SLEZSKÁ UNIVERZITA V OPAVĚ
Filozoficko-přírodovědecká fakulta
Ústav informatiky

SOUTĚŽNÍ PRÁCE SVOČ 2009

David Beneš **Opava 2009**

SLEZSKÁ UNIVERZITA V OPAVĚ
Filozoficko-přírodovědecká fakulta
Ústav informatiky

Párová kompatibilita primerů pro genotypizaci

SOUTĚŽNÍ PRÁCE SVOČ 2009

David Beneš

Vedoucí práce
Doc. Ing. Petr Sosík, Ph. D.

Opava 2009

Obsah

Přehled nejdůležitějších pojmů

Pro účely pochopení dalších kapitol by bylo vhodné si shrnout a krátce popsat některé často používané výrazy či pojmy. Jejich bližší popis následuje v kapitole č. 2.

nukleotid základní stavební jednotka DNA (popř. RNA) – jednotlivé nukleotidy v DNA jsou: adenin, thymin, cytozin a guanin. RNA navíc obsahuje uracil.

DNA deoxyribonukleová kyselina – nukleová kyselina nesoucí genetickou strukturu buněčného organizmu. Molekula DNA je tvořena dvěma spojenými vlákny, která jsou stočena do šroubovice.

ssDNA jednovláknová DNA – jedno z vláken DNA molekuly, které bylo odděleno např. denaturací

RNA ribonukleová kyselina – molekulární struktura, která slouží k přepisu části DNA na bílkovinu. Její struktura je velmi podobná DNA, obsahuje však některé odlišné nukleotidy.

PCR polymerázová řetězová reakce – metoda, při které dochází k replikaci molekul DNA

polymeráza pomocný enzym používaný při PCR, na jednoduchá vlákna DNA váže komplementární nukleotidy

amplikon produkt PCR – replikovaný úsek DNA

mikrosatelit jednoduchá sekvence opakujících se nukleotidů

gen základní jednotka dědičnosti nebo také úsek DNA nesoucí dědičnou informaci

alela forma genu – od jiné formy stejného genu se může lišit např. počtem opakování krátké sekvence nukleotidů (repeticí)

počet repetic počet opakování sekvence nukleotidů v mikrosatelitu

elektroforéza proces, který vizualizuje délkové zastoupení molekul DNA ve vzorku

báze viz nukleotid

bázová dvojice dvojice komplementárních nukleotidů spojená vodíkovým můstkem

bp zkr. *base pair* – délková jednotka DNA, která určuje počet bázových dvojic

chromozóm – organizovaná struktura DNA a bílkovin obsažená v buněčném jádře

lokus pozice na chromozómu

vodíkový můstek slabá molekulární vazba mezi nukleotidy, která bývá za některých okolností úmyslně přerušena – např. při replikaci DNA

molekulární marker molekulární struktura označující místo v DNA

duplex propojená dvojice komplementárních vláken

oligonukleotid krátké vlákno DNA zpravidla o délce několika jednotek až desítek nukleotidů

primer oligonukleotid používaný k započetí reakce při PCR

vlásenkování nežádoucí jev během PCR, kdy se část primeru spojí sama se sebou

hybridizace nežádoucí jev, při kterém se vzájemně spojí dva primery

multiplex sada skupin vzájemně kompatibilních mikrosatelitů, kde počet skupin odpovídá počtu elektroforézních kanálů

1 Úvod

Genotypizace je metoda identifikace druhu nebo jedince pomocí DNA sekvencí. Používá se v běžném lékařství a experimentální biologii, nebo také bývá hojně využívána v soudním lékařství např. při sporech o rodičovství, identifikaci podezřelého, nebo při hledání příbuzných obětí katastrof. Posledním detekčním krokem genotypizace je elektroforéza, během níž zkoumáme genetické otisky subjektů na speciálním gelu. Jednotlivé otisky jsou vyjádřeny délkami alel vybraných mikrosatelitů.

Vymezení cílů

Forenzní laboratoře mají obrovský detekční potenciál – mohou např. určit barvu očí pachatele trestného činu, od něhož mají k dispozici pouze malé množství genetického materiálu (zbytky slin, krev, vlas…). Takové testy se doposud prováděly jen ve výjimečných případech kvůli vysokým nákladům. Velkou část nákladů tvoří nákup elektroforézního gelu, na kterém se provádí určování délek alel mikrosatelitů.

Tato práce si klade za cíl návrh a implementaci sady originálních matematických metod založených na nejnovějších poznatcích molekulární biologie a bioinformatiky, které jsou schopny rozdělit zvolené mikrosatelity do skupin, ve kterých se délky jejich alel nebudou překrývat. V rámci těchto skupin musí být zároveň zajištěna vzájemná chemická kompatibilita primerů vázaných k mikrosatelitům, aby nedocházelo k jejich hybridizaci. Zkombinováním více mikrosatelitů do společné skupiny umožníme jejich současnou amplifikaci metodou PCR. Zároveň můžeme provádět pro každou skupinu detekci na elektroforézním gelu ve společném kanálu, aniž bychom omezili detekční schopnosti. Tím navýšíme celkovou propustnost a efektivitu genotypizace, urychlíme amplifikaci a omezíme spotřebu materiálu. Reálné zkrácení detekční doby významným způsobem přispívá např. ke včasnému odhalení pandemického šíření nebezpečných virů.

Nalezené metody jsou implementovány v nově vytvořené desktopové aplikaci MultiPCR. Důraz je kladen na přesnost výpočtu, podporu standardních formátů, rychlost, nezávislost na platformě a v neposlední řadě i na přehledné grafické rozhraní. Nasazení aplikace se předpokládá v genetických laboratořích forenzních expertů, kde bude sloužit jako nástroj pro efektivní snižování nákladů a zkracování detekční doby mikrosatelitů. Využití však může nalézt i u národních referenčních laboratoří při SZU, na Slovensku pak Štátné zdra-

votné ústavy. Aplikace je v provozu v Laboratoři experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc.

MultiPCR disponuje metodami určování kompatibility primerů na základě výpočtu sil jejich intramolekulárních vazeb. Oproti konkurenčním programům (Primer3 [12], Autodimer [5], FastPCR [13]) navíc také umožňuje, díky unikátní metodě testování délkové kompatibility a heuristickému prohledávání stavového prostoru, sestavovat celé multiplexy z kompatibilních mikrosatelitů. Autoři Autodimeru tuto schopnost záměrně neimplementovali kvůli příliš vysoké časové složitosti výpočtu, jde totiž o NP-těžký problém: „*Due to relatively computationally intensive nature of the algorithm we decided not employ the screening algorithm upstream in the primer selection process.*[5]“ Jak si později ukážeme, časovou složitost se nám povedlo dostat do přijatelných mezí díky pokročilým optimalizacím.

Hlavní cílovou skupinu této práce tvoří potenciální uživatelé MultiPCR, např. molekulární genetici, experti ve forenzní genetice, virologové a podobně. Tito uživatelé se zde seznámí s výpočetním pozadím aplikace, aby mohli výsledky správně interpretovat v rámci svého výzkumu. Do druhé cílové skupiny spadají bioinformatici, kteří se podílejí na vývoji obdobných biologicky zaměřených aplikací.

Na práci je možno nahlížet ze dvou pohledů – z biologického a z informatického. Snaha propojit tyto dvě značně metodologicky odlišné oblasti neustále naráží na bariéry v podobě nesourodého jazyka obou stran. Vzhledem k multioborovému průřezu tématem by tyto bariéry mohly být alespoň částečně narušeny. Bioinformatika je poměrně mladým oborem postrádajícím dostatečné množství multioborových pracovníků. Nezbývá než doufat, že tato práce kromě svého hlavního účelu také přitáhne pozornost dalších studentů, kteří svými schopnostmi přispějí k dalšímu rozvoji bioinformatiky.

Struktura práce

V úvodu práce je čtenář nejprve seznámen se stručnými základy molekulární genetiky (kap. 2). Dále pak následuje matematické vyjádření kompatibilit primerů (kap. 3 a 4). Kapitola 5 je věnována programové implementaci MultiPCR a zhodnocení časově-prostorové složitosti. V kapitole 6 jsou uvedeny provedené testy na skutečných datech a jejich srovnání s předpoklady. Přílohy obsahují dodatečné výsledky testů a kusy programového kódu, které nebylo pro jejich rozsah umístit do textu. Součástí příloh je také DVD, na kterém nalezneme aplikaci MultiPCR ve spustitelné verzi.

2 Základní pojmy z molekulární genetiky

V této kapitole se podrobněji dozvíme, jak fungují některé biologické procesy. Popíšeme si DNA, její strukturu a způsoby replikace. Vysvětlíme si, co to jsou mikrosatelity a jaký mají vztah k této práci. Dozvíme se také o procesu zvaném genotypizace a vysvětlíme si, jak by šla zvýšit její propustnost pomocí multiplexování. Pokud čtenáři tato kapitola nestačí pro pochopení základních principů, může si znalosti prohloubit v [1].

2.1 DNA – kyselina z jádra buněk

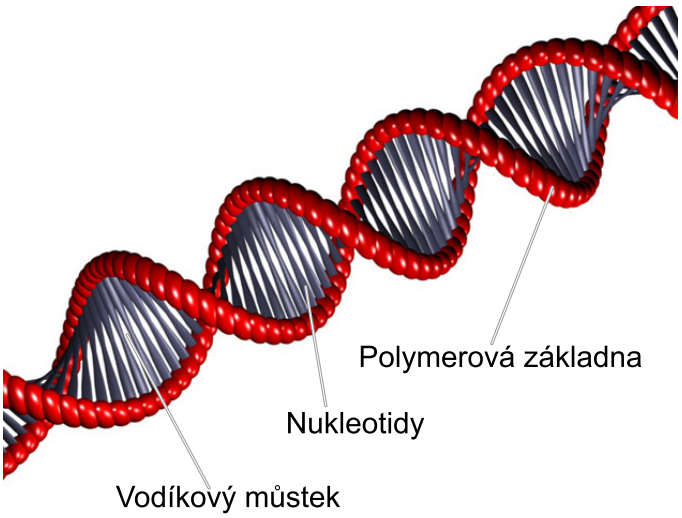
DNA je nukleová kyselina obsahující genetické informace o vývoji, stavbě a funkci živého organizmu. Nukleová proto, že ji můžeme nalézt především v buněčném jádře. Jejím hlavním účelem je dlouhodobé a bezpečné uchovávání informací o daném živočichu, popřípadě viru. Hlavní kostru molekuly tvoří dvě polymerové základny (viz obr. 1) s navázanou sekvencí menších molekul – zvaných nukleotidy, které jsou nositeli genetické informace [14, 15]. Rozlišujeme čtyři různé nukleotidy: Adenin [A][1], Cytozin [C], Thymin [T], Guanin [G].

Vzhledem ke zdvojené struktuře DNA musejí být zdvojeny i nukleotidy. Na jednom místě DNA se nacházejí vždy dva nukleotidy spojené tzv. vodíkovým můstkem. Říkáme, že jsou k sobě komplementární. K adeninu se váže pouze thymin: $A = T$, k cytozinu se váže pouze guanin: $C \equiv G$ – viz orientační obr. 2. Adenin je s thyminem spojen dvojitou vodíkovou vazbou, zatímco cytozin s guaninem vazbou trojitou. Trojitá vodíková vazba je pevnější, vyžaduje tak vyšší teploty na její přerušení. Komplementarita spolu se zdvojenou povahou DNA zajišťuje vysokou odolnost proti poškození informace. Chybějící nukleotid může být automaticky nahrazen samoopravnými mechanizmy na základě znalosti jeho komplementu. Nukleotidy dělíme do dvou skupin. Purinové báze jsou A, T a pyrimidinové báze jsou C, G.

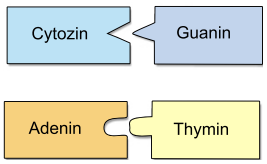
Abychom rozlišili jednotlivé konce DNA vláken v zápisech, označujeme je symboly 3’ a 5’ (čteme tři-konec a pět-konec). Vlákna jsou vůči sobě orientována antiparalelně, takže začíná-li jedno 5’, pak na stejném místě druhé začíná 3’ takto:

```
5’ -GATATGC- 3’
    |||||||
3’ -CTATACG- 5’
```

[1]Při zápisech DNA sekvence používáme vždy první písmeno z názvu daného nukleotidu.



Obrázek 1: Zjednodušený model DNA molekuly.



Obrázek 2: Vazby nukleotidů.

Gen

Vyšší logickou strukturu DNA tvoří geny. Gen je posloupnost nukleotidů se speciálním významem. Na základě genové informace jsou nepřímo produkovány bílkoviny. Nepřímo proto, že se geny podílejí na tvorbě RNA, která řídí syntézu bílkovin. Geny zásadním způsobem ovlivňují vlastnosti jedince (barvu očí, fyzické dispozice) a jsou přenášeny i na potomky. Struktura genu se dělí na dvě oblasti – kódující a nekódující. Kódující oblasti určují, co daný gen ovlivňuje, zatímco nekódující oblasti určují, kdy je aktivován [16, 17]. Význam některých nekódujících oblastí ovšem nebyl doposud prokázán. Může se jednat buď o jakousi výplň kódu pro zajištění jeho bezpečnosti, nebo pozůstatek předchozího vývoje.

Alela

Jeden gen může mít více forem. Tyto formy nazýváme alely. Abychom mohli alely mezi sebou vzájemně porovnávat, musíme brát v potaz jejich umístění na lokusu. Jednotlivé formy genu se od sebe liší délkou repetic. Repetice je několikanásobné opakování krátké posloupnosti nukleotidů, nacházíme ji v mikrosatelitech (viz níže) [18, 19].

2.2 Elektroforéza

Elektroforéza je soubor analytických metod sloužících k separaci látek s odlišnou pohyblivostí ve stejnosměrném elektromagnetickém poli. V molekulární biologii a genetice využíváme elektroforézu k rozdělení DNA fragmentů podle jejich délky. Delší fragmenty mají větší hmotnost, menší pohyblivost a proto putují pomaleji. Pohyb probíhá od záporné elektrody ke kladné, neboť je polymerová základna DNA nabita záporně.

Vzorky umisťujeme do speciálního gelu, jehož volba závisí na druhu zkoumaných vzorků. Pro separaci DNA se nejčastěji používá tzv. agarosový gel. Délku působení elektromagnetického pole a koncentraci gelu určujeme podle délky nejdelších fragmentů ve zkoumané směsi. Délka fragmentů bývá předem omezena pomocí restrikčních enzymů. Tyto enzymy přeruší DNA v určeném místě. Velikost elektrického napětí nám ovlivňuje rozlišovací schopnost experimentu. Vyšší napětí snižuje rozlišovací schopnost, ale zkracuje délku experimentu [20, 21].

Barviva

Agarosový gel je čirý a vzorek bývá také čirý. Aby byl výsledek pokusu patrný lidským okem, je třeba vzorek nějakým vhodným způsobem obarvit. Nejčastěji používanou barvou bývá ethidium bromid. Toto karcinogenní barvivo fialově fluoreskuje pod UV zářením. Přidáme-li barvivo na gel před započetím pokusu, můžeme sledovat postupný vývoj. Avšak přítomnost tohoto barviva negativně ovlivňuje přesnost experimentu. U vzorků, kde známe přibližnou velikost DNA fragmentů (a tedy i přibližnou dobu působení elektromagnetického pole) bývá výhodnější aplikovat barvivo až v závěru pokusu [26, 27].

2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity, nebo také STR's (Short Tandem Repeats) jsou krátké úseky nacházející se v DNA, které jsou složené z opakujícího se motivu nukleotidů. Délka opakujících se úseků bývá 2–4 bázové dvojice, avšak může být i větší. Tyto úseky se většinou opakují 10 až 100×. V molekulární mikrobiologii jsou využívány jako markery. Existence konkrétní alely na určitém místě genomu jedince může naznačovat přítomnost specifické choroby. Mikrosatelity jsou obvykle označovány alfanumerickými kódy jako např. „D8S1179“. Mikrosatelit s opakovaným motivem AC a délkou repetice 8 zapíšeme $(AC)_8$.

Druhy mikrosatelitů

- Úplné – Opakující se sekvence není nijak narušena.

  Např.: ACACACACACAC

- Neúplné – Opakující se motiv je přerušen jednou bází.

  Např.: ACAC**AT**ACACAC

- Složené – Jsou tvořeny dvěma a více po sobě jdoucími mikrosatelity s různými bázovými motivy.

  Např.: **ATCATC**ACACACACAC**CTCTCTCTCTCT**

Mikrosatelity mohou být amplifikovány (namnoženy) metodou zvanou polymerázová řetězová reakce (zkr. PCR). K jejich amplifikaci je zapotřebí dvojice primerů, tzv. levý a pravý primer. Levý primer se váže na 3' konec mikrosatelitu, pravý primer na jeho 5' konec. Aby bylo možné určit identitu jedince pomocí některé z metod genotypizace, potřebujeme mít k dispozici dostatečné množství jeho genetického materiálu (resp. vybraných úseků DNA). Ne vždy soudní lékaři obdrží vzorek, který by zcela kvantitativně vyhovoval (např. vlas, zbytky kůže apod.) a právě proto je prováděna PCR. Touto reakcí jsou pak schopni i z několika málo molekul DNA namnožit požadované množství. Navíc neprobíhá množení molekul v celé jejich délce, replikují se pouze vybrané úseky o kterých je známo, že svou specificitou mohou jednotlivé jedince od sebe odlišit.

Jednou z důležitých informací o mikrosatelitu je jeho délka. Délku určíme součinem délky opakovaného motivu a počtu opakování. Např. mikrosatelit $(AGC)_{24}$ bude mít délku $3 \times 24 = 72\,\text{bp}$. V praxi bude délka amplikonu (namnoženého mikrosatelitu) o něco větší, jelikož levý a pravý primer navazujeme na úsek k mikrosatelitu přilehlý, ne však vždy přímo sousedící. Skutečnou délku nám prozradí elektroforéza.

Vektor délek vybraných mikrosatelitů z genomu identifikuje jedince. Zjednodušeně řečeno - čím více jsou si dva vektory podobné, tím blíže jsou dvě osoby v příbuzenském vztahu. Čím větší máme počet vybraných mikrosatelitů, tím přesnější rozlišíme dva jedince od sebe. Větší vektory znamenají více provedených testů a tudíž vyšší náklady.

2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je metoda pro rychlé množení stejného úseku DNA. Duplikování probíhá ve třech fázích, které se periodicky opakují. Tato metoda využívá předem připravené primery (viz níže). Maximální délka duplikovaného úseku je přibližně 10 000 nukleotidů. Množství duplikovaného DNA roste exponenciálně s počtem provedených cyklů. Metodu lze uplatnit i na velmi malé vzorky obsahující pouze několik molekul DNA [28, 29].

Primer

Primer je krátký, jednoduchý oligonukleotid, který slouží jako počáteční místo replikace DNA. Tento řetězec musí být komplementární k místu, kde chceme replikaci započít. Použití primerů je při replikování vyžadováno, jelikož enzymy vázající nukleotidy (tzv. polymeráza) jsou schopny přidat nové nukleotidy pouze k již existujícímu úseku DNA. V dnešní době bývá poměrně snadné získat libovolný primer. Pokud si nevybereme z tržní nabídky, můžeme si nechat primer vyrobit na zakázku ve specializovaných laboratořích [24, 25].

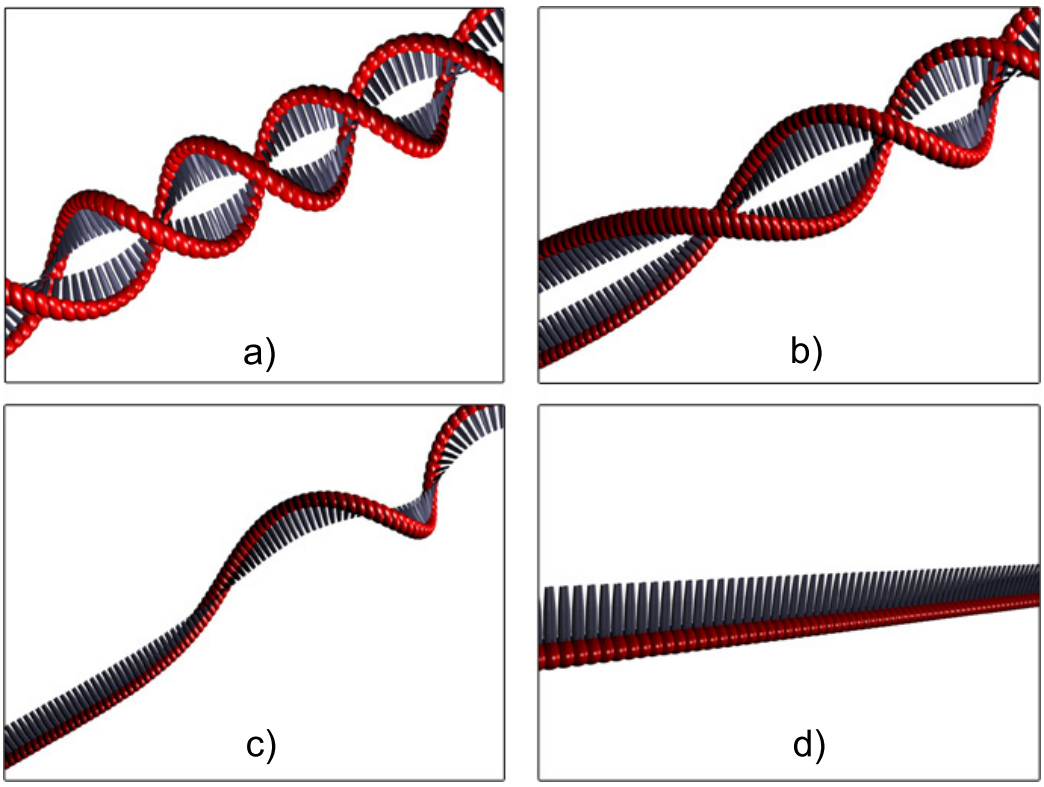
Jednotlivé fáze PCR

1. Denaturace – Po dobu 20–30 sekund působíme na DNA teplotou 94-98 °C. Působením tepla dojde k rozpadu vodíkových můstků dvoušroubovice. Vznikají nám tak dvě jednoduchá vlákna DNA. Viz obr. 3 a–d.

2. Nasednutí primerů (annealing) – Teplotu snížíme na 50–65 °C podle použitých primerů. Správně navržený primer by měl obsahovat vyvážený poměr $A = T$ a $C \equiv G$ párů, být dlouhý cca 18–24 párů a nevytvářet sekundární struktury. Sekundární struktura vznikne např. tím, že špatně navržený primer obsahuje vzájemně inverzní části, které se k sobě navážou.

   Obvyklá teplota při nasedání primerů bývá 3–5 °C pod jejich teplotou tání (Tm). Při této teplotě se začnou primery obsažené ve směsi vázat na DNA vlákna, tzv. nasedat. Vznikají tak poměrně pevné vazby, které umožní v další fázi volným nukleotidům pomocí polymerázy pokračovat v rekonstrukci komplementárního vlákna.

3. Prodlužovací fáze – Teplota závisí na použité polymeráze. Na primery se postupně začínají vázat jednotlivé nukleotidy. Navazování pokra-



Obrázek 3: Postupná denaturace DNA v důsledku působení vysokých teplot.

čuje tak dlouho, dokud není opět zrekonstruována původní dvoušroubovice, nebo není-li vyčerpána polymeráza a nebo dokud nezačneme opět denaturovat. Dotvoří se nám tak chybějící komplementární část vlákna. Výsledkem je dvojnásobný počet řetězců DNA než byl v předchozím cyklu.

2.5 Multiplex PCR

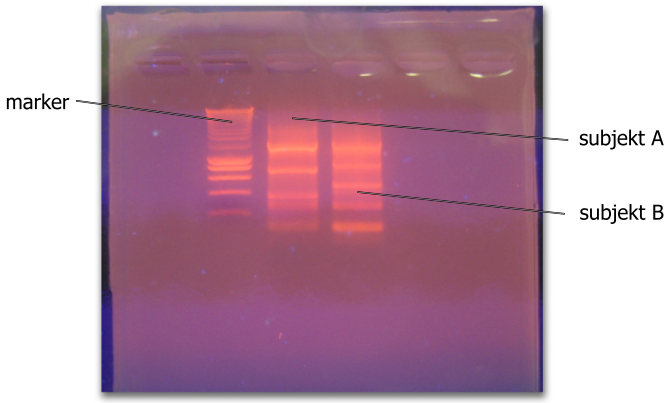
Existuje řada variant PCR. Nás bude pro účely této práce zajímat varianta označovaná jako Multiplex-PCR: Namísto jednoho mikrosatelitu jich množíme více naráz. Tím docílíme celkově vyšší propustnosti PCR a zároveň urychlíme proces genotypizace, který je na PCR závislý. S každým novým mikrosatelitem ve směsi nám ale přibývají dva nové primery. Tyto primery mohou za určitých okolností spolu reagovat – nasedat vzájemně na sebe (hybridizovat), popřípadě vlásenkovat. Další problém nastává při elektroforéze, která není schopna odlišit dva různé mikrosatelity identické délky. Všechny

tyto problémy je třeba eliminovat důkladnou přípravou před započetím experimentu a to tím, že do jedné sady testovaných subjektů vybíráme pouze kompatibilní multiplexy. Optimalizační algoritmus pro výběr vhodné sady nalezneme v kapitole 3.

2.6 Genotypizace

Souhrn genetických znaků daného jedince nazýváme genotyp. Metody a procesy, které vedou k určení genotypu nazýváme genotypizace. Genotypizaci používáme v experimentální biologii i v soudním lékařství. Genotypizační metody jsou schopny na základě porovnávání genetických vzorků určit např. druh živočicha, případně rozhodnout vzájemnou příbuznost srovnávaných jedinců (např. při sporech o mateřství/otcovství). Mezi prostředky určování genotypu patří elektroforézní zkoumání mikrosatelitů.

Na obr. č. 4 můžeme vidět výsledný produkt elektroforézy – fotografii agarosového gelu nasvíceného ultrafialovým světlem. Na tomto gelu byly využity tři tzv. kanály (sloupce, do kterých umisťujeme zkoumané vzorky). První kanál bývá zpravidla referenční – obsahuje marker, což je směs mikrosatelitů (resp. jejich alel) různých, avšak předem známých délek. Podle poloh jednotlivých alel v markeru můžeme určit délky alel v jiných kanálech na stejném řádku. Vzájemným porovnáním kanálů lze určit genotyp zkoumaného jedince.



Obrázek 4: Agarosový gel se třemi využitými kanály.

3 Optimalizace primerů pro Multiplex PCR

Prvním krokem při hledání kompatibilních multiplexů je sestavení matice délkových kompatibilit jednotlivých mikrosatelitů. Délková kompatibilita nám zajistí rozlišitelnost jednotlivých alel na elektroforézním gelu. Sestavení matice délkové kompatibility popisuje sekce 3.1. Druhým krokem je vytvoření matice chemické kompatibility. Chemická kompatibilita slouží k vyloučení nežádoucích interakcí mezi primery použitými pro namnožení mikrosatelitů. Vytvoření této matice je popsáno v sekci č. 3.2. V našem programu jsou k dispozici celkem dva moduly k určení chemické kompatibility. Autorem prvního je Dr. Ruslan Kalendar, druhý – standardní – vychází z článku prof. Santa-Lucii Jr. [3]. Popis kritérií pro určení chemické kompatibility „standardního“ modulu včetně používaných vztahů nalezneme v kapitole 4. Dalším krokem je sestavení všech možných kompatibilních multiplexů ze vstupní množiny mikrosatelitů. Poslední fází algoritmu je pak prohledávání pole kompatibilních multiplexů (které jsou uspořádány podle pořadí, v jakém byly uživatelem zadány) a seskupení požadované sady tak, aby se v ní žádný mikrosatelit neopakoval dvakrát. Sestavení multiplexů a vytvoření požadované sady je popsáno v sekci 3.3.

3.1 Matice délkových kompatibilit

Dva mikrosatelity jsou vůči sobě délkově kompatibilní tehdy, když neexistuje žádná alela prvního mikrosatelitu taková, která by měla shodnou délku s libovolnou alelou druhého mikrosatelitu. Délku určujeme vzhledem k pozicím primerů.

Matice délkových kompatibilit je sestavena následovně: její prvek na pozici (i, j) je nastaven na 1 pokud jsou mikrosatelity i a j vůči sobě délkově kompatibilní. Abychom docílili diagonální symetrie matice, nastavujeme zároveň prvek na pozici (j, i) také na hodnotu 1. Výsledná matice (pro názornost i s názvy mikrosatelitů) pak může vypadat např. takto:

	vWa	TPOX	TH01
vWa	0	1	1
TPOX	1	0	0
TH01	1	0	0

Tabulka 1: Ukázková matice délkové kompatibility.

3.2 Matice chemických kompatibilit

Ve druhém kroku algoritmu vytváříme matici chemických kompatibilit (pokud uživatel v programu zvolil testování chemické kompatibility). Tato matice je analogií výše uvedené matice délkových kompatibilit. Sestavíme ji následovně: její prvek na pozici (i, j) je nastaven na 1 pokud je levý primer mikrosatelitu i chemicky kompatibilní s levým i pravým primerem mikrosatelitu j a zároveň je pravý primer mikrosatelitu i chemicky kompatibilní s levým i pravým primerem mikrosatelitu j. Abychom docílili diagonální symetrie matice, nastavujeme zároveň prvek na pozici (j, i) také na hodnotu 1. Výsledná matice může vypadat např. takto:

	vWa	TPOX	TH01
vWa	0	0	1
TPOX	0	0	0
TH01	1	0	0

Tabulka 2: Ukázková matice chemické kompatibility.

Kombinací obou matic pomocí logické operace AND získáme matici celkové kompatibility. Tu sestavíme následovně: její prvek na pozici (i, j) je nastaven na 1 pokud platí $\mathrm{A}(i, j) = 1$ a zároveň $\mathrm{B}(i, j) = 1$. V opačném případě je nastaven na 0.

3.3 Sestavování multiplexů

Velikost multiplexů je určena jako podíl požadovaného počtu mikrosatelitů ve výsledné sadě a počtu elektroforézních kanálů. Pokud tento podíl není celočíselný, zaokrouhlí se nahoru s tím, že multiplexy pak mohou obsahovat i jistý počet „prázdných“ míst.

Příklad: Požadujeme-li 16 mikrosatelitů ve třech kanálech, program se pokusí sestavit multiplexy o velikosti 6-5-5 nebo 6-6-4 mikrosatelitů. V tomto kroku zpravidla dochází, kvůli požadavkům na vzájemnou kompatibilitu všech mikrosatelitů v multiplexu, k dramatické redukci počtu výsledných kompatibilních multiplexů oproti celkovému počtu možných kombinací (např. u výše zmíněného příkladu by šlo o kombinace všech 6-tic z 16 prvků, se započtením „prázdných“ míst pak z 18 prvků).

Vytvoření sady

Ve výše uvedeném příkladě potřebujeme vybrat celkem 3 multiplexy, a to tak, aby celkový počet mikrosatelitů v nich byl 16. Zde je použito standardní prohledávání do hloubky (depth-first search). Uživateli je předloženo první nalezené řešení a pokud s ním není spokojen, jsou postupně hledána řešení další. Pokud se nepodaří nalézt žádné řešení s požadovaným počtem mikrosatelitů, program se pokusí opakovat celý postup s menším výsledným počtem (v našem případě se začíná s 16 mikrosatelity, následně se postupuje na 15, 14...).

4 Chemická kompatibilita primerů

Molekulární polymerové struktury (DNA, primery, mikrosatelity) jsou stabilní jen při určitém rozsahu teplot, který vyplývá z jejich vnitřního uspořádání. Tohoto faktu si můžeme povšimnout i v běžném životě. Budeme-li zahřívat vaječný bílek, po určité době se nám působením tepla srazí. Ze stejného důvodu i lidské tělo obtížně zvládá působení teplot nad 42 °C.

V této sekci si určíme parametry, které popisují tepelné vlastnosti dvojic primerů v závislosti na jejich molekulární struktuře. Naším cílem bude nalezení takových podmínek, které nám naznačí, že by potenciální vazby mezi dvěma danými primery mohly být dostatečně slabé na to, aby nevznikly. O takových dvou primerech pak říkáme, že jsou kompatibilní.

U zadaných primerů předpokládáme, že jsou dobře navrženy. Neprovádí se tedy kontrola vlásenkování, protože počítáme s tím, že primery dodané uživatelem netvoří sekundární struktury. V programu nicméně tato možnost kontroly je a lze ji kdykoli aktivovat. Do budoucna je možno rovněž pracovat s návrhem primerů „de novo“.

Termodynamický systém

Při studiu termodynamických vlastností určitého systému rozlišujeme mezi systémem a jeho okolím. V našem případě jsou hranice okolí dány jednoznačně. Předmětem zkoumání je termodynamický systém nacházející se uvnitř PCR aparátu. Okolí představuje vše mimo aparát. Aparátem rozumějme nádobku se zkoumaným vzorkem a potřebnými chemikáliemi k provedení experimentu.

Pro nalezení rovnovážného stavu systému a popis probíhajících změn zavádíme veličiny ΔH°, ΔS° a ΔG°_T. Dosažením rovnovážného stavu dojde k uvolnění tepla ze systému do okolí. Tomuto stavu předcházejí vzájemné interakce jednoduchých vláken, které se na sebe váží a vytvářejí dvojitá vlákna. V izobarickém systému nazýváme změnu tepla nutnou pro dosažení rovnovážného stavu entalpie, značíme ji ΔH. V idealizovaném případě máme připravené jednotlivé primery v koncentraci 1 M. Pro označení ideálního případu používáme tzv. nulový symbol „$^\circ$“. Změnu entalpie značíme ΔH°. Základní jednotkou je cal/mol.

Působením tepla dochází v našem systému ke změnám, které snižují jeho neuspořádanost. Je zjevné, že dimer vzniklý spojením dvou primerů vykazuje větší uspořádanost (tzn. menší neuspořádanost) než dva volně se pohybující

primery. Při amplifikaci DNA jsou na vlákna vázány jednotlivé nukleotidy, čímž se také zvyšuje uspořádanost systému. Míru neuspořádanosti systému vyjadřuje veličina zvaná entropie[6]. Změnu entropie značíme ΔS° a udáváme ji v jednotkách kcal/mol K (neboli počet kilo-kalorií na kelvin-mol).

S pomocí parametrů ΔH° a ΔS° můžeme vypočítat změnu gibbsovy volné energie. Změna gibbsovy volné energie odpovídá efektivní práci vykonané při reverzibilním procesu za konstantního tlaku a teploty[7]. Veličinu zapisujeme ΔG°_T. Teplota T je udávána v Kelvinech. Vztah mezi ΔG°_T, ΔH° a ΔS° definuje rovnice č. (1). Odvozením a převodem na společné jednotky získáme požadovaný vztah č. (2).

$$G_T = H - T \times S \tag{1}$$

$$\Delta G^\circ_T = \frac{\Delta H^\circ \times 1000 - T \times \Delta S^\circ}{1000} \tag{2}$$

Pokud jsme schopni zjistit ΔH° a ΔS°, pak můžeme takto vypočítat ΔG° při libovolné teplotě T. Následující rovnice vyjadřuje vztah mezi rovnovážnou konstantou K při teplotě T a změnou gibbsovy volné energie ΔG°_T kde R je plynová konstanta odpovídající 1,9872 cal/mol K:

$$\Delta G^\circ_T = -RT \times \ln K \tag{3}$$

Teplota tání T_m

Teplota tání T_m je definována jako teplota, při které je polovina vláken ve stavu tzv. statistického klubka (random coil) a druhá polovina vláken v duplexním stavu[3, 8]. Vyjádříme-li si T z rovnic (2) a (3), dostaneme následující vztah:

$$T = \frac{\Delta H^\circ \times 1000}{\Delta S^\circ - R\ \ln K}\,. \tag{4}$$

Vycházíme-li z předpokladu, že koncentrace jednotlivých vláken (primerů) ve vzorku jsou shodné, pak pro rovnovážnou konstantu K platí $K = Ct/4$. Odvození rovnovážné konstanty K můžeme nalézt v [8], odstavec „Computation of T_m using ΔH° and ΔS°.“ Ct odpovídá koncentraci vláken v mol. Dosazením hodnoty K do rovnice (4) získáme:

$$T_m = \frac{\Delta H^\circ \times 1000}{\Delta S^\circ + R \ \ln \frac{Ct}{4}} \,. \tag{5}$$

Pokud by byla vlákna vůči sobě komplementární, pak K = Ct a vztah pro výpočet T_m vypadá takto:

$$T_m = \frac{\Delta H^\circ \times 1000}{\Delta S^\circ + R \ \ln Ct} \,. \tag{6}$$

Výše uvedené vztahy nalezneme podrobněji popsané v [3, 8].

Podmínky kompatibility primerů

Dva primery budeme považovat za kompatibilní tehdy, když se nebudou na sebe při dané teplotě vázat. Teplotu, při které potenciální vazby zanikají (popř. nemohou vůbec vznikat) udává právě T_m. Při výpočtech si zavedeme prahovou hodnotu T_m^*, což může být např. teplota, při které bude probíhat v PCR nasedání primerů. Tuto teplotu si bude volit uživatel podle svých potřeb. Je třeba mít na paměti, že některé primery spolu nebudou tvořit duplexy při žádné přijatelné teplotě (např. když $T_m \leq 0$). Z matematického pohledu vypadá podmínka kompatibility vzhledem k T_m takto:

$$T_m \in (-\infty;\ 0) \cup (T_m^*;\ \infty) \,. \tag{7}$$

Druhá podmínka nám bude vymezovat maximální změnu gibbsovy volné energie ΔG_T°. Opět si zavedeme uživatelsky nastavitelnou prahovou veličinu $\Delta G_T^{\circ\,*}$. Tentokrát požadujeme, aby byla energie ve dvojici primerů vyšší, než uživatelem nastavený práh. Podmínku zapíšeme takto:

$$\Delta G_T^\circ > \Delta G_T^{\circ\,*} \,. \tag{8}$$

Podmínky (7) a (8) využijeme v našem programu. Abychom mohli počítat ΔG_T° a T_m, potřebujeme znát termální parametry ΔH° a ΔS°. Hodnota těchto parametrů závisí na molekulární struktuře dvou zkoumaných primerů. Výpočet si ukážeme v následující sekci.

4.1 Výpočet parametrů ΔG°_T, ΔH° a ΔS° metodou NN

Metoda zvaná nearest-neighbour (zkr. NN), neboli metoda „nejbližší soused“ využívá empirických poznatků, které byly získány pozorováním chování krátkých úseků DNA za různých podmínek. Následující klasické výpočty známe díky výzkumu prof. SantaLucia, Jr. Jeho výzkum byl prezentován v [3]. Sjednocením termodynamických studií ze šesti různých laboratoří byly odvozeny vztahy pro výpočet ΔG°_{37}, ΔH° a ΔS°. Tyto vztahy byly zároveň empiricky dokázány.

Výpočetní model „nejbližší soused“ pro DNA vychází z předpokladu, že stabilita dané bázové dvojice závisí na identitě a orientaci sousedních bázových dvojic. Uvažujeme-li duplexy o délce 2 bp, počet vzájemných povolených kombinací každý-s-každým je 16. Některé z kombinací jsou totožné, proto celkový počet jedinečných kombinací je 10. Jednotlivé kombinace budeme zapisovat ve formátu TC/AG, což znamená, že 5'-TC-3' párujeme s 3'-AT-5'. Párování tedy probíhá antiparalelně, stejně jako tomu je u DNA. Celkové ΔG°_{37} počítáme takto:

Sekvence	ΔH° kcal/mol	ΔS° cal/mol K	ΔG°_{37}(NN) kcal/mol
AA/TT	-7,90	-22,20	-1,00
AT/TA	-7,20	-20,40	-0,88
TA/AT	-7,20	-21,30	-0,58
CA/GT	-8,50	-22,70	-1,45
GT/CA	-8,40	-22,40	-1,44
CT/GA	-7,80	-21,00	-1,28
GA/CT	-8,20	-22,20	-1,30
CG/GC	-10,60	-27,20	-2,17
GC/CG	-9,80	-24,40	-2,24
GG/CC	-8,00	-19,90	-1,84
inic(C · G)	0,10	-2,80	0,98
inic(A · T)	2,30	4,10	1,03
Symetrická korekce	0	-1,4	0,43

Tabulka 3: Unifikované oligonukleotidové parametry v 1M NaCl.

$$\Delta G^\circ_{37} = \Delta G^\circ_{inic}(\text{term}) + \sum_i n_i \; \Delta G^\circ_{37}(i) + \Delta G^\circ_{\text{sym}}\,, \tag{9}$$

kde jsou hodnoty nezávisející na sekvenci shrnuty v inicializačním parametru $\Delta G^\circ_{inic}(\text{A}\cdot\text{T})$ případně $\Delta G^\circ_{inic}(\text{C}\cdot\text{G})$ podle toho, začíná-li sekvence terminály $\text{A}\cdot\text{T}$ nebo $\text{C}\cdot\text{G}$. Hodnota $\sum_i n_i$ odpovídá počtu výskytů dané sekvence (např. pro i = 1 uvažujeme sekvenci AA/TT). Jednotlivé sekvence včetně odpovídajících hodnot inicializačních parametrů ΔG°_{inic} a $\Delta G^\circ_{37}(term)$ nalezneme v tab. č. 3. Dále započítáváme entropickou korekci $\Delta G^\circ_{\text{sym}} = +0,43\,\text{kcal/mol}$ pro komplementární vlákna[9]. Pro nekompl. vlákna počítáme $\Delta G^\circ_{\text{sym}} = 0$.

V mnoha případech budeme počítat ΔG° při jiné teplotě než 37° C, ačkoliv je uvedený výpočet pro teplotu 37° C nejpřesnější. K tomu nám slouží hodnoty $\Delta H^\circ(i)$ a $\Delta S^\circ(i)$ uvedené opět v tab. č. 3. Celkové ΔH° a ΔS° počítáme:

$$\Delta H^\circ = \Delta H^\circ_{inic}(\text{term}) + \sum_i n_i \; \Delta H^\circ(i) + \Delta H^\circ_{\text{sym}}\,, \tag{10}$$

$$\Delta S^\circ = \Delta S^\circ_{inic}(\text{term}) + \sum_i n_i \; \Delta S^\circ(i) + \Delta S^\circ_{\text{sym}}\,. \tag{11}$$

Dosazením ΔH° a ΔS° do rovnice č. (2) získáme požadovaný vztah pro výpočet ΔG° při libovolné teplotě T. Pokud bychom potřebovali velkou extrapolaci teploty od původních 37° C, bylo by zapotřebí započítávat tepelnou kapacitu[11].

4.2 Závislost ΔG°_T, ΔH° a ΔS° na množství $[\text{Na}^+]$

Parametry ΔG°, ΔH° a ΔS° jsou ovlivňovány množstvím monovalentní soli Na^+ ve směsi. Abychom tuto závislost zahrnuli do výpočtu, sestavíme korekční formule[3]. Korekce pro $[\text{Na}^+]$ nezávisí na prvcích sekvence, závisí však na její délce[10]. Uvažovaná závislost má logaritmický charakter. Množství Na^+ počítáme v jednotkách Mol. Délkový parametr N odpovídá počtu bázových dvojic duplexu. Do tohoto počtu nezapočítáváme terminální dvojici. Např. pro duplex o délce 20 bp bude $N = 18$.

$$\Delta G^\circ_{37}([\text{Na}^+]) = \Delta G^\circ_{37} - 0,114 \times N \times \ln[\text{Na}^+]\,, \tag{12}$$

$$\Delta S^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}]) = \Delta S^{\circ} + 0,368 \times N \times \ln [\mathrm{Na}^{+}]\,, \tag{13}$$

$$\Delta H^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}]) = \Delta G^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}]) + \frac{310,15 \times \Delta S^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}])}{1000}\,. \tag{14}$$

Dosazením $\Delta G^{\circ}_{37}([\mathrm{Na}^{+}])$ a $\Delta S^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}])$ do rovnice č. (2) získáme celkovou hodnotu $\Delta G^{\circ}_{T}([\mathrm{Na}^{+}])$, kterou můžeme přímo použít k rozhodnutí první podmínky termální kompatibility:

$$\Delta G^{\circ}_{T}([\mathrm{Na}^{+}]) = \Delta G^{\circ}_{37}([\mathrm{Na}^{+}]) + \frac{(310,15 - T) \times \Delta S^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}])}{1000}\,. \tag{15}$$

Analogicky získáme dosazením $\Delta H^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}])$ a $\Delta S^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}])$ do rovnice č. (4) hodnotu $T_m([\mathrm{Na}^{+}])$ určenou k rozhodnutí druhé podmínky termální kompatibility:

$$T_m([\mathrm{Na}^{+}]) = \frac{\Delta H^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}]) \times 1000}{\Delta S^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}]) + R\ \ln K}\,. \tag{16}$$

Dodatečné korekce

Výše uvedené vztahy nám vyjadřují termální parametry duplexu v případech, kdy jsou jednotlivé nukleotidy v bázové dvojici vůči sobě komplementární. V našem případě by byl ideální duplex takový, kde není vůči sobě žádný nukleotid komplementární a to proto, že je zde minimální šance na vznik pevných vazeb. Nekomplementarita nám ovlivňuje sílu vazby a proto s ní musíme počítat. Vzhledem k tomu, že by úplný výpočet vazebné korekce při nekomplementaritě přesahoval rozsah této práce, zvolíme stejný (konzervativní) přístup jako [5]. K hodnotě $\Delta G^{\circ}_{T}([\mathrm{Na}^{+}])$ budeme započítávat +0,438 cal/Mol za každou neshodu. Hodnota M odpovídá počtu neshod:

$$\Delta G^{\circ}_{T}([\mathrm{Na}^{+}], M) = \Delta G^{\circ}_{T}([\mathrm{Na}^{+}]) + 0,438 \times M\,. \tag{17}$$

4.3 Ukázka výpočtu termálních parametrů

Příklad: Určete termální parametry primerů GCTCAGCA a CGAGTC při $[\mathrm{Na}^{+}] = 0,085\,\mathrm{mol}$ a teplotě $T = 45^{\circ}$ C. Koncentraci vláken uvažujte 1 μmol.

Postup řešení: Nejprve přiložíme zadané primery k sobě (podle obr. č. 5) a pomocí tab. č. 3 s využitím vzorce č. (9) spočítáme ΔG°_{37}.
Postupujeme takto: Na začátku zkoumáme první sousední dvojici (první dva bázové páry). První dvojice je CG/GC. Nalezneme odpovídající hodnotu v tabulce. Druhou dvojicí bude GA/CT. Pro ní máme v tabulce také odpovídající hodnotu. Třetí dvojice bude AG/TC. Tato dvojice v tabulce není obsažena, avšak můžeme nalézt její ekvivalent CT/GA (psaný zrcadlově). Dále pokračujeme obdobně i při výpočtu ΔS°.

Obrázek 5: Ukázka přiložení primerů

```
3'-CGAGTC-5'
   ||||||
5'-GCTCAGCA-3'
```

$$\Delta G^{\circ}_{37} = inic(C{\cdot}G) + \Delta G^{\circ}_{37}(CG/GC) + \Delta G^{\circ}_{37}(GA/CT) + \Delta G^{\circ}_{37}(CT/GA) + \\ + \Delta G^{\circ}_{37}(GT/CA) + \Delta G^{\circ}_{37}(GA/CT) + \Delta G^{\circ}_{\mathrm{sym}}$$

$$\Delta G^{\circ}_{37} = 0,98 - 2,17 - 1,30 - 1,28 - 1,44 - 1,30 + 0 = -6,51\,\mathrm{kcal/mol}$$

$$\Delta S^{\circ} = inic(C \cdot G) + \Delta S^{\circ}(CG/GC) + \Delta S^{\circ}(GA/CT) + \Delta S^{\circ}(CT/GA) + \\ + \Delta S^{\circ}(GT/CA) + \Delta S^{\circ}(GA/CT) + \Delta S^{\circ}_{\mathrm{sym}}$$

$$\Delta S^{\circ} = -2,8 - 27,2 - 22,2 - 21,0 - 22,4 - 22,2 + 0 = -117,8\,\mathrm{cal/mol\,K}$$

Dále aplikujeme odpovídající korekce. Postupně si vypočteme ΔS°, ΔG°_{37} a ΔH° závislé na množství $[\mathrm{Na}^{+}]$.

$$\Delta S^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}]) = \Delta S^{\circ} + 0,368 \times N \times \ln[Na^{+}]$$

$$\Delta S^{\circ}(0,085) = -117,8 + 0,368 \times 5 \times -2,47 = -122,34\,\mathrm{cal/mol\,K}$$

$$\Delta G^{\circ}_{37}([\mathrm{Na}^{+}]) = \Delta G^{\circ}_{37} - 0,114 \times N \times \ln[Na^{+}]$$

$$\Delta G^{\circ}_{37}(0,085) = -6,51 - 0,114 \times 5 \times -2,47 = -5,10\,\mathrm{kcal/mol}$$

$$\Delta H^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}]) = \Delta G^{\circ}_{37}([\mathrm{Na}^{+}]) + \frac{(310{,}15 \times \Delta S^{\circ}([\mathrm{Na}^{+}]))}{1000}$$

$$\Delta H^\circ(0,085) = -5,10 + \frac{(310,15 \times -122,34)}{1000} = -43,04\,\text{kcal/mol}$$

Nyní vypočteme termální parametry ΔG°_T a ΔG°_{45} při zadaném množství $[\text{Na}^+]$, které lze rovnou využít v podmínce kompatibility.

$$\Delta G^\circ_T([\text{Na}^+]) = \Delta G^\circ_{37}([\text{Na}^+]) + \frac{(310,15-T) \times \Delta S^\circ([\text{Na}^+])}{1000}$$

$$\Delta G^\circ_{45}(0,085) = -5,10 + \frac{(310,15 - [45 + 273,15]) \times -122,34}{1000} = \mathbf{-4,12}\,\text{kcal/mol}$$

$$T_m([\text{Na}^+]) = \frac{\Delta H^\circ([\text{Na}^+]) \times 1000}{\Delta S^\circ([\text{Na}^+]) + R\ \ln \frac{C_t}{4}}$$

$$T_m(0,085) = \frac{-43,04 \times 1000}{-122,34 + 1,987 \times -15,20} = 282,15\,\text{K} = \mathbf{9}^\circ\,\text{C}$$

5 Popis programového řešení – MultiPCR

Manuální provádění výpočtů z předchozí kapitoly by bylo neúměrně náročnou prací. Např. pro určení kompatibility dvou primerů o délce 24 nukleotidů potřebujeme celý výpočet provést 94×. Výpočet kompatibility dvou mikrosatelitů s těmito primery bude dokonce ještě čtyřikrát náročnější. Vytvoření specializovaného software bylo v tomto případě nevyhnutelné a vyústilo ve vytvoření komplexní uživatelské aplikace v Javě o celkové velikosti kódu cca. 9 000 řádků (258 kB). Nejprve si shrneme požadavky, které byly na tento program kladeny.

5.1 Implementační požadavky

Primárním požadavkem návrhu byla nezávislost na použité platformě. Množství vědeckého software je psáno pro Linux, laboratoře bývají vybaveny počítači Apple Macintosh s Mac OS. Vědecké počítače s MS Windows také nejsou výjimkou. Obsažení přinejmenším těchto tří nejpoužívanějších platforem bylo tedy klíčové. Další požadavek spočíval v modularitě – tedy možnosti snadného rozšíření aplikace o další vyhledávací algoritmy. Vývoj v oblasti návrhu multiplexů jde nezadržitelně kupředu, proto může být sebelepší algoritmus kompatibility po čase překonán novým algoritmem, který reflektuje nejnovější poznatky z oblasti. Dále bylo nutné zajistit interkompatibilitu mezi podobnými programy použitím standardních, neproprietárních vstupně-výstupních formátů. Důvodem je fakt, že vstupem našeho programu může být výstup jiného, obdobného programu a naopak výstup našeho programu může být dále zpracováván dalším programem. I přesto však bude rozumné oddělit grafické rozhraní aplikace od jejího výpočetního jádra. Za výchozí jazyk byla zvolena angličtina. Implementační parametry aplikace, které splňují výše uvedené požadavky jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Programovací jazyk	Java 5
Řešení modularity	implementací interface
Vstupní formáty	FASTA (data) XML (uložené výsledky)
Výstupní formáty	XML PDF

Tabulka 4: Implementační parametry MultiPCR.

5.2 Knihovny a moduly

V této sekci si popíšeme používané externí knihovny funkcí a ukážeme si, na jaké jednotlivé moduly je aplikace rozdělena. Za knihovny funkcí budeme považovat samostatné balíčky dodané do aplikace, které nezávisí na žádné z jejích součástí. Moduly jsou naše vlastní funkční celky. Na obr. č. 6 vidíme ukázku uživatelského rozhraní (modul GUI).

Seznam použitých knihoven funkcí

BioJava – Balík BioJava umožňuje efektivní práci s mikromolekulárními strukturami v podobě řetězců. Optimalizované algoritmy prověřené léty zajišťují dostatečný výkon. Užitečné nástroje umožňují snadnou manipulaci s řetězci, přičemž minimalizují využití paměti a procesorového času použitím tzv. „pohledů“. Např. namísto zrcadlení dlouhého řetězce je vytvořen pohled, který obsahuje původní řetězec a informaci o směru zpracování.

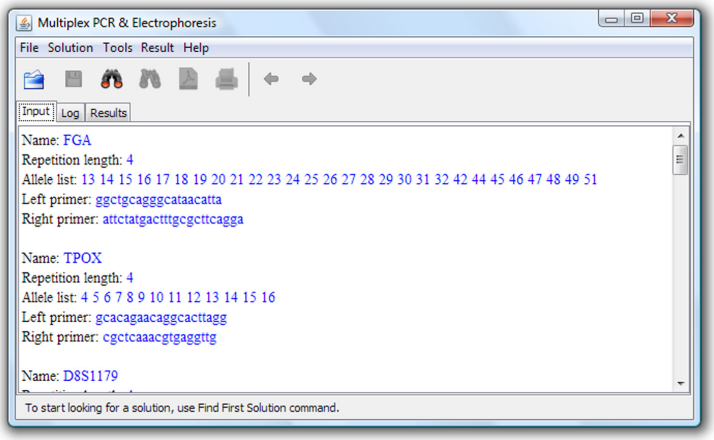
iText/PDF – iText je volně šiřitelná knihovna pro výstupy ve formátu PDF. V programu je využívána ke generování výsledků v tisknutelné podobě. Tisková sestava obsahuje grafické znázornění všech použitých kanálů a v nich umístění jednotlivých alel mikrosatelitů seřazených podle své délky. Autorem tiskových sestav je David Péres z Madridu.

Java Help System – Knihovna JHS slouží ke snadnému integrování nápovědy do aplikace. Využíváme jí především kvůli podpoře standardních formátů. Nápovědu můžeme tvořit ve formátu HTML, obsah ve formátu XML. Rozšiřování a údržbu nápovědy můžeme díky JHS provádět bez nutnosti měnit aplikační kód.

JUnit – JUnit je knihovnou pro sestavování automatizovaných aplikačních testů. Při sestavování nového algoritmu si nejprve vytyčíme výsledky, jakých chceme dosáhnout. Poté sestavíme test obsahující tyto výsledky. Algoritmus považujeme za úspěšný až tehdy, když projde naším testem.

Aplikační moduly

GUI – Modul GUI obstarává vše, co se týká vizuální komunikace s uživatelem. V tomto modulu jsou obsaženy jednotlivé dialogy a okna, vazby mezi akcemi uživatele a voláním metod výpočetního jádra. Je zde také



Obrázek 6: Ukázka hlavního okna aplikace s načteným vstupním souborem.

implementována HTML konzole, která je využívána jak pro zobrazení načteného seznamu mikrosatelitů, tak i pro logování a zobrazování nalezených výsledků. Jazyk HTML jsme zvolili proto, že umožňuje přehledně znázorňovat požadované informace. Stejné informace jako do konzole v záložce Log putují na standardní výstup. Pro lepší čitelnost jsou na standardním výstupu odfiltrovány HTML značky.

Chem – Modul Chem obsahuje komponenty výpočetního jádra zodpovědné za výpočet chemické kompatibility. V současné době modul Chem obsahuje komponentu pro původní výpočet od Dr. Ruslana Kalendara a naši vlastní komponentu pro výpočet pomocí termálních parametrů. Jsou zde také rozhraní *DimerTools* a *DimerData*. Implementováním *DimerTools* můžeme do programu přidat nový výpočetní algoritmus. Implementací rozhraní *DimerData* získáme datovou schránku, obsahující vstupní parametry nového algoritmu – tyto vstupní parametry se mohou od současných zcela diametrálně lišit. Není vyloučeno např. ani použití neuronové sítě či napojení na expertní systém.

Msat – Modul Msat obsahuje metody a datové struktury nutné pro práci s mikrosatelity. Jsou zde třídy definující primer, primerový pár nebo třeba amplikon. Metody modulu Msat umožňují načtení vstupu ve formátu FASTA. Je zde také obsažena komponenta toPDF sloužící k exportu výsledků ve formátu PDF. Také jsou tu implementovány datové třídy uchovávající seznam multiplexů v úsporném formátu.

Solver – Modul solver řídí úkony související s vyhledáváním řešení. Podle potřeby úkoluje patřičnou komponentu modulu Chem. Je také zodpovědný za výpočet délkové kompatibility. Pokrok ve výpočtu pak sděluje komponentě GUI, která odpovídajícím způsobem aktualizuje uživatelské prostředí. Tento modul je zároveň vhodný kandidát pro nový vstupní bod aplikace – v případě potřeby je možné drobnými úpravami kódu docílit podpory pro práci v příkazové řádce.

5.3 Řešení délkové kompatibility

Algoritmus sestavení matice délkové kompatibility nalezneme na začátku kapitoly 3 na straně 14. V této sekci si předvedeme způsob, jakým je uvedený algoritmus realizován programově.

Vstup:

Vstupem algoritmu je pole N mikrosatelitů (resp. amplikonů) a povolený délkový rozsah délek alel.

Výstup:

Výstupem algoritmu je matice délkové kompatibility o rozměrech N × N.

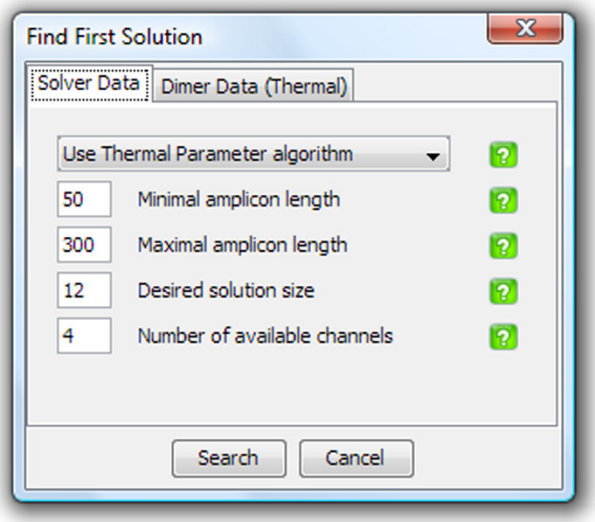
Postup řešení:

```
int i = -1;
for (STRamplicon amplicon: this) {
  bitSets[++i] = new BitSet(maxLen-minLen+1);
  for (float reps: amplicon.repList) {
    bitSets[i].set(amplicon.amplLength(reps) - minLen);
  }
}
for (i = 0; i < size(); i++) {
  for (int j = i+1; j < size(); j++) {
    if (! bitSets[i].intersects(bitSets[j])) {
      matrix.set(i, j);
      matrix.set(j, i);
    }
  }
}
```

Na řádku 1–7 procházíme všechny amplikony ze seznamu. Pro každý amplikon založíme bitové pole o velikosti jeho nejdelší alely (ř. 3) a projdeme délky všech jeho alel. Každou z délek poznamenáme na příslušném místě bitového pole (ř. 5). Pozn.: Z paměťově-optimalizačních důvodů vytváříme bitové pole kratší o délku nejkratší alely a o tuto délku pak snižujeme indexy.

Řádky 8–15 slouží k porovnání všech bitových polí stylem „každý-s-každým“, přičemž kontrolujeme, zda se nepřekrývají některé bity v bitovém poli. Je-li vše v pořádku, nastavíme matice „matrix“ na pozici (i, j) a (j, i) na hodnotu 1.

Jednou z optimalizací, kterou provádíme ještě před započetím výpočtu je odfiltrování všech amplikonů ze vstupního pole, které nesplňují zadané délky. Rozsah povolených délek určujeme v základním dialogu pro hledání řešení na záložce „Solver Data“. Dialog otevřeme buď klepnutím na ikonu 🔭, nebo stiskem klávesy F7. Rozsah délek máme označen jako „Minimal amplicon length“ a „Maximal amplicon length“. V tomto dialogu si také volíme použitý algoritmus chemické kompatibility. Podle volby algoritmu se přizpůsobí obsah na záložce „Dimer Data“. Parametry „Desired solution size“ a „Number of available channels“ využíváme až při sestavování multiplexů. Náhled dialogového okna můžeme vidět na obr. č. 7.



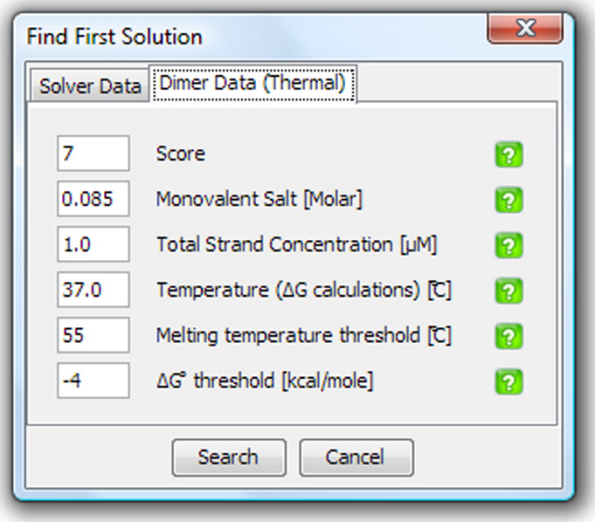
Obrázek 7: Ukázka dialogu pro hledání řešení.

5.4 Řešení chemické kompatibility

Výpočet chemické kompatibility dvou primerů pomocí termálních parametrů nalezneme v kapitole 4. Zde si popíšeme programový postup pro řešení kompatibility dvou mikrosatelitů, z nichž každý obsahuje dvojici primerů.

Vstup:

Vstupem algoritmu jsou dva vyšetřované mikrosatelity. Mezi nastavitelné parametry patří: Hodnota „Score“, množství monovalentní soli [Na^+], koncentrace vláken, teplota T a dvě prahové hodnoty T_m^* a $\Delta G_T^{\circ *}$, které jsou popsané na straně 19. Dialog zadání výpočetních parametrů můžeme vidět na obr. č. 8.



Obrázek 8: Ukázka dialogu s parametry pro řešení chemické kompatibility.

Výstup:

Výstupem algoritmu je logická hotnota *true* nebo *false* podle toho, zda jsou dva zadané mikrosatelity kompatibilní.

5.4.1 Postup řešení kompatibility mikrosatelitů

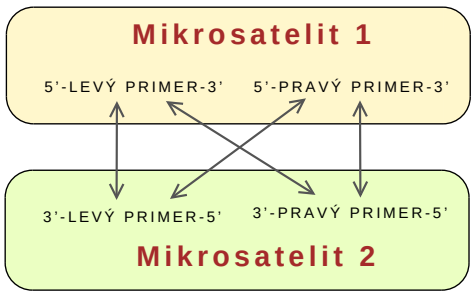
Dotaz na řešení kompatibility mikrosatelitů provádíme zavoláním metody: `public boolean isCompatible(PrimerPair p1, PrimerPair p2);`

Tato metoda rozhoduje o tom, která porovnání kompatibilit jednotlivých primerů budou provedena. Primery si označíme *pp1.L*, *pp1.R*, *pp2.L* a *pp2.R* podle toho, který (pp) primerový pár uvažujeme a také podle toho, jestli se jedná o (L) levý nebo (R) pravý primer. Dotaz na řešení kompatibility primerů provedeme zavoláním:
`public boolean isCompatible(Primer p1, Primer p2);`

Pozn.: Provádíme zde přetěžování metody isCompatible – o tom, zda bude použita metoda kompatibility mikrosatelitů nebo primerů rozhoduje datový typ vstupních proměnných.

Podle schématu na obr. č. 9 sestavíme metodu pro mikrosatelity takto:

```
1 public boolean isCompatible(PrimerPair pp1, PrimerPair pp2) {
2   boolean cond;
3   cond =
4     isCompatible(pp1.L, pp2.L) &&
5     isCompatible(pp1.L, pp2.R) &&
6     isCompatible(pp1.R, pp2.L) &&
7     isCompatible(pp1.R, pp2.R);
8   return cond;
9 }
```



Obrázek 9: Schéma vzájemného porovnávání primerů.

5.4.2 Postup řešení kompatibility primerů

Postup řešení kompatibility primerů si rozdělíme do tří kroků: V prvním kroku nalezneme všechna možná vzájemná překrytí dvou primerů. Ve druhém kroku spočteme pro každé jednotlivé překrytí termální parametry podle popisu ze sekcí 4.1 a 4.2. Ve třetím kroku rozhodneme podmínky kompatibility a vrátíme výsledek.

Krok 1 – nalezení všech překrytí dvou primerů

Nejprve si připravíme datovou třídu, do které budeme ukládat všechna použitelná překrytí. Tuto třídu nazvěme *AlignmentResult*. Bude obsahovat údaj o posunutí (pos), počet kompl. nukleotidů (matches), počet nekompl. nukleotidů (mismatches) a řetězec překrytí (mString). Řetězec překrytí obsahuje v kompl. místě písmeno označující nukleotid, v nekompl. místě symbol 'N'.

Vzhledem k velkému počtu všech možných překrytí bylo zapotřebí zavést klasifikátor, který nám vyloučí některé snadno rozhodnutelné případy. Např. šance na hybridizaci dvou primerů, které nejsou vůči sobě v daném překrytí vůbec komplementární (tzn. že nemají žádný komplementární nukleotid) je minimální. Příznakem pro náš klasifikátor bude hodnota skóre. Tu vypočítáme jako rozdíl počtu kompl. a nekompl. nukleotidů. Práh si volí uživatel na záložce DimerData (řádek Score). Nižší skóre nám zpřísňuje požadavky, ale může prodloužit dobu výpočtu. Klasifikaci podle skóre používáme ve stejném smyslu jako autoři softwaru Autodimer. Ti při svých experimentech došli k závěru, že prahové skóre 7–8 funguje pro návrh PCR primerů poměrně spolehlivě[5]. Kód pro získání seznamu všech přijatelných překrytí nalezneme v příloze A, v sekci č. A.1.

Krok 2 – Výpočet termálních parametrů

V tomto kroku budeme procházet jedno překrytí za druhým a pro každé z nich spočítáme termální parametry. Pokud se ve kterémkoliv překrytí ukáže, že primery nejsou kompatibilní, končíme výpočet a vracíme *false*.

Třída *ThermalResult* uvedená (níže) na ř. 3 je pouze další datovou třídou. Slouží nám k uchování hodnot ΔG°_{T} a T_m. Na ř. 5 si vyžádáme seznam překrytí, abychom jej mohli na ř. 6 procházet cyklem. Příkaz *computeThermal(aResult)* na ř. 7 vypočte termální parametry. Stačí mu k tomu pouze řetězec překrytí, který máme pro každé jednotlivé překrytí uložen v *aResults* a vstupní parametry, které získá ze třídy *DimerData*. Výsledek pak uloží do *tResult*. Na ř. 8 už jen ověříme podmínku kompatibility zavoláním přetížené metody *isCompatible(ThermalResult tResult)*. Implementaci této metody si ukážeme ve třetím kroku.

```
1 public boolean isCompatible(Primer left, Primer right) {
2   ArrayList<AlignmentResult> aResults;
3   ThermalResult tResult;
4   aResults = align(left, right);
```

```
5   if (aResults == null) return true;
6   for (AlignmentResult aResult:aResults) {
7     tResult = computeThermal(aResult);
8     if (!isCompatible(tResult)) return false;
9   }
10  return true;
11 }
```

Samotný výpočet termálních parametrů spočívá ve výpočtu tabulkových parametrů (níže, ř. 4–6), aplikaci korekcí (ř. 7–12) a výpočtu teploty tání (ř. 14). Konstrukce metody *computeThermal()* vypadá takto:

```
1 private ThermalResult computeThermal(AlignmentResult aResult) {
2   double g, s, salt, tempC, tempK;
3   tempK = dimerParams.getTemp() + 273.15;
4   g = deltaG(aResult.matchString);
5   s = deltaS(aResult.matchString);
6   h = deltaH(aResult.matchString);
7   double numPhos = (primer1.length() + primer2.length()) * 0.5 - 1;
8   double logSalt = Math.log(dimerParams.getSalt());
9   double gCorr = g - 0.114 * numPhos * logSalt;
10  double sCorr = s + 0.368 * numPhos * logSalt;
11  double hCorr = gCorr + (310.15 * sCorr) * 0.001;
12  double gtCorr = gCorr + ((310.15 - tempK) * sCorr) *
13            0.001 + 0.438 * (aResult.mismatches);
14  double tmCorr = meltingTemperature(hCorr, sCorr);
15  return new ThermalResult(tmCorr, gtCorr);
16 }
```

Implementace metod *deltaG()*, *deltaS()*, *deltaH()* a *meltingTemperature()* s použitím hash-mapy pro efektivní konstrukci tabulky parametrů jsou pro svůj větší rozsah uvedeny v příloze A.

Krok 3 – Rozhodnutí podmínek kompatibility

Na základě výsledků termální analýzy provedeme rozhodnutí kompatibility pro dané překrytí. K dispozici máme hodnoty ΔG°_{T} a T_m uložené v *tResult*. Prahové hodnoty jsou *dimerParams.getTm()* a *dimerParams.getDeltaG()*. Pokud je pravdivá alespoň jedna z podmínek na řádcích 2–3, pak primery prohlásíme za nekompatibilní. V opačném případě jsou kompatibilní.

```
1 private boolean isCompatible(ThermalResult tResult) {
2   cond1 = tResult.tm > dimerParams.getTm();
3   cond2 = tResult.deltaG < dimerParams.getDeltaG();
4
5   if (cond1 || cond2) return false;
6   return true;
7 }
```

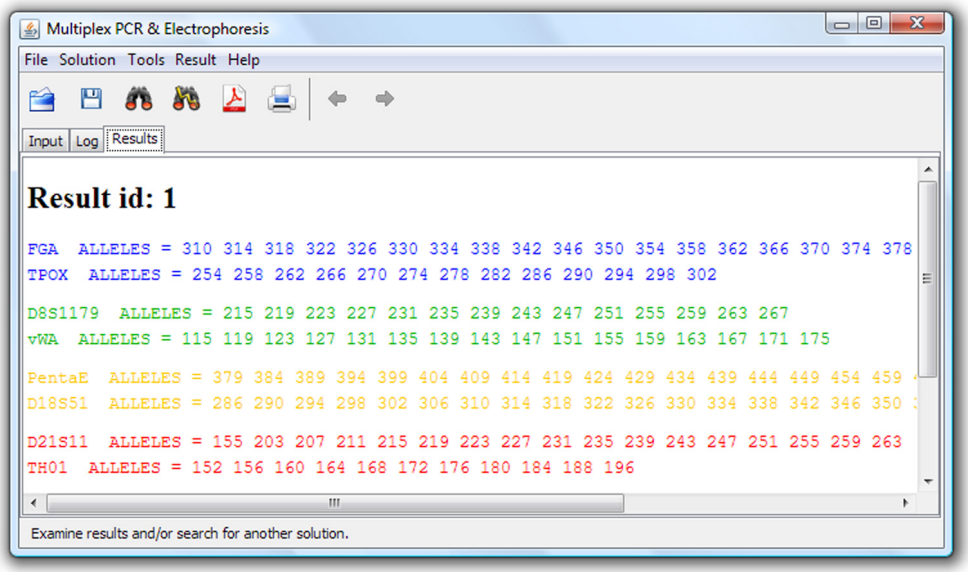
5.5 Sestavování multiplexů

Sestavování multiplexů spočívá ve výběru kompatibilních sad mikrosatelitů. Uživatel si volí požadovanou velikost řešení a počet elektroforézních kanálů, které budou během experimentu využity. Na základě těchto údajů jsou vygenerovány všechny existující kompatibilní sady požadovaných velikostí. Z nich jsou poté metodou *searchNext* sestavovány cílové multiplexy. Prostor řešení procházíme do hloubky („depth-first-search“). Implementace metody *searchNext* pro nalezení cílového multiplexu s použitím rychlé bytové indexace vypadá takto:

```
1 public void searchNext() {
2   if (size == goalSize) {
3     backtrack(); size--;
4   }
5   bestSize = 0;
6   while (size < goalSize && size >= 0) {
7     while (size < goalSize && findNextElement()) {
8       solution[size++] = forward();
9     }
10    if (size > bestSize) {
11      bestSize = size;
12      System.arraycopy(solution, 0, bestSolution, 0, size);
13    } else {
14      if (size > 0) backtrack();
15      size--;
16    }
17  }
18 }
```

Výše uvedená metoda *searchNext()* je obsažena ve třídě *BBSolver* (modul Solver). Cyklus na ř. 6 opakujeme tak dlouho, dokud nenalezneme požado-

vané řešení. Vnořený cyklus na ř. 7 postupně přidává kompatibilní sady, pokud jsou k dispozici. Tím navyšujeme velikost našeho výsledného multiplexu. Dosáhneme-li požadované velikosti, pak známe řešení a zkopírujeme jej z pole *solution* do výsledného pole *bestSolution* (ř. 12). V opačném případě jsme nalezli jen částečné řešení a zkoušíme hledat znovu jinou cestou. Podmínka na ř. 2 rozhoduje, zda jsme v minulém hledání nalezli částečné a nebo úplné řešení. Podle toho pak začínáme s hledáním nového řešení a nebo hledáme řešení obdobné. Uživateli prezentujeme pouze úplné řešení. Metoda *findNextElement* na ř. 7 hledá použitelné sady, metoda *forward* na ř. 8 poznamenává mezivýsledek do pole řešení, metoda *backtrack* na ř. 15 naopak mezivýsledek z pole řešení odstraňuje. Na obr. č. 10 můžeme vidět, jak aplikace prezentuje sestavený kompatibilní multiplex.



Obrázek 10: Ukázková sada kompatibilních mikrosatelitů.

5.6 Složitost algoritmu

Tato sekce slouží k popsání časové náročnosti výpočetního algoritmu. Hledání výsledného multiplexu probíhá ve třech fázích – 1. určení kompatibility primerů, 2. vytvoření všech možných skupin kompatibilních mikrosatelitů, 3. sestavení multiplexu z několika kompatibilních skupin. Přesněji určit lze pouze časová složitost 1. fáze (viz odstavec „Časová složitost 1. fáze algoritmu“). Ve

2. fázi je teoreticky možno vygenerovat exponenciálně mnoho kompatibilních skupin (vzhledem k počtu N zpracovávaných mikrosatelitů). Ve 3. fázi pak vybíráme do výsledného multiplexu skupiny mikrosatelitů mezi všemi kompatibilními skupinami, výpočet tedy opět může mít exponenciální časovou složitost. Z toho vyplývá, že omezení počtu kompatibilních skupin mikrosatelitů vhodným nastavením kritérií kompatibilit v 1. fázi má klíčový význam pro efektivitu algoritmu. Proto je třeba mít na paměti, že doba zpracování velmi závisí na vstupních datech i na konkrétním nastavení vyhledávacích parametrů. V neposlední řadě pak pochopitelně na použitém hardwaru.

Pro testovací účely byl použit počítač s dvoujádrovým procesorem architektury Intel s taktem jádra 1.87 Ghz a pamětí 5 GB. Testování probíhalo v operačním systému Windows Vista x64. Použité spouštěcí prostředí bylo Java Runtime 6 Update 11.

Časová složitost 1. fáze algoritmu

Nejdříve si zkusme spočítat, jak rychle nám narůstá počet vzájemných porovnání primerů s narůstajícím počtem vstupních mikrosatelitů. Víme, že chceme porovnat každý mikrosatelit s každým kromě sebe sama. To nám dává $\frac{N^2}{2} - N$ kombinací. Každé porovnání dvou mikrosatelitů sestává ze čtyř porovnání primerů. Tím pádem dochází k $2N^2 - 4N$ porovnání primerů. Uvážíme-li, že během výpočtu chemické kompatibility bude maximální délka primeru L, pak při každém porovnání dochází maximálně k $2L - 1$ překrytí řetězců. Pro každé překrytí počítáme termální parametry. Pro určení chemické kompatibility N mikrosatelitů provedeme výpočet maximálně K-krát, kde K je rovno:

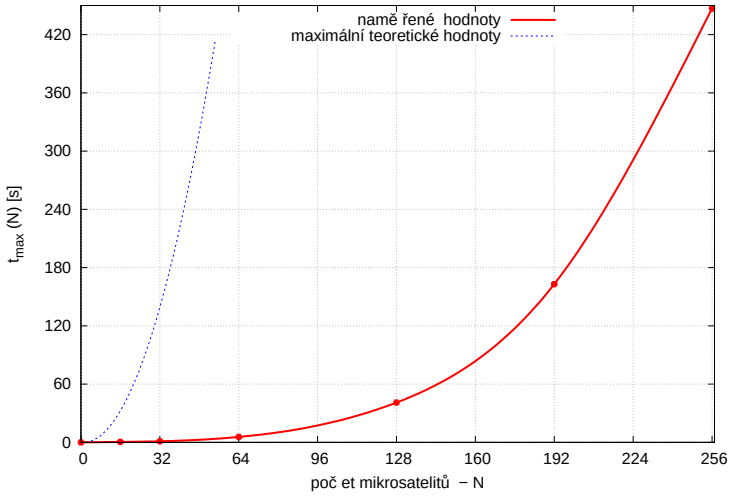
$$K(L, N) = (2L - 1)(2N^2 - 4N) \tag{18}$$

Tabulka č. 5 znázorňuje, jak rychle nám narůstá počet kombinací s rostoucím počtem porovnávaných mikrosatelitů. Délku L budeme uvažovat 24 nukleotidů.
Nyní si zkusíme porovnat, jaký bude časový rozdíl při použití optimalizačního parametru „Score“ a bez jeho použití. Měření na naší pokusné sestavě ukázalo, že průměrná doba pro určení kompatibility dvou primerů byla 1,54 ms. Vynásobíme-li touto dobou počet kombinací pro dané N, získáme teoretickou maximální dobou průběhu celého algoritmu výpočtu chemické kompatibility. Délku primerů budeme opět uvažovat 24 nukleotidů, jelikož to je průměrná délka v naší testovací skupině a zároveň uváděná optimální délka primeru.

Teoretickou maximální doba zpracování $t_{\max}$ vypočítáme takto:

$$t_{\max}(N) = 47(2N^2 - 4N) \times 1,54 \times 10^{-3} \tag{19}$$

Pro srovnání také změříme skutečnou dobu výpočtu. Měření provedeme na testovacích množinách s 16, 32, 64, 128, 192 a 256 mikrosatelity. Výsledek shrnuje graf na obr. č. 11.



Obrázek 11: Srovnání teoretické maximální doby zpracování a naměřené doby zpracování chemické kompatibility pro skupiny N mikrosatelitů.

Na grafu vidíme, jak rychle by nám rostla časová náročnost kdybychom brali v potaz všechny existující kombinace (čárkovaná křivka). Za těchto podmínek by výpočet pro $N = 256$ trval více než 2,5h. My však uplatňujeme skóre,

N	Počet kombinací (K)
16	22 560
32	93 248
64	379 008
128	1 528 064
192	3 447 168
256	6 136 320

Tabulka 5: Nárůst složitosti při výpočtu chemické kompatibility mikrosatelitů, jejichž primery mají délku 24 nukleotidů.

čímž počet přijatelných případů rapidně snížíme. Navíc, nalezneme-li překrytí dvou primerů, při kterém by mohla vzniknout vazba, ihned primery označíme za nekompatibilní a dále je nezkoumáme. Tímto způsobem výpočet značně urychlíme. Reálně naměřené hodnoty ukazuje tučněji vyznačená křivka. Skutečně naměřené hodnoty jsou na křivce zvýrazněny, ostatní hodnoty byly dopočítány.

Hodnoty znázorněné v grafu musejí být pochopitelně brány jen orientačně, jelikož zobrazují dobu zpracování, která se bude lišit podle situace. Vidíme zde však významný vliv optimalizací. Operační složitost algoritmu podle rovnice č. (18) je $O(N^2)$.

Paměťové nároky aplikace

Měření paměťové náročnosti aplikace na naší testovací sestavě bylo opět provedeno pro vstupní množiny s 16, 32, 64, 128, 192 a 256 mikrosatelity. Výsledky ukazují, že až po $N = 32$ paměťové nároky výrazně rostou (do hodnoty 520MB při $N = 64$). Odtud paměťová náročnost roste jen pozvolna do 556MB při $N = 256$. Pro objektivní změření byla aplikace před novým měřením vždy restartována. Naměřené výsledky shrnuje tabulka č. 6.

N	16	32	64	128	192	256
Paměť [MB]	128	276	520	540	553	556

Tabulka 6: Naměřené paměťové nároky aplikace.

Na první pohled je patrné, že jsou paměťové nároky aplikace relativně vysoké. Je ovšem třeba zohlednit, že test byl spuštěn na sestavě s dostatkem operační paměti. V takových případech je pro urychlení výpočtu alokováno spíše více paměti a nepoužitá paměť uvolňována jen pozvolna. Počítače s menším množstvím operační paměti budou schopny program přesto spustit, avšak lze očekávat snížení jeho výkonu kvůli častým dealokacím nepoužívaných paměťových bloků. Jiné implementace Java Virtual Machine mohou využívat paměť odlišným způsobem.

6 Dosažené výsledky

Korespondence vypočtených výsledků se skutečností má zásadní význam pro použitelnost naší aplikace. Jedině tak může být nasazena v reálném provozu pro účely, ke kterým byla vytvořena – tedy pro zvýšení propustnosti elektroforézy optimalizací primerů. V této kapitole se pokusíme ověřit vypočtené výsledky porovnáním vůči známé sadě mikrosatelitů, která je určena pro lidskou identifikaci. Nejprve si shrneme základní informace o uvažované sadě.

Powerplex 16 ® BIO

Jedna z populárních, běžně používaných mikrosatelitových sad se nazývá Powerplex 16. Využíváme ji v soudním lékařství, při genotypizování (včetně ověřování rodičovství) a také pro identifikaci lidských jedinců. Jedinečný výběr mikrosatelitů umožňuje provádět jednorázovou amplifikaci, aniž by hrozily vzájemné interakce použitých primerů. Analýza na elektroforézním gelu může probíhat v jediném kanálu při použití třech fluorescenčních barev, nebo ve třech kanálech při použití jedné barvy. Obsažené mikrosatelity splňují standardy FBI pro lidskou identifikaci v rámci celé populace. Třináct ze šestnácti obsažených mikrosatelitů využívá FBI ve svém vyhledávacím systému CODIS. Čtrnáctý mikrosatelit, Amelogenin slouží k určení pohlaví. Zbylé dva mikrosatelity pak dále navyšují rozlišovací schopnost sady. Pravděpodobnost, že budou dva různí europoidní jedinci identifikování touto sadou stejně je 1 ku $1,83 \times 10^{17}$, tedy minimální[30].

Sadu Powerplex 16 jsme pro ověření funkcí programu vybrali záměrně. Díky vysoké odolnosti zvolených primerů vůči hybridizaci můžeme provést testování přes celou škálu vstupních hodnot. Jakmile nalezneme parametry, při kterých nám program vyhodnotí mikrosatelity za nekompatibilní, provedeme zhodnocení, zda jsou tyto parametry ještě přípustné. Pokud by přípustné byly, chyba bude zřejmě v našem programu. V opačném případě lze algoritmus považovat za správný.

Bohužel jsme pro vytíženost konzultační laboratoře dosud nestihli provést praktický laboratorní test uzpůsobený specificky pro naše potřeby. Zcela průkazné ověření funkčnosti metody tedy není součástí této práce, lze se pouze spoléhat na silné teoretické podklady, ze kterých tato práce čerpá. Např. [3].

Parametry testu na sadě Powerplex 16

Test chemické kompatibility provedeme za použití výchozích vstupních parametrů. Tyto parametry na záložce SolverData jsou: Rozsah povolených délek amplikonů 1–999, požadovaná velikost řešení – 16 a tří pracovní kanály. Záložka DimerData bude obsahovat: Skóre – 7, množství Na^+ – 0,085 mol, koncentrace vláken – 1 μmol, teplota – 37° C, prahová teplota tání T_m – 64° C, ΔG° bude -10.
V průběhu testu budeme měnit vždy jen jeden parametr naráz a to do doby, než dosáhne nuly. Měnit budeme obě prahové hodnoty. T_m budeme snižovat po deseti a ΔG° budeme zvyšovat po jedné.

Výsledek a diskuze

Provedené testy chemické kompatibility ukazují (viz tabulky č. 7 a 8), že se první nekompatibilita projeví až při prahové hodnotě T_m rovno 4 °C, tedy těsně před úplným minimem. Pro T_m menší než 0 už žádné vazby prakticky ani vznikat nemohou. Při změnách prahu ΔG° se nekompatibilita dvou mikrosatelitů projeví také až těsně před nulou.

Práh T_m [° C]	64	54	44	34	24	14	4
N	0	0	0	0	0	0	1

Tabulka 7: Výsledek testu odolnosti mikrosatelitů proti hybridizaci. Postupně měníme prahovou hodnotu pro teplotu tání a sledujeme, kolik mikrosatelitů bude označeno za nekompatibilní (řádek 'N').

Práh ΔG° [kcal/mol]	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

Tabulka 8: Výsledek testu při změnách prahové hodnoty ΔG°.

Tyto výsledky naznačují, že zkoumaná množina bude mít velkou odolnost proti hybridizaci. Parametry, při kterých byly mikrosatelity označeny za nekompatibilní jsou zcela mimo škálu použitelnosti. Např. při teplotě 4 °C experimenty obvykle neprovádíme.

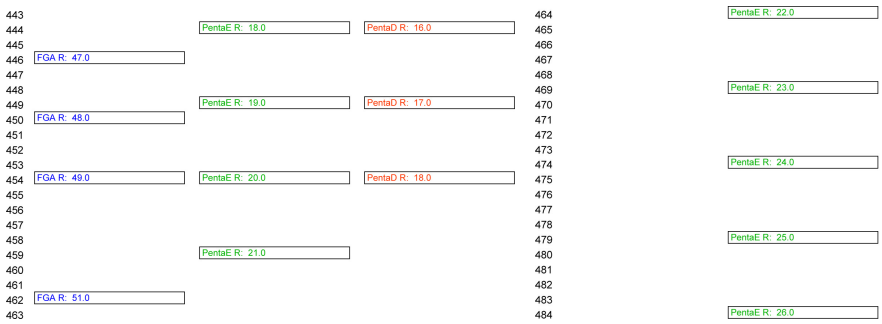
Rozdělení mikrosatelitů do skupin na základě délkových kompatibilit proběhlo také v pořádku. Žádné z nalezených řešení neobsahovalo zakázané překrytí.

Nalezené řešení s identifikačním číslem 148 navíc odpovídalo referenčnímu rozdělení do tří skupin, které můžeme nalézt na adrese: `http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/PowerPlex16.htm` [27. 4. 2009].

Detailní výstup aplikace můžeme vidět na obr. 12–14. V levém sloupci je vždy uvedena délka alel platná pro daný řádek. Jednotlivé sloupce odpovídají elektroforézním kanálum. Z tohoto výstupu je jasně patrné, že se žádné dvě alely v jednom kanálu nepřekrývají.

Obrázek 12: Výsledné rozdělení sady Powerplex 16, alely délek 90–248 bp.

Obrázek 13: Výsledné rozdělení sady Powerplex 16, alely délek 249–442 bp.



Obrázek 14: Výsledné rozdělení sady Powerplex 16, alely délek 443–484 bp.

Provedli jsme ještě obdobné testy na dvou dalších sadách mikrosatelitů, které nám poskytla k otestování naše konzultační laboratoř. Tyto sady se jmenují *human_multiplex* a *str_database*. Povedlo se nám z nich opět sestavit kompatibilní multiplexy. Detailní výstup aplikace z těchto testů, nastavení vstupních parametrů, matice kompatibilit a popis problematických primerů nalezneme v příloze B.

human_multiplex – Jedná se o menší sadu čítající 10 mikrosatelitů, která obsahuje markery pro určování lidského genotypu z databáze „The Cooperative Human Linkage Center“. Navíc ještě obsahuje mikrosatelit HUMTPOX, pomocí kterého jsme schopni měřit množství protilátek namířených proti hormonům štítné žlázy a odhalit tak její nesprávnou funkci.

str_database – Rozsáhlejší sada čítající směs celkem 27 různých lidských mikrosatelitů sloužících např. pro vyhledávání patogenů, nebo pro detekci Von Willebrandovy choroby[2].

[2]dědičná porucha srážlivosti krve

7 Závěr

Tato práce si kladla za cíl navržení a implementaci sady matematických metod, které urychlují laboratorní genotypizaci vhodným výběrem kompatibilních mikrosatelitů. Vytvořené algoritmy pro výpočet kompatibility primerů byly ověřovány na třech sadách mikrosatelitů. Ve všech případech byly výpočetní testy úspěšné, shodovaly se s předpokládaným rozdělením.

Implementace výpočetních metod v programu MultiPCR zpřístupňuje forenzním laboratořím metody výzkumu, které by jinak mohly být příliš nákladné. S pomocí tohoto nástroje jsou schopny snížit náklady na pořizování elektroforézního gelu a dalších preparátů tím, že umožní provést více experimentů najednou. Kontrola délkových kompatibilit umožní současné použití více mikrosatelitů v jediném kanálu, přičemž bude stále možné přesně identifikovat jednotlivé alely na elektroforézním gelu.

Aplikace byla optimalizována pro vícejádrové procesory (resp. víceprocesorové systémy), takže dokáže plně využít jejich výkon. Používáme v ní unikátní heuristiky ořezávající velmi účinně strom možných řešení, takže kombinatorická exploze prostoru řešení, který prohledáváme do hloubky metodou „depth-first search“, je tím dramaticky omezena. Experimenty ukázaly, že vytvořený software dovoluje efektivně nacházet multiplexy vybrané ze sad desítek nebo i stovek (do počtu 256) mikrosatelitů, což je pro praktické nasazení více než dostatečné.

V případě odhalení chemické nekompatibility program poskytuje informace potřebné k identifikaci problematických primerů. Je-li k dispozici dostatečný počet kanálů, mikrosatelity obsahující problematické primery jsou od sebe ve výsledné sadě odděleny. Chemicky kompatibilní mikrosatelity jde amplifikovat společně, čímž se sníží nutný počet provedených polymerázových řetězových reakcí.

Seznámení s aplikací usnadňuje kontextová nápověda. V místech, kde je k dispozici detailnější popis (např. při zadávání vstupních parametrů) bývá umístěno tlačítko s jasně viditelným zeleným otazníkem. Kratší popisky jsou řešeny formou tooltipových textů, které se zobrazují při najetí myši na požadovanou položku. Nejpravděpodobněji další činnost uživatele je popsána ve spodní části okna (např. informace, že jsou již k dispozici výsledky a že by si je měl prostudovat).

Modulární podoba vytvořené aplikace otevírá možnosti pro její další rozvoj, obzvláště v oblasti řešení chemické kompatibility. Současný algoritmus lze vylepšit započtením tepelné kapacity $\Delta C_{\mathrm{p}}^{\circ}$, popřípadě rozšířením na me-

todu „další nejbližší soused“ (NNN – Next Nearest Neighbour) s využitím neuronové sítě. Vstup aplikace by mohl být načítán z biologických databází, nebo být nahrazen generováním primerů „de-novo“ dle požadovaných vlastností.

MultiPCR oproti všem nám doposud známým konkurenčním programům (Autodimer[5], Primer3[12] a FastPCR[13]) poskytuje navíc unikátní metodu testování délkových kompatibilit mikrosatelitů. Také umožňuje díky heuristickému prohledávání stavového prostoru sestavovat automaticky celé multiplexy z kompatibilních mikrosatelitů. Výpočty intramolekulárních vazeb pro určování chemické kompatibility vycházejí z nejnovějších poznatků o chování primerů při PCR. Jako jediný může pracovat nativně pod libovolným operačním systémem s prostředím Java Runtime, čímž využívá procesorový čas mnohem efektivněji než ostatní aplikace spouštěné pod emulátory (Např. FastPCR musí být v Linuxu spouštěn pod Wine, v Mac OS pod emulátorem VirtualPC, Autodimer podporu OS neuvádí vůbec).

Věřím tomu, že by se brzy mohla aplikace MultiPCR zařadit do běžné softwarové výbavy forenzních genetiků. V současné době probíhá její pilotní provoz v Laboratoři experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc. Pro účely této laboratoře byla prvotně navržena.

A Příloha

A.1 Vytvoření seznamu všech překrytí

```
1 public ArrayList<AlignmentResult> align(Primer p1, Primer p2) {
2   SymbolList sList1, sList2;
3   ArrayList<AlignmentResult> results;
4   int k1, k2, len, matches, mismatches;
5   StringBuffer mString;
6
7   mString = new StringBuffer();
8   results = new ArrayList<AlignmentResult>();
9   sList1 = DNATools.createDNA(p1.seqString());
10  sList2 = DNATools.createDNA(p2.seqString());
11  int slideCount = p1.length() + p2.length();
12
13  for (int i=1; i < slideCount; i++) {
14    k1 = Math.max(sList1.length() - i, 0);
15    k2 = Math.max(i - sList1.length(), 0);
16    len = Math.min(sList1.length() - k1, sList2.length() - k2);
17    matches = 0; mismatches = 0; mString.setLength(0);
18    for (int j=0; j<len; j++) {
19      if (DNATools.complement(sList1.symbolAt(j + k1 + 1))
20            .equals(sList2.symbolAt(j + k2 + 1))) {
21        matches++;
22        mString.append(sList1.subStr(j + k1 + 1, j + k1 + 1));
23      } else {
24        mismatches++; mString.append("N");
25      }
26    }
27    int score = matches - mismatches;
28    if (mString.equals("N")) continue;
29    if (score >= dimerParams.getScore()) {
30      results.add(new AlignmentResult(
31            mString.toString, matches, mismatches, i));
32    }
33  }
34  return results;
35 }
```

Na ř. 9–10 (v bloku kódu uvedeném výše) převádíme naše primerové ře-

těžce do zpracovatelnějšího formátu – *SymbolList* z balíku BioJava. Ten nám umožní na ř. 19 provést porovnání komplementarity dvou symbolů. Hlavní cyklus na ř. 13 prochází všechna možná posunutí, vnořený cyklus na ř. 18 pro každé posunutí zkontroluje komplementaritu protilehlých symbolů. Zároveň zjišťujeme počet shod, počet neshod a vytváříme řetězec překrytí. Na ř. 28 odfiltujeme ta překrytí, kde se kryje jen jeden nukleotid a ten navíc ani není komplementární. Na ř. 29 vyhodnotíme skóre. Do výstupního seznamu přidáváme všechna posunutí, která jsou rovna prahové hodnotě, nebo vyšší.

A.2 Obecná metoda výpočtu termálního parametru

Metoda *computeParam* vypočte na základě řetězce překrytí a zvolené tabulky požadovaný termální parametr. Např. pro výpočet ΔH° s řetězcem překrytí "ATTGA" bychom volali: `computeParam("ATTGA", tG);` kde *tG* je hashovací tabulka vytvořená metodou *createTableH()*.

```
1 private cmdFloat computeParam(String mString,
2                     HashMap<String, Float> table) {
3   Float nn;
4   float param = 0;
5   float init = 0;
6
7   // Výpočet hodnot nejbližšího souseda
8   for (int i = 0; i < s1.length() - 1; i++) {
9     nn = table.get(s1.substring(i, i+2));
10    if (nn == null) continue;
11    param += nn;
12  }
13
14  // Výpočet inicializacního parametru
15  nn = table.get(String.valueOf(s1.charAt(s1.length()-1)));
16  if (nn != null) init += nn;
17
18  return init+param;
19 }
```

A.3 Implementace datových tabulek

Implementace tabulky pro výpočet ΔG°_{37}

```
private HashMap<String, Float> createTableG() {
  tG = new HashMap<String, Float>(16);

  // unified free energy at 37C
  tG.put("aa", -1.00f); tG.put("at", -0.88f);
  tG.put("ac", -1.44f); tG.put("ag", -1.28f);
  tG.put("ta", -0.58f); tG.put("tt", -1.00f);
  tG.put("tc", -1.30f); tG.put("tg", -1.45f);
  tG.put("ca", -1.44f); tG.put("ct", -1.28f);
  tG.put("cc", -1.84f); tG.put("cg", -2.17f);
  tG.put("ga", -1.30f); tG.put("gt", -1.44f);
  tG.put("gc", -2.24f); tG.put("gg", -1.42f);

  // inic. korekce G-C
  tG.put("g",   0.98f); tG.put("c",   0.98f);

  // inic. korekce A-T
  tG.put("a",   1.03f); tG.put("t",   1.03f);

  tG.put("n",   0.00f);
  return tG;
}
```

Implementace tabulky pro výpočet ΔH°

```
private HashMap<String, Float> createTableH() {
  tH = new HashMap<String, Float>(16);

  // unified delta H parameters (kcal/mol)
  tH.put("aa", -7.90f); tH.put("at", -7.20f);
  tH.put("ac", -8.40f); tH.put("ag", -7.80f);
  tH.put("ta", -7.20f); tH.put("tt", -7.90f);
  tH.put("tc", -8.20f); tH.put("tg", -8.50f);
  tH.put("ca", -8.50f); tH.put("ct", -7.80f);
  tH.put("cc", -8.00f); tH.put("cg", -10.60f);
  tH.put("ga", -8.20f); tH.put("gt", -8.40f);
  tH.put("gc", -9.80f); tH.put("gg", -8.42f);
```

```
13
14    // inic. korekce G-C
15    tH.put("g",    0.10f);
16    tH.put("c",    0.10f);
17
18    // inic. korekce A-T
19    tH.put("a",    2.30f);
20    tH.put("t",    2.30f);
21
22    tH.put("n",    0.00f);
23    return tH;
24  }
```

Implementace tabulky pro výpočet ΔS°

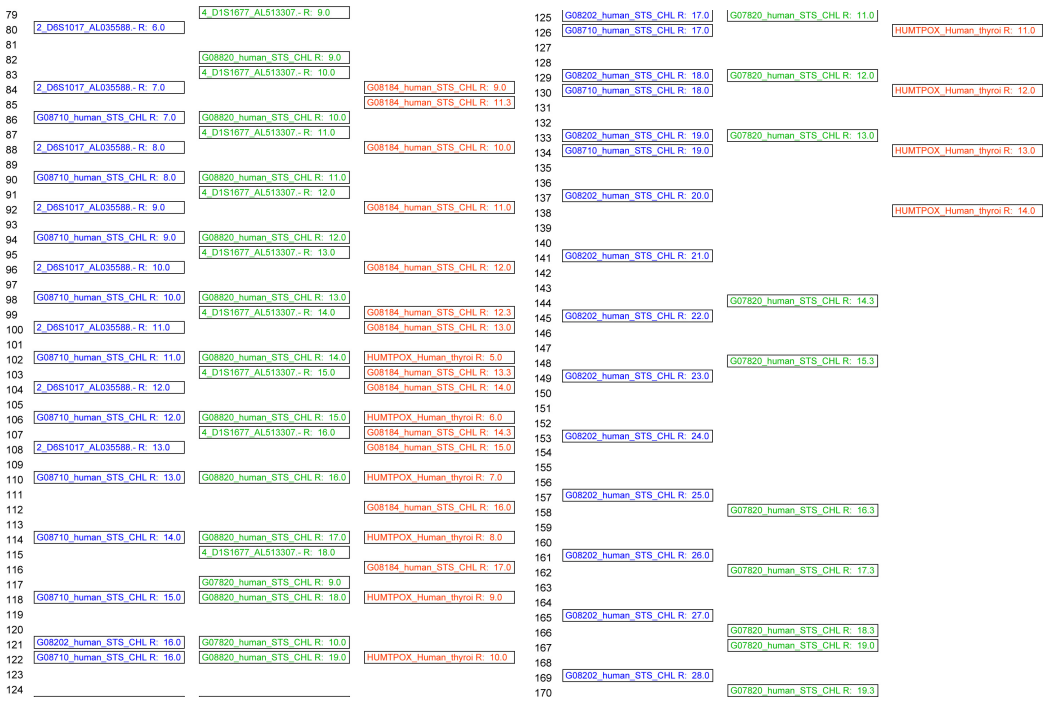
```
1  private HashMap<String, Float> createTableS() {
2    tS = new HashMap<String, Float>(16);
3
4    // unified delta S parameters (cal/k.mol)
5    tS.put("aa", -22.20f); tS.put("at", -20.40f);
6    tS.put("ac", -22.40f); tS.put("ag", -21.00f);
7    tS.put("ta", -21.30f); tS.put("tt", -22.20f);
8    tS.put("tc", -22.20f); tS.put("tg", -22.70f);
9    tS.put("ca", -22.70f); tS.put("ct", -21.00f);
10   tS.put("cc", -19.90f); tS.put("cg", -27.20f);
11   tS.put("ga", -22.20f); tS.put("gt", -22.40f);
12   tS.put("gc", -24.40f); tS.put("gg", -19.90f);
13
14   // inic. korekce G-C
15   tS.put("g",    -2.80f);
16   tS.put("c",    -2.80f);
17
18   // inic. korekce A-T
19   tS.put("a",     4.10f);
20   tS.put("t",     4.10f);
21
22   tS.put("n",     0.00f);
23   return tS;
24 }
```

B Výsledky testovaných sad

B.1 Test sady human_multiplex

Pro testování této sady jsme použili následující parametry vyhledávače: Rozsah délek amplikonů: 0–230, velikost řešení: 10, počet kanálů: 3.
Pro výpočet termálních parametrů jsme použili: Score: 7, množství soli: 0,085 mol, koncentrace vláken: 1 μmol, teplota: 37 °C, teplota tání: 25 °C, $\Delta G°$: -3 kcal/mol.
Všechny mikrosatelity ze sady mají délku repetic 4. Nejvhodnější nalezené rozdělení do tří kanálů kanály bylo 3-3-2. Celou sadu tudíž nelze použít dohromady kvůli překrývání některých alel. Najednou lze použít maximálně 8 z 10 mikrosatelitů sady. Chemická nekompatibilita nebyla žádná odhalena. Na obr. 16 vidíme matici délkových kompatibilit.

```
Name: 1_G08710_human_STS_CHL
Allele list: 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Name: 2_D6S1017_AL035588.-
Allele list: 6 7 8 9 10 11 12 13

Name: 3_G08202_human_STS_CHL
Allele list: 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Name: 4_D1S1677_AL513307.-
Allele list: 9 10 11 12 13 14 15 16 18

Name: 5_G08820_human_STS_CHL
Allele list: 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Name: 6_G08085_human_STS_CHL
Allele list: 8 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Name: 7_G08184_human_STS_CHL
Allele list: 9 10 11 11.3 12 12.3 13 13.3 14 14.3 15 16 17

Name: 8_G08921_human_STS_CHL
Allele list: 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

Name: 9_G07820_human_STS_CHL
Allele list: 9 10 11 12 13 14.3 15.3 16.3 17.3 18.3 19 19.3

Name: 10_HUMTPOX_Human_thyroi
Allele list: 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
```



Obrázek 15: Výsledné rozdělení sady human_multiplex, alely délek 79–170 bp.

Dále si ukážeme matici délkových kompatibilit a matici celkové kompatibility. V našem případě budou obě matice shodné, jelikož jsou všechny uvedené mikrosatelity vzájemně chemicky kompatibilní.

Length compatibility matrix

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
0					×	×			×
1						×	×		
2								×	
3						×	×		
4	×					×			×
5	×	×		×	×		×		×
6		×		×		×			
7			×						
8	×				×	×			

Overall compatibility matrix

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
0					×	×			×
1						×	×		
2								×	
3						×	×		
4	×					×			×
5	×	×		×	×		×		×
6		×		×		×			
7			×						
8	×				×	×			

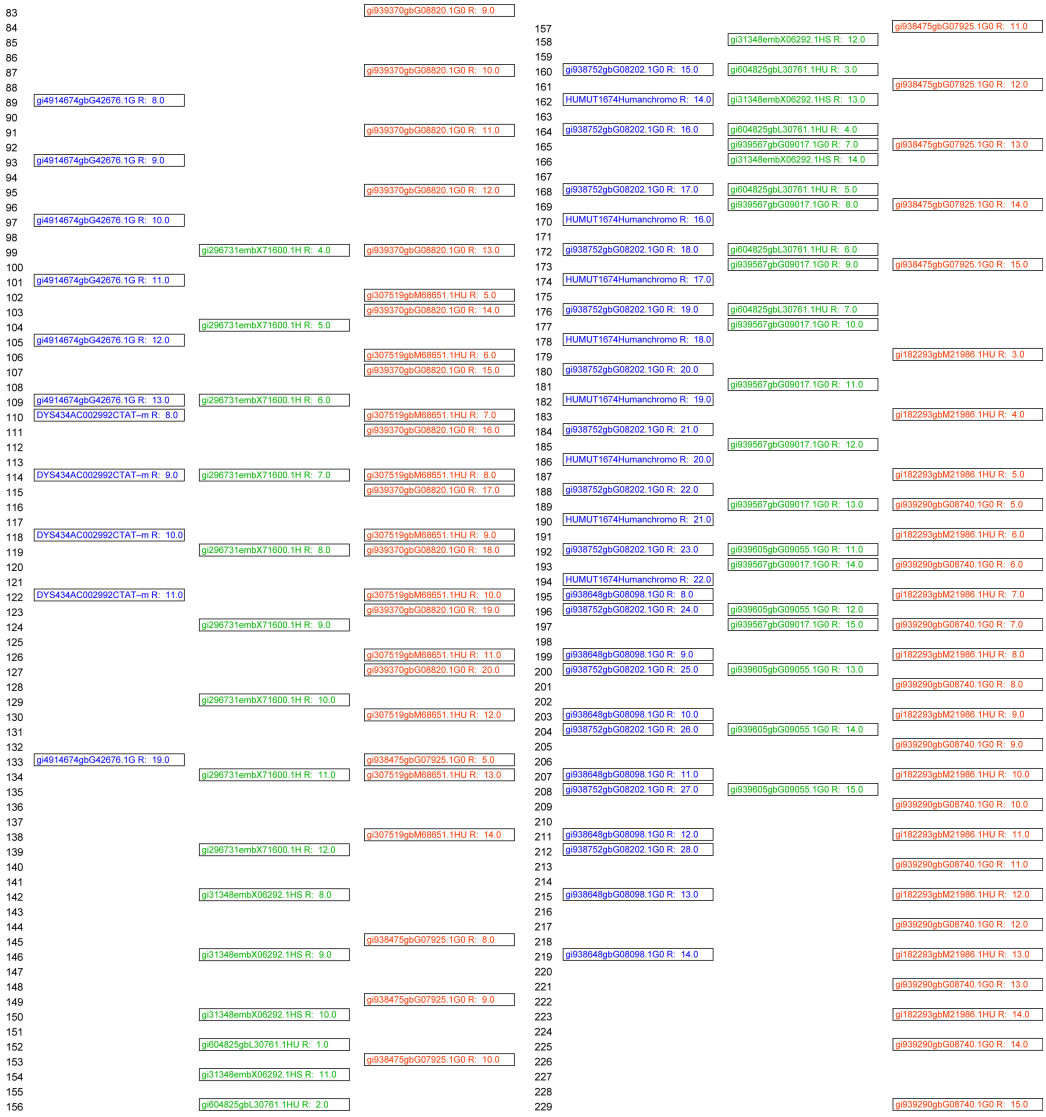
Obrázek 16: Matice kompatibilit pro sadu human_multiplex tak jak jsou zobrazeny programem MultiPCR.

B.2 Test sady str_database

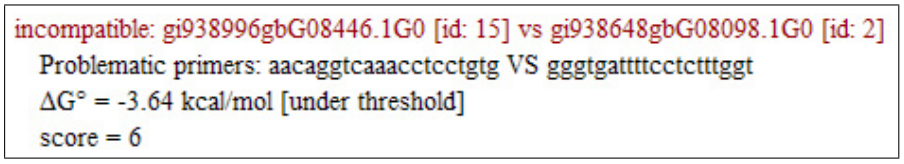
Pro testování této sady jsme použili následující parametry vyhledávače: Rozsah délek amplikonů: 0–999, velikost řešení: 15, počet kanálů: 3.
Pro výpočet termálních parametrů jsme použili: Score: 3, množství soli: 0,085 mol, koncentrace vláken: 1 μmol, teplota: 37 °C, teplota tání: 55 °C, $\Delta G°$: -3 kcal/mol.
Mikrosatelity v sadě mají délky repetic 4–6. Nejvhodnější nalezené rozdělení do tří kanálů kanály bylo 5-5-5. Zároveň byla odhalena chemická nekompatibilita mezi mikrosatelity *gi938996gbG08446.1G0* a *gi938648gbG08098.1G0*, popis problému můžeme vidět na obr. 18. Tyto dva mikrosatelity nebyly do řešení zahrnuty, protože existovaly vhodnější kandidáti. Matice kompatibilit pro jejich větší rozměry neuvádíme. Mikrosatelity zařazené do výsledné sady jsou:

```
Name: gi4914674gbG42676.1G
Repetition length: 4
Allele list: 8 9 10 11 12 13 19

Name: gi938752gbG08202.1G0
Repetition length: 4
Allele list: 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Name: gi938648gbG08098.1G0
Repetition length: 4
Allele list: 8 9 10 11 12 13 14

Name: HUMUT1674Humanchromo
Repetition length: 4
Allele list: 14 16 17 18 19 20 21 22

Name: DYS434AC002992CTAT.m
Repetition length: 4
Allele list: 8 9 10 11

Name: gi296731embX71600.1H
Repetition length: 5
Allele list: 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Name: gi939605gbG09055.1G0
Repetition length: 4
Allele list: 11 12 13 14 15

Name: gi939567gbG09017.1G0
```

```
Repetition length: 4
Allele list: 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Name: gi604825gbL30761.1HU
Repetition length: 4
Allele list: 1 2 3 4 5 6 7

Name: gi31348embX06292.1HS
Repetition length: 4
Allele list: 8 9 10 11 12 13 14

Name: gi307519gbM68651.1HU
Repetition length: 4
Allele list: 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Name: gi939370gbG08820.1G0
Repetition length: 4
Allele list: 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Name: gi938475gbG07925.1G0
Repetition length: 4
Allele list: 5 8 9 10 11 12 13 14 15

Name: gi939290gbG08740.1G0
Repetition length: 4
Allele list: 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Name: gi182293gbM21986.1HU
Repetition length: 4
Allele list: 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
```



Obrázek 17: Výsledné rozdělení sady str_database, alely délek 83–229 bp.



Obrázek 18: Popis nalezené chemické nekompatibility tak jak ji zobrazuje aplikace MultiPCR.

Literatura

[1] CLAVERIE, Jean-Michel, NOTREDAME, Cedric. *Bioinformatics For Dummies*. [s.l.] : For Dummies, 2006. 436 s. 2.

[2] VALLONE, Peter M., BENIGHT, Albert S. Melting studies of short DNA hairpins containing the universal base 5-nitroindole. In *Nucleic Acids Research*. [s.l.] : Oxford University Press, 1999. Vol. 27, no. 17. s. 3589-3596. ISSN 0305-1048.

[3] SANTALUCIA, JR., John. *A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics*. In Biochemistry. USA : Proc. Natl. Acad. Sci, 1998. Vol. 95, no 4. s. 1460-1465.

[4] CHAVALI, Sreenivas, et al. *Oligonucleotide properties determination and primer designing : a critical examination of predictions*. In Bioinformatics : Original Paper. [s.l.] : Oxford University Press, 2005. Vol. 21, no. 20. s. 3918-3925.

[5] VALLONE, Peter M., BUTTLER, John M. *AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures*. In BioTechniques : Short Technical Reports. [s.l.] : [s.n.], 2004. Vol 37, no. 2. s. 226-231.

[6] DAINTITH, John. *Oxford Dictionary of Physics*. [s.l.] : Oxford University Press, 2005. 586 s. 5. ISBN 0-19-280628-9

[7] KITTEL, Charles. *Thermal physics*. USA : Twenty-first printing, 2000. 418 s. ISBN 0-7167-1088-9

[8] SANTALUCIA, JR., John *Physical Principles and Visual-OMP Software for Optimal PCR Design*. In Methods in Molecular Biology : PCR Primer Design [s.l.] : [s.n.], 2007. Vol. 402. s. 3-34

[9] CANTOR, C. R., SCHIMMEL, P. R. *Biophysical Chemistry Part III: The Behavior of Biological Macromolecules*. San Francisco : W. H. Freeman, 1980. 624 s. ISBN 0716711923

[10] Record, M. T., Jr., Lohman, T. M. (1978) *Biopolymers 17*. s. 159–166

[11] B. CHAIRES, Jonathan. Possible origin of differences between van't Hoff and calorimetric enthalpy estimates. In COOPER, A., DI CERA, E., WINTER, R. Biophysical Chemistry. [s.l.] : [s.n.], 1997. s. 15-23. ISSN 0301-4622

[12] Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998) *Primer3*. Dostupný z WWW: <http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html>

[13] *FastPCR* [online]. 2009, 30. 4. 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>

[14] *DNA* [online]. 2009, 16. 2. 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Dna>

[15] *DNA* [online]. 2009, last modified on 7 March 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dna>

[16] *Gen* [online]. 2009, 24. 2. 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Gen>

[17] *Gene* [online]. 2009, last modified on 7 March 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Gene>

[18] *Allele* [online]. 2009, last modified on 6 March 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Allele>

[19] *Alela* [online]. 2009, 5. 1. 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Alela>

[20] *Elektroforéza* [online]. [2008], 2008-11-21 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://wapedia.mobi/cs/Elektroforéza>

[21] *Agarose Gel Electrophoresis* [online]. c2007, last updated (Tuesday, 04 September 2007) [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://alturl.com/imv>

[22] *Agarose gel electrophoresis* [online]. 2009, last modified on 6 March 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Agarose_gel_electrophoresis>

[23] *Restriction enzyme [online]*. c2009, last modified on 17 February 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_enzyme>

[24] *Primer* [online]. 2008, 29. 10. 2008 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Primer>

[25] *Primer (molecular biology)* [online]. 2009, last modified on 22 January 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Primer_(molecular_biology)>

[26] *Ethidium bromide* [online]. 2009, last modified on 19 February 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide>

[27] RACLAVSKÝ, Vladislav, MUDr., Ph.D. *Výhody a nevýhody přidávání ethidium bromidu do gelu* [online]. c2003 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovnik/Vyhody%20a%20nevyhody%20EtBr%20v%20gelu.htm>

[28] *Polymerase chain reaction* [online]. 2009, last modified on 4 March 2009 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction>

[29] *Polymerázová řetězová reakce* [online]. 2008, 19. 12. 2008 [cit. 2009-03-07]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Polymerázová_řetězová_reakce>

[30] *PowerPlex 16* [online]. c2009 [cit. 2009-04-21]. Dostupný z WWW: <http://alturl.com/famr>