



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00187

(22) Data de depozit: 13.03.2015

(41) Data publicării cererii:
30.09.2015 BOPI nr. 9/2015

(71) Solicitant:
• GENOME LIFE RESEARCH S.R.L.,
ȘOS. VIRTUȚII NR. 20, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• RAICU FLORINA, CALEA APEDUCTULUI
NR. 6, BL. D1A2, ET. 1, AP. 5, BUCUREȘTI,
B, RO;
• COCOȘ RELU, STR. DREPTĂȚII NR. 28,
BL. F6, SC. 1, ET. 3, AP. 15, BUCUREȘTI,
B, RO

(54) TRUSĂ DE DETECȚIE SIMULTANĂ A MICRODELETIILOR
CROMOZOMULUI Y BAZATĂ PE ANALIZA CURBELOR DE
TOPIRE ÎN SISTEM REAL TIME GENERATE SUCCESIV
REAȚIEI TOUCHDOWN PCR MULTIPLEX TOUCHDOWN

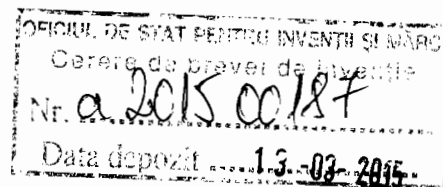
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o trusă utilizată pentru identificarea bazei genetice a infertilității masculine. Trusa conform invenției conține 4 panouri cvadruplex STS și 3 triplex STS combinate în 7 tuburi diferite, astfel încât să formeze, împreună cu reactivii necesari standard pentru reacția PCR, un amestec gata de utilizare, care se

congelează pentru păstrare și se decongelează pentru utilizare în cadrul metodei de analiză genetică moleculară.

Revendicări: 10





I. DESCRIEREA INVENTIEI

1. INTRODUCERE

1.1. Necesitatea diagnosticului molecular in cazul infertilitatii masculine idiopatice

In prezent infertilitatea este considerata o problema complexa de sanatate reproductiva si ea a crescut in lume cu pana la 50% incepand din anul 1955 astfel incat la ora actuala sunt afectate aproximativ 10 - 15% din cupluri ^[1,2]. Evolutia societatii umane a schimbat stilul de viata fapt ce a condus treptat si la o crestere a poluantilor din mediu. Mai mult, obiceiurile alimentare deficitare, efectele adverse ale unor produse farmaceutice si chimice, expunerea la radiatii nocive de zi cu zi, stresul fizic si psihologic in viata si de la locul de munca, fumatul, sedentarismul, obezitatea si cresterea varstei de casatorie reprezinta impreuna factori care pot afecta in mod direct si indirect, fertilitatea umana ^[3,4]. Persoanele de sex masculin sunt responsabile pentru 40-50% dintre cazurile de infertilitate. Infertilitatea masculina are o baza genetica substantiala si depinde in mare masura de numerosi factori de risc din mediul inconjurator care pot conduce la randul lor la aparitia de mutatii genetice. O serie de studii au sugerat ca inca de la mijlocul anilor '70 fertilitatea masculina scade cu cate doua procente in fiecare an in anumite tari europene In prezent, aproximativ unul din 20 de barbati este infertil din cauza prezentei unor defecte grave care afecteaza desfasurarea normala a spermatogenezei si aproape unul din cinci barbati sanatosi intre 18 si 25 ani au o spermograma anormala. In plus, la 50-60% dintre infertili etiologia reprezinta inca o necunoscuta (asa-numita infertilitate idiopatica) ^[5, 6, 7, 8, 9, 10].

Desi au fost identificate mai multe gene implicate in infertilitatea masculina, mecanismele biologice care conduc la perturbarea spermatogenezei la pacientii cu anomalii genetice si a caile moleculare afectate de pierderea functiei acestor gene sunt inca necunoscute. De asemenea, reglarea exprimarii genelor specific implicate in functionarea liniei germinale umane este inca putin inteleasa.

Pe de alta parte, selectia naturala previne transmiterea mutatiilor care cauzeaza infertilitatea, insa acest mecanism natural de protectie este surmontat la ora actuala cu ajutorul noilor tehnici de reproducere umana asistata. In special, tehnica de injectare intracitoplasmatica a nucleului spermatic (ICSI) este folosita la momentul actual pentru a

rezolva aceasta problema dar din pacate ea poate facilita in acelasi timp si transmiterea defectului genetic necunoscut responsabil de infertilitate din tata in fiu.

Astfel, recomandarea clinica generala in ghidurile internationale de management al infertilitatii prevad ca pentru o concentratie a spermei mai mica de 5×10^6 /ml este necesara testarea microdeletiiilor cromozomului Y.

1.2. Factorii genetici

Factorii genetici cunoscuti in prezent ca fiind implicati in infertilitatea masculina sunt urmatorii: factorii majoritari sunt reprezentati de dezechilibrele genetice cauzate de microdeletii si microduplicatii ale cromozomul Y; mai rar rearanjamentele cromozomale (translocatii robertsoniene, translocatii reciproce, inversii) precum si mutatiile genetice unice (in gena pentru receptorul androgenilor, gena fibrozei chistice- CFTR, INSL3, MTHFR) au implicare directa in infertilitate [11,12]. Pana in prezent, nu este clar daca fenotipul care rezulta in urma prezentei acestor rearanjamente se manifesta din cauza pierderii tuturor genele implicate in aceste modificari genomice sau de distrugerea unei gene majore a carei unica eliminare este capabila de a induce deteriorarea spermatogenezei.

1.3. Microdeletiiile din bratul lung al cromozomului Y. Microdeletiiile din bratul lung al cromozomului Y (Yq) reprezinta cea mai frecventa cauza genetica moleculara pentru infertilitatea si reprezinta 15% din cazurile de azoospermie non-obstructiva sau oligozoospermie severa [17, 12]. Au fost definite trei regiuni ca locusuri genice responsabile de desfasurarea spermatogenezei la om: AZFa, b, si c (azoospermia factor), incepand cu regiunea proximala si terminand cu regiunea distala a cromozomului Yq [19]. Marea majoritate a delectiilor sunt reprezentate de eliminarea totala a regiunii AZF si ele se numesc in acest caz complete. Regiunea AZFa are 0,8 Mb in lungime, microdeletiiile AZFb pot elimina o portiune de 6,2 Mb, microdeletiiile AZFb / c pot ajunge la 7,6 Mb lungime si regiunea cu cea mai frecventa eliminata este AZFc care se intinde in regiunea distala si are 3,5 Mb in lungime [13,14, 15].

Mecanismele moleculare alterate in cazul microdeletiiilor AZF sunt complet necunoscute si nu se stie care sunt functiile complete si precise ale genelor unice din regiunile AZF in desfasurarea spermatogenezei. Cele mai multe dintre microdeletiiile AZF sunt generate prin recombinarea omologa intracromozomala intre blocuri secventa

repetate similare organizate in structuri palindromice ce prezinta secvente aproape identice.

Datele recente din literatura de specialitate sugereaza ca si alte recombinari intracromosomale in cadrul AZFc, cunoscute sub denumirea de deletii partiale, ar putea fi asociate cu un risc crescut de modificare a spermatogenezei. Deletiile AZF partiale sau deletia genelor unice AZF (g1/g2, care indparteaza 1.6 Mb, b1/b3 si b2/b3 care elimina 1.8 Mb) sunt foarte rare, nu sunt bine caracterizate la nivel molecular si numeroase aspecte, atat la nivel biologic si clinic, raman sa fie clarificate. Aceste deletii partiale pot reprezenta un factor de risc puternic pentru esecul spermatogenezei.

Microdeletiile AZF pot fi considerate "pre-mutatii" care pot genera ulterior pierderea completa a cromozomului Y din spermatozoizii pacientilor cu deletia AZF, crescand astfel riscul de aparitie a celulelor embrionare XO. Recent s-a descoperit ca barbatii cu deletii AZFc produc, de asemenea, un procent mai mare de spermatozoizi cu aneuploidii. De fapt, pacientii cu deletii AZFc prezinta o reducere semnificativa a procentului de spermatozoizi normali in comparatie cu barbatii normospermici utilizati drept control, concomitent cu o crestere a spermatozoizilor nullisomici si o crestere a spermatozoizilor XY-disomici. Exista indicii conform carora pacientii cu AZFc pot prezenta spermatozoizi nucleosomici care, in urma fertilizarii unui ovul sanatos din punct de vedere genetic, pot creste riscul aparitiei sindromului Turner (45, X).

O serie de cercetari realizate de solicitant ^[12,16] indica faptul ca mai multe forme de infertilitate pot fi declansate printr-un mecanism patogenic comun, care este probabil legat de modificarile care apar la nivelul sistemului de stocare specific mRNA din celulele germinale masculine. Prezenta microdeletiiilor AZFc in linii celulare in mozaic sau pierderea functiei genelor AZFc, in special a genei DAZ, poate explica acest mecanism patogenic comun ^[16]. Pe baza datelor obtinute de noi si cele din literatura de specialitate actuala se poate ipotetiza ca pierderea functiei genei DAZ asociata cu microdeletia AZFc completa sau partiala poate explica numarul mare de cazuri despre care s-a crezut anterior ca ar avea infertilitate idiopatica si investigatiile asupra acestei gene pot fi importante pentru a dezvalui cauzele moleculare ale infertilitatii masculine.

1.4. Semnificatia analizei de baza din trusa de detectie a microdeletiiilor

In principiu analizarea unui singur locus STS nepolimorfic specific fiecarei regiuni AZF este suficient pentru a determina prezenta unui microdeletii. Situsurile ADN cu secventa cunoscuta (STS - sequence tagged sites) reprezinta secvente scurte de ADN a caror localizare si ordine a abazelor in genomul uman este deja cunoscuta. Aceste secvente sunt unice in genom motiv pentru care sunt foarte utile in cartarea genelor si servesc ca puncte de reper in genomul uman. In cazul deletiilor de fragmente cromozomale in general si a microdeletiiilor cromozomului Y in special, aceste STS-uri analizate individual sau combinat permit detectia microdeletiiilor cromozomului Y.

Analizarea a doi loci per regiune creste acuratetea analizei astfel incat analizarea cu ajutorul setului standard de primeri (sY84, Sy86, sY127, sY134, sY254, sY255) a doar 2 loci per regiune ramane inca valida. In cazul STS sY 84 s-a constatat ca exista un mismatch la mijlocul secventei primerului forward precum si un SNP in primerul reverse. Acesta este motivul pentru care acest STS a fost eliminat din cadrul trusei propuse de noi.

Semnificatia analizei de baza si a celei extinse in cazul regiunii AZFa

Avand in vedere mecanismul patogenic al microdeletiiilor atunci cand ambii markeri STS alesi sunt absenti cel mai probabil avem o deletie AZFa completa. Totusi, deletiile partiale ale regiunii AZF a au fost documentate in literatura de specialitate iar din punct de vedere fenotipic manifestarile clinice sunt mult mai putin severe decat in cazul deletiei complete. Analiza extinsa a regiunii AZFa este astfel absolut necesara, motiv pentru care sunt indicatiile cu privire la analizarea suplimentara a altor markeri STS. Urmand o cale de analiza mai sofisticata dar, in opinia noastra, foarte precisa, noi am ales urmatorul panel de markeri STS: sY 82 (prezent), Sy 1064 (absent), AZF- proximal2 (absent), sY 86(absent), sY 1182 (absent), AZF-distal1 (absent), sY 88 (prezent).

Semnificatia analizei de baza si a celei extinse in cazul regiunii AZFb

Cei doi markeri STS, sY127 si sY 134, sunt localizati in regiunea mediana respectiv diastala a AZFb. Conform informatiilor disponibile la momentul actual absentia celor doi STS indica absentia completa a regiunii AZFb. Ghidul european din 2014 prevede testarea a mai muti markeri pentru acesta regiune. Noi am ales urmatorul panel de markeri STS: sY 105

(prezent), sY 1224 (absent), sY 113, sY 116, sY117, sY127, sY134, sY 143/ 1192(absent), sY 153(prezent).

Semnificatia analizei de baza si a celei extinse in cazul regiunii AZFc

Markerii STS sY254 si sY255 sunt specifici pentru gena DAZ prezenta in 4 copii in cromozomul Y fiind organizate doua cate doua in 2 complexe palindromice (P1 si P2) orientate cap la cap. Absenta ambelor STS-uri indica absenta completa a regiunii AZFc. Absenta a doar unui singur marker nu a fost documentata si trebuie privita intotdeauna drept o eroare metodologica. Analizand si markerul sY160 specific heterocromatinei localizate in regiunea terminala a bratului scurt permite laboratorului sa indentifice daca deletia a avut loc dupa paternul b2/b4. De cele mai multe ori deletiile terminale ale cromozomului Y caracterizate de absenta heterocromatinei sunt de cele mai multe ori asociate cu cariotipul mozaic (46, XY/45, X). Prezenta liniilor celulare cu cromozomul Y absent reprezinta un prognostic negativ pentru prezenta spermatozoizilor viabili.

Deletia completa a AZFb si AZFc (P5/diastal P1 sau P4/distal P1) este indicata de absenta markerilor specifici precum si de markerii sY 116 (prezent in cazul P4/distal P1 si absent in cazul P5/distal P1).

Testarea genei SRY localizata in bratul scurt al cromozomului Y (sY14) este necesara pentru a documenta prezenta cromozomului Y chiar daca acesta a suferit modificari genetice in bratul sau lung.

Bibliografie

1. Sarvari A. 2010. *Effect of Environmental Risk Factors on Human Fertility*, J Reprod. Infertil.11(4):341.
2. Nishimune Y & Tanaka H. 2006. *Infertility caused by polymorphisms or mutations in spermatogenesis-specific genes*. Journal of Andrology 27 326–334.
3. Sharpe RM. 2004. *How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?* British Medical Journal, 328, 447-451.
4. Skakkebaek NE. 2003 *Testicular dysgenesis syndrome*. Hormone Research 60 (Supplement 3).

5. te Velde E. 2010 *Is human fecundity declining in Western countries?* Hum Reprod. 25(6):1348-53.
6. Swan SH. 2006. *Does our environment affect our fertility? Some examples to help reframe the question.* Semin Reprod Med., 24(3):142-6.
7. Skakkebaek NE, Rajperts-de Meyts E, Main KM. 2001. *Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects.* Hum Reprod; 16: 972–8.
8. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. 1995. *Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years.* N Engl J Med. 332-281.
9. Irvine DS. Falling sperm quality. BMJ 1994; 309:476.
10. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years.* BMJ 1992; 305:609.
11. Alexandra M. Lopes et al. 2013. *Human Spermatogenic Failure Purges Deleterious Mutation Load from the Autosomes and Both Sex Chromosomes, including the Gene DMRT1.* PLoS Genet; 9(3).
12. Ferlin A, **Raicu F**, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. 2007. *Male infertility: role of genetic background.* RBM Online 14: 734-745
13. Vogt, P. H., Edelman, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F. et al. 1996. *Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11.* Human Molecular Genetics 5: 933–943.
14. Machev N, Saut G, Longepied G, et al. 2004. *Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility.* Journal of Medical Genetics 41: 814-825.
15. Massart A, Lissens W, Tournaye H and Stouffs K 2012. *Genetic causes of spermatogenic failure.* Asian Journal of Andrology 14:40–48.
16. Gatta V., **Raicu F**, A. Ferlin, I. Antonucci, A.P. Scioletti, A. Garolla, G. Palka, C. Foresta, L. Stuppia, 2010. *Testis transcriptome analysis in male infertility: new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with and without AZFc microdeletion.* BMC Genomics, 11-401.
17. **Florina Raicu**, L. Popa, Pompilia Apostol, D. Cimponeriu, Letitia Dan, Elena Ilinca, Laura Luana Dracea, B. Marinescu, *Screening for microdeletions in human Y chromosome -*

AZF candidate genes and male infertility, Journal of Cellular and Molecular Medicine. Vol 7, No 1, 2003 pp. 43-48

18. Vinci G, **Raicu Florina**, Popa L, Popa O, Cocos R, McElreavey K., *A deletion of a novel heat shock gene on the Y chromosome associated with azoospermia*, 2005, Molecular Human Reproduction, Apr;11(4):295-8

19. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F. *EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013*. Andrology. 2014;2(1):5-19.

2. DESCRIEREA DETALIATA A INVENTIEI

Inventia descrie dezvoltarea unei truse de analiza genetica integrata care sa ofere un diagnostic molecular detaliat, simplu, rapid, robust, eficient si ieftin ce poate fi aplicat in diagnosticul molecular al infertilitatii masculine cu cauze genetice. Identificarea microdeletiiilor aparute in cromozomului Y asociate cu infertilitatea masculina, cu ajutorul noii truse de analize genetice propuse pentru a fi dezvoltate, ar reprezenta un diagnostic optim de rutina, la indemana fiecarui cuplu cu probleme de infertilitate, care ar genera rezultate rapide pentru stabilirea unui tratament precoce. Utilizarea acestei metode de analiza genetica de inalta rezolutie ar prezenta astfel un impact clinic relevant asupra calitatii vietii cuplurilor infertile deoarece ar permite o evaluare corecta a diagnosticului individualizat avand in acelasi timp costuri terapeutice reduse pentru societate si eficienta maxima pentru pacient.

Trusa de diagnostic molecular va contine 7 paneluri de primeri, acoperind o baterie de 21 de markeri genetici STS (Short Tagged Sequence) de confirmare a microdeletiiilor si microduplicatiilor Y. Acest panel a fost alcatuit tinand cont de noile rezultate stiintifice din ultimii ani din literatura de specialitate si are la baza toate indicatiile privind testarea microdeletiiilor cromozomului Y din ultimului Ghid European (2014). Trusa prezinta primul model de acest fel utilizat la dezvoltarea unui diagnostic genetic molecular inovator al infertilitatii masculine.

Procedeul de diagnostic molecular propus utilizeaza tehnologia Real Time PCR multiplex si reprezinta o inovare si imbunatatire clara a testelor existente pentru robustetea, simplitatea de utilizare si costul redus.

Trusa pentru testarea microdeletilor aparute in cromozomul Y se bazeaza atat pe o serie de primeri clasicii pentru STS (short tagged sequences) cat si unii noi care acopera in cele mai multe cazuri zonele cele mai predispuse la pierderi de material genetic din cromozomul Y si care sunt relevante din punct de vedere clinic urmand indicatiile ultimului Ghid European EAA/EMQN din 2014. Acest ghid european este in permanenta actualizat o data la aproximativ 10 ani, timp in care numeroase alte cauze genetice sunt nou identificate si pot furniza din ce in ce mai multe explicatii privind aparitia cazurilor de infertilitate considerate atunci idiopatice (cauze necunoscute).

Pentru regiunea AZFa subregiunile detectate sunt: sY82, sY 1064, AZF-prox2, sY 86, sy 1182, AZF-dist1, sY 88. Pentru regiunea AZFb subregiunile detectate sunt: sY 116, sY 117, sY153, sy 105, sY 1224, sY 127, sY 134, sY 1192 + sY 143, sY 1291. Pentru regiunea AZFc subregiunile detectate sunt: sY 254, sY 255, sY 160. Pentru bratul scurt al cromozomului Y: sY 14.

2.1. Metode de analiza utilizate in diagnosticul molecular ale companiilor care comercializeaza produse asemanatoare

Laboratoarele clinice internationale ofera diferite metode pentru detectarea infertilitatii masculine cu cauze genetice cum ar fi: PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex cuplat cu electroforeza, revers-hibridizarea, MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) sau analiza de fragmente cuplata cu secventierea.

2.1.1. PCR (Polymerase chain reaction) cuplata cu detectie in gel de agaroză.

Reactia PCR este cea mai mare achizitie stiintifica ce a revolutionat domeniul geneticai moleculare. Este foarte raspandita si are numeroase aplicatii deoarece permite producerea unui numar mare de copii ADN plecand de la o singura molecula de ADN.

Metoda clasica de identificarea a mutatiilor genetice asociate cu infertilitatea masculina a fost PCR combinata cu analiza ampliconilor cu ajutorul electroforezei in gel de agaroză. La ora actuala tehnica este considerata extrem de laborioasa, consumatoare de timp si poate fi supusa permanent erorilor de lucru in laborator. Mai mult, lucrul in laborator presupune

utilizarea unor substante cu un ridicat potential cancerigen cum ar fi bromura de etidiu necesara atunci cand se vizualizeaza la transiluminator produsii de amplificare in vederea analizarii rezultatelor.

2.1.2. Metoda MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) este complexa, costisitoare si necesita utilizarea secventiatorului de acizi nucleici, un echipament complex si costisitor, precum si un personal extrem de bine calificat pentru lucrul cu acest aparat. Acesta tehnica nu poate la ora actuala sa intre in randul tehnicilor de rutina realizate de catre tehnicienii de laborator.

2.1.3. Metodele Array CGH (array comparative genome hybridization) si FISH (fluorescence in situ hybridization) au fost utilizate pentru detectia modificarilor genetice privind numarul de copii (deletii/duplicatii). Rezolutia aCGH comerciala este prea scazuta pentru a detecta microdeletiile si microduplicatiile iar in cazul FISH este dovedita utilitatea doar pentru regiunile definite anterior de literatura de specialitate inasa si in acest caz rezolutia este scazuta conducand la obtinerea de date imprecise. Metoda aCGH este prea costisitoare pentru a fi utilizata in screening-ul a numerosi pacienti iar FISH este consumatoare de timp. Ambele tehnologii necesita dotari de ultima generatie precum si un personal de laborator foarte inalt specializat. Mai mult, datele obtinute trebuie oricum reconfirmate ulterior cu ajutorul altor tehnici standard.

2.1.4. Reverse dot-blot cunoscuta si sub numele de hibridizare inversa este o metoda eficienta dar laborioasa si in plus necesita costuri de productie ridicate deoarece sistemul presupune manufacturarea unor strip-uri de nylon pe care sunt depuse sondele complementare regiunilor de interes.

2.1.5. Real Time PCR reprezinta o metoda prin care se imbunatateste detectia pe baza specificitatii PCR. Procedura este simpla si necesita doar amplificarea prin PCR a fragmentelor de interes ce vor fi cuantificate in timp real intr-un sistem inchis ceea ce reduce posibilitatea contaminarii. Nu este necesara confirmarea ulterioara prin alte tehnici. Real time PCR reprezinta o metoda din ce in ce mai utilizata in diagnosticul molecular actual datorita avantajelor de ordin material, si joaca un rol din ce in ce mai important in diagnosticul integrat.

La nivel mondial, dar mai ales la nivel European, se manifesta in ultimii ani o tendinta de studiere a modalitatilor de diagnostic a cauzelor infertilitatii, in vederea

reducerii timpilor necesari si a costurilor asociate procedurilor de diagnostic si tratament. Rezultatele acestei tendinte recomanda proceduri mai ieftine si mai rapide ca prima evaluare a infertilitatii si renuntarea la o serie de teste depasite si laborioase (PCR cuplat cu electroforeza) care nu ofera informatii utile in diagnostic dar care consuma resurse, sau cele costisitoare (MLPA, analiza fragmente cu secventiere).

3. Real Time PCR cuplata cu analiza curbelor de topire

Reactia de amplificare PCR in timp real cuplata cu analiza curbelor de topire este o metoda sensibila cu aplicatii importante. Metoda poate defini precis punctele de rupere cromozomala ale microdeletiiilor. Analiza curbei de topire ADN cuplat cu coloranti fluorescenti este o noua metoda ce permite verificarea variabilitatii ADN fara a necesita secventiere.

Cu ajutorul curbei de topire (melting-curve) se verifica specificitatea reactiei de amplificare. Dupa finalizarea reactiei de amplificare simultana a 3 sau 4 STS-uri (PCR multiplex) se defineste o etapa suplimentara in care se creste controlat temperatura in mediul de reactie, monitorizand in timp real semnalului fluorescent, pentru a putea genera curba de melting multipla care va avea un profil specific in functie de STS-urile aflate in combinatie si conditiile de desfasurare a reactiei. Cand ADN dublu catenar denatureaza sub influenta temperaturii ridicate, semnalul fluorescent scade generand un peak caracteristic fiecarui amplicon rezultat atunci cand 50% dintre perechile de baze din secventa ADN a ampliconului sunt separate. Analiza Real time PCR cuplata cu analiza curbelor de topire pentru YCM se bazeaza pe compararea ampliconilor pentru markeri diferiti localizati in regiuni alelice afectate de microdeletii avand la baza chimia Eva Green.

Aplicatiile Real Time PCR sunt binevenite pentru identificarea numarului de copii alelice constitutionale permitand detectia atat a microdeletiiilor cat si a microduplicatiilor. Metoda Real-Time PCR in identificarea microdeletiiilor si mutatiilor asociate infertilitatii masculine prezinta multiple avantaje.

Din acest motiv reprezinta si metoda preferata de singura companie care produce o trusa de identificarea a integritatii cromozomului Y prin analiza a 8 STS uri (STS: 84, 86, 127,

134, 254, 255) al carei principiul de functionare este bazat pe Singleplex Real-Time cu Sybr Green si analiza Melting Curve.

Spre deosebire de acesta trusa, cea propusa de noi contine un numar de 21 STS-uri analizate pentru microdeletii comparativ cu cele 8 analizate de compania mentionata. Cele 22 de STS-uri sunt analizabile in paneluri de cate 3 respectiv 4 STS-uri simultan. De asemenea, noi vom utiliza chimia EvaGreen si nu SybrGreen, deoarece colorantul Eva Green nu are proprietatea de a inhiba reactia Real Time PCR la nivele maxime de saturatie, este singurul colorant fluorescent produs care este in totalitate sigur fiind non-mutagen si non-toxic (SybrGreen utilizat in trusa Roche este chiar mai cancerigen decat mult utilizata bromura de etidiu), prezinta stabilitate superioara celorlalti coloranti fluorescenti cunoscuti, compatibila cu PCR multiplex.

Utilizarea procedurii propus de noi reduce semnificativ timpul de lucru si costul analizelor reprezentand in acelasi timp o metoda de diagnostic foarte precisa si robusta. Raportul cost-eficienta din propunerea noastra este mai ridicat in comparatie cu toate celelalte metode de diagnostic existente la momentul actual adaugand astfel o valoare suplimentara acestei noi truse de diagnostic molecular in practica clinica.

Avantajele metode Real-Time PCR pentru diferentiere alelica:

1. detectia microdeletiiilor atipice si cartarea detaliata a punctelor de deletie aspect important in stabilirea unui diagnostic precis si abordarea corecta a unui tratament.
2. detectia microduplicatiilor – microduplicatiile nu pot fi analizabile cu metodele de rutina utilizate pana in prezent.
3. un avantaj este reactia multiplex cuplata cu analiza curbei de topire care permite detectia mai multor STS in acelasi tub de reactie.
4. in comparatie cu celelalte tehnici este mai rapida.
5. tehnica nu mai necesita confirmare ca in cazul celorlalte metode.
6. interpretarea rezultatelor este simpla si rapida iar programele de analiza specializate pe care le vom utiliza minimizeaza erorile umane de interpretare.
7. metoda poate fi automatizata pentru analize numeroase.

4. Metode

Pentru a putea realiza identificarea microdelețiilor de la nivelul cromozomului Y au fost testati toti cei 21 markeri ADN de tip STS, (Sequence Tagged Site), situati la nivelul regiunilor AZFa, AZFb, AZFc, respectiv controlul intern al amplificarii. Secventele selectate apartin in special regiunilor exonice UNI STS. Programul BLAT [Basic Local Alignment Search Tool] a fost utilizat pentru a identifica similaritati ale secventelor genice unice selectate de pana la 95% la o rezolutie de cel puțin 40pb. Am utilizat acest program pentru a verifica daca exista omologie de 100% a secventelor primerilor pentru o unica locatie din intregul genom uman. Au fost selectate conditiile de lucru care au condus la obtinerea produsilor de amplificare cu eficienta maxima astfel incat utilizarea lor in combinatie in cadrul reactiilor PCR multiplex sa ofere cele mai bune rezultate. A fost utilizat un ADN de referinta obtinut de la mai multi barbati neinruditi cu fertilitate cunoscuta si testati anterior pentru microdeleții cu ajutorul tehnicilor standard.

Procesul de testare a avut rolul de a identifica orice parametri critici ce pot afecta performanta si masurile de control si limitare necesare care trebuie luate in considerare. Parametri critici includ: caracteristicile primerilor, stabilirea temperaturii optime de aliniere a primerilor, calcularea setului termodinamic specific in vederea obtinerii unei temperaturi de topire optime, continutul de guanina si citozina al regiunilor de interes.

4.1. Izolarea ADN

Calitatea ADN-ului necesar realizarii protocolului standard de lucru a fost stabilita prin analiza spectrofotometrica standard a concentratiei ADN genomic. Concentratia a fost stabilita masurand absorbanta la 260 nm (A_{260}). Valorile normale pentru citirea facuta la 260nm sunt intre 0,15 si 1,0. Punitatea a fost calculata prin raportul A_{260} : A_{280} ce trebuie sa se situeze intre 1,8 si 2.0. O unitate de absorbanta la 260 nm corespunde la 50ug ADN/ml.

Am testat o serie de kituri de izolare ADN existente pe piata pentru a verifica compatibilitatea cu metoda de analiza genetica propusa de noi. Am selectat 4 kituri urmarind in principal ca sa: sa contina cat mai putine etape de lucru, in special cat mai putine runde de centrifugare; sa permita izolarea unui ADN a carui concentratie sa fie satisfacatoare iar puritatea sa fie maxima; sa necesite utilizarea unui numar redus de

echipamente; echipamentele necesare sa fie usor de utilizat si sa nu necesite mentenanta sau consumabile suplimentare; sa coste putin; sa poata fi livrat rapid si sa nu necesite conditii speciale de depozitare; In acest sens am analizat tehnic mai multe protocoale de lucru aferente urmatoarelor kituri de izolare:

1. „InnuPREP Blood DNA Mini Kit” produs de ANALITYK JENA
2. „Purelink genomic DNA kit” produs de INVITROGEN
3. „Qia Amp DNA mini kit” produs de QIAGEN
4. „Quickextract” produs de EPICENTRE

Deoarece probele utilizate drept control pozitiv din arhiva centrului au fost izolate prin metode clasice disponibile la momentul respectiv s-a optat si pentru citirea absorbantei la 270nm si 230nm pentru a identifica probele contaminate cu fenol sau alti compusi organici. Probele ADN care au prezentat un raport al absorbantei A260:280 mai mic de 1,7 nu au fost incluse in testare. In urma testelor am constatat ca atat ADN izolat prin metoda clasica cat si kiturile testate sunt compatibile cu metoda propusa de noi.

Am constatat ca uneori valorile temperaturilor de topire pot varia cu +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN si MgCl₂. Adaugarea unor adjuvanti (in special DMSO - dimetilsulfoxid) in reactiile PCR scade de asemenea temperatura de melting. Deoarece temperatura de melting este afectata la toate STS-urile amplificabile din reactia PCR multiplex am stabilit ca in reactiile PCR sa nu adaugam adjuvanti iar concentratia ADN sa fie in jurul valorii de 30-50 ng ADN in toate reactiile.

4.2. PCR. Aceasta metoda implica utilizarea unor perechi scurte de oligonucleotide ADN sintetizate numite primeri (de obicei de 20-25 pb lungime), ADN matrita, solutie tampon (ce contine MgCl₂), cele 4 dNTP-uri si Taq ADN polimeraza generandu-se astfel milioane de copii ale secventei tinta. PCR-ul singleplex realizeaza amplificarea unei singure secvente ADN. PCR multiplex, este utilizat pentru amplificarea unor secvente multiple. In ambele cazuri, reactia PCR este constituita din 3 etape esentiale ce definesc un ciclu PCR: denaturarea DNA matrita dublu catenar, alinierea perechilor de primeri la matritele de DNA monocatenar si extensia enzimatica a primerilor prin care se produc copii care servesc drept copii in ciclurile urmatoare.

Amestecul de reacție este mai întâi încălzit la 94°C pentru denaturarea catenelor duble ale ADN și apoi răcit la o temperatură optimă ce facilitează alinierea primerilor. Este foarte important ca temperatura de aliniere a primerilor folosiți în reacția multiplex să fie una apropiată. Perechea de primeri este formată dintr-un primer sens (forward), care se cuplează la secvența sa complementară în amonte de regiunea ce urmează să fie amplificată, și un primer "anti-sens", reverse, care se cuplează în aval, ambele având capatul 3' orientat spre interiorul secvenței țintă. În timpul extensiei primerilor, DNA polimeraza adaugă progresiv deoxinucleotide, complementare cu secvența matrice, la capatul 3' al fiecărei matrice, generându-se o nouă copie. De obicei, PCR constă într-o serie de 20-40 astfel de cicluri de temperatură. Aceste cicluri sunt adesea precedate de o singură etapă de temperatură (denumită „hold”) la o temperatură înaltă (> 90 °C) și urmată de o pauză la sfârșit pentru extinderea finală de produs. Temperaturile utilizate și durata de timp în care sunt aplicate în fiecare ciclu depinde de o varietate de parametri. Aceștia includ enzima utilizată pentru sinteza ADN-ului, concentrația ionilor bivalenți și dNTP în reacție, precum și temperatura de topire (T_m) a primerilor.

Amestecurile de reacție au fost standardizate pe baza mai multor încercări de laborator în cazul fiecărui marker STS în parte până când s-a obținut un rezultat satisfăcător în ceea ce privește calitatea ampliconului obținut.

Astfel, după selecționarea zonelor de interes din cadrul secvenței cromozomului Y s-a realizat alegerea optimă a perechilor de primeri analizându-se pentru fiecare STS în parte dimensiunea, concentrația, conținutul în GC, temperatura de topire și calitatea efectului de cuplare. Am urmărit, de asemenea, ca pentru fiecare primer în parte raportul purina: pirimidina să fie de 1:1 sau cel puțin de 40-60% iar capetele să fie terminate în 1-2 perechi de CG.

4.2.1. PCR singleplex in timp real

Amplificarea markerilor aleși s-a realizat într-un volum final 25 μL, iar amestecul de reacție a fost standardizat pe baza mai multor încercări de laborator până când s-a obținut un rezultat satisfăcător în ceea ce privește calitatea ampliconului obținut. Au fost testate mai multe tipuri de tamponuri pentru PCR evaluându-se pentru fiecare caz în parte eficiența amplificării.

Amestecul de reactie a fost realizat si testat pentru stabilirea eficientei de functionare in cazul tuturor celor 21 STS analizate. Amestecurile de reactie au fost testate utilizand:

1. Concentratii diferite de ADN; acestea s-au situate intr-un interval de 30-500 ng de ADN genomic; (Valoare optima stabilita 50ng/ 25 μ L)
2. Buffer continand: concentratii diferite de TrisHCl (pH 8,3) intre 10-50 $^{mmol}/L$, KCl intre 50-100 $^{mmol}/L$; (Valoare optima stabilita 100 $^{mmol}/L$)
3. Taq polimeraza intre 0.5-2.5 unitati 25 μ L amestec de reactie (Valoare optima stabilita)
4. MgCl₂ 0,5-2 $^{mmol}/L$; (Valoare optima stabilita 2 $^{mmol}/L$)
5. 50-1200 $^{\mu mol}/L$ din fiecare dNTP; (Valoare optima stabilita 200 $^{\mu mol}/L$)
6. 0,04-0,6 $^{\mu mol}/L$ din fiecare primer utilizat; (Valoare optima stabilita empiric 0,5 $^{\mu mol}/L$)
7. Taq-polimeraza 0,5-2U; (Valoare optima stabilita 0,5U)

De asemenea, pentru fiecare reactie in parte au fost optimizate si temperaturile de aliniere ale fiecărei perechi de primeri in parte.

Concentratia primerilor in vederea implicarii lor in metoda propusa a fost optimizata prin testarea unui interval de concentratii de la 100 la 1000nM. Concentratia optima a fost stabilita atunci cand a fost indentificat cel mai scazut Ct si ΔRn maxim. Specificitatea amplificarii fiecarui produs PCR a fost confirmata prin determinarea curbei de melting care trebuie sa apara ca un unic „peak” ce corespunde fiecarui amplicon analizat. Seturile de primeri utilizate in reactiile multiplex trebuie sa se amplifice cu eficienta comparabila. In cazul aparitiei dublelor peak-uri acestea au fost eliminate prin s-a ajustat concentratia de MgCl₂ in sensul cresterii ei. Experimentele au fost realizate cu ajutorul unei platformei Real-Time ABI Prism 7500 iar rezultatele au fost interpretate cu ajutorul programului SDS versiunea 2.1

4.2.2 PCR Multiplex Touchdown in timp real

Dupa identificarea conditiilor optime de lucru s-a trecut la realizarea combinatiilor optime de multiplexuri PCR.

In cursul reactiei multiplex PCR conditionata prin touchdown are loc o reactie de PCR simultana si una specifica ale carei conditii de realizare sunt prezentate in tabelul 1. Etapa

PCR simultana permite alinierea primelor la catena matrita in mod gradual prin cresterea temperaturii de aliniere cu 1 grad per ciclu PCR. Etapa PCR specifica permite multiplicarea numarului de copii generate anterior. Astfel in strategia touchdown, in etapa de PCR simultana, temperatura de aliniere scade cu un grad la fiecare al doilea ciclu plecand de la 65 grade si ajungand la 55 grade pentru un total de 20 de cicluri. Specificitatea amplificarii fiecarui produs PCR din amestecurile realizate de noi a fost confirmata prin determinarea curbei de melting care trebuie sa apara cu un profil alcatuit din 3 respectiv 4 „peak”-uri unice ce corespund tuturor ampliconilor analizati. Programul generarii curbei de melting este prezentat in tabelul 2.

Inainte de a pune la punct sistemele de reactie de amplificare in lant cu perechi multiple de primeri (multiplex PCR) a fost selectate anumite combinatii de markeri STS specifice locusurilor genomice de interes si au fost identificate cele mai eficiente combinatii de perechi de primeri, precum si anumiti parametri de lucru, astfel incat ampliconii rezultati sa nu se suprapuna in ceea ce priveste temperatura curbelor de topire. Acesta selectie s-a realizat prin analiza virtuala utilizand diferite programe de predictie si modelare. In cazul metodei imbunatatite de noi nu este necesara analizarea separata a ampliconilor cu aceeasi greutate moleculara asa cum este cazul metodei PCR multiplex cuplata cu electroforeza in gel de agaroz. Pentru rigurozitate a fost introdus si un control intern pozitiv in toate combinatiile de multiplexuri pentru a putea identifica corectitudinea amplificarii la fiecare pacient in parte.

Combinatiile specifice de locusuri genice analizate sunt unice si caracterizeaza aceasta aplicatie. Combinatiile de succes au fost generate prin incercari si prin ajustarea concentratiei primerilor pentru a identifica un echilibru in care toate locusurile analizate sa fie amplificate specific (Figurile 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 si tabelele complementare). Primerii utilizati cuprind regiuni unice, evitand regiunile repetitive, posibil in exoni.

Locusurile STS specifice si caracteristicile lor sunt prezentate in tabelul de mai jos (Tabelul 1)

Tabelul 1

Localizare	Nume marker	Greutate moleculara	Continut GC%	Tm Real Time predictiva	Temperatura PCR aliniere	Temperatura melting
	sY82	264pb	36%	83	60	80,88
	sY1064	110pb	38%	80	60	78,64

AZFa-prox2	220pb	53%	91	63	88,05	
sY86	318pb	51%	89,5	60	83,28	
sY1182	247pb	52%	88,5	60	85,21	
AZFa-dist1	390pb	29%	79,5	57	81,47	
sY88	123pb	36%	81,5	56	80,04	
sY 113	304pb	33%	86	60	77,44	
sY116	154pb	28%	79	61	78,04	
sY153	139pb	36%	81,5	56	80,13	
sY117	261pb	41%	85,5	56	84,79	
sY134	301pb	33%	82	56	80,73	
sY 1224	640 pb	35%	83,5	61	81,32	
sY105	301pb	40%	85	56	83,42	
sY127	274pb	41%	85,5	56	83,51	
sY143	311pb	46%	87,5	58	85,06	
sY1192	255pb	52%	92	61	88,65	
sY1191	385pb	28%	79,5	61	78,93	
sY 1291	527pb	47%	95	61	90,74	
AZFc	sY254	380pb	38%	84,5	58	82,82
AZFc	sY255	123pb	51%	88	60	85,21
control gena SRY	sY14	470pb	50%	90	58	87,75
heterocromatina	sY160	236pb	37%	83,5	61	82,07

Imbunatatirea performantelor PCR-Real Time

In general colorantii fluoresceni utilizati la analizele real-time formeaza complexe cu molecula ADN iar aceasta interactie conduce inevitabil la anumite interferente in desfasurarea reactiei PCR: topirea cu dificultatea a ADN dublu catenar, formarea dimerilor de primeri sau chiar alinierea gresita a primerilor si ingreunarea procesului de elongare. Utilizarea unor coloranti precum SybrGreen prezinta dezavantaje atunci cand este necesara detectia ampliconilor multipli din reactiile PCR multiplex din cauza migrarii colorantului de la ampliconii mai mici la cei mai mari. Utilizarea Eva Green un nou colorant fluorescent disponibil pe piata la ora actuala conduce la imbunatatirea semnalelor. Acest colorant fluorescent este alcatuit din doua unitati monomere unite printr-un element de legatura flexibil. In absenta ADN-ului structura dimerica a colorantului prezinta o coformatie in "ac de par" si este inactiva. Atunci cand ADN este disponibil structura colorantului se desface si se leaga la ADN emitand in acelasi timp fluorescena specifica. Echilibrul chimic se bazeaza pe un mecanism unic prin care este alimentata permanent forma activa a colorantului din rezerva inactiva prezenta in amestecul de reactie pe masura ce cantitatea de ADN sporeste

in cursul amplificarii real-time. In afara de acet avantaj tehnic colorantul EvaGreen este si singurul colorant non-mutagenic si non-citotoxic. Eva Green este stabila in timpul ciclurilor PCR si de-a lungul depozitatii si transportului.

Amplificarea multiplex a fost testata cu 2 tipuri de coloranti fluorescenti: SYBR Green si Eva Green. Compararea aceleiasi reactii utilizand cei doi coloranti a indicat faptul ca EvaGreen a fost cu 30% mai eficienta decat SYBRGreen calitatea peak-urilor fiind mult mai buna.

Sensibilitatea sistemului de testare a fost evaluata utilizand ADN genomic provenind de la un mascul control fara deletie pe cromozomul Y. Am realizat reactia PCR multiplex in timp real utilizand dilutii ale probei control de la 10-100 ng/ul. Pick-urile individuale se pot identifica cu acuratete pana la concentratii de 10 ng/ul.

Tabelul 2. Programul PCR multiplex conditionat touchdown

Programul de ciclurilor de amplificare	Valori		
Etapa I (touchdown)			
Numar de cicluri	20		
Modulul de analizare	PCR		
Temperaturi tinta	Segmentul 1	Segmentul 2	Segmentul 3
°C	94	65-55 (1°C/ciclu)	72
timpul de incubare (sec)	30	30	30
Rata de tranzitie a temperaturii (°/s)	0,3	0,3	0,3
Etapa II			
Numar de cicluri	15		
Modulul de analizare	PCR		
Temperaturi tinta	Segmentul 1	Segmentul 2	Segmentul 3
°C	94	58	72
timpul de incubare (sec)	30	30	30
Rata de tranzitie a temperaturii (°/s)	0,3	0,3	0,3

Tabelul 3. Programul pentru generarea curbei de melting

Programul de ciclurilor pentru analiza curbei de melting	Valori		
Numar de cicluri	1		
Modulul de analizare	Melting curve		
Temperaturi tinta	Segmentul 1	Segmentul 2	Segmentul 3
°C	94	59	94
timpul de incubare (sec)	30	Rampa 2 °C	-

Rata de tranzitie a temperaturii (°/s)	0,3	0,3	0,3
--	-----	-----	-----

5. Validarea analitica si clinica a metodei

Laboratoarele de diagnostic molecular sunt tot mai interesate pentru a respecta standardele de calitate stricte si testele de validare necesare pentru a obtine acreditare oficiala a metodei de analiza. Masurile de control adecvate au inclus utilizarea de controale pozitive si negative, analiza de replici tehnice si biologice si utilizarea unui sistem de cuantificare a calitatii.

5.1. Validarea analitica

Inainte ca trusa de diagnostic sa fie finalizata a fost necesar sa se stabileasca daca: markerii analizati sunt eficienti in diagnostic, de a stabili analitii corecti si daca numai analitii corecti sunt cei masurati. Acesti parametri ne asigura ca primerii nu se suprapun la nivelul unui polimorfism si ca acestia sunt specifici secventei genetice de interes. Alte concepte critice pe care le-am luat in considerare au fost: selectivitatea, interferenta, si cross-contaminarea. In toate experimentele derulate ne-am luat precautii procedurale stringente de rutina pentru a reduce riscul de contaminare.

Dupa stabilirea procedurii de testare adecvate am determinat gradul de acuratete si reproductibilitate.

Deoarece trusa de diagnostic reprezinta o metoda noua pentru care nu exista specificatii de performanta adecvate, am realizat o validarea completa. Acest proces implica evaluarea performantei testului in comparatie cu un test de referinta („golden standard”) capabil de evaluarea probei fara erori (un test care da numai rezultate adevarate). In cazul domeniului geneticii medicale, care in majoritatea cazurilor nu prezinta teste de referinta, sau materiale de referinta certificate, referinta este metoda de diagnostic disponibila care a demonstrat cele mai bune rezultate conform literaturii de specialitate. Daca determinarea specificitatii de performanta este necesar sa se stabileasca daca noul test indeplineste aceasta specificatie in laborator. Verificarea trebuie sa fie adecvata pentru standardele metodei de analiza “in house”.

In vederea validarii analitice am realizat primele experimente de testare a reproductibilitatii analizelor real-time pornind de la probe ADN cu concentratii diferite (Figura 1 si Figura 2). Dupa cum se poate observa in imaginea alaturata, desi concentratia

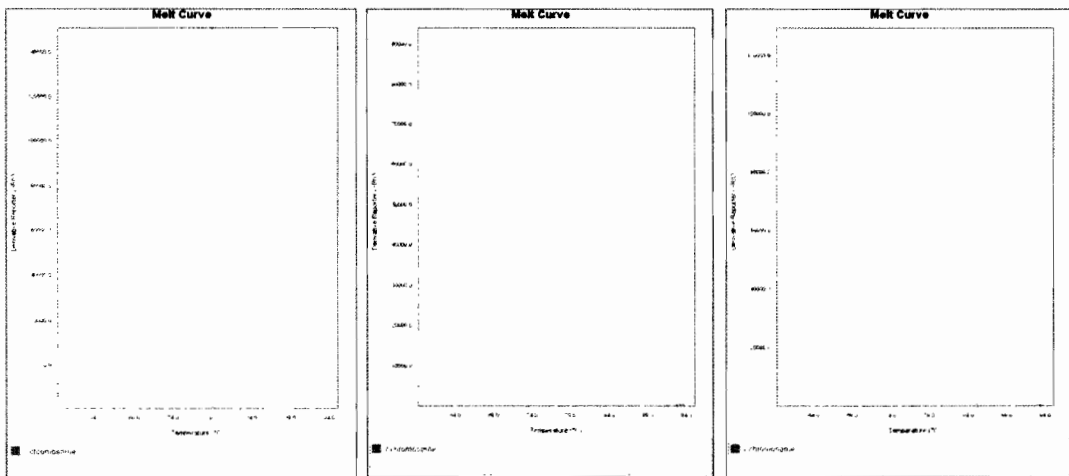
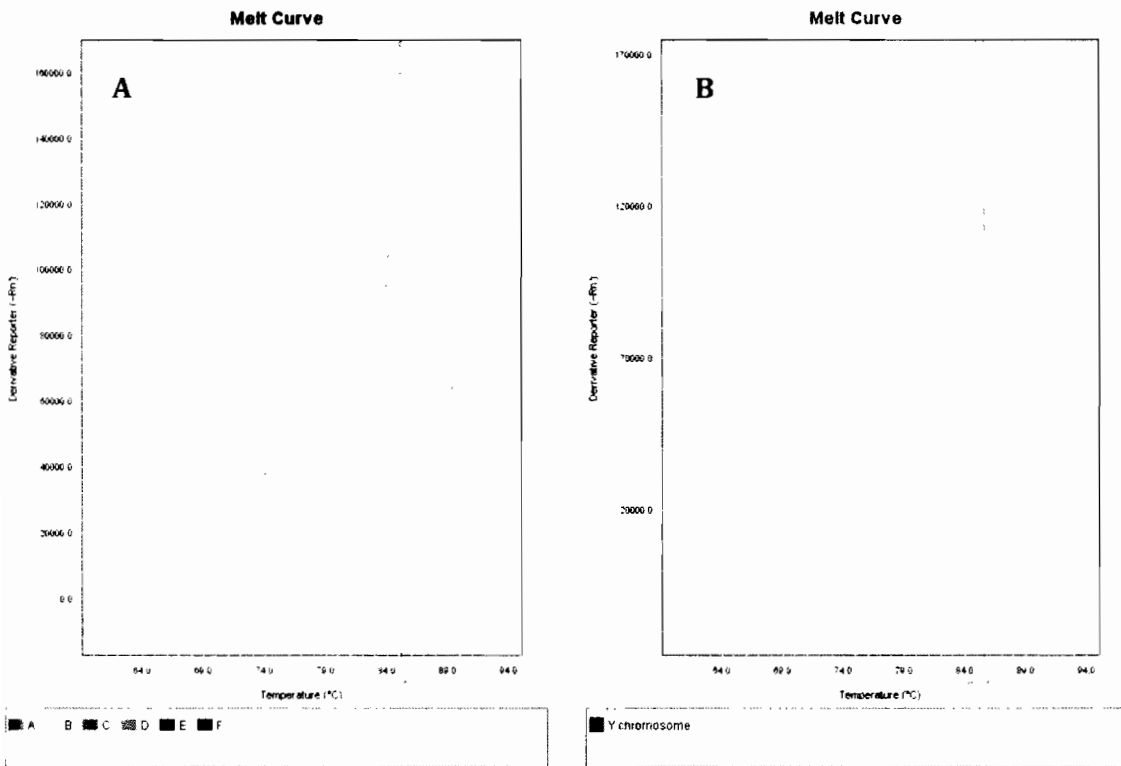


Figura 1 PCR-singleplex in care este prezentata curba de topire caracteristica produsului amplificat pornind de la concentratii diferite de ADN. Valorile tuturor temperaturilor de topire pot varia cu maxim +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN

ADN este diferita in cele doua probe de control curbele derivatele specifica temperaturii de melting sunt aproape identice. Metoda de validare cu cele mai bune rezultate a fost



considerata

PCR

Figura 2 PCR multiplex A.- Amestec reactie nr.5; B. - Amestec reactie nr.2; cu concentratii diferite de ADN. Diferenta intre cele 2 concentratii ADN este de 10x. Se observa ca intensitatea pentru EvaGreen nu se modifica semnificativ atunci cand concentratia ADN in PCR multiplex difera. Valorile tuturor temperaturilor de topire pot varia cu maxim +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite

cuplata cu electroforeza in gel de agaroză. Pentru verificarea corectitudinii rezultatelor rezultatelor reacțiilor de amplificare singleplex, câte 10 μL produs de reacție a fost supus electroforezei în gel de agaroză 2% în tampon TBE (89 mmol/L Tris, 89 mmol/L Acid boric, 2 mmol/L EDTA, pH 8,3), cu bromura de etidiu incorporată în gel la concentrația de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ drept colorant fluorescent pentru vizualizare standard. Marker-ul de greutate moleculară de 100 pb a fost utilizat pentru estimarea dimensiunii fragmentelor PCR. Fiecare probă analizată a fost considerată pozitivă pentru un marker STS dacă banda corespunzătoare acestuia a fost prezentă. În cazul reacțiilor PCR multiplex am ales exclusiv ca în urma analizei profilului curbei multiple de melting peak-urile caracteristice să corespundă peak-urilor obținute individual în ceea ce privește valoarea temperaturii de melting. Utilizarea PCR cuplata cu analiza în gel de agaroză nu are utilitate în acest caz deoarece pot exista ampliconi cu aceeași greutate moleculară care se vor suprapune în gel. Curba de melting va evidenția un profil special bazat exclusiv pe temperatura de melting și nu pe greutatea moleculară.

5.2. Validarea clinică

În vederea realizării validării clinice am realizat experimente de confirmare sau infirmare a microdelețiilor. Numeroase teste genetice sunt utilizate pentru a confirma sau infirma prezența unei anumite boli cu cauze genetice. În mod ideal asemenea teste ar trebui să identifice precis prezența sau absența modificărilor genetice asociate cu respectiva maladie. Cu alte cuvinte un test perfect nu este niciodată pozitiv pentru un pacient care nu are boala și nu este niciodată negativ pentru cel care o are.

Validarea clinică a metodei de analiză pentru infertilitatea masculină cu cauze genetice s-a realizat în acord cu practicile standardizate în diagnosticul infertilității (Figurile 3, 4, și 5). Validarea clinică a fost gândită să se realizeze pe probe ADN provenind de la pacienți încadrați în diferite grupe de infertilitate bazate pe analiza spermogramei și a caracteristicilor fenotipice la care anterior a fost identificată precis cauza genetică.

Posibilitatea de a identifica corect pacienții afectați de boli genetice este foarte importantă de atins atunci când testele sunt utilizate pentru identificarea bolilor grave tratabile. Sensibilitatea metodei propuse de noi este de 97%. Specificitatea testelor se referă la abilitatea de a identifica corect acei pacienți care nu sunt bolnavi. Specificitatea metodei propuse de noi este de 84,5%.

Experimentele au fost realizate cu ajutorul unei platformei Real-Time ABI Prism 7500 iar rezultatele au fost interpretate cu ajutorul programului SDS versiunea 2.1

Exemplificare AMESTEC nr.5

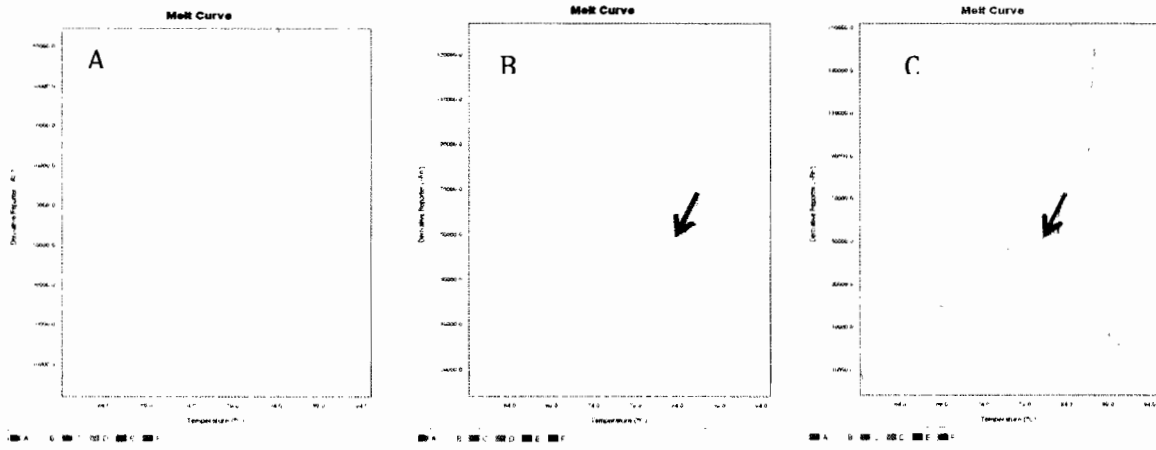


Figura 3 A. - Amestec reactie nr.5: sY 1064, AZFdist 2, sY 143, sY 14; B. - Amestec reactie nr.5 pacient cu microdeletie pentru sY 143; C. - Amestec reactie nr. 5 pacient versus control

EXEMPLIFICARE AMESTEC nr. 2

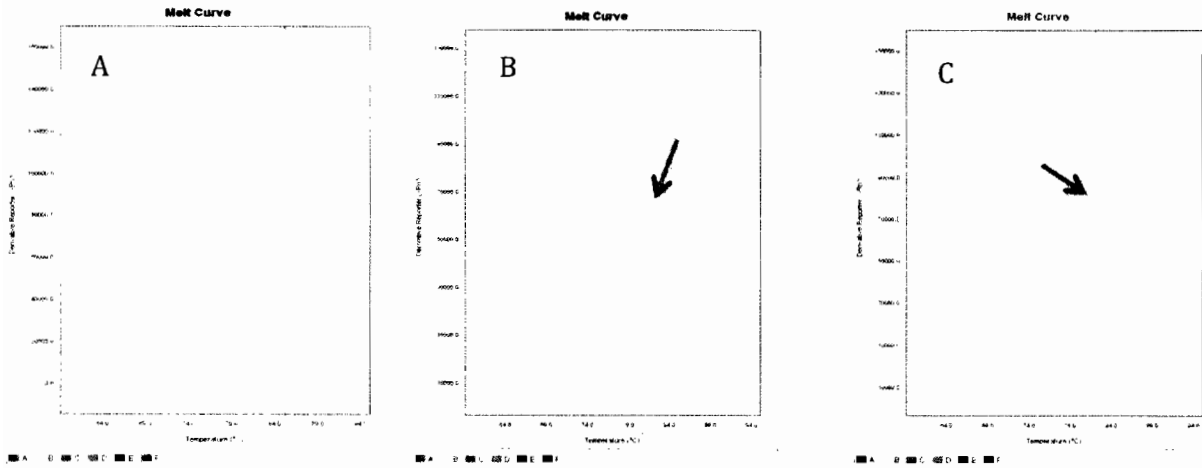


Figura 4 A. - Amestec reactie nr. 2: sY 88, sY 254, sY 255, sY 1192; B. - Amestec reactie nr.2 pacient cu microdeletie pentru sY 254
C. - Amestec reactie nr.2 pacient versus control

EXEMPLIFICARE AMESTEC nr. 3

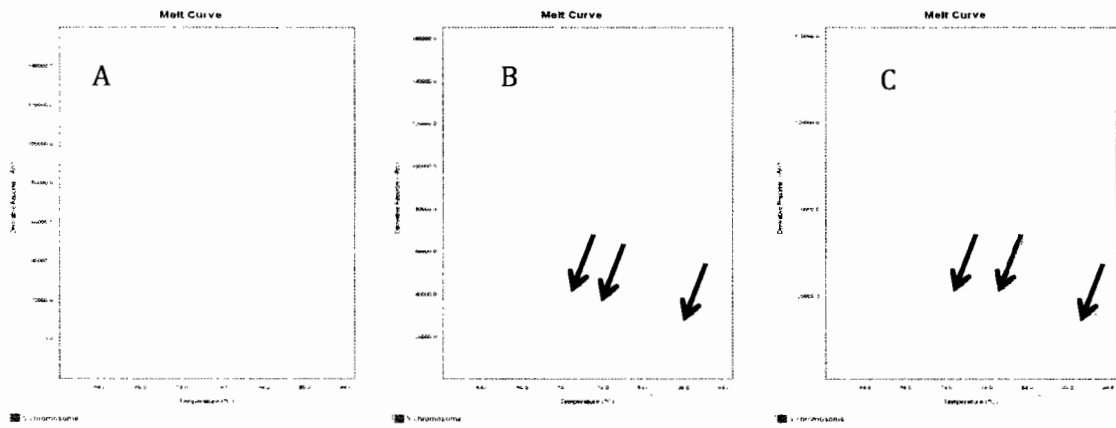
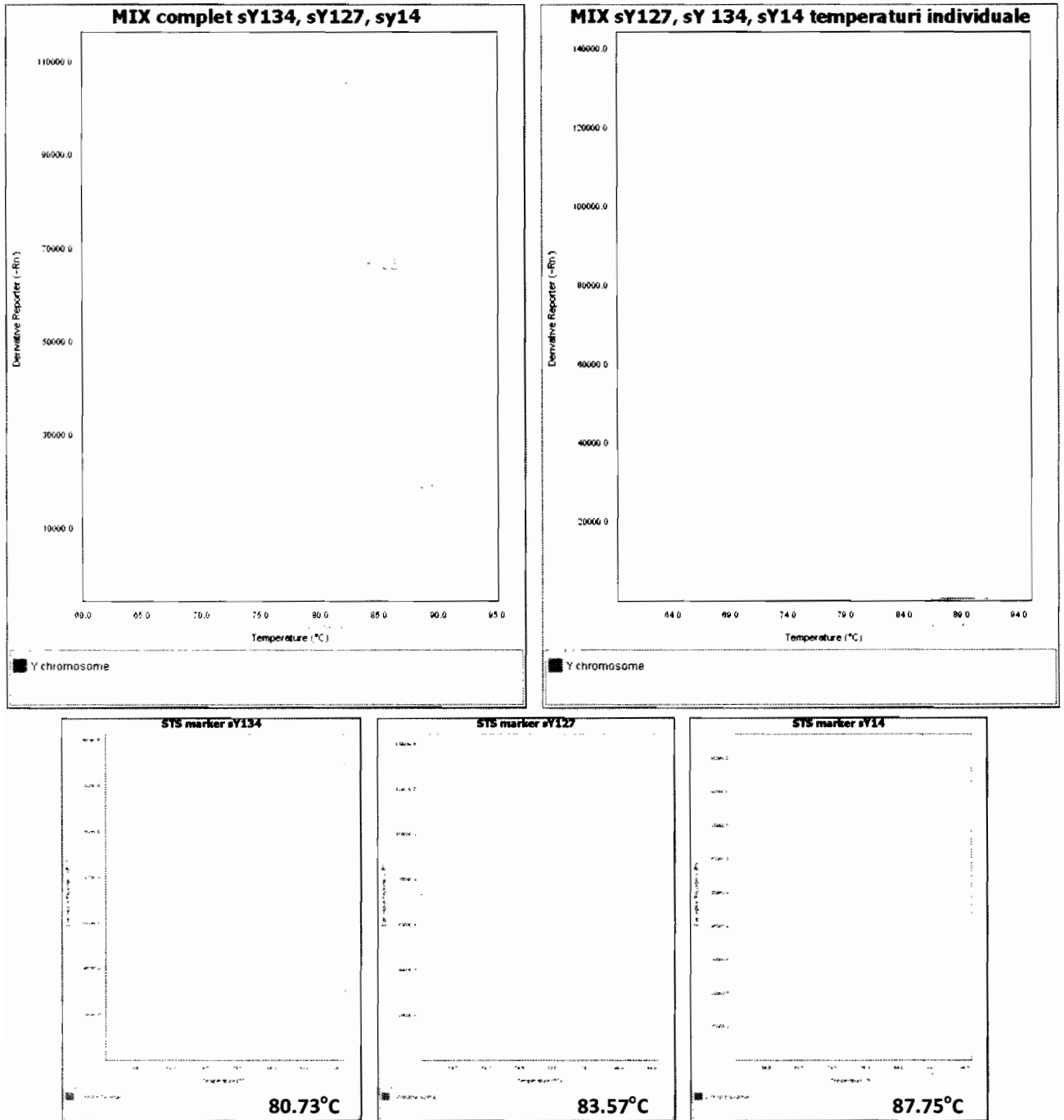


Figura 5 A. - Amestec reactie nr. 3: sY 116, sY 1224, sY 1182, sY 1291; B. - Amestec reactie nr. pacient cu microdeletie pentru sY 116, sY1224 si sY 1291
C. - Amestec reactie nr. 1 pacient versus control

Figura nr.5 – Prezentarea profilului curbei multiple de topire si a curbelor de topire individuale pentru STS-urile din AMESTECUL No. 1

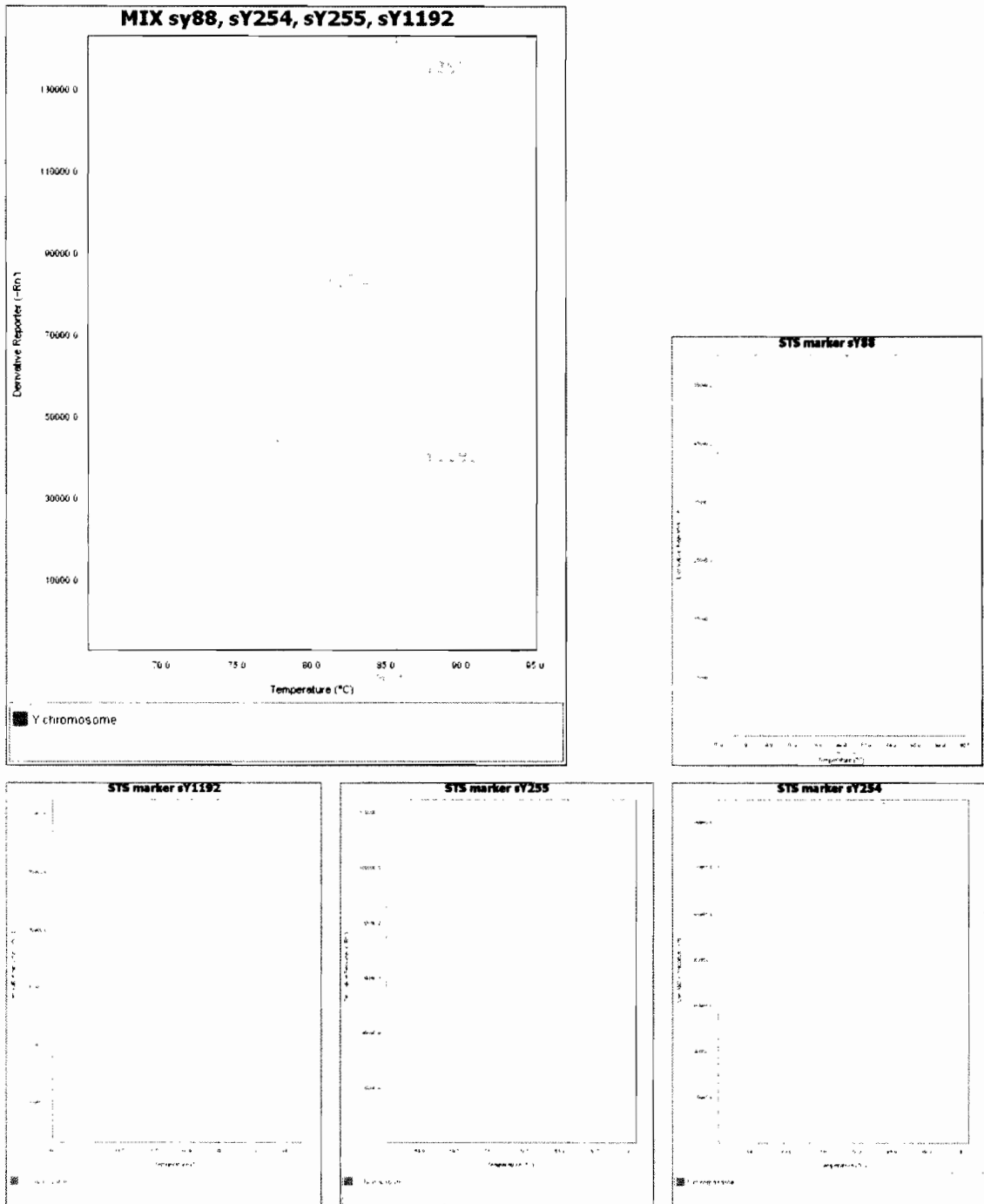


Interpretare rezultate amestec nr. 1

Primeri	Tm (°C) Control ADN femeie	Tm (°C) ADN normal	Tm (°C) ADN barbat	Tm (°C) ADN pacient
sY 134	Fara peak	80.73		Fara peak
sY 127	Fara peak	83.57		Fara peak
sY 14	Fara peak	87.75		Fara peak

Nota: Valorile temperaturilor de topire pot varia cu +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN

Figura nr.6 – Prezentarea profilului curbei multiple de topire si a curbelor de topire individuale pentru STS-urile din AMESTECUL Nr. 2

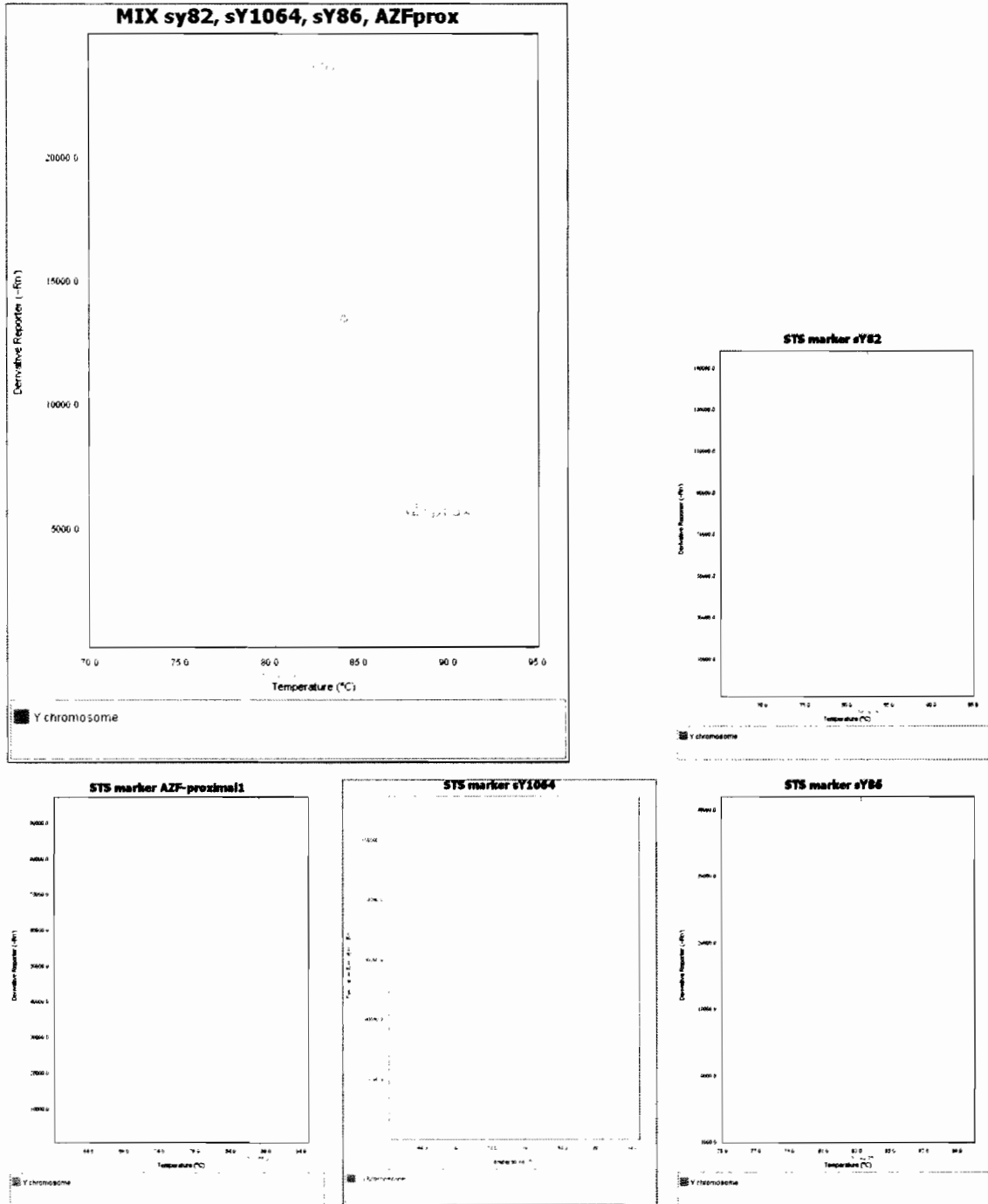


Interpretare rezultate

Primeri	Tm (°C) Control ADN femeie	Tm (°C) ADN barbat normal	Tm (°C) ADN pacient
sY88	Fara peak	80.40	Fara peak
sY254	Fara peak	82.82	Fara peak
sY255	Fara peak	85.21	Fara peak
sY1192	Fara peak	89.88	Fara peak

Nota: Valorile temperaturilor de topire pot varia cu +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN

Figura nr.7 – Prezentarea profilului curbei multiple de topire si a curbelor de topire individuale pentru STS-urile din AMESTECUL Nr.3

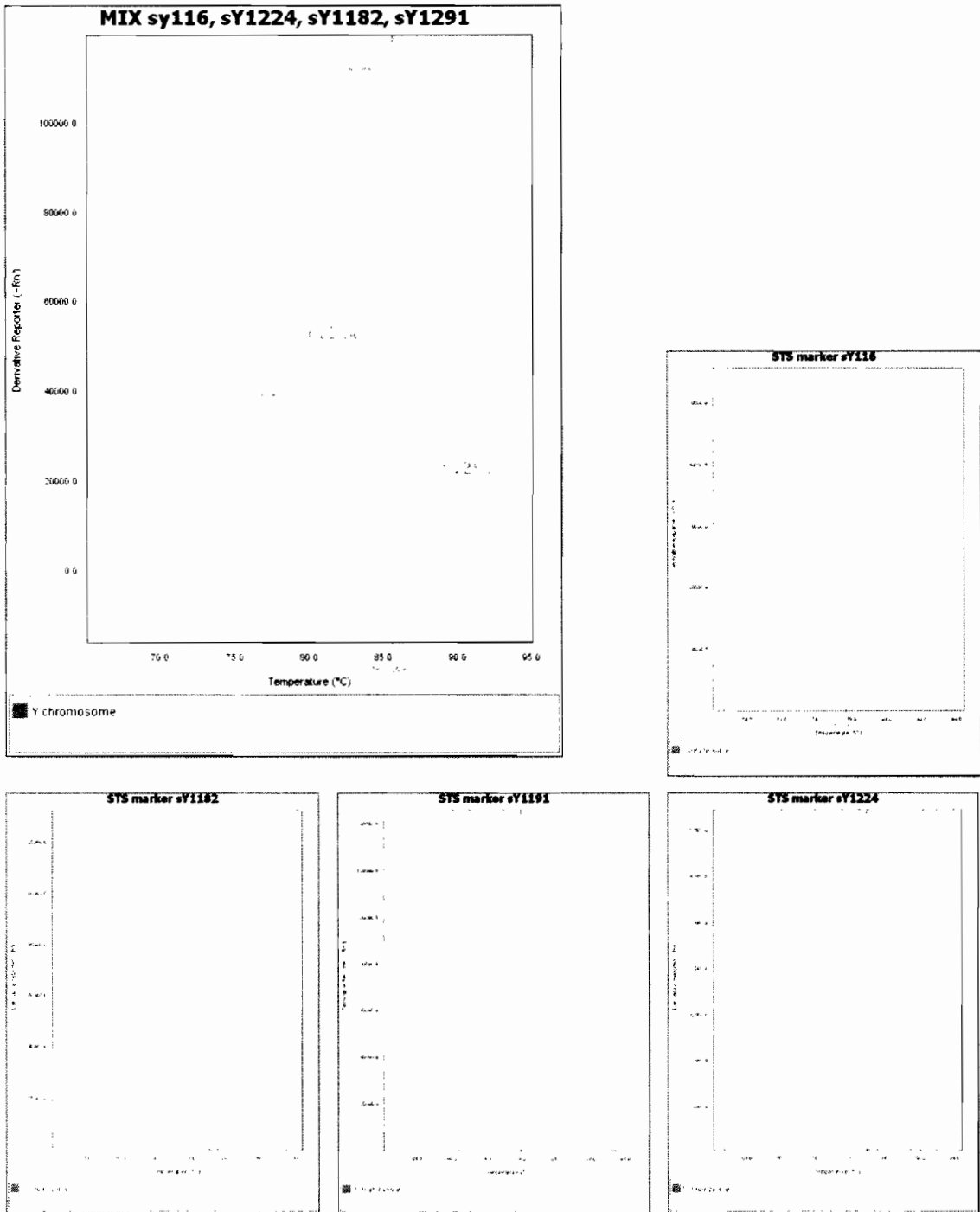


Interpretare rezultate

Amestec Primeri	Tm (°C) Control ADN femeie	Tm (°C) ADN barbat normal	Tm (°C) ADN pacient
sY 1064	Fara peak	78.64	Fara peak
sY82	Fara peak	80.88	Fara peak
sY86	Fara peak	83.28	Fara peak
AZF-proximal 1	Fara peak	88.05	Fara peak

Nota: Valorile temperaturilor de topire pot varia cu +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN

Figura nr.8 – Prezentarea profilului curbei multiple de topire si a curbelor de topire individuale pentru STS-urile din AMESTECUL Nr.4

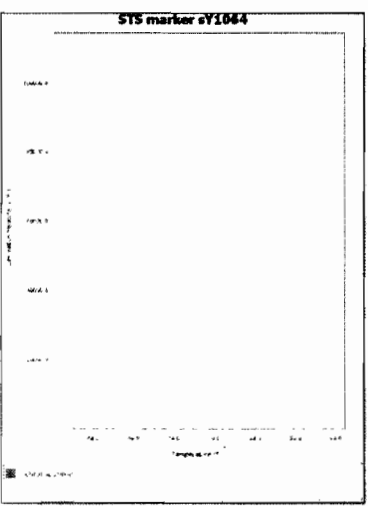
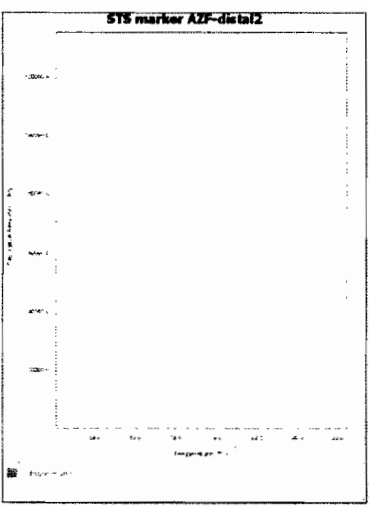
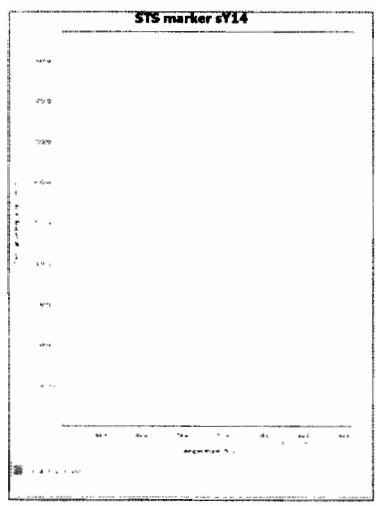
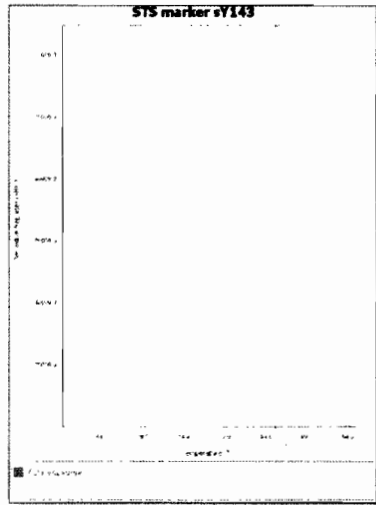
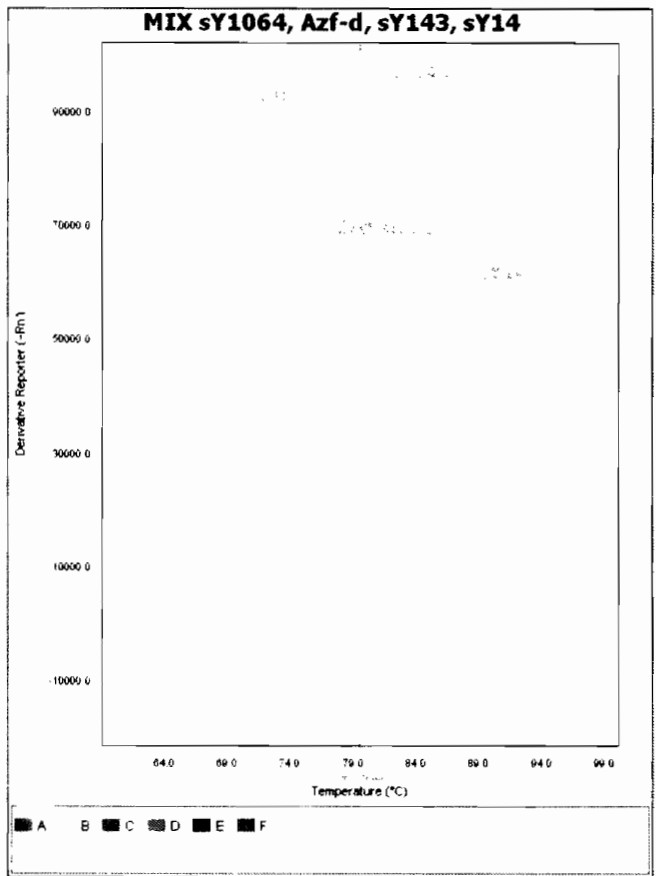


Interpretare rezultate

Amestec primeri	Tm (°C) Control ADN femeie	Tm (°C) ADN barbat normal	Tm (°C) ADN pacient
sY 116	Fara peak	78.04	Fara peak
sY 1224	Fara peak	81.32	Fara peak
sY1182	Fara peak	85.21	Fara peak
sY1291	Fara peak	90.74	Fara peak

Nota: Valorile temperaturilor de topire pot varia cu +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN

Figura nr.9 – Prezentarea profilului curbei multiple de topire si a curbelor de topire individuale pentru STS-urile din AMESTECUL Nr.5

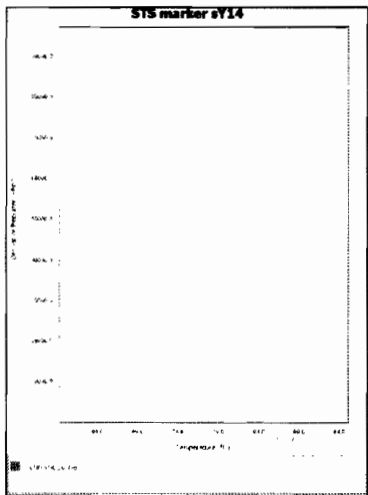
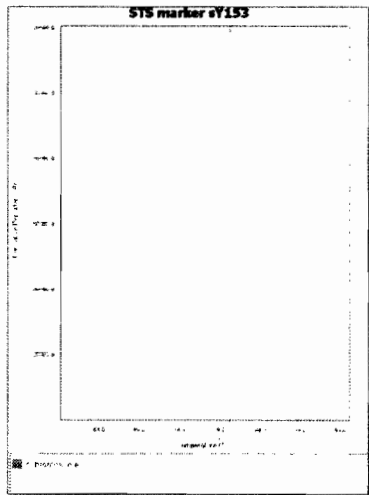
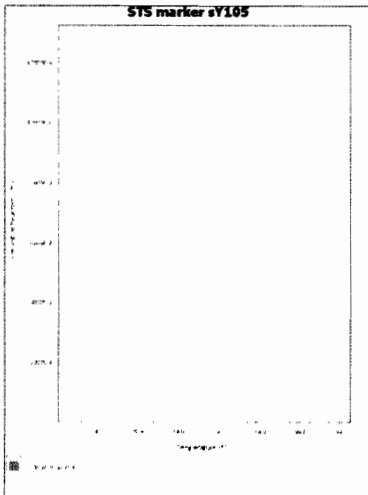
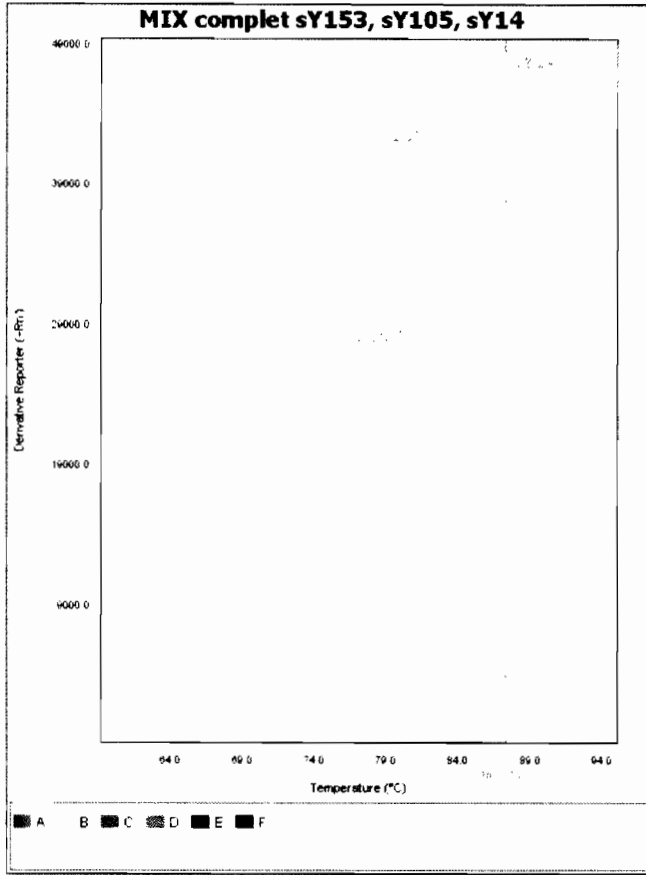


Interpretare rezultate

Amestec primeri	Tm (°C) Control ADN femeie	Tm (°C) ADN barbat normal	Tm (°C) ADN pacient
sY 1064	Fara peak	78.64	Fara peak
AZF-distal	Fara peak	81.47	Fara peak
sY 143	Fara peak	85.06	Fara peak
sY14	Fara peak	87.75	Fara peak

Nota: Valorile temperaturilor de topire pot varia cu +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN

Figura nr.10 – Prezentarea profilului curbei multiple de topire si a curbelor de topire individuale pentru STS-urile din AMESTECUL Nr.6

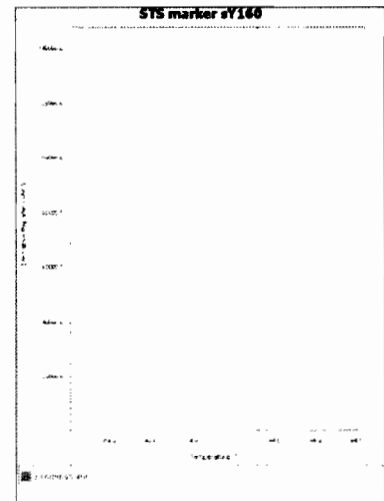
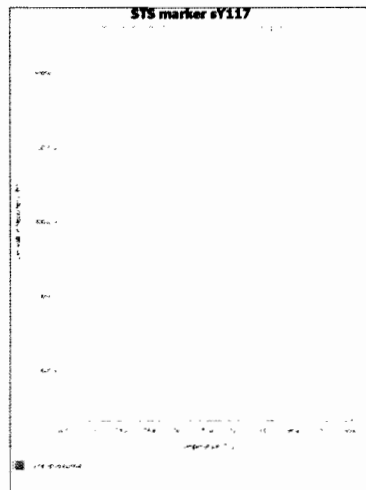
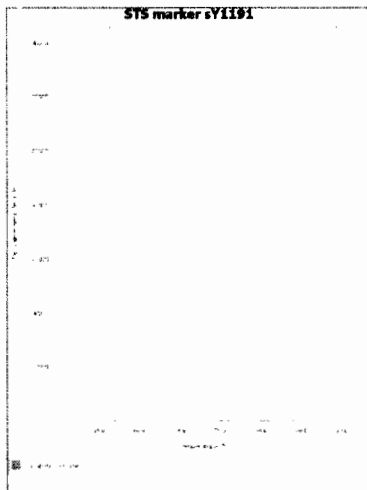
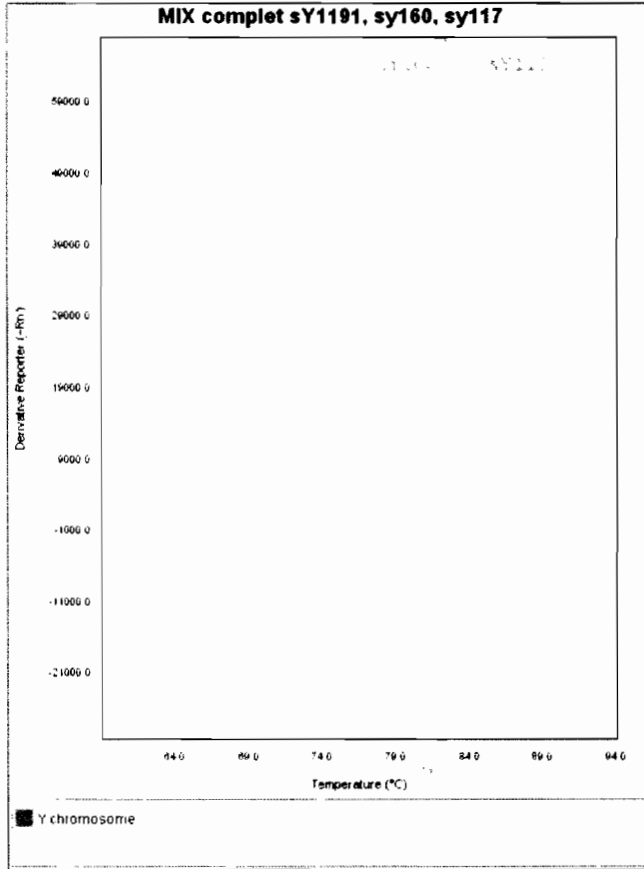


Interpretare rezultate

Amestec primeri	Tm (°C) Control ADN femeie	Tm (°C) ADN normal	ADN barbat	Tm (°C) ADN pacient
sY 153	Fara peak	80.73		Fara peak
sY 105	Fara peak	83.57		Fara peak
sY14	Fara peak	87.75		Fara peak

Nota: Valorile temperaturilor de topire pot varia cu +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN

Figura nr.11 – Prezentarea profilului curbei multiple de topire si a curbelor de topire individuale pentru STS-urile din AMESTECUL Nr.7



Interpretare rezultate

Amestec primeri	Tm (°C) Control ADN femeie	Tm (°C) ADN barbat normal	Tm (°C) ADN pacient
sY 1191	Fara peak	79.93	Fara peak
sY 160	Fara peak	82.07	Fara peak
sY117	Fara peak	84.47	Fara peak

Nota: Valorile temperaturilor de topire pot varia cu +/- 2,5 (°C) intre experimente diferite in functie de concentratia ADN

LISTA STS-uri utilizate in combinatii PCR multiplex

STS marker sY1224

Secventa Cromozom Y uman *Homo sapiens* STS (sequence tagged site) genomic

GenBank: G72342.1

Primer A: GGCTTAAACTTGGGAGGGTG

Primer B: CAAAGAGCCTCCAGACCA

STS dimensiune: 640pb

ORIGINE

```

1 ggcttaaact tgggagggtg tatgtgtcca ggaatttacc ctttctttt agattttcta
61 gtgtatttgc atagagggtg tcagagtatt atctgatgat cagcaatgat attccctatg
121 tcatttttta ttgcatctat gtgatttttc tctcttttct tctttgtag tctggctagt
181 ggtctatcta tattgttgat cttttcaaaa aaccagctta cggatttatt gatttttgaa
241 aggtttttgt gtctctgtct tcttcagttc tgctctgac atagttattt tatgtcttct
301 gctaggtttt gttatcgttt gctctcacta aactagttct ttaattttg atgttagggt
361 gtcaatttta gatctttcct gctttctctt ttgggcattt agtgctatca gtttttctct
421 aaacaccatt ttaaatgtgt ctacagagttt gtgacacatt gtgtcttcat tcttattggt
481 ttcaaagaac atctttattt ctacctattt tcagtattta cccagcaatg atttacagcc
541 tgctcctaaa tgttcagttt ctatgtagtt gtgcaggttt gtgtgagttt ctgaatcctg
601 ggttctcatt tcattgcact gtggctctggg aggctctttg
//
    
```

STS marker sY1291

Secventa Cromozom Y uman *Homo sapiens* STS genomic, sequence tagged site

GenBank: G72340.1

Primer A: TAAAAGGCAGAACTGCCAGG

Primer B: GGGAGAAAAGTTCTGCAACG

STS dimensiune: 527pb

ORIGIN

1 taaaaggcag aactgccagg tctgtgtctt attttcttg tcattctaatt ttatctttt
61 tttttttt tttttttt tttttttt tttgagacg gacttctact ctgtcgccca
121 ggctggagtg cagtggcggg atctcggtc actgcaagct cgcctccc ggttcacgcc
181 attctctgc ctcagctcc caagtagctg ggactacagg cccccccg tactcccggc
241 taatttttg tatttttagt agagacgggg tttcaccgtt ttagccggg atggctcga
301 tctcctgacc tctgtatccg cccgcctcgg cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga
361 gccaccgac ctggccaagt gtcttcttt gagaagtgtc tttcatata cttaccac
421 ttttgatgg gttgtttgt tttttctg taattttgt ttgattcat ttagattct
481 ggatattagc cctttgtcag atgagtacgt tgcagaactt tttccc
//

STS marker sY14

GenBank: G38356.1

Primer A: GAATATTCCCCTCTCCGGA

Primer B: GCTGGTGCTCCATTCTTGAG

STS dimensiune: 470pb

ORIGIN

1 ctgtgcaaga gaatattccc gctctccgga gaagctctt cttccttgc actgaaagct
61 gtaactctaa gtatcagtgt gaaacgggag aaaacagtaa aggcaacgct caggatagag
121 tgaagcgacc catgaacgca ttcctcgtgt ggtctcgcga tcagaggcgc aagatggctc
181 tagagaatcc cagaatgcga aactcagaga tcagcaagca gctgggatac cagtggaaaa
241 tgcttactga agccgaaaaa tggccattct tccaggaggc acagaaatta caggccatgc
301 acagagagaa ataccgaat tataagtatc gacctcgtcg gaaggcgaag atgctgccga
361 agaattgcag tttgcttccc gcagatccc cttcgggtact ctgcagcga gtgcaactgg
421 acaacagggt gtacagggat gactgtacga aagccacaca ctcaagaatg gagcaccagc
481 taggccactt a
//

STS marker sY1191

GenBank: G73809.1

Continut GC%: 28%

Primer A: CCAGACGTTCTACCCTTTCG

Primer B: GAGCCGAGATCCAGTTACCA

STS dimensiune: 385pb

Specific marker for U3 interval in the AZFc region.

ORIGIN

1 ctatcagaca ctatttggc aattttatgt acctaaacat gttaaataat catgcttacc
61 atttttcca gacgttctac ctttcgaga ttagttaata tgtttacaca cagagttttc
121 tttataggat tataatttac aatgttttca caattttctt aaacagtcca ctttatttta
181 ttaacttta agacaacttt tttattctta agcaaaatac atagttatgc ctataattt
241 ttaactaaa ccacttttta cttttttat acattttat gcaaatccat gtttagcagt
301 ttaattacc tgttataacg gtaattttta gcaattttta actttaatgt aaagcctatt
361 acgtgtttt tttttgttt tgtttgttt tcttttgag acagagtctt gctctctcat
421 caggctagag tgtggtaact ggatctcggc tctctgcaac ctccactctt tggatacaag

481 cgattctgct gcctcagcct cctgagtagc ttggattaca gacgcctgcc accacaccca
541 gctaattatt gtatttttag tagggaggag gttccacat gtttccagg attgtcttga
//

STS marker sY254

Continut GC%: 38%

Primer A: GGGTGTTACCAGAAGGCAAA

Primer B: GAACCGTATCTACCAAAGCAGC

STS dimensiune: 380pb

ORIGIN

1 aaggctgggt gttaccagaa ggcaaatcg tgccaaacac tgttttggt ggtggaattg
61 atgctagggt attgtattcg tacctcattt ttacctaac atacatcatg aacaatggga
121 tgtgggccct gttacaaact taaatTTTT tttgtacttc ctggagggtt agaattgctt
181 ttaggtttga cccataggtg ctaaaaatat ctttgacaaa gggctgctgg tcattcgggg
241 ataatgggg gagaaattc cacctcatgg tagtaaaatt gtagtaaagt tgaatTTTT
301 gaatgctgaa ttttactct gacgttcagt tctttccat agatggatga aactgagatt
361 ggaagctgct ttgtagata cggttcagtg aaagaagtga a
//

STS marker sY86

GenBank: G49207.1

Primer A: GTGACACACAGACTATGCTTC

Primer B: ACACACAGAGGGACAACCT

STS dimensiune: 318pb

ORIGIN

1 atggatccct cagcacatgg gtgacacaca gactatgctt cagcaggctt gctggggccc
61 aagacacatt gtttctcatc agctcccagg ggatgtcaag gctgcagatc catggatctc
121 actttgcagg acagagactt ggtaatggct tcccagagt gttacaaaga aatcccaaag
181 actgggcccc taaacaaca accttgattc tcacagtcct tgaggctaga agtctgagat
241 caagctatgg ccagggctgg ttctcctga ggctctctc cttgggttgt agatgctgtc
301 ttctccctgt gtctcacag ggtgtcct ctgtgtgtgt ctgtctctc atctcctt
361 cttatgaggt gtcttagtcc atttcaggct gctgtcacag catgccgtag actgggtggc
421 ttatcagcaa cagacattga ttctcccaca gtctggaag ctggacgtct gagatcaggg
481 tatgggcagg
//

STS marker sY143

GenBank: G38347.1

Continut GC%: 46%

Primer A: GCAGGATGAGAAGCAGGTAG

Primer B: CCGTGTGCTGGAGACTAATC

STS dimensiune: 311pb

ORIGIN

1 ctattcnagg gcttcatgac ccctgcagga tgagaagcag gtagtcatat ttgcttctg
61 cttgtaatc tagcctctat ttcatctcat ctgcataggc tttcattgg ggaggggttc

121 tttcattggg ctgttgctag ataaagctgt ctctcaccac agattattha gatgtcaggg
181 attgcagaga gcaaaagga ctttgggtag gctgtctgca ctccagattg tgggtcattg
241 tctccttttg ggggttgaag ttgtttgcac ttttcaggag gattttgggt cctctgacag
301 gantcagtga acattgatta gtctccagca cacggcagct catcctcca ggtgaactt
361 nntttcnnt tgctgtcatg ggggatccac agngctcctc atcagcagtt ntgtacacc
421 ntatcatgct tgc

//

STS marker sY134

GenBank: G12001.1

Primer A: GTCTGCCTCACCATAAAACG

Primer B: ACCACTGCCAAAACCTTCAA

STS dimensiune: 301pb

ORIGIN

1 gaatacagact cactataggg cgaattgggt acgggcccc cctcgaggtc gacggtatcg
61 ataagcttaa aatgttgag aagcctcag aaagactaca aaactgtctg cctcaccata
121 aaacgtttat cttttagagg aatagtacag gtcaaaggaa ataaatagat ggggttgata
181 ctaaagttha aaacatctgg aacattctac ttgaagcgtt ctgtgactga aagaggatat
241 gataatgaaa ctttttttt ttaacctaaa tcaaaactga actagctaag tttctgaagt
301 gcatagcatg atgaaattaa atgttctag tttaaatagt ggaaagtagg tgtttgtct
361 tgggtgttac tcatgataat ttttcttga aagtttggc agtggttgtt ataacagttt
421 agtaataagt tctacaaata gggataatta ggatgggtg ggtttatca gtttttttt
481 tgaggtggaa nctaggcttg tcaccagcg ggggtt

//

STS marker sY105

GenBank: G11994.1

Primer A: AAGGGCTTCTTCTTGCTT

Primer B: AGGGAGCTTAAACTCACCGT

STS dimensiune:: 301pb

ORIGIN

1 gggacacctg gttgnccag cttagatga cagctagctg gttngttnc nctgtgttc
61 tgtatcataa gggcttctc tctgctttg gttttgttc tcttttttg ctgttggtg
121 tgttggtacg agcataagac tactactctt gtaaagaag agctataata aaggggaaac
181 attgaacccc agagagatca accaccaag agatgacttt cacatcactt gcaatatcca
241 tcttatttat tggctccant aatagcctnc tcactacctt acaggctcaa aatggtaaga
301 gatctcctcc tttgatgcaa aaagggttct gttctggac tgagttcaga cggtaggtt
361 aagctccctc n

//

STS marker sY 127

GenBank: G11998.1

Primer A: GGCTCACAAACGAAAAGAAA

Primer B: CTGCAGGCAGTAATAAGGGA

STS dimensiune:: 274pb

ORIGIN

1 ggctgggaa tatagccaaa actaatcagc atctgaagta ataattcata gaggctaggc
61 tcacaaacga aaagaaaaag atagcaccca ctggaatcta ccaaagccca ctgtgttcat
121 gccacaaaa agagaagaaa cttttcatg agatgctaata tatacaaaaag ncaaaggcat
181 ttctgtgtca cagctgttt cttatatgg gtgagccaga tgtttgtnaa agtccttgat
241 taaatgggct ggagatttcc ctgtctgtgt agccatgagc atattncag ttacaacacc
301 cctgtgctat ttcccttatt actgcctgca gcttgattan tttttccca gtcagctttt
361 ctatgttatg tgggaatgag nactn

//

STS marker sY1192

GenBank: G67166.1

Primer A: ACTACCATTCTGGAAGCCG

Primer B: CTCCTTGGTTCATGCCATT

STS dimensiune:: 255pb

ORIGIN

1 ttttaaaaa tgaagatta ttctgtttt cactgtgaag cacaataaca ataaatttc
61 cccattgga caagtgaatg atttacatgg taaattgatg tgcttaacta ctaccattc
121 tggagccgg atttgatata aacttattt gggctgggcg cggtggctca cgctgtaat
181 ctcagcagtt tgggaggccg aggcaggtg atcacgaggt caggagatgg agaccatgct
241 ggtaacaca gtgaaacccc gtcttacta aatacaaaa aaaattagcc ggggtgatg
301 gtggcgct gtgtcccag ctactccgga ggctgaggca ggagaatggc atgaaccaag
361 ggagcggagc ttgcagtgag ctgagatcga gccactgcac tccagcctag gcgacagagc
421 cagactccgt cttaaaaaa aaaacaaca aaaacttatt tgataaaca tggcttatga
481 tacttgataa taaaattaat aaagatgttg ttttataaa catcaaatgt gaatagctgt
541 tgtcatggtt taaatgtca aaggacagcc tttgaaaatt aagatactga taacagacat
601 g

//

STS marker sY1182

GenBank: G64729.1

Primer A: ATGGCTTCATCCCAACTGAG

Primer B: CATTGGCCTCTCCTGAGACT

STS dimensiune:: 247pb

ORIGIN

1 atggcttcat ccaactgag agtgtgtggg tgtttgtggg tgtgtgtgga cctaccagg
61 acatgagaga ggattgttt atctgatgag gaggcctgg gtaggactgg tgtgatgtg
121 tgtgaatgtg ggagcctaac tagactacc agaacatggg agaggcctgt tcatctaat
181 gagaagtctt ggggcagaga aagtgtatga aagtgtgtga aagagacagt ctcaggagag
241 gccaatg

//

sY1065

GenBank: G64724.1

Primer A: TCAGGTACTGTGATGCCGTT

Primer B: TGAAGAGGACACAAAGGGAAA

STS dimensiune:: 239pb

ORIGIN

1 tcaggactg tgatgccgtt agttttgtt gtttgctca gagttgctt ggctcttgg
61 tctctatcag tttcatacaa attttagtat ttttttctt atttctattg aaaataacat
121 tgatatttg atacagactg cattgaatct gtagatggct tctagtagta tggcatttt
181 aatgatgtca attcttttga tcaatgacat gcaatgttt tcctttgtg tcctctca
//

STS marker sY160

GenBank: G38343.1

Primer A: TACGGTCTCGAATGGAATA

Primer B: TCATTGCATTCTTTCCATT

STS dimensiune:: 236pb

ORIGIN

1 ccctggaat aaagtggaaa gctacgggtc tcgaatggaa taaaaatata tggaatggaa
61 tgcaatgnaa cggaatcgaa tgtcatagaa tgtaatgcaa tgcaaaaaca tggaatccaa
121 aatcattgac tggaaaggct ggggtcgaag aggaattgac tccaatggaa tggaatcgaa
181 tggaatggaa gtgaatagaa tcgaactaaa tcgaatggaa tggaattgat aggaacggaa
241 tggaaaggaa tgcaatgatt tggcatggaa tggaatcgca tggcatcgaa tggaatggaa
301 tggaatccaa tggaatggaa tttattagaa tgtaatgcc ttttaatgga atgtactcga
361 catggcattc gactggaatg ggatgttctn gtagtgnatg gtctcactg ggaatggatt
421 caaaaaggaa ttggaatcgt ncggggatgg aatcctnatg ngatnggnat tanatgggaa
481 ntng
//

STS marker SY153

GenBank: G12004.1

Primer A: GCATCCTCATTTTATGTCCA

Primer B: CAACCCAAAAGCACTGAGTA

STS dimensiune:: 139pb

ORIGIN

1 aagcttttaa agcatcctca ttttatgtcc aacatcagag acttaatact gaacaaatgc
61 cacataaagg taatgactgt tgaagaagat ttaacttaac atcttgcagc atcactaaga
121 actcgcttta tactcagtgct ttttgggtg ggtttgn
//

STS marker sY255

GenBank: G65827.1

Primer A: GTTACAGGATTCGGCGTGAT

Primer B: CTCGTCATGTGCAGCCAC

STS dimensiune: 123pb

ORIGIN

1 ggtctgaacg tgctgagtta caggattcgg cgtgattgg ggctgcaggt aggtttcagt
61 gtttggattc cgagacgtt ctgaaactgt ggtggaggag gaggattaac taccaaagga
121 cgtggctgca catgacgagc acataacttt tgttttct
//

STS marker sY1064

GenBank: G64723.1

DEFINITE sY1064 Sequence of Y chromosome AZFa region Homo sapiens

Primer A: GGGTCGGTGACCTAAATAA

Primer B: TGACTAAAGAGTGATAATAAATTCTG

STS dimensione: 110pb

ORIGIN

1 gggtcgggtgc acctaataa ttaaataatt ctcctcaac ccctaggtct ctctgattcc

61 ttaattatcc tgctgcaaat actcagaatt tattatcact ctttagtgca

STS marker sY116

GenBank: G66528.1

Primer A: TGTGTCATTGCACTTTAGCC

Primer B: CATTCCCCATGAAGCAAAC

STS dimensione: 154pb

ORIGIN

1 aagcttgacag agagctgaga tgctgagatt gtgtgtcatt gcactttagc ctgggcaaca

61 aaaagaaact ccatcttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

121 cancaccaa aaaagaccga aaagaaaaaa aaaagtgtct gactagtgtg acttcatggg

181 gaatgagagc atcactgaca tgtgagaag actgtctctg tacatggctc cacagaaatg

241 gcaatactag ttaattttat tttattttat ttattaatta ttttctggta gtgtttatct

301 gggatngttt nggttattnc ccttagngn gttccannn tttgtgtgtg ggtagngca

361 nccctnctg nccctngtt taggngagg gggttncnc nanggcnt

//

STS marker SY117

GenBank: G11996.1

Primer A: GTTGGTTCCATGCTCCATAC

Primer B: CAGGGAGAGAGCCTTTTACC

STS dimensione: 261pb

ORIGIN

1 gaanacgact cactataggg cgaattgggt acgggcccc cctcagagtc gacggtatcg

61 ataagcttga gccaccaaag accacctcta atgcagattt tcaacacgtt ggttccatgc

121 tccatacaaa gtcagattta attgttttg tcagattat taacttttag attctgagtc

181 cagatcatga gcatggctga acaaatccat tccagacctg atattgttt tccttcagc

241 ttcattgtct tgtgtttcac cacagtctat ttggagcaac atcggagaa catcacttc

301 agccatgccc ttaccatct ggtaacaagg ctccatttc tacttggagg taaaaggctc

361 tctcctgtt tgctactta agactcatic aacacagata tcaactcttc tagggaggtg

421 cttctcatct atcatattag ttttctgtc tgtctgtgtg ccttgggcaa ccagactga

481 tggataacag tatctggcca cn

//

STS marker sY88

GenBank: G49210.1

Primer A: TTGTAATCAAATACATGGGC

Primer B: CACCCAGCCATTTGTTTTAC

STS dimensione: 123pb

ORIGIN

1 ttgagacaa taactactaaa gactcatgta actaatactt tttgtaatcc aaatacatgg
61 gcttttttac ttactgtntc gaagttgaca gtagcattaa tagaccacca tgttgttcta
121 aactctttha nanccatgta agngtaaaaa caaatggctg ggtgcagtgg ctcatgtctg
181 taatccccgc actttgggaa gctgaggcag gtcgntcacg tgaggtcagg ngttacagnc
241 cagcctgtnc aacatgggtga aaccnactta aaaatncaaa aatttggcct nncatggtn
301 gcaatgcanc tgttaggggt cagctnctn ggagtctgng gcaggagnnt cngctcaan
361 ccnngggggg ngggg

//

STS marker sY82

GenBank: G40972.1

Primer A: ATCCTGCCCTTCTGAATCTC

Primer B: CAGTGTCCACTGATGGATGA

STS dimensiune:: 264pb

ORIGIN

1 ttngantgct tntttngtn tgannaatna agggnncaag tggagttcac ggatatagtg
61 atagtgggtga agtctgggct tttagtgtat ctatcacttg aatagtgtac attgtagccc
121 ttaaataatt tctnatccct caacccccac catcctgccc ttctgaatct ccagtgtcta
181 ttattccaca ttggatgtcc atgtgaacac attctttatc tcccacttat aagtgagaga
241 atgcagaatt tgactttctg tttctgagtt gttttacttg agataattgc ctccagttct
301 agccatgttg ctgctaaata catgatttta tttntatgg ctctgtagta ttccactgtg
361 tatatatatc acattttatt tatccaaaca tccatcatc catcagtgga cactgag

REVEDICARI

1. O metoda de diagnostic pentru identificarea microdeletilor cromozomului Y, **caracterizata prin aceea ca**, permite investigarea a 21 STS-uri (Short tagged sequence) cu cazualitate directa asupra fertilitatii masculine ce cuprinde:
 - a). Combinatiile de primeri multipli capabili sa amplifice simultan STS-urile localizate in cromozomul Y .
 - b) Combinatia amestecurilor de amplificare ce contine reactivii necesari cu concentratii optimizate pentru amplificarea simultana a STS-urilor.
 - c) Programul de amplificare multiplex touchdown.
 - d) Programul de analiza curbelor de topire in sistem real time.
2. Procedeu conform revendicarii 1 , **caracterizat prin aceea ca**, amestecul de reactie multiplex nr. 1 contine combinatiile specifice de primeri pentru coamplificarea simultana markerilor STS (Short tagged sequence): sY 88, sY254, Sy 255 si Sy 1192.
3. Procedeu conform revendicarii 1 , **caracterizat prin aceea ca**, amestecul de reactie multiplex nr. 3 contine combinatiile specifice de primeri pentru coamplificarea simultana markerilor STS (Short tagged sequence): sY 1064, sY82, sY86 si AZFa-proximal1.
4. Procedeu conform revendicarii 1 , **caracterizat prin aceea ca**, amestecul de reactie multiplex nr. 4 contine combinatiile specifice de primeri pentru coamplificarea simultana markerilor STS (Short tagged sequence): sY 116, sY1224, sY1182 si Sy 1291.
5. Procedeu conform revendicarii 1 , **caracterizat prin aceea ca**, amestecul de reactie multiplex nr. 5 contine combinatiile specifice de primeri pentru coamplificarea simultana markerilor STS (Short tagged sequence): sY 1064, sY143, AZF distal2 si Sy 14.
6. Procedeu conform revendicarii 1 , **caracterizat prin aceea ca**, amestecul de reactie multiplex nr. 6 contine combinatiile specifice de primeri pentru coamplificarea simultana markerilor STS (Short tagged sequence): sY 153, sY105 si Sy 14.
6. Procedeu conform revendicarii 1 , **caracterizat prin aceea ca**, amestecul de reactie multiplex nr. 7 contine combinatiile specifice de primeri pentru coamplificarea simultana markerilor STS (Short tagged sequence): sY 1191, sY160 si Sy 117..
7. Procedeu conform revendicarii 1 , **caracterizat prin aceea ca**, combinatiile de primeri pentru toate amestecurile multiplex sunt amplificate in aceeași placa utilizand un singur program PCR multiplex touchdown cu urmatoarele caracteristici: denaturare 10 minute la 94°C, etapa1 cu 20 cicluri ce cuprinde segmentele: denaturare 94 °C timp de 30 secunde, aliniere 65-55 (descrescator cu 1 °C per ciclu) timp de 30 de secunde, elongare 72 °C timp de 30 secunde, etapa a II-a cu 15

cicluri ce cuprinde segmentele: denaturare 94 °C timp de 30 secunde, aliniere 58°C timp de 30 de secunde, elongare 72 °C timp de 30 de secunde.

8. Procedeu conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, analizeaza succesiv in acelasi sistem de analiza curbele de topire in sistem real time ale ampliconilor generati simultan prin amplificare multiplex in urmatoarele conditii: segmentul 1 denaturare la 94 °C timp de 30 secunde, segmentul 2 citire din 2 in 2 grade pe modulul "oprire-citire" in intervalul de temperatura 59-94 °C .

9. Procedeu conform revendicarii 8, **caracterizat prin aceea ca**, generarea semnalului fluorescent inregistrat de sistemul real-time, in toate amestecurile de reactie, in vederea realizarii curbelor de topire multiple, se face cu colorantul Eva Geen.

10. Procedeu conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca**, amestecurile de reactie sunt suplimentate cu solutie tampon, dNTP-uri, MgCl₂, Taq polimeraza si primeri in concentratii optimizate in apa ultrapura.