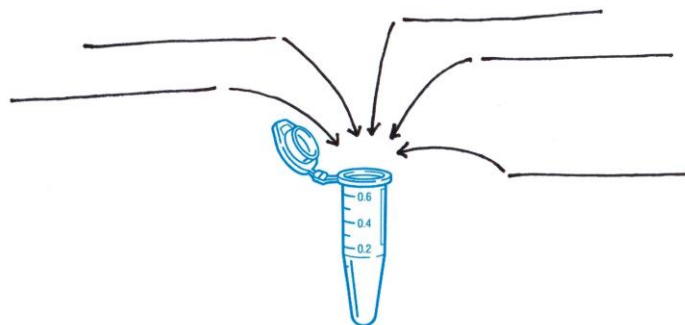




1. Napište jednotlivé komponenty, které se musí přidat do řádné PCR reakce, uveďte jen ty základní! Kromě vody, pufru a správné koncentrace Mg^{2+} je potřeba přidat:



2. Určete **délku PCR produktu** s těmito zadanými primery (orientace 5'-3')

Forward: **CGCATTCTCATCCCAGTAT**

Reverse: **AAGGACTTGGTGCAGAGTTCA**

v sekvenci (orientace 5' - 3'):

GGCACAGACAGAAGCTTGATGACTCTAAACCTAGTTTGTCTCTGACCGCCTCAGTGATTTAG

GGCGCATTCTCATCCCAGTATGAGAGTAGGTGTCCCGCCTCAGAACCCACGGCCCTCCCTGA

ACTCTGCACCAAGTCCTTTTAATCCACAAGGACAGAGTCAGATTACAG

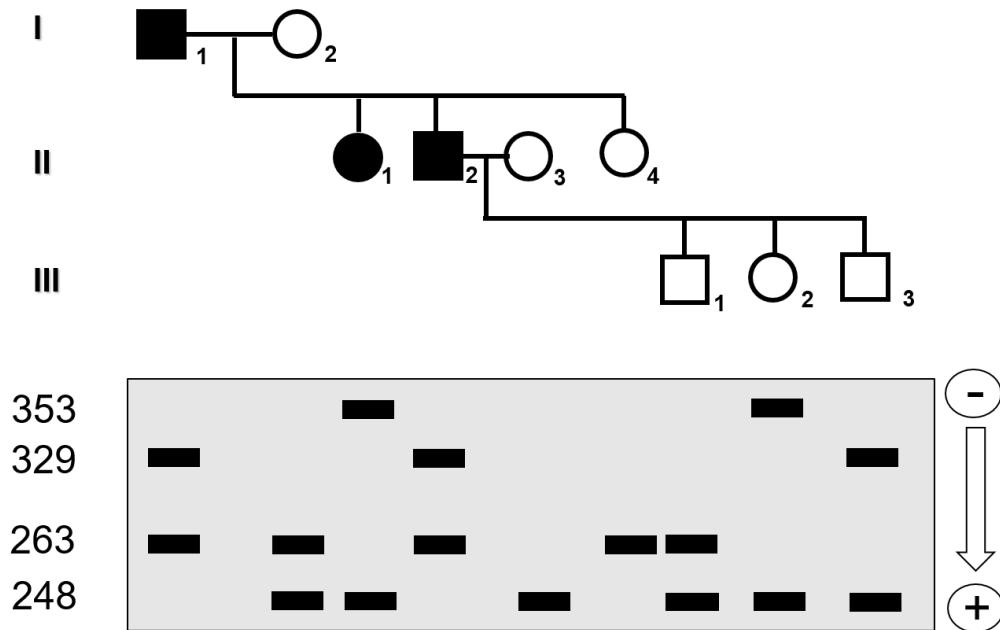
- a. délka:
b. metody detekce úspěšnosti PCR:

Vypracoval(a): Kruh: Zkontroloval(a):





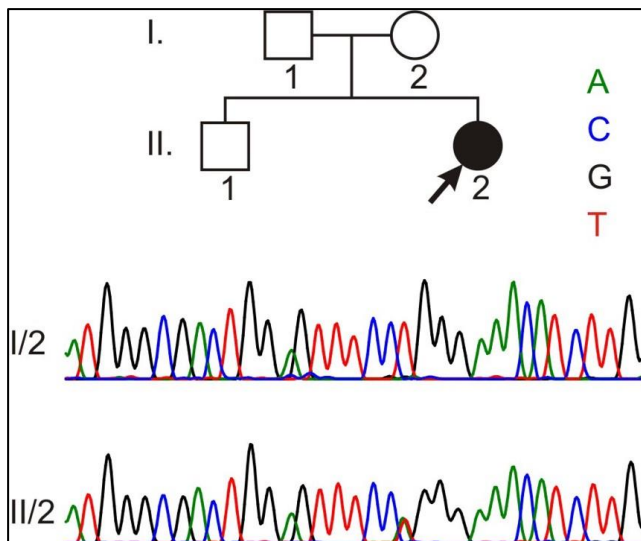
3. Str. 90, úkol č.3 : Přímá DNA diagnostika v rodině s výskytem Huntingtonovy chorey. Molekulární příčinou nemoci je nadměrné množství po sobě následujících glutaminových zbytků v proteinu zvaném huntingtin. CAG triplet, který glutamin kóduje, se i u zdravého člověka nachází v tandemové repetici (zhruba 10-25x). U nemocných dochází k nárůstu počtu opakování na 35 a více. Přímá DNA diagnostika spočívá v **hodnocení velikosti PCR produktu**. Produkt je dlouhý 203bp, pokud bychom nezahrnuli oblast repetice -CAG-. Nástup onemocnění je obvykle ve středním věku, můžeme tedy provést presymptomatickou diagnostiku u mladších osob. **Kdo z třetí generace bude postižen?**



4. Sangerovo sekvenování. Obdrželi jste výtisk sekvence DNA získané automatizovanou verzí Sangerova sekvenování. S pomocí veřejně dostupných databází (UCSC Genome Browser, OMIM, ClinVar) se pokuste zjistit následující informace:
- O jaký **gen** se jedná?
 - V databázi OMIM se pokuste dohledat informace o genu, jeho proteinovém produktu a patologii, kterou způsobí mutace tohoto genu (syndrom nebo **choroba, typ dědičnosti**)
 - Sekvence obsahuje **variantní** alelu. Zkuste tuto alelu co nejlépe popsat (typ změny na úrovni DNA, typ změny na úrovni proteinu, předpověď funkce mutovaného proteinu). Porovnejte svůj výsledek s databází ClinVar.

číslo elektro-ferogramu	gen	Choroba, typ dědičnosti	Popis varianty DNA

5. Kazuistika 1: Vrozená katarakta (AD typ dědičnosti).



Je-li referenční sekvence - ATG-GGC-GAC-TGG-AGT-TTC-CTG-GGA-AAC-ATC-TTG - v orientaci 5'-3', tak určete:

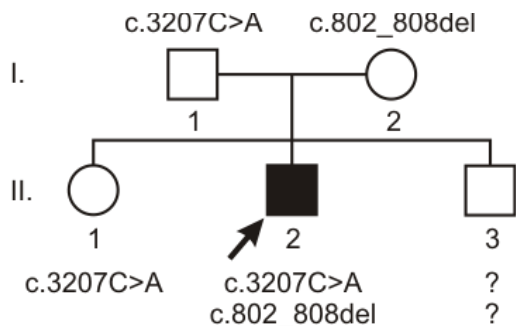
- Typ změny na úrovni DNA.
- Typ varianty/mutace na úrovni proteinu (první nukleotid, je pozice 1 iniciačního kodonu).
- Má mutace vliv na funkci proteinu (lze opět využít nástrojů na internetu, dle instrukcí lektora).
- Jaké je riziko pro děti probandky, že tuto chorobu zdědí? Jak je možné, že rodiče tuto mutaci nemají?

Odpovědi:

- | | |
|----|----|
| a. | c. |
| b. | d. |

6. Kazuistika 2: Wilsonova nemoc

21letý muž s podezřením na Wilsonovu nemoc podstoupil vyšetření mutací genu ATP7B. Rodiče a starší sestra jsou klinicky bez příznaků Wilsonovy nemoci. **Laboratoř našla u vyšetřovaného dvě varianty: NM_00053.4(ATP7B):c.3207C>A(;):c.802_808del. První z variant má i otec a starší sestra, druhá varianta byla nalezena u matky.** Odběr u mladšího bratra nebylo možné zatím uskutečnit.



a. Jsou nalezené varianty patogenní?

c.3207C>A c.802_808del

b. Vysvětlují nalezené varianty fenotypy členů rodiny?

Vypracoval(a): Kruh:..... Zkontroloval(a):



7. Restrikce - metoda využívající enzymy restrikční endonukleázy k charakterizaci DNA sekvence. K uvedené sekvenci (5'-3') dopište komplementární řetězec a najděte, zda a kde bude štěpeno pomocí enzymů:

AluI (AG/CT)

Sau3AI (/GTAC)

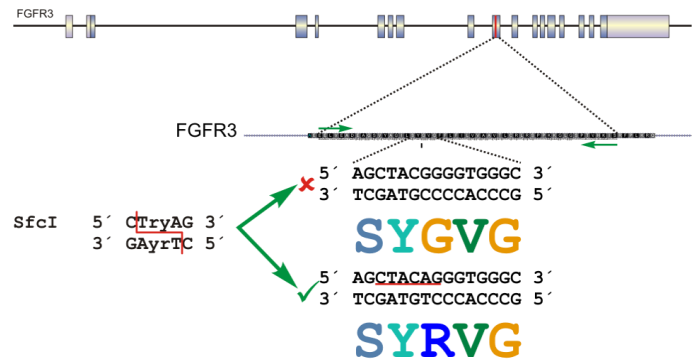
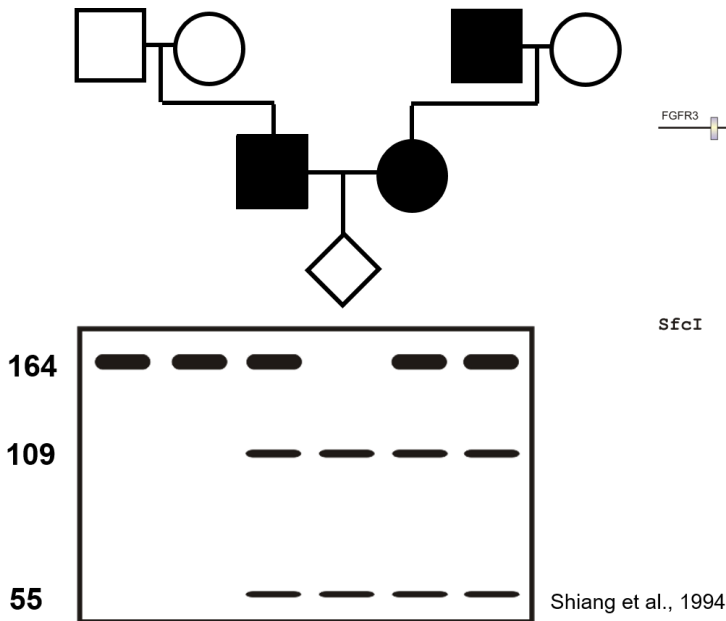
MspI (C/CGG)

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

Rozhodněte, zda budou vznikat tupé nebo lepivé konce:

AluI	tupé	lepivé
Sau3AI	tupé	lepivé
MspI	tupé	lepivé

8. V rodině s výskytem achondroplazie byla provedena prenatální přímá DNA diagnostika zaměřená na nejčastější mutaci **c.1138G>A** v genu *FGFR3*. Tato mutace zároveň vytváří nové restrikční místo pro *SfcI*. Pod rodokmenem je schéma elektroforetického gelu s amplifikovanými DNA fragmenty, které byly následně štěpené restriktázou *SfcI*.



Genotyp plodu:

Pravděpodobný klinický obraz u plodu: