

HLA systém

***HLA (Human Leukocyte Antigens) =
Hlavní histokompatibilní systém
člověka (MHC)***

Historie

- ❖ HLA systém je soubor vázaných genů na krátkém raménku chromozomu 6
- ❖ MHC geny nejdříve rozpoznány u myší na základě pokusů s transplantacemi tumorů u myší (1930-1940)
- ❖ 70. léta - již známy 3 lokusy I. třídy HLA-A, -B, -C
 - HLA antigeny definovány sérologickými a buněčnými technikami
 - účast HLA molekul v imunitní odpovědi
- ❖ 1974- fenomén HLA restrikce (T lymfocyty rozpoznávají cizorodý antigen pouze v komplexu s HLA molekulami I. nebo II. třídy)
- ❖ 80. léta- objev lokusů II. třídy HLA-DR, -DQ, -DP
- ❖ 90. léta- objev tzv. neklasických antigenů lokusů HLA-E, -F, -G, -H, -J, -K, -X
 - zavedeny techniky HLA typizace na úrovni DNA

Struktura HLA systému

- ❖ Nejkomplexnější a nejpolymorfnější systém, každý člověk nese unikátní sestavu HLA alel, výjimka – monozygotní dvojčata
- ❖ lokalizace na krátkém raménku 6. chromozomu (4100 kb, více než 200 genů)
- ❖ geny uspořádány do 3 oblastí: **HLA I., II., III. třída**

HLA I. třída (transplantační, klasické antigeny)

- ❖ I. třída obsahuje geny **HLA –A, -B, -C** pro těžký řetězec α HLA molekul
- ❖ povrchové glykoproteiny, exprimovány na téměř všech buňkách
- ❖ neklasické geny HLA-E, -F, -G (glykoproteiny - omezený výskyt)
- ❖ pseudogeny

HLA II. třída

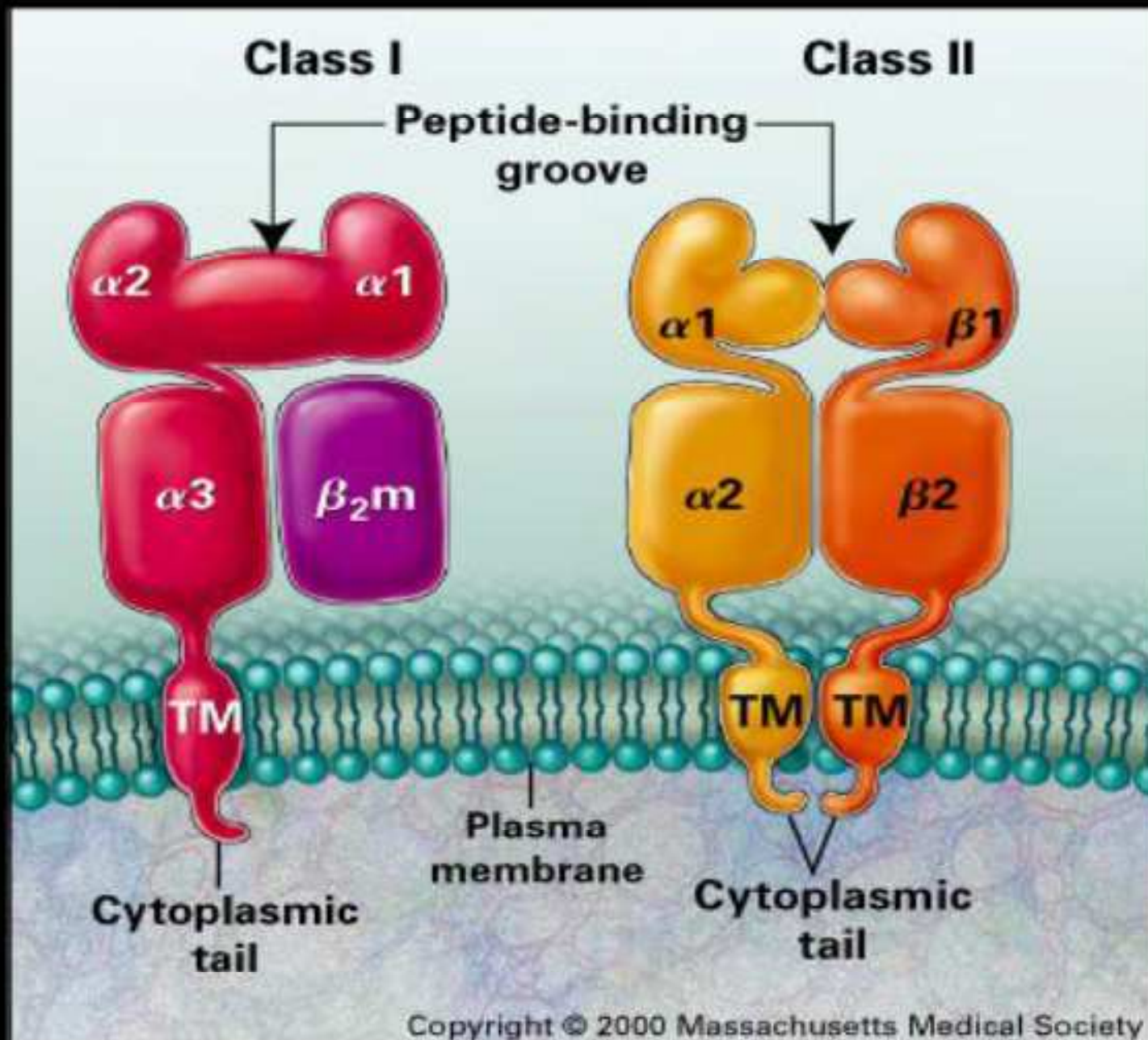
- ❖ geny pro $-\alpha$ a $-\beta$ řetězec HLA molekul – **DR, -DQ, -DP**
- ❖ glykoproteiny exprimovány na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk (buňky imunitního systému)
- ❖ **HLA-DM, -DO** geny – produkty výskyt v endozomech (naložení cizorodého peptidu na HLA molekulu II. třídy)
- ❖ geny **LMP2, LMP7** - proteiny, které štěpí cizorodé částice na menší peptidy
- ❖ geny **TAP1, TAP2**- zahrnutý do procesu transportu peptidů do ER

HLA III. třída

- ❖ strukturálně a funkčně odlišné proteiny
- ❖ složky komplement C4, C2, faktor B, 21-hydroxylasa, TNF, heat shock protein Hsp 70

Struktura HLA molekul

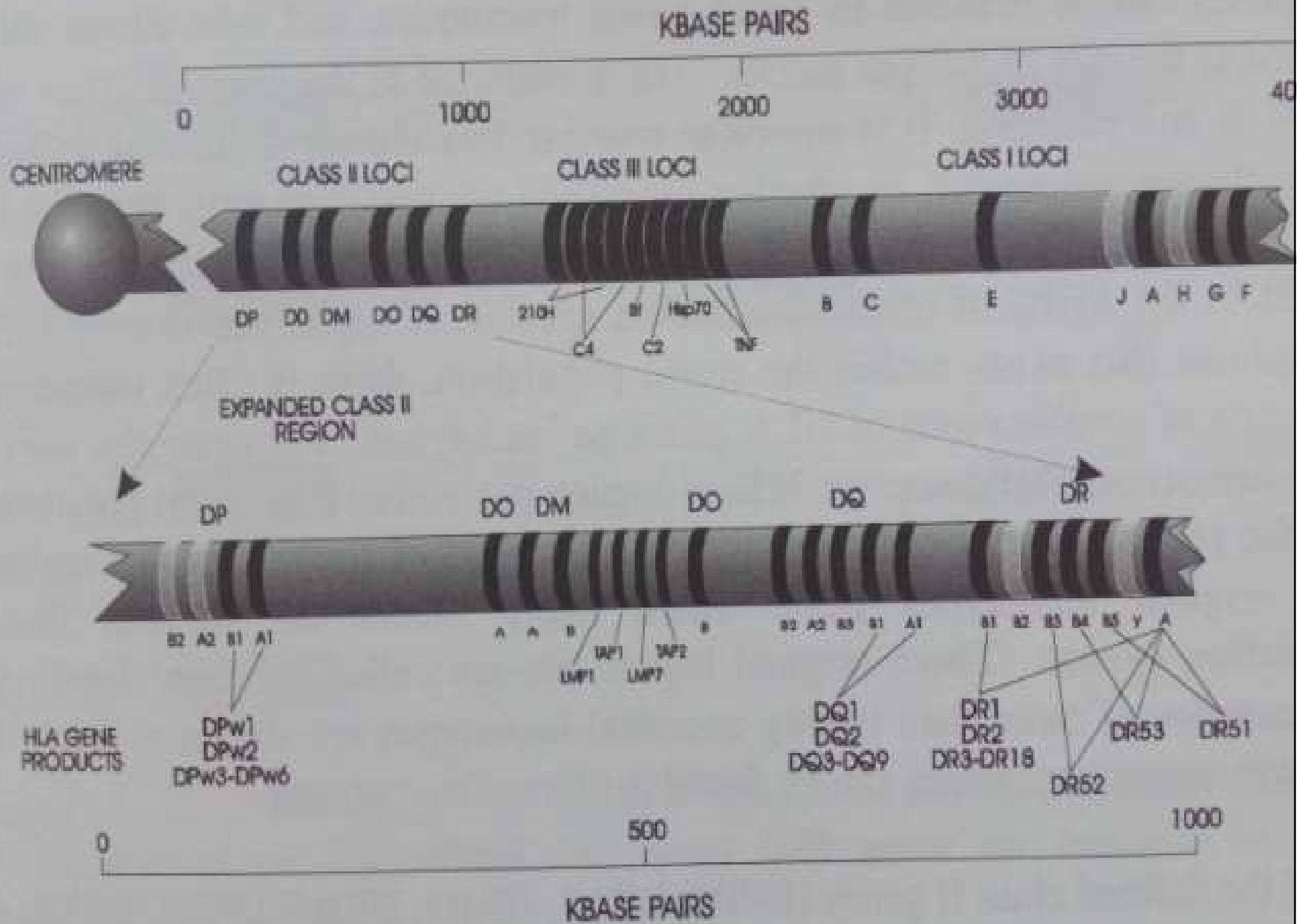
- ❖ HLA molekuly I. a II. třídy jsou glykoproteiny složené ze 2 různých proteinových řetězců (heterodimery)
- ❖ **HLA molekuly I. třídy** mají těžký α - řetězec nekovalentně vázaný s β 2-mikroglobulinem (gen pro lehký řetězec β 2- mikroglobulin lokalizován na chr. 15)
- ❖ α - řetězec vytváří 3 domény α 1, α 2, α 3
- ❖ α 1 a α 2 vytváří vazebný žlábek pro cizorodý peptid
- ❖ **HLA molekuly II. třídy** se skládají ze 2 glykoproteinových transmembránových řetězců α , β
- ❖ Každý řetězec je složen do 2 domén - α 1, α 2, β 1, β 2
- ❖ α 1, β 1 vytváří vazebný žlábek pro cizorodý peptid



Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.



The New England Journal of Medicine



Polymorfismus HLA - počet alel stále roste

Lokus	Počet alel	Proteiny
HLA-A	6921	4156
HLA-B	8181	5090
HLA-C	6779	3927
HLA-E	271	110
HLA-F	45	6
HLA-G	88	26
HLA-DRB1	3018	2063
HLA-DQB1	2033	1324
HLA-DPB1	1862	1180

<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>

Funkce HLA systému

- ❖ Primární role imunitního systému je rozpoznat a eliminovat nebezpečné cizí agensy, imunitní systém musí **rozlišovat mezi „vlastními“ a „cizími“ antigeny**
- ❖ Hlavní funkcí HLA molekul je předkládat (prezentovat) cizí antigeny buňkám imunitního systému, především T lymfocytům
- ❖ Tato prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce a tím obrany proti napadení mikroorganismy
- ❖ fenomén **HLA restrikce** - buněčné receptory T lymfocytů (TCR) rozpoznávají cizí peptidy pouze vázané v peptidovém žlábků HLA molekuly I. nebo II. třídy
- ❖ 2 způsoby prezentace antigenů T lymfocytům – endogenní (HLA I. tř.)
- exogenní (HLA II. tř.)

ENDOGENNÍ ZPŮSOB PREZENTACE

- ❖ HLA molekuly I. třídy
- ❖ rozpoznání a destrukce virem infikovaných bb.
- ❖ cizorodé peptidy prezentované molekulami HLA I. tř.
odvozené od proteinů produkovaných buňkou - **endogenní zdroj**
- ❖ cizorodý peptid + HLA I. tř. → CD8+ (Tc lymfocyty) - zabití napadených buněk

EXOGENNÍ ZPŮSOB PREZENTACE

- ❖ HLA molekuly II. třídy
- ❖ vesikulární systém buňky (transportní váček)
- ❖ exogenní antigeny jsou buňkou pohlcené (endocytóza, endozóm) - bakterie, paraziti - **exogenní zdroj**

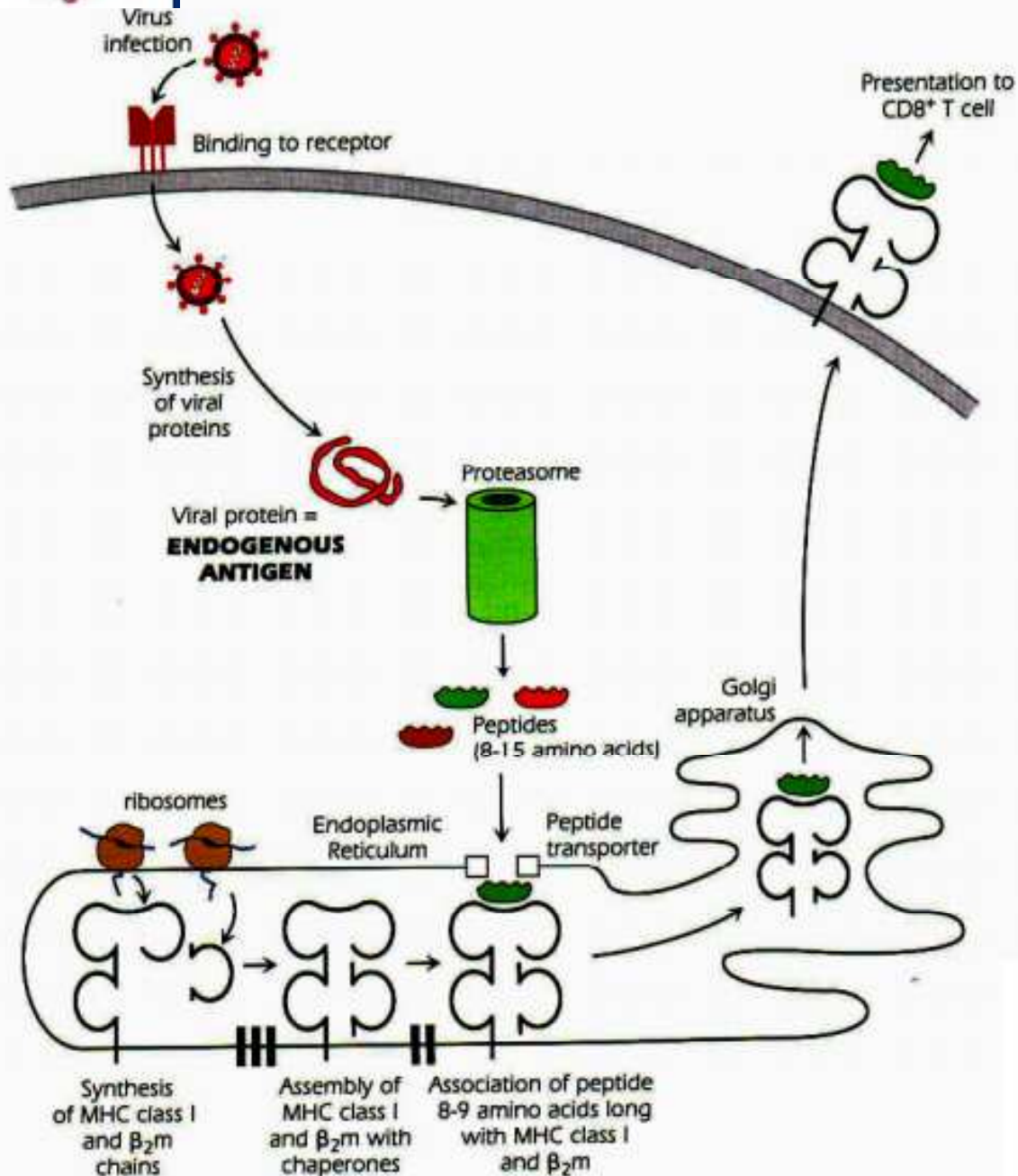
- ❖ endosom fúzuje s lysosomem (štěpení proteinu)
- ❖ fúze endolysozomu s transportním váčkem s HLA II. molekulami
- ❖ MHC class II loading compartments (MIIcCs) – naložení peptidu

- ❖ ciz. peptid + HLA II \longrightarrow CD4+ (Th lymfocyty) - aktivace zánětlivé a protilátkové odpovědi

- CD4+ Th1 - zánětlivé - aktivace makrofágů k zabití patogenu
- CD4+ Th2 - protilátková odpověď, aktivace B buněk k produkci protilátek

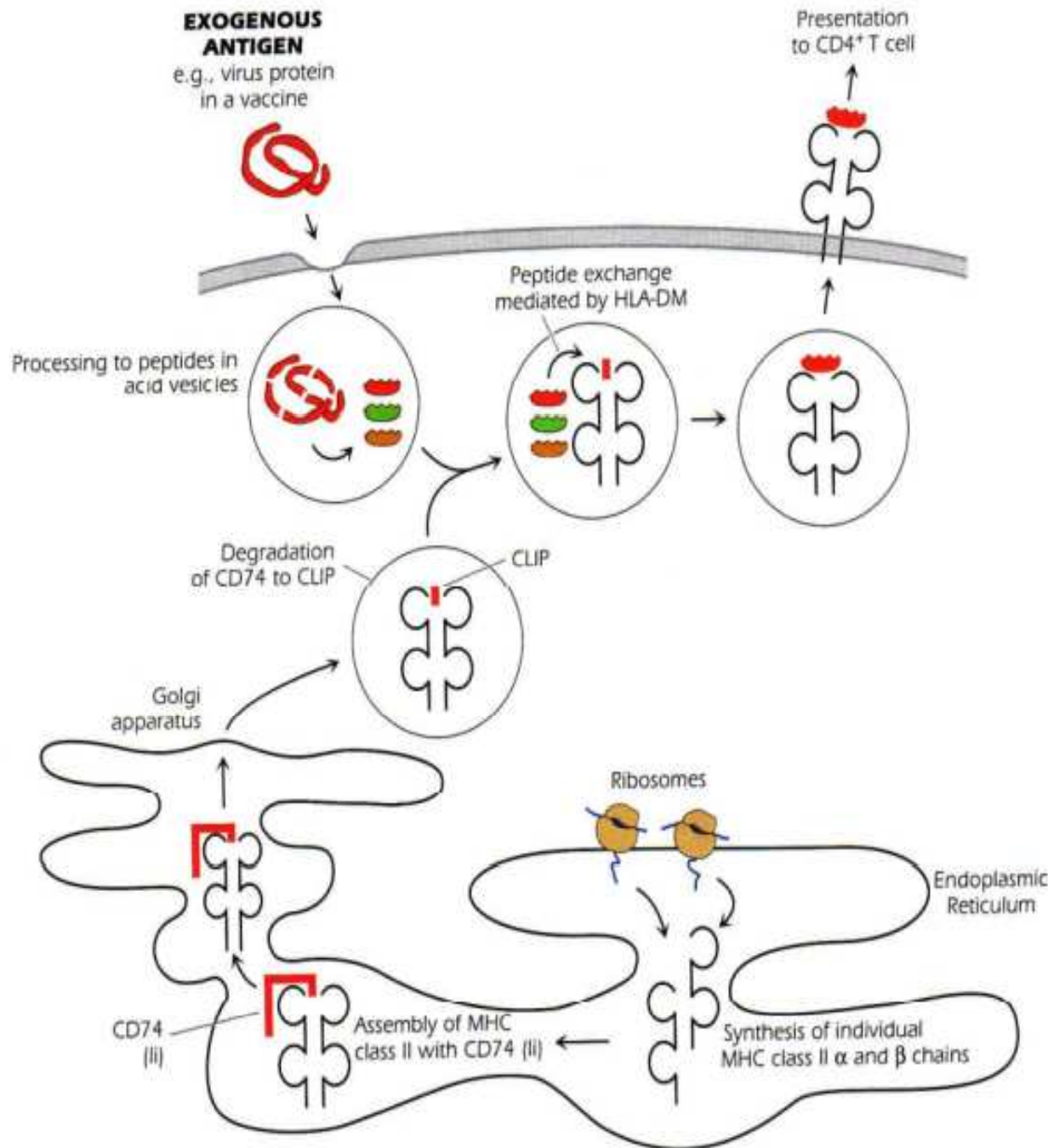


Peptidy prezentované pomocí HLA I. tř. – endogenní zdroj



1. Syntéza virových proteinů na ribosomech
2. Ubiquitin – označení proteinu k likvidaci
3. Proteasom = proteinový komplex k rozštěpení nepotřebných a poškozených proteinů
4. TAP1/TAP2 – transport peptidů do endoplasmatického retikula
5. Naložení na molekulu HLA I a transport na povrch buňky

Peptidy prezentované pomocí HLA II. tř. – exogenní zdroj



EXOGENNÍ ANTIGEN

Vesikuly s kyselým prostředím

ENDOSOMY

LYSOSOMY - proteolytické štěpení

(katepsiny, endopeptidáza)

MHC II

ENDOPLASMATICKÉ RETIKULUM

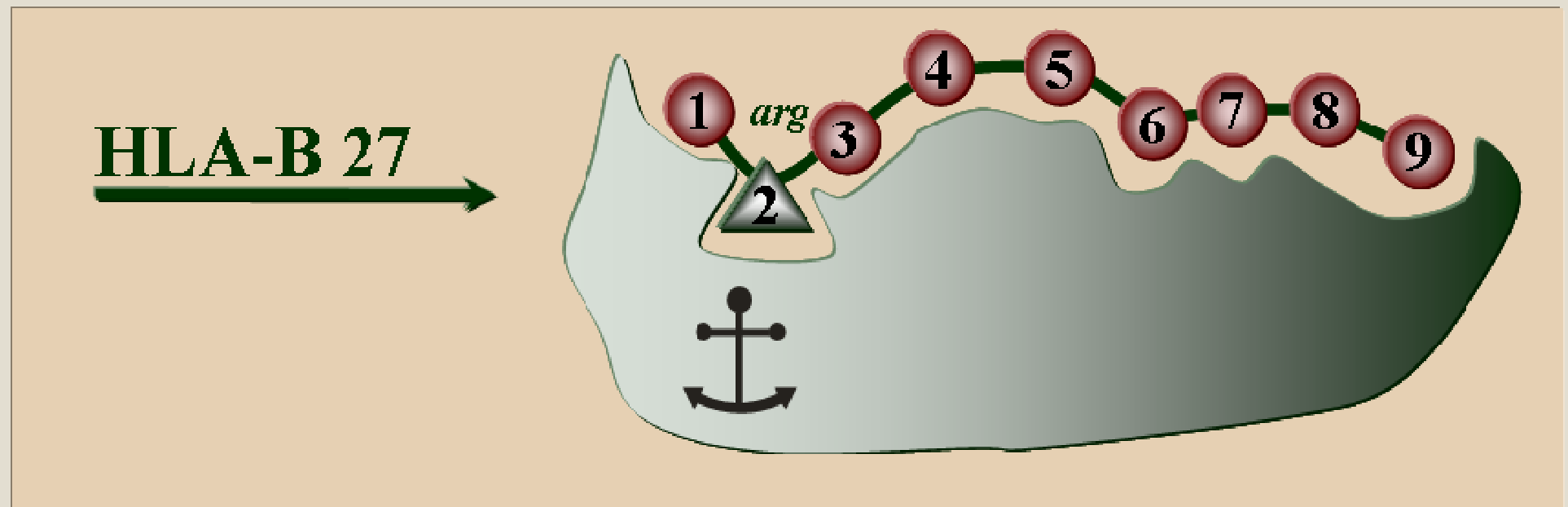
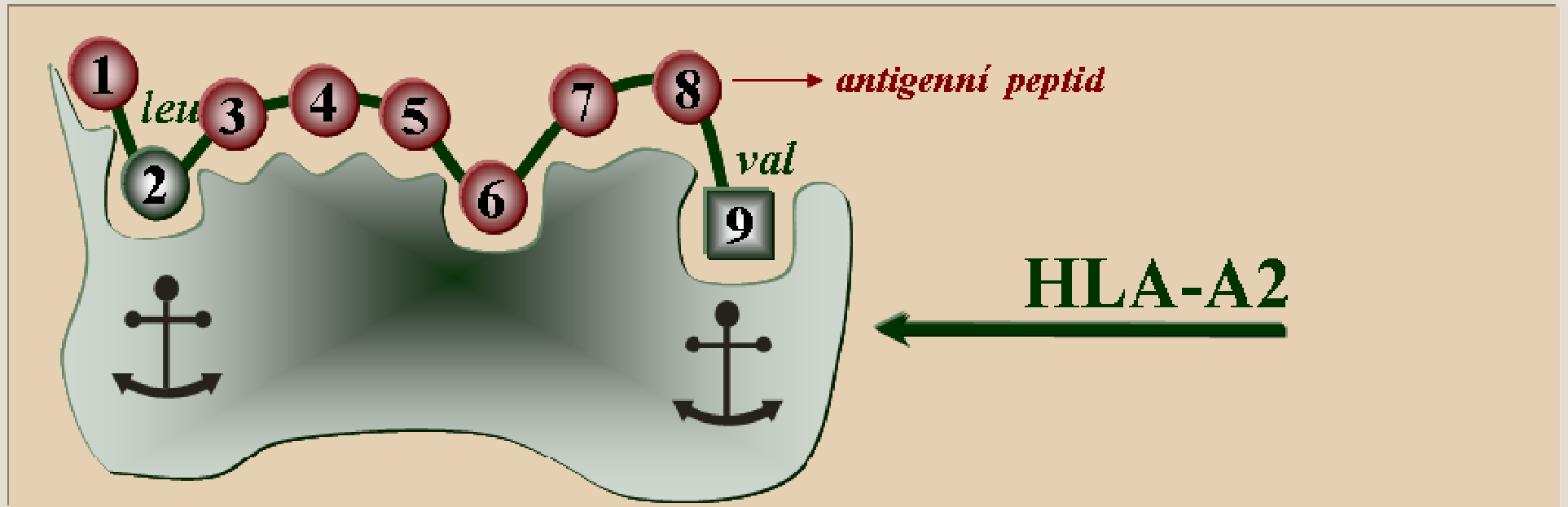
α a β řetězec MHC II + invarianční řetězec (Ii, CD74)

(zabraňuje obsazení vazebných míst vlastními peptidy) \Rightarrow CLIP (Class II associated Invariant Chain Peptide)

\Rightarrow HLA-DM \Rightarrow odstranění Ii a

záměna za antigenní fragment

VAZBA ANTIGENNÍCH PEPTIDŮ NA MOLEKULY HLA I



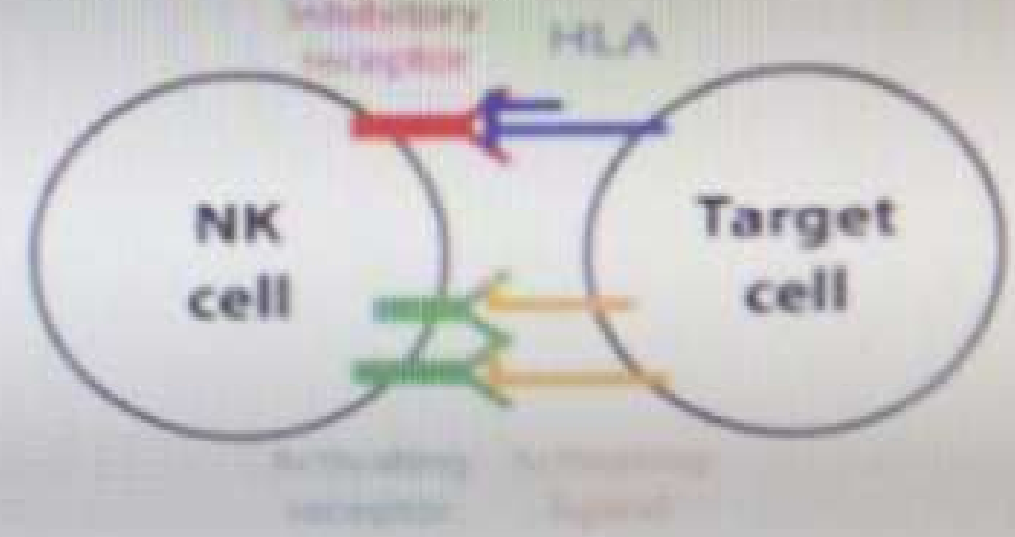
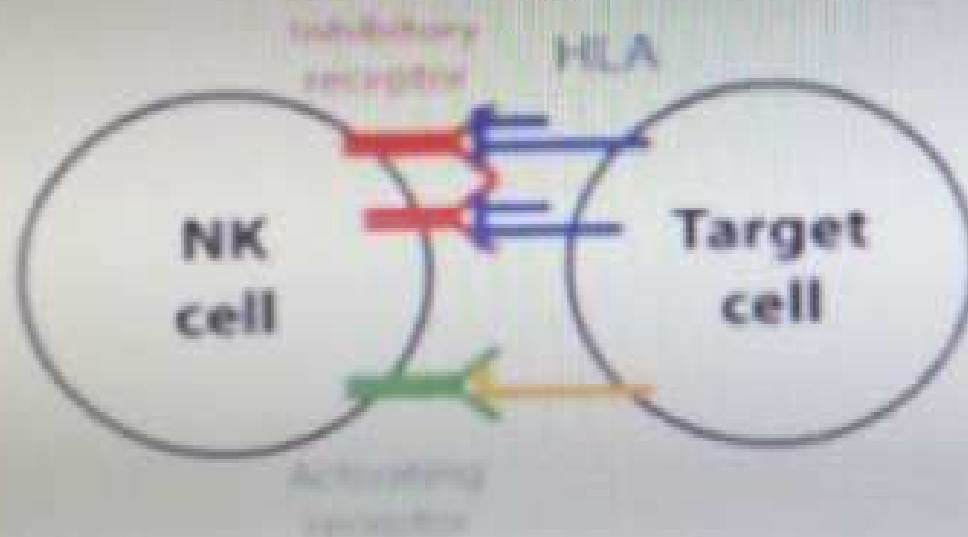
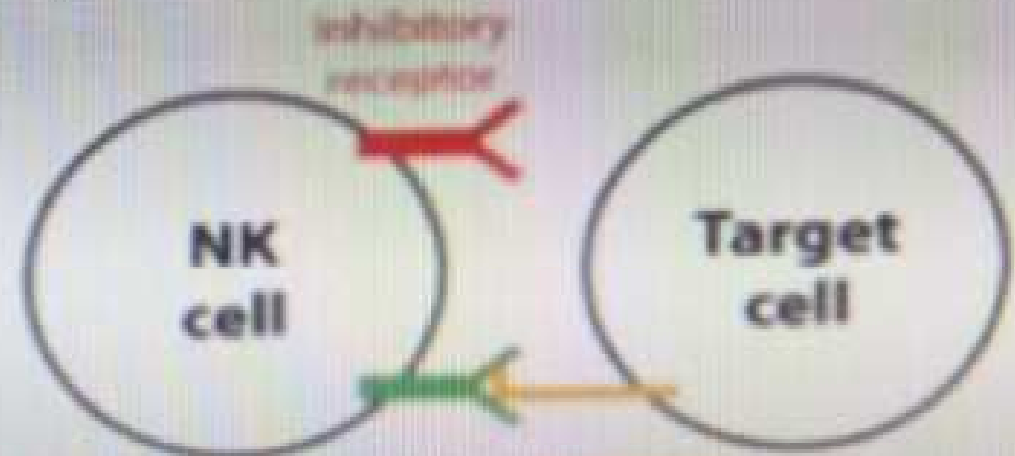
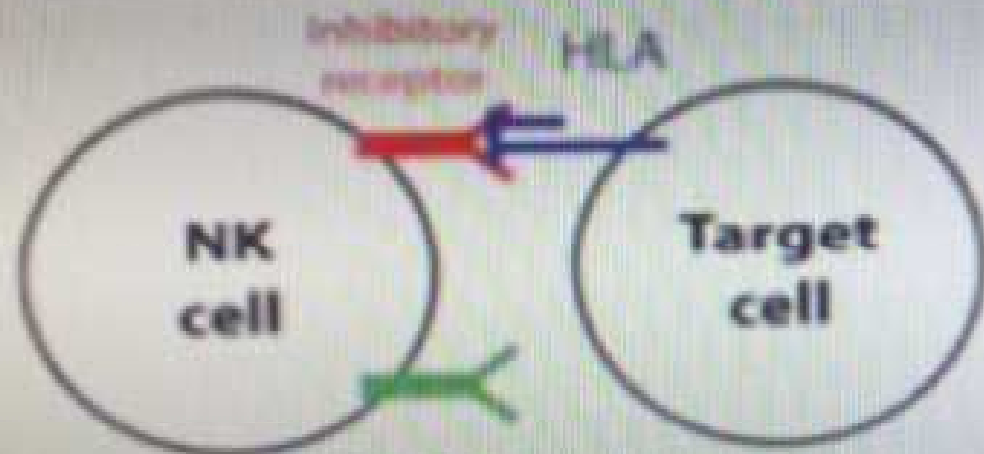
HLA molekuly jsou ligandy pro receptory NK buněk

- ❖ NK buňky (přirození zabíječi), obrana proti infekcím
- ❖ NK buňky mají na povrchu **aktivační a inhibiční receptory**, kterými je regulována aktivita NK buněk
- ❖ Inhibiční receptory rozpoznávají HLA-C molekuly a také neklasické HLA-E a -G molekuly
- ❖ **HLA molekuly aktivují nebo blokuji aktivitu NK buněk**
- ❖ T lymfocyty rozpoznávají přítomnost HLA molekul (vlastní x cizí)
- ❖ NK buňky rozpoznávají absenci HLA molekul na povrchu buňky (nádorové b., virem infikované b.)

Regulace aktivity NK buněk

NO LYSIS

LYSIS

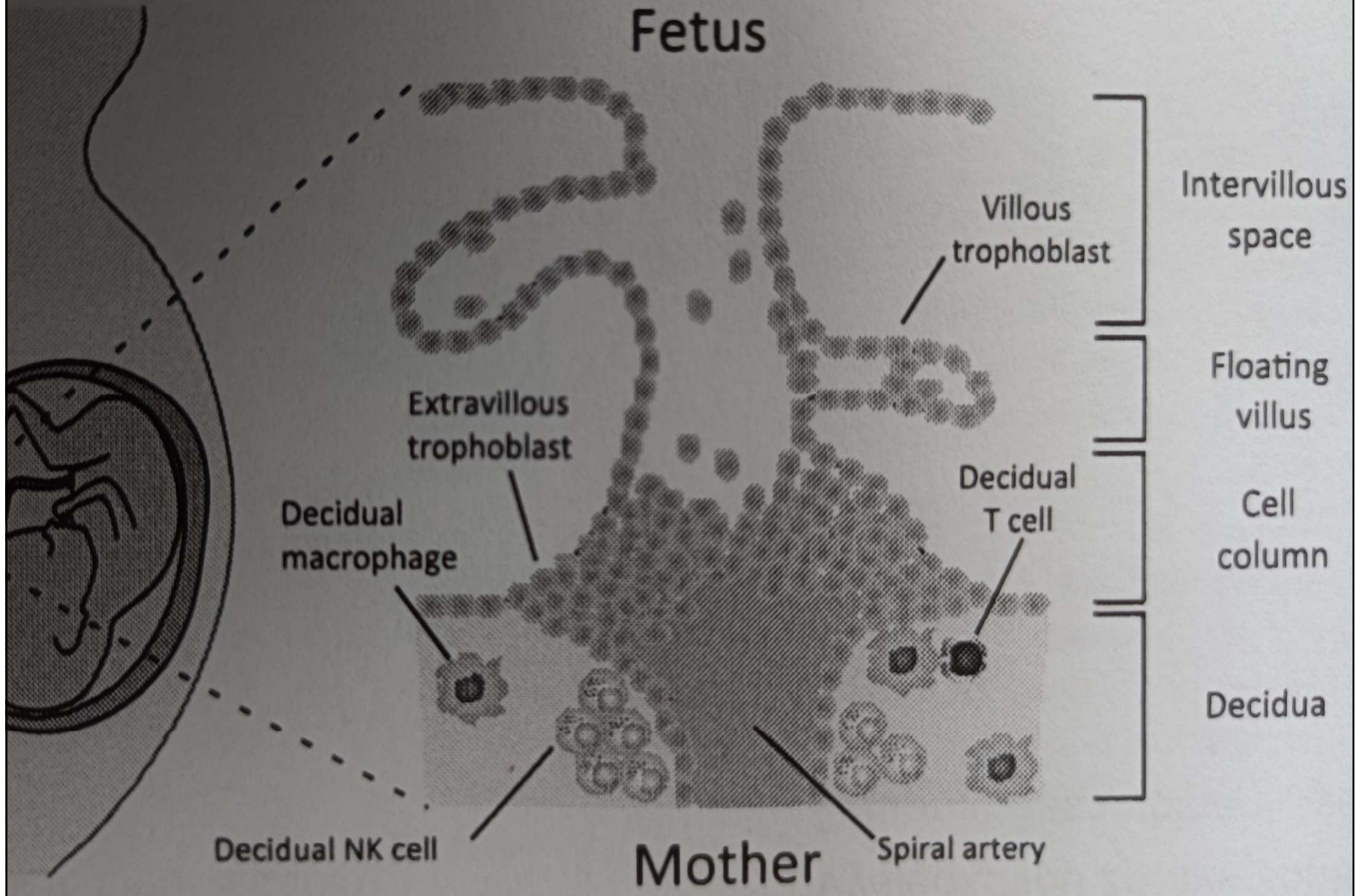


Ochrana fetálního allograftu

- ❖ Plod v těle matky je z poloviny cizí štěp
- ❖ Klasické HLA produkty I. třídy –A, -B, nejsou exprimovány na buňkách trofoblastu → T lymfocyty jsou k plodu ignorantní
- ❖ na trofoblastu jsou syntetizovány HLA-C a neklasické molekuly HLA-G, (-E,-F) → inhibice cytotoxické aktivity mateřských buněk, angiogeneze, vaskulární remodelizace
- ❖ Závěr: Neklasické HLA-G, (-E) molekuly hrají speciální biologickou roli = ochrana vyvíjejícího se fetu před mateřskými T a NK buňkami, hrají roli při potlačení imunitní odpovědi matky proti plodu – navození tolerance

Úloha HLA molekul v transplantologii

- ❖ HLA molekuly jsou silné aloantigeny indukující rejekci štěpu



Trophoblast

Fetal Side



A. Normal HLA Tissue Distribution



T Cell
Activation

Fetal Side



B. No HLA Class I Molecules



NK Cell
Activation

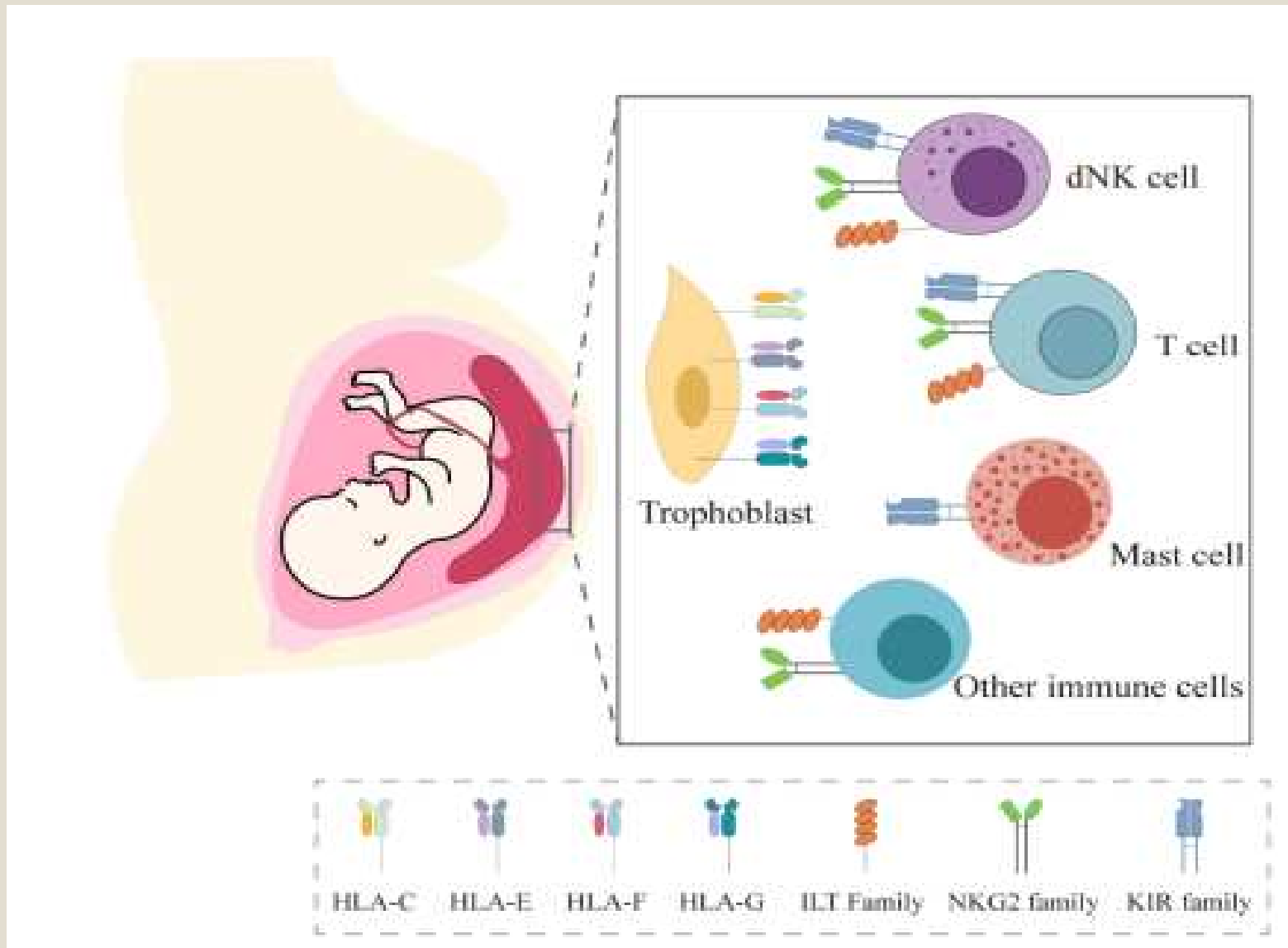
Fetal Side



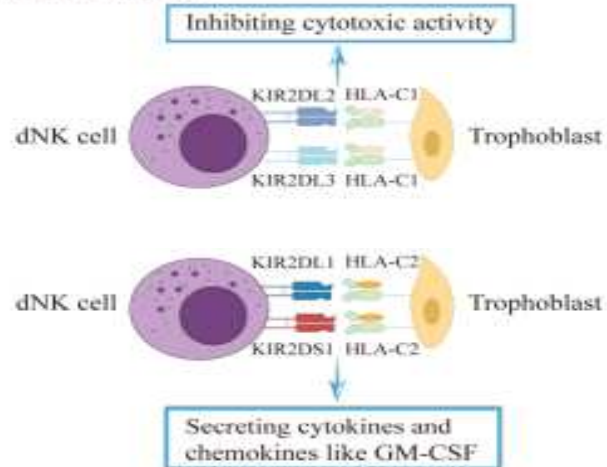
C. Specialized HLA Class I (HLA-E, -G)



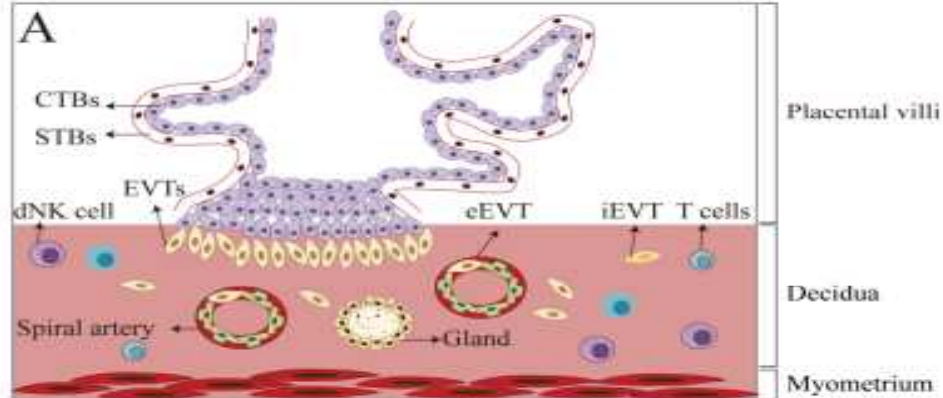
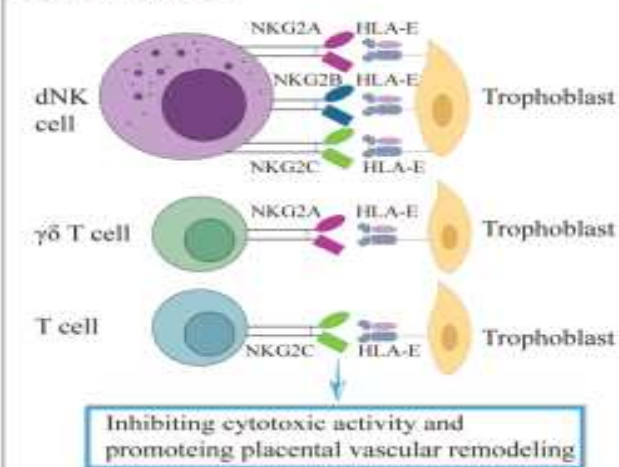
No T or NK Cell
Activation



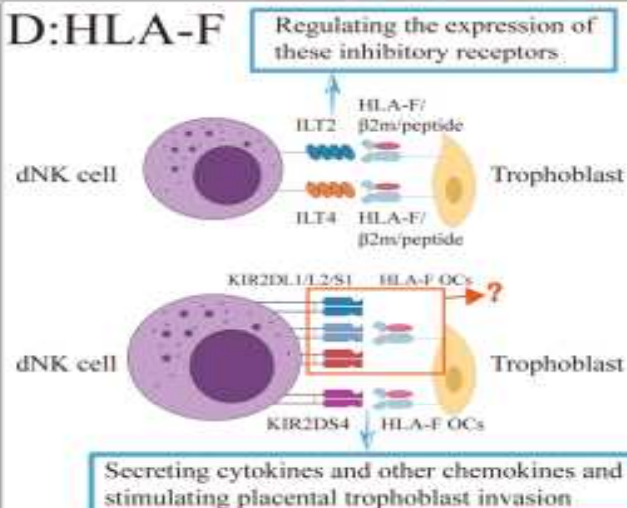
B:HLA-C



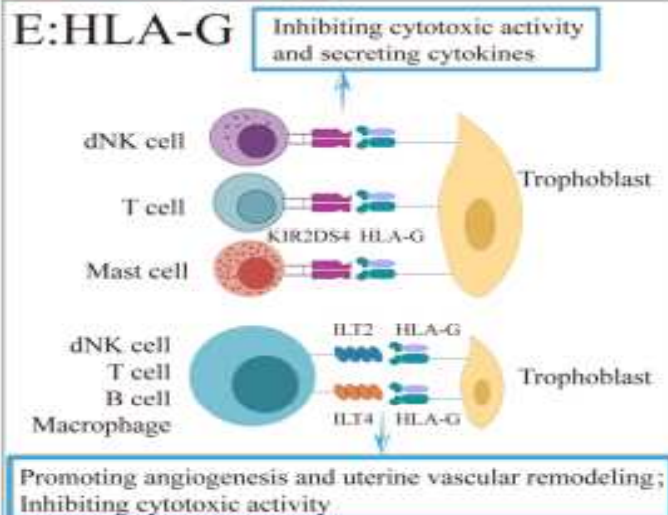
C:HLA-E



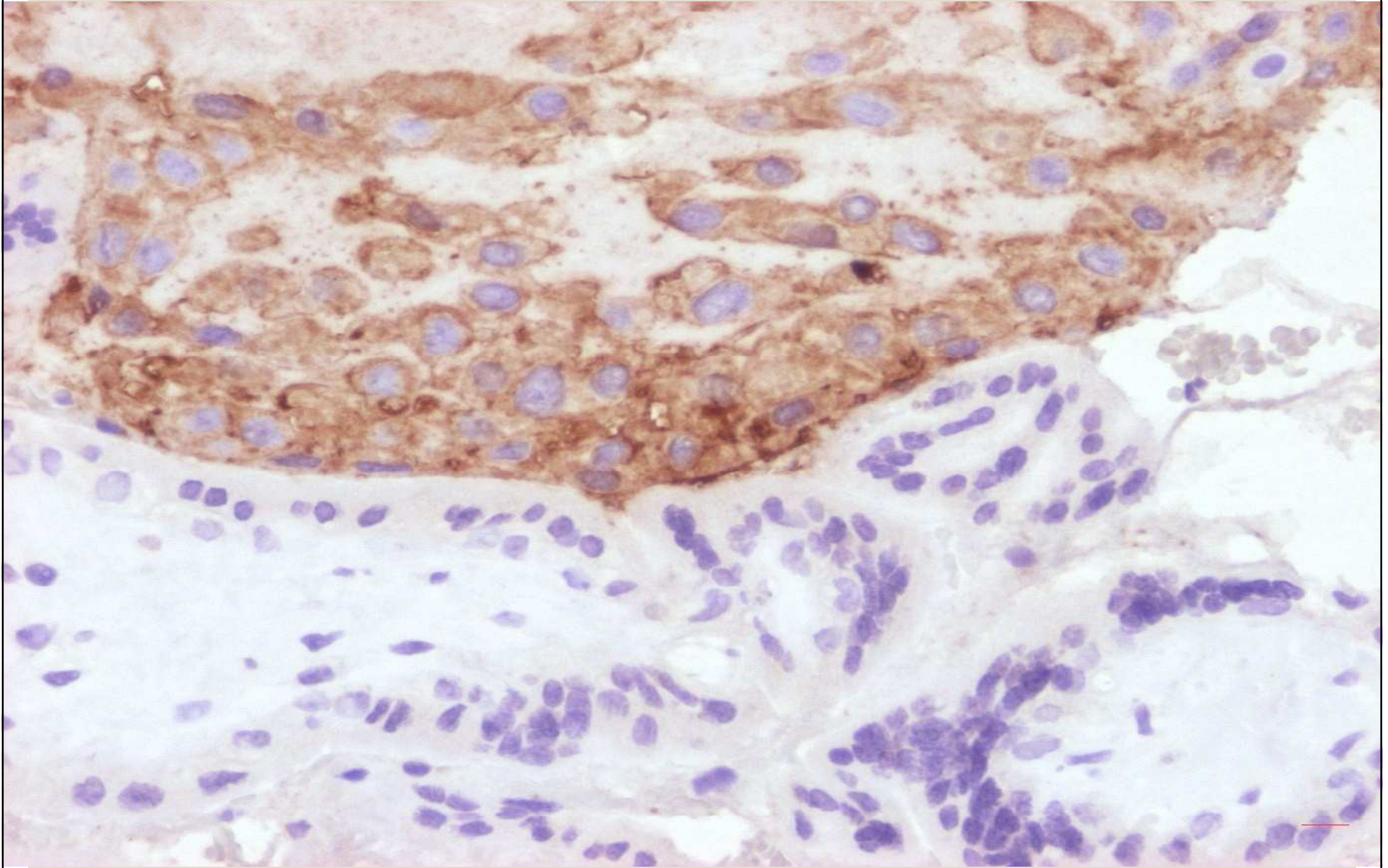
D:HLA-F



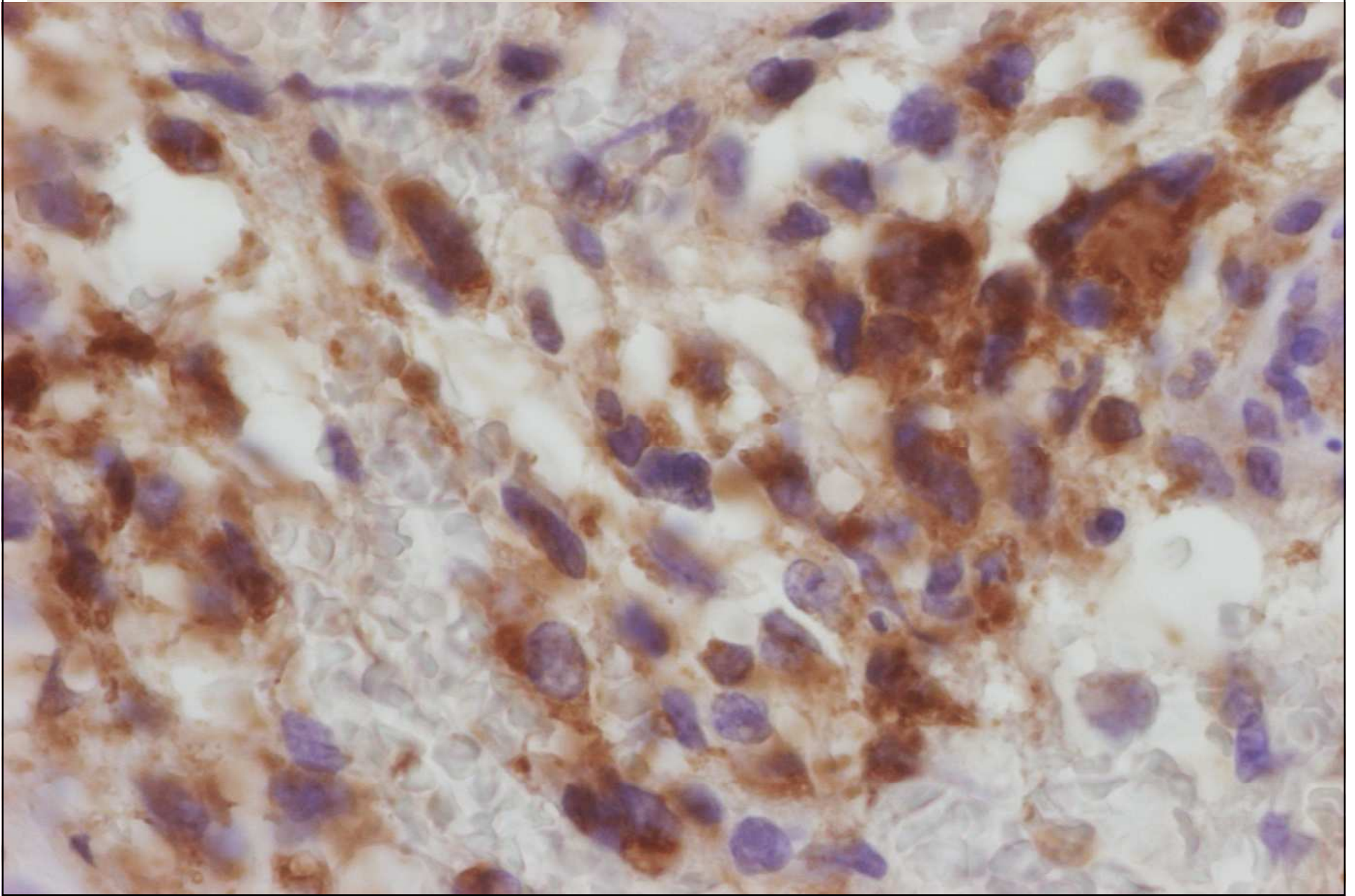
E:HLA-G



Placental trophoblast cells – HLA – E, G



Glioblastoma neoplastic cells– HLA –E, 400x



Exprese HLA molekul

- ❖ HLA I. tř. - všechny jaderné buňky
- ❖ erytrocyty - mladé erytrocyty - atypický antigenní systém **Bga, Bgb, Bgc**
 - zralé erytrocyty nemají HLA antigeny
- ❖ plazma – solubilní HLA antigeny
- ❖ trombocyty – HLA I. třídy

- ❖ HLA II. tř. – omezený výskyt: B lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky

- ❖ exprese HLA antigenů I. a II. třídy může být zvýšena během zánětu, nově indukována na určitých buňkách, na kterých se normálně neexprimují (myocyty, hepatocyty).
- ❖ zvýšená nebo nová exprese HLA antigenů je iniciována interferony

- ❖ nová exprese HLA antigenů pravděpodobně hraje majoritní roli v patogenezi rejekce transplantovaného štěpu

- ❖ snížená exprese HLA molekul - nádorové buňky, virem infikované buňky

typ buňky, tkáň	exprese	
	HLA I	HLA II
BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU		
dendritické buňky	+++	+
makrofágy	+++	++
T lymfocyty	+++	+
B lymfocyty	+++	+++
JINÉ JADERNÉ BUŇKY		
neutrofilní granulocyty	+++	-
eosinofilní granulocyty	+++	-
epitelové buňky	+++	-
hepatocyty	+	-
nervové buňky	+	-
buňky ledvin	+	-
NEJADERNÉ BUŇKY		
trombocyty	++	-
erytrocyty	-	-

Tab.1.: Odlišnosti v expresi molekul HLA I. a II. třídy na různých buněčných typech
(J. Krejsek a O. Kopecký, Klinická imunologie, str. 125, 2004)

Srovnání vlastností a funkce HLA I a HLA II

Charakteristika	HLA I	HLA II
Struktura	α řetězec + β 2m	α a β řetězce
Domény	α 1, α 2 a α 3 + β 2m	α 1, α 2 a β 1, β 2
Buněčná exprese	téměř všechny jad.buňky	APC (B buňky, dendritické buňky, makrofágy)
Peptidy vázající místo	uzavřené, váže 8-9 amk tvořené doménami α 1 a α 2	otevřené, váže 12-17amk tvořené doménami α 1 a β 1
Peptidy	endogenní antigeny	exogenní antigeny
Peptidy prezentované	CD8+T buňkám	CD4+T buňkám

Dědičnost HLA systému

- ❖ geny vázané X geny volně kombinovatelné
 - ❖ HLA geny jsou vázané → děděny „**en bloc**“ od rodičů jako **haplotyp**
 - ❖ HLA geny exprimovány kodominantně – dvě alely v každém HLA lokusu
 - ❖ **crossing-over** v HLA oblasti během meiotického dělení = výměna genetického materiálu mezi homologickými chromozómy → rekombinantní sestavy alel (1%)
 - ❖ frekvence rekombinace je závislá na vzdálenosti mezi geny
 - ❖ **vazebná nerovnováha** (linkage disequilibrium) - běžná v HLA systému
 - určité kombinace alel se vyskytují častěji, než by se očekávalo na základě genových frekvencí
 - určité kombinace HLA alel asi poskytují v některých populacích určitou selekční výhodu
- Př.: **HLA- A1 a HLA-B8** s genovými frekvencemi **0,16 a 0,1** v populaci. Očekávaná frekvence výskytu haplotypu **HLA –A1, B8** v populaci by měla být **$0,16 \times 0,1 \times 100\% = 1,6\%$** . V některých kavkazských populacích frekvence tohoto haplotypu zdaleka přesahuje očekávanou frekvenci (**8%**)

Nejčastější haplotypy v různých etnických skupinách

African

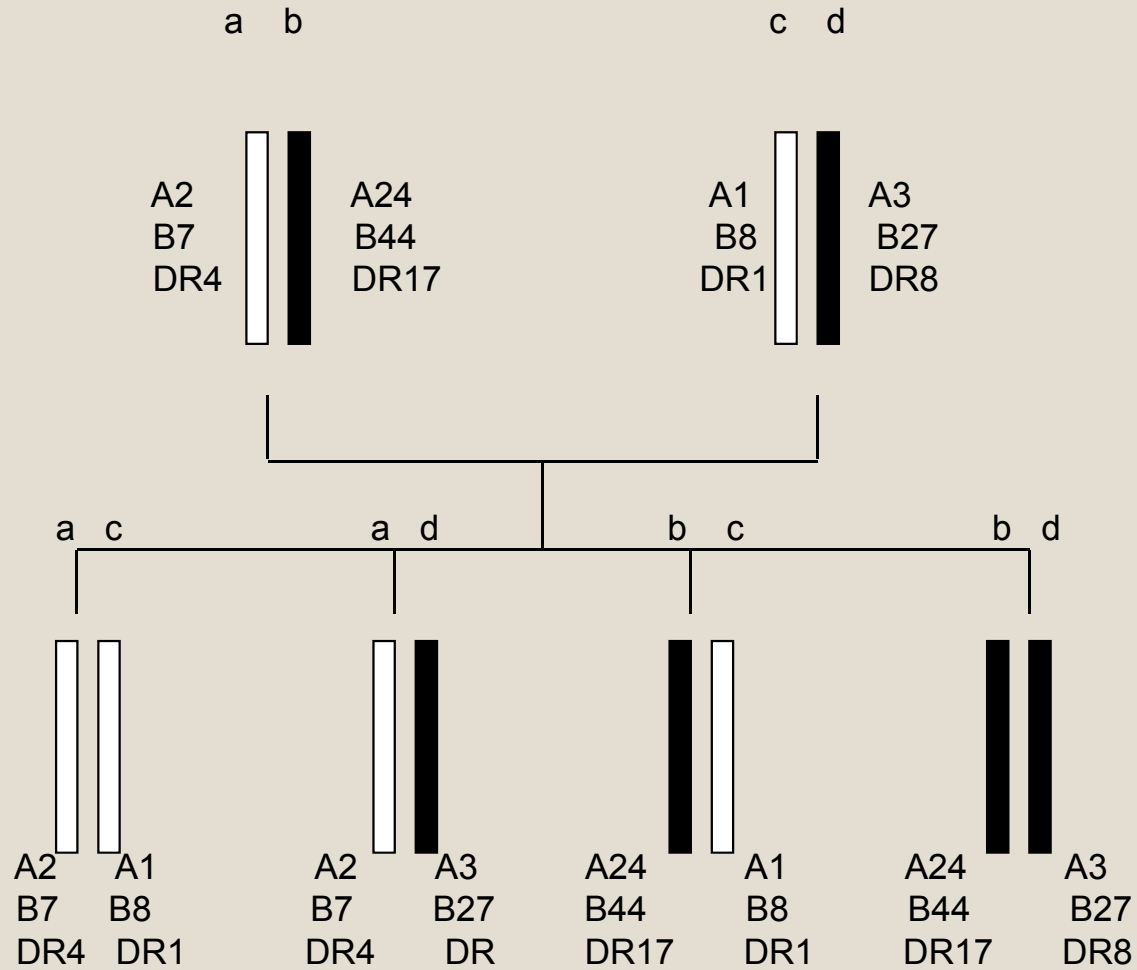
Asian

Caucasian

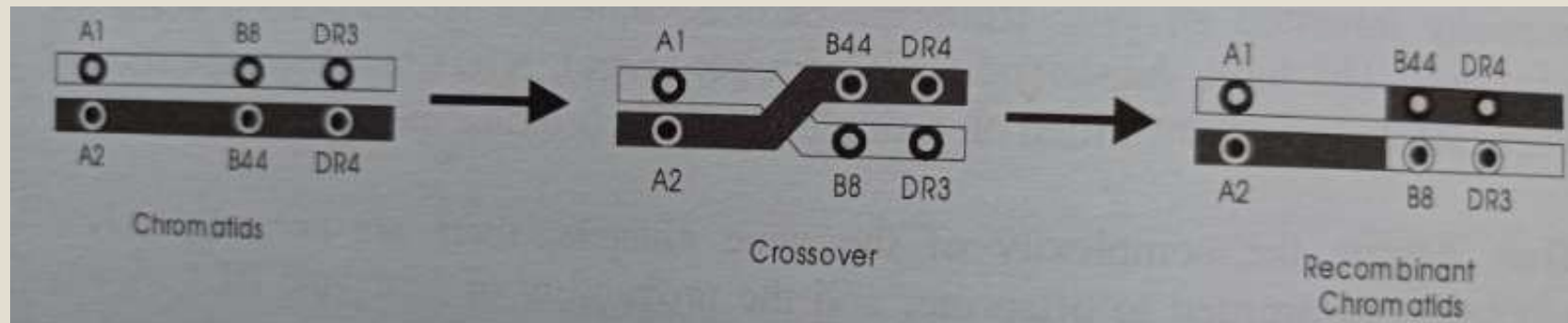
Haplotype (freq.%)

1.	A30,B42,DR3 (1,67)	A33,B58,DR3 (1,58)	A1,B8,DR3 (5,18)
2.	A1,B8,DR3 (1,25)	A33,B44,DR6 (1,46)	A3,B7,DR2 (2,63)
3.	A3,B7,DR2 (0,76)	A24,B52,DR2 (1,38)	A2,B44,DR4 (2,15)
4.	A2,B44,DR4 (0,65)	A2,B46,DR9 (1,35)	A2,B7,DR2 (1,8)
5.	A33,B53,DR8 (0,63)	A33,B47,DR7 (1,34)	A29,B44,DR7 (1,47)

Dědičnost HLA haplotypů



Vznik rekombinantních HLA haplotypů – crossing over



HLA-A1; B8; DR3

HLA-A2; B44; DR4

A1; B44; DR4

A2; B8; DR3

rekombinantní haplotypy

HLA asociovaná onemocnění

- ❖ 1967 – první zprávy o asociaci HLA systému s onemocněním u člověka
- ❖ 1973 – objevena asociace **HLA-B27 s ankylozující spondylitidou**
(m. Bechtěrev)
- ❖ u více než 50-ti onemocnění byla prokázána statisticky významná HLA asociace
- ❖ HLA asociované choroby jsou nemaligní chronická onemocnění
- ❖ převážně autoimunitní onemocnění
- ❖ většina chorob je multifaktoriálních (geny+ environmentální složka)
- ❖ spouštěčem často environmentálním faktory (mikroorganismy, stres)

Některé příklady asociace HLA alel s chorobou:

Birdshot retinopathy	-A29	RR=200
Ankylosing spondylitis	-B27	81,8
Narcolepsy	-DQB1*06:02	100
Psoriasis vulgaris	-B13, Cw6	4,5 7,2
Celiac disease	- DQB1*02, DQA1*05 (DQ2.5) - DQB1*03:02, DQA1*03:01 (DQ8)	13,3
Type I diabetes mellitus	- DQB1*02, DQA1*05 - DQB1*03:02, DQA1*03:01	10
Multiple sclerosis	-DQ6	4
Rheumatoid arthritis	-DR4	4

ANKYLOSING SPONDYLITIS (AS, M. BECHTĚREV)

- ❖ asociace s HLA-B27
- ❖ zánětlivá forma artritidy, postižení ve větší míře mladí muži
- ❖ postižení začíná obvykle v dolní části páteře, kde zánět napadá kloubní spojení mezi pánví a páteří , nemoc se může postupně šířit nahoru a dolů ke kyčelním a kolenním kloubům.
- ❖ dlouhodobý průběh onemocnění, může končit velmi vážnými deformitami
- ❖ ostatní choroby asociované s HLA-B27 – Reiterova choroba (revmatické onem., často vyvolávají chlamydie, trojice obtíží: neinf.zánět kloubů, moč.trubice a spojivek)
- ❖ Anterior uveitis (přední uveitida - zánět duhovky, řasnatého tělíska)

TYPE I DIABETES MELLITUS (IDDM)

- ❖ silná asociace s DQA1*05:01/DQB1*02:01 a DQA1*03:01/DQB1*03:02 v kavkazské populaci
- ❖ protektivní účinek vůči IDDM je asociován s DQB1*06:02 (DQA1*01:02/DQB1*06:02)
- ❖ IDDM se vyvíjí postupně, dlouhá subklinická etapa spojená s postupujícím poškozením beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, které tvoří inzulin
- ❖ klinický projev – zničeno asi 90% buněk
- ❖ za rozvoj onemocnění zodpovědno více faktorů – geny a negenetická složka (infekce enteroviry = polioviry, coxsackieviry A, B, echoviry)
- ❖ většina nákaz virem je asymptomatická

CELIAC DISEASE (CD)

Predispoziční haplotypy

-DRB1*03- DQA1*05:01- DQB1*02:01 (DQ2.5)

-DRB1*07- DQA1*02:01- DQB1*02:02 (DQ2.2)

-DRB1*04 -DQA1*03:01-DQB1*03:02 (DQ8)



- ❖ geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění
- ❖ intolerance glutenu (lepek), trávicí soustava pacienta není schopna trávit potraviny obsahující lepek
- ❖ chronický zánět sliznice tenkého střeva, prevalence v ČR 1 : 200-250 obyv.
- ❖ pro vývoj onemocnění nutné 3 podmínky:
 - genetické předpoklady
 - konzumace stravy obsahující lepek
 - spouštěč onemocnění (stres, trauma, virová infekce)
- ❖ dlouhodobé průjemy, únava, bolesti kostí, břicha, svalů, u dětí také problémy se zuby, růstem a vývojem
- ❖ léčba – celoživotní dodržování bezlepkové diety

MULTIPLE SCLEROSIS (MS)

- ❖ slabší asociace s HLA alelami DRB1*15:01, DQB1*06:02 a DQA1*01:02
- ❖ vliv faktory genetické i negenetické (vliv prostředí, neznámé imunologické procesy)
- ❖ chronické zánětlivé demyelinizující onemocnění centrálného nervového systému s nejasnou etiologií a patogenezi

NARKOLEPSIE

- ❖ neurologické **onemocnění**, v ČR 2500-5000 osob
- ❖ hypersomie – zvýšená denní spavost někdy doprovázená kataplexií (ochabnutí kosterního svalstva)
- ❖ pravděpodobně autoimunitní onemocnění s dědičným sklonem nastartované vnějším faktorem (streptokoková infekce) namířené proti hypocretinovým neuronům, které mají budivou funkci

HLA nomenklatura

1. Serologická definice HLA antigenů – maximálně 2 znaky

- ❖ antigeny základní – např. A9, A10, B51, B40, Cw3, DR2, DQ3....
- ❖ antigeny splitové (subtypy) - sdílejí společné sérologicky definované epitopy

např. A10 → A25, 26, 34

B40 → B60, 61

Cw3 → Cw9, 10

DR2 → DR15, 16

DQ3 → DQ7, 8, 9

- ❖ antigeny obecné – DR51, DR52, DR53

HLA = Hlavní histokompatibilní komplex člověka

A, B, C, DR, DQ, DP.....lokusy

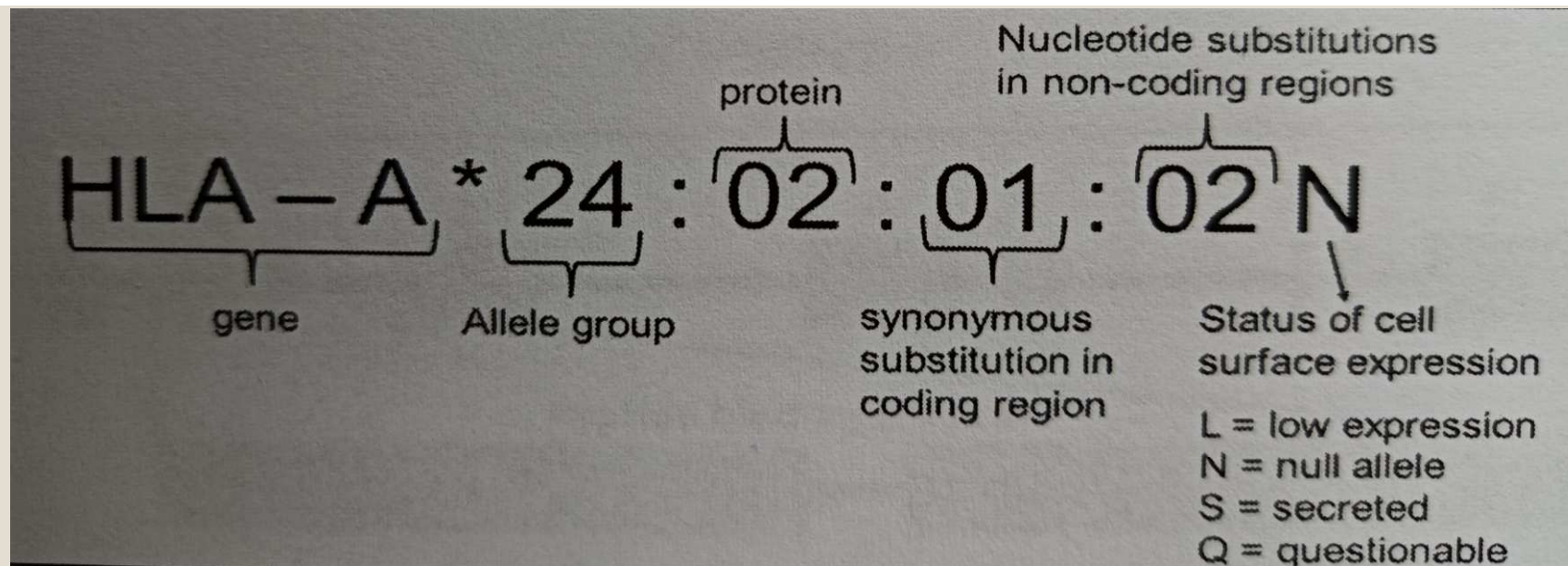
číslo (A1, Cw3) = označení specifity molekuly (antigenu)

2. Molekulárně-genetická definice HLA alel

používá znaky dvou a vícemístné

HLA-A*02, *31, B*08, *44, C*02, *12, DRB1*04, *13, DQB1*03, *08
- úroveň „low resolution“

**HLA-A*01:01, *02:02, B*07:01, *35:01, C*02:02, *03:03, DRB1*04:01,
*13:05, DQB1*03:04, *03:05**
- úroveň „high resolution“



Někdy více jak 4 znaky:

C*02:02:01, ***02:02:02**.....alely se liší v tiché nukleotidové substituci na úrovni DNA, ne v aminokyselinové sekvenci na úrovni polypeptidu (tichá mutace)

A*24:02:01:01 7. a 8. pozice – polymorfismus v nekódující oblasti

A*24:02:01:02L „ low expressed“ allele

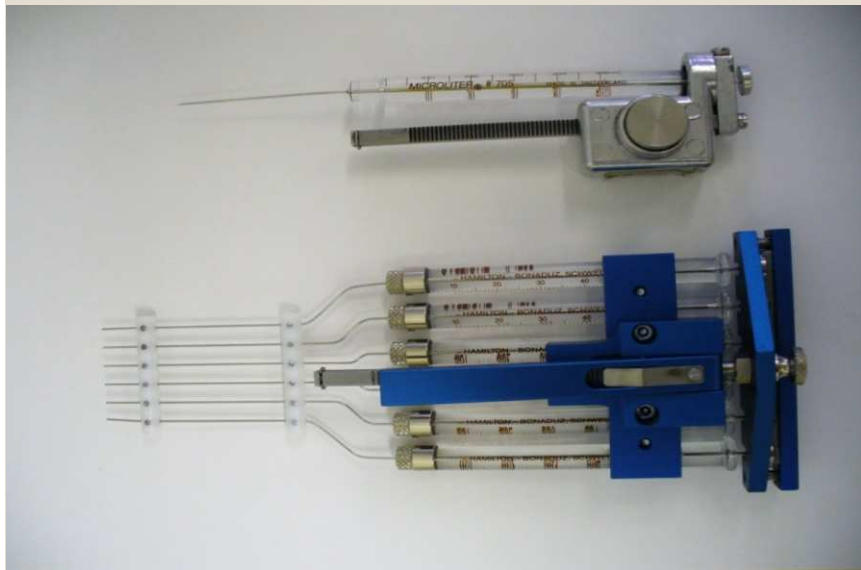
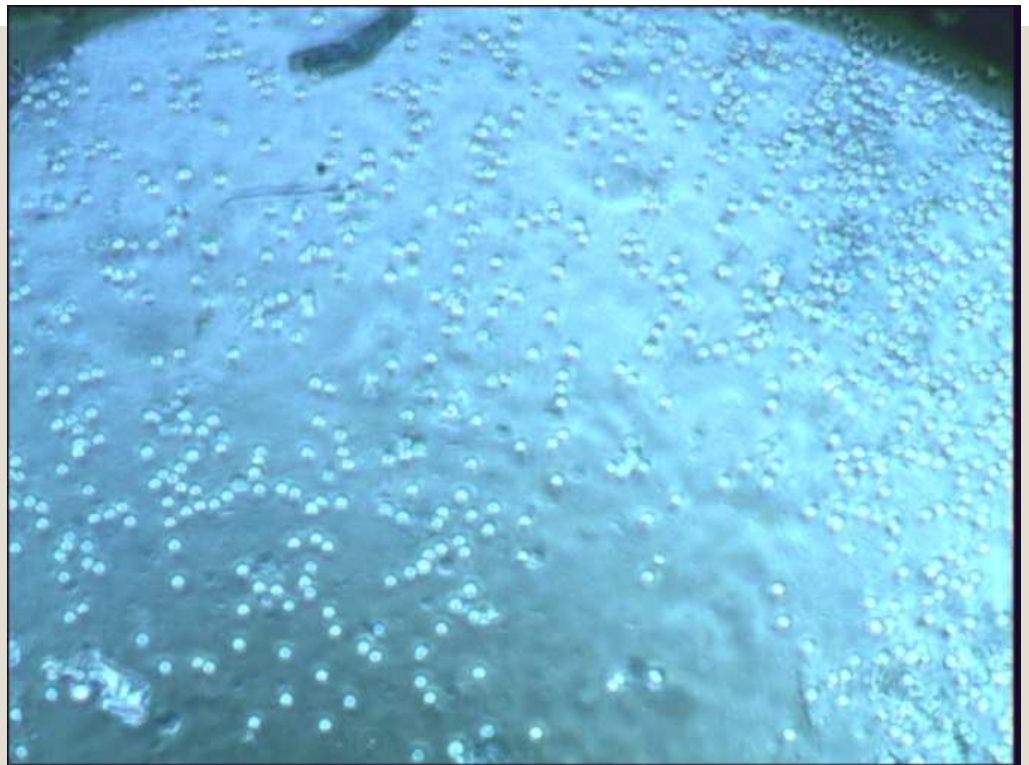
B*51:11N „ null“ allele

Metody typizace HLA antigenů

1. serologické metody

Complement –Dependent Cytotoxicity Assay (CDC) = Lymfocytotoxický test (LCT)

- ❖ lymfocyty typovaného jedince jsou nejdříve inkubovány se specifickými antiséry, která jsou rozkapána na mikrotitračních plotnách
- ❖ přidáno králičí sérum jako zdroj komplementu
- ❖ vazba protilátky se specifickým HLA antigenem na membráně lymfocytu aktivuje komplement, který poškozují buněčnou membránu
- ❖ vitální barvení (trypanová modř, eosin), mrtvé buňky se obarví
- ❖ mikroskopické hodnocení, hodnotí se procento obarvených (mrtvých) buněk, síla reakce -, 2, 4, 6, 8

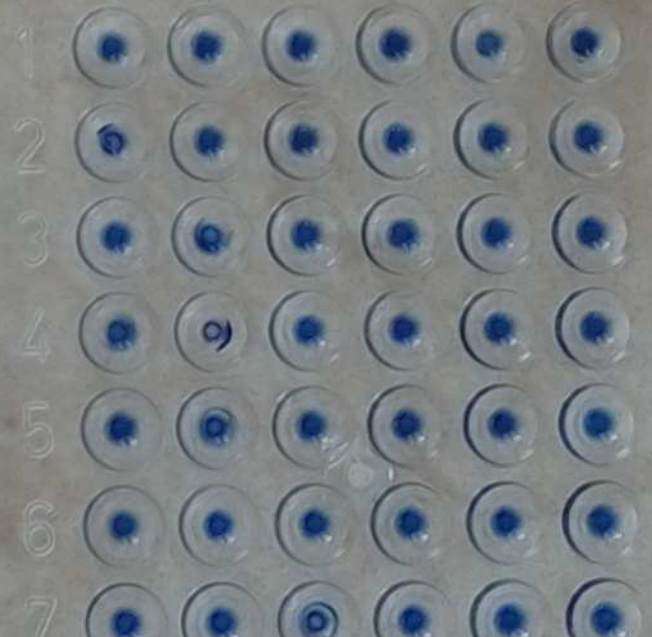




S2505/15



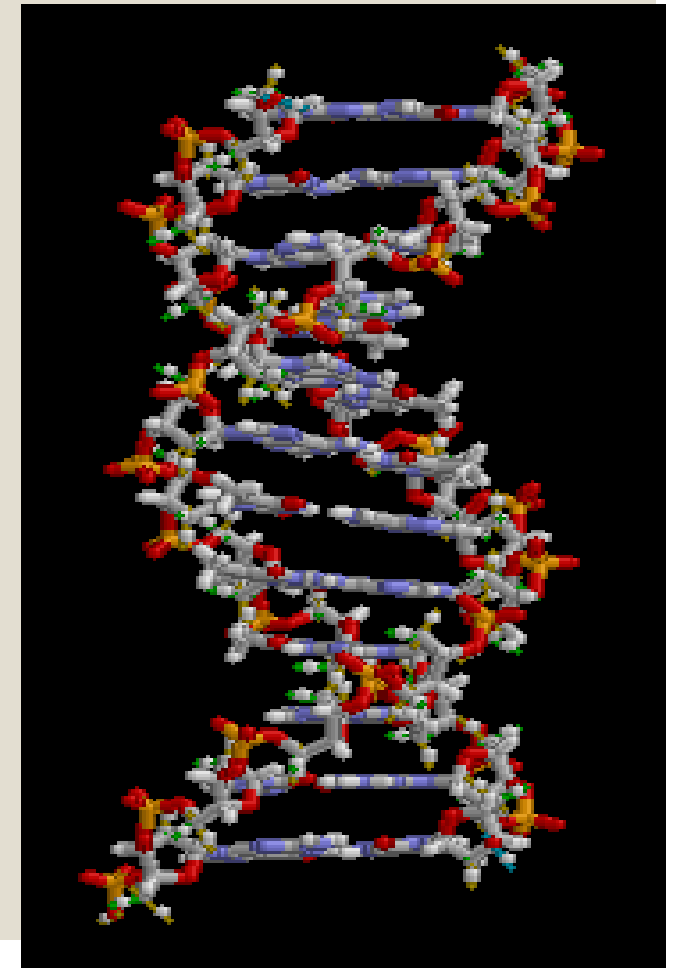
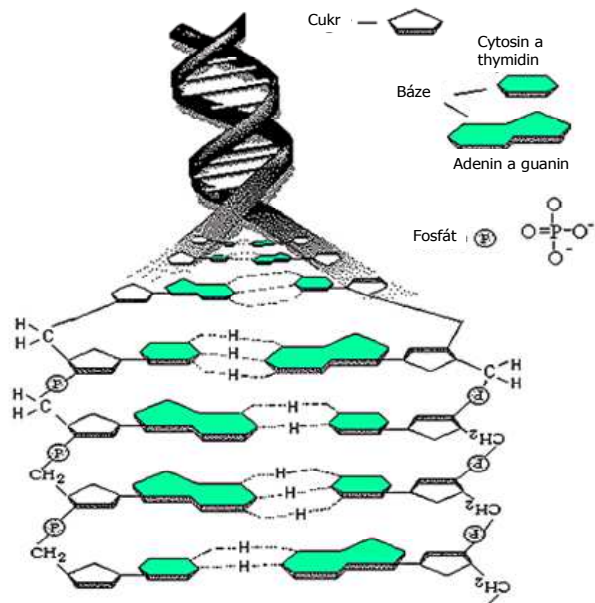
S2505/15



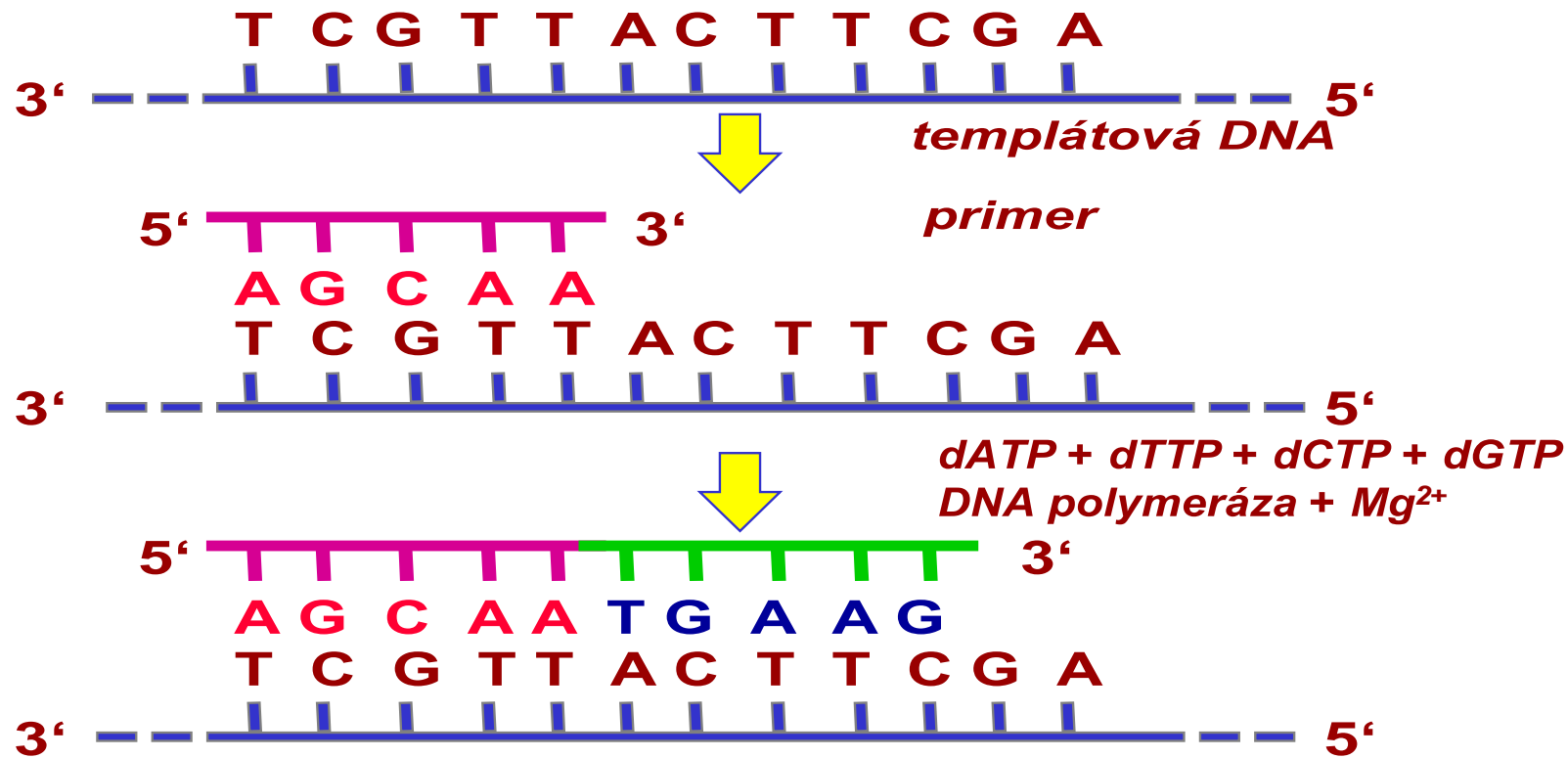
2. molekulárně - genetické metody

- ❖ PCR – polymerázová řetězová reakce
- ❖ izolace DNA (plná krev, bukání stěry, krevní skvrny, vlasové folikuly, parafínové tkáňové bloky)
- ❖ amplifikace DNA (PCR)
- ❖ detekce PCR produktu

Počet kopií DNA - 2^n
n – počet cyklů (30 – 35)



PCR - elongace primerů



HLA typizace pomocí PCR metod

PCR – SSP(sequence – specific priming)

PCR – SSO (sequence – specific oligonukleotide probes)

PCR – SBT (sequence based typing)

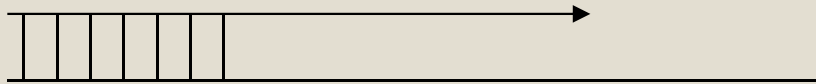
Real-Time PCR

NGS – sekvenování nové generace

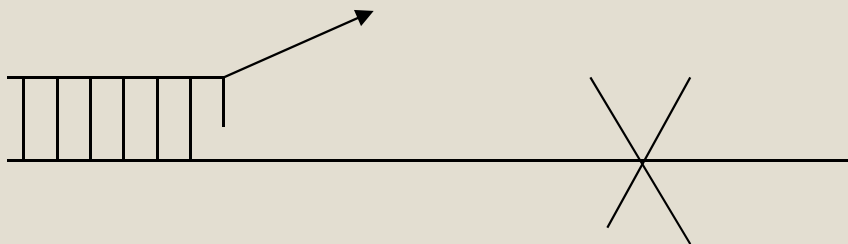
1. PCR – SSP

- ❖ alelově a skupinově specifické primery určují jednu alelu nebo skupinu alel
- ❖ tolik primerových párů, aby mohly být amplifikovány a detekovány všechny známé alely daného lokusu
- ❖ PCR – SSP může být užita pro „low resolution“ nebo „high resolution“
- ❖ HLA typizace „low resolution“ pro lokusy -A, -B, -DR, -DQ vyžaduje 95 – 100 primerových párů
- ❖ v každé amplifikační směsi interní kontrola amplifikace
- ❖ kontrola kontaminace – zkumavka obsahuje všechny reagenty pro PCR kromě templátové DNA
- ❖ Detekce elektroforeticky, amplikony s menší molekulovou hmotností migrují v gelu rychleji než amplikony s vyšší molekulovou hmotností
- ❖ vizualizace – obarvení gelu fluorescenční barvou, která se inkorporuje do DNA, expozice gelu UV světlem na transiluminátoru
- ❖ fotodokumentace

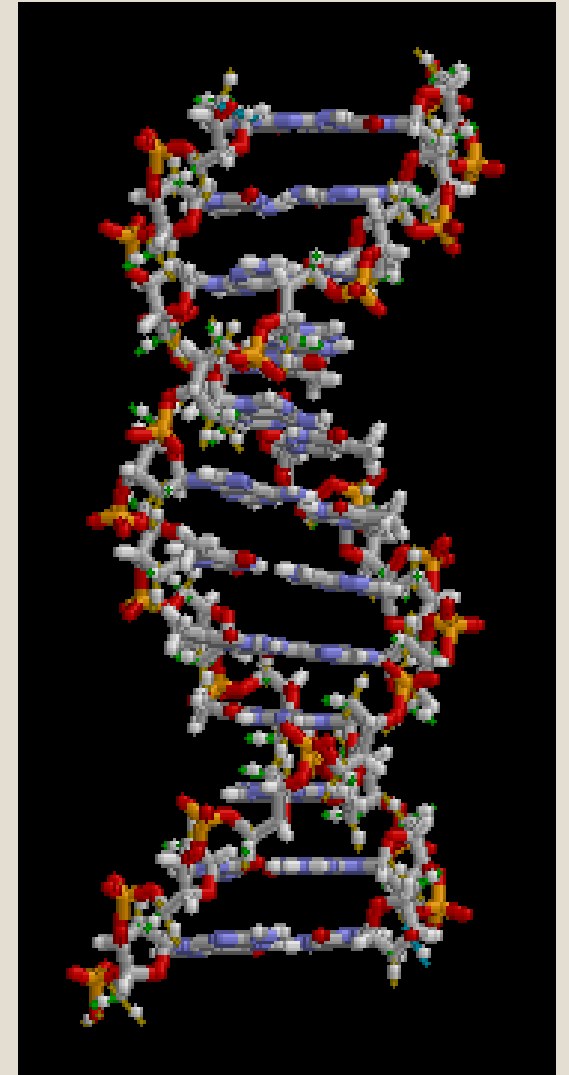
Princip SSP-PCR

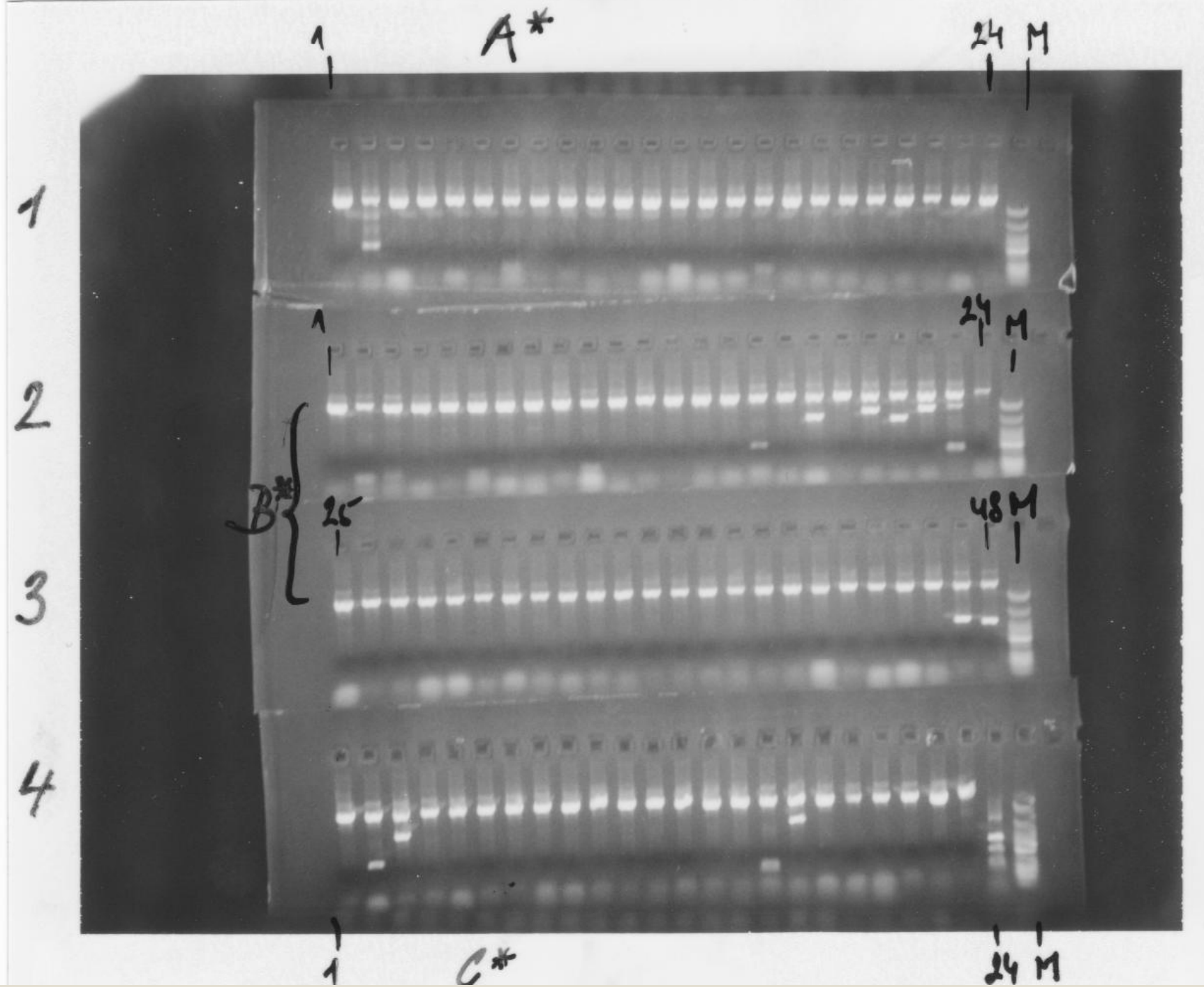


úplná shoda – amplifikace proběhne



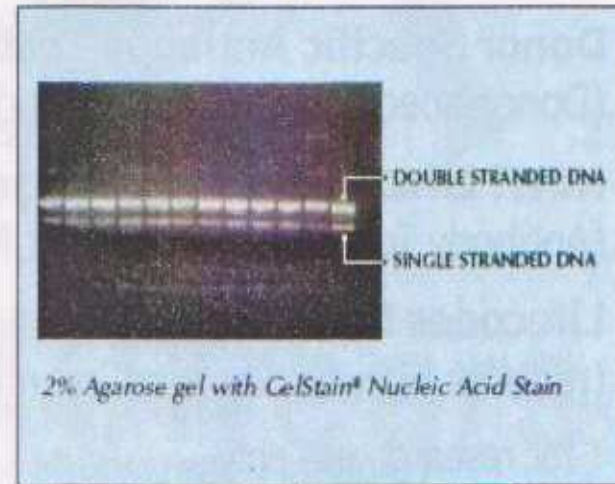
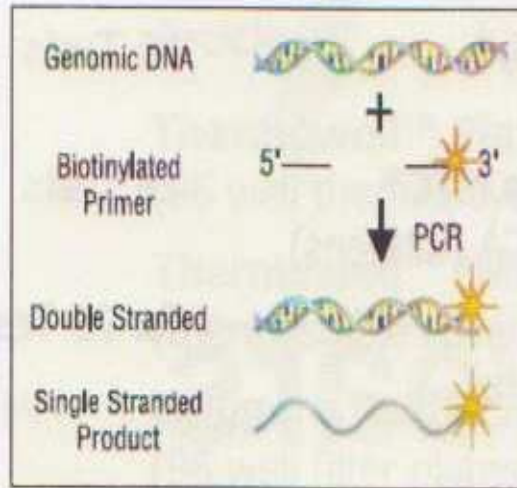
neshoda – amplifikace neproběhne



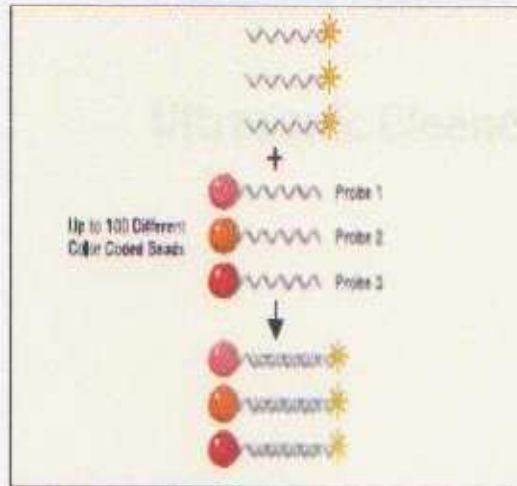


2. PCR-SSO typizace na analyzátoru Luminex

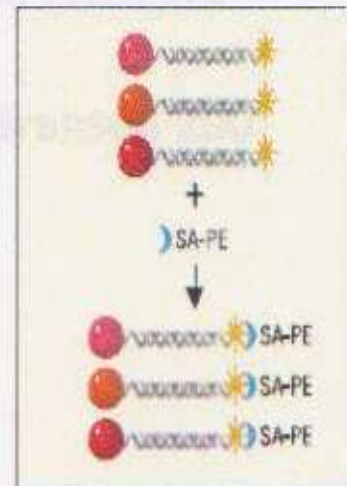
(for 100 typings)



1. Amplify with biotinylated primers



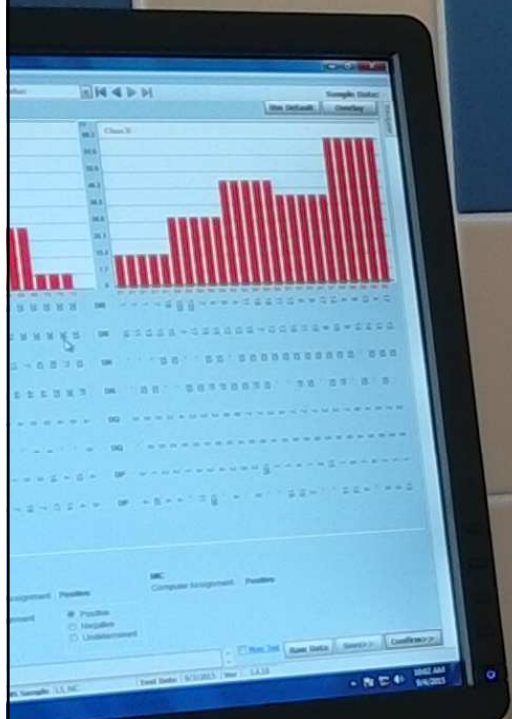
2. Hybridize with beads



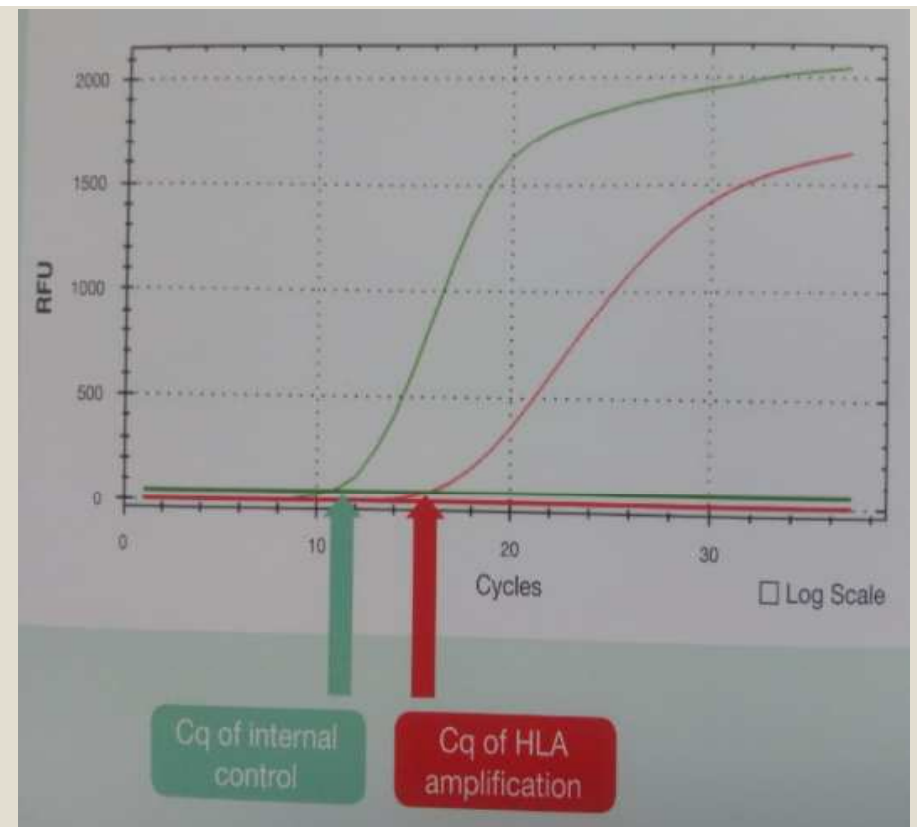
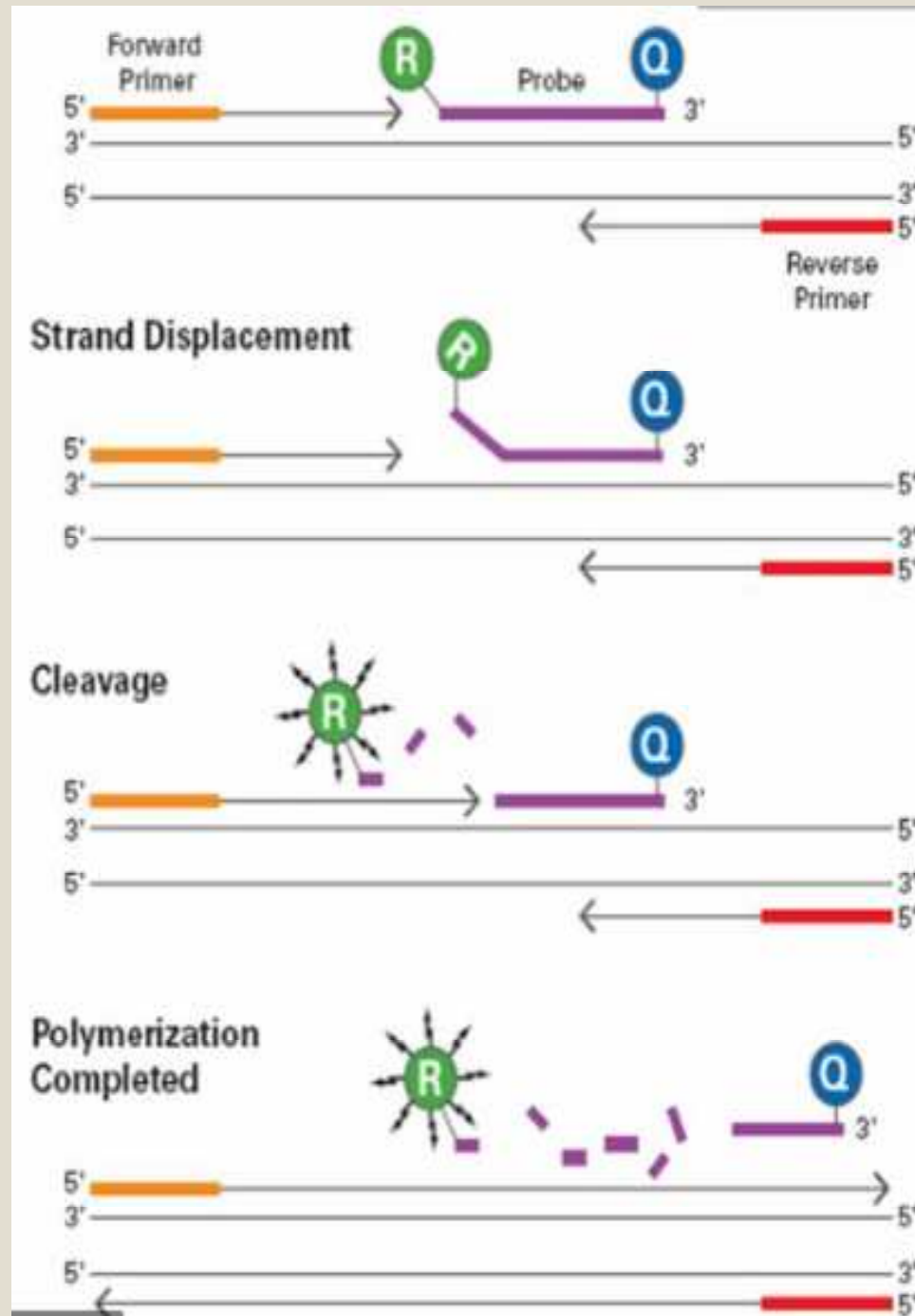
3. Label with SA-PE

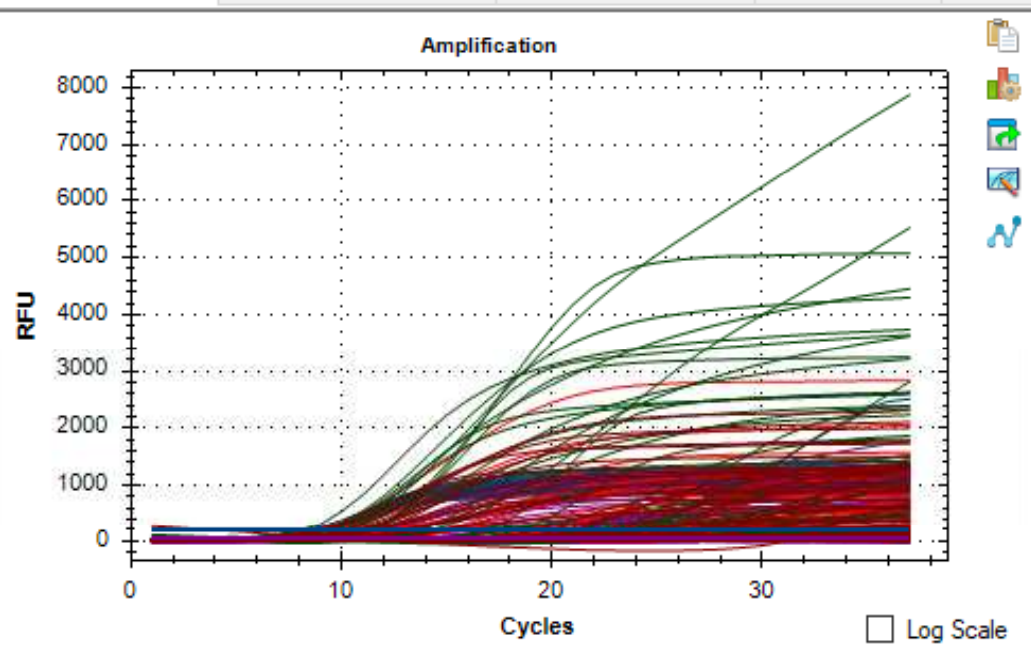


4. Analyze in the fluoroanalyzer



3. Real-Time PCR





No wells designated as Sample Type standard.

FAM HEX Texas Red Cy5 Quasar 705

Step Number: 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
D11	HEX		Unkn		N/A
D12	HEX		Unkn		N/A
E01	HEX		Unkn		N/A
E02	HEX		Unkn		N/A
E03	HEX		Unkn		N/A
E04	HEX		Unkn		N/A
E05	HEX		Unkn		N/A
E06	HEX		Unkn		N/A
E07	HEX		Unkn		30.90
E08	HEX		Unkn		N/A
E09	HEX		Unkn		N/A
E10	HEX		Unkn		22.71
E11	HEX		Unkn		0.27

4. PCR – SBT

- ❖ použití ddNTPs (dideoxy nucleotide triphosphates, chybí 3'-OH skupina), které fungují jako terminátory PCR reakce
- ❖ ddNTPs značeny 4 různými fluorescenčními barvivy, PCR probíhá v 1 zkumavce a elfo v 1 linii
- ❖ sekvenátor – probíhá kapilární elektroforéza, produkty rozdělovány podle velikosti (rozdíly v délce o 1 nukleotid)
- ❖ laserový paprsek snímá koncový fluorescenčně značený ddNTP
- ❖ interpretace výsledků pomocí softwaru

5. NGS = sekvenování nové generace

- ❖ amplifikace
- ❖ příprava genové knihovny
- ❖ příprava templátu
- ❖ sekvenování
- ❖ analýza



~ 3.5 hr



~ 6.5 hr



~ 2 hr



~ 9 hr



AMPLIFICATION

NXType™ amplification

LIBRARY PREPARATION

Barcode library creation

TEMPLATE PREPARATION

Isothermal clonal amplification onto Ion Sphere Particles™

SEQUENCING

Load Ion™ chip and run PGM™

ANALYSIS

TypeStream™ Software analyzes automatically

Day 1

Day 2

Day 3

Full workflow < 3 days

Competitive Advantages

Turn-key Solution

Multiplexed primer design (reduces library prep)

Short PCR Time (~ 1.5 hours)

Suitable for Low to High throughput (≤ 48 samples / run)

Auto-analysis with TypeStream software plug-in

Sample-to-Results < 3 Days

Unique

Workflow



Library Prep



Library Prep

Workflow

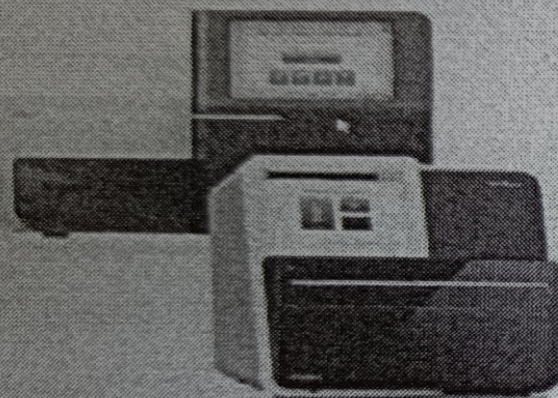
Analysis



Workflow

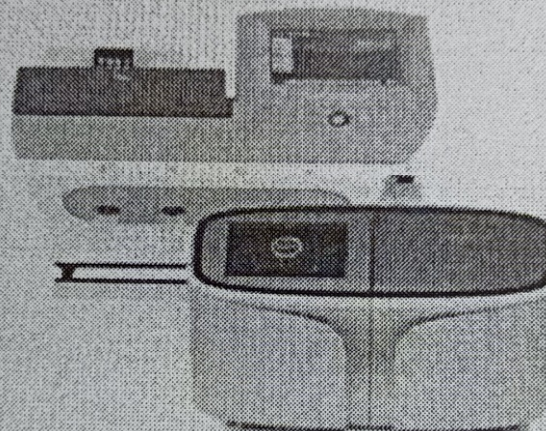


Illumina MiSeq



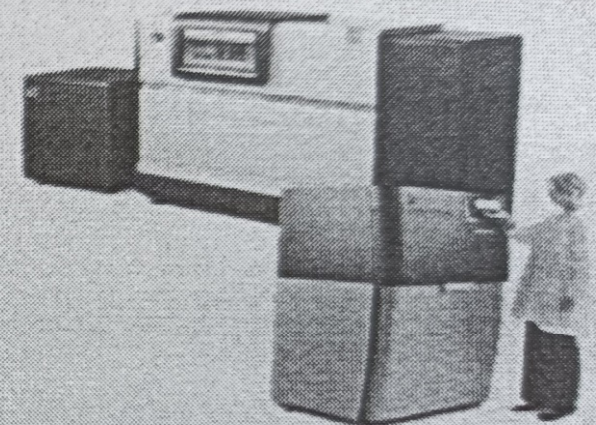
MiniSeq

Ion Torrent PGM



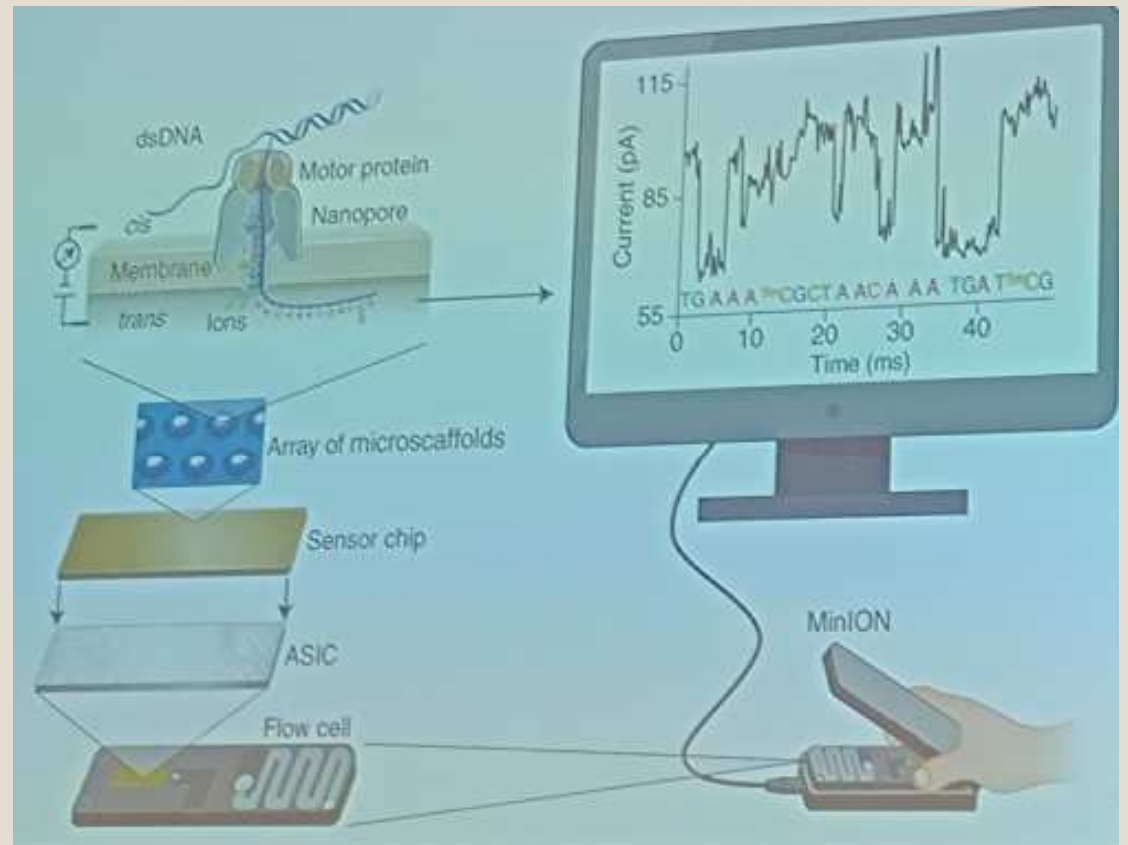
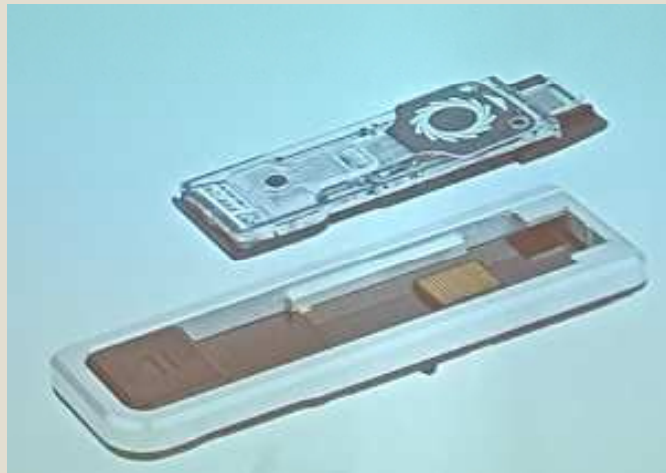
S5

Pacific Biosciences RSII



Sequel

Nanotype technology



gDNA – single tube amplification – quantitation DNA – barcoding – pooling and purification – add sequencing adapters – flow cell check – flow cell priming – mixing library with sequencing buffer and loading beads – library loading - sequencing