

## 8 PŘÍLOHA A - TABULKY

**Tabulka A - 1** Přehled reagensií a jejich koncentrací na přípravu reakční směsi PCR

reagencie	objem (μl)	koncentrace
ddH <sub>2</sub> O	N x 7	
PPP mix	N x 10	
5' primer	N x 1	10 μM
3' primer	N x 1	10 μM
„N“ počet PCR reakcí		

**Tabulka A - 2** Teplotní program PCR63 resp. PCR65

1 cyklus	predenaturace	95 °C	5 min
35 cyklů	denaturace	95 °C	30 s
	annealing	63 °C resp. 65 °C	30 s
	extenze	72 °C	30 s
1 cyklus	terminální extenze	72 °C	5 min
	konec programu	4 °C	∞

**Tabulka A - 3** Teplotní program sekvenční reakce

denaturace – 95 °C	10 s	25 x
annealing – 50 °C	5 s	
extenze – 60 °C	4 min	
konec programu – 10 °C	∞	

**Tabulka A - 4** Teplotní program Reverse Transcriptase PCR

1. krok	denaturace	70 °C	5 min
2. krok	reverzní transkripce	37 °C	75 min
3. krok	inaktivace transkriptázy	85 °C	5 min
4. krok	konec programu	14 °C	∞

**Tabulka A - 5** Postup při analýze integrity celkové RNA

1) Vybereme všechny reagensie pro přípravu separačního gelu, necháme stát 30 minut. V průběhu tohoto času vyčistíme elektrody přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer.
A/ Do čistícího čipu napipetujeme 350 $\mu$ l RNase free vody, do druhého čipu napipetujeme 350 $\mu$ l RNase Zap.
B/ Otevřeme víko přístroje, vložíme čistící chip s RNase Zap, zavřeme víko a necháme stát 4 minuty.
C/ Otevřeme víko přístroje, vyjmeme čistící chip s RNase Zap, vložíme čistící chip s vodou, zavřeme víko a necháme stát 4 minuty.
D/ Otevřeme víko přístroje, vyjmeme čistící chip s vodou a necháme oschnout 5 minut
2) Vzorky určené pro analýzu integrity naředíme na koncentraci 100-200 ng/ $\mu$ l a 3 $\mu$ l této RNA a ladder denaturujeme v termobloku při 70°C po dobu 2 minut. Po denuraci uchováváme na ledu až do použití.
3) Příprava separačního gelu
A/ Napipetujeme 550 $\mu$ l RNA Nano gel (červené víčko) do epp.zkumavky s filtrem
B/ Stočíme při 1500g/10min/RT (přefiltrovaný gel se nesmí používat déle než 4 týdny)
C/ 65 $\mu$ l přefiltrovaného gelu napipetujeme do eppendorfky o 0,5ml
4) Příprava barvičky do gelu (pozor barvička je citlivá na světlo)
A) Zvortexujeme barvičku RNA Nano dye(modré víčko) a krátce stočíme „Pulse Spin“
B/ K 65 $\mu$ l gelu přidáme 1 $\mu$ l barvičky a zvortexujeme
C/ Stočíme na centrifuze 13000g/10min/RT
D/ Připravený gel neskladujeme a ještě týž den ho spotřebujeme.
5) Příprava Priming station (PS), test těsnosti
A/ Základnu PS nastavíme do polohy C a aretační páčka pro stříkačku je v nejvyšší poloze
B/ Nepoužitý RNA 6000 Nano Chip vložíme do PS
C/ Píst dávkovací stříkačky na PS natáhneme na objem 1ml a uzavřeme PS.
D/ Zatlačíme píst až do zacvaknutí za aretační páčku, počkáme 10s a píst uvolníme.
E/ Počkáme 5s a píst by se měl vysunout na objem 0,7-0,8 ml. Pokud se tak nestane, je nutné použít novou dávkovací
F/ Píst opatrně pomalu vytáhneme zpátky na objem 1ml.
6) Nanášení do gelu
A/ Do jamky označené „G“ v černém kroužku napipetujeme 9 $\mu$ l gelu smíchaného s barvičkou
B/ Píst dávkovací stříkačky na PS natáhneme na objem 1ml a uzavřeme PS
C/ Píst zatlačíme až do zacvaknutí za aretační páčku, počkáme 30s a píst uvolníme.
D/ Počkáme 5s.
E/ Píst pomalu opatrně vytáhneme zpátky na objem 1ml.
F/ Otevřeme PS a napipetujeme 9 $\mu$ l gelu do ostatních dvou jamek označených „G“. Zbytek gelu vyhodíme.
7) Příprava a pipetování RNA 6000 Nano marker(zelené víčko)
A/ 5 $\mu$ l markeru napipetujeme do všech 12 jamek určených pro vzorky a také do jamky označené žebříčkem.
8) Příprava a pipetování vzorků a markeru molekulární hmotnosti(ladder)
A/ 1 $\mu$ l ladderu napipetujeme do jamky označené žebříčkem
B/ Napipetujeme 1 $\mu$ l vzorku do každé z 12 jamek pro ně určené. Musíme mít 12 vz.
9) Příprava čipu
A/ Chip zvortexujeme po dobu 1 minuty a vložíme do Agilent 2100 Bioanalyzeru

**Tabulka A - 6** Přehled reagensií a jejich koncentraci používaných na přípravu reakční směsi Reverse Transcriptase PCR

reagencie	objem( $\mu$ l)	koncentrace
5 x RT Buffer	N x 5	
dNTP	N x 2	10 mM
DTT	N x 1	0,1M
RNasin Plus	N x 1	40 u/ $\mu$ l
M – MLV RT	N x 1	200 u/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	N x 4	
„N“ počet PCR reakcí		

**Tabulka A - 7** Přehled reagensií používaných na přípravu reakční směsi do Real Time PCR

reagencie	objem na reakci( $\mu$ l)	koncentrace
Syber GREEN	12,5 x 2N	
Primer mix	2 x 2N	5pmol (každý primer)
H <sub>2</sub> O	9,5 x 2N	
cDNA	1 x 2N	10 ng/ $\mu$ l
„2N“ počet reakcí		

**Tabulka A - 8** Teplotní program Real-Time PCR

1 cyklus	úvodní zahřátí reakční směsi	50 °C	2 min
1 cyklus	úvodní denaturace	95 °C	10 min
45 cyklů	denaturace	95 °C	15 s
	annealing primerů + syntéza PCR	60 °C	1 min
1 cyklus	postupná denaturace produktu PCR za účelem zjištění teploty tání T <sub>m</sub> PCR produktů – tvorba „dissociation curve“	95 °C	15 s
		60 °C	15 s

**Tabulka A - 9** Sekvence primerů pro qRT PCR

Gen	Primer sequence 5' - 3'
HSPA1A	F: GCTGTTTTTGTGTTTGGAGCTTCA R: TTCAACATTGCAAACACAGGAAA
HSPA1B	F: GGCCTTTGTTCTTTAGTATGTTTGTCT R: AGCTGAAGCAGAAATGACATAGGA
HSPA1L	F: GAATCTAAGTTACCATCCGGAAA R: AACAGGATGTGAGGGAGTGTGA
$\beta$ 2-M	F: GAGCAGGTTGCTCCACAGGT R: CAAGCTTTGAGTGCAAGAGATTGA
UBC	F: TTGGTCCTGCGCTTGAGG R: GGAATGCAACAACCTTTATTGAAAGGA
TBP	F: TGTTTTTCCCATGAACCACA R: CCTGCAATACTGGAGAGGTGGA

**Tabulka A - 10** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-1 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs1008438.

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
2419	rs1008438_AA	3,536	-3,0447
3226	rs1008438_AA	4,9295	-2,5124
3236	rs1008438_AA	7,7361	-1,9361
3574	rs1008438_AA	6,4992	-2,4695
4093	rs1008438_AA	4,4102	-2,9633
4160	rs1008438_AA	6,3070	-2,9043
4204	rs1008438_AA	6,7468	-2,5401
4205	rs1008438_AA	7,0998	-2,2969
4418	rs1008438_AA	2,7678	-2,5622
4151	rs1008438_AC	4,8434	-2,0637
4170	rs1008438_AC	5,8562	-2,0211
4196	rs1008438_AC	6,9362	-2,6578
4225	rs1008438_AC	4,0118	-3,3754
4227	rs1008438_CC	5,9333	-2,1105
4174	rs1008438_CC	4,2864	-2,1694
3230	rs1008438_CC	6,2050	-2,0644
4422	rs1008438_CC	5,8370	-3,1909
4425	rs1008438_CC	5,2035	-2,6645

**Tabulka A - 11** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-1 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs1043618.

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
4227	rs1043618_CC	5,9333	-2,1105
4225	rs1043618_CC	4,0118	-3,3754
4174	rs1043618_CC	4,2864	-2,1694
3230	rs1043618_CC	6,2050	-2,0644
4422	rs1043618_CC	5,8370	-3,1909
4425	rs1043618_CC	5,2035	-2,6645
4151	rs1043618_CG	4,8434	-2,0637
4170	rs1043618_CG	5,8562	-2,0211
4196	rs1043618_CG	6,9362	-2,6578
4205	rs1043618_GG	7,0998	-2,2969
4204	rs1043618_GG	6,7468	-2,5401
4160	rs1043618_GG	6,3070	-2,9043
4093	rs1043618_GG	4,4102	-2,9633
3574	rs1043618_GG	6,4992	-2,4695
3236	rs1043618_GG	7,7361	-1,9361
3226	rs1043618_GG	4,9295	-2,5124
2419	rs1043618_GG	3,3536	-3,0447
4418	rs1043618_GG	2,7678	-2,5622

**Tabulka A - 12** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-2 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs1061581.

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
4205	rs1061581_AA	4,1231	-2,9359
4204	rs1061581_AA	4,3410	-3,6174
4160	rs1061581_AA	4,0196	-2,8932
3236	rs1061581_AA	5,3911	-3,1206
3226	rs1061581_AA	2,3619	-3,8873
2419	rs1061581_AA	0,3456	-3,1968
4418	rs1061581_AA	-0,7051	-35042
3574	rs1061581_AG	6,5074	-2,8870
4093	rs1061581_AG	1,0745	-3,5429
4151	rs1061581_AG	2,4217	-3,4270
4170	rs1061581_AG	1,7016	-3,2082
4196	rs1061581_AG	6,8255	-3,9865
4225	rs1061581_AG	2,1195	-3,4187
4227	rs1061581_GG	2,4637	-3,0804
4174	rs1061581_GG	0,8067	-3,7761
3230	rs1061581_GG	3,0248	-4,2357
4422	rs1061581_GG	1,5505	-3,8056
4425	rs1061581_GG	1,3673	-3,5222

**Tabulka A - 13** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-2 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs539689.

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
4196	rs539689_CC	6,8255	-3,9865
4174	rs539689_CC	0,8067	-3,7761
4170	rs539689_CC	1,7016	-3,2082
4151	rs539689_CC	2,4217	-3,4270
3236	rs539689_CC	5,3911	-3,1206
3230	rs539689_CC	3,0248	-4,2357
3226	rs539689_CC	2,3619	-3,8873
4418	rs539689_CC	-0,7051	-3,5042
4093	rs539689_GC	1,0745	-3,5429
4160	rs539689_GC	4,0196	-2,8932
4227	rs539689_GC	2,4637	-3,0804
4425	rs539689_GC	1,3673	-3,5222
4225	rs539689_GG	2,1195	-3,4187
4205	rs539689_GG	4,1231	-2,9359
4204	rs539689_GG	4,3410	-3,6174
3574	rs539689_GG	6,5074	-2,8870
2419	rs539689_GG	0,3456	-3,1968
4422	rs539689_GG	1,5505	-3,8056

**Tabulka A - 14** delta Ct hodnoty exprese HSP70-2 genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na genotypch pětínukleotidové mutace (rs9281590)

číslo vzorku	mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
4205	del/del	4,1231	-2,9359
4204	del/del	4,3410	-3,6174
4160	del/del	4,0196	-2,8932
4093	del/del	1,0745	-3,5429
3236	del/del	5,3911	-3,1206
3226	del/del	2,3619	-3,8873
2419	del/del	0,3456	-3,1968
4418	del/del	-0,7051	-3,5042
4225	del/ins	2,1195	-3,4187
4196	del/ins	6,8255	-3,9865
4170	del/ins	1,7016	-3,2082
4151	del/ins	2,4217	-3,4270
3574	del/ins	6,5074	-2,8870
3230	del/ins	3,0248	-4,2357
4227	ins/ins	2,4637	-3,0804
4174	ins/ins	0,8067	-3,7761
4422	ins/ins	1,5505	-3,8056
4425	ins/ins	1,3673	-3,5222

**Tabulka A - 15** delta Ct hodnoty genové exprese HSP70-Hom genu před a po indukci teplotním šokem v závislosti na bodové mutaci rs2227956

číslo vzorku	bodová mutace	$\Delta$ Ct po „HS“	$\Delta$ Ct „nHS“
3236	rs2227956_CC	-2,3384	-4,5480
4418	rs2227956_CC	-4,9722	-4,9620
4093	rs2227956_CT	-4,7206	-5,0770
4170	rs2227956_CT	-5,1265	-5,4879
4160	rs2227956_CT	-3,5320	-6,1180
4196	rs2227956_CT	-1,4420	-5,0547
3574	rs2227956_CT	-1,0507	-4,789
3226	rs2227956_CT	-4,434	-5,9087
4227	rs2227956_TT	-4,4676	-5,8715
4225	rs2227956_TT	-4,8793	-4,2295
4205	rs2227956_TT	-3,5429	-5,5940
4204	rs2227956_TT	-2,6801	-4,3246
4174	rs2227956_TT	-4,1852	-4,6053
4151	rs2227956_TT	-5,0834	-5,7466
3230	rs2227956_TT	-3,4923	-4,5744
2419	rs2227956_TT	-4,2360	-4,6418
4422	rs2227956_TT	-3,4442	-5,5508
4425	rs2227956_TT	-4,8558	-5,8523

**Tabulka A - 16** Střední hodnoty delta Ct\_HS – delta Ct\_nHS míry genové exprese v závislosti na konkrétní bodové mutaci

mutace	genotyp	medián $\Delta Ct_{HS} - \Delta Ct_{nHS}$
-110A/C (rs1008438)	AA	8,1199
	AC	7,9414
	CC	7,9330
+190G/C (rs1043618)	GG	8,1199
	GC	8,1261
	CC	7,8420
1267A/G (rs1061581)	AA	6,1475
	AG	6,8534
	GG	5,5266
2074G/C (rs539689)	GG	6,4748
	GC	5,4909
	CC	6,3717
delece/inserce (rs928190)	del/del	5,9563
	del/ins	7,2939
	ins/ins	5,0931
2437T/C (rs2227956)	TT	1,0124
	TC	2,0150
	CC	1,0997

**Tabulka A – 17** P-value hodnoty z-testu charakterizující rozdíly genové exprese v závislosti na genotypech

gen	mutace	porovnávané genotypy	p-value
HSP70-1	rs1008438	AA vs. AC	0,41
		AA vs. CC	0,40
		CC vs. AC	0,50
	rs1043618	CC vs. GC	0,37
		CC vs. GG	0,33
		GG vs. GC	0,50
HSP70-2	rs1061581	AA vs. AG	0,30
		AA vs. GG	0,26
		GG vs. AG	0,13
	rs539689	CC vs. GC	0,19
		CC vs. GG	0,47
		GG vs. GC	0,16
	rs928190	del/ del vs. del/ins	0,13
		del/del vs. ins/ins	0,13
		ins/ins vs. del/ins	0,013
HSP70-Hom	rs2227956	CC vs. CT	0,24
		CC vs. TT	0,47
		TT vs. CT	0,07

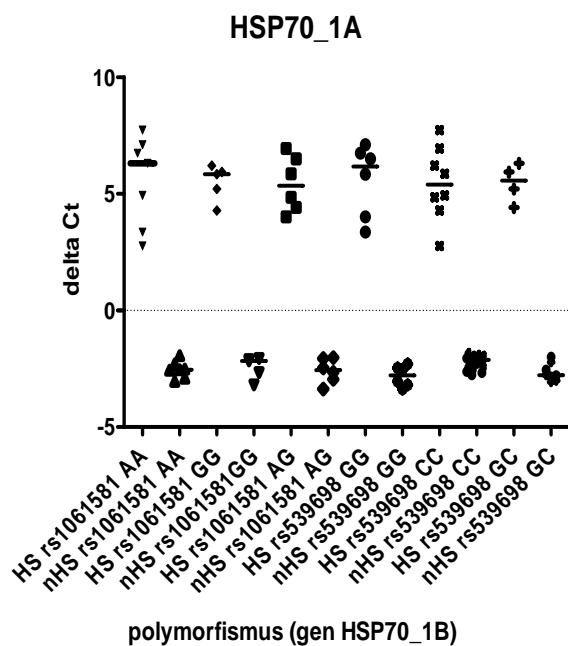
**Tabulka A - 18  $\chi^2$  test**

mutace	genotyp	n	%	$\chi^2$
-110A/C (rs1008438)	AA	23	38,98	0,701
	AC	30	50,85	
	CC	6	10,17	
+190G/C (rs1043618)	GG	22	37,29	0,103
	GC	29	49,15	
	CC	8	13,56	
1267A/G (rs1061581)	AA	20	33,90	1,158
	AG	32	54,24	
	GG	7	11,86	
2074G/C (rs539689)	GG	18	30,51	0,114
	GC	28	47,46	
	CC	13	22,03	
delece/inserce (rs928190)	del/del	25	42,37	1,596
	del/ins	30	50,85	
	ins/ins	4	6,78	
2437T/C (rs2227956)	TT	40	67,80	0,014
	TC	17	28,81	
	CC	2	3,39	

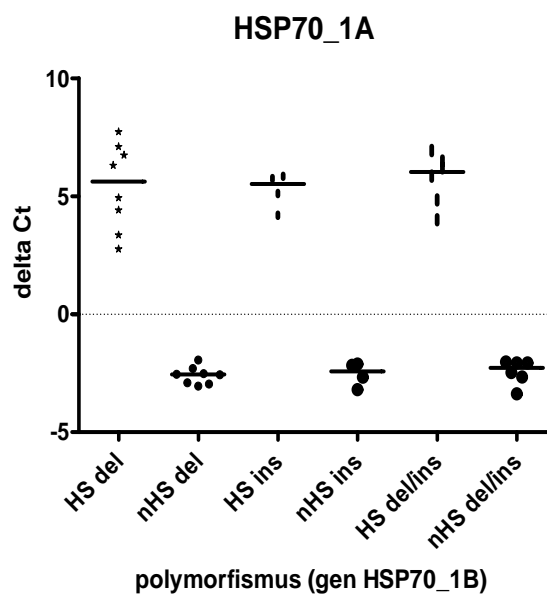
## 9 PŘÍLOHA B - GRAFY

Graf B - 1, Graf B - 2, Graf B - 3 zobrazuje spojitost mezi mírou regulace genové exprese HSP70-1 genu a polymorfismy rs1061581, rs539698, pětínukleotidovou mutací (rs9281590) a rs2227956.

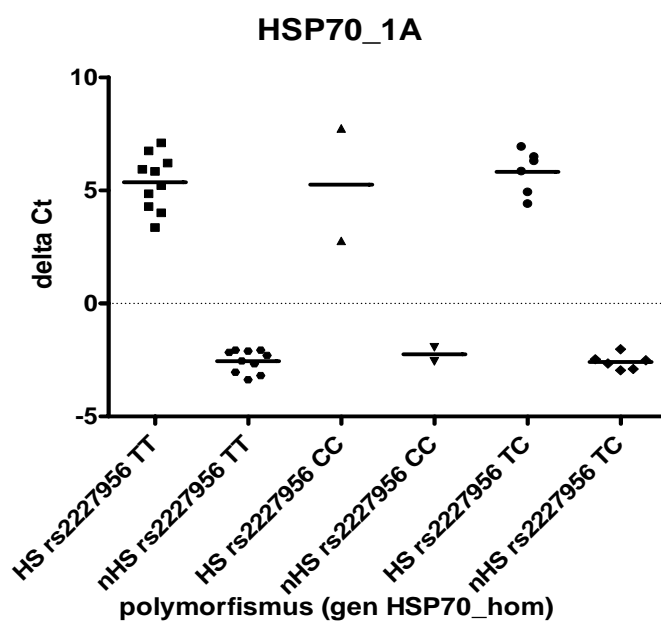
Graf B - 1



Graf B - 2

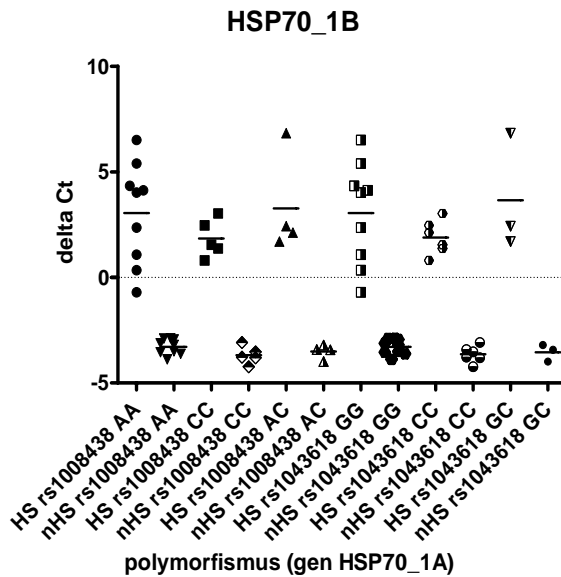


Graf B - 3

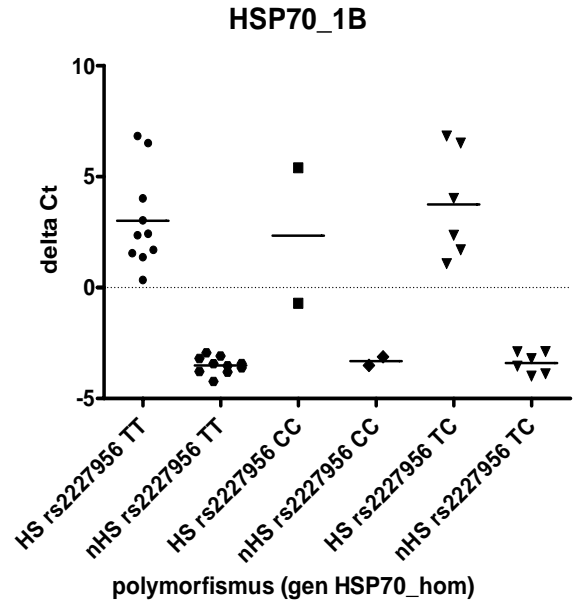


**Graf B - 4, Graf B - 5** zobrazuje spojitost mezi mírou regulace genové exprese HSP70-2 genu a polymorfismy rs1008438, rs1043618 a rs2227956.

**Graf B - 4**

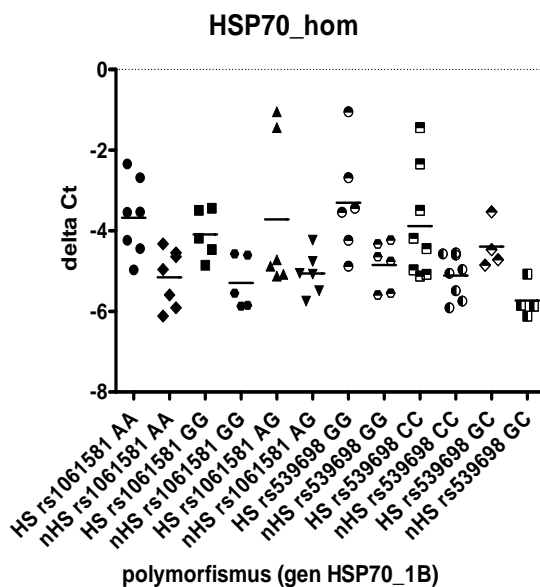


**Graf B - 5**

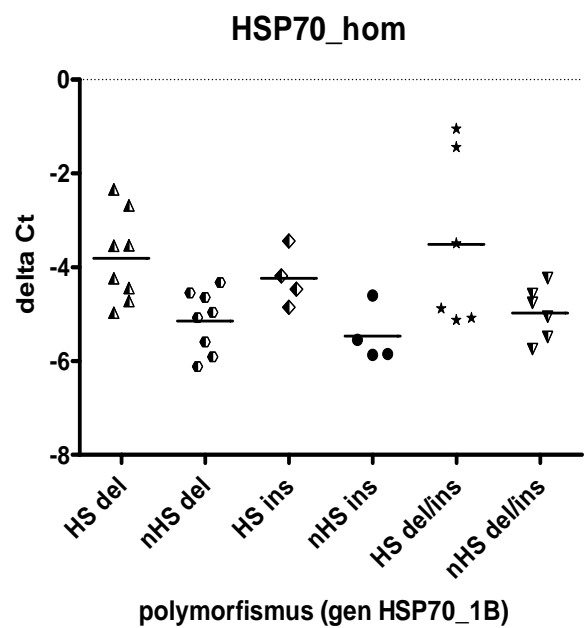


**Graf B - 6, Graf B - 7** zobrazuje spojitost mezi mírou regulace genové exprese HSP70-Hom genu a polymorfismy rs1061581, rs539689, pětínukleotidovou mutací (rs9281590), rs1008438 a rs1043618

**Graf B - 6**



**Graf B - 7**



**Graf B – 8** zobrazuje spojitost mezi mírou regulace genové exprese HSP70-Hom genu a polymorfismy rs1061581, rs539689, pětínukleotidovou mutací (rs9281590), rs1008438 a rs1043618

