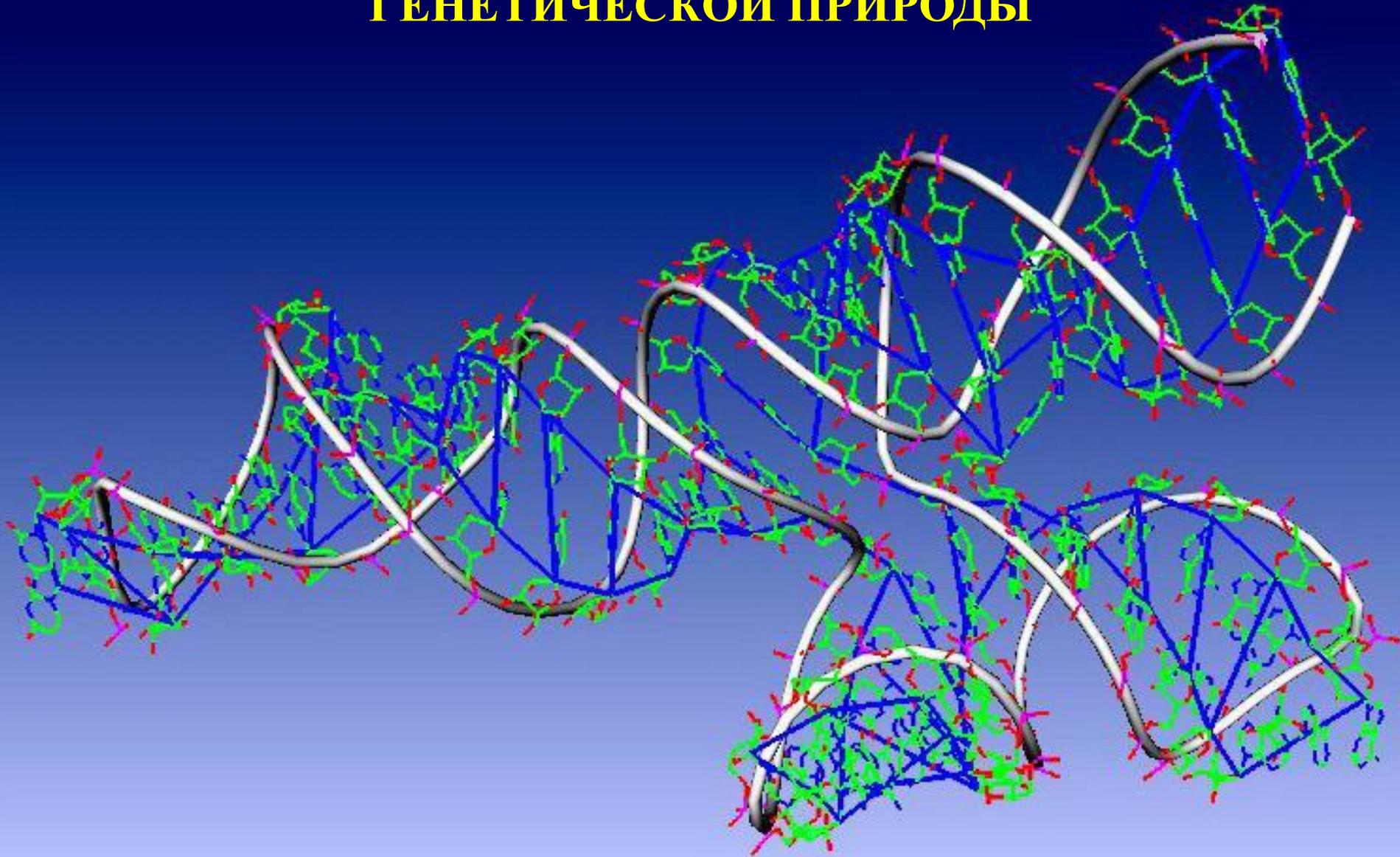
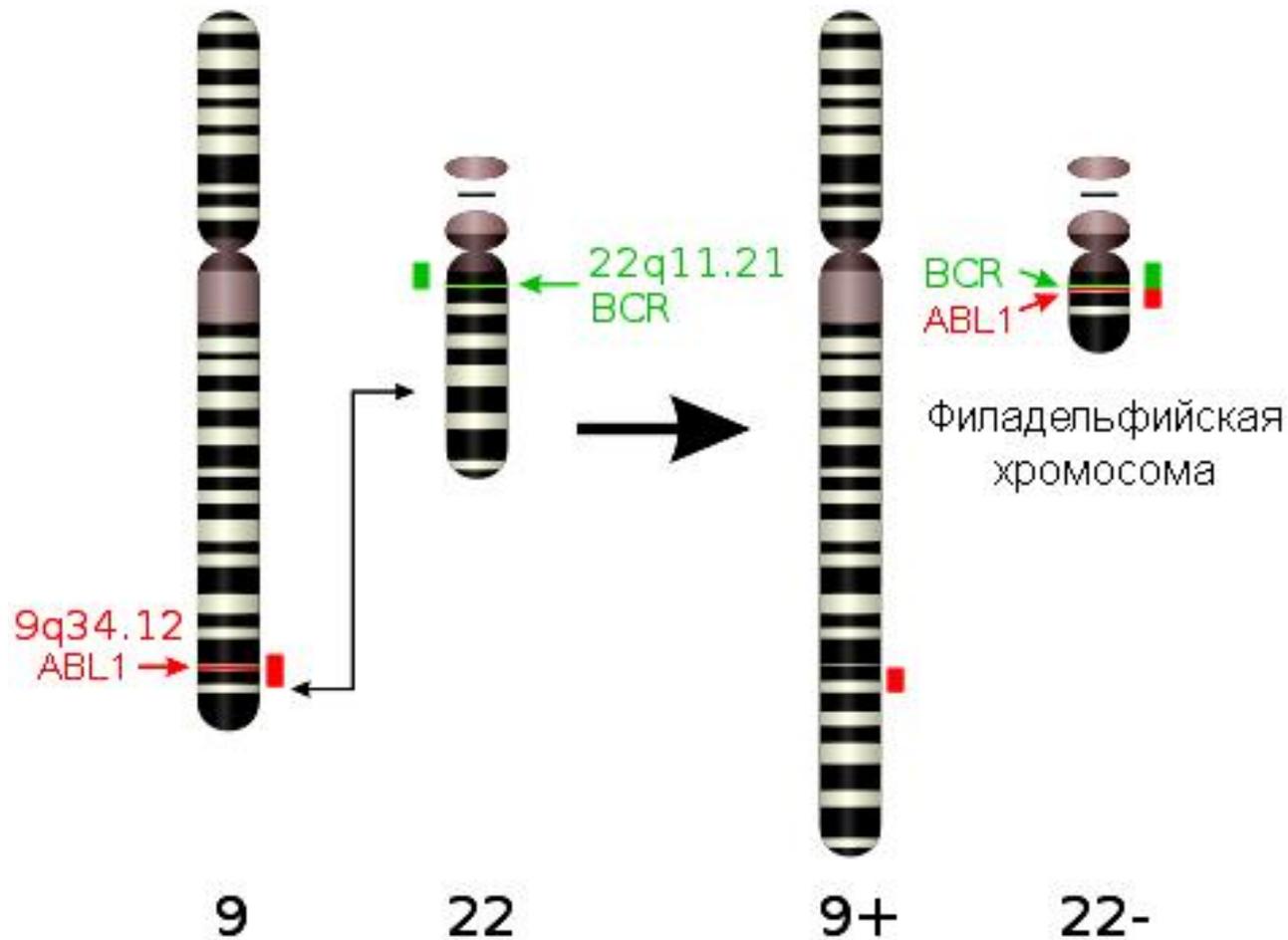


**ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ,
ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ**



ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ



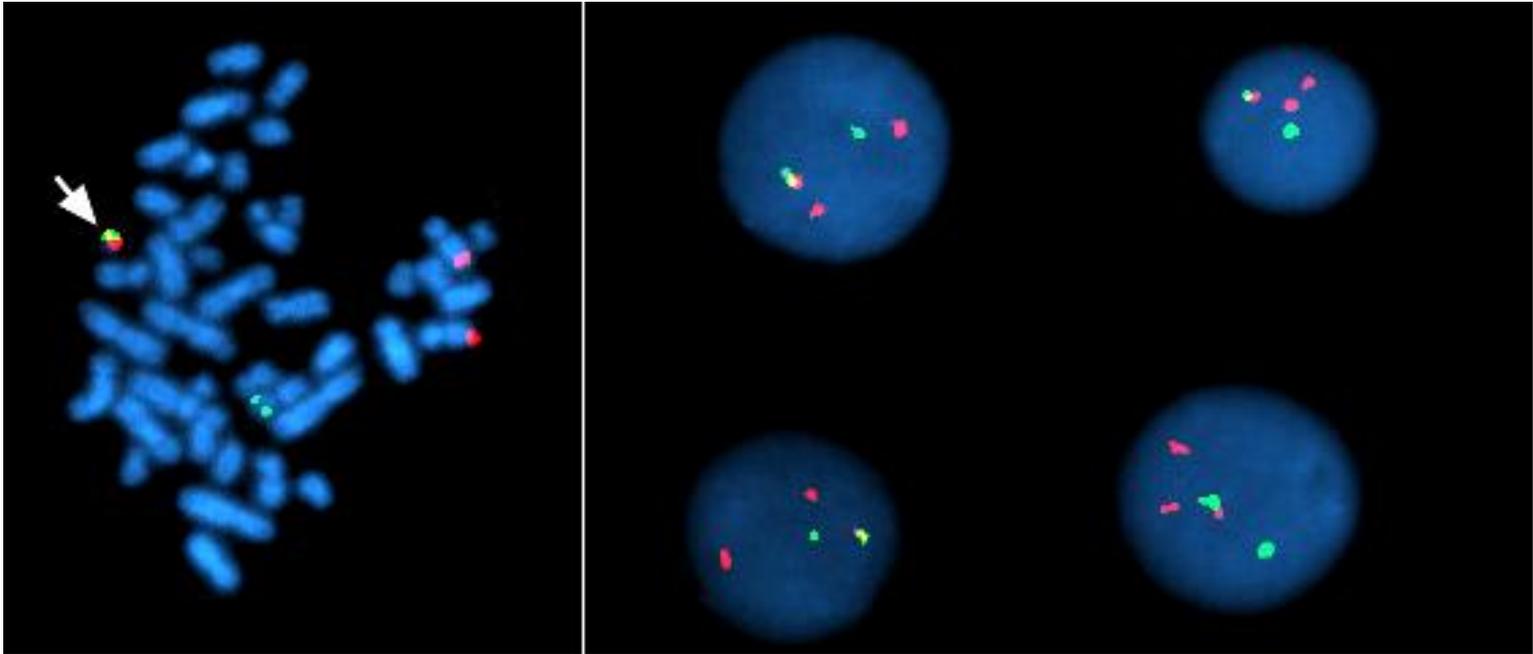
**Образование Филадельфийской хромосомы
при хроническом миелоидном лейкозе**

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ



Детекция Филадельфийской хромосомы
с помощью цитогенетического анализа

FISH АНАЛИЗ

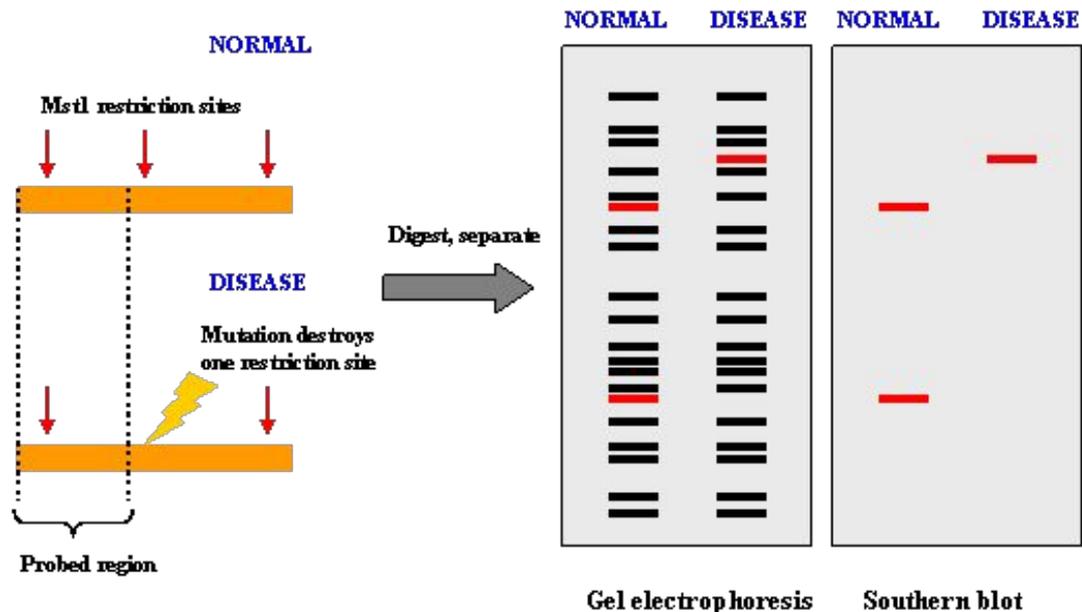


Детекция Филадельфийской хромосомы
с помощью FISH анализа

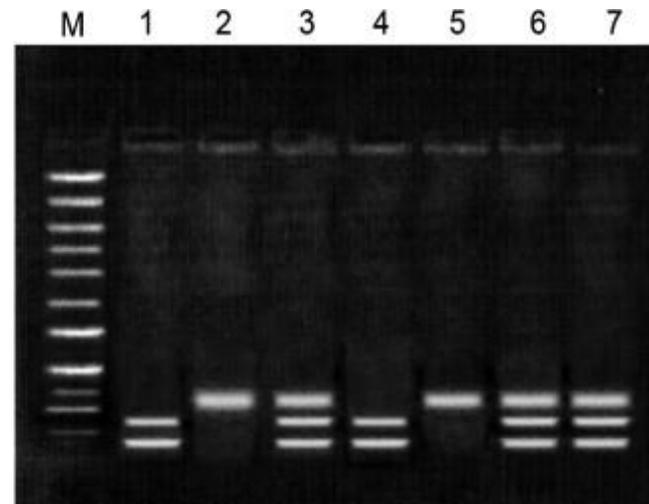
ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

ПОЛИМОРФИЗМ ДЛИН РЕСТРИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ



Схема



Стандартный ДНК
гель-электрофорез

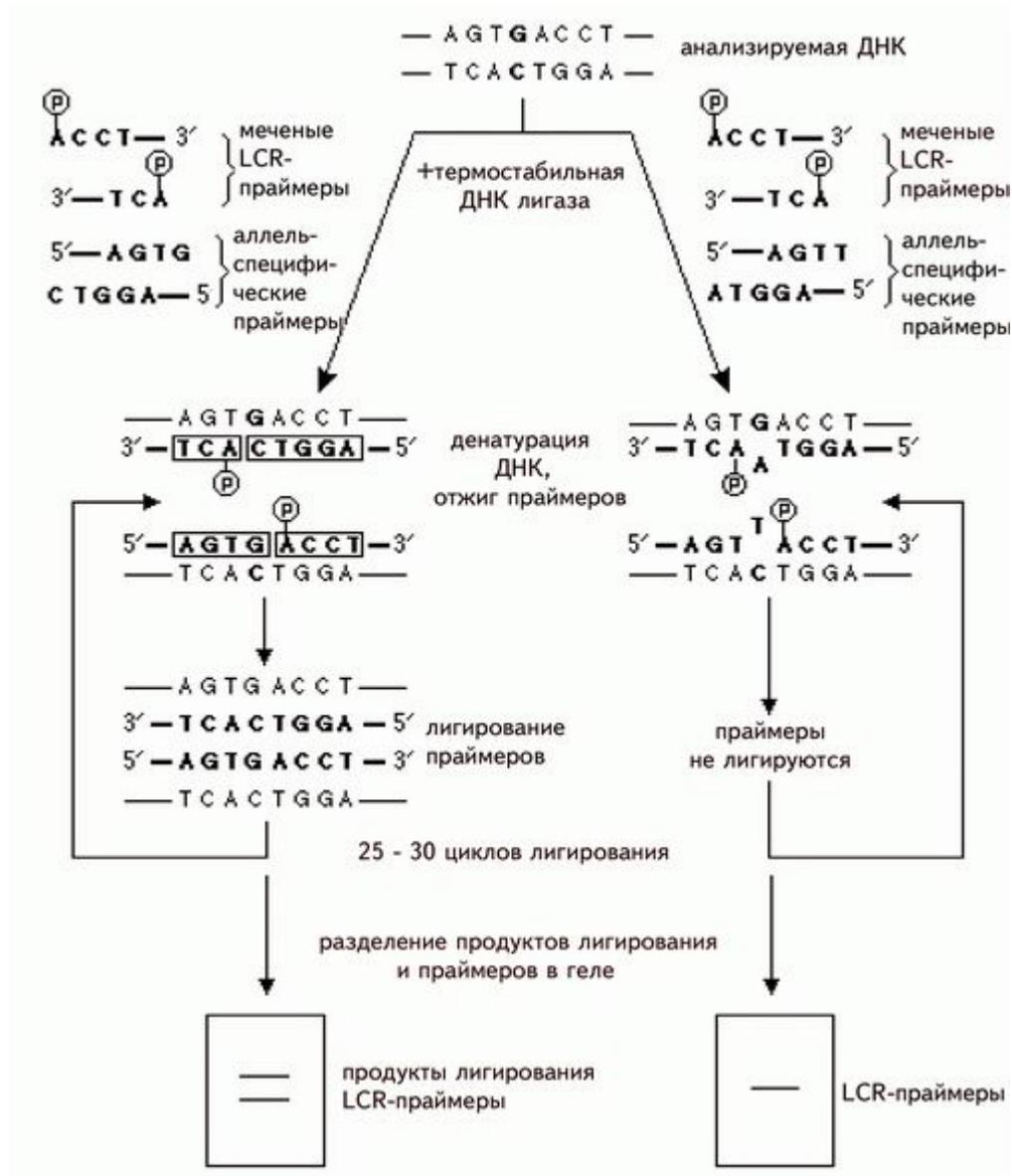
ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

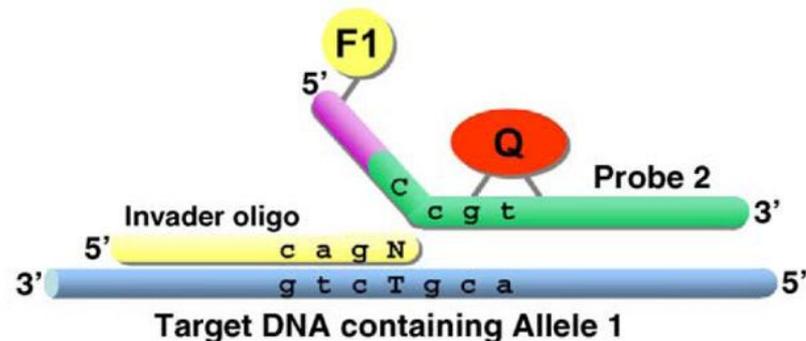
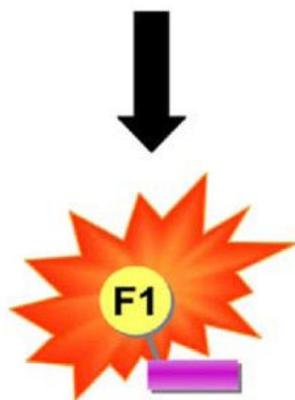
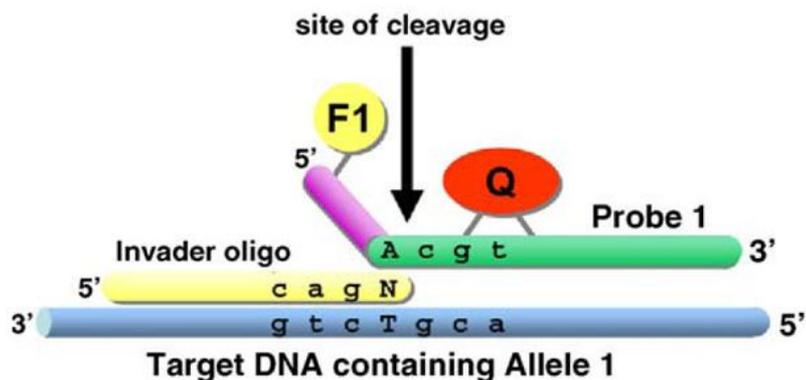
ЛИГАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ



ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

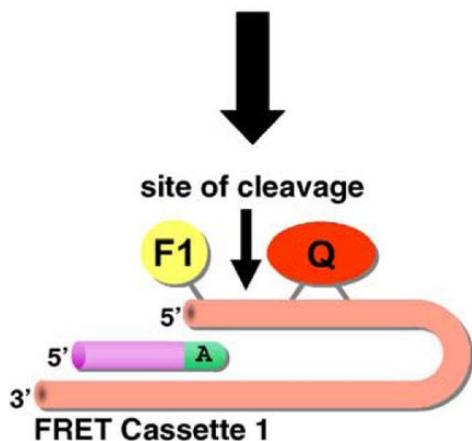
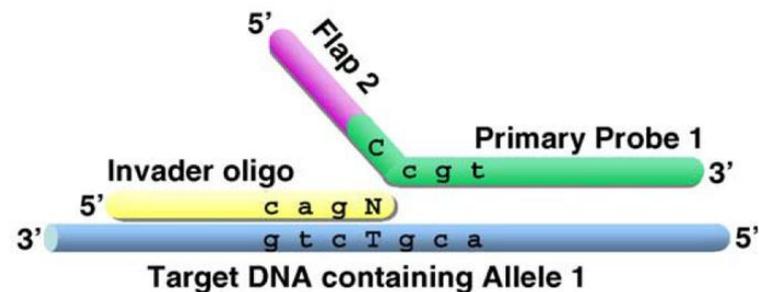
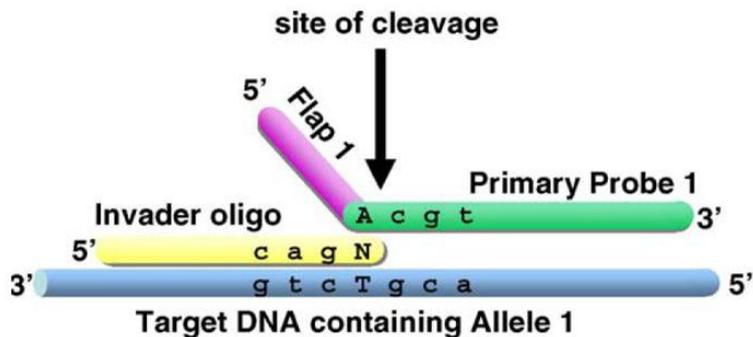
Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

ИНВАЗИВНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

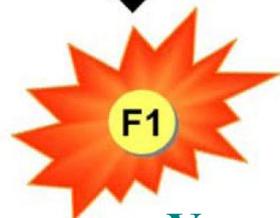
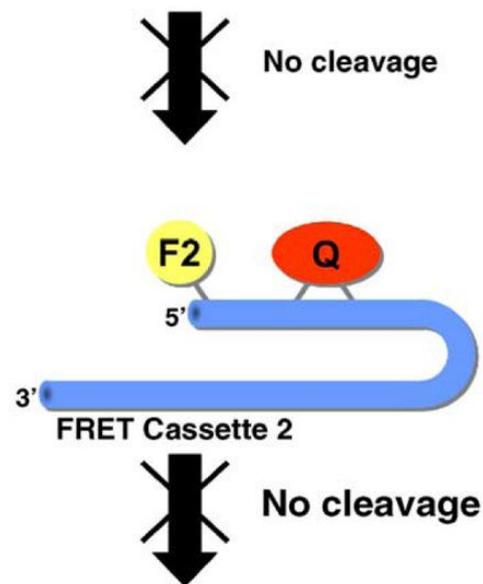


Алель-специфическое расщепление в Invader[®]-реакции с помощью FLAP-эндонуклеазы

ИНВАЗИВНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ



Secondary Reaction



Усиление сигнала в Invader[®]-реакции

ИНВАЗИВНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ



NIH Public Access

Author Manuscript

Mutat Res. Author manuscript; available in PMC 2009 November 2.

Published in final edited form as:

Mutat Res. 2005 June 3; 573(1-2): 103–110. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.08.016.

The Invader® assay for SNP genotyping

Michael Olivier*

Human and Molecular Genetics Center, Medical College of Wisconsin, 8701 Watertown Plank Road, Milwaukee, WI 53226, USA

Abstract

The Invader® assay uses a structure-specific flap endonuclease (FEN) to cleave a three-dimensional complex formed by hybridization of allele-specific overlapping oligonucleotides to target DNA containing a single nucleotide polymorphism (SNP) site. Annealing of the oligonucleotide complementary to the SNP allele in the target molecule triggers the cleavage of the oligonucleotide by cleavase, a thermostable FEN. Cleavage can be detected by several different approaches. Most commonly, the cleavage product triggers a secondary cleavage reaction on a fluorescence resonance energy transfer (FRET) cassette to release a fluorescent signal. Alternatively, the cleavage can be detected directly by use of fluorescence polarization (FP) probes, or by mass spectrometry. The invasive cleavage reaction is highly specific, has a low failure rate, and can detect zeptomol quantities of target DNA. While the assay traditionally has been used to interrogate one SNP in one sample per reaction, novel chip- or bead-based approaches have been tested to make this efficient and accurate assay adaptable to multiplexing and high-throughput SNP genotyping.

Keywords

Cleavase; Biplex invader; SISAR; FRET

NIH-PA Author Manuscript

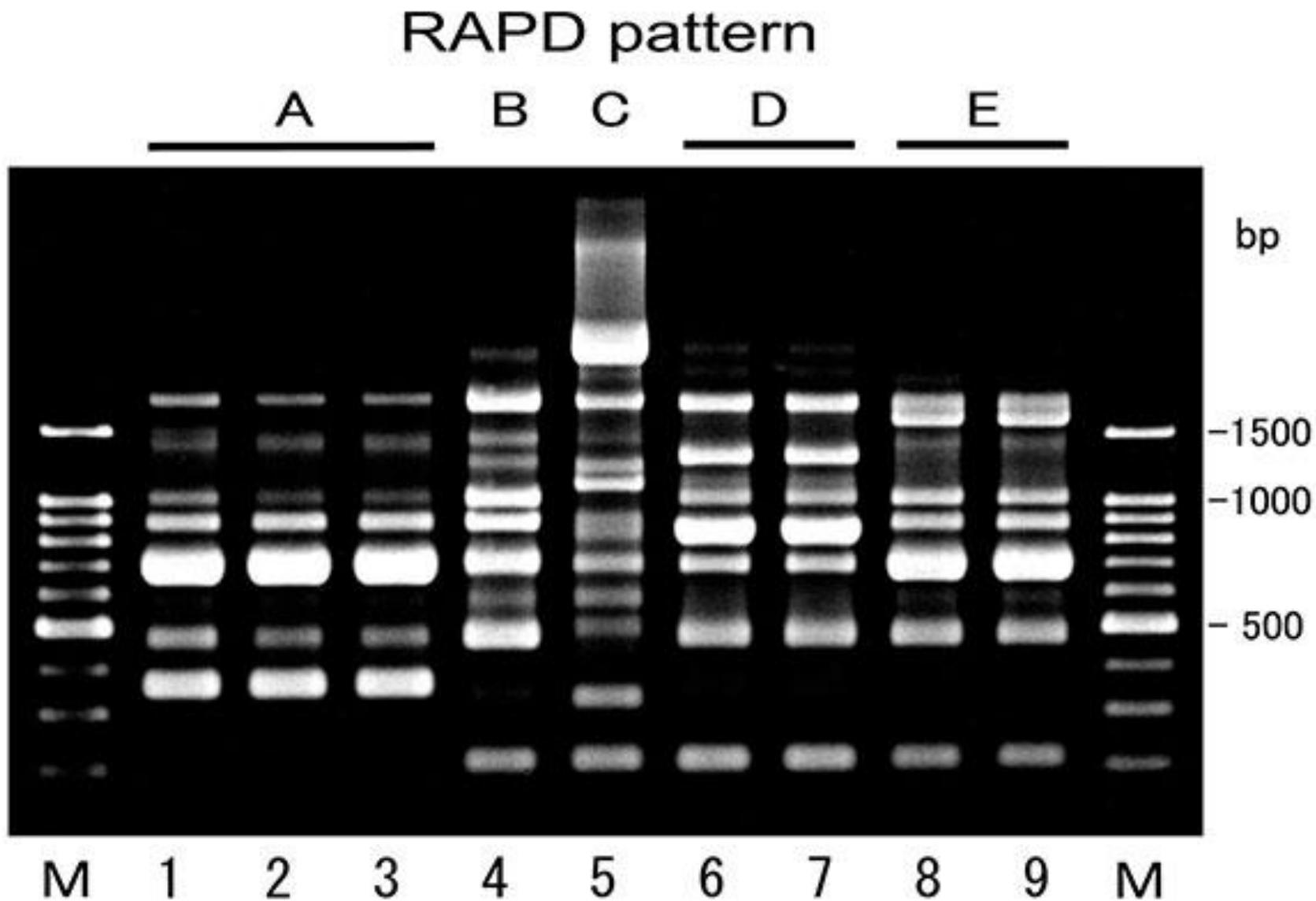
NIH-PA Author Manuscript

Более подробно – в работе Michael Olivier

ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

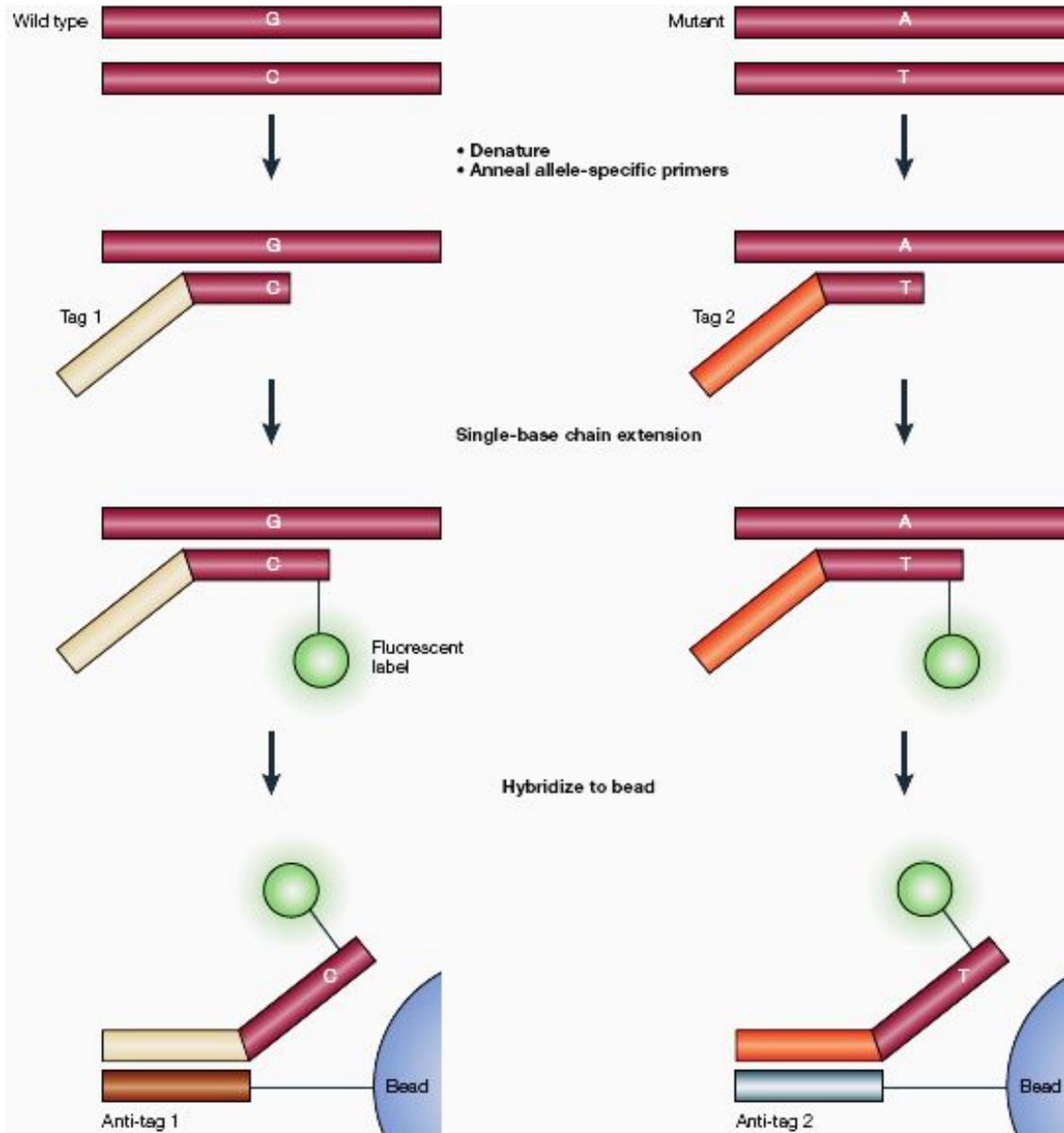
СЛУЧАЙНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ПОЛИМОРФНОЙ ДНК



ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	<p>Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP)</p> <p>Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP)</p> <p>Лигазная цепная реакция (LCR)</p> <p>Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader[®] assay)</p> <p>Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD)</p> <p>Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)</p>
Химические подходы	<p>Химическое расщепление гетеродуплексов</p> <p>Химическое лигирование</p>
Электрофоретические подходы	<p>Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP)</p> <p>Гетеродуплексный анализ</p> <p>Сиквенирование ДНК</p>
Твердофазные подходы	<p>Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах</p>
Физические подходы	<p>Масс-спектрометрия</p>
In silico подходы	<p>Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей</p>

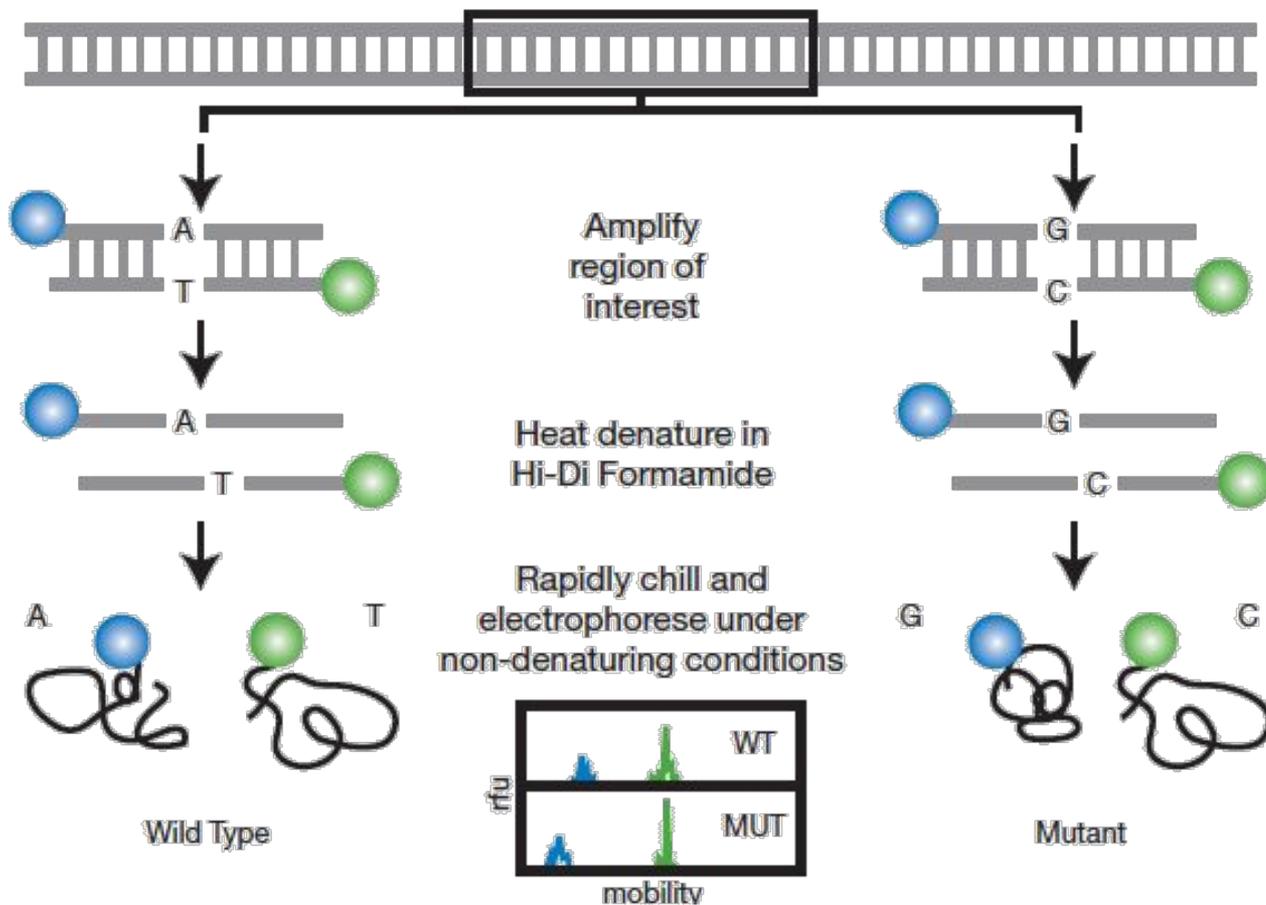
АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПЦР



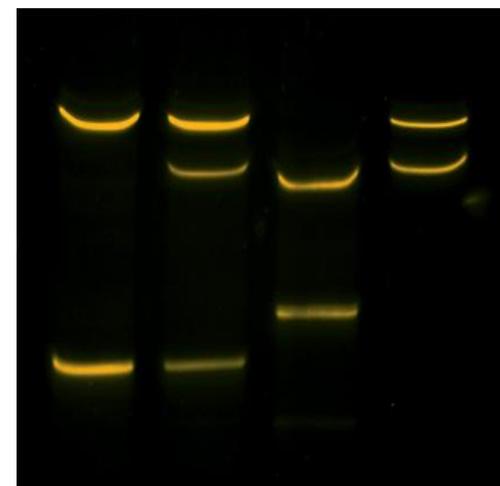
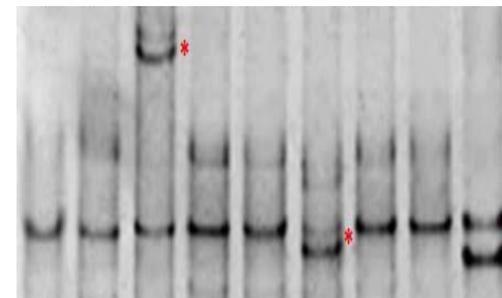
ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИИ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ



Схема

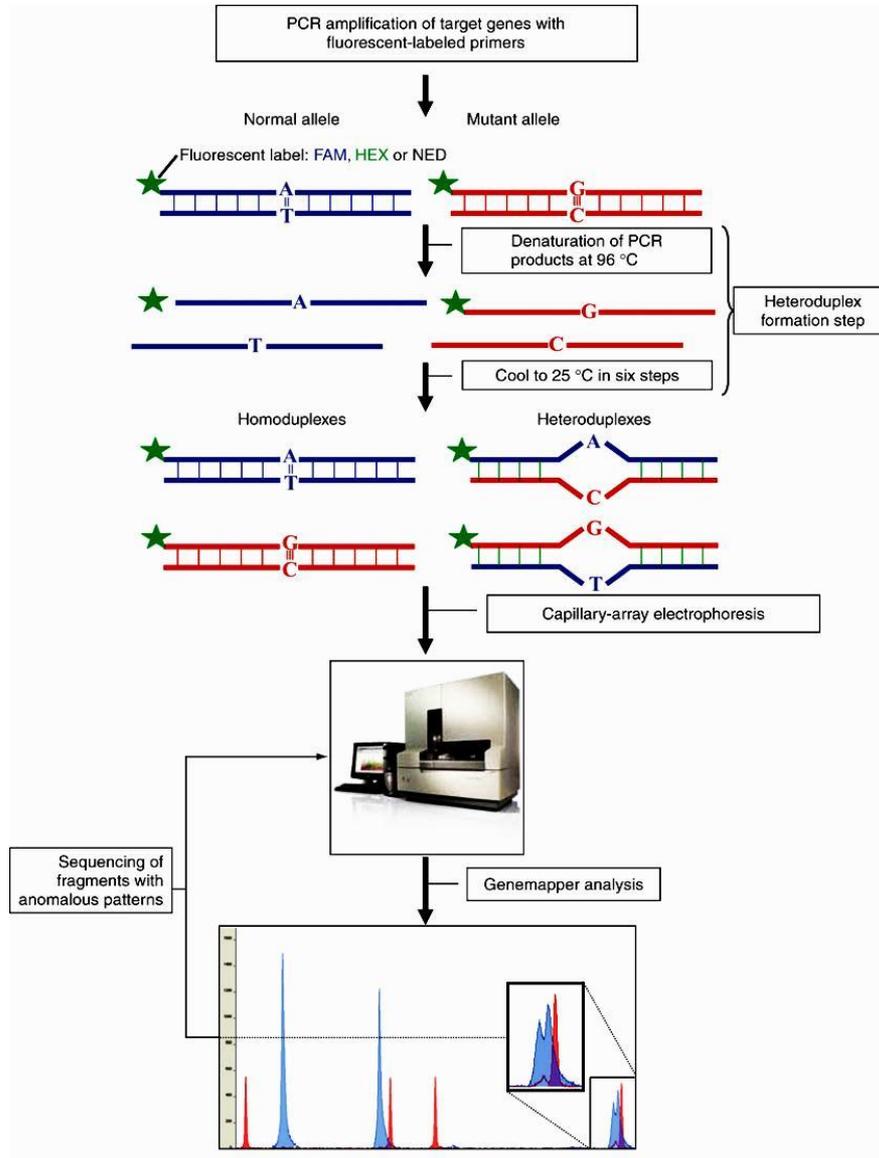


Детекция результата

ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

ГЕТЕРОДУПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ



Схема

ГЕТЕРОДУПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ

Protocol

Nature Protocols **2**, 237 - 246 (2007)

Published online: 15 February 2007 | [Corrected](#) online: 21 August 2008 | doi:10.1038/nprot.2006.482

Subject Categories: [Isolation, purification and separation](#) | [Nucleic acid based molecular biology](#)

Heteroduplex analysis by capillary array electrophoresis for rapid mutation detection in large multiexon genes

Eladio Velasco¹, Mar Infante¹, Mercedes Durán¹, Lucía Pérez-Cabornero¹, David J Sanz¹, Eva Esteban-Cardena² & Cristina Miner¹

Heteroduplex analysis (HA) has proven to be a robust tool for mutation detection. HA by capillary array electrophoresis (HA-CAE) was developed to increase throughput and allow the scanning of large multiexon genes in multicapillary DNA sequencers. HA-CAE is a straightforward and high-throughput technique to detect both known and novel DNA variants with a high level of sensitivity and specificity. It consists of only three steps: multiplex-PCR using fluorescently labeled primers, heteroduplex formation and electrophoresis in a multicapillary DNA sequencer. It allows, e.g., the complete coding and flanking intronic sequences of *BRCA1* and *BRCA2* genes from two patients (approximately 25 kb each) to be scanned in a single run of a 16-capillary sequencer, and has enabled us to detect 150 different mutations to date (both single nucleotide substitutions, or SNSs, and small insertions/deletions). Here, we describe the protocol developed in our laboratory to scan *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* genes using an ABI3130XL sequencer. This protocol could be adapted to other instruments or to the study of other large multiexon genes and can be completed in 7–8 h.

ARTICLE TOOLS

-  Send to a friend
-  Export citation
-  Export references
-  Rights and permissions
-  Order commercial reprints
-  Bookmark in Connotea

SEARCH PUBMED FOR

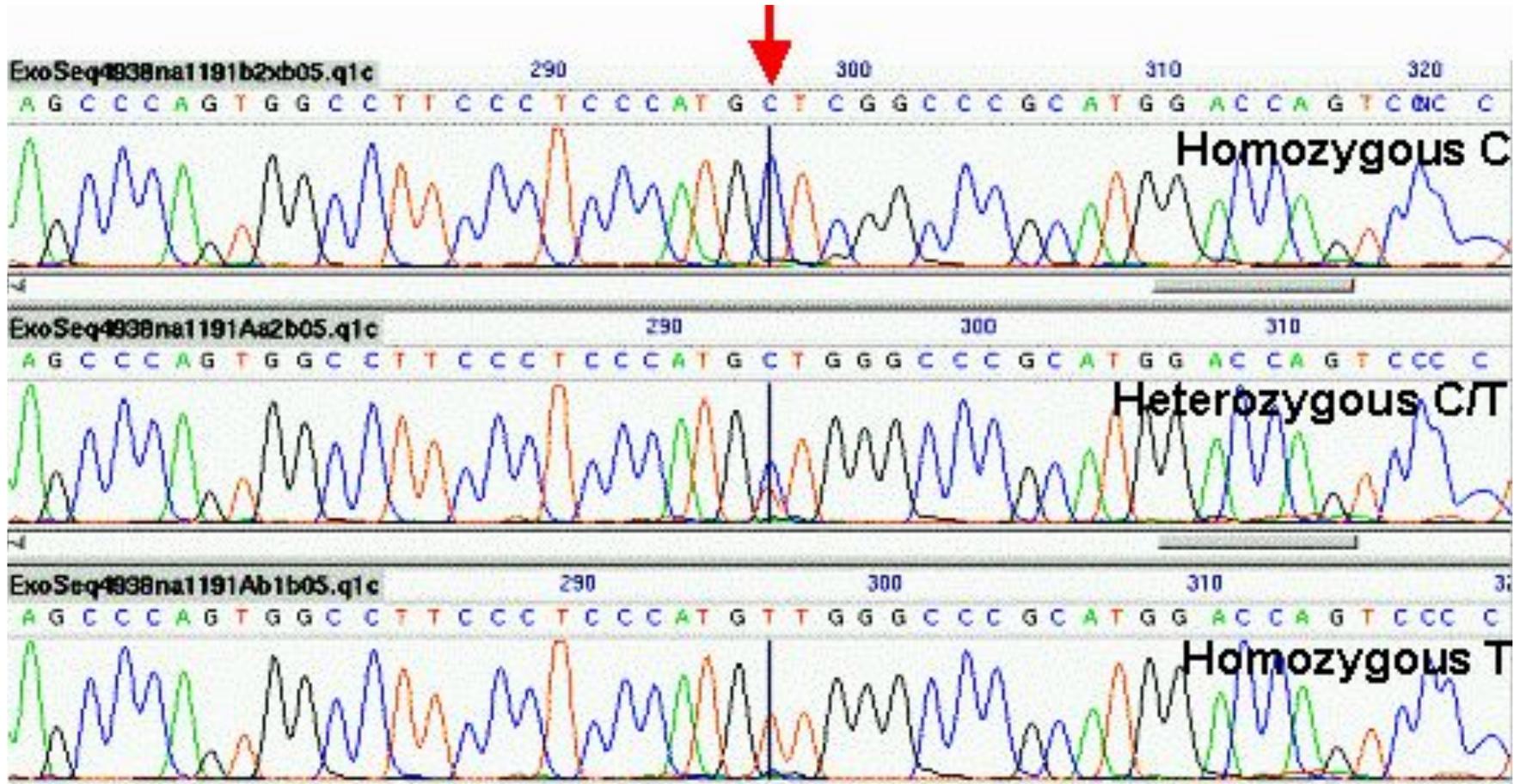
- ▶ Eladio Velasco
- ▶ Mar Infante
- ▶ Mercedes Durán
- ▶ Lucía Pérez-Cabornero
- ▶ David J Sanz
- ▶ Eva Esteban-Cardena
- ▶ [more authors of this article](#)

Более подробно – в работе Eladia Velasco и соавт.

ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

СИКВЕНИРОВАНИЕ ДНК

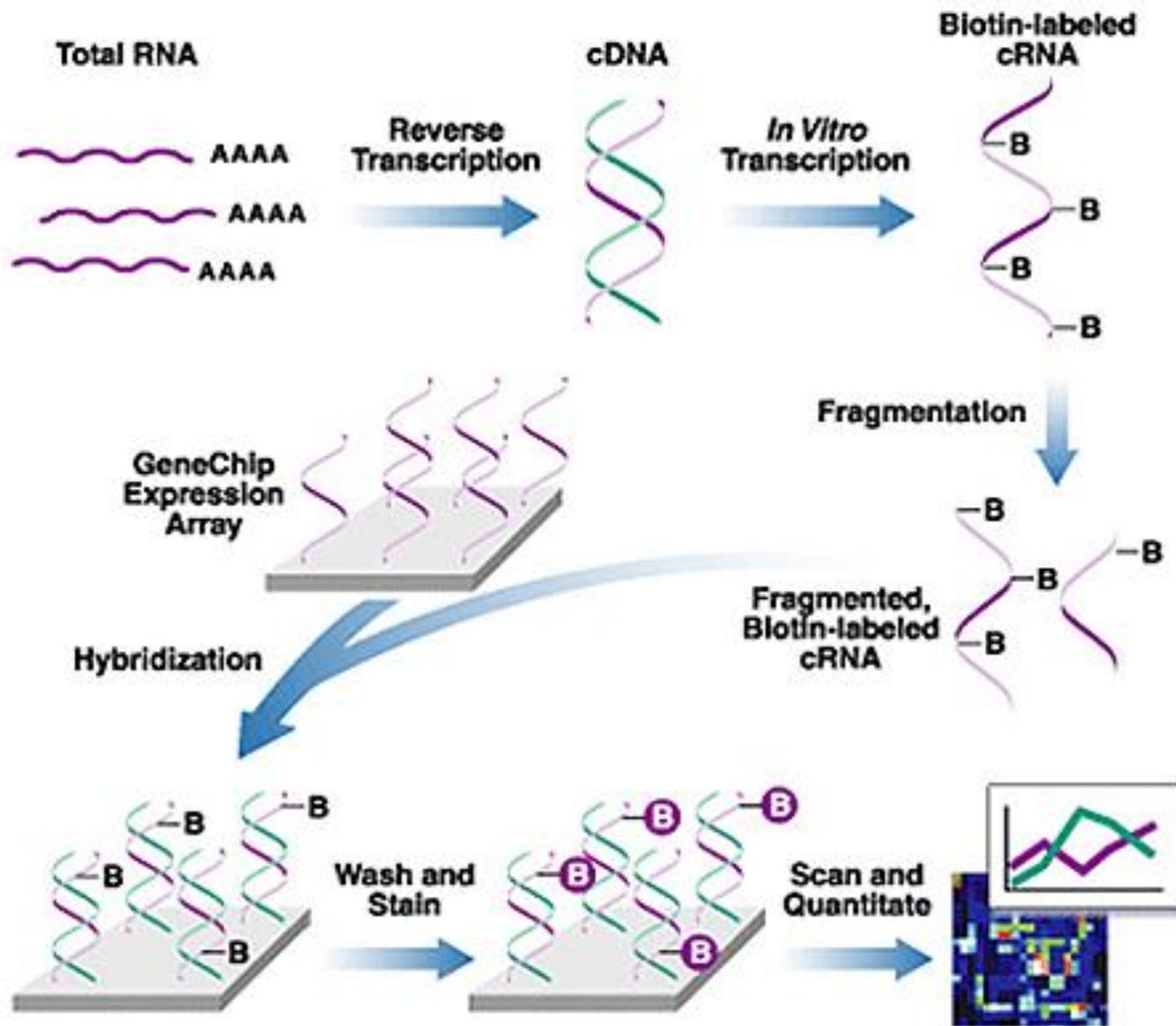


Детекция гетерозигот с помощью сиквенирования

ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ: ОБЩИЙ ОБЗОР

Группа подходов	Метод
Ферментативные подходы	Полиморфизм длин рестрицированных фрагментов (RFLP) Полиморфизм длин аплифицированных фрагментов (AFLP) Лигазная цепная реакция (LCR) Инвазивное расщепление олигонуклеотидов (Invader [®] assay) Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD) Аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR)
Химические подходы	Химическое расщепление гетеродуплексов Химическое лигирование
Электрофоретические подходы	Анализ конформации одноцепочечных фрагментов (SSCP) Гетеродуплексный анализ Сиквенирование ДНК
Твердофазные подходы	Гибридизация на олигонуклеотидных матрицах
Физические подходы	Масс-спектрометрия
In silico подходы	Сравнение имеющихся в базах данных геномных и EST последовательностей

ГИБРИЗАЦИЯ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ МАТРИЦАХ



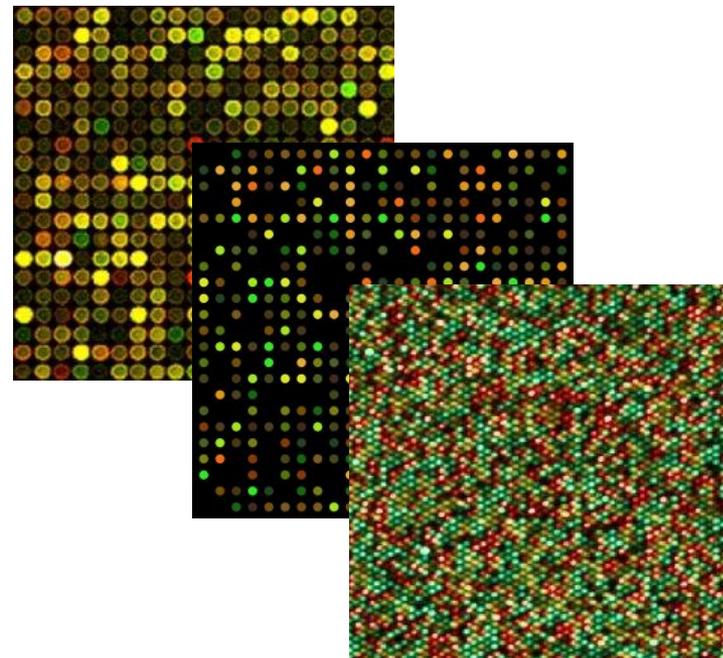
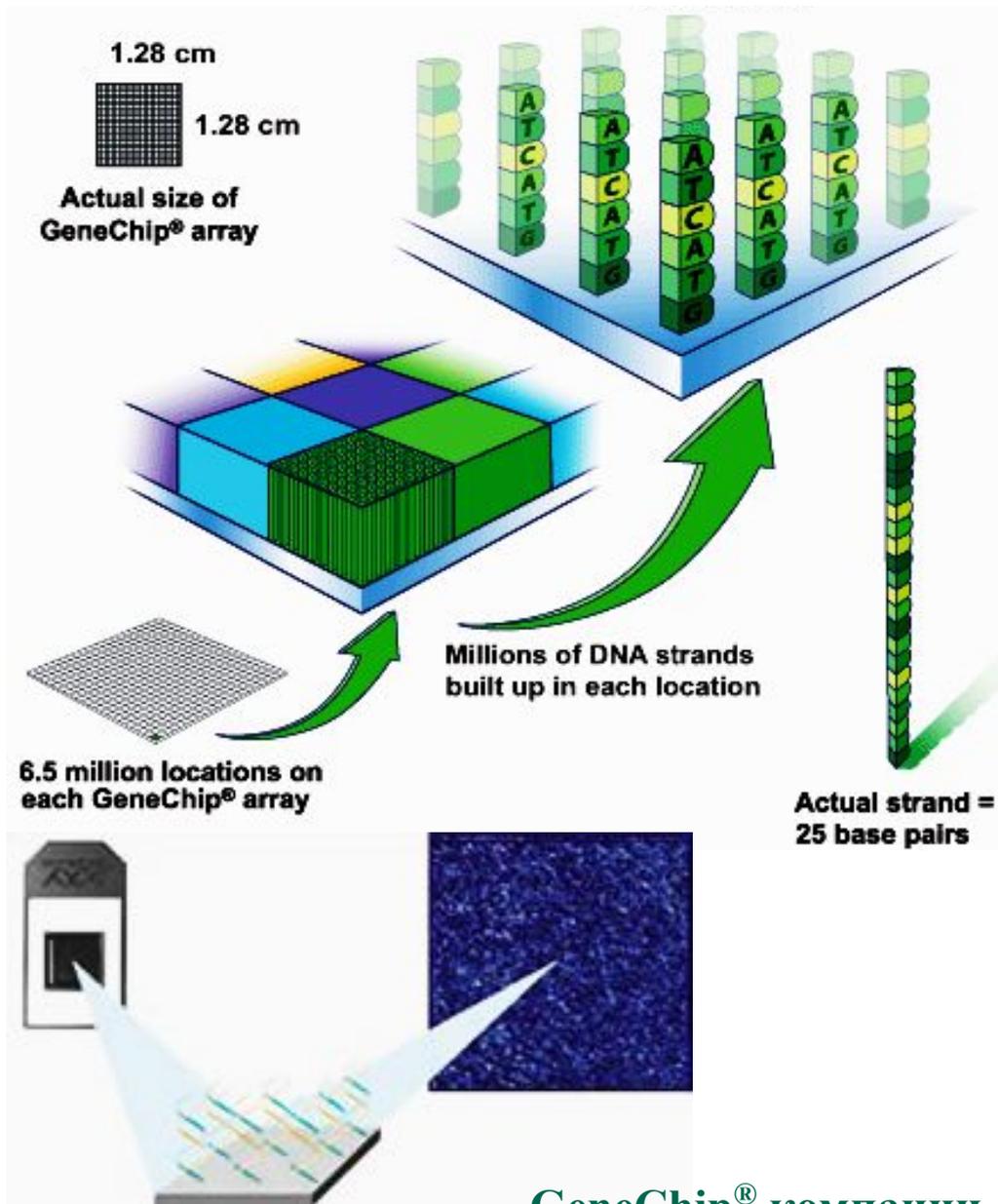
Базовая схема микроэрея при анализе экспрессии генов

ГИБРИДИЗАЦИЯ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ МАТРИЦАХ



GeneChip® компании Affymetrix

ГИБРИДИЗАЦИЯ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ МАТРИЦАХ



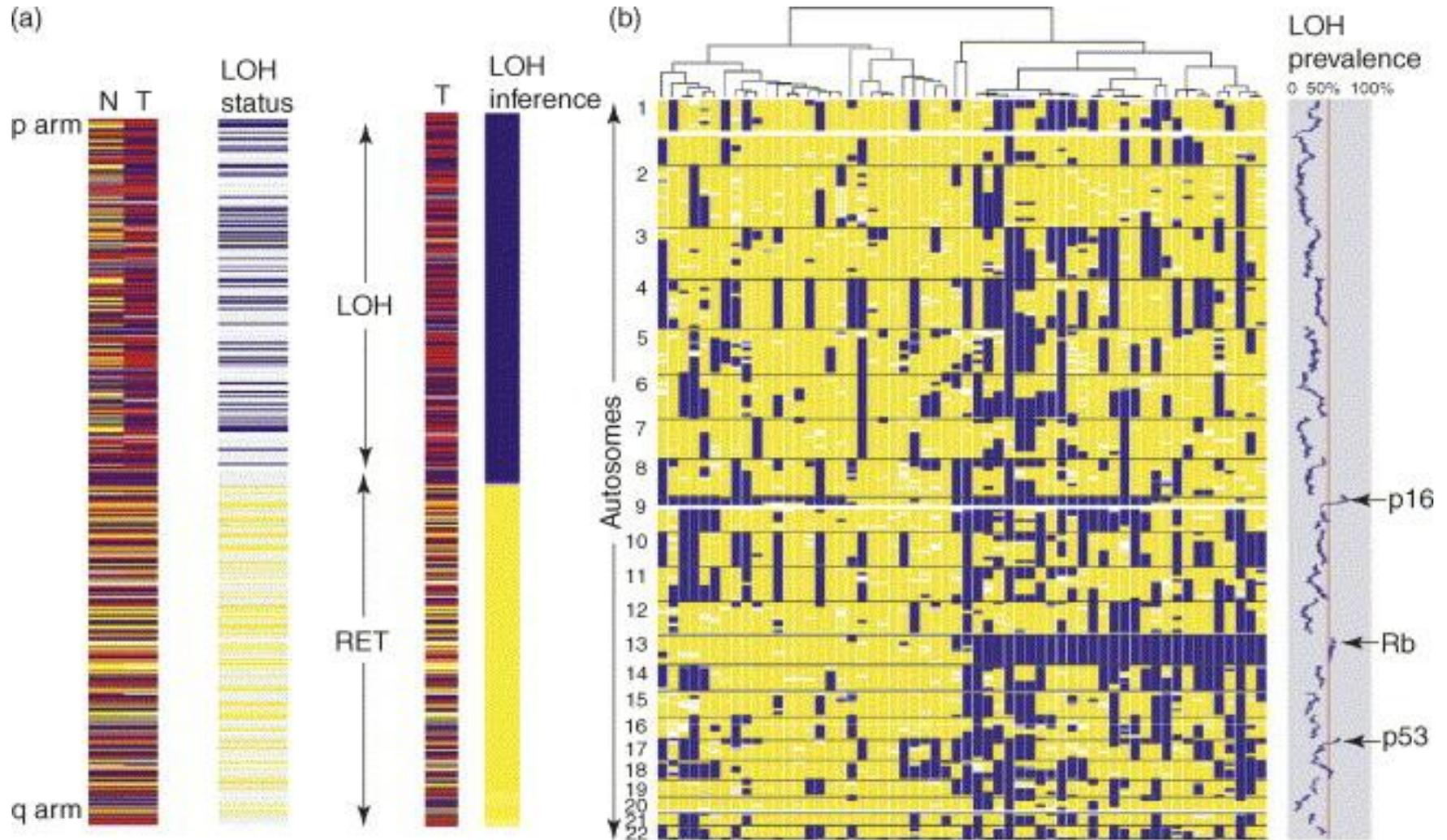
GeneChip® компании Affymetrix

ГИБРИДИЗАЦИЯ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ МАТРИЦАХ



- a probe is a 25 mer oligonucleotide complementary to target
- a probeset consists of 11 probes
- a gene can have multiple probesets
- HGU133plus2.0 54,000 probesets ($1.6 \cdot 10^6$ probes)

ГИБРИДИЗАЦИЯ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ МАТРИЦАХ



Genome-Wide Human SNP Array 6.0 компании Affymetrix

ГИБРИДИЗАЦИЯ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ МАТРИЦАХ

Платформа	Количество полиморфных маркеров	Охват, %
Illumina HumanHap300	317511	75
Affymetrix SNP Array 5.0	500568	65
Illumina HumanHap550	555352	87
Illumina Human610	620901	89
Illumina HumanHap650Y	660917	87
Affymetrix SNP Array 6.0	более 800000	83
Illumina Human1M	1199187	93

**Коммерчески доступные платформы генотипирования
на микрочипах высокой плотности**