XV CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM endocrinologia NA PRÁTICA AMBULATORIAL 2020

Princípios e aplicações do sequenciamento tradicional por *Sanger*

Mariana F. A. Funari

marianafunari@usp.br

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM42
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo

Realização MEDICINA USP HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS FMUSP

Sequenciamento por *Sanger*

Estratégia: gene candidato (exon a exon)

- Investigação de variantes de ponto e pequenas indels em genes candidatos (doenças com um ou poucos genes candidatos);

- Segregação de variantes identificadas pelo NGS.

Princípio da reação

Método de 'terminação de cadeia'

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 74, No. 12, pp. 5463–5467, December 1977
Biochemistry

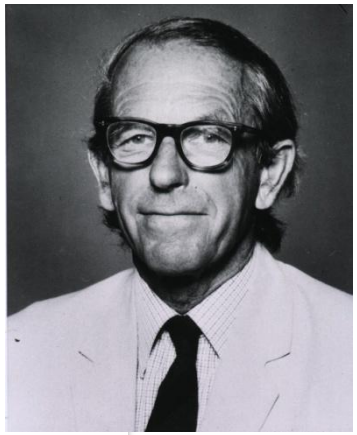
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors

(DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage ϕX174)

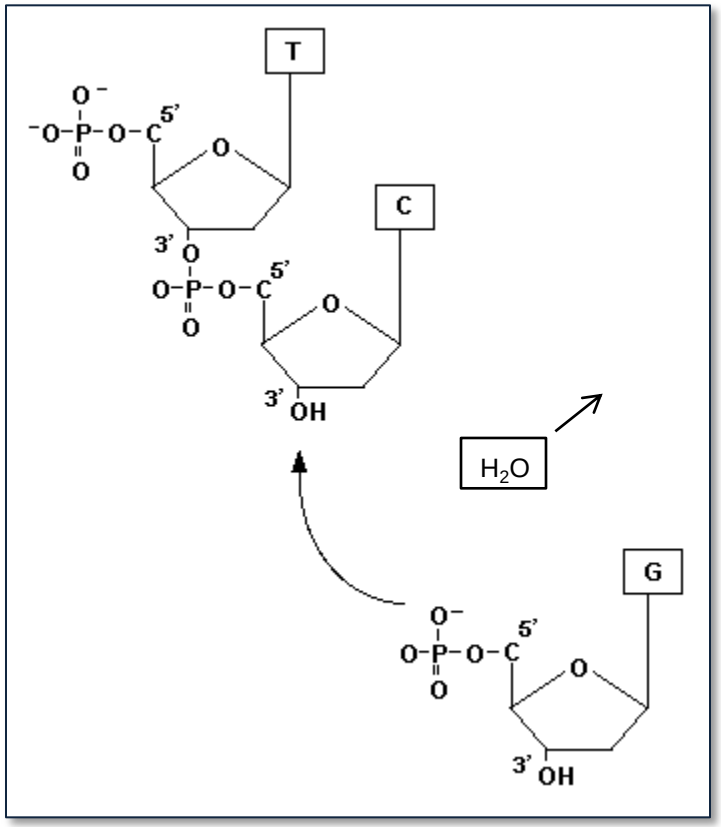
F. SANGER, S. NICKLEN, AND A. R. COULSON

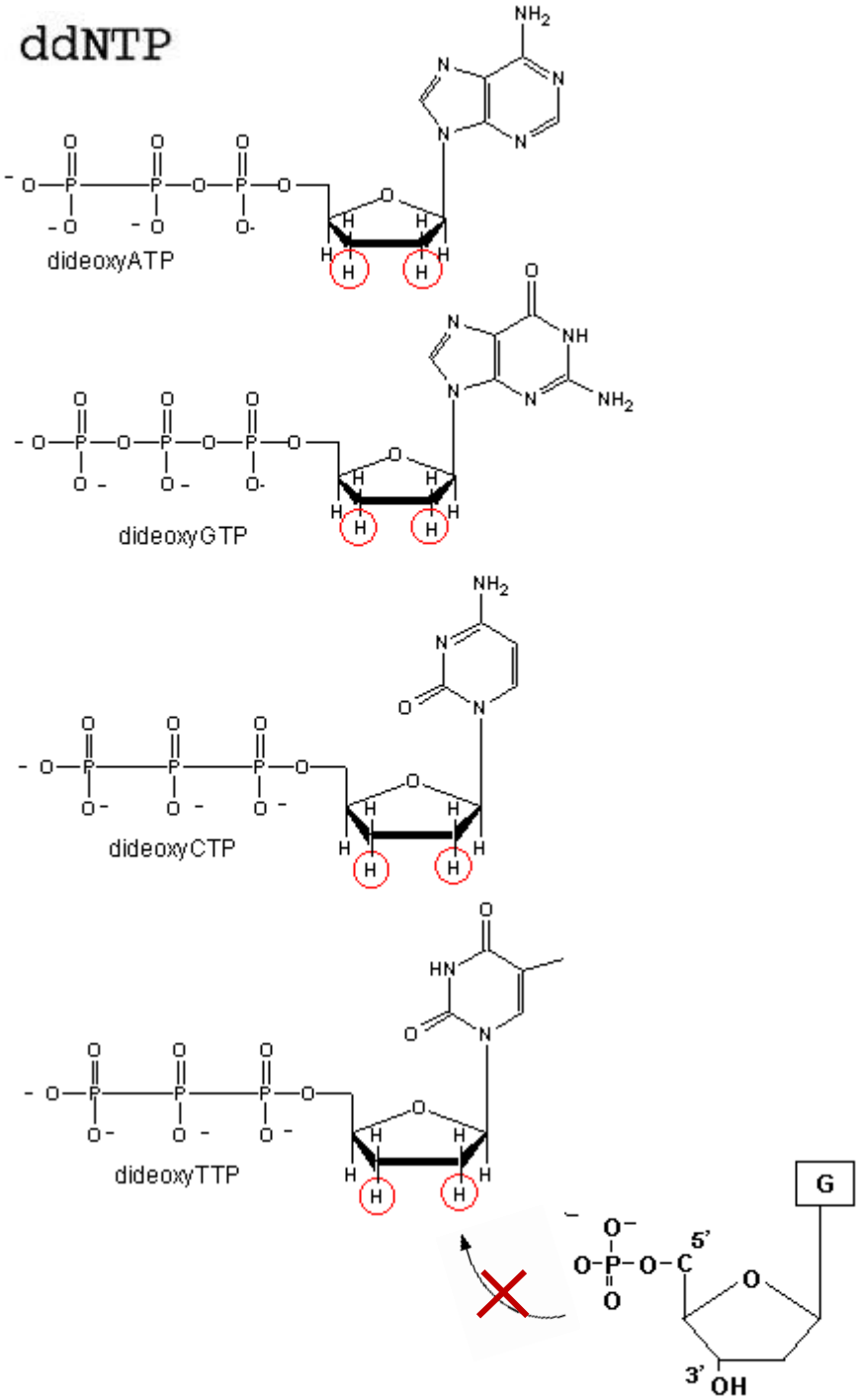
Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 2QH, England

Contributed by F. Sanger, October 3, 1977



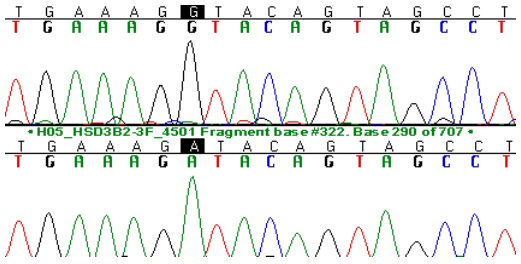
Método de *Sanger*



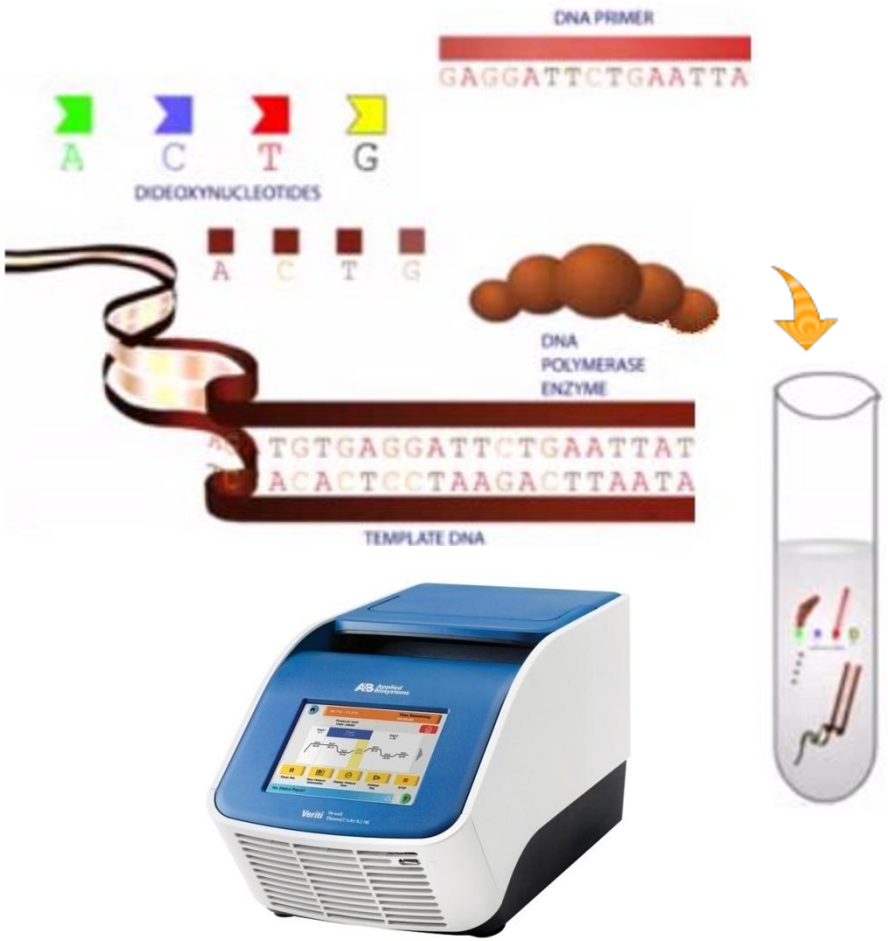


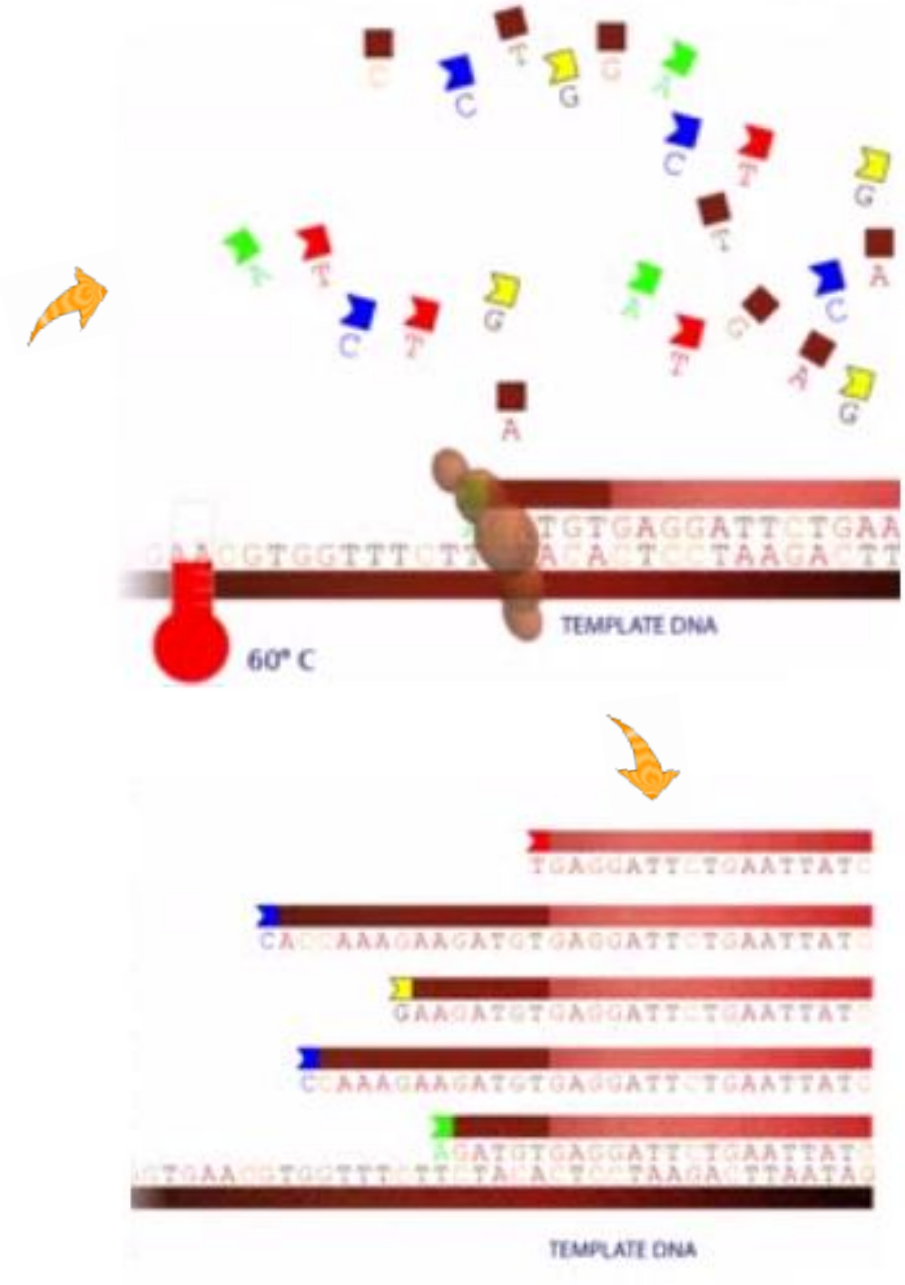
Etapas da reação do sequenciamento

- Amplificação das regiões de interesse por PCR;
- Purificação enzimática do produto de PCR;
- Reação de sequenciamento;
- Precipitação do produto do sequenciamento;
- Eletroforese capilar dos fragmentos sequenciados;
- Análise do eletroferograma em comparação a uma sequência referência.

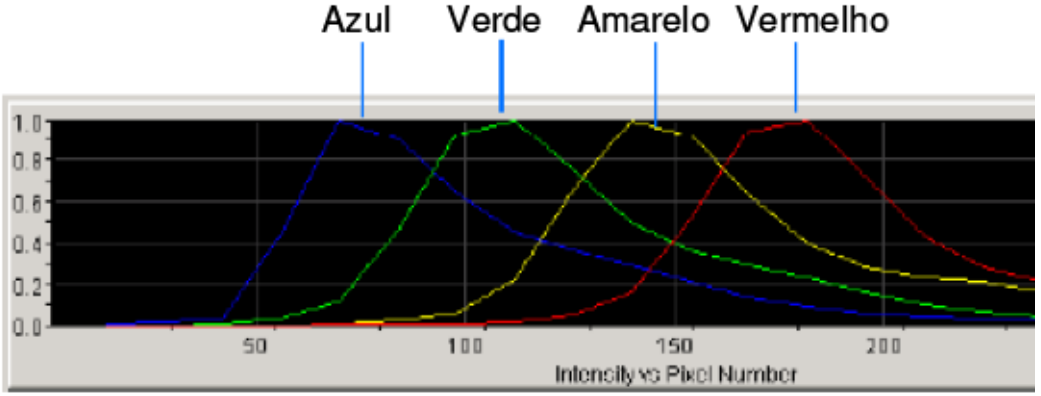


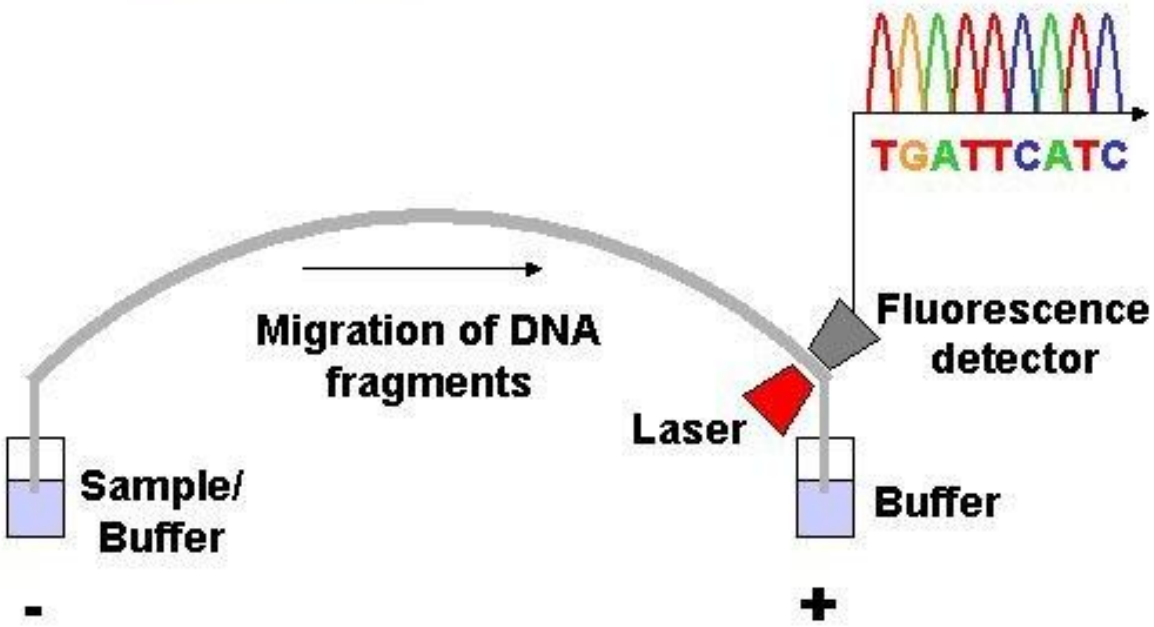
Sequenciamento automático

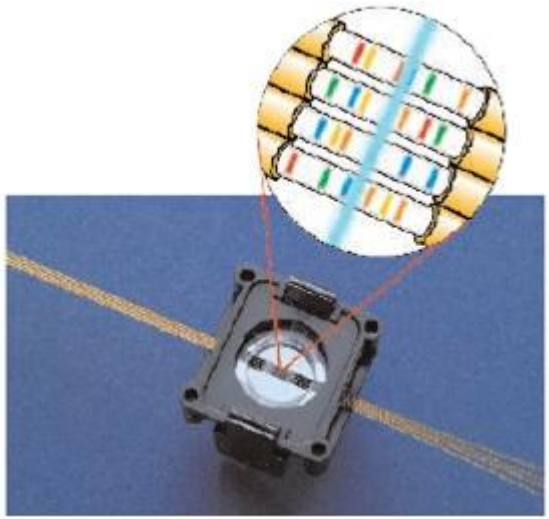




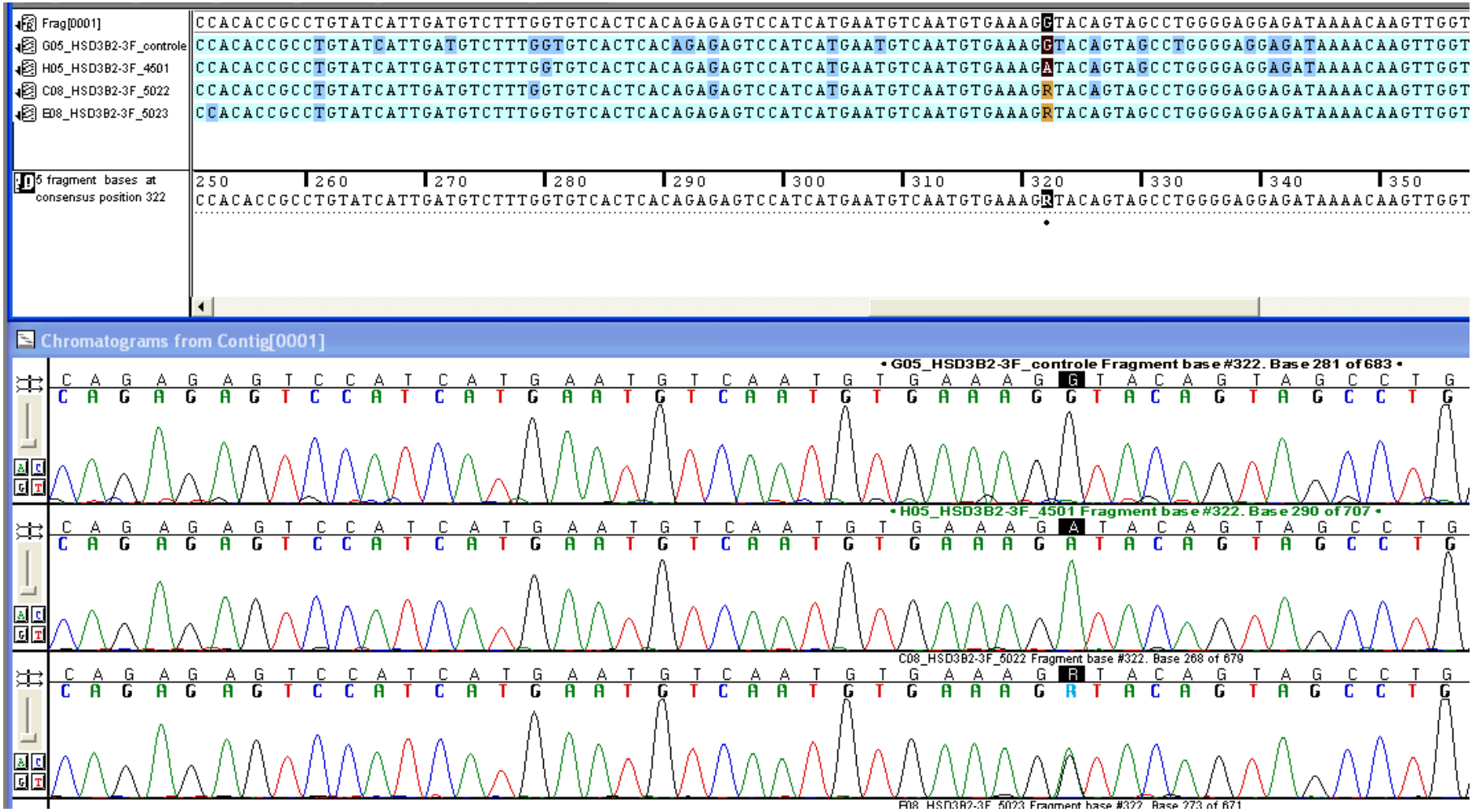
Eletroforese capilar







Eletroferograma
Sequenciamento automático



Sequência referência

e!Ensembl BLAST/BLAT | BioMart | Tools | Downloads | Help & Documentation | Blog | Mirrors

Human (GRCh37) ▼ | Location: X:585,079-620,146 | Gene: SHOX

Gene-based displays

- Gene summary
- Splice variants (4)
- Transcript comparison
- Supporting evidence
- Sequence
- External references
- Regulation
- Expression
- Comparative Genomics
  - Genomic alignments
  - Gene tree (image)
    - Gene tree (text)
    - Gene tree (alignment)
    - Gene gain/loss tree
  - Orthologues (37)
  - Paralogues (14)
  - Protein families (1)
- Phenotype
- Genetic Variation
  - Variation table
  - Variation image
  - Structural variation
- External data
  - Personal annotation
- ID History
  - Gene history

Configure this page

Add your data

Export data

Bookmark this page

Share this page

Gene: SHOX ENSG00000185960

Description short stature homeobox [Source:HGNC Symbol;Acc:10853]

Location Chromosome X: 585,079-620,146 forward strand.

This gene is mapped to the following HAP/PARs:

- Y : 535,079-570,146

INSDC coordinates chromosome:GRCh37:CM000685.1:585079:620146:1

Transcripts This gene has 4 transcripts (splice variants) Hide transcript table

Show/hide columns | Filter

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype	CCDS
SHOX-202	ENST00000381578	3757	ENSP00000370990	292	Protein coding	CCDS14107
SHOX-201	ENST00000334060	1951	ENSP00000335505	225	Protein coding	CCDS14106
SHOX-003	ENST00000554971	1902	ENSP00000452016	292	Protein coding	CCDS14107
SHOX-001	ENST00000381575	1351	ENSP00000370987	225	Protein coding	CCDS14106

Gene summary

Name SHOX (HGNC Symbol)

Synonyms GCFX, PHOG, SHOXY, SS [To view all Ensembl genes linked to the name click here.]

CCDS This gene is a member of the Human CCDS set: CCDS14106, CCDS14107

Ensembl version ENSG00000185960.8

Gene type Known protein coding

Prediction Method Annotation for this gene includes both automatic annotation from Ensembl and Havana manual curation, see article.

Alternative genes **This gene corresponds to the following database identifiers:**

Havana gene: OTTHUMG00000021053 (version 4)

Human Genome Variation Society

Sequence Variant Nomenclature

Contact Us

Discussions regarding HGVS nomenclature are necessary in order to further improve them. What is listed on these pages represents the current consensus of the recommendations. We invite everybody to send us comments or examples of cases that are not yet covered, with a suggestion of how to describe these (E-mail: VarNomen @ HGVS.org).

Follow us on Facebook

http://varnomen.hgvs.org/

Current Recommendations

General	DNA	RNA
Protein	Uncertain	Checklist
Open Issues		

Background Material

Basics	Reference Sequences	Standards
Numbering	Community Consultation	HGVS Simple
Educational Material	Glossary	

https://varnomen.hgvs.org/

Significado clínico das variantes identificadas

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES | Genetics inMedicine

Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

Sue Richards, PhD[1], Nazneen Aziz, PhD[2,16], Sherri Bale, PhD[3], David Bick, MD[4], Soma Das, PhD[5], Julie Gastier-Foster, PhD[6,7,8], Wayne W. Grody, MD, PhD[9,10,11], Madhuri Hegde, PhD[12], Elaine Lyon, PhD[13], Elaine Spector, PhD[14], Karl Voelkerding, MD[13] and Heidi L. Rehm, PhD[15]; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

Published in final edited form as:
Genet Med. 2015 May ; 17(5): 405–424. doi:10.1038/gim.2015.30.

Classificação das variantes alélicas de acordo com a patogenicidade

Evidências:

- características da variante
- dados populacionais
- estudos *in silico*
- dados de segregação
- estudos funcionais

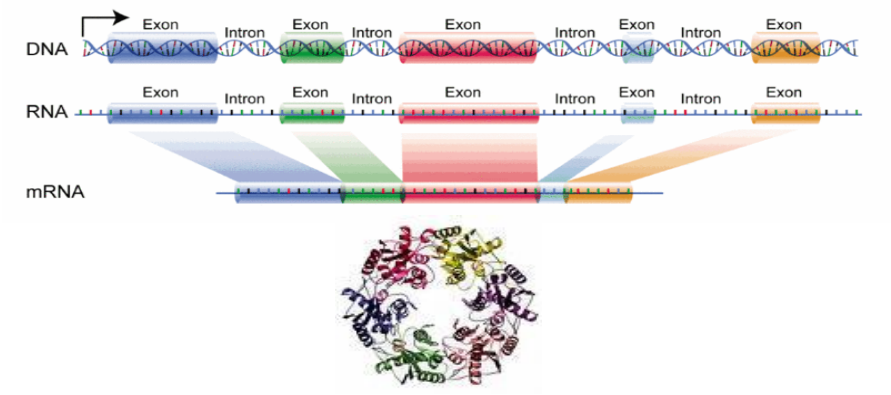
Classificação sugerida:

- **patogênica**
- **provavelmente patogênica**
- de significado incerto (VUS)
- provavelmente benigna
- benigna

Richards et al. Genet Med. 2015; 17(5):405-424

Características da variante

- Localização da variante



- Estado da variante: Heterozigose x Homozigose
- Tipo de variante
  - Variantes sinônimas;
  - Variantes *missense;*
  - *Loss of function variants (stopgain, stoploss, frameshift, splice site*).

National Human Genome Research Institute

Outros dados importantes

- Presença da variante em bancos populacionais

  ExAC, 1000 Genomes, gnomAD, AbraOM

- Presença da variante em bancos de doença

  ClinVar, OMIM, Human Gene Mutation Database, DECIPHER

- Segregação da variante com o fenótipo na família do paciente

- Patogenicidade prevista pelos programas de predição *in silico*

  Polyphen, Mutation Taster, Mutation Acessor, PROVEAN, FATHMM, SIFT, CADD, etc

- Presença ou possibilidade de se fazer um estudo funcional

  Ensaios in vitro ou in vivo

Richards et al. Genet Med. 2015; 17(5):405-424

Resumo

- estratégia de sequenciamento;

- localização da variante;

- tipo de variante;

- estado da variante (homozigose, heterozigose);

- investigação de indivíduos controles/ bancos de dados;

- segregação na família;

- softwares de predição;

- estudos funcionais;

- limitação das técnicas.

XV CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM endocrinologia NA PRÁTICA AMBULATORIAL 2020

Clínica Médica · Diagnóstico · Tratamento · Neuroendocrinologia · Hiperaldosteronismo · Metabologia · Crescimento · Tireóide · Puberdade

marianafunari@usp.br

HC

MEDICINA USP

FAPESP

Realização MEDICINA USP HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS FMUSP