

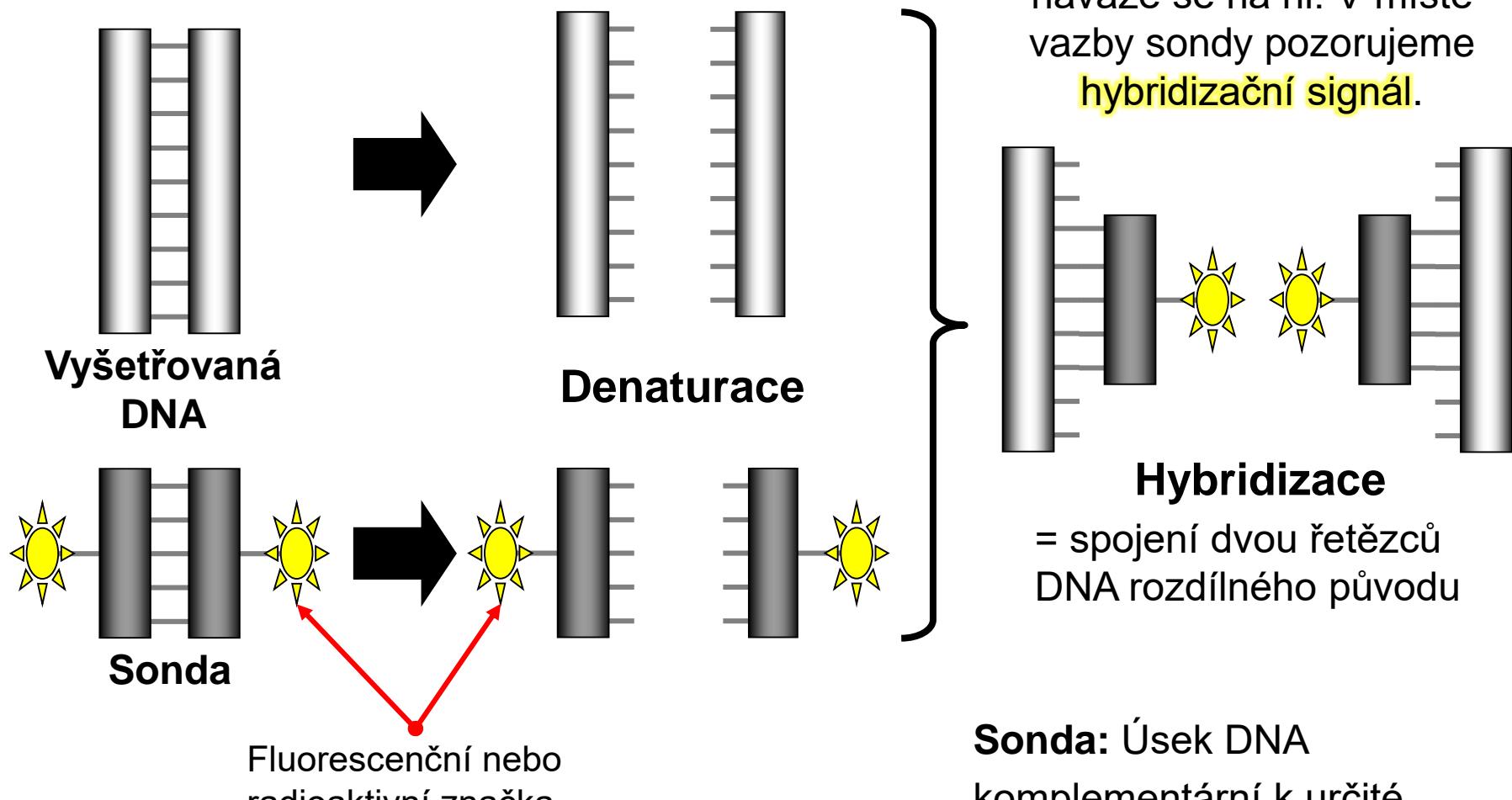
Identifikace mutací a polymorfismů

ACTTAGAGCGATGGGAAATCAT
AGAGATAAAAAGACACCCAAGGGAA
AAGACC MUTATION ACCCGCAC
GGGACAATTAAATTGGAGAAGTG
ATAGGGAGCTTGTCCCTGGGT
ATGACCGCTGACGGTACAGGCCA

Které techniky již známe?

- (Izolace DNA a elektroforéza – pomocná techniky)
- Polymerázová řetězová reakce
- Karyotypizace (umí odhalit jen rozsáhlé změny na chromozomové úrovni)

Hybridizace



Hybridizace

- *In situ* (probíhá v původních buněčných strukturách – tj. interfázních jádrech, metafázních chromozomech, popř. celých buňkách)
- Molekulární (probíhá na izolované DNA)

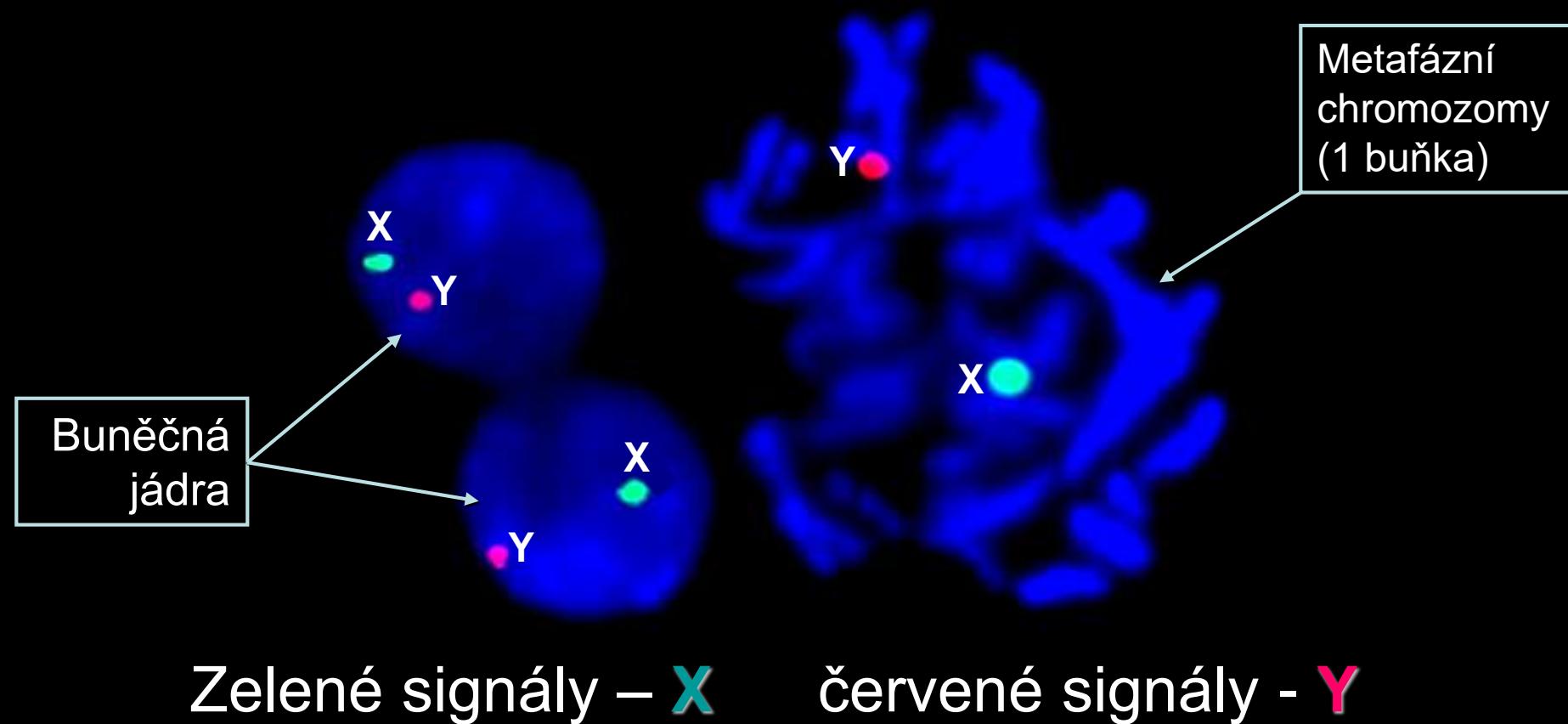
FISH neboli Fluorescenční *in situ* hybridizace

Sonda je značena
fluorescenčně

Hybridizace probíhá v
původních biologických
strukturách
(chromozomech,
buňkách, tkáních atd.),
DNA není izolována

Technika je založena na hybridizaci (zpravidla
molekul DNA, teoreticky může jít i o RNA)

Vyšetření chromozomů X a Y metodou FISH pomocí centromerických sond

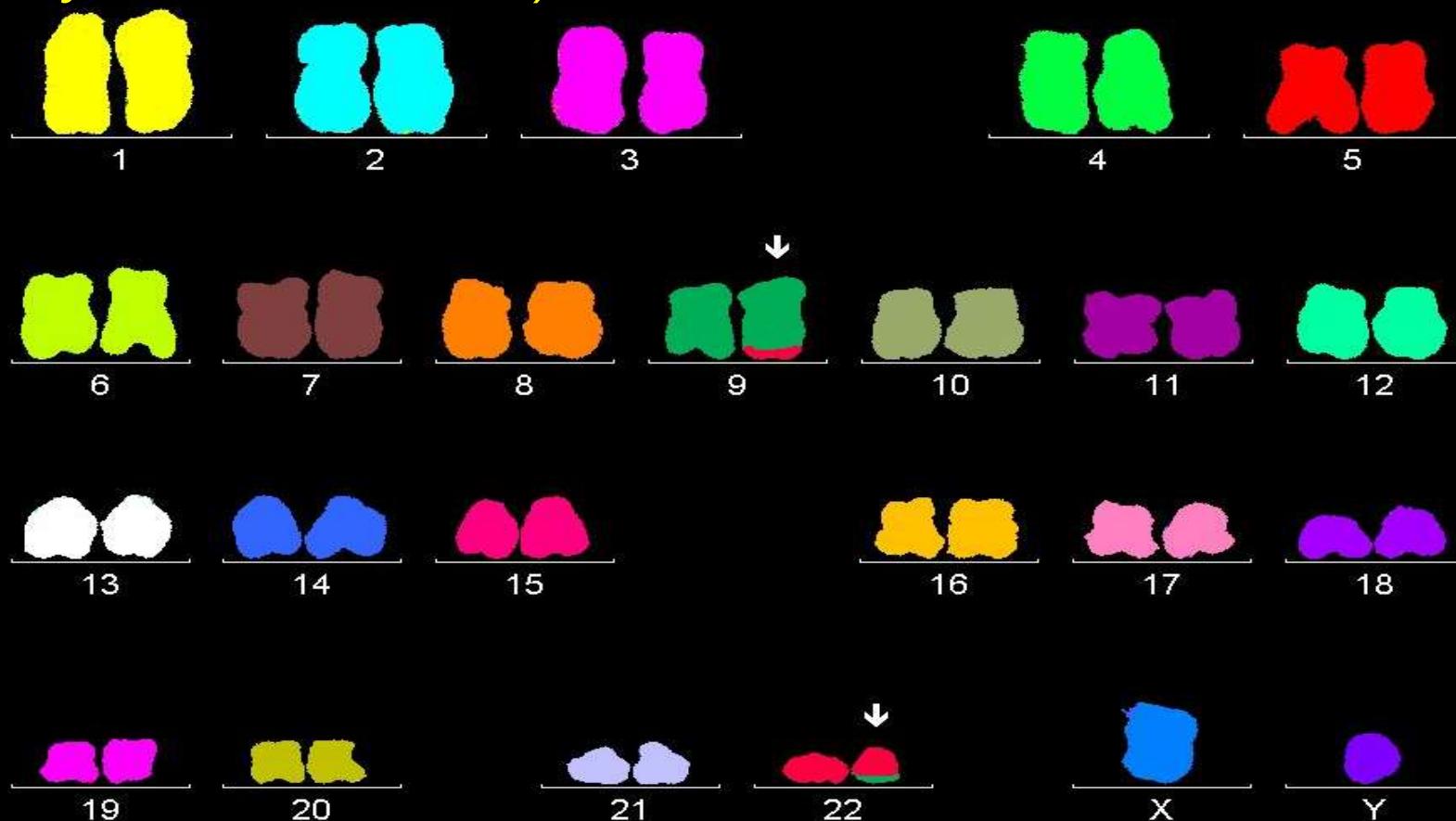


Metoda vícebarevné FISH neboli multicolor FISH

- Kombinací různě značených fluorescenčních sond označíme všechny chromozomy v buňce.
- Možnost komplexní analýzy karyotypu

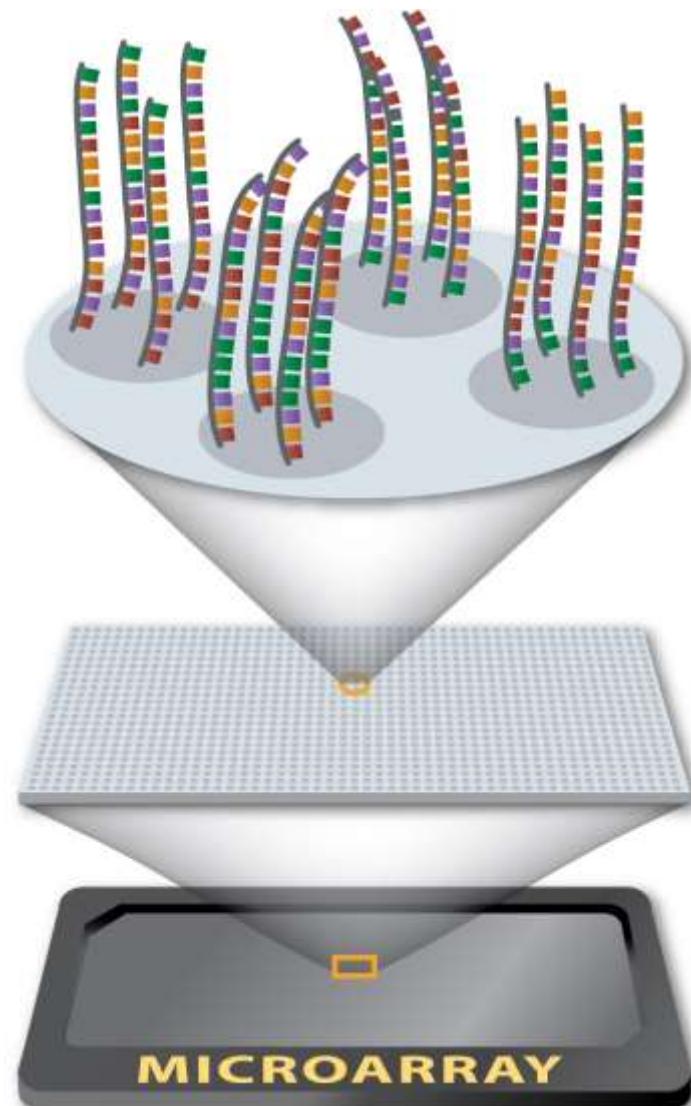
Vyšetření metodou vícebarevné FISH (M-FISH) translokace t(9;22)

(Reciproká translokace 9;22 se vyskytuje u chronické myeloidní leukémie.)



Obrázek laskavě poskytla doc. Zemanová, VFN Praha

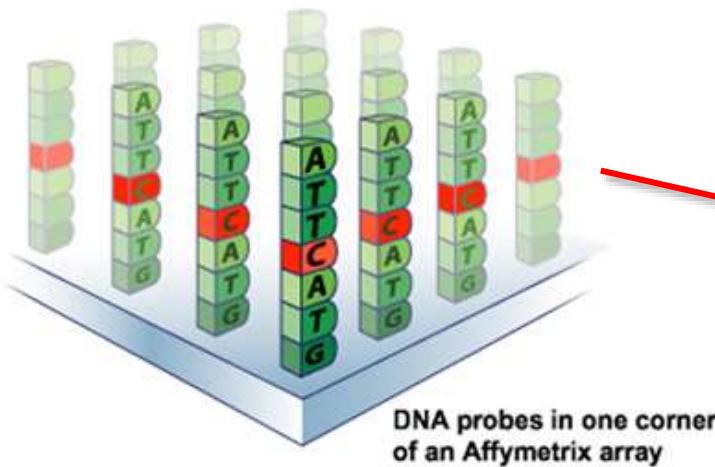
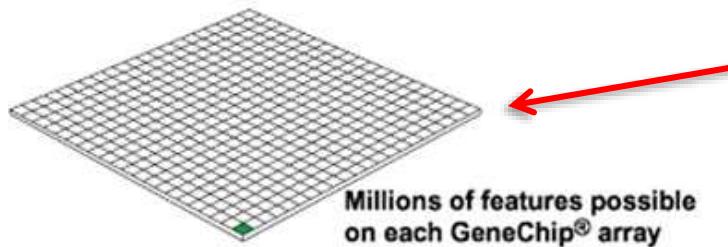
Čipové techniky



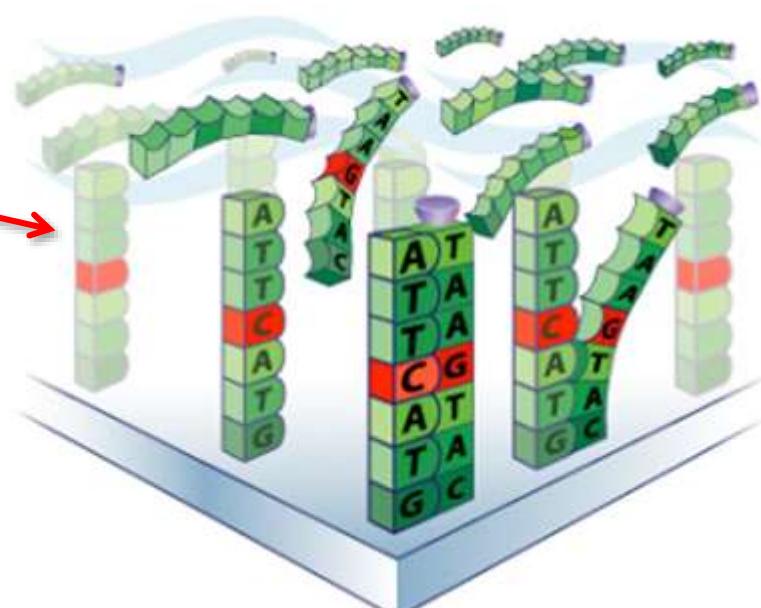
DNA čip

- Též *DNA-microarray*, zkráceně *array*
- Destička s velkým počtem nanesených (zpravidla desetitisíci až miliony) různých úseků DNA o známé sekvenci.
- Každý úsek odpovídá určité sekvenci ve vyšetřovaném genomu (popř. též určité mutované alele nebo polymorfismu).
- Umožňuje komplexní analýzu genomu.

Základem čipové analýzy je hybridizace



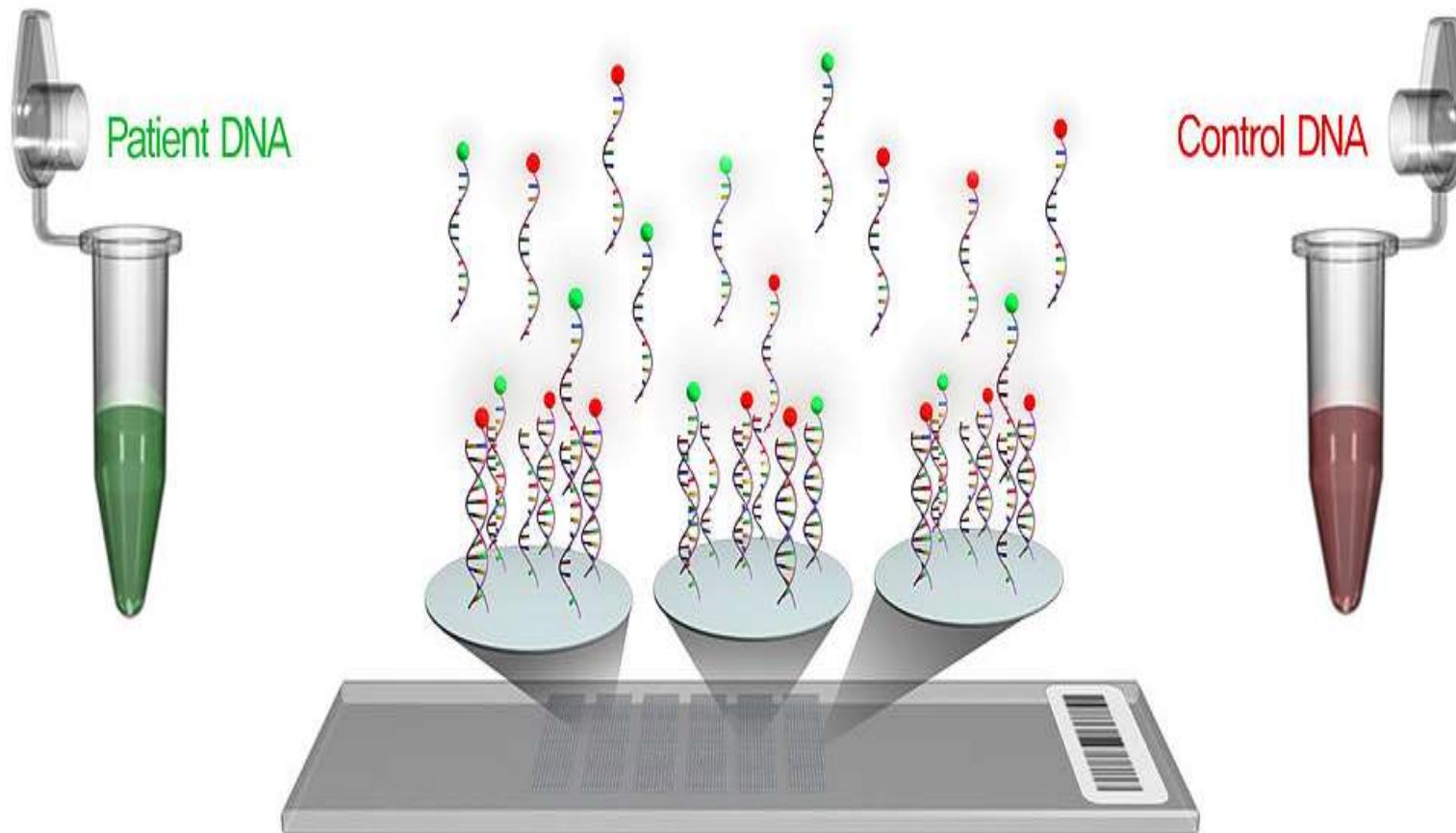
Hybridizace s
vyšetřovanou
DNA



Genový čip od firmy Affymetrix

Array CGH (aCGH)

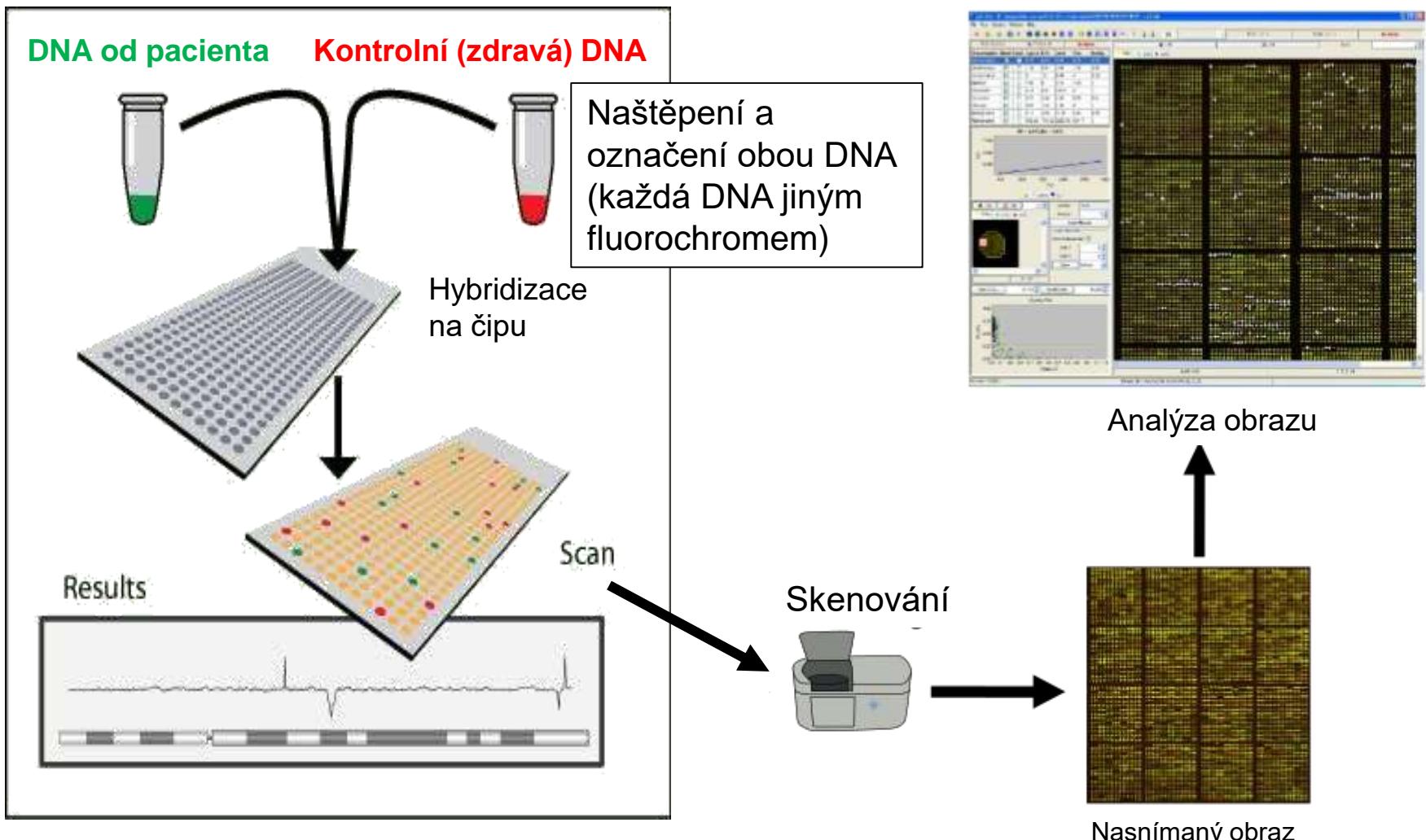
CGH = komparativní genomová hybridizace



Princip aCGH

- Srovnání normální („zdravé“) a vyšetřované („nemocné“) DNA
- Normální a vyšetřovaná DNA jsou označeny každá jiným fluorescenčním barvivem a pak „závodí“ o úseky DNA umístěné na čipu.
- Lze zjistit kvantitativní změny v genomu, tj. zmnožení či ztráty určitých úseků (viz dále).

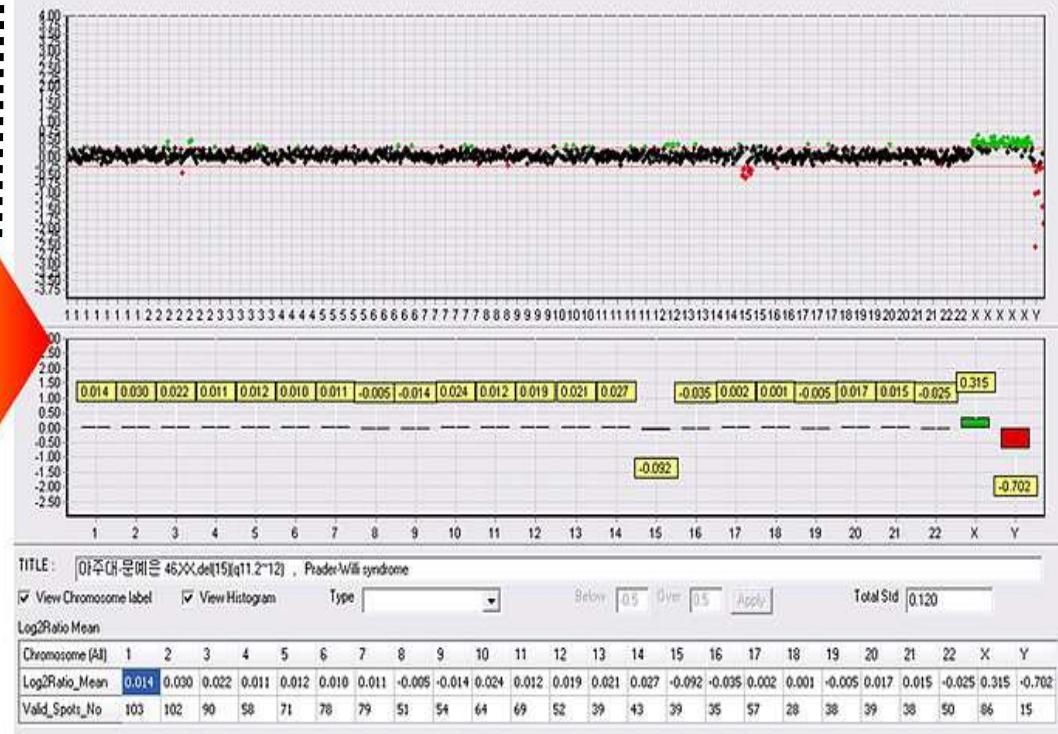
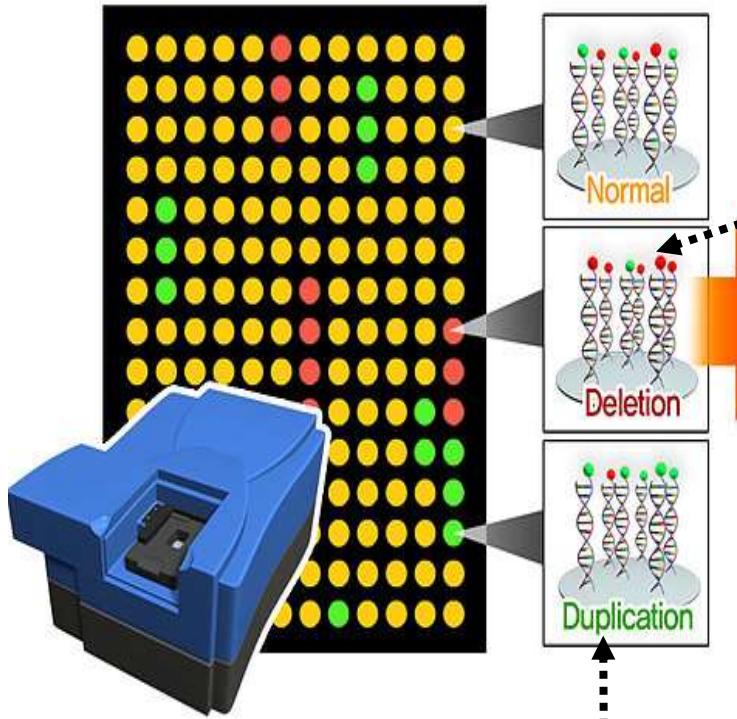
Princip aCGH podrobněji:



Vyhodnocení aCGH

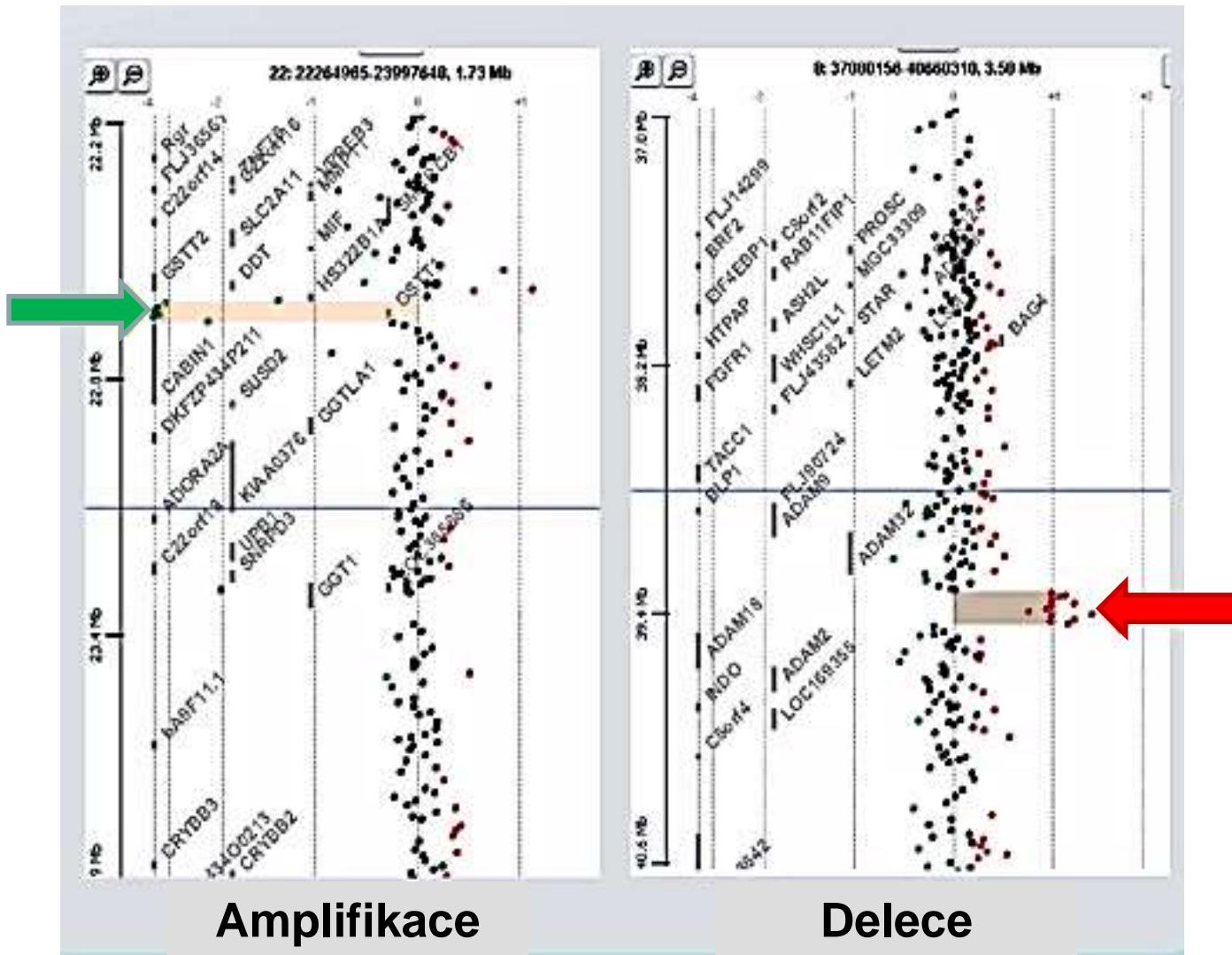
Chip Scanner

Převažuje červená barva (**barva kontrolní DNA**):
daný úsek je u pacienta ztracen (deletován)



Převažuje zelená barva (**barva DNA od pacienta**):
daný úsek je u pacienta zmnožen (duplikován,
popř. amplifikován)

Výsledek aCGH



Využití aCGH

- Komplexní vyšetření genomu se zaměřením kvantitativní odchylky – tj. delece (ztráty) a duplikace, resp. amplifikace (zmnožení) určitých úseků genomu
- Detekce mikrodelečných syndromů (syndromů spojených s delecemi malých úseků chromozomů)
- Vyšetření nádorů - detekce mutací a chromozomových aberací spojených se změnou množství genetického materiálu.

Sekvenování

- Sangerovo sekvenování
 - Zpravidla analýza jedné/několika málo úseků
 - Dnes většinou jen na verifikaci, resp. dovyšetření vybraných výsledků NGS
 - Založena na upraveném protokolu PCR
- Sekvenování nové generace (NGS)
 - Velmi početný soubor technik umožňujících komplexní analýzu velké části genomu.
 - Např. celoexomové sekvenování (vyšetření exonových sekvencí genů kódujících proteiny).

Exom: soubor všech exonů v genomu

DNA profilování (*DNA profiling*)

- Dříve DNA fingerprinting
- Identifikace osoby na základě kombinace specifických polymorfismů.
- Využití v kriminalistice a v paternitních sporech.



Na shledanou!



Chrám sv. Barbory v Kutné Hoře