UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Analýza mtDNA pomocí LightCycleru® 480 a možnosti využití ve forenzní genetice

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Klusoňová Ph.D.

Hradec Králové 2011 Lucie Voráčková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.“

V Hradci Králové, dne 15.8.2011 Lucie Voráčková

Poděkování

Děkuji paní RNDr. Haně Klusoňové Ph.D. za vedení a cenné rady při přípravě a psaní této práce.

Dále chci poděkovat pracovníkům Oddělení genetiky Kriminalistického ústavu Praha, zejména Mgr. Pavle Coufalové a Mgr. Alici Reslové, za jejich odborné poznatky a pomoc při zpracování podkladů k této práci.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Lucie Voráčková

Školitel: RNDr. Hana Klusoňová Ph.D.

Název bakalářské práce: Analýza mtDNA pomocí LightCycleru® 480 a možnosti využití ve forenzní genetice

Cílem teoretické části této práce je poskytnout základní přehled o mitochondriální DNA. Vzhledem k poměrně vysoké náročnosti analýzy mtDNA Sangerovou sekvenční metodou (jak po stránce časové tak finanční) je snahou mnoha forenzních laboratoří hledat nové metodické postupy v této analýze. Proto cílem praktické části je zjistit možnosti využití metody High resolution melting (HRM) prováděné pomocí zařízení LightCycler® 480 při analýze mtDNA ve forenzní praxi.

V praktické části jsme nejprve uvedli základní informace o metodách využívaných při analýze mtDNA ve forenzní genetice. Dále jsme provedli optimalizaci metody High resolution melting pro oblast HVI mtDNA prováděné na zařízení LightCycler® 480 a testovali metodu na pěti reprezentativních bukálních stěrech náležících k třem různým haplotypům.

Metodou HRM jsme úspěšně rozlišili jednotlivé haplotypy mtDNA v oblasti HVI. Jedná se o pilotní studii, pro zavedení této screeningové metody do forenzní praxe je nutné provést další testování u většího počtu vzorků pro nejrůznější haplotypy, u vzorků s nízkou koncentrací mtDNA, případně metodu rozšířit také o oblast HVII.

Klíčová slova: forenzní genetika, mitochondriální DNA, LightCycler® 480, High resolution melting

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculta of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Lucie Voráčková
Supervizor: RNDr. Hana Klusoňová Ph.D.
Title of bachelor thesis: LightCycler® 480 for mtDNA analysis and its use in forensic genetics

The aim of the theoretical part of the presented Bachelor´s thesis is to provide a basic overview of mitochondrial DNA. The Sanger sequencing method is wildly used for the mitochondrial DNA analysis but it has few negatives that have to be mention (e. g. high financial and time demands) and therefore other molecular genetics techniques instead of Sanger should be tested. High resolution melting method and LightCycler® 480 instrument might be very useful tool for the mitochondrial DNA analysis.

The aim of the practical part of the presented Bachelor´s thesis is to provide methods that are commonly used in the forensic genetics. Beside we present major possibilities of the LightCycler® instrument usage with the accent to sequence variability mitochondrial DNA analysis. We perform the optimization of the method HRM by the use of the LightCycler® 480 instrument. Five representative samples with three various haplotypes mtDNA were tested in HVI region for the sequence variability.

We successfully determined haplotypes mtDNA in HVI region of all samples. It´s a primary study, then for implementation in the forensic routine it´s necessary perform testing for more samples with different haplotypes, low amounts of mtDNA and extend the method for the region HVII.

Key words: forensic genetics, mitochondrial DNA, LightCycler® 480, High resolution Meeting

Seznam použitých zkratek:

Zkratka	Anglický význam	Český překlad
A	adenine	adenin
bp	base pair	páry bazí
C	cytosine	cytosin
CRS	Cambridge Reference Sequence	Cambridgeská referenční sekvence
ddNTP		dideoxyribonukleotid trifosfát
DNA	deoxyribonucleic acid	kyselina deoxyribonukleová
dNTP		deoxyrinukleotid trifosfát
dsDNA	double-stranded DNA	dvouvláknová DNA
EDTA		ethylendiamintetraoctová kyselina
EMBL	European Molecular biology Laboratory	
G	guanine	guanin
HRM	high resolution melting	analýza křivky tání s vysokým rozlišením
HVRI, II, III	hypervariable region I, II, III	hypervariabilní oblast I, II, III
mtDNA	mitochondrial DNA	mitochondriální DNA
nDNA	nuclear DNA	jaderná DNA
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonucleic acid	kyselina ribonukleová
rRNA	ribosomal DNA	ribosomální RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate	dodecyl sulfát sodný (laurylsíran sodný)
SMGF	the sorenson molecular genealogy foundatin	
ssDNA	single-stranded DNA	jednovláknová DNA
T	thymine	thymin

Obsah

Úvod **9**

Zadání (cíle) bakalářské práce **10**

I. Teoretická část **11**

1. DNA **11**

1.1 Struktura DNA 11

1.2 Funkce DNA 12

1.2.1 Nekódující DNA *12*

1.2.2 Kódující DNA *12*

2. Jaderná DNA **13**

2.1 Stavba a funkce buněčného jádra 13

2.2 Chromozómy 13

3. Mitochondriální DNA **14**

3.1 Stavba mitochondrií 14

3.2 Struktura lidské mtDNA 15

3.2.1 Shrnutí rozdílů jaderné a mitochondriální DNA *16*

3.3 Mitochondriální dědičnost 17

3.4 Hypervariabilní oblasti 18

3.5 Haploskupiny 19

II. Praktická část **20**

1. Analýza mtDNA **20**

1.1 Příprava vzorku 20

1.2 Extrakce (izolace) a purifikace vzorku 21

1.2.1 Adsorpce na silikát *22*

1.3 Amplifikace mtDNA pomocí PCR 23

1.4 Sekvenace DNA 25

1.5 Databáze mtDNA 27

2. Hlavní možnosti analýzy pomocí LightCycleru® 480 ..... **28**

2.1 Kvantifikace 28

2.1.1 Princip real-time PCR *28*

2.1.2 Sondy používané v real-time PCR *29*

2.1.3 Analýza absolutní kvantifikace *30*
2.1.4 Analýza relativní kvantifikace *31*
2.2 Genotypizace 32
2.2.1 Analýza křivky tání (Tm Calling analýza) *32*
2.2.2 High resolution melting - HRM (Analýza křivky tání s vysokým rozlišením) *33*
3. Vlastní práce 36
3.1 Materiál 36
3.2 Metody 36
3.3 Výsledky a diskuze 39
Závěr 41
Seznam doporučené literatury 42
Internetové zdroje 46

Úvod

Genetika, jako mladý přírodovědný obor, je jedním z odvětví, které jdou nejvíce kupředu.

Znalost genetické informace se kromě lékařství využívá například v zemědělství či kriminalistice. Forenzní genetika je specifický obor genetiky, který využívá poznatky z molekulární biologie, biochemie a řady dalších příbuzných biologických disciplín k identifikaci osob, stanovení příbuznosti a dalším genetickým testům určeným především pro důkazní účely. Pro potřeby objasňování trestní věci se zkoumá lidský biologický materiál obsahující úseky DNA, které jsou u každého jedince specifické (jedinečné) a neopakovatelné (výjimku tvoří pouze jednovaječná dvojčata).

Oddělení genetických expertiz provádí standardní analýzu jaderné DNA, která vede k individuální identifikaci osoby. Porovnáním srovnávacích vzorků se stopami lze jednoznačně určit osobu, jejíž biologický materiál byl zajištěn na místě trestného činu nebo lze identifikovat neznámou osobu. Dále realizuje speciální analýzy Y-chromozómu, X-chromozómu a mitochondriální DNA. Tyto analýzy neumožňují individuální identifikaci a používají se ve zvláštních případech většinou jako doplňková analýza ke standardní analýze jaderné DNA (http://www.policie.cz/clanek/celorepublikove-utvary-kriminalisticky-ustav-praha-zpravodajstvi-test-3.aspx?q=Y2hudW09Mw%3d%3d).

Mitochondriální DNA analýza neumožňuje individuální identifikaci jak je tomu u nDNA, slouží „pouze“ k určení skupinové příslušnosti. Dědí se po maternální linii, tudíž osoby jedné maternální linie mají shodnou sekvenci mtDNA (podobně platí i pro analýzu chromozómu Y). Analýza mtDNA vyžaduje náročnější metodiku vyhodnocování dat, než je tomu u ostatních metod, ale přesto může být velmi užitečná ve forenzním vyšetřování. Analýza mtDNA přináší i některé výhody, a to zejména při dlouhodobém uložení tělesných pozůstatků v zemi, kdy dochází k rychlé degradaci jaderné DNA, kterou již po několika letech nelze využít. Mitochondriální DNA je stabilnější a je přítomna v buňce ve větším počtu identických kopií (cca 500 kopií), což zvyšuje pravděpodobnost k nalezení úseků vhodných ke zkoumání.

Analýza mtDNA se v kriminalistice uplatňuje zejména pro identifikaci osob z lidských pozůstatků a k objasnění příbuzenských vztahů. Mimo kriminalistiku slouží k řešení otázek původu a migrace člověka.

Zadání (cíle) bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je přinést přehledný a souhrnný pohled na analýzu mtDNA ve forenzní genetice a ověřit metodu HRM s využitím LightCycleru® 480 pro určení sekvenční variability mtDNA v oblasti HVI u zkušebních vzorků.

Ve své práci se nejdříve budu věnovat základním informacím o mtDNA a analýze mtDNA. V dalších kapitolách se budu snažit popsat hlavní možnosti využití zařízení LightCycler® 480 s důrazem na analýzu sekvenční variability mtDNA. Práce je doplněna výsledky testování metody HRM pomocí LightCycleru® 480 pro určení sekvenční variability mtDNA v oblasti HVI u pěti reprezentativních vzorků.

I. Teoretická část

1. DNA

1.1 Struktura DNA

DNA (neboli **deoxyribonukleová kyselina**) je nukleová kyselina obsažená především v buněčném jádře (ale i v jiných buněčných organelách – mitochondriích a chloroplastech - v těchto organelách se však nachází kruhová DNA bakteriálního typu, což dokazuje bakteriální původ těchto organel), která je nositelkou dědičné informace v podobě genů. Molekula DNA je velmi dobře uzpůsobena pro uchovávání a kopírování genetické informace. DNA je pro život nezbytnou látkou, jež ve své struktuře kóduje a buňkám zadává jejich program a tím předurčuje vývoj a vlastnosti celého organismu.

DNA je dlouhá makromolekula – polymer, tvořená dvěma řetězci stočenými do tzv. „dvojité šroubovice“. V každém řetězci se střídá pětiuhlíkový sacharid deoxyribóza (monosacharid 2-deoxy-β-D-ribóza) se zbytkem kyseliny fosforečné (tzv. fosfát - PO_4^{3-}). Na deoxyribózu je po straně připojena jedna ze čtyř tzv. heterocyklických dusíkatých bází. Dvě jsou odvozeny od struktury purinu – adenin (A) a guanin (G) a dvě od pyrimidinu – thymin (T) a cytosin (C) (Raclavský, 1998).

Dusíkaté báze se mohou mezi sebou párovat pomocí vodíkových vazeb. To, které báze se budou mezi sebou párovat, není dáno náhodně, je to dáno jejich komplementaritou. Toto komplementární párování bází umožňuje párům bází zaujmout energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvoušroubovice (http://web.natur.cuni.cz/studiumchemie/materialy/Milada_Rostejnska/Biochem/BPLO/PDF/Vyklad/(3)NukleoveKyseliny.pdf). Genetická informace je v DNA zapsána v pořadí bází, samozřejmě jen v jednom z řetězců, druhý řetězec je jeho doplňkem (je tzv. komplementární). Adenin se vždy páruje s thyminem (A-T) dvěma vodíkovými vazbami a guanin s cytosinem (G-C) se páruje třemi vodíkovými vazbami. Vodíkové můstky mezi bázemi jsou dostatečně silné k držení bází pohromadě, ale současně dosti slabé k tomu, aby se mohly při přenosu informací (expresi) od sebe oddělovat.

1.2 Funkce DNA

DNA je zodpovědná za genetický přenos dědičných znaků, a současně slouží jako depositář genetické informace. Z chemického hlediska je tato informace souborem návodů pro výrobu všech typů bílkovin daného organismu. Úseku DNA, nesoucímu instrukci pro výrobu jedné bílkoviny, se říká gen (přesněji strukturní gen) a souboru všech genů říkáme genom (Vodrážka, 2002). Proteiny kóduje často pouze malá část celkové sekvence DNA (tyto geny představují jen 1,5 % lidského genomu).

Gen je z molekulárního hlediska úsek nukleové kyseliny se specifickým pořadím nuleotidů, které podmiňuje strukturu a funkci genového produktu. Obsahuje jednak úseky kódující – exony (asi 30%) a úseky nekódující – introny (asi 70%).

1.2.1 Nekódující DNA

Nekódující DNA („Junk DNA“) reprezentuje sekvence, jejichž funkce zatím nebyla odhalena. Tvoří 98% celé DNA. Tato DNA nenese žádnou genetickou informaci. Z hlediska kriminalistiky má však nesmírný význam, jelikož se zde ve větší míře nachází vysoce polymorfní lokusy, důležité především pro genetické expertízy.

1.2.2 Kódující DNA

Kódující oblast tvoří asi 2% celé DNA člověka. Genetické informace jsou přenášeny geny, což jsou konkrétní úseky DNA o konkrétní sekvenci nukleotidů. V kódující DNA se spíše nachází méně polymorfní lokusy.

2. Jaderná DNA

2.1 Stavba a funkce buněčného jádra

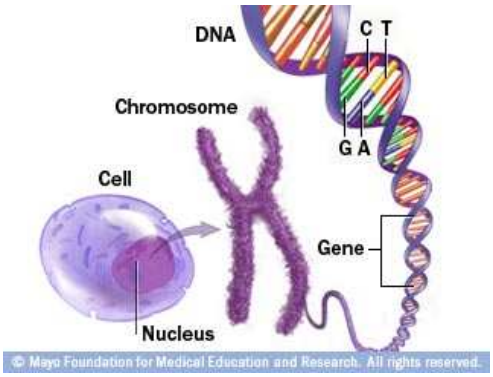
Jádro (nucleus) je buněčná organela eukaryontních buněk, ve které jsou soustředěny dědičné informace. Tato informace je zakódována v sekvenci bází molekul DNA, které tvoří určitý počet chromozómů. Jádro je ohraničeno dvojitou jadernou membránou s četnými nukleárními póry. Velikost pórů je uzpůsobena tak, aby jimi nemohly procházet chromozómy a ribozómy. Uvnitř jádra je uložena jaderná DNA (nDNA) uspořádaná do chromozómů.

2.2 Chromozómy

Chromozóm je lineární vláknitý útvar, který je rozdělen centromerou na krátké (p-) a dlouhé (q-) raménko. Konce ramének, kterými je řízeno zakončení replikace na 3'-koncích DNA chromozómu, se nazývají telomery. Konce DNA v telomerách se vyznačují sekvenčně specifickými tandemovými repeticemi.

Každý chromozóm je složen pouze z jedné lineární molekuly DNA, jak je patrno z obr. 1, na kterou jsou navázány jednoduché bazické proteiny - histony, jež umožňují svinutí tenkého vlákna do kompaktnější struktury. Tento komplex DNA a proteinů se nazývá chromatin.

Vlákno DNA v chromozómu obsahuje velké množství genů. Každý gen lze ztotožnit s určitým úsekem DNA. Pozice (místo) na chromozómu, resp. DNA, na kterém se příslušný gen vyskytuje, označujeme jako lokus. Konkrétní varianta genu na příslušném lokusu se nazývá alela.



Obr. 1: Schematické zobrazení DNA (http://www.riversideonline.com/health_reference/Tools/DS00549.cfm?RenderForPrint=1)

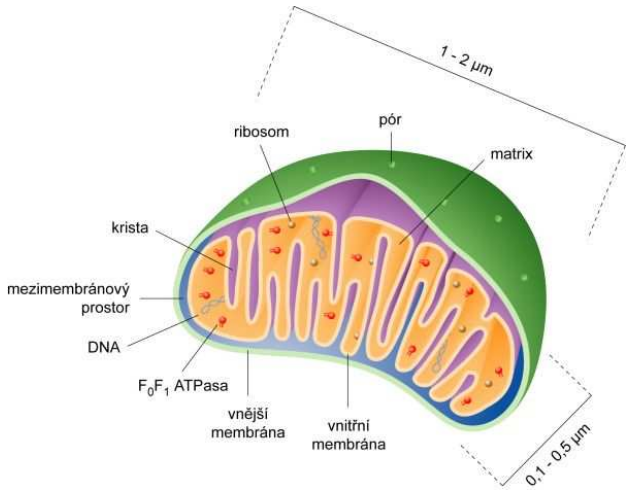
3. Mitochondriální DNA

3.1 Stavba mitochondrií

Mitochondrie jsou intracelulární, semiautonomní organely plovoucí v cytoplazmě eukaryotních buněk. Jejich počet závisí na typu tkáně, ve které se buňka nachází, a na její náročnosti na energii – např. hepatocyty (jaterní buňky) obsahují stovky až tisíce mitochondrií (Robin & Wong, 1988). Tvar a velikost je u různých buněk také rozdílná, většinou však mají protáhlý tvar.

Obal mitochondrie je tvořen dvěma lipoproteinovými membránami, mezi nimiž se nachází intermembránový prostor. Vnitřní membrána je zprohýbaná (znázorněno na obr. 2), takže směrem do nitra mitochondrie vytváří četné vchlípeniny, označované jako kristy. Vnitřní membrána ohraničuje prostor vyplněný velmi hustým roztokem tvořeným enzymy oxidačního metabolismu, substráty, nukleotidovými kofaktory a anorganickými ionty, tzv. mitochondriální matrix.

Mitochondrie se v buňce nově nevytvářejí jako ostatní organely, ale množí se dělením. Mají vlastní kružnicovou molekulu DNA, velmi podobnou molekule DNA bakterií a také svůj vlastní proteosyntetický aparát.



Obr. 2: Struktura mitochondrie (http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/mitochondrie.html)

3.2 Struktura lidské mtDNA

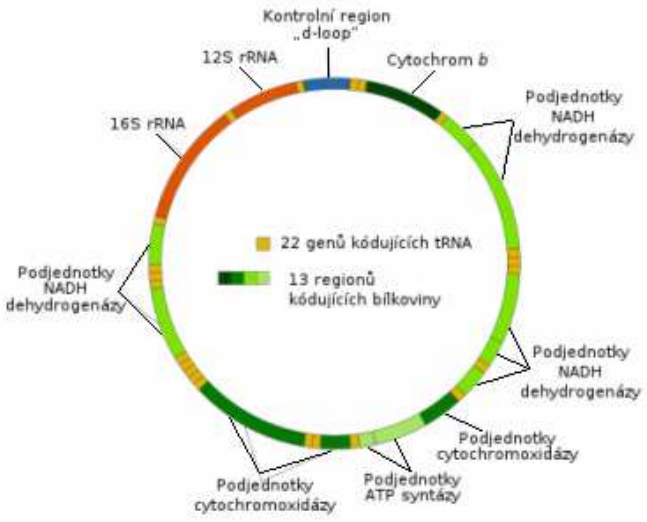
Typická mtDNA je tvořena kružnicovou molekulou dsDNA (na rozdíl od nDNA vyskytující se ve formě chromozómů) o délce cca 16-20 kb, která není vázána na žádný bílkovinný nosič typu histonů. V antiparalelních řetězcích DNA je odlišný poměr purinů a pyrimidinů, proto zde rozlišujeme řetězec těžký (H, heavy) a řetězec lehký (L, light). Těžký řetězec nese ve své sekvenci více guaninu (G) než řetězce lehký. Guanin má ze všech typů nukleotidů největší molekulární hmotnost, proto se řetězec označuje jako těžký (Butler, 2005).

Na mtDNA se nachází převážně kódující oblasti (93%), zatímco jaderný genom je tvořen kódující DNA jen z necelých 2 %. Minimálně se zde vyskytují repetitivní sekvence, geny neobsahují introny a některé se dokonce navzájem překrývají.

Počet genů v mtDNA je na rozdíl od jaderné DNA zanedbatelný. MtDNA kóduje 37 genů (nDNA kóduje 25-30 tisíc) – geny pro 12S a 16S rRNA, 22 tRNA a další geny potřebné v oxidativní fosforylaci a energetickou produkci v buňce – cytochrom b, dvě podjednotky ATPázy, tři podjednotky cytochrom c syntázy a sedm podjednotek NADH dehydrogenázy (viz obr. 3). Většina proteinů potřebných pro fungování mitochondrie je však kódována nDNA, následně syntetizována v cytoplazmě a transportována do mitochondrie (Andersom et al., 1981).

Kromě již zmíněných kódujících sekvencí, je nekódující oblast složena z přibližně 1100 bp dlouhého úseku - tzv. kontrolní úsek (Displacement loop, D-smyčka). Leží zde místo iniciace replikace H řetězce a místa iniciace transkripce. Místo pro iniciaci replikace L řetězce leží v malém nekódujícím úseku asi 5.7 kb od počátku replikace H řetězce (http://www.biopticka.cz/sluzby/molekularni-genetika/vyzkum-mtDNA.html).

D-smyčka je díky své vysoké polymorfnosti a nukleotidové variabilitě hojně využívána pro zkoumání ve forenzní genetice. Vznik mutací v této nekódující oblasti nemá následně žádný vliv na fungování mitochondrie ani na fungování buňky jako takové (Butler, 2005). Oblast D-smyčky je téměř totožná s hypervariabilní oblastí (hypervariable region - HVR), která se dělí na tři části – HVI, HVII, HVIII.



Obr. 3: Příklad molekuly mtDNA: na lidské kruhové molekule mtDNA je znázorněno umístění některých genů (http://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondri%C3%A1ln%C3%AD_DNA)

3.2.1 Shrnutí rozdílů jaderné a mitochondriální DNA

Rozdílů mezi mtDNA a nDNA, jak je patrno z tabulky 1, je mnoho. K těm nejzákladnějším patří především lokalizace v buňce, odlišná struktura, sekvence, množství obsažené v buňce a způsob dědičnosti.

Jednou z charakteristik, které umožňují větší pravděpodobnost získání výsledků z mtDNA, je její výskyt v buňkách v mnohem vyšším počtu kopií, než je tomu u nDNA. I když nDNA obsahuje mnohem více informací, vyskytuje se v buňce pouze ve dvou kopiích (1 maternální a 1 paternální), zatímco mtDNA nese jen zlomek genetické informace a vyskytuje se v buňce ve stovkách kopií. Díky většímu počtu kopií je pravděpodobnost zachování mtDNA vyšší než u nDNA (Butler, 2005).

Důvodem vyššího výskytu mutací, v porovnání s nDNA, je nižší stupeň reparačních procesů uplatňujících se v mtDNA. Vyšší mutační rychlost pomáhá k vytvoření větší variability ve vzorcích pocházejících z jedné maternální linie, která by se jiným mechanismem neměnila (Butler, 2005). Dalším důvodem větší náchylnosti ke vzniku mutací, je lokalizace molekuly mtDNA v blízkosti vnitřní mitochondriální membrány, kde vznikají reaktivní kyslíkové radikály, které mají mutagenní účinky. Na rozdíl od jaderné DNA také není chráněna histony (Kočárek, 2007).

Kruhová struktura mtDNA je méně náchylná k působení exonukleáz, které štěpí DNA a pomáhá molekule projít celou analýzou v nezměněném stavu. Vyšší odolnost mtDNA způsobuje i fakt, že je uložena v dvoumembránové organele (Butler, 2005).

Tab. 1: Rozdíly mezi jadernou a mitochondriální DNA - upraveno (Butler, Forensic DNA Typing 2005)

Charakteristika	Jaderná DNA	Mitochondriální DNA
Velikost genomu	3,2 miliard párů bází	16 568 párů bází
Počet kopií v buňce	2 (jedna kopie od každého z rodičů)	cca 500
Procento celkové DNA na buňku	99,75	0,25
Struktura	lineární, chromozómy	kruhová
Dědičnost	po matce i otci - mendelovská	po matce - maternální
Chromozomální párování	diploidní	haploidní
Rekombinace	ano	ne
Replikační opravy	ano	ne
Unikátní	ano (vyjma jednovaječných dvojčat)	ne (stejná v celé maternální linii)
Výskyt mutací	nízký	5-10x vyšší než u jaderné DNA, v D-kličce 100x vyšší
Podíl kódující DNA	2-3%	93%
Introny	ano	ne

3.3 Mitochondriální dědičnost

Dědičnost znaků kódovaných mitochondriální DNA se řídí výhradně maternální (matroklinní) dědičností – je děděna od matky, na rozdíl od mendelovské dědičnosti jaderného genomu, který je rovnoměrně děděn od obou rodičů, s výjimkou Y chromozómu (Giles et al., 1980).

Spermie obsahují jen malý počet mitochondrií (avšak dostatečné množství k tomu, aby měly dostatek energie na cestu k vajíčku), které jsou po fertilizaci destruovány vajíčkem (ženskou pohlavní buňkou). Mitochondrie pocházející ze spermie jsou aktivně vyhledány a likvidovány pomocí procesu využívajícího ubiquitinaci, jehož cílem je označení spermií bílkovinou ubiquitinem a jejich následná recyklace (Sutovsky et al., 1999). A to je důvod, proč je veškerá mtDNA čistě maternálního původu.

Vytváření maternálních linií pomáhá v situacích, kdy analýzou DNA chceme získat informace (souvislosti) mezi osobami vzdáleně příbuznými, u kterých byla analýza nDNA nedostačující. Avšak i analýza mtDNA má své nevýhody. Tou nejvýznamnější je fakt, že jednotlivé členy maternální linie nelze od sebe touto analýzou rozlišit. MtDNA se rovněž nemůže použít k testování otcovství ani nemůže sloužit pro individuální identifikaci (Rapley & Whitehouse 2007).

3.4 Hypervariabilní oblasti

Pro analýzu lidské mtDNA se z celkového počtu 16 569 bp využívá pouze 747 bp. Jde o tzv. hypervariabilní oblast, HVR (Hypervariable Region) nacházející se v D-smyčce mitochondriální DNA.

V tomto kontrolním úseku se nacházejí 3 hypervariabilní oblasti (HVI, HVII a HVIII). Hypervariabilní oblast I (HVI) se považuje za oblast nízkého rozlišení. Je to úsek 342 bp dlouhý, nacházející se mezi nukleotidy 16 024 – 16365. V HVI se nachází celkem 88 variabilních pozic, což je asi 26% z celkové délky HVI (Lutz et al., 2000). Hypervariabilní oblast II (HVII) se považuje za oblast s rozlišením vysokým. Jedná se o úsek 268 bp dlouhý, nacházející se mezi nukleotidy 73 – 340. V HVII se nachází 65 variabilních pozic, tedy 24% celkové délky HVII (Lutz et al., 2000). Hypervariabilní oblast III (HVIII) je 137 bp dlouhý úsek mezi nukleotidy 438 – 474 a nachází se v něm 25 variabilních míst, což je přibližně 18% z celkové délky HVIII (Lutz et al., 2000).

Analýza těchto oblastí slouží k přiřazení jedince do určité mitochondriální haploskupiny. Jedinci, kteří mají na určitých diagnostických pozicích HVR stejné nukleotidy, se řadí ke stejnému haplotypu. Haplotypy se pak na základě již konkrétních polymorfismů přiřazují k haploskupinám.

Pokud jsou analyzované vzorky od osob, které jsou spolu v příbuzenském vztahu, tak se předpokládá, že v sekvencích hypervariabilních úseků nebude žádný rozdíl – stav zvaný homoplazmie (Morovvati, 2007). Výjimku mohou tvořit případy, u kterých došlo k mutacím v sekvenci, či při stavu zvaném heteroplazmie (Bendall & Sykes, 1995), kdy se objeví nová mitochondriální mutace provázená přítomností více variant nukleotidů na některých pozicích v rámci mtDNA. Během dělení buněk dochází k náhodnému rozdělení mutantní a normální mtDNA do dceřiných buněk. Stupeň heteroplazmie se u nově vznikajících buněk může lišit, proto každý z členů jedné rodiny může zdědit různé procentuální zastoupení mutantů mtDNA a mít tak rozdílný haplotyp.

3.5 Haploskupiny

Na základě mutací v mtDNA lze určit tzv. "haplotyp", z kterého se dále dají sestavit genealogické vývojové stromy. Velké skupiny navzájem příbuzných haplotypů můžeme popsat jako tzv. haploskupiny, které se označují kombinací písmen (u mtDNA od A až po Z) a číslic (tedy např. N9a). Haploskupiny charakterizují různé populace, jejich historii a migraci. Každá z existujících haploskupin má své definovatelné podskupiny.

V průběhu zkoumání vzorků DNA u různých populací se zjistilo, že jednotlivci spadají do haploskupin, které mohou být definovány určitými polymorfními nukleotidy (see Wallace et al. 1999, Ruiz-Pesini et al. 2004).

MtDNA haploskupiny jsou rozděleny na základě polymorfismu v oblastech HV1/HV2 a genomových variací. Haploskupiny A, B, C, D, E, F, G a M jsou typické pro Asiaty, zatímco většina původních Američanů (Indiánů) spadá do haploskupin A, B, C a D. Haploskupiny L1, L2 a L3 jsou Afričani a haploskupiny H, I, J, K, T, U, V, W a X jsou typicky spojovány s evropskými populacemi (Wallace et al. 1999).

Evropané se mohou rozdělit do dvou skupin podle přítomnosti (přibližně 25%) či nepřítomnosti (75%) Ddel vazebného místa na nukleotidové pozici 10 394. Vazebné místo pro Ddel na pozici 10 394 mají skupiny I, J a K. Na druhé straně, vazebné místo na pozici 10 394 ztratily haploskupiny H, T, U, V, W a X (Wallace et al. 1999).

Tab. 2: Procentuální zastoupení jednotlivých haploskupin mtDNA v Evropě (Wallace et al. 1999)

Haploskupina	H	T	U	V	X	I	J	K
Zastoupení v Evropě (%)	40,5	15,2	14,7	4,8	6,9	6,7	11,3	9,1

Svůj výsledný haplotyp můžeme vložit do našich i světových internetových databází a porovnat tak své výsledky s výsledky lidí z různých koutů planety, v našem případě především Evropy, případně Ameriky a udělat si komplexnější obrázek o migraci předků a našich „příbuzných“ v jiných zeměpisných oblastech (kotacka.webnode.cz/geneticka-genealogie/).

Genealogické testy DNA byly a zatím povětšinou jsou vnímány pouze jako zpestření rodinné historie, ale postupem času s jejich stále rostoucí popularitou, vývojem a rozvojem světových databází skýtají nové a nové možnosti (kotacka.webnode.cz/geneticka-genealogie/).

II. Praktická část

1. Analýza mtDNA

Analýzy mtDNA se využívá, jak již bylo zmíněno, zejména při dlouhodobém uložení tělesných pozůstatků v zemi, kdy dochází k rychlé degradaci jaderné DNA, kterou již po několika letech nelze využít, nebo je-li vzorek nalezen ve velmi malém množství. Jedná se především o kosterní (především žebra a dlouhé kosti) či zubní pozůstatky, dále o vlasy, které jsou zbaveny kořínků, popřípadě i degradované stopy. Analýza nDNA by u těchto typů vzorků neposkytla úspěšné výsledky jaderných DNA markerů, proto se upřednostňuje analýza mtDNA.

Při sekvenační analýze mtDNA jsou nejčastěji zkoumány dva hypervariabilní úseky (HVI a HVII), které se nacházejí na nerekombinantní části mitochondriálního genomu. Tyto úseky poskytují informace, které slouží k odlišení dvou nepříbuzných jedinců (Budowle *et al.* 1999).

Analýza mtDNA je složena, stejně tak jako analýza nDNA, z několika po sobě jdoucích kroků. Mezi ně patří: příprava vzorku, extrakce DNA, amplifikace DNA, sekvenace DNA a v poslední řadě vyhodnocení dat.

1.1 Příprava vzorku

Pro přípravu vzorku je velmi důležité očistit zkoumaný materiál od jakékoliv kontaminující látky na jeho povrchu, aby se zajistilo, že výsledná DNA pochází opravdu ze vzorku a nikoli z jiného zdroje (Hagelberg & Clegg, 1991).

U vlasů je tento krok prováděn pomocí čištění detergenty v ultrazvukové vodní lázni. Po odstranění kontaminujících částic z povrchu vlasu je tento vlas umístěn do extrakčního roztoku a následně rozdrcen pomocí malého tloučku. V roztoku se poté nachází jak DNA, tak i buněčný materiál (Isenberg & Moore, 1991).

Kosti a zuby také procházejí procesem čištění. Nejprve dojde k obroušení povrchu, kdy se odstraní kontaminanty nacházející se na povrchu kosti. Následně se odebere malá část tkáně, která se poté rozdrtí na jemný prášek (Isenberg & Moore, 1991). Vzorek by se měl odebírat ze střední části kosti tak, aby nedošlo k poškození kosti a mohla být použita pro další měření. Při srovnání úspěšnosti analýzy mtDNA z různých částí skeletu se ukázalo, že žebra a stehenní kost jsou pro analýzu nejvhodnější (Edson

et al., 2004). Zuby se nejprve rozříznou na polovinu a odebere se dentin či zubní dřeň, které jsou využity pro extrakci DNA. U čerstvých zubů se DNA extrahuje pouze z dřeně, zatímco u extrémně starých zubů se naopak DNA extrahuje jen z dentinu (zubní dřeň je již vyschlá). Prášek vzniklý rozdrcením zubní a kostní tkáně je následně také umístěn do extrakčního roztoku (Isenberg & Moore, 1991).

1.2 Extrakce (izolace) a purifikace vzorku

Během degradace biologického materiálu vzniká v tkáni řada látek, které svou přítomností narušují průběh PCR a jsou proto označovány jako PCR inhibitory. V kostní tkáni se setkáváme zejména s nejrůznějšími deriváty hemu, blokujícími činnost Taq-polymerázy. Všechny tyto látky musí být během extrakce a purifikace DNA odstraněny (Šimková, 2002).

Základním principem izolace je získat z rozdrcené lidské tkáně DNA ukrytou v mitochondriích.

Prvním krokem je lýza buněk, ze kterých chceme DNA získat. U běžných buněk stačí obvykle rozpouštění cytoplazmatické membrány a denaturace proteinů detergentem (obvykle Triton X-100 a SDS, z ang. sodium dodecyl sulphate). Avšak pro lýzu pevných tkání musí být použita nějaká forma mechanické síly (Raclavský, 1998). Jako formu mechanické síly můžeme použít např. protřepávání vzorku se skleněnými kuličkami na vortexu, drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce atd.

Buněčný obsah včetně DNA se z lyzovaných buněk uvolní do extrakčního pufru, který kromě detergentů obsahuje také ethylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA). Ta funguje jako chelatační látka, a to tak, že tvoří komplexy s Ca^{2+} ionty (Raclavský, 1998). Vyvázáním Ca^{2+} je zajištěna inaktivace nukleáz, tj. enzymů, které se za normálních podmínek nacházejí v cytoplazmě buňky a štěpí nukleové kyseliny. V případě, že by nukleázy zůstaly aktivní, došlo by k rozštěpení DNA a jakákoliv další analýza genetického materiálu by byla bezpředmětná (Kočárek, 2007).

Pro zvýšení čistoty izolované DNA se někdy k lyzačnímu roztoku přidává enzym proteináza K, který štěpí bílkoviny, včetně histonů vázaných na strukturu DNA (http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm).

Extrakce mtDNA by měla být prováděna ve sterilní laboratoři, jelikož její analýza je citlivější na kontaminaci než analýza nDNA, a to z důvodu většího počtu kopií v buňce (Butler, 2005).

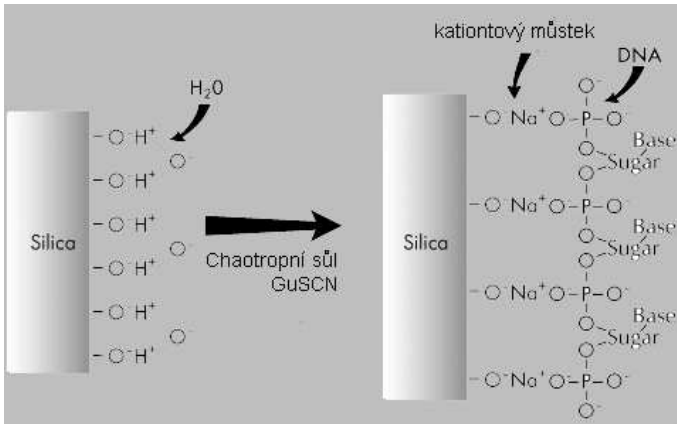
V současné době se používá široká škála izolačních metod. Mezi nejpoužívanější metody v naší laboratoři se řadí extrakce DNA z buněk adsorpcí na silikát, v ojedinělých případech fenol – chloroformová extrakce.

1.2.1 Adsorpce na silikát

Metoda využívající adsorpce nukleových kyselin na silikátový povrch patří k novějším technikám. Oproti fenol-chloroformové metodě je rychlejší a bezpečnější (odpadá manipulace s toxickým chloroformem a žíravým fenolem) a zajišťuje získání vysoce čisté DNA (Kočárek, 2007).

Základním principem adsorpčních metod, jak je patrné z obrázku 4, je využití schopnosti nukleových kyselin adsorbovat se na povrchy z oxidu křemičitého – silikátu (zpravidla speciálně připraveného skla) v přítomnosti chaotropních solí (jodid sodný nebo guanidin thiokyanát). Silikát může být dvojího typu, a to jako drobné skleněné kuličky či jako silikátové frity v kolonce (skleněné sítko zabudované ve zvláštní mikrozkumavce bez dna).

DNA se při průchodu kolonkou v přítomnosti chaotropních solí zachytí na fritě (Raclavský, 1998), avšak ostatní nečistoty či PCR inhibitory zůstávají v roztoku, který se po centrifugaci nachází ve spodní sběrné zkumavce. Zachycená DNA se poté několikrát promyje novou dávkou pufru s chaotropními solemi a následnou centrifugací. Adherovanou DNA lze z kolonky snadno uvolnit přidáním elučního pufru či vody, které neobsahují chaotropní soli a sníží tak iontovou sílu roztoku. Po krátkodobé inkubaci dojde k uvolnění DNA z kolonky do pufru, který je po centrifugaci převeden do čisté zkumavky.



Obr. 4: Princip navázání DNA na povrch SiO2 materiálu (Bromová, 2003)

Fenol – chloroformová extrakce

Klasickým a stále hojně používaným postupem pro odstranění proteinů a lipidů z buněčných lyzátů je extrakce pufrem ekvalibrovaným fenolem nebo směsí fenolu,

chloroformu a izoamylakoholu. Tyto organické látky se nemísí s vodou, a proto po přidání do vodného prostředí buněčného lyzátu způsobí tvorbu dvou vrstev – fází (Šmarda et al., 2005). Ve spodní organické vrstvě tvořené fenol/chloroformem jsou obsaženy veškeré nepolární látky, naproti tomu horní vodná fáze obsahuje všechny látky polární, tedy i DNA.

Nejprve se do roztoku přidá proteináza K a SDS (dodecyl sulfát sodný), aby došlo k rozrušení buněčné stěny a proteinů. Chloroform se nemísí s vodným roztokem obsahujícím DNA, ale při protřepání těchto částí může srážet proteiny přítomné ve vodné složce. Následnou centrifugací se na rozhraní těchto dvou fází objevuje bílý prstenec sražených proteinů. Horní vodnou vrstvu s obsahem DNA opatrně přenášíme do nové zkumavky pro další analýzu (Köchl et al. 2005).

Pro dokonalé odstranění proteinů je nutno extrakci opakovat opětovným přidáním směsi fenol–chloroform-izoamylakohol a protřepáváním tak dlouho, dokud se na rozhraní nepřestane po odstředění objevovat bílá proteinová sraženina. Nakonec je nutné extrahovat ještě jednou - pouze směsí chloroformu s izoamylakoholem (24:1), aby byly odstraněny i stopy fenolu v roztoku, které by mohly interferovat např. s použitím enzymů při dalším opracování izolovaných nukleových kyselin (http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm).

1.3 Amplifikace mtDNA pomocí PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction - PCR) je metoda molekulární biologie pro enzymatickou replikaci DNA in vitro bez použití živých organismů. Jako templát se používá malé množství DNA, které je v průběhu cyklické reakce o třech teplotních fázích exponenciálně amplifikováno. PCR se používá na amplifikaci specifické oblasti DNA. Mohou to být jednotlivé geny, části genu nebo nekódující oblasti, jejichž délka obvykle nepřesahuje 10 kb (Vlášková & Trešlová, 2008).

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5‘→3‘ prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů (úseky důležité pro nasednutí polymerázy, zpravidla obsahující pouze 20-25 nukleotidů), které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3‘-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů (v roztoku musí být přítomny všechny čtyři typy nukleotidů) pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových

řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. Taq DNA-polymeráza z Thermus aquaticus odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů (Šmarda et al., 2005). Tento proces je několikrát opakován. Během každého cyklu se teoreticky počet kopií zdvojnásobí a v konečné fázi je tak vytvořeno i několik miliónů kopií (Isenberg & Moore, 1991).

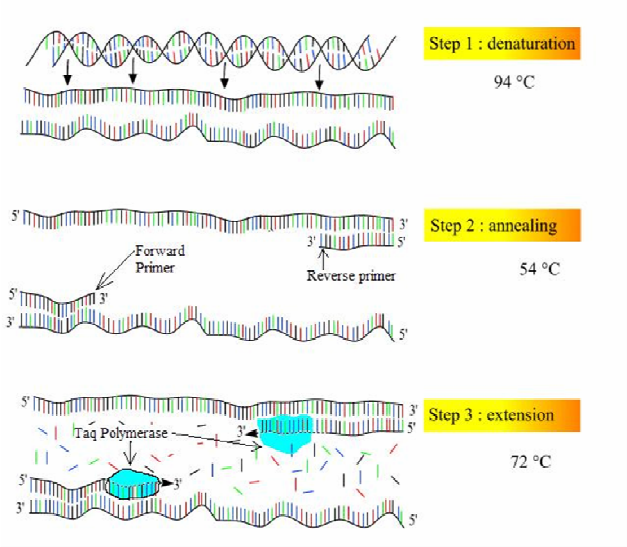
Jako optimální množství DNA je pro amplifikaci za pomoci PCR považováno 10 – 1000 pg. Jelikož je však DNA v extraktu v nestanovitelném množství, používá se pro počáteční PCR reakci 1 - 10µl extraktu DNA (Edson et al., 2004).

Mezi základní komponenty PCR patří (a) templátová DNA, (b) primery, (c) DNA-polymeráza, (d) volné nukleotidy – dNTPs (směs všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátů, které slouží jako stavební kameny pro syntézu nové DNA), (e) hořečnaté ionty – nejčastěji chlorid hořečnatý (mají v reakční směsi funkci kofaktorů - tvoří rozpustný komplex s jednotlivými dNTPs, který je následně rozpoznáván DNA-polymerázou) a (f) PCR pufr (tvoří vhodné prostředí pro činnost polymerázy).

Jeden cyklus PCR má 3 základní fáze (znázorněno na obrázku 5):

1) Denaturace – probíhá v rozmezí 94-98°C; z dsDNA vzniká rozrušením vodíkových můstků jednovláknová DNA, na kterou mohou nasedat primery
2) Hybridizace (annealing) primerů – snížení teploty na 50-65°C umožní primerům komplementárně nasednout na specifická místa templátové DNA. Místa vazby primerů vymezují oblast genomu, která bude v dalších cyklech PCR amplifikována (Kočárek, 2007). Na navázané primery se poté naváže DNA-polymeráza.
3) Prodlužování (elongace) primerů – při teplotě okolo 72°C dochází k aktivaci termostabilní polymerázy, která rozpozná a nasedne na 3‘-OH-konce navázaných primerů. Polymeráza připojuje k primerům nukleotidy komplementární k templátové DNA a prodlužuje tak řetězec ve směru 5‘→3‘.

Reakce PCR probíhá v současné době v automatizovaném přístroji zvaném termocycler. Dochází zde k pravidelnému střídaní teplot, resp. k zahřívání či chlazení zvláštního kovového bločku, ve kterém jsou umístěny mikrozkumavky se směsí. Teplota reakční směsi a délka cyklu je řízena programem, který byl nastaven uživatelem.



Obr. 5: Základní fáze jednoho cyklu PCR (http://www.thefullwiki.org/Structural_Biochemistry/Polyermase_Chain_Reaction/How_PCR_is_Performed)

1.4 Sekvenace DNA

Sekvenace je souhrnný termín pro biochemické metody, kterými se zjišťuje primární struktura neboli pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v krátkých sekvencích DNA. V současné době je nejvíce používána enzymatická Sangerova metoda (dideoxyterminační reakce – ddNTP), která zastínila druhou, chemickou Maxam-Gilbertovu metodu.

Sangerova metoda využívá stejného principu jako PCR (proto se v angličtině označuje jako „cycle sequencing“). Zde se ovšem použije, kromě DNA-polymerázy a klasických deoxyribonukleotidových bází (dNTP) prodlužujících rostoucí řetězec, také bází terminačních, tzv. dideoxyribonukleotidových bází (ddNTP), které naopak rostoucí řetězec ukončují (Sanger et al., 1977). Každý ddNTP je označen jiným fluorescenčním barvivem, jak je patrné z obrázku 6.

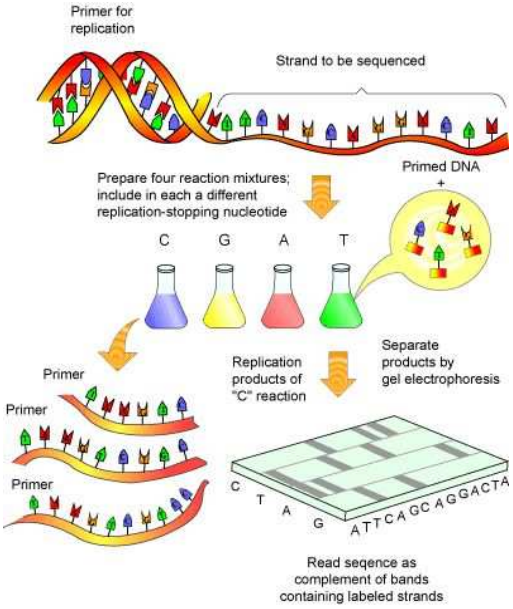
Při reakci DNA-polymeráza připojí nukleotid tak, že z něj odštěpí difosfát a získanou energii využije k tvorbě fosfodiesterové vazby mezi zbývajícím fosfátem a kyslíkem OH-skupiny předchozího nukleotidu na 3‘-konci (Raclavský, 1998). Přítomnost syntetických ddNTP působí inhibiční vliv na DNA-polymerázu. Tento inhibiční vliv je vyvolán navázáním příslušného ddNTP místo odpovídajícího dNTP do prodlužujícího se řetězce. Polymeráza tak nebude schopna pokračovat v připojování dalšího nukleotidu, neboť ddNTP má na 3‘ uhlíkovém atomu navázán pouze vodík místo OH-skupiny, která je potřebná pro tvorbu fosfodiesterové vazby (Atkinson et al.,

1969). Výsledkem tohoto procesu je vznik velkého počtu jednořetězcových fragmentů DNA různé délky, které se budou v konečné fázi lišit o délku jedné báze (Andréasson, 2005).

Specifické reakce jsou rozlišeny podle typu použitých dNTP a ddNTP. Klasické deoxyribonukleotidové báze soutěží s totožnými dideoxyribonukleotidovými bázemi o připojení do rostoucího řetězce DNA. Nově vzniklý řetězec, jenž je ukončen terminátorovou bází, má na svém konci značení, které je rozpoznáváno při následné detekci (Andréasson, 2005). Fluorescenčně může být značen buď primer či ddNTPs.

Konečné produkty sekvenace jsou následně rozdělovány podle své délky za pomoci gelové či kapilární elektroforézy.

Významného pokroku ve stanovování sekvencí DNA enzymovou metodou bylo dosaženo po zavedení přístrojů pro automatické sekvenování DNA, tzv. sekvenátorů (Šmarda et al., 2005). Ty jsou založeny na principu kapilární elektroforézy. Separace fragmentů probíhá ve velmi tenké skleněné kapiláře obsahující viskózní hydrofilní polymer (obdoba gelu). Kapilára a kladná elektroda vstupují do jamky se vzorkem, vloží se napětí (výrazně vyšší než u gelové elektroforézy - např. 15 kV) a záporně nabité fragmenty DNA vstupují do kapiláry a postupují směrem k anodě, která je na druhém konci kapiláry. Během putování kapilárou dochází k velmi účinné separaci jednotlivých fragmentů dle velikosti. Fragmenty DNA nesoucí jednu ze čtyř fluorescenčních značek jsou ozářeny argonovým laserovým světlem, dochází k excitaci a emitované světlo je snímáno tzv. CCD kamerou (4 vlnové délky jsou snímány současně). Software vyhodnocuje emisní obrazce a převádí je do podoby barevných křivek (Trešlová, 2008).



Obr. 6: Postup sekvenace DNA (http://tomas.cooked.cz/tag/sekvenace/)

1.5 Databáze mtDNA

Analýzou získané údaje nukleotidových sekvencí mtDNA mohou být porovnávány a následně ukládány v databázích. Výsledné profily jsou porovnávány s referenční sekvencí, pro kterou se vžilo označení Cambridge Reference Sequence (CRS). Je to sekvence lidské mtDNA, která byla jako první v roce 1981 sekvenována v laboratoři Fredericka Sangera v Cambridge (Anderson et al., 1981). V roce 1999 proběhla opětovná sekvenace stejného materiálu, jako v roce 1981. V nové sekvenci (tzv. rCRS – revidovaná CRS) bylo opraveno 11 chyb v CRS. Žádná z nich nebyla naštěstí nalezena v oblastech HVI a HVII, které jsou nejvíce využívány pro analýzu mtDNA (Anderson, 1981).

Jelikož je mtDNA populačně či rasově vázaná, je velkým pomocníkem při pátrání po neznámém pachateli – pomůže nám přiblížit geografický původ pachatele. Mezi jednu z největších databází se řadí mtDatabáze SMGF (The Sorenson Molecular Genealogy Foundatin). V současné době tato databáze obsahuje data od více než 75, 000 lidí z celého světa (http://www.smgf.org/pages/mtdatabase.jspx).

Pro přehlednou klasifikaci mtDNA profilů je doporučeno přiřazování čtrnáctimístného identifikačního kódu ke každému profilu. První tři písmena označují zemi původu – používají se mezinárodní kódy pro danou zemi (např. pro Českou republiku jsou typická písmena CZE). Další tři písmena označují etnickou skupinu (např. AFR = Afričané, CAU = běloši apod.). Posledních šest čísel představuje sekvenční číslo daného profilu – pořadí dané sekvence v databázi (např. byl-li vzorek sekvenován jako pátý, bude mu náležet číslo 000005) (Miller & Budowle, 2001).

2. Hlavní možnosti analýzy pomocí LightCycleru® 480

LightCycler® 480 je nejnovější systém, který umožňuje provádět real-time, online PCR kombinovanou s rychlým cyklováním pro 96 nebo 384 vzorků (dle typu vloženého termobloku) (LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual). Výsledky mohou být kvantifikovány a analyzovány současně pomocí monitorování fluorescence během amplifikace nukleových kyselin. Optický systém umožňuje provedení multiplexní PCR reakce za pomocí sekvenčně specifické detekce při použití různých typů sond (např. HybProbe sondy, SimpleProbe sondy, hydrolyzační sondy nebo sondy jiného typu). Sekvenčně nezávislá online detekce může být provedena pomocí SYBRGreen I barviva (Bustin et.al, 2004). Analýza křivek teplot tání umožňuje genotypizaci (detekce jednonukleotidých polymorfismů - SNP) za pomocí specifických sond nebo lze produkt charakterizovat při použití High resolution melting dye (HRM analýza) (LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual).

2.1 Kvantifikace

Kvantifikace je důležitým krokem při zpracovávání vzorků, jelikož nám pomáhá určit výchozí množství a čistotu extrahované DNA. Znalost množství templátové DNA umožní správné nastavení PCR a dosažení optimálních výsledků (Nielsen, et al., 2008).

Při kvantifikaci je vhodné použít negativní (blank) a pozitivní kontroly (známá DNA), pro případné vyloučení kontaminace vzorku cizorodou DNA (Isenberg & Moore, 1991).

Tato metoda dnes zahrnuje celou řadu postupů a má celou řadu variant. Ve forenzní genetice je však v současné době nejvíce využíváno real-time PCR, vzhledem k její vysoké přesnosti, citlivosti a v neposlední řadě malé spotřebě vzorků.

2.1.1 Princip real-time PCR

Metoda je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu (u klasické PCR se detekuje až finální produkt – tzv. metoda end-point). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Data jsou tedy sbírána během celého PCR procesu na speciálních "termocyklerech" s optikou

umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce (http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm).

Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi.

2.1.2 Sondy používané v real-time PCR

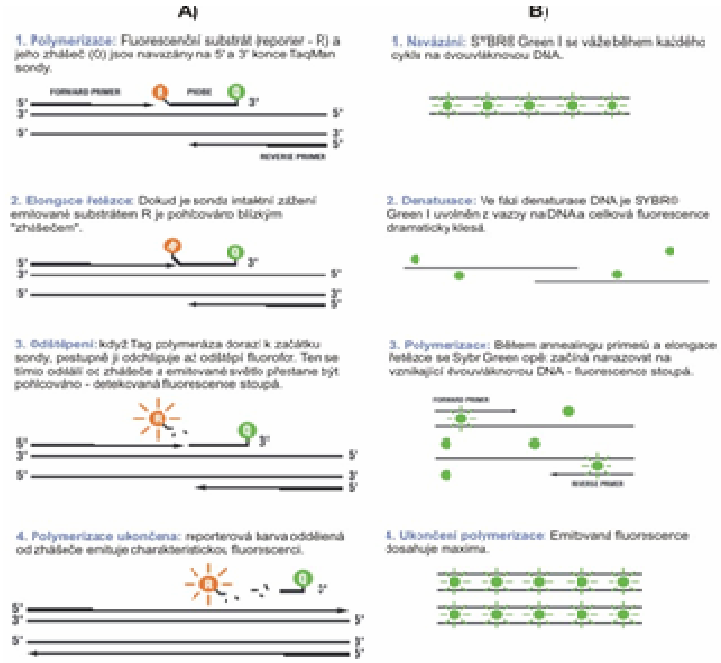
Jedná se o fluorescenční látky uvolňující záření v průběhu PCR. Dělí se podle specifičnosti k požadovanému PCR amplikonu na:

1) ***nespecifické sondy*** – interkalační a „minor groove binding“ látky (nespecificky se vážou na dvouvláknovou DNA)
   - SYBR Green I
   - Eva Green
   - Ethidium-bromid (http://mat.skolabiotechnologie.cz/2006/III.workshop/Q_PCR.pdf)

Nespecifické sondy jsou fluorescenční barviva vmezeřující se do dsDNA (znázorněno na obrázku 7). Tato barviva umožňují detekovat heteroduplexy, které vznikají po PCR reakci. Sekvenční varianty polymorfních oblastí jsou následně detekovány jako změny tvaru v křivce tání. Změnu tvaru můžeme vidět při porovnání normalizovaných křivek tání homozygotních standardů vzhledem k heterozygotnímu vzorku (Gundry et al., 2003, Wittwer et al., 2003).

2) ***specifické sondy*** - ve své struktuře mají krátký oligonukleotidový řetězec, kterým se hybridizují k PCR amplikonu
   - Hydrolyzační sondy (TaqMan®)
   - Hybridizační sondy FRET
   - Scorpions (http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/III.workshop/Q_PCR.pdf)

Specifické sondy pracují na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor) a zhášečem (quencher) → nárůst fluorescenční aktivity je způsoben zvýšením vzdálenosti mezi molekulou fluorescenčního barviva a molekulou zhášeče po rozštípnutí navázané sondy polymerázou (zhášeč se odděluje během amplifikace pomocí hydrolýzy a/nebo ztráty sekundární struktury).



Obr. 7 : Ukázka navázání A) specifické a B) nespecifické sondy (http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm)

2.1.3 Analýza absolutní kvantifikace

Absolutní kvantifikace umožňuje kvantifikovat jedinou cílovou sekvenci, přímo determinuje výchozí počet kopií cílových molekul a výsledek je vyjádřen jako absolutní hodnota.

Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu.

Typická amplifikační křivka má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části:

1) „background" (lag) fázi, kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot (počáteční fáze trvá, dokud není fluorescenční signál z PCR produktu větší než fluorescenční pozadí sondy);

2) exponenciální (log-lineární) fázi, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4-8 cyklů) a

3) konečnou fázi plató, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní.

Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce (http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/).

Cyklus, při kterém každá reakce poprvé překročí pozadí, je závislý na množství cílových molekul, které jsou přítomny na počátku reakce. Bod, při kterém fluorescence vzorku vzroste nad fluorescenci pozadí, se nazývá „Crossing point“ (CP, bod průsečíku) vzorku. Pro vytvoření standardní křivky se používá postupné zředění externích standardů s předem známou koncentrací. Amplifikace standardních roztoků probíhá v samostatných jamkách, ale v rámci stejného běhu přístroje LightCycler® 480. Body průsečíků (CP) standardů a neznámých vzorků jsou poté použity pro určení koncentrace cílové DNA (LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual).

LightCycler® 480 poskytuje dvě metody k provedení analýzy absolutní kvantifikace. Obě metody používají k výpočtu neznámé koncentrace standardní křivky, ale každá metoda určuje bod průsečíku (CP) vzorku jiným způsobem:

- Metoda maxima druhé derivace – identifikuje bod průsečíku (CP) vzorku jako bod, ve kterém se láme fluorescenční křivka vzorku prudce nahoru. Tento bod zlomu odpovídá maximu druhé derivace amplifikační křivky. Při práci s komplexními fluorescenčními daty křivky se software umí vypořádat s efekty a artefakty jako jsou píky v log-lineární fázi křivky, pozadí šumu nebo pracovat s křivkami, pro které dosud nebylo dosaženo plató fáze.
- Metoda přesných bodů (Metoda Fit Points) – vyžaduje odstranit šum pozadí horizontální prahovou přímkou (noise band), vyloučit plató hodnoty vložením několika log-lineárních bodů a poté proložit exponenciální částí amplifikační křivky přímku (log-line). Průsečnice přímky (log-line) s horizontální prahovou přímkou určuje body průsečíků (crossing points). LightCycler® 480 Software používá vypočítané body průsečíků standardních vzorků k vygenerování standardní křivky bodu průsečíku versus koncentrace vzorku (LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual).

2.1.4 Analýza relativní kvantifikace

Relativní kvantifikace se používá ke stanovení míry genové exprese mezi vzorky a vyjadřuje ji v poměru k množství jiné DNA. Porovnává se množství cílové sekvence v testovaném vzorku oproti kontrolnímu vzorku, který slouží jako standard neboli referenční gen.

Relativní kvantifikace srovnává dva poměry:

- poměr cílové sekvence („Target“) a referenční DNA sekvence („Reference") v neznámém vzorku a
- poměr stejných sekvencí ve standardním vzorku zvaném „kalibrátor“.

„Target“ je nukleová kyselina, která nás zajímá (specifická DNA sekvence). „Reference" je nukleová kyselina, která se vyskytuje v konstantním množství kopií ve všech vzorcích a slouží jako vnitřní kontrola. „Kalibrátor“ je obvykle pozitivní vzorek se stabilním poměrem cílového genu ku referenci, používá se k normalizaci všech vzorků během jednoho běhu, a také slouží v porovnání běhů na různých LightCycler 480 strojích (LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual).

2.2 Genotypizace

Tento proces je založen na faktu, že vodíkové vazby spojující dvě protilehlá vlákna DNA do dvoušroubovice jsou velice slabé, mohou být tedy roztrženy i poměrně malou dávkou energie – například ohřevem. Tento proces se nazývá denaturace (tání) a je vratný – s poklesem teploty se totiž vlákna DNA opět splétají a vytvářejí výchozí dvoušroubovici (renaturace) (Raclavský, 1998). Platí, že DNA taje nejrychleji v určitém rozsahu teplot blížících se tzv. teplotě tání - T_m.

Teplota, při které se rozvinuje (taje) řetězec DNA, kolísá v širokém rozsahu v závislosti na sekvenci, délce řetězce a obsahu GC v řetězci. Teplota tání může být různá např. pro produkty se stejnou délkou řetězce, ale s různým poměrem GC/AT či pro produkty se stejnou délkou řetězce a stejným obsahem GC, ale s různým pořadím GC. Nesprávné párování bází mezi dvěma DNA molekulami vede také ke snížení teploty tání (LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual).

Při tomto procesu je monitorována fluorescence vzorků, která se se zvyšováním teploty snižuje, přičemž platí, že fluorescenční aktivita oligonukleotidové sondy nebo interkalačního barviva je přímo úměrná množství dsDNA přítomné v reakční směsi. V případě specifického dvouřetězcového DNA barviva SYBR Green I je toto způsobeno vlivem rozvíjení DNA řetězců s následným uvolňováním SYBR Green I molekul. Pro hybridizační sondy je pokles fluorescence způsoben vlivem odtání hybridu sonda-cílová DNA, což má za následek buď zhášení referenčního barviva nebo prostorové odtržení molekul barviva (LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual).

2.2.1 Analýza křivky tání (Tm Calling analýza)

Analýza křivky tání je post PCR metoda, která se používá k určení charakteristické teploty tání cílové sekvence DNA a identifikaci genotypu či produktů PCR na základě jejich teplot tání. Pro určení teploty tání každého vzorku využívá tato analýza měření

fluorescence během programu tání. Teplota tání (T_m) vzorku je definována jako bod, při které dochází k rozvinutí (tání) poloviny molekul DNA nebo k odtržení poloviny sond od DNA (LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual). Ve spojení s oligonukleotidovými sondami lze s její pomocí provádět detekci známých SNP polymorfismů a mutační analýzu vůbec, při použití interkalačních barviv se metoda používá k odlišení specifických a nespecifických produktů PCR reakce (http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/).

Při amplifikaci PCR produktu se do reakční směsi přidá fluorescenční dsDNA interkalační barvivo (např. SYBR Green I, LCGreen), které se naváže do DNA dvoušroubovice. Touto vazbou se fluorescence DNA podstatně zvýší, přičemž fluorescence v roztoku je naopak nepatrná. Díky tomuto jevu se může analýza křivky tání uskutečnit. Po proběhnutí PCR začíná samotná analýza křivky tání - nejprve dochází k ochlazení vzorku na relativně nízkou teplotu a následně k pomalému zahřívání až nad předpokládanou teplotu tání DNA. Během postupného zahřívání dochází k tání (denaturaci) DNA (dsDNA disociuje do ssDNA) a interkalační barva se z jednořetězců uvolňuje, což se projevuje poklesem fluorescenčního signálu. Největší pokles však nastává v úzkém teplotním rozmezí (Ririe et al., 1997).

Analýza zobrazuje graf křivek tání vzorků, které ukazují intenzitu fluorescence proti příslušené teplotě (křivka náhle strmě klesá v okolí T_m). Teplota v inflexním bodě křivky se rovná teplotě tání a lze ji snadno zjistit zápornou derivací fluorescence v každém měřeném bodě (-dF/dt), kde se v grafu objeví jako vrchol píku (http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/).
Křivky tání jsou specifické pro jednotlivé DNA sekvence.

2.2.2 High resolution melting - HRM (Analýza křivky tání s vysokým rozlišením)

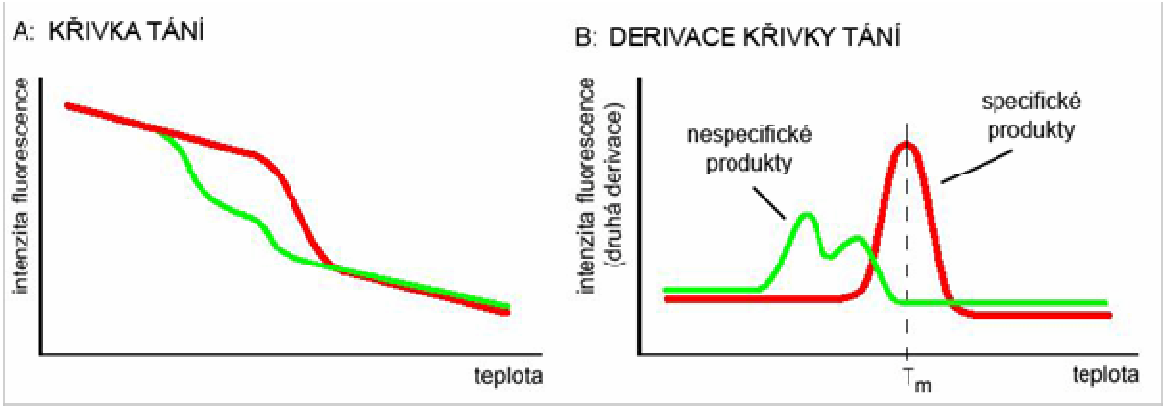
V 60. letech 20. století se pro melting („tání“) dsDNA užívalo UV absorbance. Použití této analýzy vyžadovalo µg množství DNA. Zahřívání vzorků během analýzy probíhalo rychlostí 0,1-1°C/min, proto byla analýza dokončena až za několik hodin. V roce 1997, kdy se na trhu poprvé objevil přístroj LightCycler®, začala být více využívána metoda melting DNA analýzy s využitím fluorescenčního značení. Pro tento typ analýzy se využívá malých objemů chemikálií i vzorků, což umožňuje lepší kontrolu teploty v průběhu reakce – zahřívání vzorků probíhá rychlostí 0,1-1°C/sec, a doba tání se tak zkrátila na několik minut (http://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html). K provedení HRM stačí pouze přítomnost neznačených primerů

a saturačních barviček vmezeřujících se do dsDNA přidaných před PCR (Reed et al., 2007). Ohromnou předností této analýzy je fakt, že se do průběhu reakce již nemusí zasahovat, není potřeba přidávat žádné další chemikálie či elektroforeticky separovat produkt po PCR, což zabraňuje případné nežádoucí kontaminaci (Chou et al., 2005).

HRM je screeningová metoda, která umožňuje ve většině případů přesné rozlišení různých polymorfismů a mutací lokalizovaných ve stejném fragmentu. Ačkoli byla HRM analýza navržena pro detekci heterozygotů, zachytí také homozygotní varianty polymorfních oblastí. Rozlišení obou forem homozygotů v polymorfních oblastech je však možné pouze u některých oblastí - v závislosti na sekvenci analyzovaného úseku (http://www.linkos.cz/odbornici/org_info/MOU_vyzkum.pdf). Průměrně 84% ze všech lidských SNP polymorfismů vyústí v záměnu A:T na C:G s rozdílem T_m v průměru o 1°C v krátkých amplikonech. Ve zbývajících 16% jsou tyto změny opačné či neutrální (T:A na A:T nebo G:C na C:G) a rozdíl T_m je tak ještě nižší, a to díky zachování stejné symetrie sekundární struktury. 4% těchto změn nejeví žádný rozdíl v T_m (Palais et al., 2005).

Metoda zahrnuje genotypizaci či předsekvenační skenování amplifikačních produktů (může být použita jako náhrada sekvenování či pro užší výběr pozitivních vzorků pro následné sekvenování), dále analýzu neznámých mutací/SNP, metylační analýzu, kvantifikaci nebo může sloužit jako alternativa ke gelové elektroforéze (Vossen et al., 2009). Pro zvýšení senzitivity při analýze SNP by měl být použit fragment DNA o délce 80-100 bp, a pokud je to možné, měl by obsahovat G-A variantu – je zde předpoklad většího rozdílu teplot tání (Reed & Wittwer, 2004).

Při analýze DNA o nízké kvalitě se mohou v reakci také vyskytovat nespecifické produkty, jak je patrné z obrázku 8. Jejich píky představují ve většině případů kratší produkty o typicky nižší intenzitě, tudíž v grafu vykazují vzhledem k primárnímu produktu nižší teplotu tání. Tento jev často vyúsťuje ve špatné vyhodnocení HRM analýzy. Týká se to zejména vzorků, které byly amplifikovány později (na začátku reakce není dostatek produktu, amplifikace tedy probíhá delší dobu) nebo nedosáhly plató fáze PCR. Mohou tak poskytovat neprůkazná či špatně vyhodnotitelná HRM data (http://www.appliedbiosystems.com).



Obr. 8: Graf analýzy křivky tání (http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/)

Díky velkému rozvoji této metody se rozrůstá i možnost výběru různých interkalačních barviček vytvořených speciálně pro HRM analýzu. Kromě již zmiňované SybrGreen I lze použít barvičky označené jako LCGreen® (LCGreen I, LCGreen Plus). Jejich výhoda spočívá ve využití pro široké spektrum koncentrací DNA během PCR, na rozdíl od SybrGreen I, kde je potřeba použít jen určitou koncentraci DNA, aby nedošlo k inhibici PCR (Krypuy et al., 2006, Wojdacz & Dobrovic, 2007).

3. Vlastní práce

V současnosti je pro forenzní analýzy mtDNA nejčastěji využíváno sekvenování oblastí HVI a HVII Sangerovou metodou. Tato metoda je nejen časově, ale i finančně poměrně náročná. Z tohoto důvodu jsme se pokusili pro stanovení sekvenční variability mtDNAv oblasti HVI využít metody HRM, která by genetické zkoumání značně zjednodušila, urychlila a zlevnila.

Analýzu jsme provedli pro různé koncentrace primerů a $MgCl_2$ v reakční směsi PCR, sekvence primerů a teplotu pro anealing primerů jsme převzali z analýz mtDNA, které jsou běžně využívány v laboratoři Kriminalistického ústavu.

3.1 Materiál

K práci jsme použili 5 srovnávacích vzorků, které dobrovolně poskytli pracovníci genetické laboratoře Kriminalistického ústavu. Jejich haplotyp mtDNA v oblasti HVI je znám (viz tab. 3), byl již dříve stanoven Sangerovou sekvenační metodou. Vzorky jsme zajistili stěry sliznice dutiny ústní (bukálními stěry) za pomoci sterilních vatových tampónů navržených tak, aby splňovaly hygienické požadavky.

Tab. 3: Přehled haplotypů u jednotlivých vzorků (rozdíly vůči rCRS)

označení vzorku	známá sekvence v oblasti HVI
1	shoda s rCRS
2	shoda s rCRS
3	T16298C
4	T16298C
5	T16189C

3.2 Metody

DNA 5 vzorků jsme extrahovali z bukálních stěrů metodou adsorpce na silikátovou membránu (Greenspoon et al. 1998) pomocí QIAamp DNA Mini Kitu (Qiagen), standardním postupem uvedeným výrobcem kitu v uživatelském manuálu.

PCR probíhala v zařízení LightCycler® 480 (Roche) s použitím HRM mastermixu (Roche). K amplifikaci HVI segmentu jsme použili primery A1, B0 (sekvence primerů uvedeny v tab. 4), které jsou běžně užívány v laboratoři Kriminalistického ústavu při analýze mtDNA Sangerovou sekvenační metodou.

Tab. 4: Sekvence použitých primerů (Buttler, 2005)

primer	sekvence
A1	5´-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3´
B0	5´-CACCATCCTCCGTGAAATCA -3´

Teplotní protokol pro amplifikaci a následnou metodu HRM jsme použili podle doporučení v uživatelském manuálu s teplotou pro anealing primerů 60 ºC (viz tab. 5), která je opět běžně užívána v laboratoři Kriminalistického ústavu při analýze mtDNA Sangerovou sekvenační metodou.

Tab. 5: Teplotní protokol PCR a následné HRM

	Teplota (Cº)	Čas (mm:ss)	Rychlost změny teploty (Cº/s)
Inkubace	95	10:00	4,4
Amplifikace – 40 cyklů	95	00:10	4,4
	60	00:15	2,2
	72	00:18	4,4
HRM	95	01:00	4,4
	40	01:00	2,2
	65	00:01	1
	95	–	–
Chlazení	40	00:10	2,2

Koncentraci jednotlivých složek reakční směsi PCR jsme použili podle doporučení v uživatelském manuálu, nicméně bylo nutné provést testování pro různé koncentrace primerů a $MgCl_2$. Naší snahou bylo získat dostatečné množství PCR produktu pro následnou analýzu HRM a zároveň zabránit tvorbě nespecifických produktů, které by ovlivnily průběh křivky tání. Testování jsme provedli pro šest různých reakčních směsí, vždy v pěti replikátech u dvou vybraných vzorků. Současně se vzorky byla

amplifikována negativní izolační kontrola a negativní PCR kontrola. Složení testovaných reakčních směsí a s příslušnými výsledky je uvedeno v tab. 6.

Tab. 6: Složení testovaných reakčních směsí PCR a příslušné výsledky

složka	**konečná koncentrace v reakci**					
označení směsi	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
MasterMix	1x	1x	1x	1x	**1x**	1x
primer A1(µM)	0,2	0,2	0,2	0,6	**0,6**	0,6
Primer B0 (µM)	0,2	0,2	0,2	0,6	**0,6**	0,6
$MgCl_2$ (mM)	1,5	2,0	2,5	1,5	**2,0**	2,5
DNA (ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	**1,0**	1,0
voda (doplněna do celkového objemu)	-	-	-	-	**-**	-
celkový objem (µl)	20	20	20	20	**20**	20
množství PCR produktu	0	+	+	0	**+ + +**	+ +
nespecifické PCR produkty	-	ne	ano	-	**ne**	ano

0 – negativní výsledek PCR reakce

+ - minimální výsledek PCR reakce

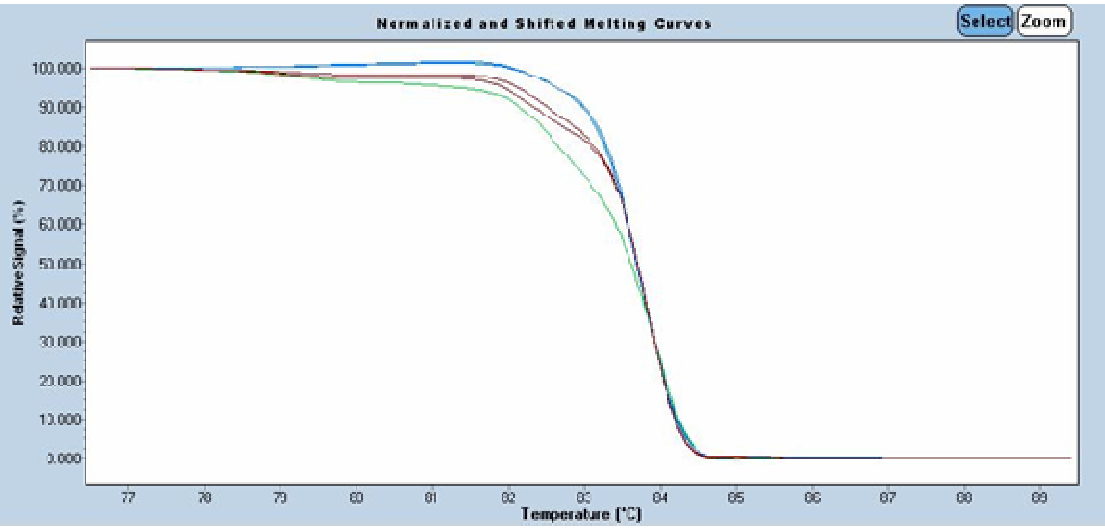
+++ - optimální výsledek PCR reakce

Z tab. 6 je zřejmé, že při nižší koncentraci primerů (0,2 µM) a nízké koncentraci $MgCl_2$ (1,5 mM) nedochází k dostatečné tvorbě produktu a naopak při vysoké koncentraci $MgCl_2$ (2,5 mM) neprobíhá amplifikace specificky, tj. vyskytují se nespecifické produkty. Jako vyhovující jsme zvolili směs označenou č. 5 (koncentrace primerů 0,6 µM, koncentrace $MgCl_2$ 2,0 mM) a tu jsme použili pro analýzu pěti reprezentativních vzorků. Tuto amplifikaci jsme provedli pro každý vzorek ve dvou replikátech a současně se vzorky byla amplifikována negativní izolační kontrola a negativní PCR kontrola.

Po amplifikaci jsme provedli HRM analýzu v zařízení LightCycler® 480 (Roche) a získali tak křivky tání produktů PCR u jednotlivých vzorků. Tyto křivky jsme analyzovali pomocí softwaru, který je součástí zařízení LightCycler® 480 (Roche).

3.3 Výsledky a diskuze

Na základě analýz křivek tání s vysokým rozlišením byly softwarem vzorky automaticky roztříděny do tří skupin, které odpovídají příslušným haplotypům. Na obr. 9 je vidět závislost poklesu fluorescencí s postupným zvyšováním teploty vzorků. Na tomto grafu je označen rozdílný průběh tání amplifikačních produktů modrou, zelenou a hnědou barvou, a tyto barvy odpovídají také jednotlivým haplotypům (viz tab. 7).

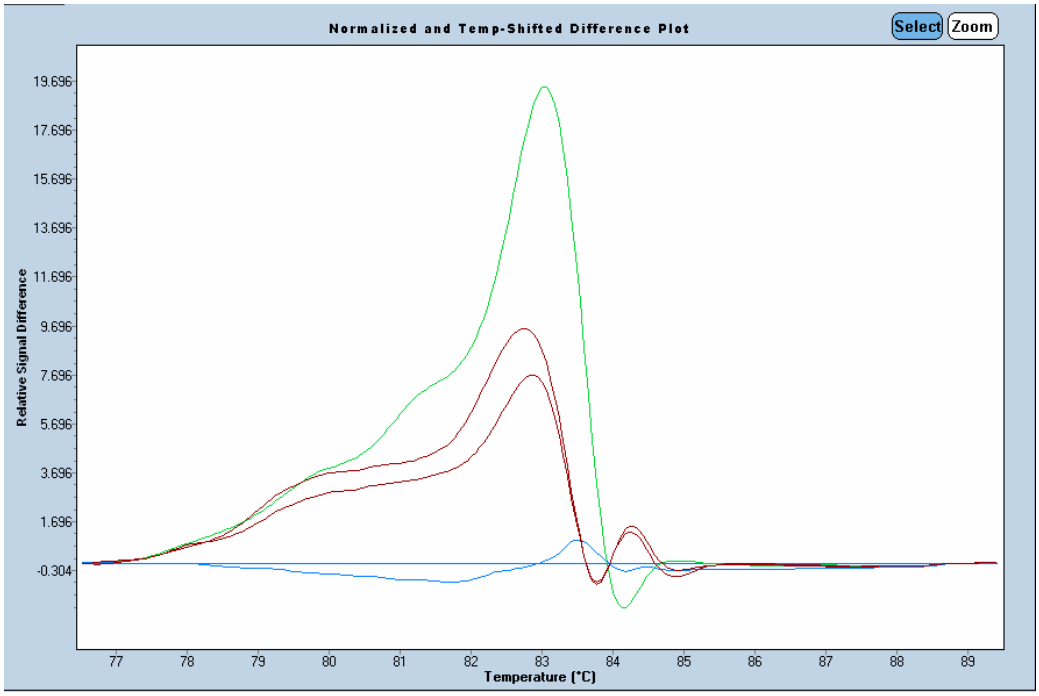


Obr. 9: Získané normalizované křivky tání (barvy odpovídají jednotlivým haplotypům – viz tab. 7)

Tab. 7: Barvy křivek u jednotlivých haplotypů

označení vzorku	známá sekvence v oblasti HVI	barva křivky
1	shoda s rCRS	modrá
2	shoda s rCRS	modrá
3	T16298C	hnědá
4	T16298C	hnědá
5	T16189C	zelená

Ještě výrazněji je rozdílný průběh křivek tání amplifikačních produktů zřejmý z diferenčního grafu (viz obr. 10), což je pouze jiná forma znázornění získaných fluorescenčních dat. Zde je křivka tání znázorněna jako rozdíl fluorescence vzorku vůči fluorescenci námi vybraného vzorku (zde označen modře) při jednotlivých teplotách. I v tomto grafu jsou barevně vyznačeny jednotlivé haplotypy.



Obr. 10: Diferenční graf normalizovaných křivek tání (barvy odpovídají jednotlivým haplotypům – viz tab. 7)

Na základě získaných výsledků můžeme konstatovat, že pomocí metody HRM pro mtDNA v oblasti HVI, kterou jsme provedli na zřízení LightCycler® 480 (Roche), jsme pět reprezentativních vzorků rozřadili do třech skupin, kde vzorky náležící do jedné skupiny mají i shodný haplotyp.

Metodou HRM nejsme sice schopni určit konkrétní haplotypy vzorků, nicméně pokud jsou touto metodou rozřazeny do různých skupin podle průběhu křivky tání, mají tyto vzorky odlišný haplotyp. Vzhledem k poměrně vysoké sekvenční variabilitě mtDNA v oblasti HVI je možná interference jednotlivých záměn, a proto pokud by po analýze metodou HRM byly neznámé vzorky na základě křivky tání zařazeny do jedné skupiny, bylo by nutné tuto shodu ověřit následnou sekvencí Sangerovou metodou. Vzhledem k tomu, že metoda HRM není destruktivní, je možné použít přímo amplifikační produkt po HRM.

Metoda HRM se tedy jeví jako vhodnou screeningovou metodou pro jednoduché, rychlé a ekonomické analýzy mtDNA.

Závěr

V posledních letech zaznamenává využití genetiky v kriminalistice obrovský rozvoj. Analýza DNA je považována již za běžnou ve všech typech případů. S jejich množstvím stoupá i počet těch, které je obtížné řešit pouze za pomoci původně využívaných autozomálních lokusů. Z těchto důvodů je snahou mnoha laboratoří zefektivnit speciální analýzy mtDNA, případně hledat nové metodiky a postupy. Jednou z možností je právě využití metody HRM prováděné na zařízení LightCycler® 480.

HRM technika patří sice k novějším metodám, ale vzhledem k rychlému rozvoji se stává nejvíce žádanou, a to především díky lepší dostupnosti přístrojů a barevných sond. Její velkou výhodou je nízká ekonomická náročnost a jednoduchost provedení. Není potřeba manipulace se vzorky ani separace produktu (např. na gelu), zmenší se tak riziko nežádoucí kontaminace. Metoda HRM není destruktivní, takže jakýkoliv vzorek může být následně osekvenován.

Provedli jsme optimalizaci metody HRM pro oblast HVI mtDNA pro zařízení LightCycler® 480. Dále jsme provedli pilotní studii na pěti reprezentativních vzorcích, u kterých jsme úspěšně rozlišili metodou HRM jednotlivé haplotypy mtDNA v oblasti HVI. Na základě získaných výsledků lze předpokládat, že metoda HRM je vhodná screeningová metoda pro forenzní genetiku. Pro její úspěšné zavedení do forenzní praxe je samozřejmě třeba provést další testování u většího počtu vzorků, u vzorků s nízkou koncentrací mtDNA, dále pro nejrůznější haplotypy a případně metodu rozšířit také o oblast HVII.

Seznam doporučené literatury

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1981). Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature 290*, 457-465.

Andréasson, H. (2005). Sensitive Forensic DNA analysis, Application od Pyrosequencing and Real-time PCR Quantification. Acta Universitatis Upsaliensis.

Atkinson, M.R., Deutscher, M.P., Kornberg, A., Russell, A.F. and Moffatt, J.G. (1969). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. XXXIV. Termination of Chain Growth by a 2‘, 3‘ – dideoxyribonucleotide. *Biochemistry 8*, 4897-4904.

Bendall, K. E., Sykes, B. C. (1995). Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 57(2), 248–256.

Bromová, M. (2003). Molekulárně biologické stanovení pohlaví u lidských jedinců archeologického naleziště v Žatci. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. Praha, 36.

Budowle B., Wilson M. R., DiZinno J. A., Stauffer C., Fasano M. A., Holland M. M., Monson K. L. (1999). Mitochondrial DNA Regions HVI and HVII Population Data, *Forensic science international*, 103(1), 23-35.

BUSTIN, S.A. (2004). A-Z of quantitative PCR, International University Line; 5.

Butler, J.M. (2005). Forensic DNA typing – biology, technology and genetics of STR markers 2nd edition. Elsevier Academic Press, 242 – 265.

Chou, L.S., Lyon, E. and Wittwer, C.T. (2005). A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *Am. J. Clin. Pathol.* 124, 330-338.

Edson, S.M., Ross, J.P., Coble, M.D., Parson, T.J. and Barritt, S.M. (2004). Naming the dead – conforming the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Science Review*.

Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M. and Wallace, D.C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Genetics, Proc Natl Acad Sci U S A 77, 6715-6718.

Hagelberg, E., Clegg, J.B. (1991). Isolation and characterization of DNA from archeological bone. *Philosophical Transactions: Biological Sciences 244*, 45-50.

Isenberg, A. R. and Moore, J. M. (1999). Mitochondrial DNA analysis at the FBI Laboratory. *Forensic Sci Commun 1*.

Kočárek, E. (2007). Molekulární biologie v medicíně. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. Brno, 48-187.

Köchl, S., Niedestätter, H., Parson, W. (2005). DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR, *Methods in molecular biology*, 297, 13–30.

Krypuy, M., Newnham, G.M., Thomas, D.M., Conron, M. and Dobrovic. A. (2006). High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-smallcell lung cancer. *BMC Cancer 6*, 295.

Lutz, S., Witting, H., Weisser, H.-J., Heizmann, J., Junge, A., Dimo-Simonin, N., Parson, W., Edelmann, J., Anslinger, K., Jung, S. and Augustin, C. (2000). Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *For Sci Int 113*, 97-101.

Miller, K.W.P. and Budowle, B. (2001). A compendium of human mitochondrial DNA control region: Development of an international standard forensic database. *Croat Med J* 42, 315-327.

Morovvati, S., Modarresi, M., Habibi, G., Kiarudi, Y., Karami, A., Peyvandi, A. A. (2007). Sequence Analysis of Mitochondrial DNA Hypervariable Regions: An Approach to Personal Identification. Arch Med Res. 38(3): 345-349.

Nielsen, K., Mogensen, H.S., Hedman, J., Niedstätter, H., Parson, W., Morling, N. (2008). Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Science International*: *Genetics 2*: 226 – 230.

Palais, R.A., Liew, M.A., Wittwer C.T. (2005). Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Anal. Biochem. 346*, 167-175.

Raclavský, V. (1998). Úvod do základních metod molekulární genetiky. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc, 4-22.

Rapley, R., Whitehouse, D. et al. (2007), Mitochondrial Analysis in Forensic Science, *Molecular Forencis*, John Wiley a Sons Ltd, Chichester, 128–138.

Reed, G.H., Kent, J.O. and Wittwer, C.T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics, 8(6)*, 598-607.

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

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during polymerase chain reaction. *Anal. Biochem. 245*, 154-160.

Robin, E.D. and Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology 136*, 507-513.

Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V. and Wallace, D.C. (2004) *Science*, 303, 223–226.

Sanger, F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating

inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5463–5467.

Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santtos, J., Dominko, T., Simerly, C. and Schatten, G. (1999). Development: Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature 402*, 371-372.

Šimková, H. (2002). Analýza starodávné DNA z vybraných archeologických a forenzních kosterních nálezů. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. Praha, 25.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005). Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita. Brno, 8-73.

Trešlová, H. (2008). Sekvenování nukleových kyselin. Sborník textů - Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Praha, 25.

Vlášková, H., Trešlová, H. (2008). PCR. Sborník textů - Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Praha, 12-15.

Vodrážka, Z. (2002). Biochemie. Academia, 106.

Vossen, R.H.A.M., Emmelien, A., Roos, A. and den Dunnen, J.T. (2009). High Resolution Melting Analysis (HRMA) - More Than Just Sequence Variant Screening. *Hum Mutat* 30: 1-7.

Wallace, D.C., Brown, M.D. and Lott, M.T. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene 238*, 211–230.

Wojdacz, T.K. and Dobrovic, A. (2007). Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res. 35*, e41.

Internetové zdroje

http://www.policie.cz/clanek/celorepublikove-utvary-kriminalisticky-ustav-praha-zpravodajstvi-test-3.aspx?q=Y2hudW09Mw%3d%3d, cit. 2010-09-18

http://web.natur.cuni.cz/studiumchemie/materialy/Milada_Rostejnska/Biochem/BPLO/PDF/Vyklad/(3)NukleoveKyseliny.pdf, cit. 2010-09-19

http://www.riversideonline.com/health_reference/Tools/DS00549.cfm?RenderForPrint=1, cit. 2010-10-09

http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/mitochondrie.html, cit. 2010-10-09

http://www.biopticka.cz/sluzby/molekularni-genetika/vyzkum-mtDNA.html, cit. 2010-10-23

http://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondri%C3%A1ln%C3%AD_DNA, cit. 2010-10-24

kotacka.webnode.cz/geneticka-genealogie/, cit. 2010-2-28

http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm, cit. 2011-06-13

http://www.thefullwiki.org/Structural_Biochemistry/Polyermase_Chain_Reaction/How_PCR_is_Performed, cit. 2011-06-13

http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm, cit. 2011-06-14

http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/, cit. 2011-06-14

http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/III.workshop/Q_PCR.pdf, cit. 2011-06-14

http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm, cit. 2011-06-14

http://tomas.cooked.cz/tag/sekvenace/, cit. 2011-06-16

http://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html, cit. 2011-06-21

http://www.smgf.org/pages/mtdatabase.jspx, cit. 2011-06-26

http://www.appliedbiosystems.com, cit. 2011-07-02

http://www.linkos.cz/odbornici/org_info/MOU_vyzkum.pdf, cit. 2011-07-04

LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual
https://www.roche-applied-science.com/, cit. 2011-07-10