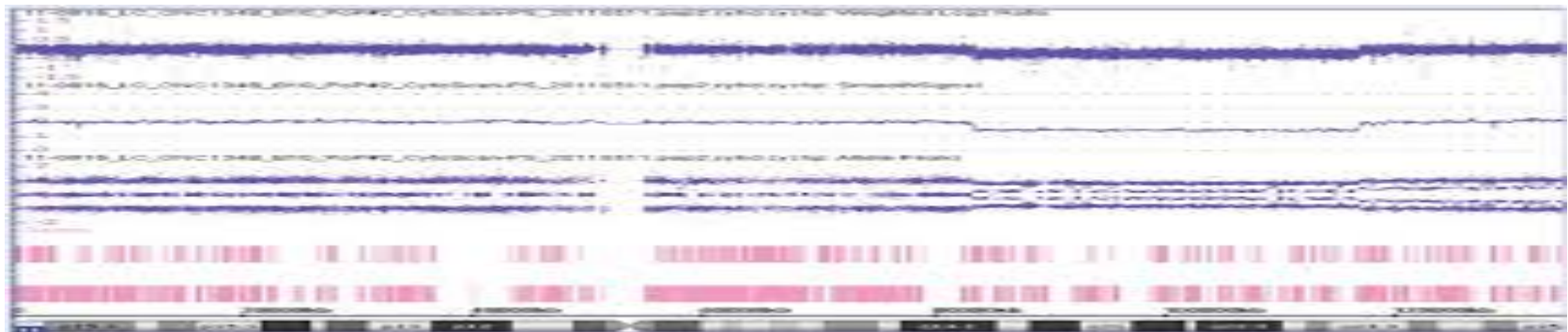




HIBRIDACAO GENOMICA EM ARRAY - aCH



Citogenética Molecular

Citogenética:

É o estudo do número e da estrutura dos cromossomos em uma célula.
Os distúrbios cromossômicos formam uma importante categoria de doenças genéticas.

Eles contribuem para:

- perdas reprodutivas;
- malformações congênitas ;
- deficiência intelectual;
- papel importante na patogenia do cancer.

Anomalias cromossômicas específicas são responsáveis por mais de 100 síndromes identificáveis.

Citogenética Molecular:

Possibilita o estudo citogenético com uma resolução bem maior.

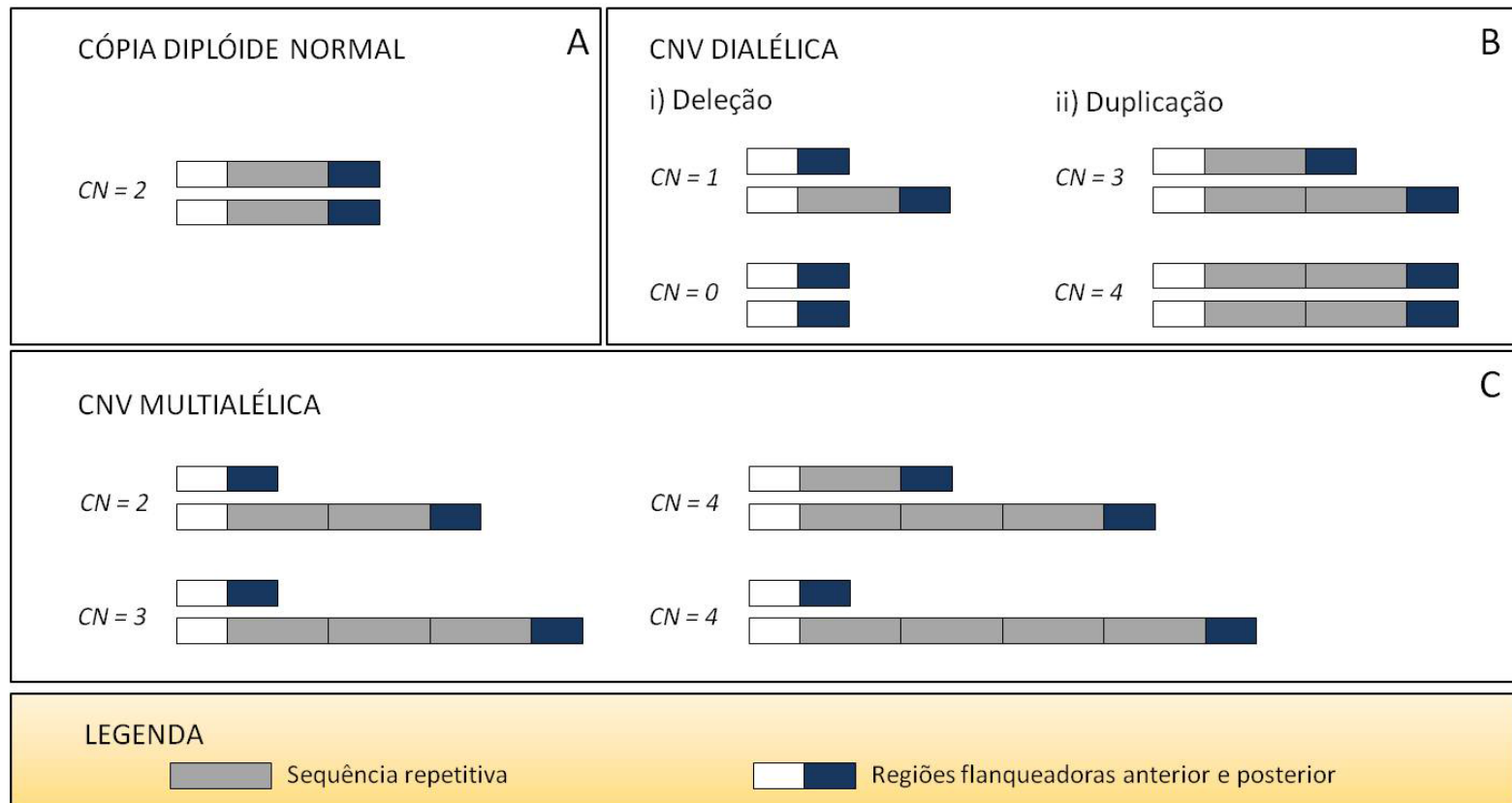
- FISH e Hibridação Genômica

Hibridação Genômica em array - aCH

Detecta alterações no número diploide de cópias dos segmentos no genoma.

- CNVs (Copy Number Variation) :

- definidas como segmentos genômicos, geralmente maiores do que 1 kilobase (kb), que variam em número de cópias em comparação com o genoma de referência.
- originadas por deleções ou duplicações no genoma



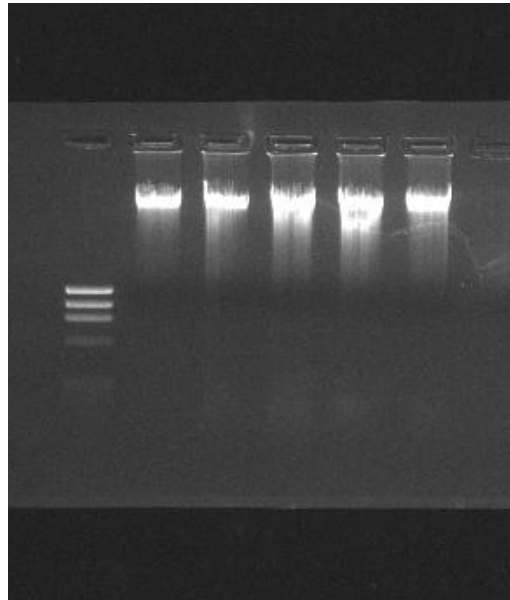
Hibridação Genômica em array - aCH

Metodologia :

- Plataforma *GeneChip System CytoScan HD* (Affymetrix®)
- o *chip CytoScan HD* contém sondas para identificar aproximadamente 2,6 milhões de *CNVs* e 750 mil *SNPs*.

Etapas:

1) Integridade do DNA:



2) aCH – Hibridacao Genomica em Array:

- Dia 1

ETAPA 1: Digestão

ETAPA 2: Ligação

- Dia 2

ETAPA 3A: PCR Setup

ETAPA 3B: PCR Product Check

ETAPA 4: Purificação

ETAPA 5: Quantificação

- Dia 3

ETAPA 6A: Fragmentação

ETAPA 6B: Fragmentação QC Gel

ETAPA 7: Marcação

ETAPA 8: Hibridação

- Dia 4

ETAPA 9: Lavagem, Coloração e Escaneamento

- Dia 1

1) Digestão: para fragmentação

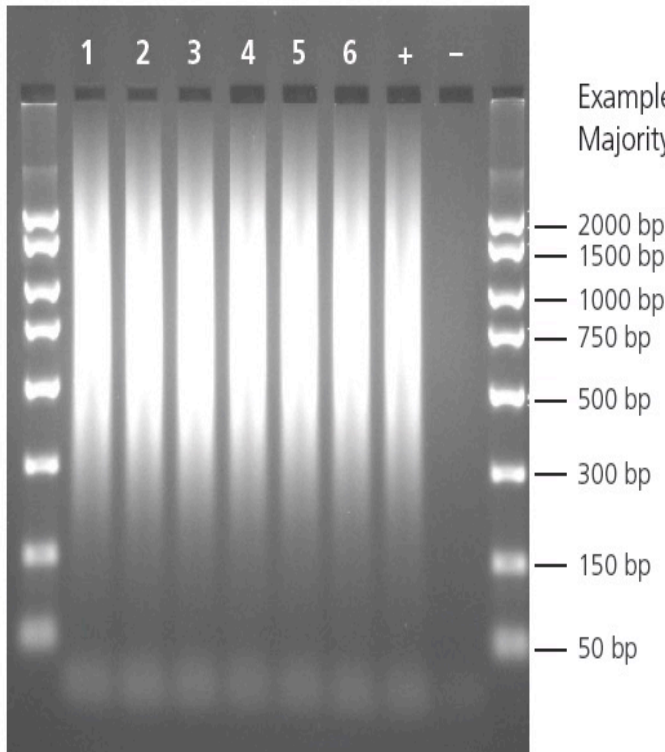
2) Ligação: adaptadores para PCR

- Dia 2

PCR e Checagem da PCR

Purificação

Quantificação: deve ser $\geq 3,0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$



Example of PCR products run on a 2% TBE gel at 5 V/cm for 45 min.
Majority of product should be between 150 and 2000 bp.

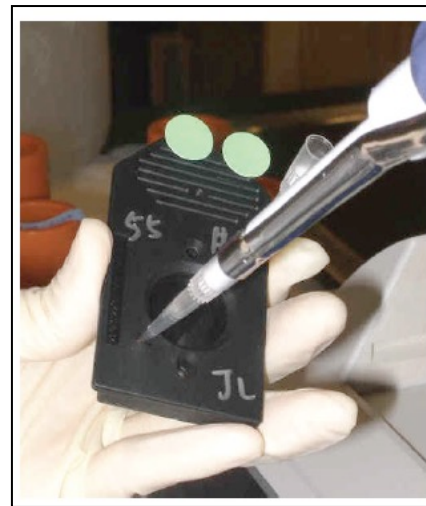
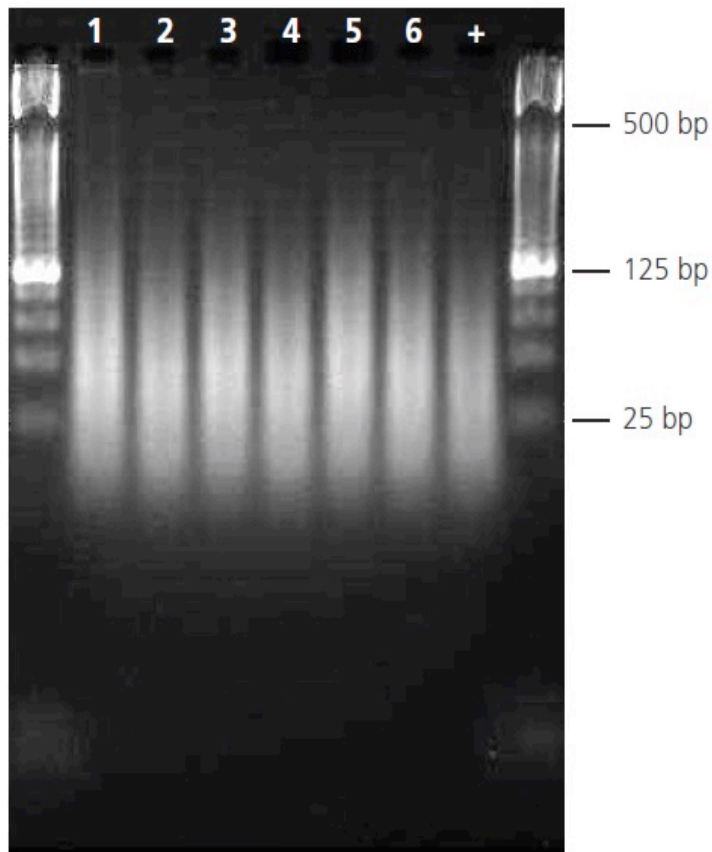
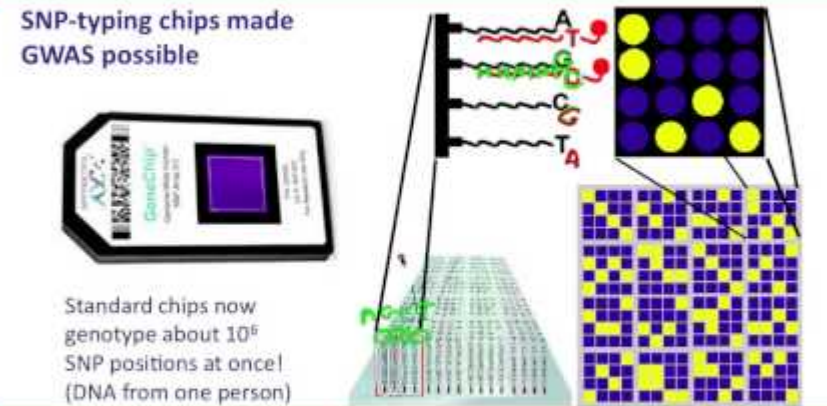
— 2000 bp
— 1500 bp
— 1000 bp
— 750 bp
— 500 bp
— 300 bp
— 150 bp
— 50 bp

- Dia 3

6: Fragmentação: 25 a 125 pb

7: Marcação: marcar DNA com fluoroforo

8: Hibridação: hibridar com a sonda no chip



Example of fragmented samples run on a 4% TBE gel at 5 V/cm for 45 min.
Average fragment distribution is between 25 to 125 bp.

- Dia 4

9: Lavagem, Coloração e Escaneamento



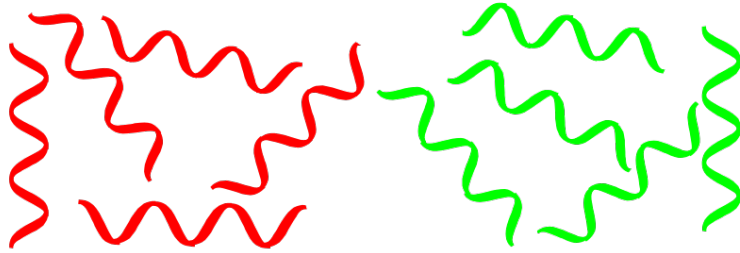
Hibridação Genômica em Array

X

Hibridação Genômica Comparativa em Array

aCH x aCGH

DNA extraction and digestion

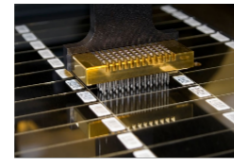


Test = Tumoral DNA
labeled with **Cy5**

Reference = Normal DNA
labeled with **Cy3**

combine equal
amounts of DNA

Spotting



Probes

Hybridisation

**Lack of tumoral DNA
Deletion**

**Excess of tumoral DNA
Amplification**

Scanning

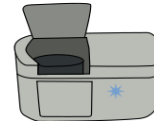
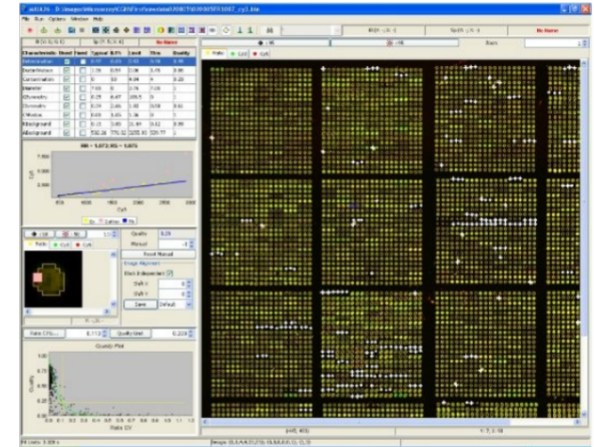


Image analysis software



Image

3) Analise: Programa Chas