

Nepřímá DNA diagnostika

Přímou DNA diagnostiku nelze nabídnout, přestože gen je znám, z důvodů:

- **velikosti genu** (gen pro dystrofin, gen pro neurofibromin)
- **existencí homologních pseudogenů**
- **rozptýlením mutací v celé délce genu**, nepřítomností tzv. “hot spot” míst v genu

Vazebná analýza je umožněna:

- v rodínách s dvěma a více jedinci s klinicky potvrzenou diagnózou
- rozlišením dvou chromozomů pomocí markerů na DNA
- přiřazením DNA markerů (tj. chromozomu) k patologii v rodině

Základní principy nepřímé DNA diagnostiky:

- 1) odlišení dvou chromozomů rodičů (heterozygota markerů)
- 2) určení fáze (určení haplotypu -souboru alel polymorfních míst ve vazbě)
- 3) určení haplotypu (chromozomu) asociovaného s patologií v rodině

Využití polymorfních míst genomu v nepřímé DNA diagnostice

- přísná rodinná specifita
- nikdy nepotvrdí klinickou diagnózu.

Polymorfní místa lidského genomu:

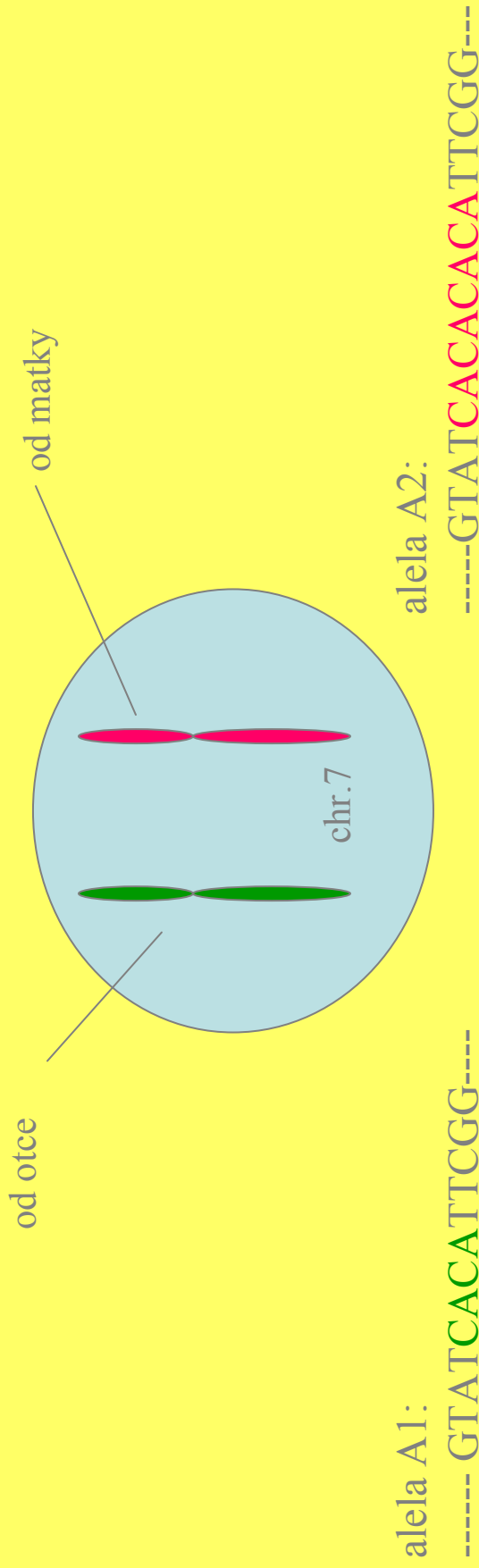
- polymorfní DNA sekvence rozlišované specifickými restrikčními enzymy
- tandemové repetice DNA, charakterizované bloky opakujících se DNA sekvencí. Podle velikosti opakujících se bloků rozlišujeme:
 - * **VNTR** (variabilní počet tandemových repetit) - opakující se jednotky tvoří oblast o velikosti 100 - 6500 párů bazí, často lokalizované extragenově
 - * **mikrosatelitní DNA** - repetice 1 - 4 párů bazí, nejčastěji lokalizované v nepřepisovaných částech genu tzv. intronech

Nepřímá DNA diagnostika

- využívá znaky (markery) rozptýlené v lidském genomu
- vyskytují se běžně v populaci
- nejsou přepisovány do proteinu (leží v intronech)
- nejsou příčinou choroby

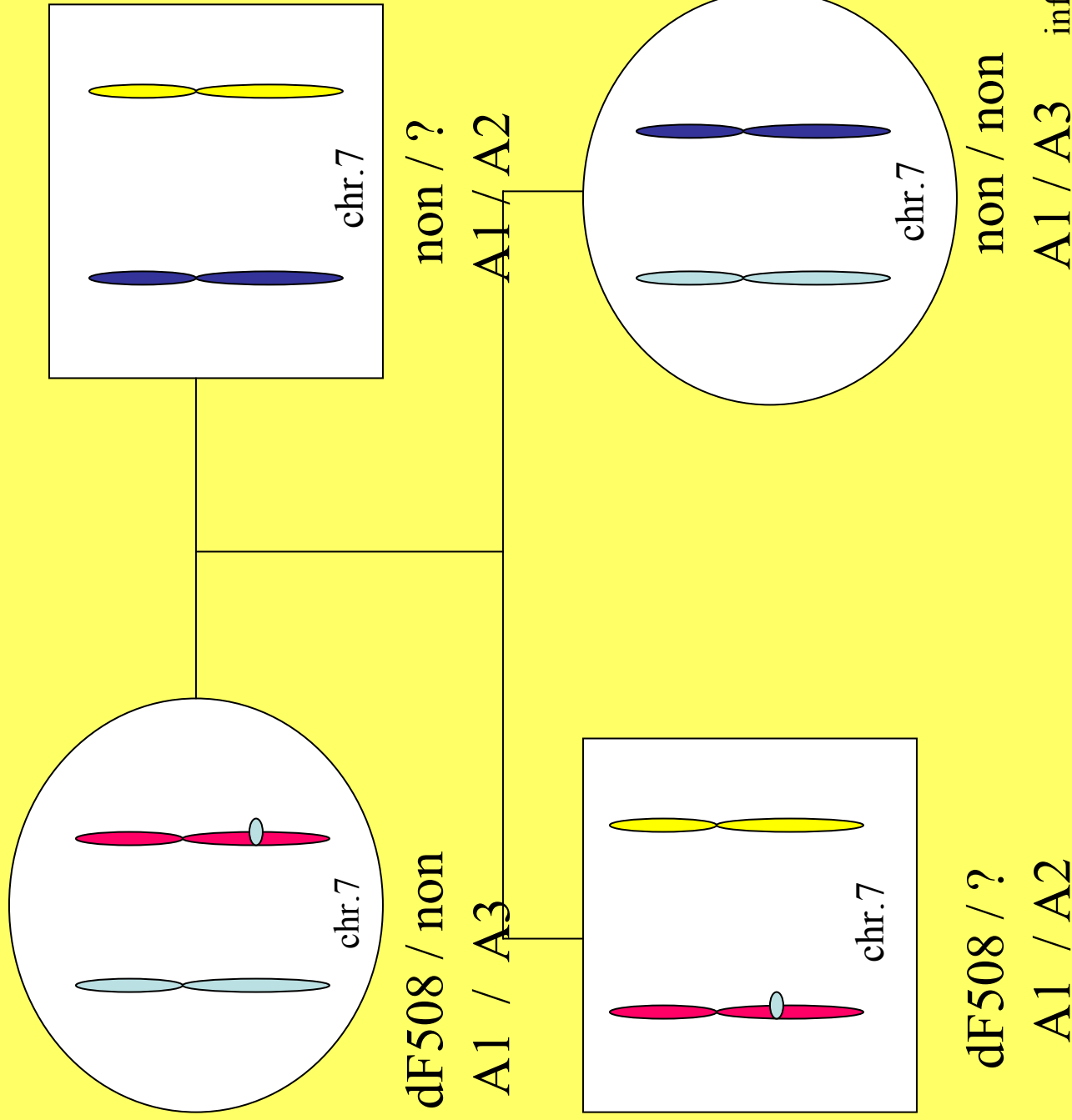
př. gen CFTR - intron 8 - polymorfní místo

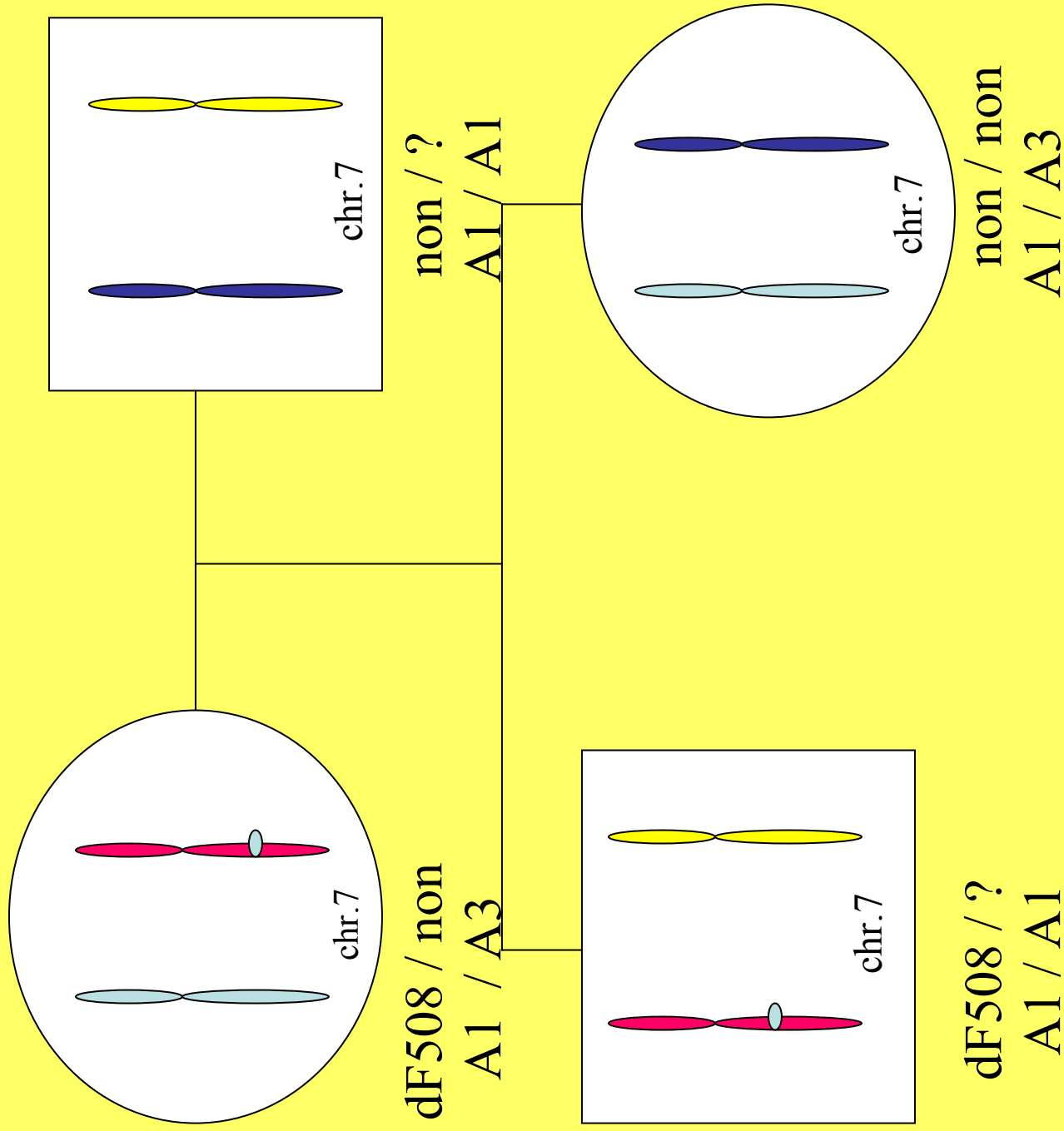
(CA)_n — GTATCACACACATTCGG —



délka alely 130 bp

délka alely 134 bp





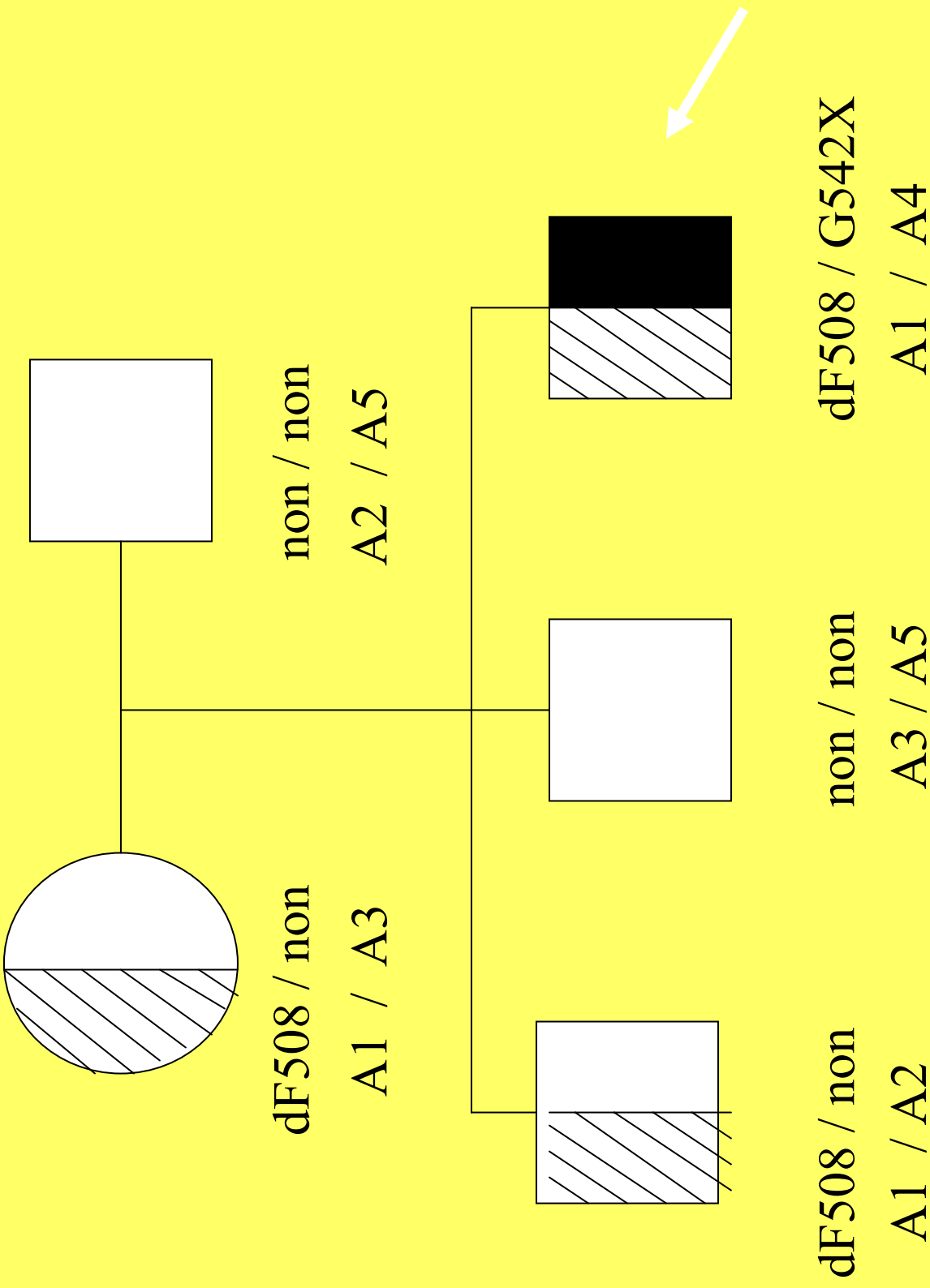
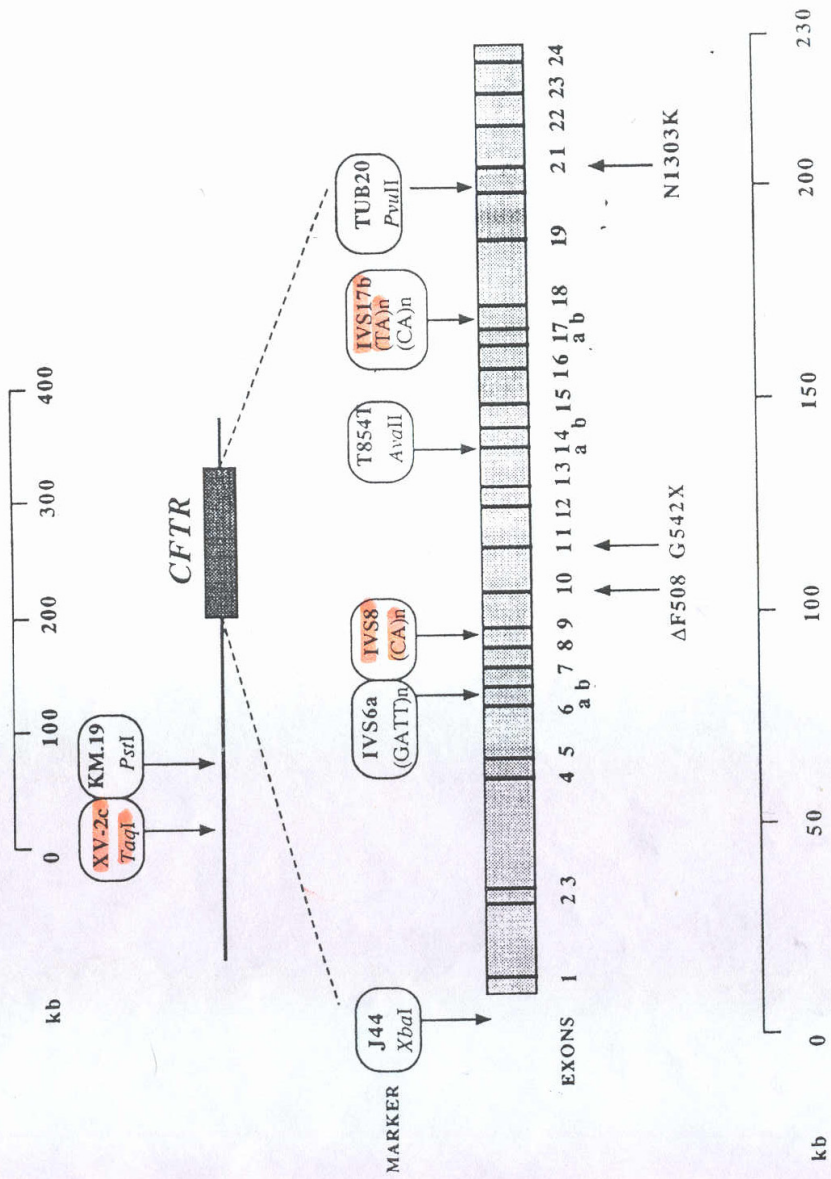
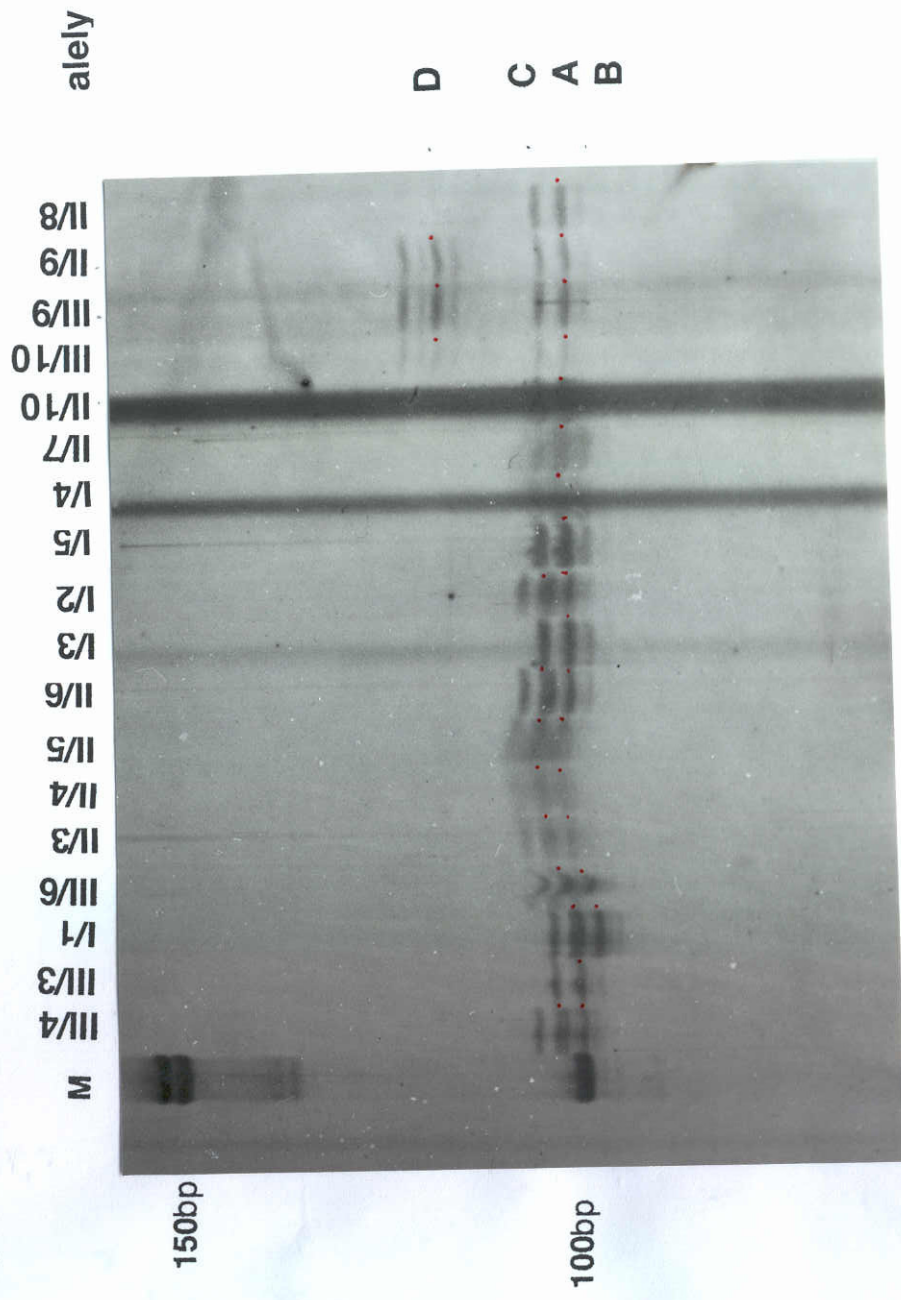


Schéma: Lokalizace extra- a intragenních polymorfních míst genu CFTR (převzato M. Claustres et al., Hum. Genet., 1996, 98:336-344)



b) IVS8BTA



legenda :

podmínky elektroforetické separace:

50W / 55°C / 2 hod.

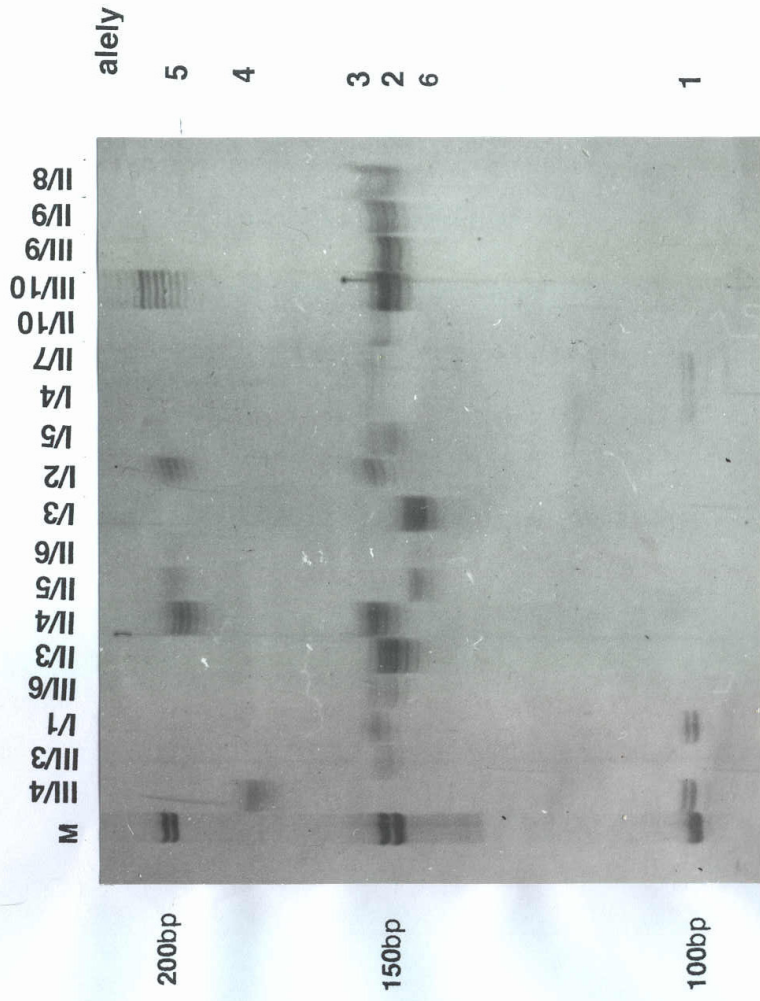
6% denaturační PAG (7M urea)

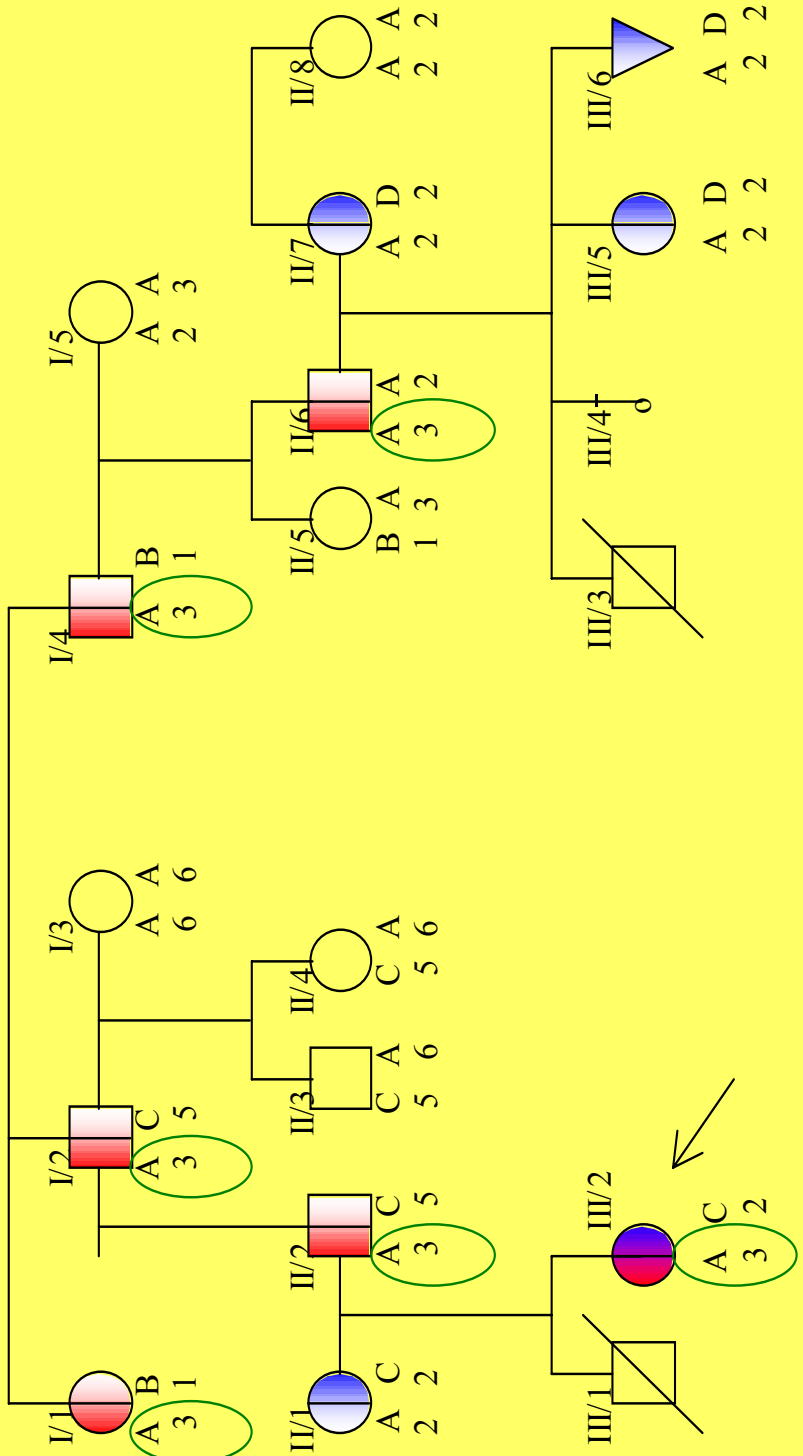
barveno stříbrem

obr. 1 : DNA analýza CF rodiny P. pomocí mikrosatelitních polymorfních míst v intronech 17b a 8






(Morral N. et al., *Hum. Genet.* 1992, 88: 356, Morral N. et al., *Genomics*, 1992, 13: 1362 - 1364)

a) IVS17BTA

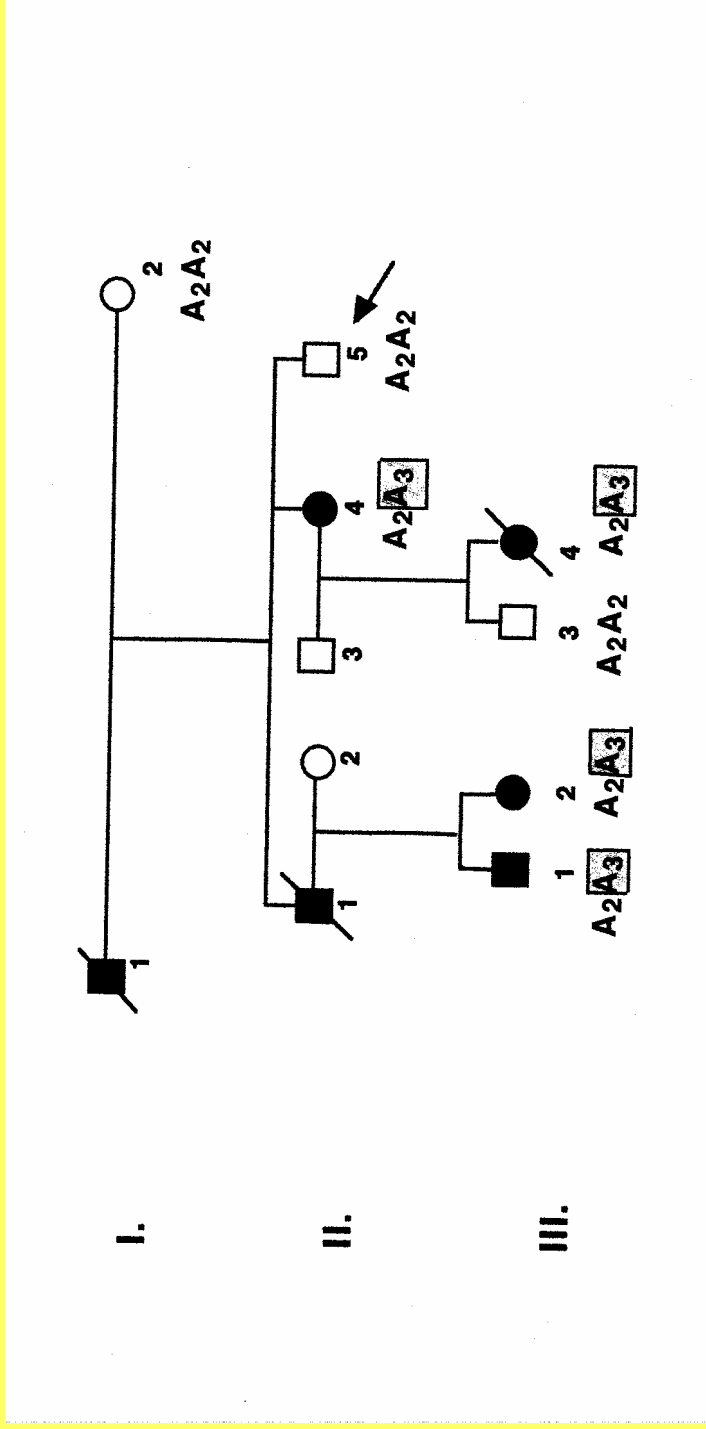




legenda:

- dF508
-  neznámá mutace
-  polymorfni systémy: IVS17BTA: alely 1 - 6
-  IVS8BTA: alely A - D
-  haplotyp v asociaci s neznámou mutací v rodině

Rodokmen rodiny P

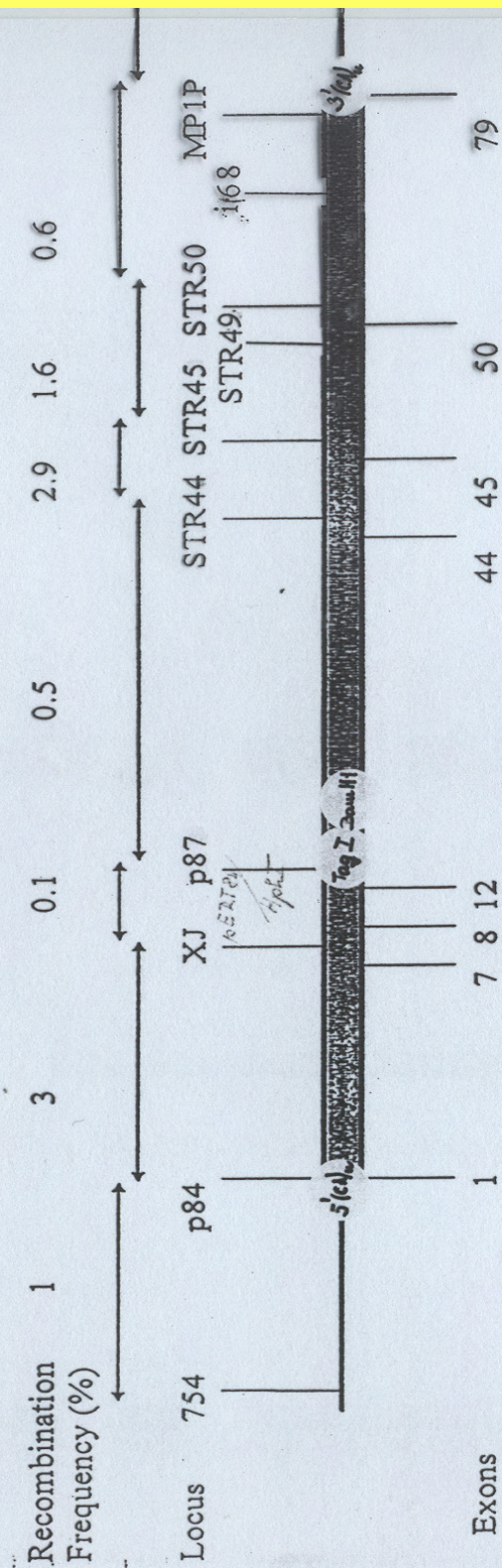


A3
A2

PAGE

III/1 III/2 III/3 III/4 III/4 II/5 I/2

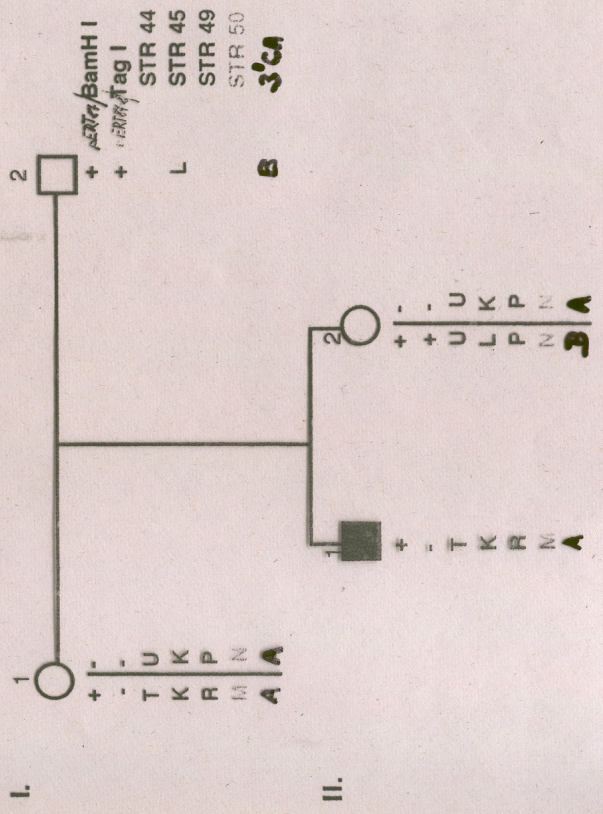
Využití polymorfních míst v dystrofinovém genu



Legenda:

- 5'(CA)_n – alely 172 - 184 bp
- pERT 87 – 8/ Tag I : alely 145bp (neštěpená, - alela) nebo 71bp a 74 bp (štěpená, + alela)
- pERT 87 – 15/ BamHI : alely 216bp(neštěpená, - alela) nebo 166bp a 50bp (štěpená, + alela)
- STR – sekvence I/(CA)_n/:
 - STR44 alely 174bp – 204bp, heterozygozita 87%
 - STR45 alely 156bp – 184 bp, heterozygozita 89%
 - STR49 alely 227bp - 257bp, heterozygozita 93%
 - STR50 alely 233bp – 251bp, heterozygozita 71%
- i68 /HinfI: 4 alely
- 3'(CA)_n: alely 131bp – 137bp
- pERT84/HphI : 236bp (-) + 16bp
108 + 128 (+) + 16bp

Rodina I. (u probanda II /1 nebyla detekována delece v genu DMD)



Využití intragenového polymorfismu STR49

