

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití NGS pro identifikaci jedinců- nástupce STR

Kostelníková Eva

Bakalářská práce

2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: využití NGS pro identifikaci jedinců- nástupce STR vypracovala samostatně a veškeré použité literární prameny a informace uvádím 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. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30.6.2017

.....

(vlastnoruční podpis)

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé práce panu Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D., za odborné vedení, připomínky a velikou podporu při zpracování daného tématu.

ANOTACE

Tato práce je zaměřena na téma klasických technik využívaných pro identifikaci jedinců jako je STR a SNP a dále využití současných technik NGS (Next Generation sequencing). Mikrosatelity neboli STR jsou krátké repetitivní sekvenace DNA vyskytující se jak v prokaryotickém tak eukaryotickém genomu. SNP varianty sekvenci DNA se vyskytují, když je v sekvenci genomu změněn pouze jeden nukleotid. Každý jedinec má mnoho jednorázových nukleotidových polymorfismů. Cílem mé práce bylo poskytnutí přehledu o metodách používaných k analýze.

KLÍČOVÁ SLOVA

DNA, NGS, STR, SNP

TITLE

Use NGS for identification individuals- successor STR

ANOTATION

This work is focused on the theme of the classic techniques used for identification of individuals such as STR and SNP, and further use of the current techniques of NGS (Next Generation sequencing). Microsatellites, or STR are short repetitivní sequencing DNA occurring both in prokaryotickém so eukaryotickém genome. SNP variants of the DNA sequence occur when it is in the sequence of the genome altered by only one nucleotide. Each individual has many one-time nucleotide polymorphisms. The aim of my work was to provide an overview of the methods used for analysis.

KEY WORDS

DNA, Next generation sequencis, Simple nukleotid polymorphism, short tandem repeat

Obsah

Úvod	10
1 Základní pojmy	11
1.1 DNA	11
1.2 Sekvence DNA	12
1.3 Sekvenování genomu	13
1.4 Nejnovější metody	13
1.4.1 Úvod.....	13
1.4.2 Klasické metody sekvenování.....	14
1.4.3 Princip pyrosekvenování	16
1.4.4 Single molecule real- time	17
1.4.5 Technologie nanoporů.....	19
2 STR a SNP	20
2.1 STR (Short tandem repeats) neboli mikrosatelity	20
2.1.1 Polymorfismy STR.....	20
2.1.2 STR spojené s různým onemocněním	23
2.2 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	23
2.3 Metody analýzy	25
2.3.1 RFLP (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)	25
2.3.2 AFLP (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)	26
2.3.3 PCR (Polymerase chain reaction)	26
2.4 Rozdíly mezi STR a SNP	29
3 Forezní genetika	31
4 Komerčně dostupné kity	32
4.1 Kity pro NGS	32
4.1.1 BRCA –Multiplicom	32
4.1.2 ADH- multiplicom	33
4.1.3 CFTR-multiplicom.....	33
4.1.4 Somatic- multiplicom.....	33
4.1.5 FMF- multiplicom.....	33
4.1.6 HCM- multiplicom.....	33
4.2 Kity pro PCR.....	33
4.2.1 I-5™ 2X High-Fidelity Master Mix.....	33
4.2.2 2X BlueStar™ PCR Master Mix.....	34

4.2.3	2X HotStart PCR Master Mix	34
5	Metody využívané ve forenzní genetice (nejnovější metody NGS)	35
5.1	Potvrzení otcovství.....	35
6	Závěr.....	39
7	Použitá literatura.....	40
8	Seznam obrázků	44
9	Seznam tabulek	45

Úvod

DNA obsahuje oblasti, které jsou pro každého jedince unikátní stejně jako otisky prstů a proto může být vyvinuta k identifikaci jedinců a určování mezi nimi.(1)

Individuální a skupinová identifikace osob je hlavní doménou forenzní genetiky. V počátcích se pro forenzní analýzu využívaly minisatelity, o velikosti 9-100 bp, postupně je ale nahradily mikrosatelity (STR o délce 2-6 bp.)Při řešení složitějších případů se ukázalo výhradně nespolehat pouze na autozomy, ale využít k testování i genetickou informaci uloženou v jiných oblastech genomu. (2)

Profil DNA- zaznamenává zobrazení polymorfizmu DNA – je přesvědčivým důkazem identity jedince. Otisky prstů hrály po mnoha desetiletí hlavní roli při určování identity člověka a byly obvykle klíčovým důkazem, který podezřelý zanechal na místě činu. Využití otisků prstů pro soudní účely je založeno na předpokladu, že u žádných dvou osob se otisky prstů neshodují. Stejně tak žádní dva jedinci – s výjimkou jednovaječných dvojčat – nemají genomy se stejnou sekvencí nukleotidů. Lidský genom obsahuje 3×10^9 párů bází; každé místo v DNA je obsazeno jednou ze čtyř bází. Mnohé substituce bází se označují jako tiché; dochází k nim v nekódujících sekvencích nebo na pozicích odpovídajících třetí bázi v kodonu, což vzhledem k degeneraci genetického kódu nevede ke změně sekvence aminokyselin v produktu příslušného genu. Takové substituce nukleotidových párů se tedy v genomu během evoluce akumulují. K evoluční divergenci genomů kromě toho přispívají i duplikace a delece v sekvencích DNA a další genomové přestavby. Poslední nálezy však prokázaly, že lidský genom obsahuje velké množství rodin polymorfizmů DNA různých typů – polymorfizmů, které mohou poskytovat spolehlivý důkaz v případech nejasné identity. Tyto polymorfizmy lze využít k vytvoření profilu DNA, což je specifický soubor pruhů získaných již zmiňovanou Southernovou hybridizací genomové DNA, která byla štěpena specifickým restrikcčním enzymem a hybridizována s odpovídajícími sondami DNA. (3)

Cílem mé práce je přiblížení problematiky analýzy DNA. Popis současných technik NGS pro identifikaci jedinců a jejich uplatnění do budoucnosti. A dále popis klasických metod využití pro identifikaci, jako jsou STR a SNP metody.

1 Základní pojmy

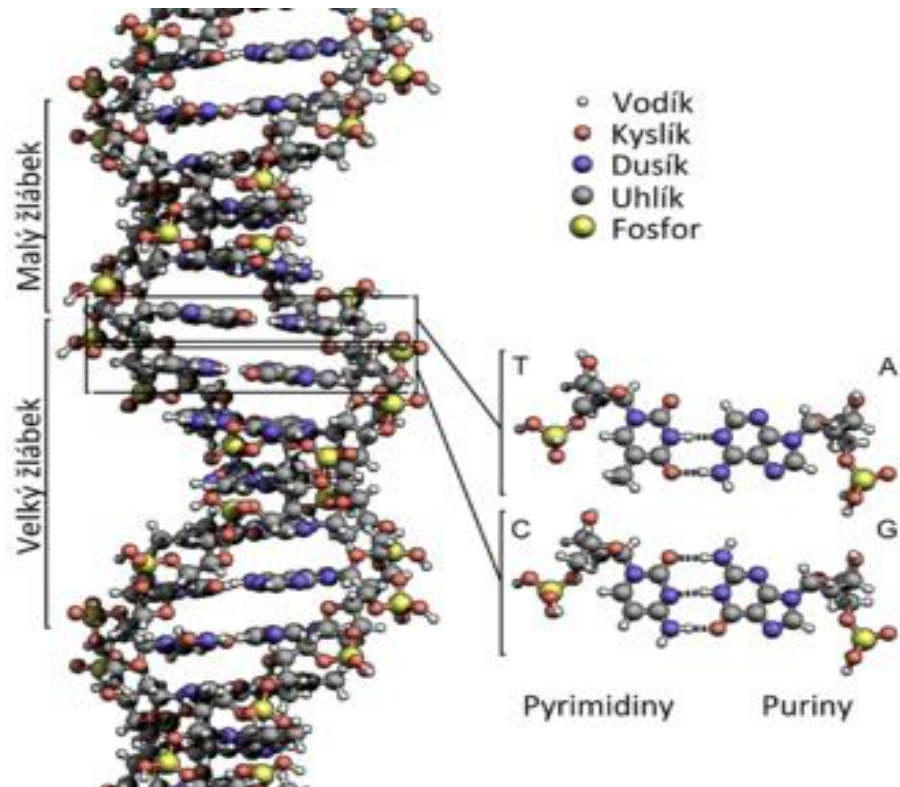
1.1 DNA

Deoxyribonukleová kyselina je látka, která se vyskytuje ve všech buněčných organismech, nese genetickou informaci. DNA předurčuje, jak bude vypadat bakterie, houba, rostlina nebo živočich a jak budou probíhat životní procesy daného organismu. DNA nemusí být v buňce uložena pouze v jádře. Existuje i mitochondriální DNA, která je uložena v mitochondriích. DNA je složena ze zbytku kyseliny fosforečné, molekuly deoxyribózy, dusíkatých bází. Ty se společně spojily a vytvářejí typický tvar dvojité šroubovice.

Strukturu DNA objevili v roce 1953 James Dewey Watson a Francis Compton Crick. Za velký přínos vědě v oblasti molekulární biologie dostali v roce 1962 Nobelovu cenu.(4)

Dusíkaté báze jsou dvojího druhu. Purinové (adenin a guanin) a pyrimidinové (thymín, cytosin a uracil) Uracil se objevuje pouze v RNA. Vždy se k sobě váží jen adenin a thymín a poté cytosin a guanin. Jejich postupným řazením vzniká dvoušroubovice. Charakteristická genetická informace se v DNA tvoří tím, jak jsou dvojice nukleových bází řazeny po sobě. Část řetězce se označuje jako gen. Celá genetická informace se označuje jako genom. (5)

Genetická informace není uložena v jednotlivých bázích, ale v jejich sekvenci a kombinaci. Lidská DNA obsahuje 3 miliardy nukleotidů, které poskytují celkem 20 000 až 25 000 genů kódující bílkoviny. (6)



Obrázek 1: Struktura DNA (<https://cs.wikipedia.org/wiki/DNA>)

Struktura DNA a zobrazení dusíkatých bází purinových a pyrimidinových.

1.2 Sekvence DNA

Sekvence DNA je souhrnný název pro metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleotidů v úsecích DNA. Tyto sekvence jsou součástí dědičné informace v jádře, plasmidech, mitochondriích a plastidech. Sekvence DNA je důležitá nejen v základním výzkumu biologických procesů, ale i v aplikovaných oborech, jimiž je diagnostika nemocí nebo forenzní medicíně- například detekce trombofilních mutací FII. (7)

Dnes je známo obrovské množství sekvencí DNA. Od 70 let 20. Století je používána zejména metoda Fredericka Sangera, která využívá v klasické podobě dideoxynukleotidů a následné elektroforézy. V poslední době se do popředí dostává hlavně pyrosekvenování a další metody (sekvenování nové generace), které urychlují celý proces. (8)

Sekvenování se uplatnilo například v projektu čtení lidského genomu (Human Genome Project), ale přečteny byly genomy i mnoha organismů včetně mnoha různých rostlin, živočichů ale i mikrobů (9)

1.3 Sekvenování genomu

Genomy jsou zpravidla velmi rozsáhlé a jejich sekvenování nukleotid po nukleotidu není ani při použití nejmodernějších postupů otázkou okamžiku. Běžné sekvenovací metody využívají obvykle separaci pomocí elektroforézy, a tak dokáží přečíst na jednu analýzu pouze několik stovek bazí. Existuje několik strategických metod.

Whole-genome shotgun je metoda, při které se genom rozštípe na náhodně velké fragmenty, každý z nich se osekvenuje a následně se tyto sekvence seřadí. Toto seřazení mohou komplikovat různé repetitivní úseky. Celé genomy se musí osekvenovat několikrát, aby se jednotlivé sekvence dostatečně překrývaly a bylo možné podle těchto přesahů sestavit genom.

BAC sekvenování kdy se využívá tzv. BAC (bacterial artificial chromosome) plazmidů. Postup je poněkud opačný. Nejprve se vytvoří mapa celého genomu, jež rozdělí tento genom na sekvence o délce asi 150 000 páru bazí, kdy každá jednotlivá sekvence se vloží do bakterie v podobě uměle připraveného plazmidu, načež se jednotlivé klony mohou sekvenovat. Výhodou je, že u této metody odpadá často složitá práce se seřazováním obrovského množství sekvencí. (10)

1.4 Nejnovější metody

1.4.1 Úvod

Technika sekvenování DNA zaznamenala během posledních let velký posun kupředu díky novým sekvenátorům tzv. druhé generace. Sekvenátory první generace detekovaly DNA báze v řadě jednu po druhé, zatímco sekvenátory druhé generace umožňují masivní paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně. Díky technologii masivního paralelního sekvenování se významně snížila doba potřebná k přečtení dlouhých DNA sekvencí. Nové technologie sekvenování umožňují určit sekvenci lidského genomu nebo jen vybraných částí za zlomek času a za mnohem nižší cenu.

Mezi nejnovější metody patří NGS (next-generation sequencing), které slibují zefektivnění, zjednodušení, urychlení nebo zpřesnění čtení DNA, co nejrychleji přečíst velké genomy.

1.4.2 Klasické metody sekvenování

1.4.2.1 Sekvence dle Sangera

Sekvenování DNA slouží ke stanovení pořadí (sekvence) nukleotidů v molekule DNA. Nejpoužívanější metodou pro stanovení sekvence DNA je enzymová (Sangerova) metoda, která využívá modifikovanou tzv. asymetrickou PCR k syntéze kopií DNA. Tato modifikovaná PCR využívá na rozdíl od „klasické“ PCR pouze jeden primer. Amplifikace PCR produktu tedy probíhá pouze na jednom řetězci DNA, na který se tento primer specificky váže. Kopie molekul DNA nepřibývají exponenciální řadou.

Sekvence dle Sangera též označována jako metoda „plus mínus“ či metoda „primed synthesis“ je použitelná k sekvenování krátké (1500 bp) sekvence jednovláknové DNA. Ve své podstatě využívá biologického procesu replikace DNA- PCR. Jedná se o nejčastější používanou sekvenační technologii založenou na elektroforéze, která se stala základem pro Human Genom Project z roku 2005. Na začátku experimentu je potřeba příprava tzv. DNA knihovny. Řetězec je sestřížen na kratší úseky, naklonován do DNA vektorů a amplifikován in vivo. Amplifikace probíhá v bakteriálních buňkách, ze kterých se následně extrahují plazmidy nesoucí klonované fragmenty. (11)

Principem je, že k jednořetězové- DNA přisedá 15-25 dlouhý primer, který je komplementární k začátku sekvenovaného místa. Od navázaného primeru probíhá syntéza DNA za přítomnosti dNTP (-dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a jednoho z dideoxynukleotidů (-ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) Jednotlivé dideoxynukleotidy jsou v porovnání s jednotlivými nukleotidy v reakci zastoupeny jen v relativně malém množství.

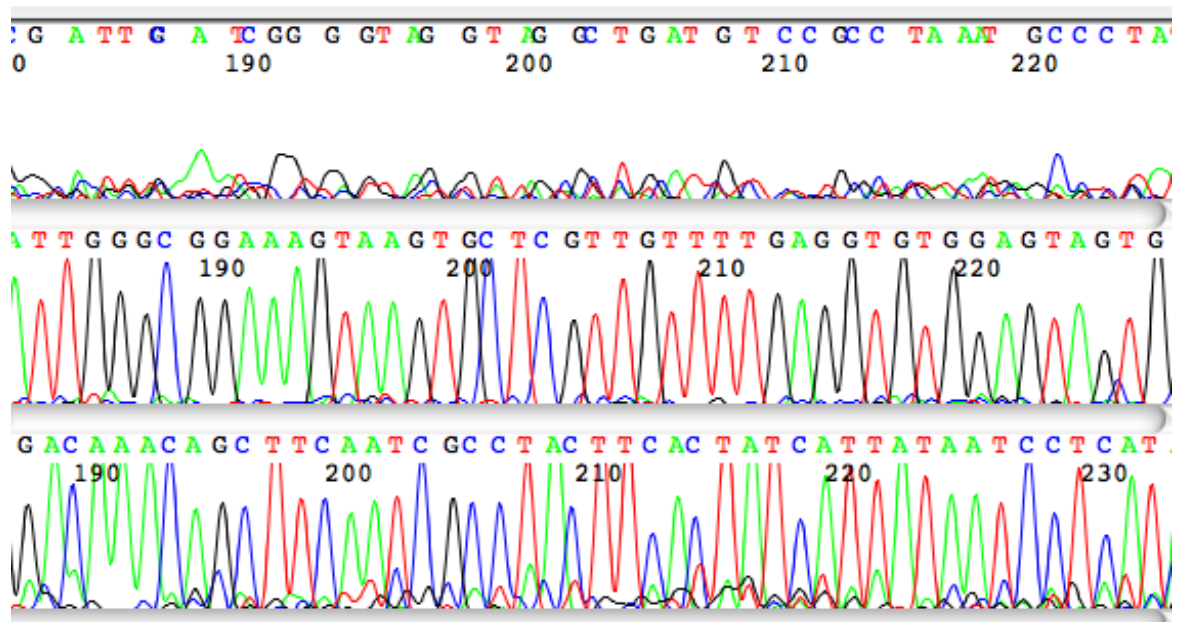
V modifikované podobě Sangerova metoda využívá fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (- každý ddNTP nese svou barevnou značku), což umožňuje provedení reakce v jedné zkumavce. Produkty jsou pak analyzovány kapilární elektroforézou a je získán výsledný sekvenogram.

Dlouhá délka čtení u metod Sanger má značné výhody oproti jiným sekvenčním metodám, zejména pokud jde o sekvenování repetitivních oblastí genomu. Využití sekvenování DNA zahrnuje detekci jednonukleotidového polymorfismu (SNP), heteroduplexovou analýzu polymorfismu jednořetězčové konformace (SSCP) a analýzu krátkého tandemového opakování (STR). Toho se využívá v kriminalistice a forezní vědě při

testování paternity, stanovení viny či nevin v případě podezření z trestné činnosti. Další využití nachází Sangerova metoda ve fylogenetice, medicíně, antropologii a zemědělství. (12)

1.4.2.2 Sekvence dle Maxam-Gilbrt

Reakce je prováděna ve čtyřech zkumavkách, kdy každá ze zkumavek obsahuje svůj dideoxynukleotid. Dideoxynukleotidy se náhodně začlení do syntetizovaného řetězce místo příslušného dNTP (například místo dATP dosedne ddATP). A protože ddNTP nemají OH skupinu po jejich dodání do syntetizovaného řetězce se syntéza zastaví. Vzhledem k tomu, že v každé reakci je obrovské množství molekul DNA a že začleňování ddNTP se děje náhodně a to díky jejich nízké koncentraci jen s malou pravděpodobností vzniká v každé reakci směs různě dlouhých fragmentů. Délka každého z fragmentů udává pozici příslušného ddNTP. Délka fragmentů je analyzována pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a to tak, že se na gel nanesou vedle sebe produkty ze všech čtyř zkumavek a po separaci fragmentů se díky radioaktivnímu značení primerů odečte délka jednotlivých fragmentů. Pozice jednotlivých fragmentů odpovídají pozicím jednotlivých nukleotidů v sekvenovaném vzorku.(13)



Obrázek 2 Chromatogramy ze Sangerova sekvenování různé kvality

(<http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=analiza-genomickych-a-proteomickych-dat--analiza-sekvenci-dna--sekvenovani-genomu>)

Zobrazení sekvenace genomu dle Sangera.

1.4.3 Princip pyrosekvenování

Polony sequencing využívá pyrosekvenování. K samotnému sekvenování dojde, jsou-li jednotlivé fragmenty DNA umístěny na streptavidinový substrát, kdy každý z těchto fragmentů je umístěn do speciálního pikolitrového reaktoru. Probíhá obrovské množství sekvenovacích procesů a výsledek je přečten počítačem.

První komerčně dostupný NGS analyzátor 454 Genome FLX Systém (Roche) byl uveden na trh v roce 2005. Pracuje na principu tzv. pyrosekvenování, což je sled enzymatických reakcí, během kterých se začleňují jednotlivé báze do nově vznikajícího řetězce DNA, přičemž dochází k emisi viditelného světla. Množství uvolněného světla je úměrné počtu začleněných nukleotidů.

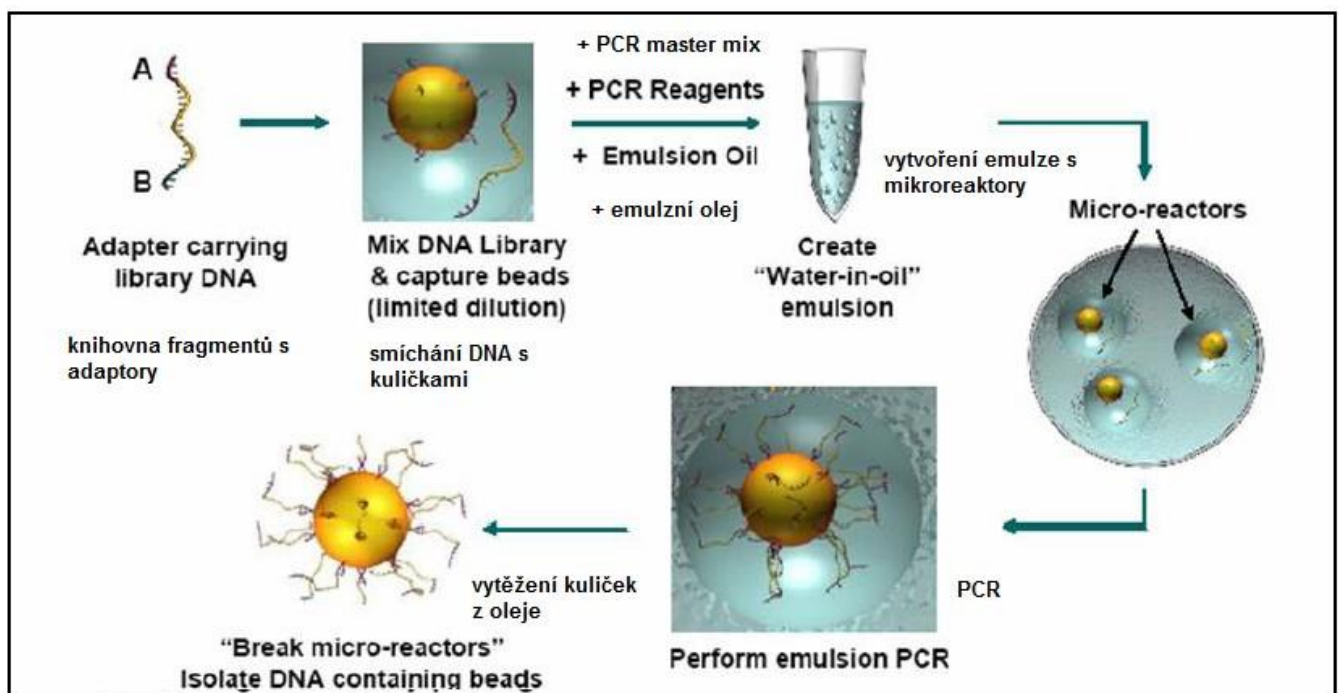
Celý proces začíná přípravou DNA knihovny, kdy je DNA neštěpena na dvouvláknové fragmenty a k jednotlivým fragmentům jsou připojeny krátké koncové specifické adaptory sloužící v dalších krocích k purifikaci a amplifikaci a v neposlední řadě i k vlastní sekvenaci. B-adaptor je na svém konci označen biotinem, který slouží k imobilizaci fragmentů na streptavidinem pokryté magnetické kuličky. Dvouvláknové fragmenty navázané na magnetické kuličky jsou denaturovány, přičemž komplementární řetězec je uvolněn. Takto vzniklé jednořetězové fragmenty jsou připraveny k hybridizaci ke speciálním kuličkám, které mají na svém povrchu komplementární sekvenaci DNA, sloužící jako primer pro následnou amplifikaci.

Vlastní sekvenace probíhá na povrchu pikotitrační destičky. Velikost jednotlivých jamek zajišťuje přítomnost pouze jedné DNA kuličky. Do jamky jsou vpraveny další kuličky, které obsahují enzymy nezbytné pro pyrosekvenační reakci (luciferázu, DNA- polymerázu a sulfurylázu) a enzymy způsobující imobilizaci kuličky.(14)

Takto připravená pikotitrační destička se umístí do přístroje, který řídí průtok nukleotidů v přesně daném pořadí. Když je nukleotid komplementární k následující bázi, je DNA polymerázou inkorporován do řetězce za současného uvolnění molekuly pyrofosfátu. Enzym ATP sulfuryláza přeměňuje uvolněný pyrosulfát na ATP, který dodá energii reakci, při níž dochází k oxidaci luciferinu na oxyluciferin a světelný paprsek. Detekce se provádí

pomocí CCD kamery, která je umístěná na spodní straně destičky, která emitované světlo detekuje.

Vyhodnocení probíhá pomocí počítačového softwaru, kdy dochází k detekci jednotlivých nukleotidů, které slouží jako standard. Emitované záblesky jsou zpracovány do FLOW grafů. Pokud je více stejných nukleotidů řazených v sekvenci za sebou, dochází vlivem odštěpení ke zvýšení intenzity detekovaného signálu. Podle intenzity emitovaného světla se vypočítá délka daného homopolymeru. (15)



Obrázek 3: Postup pyrosekvencování-

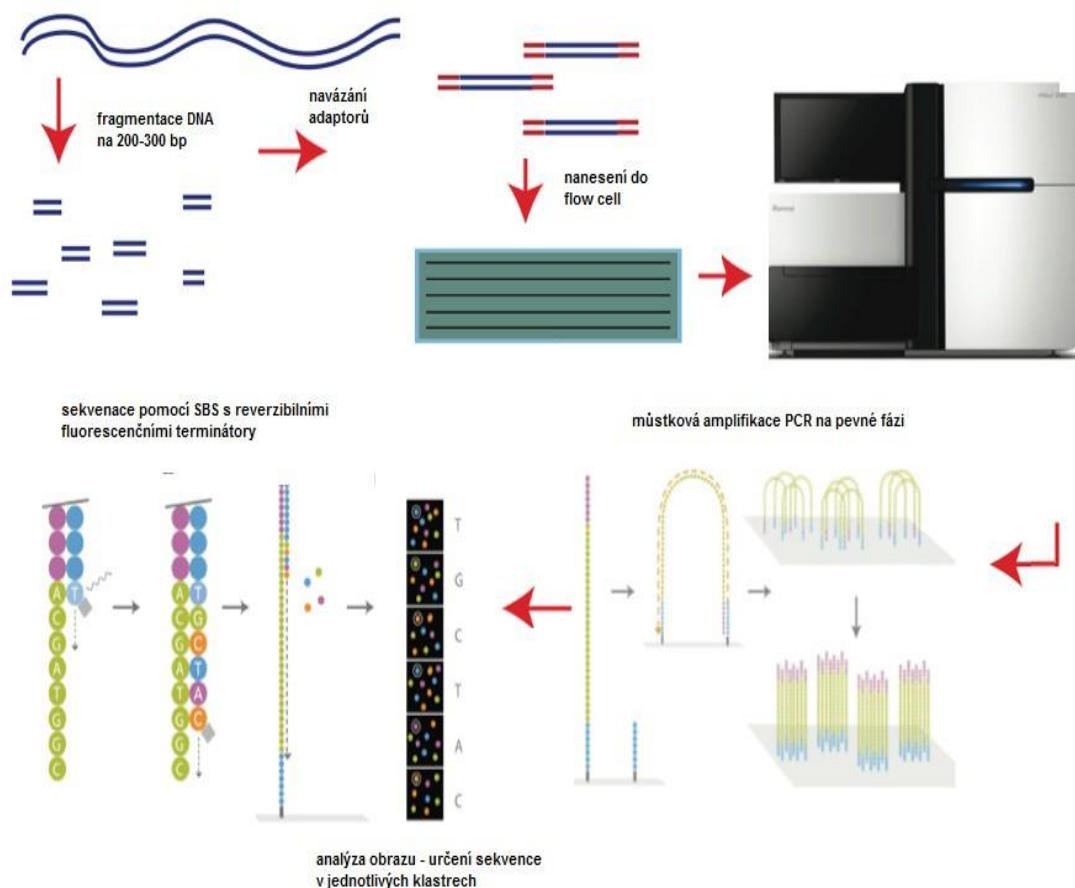
DNA s kuličkami, PCR reagentie a emulzní olej, metoda PCR.

1.4.4 Single molecule real- time

Technologie single-molecule sekvenování představuje výraznou změnu ve vývoji nových sekvenačních metod. Tato metoda je označována jako metoda třetí generace, přináší několik výhod. Tato metoda nevyužívá žádný amplifikační krok před vlastním sekvenováním, což zkracuje dobu přípravy DNA, snižuje cenu a chybovost pramenící z amplifikace, umožňuje vyšší flexibilitu v délce čten a přesnou kvantifikaci DNA molekul, protože signál je zaznamenáván v reálném čase.

Tento systém využívá nanostruktury zvané Zero Mode Waveguide – destičky s desítkami jamkami o průměru 10 nm. Během sekvenačního procesu se komplementární vlákno syntetizuje pomocí DNA polymerázy ukotvené na dně každé jamky. Fluorescenční značka je umístěna na fosfátové skupině nukleotidu, což má za následek uvolnění záblesku zároveň s jeho inkorporací. Proces inkorporace i uvolnění fluorescence trvá po určitou dobu, čehož se využívá pro určení identity báze. Tento postup nevyžaduje promývací kroky při začleňování jednotlivých typů nukleotidů a zrychluje tak průběh sekvenování.

V současnosti se používá sekvenátor Pacific Bioscience model PacBio RS II, díky své extrémní přesnosti a největší délce čtení. Využívá se zejména pro resekvenační projekty na malých prokaryotických i eukaryotických genomech. Má schopnost sekvenovat ultra dlouhé úseky (4000 bází), což umožňuje přesnější mapování na referenční sekvenci.(16)



Obrázek 4: Princip Single molecule real-time-

(<http://docplayer.cz/docs-images/57/40938778/images/15-0.png>)(28.5.2017)

Fragmentace DNA- nanesení do buňky- PCR na pevné bázi- určení sekvence v jednotlivých částech- dokončení pomocí fluorescence.

1.4.5 Technologie nanoporů

Technologie nanoporů využívá velmi tenkých otvorů na molekulární úrovni, jimiž prochází zkoumaný řetězec DNA. V nanoporů jsou umístěny drobné elektrody. Každý nukleotid ovlivňuje svým vlastním specifickým způsobem proud elektronů mezi elektrodami, je možné rychle určit pořadí procházejících nukleotidů.

Koncept využití nanoporů jako bio senzoru byl navržen už v polovině 90. let, kdy započal výzkum nanoporů na půdě akademických institucí.

Technologie je založena na biologických vlastnostech nanoporů, jsou součástí proteinových kanálků v membránách a dovolují výměnu iontů. Nanoporem protéká konstantní proud. Analyt, kterým je v případě využití pro sekvenování jednořetězcová molekula DNA, která prochází nanoporem a dochází k detekci jednotlivých nukleotidů, přičemž pro každý typ nukleotidu je předem určena modulace proudu.

Využití technologie nanoporů pro sekvenování DNA nabízí mnoho výhod oproti stávajícím platformám. Tato technologie má minimální požadavky na reagenty i přípravu vzorku. Je levná a nabízí rychlou analýzu DNA v reálném čase. Sekvence může být u stejné molekuly DNA neustále opakována. Jednotlivá čtení mohou být dlouhá až desítky kilobází. I technologie nanoporů má však svá úskalí, která je nutno vyřešit. Vysoká rychlost s jakou je DNA translokována skrz nanopór, způsobuje problémy s rozlišením signálu nukleotidu od signálu pozadí. Zjistilo se, že například působením světla o určité vlnové délce lze docílit zpomalení průtoku DNA skrz nanopór. (17)

2 STR a SNP

2.1 STR (Short tandem repeats) neboli mikrosatelity

STR neboli krátké tandemové repetice jsou známy jako mikrosatelity nebo jednoduché opakující se sekvence DNA, které jsou složeny z 1-6 párů bazí, tvořící řady o délkách až 100 nukleotidů.

Tandemové repetice jsou všudypřítomnou skupinou jednoduchých opakujících se sekvencí DNA, které jsou zastoupeny jak v eukaryotickém, tak v prokaryotickém genomu a dokazují vysoký stupeň polymorfismu alel. Jsou to tandemové repetice sekvencí DNA obsahujících několik párů bazí.(1-6). Někteří vědci jsou však toho názoru, že tandemové repetice obsahující 7 až 9 párů bazí by měly být také považovány za mikrosatelity a odlišit se tak od minisatelitů.(18)

Vzhledem k jejich polymorfismu a vysoké rychlosti mutace STRs jsou široce používány v biologickém výzkumu. STR markery mají řadu výhod oproti dříve využívaným VNTR markerům. Vzorek, který obsahuje, jen velmi malé množství DNA, může být úspěšně analyzován. Tetranukleotidové markery jsou dostatečně krátké, a lze je tedy úspěšně analyzovat i u částečně degradovaného vzorku, a přitom dostatečně dlouhé, aby nedocházelo k náhodným chybám při amplifikaci pomocí PCR, rychlost analýzy a cena analýzy je řádově mnohem nižší (19)

2.1.1 Polymorfismy STR

STR analýza vychází z anglického short tandem repeats analysis. Jde o metodu molekulární biologie, při které se využívá porovnání specifických lokusů DNA u dvou a více vzorků. Tato metoda je rychlá, cenově dostupná a nabízí nejpresnější ověření totožnosti buněčné linie. Umožňuje identifikaci jedince či konkrétní buněčné linie. Většinu DNA mají jedinci téhož druhu společnou. Nicméně jsou určité oblasti DNA, které jsou variabilní a liší se u každého jedince. Tyto určité polymorfnní sekvence v genetickém kódu lze využít k identifikaci jedince. Genomy eukaryotických buněk jsou plné genetických polymorfismů, krátkých opakujících se sekvencí DNA, které se liší počtem sousedících opakujících se jednotek nebo celkovou délkou opakované oblasti. Úseky DNA, které se skládají z 2-13 opakujících se jednotek, nazýváme *short tandem repeats*, též mikrosatelity. Tyto STR úseky, mikrosatelitní polymorfismy, jsou roztroušeny po celém genomu a jsou chápány jako rozdíly

na úrovni DNA mezi genotypy jednotlivců. Většina polymorfismů vzniká následkem změn v primární struktuře DNA a nachází se v nekódujících oblastech genomu. Polymorfismy mohou být snadno detekovány pomocí metod molekulární biologie. K analýze lze použít sekvenční polymorfismy, u kterých dochází ke změně primární struktury i délkové polymorfismy, které se vyznačují variabilitou v počtu tzv. tandemových repetitivních sekvencí. Počet opakování jednotky (repetice) v konkrétním místě DNA (lokusu) definuje alelu. Každý jedinec má v jaderné DNA dvě kopie každého mikrosatelitu, jeden zděděný po matce, druhý po otci.

STR úseky jsou považovány za jedny z nejvhodnějších genetických markerů, které lze využít k analýze. A to díky mnoha svým užitečným vlastnostem. Počet opakování jednotek STR úseků je vysoce variabilní mezi jednotlivci, což z nich dělá vhodné markery pro identifikaci jedince. Další výhodou je jejich hojný výskyt v celém genomu, extrémní variabilita a kodominantní dědičnost (umožňuje rozlišit heterozygoty). Pro účely identifikace je klíčové, aby se zvolené úseky vyznačovaly co největší variabilitou. K jejich oblíbenosti při využití v analýze přispívá i to, že mohou být snadno amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (dále PCR).

STR alely mají také menší míru mutace, která způsobí, že výsledky jsou více stabilní a předvídatelné. Rychlost mutace daného souboru STR markerů je důležitým parametrem, protože zvýšené mutace mohou vést ke vzniku nových genotypů v čisté buněčné linii. Dosavadní zkušenosti s DNA profilováním buněčných linií ukazují, že došlo pouze k minimálnímu počtu mutací. Riziko falešně pozitivní detekce buněčné linie způsobené mutací STR alely je zanedbatelné a nebylo dosud pozorováno.

Mikrosatelity v lidském genomu umožňují identifikaci buněčných linií na úrovni DNA. Variability těchto úseků využívá STR analýza, která měří přesný počet opakujících se jednotek. Metoda je založena na jevu, že genomy vyšších organismů obsahují mnoho STR úseků DNA, které vykazují tak velkou variabilitu, že je lze využít k identifikaci jedince nebo buněčné linie. Tato metoda se liší od RFLP analýzy, tím, že neřeže DNA pomocí restrikčních enzymů. Místo toho jsou k cílovým místům v řetězci DNA připojeny sondy. Proces profilování DNA za použití vysoce polymorfní STR repetice zahrnuje izolaci DNA z lidské buněčné linie nebo jiného vzorku, amplifikaci cílové oblasti této DNA a analýzu amplifikovaného produktu za použití genetického analyzátoru.(20).

STRs mohou být rozděleny do různých typů na základě různě se opakujících jednotek. Podle délky hlavní opakované jednotky jsou mikrosatelity zařazeny do opakujícího mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidu. Na druhé straně podle opakované struktury se STRs třídí do dokonale se opakujících (jednoduché opakování) – obsahuje pouze jednu opakovanou jednotku a nedokonale se opakujících sestávajících z několika různě se opakujících složek (21)

Některé mikrosatelity mohou mít vliv na regulaci genové exprese, také mohou ovlivnit rekombinaci. Ve forenzní praxi se nejčastěji používají tetranukleotidové STR markery, které vykazují nižší riziko chybovosti polymerázy (prokluz) ve srovnání s tri- či dinukleotidy.

Mechanismy STR mutace byly identifikovány v eukaryotické DNA na začátku roku 1970. Dodnes není znám přesný mechanismus vzniku STR. Byly navrženy tři možné mechanismy: (1.) nerovnoměrný crossing-over v meioze, (2.) retrotranspoziční mechanismus a (3.) uklouznutí DNA polymerázy.

Model uklouznutí DNA polymerázy je považován za hlavní mutační proces probíhající u mikrosatelitů. Během replikace DNA dochází ke sklouznutí DNA polymerázy. Následuje špatné opětovné spárování mezi vznikajícím řetězcem a původní sekvencí. Při nesprávném párování bude jeden konec přečnívat. Následně se však stabilizuje vytvořením smyčky. Pokud syntéza pokračuje dále je pozměněno číslo STR opakování. (22)

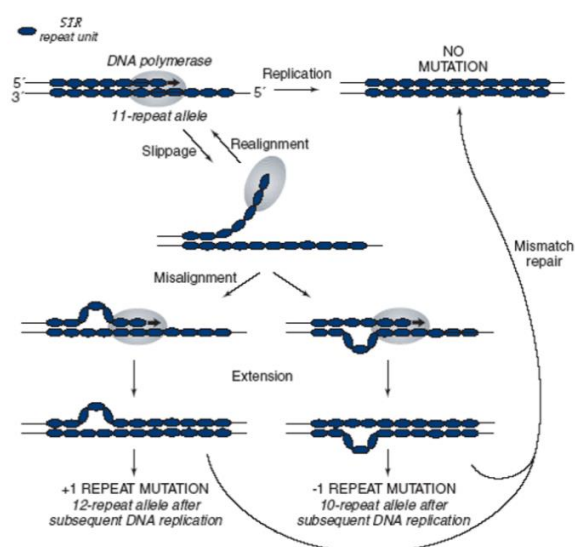


Fig. 1 Schematic illustration of the strand-slippage replication at STR (24).

Obrázek 5: Jobling. M A 2004- princip STR(short tandem repeat)

2.1.2 STR spojené s různým onemocněním

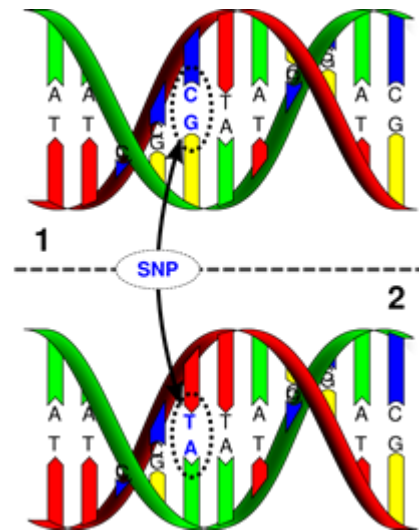
Pokud jsou uvnitř nebo v blízkosti genů, mohou mít mikrosatelity, resp. jejich různá délkaczávažné důsledky, např. v heterogenní skupině monogenních nemocí podmíněných expanzí trinukleotidových repetit. Nejznámějším příkladem je Huntingtonova chorea, fatální neurologické onemocnění s nástupem v dospělosti, projevující se jako demence s extrapyramidovou poruchou motoriky. Dosavadní choroby spojené s trinukleotidovým opakováním byly identifikovány pouze u lidí. To vedlo k hypotéze, že přítomnost trinukleotidového opakování v určitých genech souvisejících s mozkem může přispět k vývoji mozkové funkce. V genu pro huntingtin je repetitivní sekvence (CAG)_n, která kóduje úsek bílkoviny tvořený zbytky glutaminu (polyglutaminový úsek). Za normálních okolností mají lidé méně než 20 trinukleotidů CAG a tedy i glutaminu v huntingtinu, kde tyto tvoří důležitou doménu pro interakce s jinými proteiny. Pokud se však mutací toto množství zvětší nad 30 glutaminů, protein nepracuje správně s výsledným progresivním odumíráním neuronů v nucleus caudatus. U jiného onemocnění, myotonické dystrofie se nachází patologická expanze trinukleotidu CTG v 3' nepřekládané oblasti genu DMPK (dystrofia myotonica protein kinase). Mutantní mRNA má sama o sobě patogenní potenciál, škodí pravděpodobně sekvestrací různých transkripčních faktorů.(23)

2.2 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Variety sekvencí DNA, které se vyskytují, když je v sekvenci genomu změněn pouze jeden nukleotid (A, G, T, C). Každý jedinec má mnoho jednorázových nukleotidových polymorfismů, které společně vytvářejí pro danou osobu jedinečný vzor DNA. SNPs slibují, že významně posílí naši schopnost porozumět a léčit lidská onemocnění.

Jednonukleotidové polymorfismy se nacházejí v lidském genomu, pokud by byly náhodně vybrány dva lidské genomy, míra jejich vzájemné shody v sekvenci DNA bude dosahovat 99,9%. Právě zbývající 0,1% zahrnuje polymorfismy, jejichž nejjednodušší a nejběžnější forma jednonukleotidových záměn je SNP. Tyto SNPs jsou vhodné pro genetické studie, neboť jsou stabilní a roztroušeny po celém lidském genomu s frekvencí jednoho polymorfního místa na 1000 pb v nekódujících oblastech. Doposud bylo v lidském genomu identifikováno více než 1,4 milionů těchto jednonukleotidových záměn.(24)

Jeden nukleotidový polymorfismus nebo SNP (výrazný snip) je variace sekvence DNA vyskytující se v případě, že jediný nukleotid- A, T, C nebo G v genomu se liší mezi členy druhu (nebo mezi párovými chromozomy u jednotlivce). Například dva sekvenovací DNA fragmenty od různých jedinců, AAGCCTA až AAGCTTA, obsahují rozdíl v jediném nukleotidu. V tomto případě říkáme, že existují dvě alely C a T. Téměř všechny běžné SNP mají pouze dvě alely. (25)



Obrázek 6 DNA řetězec 1 se liší od řetězce DNA 2 v jediné poloze páru bází.

Jednonukleotidové polymorfismy mohou spadat do kódujících sekvencí genů, nekódujících oblastí genů nebo v intergenních oblastech mezi geny. SNP v rámci kódující sekvence nemusí nutně měnit aminokyselinovou sekvenci bílkoviny, která je produkována kvůli degeneraci genetického kódu. SNP, ve kterém obě formy vedou ke stejné polypeptidové sekvenci, je označována jako synonyma (někdy nazvaná jako tichá mutace). SNP, které nejsou v oblastech kódujících proteiny, mohou mít stále důsledky pro sdružování genů, vazbu transkripčního faktoru, nebo sekvenci nekódujícího RNA.

Rozdíly v sekvencích DNA člověka mohou ovlivnit to, jak lidé vyvíjejí choroby, reagují na patogeny, chemické látky, drogy atd. Nicméně jejich největší význam v biomedicinském výzkumu spočívá ve srovnání oblasti genomu mezi kohortami. (například: se shodovanými kohortami s nemocí a bez nemocí).

Před více než 20 lety nebyl SNPs přikládán žádný význam, dnes tyto polymorfismy nacházejí uplatnění při studiích v mnoha vědních oborech. V oblasti medicíny slouží SNPs jako genetické markery při mapování genů zodpovědných za různé patologie (např. hypertenze, diabetes, schizofrenie), intenzivně se také studují ve farmakogenetice. Pro evoluční biologii představují vhodný nástroj při srovnávání lidského genomu s genomem lidoopů, k posuzování jejich vzájemné odlišnosti a shody.

Zvláštní význam mají bialelické SNPs na patrilinárně děděném Y chromosomu, zvláště v tzv. NRY oblasti (Nonrecombining Y Chromosome), neboť jejich variabilita vykazuje výraznou závislost na geografické poloze. Nejčastější bialelickou mutací je záměna C za T. (26)

2.3 Metody analýzy

2.3.1 RFLP (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restrikční délka fragmentu polymorfismu (RFLP) je molekulární metoda genetické analýzy, která umožňuje jednotlivcům identifikovat se na základě jedinečných řezání restrikčních enzymů ve specifických oblastech DNA. (27)

V molekulární biologii je polymorfismus délky restrikčních fragmentů technikou, která využívá variace v homologních sekvencích DNA. Místo, které restrikční endonukleáza rozpozná, se na základě sekvence nukleotidů nazývá restrikční oblast. Tato oblast je vždy specifická pro danou endonukleázu (28)

Technika RFLP analýzy zahrnuje řezání určité oblasti DNA se známou proměnlivostí, restrikční enzymy, poté separací fragmentů DNA pomocí elektroforézy na agarozovém gelu, stanovení počtu fragmentu a relativních velikostí.

Celý proces RFLP vyžaduje značení sondy, fragmentaci DNA, elektroforézu, blottování, hybridizaci, mytí a autoradiografii. Zjištěná RFLP se vizualizuje za použití rentgenového filmu v autorádiografii, kde mohou fragmenty DNA pozorovány a analyzovány poté, co jsou od sebe odděleny elektroforézou.

Tato metoda může být využita např. při určování otcovství nebo pro vysledování původu, v kriminalistice k identifikaci podezřelých osob na základě důkazních vzorků shromážděných na scénách zločinů a v neposlední řadě při studiu evoluce a migrace volně

žijících živočichů, studie chovatelských modelů v populacích zvířat a při detekci a diagnostice určitých onemocnění.

Je důležité poznamenat, že technika RFLP není široce používána, protože novější, robustnější techniky se používají pro analýzu DNA ve forenzní vědě a v několika dalších oblastech. Metoda RFLP analýzy je únavná a pomalá. Kromě požadování velkého množství vzorkové DNA - vzorek by obvykle musel mít velikost přibližně čtvrtinu, což je poměrně velké pro vzorky DNA - proces, od značení sondy po mytí. (29)

2.3.2 AFLP (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)

Polymorfismus amplifikovaného fragmentu je technikou založenou na PCR, která využívá selektivní amplifikaci podskupiny štěpených DNA fragmentů pro generování a porovnávání jedinečných otisků prstů pro genomy, které jsou předmětem zájmu. Výkon této metody spočívá hlavně v tom, že nevyžaduje předchozí informace o cíleném genomu, stejně jako v jeho vysoké reprodukovatelnosti a citlivosti pro detekci polymorfismu na úrovni sekvence DNA.

Široce používány pro rostlinné a mikrobiologické studie, AFLP je používán pro různé aplikace, jako například zhodnocení genetické rozmanitosti v rámci druhů nebo blízkých příbuzných druhů, vyvozování fylogenetických a biogeografických modelů na úrovni populace, generování genetických map a určení souvislosti mezi kultivary.(30)

AFLP má jak své výhody, tak ale i značné nevýhody. Hlavní nevýhodou byla možnost vzniku chyb, např. nepravá heterozygotnost. Výhodami oproti RFLP byla rychlost a nižší náročnost na množství biologického vzorku. Tato metoda je považována za jakýsi mezikrok mezi metodami (31)

2.3.3 PCR (Polymerase chain reaction)

PCR technika, je metoda, která se v laboratoři používá k vytvoření milionů kopií určité části DNA. PCR metoda byla vyvinuta v 80 letech. Metodu PCR realizoval Kary Mullis, který za tuto práci obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii.(32)

PCR je jednoduchý a rychlý enzymatický test. Tuto metodu lze provést pomocí zdrojové DNA z různých tkání organismu, včetně periferní krve, kůže, vlasů, slin a mikrobů. Množený (amplifikovaný) úsek DNA je ohraničen tzv. primery (oligonukleotidy), což jsou fragmenty DNA o 20-25 nukleotidech, které díky své komplementaritě přisedají právě ke koncům vybraného úseku. Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*. Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA, přisedání primerů a syntézu DNA.(33)

Při PCR je využíváno podobného principu, na jakém dochází k syntéze DNA během replikace DNA v buňce. DNA polymeráza přisedá k jednořetězcovému (templátovému) úseku DNA. Podle templátového úseku DNA polymeráza syntetizuje druhý, komplementární řetězec. DNA polymeráza se při svém startu potřebuje odrazit od krátkého oligonukleotidu, který je díky své komplementaritě navázán na templátový, jednořetězcový úsek. Syntéza probíhá od místa navázaného primeru. Při syntéze vzniká z jednořetězcové molekuly dvouřetězcová molekula, která je následnou denaturací separována na dvě jednořetězcové molekuly, které jsou v dalším kole syntézy DNA polymerázou opět doplněny na dvouřetězcové. Tyto kroky se cyklicky opakují, takže teoreticky z původně jedné molekuly DNA po 32 cyklech vzniká 1 miliarda molekul DNA.(34)

2.3.3.1 Využití PCR metody pro STR analýzu

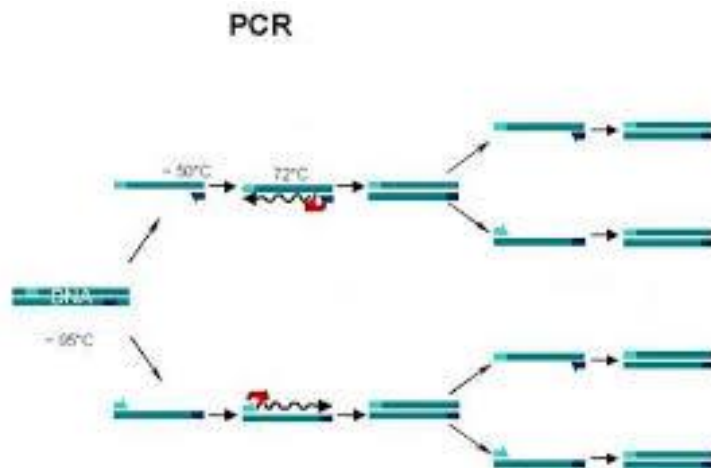
V roce 1991 navrhl Thomas Caskey Baylor College of Medicine navrhování typu mikrosatelitu nazývaného krátké tandemové repetice (STR). Peter Gill, poté vědecký pracovník britské Forezní vědecké služby, navrhl metodu PCR-STR, která umožnila současnou analýzu více STR, což je taktika nazývaná multiplexování.(35)

Nejprve dochází k extrakci DNA z téměř jakékoli lidské tkáně. (Stěr z buňky zevnitř tváře se nejčastěji používá při testování otcovství.) Zdroje DNA, které se objevily na místě činu, mohou zahrnovat krev, sperma, buňky ve vlasovém folikulu a dokonce i sliny. DNA extrahovaná z důkazů se porovnává s DNA extrahovanou z referenčních vzorků od známých jedinců.

Dále dochází k PCR amplifikaci, kdy DNA primery jsou optimalizovány tak, aby umožňovaly amplifikaci více STR míst v jediné reakční směsi. Pečlivým nastavením

vzdáleností primerů z tetramerní sekvence opakování se produkty z různých lokusů během gelové elektroforézy nepřekrývají.

PCR primery v komerčních sadách používané pro analýzu STR mají fluorescenční molekuly kovalentně spojené s primerem. K rozšíření počtu různých lokusů, které lze analyzovat v jedné reakci PCR, se používají více sad primerů s různými "barevnými" fluorescenčními značkami. Po PCR reakci se k reakční směsi přidávají standardy vnitřní délky DNA a DNA se dělí v kapilární gelové elektroforéze. Jakmile DNA píky eluují z gelu, detekují se aktivací laseru. Sekvenční stroje používané pro separaci a detekci alel jsou stejného typu, který se v současné době používá v projektu Sequencing lidského genomu, s digitálním výstupem, který lze analyzovat pomocí speciálního počítačového softwaru. (36)



Obrázek 7: PCR metoda- enzymatická metoda, množný úsek je ohraničen tzv. primery, samotnou syntesu

2.3.3.2 Využití PCR metody pro SNP analýzu

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP) jsou nejběžnější formou lidské genetické variability. SNP jsou bialelické a vyskytují se přibližně v každých 1000 párech bazí v lidském genomu. SNP jsou markery pro mapování genů, které způsobují onemocnění.

Vzhledem k jejich bialelické povaze mohou být SNP snadno genotypovány za použití technik, které rozlišují jakoukoliv dvojsměrnou kombinaci adeninu, guaninu, cytosinu a thyminových nukleotidových bází. Mezi nejsilnější testy genotypizace SNP se kvantitativní stanovení v reálném čase spoléhají na citlivou a specifickou kvantifikaci amplifikované DNA nebo cDNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Metody PCR v reálném čase nabízejí řadu různých značek pro detekci genetických variací, včetně látek interkalujících DNA, jako jsou SYBR® Green fluorogenní sondy a široce používaná chemie TaqMan. (37)

2.4 Rozdíly mezi STR a SNP

STR neboli krátké tandemové opakování je jiný druh mutace než SNP - jednonukleotidový polymorfismus. STR jsou užitečné k určování rodokmenu, v nedávném čase přibližně 500 let. Na rozdíl SNP slouží k určování, které sahají mnohem dále zpět v čase. (9)

STR (short tandem repeats) je známo přes 20 000 tetranukleotidových sekvencí STR. STR polymorfismy zaujímají přibližně 3% celého lidského genomu. Je známo přes 1 milion všech STR polymorfismů. Slouží k podrobnému využití některých oblastí mtDNA pro forenzní účely a tvorbu haploskupin v populacích. Nejčastější používání je porovnávání DNA profilů podezřelých osob, testování otcovství a mateřství, identifikace pohřešovaných osob, analýza historických DNA a v neposlední řadě identifikace jedinců při hromadných neštěstích.

SNP (single nucleotid polymorfism) významným nástrojem identifikace jedinců a vzorků, možnost analýzy SNP na fenotypové znaky jako jsou například rudá barva vlasů nebo modré oči. Identifikace ve forenzní mikrobiologii (teroristické útoky biologickými zbraněmi). (8)

Všichni lidé na planetě mají z 99,9% stejný genom, což nám zaručuje příslušnost jednoho druhu. Odlišnosti v DNA ovlivňují nejen náš zevnějšek, ale také náchylnost nebo odolnost k určitým nemocem nebo rezistenci k některým lékům. Tyto odlišnosti nazýváme SNPs (single nucleotide polymorfism) někdy také bodové polymorfismy. V současné době je známo něco málo přes 9 milionu SNPs. Většina těchto SNP se v transkripci svého genu neprojevuje. Některé SNPs však přímo ovlivňují expresi genu během onemocnění nebo obsahují takovou informaci, která se předkládá do struktury proteinu. Kdybychom mohli

„odkódovat“ informaci uloženou v SNPs, mohli bychom po přečtení DNA určit k jakým nemocem je daný organismus náchylný nebo naopak odolný.

Používání SNP map k identifikaci jedinců je rovnoměrné rozmístění SNPs v genomu z nich dělá vhodný genetický marker. Sestavení podrobné mapy může být využito ke zjištění odpovědnosti genu za danou chorobu. SNP, který se často liší u jedinců s nemocí se porovná se zdravými jedinci, tento SNP nás upozorní na blízkost genu, který nemoc způsobuje. Stejně tak podrobná SNP mapa nám pomůže identifikovat SNP, které jsou zodpovědné za odlišnou vnímavost k lékům a do budoucnosti by mohla posloužit právě k přípravě léků bez vedlejších účinků podle potřeby pacientů. (29)

3 Forezní genetika

Před rozvojem analýz DNA byly k identifikacím využívány například imunologické metody (určení krevních skupin, metody mikroskopické). Nejefektivněji se ukázalo testování nekódujících repetitivních oblastí.

Prvním kdo objevil repetitivní sekvence byl anglický genetik Alec Jeffreys. Používal metodu RFLP (restriction fragment length polymorphism), při které byly k určení vzorce produktů používány restriční endonukleázy. Pro další rozvoj forezní genetiky mělo zásadní význam zdokonalení technologií, zejména PCR (polymerase chain reaction). Metoda PCR totiž značně urychlila analýzu a umožnila amplifikaci několika úseků najednou. Na přelomu 20. a 21. století ve forezní genetice převládlo využívání STR lokusů.(38)

Hlavní odvětví forezní genetiky jsou kriminalistická genetika- genetické zkoumání biologických stop nalezených na místě trestného činu za účelem jednoznačné identifikace původce. Identifikační genetika- identifikace osob analýzou DNA prováděnou pro nejrůznější účely (identifikace neznámých mrtvol, ověření totožnosti osob) a v neposlední řadě kognitivní genetika- genetické zkoumání biologických příbuzenských vztahů (paternální analýza)

Kromě těchto základních oblastí se forezní genetika zaměřuje též na forezní využití analýz non-humanní DNA (zvířecí, rostlinné, virové i bakteriální) (39)

4 Komerčně dostupné kity

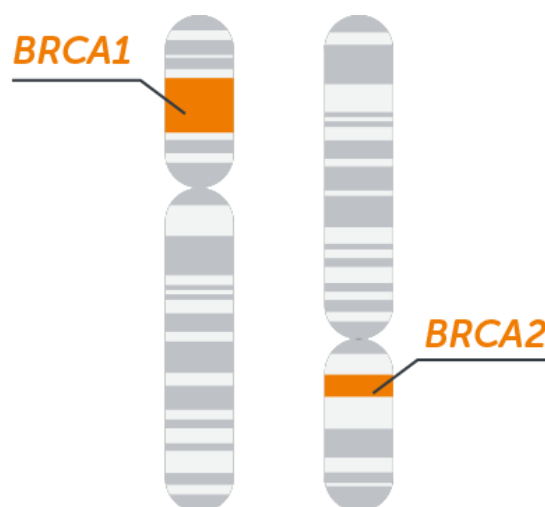
TruSight™ One Sequencing jedná se o nejrozsáhlejší dostupný sekvenační panel s více jak 4 800 geny, který umožňuje laboratořím expandovat a zefektivnit jejich sekvenační portfolio.

Laboratoře mohou takto analyzovat všechny geny na panelu nebo se zaměřit na specifické skupiny. TruSight One Sekvenační panel pokrývá 12Mb genomového obsahu, včetně 4 813 genů asociovaných s klinickými studii. To umožňuje soustředit se na geny s prokázanou relevancí. Tento panel je navržen pro sekvenování 3 vzorků na systému MiSeq nebo 36 vzorků na systému HiSeq 2500 v módu Rapid Run. Dosažená coverage je minimálně 20x u více jak 95%

4.1 Kity pro NGS

4.1.1 BRCA –Multiplicom

Brca MASTR Dx je molekulární diagnostický kit pro identifikaci mutací v kódujících oblastech genů BRCA1 a BRCA2 u jedinců se zvýšeným rizikem výskytu rakoviny prsu, vaječníků nebo jiných podobných rakovinných onemocnění. Brca MASTR Dx kit je připravený k okamžitému použití a nabízí robustní provedení s minimem času vlastní lidské práce. Součástí kitu jsou všechny reagentie nutné k multiplexní amplifikaci 93 ampliconů o délce 289 - 430 bp, a to pro pokrytí všech exonů kódujících sekvencí genů BRCA 1 a BRCA 2.



Obrázek 8:BRCA multiplicom
(<http://www.genetica.cz/brca-ngs>)

4.1.2 ADH- multiplicom

ADH MASTR amplifikuje kódující a promotorové oblasti genů LDLR, PCSK9 a část exonu 26 (c.10200 až c.11100) genu APOB. Tyto geny jsou pokryty 65 amplikony o délce 300 - 430 bp, amplifikovanými ve 4 multiplexních PCR reakcích. V assay jsou také obsaženy kontrolní amplikony pro vyhodnocování CNV.

4.1.3 CFTR-multiplicom

Jednoduchá a robustní, validovaná diagnostická assay pro analýzu mutací v celém genu CFTR.

4.1.4 Somatic- multiplicom

Kit pro detekci somatických a zárodečných mutací v genech.

4.1.5 FMF- multiplicom

FMF MASTR v2 assay amplifikuje celou kódující oblast genu MEFV, majícího na svědomí familiální středomořskou horečku (FMF). Assay obsahuje 23 amplikonů o délce 250 – 400 bp včetně amplikonů pro kvalitu kontroly, zapotřebí jsou jen 2 multiplexní PCR reakce.

4.1.6 HCM- multiplicom

HCM MASTR amplifikuje všechny kódující oblasti genů souvisejících s familiální hypertrofní cardiomyopatií, tedy MYBPC3, MYH7, TNNT3, TNNT2 a MYL2. V assay je 132 amplikonů (280 - 430 bp) včetně kontrolních amplikonů pro vyhodnocení CNV, a to v 5 multiplexních PCR reakcích. (40)

4.2 Kity pro PCR

4.2.1 I-5™ 2X High-Fidelity Master Mix

Vysoká spolehlivost, vyrábí nejpřesnější kopie DNA. Ideální pro klonování.

4.2.2 2X BlueStar™ PCR Master Mix

4.2.3 2X HotStart PCR Master Mix

DNA polymeráza, reakce pufru, primery jsou jednoduše přidány do reakce PCR. Rutinní metody PCR, zjišťování genotypu a multiplex (více párů primerů) pomocí PCR(45)

5 Metody využívané ve forenzní genetice (nejnovější metody NGS)

Podle definice je forenzní věda důležitá k zodpovězení otázek. Specializace ve forenzní analýze může zahrnovat analýzu krve, DNA, drog, vláken vlasů a výbušnin. V posledních dvaceti letech vznikla řada metod označovaných jako „next generation sequencing“ neboli sekvenování nové generace, tj. metod, které v porovnání s klasickými metodami sekvenování umožňují především rychlou a cenově příznivou produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou.

Next generation sequencing využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou data utřídit a analyzovat. Pro sekvenování nové generace v současné době existuje řada různých technologií, přičemž každá z technologií má své přednosti nebo naopak nevýhody a může být vhodná jen k určitým aplikacím.(41)

Principem, který umožňuje během jediné sekvenační reakce přečíst až stovky milionů bazí, je ukotvení milionů sekvenačních reakcí na čip (ne větší než několik cm) a simultánní detekce každé jednotlivé reakce pomocí velmi citlivých metod s obrovským rozlišením (zachycení milionů signálů na ploše několika-centimetrového čipu). Uchycení a tudíž rozmístění jednotlivých fragmentů je zcela náhodné. Každý fragment je na svém místě namnožen, což zvýší signál pro detekci, a poté je čip promýván fluorescenčně značenými nukleotidy, které jsou chemicky modifikovány tak, že se na komplementární DNA fragmentu naváže vždy jen jeden nukleotid. Syntéza nepokračuje, dokud v dalším kroku nedojde k modifikaci, umožňující navázání dalšího nukleotidu. Počítač ví, jaký konkrétní nukleotid ze 4 možných byl v kterém konkrétním místě v 1. kroku navázán. Pak pokračuje syntéza a po každém kroku je sejmout obraz. Počítač pak z těchto obrazů poskládá sekvenci každého jednotlivého fragmentu v daném místě, tudíž získá najednou sekvence milionů fragmentu z jednoho malého čipu. Na základě překryvů (DNA je nafragmentována náhodně na malé kousky) ji pak poskládá do víceméně souvislé DNA (42).

5.1 Potvrzení otcovství

Sekvence DNA každého člověka obsahuje oblasti, tzv. STR polymorfismy, které jsou v populaci vysoce variabilní a přitom jedinečné a charakteristické pro každého člověka,

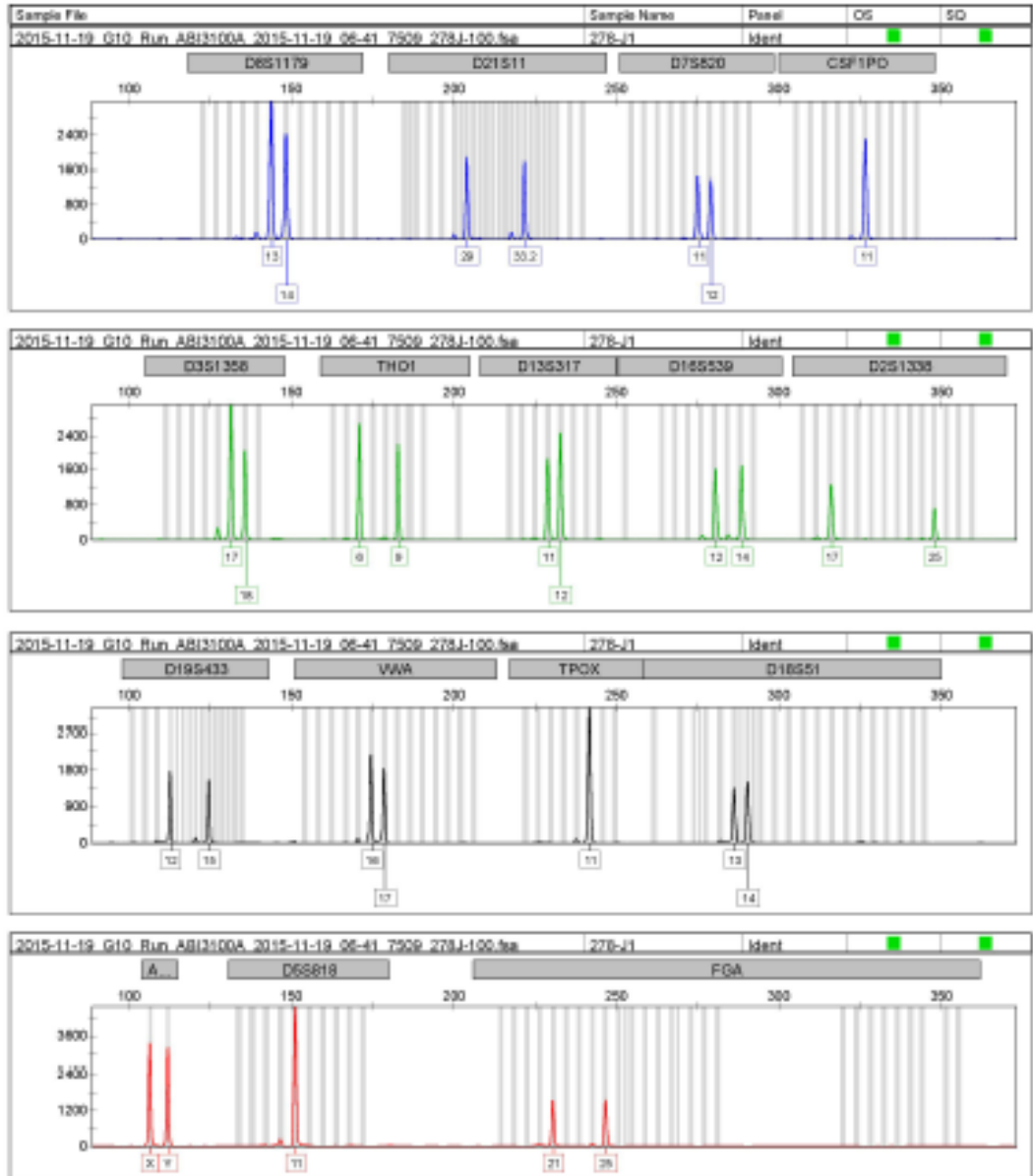
podobně jako otisk prstů. Tyto polymorfismy jsou dědičné, přesně polovinu zdědíme od matky a druhou od otce.

Odebrané vzorky jsou nejprve podrobeny izolaci DNA a amplifikaci vybraných polymorfních úseků (standardně 16 STR markerů) metodou PCR. Vzniklé reakční produkty testovaných osob lze následně zkoumat pomocí genetického analyzátoru. Vzájemným porovnáním výsledných genetických profilů lze určit, zda dítě mohlo od otce nebo matky kombinaci znaků podědit. Pokud otec nemá shodné znaky s profilem dítěte, potom je jeho otcovství se 100% jistotou vyloučeno. Jestliže se znaky profilu dítěte a otce shodují, lze s určitou pravděpodobností otcovství potvrdit. (43)

V tabulce můžeme nalézt výsledky testu otcovství, které s 99,9% vyšly pozitivní. Dítě je tedy s vysokou pravděpodobností vyšetřovaného otce.

Tabulka 1: Výsledek molekulárně genetické analýzy - potvrzení otcovství

	Označený otec		Dítě		Matka		Informativita	Otcovská alela	Frekvence otcovské alely		Paternity Index
	X	Y	X	X	X	X					
AMEL	X	Y	X	X	X	X					
D8S1179	13	14	13	14	13	14	+	13,14	0,5203	1,0	1,9220
D21S11	27	29	27	30	30	30.2	+	27	0,0298	0,5	16,8067
D7S820	11		7	11	7	8	+	11	0,2150	1,0	4,6512
CSF1PO	9	11	11	12	11	12	+	11,12	0,5975	0,5	0,8368
D3S1358	15	16	15	16	15		+	16	0,2475	0,5	2,0202
THO1	9.3		7	9.3	7	9.3	+	7,9,3	0,4580	1,0	2,1834
D13S317	11	12	11		11	13	+	11	0,3270	0,5	1,5291
D16S539	9	10	9	10	9	12	+	10	0,0450	0,5	11,1111
D2S1338	19		19	23	23	24	+	19	0,1168	1,0	8,5653
D19S433	13	14	12	14	11	12	+	14	0,3315	0,5	1,5083
VWA	14	17	14	18	17	18	+	14	0,1115	0,5	4,4843
TPOX	8		8		8	10	+	8	0,5428	1,0	1,8425
D18S51	14		14	15	13	15	+	14	0,1575	1,0	6,3492
D5S818	12		11	12	11	12	+	12	0,3833	1,0	2,6093
FGA	21	22	21		21	22	+	21	0,1830	0,5	2,7322
										45521125,21	
										99,9999978	



Obrázek 9: Elektroforetogram

Každá molekula DNA nese díky svým fosfátovým skupinám tzv. parciální záporný elektrický náboj, proto se v elektrickém poli pohybuje směrem ke kladné elektrodě. Je-li ovšem tomuto pohybu částečně bráněno nějakým vhodným médiem musí se molekula DNA skrz toto médium „prodírat“ to jí trvá tím déle čím je větší.

Výsledkem této fragmentové analýzy je pak elektroforetogram , v němž jednotlivá lokální maxima představují jednotlivé alely. Pomocí dalších korektivních a normovacích metod lze z pozice lokálního maxima v elektroforetogramu stanovit délku fragmentu v párech bází DNA a určit, o kterou alelu příslušného lokusu se jedná.(44)

6 Závěr

V posledních dvou dekáдах zaznamenává využití genetiky v kriminalistice obrovský rozvoj. Analýza DNA je považována za běžnou ve všech typech analýzy. V lidské populaci existuje genetická variace délky a sekvence. Současné systémy STR, SNP a databáze DNA fungují dobře, otázkou ale je „Co přinese budoucnost pro forenzní DNA testování“ Jedna možnost je, že budou nahrazeny jinými genetickými markery, jako jsou systémy NGS neboli next generation sequencis.

7 Použitá literatura

- (1) Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. 1985. Hypervariable „minisatellite— regions in human DNA. *Nature* 317: 67 – 73
- (2) Pereira, R., Gomes, I., Amorim, A., Gusmão, L. 2007. Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. *Int J Leg Med* 121: 192 – 197
- (3) [http://lem.ocol.cz/cs/info/dna-profilovani\(online\)](http://lem.ocol.cz/cs/info/dna-profilovani(online)) [cit. 2017-06-15]
- (4) Avery O, MacLeod C, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med.* 1944, roč. 79, čís. 2, s. 137–158
- (5) [Http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz) [online]. [cit. 2017-04-2].
- (6) Department of Forensic Genetics, Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Charité - Univer. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investig genet* [online]. 2013 [cit. 2017-05-12].
- (7) [http://www.generi-biotech.com/gb-hemo-fii\(online\)](http://www.generi-biotech.com/gb-hemo-fii(online))
- (8) [Http://www.edb.cz/clanek-86-stanoveni-sekvence-nukleotidu-v-molekulach-nukleovych-kyselin](http://www.edb.cz/clanek-86-stanoveni-sekvence-nukleotidu-v-molekulach-nukleovych-kyselin) [online]. [cit. 2017-05-2].
- (9) [Http://www.biogen.cz/klasicka-sekvenace](http://www.biogen.cz/klasicka-sekvenace) [online]. [cit. 2017-05-12].
- (10) [Http://www.edb.cz/clanek-86-stanoveni-sekvence-nukleotidu-v-molekulach-nukleovych-kyselin](http://www.edb.cz/clanek-86-stanoveni-sekvence-nukleotidu-v-molekulach-nukleovych-kyselin) [online]. [cit. 2017-05-12].
- (11) [Http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4484.pdf](http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4484.pdf) / [online]. [cit. 2017-05-2]
- (12,13) [Http://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/](http://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/) [online]. [cit. 2017-05-14].
- (14,15) Sekvenování DNA – historie, současnost, perspektivy [online]. Plzeň, 2016 [cit. 2017-05-28]. Bakalářská práce. Univerzita Plzeň. Vedoucí práce Prof. MUDr. Radim Černý CSc.

- (16) FLUSBERG, Benjamin A., et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature methods*, 2010, 7.6: 461-465.
- (17) [Http://www.linkos.cz/](http://www.linkos.cz/) [online]. [cit. 2017-05-28].
- (17) Shokralla S, Spall JL, Gibson JF et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 2012; 21(8): 1794–1805. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x.(2017-05-28)
- (18) MASTERS, John R., et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98.14: 8012-8017.
- (18) Bhargava, Atul a F. F. Fuentes. Mutational Dynamic of microsatelists . *Molecular Biotechnology*. 2010, vol. 44, issue 3, str. 250-266. DOI: 10.1007/s12033-009-9230-4.
- (19) EDWARDS, Albert, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American journal of human genetics*, 1991, 49.4: 746.
- (20) Autentizace non- human buněčných linií [online]. Univerzita Pardubice, 2016 [cit. 2017-05-28]. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Mgr. Vojtěch Vejvoda Ph.D.
- (21) URQUHART, A., et al. Variation in short tandem repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International journal of legal medicine*, 1994, 107.1: 13-20.
- (22) Decker A. E, Kline M. C, Vallone P. M, Butler J. M. The impact of additional Y-STR loci on resolving common haplotypes and closely related individuals. *Forensic Sci. Int.* 2007. 1(2): 215-217.
- (22) MASTERS, John R., et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98.14: 8012-8017.
- (23) BUTLER, John M. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of forensic sciences*, 2006, 51.2: 253-265.
- (24) AHMADIAN, Afshin, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Analytical biochemistry*, 2000, 280.1: 103-110.
- (25) CARGILL, Michele, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature genetics*, 1999, 22.3: 231-238.

- (26) SHASTRY, Barkur S. SNP alleles in human disease and evolution. *Journal of human genetics*, 2002, 47.11: 561-566.
- (27) HALUSHKA, Marc K., et al. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature genetics*, 1999, 22.3: 239-247.
- (28) Epplen, J. T.: Diagnostic applications of repetitive DNA sequences, *JIFCC*, 4, 1992, 5, s. 228-234
- (29) JEFFREYS, Alec J., et al. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985, 314.6006: 67-73.
- (30) PHILIPS, Theresa. *RFLP: Definition and DNA Analysis Applications* [online]. [cit. 2017-06-15].
- (30) RÓIS, Ana Sofia, et al. Epigenetic rather than genetic factors may explain phenotypic divergence between coastal populations of diploid and tetraploid *Limonium* spp.(Plumbaginaceae) in Portugal. *BMC plant biology*, 2013, 13.1: 205.
- (31) BUTLER, John M. *Fundamentals of forensic DNA typing*. Academic Press, 2010.
- (32) [Http://labguide.cz/metody/pcr/](http://labguide.cz/metody/pcr/) [online]. [cit. 2017-06-15].
- (33) VAID, Neha, et al. POLYMERASE CHAIN REACTION & ITS APPLICATIONS IN DENTISTRY.
- (34) PARK, Ji Young, et al. Dopamine-Assisted Synthesis of Carbon-Coated Silica for PCR Enhancement. *ACS applied materials & interfaces*, 2015, 7.28: 15633-15640.
- (35) [Https://dna-explained.com/2014/02/10/strs-vs-snps-multiple-dna-personalities/](https://dna-explained.com/2014/02/10/strs-vs-snps-multiple-dna-personalities/)[online]. [cit. 2017-05-15].
- (35) YUCE, Meral, et al. Employment of nanomaterials in polymerase chain reaction: insight into the impacts and putative operating mechanisms of nano-additives in PCR. *RSC Advances*, 2014, 4.69: 36800-36814.
- (36) http://www.biology.arizona.edu/human_bio/activities/blackett2/str_analysis.html (online)[cit. 2017-06-17]

- (37) WATERFALL, Christy M.; COBB, Benjamin D. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis. *Nucleic acids research*, 2001, 29.23: e119-e119.
- (38) Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. 1985. Hypervariable „minisatellite— regions in human DNA. *Nature* 317: 67 – 73
- (39) JOBLING, Mark A.; GILL, Peter. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5.10: 739-751.
- (40) [http://www.genetica.cz/ngs--\(online\)](http://www.genetica.cz/ngs--(online))[cit. 2017-06-19]
- (41) SHOKRALLA, Shadi, et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*, 2012, 21.8: 1794-1805.
- (42) [http://www.prf.jcu.cz/zmb/menu/sekvenovani-genomika.html\(online\)](http://www.prf.jcu.cz/zmb/menu/sekvenovani-genomika.html(online))[cit. 2017-06-19]
- (43) [http://www.imalab.cz/kategorie/anonymni-dna-test-otcovstvi.aspx-\(online\)](http://www.imalab.cz/kategorie/anonymni-dna-test-otcovstvi.aspx-(online))[cit. 2017-06-26]
- (44) KÝVALOVÁ, Marie. Sekvenační metody nové generace: jejich principy a potenciální využití v genetice člověka, etické aspekty. 2011. PhD Thesis. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- (45) [http://www.carolinabiosystems.cz/cs/40-pcr\(online\)](http://www.carolinabiosystems.cz/cs/40-pcr(online))[cit. 2017-06-19]

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura DNA (https://cs.wikipedia.org/wiki/DNA).....	12
Obrázek 2 <i>Chromatogramy ze Sangerova sekvenování různé kvality</i>	15
Obrázek 3:Postup pyrosekvenování-.....	17
Obrázek 4: Princip Single molecule real-time-	18
Obrázek 5: Jobling. M A 2004- princip STR(short tandem repeat).....	22
Obrázek 6 DNA řetězec 1 se liší od řetězce DNA 2 v jediné poloze páru bazí.	24
Obrázek 7: PCR metoda-	28
Obrázek 8:BRCA multiplicom (http://www.genetica.cz/brca-ngs)	32

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Výsledek molekulárně genetické analýzy - potvrzení otcovství	36
---	----