

Vybrané metody molekulární diagnostiky

Molekulární diagnostika

Využívá stanovení rozdílů v sekvenci DNA

Identifikace

Typizace

Léčba choroby

Prevence

**Identifikace biologické
makromolekuly / vyhledání zdroje
/ původce**

Fylogenetické studie

Genotypové metody

- Výhodou genotypových metod oproti fenotypovým je
 - nezávislost na expresi specifických genů v umělém prostředí (laboratorní média)
 - genotypové znaky jsou na rozdíl od fenotypových (biotyp, sérotyp, antibiogram) relativně stálé
 - dávají reprodukovatelné výsledky analýz i za různých laboratorních podmínek
 - jsou rychlé
 - metody založené na chromozomální DNA mají na rozdíl od fenotypových metod 100% typovatelnost

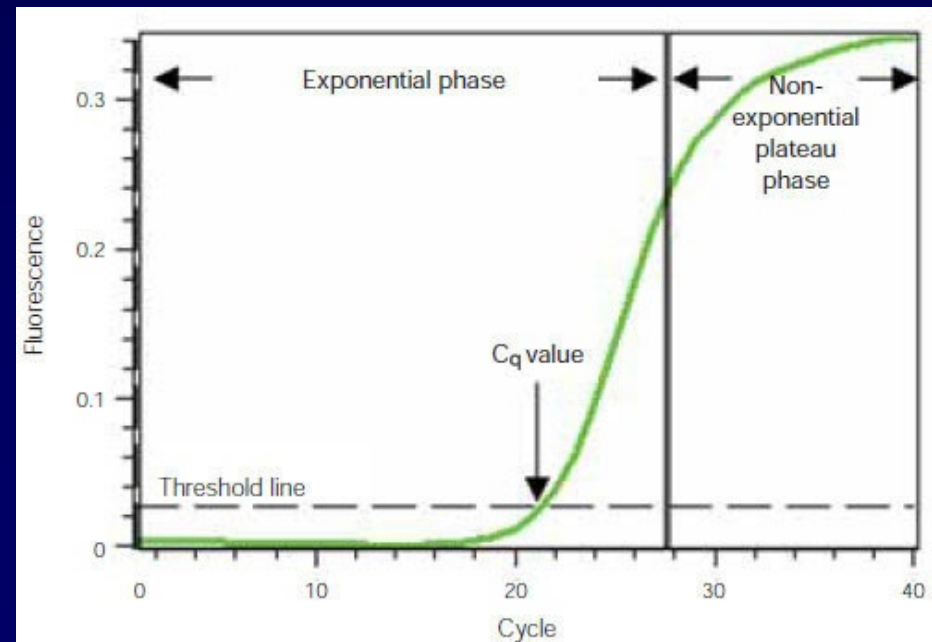
Hodnocení kvality typizačního systému

- Typizační systém je charakterizován kritériemi
 - Typovatelnost
 - Reprodukovatelnost
 - Stálost
 - Rozlišovací síla
 - Epidemiologická shoda
 - Snadnost interpretace
 - Jednoduchost provedení

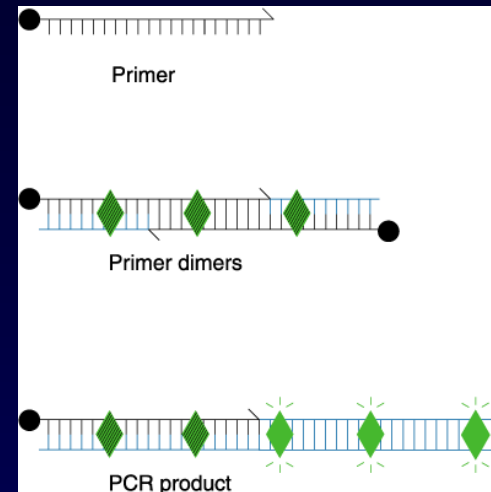
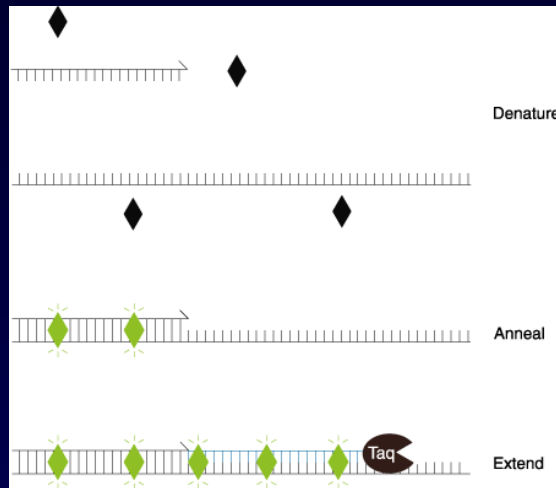
Detekční **amplifikační** metody cílicí na nukleové kyseliny

Kvantitativní PCR (qPCR)

- Polymerázová řetězová reakce sledovaná v reálném čase (real-time PCR, online PCR, kinetic PCR, quantitative PCR, zkr. Q-PCR).
- Varianta PCR umožňující přímou kvantifikaci PCR-produktu v reálném čase
- provádí se prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu
 - cyklické střídání teplot
 - detekce fluorescence
 - monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat PCR-produkty elektroforeticky
 - relativní nebo absolutní kvantifikace



Fluorescenční barviva vázající se na DNA

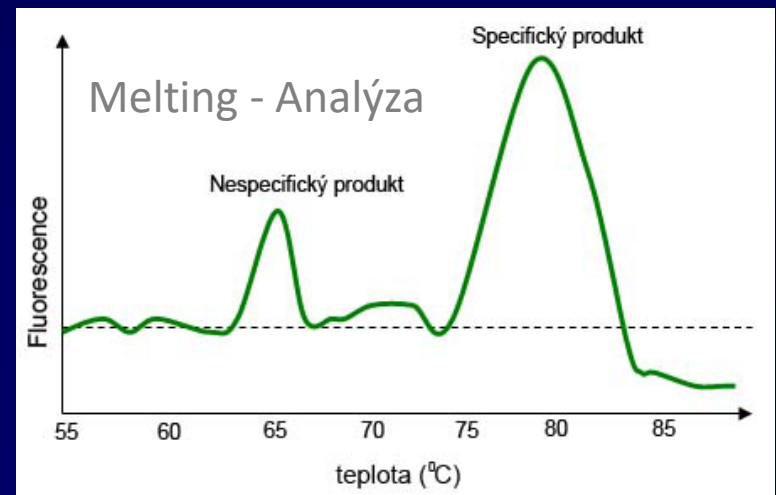
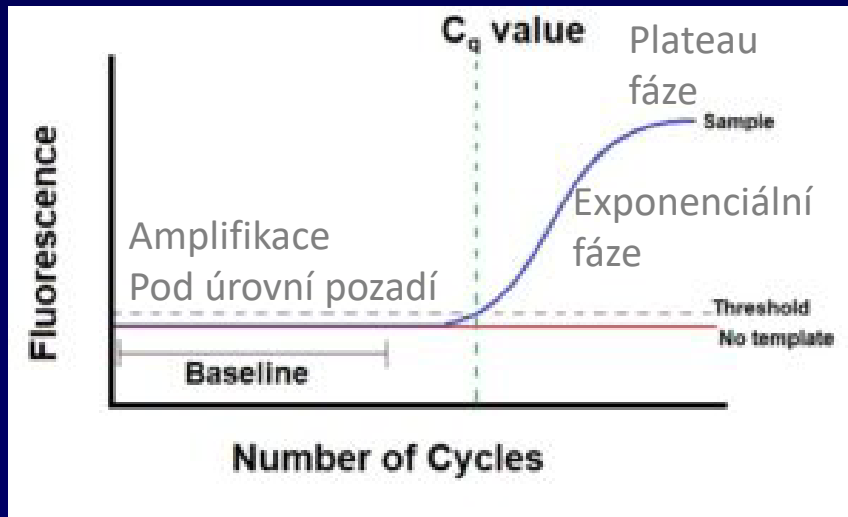


- Pro kvantifikaci ampliconů se běžně používají fluorescenční kyaninová barviva **SYBR® Green**, která fluoreskují po vazbě na dsDNA.
- Fluorescence SYBR green I je po vazbě na DNA až 1000× vyšší
- Fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR-produktu.
- Signál se měří na konci elongace nebo kontinuálně.
- Na DNA se vázající barviva nemohou být použita u mnohonásobných reakcí
- Hlavním omezením je nemožnost odlišení nespecifických produktů.
- Nespecifické signály tvořené dimery primerů mohou být zhašeny při použití primerů značených specifickými fluorofory.

Kvantifikace prostřednictvím hodnoty C_q

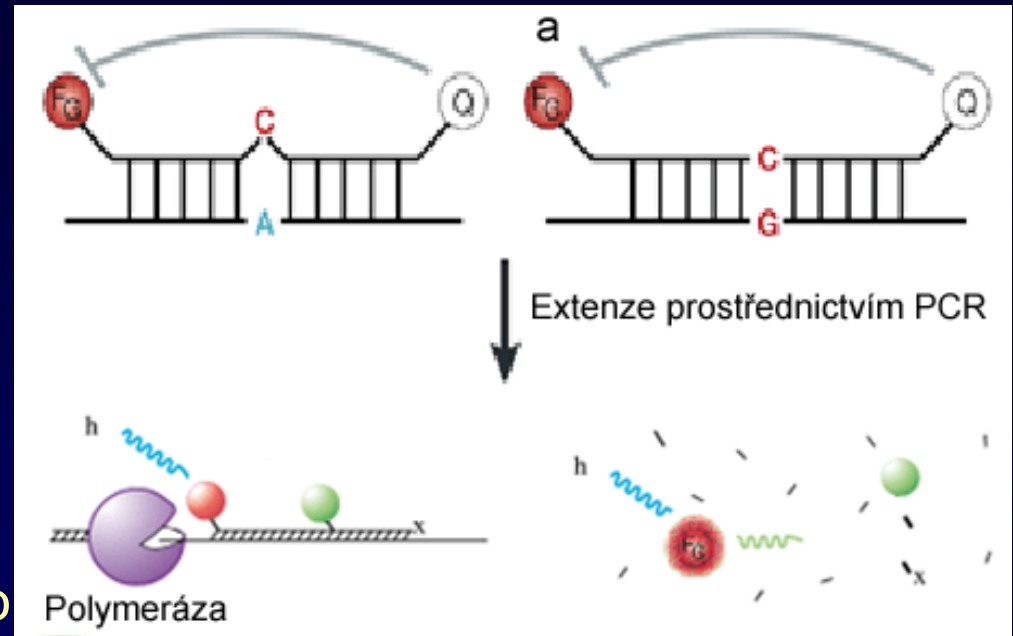
- Přes specifičnost primerů dochází při qPCR ke vzniku značného množství fluorescence pozadí.
- Zohlednění signálu pozadí umožňuje prahová čára a hodnota C_q .
 - C_t – threshold cycle
 - C_p – crossing point
 - C_q – quantification cycle

C_p - číslo cyklu PCR, při kterém reakční křivka vašeho vzorku protíná prahovou čáru.



TaqMan technologie – qPCR s detekcí prostřednictvím fluorescenčních sond

- Hybridizační metoda, kterou využívá kvantitativní PCR např. pro detekci bodových mutací
- Oligonukleotid s fluorescenční značkou a zhášečem se váže na vnitřní část amplifikované sekvence, poblíž jednoho z primerů
- Pokud sonda vytváří homoduplex, je rozložena 5'-exonukleázovou aktivitou DNA-polymerázy a vznikne fluorescence



TaqMan.exe

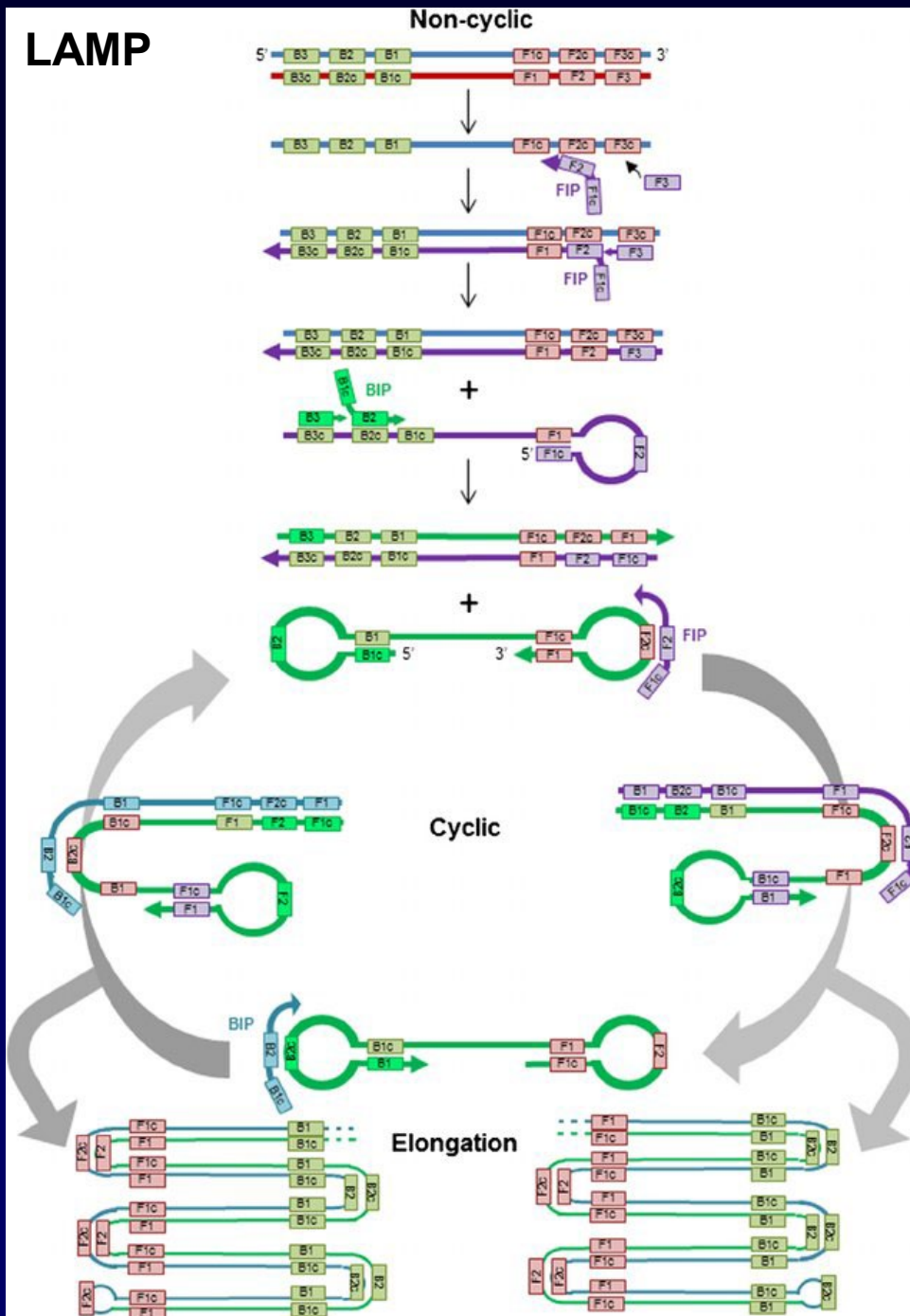
Kontroly při PCR

Negativní	Účel
Bez templátu (NTC)	Detekce dimerů primerů Detekce kontaminace
Bez polymerázy (NAC)	Detekce degradace fluorescenčně značených oligo
Bez reverzní transkriptázy	Detekce přítomnosti genomové DNA
Pozitivní	Účel
Endogenní	Jiný cíl na analyzované DNA Kontrola kvality reagensů Kontrola nepřítomnosti inhibitorů Normalizace
Exogenní	Stejný cíl na ověřené DNA Kontrola kvality reagensů
Přidaná (spiking)	Kontrola nepřítomnosti inhibitorů Vyloučení falešných negativních výsledků

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

- Amplifikace za izotermických podmínek s vysokou specificitou a rychlostí
- Metoda využívá DNA polymerázu vytěsňující řetězec (Bsm, Bst) a sadu čtyř primerů
- Primery rozpoznávají celkem šest odlišných sekvencí na cílové DNA
- LAMP iniciuje vnitřní primer obsahující cílové sense a antisense sekvence
- Následující syntéza s vnějším primerem vytěsňuje jednořetězcovou DNA
- Ta slouží jako templát pro syntézu DNA vnitřními a vnějšími primery, které hybridizují s druhým koncem, což vede k vytvoření smyčky
- Při následném cyklu LAMP hybridizuje jeden vnitřní primer se smyčkou a iniciuje syntézu vytěsňené DNA, čímž se získá původní DNA ve smyčce a nová DNA dvojnásobné délky
- Cyklická reakce pokračuje s akumulací 10^9 kopií cíle za méně než hodinu.
- Konečným produktem jsou DNA s několika obrácenými repeticemi a strukturou podobnou kvěťáku s mnoha smyčkami
- Dna lze detekovat/kvantifikovat vhodným fluorescenčním barvivem

LAMP



- Vnitřní primer FIP hybridizuje s F2c v cílové DNA a iniciuje syntézu komplementárních řetězců
- Vnější primer F3, který je o několik bází kratší a nižší v koncentraci než FIP, pomalu hybridizuje s F3c v cílové DNA a iniciuje syntézu vytěsnění řetězce DNA a uvolňuje komplementární vlákno spojené s FIP, které může na jednom konci tvořit smyčkovou strukturu
- Tato jednořetězcová DNA slouží jako templát pro syntézu DNA iniciované BIP a následnou syntézu DNA s přemístěním řetězce s primem B3
- Výsledkem je „dumb-bell“ forma DNA, která se rychle amplifikuje v cyklické části reakce kdy vznikají jak původní kopie, tak násobně prodloužené formy

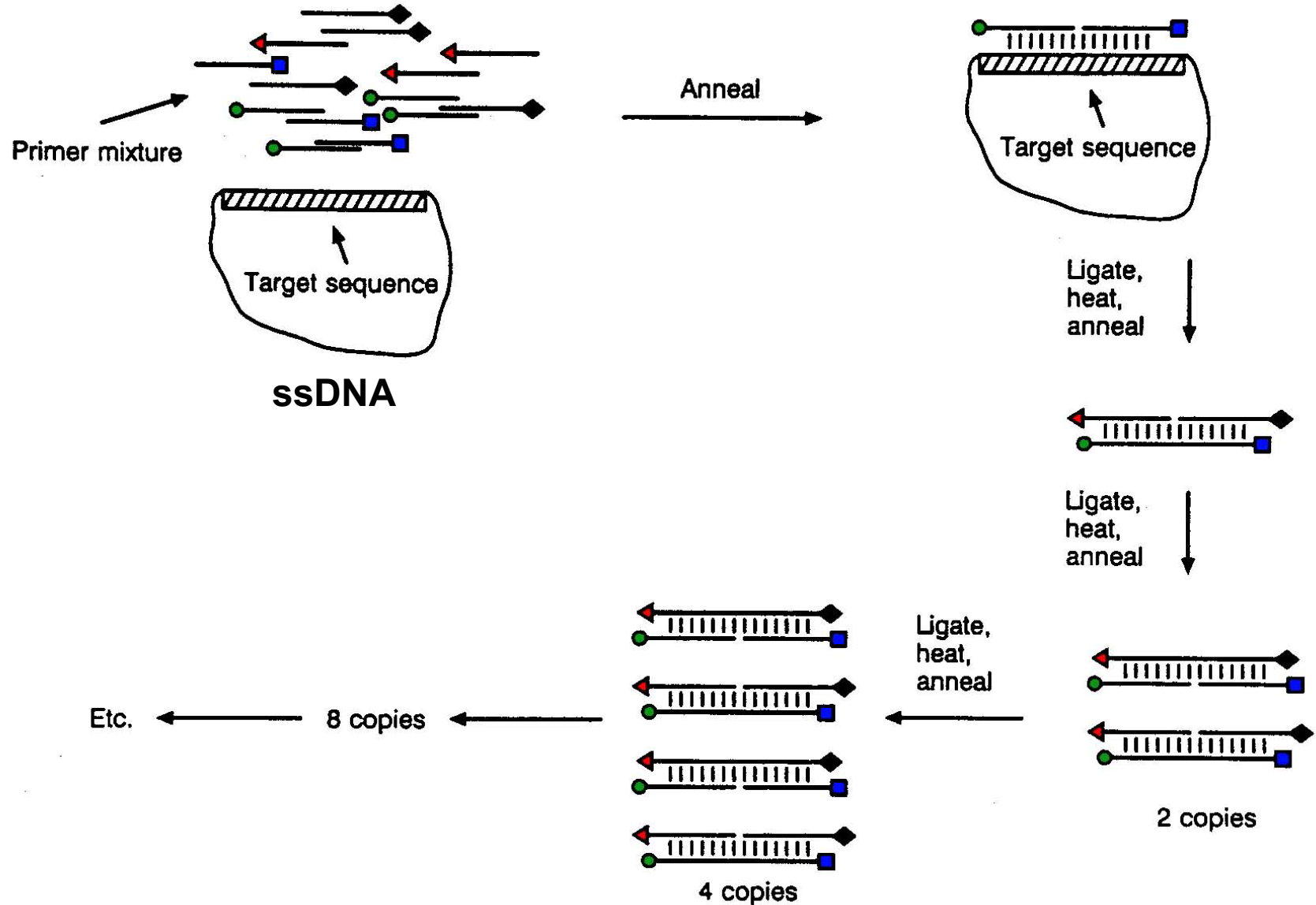
Metody pro amplifikaci molekuly navázané sondy

Alternativní metody pro detekci
nízkého počtu molekul cílové
sekvence využívající amplifikaci
samotné sondy po vazbě na
cílovou sekvenci.

Ligázová řetězová reakce (Ligase chain reaction - LCR)

- **Amplifikace cílové sekvence pomocí ligázy** je alternativní metoda pro amplifikaci **oligonukleotidové sondy** navázané na cílovou sekvenci využívající **DNA ligázu**.
- Při LCR se nevytváří nové kopie cílové sekvence, proto se řadí do skupiny **metod pro amplifikaci sondy**.
- Metoda využívá DNA ligázu ke **spojení dvou párů komplementárních oligonukleotidových sond po jejich připojení na cílovou sekvenci**.
 - Úspěšná ligace proběhne pouze při dokonalém párování 3' a 5' konců obou oligonukleotidových sond k cílové molekule.
- Po proběhnutí první úspěšné ligace vzniká produkt, který **napodobuje původní molekulu** a slouží jako templát pro připojení zbývajících dvojic oligonukleotidů a jejich ligaci.
- Nevýhodou **ligázové amplifikační reakce (LAR)** je teplotní nestabilita DNA ligázy a nutnost přidávat ligázu po každé denaturaci.
 - V současnosti se používá **termostabilní DNA ligáza** z *Thermus aquaticus*, která je stabilní po mnoha cyklech denaturace (LCR).

Ligázová řetězová reakce (LCR)



Modifikace LCR

- Využívají pouze jedné dvojice sousedících oligonukleotidů
 - ligázová detekční reakce (LDR)
 - oligonukleotidové ligační stanovení (OLA)
- Lineární kinetika amplifikace
- Může být i kvantitativní metodou
- Ve spojení s analýzou produktů PCR, kde se dá očekávat dostatečné množství templátu, je OLA používáno jako účinný detekční systém bodových mutací (PCR-OLA).
- Tento přístup nevyžaduje průkaz amplifikovaného produktu na elektroforéze

Metody pro detekci polymorfizmů v genomech

- **Přímé metody – podávají informaci o primární struktuře DNA/RNA:**
 - Sekvenování
 - Jednonukleotidové polymorfizmy

Nepřímé metody: fingerprinting

1. **RFLP** (Restriction fragment length polymorphism)
2. **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism)
3. **SSLP** (Simple Sequence Length Polymorphism)
4. **SSCP** (Single-strand conformation polymorphism)

Typů polymorfizmů je mnoho: Příklady dalších typů genetických polymorfizmů – rozmanitá terminologie a modifikace technik podle toho, co je cílem diagnostiky.

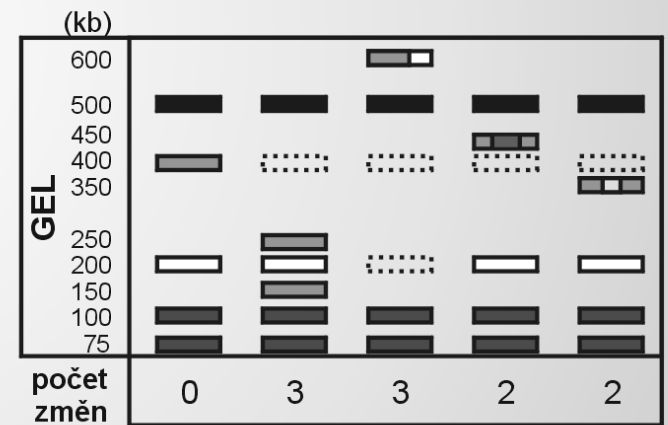
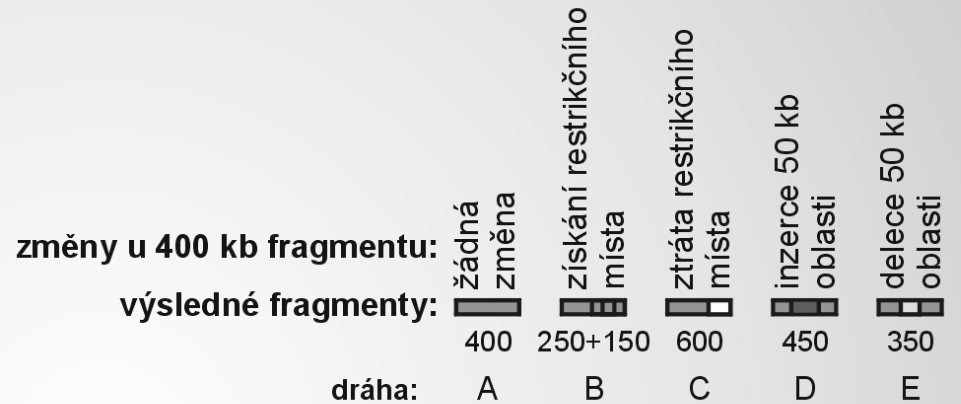
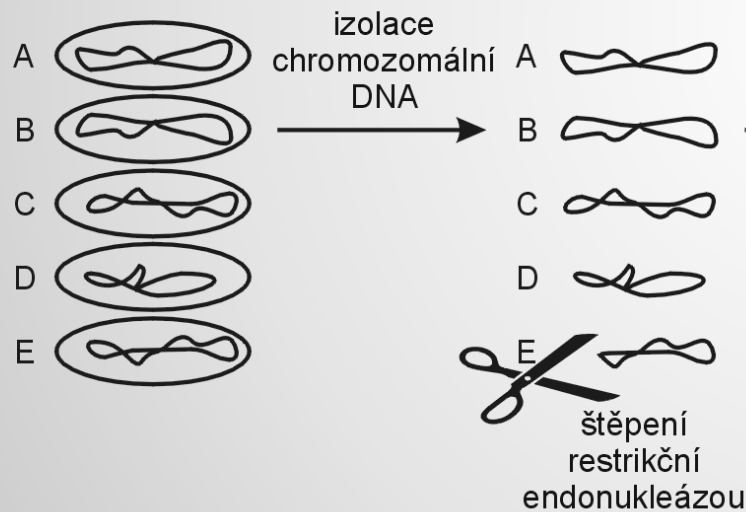
Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP), Inter-SINE amplified polymorphism (ISAP), Sequence specific amplified polymorphism (S-SAP), Intron length polymorphisms (ILPs), Inter small RNA polymorphism (iSNAP), Direct amplification of length polymorphisms (DALP), Promoter anchored amplified polymorphism (PAAP), Target region amplification polymorphism (TRAP), Conserved region amplification polymorphism (CoRAP), Start Codon Targeted Polymorphism (SCoTP).....

1. RFLP

Polymorfizmus délky
restrikčních fragmentů
(Restriction Fragment Length
Polymorphism)

Princip RFLP

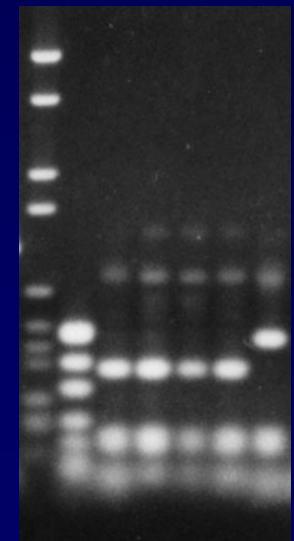
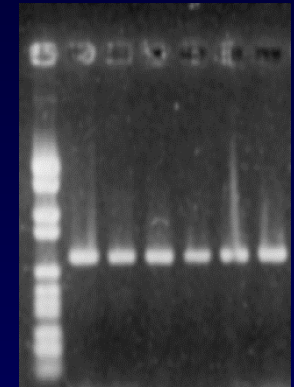
RFLP vzniká přestavbami sekvencí
 inzercemi
 delecemi
 substitucemi bazí uvnitř restričních míst



gelová elektroforéza / Southernova hybridizace

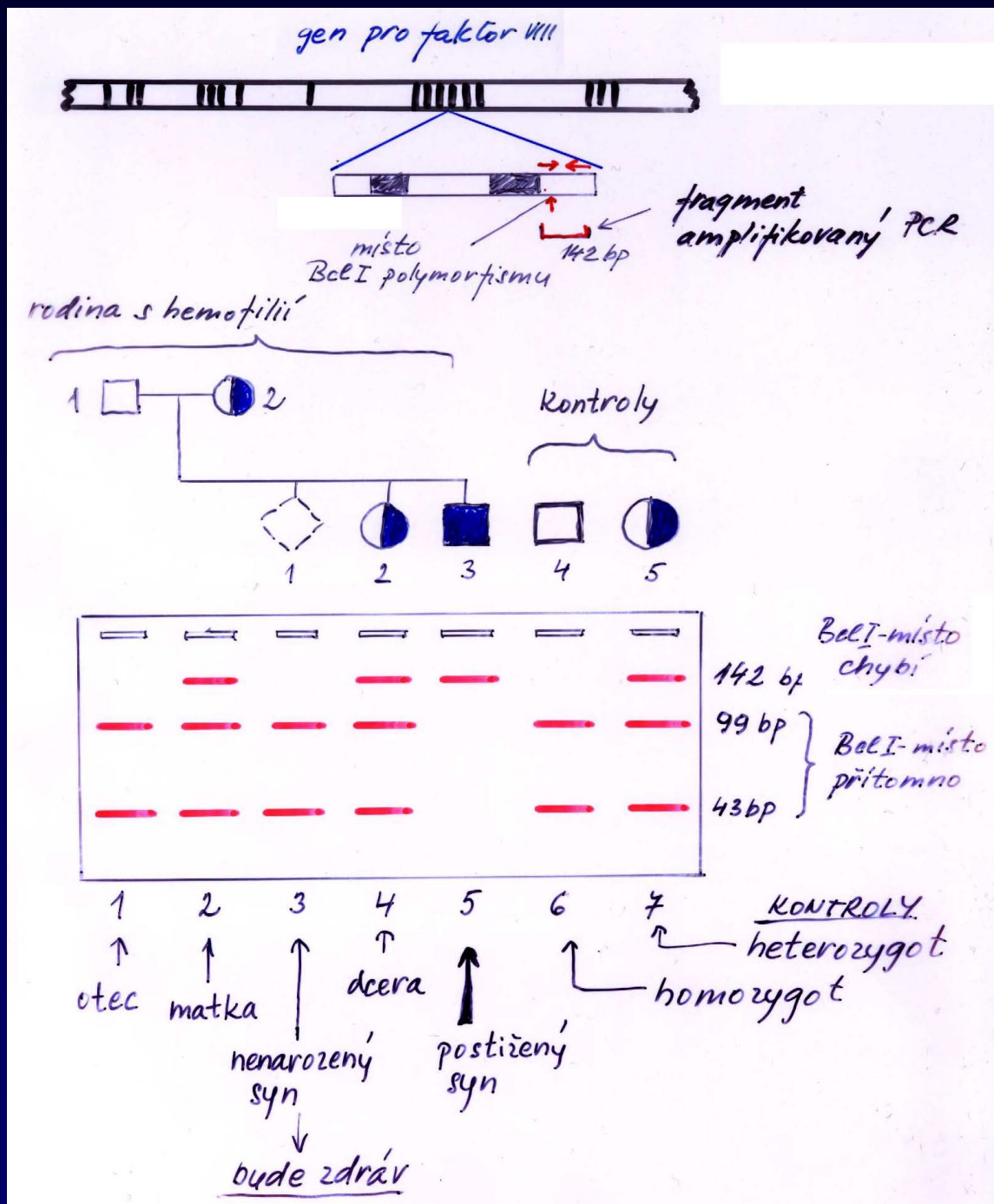
PCR-RFLP (na úrovni genů)

- Amplifikace známé sekvence se dvěma specifickými primery
 - Cílová sekvence (obvykle určitého genu) o délce 1 až 2 kb je amplifokována při vysoce stringentních podmínkách.
 - Výsledkem amplifikace jsou amplikony (PCR produkty o stejné délce) detekované elektroforeticky
- Amplikony jsou štěpeny restriční endonukleázou se 4 bp rozpoznávacím místem a poté opět analyzovány pomocí elektroforézy
- Separace fragmentů DNA v agarózovém nebo polyakralamidovém gelu.
- Srovnání restričních fragmentů amplifikované DNA u různých vzorků.



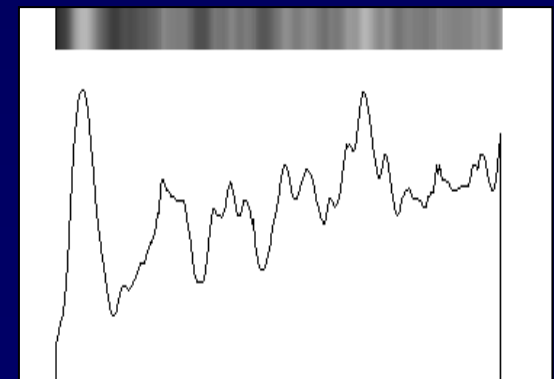
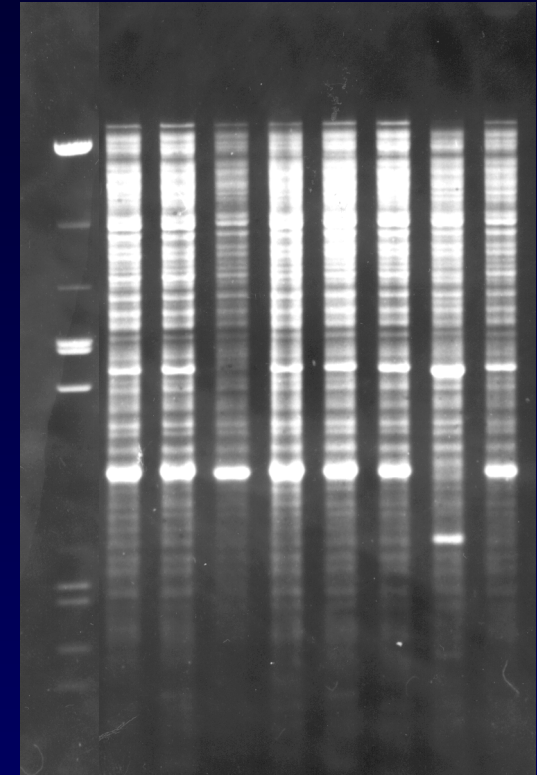
Prenatální diagnóza hemofilie pomocí PCR-RFLP

- V analyzované oblasti DNA mohou být až tři místa *BclI*, přičemž jedno z těchto míst v intronu 18 je polymorfní.
- Fragment DNA o délce 142 bp obklopující polymorfní místo *BclI* je nasyntetizován s pomocí oligonukleotidových primerů.
- Normální alela má *BclI* místo a proto je fragment štěpen na 99 + 43 bp fragmenty
- Polymorfní místo může
 - chybět na obou chromozomech (5),
 - přítomné na jednom a chybět u druhého (2,4,7)
 - nebo být přítomné na obou (1,3,6).



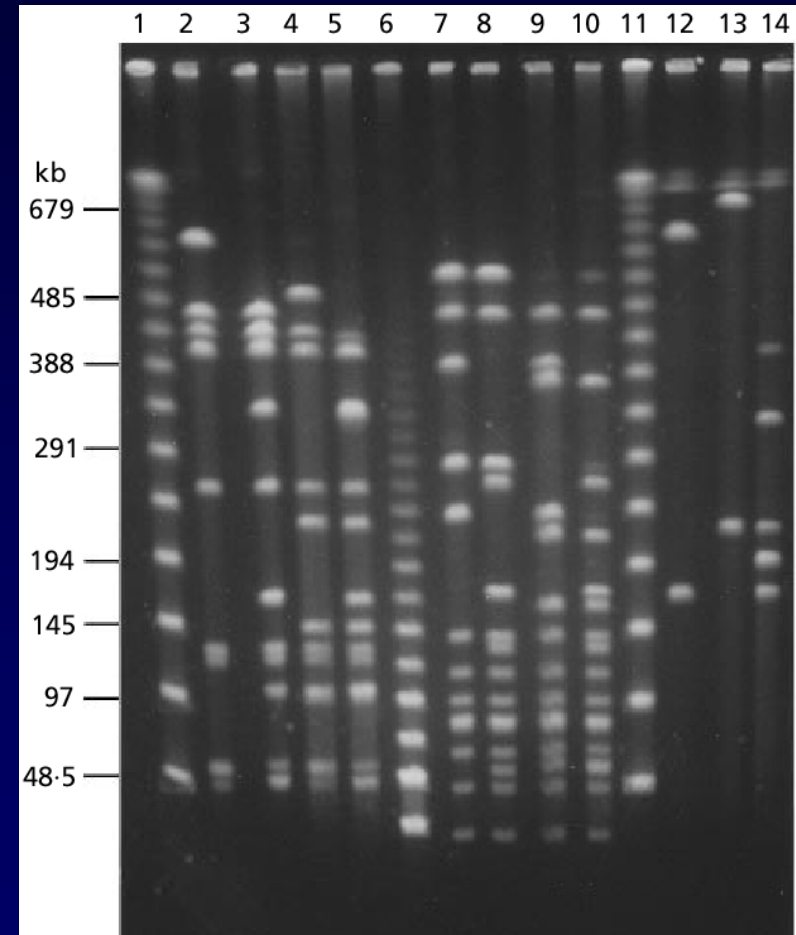
Restrikční analýza chromozomální DNA (REA)

- Nevýhodou RE analýzy celkové chromozomální DNA je velké množství vytvářených restriktů s podobnou pohyblivostí v tradičním agarózovém gelu.
- Výsledkem je spektrum pruhů vizuálně obtížně odlišitelných.
- Pro přesné vyhodnocení míry podobnosti spekter je nutné použít
 - densitometrické měření
 - korelační srovnání densitometrických křivek
- Analýzu zjednodušit hodnocením pouze
 - malých fragmentů 50 – 1000 bp (PAGE + barvení stříbrem)
 - velkých fragmentů 5 - 15 kb (FIGE)
- Přes uvedené obtíže byla REA použita ke studiu příbuznosti u řady bakteriálních druhů *Campylobacter*, *Legionella*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, streptokoky aj.



Makrorestrikční analýza chromozomální DNA pomocí PFGE

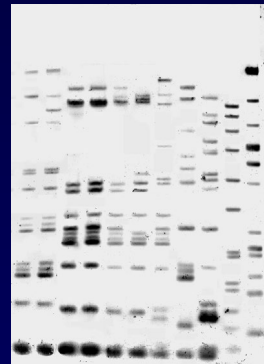
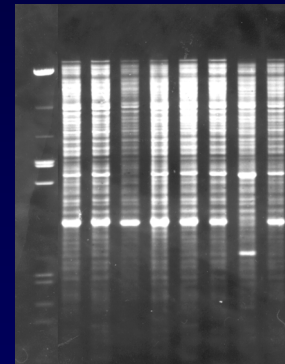
- Metoda slouží pro stanovení RFLP genomové DNA při použití restričních endonukleáz, které štěpí DNA na < 30 místech.
- Vznikají velké fragmenty chromozomální DNA (10 - 1000 kbp), které jsou separovány **pulzní gelovou elektroforézou**.
- Pro izolaci intaktní DNA není vhodná konvenční metoda, ale používá se specifický postup.



Příklad pulzní gelové elektroforézy DNA různých kmenů *Staphylococcus carnosus*.

Ribotypizace – selektivní hybridizace restričních fragmentů

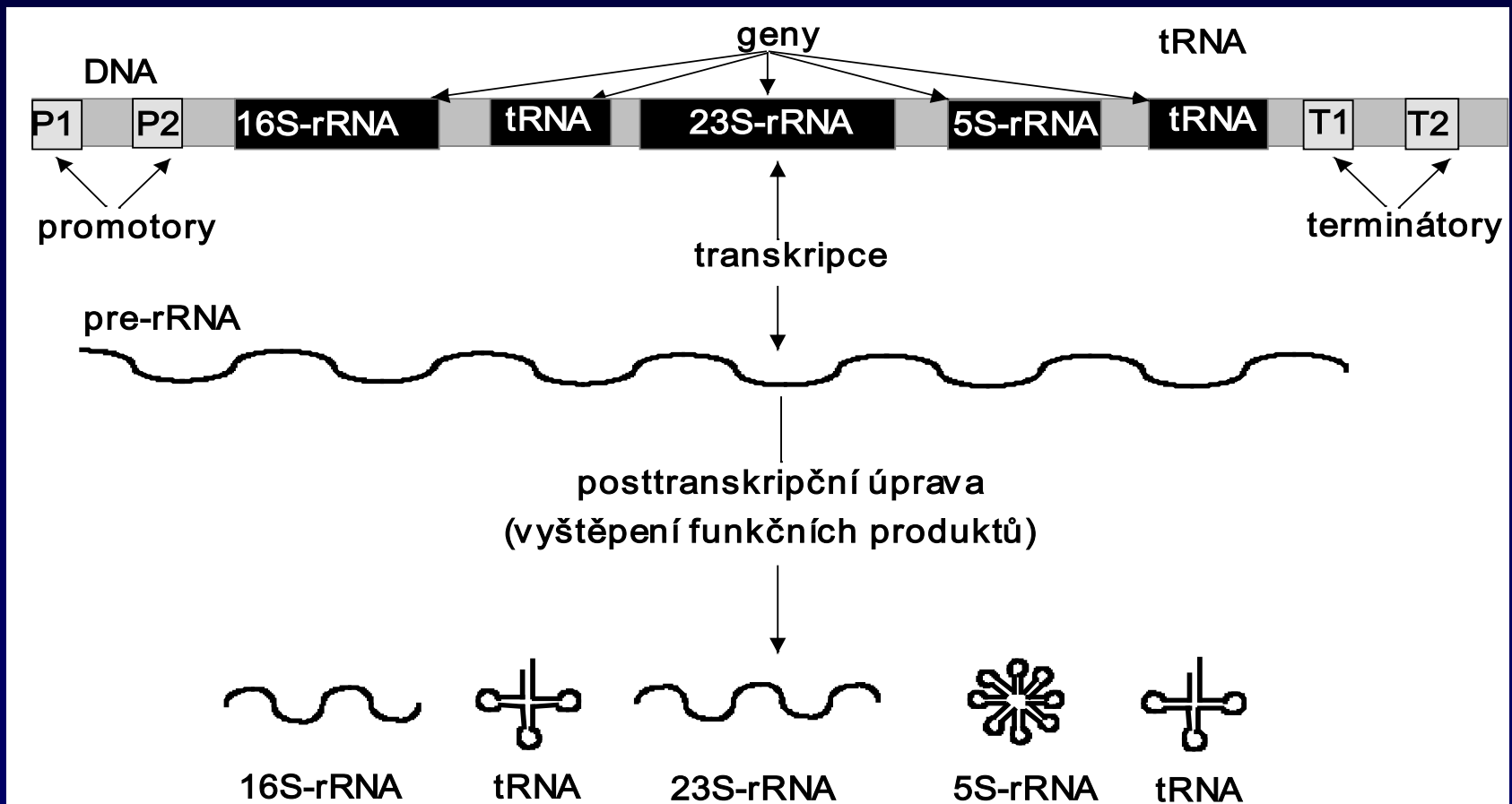
- Ribotypizace zahrnuje fingerprinting restričních fragmentů genomové DNA, které obsahují celý nebo část genu kódujícího 16S a 23S rRNA.



- Hlavní výhody ribotypizace:
 - Sekvence genů pro ribozomální RNA jsou konzervativní, proto pro ribotypizaci všech Eubakterií může být použita jediná sonda.
 - Jelikož většina bakterií obsahuje několik ribozomálních operonů, získáme po hybridizaci dostatečné množství fragmentů (signálů).

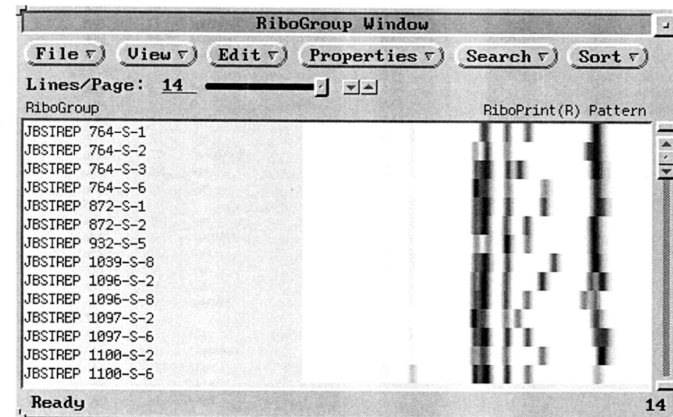
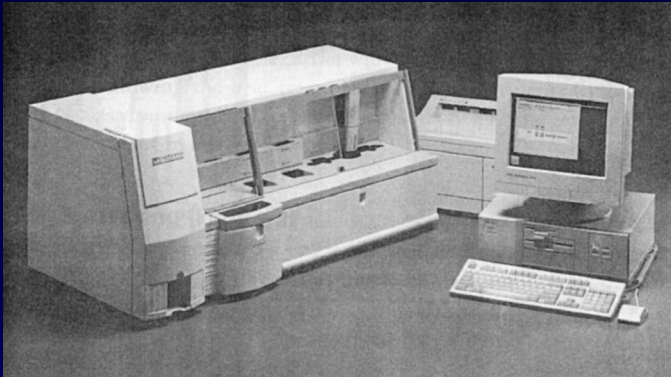
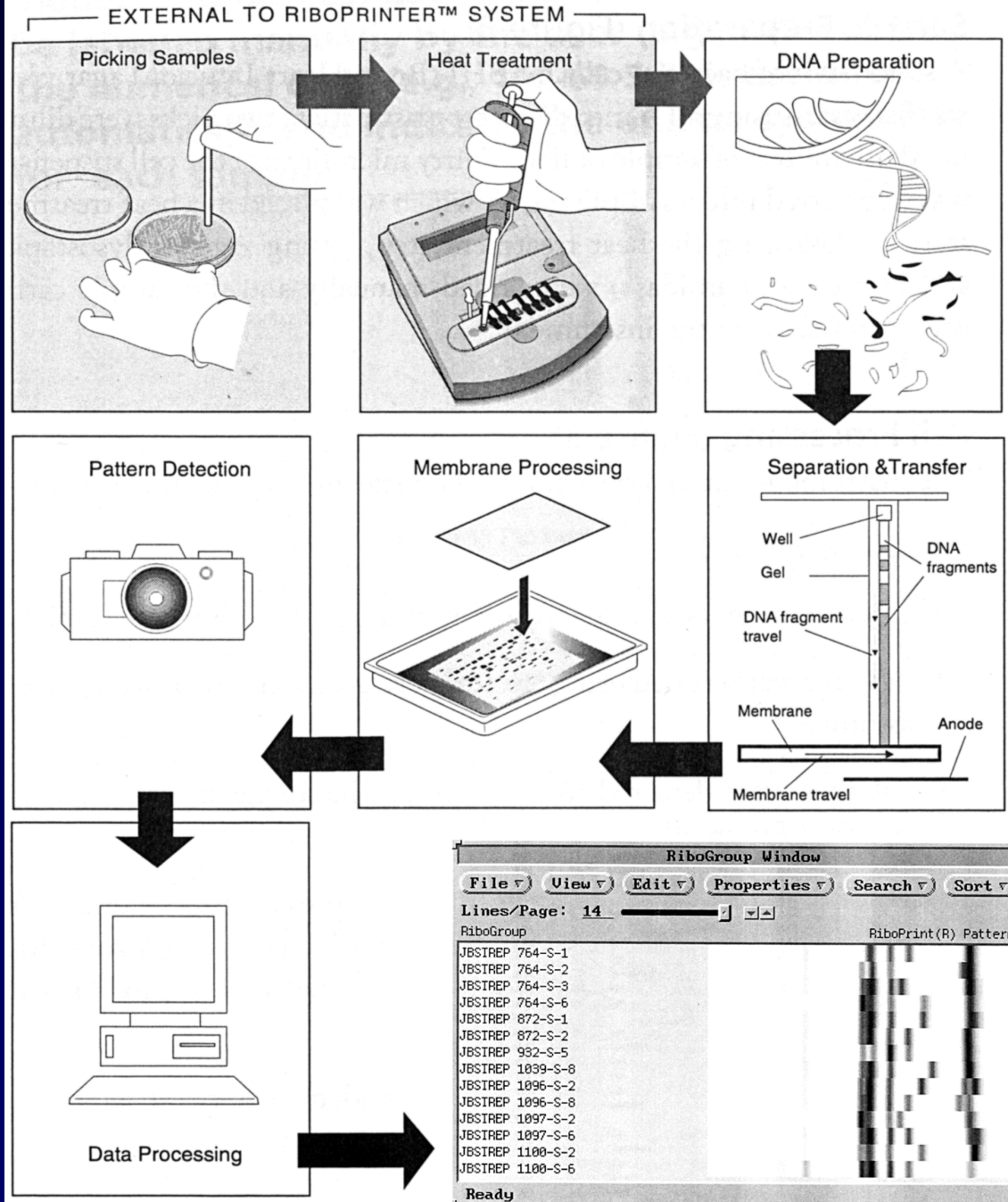
Charakteristika bakteriálního *rrn* operonu

- rRNA-operon (*rrn* operon) se vyskytuje na bakteriálním chromozómu v **několika kopiích**.



Automatizace ribotypizace

RiboPrinter™ System Work Flow



Selektivní hybridizace restričních fragmentů u eukaryot

Jednolokusové sondy

- Hybridizují k jedné hypervariabilní oblasti genomu a vytvářejí vzor o 1-2 proužcích
- Pro identifikační účely se používá směs („koktejl“) jednolokusových sond
- Jsou citlivější a dávají jednodušší obraz než multilokusové sondy
- Pro hybridizaci je třeba min 10 ng DNA

Mnoholokusové sondy

- Hybridizují k repetitivním sekvencím vyskytujícím se s četností 100 – 1000 v genomu
- Při Southernově hybridizaci se detekuje 20 – 30 proužků
- U člověka se využívá minisatelitů, z nichž 60 má společnou konvenční sekvenci
- Příklad hybridizace se sondou připravenou z minisatelitu v myoglobinovém genu s konvenční sekvencí GGAGGTGGGCAGGANG

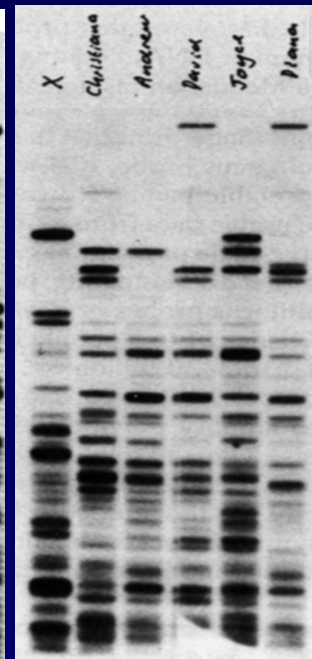
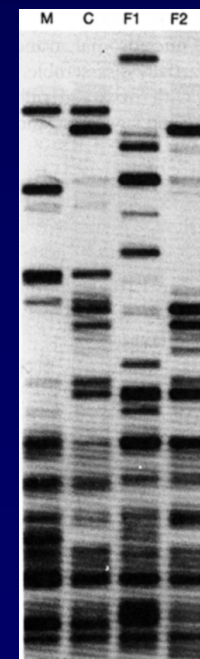
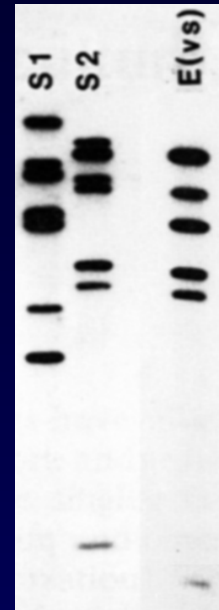
Sondy z transponovatelných sekvencí

- Transpozony
- Retrotranspozony

Sondy z dlouhých roztroušených elementů (LINEs)

Sondy z krátkých roztroušených elementů (SINEs)

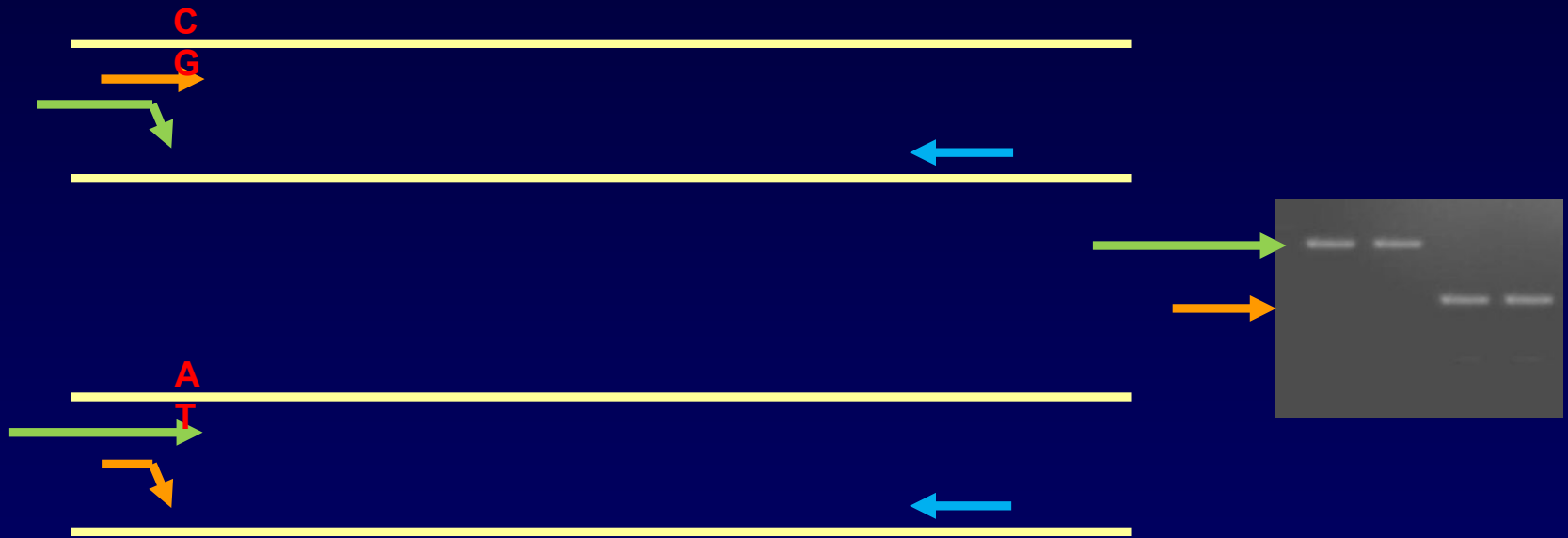
STRs (short tandem repeats) tetranukleotidové



Alelově specifická PCR (AS-PCR)

- Využití
 - Pro detekci bodových mutací v genomech
 - detekce homozygotního a heterozygotního stavu v klinických disciplínách
- Je prováděna ve dvou nebo více paralelních reakcích
 - V první reakci je horní primer komplementární ke standardní sekvenci
 - V další reakci k mutantní nebo polymorfní sekvenci
 - Spodní primer je v obou reakcích stejný
- Předpokládá se, že k elongaci dojde pouze tehdy, pokud jsou primer a cílová sekvence plně komplementární.
- Uvažujeme-li homozygotní stav, k amplifikaci bude docházet pouze v jedné reakci.
- Metoda byla popsána nezávisle pod různými označeními a využívá dva odlišné přístupy.
 - První přístup je založen na chybějící elongaci v důsledku chybného párování bází na 3'-konci primeru.
 - amplifikaci nedostupný mutační systém (ARMS),
 - PCR-amplifikace specifických alel (PASA)
 - alelově specifická amplifikace (ASA).
 - Ve druhém přístupu se chybné párování nachází ve střední části sekvence primeru a brání tak hybridizaci primeru k cílovému místu v případě, že se v templátové DNA vyskytuje.
 - kompetitivní připojení oligonukleotidu (COP).
- Pro snazší odlišení heterozygotního stavu v jediné reakci je používána varianta označená jako PCR-amplifikace více specifických alel (PAMSA) nebo dvojitý ARMS.
 - Jeden z alelově-specifických primerů obsahuje na 5'-konci přídatný úsek několika nekomplementárních nukleotidů, a tak mohou být amplifikační produkty obou alel rozlišeny na základě své délky.
- Metoda je obecně velmi citlivá na optimalizaci experimentálních podmínek reakce, zejména koncentrace jednotlivých reagentů a templátové DNA.

Alelově specifická PCR

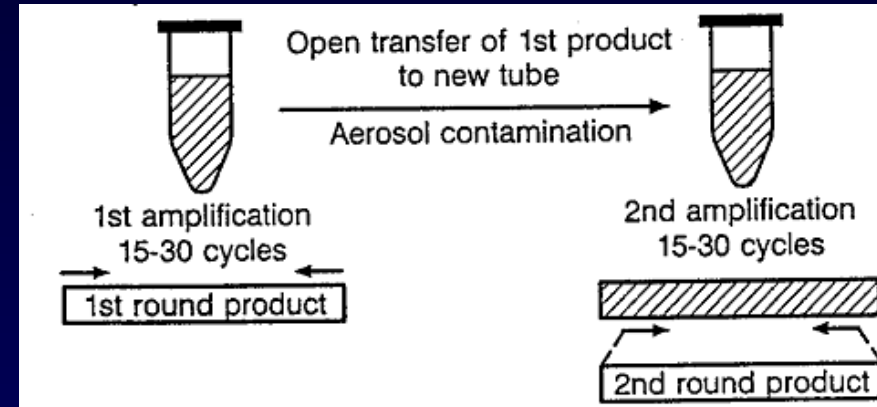


Odstupňovaná (nested) PCR

- Při PCR pomocí vnějších a vnitřních primerů se amplifikace provádí ve dvou krocích. Metoda má oproti standardní PCR velmi vysokou citlivost (nízká koncentrace templátu). Používají se 2 modifikace:

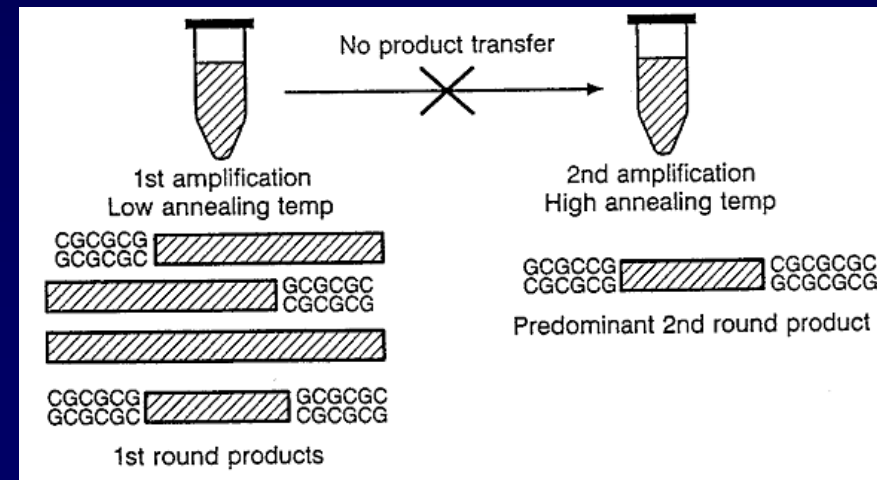
– Dvoukroková

- První kolo zahrnuje 15-30 cyklů amplifikace s jedním párem vnějších primerů.
- Potom je reakce převedena do druhé zkumavky a prováděna amplifikace zahrnující opět 15-30 cyklů s párem vnitřních primerů.



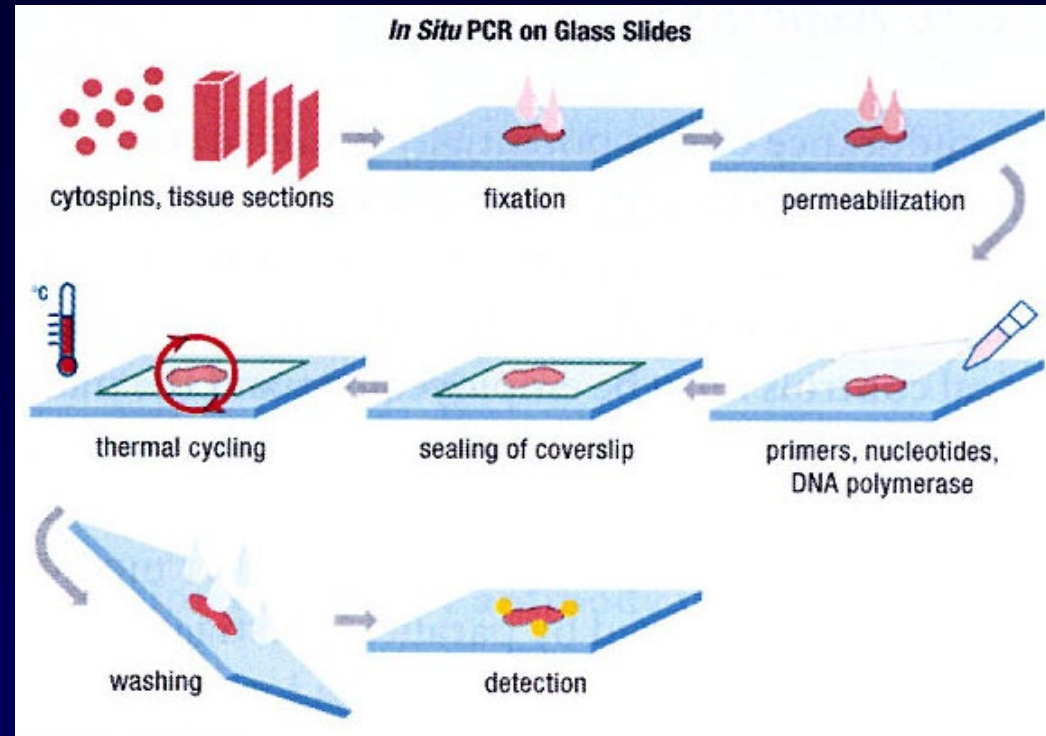
– Jednokroková

- První kolo amplifikace s jedním párem primerů se provádí při nestringentních podmínkách (nižší teplota pro připojení primerů) s 10-15 cykly.
- Následuje reamplifikace zahrnující 15-30 cyklů při stringentních podmínkách s vnitřními primery, při které se ověří specifita amplifikace z prvního kola.



In situ PCR (PCR *in situ*, in cell PCR)

- Fixace buněk nebo tkáně – zachování morfologie (paraformaldehyd)
- Permeabilizace - přístup PCR reagentů k NK (detergenty, proteázy)
 - průběh PCR
 - v buněčných suspenzích
 - v cytocentrifugačních preparátech
 - pod mikroskopickým sklem
- Detekce intracelulárních produktů
 - PCR–*in situ* hybridizace (ISH)
 - Imunochemicky (protilátky proti DIG-11-dUTP, fluorescein-dUTP, 3H-CTP)
- *In situ* PCR má aplikace jak ve výzkumu, tak v diagnostice:
 - detekce virových nebo provirových NK (HIV, CMV, HBV, HSV-2)
 - chromozomální přeskupení, translokace, hledání jednokopiových genů
 - mapování nízkokopiových chromozomálních sekvencí v metafázických chromozomech
 - detekce nízkokopiových mRNA a virových RNA



2. AFLP

Polymorfizmus délky
amplifikovaných fragmentů
(Amplified Fragment Length
Polymorphism)

Náhodně amplifikovaná DNA

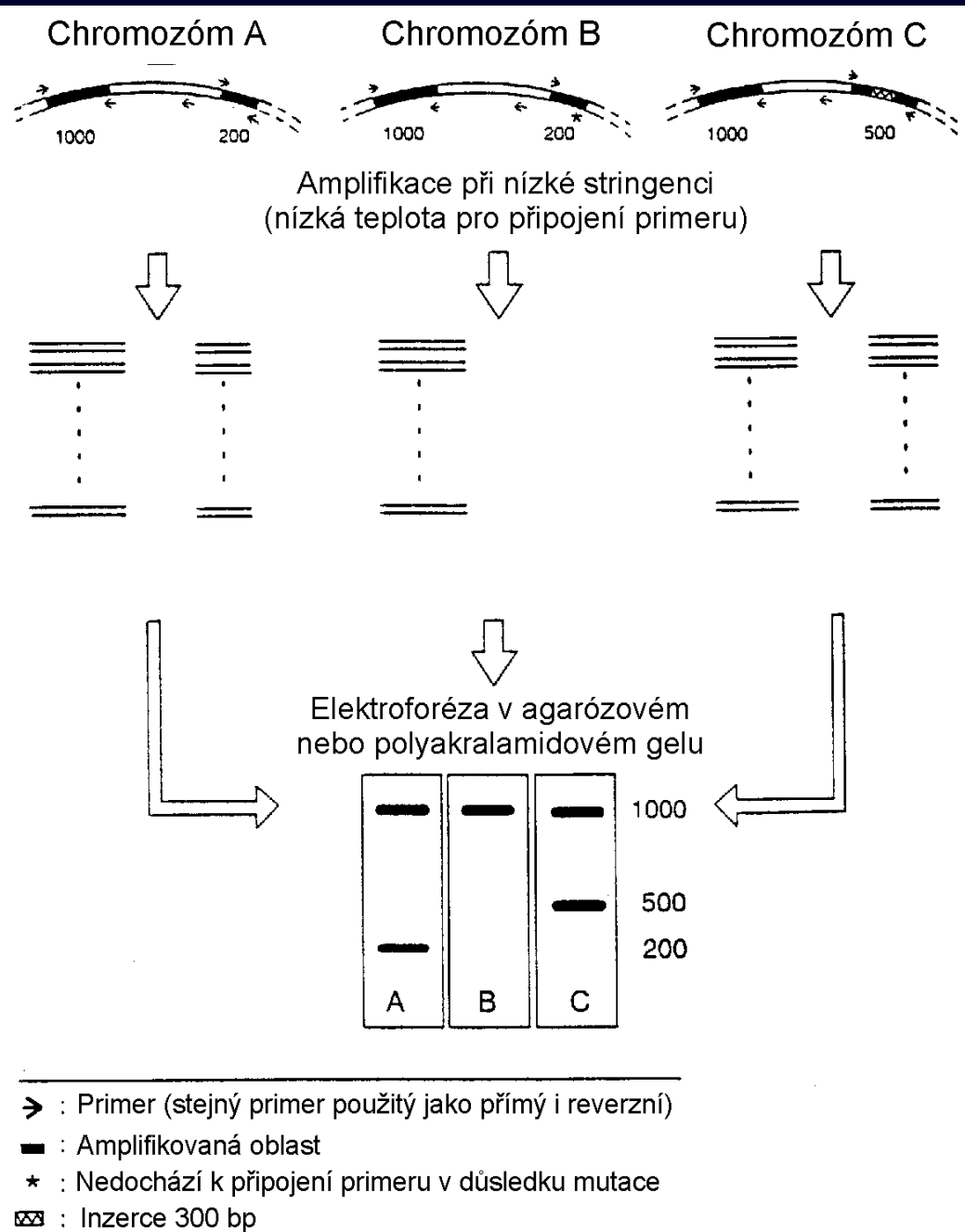
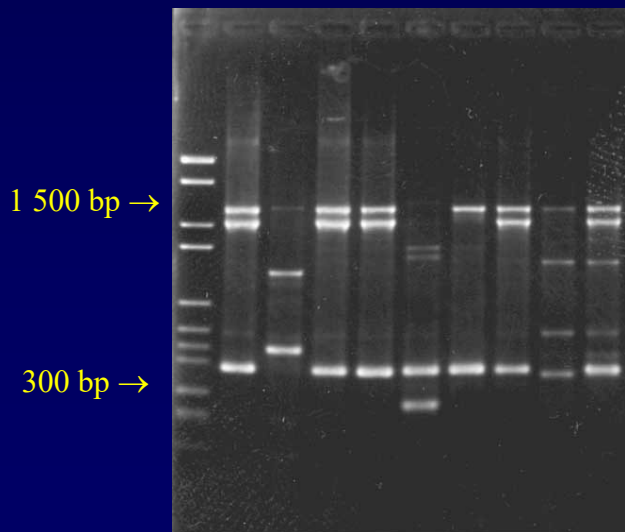
- Náhodná amplifikace využívající jeden nebo více primerů s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA
- Vzniká více amplikonů s různou velikostí a rozdílným molárním množstvím, nevyžaduje se proto štěpení restrikcí endonukleázami
- Úspěšná, rychlá a jednoduchá technika pro DNA fingerprinting popsaná nezávisle pod různými označeními:
 - **AP-PCR** (arbitrarily primed PCR fingerprinting)
 - **RAPD** (randomly amplified polymorphic DNA)
 - DAF (DNA-amplified fingerprinting)
 - MAAP (multiple arbitrary amplicon profiling)
 - PCR-mediated genotyping
- Princip metody:
 - Metoda používá obvykle jeden krátký primer (8 - 10 bp nebo M13).
 - Teplota pro připojení primeru je nižší než teoretická hodnota T_a .
 - Za těchto podmínek dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích chromozomální nebo plazmidové DNA.
 - Obvykle se vyskytne několik míst pro nasednutí primeru na protilehlých řetězcích, která nejsou od sebe příliš vzdálená, a umožní vznik produktu.
 - Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou (max. 2000 bp).

Náhodně amplifikovaná DNA

- Použití:
 - Rychlá typizace většiny izolátů mikroorganismů
 - Typizace genomové rostlinné DNA z různých kultivarů
 - Taxonomické studie a identifikační postupy
 - Analýza mikrosatelitů
 - AP-PCR může být kombinována s DGGE nebo SSCP analýzou.
 - Produkty AP-PCR slouží pro přípravu hybridizačních sond používaných při binární typizaci
 - Metoda má vyšší diskriminační schopnost než PCR 16S-23S mezerníkových oblastí, ale nižší než Rep-PCR.
- Nevýhody:
 - Nízká reprodukovatelnost mezi laboratořemi.
 - Částečné zvýšení reprodukovatelnosti je možné provedením reakce s různým ředěním DNA. Výsledek ovlivňují plazmidy přítomné v izolované DNA.

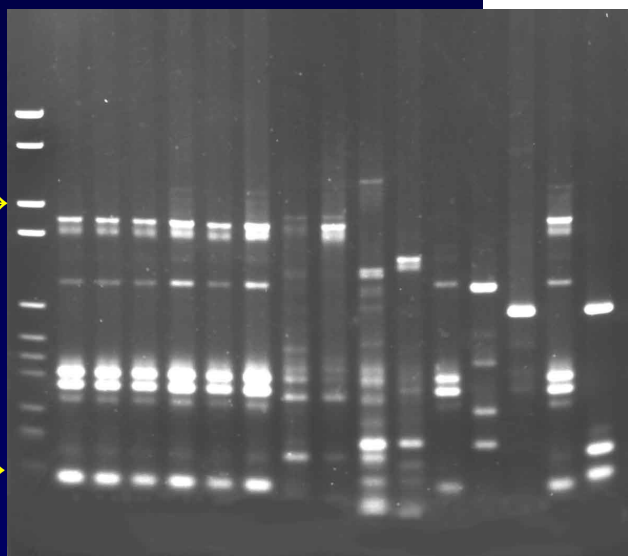
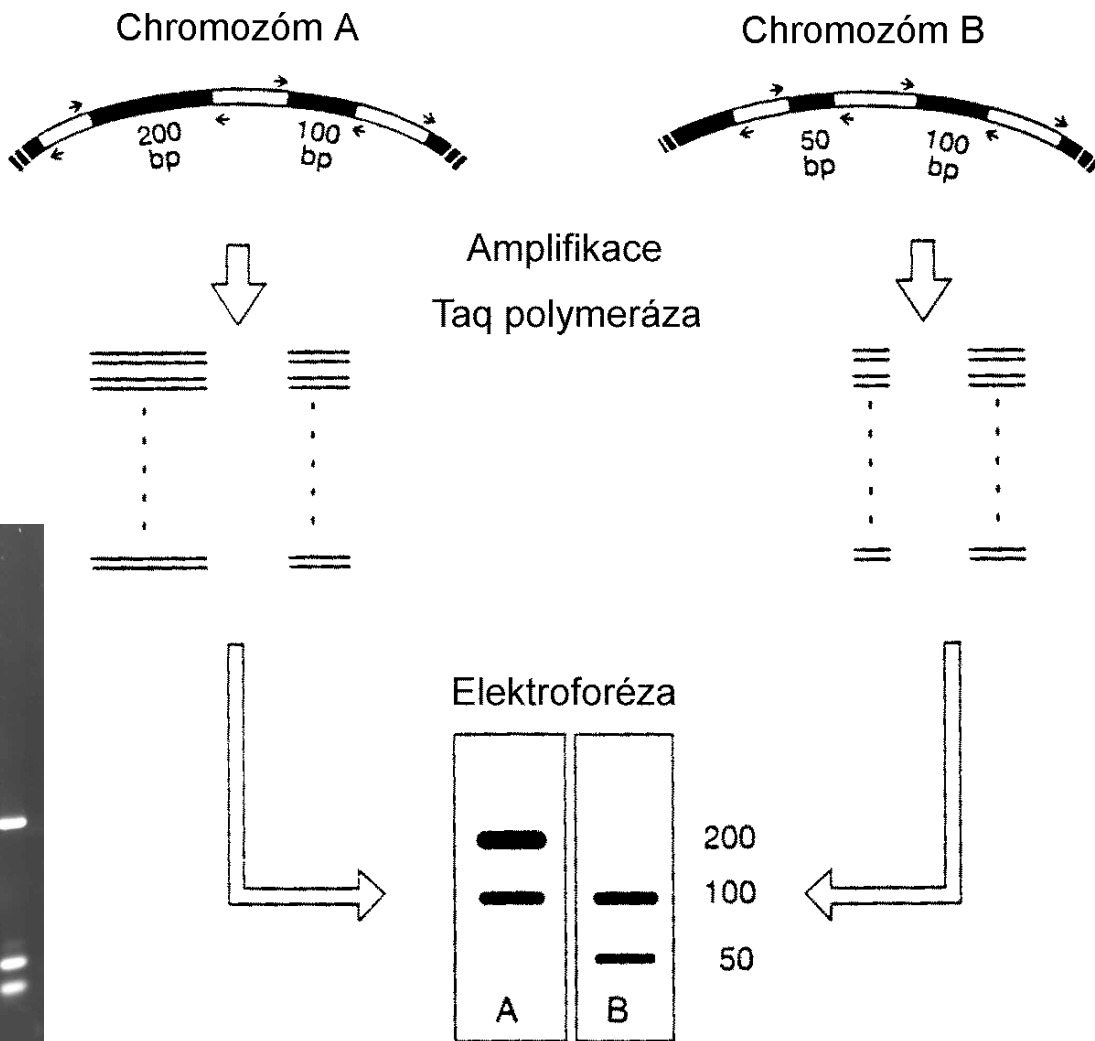
Náhodně amplifikovaná DNA (AP-PCR)

Příklad elektroforézy s AP-PCR produkty



Interrepetitivní PCR

Primery cílí na konce repetice a amplifikují oblasti mezi nimi



- Konsenzní primery směřující 3' koncem z rep. oblastí
- Repetitivní element
- Oblast mezi repeticemi (amplifikovaná)

Alu-PCR

- PCR je používána k amplifikaci DNA sekvencí specifických pro člověka, představuje velmi jednoduchý prostředek k charakterizaci a amplifikaci právě jen lidské DNA.
- Metoda používá primery pro repetitivní sekvence, které jsou inzertovány na mnoha místech genomu. Z těchto elementů jsou Alu-sequenze (opakování) přítomny v množství 900 000 kopií v lidském genomu.
- Tato 300-bp *Alu*-repetice je velmi variabilní, ale obsahuje sekvenci, která je specifická pro člověka. Připraví se dva primery, každý pro jeden směr, přičemž se využije nejvíce konzervativních úseků těchto sekvencí.
- Primery nelze použít společně, neboť vzájemně hybridizují. Sekvence *Alu* však mohou být přítomny na DNA v obou směrech, takže primery se používají samostatně.
- Lidské sekvence se budou amplifikovat, pokud leží mezi sousedními *Alu*-repeticemi, které jsou umístěny (orientovány) v opačných směrech. Tvoří se různý počet fragmentů lidské DNA v závislosti na velikosti lidské DNA v buněčné linii. Tato technika je často používána pro "odhalení" lidské DNA od ostatních DNA.

Alu-PCR

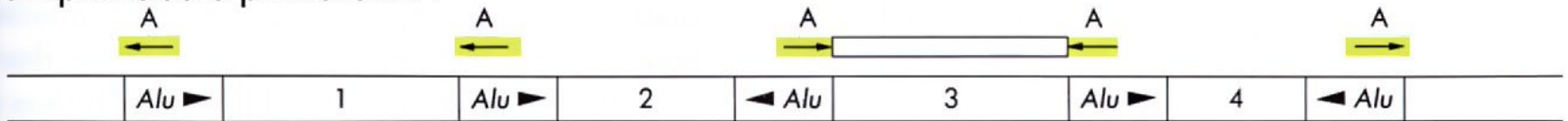
Primer A 3' AACGTCACTCGGCTCTA 5'

Část Alu sekvence
jedinečná pro primáty

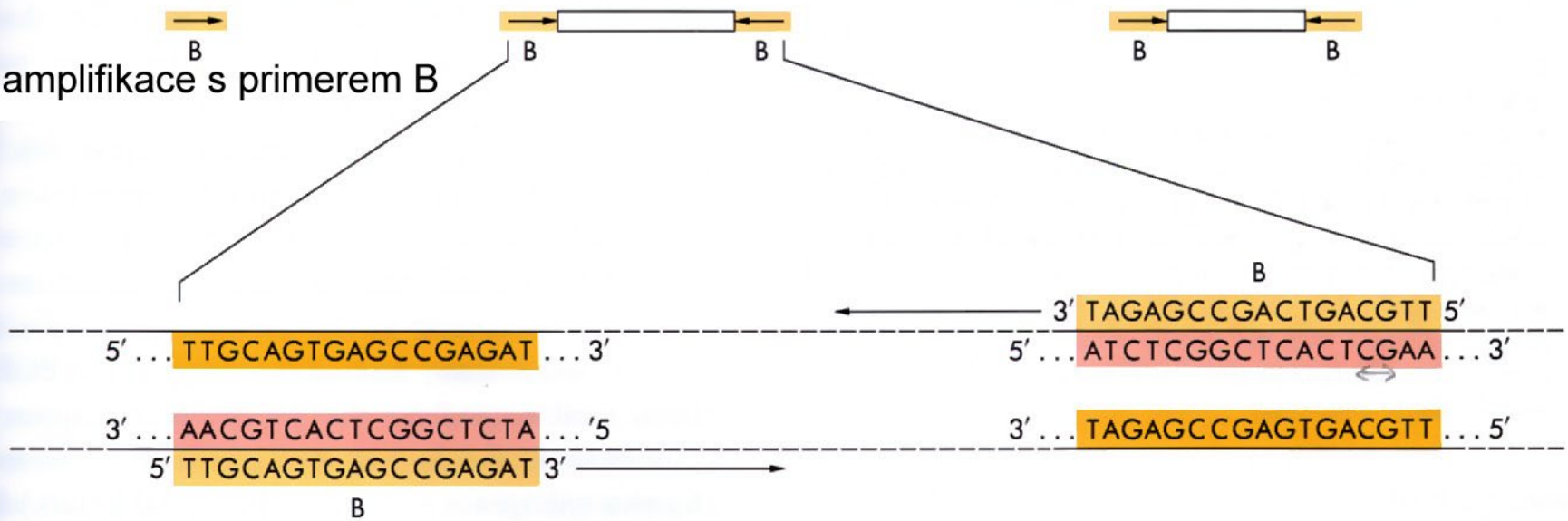
5' ... TTGCAGTGAGCCGAGAT ... 3'
3' ... AACGTCACTCGGCTCTA ... 5'

Primer B 5' TTGCAGTGAGCCGAGAT 3'

amplifikace s primerem A



amplifikace s primerem B



3.

SSLP (VNTR)

Polymorfizmus délky
jednoduchých repetitivních
sekvencí (variabilní počet
tandemových repetice)

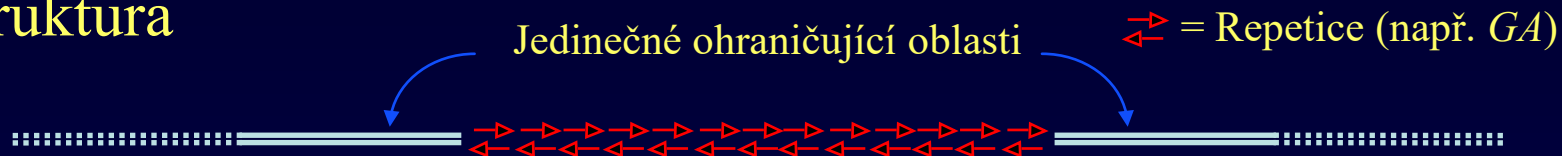
(Simple Sequence Length
Polymorphism)

Polymorfizmus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP-PCR)

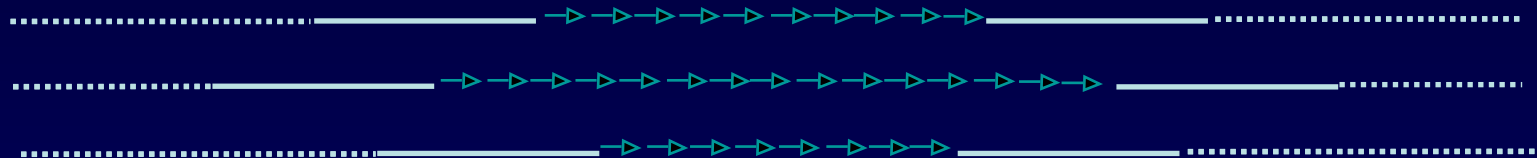
- Jednoduché repetitivní sekvence (SSR) jsou tandemové repetice o délce 2 až 10 bp (např. mikrosatelity) přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80.
- V důsledku mutací nebo rekombinace se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit.
- Primery pro tuto metodu jsou navrhovány tak, aby se připojovaly oblastem ohraničujícím SSR.
 - Tyto ohraničující sekvence bývají konzervativní pouze v rámci druhu a proto je nutné navrhovat pro každý druh novou sadu primerů.

Příklad amplifikace mikrosatelitů

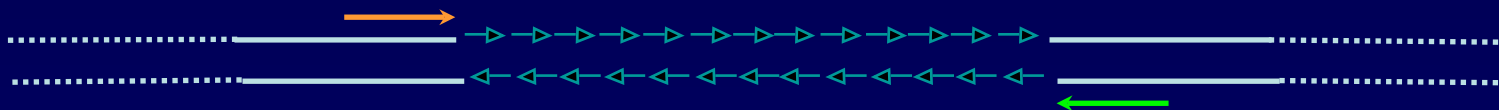
➤ Struktura



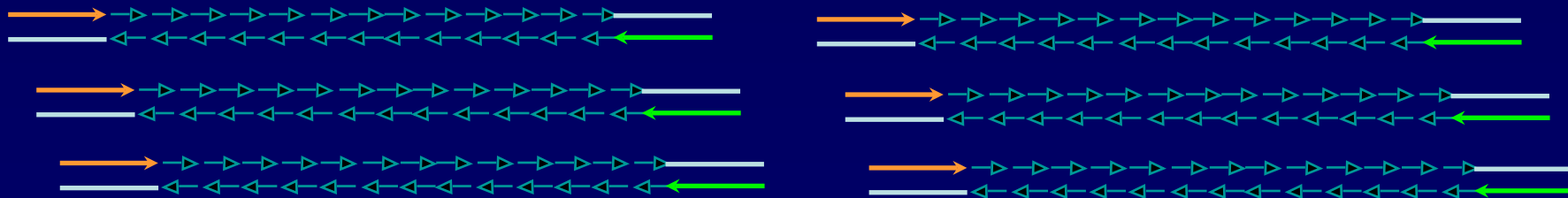
➤ Počet repeticí je velice variabilní mezi jedinci



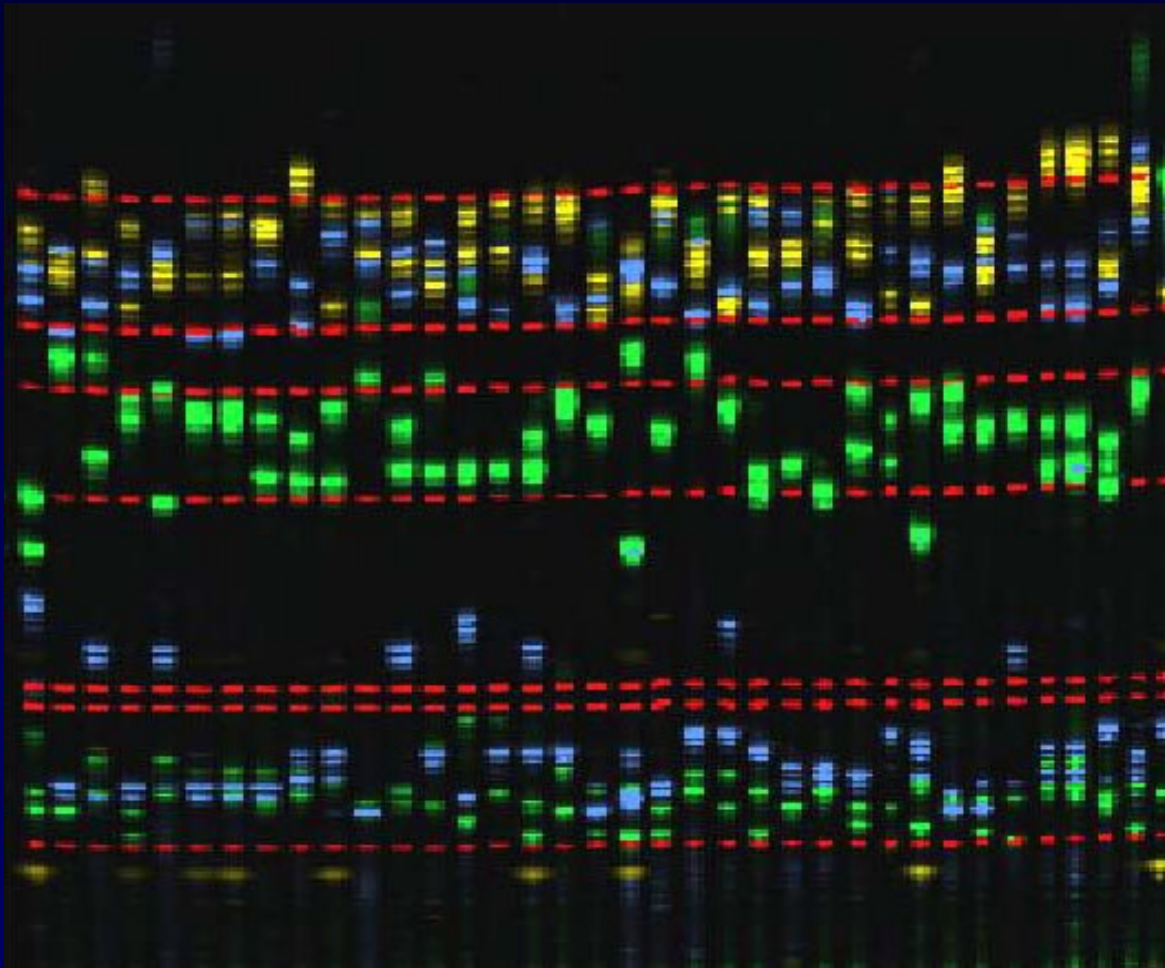
Návrh primerů (↔) komplementárních k ohraničujícím sekvencím



Amplifikace repeticí pomocí PCR

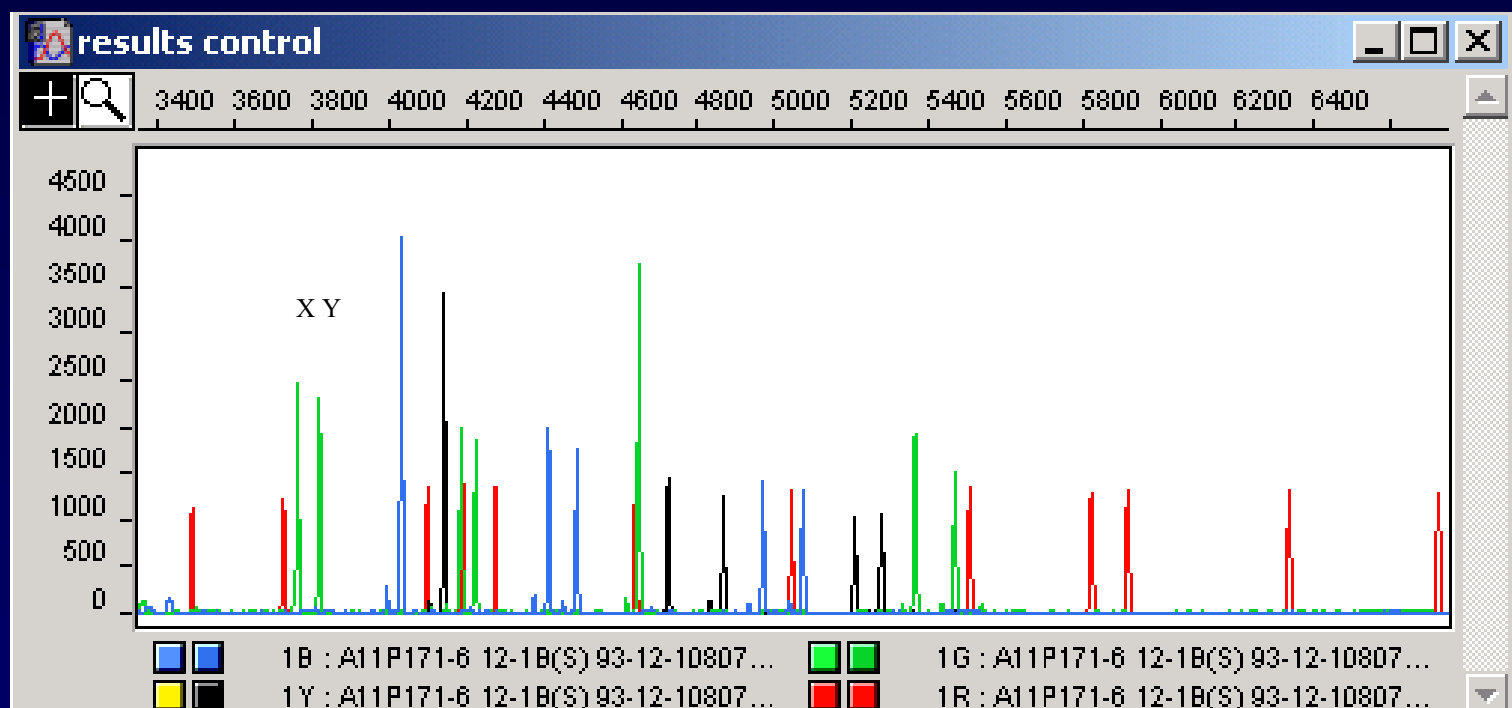


Multiplex PCR-SSLP



Fluorescenční
značení primerů
pro amplifikaci
mikrosatelitů
umožňuje
amplifikaci
několika lokusů

Příklad elektroforetogramu s výsledkem multiplex PCR s fluorescenčně značenými primery



Stanovení SSLP na automatickém sekvenátoru

CODIS markery pro identifikaci u člověka

- The official order of the 13 core CODIS loci given within the CODIS system itself is:
 - CSF1PO
 - FGA
 - THO1
 - TPOX
 - VWA
 - D3S1358
 - D5S818
 - D7S820
 - D8S1179
 - D13S317
 - D16S539
 - D18S51
 - D21S11
- Sometimes, the following two loci used more in Europe than America are added to make a standard 15:
 - D2S1338
 - D19S433

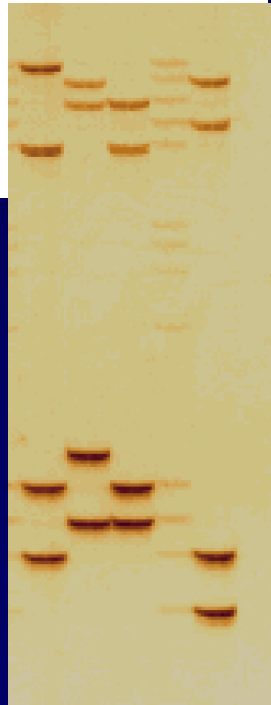
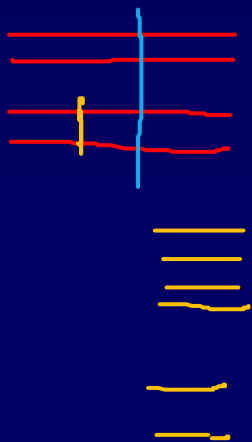
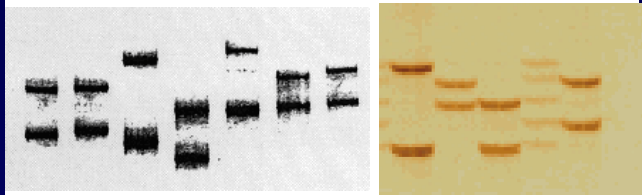
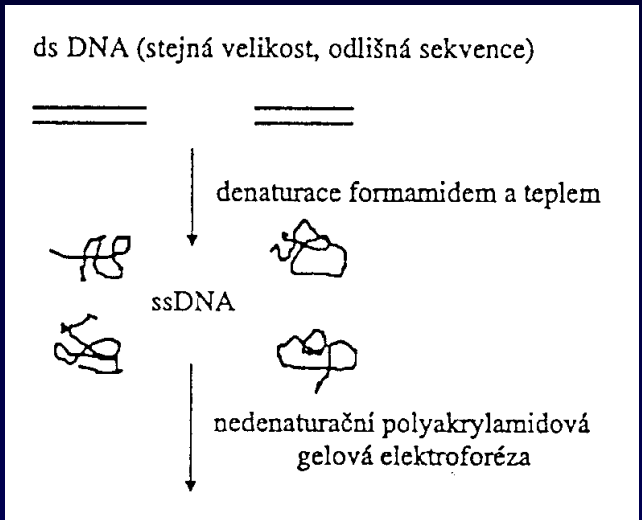
Určení pohlaví pomocí analýzy DNA

- PCR cílené pro unikátní oblasti chromozomu Y
 - Gen SRY (Sex-determining region)
 - Nevýhoda DNA XX je netytovatelná
 - Možné falešné výsledky při inhibici PCR
- PCR genu pro amelogenin
 - Kóduje protein nacházející se v zubní sklovině
 - 1 kopie genu na obou pohlavních chromozomech
 - Amplifikována oblast s 6 bp delecí v genu na chr. X
 - Mužská DNA 2 různě velké produkty 106 a 112 bp, ženská DNA 1 produkt 106 bp

4. SSCP

Polymorfizmus konformace
jednořetězců
(Single-Strand Conformation
Polymorphism)

Princip metody SSCP – viz elektroforéza



- zvýšení účinnosti SSCP se dosahuje různými modifikacemi:
 - RFLP-SSCP
 - přístup kombinující štěpení DNA restriktázami s následnou SSCP
 - vzdálenost polymorfizmu od konce fragmentu
 - Vazbou různých látek ovlivňujících elektroforetickou mobilitu ssDNA
 - RNA-SSCP (je nutno připravit ssRNA transkripcí pomocí T7- nebo SP6-RNA polymerázy)
- SSCP je vhodná pro analýzu mutací v prokaryotických (rDNA), eukaryotických a virových genomech
- Homozygotní DNA vytváří 2 elektroforetické formy
- Heterozygotní DNA obsahující sekvence dvou různých alel vytváří 4 elektroforetické formy

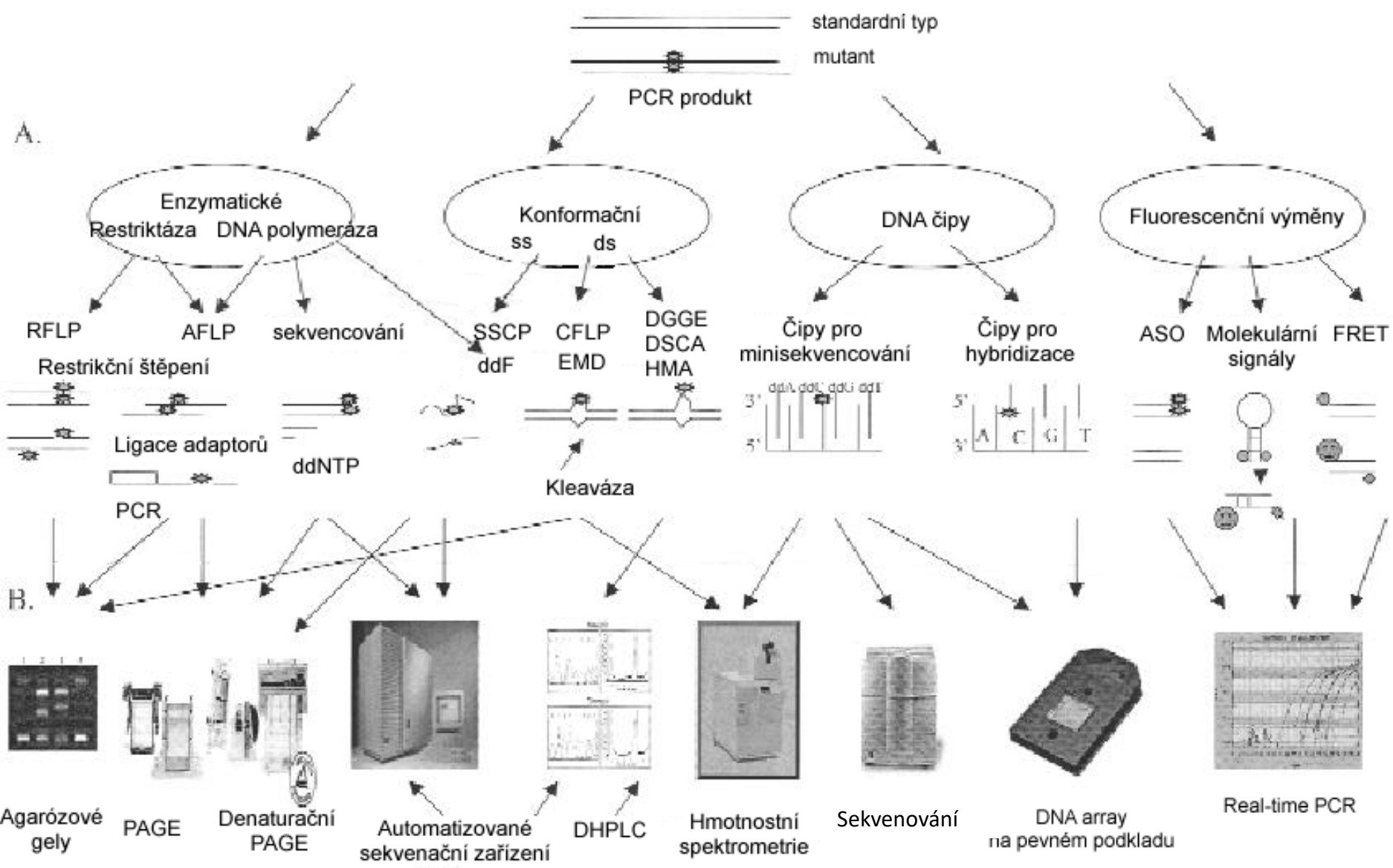
**Jednonukleotidové
polymorfizmy detekované
speciálními metodami
s vysokou rozlišovací
schopností**

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP)

Variabilita v počtu kopií genů (CNV)

Krátké inserce a delece (indels)

Schematické znázornění metod s vysokou rozlišovací schopností pro identifikaci polymorfizmů v genomech



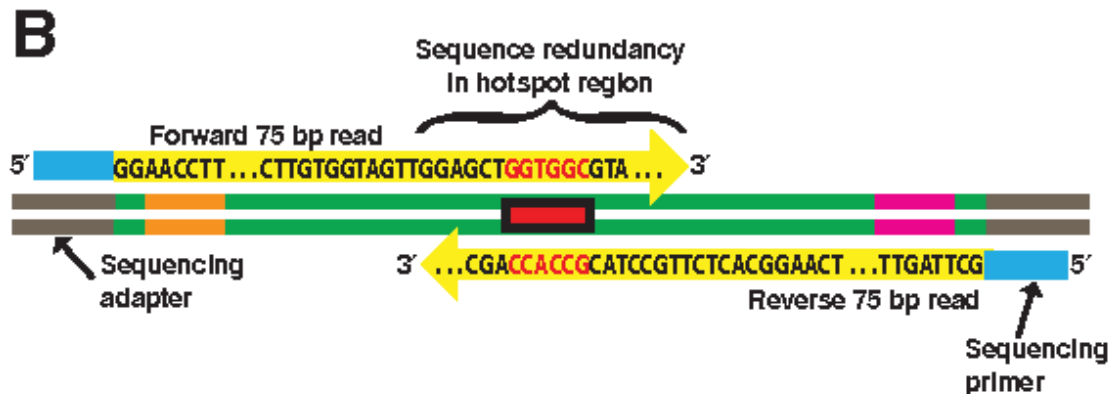
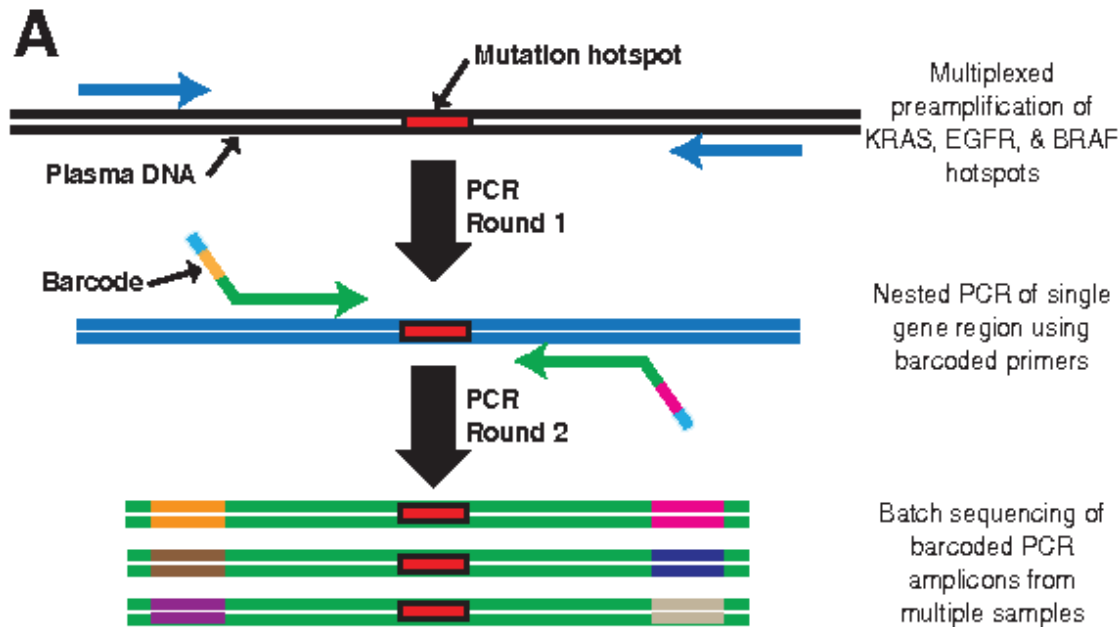
Aplikace sekvenování

- Celogenomové (WGS)
 - Krátká čtení
 - Dlouhá čtení
 - Hybridní assembly umožňuje získat celé chromozomy
 - Telomere-to-Telomere (T2T)
- Celoexomové
- Cílené – hotspot

Cílené (hotspot) sekvenování

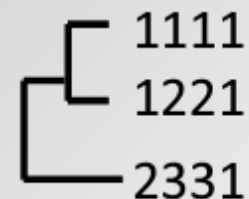
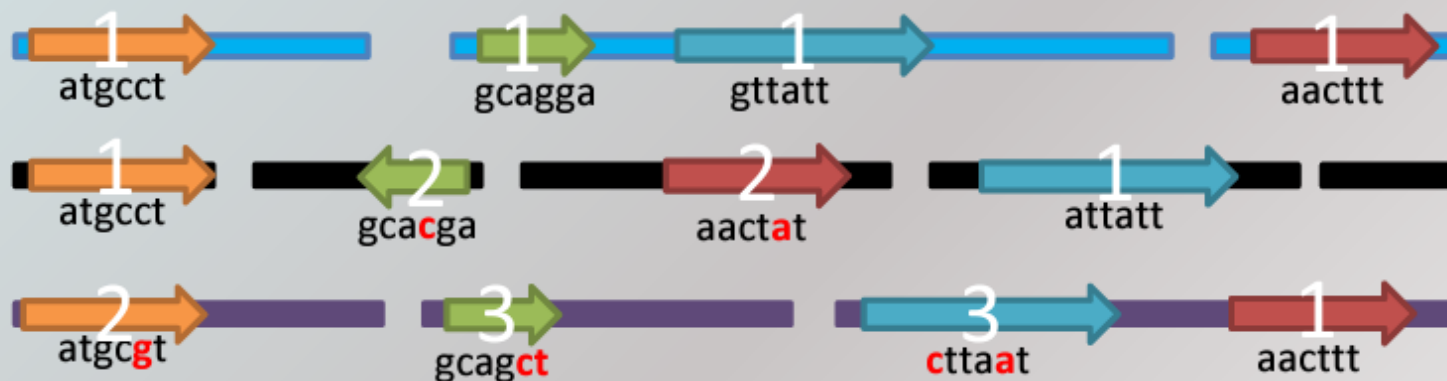
- Co nás zajímá
 - Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP)
 - Variabilita v počtu kopií genů (CNV)
 - Krátké inserce a delece (indels)
- Nádorové nebo zakázkové genové panely
 - Identifikace genetických biomarkerů asociovaných s onemocněním
 - Charakterizace genetických asociací s určitým fenotypem, jako je reakce na lék
 - Genotypizace
 - Návrh genetických testů, například pro farmakogenomiku nebo onkologii

Princip panelů pro hotspot sekvenování

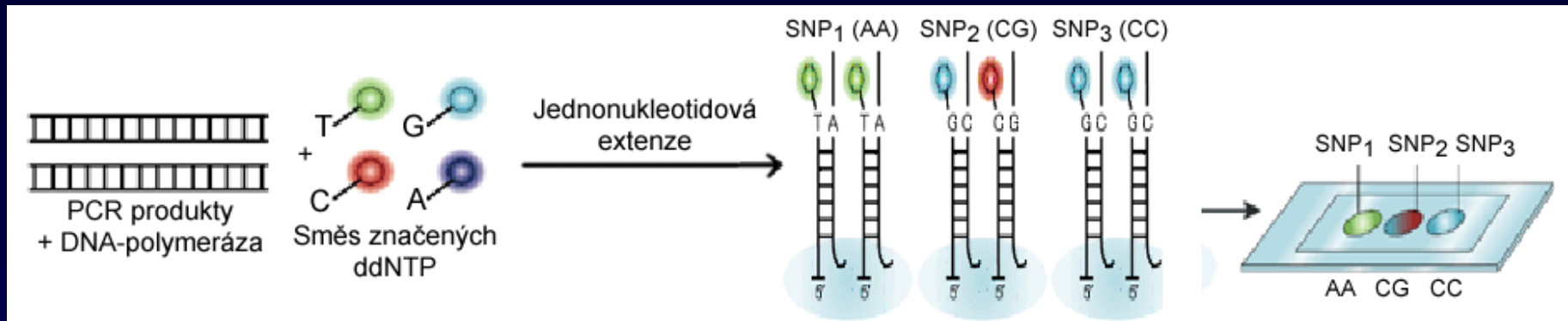


Whole genome multi locus sequence typing (wgMLST)

- Využití bioinformatických přístupů pro analýzu jednonukleotidových polymorfizmů
 - wgSNP - Whole genome SNP analysis
 - wgMLST - Whole genome MLST
 - cgMLST – Core genome MLST
- Vysoké rozlišení, reprodučibilní, hierarchická nomenklatura
- Vyžaduje vývoj daatabází alel, výběr vhodných alel, výpočetně náročné

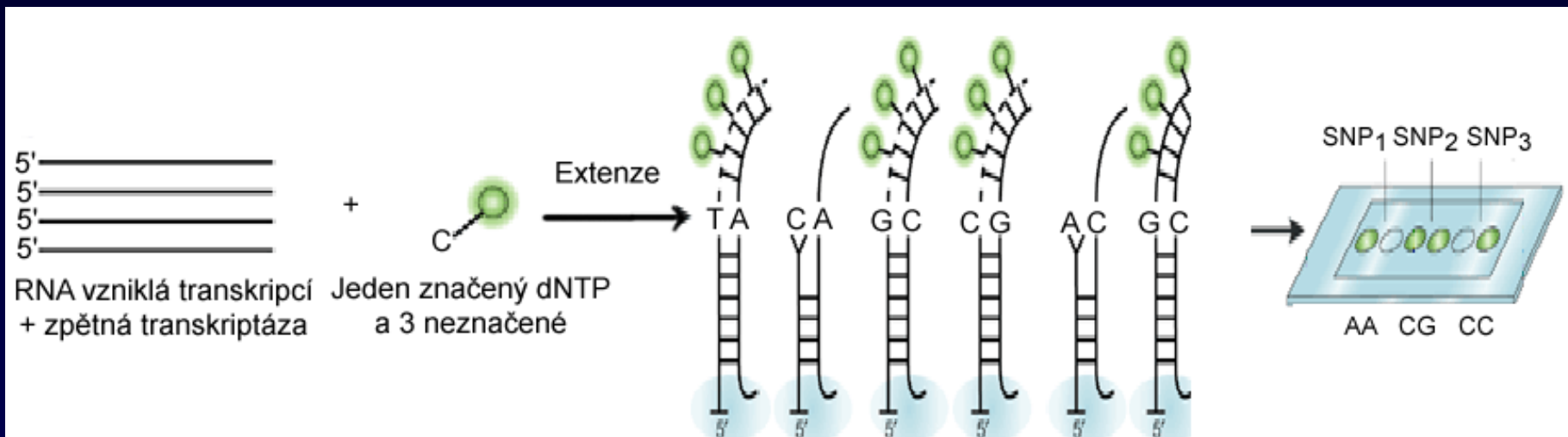


Minisekvenování - stanovení SNP pomocí DNA čipu



1. varianta - Prodloužení primeru vázaného na čipu

- Jeden primer pro každý SNP, který genotypizujeme je imobilizován na sklíčku.
- K čipu jsou přidány multiplex PCR produkty, 3' fluorescenčně značené ddNTPs a DNA-polymeráza.
- Proběhne prodloužení primeru o jeden ddNTP a výsledek reakce je vyhodnocen.
- Pozice primeru na čipu definuje, který SNP analyzujeme a fluorescence nukleotidu určuje genotyp příslušného SNP.



2. Varianta – Alelově specifické prodloužení primeru

- Na sklíčku jsou imobilizovány dva alelově-specifické primery s bází na 3'-konci komplementární k oběma možným variantám nukleotidů v každém SNP.
- Produkty multiplex PCR jsou přepsány do mnoha kopií RNA pomocí RNA-polymerázy.
- Molekuly RNA hybridizují k čipu a slouží jako templát pro prodloužení primeru, které je katalyzované pomocí zpětné transkriptázy
- Během zpětné transkripce jsou do každého produktu začleněny fluorescenčně značené dNTP.
- Pro homozygotní genotypy je signál tvořený pouze jedním ze dvou alelově-specifických primerů kdežto u heterozygotních genotypů je signál tvořený oběma primery.

Digitální PCR (dPCR)

- Vyvinuta z droplet digital PCR (emulzní)
- nanojamkové přepážky o počtu až 100.000 na destičku, do kterých je naplněna reakční směs
- cílové sekvence koncentrovány v izolovaných mikroreaktorech
- distribuce do mikroreaktorů snižuje kompetici templátu a umožňuje vyšší toleranci k inhibitorům přítomným ve vzorku

- absolutní kvantifikace
- copy number variation
- detekce SNP
- analýza exprese genů

