

FRAGMENTAČNÍ

ANALÝZA

Eva Paděrová

# GENETIC ANALYZER

## ABI PRISM 310

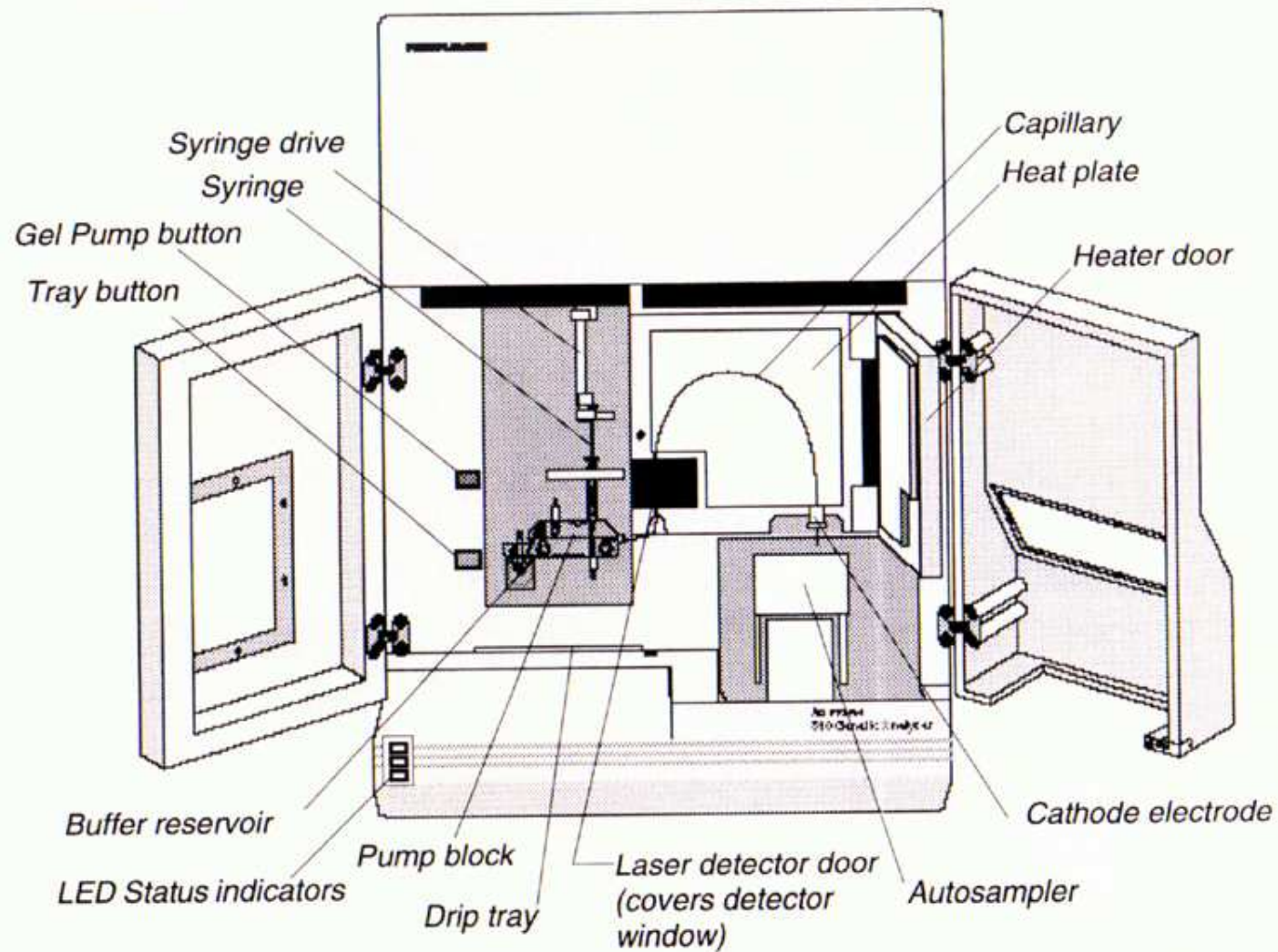
-přístroj pracuje na principu gelové kapilární elektroforézy tzn. že v kapiláře po vložení napětí (na okrajové elektrody) dochází k dělení fragmentů DNA dle jejich velikosti a náboje.

Analýzy prováděné na tomto stroji:

- radioaktivní značení nahrazeno fluorescenčním (lze použít až 5 různých barev současně pro 1 analýzu)
- automatizace, lepší reprodukovatelnost výsledků
- rychlost analýzy
- přístroj je ovládán přes PC

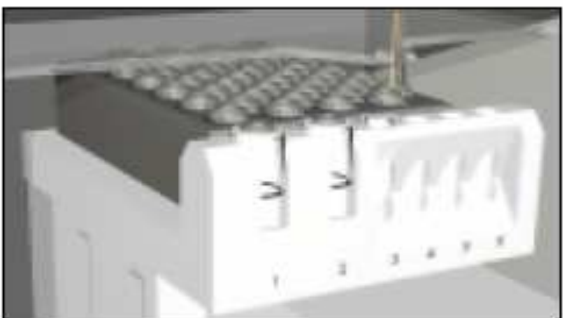


# GENETIC ANALYZER ABI PRISM 310



### Step 1:

Move to the sample



- Autosampler moves in X, Y, and Z directions
- Holds 48 or 96 samples
- Also holds necessary buffer (position 1), rinse (2), and waste (3) vials

### Step 2:

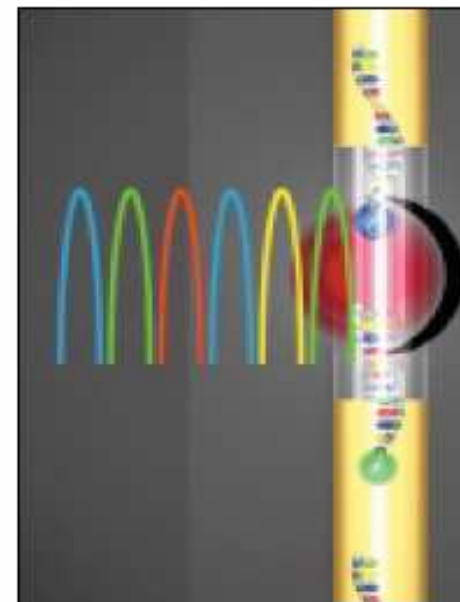
Electrokinetic injection and electrophoresis



- Instrument places capillary and electrode into the sample
- Instrument applies voltage
- Negatively charged DNA enters the capillary as it migrates toward the positively charged electrode at the other end of the capillary

### Step 3:

Fluorescence excitation and detection



- DNA fragments labeled with one of five different dyes electrophoretically migrate past the laser
- Laser excites dyes, causing them to emit light at wavelengths larger than that of the laser
- Emitted light is collected by a charged-coupled device (CCD) camera
- Software converts pattern of emissions into colored peaks

# Reakční směs pro fragmentační PCR

- DNA
- 2 primery pro 1 fragment,  
z nichž pouze 1 je značený
- dNTP
- Pufr
- Polymeráza

# FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ

## - AMIDITOVÉ

HEX (černá)

6-FAM (modrá)

TET (zelená)

filtr

délkový standard

C

TAMRA

## - NHS-ESTEROVÉ

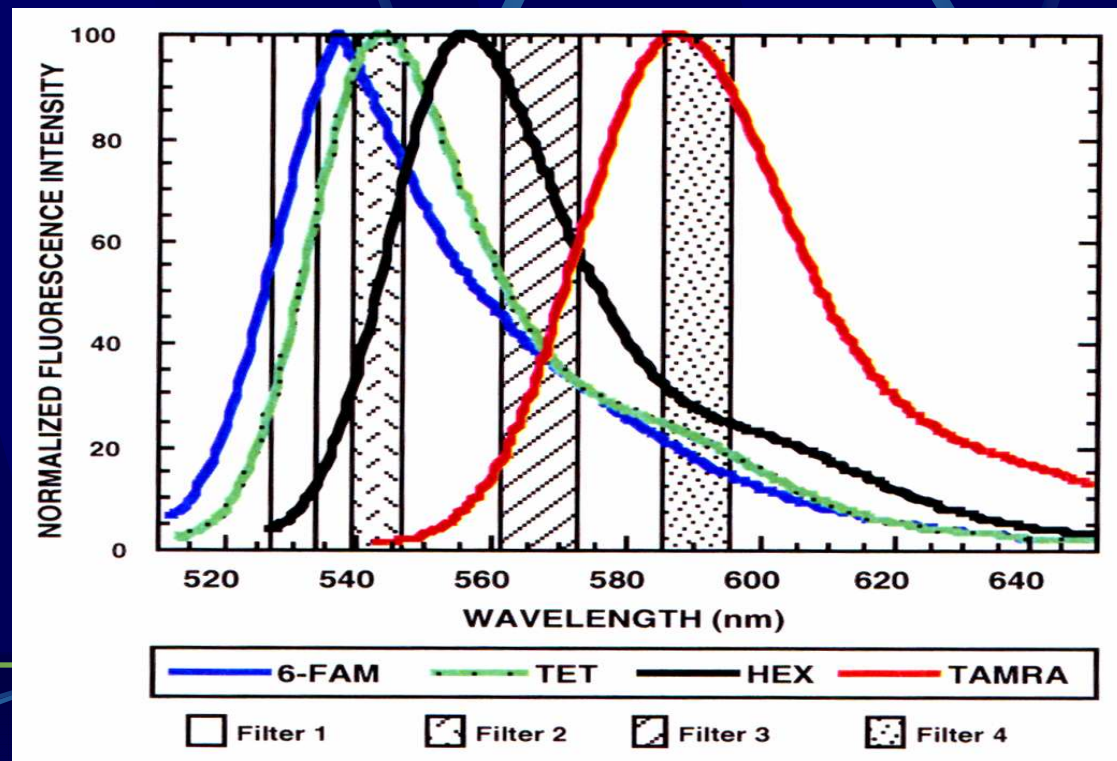
TAMRA (černá)

JOE (zelená)

5-FAM (modrá)

A

ROX



# Fragmentační analýza

- 1. Mikrosatelitní analýzy :**
  - LMS (Linkage mapping set)
  - LOH (Lost of heterozygosity)
  - RER (Replication errors)
  - STRs (Short tandem repeats)
  - AFLP (Amplified fragment length polymorphism)
- 2. Fragmentační metody :**
  - Detekce mutací:
    - SSCP / HMA (Single Strand Conformation Polymorphism / Heteroduplex Mobility Assay) }
    - SNP (Single Nucleotide Polymorphism)



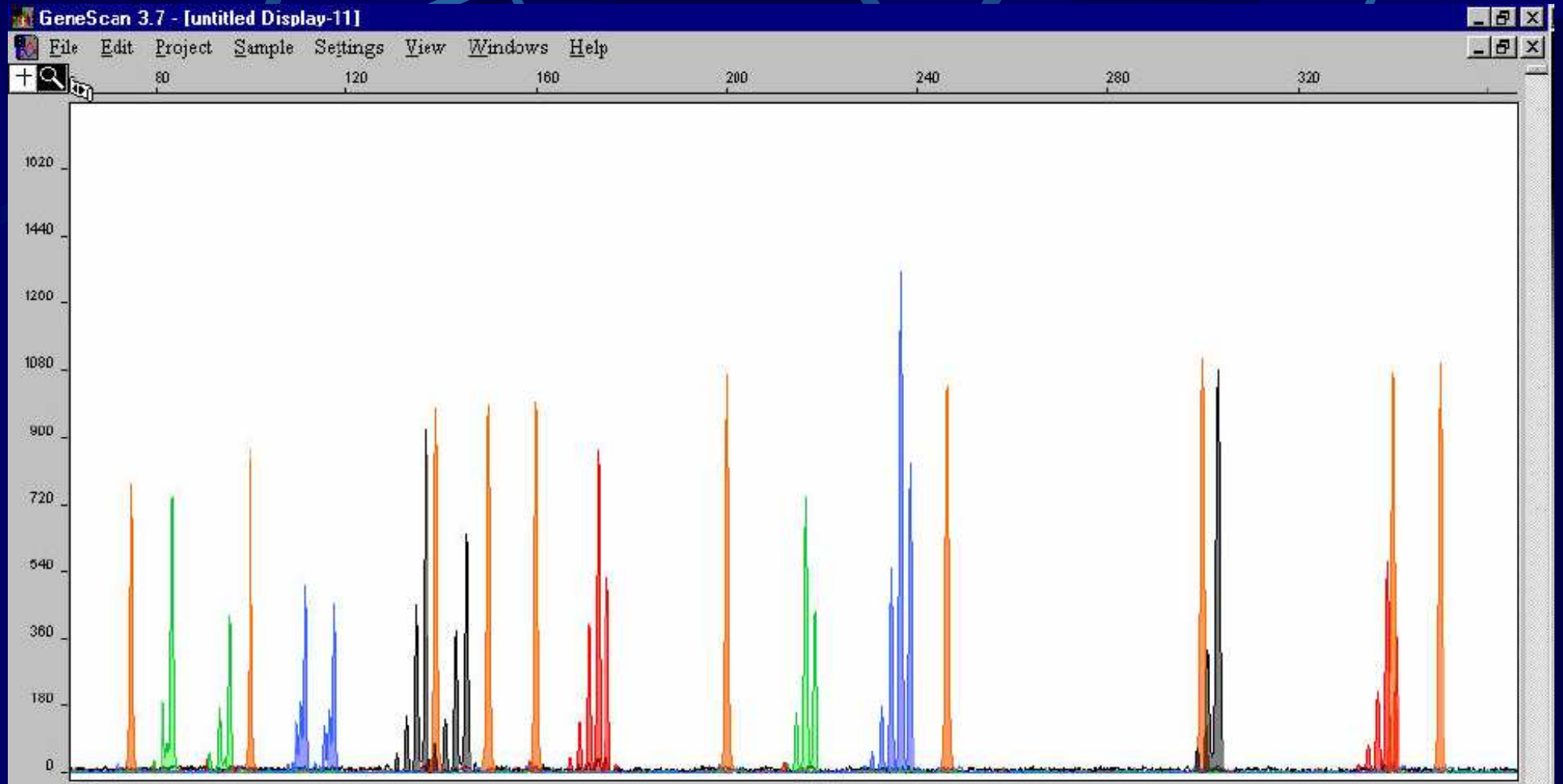
# HLAVNÍ APLIKACE FRAGMENTAČNÍ ANALÝZY

---

## 1. Mikrosatelitní analýza

- **Šlechtitelství** skotu, koní, ...
    - Animal patternity- StockMarks for Cattle (11 mikrosatelitních oblastí)
    - StockMarks for Horses (12 mikrosatelitních oblastí)
  - **Lidská identifikace**- rodičovství, soudnictví,
    - STRs- short tandem repeat markers- odpovídají polymorfním oblastem DNA, které obsahují krátké opakující se nukleotidové sekvence- pro jednotlivce charakteristické
  - **Lékařství**
    - detekce mutací – pozitivní mutace
      - negativní mutace
    - **LOH** /Lost of heterozygosity/- mikrosatelitní markery pro LOH screening mapy. Ztráta heterozygosity bývá často signálem rakovinového onemocnění.
    - **RER** /Replication Errors/- mikrosatelitní nestabilita- způsobena skluzem řetězce během replikace DNA, mutace opravných genů
- LOH a RER analýza se provádí současně, vždy N/T- 12 párů

# 5-dye LMS



# StockMarks for Horses (12 mikrosatelitních oblastí)

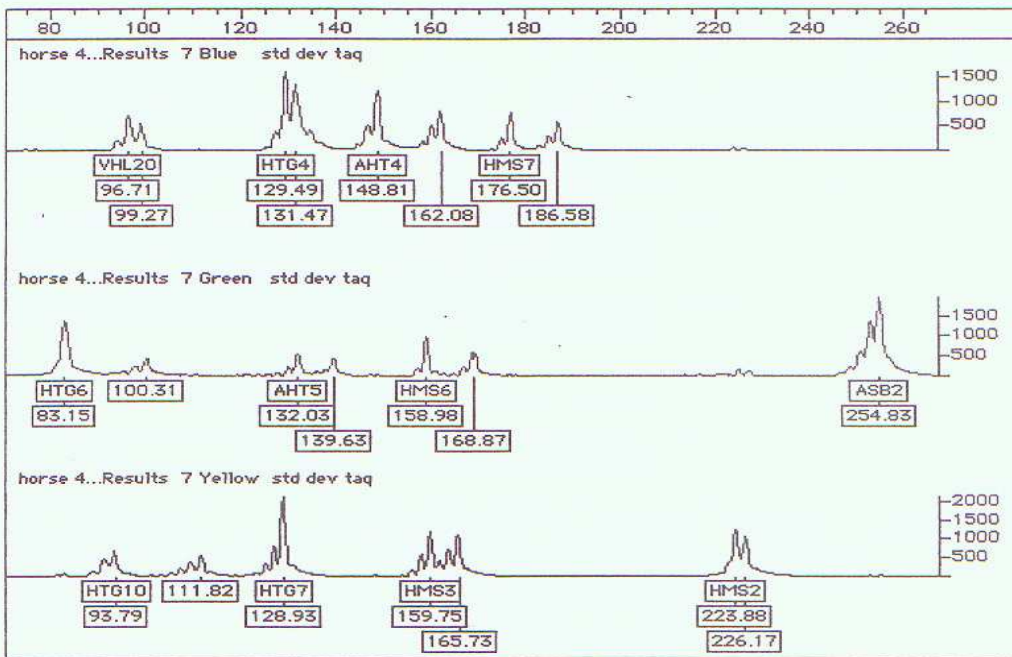
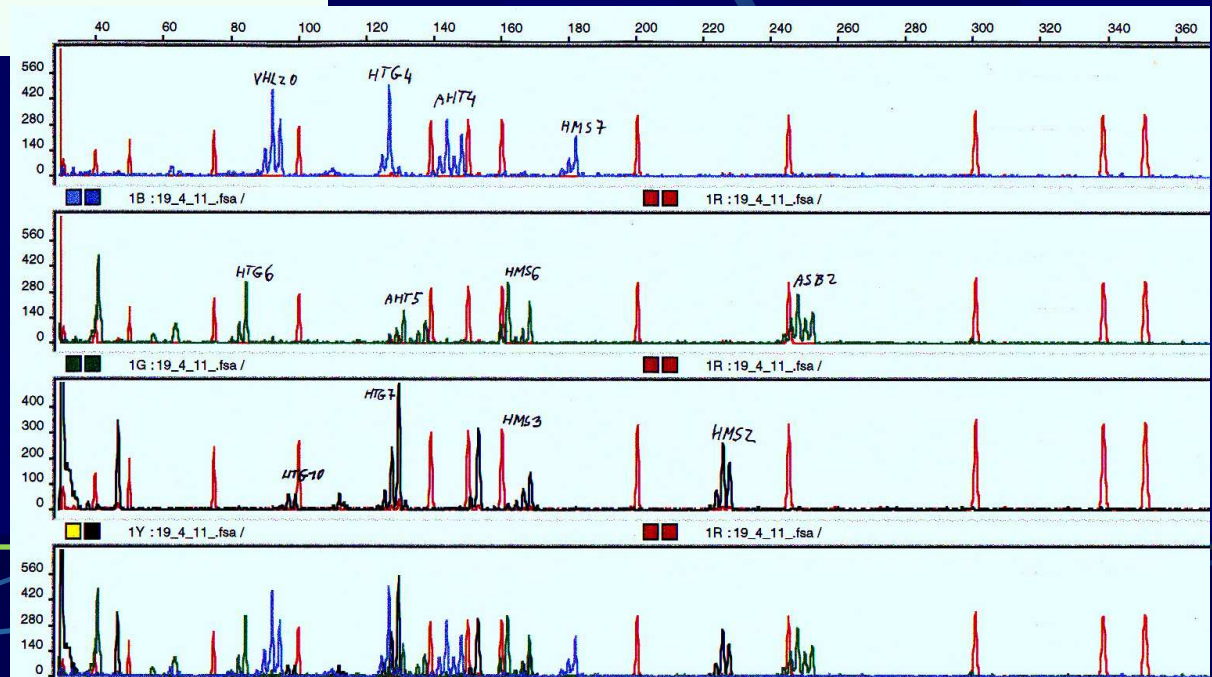


Figure 9-5 Genotyper plot of the equine control DNA



# LOH

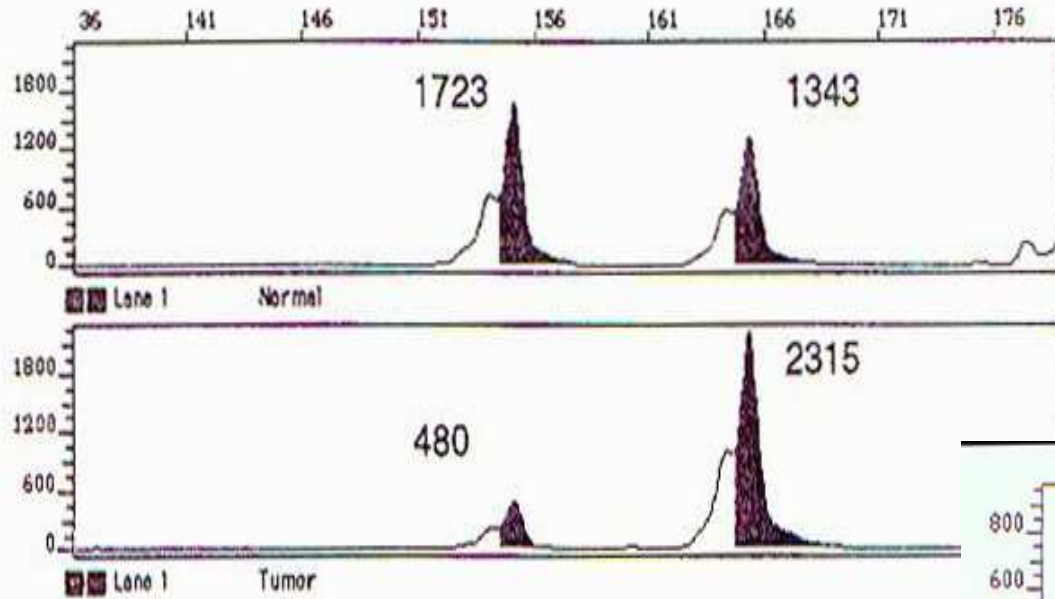


Figure 9-1 Example of LOH at TP53-Penta

# RER

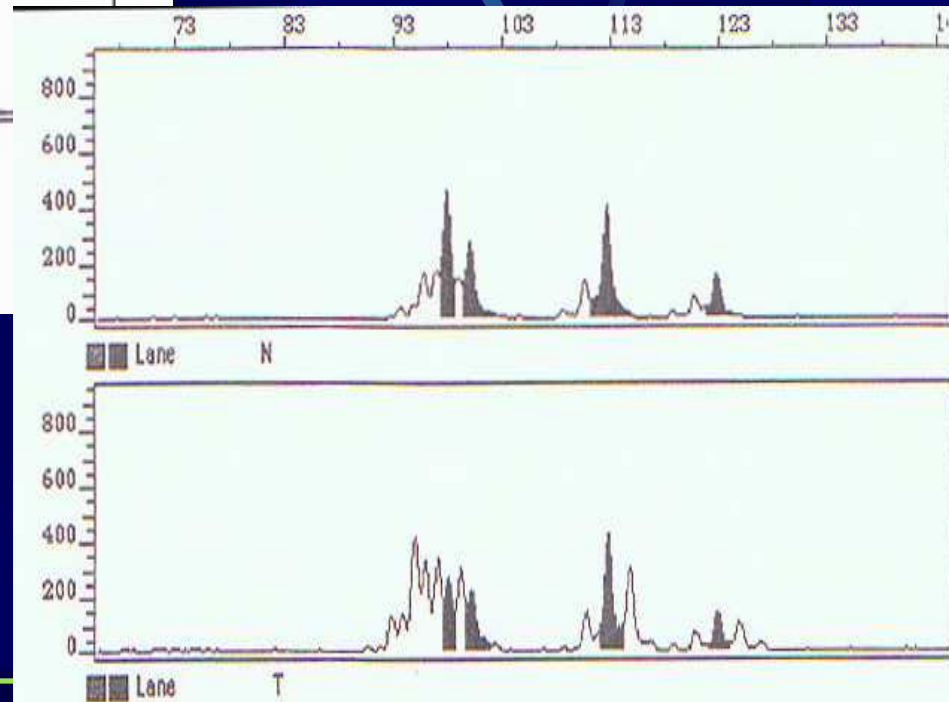
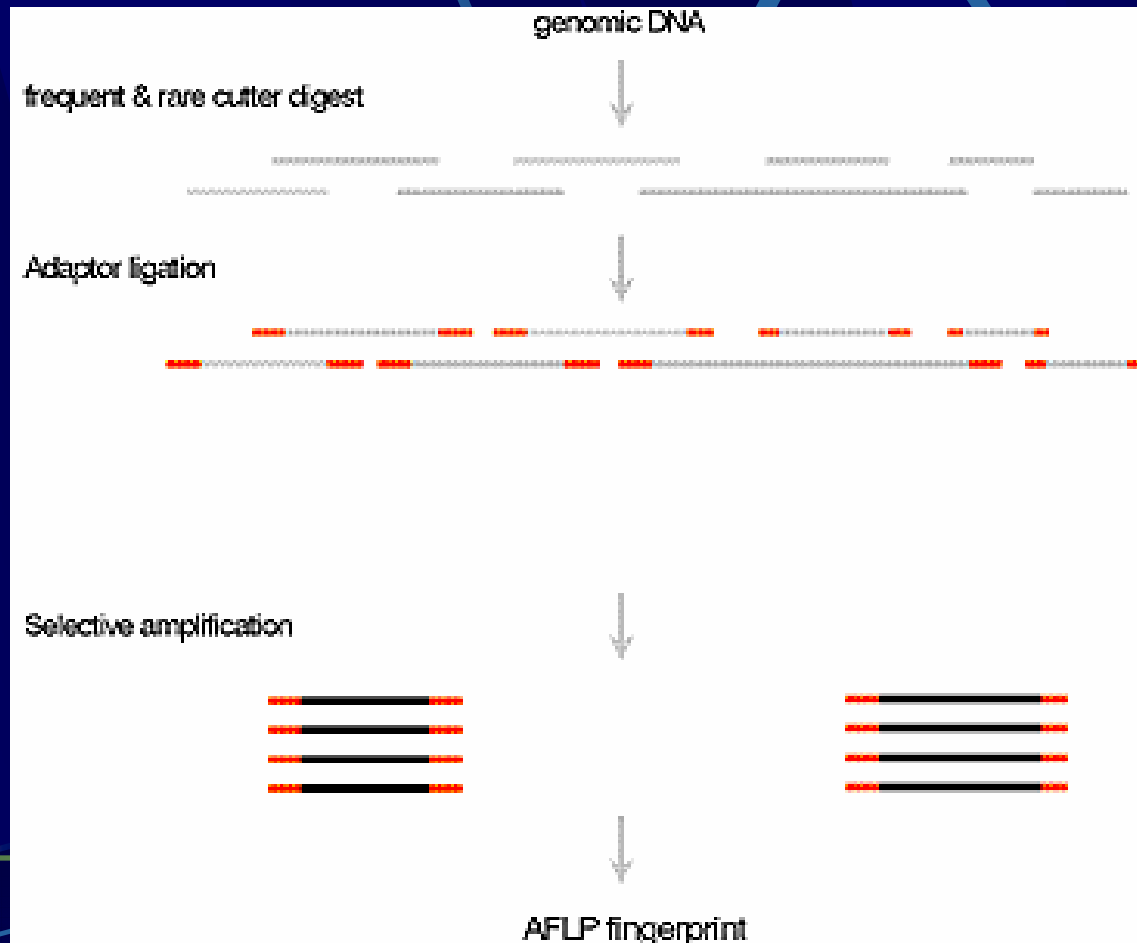


Figure 9-4 An example of RER for heterozygote alleles at markers NM23 and D5S346

## AFLP (Ampified fragment length polymorphism)

- restrikce DNA restrikčními enzymy
- ligace dvouřetězcových adaptorů na konce restrikčních fragmentů
- amplifikace části restrikčních fragmentů užitím dvou primerů komplementárních k adapteru a restrikční části sekvence, prodlužování řetězce na 3'-konci selektivními nukleotidy
- elektroforetická analýza amplifikovaných fragmentů na denaturovaném polyakrylamidovém gelu



## 2. FRAGMENTAČNÍ METODY

### SSCP

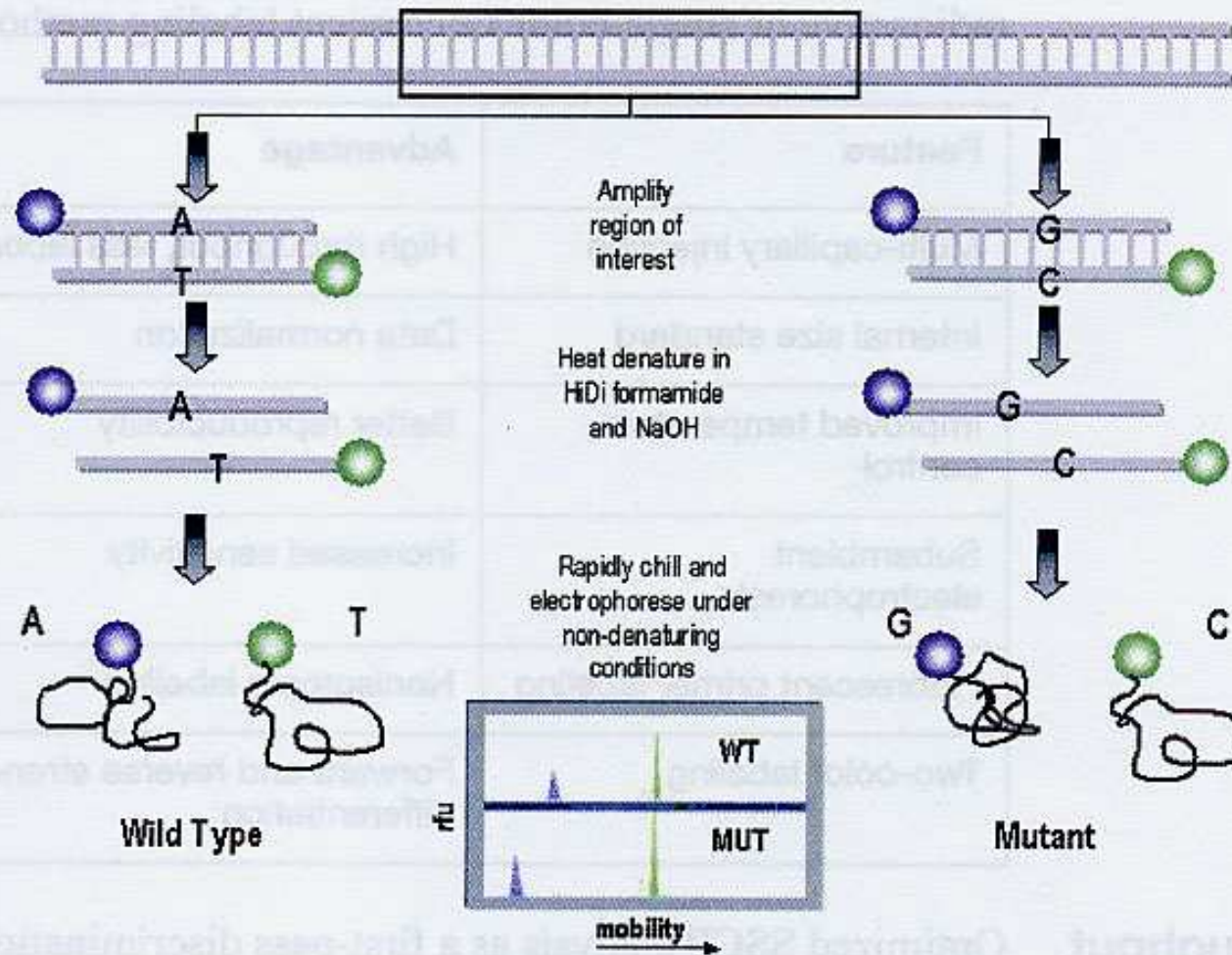
(Single Strand Conformation Polymorphism )

-metoda sloužící k odhalení mutace

SSCP- analýza jednořetězcové DNA za nenedenaturovaných podmínek

- změna nukleotidové sekvence vede ke změně konformace, která se projeví jako změna elektroforetické mobility v nenedenaturovaném polyakrylamidovém gelu

## Flow Diagram of the SSCP-PCR Technique



# SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

- minisekvenační metoda- s použitím specifického primeru a fluorescenčně značených dideoxynukleotidů
- studium genetických linií, oblastí chromozómu- zmapování
- hledání nových genů
- odhalení bodových mutací, které mohou být odpovědné za některá onemocnění
- 10 a více primer- templátů současně

SNaPshot Multiplex Kit

120 LIZ Size Standard

5-dye SNP analysis: 6-FAM

VIC

NED

PET

LIZ-size standard





- pro fragmentační analýzu používáme vždy dva primery pro 1 fragment :
  - jeden značený a jeden neznačený
- současně lze analyzovat více fragmentů
- ke každému analyzovanému vz. DNA přidáváme délkový standard
- analyzujeme- li více fragmentů současně, rozlišujeme fragmenty dvěma základními zp.:
  - délkově
  - barevně

## 1. ARR4- mutant

- ARR4 ARR4N\*, ARR4S
- ARR4 ARR4N\*, d 11
- W (wildtype) ARR4N\*, ARR4S
- W ARR4N\*, d 11

## 2. AHP4- mutant

- AHP4 SIM799\*, SIM612
- AHP4 SIM799\*, En
- W SIM799\*, SIM612
- W SIM799\*, En

## 3. ARR21- mutant

16new\*, 16kon, d8130

# GEN AHP4



W- Sim799\*, Sim612- 211,5bp

