

Fragmentační analýza

a

profil DNA

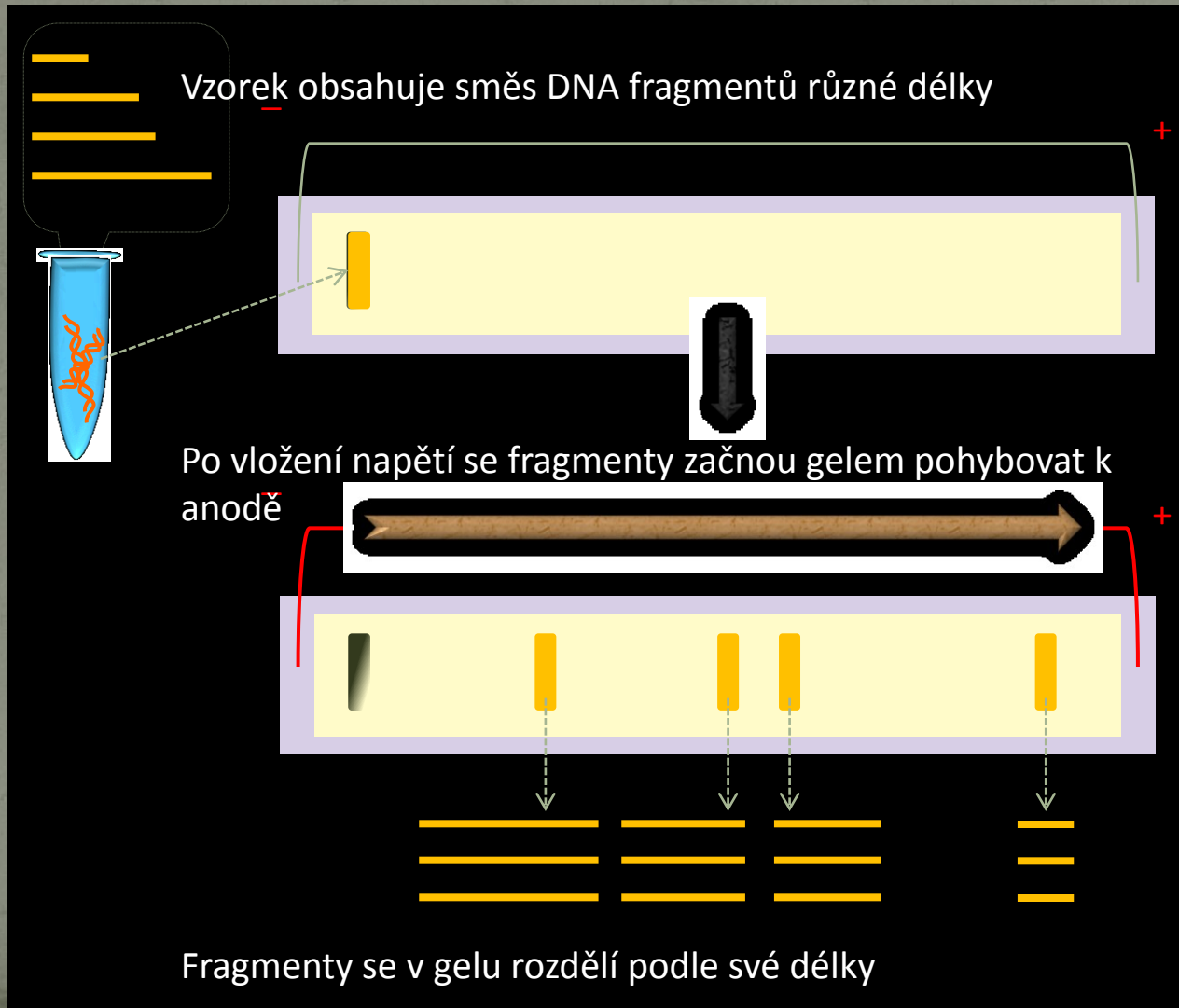
---

# Elektroforéza

Separální metody založené na pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, přičemž různé částice mají různou elektroforetickou mobilitu (tj. pohybují se v poli rozdílnou rychlostí).

Na základě této rozdílné pohyblivosti tak dojde k separaci jednotlivých typů částic.

# Princip ELFO





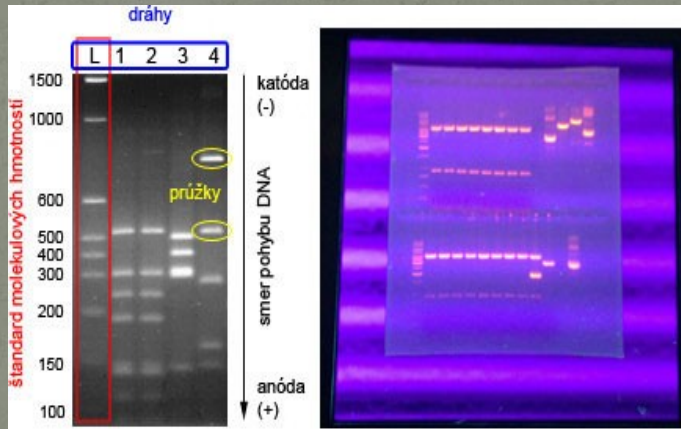
Vzorek DNA nanesen do malé jamky v gelovém plátu (vodorovný nebo svislý) ponořeném v pufro mezi elektrodami.

Agarózový gel (AGE)

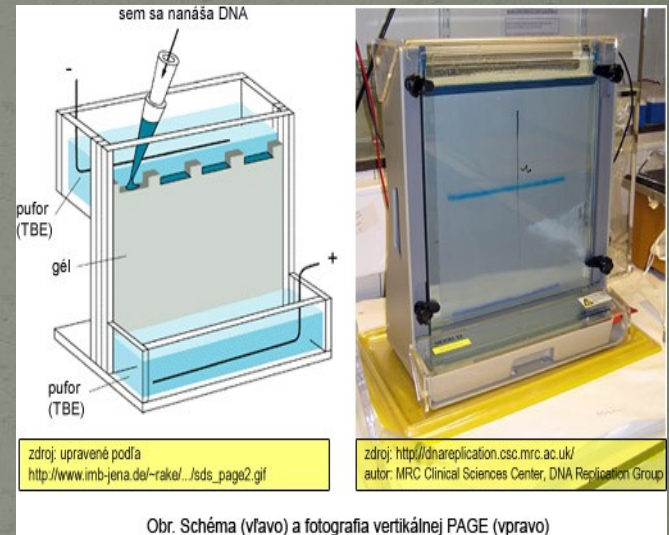
Polyakrylamidový gel (PAGE)

Výsledek: proužky (bandy)

Velikostní standard (žebříček) – uměle připravená směs fragmentů několika známých délek



Obr. Schéma elektroforetickej separácie (vľavo) a gél pod UV svetlom (vpravo)



zdroj: upravené podľa  
[http://www.imb-jena.de/~rake/.../sds\\_page2.gif](http://www.imb-jena.de/~rake/.../sds_page2.gif)

zdroj: <http://dnareplication.csc.mrc.ac.uk/>  
 autor: MRC Clinical Sciences Center, DNA Replication Group

Obr. Schéma (vľavo) a fotografia vertikálnej PAGE (vpravo)

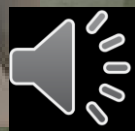


# Kapilární elektroforéza

- vzorek elektrickým pulzem nabrán na začátek tenké skleněné kapiláry naplněné polymerem lineárního akrylamidu nebo polydimethylamidu
- detekce fragmentů prováděna v průběhu času: každý fragment je již před analýzou označen fluorescenční barvou (zpravidla začleněním označeného primeru v průběhu PCR)
- při průchodu fluorescenčně značených fragmentů spec. okénkem laserový paprsek vybudí silnou fluorescenci, která je zaznamenána CCD detektorem
- vnitřní standard (žebříček) – přidáván přímo do analyzovaného vzorku
- čím kratší fragment je, tím dříve doputuje k okénku v kapiláře
- délka fragmentu určena podle relativní doby, kterou fragment potřebuje k dosažení okénka kapiláry (na základě porovnání s velikostním standardem).

# Genetický analyzátor 3130



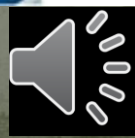




# Genetický analyzátor 3500

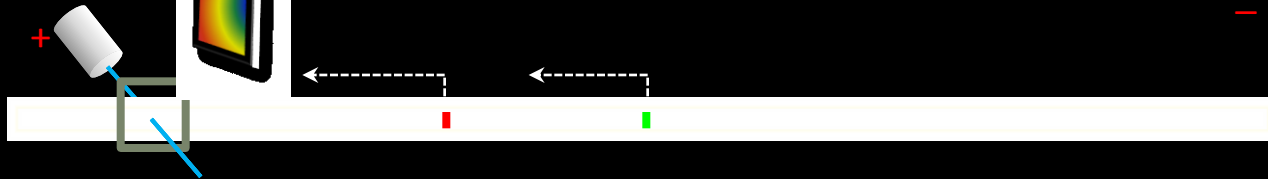


- 8- or 24-Capillary
- 505 nm Solid State Laser
- Polymer Pump
- Performance Optimized Polymer (POP) Pouch
- Anode Buffer Container (ABC)
- 96- and 384-Well Plates (8 tube strips also available)
- Cathode Buffer Container (CBC)





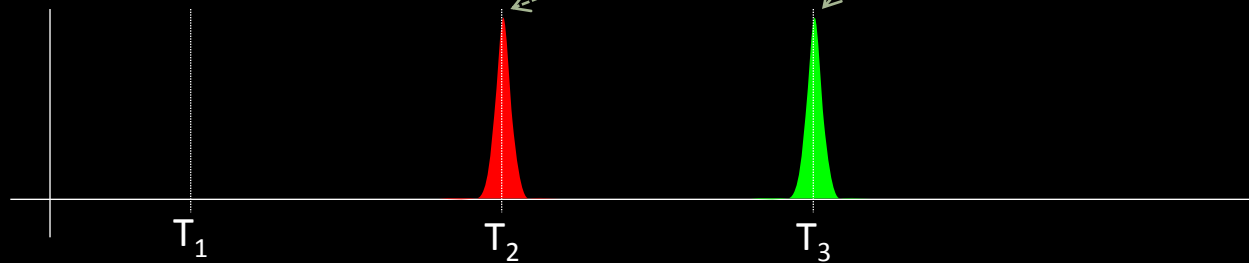
čas  $T_1$  Vzorek s fluorescenčně značenými DNA fragmenty různé délky putuje skleněnou kapilárou naplněnou polymerem



čas  $T_2$  Při průchodu fragmentu detekčním okénkem vyvolá laser silnou fluorescenci, která je zaznamenána CCD detektorem



čas  $T_3$  V časovém záznamu elektroforézy – elektroforetogramu – se zvýšení fluorescence projeví jako tzv. pík

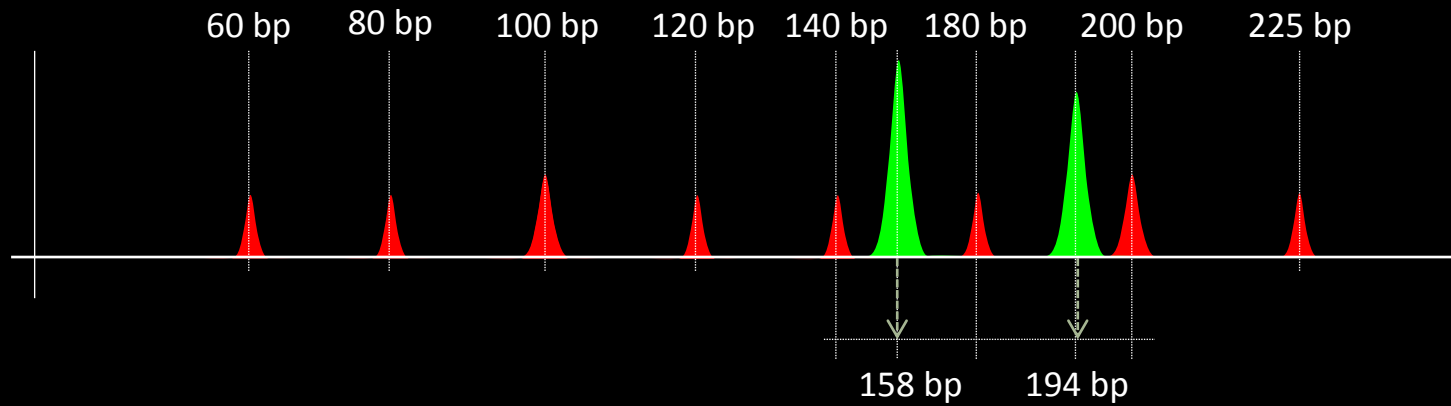




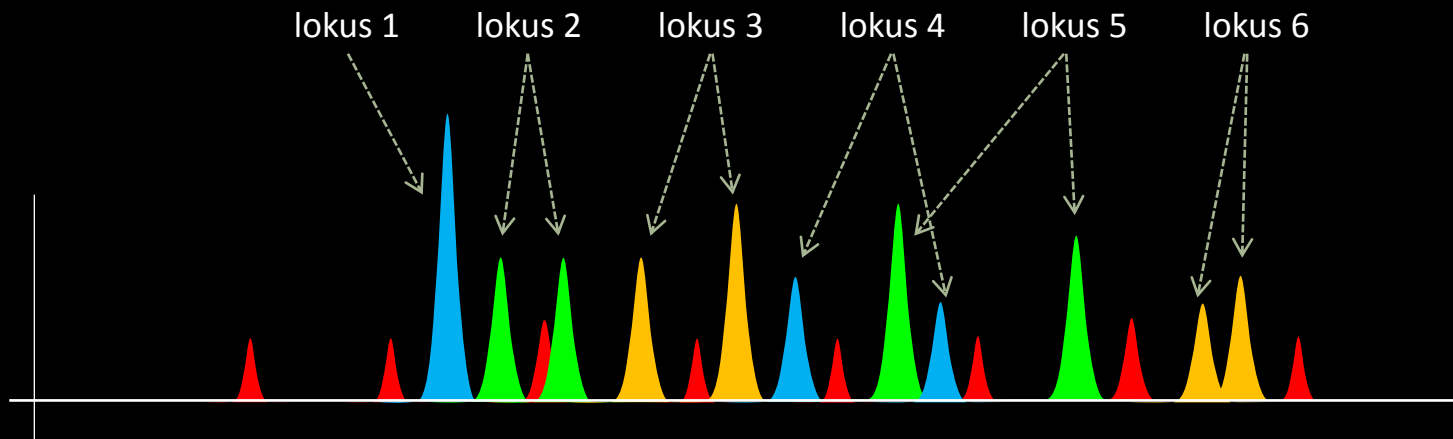
# Postup přípravy vzorků

- **PCR amplifikace** – multilokusová; několik párů primerů (jeden primer z každého páru označen fluorescenční barvičkou) + pár primerů pro PCR specifického úseku v genu pro amelogenin (určení pohlaví)
- **Kapilární elektroforéza** – PCR produkt spolu s vnitřním standardem napipetujeme do zkumavky s formamidem (silně denaturující účinek), resp. HiDi formamid+vnitřní standard a pak přidám vzorek

## Monoplex – analýza jediného STR lokusu



## Multiplex – analýza několika STR lokusů



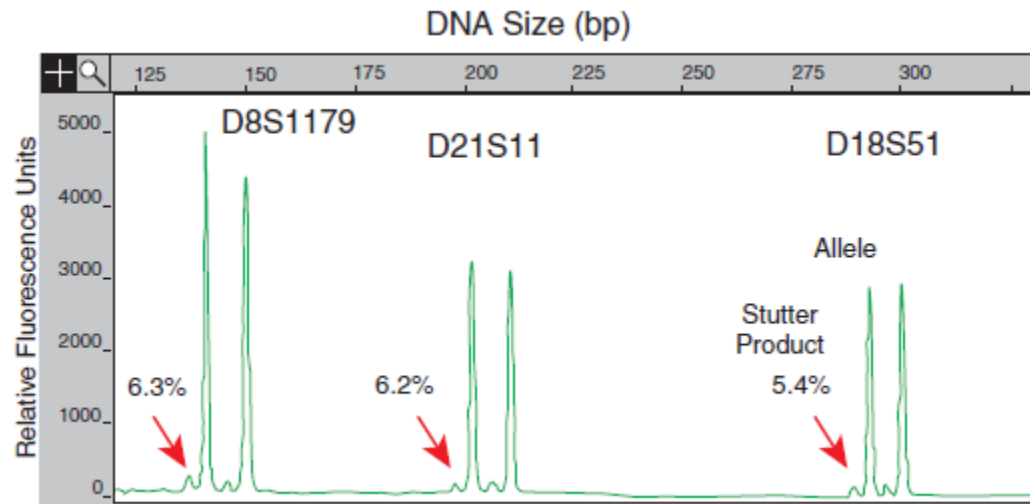
# Délka fragmentu x struktura

- délkový polymorfismus – nerozpoznám bodové mutace
  - příklad: AAGT AAGT AAGT AAGT AAGT AAGT AAGT  
AATT AAGT AAGT AAGT AAGT AAGT
- Delece
  - příklad: THo1 9.3 – TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT  
TCAT TCAT TCAT TCAT TCA
  - TCAT TCAT TCAT TCA TCAT TCAT TCAT TCAT  
TCAT TCAT
  - důležitý je počet písmenek dělitelný 4-mi

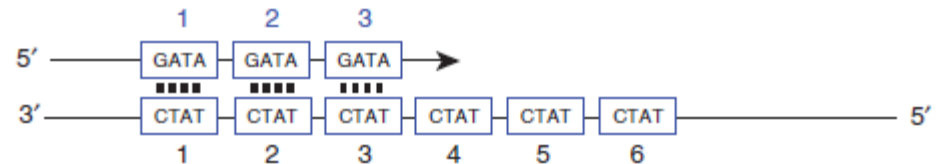


# Stutter

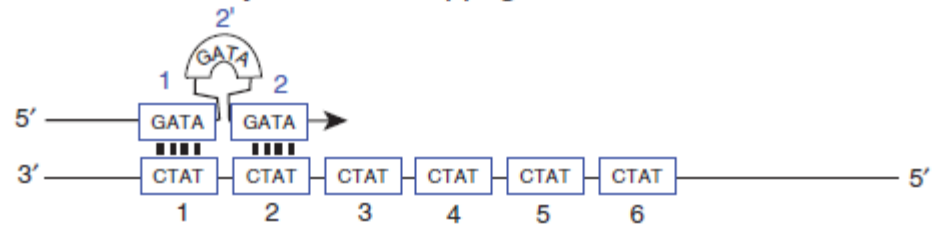
- malý peak před „reálnou“ alelou
- o právě jedno opakování kratší (min. výška u Pent D a E – výhoda u směsí)
- dobře hodnotitelný u jednoduchých profilů DNA
- u směšného profilu se nutně nemusí jednat o stutter, ale o alelu minoritního zůstavitele



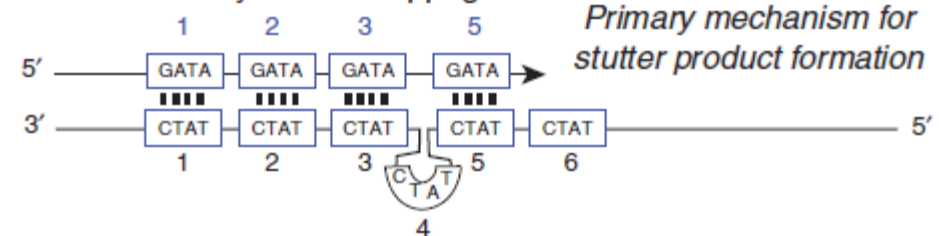
(a) Normal replication



(b) Insertion caused by backward slippage

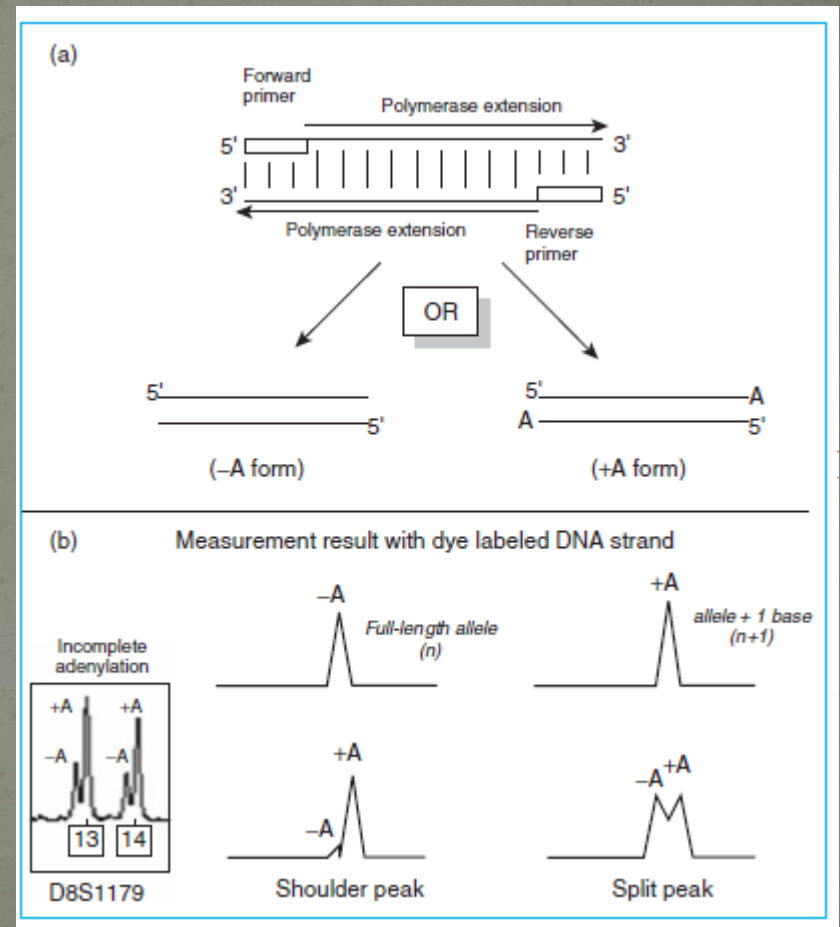


(c) Deletion caused by forward slippage



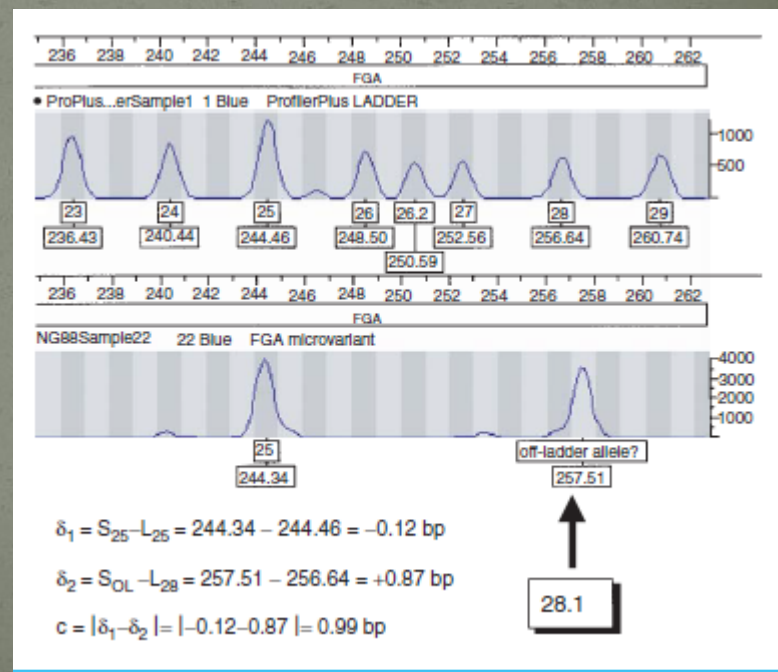
# Non-templátova adice

- Adenylace - '+A' forma amplikonu
- *Taq* polymerase, používaná na PCR, přidává na 3' konec produkt kopírující templátové vlákno
- většinou právě adenosin
- výsledkem je vlákno o jeden nukleotid delší
- řešením je přidat další krok o teplotě 60°C nebo 72°C po ukončení cyklů



# Mikrovarianty a off-ladder alely

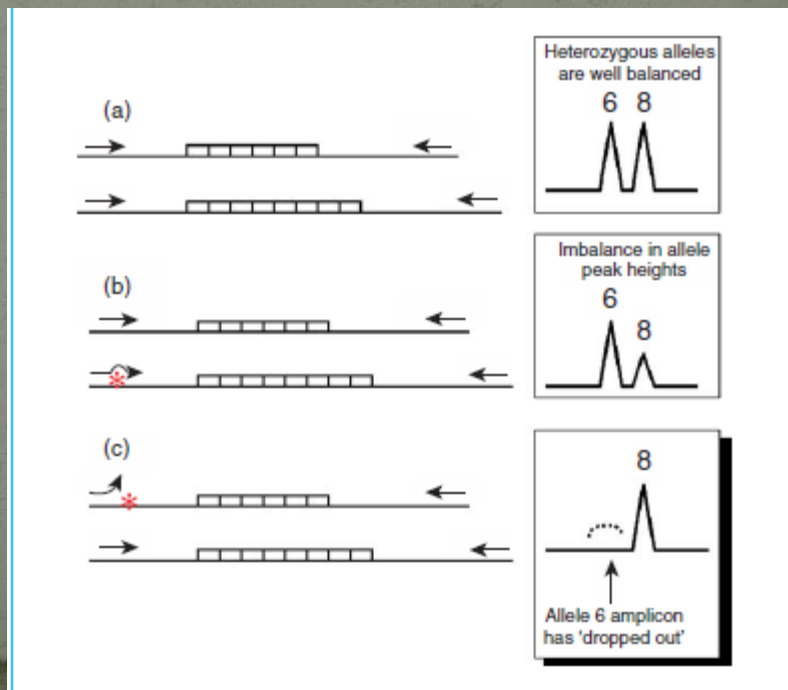
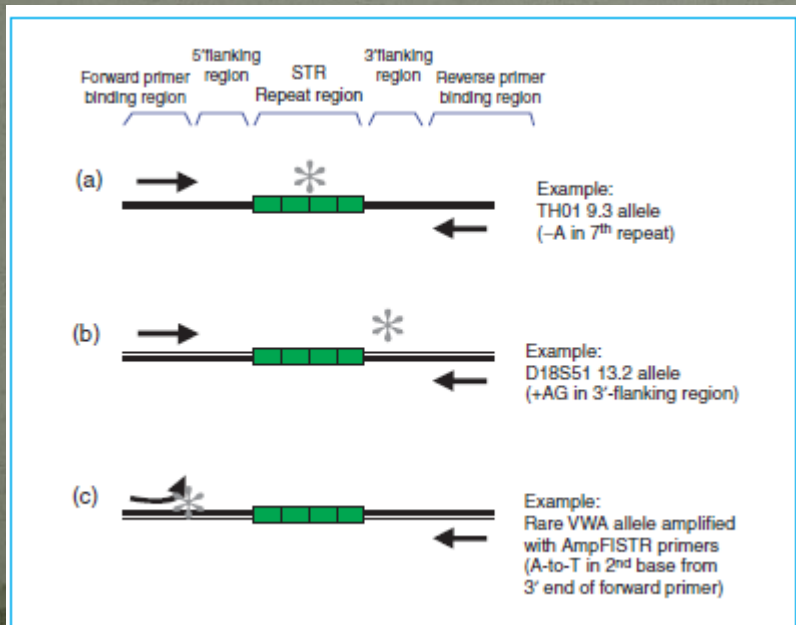
- jedna alela je v daném binu a druhá se vymyká
- pokud již byla pozorována, výrobce kitu jí zařadí do „ladderu“ a systém ji označí velikostí (číslem)
- úplná novinka je mimo biny a systém ji označí jako off-ladder a je potřeba dopočítat velikost a v každém případě pro jistotu zopakovat od kroku amplifikace





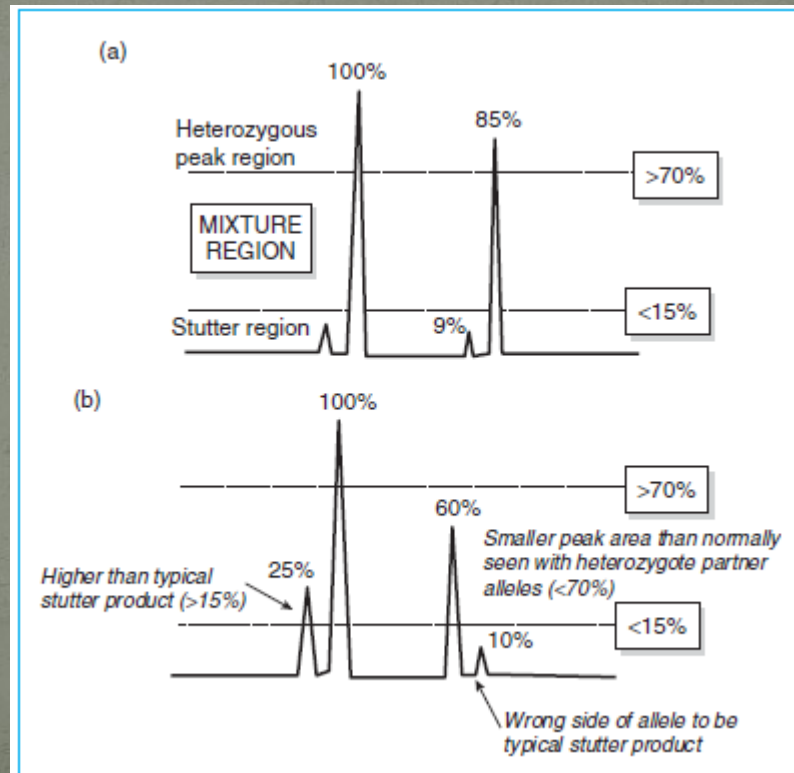
# Alelický drop out a nulové alely

- Alela se nezobrazí, protože:
  - zájmová oblast je poškozená (není zde repetice)
  - poškození v prostoru před zájmovou oblastí
  - místo nasedání primeru je poškozené (mutované, degradace)



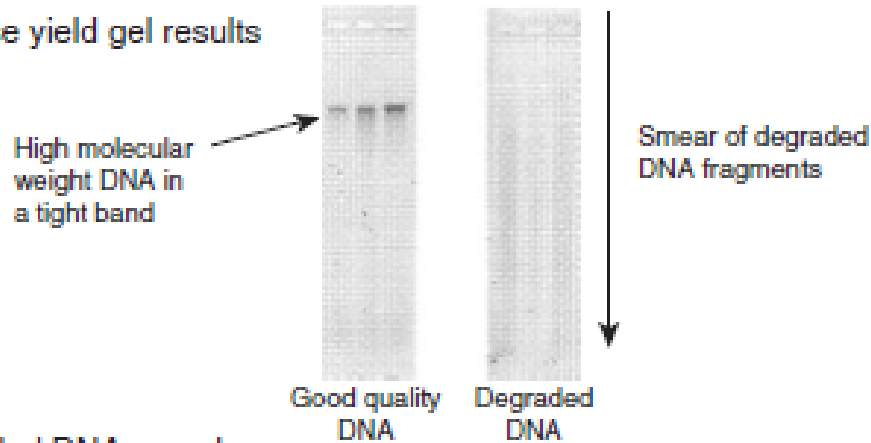
# Směs více vzorků

- v lokusu se objevuje více jak dva píky
- v lokusu jsou píky různé výšky se zjevnou imbalancecí mezi jednotlivými píky
- jedná se o stutter více jak 15% (až 25 %) výšky vedlejšího píku

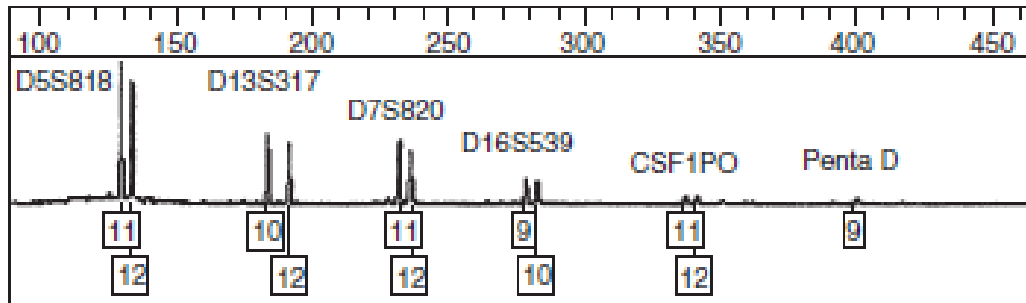


# Degradovaná DNA

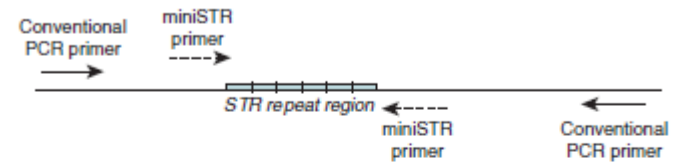
(a) Agarose yield gel results



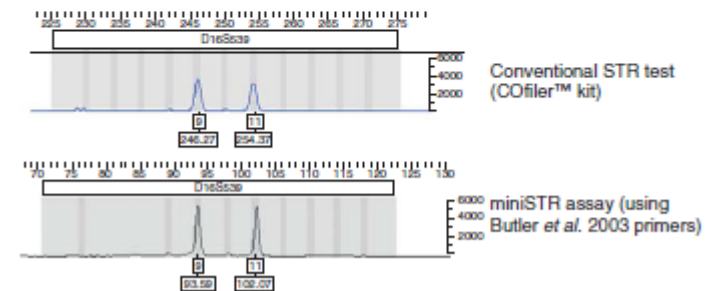
(b) Degraded DNA sample



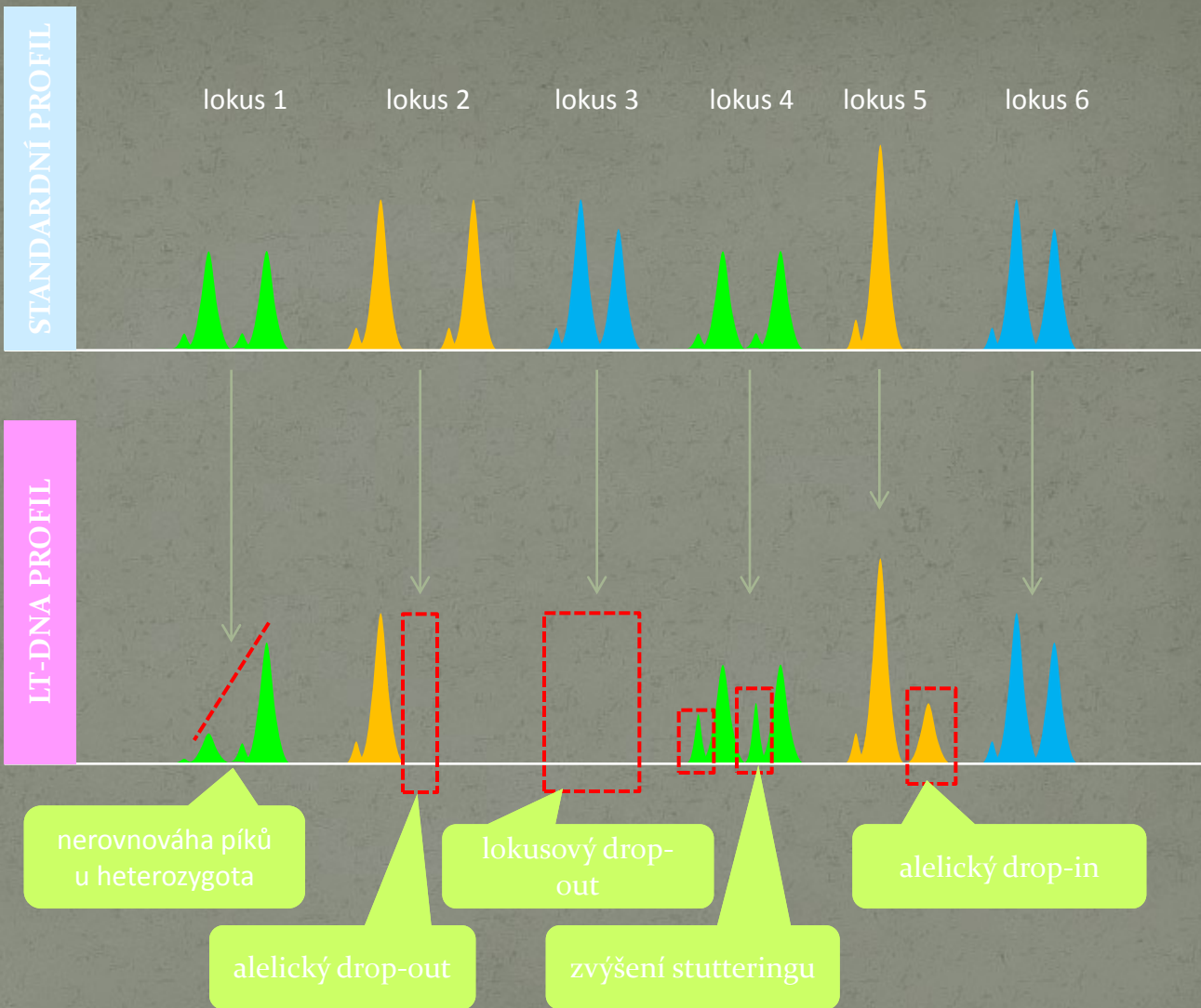
(a)



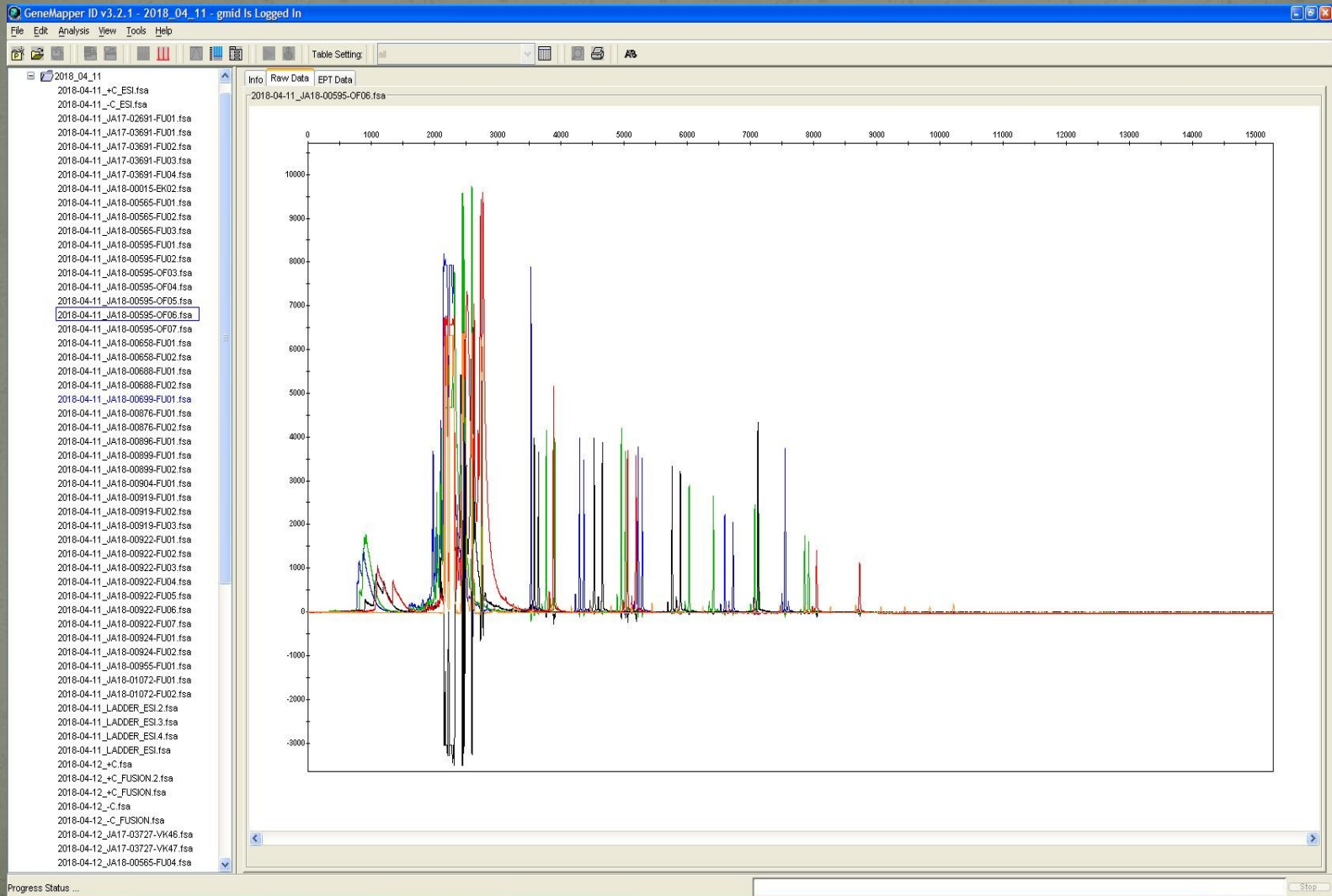
(b)



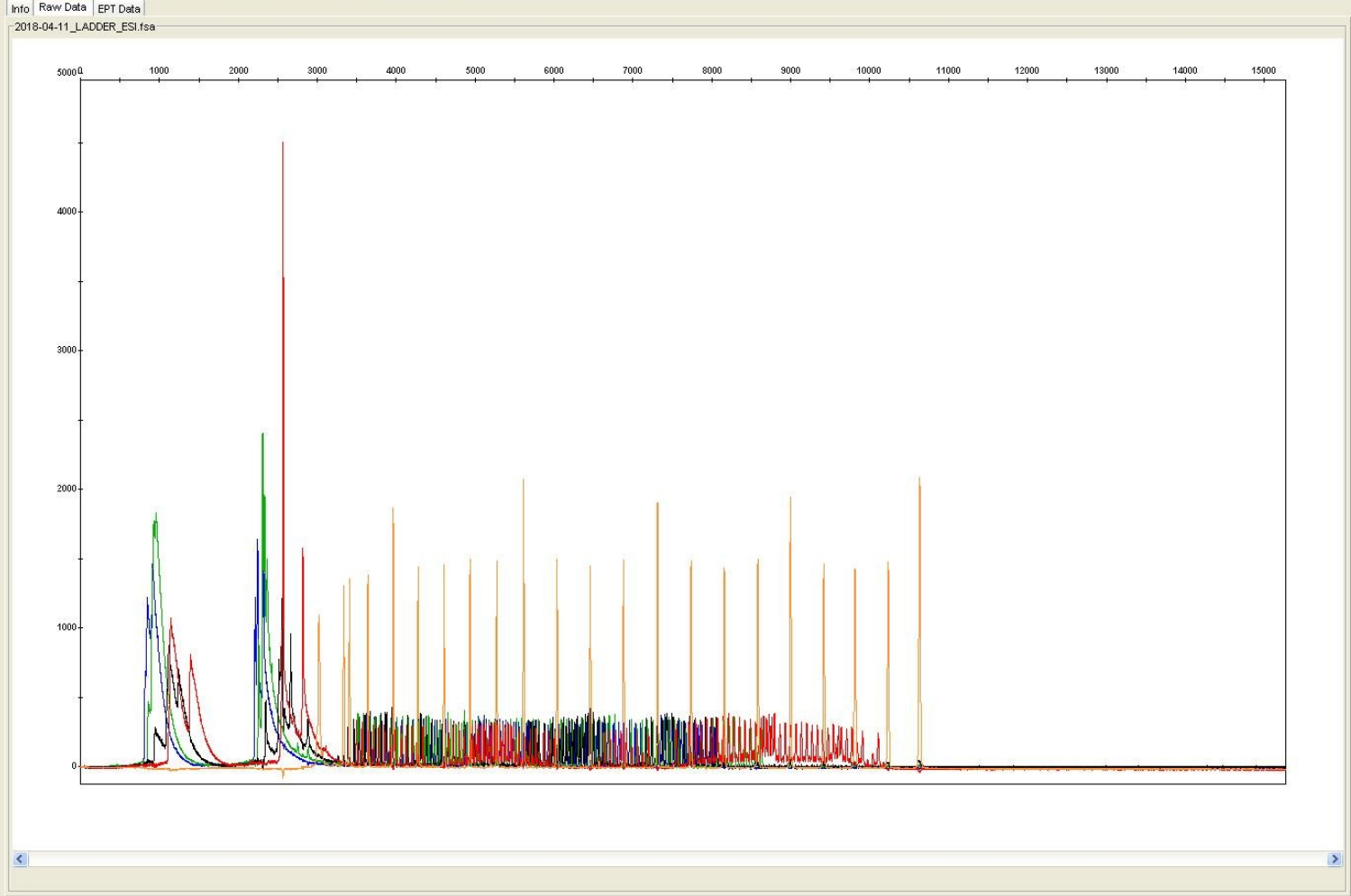




# Raw data



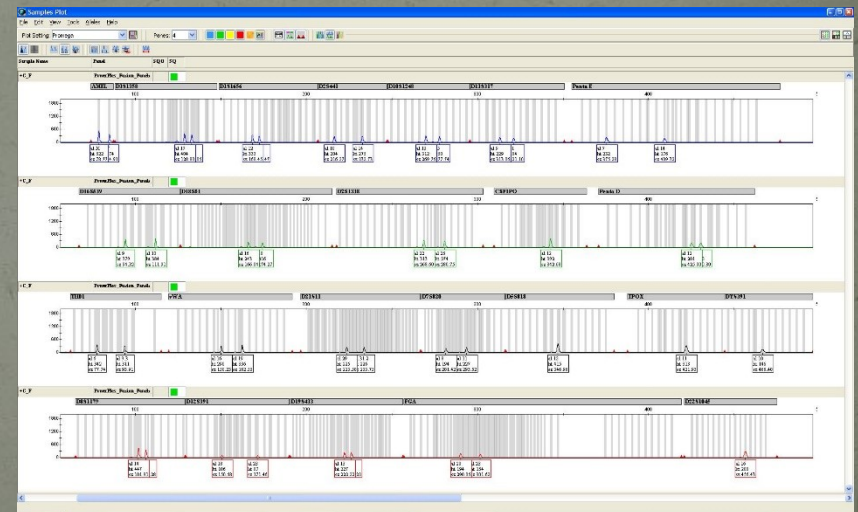
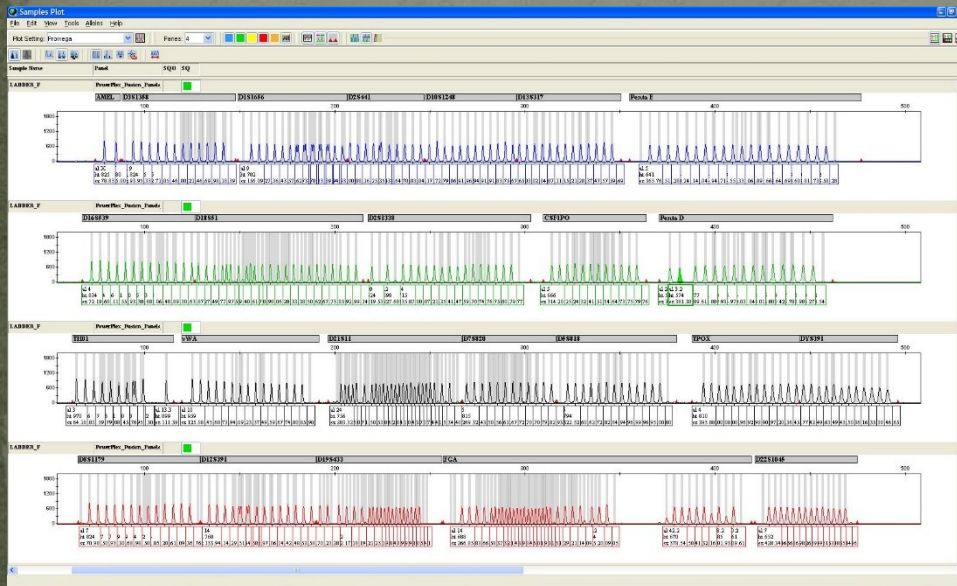
- 2018\_04\_11
- 2018-04-11\_+C\_ESI.fsa
- 2018-04-11\_-C\_ESI.fsa
- 2018-04-11\_JA17-02691-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA17-03691-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA17-03691-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA17-03691-FU03.fsa
- 2018-04-11\_JA17-03691-FU04.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00015-EK02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00565-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00565-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00565-FU03.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00595-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00595-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00595-OF03.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00595-OF04.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00595-OF05.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00595-OF06.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00595-OF07.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00658-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00658-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00688-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00688-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00699-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00876-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00876-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00896-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00899-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00899-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00904-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00919-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00919-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00919-FU03.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00922-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00922-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00922-FU03.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00922-FU04.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00922-FU05.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00922-FU06.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00922-FU07.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00924-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00924-FU02.fsa
- 2018-04-11\_JA18-00955-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-01072-FU01.fsa
- 2018-04-11\_JA18-01072-FU02.fsa
- 2018-04-11\_LADDER\_ESI.2.fsa
- 2018-04-11\_LADDER\_ESI.3.fsa
- 2018-04-11\_LADDER\_ESI.4.fsa
- 2018-04-11\_LADDER\_ESI.fsa
- 2018-04-12\_+C.fsa
- 2018-04-12\_+C\_FUSION.2.fsa
- 2018-04-12\_+C\_FUSION.fsa
- 2018-04-12\_-C.fsa
- 2018-04-12\_-C\_FUSION.fsa
- 2018-04-12\_JA17-03727-VK46.fsa
- 2018-04-12\_JA17-03727-VK47.fsa
- 2018-04-12\_JA18-00565-FU04.fsa



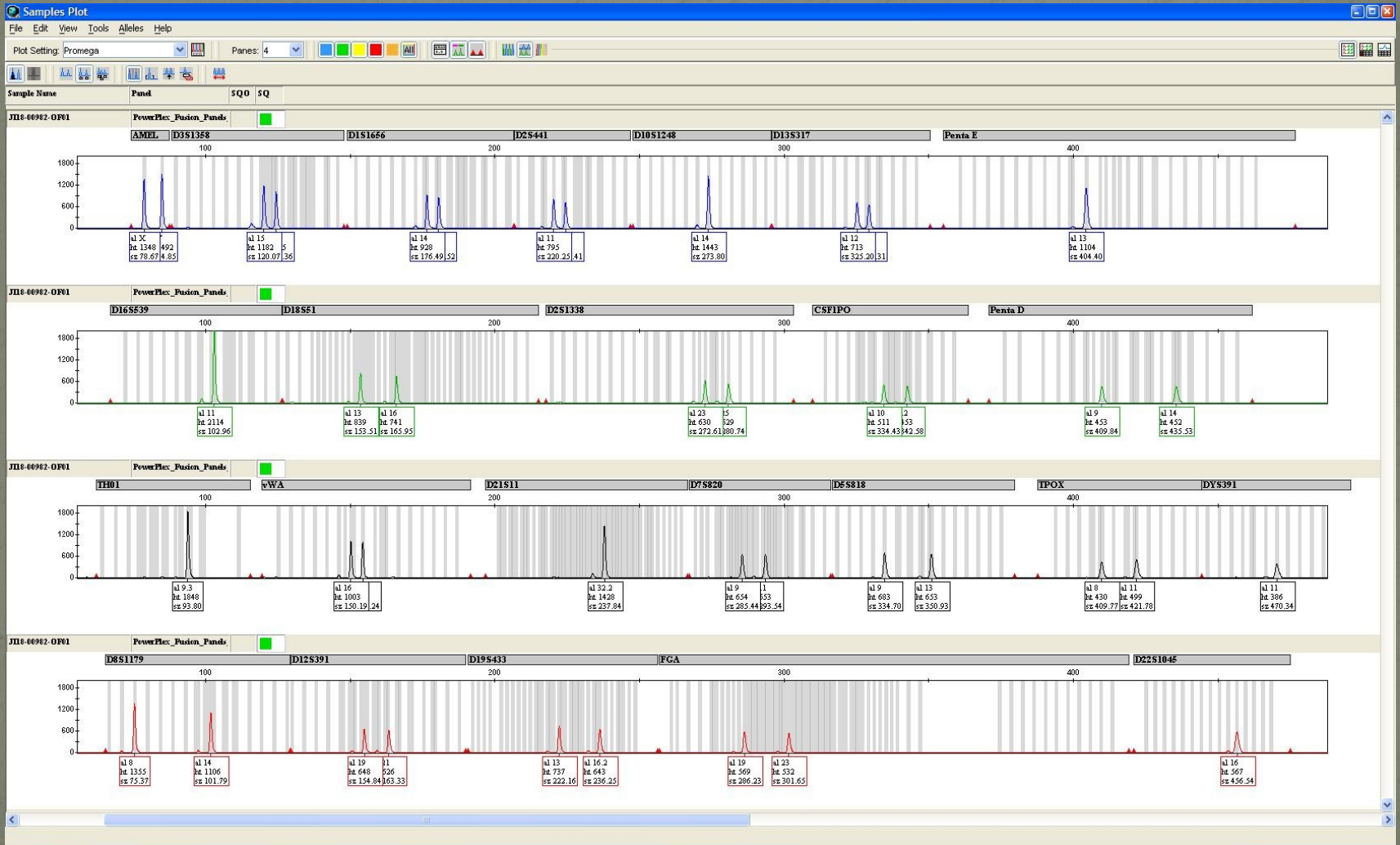


# K hodnocení:

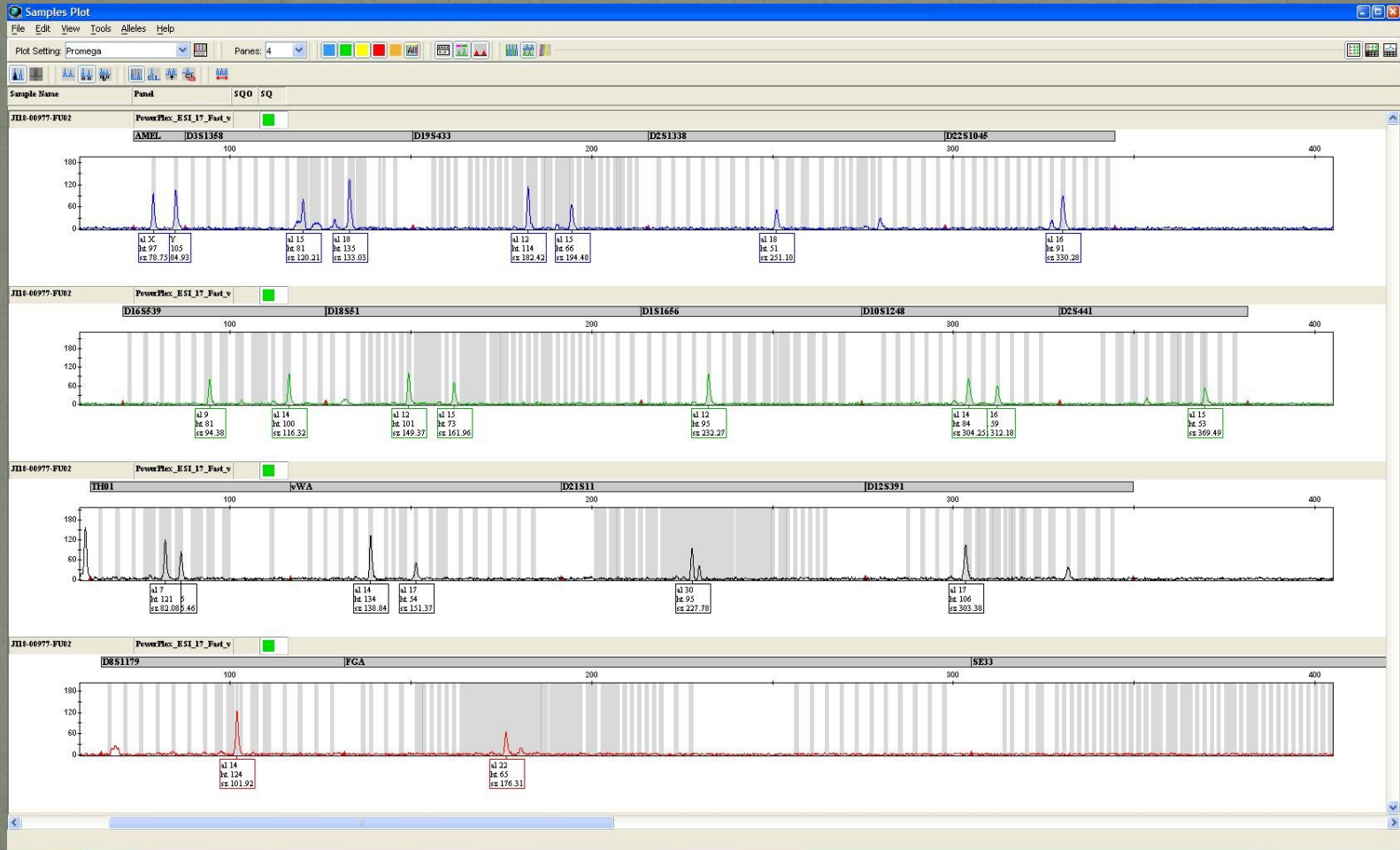
- velikostní standard (Sice standard)
- žebříček (Ladder)
- pozitivní kontrolu



# Bukální stěr



# Stopa 1 osoba





# Směs 2 osob

