

Využití celogenomové amplifikace pro čipové technologie

Bystrická D.¹, Zemanová Z.¹, Gančarčíková M.¹,
Březinová J.² a Michalová K.^{1,2}

¹Centrum nádorové cytogenetiky, ÚKBLD, VFN a 1. LF UK, Praha

²Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Retrospektivní studie

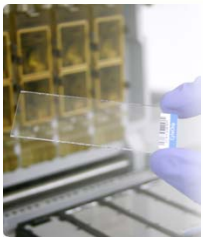
- diagnóza myelodysplastický syndrom (MDS) nebo akutní myeloidní leukemie (AML)
- komplexní karyotypy
- nebalancované chromosomové aberace

Cíl studie

- přesná analýza komplexních chromosomových aberací
amplifikace/delece
- určení zlomových míst

Problémy

- Málo materiálu pro čipovou analýzu
 - Koncentrace a kvalita vstupní DNA
-
- Výsledná analýza je ovlivněna



velikostí klonu nádorových buněk
výskytem více klonů v buněčné populaci
polyploidií

Izolace DNA

Qiagen

Výchozí materiál pro analýzu
buňky kostní dřeně (KD) nebo periferní krve (PK)

- kultivované
- fixované v metanolu a kyselině octové (poměr 3:1)
- fixace je odstraněna

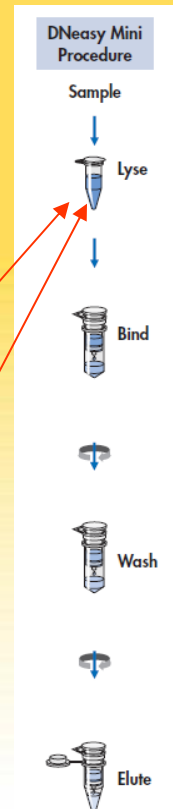
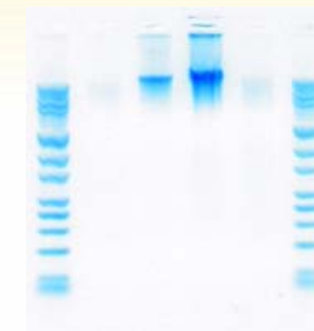
Komerční kity pro izolaci DNA:

QIAamp DNA mini kit (Qiagen)

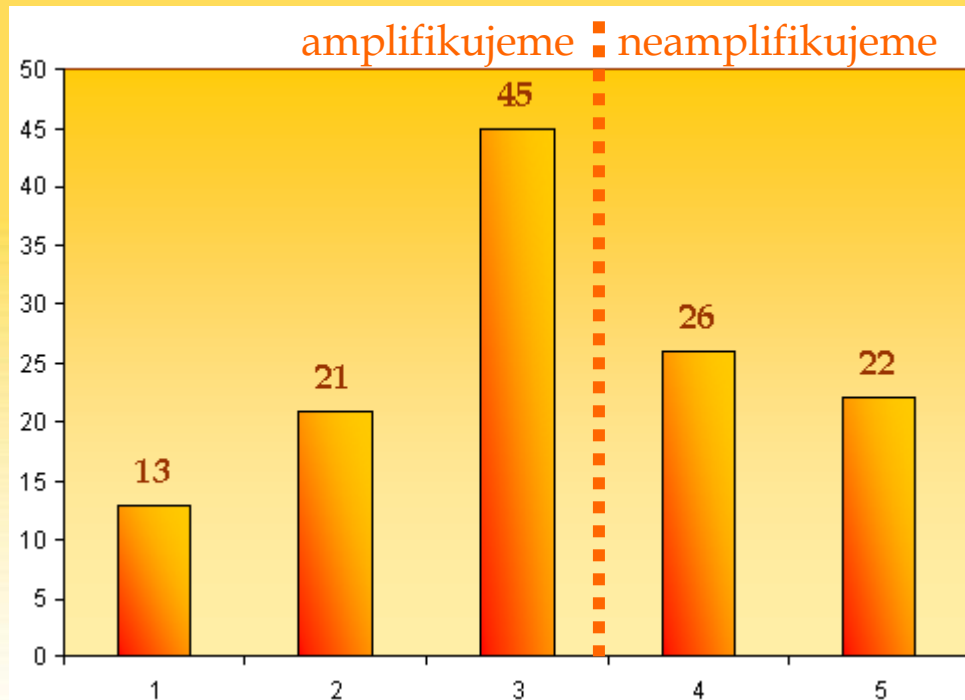
GenElute™ Blood Genomic DNA Kit (Sigma)

- celkový objem 50 μ l

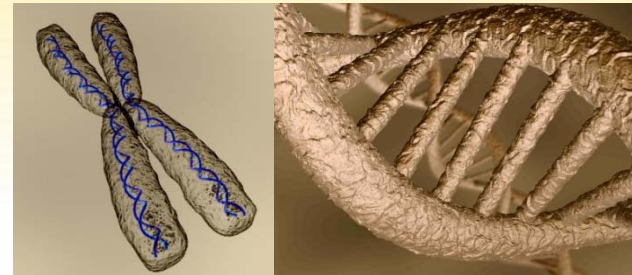
výtěžek ~10 - 100 ng/ μ l



Izolace DNA z fixovaných buněk KD nebo PK



- 1 0-10 ng/μl
- 2 10-20 ng/μl
- 3 20-50 ng/μl
- 4 50-100 ng/μl
- 5 100 a více ng/μl



123 vzorků

119 kostní dřeň

4 periferní krev

Rozsah koncentrace:

2,9 - 329,7 ng/μl

OD 260/280: 0,96 - 2,7

OD 260/230: 0,09 - 8,03

Použité platformy

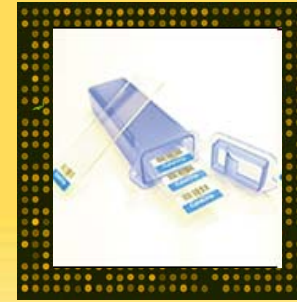
- BAC čipy

CytoChip Focus Hematology (BlueGnome)

BlueFuse Multi BlueGnome

vstupní množství DNA – 400 ng

Celogenomová amplifikace WGA2 – dobré výsledky



- Oligonukleotidové čipy

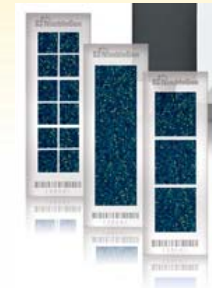
HG18 WG CGH Whole Genome Tiling Array (NimbleGen, Roche)

HG18 CHR5 FT Chromosome 5 Tiling Array (NimbleGen, Roche)

Software: SignalMap Version 1.9

vstupní množství DNA – 1000 ng

Celogenomová amplifikace WGA2 – dobré výsledky



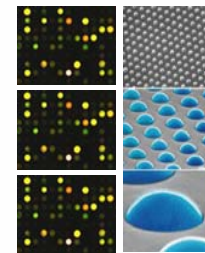
- SNPs array

HumanCytoSNP-12 BeadChips (Illumina)

Karyo Studio Illumina

vstupní množství DNA – 200 ng

Celogenomová amplifikace zahrnuta v protokolu



CELOGENOMOVÁ AMPLIFIKACE

Repli-g Kit Qiagen/MDA systém

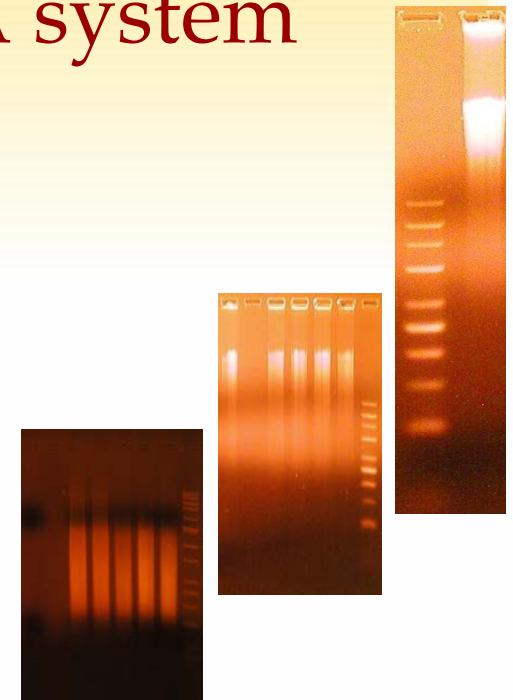
- vhodné pro nepurifikovanou DNA fragmentovanou na <2 kb
- Repli-g DNA polymerasa, výtěžek 10 µg DNA
- 120 minut, produkty >10 kb

GE-Healthcare Genomi-Phi/MDA systém

- GenomiPhi 29 DNA polymeráza,
- 4-7 µg DNA z 10 ng purifikované DNA
- 90 minut, produkty >10 kb

Sigma WGA2

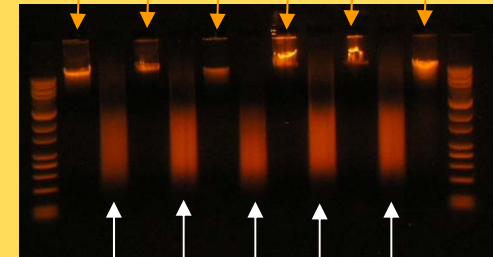
- WGA DNA polymeráza, OmniPlex knihovna,
- amplifikace ve 14 cyklech, 210 minut
- z 10 ng DNA > 10µg DNA, produkty 200 – 2000 bp



Celogenomová amplifikace

kultivované buňky kostní dřeně/per. krve
fixované v methanolu-kyselině octové (3:1)

neamplifikovaná DNA



amplifikovaná DNA

100 - 200 μ l suspenze

výtěžek ~10 - 100 ng/ μ l (celkový objem 50 μ l)

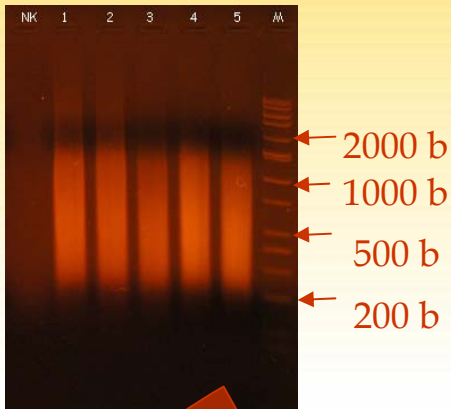
!!! množství a kvalita získané DNA !!!

DNA použita pro WGA amplifikaci 100-250 ng
amplifikovaná DNA: 150 - 400 ng/ μ l (50 μ l)

kvalitní, ale fragmentovaná DNA
OD 260/280 mezi 1.8-2.0
OD 260/230 >2.0

Získané fragmenty: 200-2000 bází

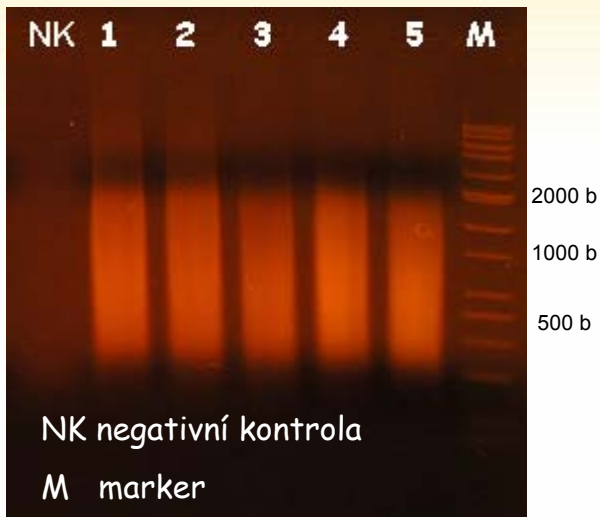
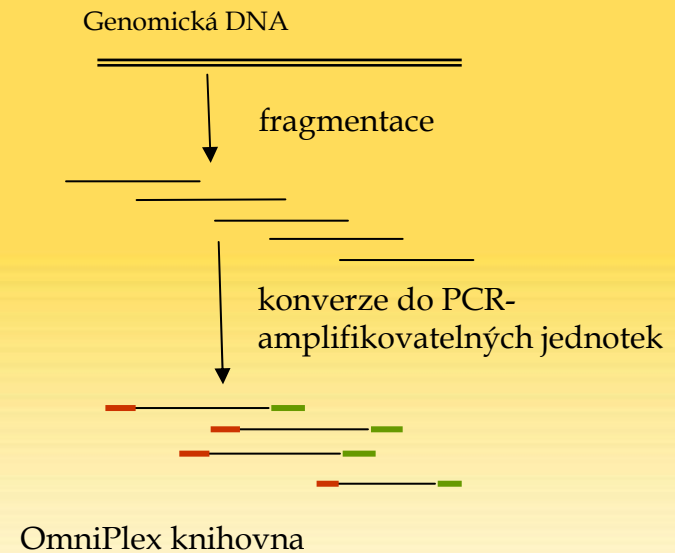
GenomePlex[®] Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit



Kit WGA2 (Sigma)

- příprava celogenové knihovny (univerzální primery, PCR)
- fragmentace + cyklická amplifikace (14 cyklů)
- produkty 200 - 2000 kb
- >10 µg DNA
- 3.5 hodiny
- GenElute™ PCR Clean-Up Kit

Princip WGA amplifikace



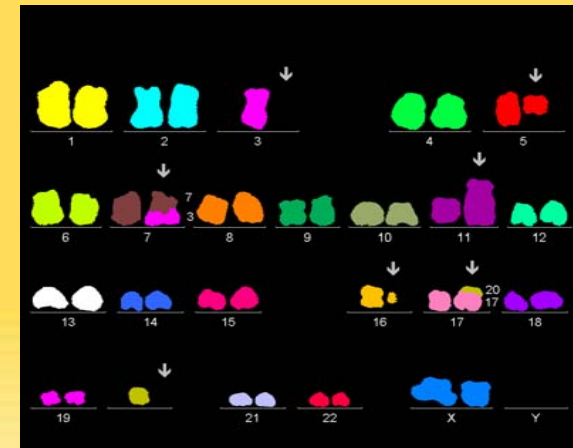
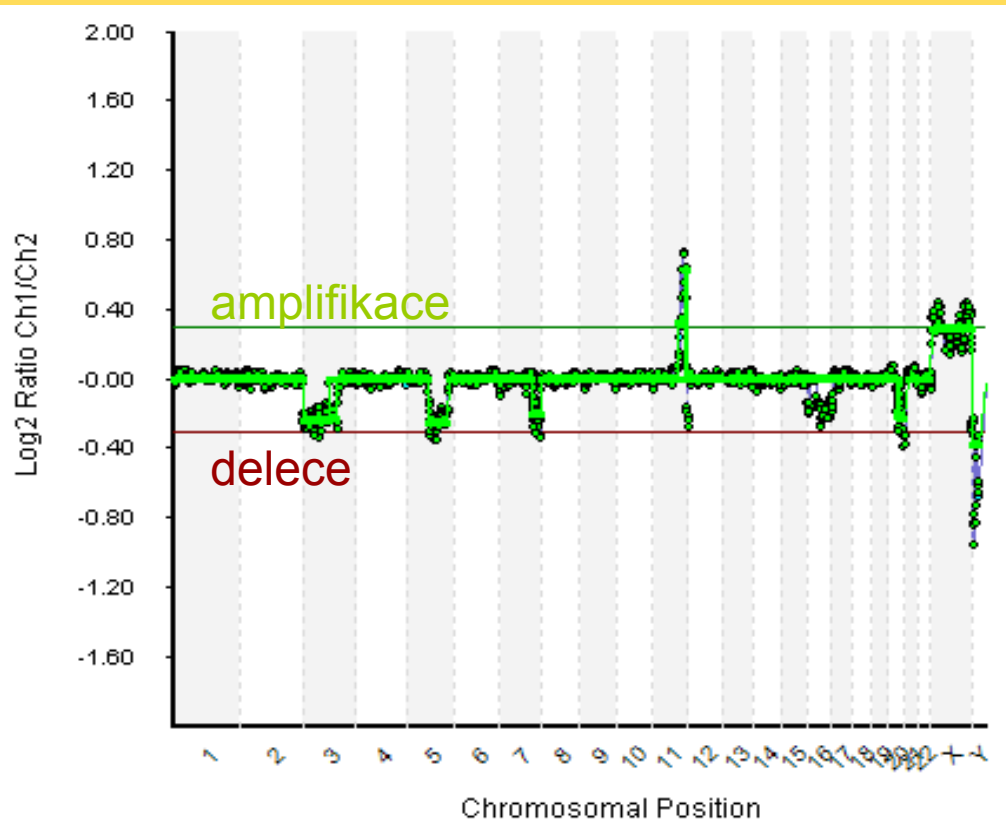
Výtěžek z 250 ng DNA

1. 344.2 µg/ml; 1.93
2. 345.7 µg/ml; 1.93
3. 247.1 µg/ml; 1.93
4. 282.5 µg/ml; 1.92
5. 269,8 µg/ml; 1.93

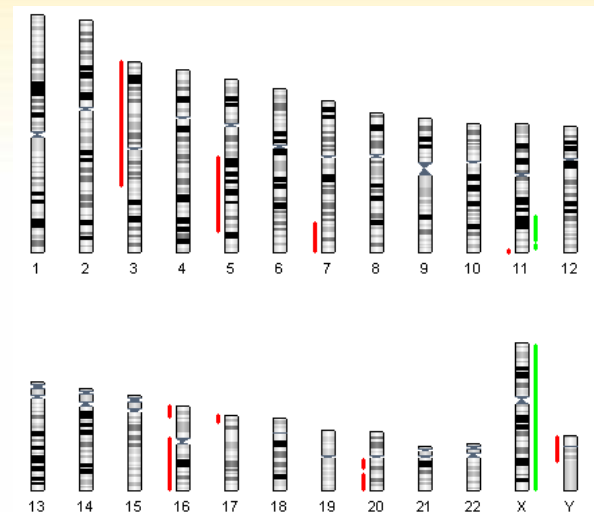
Pacientka AML

22x 46,XX rozsáhlé chromosomové aberace

mFISH analýza: 3 klony



SD Autosome/Robust	0.10/0.03
% Included Clones	99.51

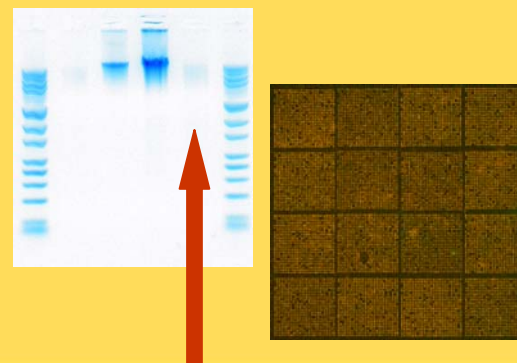


Koncentrace DNA: 7,6 ng/ μ l 1,42/0,91
Po WGA: 180,6 ng/ μ l 1,95/2,49

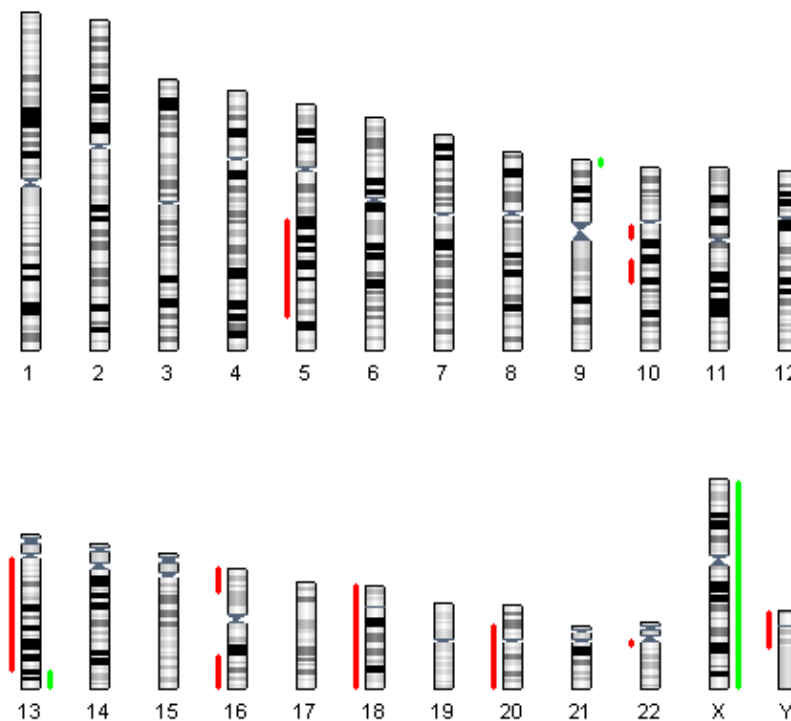
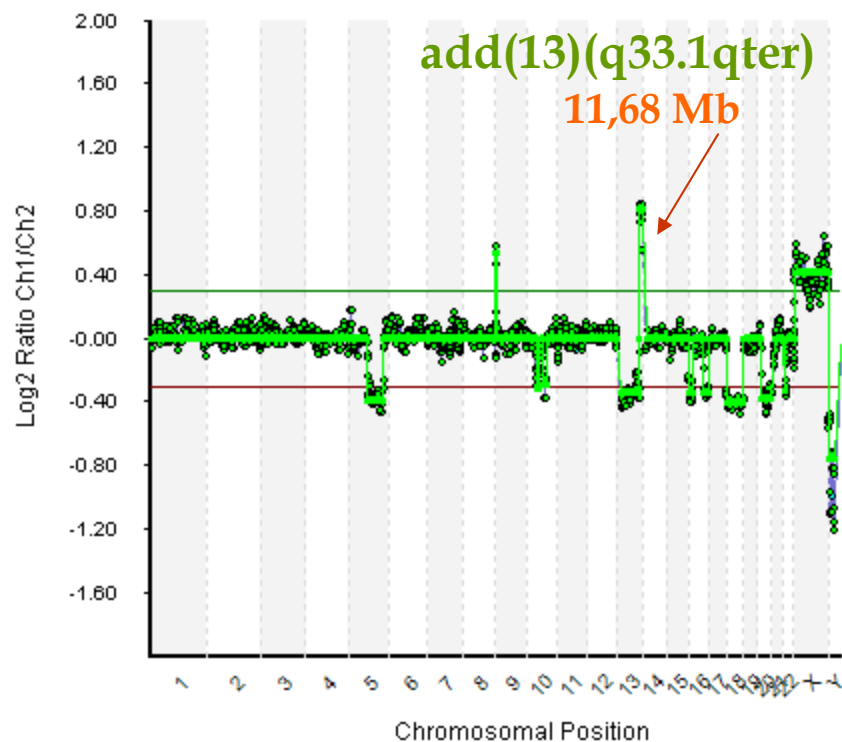
MDS RAEB II.

Kvalita DNA: 19.7 ng/ μ l; 1.77
po WGA: 321.6 ng/ μ l; 1.88/2.31

SD Autosome/Robust 0.15/0.06
% Included Clones 99.45



Genomová DNA



CytoChip Focus Hematology (BlueGnome)

Dg. anémie, k vyloučení MDS

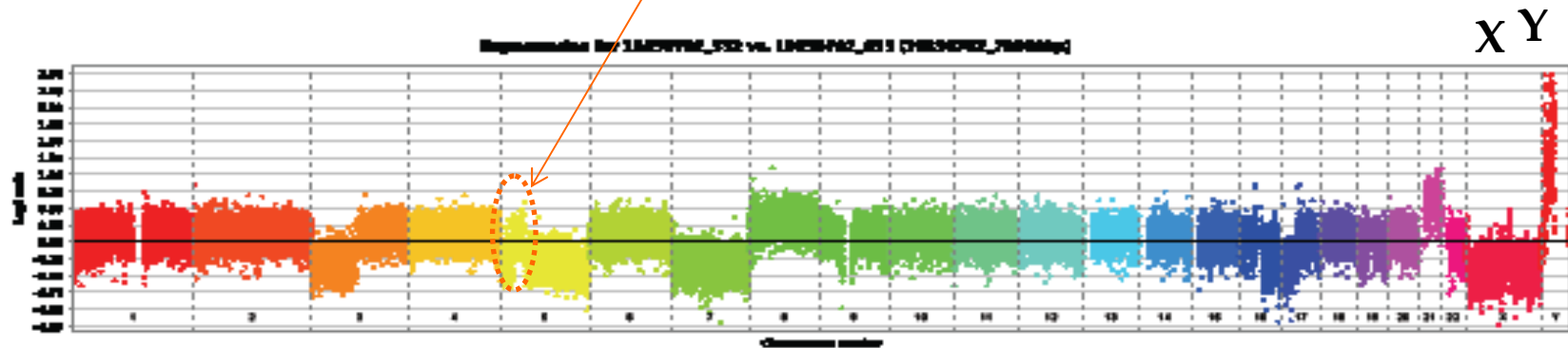
Kvalita DNA: 47.9 ng/μl; 1.93

po WGA: 282.5 ng/μl; 1.92/2.27

cytogenetika

37-44,XY,der(3)t(3;4)(?;?),-4,-5,-7,+8,der(10)ins(10;4)(q21;?),der(16)t(16;17)(q12;?),
-17,+21 cp

CHROMOZOM 5



VÝSLEDEK ARRAY CGH - NIMBLEGEN (ROCHE) - full service

CGH Whole Genome Tiling Array 385K

385 000 oligonukleotidů - median probe spacing 6,270 bp

arr cgh

del(3)(p11.1p26.3),del(4)(q35.1),del(5)(p14p15.3),del(5)(q11.1q35.3), -7, +8,
del(16)(q12q13),del(16)(q21q22.1),del(16)(q23.2q24.3),del(17)(p11.1p13.3),
del(17)(q11.2q12),+21

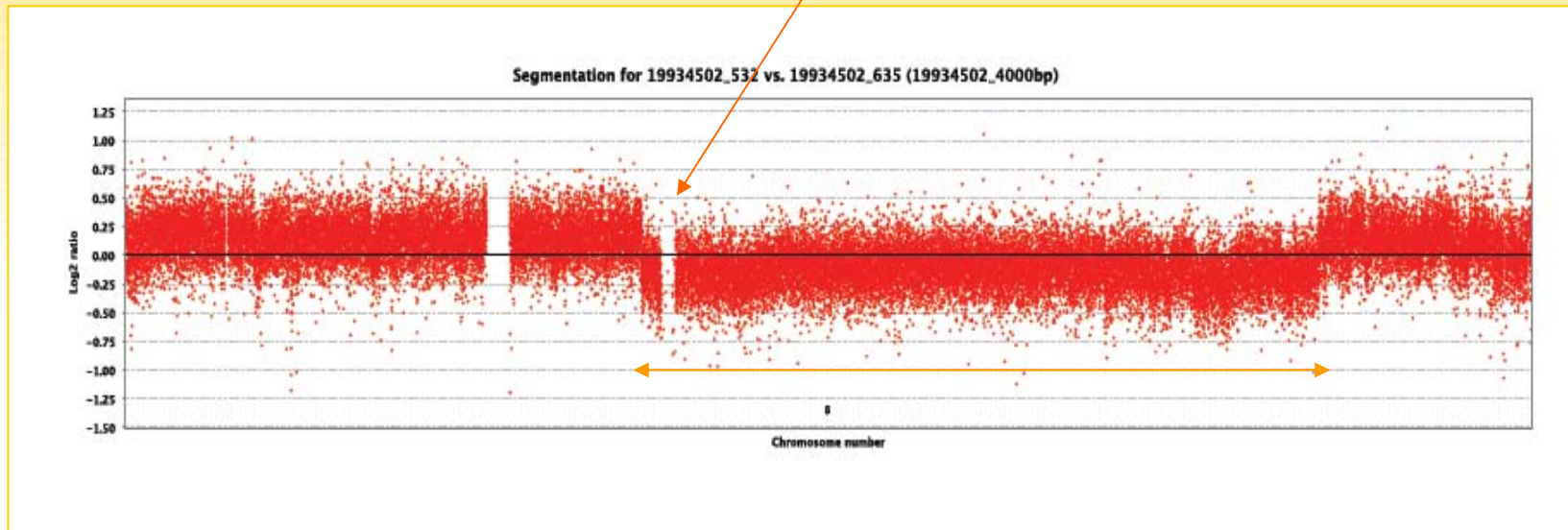
VÝSLEDEK ARRAY CGH - NIMBLEGEN (ROCHE)

Full service

Chromosome 5 Specific Tiling Set: median probe spacing 425 bp

arr cgh del(5)(q12.3q33.2)

1.9 Mb nepokrytá oblast oligonukleotidy



Poděkování

Všem lékařům 1. int. kliniky a ÚHKT

Pracovnímu kolektivu

CNC ÚKBLD, VFN a 1.LF UK a ÚHKT

- MUDr. Adéla Berková
- Mgr. Lenka Grosová
- Mgr. Eva Malinová
- RNDr. Libuše Lizcová
- Mgr. Silvia Izáková
- Mgr. Iveta Šárová
- Ing. Michaela Dostálová-Merkerová
- Ing. Zdeněk Krejčík

Děkuji za pozornost.

