

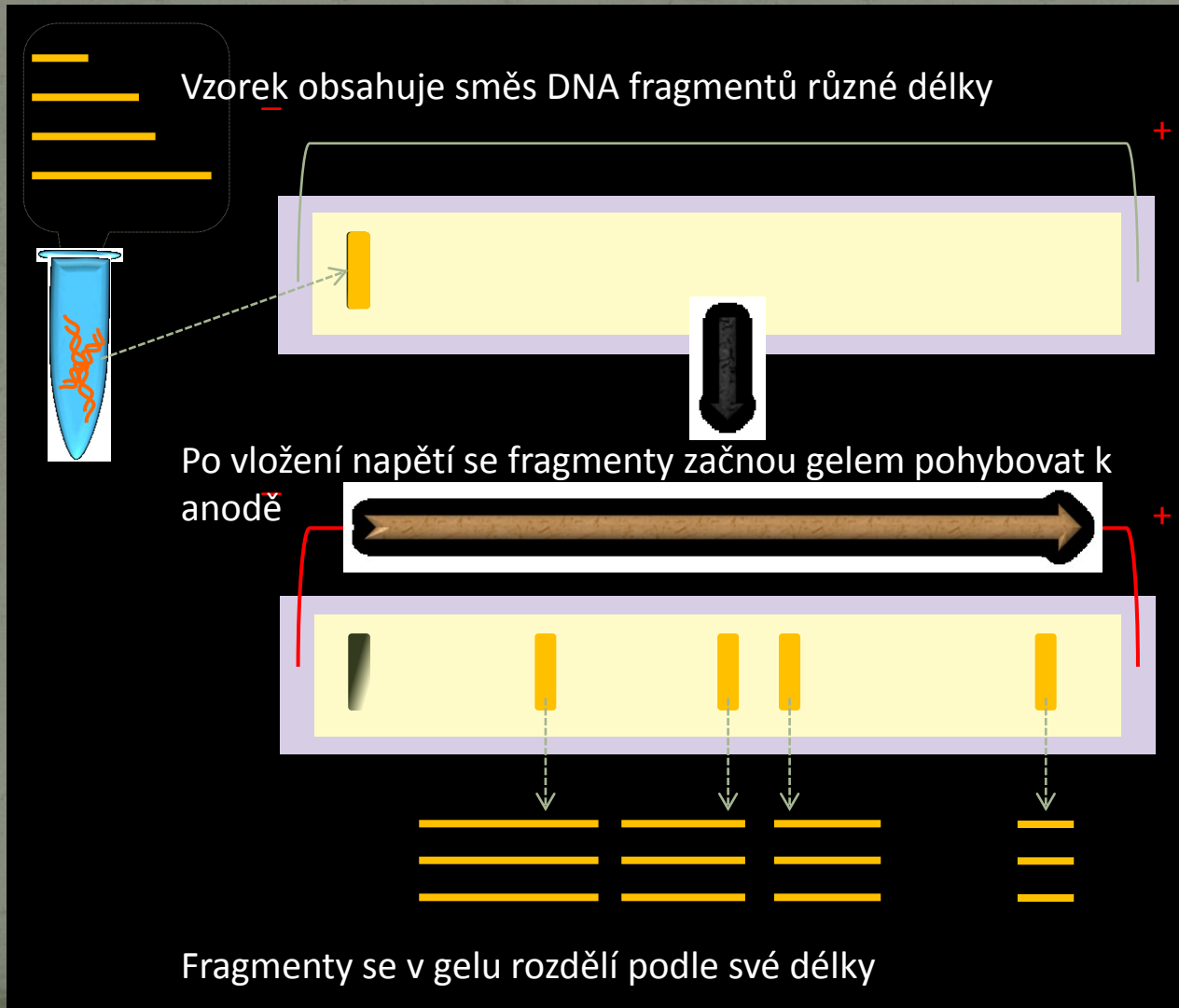
Fragmetnační analýza a profil DNA

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



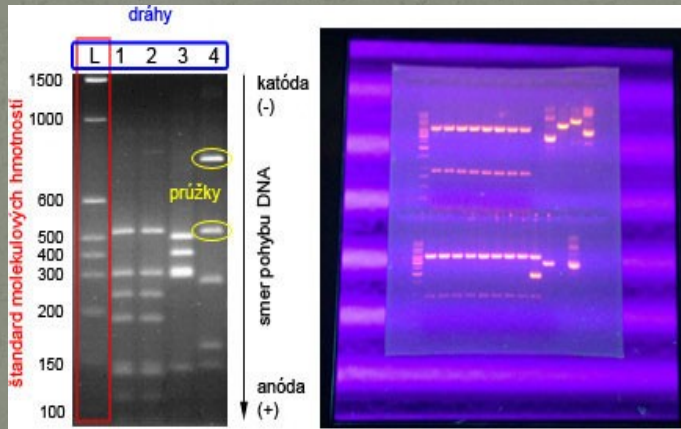
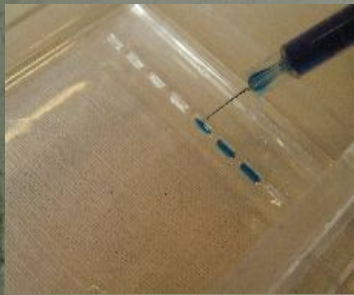
Vzorek DNA nanesen do malé jamky v gelovém plátu (vodorovný nebo svislý) ponořeném v pufro mezi elektrodami.

Agarózový gel (AGE)

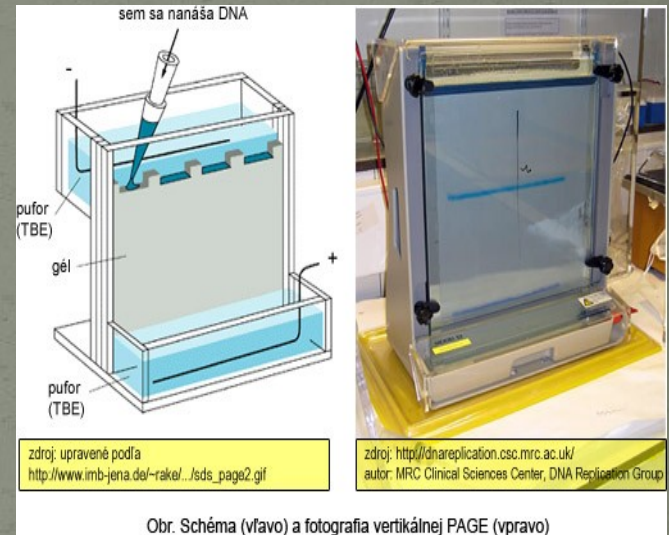
Polyakrylamidový gel (PAGE)

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/~rakeh/.../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).

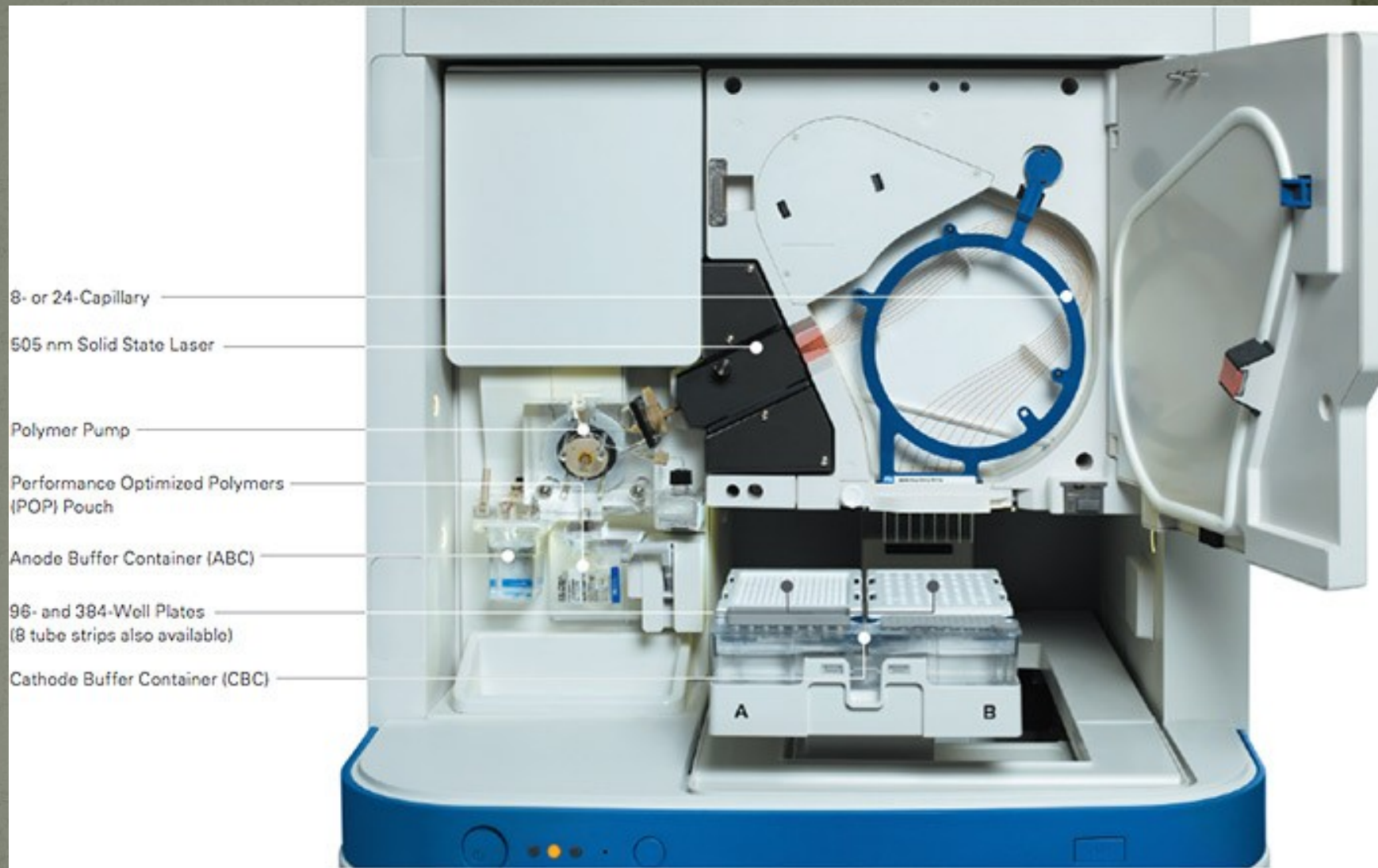
Genetický analyzátor 3130



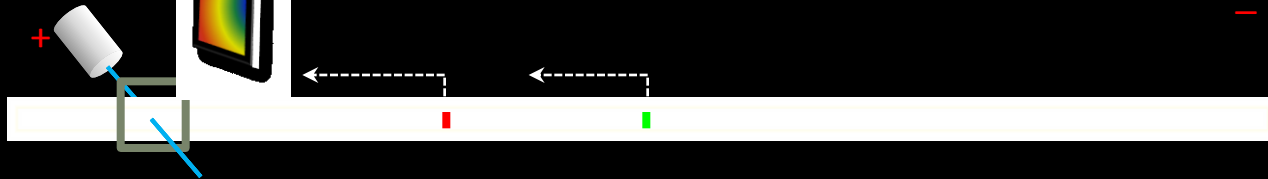


Genetický analyzátor 3500





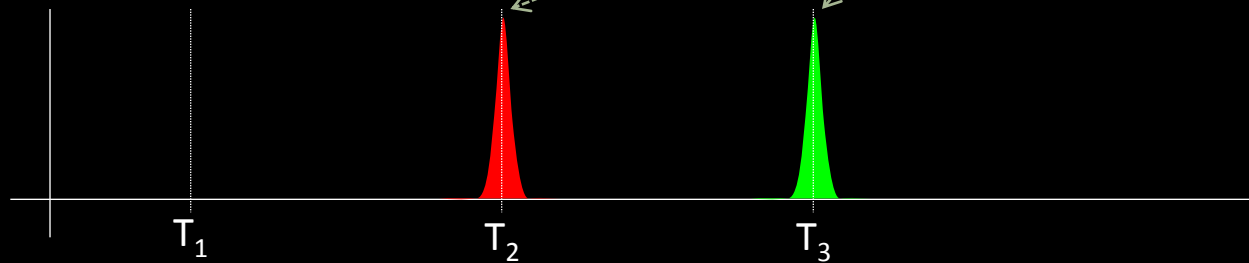
čas T_1 Vzorek s fluorescenčně značenými DNA fragmenty různé délky putuje skleněnou kapilárou naplněnou polymerem



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



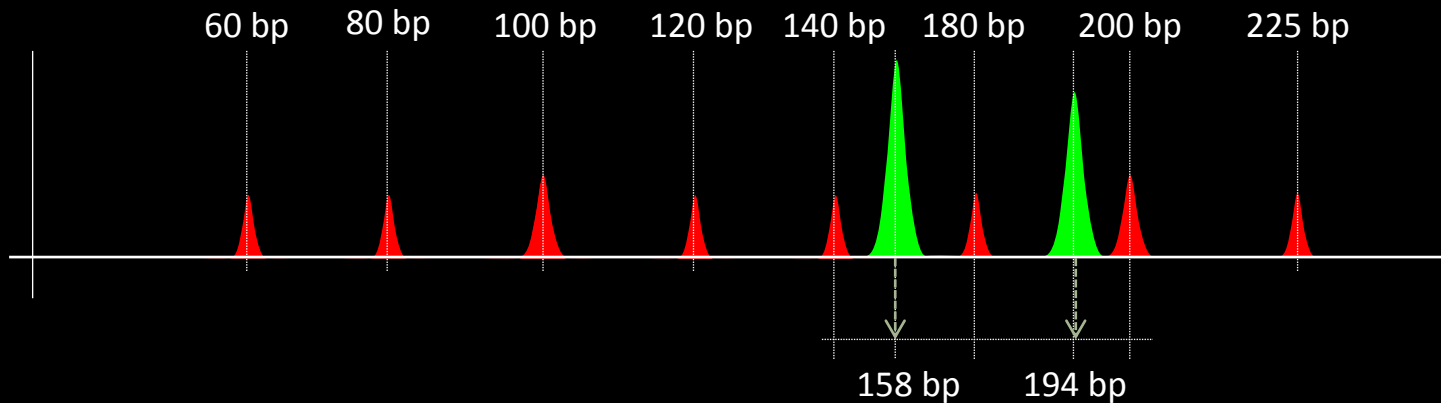
čas T_3 V časovém záznamu elektroforézy – elektroforetogramu – se zvýšení fluorescence projevívá jako tzv. pík



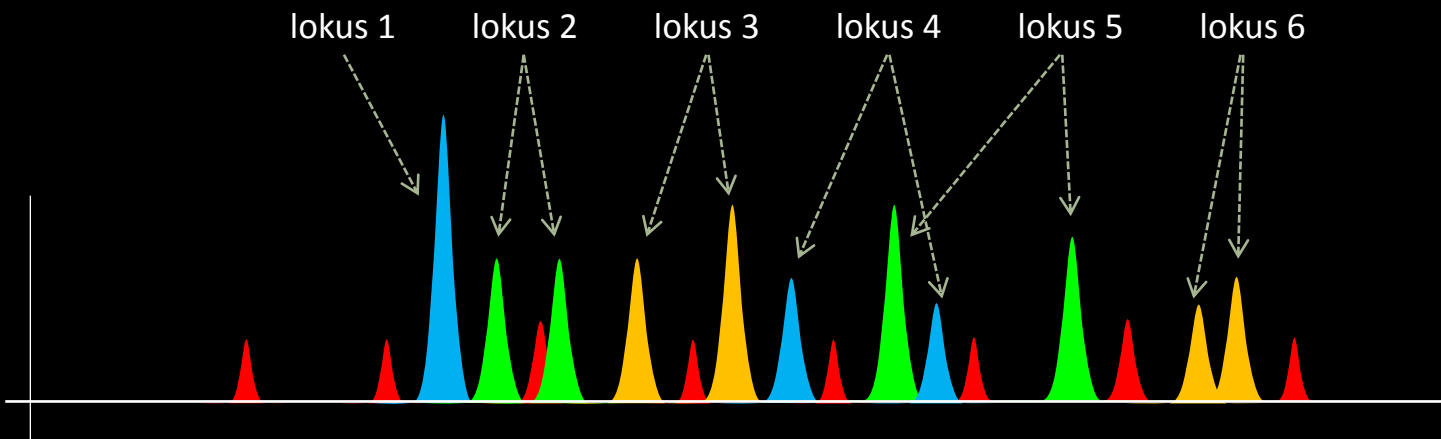
Postup přípravy vzorků

- **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

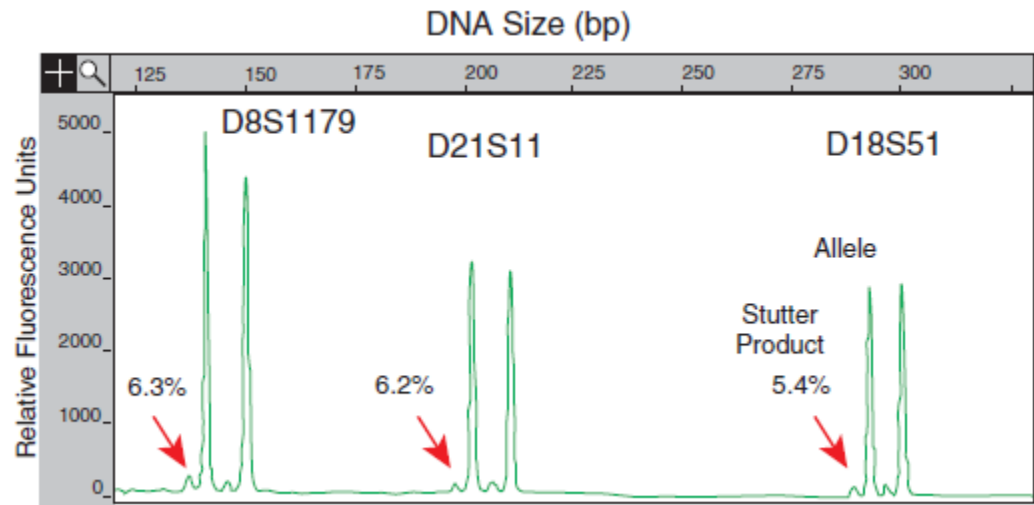


Délka fragmentu x struktura

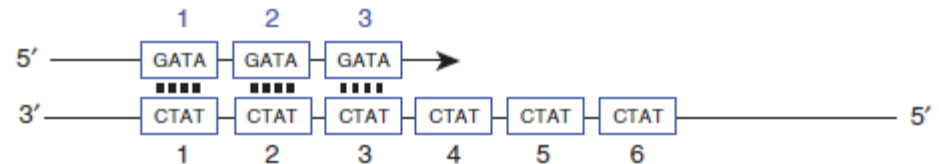
- délkový polymorfismus – nerozpoznám bodové mutace
 - příklad: AAGT AAGT AAGT AAGT AAGT AAGT AAGT
AATT AAGT AAGT AAGT AAGT AAGT
- Delece
 - příklad: TH01 9.3 – TCAT TCAT TCAT TCAT TCAT
TCAT TCAT TCAT TCAT TCA
 - TCAT TCAT TCAT TCA TCAT TCAT TCAT TCAT
TCAT TCAT
 - důležitý je počet písmenek dělitelný 4-mi

Stutter

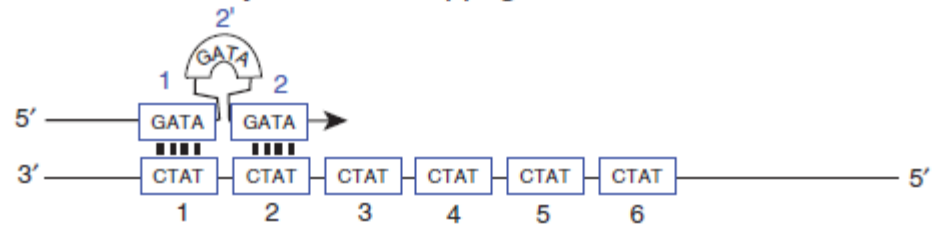
- malý peak před „reálnou“ alelou
- o právě jedno opakování kratší (min. výška u Pent D a E – výhoda u směsí)
- dobře hodnotitelný u jednoduchých profilů DNA
- U směsného profilu se nutně nemusí jednat o stutter, ale o alelu minoritního zůstavitele



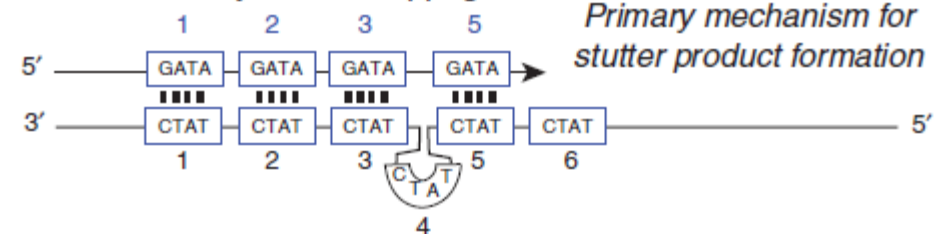
(a) Normal replication



(b) Insertion caused by backward slippage

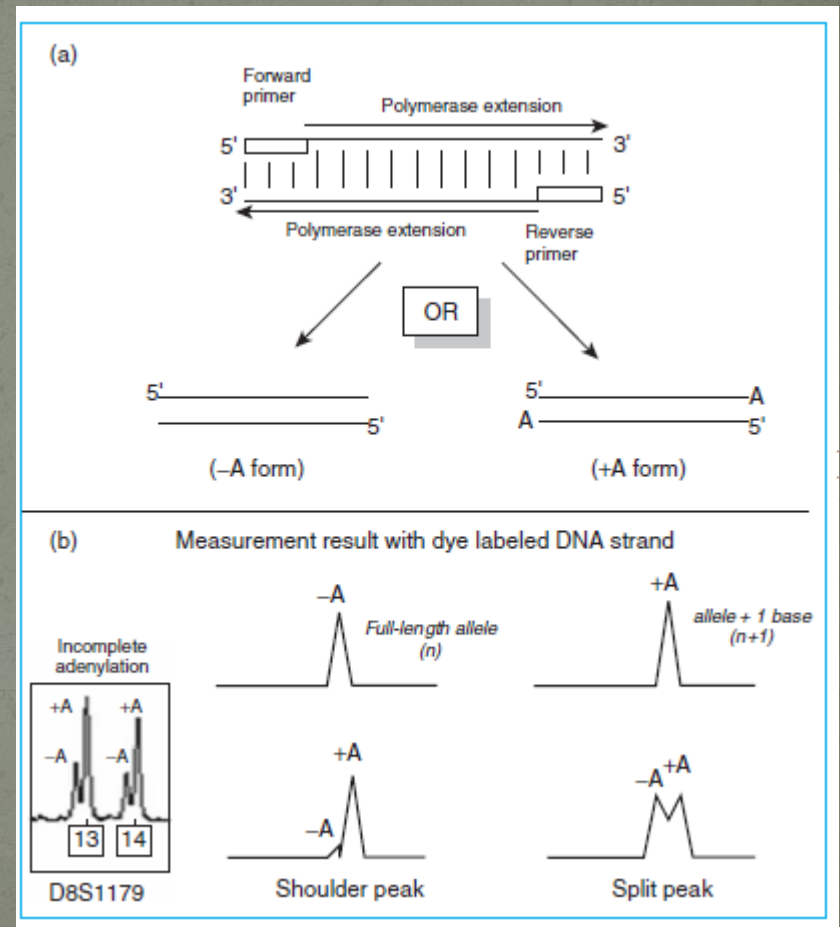


(c) Deletion caused by forward slippage



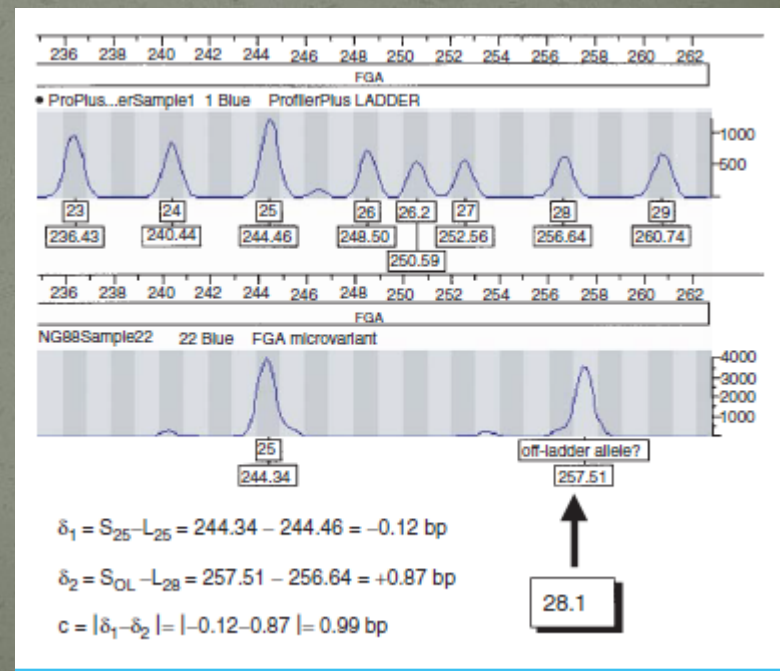
Non-templátova adice

- 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



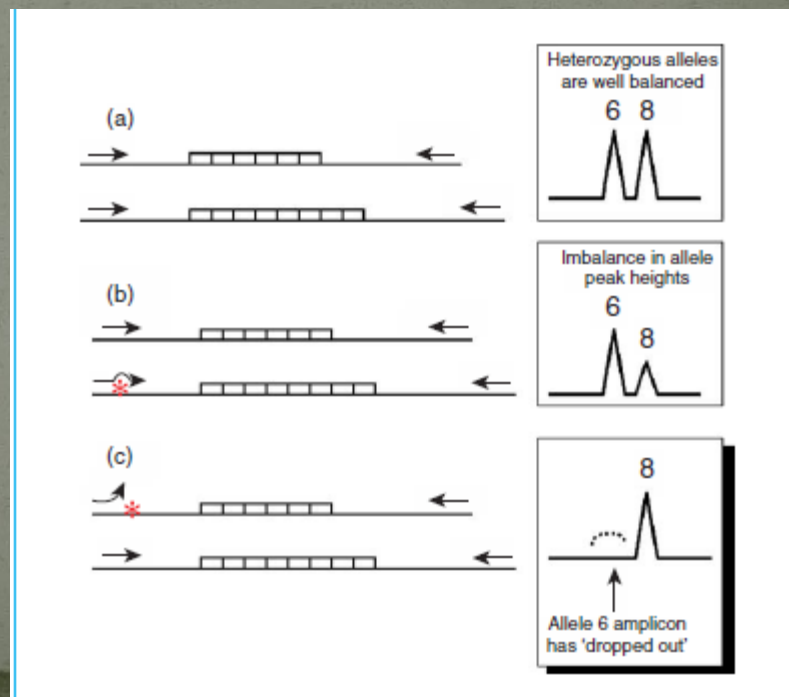
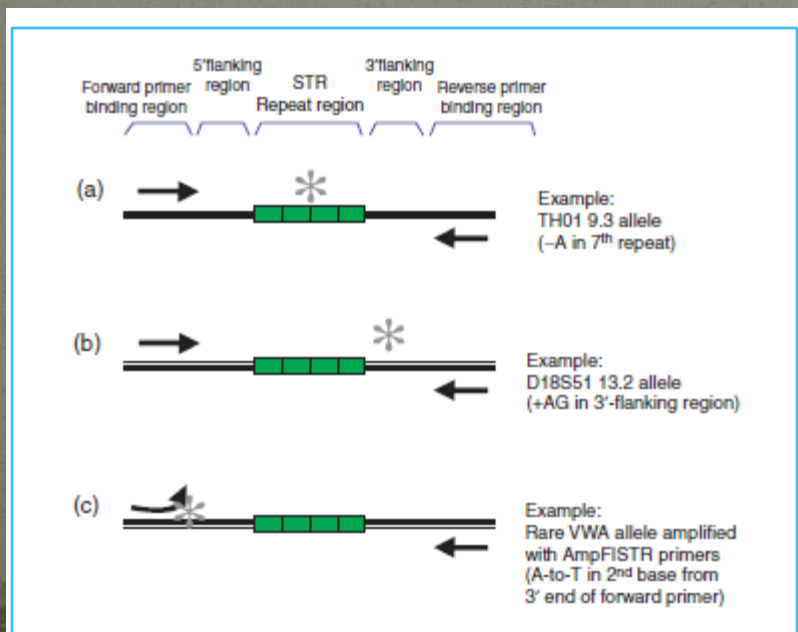
Mikrovarianty a off-ladder alely

- 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



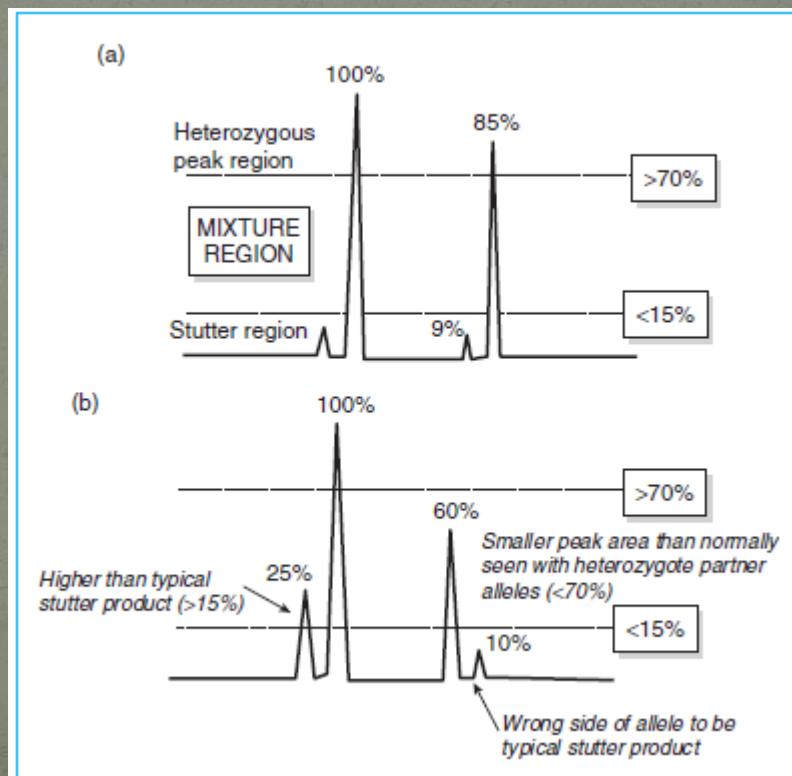
Alelický drop out a nulové alely

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



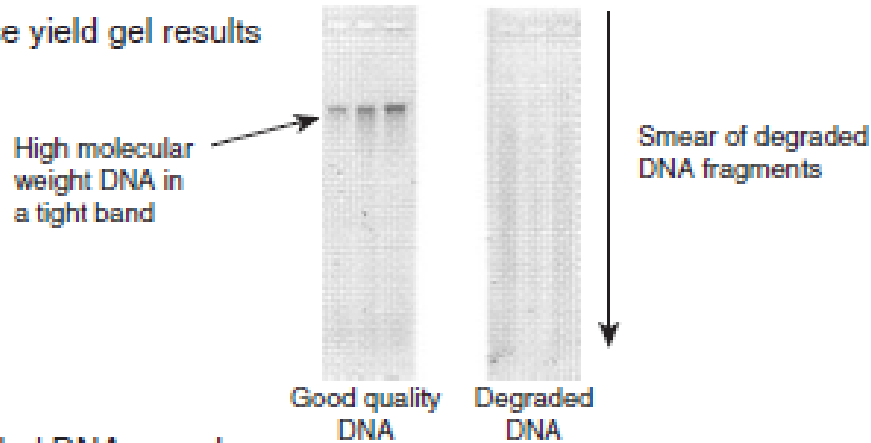
Směs více vzorků

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

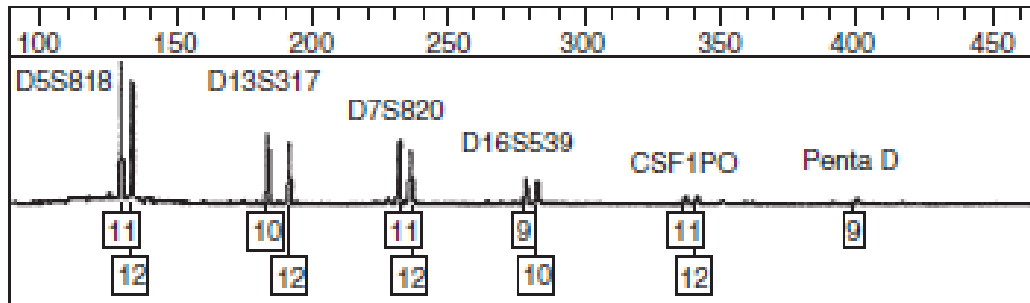


Degradová DNA

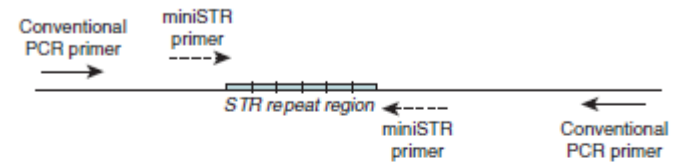
(a) Agarose yield gel results



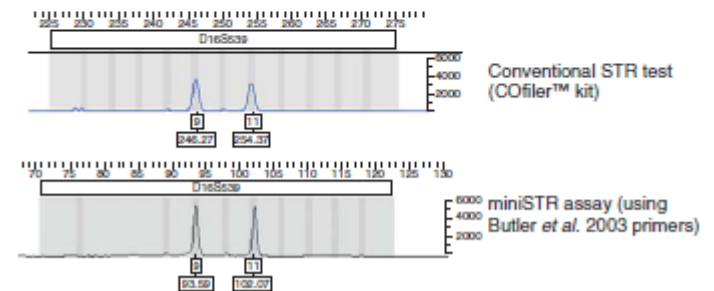
(b) Degraded DNA sample

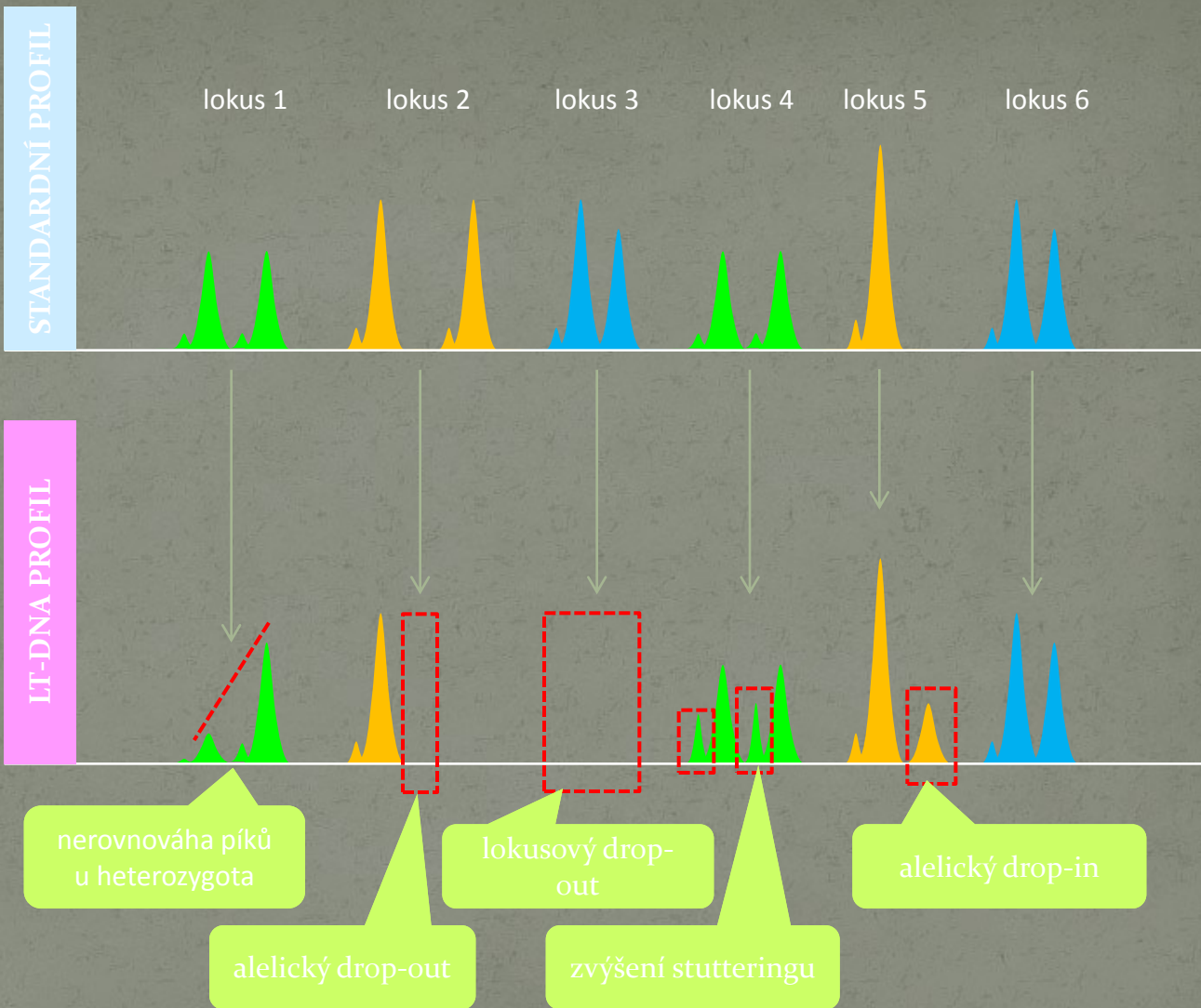


(a)



(b)





nerovnováha píků u heterozygota

alelický drop-out

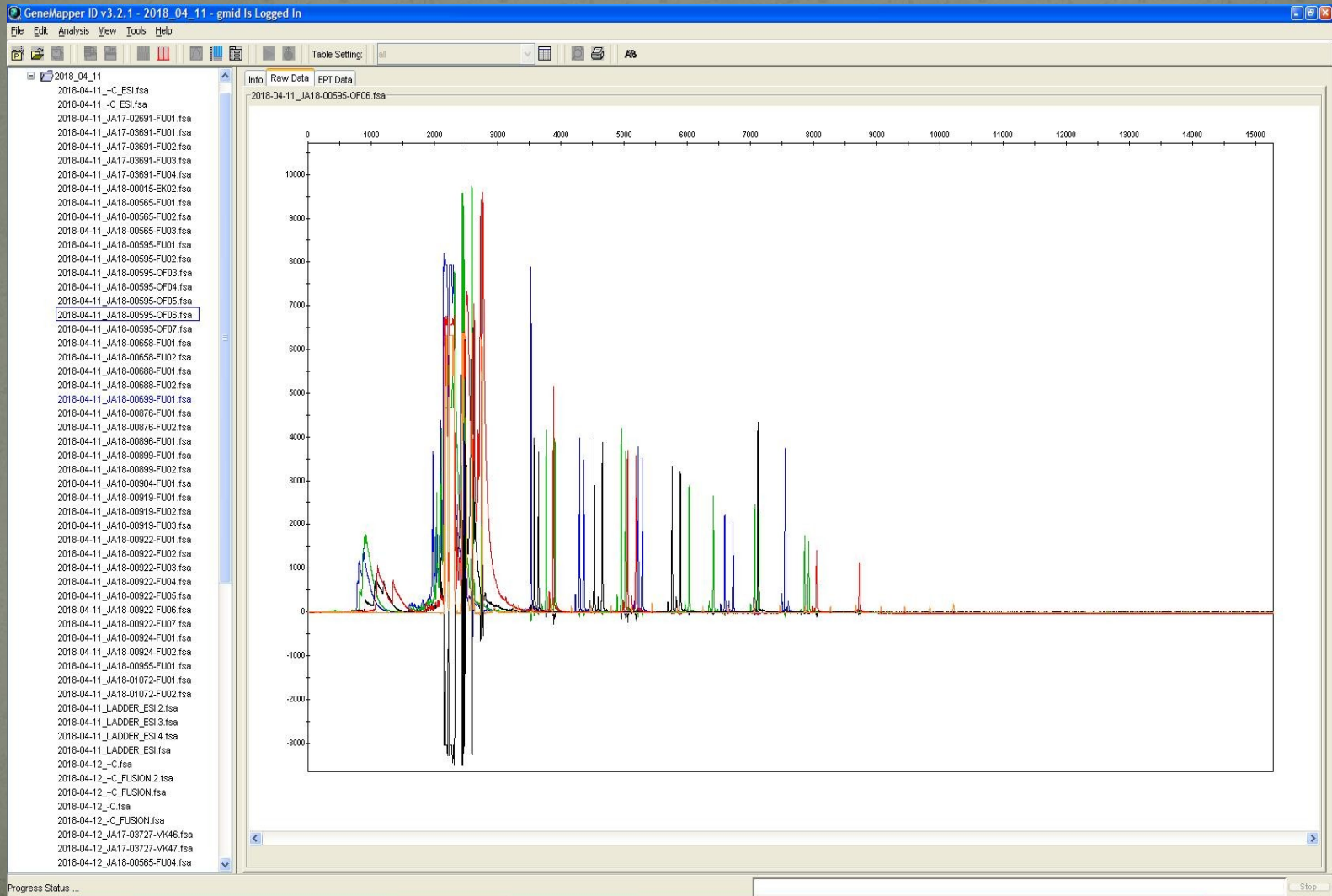
lokusový drop-out

zvýšení stutteringu

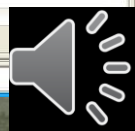
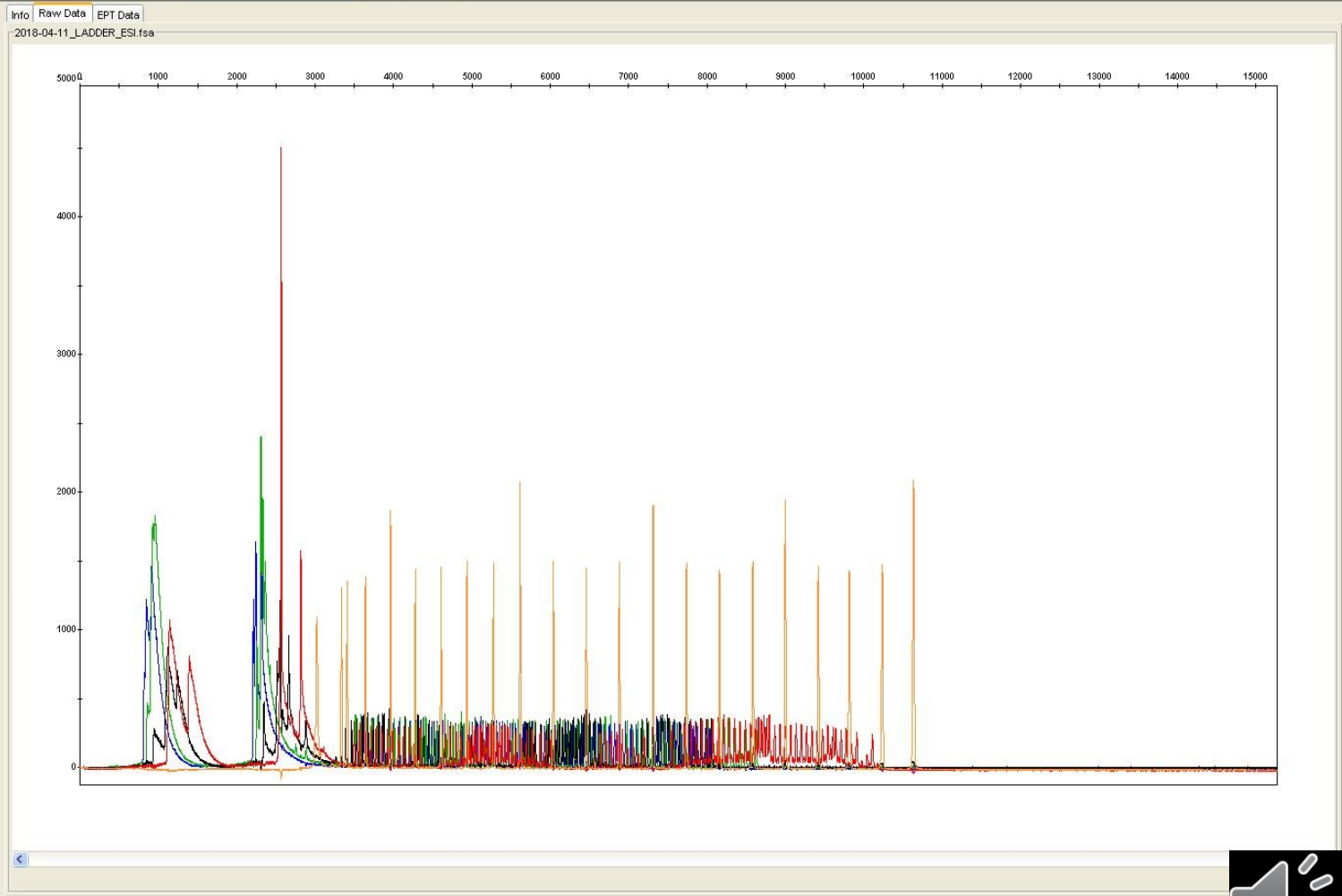
alelický drop-in



Raw data

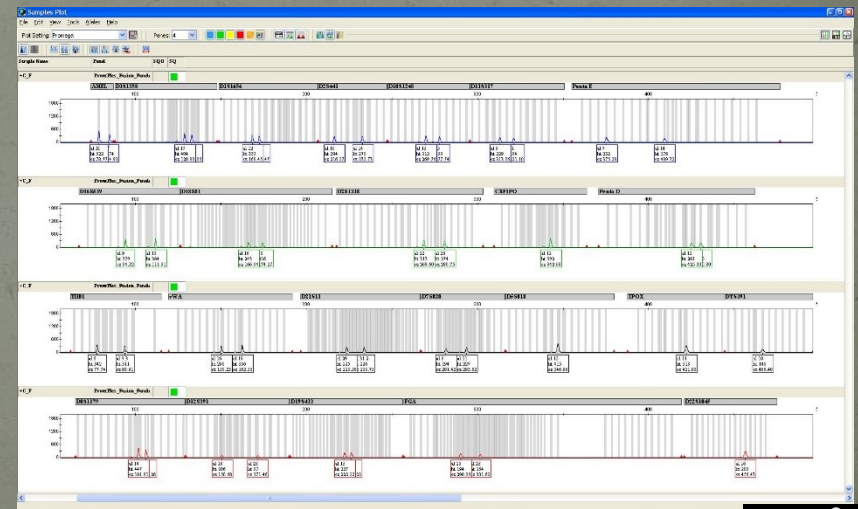
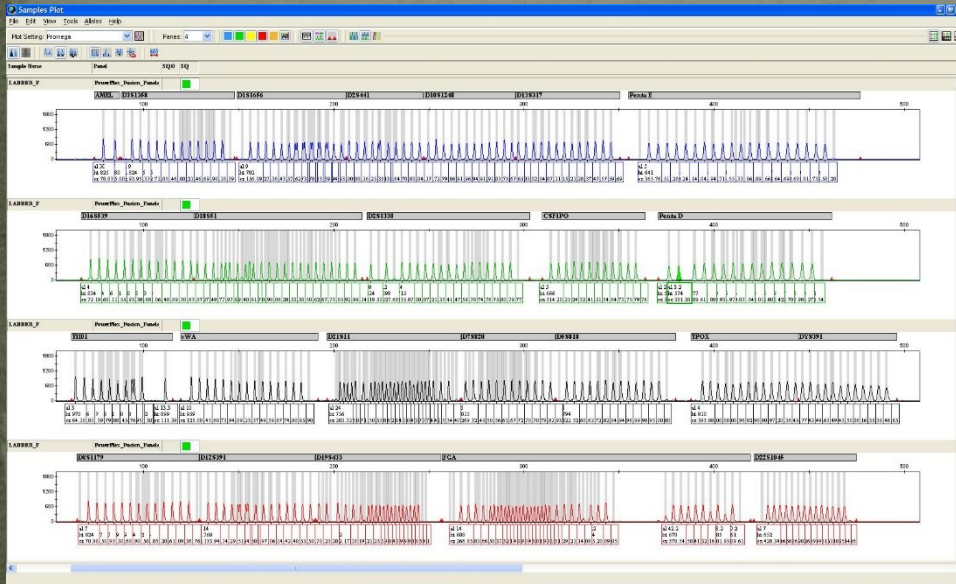


- 2018_04_11
- 2018-04-11_+C_ESI.fsa
- 2018-04-11_-C_ESI.fsa
- 2018-04-11_JA17-02691-FU01.fsa
- 2018-04-11_JA17-03691-FU01.fsa
- 2018-04-11_JA17-03691-FU02.fsa
- 2018-04-11_JA17-03691-FU03.fsa
- 2018-04-11_JA17-03691-FU04.fsa
- 2018-04-11_JA18-00015-EK02.fsa
- 2018-04-11_JA18-00565-FU01.fsa
- 2018-04-11_JA18-00565-FU02.fsa
- 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:

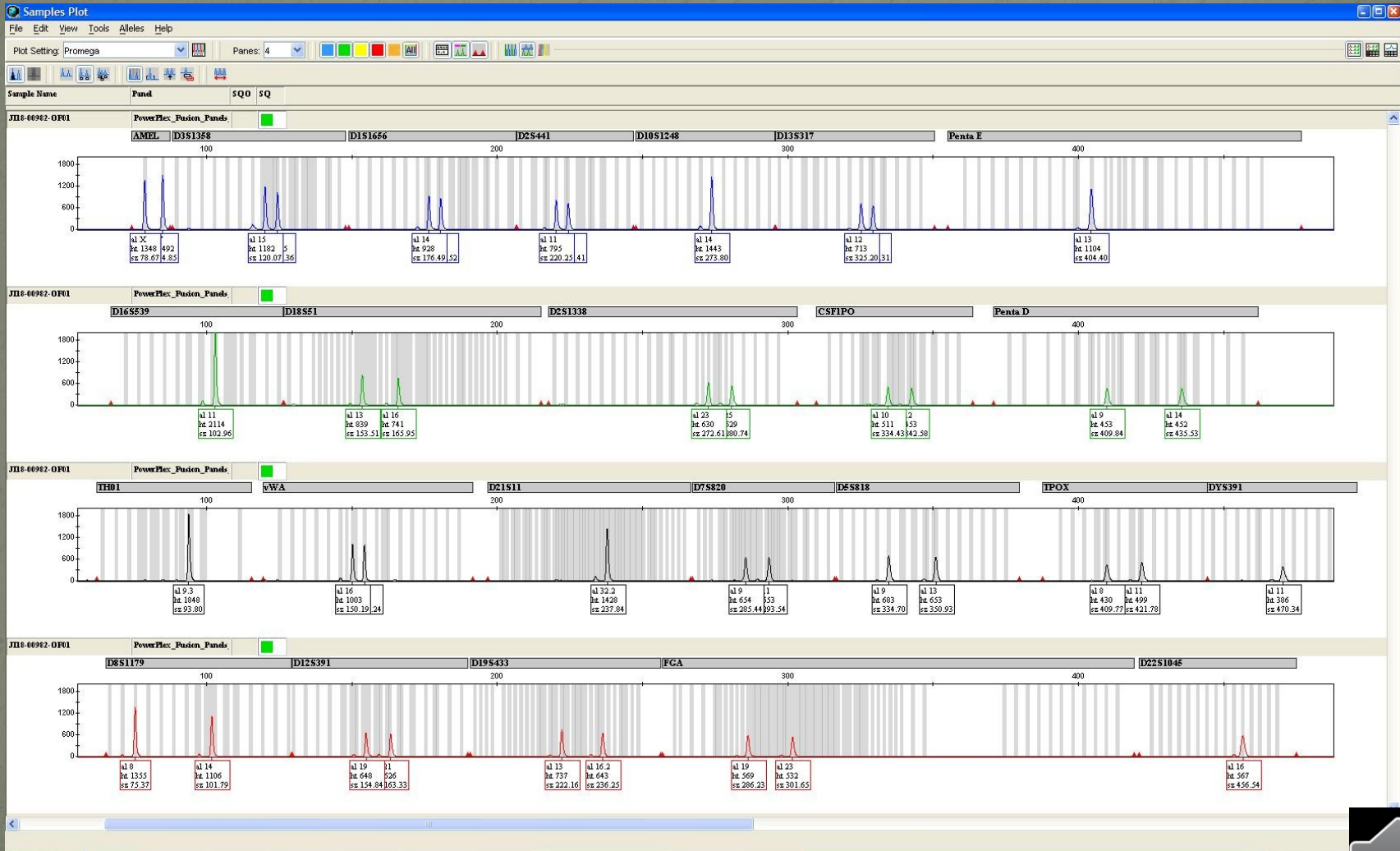
- velikostní standard (Sice standard)
- žebříček (Ladder)
- pozitivní kontrolu
- negativní kontrola



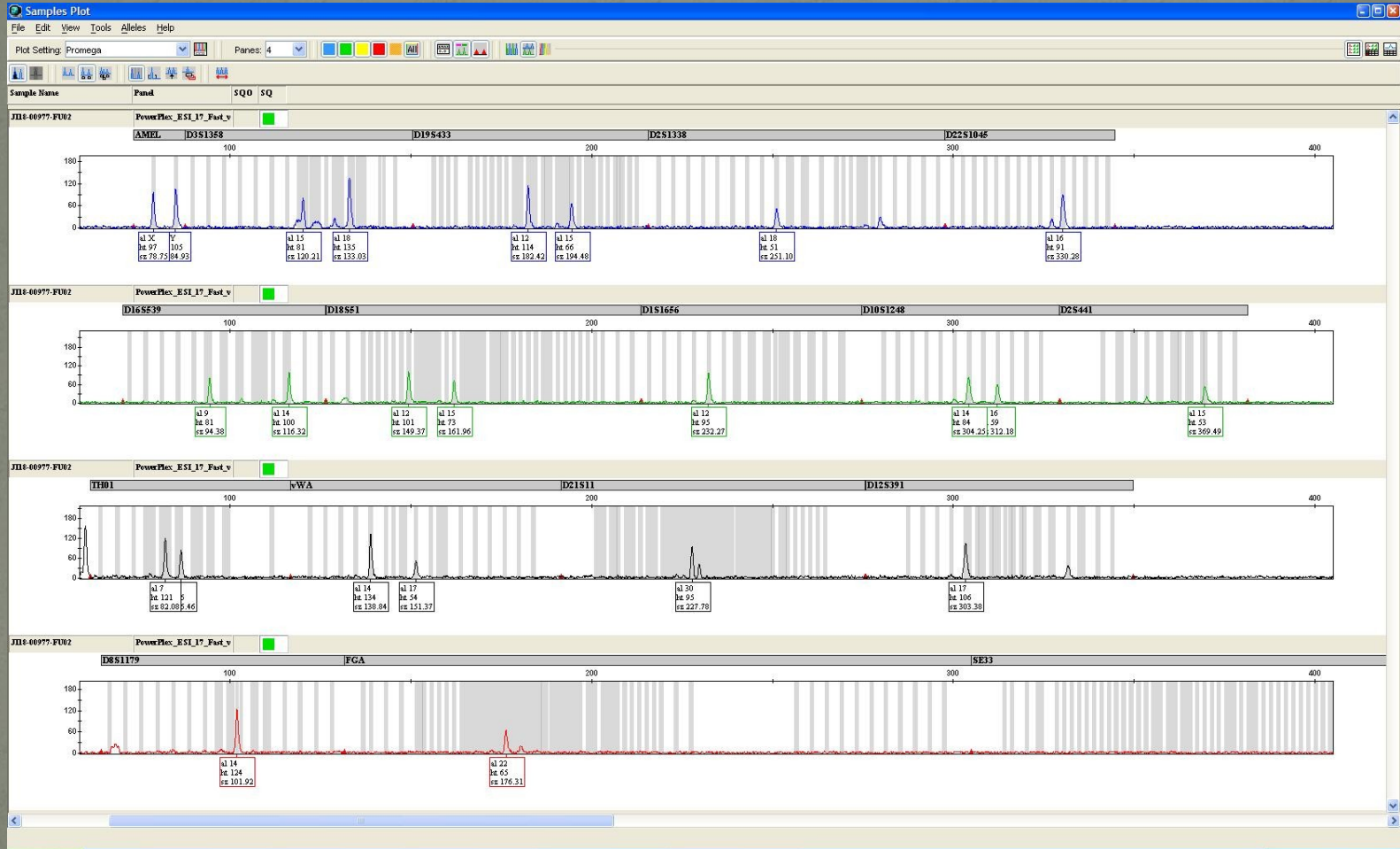
Hodnocení profilu DNA

- upotřebitelný x neupotřebitelný
- upotřebitelný: jedna osoba, major x minor, nelze vyloučit x zahrnout
- neupotřebitelný: směs více osob, neúplný (RMP)

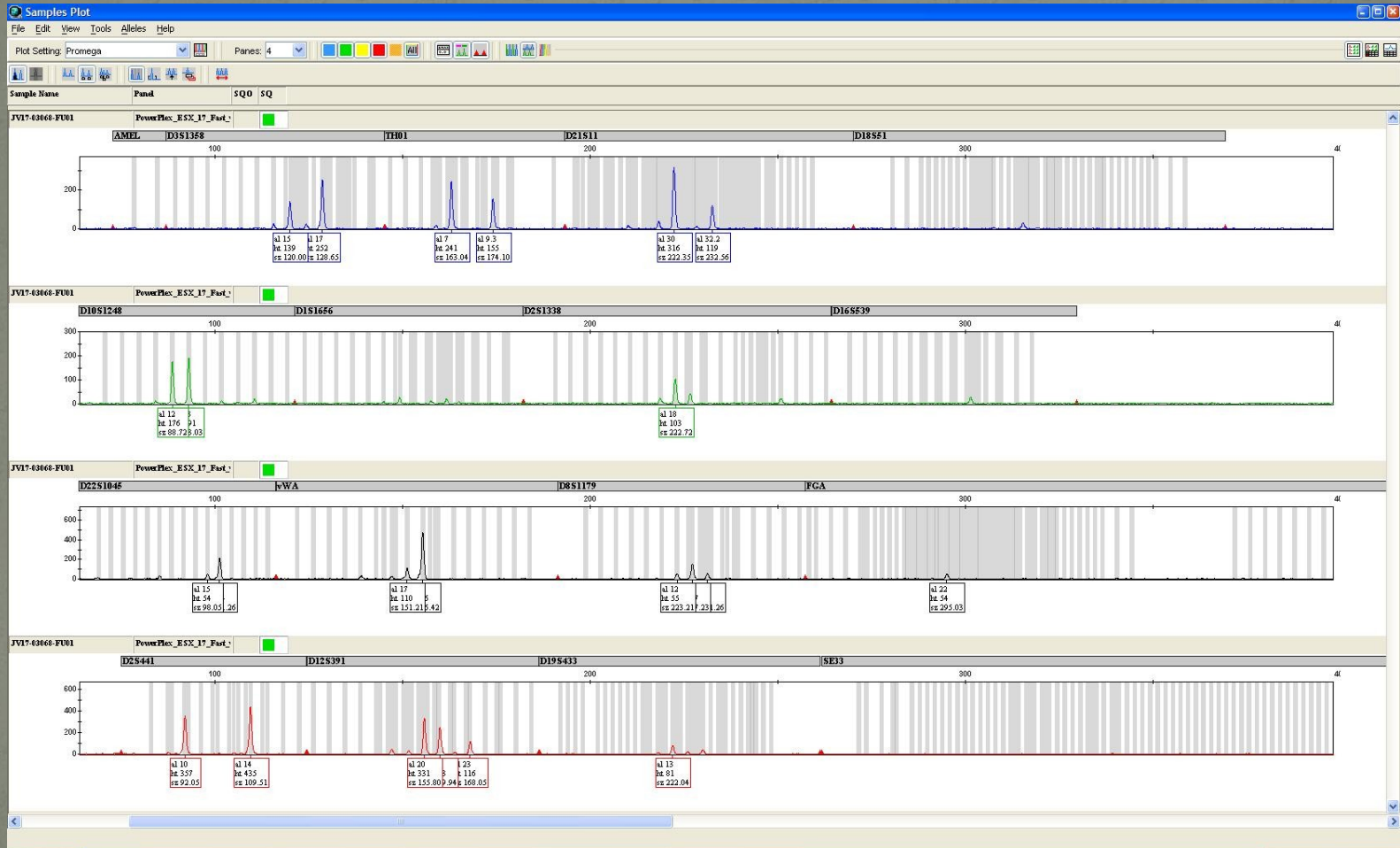
Bukální stěr



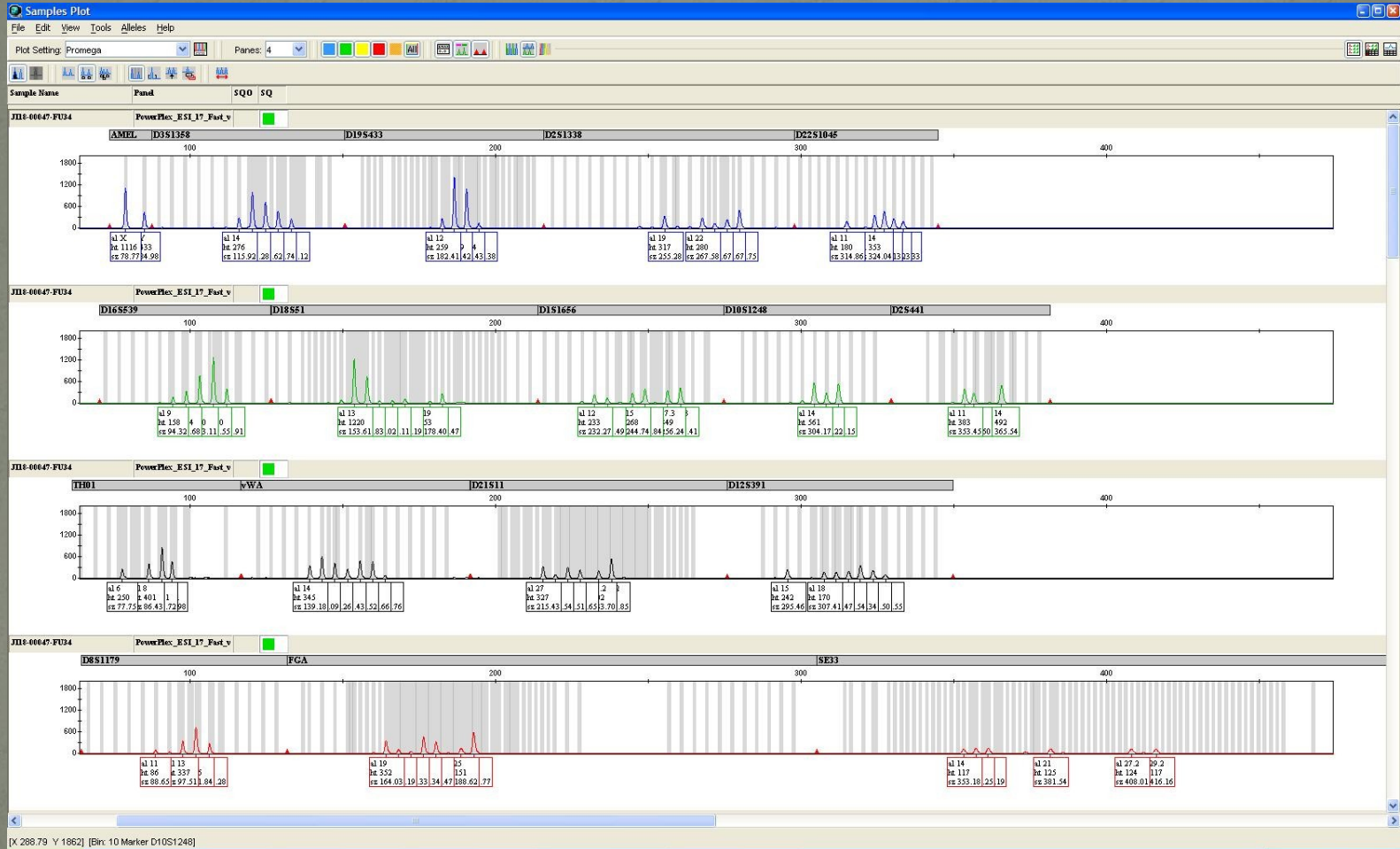
Stopa 1 osoba



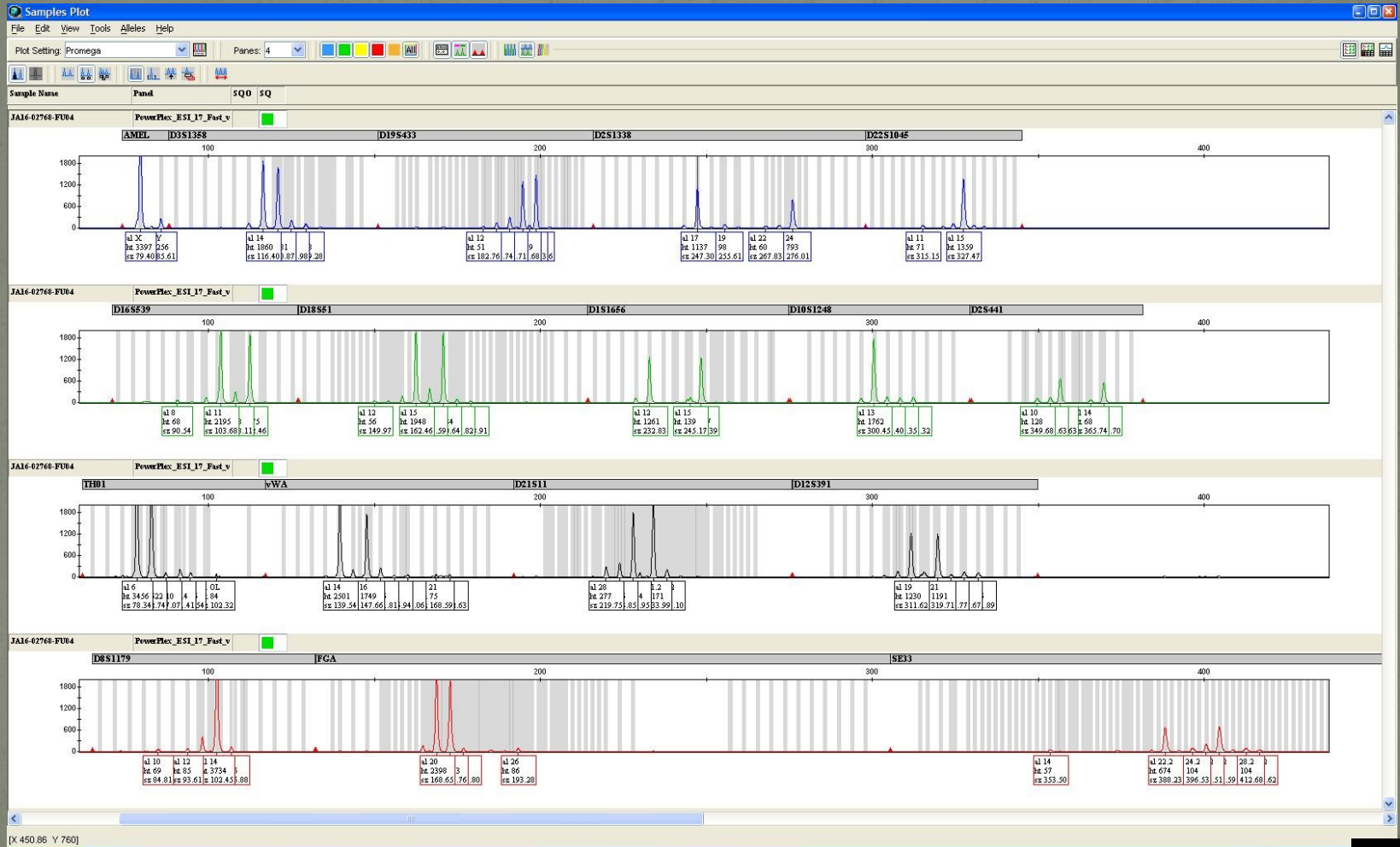
Směs 2 osob

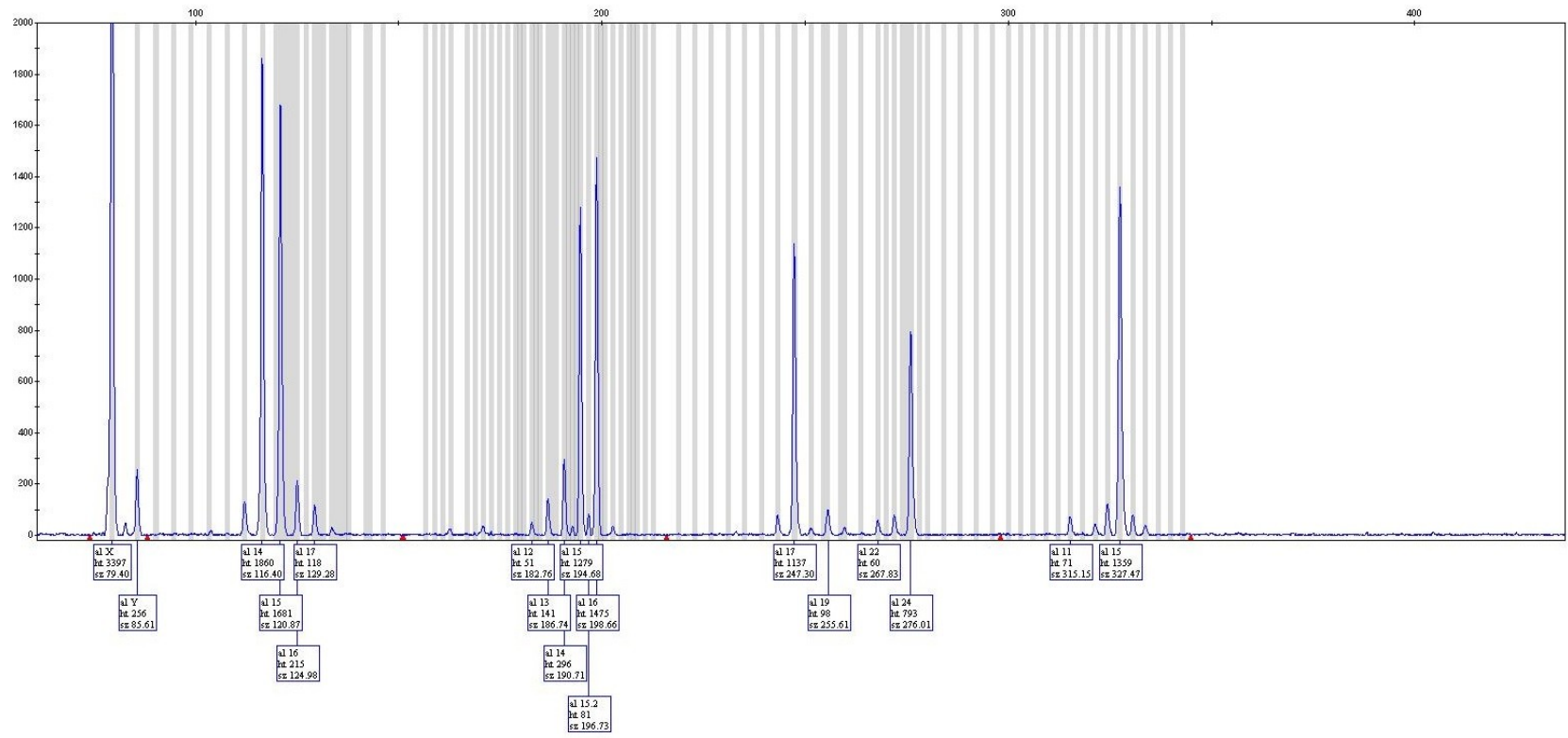


Směs více osob



K odečtení - stopa





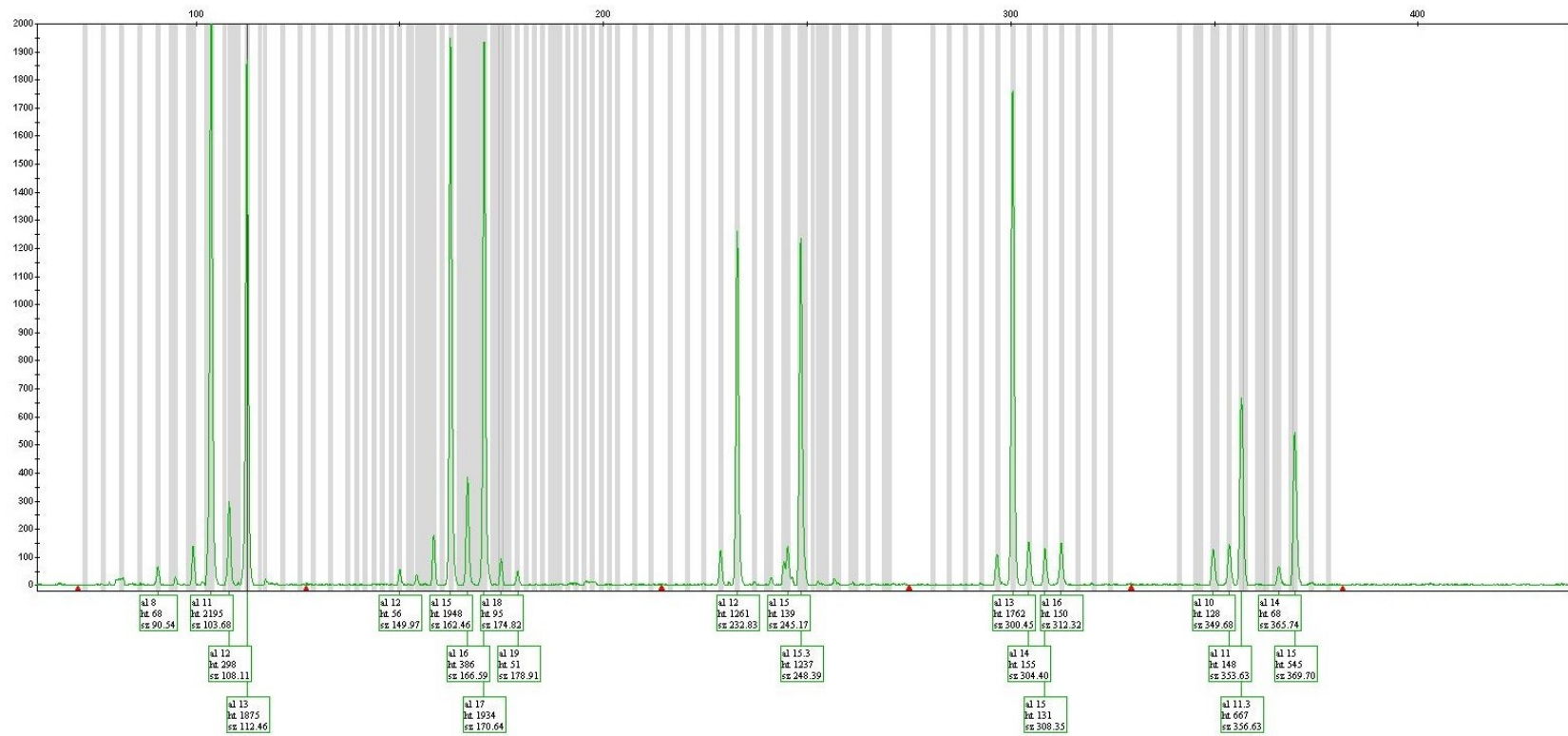
D16S539

D18S51

D1S1656

D10S1248

D2S441

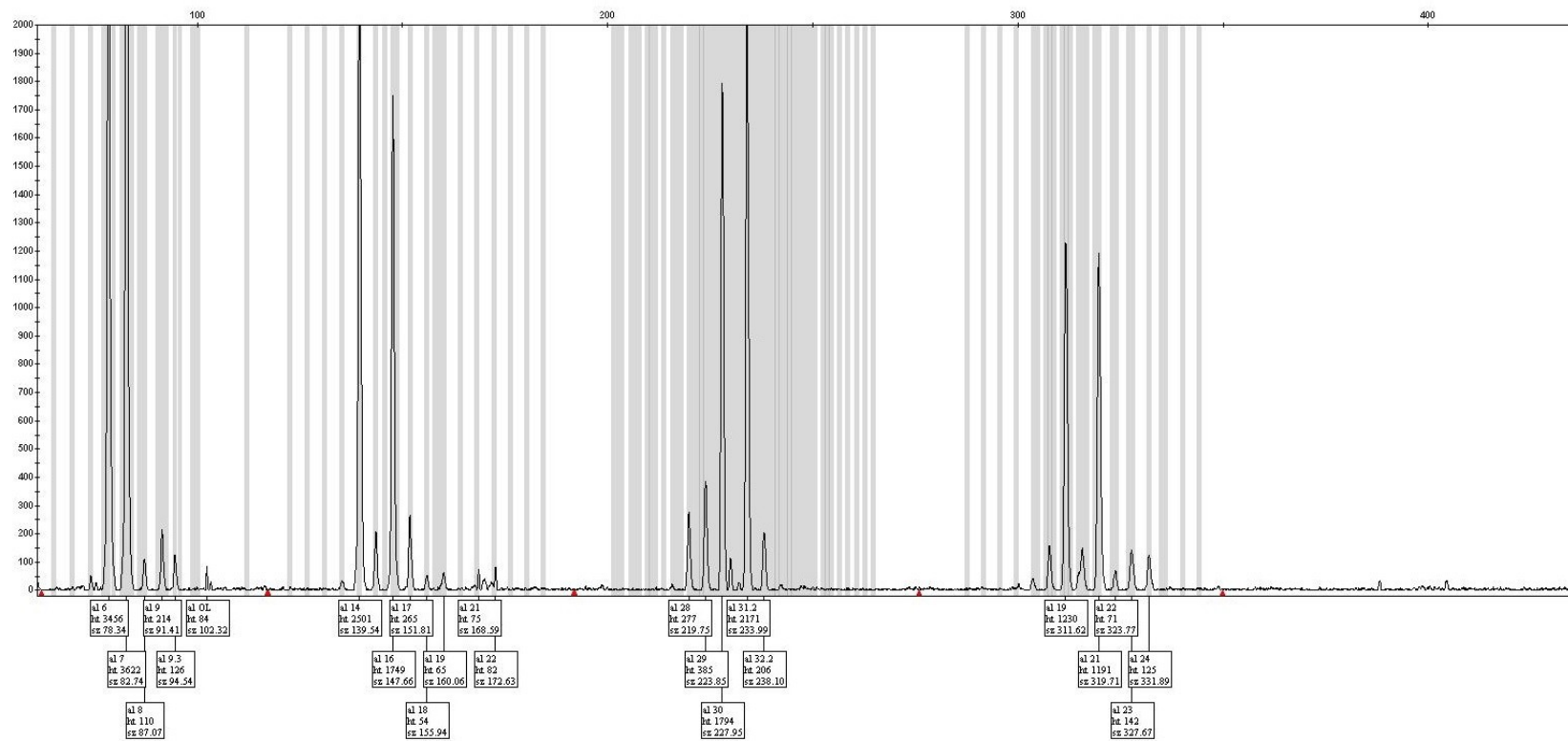


TH01

hWA

D21511

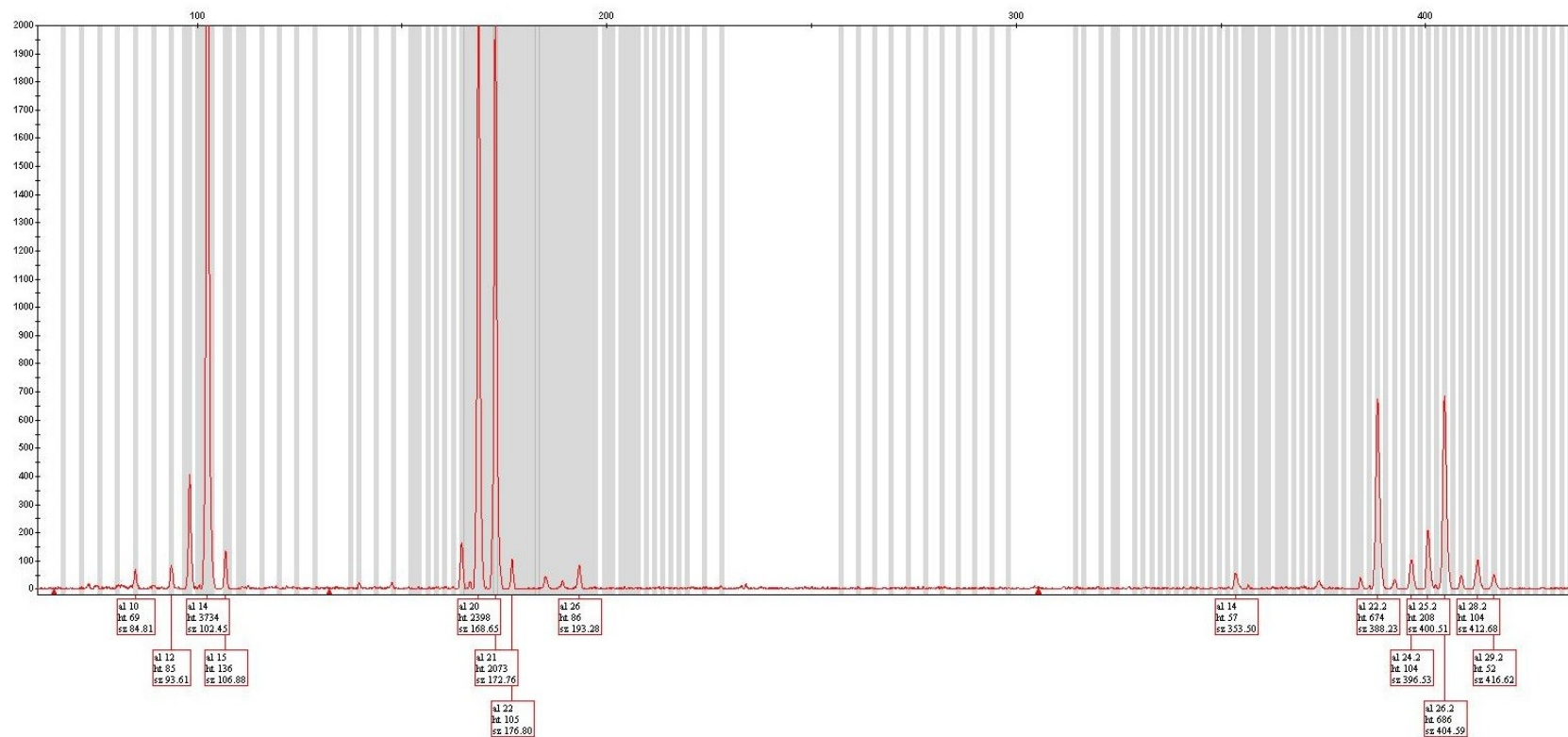
D125391



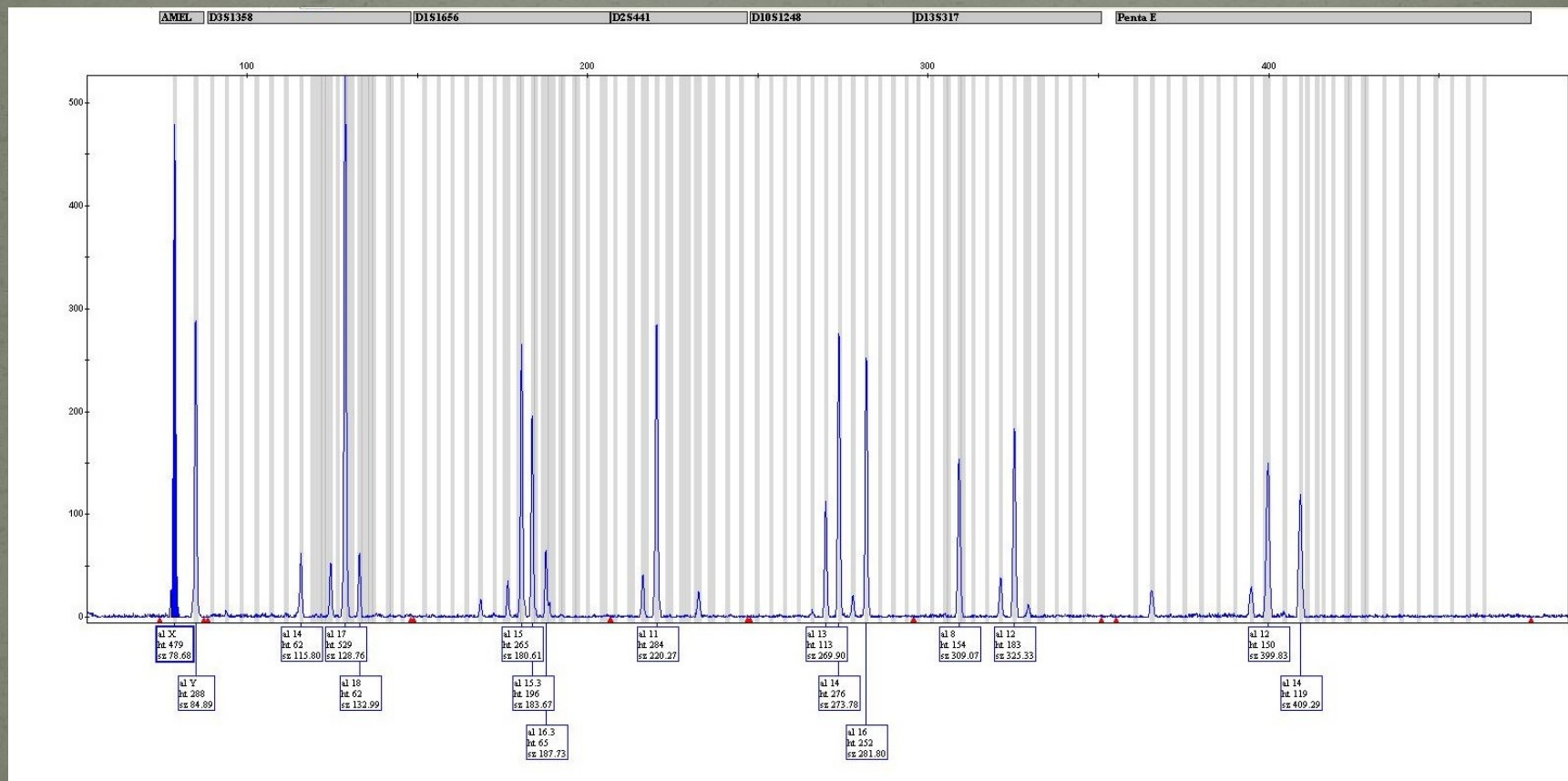
D8S1179

FCA

SE33



K odečtení



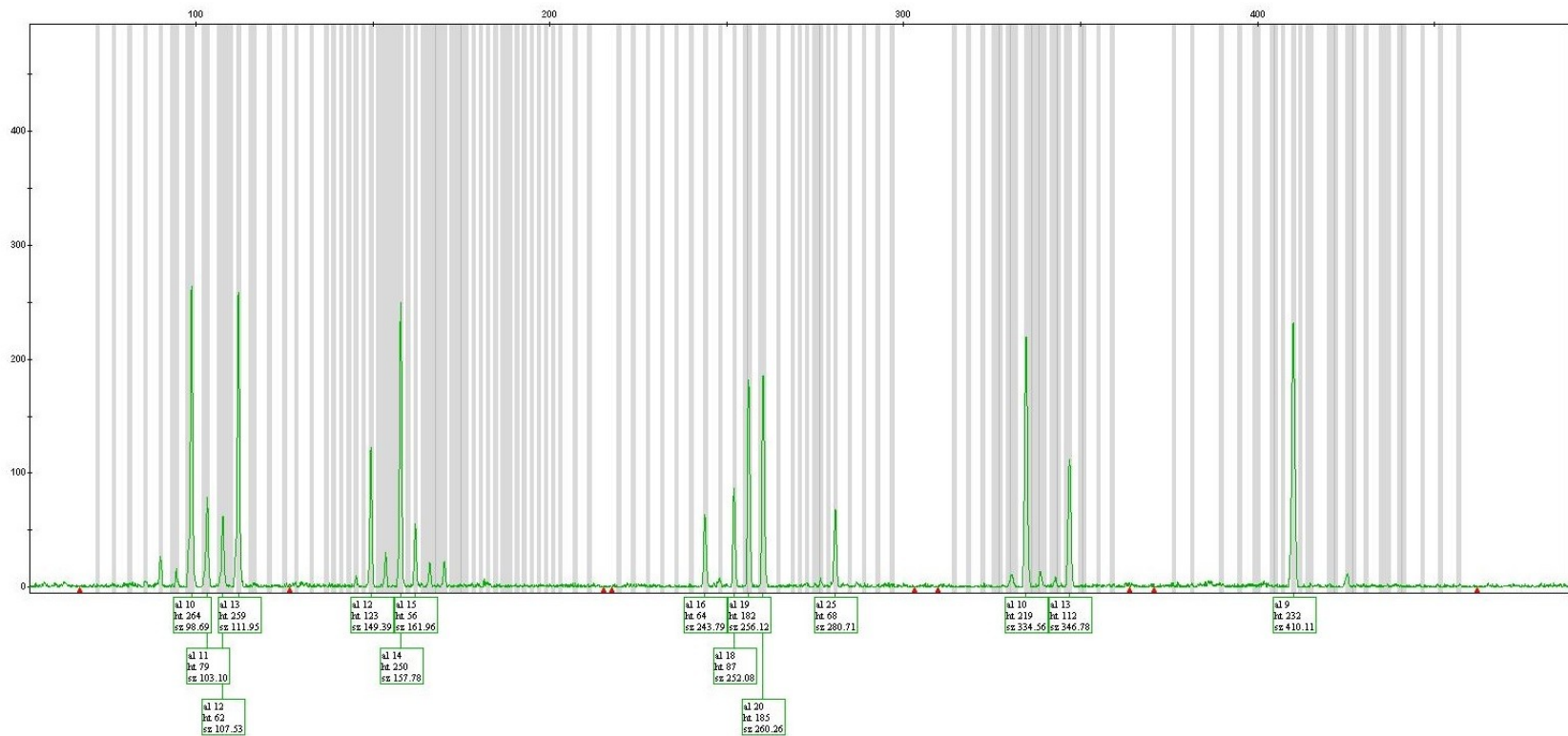
D16S539

D18S51

D2S1338

CSF1PO

Penta D



TH01

VWA

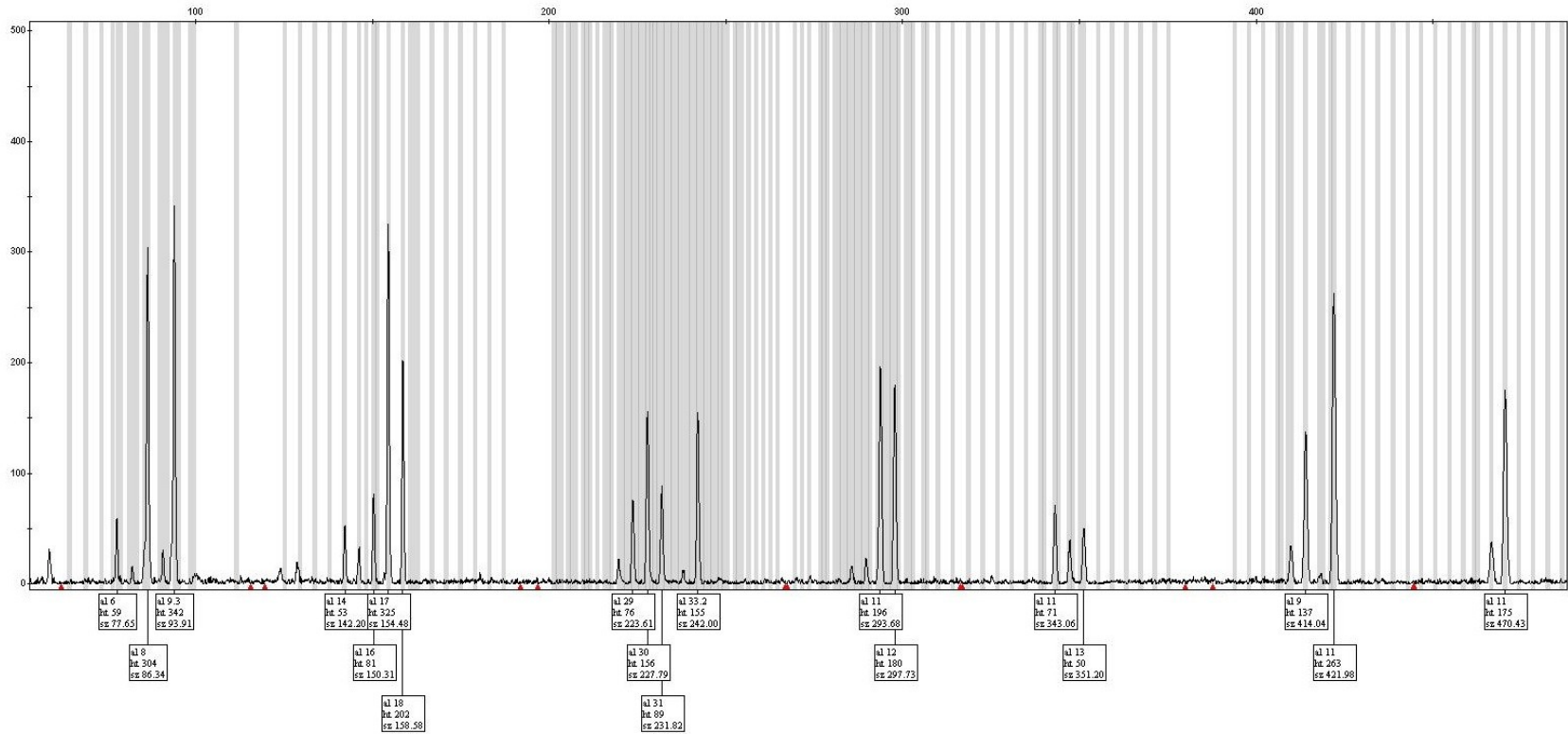
D21S11

D7S820

DES818

TPOX

DYS391



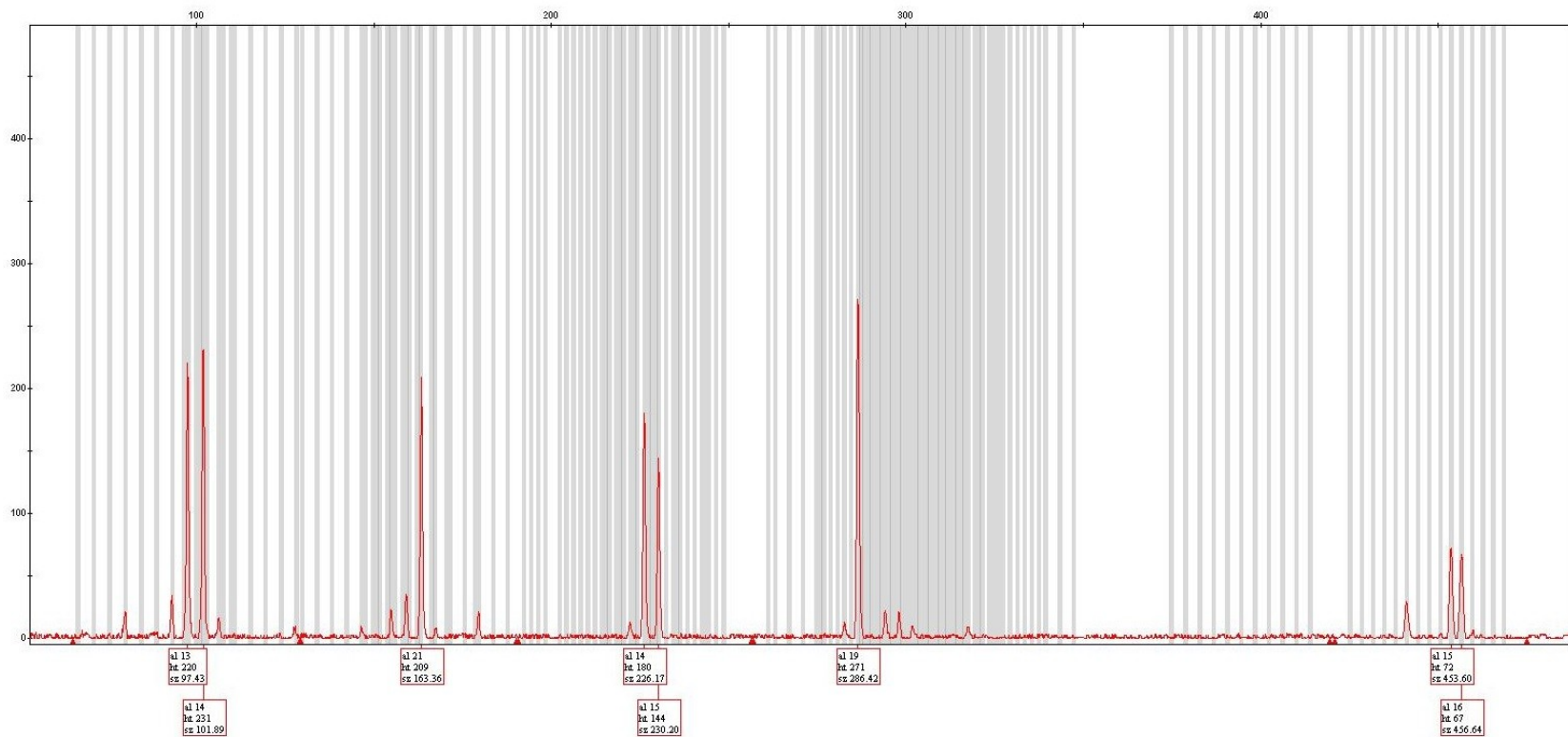
D8S1179

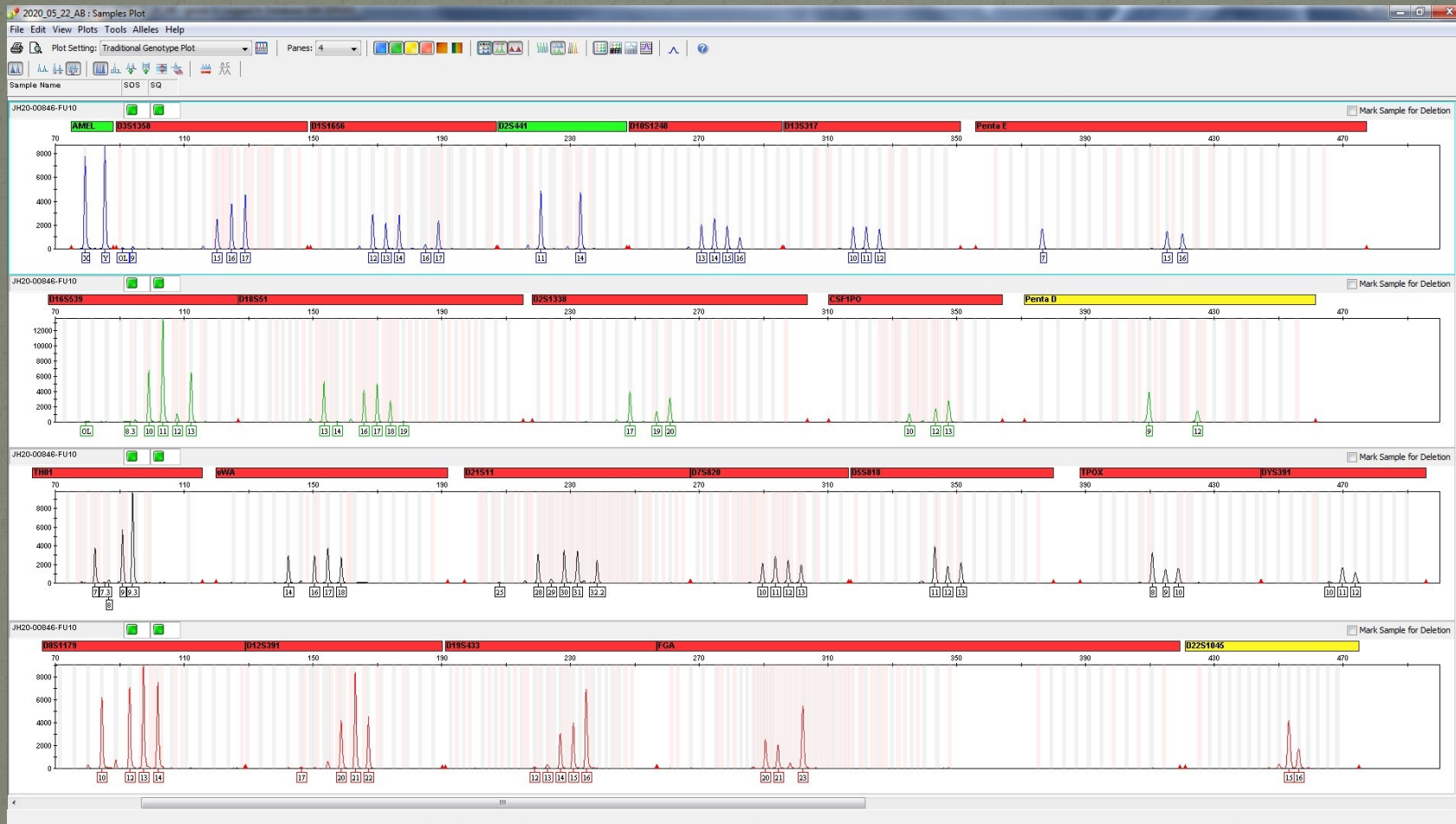
D12S391

D19S433

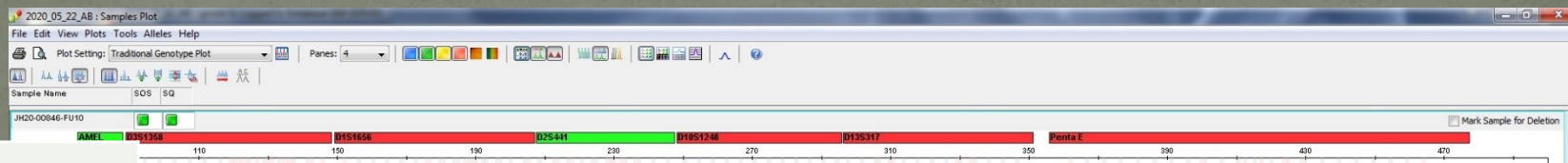
FGA

D22S1045









15	16	17		
12	13	14	17	
11	14			
13	14	15	16	
10	11	12		
7	15	16		
10	11	13		
13	16	17	18	
17	19	20		
10	12	13		
9	12			
7	9	9.3		
14	16	17	18	
28	30	31	32.2	
10	11	12	13	
11	12	13		
8	9	10		
11	12			
10	12	13	14	
20	21	22		
14	15	16		
20	21	23		
15	16			

poškozený	stopa			pachatel
17	15	16	17	15/16
13/17	12	13	14	12/14
11/14	11	14		11/14
15/16	13	14	15	13/14
11	10	11	12	10/12
15	7	15	16	7/16
10/11	10	11	13	11/13
13/17	13	16	17	16/18
17/20	17	19	20	17/19
10/13	10	12	13	12/13
9/12	9	12		9
9/9.3	7	9	9.3	7/9.3
17/18	14	16	17	14/16
30/32.2	28	30	31	28/31
10/11	10	11	12	12/13
11/12	11	12	13	11/13
8/9	8	9	10	8/10
12	11	12		11
13/14	10	12	13	10/12
20/21	20	21	22	21/22
14/16	14	15	16	15/16
21/23	20	21	23	20/23
15	15	16		15/16

Identifikace analýzou DNA se vždy týká GENETY

- GENETA - genetické „já“
 - soubor všech buněk původem z jedné zygoty
- RAMETA - fyzické „já“
 - prostorově ohraničený jedinec

Identifikace analýzou DNA se vždy týká GENETY!!!

Výjimky z pravidla „jedinec genetický = jedinec fyzický“:

- jednovaječná dvojčata
- vrozený tetragametický chimérizmus
- směna buněk mezi dvojvaječnými dvojčaty
- maternální a paternální mikrochimérizmus
- trvalý posttransplační chimérizmus

Jednovaječná dvojčata

- geneticky (STR) neodlišitelná (metodika nákladnější)
- využití forenzní daktyloskopie a antropologie
- jednovaječná X-čata – nelze odlišit, které dítě je čí...



Dvojvaječná dvojčata

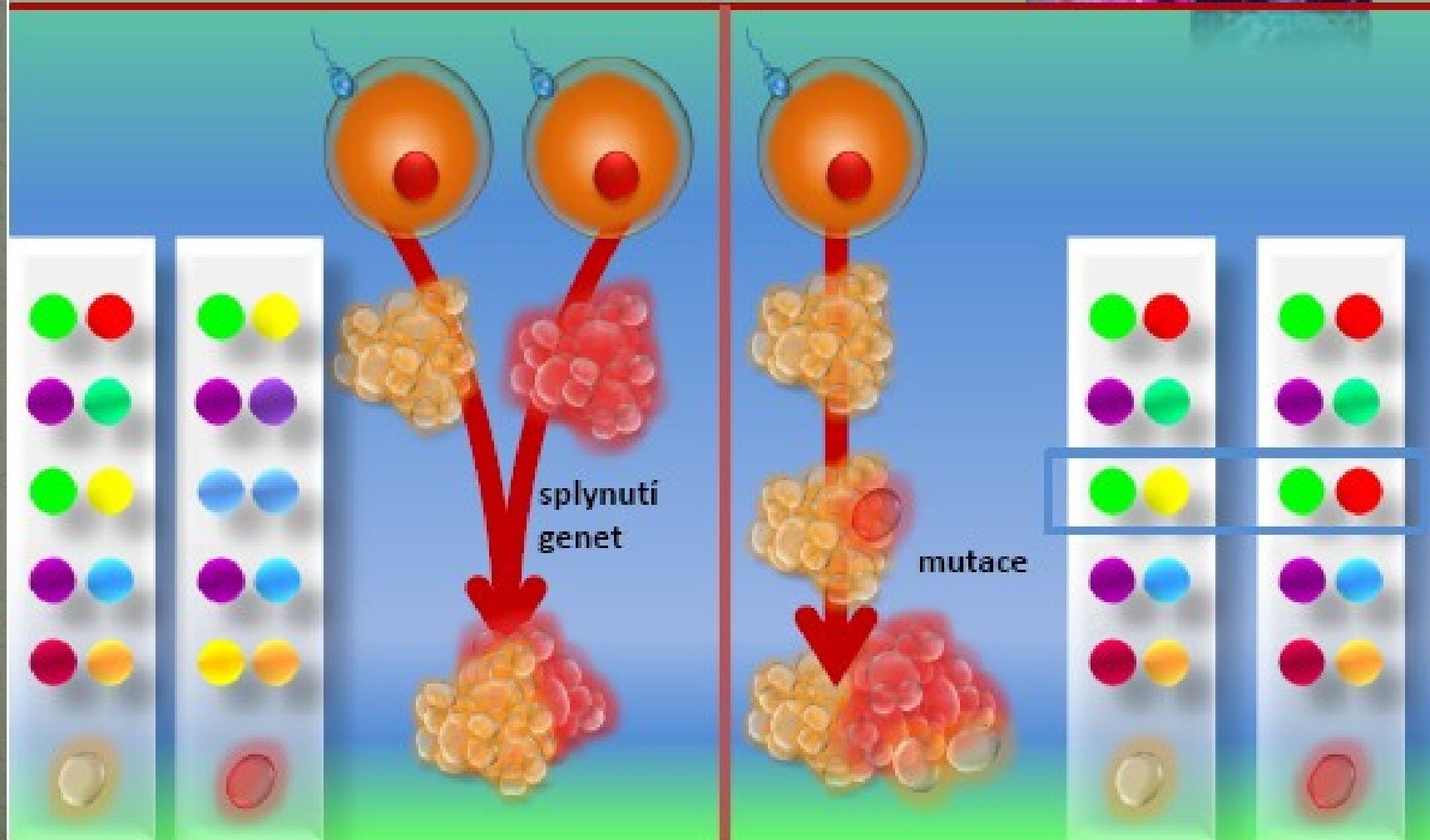
- dvojvaječná (fraternální, dizygotní) dvojčata jsou normálními biologickými sourozenci, ovšem počatými v témže okamžiku (či s velmi krátkým časovým odstupem) a sdílejícími tudíž během prenatálního vývoje tutéž dělohu
- dvojvaječná dvojčata lze analýzou DNA rozlišit stejně jako biologické sourozence
- POZOR na heteropaternální superfekundace (dvojčata dvou otců)

Chimérizmus

- většinou je KRYPTICKÝ (= skrytý)
- zjištění většinou na základě náhody
- někdy lze drobné projevy detekovat



chimérismus vs. mozaicismus



Mohou testy DNA opravdu dokázat, že jste rodiči svých dětí?



Lydia Fairchild (USA)



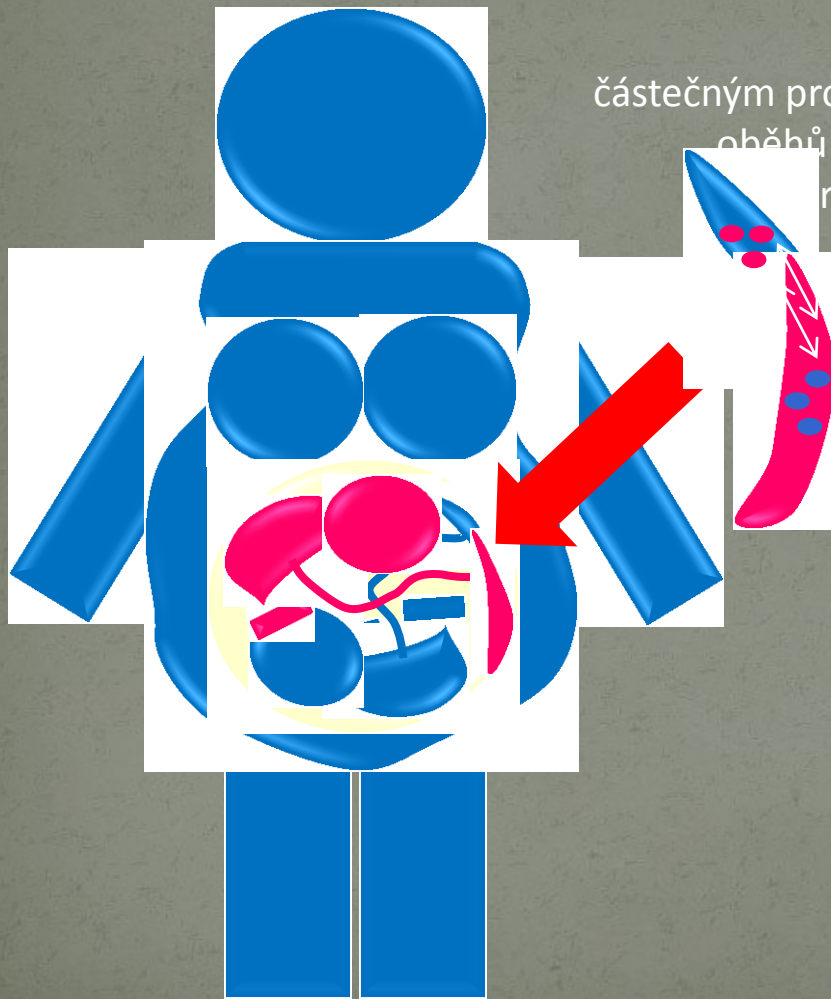
Karen Keegan (UK)



Tetragametický chimérizmus

- pomyslný opak jednovaječných dvojčat
- dvě genety se spojí do jedné ramety
- vznik jednoho fyzického jedince tvořeného buňkami dvojího „sourozeneckého“ původu (dvě vajíčka + dvě spermie = čtyři pohlavní buňky ■■■■■ ázev tetragametický)
- předpokládané (nedoložené) zvýšení frekvence chimérizmu u IVF

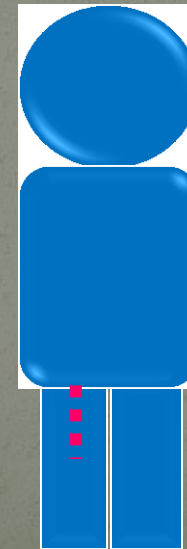
Směna buněk mezi dvojvaječnými dvojčaty



částečným propojením krevních oběhů dochází ke směně krvevorných buněk



kostní dřeň trvale obsahuje malé množství krvevorných buněk dvojčete

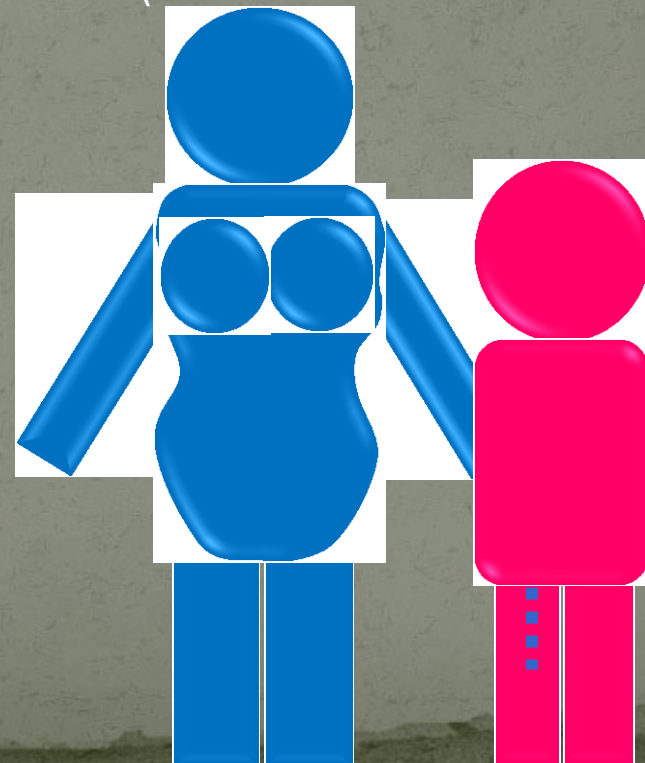
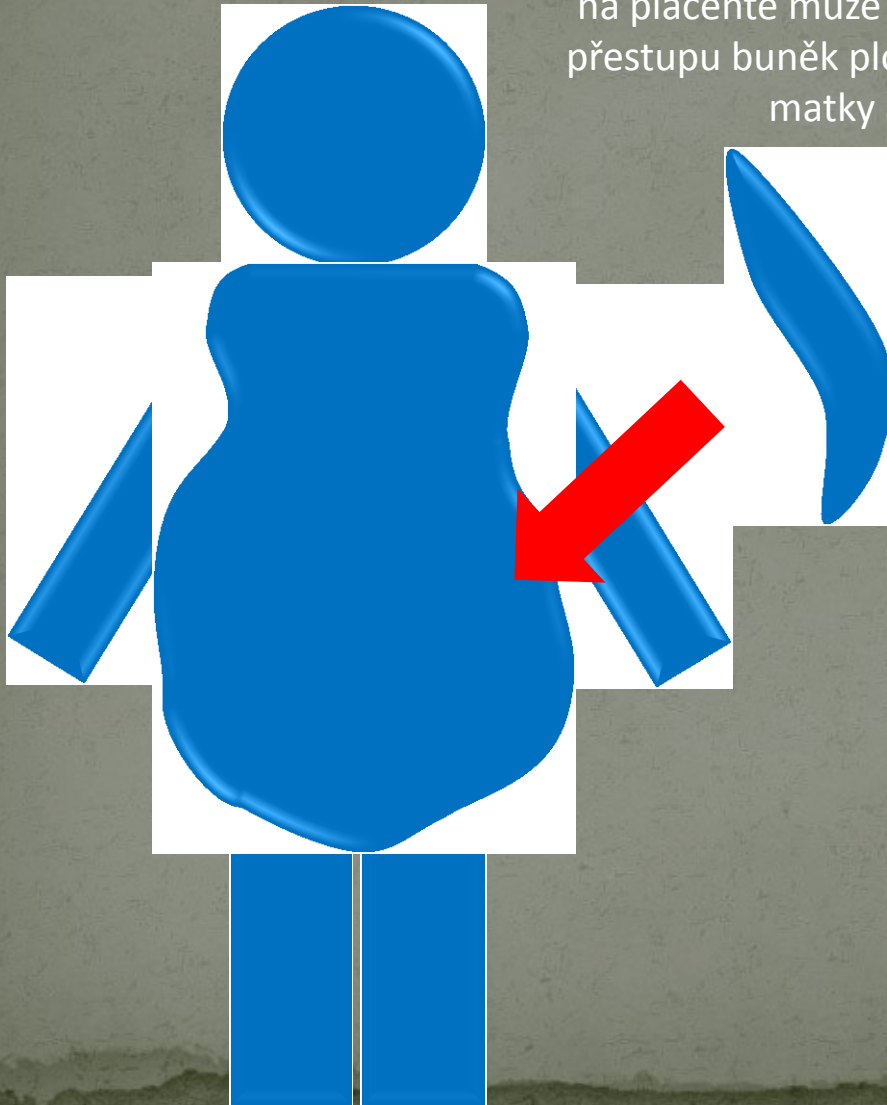


Maternální a fetální mikrochimérismus

na placentě může docházet k
přestupu buněk plodu do těla
matky a obráceně



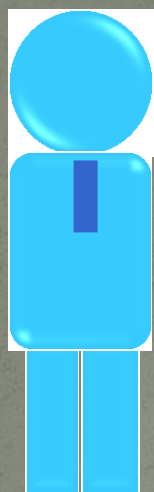
tělo matky trvale obsahuje buňky
dítěte (**fetální mikrochimérismus**) a
tělo dítěte buňky matky
(**maternální mikrochimérismus**)



Dočasný posttransplantační chimerismus

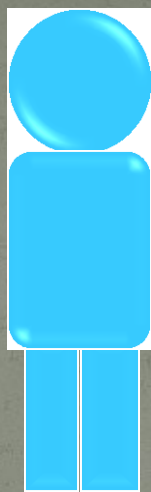
DNA je pouze v leukocytech – záleží na typu derivátu

- po transplantaci je materiál vybírán na základě kompatibility „krevních skupin“, tj. erytrocytárních antigenů ABo a Rh systémech
- žádná souvislost s identifikačním profilem DNA
- po transplataci se v krvi objeví smíšený profil DNA
- postupně se „vyředí“ a vrátí se k původnímu čistému profilu pacienta
- tedy měl by

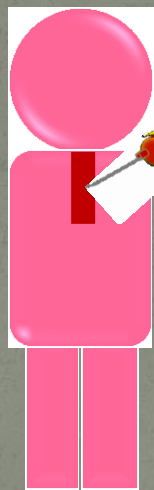
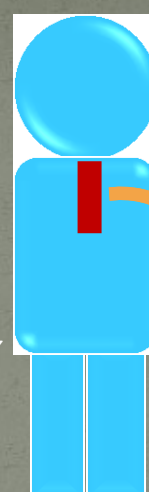


PACIENT

likvidace
vlastní kostní
dřeně
chemoterapií



transplantace
dárcovy kostní
dřeně



DÁRCE

odběr dárcovy
kostní dřeně



tělo pacienta trvale obsahuje
kostní dřeň dárce; genetický
profil buněk kostní dřeně a
buněk od nich odvozených je
identický s genetickým profilem
dárce

Chimerismu trvalý posttransplantační

Týká se všech allotranplantací (vyjma těch, kde je dárce MZ dvojče)

Při transplantaci je materiál vybírán na základě kompatibility tkáňových antigenů HLA systému – žádná souvislost s identifikačním profilem DNA

DNA profil dárce se vyskytuje v transplantovaných orgánech a dále ve všech tkáních, do nichž penetrují buňky z tohoto orgánu

Chimérismus

trvalý posttransplantační chimérismus



- ✿ forezně geneticky nejzávažnější důsledek má allotransplantace kostní dřeně (BMT)
- ✿ profil dárce se vyskytuje v čisté formě v krvi, ve smíšené podobě s profilem pacienta pak např. v buukálním stěru
- ✿ v principu může dojít k závažným omylům – falešně negativní/pozitivní identifikace osoby
 - ✿ řešením by byl pouze regist „koexistujících DNA profilů“ – zatím eticky problematické

