

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

STR analýza chromozomu X

Bc. Veronika Šmídová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Šmídová**  
Osobní číslo: **C15629**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **STR analýza chromozomu X**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vysvětlit a porovnat dědičnost autozomálních chromozomu a chromozomu X
2. Příprava multiplexní PCR pro vybrané polymorfismy
3. Frekvenční analýza vybraných polymorfismů chromozomu X

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**  
Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové

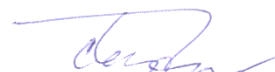
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Veronika Šmídová

## **Poděkování**

Děkuji Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při konzultacích mé diplomové práce. Dále děkuji za podporu rodině a přátelům.

## **Anotace**

Práce je věnována analýze krátkých tandemových repetitivních sekvencí (STR) a to na chromozomu X. Povedlo se nám sestrotit a optimalizovat multiplexní PCR assay. Díky tomu jsme výrazně zkrátily dobu analýzy a celkově jsme snížili její náročnost. Pomocí multiplexní PCR jsme analyzovali vzorky 100 nepříbuzných žen z české populace. Takto jsme vytvořili databázi frekvencí vybraných alel v české populaci.

## **Klíčová slova**

STR, krátké tandemové repetitivně sekvence, chromozom X, X-STR, multiplex PCR, analýza

**Title**

STR analysis X chromosome

**Annotation**

The work is aimed to short tandem repeat sequences (STR) on X chromosome. We have optimized the multiplex PCR assay, what is important for analysis time and is much more user friendly. 100 woman samples from un-related czech womans was analysed and the frequency database was created.

**Keywords**

STR, short tandem repeat, chromosome X, X-STR, multiplex PCR, analysis

## Obsah

Úvod.....	14
1 Krátké tandemové repetitivní sekvence - STR.....	15
1.1 Klasifikace STR .....	16
1.2 Genetická vazba .....	17
2 Krátké repetitivní sekvence na chromozomu X .....	20
2.1 Výhody STR analýzy chromozomu X .....	21
2.2 STR na chromozomu X.....	23
2.2.1 Vázané STR na chromozomu X.....	27
2.3 Statistické výpočty pro otcovství .....	27
3 Amplifikace .....	29
3.1 Polymerázová řetězová reakce .....	29
3.2 Sestavování multiplex PCR.....	31
4 Cíle práce.....	33
5 Experimentální část .....	34
5.1 Sběr vzorků .....	34
5.2 Izolace DNA.....	35
5.3 PCR amplifikace .....	35
5.3.1 Buněčná linie K562 .....	35
5.3.2 Optimalizace koncentrace primerů a DNA v reakční směsi .....	38
5.3.3 Optimalizace teplotního profilu.....	39
5.3.4 Vliv aditiv na PCR produkty .....	40
5.3.5 Sestavování multiplexní reakce.....	43
5.4 Analýza .....	44
5.5 Statistický popis frekvenční databáze .....	45
6 Výsledky a diskuze.....	48
6.1 DXS8378.....	51



6.2	DXS7424.....	54
6.3	DXS8377.....	56
6.4	DXS7133.....	59
6.5	DXS101.....	61
6.6	DXS6807.....	65
6.7	DXS7423.....	66
6.8	GATA172D05.....	69
6.9	Vázané polymorfismy .....	71
6.10	Využití metody na reálných vzorcích.....	71
7	Závěr.....	76
8	Použitá literatura.....	77

## Seznam ilustrací

Obrázek 1 - Délkový polymorfismus STR (ŠIMKOVÁ, 2012) .....	17
Obrázek 2 - Schéma - crossing-over (SUZUKI, 2000).....	18
Obrázek 3 - Kombinace gonozomů .....	20
Obrázek 4 - Výsledky analýzy 20 X-STR v případě – A case of false mother included with 46 autosomal STR markers (LI, 2015) .....	21
Obrázek 5 - Ukázka rodokmenu, testování otcovství – dcera, matka, babička (matka domnělého otce).....	22
Obrázek 6 - Idiogram chromozomu X (ChrX-STR.org).....	25
Obrázek 7 - Polymerázová řetězová reakce (UNIVERSITY OF LEICESTER) .....	30
Obrázek 8 - Odběr vzorku z bukální sliznice (A-TEST) .....	34
Obrázek 9 - Buněčná linie K562 (ATCC) .....	38
Obrázek 10 – Multiplex M DXS8378, DXS7424 a DXS8377 - analýza buněčné linie K562, teplotní profil DXS_2 .....	39
Obrázek 11 - Multiplex M - analýza buněčné linie K562, teplotní profil DXS_26 .....	48
Obrázek 12 - Multiplex X - analýza buněčné linie K562, teplotní profil DXS_26 .....	49
Obrázek 13 – Fluorescenční značení CFR 610 (Generi Biotech).....	50
Obrázek 14 – Fluorescenční značení HEX (Generi Biotech) .....	50
Obrázek 15 – Fluorescenční značení 6-FAM (Generi Biotech) .....	50
Obrázek 16 – Analýza buněčné linie K562, multiplex – modrý kanál – DXS7133, DXS7424, DXS 8377; zelený kanál – GATA172D05, DXS7423; červený kanál - DXS8378, DXS101, DXS6807 .....	51
Obrázek 17 - Příklad 1 - dostupné vzorky růžové, nedostupné šedé .....	72
Obrázek 18 - Příklad 2 .....	73
Obrázek 19 - Příklad 3 .....	75

## Seznam tabulek

Tabulka 1 - Lokusy na chromozomu X, sekvence primerů (Generi Biotech) .....	26
Tabulka 2 - Primery a předpokládané velikosti alel (Generi Biotech, dle ChrX-STR.org) .....	27
Tabulka 3 – Referenční STR profil chromozomu X buněčné linie K562 (ChrX-STR.org) .....	36
Tabulka 4 - Profil buněčné linie K562 - autozomální STR .....	36
Tabulka 5 - Vliv aditiv na PCR produkty I.....	42
Tabulka 6 - Vliv aditiva na PCR produkty II.....	42
Tabulka 7 - Sestavování multiplexu (značení – nefunguje; + funguje za daných podmínek) .....	44
Tabulka 8 - Teplotní profil DXS_26.....	48
Tabulka 9 - DXS8378 - námi naměřené frekvence v české populaci.....	52
Tabulka 10 - DXS8378 - populační data v české populaci.....	52
Tabulka 11 - DXS8378 - populační data (ChrX-STR.org).....	52
Tabulka 12 - DXS8378 – frekvence (ChrX-STR.org).....	53
Tabulka 13 - DXS7424 - námi naměřené frekvence v české populaci.....	54
Tabulka 14 – DXS7424 - populační data v české populaci .....	54
Tabulka 15 - DXS7424 - populační data (ChrX-STR.org).....	55
Tabulka 16 - DXS7424 – frekvence (ChrX-STR.org).....	55
Tabulka 17 - DXS8377 - námi naměřené frekvence v české populaci.....	56
Tabulka 18 - DXS8377 - populační data v české populaci.....	56
Tabulka 19 - DXS8377 - populační data (ChrX-STR.org).....	57
Tabulka 20 - DXS8377 – frekvence (ChrX-STR.org).....	58
Tabulka 21 - DXS7133 - námi naměřené frekvence v české populaci.....	59
Tabulka 22 – DXS7133 - populační data v české populaci .....	60
Tabulka 23 - DXS7133 - populační data (ChrX-STR.org).....	60
Tabulka 24 - DXS7133 – frekvence (ChrX-STR.org).....	61
Tabulka 25 - DXS101 - námi naměřené frekvence v české populaci.....	61
Tabulka 26 - DXS101 - populační data v české populaci.....	62
Tabulka 27 - DXS101 - populační data (ChrX-STR.org).....	62
Tabulka 28 - DXS101 – frekvence (ChrX-STR.org).....	63
Tabulka 29 - DXS6807 - námi naměřené frekvence v české populaci.....	65

Tabulka 30 - DXS6807 - populační data v české populaci.....	65
Tabulka 31 - DXS6807 - populační data (ChrX-STR.org).....	65
Tabulka 32 - DXS6807 – frekvence (ChrX-STR.org).....	66
Tabulka 33 - DXS7423 - námi naměřené frekvence v české populaci.....	66
Tabulka 34 - DXS7423 - populační data v české populaci.....	66
Tabulka 35 - DXS7423 – populační data (ChrX-STR.org) .....	67
Tabulka 36 - DXS7423 – frekvence (ChrX-STR.org).....	68
Tabulka 37 - GATA172D05 - námi naměřené frekvence v české populaci.....	69
Tabulka 38 - GATA172D05 - populační data v české populaci.....	69
Tabulka 39 - GATA172D05 - populační data (ChrX-STR.org).....	70
Tabulka 40 – GATA172D05 – frekvence (ChrX-STR.org) .....	70
Tabulka 41 - Případ 1 .....	71
Tabulka 42 - Případ 2.....	73
Tabulka 43 - Případ 3.....	74

## Seznam použitých zkratek

BSA	bovine serum albumin - hovězí sérový albumin
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidfosfát
EDTA	ethyldiaminetetraacetic acid – kyselina ethyldiamintetraoctová
EOF	electro-osmotic flow - elektro-osmotický tok
HET	expected heterozygosity – očekávaná heterozygozita
HiDi Formamid	highly deionized formamide – vysoce deionizovaný formamid
LIZ	internal line size standard – vnitřní velikostní standard
LR	likelihood ratio - věrohodnostní poměr
MEC	mean exclusion chance – průměrná šance vyloučení
PCR	polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce
PD	power of discrimination – diskriminační síla
PI	paternity index – paternitní index
PIC	polymorphism information content – informační obsah polymorfismu
POP-4	performance optimized polymer
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction – kvantitativní PCR
SNP	single nucleotide polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus
STR	short tandem repeat – krátké tandemové repetitivně sekvence

## Úvod

Analýza DNA se stala již nedílnou součástí celé řady vyšetřovacích metod a nahradila jiné dříve používané postupy. Výhodou tohoto postupu často bývá kratší doba potřebná k získání výsledku, větší specifita nebo specifita, které nelze dosáhnout jiným způsobem.

Jelikož DNA každého člověka je jedinečná, je logickým krokem ji využít pro identifikaci jedince. Další možnosti analýz svázaných s identifikací jedinců se nabízí. Jedná se o různé způsoby vyšetřování příbuznosti. Tyto metody jsou často využívány forenzně (při určování pachatele, identifikace obětí), ale i v případech soukromých (dědictví, testy otcovství). U standardních případů kdy jsou lehce dostupní příbuzní a lze získat vzorky od potřebných osob, jsou zažité metody i způsoby statistického vyhodnocení. Nicméně u případů, kde není možné získat všechny potřebné vzorky nebo jen od vzdálených příbuzných, se situace velmi komplikuje. Např. při určování otcovství, kdy není možné získat vzorek otce (zahynul, není dohledatelný atp.). V takových případech právě napomáhá vyšetření jiných než autozomálních polymorfismů, které se využívají u standardních případů.

V našem případě se práce soustředí na analýzu gonozomálního chromozomu X, který je vhodný pro případy, které „obsahují“ ženské vzorky. Pro správné statistické výpočty je ovšem potřeba mít nejen vhodnou metodu, ale i populační databázi, která nám napovídá o distribuci jednotlivých alel v populaci.

Určité metody pro stanovení chromozomu X již byly popsány, ale soustřeďují se na stanovení jednotlivých lokusů. My jsme se rozhodli sjednotit tyto poznatky do metody, která by byla schopná analyzovat několik polymorfismů najednou, čímž se zvýší diskriminační síla celé analýzy. Dále jsme se snažili získat co největší množství vzorků nepříbuzných osob, abychom získali alespoň základní představu o distribuci jednotlivých alel v populaci, protože pro českou populaci žádná taková data neexistují.

Pro ověření této metody, jsme se rozhodli ji porovnat s klasickou analýzou autozomálních polymorfismů na reálných vzorcích u soudních případů, zadaných znaleckému ústavu, který spolupracuje s laboratoří, kde jsem diplomovou práci prováděla.

# 1 Krátké tandemové repetitivní sekvence - STR

STR jsou jedny z více druhů tandemově opakovaných sekvencí. Repetitivní sekvence patří mezi nekódující sekvence tzv. introny. Tyto nekódující sekvence zabírají velké místo v lidském genomu, tvoří 5-15 % DNA (ROŠYPAL, 2006), z tohoto důvodu je pouhá jedna třetina genomu přepisována do RNA a jen 1,5 % genomové DNA tvoří exony strukturních genů. Z důvodu velkého množství nekódujících sekvencí vyskytujících se v genomu jsou genomy některých eukaryotních organismů rozsáhlejší než genom člověka (KOČÁREK, 2004).

Tandemové sekvence jsou umístěny v určité pozici v genomu. Jejich kopie bezprostředně následují jedna za druhou. Počet opakování kopií může být proměnlivý, tato skutečnost umožňuje identifikaci jednotlivých jedinců i nepřímou diagnostiku některých geneticky vázaných chorob. Z etických důvodů se sekvence umožňující zjištění choroby nevyužívají pro identifikaci osob.

STR – krátké tandemové repetitivní sekvence se v současnosti hojně využívají pro identifikaci za pomoci DNA. Nesou velký význam při identifikaci osob například ve forenzní genetice. Do současnosti bylo v lidském genomu popsáno více než 8000 STR sekvencí. STR jsou krátké sekvence o velikosti 2-4 párů bazí, které se mnohokrát opakují (také se jim říká mikrosatelitní DNA). Principem identifikace osob je zjištění, kolikrát je daná sekvence u identifikované osoby opakovaná. (Československá společnost pro forenzní genetiku, 2016)

Mezi tandemově opakující se sekvence dále řadíme makrosatelitní sekvence, které jsou přítomny hlavně v okolí centromer. Makrosatelitní sekvence jsou dlouhé až několik desítek párů bazí a jsou významné pro identifikaci jednotlivých chromozomů. Dalším druhem jsou minisatelitní sekvence o velikosti 5-30 párů bazí (KOČÁREK, 2007).

Výhodou STR je velké množství pro výběr analyzovaných lokusů. Pro identifikaci jsou nejčastěji vybírány lokusy s největší variabilitou – lokusy s nejvyšším počtem možných alel. Výsledkem analýzy je profil identifikované osoby a to u nepohlavních chromozomů se dvěma kopiemi lokusu. Jedinec tedy může být heterozygotní (11/13 – jednu alelu má 11 a druhou 13) nebo homozygotní (13/13 – obě alely jsou stejné - 13). Y chromozom nacházející se pouze u mužů je pouze v jedné kopii a má vždy jen jednu alelu, mohou se však vyskytnout lokusy, které jsou na chromozómu Y duplikovány a mohou tedy být heterozygotní (např. polymorfismus DYS385). U X chromozómu je muž vždy homozygotní (muž XY – má pouze

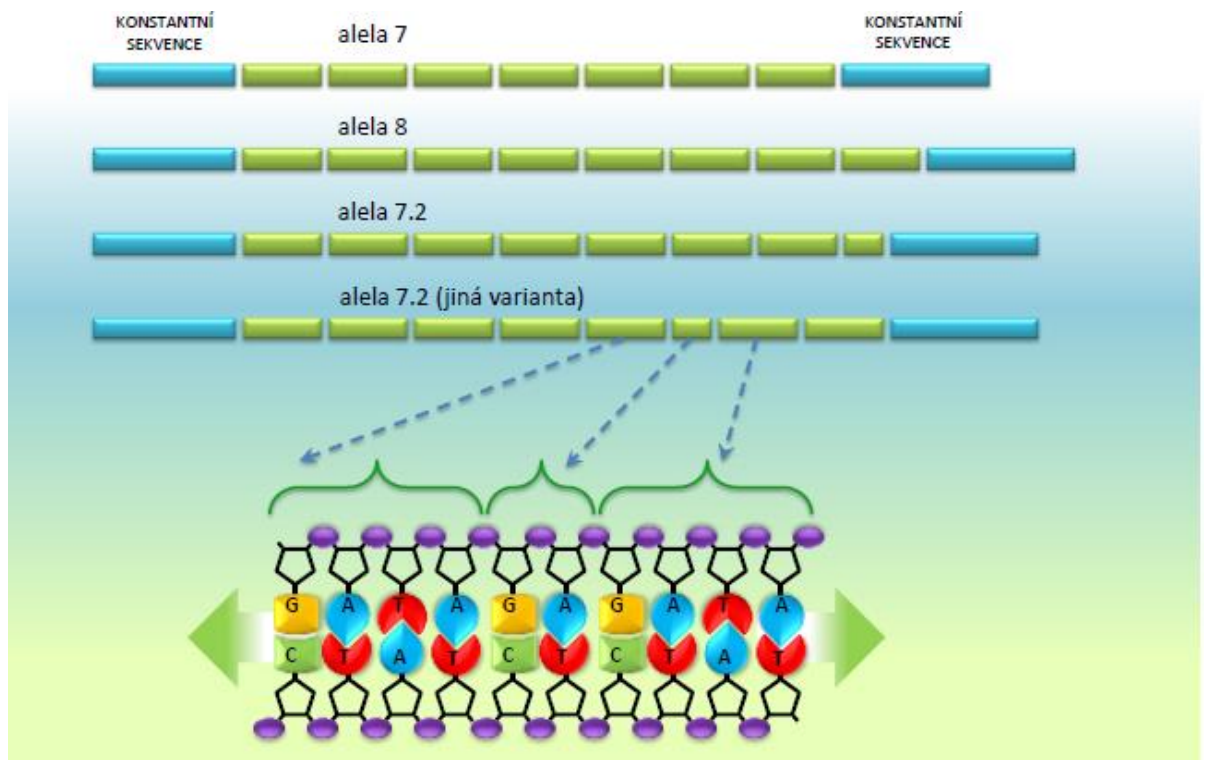
jeden X chromozóm). U žen je X chromozom ve dvou kopiích a může být homozygotní i heterozygotní (ŠIMKOVÁ, 2012).

Díky svému významu a využitelnosti byla sestavena STR databáze. Tuto databázi můžeme najít na internetových stránkách National Institute of Standards and Technology pod názvem STRBase - <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/>. V databázi je možné najít důležité informace a data získaná pomocí kitů. Tyto stránky založil J. Butler a D. Reeder již v roce 1997. Databáze je stále obnovována a jsou přidávány další informace (BUTLER, 2006).

## 1.1 Klasifikace STR

STR lokusy jsou na všech lidských chromozomech a to na autozomálních i pohlavních. Nevyskytují se pouze v mitochondriální DNA. STR lokusy jsou označovány systematicky i triviálně. U triviálních názvů se jedná o označení podle blízké genové sekvence – například FGA, TPOX a podobně. Nově nalezené lokusy jsou označovány systematickým názvem například DXS8377, DXS7424, D21S11, D19S433, D5S818 (D – DNA, číslo/označení chromozomu, S-Segment, tj DXS8377 – polymorfismus 8377 na chromozomu X). Další možnost značení je používána u pětinukleotidových lokusů, jedná se o názvy Penta E a Penta D. STR jsou klasifikovány dle základního motivu, který může mít délku 2-9 nukleotidů na di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, okta- a nonanukleotidové. Pro identifikaci osob jsou nejčastěji využívány tetra- nebo pentanukleotidové STR lokusy. Alely STR lokusů jsou označovány číslem, které vyjadřuje počet opakování základního motivu v dané alele. Alela se sedmi opakováními základní jednotky má tedy označení 7. V případě, že alela není tvořena jen celými ukončenými jednotkami, je nazývána mikrovarianta. Jedná se například o alely s osmi opakováními, přičemž osmé není úplné (například pokud je základní jednotka tetranukleotidová jsou v osmém opakování pouze dva nukleotidy). Takové alely jsou označovány číslem úplných opakování a počtem nukleotidů v poslední neúplné repetici (7.2.) (ŠIMKOVÁ, 2012).





Obrázek 1 - Délkový polymorfismus STR (ŠIMKOVÁ, 2012)

## 1.2 Genetická vazba

Genetická vazba byla poprvé popsána na počátku 20. století Thomas H. Morganem, který prováděl výzkum na octomilkách (*Drosophila*) (Morgan, 1910). Díky výzkumu definoval v roce 1926 tzv. Morganovy zákony. První zákon – geny jsou lokalizovány na chromozomech a jsou na nich uspořádány lineárně; druhý zákon – geny jednoho chromozomu tvoří vazebnou skupinu. Organismus má tolik vazebných skupin, kolik má párů homologních chromozomů a třetí zákon – mezi geny homologních párů chromozomů může proběhnout výměna genetického materiálu (crossing-over), jejichž frekvence je přímo úměrná vzdálenosti genů (MENDELU). Za tyto objevy v oblasti genetiky získal T. H. Morgan v roce 1933 Nobelovu cenu (NOBELPRIZE).

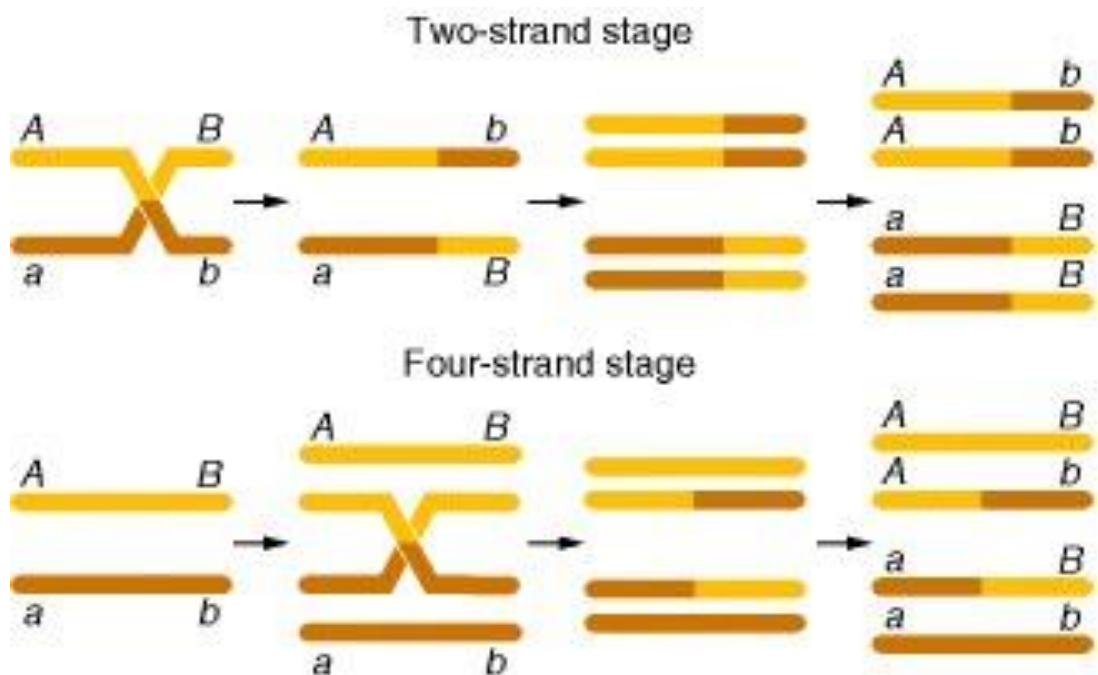
Genetická vazba je označení pro vztah dvou či více lokusů vyskytujících se na jednom chromozomu v těsné blízkosti. Pokud jsou lokusy takto blízko u sebe je mezi nimi omezena rekombinace. Tyto lokusy jsou děděny společně, tedy pokud potomek dědí jeden z asociovaných lokusů zákonitě s ním dědí i další lokusy v těsné blízkosti (DRÁBEK, 2011).

Vazebná skupina v genetice znamená, že blízké geny na jednom chromozomu jsou děděny společně – jako jeden celek. Vazebné skupiny jsou důvodem, proč některé znaky nejsou v souladu s Mendelovými zákony – volná kombinovatelnost. Ke správné rekombinaci

genů může dojít pouze v případech, kdy jsou geny umístěny na různých chromozomech (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA).

Lokusy na jednom chromozomu v genetické vazbě tvoří společnou vazebnou skupinu. Alely vazebné skupiny společně přecházejí na potomky, proto jsou rodičovské kombinace těchto alel velmi časté u potomků. V případě, že mezi lokusy je velká vzdálenost (netvoří společnou vazebnou skupinu) může dojít ke crossing-overu, čím je vzdálenost lokusů větší tím je vyšší pravděpodobnost crossing-overu. Takto vznikají nové kombinace alel, ty se nazývají rekombinované sestavy. Frekvence rekombinantních sestav je úměrná vzdálenosti lokusů (KOČÁREK, 2007).

Crossing-over probíhá během meiotického dělení. Dvě chromatidy homologních chromozomů se během profáze přiblíží a spojí se v oblasti centromer. U takto spojených chromatid dojde k překřížení, rozpojení nebo zlomům. Chromatidy si vyměňují odpovídající části a následně je napojují. Výsledkem jsou chromozomy s různou sestavou alel, než byly původní - rekombinantní. Rekombinace umožňují vznik nových kombinací znaků u potomků (SUZUKI, 2000).



Obrázek 2 - Schéma - crossing-over (SUZUKI, 2000)

Síla vazby genů se vyjadřuje jako pravděpodobnost, kdy se dva geny v dané kombinaci nepřenese do další generace - dochází ke crossing-overu. Pravděpodobnost je

označována  $\theta$  (*theta*). Pokud se jedná o úplnou vazbu  $\theta = 0,00$ , těsná vazba  $\theta = 0,01 - 0,20$ , středně těsná vazba  $\theta = 0,21 - 0,35$ , volná vazba  $\theta = 0,36 - 0,49$  a volná kombinovatelnost nabývá hodnot  $\theta = 0,50$ . Vzdálenost mezi jednotlivými geny je vyjadřována pomocí centimorganů (cM). 1 cM je roven 1% pravděpodobnosti vzniku crossing-overů. Tato hodnota vyjadřuje vzdálenost dvou genů na jednom chromozomu a je využitelná i pro určení velikosti genomu nebo například délky chromozomu (MENDELU).

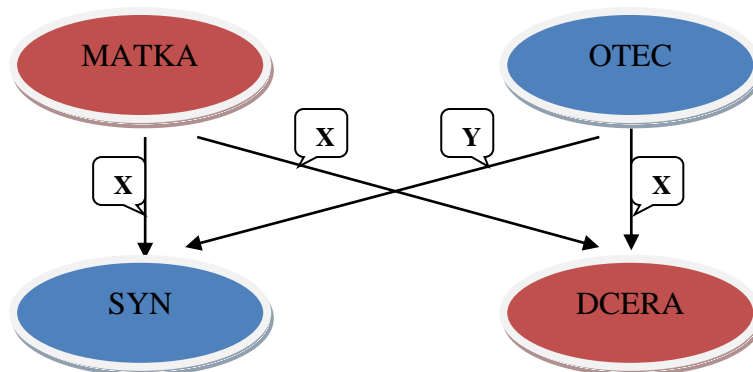
Zjištění genetické vazby mezi markery je možné provádět pomocí analýzy rodokmenů nebo pomocí metody radiačních hybridů. Pomocí radiačních hybridů je možné určit fyzickou vzdálenost mezi markery (SZIBOR, 2002).

Radiačně hybridní buňky jsou buňky obsahující malé fragmenty ozářených chromozomů. Radiační hybridní mapování je genetická metoda pro zjištění polohy genetických markerů ve vztahu k sobě navzájem. Toto mapování je využíváno pro měření vzdálenosti mezi DNA markery a jejich pořadí na chromozomech. Prvním krokem metody je amplifikace a purifikace DNA. DNA je rozdělena pomocí záření na menší segmenty, tyto segmenty jsou následně začleněny do hybridní buňky. Výsledná DNA v hybridní buňce dodává buňce například rezistenci proti toxinům a podobně. Buňky jsou poté kultivovány v prostředí s toxinem, hybridní buňky přežívají a množí se. Výsledná kultura se podrobí PCR, kdy jsou zjišťovány dva specifické genetické markery – první pocházející z původních buněk, druhý přenesený pomocí ozářených DNA segmentů. Frekvenci markerů v kultivovaných buňkách je možné vypočítat pomocí statistických metod (WINESINO).

## 2 Krátké repetitivní sekvence na chromozomu X

Chromozom X patří mezi pohlavní chromozomy. V lidském karyotypu je 22 párů autozomálních chromozomů a dva chromozomy gonozomální. Gonozomy mají na koncích svých dlouhých a krátkých ramének geneticky obdobné pseudoautozomální oblasti, ty jsou využívány pro párování gonozomů při profázi prvního meiotického dělení. Gonozomy X a Y spolu mohou vyměňovat asi 5% genetické informace, zbytek informace na chromozomech je jiný tudíž se nemůže vyměňovat. Karyotyp u žen je 46 XX - homogametní, u mužů 46 XY - heterogametní. Tento způsob určení pohlaví se nazývá typ *Drosophila* neboli savčí typ. Gonozom X je středně velký submetacentrický chromozom, řadí se do skupiny C (KOČÁREK, 2004).

V průběhu meiózy u samců (mužů) se pohlavní chromozomy rozcházejí do dvou různých gamet. Tyto pohlavní buňky mají 22 autozomálních chromozomů a jeden pohlavní chromozom. Takto vznikají dva typy spermií, jedny s chromozomem X druhé s chromozomem Y. U savčího typu určuje pohlaví plodu pouze muž (spermie). Gamety obsahující X i Y jsou produkovány ve stejném počtu, ale při oplození vajíčka mají spermie nesoucí chromozom Y výhodu, jsou lehčí a proto i rychlejší. Skutečný poměr pohlaví zygot je tedy 1,3:1. Během dalšího vývoje je tento poměr redukován omezenou životaschopností samčích embryí. Proto je šance zplození dívky či chlapce úplně stejná. Ženy tvoří všechny gamety stejné a to vajíčka s chromozomální výbavou 22 X. Tato vlastnost předurčuje, že každý z potomků dané ženy má jeden chromozom X právě od ní. Pokud je potomek chlapec vždy má X od matky a Y od otce, dcera má jedno X od matky a druhé od otce (SNUSTAD, 2009).



Obrázek 3 - Kombinace gonozomů

## 2.1 Výhody STR analýzy chromozomu X

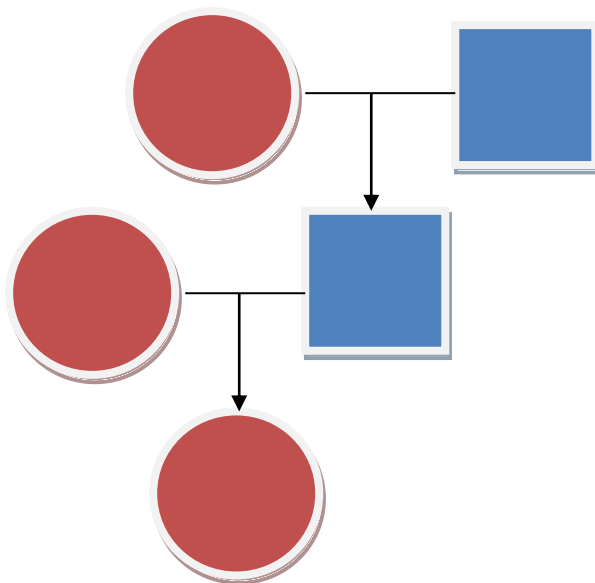
Hlavní využití analýzy polymorfismů na chromozomu X, je v případech, kdy chybí otcovská DNA a vyšetřovaní příbuzní jsou ženského pohlaví. Analýza autozomálních STR je v takovém případě nevýhodná a její výsledky často nemají dostatečnou vypovídací hodnotu. Autozomální chromozomy jsou děděny od matky i otce rovným dílem, dochází zde k rekombinaci těchto dvou původních genomů. Při vyšetřování otcovství, v případech kdy chybí otcovská DNA a snažíme se k výsledku dobrat pomocí analýzy DNA příbuzných, nejsou autozomální markery vhodnou volbou. Proto je vhodné analýzu autozomů rozšířit nebo zcela nahradit analýzou chromozomu X. Výhoda analýzy X-STR oproti autozomálním již byla popsána – A case of false mother included with 46 autosomal STR markers. V tomto případě (duo matka a syn) byla domnělá matka pomocí analýzy 46 autozomálních STR určena jako biologická matka i přesto, že popírala mateřství. Pro vyřešení případu bylo dále analyzováno 20 polymorfismů na chromozomu X, 40 autozomálních SNP a mitochondriální DNA. Dle analýzy 46 autozomálních STR bylo mateřství nepravdivě potvrzeno. Analýza pouze 20 STR na chromozomu X mateřství jednoznačně vyloučila. Profil dítěte a domnělé matky se neshodoval ve 13 X-STR. Později bylo zjištěno, že domnělá matka byla ve skutečnosti chlapcova teta (sestra chlapcova otce). Je zjevné, že v některých případech (domnělý rodič je sourozencem biologického rodiče) jsou autozomální markery nedostatečné a mohou vést k falešným výsledkům. STR na chromozomu X jsou v takovýchto případech nenahraditelné i přesto, že jejich diskriminační síla je menší než u autozomálních (LI, 2015).

X-STR locus	Mother (M)	Boy (B)
GATA165B12	10, 12	9
DXS101	24, 26	24
GATA172D05	8, 11	10
HPRTB	12, 14	13
DXS981	13, 15	14
DXS8378	11	11
DXS6795	16, 17	16
GATA31E08	9, 11	12
DXS6809	33, 35	34
DXS6803	11, 12	11
DXS9902	10, 11	9
DXS6807	11, 14	14
DXS7423	15	14
DXS7133	9	10
DXS6810	18, 19	18
DXS7132	15, 16	13
DXS10134	37, 38	38
DXS10074	17	15
DXS10101	30, 31	30, 2
DXS10135	23, 26	33

Obrázek 4 - Výsledky analýzy 20 X-STR v případě – A case of false mother included with 46 autosomal STR markers (LI, 2015)

Analýza polymorfismů na chromozomu Y je vhodná pouze při určování otcovství, kdy jsou k dispozici vzorky syna a domnělého otce (chromozom Y je v genomu mužů – XY, z otce na syna je děděn beze změn). Chromozom je takto děděn beze změny až do doby, kdy dojde k přirozené mutaci (může se jednat až o desítky či stovky generací). V takovýchto případech je analýza chromozomu Y nezastupitelná a poskytuje nejlepší výsledky. Y-chromozomální STR jsou dále užitečné pro genetickou genealogii, hodnocení migračních trajektorií lidských populací a určování haploskupiny (YAO, 2016).

Analýza polymorfismů na chromozomu X může v mnoha případech velice pomoci při určování otcovství. Například u dvou žen – sester a to i u polovičních sester, obě mají stejný otcovský chromozom X vyloučení otcovství je tedy možné i v případě, že rodičovský vzorek není dostupný pro testování. Další možností určení otcovského chromozomu X je analýza vzorku otce matky, která jeden ze svých chromozomů X předala právě svému synovi (EDELMAAN, 2004).



**Obrázek 5 - Ukávka rodokmenu, testování otcovství – dcera, matka, babička (matka domnělého otce)**

Otcovství je možné určit ne jen ze vzorku dané osoby (domnělého otce), pokud je jeho vzorek nedostupný lze použít DNA jeho příbuzných. V praxi se většinou jedná o případy, kdy domnělý otec zemřel a jeho ostatky byly pohřbeny, aniž by došlo k odběru biologického materiálu. Další možností je, že domnělý otec přebývá na neznámém místě například bezdomovci, narkomani nebo osoby v zahraničí, nebo se jen vyhýbá odběru a prodlužuje

řešení případu. Otcovství je možné prokázat z DNA bratra, pokud je ovšem potomek chlapec je vhodnější použít analýzu chromozomu Y. Další možností určování otcovství za nepřítomnosti domnělého otce je pomocí DNA jeho rodičů, nebo z DNA profilu dalšího biologického potomka domnělého otce. V tomto případě uvažujeme nad možností, že potomci jsou úplní sourozenci s totožnou matkou nebo poloviční sourozenci. Podobná situace nastává v případě určování obou rodičů (krádež dítěte, záměna v porodnici. (DRÁBEK, 2011, s46).

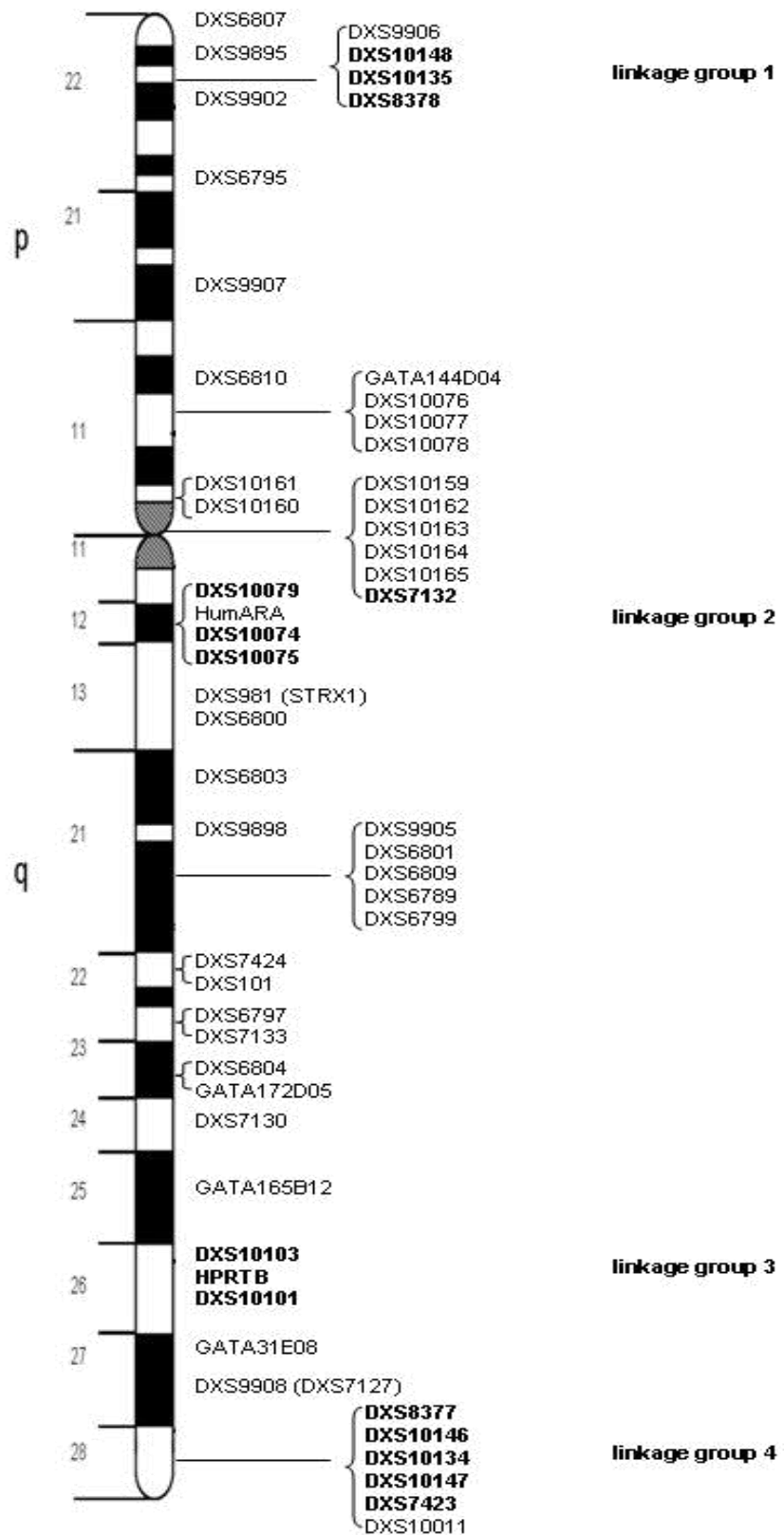
Díky gonozomální dědičnosti chromozomu X je možné využít STR X-chromozomu k vyšetření příbuznosti v rodové linii, kde se nenachází dvojice otec-syn, která přerušuje přenos tohoto chromozomu. Analýza chromozomu X může v určitých případech doplňovat či úplně nahrazovat analýzu autozomálních chromozomů a chromozomu Y. Většinou se jedná o velmi komplikované případy vyšetřování příbuznosti, to jsou například: nedostupnost žalovaného z otcovství, určování paternity (otec - dcera), určování maternity (matka – syn), ověřování příbuznosti strýce ze strany otce a neteři, polobratr, polosestra, incest s otcem nebo bratrem, identifikace obětí hromadného neštěstí. V případě paternity matka, dcera a domnělý otec je použití STR analýzy chromozomu X účinnější než analýza autozomálních chromozomů, z důvodu větší pravděpodobnosti vyloučení. X-STR převažuje nad autozomálními chromozomy obzvláště pokud mají stejnou populační frekvenci a tato frekvence je nízká. Tyto výhody jsou zapříčiněny faktem, že jsou muži heterozygoti a jejich chromozom X přechází na všechny jejich dcery v nezměněné formě. U žen je chromozom X ve dvou kopiích. V každé buňce ženského těla je jedna kopie chromozomu X inaktivovaná pomocí lyonizace. Jeho vypovídací hodnota je tedy podobná jako autozomálních chromozomů. Pokud dojde u rodičů k mutacím chromozomu X a dalším jeho aberacím, většinou dojde i k neplodnosti. Chromozom X může nést i genetické onemocnění například Turnerův syndrom, částečné a úplné monozomie. Takto postižený karyotyp není možné zařadit do vyšetření příbuznosti, protože se osoba, pro kterou je daná analýza prováděna nesmí dozvědět o dědičných onemocněních. Stejně tak je vyšetření chromozomu X nepřínosné v případě vyšetření vzorku z potratu plodu 46 XX po incestu otce s dcerou – dcera i plod zdědily po otci stejné X, ten není možné ve směsi mateřských a dětských buněk odlišit (DRÁBEK, 2011).

## **2.2 STR na chromozomu X**

STR lokusy na chromozomu X se využívají pro identifikaci osob, zjišťování příbuznosti, potvrzení či vyloučení otcovství a například určování haplotypu osob (Generi Biotech).

Analýzu STR na chromozomu X lze velmi efektivně využít pro řešení složitých případů testování příbuznosti. Na rozdíl od chromozomu Y dochází u X k rekombinaci během meiózy. Genetická lokalizace markerů je důležitá při použití chromozomu X pro testování příbuznosti. Všechny markery jsou umístěny na jednom chromozomu v prostoru 240 cM, proto je důležitá přesná znalost lokace každého markeru (viz obrázek – Idiogram chromozomu X) (CHRX-STR).





Obrázek 6 - Idiogram chromozomu X (ChrX-STR.org)

**Tabulka 1 - Lokusy na chromozomu X, sekvence primerů (Generi Biotech)**

<b>Lokus</b>	<b>Sekvence primeru</b>	<b>název</b>
<b>DXS8377</b>	CACTTCATGGCTTACCACAG	DXS8377_F
	GACCTTTGGAAAGCTAGTGT	DXS8377_R
<b>DXS101</b>	ACTCTAAATCAGTCCAAATATCT	DXS101_F
	AAATCACTCCATGGCACATGTAT	DXS101_R
<b>DXS7424</b>	CTGCTTGAGTCCAGGAATTCAA	DXS7424_F
	GAACACGCACATTTGAGAACATA	DXS7424_R
<b>DXS7133</b>	CTTCCAGAATCAGAAGTCTCC	DXS7133-R
	AGCTTCCTTAGATGGCATTCA	DXS7133-R
<b>DXS6789</b>	AAGAAGTTATTTGATGTCCTATTGT	DXS6789-R
	GTTGGTACTTAATAAACCCCTCTTT	DXS6789-F
<b>DXS7132</b>	GAGCCCATTTTAATAAATCC	DXS7132_F
	GCCAAACTCTATTAGTCAAC	DXS7132_R
<b>DXS6807</b>	GAGCAATGATCTCATTTGCA	DXS6807_F
	AAGTAAACATGTATAGGAAAAAGCT	DXS6807_R
<b>DXS8378</b>	TTAGGCAACCCGGTGGTCC	DXS8378_F
	ACAAGAACGAAACTCCAAC	DXS8378_R
<b>DXS6800</b>	GTGGGACCTTGTGATTGTGT	DXS6800_F
	CTGGCTGACACTTAGGGAAA	DXS6800_R
<b>DXS9898</b>	CGAGCACACCTACAAAAGCT	DXS9898_F
	TCGATTAGGTTCAAGTCCCA	DXS9898_R
<b>HPRTB</b>	TCTCTATTTCCATCTCTGTCTCC	HPRTB_F
	TCACCCCTGTCTATGGTCTCG	HPRTB_R
<b>DXS10011</b>	TGGGAGAACCGTTTGAAGTT	DXS10011-R
	CTGAGATTGCACCATTGCAC	DXS10011-F
<b>DXS9895</b>	TTGGGTGGGGACACAGAG	DXS9895_F
	CCTGGCTCAAGGAATTACAA	DXS9895_R
<b>DXS6809</b>	TGAACCTTCCTAGCTCAGGA	DXS6809-F
	GCAAATTGGATTCTCCAGA	DXS6809-R
<b>GATA172D05</b>	TAGTGGTGATGGTTGCACAG	GATA172D05-F
	ATAATTGAAAGCCCGGATTC	GATA172D05-R
<b>DXS7423</b>	GTCTTCCTGTCATCTCCCAAC	DXS7423-F
	AGCTTAGCGCCTGGCACATA	DXS7423-R
<b>DXS6809</b>	TGAACCTTCCTAGCTCAGGA	DXS6809-F
	GCAAATTGGATTCTCCAGA	DXS6809-R
<b>DXS10079</b>	AGGAGAATGGCTTGAACCTG	DXS10079-F
	TGGGTATCCTTGTGTTCCAA	DXS10079-R

Tabulka 2 - Primery a předpokládané velikosti alel (Generi Biotech, dle ChrX-STR.org)

lokus	min	max	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325
DXS101	182	227										
DXS10011	221	301										
DXS10079	271	315										
DXS6789	154	198										
DXS6800	194	218										
DXS6807	251	275										
DXS6809	235	279										
DXS6809	235	279										
DXS7132	131	167										
DXS7133	106	132										
DXS7423	175	199										
DXS7424	147	174										
DXS8377	207	252										
DXS8378	110	134										
DXS9895	135	163										
DXS9898	194	214										
GATA172D05	104	132										
HPRTB	144	176										

### 2.2.1 Vázané STR na chromozomu X

Při analýze STR na chromozomu X je nutné respektovat vazbu jednotlivých polymorfismů. Jelikož jsou všechny umístěny na jednom chromozomu, je nutné znát jejich pozici a vazbu. Na chromozomu X jsou 4 vazebné skupiny (viz obrázek idiogram chromozomu X). První skupina je na krátkém raménku chromozomu v oblasti 22 a obsahuje následující polymorfismy – DXS10148; DXS10135 a DXS8378. Druhá, třetí a čtvrtá vazebná skupina jsou na dlouhém raménku chromozomu X. Druhá skupina umístěná blízko centromery v oblasti 11 a 12 obsahuje polymorfismy DXS7132; DXS10079; DXS10074 a DXS10075. Třetí skupina zahrnuje polymorfismy umístěné v oblasti 26 a jsou to DXS10103; HPRTB a DXS10101. Poslední tedy čtvrtá skupina je složena z 5 polymorfismů umístěných v oblasti 28, jedná se o DXS8377; DXS10146; DXS10134; DXS10147 a DXS7423 (CHRX-STR).

### 2.3 Statistické výpočty pro otcovství

Výpočty pro určení otcovství se provádí pomocí výpočtu pravděpodobnosti (P). Při výpočtech pravděpodobnosti je možné použít sčítání pravděpodobností a to v případech, že předpokládáme přítomnost jednoho nebo druhého genu. Násobení pravděpodobností se provádí, pokud se jedná o zhodnocení dvou nezávislých genů – pouze genů, které nejsou ve vazbě. Pomocí takovýchto výpočtů lze spočítat věrohodnostní poměr - LR. V případech určování otcovství je věrohodnostní poměr označován jako PI – paternitní index.

Věrohodnostní poměr vyjadřuje podíl dvou pravděpodobnostní výsledků genotypizace matky, dítěte a domnělého otce. V čitateli je hypotéza otcovství, pokud v takovémto poměru je výsledek větší než jedna svědčí pro hypotézu otcovství, v případě kdy je hodnota rovna jedné nelze se naklonit k hypotéze otcovství ani naopak. Pokud je výsledná hodnota nižší než 1 je hypotéza otcovství méně pravděpodobná (BALDING, 2005).

Pro výpočet pravděpodobnosti otcovství se využívá Bayesova věta. Bayesova věta je matematický vzorec pro výpočet podmíněné pravděpodobnosti určitého jevu za předpokladu, že nastal jiný jev. Jedná se tedy o vyjádření pravděpodobnosti A za předpokladu pravdivosti jevu B (DRÁBEK, 2011).

$$P(A|B) = P(A) \times \frac{P(B|A)}{P(B)}$$

$P(A)$  – výchozí pravděpodobnost – pravděpodobnost výskytu jevu A

$P(B)$  – pravděpodobnost jevu B

$P(B|A)$  – pravděpodobnost jevu B za předpokladu pravdivosti A

### 3 Amplifikace

Amplifikace specifických úseků DNA se v dnešní době provádí nejčastěji pomocí PCR – polymerázové řetězové reakce. PCR úspěšně nahradila dřívější způsob amplifikace, kdy byly fragmenty DNA vpraveny do bakterie nebo buňky jiného organismu. PCR je mnohokrát rychlejší, účinnější a stále více využívána v laboratořích. PCR byla poprvé použita K. Mullisem, který byl v roce 1993 za tuto metodu oceněn Nobelovou cenou (MULLIS, 2009, PCR).

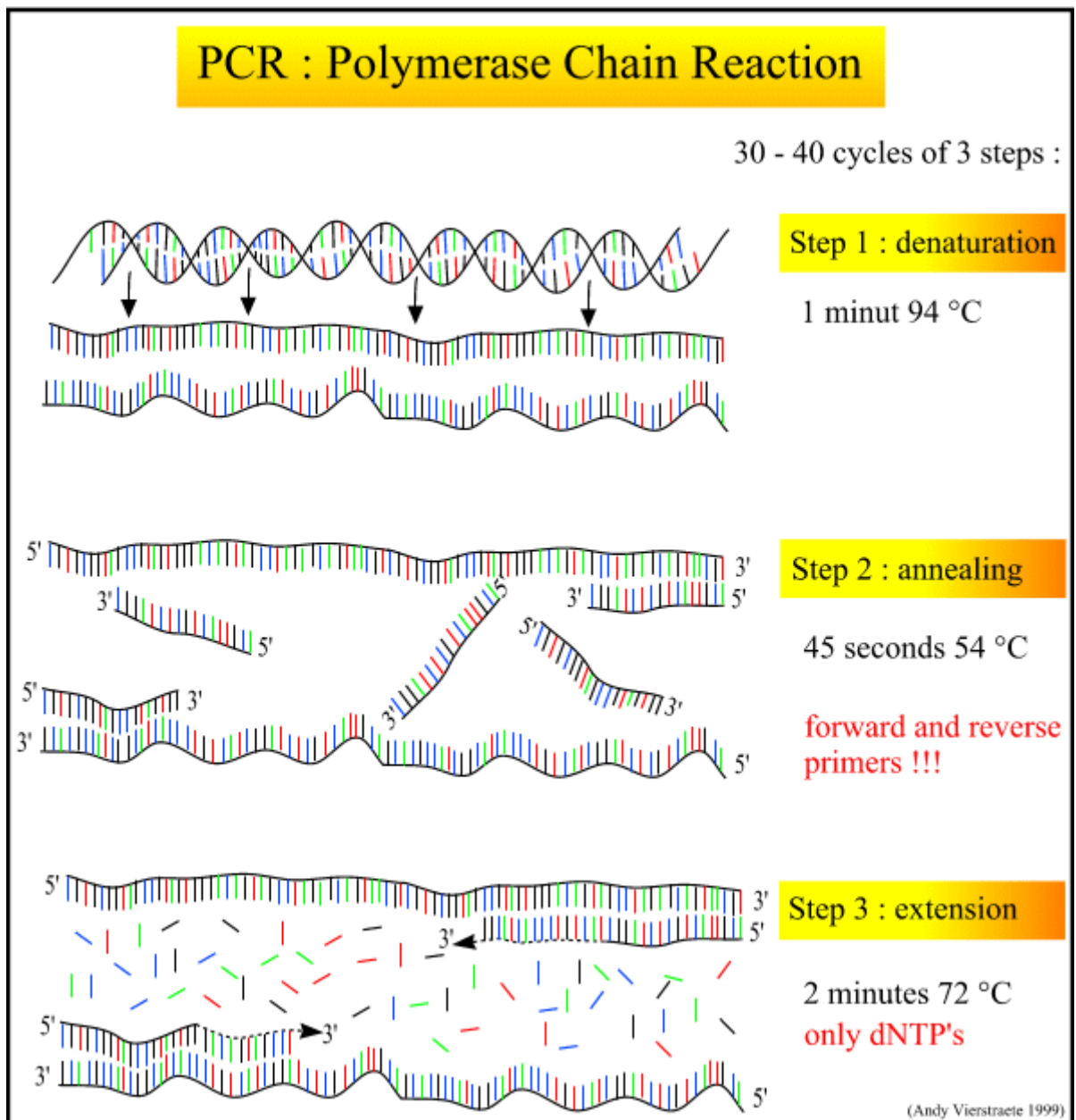
#### 3.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce slouží k amplifikaci sekvencí DNA. Amplifikace se provádí *in vitro* a během několika hodin je možné pomocí PCR sekvence amplifikovat až milionkrát. Pro použití PCR je nutné znát krátké nukleotidové sekvence před a za požadovanou sekvencí. Na tyto sekvence nasedají komplementární syntetické oligonukleotidy o délce 20-25 nukleotidů tzv. primery, které ohraničují zkoumanou oblast (VALONES, 2009).

PCR se skládá ze tří opakujících se kroků – denaturace, annealing a prodlužování. V prvním kroku je templátová DNA denaturována zahřáním na teplotu 92-95 °C, tento krok trvá přibližně 30 sekund. Na takto připravenou jednovláknovou DNA nasedají primery a to při teplotě 50-60 °C. Primery poskytují 3'-OH skupinu, na kterou se připojují volné nukleotidy. Tento druhý krok se nazývá annealing a trvá přibližně 30 sekund. Třetí krok obnáší použití DNA polymerázy pro replikaci DNA. Dochází k navázání volných nukleotidů A, T, C a G a následném prodlužování řetězce. Volné nukleotidy jsou ve formě deoxyribonukleotidfosfát - dNTP. Polymerace probíhá při teplotě 70-72 °C po dobu 1,5 minuty. Teplotní profil reakce může být nastaven dle zvolené polymerázy. Takto syntetizované sekvence DNA slouží v dalším cyklu PCR jako templát. Kvantita produktu roste exponenciálně (SPENCER, 2015).

DNA polymeráza je termostabilní, aby nedegradovala při prvním kroku PCR (95 °C). Proto se nejčastěji používá Taq-polymeráza objevená u termofilních bakterií *Thermus aquaticus*. Díky tomuto objevu není nutné po každém cyklu opětovně přidávat novou polymerázu a stačí ji dát dostatek do počáteční směsi pro PCR. Amplifikační kroky jsou řízeny pouze střídáním teploty v termocykléru. Nevýhodou Taq-polymerázy je nepřítomnost 3'→5' korekční aktivity, proto při amplifikaci produkuje i chybně sestavené sekvence. Pokud

je potřeba při testu DNA vysoké kvality je vhodnější využít termostabilní polymerázy s korekční aktivitou. To jsou například Pfu z bakterie *Pyrococcus furiosus* nebo Tli z *Thermococcus litoralis*. Další nevýhodou Taq-polymerázy je, že není schopná amplifikovat úseky delší než několik tisíc nukleotidových párů. V tomto případě je možné Taq-polymerázu nahradit Tfl-polymerázou získanou z bakterie *Thermus flavus*, která je schopná amplifikovat sekvence dlouhé až 35 kbp (SNUSTAD, 2009).



Obrázek 7 - Polymerázová řetězová reakce (UNIVERSITY OF LEICESTER)

## 3.2 Sestavování multiplex PCR

Multiplexní PCR je metoda, ve které je možné amplifikovat několik lokusů zároveň. Tato metoda byla úspěšně aplikována v mnoha případech testování DNA (polymorfismy, mutace, delece). Pokud je multiplex špatně sestaven neprobíhá amplifikace správně, některé lokusy se nemusí vůbec amplifikovat, některé mohou být ve velmi nízké kvantitě. Klasická multiplexní PCR reakční směs je složena z deionizované vody, PCR pufru, dNTP, primerů, BSA, Taq polymerázy a templátové DNA. Koncentraci jednotlivých složek je nutné optimalizovat pro další použití. V některých případech jsou do reakce přidávána aditiva, která napomáhají amplifikaci templátové DNA (HENEGARIU, 1997).

Pomocí optimalizace PCR je možné docílit využívání více primerů značených více fluorofory použitých v jediné reakci. Multiplexní PCR pracuje s menším množstvím DNA než klasická PCR a celkové množství spotřebovaného materiálu je mnohem menší, to je velmi důležité například pro forenzní analýzu, kde se často setkáváme s nedostatečným vzorkem DNA. Komerční STR testy zahrnují až 24 páťů primerů (např. GlobalFiler STR kit – ThermoFisher Scientific). Při navrhování nové metody – tedy i nových primerů je nutné primery přizpůsobit tak, aby negativně neovlivňovali metodu ani sebe navzájem. Návrhy primerů je možné provádět v různých počítačových programech a data získat v internetových databázích (GenBank). GenBank často udává zápis komplementárního vlákna, je tedy potřeba provést i reverzní zápis vlákna, tak aby odpovídal známým STR (TTTC → GAAA). Nejprve je nutné vybrat lokusy, které budeme chtít analyzovat, určit jejich velikost a počet opakování. Zvolené primery musí vymezovat danou oblast, aby výsledné produkty měli vhodnou velikost a nepřekrývaly se. Je vhodné, aby všechny primery byly stabilní ve stejném teplotním rozsahu. Každý značený primer musí být před přidáním do multiplexu bezproblémově samostatně funkční, po smíchání by neměly mezi sebou nijak interagovat. Volba fluorescenčního barviva závisí na instrumentaci a detekci reakce, dalším kritériem je pokud možno co nejnižší spektrální překrývání. Takové primery by neměly být často rozmrazovány a zpětně zamrazovány, to může vést k narušení vazby barviva na oligonukleotid. Pro testovací účely jsou primery míchány do roztoku o koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$ . Do reakce jsou přidávány další činidla a to DNA polymeráza, volné nukleotidy, chlorid hořečnatý, pufr a BSA. BSA zlepšuje amplifikaci v multiplexu. Roztok primerů je připravován v ekvimolárním poměru. Značené primery by měly být skladovány spíše v roztoku s pH okolo 8 a ne v deionizované vodě, která má pH okolo 5. Bazické pH zajišťuje nižší degradaci primerů a zamezuje vzniku

barevných artefaktů, které mohou rušit stanovení. PCR je zpuštěna za standardních podmínek (BUTLER, 2005, a).

Sestavení multiplex PCR pro určování STR je výhodné zejména díky rychlosti a velké využitelnosti analýzy (určování příbuznosti, diagnostika chorob, transplantace kostní dřeně, zemědělská genetika, posouzení rodičovství a populační genetika). Výhodou multiplexní PCR je kombinování více různých STR, to přináší přesnější výsledky. Pravděpodobnost, že dva náhodně vybraní jedinci budou mít například 15 STR polymorfismů stejných je velmi malá (záleží na frekvenci výskytu dané alely). STR jsou vždy vybírány dle jejich vhodnosti z pohledu Mendelovi dědičnosti, genetické vazby a tak aby bylo možné získat alespoň částečné výsledky u fragmentovaných vzorků (nekompletní sada chromozomů, nejčastěji u forenzních vzorků získaných za nestandardních podmínek jako je například místo činu). Každá STR sekvence musí být děděna nezávisle na jiné (viz kapitola Genetická vazba). STR lokusy u jednoho z takto vyvinutých multiplexů jsou autozomální STR - D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D8S1179, D21S11, D18S51, D16S539, D2S1338, D19S433 a mohou být amplifikovány pomocí šesti kitů - AmpFSTR Blue, AmpFSTR GreenI, AmpFSTR Profiler, AmpFSTR Profiler Plus, AmpFSTR COfiler a AmpFSTR SGM Plus. Při použití těchto kitů se jako nejlepší teploty pro denaturaci a annealing PCR jeví 94 °C a 59 °C, maximální výtěžek ampliconů byl získán po 8 minutách. Optimalizace metody určování více lokusů v jedné reakci vede k větší robustnosti a tím i k věrohodnějším výsledkům (WALLIN, 2002).



## **4 Cíle práce**

Schválené cíle práce:

1. Vysvětlit a porovnat dědičnost autozomálních chromozomů a chromozomu X.
2. Příprava multiplexní PCR pro vybrané polymorfismy.
3. Frekvenční analýza vybraných polymorfismů chromozomu X.

## 5 Experimentální část

Cílem naší práce bylo optimalizovat metodu pro STR analýzu chromozomu X.

Po provedení rešerše jsme vybrali 16 kandidátních polymorfismů, tak aby s jejich pomocí bylo možno vytvořit multiplexní reakci. Jako výborný zdroj databázového charakteru se osvědčila databáze věnovaná STR na chromozomu X - <http://chrX-str.org/>.

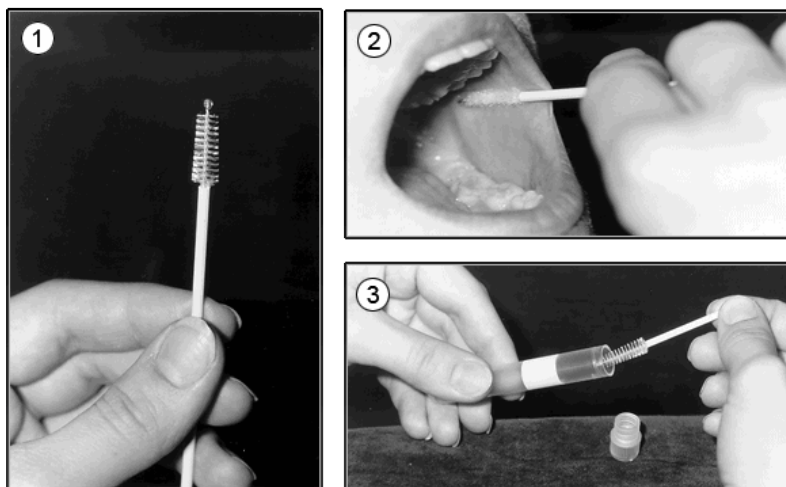
Zvolili jsme následující polymorfismy – DXS8378, DXS7424, DXS8377, DXS7133, DXS101, DXS6807, DXS7423, DXS7132, DXS6800, DXS10079, DXS9898, DXS9895, DXS6809, GATA172D05, DXS6789 a DXS10011. Z vybraných polymorfismů jsme se snažili vytvořit multiplexní PCR pro zjednodušení a urychlení analýzy. Pro vybrané polymorfismy jsme využili publikované sekvence primerů na serveru <http://www.chrx-str.org/>.

Další částí naší práce bylo získat vzorky z populace, zjistit frekvenci alel jednotlivých polymorfismů a zjištěná data vyhodnotit. Tato část je nutná pro správné pravděpodobnostní výpočty.

### 5.1 Sběr vzorků

Odběr vzorků pro STR analýzu chromozomu X byl prováděn z bukalní sliznice pomocí štětečku, na jehož konci jsou jemné štětičky. Tento odběr je absolutně bezbolestný a velmi rychlý. Je možné jej provádět kdekoliv. Veškeré pomůcky pro odběr (štěteček, zkumavky, nůžky) musí být DNA-free. Při odběru je důležité, aby nedošlo k náhodné kontaminaci jiným vzorkem nebo odebírající osobou. Proto je velmi důležité respektovat zásady čisté a rychlé práce.

Odběr počíná podepsáním souhlasu a informováním dobrovolníků o dalším použití jejich biologického materiálu. Následně je proveden stěr pomocí štětečku. Stěr se provádí ze sliznice dutiny ústní krouživými pohyby po dobu alespoň jedné minuty na každé



Obrázek 8 - Odběr vzorku z bukalní sliznice (A-TEST)

straně úst. Poté je štěteček opatrně vložen do zkumavky a zkrácen tak aby bylo možné zkumavku uzavřít. Každá zkumavka byla řádně označena pořadovým číslem. Vzorky byly co nejrychleji dopraveny do laboratoře, kde byla provedena izolace (Generi Biotech).

## **5.2 Izolace DNA**

DNA ze vzorků byla izolována na kolonkách se silikagelovou membránou. K izolaci nukleových kyselin ze vzorků byl použit kit pro izolaci DNA (Kit for isolation of DNA from tissues - Generi Biotech). Nejprve byly vzorky lyzovány pomocí Proteinasy K a roztoku s vyšším obsahem chaotropních iontů. Roztok ve zkumavkách byl řádně promíchán pomocí vortexu a inkubován v blokovém termostatu při 56 °C po dobu 3 hodin (většinou byla inkubace prodloužena do druhého dne, přibližně na 10 hodin, ve shodě s validovaným standardním operačním postupem). Následně byl ze zkumavek odstraněn kartáček a přidán pufr BL1. Zkumavka byla opět promíchána na vortexu a inkubována 15 minut při 70 °C. Po inkubaci byl ke vzorku přidán etanol, který zajišťuje specifické podmínky pro navázání DNA na silikagelovou membránu. Takto připravený a řádně promíchaný roztok byl pipetován na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugován 1 minutu při 11000 g. Kolonka s navázanou DNA byla promývána postupně dvěma promývacími pufrů, které slouží k odstranění nečistot. Po posledním promytí byla sběrná zkumavka odstraněna a kolonka byla vložena do nové a řádně označené zkumavky. Na střed kolonky byl pipetován přehřátý eluční roztok (50 µl), kolonka byla inkubována po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě tak, aby došlo k uvolnění veškeré DNA přítomné na membráně. Posledním krokem izolace byla opět centrifugace. Takto byla získána čistá genomová DNA připravená pro další použití (Generi Biotech).

## **5.3 PCR amplifikace**

PCR je nejdůležitější krok celé analýzy, proto bylo nutné provést optimalizaci PCR metody a přizpůsobit podmínky amplifikace pro STR analýzu chromozomu X. Optimalizovali jsme obsah aditiva, teplotní profil, koncentraci primerů a koncentraci DNA v reakčním roztoku. Cílem optimalizace bylo nastavit podmínky PCR pro jednotlivé polymorfismy, aby bylo možné vytvořit funkční multiplex.

### **5.3.1 Buněčná linie K562**

Optimalizace byla prováděna na buněčné linii K562 pocházející z buněčné banky ECACC Lot 10H021. Buněčná linie K562 byla dále používána jako pozitivní kontrola, jelikož

jsou pro používané polymorfismy publikovány hodnoty alel. Dle naměřených velikostí daných alel byly kalibrovány výsledky na vzorcích.

**Tabulka 3 – Referenční STR profil chromozomu X buněčné linie K562 (ChrX-STR.org)**

	<b>K562 (BRL)</b>	<b>K562 (Promega)</b>	
<b>DXS101</b>	24	23	24
<b>DXS10011</b>	29	29	
<b>DXS10079</b>		17	
<b>DXS6789</b>	21	21	
<b>DXS6800</b>	21	21	
<b>DXS6807</b>	11	11	
<b>DXS6809</b>	34	34	
<b>DXS7132</b>	13	13	
<b>DXS7133</b>	10	10	
<b>DXS7423</b>	17	17	
<b>DXS7424</b>	17	17	
<b>DXS8377</b>	52	52	
<b>DXS8378</b>	10	10	
<b>DXS9895</b>	16	16	
<b>DXS9898</b>	12	12	
<b>GATA172D05</b>	12	12	
<b>HPRTB</b>	13	13	

Ověření buněčné linie jsme provedli pomocí analýzy autozomálních STR. Námi zjištěné hodnoty jsme porovnali s udávanými hodnotami firmou ATCC. Výsledky byly shodné.

**Tabulka 4 - Profil buněčné linie K562 - autozomální STR**

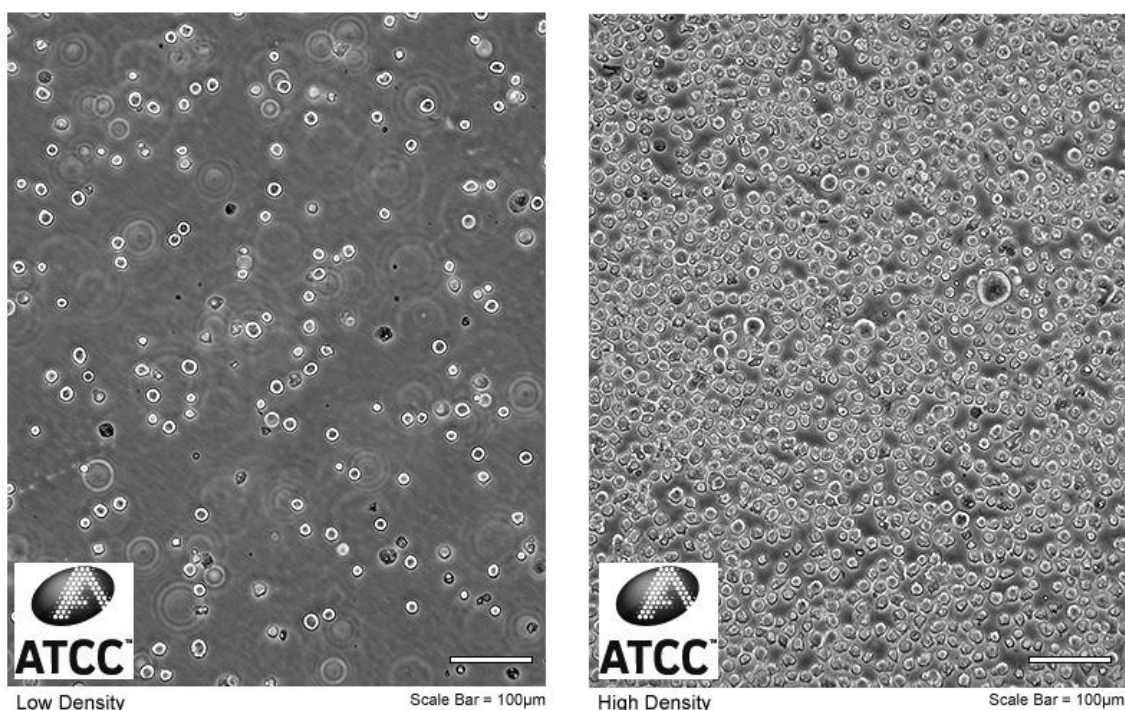
<b>Marker</b>	<b>K562 - ECACC</b>		
<b>D8S1179</b>	12		
<b>D21S11</b>	29	30	31
<b>D7S820</b>	9	11	
<b>CSF1PO</b>	9	10	
<b>D3S1358</b>	16		
<b>TH01</b>	9.3		
<b>D13S317</b>	8		
<b>D16S539</b>	11	12	
<b>D2S1338</b>	17		
<b>D19S433</b>	14	14.2	
<b>VWA</b>	16		
<b>TPOX</b>	8	9	
<b>D18S51</b>	15	16	
<b>AMEL</b>	X		
<b>D5S818</b>	11	12	
<b>FGA</b>	21	24	

Buněčná linie K562 byla získána z pleurálního výpotku 53leté ženy s chronickou myeloidní leukémií v terminální blastické fázi. Získané buňky granulocytární řady byly vysoce nediferencované. Nedávné studie prokázaly, že K562 blasty jsou multipotentní krvetvorné maligní buňky. Mohou se spontánně diferencovat v prekursory erytrocytů, granulocytů (neutrofilů, eozinofilů a basofilů) a monocytů (PUBLIC HEALTH ENGLAND).

Tato linie je využívána pro různé analýzy například protinádorové testy, testy karcinogenity, diferenciací, farmakodynamika, klonování, cytotoxicita, v buněčné biologii, STR a SNP analýze a v testování aktivity natural killer (HYPER CLDB).

Široké využití má buněčná linie K562 pro testy natural killer buněk *in vitro*. Kultury z této populace vykazují vysokou citlivost pro testy aktivity natural killer buněk. Povrchové vlastnosti membrány buněk prokázaly, že K562 je z linie erytroleukemických buněk. Karyologická studie různých sublinií rozděluje linii na tři skupiny – A, B a C. Kmen ATCC se nejvíce podobá populaci B. Živné médium pro tuto buněčnou linii obsahuje 4 mM L-glutaminu, 4500 mg/l glukózy a 1500 mg/l hydrogenuhličitanu sodného. K tomuto médiu se ještě před použitím přidává BSA, tak aby ve výsledném roztoku měl koncentraci 10 %. Kultury lze udržovat přidáním nebo výměnou čerstvého živného média, doporučená doba, po které je nutné médium vyměnit je 2 až 3 dny. Pro založení nové kultury se používá koncentrace  $1 \times 10^5$  živých buněk/ml (ATCC).

ATCC Number: **CCL-243**™  
Designation: **K-562**



**Obrázek 9 - Buněčná linie K562 (ATCC)**

### **5.3.2 Optimalizace koncentrace primerů a DNA v reakční směsi**

Ideální koncentrace templátové DNA v reakční směsi je velmi důležitá pro správný průběh amplifikace. Vyšší koncentrace mohou inhibovat produkty PCR, naopak nižší množství templátové DNA nemusí být dostačující a může dojít k výraznému snížení kvantity produktu (Generi Biotech).

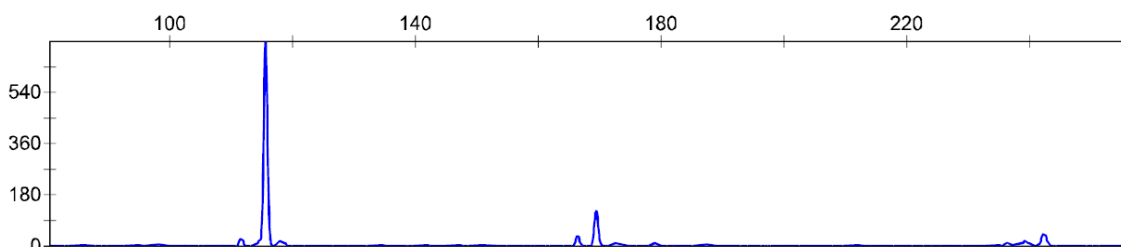
U buněčné linie K562 jsme testovali rozsah koncentrací DNA. Různá ředění dávala dobré výsledky, to nám naznačuje vysokou robustnost metody. Ředění nemělo žádný vliv na kvalitu produktů, s rostoucí koncentrací templátové DNA se zvyšovala kvantita produktů. Pro další práci a jednoduchost jsme zvolili ředění 50×, původní koncentrace DNA byla 89,9 ng/µl. U nasbíraných vzorků jsme zkoušeli obdobné ředění. Pro stanovení správné koncentrace DNA jsme zkoušeli 10 náhodně vybraných vzorků. Zde se jako vhodnější jevílo ředění pouze 25×, důvodem byla nižší koncentrace získané DNA z bukálních stěrů oproti DNA z buněčné linie. U DNA ředěné 50× byla kvantita produktů ztelněji nižší, to mělo vliv na vyhodnocování dat z fragmentační analýzy. Použití ředícího faktoru na všechny vzorky

místo přesného měření koncentrace jsme zvolili z důvodu jednoduššího provedení experimentu po předchozím ověření na malé sérii vzorků.

Dále jsme testovali nejvhodnější koncentraci primerů v monoplexu. Zkoušeli jsme různé koncentrace v rozsahu 100 až 300 nM ve výsledné reakční směsi. U všech koncentrací nebyla pozorována změna v kvalitě produktu, kvantita rostla úměrně s rostoucí koncentrací primerů. Nejvíce produktu bylo pozorováno u koncentrace 300 nM primeru, z finančních důvodů by však bylo zbytečné používat tuto koncentraci, dostačující je koncentrace 200 nM. Jako nejlepší pro další práci byla vyhodnocena koncentrace 200 nM, u níž byla kvantita produktu velmi dobrá.

### 5.3.3 Optimalizace teplotního profilu

Vhodně optimalizovaný teplotní profil je nezbytným aspektem pro PCR reakci. Pro zvýšení účinnosti amplifikace jsme upravovali časy a teploty jednotlivých kroků PCR. Zásadním problémem byla nízká kvantita druhého a třetího polymorfismu, které poskytují delší PCR produkt (produkty delší než 150 bází - viz obrázek multiplex M DXS8378, DXS7424 a DXS8377 – analýza buněčné linie K562, teplotní profil DXS\_2). Optimalizací PCR jsme se snažili zvýšit koncentraci delších produktů v multiplexní reakci, aby bylo možné je kvalitně vyhodnotit.



**Obrázek 10 – Multiplex M DXS8378, DXS7424 a DXS8377 - analýza buněčné linie K562, teplotní profil DXS\_2**

V původním profilu jsme měli 3 kroky denaturace. První 95 °C 11 minut, druhý 96 °C 2 minuty a třetí 94 °C 1 minutu. Pro zjednodušení a zkrácení reakce jsme provedli pokusy sjednocení denaturace do menšího počtu kroků, případně úpravy časů denaturace.

Nejprve jsme odebrali krok 96 °C po dobu 2 minut, abychom docílili vyšší účinnosti polymerázy, kterou vyšší teplota postupně deaktivuje. Dále jsme zkrátili čas první denaturace z 11 minut na 2 minuty. Předpokládali jsme, že bude docházet k postupné aktivaci

polymerázy teplem v opakujících se denaturačních krocích a tím bude postupně nahrazována již vyčerpaná polymeráza. Dále by tato krátká denaturace měla být dostatečná pro denuraci templátové DNA. Denuraci 94 °C 1 minutu jsme ponechali.

Upravovali jsme teplotu a čas annealingu, zvolili jsme teplotní rozsah 55 až 66 °C. Dobře zvolená teplota annealingu je důležitá pro správné nasednutí primerů. Pokud je teplota nižší mohou primery nasedat i na nekomplementární vlákna a specifita reakce se snižuje, naopak pokud je teplota vyšší zvýší se specifita reakce, ale efektivita je nižší. V případě kdy by teplota vůbec nevyhovovala zvoleným primerům, může dojít k úplné neúčinnosti amplifikace. Teplotu jsme se snažili optimalizovat pro všechny lokusy na stejnou hodnotu tak, aby bylo možné následně sestavit funkční multiplex z těchto lokusů. Jako nejvhodnější se jevila teplota 62 °C. Čas annealingu jsme zkoušeli prodloužit na 1,5 a 2 minuty z původní 1 minuty. Prodloužení času nepřineslo žádnou změnu, proto jsme ponechali původní 1 minutu.

Teplotu elongace jsme zkoušeli v rozmezí 70 – 76 °C. Vyšší teplota je vhodnější pro delší produkty. V našem případě (produkty v délkovém rozpětí 100 až 300 bp) nejlépe fungovala teplota 70 °C. Čas elongace jsme prodloužovali. Vyzkoušeli jsme 1,5; 2; 2,5; 3 a 3,5 minuty. Prodloužení času bylo důležité hlavně při použití multiplexu, kde bylo nutné ponechat delší čas pro prodlužování delších řetězců, tak aby byla kvantita kratších řetězců co nejpodobnější jako kvantita delších řetězců. Pro naše účely byla nejlepší doba 3 minuty, delší čas už byl zbytečný a nedošlo k žádným kvantitativním změnám.

Finální elongaci při 60 °C, při které dochází k doplnění řetězců, jsme zkrátili z 60 minut na 15 minut. 15 minut mělo stejné výsledky jako původních 60 minut, tímto krokem jsme výrazně zkrátili dobu amplifikace (MEDICINE.YALE).

Během optimalizace teplotního profilu jsme vyzkoušeli 26 různých variant. Nejlepší byl teplotní profil s názvem DXS\_26. Tento teplotní profil je přibližně o hodinu kratší než původní a trvá 2 hodiny a 47 minut.

#### **5.3.4 Vliv aditiv na PCR produkty**

Do reakční směsi jsme přidávali aditiva za účelem zlepšení PCR reakce. Aditiva napomáhají funkci polymerázy, neutralizují její inhibitory, zlepšují specifitu reakce a zvyšují stabilitu templátu v denaturované formě. Do reakce jsme použili aditiva BSA (hovězí sérový albumin), DMSO (dimetylsulfoxid), betain, MgCl<sub>2</sub> (chlorid hořečnatý) a glycerol.



BSA bylo přidáváno do reakční směsi za účelem neutralizace inhibitorů polymerázy, jako jsou například melanin, hemin, ionty železa, různé kyseliny a inhibitory vyskytující se ve starších vzorcích (SIMONOVIC, 2012). Hovězí sérový albumin jsme do reakce přidávali v rozmezí koncentrací 50 - 500 µg/ml (GRUNENWALD, 2003). Původní master mix (GB Elit) již BSA obsahuje. Zvýšením koncentrace aditiva jsme se snažili zamezit inhibici polymerázy a zvýšit kvantitu produktů.

Dimethylsulfoxid byl přidáván do reakce v koncentračním rozmezí 1 – 10 %. Toto aditivum zlepšuje specifitu a účinnost obzvláště u sekvencí bohatých na G a C nukleotidy. DMSO ruší vodíkové vazby, díky tomu redukuje vznik sekundárních struktur templátu, tím snižuje teplotu tání DNA (SIMONOVIC, 2012).

Betaine (N,N,N-trimethylglycin) napomáhá oddělení řetězců DNA, snižuje teplotu tání nukleových kyselin a má termostabilizační efekt na Taq polymerázu. Zvyšuje účinnost a specifitu PCR. Betaine jsme použili v koncentračním rozmezí 1 – 3 M (SIMONOVIC, 2012).

Chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>) respektive hořečnaté ionty jsou důležitým kofaktorem polymerázy. Pokud je jeho koncentrace nízká dojde ke snížení výtěžku reakce, v opačném případě se mohou vyskytovat nespecifické produkty. Chlorid hořečnatý jsme zkoušeli v koncentračním rozmezí 1 – 4 mM (WALLIN, 2002).

Glycerol zlepšuje specifitu a efektivitu reakce a ovlivňuje tepelnou stabilitu DNA a primerů. Glycerol jsme do reakční směsi přidávali v koncentračním rozmezí 1 – 15 % (SIMONOVIC, 2012).

Aditiva jsme přidávali do reakční směsi obsahující 1,49 µl master mixu GB Elite, 1 µl 50 × ředěné DNA buněčné linie K562 a 0,61 µl primer mixu. BSA, DMSO, betain a chlorid hořečnatý byly testovány s lokusy DXS8377, DXS8378, DXS7424 a multiplexem z těchto lokusů. Glycerol byl přidáván již pouze k multiplexu. Výsledná koncentrace primerů v reakci byla 200 nM. U multiplexu byly koncentrace DXS8378 – 100 nM, DXS8377 – 200 nM, DXS7424 – 200 nM. Vliv aditiva byl hodnocen dle kvantity produktu a výskytu nežádoucích píků, nejlepší +++, nejhorší – (viz tabulka Vliv aditiv na PCR produkty). Jako kontrola byl využit master mix GB Elite bez aditiv.

Tabulka 5 - Vliv aditiv na PCR produkty I

Aditivum a koncentrace	DXS 8377	DXS 8378	DXS 7424	multiplex
BSA 50 ug/ml	++	+++	++	-
BSA 100 ug/ml	+	+	+	-
BSA 200 ug/ml	+	+	++	-
BSA 300 ug/ml	++	++	++	-
BSA 500 ug/ml	++	++	+	-
DMSO 1 %	+	+	+	-
DMSO 2,5 %	+	-	-	-
DMSO 5 %	+	+	++	++
DMSO 7,5 %	+	+	++	++
DMSO 10 %	-	-	+	+
betaine 1 M	+++	+	+	+
betaine 1,5 M	+++	+	+	-
betaine 2 M	++	-	+	-
betaine 2,5 M	-	-	-	-
betaine 3 M	-	-	-	-
MgCl <sub>2</sub> 1 mM	++	++	+	+
MgCl <sub>2</sub> 2 mM	++	++	+	-
MgCl <sub>2</sub> 3 mM	+	+	+	-
MgCl <sub>2</sub> 4 mM	+	+	-	-
MM GB Elite (bez aditiv, kontrola)	+++	++	++	++

Tabulka 6 - Vliv aditiva na PCR produkty II

Aditivum a koncentrace	multiplex
glycerol 1 %	++
glycerol 2 %	++
glycerol 3 %	+
glycerol 4 %	+
glycerol 5 %	+
glycerol 7,5 %	-
glycerol 10 %	-
glycerol 12 %	-
glycerol 15 %	-
MM GB Elite (bez aditiva, kontrola)	++

Většina přidávaných aditiv neměla zásadní vliv na kvalitu ani kvantitu produktů PCR. Použití BSA mělo vliv pouze na kvantitu produktů jednotlivých markerů, nikoli na multiplex. DMSO ve vyšších koncentracích mělo dobrý vliv na kvantitu produktů multiplexu, výsledky ovšem nebyly lepší než v samotném MM GB Elite. Betaine ani chlorid hořečnatý v různém koncentračním rozmezí nepřinesly zlepšení výsledků u multiplexu. Glycerol byl do reakční

směsi přidáván původně v koncentračním rozmezí 5 - 15 %. Nejlépe byla vyhodnocena nejnižší koncentrace 5 %, proto jsme ještě zkusili koncentrace 1, 2, 3 a 4 % glycerolu ve směsi. Nižší koncentrace glycerolu měly dobrý vliv na kvantitu produktů multiplexu, i přesto byly výsledky samotného MM GB Elite lepší.

Jako nejlepší byl vyhodnocen samotný GB Elite PCR Master Mix bez dalších aditiv. Tento master mix se díky vyváženému složení vyznačuje zvýšenou odolností vůči inhibitorům PCR.

Dále byly testovány různé master mixy dodávané Generi Biotech. Jednalo se o master mixy Basic, SG, Easy a Ideal. Kontrola byla provedena s master mixem GB Elite, který byl nakonec opět vyhodnocen jako nejlepší pro další práci.

### **5.3.5 Sestavování multiplexní reakce**

Pro zjednodušení a urychlení analýzy jsme sestavili zkušební multiplex. Multiplex jsme vždy sestavovali z polymorfismů, které se svým velikostním rozsahem nepřekrývají. Tím jsme zajistili možnost odečítání jednotlivých alel. Testovali jsme několik variant multiplexů (viz tabulka sestavování multiplexu) a to multiplexy:

- M - DXS8378, DXS7424 a DXS8377
- L – DXS7132, DXS6800 a DXS10079
- X - DXS7133, DXS101 a DXS6807
- K – DXS7132, DXS9898 a DXS10079
- Y – DXS9895, DXS7423 a DXS6809
- J – GATA172D05, DXS6789, DXS10011 a DXS6809

Polymorfismy jsme zkoušeli jednotlivě a v multiplexech. Takto byly sestaveny multiplexy M a X, multiplex M obsahuje lokusy DXS8378, DXS7424 a DXS8377. Multiplex X obsahuje DXS7133, DXS101 a DXS6807. Zkoušeli jsme zvýšení koncentrace primerů nejdelšího z polymorfismů v multiplexu na 300 nM, abychom zvýšili kvantitu tohoto produktu. Tato koncentrace primerů nebyla vhodná a nepřispěla k zvýšení produktu nejdelšího lokusu. Dále byla koncentrace primerů v multiplexech upravena vždy u nejkratších produktů na poloviční hodnotu, tedy 100 nM. Snížení koncentrace jsme provedli za účelem snížení kvantity nejkratších polymorfismů v multiplexu a následné zvýšení kvantity produktů další (delších) polymorfismů. Ostatní primery byly ve stejné koncentraci jako u singleplexu – 200 nM.

Tabulka 7 - Sestavování multiplexu (značení – nefunguje; + funguje za daných podmínek)

DXS	Jednotlivě	Multiplex
8378	+	+
7424	+	+
8377	+	+
7133	+	+
101	+	+
6807	+	+
7423	+	+
7132	-	-
6800	+	+
10079	-	-
9898	+	+
9895	+	-
6809	-	-
GATA172D05	+	+
6789	+	-
10011	+	-

## 5.4 Analýza

Separace probíhala na sekvenátoru ABI AVANT 3100. Tento sekvenátor pracuje na principu kapilární elektroforézy. První použití této metody pro analýzu DNA a to přímo pro STR bylo již v roce 1992. Obvyklý čas separace se pohybuje v rozsahu 5 – 30 minut, oproti klasické gelové elektroforéze, u které se časy pohybují až v několika hodinách. Markantní zkrácení doby analýzy je způsobeno použitím vyšší napětí.

Sekvenátor je složen z kapiláry umístěné mezi pumpou a vstupní elektrodou. Vyhřívané desky udržují kapiláru ve správné teplotě. Vzorky jsou umístěny v autosampléru. Tento zásobník se pohybuje směrem dolů a nahoru, tak aby předkládal vzorky na kapiláru a mohlo dojít k nasátí vzorku. Sekvenátor ABI AVANT 3100 má 4 kapiláry. Kapilára je velmi úzká skleněná trubička s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ . Povrch je pokryt polyimidem, aby nedošlo k poškození kapiláry při běžné manipulaci. Tato vrstva polymeru je neprůhledná - nesmí být tedy v okénku detekční cely. Délka kapiláry ovlivňuje separační vlastnosti kapiláry. Delší kapilára umožňuje separace delších fragmentů. Při analýze STR jsme použili kapiláru dlouhou 36 cm. Vnitřní stěna kapiláry není nijak upravovaná, aby nedošlo k elektroosmotickému toku je využíván roztok polymeru POP-4, který dynamicky upravuje stěnu kapiláry. Kapilára je plněna polymerem pomocí pumpy. POP-4 je polymer obsahující 4 % lineárního dimetyl polyakrylamidu a vysokou koncentraci močoviny (8 M), která zajišťuje

prostředí, v němž zůstávají molekuly DNA denaturované. POP-4 dále obsahuje 5 % 2-pyrrolidinon, 100 mM N-Tris (hydroxymetyl), metyl-3-aminopropan-sulfonovou kyselinu a hydroxid sodný, které udržují pH 8.

Pro průchod proudu kapilárou se používá elektroforetický pufr obsahující ionty. Pokud tento pufr není správně doplňován, může dojít ke kolísání proudu a nesprávné analýze. Při analýze jsme použili pufr Genetic Analysis dodávaný firmou Applied Biosystems. Tento elektroforetický pufr obsahuje navíc EDTA (BUTLER, 2005, b).

Samotná analýza počíná nanesením vzorků na plato – 96 jamkovou destičku. Vzorky mohou být značeny různou fluorescenční značkou (modrá - FAM, zelená - VIC, žlutá - NED a červená - PET). Vnitřní velikostní standard má oranžovou barvu - LIZ. Do každé jamky na platě byla napipetována směs LIZ (vnitřní velikostní standard) a HiDi Formamid (vysoce deionizovaný formamid) v objemu 9  $\mu$ l. Dále byl do každé jamky napipetován 0,5  $\mu$ l vzorku po amplifikaci. Takto připravené plato bylo centrifugováno. Celé plato bylo následně vloženo do cykléru a inkubováno při 95 °C po dobu 3 minut. Inkubace se před sekvenací provádí, aby došlo k denaturaci všech vláken DNA v roztoku. Následně bylo plato chlazeno 3 minuty na ledu. V softwaru byly nastaveny pozice jednotlivých vzorků na destičce a parametry metody – použití vnitřního standardu LIZ 75-500 (75-500 označuje velikostní rozsah vnitřního standardu v bp); fragmentační analýza na 36 cm dlouhé kapiláře s polymerem POP4 a dobou nástřiku 2 s. Teplota byla nastavena na 60 °C, napětí při nástřiku 3000 V. Napětí při separaci bylo nastaveno na 15 kV a čas separace byl 1500 sekund.

## 5.5 Statistický popis frekvenční databáze

Výpočty byly provedeny pomocí automatizovaného softwaru na webu [www.chrx-str.org](http://www.chrx-str.org).

PIC – polymorphism information content – informační obsah polymorfismu. PIC vyjadřuje míru polymorfismu daného lokusu, nabývá hodnot od 0 do 1. Čím je hodnota PIC vyšší, tím je polymorfismus více informativní. Obvykle je za dostatečně informativní považována hodnota  $\geq 0,5$  (BOTSTEIN, 1980).

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n f_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 f_i^2 f_j^2$$

$f_i$  ...frekvence dané alely (i,j...)

HET - expected heterozygosity – očekávaná heterozygotita. HET vyjadřuje míru heterozygotních jedinců v populaci. Nabývá hodnot 0 – 1, může být vyjádřena také v procentech. Vyšší HET značí vyšší diverzitu alel, což je lepší pro identifikaci jedince (NEI, 1974).

$$HET = 1 - \sum_i^n f_i^2$$

Výpočty PIC a HET jsou více obecné a proto jsou stejné jako u autosomálních chromosomů. Ostatní výpočty jsou specifické pro chromozom X.

MEC Krüeger – průměrná šance vyloučení pro trojice matka, dítě a domnělý otec. Tento parametr není příliš vhodný pro markery na chromozomu X, ale spíše pro autozomální chromozomy. Výhodný je v případě, kdy není dostupný vzorek domnělého otce a místo něho je použit vzorek od domnělé babičky (matky domnělého otce) (KRÜGER, 1968).

$$\text{MEC Krüeger} = \sum_i f_i^3 (1 - f_i)^2 + \sum_i f_i (1 - f_i)^3 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j) (1 - f_i - f_j)^2$$

MEC Kishida – průměrná šance vyloučení pro trojice zahrnující dceru. V trojicích zahrnujících dceru je výrazně větší vypovídací hodnota markerů na chromozomu X než autozomálních markerů (KISHIDA, 1997).

$$\text{MEC Kishida} = \sum_i f_i^3 (1 - f_i) + \sum_i f_i (1 - f_i)^2 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j) (1 - f_i - f_j)$$

MEC Desmarias – průměrná šance vyloučení pro trojici zahrnující dceru (Desmarias verze). Obdobný výpočet jako MEC Kishida.

$$\text{MEC Desmarias} = 1 - \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^4 - \left( \sum_{i < j} f_i^2 \right)^2$$

MEC Desmarias duo – průměrná šance vyloučení pro dvojici otec – dcera. Výpočet je vhodný i pro testování dvojice matka – syn (DESMARIAS, 1998).

$$\text{MEC Desmarias duo} = 1 - 2 \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^3$$

Power of discrimination (PD) i females – diskriminační síla u žen. PD vyjadřuje sílu daného polymorfismu pro účely identifikace.

$$PD (\text{ženy}) = 1 - 2\left(\sum_i f_i^2\right)^2 + \sum_i f_i^4$$

PD for ChrX markers in males – diskriminační síla u mužů.

$$PD (\text{muži}) = 1 - \sum_i f_i^2$$

## 6 Výsledky a diskuze

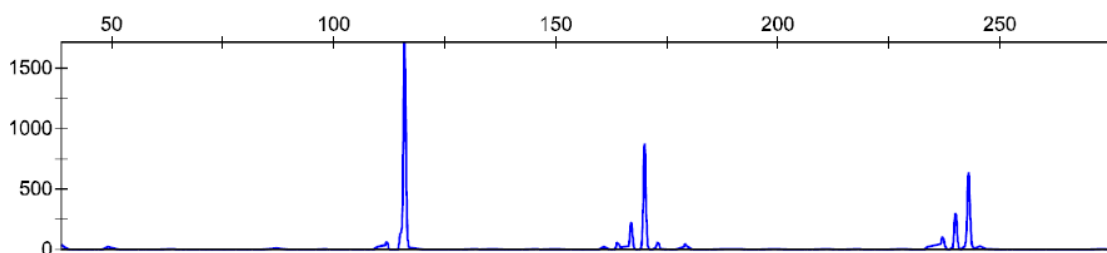
Pro frekvenční analýzu bylo shromážděno 100 vzorků. Všechny vzorky byly získány od českých žen. Pro zkvalitnění analýzy a zpřesnění výsledků byly vybírány pouze nepříbuzné ženy. Výhodou analýzy vzorků získaných od žen (XX) je získání dvojnásobné informace oproti vzorkům od mužů (XY).

Analýza polymorfismů na chromozomu X byla prováděna pomocí optimalizované PCR reakce. Do reakční směsi bylo pipetováno 1  $\mu$ l 25  $\times$  ředěné templátové DNA, 1,49  $\mu$ l MM GB Elit bez aditiv a 0,61  $\mu$ l primer mixu. Koncentrace primerů byla optimalizována na 100 nM u nejkratších produktů a 200 nM u zbývajících primerů. Teplotní profil byl zvolen DXS\_26. Díky optimalizaci PCR jsme docílili až trojnásobné kvantity výsledných produktů a podobné kvantity všech produktů multiplexu – tím je zaručeno kvalitní a bezchybné vyhodnocení.

Tabulka 8 - Teplotní profil DXS\_26

DXS_26	Teplota	Čas
Denaturace I	95 °C	2 minuty
Denaturace II	94 °C	1 minuta
Annealing	62 °C	1 minuta
Elongace	70 °C	3 minuty
<b>Opakovat od 2. denaturace 30 x</b>		
Finální elongace	60 °C	15 minut

Multiplexy M (lokusy - DXS8378, DXS7424 a DXS8377) a X (lokusy - DXS7133, DXS101 a DXS6807) jsme úspěšně použili. Jako pozitivní kontrolu jsme vždy použili buněčnou linii K562 (viz obrázek multiplex M – analýza buněčné linie K562, multiplex X – analýza buněčné linie K562).

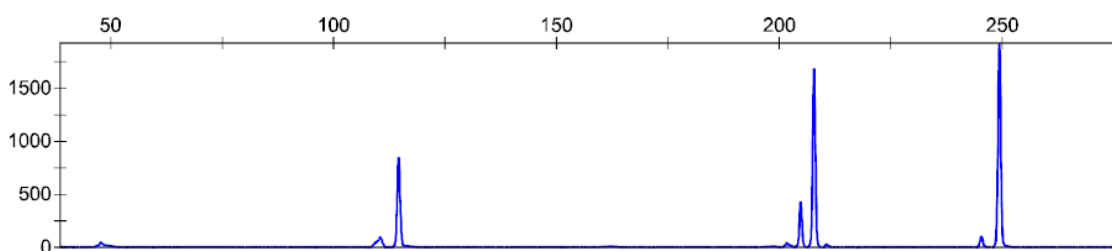


Obrázek 11 - Multiplex M - analýza buněčné linie K562, teplotní profil DXS\_26



Před lokusy DXS7424 a DXS8377 v multiplexu M se vyskytují stutter píky. Tyto takzvané předskokany se bohužel nepodařilo odstranit. Častěji se vyskytují u polymorfismů s kratším základním motivem, DXS7424 i DXS8377 mají trinukleotidovou základní jednotku. Stutter píky vznikají díky prokluzu polymerázy (ŠIMKOVÁ, 2012). Stutter pík před DXS7424 je vždy menší než třetina vlastního píku DXS7424, proto není až tak problematický při vyhodnocování. V případech, kdy má osoba heterozygotní lokus DXS7424 je menší z alel navýšena právě o hodnotu stutter píku.

Stutter pík vyskytující se před lokusem DXS8377 je bohužel výraznější avšak nikdy nepřesahuje polovinu vlastního píku DXS8377. Při vyhodnocování je důležité s tímto píkem počítat. U heterozygotů je menší alela navýšena o velikost stutter píku, rozdíl mezi heterozygotem a homozygotem je tedy velmi výrazný, vyhodnocení je i přes výskyt stutter píku možné.



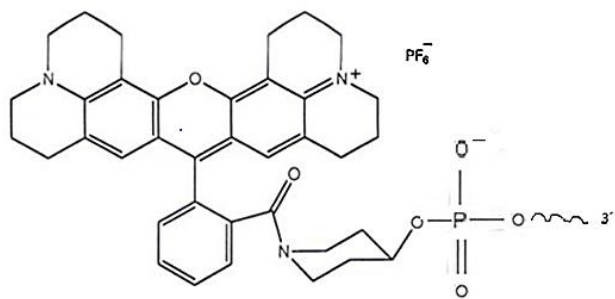
**Obrázek 12 - Multiplex X - analýza buněčné linie K562, teplotní profil DXS\_26**

Multiplex X sestavený z lokusů DXS7133, DXS101 a DXS6807 funguje velmi dobře. Pouze u buněčné linie K562, která má heterozygotní lokus DXS101 nabývající alel 23 a 24 je alela 23 nižší i přesto je možné ji vyhodnotit. Tento problém jsme u našich vzorků pro frekvenční analýzu nepozorovali, heterozygotní lokusy vycházely dobře a oba píky byly stejně velké.

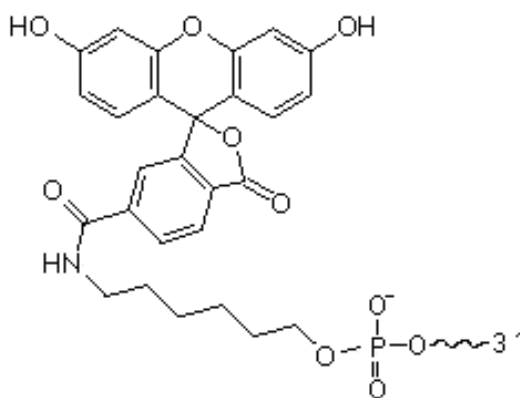
Po úspěšném sestavení dvou multiplexů M a X, které fungují ve stejném teplotním profilu, a za stejných podmínek jsme sestavili jeden multiplex obsahující polymorfismy používané v těchto dvou multiplexech. Dále jsme přidali další dva polymorfismy – DXS7423 a GATA172D05, tyto lokusy jsme vyzkoušeli v jiných multiplexech. Výsledný multiplex jsme tedy složili z polymorfismů DXS8378, DXS7424, DXS8377, DXS7133, DXS101, DXS6807, DXS7423 a GATA172D05. Jednotlivé primery jsme zaznačili různými modifikacemi a to DXS8378 – 5' CFR 610, DXS7424 – 5' 6-FAM, DXS8377 - 5' 6-FAM,

DXS7133 - 5' 6-FAM, DXS101 - 5' CFR 610, DXS6807 - 5' CFR 610, DXS7423 - 5' HEX a GATA172D05 - 5' HEX.

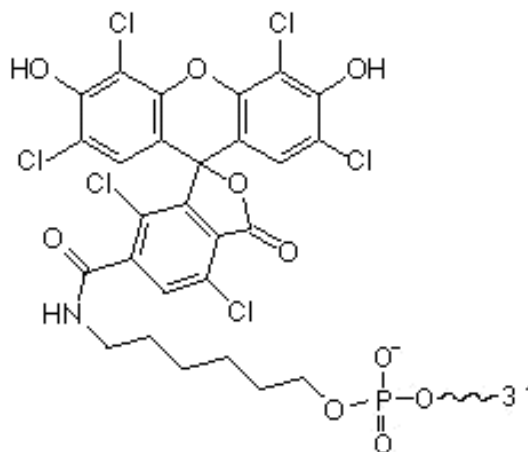
CFR 610 je fluorescenční značka z oranžovo-červené oblasti s absorpčním maximem 590 nm a emisním maximem 610 nm. 6-FAM je izomer 6-karboxyfluoresceinu s absorpčním maximem 495 nm a emisním maximem 520 nm. HEX je hexachlorofluorescein, jeho absorpční maximum je 537 nm a emisní maximum 556 nm, běžně je využíván v multiplexních reakcích s FAM (Generi Biotech).



Obrázek 13 – Fluorescenční značení CFR 610 (Generi Biotech)

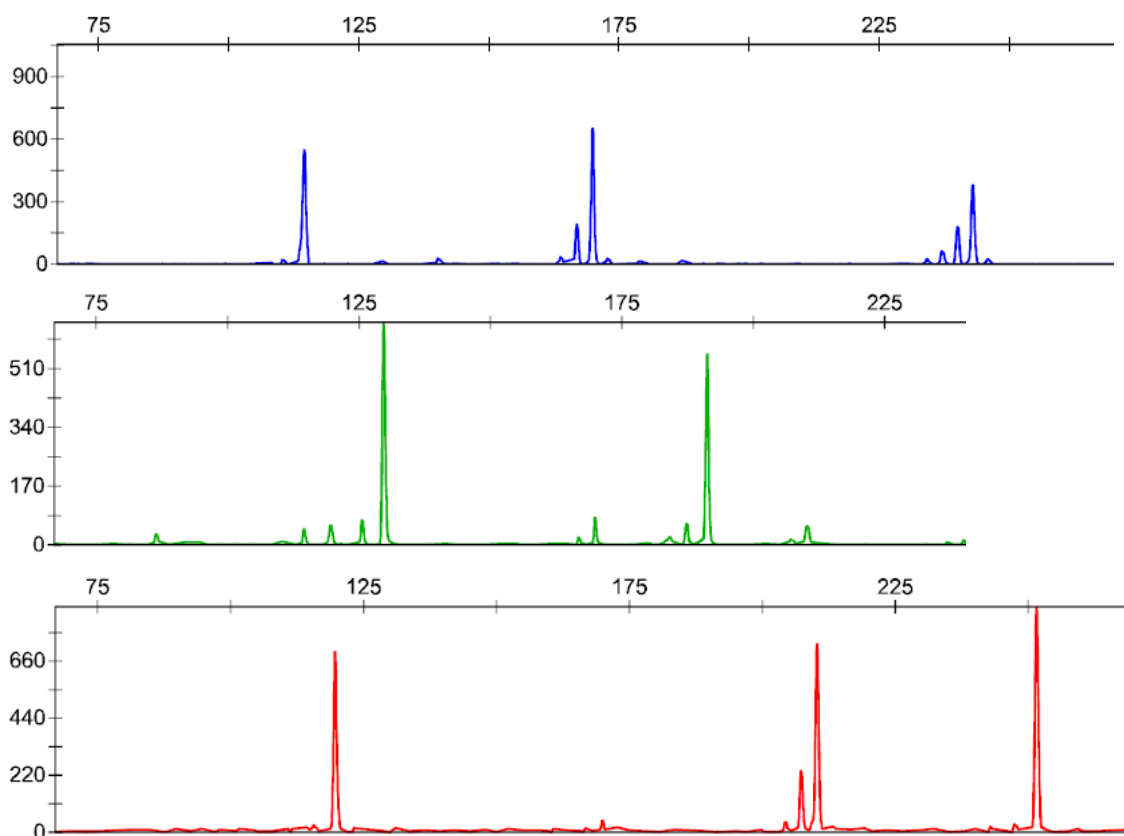


Obrázek 15 – Fluorescenční značení 6-FAM (Generi Biotech)



Obrázek 14 – Fluorescenční značení HEX (Generi Biotech)

Multiplex jsme vyzkoušeli na buněčné linii K562.



**Obrázek 16 – Analýza buněčné linie K562, multiplex – modrý kanál – DXS7133, DXS7424, DXS 8377; zelený kanál – GATA172D05, DXS7423; červený kanál - DXS8378, DXS101, DXS6807**

Analýzu vzorků jsme prováděli pomocí nově sestaveného multiplexu obsahujícího 8 polymorfismů. Použili jsme následující primery s uvedenou modifikací - DXS8378 – 5' CFR 610, DXS7424 – 5' 6-FAM, DXS8377 - 5' 6-FAM, DXS7133 - 5' 6-FAM, DXS101 - 5' CFR 610, DXS6807 - 5' CFR 610, DXS7423 – 5' HEX a GATA172D05 – 5' HEX.

V kapitolách 6.1 – 6.8 jsme porovnali naše výsledky STR analýzy chromozomu X s výsledky v různých světových populacích.

## 6.1 DXS8378

DXS8378 s cytogenetickou lokalizací p 22.31 je tetranukleotidový polymorfismus patřící do vazebné skupiny X1 (EDELMAAN, 2001, a). Základní jednotka je CTAT. Velikostní rozsah při použití daných primerů (viz tabulka 1) DXS8378 je 110 – 134 bp, tento lokus se vyskytuje v 7 různých alelách – alely 8 – 14 (EDELMAAN, 2002, a).

Tabulka 9 - DXS8378 - námi naměřené frekvence v české populaci

DXS8378	
9	0,0114
10	0,2841
11	0,3580
12	0,3068
13	0,0341
14	0,0057

Tabulka 10 - DXS8378 - populační data v české populaci

DXS8378	
Informační obsah polymorfismu (PIC)	0.634870
Homozygotita (h)	0.304321
Heterozygotita (HET):	0.695679
Pravděpodobnost vyloučení (PE):	0.421607
Paternitní Index (PI):	0.152160
Diskriminační síla (PD) - ženy:	0.846579
Diskriminační síla (PD) - muži:	0.695679
MEC Krüger:	0.424665
MEC Kishida:	0.634146
MEC Desmarais:	0.634870
MEC Desmarais Duo:	0.489091

Tabulka 11 - DXS8378 - populační data (ChrX-STR.org)

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
Belo Horizonte, Brazílie	0.6165	0.6829	0.4016	0.6165	0.6165	0.4696	0.8331	0.6829
Čína (Guangdong)	0.5329	0.6026	0.3342	0.5329	0.5329	0.3877	0.7724	0.6026
Německo	0.6511	0.7068	0.4471	0.6507	0.6511	0.5067	0.8583	0.7068
Německo	0.6404	0.6998	0.4321	0.6399	0.6404	0.4951	0.8505	0.6998
Německo	0.6479	0.7047	0.4425	0.6475	0.6479	0.5032	0.8559	0.7047
Německo	0.6577	0.7127	0.4541	0.6577	0.6577	0.5138	0.8625	0.7127
Německo	0.6338	0.6948	0.4247	0.6338	0.6338	0.4881	0.8459	0.6948
Německo (severovýchod)	0.6434	0.7004	0.4398	0.6446	0.6434	0.4985	0.8532	0.7004
Ghana	0.6330	0.6947	0.4218	0.6329	0.6330	0.4869	0.8451	0.6947
Japonsko (Fukuoka)	0.5595	0.6142	0.3617	0.5596	0.5595	0.4109	0.7964	0.6142

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
Lotyšsko	0.6980	0.7413	0.5093	0.6981	0.6980	0.5590	0.8897	0.7413
Polsko	0.6361	0.6972	0.4260	0.6361	0.6361	0.4903	0.8472	0.6972
Portugalsko (sever)	0.6295	0.6914	0.4191	0.6295	0.6295	0.4834	0.8429	0.6914
Rio de Janeiro, Brazílie	0.6214	0.6838	0.4114	0.6214	0.6214	0.4749	0.8376	0.6838
Španělsko (Valencia)	0.6662	0.7188	0.4653	0.6661	0.6662	0.5232	0.8683	0.7188
São Paulo, Brazílie	0.6076	0.6735	0.3954	0.6076	0.6076	0.4606	0.8275	0.6735
Vitória, Brazílie	0.6201	0.6848	0.4067	0.6201	0.6201	0.4733	0.8359	0.6848

Tabulka 12 - DXS8378 – frekvence (ChrX-STR.org)

Populace	n*	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17
Belo Horizonte, Brazílie	245			0.0026	0.3514	0.3286	0.2919	0.0198	0.0057		
Čína (Guangdong)	272			0.0225	0.5250	0.3325	0.1025	0.0150	0.0025		
Německo ženy	278			0.0180	0.3483	0.3303	0.2454	0.0469	0.0072		0.0036
Německo mužů	439		0.0045	0.0205	0.3318	0.3386	0.2723	0.0297		0.0022	
Německo	717		0.0015	0.0188	0.3428	0.3331	0.2544	0.0412	0.0048	0.0007	0.0024
Německo	427		0.0020	0.0460	0.3120	0.3320	0.2770	0.0290	0.0020		
Německo	217			0.0220	0.3440	0.3380	0.2680	0.0160	0.0090	0.0030	
Německo (severových)	205		0.0030	0.0260	0.3120	0.3740	0.2460	0.0330	0.0070		
Ghana mužů	59				0.3051	0.3559	0.2881	0.0508			
Japonsko (Fukuoka) mužů	93			0.0108	0.5484	0.1828	0.2258	0.0215	0.0108		
Lotyšsko	152		0.0270	0.0541	0.3514	0.2432	0.2635	0.0541	0.0068		
Polsko	240		0.0028	0.0111	0.3306	0.3250	0.2944	0.0333		0.0028	
Portugalsko (severní) mužů	347			0.0144	0.2795	0.3055	0.3689	0.0288	0.0029		
Rio de Janeiro, Brazílie	261			0.0098	0.3128	0.3941	0.2488	0.0320	0.0025		

Populace	n*	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17
Španělsko (Valencia)	145 žen	0.0034		0.0276	0.2862	0.3379	0.2862	0.0483	0.0103		
São Paulo, Brazílie	250			0.0121	0.3986	0.3333	0.2367	0.0193			
Vitória, Brazílie	245			0.0048	0.3062	0.3704	0.2889	0.0272	0.0025		

n\* ... počet vzorků

## 6.2 DXS7424

DXS7424 je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu X v oblasti 22.10 (EDELMAAN, 2001, a). Polymorfismus má trinukleotidovou základní jednotku TAA. Velikostní rozsah při použití daných primerů (viz tabulka 1) je 147 – 174 bp. Alely jsou 9 – 18 (EDELMAAN, 2002, b).

Tabulka 13 - DXS7424 - námi naměřené frekvence v české populaci

DXS7424	
10	0,0118
11	0,0000
12	0,0588
13	0,0588
14	0,2059
15	0,3235
16	0,2059
17	0,1294
18	0,0059

Tabulka 14 – DXS7424 - populační data v české populaci

DXS7424	
Informační obsah polymorfismu (PIC)	0.756090
Homozygotita (h)	0.213275
Heterozygotita (HET):	0.786725
Pravděpodobnost vyloučení (PE):	0.574638
Paternitní Index (PI):	0.106638
Diskriminační síla (PD) - ženy:	0.923878
Diskriminační síla (PD) - muži:	0.786725
MEC Krüger:	0.587584
MEC Kishida:	0.756090
MEC Desmarais:	0.756090
MEC Desmarais Duo:	0.627338

Tabulka 15 - DXS7424 - populační data (ChrX-STR.org)

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
Německo	0.7656	0.7953	0.6004	0.7656	0.7656	0.6393	0.9284	0.7953
Německo	0.7471	0.7792	0.5775	0.7471	0.7471	0.6173	0.9191	0.7792
Německo	0.7625	0.7927	0.5966	0.7625	0.7625	0.6357	0.9269	0.7927
Německo (severovýchod)	0.7463	0.7805	0.5726	0.7474	0.7463	0.6152	0.9176	0.7805
Korea	0.6702	0.7162	0.4805	0.6714	0.6702	0.5283	0.8735	0.7162
Lotyšsko	0.7782	0.8036	0.6219	0.7783	0.7782	0.6555	0.9360	0.8036

Tabulka 16 - DXS7424 – frekvence (ChrX-STR.org)

Populace	n*	9	10	11	12	13	14
Německo	370 žen	0.0014	0.0027	0.0014	0.0365	0.0811	0.2460
Německo	394 mužů	0.0025	0.0025	0.0102	0.0330	0.0457	0.1700
Německo	764	0.0018	0.0026	0.0044	0.0353	0.0688	0.2196
Německo (severovýchod)	205		0.0070	0.0030	0.0330	0.0390	0.2100
Korea	300				0.0070	0.0670	0.1670
Lotyšsko	152		0.0068	0.0068	0.0405	0.1081	0.3176
Populace	15	16	17	18	19	20	
Německo	0.2811	0.2149	0.1027	0.0203	0.0122		
Německo	0.3071	0.2868	0.1066	0.0228	0.0102	0.0025	
Německo	0.2901	0.2399	0.1041	0.0212	0.0115	0.0009	
Německo (severovýchod)	0.2560	0.2920	0.1480	0.0070	0.0030	0.0030	
Korea	0.2960	0.4020	0.0420	0.0200			
Lotyšsko	0.1824	0.2027	0.0811	0.0270	0.0203	0.0068	

### 6.3 DXS8377

DXS8377 má cytogenetickou lokaci q 28.00. Patří do vazebné skupiny X4 (EDELMAAN, 2001, a). Tento polymorfismus má trinukleotidovou základní jednotku a to AGA. Velikostní rozsah při použití daných primerů (viz tabulka 1) DXS8377 je 207 – 252 bp. Polymorfismus má 16 různých alel počínaje alelou 38 až alela 53 (EDELMAAN, 2002, a).

Tabulka 17 - DXS8377 - námi naměřené frekvence v české populaci

DXS8377	
38	0,0176
39	0,0118
40	0,0412
41	0,0235
42	0,0706
43	0,0235
44	0,0353
45	0,0941
46	0,0824
47	0,0882
48	0,0882
49	0,0941
50	0,1412
51	0,0529
52	0,0588
53	0,0765

Tabulka 18 - DXS8377 - populační data v české populaci

DXS8377	
Informační obsah polymorfismu (PIC)	0.920288
Homozygotita (h)	0.074873
Heterozygotita (HET):	0.925127
Pravděpodobnost vyloučení (PE):	0.846983
Paternitní Index (PI):	0.037436
Diskriminační síla (PD) - ženy:	0.989555
Diskriminační síla (PD) - muži:	0.925127
MEC Krüger:	0.770273
MEC Kishida:	0.840960
MEC Desmarais:	0.920288
MEC Desmarais Duo:	0.857450



Tabulka 19 - DXS8377 - populační data (ChrX-STR.org)

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
<b>Rakousko</b>	0.9169	0.9223	0.8464	0.9212	0.9169	0.8515	0.9886	0.9223
<b>Finsko</b>	0.9107	0.9168	0.8310	0.9107	0.9107	0.8415	0.9870	0.9168
<b>Německo</b>	0.9161	0.9215	0.8410	0.9161	0.9161	0.8503	0.9884	0.9215
<b>Německo</b>	0.9157	0.9212	0.8412	0.9168	0.9157	0.8497	0.9883	0.9212
<b>Německo</b>	0.9085	0.9147	0.8279	0.9088	0.9085	0.8382	0.9865	0.9147
<b>Německo (severovýchod)</b>	0.9081	0.9145	0.8267	0.9081	0.9081	0.8376	0.9863	0.9145
<b>Německo (jih)</b>	0.8971	0.9045	0.8075	0.8960	0.8971	0.8208	0.9834	0.9045
<b>Itálie (Tuscany)</b>	0.9064	0.9130	0.8245	0.9074	0.9064	0.8347	0.9858	0.9130
<b>Lotyšsko</b>	0.8975	0.9050	0.8088	0.8977	0.8975	0.8212	0.9834	0.9050
<b>Portugalsko (sever)</b>	0.9123	0.9181	0.8344	0.9122	0.9123	0.8444	0.9875	0.9181
<b>Španělsko (Basque country)</b>	0.9067	0.9131	0.8236	0.9056	0.9067	0.8355	0.9860	0.9131
<b>Španělsko (Cantabria)</b>	0.9196	0.9246	0.8471	0.9196	0.9196	0.8559	0.9893	0.9246
<b>Španělsko (Valencia)</b>	0.9182	0.9234	0.8444	0.9180	0.9182	0.8536	0.9889	0.9234
<b>Taiwan</b>	0.8976	0.9053	0.8079	0.8976	0.8976	0.8209	0.9833	0.9053

Tabulka 20 - DXS8377 – frekvence (ChrX-STR.org)

Populace	n*	33	37	38	39	40	41	42	43
Rakousko	270 žen		0.0080		0.0230	0.0340	0.0410	0.0490	0.0530
Finsko	103				0.0070		0.0070	0.0270	0.0270
Německo	557		0.0070	0.0100	0.0240	0.0310	0.0440	0.0430	0.0500
Německo	217						0.0070	0.0170	0.0310
Německo	105					0.0313	0.0125	0.0250	0.0500
Německo (severových)	205				0.0070		0.0160	0.0200	0.0430
Německo (jih)	220 žen		0.0050	0.0140	0.0180	0.0180	0.0640	0.0450	0.0360
Itálie (Tuscany)	160		0.0040	0.0040	0.0040	0.0170	0.0420	0.0710	0.0710
Lotyšsko	152					0.0068	0.0068	0.0270	0.0473
Portugalsko (sever)	347 mužů			0.0029	0.0115	0.0115	0.0202	0.0403	0.0288
Španělsko (Basque country)	147		0.0080	0.0040	0.0080	0.0330	0.0330	0.0330	0.0420
Španělsko (Cantabria)	244		0.0120	0.0140	0.0200	0.0260	0.0630	0.0490	0.0630
Španělsko (Valencia)	145 žen				0.0034	0.0207	0.0172	0.0414	0.0448
Taiwan	450	0.0030		0.0020		0.0030	0.0090	0.0190	0.0310
Populace	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Rakousko	0.0830	0.0800	0.1050	0.1200	0.1020	0.0860	0.0800	0.0610	0.0410
Finsko	0.0680	0.0680	0.0540	0.1160	0.1160	0.1090	0.1090	0.0950	0.0680
Německo	0.0690	0.0920	0.1100	0.1130	0.1270	0.0820	0.0630	0.0600	0.0400
Německo	0.0140	0.0480	0.0510	0.0680	0.0750	0.0880	0.1020	0.0750	0.1160
Německo	0.0500	0.0438	0.1000	0.0875	0.1063	0.1500	0.1063	0.0875	0.0563
Německo (severových)	0.0750	0.0490	0.0890	0.0950	0.0980	0.1050	0.1080	0.1380	0.0620
Německo (jih)	0.0320	0.0950	0.1180	0.1820	0.1140	0.0950	0.0730	0.0450	0.0180
Itálie (Tuscany)	0.0670	0.0880	0.1250	0.1330	0.1080	0.0960	0.0750	0.0460	0.0170
Lotyšsko	0.0203	0.0676	0.0743	0.0676	0.1689	0.1284	0.1149	0.1014	0.0608
Portugalsko (sever)	0.0576	0.0432	0.0749	0.0980	0.1009	0.1239	0.1210	0.1153	0.0317
Španělsko (Basque country)	0.0710	0.1130	0.1040	0.1040	0.0830	0.1540	0.0920	0.0330	0.0210
Španělsko (Cantabria)	0.0950	0.0690	0.1040	0.1100	0.0810	0.1120	0.0520	0.0580	0.0320
Španělsko (Valencia)	0.0552	0.0828	0.1069	0.0724	0.0862	0.1000	0.1207	0.0862	0.0448
Taiwan	0.0820	0.0700	0.1350	0.1230	0.1260	0.1200	0.0890	0.0630	0.0650

Populace	53	54	55	56	57	58	59	60
Rakousko	0.0260	0.0040	0.0040	0.0040				
Finsko	0.0610	0.0340	0.0130	0.0070		0.0070		0.0070
Německo	0.0140	0.0140	0.0050	0.0010	0.0010			
Německo	0.1160	0.0920	0.0440	0.0270	0.0100	0.0100	0.0100	
Německo	0.0375	0.0125	0.0375	0.0063				
Německo (severových)	0.0430	0.0160	0.0200	0.0160				
Německo (jih)	0.0180		0.0090					
Itálie (Tuscany)	0.0170	0.0080	0.0040	0.0040				
Lotyšsko	0.0608	0.0135	0.0270	0.0068				
Portugalsko (sever)	0.0519	0.0231	0.0144	0.0173	0.0115			
Španělsko (Basque country)	0.0380	0.0130	0.0080	0.0040				
Španělsko (Cantabria)	0.0200	0.0170		0.0030				
Španělsko (Valencia)	0.0517	0.0310	0.0172	0.0138	0.0034			
Taiwan	0.0410	0.0120	0.0070					

## 6.4 DXS7133

Polymorfismus DXS7133 je umístěn na dlouhém raménku chromozomu X v oblasti 22.30 (EDELMAAN, 2001, a). Základní motiv DXS7133 je tetranukleotidový a to ATAG. Tento polymorfismus se vyskytuje v 8 různých alelách, alely jsou 7 – 14. Velikostní rozsah při použití daných primerů (viz tabulka 1) je 106 – 132 bp (EDELMAAN, 2002, a).

Tabulka 21 - DXS7133 - námi naměřené frekvence v české populaci

DXS7133	
7	0,0103
8	0,0155
9	0,4072
10	0,1289
11	0,3969
12	0,0309
13	0,0052
14	0,0052

Tabulka 22 – DXS7133 - populační data v české populaci

<b>DXS7133</b>	
<b>Informační obsah polymorfismu (PIC)</b>	0.594787
<b>Homozygotita (h)</b>	0.341308
<b>Heterozygotita (HET):</b>	0.658692
<b>Pravděpodobnost vyloučení (PE):</b>	0.367291
<b>Paternitní Index (PI):</b>	0.170654
<b>Diskriminační síla (PD) - ženy:</b>	0.819604
<b>Diskriminační síla (PD) - muži:</b>	0.658692
<b>MEC Krüger:</b>	0.393595
<b>MEC Kishida:</b>	0.594425
<b>MEC Desmarais:</b>	0.594787
<b>MEC Desmarais Duo:</b>	0.449603

Tabulka 23 - DXS7133 - populační data (ChrX-STR.org)

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
<b>Belo Horizonte, Brazílie</b>	0.6278	0.6835	0.4282	0.6278	0.6278	0.4826	0.8441	0.6835
<b>Německo</b>	0.5753	0.6409	0.3718	0.5753	0.5753	0.4288	0.8055	0.6409
<b>Německo (severovýchod)</b>	0.6268	0.6814	0.4326	0.6280	0.6268	0.4824	0.8439	0.6814
<b>Itálie</b>	0.6017	0.6630	0.3984	0.6017	0.6017	0.4554	0.8252	0.6630
<b>Lotyšsko</b>	0.6283	0.6887	0.4210	0.6284	0.6283	0.4824	0.8427	0.6887
<b>Rio de Janeiro, Brazílie</b>	0.6529	0.7055	0.4535	0.6529	0.6529	0.5089	0.8606	0.7055
<b>São Paulo, Brazílie</b>	0.5876	0.6442	0.3902	0.5875	0.5876	0.4408	0.8168	0.6442
<b>Vitória, Brazílie</b>	0.6343	0.6908	0.4338	0.6343	0.6343	0.4896	0.8479	0.6908

Tabulka 24 - DXS7133 – frekvence (ChrX-STR.org)

Populace	n*	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Belo Horizonte, Brazílie	244		0.0057	0.3250	0.1679	0.4243	0.0456	0.0171	0.0144	
Německo	286	0.0030		0.4730	0.1420	0.3370	0.0400	0.0050		
Německo (severových.)	205	0.0070	0.0230	0.3480	0.1120	0.4230	0.0720	0.0160		
Itálie	85 žen			0.4460	0.1630	0.3310	0.0420	0.0120	0.0060	
Lotyšsko	152		0.0068	0.2162	0.3514	0.3716	0.0541			
Rio de Janeiro, Brazílie	261	0.0049	0.0025	0.3103	0.2069	0.3892	0.0591	0.0172	0.0099	
São Paulo, Brazílie	249	0.0072	0.0097	0.4999	0.1408	0.2913	0.0291	0.0097	0.0122	
Vitória, Brazílie	242	0.0024	0.0050	0.3665	0.1746	0.3766	0.0474	0.0150	0.0075	0.0050

## 6.5 DXS101

DXS101 je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu X v oblasti 22.10. Polymorfismus DXS 101 má dvě základní trinukleotidové jednotky, první CTT a druhou ATT. Velikostní rozsah při použití daných primerů (viz tabulka 1) je od 182 bp do 227 bp. Polymorfismus má 16 různých alel – alely 15 až 30. (EDELMAAN, 2001, b).

Tabulka 25 - DXS101 - námi naměřené frekvence v české populaci

DXS101	
15	0,0412
16	0,0052
17	0,0103
18	0,0825
19	0,0464
20	0,0155
21	0,0361
22	0,0258
23	0,0670
24	0,1649
25	0,1959
26	0,1443
27	0,0825
28	0,0619
29	0,0155
30	0,0052

Tabulka 26 - DXS101 - populační data v české populaci

DXS101	
Informační obsah polymorfismu (PIC)	0.874857
Homozygotita (h)	0.114757
Heterozygotita (HET):	0.885243
Pravděpodobnost vyloučení (PE):	0.765384
Paternitní Index (PI):	0.057378
Diskriminační síla (PD) - ženy:	0.976445
Diskriminační síla (PD) - muži:	0.885243
MEC Krüger:	0.770453
MEC Kishida:	0.874308
MEC Desmarais:	0.874857
MEC Desmarais Duo:	0.787396

Tabulka 27 - DXS101 - populační data (ChrX-STR.org)

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
Rakousko	0.8519	0.8654	0.7298	0.8475	0.8519	0.7544	0.9684	0.8654
Čína	0.7687	0.7980	0.6038	0.7687	0.7687	0.6428	0.9299	0.7980
Finsko	0.8246	0.8397	0.6968	0.8246	0.8246	0.7178	0.9591	0.8397
Německo	0.8703	0.8812	0.7628	0.8692	0.8703	0.7808	0.9750	0.8812
Německo	0.8707	0.8817	0.7645	0.8713	0.8707	0.7812	0.9750	0.8817
Německo (východ)	0.8707	0.8816	0.7622	0.8685	0.8707	0.7814	0.9752	0.8816
Německo (východ)	0.8798	0.8892	0.7789	0.8787	0.8798	0.7949	0.9783	0.8892
Německo (východ)	0.8784	0.8880	0.7765	0.8773	0.8784	0.7929	0.9779	0.8880
Německo (severovýchod)	0.8635	0.8755	0.7512	0.8624	0.8635	0.7709	0.9725	0.8755
Německo (jih)	0.8650	0.8763	0.7571	0.8661	0.8650	0.7734	0.9734	0.8763
Itálie (Tuscany)	0.8675	0.8789	0.7609	0.8697	0.8675	0.7765	0.9740	0.8789
Japonsko	0.7793	0.8049	0.6214	0.7793	0.7793	0.6562	0.9363	0.8049
Korea	0.7928	0.8170	0.6404	0.7928	0.7928	0.6738	0.9424	0.8170
Korea	0.7934	0.8180	0.6445	0.7980	0.7934	0.6743	0.9423	0.8180
Lotyšsko	0.8395	0.8528	0.7194	0.8399	0.8395	0.7382	0.9650	0.8528
Filipíny	0.7600	0.7884	0.5970	0.7602	0.7600	0.6330	0.9268	0.7884
Portugalsko (sever)	0.8747	0.8855	0.7697	0.8747	0.8747	0.7868	0.9761	0.8855
Španělsko (Cantabria)	0.8626	0.8744	0.7497	0.8604	0.8626	0.7699	0.9724	0.8744

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
<b>Španělsko (Valencia)</b>	0.8418	0.8561	0.7199	0.8415	0.8418	0.7408	0.9650	0.8561
<b>Taiwan</b>	0.7693	0.7952	0.6119	0.7704	0.7693	0.6445	0.9321	0.7952
<b>Thajsko</b>	0.7878	0.8120	0.6354	0.7880	0.7878	0.6678	0.9404	0.8120

Tabulka 28 - DXS101 – frekvence (ChrX-STR.org)

Populace	n*	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<b>Rakousko</b>	270 žen		0.0230	0.0040		0.0900	0.0260	0.0150	0.0110	0.0150
<b>Čína</b>	90									0.0500
<b>Finsko</b>	103		0.0410	0.0070		0.0960	0.0270	0.0270	0.0340	0.0140
<b>Německo</b>	217		0.0360	0.0030		0.0650	0.0460	0.0200	0.0290	0.0200
<b>Německo</b>	105		0.0313			0.0938	0.0313	0.0188	0.0313	0.0063
<b>Německo (východ)</b>	216 mužů		0.0370	0.0050		0.0780	0.0690	0.0140	0.0420	0.0140
<b>Německo (východ)</b>	348 žen	0.0030	0.0460	0.0060	0.0030	0.0860	0.0400	0.0110	0.0290	0.0240
<b>Německo (východ)</b>	564	0.0020	0.0440	0.0050	0.0020	0.0840	0.0470	0.0120	0.0320	0.0220
<b>Německo (severových)</b>	205	0.0030	0.0160		0.0100	0.0620	0.0460	0.0360	0.0100	0.0130
<b>Německo (jih)</b>	214 žen		0.0330	0.0050	0.0050	0.0790	0.0470	0.0190	0.0330	0.0230
<b>Itálie (Tuscany)</b>	160		0.0380	0.0040	0.0040	0.1130	0.0670	0.0170	0.0330	0.0080
<b>Japonsko</b>	95 mužů									0.0632
<b>Korea</b>	300								0.0110	0.0380
<b>Korea</b>	401						0.0020		0.0050	0.0360
<b>Lotyšsko</b>	152		0.0068		0.0135	0.0676	0.0541	0.0203	0.0541	0.0338
<b>Filipíny</b>	115							0.0058	0.0058	0.0405
<b>Portugalsko (sever)</b>	347 mužů	0.0029	0.0202	0.0029	0.0058	0.0836	0.0461	0.0173	0.0288	0.0288
<b>Španělsko (Cantabria)</b>	131		0.0550		0.0050	0.0850	0.0750	0.0250	0.0150	0.0250
<b>Španělsko (Valencia)</b>	145 žen		0.0241		0.0069	0.0517	0.0448	0.0172	0.0379	0.0241
<b>Taiwan</b>	448					0.0020	0.0070		0.0090	0.0430
<b>Thajsko</b>	157						0.0051		0.0152	0.0556

<b>Populace</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>
<b>Rakousko</b>	0.0600	0.2370	0.1690	0.1540	0.0860	0.0640	0.0340	0.0080		
<b>Čína</b>	0.1500	0.2600	0.2700	0.1800	0.0600	0.0200	0.0100			
<b>Finsko</b>	0.0410	0.3080	0.1920	0.0890	0.0550	0.0410	0.0210	0.0070		
<b>Německo</b>	0.0820	0.2060	0.1760	0.1370	0.0650	0.0750	0.0230	0.0160		
<b>Německo</b>	0.0625	0.1688	0.2000	0.1375	0.0938	0.0688	0.0250	0.0250		0.0063
<b>Německo (východ)</b>	0.0460	0.2170	0.1390	0.1480	0.0880	0.0740	0.0090	0.0180		
<b>Německo (východ)</b>	0.0720	0.2100	0.1610	0.1030	0.0760	0.0690	0.0330	0.0260		0.0010
<b>Německo (východ)</b>	0.0660	0.2120	0.1560	0.1140	0.0790	0.0700	0.0270	0.0240		0.0010
<b>Německo (severových)</b>	0.0850	0.2000	0.1770	0.1670	0.0690	0.0690	0.0160	0.0200		
<b>Německo (jih)</b>	0.0560	0.2290	0.1640	0.1400	0.0890	0.0330	0.0230	0.0230		
<b>Itálie (Tuscany)</b>	0.0290	0.2170	0.1210	0.1540	0.0630	0.0960	0.0380			
<b>Japonsko</b>	0.1368	0.3158	0.2000	0.1368	0.1158	0.0211	0.0105			
<b>Korea</b>	0.1090	0.2780	0.2130	0.1800	0.1130	0.0400	0.0070	0.0110		
<b>Korea</b>	0.1460	0.2560	0.2310	0.1710	0.0970	0.0390	0.0160	0.0040	0.0010	
<b>Lotyšsko</b>	0.0473	0.1824	0.2905	0.0946	0.0541	0.0541		0.0135	0.0068	0.0068
<b>Filipíny</b>	0.1792	0.3353	0.2254	0.0983	0.0578	0.0173	0.0347			
<b>Portugalsko (sever)</b>	0.0922	0.1729	0.1527	0.1527	0.1268	0.0346	0.0259	0.0058		
<b>Španělsko (Cantabria)</b>	0.0450	0.1560	0.2210	0.1710	0.0300	0.0400	0.0250	0.0250		
<b>Španělsko (Valencia)</b>	0.0655	0.1931	0.2586	0.1483	0.0655	0.0276	0.0276	0.0069		
<b>Taiwan</b>	0.1290	0.3410	0.1970	0.1650	0.0550	0.0240	0.0150	0.0050	0.0070	0.0020
<b>Thajsko</b>	0.1061	0.2525	0.2828	0.1414	0.0909	0.0354	0.0101	0.0051		



## 6.6 DXS6807

DXS6807 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu X v oblasti 22.33. Základní repetitivní sekvence je tetranukleotidová – GATA. Polymorfismus má velikostní rozsah 251 – 275 bp při použití daných primerů (viz tabulka 1). DXS6807 má 7 různých alel a to alely 11 – 17 (EDELMANN, 1999).

Tabulka 29 - DXS6807 - námi naměřené frekvence v české populaci

DXS6807	
11	0,5309
12	0,0103
13	0,0103
14	0,2474
15	0,1959
16	0,0000
17	0,0052

Tabulka 30 - DXS6807 - populační data v české populaci

DXS6807	
Informační obsah polymorfismu (PIC)	0.557306
Homozygotita (h)	0.381678
Heterozygotita (HET):	0.618322
Pravděpodobnost vyloučení (PE):	0.313447
Paternitní Index (PI):	0.190839
Diskriminační síla (PD) - ženy:	0.793306
Diskriminační síla (PD) - muži:	0.618322
MEC Krüger:	0.354026
MEC Kishida:	0.557306
MEC Desmarais:	0.557306
MEC Desmarais Duo:	0.408944

Tabulka 31 - DXS6807 - populační data (ChrX-STR.org)

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
Německo	0.6132	0.6665	0.4137	0.6132	0.6132	0.4662	0.8355	0.6665
Německo	0.6053	0.6575	0.4074	0.6053	0.6053	0.4579	0.8305	0.6575
Německo (severovýchod)	0.6364	0.6890	0.4382	0.6376	0.6364	0.4910	0.8506	0.6890
Korea	0.6236	0.6824	0.4230	0.6248	0.6236	0.4785	0.8403	0.6824

Tabulka 32 - DXS6807 – frekvence (ChrX-STR.org)

Populace	n*	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20
Německo	308 žen		0.4790	0.0230	0.0100	0.2350	0.2180	0.0240	0.0110		
Německo	517		0.4960	0.0220	0.0110	0.2340	0.2010	0.0250	0.0110		
Německo (severových.)	205		0.4390	0.0070	0.0230	0.2560	0.2260	0.0300	0.0100	0.0070	0.0030
Korea	401	0.0040	0.3870	0.0180	0.0250	0.3700	0.1720	0.0190	0.0060		

## 6.7 DXS7423

DXS7423 má cytogenetickou lokaci q 28.00 a patří do vazebné skupiny X4 (EDELMAAN, 2001, a). Základní motiv polymorfismu DXS7423 je tetranukleotidový – TCCA. Polymorfismus nabývá 7 různých alel, alely jsou 12 – 18. Velikost polymorfismu je v rozmezí 175 – 199 bp při použití daných primerů (viz tabulka 1) (EDELMAAN, 2002, a).

Tabulka 33 - DXS7423 - námi naměřené frekvence v české populaci

DXS7423	
13	0,1500
14	0,3250
15	0,3917
16	0,1333

Tabulka 34 - DXS7423 - populační data v české populaci

DXS7423	
Informační obsah polymorfismu (PIC)	0.646602
Homozygotita (h)	0.299323
Heterozygotita (HET):	0.700677
Pravděpodobnost vyloučení (PE):	0.429308
Paternitní Index (PI):	0.149661
Diskriminační síla (PD) - ženy:	0.856331
Diskriminační síla (PD) - muži:	0.700677
MEC Krüger:	0.444429
MEC Kishida:	0.646602
MEC Desmarais:	0.646602
MEC Desmarais Duo:	0.501524

Tabulka 35 - DXS7423 – populační data (ChrX-STR.org)

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
<b>Belo Horizonte, Brazílie</b>	0.6416	0.6944	0.4468	0.6416	0.6416	0.4980	0.8538	0.6944
<b>Čína (Guangdong)</b>	0.4219	0.5186	0.2324	0.4219	0.4219	0.2877	0.6715	0.5186
<b>Finsko</b>	0.6619	0.7142	0.4596	0.6619	0.6619	0.5176	0.8660	0.7142
<b>Německo</b>	0.6768	0.7245	0.4818	0.6765	0.6768	0.5349	0.8764	0.7245
<b>Německo</b>	0.6708	0.7192	0.4755	0.6704	0.6708	0.5284	0.8727	0.7192
<b>Německo</b>	0.6751	0.7229	0.4800	0.6746	0.6751	0.5331	0.8754	0.7229
<b>Německo (východ)</b>	0.6557	0.7085	0.4560	0.6557	0.6557	0.5119	0.8622	0.7085
<b>Ghana</b>	0.6411	0.6917	0.4435	0.6411	0.6411	0.4959	0.8543	0.6917
<b>Maďarsko</b>	0.6615	0.7119	0.4626	0.6591	0.6615	0.5183	0.8666	0.7119
<b>Japonsko (Fukuoka)</b>	0.4367	0.5041	0.2518	0.4367	0.4367	0.2968	0.6867	0.5041
<b>Korea</b>	0.4481	0.5362	0.2550	0.4481	0.4481	0.3099	0.6968	0.5362
<b>Polsko</b>	0.6640	0.7126	0.4675	0.6639	0.6640	0.5205	0.8688	0.7126
<b>Portugalsko (sever)</b>	0.6173	0.6760	0.4170	0.6173	0.6173	0.4721	0.8364	0.6760
<b>Rio de Janeiro, Brazílie</b>	0.6380	0.6911	0.4434	0.6380	0.6380	0.4943	0.8515	0.6911
<b>Španělsko (Basque country)</b>	0.6277	0.6854	0.4258	0.6289	0.6277	0.4821	0.8433	0.6854
<b>Španělsko (Cantabria)</b>	0.6643	0.7129	0.4659	0.6619	0.6643	0.5210	0.8690	0.7129
<b>Španělsko (Valencia)</b>	0.6350	0.6868	0.4382	0.6349	0.6350	0.4899	0.8501	0.6868
<b>São Paulo, Brazílie</b>	0.5822	0.6424	0.3857	0.5821	0.5822	0.4365	0.8119	0.6424
<b>Vitória, Brazílie</b>	0.6103	0.6691	0.4116	0.6103	0.6103	0.4651	0.8317	0.6691

Tabulka 36 - DXS7423 – frekvence (ChrX-STR.org)

Populace	n*	8	10	12	13	14	15	16	17	18	19
Belo Horizonte, Brazílie	245			0.0057	0.0595	0.3851	0.3684	0.1190	0.0623		
Čína (Guangdong)	272				0.0025	0.3750	0.5825	0.0375	0.0025		
Finsko	103				0.1290	0.3670	0.3130	0.1910			
Německo	278 žen			0.0018	0.1263	0.3465	0.3375	0.1570	0.0306		
Německo	439 mužů				0.1366 ; 13.II 0.0023	0.3621	0.3348	0.1343	0.0296		
Německo	717			0.0012	0.1297 ; 13.II 0.0007	0.3517	0.3366	0.1494	0.0303		
Německo (východ)	620 chrx			0.0020	0.0770	0.3480	0.3560	0.1930	0.0220	0.0020	
Ghana	59 mužů				0.1864	0.4407	0.2712	0.0678	0.0339		
Maďarsko	384			0.0020	0.1350	0.3420	0.3680	0.1310	0.0180		0.0020
Japonsko (Fukuoka)	93 mužů					0.2688	0.6452	0.0860			
Korea	401			0.0010		0.3560	0.5770	0.0640	0.0020		
Polsko	240				0.1361	0.2944	0.4000	0.1472	0.0222		
Portugalsko (sever)	347 mužů		0.0029		0.0605	0.3573	0.4150	0.1412	0.0231		
Rio de Janeiro, Brazílie	261	0.0074		0.0049	0.0714	0.3596	0.3990	0.1158	0.0419		
Španělsko (Basque country)	147				0.0500	0.3310	0.4090	0.1860	0.0250		
Španělsko (Cantabria)	125				0.0730	0.2720	0.4030	0.2090	0.0410		
Španělsko (Valencia)	145 žen			0.0034	0.0655	0.2966	0.4414	0.1586	0.0310		0.0034
São Paulo, Brazílie	250	0.0048	0.0024		0.0555	0.3309	0.4855	0.0918	0.0290		
Vitória, Brazílie	245			0.0049	0.0494	0.3531	0.4321	0.1259	0.0346		

## 6.8 GATA172D05

GATA172D05 je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu X v oblasti 23.00. Základní repetitivně sekvence je tetranukleotidová – TAGA (EDELDMANN, 2001, a). Polymorfismus má velikostní rozsah 104 – 132 bp při použití daných primerů (viz tabulka 1). GATA172D05 má 8 různých alel a to jsou alely 5 – 12 (SZIBOR, 2003).

Tabulka 37 - GATA172D05 - námi naměřené frekvence v české populaci

GATA172D05	
6	0,1667
7	0,0083
8	0,2083
9	0,0417
10	0,2250
11	0,2583
12	0,0917

Tabulka 38 - GATA172D05 - populační data v české populaci

GATA172D05	
Informační obsah polymorfismu (PIC)	0.771508
Homozygotita (h)	0.198738
Heterozygotita (HET):	0.801262
Pravděpodobnost vyloučení (PE):	0.601384
Paternitní Index (PI):	0.099369
Diskriminační síla (PD) - ženy:	0.930749
Diskriminační síla (PD) - muži:	0.801262
MEC Krüger:	0.605112
MEC Kishida:	0.771508
MEC Desmarais:	0.771508
MEC Desmarais Duo:	0.645662

Tabulka 39 - GATA172D05 - populační data (ChrX-STR.org)

Populace	PIC	HET	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC Desmarais	MEC Desmarais duo	PD ženy	PD muži
<b>Belo Horizonte, Brazílie</b>	0.8138	0.8356	0.6680	0.8138	0.8138	0.7001	0.9512	0.8356
<b>Německo</b>	0.7753	0.8037	0.6119	0.7753	0.7753	0.6506	0.9331	0.8037
<b>Korea</b>	0.7143	0.7484	0.5374	0.7143	0.7143	0.5778	0.9026	0.7484
<b>Korea</b>	0.7023	0.7356	0.5240	0.7011	0.7023	0.5638	0.8968	0.7356
<b>Portugalsko (Sever)</b>	0.7503	0.7829	0.5771	0.7502	0.7503	0.6198	0.9203	0.7829
<b>Rio de Janeiro, Brazílie</b>	0.7833	0.8105	0.6223	0.7833	0.7833	0.6604	0.9369	0.8105
<b>Španělsko (Valencia)</b>	0.7839	0.8112	0.6228	0.7838	0.7839	0.6611	0.9371	0.8112
<b>São Paulo, Brazílie</b>	0.7879	0.8137	0.6305	0.7879	0.7879	0.6666	0.9395	0.8137
<b>Vitória, Brazílie</b>	0.7911	0.8154	0.6369	0.7911	0.7911	0.6710	0.9417	0.8154

Tabulka 40 – GATA172D05 – frekvence (ChrX-STR.org)

Populace	n*	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>Belo Horizonte, Brazílie</b>	245		0.1530	0.0369	0.1246	0.1842	0.2068	0.1953	0.0964	0.0028
<b>Německo</b>	503	0.1420	0.0030	0.1730	0.0600	0.2730	0.2370	0.1090	0.0030	
<b>Korea</b>	300		0.0800	0.0040	0.1560	0.0870	0.4020	0.2220	0.0490	
<b>Korea</b>	401		0.0650	0.0040	0.1380	0.1000	0.4300	0.2080	0.0540	
<b>Portugalsko (Sever)</b>	347 muži		0.2017	0.0029	0.1671	0.0375	0.3199	0.1988	0.0720	
<b>Rio de Janeiro, Brazílie</b>	261		0.1896	0.0222	0.1724	0.1576	0.2685	0.1601	0.0271	0.0025
<b>Španělsko (Valencia)</b>	145 ženy		0.1931	0.0034	0.1586	0.0655	0.2517	0.2138	0.1138	
<b>São Paulo, Brazílie</b>	250		0.1473	0.0168	0.1546	0.1256	0.2730	0.2126	0.0701	
<b>Vitória, Brazílie</b>	245		0.1481	0.0272	0.1531	0.1407	0.2963	0.1605	0.0716	0.0025

Námi naměřené frekvence (české populace) jsou u všech polymorfismů velice podobné hodnotám v německé populaci. Pouze u polymorfismu GATA172D05 se naše výsledky neshodují s výsledky v Německu. Naše výsledky jsou v tomto případě obdobné jako u portugalské a španělské populace.

## 6.9 Vázané polymorfismy

Polymorfismy DXS8377 a DXS7423 jsou tzv. vázané polymorfismy, tj. nedědí se nezávisle, ale pouze jako celý haplotyp. Je to dáno jejich fyzickou blízkostí na chromozomu. Pokud se tedy využívá pouze frekvenční analýza jednotlivých alel jednotlivých lokusů, jedná se o analýzu neúplně přesnou. Dochází ke zjednodušení frekvencí, protože pro získání obrázku (frekvence) o výskytu jednotlivých haplotypů by bylo nutné získat velké množství vzorků (jen pro tyto tři haplotypy existuje přes 1300 unikátních haplotypů, z čehož si lze udělat představu o tom, jak velká by musela být populační databáze). Pokud by ale bylo možné do budoucna tyto vázané polymorfismy sledovat a zaplnit populační databázi, získali bychom nástroj s vysokou diskriminační silou. Odhadnutá hodnota PD je větší než 0,999 999.

Jelikož ale taková databáze není k dispozici, využíváme pouze frekvenční databázi pro jednotlivé polymorfismy, jako by se jednalo o nezávislé lokusy, čímž si vědomě snižuje diskriminační sílu.

## 6.10 Využití metody na reálných vzorcích

### Případ 1

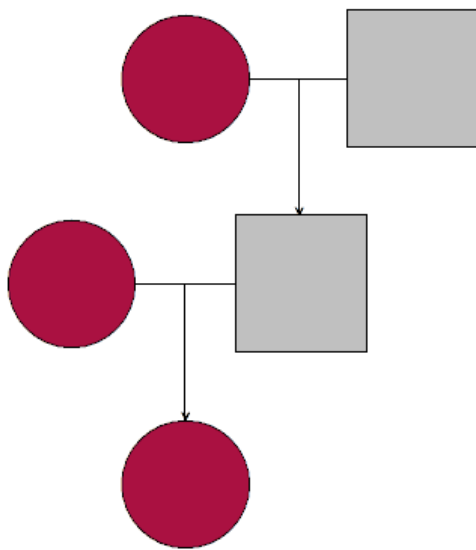
V tomto případě nebyl dostupný domnělý otec ani dědeček. Dostupné vzorky (dcera, matka a babička – matka domnělého otce) byly testovány pomocí 16 autozomálních polymorfismů a 6 polymorfismů na chromozomu X – zde byl rekonstruován profil pravděpodobného otce.

Tabulka 41 - Případ 1

	matka M0	dcera D1	babička J1	profil otce	PI
<b>DXS8378</b>	11, 12	11, 12	<b>11, 12</b>	11, 12	1,465201
<b>DXS7424</b>	15, 17	15, 17	<b>12, 15</b>	15	1,608752
<b>DXS8377</b>	43	54	<b>50, 54</b>	54	7,5
<b>DXS101</b>	19	27, 28	<b>26, 28</b>	28	9,242144
<b>DXS6807</b>	11, 15	11, 14	<b>11, 14</b>	14	2,114165

$CPI_{DXS} - 345,43$ ;  $W_{DXS} - 99,71 \%$

CPI zjištěné pomocí autozomálních polymorfismů – 303,3376;  $W - 99,67 \%$



**Obrázek 17 - Příklad 1 - dostupné vzorky růžové, nedostupné šedé**

Porovnáním pravděpodobností otcovství (CPI – kombinovaný paternitní index) je vidět, že analýza pouze 5 polymorfismů na chromozomu X dává silnější pravděpodobnost otcovství než analýza 16 autozomálních polymorfismů. Jedná se o nejjednodušší případ, kde se obvykle analýza chromozomu X využívá.

Slovní zhodnocení případu by mohlo znít následovně:

Ať jsou jiné důkazy ve prospěch otcovství domnělého otce vůči dítěti ve srovnání s otcovstvím neznámého muže jakkoli velké, toto vyšetření je posiluje 345 krát. Pokud je výchozí pravděpodobnost otcovství domnělého otce vůči dítěti 50%, toto vyšetření ji upravuje na 99,71 %, což lze dle Hummelovy tabulky považovat jako vysoce pravděpodobné otcovství.



## Případ 2

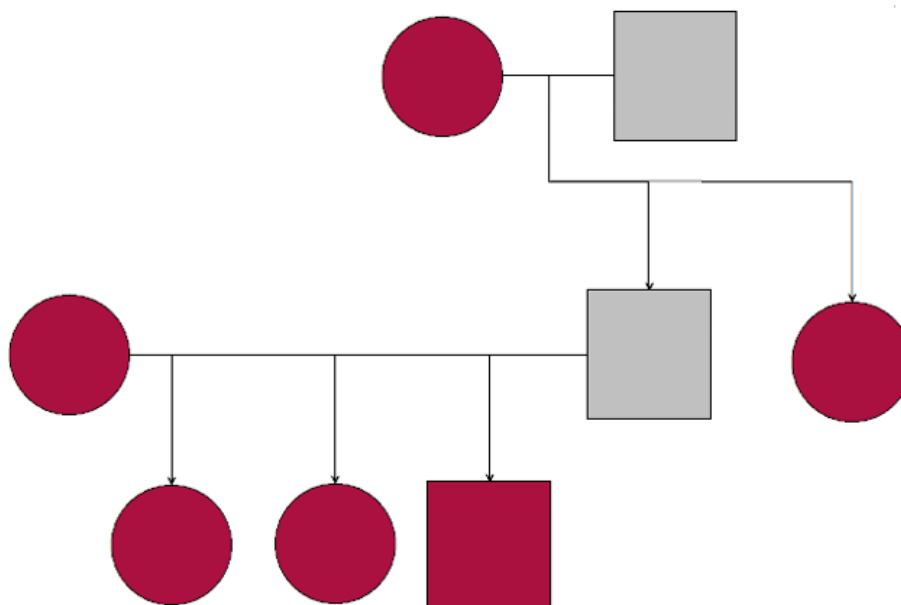
V případě 2 byl nedostupný vzorek domnělého otce, proto byly využity vzorky sestry a matky domnělého otce. Vzorky byly analyzovány pomocí 16 autozomálních polymorfismů a 6 polymorfismů na chromozomu X – zde byl rekonstruován profil pravděpodobného otce.

Tabulka 42 - Případ 2

	dcera	syn	dcera	manželka	matka AF	sestra AF	profil otce dle dětí AF
	D1	D2	D3	M0	J1	J2	AF
<b>DXS8378</b>	10, 12	10	10, 12	10, 13	12	11, 12	12
<b>DXS7424</b>	15, 16	15	15, 16	15	16	14, 16	16
<b>DXS8377</b>	44, 48	42	44, 48	42, 48	40, 44	44, 54	44
<b>DXS7133</b>	9, 11	9	9, 11	9	9, 11	10, 11	11
<b>DXS101</b>	23, 26	23	23, 26	22, 23	25, 26	24, 26	26, 27
<b>DXS6807</b>	11, 15	11	15	11, 15	15, 17	15	11, 15

$CPI_{DXS} - 1356,112$ ;  $W_{DXS} - 99,93 \%$

CPI zjištěné pomocí autozomálních polymorfismů – 11540;  $W - 99,991 \%$



Obrázek 18 - Případ 2

I v tomto případě je vidět, že analýzy 6 polymorfismů na chromozomu X dává srovnatelné výsledky jako analýza 16 autozomálních polymorfismů. Vzorek syna nelze samozřejmě pro analýzu chromozomu X použít, protože dědí chromozom X pouze od matky.

Slovní zhodnocení případu by mohlo znít následovně:

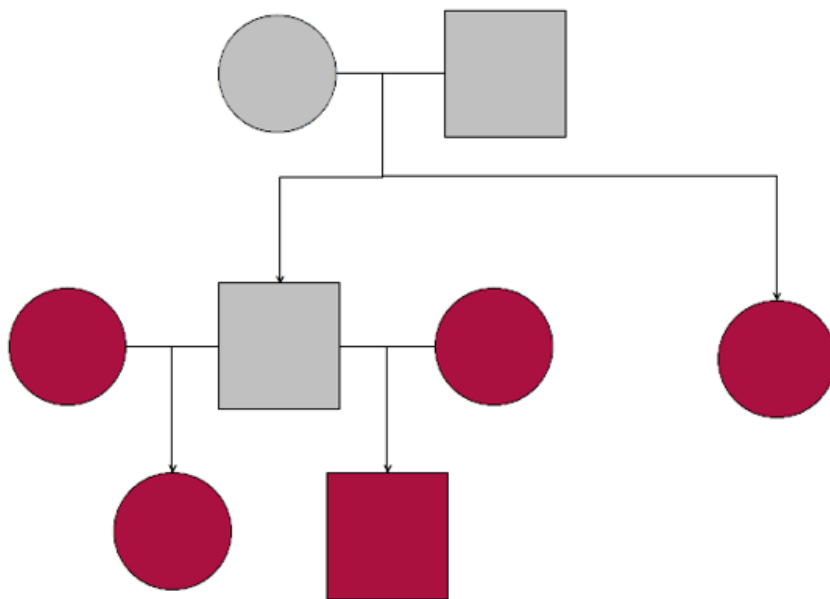
Ať jsou jiné důkazy ve prospěch otcovství domnělého otce vůči dítěti ve srovnání s otcovstvím neznámého muže jakkoli velké, toto vyšetření je posiluje 1356 krát. Pokud je výchozí pravděpodobnost otcovství domnělého otce vůči dítěti 50%, toto vyšetření ji upravuje na 99,93 %, což lze dle Hummelovy tabulky považovat jako vysoce pravděpodobné otcovství.

### Případ 3

V případě 3 byl domnělý otec nedostupný, byly analyzovány vzorky dcery, syna, matky syna, přítelkyně a sestry domnělého otce.

Tabulka 43 - Případ 3

	dcera D1	přítelkyně M0	syn AF J1	matka 2 J2	sestra AF J3	profil otce AF	informativita
<b>DXS8378</b>	10	10, 12	11	10, 11	<b>10, 12</b>	10	10
<b>DXS7424</b>	13, 17	17	15	15	<b>15, 16</b>	13	-
<b>DXS8377</b>	45, 50	43, 45	47	47	<b>49, 52</b>	50	-
<b>DXS7133</b>	10	9, 10	12	10, 12	<b>9, 12</b>	10	-
<b>DXS101</b>	18, 25	18, 25	27	24, 27	<b>24, 25</b>	18, 25	25
<b>DXS6807</b>	14, 15	15	11	11	<b>11</b>	14	-



**Obrázek 19 - Případ 3**

Z profilu dcery a její matky (přítekně) rekonstruován profil domnělého otce.

Pomocí DXS bylo jasně vyloučeno otcovství nařčeného. Pro tuto analýzu nebylo nutné (ani možné) využít druhou rodinu domnělého (označenou J1 a J2). Zde je vidět, že analýza chromozomu X dokáže tento případ velmi zjednodušit, protože pro jeho vyšetření se omezí pouze na 3 vzorky (přítekně a její dítě a sestra domnělého otce).

Slovní zhodnocení případu by mohlo znít následovně:

Ať jsou jiné důkazy ve prospěch otcovství domnělého otce vůči dítěti ve srovnání s otcovstvím neznámého muže jakkoli velké, toto vyšetření je posiluje 0,0055 krát. Pokud je výchozí pravděpodobnost otcovství domnělého otce vůči dítěti 50%, toto vyšetření ji upravuje na 0,55 %, což lze dle Hummelovy tabulky považovat jako otcovství velmi nepravděpodobné.

## 7 Závěr

Podařilo se nám na základě publikovaných polymorfismů sestavit úplně nový multiplex, který zatím nebyl vyzkoušen. Provedli jsme značení novými barvami (HEX a CFR 610). Optimalizace multiplexu (výběr polymorfismů a reakční podmínky) byla důležitou součástí diplomové práce.

Provedli jsme frekvenční analýzu těchto polymorfismů pro českou populaci (přes 100 vzorků nepříbuzných žen), žádná taková analýza ještě nebyla pro tuto populaci publikována. Tato analýza bude využita jako základ pro budovanou frekvenční databázi, která bude v průběhu následujících analýz (ty již nejsou součástí diplomové práce) ještě doplněna.

Takto připravený multiplex spolu s frekvenční databází umožňuje analýzu komplikovaných případů, které nelze řešit standardní analýzou autozomálních polymorfismů a rozšiřuje možnosti analýzy lidské DNA pro forenzní účely.

Předpokládáme reálné využití takto připravené metody v laboratořích společnosti GENERI BIOTECH. Do budoucna se plánuje případné doplnění multiplexu o další polymorfismy a rozšíření frekvenční databáze, pro další zpřesnění. Nicméně to bude již nad rámec této práce.

## 8 Použitá literatura

- AAA
- ATCC. *K-562 (ATCC CCL-243)*. Products. [online]. [cit.2016-11-11]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-243.aspx>
- A-TEST. Provedení odběru vzorků. [online]. 2017. [cit.2017-03-01]. Dostupné z: <http://www.a-test.cz/a-test-provedeni-odberu/>
- BALDING, D.J. *Weight of evidence for Forensic DNA Profiles* Chichester: John Wiley and Sons. 2005. 198 s.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. *Construction of Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms*. Am J Hum Genet. 1980
- BUTLER, J.M. (a) *Constructing STR Multiplex Assays*. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg. 2005. 18s
- BUTLER, J.M. (b) *Forensic DNA typing*. Biology, Technology and Genetics of STR Markers. Second Edition. Elsevier academic press. 2005. 660s. ISBN-13 978-0-12-147952-7
- BUTLER, J.M. *Genetics and Genomics of Core STR Loci Used in Human Identit Testing*, J Forensic Sci. 2006. 48s
- CHR-X-STR.org 2.0. *Database avers many issues concerning the usage of X-chromosomal markers for forensic purpose*. [online]. [cit.2016-04-19]. Dostupné z: <http://www.chrx-str.org/>
- ČESKOSLOVENSKÁ SPOLEČNOST PRO FORENZNÍ GENETIKU. *Metody forezní genetiky. Určování identity osob*. [online]. 2016 [cit.2016-02-23]. Dostupné z: <http://www.cssfg.org/cz/1113/metody-forezní-genetiky/?print=1>
- DESMARIAS, D., ZHONG, Y., CHAKRABORTY, R., PERREAULT, C., BUSQUE, L., *Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA)*. PRO-ADN Diagnostic, Polyservices Maisonneuve-Rosemont, Montreal, Canada. 1998
- DRÁBEK, J. *Interpretace DNA profilů při určování otcovství a příbuznosti*. Tribun EU. 2011. 94s. ISBN 978-80-263-0066-3

- EDELMANN, J., SZIBOR, R., *Validation of the HumDXS6807 short tandem repeat polymorphism for forensic application*. Institut für Rechtsmedizin, Universität Leipzig. 1999
- EDELMANN, J. (a), HERING, S., MICHAEL, M., LESSIG, R., DEICHSEL, D., MEIER-SUNDHAUSEN, G., ROEWER, L., PLATE, I., SZIBOR, R., *16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population*. Institut für Rechtsmedizin. 2001
- EDELMANN, J. (b), SZIBOR, R., *DXS101: a highly polymorphic X-linked STR*. Institut of Legal Medicine, University of Leipzig. 2001
- EDELMANN, J. (a), DEICHSEL, D., HERING, S., PLATE, I., SZIBOR, R., *Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS 8377*. Institut für Rechtsmedizin, Universität Leipzig. 2002.
- EDELMANN, J. (b), HERING, S., KUHLSCH, E., SZIBOR, R., *Validation of the STR DXS7424 and linkage situation on the X-chromosome*. Institut für Rechtsmedizin, Universität Leipzig. 2002
- EDELMANN, J., et al. *Advantages of X-chromosomal microsatellites in deficiency paternity testing: presentation of cases*. Institut für Rechtsmedizin, Universität Leipzig. 2004. 3s
- ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. *Linkage group*. [online]. [cit.2017-02-20]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/linkage-group>
- GRUNENWALD, H. *Optimization of Polymerase Chain Reactions*. Epicentre Technologies Corp., Madison, WI, USA. 2003
- HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., DLOUHY, S.R., VANCE, G.H., VOGT, P.H. *Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol*. Bio techniques, Indiana University. 1997. 8s
- HYPER CLDB. K-562 (human, Caucasian, pleural effusion, leukemia, chronic myeloid). [online]. 2016 [cit.2016-11-11]. Dostupné z: <http://bioinformatics.hsanmartino.it/cldb/cl2967.html>
- KISHIDA, T., WANG, W., FUKUDA, M., TAMAKI, Y. *Duplex PCR of the Y-27H39 and HPRT loci with reference to Japanese population data on the HPRT locus*. Oita Medial University, Japan. 1997

- KOČÁREK, E. *Genetika*. Scientia, spol s.r.o., pedagogické nakladatelství. 2004. 211s. ISBN 80-7183-326-6
- KOČÁREK, E. *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. 2007. 218s. ISBN 978-80-7013-450-4
- KRÜGER, J., FUHRMANN, W., LICHTER, K.-H., STEFFENS, CHR. *Zur Verwendung des Polymorphismus der sauren Erythrocytenphosphatase bei der Vaterschaftsbegutachtung*. Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin. 1968.
- LI, L., LIN, Y., ZHU, R., ZHAO, Z., QUE, T. *A case of false mother included with 46 autosomal STR markers*. Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Institute of Forensic Science, Ministry of Justice, Shanghai, China. 2015
- MEDICINE.YALE. Troubleshooting for PCR and multiplex PCR. Genetics. [online]. 2009 [cit.2017-03-08]. Dostupné z: <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html>
- MENDELU. *Vazba genů a rekombinace*. [online]. 2008 [cit.2016-03-07]. Dostupné z: [http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas\\_vazba1.html#](http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas_vazba1.html#)
- MORGAN, T. K. *Sex Limited Inheritance in Drosophila*. Woods Hole, Massachusetts. 1910
- MULLIS, K. *Polymerase Chain Reaction, Making DNA accessible*. PCR. Dr. Kary Banks Mullis. [online]. 2009 [cit.2016-03-08]. Dostupné z: <http://www.karymullis.com/pcr.shtml>
- NEI, M., ROYCHOUDHURY, AK. *Sampling variances of heterozygosity and genetic distance*. Genetics. 1974
- NOBELPRIZE. The Official Web Site of the Nobel Prize. Thomas H. Morgan – Biographical. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1933. [online]. 2017 [cit.2017-02-20]. Dostupné z: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1933/morgan-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1933/morgan-bio.html)
- PUBLIC HEALTH ENGLAND. *ECACC General Cell Collection: K562*. Culture Collections. [online]. [cit.2016-11-11]. Dostupné z: [http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=89121407&collection=ecacc\\_gc](http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=89121407&collection=ecacc_gc)
- ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie*. První díl, vydání čtvrté. Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc. Brno. 2006. 289s. ISBN 80-902562-5-2

- SIMONOVIĆ, A., TRIFUNOVIĆ, M., RASPOR, M., CINGEL, A., BOGDANOVIĆ, M., DRAGIĆEVIĆ, M., SUBOTIĆ, A. *Dimethyl sulfoxide improves sensitivity and specificity of RT-PCR and QRT-PCR amplification of low-expressed transgenes*. Department for Plant Physiology, Institut for Biological Research „Saniša Stanković“, University of Belgrade. 2012
- SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J. *Genetika*. Muni Press Masarykova univerzita. 2009. 894s. ISBN 978-80-210-4852-2
- SPENCER, M., BARNES, S., PARADA, J., BROWN, S., PERRI, L., UETTWILLER-GEIGER, D., JOHNSON, H.B., GRAHAM, D. *A primer on on-demand polymerase chain reaction technology*. American Journal of Infection Control. 2015. 7s
- SUZUKI, D.T., GRIFFITHS, A.J.F., et al. *Nature of crossing-over*. An introduction to genetic analysis. 7th edition. 2000. 960s. ISBN 978-0716737711
- SZIBOR, R., KRAWCZAK, M., HERING, S., EDELMANN, J., KUHLISCH, E., KRAUSE, D., *Use of X-linked markers for forensic purposes*. Legal Med. 2002
- SZIBOR, R., EDELMANN, J., HERING, S., PLATE, I., WITTING, H., ROEWER, L., WIEGAND, P., CALI, F., ROMANO, V., MICHAEL, M. *Cell line DNA typing on forensic genetics—the necessity of reliable standards*. Institut für Rechtsmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Leipzig, Germany. 2003
- ŠIMKOVÁ, H. *Breviář forezní genetiky*. Forezní analýza DNA v otázkách a odpovědích. Tribun EU s.r.o. Brno. 2012. 214s. ISBN 978-80-263-0247-6
- UNIVERSITY OF LEICESTER. Virtual Genetics Education Centre. *Recombinant DNA and genetic techniques*. [online]. 2008 [cit.2016-03-07]. Dostupné z: <http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/vgec/highereducation/topics/recombinanttechniques>
- VALONES, M.A.A., et al. *Principle and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review*. Brazil Journal of Microbiology. 2009. 11s
- WALLIN, J.M., et al. *Constructing universal multiplex PCR systems for comparative genotyping*. J Forensic Sci. 2002. 52-65s
- WINESINO. *Definition of Radiation Hybrid*. Public Health Safety. [online]. 2015 [cit.2017-02-27]. Dostupné z: <http://cs.winesino.com/public-health-safety/public-health/1010077359.html>



- YAO, J., WANG, B., *Genetic Variation of 25 Y-Chromosomal and 15 Autosomal STR Loci in the Han Chinese Population of Liaoning Province, Northeast China*. School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang. 2016