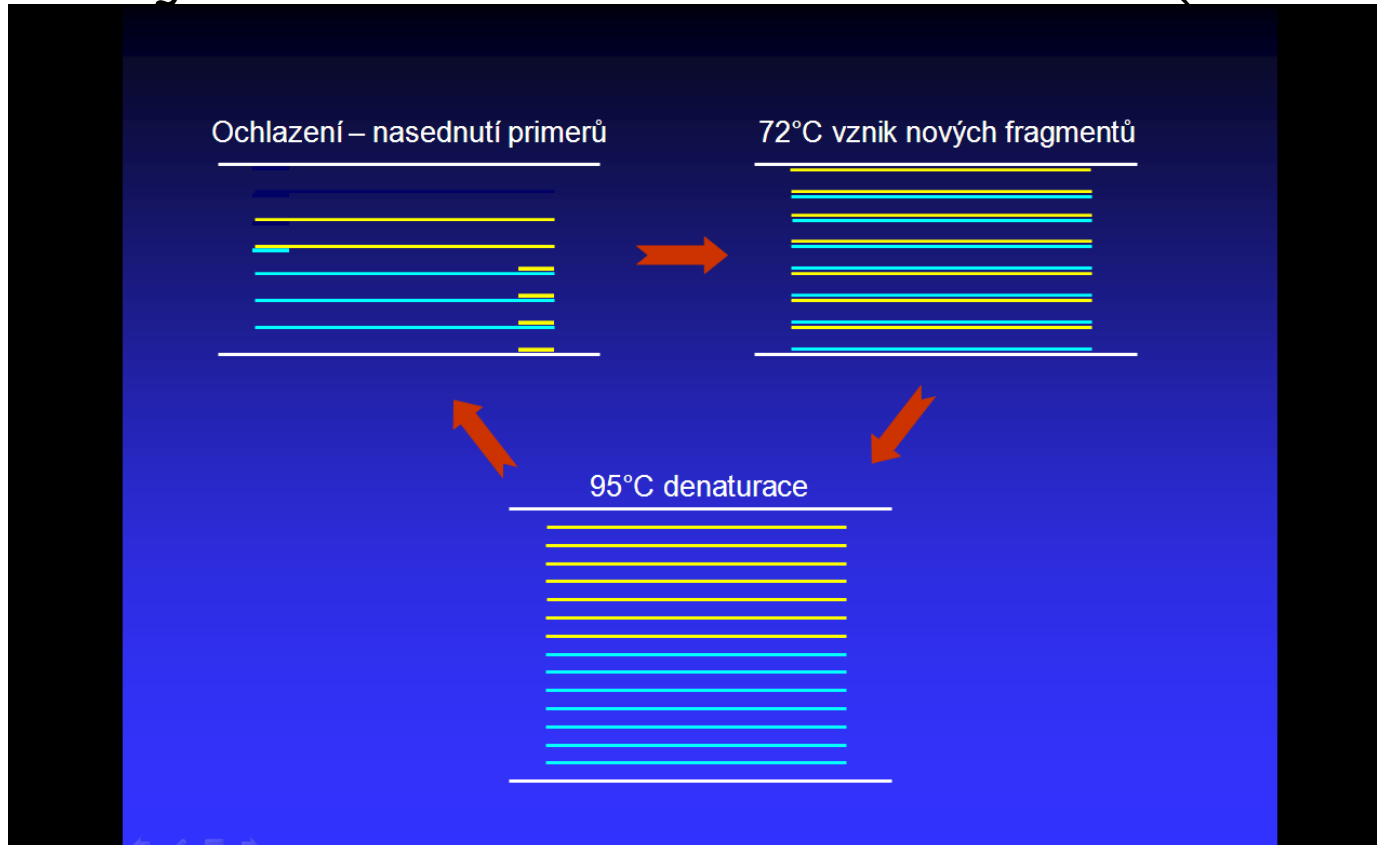


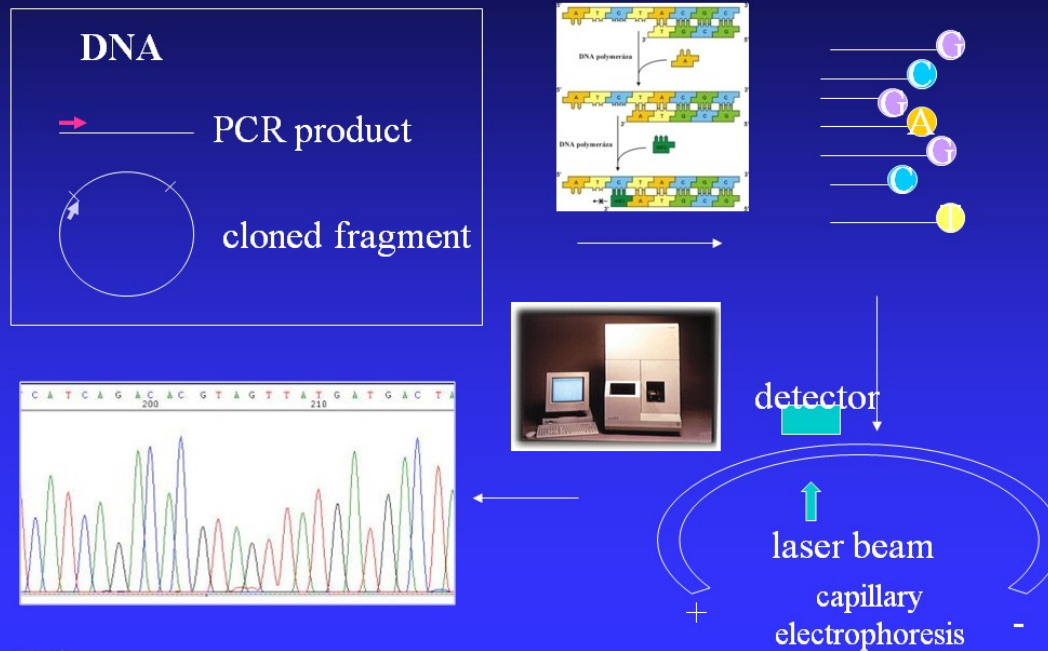


# Polymerase chain reaction (PCR)



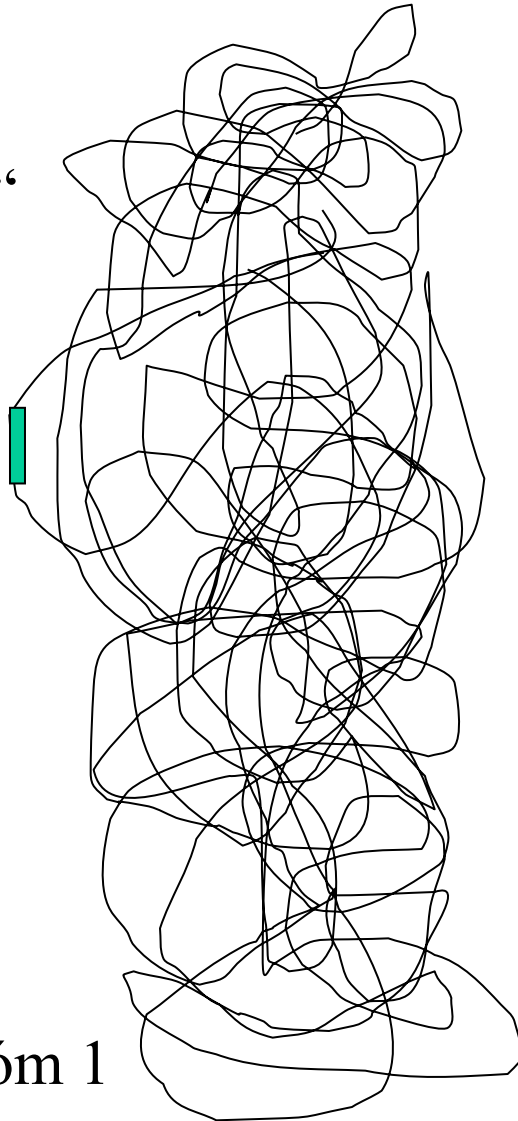
# Sekvencování

## Sekvencování DNA

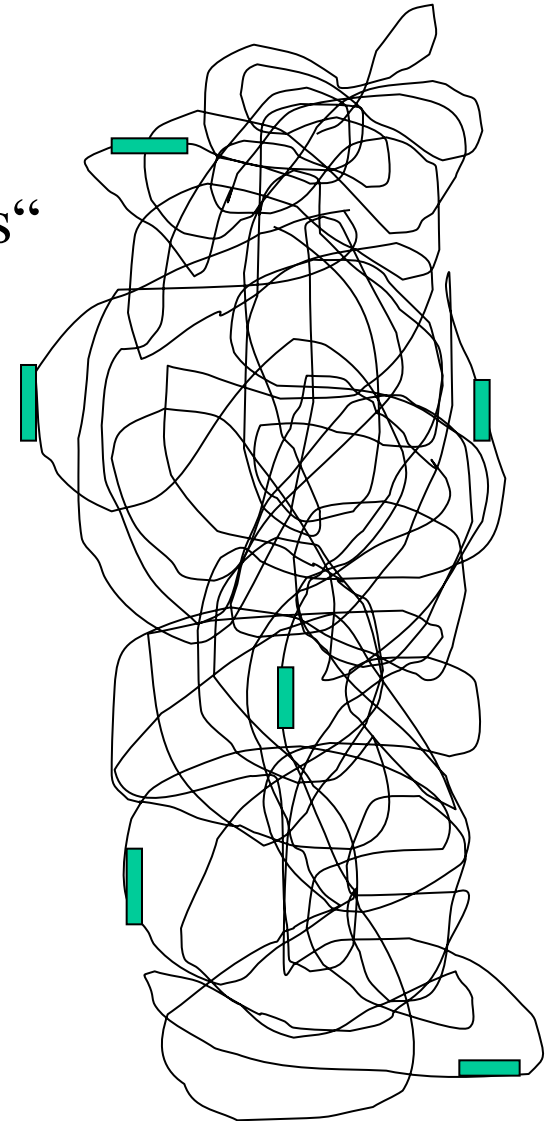


# Typy genetických markerů

„single-locus“



„multi-locus“



Př.: chromozóm 1

# Typy genetických markerů

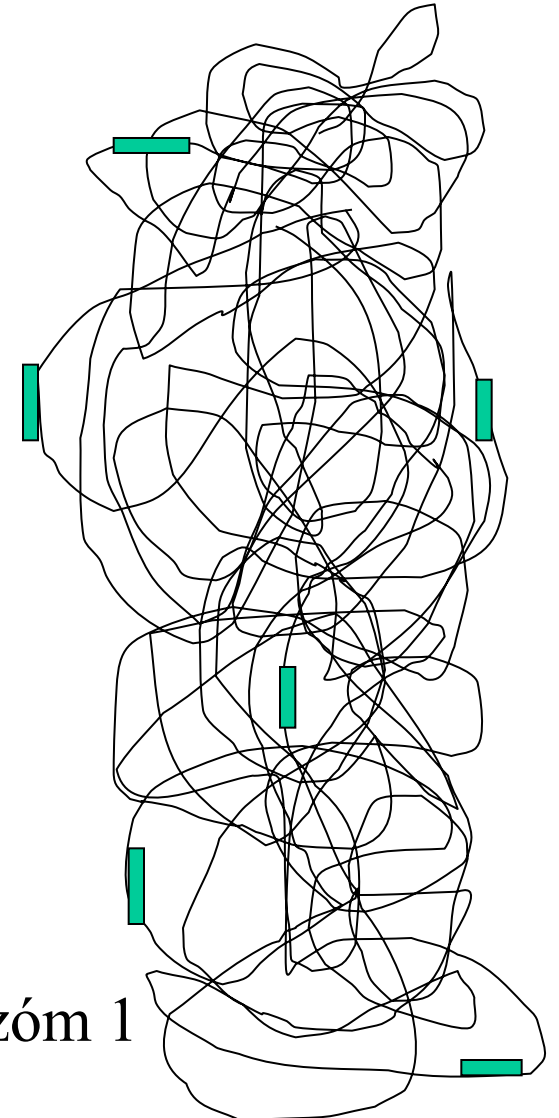
- **dominantní** markery – odliší pouze přítomnost (či nepřítomnost) daného znaku; tj. neodliší obě jeho formy na homologních chromozómech
- **kodominantní** markery – identifikace homologních alel, tj. je možno rozlišit homozygotní a heterozygotní stav (umožňují stanovit frekvenci alel)

# Typy genetických markerů

	Single locus	Codominant	PCR assay	Overall variability
Nuclear multilocus				
Minisatellite DNA fingerprints	No	No	No	High
RAPD	No	No	Yes	High
AFLP	No	No	Yes	High
Nuclear single locus				
Alozymy	Yes	Yes	No	Low-medium
Mikrosatelite	Yes	Yes	Yes	High
SINE (LINE)	Yes	Yes	Yes	Low
SNPs (sekvence)	Yes	Yes	Yes	Low-high

# Multi-locus genetic markers

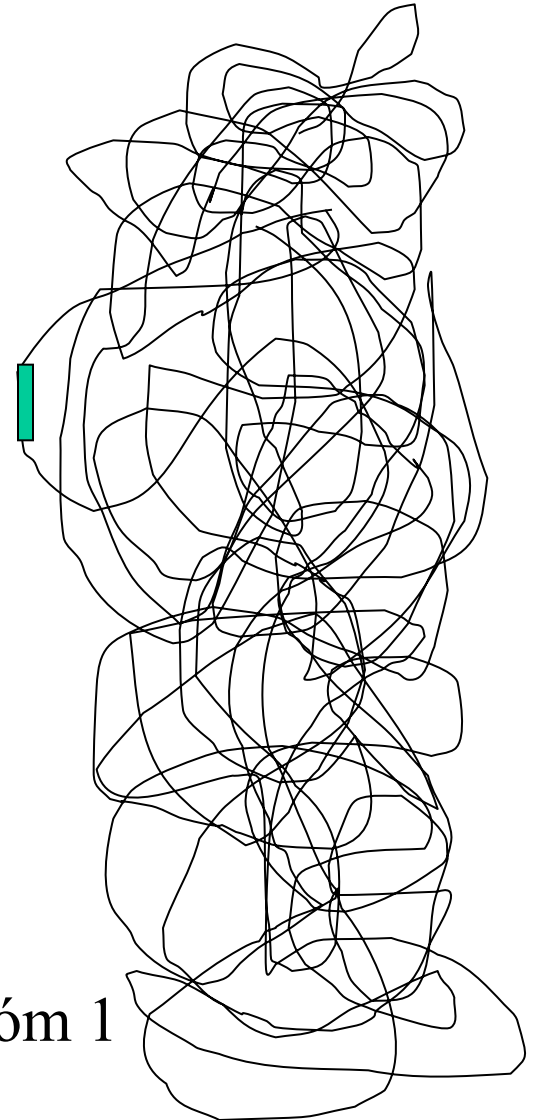
- Mnoho znaků náhodně rozmístěných v genomu – **celogenomový scan**
  - minisatellite DNA fingerprinting
  - RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)
  - AFLP (amplified fragment length polymorphism)
- presence vs. absence = dominantní znaky (neodliší heterozygota)



Př.: chromozóm 1

# Single-locus genetic markers

- kodominantní – možno stanovovat frekvence alel (= lze odlišit homo- a heterozygota)
- allozomy a jiné funkční geny - MM
- mikrosatelity – délkový polymorfismus
- SNPs (single nucleotide polymorphisms) – sekvenční polymorfismus
- SINE, LINE

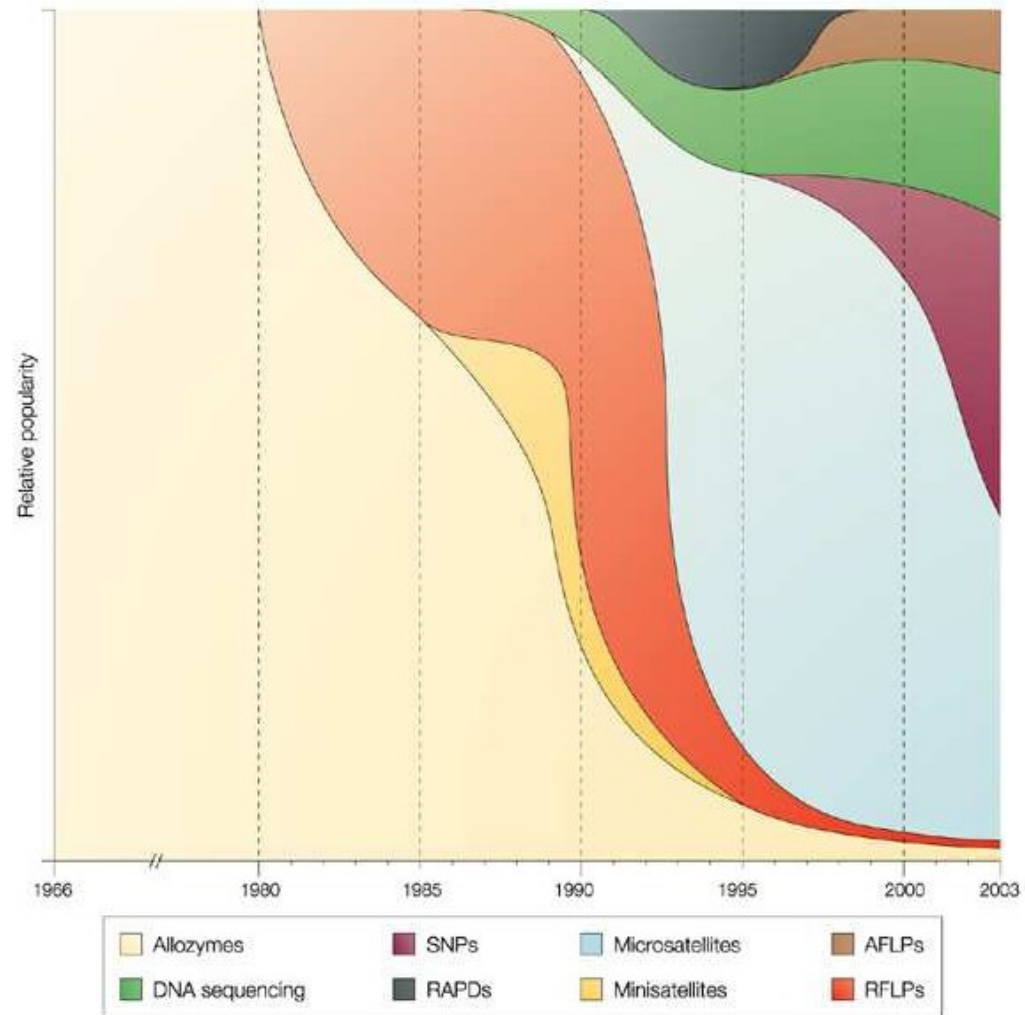


Př.: chromozóm 1

Mikrosatelite



# Mikrosatelity jsou stále nejpoužívanější markery v molekulární ekologii



# Mikrosatelity

- VNTR („variable number of tandem repetitions“), SSR („simple sequence repeats“)
- jednotlivé alely se liší délkou

**TTCAGG**CACACACA**ATCTCTAGCTTCGA**

**27 bp**

**TTCAGG**CACACA**ATCTCTAGCTTTGA**

**25 bp**

genotyp diploidního jedince: **25/27**

# Mikrosatelity

- 1-6 (nejč. 2-4) bp motiv
- početné po celém genomu
- vysoká úroveň polymorfismu (běžně 15 alel v populaci)
- Mendelovská dědičnost (autosomy) - kodominance
- ideální pro studium populační struktury a příbuzenských vztahů

# Mikrosatelity - postup analýzy

- Izolace DNA



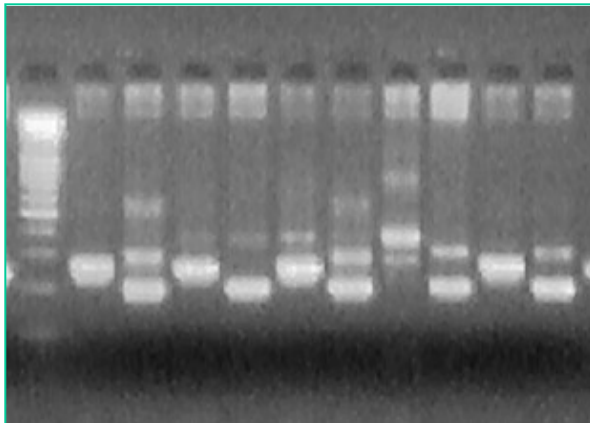
- PCR

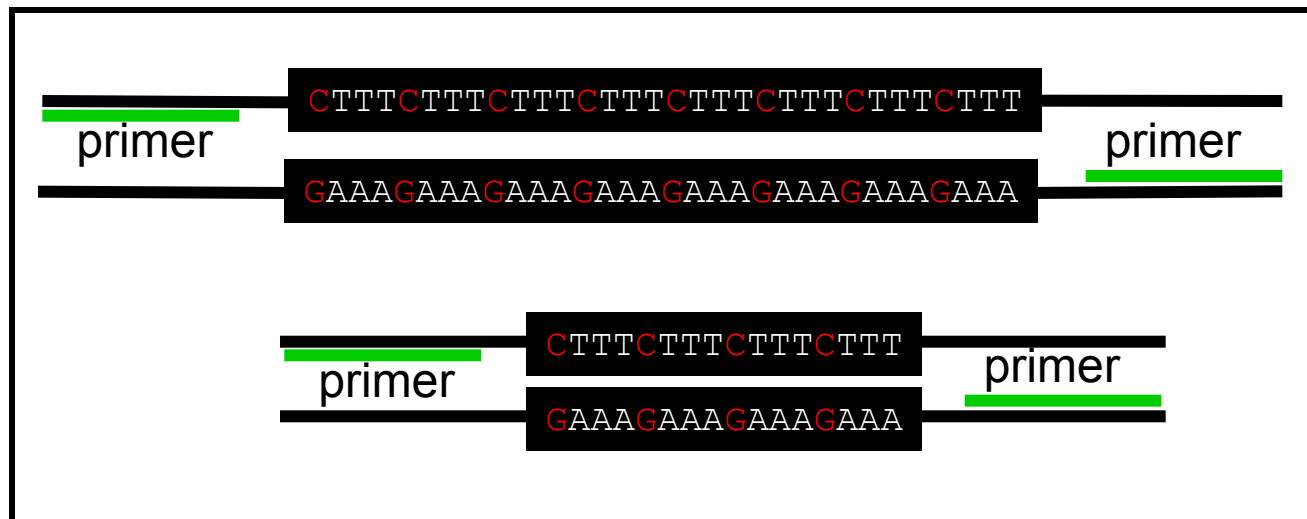
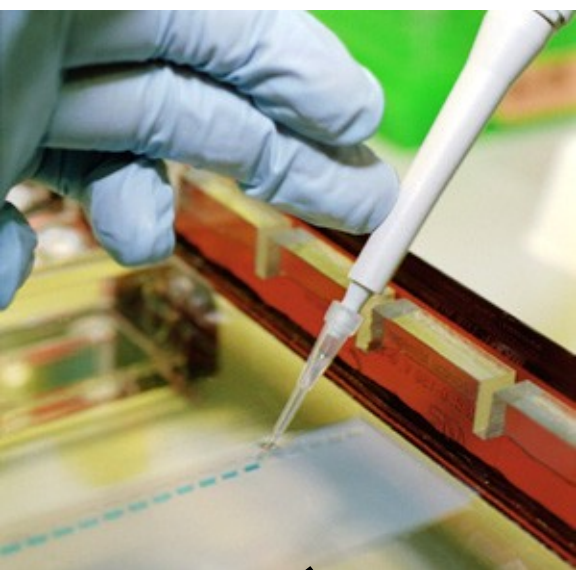


- Detekce  
→ elektroforéza

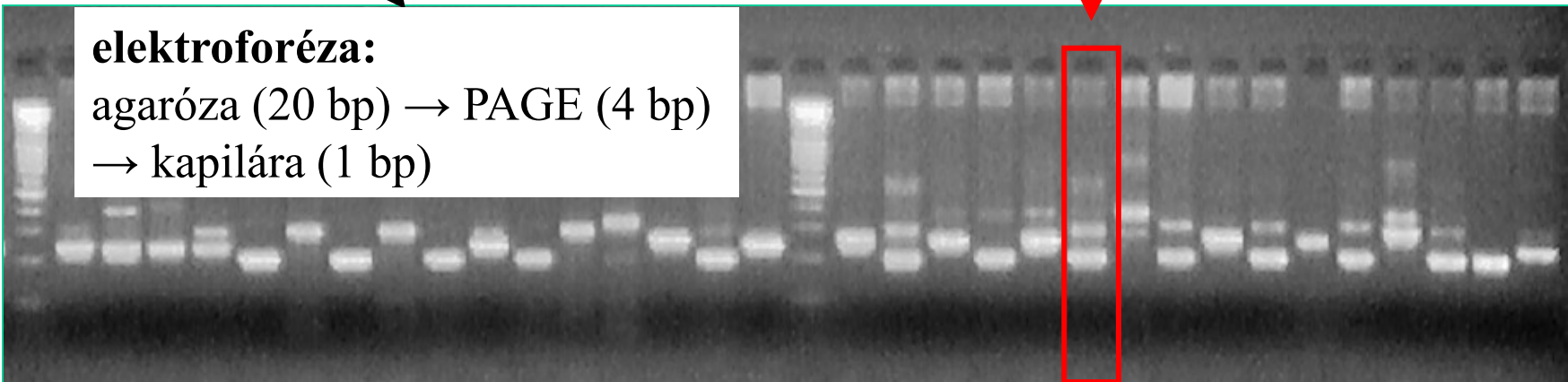


- sekvenátor, fragmentační analýza

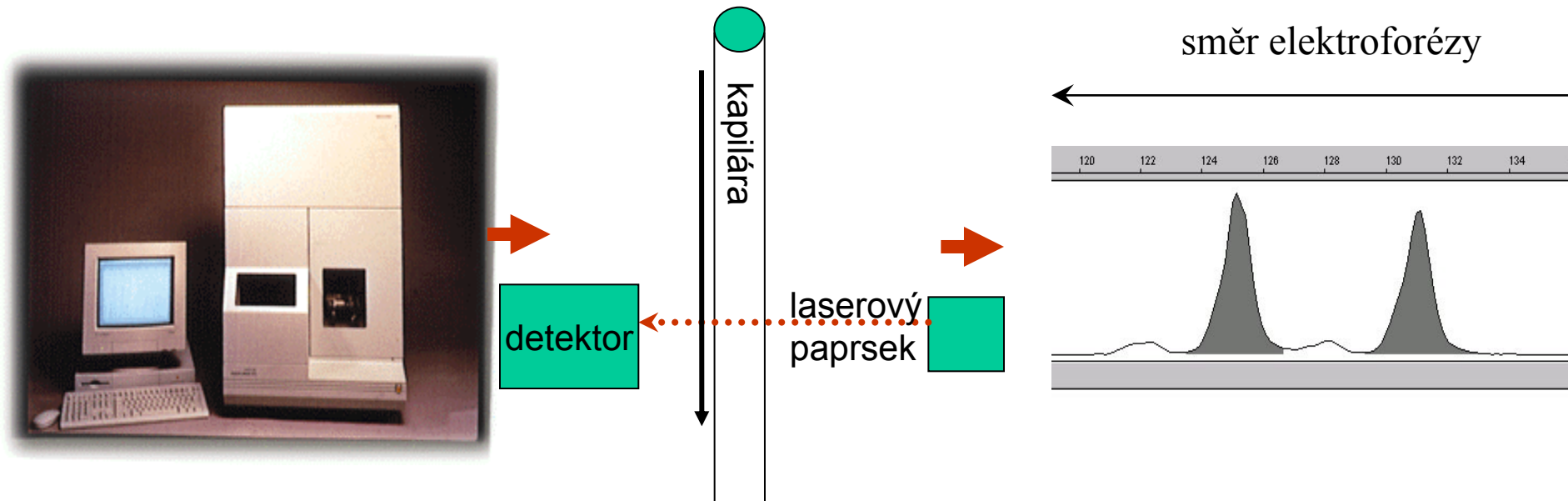




**elektroforéza:**  
agaróza (20 bp) → PAGE (4 bp)  
→ kapilára (1 bp)



# Kapilární elektroforéza ~ Fragmentační analýza



Stanovení délky PCR fragmentů srovnáním se známým standardem

Samples Plot

File Edit View Tools Alleles Help

Plot Setting: AFLP Default

Panes: 4

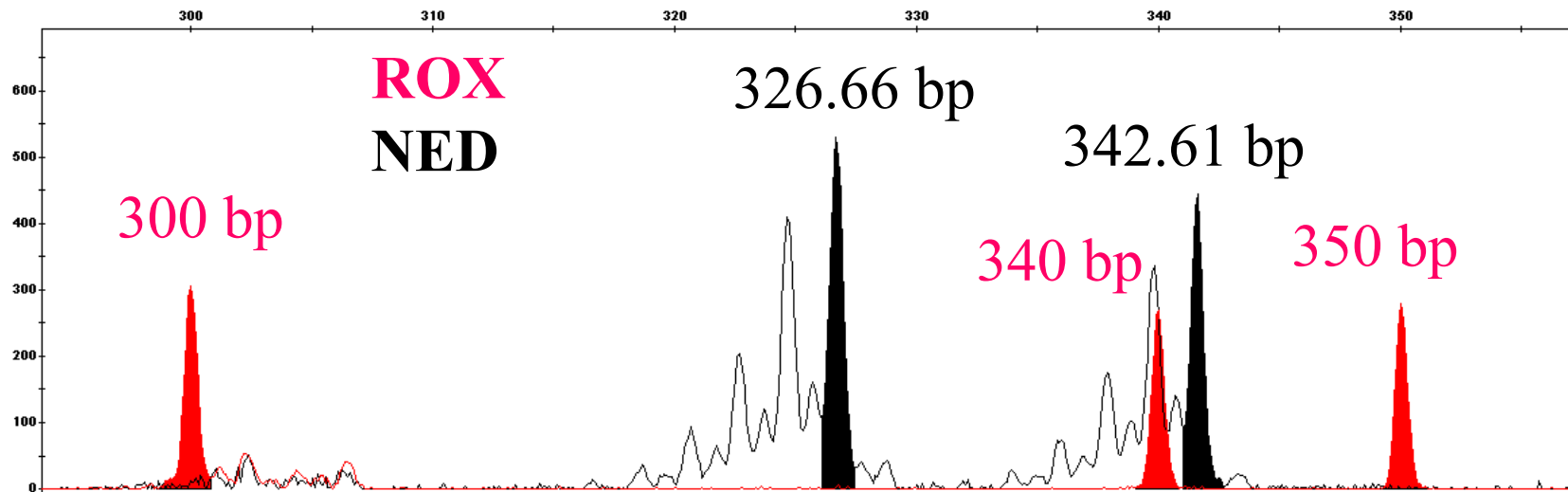
Sample File: 4344\_004.fsa

Sample Name: 4344

Panel: None

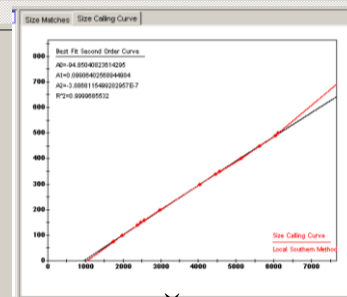
OS:

SQ:



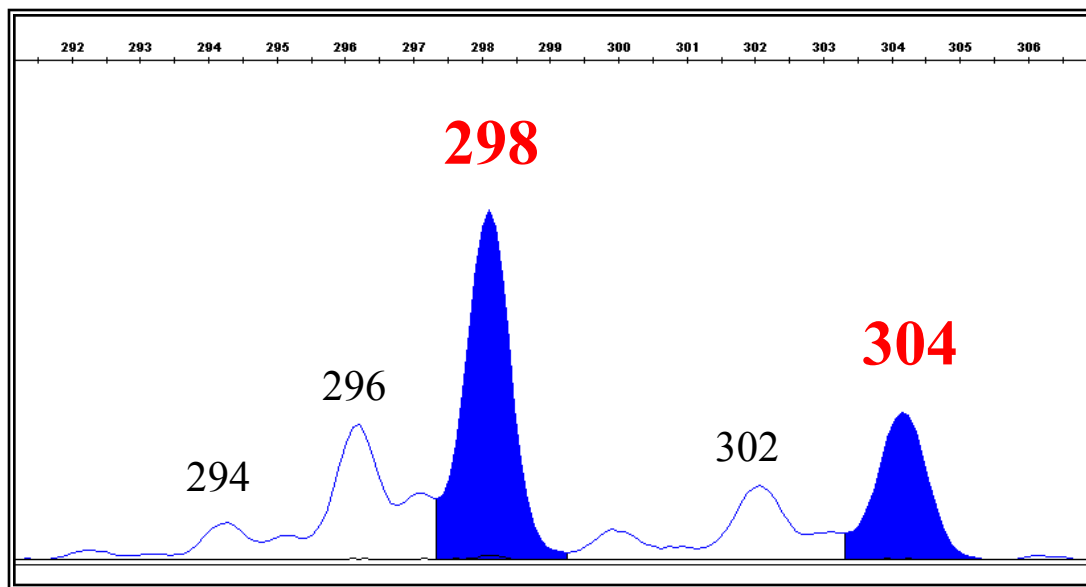
Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
Y,66	4344_004.fsa			326.66	530	3904	4321
Y,67	4344_004.fsa			335.98	73	495	4419
Y,68	4344_004.fsa			336.92	50	390	4429
Y,69	4344_004.fsa			337.86	176	1327	4439
Y,70	4344_004.fsa			338.88	102	733	4450
Y,71	4344_004.fsa			339.81	336	2634	4460
Y,72	4344_004.fsa			340.68	140	1004	4470
Y,73	4344_004.fsa			341.61	445	3391	4481
Y,74	4344_004.fsa			365.13	50	352	4756

Délka fragmentu



Čas

Genotyp mikrosatelitu na lokusu NED = 326/342 nebo 327/343



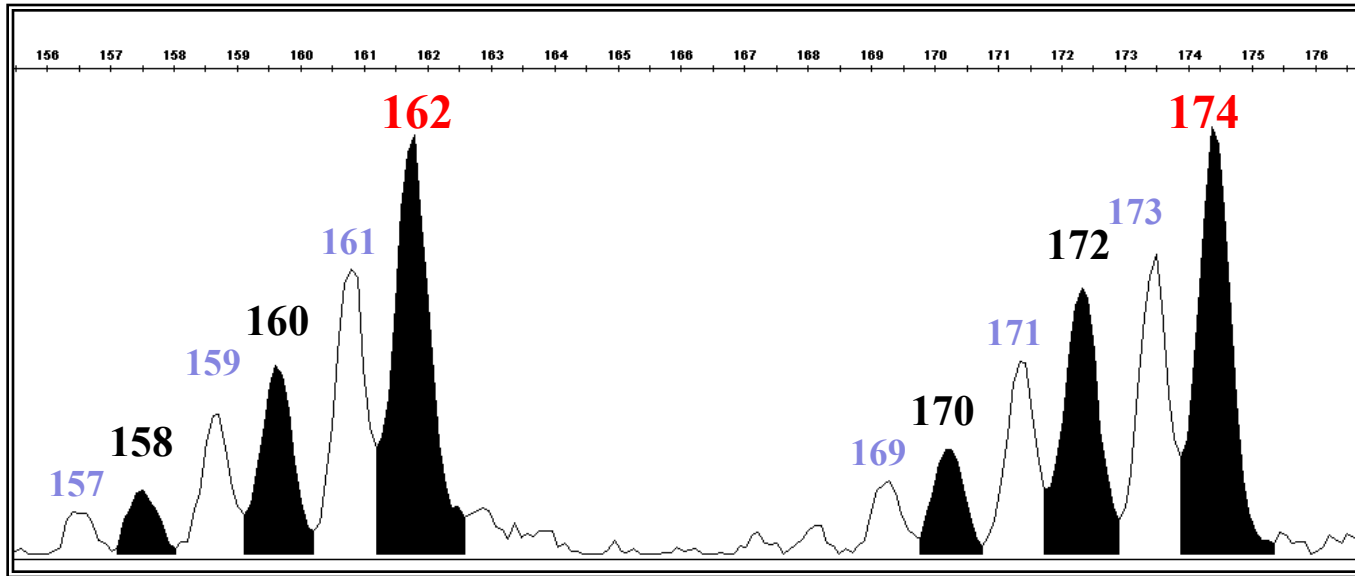
Genotyp 298/304

„stutters“ – chyby v důsledku „sklouznutí“ polymerázy při PCR

- často odlišují mikrosatelity od nespecifických PCR produktů
- rozdíl mezi alelou a „stutter“ je délka repetice (zde 2 bp)

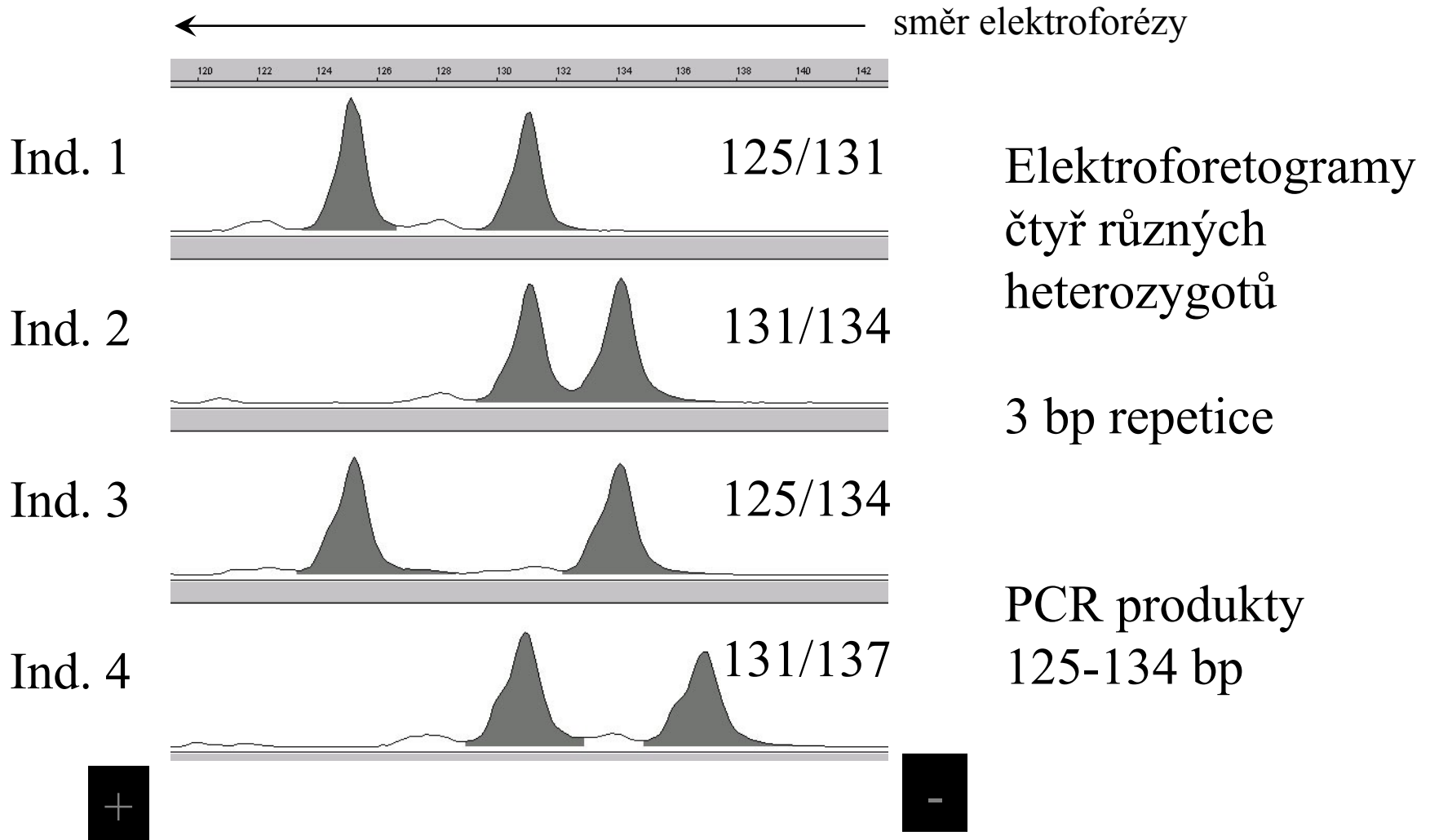


# Genotyp 162/174

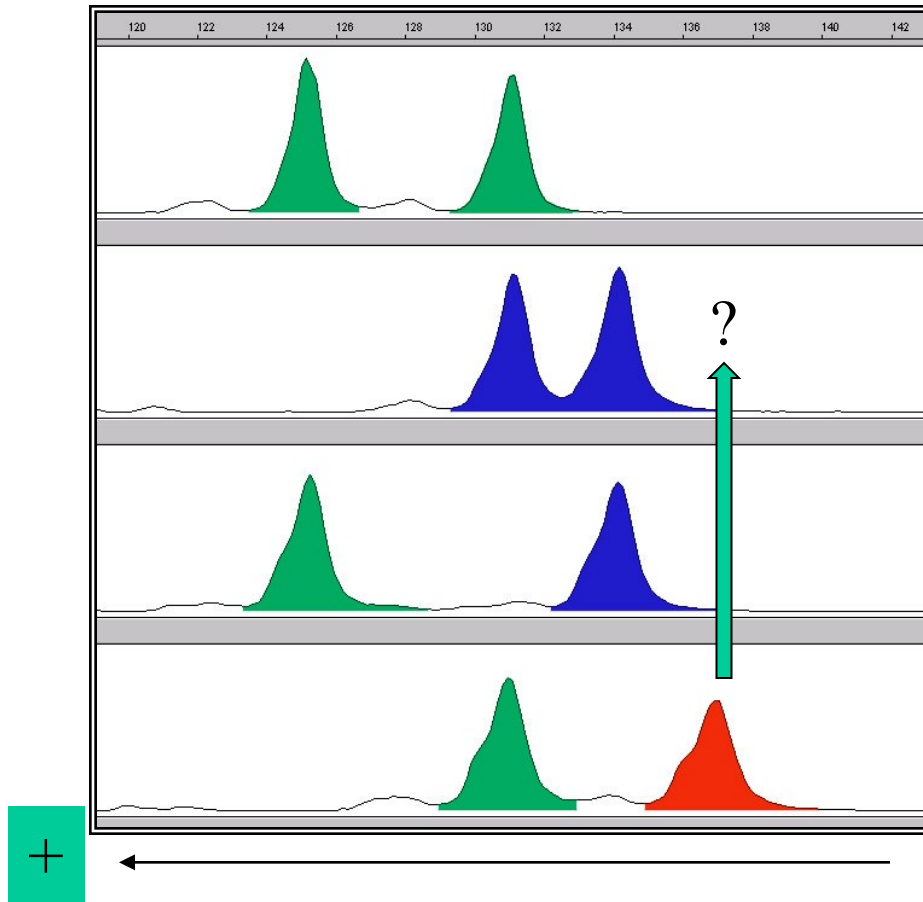


- alely a jejich stuttery jsou černě (rozdíl mezi nimi je 2 bp)
- bílé píky jsou tzv. „mínus A-alely“ a jejich stuttery = výsledek jiné chyby polymerázy, a to nepřidání koncového adeninu
- rozdíl mezi černým a sousedním bílým píkem je 1 bp (tj. chybějící adenin)
- pattern daného lokusu je vždy specifický a často záleží na PCR podmínkách

# Srovnání různých jedinců - analýzy příbuznosti



# Př. Analýza příbuzenských vztahů



Genotyp (bp)

**Matka: 125/131**

**Otec: 131/134**

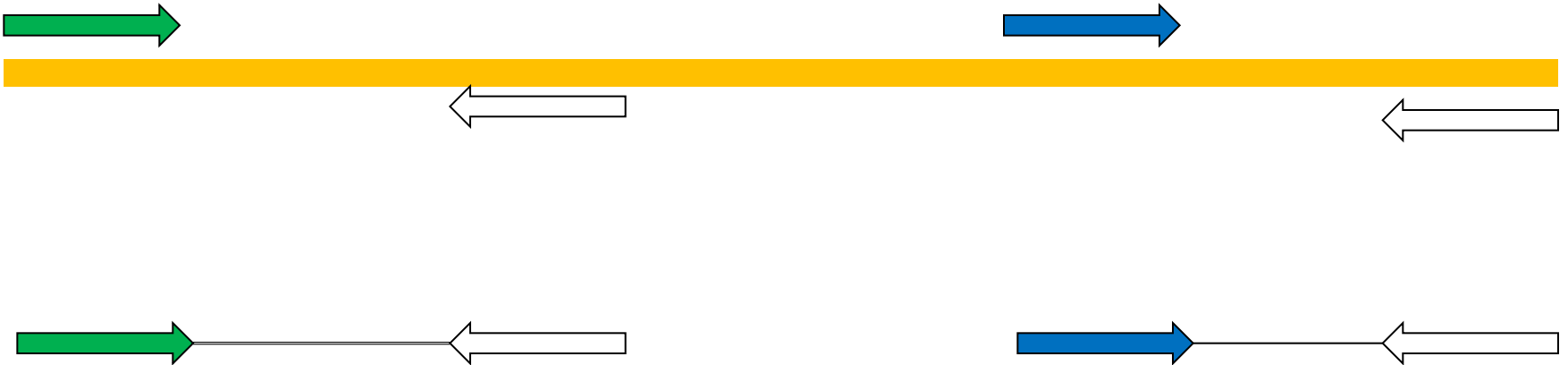
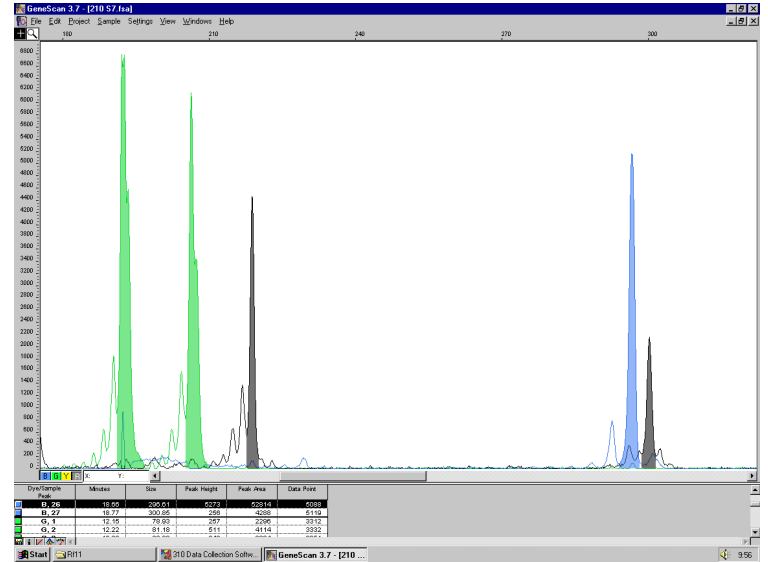
**Potomek 1: 125/134**

**Potomek 2: 131/137**

Sledovaný otec mohl zplodit potomka 1, ale zcela jistě není otcem potomka 2

# Různé značení různých znaků

- Snížení časových a finančních nákladů
- = „multiplex set“
- Až 4 různé barvy (+ 5. barva jako velikostní standard) - analýza až 4 lokusů o stejné velikosti alel



# Mikrosatelity - omezení

- nalezení lokusů (navržení primerů) je pracné a nákladné u volně žijících druhů (genomová knihovna, klonování, screening, sekvencování)

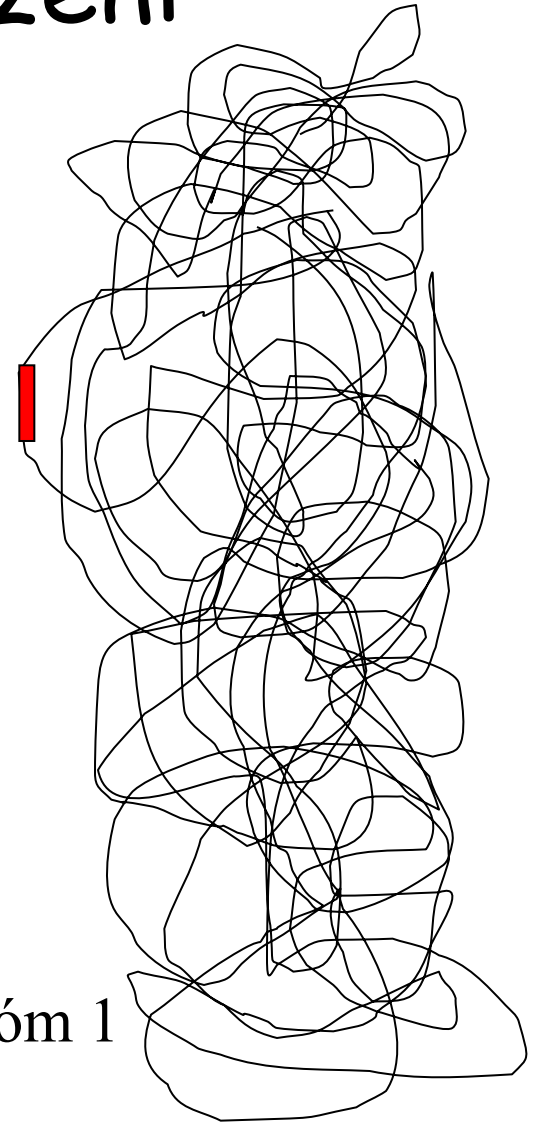


TTCAGG**CACACACA**TCTCTAGCTTCGA

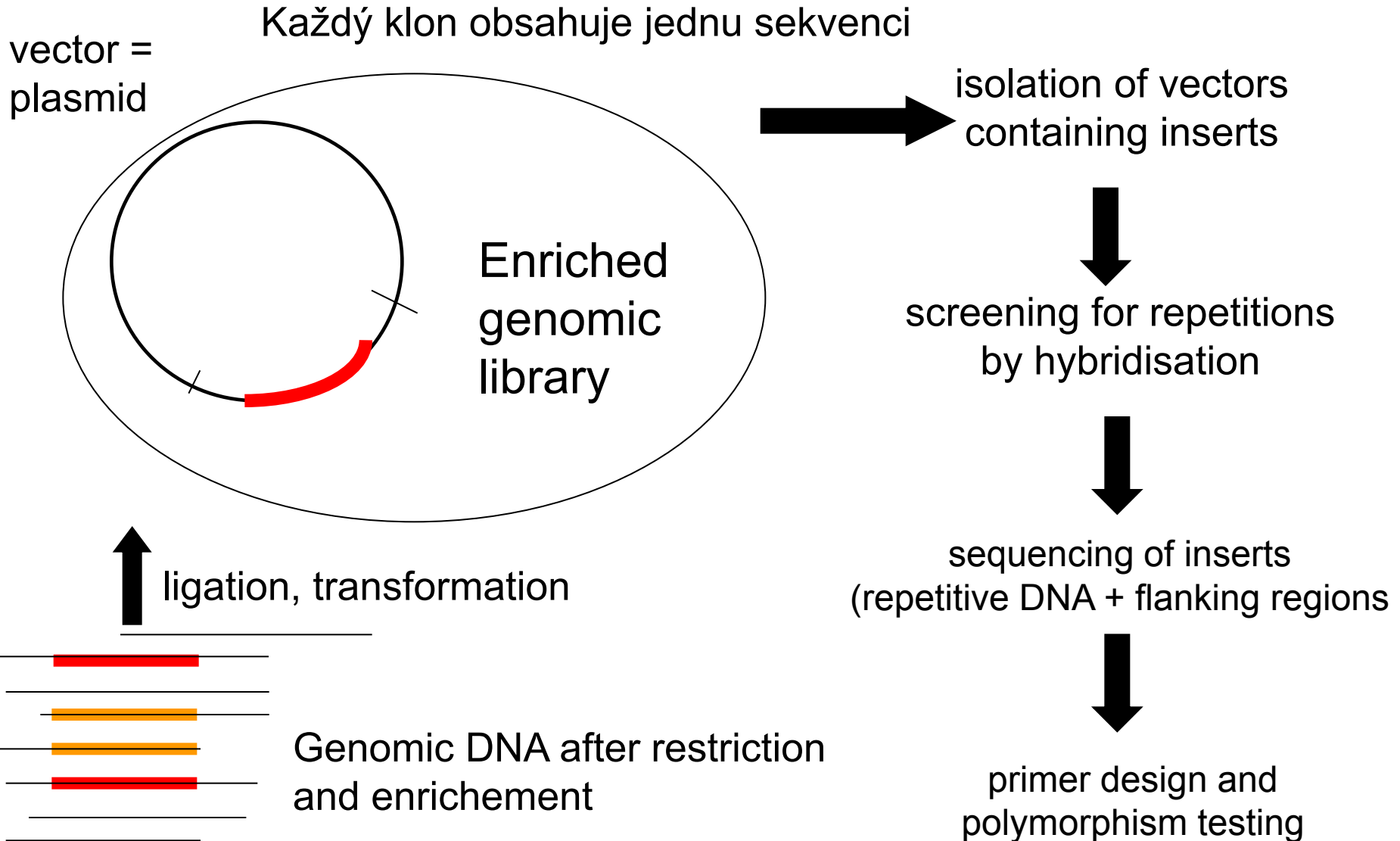


„flanking regions“ – ohraničují repetici a zde musí být navrženy primery pro PCR

Př.: chromozóm 1

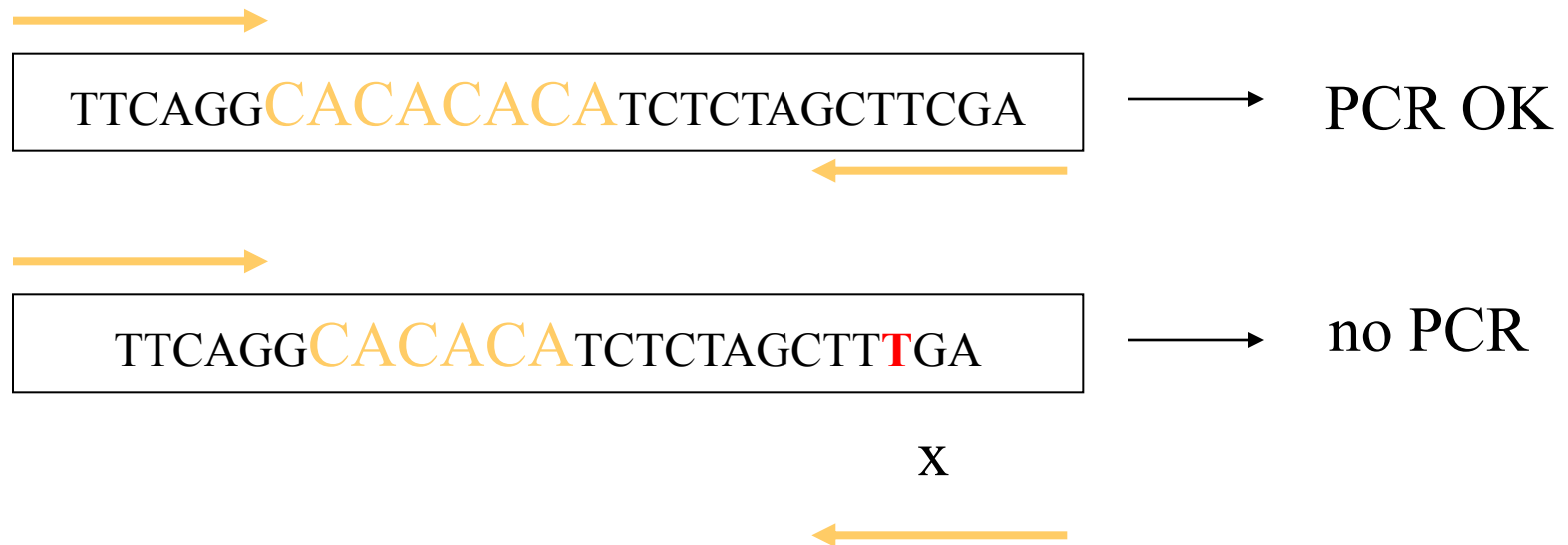


# Restriction, enrichment, cloning, and sequencing



# Mikrosatelity - omezení

- „cross-amplification“ – úspěšnost klesá s fylogenetickou vzdáleností
- nulové alely (mutace v primerových sekvencích) → vyšší proporce „homozygotů“



# Mikrosatelity - budoucnost (?)

- „next-generation sequencing“ – velice rychlá sekvenace stovek tisíců fragmentů z jakéhokoliv genomu
- vyhledání repetitivních sekvencí vhodným softwarem a navržení primerů
- identifikace nových mikrosatelitů rychle, elegantně a relativně levně (1500 EUR)



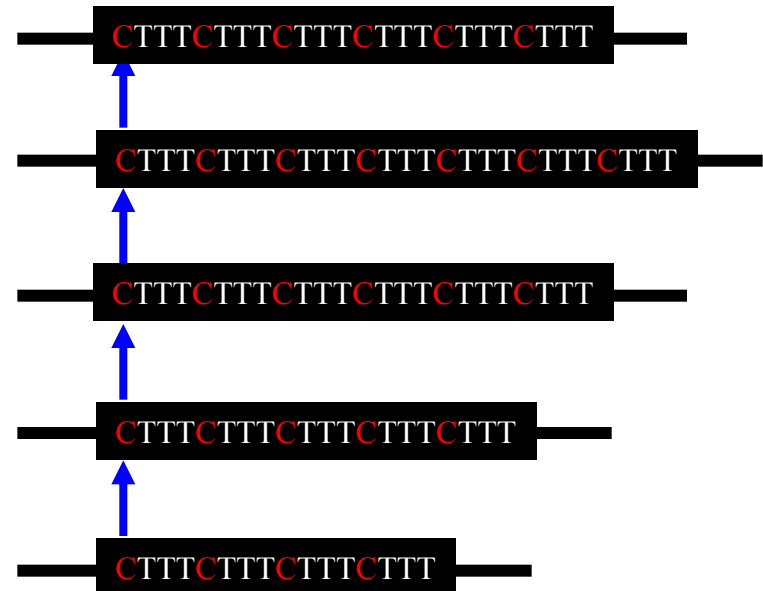
# Teoretické mutační modely - analýzy vyžadující údaj o podobnosti alel

## Dva extrémy

- **IAM – infinitive allele model**  
Při mutaci ztráta nebo získání libovolného počtu opakování. Vzniká nová alela, která doposud v populaci nebyla - každá alela vznikne pouze jednou a pak už se nemění. **Není možno** určit podobnost (similarity) alel



- **SMM – stepwise mutation model**  
(Mutace způsobeny pouze ztrátou nebo získáním jediného opakování motivu. Mutací může vzniknout alela, která je již v populaci přítomna – tzv. **homoplázie**. Je možno odhadnout podobnost alel.



# Indels

- inzerce nebo delece 1bp či delších úseků – použití pouze pro modely vyžadující „**identity**“ (nepoužitelné pro modely vyžadující „**similarity**“)

TTCAGG CACACACA TCTCTAGCTTCGA

27 bp

SMM model – možno kvantifikovat podobnost alel

TTCAGG CACACACA CA TCTCTAGCTTCGA

29 bp

TTCAGG CACACACA TCTC G TAGCTTCGA

28 bp

TTCAGG CACAC GACA TCTCTAGCTTCGA

28 bp

„Indels“ – pouze pro analýzy, kde je vyžadována „identity“ a nikoliv podobnost

TTCAGG CACACCA TCTCTAGCTTCGA

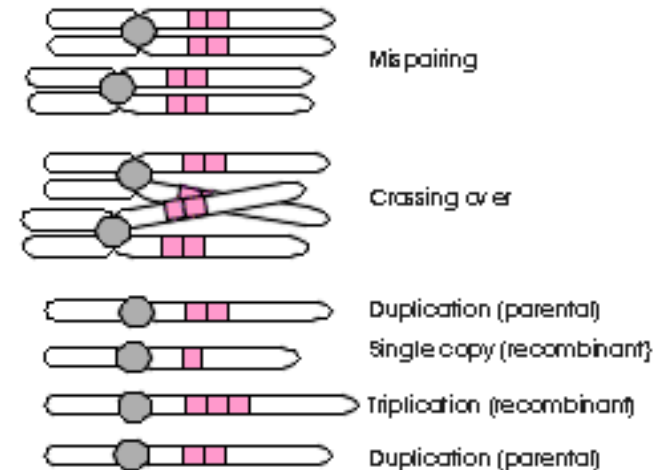
26 bp

TTCAGG CACACACA TCTCTAGTTCGA

26 bp

# Proč je tolik alel? (microsatellite instability)

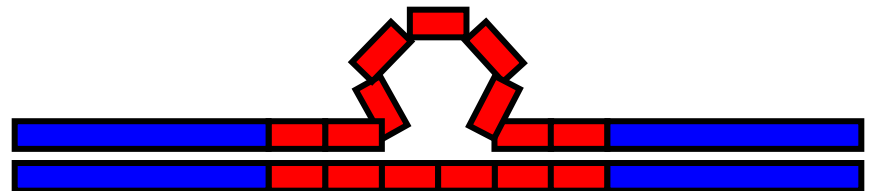
- **Nerovnoměrný (Unequal) crossing-over**  
(díky špatnému alignmentu)



- **Sklouznutí polymerázy při replikaci**

Slip-strand mispairing

(při replikaci nejprve polymeráza sklouzne a vyrobí odlišný počet opakujícího se motivu mikrosatelitu, při alignmentu je pak část opakování vykloněna mimo dvoušroubovici, flanking regions tedy párují)



# Bias (skutečná data)

- **Kratší mikrosatelity** (s malým počtem opakování motivu) **mají zřejmě tendenci se spíše prodlužovat** (slabě převládají adice nad delecemi)
- **Delší mikrosatelity se spíše zkracují** (náchýlnější k velkým delecím)
- **Delší mikrosatelity rychleji mutují** (díky více opakováním je vyšší pravděpodobnost pro sklouznutí polymerázy (SSM) – mají více alel)

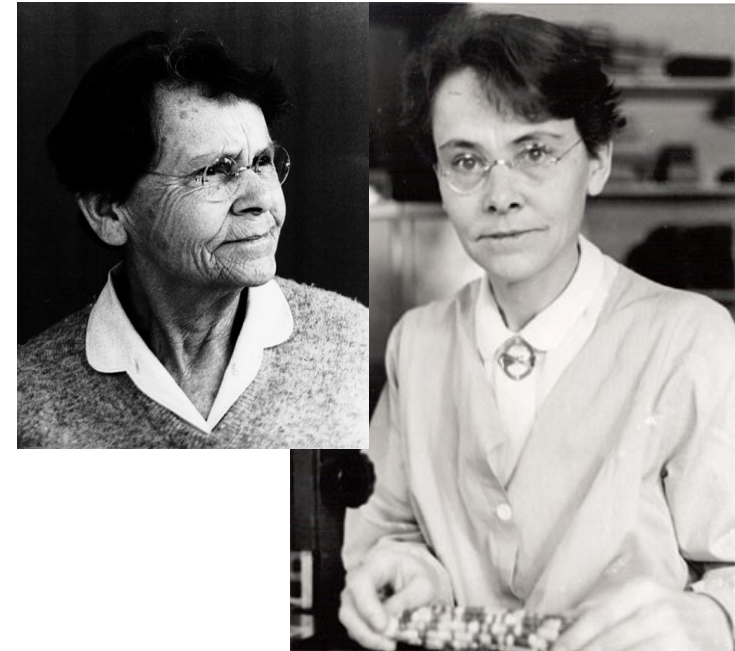
# Mikrosatelity - závěry

- Mechanismy evoluce mikrosatelitů stále nepříliš objasněny
- Stepwise mutation model SMM platí jen omezeně
- = nevýhoda v populační genetice (jsou rychle nahrazovány jinými markery, např. SNPs)
- = tolik nevádí při identifikaci jedinců a analýzy příbuznosti (paternity)

# SINE, LINE, etc.

(Shedlock et al. 2004, TREE; Ray et al. 2007, MolEcol)

- **Transposable elements**
- Vytváří kopie (většinou)
- Kopie integrovány na nová místa v genomu
- Obvykle nejsou specificky odstraňovány
- Molekulární fosílie – neexistují homoplasie !!!
- Nesmírně početné
- Člověk – víc jak polovina genomu (ost. druhy – 40-90%)

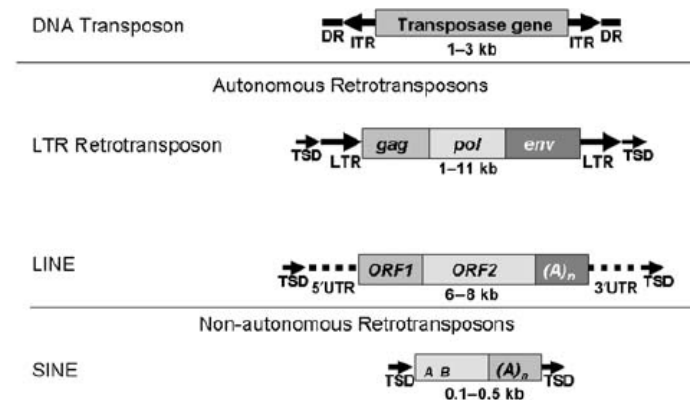


*Objev DNA transpozonů u kukuřice:  
Barbara McClintock*

# Typy transposabilních elementů

- **Kódující své proteiny, autonomní, 1-10 kb**

- **DNA transposony** (cut-and-paste)
- transposasa
- **Retrotransposony** (copy-and-paste)
- **LINE**  
1-2 proteiny, kopie přes RNA
- **LTR retrotransposony**  
5-6 proteinů, také přes RNA

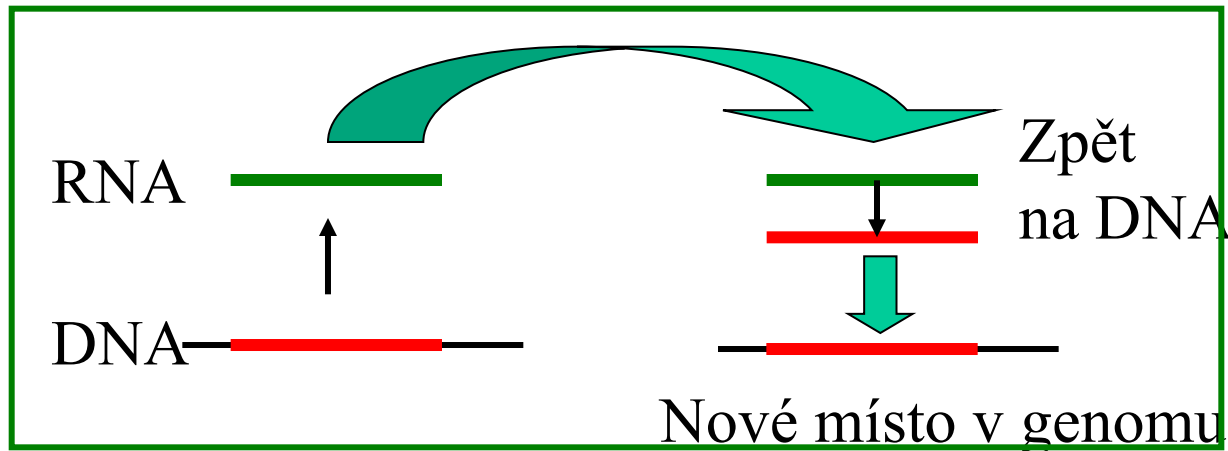


- **Nekódují proteiny, neautonomní, 100-1000 bp**

paraziti předešlých, např. **SINE** (člověk *Alu* – více než 1 milion kopií) – nejčastěji používané v populačních a fylogenetických studiích

# LINE - mechanismus transpozice

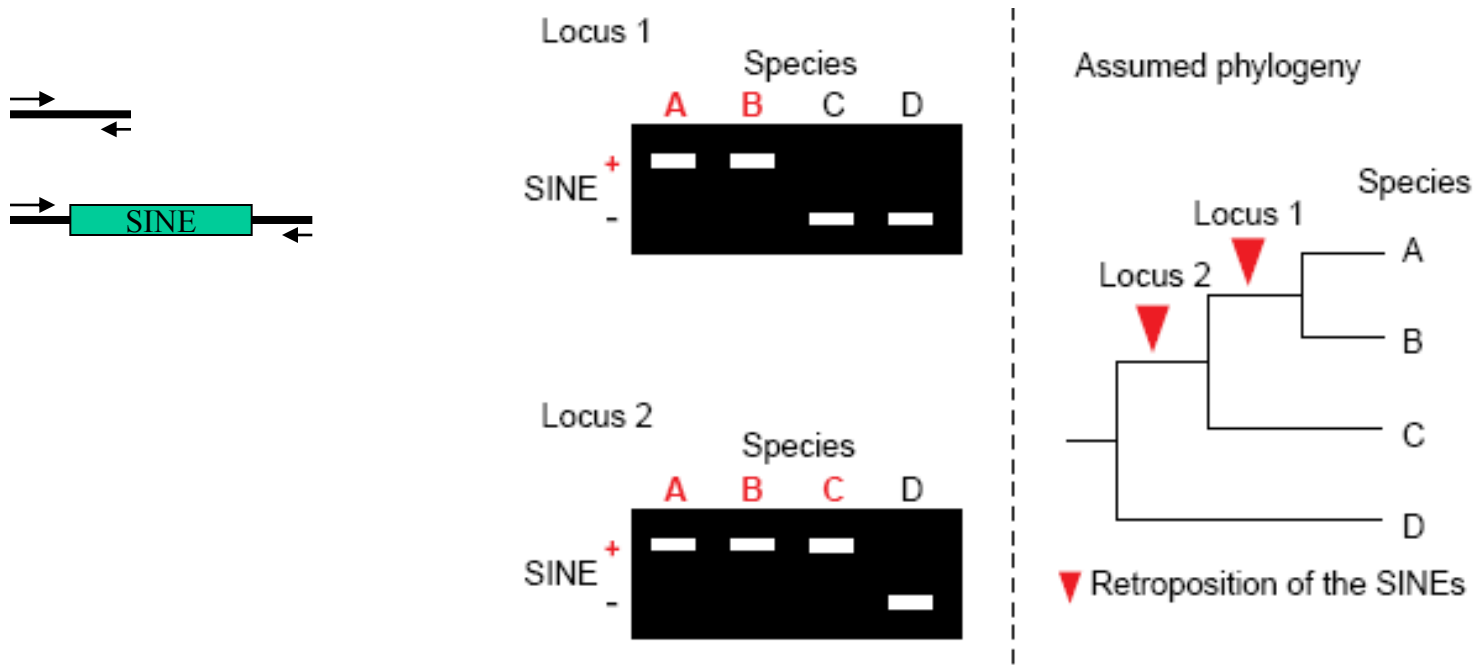
- Kopie přes RNA
- Reversní transkriptáza
- Mašinerii využívají **SINE** (jsou to „paraziti“),  
*Alu* (SINE) a *L1* (LINE) se stejně rychle množí



- **LTR retrotransposony – opět přes RNA, složitější proces**



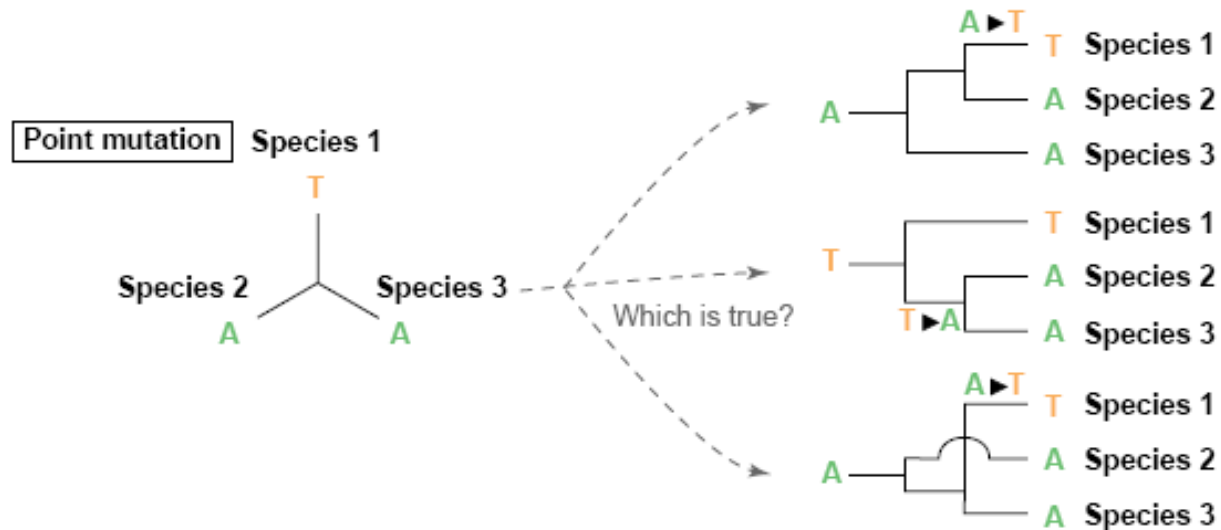
# Velmi nízké riziko homoplázií → SINE = ideální fylogenetické markery



„single-locus marker“

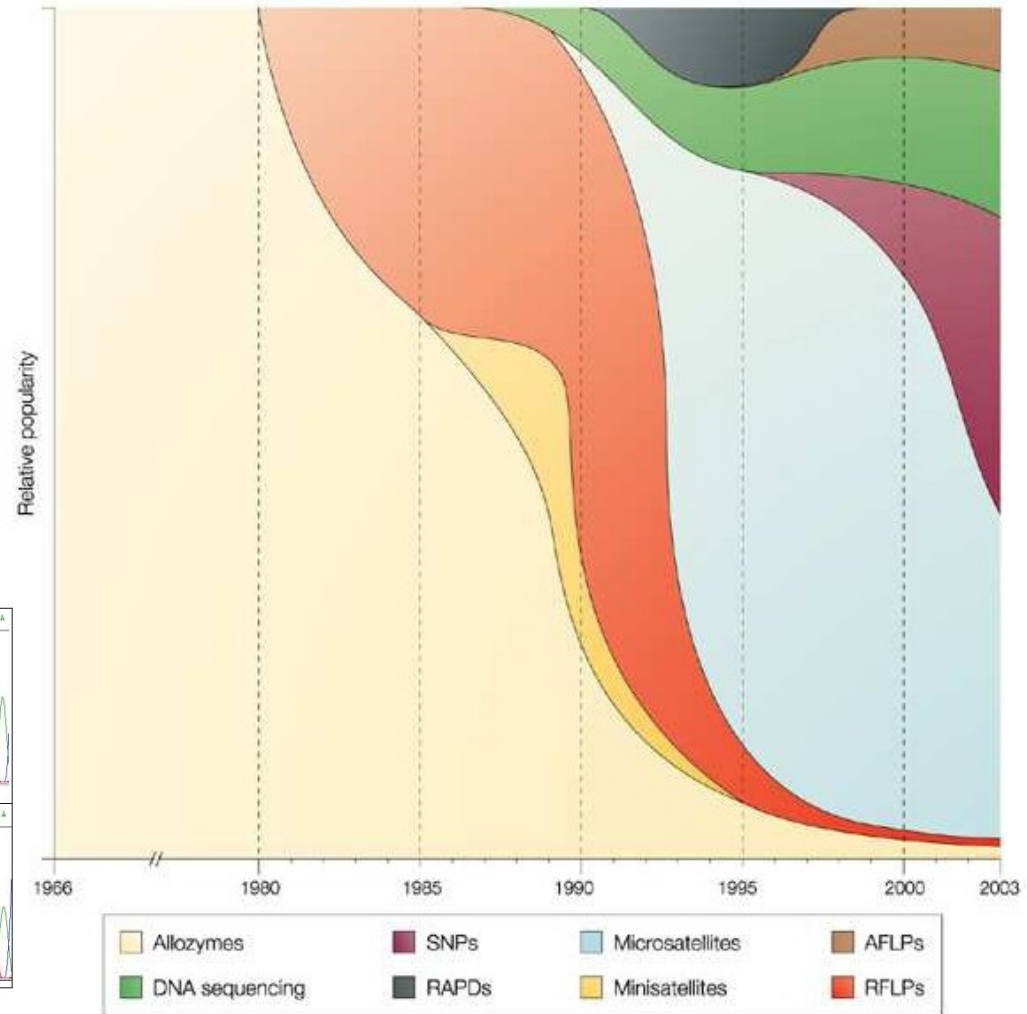
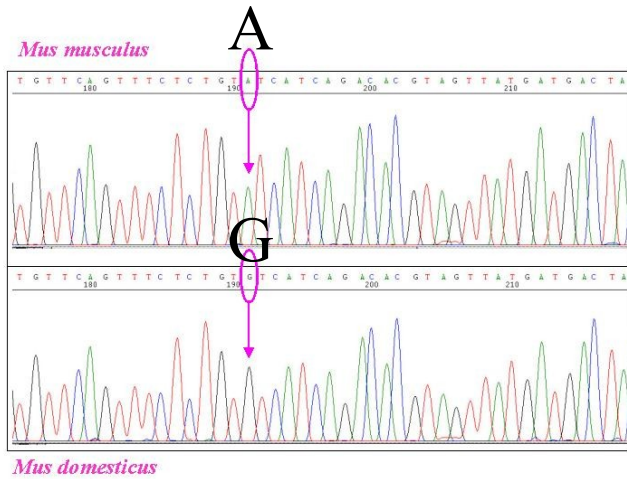
- PCR amplifikace daného úseku a elektroforéza

# Neexistují zpětné mutace = výhoda oproti sekvenačním datům

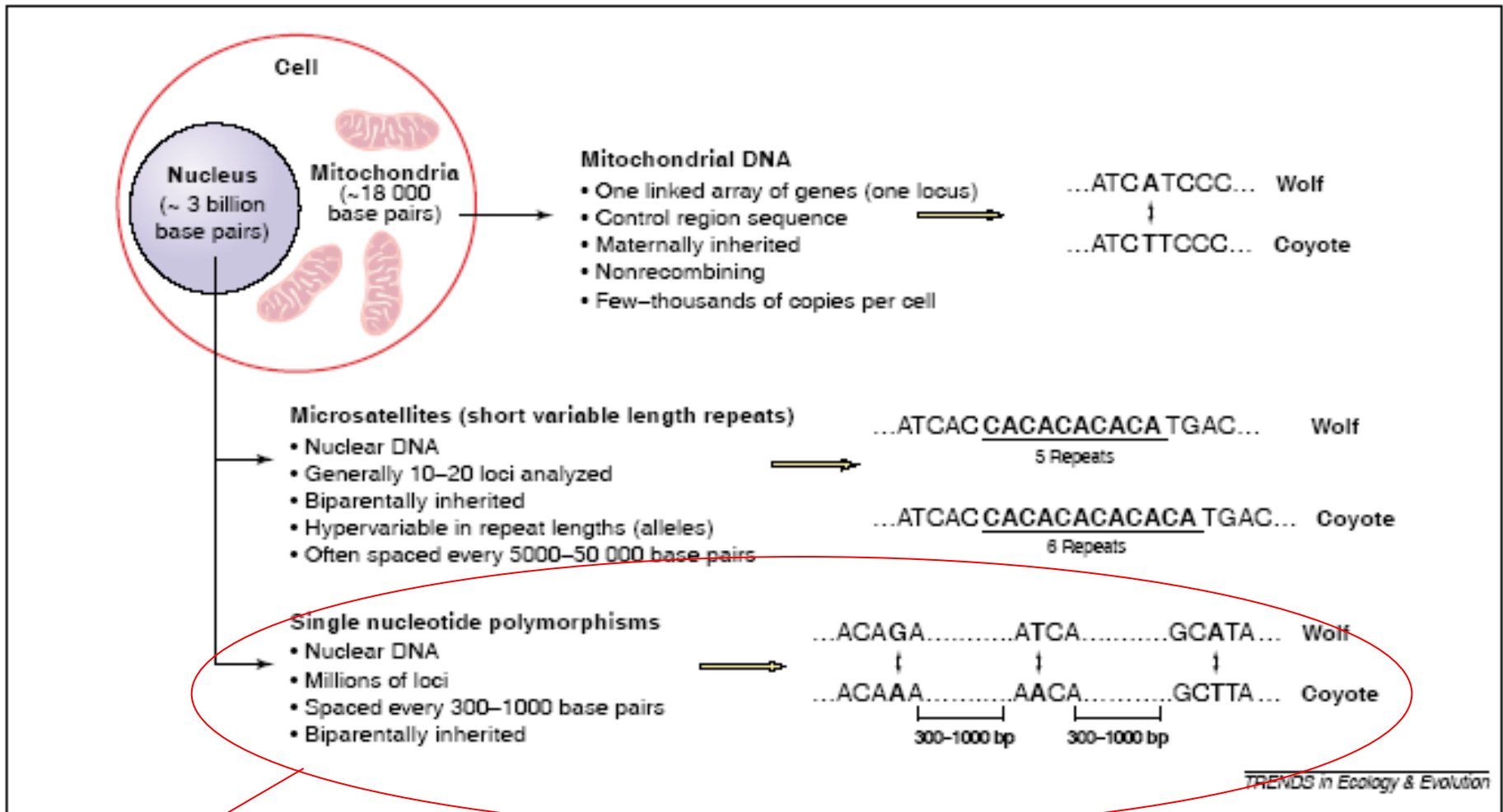


Příklad aplikace: kytovci vs. sudokopytníci (hroch je bratr velryby)

# SNP Fashion on the rise



# Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

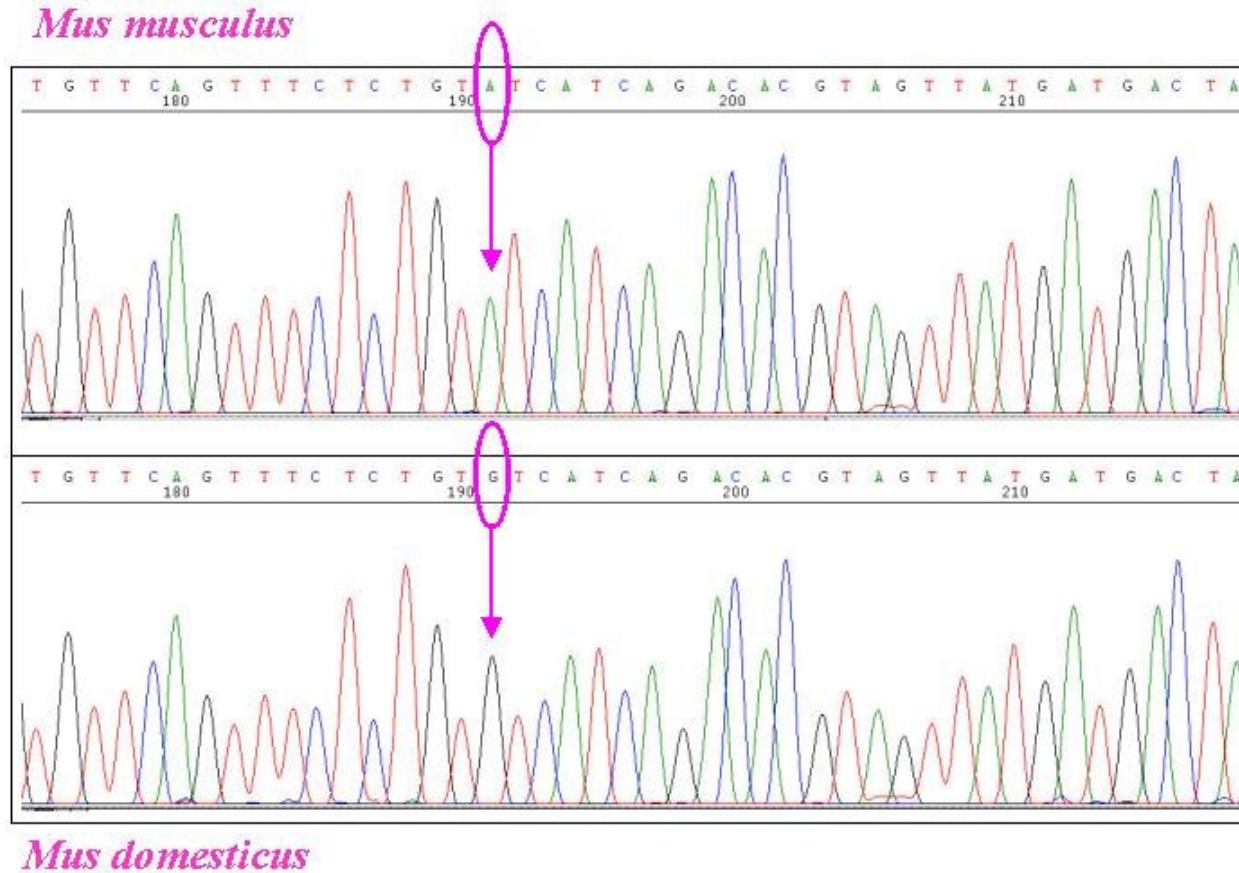


SNPs : nuclear genome (consensus)

# Kolik SNPs se vyskytuje u člověka?

- mutační rychlost je  $\sim 2.5 \times 10^{-8}$  mutací / místo / gen
- $\sim 150$  mutací/diploidní genom/generace
- 6.3 miliard lidí na světě = 945,000,000,000 mutací v současném světě
- 3 miliardy nukleotidů = každý nukleotid je zmutovaný 315 krát

# Příklad informativního SNP znaku



**transice**  
**A ↔ G**

transition: Pu → Pu or Py → Py

transversion: Pu → Py or Py → Pu

# Využití SNPs znaků

- identifikace druhu (nebo genetické skupiny) - studium hybridizace
- fylogeografie
- populační genetika (genetická variabilita, identifikace jedinců a vztahů mezi nimi, populační velikost a její změny atd.)

# Výhody

- početné a rozšířené v genomu (v kódujících i nekódujících oblastech) – milióny lokusů
- 1 SNP cca každých 300-1000 bp
- Mendelovská dědičnost (vs. mtDNA)
- evoluce je dobře popsitelná jednoduchým mutačním modelem (vs. microsatellites)
- jsou analyzovány kratší fragmenty DNA – neinvazivní genetika



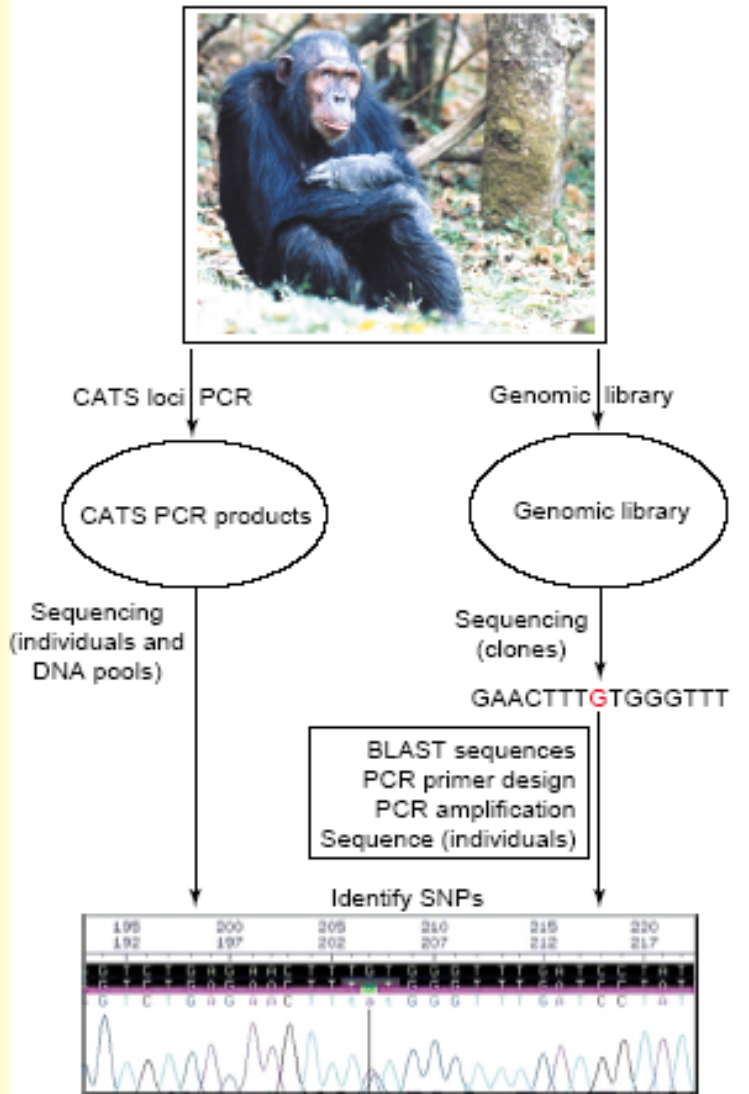
# Nevýhody

- „ascertainment bias“ – výběr znaků se provádí na základě jen malého počtu jedinců a nemusí být reprezentativní
- nízká variabilita na lokus (většinou jen 2 alely)
- pro populační genetiku je vyžadován větší počet lokusů (4-10 krát více než u mikrosatelitů)

# Metody analýzy

1. Nalezení lokusů („ascertainment“)
2. Genotypizace

# Nalezení SNPs

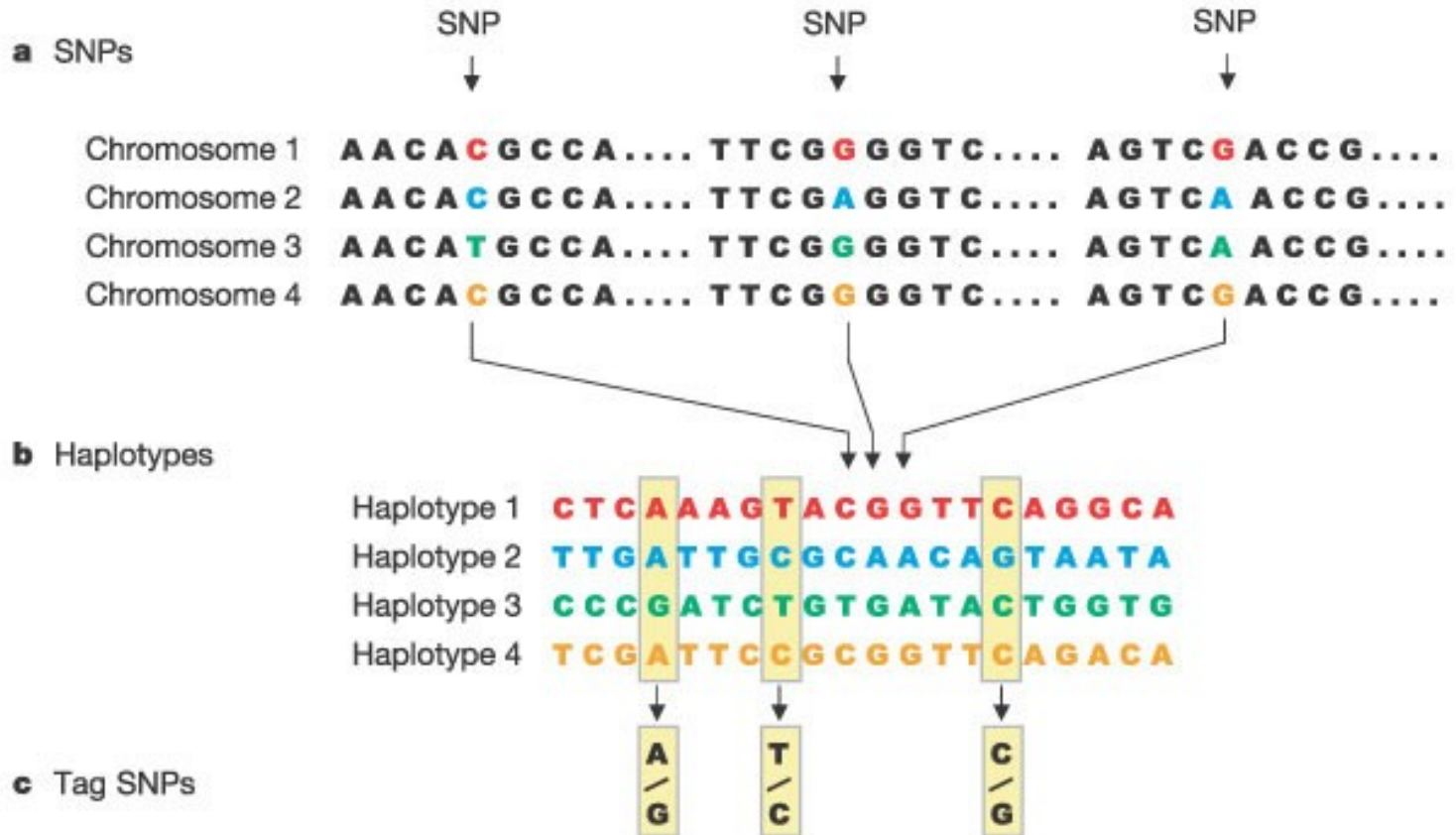


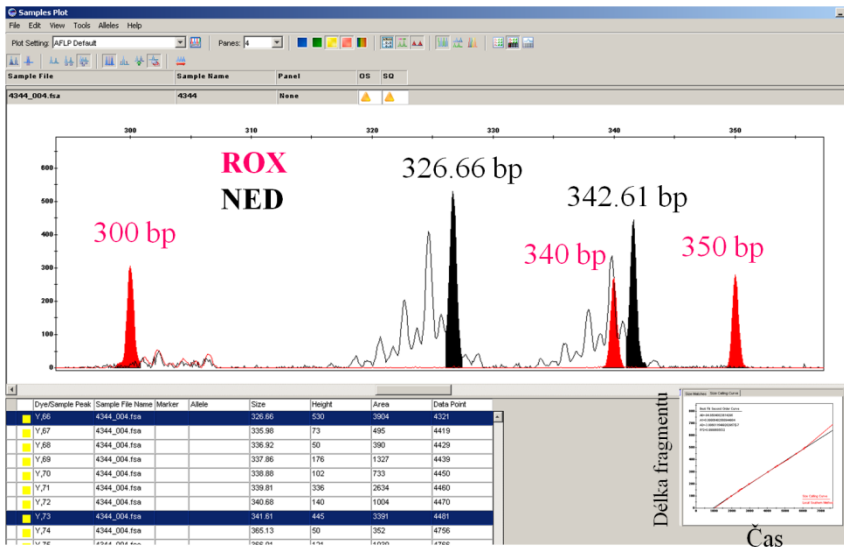
CATS loci = comparative anchor tagged site loci (= cross amplification)

Genomic library = genome restriction + cloning

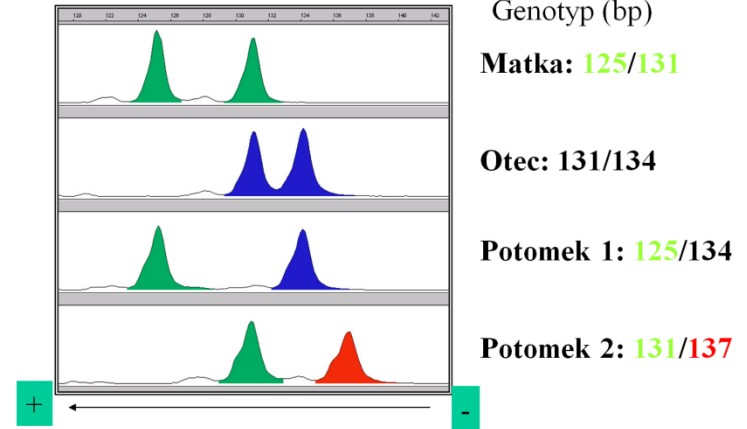
Next-generation sequencing –  
analýza více jedinců a hledání  
polymorfismů

# Identifikace různých genotypů u různých jedinců (= homologních chromozómů, tj. variabilita alel)



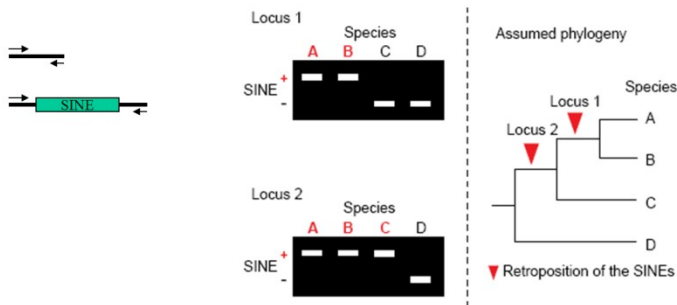


## Př. Analýza příbuzenských vztahů



Genotyp mikrosatelitu na lokusu NED = 326/342 nebo 327/343

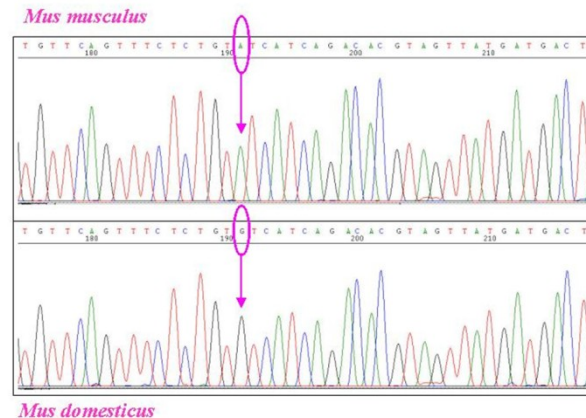
Velmi nízké riziko homoplázií →  
SINE = ideální fylogenetické markery



„single-locus marker“

- PCR amplifikace daného úseku a elektroforéza

## Příklad informativního SNP znaku



**transice**  
**A ↔ G**

transition: Pu → Pu or Py → Py

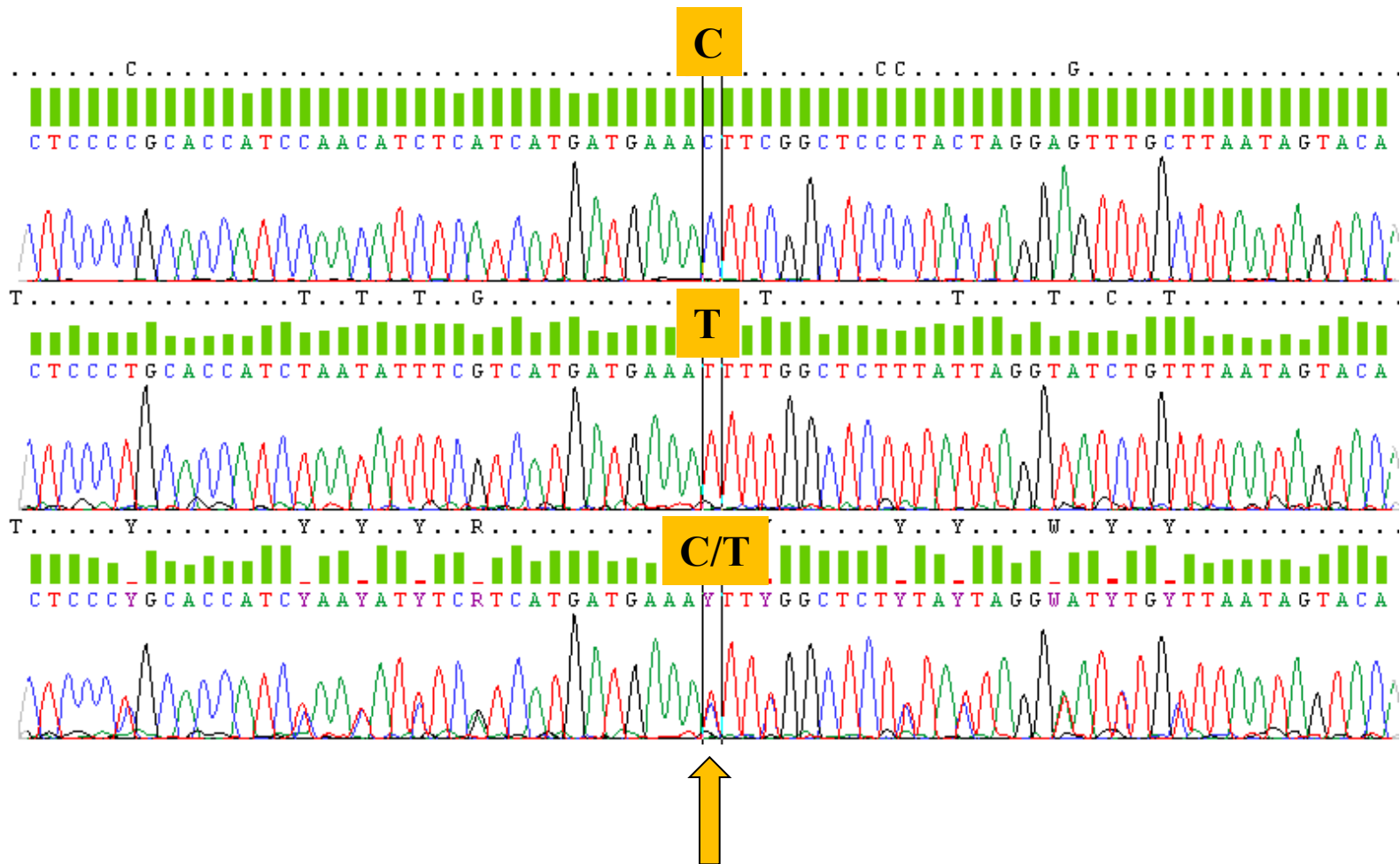
transversion: Pu → Py or Py → Pu

SNPs genotyping

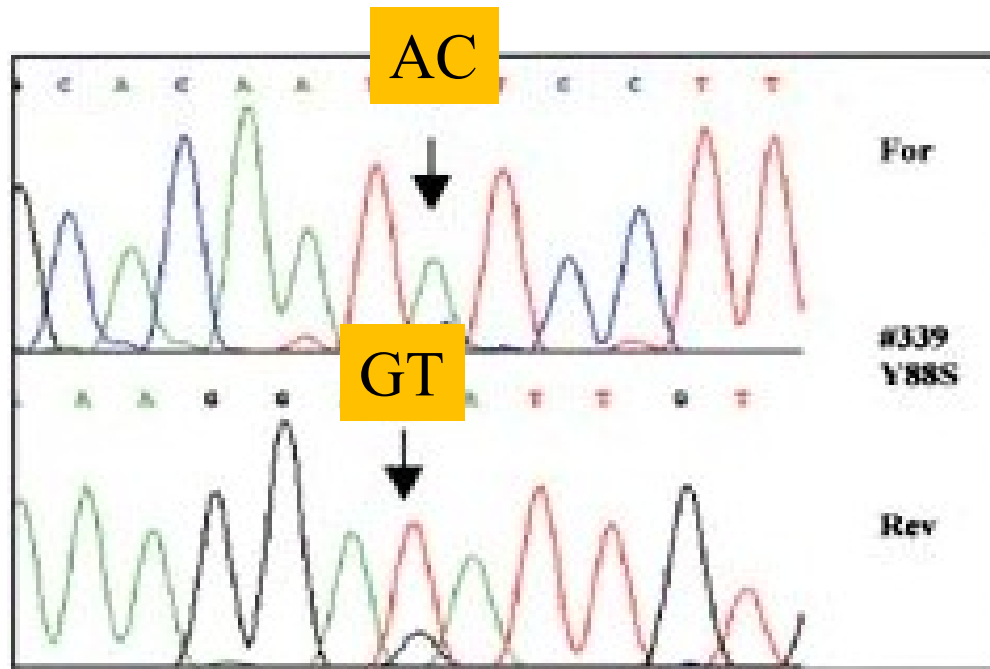
= zjištění genotypu daného  
jedince

# SNPs genotyping - sekvenování?

## Je drahé a nejasné u heterozygotů



# Heterozygotes?



Bi-directional sequencing - are you really sure?



SNPs genotyping - klonování a následné sekvenování?  
- separation of two (or more in duplicated genes) alleles

each clone contain the only allele

!!! cloning - 1000 Kč  
!!! sequencing 1 clone - 150 Kč

↑ ligation, transformation

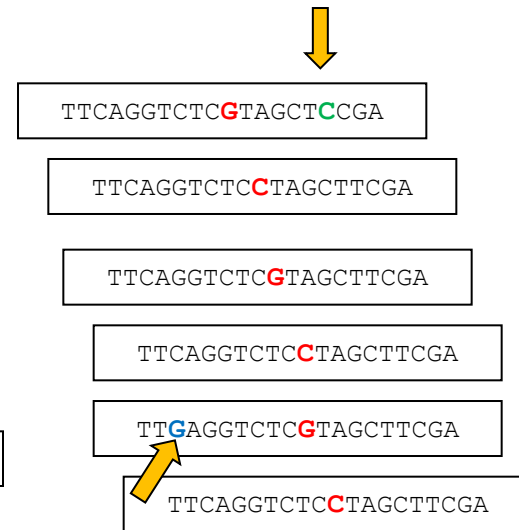
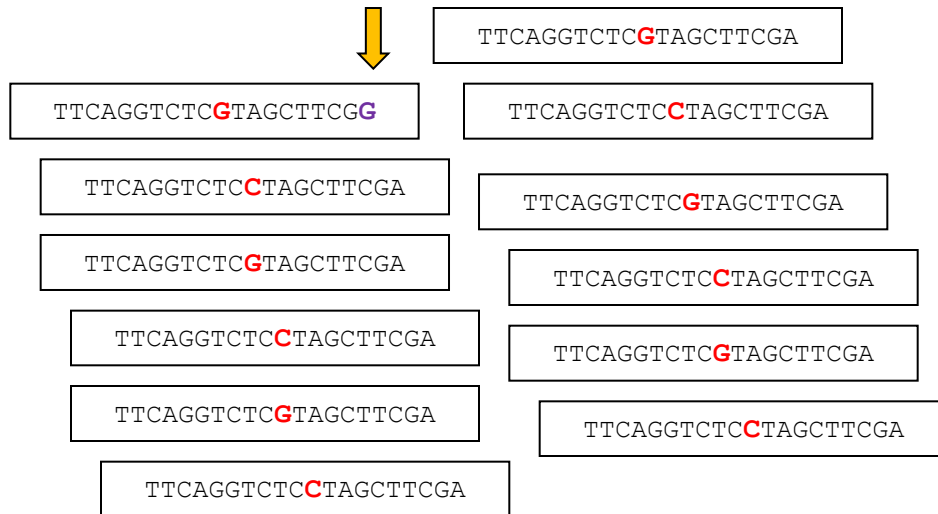
 Ex.: heterozygote = two diff. alleles

# PCR is making substitution errors that are visualised by cloning

TTCAGGTCTC**G**TAGCTTCGA

TTCAGGTCTC**C**TAGCTTCGA

... před PCR = heterozygot G/C



# SNPs genotyping

## 1. Old standards (PCR-based)

- RFLP, DGGE, TGGE, SSCP
- původně detekce geneticky podmíněných chorob, např. cystická fibróza

## 2. New methods (not based on standard PCR)

- real-time PCR se specifickými sondami (TaqMan, molecular beacon)
- ASPE: allele-specific primer extension
- SBE: single base extension
- SNP microarrays (GeneChip method)

# SNP genotyping - old standards

## PCR-RFLP

(restriction fragments length polymorphism)

## Enzyme Site Recognition

- Each enzyme digests (cuts) DNA at a specific sequence = restriction site
- Enzymes recognize 4- or 6- base pair, palindromic sequences (eg GAATTC)

**Restriction site**

**Palindrome**

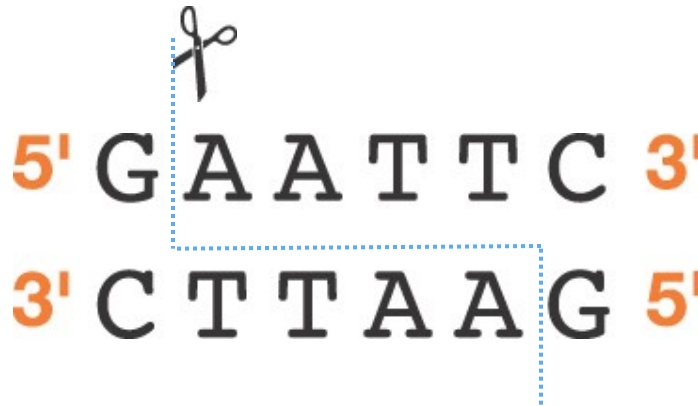
G T A G A A T T C A T T C A C G C A  
C A T C T T A A G T A A G T G C G T

G T A G                      A A T T C A T T C A C G C A  
C A T C T T A A                      G T A A G T G C G T

**Fragment 1**

**Fragment 2**

# Common Restriction Enzymes



**EcoRI**

- Escherichia coli
- 5 prime overhang



**PstI**

- Providencia stuartii
- 3 prime overhang

# SNP genotyping - old standards

## PCR-RFLP

### Allele A

CCGATCA**A**TGCGGCAA  
GGCTAGT**T**ACGCCGTT

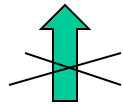


cutting by restriction endonuclease

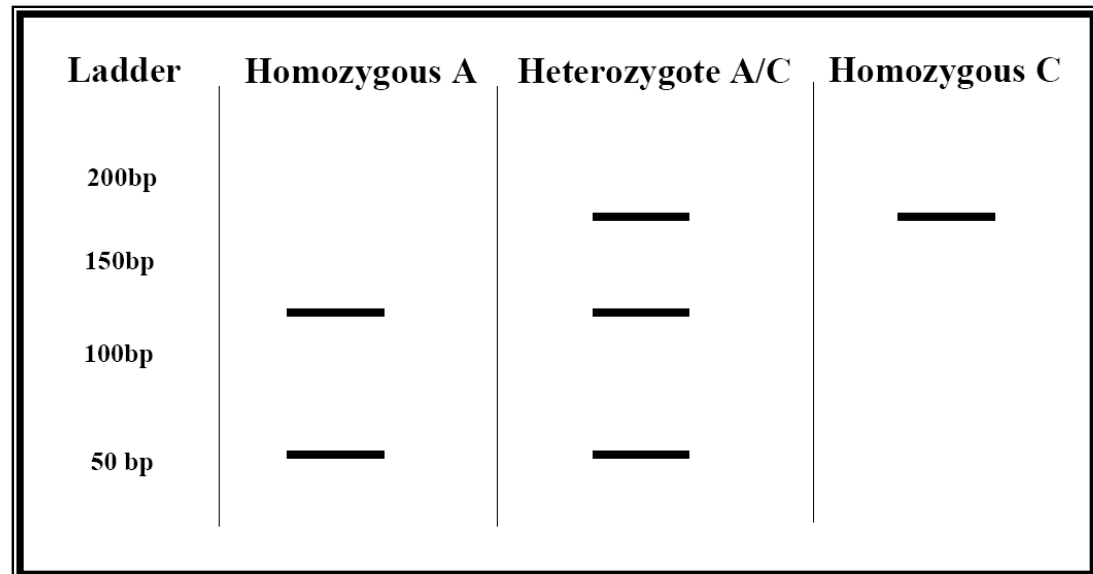
- neumožní nalézt novou variantu daného SNP (odliší pouze 2 formy daného znaku: +/- )

### Allele C

CCGATCA**C**TGCGGCAA  
GGCTAGT**G**ACGCCGTT



no cut



# SNPs genotyping - old standards

## Methods of mutation detection

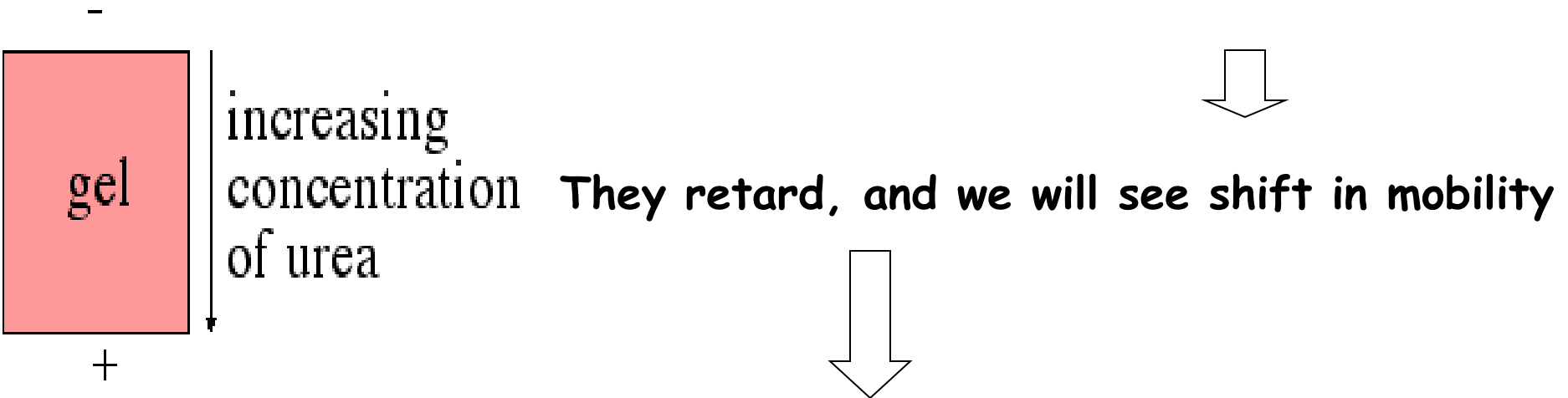
- Thermal gradient gel electrophoresis (TGGE)
  - Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)
  - Single-strand conformation polymorphism (SSCP)
- = special electrophoresis methods based on differences in mobility of different DNA sequences

# Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (TGGE - podobné, ale gradient teploty)

The small (200-700 bp) genomic fragments are run on a low to high denaturant GRADIENT acrylamide gel

Each fragments move according to molecular weight, but as they progress into more denaturing conditions, each (depending on its sequence composition) reaches

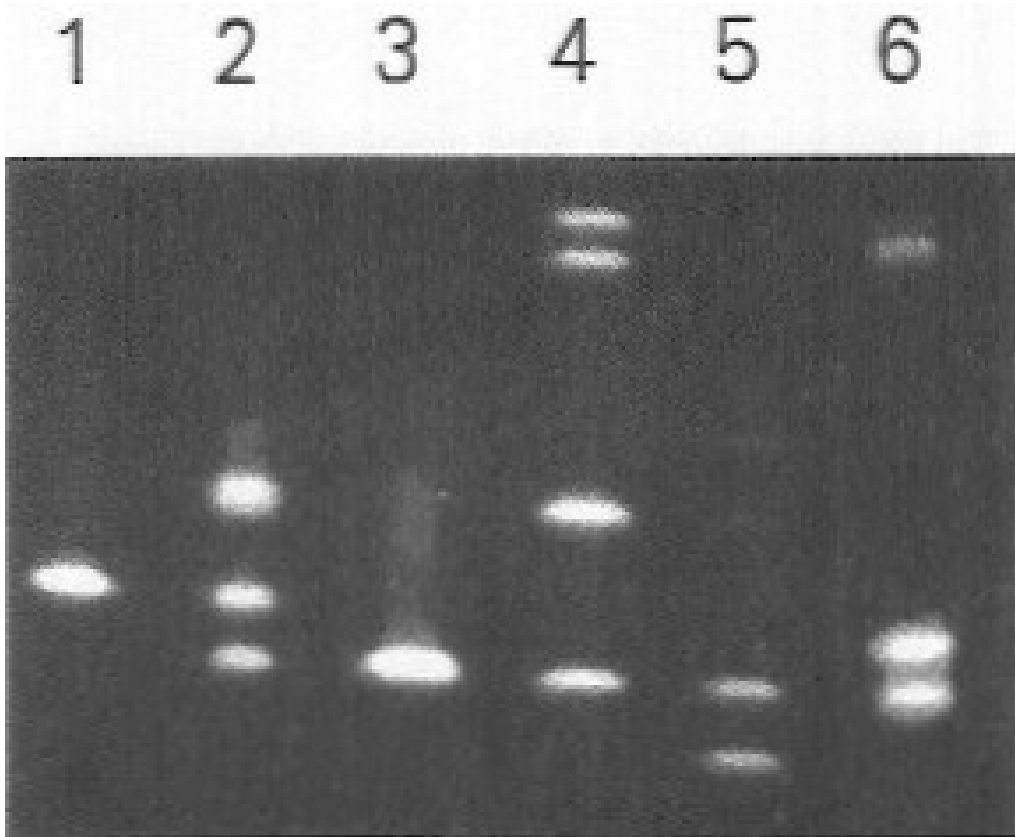
**A POINT where the DNA BEGINS TO MELT**



We will see different shifts in mobility for differing products



Detekce nových mutací – např. v diagnostice genetických chorob  
nebo při analýzách MHC



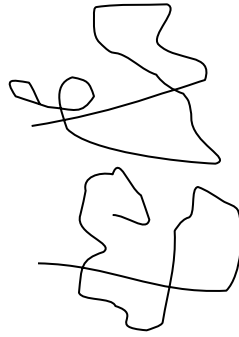
1- normal homozygote  
3- homozygous mutations  
will yield one band  
on a different position  
2, 4, 5, 6 - heterozygous  
mutations will yield 4  
bands (2 homozygous and 2  
heterozygous)

**NOT ALL BANDS ARE  
SEEN !!!!!**

# Single strand conformation polymorphism (SSCP)

## Allele 1

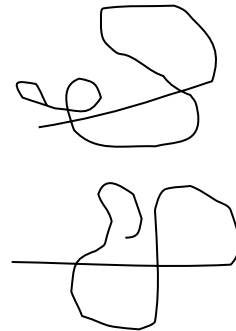
...CGCTTCAGG ...  
...GCGAAGTCC...



heating - denaturation  
snap-cooling → partial renaturation

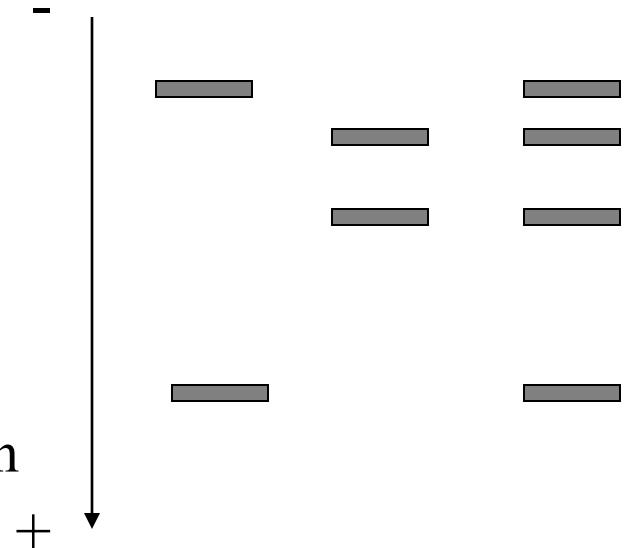
## Allele 2

...CGCTTAAGG ...  
...GCGAATTCC...



sequence-specific  
ssDNA conformations

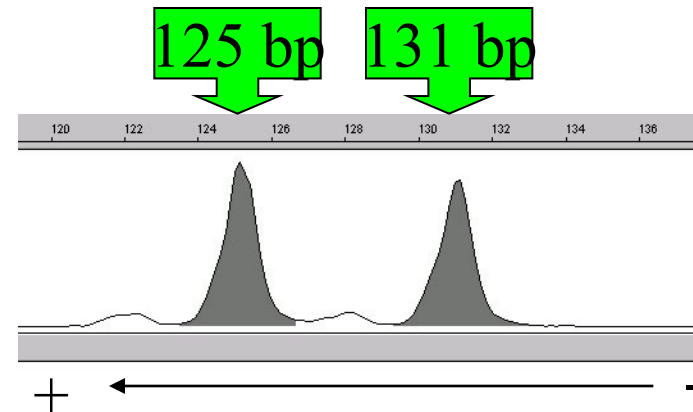
Homo1 Homo2 Hetero



**!!! non-denaturing PAGE**

radioisotopes  
silver-staining  
fluorescent dyes (SYBR gold)

# Použití automatických sekvenátorů (denaturing polymer POP7 - ssDNA, e.g. microsatellites)



Well controlled electrophoresis parameters, high sensitivity

# Použití automatických sekvenátorů

Why not non-denaturing electrophoresis?

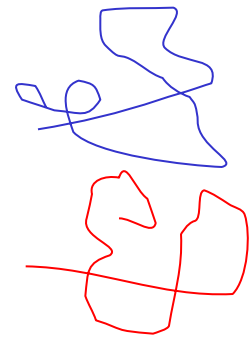
CAP (conformation analysis polymer) - Applied Biosystem



- well controlled electrophoresis
- two fluorescent labels
- high sensitivity

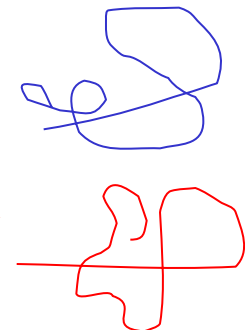
## Allele 1

*FAM*... CGCTTCAGG ...  
... GCGAAGTCC ...*HEX*



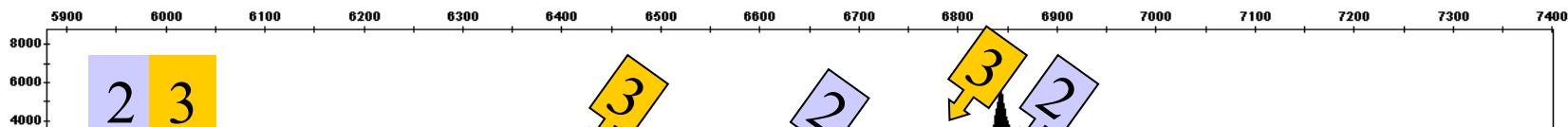
## Allele 2

*FAM*... CGCTTAAGG ...  
... GCGAATTCC ...*HEX*



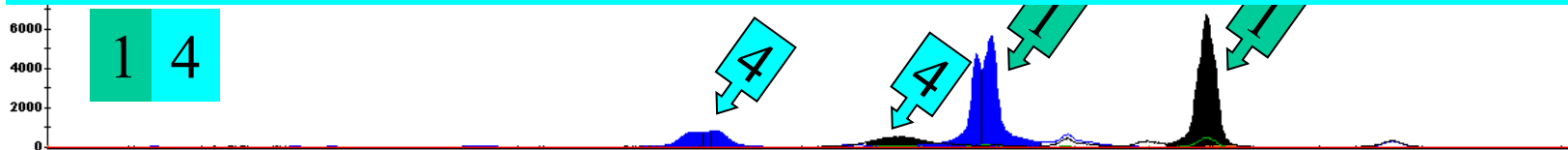
## MHC Class II (DQA gene) – mice HZ

Sample File	Sample Name	Panel	DS	SQ
hz319_004.fsa	hz319	None		



1 hour, ~ 100 Kč/4 samples incl. PCR

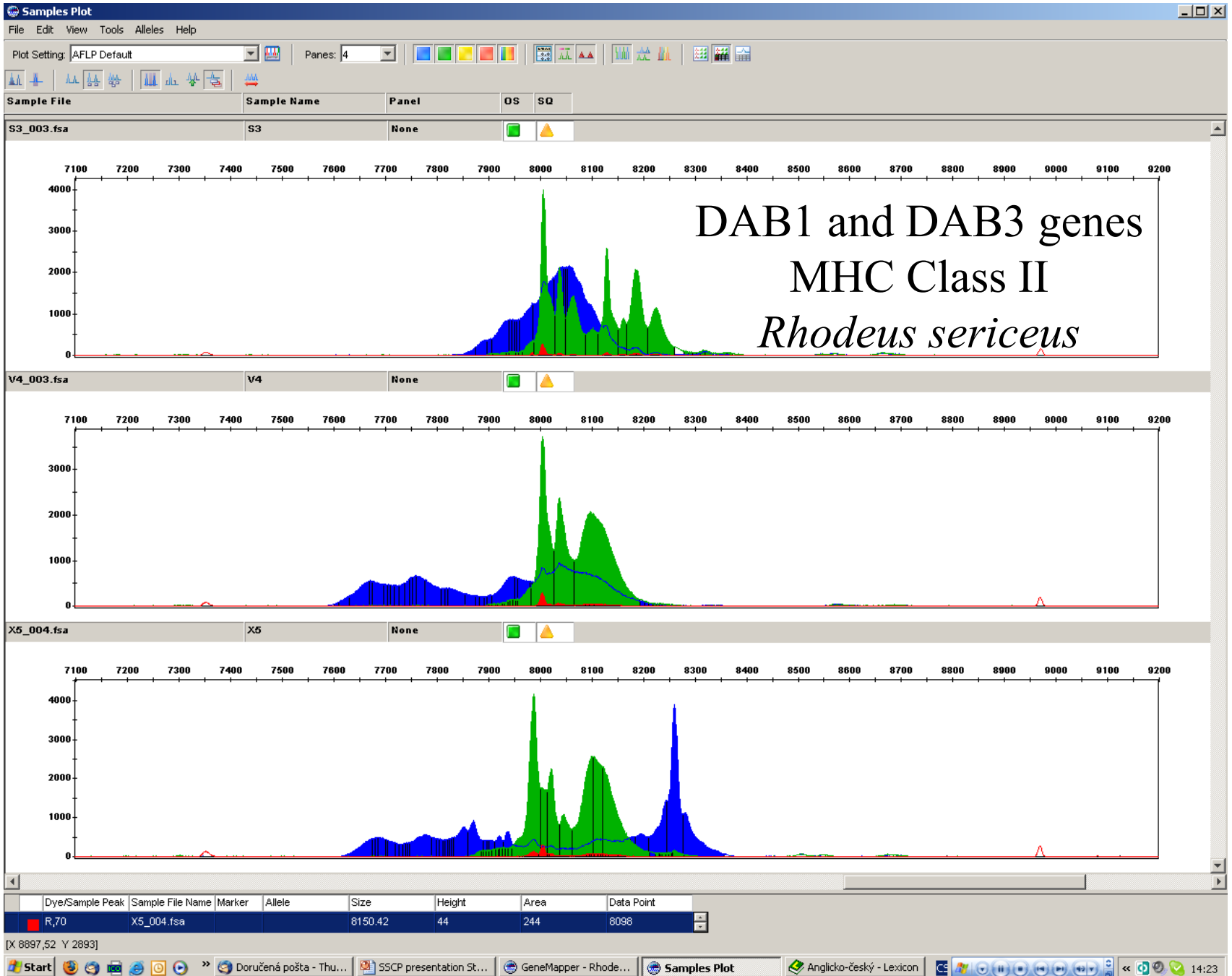
Information about all alleles (vs. cloning-sequencing)



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
	B.65	hz701_003.fsa			6537.54	788	6803	6530
	B.66	hz701_003.fsa			6542.55	830	17081	6535

# Advantages of CE-SSCP

- high throughput (when using 4, 16, or 96 - capillary sequencer) - time and money saving
- no need of gel preparation and autoradiography
- distinction of two DNA strains by two colour-labeling (usually FAM and HEX)
- potential of multiplexing - not yet used !!!



# Disadvantages

- need for electrophoresis optimisation (running temperature, sieving matrix, dilution of samples)
- „complex“ patterns in some sequences
- alleles with the same pattern may rarely occur
- it is necessary to test several run temperatures



Plot Setting: AFLP Default

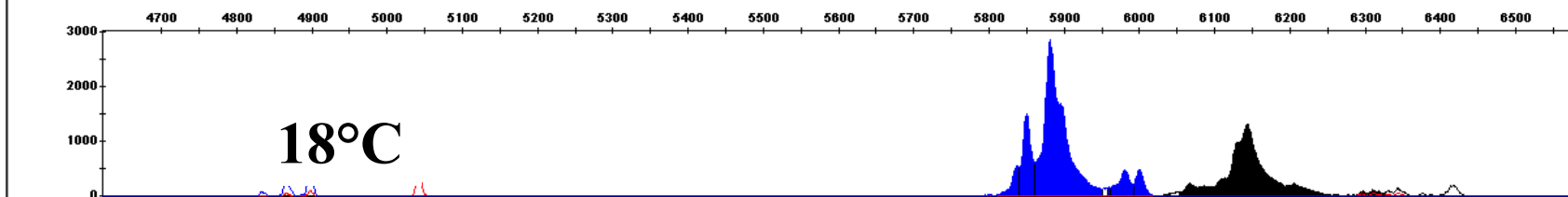
Panels: 4



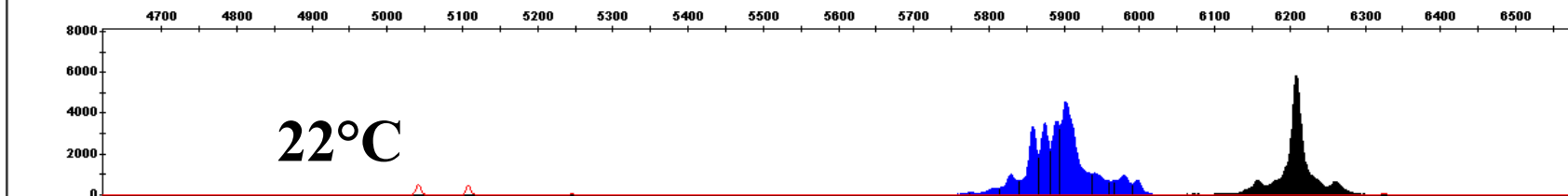
# *Rupicapra rupicapra* – MHC Class II DRB gene, individual SR18t

Sample File	Sample Name	Panel	OS
SR18t-5_002.fsa	SR18t-5	None	OS

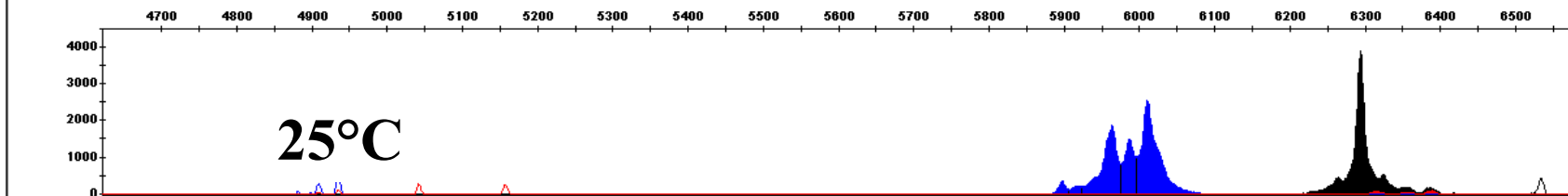
Sample File	Sample Name	Panel	OS
SR18t_004.fsa	SR18t	None	OS



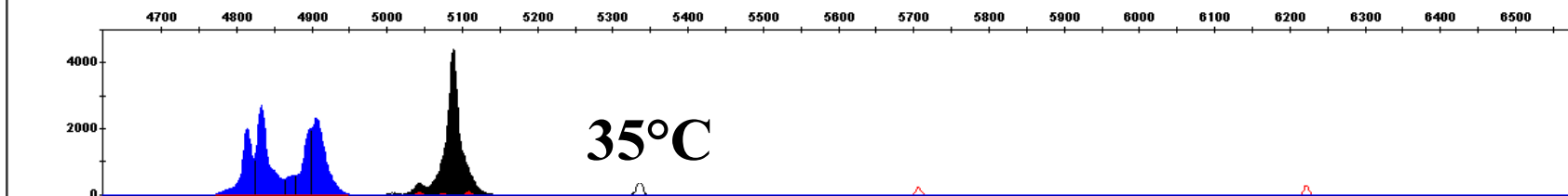
Sample File	Sample Name	Panel	OS
SR18t_004.fsa	SR18t	None	OS



Sample File	Sample Name	Panel	OS
002-5.fsa	SR18t-5	None	OS



Sample File	Sample Name	Panel	OS
SR18t-5_002.fsa	SR18t-5	None	OS



Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
R_26 *	SR18t-5_002.fsa			5108.0	90	497	5186

# Data analysis

- GeneMapper (Applied Biosystems)
- different „Size Standard“ for each temperature
- alignment of more samples

# Applications

- 1) Genotyping of codominant markers  
(e.g. single copy MHC genes)

# MHC Class II (DQA gene) – mice HZ



Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
B,65	hz701_003.fsa			6537.54	788		
B,66	hz701_003.fsa			6542.55	830		

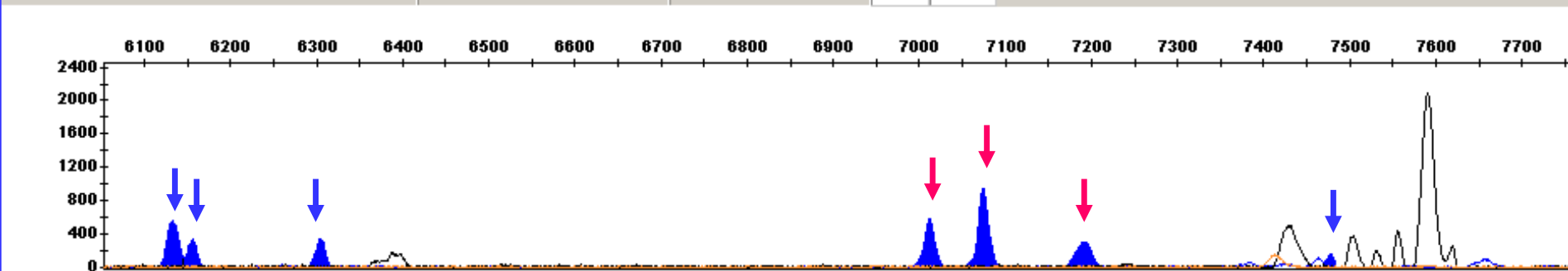
... even shape of the peaks is important !!!

# Applications

- 1) Genotyping of codominant markers  
(e.g. single copy MHC genes)
- 2) Identification of number of genes  
(e.g. duplicated MHC genes)



Seven peaks in one colours =  
= At least four amplified copies !!!

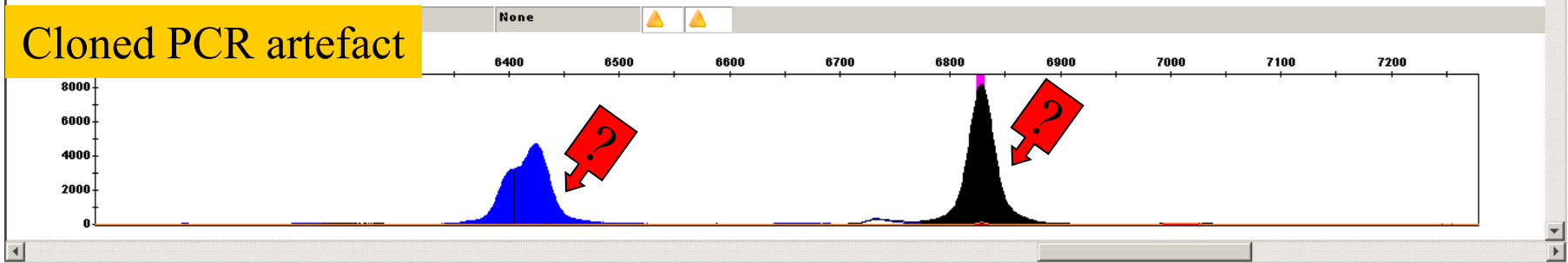
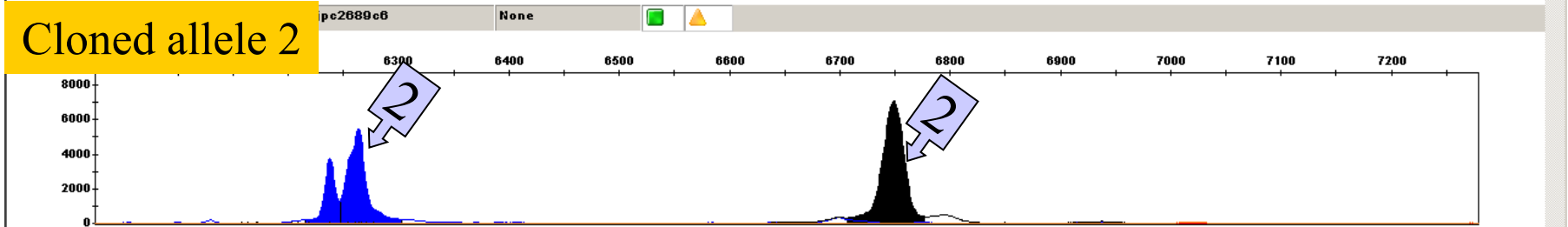
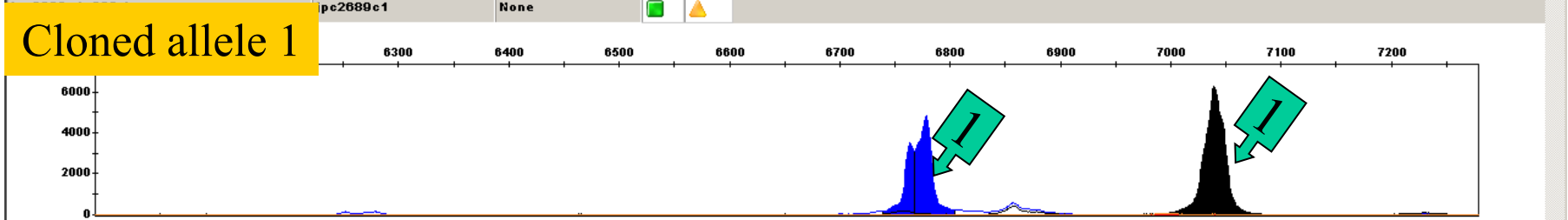
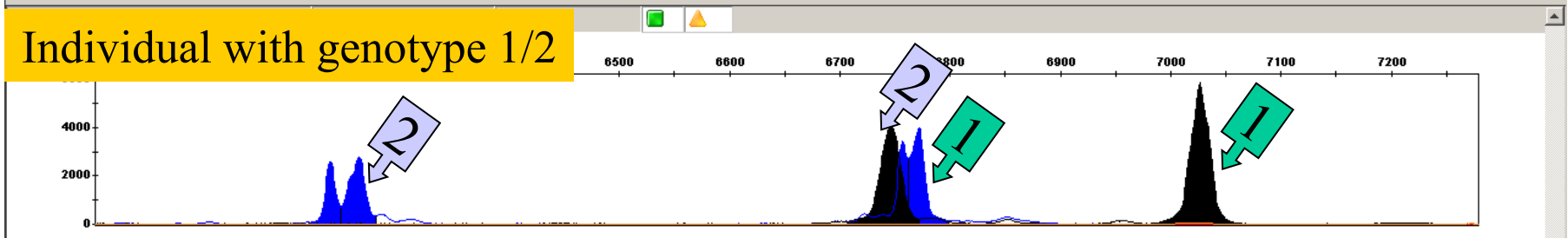


SSCP of three individuals:

↓ - different alleles

↓ same alleles

# MHC Class II (DQA gene) – mice HZ



**Detection of PCR artefacts during cloning of heterozygotes**

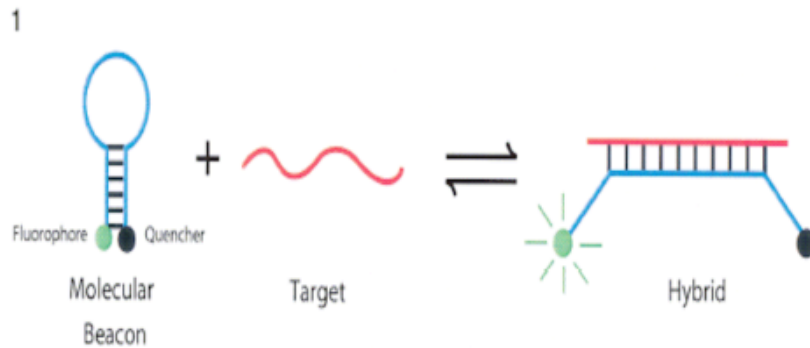
# SNP genotyping - new methods

= not based on standard PCR

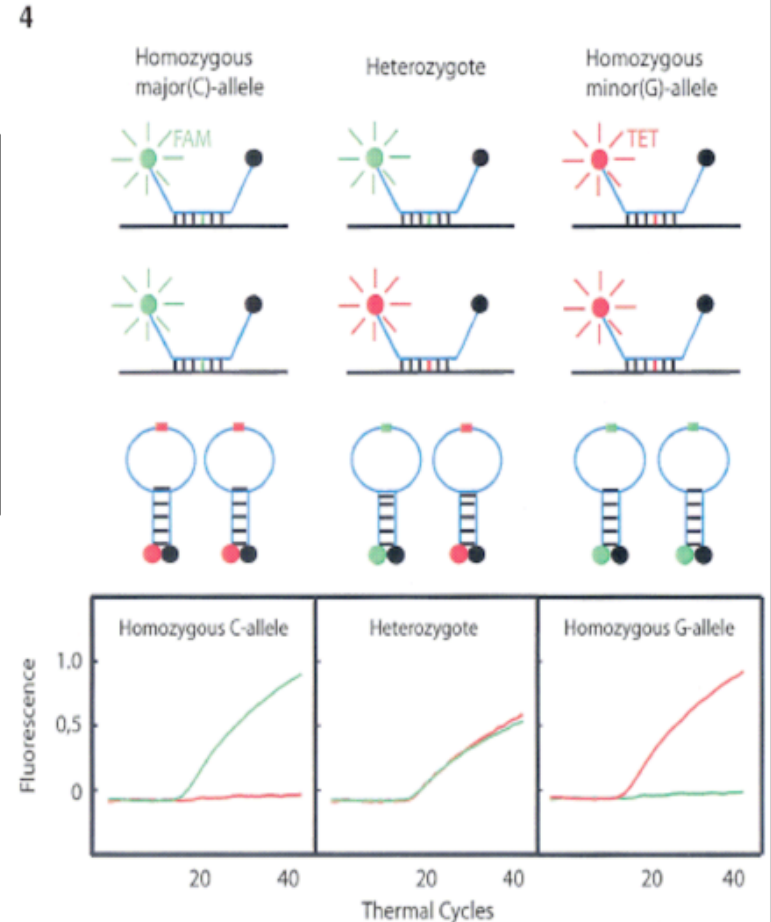
1. real-time PCR se specifickými sondami (TaqMan, molecular beacon)
2. ASPE: allele-specific primer extension
3. SBE: single base extension
4. SNP microarrays (GeneChip method)



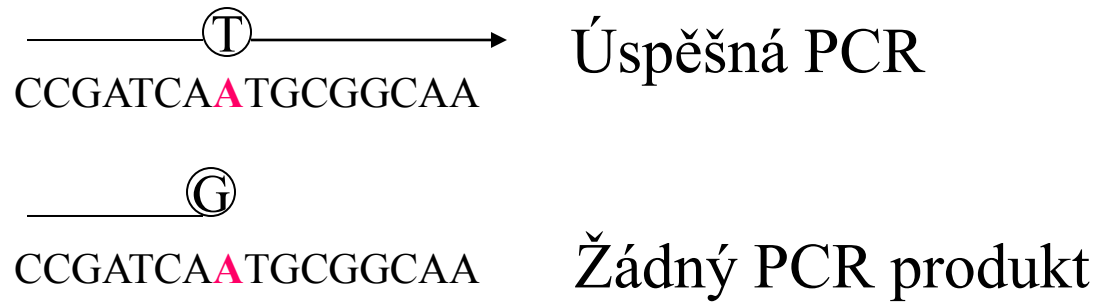
# (1) Real-time PCR se specifickou sondou



- 1) TaqMan sondy
- 2) Molecular Beacons („maják“)

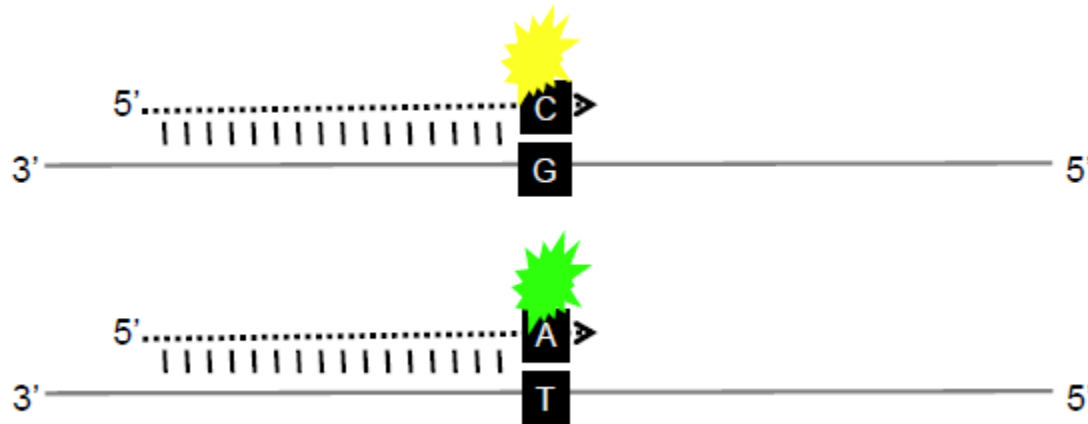


## (2) ASPE: allele-specific primer extension



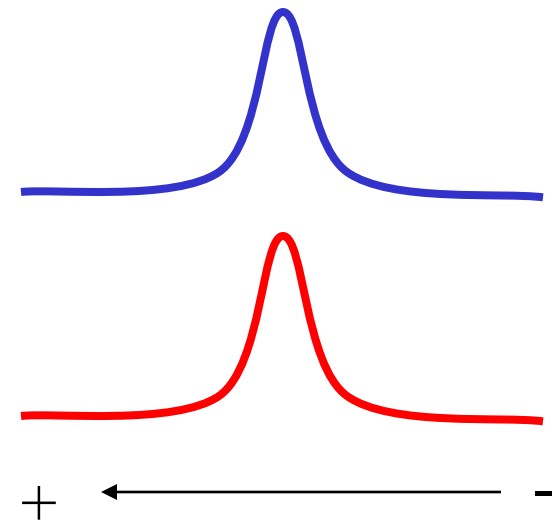
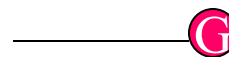
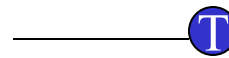
- dvě PCR se specifickými primery
- 3' terminální nukleotid na primerech je komplementární k SNP nukleotidu
- alelově-specifická amplifikace je umožněna vysoce specifickou polymerázou

# ASPE: allele-specific primer extension (automatizovaná verze)



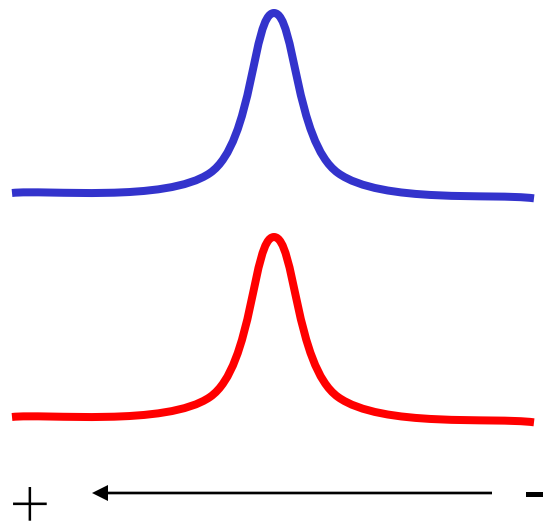
- existují zoptimalizované multiplexy pro modelové druhy (např. člověk 1536 SNPs)
- fluorescenční detekce (Illumina)

# (3) SBE: single base extension

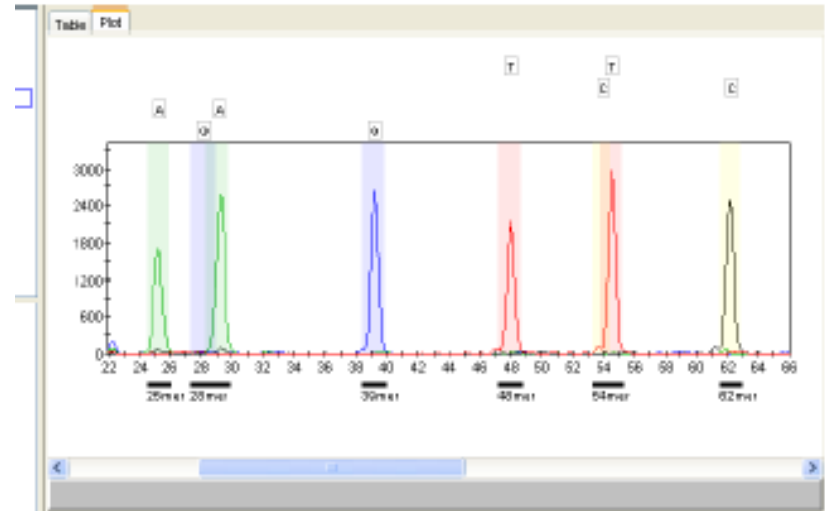


- pouze jeden dideoxynukleotid je přidán k primeru
- detekce různými metodami

# Detection of SBE products



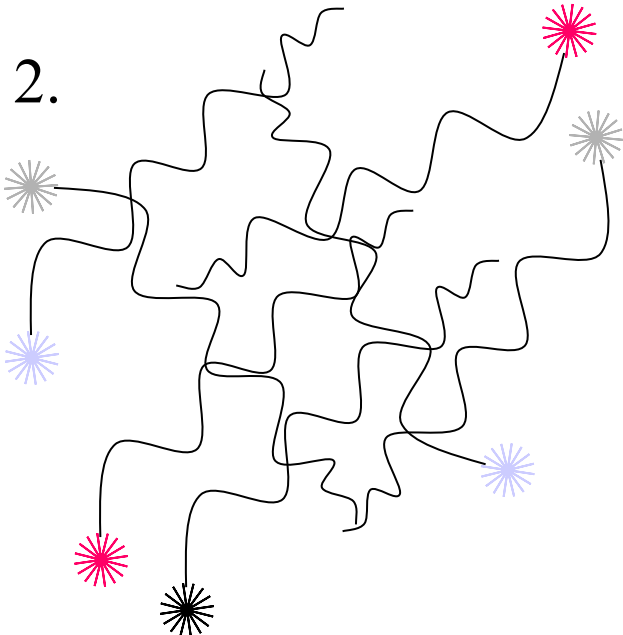
electrophoresis in a capillary  
SNaPShot Multiplex Kit (Applied Biosystems)



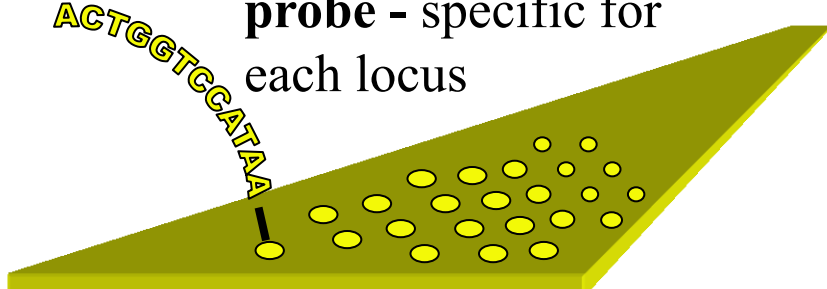
„multiplex version“ – různé  
dlouhé primery, aby bylo možné  
odlišit různé lokusy

# Microarray detection of SBE products

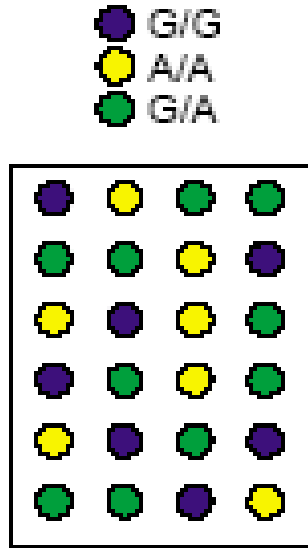
1. tag – specific for each locus



3. tag-complementary probe - specific for each locus



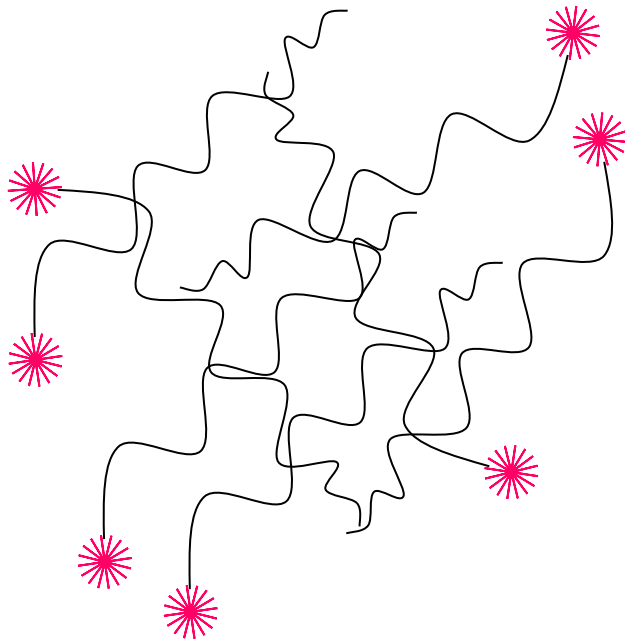
4.



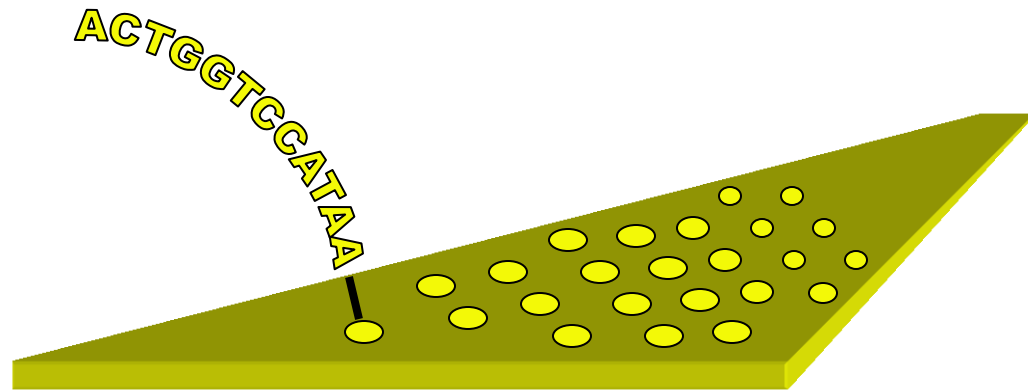
Small-scale “in house” SNP genotyping

multicolor detection (using of 5’ oligonucleotide tags on SBE primers)

# (4) Microarray analysis of SNPs (whole genome approach - „chip technology“)

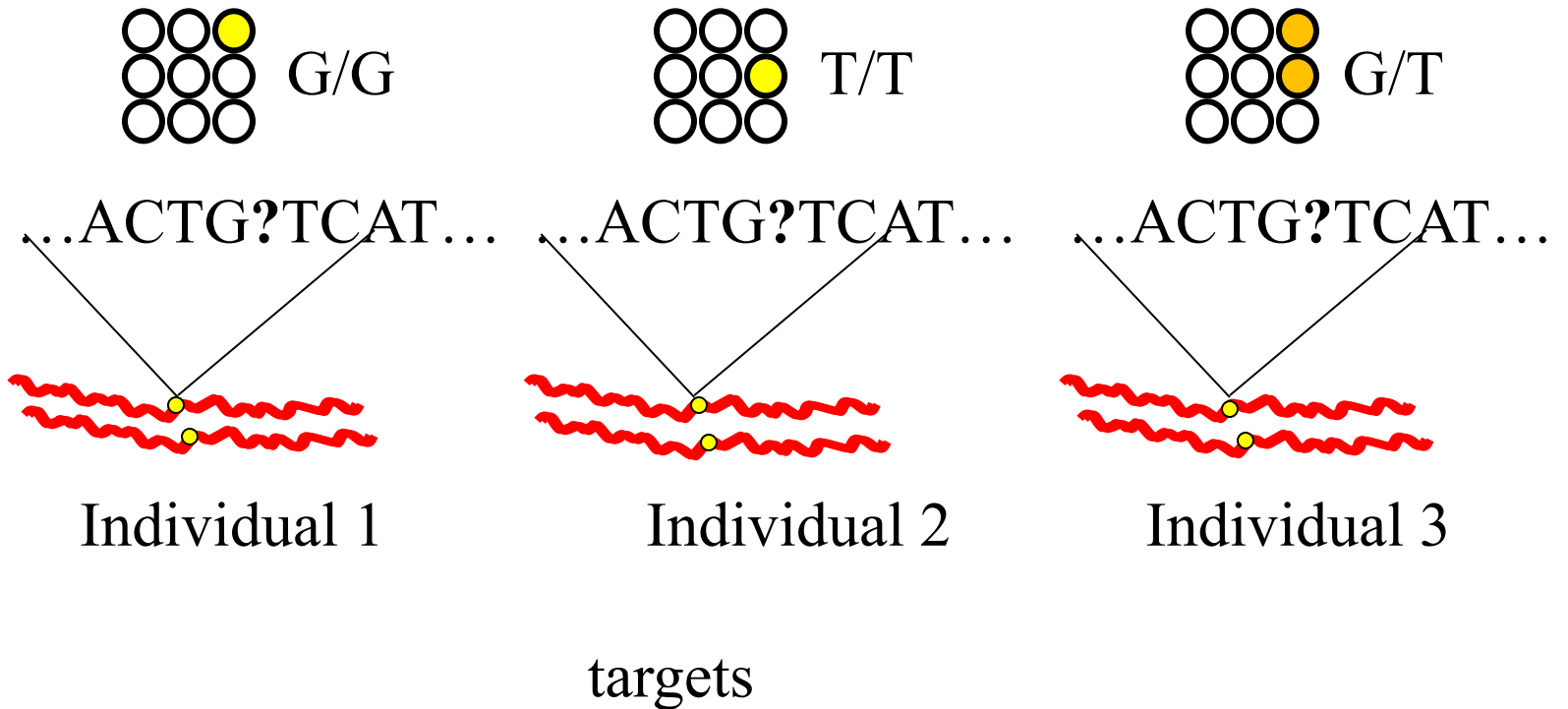


**Target**



**Probe**

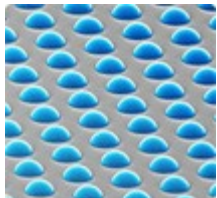
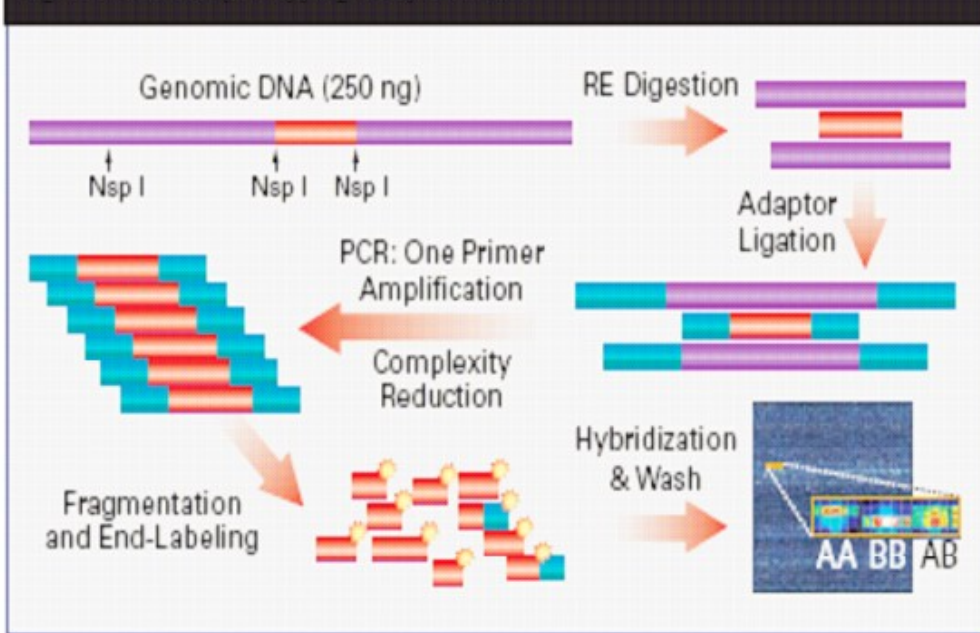
# Microarray SNP Genotyping



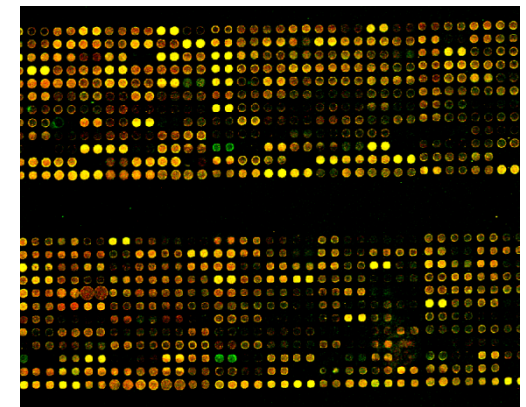
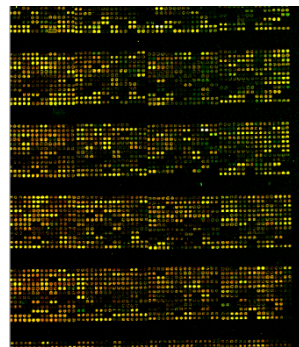


# Detekce: Affymetrix, Illumina

Figure 1: GeneChip® Mapping Assay Overview.



BeadArray (Illumina)



10 – 500 tisíc SNP znaků najednou – „chip technology“

Fees - Whole Genome Genotyping									
Platform	SNP multiplex	# samples per array	# genotypes	array \$	reagent \$	core fee \$	Project price per sample	Project price per genotype	volume discount bins
Affymetrix 10K	10,000	1	10,000	185	50	255	\$490.00	\$0.0490	
Affymetrix 50K	50,000	1	50,000	210	50	255	\$515.00	\$0.0103	
Affymetrix 100K (50K x2)	100,000	1	100,000	420	100	510	\$920.00	\$0.0092	
Affymetrix 250K	250,000	1	250,000	470	55	255	\$780.00	\$0.0031	
Affymetrix 500K (250K x2)	500,000	1	500,000	940	110	510	\$1,560.00	\$0.0031	
Affymetrix 500K (250K x2)	500,000	1	500,000	800	110	510	\$1,420.00	\$0.0028	1000-2000 samples
Affymetrix 500K (250K x2)	500,000	1	500,000	700	110	510	\$1,320.00	\$0.0026	2001-5000 samples
Illumina Human-1	109,000	1	109,000	800	na	110	\$910.00	\$0.0083	1-256 samples
Illumina Human-1	109,000	1	109,000	720	na	110	\$830.00	\$0.0076	257-496 samples
Illumina Human-1	109,000	1	109,000	640	na	110	\$750.00	\$0.0069	497-736 samples
Illumina Human-1	109,000	1	109,000	560	na	110	\$670.00	\$0.0061	737-976 samples
Illumina Human-1	109,000	1	109,000	480	na	110	\$590.00	\$0.0054	977+ samples
Illumina HumanHap300	317,000	1	317,000	1100	na	110	\$1,210.00	\$0.0038	1-256 samples
Illumina HumanHap300	317,000	1	317,000	990	na	110	\$1,100.00	\$0.0035	257-496 samples
Illumina HumanHapS	240,000	1	240,000	700	na	110	\$810.00	\$0.0034	737-976 samples
Illumina HumanHapS	240,000	1	240,000	600	na	110	\$710.00	\$0.0030	977+ samples
Illumina HumanHap550	550,000	1	550,000	1600	na	110	\$1,710.00	\$0.0031	1-256 samples
Illumina HumanHap550	550,000	1	550,000	1440	na	110	\$1,550.00	\$0.0028	257-496 samples
Illumina HumanHap550	550,000	1	550,000	1280	na	110	\$1,390.00	\$0.0025	497-736 samples
Illumina HumanHap550	550,000	1	550,000	1120	na	110	\$1,230.00	\$0.0022	737-976 samples
Illumina HumanHap550	550,000	1	550,000	960	na	110	\$1,070.00	\$0.0019	977+ samples
HumanHap300 + HumanHapS	550,000	1	550,000	1750	na	220	\$1,970.00	\$0.0036	1-256 samples
HumanHap300 + HumanHapS	550,000	1	550,000	1575	na	220	\$1,795.00	\$0.0033	257-496 samples
HumanHap300 + HumanHapS	550,000	1	550,000	1400	na	220	\$1,620.00	\$0.0029	497-736 samples
HumanHap300 + HumanHapS	550,000	1	550,000	1225	na	220	\$1,445.00	\$0.0026	737-976 samples
HumanHap300 + HumanHapS	550,000	1	550,000	1050	na	220	\$1,270.00	\$0.0023	977+ samples

Použití u příbuzných druhů je možné, ale je tam velmi silný „ascertainment bias“