



# Metody používané k detekci polymorfismů



# Rozdělení polymorfismů

Bodové

ATGCGGTAACG TAGGCTTCAGG  
ATGCGGTAACA TAGGCTTCAGG

Možno využít DNA čipy



Inzerčně-deleční

ATGCGGTAACG TAGGCTTCAGG  
ATGCGGTAAC - TAGGCTTCAGG  
ATGCGGTAACG - TAGGCTTCAGG  
ATGCGGTAACGG TAGGCTTCAGG

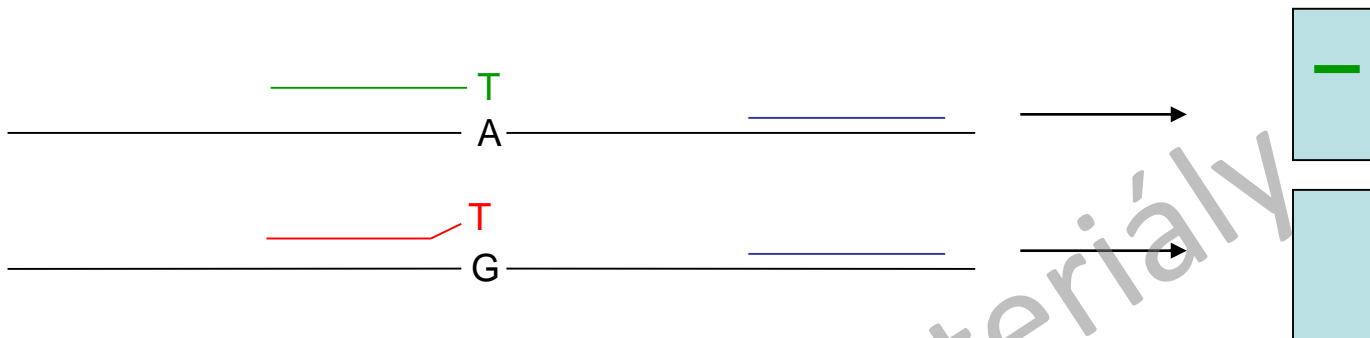
Není možné využít DNA čipy





# Detekce polymorfismů pomocí PCR

Detekce bodových SNP pomocí mis-match primeru na 3'konci



DNA polymerasa má často 3'→5' exonukleasovou aktivitu, která neumožňuje použití této metody, dostáváme nejednoznačné výsledky.

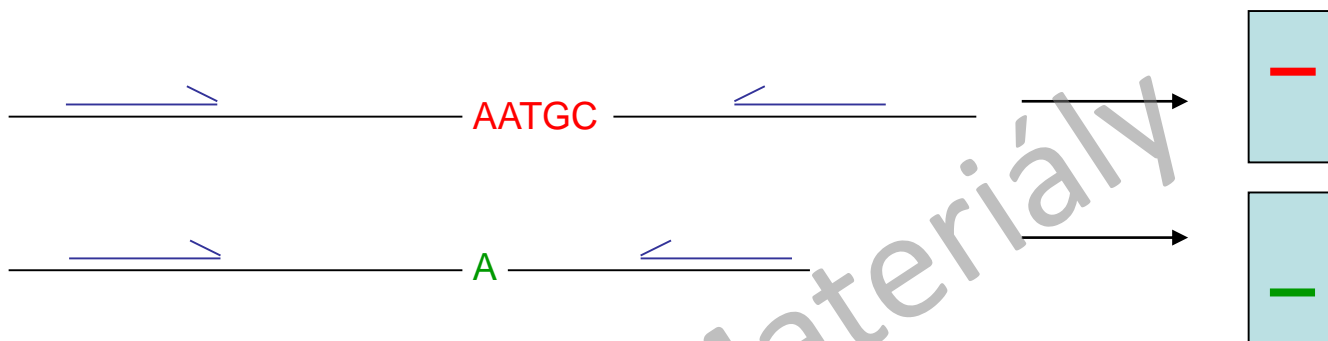
Využití v HLA typizaci pomocí SSP-PCR



DQA1 alleles	DQB1 alleles	Positive DQA1 wells	Positive DQB1 wells
*05:01	*02:01 (DQ2)	3, 5	8, 10, 12
(*02:01) *05:05	*02:02 (DQ2) (*03:01)	1 3, 5, 6	8, 9, 12 10, 15, 17
*03	*03:02 (DQ8)	2	10, 12, 13, 15
*05:01		3, 5	
*05:05		3, 5, 6	
*02:01		1	
*03		2	
	*02:01		8, 10, 12
	*02:02		8, 9, 12
	*03:01		10, 15, 17
	*03:02		10, 12, 13, 15



## Detekce inzerčně/delečních polymorfismů (inzerce/delece větší než 2 báze)

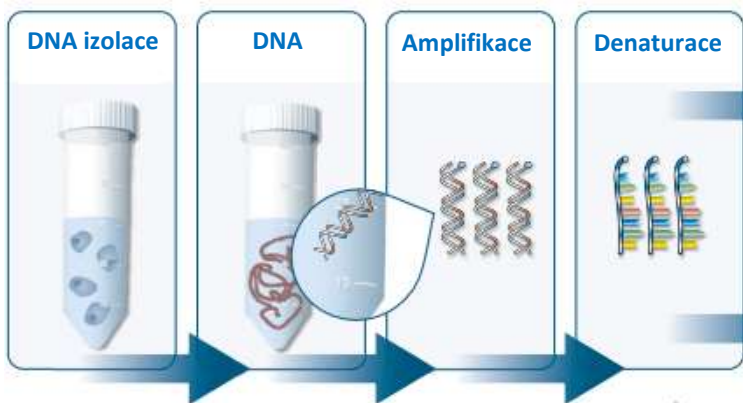


Analýza PCR produktů se provádí na agarosovém (> 5-10bp) nebo polyakrylamidovém gelu - možnost automatizace analýzy na Genetickém analyzátoru

Studijní Materiály



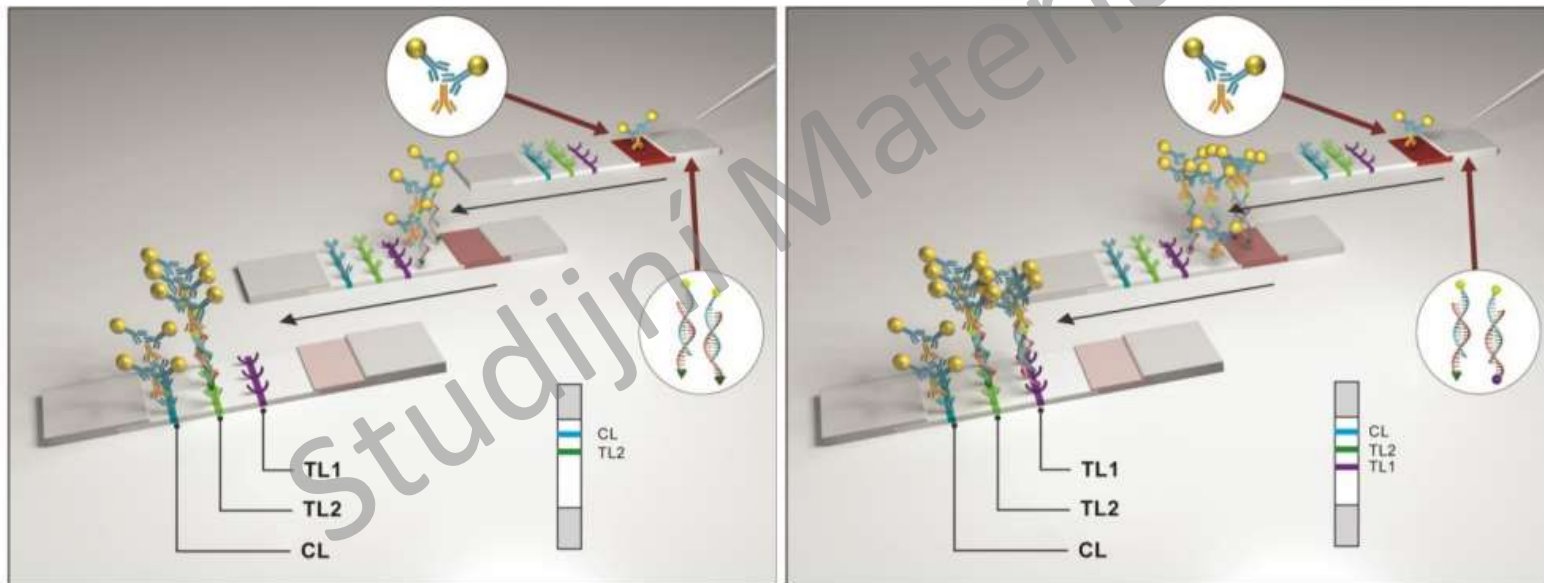
# Detekce pomocí proužků (Strip assay)





# Detekce pomocí lateral flow assay (LFA)

1. Izolace DNA
2. Amplifikace
3. Hybridizace se značenou sondou
4. Detekce pomocí LFA



FITC  
BIOTIN

Amplification of  
Leishmania DNA

FITC  
DIGOXIG

Amplification of 18S rRNA gene  
(Endogenous control)



AuNP



Streptavidin



Goat anti-FITC



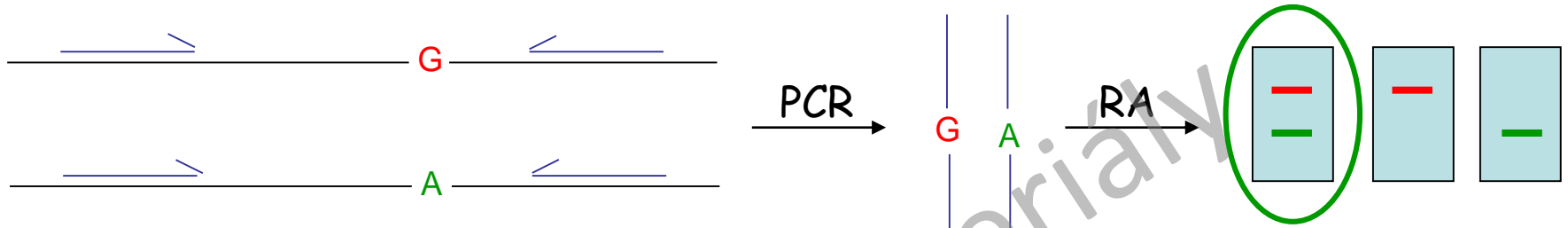
Chicken anti-goat



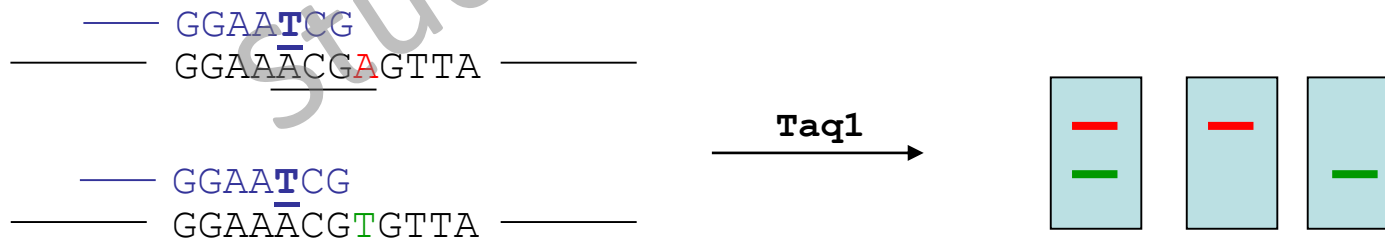
Chicken anti-digoxigenin



# Detekce polymorfismů restrikční analýzou



Velmi často se snažíme používat co nejlevnější restrikční endonukleasu, např. Taq1 (5'-T<sup>^</sup>C G A-3'). Pokud sekvence v oblasti SNP nesouhlasí s danou restriktašou, je možno použít primer, který nám požadovanou sekvenci pro restrikci vytvoří.



**Taq1 - TCGA**



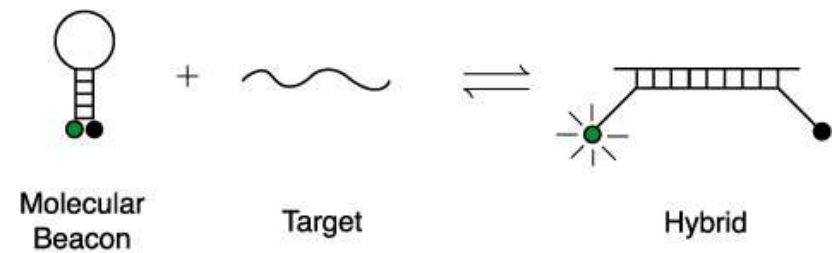
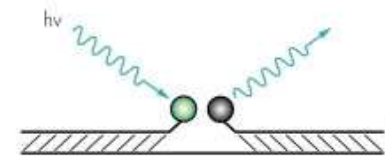
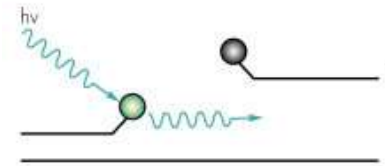
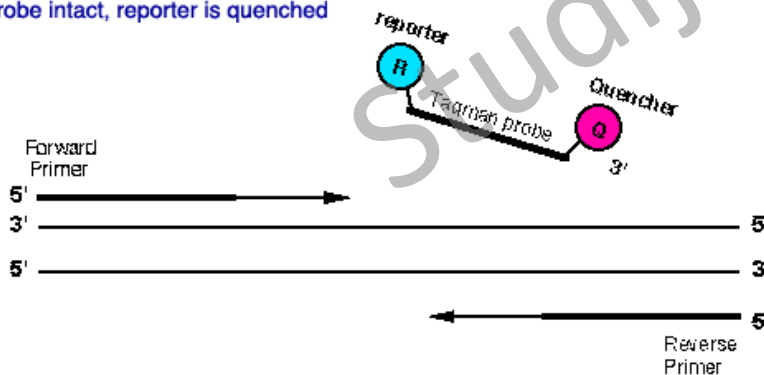
# Detekce polymorfismů pomocí Real-Time PCR

Použití specifických fluorescenčních sond

Hydrolizační sondy  
TaqMan

Hybridizační sondy  
Molecular beacon, FRET

Probe intact, reporter is quenched



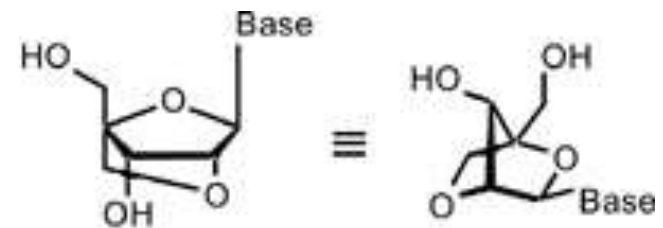
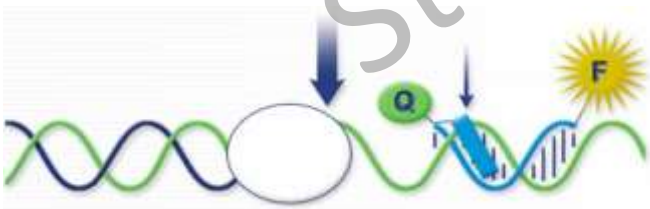




# Detekce polymorfismů pomocí Real-Time PCR

## Pravidla pro návrh sond:

- polymorfismus by měl být umístěn přibližně uprostřed sondy
- $T_m$  sondy by měla být o deset stupňů vyšší, než  $T_m$  primerů
- sonda by neměla vytvářet žádné stabilní struktury v rámci sebe
- pro zvýšení stability duplexu sonda-DNA je možné použít modifikace bazí
  - MGB sondy
  - LNA sondy



LNA Monomer

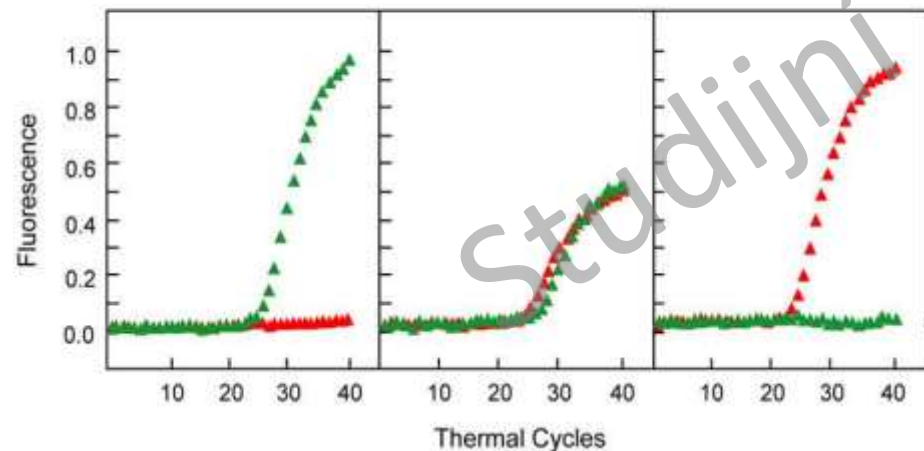
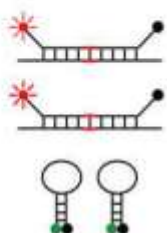
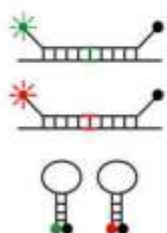
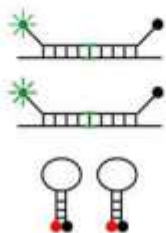


# Detekce polymorfismů pomocí Real-Time PCR

Homozygous Wild-type

Heterozygote

Homozygous Mutant

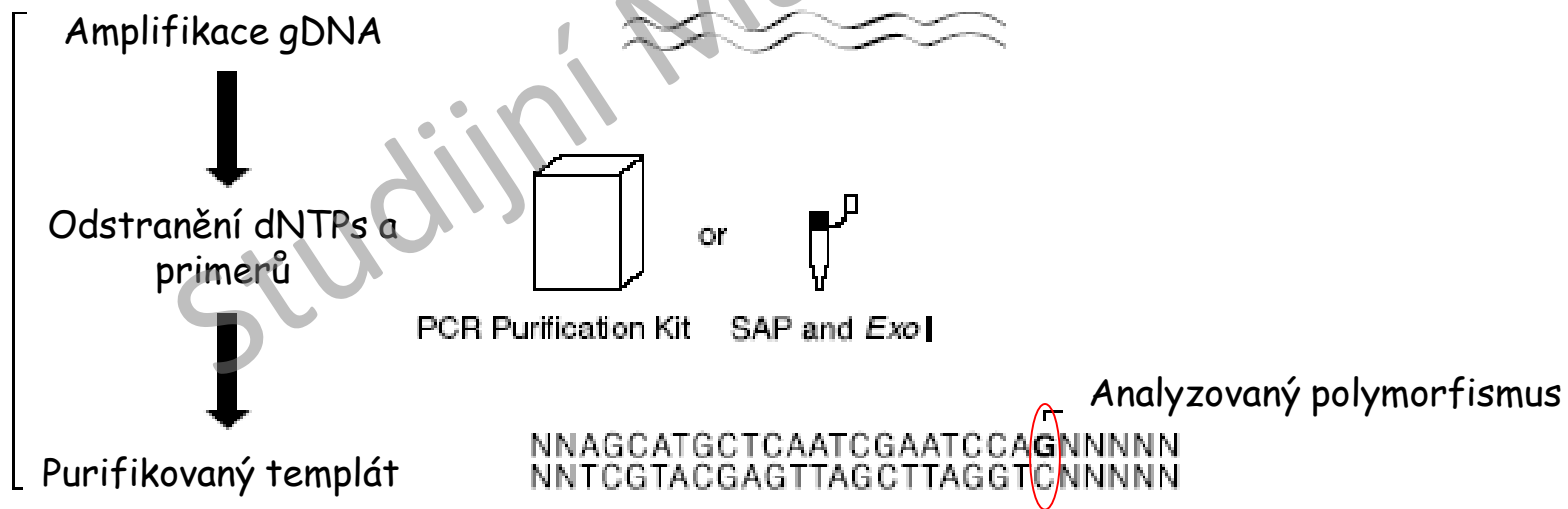




# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí metody SNaPshot

- možno detekovat až 12 SNPs najednou
- metoda trvá 1 den

## Příprava templátu

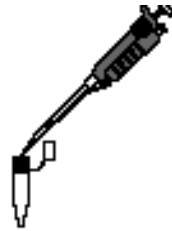




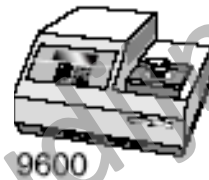
# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí metody SNaPshot

Příprava reakce:

- templát
- Primer
- SNaPshot Multiplex
- Reakční směs



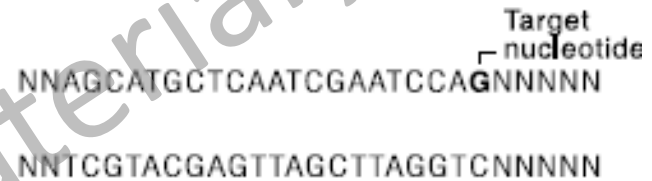
Provedení teplotních cyklů



Odstranění volných ddNTP



Denaturace  
templátu



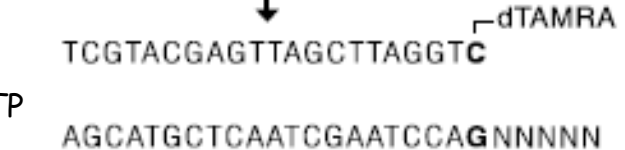
Nasednutí  
primeru



Extenze  
primerů pomocí  
ddNTP



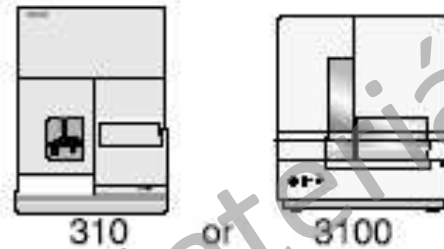
Odstranění  
volných ddNTP  
a denaturace



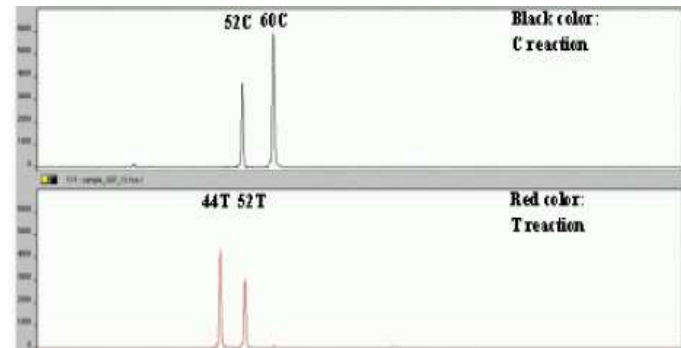
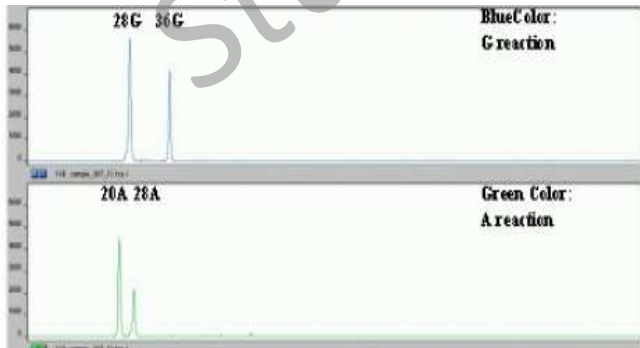
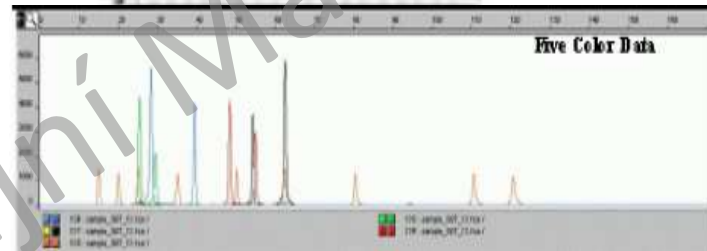


# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí metody SNaPshot

↓  
Elektroforéza vzorků na  
kapilárovém sekvenátoru



↓  
Analýza dat





# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí metody GoldenGate

- Genotypizace vybraných SNPs
- Průměrná call rate > 99%
- 96-1536 SNPs/vzorek
- 16 nebo 96 vzorků najednou
- Formát matrice nebo čipu



Studijní Materiály



# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí metody GoldenGate

## BeadArray Microwell Fabrication



Optical fiber

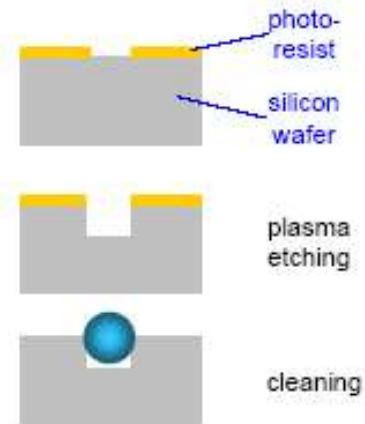
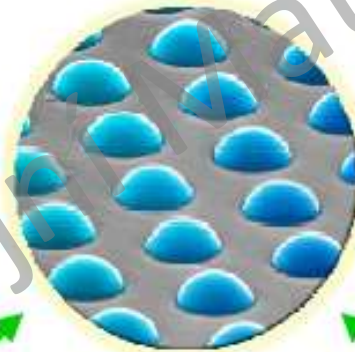
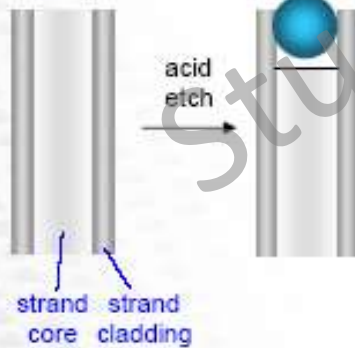
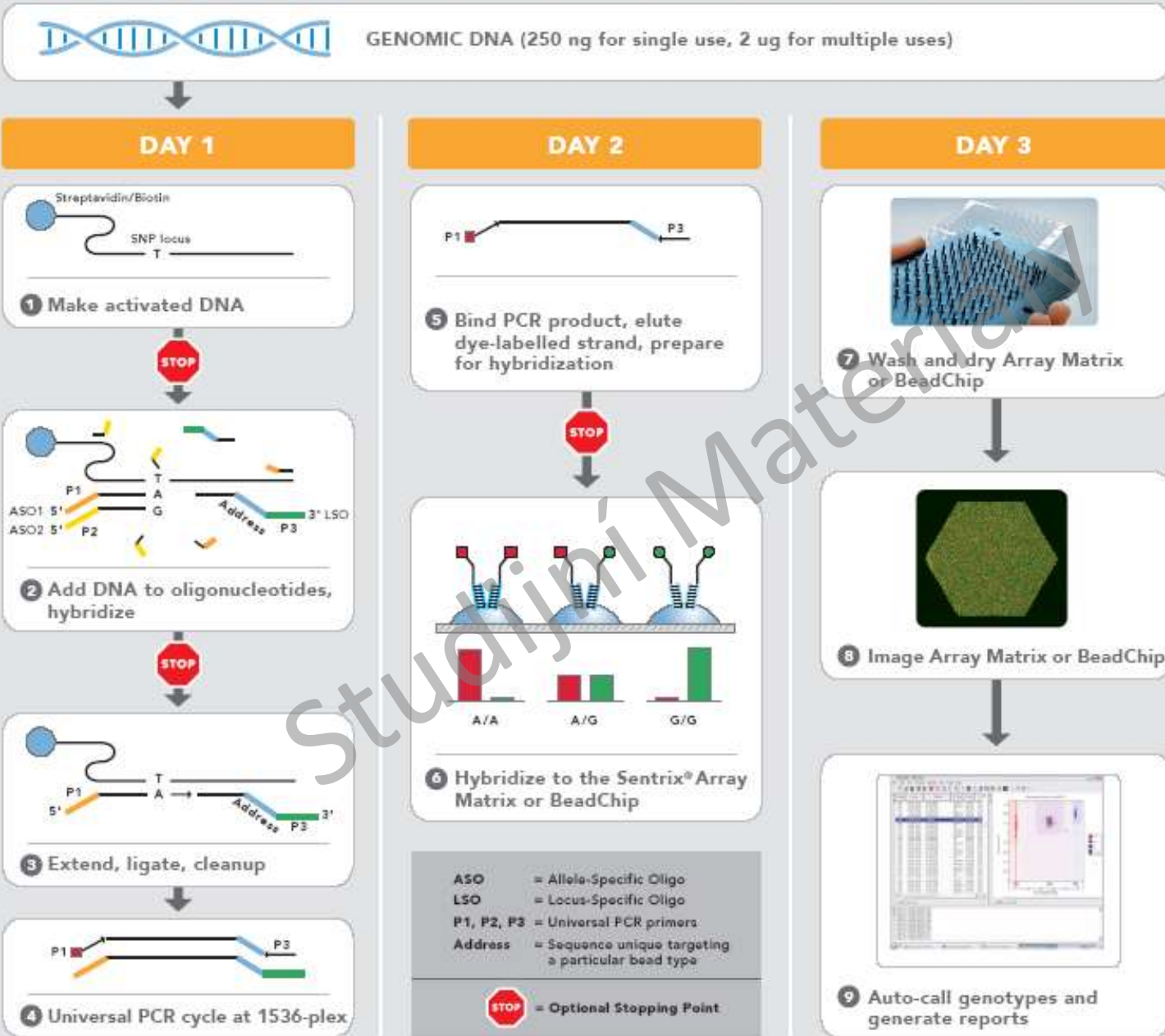


FIGURE 1: GOLDENGATE ASSAY







# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí metody Infinium

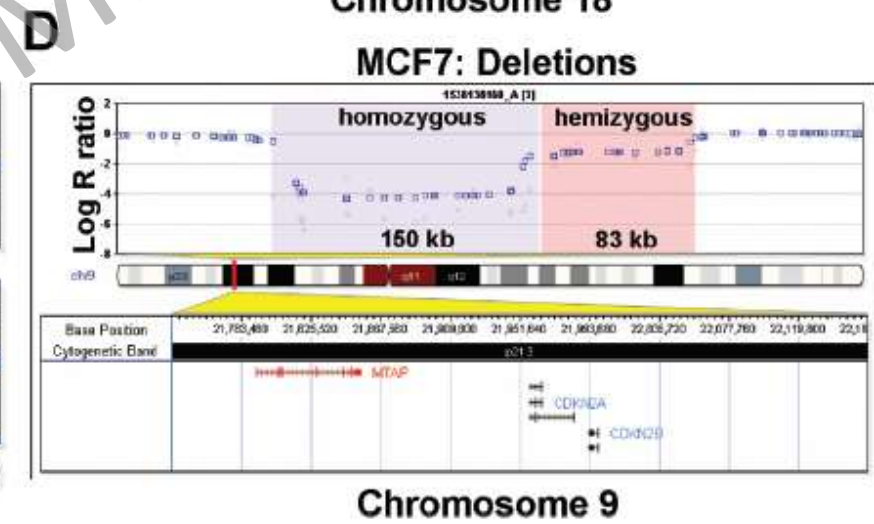
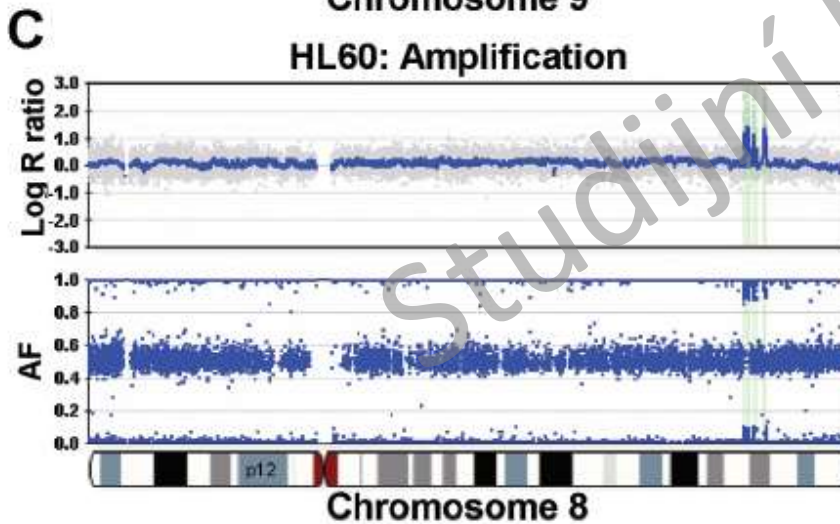
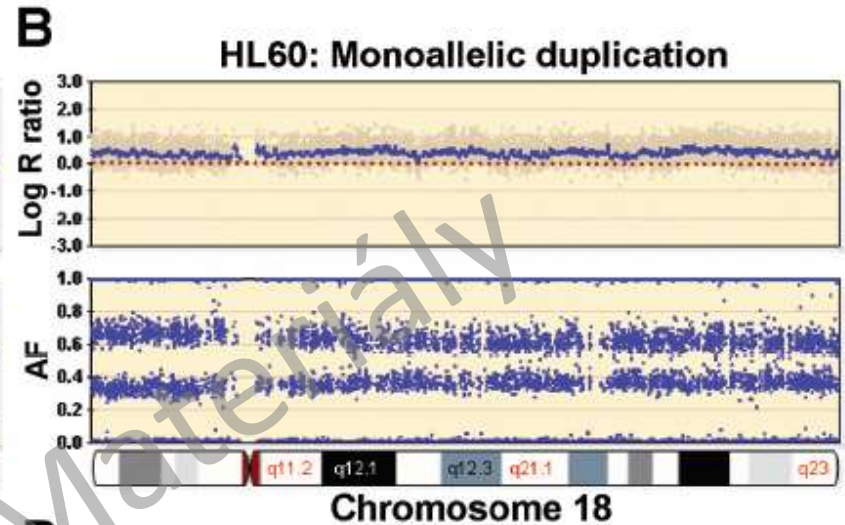
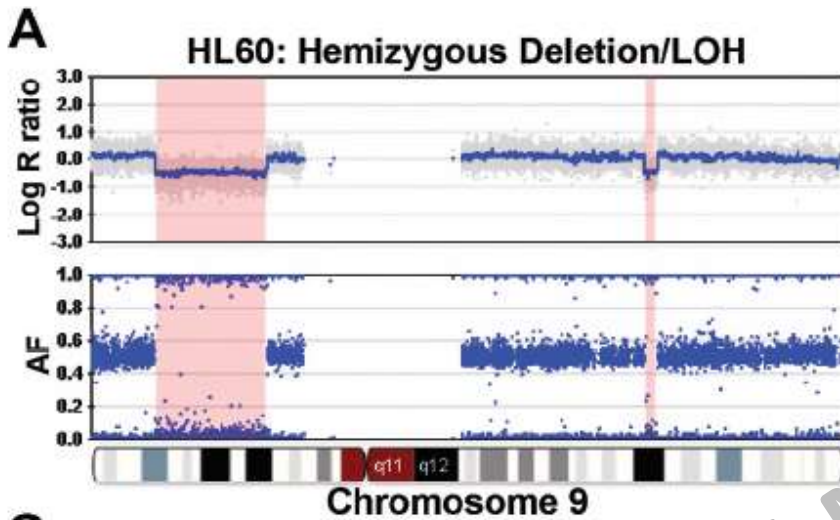
- Celogenomové typizace SNPs
- Možnost provádění CNV analýz (copy number variation)
- Průměrná call rate > 99%
- 1 072 820 SNPs/vzorek
- 4 až 48 vzorků najednou

Infinium HD BeadChips	Samples per BeadChip	Markers per Sample
HumanOmni1-Quad	4	> 1 million*
Human1M-Duo	2	> 1 million
HumanOmniExpress	12	> 700,000
Human660W-Quad	4	> 658,000
HumanCytoSNP-12	12	~ 300,000
Semi-Custom Human1M-Duo+, and HumanHap550-Quad+	2 / 4	standard content and up to 60,800 customized SNPs per sample





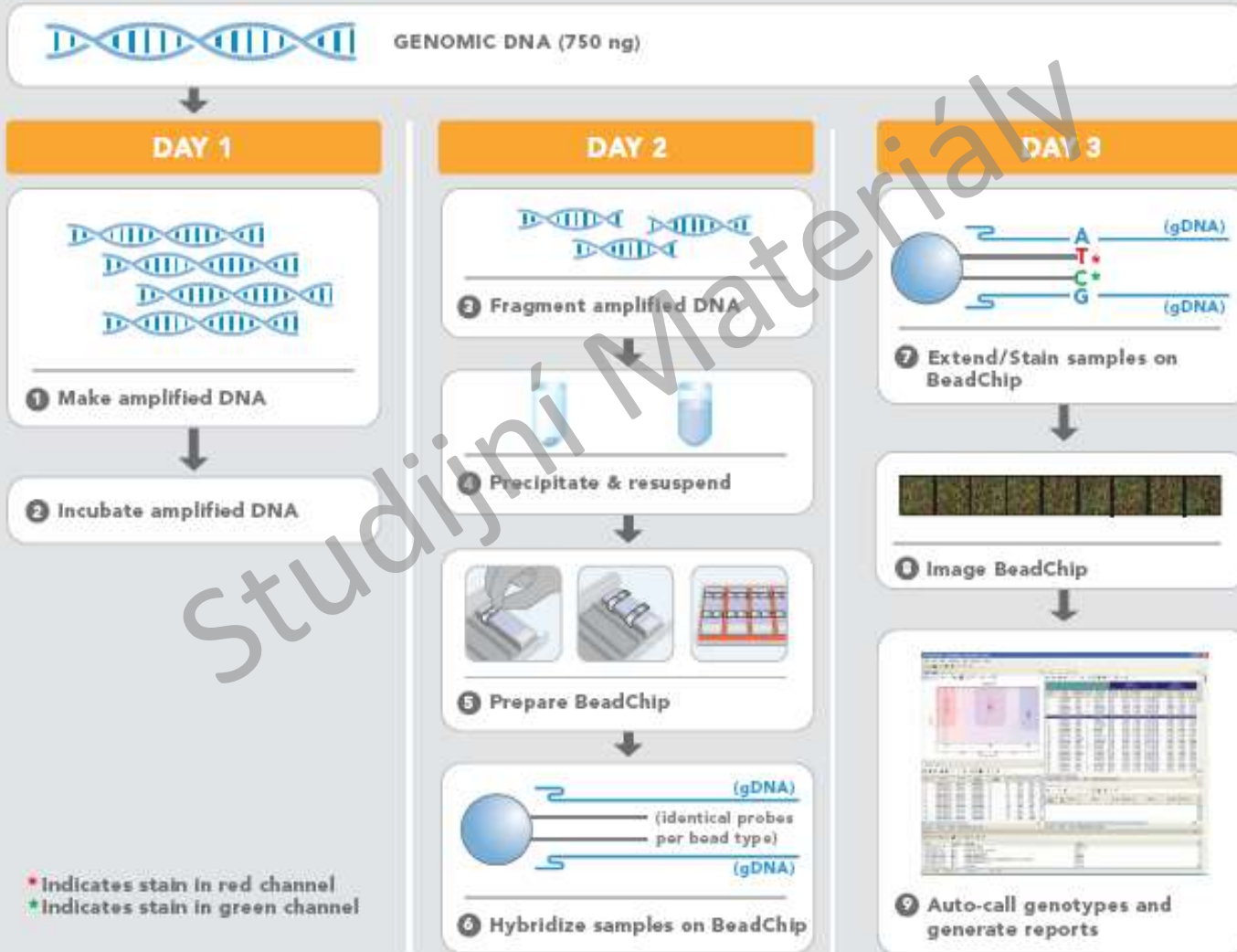
# CNV analýza





# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí metody Infinium

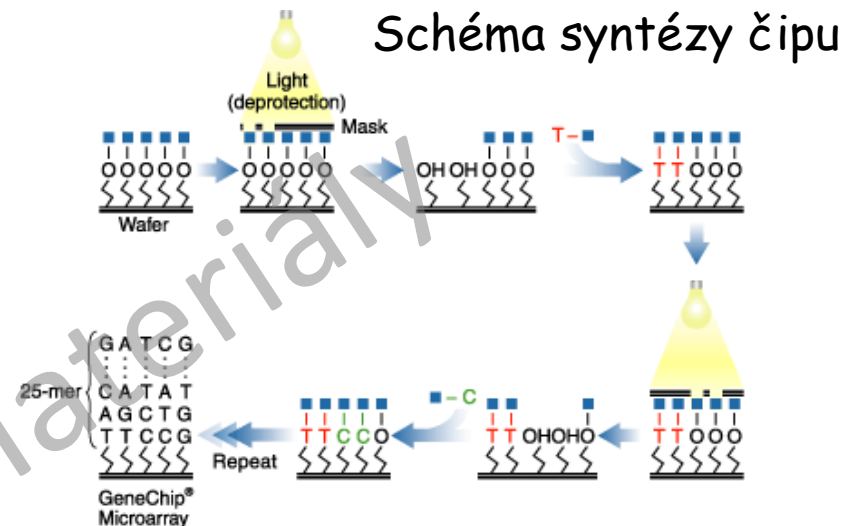
FIGURE 1: INFINIUM II ASSAY PROTOCOL





# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí čipů Affymetrix

	270 HapMap	Site 1	Site 2
Call Rate	99.8	99.7	99.7
HapMap Concordance	99.8	99.7	99.8
Mendelian Consistency	99.97	99.95	99.96
Reproducibility	NA	99.9	99.9
SNP Completeness*	99.9	99.7	99.8





# Detekce jednobodových polymorfismů pomocí čipů Affymetrix

## Schéma detekce

### Fluorescence-Detection DNA Chip

The four bases A, T, G, and C bind A to T or G to C. A target DNA sequence is analyzed by checking which bases the target DNA bases bind.

