

# Využití technologie LabMAP Luminex pro detekci SNP polymorfismů

Bruchová H.<sup>1</sup>, Kráčmarová A.<sup>1</sup>, Černý V.<sup>2</sup>, Brdička R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

<sup>2</sup>Archeologický ústav AV ČR, Praha

## SOUHRN

Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) se nacházejí v lidském genomu s frekvencí jednoho polymorfního místa na 1000 bp. Proto SNPs představují nejběžnější formy polymorfismů lidského genomu a jsou často využívány jako genetické markery v populačních studiích. Technologie LabMAP Luminex představuje univerzální čipovou platformu založenou na využití fluorescenčně značených polystyrenových mikrosfér, které slouží jako nosiče pro oligonukleotidové sondy. Systém LabMAP Luminex umožňuje detekovat 100 různých genových lokusů v rámci jednoho vzorku. Firma Marligen vyvinula kit SNP-Y Identification System pro analýzu SNPs lokalizovaných na Y chromosomu s použitím přístroje Luminex. Kit umožňuje detekovat 43 SNPs včetně lokusu pro amelogenin, který je zahrnut jako marker pro ověření pohlaví. Tímto kitem jsme testovali 30 mužů z jižních Čech a Moravy (15 mužů z Jindřichova Hradce a 15 mužů z Třebíče). Do souboru byli zařazeni nepřibuzní muži, jejichž otcové se narodili v příslušném regionu.

Genomická DNA byla izolována z periferní krve mužů. Sledované polymorfní lokusy byly amplifikovány multiplex PCR a fluorescenčně značeny. Značené PCR produkty byly následně hybridizovány s alelicky specifickými sondami imobilizovanými na povrchu mikrosfér. Směs hybridizovaných mikrosfér byla analyzována přístrojem Luminex 100 System, který kvantifikuje integrální intenzitu fluorescence ve vzorku.

Cílem této studie byla optimalizace technologie Luminex pro analýzu SNPs polymorfismů a stanovení haploskupin na základě detekovaných SNPs u vybraných mužů. Tyto haploskupiny mohou vypovídat o původu a stáří populace, migračních směrech, historických událostech atd. Z celkového počtu 42 SNPs byly zjištěny různé alelické frekvence u 10 polymorfismů. Pro SNPs M45, M207 byly pozorovány podobné četnosti obou alel. V polymorfismech M42, M94, M168 byla u všech mužů nalezena pouze odvozená alela. U ostatních SNPs byla detekována vždy původní alela. Ve vzorcích z Třebíče bylo stanoveno 6 různých haploskupin, zatímco ve vzorcích z Jindřichova Hradce byly určeny pouze 4 haploskupiny. V obou skupinách převládala haploskupina R, charakteristická pro Evropu a severozápadní Asii.

*Klíčová slova:* Luminex, mikrosféry, SNP, Y-chromosom, Třebíč, Jindřichův Hradec.

## SUMMARY

**Bruchová H., Kráčmarová A., Černý V., Brdička R.: Using LabMAP Luminex Technology for SNP Detection**

One single nucleotide polymorphism (SNP) is estimated to occur approximately in every 1000 bp of the genome. So SNPs are the most prevalent genetic variations in human genome and they may serve as markers in genetic studies of human population. LabMAP Luminex technology represents a powerful array platform using fluorescent polystyrene microspheres as a solid support for oligonucleotide probes. The LabMAP Luminex system is capable to detect 100 different analytes simultaneously in a single sample. Company Marligen has developed SNP-Y Identification System for SNP profiling of the Y chromosome on Luminex instrument. The kit enables to determine 43 SNPs including amelogenin marker to verify gender. Using the kit we tested 30 males from Southern Bohemia and Moravia (15 males from Jindřichův Hradec and 15 males from Třebíč). The selected males were born in the region as well as their fathers. Genomic DNA was isolated from peripheral blood of the males. Studied polymorphic loci were amplified by multiplexed PCR and labelled with fluorescent tag. Labelled PCR products were hybridized to allele-specific probes immobilized on beads. The bead mixes were analyzed by Luminex 100 System that measured integral intensity of sample fluorescence. The aims of the study were an optimization of Luminex technology for SNP detection and a determination of haplogroups according to identified SNPs in males. The haplogroups may reflect origin and age of population, migration routes, history events etc. Out of 42 tested SNPs we identified different allelic frequencies in 10 polymorphisms. SNPs M45, M207 demonstrated similar frequencies of both alleles. In M42, M94, M168 we observed only derived allele. In the rest of the SNPs in all Y-chromosomes ancestral alleles were detected. Although in the Třebíč group we determined 6 different haplogroups, in the Jindřichův Hradec group only 4 haplogroups were observed. However in both groups the predominant haplogroup was R that is typical for Europe and North-western Asia.

*Key words:* Luminex, bead array, SNP, Y-chromosome, Třebíč, Jindřichův Hradec.

## Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs)

Genomická DNA každého jedince se liší v drobných odchylkách, které jsou klasifikovány jako polymorfismy či mutace. Pokud by byly náhodně vybrány dva lidské genomy, míra jejich vzájemné shody v sekvenci DNA bude dosahovat 99,9 %. Právě zbývající 0,1 % zahrnuje polymorfismy, jejichž nejjednodušší a nejběžnější forma jednonukleotidových záměn je označována jako

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (1). Tyto SNPs jsou vhodné pro genetické studie, neboť jsou stabilní a roztroušeny po celém lidském genomu s frekvencí jednoho polymorfního místa na 1000 bp v nekódujících oblastech (v kódujících oblastech případně jednonukleotidová diference na každých 1200 bp). Doposud bylo v lidském genomu identifikováno více než 1,4 milionů těchto jednonukleotidových záměn. Ačkoliv před 20 lety nebyl SNPs přikládán žádný význam, dnes tyto po-

lymorfismy nacházejí uplatnění při studiích v mnoha vědních oborech. V oblasti medicíny slouží SNPs jako genetické markery při mapování genů zodpovědných za různé patologie (např. hypertenze, koronární onemocnění, diabetes, schizofrenie), intenzivně se také studují ve farmakogenomice. Pro evoluční biologii představují vhodný nástroj při srovnávání lidského genomu s genomem lidoopů (šimpanz, gorila), k posuzování jejich vzájemné odlišnosti a shody.

Zvláštní význam mají bialelické SNPs na patrilinéárně děděném Y chromosomu, zvláště v tzv. NRY oblasti (Nonrecombinig Y Chromosome), neboť jejich variabilita vykazuje výraznou závislost na geografické poloze. Za jednu z příčin této korelace se považuje tzv. fenomén patrilokality, tedy skutečnost, že muži zůstávali po sňatku většinou v místě svého rodiště, zatímco jejich novomanželky je následovaly, a své rodné město tak opustily. Studie prokázaly až 8krát vyšší migraci žen oproti mužům (2).

Nelze opomenout výraznější působení genetického driftu, neboť efektivní velikost populace je ve srovnání s kterýmkoliv autosomem čtvrtinová. NRY oblast představuje 95 % Y chromosomu, a proto není možné, aby docházelo k rekombinacím. Téměř veškeré změny Y chromosomální DNA tedy vznikají v důsledku mutačních událostí. Těchto souvislostí a specifických vlastností Y chromosomu využívá zvláště populační genetik, která hledá ve spolupráci s historií, archeologií a lingvistikou odpovědi na otázky týkající se původu a vzájemné příbuznosti jednotlivých populací, původu a období osídlení každého z kontinentů, průběhu migrací, jejich rozsahu a dopadu. Je známo, že některé alely příslušných polymorfismů jsou kosmopolitně zastoupeny, a tedy z evolučního hlediska patří k nejstarším. Jiné alely, jejichž vznik je datován do mladších období, bývají ve svém výskytu omezeny pouze na určitou lokalitu, a proto mohou představovat specifický marker pro populaci obývající příslušné území. Polymorfismy v NRY oblasti tedy našly své uplatnění nejen v evoluční biologii a populační genetice, ale také v kriminalistice. Přestože SNPs nemohou sloužit k individuální identifikaci, jako je tomu v případě STRs (Short Tandem Repeats), jejich význam díky korelaci se zeměpisnou polohou spočívá v predikci populační, případně národnostní příslušnosti (3).

## Technologie LabMAP Luminex

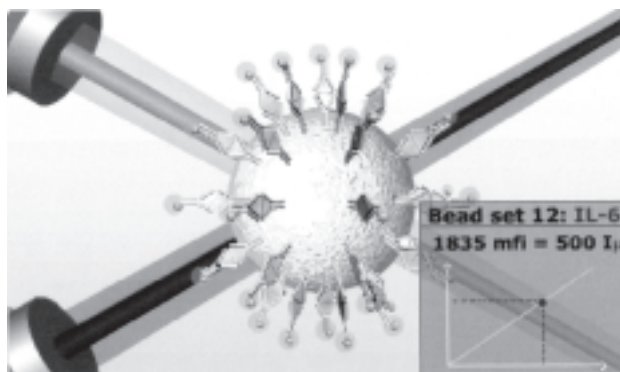
Globální studium genomu umožňuje řada moderních technologií včetně tzv. biočipů. V současné době jsou na trhu k dispozici různé typy čipů pro nejrůznější aplikace v molekulární biologii. Univerzální a velmi výkonnou čipovou technologií představuje LabMAP Luminex System (Luminex MultiAnalyte Profiling Technology), který patří mezi tzv. kuličkové mikročipy (bead arrays) (4). Tento systém lze využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzy nejen nukleových kyselin, ale i proteinů. Technologie Luminex je zajímavá tím, že jako nosiče sond zde slouží polystyrenové mikrosféry o průměru 5,6 μm.



**Fig. 1.** The LabMAP Luminex technology uses 5.6 micron polystyrene microspheres which are internally dyed with fluorophores. Probes are bound to surface through carboxyl groups or avidin.

Na povrch mikrosfér modifikovaný COOH- či avidinem jsou kovalentně ukotveny sondy (oligonukleotidy, protilátky). V závislosti na typu použitých mikrosfér jsou navazované sondy na 5'-konci modifikovány aminoskupinou (u karboxylovaných mikrosfér) či biotinem (u avidinových mikrosfér). Na doporučení výrobce by se délka navazovaných oligonukleotidových sond měla pohybovat v rozmezí 18–24 nt. Sondy by samozřejmě měly být navrhovány tak, aby obsahovaly jedinečné sekvence bez homologií a repetice, aby se minimalizovala nespecifická hybridizace. Množství navazovaných sond se může pohybovat od 1 do 20 nmol, ale převážná část protokolů používá 1 nmol. Délka hybridizovaných fragmentů by neměla přesáhnout 300 bp a kvůli optimální hybridizaci by měly být sondy navrženy tak, aby byly komplementární k úseku uprostřed fragmentů.

Mikrosféry jsou interně fluorescenčně značeny, přičemž v Luminex systému je k dispozici sto setů (sad) mikrosfér s odlišnou fluorescencí, a to díky smíchání různých poměrů dvou fluorescenčních barev. Každý set mikrosfér má tedy charakteristickou fluorescenci, na základě které je při průchodu lasery identifikován. Tento systém tak umožňuje v rámci jednoho vzorku detekovat 100 různých genů či proteinů. Pro značení testovaných vzorků jsou využívány fluorescenční barvy s emisní vlnovou délkou 560–590 nm. Pevážná část protokolů používá fluorescenční barvu phycoerytrin, neboť poskytuje velmi silný signál, další alternativou jsou barvy Alexa či Cy3. Vlastní analýza mikrosfér, resp. detekce fluorescence, je dvoustupňová. Mikrosféry s navázaným vzorkem protékají detekčním kanálem, skrze který probíhají dva laserové paprsky, a je snímána fluorescence uvnitř mikrosfér (identifikace mikrosfér) a na jejich povrchu (měření fluorescence navázaného vzorku).



**Fig. 2.** Microspheres pass through the detection chamber, the first laser excites dyes in the microsphere for its classification, the second one excites fluorescence associated with binding of a sample on surface of the microsphere.

V rámci každého setu mikrosfér nesoucích určitou sondu je měřeno několik desítek kuliček a výsledná hodnota fluorescence je kalkulována jako průměrná hodnota všech měření v setu (MFI-Mean Fluorescence Intensity).

Hlavní předností čipových metodik je možnost testování velkého počtu genů (lokusů), avšak u řady diagnostických testů stačí detekovat nižší počet genů, které však nemohou být testovány, např. v rámci jedné multiplex PCR. Čipová technologie Luminex je v tomto směru velmi flexibilní, neboť při jednotlivých analýzách umožňuje volný výběr setů mikrosfér, a není tedy nutné testovat všech 100 setů. Navíc u většiny čipů jsou genové jednotky (tzv. spoty) přítomny pouze v duplikátech, zatímco u systému Luminex jsou v rámci jednoho setu analyzovány desítky mikrosfér. Každá mikrosféra v setu tedy představuje jednu jednotku na klasickém čipu a průměrná hodnota určena z většího počtu jednotek je samozřejmě přesnější, což se odráží ve vysoké reprodukovatelnosti této metody.

Podle publikací je technologie Luminex využívána především pro studium proteinů, přičemž převážná část studií a diagnostických testů je zaměřena na detekci cytokinů, které hrají důležitou roli v hematopoezi (5, 6, 7). Kity pro analýzu cytokinů přístrojem Luminex nabízí několik firem, např. BioSource, Qiagen, Clontech. Kromě cytokinů jsou samozřejmě touto technologií studovány také další proteiny, jako jsou růstové faktory, kinázy, hormony, faktory pro angiogenezi, virové a bakteriální proteiny atd. (6). V genomice je technologie LabMAP Luminex využívána hlavně pro detekci SNP polymorfismů (8, 9, 10). Kity pro tuto aplikaci vyrábí firma Marligen, která nabízí sety pro detekci polymorfismů na Y chromosomu a v mitochondriální DNA. Technologie Luminex je také vhodná pro charakterizaci velmi polymorfního HLA systému (11, 12). V této oblasti lze využít kity od firmy One Lambda a Orchid Diagnostics. Firma Luminex také vypracovala protokoly pro detekci mutací v genu pro cystickou fibrózu a faktor V (13). Vývojem detekčních systémů pro mutace se zabývá firma TmBiosciences nabízející v současné době sety pro detekci mutací v genech pro faktory krevního srážení, pro cystickou fibrózu a cytochrom P450. V neposlední řadě byl přístroj Luminex využit pro zjištění přítomnosti patogenů, jakými jsou *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, HIV, hepatida C atd. (14, 15).

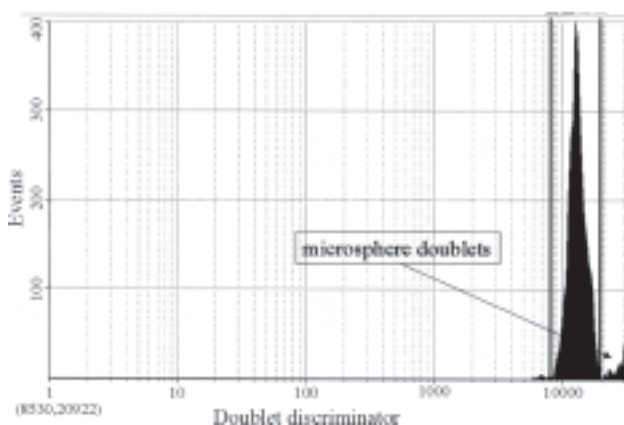
## Signet Y-Chromosome Identification System

Firma Marligen vyvinula kit Signet Y-Chromosome Identification System pro detekci 42 SNP polymorfismů na Y chromosomu, které definují 38 haploskupin představujících hlavní vývojové větve YCC (Y Chromosome Consortium) stromu (16). Polymorfismy jsou rozděleny převážně podle svého výskytu do pěti skupin:

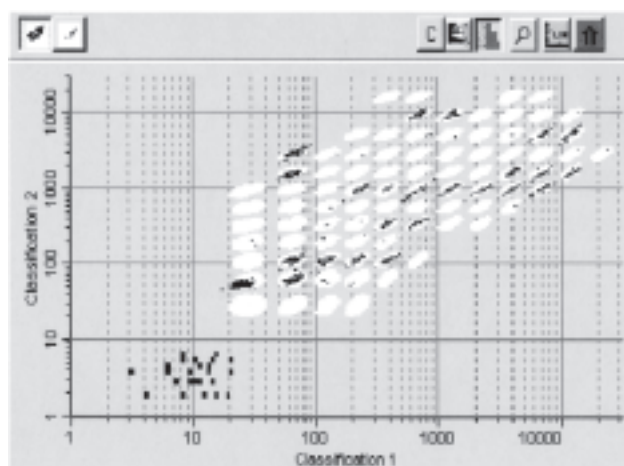
1. První skupina zahrnuje polymorfismy určující základní větvení YCC stromu.
2. Druhá skupina sdružuje SNPs typické zvláště pro africké populace.

3. Třetí skupina – SNPs přímo nevymezují populace konkrétního kontinentu, ale definují sedm velkých haploskupin.
4. Čtvrtá skupina polymorfismů charakterizuje obyvatelstvo Euroasie.
5. Pátá skupina určuje detailní větvení v rámci haploskupiny R, která je bohatě zastoupena v evropském genofondu.

Obecný postup metodiky při využití technologie Luminex zahrnuje amplifikaci studovaných polymorfismů, odstranění nespotřebovaných primerů exonukleázou I, fluorescenční značení PCR produktů, hybridizaci a detekci fluorescence. Hybridizace probíhá pouze 30 minut a obecně, u experimentů využívajících Luminex, se pohybuje v rozmezí 30–120 minut, což je krátká doba ve srovnání s ostatními čipovými metodami, při kterých se vzorky většinou hybridizují přes noc. Taktéž analýza mikrosfér je časově nenáročná, jeden vzorek je zpracován za 30 vteřin, takže analýza 96 vzorků v mikrotitrační destičce vyžaduje necelou hodinu. Během jednoho dne lze tedy provést analýzu více než 2000 vzorků.



**Fig. 3.** Example of a histogram that displays light-scattering properties of the microspheres. The highest peak is bounded by gate lines eliminating particles smaller or larger than a microsphere.



**Fig. 4.** Example of a dot plot that provides information how the analyzed beads (multiplex 2) are hitting with respect to their region (a designated area of fluorescence specific to a particular bead set).

## Materiál a metodika

### Vyšetřené osoby

V rámci studie bylo vyšetřeno 30 mužů z jižních Čech a Moravy (15 mužů z Jindřichova Hradce a 15 mužů z Třebíče). Do souboru byli zařazeni pouze nepřibuzní muži, jejichž otcové pocházeli z dané lokality (neboli narodili se zde, nebyli „přistěhovalci“). Krevní vzorky byly odebrány na místních transfuzních stanicích s informovaným souhlasem dárců a byly anonymizovány. Z periferní krve mužů byla izolována genomická DNA vysolovací metodou podle Millera (17).

### Signet Y-SNP Identification System

Pro detekci SNP polymorfismů byl použit kit Signet Y-SNP Identification System (Marligen). SNP polymorfismy byly rozděleny do 5 multiplex PCR. Každá reakční směs obsahovala 10  $\mu$ l Y-SNP PCR mixu (Marligen), 2U Platinum Taq DNA polymerázy (Invitrogen), 1–8ng DNA a celkový objem 20  $\mu$ l byl doplněn destilovanou vodou. Teplotní podmínky pro PCR byly: 94 °C 5 min; 35 cyklů/94 °C 30 sec, 58 °C 60 sec, 72 °C 60 sec; 72 °C 3 min. Pro odstranění primerů byly PCR produkty inkubovány s exonukleázou I (2U) 30 minut při 37 °C a 20 minut při 80 °C. Následná PCR reakce zahrnovala fluorescenční značení, pro které bylo použito 5  $\mu$ l fluorescenčního mixu (Marligen), 2,5 U Platinum Taq DNA polymerázy, 1  $\mu$ l PCR produktů z předešlé PCR reakce, a destilovaná voda, tak aby výsledný objem byl 25  $\mu$ l. Teplotní podmínky této PCR se oproti první lišily pouze ve dvou bodech: nasedání primerů probíhalo 30 sec při 55 °C a extenze 30 sec při 72 °C. Před hybridizací byly mikrosféry pro příslušný multiplex sonikovány a vortexovány. Do 33,5  $\mu$ l hybridizačního pufru (Marligen) byly přidány 2  $\mu$ l mikrosféry a celá směs byla opět vortexována a sonikována. 20  $\mu$ l fluorescenčně označených PCR produktů bylo inkubováno s 34,5  $\mu$ l blokačního roztoku (Marligen) 4 min při 55 °C; následně byla tato směs přidána do hybridizačního pufru. Hybridizace probíhala 30 min při 55 °C. Pro analýzu mikrosféry byl použit systém Luminex 100™ s parametry doporučenými výrobcem kitu (18).

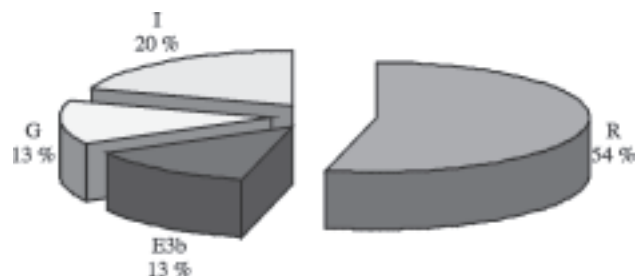
## Výsledky a diskuse

Z celkového počtu 42 testovaných SNPs (bez amelogeninového lokusu) byly zjištěny odlišné frekvence alel mezi vzorky z Jindřichova Hradce a vzorky z Třebíče pouze u 10 SNPs (M45, M89, P25, M207, M35, DYS391, M170, M172, M201, SRY10831). Pro SNP M45 a M207 bylo zastoupení obou alel (původní i odvozené) v relativně stejné frekvenci. Výsledky analýzy v SNPs M42, M94 a M168 ve všech vzorcích poukázaly vždy na přítomnost odvozené alely. Naopak ve zbývajících polymorfních lokusech byla detekována alela původní, tedy ta, která byla ve srovnávacích studiích identifikována v genomech lidopů.

Podle zjištěných kombinací alel jednotlivých SNPs je možné určit příslušné haploskupiny. Ve vzorcích z Jindřichova Hradce byly detekovány 4 různé haplosku-

piny: E3b, G, I a R. Y chromosomy z Třebíče byly naopak rozděleny do 6 haploskupin: E3b, F\* či K\* (nejsme schopni na základě testovaných polymorfismů rozlišit tyto dvě haploskupiny), G, I, J2 a R. V obou sledovaných skupinách byla vždy dominantně zastoupena haploskupina R.

### Y SNP haplogroups – Jindřichův Hradec



### Y SNP haplogroups – Třebíč

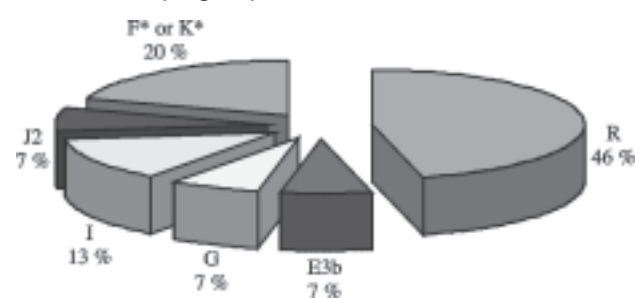


Fig. 5. Y-SNP haplogroup frequencies in 15 samples from Jindřichův Hradec and 15 samples from Třebíč.

Haploskupina E3b (určena polymorfismem M35) má svůj původ pravděpodobně na Blízkém východě, odkud se prostřednictvím neolitické expanze rozšířila do oblasti Středomoří. V současné době je zastoupena nejen v jižní Evropě, ale také v severní a východní Africe. Haploskupina G (definovaná polymorfismem M201) vznikla pravděpodobně v Indii či Pákistánu před 30 000 lety, odtud se rozšířila do střední Asie, na Blízký východ a společně se zemědělstvím také do Evropy. Vznik haploskupiny I (vymezena polymorfismem M170) je datován do období paleolitu okolo 22 000 let př. n. l. v oblasti Blízkého východu. Její disperze je dávana do souvislosti s rozšířením gravettienské kultury do Evropy. Haploskupina J2 (určena polymorfismem M172) pochází z oblasti označované jako „Úrodný půlměsíc“ (území od Iránu po Jordánsko), odtud expandovala do střední Asie, Indie a do Středomoří. Haploskupina R (definovaná polymorfismem M207) je typická pro Evropu a severozápadní Asii, větví se dále na 2 hlavní linie: R1a a R1b. Právě druhá jmenovaná je nejvíce zastoupena v evropských populacích, které ji do svého genofondu přijaly pravděpodobně v průběhu rekolonizace po skončení poslední doby ledové (tedy asi před 10–12 tisíci lety).

Známa mutační rychlost, rozsáhlé studie SNPs i STRs v NRY oblasti umožnily pro mnohé haploskupiny získat informace o jejich stáří, mateřské linii a dceřiných liniích. Názorně tyto vztahy vyjadřuje vývojový YCC strom. Získaná genetická data bývají posléze porovnávána s historickými a archeologickými prameny.

Výsledky obou oborů se někdy přesně shodují, avšak v některých případech vnáší do zdánlivě vyřešených problémů nové otázky.

Vzhledem k nízkému počtu nejsou získané výsledky dostatečně reprezentativní, a proto stávající dva soubory budou rozšířeny o další jedince na celkový počet 50 a budou doplněny vzorky z dalších čtyř lokalit – Klattovy, Písek, Hodonín, Vsetín. Získaná data budou statisticky zpracována a bude stanovena míra populační variability studovaných SNPs, resp. jednotlivých haploskupin.

Poděkování: Autoři děkují transfuzním stanicím v Jindřichově Hradci a Třebíči za poskytnutí krevních vzorků.

## Literatura

1. **Shastri, B. S.** SNP alleles in human disease and evolution. *J. Hum. Genet.*, 2002, 47, p. 561–566.
2. **Seielstad, M. T., Minch, E., Cavalli-Sforza, L. L.** Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nat. Genet.*, 1998, 20, p. 278–280.
3. **Jobling, M. A.** Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Science International*, 2001, 118, p. 158–162.
4. www.luminexcorp.com
5. **Carson, R. T., Vignali, D. A. A.** Simultaneous quantitation of fifteen cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J. Immunol. Methods*, 227, 1999, p. 41–52.
6. **Vignali, D. A. A.** Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J. Immunol. Methods*, 2000, 243, p. 243–255.
7. **Oliver, K. G., Kettman, J. R., Fulton, R. J.:** Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clin. Chem.*, 1998, 44, p. 2057–2060.
8. **Taylor, J. D., Briley, D., Nguyen, Q., Long, K., Iannone, M. A. et al.** Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *Biotechniques*, 2001, 30, p. 661–669.
9. **Chen, J., Iannone, M. A., Li, M. S., Taylor, D., Rivers, P. et al.** A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Res.*, 2000, 10, p. 549–557.
10. **Ye, F., Li, M. S., Taylor, J. D., Nguyen, Q., Colton, H. M., et al.** Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum. Mutat.*, 2001, 17, p. 305–316.
11. **Lobashevsky, A., Senkbeil, R., Townsend, J., Shoaf, J. et al.** HLA-A,B,DR loci molecular typing using fluorescence PCR-SSO luminex methodology. *Hum. Immunol.*, 2002, 63, p. S91.
12. **Osada, M., D'Ambrose, M., Balazs, I.** Validation studies on the use of SSOP DNA typing of HLA-C alleles with the luminex flow cytometer. *Hum. Immunol.*, 2002, 63, p. S39.
13. **Dunbar, S. A., Jacobson, J. W.** Application of the luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study. *Clin. Chem.*, 2000, 46, p. 1498–1500.
14. **Dunbar, S. A., Vander, Z. C., Oliver, K. G., Karem, K. L. et al.** Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 53, p. 245–252.
15. **Smith, P. L., WalkerPeach, C. R., Fulton, R. J., DuBois, D. B.** A rapid, sensitive, multiplexed assay for detection of viral nucleic acids using the FlowMetrix system. *Clin. Chem.*, 1998, 44, p. 2054–2056.
16. Y Chromosome Consortium. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.*, 2002, 12, p. 339–348.
17. **Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F.:** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16, p. 1215.

Podpořeno výzkumným záměrem CEZ:L33/98:237360001 MZ ČR.

Redakci předáno 24. 2. 2005.

Adresa pro korespondenci:  
RNDr. Hana Bruchová, Ph.D.  
Ústav hematologie a krevní transfuze  
U Nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
e-mail: hana.bruchova@uhkt.cz