

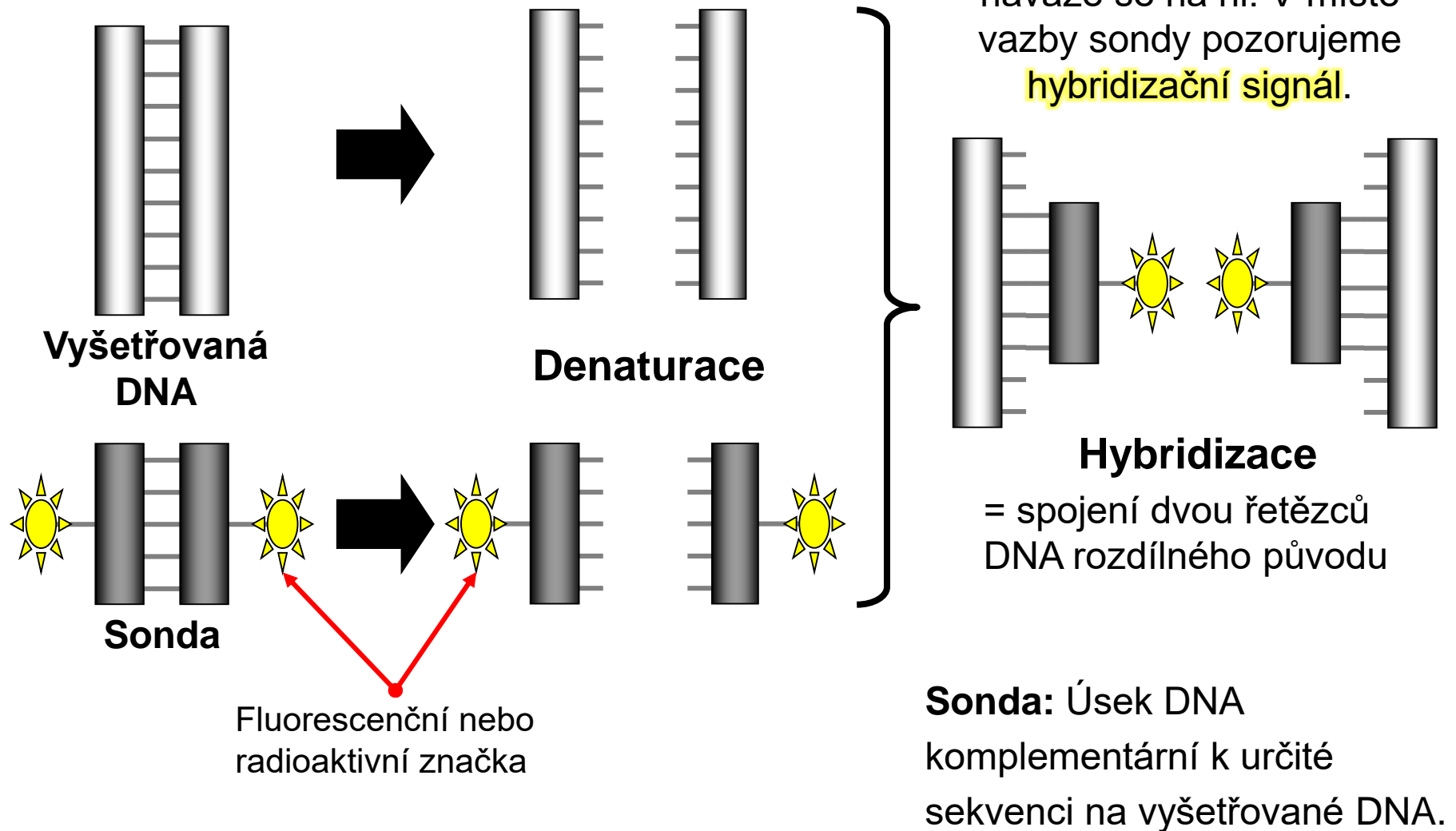
# Identifikace mutací a polymorfismů

AACTTAGAGCGATGGGAAATCAT  
AGAGATAAAAGACACCAAGGAA  
AAGACC MUTATION ACCGCAC  
GGGACAATTAAATTGGAGAAAGTG  
ATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGT  
ATGACGCTGACGGTACAGGCCA

# 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

Sonda je značena  
fluorescenčně

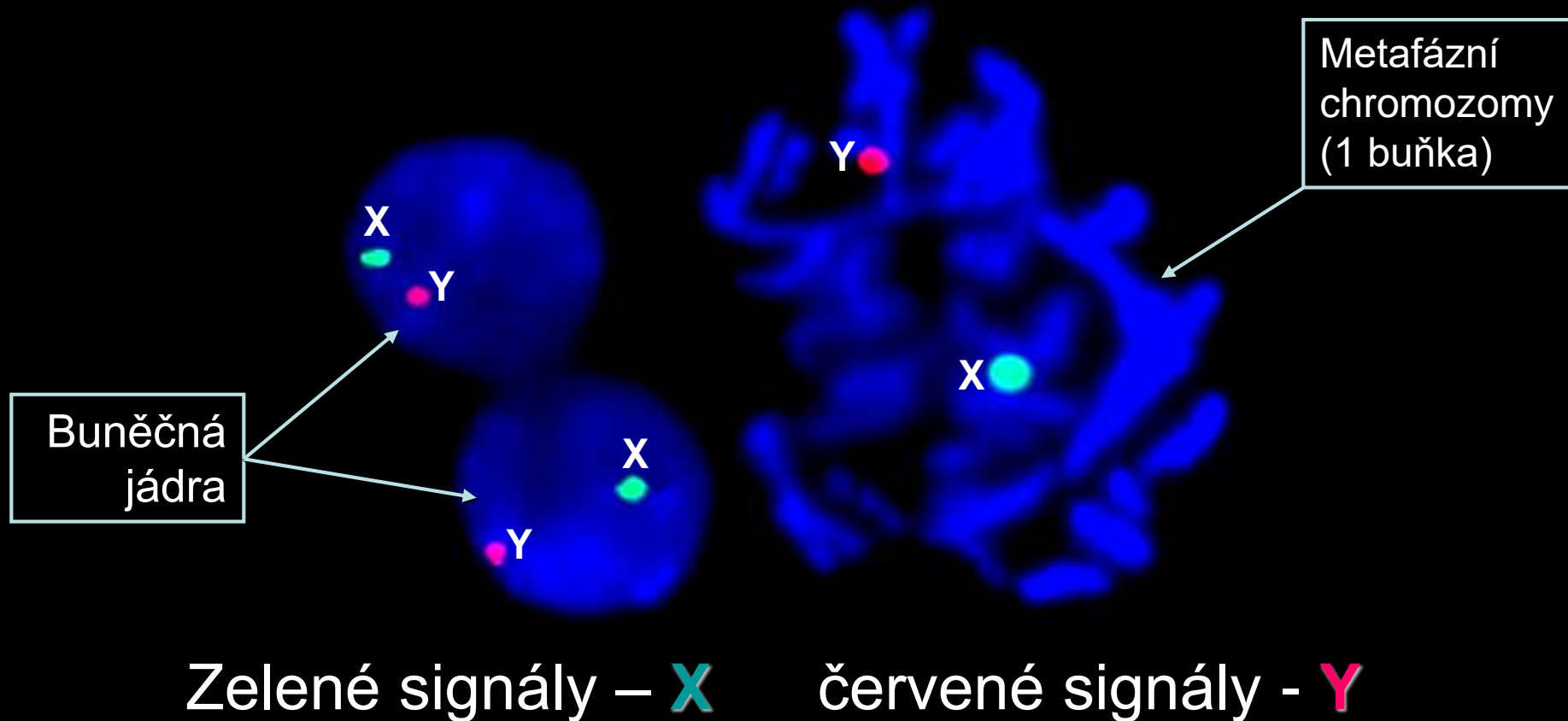
*in situ*

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

## hybridizace

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

# Vyšetření chromozomů X a Y metodou FISH pomocí centromerických sond

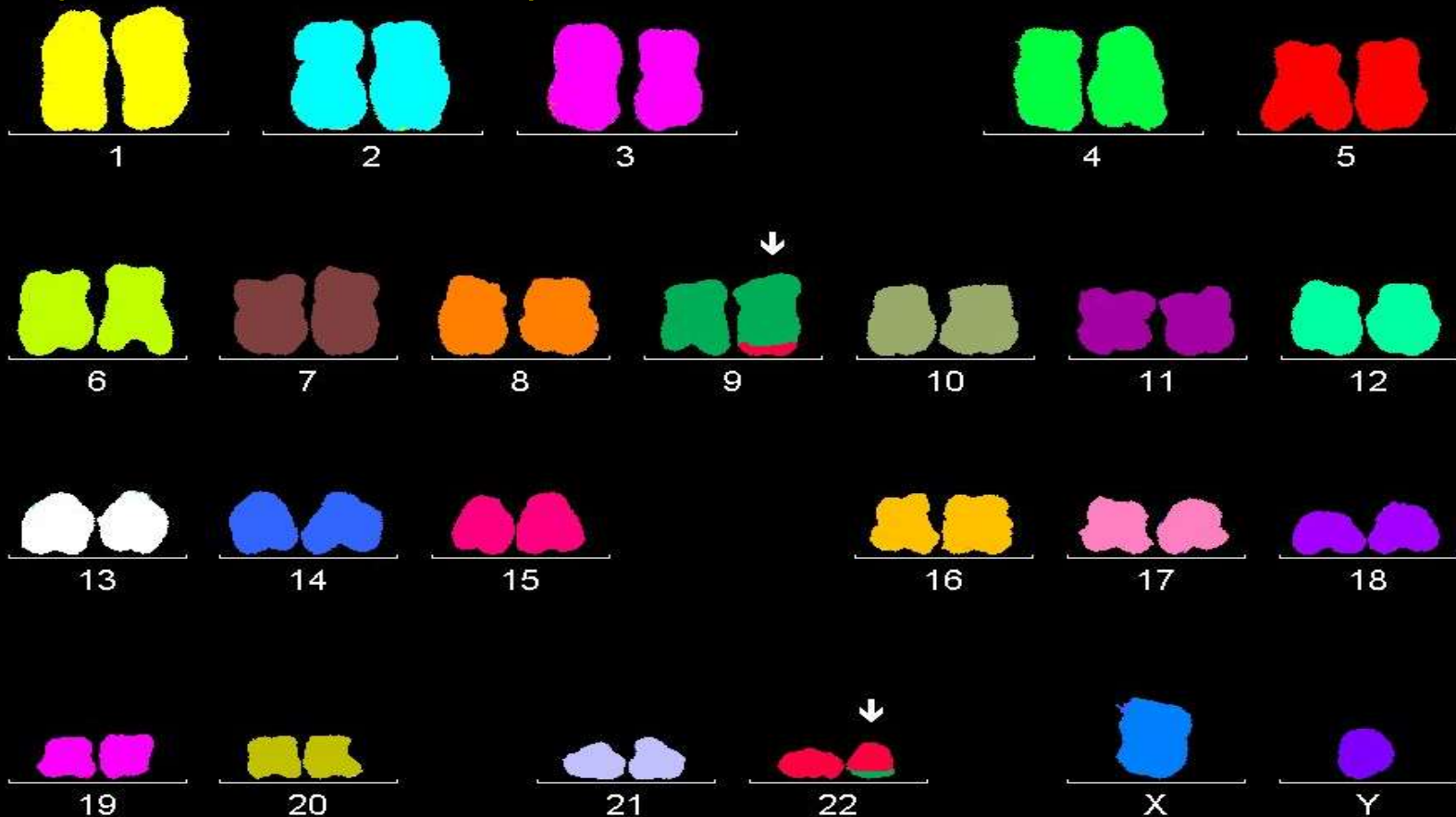


# Metoda vícebarevné FISH neboli multicolor FISH

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

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

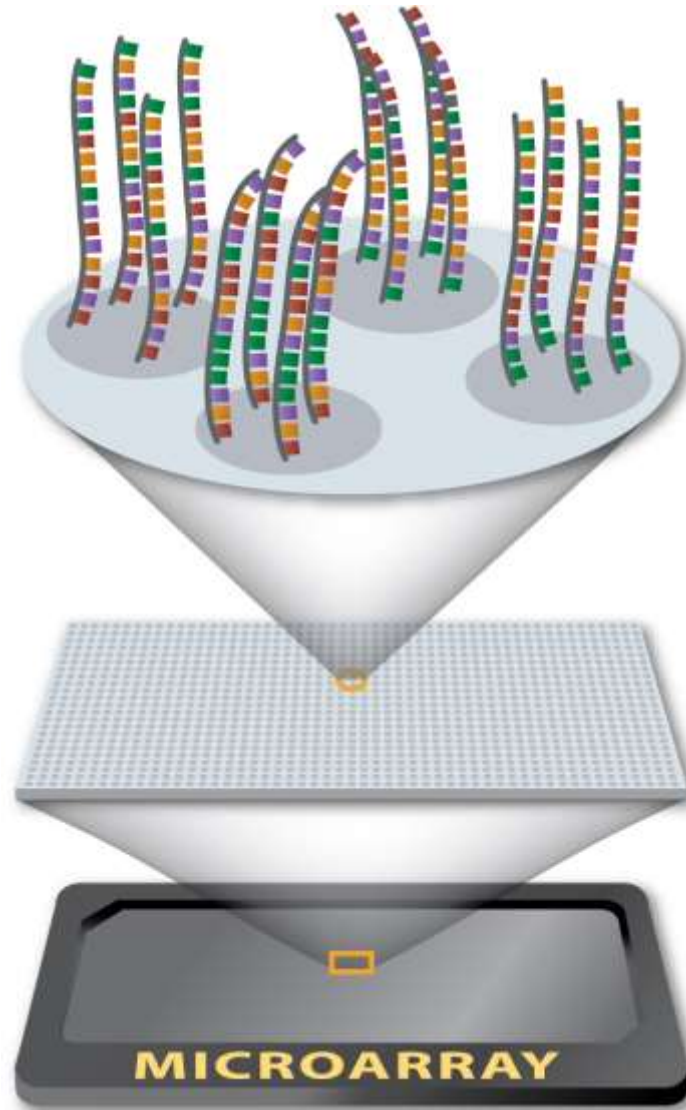
*(Reciproká translokace 9;22 se vyskytuje u chronické myeloidní leukémie.)*



Obrázek laskavě poskytla doc. Zemanová, VFN Praha



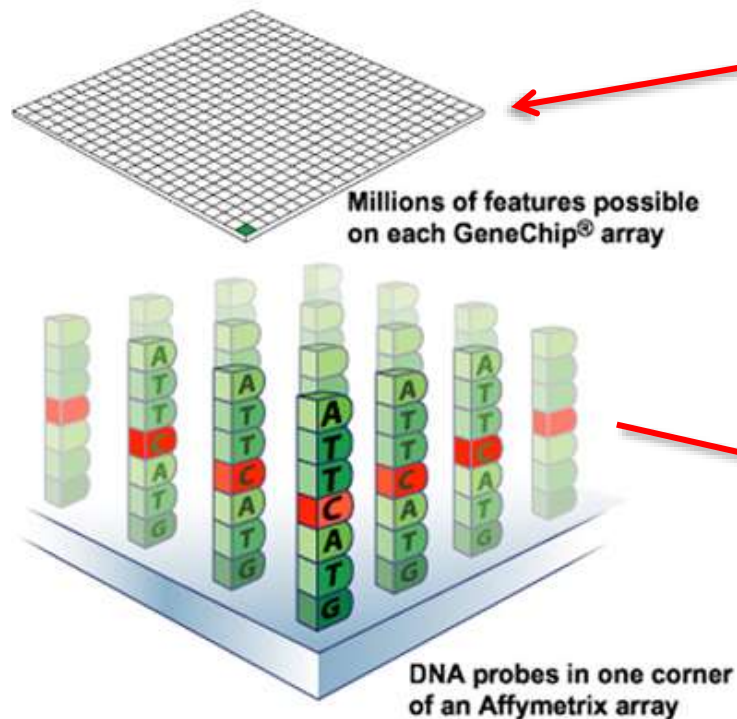
# Čipové techniky



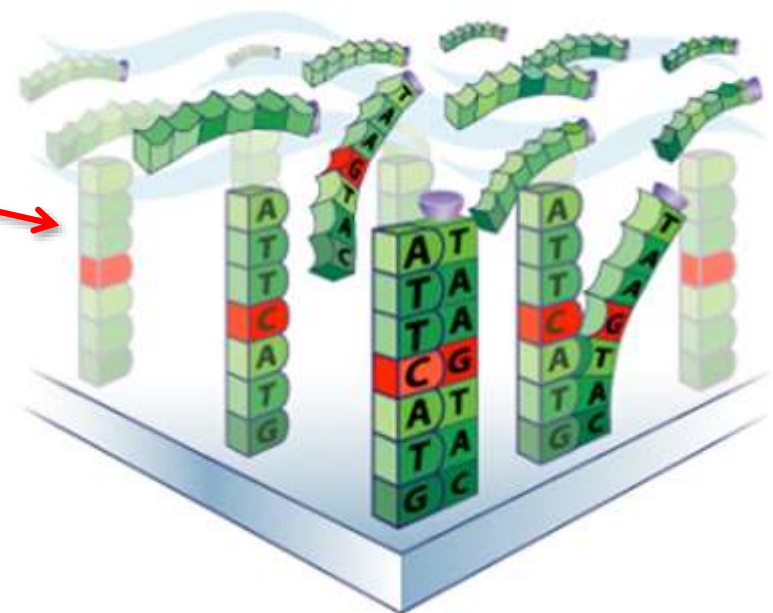
# DNA čip

- 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

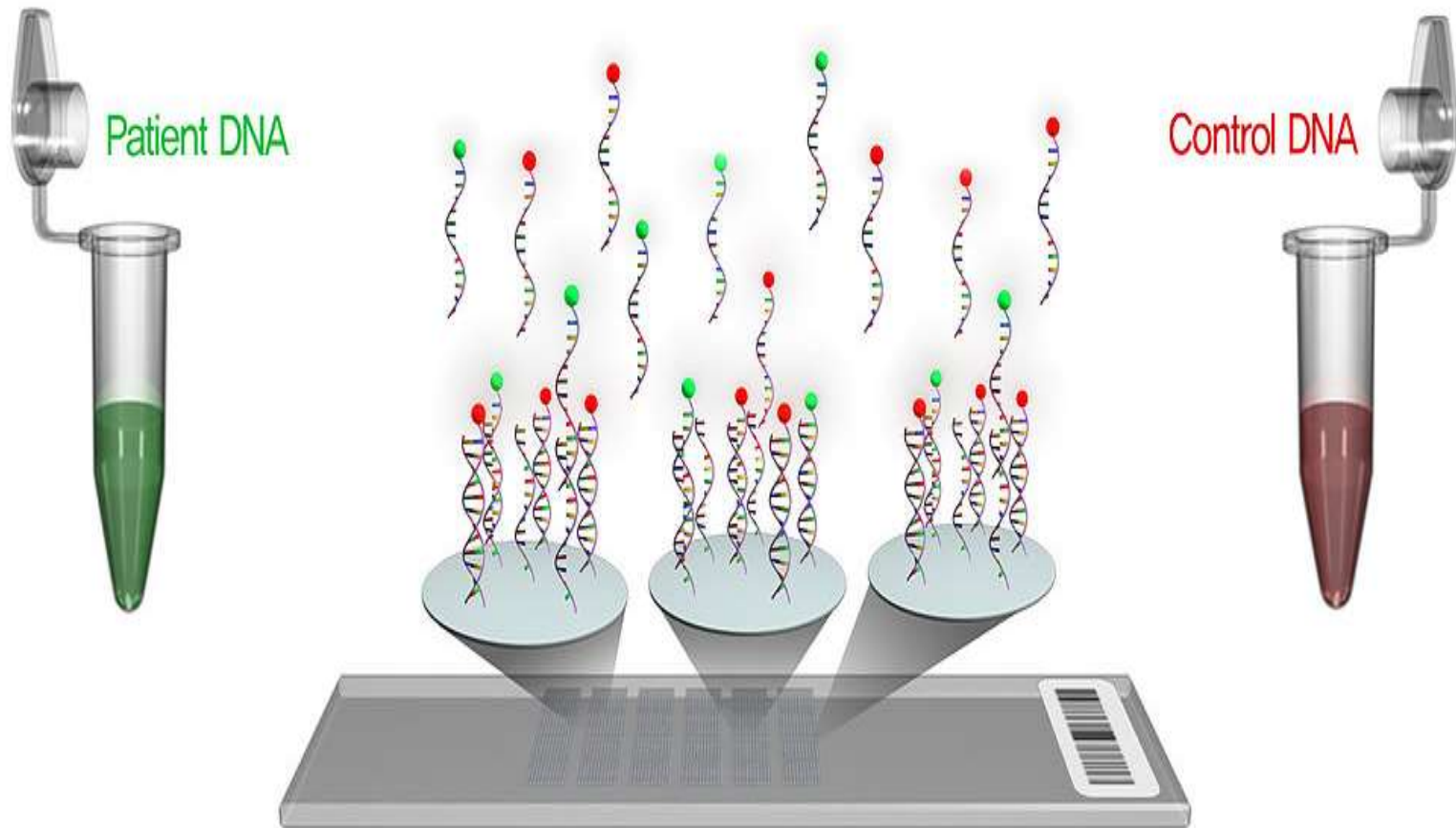


Genový čip od firmy Affymetrix



# Array CGH (aCGH)

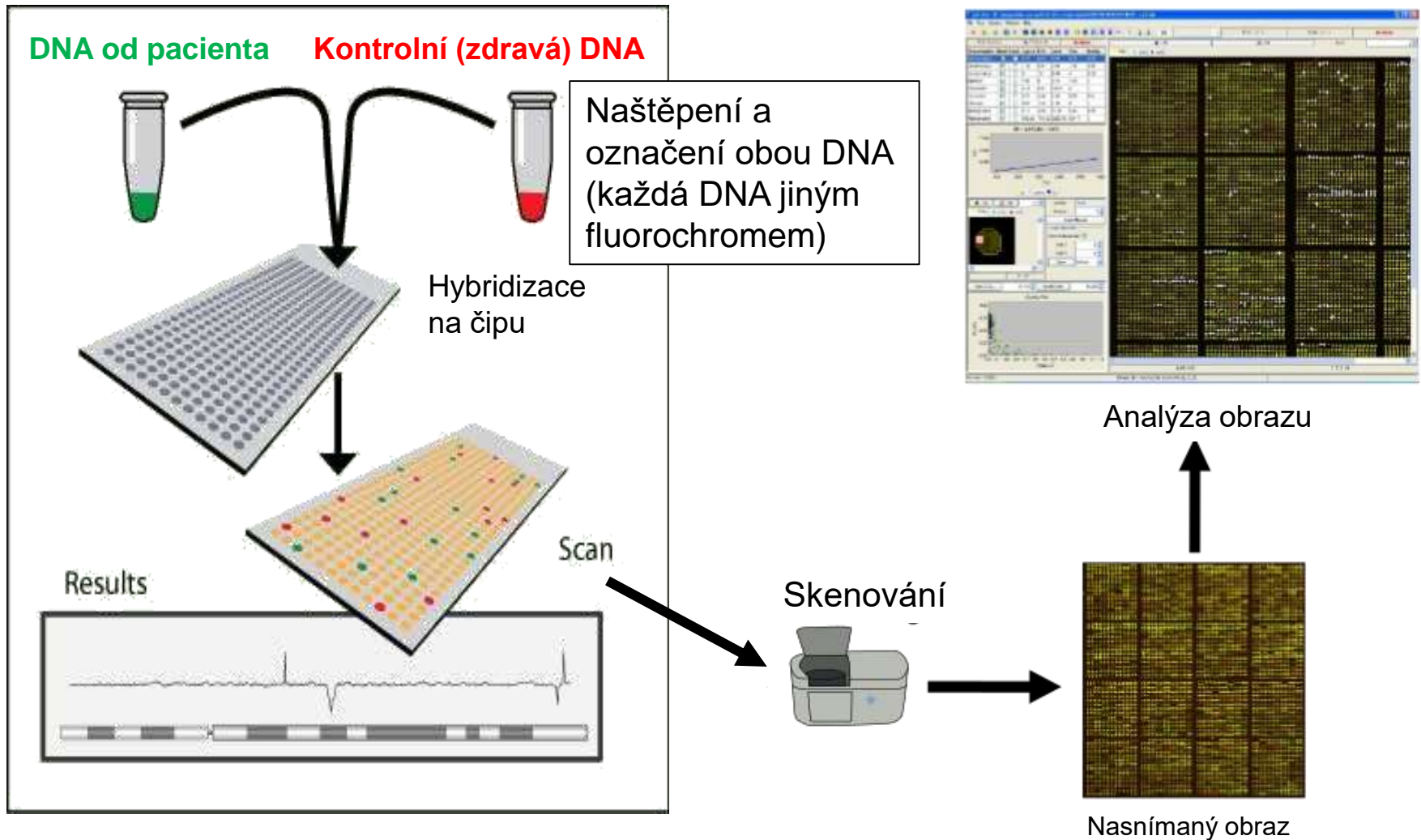
CGH = komparativní genomová hybridizace



# 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:

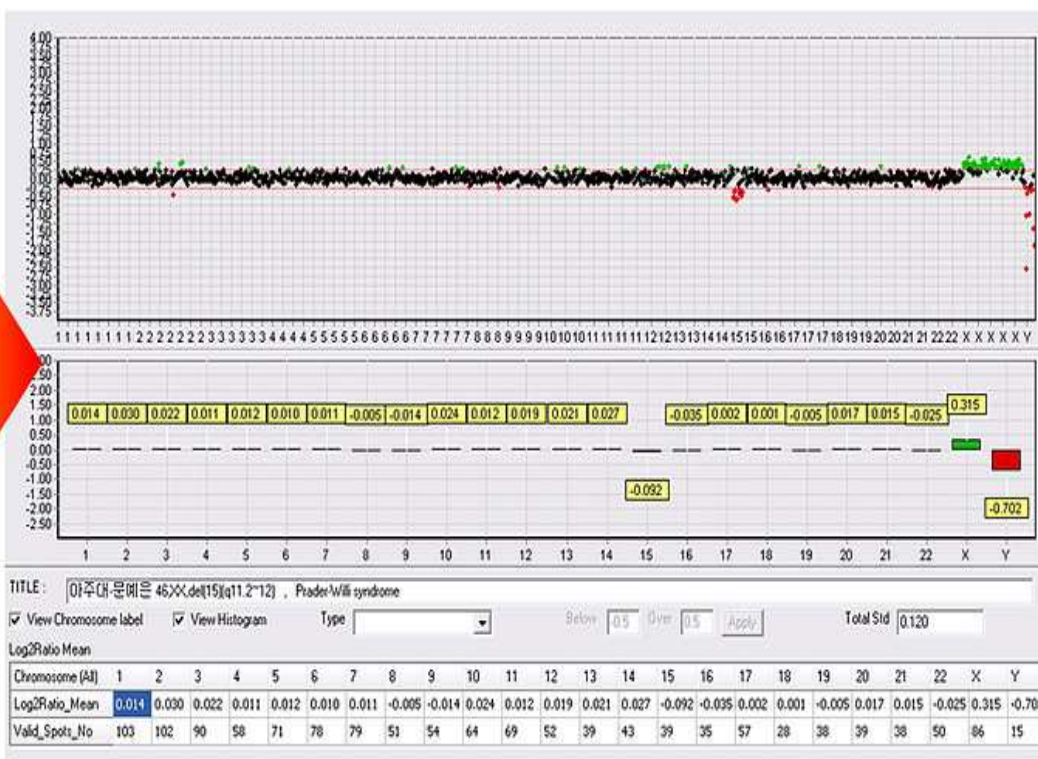
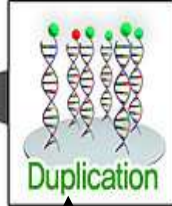
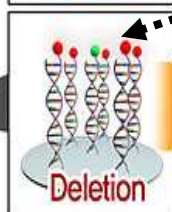
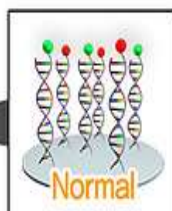
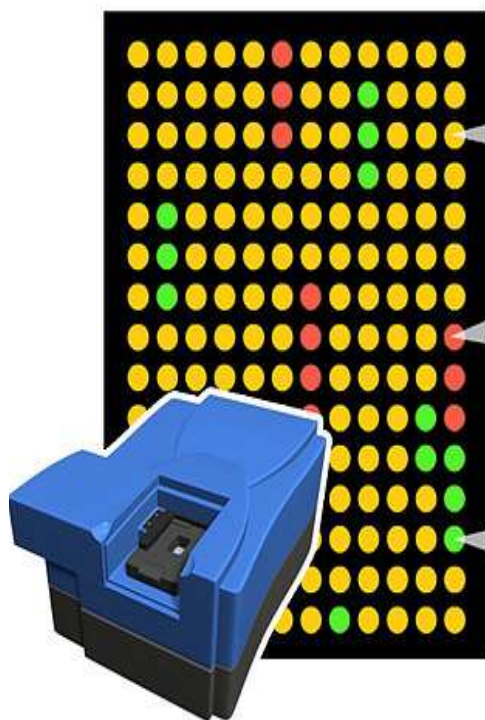




# Vyhodnocení aCGH

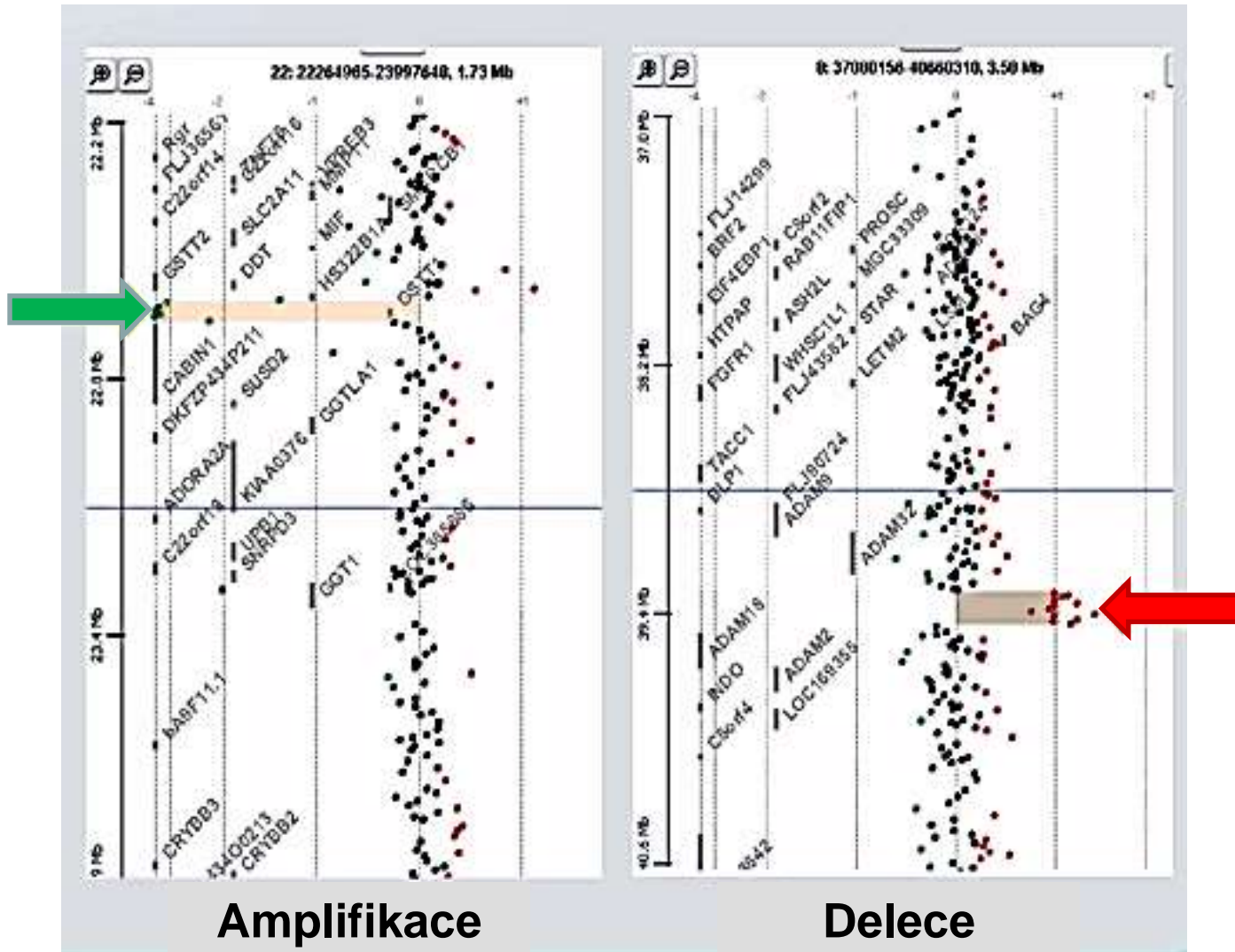
Chip Scanner

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 mikródelečních syndromů (syndromů spojených s delecemi malých úseků chromozomů)
- Vyšetření nádorů - detekce mutací a chromozomových aberací spojených se změnou množství genetického materiálu.

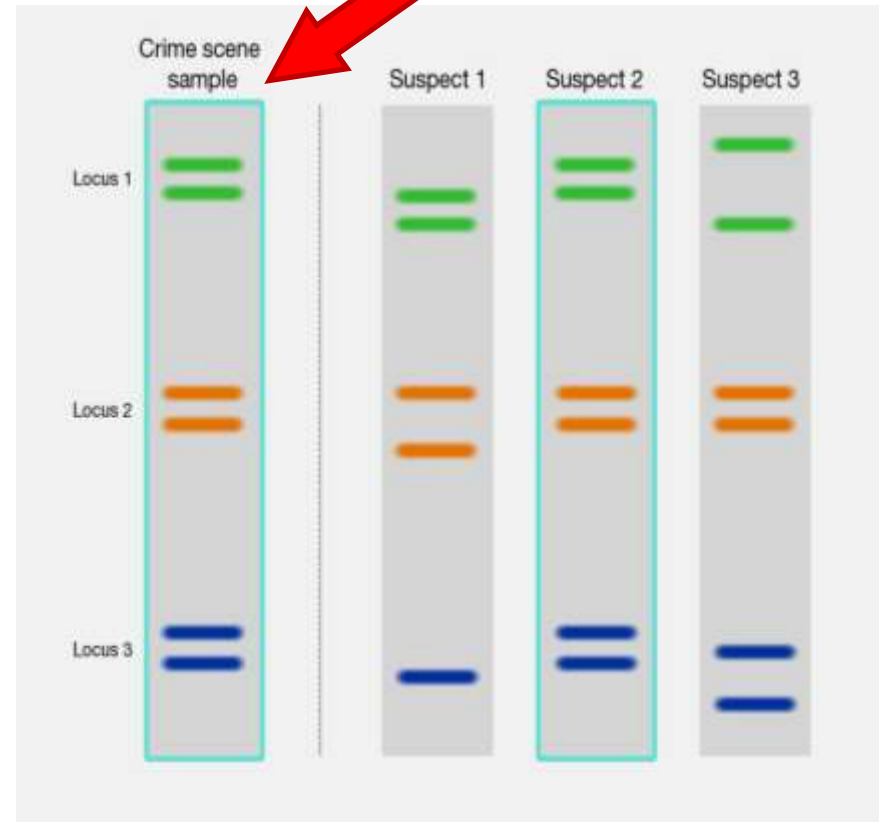
# Sekvenování

- 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