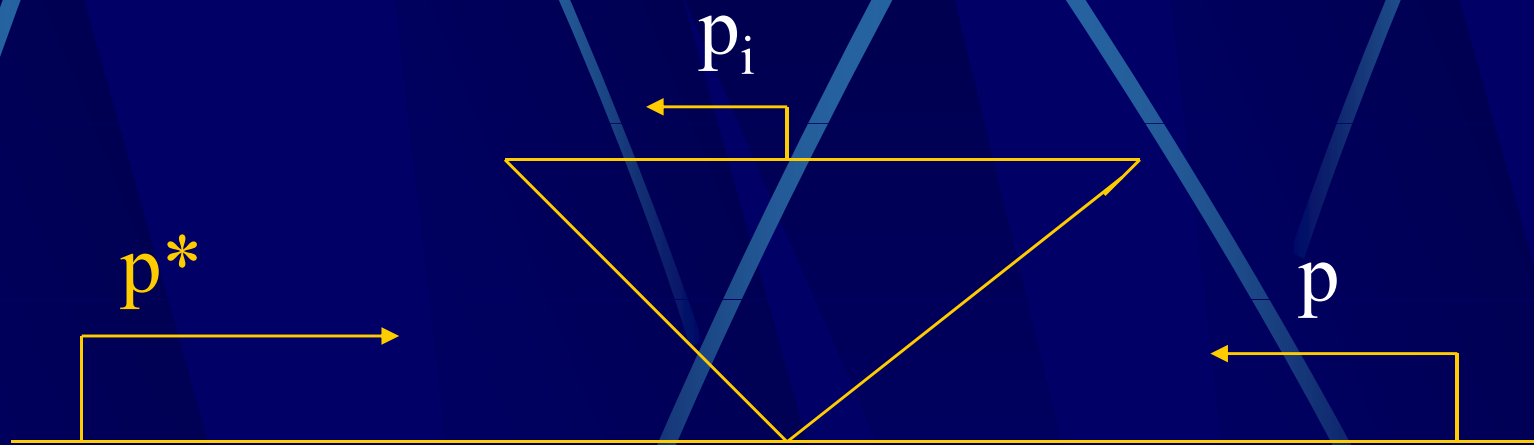


FRAGMENTAČNÍ

ANALÝZA

Eva Paděrová



GENETIC ANALYZER

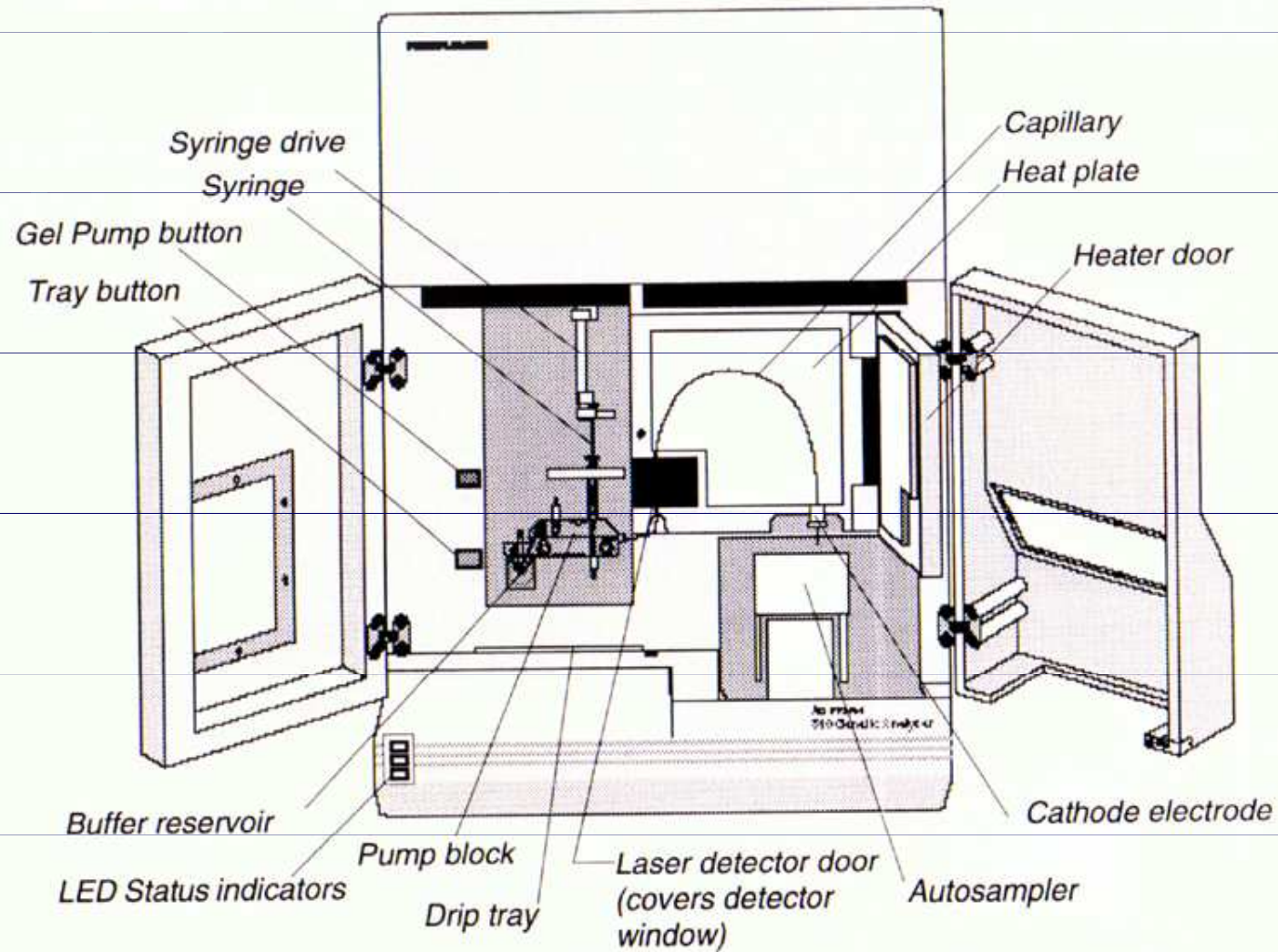
ABI PRISM 310

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

Analýzy prováděné na tomto stroji:

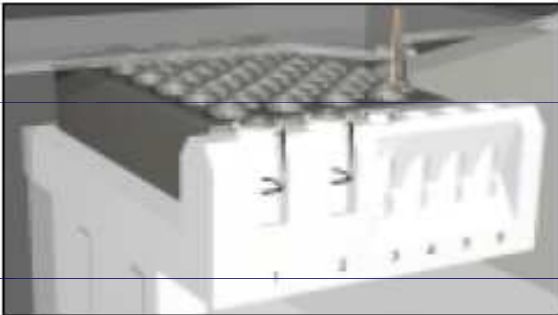
- radioaktivní značení nahrazeno fluorescenčním (lze použít až 5 různých barev současně pro 1 analýzu)
- automatizace, lepší reprodukovatelnost výsledků
- rychlost analýzy
- přístroj je ovládán přes PC

GENETIC ANALYZER ABI PRISM 310



Step 1:

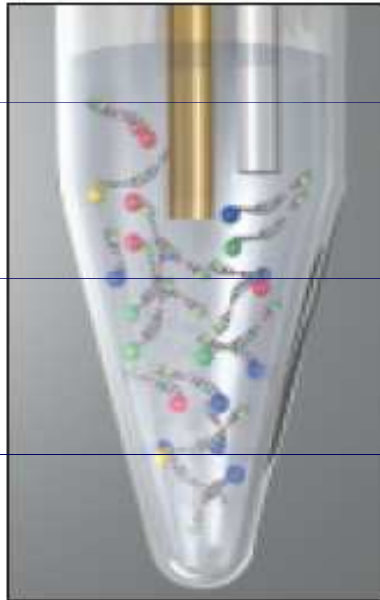
Move to the sample



- 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:

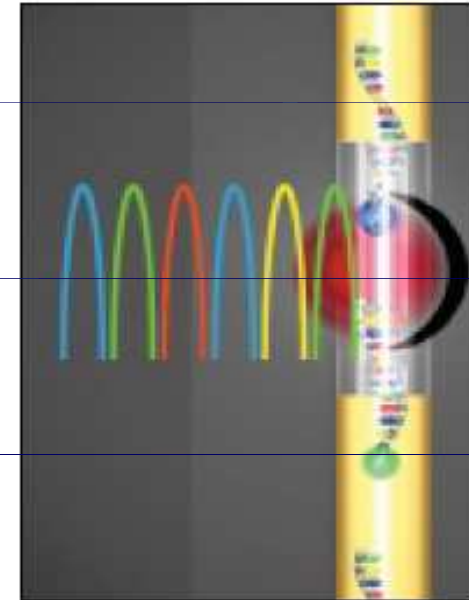
Electrokinetic injection and electrophoresis



- 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 charge-coupled device (CCD) camera
- Software converts pattern of emissions into colored peaks

GENETIC ANALYZER ABI PRISM 310

- FRAGMENTAČNÍ ANALÝZY

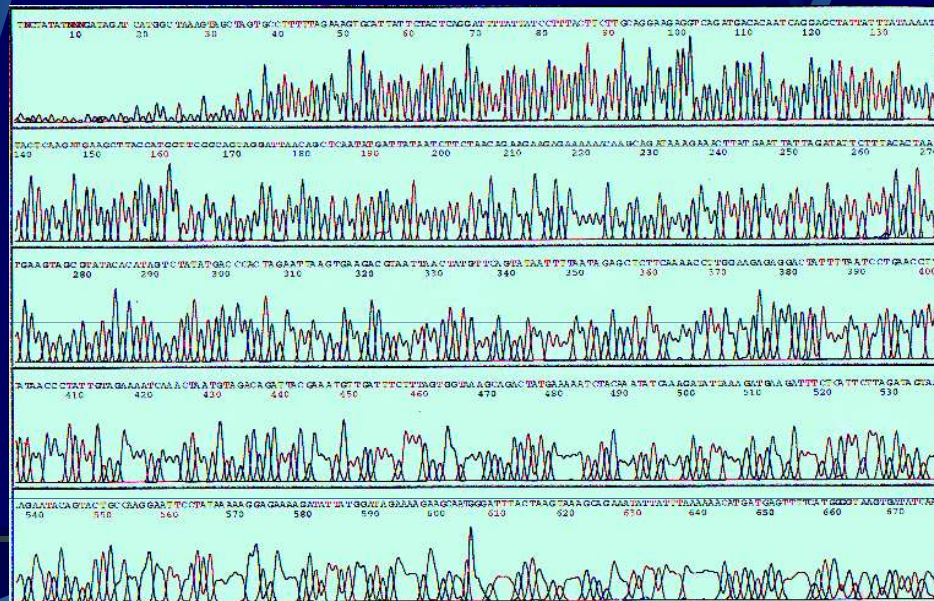
POP4

kap. 47 cm

- SEKVENAČNÍ ANALÝZY

POP6

kap. 61cm



Prvním krokem obou typů analýz je vždy odpovídající PCR

Sekvenační analýza

- provádíme s cílem zjistit řazení nukletidů v řetězci DNA
- užití jednoho značeného nebo neznačeného primeru, z druhého konce jsou pak řetězce DNA omezeny ddNTP

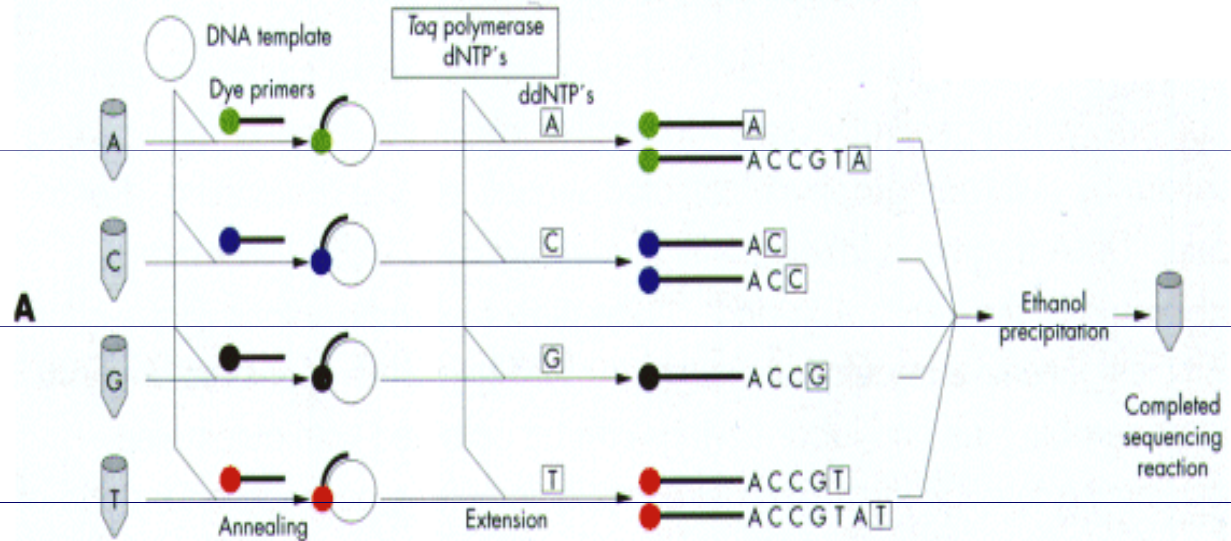
Fragmentační analýza

- cílem je většinou zjistit délku fragmentu DNA, jež je vymezena dvěma primery (jeden primer je fluorescenčně značený, druhý je neznačený)
 - lze analyzovat více fragmentů současně a fragmenty odlišit délkově nebo fluorescenční barvou (- multiplexy)
 - ke každému vzorku přidáváme tzv. délkový standard

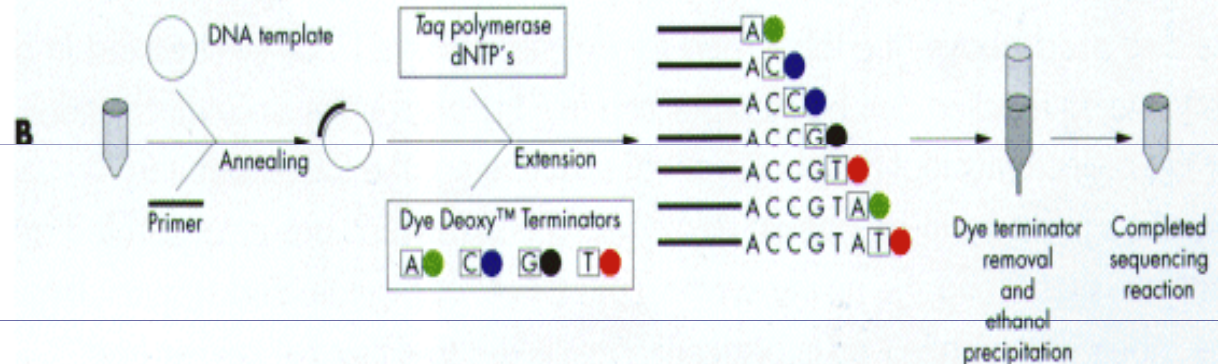
SEKVENACE

Dye Primer Sequencing

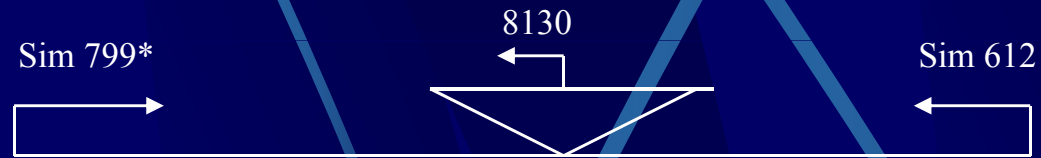
Figure 6. Automated sequencing chemistry.
 A) Sequencing with dye-labeled primers.
 Note the correlation between the dye on the labeled primer and the specific dideoxynucleotide in each reaction.
 B) Sequencing with dye-labeled terminators.
 The colored circles represent different types of fluorescent dye. The extended primers shown represent the shortest molecules in a population with lengths up to 800 bases.
 (Reproduced by kind permission of Applied Biosystems Division of Perkin-Elmer Corporation.)



Dye Terminator Sequencing



Reakční směs pro fragmentační PCR



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

CV

1. ARR4- mutant

- ARR4 ARR4N*, ARR4S2
- ARR4 ARR4N*, d 11
- W (wildtype) ARR4N*, ARR4S2
- W ARR4N*, d 11

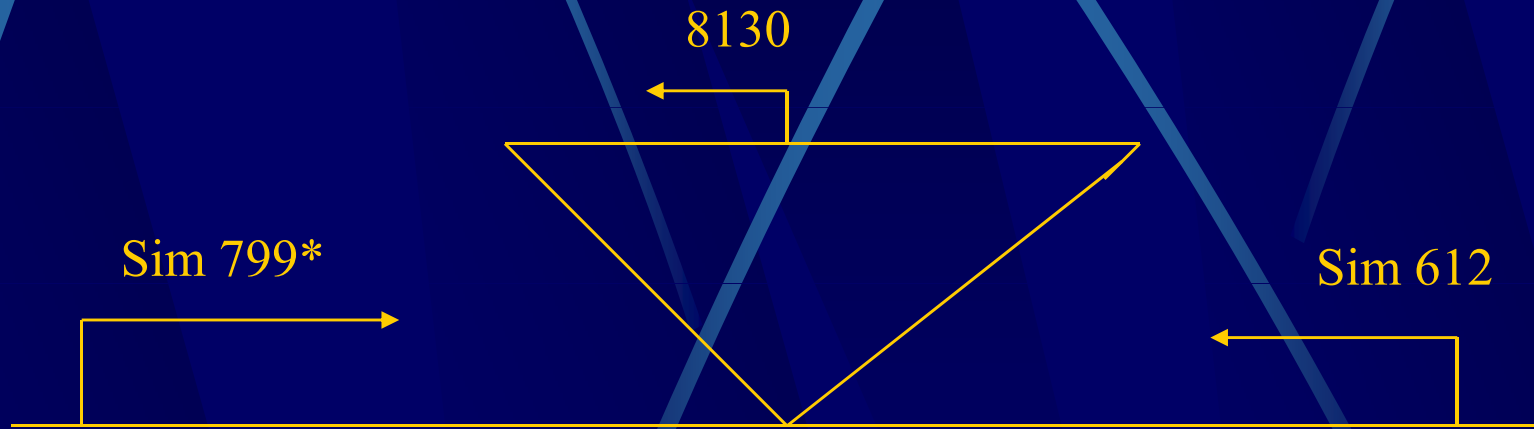
2. AHP4- mutant

- AHP4 SIM799*, SIM612
- AHP4 SIM799*, 8130
- W SIM799*, SIM612
- W SIM799*, 8130

3. ARR21- mutant

16new*, 16kon, 8130

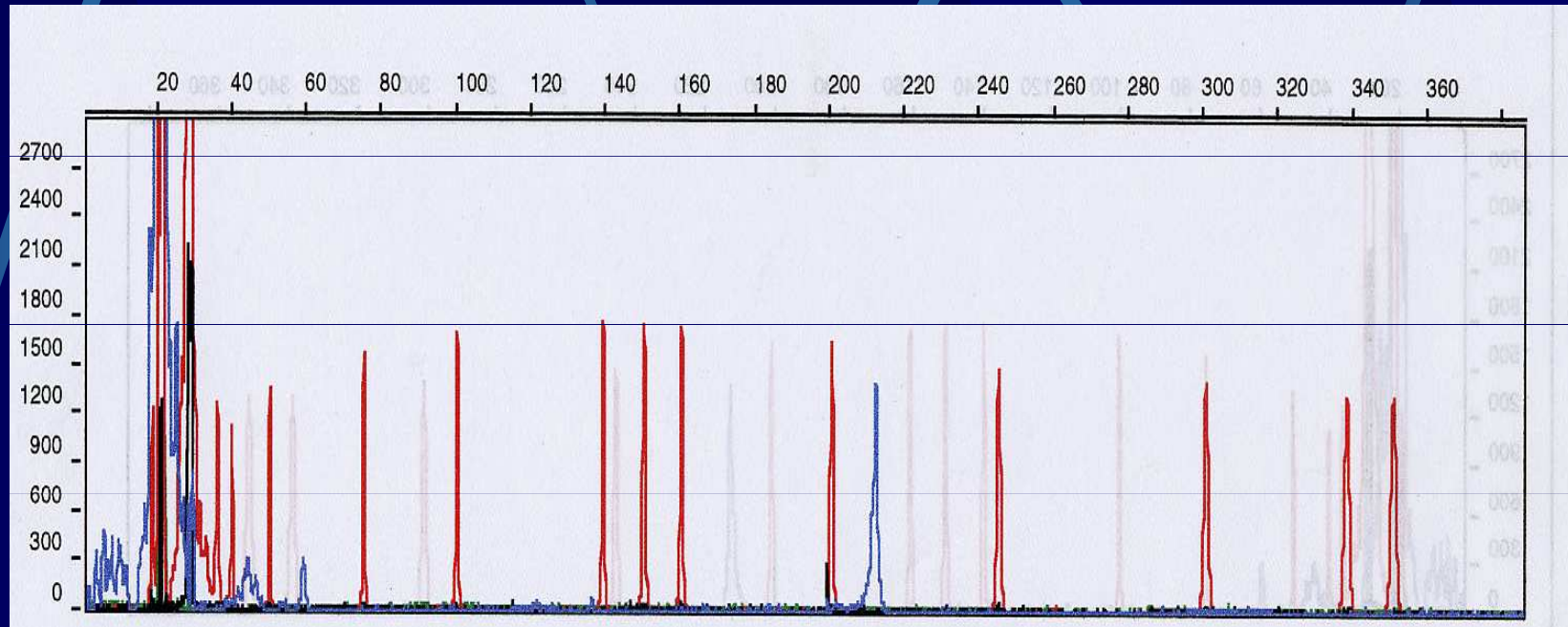
GEN AHP4



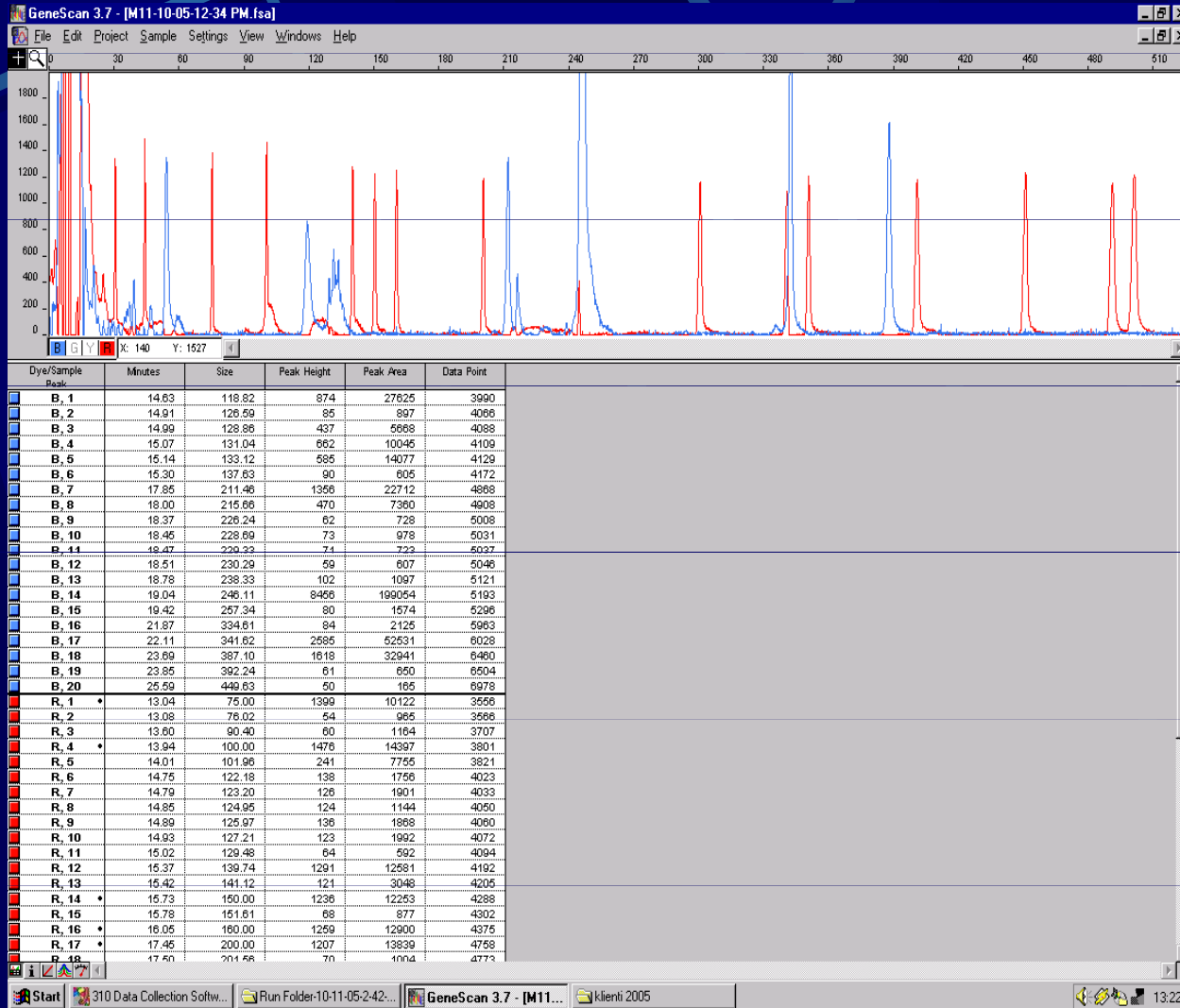
Vialka pro analýzu na ABI Prism 310:

- formamid
- Size standard (TAMRA 500)
- DNA po PCR

W- Sim799*, Sim612- 211,5bp



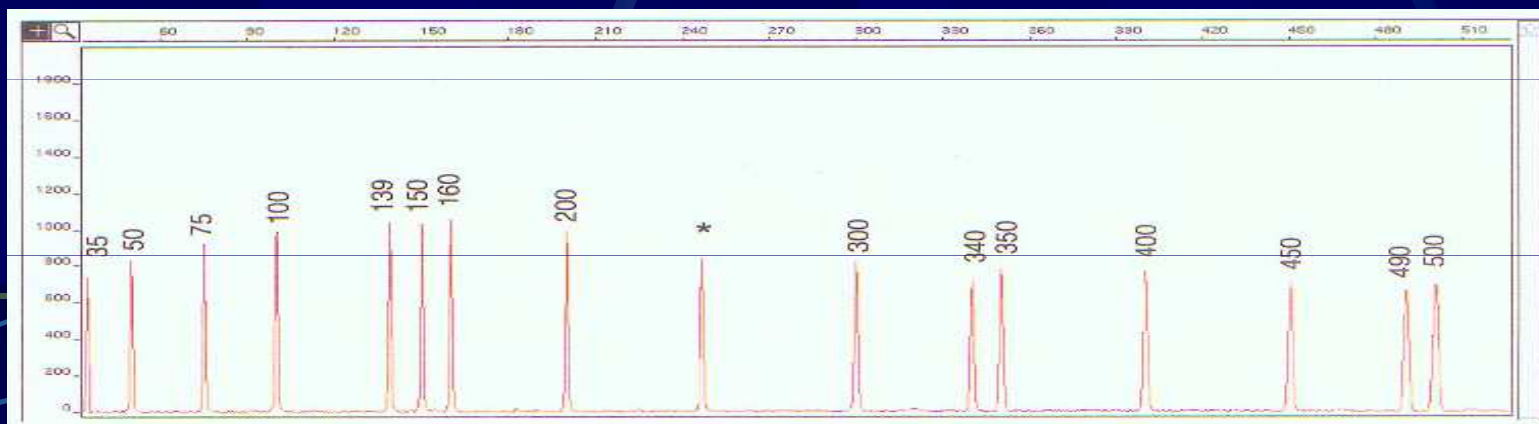
MULTIPLEX



| vzorek | PRIMERY ML | | PRIMERY HB | | PRIMERY JH | |
|---|------------------|---------------|---------------------|------------------|-------------------|----------------|
| | ARR4N* ARR4S2 | ARR4N* d11 | Sim 799* Sim 612 | Sim 799* 8130 | 16 NEW* 16 KON | 16NEW* 8130 |
| ARR4 | 133,5 | 215,8 | — | — | — | — |
| AHP4 | — | — | ∅ | 245,6 | — | — |
| ARR21 | — | — | — | — | ∅ | 388,3 |
| W | 133,5 | ∅ | 211,5 | ∅ | 340 | ∅ |
| MULTIPLEX W,AHP4,ARR1 W,ARR4,ARR1 | | | | | | |

Délkový standard- TAMRA 500

50-75-100-139-150-160-200-X-300-X-350-400-450-490-500

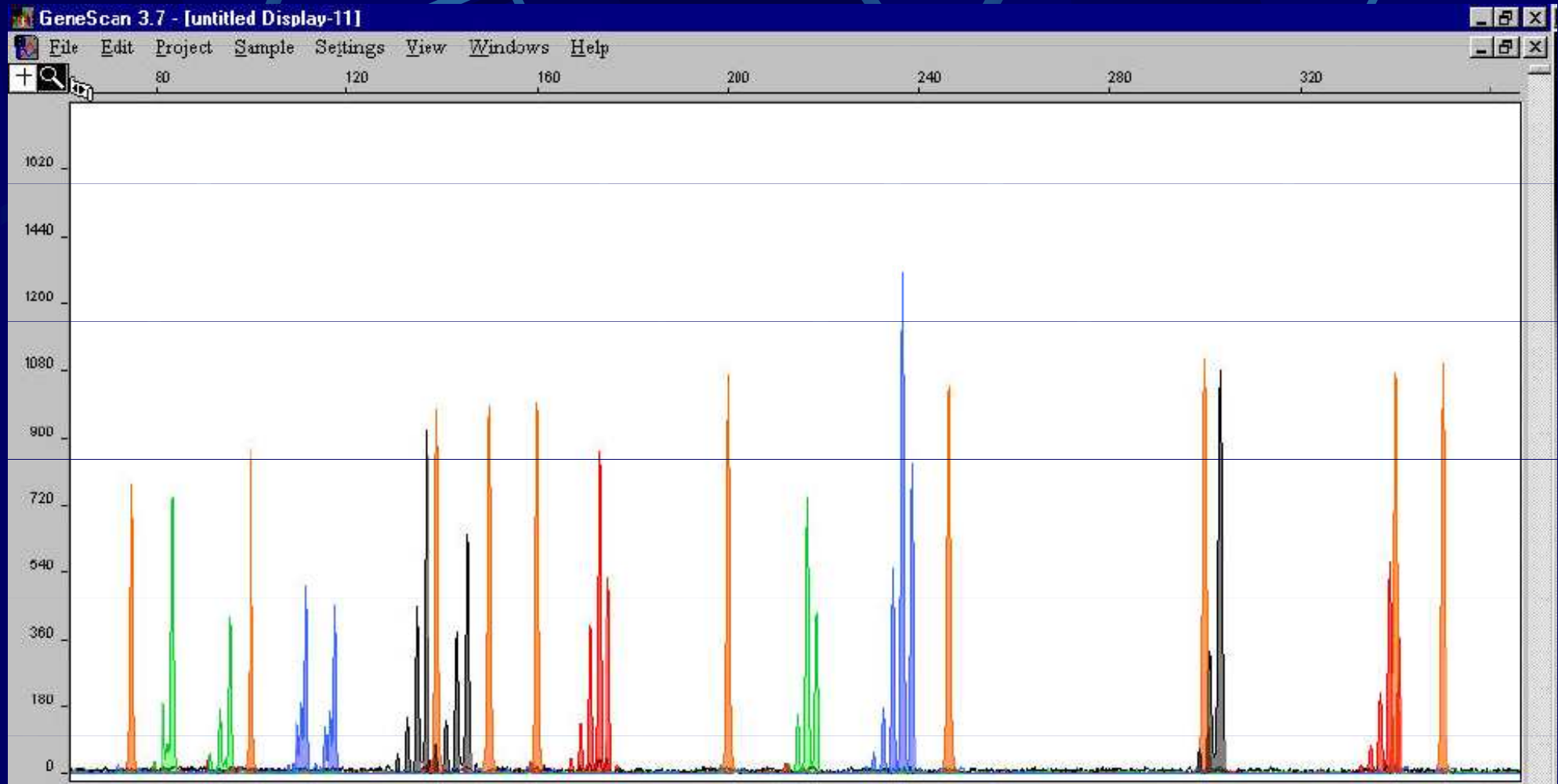


- pro fragmentační analýzu používáme vždy dva primery pro 1 fragment :
jeden značený a jeden neznačený
- současně lze analyzovat více fragmentů
- ke každému analyzovanému vz. DNA přidáváme délkový standard
- analyzujeme- li více fragmentů současně, rozlišujeme fragmenty dvěma základními zp.:
 - délkově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

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)

5-dye LMS



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

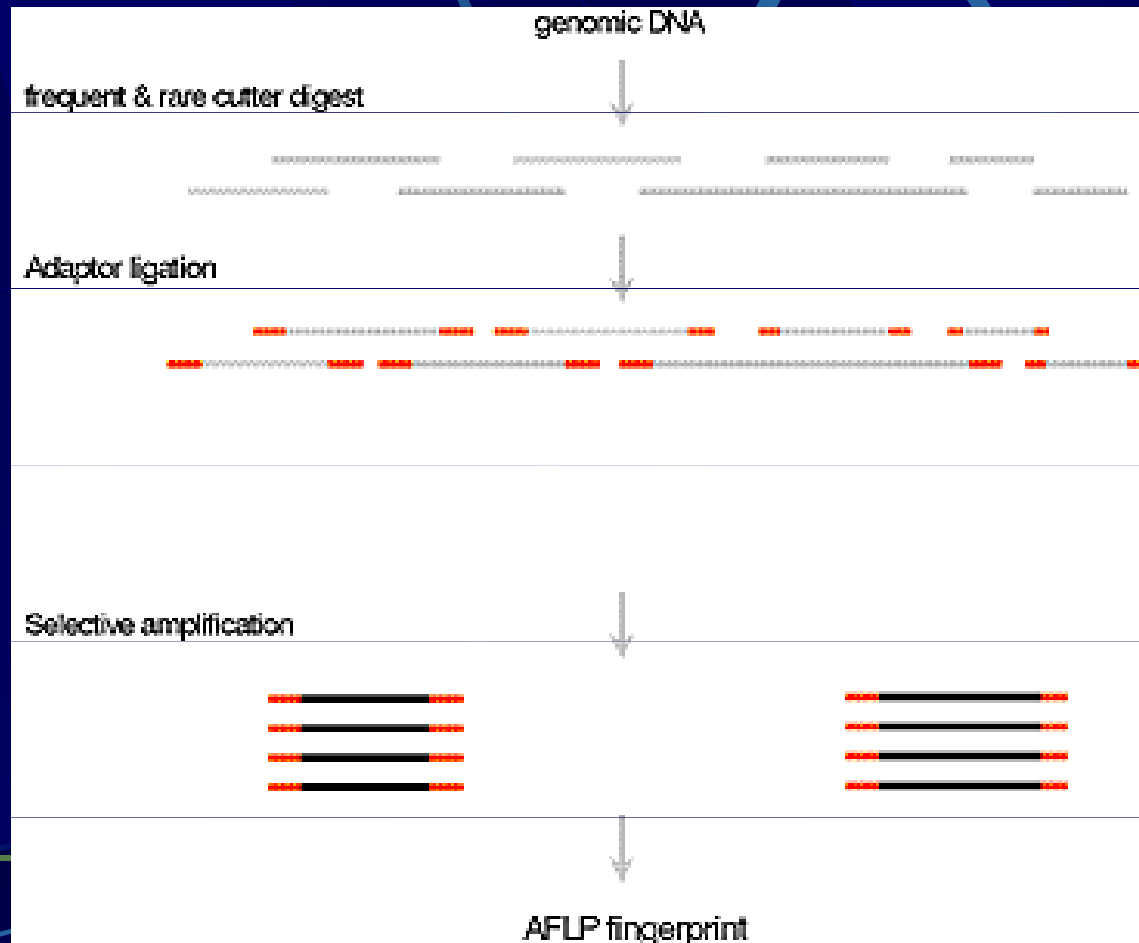
- detekce mutací – pozitivní mutace
 - negativní mutace
 - LOH /Lost of heterozygosity/- mikrosatelitní markery pro LOH screening mapy, které zachycují oblasti obsahující onkogeny nebo tumor- suppresní geny. Ztráta heterozygosity bývá často signálem rakovinového onemocnění.
 - RER /Replication Errors/- mikrosatelitní nestabilita- způsobena skluzem řetězce během replikace DNA \uparrow mutace opravných genů
- LOH a RER analýza se provádí současně, vždy N/T- 12 párů

Lékařství

- detekce mutací – pozitivní mutace
 - negativní mutace
 - LOH /Lost of heterozygosity/- mikrosatelitní markery pro LOH screening mapy, které zachycují oblasti obsahující onkogeny nebo tumor- suppresní geny. 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

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



SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

- minisekvenční 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

SNP

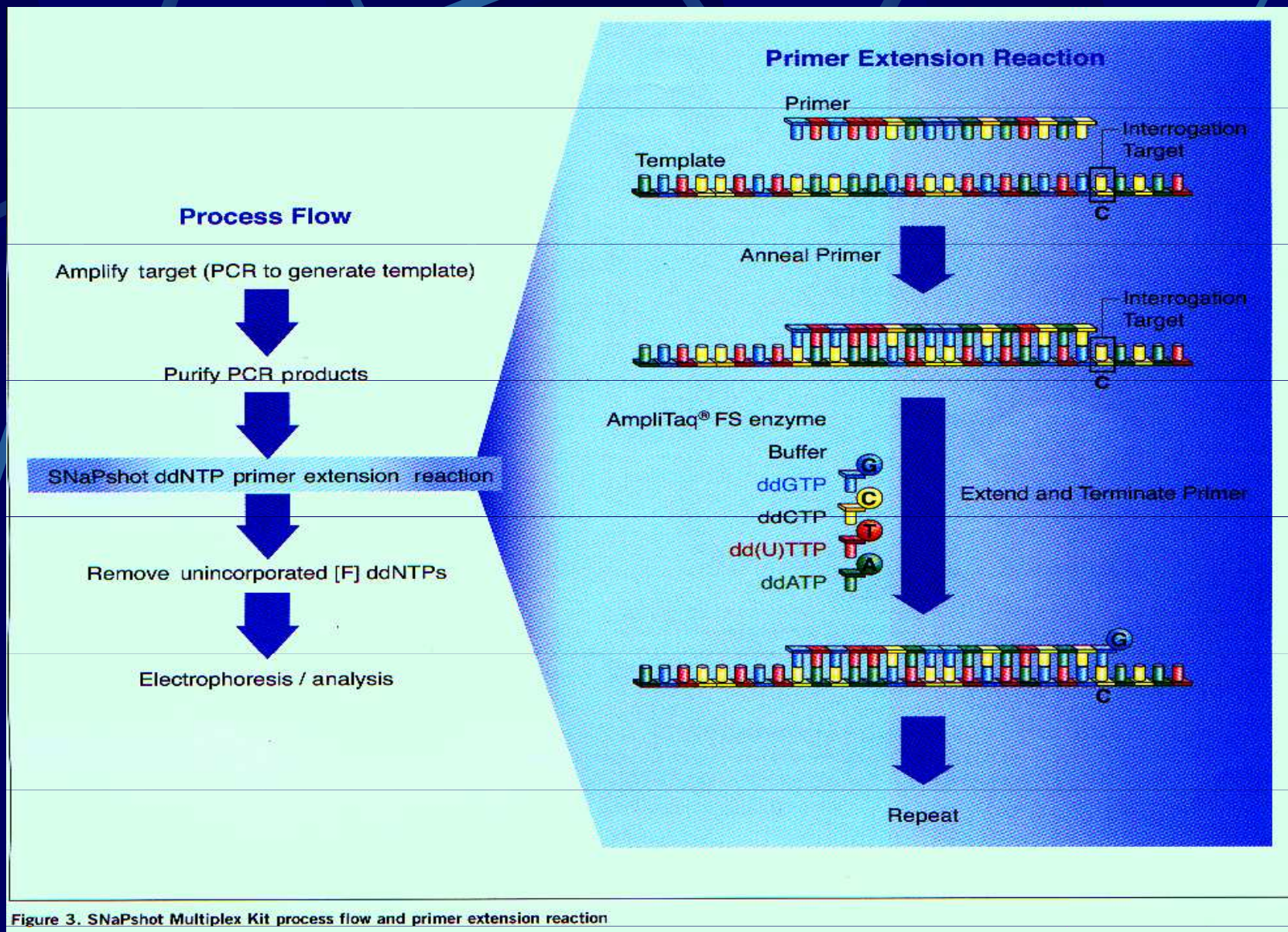
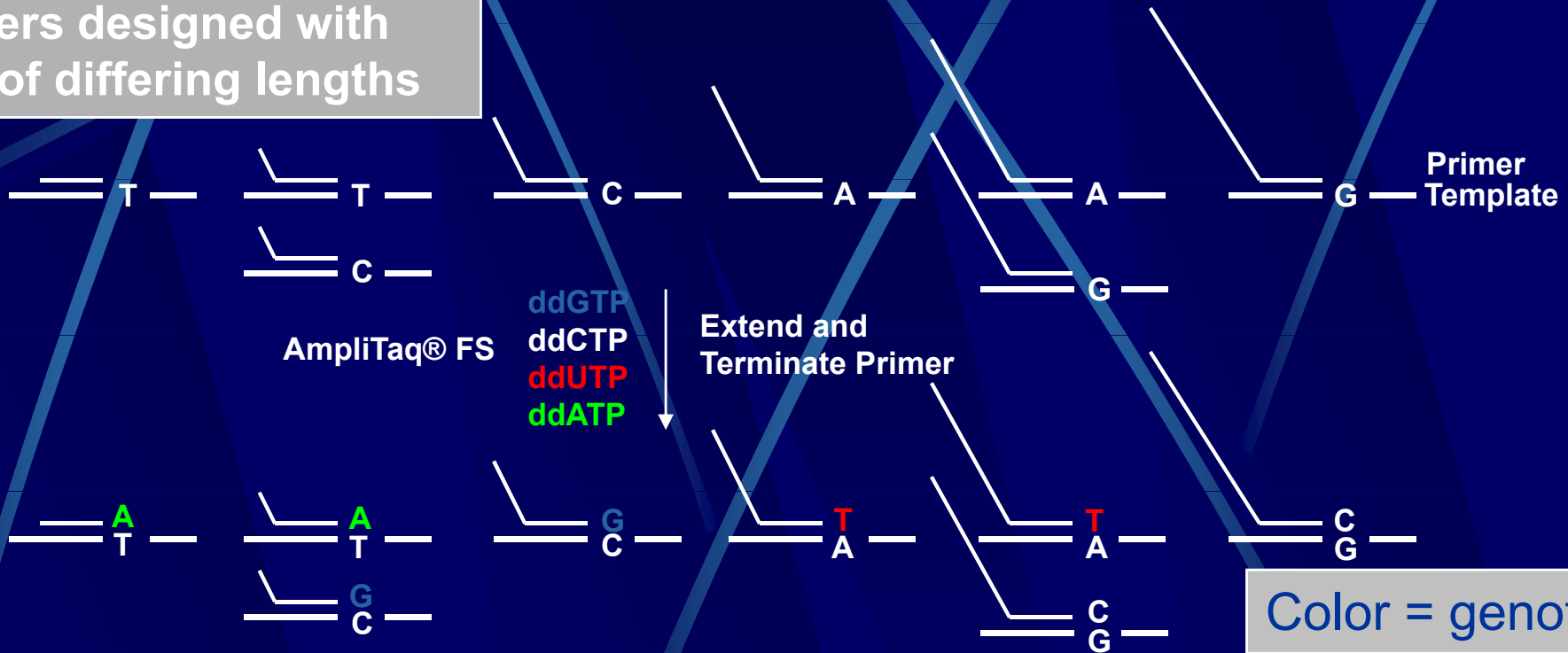


Figure 3. SNaPshot Multiplex Kit process flow and primer extension reaction

Single Tube

Multiplexed Single Base Extension Reactions

Primers designed with tails of differing lengths



Electrophoresis

Size = locus

