

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 rodinách 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 repetice) - opakující se jednotky tvoří oblast o velikosti 100 - 6500 párů bází, často lokalizované extragenově
 - * **mikrosatelitní DNA** - repetice 1 - 4 párů bází, nejčastěji lokalizované v nepřepisovaných částech genu tzv. intronech

Nepřímá DNA diagnostika

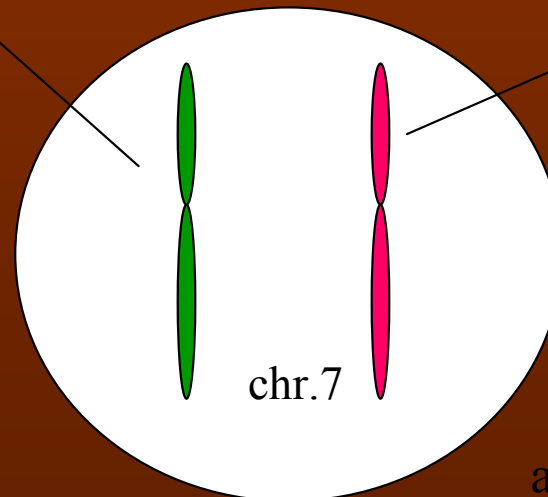
- využívá znaky (markery) rozptýlené v lidském genomu
- vyskytují se běžně v populaci
- nejsou přepisovány do proteinu (leží v intronech)
- nejsou příčinou choroby

př. gen CFTR - intron 8 - polymorfní místo

(CA)_n — GTATCACACACATTCGG —

od otce

od matky



alela A1:

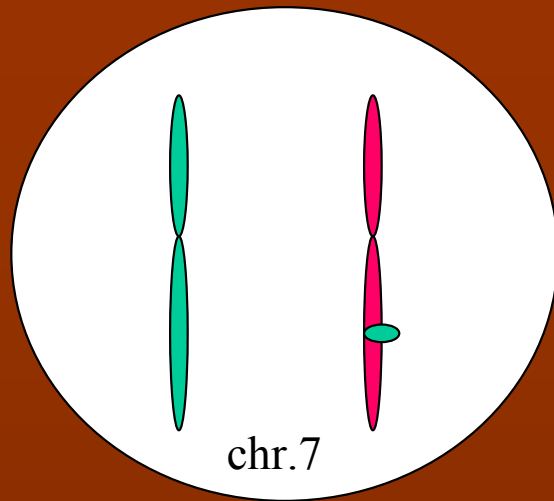
-----GTATCACATTCGG-----

délka alely 130 bp

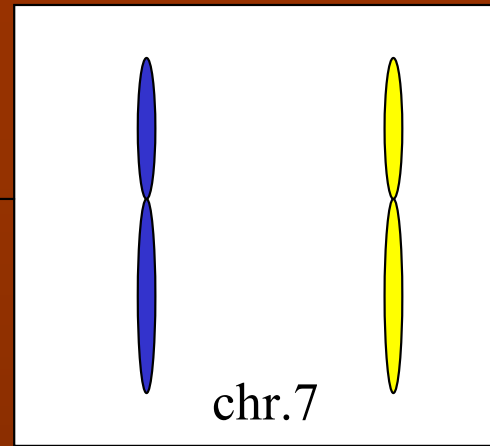
alela A2:

-----GTATCACACACATTCGG---

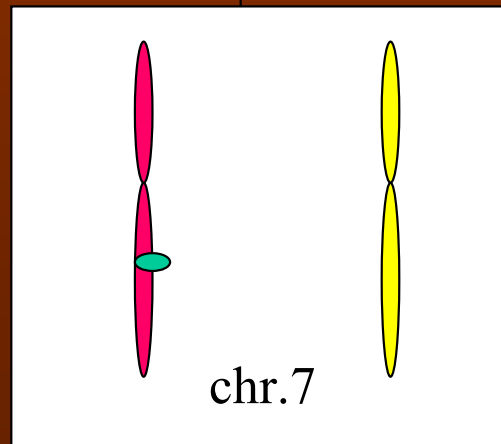
délka alely 134 bp



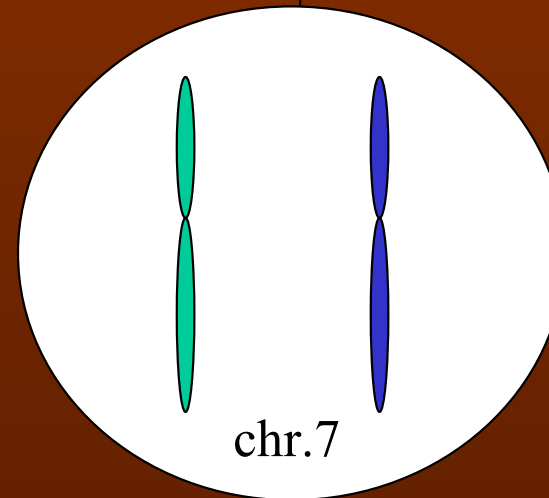
dF508 / non
~~A1~~ // ~~A3~~



non / ?
~~A1~~ // ~~A2~~



dF508 / ?
 A1 // ~~A2~~



non / non
~~A1~~ // ~~A3~~

informační

● mutace v genu CFTR

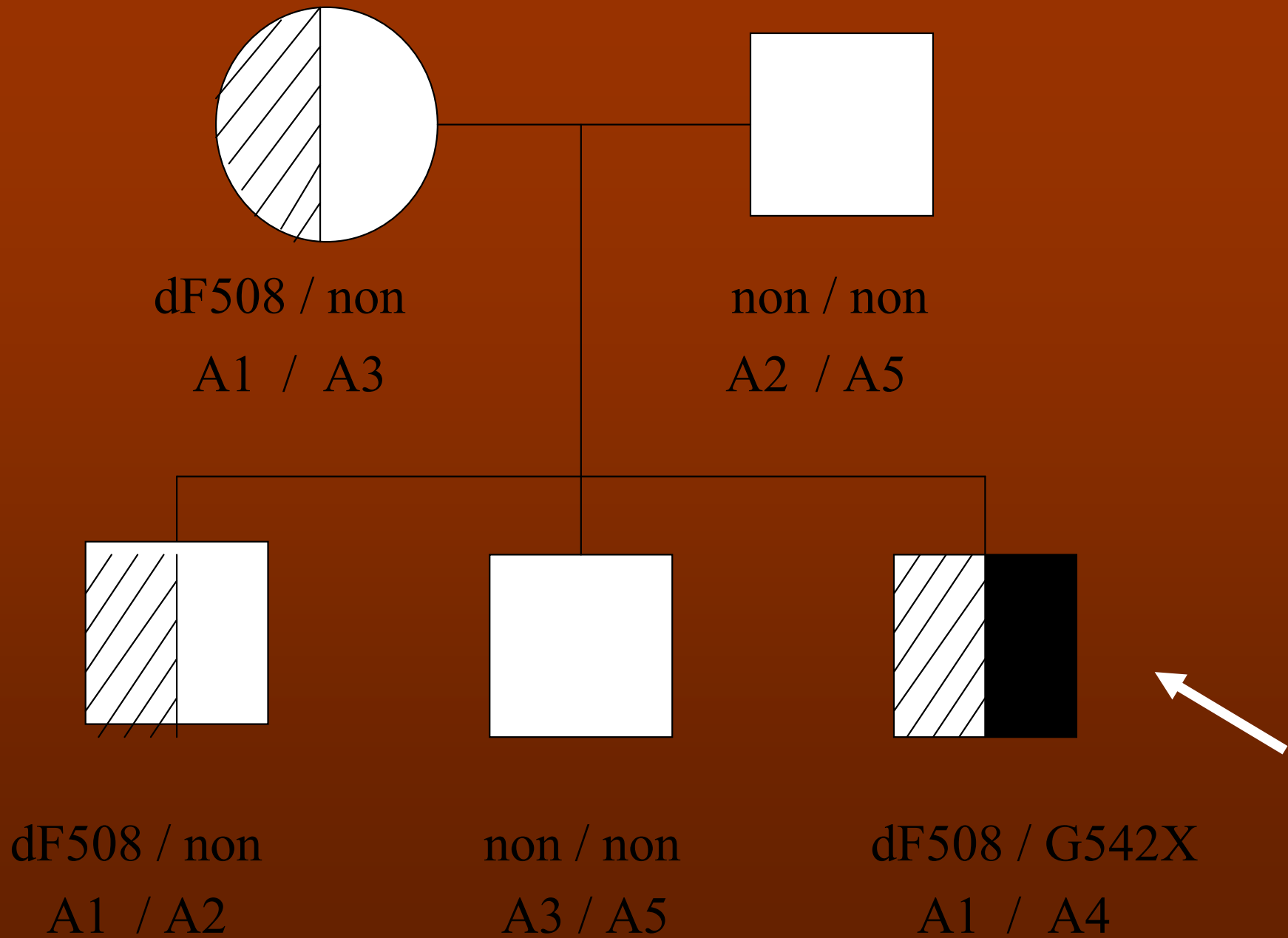
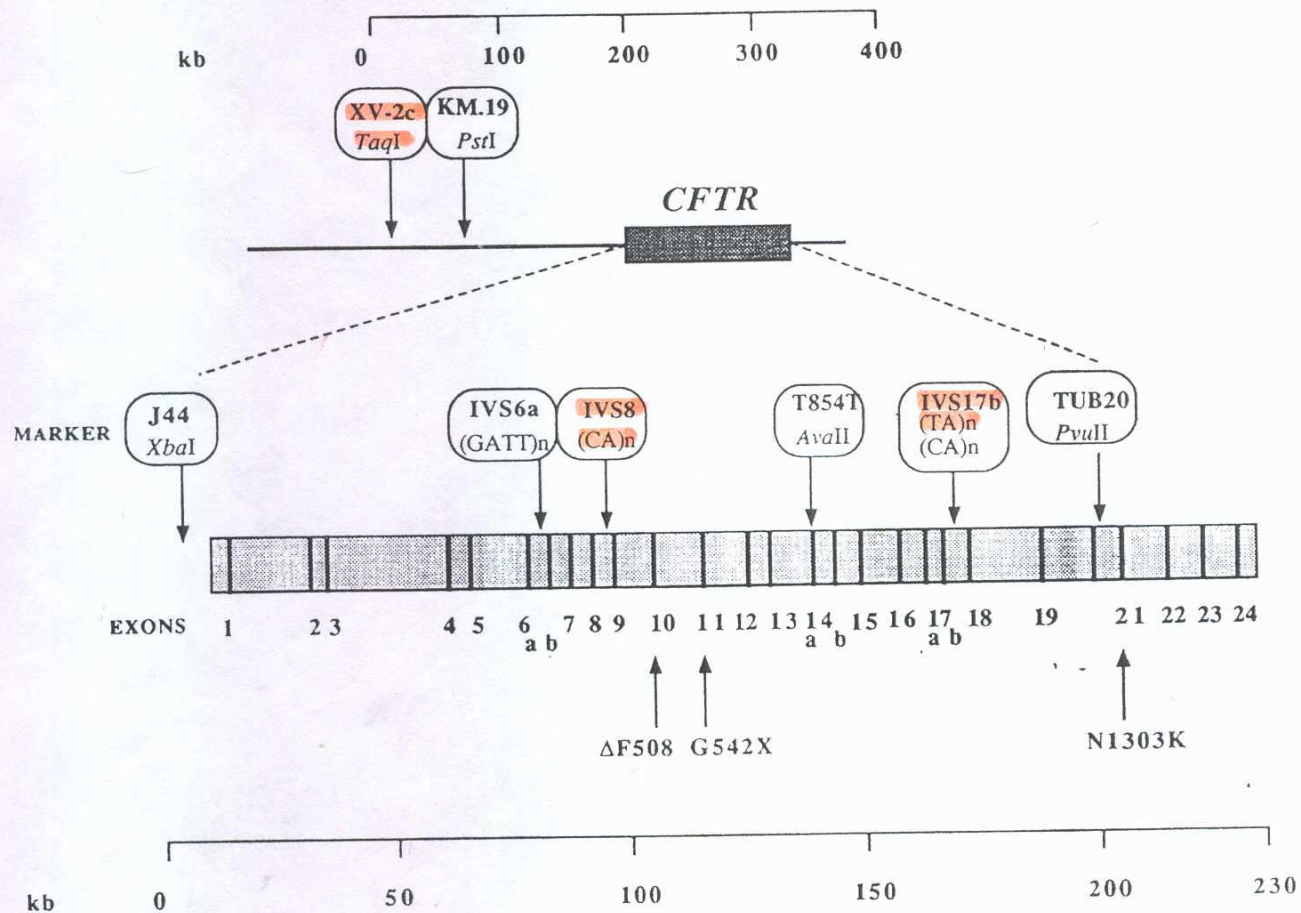
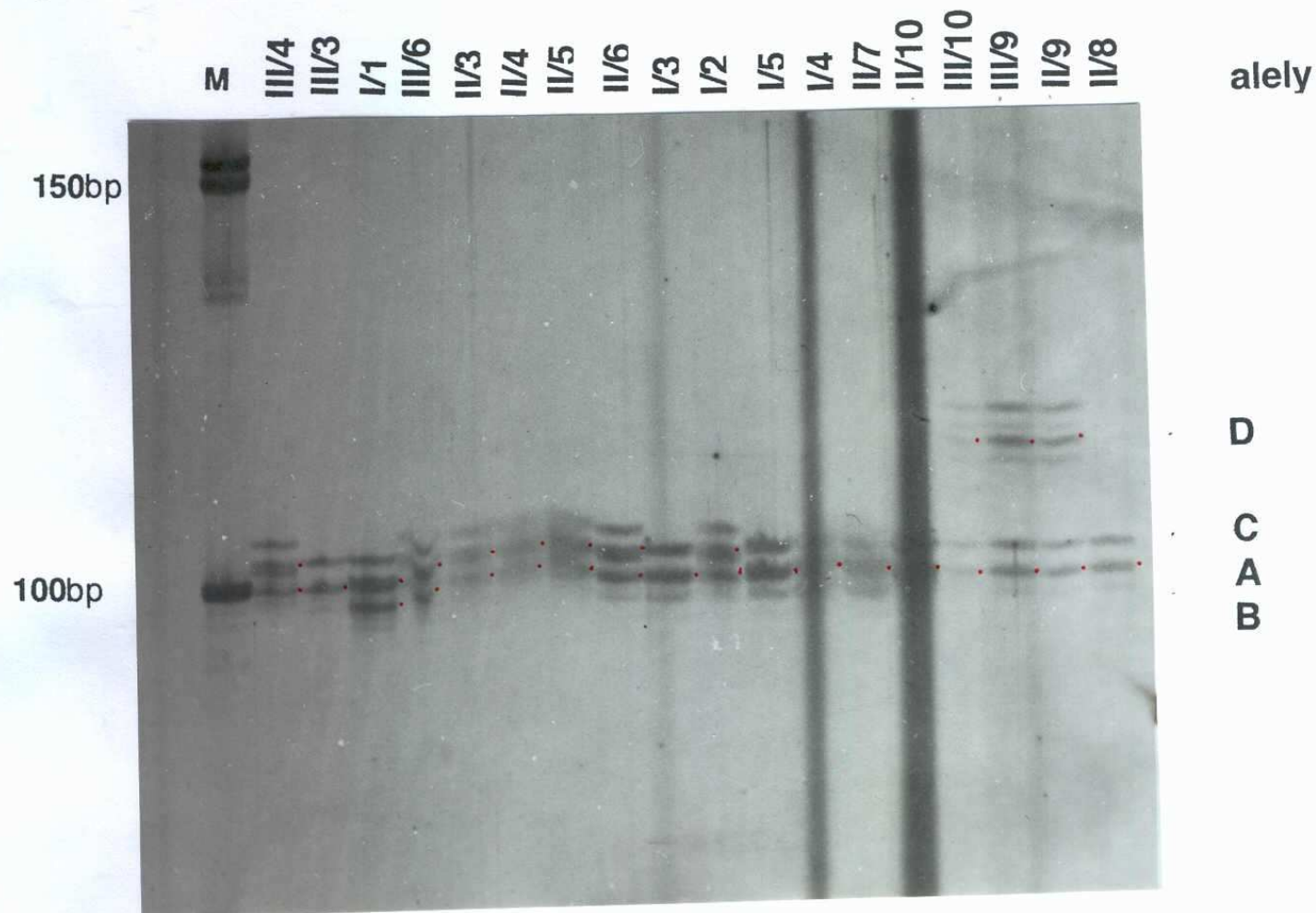


Schéma: Lokalizace extra- a intragenních polymorfních míst genu CFTR (převzato M. Claustres et al., Hum. Genet., 1996, 98:336-344)



b) IVS8BTA



legenda :

podmínky elektroforetické separace:

50W / 55°C / 2 hod.

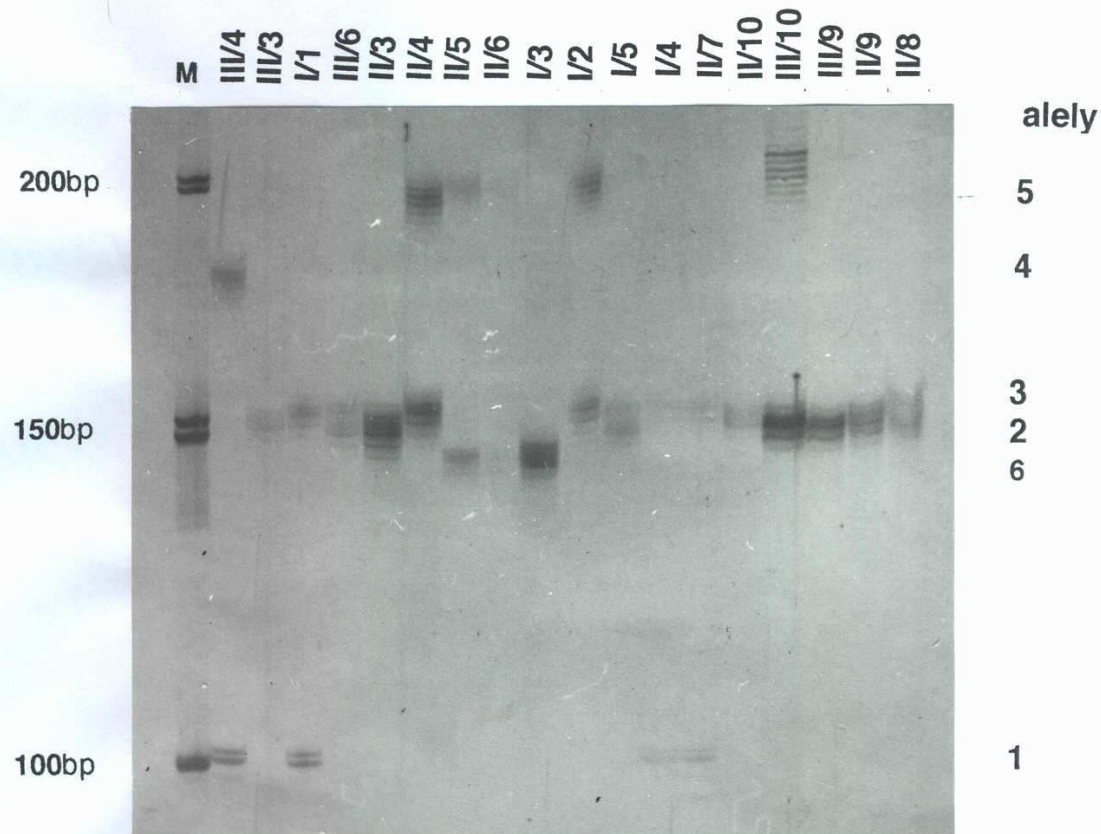
6% denaturační PAG (7M urea)

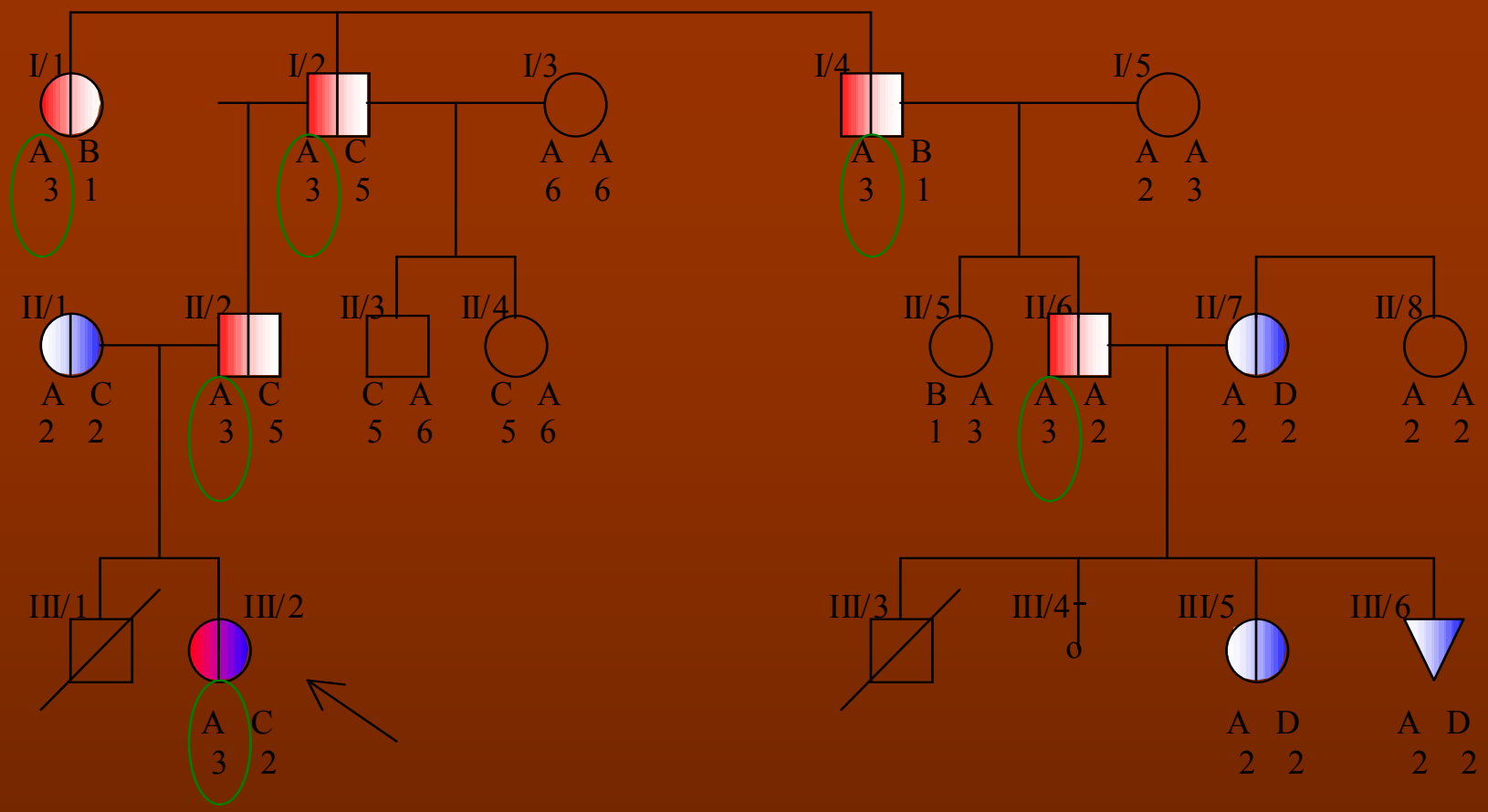
barveno stříbrem

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

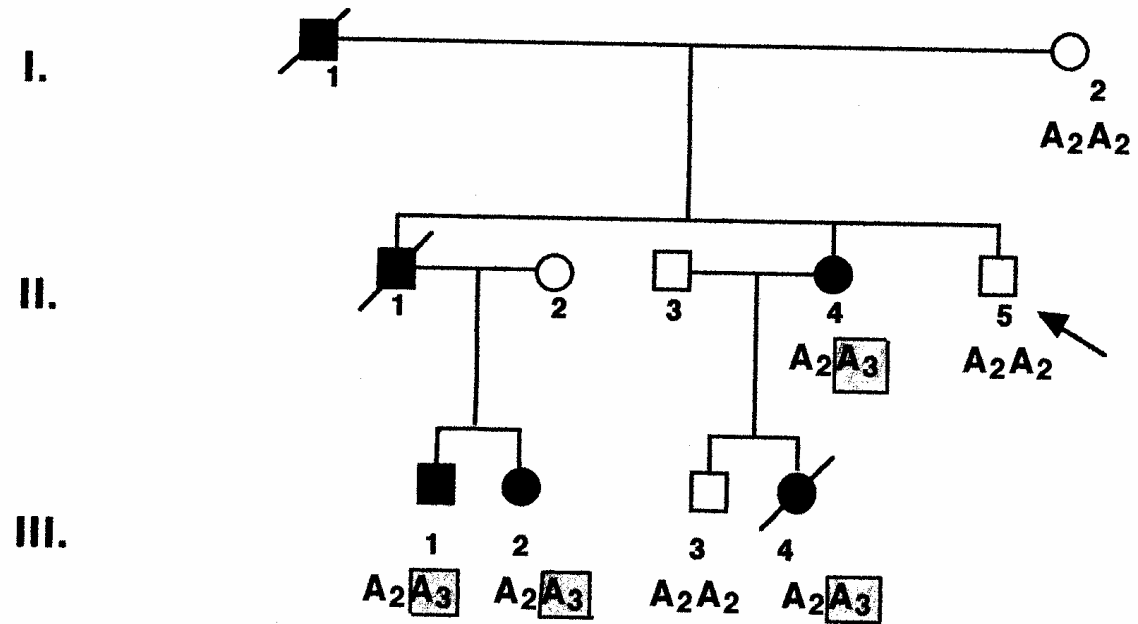




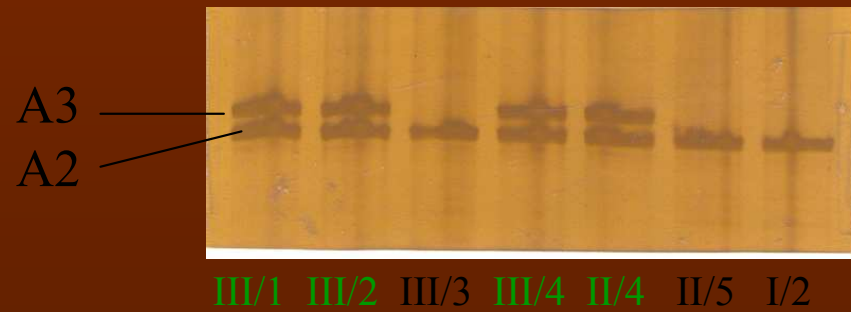
legenda:

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

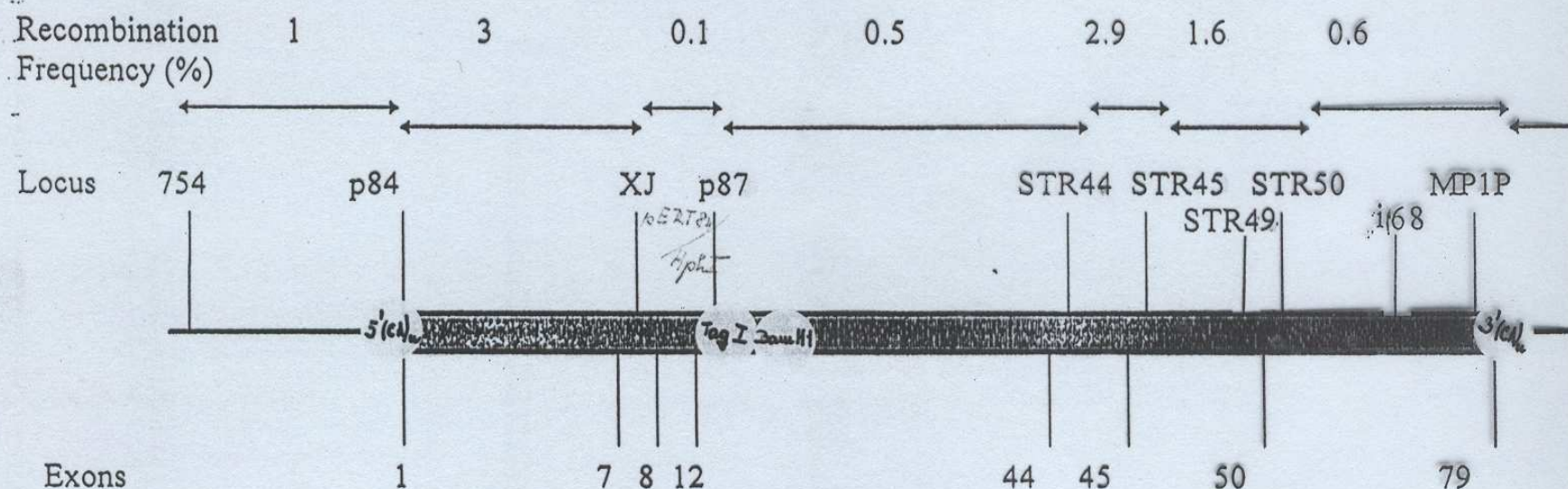
Rodokmen rodiny P



PAGE



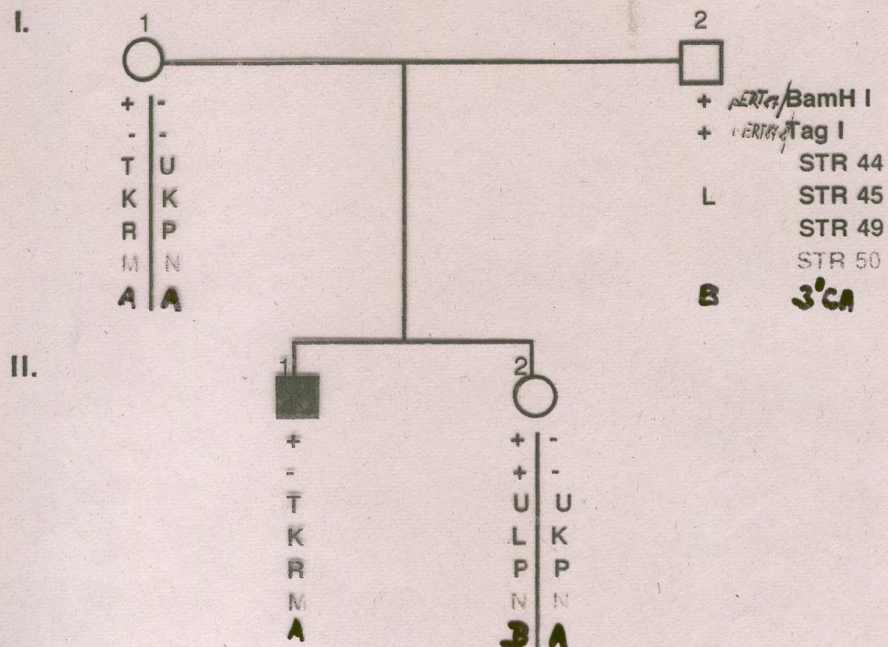
Využití polymorfních míst v dystrofinovém genu



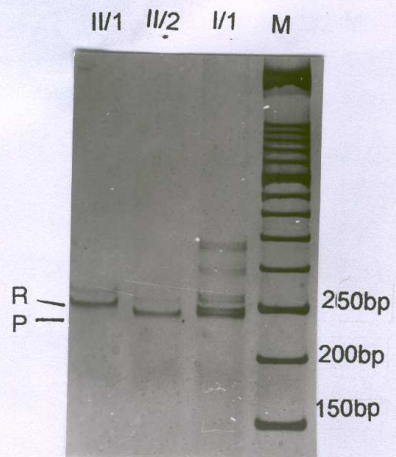
Legenda:

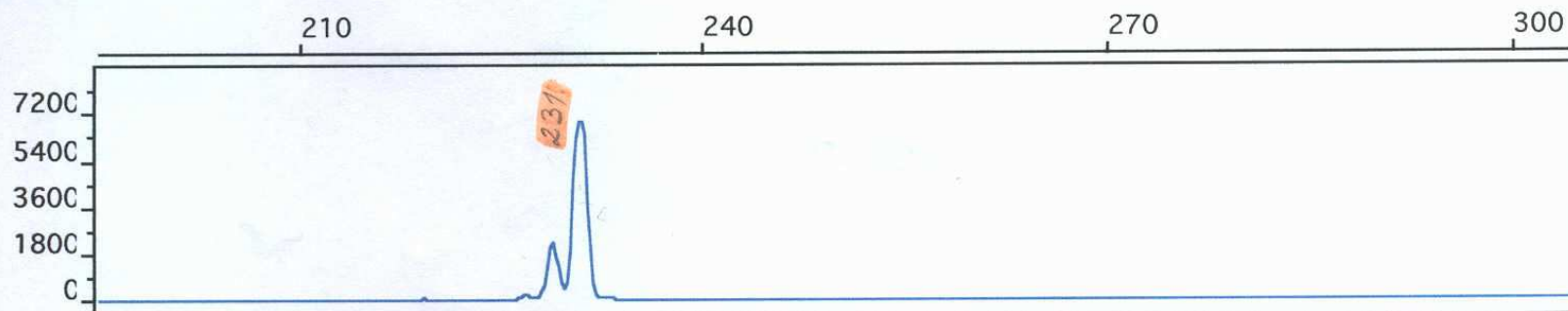
- 5'(CA)n – alely 172 - 184 bp
- pERT 87 – 8/ Tag I : alely 145bp (neštěpená, - alela) nebo 71bp a 74 bp (štěpená, + alela)
- pERT 87 – 15/ BamHI : alely 216bp(neštěpená, - alela) nebo 166bp a 50bp (štěpená, + alela)
- STR – sekvence $n(CA)_n$:
 - STR44 alely 174bp – 204bp, heterozygotita 87%
 - STR45 alely 156bp – 184 bp, heterozygotita 89%
 - STR49 alely 227bp - 257bp, heterozygotita 93%
 - STR50 alely 233bp – 251bp, heterozygotita 71%
- i68 /Hinfl: 4 alely
- 3'(CA)n: alely 131bp – 137bp
- pERT 84 /Hph.I : 236 bp (-) + 16bp
108 + 128 (+) + 16bp

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

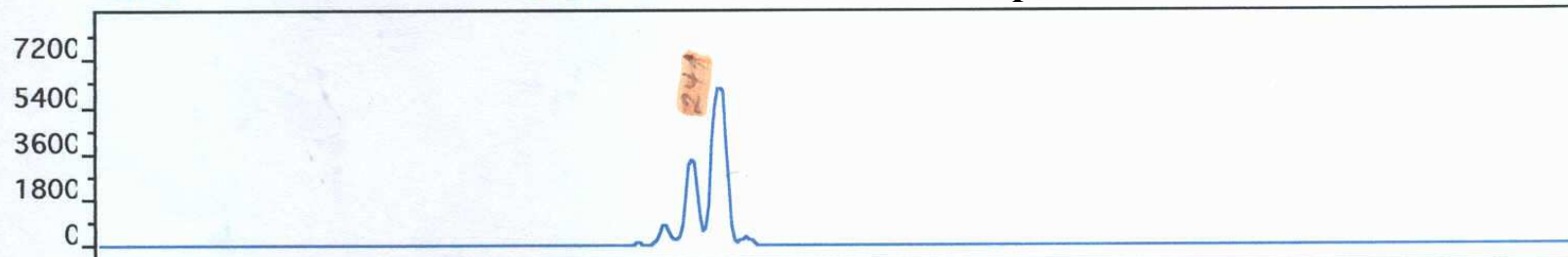


Využití intragenového polymorfismu STR49

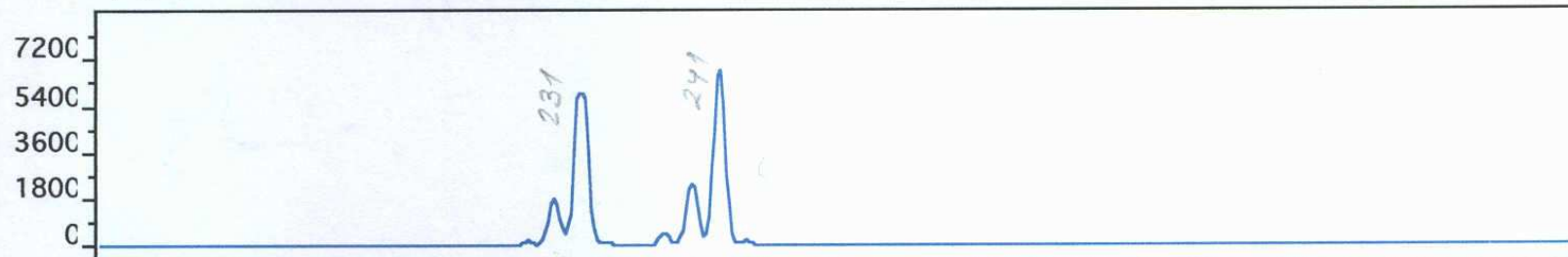




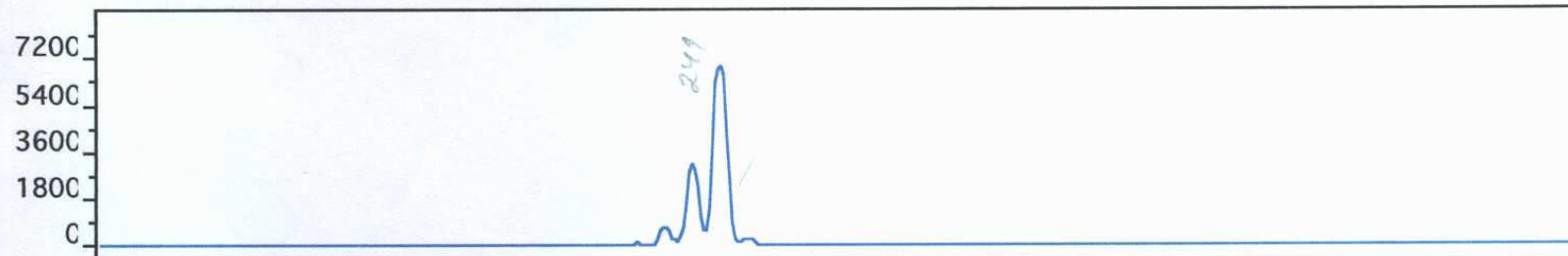
13B:Sample13 / 88/95 STR50 / * **proband**



14B:Sample14 / 89/95 STR50 / *sestra* **sestra**



15B:Sample15 / 90/95 STR50 / *matka* **matka**



16B:Sample16 / 91/95 STR50 / *otec* **otec**