

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Použití principu CO-amplifikace při nižší teplotě
denaturace (COLD) PCR pro DNA profilování
pomocí STR genotypizace**

Diplomová práce

Autor:

Bc. Tereza Tichá

Studijní program:

Chemie

Studijní obor:

Bioorganická chemie

Typ studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

Doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. Mgr. Jiřího Drábka, Ph.D. za použití literatury, která je citována a uvedena na konci diplomové práce.

V Olomouci, 07. 04. 2014

Podpis

Poděkování:

Přednostně bych ráda chtěla poděkovat **doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, PhD** za odborný dohled, ochotu, čas, cenné rady a věcné připomínky. Následně bych chtěla poděkovat celému kolektivu DNA laboratoře Ústavu molekulární a translační medicíny, kteří se podíleli na této diplomové práci. Mým drahým spolužákům za pomoc a rady. A v neposlední řadě mé rodině za podporu a pevné nervy.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Tereza Tichá

Název práce: Použití principu CO-amplifikace při nižší teplotě denaturace (COLD) PCR pro DNA profilování pomocí STR genotypizace

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, UPOL

Školitel: Doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt:

Mikrosatelity neboli STRs (short tandem repeats), jsou specifické tandemově se opakující krátké segmenty DNA. Mikrosatelity se vyskytují v celém genomu prokaryotických i eukaryotických organismů. Jejich využití je rozsáhlé například v nepřímé diagnostice monogenních chorob, při identifikaci osob nebo vzorků DNA, hledání nových genů a při určování příbuznosti.

COLD-PCR (koamplifikace za snížené denaturační teploty) je metoda, která byla vyvinuta pro zvýšení citlivosti detekce a identifikace minoritně zastoupených mutací nebo variant, které mají nižší teplotou tání ve srovnání s Wild-type DNA. Skládá se z pěti základních kroků: denaturace probíhající při vysoké teplotě, hybridizace mutantní alely a Wild-type DNA, denaturace při kritické teplotě (specifické pro každou sekvenci DNA), nasednutí primerů po ochlazení a syntéza komplementární DNA pomocí Taq polymerázy.

Pro zvýšení citlivosti metod DNA profilování mikrosatelitů se využívají různé modifikace, které však stejným dílem zvýší signál majoritní i minoritní složky. Někdy je žádoucí zvýšit podíl minoritního profilu ve směsi. Metoda COLD PCR, která využívá nižších teplot ve fázi denaturace DNA dvoušroubovice, je s úspěchem využívána k detekci bodových polymorfismů (SNPs) u onkologických vzorků, ale k vyšetření STRs nebyla prozatím použita.

Klíčová slova: mikrosatelity, STRs, PCR, COLD-PCR

Počet stran: 55

Počet příloh: 00

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Tereza Tichá

Title: Application of CO-amplification at Lower Denaturation temperature (COLD) PCR principle to DNA profiling by STR genotyping

Type of thesis: Master's

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, UPOL

Advisor: Doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract:

Microsatellites or STRs (short tandem repeats), specific short tandemly repeated DNA segments. Microsatellites are present in the whole genome of prokaryotic and eukaryotic organisms. Their use is extensive, for example in the indirect diagnosis of monogenic diseases, identification of persons or DNA samples, in the search for new genes or in determining kinship.

COLD-PCR (CO-amplification at Lower Denaturation temperature PCR) is a method that has been developed to increase sensitivity of detection and identification of a minority mutations or variants that have a lower melting point in comparison with the Wild-type DNA. It consists of five basic steps: high temperature denaturation, hybridization mutant alleles with Wild-type DNA, denaturation at a critical temperature, which is specific for each of DNA sequence), primer annealing after cooling, and synthesis of complementary DNA using Taq polymerase.

To increase the sensitivity methods of DNA profiling by microsatellites are used various modifications, however, there are equally increase the signal majority and minority component. Sometimes is desirable to increase the proportion of minority profile in the mixture. COLD PCR method use the lower temperature phase denaturing the double stranded DNA for successfully used to detect point polymorphisms (SNPs) in cancer samples, but by STRs examination has not been used yet.

Keywords: microsatellites, STRs, PCR, COLD-PCR

Number of pages: 55

Number of appendixes: 00

Language: Czech

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle diplomové práce	10
3. Teoretická část	11
3.1. Mikrosatelity	11
3.1.1. Nerovnoměrný Crossing-over neboli překřížení.....	11
3.1.2. Sklouznutí polymerázy při replikaci, stutter	12
3.1.3. Využití polymorfismu mikrosatelitů.....	13
3.1.4. Mikrosatelit DXS101	13
3.2. Metody PCR.....	15
3.2.1. PCR	15
3.2.2. Metody ke zvýšení citlivosti detekce minoritní složky.....	19
4. Experimentální část.....	29
4.1. Materiál a pomocné nástroje	29
4.1.1. Materiál a reagentie	29
4.1.2. Spotřební materiál	29
4.1.3. Přístroje a vybavení.....	30
4.1.4. Software	30
4.2. Metody	31
4.2.1. Biologické vzorky a jejich izolace	31
4.2.2. Metody PCR.....	31
4.2.3. Fragmentační analýza	35
4.2.4. Vyhodnocení	35
5. Výsledky	37
5.1. Optimalizace teploty pomocí teplotního gradientu.....	37

5.2. Interpretace dat u jednotlivých vzorků.....	39
5.2.1. Výška píku	39
5.2.2. Podíl stutteru a správného píku	41
5.3. Interpretace dat u směsných vzorků.....	42
5.3.1. Ovlivnění signálu ve směsi	42
5.3.2. Ovlivnění minoritního píku.....	44
6. Diskuze.....	47
7. Závěr	50
8. Literatura:	51

Zkratky:

COLD-PCR – CO-amplification at Lower Denaturation temperature PCR

dATPs – deoxyadenosine triphosphate

dCTPs – deoxycytosine triphosphate

DEPC – diethylpyrocarbonate

dGTPs – deoxyguanine triphosphate

DNA – deoxyribonucleic acid

dNTPs – deoxynucleotide triphosphate

dsDNA – double stranded DNA

dTTPs – deoxythymine triphosphate

FFPE – formalin-fixed, paraffin-embedded

MEC – mean exclusion chance

Pb – párů bází

PCR – polymerase chain reaction

PIC – polymorphism information content

RS – oligonukleotidové referenční sekvence

SLS – deionizovaný formamid s nízkou konduktivitou

SPN – single nucleotide polymorfism

ssDNA – single stranded DNA

STRs – Short Tandem Repeats

Tc – critical temperature

Tm – melting temperature

Tris HCl – buffer

Triton-X – detergent

VNTRs – variable number of tandem repeats

WT DNA – Wild-type DNA

1. Úvod

COLD-PCR (CO-amplification at Lower Denaturation temperature) je varianta polymerázové řetězové reakce cílená na detekci sekvenčních variant přítomných v minoritním množství oproti standardní variantě. Metoda je založená na snížení denaturační teploty v PCR cyklech na úroveň, kdy jsou rozpleteny a amplifikovány pouze heteroduplexy. Amplifikované heteroduplexy jsou tvořeny minoritně zastoupenou variantní DNA molekulou (se somatickou nebo germinální mutací), spárovanou s majoritně zastoupenou standardní (Wild-type) DNA molekulou. Naproti tomu mutantní homoduplex ani standardní homoduplexy nejsou denaturovány, a proto také nedochází k jejich amplifikaci. V teoretické rovině dojde k tzv. nivelizované amplifikaci původně majoritních a minoritních úseků DNA a tím ke zvýšení citlivosti záchytu minoritní mutace.

Od roku 2008 byly techniky COLD-PCR s úspěchem použity pro zvýšení citlivosti záchytu minoritní populace DNA sekvence s bodovými polymorfismy (SNP) za pomoci technik High Resolution Melting, Sangerova sekvenování, dHPLC nebo Gene Scanning. Přestože je zřejmé, že v některých aplikacích PCR je COLD princip nepoužitelný (např. při použití šcorpionových primerů), metoda má široké pole uplatnění. Ohledně použití COLD-PCR pro typizaci délkových polymorfismů typu mikrosatelitů však není dostupná žádná publikace.

Tato diplomová práce se zabývá otestováním COLD-PCR principu pro genotypizaci mikrosatelitů v případech, kdy by bylo možné a výhodné alespoň teoreticky navýšit citlivost detekce minoritní DNA sekvence ve směsi (např. u forenzních směsných vzorků pachatele a oběti, u detekce kontaminace DNA, ztráty heterozygoty v nádoru nebo při detekci DNA plodu cirkulující v krevní plazmě matky).

2. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda metoda COLD-PCR (koamplifikace za snížené denaturační teploty) přináší výhody ve srovnání se standardní PCR pro genotypizaci mikrosatelitů s ohledem na detekci signálů minoritní složky ve směsi.

Dílčí cíle diplomové práce lze shrnout do několika bodů:

- Zpracování literární rešerše popisující mikrosatelity, princip COLD-PCR a jiné citlivé metody pro detekci variant nukleových kyselin.
- Porovnání účinnosti amplifikace minoritní složky ve směsi COLD-PCR ve srovnání se standardní PCR dosažené pomocí dílčích kroků:
 - Optimalizace denaturační teploty PCR reakce pro heteroduplexy.
 - Srovnání účinnosti metod PCR a COLD-PCR u směsných vzorků sledované pomocí absolutní a relativní výšky minoritního píku (zkráceně vrchol křivky, z anglického peak), spolu se sledováním vzniku artefaktů typu stutter.

3. Teoretická část

Teoretická část této diplomové práce je rozdělena do dvou základních oblastí. V první oblasti je obecně shrnuta problematika mikrosatelitů. Ve druhé oblasti je stručně shrnuta metoda COLD-PCR a jiné metody zvyšující citlivost detekce minoritní sekvence.

3.1. Mikrosatelity

Mikrosatelity, které se nazývají také STRs (short tandem repeats), SSRs (simple sequence repeats), jsou specifické tandemově se opakující krátké segmenty DNA. Délka základní repetice mikrosatelitu je 1-6 párů bází¹. Základní repetice se většinou může opakovat 2-100krát.

Mikrosatelity se podle délky repetice rozdělují na mono-, di-, tri- až hexanukleotidy. Zapisují se zkráceně (A)_n, (AT)_n, (AAT)_n, (GATA)_n,...²

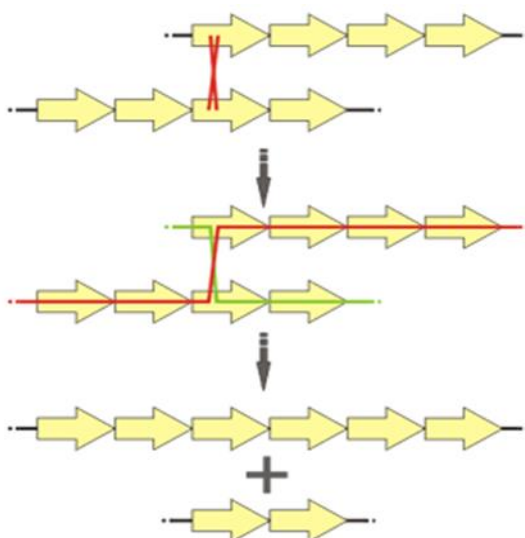
Mikrosatelity jsou buď jednoduché ...CACACACACACACA..., složené ...CACACATGTGTG... nebo přerušované ...CACATTCACACATTCACA...³

Mikrosatelity se vyskytují v celém genomu prokaryotických i eukaryotických organismů, s největší koncentrací v intronech (81-75%). Koncentrace v exonech se pohybuje pouze mezi 9-15%.^{4,5,6} Mikrosatelity ležící v kódujících oblastech mohou ovlivňovat transkripci, ale není přesně zjištěno jakým způsobem. Tento jev byl zjištěn v souvislosti s výzkumem Friedreichovy ataxie.⁷

Mikrosatelity jsou ve srovnání s jinými neutrálními oblastmi DNA velice polymorfní, a to díky vysoké mutační rychlosti (10^{-3} - 10^{-5})⁸, kdy mutace jsou způsobeny nerovnoměrným crossing-overem a sklouznutím polymerázy při replikaci. Tyto mutace jsou nejpravděpodobnější u dlouhých, pravidelných repetit.⁹

3.1.1. Nerovnoměrný Crossing-over neboli překřížení

Na rozdíl od normálního crossing-overu, u meiotického dělení vzniká u nerovnoměrného crossing-overu na mikrosatelitech problém, jak najít správné místo oddělení. Díky tomu dochází k nerovnoměrně výměně DNA. Nastává situace, kdy je jedno vlákno delší a druhé kratší (inzerce a delece).



Obrázek č.1: Nerovnoměrný crossing-over¹⁰

3.1.2. Sklouznutí polymerázy při replikaci, stutter

K prokluzu polymerázy dochází v případě, kdy čerstvě vzniklá DNA ještě není zcela stabilizovaná a dochází u ní k teplotním fluktuacím. Za těchto podmínek může dojít k tomu, že DNA polymeráza nenasedne přesně na templátovou DNA, ale dochází k posunutí. Vedlejším produktem tohoto procesu je vytvoření smyčky, kdy se ssDNA spáruje sama se sebou. V případě replikace mikrosatelitů může dojít ke ztrátě nebo navýšení počtu jednotek repetice. Ke stutteru jako k jednomu z nechtěných artefaktů dochází i v průběhu PCR.

information content) tohoto mikrosatelitu je 0,884 a MEC (mean exclusion chance) 0,879. Má typicky na chromozom X-vázanou dědičnost a v 340 meiózách nebyly jištěny žádné mutace¹². DXS101 je lokalizován 104,9-121 cM od XP-telomery (Xp-tel) korespondující s Xq21.33-Xq22.3.¹²

V literatuře jsou diskutovány experimenty, kdy mikrosatelit DXS101 a jemu podobné pomáhají najít geny pro různé nemoci, jako je hypogamaglobulinemie, jejíž genetická složka leží mezi Xq21.33 a Xq23.¹³ Další využití spočívá ve zkoumání, zda nemoci jako jsou dystonie, geneticky podmíněná slepota, náchylnost ke zlomeninám a mentální retardace, jsou vázané k Xq22.¹⁴ Nejčastějším typem výzkumu je však sledování, v jaké frekvenci se alely tohoto mikrosatelitu vyskytují v určitých populacích. Jedná se například o populační vzorky z oblastí Afriky¹⁵, Argentiny¹⁶, Brazílie¹⁷, Polska¹⁸, Itálie¹⁹ nebo Číny²⁰.

3.2. Metody PCR

3.2.1. PCR

Anglický termín Polymerase Chain Reaction (PCR) lze přeložit jako „polymerázová řetězová reakce“. Je to biochemická metoda, která exponenciálně enzymaticky amplifikuje vybrané sekvence DNA *in vitro*. Výsledkem reakce jsou tisíce až miliony kopií dané sekvence DNA.

PCR byla vyvinuta v roce 1983 ve společnosti Cetus Corporation v Kalifornii Kary Mullisem, který v roce 1993 získal společně s Michaellem Smithem za tuto reakci Nobelovu cenu za chemii.²¹

Skoro všechny aplikace PCR využívají tepelně stabilní DNA polymerázu, která dobře snáší drastické teplotní změny v průběhu amplifikace. Nejčastěji používaná polymeráza je *Taq* polymeráza pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato DNA polymeráza sestavuje komplementární řetězec DNA z příslušných dNTP. Nově vzniklý řetězec DNA se může použít jako templát pro další následnou syntézu (replikaci). Z toho důvodu je PCR cyklizační proces, ve kterém dochází k exponenciálnímu nárůstu amplikonů.

Polymerázová řetězová reakce má tři základní kroky v jednom cyklu. Cykly se opakují 20-40krát.

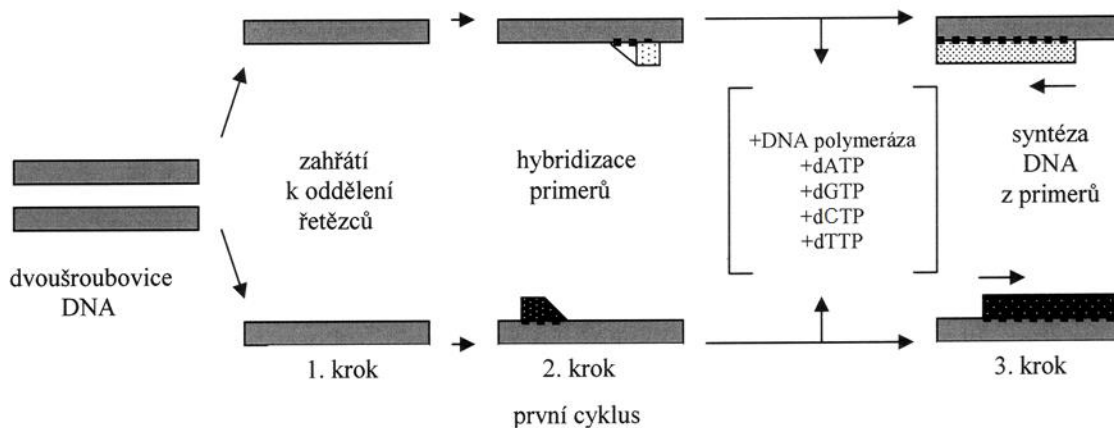
3.2.1.1. Princip reakce

1. krok: Denaturace – vzorek se směsí DNA a dalšími komponenty se obvykle na dobu 10 sekund zahřeje na teplotu 95 °C. Při této teplotě dochází k relaxaci a následné denaturaci DNA ve vzorku rozrušením vodíkových můstků mezi nukleotidy ve struktuře dsDNA. Dochází ke vzniku jednovláknové templátové molekuly ssDNA.

2. krok: Hybridizace primerů – teplota v reakční směsi se obvykle sníží na 65 °C po dobu 30 sekund. Tento proces umožňuje navázání primerů ke komplementárním specifickým místům na templátové ssDNA. Následně dochází k navázání DNA polymerázy na vzniklé dvouřetězcové úseky tvořené dvojicemi DNA-primerů.

3. krok: Syntéza DNA – teplota se ve směsi zvýší obvykle (v závislosti na použité DNA polymeráze) na 75°C. Nejčastěji používaná *Taq* polymeráza má optimální aktivitu mezi 75-80°C. V této fázi DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec. Pomocí

volných dNTP se ve směru od 5' konce ke 3' konci syntetizuje vlákno DNA komplementární k templátové DNA molekule. V optimálních podmínkách DNA polymeráza dokáže zpracovat tisíce bází za minutu. V ideálním případě se za jeden cyklus obsah DNA ve vzorku zdvojnásobí. Každá vzniklá DNA může být v dalším cyklu použita jako templát. Takto může v 31 cyklech vzniknout až 1 miliarda kopií.²²



Obrázek č.3: Tři základní kroky PCR reakcí²³

3.2.1.2. Reakční směs

je složena z těchto základních a nezbytných složek:

- Vzorek DNA, který má být amplifikován
- Primery
- DNA polymeráza
- Deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs)
- Pufrový roztok
- Hořčík Mg^{2+}
- DEPC voda

Vzorek DNA:

Zdroj DNA: mikroorganismy, stěry, tělní tekutiny, vzorky z biopsií, buňky tkáňových kultur nebo vlasy.

Potřebné množství DNA pro jednu PCR reakci se pohybuje kolem 0,2 μ g.

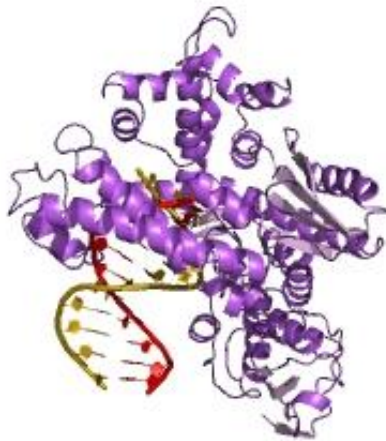
Primery:

Primery jsou krátké úseky oligonukleotidů, které obsahují komplementární sekvence k templátové DNA. Délka primeru je nejčastěji 20-30 nukleotidů, ale může být i delší nebo kratší. Poměr mezi dvojicemi bází GC:AT by měl být 1:1. Do reakční směsi se dávají: jeden primer, který je komplementární k začátku cílové oblasti DNA a jeden primer, který je komplementární ke konci cílové oblasti DNA, kterou chceme amplifikovat. Dodávané primery nesmí být vzájemně komplementární, aby nedošlo ke vzniku nechtěného dimeru, duplexu.²⁴

DNA polymeráza:

Řídící enzym syntézy nové DNA. DNA polymeráza je multijednotkový enzym, účastní se spolu s dalšími enzymy procesu replikace DNA v buňkách živých organismů ve směru 5'-3'. Pro svou činnost potřebuje kromě DNA sloužící jako templát také deoxynukleotidtrifosfáty (dNTPs).

DNA polymeráza při PCR umožňuje z jednoho vlákna DNA získat až řádově miliardy identických kopií. Při tak vysoké efektivitě (okolo 100 bází/s)²⁵, DNA polymeráza bez korekturní funkce pracující za podmínek in vitro bohužel generuje na každých tisíc bází přibližně $2 \cdot 10^{-5}$ chyb.²⁶



Obrázek č. 4 : DNA polymeráza²⁷

Deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs)

Jsou to stavební kameny, ze kterých DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec. Ve své struktuře obsahují makroenergetické vazby, které DNA polymeráza využívá jako zdroj energie při jejich zabudování do tvořícího se řetězce DNA.

Do reakční směsi se dodávají jako směs dATPs, dCTPs, dGTPs a dTTPs ve formě sodných nebo lithných solí. Jsou rozpuštěny v DEPC vodě o pH 7,5, která se používá pro molekulárně genetické analýzy. Koncentrace používaná pro PCR je 20 až 400 $\mu\text{mol/l}$ roztoku.

Pufrovací roztok

Pufrovací roztok odolává změnám pH. U metody PCR je důležité, aby reakce probíhala v prostředí, ve kterém má DNA polymeráza maximální aktivitu, což znamená hodnotu pH roztoku kolem 8. Roztok většinou obsahuje KCl, Tris HCl, Triton-X.

Hořčík Mg^{2+}

DNA polymeráza potřebuje pro svou aktivitu hořčík, ale jeho nadbytek aktivitu snižuje. Proto se před každou reakcí musí přepočítat potřebné množství hořčíku podle koncentrace dNTPs a DNA polymerázy. Nejčastěji se koncentrace Mg^{2+} pohybuje od 1,5 do 2mM. Jako nejběžnější zdroj Mg^{2+} iontů se používá magnesium chlorid MgCl_2 ²⁸.

DEPC voda

Tato voda je určena k práci v molekulární genetice. Je to sterilně filtrovaná voda s dietylpyrokarbonátem (DEPC). Dietylpyrokarbonát inhibuje RNA-sy a DNA-sy, modifikací histidinu na N-karboethoxyhistidin.

3.2.1.3. Využití PCR

PCR od svého vzniku prošla mnohými změnami a byly vytvořeny i různé modifikace. Je to metoda používaná na celém světě, ve všech laboratořích a výzkumných centrech. PCR je hojně užívána z toho důvodu, že je rychlá, jednoduchá a nenáročná. Její využití je velmi široké, od molekulární biologie až po testy paternity²². Velký pokrok přinesl objev PCR v medicíně, kdy za všechny aplikace je možno jmenovat například rychlé a vysoce citlivé stanovení srpkovité anémie v prenatální diagnostice.

3.2.2. Metody ke zvýšení citlivosti detekce minoritní složky

Technologie, které detekují mutace v DNA, hrají důležitou roli v oblasti výzkumu, prevence a léčby rakoviny. Rakovina, nebo též nádorové onemocnění, je skupina chorob, jejichž společným rysem je vznik somatické mutace, která uvolní určitou populaci vlastních buněk organismu z kontroly a spustí její autonomní růst. K dnešnímu dni existují různé metody, které jsou schopny identifikovat s vysokou citlivostí známé nebo neznámé mutace, například ARMS (Allele-specific-PCR), RSM, RFLP, iFLP a COLD-PCR.

3.2.2.1. The amplification-refractory mutation system (ARMS) – PCR, allele specific PCR

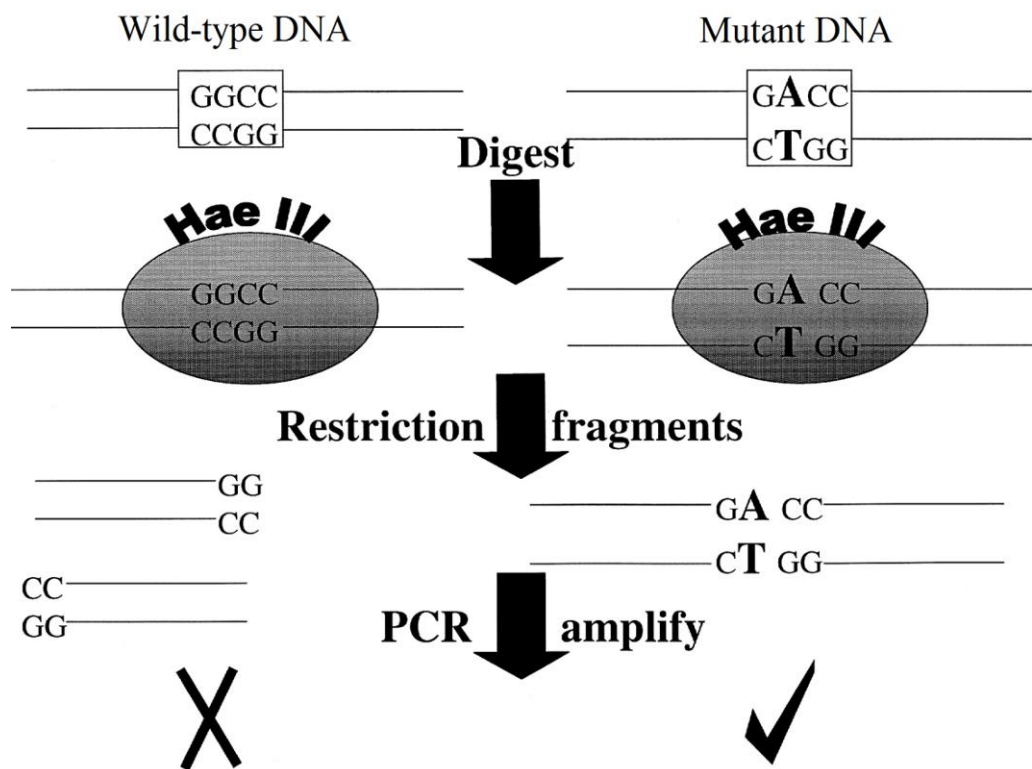
ARMS je metoda užívaná pro detekci bodových mutací nebo malých delecí, popsána v roce 1989.

ARMS je založena na použití sekvenčně specifických PCR primerů, které umožňují amplifikaci DNA pouze v případě, kdy je cílová sekvence obsažena ve vzorku. Tímto se možné zjistit přítomnost nebo nepřítomnost cílové alely. Použitý primer umožní amplifikaci jedině za předpokladu, že je po celé délce a zvláště na svém 3' terminálním konci přesně komplementární k cílové sekvenci.²⁹

3.2.2.2. The restriction site mutation (RSM) - PCR

Metoda RSM je kombinace restrikce a PCR, popsána v roce 1990.³⁰

Tato technika je schopná detekovat mutace a polymorfismy v rozpoznávacích místech pro restrikční enzymy v jakémkoliv genu nebo organismu.³¹ Restriktázy štěpí standardní Wild-type DNA a tím umožňují amplifikaci a detekci mutantní DNA (po PCR může následovat sekvenace).³²



Obrázek č. 5 : Princip RSM³³

3.2.2.3 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR

PCR-RFLP je kombinace restrikce a PCR stejně jako metoda RSM, ale v tomto případě jsou metody použity v obráceném pořadí. Nejprve je amplifikován úsek v délce 1 000 - 4 000 párů bázi. V následujícím kroku je provedeno restrikční štěpení vzniklého produktu PCR reakce za pomoci restrikčních endonukleáz, které štěpí jen tehdy, pokud je přítomna specifická sekvence.

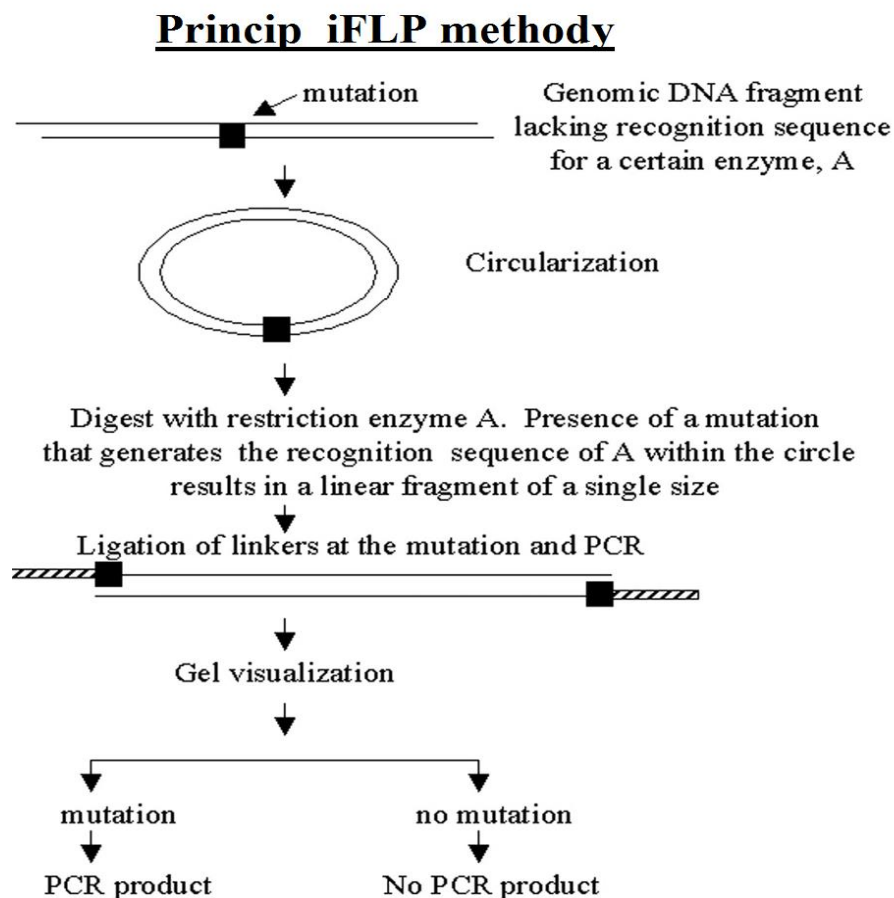
Následná elektroforéza takto získaných fragmentů a jejich vizualizace ukazuje rozdíly v DNA profilu standardní a mutované DNA.

Metoda se používá především ke studiu nekódující DNA, ale je možné ji využít i pro případy, kdy je dostupné jen malé množství templátové DNA. Rovněž se jedná o relativně jednoduchou a rychlou metodu s vysoce reprodukovatelnými výsledky. Nevýhodou této metody je nutnost provádět počáteční screening pro nalezení kombinací amplifikovatelných úseků a odpovídajících restrikčních endonukleáz.³⁴

3.2.2.4. Inverse PCR-based RFLP scanning

Metoda je kombinací inverzní PCR, RFLP a denaturující vysoce účinné kapalinové chromatografie a je cílena zejména na nízkourovňové mutace v buněčných liniích a lidských nádorech.

Fragmenty DNA se spojí do kruhu. V dalším kroku je získaná kruhová DNA vystavena působení *TagI* restriktivního enzymu, který ji naštěpí. Následuje připojení specifických adaptérů, generická PCR amplifikace a genově-specifická inverzní PCR amplifikace.³⁵



Obrázek č. 6: Princip iFLP metody³⁵

3.2.2.5. A random mutation capture assay (RMC)

Metoda RMC³⁶ je kombinací restrikce a digitální ARMS PCR.

Genomová DNA je štěpena restriktivním enzymem *TagI*, naředěna až po úroveň jediné molekuly DNA na zkumavku a amplifikována jednak s mutant-specifickými, jednak se standardními primery.³⁷

3.2.2.6. Koamplifikace za snížené denaturační teploty, COLD-PCR

První zmínka o COLD-PCR³⁸ se objevila roku 2008 v časopise *Nature Medicine*³³. Principem této metody je společná amplifikace standardní a mutované DNA při snížené teplotě denaturace. Metoda byla vyvinuta pro zvýšení citlivosti detekce a identifikace minoritně zastoupených mutací nebo variant, které mají nižší teplotu tání ve srovnání s Wild-type DNA.

Metoda COLD-PCR přednostně obohacuje minoritní alely ze směsi Wild-type DNA a sekvence obsahující mutace a to bez ohledu na typ mutace a jejich umístění v amplikonu. Funguje na principu rozdílu teplot tání (T_m) amplikonu, který je malý, kritický a reprodukovatelný. Změna jediného nukleotidu změní teplotu tání amplikonu. Teplota tání pro amplikon je tedy závislá na složení sekvence. T_m amplikonu o délce až 200 párů bází se může lišit přibližně o 0,2 až 1,5°C. Kromě samotné teploty tání je také kritickou hodnotou teplota denaturace (T_c), která určuje účinnost PCR. Pokud snížíme používanou teplotu denaturace na hodnotu kritické teploty, sníží se také účinnost, protože se sníží počet denaturovaných amplikonů. Rozdíl mezi T_m a T_c je v COLD-PCR velmi důležitý, protože při jeho využití lze selektivně obohatit minoritně zastoupené mutantní alely. V případě, že je teplota denaturace (T_c) nižší než teplota tání (T_m) amplikonu Wild-type DNA, je umožněna selektivní denaturace mutovaných sekvencí v každém kole PCR, zatímco sekvence Wild-type DNA zůstávají v podstatě dvouřetězcové, a tím je jejich amplifikace podstatně menší. Využitím tohoto postupu lze zlepšit citlivost detekce až stokrát.³⁹

Pro každou analýzu je rovněž důležité použít kvalitní vzorek DNA. V opačném případě může dojít k falešně pozitivním výsledkům. COLD-PCR je ovšem navržena tak, aby mohla fungovat i s poškozenou DNA, získanou například z formalínem fixovaných a v parafínu zalitých vzorků (FFPE), jejichž kvalita je srovnatelná se vzorky zmražené DNA.⁴⁰

Metoda COLD-PCR byla úspěšně použita pro detekci mutací u různých cílů, jako je v-Ki-ras2, neboli KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)^{39, 41, 42}, GNAS1 (GNAS komplex locus)⁴³, EGFR (epidermal growth factor receptor)⁴⁴, BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)⁴⁵, nebo IDH1 [isocitrát dehydrogenáza 1 (NADP⁺)].⁴⁶

COLD-PCR má dvě základní modifikace, a to *Full-COLD-PCR* a *Fast-COLD-PCR*. Z nich se později vyvinuly další modifikace *Ice-COLD-PCR* a Temperature-Tolerant COLD-PCR (TT-COLD-PCR).³⁹

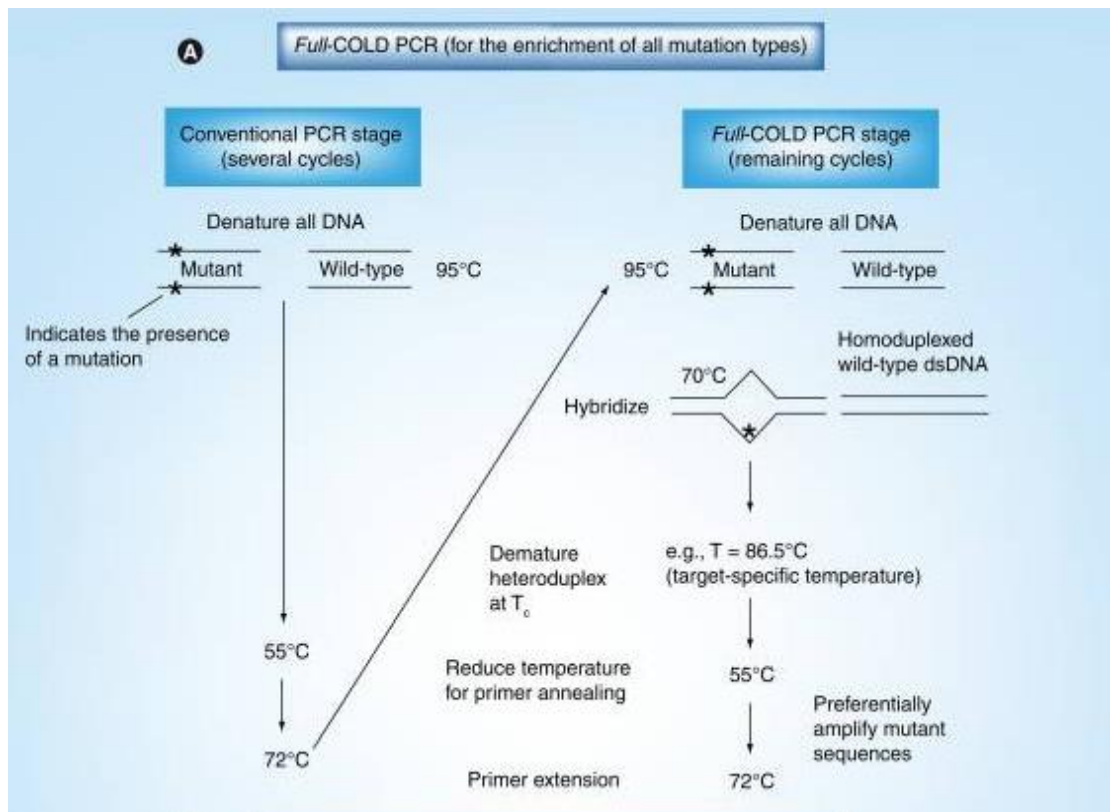
Full-COLD-PCR a *Fast-COLD-PCR* používají stejné koncentrace činidel a stejné podmínky jako konvenční PCR. Rozhodnutí, zda provést modifikaci *Full* nebo *Fast*, závisí na typu mutace (*viz dále*).

3.2.2.6.1. Modifikace *Full-COLD-PCR*

Full-COLD-PCR amplifikuje všechny možné mutace podél sekvence DNA.

Metoda má pět základních kroků:

1. **Denaturace:** Denaturace probíhá při teplotě 94-95°C, zaleží na použité polymeráze.
2. **Hybridizace:** Teplota je snížena průměrně na 70°C a amplikony se inkubují v průměru 2-8 minut. Dochází k hybridizaci mutantní alely a Wild-type DNA. Při tomto procesu vznikají homoduplexy a heteroduplexy DNA.
3. **Kritická teplota:** Teplota se zvýší na kritickou teplotu denaturace, která je specifická pro každou sekvenci DNA. Přednostně se denaturují heteroduplexní formy amplikonu (mají v sobě neodpovídající sekvence), které mají nižší teplotu tání než homoduplexní formy molekul⁴⁷.
4. **Nasednutí primeru:** Teplota se sníží přibližně na 55°C, na teplotu vhodnou pro nasednutí primeru. Homoduplexní DNA zůstane dvouvláknová a z toho důvodu nedochází k hybridizaci primerů.
5. **Extenze:** Teplota se zvýší na 72°C. DNA polymeráza dokončí komplementární řetězec k templátové DNA. Jako templátová DNA slouží heteroduplexní amplikon, čímž dojde ke zvýšení minoritně zastoupené mutace, která slouží jako templát pro další kola PCR. Opakováním tohoto postupu dochází ke zvětšování koncentrace minoritně zastoupené mutace.



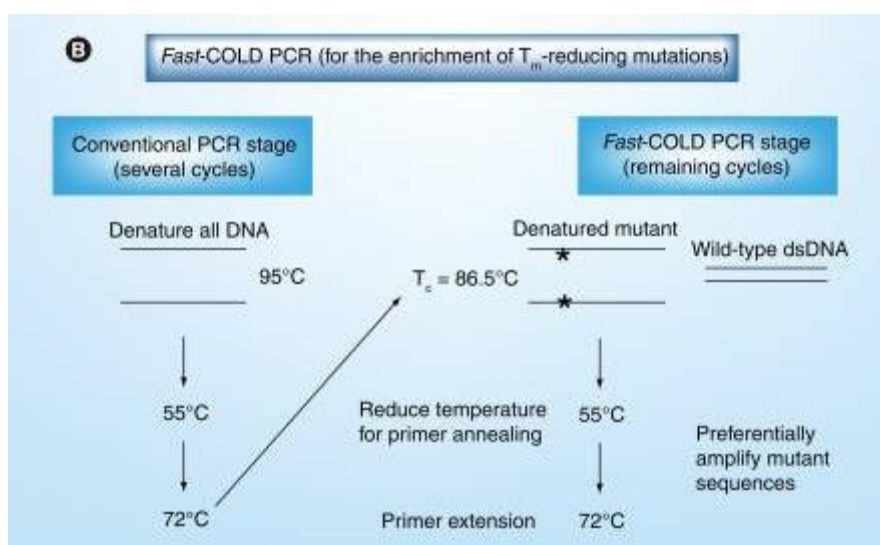
Obrázek č. 7: Full-COLD-PCR⁴⁸

3.2.2.6.2. Modifikace *Fast-COLD-PCR*

Fast-COLD-PCR se provádí v případě, kdy je zřejmé, že nepotřebujeme tvořit heteroduplexní formu z DNA mutanta a Wild-typu, protože v některých případech amplikon obsahuje hodně T_m -redukujících variant (mutací) jako jsou například G:C > A:T, nebo G:C > T:A. Rozdíl spočívá v tom, že teplota tání mutantních homoduplexů je v porovnání s T_m redukujícími variantami nižší než u normálního (Wild-type) amplikonu.

Na rozdíl od *Full-COLD-PCR* je tento přístup rychlejší, jelikož mu chybí dva první kroky, ale má i nevýhody. Jednou z nich je fakt, že v průběhu amplifikace mohou být amplifikovány pouze T_m -redukční mutace. Ovšem výhodou *Fast-COLD-PCR* je její robustnost, a dosažení deseti- až sto-násobné zesílení amplifikace oproti normální PCR.

Fast-COLD-PCR má tři základní kroky. Prvním krokem je denaturace, kdy je teplota nastavená na kritickou teplotu, která přednostně denaturuje vlákna alely s nižší teplotou tání (variantní, mutantní) oproti normálním vláknům DNA. Druhým krokem je nasednutí primeru, třetím krokem je následná extenze DNA. Tyto kroky jsou stejné jako u předchozí *Full-COLD-PCR*.



Obrázek č. 8: Fast-COLD-PCR⁴⁸

3.2.2.6.3 Modifikace *Ice-COLD-PCR*

Tato modifikace je kombinací předchozích modifikací *Full-* a *Fast-COLD-PCR*. Dochází zde ke zkrácení doby hybridizace a zlepšení amplifikačního potenciálu. Zároveň je zde možné amplifikovat všechny typy mutací pomocí specifické, syntetické, jednovláknové, oligonukleotidové, Wild-type referenční sekvence (RS), která se váže na Wild-type DNA templát a inhibuje jeho amplifikaci.

RS oligonukleotid má tři základní vlastnosti:

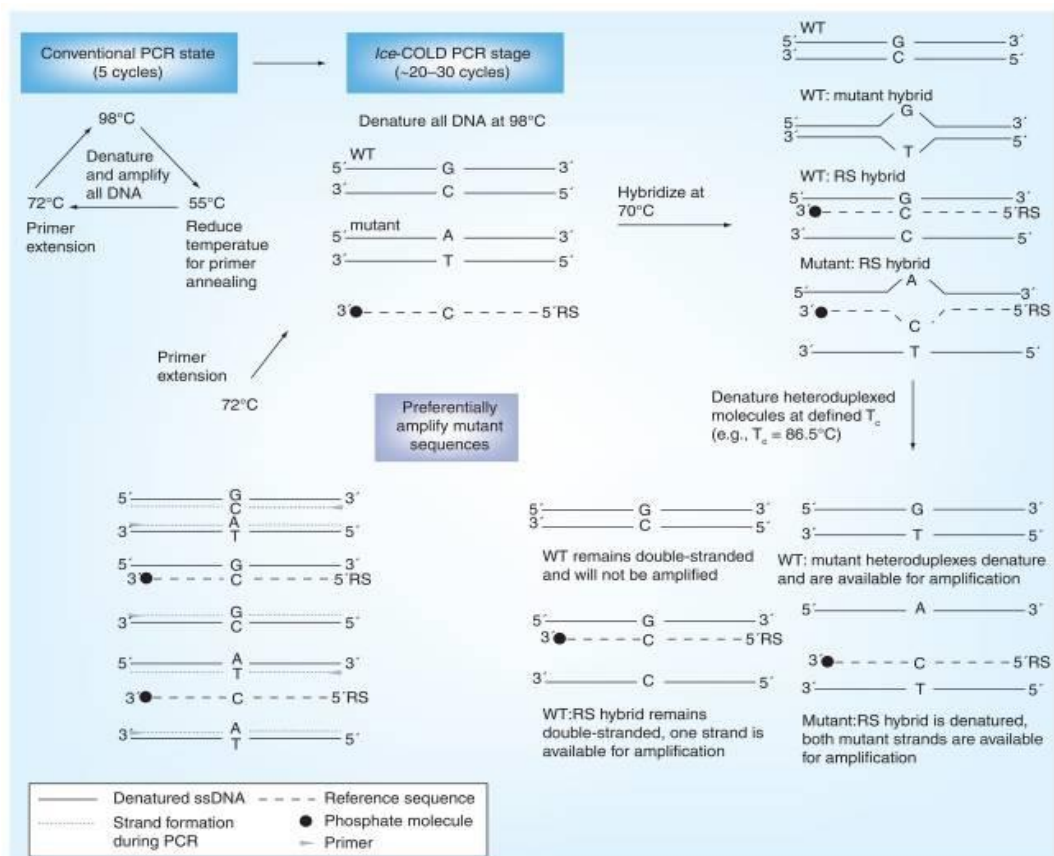
1. Shoduje se komplementárně s Wild-tyt sekvencí DNA.
2. Zabraňuje navázání primerů na heteroduplex RS : WT DNA, protože RS je kratší než Wild-type o ≤ 5 párů bází a má pevnější vazbu k WT DNA než primery.
3. Obsahuje na 3' konci fosfátovou modifikaci, která zabraňuje aktivitě DNA polymerázy.

Při PCR se referenční sekvence přidávají v přebytku vzhledem k templátové DNA, aby se rychle navázaly do amplikonů. Při kritické teplotě denaturace zůstávají RS : WT duplexy dvouřetězcové a tím dochází k inhibici amplifikace Wild-tyt alel v celém cyklu PCR. Naopak dvojice RS : mutantní duplexy jsou přednostně denaturovány

a amplifikovány. Pomocí Wild-typ specifických RS mohou být koncentrace všech mutace zvýšeny bez ohledu na jejich typ a umístění.

Ice-COLD-PCR má pět základních kroků velmi podobných krokům u *Full-COLD-PCR*. Jedinou podstatnou odlišností je zde doba hybridizace, která se může zkrátit až na 30 sekund z původních 2-8 minut.⁴⁰

1. **Denaturace:** Denaturace probíhá nejčastěji při teplotě 98°C, ale zase závisí na typu DNA polymerázy.
2. **Hybridizace:** Dochází zde k hybridizaci duplexu RS : mutantní při teplotě 70°C na 30 sekund.
3. **Kritická teplota:** Heteroduplex obsahující mutantní DNA se denaturuje při kritické teplotě tání.
4. **Navázání primeru:** Primery se při teplotě kolem 55°C naváží jen na rozpletenou mutantní DNA.
5. **Extenze:** Při 72°C dochází k amplifikaci mutantní DNA⁴⁰



Obrázek č. 9: *Ice-COLD-PCR*⁴⁸

3.2.2.6.4. Modifikace Temperature-Tolerant COLD-PCR (TT-COLD-PCR)

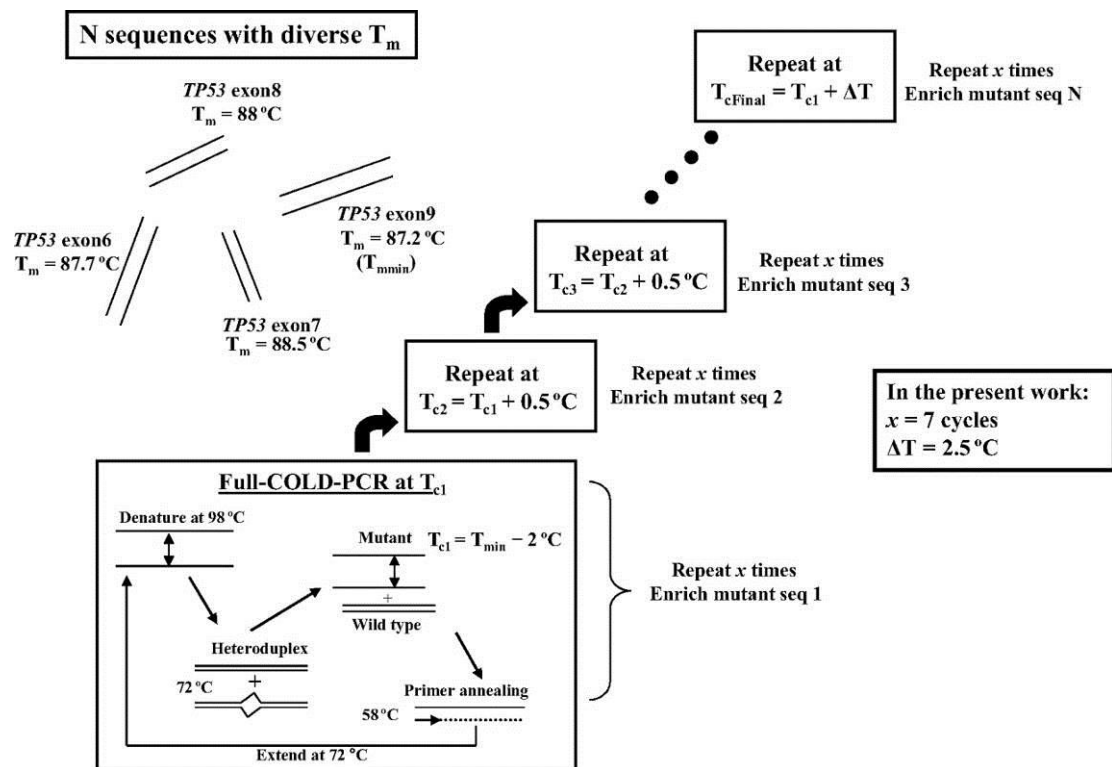
Tato modifikace je v současné době nejnovější technikou ze skupiny COLD-PCR, a je možné ji aplikovat na všechny situace, pro které byly vyvinuty dříve zmíněné přístupy *Full-*, *Fast-* a *Ice-* COLD-PCR. Metoda byla popsána v době, kdy veškerá experimentální část diplomové práce byla před dokončením.

Odstraňuje nedostatek předchozích přístupů COLD-PCR, což byla nutnost nastavit teplotu denaturace pro danou sekvenci v rozmezí $\pm 0,3$ °C od kritické teploty, čímž docházelo k výraznému omezení možnosti provést amplifikace více sekvencí najednou.⁴⁹

Temperature-Tolerant COLD-PCR je založena na postupném zvyšování teploty denaturace tak, aby byly přednostně denaturovány a amplifikovány mutantní alely ve srovnání s alelami normálními (Wild-type).

Postup TT-COLD-PCR:

1. Před zahájením jsou experimentálně stanoveny teploty tání standardních DNA za pomoci konvenční PCR, čímž je určena počáteční kritická teplota. Teploty tání se dají zjistit i na základě bioinformatické analýzy⁵⁰.
2. Počáteční kritická teplota se nastaví na ≥ 1 °C ve srovnání s minimální teplotou tání všech amplikonů.
3. Proběhne 7 cyklů COLD-PCR.
4. Zvýší se kritická teplota o 0,5°C.
5. Proběhne dalších 7 cyklů COLD-PCR.
6. Tímto způsobem se zvyšuje v průběhu 7 cyklů kritická teplota až o 2,5°C, a tím se vymezí teplotní kritické okno.



Obrázek č. 10 : TT- COLD PCR⁴⁹

Tento postup může být upraven změnou počtu cyklů nebo posunutím okna kritické teploty.

Nevýhody modifikace TT-COLD-PCR:

- může docházet k dimerizaci primerů způsobené rostoucím počtem PCR cyklů,
- může dojít k inaktivaci DNA polymerázy vlivem opakovaného zvyšování teploty,
- musí se brát v potaz maximální počet cyklů povolený používaným software, který je využíván termocyklérem.

Pokud ovšem budou tyto nedostatky překonány, lze využívat optimální TT-COLD-PCR.⁴⁹

4. Experimentální část

Experimentální část předložené diplomové práce je rozdělena do dvou základních kapitol. V kapitole 4.1. je uveden stručný souhrn použitých materiálů a reagensů, spotřebních materiálů, přístrojů a software, se kterými se v této diplomové práci pracovalo. V kapitole 4.2. jsou popsány použité metody. Konkrétně se zde pojednává o biologických vzorcích a jejich izolaci, o metodách PCR („standardní“ PCR a COLD-PCR) a dále o fragmentační analýze získaných ampliconů.

4.1. Materiál a pomocné nástroje

4.1.1. Materiál a reagensie

DEPC - treated water (Ambion, USA)

DNA CEQ Sep Buffer Kit, (Beckman Coulter, USA)

DNA Size Standard Kit – 400 - DNA velikostní standard (Beckman Coulter, USA)

DNeasy Blood & Tissue Kit 250 (Qiagen, Nizozemí)

dNTP mix (Thermo Scientific, USA) koncentrace 25 mM

EVAGreen (Biotium, USA)

FlexiGene[®] DNA Kit (Qiagen, Nizozemí)

Směsi primerů: PM 376 = 653+654 o sekvenci GAATATAATCCCAAGCGGTTTG a GCAGCATTGAACCAGAGGAG.

MgCl₂ solution (Thermo Scientific, USA) koncentrace 25 mM

Minerální olej (Beckman Coulter, USA)

QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Nizozemí)

SLS - deionizovaný formamid s nízkou konduktivitou (Beckman Coulter, USA)

Thermo Start DNA polymerase (Thermo Scientific, USA) koncentrace 5U/ml

10x PCR pufr (Thermo Scientific, USA)

4.1.2. Spotřební materiál

Mikrozkumavky pro PCR s plochým víčkem 0,2 ml (P-LAB, ČR)

Mikrozkumavky se šroubovacím víčkem 0,5 ml (P-LAB, ČR)

Ochranné rukavice Digitil N (Hartmann, ČR)

Zkumavky 1,5 ml (P-LAB, ČR)

Zkumavky 1,7 ml (P-LAB, ČR)

Sběrací zkumavky 2 ml (P-LAB, ČR)

Špičky s dvojitým filtrem (Eppendorf, Německo) o objemech: 10, 20, 100, 200, 1000 µl

96-ti jamkové destičky LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 clear + fólie (Roche, Švýcarsko)

4.1.3. Přístroje a vybavení

Centrifuge 5430 (Eppendorf, Německo) – centrifuga

CEQ™ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, USA) – genetický analyzátor pro fragmentační analýzu a sekvenování

Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Německo) – centrifuga

Chladicí stojánek na mikrozukumavky (Eppendorf, Německo)

Chladicí stojánek na zkumavky 1,5 ml (P-LAB, ČR)

Chladnička a mrazák (Liebherr, Německo)

Laminární box (BioSan, USA)

LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Švýcarsko) – termocyklér pro real-time analýzu

MJR PTC 100 (Biotech, ČR) – termocyklér

Mrazící box C340New Brunswick Scientific (USA)

Mrazící box LG (Jižní Korea)

Nanodrop - Spectrofotometer ND 1000 (Biotech, USA)

Pipety: 0,1 – 2,5 µl; 0,5 – 10; µl; 2 – 20 µl; 10 – 100 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl (Eppendorf, Německo)

Stojánek PCRack s víčkem (P-LAB, ČR)

Termostat Bio TDB – 100 (BioSan, USA)

Tprofessional basic thermocycler (Biometra, Německo) – termocyklér

Vortex (Merci, ČR)

4.1.4. Software

CEQ™ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, 2004)

FastPCR (primerdigital.com/fastpcr.html)

LightCycler 480 SW 1.5 (Roche, Švýcarsko)

Microsoft Office – Word, Excel a PowerPoint (Microsoft Corporation, USA)

ND – 1000 v3.3.0 (Biotech, USA)

Statistica v7.0 (StatSoft Inc.)

TProfessional Manager Software (Biometra, Německo)

4.2. Metody

4.2.1. Biologické vzorky a jejich izolace

Vzorky DNA byly izolovány z vzorků krve, nádorových tkání, cytologického materiálu pacientů, které byly součástí grantových projektů se souhlasem etické komise, případně byla DNA izolována z buněčných linií. Izolace vzorků byla prováděna pomocí kitů: DNeasy Blood & Tissue Kit 250 a FlexiGene DNA Kit.

Celkově bylo pro účely této práce použito 16 různých biologických vzorků DNA.

Tuto část práce prováděly laborantky DNA laboratoře Ústavu molekulární a translační medicíny, Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc.

4.2.2. Metody PCR

4.2.2.1. Změření koncentrace vzorku DNA

Koncentrace DNA byla měřena spektrofotometricky na přístroji Nanodrop.

Postup:

- Každý DNA vzorek se zamíchá na Vortexu po dobu 5 sekund;
- zapne se Nanodrop a software ND1000 – vybere se příslušný program;
- napipetuje se 1 μ l deonizované vody na čočku Nanodropu a změří se „blank“, poté se utře buničinou;
- napipetuje se 1 μ l vzorku DNA na čočku Nanodropu a změří se absorbance při 230, 260, 280 nm;
- setře se vzorek a vypne se přístroj Nanodrop.

4.2.2.2. Příprava reakční směsi a postup PCR reakce

Objem reakční směsi byl nastaven na 10 μl na jednu mikrozkušavku nebo jednu jamku v 96-jamkové destičce. Master-mixu bylo 9,5 μl a vzorku DNA bylo 0,5 μl nezávisle na koncentraci vzorku.

Chemikálie na Master-mix se uchovávají při -18°C až -30°C .

Složení Master-mixu bylo:

- 1xPCR pufr
- 1,5 mM MgCl_2
- 0,2 mM dNTPs
- 0,05 U/ μl ThermoTaq DNA polymeráza
- 0,25 mM primerového páru
- 1x EvaGreen
- DEPC voda (doplňující master-mix do objemu 9,5 μl)

Nejdříve se chemikálie rozmrazí, zamíchají na Vortexu, stočí (zcentrifugují) a následně smíchají PCR pufr, MgCl_2 , dNTP's, primery, DEPC voda. Až poté se přidá ThermoTaq DNA polymeráza, která se nerozmrazuje, jen zamíchá na Vortexu a krátce zcentrifuguje.

Připraví se 0,2ml zkumavky do vychlazené destičky. Do připravených 0,2ml zkumavek se napipetuje 9,5 μl Master-mixu, přidá se 0,5 μl vzorku DNA a do jedné (poslední) 0,5 μl DEPC vodu jako negativní kontrola. Zkumavky se vloží do karuselu a vyváží. Zapne se LightCycler[®] 480 nebo přístroj Biometra. Spustí se příslušný program (*viz níže*). Po proběhnutí PCR reakcí se provede fragmentace a vyhodnocení.

96-jamková destička se používala pro LightCycler[®] 480. Na přístroji Biometra se používaly mikrozkušavky s plochým víčkem 0,2 ml.

Vždy byly testovány dva vzorky DNA a jejich směsi v optimalizační fázi v poměrech 1:100, 100:1, 1:50, 50:1, 1:10 a 10:1. Každý pokus byl opakován minimálně třikrát.

První dva vzorky byly testovány při všech těchto poměrech. Následně podle prvních předběžných výsledků už byly další vzorky testovány jen v poměru 1:10 a 10:1.

Pro přístroj LightCycler[®] 480 se nastavil program 1 (*viz tabulka 1.*) a vzorky se vložily do přístroje na PCR reakci.

Název	Teplota	čas (min:sec)	počet cyklů
1. denaturace	95°C	10:00	1
2. PCR touchdown	95°C	00:15	10
	63°C	00:50	
	72°C	00:20	
3. PCR amplifikace	95°C	00:15	25
	63°C	00:50	
	72°C	00:20	
4. +A boosting	65°C	00:20	1
5. Down před metlingem	50°C	00:01	1
6. Melting	95°C	průběžné	1
7. Parking	50°C	00:01	

Tabulka číslo 1: Program 1 (LightCycler)

Pro COLD-PCR byl použit přístroj Biometra a tři různé programy číslo 2,3,4 (viz tabulky 2,3,4).

Název	Teplota	čas (min:sec)	počet cyklů
1.denaturace	95°C	10:00	1
2.PCR touchdown	95°C	00:15	10
	63°C	00:50	
	72°C	00:20	
3.PCR amplifikace	72-81°C	00:15	25
	54°C	00:50	
	72°C	00:20	
4.Melting	65°C	20:00	1
5.Parking	4°C	pauza	

Tabulka číslo 2: Program 2 (Biometra)

Název	Teplota	čas (min:sec)	počet cyklů
1.denaturace	95°C	10:00	1
2.PCR touchdown	95°C	00:15	10
	63°C	00:50	
	72°C	00:20	
3.PCR amplifikace	75,8-82°C	00:15	25
	54°C	00:50	

4.Melting	72°C	00:20	
	65°C	20:00	1
5.Parking	4°C	pauza	

Tabulka číslo 3: Program 3 (Biometra)

Název	Teplota	čas (min:sec)	počet cyklů
1.denaturace	95°C	10:00	1
2.PCR touchdown	95°C	00:15	10
	63°C	00:50	
3.PCR amplifikace	72°C	00:20	25
	76-83°C	00:15	
	54°C	00:50	
	72°C	00:20	
	72°C	00:20	
4.Melting	65°C	20:00	1
5.Parking	4°C	pauza	

Tabulka číslo 4: Program 4 (Biometra)

Tyto programy se liší teplotním gradientem, kdy každá zkumavka v určeném místě se zahřívá na jinou kritickou teplotu (viz tabulka 5).

Číslo zkumavek	Program 2: Teplotní gradient 72-81°C	Program 3: Teplotní gradient 75,8-82°C	Program 4: Teplotní gradient 76-83°C
1	72°C	75,8°C	76°C
2	72,3°C	76°C	76,2°C
3	72,9°C	76,4°C	76,7°C
4	73,8°C	77°C	77,4°C
5	74,9°C	77,8°C	78,2°C
6	76°C	78,5°C	79,1°C
7	77°C	79,3°C	79,9°C
8	78,1°C	80°C	80,8°C
9	79,2°C	80,8°C	81,6°C
10	80,1°C	81,4°C	82,3°C
11	80,7°C	81,8°C	82,8°C
12	81°C	82°C	83°C

Tabulka číslo 5: Teplotní gradienty

Po reakci se 96-jamková destička a zkumavky vyjmou a uloží do mrazáku pro další zpracování.

4.2.3. Fragmentační analýza

Fragmentační analýza se provádí na sekvenátoru CEQ™ 8800 Genetic Analysis System.

Master-mix na jeden vzorek byl napočítán na 19 µl SLS - deionizovaný formamid s nízkou konduktivitou a 0,25 µl DNA velikostní standard - DNA Size Standard Kit – 400. Do první destičky se napipetuje 1 µl ampliconu z předešlých PCR reakcí a 19 µl master-mixu a následně se do tří čtvrtin jamky nakape minerální olej, aby nedošlo k vypaření vzorků. Do druhé destičky se nakape separační pufr DNA CEQ Sep Buffer Kit, vloží se do přístroje a zapne se program číslo 5 (viz tabulka 6).

Parametry	Hodnoty
Kapilární teplota	60°C
Denaturační teplota	90°C
délka denaturace	180 sec
Napětí při vstřikování	2.0 kV
Délka vstřikování	15 sec
Napětí při separaci	4,8 kV
Délka separace	50 min

Tabulka číslo 6: Program 5 (Sekvenátor)

4.2.4. Vyhodnocení

Následuje vyhodnocení a přepsání výsledků z grafů do přehledných tabulek. Dále se údaje vyhodnocují v programu Statistika 7 pomocí statistických metod:

- dvoucestná analýza rozptylu – Two-way ANOVA – srovnávání kvality dat u dvou a více souborů nezávislých na sobě
 - Friedmannův neparametrický test – sledování závislosti určitých znaků na daných podmínkách
- jednocestná analýza rozptylu – One-way ANOVA pro faktor teplota – srovnání dvou souborů, zda se signifikantně liší
 - neparametrický Kruskalův-Wallisův test – srovnání účinnosti (efektivity) metod za zkoumaných podmínek

- Tukeyovo párové porovnání – srovnává dvě skupiny dat navzájem
- Levenův test – zkoumání homogenity datového souboru

Vyhodnocení zpracovala Mgr. Jana Vrbková, Ph.D. Laboratoře Experimentální Medicíny ÚMTM při FN Olomouc.

5. Výsledky

Reprezentativní výsledky byly získány z devíti jednotlivých vzorků, a čtyř směsných vzorků. Tři zbývající vzorky byly kontaminovány během práce a uchování.

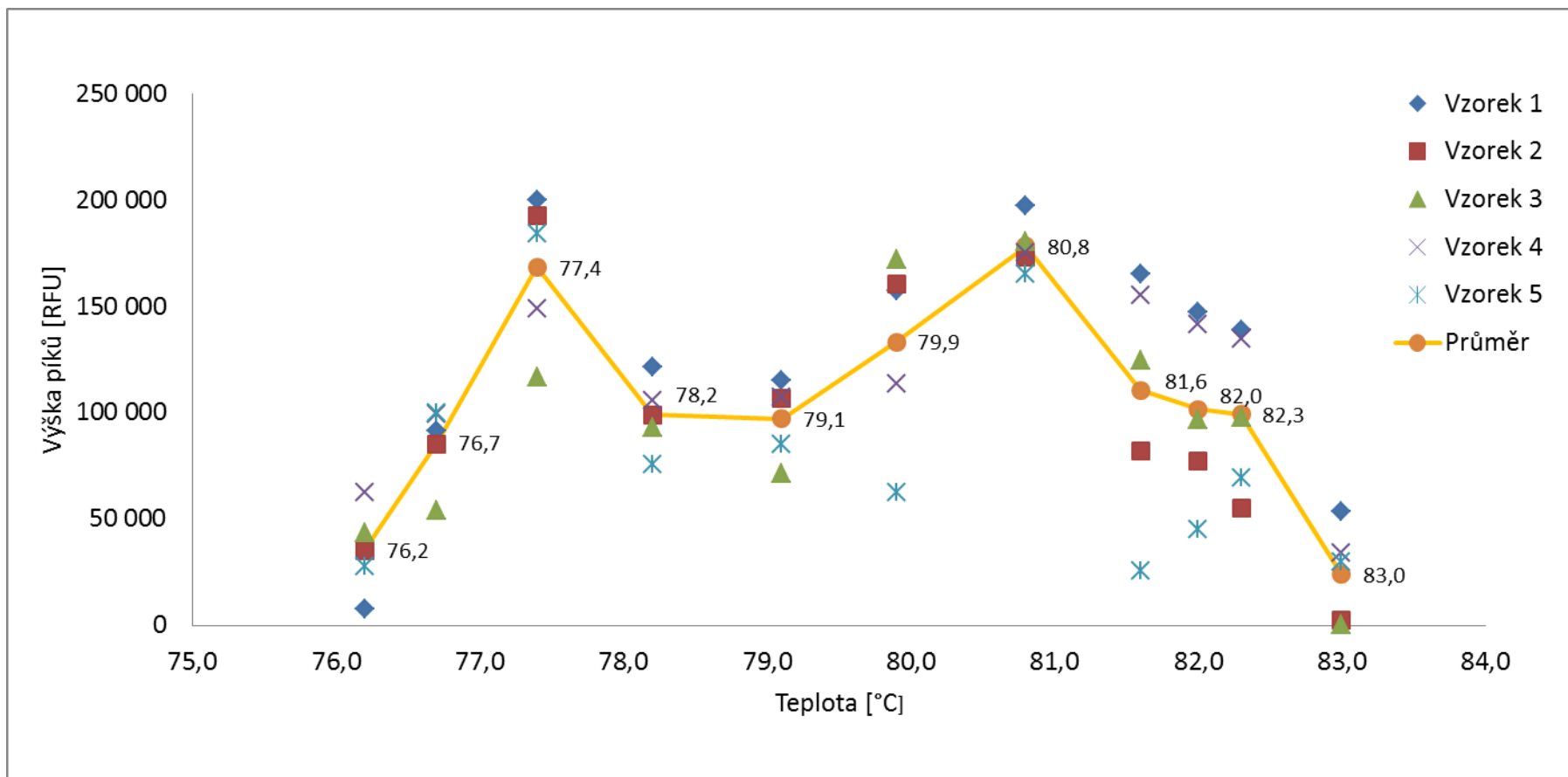
U všech jednotlivých vzorků byly zkoumány dva druhy píků. Prvním z nich byl stutter, který se nacházel na pozici o jednu repetici (2 bp) větší nebo menší než hlavní pík ve výstupním grafu ze sekvencéru Beckman CEQ8000. Druhým sledovaným píkem byl hlavní, správný pík, který měl na elektroforeogramu největší výšku. U směsných vzorků byl sledován minoritní pík (správný pík náležící méně zastoupené složce ve směsi) a majoritní pík (správný pík náležící více zastoupené složce ve směsi). Všechny použité jednotlivé vzorky byly homozygotní, takže ve směsi ze dvou jednotlivých vzorků byly jen dva správné píky.

5.1. Optimalizace teploty pomocí teplotního gradientu

Vzorky byly testovány metodou COLD-PCR na přístroji Biometra za použití výše zmíněných programů. Metodou se porovnávaly teplotní gradienty u vzorků číslo 1 (212 pb), 2 (182 pb), 3 (224 pb), 4 (215 pb) a 5 (213 pb) prostřednictvím grafu průměrných výšek správných píků pro jednotlivé teploty (*viz graf 1*), ve snaze určit nejučinnější denaturační teplotu pro genotypizaci mikrosatelitu DXS101. Jak je vidět (*viz graf 1*), nejučinnější kritické teploty (maxima) byly dvě, a to při 77,4°C a 80,8°C. Při těchto teplotách pravděpodobně DNA zaujímá takovou konformaci, která je vhodná k amplifikaci. Vliv na tento fenomén by mohly mít vodíkové vazby a jiné nekovalentní interakce určující konformaci amplifikované DNA.

Minima teplotních gradientů se nacházejí při teplotách 76,2°C a 83°C. Vypovídají, že amplifikace při těchto teplotách skoro neprobíhá.

Jako teploty s největším potenciálem pro další experimenty byly vybrány hodnoty 77,4°C a 80,8°C. Výběr byl proveden na základě efektivity amplifikačního procesu, zhodnocené na základě průběhu teplotní křivky (*viz graf 1*). U těchto teplot se předpokládá dispozice k projevu COLD PCR efektu - účinnější amplifikaci DNA s minoritním zastoupením ve srovnání s DNA s majoritním zastoupením ve směsi. V kontrastu s ostatními sledovanými teplotami, experimenty prováděné při těchto dvou teplotách pravděpodobně poskytují větší efektivity tohoto procesu.



Graf číslo 1: Graf průměrných výšek píků pro jednotlivé teploty.

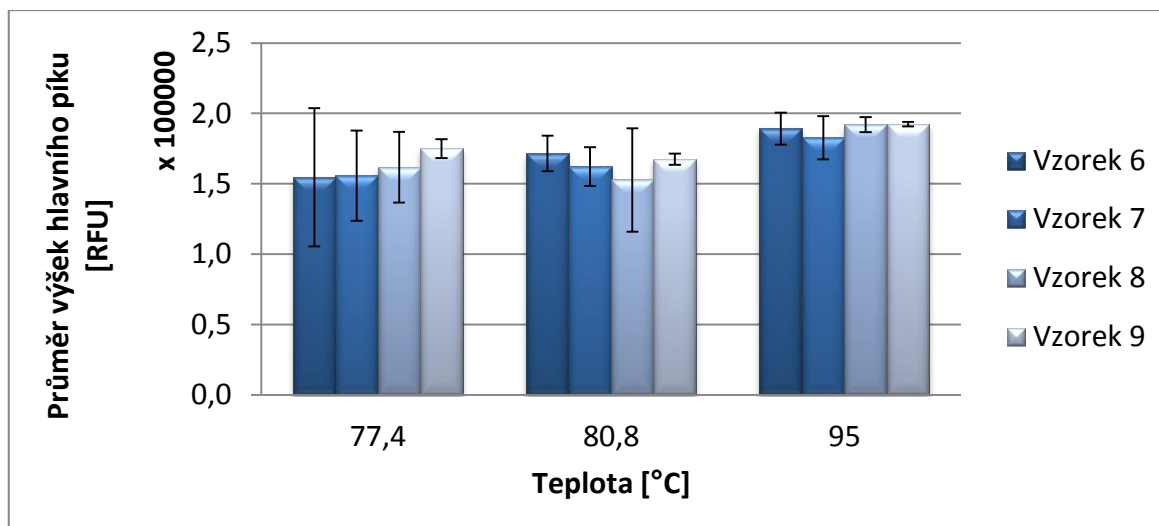
5.2. Interpretace dat u jednotlivých vzorků

Vzorky zde použité byly zkoumány metodou COLD-PCR pro denaturační teploty 77,4°C a 80,8°C a metodou normální PCR pro denaturační teplotu 95,0°C. Pro každou teplotu byl pokus nejméně třikrát opakován. Při pokusech byly použity čtyři vzorky s čísly 6-9 s homozygotním genotypem 211 pb, 220 pb, 218 pb, 208 pb, pro lokus DXS101.

U zkoumaných vzorků byly sledovány tyto hodnoty: výška píku (čím vyšší, tím lepší) a podíl stutteru (čím nižší, tím lepší).

5.2.1. Výška píku

Jak lze vidět z *grafu číslo 2*, hodnoty získané z průměrů hlavních píků u jednotlivých vzorků (viz graf 2) jsou velmi podobné. Pohybují se od 1,5-1,9.10⁵ RFU. Hodnoty byly měřeny při třech zkoumaných teplotách. Oproti tomu směrodatné odchylky jednotlivých teplot vykazují poměrně závažnou odlišnost. Jak je patrné ze zobrazených dat, odchylky pro teplotu 77,4°C jsou výrazně větší pro většinu zkoumaných vzorků ve srovnání s odchylkami pro ostatní teploty. Výjimku tvoří pouze vzorek 9, který má podobný rozsah odchylek pro všechny sledované teploty. Tuto anomálii si lze vysvětlit tak, že pro teplotu 77,4°C je větší možnost variability prostorového uspořádání amplifikované DNA ve srovnání s ostatními teplotami, a proto dosahujeme při prováděných experimentech poměrně variabilních výsledků. Vzhledem ke skutečnosti, že k anomálii dochází pouze u jedné ze sledovaných teplot, lze předpokládat, že diskutovaná odchylka není způsobena chybami v pipetování nebo v operačním postupu provedení analýzy.



Graf číslo 2: Průměr výšek hlavního píku pro jednotlivé vzorky při teplotách 77,4°C; 80,8°C a 95°C

Střední hodnota průměru výšek píků se vzhledem k teplotě statisticky významně odlišuje podle one-way ANOVA (p-value=0,016107).

Průměry výšek píků byly podrobeny Friedmannově neparametrickému testu pro zjištění, zda existuje závislost vzorků na teplotě, případně teploty na vzorcích. Friedmannův neparametrický test vyšel pro teplotu p-value = 0,03878 a pro vzorek p-value = 0,1718. Průměr výšky píků se významně lišil vzhledem k teplotě, ale ne vzhledem ke vzorku.

Za pomoci Levenova statistického testu byla zjišťována homogenita získaných dat v rámci teplot (p-value = 0,0161066). Zkoumaná data vykazovala statisticky významnou odchylku.

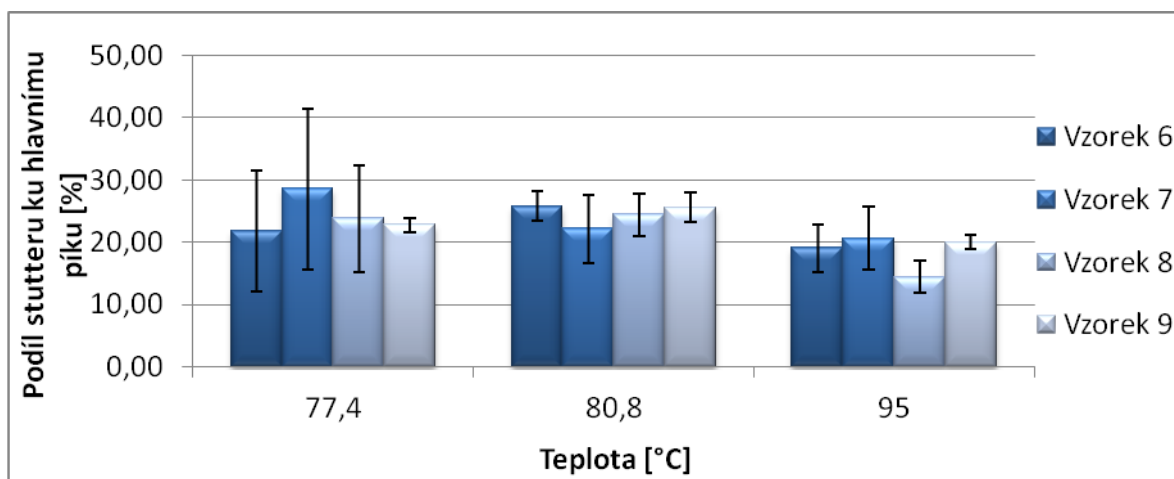
Tukeyovým párovým porovnáním bylo zjištěno, že statisticky významně se liší průměr píků pro teploty 77,4°C a 95°C (p-value = 0,024801) a také pro 80,8°C a 95°C (p-value= 0,030078), ale neliší se pro dvojici teplot 77,4 a 80,8 °C.

Pro COLD-PCR při teplotě 77,4°C je velikost průměrných výšek píků o 14% ± 7% a pro teplotu 80,8°C je velikost průměrných výšek píků o 13% ± 3% menší než u standardní PCR.

Z grafu a statistických testů lze vyvodit, že metoda COLD-PCR pro teplotu 77,4°C a 80,8°C má signifikantně nižší účinnost než standardní PCR při 95°C.

5.2.2. Podíl stutteru a správného píku

Hodnoty podílů výšek stutteru vůči výškám hlavního píku pro sledované vzorky se pohybují u sledovaných teplot v rozsahu od 15% do 30%. Z grafu 3 je patrný trend, kdy hodnoty podílu pro COLD teploty 77,4°C a 80,8°C jsou u většiny vzorků zvýšené ve srovnání s teplotou 95°C. Směrodatné odchylky jsou velmi podobné pro teploty 80,8°C a 95°C; pro teplotu 77,4°C jsou velmi rozdílné až na vzorek číslo 9, který má odchylky pro všechny tři teploty podobné.



Graf číslo 3: Podíl výšek stutteru a hlavního píku pro izolované vzorky v teplotách 77,4°C; 80,8°C a 95°C

Podle jednocestné ANOVA se střední hodnota podílu stutteru a správného píku v závislosti na teplotě statisticky významně liší (p-value=0,044073).

Průměry výšek píků byly podrobeny Friedmannově neparametrickému testu, pro zjištění zda je vzorek závislý na teplotě, a dále jestli je teplota závislá na vzorku. Podíl výšky stutteru a správného píku se významně lišil vzhledem k teplotě (p-value = 0,03878), ale ne ke vzorku (p-value = 0,45749).

Za pomoci Levenova statistického testu byla zjišťována homogenita získaných dat v rámci teplot p-value = 0,0440726. Zkoumaná data měla statisticky významnou odchylku.

Z Tukeyova párového porovnání bylo zjištěno, že statisticky významně se liší průměr píků pro teploty 80,8°C a 95°C (p-value= 0,041308), ale neliší se průměr píků pro dvojici teplot 77,4 a 80,8 °C a ani 77,4°C a 95°C.

Z grafu a testů tedy plyne, že metoda COLD-PCR při 80,8°C má statisticky významně vyšší stutter než standardní PCR.

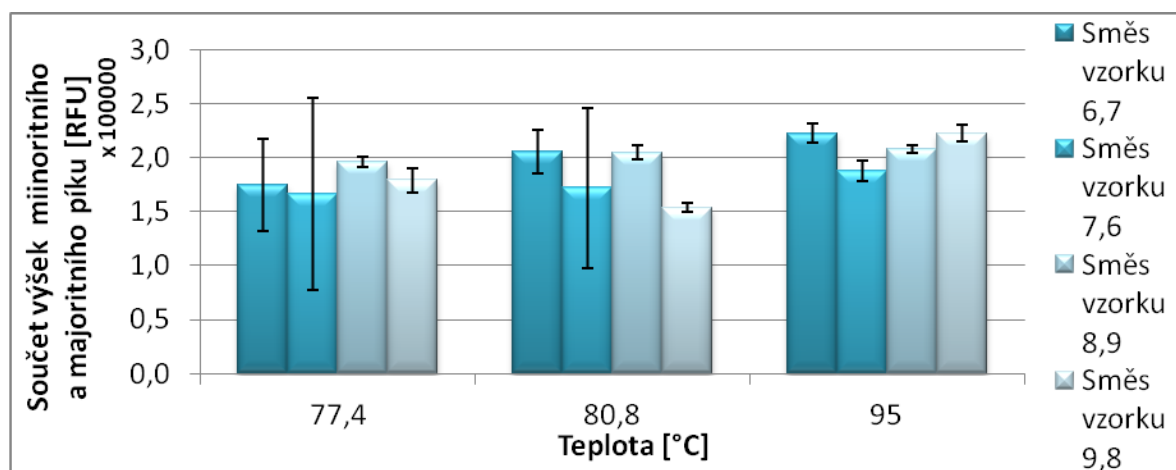
5.3. Interpretace dat u směsných vzorků

Směsi vzorků 6,7 (211, 220 pb); 7,6 (220, 211 pb); 8,9 (218, 208 pb) a 9,8 (208, 218 pb) pro lokus DXS101, v poměrech 10:1 a 1:10 byly podrobeny zkoumání pomocí COLD-PCR pro teploty 77,4°C a 80,8°C a normální PCR pro teplotu 95,0°C. Reakce byly pro každou teplotu celkem třikrát opakovány.

Testovali jsme, jestli COLD-PCR modifikace zlepší signál obou složek ve směsi, a dále, zda navýší signál minoritní složky vůči majoritní složce. Byly sledovány hodnoty: součet majoritního píku a minoritního píku pro každou směs dvou homozygotních DNA a podíl výšek majoritního a minoritního píku (rovnováha píků ve směsi). Hodnoty pro součet a podíl byly sledovány pro tři zkoumané teploty.

5.3.1. Ovlivnění signálu ve směsi

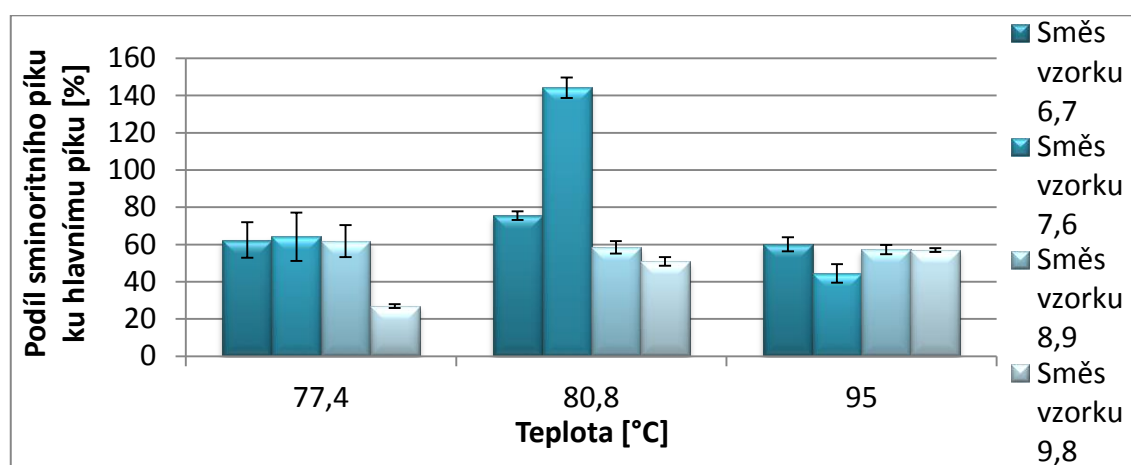
Hodnoty získané pro součty výšek píků u standardní teploty denaturace (*viz graf 4*), vykazují pro rozdílné kombinace DNA vesměs podobné hodnoty, které se pohybují kolem $1,9 \cdot 10^5$ RFU. V kontrastu s tímto poznatkem dochází k poměrně velkému rozpětí odchylek teplot u metody COLD-PCR. Jak je patrné ze zobrazených dat, směrodatné odchylky pro teplotu 77,4°C a 80,8°C jsou větší pro většinu zkoumaných vzorků ve srovnání s odchylkami pro teplotu 95°C. Toto je nejvíce markantní u směsného vzorku 7,6.



Graf číslo 4: Součty výšek minoritního a majoritního píku pro směsné vzorky v poměrech 1:10 při teplotách 77,4°C, 80,8°C a 95°C

Z podílu minoritního píku k majoritnímu píku zobrazeného v grafu (viz graf 5) je patrné, že hodnoty pro teplotu 95°C jsou u zkoumaných vzorků téměř identické ve srovnání s teplotou 77,4°C. Odchyly jsou u všech vzorků a teplot srovnatelné.

U směšného vzorku 7,6 dochází při teplotě 80,8°C k anomálii, kdy hodnota poměru převyšuje 140%. Tyto výsledky naznačují, že mohlo dojít v postupu práce na tomto vzorku k chybě v pipetování nebo ke špatnému zacházení se vzorky 7,6 v mezichase mezi PCR metodou a fragmentační analýzou. Pokud se tento směšný vzorek vyřadí, nebudou nijak významně ovlivněny výsledky analýzy.



Graf číslo 5: Podíly výšek minoritního a majoritního píku pro směšné vzorky v poměru 1:10 při teplotách 77,4°C; 80,8°C a 95°C

Rozdíly v homogenitě testovaných dat podle Levenova statistického testu pro součet ($p = 0,092761232$) a podíl ($p=0,660475217$) minoritního a majoritního píku nebyly významné na hladině $p=0,05$.

Za pomoci Friedmanova testu byla zkoumána závislost sledovaných hodnot součtů a podílů píků u směšných vzorků na teplotě a na jednotlivých směšných vzorcích. Friedmanův neparametrický test vyšel pro součet správných píků v závislosti na teplotě $p\text{-value}=0,03878$ a v závislosti na vzorku $p\text{-value}=0,24066$. Dále Friedmanův neparametrický test vyšel pro podíl správných píků v závislosti na teplotě, $p\text{-value}=0,04979$ a v závislosti na vzorku $p\text{-value}=0,0858$. Tento test lze interpretovat tak, že zkoumané hodnoty výšek a poměru píků nezávisí na konkrétních DNA vzorcích. Friedmanův test naopak ukazuje, že metoda COLD-PCR má oproti očekávání spíše

negativní vliv jak na výšku píků ve směsi dvou homozygotů, tak na podíl minoritní složky.

Z grafů a statistických testů je zřejmé, že metoda COLD-PCR signifikantně snižuje celkovou účinnost u směsných vzorků.

5.3.2. Ovlivnění minoritního píku

V předešlých testech se zkoumala celková účinnost COLD-PCR, ale částečně i ovlivnění minoritního píku (*viz graf 2,3*). V této sekci se zkoumá pomocí statistických testů pouze to, jaký vliv má COLD-PCR na minoritní složku a dále její interakce s majoritní složkou ve směsných vzorcích.

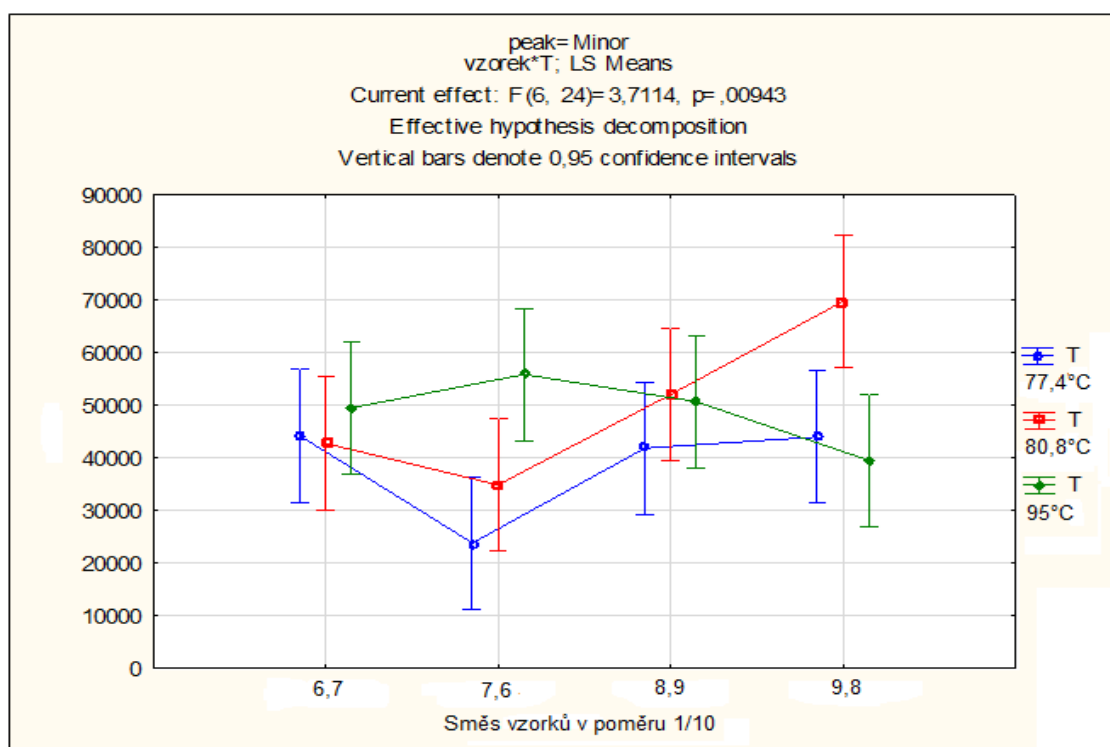
Za pomoci dalších statistických testů byla zkoumána závislost ovlivnění minoritního píku pro součet a podíl píků u směsných vzorků pro teploty 77,4°C, 80,8°C (COLD-PCR) a 95°C (normální PCR). Podstatou posouzení, s jakou mírou je zkoumaná metoda COLD-PCR schopna zefektivnit proces amplifikace minoritně zastoupené DNA, je zhodnocení ovlivnění minoritního píku. Při hodnocení této efektivity je třeba posoudit ovlivnění z hlediska změn teploty i z pohledu studovaných vzorků.

Pro objektivní posouzení byla získaná data podrobena dvoucestné analýze rozptylu – two-way ANOVA a jednocestné analýze rozptylu – one-way ANOVA pro faktor teplota. Jedná se o neparametrický Kruskalův-Wallisův, Tukeyův a Levenův test.

Z hlediska dvoucestné analýzy rozptylu v modelu, zahrnující faktor denaturační teploty i vzorku (včetně jejich interakce) je významný jak faktor teploty, tak i faktor vzorků. Výsledky je možné interpretovat tak, že součet minoritního a majoritního píku se liší vzhledem k teplotě a v rámci určité teploty i mezi vzorky. Statisticky významné jsou vzhledem k součtu píků odlišné výsledky pro teploty 77,4°C a 80,8°C. Pro podíly správných píků v modelu, který zahrnuje faktor teploty i vzorku (včetně jejich interakce), jsou významné oba faktory, ale nikoliv jejich vzájemná interakce. (*viz tabulka 7 a graf 6*). Z výsledků pro součet píků je patrná odlišnost mezi jednotlivými teplotami testovanými metodou COLD-PCR, nicméně výsledky nenaznačují odlišnost od metody standardní PCR.

	<i>P</i> pro součet píků	<i>P</i> pro podíl píků
Intercept	0,000000	0,000000
Vzorek	0,087158	0,000071
Teplota	0,025631	0,000398
Vzorek a Teplota	0,009426	0,220184

Tabulka číslo 7: Two-way ANOVA pro součet píků



Graf číslo 6: Two-way ANOVA pro součet píků

Pomocí Tukeyova párového porovnání bylo zjištěno, že statisticky významné jsou vzhledem k součtu píků odlišnosti mezi výsledky pro teploty 77,4 °C a 80,8 °C (p -value= 0,037056), a dále u podílu píků se statisticky významně liší výsledky pro teploty 80,8 °C a 95 °C (p -value= 0,007989).

Na základě výsledku Levenova testu homogenity byl pro součet píků nalezen rozdíl středních hodnot součtu výšek píků, který je vzhledem k teplotě na hladině 5% statisticky nevýznamný (p -value=0,086713) a pro podíl píků statisticky významný (p -value=0,009405). Data ukazují na celkovou homogenitu dat u zkoumaných vzorků pro součet a velký rozsah odchylek u podílů.

Pomocí Kruskalova-Wallisova testu bylo zjištěno, že rozdíl středních hodnot podílu výšek píků je vzhledem k teplotě statisticky významný (Kruskalův-Wallisův test, p -value=0,0151). Statisticky významně se lišil podíl výšek píků mezi teplotami 80,8°C a 95°C.

Data ukazují, že se signifikantně liší výsledky pro metodu COLD-PCR a metodu standardní PCR. Na základě získaných dat se liší pouze podíl výšek píků a nikoliv

součet jejich výšek, což v důsledku znamená, že metoda COLD-PCR nezvyšuje minoritní složku ve směsi ve srovnání se standardní PCR.

Celkově jde shrnout, že metoda COLD-PCR (koamplifikace za snížené denaturační teploty) snižuje amplifikaci minoritní složky ve směsi ve srovnání se standardní PCR pro genotypizaci mikrosatelitu DXS101.

6. Diskuze

Předložená diplomová práce se zabývá metodou COLD-PCR a její optimalizací pro genotypizaci mikrosatelitů. Metoda COLD-PCR byla vyvinuta pro zvýšení citlivosti detekce a identifikace minoritně zastoupených mutací nebo variant, které mají nižší teplotu tání ve srovnání s Wild-type DNA.

V průběhu diplomové práce bylo testováno 16 vzorků DNA izolovaných pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit 250 a FlexiGene DNA Kit. Z těchto 16 vzorků bylo pouze 9 reprezentativních. U zbylých vzorků došlo ke kontaminaci v průběhu experimentu, nebo uchovávání.

Optimalizace metody COLD-PCR pro genotypizaci mikrosatelitů probíhala na přístroji Biometra. Pomocí teplotního gradientu bylo zjištěno, že maximální signál je získán při dvou COLD-PCR teplotách, konkrétně 77,4°C a 80,8°C. Pro tento fenomén nemáme jiná než spekulativní vysvětlení. Jednou z možností jak vysvětlit, proč právě u těchto teplot byl zaznamenán maximální signál, je strukturální uspořádání testovaného mikrosatelitu DXS101. Testovaný mikrosatelit je složen ze dvou základních strukturálních periodicky se opakujících motivů, a to CTT a ATT.¹² Lze předpokládat, že při teplotě 77,4°C dochází k efektivnější denaturaci sekvencí ATT, kde jsou tři dvojné vazby, na rozdíl od sekvencí CTT, kde je jedna trojná vazba a dvě dvojné vazby. Stejně je tomu i u teploty 80,8°C.

Minima, která byla zaznamenána u teplotního gradientu, jsou důkazem snížené efektivity amplifikace studované molekuly DNA. U těchto teplot je možné předpokládat, že dochází ke strukturálním změnám v amplifikované molekule DNA. Tyto změny pravděpodobně snižují účinnost amplifikačního procesu. U diskutovaných minim je naopak značně nepravděpodobné, že by vznikla v důsledku vlivu teploty na další složky PCR směsi, např. na DNA polymerázu, jelikož používaný enzym je vysoce teplotně stabilní.

Získané dvě teploty představující maxima v teplotním gradientu byly následně využity pro další experimenty, ve snaze porovnat účinnost metody COLD-PCR u izolovaných a směsných vzorků se standardní metodou PCR běžící při teplotě 95°C. PCR amplifikace pro metodu COLD-PCR se standardní PCR bylo prováděno na již

dříve zmíněném přístroji Biometra pro teploty 77,4°C a 80,8°C a LightCycleru pro teplotu 95°C.

U izolovaných DNA vzorků se porovnávala změna výšky správného píku a podíl stutteru a správného píku. Data získaná v průběhu experimentů byla následně vyhodnocována za použití statistických testů, které jsou popsány v kapitole 5. Výsledky. Identické testy byly prováděny jak pro jednotlivé vzorky, tak i pro směsné vzorky.

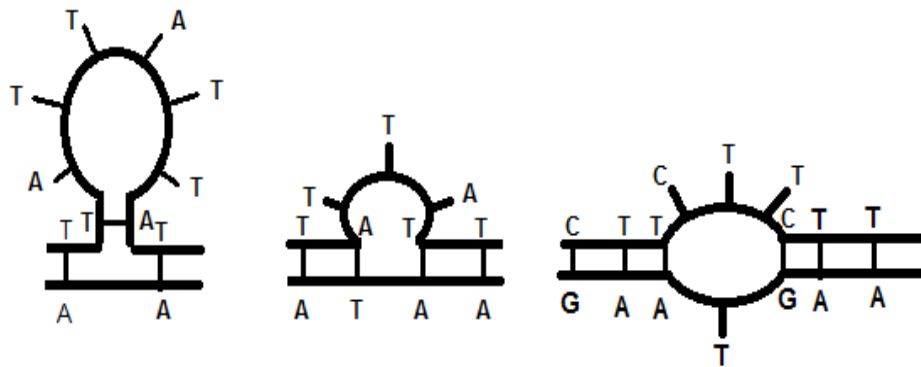
Jako první byly statisticky vyhodnocovány jednotlivé vzorky. Zde z výsledků statistických testů plyne, že pro tři dané teploty se střední průměry výšek píků statisticky liší vzhledem k teplotě. Naproti tomu nedochází ke statisticky významným odlišnostem u studovaných vzorků DNA. Nicméně byla rovněž nalezena statisticky významná nehomogenita dat, což znamená, že buď došlo k chybě v průběhu pipetování a následné práce se vzorky, nebo došlo v průběhu přípravných operací a izolace DNA ke strukturálním změnám. Mezi možné změny patří denaturace DNA a její následná špatná renaturace. Z toho důvodu je možné, že dochází ke vzniku takto variabilních výsledků.

U směsných vzorků bylo pomocí statistických testů studováno ovlivnění signálů složek směsi DNA s využitím součtů a podílů výšek jednotlivých píků. Pro obě pozorované hodnoty byly získány téměř srovnatelné závěry.

Z pohledu homogenity studovaných vzorků nedochází ke statisticky významným odchylkám, na což ukazují nevelké rozdíly ve směrodatných odchylkách zkoumaných výsledků. Zkoumané hodnoty výšek a poměru píků nezávisí na konkrétních DNA vzorcích, ale na teplotě. Rozdíl středních hodnot píků je statisticky významný pro podíl, ale nikoliv pro součet píků. Pro podíl se statisticky významně liší pro teploty 80,8°C a 95°C, pro součet se statisticky významně liší pro teploty 77,4°C a 80,8°C. Pomocí těchto testů bylo zjištěno, že metoda COLD-PCR nezvyšuje účinnost amplifikace minoritně zastoupených DNA fragmentů ve srovnání se standardně používanou metodou PCR.

Příčinou nedostatečného zvýšení efektivity amplifikace molekuly DNA by mohly být vodíkové vazby a jiné nekovalentní interakce určující konformaci amplifikované DNA u mikrosatelitů a následný vznik sekundárních struktur (*viz obrázek 11*) za účasti opakujících se tandemových motivů při snížených teplotách. Z

toho důvodu je veškerý pozitivní efekt na amplifikaci minoritní složky ve směsi pomocí COLD-PCR anulován. Z grafů a statistických testů je tedy zřejmé, že metoda COLD-PCR signifikantně nezvyšuje celkovou účinnost u směsných vzorků.



Obrázek číslo 11: Příklady sekundárních struktur DNA s tandemovými repeticemi

Je možné, že použití jiné modifikace COLD-PCR, a to TT-COLD-PCR⁴⁹, u které by nebylo nutno provádět optimalizace pro denaturační teploty, by mohlo zvýšit účinnost amplifikace pro genotypizaci mikrosatelitů. Zde se totiž kritická denaturační teplota zvyšuje v každém teplotním okně po 7 cyklech amplifikace. Tímto by se možná vyřešil problém dvou denaturačních teplot v optimalizačním kroku. Použití TT-COLD-PCR by mohlo vést k lepším výsledkům amplifikace při genotypizaci mikrosatelitů.

Další možnost ovlivnění účinnosti COLD-PCR u mikrosatelitů je použití jiných primerů nebo jiného mikrosatelitu, protože je teoreticky možné, že mikrosatelit DXS101 je něčím zvláštní. Metoda TT-COLD-PCR by teoreticky mohla fungovat i pro multiplexní směsi několika primerů pro rozdílné mikrosatelity v jediné zkumavce. Nicméně uvedené postupy dosud nebyly ověřeny v praxi a jedná se tedy pouze o hypotetické možnosti, jak vyřešit problém pro genotypizaci mikrosatelitů, pro kterou byla COLD PCR vyhodnocena jako metoda nevhodná.

7. Závěr

Předložená diplomová práce je zaměřena na aplikaci metody COLD-PCR (koamplifikace za snížené denaturační teploty) při genotypizaci mikrosatelitů u jednotlivých homozygotních vzorků a u směsi dvou homozygotních vzorků. Byla zpracována teoretická část a praktická (experimentální) část.

První, teoretická část diplomové práce popisuje problematiku mikrosatelitů a PCR metod pro detekci variant nukleových kyselin ve směsi dvou variantních DNA.

Druhá, experimentální část diplomové práce byla zpracována v Laboratoři Experimentální Medicíny ÚMTM při FN Olomouc. Při experimentech byla porovnávána účinnost amplifikace minoritní složky ve směsi při použití metody COLD-PCR ve srovnání se standardní metodou PCR. Přitom prvním krokem byla optimalizace denaturační teploty PCR reakce pro heteroduplexy. Už tento krok poskytl zajímavé zjištění, vzhledem k tomu, že na teplotních gradientech a následně prostřednictvím grafu průměrných výšek správných píků vyšel maximální signál při dvou hodnotách COLD-PCR teplot, a to 77,4°C a 80,8°C.

Druhým krokem bylo srovnání účinnosti metod PCR a COLD-PCR u jednoduchých a směsných vzorků, sledované pomocí absolutní a relativní výšky minoritního píku, spolu se sledováním vzniku artefaktů typu stutter. Oproti našemu očekávání testování jednoduchých a směsných vzorků při COLD teplotách přineslo signifikantní snížení signálu minoritní alely. Toto bylo prokázáno pomocí testů two-way ANOVA a one-way ANOVA pro faktor teplota (neparametrický Kruskalovův-Wallisův test, Tukeyův test a Levenův test).

Technika COLD-PCR tedy pravděpodobně není vhodná pro DNA profilování pomocí genotypizace mikrosatelitů, protože snižuje účinnost amplifikace. Je možné, že při nižší teplotě denaturace vznikají sekundární struktury (viz kap. 6. Diskuze) za účasti opakujících se tandemových motivů, a proto je veškerý pozitivní efekt na amplifikaci minoritní složky ve směsi pomocí COLD-PCR anulován.

Je sice možné, že použití jiných primerů, nebo použití modifikace metody TT-COLD-PCR může prokázat pozitivní efekt COLD-PCR na STR detekci, nepovažujeme to však za pravděpodobné.

8. Literatura:

1. Turnpenny P., Ellard S. (2005): Emery's Elements of Medical Genetics, *Elsevier*, **12**.
2. Whittaker J. C., Harbord R. M., Boxall N., Mackay I., Dawson G., Sibly R. M. (2003): Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, **164**, 781-787.
3. Goldstein D. B., Schlötterer Ch. (1999): Microsatellites, Evolution and Applications. *Oxford University Press*, **336**.
4. Moran, C. (1993): Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *Journal of Heredity*, **84**, 274–280.
5. Jurka J., Pethiyagoda C. (1995): Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *Journal of Molecular Evolution*, **40**, 120–126.
6. Van Lith H. A., Van Zutphen L. F. (1996): Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. *Animal Genetics*, **27**, 387–395.
7. Sharma R., De Biase I., Gomez M., Delatycki M. B., Aschizawa T., Bidichandami S. I. (2004): Friedrich ataxia in carriers of unstable borderline GAA triplet-repeat alleles. *Annals of neurology*, **56**, 898-901.
8. Litt M., Luty J. A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, **44**, 397-401.
9. Blouin M. S., Parsons M., Lacaille V., Lotz S. (1996): Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, **5**, 393–401.
10. http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm
11. Coltman D. W. (1999): Male reproductive success in a promiscuous mammal: behavioural estimates compared with genetic paternity. *Molecular Ecology*, **8**, 1199-1209.
12. Edelman J., Szibor R. (2001): DXS101: a highly polymorphic X-linked STR. *International Journal of Legal Medicine*, **114**, 301–304.

13. Sweatman A., Lovering R., Middleton-Price H., Jones A., Morgan G., Levinsky R., Kinnon C. (1993): A new restriction fragment length polymorphism at the DXS101 locus allows carrier detection in a family with X linked agammaglobulinaemia. *Journal of Medical Genetics*, **30**, 512-514.
14. Tranebjxrg L., Schwartz C., et kol. (1995): A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *Journal of Medical Genetics*, **32**, 257-263.
15. Gomes I., Alves C., et kol. (2007): Analysis of 10 X-STRs in three African populations. *Forensic Science International:Genetics*, **1**, 208–211.
16. Nosedá P. A., et kol. (2013) : Population data for DXS6800, DXS101 and DXS8377 loci from Buenos Aires (Argentina). *Journal of Forensic and Legal Medicine*, **20**, 522-524.
17. Penna L. S., Silva F. G., Salim P. H, et kol (2012): Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 14 X-chromosomal STR loci in a southern Brazilian population sample. *International Journal of Legal Medicine*, **126**, 327–330.
18. Łuczak S., Rogalla U., Malyarchuk B. A., Grzybowski T. (2011): Diversity of 15 human X chromosome microsatellite loci in Polish population. *Genetics*, **5**, 71–77.
19. Inturri S., Menegon S., Amoroso A., Torre C., Robino C., (2011): Linkage and linkage disequilibrium analysis of X-STRs in Italian families. *Genetics*, **5**, 152–154.
20. Gao S., Qiao K., Rakha A., Lai J., Li S., (2007): Allele frequencies for 10 X-STR loci in Nu population of Yunnan, China. *Legal Medicine*, **9**, 284–286.
21. Bartlett, J. M. S.; Stirling, D. (2003): A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols*, **226**, 3–6.
22. Joshi M., a Deshpande J. D. (2011): Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, **2**, 10-11.
23. <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/uni03/uni03.html>
24. Rychlik W., Spencer W. J., Rhoads R. E. (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, **18**, 6409–6412.

25. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. (2004): In: *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed., Freeman W. H., New York, p963.
26. Losick R, Watson J. D., Baker T. A., Bell S., Gann A., Levine M. W. (2008): In: *Molecular biology of the gene*. 6th ed.
27. <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=3&evtc=Suggest&evta=Moleculeof%20the%20Month&evtl=OtherOptions>
28. Pavlov A. R., Pavlova N. V., Kozyavkin S. A., Slesarev A. I. (2004): Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends in Biotechnology*, **22**, 253–260.
29. Newton C. R., Graham A., Heptinstall L. E. (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, **17**, 2503-2516.
30. Parry J. M., Shamsheer M., Skibinski D. (1990): Restriction site mutation analysis, a proposed methodology for the detection and study of DNA base changes following mutagen exposure. *Mutagenesis*, **5**, 209–212.
30. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-4.
31. Diallo I. D., Hewitson G., Wright L., Rodwell B. J., Corney B. G. (2006): Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, **131**, 92-98.
31. Steingrimsdottir H., Beare D., Carr A. M., Cole J., Lehmann A. R. (1995): UV hypermutability of xeroderma pigmentosum cells demonstrated with a DNA based mutation system. *Oncogene*, **10**, 2057–2066.
32. Parsons B. L., Heflich R. H. (1997): Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mutation Research*, **387**, 97–121.
33. Jenkins G. J. S., Suzen H. S., Sueiro R. A., Parry J. M. (1999): The restriction site mutation assay: a review of the methodology development and the current status of the technique. *Mutagenesis*, **14**, 439–448.

34. Bernatzky R. (1989): Restriction fragment length polymorphism. *Plant Molecular Biology*, 467-484
35. Liu W., Kaur M., Wang G., Zhu P., Zhang Y., Makrigiorgos G. M. (2004): Inverse PCR-Based RFLP Scanning Identifies Low-Level Mutation Signatures in Colon Cells and Tumors. *Cancer Research*, **64**, 2544-51.
36. Bielas J., Loeb L. (2005): Quantification of random genomic mutations. *Nature Methods*, **2**, 285–290.
37. Wright J. H., Modjeski K. L., Bielas J. H., Preston B. D., Fausto N., Loeb L. A, Campbell J. S. (2011): A random mutation capture assay to detect genomic point mutations in mouse tissue. *Nucleic Acids Research*, **39**, 73.
38. Milbury C. A., Li J., Makrigiorgos G. M. (2009): PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. *Clinical Chemistry*, **55**, 632.
39. Li J., Wang L., Mamon H., Kulke M. H., Berbeco R., Makrigiorgos G. M. (2008): Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nature Medicine*, **14**, 579–84.
40. Milbury C. A., Li J., Makrigiorgos G. M. (2011): Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Research*, **39**,2.
41. Song C., Milbury C. A., Li J., Liu P., Zhao M., Makrigiorgos G. M. (2011): Rapid and sensitive detection of KRAS mutation after fast-COLD-PCR enrichment and high-resolution melting analysis. *Diagnostic Molecular Pathology*, **20**,81–9.
42. Carotenuto P., Roma C., Cozzolino S., Fenizia F., Rachiglio A. M., Tatangelo F. et kol. (2012) Detection of KRAS mutations in colorectal cancer with Fast COLD-PCR. *International Journal of Oncology*, **40**, 378–84.
43. Delaney D., Diss T. C., Presneau N., Hing S., Berisha F., Idowu B. D., et kol. (2009): GNAS1 mutations occur more commonly than previously thought in intramuscular myxoma. *Modern Pathology*, **22**,718–24.
44. Santis G., Angell R., Nickless G., Quinn A., Herbert A., Cane P. (2011): Screening for EGFR and KRAS mutations in endobronchial ultrasound derived transbronchial needle aspirates in non-small cell lung cancer using COLD-PCR. *PLoS One*, **6**.

45. Pinzani P., Santucci C., Mancini I., Simi L., Salvianti F., Pratesi N. et kol. (2011): BRAFV600E detection in melanoma is highly improved by COLD-PCR. *Clinica Chimica Acta*, **412**, 901–5.
46. Boisselier B., Marie Y., Labussiere M., Ciccarino P., Desestret V., Wang X. et kol. (2010): COLD PCR HRM: a highly sensitive detection method for IDH1 mutations. *Human Mutation*, **31**, 1360–5.
47. Palais B. (2007): Quantitative heteroduplex analysis. *Clinical Chemistry*, **53**, 1001–1003.
48. Milbury C. A., Li J., Liu P., Makrigiorgos G. M. (2011): COLD-PCR: improving the sensitivity of molecular diagnostics assays. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **11**, 159–169.
49. Castellanos-Rizaldos E., Liu P., Milbury C. A., Guha M, et kol. (2012): Temperature-Tolerant COLD-PCR Eliminates Temperature Stringency and Enables Robust Mutation Enrichment. *Clinical Chemistry*, **58**, 1130-1138.
50. Bielas J. H., Loeb L. A. (2005): Quantification of random genomic mutations. *Nature Methods*, **2**, 285–90.