

# Detekcia mutácií v ľudskom genóme

## A. IDENTIFIKÁCIA NEZNÁMYCH MUTÁCIÍ

## B. DETEKCIA ZNÁMYCH MUTÁCIÍ (diagnostické metódy)

## A. IDENTIFIKÁCIA NEZNÁMYCH MUTÁCIÍ

### I. Referenčná metóda: sekvenovanie

### II. Skriningové metódy založené na analýze:

#### 1. *homoduplexných nk:*

- DGGE (TGGE)
- SSCP, REF

#### 2. *heteroduplexných nk:*

- HA (elektroforéza)

## B. DIAGNOSTICKÉ METÓDY (cielená detekcia známych mutácií):

- RA
- ACRS
- ASO (SSO)
- ARMS (ASA)
- TaqMan

# DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

(Fischer a Lerman, 1979)

## Teoretické východisko:

- väčšina DNA fragmentov sa skladá z 2 a viac denaturačných domén
- stringencia denat. podmienok je funkciou sekvencie
- pri elfo vo  $\uparrow$  koncentrácii denaturantu rýchlosť migrácie fragmentov pri určitej koncentrácii prudko  $\downarrow$  (*denaturácia 1. domény*).

## Princíp:

separácia fragmentov na základe rozdielnych podmienok denaturácie

## Metodické prevedenie:

1. Získavanie DNA fragmentov: *PCR, RŠ*
2. Elektroforéza
  - gél: *PAGE*
  - denaturant: *urea a formamid*  
(100 % denaturant - 7 M urea a 40% formamid)
  - detekcia: *farbenie striebrom, hybridizácia*
  - typy gélov: - *kolmé (perpendicular)*  
- *paralelné*

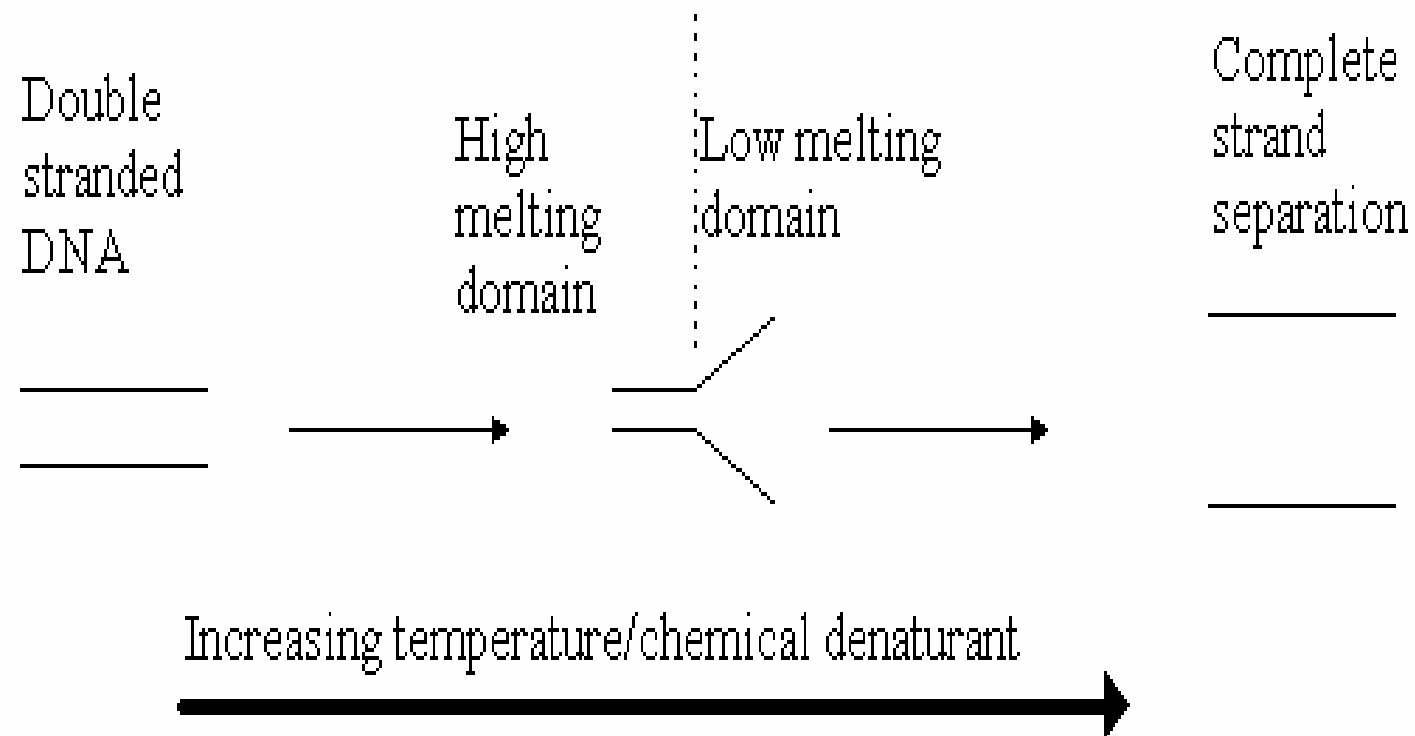
# DGGE: charakteristika

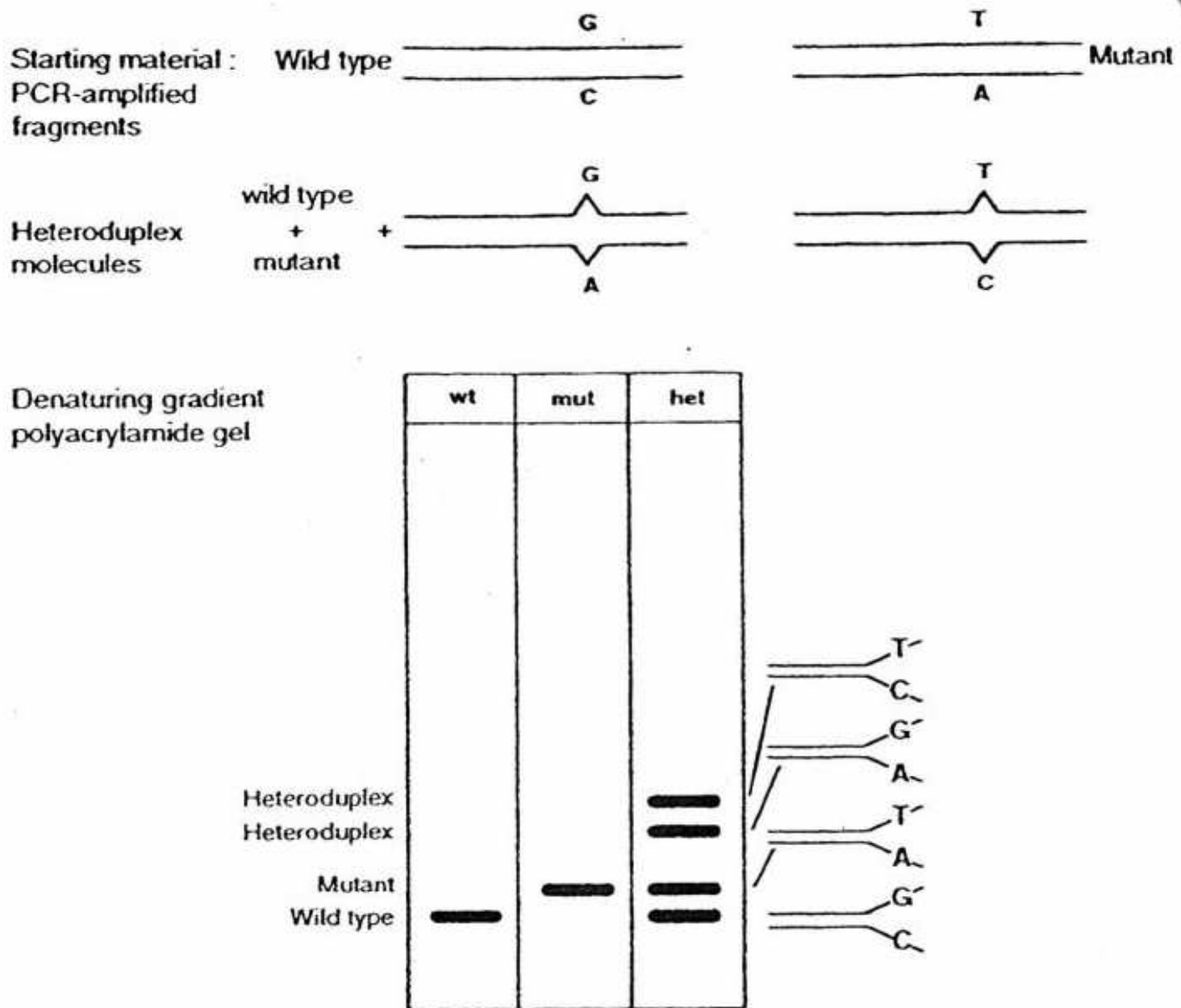
## Charakteristika

- **dĺžka fragmentov 100 - 1000 bp**
- **fragment musí obsahovať min. 2 denat. domény**  
(neidentifikuje mutácie v doméne s najvyššou stringenciou denat.)
- **detekčná schopnosť je 50 - 70 %**
- **“GC-clamp” - umelo priradená doména s vysokou stringenciou na 5' - koniec fragmentu: *detekčná schopnosť cca 95%***
- **nedáva informáciu o lokalizácii mutácie**
  
- **TGGE - Temperature Gradient Gel Elpho**
  - **- modifikácia DGGE (zvýšenie stringencie denaturácie pomocou zvyšovania teploty)**

# DGGE

## DNA MOLECULES ANNEAL IN DISCRETE DOMAINS

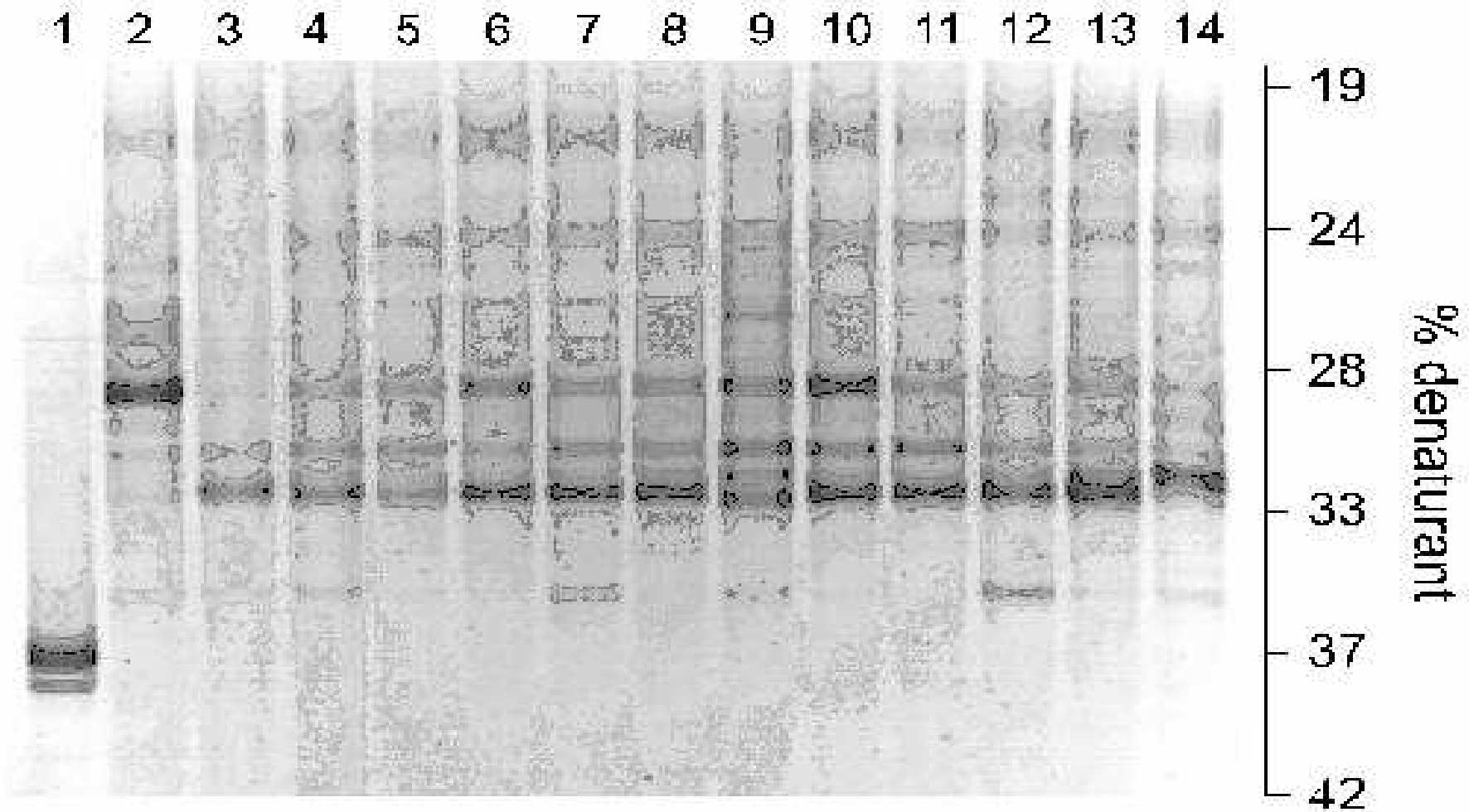




**Figure 6**

Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

# DGGE: gél; gradient denaturantu smerom dolu



# **SSCP: Single-Strand Conformational Polymorphism**

*(Orita a spol., 1989)*

## **Teoretické východisko**

- **jednovláknová DNA za nenedenaturačných podmienok vytvára terciárnu štruktúru, stabilizovanú vnútrovláknovými interakciami**
- **mobilita ssDNA je v nenedenaturačnom PAGE je funkciou terciárnej štruktúry**
- **zámena báz môže viesť k zmene terciálnej štruktúry s následnou zmenou mobility**

## **Princíp**

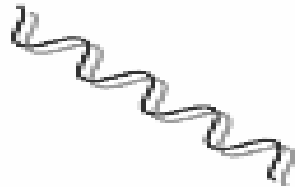
- **separácia na základe rozdielnej terciálnej štruktúry SSDNA**

## **Metodické prevedenie**

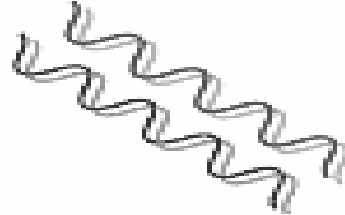
- **Získavanie DNA fragmentov: PCR, RŠ**
- **Denaturácia fragmentov: teplota, formamid**
- **PAGE (nenedenaturačný gél)**

# SSCP: Single-Strand Conformational Polymorphism

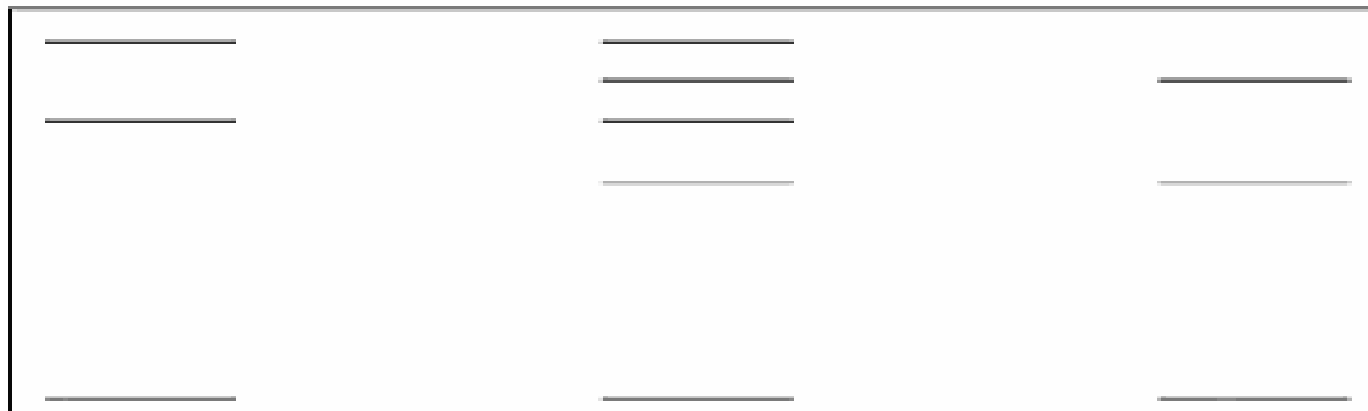
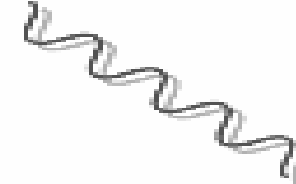
Homozygote A



Heterozygote



Homozygote B





# SSCP: Single-Strand Conformational Polymorphism

- Charakteristika:
  - Dĺžka analyzovaných fragmentov: do 400 bp
  - Detekčná schopnosť: <100%
    - Fragmenty 200 bp: cca 80%
    - Fragmenty 300 bp: cca 60%
    - Dlhšie fragmenty: štiepiť RE
  - Neinformuje o lokalizácii mutácie
  - Veľmi jednoduchá, široko využívaná metóda
  - Občas používaná aj pri diagnostike

# SSCP Gel

→ Het

↘ Het

↻ Homo

↻ Homo

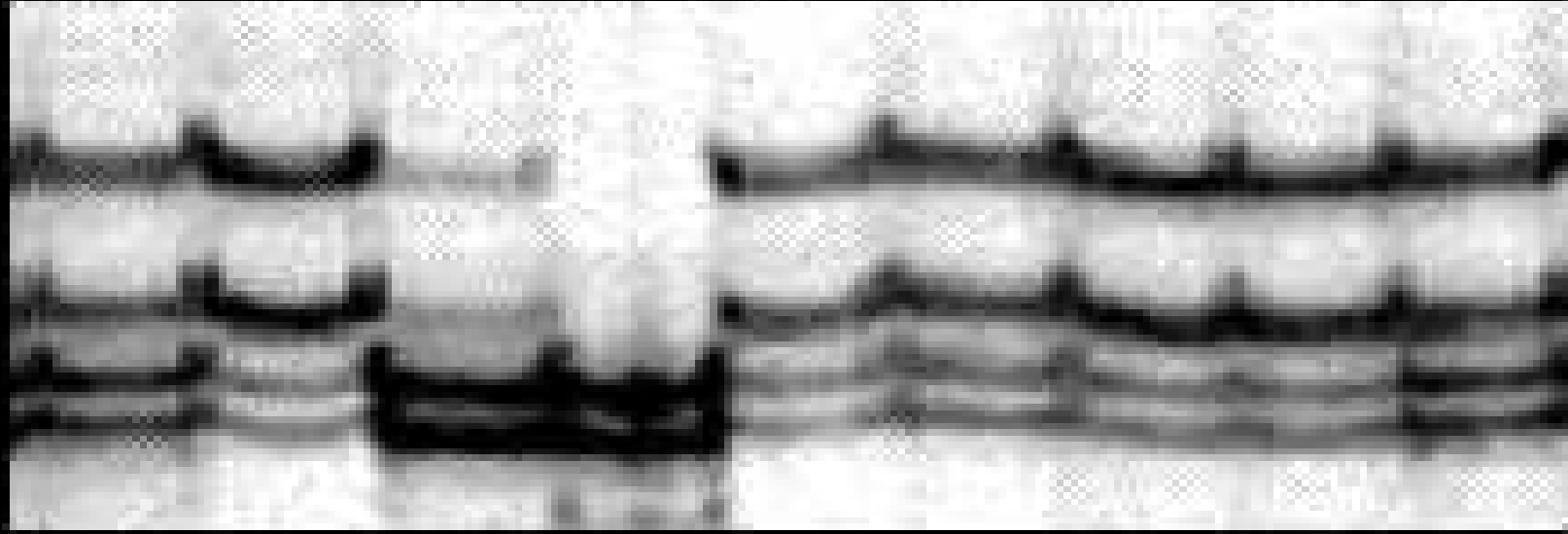
↗ Het

↻ Het

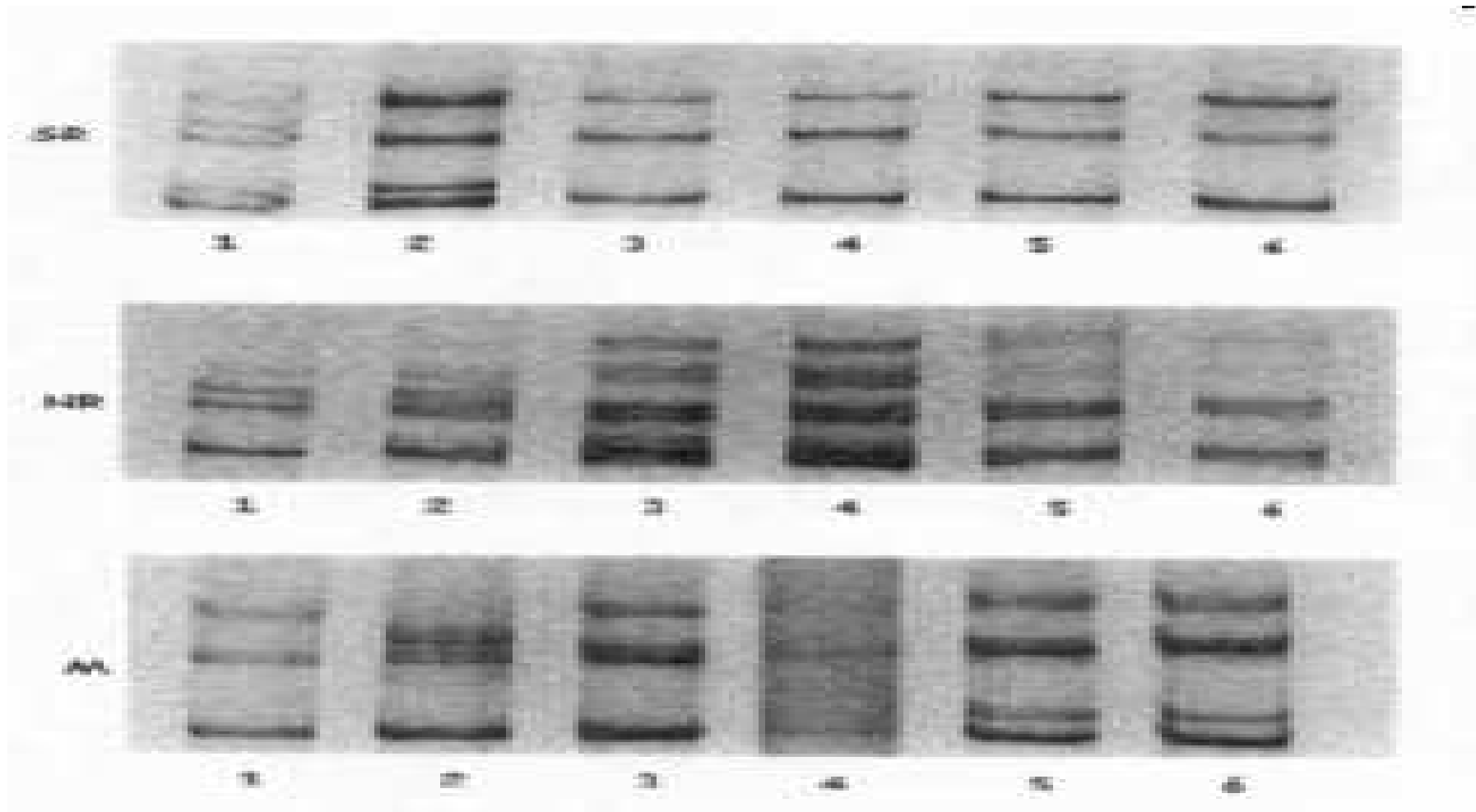
↘ Het

↻ Het

↗ Het

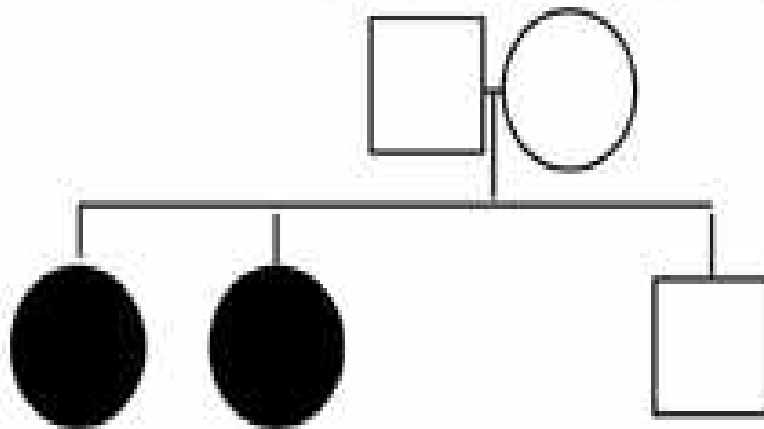
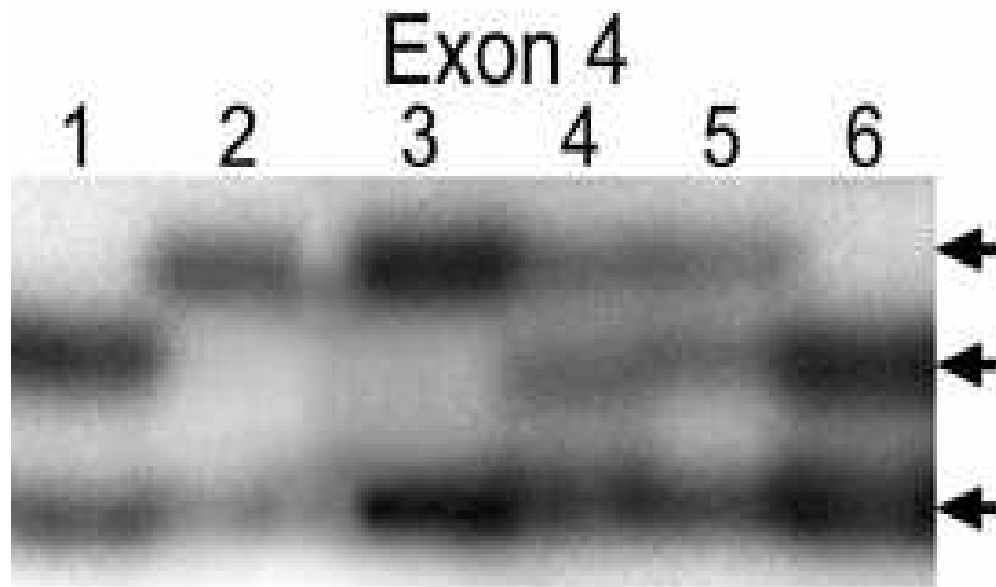


# SSCP: gély; tri exóny jedného génu

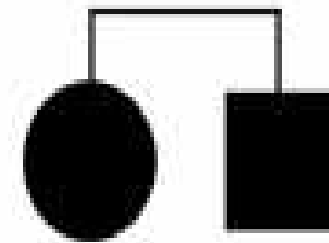
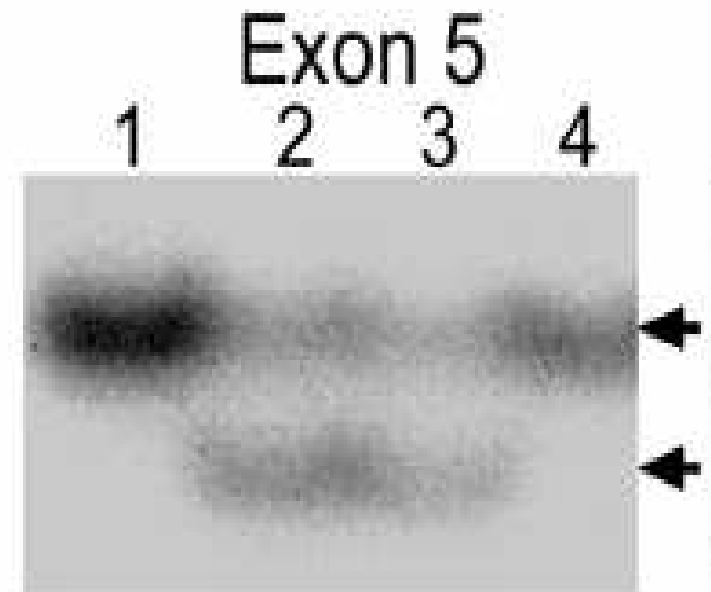


# SSCP v diagnostike

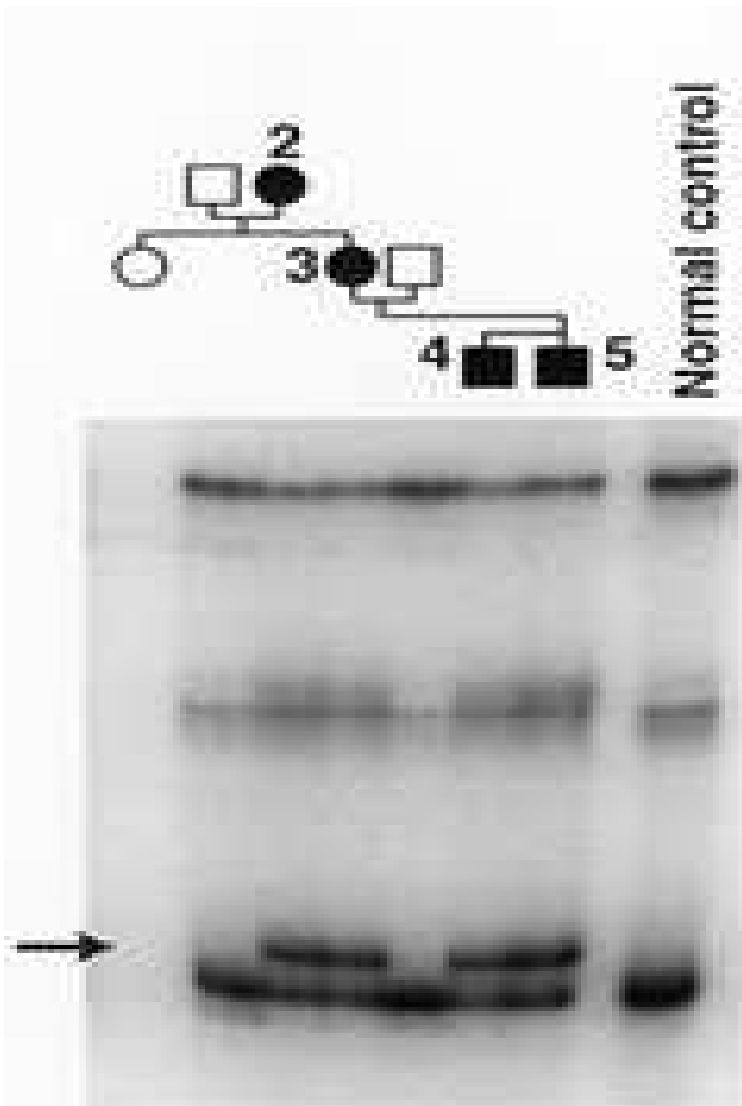
A. Family 1002



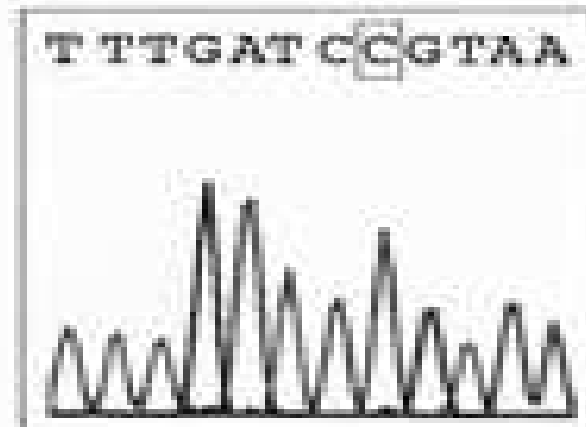
B. Family 1006



# SSCP v diagnostike



Normal



P121L Mutation



# REF: Restriction Endonuclease Fingerprinting

- Teoretické východisko:
  - ide o modifikáciu SSCP
  - analyzovaný fragment sa separátne štiepi 5-6 RE (získa sa 10-12 dsDNA obsahujúcich mutáciu)
  - zmenená mobilita môže byť výsledkom:
    - zmenou sekundárnej štruktúry (SSCP komponent)
    - zmenou RM (RFLP komponent)
- Metodické prevedenie:
  - PCR generujeme fragment
  - fragment separátne štiepime RE
  - zmiešame štiepne produkty
  - SSCP elfo (nedenat. PAGE gél)
  - detekčná schopnosť: veľmi vysoká; potrebujeme referenčnú vzorku (bez mutácie)

# RA: Restriction Analysis

- Teoretické východisko:
  - RE sú vysoko špecifické
  - mutácia: a) vytvorí nové RM
    - b) eliminuje existujúce RM
  - CpG dinukleotidy: mutačný „hot spot“ (prednostne využívame RE s CpG v cieľovej sekvencii)
- Metodický prístup:
  - Southernova hybridizácia
  - PCR
- Charakteristika:
  - dĺžka fragmentov: pri SH neobmedzná, pri PCR limitovaná PCR
  - detekčná schopnosť pod 50%
  - používa sa aj ako diagnostická metóda (bežná, historicky prvá)

# ACRS: Amplification Created Restriction Site

Rozširuje RE na prípady, keď mutácia nevytvorí ani neeliminuje RM

- Princíp:  
pomocou PCR zavedieme do nemutovanej alely RM, ktoré je prípadnou mutáciou eliminované
- Metodický postup:
  - PCR s jedným upraveným primerom
  - restričné štiepenie
  - elektroforéza
  - vizualizácia



# ARMS: Amplification Refractory Mutation System

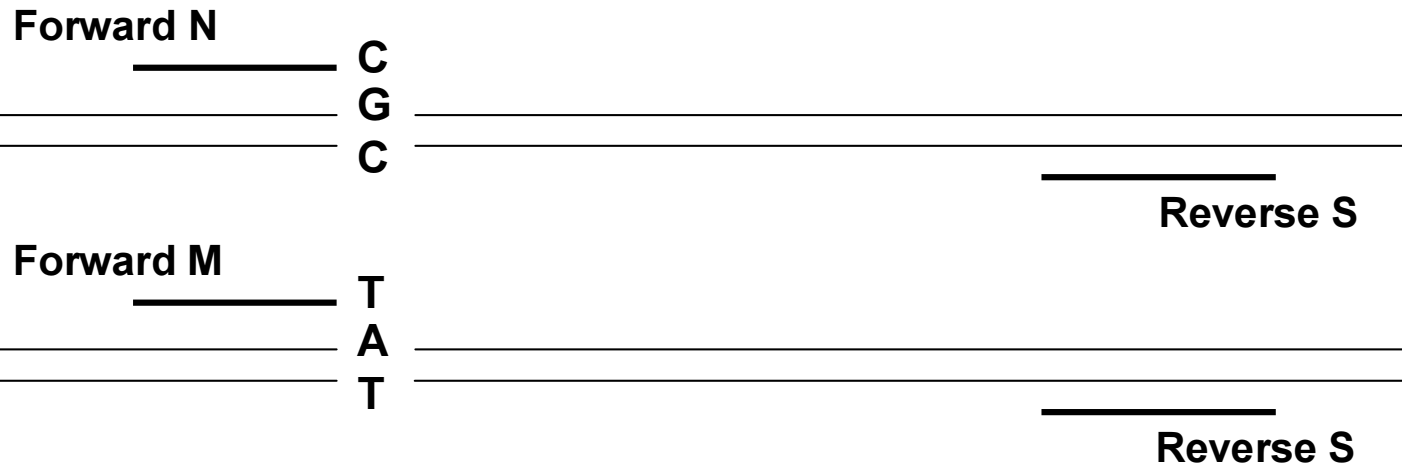
## ASA: Allele Specific Amplification

- Princíp: mismatch PCR primeru na 3'konci znemožňuje PCR
- Metodické prevedenie:
  - 3 primery:
    - 1 spoločný (S) - reverse primer
    - 1 špec. pre normálnu alelu (N) – forward primer
    - 1 špec. pre mutovanú alelu (M) – forward primer
    - plus pár primerov pre kontrolnú PCR reakciu

– 2 PCR reakcie:

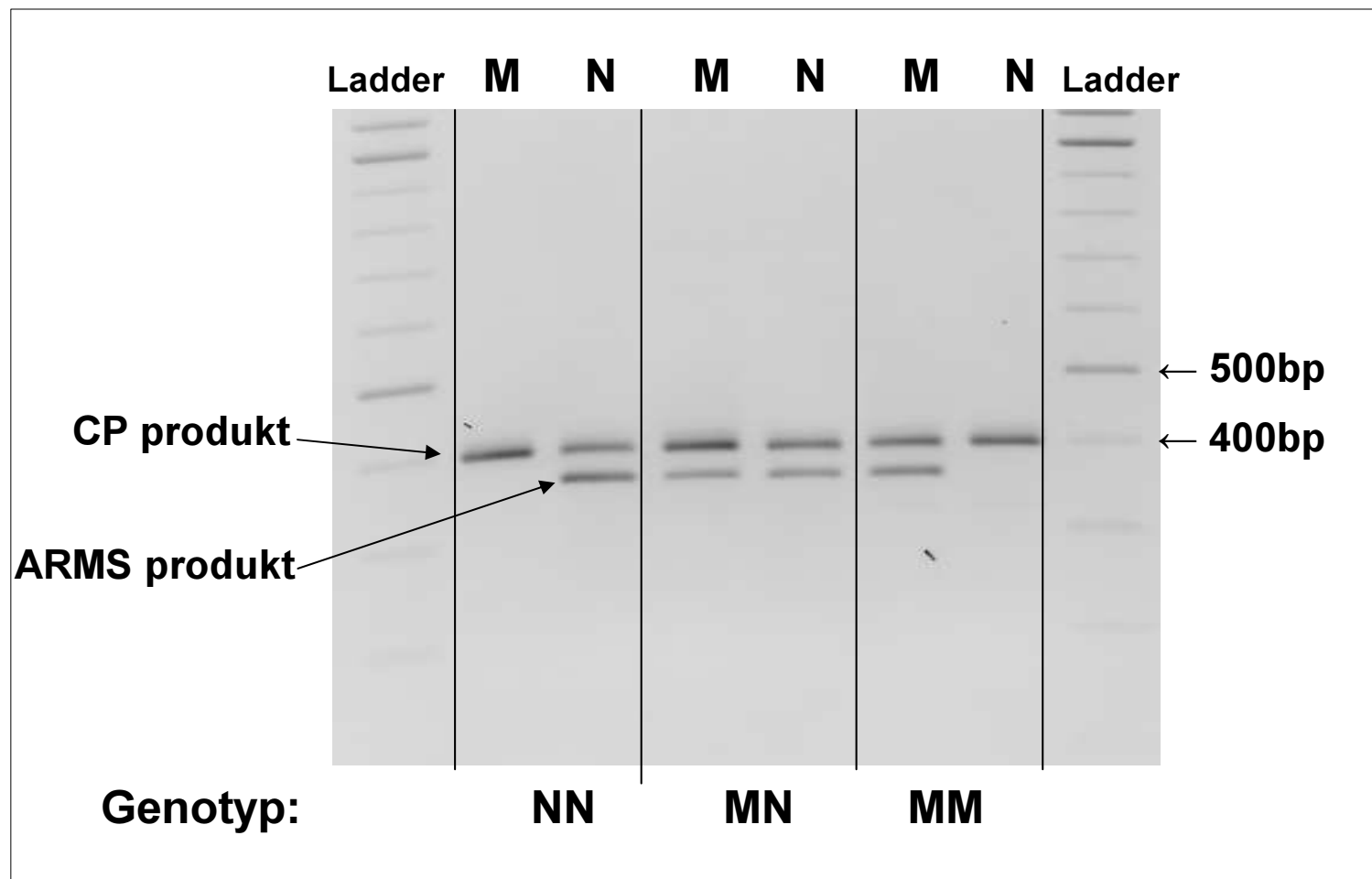
	<b>N N</b>	<b>N M</b>	<b>M M</b>
• 1. PCR S-N	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
• 2. PCR S-M	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

# ARMS-PCR: princíp

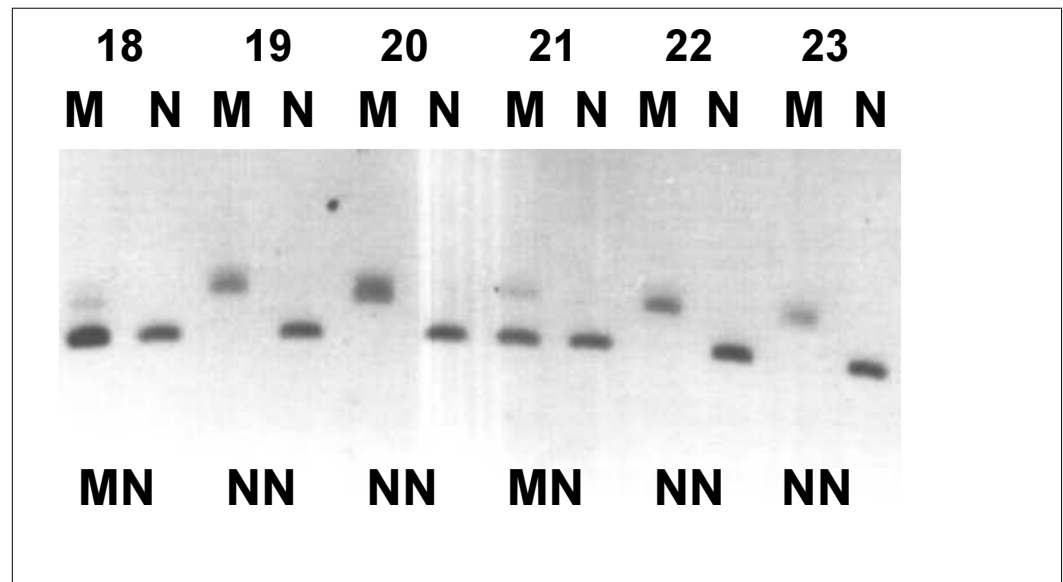
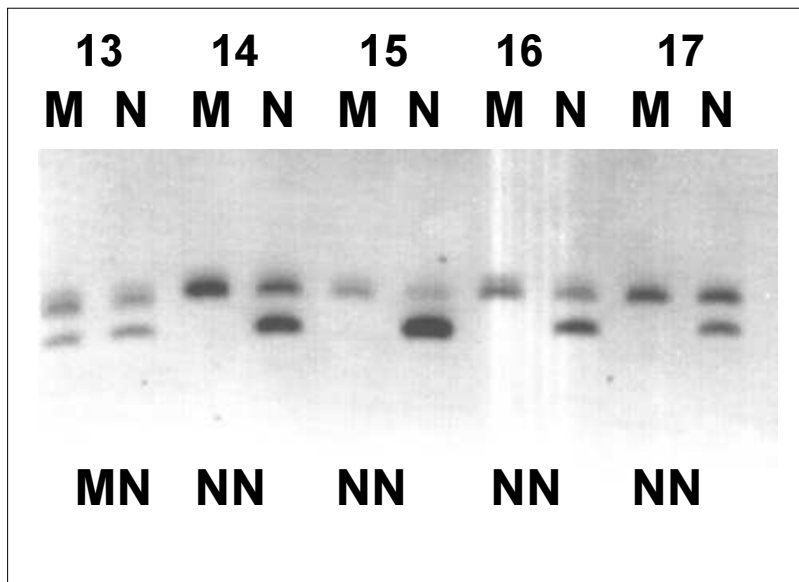
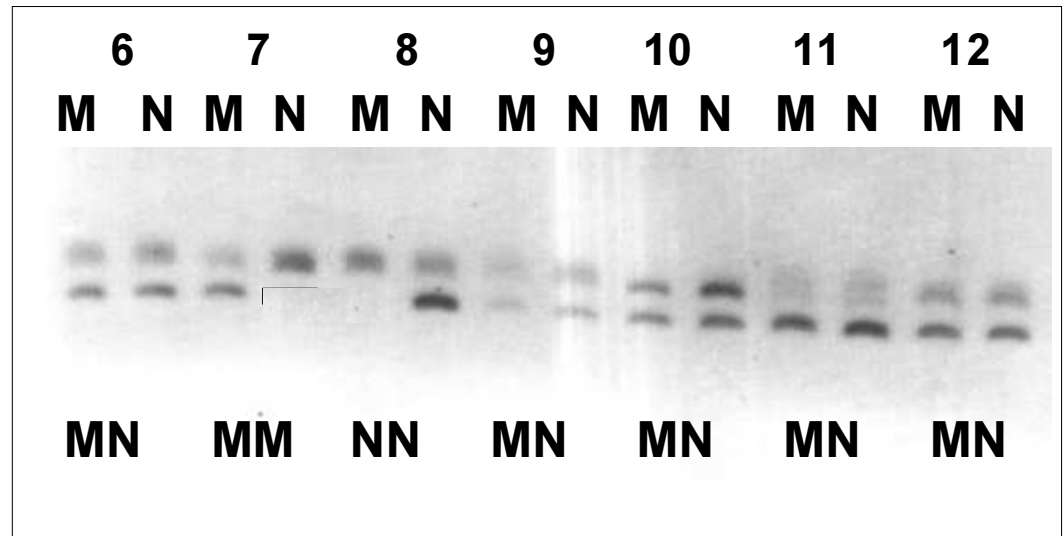
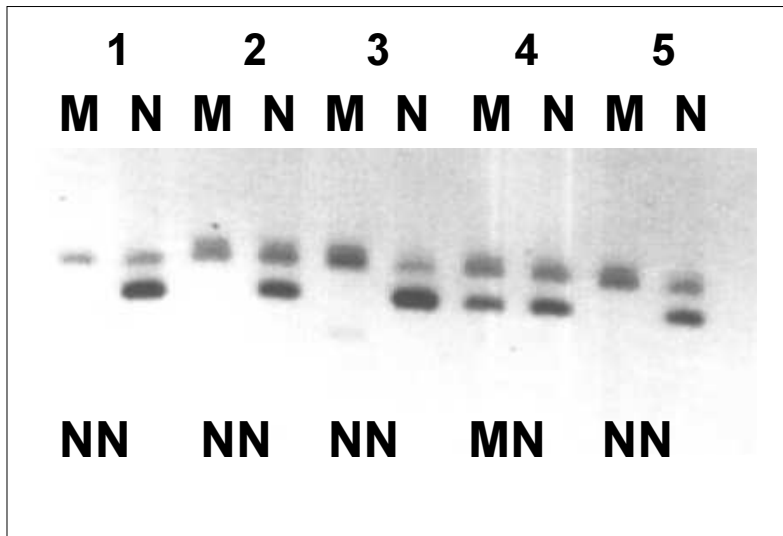


ARMS primery	M + S	N + S
PCR produkty: MM	+	-
PCR produkty: MN	+	+
PCR produkty: NN	-	+

## Vyšetrenie 2. exónu génu *GJB2* na mutáciu R127H pomocou ARMS-PCR

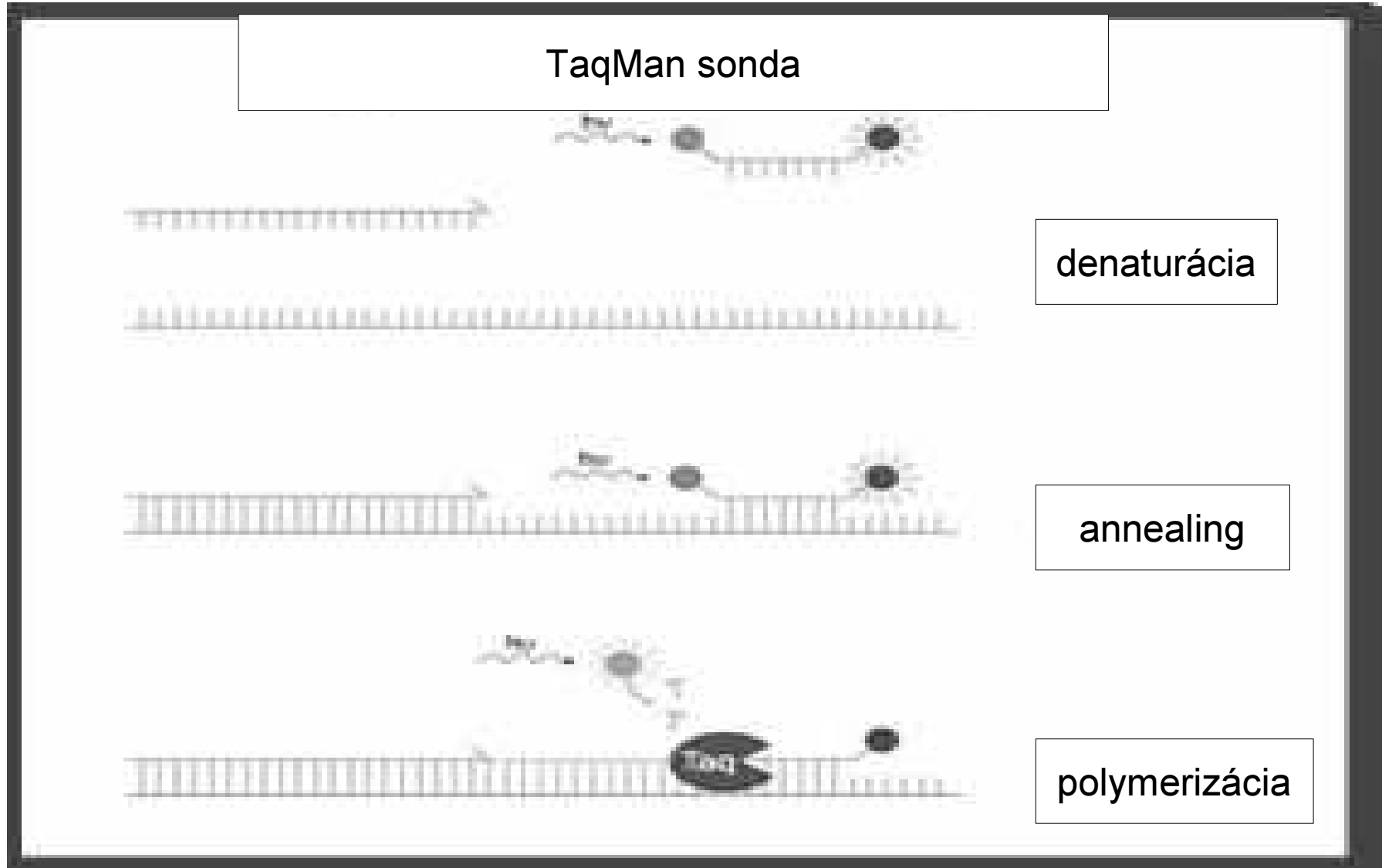


# ARMS: populačná štúdia

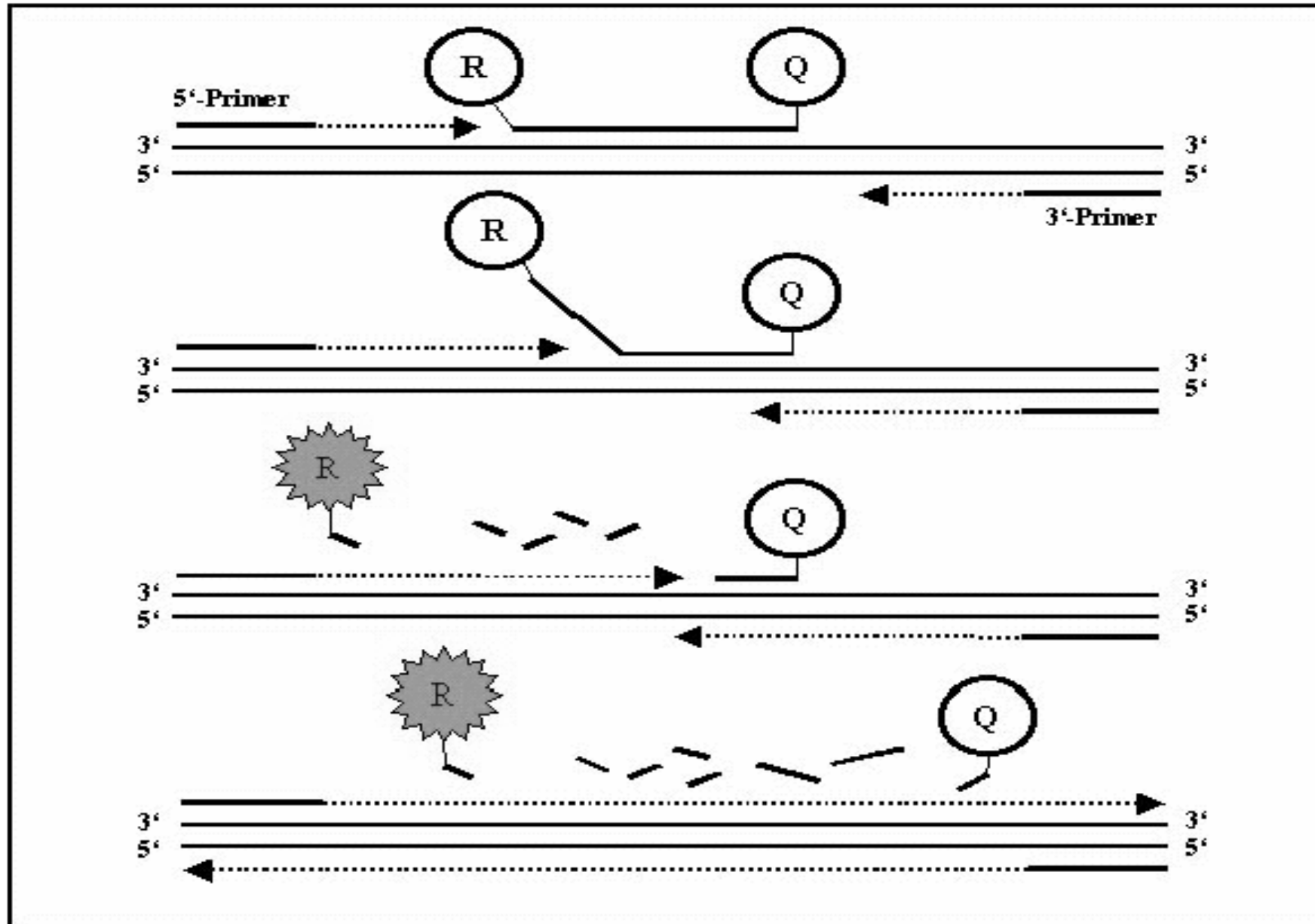


# TaqMan

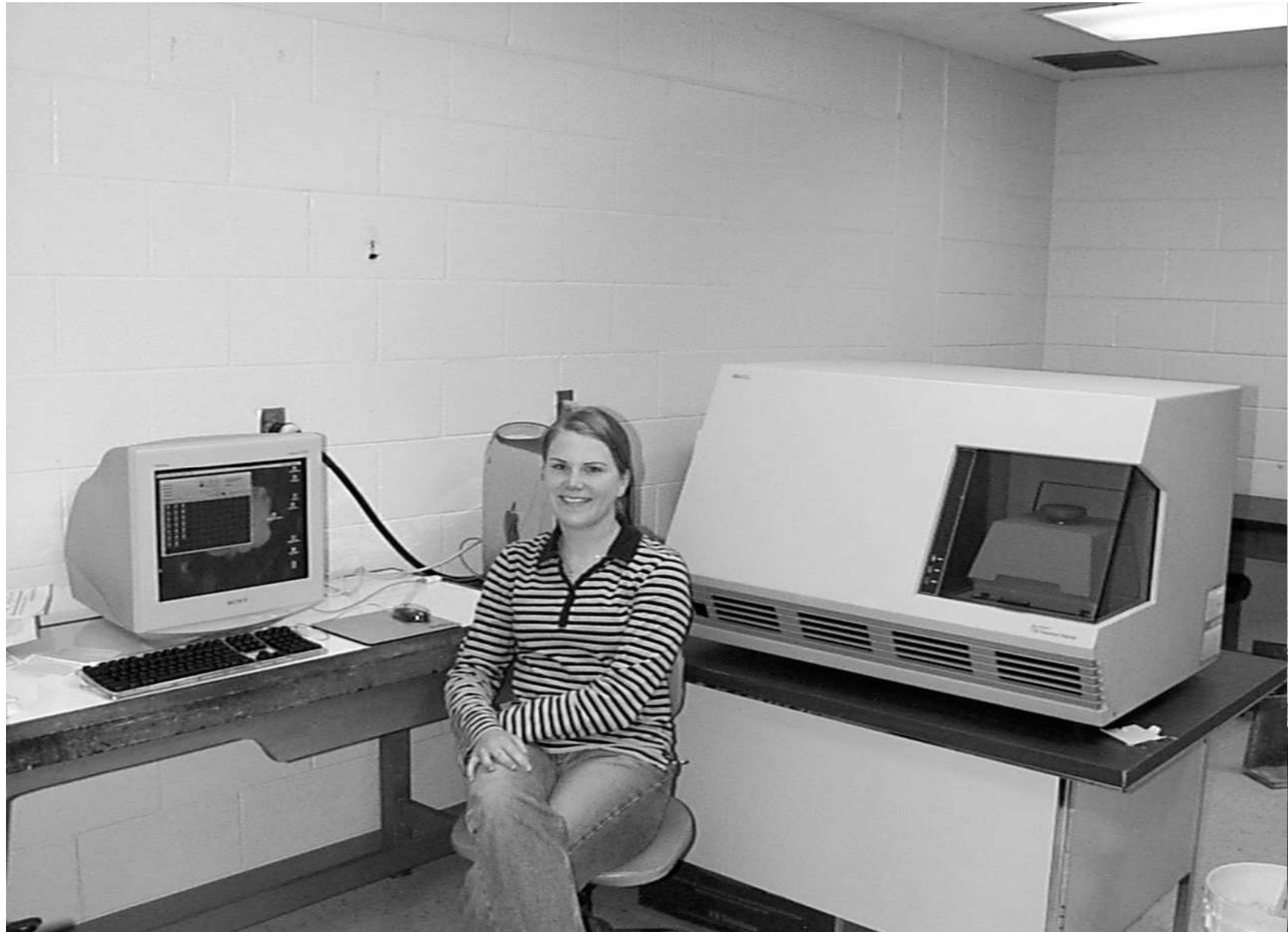
TaqMan špecifická sonda: „reporter“ a „quencher“  
DNA polymeráza pri PCR sondu odbúrava: reportér svieti



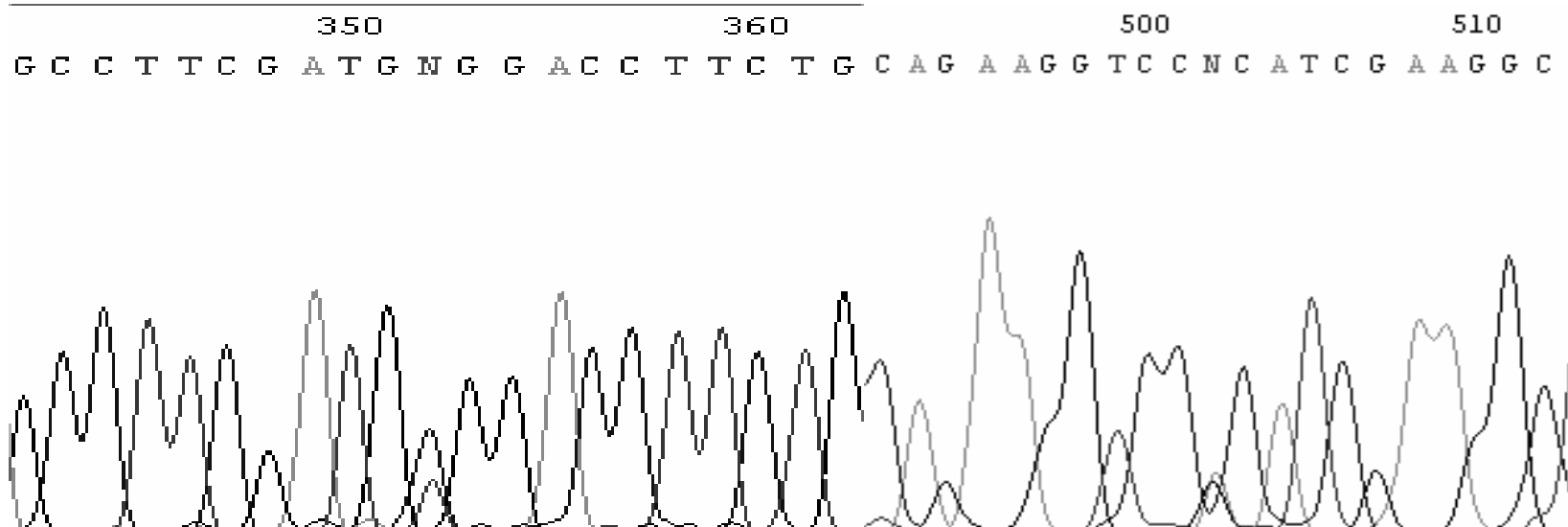
# TaqMan: priebeh



# TaqMan 7700



# Perspektíva: sekvenovanie – aj ako diagnostická, aj ako skriningová metóda





# Celera's sequencing center in Rockville, MD.

