Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Bc. Zdeňka Sedláková

Zvýšení diagnostické efektivity QF-PCR pro vyšetření aneuploidií z plodové vody

Diplomová práce

Školitel: doc. MUDr. Milan Macek, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce a ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 8. 2013 .....

Bc. Zdeňka Sedláková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, doc. MUDr. Milanovi Macekovi, CSc. za odborné vedení a rady k diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře Centra cystické fibrózy na Ústavu biologie a lékařské genetiky ve Fakultní nemocnici v Motole za cenné rady a pomoc při řešení problémů.

ABSTRAKT

Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR) je molekulárně genetická metoda založená na amplifikaci krátkých tandemových repetic (Short tandem repeats, STR) a měření výšek píků amplikonů na elektroforeogramu. V současné době je QF-PCR považována za spolehlivou, rychlou a levnou metodu nahrazující postupně běžné cytogenetické analýzy aneuploidie (vyšetření z dlouhodobých kultur buněk plodové vody). Přesto však v některých případech nelze pomocí QF-PCR určit parentální a meiotický původ aneuploidie.

Cílem mé práce bylo ověřit nové dinukleotidové STR markery na chromozomech 13, 16, 18, 21 a 22. Dále zvýšit diagnostickou efektivitu QF-PCR přibráním dalších tetranukleotidových STR markerů na chromozomech 15, 16, 22 a zjistit populační a analytické charakteristiky těchto markerů.

U všech dinukleotidových STR markerů se vyskytovaly ve větší míře stuttery, a proto nejsou vhodné pro účely rutinní diagnostiky. STR markery pro chromozomy 15, 16 a 22 byly ověřeny na 100 pacientech. Byly vybrány 4 informativní markery pro chromozom 16, 4 pro chromozom 22 a 3 pro chromozom 15. V diplomové práci jsem tak rozšířila spektrum diagnostických STR markerů.

Klíčová slova:

QF-PCR, STR markery, prenatální diagnostika, trizomie.

ABSTRACT

Quantitative fluorescence polymerase chain reaction (QF-PCR) is a molecular genetic method based on the amplification of microsatellites (Short tandem repeats, STR) and measurement of the peak heights of amplicons in the electropherogram. Currently, the QF-PCR deemed reliable, fast, and inexpensive method that is gradually replacing conventional cytogenetic analysis of aneuploidy (examination of long-term cultures of amniotic fluid). However, in certain cases it is impossible to determine the parental origin and meiotic aneuploidy by QF-PCR.

The aim of this work was to verify the new dinucleotide STR markers on chromosomes 13, 16, 18, 21, and 22 and further increase the diagnostic efficiency of QF-PCR retaining other STR markers on chromosome 15, 16, 22 and to determine the population and the analytical characteristics of these markers.

For all dinucleotide STR markers stutter occurred in high frequency and therefore there were found not to be suitable for routine diagnostics. STR markers for chromosomes 15, 16 and 22 were tested on 100 patients. We selected four informative markers for both chromosome 16 and 22, and three markers for chromosome 15. Thus, I expanded set of diagnostic STR markers in this thesis.

Key words:

QF-PCR, STR markers, prenatal diagnosis, trisomy.

OBSAH

Abstrakt **4**

Abstract **5**

Seznam použitých zkratek **9**

1. Úvod **10**

2. Cíl práce **11**

3. Prenatální diagnostika **12**

4. Metody prenatální diagnostiky **12**

4.1. Neinvazivní vyšetření 13

4.1.1. Ultrazvuk 13

4.1.2. Screening mateřského séra (maternal serum markers) 13

4.1.3. Fetální buňky v krvi matky 14

4.2. Invazivní vyšetření 15

4.2.1. Amniocentéza 15

4.2.2. Odběr choriových klků 16

4.2.3. Kordocentéza 16

4.3. Laboratorní metody 16

4.3.1. FISH 17

4.3.2. QF-PCR 18

5. Vrozené chromozomální aberace **18**

5.1. Aneuploidie autozomů 18

5.1.1. Downův syndrom 19

5.1.2. Patauův syndrom (Trizomie 13) 20

5.1.3. Edwardsův syndrom (Trizomie 18) 21

5.2. Další časté chromozomální trizomie 22

5.2.1. Trizomie 15 22

5.2.2. Trizomie 16 23

5.2.3. Trizomie 22 23

5.3. Aneuploidie pohlavních chromozomů (gonozomů) 24
5.3.1. Turnerův syndrom 24
5.3.2. Klinefelterův syndrom (47, XXY) 25
5.3.3. Syndrom XXX (Superfemale syndrom) 25
5.3.4. Syndrom XYY (Supermale syndrom) 26
6. QF-PCR 26
6.1. Princip 27
6.2. Složky reakční směsi 30
6.2.1. Templátová DNA 30
6.2.2. Primery 30
6.2.3. DNA polymeráza 31
6.2.4. DNTPs (deoxynukleotidtrifosfáty) 31
6.2.5. Pufr 31
6.2.6. Hořečnaté ionty 32
6.2.7. Další složky reakční směsi 32
6.3. Modifikace PCR 32
6.3.1. „Hot start“PCR 32
6.3.2. „Nested“ PCR (nPCR) 33
6.3.3. Alelově specifická PCR (AS - PCR) 33
6.3.4. Asymetrická PCR 33
6.3.5. Multiplexová reakce 33
6.3.6. Inverzní PCR 34
6.3.7.Stanovení polymorfizmů délky restrikčních fragmentů (RFLP) 34
6.3.8. Reverzní transkripce následovaná PCR (RT-PCR) 34
6.3.9. Rychlá amplifikace konců cDNA (RACE) 34
6.4. Výhody a nevýhody 35
6.5. Výsledky a analýza 36
6.6. Problémy při vyhodnocení 39

6.6.1. Nespecifické artefakty 39
6.6.2. Stutter píky 39
6.6.3. Pull up píky (Bleedthrough) 40
6.6.4. Spikes 40
6.6.5. Split píky (+/- A) 40
6.6.6. Dye blobs 41
6.7. Elektroforéza 42
6.7.1. Gelová elektroforéza 42
6.7.2. Kapilární elektroforéza 43
7. Materiál a metody 45
7.1. Materiál 45
7.1.1. Vzorky DNA 45
7.1.2. Přístroje a pomůcky 45
7.1.3. Spotřební materiál 46
7.1.4. Chemikálie 46
7.2. Metody 47
7.3. Gradientová PCR 47
7.4. Elektroforéza v agarózovém gelu 48
7.5. Fragmentační analýza pomoci kapilární elektroforézy 49
8. Vyhodnocení výsledků 50
8.1. Optimalizace PCR pro chromozomy 13, 16, 18, 21, 22 50
8.2. Optimalizace PCR pro chromozomy 15, 16, 22 54
8.2.1. Výsledky gradientové PCR 56
8.2.2. Výsledky fragmentační analýzy zoptimalizovaných primerů 57
8.2.3. Výsledky populační studie STR markerů 59
9. Diskuze 63
10. Závěr 65
11. Seznam použité literatury 66

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFP	alpha-fetoprotein	alfa-fetoprotein
AMC	amniocentesis	amniocentéza
CC	cordocentesis	kordocentéza
CVS	chorion villus sampling	odběr choriových klků
EtBr	ethidium bromide	ethidiumbromid
hCG	human chorionic gonadotropin	lidský choriový gonadotropin
NTD	neural tube defects	defekty neurální trubice
PGD	preimplantation genetic diagnosis	preimplantační genetická diagnostika
QF-PCR	quantitative fluorescent polymerase chain reaction	kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce
STR	short tandem repeats	krátké tandemové repetice
Ta	annealing (hybridization) temperature primer	annealingová (hybridizační) teplota primerů
Tm	melting temperature primers	teplota tání primerů
uE3	unconjugated estriol	nekonjugovaný estriol

1. ÚVOD

Těhotné se zvýšeným rizikem chromozomálních abnormalit u plodu podstupují klasickou cytogenetickou analýzu (karyotypování) z odběru choriových klků (CVS) nebo plodové vody (amniocentéza, AMC), které je třeba kultivovat k získání buněk v metafázi vhodných pro cytogenetickou analýzu (Cirigliano et al., 2006). Nejenže je CVS a AMC invazivní metoda (při amniocentéze se odebírá 15 – 20 ml plodové vody), ale kultivace je zdlouhavá a celé vyšetření trvá 10 – 21 dnů (Bocian et al., 2001; Tepperberg et al., 2001; Liehr et Ziegler, 2005; Ogilvie et al., 2003).

Alternativním přístupem k identifikaci vybraných numerických abnormalit (aneuploidií) je použití metody QF-PCR cílené na krátké tandemové repetice (STRs) (Mansfield 1993; Pertl et al., 1997; Findlay et al., 1998; Toth et al., 1998; Verma et al., 1998). Vzorek DNA získaný z matčiny krevní plazmy, plodové vody nebo CVS je amplifikovaná pomocí PCR s fluorescenčně značenými primery. U krátkých tandemových repetic je polymorfismus v lidské populaci délkový (v počtu repetic), což spolu s fluorescenčním značením primerů umožňuje separaci a kvantifikaci PCR produktů (amplikonů) pomocí genetického analyzátoru. Vyšetření trvá i s vyhodnocením do 24 hodin a umožňuje tak snížení stresu z nejistoty u matek rychlým poskytnutím informací pro rozhodnutí o dalším osudu těhotenství. (Donaghue et al., 2003). Nejčastěji se jedná o vyšetření STR markerů na chromozomech 13, 18, 21, X a Y, jejichž numerické abnormality tvoří většinu chromozomálních aberací v ČR (Downův syndrom, Patauův syndrom, Edwardsův syndrom, Turnerův syndrom, Klinefelterův syndrom, syndrom XXX a syndrom XYY).

Navíc metoda QF-PCR představuje perspektivní techniku pro analýzu z jedné buňky v preimplantační genetické diagnóze – PGD (Findlay et al., 1997; Findlay et al., 1998a; Findlay et al., 1998b; Sherlock et al., 1998). QF-PCR poskytuje jedinečné diagnostické možnosti v neinvazivní analýze fetální aneuploide z transcervikálních vzorků buněk (Adinolfi et al., 1995; Tutschek et al., 1995), z fetálních buněk nebo fetální DNA v maternální krvi (Pertl et al., 2000; Samura et al., 2000; Tutschek et al., 2000). Klinická prospěšnost QF-PCR byla opakovaně potvrzena její vysokou senzitivitou a specificitou při odhalování hlavních chromozomálních abnormalit (Pertl et al., 1999a, b; Schmidt et al., 2000; Adinolfi et Sherlock., 2001; Cirigliano et al., 2001a, 2004, 2006; Mann et al., 2001, 2004).

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

- Ověřit nové STR markery na chromozomech 13, 16, 18, 21, 22.
- Zavést a rozšířit nové STR markery na chromozomech 15, 16, 22.
  - Zjistit heterozygozitu těchto markerů v naší populaci.

3. PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA

Prenatální diagnostika umožňuje diagnózu vrozených vývojových vad a genetických poruch dítěte před jeho narozením, z biologického materiálu pocházejícího z plodu v těle matky. Frekvence genetických poruch u novorozenců dosahuje přibližně 3 – 5 %. Tato frekvence je mnohem vyšší v raných fázích těhotenství, protože vážné malformace a genetické poruchy obvykle vedou ke spontánnímu potratu. Prenatální diagnostika umožňuje identifikaci malformací a/nebo některých genetických syndromů plodu během prvního trimestru těhotenství (Stemblaska et al., 2007). Indikací pro vyšetření je vyšší věk matky, pozitivní biochemický screening nebo ultrazvukové abnormality plodu. Většina chromozomálních abnormalit plodu vzniká v důsledku početních odchylek chromozomů 13, 18, 21, X a Y.

Pokročilé zobrazovací techniky, stejně jako cytogenetické a molekulárně biologické metody, poskytují prostředky pro prenatální diagnostiku četných vrozených strukturálních vad a genetických poruch u rodin s vysokým rizikem. Včasná diagnóza plodu může být zásadní pro průběh těhotenství, prenatální a postnatální zdravotní péči, a léčbu. Rovněž umožňuje matkám učinit důležité rozhodnutí o pokračování nebo ukončení těhotenství.

Prenatální diagnostika nemůže sloužit k vyloučení všech abnormalit plodu. Je indikována v případech, kdy je zvýšené riziko genetické abnormality dané pokročilým věkem matky, rodinnou anamnézou nebo jinými jasně definovanými rizikovými faktory (Nussbaum et al. 2004). Jako u každého zdravotního vyšetření poskytuje výsledek pravděpodobnost, zda plod má (nebo pravděpodobně má) určité postižení.

4. METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

Při sledování gravidní ženy lze využít celou řadu metod, které umožňují sledovat růst a vývoj plodu v děloze. Mezi tyto metody patří vyšetření ultrazvukem, krevního séra nebo plazmy matky, amniocentéza a odběr choriových klků. Kombinací těchto technik je možné zjistit malformace, genetické abnormality, celkový růst plodu i komplikace těhotenství, jako jsou placentární a děložní abnormality (Sadler, 2011). Metody prenatální diagnostiky lze rozdělit na neinvazivní a invazivní (Stemblaska et al., 2007).

4.1. NEINVAZIVNÍ VYŠETŘENÍ

Neinvazivní vyšetření jsou používány pro stanovení diagnózy vrozených anomálií a posuzování rizik daných genetických poruch (Stemblaska et al., 2005).

4.1.1. ULTRAZVUK

Ultrazvukové vyšetření v reálném čase s vysokým rozlišením je stále důležitější součástí prenatální diagnostiky v hodnocení vývoje plodu a záchytu morfologických anomálií (Nussbaum, 2004). Ultrazvuk slouží k určení gestačního stáří plodu a růstu, odhalení jeho případných tělesných abnormalit (Pritchard et Korf, 2007), identifikaci vícečetných těhotenství, potvrzení životaschopnosti plodu, lokalizaci placenty a změření objemu amniové tekutiny. Vyšetření se rutinně provádí v těhotenství 3x: v období mezi 10. – 15. týdnem gestace, 18. – 22. týdnem a 28. – 32. týdnem. V prvním termínu se zaměřuje na životaschopnsot embrya, jejich počet v děloze a přímé i nepřímé známky nejvážnější typů vrozených vad. Období kolem 20. týdne má nejvyšší vypovídací hodnotu. V tomto období lze posoudit již drobnější defekty, jako jsou rozštěpové vady obličeje, tvar a postavení prstů, detailně zhodnotit CNS a v podstatě všechny orgánové systémy. V termínu kolem 30. týdne se vyšetření zaměřuje na růstové parametry plodu, ale i vady, které se objevují až ve vyšších stádiích těhotenství. Patří sem např. velikostní změny hlavičky – hydrocefalie, mikrocefelie, poruchy v odtoku moči či cystické nebo pseudocystické útvary nejrůznějšího původu a pak např. snížené nebo naopak zvýšené množství plodové vody. Ultrazvuková zobrazovací technika se stále vyvíjí a zdokonaluje. Jedním z posledních velmi efektivních nástrojů je vysoce realistické (High Density) trojrozměrné zobrazení, které dále posunulo možnosti prostorového zobrazení v těhotenství. Již v prvním trimestru lze získat velmi realistické obrazy vyvíjejécího se zárodku.

4.1.2. SCREENING MATEŘSKÉHO SÉRA (MATERNAL SERUM MARKERS)

Screening maternálního séra, někdy nazývaný triple test, spočívá ve stanovení tří markerů v krvi matky. Je dostupný mezi 15. a 20. týdnem těhotenství k rozeznání těch, které mají zvýšené riziko Downova syndromu, trizomie 18 a defektů neurální trubice (Nussbaum, 2004). Triple test je měření hladin alfa-fetoproteinu (AFP), volného beta lidského choriového gonadotropinu (β-HCG) a volného estriolu (uE3) v maternálním séru.

Hodnoty těchto parametrů mohou být ovlivněny přítomností diabetu 1. typu matky (Stemblaska et al, 2007).

AFP je normálně syntetizován ve fetálních játrech, ve 14. týdnu jeho tvorba dosahuje vrcholu a AFP prochází placentou do krevního oběhu matky. Během druhého trimestru se zvyšuje koncentrace AFP v mateřském séru a po 30. týdnu gestace začíná plynule klesat. Ke snížení hladiny AFP dochází u Downova syndromu, trizomie 18, abnormalit pohlavních chromozomů a triploidie (Tab. 1.). Tyto poruchy jsou také provázeny nízkou sérovou koncentrací lidského choriového gonadotropinu (hCG) a nekonjugovaného estriolu (uE3). Vyšetření mateřského séra umožňuje časné ověření stavu fétu (Sadler, 2011).

Tab. 1. Triple test. Převzato z Nussbaum (2004).

	AFP	**uE3**	**HCG**
Zvýšené riziko Downova syndromu	↓	↓	↑
Trizomie 18	↓	↓	↓
NTD	↑	nehodnotí se	nehodnotí se

4.1.3. FETÁLNÍ BUŇKY V KRVI MATKY

Již v roce 1969 bylo ukázáno, že se v krevním oběhu matky, byť v minimálním množství, nalézají buňky plodu. Tento objev vedl k idei, že izolace fetálních buněk z krve matky by mohla sloužit jakožto neinvazivní metoda prenatální diagnostiky některých monogenních chorob a pro chromozomální analýzu. Z krve matky lze různými postupy získat několik typů fetálních buněk, které lze dále separovat s použitím monoklonálních protilátek. Získané fetální buňky mohou být použity pro vyšetření chromozomů, určení pohlaví a molekulárně genetickou diagnostiku monogenních onemocnění. Tato technologie se stále nalézá v raných stádiích vývoje a před širokým nasazením musí být ještě zodpovězena řada důležitých otázek. Jedním ze závažných problémů, na které je třeba se soustředit, je výběr ideálního typu fetálních buněk pro tuto analýzu. Zatímco fetální lymfocyty mohou v krvi matky perzistovat i několik let, u jaderných erytrocytů a buněk trofoblastu bylo ukázáno, že nepřetrvávají. Perzistence fetálních lymfocytů v maternální cirkulaci může být překážkou použití vzorku celé populace fetálních buněk v dalších těhotenstvích. Mezi další problémy patří správné načasování odběru krve matky během těhotenství a zjištění podílu fetálních buněk v získaných vzorcích. Bylo zjištěno, že větší množství fetálních buněk se do oběhu matky dostává, je-li plod postižen aneuploidií,

obzvláště trizomií 21, což by mohlo být využito ke zlepšení záchytu těchto těhotenství (Nussbaum, 2004). Fragmenty volné fetální DNA jsou v krevním oběhu matky detekovatelné zhruba od 4. týdne těhotenství. Jejich zastoupení v poměru k volné mateřské DNA je v průměru kolem 10 % (Ehrich et al., 2011). Důležitou vlastností, z hlediska praktického využití, je skutečnost, že doba přetrvávání v mateřské cirkulaci je kolem 24 hodin. V krevním oběhu matky se nacházejí také fetální buňky, ale narozdíl od volné DNA jsou zastoupeny v mnohem menším poměru k mateřským buňkám a navíc v krvi matky lez identifikovat až 27 let po porodou plodu (Wright, 2009). Tato skutečnost znemožňuje využitzí fetálních buněk v neinvazivní prenatální diagnostice, protože nejsme schopni spolehlivě rozlišit, ze kterého těhotenství buňky pocházejí (Loucký et Zemánek, 2012).

Nicméně, jak zmiňuje studie profesora Dennies Lo Yuk-min (Lo et al., 2010) je vyšetření fetální DNA z krve matky stále finančně nákladná metoda pro rutinní diagnostiku. Existují také určité problémy, například limitace při rozlišení DNA matky a plodu a při interpretaci výsledků, které mohou být velmi komplexní a složité. Tým profesora Lo však přinesl nový pohled na možnosti této metody. Vědci provedli komplexní analýzu genetické informace nalezené v krvi matky. Objevili, že v krvi je kompletně zastoupen genom matky i plodu (genom matky je zastoupen samozřejmě ve větším množství), a také že existuje rozdíl mezi průměrnou velikostí fragmentů DNA matky a DNA plodu (Lo et al., 2010).

4.2. INVAZIVNÍ VYŠETŘENÍ

Invazivní postupy zahrnují přímé vyšetření fetálních buněk nebo tkání (Alfirevic et al., 2003) a jsou prováděny pouze tehdy, pokud riziko potratu plodu způsobené touto metodou je nižší než riziko narození těžce postiženého dítěte (Roztočil et al., 1998). Tyto invazivní techniky, i když dobře propracované a efektivní, s sebou nesou nezanedbatelné riziko pro plod a těhotenství (Hromadníková et Daněk, 2000).

4.2.1. AMNIOCENTÉZA

Amniocentézou (AMC) se označuje výkon, při němž je transabdominálně jehlou odebrán vzorek plodové vody (Nussbaum, 2004). Vzorek asi 15 ml plodové vody je získán pod ultrazvukovým vedením (Stembalska et al., 2007). Plodová voda obsahuje buňky pocházející z plodu, které se pro diagnostické účely dají kultivovat. AMC je prováděna buď v 13. – 15. týdnu těhotenství (časná amniocentéza), nebo častěji v 16. – 18. týdnu

těhotenství (Nussbaum, 2004). Její nevýhodou je nevyhnutelnost buněčné kultivace a tudíž delší doba k získání konečné diagnózy, což pro pacientku znamená výraznější emoční zátěž a vyšší medicínské riziko v případě nutnosti pozdějšího přerušení těhotenství (Hromadníková et Daněk, 2000). Riziko amniocentézy je asi 0,5 – 1 % a zahrnuje potrat, přechodný únik plodové vody, poranění plodu, malformace dolních končetin nebo intrauterinní infekce.

4.2.2. ODBĚR CHORIOVÝCH KLKŮ

Odběr choriových klků (CVS) umožňuje rychlou cytogenetickou analýzu přímé preparace placentárních klků (nejčastěji v případech abnormálních ultrazvukových nálezů) (Hromadníková et Daněk, 2000). Choriové klky jsou součástí vyvíjející se placenty a buňky zde přítomné jsou totožné s buňkami plodu (Roztočil et al., 2008). Provádí se mezi 10. - 12. týdnem těhotenství (Kingston, 2002). Riziko v těhotenství je asi 2 %. Mezi rizika této metody patří: potrat, infekce, krvácení, postižení končetin dítěte. Výhodou CVS je včasná diagnóza a možnost ověřit výsledky dalšími invazivními metodami (Stemblaska et al., 2007).

4.2.3 KORDOCENTÉZA

Kordocentéza je výkon, při němž je z pupečníku s pomocí ultrazvuku přímo odebráno 0,5 – 1 ml vzorku krve plodu (Stemblaska et al., 2007). Kordocentéza je většinou prováděna mezi 19. a 21. týdnem těhotenství. Riziko zákroku se odhaduje přibližně na 2 %. Mezi nejčastější komplikace patří smrt zárodku, předčasný porod, krvácení (obvykle přechodné) a fetální bradykardie plodu (obvykle krátkého trvání) (Preis et al., 2004).

4.3. LABORATORNÍ METODY

Amniocentézou či CVS jsou získány buňky plodu, které mohou být použity pro karyotypování stejně tak jako na biochemickou nebo molekulárně genetickou analýzu. Příprava a analýza chromozomů z kultivovaných buněk plodové vody nebo klků choria vyžaduje 1 – 2 týdny. Buňky choriových klků mohou být pro karyotypování použity po krátkodobé nebo dlouhodobé kultivaci. Krátkodobá kultivace sice umožňuje rychlejší výsledek, ale poskytuje poměrně málo kvalitní preparáty, jejichž pruhování je pro podrobnou analýzu nedostatečné (Nussbaum, 2004).

V posledních letech bylo koncipováno několik rychlých metod tak, aby umožnily rychlou prenatální diagnózu nejčastějších aneuploidií, zahrnující fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) na buňkách v interfázi (Klinger et al., 1992; Adinolfi et Crolla, 1994; Eiben et al., 1998; Evans et al., 2000) a kvantitativní fluorescenční polymerázovou řetězovou reakci (QF-PCR) (Mansfield, 1993; Pertl et al., 1994; Cirigliano et al., 2001a; Cirigliano et al., 2001b; Cirigliano et al., 2004, Cirigliano et al., 2005). Tyto metody analýzy nevyžadují kultivaci. Množství vzorku materiálu může být velmi malé a výsledek je získán během několika dnů (Stemblaska et al., 2007).

4.3.1. FISH

Od roku 1992 se začala používat metoda fluorescence *in situ* hybridizace (FISH) pro rychlou detekci numerických aberací chromozomů X, Y, 13, 18 a 21 na nekultivovaných amniocytech rizikového těhotenství (Lewin et al., 2000).

Fluorescenční *in-situ* hybridizace poskytuje rychlé výsledky bez čekání na rozdělení buněk v interfázi. Provádí se pomocí jedné či více fluorescenčně barvených sond (Ochshorn et al., 2006), které fluoreskují přímo nebo můžou být zjištěny navázáním značené molekuly (Kuo et al., 1991; Whiteman et Klinger, 1991; Divane et al., 1994; Roberts et al., 1999; Leung et al., 2001; Tepperberg et al., 2001). Na místě, kde se sonda navázala, lze pozorovat hybridizační signál. Podoba hybdrizačního signálu závisí na způsobu značení sondy a na rozsahu úseku, s nímž sonda hybridizuje. Jde o svítící bod, popř. svítící plochu v tmavém zorném poli fluorescenčního mikroskopu.

V klinické genetice se metoda FISH používá zejména při vyšetření, popř. verifikaci některých chromozomálních aberací. Výhoda této metody spočívá v tom, že je daleko citlivější než běžná cytogenetická vyšetření a umožňuje zjištění takových chromozomálních změn, které nelze klasickými postupy identifikovat (Kočárek, 2007). Ačkoli FISH trvá obvykle jen 24 až 48 hodin (Donaghue et al., 2003) je tato technika náročná a drahá (Evans et al., 1999).

4.3.2. QF-PCR

V nedávné době byly zavedeny metody polymerázové řetězové reakce (QF-PCR) (Mansfield, 1993; Pertl et al, 1994) do diagnostických laboratoří umožňující rychlou a efektivní diagnostiku numerických chromozomálních abnormalit a určení pohlaví plodu (Schmidt et al., 2000; Levett et al., 2001; Mann et al., 2001; Bili et al., 2002, systematicky viz studie Verma et al., 1998).

QF-PCR má určité výhody oproti metodě FISH (Cirigliano 2001b; Hultén et al., 2003). Při QF-PCR postačí použít jen malé množství buněk, které dokáže odhalit triploidii, kontaminaci mateřskými buňkami, mozaicizmus (Mann et Ogilvie, 2012). Jedna z výhod metody QF-PCR je automatizace postupu, který umožňuje vysokou propustnost vzorků za velmi nízkou cenu (Adinolfi et al., 1997, 2000; Cirigliano et al., 2005, 2006). Na základě těchto posouzení se stále více využívá metoda QF-PCR jako doplňující vyšetření nebo dokonce jako alternativa ke klasické cytogenetické analýze v prenatální diagnostice (Grimshaw et al, 2003; Ogilvie, 2003; Leung et al., 2004). Více k metodě QF-PCR v kapitole 5.

5. VROZENÉ CHROMOZOMÁLNÍ ABERACE

Jedná se o numerické chromozomální změny označující jakoukoliv odchylku od normálního počtu chromozomů (Kočárek, 2007). Numerické aberace vznikají většinou na podkladě *de novo* mutací způsobených chybou během buněčného dělení (nondisjunkce). Nondisjunkce vede ke vzniku aneuploidních zárodečných buněk a v případě jejich oplodnění k vývoji aneuploidní zygoty. S věkem matky nondisjunkcí přibývá. Podle novějších údajů má na vznik numerických aberací však vliv i věk otce (Muntau, 2009). Aberace se mohou vyskytovat ve všech buňkách nebo jako mozaika. Mozaika znamená přítomnost dvou či více buněčných kmenů s odlišným karyotypem v těle pacienta. Při cytogenetickém vyšetření většího počtu buněk lze zjistit různé chromozomové nálezy. Mozaiky vznikají zpravidla nondisjunkcí při mitotickém dělení blastomer při vývinu embrya (Kočárek, 2007).

5.1. ANEUPLOIDIE AUTOZOMŮ

Je známo velké množství chromozomálních poruch, u nichž byla popsána ztráta nebo naopak přítomnost nadpočetného chromozomu, popř. jeho části. Většina těchto

aberací však byla nalezena pouze u spontánně potracených plodů nebo obsahovala jen velmi malé chromozomální segmenty. Pouze tři dobře popsané chromozomální poruchy bez mozaiky na bázi trizomie určitého chromozomu jsou postnatálně slučitelné se životem: trizomie 21 (Downův syndrom), trizomie 18 (Patauův syndrom) a trizomie 13 (Edwardsův syndrom) (Nussbaum, 2004). U každé z těchto trizomií se vyskytuje růstová a mentální retardace a mnohočetné vývojové vady (Kingston, 2002). Nicméně každá z nich má jasně odlišný fenotyp (Nussbaum, 2004).

5.1.1. DOWNŮV SYNDROM

Trizomie 21 (47, XX nebo XY, + 21) byla první popsanou chromozomální abnormalitou (Lejeune et al., 1959). Incidence je 1 : 700 živě narozených (Muntau, 2009). Syndrom byl poprvé klinicky popsán Johnem Langdonem Downem (1828 - 1896) roku 1866 a dnes je znám jako Downův syndrom (Down, 1866).

Downův syndrom (DS) patří mezi nejčastější chromozomální syndromy (Muntau, 2009) a současně nejznámější genetickou příčinou mírné mentální retardace (Nussbaum, 2004). Výskyt DS je ovlivněn věkem matky a liší se mezi populacemi (O´Nuallain et al., 2007; Carothers et al., 1999; Canfield et al., 2006; Murthy et al., 2007; Wahab et al., 2006). U trizomických plodů je zvýšené riziko potratu, a lidé s DS mají zvýšené riziko vzniku některých onemocnění, viz níže (Morris et al., 1999). U 95 % případů je přítomna čistá trizomie 21, ve zbývajících 5 % se jedná o translokaci. Lidé postižení kompletní formou trizomie 21. chromozomu jsou neplodní, u mozaikového typu této choroby byla reprodukce prokázána (Sršeň et Sršňová, 2000).

DS lze většinou diagnostikovat již při narození nebo krátce po něm, neboť pacienti mají charakteristické dysmorfické rysy. Ty mohou být sice u různých jedinců variabilní, avšak vytvářejí dobře rozpoznatelný fenotyp. První abnormalitou, kterou lze u novorozenců pozorovat, je hypotonie (Nussbaum, 2004). Děti bývají klidné s menší citlivostí na podněty (Kingston, 2002). Kromě charakteristických dysmorfických rysů ve tváři (Obr. 2.) mají pacienti malou postavu, brachycefalii a ploché záhlaví. Krk je krátký s uvolněnou kůží na týlu. Nosní hřeben je plochý, ušní boltce nasedají níže a jsou typickým způsobem tvarované (Nussbaum, 2004). Ústa jsou nápadně malá se silnými, evertovanými rty. Dále mongoloidní postavení očních štěrbin (šikmo směrem nahoru a zevně), hypertelorizmus (nadměrná vzdálenost vnitřních očních koutků) a epikantus (kožní řasa horního víčka překrývající vnitřní oční koutek). Oční řasy jsou prořídlé a krátké, častým

nálezem jsou bílé skvrny v duhovce (Brushfield spots). Dalšími znaky jsou deformity rukou a nohou: krátké široké ruce s krátkými prsty (brachymezofalangie), klinodaktylie 5. prstu, čtyřprstová rýha, malá chodidla s krátkými prsty a tzv. sandálová mezera (větší odstup mezi 1. a 2. prstem na noze) (Muntau, 2009). Téměř nikdy nechybějícím znakem je makroglosie. U jedné třetiny narozených postižených dětí a u poněkud vyššího podílu spontánně potracených plodů s Downovým syndromem se vyskytuje vrozená srdeční vada. DS je spojen i s brzkým počátkem Alzheimerovy choroby a dětské leukemie (Frances et al., 2009). Dalším projevem Downova syndromu je mentální retardace. Třebaže se v časném dětství nemusí zdát, že vývoj dítěte je zpomalen, od prvního roku života je obvykle pozorováno nápadné opoždění.

Obr. 2. Downův syndrom. Charakteristické epikanty, vzhůru směřující oční štěrbiny, otevřená ústa. Dlaň s jedinou příčnou rýhou.
Převzato z http://www.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/genetique/notesgenet/notesgenet_9.htm

5.1.2. PATAUŮV SYNDROM (TRIZOMIE 13)

Trizomie 13 (47, XX nebo XY, + 13) byla poprvé popsána v roce 1960 (Patau et al., 1960). Incidence je přibližně 1 z 12 000 narozených s vyšší frekvencí výskytu u dívek než chlapců. Opět platí, že se riziko trizomie zvyšuje s věkem matky (Gersen et Keagle, 2005). U 80 % se jedná o čistou trizomii na podkladě meiotické nondisjunkce, 20 % případů tvoří mozaiková forma nebo translokace (Muntau, 2009).

Její klinické příznaky jsou velmi závažné. Asi polovina postižených jedinců umírá během prvního měsíce života. Přítomna je růstová a těžká mentální retardace, kterou doprovázejí závažné malformace centrálního nervového systému, jako je arinencefalie a

holoprosecefalie (Obr. 3) (Nussbaum, 2004), obvykle spojené s epilepsií, slepotou a hluchotou (Kingston, 2002). Čelo je vystouplé, vyskytuje se mikrocefalie a široké otevřené švy. Přítomna může být také mikroftalmie, kolobom duhovky a dokonce mohou oči zcela chybět. Ušní boltce jsou malformované. Na rukou a nohou se může vyvinout postaxiální polydaktylie a v sevřených pěstích je podobně jako u trizomie 18 překřížený druhý a pátý prst přes třetí a čtvrtý. Chodidlo má tvar „houpací židle“. Na dlaních jsou často opičí rýhy (Nussbaum, 2004). Co se týče vrozených vývojových vad orgánů, postižené je zejména srdce (defekt septa komor a perzistující tepenná dučej) a ledviny (polycystická degenerace). Biochemickým znakem syndromu je perzistence embryonálního a fetálního hemoglobinu (Muntau, 2009).

Obr. 3. **Trizomie 13.** Mrtvě narozené s rozštěpem rtu a holoprosencefalií. Převzato z Gersen et Keagle (2005).

5.1.3. EDWARDSŮV SYNDROM (TRIZOMIE 18)

Trizomii 18 (47, XX nebo XY, + 18) poprvé popsal Edwards et al. (Edwards et al., 1960). Incidence tohoto syndromu u živě narozených dětí je asi 1 z 6 000 - 8 000 porodů (Gersen et Keagle, 2005). Asi 80 % pacientů jsou dívky, snad proto, že plody ženského pohlaví mají obecně lepší šance na přežití (Nussbaum, 2004). Asi 95 % zárodků s trizomií 18 je spontánně potraceno. Podobně jako u většiny ostatních trizomií je významným faktorem zvýšený věk matky, neboť riziko narození dítěte s trizomií 18 je podstatně vyšší u žen starších než 35 let (Nussbaum, 2004). 90 % postižených dětí umírá během 6 měsíců, ale 5 % se dožívá nad první rok života (Kingston, 2002).

Trizomie 18 je genetický syndrom mnohočetných anomálií (Obr. 4) s těžkou mentální retardací. Typickým nálezem je hypertonie. Na hlavě nápadně vystouplé záhlaví a ustupující čelist. Uši nasedají nízko a jsou malformované. Hrudní kost je krátká. Pěsti jsou

zaťaty charakteristickým způsobem – druhý a pátý prst jsou překříženy přes třetí a čtvrtý. Chodidla mají typický vzhled tzv. „houpací židle“ s nápadně vystouplými patními kostmi. Dermatoglyfy jsou výrazné - opičí rýhy na dlaních, jednoduché obloučky na všech nebo většině prstů. Nehty jsou většinou hypoplastické (Nussbaum, 2004).

Obr. 4. Trizomie 18. Vystupující záhlaví a nízko posazené a malformované uši. Druhý a pátý prst překřížený přes třetí a čtvrtý. Chodidla ve tvaru „houpací židle“ a vystouplé patní kosti. Převzato z http://www.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/genetique/notesgenet/notesgenet_9.htm.

5.2. DALŠÍ ČASTÉ CHROMOZOMÁLNÍ TRIZOMIE

5.2.1. TRIZOMIE 15

Trizomie 15 je většinou způsobena meiotickou chybou (Robinson et al., 1999). Případy mozaiky lze nalézt u uniparentálních disomií (UPD) v množství případů. Uniparentální disomie vznikne, pokud pacient obdrží dvě kopie chromozomu nebo části chromozomu od jednoho rodiče a žádnou kopii od druhého rodiče. Upd(15)mat je případ syndromu Prader-Williho a upd(15)pat je spojený s Angelmanovým syndromem (Engel et Antonarakis, 2002). Tyto diagnózy je třeba vzít v úvahu, pokud je trizomie 15 buněčné linie stanovena v CVS nebo amniocytech (Milunsky et Milunsky, 2011).

Testování UPD chromozomu 15 má význam při mnoha prenatálních diagnostických stavech, např. při placentálním mozaicismu, homologní nebo nehomologní Robertsonské translokaci a jako genomický biomarker pro detekci původu chromozomů.

Z 13 případů mozaiky ve druhém trimestru (Hsu et al., 1997; Zaslav et al., 1998) mělo 7 (54 %) za následek abnormální potomky (6 potratů, 1 živě narozené). Objevovaly se u nich srdeční defekty (4), IUGR (3) (1 případ s arinencefalii, nízko posazené uši, malformovaná střeva a dvě umbilikální vény). Ve dvou potratech bylo prokázáno upd(15)mat, což by vedlo k Prader Williho syndromu, pokud by těhotenství pokračovalo (Milunsky et Milunsky, 2011).

5.2.2. TRIZOMIE 16

Trizomie 16 je nejčastější autozomální aneuploidie (Benn, 1998; Gersen et Keagle, 2005) při spontánních abortech a její frekvence je asi 16 % ze všech numerických aberací chromozomů (Be et al., 1997). U včasných samovolných potratů je neslučitelná s vývojem plodu (Fantel et al., 1980; Hook et al., 1992; Mardesic 1996; Weismanová et al, 2002). Přibližně 50 % pacientů umírá v průběhu prvního roku života. Nicméně bylo pozorováno i přežití více než 5 let (Gilbertson et al., 1990; Devis et al., 1993; Lindro et al., 1993; Garber et al., 1994; Pletcher et al., 1994; Hajianpour 1995; Hsu et al., 1998).

Diagnóza je spojena s velkou variabilitou znaků v těhotenství a poradenství je proto velmi obtížné (Benn et Collins, 1999). Většina případů trizomie 16 je zjištěna pomocí CVC a výsledky v těchto případech jsou nejčastěji součástí úmrtí plodu (Milunsky et Milunsky, 2011). Zvýšená úrověň lidského choriového gonadotropinu (hCG) v maternálním séru nebo hladina α-feto proteinu v průběhu těhotenství byla popsána u více než 50 % případů. Kongenitální srdeční vady byly u 60 % pacientů. Další klinické příznaky zahrnují postnatální růstovou retardaci, mírnou formu vývojového zpoždění, kraniofaciální asymetrii, ptózu, plochý široký kořen nosu, nízko posazené dysplastické uši, hypoplastické bradavky, pupeční kýlu, hlubokou sakrální jamku, skoliózu, hypoplastické nehty, přechodový palmární přehyb. Riziko recidivy při dalším těhotenství je pravděpodobně zanedbatelné (Gersen et Keagle, 2005).

5.2.3. TRIZOMIE 22

Trizomie 22 byla poprvé popsána v roce 1971 (Hsu et al., 1971). Od té doby bylo popsáno více než 20 živě narozených dětí (přezkoumáno v ref. Bacino et al., 1995; Hirschhorn et al, 1973; Pridjian et al., 1995; Ladonnne et al., 1996; Crowe et al., 1997). I když ve většině případů byla zřejmě plná trizomie bez mozaiky, tak přítomnost nerozpoznané normální buněčné linie omezené na určité tkáně nelze vyloučit, jak poukázal Robinson a Kalousek (Robinson et Kalousek, 1996).

Nejčastější fenotypové abnormality zahrnují intrauterinní růstovou retardaci, nízko posazené uši a hypoplázie středu obličeje. Mezi další časté abnormality patří mikrocefalie, hypertelorismus, epikantus, rozštěpy patra, blána na krku, anální atrézie/stenóza a hypoplastické genitálie. Srdeční defekty jsou až u 80 % pacientů. Renální hypoplázie/dysplázie jsou také běžné. Hypopigmentace kůže se objevuje obvykle

v případech mozaiky. Většina pacientů s plnou trizomií bez mozaiky umírá v prvním měsíci života. Pacienti, kteří měli vážné růstové a vývojové zpoždění, zemřeli před ukončením 3. roku života. Dožití více než 20 let bylo pozorováno u mozaiky. Riziko recidivy je neznámé (Gersen et Keagle, 2005).

5.3. ANEUPLOIDIE POHLAVNÍCH CHROMOZOMŮ (GONOZOMŮ)

Aberace pohlavních chromozomů mohou být přítomny ve všech buňkách nebo v mozaikové formě (Nussbaum, 2004). Aneuploidie chromosomů X a Y jsou poměrně časté. Abnormality pohlavních chromozomů patří k nejčastějším genetickým poruchám u člověka, neboť jejich celková incidence je asi 1 na 400 až 500 porodů. Fenotypické znaky vyvolané těmito poruchami chromosomů jsou v zásadě méně závažné než u odpovídajících autozomálních aberací. To je podmíněno především inaktivací jednoho z chromozomů X v normálním karyotypu a nápadně malým počtem genů na chromozomu Y. Klinické důsledky nebalancované konstituce pohlavních chromosomů se tak výrazně minimalizují. Nejčastějšími poruchami pohlavních chromozomů jsou u živě narozených dětí trizomie (XXX, XXY a XYY), které jsou však vzácné u spontánních potratů. Na rozdíl od toho je monozomie chromozomu X (Turnerův syndrom) méně častá u živých novorozenců, ale představuje nejčastější chromozomální anomálii zjišťovanou u spontánních potratů.

5.3.1. TURNERŮV SYNDROM

Na rozdíl od ostatních aneuploidií pohlavních chromozomů lze ženy s Turnerovým syndromem většinou identifikovat již při narození nebo před pubertou na základě výrazných fenotypických znaků (Nussbaum, 2004). K typickým abnormalitám přítomných u Turnerova syndromu patří malá postava bez ohledu na počet nadbytečných chromozomů X, a to téměř u všech dívek s Turnerovým syndromem (Lippe et Saenger, 2002), dysgeneze gonád (většinou tzv. lištovité nebo též proužkovité gonády, z jejichž stavby je patrné selhání tvorby vaječníků), nízká hranice vlasů na šíji, kožní duplikatura v krční oblasti (tzv. pterygium colli), široký hrudník s výrazně oddálenými bradavkami a zvýšený výskyt kardiovaskulárních anomálií (Nussbaum, 2004). Lymfedémy lze najít až v 97 % případů novorozenců a kojenců s TS (Sävendahl et Davenport, 2000). Inteligence žen s TS je většinou průměrná nebo nadprůměrná. Přesto se u pacientek projevují poruchy prostorového vidění, koordinace pohybů nebo jemné motoriky. Důsledkem toho je, že neverbální IQ bývá prokazatelně nižší než verbální IQ, a tak mnoho pacientek vyžaduje

zvláštní péči při učení, zejména při výuce matematiky. Kromě toho mají pacientky s TS zvýšené riziko výskytu poruch sociálního chování (Nussbaum, 2004).

5.3.2. KLINEFELTERŮV SYNDROM (47, XXY)

Klinefelterův syndrom (47, XXY) je nejčastější sexuální poruchou chromozomů. Incidence se odhaduje alespoň na 1 na 1 000 živě narozených chlapců (Nussbaum, 2004).

Fenotypické znaky jsou poměrně mírné a variabilní (Nussbaum, 2004). Pouze jedna třetina pacientů je však diagnostikována (Verri et al., 2010). V časném dětství je symptomatologie chudá. Diagnóza bývá stanovena až kolem puberty (Muntau, 2009). Primárním rysem syndromu je hypogonadismus (Kingston, 2002). K nástupu puberty dochází v normálním věku, varlata jsou hypoplastická (Muntau, 2009) a zůstávají malá, sekundární pohlavní znaky jsou málo vyvinuty. Nápadná je mentální retardace a psychické poruchy ve smyslu úzkostlivosti, stydlivosti, nezralosti a agresivity (Nussbaum, 2004). Pacienti s Klinefelterovým syndromem jsou téměř vždy infertilní, neboť se u nich nevyvíjejí zárodečné buňky. Výskyt infertility bývá zpravidla důvodem k prvnímu klinicko-genetickému vyšetření většiny těchto pacientů. U některých jedinců s tímto syndromem se vyvíjí gynekomastie (Nussbaum, 2004). Častým nálezem je azoospermie. Typický je eunuchoidní habitus s vysokým vzrůstem a dlouhými dolními končetinami. Dalším viditelným znakem je porucha růstu vousů (Muntau, 2009). U dětí ve školním věku se může projevit jazykové zpoždění, porucha učení nebo chování (Visootsak et Graham, 2006).

5.3.3. SYNDROM XXX (SUPERFEMALE SYNDROM)

Incidence trizomie X je asi 1 na 1 000 novorozených dívek. U buněk s konstitucí 47, XXX jsou dva chromozomy X inaktivované a později se replikují, což bylo původně zjištěno nálezem dvou Barrových tělísek. Téměř všechny případy této aberace vznikají následkem chybné nondisjunkce v meióze I u matky (Nussbaum, 2004).

Fenotyp je nenápadný, i když mají vyšší postavu, jsou fertilní a průběh puberty je normální. Někdy bývá patrna porucha vývoje intelektových schopností. Pacientky jsou spíše klidnými, pasivními a snadno vychovatelnými osobnostmi. Mimoto často nacházíme poruchy vývoje řeči a opoždění emocionálního vyzrávání (Muntau, 2009).

5.3.4. SYNDROM XYY (SUPERMALE SYNDROM)

Syndrom XYY je chromozomální porucha, která postihuje muže. U živě narozených chlapců se incidence výskytu karyotypu 47, XYY pohybuje kolem 1 na 1 000. Syndrom je způsoben nondisjunkcí při druhém meiotickém dělení u muže, kdy vzniká spermie s konstitucí YY. Méně běžné varianty XXYY a XXXYY, na jejichž fenotypy se podílejí znaky typické pro XYY a pro Klinefelterův syndrom, vznikají pravděpodobně také u otce jako důsledek následných nondisjunkcí v prvním i druhém meiotickém dělení (Nussbaum, 2004).

V endokrinním vyšetření nejsou patrny žádné odchylky, zejména hladina testosteronu je v mezích normy (Muntau, 2009). Muži jsou vyšší postavy a mají heterosexuální zaměření. Většina je fertilní. U mužů s nálezem XYY byly sice popsány poruchy pozornosti, hyperaktivita a impulzivita, avšak výrazná agresivita nebo psychopatologické poruchy rozhodně nepatří k běžným projevům tohoto syndromu. (Nussbaum, 2004).

6. QF-PCR

QF-PCR neboli kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce je molekulárně genetická metoda, která slouží k namnožení specifického úseku DNA prakticky v neomezeném množství, přičemž množství vzorku DNA může být velmi malé (teoreticky postačí jediná molekula DNA).

Princip metody QF-PCR byl vyvinut v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii a byl poprvé popsán v roce 1985 biochemikem Kary B. Mullisem, který za metodu PCR obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu (Butler, 2005). Analýza QF-PCR zahrnuje amplifikaci, detekci a analýzu fluorescenčně značených STR markerů. Produkty PCR reakce jsou separovány a rozděleny elektroforézou v kapiláře. Rychlost průchodu PCR produktu kapilárou závisí na velikosti molekuly a intenzita fluorescence je závislá na množství značeného produktu.

Použití metody QF-PCR v prenatální diagnostice jako doplněk ke klasickým cytogenetickým chromozomálním analýzám bylo popsáno v řadě studií (Mansfield, 1993; Adinolfi et al. 1995a; Adinolfi et al., 2000; Pena, 1998; Veŕma, 1998; Valero et al., 1999; Cirigliano et al., 1999; Schmidt et al., 2000; Toth et al., 1998; Macek et al., 1998). V současné době má významnou roli při diagnostice mnoha geneticky podmíněných

chorob, ale využití má i ve forenzní medicíně a v archeologii, při určení pohlaví nebo diagnostice infekčních onemocnění.

6.1. PRINCIP

Jedná se o enzymatickou amplifikaci DNA, o *in vitro* syntézu mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích (Saiki et al., 1988; Schutzak et al., 1993; White et al., 1992).

Dvouvláknová DNA je denaturována na dvě jednovláknové templátové (matricové) molekuly DNA. Celá nukleotidová sekvence cílové DNA nemusí být známa, ale musí být známa alespoň sekvence krátkých úseků na obou koncích cílové amplifikované DNA. Oligonukleotidové sondy (primery), které hybridizují na obou stranách cílové DNA, řídí syntézu nových vláken. K syntéze DNA se používají termostabilní DNA polymerázy (například *Taq* polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*) odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů, přidáváním nukleotidů od 5´konce ke 3´konci nascentního řetězce (vždy začínající od 3´konce primerů). Během prvního cyklu syntéza nového vlákna pokračuje dále až za sledovanou sekvenci, ale následné cykly již amplifikují převážně pouze úsek mezi dvěma vybranými primery. Některé termostabilní DNA polymerázy umožňují amplifikaci fragmentů až 5 000 bp (Zima et al, 2002).

Každý cyklus má 3 základní kroky (denaturace, annealing a extenze) s různými teplotami (Obr. 5). Reakce PCR má obvykle 28 – 32 cyklů. V případě, že je množství cílové DNA velmi nízké, může se počet cyklů navýšit až na 34 (Godwin, 2005). Příliš vysoký počet cyklů zvyšuje možnost vzniku nespecifických produktů PCR. Cyklickou fázi předchází ještě úvodní denaturace a zakončuje závěrečná extenze.

Úvodní denaturace

Úvodní denaturace zajistí, aby vlákna DNA byla plně rozpletena a případná hot-start polymeráza aktivována. Obvykle postačuje zahřátí směsi na 94 – 97 °C po dobu 2 – 5 minut. V případě, že dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují, což vede k nespecifické vazbě jednořetězcové DNA a primerů („self-priming“) a falešným výsledkům (Šmarda et al, 2008).

Denaturační fáze

V denaturační fázi se reakční směs zahřívá na teplotu 94 °C (Godwin, 2005). Toleranční rozpětí je v rozmezí 92 – 98 °C, pro fragmenty do 1 kb postačí 15 sekund, pro větší fragmenty 0,5 – 1,0 minutu (Zima et al., 2002). Vysoká teplota způsobí rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a rozvolnění dvouřetězcové DNA.

Annealing (nasednutí primerů)

V další fázi dochází ke snížení teploty, která se pohybuje obvykle mezi 50 – 65 °C po dobu 30 – 60 s. Dochází k nasednutí 2 oligonukleotidových primerů na specifická místa DNA na principu komplementarity bazí. Nízká teplota podstatně snižuje specifitu, vysoká teplota zamezuje amplifikaci. Podmínky pro hybridizaci primerů závisí na zastoupení bazí, délce oligonukleotidů a hodnotě *Tm* produktu. Teplota pro připojení primerů (*Ta*) se stanovuje podle vztahu:

$$T_a = 0{,}3 \text{ x } T_m^{Primer} + 0{,}7 \text{ x } T_m^{Produkt} - 25$$

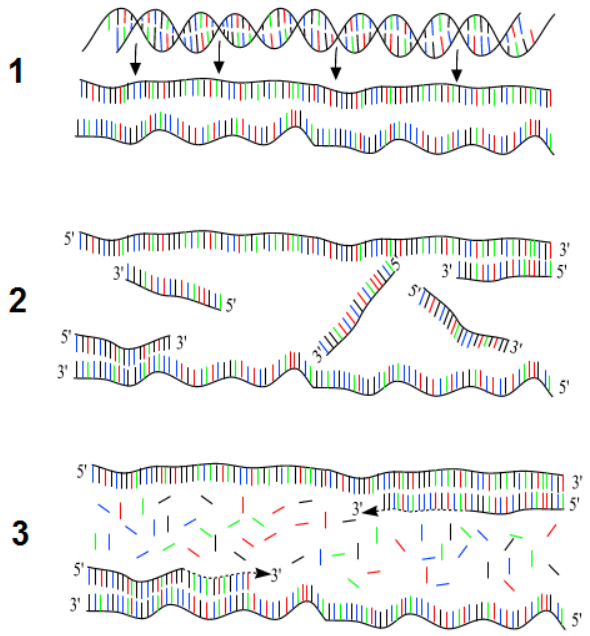
Obecně užívaným pravidlem pro stanovení T_a je snížení teploty T_m o 5 °C.

Extenze (syntéza DNA)

Posledním krokem je extenze, při které dochází k syntéze komplementárního řetězce DNA. Syntéza probíhá většinou při teplotě 68 – 72 °C. Oligonukleotidy, které dosedly na jednořetězcovou DNA v předchozí fázi, působí jako primery pro DNA syntézu. Prodlužování nukleotidových řetězců je katalyzována termostabilní DNA polymerázou a to nejčastěji *Taq* polymerázou. DNA polymeráza nasedá na 3´ konec primerů a prodlužuje řetězec ve směru 5´→ 3´. *Taq* DNA polymeráza má teplotní optimum při 72 °C. Při této teplotě syntetizuje DNA rychlostí 40 – 60 bazí za sekundu (Takagi et al, 1997; Apllied Biostystems, 2000). Doba extenze závisí na délce amplifikovaného úseku DNA. Amplifikace fragmentů o délce do 1 kb trvá zpravidla 0,5 – 1 minutu, pro úseky 6 – 10 kb je třeba dobu extenze prodloužit až na 15 minut, pro primery bohaté na obsah GC je někdy vhodná teplota 80 °C (Kočárek, 2007; Zima et al., 2002).

Závěrečná extenze

Extenze posledního cyklu PCR se prodlužuje na 5 – 10 min při 72 °C. To zajistí, aby byly všechny produkty správně dosyntetizovány a ke všem amplikonům byl přidán na konec beztemplátový adenin (Bartlett et Stirling, 2003).



Obr. 5. Průběh PCR. 1. Denaturace (95 °C); 2. Annealing se sondou (55 °C); 3. Extenze: (72 °C). Převzato z http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

Celá reakce PCR probíhá v programovatelném termostatu termocykleru (Obr. 6), kde lze velmi rychle měnit teplotu potřebnou pro provedení jednotlivých kroků.

Obr. 6. Termocycler. Převzato z http://www.e-laboratoria.pl/media/catalog/product/cache/1/thumbnail/600x600/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/f/a/falc_termocycler_foto16.jpg

Výsledným produktem PCR reakce jsou dvouřetězcové fragmenty DNA definované délky – tzv. amplikony. PCR metoda dokáže při 100% účinnosti z 2 vláken vytvořit po 30 (n) cyklech teoreticky 2^{30} (2^{n}) molekul kopií (1,07 miliard).

Vysoká citlivost a specificita PCR způsobuje, že kontaminace i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA může vygenerovat falešný signál (Šmarda et al., 2002). Opatřením umožňující zjistit případnou kontaminaci je použití tzv. negativní kontroly. Jedná se o vzorek reakční směsi bez přidání DNA. Místo DNA se do reakce přidá voda. Pokud se v negativní kontrole objeví amplifikovaný fragment, znamená to, že vzorek byl kontaminován cizorodou DNA a vyšetření je nutné zopakovat (Kočárek, 2007). Preventivní antikontaminační opatření zahrnují fyzické oddělení pre-PCR a post-PCR areálů, častá výměna rukavic, použití reagencií a spotřebního materiálu s certifikátem „pro molekulární biologii“, bez DNA a Dnáz, např. jednorázové pipetovací špičky s dvojitým filtrem.

6.2. SLOŽKY REAKČNÍ SMĚSI

Reakci tvoří následující komponenty: templátová DNA, primery, termostabilní DNA polymeráza (*Taq* polymeráza), dNTPs, hořečnaté ionty, pufr a voda.

6.2.1. TEMPLÁTOVÁ DNA

Templátová DNA slouží jako matrice pro tvorbu nového vlákna. Množství potřebné pro reakci je mezi 1,0 a 500,0 ng, řádově se pohybuje kolem 10^4 – 10^7 molekul (záleží na délce cílové sekvence). K anylýze teoreticky postačí pouze jediná molekula DNA. Velké množství DNA v reakci může způsobit nespecifické nasedání primerů.

6.2.2. PRIMERY

Primery jsou krátké jednořetězcové oligonukleotidy, které jsou syntetizovány tak, aby hybridizovaly s komplementární sekvencí na obou vláknech dvoušroubovice DNA. Jsou dlouhé obvykle 18 – 30 nukleotidů.

Pro správné proběhnutí reakce by primery měly splňovat několik požadavků:

- Obsah GC 40 – 60 %.
- Primery by neměly obsahovat vnitřně komplementární sekvence, aby nedocházelo ke tvorbě smyček (loop).
- Neměly by být vzájemně komplementární. Zejména na 3´konci, kde překrytí dvou nebo tří bazí může způsobit vznik dimeru primerů, zejména při nadbytku primeru.

- Musí být specifické k amplifikované reakci.
- Podobná teplota *Tm* u obou primerů.

Potřebné množství každého primeru pro jednu reakci je 25 – 50 pmol. Příliš vysoká koncentrace způsobuje nespecifické nasedání primerů na templátovou DNA nebo může způsobit párování primerů navzájem. Příliš nízká koncentrace může vést k nedostatečnému množství produktu. Někdy vznikají problémy se sekundární strukturou, zejména u primerů bohatých na GC. V tom případě jsou vhodné primery delší, např. 25 – 30 bp (Zima et al., 2002), vyšší teplota hybridizace nebo aditiva PCR.

6.2.3. DNA POLYMERÁZA

V současné době se používají termostabilní DNA polymerázy původně izolované z bakterií žijících v horkých pramenech a podrobené genetickému inženýrství. Nejběžněji používanou termostabilní polymerázou je *Taq* polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticu*s s teplotním optimem kolem 72 °C.
Optimální množství *Taq* polymerázy je 1 – 2 U pro každou reakci, toleranční rozpětí 0,5 – 5 U. Vyšší koncentrace polymerázy zvyšuje pravděpodobnost chybné hybridizace (Zima et al., 2002). V současné době byly zavedeny i další termostabilní polymerázy (DNA polymeráza *Pwo* z *Pyrococcus woesci*, *Pfu* z *Pyrococcus furiosus*) disponující korekturskou funkcí, 3´→5´exonukleázovou aktivitou, která jim umožňuje opravit chybně zařazený nukleotid. Frekvence chyb u těchto polymeráz je nižší (2 - 6krát) než u *Taq* DNA polymerázy.

6.2.4. DNTPS (DEOXYNUKLEOTIDTRIFOSFÁTY)

Deoxynukleotidtrifosfáty (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) jsou stavebními kameny PCR reakce. Jsou začleněny do vznikajícího řetězce DNA během replikace. Jednotlivé nukleotidy jsou zastoupeny v reakci ve stejné koncentraci, optimálně 200 µM (Godwin, 2007).

6.2.5. PUFR

Reakční pufr udržuje optimální pH a potřebnou koncentraci solí pro reakci. Obvyklé složení je 50 mM KCl a 10 - 50 mM Tris-HCl, pH 8. 3. koncentrace solí ovlivňuje specificitu nasedání primerů.

6.2.6. *HOŘEČNATÉ IONTY*

Hořečnaté ionty působí jako kofaktor polymerázy. Optimální koncentrace Mg^{2+} závisí na typu PCR, toleranční rozpětí bývá 1 – 8 mmol/l (Zima et al., 2002). Příliš vysoká koncentrace Mg^{2+} snižuje specificitu reakce a tvorbu nespecifických produktů. U primerů bohatých na GC je vyšší koncentrace Mg^{2+} výhodnější. Naopak příliš nízká koncentrace může mít za následek nízký výtěžek reakce.

6.2.7. *DALŠÍ SLOŽKY REAKČNÍ SMĚSI*

PCR voda se přidává do reakce pro doplnění na požadovaný objem. Pro přípravu reakční směsi se používá většinou voda v kvalitě pro molekulární biologii – RNase-free water.

Aditiva jako telecí sérový allbuminbetain, formamid, DMSO, síran amonný mohou vychytávat inhibitory PCR, stabilizovat polymerázu nebo destabilizovat nespecifickou vazbu primerů na templát a zlepšit tak specifičnost nebo výtěžek produktu.

6.3. MODIFIKACE PCR

6.3.1. *„HOT START“PCR*

Tato modifikace PCR významně ovlivňuje specifičnost a výtěžek reakce. I krátká inkubace směsi PCR při teplotách nižších než je *Tm*, může způsobit tvorbu dimerů a nespecifické produkty (Kenneth, 2009). Primery v reakční směsi mohou při nízké teplotě hybridizovat s nespecifickými místy templátu a polymeráza tak může syntetizovat nespecifické produkty do chvíle, než dojde k denaturaci. Hot start PCR (D´Aquila et al., 1991; Erlich et al., 1991) může výrazně snížit tyto problémy.

Určité složky reakční směsi jsou odděleny od ostatních, dokud teplota ve zkumavce nepřekročí optimální teplotu pro připojení primeru (obvykle 55- 65 °C). DNA polymeráza je v této reakční směsi nefunkční, a proto nedochází k prodlužování nespecificky navázaných primerů, dokud není dosažena teplota *Ta*. Separace důležitých složek reakční směsi je dosažena několika způsoby. První možností je přidání DNA-polymerázy nebo iontů Mg^{2+}, které jsou v původní reakční směsi vynechány a přidány až po dosažení teploty > 70 °C. Nevýhodou je možnost kontaminace (Zima et al., 2002). Jiný způsob je využití tzv. hot start polymerázy, např. AmpliTaq Gold DNA polymeráza. K aktivaci polymerázy dochází až působením denaturační teploty 95 °C (Moretti et al., 1998). Další možností je

rozdělení reakčních komponentů do dvou směsí, které jsou rozděleny fyzikální bariérou (vosková přepážka nebo voskové korálky obsahující $MgCl_2$). Vlivem vysokých denaturačních teplot tato bariéra roztaje a umožní smíchání složek (Chou et al., 1992).

6.3.2. „NESTED“ PCR (NPCR)

„Nested“ PCR nebo-li „dvojitá PCR“ umožňuje amplifikaci velmi malého množství DNA. Je založena na dvou polymerázových reakcích s rozdílnými primery. Nejprve se amplifikuje úsek, kde je templátem genomická DNA. Následuje další PCR tzv. „nested“ reakce, kde templátem je produkt reakce předcházející. Pro první reakci se použijí dva oligonukleotidy, které vymezí první amplifikovaný úsek. Ve druhé („nested“) reakci se použijí nové dva oligonukleotidy, které hybridizují uvnitř úseků, vzniklých při první PCR (Kočárek, 2007; Zima et al., 2002).

6.3.3. ALELOVĚ SPECIFICKÁ PCR (AS - PCR)

Alelově specifická PCR je používána k přímé detekci malých delecí a bodových mutací probíhajicí ve dvou či více paralelních reakcích, využívající diskriminační schopnosti 3´ konce primeru. V první reakci je jeden primer komplementární ke standardní sekvenci a v další reakci k mutantní nebo polymorfní sekvenci. Druhý primer je v obou reakcích stejný. Předpokládá se, že k elongaci dojde, jen pokud jsou primer a cílová sekvence plně komplementární (Šmarda et al., 2008).

6.3.4. ASYMETRICKÁ PCR

Asymetrická PCR umožňuje syntézu převážně jednoho vlákna z dvoušroubovice DNA tím, že jeden z primerů je v nadbytku (většinou v poměru 50 : 1 až 100 : 1) a druhý primer se spotřebuje většinou v průběhu prvního cyklu. Produktem PCR reakce je jednovláknová DNA, která je vhodná např. pro sekvenování.

6.3.5. MULTIPLEXOVÁ REAKCE

Multiplexová reakce je varianta PCR reakce umožňující amplifikaci dvou a více lokusů v jedné reakci PCR. Využívá větší počet primerů, které hybridizují s různými úseky templátové DNA. Nejsložitější je fáze přípravná, kdy je třeba navodit správné reakční podmínky (sekvence nukleotidů, koncentrace primerů, optimální teplota jednotlivých kroků cyklu atd.) (Shuber et al., 1995; Henegariu et al., 1997; Markoulatos et al, 2002). Koncentrace primerů je nejdůležitější faktor v multiplexové reakci, vymezující celkový výtěžek jednotlivých amplikonů (Schoske et al., 2003).

6.3.6. INVERZNÍ PCR

Omezení standardní PCR je, že hraniční oblasti DNA fragmentu 5´a 3´ konce musí být známé sekvence. Inverzní PCR je varianta umožňující amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci ohraničené na obou stranách DNA se známou sekvencí (Šmarda et al., 2008).

6.3.7. STANOVENÍ POLYMORFIZMŮ DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ (RFLP)

PCR-RFLP je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, obsahující sekvenční polymorfizmus v restrikčním místě. Tato sekvence o délce až 5 kb se amplifikuje za přísných podmínek pomocí primerů připojujících se ke koncovým konzervovaným oblastem. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR o stejné délce, které jsou štěpeny restrikční endonukleázou a poté jsou analyzovány elektroforézou v agarózovém či polyakrylamidovém gelu (Šmarda et al., 2008).

6.3.8. REVERZNÍ TRANSKRIPCE NÁSLEDOVANÁ PCR (RT-PCR)

RT-PCR je metoda určená k amplifikaci molekul RNA využívající reverzní transkripci, pomocí které se přepíše mRNA na cDNA. Enzym, který umožňuje přepis mRNA do cDNA, se nazývá reverzní transkriptáza. Nakonec se provede s cDNA jako templátem běžná PCR reakce.

6.3.9. RYCHLÁ AMPLIFIKACE KONCŮ cDNA (RACE)

RACE je metoda rychlé amplifikace cDNA konců pomocí PCR (Innis et al., 1990). Nejdříve se syntetizuje cDNA reverzní transkripcí z mRNA. Syntéza probíhá na 5´nebo 3´konci templátové DNA. Musí být známa část sekvence některého exonu. Amplifikace 5´konců vyžaduje purifikaci prvotní cDNA a ukončení řetězce terminální transferázou za vzniku druhého poly (A) konce. Kombinací se nakonec získá celá cDNA (Zima et al., 2004).

6.4. VÝHODY A NEVÝHODY

Výhody PCR:

1. ***Vysoká specificita a citlivost*** – k analýze postačí jediná molekula DNA.
2. ***Rychlost*** - čas potřebný k analýze je méně než 24 hod (délka závisí na délce amplifikovaného úseku a také na tom, jak velké množství amplikonu potřebujeme připravit).
3. ***Bezpečnost práce*** – při PCR se zpravidla nepoužívají radioaktivně značené nukleotidy.
4. ***Návaznost na ostatní ošetření*** – produkty PCR lze využít i k dalším molekulárně-biologickým analýzám.
5. ***Dobrá rozlišovací schopnost*** – pomocí PCR lze amplifikovat i silně degradovanou DNA.
6. ***Možnost automatizace*** – poskytují cykléry, kde umožňují zvolit vhodný program (zadat teploty, časy a počet jednotlivých cyklů) a reakce probíhá bez nutnosti osobní asistence. Sběr dat a částečně i jejich analýza jsou automatizovány.
7. ***Multiplexová reakce*** – několik různých STR páru primerů může být amplifikováno v jedné reakci (Kočárek, 2007; Buckleton, 2005).

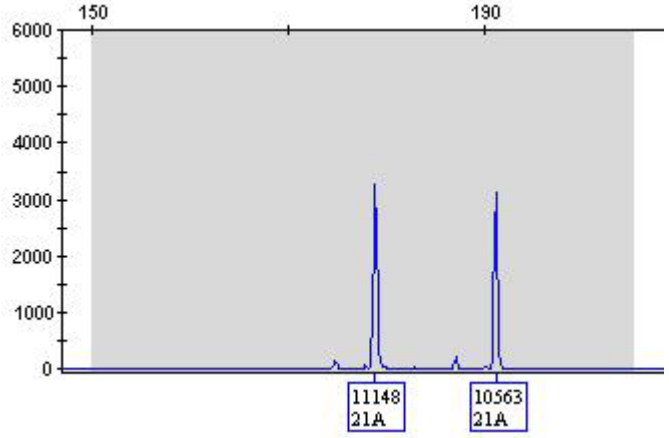
Nevýhody PCR

1. ***Délka amplifikovaného úseku*** – nelze amplifikovat dlouhé sekvence.
2. ***Nutnost znát sekvence ohraničující amplifikovaný úsek*** – aby bylo možno vybrat vhodné primery.
3. ***Možnost kontaminace cizorodou DNA*** – i při dodržení antikontaminačních opatření ke kontaminaci dochází.
4. ***Nepřesnost replikace*** – při syntéze DNA může dojít chybným zařazením nukleotidu do nascentního řetězce, které budou při následných cyklech PCR „kopírovány“ do nově vznikajících amplikonů (Kočárek, 2007).

6.5. VÝSLEDKY A ANALÝZA

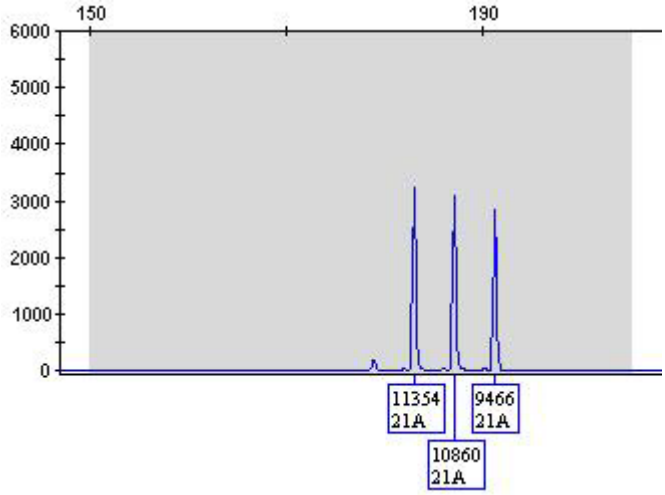
QF-PCR se používá pro zjištění počtu kopií chromozomu amplifikací opakujících se sekvencí u polymorfních lokusů (Mann et Ogilvie, 2012). Chromozom-specifické krátké DNA sekvence (STR – short tandem repeats) jsou amplifikovány pomocí PCR. Vizualizací fluorescenčně značených primerů na elektroforeogramu lze kvantifikovat PCR produkty. Množství namnoženého produktu se ukazuje na monitoru jako tzv. píky (jednotlivé alely jedince). Kvantifikace se provádí výpočtem plochy píku amplikonu příslušné STR alely pomocí automatického DNA sekvenátoru. STR se liší mezi jedinci velikostí, podle toho, kolikrát se opakuje jednotka repetice - trojice, čtveřice nebo pětice nukleotidů. Výsledek reakce se sleduje pro každý lokus zvlášť:

Normální **heterozygotní jedinec** pro specifickou STR sekvenci bude mít 2 píky o stejné výšce fluorescenčního signálu s odlišnou délkou amplikonu, jejichž poměr je hodnocen 1 : 1 (Obr. 7).

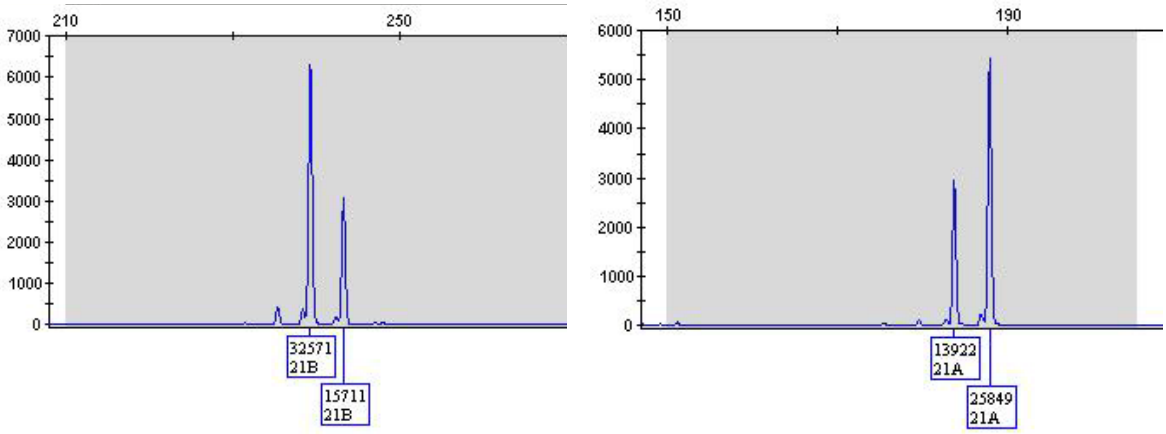


Obr. 7. Heterozygotní marker (poměr ploch 1 :1). Převzato z http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Compact_v3,_CS.pdf

Pro **trizomii** příslušného chromozomu svědčí přítomnost 3 různých píků (3 různé alely) se stejnou plochou (Obr. 8) nebo přítomnost 2 píků (2 různé alely), z nichž jeden má dvojnásobnou plochu, než ten druhý (Obr. 9). Poměr ploch pro 2 alely je hodnocen jako 2 : 1 nebo 1 :2 a poměr ploch pro 3 alely je 1 : 1 : 1.

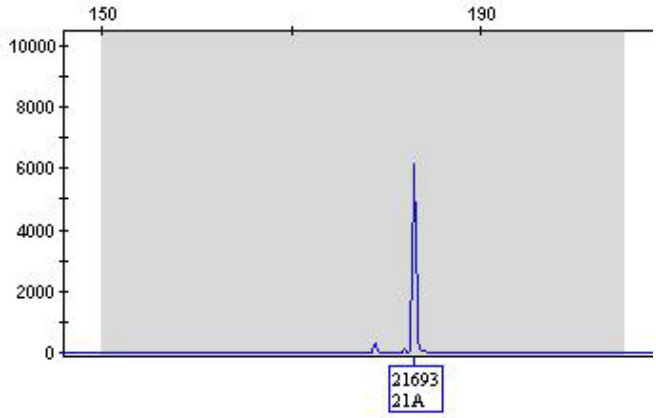


Obr. 8. Trizomický troj-alelický marker (poměr ploch 1 : 1 : 1). Převzato z http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Compact_v3,_CS.pdf



Obr. 9. Trizomický dvoj-alelický marker (poměr ploch 2 : 1; 1 : 2). Převzato z http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Compact_v3,_CS.pdf

Homozygotní jedinci (alely se stejnou délkou) – mají pouze 1 pík (Obr. 10) a vyšetření pro tento marker je neinformativní.



Obr. 10. Neinformativní marker. Převzato z http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Compact_v3,_CS.pdf

Provedení analýzy:

Analýza dialelických markerů se provádí výpočtem poměrů ploch píků (pík1/pík2). Pík1 představuje plochu píku kratšího fragmentu, pík2 je plocha píku delšího fragmentu (Tab. 2).

Tab. 2. Poměrová kritéria – (Ratio criteria – RC).

Dialelické markery:

Poměr	1 : 2	Neprůkazný	1 : 1	Neprůkazný	2 : 1
RC 1	< 0,65	0,65 – 0,74	0,75 – 1,44	1,45 – 1,80	> 1,80
RC 2	< 0,65	0,65 – 0,74	0,75 – 1,54	1,55 – 1,80	> 1,80

Trialelické markery:

Poměr	Neprůkazný	1 : 1 : 1	Neprůkazný
RC 1	< 0,75	0,75 – 1,44	> 1,45
RC 2	< 0,74	0,75 – 1,54	> 1,55

Poměrové kritérium (RC1) 1 se používá, když je vzdálenost píků < 24 bp.
Poměrové kritérium (RC2) 2 používá, když je vzdálenost píků ≥ 24 bp.

Výškový poměr:
Výškový poměr lze použít, pokud je poměr ploch píků hodnocen jako neprůkazný. Pro výpočet poměrů ploch se použijí stejná poměrová kritéria.

Interpretace výsledků – hodnocení jednotlivých markerů:

Výsledek hodnotíme jako **normální (dizomický, dialelický)**, s poměrem píku v rozmezí od 1 : 0,7 do 1 : 1,4 pro nejméně 2 informativní STR markery na chromozom. (Putzova et al, 2008). Nicméně, pro alely delší než 24 repetic je přijatelný poměr až 1,5.

Výsledek hodnotíme jako **abnormální (trizomický)**, pokud jsou alespoň 2 informativní markery v souladu s trialelickým genotypem s poměrem píků méně než 0,7 nebo více než 1,4 a rozdíl v délce alel je menší než 20 bp. V případě, kdy je rozdíl mezi alelami větší než 20 bp, se mohou vyskytnout vyšší rozdíly ve výšce píků. Je to způsobeno přednostní amplifikací kratších alel, obvykle až k 1 : 0,5 – 1,5. Takový marker se považuje za neinformativní. Poměr menší než 0,25 nebo větší než 4,0 se považuje za artefakt a analýza je opakována (Putzova et al, 2008).

6.6. PROBLÉMY PŘI VYHODNOCENÍ

6.6.1. NESPECIFICKÉ ARTEFAKTY

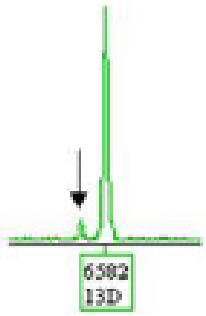
Nespecifické artefakty vznikají v průběhu PCR amplifikace STR alel a mohou narušovat správnou interpretaci a genotypizaci alel přítomných v templátu DNA (Goodwin et al., 2007). Nespecifické artefakty obvykle atypicky migrují v gelu. Může se jednat o odlišnou sekvenci STR alel nebo se jedná o částečně renaturovaný PCR produkt (Buckleton, 2005).

6.6.2. STUTTER PÍKY

Stutter píky (Obr. 11) jsou samostatné píky vznikající v průběhu PCR amplifikace STR alel a jsou o jednu nebo několik repetitivních jednotek menší (minor) nebo výjimečně i delší, než hlavní alela (Shinde, et al., 2003). Mohou se tvořit v důsledku prokluzu DNA polymerázy při prodlužování DNA vlákna (Hauge et Litt, 1993; Schlotterer et Tautz, 1992). Stutter pík je zpravidla menší než 15 % výšky hlavní alely (Butler, 2005).

Počet stutterů závisí na lokusu, stejně jako na PCR podmínkách a používané polymerázy. Procento stutterů se zvyšuje s vyšším počtem PCR cyklů a s větším počtem templátové DNA. Výskyt stutterů klesá s delšími opakujícími jednotkami (pentanukleotidové jednotky<tetra<tri<dinukleotidy). U tetranukleotidových repetic se objevuje asi v 15 %, pro tri- a dinukleotidové repetice se procento výskytu stutterů zvyšuje až na 30 % (Butler, 2005). Počet stutterů je nižší, pokud je sekvence opakování nedokonalá, narušená nepravidelností sekvence (imperfect) (Goodwin et al., 2007; Gill et

al, 1997; Corporation, T.P.-E., 1999). Při interpretaci výsledků je nutné stutter píky brát v úvahu (Godwin et al., 2007).



Obr. 11. Stutter pík označený šipkou. Převzato z http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Compact_v3,_CS.pdf.

6.6.3. PULL UP PÍKY (BLEEDTHROUGH)

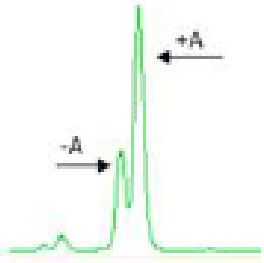
Pull up píky jsou malé píky jedné barvy nacházející se na místě hlavního píku jiné barvy (Butler et al., 2004). Vznikají při příliš silném signálu amplikonu hlavního píku (příliš mnoho templátové DNA při PCR). Vzniklé přesahující píky musí být z analýzy vyloučeny.

6.6.4. SPIKES

Spikes jsou ostré píky, které se objevují se stejnou intenzitou fluorescence v několika barevných kanálech. Píky vzniklé z elektroforetických spiků musí být z analýzy vyloučeny.

6.6.5. SPLIT PÍKY (+/- A)

-A píky jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jeden pár bazí kratší, než PCR produkt s plnou délkou (+A pík). -A píky můžeme zahrnout do výpočtu poměrů. Split píky (Obr. 12) jsou obvykle způsobeny nižší aktivitou *Taq* polymerázy, která přidává další adenosin na 3´konec PCR produktu nebo příliš velkým množstvím DNA v PCR reakci (Godwin et al, 2007; Butler et al., 2004).

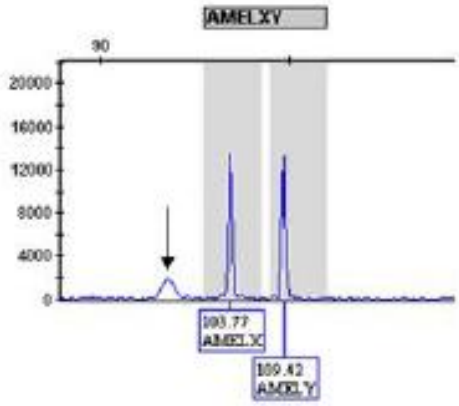


Obr. 12. –A a +A píky jsou označeny šipkou. Převzato z http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Compact_v3,_CS.pdf

Alelický drop-out je jev, při kterém dochází ke ztrátě jedné ze dvou alel v průběhu PCR amplifikace. Problém nastává, pokud k tomuto jevu dojde u heterozygotního genotypu (2 odlišné alely). Alelický drop-out tak může vést k falešnému určení homozygotického genotypu (1 alela) a tím i k špatné interpretaci výsledků (Miller et al, 2002). Při degradované vstupní DNA může někdy docházet i k lokusovému drop-outu. Takový lokus je pak neinformativní.

6.6.5. DYE BLOBS

Dye blobs, uvolněná fluorescenční barva ze značeného primeru, se vyskytují relativně brzy na začátku elektroforeogramu, ale mohou se objevit v celém rozsahu analýzy (Obr. 13). Dye blobs vypadá jako široký pík bez definovaného vrcholu jedné barvy.



Obr. 13. Dye blob je označen šipkou. Převzato z http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Compact_v3,_CS.pdf

6.7. ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza je metoda založená na separaci molekul podle relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje (Sambrook et al., 1989). Používá se k separaci fragmentů DNA, RNA, proteinů, ale i dalších biochemicky významných látek. Částice nukleových kyselin mají vlivem přítomnosti aniontových fosfátových skupin (PO_4^{3-}) negativní elektrický náboj, a proto se pohybují směrem k anodě (kladně nabité elektrodě) (Zima et al., 2002). Pohyb těchto vysoce elektronegativních molekul v elektrickém poli vede k jejich separaci podle molekulové hmotnosti. Kratší fragmenty se pohybují rychleji než delší molekuly.

6.7.1. Gelová elektroforéza

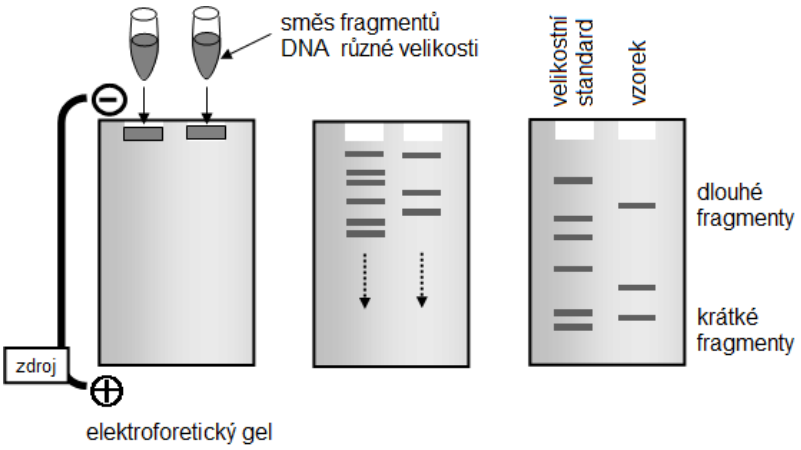
Gelová elektroforéza probíhá na agarózovém či polyakryamidovém gelu. Elektroforéza na gelu rozlišuje větší molekuly až kolem 5000 kb (Voytas, 2001). Koncentrace agarózy se volí podle velikosti fragmentů, které mají být separovány (Tab. 3). Polyakrylamidový gel rozlišuje menší molekuly, do 10 bp (Maniatis et al., 1975).

Tab. 3. Přehled koncentrace agarózy podle velikosti fragmentů. Převzato ze Zima et al. (2002).

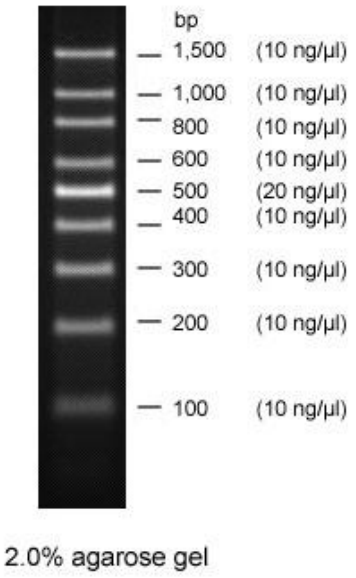
Velikost fragmentu	Koncentrace agarózy
1 – 20 kbp	0,4 – 0,8 %
500 – 1000 bp	2 %
100 – 500 bp	3 %
10 – 100 bp	5 %

Mnoho aplikací využívá horizontální elektroforézu (Obr. 14) a gel je ponořen do pufru (TBE, TAE). Nejčastěji se používají dvě velikosti gelů, např. 12krát 20 cm a 5krát 9cm, což představuje přibližně 4,5, reps. 9 V/cm. Nanášení vzorku (0,1 – 5,0 µg DNA) do jamek předchází smíchání s nanášecím pufrem obvykle v poměru 1 : 4 nebo 1 : 5, který obsahuje barvu viditelného spektra (např. bromfenolová modř 0,5 g/l, 400 g/l sacharóza, 20 mmol/EDTA).

Vizualizace se provede pomocí fluorescenčních barviv, např. ethidiumbromidem a posvícením na transiluminátoru v UV světle s následnou fotodokumentací. Jako kalibrační škály molekulové hmotnosti se používá krokový žebříček po 50 nebo 100 bp (Step ladder, Obr. 15) nebo jiné PCR markery (Zima et al., 2002).



Obr. 14. Horizontální gelová elektroforéza. Převzato z: http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz.



Obr. 15. 100 bp DNA ladder. Skládá z 9 proužků (bands) po 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 800 bp, 1 000 bp, 1 500 bp. Převzato z http://www.genscript.com/molecule/M102O-100_bp_DNA_Ladder_original_format.html.

6.7.2. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Kapilární elektroforéza je založena na separaci fluorescenčně značených fragmentů DNA, které procházejí kapilárou pod elektrickým napětím. Při průchodu kapilárou se fragmenty DNA rozdělují podle své délky a jsou detekovány laserovým detektorem. U kapilární elektroforézy probíhá separace v lineárním hydrofilním akrylamidovém polymeru v tenké kapiláře (vnitřní průměr 25 – 50 µm a délka několik cm až 1 m) a

elektroforetickém pufru podle molekulové hmotnosti. Kapilára spojuje 2 nádoby naplněné elektrolytem (vodivým roztokem). V jedné nádobě je umístěna kladná elektroda (anoda) a ve druhé záporná elektroda (katoda). Po naplnění aparatury elektrolytem se do jednoho konce kapiláry aplikuje malé množství vzorku a zapne se zdroj stejnosměrného proudu. Obdobně jako u gelové elektroforézy se i zde částice o nižší molekulové hmotnosti v elektrickém poli pohybují k opačnému pólu rychleji, než částice s vyšší hmotností. Na opačném konci kapiláry je umístěn detektor pro přímou detekci měřením absorbance při 260 nm. Typická analýza trvá asi 20 minut. Pro separaci jednovláknové DNA se používá pufr obsahující ureu (7 mol/l) (Zima et al., 2002; Kočárek, 2007).

Kapilární elektroforéza nabízí mnoho výhod: nižší náročnost na spotřebu pufrů a dalších materiálů, minimální spotřeba vzorku (1 – 2 nl o koncentraci 5 – 50 mg/l), možnost aplikace vysokého napětí a tím vyšší rychlost separace a snadná, digitalizovaná vizualizace. Na bázi kapilární elektroforézy fungují automatizované přístroje (genetické analyzátory). Na trhu je dostupných mnoho typů přístrojů např. od firmy Applied Biosystems. V současnosti je nejmodernějším aparátem ABI PRISM (Obr. 16). Analyzátory se využívají pro sekvenační i fragmentační analýzu.

Obr. 16. Genetický analyzátor ABI Prim 3130xl Genetic Analyzer. Převzato z http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/mambo/images/abiprism3130xl.jpg.

7. MATERIÁL A METODY

7.1. MATERIÁL

7.1.1. VZORKY DNA

Jako biologický materiál byla použita kontrolní DNA se souhlasem 100 anonymizovaných pacientů a povolením etické komise k pokusům z Ústavu biologie a lékařské genetiky ve Fakultní nemocnici v Motole.

7.1.2. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Pipety

- Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000 (Gilson, Middleton, WI, USA)

Termocykléry

- AB 270 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- MJ Research Peltier Thermal Cycler (MJ Research, San Francisco, CA, USA)

Kapilární genetický analyzátor

- ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Laminární boxy

- LaminAir HB2436 Telstar BIO-II-A (Heraeus Telstar, Španělsko)
- Ms2 IKA (IKA – Works, Wilmington, NC, USA)

Centrifugy

- Mini Spin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Spectrafuge 16M (Labnet, Windsdor, Velká Británie)
- Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Elektroforetická vana a proudový zdroj

- Horizont 58 (Life Technology, Gaithersburg, MD, USA)
- Lightning Volt Power Supply (Polysciences, Neles, IL, USA)

UV transiluminátor a gelový dokumentační systém

- Electronic Transilluminator Dual Light (Ultralum, Claremont, CA, USA)

- Edas 290 + Kodak ID Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Orchester, NY, USA)

7.1.3. SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

- PCR zkumavky s plochým víčkem 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Špičky s filtrem, bez filtru 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA)
- Špičky DistriTip Mini 1 µl – 12,5 µl, 10 µl – 125 µl (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA)
- Kapiláry 3130xl/3100 Genetic Analyzer Capillary Array – 36 cm x 50 µm (Applied Biosystems, Česká Republika s. r. o.)
- 96 jamková optická destička - MicroAmp 96-Well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems, Česká Republika s. r. o.)
- Základna pro 96 jamkovou destičku - 96-Well Plate Base (Applied Biosystems, Česká Republika s. r. o.)
- Přidržovač pro 96 jamkovou destičku – 96-Well Plate Retainer (Applied Biosystems, Česká Republika s. r. o.)
- Gumičky - 96-Well Plate Septa (Applied Biosystems)

7.1.4. CHEMIKÁLIE

- 10x TBE pufr
- 3130 POP-7™ Polymer (Applied Biosystems)
- 6x Loading Dye Solution (100bp DNA ladder) (Fermentas)
- Agarose SFR™ (Amresco®)
- Buffer (10X) with EDTA (Applied Biosystems)
- Destilovaná voda pro laboratorní účely (Lékárna FN Motol)
- Etanol 95% (Lékárna FN Motol)
- Etidiumbromid – 1% roztok ve vodě (Merck)
- GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard Standards Kit (Applied Biosystems)
- Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems)
- Multiplex PCR Master Mix** (Qiagen)
- Orange G (Sigma)

- Primery (Microsynth)
- Q-Solution** (Qiagen)
- RNase-Free Water (dH_2O)** (Qiagen)
- Voda bez přítomnosti nukleáz (Fermentas)
- Voda pro injekční účely Braun (B. Braun)

** jedna sada – patří do jednoho balení

7.2. METODY

V této diplomové práci jsem použila následující metody:

- Gradientová PCR
- Elektroforéza v agarózovém gelu
- Fragmentační analýza pomocí kapilární elektroforézy

7.3. GRADIENTOVÁ PCR

U každého páru primerů bylo třeba zjistit jejich optimální teplotu nasedání. Bylo připraveno 12 vzorků a negativní kontrola kontaminace (NTC) pro každý pár primerů v teplotním rozmezí 50 – 65 °C (Tab. 4).

Tab. 4. Složení reakční směsi pro gradientovou PCR.

Reagencie:	**1 reakce (µl)**
Multiplex PCR Master Mix (Qiagen)	10
Q-solution (Qiagen)	2,0
Primer – R (5 pmol/ µl)	2,0
Primer – F (5 pmol/ µl)	2,0
RNase-free water (Qiagen)	2,0
DNA (50 – 100 ng/ µl)	2,0
Celkem	**20,0**

1. Vzorky byly vloženy do cycléru, který umožňuje nastavit více různých teplot nasedání primerů.
2. Byly naprogramovány jednotlivé kroky (Tab. 5) gradientové PCR reakce v teplotním gradientu:

Teplotní gradient:

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
50° C	50,4° C	51,3° C	52,4°C	54,2°C	56,4°C	58,9°C	61,6°C	62,7°C	63,8°C	64,7°C	65,0°C

Tab. 5. Amplifikační program.

Teplota	Čas
95°C	15 min
94°C	30 s
50 – 65°C	1,5 min
72°C	1 min
30 cyklů	
72°C	10 min
60°C	30 min
4°C	forever

3. Po skončení amplifikačního programu byly zkumavky vyjmuty z cycleru a vzorky byly použity pro kontrolu správnosti průběhu PCR (gelová elektroforéza) nebo uskladněny při – 20 °C.

7.4. ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU

Postup přípravy gelu

1. Pro přípravu byl použit 3 % agarózový gel (3 g Agarose SFR^{TM} (Amresco ^{R}) a 100 ml TBE pufru).
2. Agaróza byla v mikrovlnné troubě rozpuštěna opakovaným povařením.
3. Po ochlazení agarózy asi na 55 °C byla nalita do vaničky, kam byly přidány vhodné hřebeny pro vytvoření příslušných jamek.
4. Po zatuhnutí gelu (asi po 30 minutách) byly vyndány hřebeny a gel byl ihned použit. Nepoužitý gel byl uchován v plastikové formě s 0,5 % TBE v lednici při 2 °C.

Průběh elektroforézy

1. Připravený gel byl vložen do elektroforetické vany Horizon^{R} (Life Technologies GIBCO BRL, Gaithersbutg, MD, USA) naplněné 0,5 % TBE pufrem.
2. Do jamek byly přidány PCR produkty (5 µl) smíchané s Orange G.

3. Do jedné z jamek bylo naneseno 5 µl hmotnostního standardu neboli „žebřík“ (ladder).
4. Komora elektroforetické vany byla zavřena a připojena ke zdroji elektrického napětí Lightning Volf Power Supply OSP-300 (Polysciences, Neles, IL, USA) po dobu 30 min (500mA, 100V).
5. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut a obarven ponořením do 0,0002 % roztoku etidiumbromidu po dobu 15-20 min.
6. Vizualizace fragmentů proběhla na transluminátoru Electronic Translluminator Dual Light (Ultralum, Claremont, CA, USA) v UV světle a následně vyfotografováním digitálním fotoaparátem Kodak ID Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Orchester, NY, USA).

7.5. FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA POMOCI KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

Fragmentační analýza pomocí kapilární elektroforézy byla provedena na genetickém analyzátoru. Vzorky pro kapilární elektroforézu byly připraveny podle následujiciho postupu:

1. Byl připraven zaváděcí roztok smícháním směsi 0,5 µl vnitřního standardu GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) a 9 µl Hi-Di™ Formamidu (Applied Biosystems) na jamku. Roztok byl zvortexován.
2. Do 96 jamkové destičky bylo nepipetováno po 9,5 µl roztoku a 1 µl PCR produktu / na jamku.
3. Destička byla utěsněna gumičkou a uzavřena víčkem.

8. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Analýza výsledků fragmentační analýzy proběhla na genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Velikost fragmentů byla vyhodnocena v programu GeneMapper Software version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pomocí vnitřního molekulového standardu GeneScan™ - 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems).

8.1. OPTIMALIZACE PCR PRO CHROMOZOMY 13, 16, 18, 21, 22

Bylo otestováno celkem 46 dinukleotidových STR markerů pro chromozomy 13, 16, 18, 21 a 22. Přehled vybraných STR markerů uvádí Tab 7.

Nejdříve byla připravena reakční směs pro teplotní gradientovou PCR (Tab. 4) podle programu uvedeného v tab. 5 v teplotním gradientu hybridizační teploty 50 – 65 °C. Specificita produktů byla zkontrolována podle délky amplikonu na agarózovém gelu a po úspěšné amplifikaci byly produkty PCR analyzovány v genetickém analyzátoru pomocí kapilární elektroforézy.

Výsledky elektroforézy na agarózovém gelu ukázaly u většiny markerů nespecifické produkty. U všech STR markerů byly zjištěny tzv. stutter píky, které jsem se snažila odstranit následnou optimalizací zahrnující:

změnu nastavení hodnot v amplifikačním programu (Tab. 8)

- změnu koncentrace Q-Solution (0,5 µl, 1 µl, 1,5 µl, 2 µl)
- změnu koncentrace DNA
- změnu koncentrace primerů
-

Tab. 8. Amplifikační programy.

Teplota	**Čas**
95°C	15 min
94°C	30 s
50 – 65°C	1,5 min
72°C	1 min
30 cyklů	
72°C	30 min
4°C	forever

Teplota	**Čas**
95°C	15 min
94°C	30 s
50 – 65°C	1,5 min
72°C	1 min
28 cyklů	
72°C	30 min
4°C	forever

Avšak ani změna v nastavení amplifikačního programu nebo změna reagencií nesnížila procento stutterů a stále docházelo ke vzniku nespecifických produktů.

Tab. 7. Přehled dinukleotidových STR markerů.

Marker	Fluorescent colour	Position	Size (bp)	Forward primer	Reverse primer
Chr. 13					
D13S1493	6-FAM	13q13	223-248	ACCTGTTGTATGGCAGCAGT	GGTTGACTCTTTCCCCAACT
D13S1317	6-FAM	13q14.3-q21.1	221-241	CTTGGAAACCAACAAGTCAC	ATTTTGCCACCTAGAACGG
D13S284	HEX	13q21	197-227	AAAATCAGGTGGAAACAGAAT	AAAGGCTAACATCGAAGGGA
D13S1303	NED	13q21.1	180-214	GCTCCATCTCTGGAGTATCTG	CACCAATAAGAAGGTGACATAACTT
D13S762	6-FAM	13q31-33	306-325	AATGAGATTGCTGGGTCAGA	GTGGCTCCATGGAAAATTTA
D13S174	HEX	13q34	173-199	GACGACTAACCTCAAGTGCG	TGAAGGCAGAAGTAAAACCATTATC
D13S159	6-FAM	13q31-q33	168-203	AGGCTGTGACTTTTAGGCCA	CCAGGCCACTTTTGATCTGT
D13S17	6-FAM	13q22-31	200-230	CAAGGAGCTTGACTTCCTGG	TGTCTTGTTGTTAGCAACCC
GATA186A12	6´-FAM	13pter-qter	212-236	GCTTCCAAGCTGCCAGACTA	TTAATTAGGGCCACAACCAG
Ch. 16					
D16S521	6-FAM		156-172	GAGCGAGACTCCGTCTAA	CAGCAGCCTCAGGGTT
D16S3134	HEX		161-174	CTGGGAAATTCTGGGA	GGCCAAGGTGTTTGTT
D16S3024	6-FAM		208-248	ACATGCTGTGCCACCT	AGCTGCCAGTATATGGAGGA
D16S423	6-FAM		121-139	AACAGGCTTGAAAGTCTCTGTC	GCCTATTTGATAATGCTGTACG
D16S3021	NED		140-174	TGTGGATGTCATCACAAGG	CACAGATATGTTTCATCTAGGGAG
D16S520	6-FAM		181-197	GCTTAGTCATACGAGCGG	TCCACAGCCATGTAAACC
Chr. 18					
D18S1104	NED	18q11.2	136-160	GACATCACGCCACTCAC	TTATTCTAGATACTCTTAGGTCCCC
D18S66	HEX	18q11.2	244-262	AGAGCAAGTCCCTGCC	CAGCCTCGGAGAAACG
D18S57	6-FAM	18q12	88-110	TTCAGGGTCTTTTGAAGAGG	AGAAGGCATTAAATTTTGCA
D18S1145	NED	18q12	221-247	GGAACTAATGGCTACTGACGCCTT	CTGGCTGCAAATGGAGAGACTT

D18S1127	6-FAM	18q21	178-204	AGACCCTGGAGAGTGACTGC	TGCCCATGAACTTAGTGTGA
D18S61	6-FAM	18q22	157-183	ATTTCTAAGAGGACTCCAAACT	ATATTTTGAAACTCAGGAGCAT
GATA8C07	HEX	18q22-qter	220-260	GTCAGAGGTAGGGTATACGTG	GGTGCTGGATTACAATTGGA
GATA178F11	NED	18pter-18qter	350-410	TTAAGAATGAAATGATCTAAT	TCAGATACGTTCCCCAACAT
Chr. 21					
D21S21914	6´-FAM	21q21.1	203-223	CATTGGGCCTTCTGTCAAAT	CTGAACCAGGGCATGT
D21S1888	6-FAM	21q22.1|21q22.11	262-287	AGGCAGGAGAATCACTTGAA	AGAAAGACATTCCATCGCT
D21S1910	HEX	21q22.1	194-266	TTCTCTGGAATAAACGTGG	CACGGCAAAGTAGTATTTAATG
D21S267	NED	21q22.2	175-203	ATGGATCTGGATTTCTATCTTC	CTT CCA ACC TGG GTG A
D21S1890	HEX	21q22.3	143-173	GGTCTGACCACAGATTTCC	AAAAACACTCTGAACGATTAAGG
D21S1903	6-FAM	21q22.3	225-265	GCTTGCTGAACTCACCTG	GCCTCCCAAAGTGCTC
D21S1899	6-FAM	21q11.2-21	153-187	ACTGCATTATTCACAATAGCGAAG	CATGCTACAGGTTCATACACAGAG
D21S268	NED	21q22.2	226-250	GGGAGGCTGAAGCAGG	CCCCGCTGGCAGTGTA
Ch. 22					
D22S423	HEX		215-235	TGCAAACTCAGCCTGGA	ACCAACTGACTCGTTTAGGTCAT
D22S277	6-FAM		140-170	TTCTTGTGTGGTAGTCTGGG	TACCNACTCCCCAAACTATG
D22S283	HEX		126-152	ACCAACCAGCATCATCAT	AGCTCGGGACTTTCTGAG
D22S282	NED		144-164	TAGGGCTTGCCCAAAGAC	GGCTTGATGACACTGCATT
D22S1157	NED		193-250	ACCAGCCTGTAGTCCCA	CCAGCATAGAGCAGACATTT
D22S1158	6-FAM		218-244	ATGTCTGGACTCTAATGTTCATTG	TGTTTTACTAGGCATAATCGTTTC

8.2. OPTIMALIZACE PCR PRO CHROMOZOMY 15, 16, 22

Optimalizace zahrnovala 4 STRs markery pro každý chromozom 15, 16 a 22. Přehled vybraných STR markerů uvádí Tab 9.

Po proběhnutí teplotní gradientové PCR a úspěšné amplifikaci na agarózovém gelu byla provedena fragmentační analýza. Analýza produktů byla provedena kapilární elektroforézou. Následně byla vybrána vhodná teplota nasedání primerů podle tab. 10. Primery se stejnou teplotou nasedání byly vybrány do multiplexové reakce (tab. 11). Přípravu jednotlivých master mixů zobrazuje tab. 12. Výsledky fragmentační analýzy zoptimalizovaných primerů (SET A, B, C, D, E a F) zobrazují obrázky 18 - 23.

Tab. 9. Přehled tetranukleotidových STR markerů.

Marker	Fluorescentní barvička	Pozice	Velikost (bp)	Heterozygozita	Forward primer	Reverse primer
Chr. 16						
D16S752	HEX	16q22.3	104 - 120	0.97	AATTGACGGTATATCTATCTGTCTG	GATTGGAGGAGGGTGATTCT
D16S771	6-FAM	16q12.2	173 - 209	0.88	GTCCAAAACACCACCCTCTA	AAGTAGATCAGTCATCTTGCTGC
D16S753	6-FAM	16p11.2	248 - 272	0.90	CAGGCTGAATGACAGAACAA	ATTGAAAACAACTCCGTCCA
D16S541	HEX	16q12.1	149 - 165	0.80	CCACACCAGCGTTTTTCTAA	CACACTTTACACACACCTATACCC
Chr. 22						
D22S526	6-FAM	22q13.33	258 - 288	0.91	AGAGCAAGACTCTGTCTCAACA	TTCTCCTTCACTTTCTGCCATG
D22S684	HEX	22q12.3	232 – 256	0.83	CCCTCTCCCTCTCTTACAGG	TTCTTAGTGGGGAAGGGATC
D22S686	6-FAM	22q11.22	202 - 218	0.76	TTGATTACAGAGTGGCTCTGG	TAAGCCCTGTTAGCACCACT
D22S683	HEX	22q12.3	246 - 270	0.72	AACAAAACAAAACAAAACAAACA	GGTGGAAATGCCTCATGTAG
Chr. 15						
D15S659	6-FAM	15q21.1	176 - 204	0.85	GTGGATAGACACATGACAGATAGG	TATTTGGCAAGGATAGATACAGG
D15S189	NED	15q25.3	304	-	GGTGTTGCAGCGAGACTCT	TCCCCTTTCATTCATCCTTC
D15S217	HEX	15q12	160 - 202	0.84	GATGATAGCTGATGGATAGATGC	TCTGAAAGTATCTTTCATTTGTCC
D15S526	HEX	15q26.1	221 - 275	0.81	ACTGCACTCCAGCCTGGGT	TCCCGTGAATGTTCAAGCC

8.2.1. *VÝSLEDKY GRADIENTOVÉ PCR*

Tab. 10. Přehled výsledků teplotní gradientové PCR jednotlivých primerů**.** Žluté pozadí označuje vhodné teploty nasedání primerů.

MARKER	**Teploty**											
	50°C	**50,4°C**	**51,3°C**	**52,4°C**	**54,2°C**	**56,4°C**	**58,9°C**	**61,6°C**	**62,7°C**	**63,8°C**	**64,7°C**	**65°C**
Chr. 16												
D16S752												
D16S771												
D16S753												
D16S541												
Chr. 22												
D22S526												
D22S684												
D22S686												
D22S683												
Chr. 15												
D15S659												
D15S189												
D15S217												
D15S526												

Tab. 11 Přehled setů zahrnující STR markery pro chromozomy 15, 16 a 22.

SET A (62°C)	**SET B (54°C)**	**SET C (58°C)**	**SET D (60°C)**	**SET E (52°C)**	**SET F (50°C)**
D22S686	D22S683	D16S753	D15S217	D15S659	D15S189
D22S684	D16S771	D16S541	D15S526		
D22S526					
D16S752					

Tab. 12. Příprava master mixů SETŮ A, B, C, D, E a F.

NÁZEV SETU	1 reakce (µl)
SET A	
MasterMix	10
Q-Solution	2
Primer D22S686-R/D22S686-F	0,5/0,5
Primer D22684-R/D22684-F	1,0/1,0
Primer D22S526-R/D22S526-F	0,6/0,6
Primer D16S752-R/D16S752-F	0,9/0,9
H_2O	-
DNA	2
CELKEM	**20**
SET B	
MasterMix	10
Q-Solution	2
Primer **D16S771**-R/ **D16S771**-F	0,8/0,8

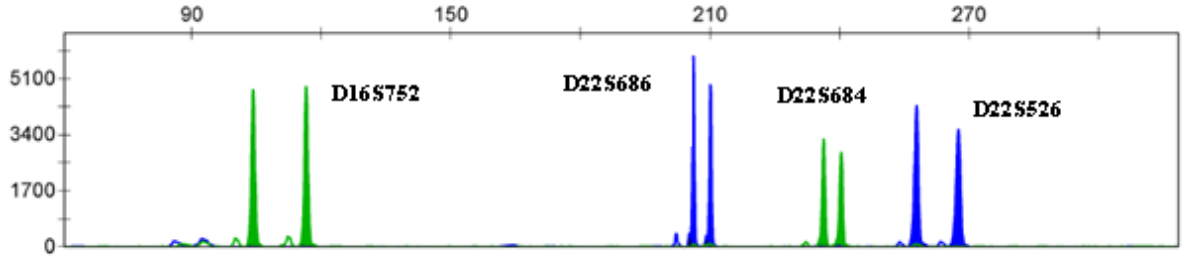
Primer **D22S683**-R/ **D22S683**-F	1,2/1,2
H_2O	2
DNA	2
CELKEM	**20**
SET C	
MasterMix	10
Q-Solution	2
Primer **D16S753**-R/ **D16S753** -F	1,0/1,0
Primer **D16S541** -R/ **D16S541** -F	1,2/1,2
H_2O	1,6
DNA	2
CELKEM	**20**
SET D	
MasterMix	10
Q-Solution	1,4
Primer **D15S217**-R/ **D15S217**-F	1,9/1,9
Primer **D15S526** -R/ **D15S526** -F	1,4/1,4
H_2O	-
DNA	2
CELKEM	**20**
SET E	
MasterMix	10
Q-Solution	2
Primer **D15S659**-R/ **D15S659**-F	2,0/2,0
H_2O	2
DNA	2
CELKEM	**20**
SET F	
MasterMix	10
Q-Solution	2
Primer **D15S189**-R/ **D15S189**-F	2,5/2,5
H_2O	1,0
DNA	2
CELKEM	**20**

8.2.2. VÝSLEDKY FRAGMENTAČNÍ ANALÝZY ZOPTIMALIZOVANÝCH PRIMERŮ

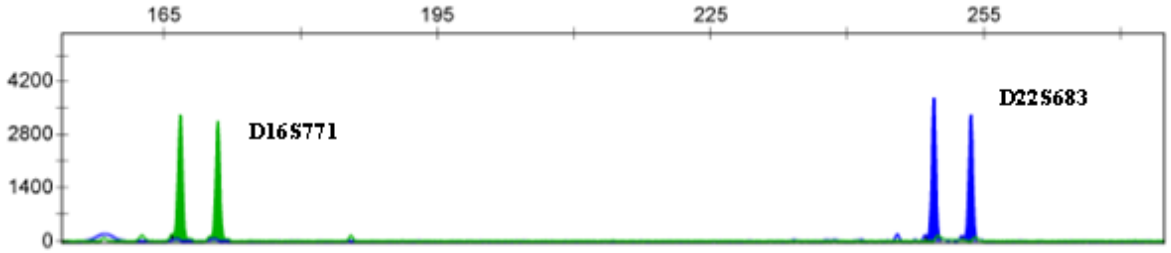
Produkty PCR reakce byly rozděleny kapilární elektroforézou, kde byl změřen fluorescenční signál. Intenzita fluorescenčního signálu závisí na množství produktu. Vzory výsledků jsou uvedeny níže. Délka fragmentů (bp) je uvedena na horizontální ose a množství produktu na ose vertikální.

Výsledek hodnotíme jako normální (dialelický heterozygotní jedinec) s poměrem píku 1 : 1 (v rozmezí od 1 : 0,7 do 1 : 1,4) pro nejméně 2 informativní STR markery na chromozom (Obr. 18 – 22) (Putzova et al, 2008).

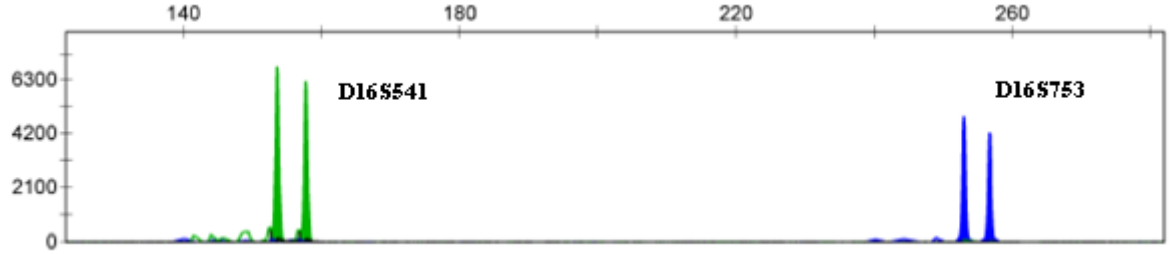
Homozygotní jedinci (alely se stejnou délkou) – mají pouze 1 pík (Obr. 23). Takový marker se považuje za neinformativní a nevhodný pro diagnostické účely.



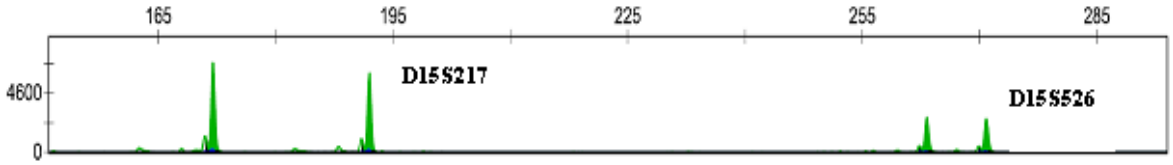
Obr. 18. Výsledek fragmentační analýzy setu A. Multiplex QF-PCR zobrazující STR markery pro chromozom 16 (D16S752) a chromozom 22 (D22S686, D22S684 a D22S526).



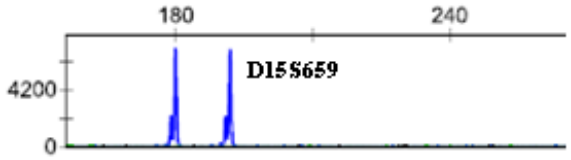
Obr. 19. Výsledek fragmentační analýzy setu B. Multiplex QF-PCR zobrazující STR markery pro chromozom 16 (D16S771) a chromozom 22 (D22S683).



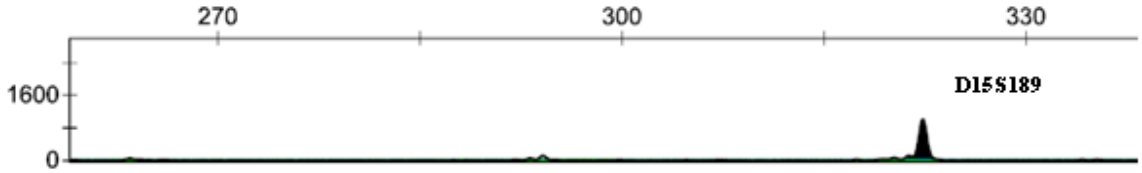
Obr. 20. Výsledek fragmentační analýzy setu C. Multiplex QF-PCR zobrazující STR markery pro chromozom 16 (D16S541, D16S753).



Obr. 21. Výsledek fragmentační analýzy setu D. Multiplex QF-PCR zobrazující STR markery pro chromozom 15 (D15S217, D15S526).



Obr. 22. Výsledek fragmentační analýzy markeru D15S659.



Obr. 23. Výsledek fragmentační analýzy markeru D15S189. Tento marker se ukázal jako zcela neinformativní (homozygotní marker) a nevhodný pro diagnostické účely.

8.2.3. VÝSLEDKY POPULAČNÍ STUDIE STR MARKERŮ

Po optimalizaci podmínek STR markerů byly do populační studie vybrány následující markery:

- pro chromozom 16: D16S752, D16S771, D16S753 a D16S541
- pro chromozom 22: D22S526, D22S684, D22S686 a D22S683
- pro chromozom 15: D15S659, D15S217 a D15S526

- pro chromozom 16: D16S752, D16S771, D16S753 a D16S541
- pro chromozom 22: D22S526, D22S684, D22S686 a D22S683
- pro chromozom 15: D15S659, D15S217 a D15S526

Z tab. 9 lze vyčíst velikost jednotlivých markerů v populaci a jejich heterozygozitu. Nejvíce informativní marker byl D16S752 (heterozygozita 0,97) a nejméně informativní D22S683 (heterozygozita 0,72).

Počet alel, délku fragmentů (bp) a výskyt jednotlivých alel v populaci ukazuje Tab. 13. Zde si lze povšimnout, že nejčastější alely v populaci (označeny v žlutém políčku) jsou u markeru: D16S752 alela 116 a 112, D16S541 alela 157 a 161, D16S771 alela 179 a 177, D16S753 alela 260 a 264, D22S526 alela 272 a 266, D22S684 alela 240 a 244, D22S686

alela 206 a 210, D22S683 alela 258 a 254, D1659 alela 196 a 192, D15S217 alela 188 a 184 a D15S526 alela 263 a 267.

Tab. 13. Vybrané markery pro populační studii. Žlutě označená políčka ukazují nejčastěji vyskytované alely.

MARKER D16S752

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6
VELIKOST (bp)	104	106	108	112	116	120
VÝSKYT (%)	5,0	1,0	17,5	29,1	34	13,4

MARKER D16S541

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5
VELIKOST (bp)	149	153	157	161	165
VÝSKYT (%)	2,5	5,0	46,25	41,25	5,0

MARKER D16S771

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16
VELIKOST (bp)	173	175	177	179	181	183	187	189	191	195	197	199	201	203	205	209
VÝSKYT (%)	4,5	11,4	15,9	17	9,1	5,7	10,2	1,1	3,4	3,4	6,8	1,1	5,7	2,5	1,1	1,1

MARKER D16S753

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
VELIKOST (bp)	248	252	256	258	260	262	264	268	272
VÝSKYT (%)	1,1	1,1	12,2	12,2	29,0	1,1	24,4	16,7	2,2

MARKER D22S526

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
VELIKOST (bp)	258	260	262	264	266	268	270	272	274	276	280	282	284	286	288
VÝSKYT (%)	2,2	2,2	2,2	10,9	3,3	13,2	1,1	14,3	5,5	18,7	3,3	9,9	9,9	1,1	2,2

MARKER D22S684

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6
VELIKOST (bp)	232	236	240	244	248	256
VÝSKYT (%)	3,6	21,7	35,0	33,7	3,6	2,4

MARKER D22S686

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6
VELIKOST (bp)	202	204	206	210	214	218
VÝSKYT (%)	17,1	1,3	39,5	38,2	2,6	1, 3

MARKER D22S683

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
VELIKOST (bp)	246	250	254	256	258	262	264	266	268	270
VÝSKYT (%)	4,2	9,7	29,2	1,4	34,7	11,1	1,4	5,5	1,4	1,4

MARKER D15S659

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
VELIKOST (bp)	176	180	182	184	188	192	194	196	200	202	204
VÝSKYT (%)	1,1	4,3	1,1	12	3,3	22,8	2,2	23,9	21,7	2,2	5,4

MARKER D15S217

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6
VELIKOST (bp)	172	180	184	188	192	196
VÝSKYT (%)	3,6	2,4	29,8	36,9	21,4	5,9

MARKER D15S526

ALELA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
VELIKOST (bp)	233	251	253	257	259	261	263	267	271	273	275	277	279	283	295
VÝSKYT (%)	1,2	5,0	1,2	2,5	7,4	3,7	22,2	16,1	14,8	1,2	11,1	7,4	1,2	2,5	2,5

9. DISKUZE

Cílem mé diplomové práce bylo ověřit použitelnost publikovaných dinukleotidových markerů pro chromozomy 13, 16, 18, 21, 22 a zjistit, zda budou vhodné pro klinické použití v prenatální diagnostice v české populaci. U těchto STR markerů, původně testovaných na americké populaci, docházelo ve větší míře k výskytu tzv. stutterů, které nebyly odstraněny ani následnou optimalizací podmínek. Výskyt vyšší úrovně stutterů může být způsoben typem repetice, smíšeným profilem nebo jinými problémy PCR (vysokým počtem cyklů PCR, větším množstvím templátové DNA) a elektroforézy. Za primární příčinu vyššího stutteru testovaných STR považuji délku jednotky repetice. U tetranukleotidových repetic se stuttery vyskytují asi u 15 %, kdežto u di- a trinukleotidových repetic je procento výskytu až 30 % (Butler, 2005). Obecně se procento stutterů snižuje s délkou a nepravidelností repetice (pentanukleotidové repetice<tetra nepravidelné<tetranukleotidové pravidelné<trinukleotidové <dinukleotidové jednotky). Dinukleotidové STR markery by mohly být nahrazeny vhodnějšími markery tetra/pentanukleotidové povahy, které již byly použity v jiných studiích (Adinolfi et al., 1997; Pertl et al., 1997, Cirigliano et al., 1999; Adinolfi et Cirigliano, 2000; Putzova et al., 2008), nebo které jsou popsány v STR databázi (http://www.veenuash.info/chromosubspl.asp nebo http://www.cstl.nist.gov/strbase/). Mezi populacemi mohou být také rozdíly ve frekvenčním zastoupení jednotlivých alel.

Dalším úkolem bylo rozšířit nové markery na chromozomy 15, 16 a 22 pro prenatální diagnostiku QF-PCR. Byly optimalizovány a vybrány 4 informativní markery pro chromozom 16, 22 a 15. Všechny markery, kromě markeru D15S189, byly informativní Tento marker byl z populační studie vyloučen.

Mezi nejvíce informativní markery patří D16S752, D22S526 a D16S753 a nejméně informativní byl marker D22S683. Při porovnání české frekvence s populací evropskou jsem došla k podobným výsledkům: marker D16S752 měl heterozygozitu pro českou populaci 0,97 (pro evropskou populaci 0,92), marker D22S526 s heterozygozitou 0,91 (pro evropskou populaci 0,94), marker D16S753 s heterozygozitou 0,90 (pro evropskou populaci 0,87), marker D22S683 měl v naší populaci heterozygozitu 0.72 (pro evropskou populaci byl výskyt tohoto markeru vyšší a dosahoval heterozygozity 0,94). Alelová frekvence a z ní odvozená heterozygozita (informativita) STR se liší mezi populacemia může ovlivnit výběr markerů pro danou populaci. Z mých výsledků vyplývá, že se naše

popualce výrazně neliší od populace evropské, a proto mohou být v české populaci použity markery, validované pro evropskou populaci

V poslední době byla provedena řada studií, která porovnává rychlou metodou QF-PCR v prenatální diagnostice s konvenčními cytogenetickými metodami. Zabývá se spolehlivostí, přesností, výhodami a nevyýhodami oproti jiným cytogenetickým metodám. Velkou klinickou studii v České Republice uskutečnila RNDr. M. Putzová, PhD. (Putzova et al., 2008), která se zabývala přítomností trizomie chromozomu 21 a dále testování běžných aneuploidií. Velmi rozsáhlá 9-tiletá studie Vincenza Cirigliana byla aplikována na 43 000 fetálních vzorků. Metoda QF-PCR odhalila 95 % všech významných klinických chromozomálních abnormalit pro chromozomy 13, 18, 21, X a Y. I další studie potvrzují přesnost, spolehlivost a rychlost metody QF-PCR. Metoda dokáže odhalit kontaminaci mateřskými buňkami (Stojilkovic-Mikic et al., 2005), mozaicismus a triploidii (Mann et Ogilvie, 2012), ale neumožní korektní analýzu pro mozaicismus, translokace, malé delece či duplikace. Tyto studie a komerční QF-PCR soupravy se zaměřují na vyšetření nejčastějších aneuploidií (chromozomů 13, 18, 21, X a Y). V mé diplomové práci jsem se zaměřila na výběr markerů pro méně běžné aneuploidie - trizomie 15, 16 a 22 a zavedla jsem nové, dosud nepoužívané markery.

10. ZÁVĚR

QF-PCR nabízí alternativní metodu ke klasickým cytogenetickým analýzám. Představuje spolehlivou a rychlou metodu k odhalení nejčastějších chromozomálních aberací bez kultivace fetálních buněk.

Výběr vhodných markerů je důležitý pro minimalizaci podílu neinformativních a nejednoznačných výsledků (Putzova et al., 2008) a může být rozdílný pro každou populaci (Guzel et al., 2012). Pro každý chromozom je třeba použít minimálně dva informativní STR markery. Použití markerů s vysokým koeficientem informativity snižuje pravděpodobnost homozygozity a tudíž neinformativních QF-PCR profilů (Pertl et al., 1997).

V diplomové práci jsem zvýšila diagnostickou efektivitu tím, že jsem rozšířila spektrum informativních STR markerů pro chromozomy 15, 16 a 22, které u nás doposud nebyly použity a zjistila populační frekvenci jejich heterozygotnich genotypů v naší populaci, aby byly do prenatální diagnostiky zavedeny nové STR markery diagnosticky nejvhodnější.

11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adinolfi M. et Crolla J. (1994). Nonisotopic in situ hybridization. Clinical cytogenetics and gene mapping applications. Adv Hum Genet **22:** 187-255.

Adinolfi M., Sherlock J., Tutschek B., Haldek A., Delhanty J. et Rodeck C. (1995). Detection of fetal cells in transcervical samples and prenatal diagnosis if chromosome abnormalities. Prenat Diagn **15:** 943-949.

Adinolfi M., Pertl B. et Sherlock J. (1997). Rapid detection fo aneuploidies by microsateliite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. Prenat Diagn **17:** 1299-1311.

Adinolfi M., Sherlock J., Cirigliano V. et Pertl B. (2000). Prenatal screening of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. Community Genet **3:** 50-60.

Adinolfi M. et Sherlock J. (2001). Prenatal detection of chromosome disorders by QF-PCR. Lancet **358:** 1030-1031.

Alfirevic Z., Sundberg K. et Brigham S. (2003). Amniocentesis and chorionic villous sampling for prenatal diagnosis. Cochrame Database Sts Rev **3:** CD003252

Bacino CA., Schreck R., Fischel-Ghodsian N., Pepkowitz S., Prezant TR. et Graham JM. Jr. (1995). Clinical and molecular studies in full trisomy 22: further delineation of the phenotype and review of the literature. J Am Med Genet **56:** 359-365.

Barlett JMS. et Stirling D. (2003). Methods in Molecular Biology: PCR Protokols, Second Edition: Grunenwald, H.: Optimization of Polymerase Chain Reactions **226:** 89-99.

Be C., Velasguez P. et Youlton R. (1997). Spontaneous abortion: cytogenetic sudy of 609 cases. Rec Med Chil **125(3):** 317-322.

Benn PA. et Collins R. (1998). Abnormal maternal serum inhibin-A levels in trisomy 16 mosaic pregnanies. Am J Hum Genet **65:** A172.

Bili C., Divane A., Apessos A. et al. (2002). Prenatal diagnosis of common aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. Prenat Diagn **22(5):** 360-365.

Bocian E., Jakubów-Durska K. et Mazurczak T. (2001). Retrospektywna analiza 1043 wyników prenatalnych badán cytogenetycznych w kontekście przydatności diagnostycznej FISH interfazowej. Gin Pol

Buckleton J., Triggs CH., Walsh M., S., J. (2005). Forensic DNA Evidence Interpretation, CRC press.

Butler J. M. (2005). Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Elsevier Academic Press.

Carothers AD., Hecht CA. et Hook EB. (1999). International variation in reported livebirth prevalence rates of Down syndrome, adjusted for maternal age. J Med Genet **36:** 386–393.

Canfield MA., Honein MA., Yuskiv N., Xing J., Mai CT., Collins JS., Devine O., Petrini J., Ramadhani TA., Hobbs CA. et Kirby RS. (2006). National estimates and race/ethnic-specific variation of selected birth defects in the United States, 1999–2001. Birth Defects Res. A Clin Mol Teratol **76:**747–756.

Cirigliano V., Sherlock J., Conway G., Quilter C., Rodeck Ch. et Adinolfi M. (1999). Rapid detection of chromosome X and Y aneuploidies by quantitatove fluorescent PCR. Prenat Diag **19:** 1099-1103.

Cirigliano V., Lewin P., Szpiro-Tapies S., Fuster C. et Adiolfi M. (2001a). Assessment of new markers fot the rapid prenatal detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). Ann Hum Genet **65:** 421-427.

Cirigliano V., Ejarque M., Cañadas M., Paz Lloveras AP., del Mar Perez M., Fuster C. et Egozcue J. (2001b). Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. Mol Hum Reprod **7:** 1001-1006.

Cirigliano V., Voglino G., Cañadas MP., Marongiu A., Ejarque M., Ordoñez E., Plaja A., Massobrio M., Todros T., Fuster C., Campograde M., Egozcne J. et Adinolfi M. (2004). Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18.000 consecutive clinical samples. Mol Hum Reprod **10:** 839-846.

Cirigliano V., Voglino G. et Adinolfi M. (2005). Non invasive screening and rapid QF-PCR assay can greatly reduce the need of cytogenetic analysis in prenatal diagnosis. Repr Biomed Online **11**: 671-673.

Cirigliano V., Voglino G., Marongiu A., Cañadas P., Ordoñez E., Lloveras E., Plaja A., Fuster C. et Adinolfi M. (2006). Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: Evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications. Ann N. Y. Acad Sci; **1075:** 288-298.

Corporation, T. P.-E. (1999). AmpFISTR SGM Plus^{TM} PCR Amplifiction Kit – User´s Manual.

Crowe CA., Schwartz S., Black CJ. et Jaswaney V. (1997). Mosaic Trisomy 22: a case presentation and literature review of trisomy 22 phenotypes. Am J Med Genet **71:** 406-413.

D'Aquila RT., Bechtel LJ., Videler JA., Eron JJ., Gorczyca P. et Kaplan JC. (1991). Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. Nucleic Acids Res **19:** 3749.

Devis AS., Velinov M., Kamath MV. et al. (1993). Variable clinical expression of mosaic trisomy 16 in the newborn infant. Am j Med Genet **47:** 294-298.

Divane A., Carter NP., Spathas DH., Ferguson-Smith MA. (1994). Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy from uncultured amniotic fluid cells using 5 colour fluorescence *in situ* hybridization. Prenat Diagn **14:**1061-1069.

Donaghue C., Roberts A., Mann K. et Ogilvie C. M. (2003). Development and target application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance. Prenat Diagn **23:** 201-210.

Down J. L. H. (1866). Observations on an ethnic classification of idiots. Clin. Lect. Rep. London Hosp. **3:** 259.

Edwards JH., Harnden DG., Cameron AH., Crosse VM. et Wolff OH. (1960). A new trisomic syndrome. Lancet **1:** 787-790.

Eiben B., Trawicki W., Hammans W., Goebel R. et Epplen JT. (1998). A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridisation (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. Prenat Diagn **18:** 901-916.

Ehrich M., Deciu C., Zwiefelhofer T. et al. (2011). Noninvasive detection of fetaltrisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clonical setting. Am J Obstet Gynecol. **204:** 205. e1-11.

Engel E. et Antonarakis SE. (2002). Genomic imprinting and uni-parental disomy in medicine: clincla and molecular aspects: New York: Wiley-Less.

Erlich HA., Gelfand D. et Sninsky JJ. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. Science **252:** 1643–1651.

Evans MI., Henry GP., Miller WA, Bui TH., Snidjers RJ., Wapner RJ., Miny P., Johnson MP., Peakman D., Johnson A., Nicolaides K., Holzgreve W., Ebrahim SA., Babu R. et Jackson L. (1999). International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. Hum Reprod **14(5):** 1213-1216.

Evans MI., Henry GP., Miller WA., Bui TH., Snidjers RJ., Wapner RJ., Miny P., Johnson MP., Peakman D., Johnson A., Nicolaides K., Holgreve W., Ebrahim SAD., Babu R. et Jackson L. (2000).

International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. Hum Reprod **14:** 1213-1216.

Fantel AD., Shepard T.H. et Valdheim-Roth C. (1980). Embryonic and fetal phenotypes: prevalence and other associated factors in a large study of sponatenoues abortion. In: Porter, S. H., Hook E. B.: Human embryonic and fetal death. New York, Acad. Press, 71-87.

Findlay I., Taylor A., Quirke P., Frazier R. et Urquhart A. (1997). DNA fingerprinting from single cells. Nature **389:** 555-556.

Findlay I., Toth T., Matthews P., Marton T., Quirke P. et Papp Z. (1998a). Rapid trisomy diagnosis (21, 18 and 13) using flurescent PCR and short tandem repeats: applications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis. J Assist Reprod Genet **15:** 266-275.

Findlay I., Toth T., Matthews P. et Quirke P. (1998b). Multiple genetic diagoses from single cells using mulitplex PCR: reliability and allele dropout. Prenat Diagn **18:** 1413-1421.

Findlay I., Toth T., Matthews P. et al. (1998): Rapid determination of trisomy 18 parental origin using fluorescent PCR and small tandem repeat markers: case reports. Clin Genet; **53:** 92-95.

Frances K. Wiseman, Kate A. Alford, Victor LJ. Tybulewicz and Elizabeth MC. Fisher (2009). Down syndrome-recent progress and future prospects. Human Molecular Genetics, Vol. 18, Review Issue 1. R75-R83.

Garber A., Carlson D., Schreck R. et al. (1994). Prenatal diagnosis and dysmorphic findings in mosaic trisomy 16. *Prenat Diagn* **14:** 257-266.

Gersen S. L. et Keagle M. B. (2005). The principles of clinical cytogenetics. Basic laboratory procedures. New Jersey Humana Press Inc.

Gilbertson NJ., Taylor JW. et Kovar IZ. (1990). Mosaic trisomy 16 in love newborn infant. Arch Dis Child **65:** 388-389.

Gill P., Sparkes R. et Kimpton C. (1997). Development of guidelines to designate alleles using an STR mulitplex system. Forensic Science International **89:** 185-197.

Godwin W., Linacre A. et Hadi S. (2007). An introduction forensic genetics. Wiley.

Grimshaw GM., Szczepura A., Hultén M., MacDonald F., Nevin NC., Sutton F. et Dhanjal S. (2003). Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. Health Technol asses **7:** 1-77.

Guzel Al., Yilmaz MB, Demirhan O, Pazarbasi A, Kocaturk-Sel S, Erkoc MA, Inandiklioglu N, Ozgunen FT et Sariturt C. (2012). Rapid detection of fetal aneuploidies by quantitative fluorescnet-polymerase chain reaction for prenatal diagnosis in the Turkish population. Balkan Journal of Medical Genetics. **15 (1):** 11-18.

Hajianpour M. J. (1995). Postnatallyconfirmed trisomy 16 mosaicism: follow-up on a previously reported patient. Prenat Diagn **15:** 877-879.

Hauge X. Y. et Litt M. (1993). A study of the origin of shadow nabds seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the Per. Human Molecular Genetics **2:** 411-415.

Henegariu O., Heerem N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H. et Vogt P. H. (1997). Biotechniques **23:** 504 – 511.

Hirschhorn K., Lucas M. et Wallace I. (1973). Precise identificaion of various chromosomal abnormalities. Ann Hum Genet **36:** 375-379.

Hook FB. (1992). Chromosome abnormalities**. In: Brock P. J. H., Rodeck CH., Ferguson-Smith M. A. (eds).** Prenatal diagnosis and screenin. Edingurg: Churcill Livinstone.

Hromadníková I., et Daněk M. (2000). Fetální buňky - zdroj neinvazivní prenatální diagnostiky. Postgraduální medicína **4:** 428-431.

Hsu L. Y. F., Shapiro LR., Gertner M., Lieber E. et Hirschhorn K. (1971). Trisomy 22: a clinical etnity. J Pediatr **79:** 12-19.

Hsu WT., Shchepin D. A., Mao R. et al (1988). Mosaic trisomy 16 ascertained through amniocentesis: ecaluation of 11 new cases. Am J Med Genet **80:** 473-480.

Hultén MA., Dhanjal S., Pertl B. (2003). Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders? Advantages and disadvatages of the molecular methods FISH and QF-PCR. Reproduction **126(3):** 279-297.

Chou, Q., Russell, M., Birch, DE., Raymond, J. et Bloch W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Research **20 (7):** 1717 – 1723.

Innis MA., Gelfand DH., Sninsky JJ. et White TJ. (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press.

Kenneth H. Roux (2009). Optimization and Troubleshooting in PCR. PCR Primer. A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harb Protoc, Vol. 4, Issue 4.

Kingston H. M. (2002). ABC of Clinical Gnetics.London: BMJ Books.

Klinger K., Landes G., Shook D., Harvey R., Lopez L., Locke P., Lerner P., Osathanondh R., Leverone B., Houseal T. et al. (1992). Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). Am J Hum Genet **51(1):** 55-65.

Kočárek E. (2007). Molekulární biologie. Brno.

Kuo WL., Tenjin H., Segraves R., Pinkel D., Golbus MS. et Gray J. (1991). Detection of aneuploidy involving chromosome 13, 18 or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. Am J Hum Genet **49:** 112-119.

Ladonnne J., Gaillard D., Carre-Pigeon F. et Gabriel R. (1996). Fryns syndrome phenotype and trisomy 22. Am J Med Genet **61:** 68-70.

Lejeune J., Gautier M. et Turpin R. (1959). Les chromosomes humains en culture de tissus. C. R. Acad Sci **248:** 602–603.

Leung WC., Lau ET., Lao TT. et Tang MH. (2001). Can amnio-polymerase chain reaction alone replace conventional cytogenetic study for women with positive biochemical screening for fetal Down syndrome? Obstet Gynecol **101:** 856-861.

Leung WC., Lau ET., Lao TT. et Tang MH. (2004). Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis? Expert Rev Mol Diagn **4:** 333-337.

Levett LJ.,Liddle S. et Meredith R. (2001). A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. Ultrasound Obstet Gynecol **17:**115–118.

Lewin P., Kleinfinger P., Bazin A., Mossafa H., Szpiro-Tapia S. (2000). Defining the efficiency of fluorescence in situ hybridization on uncultered amniocytes on a retrospective cohort of 27407 prenatal diagnoses. Prenat Diagn **20 (1):** 1-6.

Liehr T, Ziegler M. (2005): Rapid prenatal diagnostics in the interphase nucleus: procedure and cut-off rates. J Histochem Cytochem **53:** 289-291.

Lindor NM., Jalal SM., Thibodeau SN., Bonde D., Sauser KL. et Karnes PS. (1993). Mosaic trisomy 16 in a thriving infant: maternal heterodisomy for chromosome 16. Clin Genet **44:** 185-189.

Lippe BM. et Saenger PH. (2002). Turner syndrome. Pediactric Endocrinology. Saunders, Philadeplhia.

Lo Y. M., Chan K. C. A., Sun H. et al. (2010). Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and Mutational Profile of the Fetus. Sci Transl Med **61(2):**61-91.

Loucký J. et Zemánek M. (2012). Neinvazivnní prenatální diagnsotika nejčastějších chromozomálních aneuploidií – od teorie k praxi. Actual Gyn. **4:** 99-100.

Macek M., Jobert S., Chudoba D., Novotna D., Krebsova A. et Macek M. Jr. (1998). Rapid prenatal diagnosis for the most frequent chromosome-induced congenital defects by quantitative fluorescent PCR. Ces Pediatrie **53:** 665-669.

Maniatis, T., Jeffrey, A. et Van deSade H. (1975). Chain lenght determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry **14:** 3787 – 3794.

Mann K., Fox SP., Abbs SJ., Yau SCH., Scriven PN., Docherty Z. et Ogilvie CM. (2001). Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK national health service and implications for the future of prenatal diagnosis. Lancet **358(9287):** 1057-1061.

Mann K., Donaghue C., Fox SP., Docherty Z. et Ogilvie CM. (2004). Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. Eur J Hum Genet **12:** 907-915.

Mann K. et Ogilvie CM. (2012). OF-PCR: Application, overview and review of the literature. Prenatal Diagnosis **32(4):** 309 – 314.

Mansfield ES. (1993). Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. Hum Mol Genet **2(1):** 43-50.

Mardesic T., Nejezchlebova L., Subrt I., Mullr P., Voboril J., Zetova I., Grocholova B. et Mikova M. (1996). Chromosomal aberrations in the etiology of abortions after infertility treatment using IVF and ET. Česká Gynekol **61(3):** 142-143.

Markoulatos P., Siafakas N. et Moncany M. (2002). Journal of Clinical Laboratory Analysis **16:** 47 – 51.

Miller C. R., Joyce P. et Waits L. P. (2002). Assesing Allelic Dropout and Genotype Reliability Using Maximum Likelihood. Genetics **160(1):** 357 – 366.

Milunsky A. et Milunsky J. (2011). Genetic Disorders and the Fetus Diagnosis, Prevention and Treatment. Oxford: Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons.

Moretti T., Koons B. et Budowic B. (1998). Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaqGold™ DNA polymerase. Biotechniques **25:** 716 – 722.

Morris JS., Scott SK. Et Dolan RJ. (1999). Saying it with feeling: neural responses to emotional vocalisation. Neuoropsychologia **37:** 1155-1163.

Muntau A. C. (2009). Pediatrie. Praha: Grada Publishing.

Murthy SK., Malhotra AK., Mani S., Shara ME., Al Rowaished EE., Naveed S., Alkhayat AI. et Alali MT. (2007). Incidence of Down syndrome in Dubai, UAE. Med Princ Pract **16:**25–28.

Nussbaum R. L., McIness R. R. et Willard F. (2004). Klinická genetika. Praha: Triton.

Ogilvie CM. (2003). Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. Path Biol **51:** 156-160.

Ochshorn Y., Bar-Shira A., Jonish A. et Yaron Y. (2006). Rapid Prenatal Diagnosis of Aneuploidy for Chromosome 21, 18, 13, and X by Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction. Fetal Diagn Ther **21(4):** 326-331.

O'Nuallain S., Flanagan O., Raffat I., Avalos G. et Dineen B. (2007). The prevalence of Down syndrome in County Galway. Ir Med J **100:**329–331.

Patau K., Smith D. W., Therman E., Inhorn S. L. et Wagner HP. (1960). Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. Lancet **i,** 790–793.

Pena SDJ. (1998). Mini-review: Molecular Cytogenetics I: PCR-based diagnosis of human trisomies using computer-assisted laser densitometry. Genet and Mol Biol **21(3):** 317-322:

Pertl B., Yau SC., Sherlock J., Davies AF., Mathew CG. et Adinolfi M. (1994). Rapid molecular method for prenatal detection of Down´s syndrome. Lancet **343(8907):** 1197-1198.

Pertl B., Kopp S., Kroisel PM., Häusler M., Sherlock J., Winter R. et Adinolfi M. (1997). Quantitative fluorescent polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection if common aneuploidies and fetal sex. Am J Obstet Gynaecol. 899-906.

Pertl B. et Adinolfi M. (1998). Diagnosis of chromosomal aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. In Lo YMD: Methods in molecular medicine: Clinical application of PCR **(16):** 287-299.

Pertl B., Kopp S., Kroisel PM., Titui L., Brambati B. et Adinolfi M. (1999a). Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. J Med Genet **36:** 300-303.

Pertl B., Pieber D., Lercher-Hartlieb A., Orescovic I., Haeusler M., Winter R., Kroisel P. et Adinolfi M. (1999b). Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative PCR on fetal smaples from mothers at high risk for chromosome disorders. Mol Hum Reprod **5 (12):** 1176-1179.

Pertl B., Sekizawa A., Samura O., Orescovic I., Rahaim PT. et Bianchi BW. (2000). Detection of male and female fetal DN in maternl plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. Hum Genet **106:** 45-49.

Pletcher BA., Sanz MM., Schlessel JS. et al. (1994). Postnatal confirmation of prenatally diagnosed trisomy 16 mosaicism in two phenotypically abnormal liveborns. Prenat Diagn **14:** 933-940.

Preis K., Ciach K. et Swiatkowska-Freund M. (2004). The risk of complications of diagnostic and therapeutic cordocentesis. Gin Pol **75(10):**765-769.

Pridjian G., Gill WL. et Shapira E. (1995). Goldenhar sequence and mosaic trisomy 22. Am J Med Genet **59:** 411-413.

Pritchard DJ. et Korf BR. (2007). Základy lékařské genetiky. Praha: Galén.

Putzova M., Pecnova L., Dvořáková L., Soldatová I., Goetz P. et Stejskal D. (2008). OmniPlex- a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci un the Czech population. Prenat Diagn **28:** 1214-1220.

Roberts E., Ely A., Hulten M et Davison EV. (1999). The impact of FISH/PCR technology on routine prenatal diagnoss for chromosome abnormality. Cytogenet Cell Genet **85:** 57-58.

Robinson WP. et Kalousek DK. (1996). Mosaicism most likely accounts for extended survival trismy 22. Am J Med Genet **62:** 100.

Robinson WP., Bernasconi F., Lau A. et McFadden DE. (1999). Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of entertainment. Am J Med Genet **84:** 34.

Roztočil A. kolektiv (2008). Moderní porodnictví. Praha: Grada..

Sadler T. W. (2011). Langmanova lékařská embryologie. Praha: Grada.

Saadí AV., Kushtagi P., Gopinath PM et Satyamoorthy K. (2010). Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) for Prenatal Diagnosis of Chromosomal Aneuploidies. Int J Hum Genet **10(1-3):** 121-129.

Saiki RK., Gelfand DH., Stoffel S., Scharf SJ., Higuvhi R., Horn GT., Mullis KB. Et Erlich H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239:** 487 - 91.

Sambrook J., Fritsch EF. et Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Vol. 1, 2, 3. New York: Cold Spring Harbor.

Samura O., Pertl B., Sohda S., Johnson KL., Sekizawa A., Falco VM., Elmes RS. et Biancha BW. (2000). Female fetal cells in maternal blood: use of DNA polymorphisms to prove origm. Hum Genet **107:** 28-32.

Seemanová E. (2002). Genetická syndromologie. Časopis lékařů českých **141:** 299-303.

Sherlock J., Cirigliano V., Petrou M., Tutschek B. et Adinolfi M. (1998). Assessment of daignostic quantitative fluorescent mulitplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. Am Hum Genet **62:** 9-23.

Shuber AP., Grondin VJ. et Klinger KW. (1995). Genome Research **5:** 488 – 493.

Schlotter C. et Tautz D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research **20:** 211-215.

Schmidt W., Jenderny J., Hecher K. et al. (2000). Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. Mol Hum Reprod **6(9):** 855-860.

Schoske R., Vallone PM., Ruitberg, CM. et Butler JM. (2003). Analytical Bioanalytical Chemistry **375:** 333 – 343.

Schutzbank TE. et Stern HJ. (1993). Principles and applications of the polymerase chain reaction. JIFCC 5, No. **3:** 96–104.

Sršeň S. et Sršňová K. (2000). Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata. Osveta.
Stembalska A., Ślezak R., Pesz K., Gil J. et Sasiadek MM. (2007). Prenatal diagnosis – principles of diagnostic procedures and genetic counseling. Folia Histochemica et Cytobiologica **45:** 11-16.

Stembalska A., Ślezak R. et Sasiadek MM. (2005). Badania prenatalne. Fam Med Prim Care Rev **7:** 18-24.

Stojilkovic-Mikic T., Mann K., Docherty Z. et al. (2005). Maternal cell contamination of prenatal samples assessed by QF-PCR genotyping. Prenat Diagn **25(1):** 79-83.

Šmarda J., Doškař J., Pontůček R., Růžičková V. et Koptíková J. (2008). Metody molekulární biologie. Brno.

Takagi M., et al. (1997). Charakterization of DNA polymerase from Pyrococcus sp. Strain KOD1 and its application to PCR. Applied and Environmetal Microbiology **63:** 4504 – 4510.

Tepperberg J., Pettenati MJ., Rao PN. et al. (2001). Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review study and review of the literature. Prenat Diagn; **21:** 293-301.

Toth T., Findley I., Papp C. et al. (1998). Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase reaction. J Med Genet **35:** 126-129.

Tutschek B., Sherlock J., Halder A., Delhanty J., Rodeck C. et Adinolfi M. (1995). Isolation of fetal cells from transcervical samples by micromanipulation: molecular confirmation of them fetal origin and diagnosis of fetal aneuploidy. Prenat Diagn **15:** 951-960.

Tutschek B., Reinhard J., Kögler G., Wernet P. et Niedracher D. (2000). Clonal ulture of fetal cells from maternal blood. The Lancet **356:** 1736-1737.

Valero R., Marfany G., Gil-Benso R, De los Angeles Ibánez M., López-Pajar I, Prieto F, Rulilan G., Sarret E. et Gonzáleuz-Duarte R. (1999). Molecular charakterization of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. J Med Genet **36:** 694-699.

Verma L., Macdonald F., Leedham P. McConachie M., Dhanjal S. et Hultén M. (1998). Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down´s syndrome. Lancet **352:** 9-12.

Verri A., Cremante A., Clerici F., Destefani V., Radicioni A. (2010). Klinefelter´s syndrome and psychoneurologic function. Mol Hum Reprod **16(6):** 425-33.

Visootsak J. et Graham JM Jr. (2006). Klinefelter syndrome and other sex chromosome aneuploidies. Orphanet J Rare Dis **1:** 42.

Voytas D. (2001). Agarose gel electrophoresis. Curr Protocs Mol Biol. Chapter 2: Unit 2.5 A.

Wahab A., Bener A. et Teebi AS. (2006). The incidence patterns of Down syndrome in Qatar. Clin Genet **69:** 360–362.

Ward BE., Gersen SL., Carelli MP., McGuire NM., Dackowski WR., Weinstein M., Sandlin C., Warren R et Klinger KW. (1993). Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: Clinical experience with 4,500 specimens. Am J Hum Genet **52(5):** 854-865.

Weismanová E., Weismann P., Vizváryová M., Lehotská, V. Križanová O., Repiská V. et Kaušitz J. (2002). New approach to human high-risk papillomavirus (HR-HPV) genotyping. Neoplazma **49(4)**: 247-223.

White, TJ., Madej, R., Persing, DH. (1992). The polymerasechain reaction: clinical applications. Adv Clin Chem **29:** 161–196.

Whiteman DAH. et Klinger K. (1991). Efficiency of rapid in situ hybridization mezhods for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities causing birth defects. Am J Hum Genet **49:** A1279.

Wright C. (2009). Cell-free nucleicacids for non-invasive prenatal diagnosis. Report of the UK Expert Working Group. CHG Foundation.

Zaslav AL., Fallet S., Brown S., Ebert R., Fleischer A., Valderama E. et Fox JE. (1998). Prenatal diagnosis of low level trisomy 15 mosaicism: review of literature. Clin Genet **53:** 286.

Zima T. (2000). Laboratorní diagnostika. Praha: Galén.

Internetové zdroje:

http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Compact_v3,_CS.pdf

http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Devyser_Extend,_CS.pdf

http://www.aneufast.com/files/ANEUFASTUsersManual%20July%202007%20nm.pdf

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/cms_064677.pdf

http://www.gate2biotech.cz/qfpcr-nova-metoda-prenatalni-diagnostiky/

http://www.imalab.cz/clanek/187-vysetreni-aneuploidii-chromozomu-13-18-21-x-a-y-metodou-qfpcr-tzv-amniopcr.aspx

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/cms_064677.pdf

http://www.vfn.cz/priloha/510a572e4f0e9/tz-20-let-centra-fetalni-mediciny-15-03-13-rozsireni-ok.pdf

http://www.gate2biotech.cz/vysetreni-fetalni-dna-z-krve-matky-prinasi-nove-moznosti-v-prenatalni-diagnostice/

http://www.pentagen.cz/en/QF-PCR/Uniparentalni-disomie-15/

Obrázky:

http://www.genscript.com/molecule/M102O-100_bp_DNA_Ladder_original_format.html.

http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz.

http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

http://www.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/genetique/notesgenet/notesgenet_9.htm.

http://www.e-laboratoria.pl/media/catalog/product/cache/1/thumbnail/600x600/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/f/a/falc_termocycler_foto16.jpg