



# Možnosti použití systému WGA = Whole Genome Amplification pro klinickou diagnostiku a výzkum

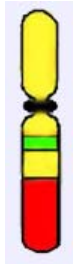
Martin Šušla



# Úvod

---

- Dostupnost dostatečného množství DNA je klíčová pro řadu metod používaných k analýze genomu
  - Např. pro CGH se jedná o mikrogramy DNA
- V mnoha případech je množství biologického vzorku z pacienta limitováno a získaná DNA ke komplexním analýzám nestačí
  - Histologické řezy
  - Bukální stěry
  - Nádorové buňky získané laserovou mikrodisekcí
  - Blastomery získané pro účely preimplantační genetické diagnostiky
- Z nanogramového množství DNA je potřeba získat mikrogramové množství
  - Dá se použít jako zásoba pro budoucí genetické testování





# Whole Genome Amplification

---

- Metoda se začala objevovat v literatuře na počátku 90. let
- Cílem bylo amplifikovat genomovou DNA (gDNA) a získat tak dostatek templátu pro další PCR
- Ideální celogenomová amplifikace by měla být schopna reprezentativně amplifikovat veškerou DNA přítomnou ve vzorku beze změn v původní sekvenci
- V současné době jsou metody celogenomové amplifikace rozdělovány do dvou skupin:
  1. Metody využívající různé varianty PCR
  2. Metody založené na isothermální amplifikaci

# Celogenomová amplifikace s použitím PCR

- Na rozdíl od tradiční PCR, která je zaměřena na amplifikaci specifickými primery vymezené cílové sekvence, by mělo dojít k amplifikaci všech sekvencí

Jak toho dosáhnout?

- Primery komplementární k často se vyskytujícím repetitivním v genomu (*Alu*-PCR) – zkreslování díky preferenční amplifikaci oblastí s vysokým počtem *Alu* repetit
- Úplně náhodné primery o délce 15 nukleotidů (PEP-PCR)

5'-NNNNNNNNNNNNNNNN-3'

- primery nasedají za nízké teploty, velký počet míst pro nasedání primerů
- nízká účinnost v případě amplifikace DNA z malého množství buněk, nepřesná amplifikace repetitivních sekvencí

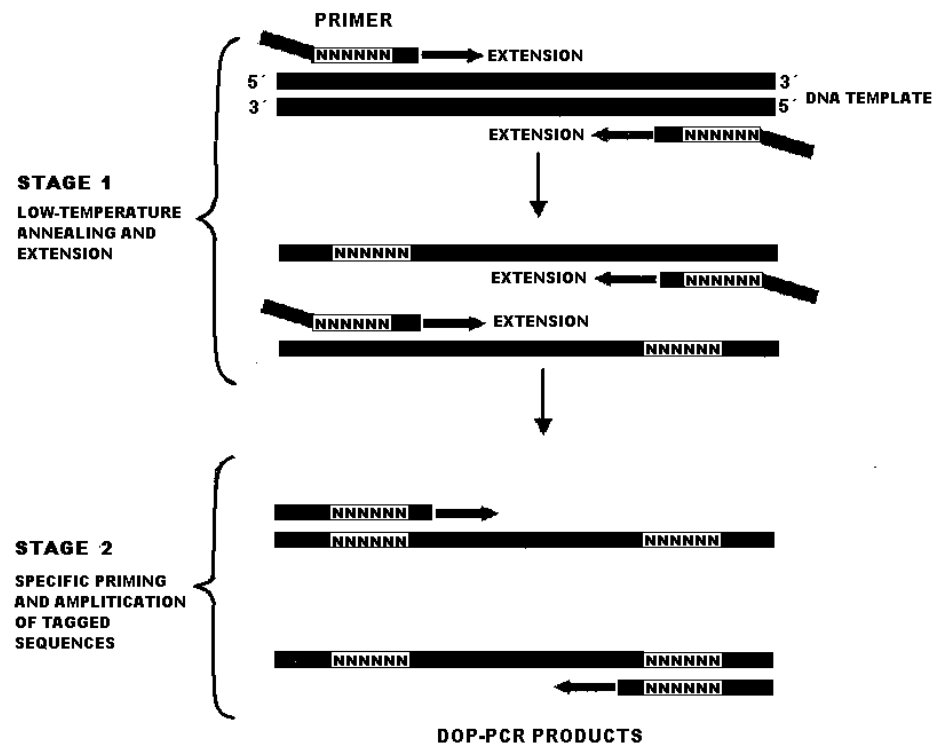
# Celogenomová amplifikace s použitím PCR

Relativně specifické primery obsahující kombinaci známých sekvencí na 5' a 3' konci mezi nimiž je sekvence náhodná (DOP-PCR)

5' - CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG - 3'

Primery nasedají řádově na  $10^6$  míst v genomu

Výsledkem amplifikace je soubor fragmentů o velikosti 200-3000 bází





# Celogenomová amplifikace s použitím PCR

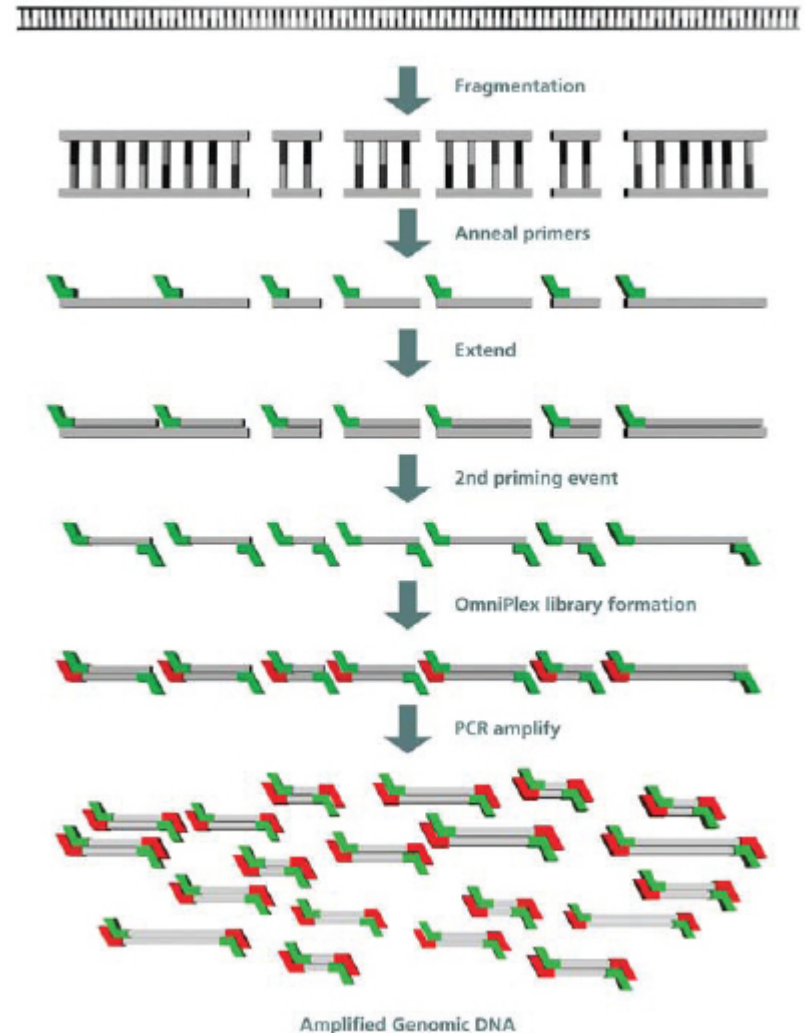
---

Možnosti překonání limitace dostupnosti „priming sites“ v genomu

- po nafragmentování se konce DNA fragmentů opatří krátkou definovanou sekvencí, která slouží v následujícím amplifikačním kroku jako kotva pro připojení primeru pro amplifikaci:
  1. Ligace krátkého oligonukleotidu na lepidivé konce DNA fragmentů (Ligation-mediated PCR)
  2. Přidání poly (dT) sekvencí na 3' konce fragmentů pomocí terminální transferasy (T7-based linear amplification, nepatří do metod založených na PCR)
  3. Preamplifikace s použitím semidegenerovaných primerů – GenomePlex – vytvoření OmniPlex knihovny

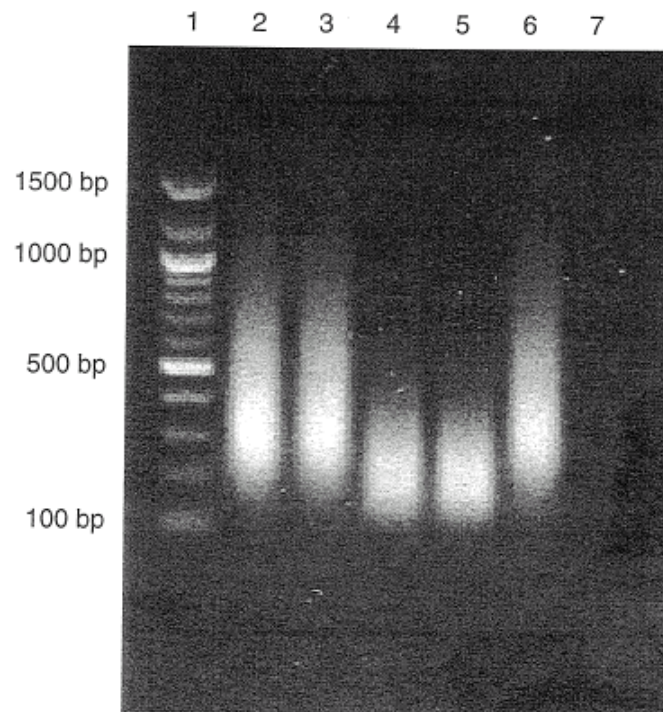
# GenomePlex® WGA

- Je založena na principu DOP-PCR
- DNA je neenzymaticky nafragmentována na fragmenty o velikosti 100-1000 bp
- Na konce fragmentů je pomocí semi-degenerovaných primerů připojena definovaná sekvence – vytvoření OmniPlex knihovny
- OmniPlex knihovna je amplifikována s použitím primeru nasedajícího na definovanou část fragmentů
- Po 14 PCR cyklech je nasyntetizováno 5-10 mikrogramů gDNA, která je použitelná pro genotypizace, sekvencování, microarrays, CGH, TaqMan assays



# Dosavadní zkušenosti s GenomePlex® WGA

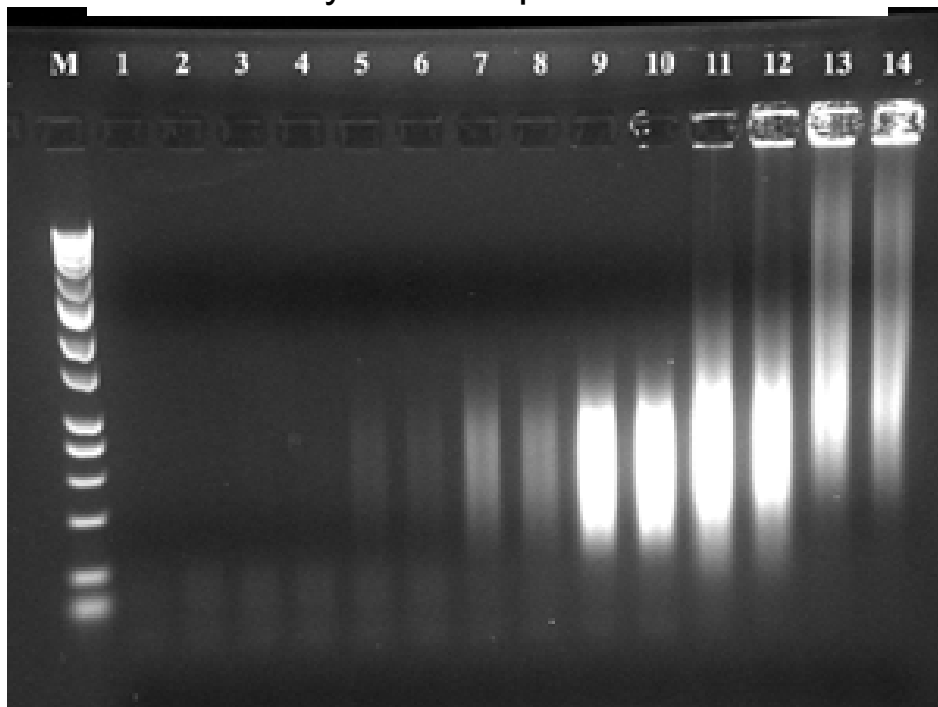
- Je možné účinně amplifikovat DNA izolovanou z téměř všech typů vzorků:
  - fixované, zmražené i archivní tkáně
  - buňky periferní krve
  - buňky získané bukalními stěry
  - buňky získané laserovou mikrodisekcí



**Figure 3. Example of the DNA smears produced from fresh tissue/blood (50–2000 bp) or fixed tissue (<500 bp).**  
(Lane 1) 100 bp DNA size ladder; (lanes 2 and 3) amplification products obtained using DNA extracted from fresh tissue; (lanes 4 and 5) amplification products obtained using DNA extracted from fixed tissue; (lane 6) positive control (included with kit); (lane 7) negative control (no DNA).

# Dosavadní zkušenosti s GenomePlex® WGA

Vliv vstupního množství templátu na  
výtěžek amplifikace



Lanes 1, 2:	no template
Lanes 3, 4:	1 pg DNA
Lanes 5, 6:	10 pg DNA
Lanes 7, 8:	100 pg DNA
Lanes 9, 10:	1 ng DNA
Lanes 11, 12:	10 ng DNA
Lanes 13, 14:	100 ng DNA

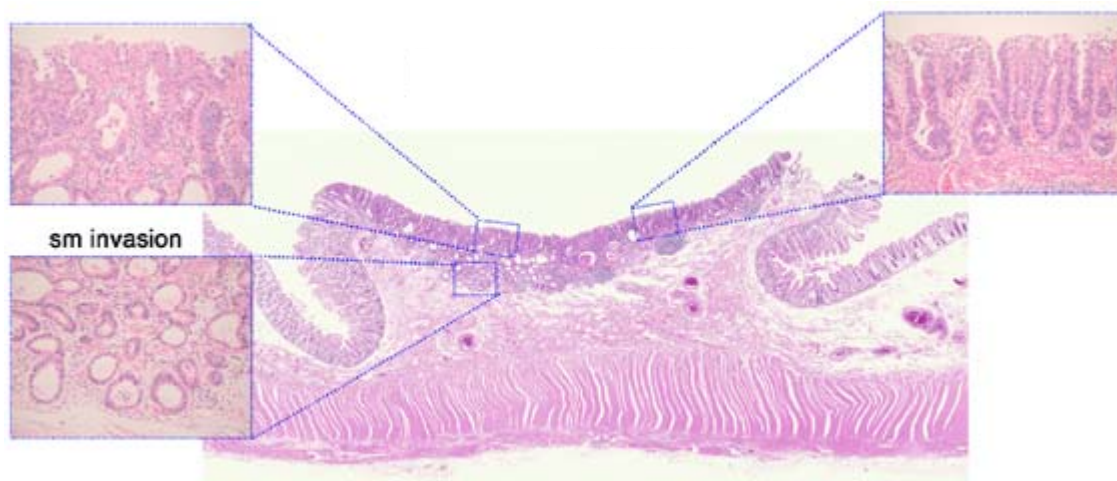
- počáteční koncentrace DNA je klíčová pro správný průběh amplifikace
- GenomePlex® WGA účinně amplifikuje ng množství DNA

# Amplifikace DNA z tkání v parafinových bločcích

- Retrospektivní analýza archivní DNA je jedinečným zdrojem informací
- Část tkáně získaná laserovou mikrodisekcí však neposkytuje dostatečné množství DNA pro genetické analýzy
- Fixace tkání formalínem způsobuje poškození DNA, které znemožňuje následnou amplifikaci – zlomy v řetězcích, poškození bazí, crosslinky DNA a proteinů
- **WGA metoda musí být schopna amplifikovat relativně krátké fragmenty (1 kb i méně) – je výhodnější použít metody založené na PCR než MDA**

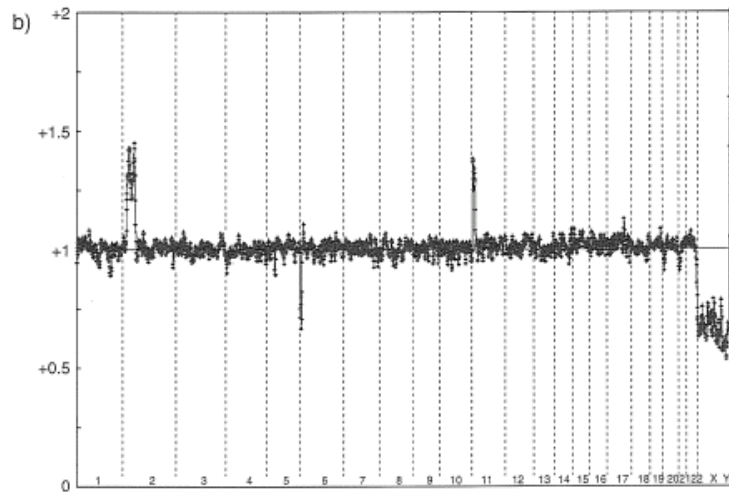
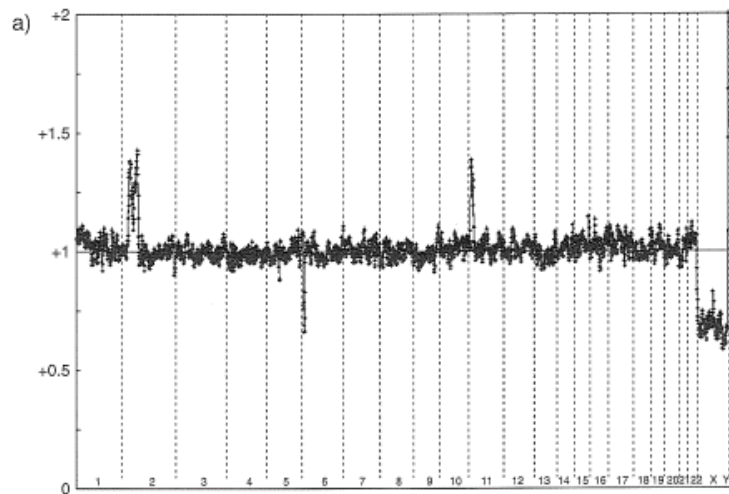
## GenomePlex® WGA:

- nevyžaduje dlouhé templáty, účinně amplifikuje krátké fragmenty
- primery dobře pokrývají i úseky kratší než 1 kb



SIGMA-ALDRICH

# Aplikace pro GenomePlex-amplified DNA



Chromosome

## CGH, array CGH

- funkční kombinace GenomePlex® WGA a CGH umožňuje snížení nároku na množství DNA až o tři řády
- vysoká míra shody mezi CGH bez amplifikace a GenomePlex CGH a to jak s DNA izolovanou ze zmražených tak z fixovaných tkání (*Little et al. (2006), Genomics 87: 298-306*)

*Obr.:* Výsledek CGH získaný s kolorektální buněčnou linií DLD1 s použitím neamplifikované (a) a amplifikované DNA (b)

- kvantitativní změny v genomu jsou v obou případech identické: ztráta na chromozomu 6 a nadbytek na chromozomech 2 a 11



SIGMA-ALDRICH

# Aplikace pro GenomePlex-amplified DNA

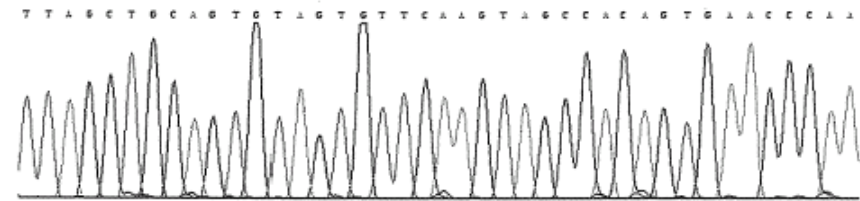
- **Sekvencování**

- mezi sekvencemi kontrolní DNA a DNA amplifikované s použitím GenomePlex® WGA nebyly nalezeny žádné rozdíly (*Hughes et al. (2005), Methods express, WGA: 59-76*)

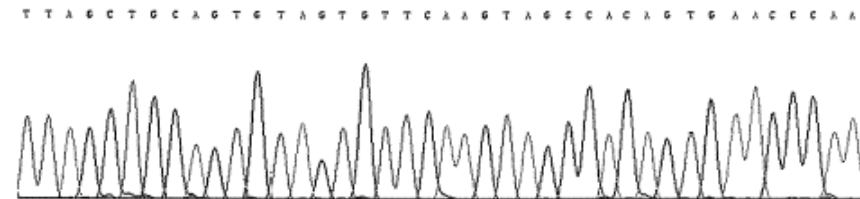
- **Detekce bodových polymorfizmů (SNP)**

- GenomePlex® WGA umožňuje efektivně amplifikovat DNA izolovanou z buněk vlasových kořínků
- získaná DNA je vhodná pro SNP genotypizaci (*Leanza et al. (2007), Cancer Detection and Prevention 6: 480-488*)

Non-amplified



GenomePlex amplified



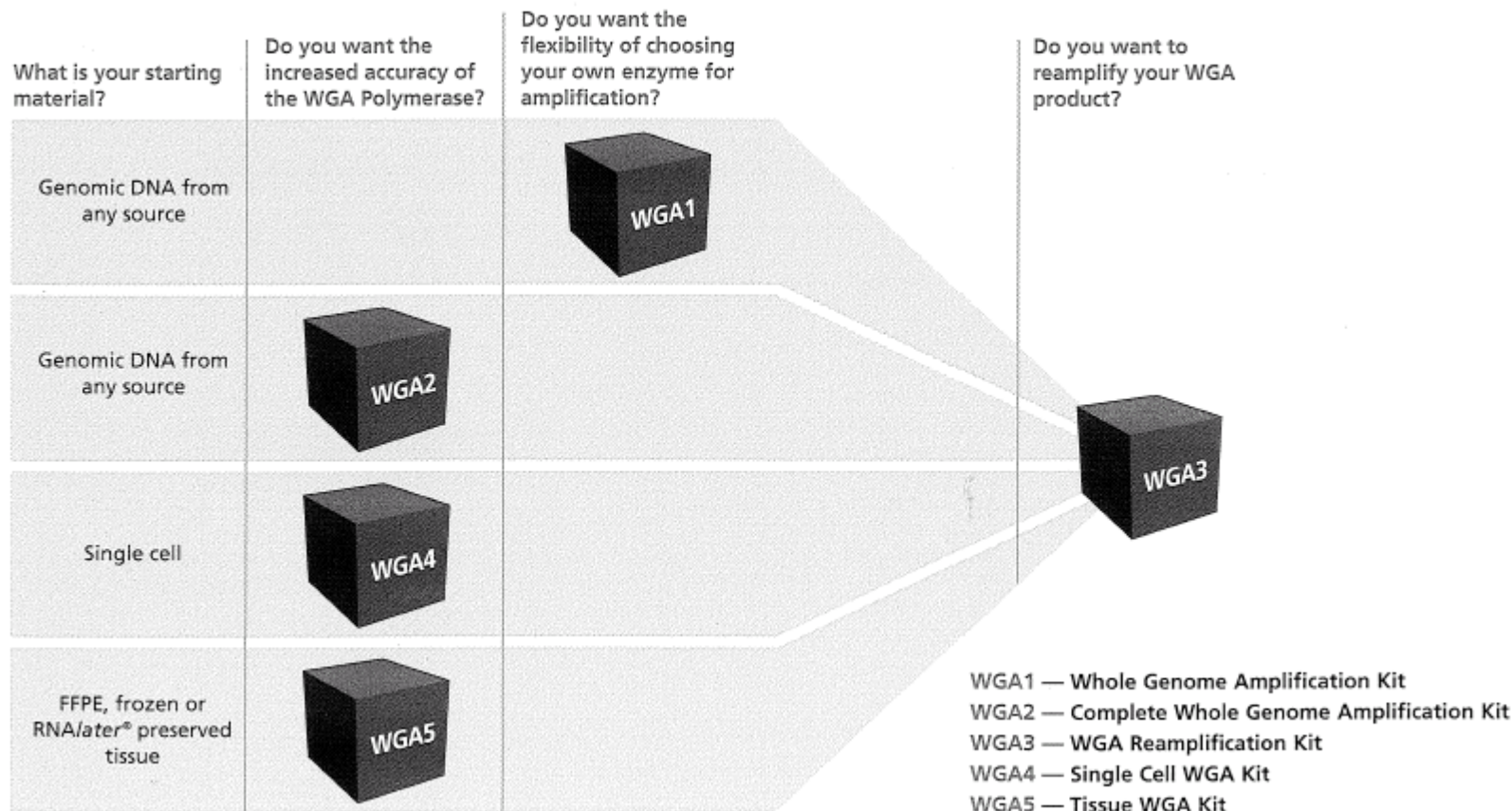


# Hlavní výhody použití GenomePlex® WGA

---

- amplifikuje DNA z mnoha různých zdrojů
- na rozdíl od MDA, která amplifikuje jen dlouhé nepoškozené fragmenty, je GenomePlex® WGA schopna amplifikovat i poškozenou nebo degradovanou DNA – **zvláště vhodné pro amplifikace DNA z parafinových bločků**
- při amplifikaci dochází k minimálnímu zkreslování
- vysoký výtěžek amplifikace
- časová úspora (celý protokol méně než 4 hodiny)
- naamplifikovaná DNA je použitelná pro řadu downstream aplikací

# GenomePlex® WGA produkty





---

# Jaké využití může mít **GenomePlex® WGA** ve Vaší laboratoři?

Děkuji Vám za pozornost

[martin.susla@sial.com](mailto:martin.susla@sial.com)

