

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko - technologická

Autentizace myších buněčných linií pomocí STR analýzy

Sabina Poláková

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Sabina Poláková**
Osobní číslo: **C16457**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Autentizace myších liniích pomocí STR**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Rešerše autentizace lidských buněčných linií a myších buněčných linií
2. Optimalizace metody autentizace myších linií (metoda STR)
3. Zavedení multiplexní PCR STR analýzy pro myší buněčné linie

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Dle provedené rešerše

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.

Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlášení autora

Prohlašuji:

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Sabina Poláková

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D., vedoucímu této diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a podporu při zpracování zadaného úkolu.

ANOTACE

Tato práce se zaměřuje na problematiku autentizace myších buněčných linií. Popisuje využití buněčných linií a metody autentizace non-human buněčných linií. V experimentální části . se zabývá optimalizací multiplexní PCR reakce.

KLÍČOVÁ SLOVA

Autentizace, non-human buněčné linie, STR analýza, multiplexní PCR, krátké tandemové repetice

TITLE

Mouse Cell Lines Authentication - STR

ANNOTATION

This work focuses on the problematics of authentication of mouse cell lines. Describes the use of cell lines and basic methods of non-human cell lines authentication. The final section deals with optimization multiplex PCR assay condition.

KEYWORDS

Authentication, non-human cell lines, STR analysis, multiplex PCR, short tandem repeat

OBSAH

ÚVOD	13
1. Buněčné linie a jejich využití jako modelové systémy	14
2. Autentizace buněčných linií	16
2.1 Význam autentizace buněčných linií	16
2.2 Příčiny a prevence křížové kontaminace	18
3. Metody autentizace buněčných linií	19
3.1 DNA polymorfismy	20
3.2 STR analýza	21
3.2.1 Izolace DNA	22
3.2.2 PCR - polymerázová řetězová reakce	23
3.2.3 Fragmentační analýza a interpretace výsledků	25
3.2.4 Výhody a nevýhody metody STR analýzy	28
3.3 DNA Barcoding	29
3.4 Další metody autentizace buněčných linií	31
3.4.1 Izoenzymová analýza	31
3.4.2 DNA karyotypizace	32
3.4.3 NGS sekvenování	33
4. Multiplexní PCR a její optimalizace	34
5. Problémy při STR analýze	37
6. Autentizace non-human buněčných linií	38
6.1 Metody pro autentizaci non-human buněčných linií	38
6.2 Myší buněčné linie	39
6.3 Buněčné linie použité v této práci	41
6.3.1 NIH3T3	41
6.3.2 J774	41
7. Cíle práce	42

8. Experimentální část	43
8.1 Izolace DNA.....	43
8.2 Primery pro STR analýzu.....	45
8.3 Chemikálie, přístroje a další materiál.....	45
8.4 Složení reakční směsi.....	45
8.5 Amplifikační teplotní profil.....	47
8.6 PCR amplifikace.....	47
8.7 Analýza PCR produktů.....	47
8.8 Sestavení multiplexní reakce.....	49
8.9 Analýza smíšených vzorků.....	50
8.10 Optimalizace lokusu X-1.....	50
8.11 Testování vlivu aditiv na PCR produkty.....	51
8.12 Návrh multiplexní reakce s vícebarevným značením.....	52
8.13 Identifikace extrahované DNA metodou fragmentační analýzy COX1.....	54
8.13.1 Primery pro COX1 fragmentační analýzu.....	55
8.13.2 Chemikálie, přístroje a další materiál.....	56
8.13.3 Složení reakční směsi.....	56
8.13.4 Amplifikační teplotní profil.....	56
8.13.5 Postup izolace DNA z mletého masa.....	56
8.13.6 PCR amplifikace a vyhodnocení výsledků.....	57
9. Výsledky a diskuze	58
9.1 Stanovení profilů buněčných linií NIH3T3 a J774.....	58
9.2 Sestavení a finální složení multiplexní reakce.....	59
9.3 Optimalizace teplotního profilu.....	62
9.4 Analýza smíšených vzorků.....	63
9.5 Optimalizace lokusu X-1.....	63
9.6 Vliv aditiv na PCR produkty a lokus X-1.....	65

9.7 Složení a vyhodnocení finálního multiplexu.....	66
10. Závěr	69
11. Seznam citací.....	71
Zdroje obrázků:	76

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Krátké tandemové repetice (ŠIMKOVÁ,2012).....	21
Obrázek 2:Schéma STR analýzy.....	22
Obrázek 3: Schéma polymerázové řetězové reakce (UNIVERSITY OF LEICESTER).....	25
Obrázek 4: Elektroforetogram homozygota a heterozygota (ATCC).....	26
Obrázek 5: Elektroforetogram - shodné buněčné linie	27
Obrázek 6: Elektroforetogram- odlišné buněčné linie	27
Obrázek 7: DNA barcoding schéma (BIORELIANCE).....	30
Obrázek 8: Izoenzymová analýza směsi buněk křečka a myši (BIOPHARM,2005)	32
Obrázek 9: Přednostní amplifikace krátkých fragmentů (STR Data Analysis).....	37
Obrázek 10: Postup izolace DNA (GENERI BIOTECH)	44
Obrázek 11: Přehled setů fluorescenčního značení používaných pro genotypizaci (GENERI BIOTECH).....	52
Obrázek 12: Návrh vícebarevného fluorescenčního značení dle délky amplikonů	53
Obrázek 13: Vzorce použitých fluorescenčních dye (GENERI BIOTECH).....	53
Obrázek 14: Testování zkušebního Primer mixu 1 na buněčné linii NIH3T3.....	60
Obrázek 15: Testování zkušebního Primermixu 2 na buněčné linii NIH3T3.....	60
Obrázek 16: Testování zkušebního Primermixu 3 na linii NIH3T3	60
Obrázek 17: NIH3T3 multiplexní reakce, značení FAM.....	61
Obrázek 18: Porovnání původního a optimalizovaného prodilu DXS_26	63
Obrázek 19: Porovnání dvou koncentrací GB Elite Master mixu v reakční směsi.....	64
Obrázek 20: Analýza buněčné linie NIH3T3.....	67
Obrázek 21: Aanalýza buněčné linie J774.....	67
Obrázek 22: Analýza potkaní buněčné linie WBF344.....	68

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled metod autentizace buněčných linií	31
Tabulka 2: Přehled metod pro autentizaci non-human buněčných linií.....	38
Tabulka 3: Přehled použitých oligonukleotidů (primerů).....	46
Tabulka 4: Korelace vztahu délky fragmentů (bp) a příslušných alel	48
Tabulka 5: Primery pro COX1 analýzu	55
Tabulka 6: Porovnání výsledků COX1 analýzy a očekávaných výsledků.....	57
Tabulka 7: Experimentálně určený profil buněčné linie NIH3T3 a jeho porovnání s referenčním profilem.....	59
Tabulka 8: Profil buněčné linie J774	59
Tabulka 9: Složení multiplexní reakce.....	61
Tabulka 10: Původní amplifikační profil	62
Tabulka 11: Optimalizovaný amplifikační profil.....	62
Tabulka 12: Testování vlivu aditiv	65
Tabulka 13: Finální složení multiplexu	66

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

DNA – deoxyribonukleotidová kyselina

STR – krátké tandemové repetice (*short tandem repeats*)

SNP – jednonukleotidové polymorfismy

PCR – polymerázová řetězová reakce

mtDNA – mitochondriální DNA

NGS – sekvenování nové generace

BSA – hovězí sérový albumin

DMSO – dimetylsulfoxid

ÚVOD

Buněčné linie jsou v současnosti efektivním nástrojem pro studium buněčných mechanismů a mají široké využití jako modelové systémy v biomedicinském výzkumu. Problémem je ovšem nedostatečná kontrola kvality buněčných linií. Následkem jsou záměny buněčných linií nebo jejich kontaminace. Použití kontaminovaných linií nebo záměně lze snadno předejít autentizací - ověřením identity dané linie. Autentizace buněčných linií by měla být rutinním postupem. Používání neověřených buněčných linií totiž představuje rozsáhlý problém, který vede k zavádějícím výsledkům výzkumů.

V současnosti již máme k dispozici řadu účinných metod, jimiž lze ověřit identitu buněčné linie. Pro lidské buněčné linie je nejvhodnější metodou STR analýza. Non-human buněčné linie ale vyžadují jiný přístup. Často pocházejí z geneticky homogenních laboratorních jedinců, u kterých je vysoká míra příbuzenského křížení. Běžné techniky pak nemusí spolehlivě rozeznat buněčné linie odvozené od jedinců stejného inbredního kmene. Problémem u autentizace non-human buněčných linií je také fakt, že nejsou k dispozici komplexní databáze a komerční kity pro všechny druhy.

Cílem této práce je v teoretické části zdůraznit význam autentizace, popsat metody autentizace a rozdíly mezi autentizací lidských a non-human buněčných linií. Tato práce tak plynule navazuje na předchozí bakalářskou práci Autentizace non-human buněčných linií. Hlavní zaměření práce je ovšem na myší buněčné linie, jejichž autentizace je problematičtější, jelikož většina myších linií pochází z inbredních kmenů.

Cílem této práce je vývoj metody autentizace myších buněčných linií na bázi multiplexního STR testu, který by poskytoval unikátní profily a umožňoval snadnou a efektivní autentizaci. Náplní experimentální části je proto zavedení multiplexní PCR STR analýzy pro myší buněčné linie a optimalizace této metody tak, aby mohla mít skutečně rutinní uplatnění v laboratoři. Tato práce tak v sobě shrnuje poznatky o autentizaci non-human buněčných linií v rešerši a zároveň popis procesu optimalizace a zavedení nové metody v experimentální části.

1. Buněčné linie a jejich využití jako modelové systémy

Udržet buňky odebrané z živého organismu životaschopné a efektivně je pěstovat v *in vitro* podmínkách, se dříve zdálo jako nemožné. První, kdo dokázal dlouhodobě kultivovat buňky po jejich vyjmutí z živého organismu, byl francouzský laureát Nobelovy ceny Alexis Carrel, který tak způsobil průlom v historii buněčné biologie [1]. Od prvních pokusů o cílenou kultivaci buněk uběhla již řada let a v současnosti jsme schopni za daných laboratorních podmínek a ve speciálních médiích cíleně pěstovat buňky *in vitro*. Kultivovat lze buňky eukaryotické, rostlinné i prokaryotické. Podle stáří buněčných kultur rozeznáváme primární kultury a buněčné linie. Primární kultury se skládají z buněk odebraných přímo z části živého organismu. Tento druh kultury se však vyznačuje krátkou životností v řádu jen několika dní a problémem je i nehomogenní populace buněk, kdy se v jedné kultuře může vyskytovat více typů buněk.

Tuto nevýhodu primárních buněčných kultur nemají buněčné linie, které jsou velice efektivním nástrojem pro studium buněčných mechanismů a mají proto široké využití jako modelové systémy. Oproti primárním kulturám mají řadu výhod. Procesem transformace u nich lze navodit poruchu regulace buněčného cyklu a získat tak immortalizovanou buněčnou linii, která má téměř neomezenou schopnost buněčného dělení. Hovoříme pak o tzv. kontinuálních buněčných liniích, jejichž dělení není omezeno *Hayflickovým* limitem. Příkladem mohou být HeLa buňky, izolované v 50. letech 20. století z karcinomu děložního hrdla Henrietty Lacksové. Jedná se o immortalizovanou buněčnou linii z lidských epitelových buněk, která se od svého založení stále nepřetržitě dělí [2].

Buněčné linie tedy na rozdíl od primárních kultur mají delší životnost. Pokus také probíhá na jediném dobře charakterizovaném druhu buněk. Jeho výsledky tak nejsou ovlivněny interakcí s jinými buněčnými populacemi, tkáněmi či orgány. Buněčné linie lze snadno kultivovat a v poměrně krátké době lze získat velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu. Buněčná linie by ideálně měla mít zachovanou schopnost proliferace, stabilní diferenciaci a karyotyp [3].

Zároveň je však třeba si uvědomit, že buněčné linie mají i jistá omezení. Jsou pěstovány za nefyziologických podmínek v umělém kultivačním médiu. Proto mohou vykazovat určité rozdíly oproti buňkám v živém organismu, jako například postrádat určité vlastnosti nebo měnit svou morfologii a genovou expresi. Slouží tedy jako *in vitro* model, který však může vykazovat určité odlišnosti od buněk *in vivo*. I přes jmenovaný nedostatek jsou však buněčné linie cenným nástrojem pro výzkum [3].

Dnes mají buněčné linie široké využití v mnoha různých odvětvích biologického výzkumu a jejich obliba jako modelového systému stále stoupá. Důvodem jsou jejich výhodné vlastnosti, jako je například schopnost neomezeného dělení a fakt, že buněčné linie lze vystavit různým podnětům za kontrolovaných podmínek. Tímto způsobem lze získat odpovědi na různé experimentální otázky. Nádorové buněčné linie pomáhají pochopit mechanismy vedoucí ke vzniku nádorů a umožňují studium vlastností nádorových buněk [4]. Dále se buněčné linie uplatňují ve studiu buněčného cyklu a jeho regulace, při pokusech o mapování genomu, klonování nebo obecně při výrobě proteinů. Důležitou roli mají i při výrobě monoklonálních protilátek v imunologii, při testování cytotoxicity, vývoji léků a při genových manipulacích [5].

Nejčastěji využívané jsou lidské buněčné linie. Používané jsou však i tzv. non-human buněčné linie. Běžně se používají savčí linie izolované z laboratorních myší, králíka a křečka [6]. Důležitým mezníkem pro použití non-human buněčných linií byl vývoj inbredních myší, které se staly nejvhodnějším modelovým druhem pro studium a jimiž se zabývá tato práce. Dále se v menší míře lze setkat i s využitím rostlinných buněčných linií, které mají svůj význam v genetickém inženýrství a při vývoji transgenních plodin [7].

Předpokládá se, že buněčné linie jako modelové systémy budou i v budoucnosti dále nabývat na významu. Jejich zvýšenému využití pomáhá i rychlý rozvoj souvisejících oborů jako je molekulární biologie a genomika. Toto zrychlené využití buněčných linií spolu s nedostatkem kontrolních postupů při jejich kultivaci ovšem vedlo ke kontaminacím buněčných linií a k jejich záměnám [6].

Ačkoliv si jsou jednotlivé buněčné linie velmi podobné, nejsou zcela identické a mohou měnit svůj karyotyp, mít sklony k de-diferenciaci nebo podléhat mutacím. Na všech těchto faktorech závisí hodnota kvality výsledků testů, při kterých jsou buněčné linie využívány. Nesmírně důležitým krokem je proto jejich identifikace. Použití kontaminovaných linií nebo záměně lze snadno předejít ověřením typu buněčné linie. Tento postup nazýváme autentizace a v současnosti je dostupných mnoho metod, jak ověřit identitu buněčné linie [8].

2. Autentizace buněčných linií

2.1 Význam autentizace buněčných linií

Autentizace buněčných linií slouží k ověření identity buněčné linie a k odhalení případné záměny nebo kontaminace, které jsou velkým problémem v biomedicínském výzkumu. Kontaminovaná buněčná linie nebo linie, která podlela genovým mutacím či jiným změnám, může vykazovat odlišné vlastnosti a studie provedená na takovéto linii může vést k zavádějícím závěrům a k jejich nesprávné interpretaci. Zejména nádorové buněčné linie mají tendenci ke spontánním genetickým mutacím a jejich vlastnosti se mohou v průběhu experimentu měnit, což je nežádoucí.

Cílem autentizace je prověřit zjisti identitu buněčné linie a to její genotypovou analýzou a porovnáním s referenčním profilem, který je obvykle dostupný v databázích. Pokud srovnání obou profilů neodpovídá, je buněčná linie kontaminována nebo chybně identifikována. Dále je cílem prověřit čistotu buněčné linie a odhalit případnou kontaminaci. Jako poslední je vhodné prověřit i fenotyp, kdy fenotypové znaky (např. citlivost na léky, proliferace) buněčné linie vyplývají z jejího genotypu a vyžadují speciální testy pro ověření konkrétní vlastnosti buněčné linie, která je předmětem našeho výzkumu. Buněčná linie je považována za autentickou, pokud odpovídá původnímu zdroji při srovnání profilů DNA. Autentické buněčné linie udržované v různých laboratořích mohou mít variabilní fenotyp [9].

Autentizace buněčných linií však není prováděna vždy a její význam se do dnes přehlíží. Pro ilustraci - ve studii Johna Ryana z *Corning Life Sciences* pouze 18 % respondentů uvedlo, že pravidelně provádí ověření používaných buněčných kultur ve svých laboratořích. Je však pravděpodobné, že počet laboratoří, které používají netestované linie je ve skutečnosti vyšší [10]. Výsledky nedávné analýzy potvrdily, že až desítky tisíc publikovaných článků využívají buněčné linie bez ověřeného původu. Dle průzkumu je studií, které jsou postaveny na využití nesprávně identifikovaných buněčných linií více než 32 tisíc. Navíc jsou tyto články citovány v dalších publikacích a přispívají tak k šíření nedůvěryhodných výsledků výzkumu. Tento problém má tedy dalekosáhlé následky. Přestože si jej většina vědců již dnes uvědomuje, počet nových publikací založených na neidentifikovaných buněčných liniích i nadále roste [11]. Odhaduje se, že v přibližně 15 až 20 % publikovaných vědeckých pracích jsou použity kontaminované či neověřené buněčné linie [12]. Také se odhaduje, že 18-32 % buněčných linií je v současnosti chybně označeno a identifikováno [10].

Zájem o prevenci kontaminace a o autentizaci buněčných linií však stoupá. Zvýšená pozornost je jí věnována přibližně od roku 1966, kdy byla hlášena kontaminace 18 nezávislých buněčných linií HeLa buňkami [13]. Nejčastějším problémem je právě kontaminace původní buněčné kultury jiným typem buněk. Některé buněčné linie jsou totiž schopné přerůstat ostatní buňky. Rychleji rostoucí, agresivnější linie, přerostou pomaleji rostoucí buněčnou linií a postupně ji úplně nahradí. K tomu stačí i jejich přítomnost ve velmi malém množství. Typickým příkladem jsou již zmíněné HeLa buňky, které se snadno šíří a přerůstají původní buňky. Jsou nejčastějším zdrojem kontaminace. Například průzkum realizovaný v roce 2004 odhalil, že ze 483 respondentů ankety celkem 32 % dotázaných nevědomky pracovalo s HeLa buňkami místo s předpokládanou buněčnou linií [14].

Také bylo zjištěno, že řada buněčných linií je dle genetického profilu identická nebo pochází z jiného zdroje, než se uvádí. Samostatnou kapitolou je kontaminace *Mycoplasmaty*, která zpomalují růst buněk a mění jejich reakci na různé podněty. Méně častá je mezidruhovú kontaminace, kdy kontaminantem jsou buňky jiného živočišného druhu.

Protože v kulturách si jsou na pohled buňky k nerozeznání podobné, bez použití některé z metod autentizace nelze tento problém odhalit. Faktem je, že mnoho současných buněčných linií je již ve skutečnosti kontaminovaných a jedná se o buňky maskované pod jiným názvem. Pro vyřešení tohoto problému je nutné zavést jistá opatření. Autentizace buněčných linií by měla být základní podmínkou pro publikování studie na buněčných liniích ve vědeckých časopisech, pro udělení grantů a dotací na výzkumné programy. Autentizace buněčných linií má sloužit jako prevence k dalšímu plýtvání financí na studie, jejichž výsledky jsou nedůvěryhodné [6]. Použití autentizace buněčných linií vždy před začátkem nové studie by mělo sloužit k ověření, že v kultuře máme jeden požadovaný typ buněk. Cílem je úplně eradikovat všechny kontaminované a nesprávně identifikované buněčné linie. V současnosti již máme k dispozici řadu účinných a rychlých metod, jimiž lze ověřit identitu buněčné linie, detekovat přítomnost Mykoplasmat nebo odhalit případnou mezidruhovú kontaminaci [12].

2.2 Příčiny a prevence křížové kontaminace

Neověřené a kontaminované buněčné linie se stále používají v nepříjemně vysoké frekvenci. Jedním z důvodů je nedostatečná kontrola kvality a nedodržování ověření identity buněčné linie jako rutinního postupu [15].

Největším problémem jsou kultury, které byly chybně identifikovány již na začátku při jejich zavedení. Tyto kultury jsou dodnes používány a uživatelé tak nevědomky pracují s jinou buněčnou linií. K šíření kontaminace přispívá i fakt, že mnoho laboratoří používá netestované buněčné linie z neoficiálních zdrojů. Nesprávně identifikované linie si tak mezi sebou laboratoře navzájem předávají. Je to levnější alternativa, než nákup z buněčných bank, které jsou ovšem důvěryhodnějším zdrojem. Většina buněčných bank již dnes rutinně ověřuje totožnost buněčné linie předtím, než ji distribuuje svým zákazníkům [10]. Konkrétně se jedná např. o instituce - *The American Type Culture Collection (ATCC)*, *European Collection of Cell Cultures (ECACC)*, *DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)*.

V roce 2012 též byla vytvořena databáze kontaminovaných buněčných linií ICLAC (*International Cell Authentication Committee*) [16]. V databázi jsou buněčné linie seřazeny dle názvu spolu s uvedeným buněčným druhem, typem a informací, jakou nežádoucí buněčnou linií jsou kontaminovány. Seznam byl naposledy aktualizován v prosinci roku 2016 a nyní obsahuje 451 buněčných linií [17].

Ke kontaminaci dochází i vlivem nevhodné manipulací s buněčnými liniemi. Časté je šíření pomocí aerosolů nebo náhodným kontaktem. Zásadní je používat média, činidla, pipety a další pomůcky pro každou buněčnou linii zvlášť. Časté jsou i náhodné chyby při popisu kultivačních nádob. Laboratorní pracovníci by proto měli být řádně proškoleni a respektovat zásady práce v buněčné laboratoři [18].

Jako prevence je vhodné provést autentizaci buněčné linie při nákupu nebo zakoupení již ověřenou kulturu. Žádoucí je provádět autentizaci před zahájením experimentu, v jeho průběhu i na konci, aby se vyvrátila možnost případné kontaminace [6]. Pro efektivní eradikaci kontaminovaných buněčných linií je nutná spolupráce buněčných bank, uživatelů a vědeckých periodik. Důležité je zdůrazňovat význam autentizace a informovat uživatele o správné práci s buněčnými liniemi. Jen tak lze zabránit dalším experimentům prováděným na buněčných liniích s neověřeným původem.

3. Metody autentizace buněčných linií

V současnosti je dostupných mnoho metod k ověření identity buněčné linie, které se liší v mnoha ohledech. Rozeznáváme metody, které slouží k určení identity jedince nebo metody, které slouží k ověření druhu. Autentizace dnes zahrnuje nejen ověření identity buněčné linie, ale i testování kontaminace. Důležité je zvolit správnou metodu, protože tatáž metoda nemusí být vhodná pro všechny vzorky. Každá z uvedených metod má své výhody i nevýhody. Při výběru vhodné metody je třeba zvážit i další faktory, jako je finanční náročnost a vybavení, které má laboratoř k dispozici [19].

V době, kdy se ověřování buněčných linií teprve zavádělo, byla nejpoužívanější metodou cytogenetická chromozomální analýza a izoenzymová analýza. Obě techniky byly velmi pracné a náročné na zkušenosti pracovníka i na vybavení. V současnosti je pro lidské i non-human buněčné linie nejpoužívanější metoda STR analýzy. Pro svoji spolehlivost a další výhody je doporučována jako snadný, dostupný a ekonomický způsob, jak potvrdit identitu buněčné linie. Řada laboratoří a dalších institucí ji dnes nabízí jako jednu ze svých standardních služeb. Dostupné jsou i rozsáhlé databáze, které slouží k porovnání profilů testované a referenční buněčné linie [20]. Tato metoda se používá primárně pro lidské buněčné linie. Lze ji však aplikovat i na non-human buněčné linie, jak jsme dokázali v experimentální části této práce. Jelikož je STR analýza hlavní metodou využívanou v této práci, je jí věnována samostatná podrobná kapitola.

Samostatná kapitola je též věnována autentizaci non-human a myších buněčných linií, které vyžadují jiný přístup a metody. K ověření druhu se v současnosti nejvíce používají druhově specifické primery a DNA barcoding. Pro myší buněčné linie se využívají jednonukleotidové SNP polymorfismy a experimentuje se i s dalšími metodami.

3.1 DNA polymorfismy

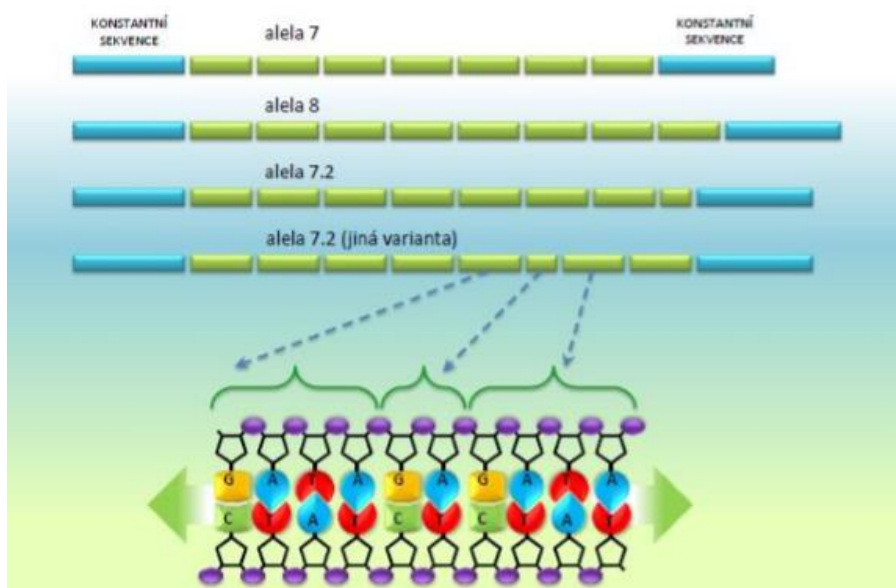
Nositelkou genetické informace u eukaryot a prokaryot je DNA neboli deoxyribonukleová kyselina. Ve všech buňkách jednoho organismu je stejná DNA. Ve struktuře DNA jsou však u každého jedince určité individuální rozdíly. Tyto variabilní úseky DNA nazýváme polymorfismy a lze je využít k identifikaci jedince. DNA fingerprinting je soubor metod, který využívá DNA polymorfismy k ověření identity jedince nebo v našem případě k určení identity buněčné linie [6].

Tuto techniku vyvinul v roce 1984 britský genetik Alec Jeffreys. V současné době je to nejpoužívanější způsob identifikace jedince. Využívá toho, že v lidském genomu je řada sekvenčních i délkových polymorfismů [19]. Jedná se o jedno-nukleotidové SNP polymorfismy, které vznikají záměnou jednoho nukleotidu v DNA sekvenci za jiný nukleotid. Dále lze využít i délkové polymorfismy, u kterých nedochází ke změně v základní sekvenci, ale k rozdílnému počtu opakování tzv. tandemových repetitivních sekvencí. V rámci populace se liší délka i počet repetitivních sekvencí [21].

Tyto úseky DNA nazýváme mikrosatelity nebo též *short- tandem repeats*. Opakuje se v nich základní sekvenční motiv o délce 2-13 bp a o to několikrát za sebou (tandemově). Počet těchto repetitivních jednotek je variabilní a řádově se jedná o jednotky až desítky opakování. Délka těchto úseků může být různá. STR polymorfismy jsou roztroušeny po celém genomu a jsou chápány jako rozdíly na úrovni DNA mezi genotypy jednotlivců. Jejich dědičnost odpovídá Mendelovským pravidlům, kdy počet opakování repetitivních jednotek na konkrétním místě DNA (lokusu) definuje alelu [22]. Jedinec může zdědit obě alely stejné, se shodným počtem opakování krátkých tandemových repetitivních jednotek a pak se jedná o homozygota. Heterozygotní jedinec naopak zdědil dvě odlišné alely [23].

STR úseky jsou považovány za nejvhodnější marker, který lze využít k určení identity jedince, protože počet opakování jednotek STR úseků je vysoce variabilní mezi jednotlivci a zároveň se tyto úseky hojně vyskytují v celém genomu [24]. STR úseky jsou také poměrně stabilní a málo podléhají novým mutacím. Variability těchto úseků využívá STR analýza. Pro větší rozlišení se testuje více STR lokusů a to obvykle ty, které jsou nejvariabilnější. Platí, že čím více polymorfnější lokusy se testují a čím jich je více, tím menší je pravděpodobnost, že by u nepříbuzných jedinců došlo k identické sestavě alel. Jednotlivé alely přitom označujeme číslem, které udává počet opakování základního motivu.

Proces profilování DNA pomocí STR úseků zahrnuje několik kroků. Nejprve izolaci DNA z buněčné linie nebo jiného vzorku, navázání primerů k cílovým oblastem, amplifikaci a nakonec analýzu amplifikovaného produktu [25].



Obrázek 1: Krátké tandemové repetice (ŠIMKOVÁ,2012)

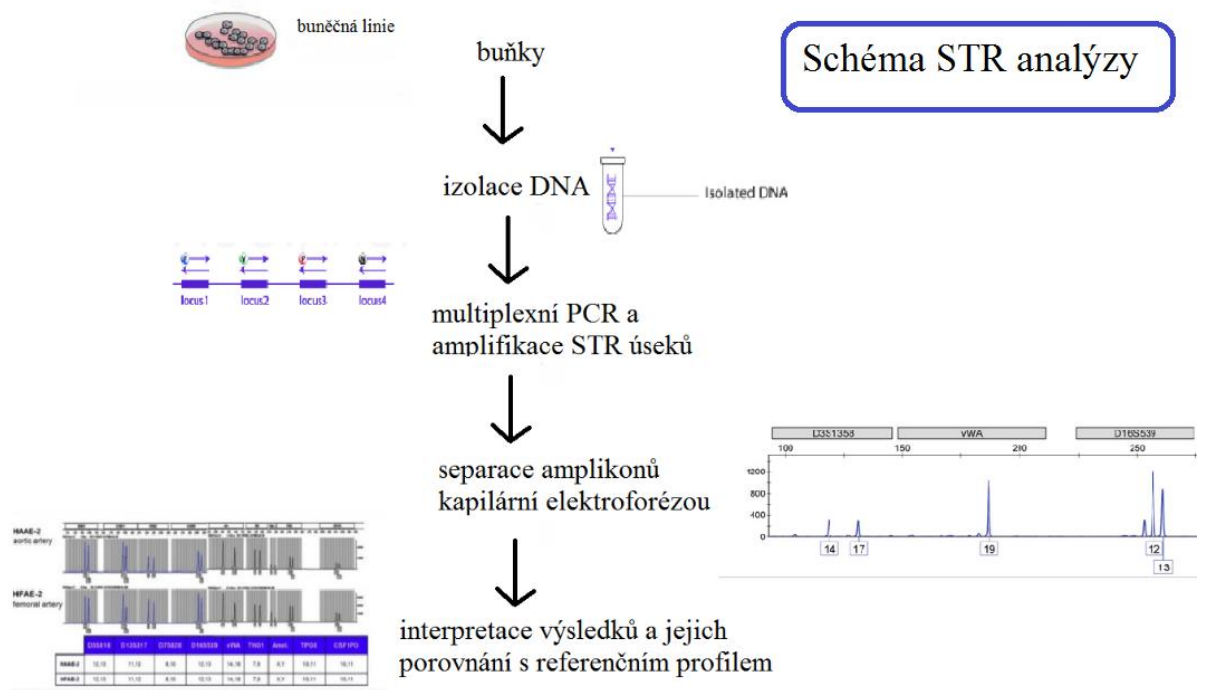
3.2 STR analýza

STR analýza je v současnosti nejpoužívanější metodou pro autentizaci lidských buněčných linií. Její využití není však omezené pouze na ověření identity buněčných linií. Variabilitu polymorfních STR úseků lze využít i při forenzní analýze, kriminalistice, určování příbuznosti, rodičovství a při dalších aplikacích [26]. V současnosti je tato metoda považována za referenční, standardizovanou a dostupné jsou rozsáhlé databáze referenčních profilů buněčných linií. Dostupné jsou i komerční kity s předem připravenými primery a standardní směsí, která obsahuje polymerázu, pufrý a další komponenty PCR reakce [27].

Při autentizaci buněčných linií se analyzují STR markery na specifických pozicích DNA daného vzorku. Obvykle se vyšetřuje více polymorfismů najednou a to ty, které jsou v rámci populace nejvariabilnější. Prvním krokem je izolace DNA z dané buněčné linie, tkáně nebo jiného vzorku [26]. Poté následuje amplifikace specifických polymorfních úseků DNA, která se provádí pomocí PCR – polymerázové řetězové reakce. Obvykle se testuje více úseků současně v multiplexu, a proto hovoříme o multiplexní PCR. Při PCR reakci využíváme dva primery přímý a reverzní (též *forward a reverse*) z nichž jeden je fluorescenčně značený (*forward* na svém 5' konci). Následně jsou amplikony získané z PCR reakce rozděleny podle své velikosti

a to metodou gelové kapilární elektroforézy. Jednotlivé fragmenty jsou fluorescenčně označeny a detekuje se právě fluorescence značených fragmentů. Zajímá nás velikost daného fragmentu, jeho kvalita a druhotně také kvantita.

Při autentizaci buněčných linií je závěrečným krokem porovnání získaného STR profilu testované buněčné linie s profilem referenčním, který je uveden v databázi buněčných bank. Jestliže se oba profily shodují, skutečně se jedná o danou buněčnou linii. Pokud se profily neshodují, pravděpodobně došlo ke kontaminaci nebo k záměně buněčné linie [27]. Porovnání s referenčním profilem jsme prováděli i v rámci této práce u myši buněčné linie NIH3T3, kdy jsme vlastní experimentálně získaná data porovnávali s referenčním profilem.



Obrázek 2: Schéma STR analýzy

3.2.1 Izolace DNA

Prvním krokem při autentizaci buněčných linií je izolace DNA. Proces začíná centrifugací suspenze buněčné kultury, při které dojde k jejímu rozdělení na sediment a supernatant. Sediment je dále využit k izolaci DNA.

Pro izolaci genomové DNA se dnes obvykle využívají komerčně dostupné soupravy na principu izolace DNA vazbou na silikátovou kolonku. Běžné sestavy obsahují lyzační pufr, který rozpouští membrány, enzym proteinázu K pro štěpení bílkovin a RNAázy pro štěpení RNA. Poté, co se zbavíme nežádoucích komponent se buněčný lyzát přenesse na izolační

kolonku se silikátovým povrchem a v přítomnosti chaotropních solí se DNA adhuje na silikát. Následují promývací kroky a eluce čisté DNA [28].

Proces izolace DNA jsem si vyzkoušela i prakticky, jelikož byl prvním krokem při zahájení naší experimentální práce, kdy cílem bylo izolovat DNA z buněčných linií NIH3T3 a J774.

3.2.2 PCR - polymerázová řetězová reakce

Dalším krokem je amplifikace získané DNA pomocí metody polymerázové řetězové reakce. Tato metoda slouží ke zmnožení (amplifikaci) určitého úseku DNA *in vitro* [6].

Pro použití PCR je nutné znát část nukleotidové sekvence před a za cílovou sekvencí. Na tyto sekvence totiž nasedají primery, což jsou syntetické oligonukleotidy o délce 10-25 nukleotidů [29]. Primery slouží jako počáteční místo replikace. Nasedají na úsek DNA, ke kterému jsou komplementární a ohraničují oblast, která se má amplifikovat. K úspěšně provedené PCR reakci je třeba mít správně zvolené primery. Primery musejí být specifické pro amplifikovanou sekvenci a měly by být zcela komplementární k úseku, na který mají dosedat. Primery by též neměly být komplementární k sobě navzájem. V takovém případě se samy začnou chovat jako templáty a během reakce se budou tvořit jejich dimery.

Primery patří mezi jednu ze základních složek reakční směsi. Další složkou je templátová DNA ze vzorku. Klíčovou komponentou je enzym DNA polymeráza, která při amplifikaci buduje nový řetězec podle templátu. Nejčastěji se používá Tag- polymeráza, která pochází z termofilních bakterií *Thermus aquaticus* a je termostabilní. Díky této vlastnosti polymerázu stačí přidat pouze na začátku reakce, v průběhu PCR nedegraduje a odolává denaturaci i při teplotě 95 °C. Její teplotní optimum se pohybuje kolem 72 °C, kdy dokáže k primeru přidat až 150 bází za sekundu. Nevýhodou však je, že tento typ polymerázy není schopen amplifikovat úseky delší než několik tisíc nukleotidových párů. Dnes se polymerázy vyrábějí rekombinantními technologiemi a lze využít i jiné typy polymeráz, které mají vyšší aktivitu, dokáží syntetizovat delší řetězce nebo mají 3'-exonukleasovou aktivitu, která jim umožňuje opravit chybně zařazené nukleotidy.

Kofaktorem polymerázy jsou Mg^{2+} ionty. K tomu aby polymeráza mohla začít budovat nové vlákno, jsou potřeba volné nukleotidy (dNTP). Jde o směs deoxynukleosid trifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), které slouží jako základní stavební jednotky při syntéze nového

vlákna. Další složkou směsi je vhodný PCR pufr, který udržuje pH a optimální aktivitu DNA-polymerázy [29].

Důležité je, aby vzorek neobsahoval inhibitory PCR reakce, které mohou narušit její průběh a výsledek. Často se jedná o látky, které se běžně používají při purifikaci a izolaci DNA, jako je o heparin, fenol nebo proteinasa K.

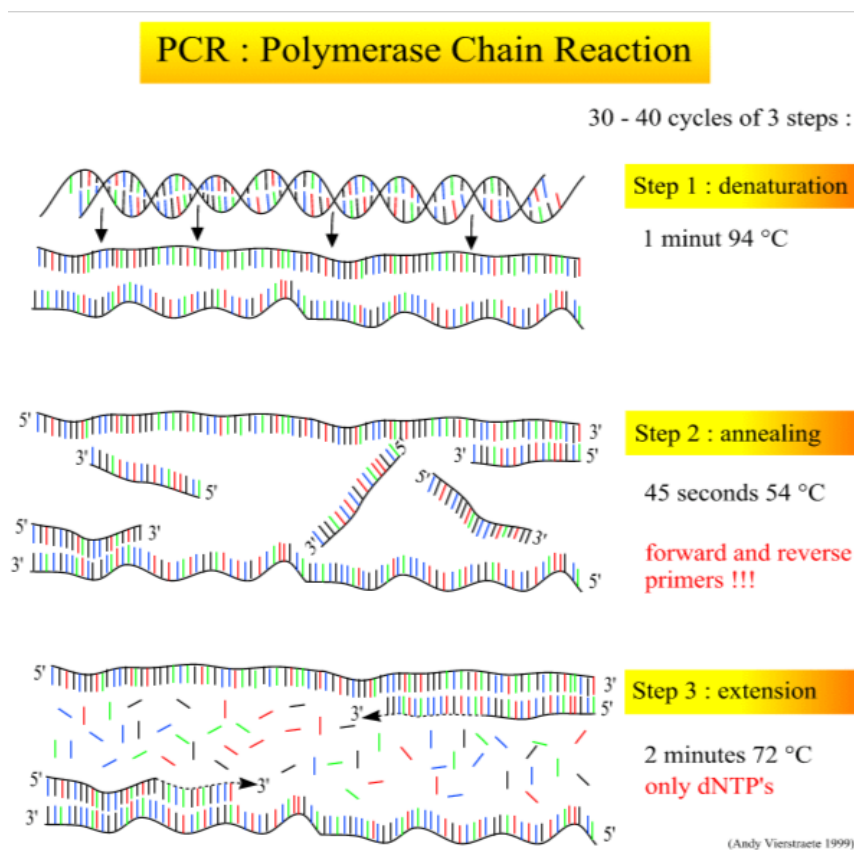
V současnosti lze využít komerčně dostupné předpřipravené Master mixy, které již obsahují namíchané PCR komponenty - pufr, hořčík, nukleotidy a DNA polymerázu. K Master mixu stačí pouze přidat templátovou DNA a primery. Komerční Master mixy jsme používali i v experimentální části práce, abychom snížili čas nutný pro přípravu reakce a eliminovali riziko chyb při přípravě směsi.

K pozitivnímu ovlivnění průběhu reakce lze použít i přídatné látky neboli aditiva, jež mohou ovlivnit účinnost a specifitu reakce. K tomuto účelu se používá BSA (albumin z bovinního séra) nebo DMSO (dimetylsulfoxid), s kterými jsme pracovali v experimentální části práce a která redukuje nespecifickou vazbu primerů.

Vlastní PCR reakce se skládá ze tří opakujících se kroků- denaturace, annealingu a polymerace. Prvním krokem je denaturace. Templátová DNA je denaturována zahřátím na teplotu 92 až 95 °C. Tento krok trvá přibližně 30 sekund a dojde během něho k rozpadnutí vodíkových můstků, které k sobě poutají komplementární vlákna DNA dvojšroubovice. Vznikne tak jednovláknová *ssDNA*, na kterou v dalším kroku nasedají primery a to při teplotě 50-60 °C. Teplota, při které probíhá annealing neboli nasedání primerů, musí být vhodně nastavena pro použitý pár primerů. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, k nimž jsou komplementární jen z části a vytvořit tak nespecifický produkt. Naopak při příliš vysoké teplotě budou primery hybridizovat málo a produktu se nevytvoří dostatečné množství.

Během polymerace dochází k navázání volných nukleotidů a prodlužování řetězce. Syntézu nových řetězců katalyzuje DNA polymeráza a to od místa nasednutí primeru, ve směru od 3'-konce. Prodlužování řetězce probíhá při teplotě 65-75 °C. Výsledné syntetizované sekvence DNA slouží v dalším cyklu PCR jako templát. Platí, že kvantita produktu roste exponenciálně, protože v dalším cyklu jako templát pro polymerasu slouží i nově vytvořené řetězce. Počet cyklů se pohybuje kolem 25-35 opakování. Po určitém množství cyklů však dojde k vyčerpání složek potřebných k amplifikaci a výtěžek nově syntetizované DNA se již nezvyšuje.

Amplifikační kroky jsou řízeny střídáním teploty v termocykléru. Ten zajišťuje rychlé, přesné a cyklické střídání teplot.



Obrázek 3: Schéma polymerázové řetězové reakce (UNIVERSITY OF LEICESTER)

Výsledkem PCR je amplifikovaný požadovaný úsek DNA, který lze vizualizovat po inkorporaci UV fluorescenčního barviva do DNA pod UV světlem. Při analýze více lokusů je výhodné sestavit tzv. multiplexní PCR, při které se amplifikujeme více lokusů v jedné reakci [30]. Právě sestavení a optimalizace reakčních podmínek PCR reakce byla hlavní náplní této práce. Sestavením multiplexu jsme snížili finanční i časové náklady na analýzu.

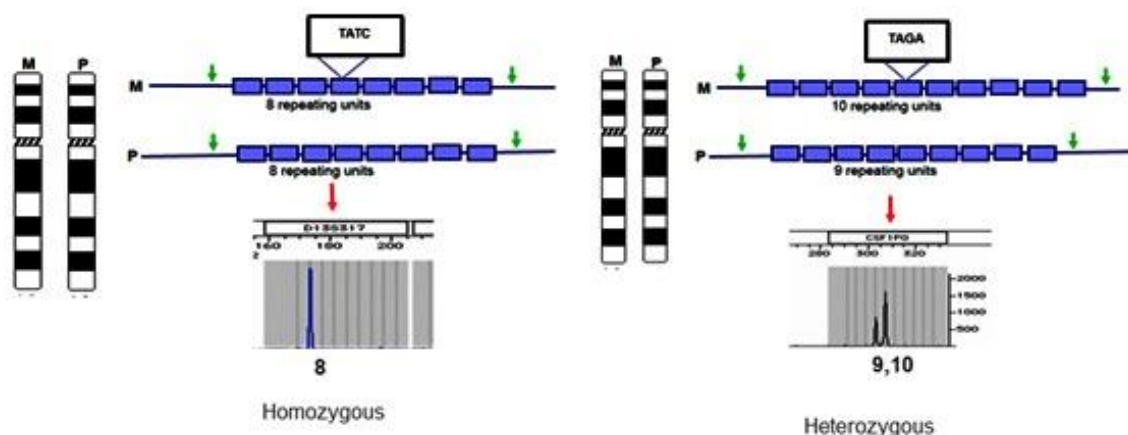
3.2.3 Fragmentační analýza a interpretace výsledků

Dalším krokem STR analýzy je rozdělení získaných ampliconů pomocí kapilární elektroforézy na základě jejich odlišné délky. Každý z ampliconů je fluorescenčně značený a detekuje se jejich fluorescence. Obvyklé je značení jedním fluoroforem. V praxi se však často analyzuje více lokusů v jedné reakci (tzv. multiplexní PCR), které jsou značený různými fluorescenčními barvivy. V této práci jsme se zabývali i vlastním návrhem tříbarevného fluorescenčního značení pomocí fluorescenčních dye HEX, CFR610 a FAM.

Vlastní separace fragmentů probíhá v kapiláře s polymerem podle jejich molekulové hmotnosti a rychlosti migrace v elektrickém poli. Po vložení napětí se fragmenty začnou pohybovat směrem k anodě. Rychleji se pohybují fragmenty kratší, pomaleji delší. Každé z použitých barviv po excitaci laserem emituje charakteristické spektrum, přičemž intenzitu záření zaznamenává detektor. V časovém záznamu elektroforézy – elektroforetogramu, se zaznamenaný signál objeví jako pík. Výsledkem je rozdělení amplikonů na základě jejich délky a časový záznam elektroforézy [31].

Elektroforetogram poskytuje informace o intenzitě fluorescence a o délce fragmentů. Intenzita fluorescence je charakterizována výškou píku na ose y. Osa x znázorňuje migrační čas jednotlivých fragmentů. Platí, že čím delší fragment, tím delší má i migrační čas. Fragmenty DNA jsou prezentovány jednotlivými píky v elektroforetogramu. Délka těchto fragmentů se porovnává s vnitřním velikostním standardem, což je soubor fragmentů se známou délkou, který umožňuje přesné stanovení délky fragmentů.

Elektroforetogram je důležitý při interpretaci výsledků. Lze z něj vyčíst, jestli se jedná o homozygota nebo heterozygota. U diploidní buněčné linie jsou vždy k dispozici dvě kopie téhož genu [6]. V případě, že obě kopie alely mají stejný počet opakujících se jednotek, fragmenty mají stejnou velikost, migrují v elektrickém poli stejnou rychlostí, a proto se zobrazí na elektroforetogramu jako jeden pík. Zatímco heterozygot má dvě odlišné alely, což se na elektroforetogramu projeví jako dva různé píky [31].

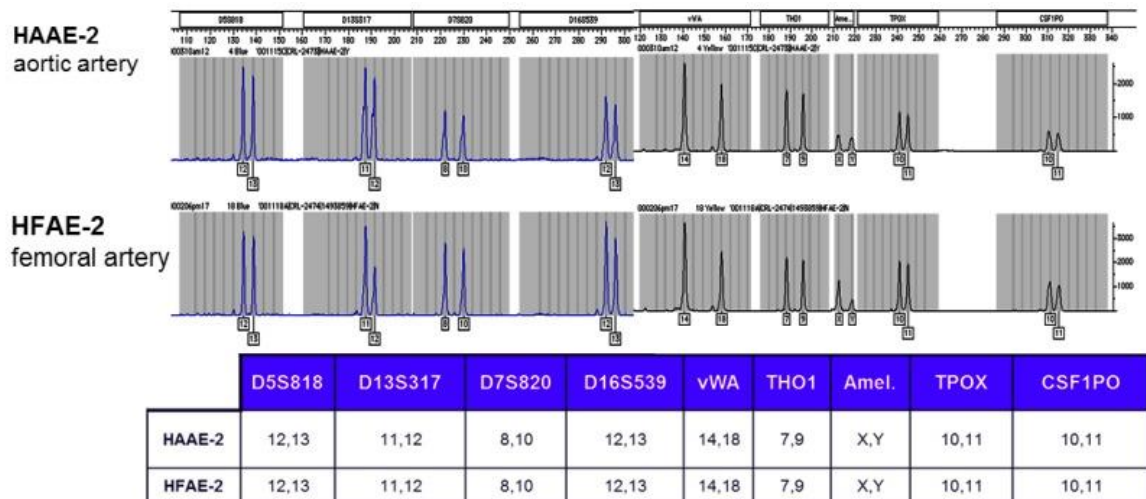


Obrázek 4: Elektroforetogram homozygota a heterozygota (ATCC)

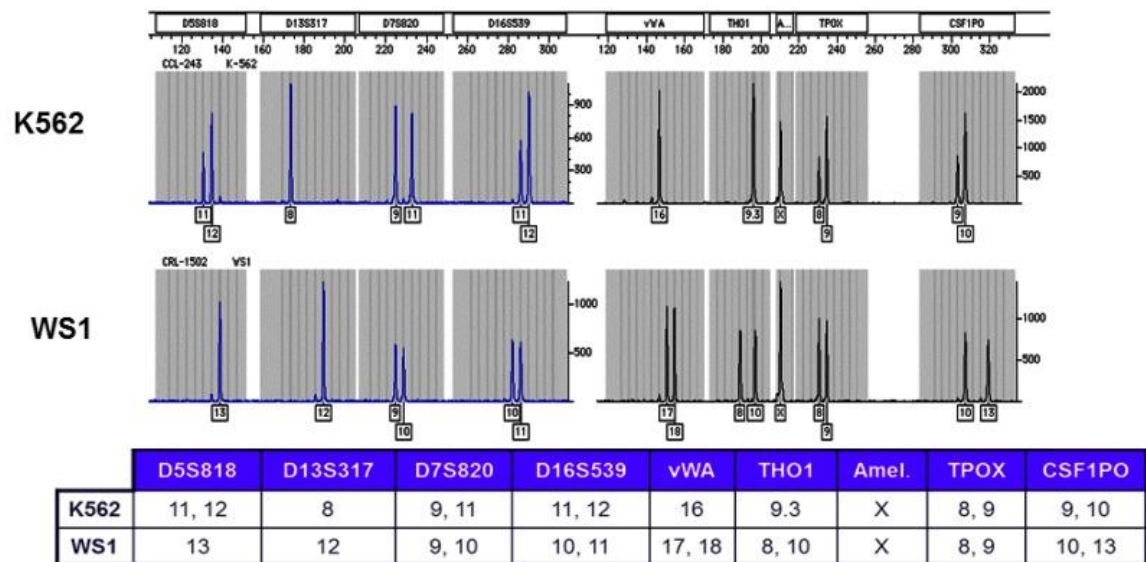
Finálním krokem při autentizaci buněčných linií je porovnání výsledného elektroforetogramu s referenční databází naprofilovaných buněčných linií. Porovnává se vzájemná shoda získaného a referenčního elektroforetogramu. Pokud jsou buněčné linie shodné, projeví se to na elektroforetogramu jako stejně vysoké a totožně umístěné píky. Naopak

jestliže buněčné linie nejsou shodné, mají na elektroforetogramu odlišně umístěné píky. Pokud je shoda mezi testovanou buněčnou linií a linií v databázi více než 80 %, jedná se o stejnou linii. Pokud je shoda 50-80 % je vhodné provést další analýzu. Při shodě méně než 50 % se jedná o rozdílné linie [32].

Pomocí elektroforetogramu lze odhalit i případnou kontaminaci buněčné linie, která se projeví přítomností více než dvou píků u dvoualelového polymorfismu.



Obrázek 5: Elektroforetogram - shodné buněčné linie



Obrázek 6: Elektroforetogram- odlišné buněčné linie

3.2.4 Výhody a nevýhody metody STR analýzy

Metoda STR analýzy je doporučována jako nevhodnější referenční metoda pro autentizaci buněčných linií. Její velkou předností jsou rozsáhlé databáze naprofilovaných buněčných linií, které slouží k porovnání dat [33]. Dále se metoda vyznačuje vysokou citlivostí, přičemž k úspěšné analýze stačí méně než 100 ng DNA. Další výhody jsou rychlost, snadná dostupnost a relativně příznivá cena [27]. STR analýza však neposkytuje žádné informace o genomových modifikacích, jako jsou genomové přestavby typické pro nádorové linie [34].

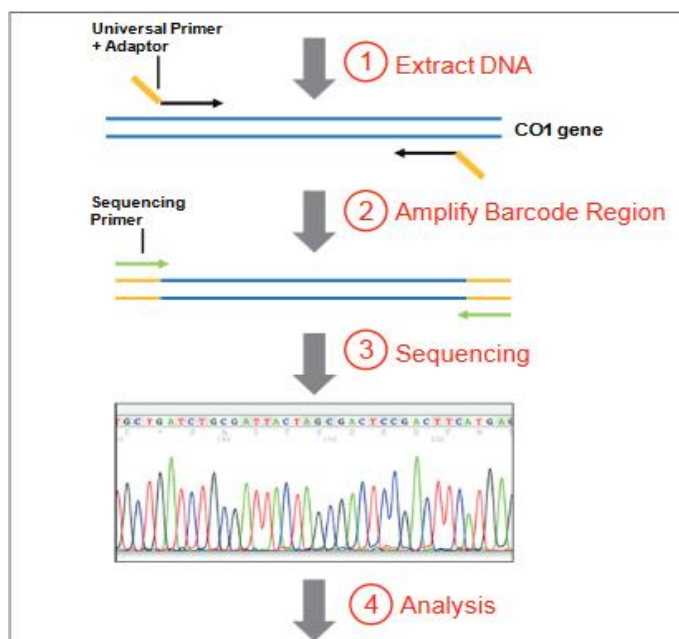
STR analýzu dnes nabízí mnoho specializovaných firem jako běžnou službu a obecně je STR analýza na vzestupu. Dostupné je množství kitů a specializovaných softwarů. Většina komerčních souprav je určena k autentizaci lidských buněčných linií, ale dostupné jsou i kity pro analýzu non-human buněčných linií. Použití STR analýzy se však neomezuje jen na autentizaci buněčných linií. Umožňuje individuální identifikaci jedince, identifikaci buněčné linie nebo určování příbuznosti. Metoda má široké uplatnění ve forenzní genetice, kriminalistice, genealogii, v medicíně, v prenatální diagnostice a při diagnostice genetických poruch [35].

3.3 DNA Barcoding

Metodu zvanou DNA barcoding, poprvé navrhli v roce 2003 vědci z *University of Guelph* v Ontariu, jako taxonomickou metodu vhodnou k určení živočišného druhu organismu[6]. V současnosti metoda slouží jako základní nástroj pro druhovou identifikaci neznámého vzorku a k taxonomických účelům. Základní myšlenkou této metody je, že každý biologický druh ve svém genomu obsahuje krátkou sekvenci, která je pro něj naprosto unikátní a podle které může být snadno identifikován. Tato oblast by měla vykazovat velké mezidruhové rozdíly, vyvíjet se a podléhat mutacím dostatečně rychle na to, aby byla odlišná od sekvencí jiných druhů. Dostatečně velkou mutační rychlost má mitochondriální DNA, která se dědí maternálně a vykazuje i další výhodu, jako je fakt, že v jedné buňce může být až tisíc mitochondrií [36]. Z již malého vzorku tkáně je proto velká šance na úspěšné vyextrahování mitochondriální DNA [37].

Nejvhodnější oblastí pro určení druhu je úsek dlouhý 648 párů bází genu pro podjednotky I cytochromoxidázy (COI). Tento úsek mitochondriálního genu vykazuje značné mezidruhové rozdíly a naopak malou variabilitu v rámci druhu. Úsek je dostatečně krátký pro rychlou analýzu a zároveň dostatečně dlouhý na to, aby mohl spolehlivě sloužit k identifikaci druhu. Metodu lze navíc aplikovat téměř na všechny živočišné skupiny, u kterých se tento úsek vyskytuje. DNA barcoding lze použít pro určování ptáků, ryb, savců, hmyzu a dalších živočišných skupin. Proběhly i úspěšné pokusy o molekulární identifikaci mtDNA plazů. Problém však nastává, pokud chceme DNA barcoding použít u rostlin. Lze však využít jiné vhodné oblasti, konkrétně dvě genové oblasti chloroplastu *matK* a *rbcL*. U hmyzu je naopak vhodné se zaměřit na úsek prvních 450 bp úseku pro COI[38].

Metoda zahrnuje několik kroků. Prvním z nich je izolace mtDNA. Poté následuje PCR amplifikace úseku cytochromoxidázy I (COI) pomocí dvojice primerů, které jsou komplementární k cílové sekvenci. Dalším krokem je sekvenování získaných ampliconů a porovnání sekvence DNA s referenčními sekvencemi v databázi. Databáze slouží jako veřejná knihovna sekvencí z již naprofilovaných exemplářů různých druhů. Porovnáním s těmito referenčními sekvencemi lze identifikovat i neznámý vzorek. V současné době existují dvě hlavní databáze, které naplňují tuto roli [39]. Nejrozsáhlejší je evropská *EMBL*, což je Evropská primární nukleotidová databáze. Další databází je například americká GenBank při Národním centru biotechnologické informace (NCBI). Referenční sekvence zatím nejsou dostupné pro všechny druhy, předpokládá se však, že další budou brzy následovat [36].



Obrázek 7: DNA barcoding schéma (BIORELIANCE)

Při autentizaci buněčných linií je doporučeno používat DNA barcoding pro genetickou identifikaci non-human buněčných linií. Metoda je vhodná k identifikaci druhu. Naopak není vhodná k identifikaci konkrétního jedince, protože jak již bylo zmíněno, oblast COI vykazuje jen malou vnitrodruhovou variabilitu. Lze i ověřit, jestli není např. lidská buněčná linie kontaminována buněčnou linií jiného druhu. Pro ověření identity buněčných linií, nejčastěji používaných v laboratořích, lze použít multiplexní PCR reakce pro současné určení více druhů. Je možné detekovat 14 nejčastějších druhů. Je ovšem nutné optimalizovat PCR reakci a všechny komponenty. Současně lze využít i přístup se speciálně navrženými druhovými primery, kdy pro každý druh vzniká při PCR jinak velký amplikon. S jejich pomocí lze určit následující druhy: člověk, myš, krysa, čínský a syrský křeček, kočkodan zelený.

DNA barcoding však neslouží pouze k identifikaci buněčných linií. Je nepostradatelným výzkumným nástrojem pro taxonisty, slouží k mapování druhové rozmanitosti, k objevování nových druhů a řešení evolučních otázek. Ačkoliv je metoda známa přibližně po dobu deseti let, její využití narůstá a počet sekvencí v databázi exponenciálně stoupá. Jde o rychlý a spolehlivý způsob, jak identifikovat druh a v kombinaci s STR analýzou poskytuje nejkompaktnější informace o původu buněčné linie [40].

3.4 Další metody autentizace buněčných linií

Ačkoliv je v současnosti STR analýza jednoznačně nejpoužívanější metodou pro autentizaci buněčných linií, k dispozici je mnoho dalších metod autentizace. Výběr správné metody autentizace záleží na našich požadavcích, zkušenostech pracovníka a dostupném vybavení. Přehled nejběžnějších metod a jejich využití je popsáno v následující tabulce. Ke studiu chromozomálních abnormalit se používá karyotypizace. Metody DNA profilování pomocí SNP nebo STR polymorfismů jsou nejvhodnější k autentizaci. Umožňují individuální identifikace jedince, odhalení mezidruhovú kontaminace i spontánních mutací. DNA Barcoding a druhově specifické primery se používají pro určení druhu a jsou schopné odhalit i případnou mezidruhovú kontaminaci.

Tabulka 1: Přehled metod autentizace buněčných linií

	DNA Barcoding	Karyotypizace	STR	SNP	Druhově specifické primery
Identifikace druhu	X	X	X		X
Identifikace jednotlivce			X	X	
Chromozomální abnormality		X			
Spontánní mutace			X	X	
Mezidruhovú kontaminace	X	X	X	X	X

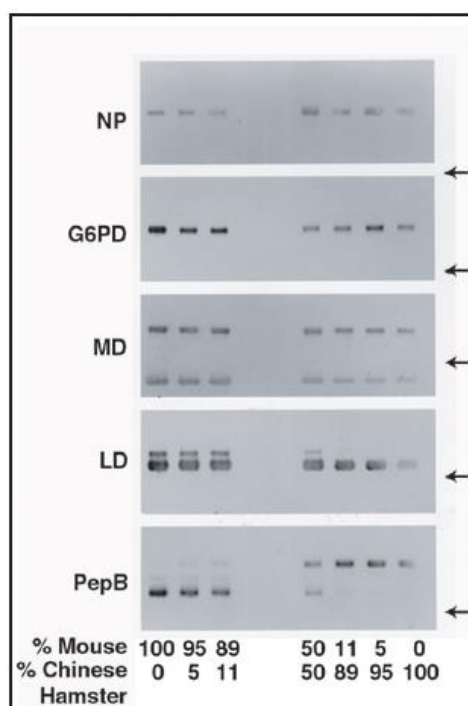
3.4.1 Izoenzymová analýza

Metoda autentizace buněčných linií pomocí izoenzymů umožňuje určit aktivitu enzymů a jejich zastoupení v buňce. Metoda vychází z faktu, že enzymatická výbava různých buněk mezi jednotlivými populacemi se může značně lišit. Analyzují se izoenzymy, které jsou druhově specifické a liší se svým zastoupením v tkáních a buňkách. Testuje se obvykle osm polymorfních genových enzymatických systémů, které dohromady poskytují jedinečný enzymový podpis dané buněčné linie. Pravděpodobnost, že by profil mohl být shodný s jinou buněčnou linií, je zanedbatelná [41].

Metoda umožňuje určení druhu nebo odhalení mezidruhovú kontaminace. Principem je elektroforetická separace izoenzymů, které se rozdělí dle své odlišné mobility v elektrickém poli. Výsledkem jsou migrační pásy na gelu, které ukazují zastoupení jednotlivých isoformů enzymů. Nepatrné rozdíly mezi proužky na gelu od sebe odlišují různé druhy [55]. Obvykle

hodnocené specifické intracelulární enzymy jsou např. *malát-dehydrogenáza (MD)*, *glukóza-6fosfátdehydrogenáza (G6PD)*, *laktát-dehydrogenáza (LD)*, *peptidáza B (PepB)* nebo *aspartát-aminotransferáza (AST)* [42]. Na obrázku níže je vidět výsledek analýzy. Zkratka vpravo značí testovaný enzym, vlevo jsou vidět elektroforetické proužky. V tomto případě se jedná o analýzu směsi buněk křečka a myši.

Tato metoda má však jistá omezení. Problémem je obtížná interpretace dat. Je obtížné rozlišit blízce příbuzné živočišné druhy. Navíc se tato metoda v laboratořích příliš nepoužívá a postrádá dostatečnou citlivost. Kontaminaci lze totiž odhalit jen v případě, kdy kontaminující buněčná linie tvoří alespoň 20 % z celkové populace buněk [43].



Obrázek 8: Izoenzymová analýza směsi buněk křečka a myši (BIOPHARM,2005)

3.4.2 DNA karyotypizace

DNA karyotyping, neboli cytogenetická analýza chromozomů, je jednou z nejstarších metod autentizace buněčných linií. Při tomto testu se hodnotí počet a struktura chromozomů. Chromozómy jsou specificky barvitelné vláknité struktury v jádře eukaryotických buněk. Jsou pozorovatelné světelným mikroskopem ve fázi buněčného dělení. Soubor všech chromozomů v jádře se nazývá karyotyp. U každého druhu je počet, ale i velikosti a tvar chromozomů konstantní. Jednotlivé druhy se od sebe odlišují počtem chromozomů, proto lze využít karyotyp jako druhový znak [44].

Vlastní karyotypizace začíná odebráním buněk z buněčné kultury. Proces dělení buněk je zastaven přidávkem mitotického jedu kolchicinu, který zastaví dělení buněk v metafázi. V této fázi buněčného cyklu chromozómy kondenzují, proto jsou nejlépe pozorovatelné. Poté dojde k hypotonické lýze buněk. Po vhodném obarvení jader lze chromozomy pozorovat pod mikroskopem a hodnotit jejich počet a strukturu. Karyotypizaci lze určit, jestli je buněčná linie lidská, zvířecí nebo nádorová. Nádorové buněčné linie se vyznačují větším počtem chromozomálních abnormalit [45].

Karyotypizace je metoda velmi náročná na zkušenosti pracovníka a časově zdlouhavá. Dnes se využívají modernější a méně pracné metody. Karyotyping se ale i nadále používá ke sledování genomové stability buněk v kultuře u nestabilních nádorových buněčných linií. Karyotyping obecně má významnou roli v prenatální diagnostice a onkologické diagnostice [44].

3.4.3 NGS sekvenování

Zkratka NGS sekvenování (*next generation sequencing*) je označení pro skupinu metod, které umožňují rychlé a efektivní DNA sekvenování. Pomocí metod nové generace lze zjistit pořadí nukleových bází v DNA mnohem rychleji a s větší přesností než v případě klasické Sangerovy metody sekvenování. Moderní metody jsou schopné osekvenovat kompletní genom za zlomek času a to především díky sekvenátorům nové generace. Novější sekvenátory totiž již nečtou báze jednu po druhé v řadě za sebou, ale umožňují masivní paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně. Významně tak snižují čas potřebný k přečtení DNA sekvence [46].

Všechny metody NGS sekvenování fungují na podobném principu. První krok zahrnuje izolaci a fragmentaci DNA. Dalším krokem je navázání tzv. adaptérů, od kterých pak probíhá sekvenování jednotlivých fragmentů a poté následuje jejich amplifikace pomocí PCR a vlastní sekvenování na sekvenátoru nové generace [46].

Metodu lze použít pro celogenomové sekvenování, pro studium genetické variability, detekci mutací nebo pro cílené sekvenování vybraných úseků DNA či plasmidů. Sekvenování nové generace lze použít i pro autentizaci buněčných linií, jelikož každá buněčná linie má svoji jedinečnou DNA sekvenci. NGS sekvenování dnes již používají buněčné banky pro ověření identity buněčné linie nebo její kontaminace. Stále se však jedná o finančně náročnou metodu.

4. Multiplexní PCR a její optimalizace

Multiplexní PCR je modifikace PCR, která umožňuje amplifikaci více lokusů současně. V multiplexní PCR je v reakční směsi přítomno více párů specifických primerů komplementárních k cílovým sekvencím [23]. Díky tomu lze po vhodné optimalizaci metody identifikovat více lokusů v jedné reakci. Vlastnosti multiplexní PCR, která šetří náklady na čas a reakční činidla, činí z této techniky metodu v mnoha případech výhodnější než je klasická PCR. Multiplexní PCR vykazuje větší flexibilitu při experimentálním návrhu, má řadu výhod a široké využití [47]. Umožňuje sledování různých segmentů cílového genomu, detekci patogenů, diagnostiku genetických onemocnění, testování mutací a polymorfismů [48].

V případě autentizace buněčných linií umožňuje současnou amplifikaci více STR úseků najednou. Usnadňuje tak a zrychluje průběh analýzy, která probíhá v jediné zkumavce. Výhodou je vysoký stupeň diskriminace v jediném testu a to bez větší spotřeby DNA. Multiplexní PCR vyžaduje menší množství DNA než klasická PCR, přičemž na jednu multiplexní reakci stačí přibližně 1 ng DNA [27]. Snížení počtu zkumavek, ke kterým je třeba přidávat alikvoty DNA, také minimalizuje možnost kontaminace a záměnu vzorků při přípravě reakce [49].

Při multiplexní PCR jsou produktem amplikony s různou délkou. Abychom je spolehlivě rozeznaly, používáme primery značené různými fluorofory. Obdobně jsme postupovali i při našem návrhu vícebarevného značení, kdy důležité bylo, aby se amplikony s podobnou délkou navzájem nepřekrývaly. Proto jsme amplikony s podobnou délkou označily odlišnými fluorescenčními barvivy, což umožnilo jejich snadnou detekci a rozlišení.

Svým složením je reakční směs u multiplexní PCR podobná klasické PCR. Stejně jako v případě klasické PCR lze použít komerčně dostupné **Master mixy**, které již obsahují namíchané PCR komponenty - pufr, hořčík, volné nukleotidy a DNA polymerázu [23].

Neexistuje však soubor podmínek, které by byly vhodné pro všechny PCR reakce. Průběh reakce závisí na vlastnostech primerů, kvalitě DNA, interakci mezi reagensy a na řadě dalších podmínek. Je proto nutné každou reakci zvlášť optimalizovat. Právě náročné sestavení metody tak, aby amplifikace všech lokusů byla stejně účinná, je největší nevýhodou multiplexní PCR. Pokud je totiž multiplexní reakce sestavena špatně, některé lokusy se nemusí amplifikovat nebo mohou být amplifikovány pouze v nízké kvantitě, jak jsme se sami přesvědčily při optimalizaci reakci v experimentální části práce.

Nedostatečná optimalizace také může vést k nespecifickým produktům. Z tohoto důvodu je nutné metodu optimalizovat a to všechny její komponenty, včetně teplotního profilu, dokud není dosaženo optimálního výsledku. Právě optimalizace multiplexní reakce byla klíčovou složkou této práce. Cílem optimalizace multiplexní reakce byl specifický průběh PCR reakce, tj. aby vznikal pouze jediný produkt odpovídající amplifikovanému úseku. V případě, že produkt PCR reakce není zřetelný nebo jsou výsledkem nespecifické produkty, reakce neproběhla optimálně. V takovém případě je nutné změnit reakční podmínky tak, aby PCR proběhla úspěšně [50].

Základem reakce jsou vhodně navržené **primery**. Při jejich návrhu platí několik pravidel a cílem je navrhnout primery tak, aby negativně neovlivňovaly reakci ani sebe navzájem. Primery nesmí být k sobě navzájem komplementární a musí být specifické k cílové sekvenci. Měly by mít podobnou teplotu annealingu a být stabilní ve stejném teplotním rozsahu. Před vlastním sestavením multiplexní PCR je vhodné ověřit funkčnost primerů samostatně v monoplexu. Pokud jsou primery samostatně bezproblémově funkční, lze přistoupit k jejich smíchání. Primery většinou přidáváme do reakce v ekvimolární koncentraci 0,1 – 0,5 μM . Při příliš vysoké koncentraci mohou způsobit tvorbu nespecifických produktů, naopak nízká koncentrace vede k nízkému výtěžku. V rámci této práce byly např. primery přidávány v rozmezí koncentrací 0,6 až 0,355 μM , přičemž jejich koncentrace musela být dále optimalizována.

Jednotlivé primery jsou značeny **fluorescenčními barvivy**. Použití barev, které integrují s DNA a pod UV světlem fluoreskují, je nejčastější technikou pro vizualizaci produktu. Obvykle používáme v multiplexu 2-4 fluorescenční barviva, podle potřeb reakce. Volba fluorescenčního barviva závisí na instrumentaci a detekci reakce, dalším kritériem je pokud možno co nejnižší spektrální překrývání barviv [23]. Produkt PCR reakce se analyzuje podobně jako u klasické PCR. Proběhne elektroforetická separace na automatizovaném sekvenátoru a detekuje se fluorescence ve více barevných kanálech [54]. Amplikony jsou rozděleny podle standardu interní velikosti softwarem a výsledkem je elektroforetogram [51].

Pro kvalitní a efektivní multiplexní PCR je důležité i optimální složení PCR pufru. Ten upravuje pH reakce, přičemž DNA-polymeráza je nejúčinnější při pH 7,2 a 72°C. Jelikož je DNA polymeráza Mg^{2+} dependentní enzym, pufr obsahuje i hořečnaté ionty ve vhodné koncentraci. Hořčík stabilizuje komplex DNA- polymeráza. Zvýšení koncentrace těchto iontů může přispět k pozitivnímu ovlivnění enzymatické aktivity polymerázy [51].

Nutná je i optimální **koncentrace templátové DNA**, aby nedocházelo k inhibici templátem. Snížením koncentrace DNA zároveň snížíme i koncentraci případných inhibitorů PCR. Manipulovat lze i s množstvím Tag polymerázy. Jen s vhodnou koncentrací Tag polymerázy a templátové DNA lze získat účinnou a specifickou reakci.

Důležité je i nastavení správné koncentrace volných nukleotidů (dNTP). Vysoké koncentrace dNTP působí na reakci inhibičně a to tak, že zvyšují pravděpodobnost tvorby nesespecifických produktů.

V některých případech se též pro pozitivní ovlivnění výsledku reakce přidávají **aditiva**, která mohou ovlivnit účinnost reakce, jako je např. BSA, DMSO, beatin, formamid nebo glycerol. Tyto látky zvyšují stabilitu polymerázy a specifčnost vazby primerů k templátu. Obecně je při použití aditiv cílem zvýšit výtěžek nebo specifitu reakce. Za tímto účelem jsme testovali přidavek aditiv i v této práci. Konkrétně jsme pracovali s BSA a DMSO. Podle výsledků této práce i dalších článků, může být účinnější použití samotného Master Mixu než s přidavkem aditiv [52].

Ovlivnit průběh multiplexní PCR lze i pomocí fyzikálních vlivů, jako reakční objem nebo typ termocykleru. Modifikovat lze i **teplotní program a cyklus**. Lze prodloužit nebo zkrátit dobu elongace, zvýšit počet cyklů apod. Lze změnit teplotu anealingu primerů a tím umožnit lepší vazbu primerů na templátovou DNA, přílišné snížení však může vést k tvorbě nesespecifických produktů [53]. Roli hraje i teplota ve třetí fázi cyklu, kdy teplotu pro extenzi primerů určuje teplotní optimum DNA polymerázy a délka produktu. Obvykle je to 1 minuta na 1 kb amplifikovaného produktu. Jednotlivé fáze reakce se opakují v cyklech a jejich počet se odvíjí od počátečního množství DNA. Běžně se používá 25-35 cyklů. Při vyšším počtu cyklů se zvyšuje množství nesespecifických produktů, příliš málo cyklů naopak může vést k malému výtěžku reakce [50].

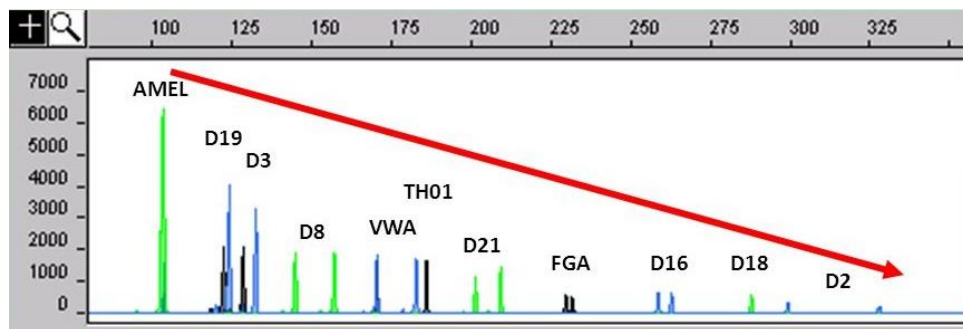
Optimalizací teplotního programu lze též výrazně zkrátit dobu amplifikace, jak jsme prokázali v experimentální části. Optimalizací je možné získat teplotní profil, při kterém lze dosáhnout stejných výsledků ovšem za zlomek času než při použití neoptimalizovaného profilu.

5. Problémy při STR analýze

Při nevhodné optimalizaci multiplexní PCR reakce se můžeme setkat se řadou nežádoucích jevů, které snižují hodnotu výstupních dat a mohou vést k zavádějícímu vyhodnocení reakce.

Nejčastějším problémem je **přednostní amplifikace některého z fragmentů**. S tímto problémem jsme se setkali v rámci této diplomové práce, kdy některé amplikony vznikali ve větší míře na úkor ostatních. Důvodem tohoto jevu může být kolísání vzájemné interakce všech PCR reagensů nebo přednostní amplifikace fragmentu, kvůli jeho vlastnostem. Primery se totiž ve směsi chovají jinak, než samostatně. Kompetují o zdroje, zejména o DNA polymerázu, protože PCR reakce má omezené množství enzymů a nukleotidů [52]. Řešením nerovnovážné amplifikace fragmentů je optimalizovat koncentraci jednotlivých primerů a vyvážit jejich poměry, o což jsme se při optimalizaci snažili.

Typický je tento problém u dlouhých fragmentů. Při amplifikaci totiž dochází přednostně k amplifikaci krátkých fragmentů a fragmenty s větší délkou nemusí být amplifikovány v dostatečné míře. S tímto problémem jsme se setkali právě u dlouhého fragmentu X-1o délce 388bp, který v našem případě byl zachycen velmi slabě nebo vůbec. Nejjednodušším řešením, které jsme jako první zkusili, je zvýšit koncentraci primerů dlouhých fragmentů v multiplexu nebo naopak snížit koncentraci krátkých fragmentů [47].



Obrázek 9: Přednostní amplifikace krátkých fragmentů (STR Data Analysis)

Pokud se daný lokus neamplifikuje vůbec, hovoříme o tzv. **lokusovém drop-outu**, kdy se na výsledném elektroforetogramu vůbec neobjeví příslušný pík. Jeho obdobou je **alelický drop-out**, kdy se naopak neamplifikuje a na elektroforetogramu neobjeví jedna alel. Vzorek se tak může jevit jako homozygotní, ačkoliv jde ve skutečnosti o heterozygota. Dalším známým jevem je **alelický drop-in**, kdy se na elektroforetogramu laicky řečeno objeví alela navíc. Nejčastější příčinou je kontaminace vzorku [54].

6. Autentizace non-human buněčných linií

6.1 Metody pro autentizaci non-human buněčných linií

Non-human buněčné linie jsou, podobně jako lidské linie, užitečným modelovým systémem v biomedicínském výzkumu. I u nich dochází k jejich záměnám a kontaminacím. Zároveň s pokrokem v metodách pro autentizaci lidských buněčných linií dochází k vývoji nových metod i pro non-human buněčné linie. Ty totiž vyžadují jiný přístup. Zvířecí buněčné linie často pocházejí z geneticky homogenních laboratorně chovaných jedinců, u kterých je vysoká míra příbuzenského křížení. Běžné techniky pak nemusí spolehlivě rozeznat buněčné linie odvozené od jedinců stejného inbredního kmene. Problémem u autentizace non-human buněčných linií je také fakt, že nejsou k dispozici komplexní databáze, komerční kity pro všechny druhy a nejsou k dispozici navržené standardy pro všechny metody. Tabulka č. 2 shrnuje dosavadní pokrok v autentizaci non-human buněčných linií [56].

Tabulka 2: Přehled metod pro autentizaci non-human buněčných linií

Druh	Metoda	Standard metody	Komerční kity	Databáze
Human	STR	ASN-0002	Yes	ATCC, DSMZ, JCRB, NCBI**
	SNP	No	Yes	[21], [32], NCBI
Mouse	STR*	No	No	Unpublished
	SNP	No	Yes	[19]
African green monkey	STR*	No	No	None
Chinese hamster ovary	STR*	No	No	None
Rat	STR*	No	No	None
Species-level identification	CO1 DNA barcode	ASN-0003	Yes	Barcode of Life Data System, NCBI**
	Species-specific primers	No	No	None needed

Pokud chceme pouze určit, z jakého druhu pochází daná buněčná linie, nevhodnějším řešením je **DNA barcoding**. Další vhodnou metodou je profilování DNA pomocí PCR a specifických primerů. **Druhově specifické primery** slouží k určení druhu, avšak postrádají dostatečnou specifičnost pro individuální identifikaci jednotlivce. Použití specifických primerů je snadným a levným způsobem autentizace. V současnosti však nejsou dostupné komerční kity pro všechny druhy. Tímto způsobem lze např. autentizovat buněčné linie křečka, myši a krysy [48].

I u non-human buněčných linií lze využít specifických polymorfních lokusů pro ověření identity buněčné linie. Existují návrhy STR multiplexních testů, které fungují na podobném principu jako STR analýza u lidských buněčných linií. STR analýza se dnes již běžně používá

pro individuální identifikaci zvířat v plemenitbě a chovatelství. Dostupné jsou komerční kity pro kočky, psy a koně. Testy ovšem nejsou dostupné pro všechny druhy a k dispozici nejsou ani komplexní referenční databáze [57].

Příkladem může být například PCR multiplexní test, který využívá významné homologie mezi genomem člověka a afrického primáta- kočkodana zeleného. VERO buňky ledvin kočkodana totiž patří mezi oblíbené linie k testování cytotoxicity a vakcín. Testuje se osm STR markerů, u nichž byla prokázána homologie se stejnými úseky v lidském genomu. Lze tak úspěšně použít referenční STR markery, které se testují i u lidských buněčných linií. [58].

Podobně jsou k dispozici již i kity pro autentizaci buněčných linií koně. Buněčné linie domestikovaného koně slouží jako modelové systémy v regenerační terapii. Komerčně dostupný kit zahrnuje analýzu 17 STR úseků a kromě autentizace se používá i v plemenitbě k určení původu [59].

Na podobném principu funguje i tzv. **Meow plex**. Komerčně dostupný kit pro STR analýzu vzorků koček. Do testu bylo vybráno 11 vysoce polymorfních lokusů. Výsledkem je spolehlivý multiplexní test, který umožňuje individuální identifikaci koček s dostatečnou mírou genetické diskriminace [60]. Obdobně jsou dostupné komerční kity pro individuální identifikaci psů. Principem je opět multiplexní PCR založená na analýze STR úseků [61].

Ve vývoji jsou i další testy, které je však třeba ještě optimalizovat, než bude možné jejich rutinní použití.

6.2 Myší buněčné linie

Non-human buněčné linie se používají v menší míře než lidské buněčné linie, přesto však mají různorodé využití jako modelové systémy. Nejběžnější a nejpoužívanější jsou myší buněčné linie, dále jsou běžné buněčné linie izolované z čínského křečka, potkana, králíka nebo kočkodana.

Myší buněčné linie jsou nejvíce využívané non- human buněčné linie. S tím souvisí i fakt, že jsou nejčastějším mezidruhovým kontaminantem. Pocházejí z tkání myší druhu *Mus musculus*. Myší buněčné linie vhodnými modelovými systémy pro studium chorob a genů. Myší buněčné linie jsou velmi rozmanité. Pocházejí z různých tkání, nejčastěji z fibroblastů, z tkáně jater, z centrálního nervového systému nebo z nádorových buněk. Používají se při výrobě rekombinantních proteinů nebo fungují jako podpůrné buňky při kultivaci

embryonálních kmenových buněk. K dispozici jsou i upravené buněčné linie, které slouží ke studiu buněčného cyklu a reparace DNA [62].

Myši jako vysoce adaptabilní, rychle se rozmnožují a proto jsou ideální jako laboratorní zvířata. V rámci chovu myši však došlo k blízkému a opakovanému příbuzenskému křížení. Výsledkem jsou tzv. inbrední kmene myši, které vznikly úzkou příbuzenskou plemenitbou a to po více než 20 generací. Myši z takového kmene většinou pocházejí od jednoho zakládajícího chovného páru a je proto obtížné u nich určit genotyp, jelikož mají velké množství sdílených alel v důsledku incestu a úzkého příbuzenského křížení [63]. Inbreeding (příbuzenské křížení) dosahuje až 98,6 %. Je tedy jasné, že genetická variabilita u jedinců z inbredních kmenů je velmi malá [64].

Přičemž až 97,7 % myších buněčných linií pochází z inbredního kmene, zbývající 2,3 % z neinbredního kmene. Z tohoto důvodu vyžaduje autentizace myších buněčných linií jiný postup. Inbrední myši buněčné linie si jsou z velké části geneticky podobné a zástupci jedné inbrední generace mohou být všichni homozygotní pro stejnou alelu daného lokusu. Pro spolehlivé rozlišení buněčných linií odvozených ze stejného inbredního kmene, lze použít SNP analýzu jednonukleotidových polymorfismů. Jednobodové mutace jsou u inbredních myši hlavním zdrojem genetické variability. Metoda je však finančně náročná a hůře dostupná [64]. Z tohoto důvodu se více používá STR analýza, kterou lze úspěšně aplikovat i pro rozlišení myších buněčných linií, jak jsme sami prokázali v experimentální části, kdy jsme sestavili multiplexní STR test vhodný pro efektivní a přesnou autentizaci myších buněčných linií.

Nejnovější trend v autentizaci myších buněčných linií je vývoj metody na základě analýzy polymorfismu jednoduché sekvenční délky (SSLP). Tyto tzv. MIT lokusy vědci identifikovali jako nejvhodnější pro rozlišení jedinců z různých inbredních kmenů. Avšak profilování SSLP založené na markerech MIT postrádá schopnost rozlišit mezi buněčnými liniemi pocházejícími ze stejného kmene myši [65]. V současnosti jsou k dispozici údaje o analýze MIT lokusů 47 inbredních kmenů myši. Tyto lokusy je možné amplifikovat za použití komerčně dostupných sad primerů. Produkty PCR se současně analyzují spolu se standardy velikosti pomocí automatizovaných metod a fluorescenční detekce. Výsledkem je jednoduchý číselný kód, který odpovídá délce amplifikovaných PCR produktů. Současným cílem je vytvořit jednoduchou a spolehlivou metodu pro rutinní použití. [65]

6.3 Buněčné linie použité v této práci

6.3.1 NIH3T3

Buněčná linie NIH3T3 je standardní buněčnou linií myších embryonálních fibroblastů. Buňky byly poprvé izolované z již existující buněčné linie a to v roce 1962. Dnes se jedná o jednu z nejčastěji používaných a nejsnadněji dostupných myších buněčných linií. Jde o immortalizovanou buněčnou linii adherentních buněk. Uvádí se, že je to linie tetraploidní, přičemž počet chromozomů může být variabilní [67].

6.3.2 J774

Buněčná linie J774 je myší makrofágová linie, která má zachované všechny funkční vlastnosti makrofágů. Používá se k testům cytotoxicity a testování odpovědi makrofágů na infekci. Buňky jsou částečně adherentní [68].

7. Cíle práce

Schválené cíle práce:

1. Rešerše na téma autentizace lidských buněčných linií a myších buněčných linií
2. Optimalizace metody autentizace myších buněčných linií (metoda STR)
3. Zavedení multiplexní PCR STR analýzy pro myší buněčné linie

8. Experimentální část

Cílem této práce je optimalizace multiplexní polymerázové řetězové reakce (dále PCR), která se zaměřuje na devět tetranukleotidových polymorfních STR markerů v genomu myši. Cílem je vyvinout multiplexní test, který by poskytoval unikátní STR profily pro každý vzorek myších buněčných linií a sloužil by k jejich spolehlivé a efektivní autentizaci. Nutné je optimalizovat metodu, všechny její komponenty a teplotní profil, aby se spolehlivě amplifikovaly všechny testované lokusy a průběh reakce byl optimální. Součástí práce bylo provedení testu nejprve v monoplexním provedení, následně sestavení multiplexní reakce, návrh vhodného značení primerů pomocí fluorescenčních barviv a testování různých reakčních podmínek s cílem optimalizovat multiplexní reakci. Optimalizace PCR byla prováděna na myších buněčných liniích NIH3T3 a J774. Druhá z linií nebyla dosud naprofilována a součástí diplomové práce bylo i určení jejího referenčního profilu.

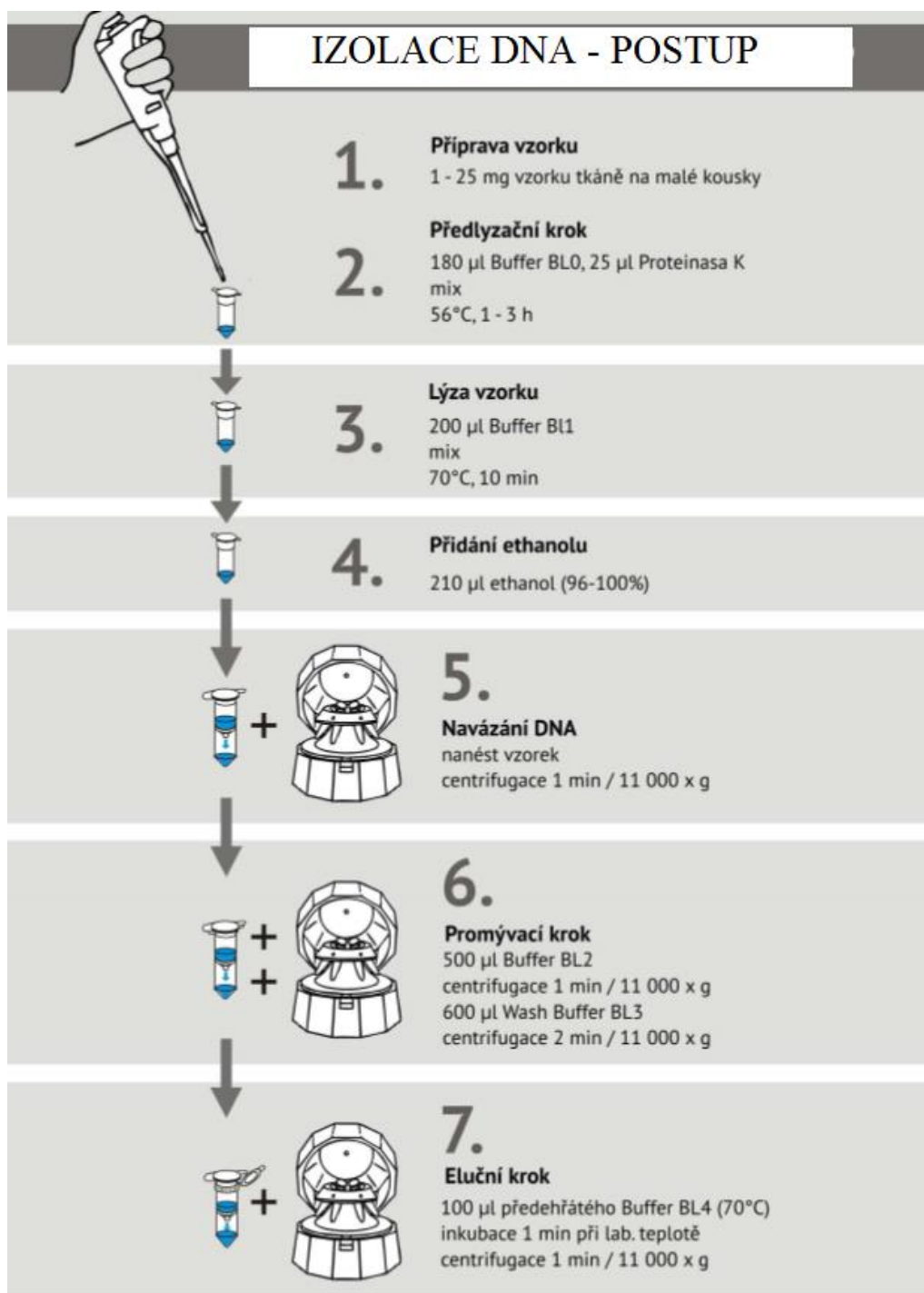
8.1 Izolace DNA

Pro účely této diplomové práce byly použity vzorky genomové DNA ze dvou myších buněčných linií - z linie myších fibroblastů NIH3T3 a makrofágové linie J774. Vzorky pocházejí z laboratoře *Generi Biotech*. DNA z příslušných vzorků byla izolována na kolonkách se silikagelovou membránou. K izolaci nukleových kyselin ze vzorků byl použit kit pro izolaci DNA (*Kit for isolation of DNA from tissues* - Generi Biotech). Tento kit umožňuje získat vysoce čistou genomovou DNA z buněčné kultury.

Izolace DNA proběhla dle validovaného standardního operačního postupu. Izolace zahrnuje přípravu vzorku, přidání ethanolu, navázání DNA na kolonku, promývací a eluční krok. Příprava vzorku zahrnuje přípravu buněčné suspenze, která obsahuje 10^7 buněk. K této suspenzi bylo přidáno 25 μ l Proteinázy K a 200 μ l roztoku Buffer 1. Roztok ve zkumavkách byl následně promíchán pomocí vortexu a inkubován při 70 °C po dobu 10-15 minut. Dalším krokem je přidání ethanolu, který zajišťuje specifické podmínky pro navázání DNA na silikagelovou membránu. Před samotným přidáním 210 μ l ethanolu je nutné zkumavku se vzorkem krátce stočit (3000x g, 5 sekund). Po přidavku ethanolu následuje další stočení na vortexu.

Takto připravený a řádně promíchaný roztok byl pipetován na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugován 1 minutu při 11000 g. Poté byla kolonka s navázanou DNA postupně promyta dvěma promývacími pufrý (500 μ l BL2 a 600 μ l BL3), které slouží

k odstranění nečistot. Po posledním promytí byla sběrná zkumavka s nepotřebným filtrátem odebrána a kolonka byla vložena do nové a řádně označené zkumavky. Na střed kolonky byl napipetován přehřátý eluční roztok (50 μ l BL4) a kolonka byla inkubována po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě tak, aby došlo k uvolnění veškeré DNA přítomné na silikagelové membráně. Posledním krokem izolace byla opět centrifugace. Takto byla získána čistá genomová DNA a připravena pro další použití.



Obrázek 10: Postup izolace DNA (GENERI BIOTECH)

8.2 Primery pro STR analýzu

Výběr vhodných STR markerů a návrh sekvencí komplementárních primerů použitých v této diplomové práci vychází z původního návrhu vědců v článku *Mouse cell line authentication* [62].

Do multiplexní reakce bylo vybráno devět tetranukleotidových STR markerů. Dva STR markery jsou umístěny na šestém chromozomu, ovšem na opačných raménkách chromozomu, takže nejsou v genetické vazbě a jsou od sebe v dostatečné vzdálenosti. Do testu byly zahrnuty i dva dobře charakterizované lidské STR markery - D8S1106 a D4S2408. Tyto kontrolní markery umožňují odhalit případnou kontaminaci lidskými buněčnými liniemi.

Cílem bylo ze všech devíti vybraných polymorfismů sestavit a optimalizovat PCR reakci, která by zjednodušila a usnadnila autentizaci myších buněčných linií. Přehled všech STR markerů lze najít v tabulce č. 3, která obsahuje sekvence primerů komplementární k vybraným STR polymorfismům, jejich označení dle *GenBank* a doporučené koncentrace. Pro ideální průběh reakce však musely být v rámci této diplomové práce všechny koncentrace optimalizovány, jak je podrobněji popsáno v následujících kapitolách. Všechny přímé (*forward*) primery byly na začátku značeny barvivem FAM na svém 5' konci. V pozdější fázi optimalizace jsme navrhli vícebarevné fluorescenční značení pomocí tří fluorescenčních barviv pro usnadnění analýzy a jednodušší vyhodnocení výsledků.

8.3 Chemikálie, přístroje a další materiál

GB Elite PCR Master Mix (*Generi Biotech*)

Primer mix (připravený dle uvedených tabulek)

DNA z buněčných linií NIH3T3, J774, WBF344

IWA (demineralizovaná voda)

Termocykler, sekvenátor, vortex, pipety, špičky, laminární box

8.4 Složení reakční směsi

1,49 μ l gb Elite PCR Master Mix (též testovány různé koncentrace od 1,49 až po 2,98)

0,61 μ l Primer mix

1 μ l DNA

Doporučená koncentrace DNA je 0,5 ng/ μ l

Tabulka 3: Přehled použitých oligonukleotidů (primerů)

STR marker	Označení GenBank	Název	Primery (5´-3´konec)	Značení	Doporučená koncentrace v primermixu (nM)
18-3	NT_039674.8	M18-3_F	TCTTTCTCCTTTTGTGTCATGC	FAM	200
		M18-3_R	GTTTCTTGCTAAATAACTAAGCAAGTGAACAGA		200
4-2	NT_187032.1	M4-2_F	AAGCTTCTCTGGCCATTGTA	FAM	125
		M4-2_R	GTCATAAACTTCAAGCAATGACA		125
6-7	NT_039353.8	M6-7_F	AGTCCACCCAGTGCATTCTC	FAM	75
		M6-7_R	GTTTCTTCATGTGGCTGGTATGCTGTT		75
9-2	NT_039474.8	M9-2_F	GGATTGCCAAGAATTTGAGG	FAM	80
		M9-2_R	GTTTCTTTCCTGAGTTGTGGACAGGGTTA		80
15-3	NT_039617.8	M15-3_F	TCTGGGCGTGTCTGTCATAA	FAM	60
		M15-3_R	GTTTCTTTTCTCAGGGAGGAGTGTGCT		60
6-4	NT_039360.8	M6-4_F	TTTGCAACAGCTCAGTTTCC	FAM	100
		M6-4_R	GTTTCTTAATCGCTGGCAGATCTTAGG		100
12-1	NT_039548.8	M12-1_F	CAAATTGTCATTGAACACATGTAA	FAM	200
		M12-1_R	GTTTCTTTCATGGTCAAGAAATACTGAAGTACAA		200
5-5	NT_109320.5	M5-5_F	CGTTTTACCTGGCTGACACA	FAM	300
		M5-5_R	GTTTCTTGTTTTAAACTCAATACCAAACAA		300
X-1	NT_039706.8	MX-1_F	GGATGGATGGATGGATGAAA	FAM	300
		MX-1_R	GTTTCTTAAGGTATATATCAAGATGGCATTATCA		300
D8S1106	NT_167187.1	D8S1106_F	GTTTACCCCTGCATCACTGG	FAM	150
		D8S1106_R	GTTTCTTTCAGAATTGCTCATAGTGCAAGA		150
D4S2408	NT_006316.16	D4S2408_F	TCATTTCCATAGGGTAAGTGA AAA	FAM	200
		D4S2408_R	GTTTCTTGCCATGGGGATAAAATCAGA		200

8.5 Amplifikační teplotní profil

Teplotní profil DXS_26	
95°C	2 min
94°C	1 min
62°C	1 min
70°C	3 min 30x
60°C	15 min

Amplifikační teplotní profil byl složený z denaturace, annealingu primerů a závěrečné elongace. Profil DXS_26 měl následující parametry; reakční cyklus obsahoval dva denaturační kroky. Byl zahájen tepelnou denaturací 95°C po dobu 2 minut. Nasednutí primerů probíhalo při teplotě 62°C po dobu 1 minuty. Následovala fáze elongace při teplotě 70°C po dobu 3 minut a s 30 cykly. Finální elongaci při 60 °C, při které dochází k doplnění řetězci, probíhala po dobu 15 minut. Amplifikační profil DXS_26 vychází z původního teplotního profilu s označením DXS_26 , který byl pro účely této práce optimalizován. Cílem optimalizace bylo zkrácení doby amplifikace a vyřešit nedostatečnou amplifikaci dlouhých fragmentů.

8.6 PCR amplifikace

PCR amplifikace proběhla v termocykléru při použití výše uvedeného složení reakční směsi a optimalizovaného teplotního profilu DXS_26. Nejprve proběhla PCR amplifikace všech testovaných STR lokusů samostatně (tj. v monoplexu) a byl tak získán profil buněčných linií NIH3T3 a J774. Dalším cílem bylo spojit 1-3 samostatné reakce do jedné multiplexní reakce a tímto způsobem postupně docílit spojení všech reakcí do jedné multiplexní PCR. Bylo nutné správně sestavit Primer mixy tak, aby se nepřekrýval rozsah alel jednotlivých polymorfismů. Dále bylo nutné provést optimalizaci PCR metody a přizpůsobit podmínky amplifikace. Optimalizovali jsme koncentraci jednotlivých primerů, přídavek aditiv, teplotní profil a koncentraci DNA v reakční směsi. Cílem optimalizace bylo nastavit podmínky PCR pro jednotlivé polymorfismy, aby bylo možné vytvořit funkční multiplexní reakci.

8.7 Analýza PCR produktů

Příslušné produkty PCR, amplikony s odlišnou délkou, byly následně rozděleny pomocí kapilární gelové elektroforézy. Přímé primery byly při monoplexních reakcích na svém 5' konci značeny fluorescenčním barvivem FAM. Později jsme pro usnadnění analýzy navrhli vícebarevné značení pomocí kombinace tří fluorescenčních barviv. Na základě údajů o délce jednotlivých fragmentů byly určeny profily myších buněčných linií. Distribuční rozsah alel STR markerů byl předběžně určen v práci *Mouse cell line authentication* [62].

Tabulka 4: Korelace vztahu délky fragmentů (bp) a příslušných alel

STR	Opakující se motiv	Korelace délky fragmentů a alel															
18-3	[ATCT] _n	137	146	150	154	158	162	166	171	175	179						
		<i>12.2</i>	<i>15</i>	<i>16</i>	17	18	19	<i>20</i>	<i>21</i>	22	<i>23</i>						
4-2	[GATA] _n [GATG] _n [ATAG] _n	209	213	216	217	220	221	222	224	225	228	232	236	240	244	248	
		<i>14</i>	<i>15</i>	<i>15.3</i>	16	<i>16.3</i>	<i>17</i>	<i>17.1</i>	17.3	<i>18</i>	<i>18.3</i>	<i>19.3</i>	20.3	21.3	22.3	<i>23.3</i>	
6-7	[CTAT] _n	333	337	341	345	349	352	355	356	360	363	364	366	368	376	377	388
		12	<i>13</i>	14	15	<i>16</i>	<i>17</i>	17.3	18	<i>19</i>	<i>19.3</i>	<i>20</i>	<i>20.1</i>	<i>21</i>	<i>23</i>	<i>23.1</i>	<i>26</i>
9-2	[TAGA] _n [AGAT] _n	188	192	204	219	220	223	227	231	235							
		<i>7.1</i>	<i>8.1</i>	<i>11.1</i>	15	<i>15.1</i>	16	17	18	<i>19</i>							
15-3	[TAGA] _n	157	165	169	177	181	184	189	193	196	200	204	208	212	216	220	222
		<i>12</i>	<i>14</i>	15	17	18	18.3	19.3	20.3	21.3	<i>22.3</i>	<i>23.3</i>	24.3	<i>25.3</i>	<i>26.3</i>	<i>27.3</i>	<i>28.1</i>
6-4	[ATAG] _n [ATGA] _n [TAGA] _n	276	285	286	289	290	293	294	297	298	301	302	307	311			
		<i>11.2</i>	<i>13.3</i>	<i>14</i>	14.3	<i>15</i>	<i>15.3</i>	16	16.3	17	<i>17.3</i>	18	<i>19</i>	<i>20</i>			
12-1	[AGAT] _n [GATA] _n	222	226	227	230	231	234	235	238	239	242	246	247	250	254	259	
		<i>15</i>	16	<i>16.1</i>	17	<i>17.1</i>	18	<i>18.1</i>	<i>19</i>	<i>19.1</i>	<i>20</i>	<i>21</i>	21.1	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>24.1</i>	
5-5	[TATC] _n	326	330	334	338	342	346	350	354	365							
		<i>11</i>	12	13	14	15	16	17	18	<i>21</i>							
X-1	[ATAG] _n [ATGA] _n [TAGA] _n	380	385	389	393	397	401	404	405	409	413	421	428	448			
		<i>20</i>	<i>21</i>	<i>22</i>	23	<i>24</i>	25	<i>25.3</i>	26	27	<i>28</i>	<i>30</i>	<i>32</i>	<i>37</i>			

Délka jednotlivých amplikonů odpovídá počtu opakování tandemových repetit a definuje alelu. Dle výsledků elektroforetogramu a tabulky č. 4 lze určit profil buněčných linií na základě korelace mezi délkou fragmentů a alel. Tímto způsobem byl určen profil buněčné linie NIH3T3, který jsme dále porovnávali s dostupným referenčním profilem. Experimentálně byl též určen profil buněčné linie J774, která dosud nebyla naprofilována a proto není možné ji srovnat s referenčním profilem. Zároveň tak měla tato práce kromě optimalizace reakce i další praktický přínos a to naprofilování buněčné linie J774. Součástí setu testovaných lokusů jsou i kontrolní lidské polymorfismy D8S1106 a D4S2408, které by měly indikovat přítomnost lidské DNA. Pokud v průběhu reakce nedošlo ke kontaminaci lidskou DNA, neměly by tyto lokusy být zachyceny.

8.8 Sestavení multiplexní reakce

Počáteční monoplexní analýza sloužila především k ověření funkčnosti všech primerů a zjištění, jestli jsou správně naznačené a jestli mají amplikony odpovídající délku. Po pozitivních výsledcích monoplexní analýzy, které ukázali, že primery jsou v samostatné reakci plně funkční a analýzy poskytují stabilní výsledky, následovalo sestavení multiplexu. Pro zjednodušení jsme nejdříve sestavovali tři zkušební multiplexy, které spojovali 3 samostatné reakce a to tak, aby se nepřekrývaly polymorfismy se stejným velikostním rozsahem. Tímto způsobem bylo zajištěno přehledné odečítání jednotlivých alel. Zároveň analýza tří spojených reakcí umožňuje jednodušší optimalizaci reakčních podmínek, než při testování všech devíti lokusů najednou.

Testováno bylo několik multiplexů. V multiplexech s pořadovým číslem PMM1 až PMM3, bylo testováno spojení tří samostatných reakcí do jedné. Celkový objem multiplexu byl 200 μ l. Nejprve byly všechny přímé i reverzní primery přidávány do zkušebních multiplexů ve stejné koncentraci jako v monoplexu. Postupně s ohledem na výsledky byla jejich koncentrace optimalizována. Hlavním problémem totiž byla nedostatečná amplifikace fragmentů s délkou nad 300bp. To jsme řešili navýšením koncentrace dlouhých fragmentů v primer mixu, dokud nebylo dosaženo jejich amplifikace v dostatečné kvantitě. V případě, kdy nebylo ani navýšení koncentrace účinné (u lokusu X-1), bylo nutné dále optimalizovat reakci.

Složení zkušebních multiplexů:

- Primer mix č. 1 – 12-1, 6-7, 9-2
- Primer mix č. 2 – 18-3, 5-5, 4-2
- Primer mix č. 3 – 15-3, 6-4, X-1

Po optimalizaci koncentrace ve zkušebních multiplexech následovalo spojení všech tří dílčích reakcí do jedné multiplexní PCR a sestavení tabulky finálních koncentrací všech lokusů. Protože některé lokusy mají podobný délkový rozsah, je problematické, je při použití jednobarevného značení odlišit. Dalším krokem proto byl návrh vícebarevného značení.

8.9 Analýza smíšených vzorků

Dalším cílem práce byla analýza smíšených vzorků, které kromě genomové DNA izolované z buněk myši buněčné linie NIH3T3 obsahovaly i DNA z buněčné linie krysy WBF344. Tyto vzorky byly analyzovány za účelem vyhodnocení schopnosti multiplexního testu detekovat i nízké úrovně kontaminace buněk NIH3T3. Buněčná linie WBF344 v tomto případě je modelový kontaminant, který byl do reakce přidán v různých poměrech. DNA byla přidána do jednotlivých reakcí s konečnou koncentrací 1 ng celkové DNA v následujících poměrech NIH3T3: WBF - 1: 9, 2: 8, 3: 7, 5: 5, 7: 3, 8: 2 a 9: 1. Bylo hodnoceno, jestli byly zachyceny všechny fragmenty a jestli byl získán kompletní profil.

8.10 Optimalizace lokusu X-1

Dalším cílem práce bylo zoptimalizovat multiplexní reakci tak, aby docházelo k rovnoměrné amplifikaci všech fragmentů. Jako nejvíce problematický se ukázal být nejdelší lokus s názvem X-1 o délce 398 bp. Docházelo k přednostní amplifikaci krátkých fragmentů a lokus X-1 nebyl v multiplexní reakci zachycen vůbec nebo jen ve velmi nízké kvantitě. Z tohoto důvodu jsme zaměřili optimalizaci reakce především na tento lokus. Nejjednodušším řešením bylo **navýšit jeho koncentraci**. Testovali jsme tak různé koncentrace lokusu X-1 ve výsledném složení multiplexu v rozmezí 300 nM až 500 nM. Ani jedna z testovaných koncentrací nebyla optimální. Došlo sice k zachycení X-1, ale jen jako velmi slabý pík na výsledném elektroforetogramu.

Dalším pokusem o optimalizaci lokusu X-1 bylo **navýšení množství Master Mixu GB Elite v reakční směsi**. Použitý Master Mix již obsahuje směs volných nukleotidů, PCR pufr, polymerázu a hořčičné ionty, které slouží jako kofaktory polymerázy. V našem případě byl použit Master Mix GB Elite do firmy *Generi Biotech*, který se díky speciálnímu složení se vyznačuje zvýšenou odolností vůči inhibitorům PCR, obsahuje všechny komponenty nutné k PCR a obsahuje Taq polymerázu typu hot-start s krátkým aktivačním časem (3 min / 95 °C), má 5'-3' polymerázovou a exonukleázovou aktivitu. Jeho použitím se výrazně snižuje čas nutný pro přípravu PCR reakce. Při multiplexní PCR v podstatě dochází ke kompetici o zdroje – polymerázu, volné nukleotidy a hořčičné ionty. Zároveň dochází k přednostní amplifikaci

krátkých fragmentů. V případě zvýšení množství těchto komponent by mělo být k dispozici více zdrojů i pro dlouhé fragmenty. Vyzkoušeli jsme proto různé složení reakční směsi. Ve standardním složení reakční směs obsahovala 1,49 μ l gb Elite PCR Master Mixu. Při optimalizaci reakce jsme testovali různé koncentrace GB Elite Master mixu od 1,49 až po dvojnásobné množství GB Elite, což je 2,98 μ l. Analýza byla prováděna na obou buněčných liniích NIH3T3 i J774 a při různém ředění DNA.

Dalším provedeným testem s cílem optimalizovat reakci bylo vyzkoušení **jiného druhu polymerázy**. Dosud byla při reakcích používána termostabilní Taq polymeráza z druhu termofilních bakterií *Thermus aquaticus*, s krátkým aktivačním časem. Naším cílem bylo zjistit, jestli má polymeráza dostatečnou polymerázovou aktivitu a negativně neovlivňuje multiplexní reakci. Pro ověření této teorie jsme provedli sérii pokusů s polymerázou Taq Gold, což je chemicky modifikovaná hot start polymeráza, která k zahájení své aktivity potřebuje zvýšení teploty. Taq Gold polymeráza by měla mít větší robustnost a specifitu než běžně používaná polymeráza.

8.11 Testování vlivu aditiv na PCR produkty

Do reakční směsi jsme přidávali aditiva za účelem zlepšení PCR reakce a navýšení kvantity dlouhých produktů. Aditiva napomáhají funkci polymerázy, zlepšují specifitu reakce a zvyšují stabilitu templátu v denaturované formě. Do reakce jsme použili aditiva BSA (hovězí sérový albumin) a DMSO (dimetylsulfoxid).

BSA bylo přidáváno do reakční směsi za účelem neutralizace inhibitorů polymerázy, jako jsou například melanin, hemin nebo ionty železa. Hovězí sérový albumin jsme do reakce přidávali v rozmezí koncentrací 50 - 500 μ g/ml, přičemž původní master mix (GB Elite) již BSA obsahuje. Zvýšením koncentrace aditiva jsme se snažili zamezit inhibici polymerázy a zvýšit kvantitu produktů.

Dimetylsulfoxid byl přidáván do reakce v koncentračním rozmezí 1 – 10 %. DMSO aditivum zlepšuje specifitu a účinnost obzvláště u sekvencí bohatých na G a C nukleotidy, jelikož ruší vodíkové vazby a díky tomu redukuje vznik sekundárních struktur templátu.

Aditiva jsme přidávali do reakční směsi obsahující 1,49 μ l master mixu GB Elite, a 0,61 μ l primer mixu a 1 μ l 50 \times nebo 20x ředěné DNA. Testován byl vliv aditiv na obě buněčné linie J774 i NIH3T3. Vliv aditiva byl hodnocen dle kvantity produktu a výskytu nežádoucích piků, Jako kontrola byl využit master mix GB Elite bez aditiv.

8.12 Návrh multiplexní reakce s vícebarevným značením

Po úspěšném sestavení zkušebních multiplexů následovalo sestavení finálního multiplexu. Zkušební multiplexy spojovaly vždy tři samostatné reakce, finální multiplex již spojuje všech devět reakcí do jedné. Šetří tak náklady na analýzu, minimalizuje chyby a zrychluje průběh analýzy. Jelikož délka některých amplikonů je velmi podobná, navrhli jsme vícebarevné značení s použitím tří fluorescenčních barviv.

Applied Biosystems Standard Dye Sets for Genotyping Applications								
Dye Set	DS-02	DS-20*	DS-30	DS-31	DS-32	DS-33	DS-34	DS-40
Filter Set	E5	A	D	D	F	G5	C	S
Blue Dyes	dR110	5-FAM™	6-FAM™	6-FAM	5-FAM	6-FAM	6-FAM	6-FAM
Green Dyes	dR6G	JOE™	HEX™	VIC®	JOE	VIC	TET™	dR6G
Yellow Dyes	dTAMRA™	TAMRA™	NED™	NED	NED	NED	HEX	
Red Dyes	dROX™	ROX™	ROX	ROX	ROX	PET®	TAMRA	
Orange Dyes	LIZ®					LIZ		LIZ

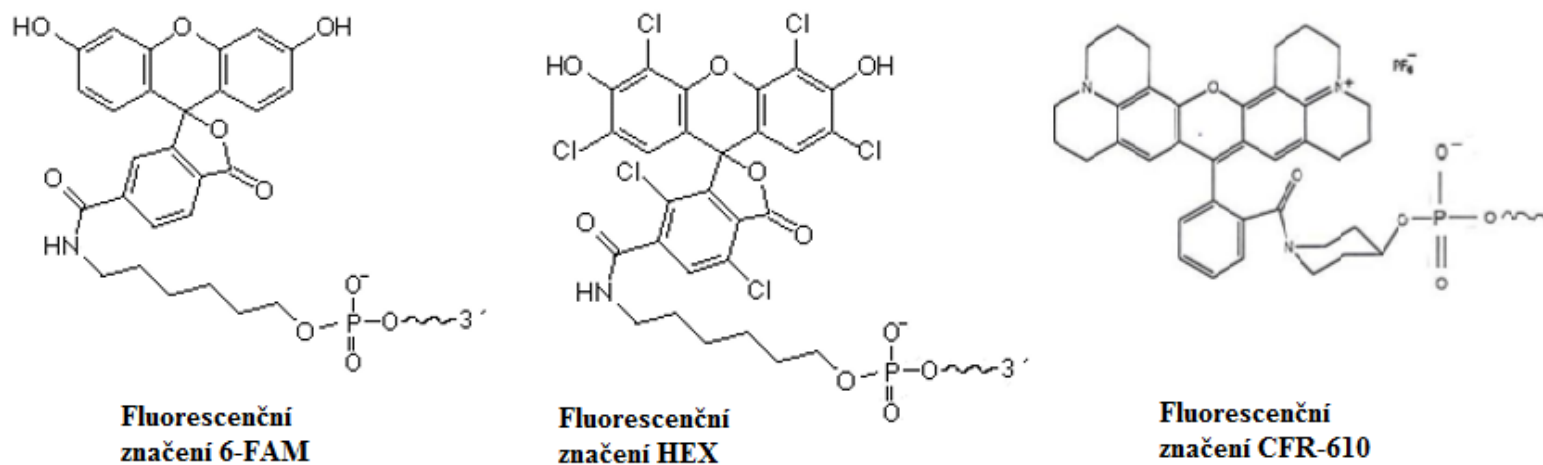
Obrázek 11: Přehled setů fluorescenčního značení používaných pro genotypizaci (GENERI BIOTECH)

V rámci genotypizace se používá několik standardních setů fluorescenčního značení. Většinou se jedná o kombinaci tří až čtyř fluorescenčních dye, kterými se naznačí vybrané primery tak, aby se nepřekrývali fragmenty o stejné délce. Výhodou je pak jednodušší odečítání, protože výsledky jsou rozdělené do barevných kanálů. V daném barevném kanálu pak jsou pouze píky lokusů naznačených jednou fluorescenční dye. V našem případě jsme se rozhodli pro systém s použitím tří fluorescenčních dye – modré 6-FAM, zelené HEX a červené CFR 610.

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

lokus	modifika	min	max	rozsah		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350	375	400
18-3	FAM	135	179	11	0,75	0,75		154										
15-3	610	157	222	16,25	0,8	0,8			192									
4-2	FAM	209	248	9,75	0,85	0,85				232								
12-1	HEX	222	259	9,25	0,9	0,9					240							
5-5	FAM	258	298	10	0,95	0,95						340						
6-4	610	270	311	10,25	1	1							288					
9-2	FAM	318	360	10,5	1,05	1,05								220				
6-7	HEX	333	388	13,75	1,1	1,1									334			
x-1	610	357	442	21,25	1,15	1,15											398	

Obrázek 12: Návrh vícebarevného fluorescenčního značení dle délky amplikonů



Obrázek 13: Vzorce použitých fluorescenčních dye (GENERI BIOTECH)

Jednotlivé primery byly naznačeny dle obrázku č. 11 na předchozí straně tak, aby se nepřekrývaly v rámci jedné barvy amplikony se stejným rozsahem. Do obrázku je navíc vepsána délka amplikonu, přičemž tento údaj jsme získali experimentálně z našich analýz. Lokusy 15-3, 6-4 a X-1 byly modifikovány CFR-610. Další čtyři lokusy 18-3, 4-2, 5-5 a 9-2 byly označeny 6-FAM. Zbylé dva lokusy 6-7 a 12-1 byly označeny barvivem HEX.

Návrh vícebarevného značení byl poté testován na obou myších buněčných liniích J774 a NIH3T3. Jako kontrolu jsme do testu zařadily i potkaní buněčnou linii WBF344 a jako negativní kontrolu vodu.

8.13 Identifikace extrahované DNA metodou fragmentační analýzy COX1

V diplomové práci jsme se zabývali metodou optimalizace multiplexní PCR reakce, která slouží k efektivní autentizaci myších buněčných linií. Metoda STR analýzy však slouží pouze k identifikaci jedince. Naším cílem bylo získat co nejkomplexnější informace o dané buněčné linii. Nad rámec této práce jsme se proto kromě STR analýzy zabývali i identifikací extrahované DNA metodou fragmentační analýzy COX1. Tuto metodu lze využít pro určení čistoty buněčné linie, přičemž je možné identifikovat až 14 nejčastějších druhů současně v jedné reakci. Dále metodu lze využít pro určení druhu původce DNA a druhové autentizaci non-human buněčných linií. Cílem pro amplifikaci je 648 bp dlouhá genová sekvence CO1 (cytochromoxidázy) v mitochondriální DNA, která vykazuje značné mezidruhové rozdíly.

Vycházeli jsme z článku *Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach* [43]. V tomto článku byl navržen test pro detekci mezidruhové kontaminace a ověření druhu buněčné linie. My jsme původní metodu převedli na sekvenátor, takže výsledkem je elektroforetogram. Jejím principem je druhově specifická PCR, kdy primery jsou navrženy tak, aby fungovaly v multiplexním PCR testu a generovaly amplikon o velikosti specifické pro každý detekovaný druh. Podle druhové příslušnosti tak vznikají různě dlouhé amplikony. Zkoušeli jsme optimalizovat multiplexní test založený na PCR, tak abychom rychle identifikovali nejběžnější druhy buněčných linií a odhalili případnou mezidruhovou kontaminaci DNA. Velikost fragmentů, finální koncentrace v reakci a sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce č.5. Příprava vzorku zahrnuje izolaci DNA podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.

8.13.1 Primery pro COX1 fragmentační analýzu

Sekvence primerů a jejich koncentrace v multiplexní reakci použitých v této diplomové práci vychází z původního návrhu vědců v článku *Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach* [43]. Test vyvinutý v tomto článku umožňuje identifikovat až 14 nejčastějších druhů najednou. V našem případě jsme měli k dispozici pouze DNA z některých uvedených živočišných druhů. Do testu jsme proto zahrnuli pouze DNA z myši buněčné linie J774, potkaní buněčnou linii WB344, VERO buňky kočkodana, CHO buňky křečka a lidské buněčné linie SKOV a Hep. Všechny přímé (*forward*) primery byly na začátku značeny barvivem FAM na svém 5'konci.

Tabulka 5: Primery pro COX1 analýzu a velikost příslušného amplikonu

velikost amplikonu	druh	koncentrace v reakci (nM)	název	Primery (5'konec- 3'konec)
460	vepř	200	Sus-F	CTACTATCCCTGCCAGTT
			Sus-R	GAATAGGAAGATGAAGCCC
391	člověk	100	Homo-F	TAGACATCGTACTACACGACACG
			Homo-R	TCCAGGTTTATGGAGGGTTC
341	kočka	200	Felis- F	TATTGCCATTCTACCGGGGTG
			Felis- R	ACGTTATATTGACTCCTACAAACATAATC
315	křeček	200	Cricetulus-F	ACTAACCCGCTTCTTCGCATTC
			Cricetulus-R	GCGTAGGCGAACGGAAGTATC
287	makak	400	Macaca-F	CCCACCCAGTTCAACTAAGC
			Macaca-R	AATGGTGAAGGATGGGTTCG
267	ovce	200	Ovis-F	CGATACACGGGCTTACTTCAGG
			Ovis-R	AAATACAGCTCCTATTGATAAT
243	kůň	200	Equus-F	CTGCCCTAAGCCTCCTAAT
			Equus-R	AGAAGTAGGAATGATGGGGG
222	kočkodan	400	Ceratop-F	CTTCTTTCCTGCTGCTAATG
			Ceratop-R	TTTGATACTGGGATATGGCG
196	potkan	100	Rattus-F	CGGCCACCCAGAAGTGTACATC
			Rattus-R	GGCTCGGGTGTCTACATCTAGG
172	pes	200	Canis-F	GAACTAGGTCAGCCCGTACTT
			Canis-R	TTCGGGGGAATGCCATGTC
150	myš	140	Mus-F	ATTACAGCCGTACGCTCCTAT
			Mus-R	CCCAAAGAATCAGAACAGATGC
136	králík	200	Orynt-F	CGCCTATAACAATATGAAATACTGTT
			Orynt-R	TGTGGTTGTTAGTTCAATAGTCT
117	koza	200	Capra-F	ATATCAATCGGGTTTCTAGGATTTATT
			Capra-R	AGTTGGGATAGCGATAATTATGGTAGT
102	tur	200	Bos-F	GCTATTCCAACCGGGTAAAAGTC
			Bos-R	GAAATAAAGCCTAGGGCTCAC

8.13.2 Chemikálie, přístroje a další materiál

GB Elite PCR Master Mix (*Generi Biotech*)

Primer mix (připravený dle uvedených tabulek)

DNA z buněčných linií J774, WBF344, VERO buňky kočkodana, CHO buňky křečka, lidské buněčné linie SKOV a Hep, DNA izolovaná z mletého masa vepře

IWA (demineralizovaná voda)

Termocykler, sekvenátor, vortex, pipety, špičky, laminární box

8.13.3 Složení reakční směsi

9,19 μ l gb Elite PCR Master Mix

3,81 μ l Primer mix

1 μ l DNA

Demineralizovanou vodou doplnit do 20 μ l

8.13.4 Amplifikační teplotní profil

Teplotní profil COX	
95°C	5 min
95°C	30s 30x
60°C	15min
72°C	30s
72°C	7min
4°C	ad finitum

8.13.5 Postup izolace DNA z mletého masa

Izolace DNA z tkání vyžaduje jiný postup, než izolace z buněčné suspenze. Vzorek mletého masa bylo nutné izolovat v 15ml zkumavkách s použitím izolačního kitu firmy Generi Biotech. Nejprve je vzorek ošetřen 1ml xylenu po dobu 10 minut. Poté následuje vortexování, odsátí xylenu a dvakrát oplach ethanolem vždy po dobu 1 minuty při 56 °C. Od tohoto kroku je již postup izolace shodný s protokolem použitým k izolaci DNA z buněčné suspenze nebo z bukálního stěru.

Následujícím krokem je proto přidání 360 μ l BL0, 25 μ l PK při 56 °C a inkubace 1 hod. Poté přidavek 400 μ l BL1; při 70 °C a inkubace 15 min. Následuje přidavek 420 μ l EtOH a 500 μ l BL2 a 600 μ l elučního pufru BL3.

8.13.6 PCR amplifikace a vyhodnocení výsledků

PCR amplifikace proběhla v termocykleru při použití výše uvedeného složení reakční směsi a dle uvedeného teplotního profilu. Nejprve jsme testovali vzorky s DNA jednotlivých buněčných linií samostatně, později všechny dohromady jako směsný vzorek obsahující více DNA z více druhů. Testovali jsme DNA v různých koncentracích od 1 μ l až po 2 μ l DNA v reakční směsi. Příslušné produkty PCR, amplikony s odlišnou délkou, byly následně rozděleny pomocí kapilární gelové elektroforézy. Na základě údajů o očekávané délce ampliconů u jednotlivých druhů, jsme odečetly výsledky ze sekvenátoru.

Tabulka 6: Porovnání výsledků COX1 analýzy a očekávaných výsledků

druh	buněčná linie	očekávaná velikost ampliconu	zjištěná velikost ampliconu
člověk	SKOV	391	386
člověk	Hep	391	386
myš	J774	150	145
potkan	WBF344	196	195
kočkodan	VERO	222	219
vepř	mleté maso	460	462
křeček	CHO	315	315

Z výsledků monoplexní analýzy vyplývá, že se nám podařilo identifikovat všechny testované druhy. Mezi očekávanou a zjištěnou velikostí ampliconu byl minimální rozdíl. Pro další použití této metody by však bylo vhodné použít jiný vnitřní standard, který by platil i v rozmezí pod 100 bp.

V dalším kroku jsme se pokusili propojit všechny samostatné reakce do jednoho multiplexu. Nepodařilo se nám však zachytit všechny druhy. Tato metoda vyžaduje další optimalizaci multiplexní reakce. Vhodné by bylo i navrhnout vícebarevné značení. Až po další optimalizaci bude metoda vhodná k rutinnímu použití a jako užitečný nástroj pro snadné a spolehlivé určení druhu buněčné linie. Jelikož jsme tuto metodu zkoušeli nad rámec této diplomové práce, další optimalizace již nebyla náplní naší experimentální činnosti.

9. Výsledky a diskuze

Optimalizace reakce byla prováděna na vzorcích buněčných linií NIH3T3 a J774. Z těchto dvou buněčných linií byla dle uvedeného postupu izolována genomová DNA. Do reakční směsi bylo pipetováno 1,49 μl MM GB Elite a 0,61 μl primer mixu. Další součástí reakce byl 1 μl ředěné templátové DNA.

U obou buněčných linií NIH3T3 a J774 jsme testovali rozsah koncentrací DNA. Původní doporučená koncentrace DNA byla 0,5 ng/ μl . Testována byla různá ředění od 5x ředěné DNA až po 50x ředěnou DNA. Různá ředění dávala dobré výsledky, což naznačuje vysokou robustnost této metody. U 50x ředěné DNA byla kvantita produktů již nižší. Jako nejoptimálnější se ukázalo ředění templátové DNA 5x nebo 10x a toto ředění bylo použito v dalších reakcích.

9.1 Stanovení profilů buněčných linií NIH3T3 a J774

Samotná PCR amplifikace proběhla při použití výše uvedeného složení reakční směsi a optimalizovaného teplotního profilu DXS_26. Prvním krokem bylo ověření reakce samostatně pro každý testovaný lokus (tj. v monoplexu) a stanovení profilů testovaných buněčných linií NIH3T3 a J774. Tímto způsobem byl určen profil buněčné linie NIH3T3, který jsme porovnali s dostupným referenčním profilem. Výsledky byly shodné. Povedlo se nám zachytit všechny lokusy, které odpovídají příslušným alelám a to i při opakovaném provedení analýzy. Úspěšně jsme zachytili i obě alely u heterozygotních lokusů.

Experimentálně byl též určen profil buněčné linie J774, která dosud nebyla naprofilována a proto není možné ji srovnat s referenčním profilem. V rámci této diplomové práce se tak podařilo získat nový referenční profil pro buněčnou linii J774.

Kontrolní lidské polymorfismy D8S1106 a D4S2408, které by měly indikovat přítomnost lidské DNA, nebyly dle očekávání zachyceny. Jelikož sloužili pouze jako kontrola kontaminace lidskou DNA, nebyly již dále součástí návrhu multiplexní reakce.

Tabulka 7: Experimentálně určený profil buněčné linie NIH3T3 a jeho porovnání s referenčním profilem

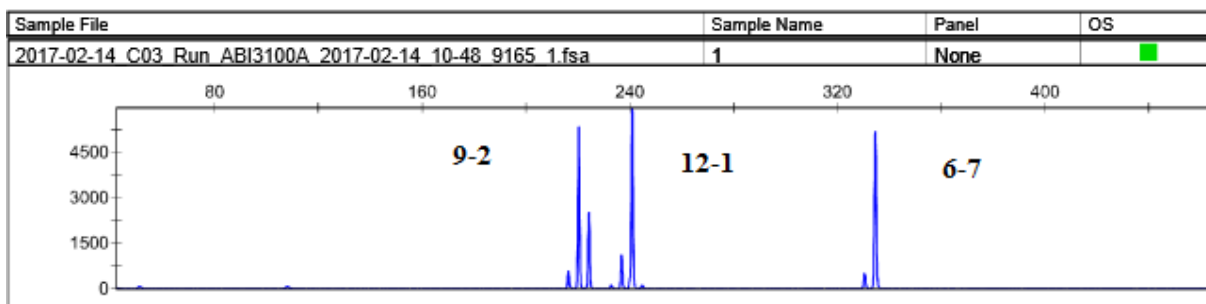
NIH3T3					
lokus	délka amplikonu(bp)	referenční profil		experimentální profil	
		alely	délka amplikonu (bp)	alely	délka amplikonu (bp)
18-3	135 - 179	17, 19	154, 162	17, 19	154, 164
4-2	209 - 248	19.3, 19.3	232	19.3, 19.3	232
6-7	333 - 388	12, 12	333	12, 12	334
9-2	318 - 360	15, 16	219, 223	15, 16	220, 224
15-3	157 - 222	20.3, 20.3	193	20.3, 20.3	193
6-4	270 - 311	14.3, 14.3	289	14.3, 14.3	289
12-1	222 - 259	20, 20	242	20, 20	240
5-5	258 - 298	14, 15	338, 342	14, 15	335, 340
X-1	357 - 442	25, 25	401	24	398

Tabulka 8: Profil buněčné linie J774

J774			
lokus	délka amplikonu(bp)	experimentální profil	
		alely	délka amplikonu (bp)
18-3	135 - 179	17, 19	155, 161
4-2	209 - 248	19.3, 19.3	232
6-7	333 - 388	12, 12	334
9-2	318 - 360	15, 16	220, 224
15-3	157 - 222	22.3, 22.3	201
6-4	270 - 311	17, 17	298
12-1	222 - 259	16, 20	225, 240
5-5	258 - 298	14	335
X-1	357 - 442	24	398

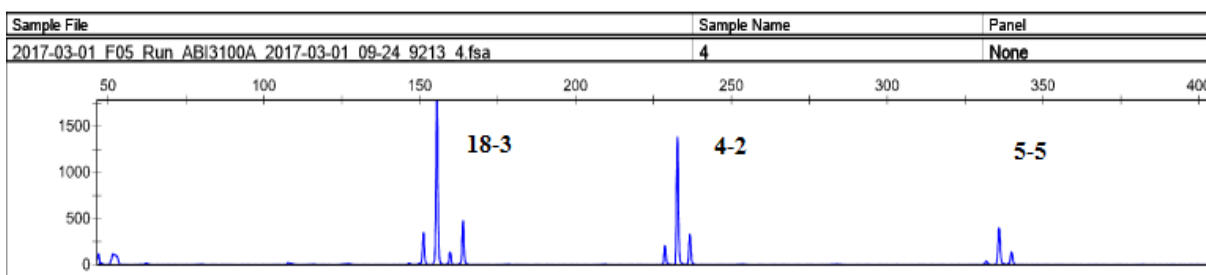
9.2 Sestavení a finální složení multiplexní reakce

Dalším krokem bylo spojit jednotlivé reakce do multiplexní PCR. Testovány byly tři verze zkušebních multiplexů, přičemž koncentrace primerů byla optimalizována. Vycházeli jsme z doporučených koncentrací a postupně testovali různá rozmezí koncentrací od 60 nM až po 500 nM u nejdelších fragmentů. První zkušební multiplex obsahoval polymorfismy 12-1, 6-7 a 9-2 v doporučených koncentracích. Jelikož se však nejdelší polymorfismus 6-7 neamplifikoval s dostatečnou intenzitou, bylo nutné zvýšit koncentraci z původních 75 nM na 175 nM. Tato koncentrace již přispěla k amplifikaci produktu v dostatečné kvantitě.



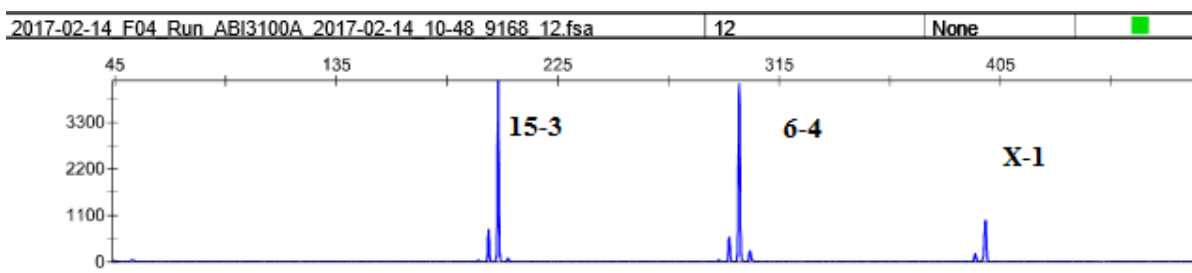
Obrázek 14: Testování zkušebního Primer mixu 1 na buněčné linii NIH3T3

Druhý multiplex obsahoval polymorfismy 18-3, 5-5 a 4-2. I v tomto případě došlo k nedostatečné amplifikaci jednoho z lokusů. Lokus 5-5 se neamplifikoval v dostatečné míře, jak je vidět na níže uvedeném elektroforetogramu. Jedná o dlouhý fragment s délkou nad 300 bp. Pravděpodobně docházelo k přednostní amplifikaci krátkých produktů a následkem toho nebyly dlouhé fragmenty amplifikovány v dostatečné kvantitě. Z tohoto důvodu byla jeho koncentrace navýšena z původních 300 nM na 350 nM. Podobně jsme postupovali i dlouhých fragmentů v posledním z multiplexů.



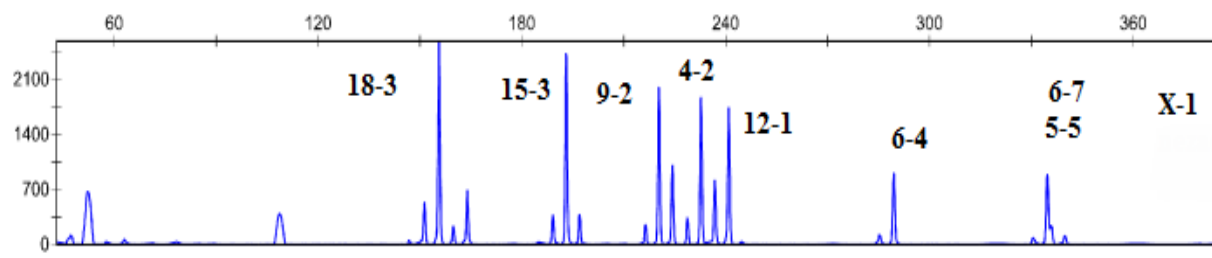
Obrázek 15: Testování zkušebního Primermixu 2 na buněčné linii NIH3T3

Třetí multiplex obsahoval lokusy 15-3, 6-4 a X-1. Nejdelší fragment X-1, který má délku ampliconu 398 bp, se neamplifikoval v dostatečné kvantitě. Z tohoto důvodu jsme opět navýšili jeho koncentraci z původních 200 nM na 300 nM. Tato koncentrace však stále nezajistila amplifikaci produktu v dostatečné kvantitě a bylo nutné zajistit další optimalizaci reakce.



Obrázek 16: Testování zkušebního Primermixu 3 na linii NIH3T3

Dalším krokem bylo spojení třech dílčích reakcí do jedné multiplexní reakce. Výsledné složení finálního multiplexu zobrazuje tabulka č. 9., která obsahuje informace o finální koncentraci jednotlivých lokusů a udává kolik ul je třeba pipetovat, když na počátku byly primery v roztoku o vstupní koncentraci 100 uM.



Obrázek 17: NIH3T3 multiplexní reakce, značení FAM

Podářilo se nám zachytit všechny lokusy až na fragment X-1. Dále jsme se proto zabývali optimalizací reakce s cílem zajistit jeho dostatečnou amplifikaci. Zvyšovali jsme koncentraci X-1, experimentovali s teplotním profilem, přidavkem aditiv, s odlišnou polymerázou a s navýšením množství Master Mixu GB Elite v reakční směsi.

Tabulka 9: Složení multiplexní reakce

Finální složení multiplexu					
celkový objem (ul)	lokus	označení	finální koncentrace (nM)	vstupní koncentrace (uM)	pipetovaný objem 100 uM roztoku (ul)
200	12-1	M12-1_F	200	100	2
		M12-1_R	200	100	2
	6-7	M6-7_F	175	100	1,75
		M6-7_R	175	100	1,75
	9-2	M9-2_F	80	100	0,8
		M9-2_R	80	100	0,8
	18-3	M18-3_F	200	100	2
		M18-3_R	200	100	2
	5-5	M5-5_F	350	100	3,5
		M5-5_R	350	100	3,5
	4-2	M4-2_F	125	100	1,25
		M4-2_R	125	100	1,25
	15-3	M15-3_F	60	100	0,6
		M15-3_R	60	100	0,6
6-4	M6-4_F	100	100	1	
	M6-4_R	100	100	1	
X-1	MX-1_F	300	100	3	
	MX-1_R	300	100	3	

9.3 Optimalizace teplotního profilu

Vhodně optimalizovaný teplotní profil je nezbytným aspektem pro PCR reakci. Výchozím amplifikačním profilem by teplotní profil s označením DXS_20. V průběhu optimalizace jsme však upravovali časy a teploty jednotlivých kroků se záměrem zvýšit koncentraci dlouhých produktů tak, aby bylo možné je kvalitně vyhodnotit. V původním amplifikačním profilu DXS_20 jsme měli 3 kroky denaturace. První 95 °C po dobu 11 minut, druhý 96 °C 2 minuty a třetí 94 °C 1 minutu. Později jsme pro zjednodušení reakce spojili tři kroky denaturace do menšího počtu kroků a doba denaturace se tak zkrátila. Dosaženo toho bylo odebráním druhého kroku denaturace 96 °C po dobu 2 minut, čímž se zvýšila účinnost polymerázy, kterou vyšší teplota postupně deaktivuje. Zároveň jsme zkrátili čas první denaturace z původních 11 minut na pouhé 2 minuty. Tato doba denaturace by měla být dostatečná pro denuraci templátové DNA a její zkrácení umožňuje úsporu času. Třetí krok denaturace byl nezměněn. Dále byl optimalizován čas elongace, který se ukázal jako neúčinnější po dobu 3 minut místo původních 2,5 minuty. Prodloužení času elongace bylo důležité, aby byl dostatek času pro prodlužování delších řetězců, jejichž amplifikací jsme měli v rámci optimalizace reakce problém (konkrétně lokus X-1).

Finální elongaci při 60 °C, při které dochází k doplnění řetězců, jsme zkrátili z původních 60 minut na 15 minut. Z výsledků experimentu vyplývá, že finální elongace trvající 15 minut měla stejné výsledky jako původních 60 minut. Jejím zkrácením jsme zároveň výrazně zkrátili dobu amplifikace.

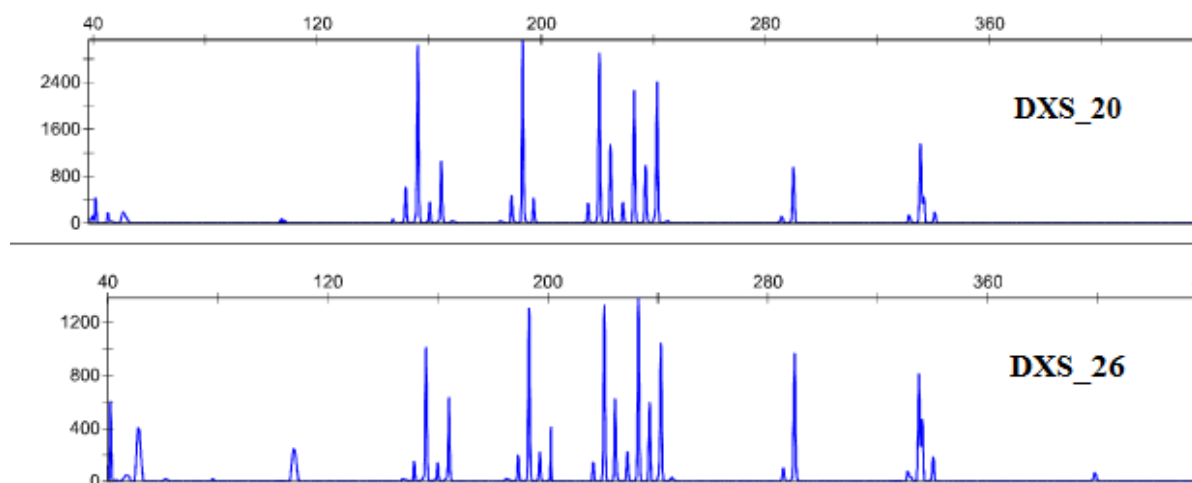
Tabulka 10: Původní amplifikační profil

Teplotní profil DXS_20	
95°C	11 min
95°C	1 min
94°C	1 min
62°C	1 min
70°C	2,5 min 30x
60°C	60 min

Tabulka 11: Optimalizovaný amplifikační profil

Teplotní profil DXS_26	
95°C	2 min
94°C	1 min
62°C	1 min
70°C	3 min 30x
60°C	15 min

Výsledkem optimalizace je profil DXS_26, který umožňuje výrazně rychlejší amplifikaci a poskytuje srovnatelné výsledky s původním profilem DXS_20. Produkty se amplifikují se stejnou kvantitou a poskytují píky o stejné výšce. Z důvodu úspory času byl dále ve všech reakcích používán tento optimalizovaný amplifikační profil. Původní problém – nedostatečnou amplifikaci dlouhých fragmentů se ovšem optimalizací teplotního profilu nepovedlo vyřešit a bylo proto nutné přistoupit k dalším krokům optimalizace.



Obrázek 18: Porovnání původního a optimalizovaného profilu DXS_26

9.4 Analýza smíšených vzorků

Součástí práce byla i analýza smíšených vzorků za účelem vyhodnocení schopnosti multiplexního testu detekovat i nízké úrovně kontaminace. Jako kontaminant byla záměrně použita potkaní buněčná linie WB344. Analyzováno bylo dohromady 14 vzorků o různých poměrech obsahu DNA buněčných linií NIH3T3 a WB344. Nejvíce kontaminovaný vzorek obsahoval poměr DNA linií NIH3T3 a WB344 1:9. I přesto, že DNA testované buněčné linie NIH3T3 tvořila pouhou desetinu z celkové DNA ve vzorku, podařilo se nám zachytit všechny testované lokusy. Všechny lokusy se podařilo též zachytit i ve všech dalších poměrech. Locus X-1 byl však zachycen s velmi nízkou intenzitou, což ovšem není z důvodu kontaminace. Tento lokus bylo problematické zachytit i v reakcích s použitou čistotou bez kontaminace. Výsledky ukazují, že metoda má velkou robustnost a poskytuje kompletní profil buněčné linie i při její velmi nízké koncentraci.

9.5 Optimalizace lokusu X-1

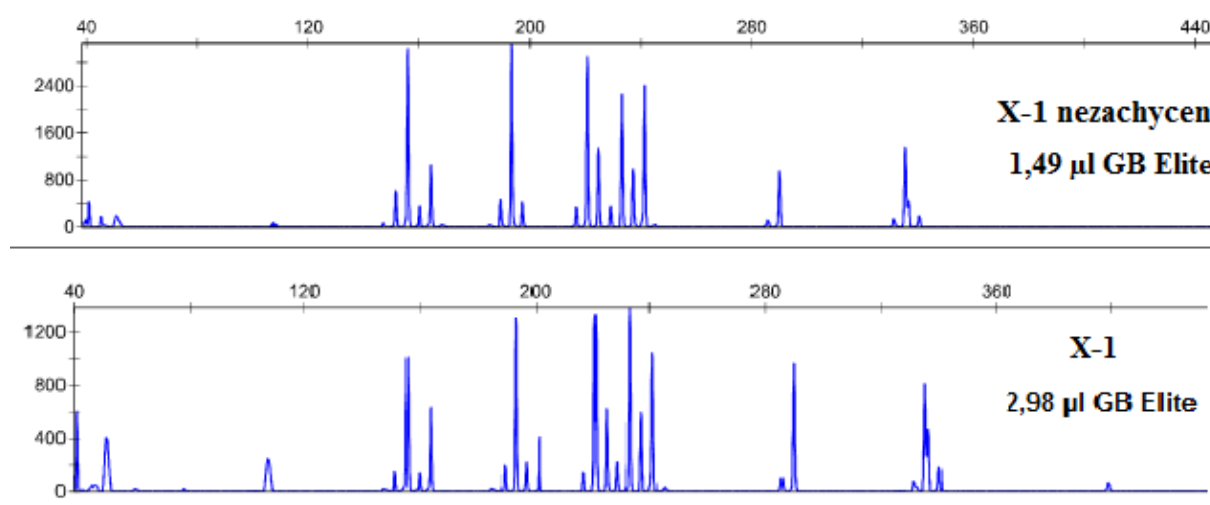
Dalším krokem byla optimalizace lokusu X-1, který ve většině případů nebyl zachycen. Důvodem byla přednostní amplifikace krátkých fragmentů, kdy na výsledném elektroforetogramu byla vidět klesající výška píků v závislosti na rostoucí délce amplikonu.

Pokud jsou dlouhé fragmenty slabé, je několik možných řešení – zvýšit koncentraci primerů slabého lokusu, upravit teplotní profil navýšením času extenze, přidavkem aditiv nebo změnou koncentrace Master mixu v reakční směsi. Vyzkoušeli jsme různé kombinace těchto možností.

Prvním zvoleným krokem k optimalizaci lokusu X-1 byla **optimalizace jeho koncentrace** ve výsledném složení multiplexu. Testovány byly koncentrace v 300 nM až 500 nM. Ovšem ani přes navýšení koncentrace se nepodařilo tento lokus zachytit v dostatečné kvantitě. Ovšem ani při koncentraci 500 nM, jsme nedosáhly požadovaného výsledku. Jelikož změna koncentrace lokusu X-1 neměla vliv na jeho amplifikaci a množství výsledného produktu, pokračovali jsme v jeho optimalizaci.

Dalším pokusem o optimalizaci lokusu X-1 bylo **navýšení množství GB Elite Master Mixu** v reakční směsi. Ve standardním složení reakční směs obsahovala 1,49 μ l gb Elite PCR Master Mixu. Při optimalizaci jsme vyzkoušeli různé varianty složení reakční směsi s koncentrací GB Elite Master mixu v rozmezí 1,49 μ l až 2,98 μ l. Ani jedna z testovaných koncentrací nebyla optimální. Lokus X-1 se i nadále dařilo zachytit jen slabě a výsledný produkt se amplifikoval jen v malém množství.

Navýšení koncentrace primerů X-1 v multiplexu, ani navýšení množství GB Elite Master mixu v reakční směsi nebylo řešením problému s amplifikací dlouhých fragmentů. Naším cílem následně bylo zjistit, jaký vliv bude mít na amplifikaci dlouhých produktů použití jiné polymerázy. Byla proto provedena série pokusů s **polymerázou Taq Gold**, který by měla zaručit vyšší výtěžnost a specifitu při PCR reakci.



Obrázek 19: Porovnání dvou koncentrací GB Elite Master mixu v reakční směsi

V našem případě však nedošlo k lepší výtěžnosti. Problematický lokus X-1 se ani s použitím *Taq Gold polymerázy* nepodařilo zachytit. Vylepšení nebylo znát ani na specifčnosti reakce. Naopak na výsledném elektroforetogramu bylo znát více tzv. stutter píků, které vznikají prokluzem polymerázy. Jako vhodnější se ukázala původní používaná *Taq polymeráza*, která zajišťovala specifčtější reakci s menším množstvím stutter píků. a proto byla použita pro všechny další analýzy.

9.6 Vliv aditiv na PCR produkty a lokus X-1

Jelikož ani použití jiné polymerázy neovlivnilo kvantitu dlouhých PCR produktů, jako další postup jsme zvolili **testování vlivu aditiv na PCR produkty**. Do reakční směsi jsme přidávali aditiva za účelem navýšení kvantity dlouhých produktů. Konkrétně se jednalo o aditiva BSA v koncentracích 50 - 500 µg/ml a DMSO v koncentračním rozmezí 1 – 10 %. Testován byl vliv aditiv konkrétně na lokus X-1 a celkově na multiplex. Vliv aditiva byl hodnocen dle kvantity produktu a výskytu nežádoucích píků.

Tabulka 12: Testování vlivu aditiv

	BSA			DMSO	
	vliv na lokus X-1	vliv na multiplex		vliv na lokus X-1	vliv na multiplex
50ng/ml	nezachycen	-	1%	nezachycen	-
100ng/ml	nezachycen	-	3%	nezachycen	-
300ng/ml	nezachycen	+	5%	nezachycen	-
500ng/ml	nezachycen	+	10%	nezachycen	+

Většinou přidávaná aditiva neměla zásadní vliv na kvalitu ani kvantitu PCR produktů. Použití BSA ve vyšších koncentracích mělo pozitivní vliv na multiplex, kdy se produkty amplifikovali ve větší kvantitě. Stejný účinek měl přídavek DMSO v nejvyšší koncentraci. Výsledky ovšem nebyly lepší než při použití samotného MM GB Elite. Přídavek aditiv nepomohl ani k navýšení kvantity dlouhých fragmentů a lokus X-1 se nepodařilo zachytit ani s přídatkem aditiv. Jako nejlepší byl proto vyhodnocen samotný GB Elite PCR Master Mix bez přidávaných aditiv. Tento master mix se díky vyváženému složení a dle námi dosažených výsledků jeví jako nejvhodnější pro tuto multiplexní reakci.

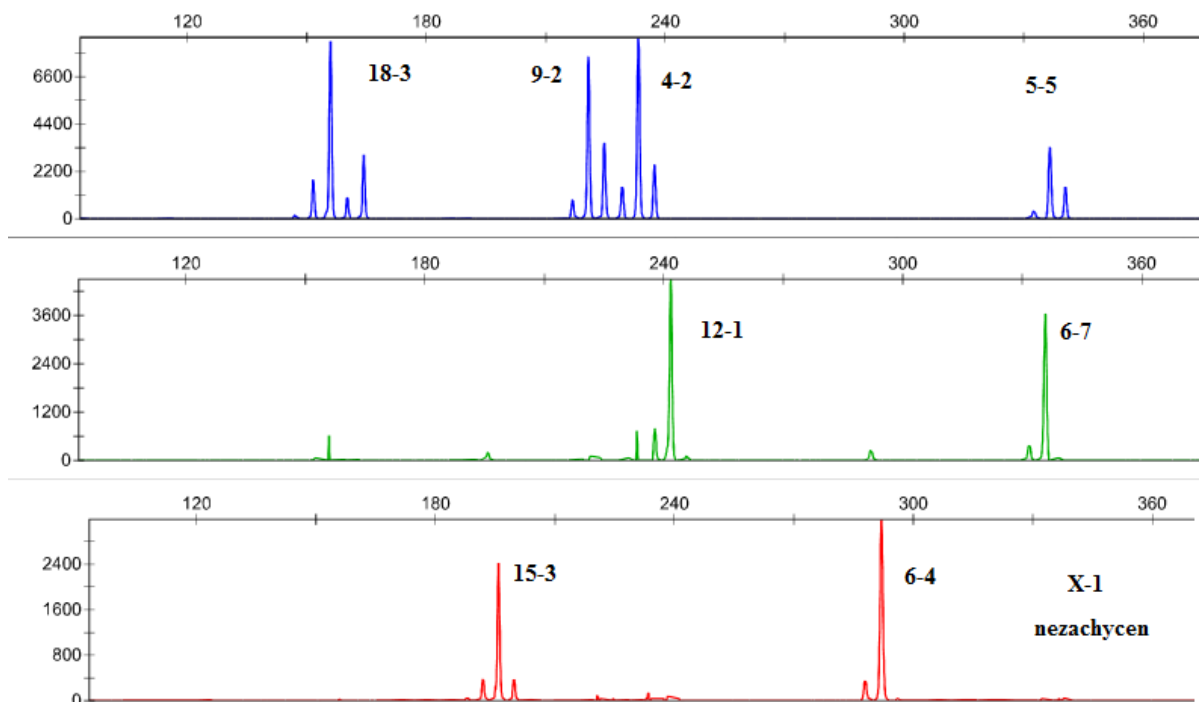
9.7 Složení a vyhodnocení finálního multiplexu

Po snaze o optimalizaci lokusu X-1 následoval návrh vícebarevného fluorescenčního značení s použitím kombinace tří fluorescenčních dye, kterými byly modifikovány jednotlivé primery. Následující tabulka obsahuje výsledné složení finálního multiplexu, včetně koncentrací jednotlivých primerů a údajů o tom, jakou barvou byly modifikovány.

Tabulka 13: Finální složení multiplexu

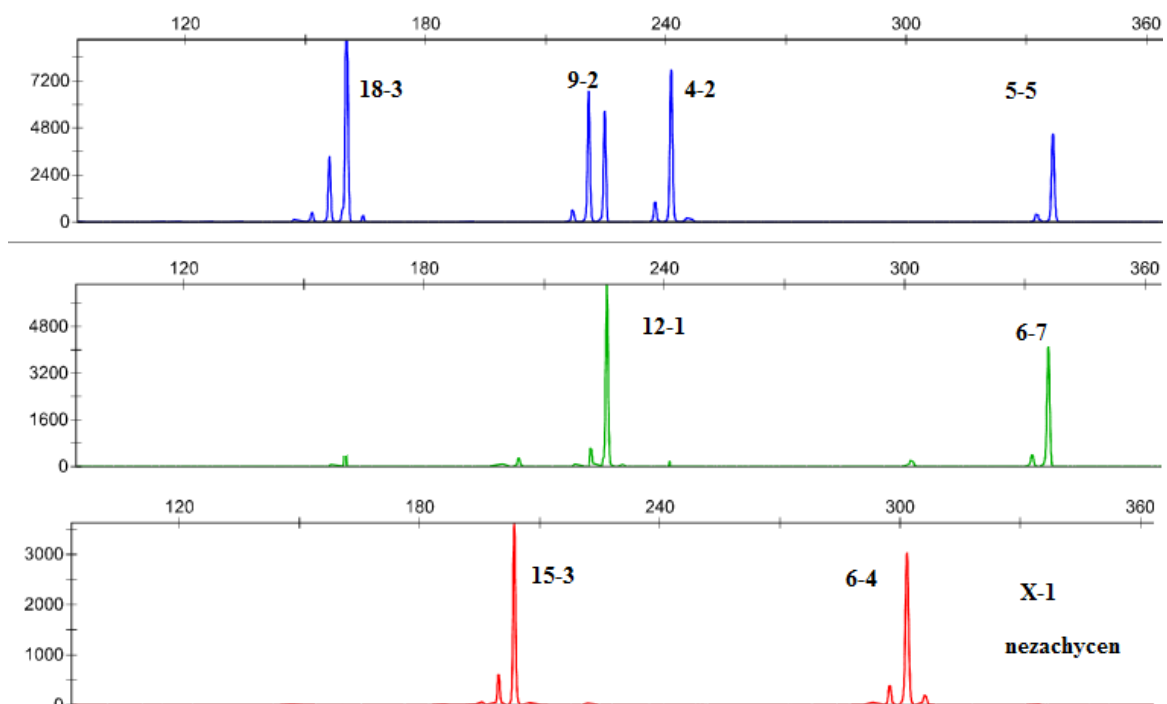
Finální složení multiplexu s použitím vícebarevného značení						
celkový objem (ul)	lokus	modifikace	označení	finální koncentrace (nM)	vstupní koncentrace (uM)	pipetovaný objem 100 uM roztoku (ul)
200	12-1	HEX	M12-1_F	200	100	2
			M12-1_R	200	100	2
	6-7	HEX	M6-7_F	175	100	1,75
			M6-7_R	175	100	1,75
	9-2	FAM	M9-2_F	80	100	0,8
			M9-2_R	80	100	0,8
	18-3	FAM	M18-3_F	200	100	2
			M18-3_R	200	100	2
	5-5	FAM	M5-5_F	350	100	3,5
			M5-5_R	350	100	3,5
	4-2	FAM	M4-2_F	125	100	1,25
			M4-2_R	125	100	1,25
	15-3	610	M15-3_F	60	100	0,6
			M15-3_R	60	100	0,6
6-4	610	M6-4_F	100	100	1	
		M6-4_R	100	100	1	
X-1	610	MX-1_F	300	100	3	
		MX-1_R	300	100	3	

Finální multiplex jsme vyzkoušeli na buněčných liniích J774 a NIH3T3. U obou linií se nám podařilo zachytit všechny lokusy s výjimkou lokusu X-1. Tento lokus se ani přes veškerou snahu a optimalizaci reakce nepodařilo zachytit. Podařilo se nám zachytit i heterozygotní alely (např. lokus 9-2 u buněčné linie J744), amplicony se amplifikují v dostatečné kvantitě a píky mají přibližně stejnou výšku. Před některými lokusy se náhodně vyskytují stutter píky. Tyto takzvané předskokany se bohužel nepodařilo odstranit. Vždy jsou však menší než třetina vlastního píku. Díky tomu není obtížné výsledné elektroforetogramu vyhodnotit.

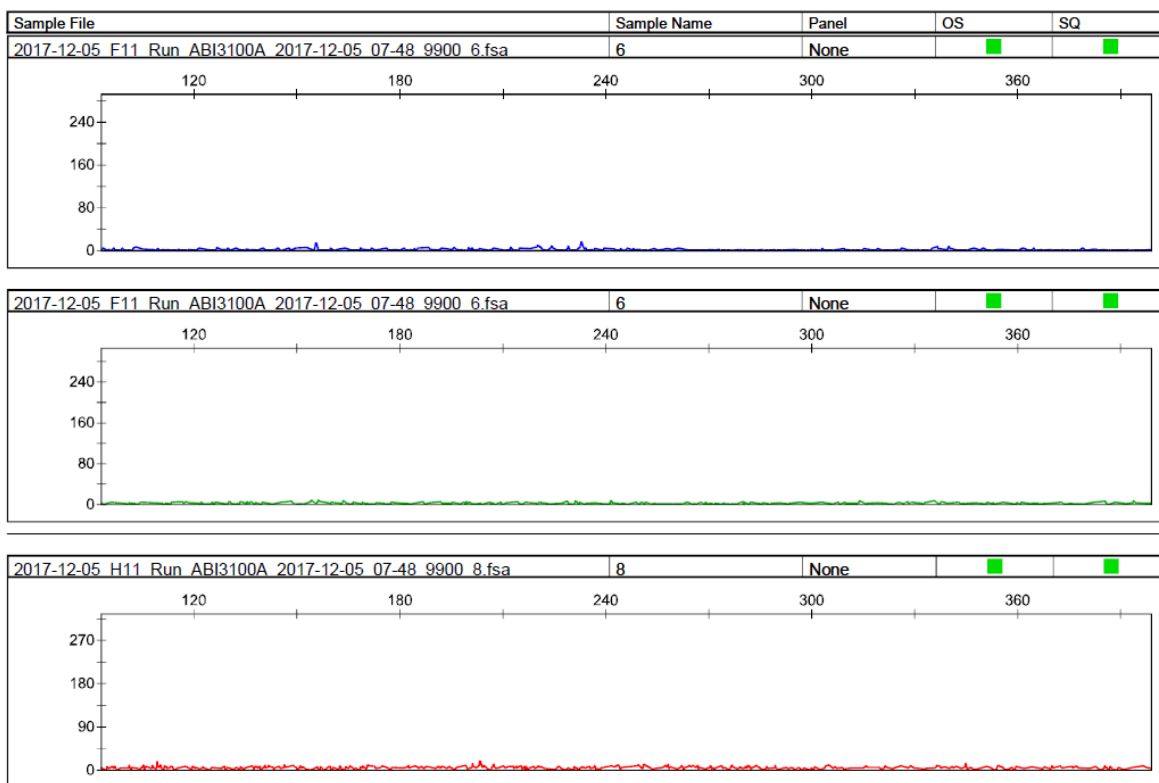


Obrázek 20: Analýza buněčné linie NIH3T3

Otestována byla i potkaní buněčná linie WBF344. Podle očekávání na výsledném elektroforetogramu nebyly zachyceny žádné píky, jelikož se nejedná o myšičí buněčnou linii. Prokázali jsme tak, že naše multiplexní reakce je specifická pouze pro myšičí buněčnou linii.



Obrázek 21: Analýza buněčné linie J774



Obrázek 22: Analýza potkaní buněčné linie WBF344

10. Závěr

Výsledkem naší práce je optimalizovaná metoda STR autentizace myších buněčných linií, která umožňuje jejich efektivní autentizaci. Kombinuje analýzu devíti STR markerů do jedné reakce. Šetří tak náklady a čas potřebné na analýzu, minimalizuje riziko chyb při pipetování a zároveň díky velké diskriminační síle umožňuje autentizaci i inbredních kmenů myši, které mají velkou část alel sdílených. Metoda je vhodná ke komerčnímu využití a je optimalizována.

S výjimkou lokusu X-1, který se nepodařilo ani přes veškeré spektrum provedených testů optimalizovat, se všechny lokusy amplifikují v dostatečné kvantitě. Důvodem nedostatečné amplifikace lokusu X-1 je velká délka amplikonu přes 360 bp, kdy dochází k přednostní amplifikaci krátkých fragmentů. Při pokusu o optimalizaci lokus X-1 jsme testovali vliv množství GB Elite Mastermixu v reakční směsi na tento lokus. Navýšení koncentrace GB Elite Mastermixu se ukázalo jako neúspěšné řešení. K amplifikaci dlouhých fragmentů ve větší kvantitě nepřispělo ani použití jiného druhu polymerázy Tag Gold polymerázy nebo navýšení primerů pro lokus X-1 v reakční směsi. Testovali jsme i vliv aditiv BSA a DMSO v různých koncentracích na amplifikaci dlouhých fragmentů, přičemž nejvíce pozitivně reakci ovlivňoval samotný GB Elite MasterMix bez přidaných aditiv.

Píky na výsledném elektroforetogramu dosahují stejné výšky a podařilo se nám zachytit i všechny heterozygotní alely. Při analýze nevznikají žádné nespecifické produkty. Díky optimalizaci se nám dále podařilo minimalizovat stutter píky a navrhnout vhodný amplifikační profil DXS_26, který výrazně zkrátí čas analýzy. Teplotní profil DXS_26 zároveň dosahuje srovnatelných výsledků s původním teplotním profilem DXS_20. Při analýze směsných vzorků jsme prokázali, že k úspěšné provedené analýze stačí i malé množství myší DNA ve směsném vzorku a metoda má velkou selektivitu.

Výsledky se dají díky námi navrženému třibarevnému značení snadno odečítat. Navíc díky použití pouze tří barev je tu možnost do budoucna přidat další lokusy do multiplexní reakce a označit je čtvrtou fluorescenční dye. Metoda má praktický přínos pro autentizaci myších buněčných linií, což jsme již prokázali úspěšným naprofilováním buněčné linie J774. Buněčná linie J774 nebyla dosud naprofilována a v rámci této diplomové práce jsme získali její kompletní profil, který může sloužit jako referenční. Stejným způsobem jsme získali i profil buněčné linie NIH3T3, který jsme porovnali s dostupným referenčním profilem a ověřili si tak, že metoda poskytuje správné výsledky. Podařilo se nám tak naplnit všechny experimentální cíle

práce a vyvinout metodu, u které se předpokládá další využití v laboratořích firmy Geneti Biotech k praktickým aplikacím jako součást jejich komerčních služeb autentizace buněčných linií.

Nad rámec této práce jsme se dále zabývali i identifikací extrahované DNA metodou fragmentační analýzy COX1, sloužící k ověření druhu. Tuto metodu jsme převedli na sekvenátor a vyzkoušeli monoplexní analýzu. Takto se nám povedlo identifikovat všech 6 testovaných živočišných druhů. Tento test se může stát rychlým a snadným způsobem, jak identifikovat druh buněčné linie. Propojení všech reakcí do multiplexu ovšem vyžaduje další optimalizaci. Jelikož jsme tuto metodu zkoušeli nad rámec diplomové práce, další optimalizace již nebyla náplní naší experimentální činnosti a naopak je vhodným novým tématem pro další studenty, kteří se chtějí podílet na vývoji a zavedení nové metody. Stejně jako v našem případě by konečným cílem mělo být zavedení metody k běžnému použití. Tento cíl se nám podařilo naplnit a zavést metodu autentizace myších buněčných linií pomocí STR analýzy.

11. Seznam citací

1. FRESHNEY, R. Ian. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 04-705-2812-5.
2. CALLAWAY, Ewen. Deal done over HeLa cell line. *Nature*. 2013-8-7, **500** (7461), s. 132-133. DOI: 10.1038/500132a. ISSN 0028-0836
3. VEJRAŽKA, Martin., *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami*. 2004: Praha. Ústav lékařské biochemie. 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
4. HERMANOVÁ, Petra. *Nádorové buněčné linie a jejich analýza v reálném čase*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Michal Masařík, Ph.D
5. BOEHM JS, Hahn WC. Immortalized cells as experimental models to study cancer, *Cytotechnology*. 2004; 45: s.47–59..
6. POLÁKOVÁ, Sabina. *Autentizace non-human buněčných linií*, Pardubice, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D
7. *Kultivace buněk in vitro*, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, dostupné z: http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf
8. STACEY, Glyn. Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley, 2001. DOI:10.1038/npg.els.0003960.
9. CAPES-DAVIS, Amanda a Richard M. NEVE. Authentication: A Standard Problem or a Problem of Standards? *PLOS Biology* [online]. 2016, **14**(6), e1002477- [cit. 2017-11-16]. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002477. ISSN 1545-7885.
10. LACROIX, Marc , Persistent use of “false” cell lines. *International Journal of Cancer*. 2008, **122** (1).
11. GRENS, Kerry. *Papers Based on Misidentified Cell Lines Top 32,000* [online]. 2017 [cit. 2017-11-12]. Dostupné z: <http://www.thescientist.com/?articles.view/articleNo/50655/title/Papers-Based-on-Misidentified-Cell-Lines-Top-32-000>
12. NARDONE RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biology and Toxicology*. 2007, **23** (6), s. 367-372. DOI: 10.1007/s10565-007-9019-9.
13. CAPES-DAVIS, Amanda, THEODOSOPOULOS, George. ATKIN Isobel, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines: A call for action. *International Journal of Cancer*. 2010, 127(1), s.1-8. DOI: 10.1002/ijc.25242.
14. BUEHRING G.C., Eby E.A., Eby M.J. Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? 2004. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 40 (7): s.211-215.
15. ROJAS, Armando, GONZALEZ Ileana, FIGUEROA Hector a R. A. F MACLEOD. *Cell line cross-contamination in biomedical research: a call to prevent unawareness*. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008, 29(7), s.877-880

16. COSME, Bruno, Priscila FALAGAN-LOTSCH, Mariana RIBEIRO, Kely NAPOLEÃO, José Mauro GRANJEIRO a Rodrigo MOURA-NETO. Are your results valid? Cellular authentication a need from the past, an emergency on the present. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2017, 53(5), 430-434 [cit. 2017-11-16]. DOI: 10.1007/s11626-016-0124. ISSN 1071-2690.
17. HORBACH, Serge P. J. M., Willem HALFFMAN a Wolfgang GLANZEL. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature. *PLOS ONE* [online]. 2017, 12(10), [cit. 2017-11-12]. DOI: 10.1371/journal.pone.0186281. ISSN 1932-6203.
18. ARLETT, Colin F, George THEODOSOPOULOS, Isobel ATKIN, et al. The use of dubious cell lines in research: is trust enough? *The Lancet Oncology*. 2001, 2(8), s. 467. ISSN 14702045
19. BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 9788024632247.
20. Short Tandem Repeats. *DNA Testing System*, [online]. [cit. 2017-11-17]. Dostupné z <http://www.forensicdnacenter.com/dna-str.html>
21. IRKS, Wilhelm Gerhard, Silke FAEHNRICH, I. A. ESTELLA a Hans Günter DREXLER, 2005. *Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines*. *Altex*. 22 (2), s. 103
22. ŠTOURAČOVÁ, Marcela. *Vyhodnocování a interpretace směsných forezních vzorků fragmentační analýzou STR polymorfismů*. Brno, 2009. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Lékařská fakulta. Vedoucí práce doc. RNDr. Igor Kraus
23. ŠMÍDOVÁ, Veronika. *STR analýza chromozomu X*. Pardubice, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Vojtěch Vejvoda.
24. *Analýza mikrosatelitů*. Laboratoř molekulární biologie PŘF Jihočeské Univerzity [online]. [cit. 2017-12-1]. Dostupné z: <http://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/mikrosatelitey.html>
25. MLČOCHOVÁ, Hana. *Praktické využití DNA polymorfismů*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce doc. RNDr. Radek Horváth.
26. MASTERS, J. R., J. A. THOMSON, B. DALY-BURNS, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, 98 (14), s. 49 [cit. 2017-12-1]. ISSN 00278424
27. BUTLER, John. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques* [online]. 2007, 43(4), Sii-Sv [cit. 2017-12-01]. DOI: 10.2144/000112582. ISSN 0736-6205. Dostupné z: <http://www.biotechniques.com/article/000112582>
28. *Izolace nukleových kyselin*. Biologie UPOL [online]. [cit. 2016-06-17]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>
29. *Polymerázová řetězová reakce (PCR)*. Laboratoř molekulární biologie. PŘF JU. [online]. [cit. 2017-31-11]. Dostupné z: <http://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>

30. REID Yvonne, Storts D., *Authentication of Human Cell Lines by STR DNA Profiling Analysis*. 2013. Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
31. GRAFNETTEROVÁ, Anna. *Využití kapilární elektroforézy v rámci forenzních molekulárně genetických zkoumáních*. Praha, 2010. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.. Vedoucí práce Mgr. Klára Doubková
32. CAPES-DAVIS, Amanda, Yvonne A. REID, Margaret C. KLINE, et al. Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line? *International Journal of Cancer*. 2013, 132(11), s. 2510-2519. DOI: 10.1002/ijc.27931. ISSN 00207136.
33. YOSHINO, Kaori, Emi IIMURA, Kaoru SAIJO, Shigeru IWASE, Kaoru FUKAMI, Tadao OHNO, Yuichi OBATA a Yukio NAKAMURA. Essential role for gene profiling analysis in the authentication of human cell lines. *Human Cell* [online]. 2006, **19**(1), 43-48 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1111/j.1749-0774.2005.00007.x. ISSN 0914-7470.
34. *How cell line authentication works....* Cell Line Authentication Services [online]. [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: <http://cell-line-authentication.info/cell-lineauthentication-services>
35. LINCOLN, Patrick J. a Jim THOMSON. *Forensic DNA profiling protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, c1998. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 98. ISBN 0896034437.
36. BRABENCOVÁ, Klára. *Analýza mitochondriálních genů živočichů pro DNA barcoding*. Brno, 2014. Diplomová práce. Fakulta elektrotechniky. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Denisa Maďěránková
37. CHAO, Zhi, Jing LIAO, Zhenbiao LIANG, Suhua HUANG, Liang ZHANG a Junde LI. Cytochrome C oxidase subunit I barcodes provide an efficient tool for *Jinqian Baihua She (Bungarus parvus)* authentication. *Pharmacognosy Magazine*. 2014, 10(40), 449-451. ISSN 0973-1296.
38. LESAKOVA, Kateřina. *Molekulární taxonomie pomocí mitochondriální DNA*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Fakulta elektrotechniky. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Denisa Maďěránková
39. *What is DNA Barcoding. Barcode of Life* [online]. [cit. 2016-06-17]. Dostupné z: <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>
40. KRESS, W. John a David L. ERICKSON. DNA Barcodes: Methods and Protocols. [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-3-29, s. 3-8 [cit. 2018-01-21]. *Methods in Molecular Biology*TM. DOI: 10.1007/978-1-61779-591-6_1.
41. O'BRIEN, Stephen J., John E. SHANNON a Mitchell H. GAIL. A molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: Isozyme and allozyme genetic signatures. *In Vitro* [online]. 1980, 16(2), s.119-135 [cit. 2016-06-19]. ISSN 0073-5655. 37
42. HALTON, David M., Ward D. PETERSON a Bharati HUKKU. Cell culture quality control by rapid isoenzymatic characterization. *In Vitro*. 1983, 19 (1), s. 16-24. ISSN 0073-5655

43. COOPER, Jason K., Greg SYKES, Steve KING, Karin COTTRILL, Natalia V. IVANOVA, Robert HANNER a Pranvera IKONOMI. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cellular*. 2007, 43(10), s.344-351. DOI: 10.1007/s11626-007-9060-2. ISSN 1071-2690
44. RONDN LAGOS, Sandra Milena a Nelson Enrique RANGEL JIMNEZ. *Cytogenetic Analysis of Primary Cultures and Cell Lines: Generalities, Applications and Protocols*. Recent Trends in Cytogenetic Studies - Methodologies and Applications. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0178-9.
45. Standard Karyotype of the mouse: Comittee and standardized genetic nomenclature for mice [online]. *Oxford Journals* [cit. 2018-02-10]. Dostupné z: http://www.oxfordjournals.org/our_journals/jhered/freepdf/63-69.pdf
46. KOUBKOVÁ, L., B. VOJTĚŠEK a R. VYZULA. *Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi* [online]. Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, 2014 [cit. 2018-02-10].
47. EDWARDS, Mary C., GIBBS, Richard A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research* [online]. 1994, (3) [cit. 2018-02-04]. ISSN 1054-9805/94
48. HENEGARIU, O., N. HEREEMA, S. DLOUHY a G. VANCE. Multiplex PCR: Critical Parametres and Step-by-Step protocol. *BioTechniques* [online]. 1997,(23), 504-511 [cit. 2018-02-02].
49. ZANGENBERG, G., R.K. SAIKI a R. REYNOLDS. Multiplex PCR: Optimization guidelines. *PCR Applications* [online]. Elsevier, 1999, 1999, s. 73-94 [cit. 2018-02-20]. DOI: 10.1016/B978-012372185-3/50007-9. ISBN 9780123721853.
50. VOJTOVÁ, Magda. *Optimalizace parametrů polymerázové řetězové reakce*. České Budějovice, 2013. Bakalářská práce. Zdravotně-sociální fakulta. Jihočeská univerzita. Vedoucí práce Mgr. Jaroslava Kohoutová, Ph.D
51. KIMPTON, Colin P., Nicola J. OLDROYD, Stephanie K. WATSON, et al. Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification. *Electrophoresis* [online]. 1996, 17(8), 1283-1293 [cit. 2018-02-10]. DOI: 10.1002/elps.1150170802. ISSN 0173-0835.
52. MARKOULATOS, P., N. SIAFAKAS a M. MONCANY. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2002, 16(1), 47-51 [cit. 2018-02-10]. DOI: 10.1002/jcla.2058.
53. RYCHLIK, W., SPENCER, W. J., RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Oxford University Press* [online]. 1990, no. 21 [cit. 2018-02-04].
54. *STR Data Analysis & Interpretation for Forensic Analysts*. San Jose University. Online course. [online]. [cit. 2018-02-10]. Dostupné z: <http://www.sjsu.edu/people/steven.lee/courses/c2/s2/STR%20Data%20Analysis%20and%20Interpretation%20for%20Forensic%20Analysts.pdf>
55. GILL, P., SPARKES, R., KIMPTON, C. 1997. Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *Forensic Science International* 89: 185 – 197
56. ALMEIDA, Jamie L., Plant A., Cole K. Standards for Cell Line Authentication

- and Beyond. *PLOS Biology*, 2016 14(6) DOI:10.1371/journal.pbio.1002476
57. FRESHNEY, R Ian, George THEODOSOPOULOS. Authentication of cell lines: ignore at your peril!. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2014, 8 (3), s. 311314. DOI: 10.1586/14737140.8.3.311. ISSN 1473-7140.
 58. ALMEIDA, Jamie L, Carolyn R HILL a Kenneth D COLE. Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. *BMC Biotechnology*. 2011, 11(1), s.102-107. ISSN 1472-6750.
 59. NAGY, Kristina, Hoon-Ki SUNG, Puzheng ZHANG, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2011, 7(3), 693-702.
 60. BUTLER, J.M., David, V.A., O'BRIEN, S.J., MENOTTI, M. (2002) The MeowPlex: a new DNA test using tetranucleotide STR markers for the domestic cat. Profiles in DNA. *Promega Corporation*, Volume 5, No. 2, pp. 7–10. http://www.promega.com/profiles/502/ProfilesInDNA_502_07.pdf
 61. O'DONOGHUE, L. E., J. P. RIVEST a D. L. DUVAL. Polymerase chain reaction based species verification and microsatellite analysis for canine cell line validation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011, 23(4), 780-785. ISSN 10406387.
 62. ALMEIDA, Jamie L., Carolyn R. HILL a Kenneth D. COLE. Mouse cell line authentication. *Cytotechnology*. 2014, 66(1), s.133-147. ISSN 0920-9069.
 63. LAU, Ho-Tak, Lizhi LIU, Chelsea RAY, Fong T. BELL a Xiajun LI. Derivation of hybrid ES cell lines from two different strains of mice. *Stem Cell Research*. 2016, 16(2), s.252-255. DOI: 10.1016/j.scr.2016.01.017. ISSN 18735061. 52
 64. CASELLAS, J. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal* [online]. 2011, 5(01), 1-7 [cit. 2017-11-27]. DOI: 10.1017/S1751731110001667. ISSN 1751-7311.
 65. UCHIO-YAMADA, Kozue, Fumio KASAI, Midori OZAWA a Arihiro KOHARA. Incorrect strain information for mouse cell lines: sequential influence of misidentification on sublines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* [online]. 2017, 53(3), 225-230 [cit. 2018-02-23]. DOI: 10.1007/s11626-016-0104-3. ISSN 1071-2690.
 66. YOSHINO, Kaori, Kaoru SAIJO, Chikako NORO a Yukio NAKAMURA. Development of a Simple Method to Determine the Mouse Strain from Which Cultured Cell Lines Originated. *Interdisciplinary Bio Central* [online]. 2010, 2(4), 14.1-14.9 [cit. 2018-02-23]. DOI: 10.4051/ibc.2010.2.4.0014. ISSN 2005-8543.
 67. LEIBIGER, Christine, Nadezda KOSYAKOVA, Hasmik MKRTCHYAN, , Vladimir TRIFONOV a Thomas LIEHR. First Molecular Cytogenetic High Resolution Characterization of the NIH 3T3 Cell Line by Murine Multicolor Banding. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. 2012, 61(4), 306-312 [cit. 2017-11-27]. DOI: 10.1369/0022155413476868. ISSN 0022-1554.
 68. ATCC: J774 Cell Line from mouse. [online]. [cit. 2017-11-27]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-67>

Zdroje obrázků:

Obrázek č. 1: Krátké tandemové repetice

Zdroj: ŠIMKOVÁ, H. Breviář forenzní genetiky. Forenzní analýza DNA v otázkách a odpovědích. Tribun EU s.r.o. Brno. 2012. 214s. ISBN 978-80-263-0247-6

Obrázek č. 3: Schéma polymerázové řetězové reakce

Zdroj: UNIVERSITY OF LEICESTER. Virtual Genetics Education Centre. Recombinant DNA and genetic techniques. [online]. 2008 [cit.2018-03-04].

Obrázek č. 4: Elektroforetogram homozygota a heterozygota

Zdroj: ATCC [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z :
<http://www.atcc.org/~media/PDFs/webinars/ATCC%20Webinar%20STR%20for%20Human%20Cell%20Line%20Authentication.ashx>

Obrázek č. 5 a č. 6 : Elektroforetogram dvou odlišných buněčných linií, Elektroforetogram shodných buněčných linií

Zdroj: M. PRIETO, Rosa. *Human Cell Line Authentication. Why is it so important?* [online]. Dostupný na: <http://www.slideshare.net/VHIR/seminario-autenticacin-lneas-celulares-humanas>

Obrázek č. 7: DNA barcoding

Zdroj: *Bioreliance: CO1 Barcode Assay* [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z:
<https://www.bioreliance.com/nl/services/biopharmaceutical-services/cell-line-characterization/cell-line-authentication/co1-barcode-assay>

Obrázek č. 8: Izoenzymová analýza směsi buněk křečka a myši

Zdroj: Biopharm: *Cell Line Authentication Using Isoenzyme Analysis* [online]. 2005 [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://www.bioreliance.com/nl/services/biopharmaceutical-services/cell-line-characterization/cell-line-authentication/co1-barcode-assay>

Obrázek č. 9 : Přednostní amplifikace krátkých fragmentů

Zdroj: *STR Data Analysis & Interpretation for Forensic Analysts* [online]. 2008 [cit. 2018-05-07]. Dostupné z:
<http://www.sjsu.edu/people/steven.lee/courses/c2/s2/STR%20Data%20Analysis%20and%200Interpretation%20for%20Forensic%20Analysts.pdf>

Obrázek č. 10 Postup izolace DNA

Zdroj: <http://www.generi-biotech.com>

Obrázek č. 11 : Přehled setů fluorescenčního značení pro genotypizaci

Zdroj: <http://www.generi-biotech.com>

Obrázek č. 12: Vzorce použitých fluorescenčních dye

Zdroj: <http://www.generi-biotech.com>