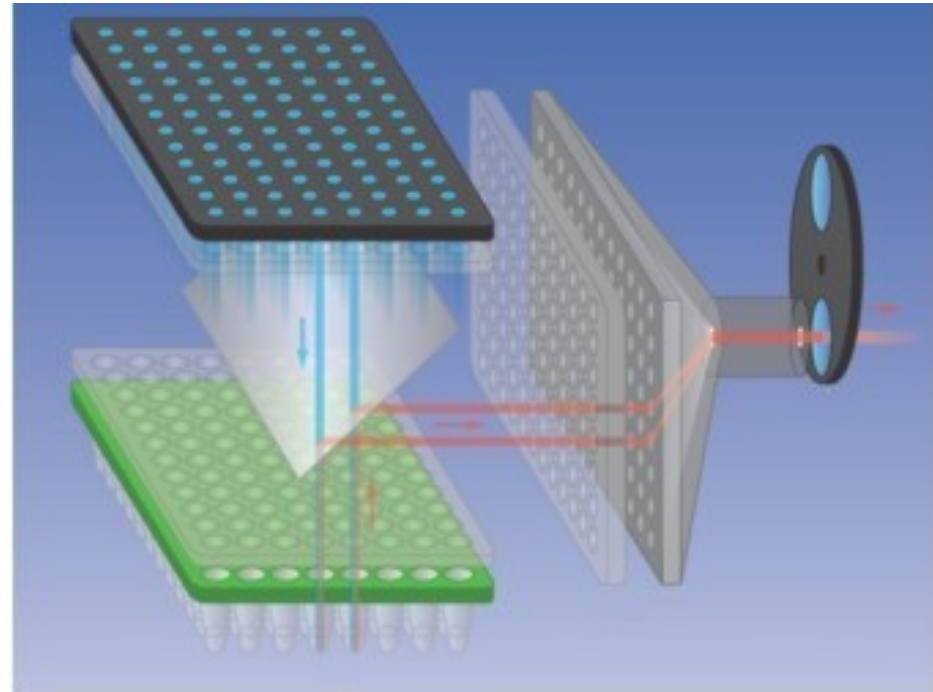
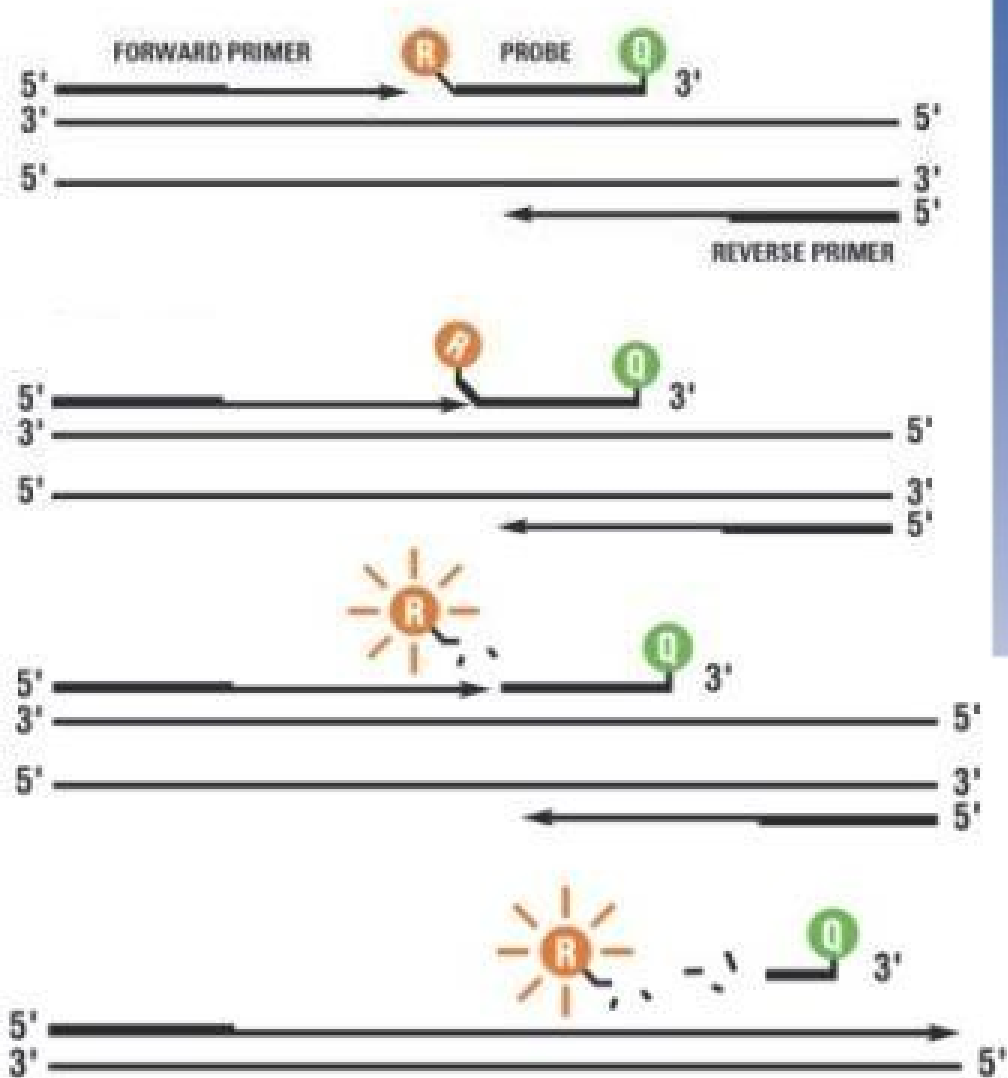
Interní kontrola eliminuje
falešně negativní výsledky



Kvantitativní PCR v reálném čase

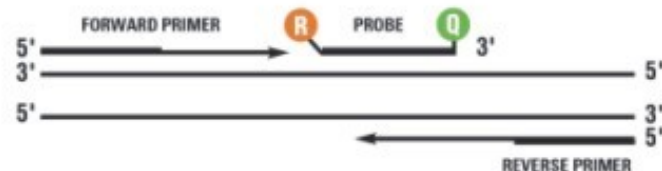
- sondy označené fluorescenčním barvivem
- hybridizují s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery (v oblasti mezi nimi)
- DNA-polymeráza má také exonukleázovou aktivitu - odbourává nasedlou sondu
- schopnost fluorescence až po uvolnění do roztoku - v průběhu PCR je ozařován vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva
- reverzní transkripce - PCR (Real-time RT PCR)
- přesné množství vstupní templátové DNA

Real-time RT PCR

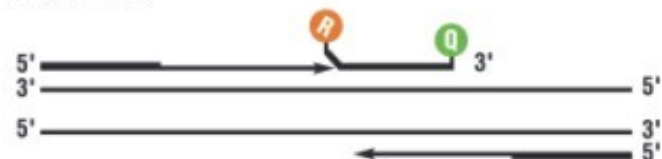


A)

1. **Polymerizace:** Fluorescenční substrát (reporter - R) a jeho zhášec (Q) jsou navázány na 5' a 3' konce TaqMan sondy.



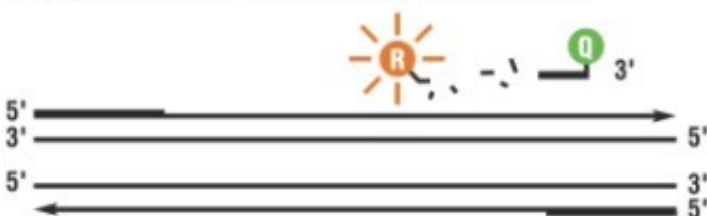
2. **Elongace řetězce:** Dokud je sonda intaktní záření emitované substrátem R je pohlcováno blízkým "zhášecem".



3. **Odštěpení:** když Tag polymeráza dorazí k začátku sondy, postupně ji odchlipuje až odštěpí fluorofor. Ten se tímto oddálí od zhášec a emitované světlo přestane být pohlcováno - detekovaná fluorescence stoupá.



4. **Polymerizace ukončena:** reporterová barva oddělená od zhášec emituje charakteristickou fluorescenci.



B)

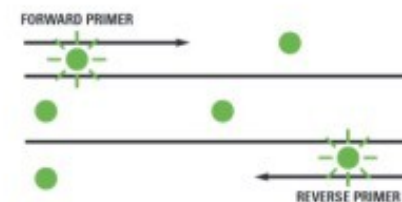
1. **Navázání:** SYBR® Green I se váže během každého cyklu na dvouvláknovou DNA.



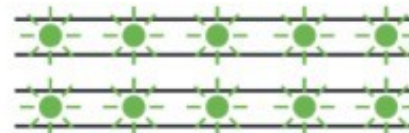
2. **Denaturace:** Ve fázi denaturace DNA je SYBR® Green I uvolněn z vazby na DNA a celková fluorescence dramaticky klesá.



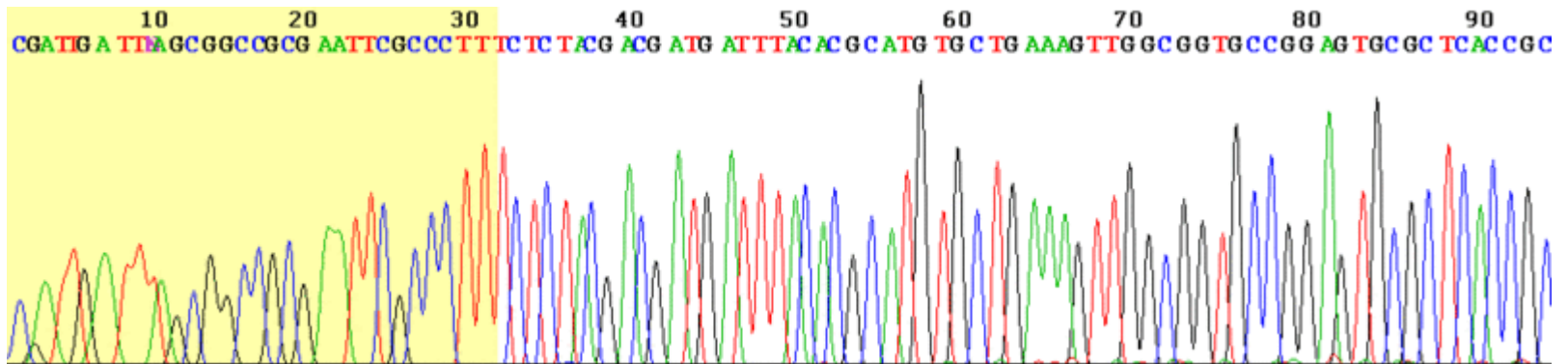
3. **Polymerizace:** Během annealingu primerů a elongace řetězce se Sybr Green opět začíná navazovat na vznikající dvouvláknovou DNA - fluorescence stoupá.



4. **Ukončení polymerizace:** Emitovaná fluorescence dosahuje maxima.

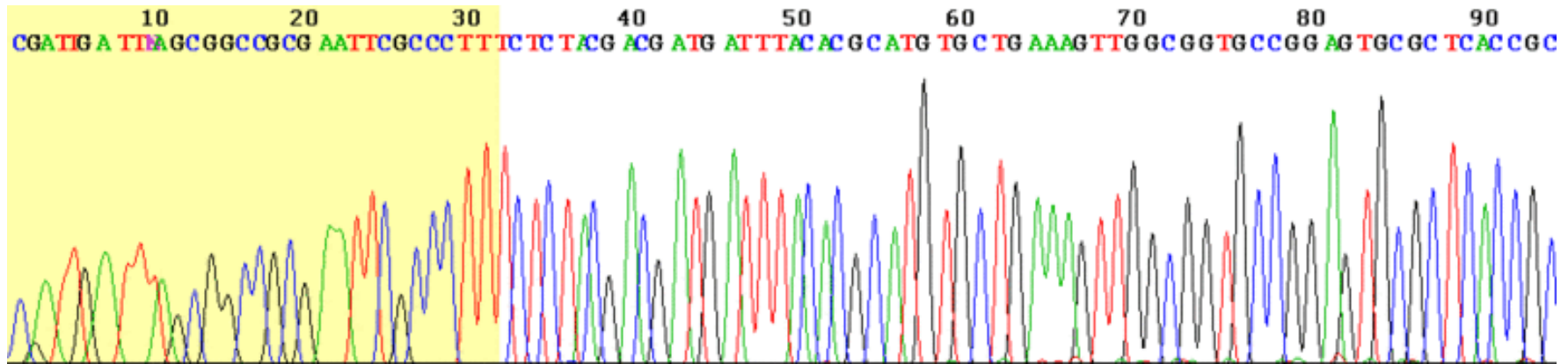


Sekvenování



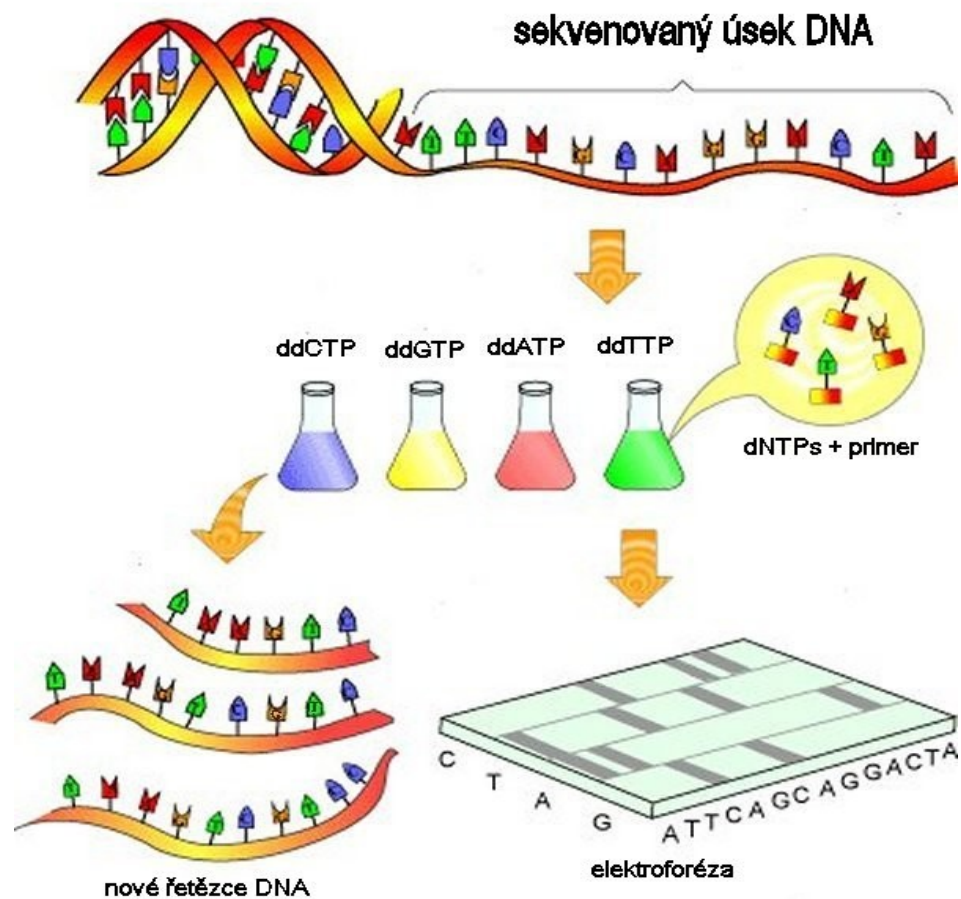
Sekvenování (sekvenace, sekvencování)

- zjišťuje pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA (jádro, mitochondrie, plazmidy)
- od 70. let 20. století je používána metoda Fredericka Sangera, která využívá dideoxynukleotidů a následné elektroforézy
- projekt čtení lidského genomu

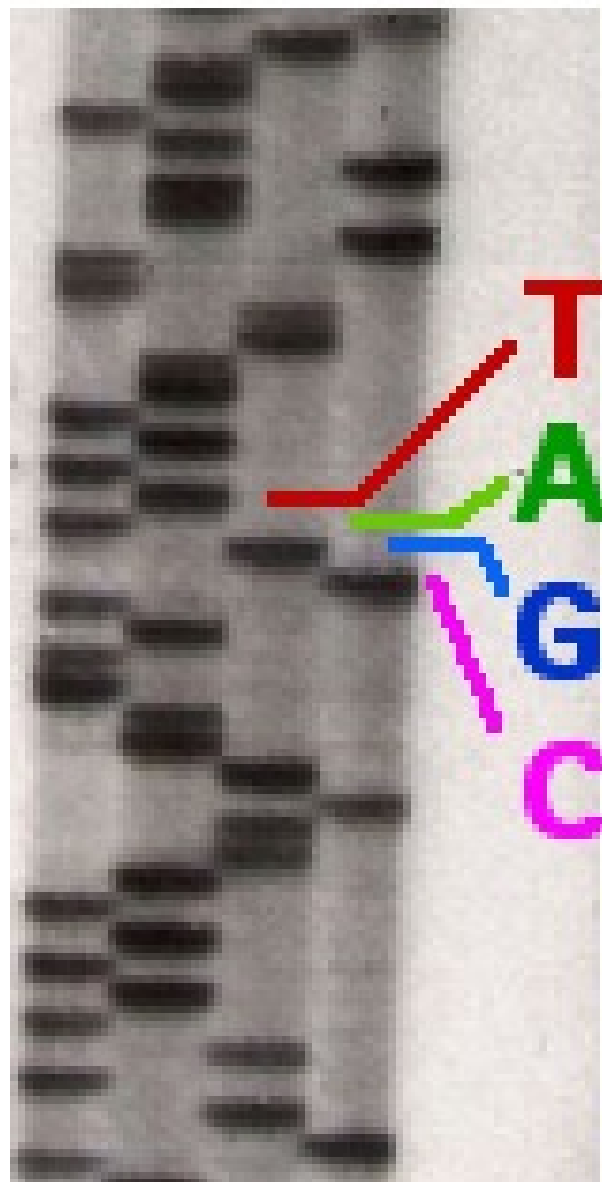


Sangerova metoda

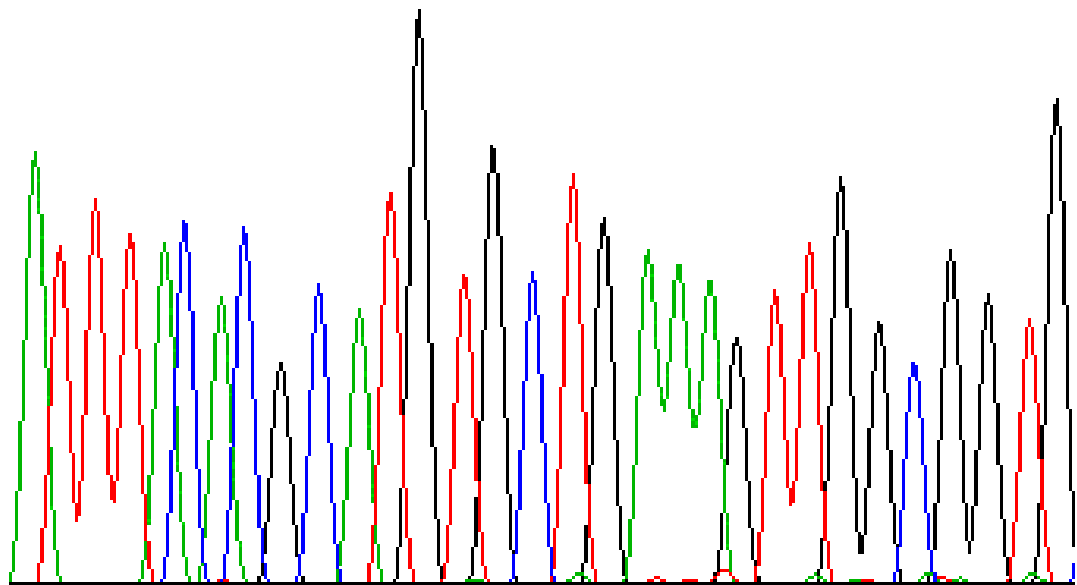
- sekvence, primer, DNA polymerázu, dNTP, jeden ze čtyř dideoxynukleotidů
- začlení se do replikující se DNA, ale zastaví elongaci řetězce - nemá OH skupinu
- každý dideoxynukleotid se vloží do jedné ze čtyř nádob
- radioaktivní primer



A T G C

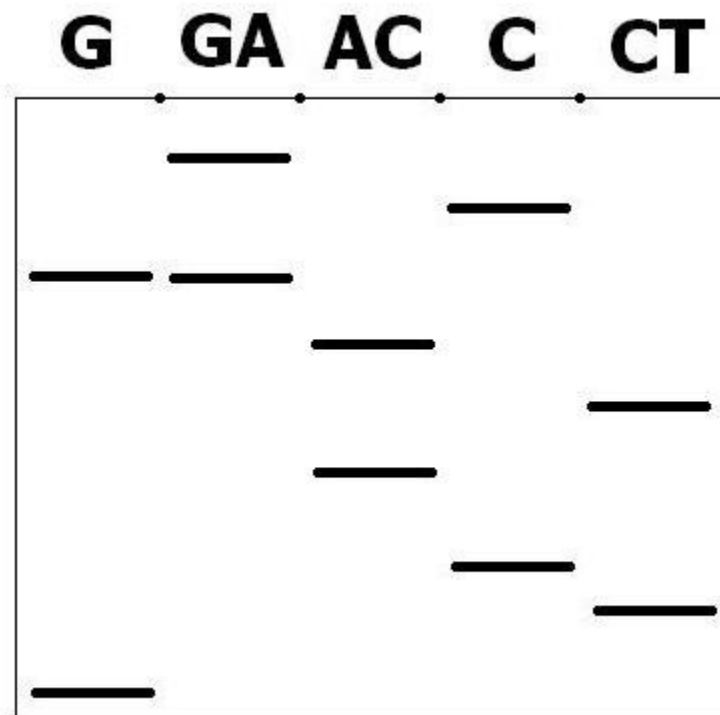


ATTTACACGCATG TGC TG AAAGTTGGC GGTG



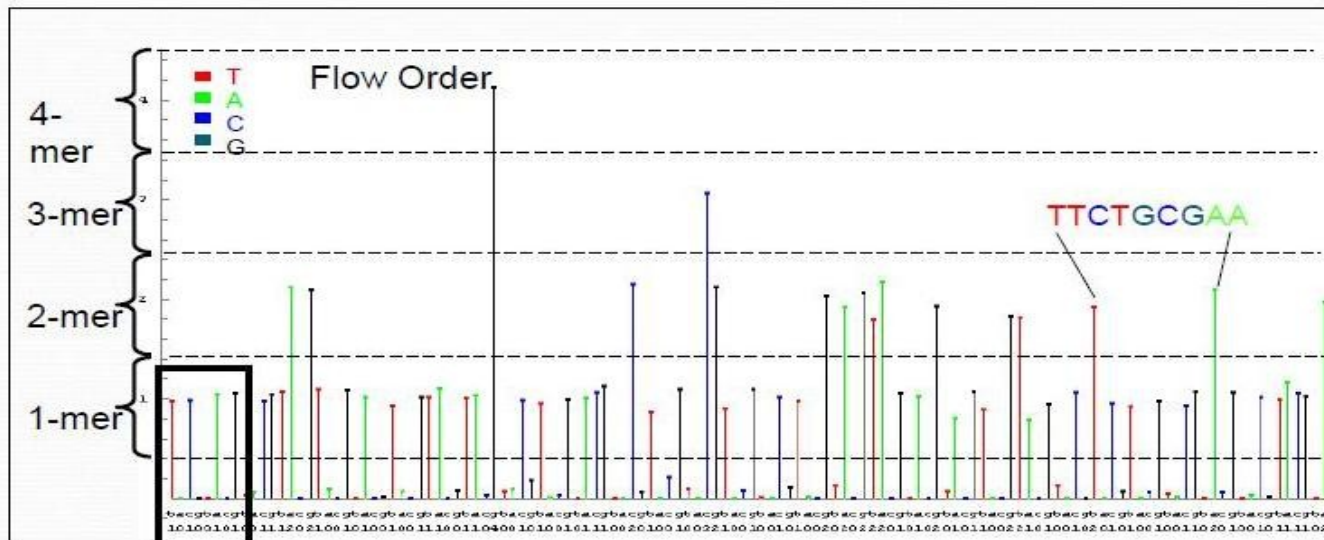
Maxam-Gilbertova metoda

- DNA na 5' konci radioaktivně označena fosforem
- vystavena chemikáliím, které specificky štípají sekvenci DNA v místě, kde rozpoznají jistou nukleovou bázi
- do polyakrylamidového gelu a spustí se elektroforéza
- sekvence DNA je GTCATAGCA (čte se zesponu)



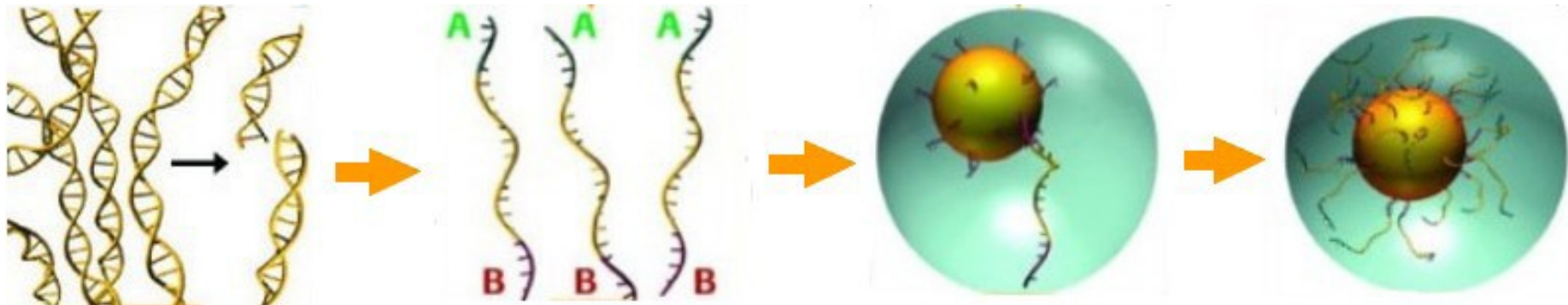
Pyrosekvenování

- novější metoda, vznikla v roce 1996
- mimo DNA polymerázy ještě ATP sulfuryláza, luciferáza a apyráza, adenosinfosulfát a luciferin
- postupně vkládány nukleotidy různých typů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) – přidáním se z uvolní světelné záření... uvolnění pyrofosfátu z nukleotidu a spotřeba vzniklého ATP luciferázou k oxidaci luciferinu



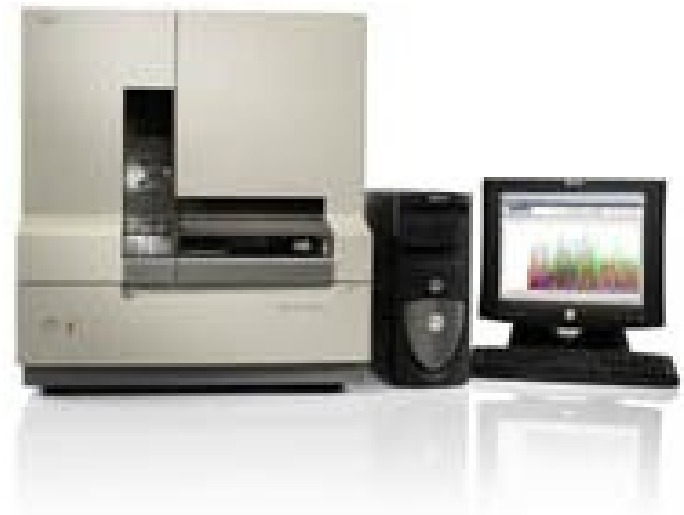
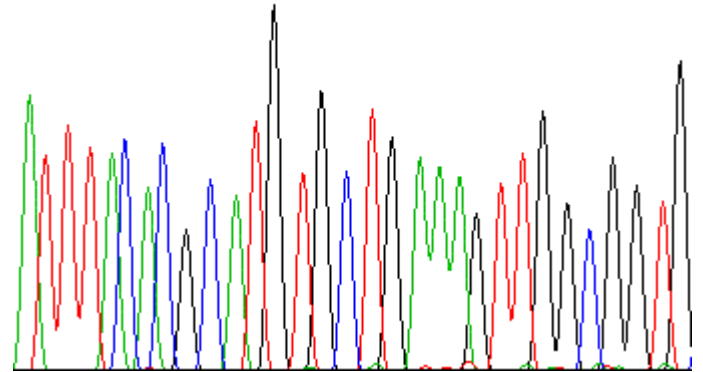
Sekvenace nové generace (NGS – next generation sequencing)

- vazba fragmentu nukleové kyseliny na mikrokuličky
- na každé kuličce ke klonální amplifikaci
- čtení sekvence buď sekvenováním syntézou nebo sekvenováním založeném na ligaci



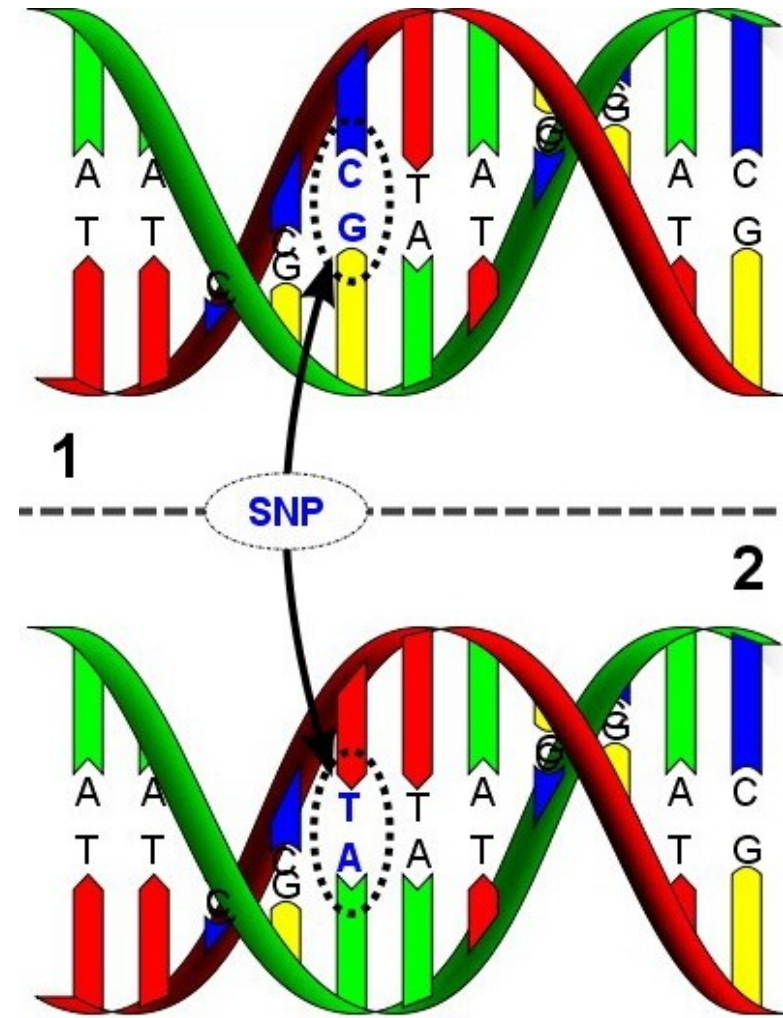


ATTTACACGCATG TGC TG AAAGTTGGCGGTG



Sekvenator - ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer

Detekce mutací vs. polymorfismů



Typy polymorfizmů

- **Jednonukleotidové polymorfismy (SNP)** – markery pro genetické mapování a souvislost určitého genu s nemocí
- **Vícebodové polymorfismy**
- **Polymorfismy minisatelitů** (variabilní počty tandemových repeticí, VNTR) – tandemová inserce jednotek o délce 10-100 bp podmiňuje alely pro daný lokus
- **Polymorfismy mikrosatelitů** (krátké tandemové repetice, STR), jednotky 2-10 bp

STR lokusy (mikrosatelity)

- **Typy mikrosatelitů**

- dinukleotidy (AC)_n nebo (AT)_n
- trinukleotidy (AAT)_n a (CAG)_n
- tetranukleotidy (GATA)_n a (GACA)_n

- **Výskyt**

nekódující oblasti (telomery, subtelomery, centromery)

dinukleotidy v intronech

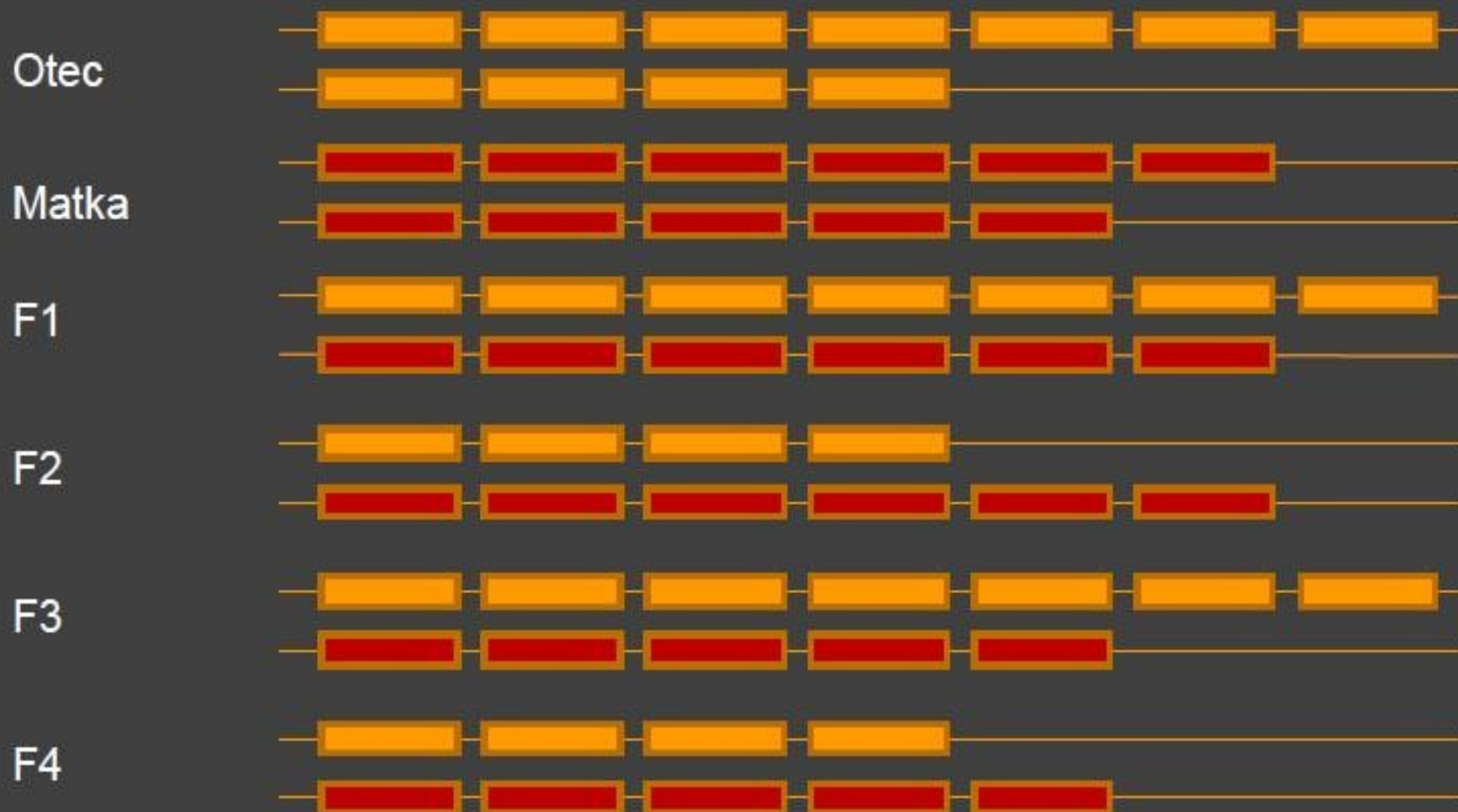
trinukleotidy a hexanukleotidy i v exonech

tetranukleotidy v oblasti centromer

v kódujících oblastech obratlovců jen 10 % STR

- Okolí mikrosatelitů tvoří jedinečné sekvence – výhodné pro design primerů pro PCR

Vyšetřované tandemové repetice v lidském organismu (VNTR a STR) se dědí mendelovským typem dědičnosti. Otec (počet jednotek repetice v somatické buňce 7+4) a matka (6+5) dávají vznik potomkům F1-F4 (7+6; 4+6; 7+5; 4+5). U nepříbuzných osob jsou díky populační variabilitě počty repetic rozdílné.



Přímá analýza mutací v lidském genomu

- **Přímá analýza** – detekce příčinné mutace způsobující chorobu
- Mutace jednobodové jako predispozice chorob (**SNP**) nebo příčina choroby (faktory krevního srážení, hemochromatosa, cystická fibrosa...)
- Vícebodové změny (del, ins - F508del u CF)
- Poruchy tripletových repetic – **expanze tripletů v exonech genů** mění jejich expresi (*Huntingtonova chorea* – gen huntingtin, nemoc >40 jednotek **CAG**, *sy fragilního X* – Xp27.3, gen FMR1, nemoc >200 jednotek **CGG**, *myotonická dystrofie*, gen DMPK, nemoc >2000 jednotek **CTG**, *Friedreichova ataxie* – gen frataxin, nemoc >100 jednotek **AAG**)

Nepřímá analýza mutací v lidském genomu

- **Nepřímá vazebná analýza** - alely genů ležící na chromosomu blízko sebe mají tendenci procházet meiosou jako jednotka (vazebná skupina)
- Vazba **polymorfního** genetického markeru segregujícího s chorobou v rodině - mapování genů (RFLP, VNTR, STR...)
- **Kdy volíme nepřímou analýzu:**
 - Není známa pozice mutace nebo pozice genu
 - Je známo mnoho mutací v rozsáhlém genu
 - Je k dispozici rodina (DNA rodiny) s 1 či několika postiženými jedinci
- **Volba markeru pro nepřímou analýzu:** K dispozici genetické mapy s rozlišením 1cM/MB
- Markery ohraničují místo z obou stran nejlépe v oblasti intronů genu - nehrozí riziko rekombinace z crossing-overu (= úplná vazba)
- **1% pravděpodobnost rekombinace = 1 cM** (odpovídá asi 1 Mb)

Přímá analýza mutací

Jedna známá mutace
(SNP polymorfismy)

PCR – RFLP

ARMS (ASA)

Real-time PCR

Hybridizace
na pevném podk.

Sekvenování

Primer extension

Více známých mutací
v daném genu

Multiplex PCR

Hybridizace
na pevném podk.

Biočipy

MLPA

Neznámé mutace
(screening)

SSCP

HD

DGGE

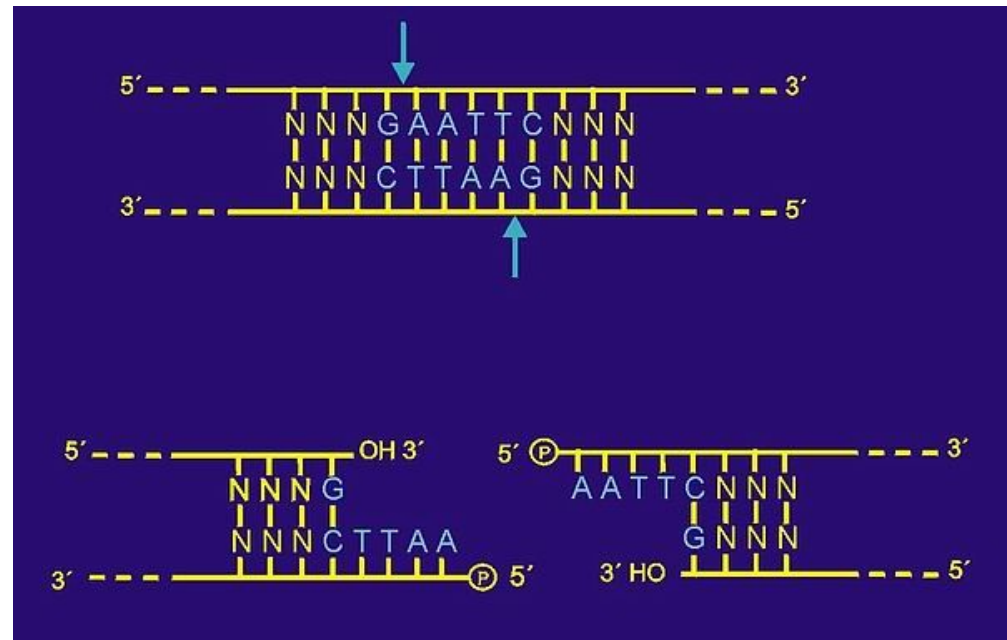
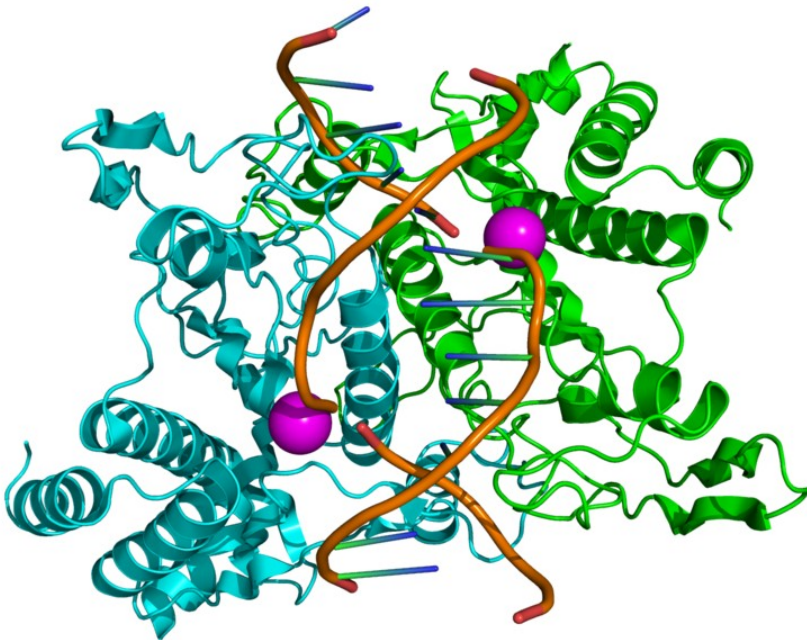
TGGE

HRM

↓
Sekvenování

RFLP (délkový polymorfizmus restričních fragmentů)

- bakteriálních endonukleázy („restriktázy“), které štěpí DNA, v přesně definované sekvenci nukleotidů, např. bakterie *Escherichia coli* - enzym s názvem EcoRI



Restrikční endonukleázy

- přirozeně se vyskytují v bakteriích
- chrání je před infikujícími bakteriofágy
- enzym „rozstříhá“ DNA fága, když vnikne do buňky
- bakteriální DNA je chráněna metylací sekvencí, které enzym rozeznává
- typicky rozeznávají úseky o 4-6 bp
- známe asi 300-400 různých endonukleáz

Restrikční analýza -573G/C v IL-6

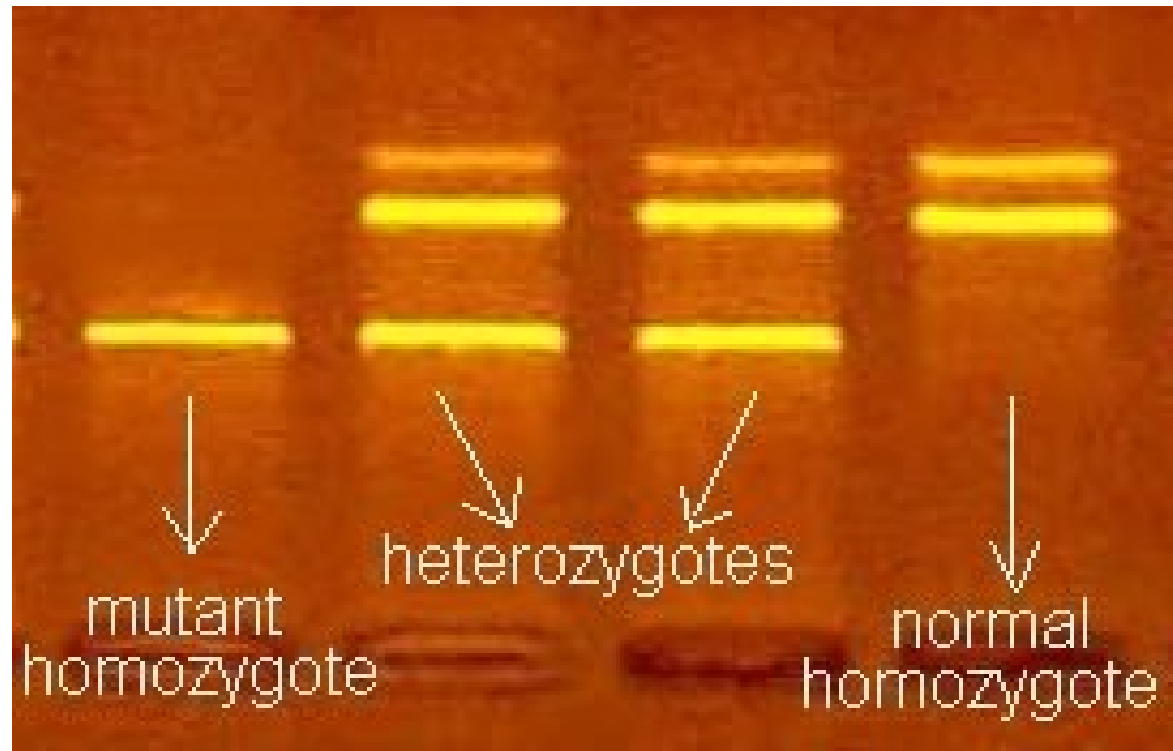
PCR produkt 543bp 12 μ l

- voda 2,7 μ l
- pufr 2,0 μ l
- BsrBI 0,3 μ l

inkubace při 37°C po dobu 4 hod

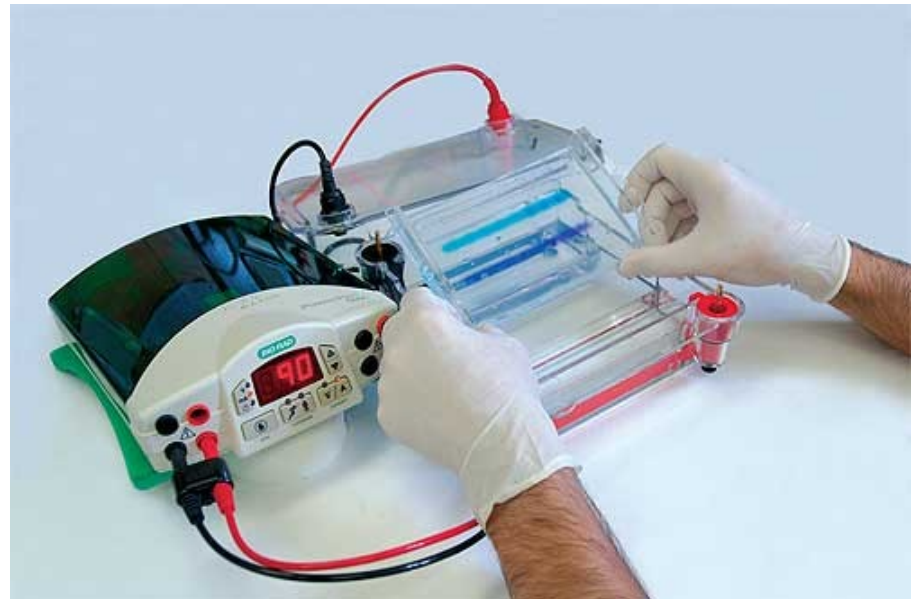
výsledné fragmenty: 274 a 269 bp (G alela)
543 bp (C alela)

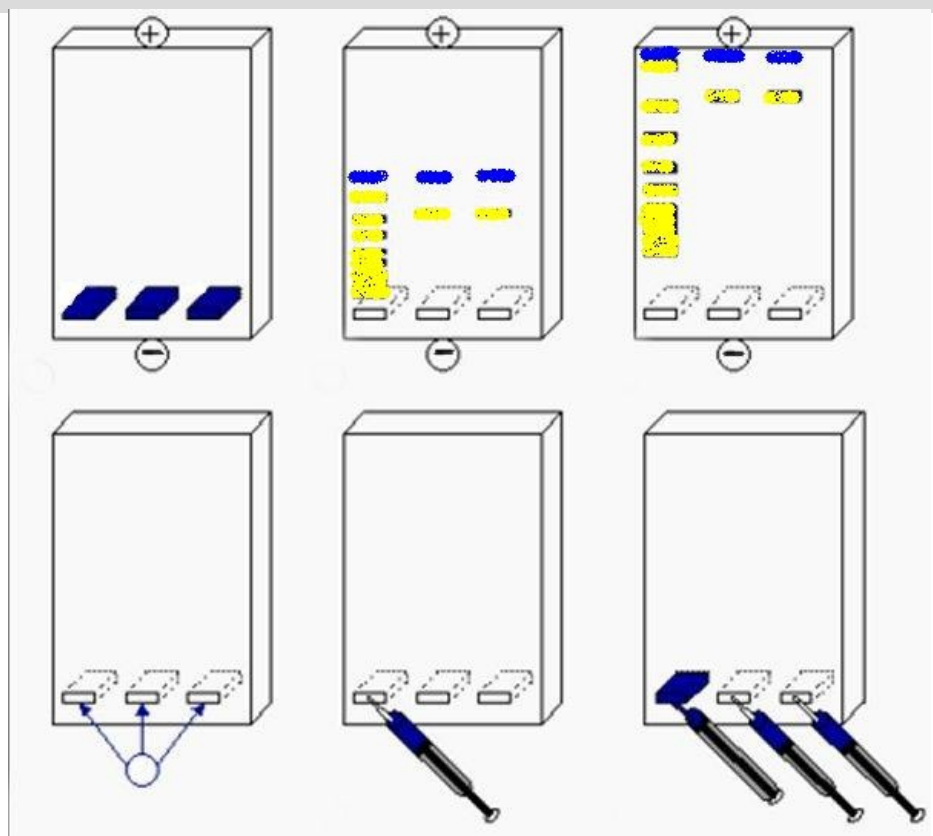
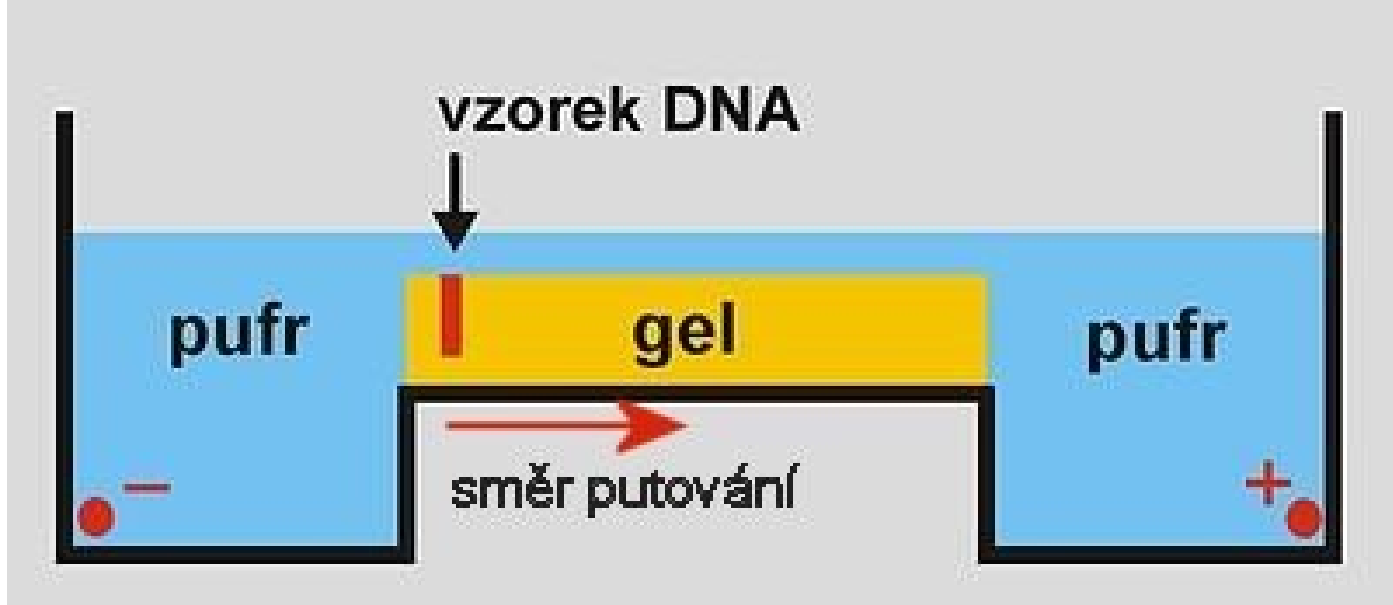
ELFO ve 2% agarózovém gelu



Elektroforéza fragmentů DNA

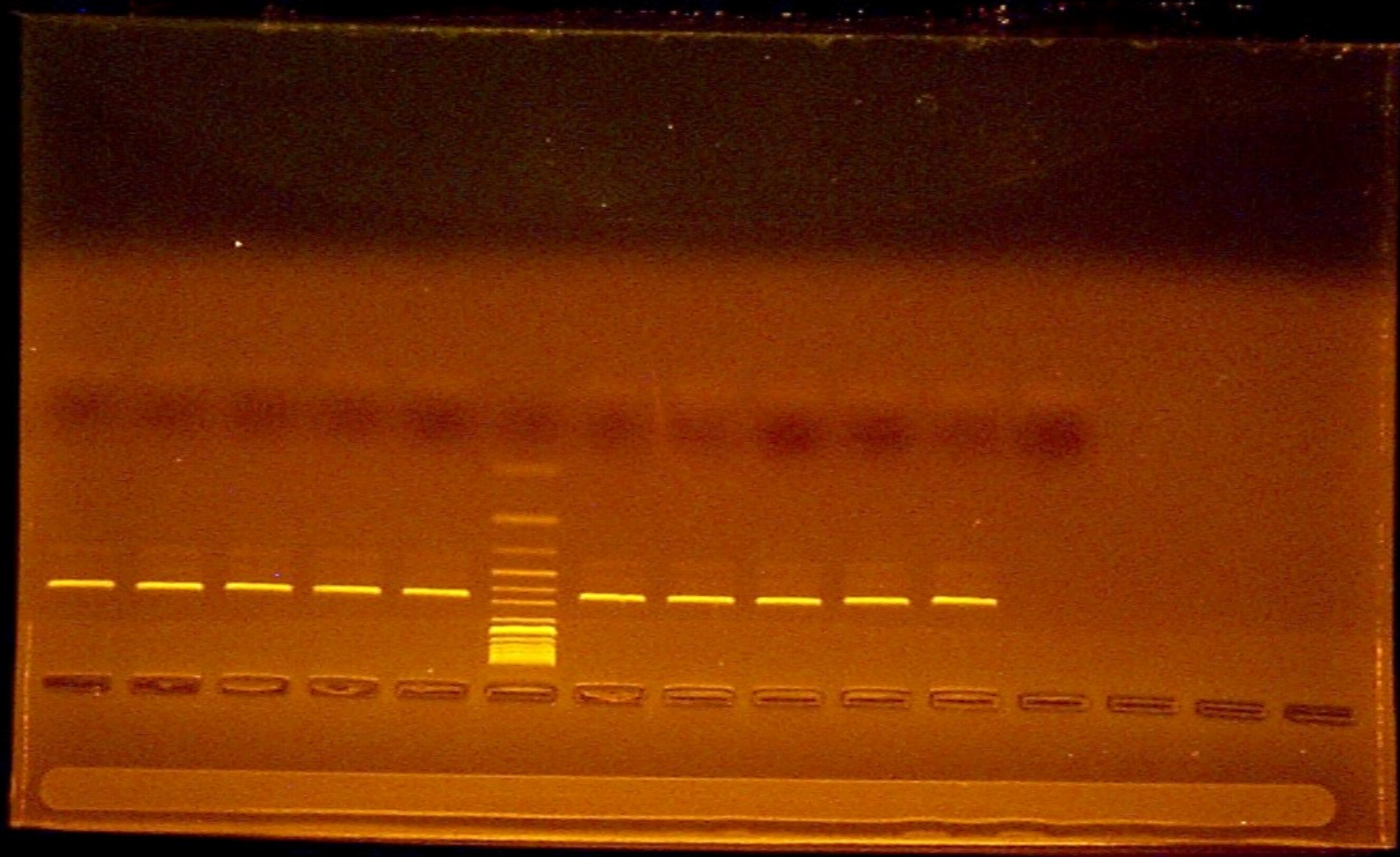
- vkladací pufrý - roztoky o vysoké hustotě usnadní vkladání vzorků DNA do jamek
- manipulaci se vzorky umožní barviva - pohyblivost při elfo jako DNA (např. bromofenolová modř)
- záporný náboj - pohybují v elektrickém poli od katody k anodě
- vizualizace pomocí ethidium bromidu popř. jiných barviv (*SYBRGreenu*, *GelGreen* a *GelRed*)

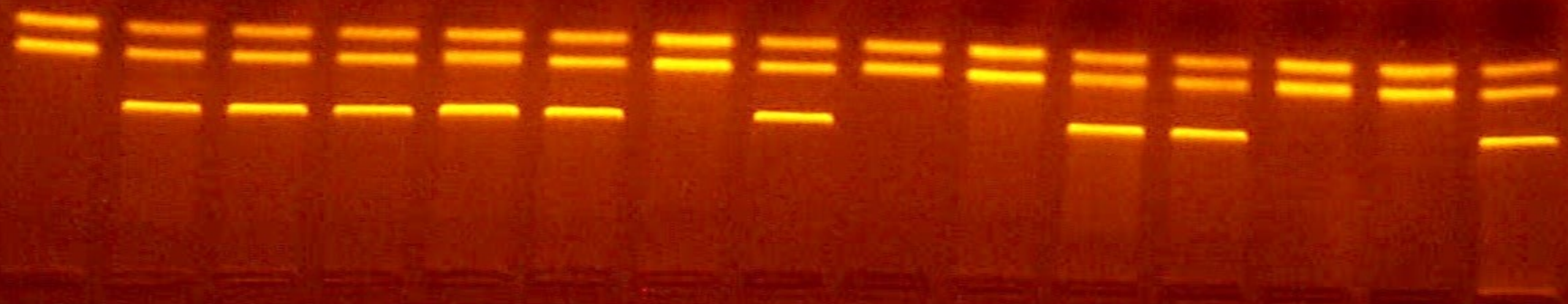
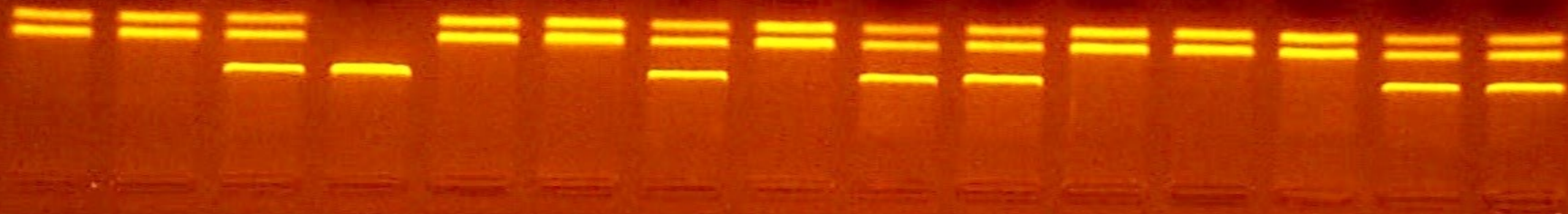
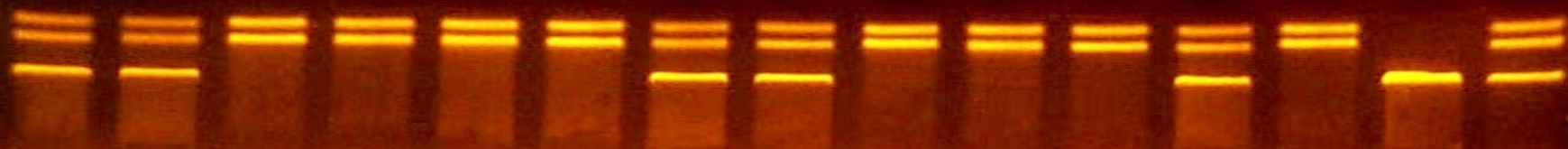


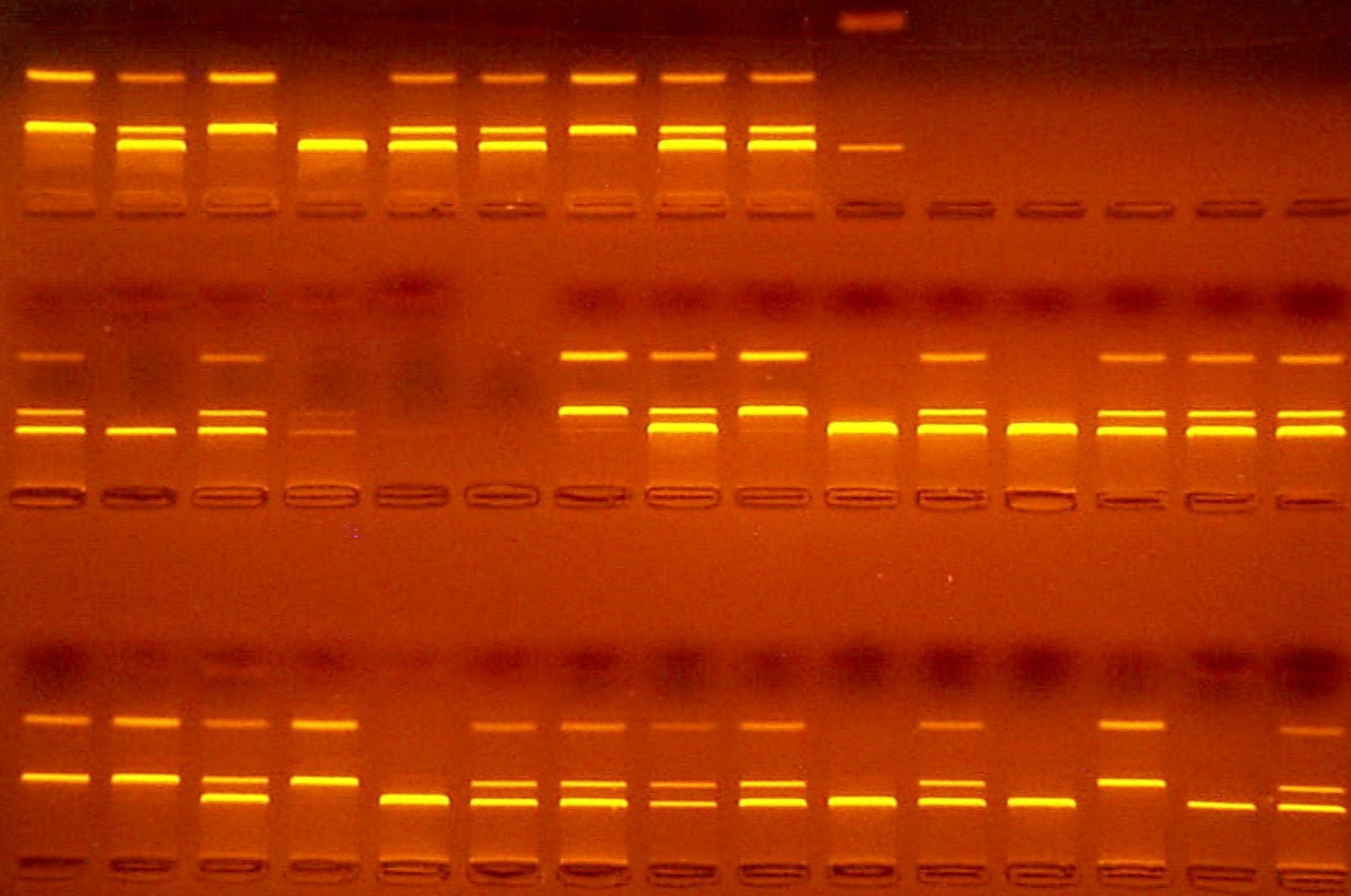


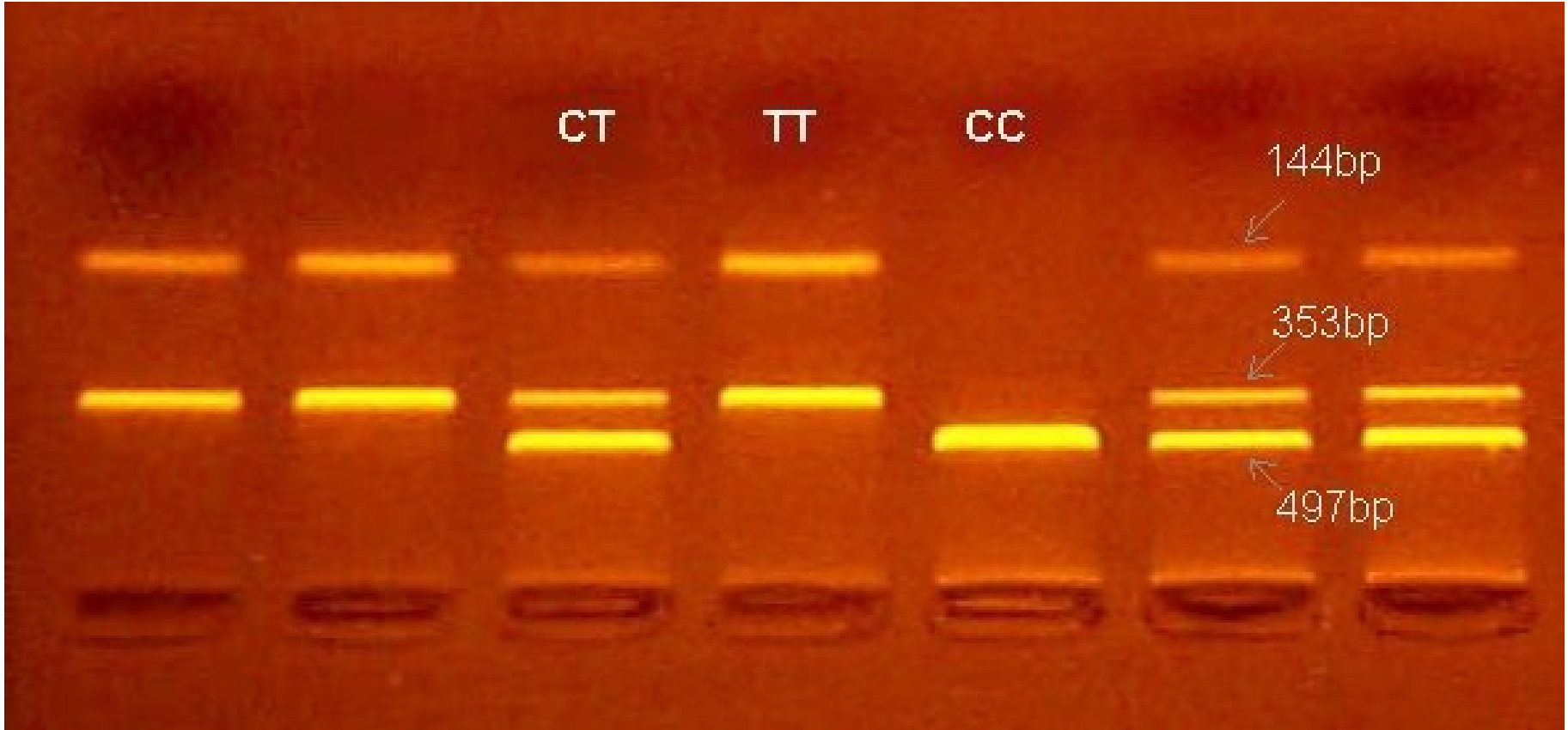
UV transluminátor

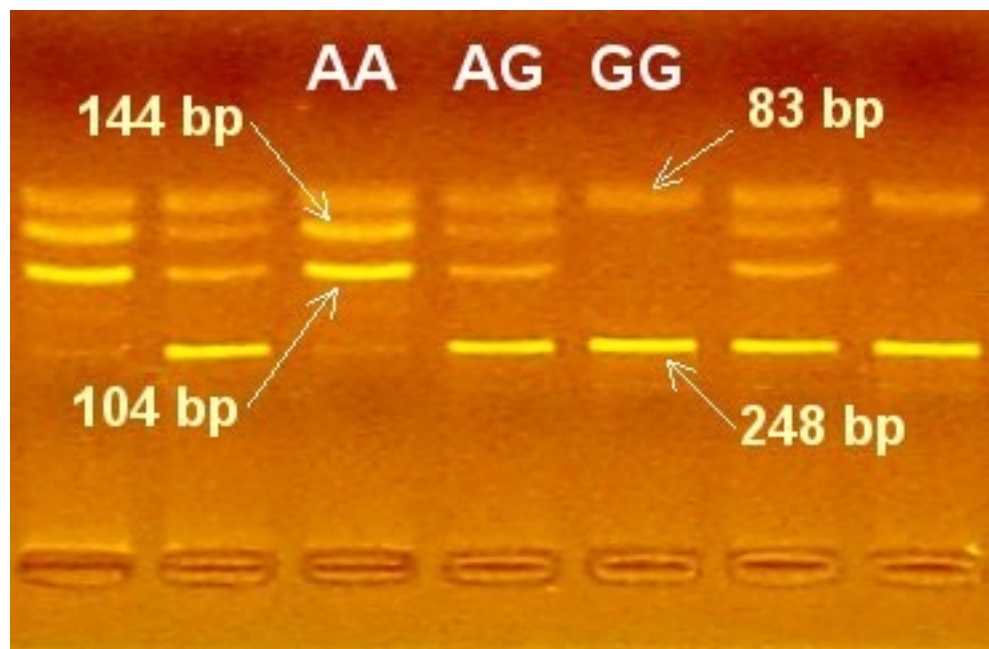
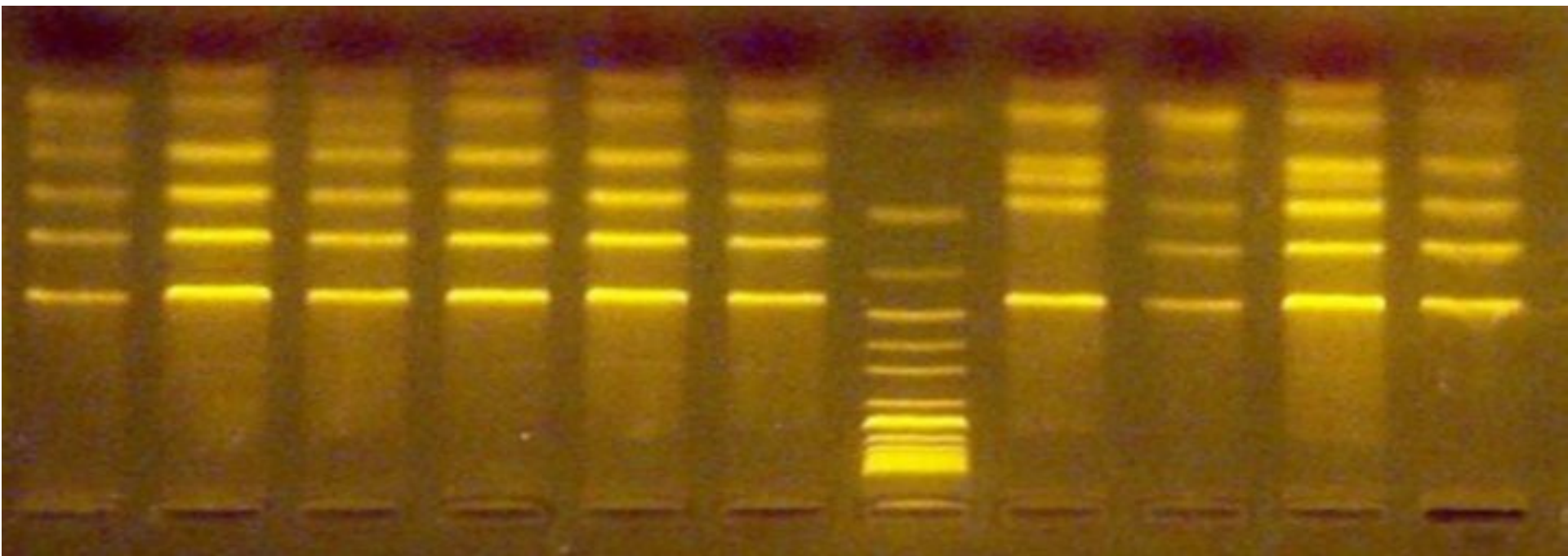


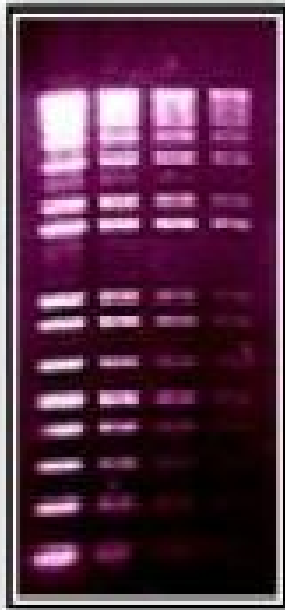




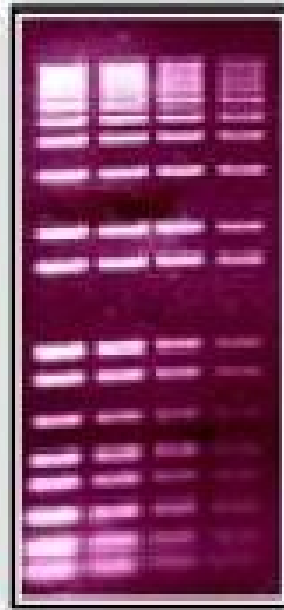








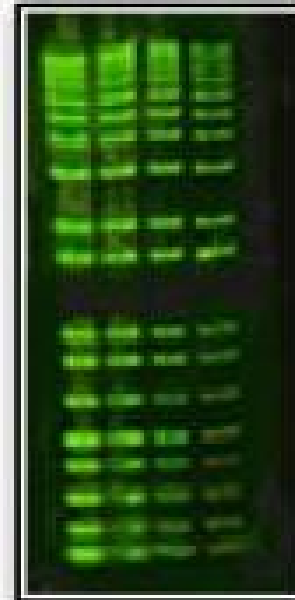
GelRed™
Precast
Staining



GelRed™
Post
Staining



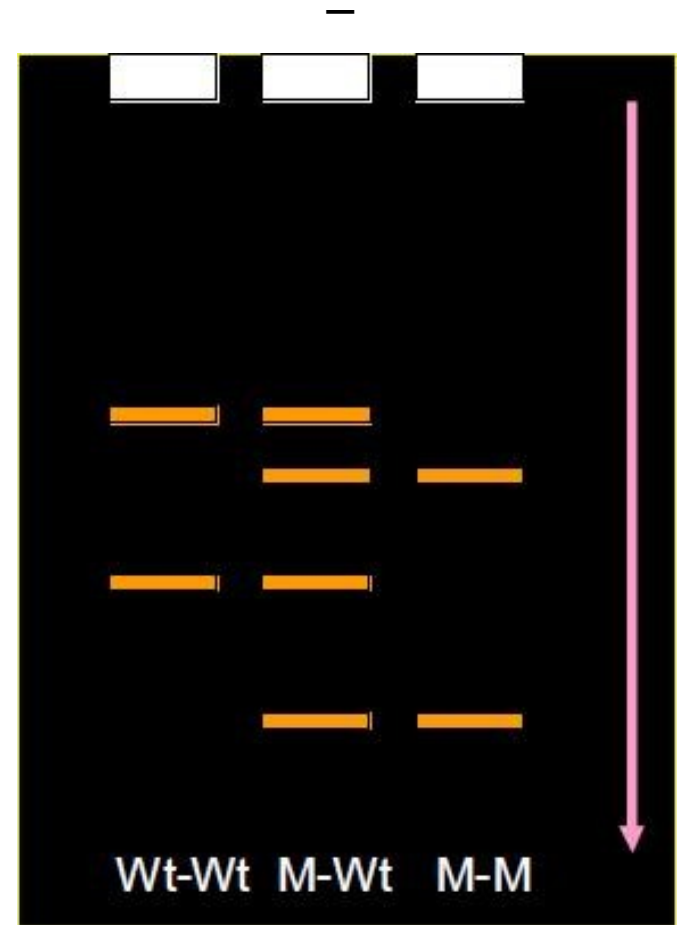
EB
Precast
Staining



GelGreen™
Post
staining

Vyhledávání neznámých mutací

- **SSCP** (single strand conformation polymorphism, **polymorfismus konformace jednořetězcové DNA**)
- elektroforéza jednovláknové DNA na polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě - rychlost, jakou putuje během elektroforézy, závisí na přesné konformaci
- **odliší i záměnu jediné báze**
- elfo při 4 C nebo s glycerolem

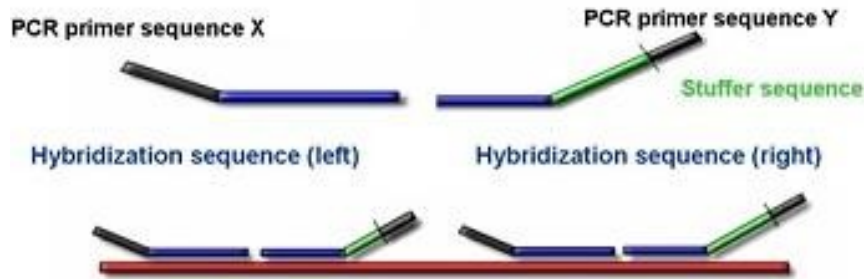


+

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

- poprvé publikovaná v roce 2002
- vyhledávání více chromozomálních aberací
- hybridizace, navázání oligonukleotidových sond
- sonda se skládá ze dvou oligonukleotidů
- oligonukleotidy spojeny ligací
- spojené sondy jsou po denaturaci amplifikovány pomocí klasické PCR
- rozděleny kapilární elektroforézou na základě jejich různé délky

1. Denaturation and Hybridization



2. Ligation

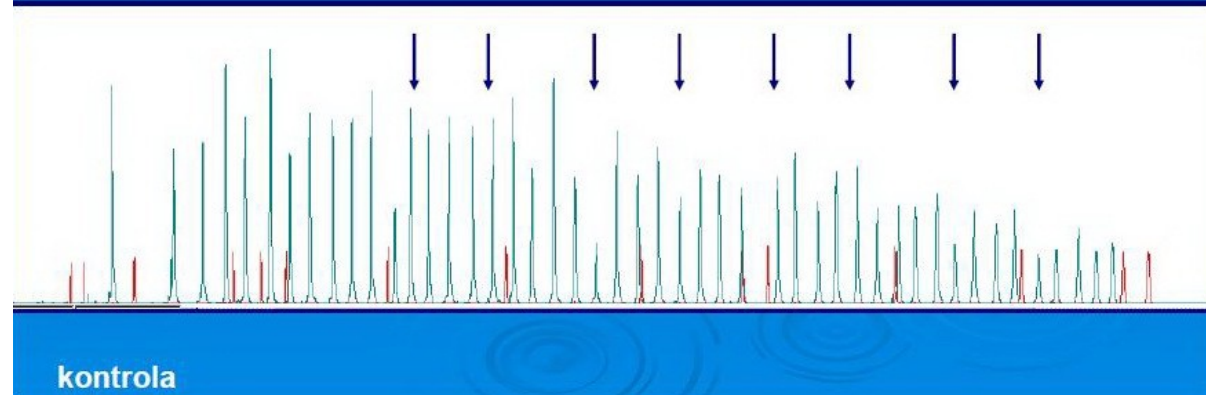
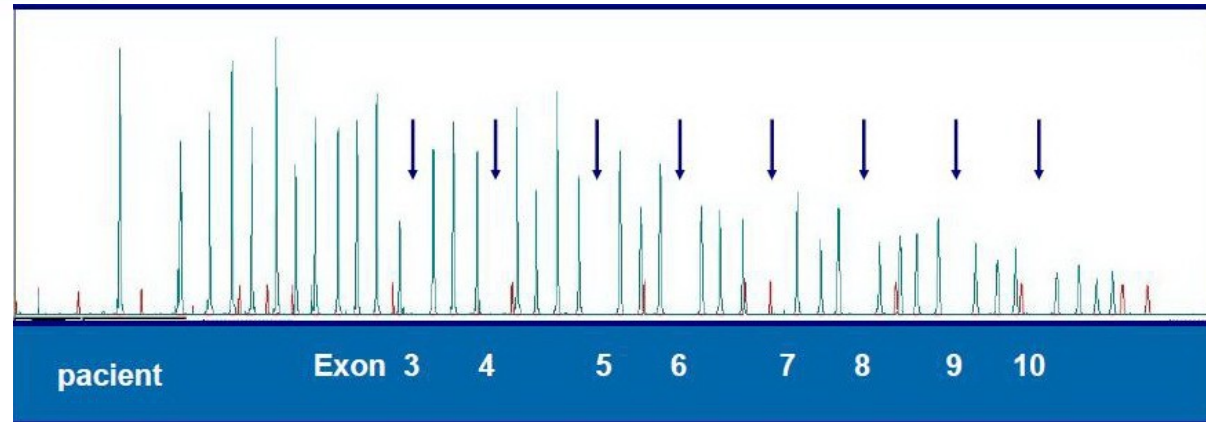


3. PCR with universal primers X and Y exponential amplification of ligated probes only



Duchennova/Beckerova svalová dystrofie

- X-recesivně vázané onemocnění
- gen pro dystrofin má 79 exonů a velikost 2,4 Mb



Děkuji za pozornost

