

Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění

Gojová L., Kozák L.

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Fakultní nemocnice Brno

SOUHRN

Poznání sekvence celého lidského genomu v roce 2001 rozšířilo možnosti uplatnění molekulární biologie v klinické praxi. Neustále jsou objevovány další a další geny, jejichž mutované formy jsou příčinou nejrůznějších onemocnění. V oblasti diagnostiky si molekulární biologie klade za cíl správně a přesně detekovat mutace v genech u pacientů s výskytem příslušné dědičné choroby; potvrdit či vyvrátit diagnózu pacienta stanovenou lékařem na klinické nebo biochemické úrovni; odhalit včas onemocnění u jedinců, kteří zatím nemají příznaky choroby; získat přehled o výskytu mutantních alel u rodinných příslušníků pacienta; provádět prenatální testování u matek s podezřením na postižení plodu apod. U onkologických pacientů lze také pomocí DNA či RNA analýzy sledovat průběh onemocnění a účinnost léčby. Současné metody molekulární biologie pro detekci mutací v genech jsou časově zdouhavé a materiálově nákladné. V posledních letech se proto odborníci zaměřili na zavádění nových efektivních technologií na bázi DNA čipů (microarrays). DNA čipy umožní analyzovat široké spektrum mutací a polymorfismů v různých genech způsobujících dědičná onemocnění v rámci jediné analýzy a představují tak jednu z možností jak urychlit DNA diagnostiku a snížit její ekonomickou nákladnost.

Klíčová slova: DNA čip, microarray, dědičná onemocnění, molekulární diagnostika.

SUMMARY

Gojová L., Kozák L.: Potency of application of DNA microarrays in molecular diagnostics of inherited diseases

The knowledge of the sequence of the entire human genome in 2001 brought new possibilities for molecular biology in clinical medicine. More and more genes, whose mutated functionless forms cause various diseases, are found every day. The aim of molecular biology for diagnostics purpose is to detect correctly and accurately the mutations in genes of patients suffering with high risk disease; to confirm or to refute the diagnosis of patients defined by doctors on the clinical or biochemical level; to reveal the disease in individuals who do not have any symptoms yet because they are at an early stage; to obtain knowledge about occurrence of mutant alleles in parents and siblings of patients and to make prenatal diagnosis of pregnant women with suspicion of duplicitas. The development of cancer and the effectiveness of its treatment can be detected on DNA or RNA level too. Present molecular genetics methods for the detection of mutations in genes are time and material consuming. That is why scientists focus on the new useful technologies based on DNA microarrays in the last years. The DNA microarrays allow to analyse whole spectrum of mutations and polymorphisms in various genes that cause hereditary diseases all at once. Thus, the DNA microarrays represent the possibility to speed up the analyses and lower its economical expensiveness.

Key words: DNA chip, microarray, inherited diseases, molecular diagnostics.

Postavení molekulární biologie v medicíně

Molekulárně biologická vyšetření mají v dnešní medicíně již nepostradatelnou úlohu. Napomáhají lékařům určit diagnózu pacienta v mnoha medicínských oborech – pediatrii, interním lékařství, neurologii, imunologii, onkologii, v infekčním lékařství, gynekologii apod.

Vyšetřovaným materiálem při molekulárně genetických analýzách je DNA či mRNA pacienta izolovaná nejčastěji z periferní krve (leukocytů), z tkáně po biopsii, plodové vody nebo lidských sekretů (nazofaryngeální stěr, bronchoalveolární tekutina apod.). Odhaduje se, že lidský genom je tvořen až 35 000 geny. Většina z nich kóduje genetickou informaci o struktuře určitého peptidu či proteinu, který plní v organismu jedinečnou funkci a dohromady s ostatními makromolekulami tvoří fungující celek. Chybí-li nějaký kódující gen, nebo je-li poškozen (mutován), může to mít za následek určitou různě se projevující indispozici jedince. Nemoci, které vznikají z důvodu poškození sekvence určitého genu nebo genů a přenášejí se z generace na generaci, ozna-

čujeme jako dědičné. Prostřednictvím molekulárně genetických metod lze ze vzorku DNA a mRNA pacienta spolehlivě detekovat změny v genech a také genovou expresi, která může být v různých buňkách a tkáních těla odlišná a může se lišit také v závislosti na fyziologických podmínkách organismu.

V jakých případech tedy lékaři nejčastěji využívají molekulárně genetických vyšetření? Je to u jedinců, v jejichž rodině se vyskytlo jednou či opakovaně dědičné onemocnění. U takových rodin je důležité zjistit, kdo z jejich příslušníků je skrytým přenašečem defektního genu způsobujícího onemocnění (je heterozygot pro recesivní mutaci) a jaké je riziko přenosu defektního genu na potomstvo. Molekulárně genetické vyšetření požadují lékaři také u pacientů, u nichž chtějí potvrdit diagnózu onemocnění indikovanou na základě biochemického vyšetření a fenotypového projevu. U některých dědičných onemocnění je nutné znát přesný typ mutace vyřazující daný gen a následně příslušný protein z funkce, aby se zjistilo, proč se daný gen neexprimuje či se exprimuje abnormálně a na tomto základě byla zahájena příslušná terapie pacienta. Další skupi-

nou běžně prováděných molekulárně genetických analýz jsou vyšetření prenatalní. Ta lékař požaduje v případě patologických biochemických testů prováděných z periferní krve těhotné ženy, na základě růstových abnormalit plodu zjištěných při ultrazvuku či v případě zvýšeného rizika výskytu určité dědičné choroby u plodu. V neposlední řadě se molekulárně genetická analýza používá pro stanovení a průkaz maligních buněčných klonů, patogenních virů, bakterií a hub, což má nesmírný význam pro zahájení specifické léčby.

Molekulárně genetické metody užívané při diagnostice dědičných onemocnění

Pro diagnostiku dědičných onemocnění se v současnosti využívá různých variant klasických metod molekulární biologie. Ve vzorku pacienta se nejprve analyzují mutace vyšetřovaného genu, které se v populaci vyskytují nejčastěji. Tento přístup zahrnuje amplifikaci úseků genu prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (PCR), následné restriční štěpení PCR produktů vhodným enzymem rozeznávajícím změny v nukleotidové sekvenci a detekci výsledků štěpení elektroforézou na agarózovém gelu (metoda PCR/RFLP nebo ACRS). Pro vyhledávání méně častých bodových mutací v sekvenci DNA se používají metody založené na tvorbě tzv. heteroduplexů. Patří mezi ně denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), teplotní gradientová gelová elektroforéza (TTGE), či denaturační vysokoúčinná kapalinná chromatografie (DHPLC). Princip heteroduplexních analýz je založen na prosté denaturaci a renaturaci komplementárních vláken DNA získaných od heterozygotů s jednou normální a druhou mutantní alelou (obr. 1). Vytvořené homoduplexy a heteroduplexy jsou separovány v prostředí rostoucího denaturačního činidla (např. močovina + formamid). Heteroduplexy, které nejsou stoprocentně komplementární, denaturují rychleji než homoduplexy a jejich průchod gelem se zpomaluje. Fragменты o stejné velikosti tak mohou být separovány na základě odlišné migrace. Detekce více než jednoho fragmentu znamená přítomnost nukleotidové záměny v analyzovaném DNA úseku. V případě, že ve vzorku pacien-

ta nebyla nalezena mutace výše uvedenými postupy, je nutné sekvenovat celý gen. Sekvence vyšetřovaného genu se provádí na automatických sekvenátorech (obr. 2), nicméně příprava vzorku i samotná analýza je časově velmi zdlouhavá a spotřeba laboratorního materiálu je značná.



Fig. 2. CEQ™ 8000 Genetic Analysis System fy. Beckman Coulter

DNA čipy

Ve druhé polovině 90. letech minulého století se v oblasti molekulární biologie a genetiky začala uplatňovat myšlenka miniaturizace a automatizace analýz, která vyústila ve vývoj DNA čipů – neboli microarrays. DNA mikročipy mohou být efektivně využity pro detekci mutací a polymorfismů, sekvenační analýzy či studie genové exprese [1]. Široké uplatnění mohou najít v molekulárně genetických laboratořích a klinickém výzkumu, kde by mohly nahradit drahé a složité přístroje. Princip techniky DNA čipů spočívá v hybridizační reakci mezi vzorkem DNA a sekvenčně specifickými DNA sondami, které jsou navázány na povrchu čipu (obr. 3 a 4). Na čipu může být imobilizováno až několik stovek tisíců sond specifických vůči různým úsekům DNA, což umožní např. analyzovat široké spektrum mutací v genech způsobujících dědičná onemocnění najednou. Microarrays tak představují jednu z možností, jak urychlit DNA analýzu a snížit její ekonomickou nákladnost.

Podle využití čipové analýzy a podle typu imobilizovaných sond na povrchu čipu lze rozdělit DNA microarrays do dvou skupin. Tzv. expresní čipy obsahují jako sondy buď dvouřetězcové úseky molekul cDNA (komplementární DNA) vzniklé reverzní transkripcí mRNA, nebo oligonukleotidové sondy sekvenčně specifické pro každý gen z genomu. Uplatňují se především v onkologické problematice při porovnávání exprese různých genů u nádorových buněk [2]. Aplikace expresních čipů již do značné míry pokročila a v posledním období exponenciálně narůstá počet vědeckých prací, které tuto technologii využívají. Pro diagnostiku monogenních dědičných onemocnění, jsou vhodné tzv. mutačně specifické oligonukleotidové čipy. V tomto případě tvoří imobilizované sondy uměle syntetizované oligonukleotidy o délce 25–70 bp, jejichž sekvence po-

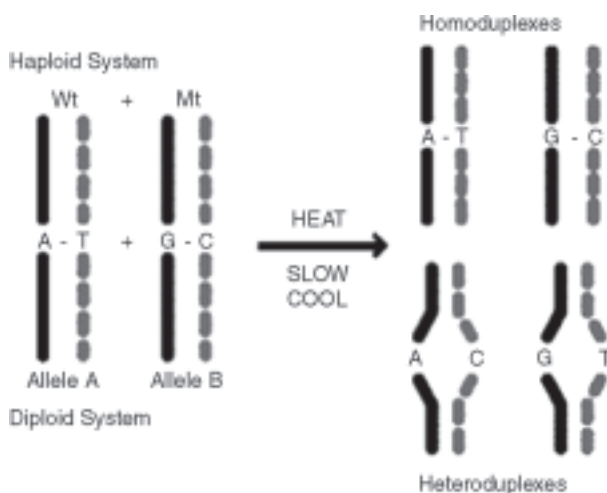


Fig. 1. Principle of heteroduplex analysis

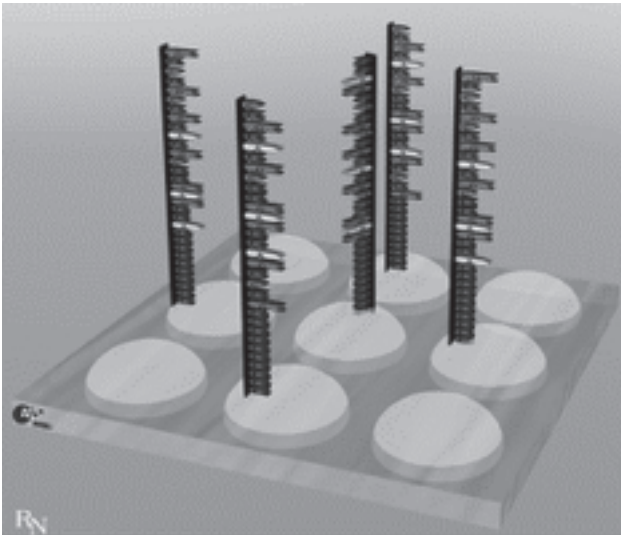


Fig. 3. DNA oligonucleotides immobilized on chip

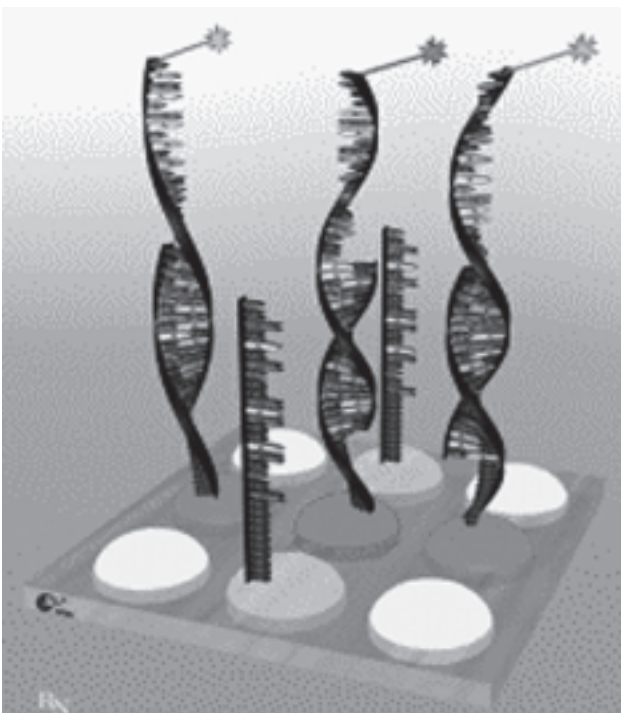


Fig. 4. Hybridization of labeled DNA with immobilized oligonucleotides

cháží z jednoho nebo omezeného počtu analyzovaných genů. Jsou navrhovány počítačovým softwarem tak, aby byly komplementární k normálním či mutantním sekvencím DNA, které mají být čipem analyzovány. Důležitou podmínkou je, aby měly podobné parametry pro hybridizaci. Takovéto oligonukleotidové čipy mohou sloužit k vyhledávání konkrétních mutací a polymorfismů genů i ke „čtení“ celých sekvencí (resequencing).

DNA čipy se zhotovují z materiálů, které mají optimální vlastnosti pro snadnou imobilizaci DNA sond a vlastní hybridizaci. Nejčastěji používaným materiálem pro konstrukci DNA čipů je sklo, jehož povrch je speciálně upraven (obr. 5 a 6). Mikroskopická sklíčka (25 x 75 mm) jsou ošetřena hydrofobními polymery (např. poly-L-lysinem nebo aminosilanem) a DNA son-

dy mohou být modifikovány na 5'koncích aminoskupinou, jejímž prostřednictvím dochází k vazbě. Při imobilizaci sond na povrchu čipu se uplatňují dva rozdílné přístupy. První spočívá v přímé syntéze oligonukleotidových sond na čipu – *in situ*. Zástupcem této skupiny čipů jsou GeneChipy komerčně vyráběné firmou Affymetrix fotolitografickou technikou a Oligo-čipy firmy Agilent a Rosetta vzniklé technologií „ink-jet printing“ s využitím fosforamidátové chemie. Výhodou těchto metod je dosažení vysoké hustoty nanosení každého z oligonukleotidů na čip v řádu desítek mikrometrů. Druhý přístup zahrnuje nanášení oligonukleotidových sond na

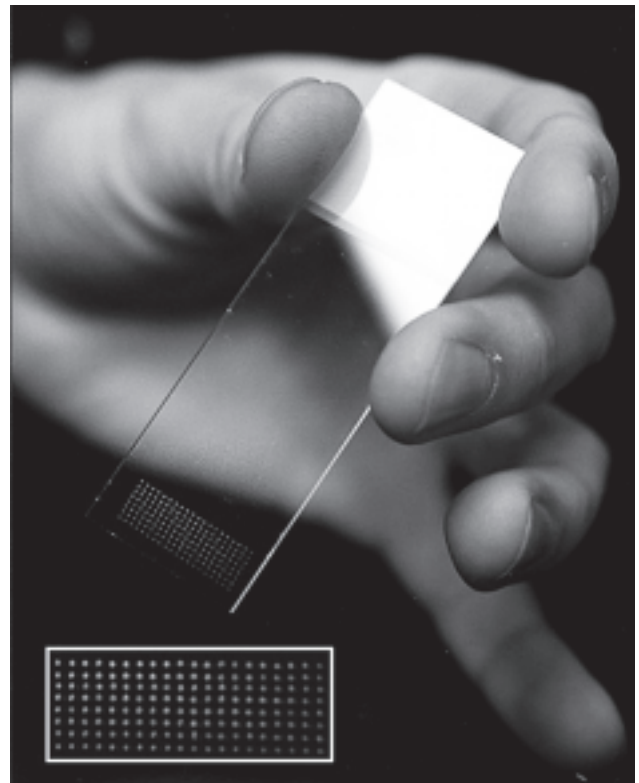


Fig. 5. DNA microarrays

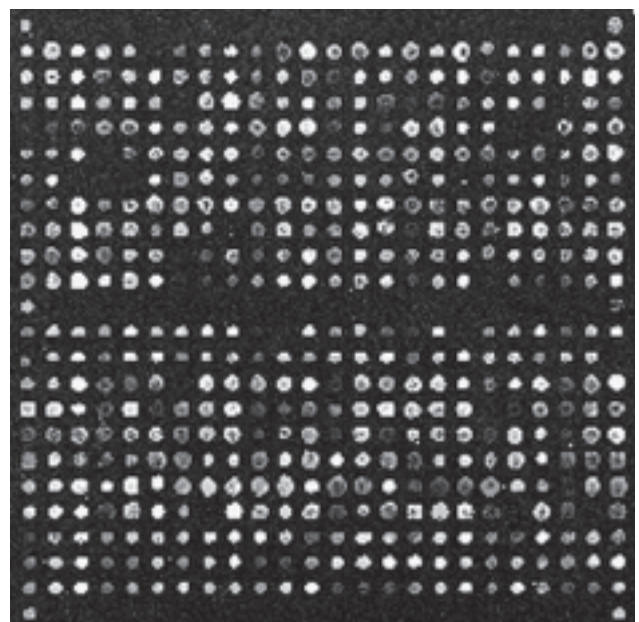


Fig. 6. DNA microarrays – detail

čip ve formě roztoku tzv. spotování. Sondy jsou nasávány do speciálních, velmi tenkých jehel (až 48 vzorků současně), přeneseny a „natištěny“ na povrch čipu přístrojem zvaným spotter.

Metody detekce mutací na DNA čípech

Pro detekci mutací DNA čipy slouží jako výchozí biologický materiál genomová DNA izolovaná z krve. Úseky vzorků DNA určené k analýze jsou amplifikovány běžnými metodami PCR a před hybridizací nebo po hybridizaci na čipu musí být vhodně naznačeny.

Nejstarší a dnes již překonanou metodou značení DNA při čipové analýze je inkorporace radioaktivních značek. V některých případech se můžeme setkat s použitím systému streptavidin-biotin, využívaným např. pro detekci mutací u β -thalasémie a HLA-DQA genotypování [3]. U této metody jsou vzorky DNA určené k testování amplifikovány za použití primerů značených biotinem. Po hybridizaci amplikonů s imobilizovanými sondami je do systému přidán streptavidin s navázanou peroxidázou a chromogenní enzymový substrát. Pozitivní výsledek hybridizace je přímo úměrný vzniklé kolorimetrické reakci. V současné době je u DNA čipů zcela převládajícím přístupem fluorescenční značení. Fluorescenční značka může být do vzorků DNA, určených

k analýze, zabudována přímo či nepřímo. Přímé značení znamená inkorporování fluorescenčně značeného nukleotidu do nukleové kyseliny (amplikonu) při amplifikační reakci před hybridizací na čipu (obr. 7a). V případě nepřímého značení se do nukleové kyseliny v průběhu amplifikace inkorporuje nukleotid obsahující specifickou značku – většinou aminoallylovou skupinu – a až následně po hybridizaci na čipu se na tuto značku naváže fluorescenční barvička. Tato technika značení je přesnější pro srovnávání výsledků různých vzorků, neboť při ní nevznikají chyby nestejnou inkorporací fluoroforů do DNA. Další možností je zabudování fluorescenční značky až po hybridizaci PCR produktů (tzv. prodlužování DNA sond), což je případ metody APEX nebo alelově specifické hybridizace (obr. 7b). Nejčastěji užívané fluorescenční barvy jsou zelený cyanin (Cy3), červený cyanin (Cy5) a barvy Alexa s podobnou vlnovou délkou. Světelný signál je snímán fluorescenčním skenerem a vyhodnocen. Vzhledem k vysokému počtu DNA sond na malé ploše čipu musí být pro fluorescenční analýzu použit vysoce přesný skener s rozlišovací schopností 5–10 μm .

Téměř všechny současné aplikace DNA microarrays pro detekci mutací a polymorfismů (SNP) jsou oligonukleotidového formátu. Uplatňuje se při nich několik rozdílných přístupů k hybridizaci, značení a hodnocení výsledku (obr. 8).

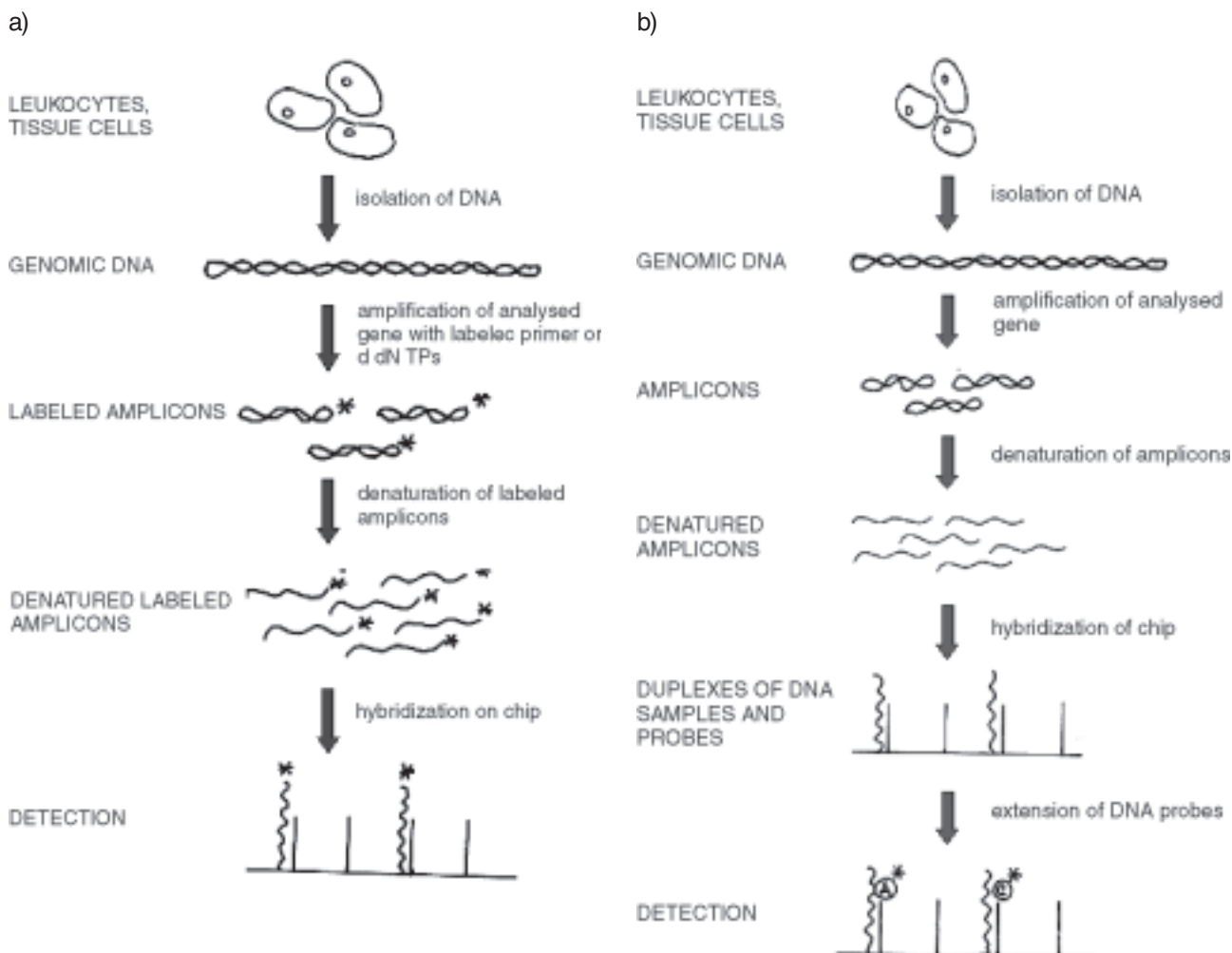


Fig. 7a, b. Preparation of DNA samples for microarray analysis

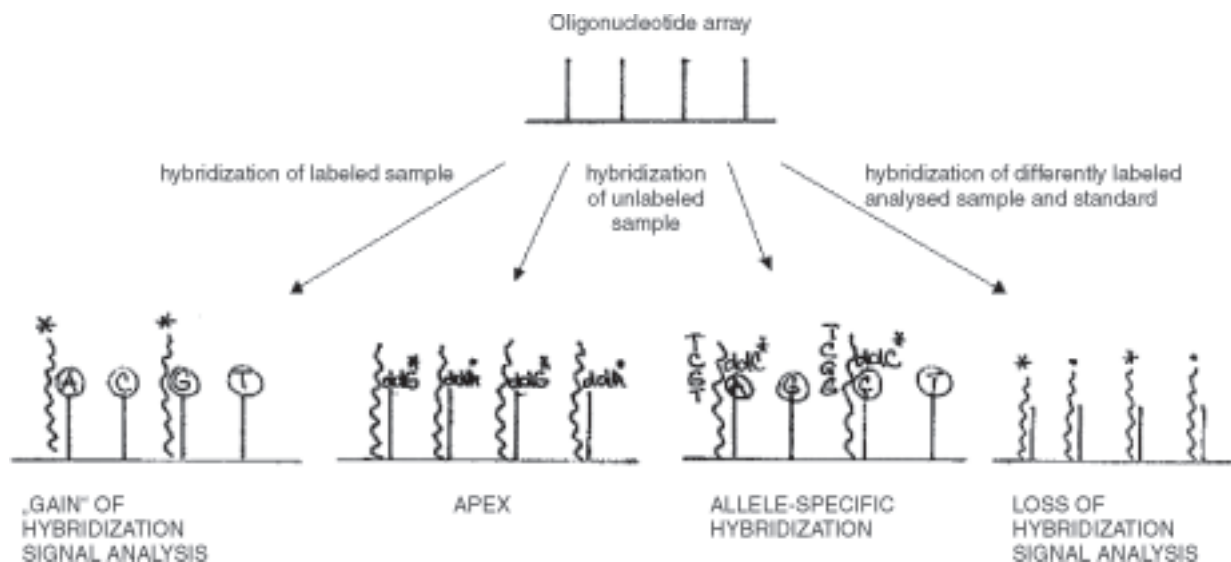


Fig. 8. Methods for detection of mutations on DNA microarrays

1. Metoda měření „nárůstu signálu“

Pro účely vyhledávání mutací v sekvenci DNA se porovnávají fluorescenční signály z hybridizačních reakcí sond komplementárních k mutované či normální sekvenci. Tímto způsobem mohou být detekovány pouze takové mutace v DNA, které mají na čipu imobilizovanou svou komplementární sondu. Pokud chceme sledovat všechny možné jednonukleotidové záměny (substituce), které mohou být přítomny v úseku DNA, který nás zajímá, je nutné navrhnout a na čip imobilizovat 8N sond (2 x 4N sond komplementárních k jednomu ze čtyř nukleotidů, které mohou být v mutačním místě). Podobně se uvažuje při navrhování DNA sond pro skenování všech delecí o různém počtu nukleotidů. Oligonukleotidové microarrays pro vyhledávání všech možných inzercí v daném úseku testované DNA se z důvodu přílišné složitosti nevyužívají.

2. Metoda měření „poklesu signálu“

Sekvenční rozdíly mezi testovaným a referenčním vzorkem lze analyzovat také prostřednictvím měření kvantity poklesu signálu. Homozygotní změna v sekvenci vzorku DNA zapříčiní úplné vymizení fluorescenčního signálu na čipu v místě DNA sond komplementárních k normální sekvenci a poloviční pokles signálu u vzorku s heterozygotní změnou v sekvenci. Citlivost a přesnost tohoto přístupu lze zvýšit použitím dvoubarevných microarrays, kde referenční a testovaný vzorek jsou označeny jinou fluorescenční barvičkou.

Předchozí dva přístupy fluorescenční detekce mutací v DNA byly neenzymové. V dalších metodách se využívá polymerázová řetězová reakce prováděná přímo na čipu na principu minisekvenování.

3. Metoda APEX (arrayed primer extension)

Tato metodika je vhodná pro konstrukci čipů určených k vyhledávání známých bodových mutací (substitucí, delecí i inzercí) v genech [4]. DNA sondy určené k imobilizaci na čip musí být navrženy tak, aby byly komplementární k úseku sledovaného genu a jejich volný

3'OH konec byl v sousedství očekávaného mutantního nukleotidu v sekvenci analyzované DNA. Po proběhnutí hybridizační reakce mezi vzorkem DNA a sondami jsou na čip aplikovány DNA polymeráza a ddNTPs (tj. ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP, každý značený jinou fluorescenční barvičkou). Enzym připojí na 3'OH volnou skupinu imobilizovaných oligonukleotidů – jeden značený ddNTP komplementárně podle vlákna analyzované DNA (místo mutace). Podle toho, který ze čtyř ddNTPs je inkorporován do DNA sondy, lze usoudit, zda se ve sledovaném úseku genu nachází bodová mutace či nikoliv. Výhodou této metody je, že pro detekci konkrétní bodové mutace stačí jedna imobilizovaná sonda. Nutnou podmínkou je však microarray skener se čtyřmi odlišnými lasery pro detekci čtyř různých fluorescenčních spekter.

4. Metoda alelově specifické hybridizace (resequencing)

Také tato metoda slouží k vyhledávání nukleotidových změn v DNA [5–7]. Na rozdíl od metody APEX je pro detekci jedné mutace zapotřebí imobilizovat na čip 4 různé oligonukleotidové sondy lišící se typem dNTP na 3'OH konci, které je místem předpokládané bodové změny v DNA. Do reakce se přidá DNA polymeráza a značené ddNTPs. Výsledek je takový, že v případě homozygota se bude prodlužovat o jeden značený ddNTP pouze jedna ze sond přesně komplementární k analyzované DNA, v případě heterozygota dvě sondy.

Příklady současných výzkumných aplikací DNA microarrays

Počet nově objevených nukleotidových změn v různých genech rapidně narůstá. Tyto změny jsou spojené s genetickými chorobami, predispozicemi k onemocněním, rakovinou, vznikem lékové rezistence u mikroorganismů apod. U mnoha genů sledovaných v souvislosti s dědičnými onemocněními byla vypracována komplexní mutační spektra – tzn. byly zaznamenány všechny dosud objevené mutace v daném genu a četnost jejich výskytu v populaci.

BRCA1 je gen související s dědičnou formou rakoviny prsu a vaječníku, u kterého bylo identifikováno více než 400 různých mutací. Byly zkonstruovány DNA microarrays, které umožňují detekovat sekvenční změny v 3.45 kpb dlouhém exonu 11 u homozygotních i heterozygotních vzorků. Nejnovější navržený čip obsahuje 96 000 imobilizovaných oligonukleotidů, které zachytí jakoukoliv změnu sekvence v celém exonu [8]. Oligonukleotidové mikročipy byly navrženy také pro screening 200 známých mutací genu *CFTR*, což je gen související s cystickou fibrózou [9]. Ve virologii se testují DNA čipy, které umožňují analyzovat všechny možné jednonukleotidové substituce ve 297 pb dlouhém genu kódujícím HIV-1 proteázu. Výsledky získané jejich prostřednictvím se v 98 % shodují s výsledky klasického sekvenování [10]. Publikovány byly již také výsledky použití DNA microarrays pro vyhledávání mutací v 705 pb dlouhém segmentu genu *proB* z *Mycobacterium tuberculosis*. Mutace v tomto genu jsou dávány do souvislosti se vznikem rezistence na rifampicin [11]. Oligonukleotidové čipy byly navrženy i pro screening všech heterozygotních mutací v 9.17 kpb dlouhé kódující oblasti genu *ATM*, které jsou spojené se vznikem *ataxia telangiectasia*. V tomto případě bylo technikou microarrays detekováno pět sekvenčních změn, které nebyly jinými metodami zaznamenány. APEX mikročipy byly vyvinuty pro sekvenční analýzy tumorového supresorového genu *TP53* [12]. Pro analýzu nejčastěji se vyskytujících mutací v genu pro β -globin hemoglobinu projevujících se jako onemocnění β -thalasémií byly již oligonukleotidové DNA čipy také vyzkoušeny [13–14].

Výhled do budoucna

DNA čipy slibují na poli medicíny obrovský pokrok. Jsou vyráběny již řadou biotechnologických firem (např. Affymetrix, Agilent aj.), ovšem zatím pouze pro výzkumné účely v oblasti mRNA expresních studií. S první diagnostickou aplikací přišla firma Roche, která uvedla na trh pro účely farmakogenetiky AmpliChip CYP450 pro detekci mutací a polymorfismů ve dvou genech (*CAP2D6* a *CAP2C19*). Širší uvedení čipové technologie do klinické praxe je otázkou nedaleké budoucnosti. Před úspěšným zavedením jakékoliv nové technologie musí být provedeno mnoho testů týkajících se přesnosti, správnosti, citlivosti nové metody a musí být prokázáno, že je jednoznačně výhodnější a přínosnější než stávající technologie.

DNA čipy mohou být efektivně využity pro molekulárně genetickou diagnostiku dědičných onemocnění. Jejich prostřednictvím bude možné analyzovat velké množství vzorků DNA pacientů pro široké spektrum mutací v genech, což představuje obrovské zrychlení analýz a snížení ekonomické nákladnosti. Velkým přínosem budou také pro mikrobiologii, virologii a imunologii z hlediska usnadnění diagnostiky patogenů. Včasná detekce patogenních mikroorganismů (během několika hodin) může mít životně důležitý význam u pacientů s oslabenou imunitou podstupující onkologickou terapii nebo posttransplantační léčbu. Speciální uplatnění mo-

hou DNA microarrays nalézt v onkologii při určení správné diagnózy, typu nádoru (např. rozlišit mezi různými typy leukémií), na jehož základě bude možné nasadit efektivní léčbu s minimálními vedlejšími účinky. Prostřednictvím expresních čipů mohou být vyhledávány a sledovány včasné markery onemocnění. Microarrays umožní porovnávat DNA a expresi genů ve zdravé tkáni, v tkáni nemocné a v tkáni po léčebné terapii.

Velký význam bude mít využití DNA čipů také ve farmacii. Microarrays představují možnost urychlení vývoje nových léčiv. Mohou sloužit k rychlému vyhledávání potenciálních cílů terapie (genů, proteinů) a testování všech dostupných látek, které by mohly vybrané cílové molekuly ovlivňovat. Další výhodou mikročipů je obrovské snížení nákladů na vývoj léčebných preparátů a možnost produkce specifických léků pro malé skupiny pacientů.

Je pochopitelné, že každá metoda či technologie má své nevýhody a těžkosti. Microarrays nejsou výjimkou. Úskalím techniky DNA čipů je samotná hybridizační reakce mezi DNA sondami imobilizovanými na čipu a vzorkem DNA. Podmínky hybridizační reakce (teplota, iontová síla prostředí) musí být nastaveny tak, aby docházelo k hybridizaci pouze 100% komplementárních vláken DNA vzorku se sondami. Jen tak mohou microarrays poskytovat spolehlivé výsledky. Reakční podmínky musí být optimalizovány pro každý jednotlivý typ čipu. DNA čipy nejsou příliš vhodné pro detekci inzerčních a delečních mutací v genech kvůli přílišné složitosti navrhovaných DNA sond. Pro některé sekvence genomové DNA může být obtížné navrhnout vhodnou komplementární DNA sondu tak, aby netvořila intermolekulární vlásenky apod. I přes tyto nevýhody mají microarrays pro klinickou praxi nesporný význam.

S potěšením lze konstatovat, že technologie DNA čipů se začíná pozvolna rozvíjet také v České republice. Vývojem a aplikací této nové oblasti molekulární genetiky se zabývá již několik pracovišť Akademie věd ČR, univerzitních ústavů i výzkumných center fakultních nemocnic. Držme jim palce.

Literatura

1. **Bottwell, D., Sambrook, J.** *DNA Microarray – A Molecular Cloning Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor : New York 2002, p. 1–712.
2. **Pospíšilová, Š., Mayer, J.** DNA čipy – moderní metodika analýzy diferenciální genové exprese a její význam pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění. *Čas. Lék. čes.*, 2005, 144, p. 11–17.
3. **Saiki, K. R., Walsh, S., Levenson, H. C., Erlich, A. H.** Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, 86, p. 6230–6234.
4. **Kurg, A., Tonisson, N., Georgiou, I., Shumaker, J., Tollett, J., Metspalu, A.** Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet. Test.*, 2000, 4, 1, p. 1–7.
5. **Hacia, G. J.** Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat. Gen.*, 1999, Suppl. 21, p. 42–47.

6. **Pastinen, T., Raitio, M., Lindroos, K., Tainola, P., Peltonen, L., Syvänen, A. Ch.** A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Gen. Res.*, 2000, 10, p. 1031–1042.
7. **Karaman, W. M., Groshen, S., Lee, Ch., Pike, B. L., Hacia, G. J.** Comparisons of substitution, insertion and deletion probes for resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33, 3, p. 33.
8. **Hacia, J. G., Brody, L. C., Chee, M. S., Fodor, S. P. A., Collins, F. S.** Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat. Gen.*, 1996, 14, p. 441–447.
9. **Schrijver, I., Oitmaa, E., Metspalu, A., Gardner, P.** Genotyping microarray for the detection of more than 200 CFTR mutations in ethnically diverse populations. *J. Mol. Diagn.*, 2005, 7, p. 375–387.
10. **Kozal, M. J., Shah, N., Shen, N.** Extensive polymorphisms observed in HIV-1 cladeB protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Med.*, 1996, 2, p. 753–759.
11. **Gingeras, T. R., Ghandour, G., Wang, E.** Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic Mycobacterium DNA arrays. *Gen. Res.*, 1998, 181, p. 435–448.
12. **Tönisson, N., Zernant, J., Kurg, A. et al.** Evaluating the arrayed primer extension resequencing assay of TP53 tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, 99, p. 5503–5508.
13. **Drobyshev, A., Mologina, N., Shik, V., Pobedimskaya, D., Yershov, G., Mirzabekov, A.** Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip: identification of β -thalassemia mutations. *Gene*, 1997, 188, p. 45–52.
14. **Gemignani, F., Perra, C., Landi, S. et al.** Reliable detection of beta-thalassemia and G6PD mutations by a DNA microarray. *Clin. Chem.*, 2002, 48, 11, p. 2051–2054.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR reg. č. NR 8451–3/2005.

Do redakce došlo 15. 3. 2006.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Lucie Gojová

Centrum molekulární biologie a genové terapie

Fakultní nemocnice Brno

Černopolská 9

625 00 Brno

e-mail: LucieGojova@seznam.cz

studijní texty

TRESTNÍ PRÁVO A ZDRAVOTNICTVÍ

Dagmar Císařová, Olga Sovová a kol.

druhé, upravené
a doplněné vydání

LexisNexis
Nakladatelství Orac

Nová učební pomůcka z nakladatelství LexisNexis CZ je podstatně přepracovaným a zcela aktualizovaným druhým vydáním populární publikace.

A5, 144 stran, 200 Kč

 LexisNexis CZ s. r. o.

LexisNexis CZ s. r. o.,
Limuzská 2110/8, 100 00 Praha 10
tel.: 274 013 268, fax: 274 013 256
e-mail: obchod@lexisnexus.cz,
www.lexisnexus.cz