

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Dominika Kadlčíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**DNA profilování pomocí křivek tání
mikrosatelitových amplikonů**

Bakalářská práce

**Dominika
Kadlčíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Jiřího Drábka, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:

Podpis:

Souhrn

Krátké tandemové repetice (STR) či mikrosatelity jsou krátké sekvence DNA, které jsou v genomu několikrát za sebou opakovány. Počet repetic se liší mezi jedinci a k detekci je po PCR standardně využívána kapilární elektroforéza. Mikrosatelity jsou ve forenzní genetice používány jako identifikační marker při stanovení DNA profilu. Metody, které jsou konvenčně využívané, jsou v některých případech časově, finančně a technicky náročné. V této práci byla navržena alternativní analýza profilování DNA pomocí HRM metody na termocyklérech jako je např. CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. Obvykle je HRM analýza využívána pro detekci bodových polymorfismů a mutací.

V teoretické části práce jsou popsány současné metody STR profilování a metoda High Resolution Melting (HRM), která rozlišuje amplikony DNA na základě křivek tání. Principem post-PCR části HRM analýzy je postupná denaturace ampliconů zvyšující se teplotou, kdy jsou detekovány uvolňované fluorofory.

V praktické části práce bylo provedeno profilování mikrosatelitů (*vWA*, *D18S51*) HRM metodou. Nejprve byly tyto mikrosatelity testovány na dvou různých termocyklérech a ve dvou různých reakčních směsích. Následně byla otestovaná stabilita profilu křivek a teplota tání při různých koncentracích vstupní DNA, reprodukovatelnost a schopnost HRM slučovat stejné genotypy do jednotných klastrů. Bylo zjištěno, že HRM analýza na cykléru Bio-Rad s firemním softwarem nemůže být použita pro profilování DNA.

Summary

Short tandem repeats (STRs) or microsatellites are short sequences of DNA that are repeated numerous times in each others trail in genome. The number of repeats varies among individuals and can be detected by capillary electrophoresis after PCR. Currently, STRs are workhorse of forensic human identification by DNA profiling and databasing but the method has several limitations. It is laborious, time-consuming, expensive, and technically challenging in some cases. In this thesis, it has been proposed that STRs could be analysed by high resolution melting on amenable thermocycler such as CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), though usually HRM is used only for single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping or for mutation scanning.

In the theoretical part of this thesis, current methods of STR profiling are described together with method of High Resolution Melting (HRM) which differentiates DNA amplicons based on melting curves. During the post-PCR analysis, DNA is exposed to gradually increasing temperature and fluorophores released from dsDNA upon denaturation are detected.

In the experimental part of this thesis, DNA profiling by High-resolution melting (HRM) was performed, for two STRs (*vWA*, *DI8S51*), two types of thermocyclers, and two premix mixtures. Then, stability of melting profiles and melting temperatures at different input DNA concentrations, reproducibility and ability of HRM to cluster genotypes was tested. It was concluded that HRM cannot be used for DNA profiling using BioRad thermocycler and its firmware.

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce, panu doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D. za korekturu, trpělivost, vstřícnost, odborné vedení a čas, který mi věnoval při zpracování této bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala panu Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. a paní Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D., bez jejichž pomoci by tato práce nevznikla.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce	9
3	Současný stav řešené problematiky.....	10
3.1	Mikrosatelity.....	10
3.1.1	Pozice mikrosatelitů v genomu	11
3.1.2	Generování mikrosatelitového polymorfismu.....	13
3.1.3	Současné metody genotypizace mikrosatelitů a jejich omezení	18
3.2	Metoda High Resolution Melting	23
4	Experimentální část.....	27
4.1	Biologický materiál.....	27
4.2	Design experimentů	28
4.2.1	Ověření kvality a kvantity vybraných vzorků - přeměření koncentrace DNA	29
4.2.2	Testování vlivu koncentrace DNA na profil křivek a teplotu disociace T_m při HRM analýze - ředění DNA.....	29
4.2.3	Testování vlivu čistoty DNA na analýzu HRM - přečištění ethanolovou precipitací	29
4.2.4	Testování vlivu složení PCR směsi na analýzu HRM.....	30
4.2.5	Testování vhodnosti termocykléru pro HRM.....	32
4.2.6	Nastavení Bio – Rad Precision Melt Analysis Software.....	33
4.3	Seznam použitých chemikálií a reagentů.....	34
4.4	Přístrojové vybavení laboratoře	34
5	Výsledky.....	35
5.1	Koncentrace, čistota a ředění jednotlivých vzorků.....	35
5.2	Srovnání Termocyklérů a PCR reakčních směsí.....	36
5.3	Vliv rozdílné koncentrace vstupní DNA na chování křivek tání a teplotu T_m	39
5.4	Metoda HRM jako nástroj ke genotypizaci	46
5.4.1	Schopnost rozlišení genotypů na lokusu vWA a D18S51.....	48
6	Diskuze.....	57
7	Závěr.....	60
8	Seznam zkratk	61
9	Literatura	62
10	Přílohy	72

1 Úvod

Mikrosatelity, short tandem repeats, STR jsou jednoduché, tandemově se opakující sekvence, které se nejčastěji vyskytují v nekódujících oblastech DNA. Velká mutační rychlost způsobuje polymorfismus v populaci a činí z mikrosatelitů účinný genetický marker. V přilehlých, „flanking“ oblastech, ohraničujících mikrosatelitové lokusy, lze navrhovat specifické primery a využít tak mikrosatelity pro profilování DNA, genetické mapování či fylogenetickou analýzu. Profilování DNA pomocí mikrosatelitů našlo velké uplatnění v paternitních analýzách a forezních identifikacích. Standardní analýza mikrosatelitů sestává z amplifikace kvantifikované DNA následované kapilární elektroforézou, kde jsou rozlišeny fluorescenčně značené amplikony. V posledních letech je snaha tyto kroky zrychlit a sloučit na integrovaný mikrofluidní čip. Screeningovou nebo genotypizační alternativou pro zrychlení a zlevnění profilování mikrosatelitů by mohla být vysokorozlišovací analýza křivek tání (high resolution melting, HRM), která nepotřebuje k analýze amplikonů kapilární elektroforézu.

HRM se vyvinula na základě dvou inovací: převedení PCR na testování v reálném čase a analýzy podle křivek tání (low resolution melting, LRM). Využití HRM i u mikrosatelitů, konkrétně u vzorků nalezených na místech činu, by mohlo znamenat levnou a rychlou analýzu na úrovni screeningu (předešlo by se zbytečnému, zdlouhavému a drahému analyzování irelevantních vzorků). Pokud by rozlišení alel pomocí HRM odpovídalo rozlišení, dosaženého standardní analýzou mikrosatelitů, mohlo by HRM nahradit současné fluorescenčně značené profilovací kity.

2 Cíl práce

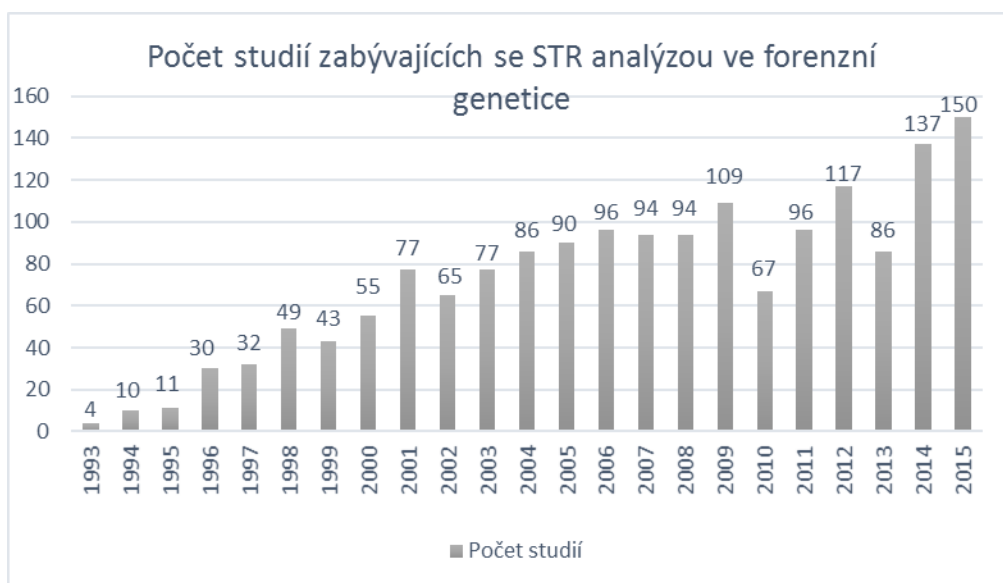
Cílem této bakalářské práce je vypracovat v teoretické části literární rešerši, zabývající se krátkými tandemovými repeticemi (mikrosatelity), jejich pozicí a chováním v genomu a využitím při profilování DNA. V poslední části rešerše je představena metoda High resolution melting, HRM.

Praktická část se zabývá testováním a analýzou vybraných mikrosatelitových lokusů metodou HRM. Byly vybrány mikrosatelity *vWA* a *DI8S51*, které byly profilovány za pomoci primerů podle článku Nicklas *et al.*, 2011. U lokusu *vWA* jsem se pokusila rozlišit alely 14/14, 15/15, 16/16, 17/17, 18/18, 19/19, 14/16, 14/18, 14/19, 15/16, 15/19, 16/17, 16/18, 17/18, 17/19, 17/21, 18/19. Na lokusu *DI8S51* to byly alely 13/13, 14/14, 15/15, 16/16, 18/18, 14/15, 12/13, 12/15, 18/18, 12/17, 12/21, 12/22, 13/15, 13/16, 13/17, 13/19, 14/15, 14/17, 14/20, 15/17, 15/18, 16/18, 16/19, 17/18, 17/21. Hlavním cílem byla standardizace a optimalizace metody tak, aby od sebe jednotlivé genotypy šly odlišit na základě tvaru křivky a teploty bodu tání T_m . Následným cílem bylo charakterizovat diskriminační schopnost metody HRM pro screeningové profilování DNA.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Mikrosatelity

Mikrosatelity (Simple Sequence Repeats, SSRs, Short Tandem Repeats, STR) jsou krátké, tandemově se opakující sekvence DNA, složené z 1-6 párů bází (bp). Vyskytují se v eukaryotickém i prokaryotickém genomu (Field *et Wills*, 1998; Tóth *et al.*, 2000). Byly detekovány před více než 35 lety a zpočátku nebyly považovány za sekvence se specifickou úlohou. Na konci 80. let minulého století, s rozvojem PCR, se začaly využívat jako markery s mendelistickou dědičností pro mapování genomu a jako asociační markery pro genetická onemocnění (Queller *et al.*, 1993; Charlesworth *et al.*, 1994; Di Rienzo *et al.*, 1994; Estoup *et al.*, 1995). Díky vysoké frekvenci mutací, která je vyšší než ve zbytku genomu (Jarne *et Lagoda*, 1996), jsou mikrosatelity vysoce polymorfní napříč populací. Zároveň jsou přítomny v genomu ve velkém počtu, což vedlo k jejich popularitě v populační genetice a forenzní genetice (Goldstein *et Schlötterer*, 1999). V 90. letech minulého století se staly základním genetickým (profilovacím) markerem pro identifikaci osob a zjištění příbuznosti (**Obr. 1**).



Obr. 1: Počet studií zabývajících se STR analýzou ve forenzních vědách od roku 1992 na základě dat z PubMed: Srovnání počtu publikací, které se zabývaly problematikou STR ve forenzní genetice od roku 1992 do roku 2015 (na základě dat z PubMed databáze, klíčová slova: STR forensic analysis, filtr: Humans).

Kromě STR (short tandem repeats) existují v lidském genomu i polymorfismy SNP (bodové polymorfismy, single nucleotide polymorphisms). Bodové polymorfismy, SNP, jsou

početně zastoupeny v genomu mnoha organizmů. V lidském genomu je to průměrně každých 100-300 bp (Thorisson *et al.*, 2005), ve srovnání s STR, kde je to každých 2000-30000 bp (Webster *et al.*, 2002). Frekvence mutace na generaci se liší u obou markerů. U STR je to v průměru 10^{-3} do 10^{-4} nukleotidů na lokus na generaci (Ellegren, 2000), a u SNP jen 10^{-9} (Guichoux *et al.*, 2011).

3.1.1 Pozice mikrosatelitů v genomu

Většina mikrosatelitů se nenachází v protein-kódujících sekvencích, nicméně mnoho studií poukazuje na velké množství STR nacházejících se v transkribovaných oblastech genomu, zahrnující i protein-kódující geny (Tab. I).

Tab. I: STR v kódujících oblastech – jejich funkce a fenotypový efekt v několika druzích (Li *et al.*, 2004)

Druh	Repetice	Gen	STR funkce a pozorovaný fenotypový efekt	Reference
Člověk	(CAG) _n	<i>HD</i>	Expanze způsobí Huntingtonovu chorobu	Zoghbi <i>at</i> Orr (2000)
	(CAG) _n	<i>KR</i>	Spinobulbární muskulární atrofie	Mao <i>et al.</i> (2002)
	(CAG) _n	<i>SCA</i>	Spinocerebelární ataxie	
<i>Drosophila</i>	(CAG) _n	Homeobox gen <i>DLX6</i>	Tripletová expanze vede k buněčné smrti	Ferro <i>et al.</i> (2001)
<i>Haemophilus somnus</i>	CAAT	<i>LOS</i> component gene	Zprostředkování variace a adaptace lipooligosacharidů	Inzana <i>et al.</i> (1997)

Mikrosatelity v kódujících oblastech mají specifické složení nukleotidů: A/T repetice jsou mnohem frekventovanější (11,8 % z 45 425 kódujících sekvencí) než G/C repetice (0,7 %) (Olivero *et al.*, 2003). V intronech se nejčastěji nacházejí mikrosatelity ve formě dinukleotidů (Toth *et al.*, 2000).

Z dinukleotidových repetic je u obratlovců nejvíce zastoupen dinukleotid (AC)_n, který je až trojnásobně častější než druhý nejčastější (AT)_n motiv (Chistiakov *et al.*, 2005). U rostlin je to pak TA a GA (Depeiges *et al.*, 1995).

Trinukleotidové motivy se nejvíce studují ve spojení s různými onemocněními. Nacházejí se také často v exonech, kde nenarušují čtecí rámec (Jurka *et Pethiyagoda*, 1995). Například repetice GTC (kódující valin) jsou na lidském chromozomu nejčastěji lokalizované v subtelomerách (Nanda *et al.*, 1990).

Nejvíce zastoupenými motivy u tetranukleotidových repetic jsou GATA a GACA, jejich distribuce a hustota se liší mezi druhy. V genomu lidí a rajčat se nacházejí často v oblasti centromer (Nanda *et al.*, 1990; Arens *et al.*, 1995). U hadů (gonozomy ZZ mají samci, ZW samice) jsou akumulovány na pohlavním chromozomu W. Tetranukleotidové repetice jsou široce využívány v biologických studiích, jelikož jsou vysoce polymorfní a zároveň mají méně častý prokluz, stutter, viz níže (Weber *et Wong*, 1993; Ellegren, 1995).

Změny v počtu trinukleotidových mikrosatelitů jsou podstatou neurodegenerativních onemocnění, jako je například Huntingtonova choroba, při které dochází k úbytku neuronů ocasatého jádra (*corpus striatum*) při nárůstu počtu opakování CAG motivu v genu kódujícího protein huntingtin nad 40 (Moxon *et Wills*, 1999; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064>). Dalším příkladem je spinocerebelární ataxie (Zoghbi *et Orr*, 2000). Podstatou tohoto onemocnění je expanze CAG repetic, které kódují dlouhý polyglutaminový řetězec v ataxinech. Prodlužování délky řetězců vede ke změně sekundární struktury a agregativní tvorbě inkluzí v buňce (Hammock *et Young*, 2005; Zumrová *et al.*, 2007).

Trend zvyšování počtu jednotlivých trinukleotidových nestabilních repetic se může přenášet na další generace. Tento jev se nazývá genetická anticipace. Jedno z onemocnění, které je způsobeno touto mutací, je syndrom fragilního X. Začátek sekvence u odpovědného genu jsou CGC triplety. V běžné populaci se jejich počty pohybují ve škále 7-56 a jakmile počet repetic přesáhne horní hranici, úsek se stává nestabilním a množství tripletů CGC nekontrolovaně roste. Zvyšující se počet opakování trinukleotidů způsobí, že nemoc se v následujících generacích vyvíjí ve stále nižším věku a se závažnějšími následky (Zumrová, 2005).

Zastoupení genomických mikrosatelitů se liší mezi taxony. V rostlinách jsou mikrosatelity zastoupeny v menší části genomu než u živočichů: v *Arabidopsis* tvoří 0,85 % genomu a v *Zea mays* 0,37 %, zatímco u ryb je to 3,21 % v *Tetraodon nigroviridis* a 2,12 % u *Fugu* (Crollius *et al.*, 2000). Distribuce mikrosatelitů se neliší jenom mezidruhově, ale také v rámci chromozomu jednoho organismu (*Arabidopsis thaliana*) (Schlötterer, 2000). Redukce hustoty mikrosatelitů najdeme v oblasti centromery; tento fenomén byl popsán i u *Drosophila melanogaster* (Pardue *et al.*, 1987; Lowenhaupt *et al.*, 1989). U ptáků jsou mikrosatelitové markery málo prozkoumané a praktická aplikace je omezená; je málo údajů o

SSR genomové distribuci a velikosti napříč různých ptačích taxonů, avšak jsou postupně získávány nové poznatky; jedním z nejnovějších je osekvenování genomu kura bankivského (*Gallus gallus*) (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004). Nicméně u studií ptáků je rozšířená tzv. cross-species amplifikace, kdy se využívají primery odvozeny od příbuzného druhu (Primmer *et al.*, 1996).

Mikrosatelity jsou klasifikovány podle typu opakování sekvence do několika rodin – dokonalé (perfect), nedokonalé (imperfect), přerušené (interrupted) a složené (composite). U dokonalých mikrosatelitů není repetitivní sekvence přerušena žádnou jinou bází nepříslušící do motivu (TATATATATATATATA), zatímco u nedokonalých je včleněna jiná sekvence, která naruší opakující se motiv (TATATATACTTATATATA). V případě přerušených mikrosatelitů je v opakující se sekvenci včleněna jiná, nerepetitivní, kratší sekvence (TATATACGTGTTATATATATA). U složených obsahuje sekvence dvě různé, delší, opakující se sekvence (TATATATATAGGTGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

Homozygotní mikrosatelitní lokusy mají alely se stejným počtem repetice na obou homologických chromozomech, zatímco heterozygotní lokus má jiný počet opakování pro každou alelu. Například jedna alela může obsahovat 9 opakování, zatímco druhá 10. V populaci se nachází na lokusu několik alel, charakterizovaných počtem opakujících se repetice. Vysoká úroveň polymorfismu způsobuje vysokou diskriminační sílu mikrosatelitů - mikrosatelitové markery jsou užitečný nástroj pro rozlišování jedinců v populačních genetických studiích a forezních vědách. Za předpokladu, že m je počet alel v populaci, maximální počet různých genotypů bude $m(m+1)/2$ a počet možných heterozygotních genotypů $m(m-1)/2$ (Oliveira *et al.*, 2006). Například při $m = 55$ na lokusu *D18S51* (http://www.cstl.nist.gov/strbase/str_D18S51.htm, navštíveno 10.11.2016), je 1 540 různých genotypů a 1 485 heterozygotních genotypů.

Některé STR lokusy mají vzácné alely, které obsahují částečné opakování repetice. Tyto alely jsou označovány jako mikrovarianty. Mikrosatelity využívané v kriminalistice mají opakující se motiv složený ze 4 párů bází. Mikrovarianta nastane, jestliže opakující se motiv není úplný. Příkladem může být alela 9.3 na lokusu *TH01*, který obsahuje 9 celých opakování tetranukleotidového motivu AATG a desáté, které je neúplné, obsahuje tři nukleotidy (Butler, 2005).

3.1.2 Generování mikrosatelitového polymorfismu

Frekvence mutací pro eukaryotickou sekvenci je přibližně 1 na 10^9 nukleotidů na generaci (Crow, 1993). Je známo, že mutační rychlost mikrosatelitů je mnohem vyšší než

u zbylých částí genomu (Jarne *et Lagoda*, 1996), dosahuje od 1 na 10^2 do 1 na 10^6 nukleotidů na generaci (Sia *et al.*, 2000).

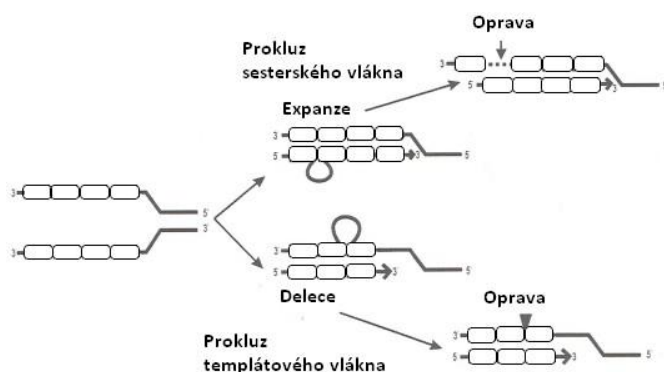
Mutační rychlost závisí na typu mikrosatelitů. Například bodové mutace u přerušených a nedokonalých mikrosatelitů narušují dokonalé repetice a redukují prokluz polymerázy, stutter, což je hlavní mutační mechanismus (Jin *et al.*, 1996).

Mikrosatelitní stabilita je citlivý indikátor genomické stability, která má souvislost s lidskými onemocněními. Příkladem může být globální mikrosatelitní nestabilita, vyplývající z chyb u oprav nesprávného párování bází (tzv. mismatch repair). Ta je asociována s hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomem (Marra *et Bolland*, 1995).

Mutační mechanismy

K vysvětlení vysoké míry mutací u mikrosatelitů bylo popsáno několik mechanismů: chyby během rekombinace, nerovnoměrný crossing-over a prokluz polymerázy během DNA replikace či reparační (Strand *et al.*, 1993).

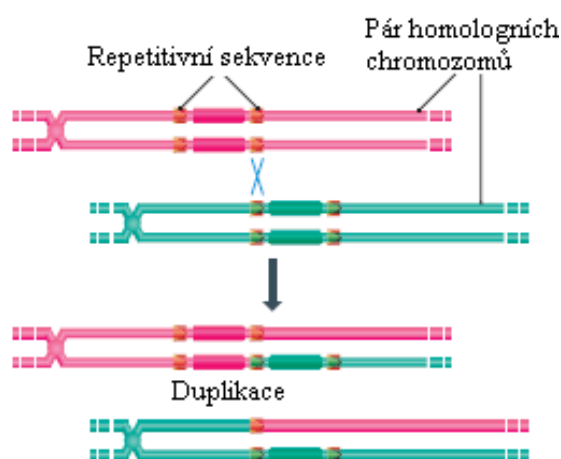
V současnosti je obvykle přijímáno, že replikační prokluz je hlavní mechanismus způsobující vznik nových mikrosatelitových alel (Brinkmann *et al.*, 1998) (**Obr. 2**). Tento typ mutace nastane, jestliže DNA polymeráza narazí na úsek obsahující repetice a dojde k jejímu uvolnění z templátového DNA vlákna. Následně se znovu napojí na komplementárním, ale nesprávném místě a replikace pokračuje. Buď dojde k delecí vybraného úseku nebo naopak k inzerci dalších repetetic (Canceill *et al.*, 1999). Je prokázáno velké množství „slippage“ mutací, ovšem ty jsou zodpovědné pouze za nárůst či ztrátu jedné či dvou repetetic (Hentschel, 1982; Streisinger *at Owen*, 1985; Schlötterer *at Tautz*, 1992).



Obr. 2: Schéma prokluzu polymerázy: V horní části schématu je znázorněná inzercie (expanze) nové repetice, kdy klička vzniká na rostoucím, polymerovaném vlákne, což je častější model, zatímco v dolní části je znázorněná delecí, kdy z původních čtyř opakování jsou tři repetice a klička vzniká na templátovém řetězci.

Dalším mutačním mechanismem vedoucím ke změnám v počtu repetitív může být nerovnoměrný crossing-over nebo genová konverze (Hancock, 1999; Brohede *at* Ellegren, 1999; Richard *at* Paques, 2000).

Příčinou nerovnoměrného crossing-overu je nesprávné určení párování homologních sekvencí u homologních chromozomů nebo sesterských chromatid, kvůli velkému množství tandemově se opakujících repetitív. Při následné rekombinaci jeden chromozom ztratí DNA sekvenci, zatímco druhý homologní chromozom ji získá (Golberg *et al.*, 1983) (**Obr. 3**). Výsledkem nerovnoměrného crossing-overu mohou být velké změny, jako ztráta či nárůst většího množství repetitivních úseků (Oliveira *et al.*, 2006).

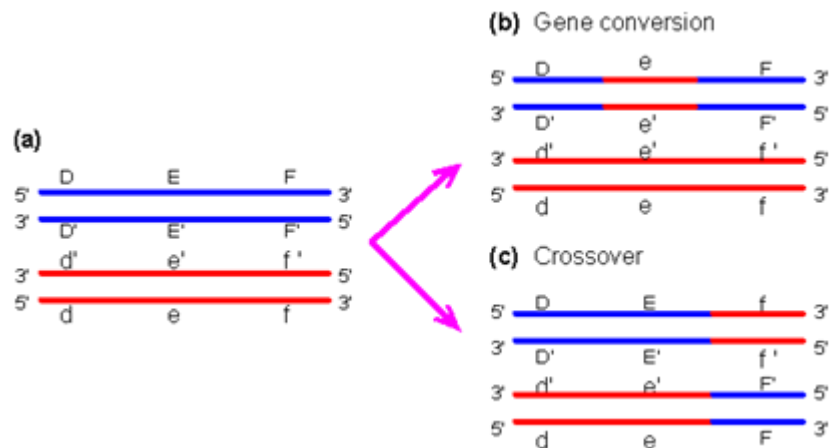


Obr. 3: Znázornění nerovnoměrného crossing-overu: Výsledkem nerovnoměrného crossing overu je rozdílná délka repetitivních sekvencí na obou homologních chromozomech. (Převzato a upraveno <https://sciknowledge.wordpress.com/2013/01/06/genome-evolution/>)

Častější než crossing-over je za polymorfismus tandemových repetitív zodpovědná genová konverze (Richard *at* Pâques, 2000).

Genová konverze a crossing-over jsou často (ovšem ne vždy) sdružené (Szostak *et al.*, 1983). Genová konverze generuje novou alelu dárcovstvím genetického úseku z alely, která je přítomná na homologním chromozomu (**Obr. 4**).

Welch *et al.* (1990) jako první navrhli korelaci mezi genovou konverzí a přestavbou tandemových repetitív, když pozorovali meiotickou expanzi a zkrácení na lokusu *CUP1* *Saccharomyces cerevisiae*. Později byla přestavba tandemových repetitív způsobená genovou konverzí pozorována i u *Drosophila melanogaster* (Pâques *at* Wegnez, 1993; Thompson-Stewart *et al.*, 1994; Delattre *et al.*, 1995; Pâques *et al.*, 1996).



Obr. 4: Srovnání genové konverze a crossing-overu:

- (a) Dvě DNA molekuly.
- (b) Genová konverze – červená DNA je donor a poskytne část své genetické informace (e-e' region) modré DNA.
- (c) DNA crossing – over – u dvou DNA proběhne výměna genetické informace (f-f' a F-F')

(převzato z: <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch8D4.htm>)

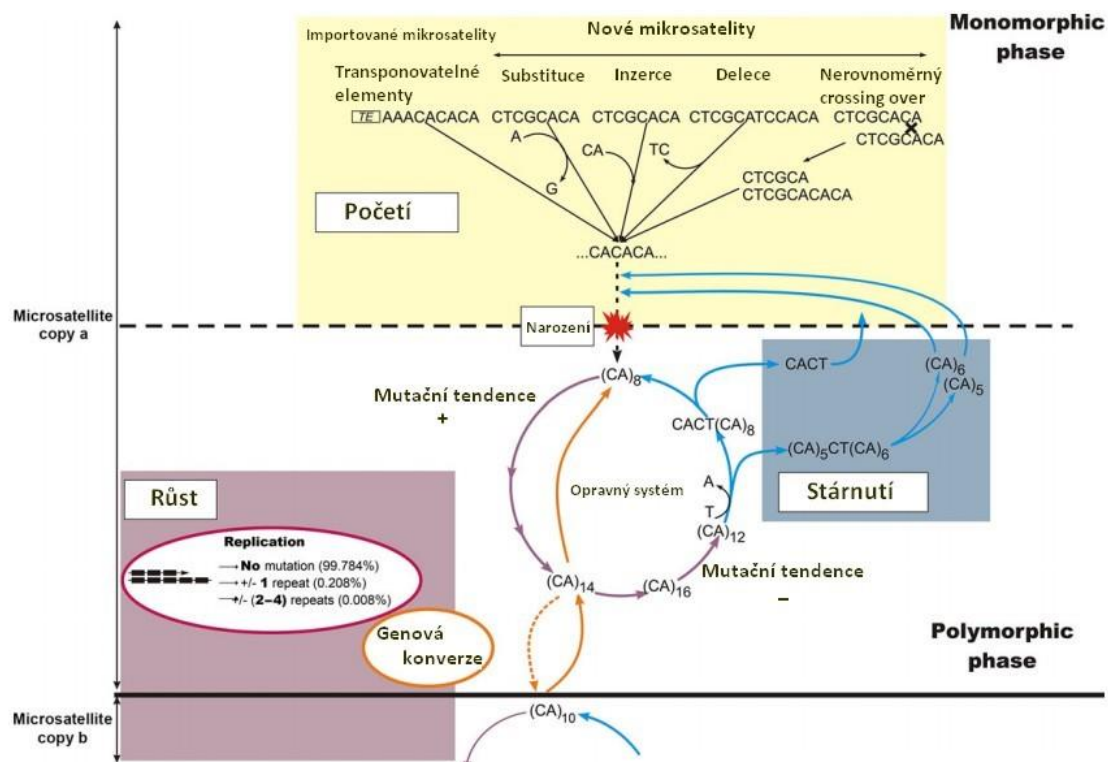
Schlötterer (2000) uvedl několik potenciálních faktorů, které mohou přispívat k pozorovaným rozdílům ve vývojové rychlosti mikrosatelitů – počet opakování, sekvence opakujícího se motivu, délka opakujícího se motivu, flanking sekvence (přílehlá sekvence), přerušení v opakující se sekvenci, míra rekombinace, míra transkripce.

- Počet opakování (Repeat number)
 - Na základě pozorování z rodokmenů (Weber *at* Wong, 1993; Brinkmann *et al.*, 1998; Schlötterer *et al.*, 1998; Schug *et al.*, 1998b) vyplynulo, že míra mutací roste s počtem opakování v původní alele.
- Typ repetice (Repeat type)
 - Příkladem může být srovnání di- a tetranukleotidových mikrosatelitů. Přímé sledování mutací na mikrosatelitech v rodokmenech naznačuje, že míra mutace u tetranukleotidů je vyšší než u dinukleotidů (Weber *at* Wong, 1993). Ovšem studie z roku 1999 (Lee *et al.*, 1999), která srovnávala stejný počet opakování u obou typů repetice, ukázala, že míra mutací u tetranukleotidů je značně nižší. Tento výsledek se shoduje se studiemi *in vitro* „slippage“ mutací, které

naznačují negativní korelaci mezi délkou opakujícího se motivu a mírou prokluzu (slippage rate) (Schlötterer *et al.*, 1992).

- Přílehlá sekvence (Flanking sequence)
 - Glenn *et al.* (1996) pozoroval významnou negativní korelaci mezi alelickou diversitou a GC bázemi přítomných v přílehlé sekvenci, a také mezi počtem opakování a obsahem GC v přílehlé, „flanking“ sekvenci, zatímco Balloux *et al.* (1998) nepozoroval žádný vliv.

Označíme-li genovou konverzi jako hlavní důvod mikrosatelitního vývoje, přidáme tím další vývojovou linii do tradičního ztvárnění evoluce mikrosatelitů (**Obr. 5**).



Obr. 5: Inkorporace genové konverze do vývoje mikrosatelitů: Mikrosatelitní sekvence prodělají dvě fáze – monomorfní (nahore), ve které je počet opakování příliš nízký na to, aby mohl mikrosatelit představovat potencionální substrát pro prokluz polymerázy a změnu v délce a polymorfní fáze (dole), ve které je počet opakování dostatečný (8) pro další nárůst i ztrátu repetice (s tendencí nárůstu mutací u menších repetice a ztrátou u větších repetice). Přerušením repetitivní sekvence se může mikrosatelit vrátit do monomorfní fáze. Genová konverze (vespod) s další kopií mikrosatelitu způsobí nárůst nebo ztrátu většího množství repetice v jednom kroku (Převzato a upraveno z Balaesque *et al.*, 2014).

Můžeme uzavřít, že mikrosatelity jsou dynamické sekvence, u kterých se molekulární struktura mění v průběhu času různými vývojovými mechanismy (Balaesque *et al.*, 2014). Délka repetice a počet opakování mají přímý vliv na jejich polymorfismus a míru mutace (Schlotterer, 2000).

3.1.3 Současné metody genotypizace mikrosatelitů a jejich omezení

Mikrosatelity jsou od konce osmdesátých let využívány pro aplikace, jakými jsou profilování DNA, analýza příbuznosti nebo genetické mapování. Staly se užitečným nástrojem díky své genomové distribuci, vývojové rychlosti a biologické funkci. Mikrosatelitní genotypizace je široce využívána jako identifikační marker (Ellegren, 2004; Mittal *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2010).

Poprvé bylo profilování DNA popsáno v roce 1985 anglickým genetikem Alecem Jeffreysem. Ten objevil určité regiony DNA, obsahující sekvence, které se několikrát opakovaly. Objevil také, že se tyto opakující sekvence liší u různých jedinců. Na základě vývoje techniky, která byla schopná otestovat délku repetice, začal Jeffreyse provádět testy na zjištění lidské identity. Tyto repetice se později staly známé jako VNTRs a technika užitá prof. Jeffreysem byla nazvaná RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). RFLP metoda využívá enzymy restrikční endonukleázy, které štěpí genom na různě dlouhé fragmenty. Velikost fragmentů je polymorfní díky existenci a umístění štěpného místa (Butler, 2005). VNTRs neboli minisatelity jsou tandemově se opakující sekvence dlouhé 15-100 bp (Martin *et al.*, 2017), zatímco STR jsou dlouhé 1-6 bp. Genotypizace s VNTRs markery se ukázala jako limitující kvůli nízké reprodukovatelnosti a vysokým nárokům na množství a kvalitu testované DNA. Mikrosatelity umožňují efektivnější PCR amplifikaci a jsou detekovatelné i v degradované DNA (<http://science.kennesaw.edu/~rrascati/forensicpolymorphs.html>).

Techniky, využívané forenzními DNA laboratořemi, zabývajícími se testováním lidské identity, pro lékařskou diagnostiku či pro genové mapování, jsou založeny na stejném principu. Celkový genetický profil lze sestavit z velmi malého množství DNA obsaženého v krvi, slinách, kostech, vlasech nebo v jiném biologickém vzorku. Profilování DNA může být provedeno RFLP metodami či metodami, které fungují na základě PCR reakce. PCR metody se dostaly do popředí díky schopnosti zanalyzovat i vzorky z místa činu, které jsou často ve špatné kvalitě a kvantitě (Butler, 2005).

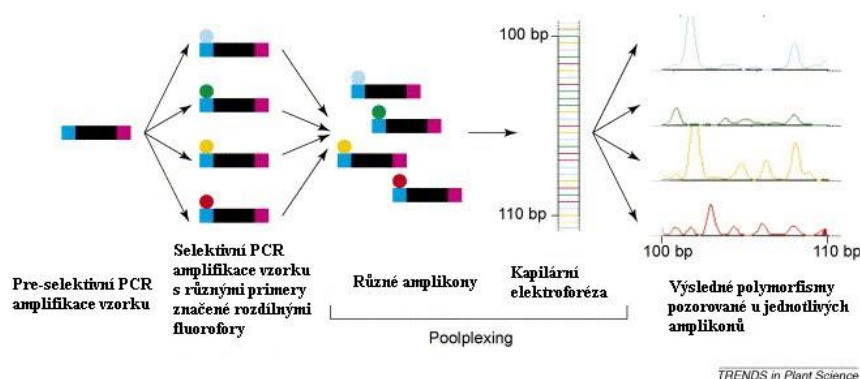
Při srovnání SNP a STR vychází v mnoha ohledech výhodnější použít STR markery. Například přítomnost mnoha alel na lokusu u STR umožňuje identifikaci jednotlivých

zástupců ve směsi (Schlötterer, 2004; Li *et al.*, 2008), což je pomocí bodových polymorfismů jen se dvěma alelami obtížně dosažitelné. V evolučních studiích nebo studiích u nesequenovaných genomů lze u STR s výhodou využít křížovou amplifikaci univerzálními primery (Sharma *et al.*, 2007).

Nomenklatura DNA markerů

Ještě před stanovením nomenklaturních pravidel platilo, že mikrosatelitu se dal název genu, do kterého spadal. Příkladem může být STR marker *TH01*, jehož název je odvozen od genu tyrosin hydroxylázy, který je lokalizovaný na chromozomu 11. Dodatek 01 pochází z faktu, že repetice se nachází v intronu 1 genu pro tyrosin hydroxylázu. Markery, které se nachází mimo genové oblasti, jsou nazvány podle chromozomální pozice. STR lokus D16S539 – D: DNA, 16: chromozom 16, S: „Single copy sequence“ (jedna kopie dané sekvence v rámci genomu), 539: 539. lokus popsáný na chromozomu 16 (Butler, 2005).

Pokroky nastaly v PCR, kdy multiplexní (mnohonásobná) PCR, ve které je užito více párů specifických primerů, komplementárních k různým cílovým sekvencím, umožňuje ko-amplifikaci několika mikrosatelitů v jednom PCR koktejlu v jediné zkumavce. Alternativou tohoto multiplexingu může být proces označen jako „pseudo-multiplexing“ či „pool-plexing“ (Ghislain *et al.*, 2004; Meudt *et Clarke*, 2007), kdy jsou amplikony míchány až po PCR a operátor se tak vyhne se tak kroku optimalizace koncentrací primerů v jediné multiplexní PCR (**Obr. 6**).



Obr. 6: Schématické znázornění PCR „poolplexing“: Při selektivní PCR amplifikaci jsou v několika zkumavkách různé primery, značené různými fluorofory. To proto, aby pozdější PCR produkty, z různých kombinací primerů, mohly být sloučeny pro kapilární elektroforézu. Kapilární přístroj pak detekuje fragmenty na základě spektra fluoroforu. Tento proces je často nesprávně označen jako „multiplexování“, ale dává se přednost přesnějšímu „poolplexing“ (převzato a upraveno z Meudt *et Clarke*, 2007).

Problémem při genotypizaci jsou nulové či neamplifikující se alely, které zdánlivě ukazují na homozygotnost vzorku. Představují problém při parentálních analýzách, kdy genotyp potomka neodpovídá rodičovským genotypům. Příčinou nulové alely může být mutace v přílehlé sekvenci pro nasedání primerů, špatná amplifikace různě dlouhých alel (Wattier *et al.*, 1998) nebo horší kvalita templátové DNA (Gagneux *et al.*, 1997; Garcia de Leon *et al.*, 1998).

Nástup nové generace sekvenčních technologií (next-generation sequencing, NGS nebo také massive parallel sequencing, MPS) umožnil rychlejší identifikaci mikrosatelitů (Abdelkrim *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2009). Generování obrovského množství sekvencí a následné seskupování do veřejných databází bylo využito k vyhledávání nových STR markerů.

V současnosti je např. v USA využíváno 20 STR lokusů ke stanovení DNA profilu forenzního vzorku. Tyto lokusy, které byly vybrány FBI laboratoří po zhodnocení mnoha STR, jsou využívány v DNA databázi, která se nazývá Combined DNA Index System (CODIS) (Hares, 2015). Ekvivalentem pro Evropu je European Core Loci (**Tab. II**).

Tab. II: STR lokusy využívané při DNA profilování

CODIS STR lokusy (U.S.)	Originálních 13 (+1) lokusů od roku 1997
	<i>CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, (+Amelogenin)</i>
	7 přidanych v roce 2017
	<i>DIS1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, D22S1045</i>
Evropské STR lokusy	<i>FGA, TH01, vWA, DIS1656, D2S441, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D18S51, D21S11, D22S1045</i>
	<i>D2S1338, D16S539, D19S433, SE33, Amelogenin</i>

Převzato: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/coreSTRs.htm> (navštíveno: 2.3.2017)

Je k dispozici velké množství komerčních, forenzně genetických kitů, využívaných pro PCR amplifikaci STR markerů (**Tab. III**).

Tab. III: Přehled komerčních STR kitů

Applied Biosystems	AmpFISTR Identifiler, AmpFISTR Identifiler Direct, AmpFISTR Identifiler Plus, AmpFISTR NGM, AmpFISTR NGM SElect, AmpFISTR GlobalFiler, AmpFISTR VeriFiler, AmpFISTR MiniFiler, AmpFISTR Yfiler, AmpFISTR SGM Plus, AmpFISTR Profiler Plus, AmpFISTR Profiler Plus ID, AmpFISTR, AmpFISTR Sinofiler, AmpFISTR Profiler, AmpFISTR SEfiler, AmpFISTR SEfiler Plus, AmpFISTR Green I, AmpFISTR Blue
Promega Corporation	PowerPlex 16, PowerPlex Fusion, PowerPlex Y, PowerPlex Y23, PowerPlex 1.2, PowerPlex 1.1, PowerPlex 2.1, PowerPlex 16, PowerPlex ES, PowerPlex 16 HS, PowerPlex 18D, PowerPlex ESX 16, PowerPlex ESX 17, PowerPlex ESI 16, PowerPlex ESI 17, PowerPlex 21, Silver Stain Systems
QIAGEN N.V.	Investigator IDplex Plus Kit, Investigator ESSplex SE Plus Kit, Investigator ESSplex Plus Kit, Investigator Nonaplex ESS Kit, Investigator Hexaplex ESS Kit, Investigator HDplex Kit, Investigator Triplex AFS QS Kit, Investigator Triplex DSF Kit, Investigator Argus X-12 Kit, Investigator Argus Y-12 QS Kit
Biotype	Mentype®: Nonaplex I, Nonaplex ^{QS} , Nonaplex ^{QS} Twin, Pentaplex ESS, Argus Y-MH ^{QS} , Argus X-8, Chimera®
Beckman Coulter	Genome Lab™ Human STR Primer Set

Převzato: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/multiplx.htm> (navštíveno: 2.3.2017)

Analýza mikrosatelitů kapilární elektroforézou

Při PCR reakci se pro DNA fragmenty používá fluorescenční značení. Následuje kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis, CE), která využívá principy klasické deskové elektroforézy. Dochází k pohybu elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Jak název napovídá, provádí se v mikrokapilární trubici, která je naplněná nosným médiem (elektrolyt, gel). Jakmile jsou vzorky, gelový polymer a pufr připraveny v přístroji, kapilára se naplní gelovým polymerem a vzorky jsou nasazovány elektrokineticky. K rozdělení nabitých částic na základě molekulové hmotnosti dochází proplétáním přes gel, který funguje jako molekulární síto (Butler, 2004).

Pro lepší rozlišení a odstranění efektu sekundárních konformací musí být amplifikované STR fragmenty denaturované. Teplota je proto v kapiláře vyšší než teplota okolní (mezi 50 °C a 70 °C). Dále se přidávají denaturující aditiva, jako je například močovina či formamid (Rosenblum *et al.*, 1997).

K vyhodnocení DNA profilu se používá fragmentační analýza. Výsledek elektroforézy je zaznamenán na elektroforetogramu, kde jsou jednotlivé fragmenty DNA představovány pomocí píků. Výška píku je přímo úměrná intenzitě fluorescence a srovnává se s vnitřním standardem (soubor fragmentů o známé délce, značený jinou fluorescenční barvou), který se analyzuje s testovanou DNA (Butler, 2005).

Díky fluorescenčnímu barvení jednotlivých fragmentů DNA můžeme analyzovat vícero nezávislých lokusů v jednom nástřiku. Fluorescenční barvy, které se využívají, jsou např.: 5-FAM, 6-FAM, JOE, R110, HEX, NED, TET, ROX. K detekci barev se využívá fluorescenční detektor s duálním argonovým laserem, který je nutný k proběhnutí excitace. Produkuje dva světelné paprsky s různou vlnovou délkou. Fluorescenční barvy pak vyzáří přijatou energii ve formě barevného světla, které je následně zachyceno detektorem (Applied Biosystems, 2000).

Konvenční techniky profilování STR, které zahrnují gelovou či kapilární elektroforézu jsou nákladné a zdlouhavé. Jednoduchá analytická metoda, která pomůže vybrat předběžným screeningovým testem pouze malou část vzorků k podrobnému profilování STR, zlevní a zrychlí analýzu či by úplně v některých případech nahradila nutnou elektroforézu, by ušetřila často důležitý čas i prostředky (Nicklas *et al.*, 2011). Takovou metodou by mohlo být využití křivek tání amplikonu.

Křivky tání popisují denuraci dvoušroubovice. Na rozdíl od elektroforetické mobility, která závisí na velikosti DNA fragmentů, disociační teplota nebo teplota tání (T_m) dvoušroubovice DNA (dsDNA) se mění také v závislosti na nukleotidové sekvenci, délce a stupni komplementarity mezi dvěma řetězci DNA. Rozdíl v tání STR alel může být využitý ke genotypizaci dsDNA molekul v procesu nazvaném analýza křivek tání (High resolution melting analysis) (Nguyen *et al.*, 2012).

3.2 Metoda High Resolution Melting

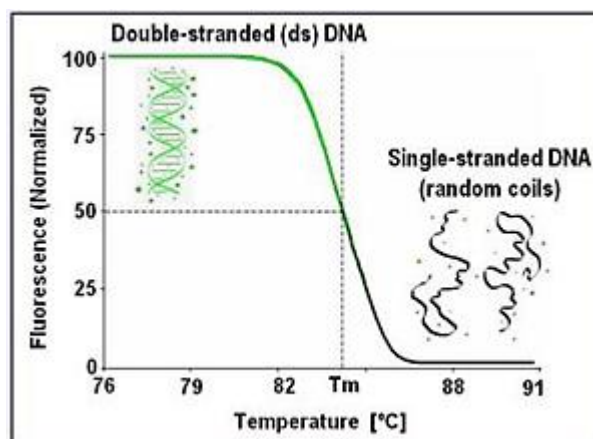
High Resolution Melting metoda byla představena roku 2002 ve spolupráci University of Utah a Idaho Technology. Její popularita stále roste díky jednoduchosti a využitelnosti. Prvním krokem je PCR amplifikace požadovaného úseku za přítomnosti fluorescenčního barviva, vázícího se k dsDNA. Po proběhnutí PCR již není nutná žádná separace či jiné zpracování vzorků. Vysokorozlišovací analýza křivek tání (High resolution melting, HRM) je využívána v termocykléru umožňujícím real-time PCR. Hned po amplifikaci jsou generovány křivky tání díky monitorování fluorescence při postupném zahřívání amplikonů. HRM lze užít pro genotypizaci a mutační skenování. Dokáže rozlišit SNP, menší delece a inserce (White *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2007).

Prvně popsané analýzy křivky tání amplifikovaného produktu s využitím SYBR® Green I dsDNA interkalačního barviva k detekci dimerů či jiných nespecifických produktů nyní nazýváme Low resolution melting, LRM. HRM se od LRM odlišuje barvivy lépe se vázícími k dsDNA, kvalitnějšími cykléry, které dokáží přesněji zahřívát na určené teploty a propracovanějším software, který dokáže lépe rozlišit jednotlivé alely.

Princip analýzy tání

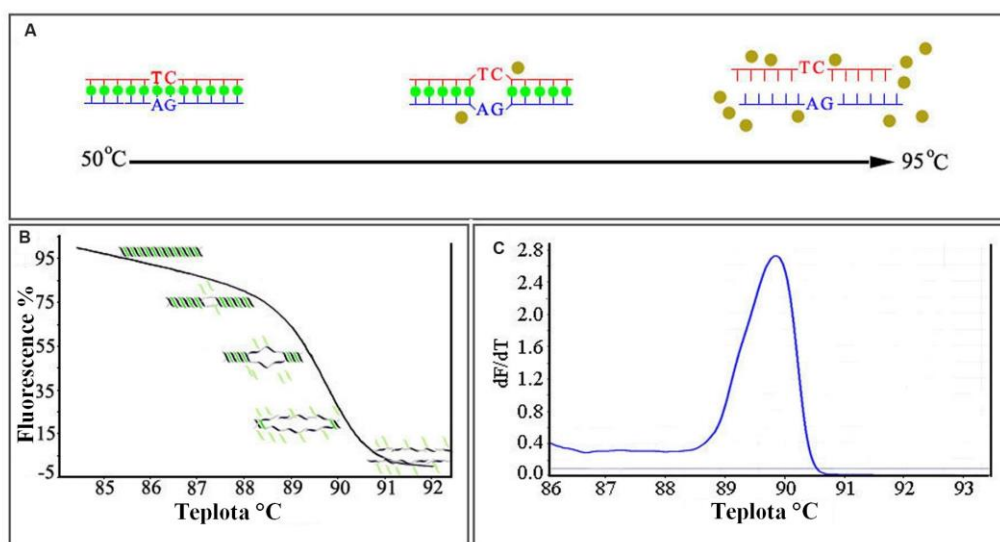
Křivka LRM je generována zvyšováním teploty, typicky po 0,5°C krocích. Tím dochází k postupné denaturaci amplifikované DNA. Jelikož SYBR® Green I je fluorescenční pouze pokud se váže na dsDNA, fluorescence klesá, jakmile je DNA duplex denaturován. Profil křivky závisí na délce, obsahu GC bází, sekvenci a heterozygotnosti amplifikovaného úseku.

Princip HRM je stejný jako LRM, rozdíl je jen v tom, že krok čtení fluorescence je zmenšen. Místo 0,5°C inkrementů jsou to typicky 0.008 - 0.3°C kroky. K analýze se využívají DNA-saturující fluorescenční barviva (LSGreen, EVAGreen). Monitorováním postupné změny fluorescence v reálném čase způsobené pozvolným uvolňováním barviva z denaturující DNA dvoušroubovice, je generována křivka tání. Po amplifikaci, těsně před táním dvoušroubovice, je fluorescence největší, kvůli začlenění barviva do mnoha kopií dvoušroubovicových amplikonů. Jakmile teplota roste, fluorescence slábne až dosáhne minima, při které je amplikon zcela rozvolněn na dva jednořetězce (**Obr. 7**) (Bio-Rad, 2010).



Obr. 7: Křivka tání: Na obrázku je znázorněna křivka tání. Na počátku je fluorescence vysoká kvůli mnoha kopiím amplikonů a integrovaného barviva. Čím je teplota vyšší, tím je fluorescence slabší. V bodě teploty tání je fluorescence nejnižší a DNA z dvouřetězcové formy přejde do jednořetězcové. (Převzato z <http://www.biotechniques.com/news/The-Moments-Melting-Curve-Analysis/biotechniques-354585.html#.WJi4CxvhDIU>).

Nejvyšší míra poklesu fluorescence je v bodu tání (T_m) dvoušroubovice DNA. Teplota bodu tání (T_m) je definována jako teplota, ve které je 50 % DNA vzorku přítomno ve dvoušroubovici a 50 % v jednošroubovicové formě. Teplota T_m je typicky vyšší pro delší DNA fragmenty či s vyšším obsahem GC. Vynesáním derivovaných dat fluorescence oproti teplotě do grafu lze odvodit T_m (Kapa biosystems, 2014) (**Obr. 8**).



Obr. 8: Znázornění průběhu real-time HRM analýzy: V horní části obrázku (A) je znázorněna disociace dsDNA během zvyšování teploty. V části B je generována křivka tání. Největší fluorescence je při navázání barviva na dsDNA. V části C je pak vyobrazena křivka derivační, ve které je zviditelněný bod T_m . (Převzato a upraveno ze Sun *et al.*, 2016).

Teplota tání (T_m) PCR produktu je důležitý aspekt; je to ovšem pouze jeden bod z celé křivky tání. Více informací získáme z kompletní křivky. Tvar se využívá k mutačnímu a sekvenčnímu skenování a jako indikátor heteroduplexů (Reed *et al.*, 2007).

Právě analýza heteroduplexů je uplatňována při HRM analýze. Každý DNA duplex má charakteristický profil tání (Reed *et Wittwer*, 2004). Různé SNP křivku tání mění a ovlivňují teplotu tání (T_m) rozdílně (Venter *et al.*, 2001) (**Tab. IV**). Vzorek se standardní sekvencí v obou alelách nebo s homozygotní mutací generuje po amplifikaci 1 typ homoduplexu (všechny báze se budou párovat). Profil tání zůstává stejný a pouze se objeví posun vůči standardní T_m křivce. Naopak po amplifikaci heterozygotního vzorku, nesoucího dvě různé alely téhož genu, vznikají 4 různé produkty (2 homoduplexy + 2 heteroduplexy). Heteroduplexy se projevují zejména snížením T_m a změnou ve tvaru křivky tání (Reed *et Wittwer*, 2004).

Tab. IV: Předpokládaná změna T_m u lidských SNP (Kapa biosystems, 2014)

Třída SNP	Substituce bází	Změna T_m	Výskyt v lidském genomu
I	C/T a G/A	Velká – až 0,5 °C	64 %
II	C/A a G/T	Velká – až 0,5 °C	20 %
III	C/G	Malá – (0,2 – 0,5 °C)	9 %
IV	A/T	Velmi malá – méně jak 0,2 °C	7 %

Vzhledem k vysoké citlivosti HRM je správné navrhnutí experimentu kritickým faktorem. Zvláštní pozornost by měla být věnována PCR reagensům, navržení primerů a PCR protokolu. I malé rozdíly v počátečním nastavení mohou výrazně ovlivnit konečné výsledky. Délka ampliconů by neměla přesahovat 400 bp (Kapa biosystems, 2014).

DNA kvalita a kvantita jsou další faktory, které mohou negativně ovlivnit analýzu. Pufry, využívané např. při DNA izolaci, obsahují soli, které mohou negativně ovlivňovat chování PCR produktu při tání dvoušroubovice. To může mít za následek nízkou citlivost, špatnou reprodukovatelnost či chybné určení genotypů. Všechny DNA vzorky by měly být při izolaci eluovány pufrům bez solí, v ideálním případě 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (Kapa biosystems, 2014).

HRM byla prokázána jako relativně účinný, přesný a levný způsob analýzy genetických variací a polymorfismů, zejména SNP (Nicklas *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2012).

Před několika lety byla HRM použita i k analýze STR. Nicméně, pouze 3 studie se zabývají provedením této metody pro forenzní aplikace. Tyto práce naznačily, že analýza

STR HRM může být rychlý, jednoduchý a levný genetický screeningový nástroj použitelný ve forenzní identifikaci (Nicklas *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2012, Deng *et al.*, 2016). V mé práci tuto hypotézu testuji.

4 Experimentální část

4.1 Biologický materiál

Na testování mikrosatelitů byly použity:

- 1) Trojice DNA biologická matka, biologický otec, dítě, s referenčními čísly 13185, 13173 a 13166 se známými profily DNA na lokusech *vWA* a *DI8S51*.
- 2) 3 vyizolované DNA s následujícími referenčními čísly: 13157 náležící k buněčné linii SW 403; 13158, buněčná linie CCRF – CEM a 13184, buněčná linie SW 480, u kterých byly známy profily DNA na lokusech *vWA* a *DI8S51*.
- 3) 48 DNA vyizolovaných z bukálního stěru od osob z europoidní populace, které vzorky poskytly spolu s informovaným souhlasem, a u kterých byly známy profily DNA na lokusech *vWA* a *DI8S51*. DNA mělo následující referenční čísla: 1238, 1278, 1306, 1382, 2211, 2212, 2592, 2596, 2927, 2946, 2958, 3544, 3115, 3963, 3975, 4539, 4709, 5124, 5213, 5401, 5491, 5599, 5706, 6063, 6171, 6308, 6679, 7214, 7309, 7352, 8795, 8858, 9010, 9064, 9068, 9192, 9341, 9518, 9539, 9693, 9174, 9720, 14714, 14619, 14620, 14621, 12555.

Izolaci DNA provedly laborantky LEM ÚMTM. Veškerá vyizolovaná DNA byla rozpuštěna ve vodě pro molekulární biologii a uchovávána v mrazničce při -20 °C.

4.2 Design experimentů

Plánované experimenty měly splnit následující dílčí cíle:

- Ověřit kvalitu a kvantitu vybraných DNA vzorků
- Otestovat vliv koncentrace DNA na profil křivek a teplotu disociace T_m při HRM analýze
- Přečistit DNA a zjistit vliv čistoty DNA na analýzu HRM
- Otestovat vliv složení PCR směsi na analýzu HRM
- Srovnat vhodnost termocyklérů pro HRM
- Najít nejvhodnější parametry software Precision Melt Analysis (Bio-Rad) k HRM analýze

Z výsledků těchto experimentů pak měl být učiněn závěr ohledně vhodnosti HRM jako nástroje k profilování DNA

4.2.1 Ověření kvality a kvantity vybraných vzorků - přeměření koncentrace DNA

Spektrofotometrické:

Před samotnými PCR reakcemi bylo nutné změřit na přístroji NanoDrop koncentraci a čistotu poměrem absorpance při 260 nm a 280 nm.

DNA vzorky byly promíchány na Vortexu. Na přístroj Nanodrop ND-1000 bylo napipetováno 1 μ l deionizované vody na čočku pro nastavení hodnoty nula, „vyblankování“. Po změření se voda setřela buničinou a přešlo se k samotnému měření vzorků. Bylo napipetováno 1 μ l DNA vzorku a změřena absorpance při vlnové délce 230, 260 a 280 nm.

Fluorometrické:

Vzhledem k dalším experimentům s ředěním bylo nutné změřit přesněji koncentraci 3 DNA vybraných k testování (13157, 13158 a 13184) na fluorometru Qubit [®] 2.0.

Do mikrozkušavky bylo napipetováno 198 μ l pufru Qubit [®] dsDNA HS Buffer, 1 μ l fluorescenční barvy Qubit [®] ds DNA Reagent *200x concentrate in DMSO* a 1 μ l měřeného vzorku. Mikrozkušavka byla krátce zvortexována a vložena do přístroje. Příslušným programem byla změřena koncentrace za využití archivované kalibrační křivky.

4.2.2 Testování vlivu koncentrace DNA na profil křivek a teplotu disociace T_m při HRM analýze - ředění DNA

Veškerá další využívaná DNA byla naředěna na koncentraci cca 5 ng/ μ l, která byla přidávána do jednotlivých reakcí. Ředění využívaných 47 vzorků vyizolovaných z bukální sliznice a trojice DNA matka, otec, dítě je podrobněji uvedeno v **Příloze 3**.

Kvůli analýze vlivu vstupního množství DNA na teplotu tání T_m a profil křivek tání bylo nutné pro další testování u DNA 12157; 12158 a 13184 naředit koncentraci:

1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16, 1/32; 1/64, 1/128; 1/256; 1/512

4.2.3 Testování vlivu čistoty DNA na analýzu HRM - přečištění ethanolovou precipitací

Soli, obsažené v izolačních pufrech, mohou mít nepříznivý vliv na chování PCR produktu při tání dvoušroubovice. Mohou měnit nespecificky teplotu tání T_m a tvar křivky (Kapa biosystems, 2014). Proto jsem přečistila DNA pomocí ethanolové precipitace.

K DNA ve zkumavce byla přidána PCR voda do objemu 100 µl. Následně bylo přidáno 1 µl TE pufru o koncentraci 0,5 mol/l, 10 µl octanu sodného a 330 µl 96% ethanolu. Vše bylo promícháno a uloženo do mrazničky na 15 minut. Po uplynutém čase proběhla centrifugace v chlazené centrifuze při 2500 g, 30 min. při 4 °C. Byl odpipetován supernatant do odpadu, zkumavka byla otočena krátce na vatu pro odsátí a krátce stočena na centrifuze.

Po vyjmutí bylo do zkumavky přidáno 500 µl 70% ethanolu a krátce zvortexováno a zcentrifugováno při 2500 g, 15 min. při 4 °C. Supernatant byl zase odpipetován do odpadu a zkumavka byla otočena krátce na vatu a stočena na centrifuze. Znovu bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu, krátce zvortexováno a centrifugováno při 2500 g, 15 min. při 4 °C, do odpadu byl odpipetován supernatant, zkumavka byla otočena na vatu a proběhlo sušení ve flowboxu 5 min. Nakonec bylo přidáno 50 µl H₂O, zvortexováno 20 s a inkubováno 5 min. při 70 °C.

4.2.4 Testování vlivu složení PCR směsi na analýzu HRM

Při optimalizaci byly použity 2 druhy PCR master mixů: kit Master mix GoTaq® qPCR Master Mix a master mix připravený smícháním individuálních reagensů (Thermo Scientific).

4.2.4.1 Testování reakční směsi GoTaq® qPCR Master Mix

Objem celkové směsi pro rozpipetování jednotlivých reakcí byl stanoven:

$$x \cdot 1,17 \cdot y$$

x ... počet vzorků

1,17 ... pipetovací faktor

y ... objem jedné PCR reakce

PCR mix byl připraven napipetováním reagensů podle **Tab. VI**. Objem pipetování byl stanoven vzorcem viz výše.

Tab. VI: Reakční směs GoTaq® qPCR Master Mix (2)

Reagencie	Faktor ředění	Objem [µl]
H ₂ O	-	
Promega pufr GoTaq	2	
PM	200	
Celkem	-	

Na jednu reakci byl stanoven celkový objem 10 μ l. Pipetovalo se 9 μ l reakční směsi buď do jednotlivých PCR zkumavek nebo do 96 jamkové destičky. K reakční směsi byl přidán 1 μ l DNA.

4.2.4.2 Testování reakční směsi Thermo Scientific

V případě tohoto master mixu nebyl použitý komerční kit, ale jednotlivé reagenty uvedené v **Tab. VII**. Objem pipetování byl stanoven vzorcem viz výše.

Tab. VII: Reakční směs Thermo Scientific

Reagencie	Faktor ředění	Objem [μ l]
H ₂ O		
PCR pufr 10x	10	
Eva Green 20x	20	
Thermo <i>Taq</i> DNA polymeráza 5 U/ μ l	100	
dNTPs, 25 mM	125	
Primerová směs PM, 50 μ m každý primer	200	
Celkem		

Celkový objem jedné reakce byl 10 μ l. Do jednotlivých PCR zkumavek se pipetovalo 9 μ l PCR reakční směsi a poté byl přidáno 1 μ l DNA.

K amplifikaci byly využívány primerové směsi PM 496, 498. Veškeré primerové směsi byly připraveny do mikrozkušavek na chladicí destičce ze zásobní koncentrace 100 μ m v poměru 1:1 (Forward : Reverse). Primerové směsi jsou vedené v **Tab. VIII**.

Tab. VIII: Primery používané k amplifikaci

Lokus	Označení primerové směsi	Sekvence primerů (5' → 3')	Zdroj
<i>D18S51</i>	PM 496	F: TGAGTGACAAATTGAGACCTT R: GTCTTACAATAACAGTTGCTACTATT	Nicklas <i>et al.</i> 2011
<i>vWA</i>	PM 498	F: ATAATCAGTATGTGACTTGGATTGA R: ATAGGATGGATGGATAGATGGA	Nicklas <i>et al.</i> 2011

4.2.5 Testování vhodnosti termocykléru pro HRM

PCR amplifikace proběhla v termocyklérech LightCycler® 480 Instrument II (Roche) a Bio-Rad CFX96. Analyzované vzorky byly amplifikované podle následujících časových a teplotních intervalů (Tab. IX a X).

Tab. IX: Časový a teplotní interval PCR reakce (1)

Krok PCR	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace	95 °C	2:00	1
Denaturace	95 °C	0:03	40
Annealing	60 °C	0:30	
HRM	65–95 °C 0,3 °C inkrement (0,5 °C inkrement)*	0:05	1
Konec reakce	37 °C	0:01	1

* Inkrement použitý v LightCycler® 480 Instrument II

Tab. X: Časový a teplotní interval PCR reakce (2)

Krok PCR	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace	95 °C	2:00	1
Denaturace	95 °C	0:03	24
Annealing	60 °C	0:30	
Prodloužení řetězce	72 °C	2:00	
HRM	65–95 °C 0,3 °C inkrement	0:05	1
Denaturace	95 °C	0:03	4
Annealing	60 °C	0:30	
Prodloužení řetězce	72 °C	2:00	
HRM	65–95 °C 0,3 °C inkrement	0:05	1
Konec reakce	37 °C	0:01	1

} 4x opakování

4.2.6 Nastavení Bio – Rad Precision Melt Analysis Software

Nejprve bylo využito parametrů, které byly v programu přednastaveny pro SNP. Následně byly parametry upraveny ručně s ohledem na počet klastrů pro pozdější srovnání. Hodnoty přednastavené jsou znázorněné v **Tab. XI**:

Tab. XI: Parametry pro klastrování 1 (přednastaveny softwarem)

pre-melt range [°C]	post-melt range [°C]	Temperature-shifted bar height	T _m difference threshold [°C]	Melt curve shape sensitivity
71,7	78,1	0,2	0,15	50
72,2	78,6			

Typicky jsou tyto parametry využity pro analýzu SNP. Poté byly jednotlivé hodnoty změněny a nastaveny ručně na hodnoty zobrazené v **Tab. XII**:

Tab. XII: Parametry pro klastrování (2) (nastaveny ručně)

	pre-melt range [°C]	post-melt range [°C]	Temperature-shifted bar height	Melt curve shape sensitivity	T _m difference threshold [°C]
<i>vWA</i>	66,3	79	0,5	0,15	90
	67,2	79,9			
<i>DI8S51</i>	71,8	77,5	0,2	0,15	90
	72,5	78,1			

Na základě nastavených parametrů byly zanalyzovány křivky tání jednotlivých genotypů u lokusů *vWA* a *DI8S51*. Po vyhodnocení softwarem byly jednotlivé vzorky rozřazené do klastrů.

4.3 Seznam použitých chemikálií a reagensí

deionizovaná voda v kvalitě pro molekulární biologii

DNA-ExitusPlus (AppliChem)

ethanol (90%, 70%)

EvaGreen (Biotium)

GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)

Magnesium chlorid 25 mM (Thermo Scientific)

Nuklelotidy dNTPs 25 mM (Bioline)

octan sodný 3M

Primery (ozn. 999, 1000, 1003, 1004) (Generi biotech)

Qubit® ds DNA Reagent *200x concentrate in DMSO*

Qubit dsDNA HS Buffer

TE pufr (10 mM Tris a 1 mM EDTA)

Thermo-Start PCR buffer 10x (Thermo Scientific)

Thermo-Start Taq DNA polymerase 5 U/μl (Thermo Scientific)

4.4 Přístrojové vybavení laboratoře

Centrifuga Centrifuge 5430 (Eppendorf)

Centrifuga Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf)

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Chladnička a mraznička (Gorenje)

LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche)

Spectrofotometer ND 1000 (Biotech)

Precision Melt analysis software (Bio-Rad)

Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)

Termostat Bio TDB – 100 (BioSan)

Vortex mixer VX-200 (Labnet)

5 Výsledky

Cílem všech prováděných experimentů bylo zhodnocení metody HRM jako nástroje k analýze mikrosatelitových lokusů.

5.1 Koncentrace, čistota a ředění jednotlivých vzorků

Výsledky měření, které proběhlo na přístroji Nanodrop ND-1000 a následně ředění jednotlivých vzorků je znázorněno v **Příloze 3**.

Výsledky měření koncentrací vzorků 13157, 13158, 13184 na přístroji Qubit® 2.0. je uvedeno v **Tab. XIII**.

Tab. XIII: Změřené výchozí koncentrace na fluorometru

DNA	Výchozí koncentrace změřená na fluorometru [ng/μl]
13157	61
13158	197
13184	172

Vzorky byly z výchozí koncentrace naředěny na jednotnou koncentraci 5 ng/μl a dále naředěny na ředící řadu viz kapitola 4.2.2..

Měření čistoty a koncentrace po provedení ethanolové precipitace u vzorků 13157, 13158, 13184 na přístroji NanoDrop poměrem optické hustoty 260/280 a poté na přístroji Qubit® 2.0. je znázorněno v **Tab. XIV**

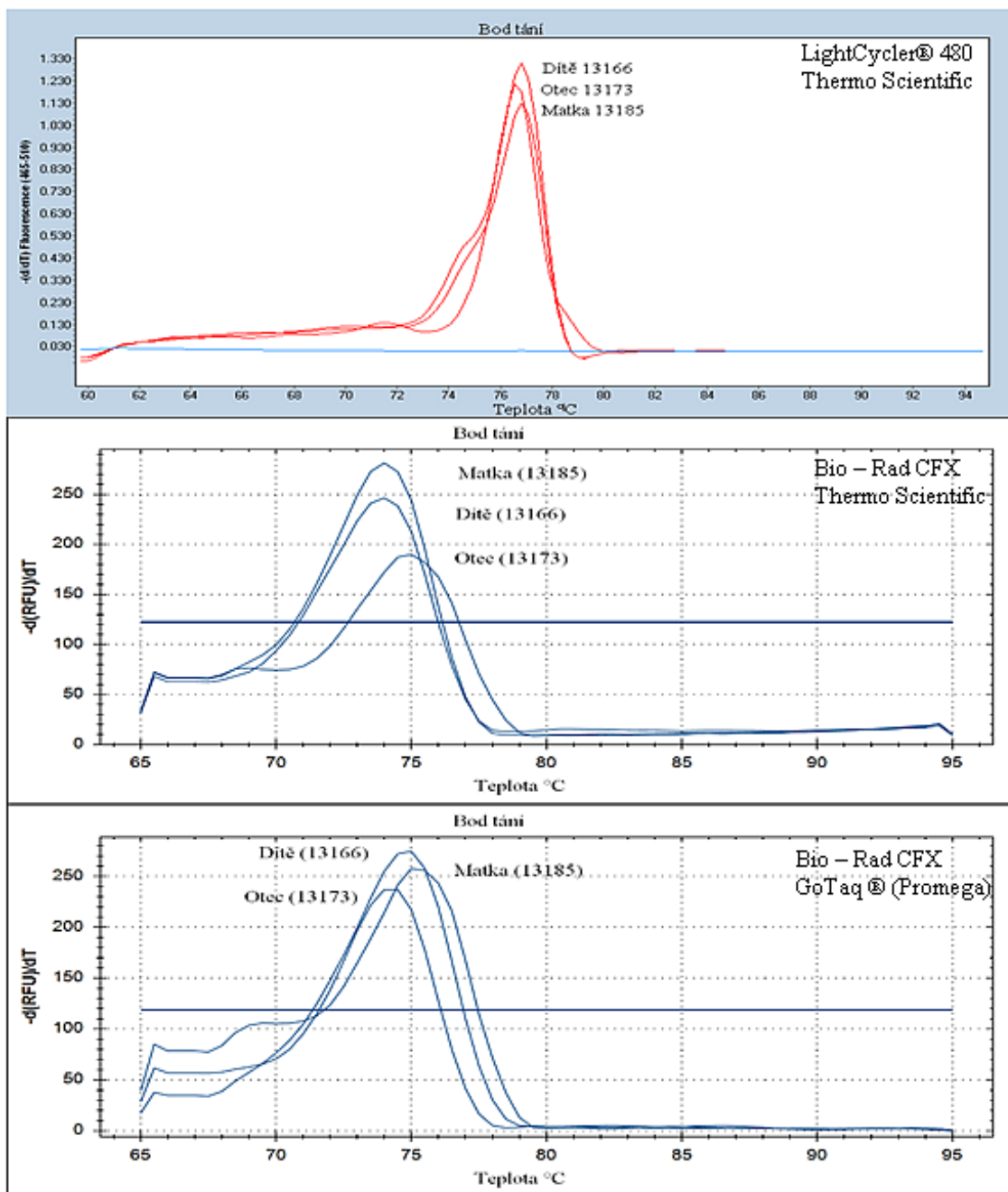
Tab. XIV: Změřená koncentrace a čistota pročištěné DNA ethanolovou precipitací

DNA	Čistota (260/280)	Koncentrace [ng/μl] (spektrofotometr)	Koncentrace [ng/μl] (fluorometr)
13157	1,58	25,73	0,90
13158	1,62	29,77	3,26
13184	1,69	78,90	4,24

Pro další práci s koncentracemi byla využívána koncentrace naměřená fluorometrem a vzorky byly pro další testování naředěny na jednotnou koncentraci 0,5 ng/μl (tato koncentrace je dále zobrazena jako 1/10) a poté naředěny na koncentrace z původní ředící řady. Tedy na 1/256 a 1/512 (odpovídající $3,9 \cdot 10^{-2}$ ng/μl a $1,9 \cdot 10^{-2}$ ng/μl)

5.2 Srovnání Termocyklérů a PCR reakčních směsí

Srovnávání cykléru a PCR master mixů patřilo k optimalizačním experimentům, jejichž výsledky sloužily k dalším prováděným pokusům s HRM. Testovány byly termocykléry: LightCycler® 480 Instrument II (Roche) a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). DNA využitá k testování byla trojice: matka (13185), otec (13173) a dítě (13166) pro kontrolu mendelovské dědičnosti znaků a jako negativní kontrola byla použita DEPC voda. Pro amplifikaci byl použit PCR program 1 (kapitola 4.2.5) a master mix Thermo Scientific (složení viz 4.2.4.2). V další části srovnávání byl využit také GoTaq® (Promega) master mix (viz 4.2.4.1). Cílené lokusy byly *vWA* a *D18S51* (primerové směsi viz 4.2.4). Výsledky srovnávání jsou vedeny v **Obr. 9**.



Obr 9: Srovnání Termocyklérů za použití Thermo Scientific master mixu a srovnání Thermo Scientific a GoTaq® (Promega) v CFX96 cykléru (lokus ν WA): V horní části obrázku (A, B) je vyobrazeno srovnání 2 termocyklérů - CFX96 a LightCycler® 480. Ve spodní části (B, C) je pak srovnání dvou různých mixů, kdy amplifikace proběhla v termocykléru CFX96 (Basic program). Jednotlivé DNA se již jeví odlišně na základě profilu tání křivek.

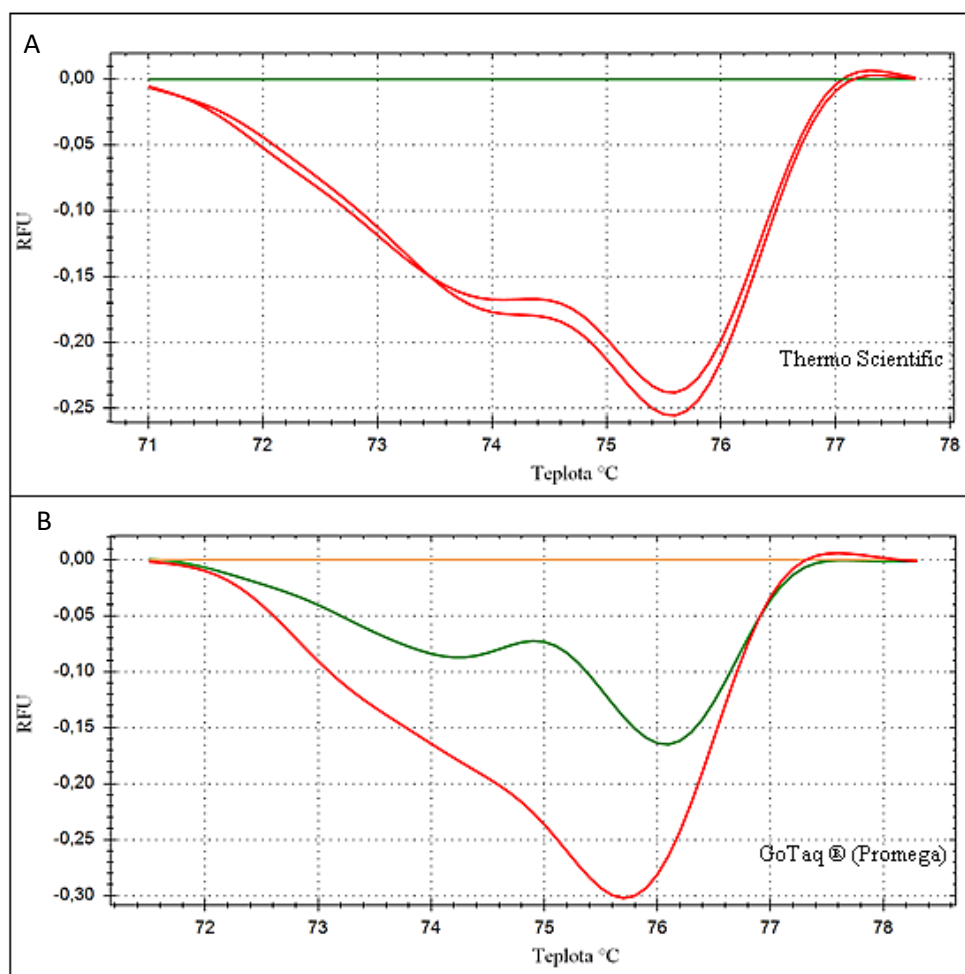
Hodnoty T_m :

část A: 13185 – 76,13 °C; 13166 – 76,87 °C; 13173 – 76,59 °C.

část B: 13185 – 74 °C; 13166 – 74 °C; 13173 – 75 °C

část C: 13185 – 74,50 °C; 13166 – 75,50 °C; 13173 – 75,50 °C

Cílem další optimalizační části byl výběr PCR reakční směsi. Srovnány byly dvě směsi: GoTaq® qPCR Master Mix (komerční kit) a Thermo Scientific master mix (namíchaná z dílčích reagensí) (pipetované objemy viz kapitola 4.2.4). Pokud by namíchaná směs z reagensí ThermoScientific měla stejné parametry jako dražší komerční směs, používali bychom dále jen míchanou směs. Nastavení cykléru, DNA a PM zůstalo shodné. Srovnání proběhlo ve dvou softwarech, které nabízí cyklér Bio-Rad CFX96, Basic (**Obr. 9**) a Precision Melt Analysis (**Obr. 10**).



Obr 10: Srovnání reakčních směsí v přístroji CFX96 (lokus *vWA*): Srovnání dvou master mixů. Vyhodnocení proběhlo v programu Precision Melt Analysis. V případě master mixu Thermo Scientific (A) program nerozpoznal tři rozdílné DNA a dvě vyhodnotil jako shodné. Naopak při použití GoTaq® (B) je již patrné, že se jedná o tři různé DNA. Program správně přiřadil tři různé klastry. V obou případech byl vybrán vzorek 13173 jako referenční (rovná čára) a ostatní vzorky se řadily podle něj.

Master mix GoTaq® (Promega) poskytl mnohem lepší výsledky při použití v HRM analýze. Program Precision Melt Analysis s přednastavenými hodnotami pro SNP (viz kapitola 4.2.6) přiřadil tři různé klastry a rozlišil tak všechny DNA (**Obr. 10B**). V případě míchaného mixu program odlišil DNA pouze dvě. (**Obr. 10A**).

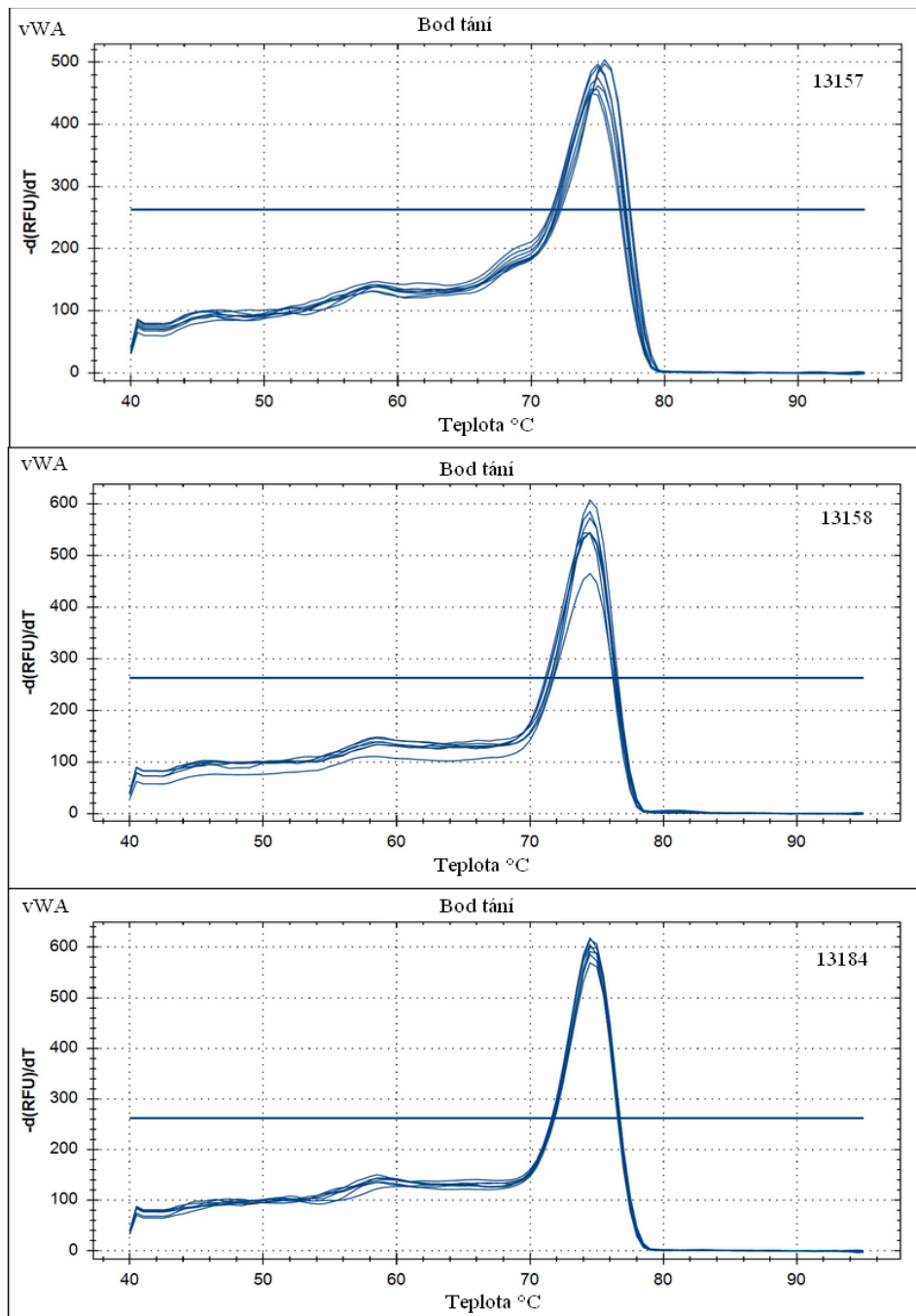
Zhodnocení:

Na základě těchto experimentů byl pro další testování vybrán cyklér CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), který nabízí větší možnosti v post-PCR detekci. Výsledky amplifikace jsou totožné, avšak v případě LightCycler® 480 (**Obr. 9A**) hůře čitelné. Reakční směs byla vybrána GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), která poskytla mnohem lepší výsledky, co se týče rozlišitelnosti různých DNA (**Obr. 10B**).

5.3 Vliv rozdílné koncentrace vstupní DNA na chování křivek tání a teplotu T_m

Na počáteční testování profilů křivek byl vybrán PCR protokol 1 (viz kapitola 4.2.5), reakční směs GoTaq® qPCR Master Mix (rozpis viz kapitola 4.2.4.2. Testovány byly lokusy *vWA* a *D18S51*; využití primerové směsi 496 a 498 jsou uvedené v kapitole 4.2.4.3. K testování byly využity 3 DNA vzorky buněčných linií (13157, 13158, 13184) a jako negativní kontrola sloužila DEPC voda.

Cílem bylo zjistit stabilitu tvaru křivky s klesajícím množstvím DNA v reakci. Pokud by tvar křivky byl stálý i při redukováném množství vstupní DNA, používali bychom dále jen minimální přípustné množství DNA s ohledem na zachování DNA na další projekty. Vzorky byly naředěny z původní koncentrace 5 ng/μl na ředící řadu 1–1/512. Ukázka generovaných křivek viz **Obr. 11 a Obr. 12**, kde jsou znázorněny DNA 13157, 13158 a 13184 a výsledné profily křivek pro oba testované lokusy.



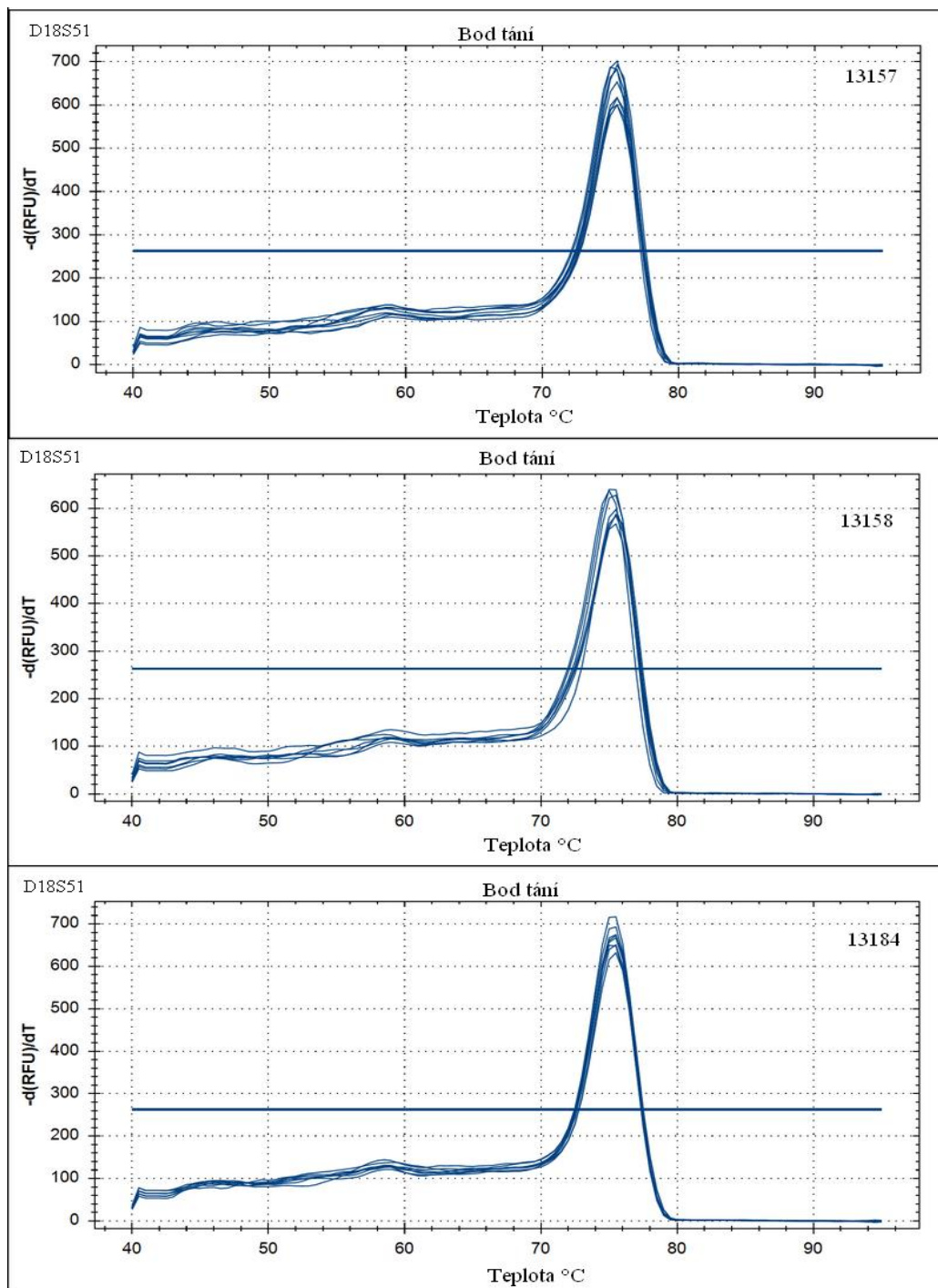
Obr. 11: Profil křivek tání za rozdílného ředění na lokusu vWA: Profil generovaných křivek o různé koncentraci (ředění 1-1/512) na mikrosatelitovém lokusu vWA se jeví vizuálně i podle teplot T_m relativně stabilně.

Hodnoty T_m :

13157: 1 (74 °C); 1/2–1/16 (75 °C); 1/32 (75,5 °C); 1/64 (75 °C); 1/125 (75,5 °C); 1/256–1/512 (75,5 °C)

13158: 1–1/2 (74,5 °C); 1/4 (74,5 °C); 1/8–1/512 (74,5 °C)

13184: 1–1/512 (74,5 °C)



Obr. 12: Profil křivek tání za rozdílného ředění na lokusu *D18S51*: I na lokusu D18S51 se profil generovaných křivek na obou mikrosatelitových lokusech zdá po vizuálním zhodnocení napříč ředěním stabilní.

Hodnoty T_m :

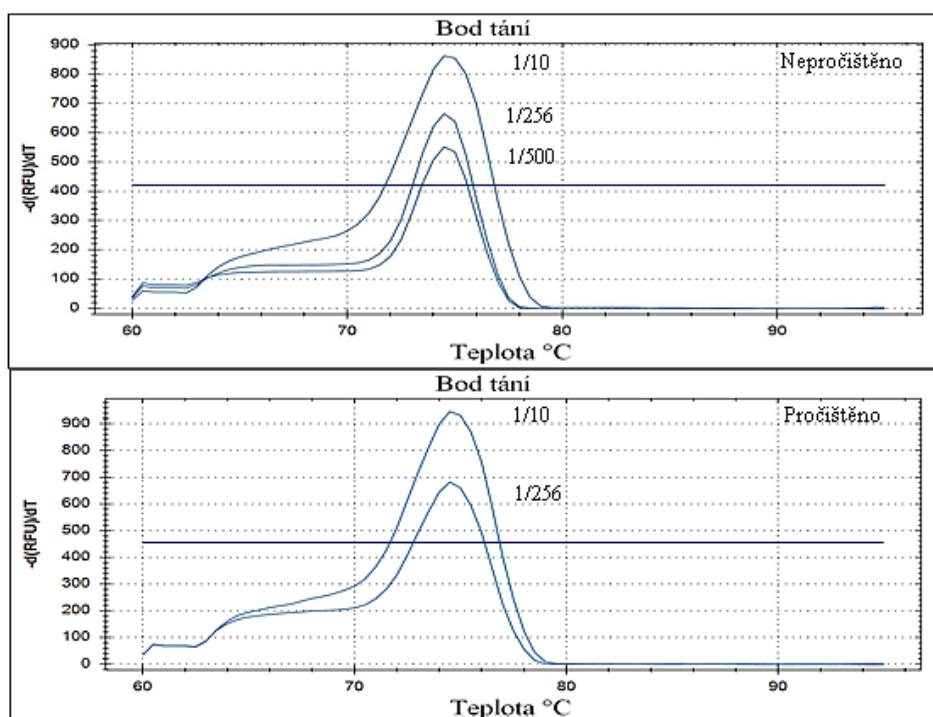
13157: 1–1/512 (75,5 °C)

13158: 1–1/512 (75,5 °C)

13184: 1–1/4 (75 °C); 1/8–1/512 (75,5 °C)

Zhruba po třech měsících byla využita stejná trojice archivované DNA (13157, 13158, 13184) k testování teploty T_m . Testovaly se 3 koncentrace z ředící řady (1/10, 1/256 a 1/512) a používán byl PCR protokol (2) (viz kapitola 4.2.5).

Cílem bylo testování vlivu počtu PCR cyklů na teplotu T_m . Pokud by se T_m měnila v závislosti na počtu cyklů PCR, musela by být PCR dále optimalizována pro nalezení optimálního množství vstupní DNA a počtu cyklů PCR. První zaznamenaná teplota byla po 25 cyklech a poté po 5 cyklech až na konečnou teplotu T_m po 45. cyklu. Výsledky testování a veškeré hodnoty T_m jsou uvedené v **Příloze 2** a **Příloze 3**. Následně se přistoupilo i k testování vlivu čistoty DNA na HRM analýzu, jelikož chování teploty tání bylo nestálé. Pročištění bylo provedeno ethanolovou precipitací, viz kapitola 4.2.3. Srovnané profily křivek tání za rozdílného ředění a čistoty po 45. cyklu PCR reakce jsou zaznamenané na **Obr. 13** a **14**. Výsledné hodnoty teploty T_m z různých cyklů a rozdílného ředění jsou zobrazeny v **Příloze 2** a **Příloze 3**. Statistické zhodnocení pak viz **Obr. 15**.



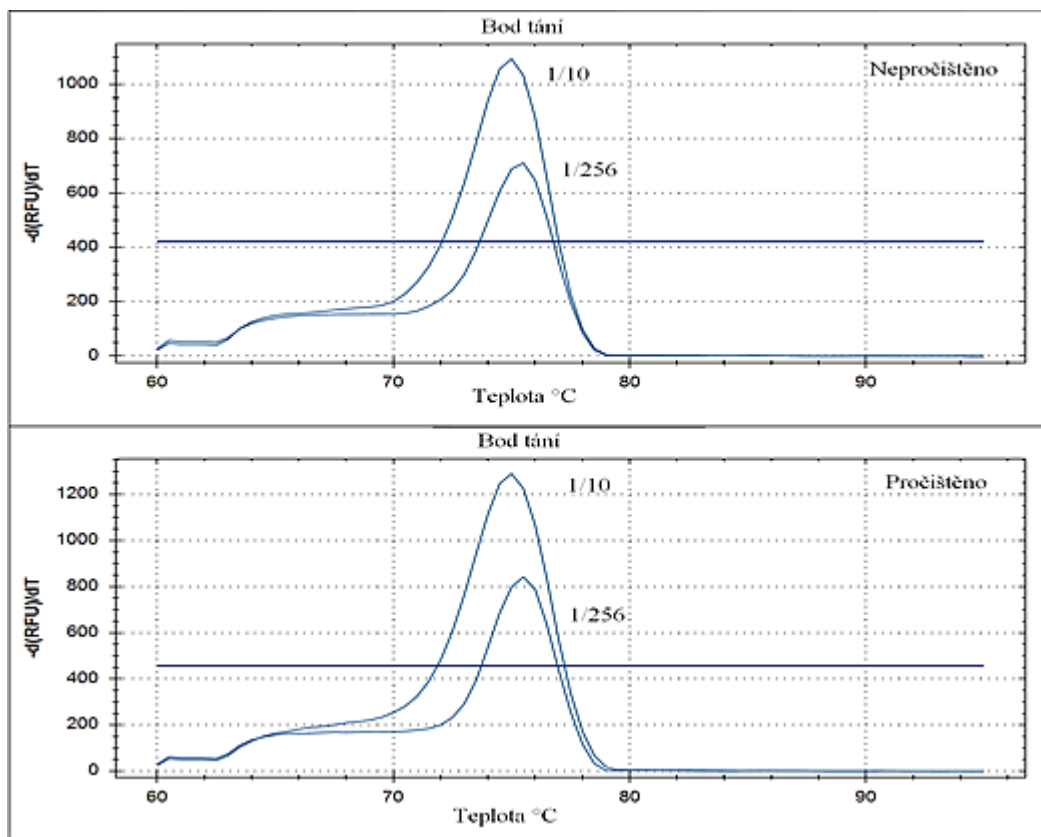
Obr. 13: Profil křivek tání DNA 13158 při rozdílném ředění na lokusu vWA (nepročištěno/pročištěno): Křivky tání na lokusu vWA vykazují stabilní tvar při různých koncentracích DNA. Pročištění nemělo na křivky žádný vliv, nijak se nezměnila poloha v grafu. Hodnota 1/512 se v případě pročištění neamplifikovala, což naznačuje, že dalším čištěním dochází ke ztrátám DNA.

Hodnoty T_m :

Pročištěno: 1/10–1/512-75 °C

Nepročištěno: 1/10–1/256-75 °C

Na lokusu *DI8S51* pročištění opět nemělo vliv a nijak nezměnilo tvar křivek. (Obr. 14).



Obr. 14: Profil křivek tání DNA 13158 při rozdílném ředění na lokusu *DI8S51* (nepročištěno/pročištěno): Srovnání ředění koncentrací na lokusu *DI8S51*, v tomto případě největší srovnání ředění 1/10 (o koncentraci 0,5 ng) a 1/256. Pročištění nemělo žádný vliv na stabilitu profilu či polohu křivek v grafu.

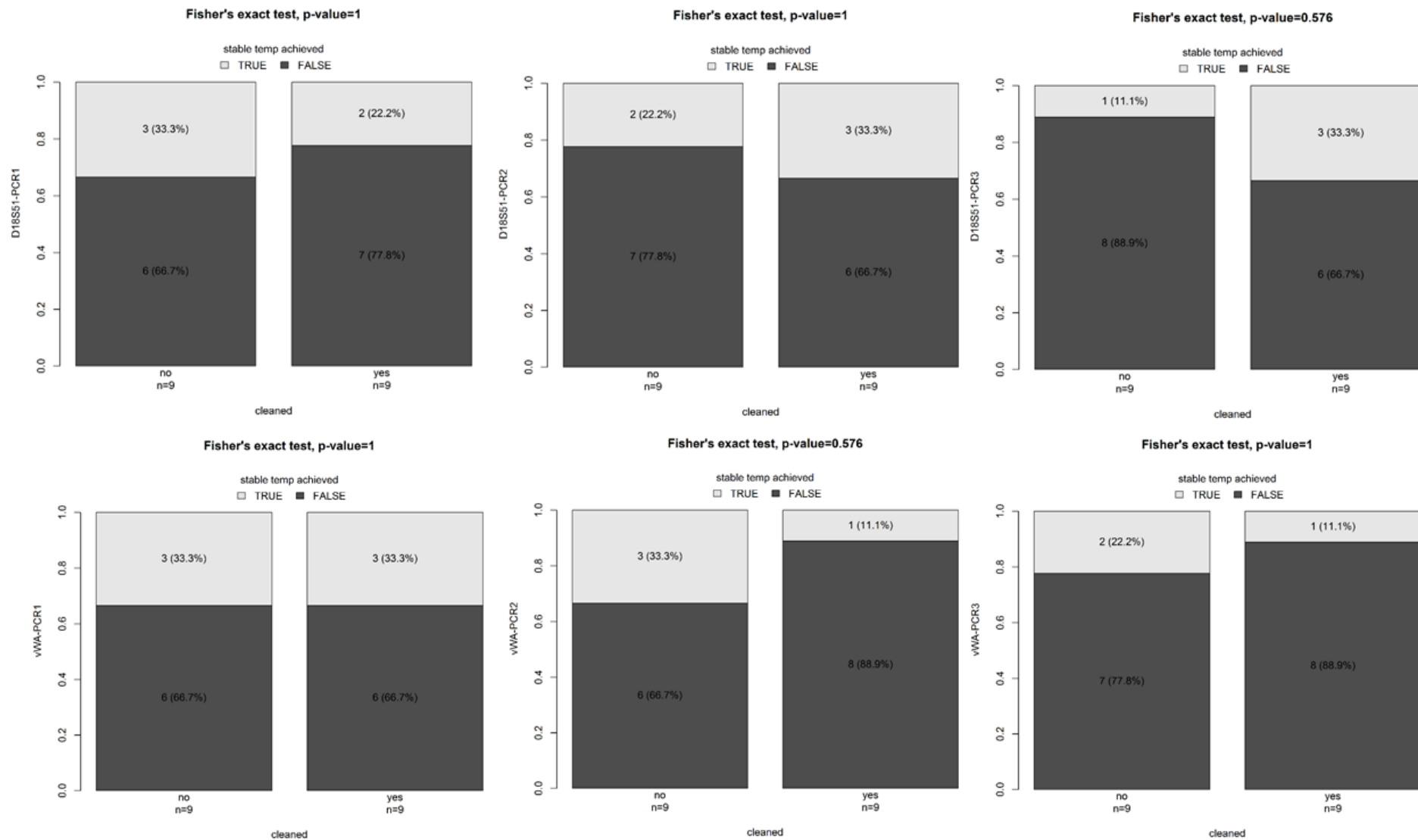
Hodnoty T_m :

Nepročištěno: 1/10-75 °C, 1/256-75,5 °C

Pročištěno: 1/10-75 °C, 1/256-75,5 °C

Výsledné teploty T_m pro všechny testované DNA, jednotlivá ředění a testované cykly jsou zaznamenány viz **Příloha 2** a **Příloha 3**.

Bylo statisticky vyhodnoceno, zda teplota T_m dosáhne ustálení během 45 cyklů a zároveň, zda na ustálení teploty má vliv přečištění DNA. Celkové zhodnocení teploty T_m pro oba lokusy je vyobrazeno na **Obr. 15**.



Obr. 15: Zhodnocení lokusu *D18S51* a *vWA* (nepročištěno/pročištěno) na dosažení stabilní teploty: Stabilní teploty bylo dosaženo pouze v 11-33 % případů. Z grafů vyplývá, že pročištění DNA mělo spíše negativní vliv a dosáhnout stabilní teploty se podařilo pouze u *D18S51* v PCR 2 a 3.

Další parametr, který by mohl ovlivnit analýzu HRM při testování mikrosatelitů, je první naměřená teplota. Podle **Tab. XV a XVI** můžeme usuzovat, že nejstabilněji se jeví ředění 1/10 a 1/256, které vykazuje nejmenší rozptyl hodnot a vždy byla nějaká teplota naměřena. Hodnota 1/512 se jeví již nízká na to, aby vykazovala stabilní výsledky.

Tab. XV: První naměřená teplota na lokusu *vWA*

PCR běhy	13157/10	13157/256	13157/512	13158/10	13158/256	13158/512	13184/10	13184/256	13184/512
1	76	76	75,5	75,5	75	75	75,5	75	75
2	76	75	74,5	75	76	74,5	75	75	75
3	75,5	75,5	74,5	75,5	75		75	74	

Tab. XVI: První naměřená teplota na lokusu *DI8S51*

PCR běhy	13157/10	13157/256	13157/512	13158/10	13158/256	13158/512	13184/10	13184/256	13184/512
1	76,5	76,5	76,5	76,5	76	76	76,5	76	75,5
2	77	75,5	75,5	76	76	74,5	76	75,5	74
3	76,5	75,5		76,5	76		76	75,5	

Zhodnocení

Veškeré pokusy byly zopakovány minimálně třikrát. Křivky tání se chovají stabilně při různém ředění (**Obr. 11 a 12**). Při podrobnějším testování teploty T_m po několika měsících byl již rozdíl v hodnotách T_m pro stejnou DNA vyšší, schopnost amplifikovat nejmenší koncentraci klesala s každým dalším pokusem a hodnoty nevykazovaly takovou stabilitu jako v přecházejícím pokusu. Pozitivní vliv nemělo ani pročištění DNA ethanolovou precipitací. Nijak nestabilizovalo chování teploty T_m a dokonce mělo v případě lokusu *vWA* negativní vliv (viz **Obr. 16**). Zdá se, že u teplot disociace dochází k postupnému snižování hodnot s větším ředěním. Hodnota 1/512 se zde jeví již příliš nízká na to, aby generovala stabilní výsledky. Často nedošlo k amplifikaci vůbec (viz **Tab. XV a XVI**). Chování teploty T_m se však jeví nepředvídatelně a přečištění DNA od solí to nijak nezměnilo. Dá se tedy usuzovat, že koncentrace solí u HRM analýzy nehraje až takový vliv anebo že v původním izolátu DNA již bylo solí zanedbatelné množství.

Bylo provedeno málo opakování pro jednotlivé koncentrace, aby mohly být vyvozené jednoznačné závěry, ale všechny tyto prokázané nestability mohou mít vliv na genotypizaci. Rozdílná koncentrace u DNA se může jevit na profilu křivky tání jako naprosto jiný genotyp, vzhledem k nestabilnímu chování teploty T_m .

5.4 Metoda HRM jako nástroj ke genotypizaci

Na základě nastavení softwaru byly jednotlivé vzorky DNA řazeny do klastrů podle tvarů křivek tání. Byla vytvořena hlavní hypotéza, se kterou se přistupovalo k samotnému hodnocení výsledných klastrů (shluků). Pokus byl proveden 3x, aby bylo možné zhodnotit reprodukovatelnost utvořených klastrů. Genotyp byl zjištěn standardním vyhodnocením na kapilární elektroforéze na Ústavu experimentální botaniky a je popsán jako spojení číselných hodnot alel (homozygot alel 15 a 15 je zobrazen jako 1515).

Hypotéza:

1. Neočekáváme, že metoda HRM bude schopna rozlišit všechny genotypy mikrosatelitů (u testovaného souboru je to 13 teoreticky možných genotypů u *vWA*, 25 genotypů u *DI8S51*). Při slučování genotypů do shluků, klastrů, očekáváme, že při formování homoduplexů a heteroduplexů není ani tak důležitá délka alely, ale spíše rozdíl délek alel u heterozygota (**Tab. XVII**)

Alternativní hypotézy:

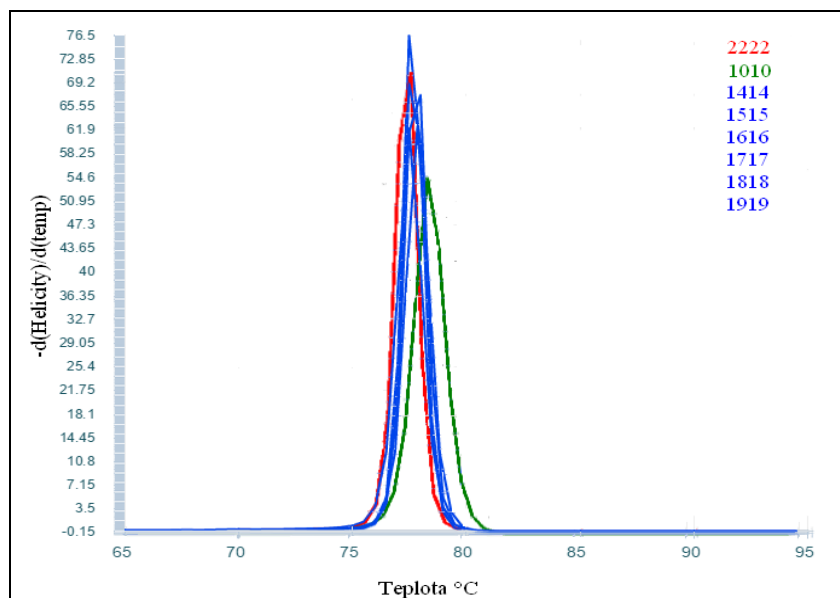
1. Záleží na délce alel
2. Záleží na délce alel i na rozdílu délek alel u heterozygota
3. Nezáleží na délce alel, ale stejně dlouhé alely homozygota se mohou lišit kvůli mikrovariantám

Tab. XVII: Očekávané klastry podle hlavní hypotézy

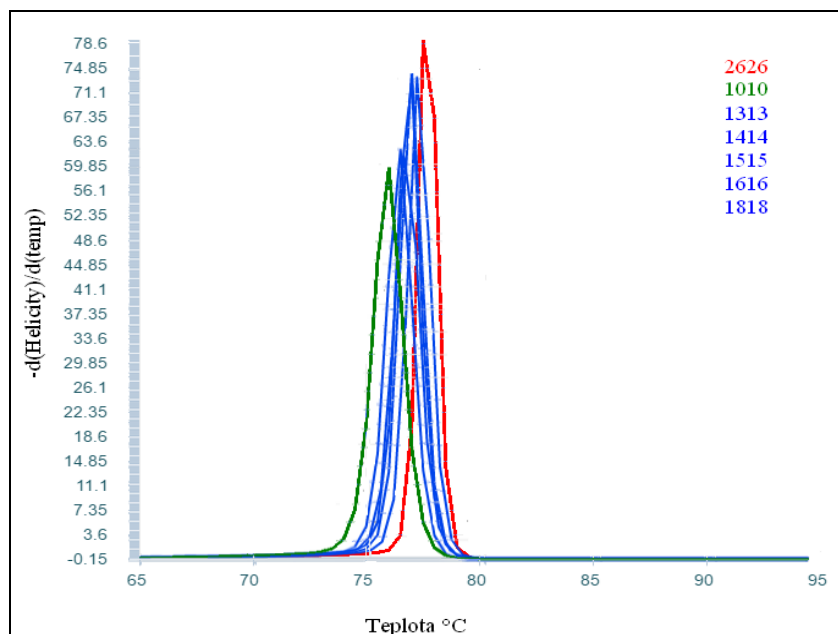
<i>DI8S51</i>						<i>vWA</i>					
Alely	rozdíl alel	klastr	alely	rozdíl alel	klastr	alely	rozdíl alel	klastr	alely	rozdíl alel	klastr
1616	0	1	1417	3	4	1414	0	1	1418	4	4
1414	0	1	1619	3	4	1515	0	1	1519	4	4
1818	0	1	1316	3	4	1616	0	1	1721	4	4
1515	0	1	1215	3	4	1717	0	1	1419	5	4
1313	0	1	1317	4	5	1818	0	1			
1718	1	2	1721	4	5	1919	0	1			
1213	1	2	1217	5	6	1516	1	2			
1415	1	2	1318	5	6	1617	1	2			
1718	1	2	1420	6	7	1718	1	2			
1618	2	3	1319	6	7	1819	1	2			
1315	2	3	1221	9	8	1416	2	3			
1517	2	3	1222	10	8	1618	2	3			
1518	3	4				1719	2	3			

Pro předběžné zhodnocení hypotézy byla provedena simulační *in silico* reakce HRM, s využitím softwaru uMelt (<https://www.dna.utah.edu/umelt/um.php>), který je využíván pro

predikci křivek tání. Kvůli omezení softwaru, který je designován na rozlišení SNP a nezvládá délkové polymorfismy v heterozygotních genotypech STR, byla provedena simulace pouze homozygotních genotypů *vWA* (**Obr. 16**) a *D18S51* (**Obr. 17**) s rozdílnými délkami.



Obr. 16: Simulace HRM homozygotních genotypů lokusu *vWA* v softwaru uMelt: Srovnání testovaných genotypů simulační HRM analýzou v predikčním softwaru křivek tání uMelt. Testované genotypy byly srovnány s extrémními homozygoty 22/22 (červeně) a 10/10 (zeleně).



Obr. 17: Simulace HRM homozygotních genotypů lokusu *vWA* v softwaru uMelt: Srovnání testovaných genotypů na lokusu *D18S51* simulační HRM analýzou pomocí predikčního softwaru uMelt. Testované genotypy (modře) byly srovnány s extrémními homozygoty 26/26 (červeně) a 10/10 (zeleně).

Software uMelt (<https://www.dna.utah.edu/umelt/um.php>) neumožňuje automatické klastrování. Mezi testovanými genotypy (modře) není v případě *vWA* (Obr. 16) téměř rozdíl v profilu a teplotě tání, u *D18S51* (Obr. 17) je rozdíl větší, ovšem i tak se chovají při tání dvoušroubovice podobně. Výrazněji se ale odlišuje genotyp 10/10 (zeleně) v obou případech. Můžeme tedy říct, že na délce opakovaného motivu nejspíš záleží a vyslovená hlavní hypotéza se zdá být chybná. Nicméně využití programu uMelt pro predikci u STR nebylo zatím v literatuře popsáno, a proto hypotézu zatím nezavrhneme.

5.4.1 Schopnost rozlišení genotypů na lokusu *vWA* a *D18S51*

Genotypy byly hodnoceny na 47 vzorcích (vyizolované pracovníky IMTM ústavu) Použitá PCR reakční směs byla GoTaq® qPCR Master Mix, užitá primerová směs pro lokus *vWA* PM 498 (objemy pipetování viz kapitola Příprava reakční směsi 4.2.4). Veškeré pokusy byly prováděné na Termocykléru Bio-Rad CFX96, PCR protokol byl použit č.1 (viz 4.2.5). Konečné vyhodnocení proběhlo v programu Precision Melt Analysis (parametry nastavení jsou uvedeny v kapitole 4.2.6).

Program Precision Melt Analysis podle nastavených parametrů (SNP default) a parametrů ručně nastavených rozřídil genotypy do klastrů na základě tvarů křivek tání. Veškeré výsledky přiřazených klastrů pro genotypy dvou testovaných mikrosatelitů u 47

vzorků DNA jsou uvedeny v **Tab XVIII** a **Tab. XIX**. Ve sloupcích je uvedeno identifikační číslo vzorku, genotyp a číslo klastru. Vzorky, které spadly do stejného klastru, jsou vyznačeny barevně.

Tab. XVIII: Výsledky klastrování jednotlivých genotypů lokusu *vWA*

PCR 1 sample	přednastaveno cluster	genotype	PCR1 sample	nové nastavení cluster	genotype	PCR2 sample	přednastaveno cluster	genotype	PCR2 sample	nové nastavení cluster	genotype	PCR 3 sample	přednastaveno cluster	genotype	PCR 3 sample	nové nastavení cluster	genotype
1238	5	1818	1238	5	1818	1238	4	1818	1238	5	1818	1238	2	1818	1238	4	1818
12555	18	1721	12555	17	1721	1270	2	1515	1270	9	1515	1270	4	1515	1270	3	1515
1270	2	1515	1270	2	1515	1306	2	1616	1306	2	1616	1306	2	1616	1306	2	1616
1306	3	1616	1306	3	1616	1382	3	1919	1382	2	1919	1382	2	1919	1382	2	1919
1382	2	1919	1382	2	1919	14619	2	1719	14619	2	1719	14619	5	1719	14619	8	1719
14619	3	1719	14619	2	1719	14620	2	1717	14620	2	1717	14620	2	1717	14620	2	1717
14620	4	1717	14620	4	1717	14621	2	1717	14621	2	1717	14621	2	1717	14621	3	1717
14621	4	1717	14621	4	1717	14714	2	1616	14714	2	1616	14714	2	1616	14714	2	1616
14714	3	1616	14714	3	1616	2211	2	1717	2211	2	1717	2211	2	1717	2211	2	1717
2211	4	1717	2211	4	1717	2212	4	1717	2212	5	1717	2212	5	1717	2212	8	1717
2212	4	1717	2212	4	1717	2592	3	1616	2592	2	1616	2592	7	1616	2592	13	1616
2592	3	1616	2592	3	1616	2596	3	1717	2596	2	1717	2596	5	1717	2596	14	1717
2596	3	1717	2596	2	1717	2927	2	1519	2927	2	1519	2927	2	1519	2927	2	1519
2927	2	1519	2927	3	1519	2946	7	1515	2946	6	1515	2946	11	1515	2946	19	1515
2946	2	1515	2946	2	1515	2958	2	1616	2958	2	1616	2958	2	1616	2958	2	1616
2958	3	1616	2958	3	1616	3115	2	1717	3115	2	1717	3115	2	1717	3115	2	1717
3115	4	1717	3115	4	1717	3544	2	1717	3544	2	1717	3544	2	1717	3544	4	1717
3544	4	1717	3544	4	1717	3963	2	1616	3963	2	1616	3963	2	1616	3963	2	1616
3963	3	1616	3963	3	1616	3975	2	1818	3975	2	1818	3975	2	1818	3975	2	1818
3975	5	1818	3975	5	1818	4539	2	1516	4539	2	1516	4539	2	1516	4539	2	1516
4539	14	1516	4539	12	1516	4709	3	1616	4709	3	1616	4709	2	1616	4709	2	1616
4709	3	1616	4709	3	1616	5124	9	1616	5124	8	1616	5124	2	1616	5124	2	1616
5124	3	1616	5124	3	1616	5213	2	1717	5213	2	1717	5213	2	1717	5213	2	1717
5213	4	1717	5213	4	1717	5401	5	1418	5401	4	1418	5401	6	1418	5401	18	1418
5401	11	1418	5401	9	1418	5491	3	1718	5491	3	1718	5491	2	1718	5491	3	1718
5599	2	1719	5599	2	1719	5599	3	1719	5599	2	1719	5599	2	1719	5599	2	1719
5706	8	1419	5706	6	1419	5706	6	1419	5706	4	1419	5706	6	1419	5706	11	1419
6063	5	1818	6063	5	1818	6063	2	1818	6063	2	1818	6063	2	1818	6063	4	1818
6171	7	1819	6171	7	1819	6171	3	1819	6171	3	1819	6171	4	1819	6171	3	1819
6308	3	1616	6308	3	1616	6308	3	1616	6308	3	1616	6308	4	1616	6308	9	1616
6679	3	1616	6679	3	1616	6679	2	1616	6679	2	1616	6679	2	1616	6679	2	1616
7214	5	1818	7214	5	1818	7214	2	1818	7214	2	1818	7214	2	1818	7214	2	1818
7309	5	1818	7309	5	1818	7309	2	1818	7309	2	1818	7309	2	1818	7309	2	1818
7352	4	1717	7352	4	1717	7352	3	1717	7352	2	1717	7352	2	1717	7352	2	1717
8795	2	1618	8795	3	1618	8795	2	1618	8795	2	1618	8795	2	1618	8795	2	1618
8858	2	1719	8858	3	1719	8858	2	1719	8858	2	1719	8858	2	1719	8858	4	1719
9010	8	1414	9010	6	1414	9010	7	1414	9010	6	1414	9010	6	1414	9010	11	1414
9064	10	1516	9064	2	1516	9064	3	1516	9064	3	1516	9064	4	1516	9064	9	1516
9068	1	1414	9068	6	1414	9068	10	1414	9068	1	1414	9068	1	1414	9068	5	1414
9174	7	1718	9174	7	1718	9174	3	1718	9174	3	1718	9174	4	1718	9174	15	1718
9192	3	1617	9192	2	1617	9192	2	1617	9192	2	1617	9192	2	1617	9192	2	1617
9341	11	1416	9341	9	1416	9341	5	1416	9341	4	1416	9341	8	1416	9341	16	1416
9518	1	1414	9518	10	1414	9518	1	1414	9518	1	1414	9539	2	1617	9539	2	1617
9539	2	1617	9539	3	1617	9539	2	1617	9539	2	1617	9693	2	1719	9693	2	1719
9693	3	1719	9693	2	1719	9693	2	1719	9693	2	1719	9720	10	1416	9720	17	1416
9720	8	1416	9720	6	1416	9720	6	1416	9720	4	1416						

Hlavní hypotéza (označena jako cluster expert), že metoda nerozliší všechny genotypy mikrosatelitů *vWA* a *D18S51* a důležitější než délka, je rozdíl alel u heterozygota, byla statisticky otestována. Očekávané klastry byly srovnány s klastrováním podle software. Výsledky statistiky jsou zobrazeny v Tab. XX, kde je srovnání testovaných mikrosatelitů (*D18S51* a *vWA*) i obou nastavených parametrů pro klastrování.

Tab. XX: Statistické srovnání hlavní hypotézy s údaji klastrování podle softwaru

expert clusters	purity	nmi	rand_index
D18S51-1-new	0,370	0,188	0,575
D18S51-1-SNPdefault	0,370	0,188	0,575
D18S51-2-new	0,444	0,216	0,407
D18S51-2-SNPdefault	0,356	0,069	0,245
D18S51-3-new	0,409	0,255	0,595
D18S51-3-SNPdefault	0,364	0,083	0,377
vWA-1-new	0,739	0,307	0,581
vWA-1-SNPdefault	0,761	0,349	0,600
vWA-2-new	0,717	0,278	0,555
vWA-2-SNPdefault	0,674	0,207	0,534
vWA-3-new	0,711	0,261	0,567
vWA-3-SNPdefault	0,711	0,256	0,567

Legenda:

- „purity“ ... Evaluace klastrování – Pohybuje se od hodnot 0-1 (0 - špatné klastrování)
- „nmi“ ... Normalized mutual information – Kvalita vytvořených klastrů proti počtu možných klastrů (0-1)
- „rand_index“ ... Penalizuje falešnou pozitivitu a falešnou negativitu během klastrování
- „new, default“ ... Nastavení parametrů v Precision Melt Analysis Software
- 1,2,3 ... PCR běhy

Podle statistického vyhodnocení jsou parametry „purity“, „normalized mutual information“ a „rand index“ příliš nízké. Lépe se klastruje *vWA*, ovšem hodnoty jsou i tak příliš nízké a zdají se být spíše náhodné. Srovnání dvou nastavení softwaru - SNP default a ruční nastavení u tří provedených PCR je zobrazeno v **Tab. XXI** až **Tab. XXVI**.

Tab. XXI: Klastrování *DI8S51* – SNP default (přednastaveno) a vlastní nastavení parametrů (1. PCR)

		cluster expert								
cluster HRM	1	2	3	4	5	6	7	8	sum	
1	7	5	4	3	2	1	2	1	25	
2	2	2		2	1				7	
3	2	1		1		1			5	
4	1			1					2	
5	2	1							3	
6	1	1							2	
7	1								1	
8								1	1	
sum	16	10	4	7	3	2	2	2	46	

purity – 0,370
nmi – 0,1882
rand_index – 0,5749

purity – 0,370
nmi – 0,1882
rand_index – 0,5749

Tab. XXII: Klastrování *DI8S51* – SNP default a vlastní nastavení parametrů (2. PCR)

		cluster expert								
cluster HRM	1	2	3	4	5	6	7	8	sum	
1	15	9	4	7	3	2	2	1	43	
2	1							1	2	
sum	16	9	4	7	3	2	2	2	45	

		cluster expert								
cluster HRM	1	2	3	4	5	6	7	8	sum	
1	13	6	4	6	2	2	2	1	36	
2	1			1	1				3	
3		2							2	
4		1							1	
5	1								1	
6	1								1	
7								1	1	
sum	16	9	4	7	3	2	2	2	45	

purity – 0,356
nmi – 0,069
rand_index – 0,245

purity – 0,444
nmi – 0,216
rand_index – 0,4

Tab. XXIII: Klastrování *DI8S51* – SNP default a vlastní nastavení parametrů (3. PCR)

		cluster expert								
cluster HRM	1	2	3	4	5	6	7	8	sum	
1	12	9	3	5	2	1	2	2	36	
2				1					1	
3	2	1	1	1	1				6	
4	1								1	
sum	15	10	4	7	3	1	2	2	44	

		cluster expert								
cluster HRM	1	2	3	4	5	6	7	8	sum	
1	7	5	3	4	2	1	1		23	
2				1					1	
3	4	3					1	2	10	
4	2				1				3	
5	1	1		1					3	
6		1		1					2	
7	1								1	
8			1						1	
sum	15	10	4	7	3	1	2	2	44	

purity – 0,363
nmi – 0,083
rand_index – 0,377

purity – 0,409
nmi – 0,255
rand_index – 0,595

Tab. XXIV: Klastrování vWA – SNP default a vlastní nastavení parametrů (1. PCR)

cluster HRM	cluster expert				sum
	1	2	3	4	
1	2				2
2	3	1	3	1	8
3	10	1	2		13
4	8				8
5	5				5
6		2			2
7	1		1	1	3
8		1			1
9			1	1	2
10		1			1
11				1	1
sum	29	6	7	4	46

purity – 0,761
nmi – 0,349
rand_index – 0,6

purity – 0,739
nmi – 0,307
rand_index – 0,58

Tab. XXV: Klastrování vWA – SNP default a vlastní nastavení parametrů (2. PCR)

cluster HRM	cluster expert				sum
	1	2	3	4	
1	1				1
2	16	3	4	1	24
3	6	4	1		11
4	2				2
5			1	1	2
6			1	1	2
7	2				2
8	1				1
9	1				1
sum	29	7	7	3	46

purity – 0,674
nmi – 0,207
rand_index – 0,534

purity – 0,7174
nmi – 0,278
rand_index – 0,555

Tab. XXVI: Klastrování vWA – SNP default a vlastní nastavení parametrů (3. PCR)

	cluster expert				
cluster HRM	1	2	3	4	sum
1	1				1
2	20	4	4	1	29
3	2	3			5
4	2		1		3
5	1			2	3
6	1				1
7			1		1
8			1		1
9	1				1
sum	28	7	7	3	45

	cluster expert				
cluster HRM	1	2	3	4	sum
1	16	3	3	1	23
2	2	2			4
3	3		1		4
4	1				1
5	1		1		2
6	1	1			2
7	1			1	2
8	1				1
9	1				1
10		1			1
11			1		1
12			1		1
13				1	1
14	1				1
sum	28	7	7	3	45

purity – 0,711
nmi – 0,256
rand_index – 0,567

purity – 0,711
nmi – 0,261
rand_index – 0,567

V případě srovnání lokusů navzájem vychází lépe vWA, kdy se vytvořilo více klastrů, avšak podle statistického zhodnocení se míra klastrování neshoduje s předpovězenou hypotézou.

Na základě přecházejícího výsledku, kdy se nepotvrdila domněnka, že na délce alel u metody HRM nezáleží ani u jednoho testovaného mikrosatelitu, bylo provedeno nové statistické vyhodnocení podle alternativních hypotéz. Při klastrování v programu Precision Melt Analysis Software záleží na unikátním genotypu alely. Výsledky klastrování jsou shrnuté do tabulky **XXVII** na základě statistických parametrů „purity“, „normalized mutual information“ a „rand index“.

Tab. XXVII: Statistické srovnání alternativních hypotéz s údaji klastrování podle softwaru

genotype clusters	purity	nmi	rand_index
D18S51-1-new	0,217	0,388	0,653
D18S51-1-SNPdefault	0,217	0,388	0,653
D18S51-2-new	0,244	0,299	0,366
D18S51-2-SNPdefault	0,133	0,080	0,119
D18S51-3-new	0,273	0,443	0,664
D18S51-3-SNPdefault	0,205	0,264	0,342
vWA-1-new	0,696	0,770	0,906
vWA-1-SNPdefault	0,696	0,788	0,914
vWA-2-new	0,391	0,507	0,635
vWA-2-SNPdefault	0,348	0,439	0,661
vWA-3-new	0,467	0,533	0,709
vWA-3-SNPdefault	0,356	0,461	0,594

Legenda:

- „purity“ Evaulace klastrování – Pohybuje se od hodnot 0-1 (0 - špatné klastrování)
- „nmi“ Normalized mutual information – Kvalita utvořených klastrů proti počtu možných klastrů (0-1)
- „rand_index“ Penalizuje falešnou pozitivitu a falešnou negativitu během klastrování
- new, default Nastavení parametrů v Precision Melt Analysis Software
- 1,2,3 PCR běhy

Podle statistického vyhodnocení jsou parametry „purity“, „normalized mutual information“ a „rand index“ příliš nízké i u alternativní hypotézy. Lépe se klastruje vWA, ovšem hodnoty jsou i tak příliš nízké a zdají se být spíše náhodné.

Zhodnocení

Hlavní stanovená hypotéza se ukázala jako chybná. Podle statistického zhodnocení lokusu *D18S51* i vWA jsou statistické míry „purity“, „normalized mutual information“ a „rand index“ příliš nízké. Pro reálnou použitelnost metody HRM pro screening STR genotypů by bylo potřeba dosáhnout hodnoty alespoň 0,8. Téměř vždy vychází lépe ruční nastavení programu. Alternativní hypotéza, že klastrování v programu Precision Melt Analysis Software se děje na základě unikátního genotypu, se ovšem také nepotvrdila. I při této hypotéze jsou statistické parametry shody klastru s referenčním genotypem příliš nízké na to, aby se daly brát za směrodatné. V případě lokusu vWA jsou jednotlivé míry lepší, avšak zdá se, že klastrování probíhá nedostatečně standardně a je nezopakovatelné.

6 Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit metodu High resolution melting (HRM) jako nástroj ke screeningu nebo genotypizaci STR. Z článku Nicklas *et al.* (2011) byly vybrány dva mikrosatelity k testování, jejichž primerové sekvence byly použity (**Tab VIII**).

Bylo provedeno několik optimalizačních testů. Nejprve bylo nutné zvolit vhodný cyklér. Oba testované termocykléry (LightCycler® 480 Instrument II (Roche) a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)) vykazovaly shodné výsledky (**Obr. 9**). Cyklér CFX96, který byl vybrán pro testování HRM, nabízí program Bio-Rad Precision Melt pro post-PCR detekci amplikonů, který umožňuje slučovat (klastrovat) shodně vyhodnocené DNA. Byly vyzkoušeny dva PCR programy (**Tab. IX a X**). Program 1, využívaný k analýze 47 vzorků, se nastavením výrazně lišil od nastavení využívaného v článku Nicklas *et al.* (2011). Zejména tedy krok pro nasednutí primerů a prodloužení řetězce. Ve výše zmíněném článku využívali rozdílných teplot pro nasednutí (56 °C) a prodloužení řetězce (65 °C), zatímco v této práci byl krok pro nasednutí i prodloužení sloučen (60 °C) na základě doporučení výrobce PCR koktejlu GoTaq®. Chyběl také krok pro stabilizaci (72 °C) 2 min., který ovšem již byl zahrnut v programu 2, který byl následně využívaný k širšímu testování teploty T_m . Žádný rozdíl u amplifikace pozorovaný nebyl (data nezveřejněna). V článku Nguyen *et al.* (2012) byl využit také pouze jeden krok pro nasednutí i prodloužení (68 °C) s uspokojivými výsledky.

Byly srovnány dvě reakční směsi, komerční GoTaq® qPCR Master Mix a master mix připravený z jednotlivých komponent. Mnohem lepší výsledky vykazovala komerční reakční směs GoTaq®, která je přímo určena pro real-time PCR, obsahuje novou řadu dsDNA vázajících se barviv, které vykazují větší fluorescenci při vazbě na dvoušroubovici DNA a je tedy vhodná pro analýzu HRM. Zároveň obsahuje jasně optimalizovanou koncentraci $MgCl_2$ pro qPCR (Promega, 2014).

Důležité kritérium při genotypizaci pomocí HRM je stabilita teploty tání T_m . Různé hodnoty teploty generují různý tvar křivky a dochází tak k odchýlkám při slučování DNA do klastrů. Bylo provedeno několik experimentů k monitorování teploty T_m . Nejprve bylo využito PCR programu 1 a ředící řady 1-1/512, kdy koncentrace 1 odpovídala 5 ng/μl. Jednotlivé profily tání se zdály být shodné. Rozdíl v T_m u vWA byl ovšem až 1,5 °C. Větší stabilitu generoval lokus *D18S51*, kdy byl rozdíl pouze 0,5 °C (**Obr. 11, 12**). Po třech měsících byly využity vzorky archivované DNA a provedena ethanolová precipitace pro zbavení DNA možných solí, vyskytujících se v pufrech, které se využívají při izolaci. Soli mohou způsobit

rozdíly při generování křivek tání a zvýšení teploty T_m (Nguyen *et al.*, 2012), což je v případě analýzy pomocí HRM nežádoucí. Jelikož byla při přečištění ztracena část DNA, nemohlo být využito původní ředící řady. Vzorky byly ředěny na jednotnou koncentraci 0,5 ng/μl (označenou 1/10) a poté na koncentrace s označením 1/256 a 1/512, které odpovídaly koncentracím v původní ředící řadě. Byl využit PCR program 2, který byl nastaven tak, aby zaznamenával komplexněji teplotu tání T_m . První měřená teplota byla po 25. cyklu a poté po 5 až do konečného 45. cyklu. Původní předpoklad byl, že teplota klesá s rostoucím počtem cyklů až do ustálení. Ovšem tato hypotéza byla vyvrácena provedenou statistikou, kdy ustálení nastalo jen v 11-33 % případů. Další hypotézou byla stabilizace teploty po provedené ethanolové precipitaci. Podle statistických údajů i tato hypotéza byla chybná. Přečištění pomohlo pouze u dvou ze 6 provedených PCR reakcí. Provedení ethanolové precipitace v mnoha případech spíše uškodilo a DNA nebyla amplifikována vůbec. Důvodem mohl být zbytek ethanolu, který narušil PCR reakci či přesušená DNA. Nepovedlo se tak stabilizovat teplotu T_m . V článku Nicklas *et. al* (2011) se teplota tání chovala velmi stabilně a téměř se neměnila, byla ovšem testována pouze v rozmezí tří dnů a ne tří měsíců. Zároveň článek prokázal stabilní profil tání při různém ředění, ovšem teploty T_m chybí úplně. V mých pokusech se testované teploty chovaly rozdílně v rámci stejného ředění u rozdílných vzorků DNA (**Příloha 1, 2**), kdy například hodnota 1/512 se v rámci jednoho PCR jednou amplifikovala u 40. cyklu a u jiného vzorku při 35. cyklu. Na vině mohou být různé koncentrace vstupní DNA, ačkoliv měly být vzorky ředěny shodně podle měření fluorometru Qubit ® 2.0.. Měření již tak vykazovalo až 20x nižší hodnoty oproti měření spektrofotometrem, které proběhlo souběžně (**Tab. XIV**). Jiný experiment právě probíhající na IMTM dokazuje, že tato hypotéza se zdá býti pravdivá. Testování koncentrací kvantitativní PCR ukazuje, že u shodně naředěných vzorků na základě fluorometrických měření, se reálná koncentrace liší až 100x. Rozdíl v množství vstupní DNA má zcela jistě vliv na genotypizaci pomocí HRM.

Veškeré vzorky, které byly využity pro profilování, byly rozpuštěny ve vodě a naředěny na jednotnou koncentraci 5 ng/μl na základě měření na spektrofotometru (**Příloha 3**). Naředěné vzorky DNA mohly tedy obsahovat příliš rozdílné koncentrace na to, aby je program shlukoval podle tvaru křivky a teploty tání T_m shodně.

Při samotném hodnocení genotypizace bylo využito softwaru, který nabízí přímo firma Bio-Rad k termocykleru (Precision Melt Analysis Software). K hodnocení klastrování bylo využito dvou rozdílných nastavení. Nejprve bylo využito přednastavených hodnot pro SNP detekci. Nastavení nevykazovalo podle statistických parametrů dobrých výsledků. Hůře se

klastrovaly genotypy mikrosatelitu *D18S51*, kdy například v PCR běhu 2 program zachytil pouze dva různé genotypy z 25 možných. Jedním z možných vysvětlení může být sekvence mikrosatelitu $[AGAA]_n$, která je poměrně jednoduchá a program pro jednonukleotidové polymorfismy ji nedokáže rozlišit, co se týče délky vůbec a zachytává pouze případné mikrovariantní změny v jinak stabilní repetici. Genotypy mikrosatelitu *vWA* vykazovaly lepší klastrovací vlastnosti ať už při přednastaveném, či vlastním nastavení. V již zmíněném článku Nicklas *et al.* (2011) se povedlo rozdělit 11 genotypů *vWA* do 7 skupin. Genotypy mikrosatelitu *D18S51* vykazovaly lepší vlastnosti a úplně tak odporují získaným výsledkům této práce. 19 hodnocených genotypů program využívaný autory článku roztrídil do 13 klastrů.

Můžeme uzavřít, že přednastavené parametry pro SNP nejsou vhodné pro analýzu STR. Nepovedlo se ovšem najít takové parametry, aby umožnilo klastrovat genotypy jednoho či druhého mikrosatelitu. Velkým problémem použitého softwarového programu je jeho uzavřenost. Nejsme schopni přesně říct, na jakém principu funguje klastrování a nemůžeme nastavit jednotlivé parametry a počet klastrů, do kterých se budou vzorky shlukovat. Takové možnosti nabízí například software Rotor-Gene, který využívali autoři článku Nicklas *et al.* (2011) a Deng *et al.* (2016).

Problém při genotypizaci s využitím HRM je samotný počet studií, které by se tím zabývaly. Speciálně pro forenzní genetiku jsou pouze 3 a všechny byly uzavřeny s jednoznačně pozitivním výsledkem a nadějnou predikcí do budoucna-využití HRM metody jako rychlý screening ve forenzní analýze (Nicklas *et al.*, 2011, Nguyen *et al.*, 2012 a Deng *et al.*, 2016). Nízký počet citací by mohl naznačovat nějaký problém s reprodukovatelností. Práce Nicklas *et al.* (2011) byla citována celkem 7x, publikace Nguyen *et al.* (2012) třikrát a publikace Deng *et al.* (2016), která se zabývala konkrétně HRM analýzou Y-STR, byla citována jednou. Pouze práce Deng *et al.* (2016), se ze všech prací odkazujících se na studie Nicklas *et al.* (2011) a Nicklas *et al.* (2011) zabývala stejnou problematikou a vyšla se stejně optimistickou prognózou.

7 Závěr

První část teoretické část bakalářské práce byla věnována problematice mikrosatelitů. Za použití uvedené literatury byla vypracována literární rešerše, ve které je shrnuto jejich umístění v genomu, míra polymorfismu a současné možnosti genotypizace. Jako možnou alternativou ke konvenčním metodám byla navržena metoda HRM (High resolution melting), které je věnována druhá část teoretické rešerše.

V experimentální části bakalářské práce bylo provedeno DNA profilování pomocí vysokorozlišujících křivek tání mikrosatelitových amplikonů. K testování byly využity mikrosatelity *vWA* a *D18S51* a cyklér Bio-Rad. Na základě mých výsledků není možné učinit jednoznačné obecné závěry. Každopádně za podmínek nastavených v této práci, při použití cykléru Bio-Rad a jeho softwaru, metoda užít k profilování DNA nejde. Nepodařilo se plně optimalizovat podmínky a ani najít vhodné nastavení pro post-PCR detekci.

8 Seznam zkratek

CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	deoxynukleotid trifosfátu
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleotidová kyselina (double stranded deoxyribonucleic acid)
HRM	vysoko rozlišovací analýza křivek tání (high resolution melting)
kb	kilobáze (kilobase)
LRM	analýza křivek s nízkým rozlišením (low resolution melting)
MPS	masivně paralelní sekvencování (massive parallel sequencing)
NGS	sekvenování nové generace (next-generation sequencing)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PM	primerová směs (primer mixture)
qPCR	kvantitativní PCR, PCR v reálném čase
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphisms)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
ssDNA	jednořetězcová deoxyribonukleotidová kyselina (single stranded deoxyribonucleic acid)
SSRs	krátké tandeomé repetice (short tandem repeats)
STR	krátké tandeomé repetice (short tandem repeats)
TE pufr	Tris/EDTA pufr (Tris/EDTA buffer)
T _m	teplota tání (melting temperature)
VNTRs	variabilní počet tandemových repetic, minisatelity (variable number tandem repeats)
Y-STR	mikrosatelity na chromozomu Y

9 Literatura

Abdelkrim J., Robertson B., Stanton J. A., Gemmell N. (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46: 185–192.

Arens, P., Odinet, P., van Heusden, A.W., Lindhout, P., Vosman, B. (1995) GATA- and GACA- repeats are not evenly distributed throughout the tomato genome. *Genome* 38(1): 84-90.

Balaresque P., King T. E, Parkin E. J., Heyer E., Carvalho-Silva D., Kraaijenbrink T., de Knijff P. Tyler-Smith C., Jobling M.A (2014) Gene Conversion Violates the Stepwise Mutation Model for Microsatellites in Y-Chromosomal Palindromic Repeats. *Human mutation* 5: 609–617.

Balloux F., Ecoffey E., Fumagalli L., Goudet J., Wytenback A., Hausser J. (1998) Microsatellite conservation, polymorphism, and GC content in shrews of the genus *Sorex* (Insectivora, Mammalia). *Molecular Biology and Evolution* 15: 473–475.

Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F., Huhne J., Rolf B. (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *The American Journal of Human Genetics* 62: 1408–1415.

Brohede J., Ellegren H. (1999) Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266: 825-833.

Butler J. M. (2005) *Forensic DNA typing biology, technology, and genetics of STR markers*. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier Academic Press.

Butler J. M., Buel E., Crivellentes F., McCords B. R. (2004) *Forensic DNA Typing by Capillary Electrophoresis Using the ABI Prism 310 and 3100 Genetic Analyzers for STR Analysis*. *Electrophoresis* 25: 1397-1412.

Canceill D., Viguera, E., Ehrlich, S. D. (1999) Replication slippage of different DNA polymerases is inversely related to their strand displacement efficiency. *Journal of Biological Chemistry* 274(39): 27481-90.

- Crollius H. R., Jaillon O., Dasilva C., Ozouf Costaz C., Fizames C., Fischer C., Bouneau L., Billault A., Quetier F., Saurin W., Bernot A., Weissenbach J. (2000) Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Research* 10(7): 939–949.
- Crow J (1993) How much do we know about spontaneous human mutation rates? *Environmental and Molecular Mutagenesis* 21(2): 122-129.
- Delattre M., Anxolabehere, D., Coen, D. (1995) Prevalence of localized rearrangements vs. transpositions among events induced by *Drosophila* P element transposase on a P transgene. *Genetics* 141: 1407–1424.
- Deng J. Q., Liu B.Q., Wang Y., Liu W., Cai J.F., Long R., Li W.H. (2015) Y-STR genetic screening by high-resolution melting analysis. *Genetics and Molecular Research* 15.
- Depeiges A., Goubely C., Lenoir A., Cocherel S., Picard G., Raynal M., Grellet F., Delseny M. (1995) Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 160–168.
- Di Rienzo A., Peterson A. C., Garza J. C., Valdes A. M., Slatkin M., Freimer N. B. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(8): 3166–3170.
- Ellegren H. (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* 16(12): 551-558.
- Ellegren H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435–445.
- Ellegren, H. (1995) Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mammalian Genome* 6: 376-377.
- Estoup A, Garnery L., Solignac M., Cornuet J. M. (1995) Microsatellite Variation in Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Populations: Hierarchical Genetic Structure and Test of the Infinite Allele and Stepwise Mutation Models. *Genetics* 140(2): 679–695.
- Ferro, P., dell'Eva R., Pfeffer U. (2001) Are there CAG repeat expansion-related disorders outside the central nervous system? *Brain Research Bulletin*, 56(3-4): 259-264.
- Field D., Wills C. (1998) Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 263: 209-215.

- Gagneux P., Boesch C., Woodruff D. S. (1997) Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* 6: 861–868.
- Garcia de Leon F. J., Canonne M., Quillet E., Bonhomme F., Chatain B. (1998) The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 159: 303–316.
- Ghislain M., Spooner D. M., Rodríguez F., Villamón F., Núñez J., Vásquez C., Waugh R. Bonierbale M. (2004) Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 881–890.
- Glenn T. C., Stephan W., Dessauer H. C., Braun M. J. (1996) Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1151-1154.
- Goldberg D. A., Posakony J. W., Maniatis T. (1983) Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the *Drosophila* germ line. *Cell* 34: 59–73.
- Goldstein D., Schlötterer C. (1999) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R. J. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11(4): 591-611.
- Hammock E. A. D., Young, L. J. (2005) Microsatellite instability generates diversity in brain and sociobehavioral traits. *Science* 308(5728): 1630-1634.
- Hancock J. M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms. In *Microsatellites: Evolution and Applications* (Goldstein, D. B., Schlötterer C). Oxford University Press, New York 1-9.
- Hares D. R. (2015) Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Science International* 17: 33-34.
- Hentschel C. C. (1982) Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene repeat are sensitive to S₁ nuclease. *Nature* 295: 714-716.

- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 413-417.
- Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.
- Chistiakov D. A., Hellemans B., Haley C. S., Law A. S., Tsigenopoulos C. S., Kotoulas G., Bertotto D., Libertini A., Volckaert F. A. (2005) A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L.. *Genetics* 170(4): 1821–1826.
- Inzana, T. J., Hensley J., McQuiston J., Lesse A. J., Campagnari A. A., Boyle S. M. and Apicella M. A. (1997) Phase variation and conservation of lipooligosaccharide epitopes in *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity* 65(11): 4675-4681.
- Jarne P. and Lagoda P. J. L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11(10): 424-429.
- Jin L., Macaubas C., Hallmayer J., Kimura A., Mignot E. (1996) Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: Phylogenetic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 15285–15288.
- Jones A. G., Small C. M., Paczolt K. A., Ratterman N. L. (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10: 6–30.
- Jurka J., Pethiyagoda C. (1995) Simple repetitive DNA sequences from primates: Compilation and analysis. *Journal of Molecular Evolution* 40(2): 120-6.
- Lee J. S., Hanford M. G., Genova J. L., Farber R. A. (1999) Relative stabilities of dinucleotide and tetranucleotide repeats in cultured mammalian cells. *Human Molecular Genetics* 8: 2567-2572.
- Li J. Z., Absher D. M., Tang H., Southwick A. M., Casto A. M., Ramachandran S., Cann H. M., Barsh G. S., Feldman M., Cavalli-Sforza L. L., Myers R. M. (2008) Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science* 319: 1100–1104.
- Li Y. C., Korol A. B., Fahima T., Nevo E. (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21(6): 991-1007.

- Lowenhaupt K., Rich A., Pardue M. L. (1989) Nonrandom distribution of long mono- and dinucleotide repeats in *Drosophila* chromosomes: Correlations with dosage compensation, heterochromatin, and recombination. *Molecular Cell Biology* 9: 1173–1182.
- Mao R., Aylsworth A. S., Potter N., Wilson W. G., Breningstall G., Wick M. J., Babovic-Vuksanovic D., Nance M., Patterson M. C., Gomez C. M., Karen Snow (2002) Childhood-onset ataxia: Testing for large CAG-repeats in SCA2 and SCA7. *American Journal of Medical Genetics* 110(4): 338-345.
- Marra G., Boland C.R. (1995) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *Journal of the National Cancer Institute* 87: 1114–1125.
- Martin E., Hine R. (2014) VNTRs, *A Dictionary of Biology* (6 ed.), Oxford University Press.
- Meudt H. M., Clarke A. C. (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12: 106–117.
- Mittal N., Dubey A. (2009) Microsatellite markers - A new practice of DNA based markers in molecular genetics. *Pharmacognosy Reviews* 3: 235–246.
- Moxon E. R., Wills C. (1999) DNA microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American* 280: 94–99.
- Nanda I., Deubelbeiss C., Guttenbach M., Epplen J. T. Schmid M. (1990) Heterogeneities in the distribution of (GACA)_n simple repeats in the karyotypes of primates and mouse. *Human Genetics* 85: 187–194.
- Nguyen Q., McKinney J., Johnson D. J., Roberts K.A, Hardy W. R. (2012) STR Melting Curve Analysis as a Genetic Screening Tool for Cri Journal of Forensic Sciencesme Scene Samples. *Journal of Forensic Sciences* 57: 887–899.
- Nicklas J.A, Noreault-Conti T., Buel E. (2011) Development of a Fast, Simple Profiling Method for Sample Screening Using High Resolution Melting (HRM) of STRs. *Journal of Forensic Sciences* 57: 478-88.
- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R., Vieira M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.
- Olivero, M., Ruggiero T., Coltella N., Maffe A., Calogero R., Medico E., Di Renzo M. F. (2003) Amplification of repeat-containing transcribed sequences (ARTS): a transcriptome

fingerprinting strategy to detect functionally relevant microsatellite mutations in cancer. *Nucleic Acids Research* 31(7): e33.

Pâques F., Bucheton, B., Wegnez, M. (1996) Rearrangements involving repeated sequences within a P element preferentially occur between units close to the transposon extremities. *Genetics* 142: 459–470.

Pâques F., Wegnez M. (1993) Deletions and amplifications of tandemly arranged ribosomal 5S genes internal to a P element occur at a high rate in a dysgenic context. *Genetics* 135: 469-476.

Primmer C. R., Moller A. P., Ellegren H. (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5:365-378.

Queller, D. C., Strassmann, L. E., Hughes C. R. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*. 8 (8): 285-288.

Rasmussen D. A, Noor M. A. F. (2008) What can you do with 0.1x genome coverage? A case study based on a genome survey of the scuttle fly *Megaselia scalaris* (Phoridae). *BMC Genomics* 10: 382–382.

Reed G. H., Kent J. O., Wittwer C. T (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8: 597-608.

Reed, G. H., Wittwer C. T. (2004) Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry* 50: 1748-1754.

Richard G., Pâques F. (2000) Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Reports* 1(2): 122–126.

Rosenblum, B. B., Oaks, F., Menchen, S., Johnson, B. (1997) Improved Single-Strand DNA Sizing Accuracy in Capillary Electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 25: 3925–3929.

Santana Q. C., Coetzee M. P. A., Steenkamp E. T. Mlonyeni O., Hammond G., Wingfield M., Wingfield B. (2009) Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *BioTechniques* 46: 217–223.

- Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution (2004) International Chicken Genome Sequencing Consortium. *Nature* 432: 695–716.
- Sharma P. C., Grover A., Kahl G. (2007) Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology* 25: 490–498.
- Schlötterer C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109(6): 365-371.
- Schlötterer C. (2004) The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63–69.
- Schlötterer C., Pemberton J. (1998) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations, In *Molecular Approaches to Ecology and Evolution* (DeSalle R., Schierwater B.) 71–86. Birkhauser Verlag, Basel.
- Schlötterer C., Tautz D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20(2): 211-5.
- Schug M. D., Hutter C. M., Wetterstrand K. A., Gaudette M. S., Mackay T. F., Aquadro C. F. (1998b) The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 15(12): 1751-1760.
- Sia E. A., Butler C. A., Dominska M., Greenwell P., Fox T. D., and Petes T. D. (2000) Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 250-255.
- Strand M., Prolla T. A., Liskay R. M. and Petes T. D. (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276.
- Streisinger G., Owen J. E. (1985) Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* 109(4): 633–659.
- Sun W., Li J. J., Xiong C., Zhao B., Chen, S. (2016) The potential power of Bar-HRM technology in herbal medicine identification. *Frontiers in Plant Science* 7: 367.
- Szostak, J. W., Orr-Weaver T. L., Rothstein, R. J., Stahl, F. W. (1983) The double-strand break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35.

Thompson-Stewart D., Karpen, G. H., Spradling, A. C. (1994) A transposable element can drive the concerted evolution of tandemly repetitive DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 9042–9046.

Thorisson G. A., Smith A. V., Krishnan L., Stein L. D., (2005) The International HapMap Project Web site. *Genome Research* 15(11): 1592-1593.

Tóth G., Gáspari Z., Jurka J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10(7): 967–981.

Venter, J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J, Sutton ., G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P, Ballew ., R. M., Huson D. H., Wortman J. R., Zhang Q., Kodira C. D., Zheng X. Q. H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P. D., Zhang J. H., Miklos G. L. G., Nelson C., Broder S., Clark A. G., Nadeau C., McKusick V. A., Zinder N., Levine A. J., Roberts R. J., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M, Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z. M., Francesco V. Di, Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A. E., Gan W., Ge W. M., Gong F. C., Gu Z. P., Guan P., Heiman T. J., Higgins M. E., Ji R. R., Ke Z. X., Ketchum K. A, Lai Z. W., Lei Y. D., Li Z. Y, Li J. Y., Liang, X. Y. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan Y., Neelam B., Nusskern D., Rusch D. B., Salzberg S., Shao W., Shue B. X., Sun J. T., Wang Z. Y., Wang A. H., Wang X., Wang J., Wei M. H., Wides R., Xiao C. L., Yan C. H. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507): 1304-1351.

Wattier R., Engel C. R., Saumitou-Laprade P., Valero M. (1998) Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7: 1569-1573.

Weber J. L., Wong C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2(8): 1123–1128.

Webster M. T, Smith N. G. C., Ellegren H. (2002) Microsatellite evolution inferred from human-chimpanzee genomic sequence alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 8748–8753.

Welch, J. W., Moloney, D. H. and Fogel, S. (1990) Unequal crossing-over and gene conversion at the amplified *CUP1* locus of yeast. *Molecular Genetics and Genomics* 222: 304-310.

White H., Potts G. L., N. C. P. Cross (2006) NGRL (Wessex) evaluation of high resolution melt curve analysis for mutation scanning. *Journal of Medical Genetics* 43: 85-85.

Zoghbi H. Y., Orr H. T. (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience* 23: 217–237.

Zumrová A. Syndrom premutace fragilního X chromosomu s tremorem/ataxií (FXTAS) (2005) *Neurologie*, 1. vydání. Praha, Triton 2005 116-117.

Zumrová A., Kopečková M., Mušová Z., Křepelová A., Apltová L., Paděrová K. (2007) Autosomálně dominantní spinocerebelární ataxie. *Neurologie pro praxi* 8: 277–282.

Komerční firmy, materiály:

Applied Biosystems (2000) Chemistry Reference for the ABI PRISM®310 Genetic Analyzer, GeneScan®Reference Guide.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040961.pdf.

Bio-Rad (2010) High resolution Melt Parametr Considerations For Optimal Data Resolution, tech note 6009.

http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6009.pdf

Kapa Biosystems (2014) Introduction to High Resolution Melt Analysis, KAPA™ HRM FAST PCR Kit.

<http://www.grisp.pt/docs/kapahrmfasttds.pdf>

Promega (2014) Instructions for Use of Products A6001 a A6002, GoTaq® qPCR Master Mix, technical manual.

Webové odkazy:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064>

<https://sciknowledge.wordpress.com/2013/01/06/genome-evolution>

<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch8D4.htm>

<http://science.kennesaw.edu/~rrascati/forensicpolymorphs.html>

<http://www.cstl.nist.gov/strbase/coreSTRs.htm>

<http://www.cstl.nist.gov/strbase/multiplx.htm>

<http://www.biotechniques.com/news/The-Moments-Melting-Curve-Analysis/biotechniques-354585.html#.WJi4CvhdIU>

10 Přílohy

Příloha 1: Zhodnocení T_m při rozdílném ředění na lokusech ν WA a *DI8S51* (bez pročištění)

Vzorek	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m
	25 [°C]	30 [°C]	35 [°C]	40 [°C]	45 [°C]	25 [°C]	30 [°C]	35 [°C]	40 [°C]	45 [°C]	25 [°C]	30 [°C]	35 [°C]	40 [°C]	45 [°C]
νWA	PCR 1					PCR 2					PCR 3				
13157/10	76	75,5	75	74,5	74,5	/	76	75	76	74	/	75,5	75	74,5	74,5
13157/256	/	76	75,5	75	75	/	/	75	74,5	74,5	/	/	75,5	/	74
13157/512	/	/	75,5	75	74,5	/	/	/	/	74,5	/	/	/	/	74,5
13158/10	/	75,5	74,5	74,5	74	/	75	75	74,5	75	/	75,5	75	74,5	74,5
13158/256	/	/	75	74,5	74	/	/	76	75	75	/	/	/	75	74,5
13158/512	/	/	/	75	74,5	/	/	/	/	74,5	/	/	/	/	/
13184/10	/	75,5	75	74,5	74,5	/	/	75	74,5	74,5	/	/	75	74,5	75
13184/256	/	/	75	74,5	74	/	75	/	/	74,5	/	/	/	/	74
13184/512	/	/	/	75	74,5	/	/	/	/	75	/	/	/	/	/
<i>DI8S51</i>	PCR 2														
13157/10	76,5	76	75,5	75	75	77	76,5	75,5	75	75	76,5	76	75,5	75	74,5
13157/256	/	76,5	75,5	75	75	/	/	75,5	/	75,5	/	/	75,5	/	74
13157/512	/	/	76,5	75,5	75	/	/	/	/	75,5	/	/	/	/	/
13158/10	/	76,5	75,5	75,5	75	/	76	76	75	75	/	76,5	76	75,5	75
13158/256	/	/	76	75,5	75	/	/	/	76	75	/	/	/	76	75,5
13158/512	/	/	/	/	76	/	/	/	/	74,5	/	/	/	/	/
13184/10	/	76,5	75,5	75	75	/	/	76	75,5	75	/	/	76	75	75
13184/256	/	/	76	75,5	75	/	/	75,5	74	74,5	/	/	/	/	75,5
13184/512	/	/	/	75,5	75	/	/	/	/	74	/	/	/	/	/

Příloha 2: Zhodnocení T_m při rozdílném ředění na lokusech ν WA a *DI8S51* (pročištění)

Vzorek	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m	T_m
	25 [°C]	30 [°C]	35 [°C]	40 [°C]	40 [°C]	25 [°C]	30 [°C]	35 [°C]	40 [°C]	45 [°C]	25 [°C]	30 [°C]	35 [°C]	40 [°C]	45 [°C]
νWA	PCR 1					PCR 2					PCR 3				
13157_10	76	75,5	75	74,5	74,5	76	75,5	75	75	74,5	76	75,5	75	75	74,5
13157_256	/	/	/	75,5	74,5	/	/	/	75,5	74,5	/	/	/	75,5	75
13157_512	/	/	/	/	74,5	/	/	/	/	74,5	/	/	/	/	/
13158_10	76	75	74,5	74	74	76	75,5	74,5	74,5	74	76	75,5	74,5	74,5	74
13158_256	/	/	/	/	/	/	/	/	75	74,5	/	/	/	/	74,5
13158_512	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
13184_10	76	75	74,5	74,5	74,5	76	75	74,5	74,5	74,5	76	75	74,5	74,5	74,5
13184_256	/	/	/	75	74,5	/	/	/	/	74,5	/	/	/	/	74,5
13184_512	/	/	/	75	74,5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>DI8S51</i>	PCR 1					PCR 2					PCR 3				
13157_10	77	76	75,5	75	75	77	76	75,5	75	75	77	76,5	75,5	75	75
13157_256	/	/	/	76	75,5	/	/	/	/	75,5	/	/	/	/	75,5
13157_512	/	/	/	/	75,5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	75,5
13158_10	77	76	75,5	75	75	77	76,5	75,5	75	75	77	76,5	75,5	75	75
13158_256	/	/	/	/	/	/	/	/	76	75,5	/	/	/	76	75,5
13158_512	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
13184_10	76,5	76	75,5	75	74,5	/	/	76	75	75	77	76,5	75,5	75	75
13184_256	/	/	/	/	75,5	/	/	/	/	75,5	/	/	/	/	75,5
13184_512	/	/	/	/	75,5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	75,5

*Teploty byly v obou případech zaznamenávány po 25 cyklech až do konečného 45. cyklu.

Příloha 3: Změřená koncentrace a čistota jednotlivých vzorků DNA a následné ředění na koncentraci cca 5 ng/μl

DNA	Výchozí koncentrace [ng/μl]	260/280	Množství DNA [μl]	Množství vody [μl]	Konečná koncentrace [ng/μl]
1238	179,83	1,95	0,8	29,2	4,79
1270	21,99	1,75	6,7	23,3	4,91
1306	28,98	1,85	5,0	25,0	4,83
1382	23,27	1,67	6,4	23,6	4,96
2211	23,22	2,01	6,8	23,2	5,26
2212	24,41	1,96	5,9	24,1	4,80
2592	59,97	1,79	2,4	27,6	4,79
2596	12,63	1,81	11,9	18,1	5,01
2927	171,62	2,13	0,8	29,2	4,57
2946	24,01	2,03	5,6	24,4	4,48
2958	16,64	1,5	8,5	21,5	4,71
3115	28,37	2,07	5,3	24,7	5,01
3544	155,86	1,53	1,0	29,0	5,19
3963	16,74	2,03	9,0	21,0	5,02
3975	14,82	1,78	10,9	19,1	5,38
4539	15,81	1,89	10,1	19,9	5,32
4709	32,13	1,89	4,5	25,5	4,81
5124	7,85	1,61	19,1	10,9	4,99
5213	29,26	1,79	5,0	25,0	4,87
5401	45,45	1,52	3,2	26,8	4,84
5491	11,28	1,86	13,3	16,7	5,00
5599	26,2	1,75	5,7	24,3	4,97
5706	15,64	1,7	9,6	20,4	5,01
6063	12,82	1,77	11,7	18,3	4,99
6171	10,66	1,94	14,1	15,9	5,01
6308	16,38	1,98	9,8	20,2	5,35
6679	15,04	1,61	10,0	20,0	5,01
7214	20,16	1,5	7,1	22,9	4,77
7309	25,83	2,02	5,6	24,4	4,82
7352	12,75	1,92	11,8	18,2	5,01
8795	25,68	2,11	5,8	24,2	4,96
8858	32,84	1,92	4,4	25,6	4,81
9010	38,27	2,16	3,8	26,2	4,84
9064	109,98	2,03	1,3	28,7	4,76
9068	139,45	2,08	1,0	29,0	4,64
9192	25,06	2,22	6,0	24,0	5,01
9341	55,25	1,92	2,6	27,4	4,78
9518	50,6	2,1	2,8	27,2	4,72
9539	11,89	2,09	12,6	17,4	4,99
9174	87,75	2,09	17,0	13,0	4,97
9720	89,97	1,57	1,6	28,4	4,79
14714	24,85	2,07	6,0	24,0	4,97
14619	11,24	1,92	13,3	16,7	4,98
14620	12,75	2,15	11,8	18,2	5,01
14621	111,92	2,01	1,3	28,7	4,84
12555	373	2,29	0,4	29,6	4,97
13185	295	1,67	0,2	9,83	5,90
13173	140	1,78	0,36	9,64	5,04
13166	112	1,83	0,45	9,55	5,04

