

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Porovnání metod stanovení obsahu nukleových kyselin

Bc. Petra Zámečnicková

Diplomová práce

2017

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 Hradci Králové dne 9. května 2017

Bc. Petra Zámečníková

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat především PharmDr. Antonínu Librovi, Ph.D. a PharmDr. Lucii Krausové, Ph.D. za jejich odborné vedení, cenné rady, vřelý přístup a dohled, který mi při zpracování diplomové práce věnovali. Také bych chtěla poděkovat své rodině a partnerovi za vstřícnost, podporu a zázemí, které mi bylo během studia poskytnuto.

ANOTACE

Tato diplomová práce porovnává výkonnostní parametry měření obsahu DNA spektrofotometrickými a fluorescenčními metodami. Jako doplňující metoda byla zvolena i real-time PCR. Teoretická část se věnuje nukleovým kyselinám, jednotlivým typům DNA a principům všech použitých metod. Definovány jsou také stanovované výkonnostní charakteristiky včetně způsobů jejich získání. V experimentální části jsou pak uvedeny protokoly, výsledky a grafy, všechny členěny po jednotlivých metodách.

KLÍČOVÁ SLOVA

nukleové kyseliny, kvantifikace, spektrofotometrie, fluorimetrie, real-time PCR, linearita, preciznost, limit detekce, limit kvantifikace, pracovní rozsah

TITLE

Comparison of methods for assessment of nucleic acid content

ANNOTATION

This master thesis compares characteristics of measuring DNA content by spectrophotometric and fluorescent methods. As an additional method was chosen real-time PCR. In the theoretical part are described nucleic acid, individual types of DNA and principles of used methods. Defined are also assayed parameters, including ways of obtaining them. In the experimental part are listed individual protocols, results and graphs all division into chapters by methods.

KEYWORDS

nucleic acid, quantification, spectrophotometry, fluorimetry, real-time PCR, linearity, precision, limit of detection, limit of quantification, working range

OBSAH

ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Nukleové kyseliny.....	16
1.1.1 Struktura nukleových kyselin	16
1.1.2 Význam DNA	19
1.1.3 Typy DNA	20
1.2 Kvantitativní stanovení nukleových kyselin	23
1.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin.....	23
1.2.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace NK	26
1.2.3 Real-time PCR (qPCR).....	28
1.3 Výkonnostní parametry metod.....	32
1.3.1 Limit detekce (LOD)	32
1.3.2 Limit kvantifikace (LOQ).....	34
1.3.3 Linearita	35
1.3.4 Pracovní rozsah.....	36
1.3.5 Preciznost.....	36
2 Cíle práce	39
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
3.1 Metodika	40
3.1.1 Testovaný materiál a příprava ředících řad vzorků	40
3.1.2 Spektrofotometrické stanovení DNA v kapce	43
3.1.3 Spektrofotometrické stanovení DNA v kyvetě.....	44
3.1.4 Spektrofotometrické stanovení DNA v destičce.....	46
3.1.5 Fluorimetrické stanovení DNA.....	47
3.1.6 Stanovení DNA pomocí metody real-time PCR.....	49

3.1.7	Zpracování a analýza dat	52
3.2	Výsledky	55
3.2.1	Spektrofotometrické stanovení DNA v kapce	55
3.2.2	Spektrofotometrické stanovení DNA v kyvetě	61
3.2.3	Spektrofotometrické stanovení DNA v destičce	67
3.2.4	Fluorimetrické stanovení DNA	73
3.2.5	Stanovení DNA pomocí metody real-time PCR	79
3.2.6	Porovnání metod	82
4	Diskuze a závěry	85
5	Seznam literatury	88
6	Zdroje použitých obrázků	91

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1	Strukturální vzorce dusíkatých bází.....	16
Obrázek 2	Porovnání molekulární struktury DNA a RNA	17
Obrázek 3	Uspořádání dvouřetězcové DNA	18
Obrázek 4	Biologicky významné konformace DNA.....	19
Obrázek 5	Centrální dogma molekulární biologie	20
Obrázek 6	Znázornění bakteriální a plazmidové DNA	21
Obrázek 7	Případy štěpení restrikcí endonukleázami	22
Obrázek 8	Znázornění absorpce světla roztokem v kyvetě a v mikrotitrační destičce	24
Obrázek 9	Příklad uspořádání kyvetového spektrofotometru s jeho základními částmi.....	25
Obrázek 10	Znázornění Stokesova posunu	27
Obrázek 11	Příklad instrumentace kyvetového (spektr)fluorimetru	27
Obrázek 12	Exponenciální nárůst počtu molekul DNA během PCR cyklů.....	29
Obrázek 13	Průběh a kinetika qPCR reakce.....	31
Obrázek 14	Grafické znázornění odhadu meze detekce (LOD).....	35
Obrázek 15	Kalibrační křivka s uvedením lineárního rozsahu, pracovního rozsahu, meze stanovitelnosti a meze detekce.....	36
Obrázek 16	Spektrofotometr Nanodrop 2000c.....	43
Obrázek 17	Infinite® 200 PRO series	46
Obrázek 18	Termocykler CFX96 Touch.....	50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Měřené koncentrační rozsahy jednotlivých typů DNA vyznačené světle šedou barvou	42
Tabulka 2 Ověření linearity měření a určení případné horní hraniční hodnoty pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu u spektrofotometrické kapkové metody stanovení DNA	60
Tabulka 3 Ověření linearity měření a určení případné horní hraniční hodnoty pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu u spektrofotometrické destičkové metody stanovení DNA	66
Tabulka 4 Ověření linearity měření a určení případné horní hraniční hodnoty pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu u spektrofotometrické kyvetové metody stanovení DNA	72
Tabulka 5 Ověření linearity měření a určení případné horní hraniční hodnoty pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu u fluorimetrické metody stanovení DNA	78
Tabulka 6 Stanovení limitu detekce pomocí FNR a ověření linearity pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu	81

SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1** Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce....55
- Graf 2** Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin linearizovaného plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce56
- Graf 3** Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce56
- Graf 4** Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce.57
- Graf 5** Znázornění relativní směrodatné odchylky sloupcovými grafy pro všechny typy DNA stanovené pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce.....57
- Graf 6** Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce....58
- Graf 7** Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce.59
- Graf 8** Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce.....59
- Graf 9** Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě ..61
- Graf 10** Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin linearizovaného plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě.....62
- Graf 11** Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě.....62
- Graf 12** Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě. ...63
- Graf 13** Znázornění relativní směrodatné odchylky sloupcovými grafy pro všechny typy DNA stanovené pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě.....64
- Graf 14** Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě ..65

Graf 15	Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě.....	65
Graf 16	Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě. ..	66
Graf 17	Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce	67
Graf 18	Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce..	68
Graf 19	Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce	68
Graf 20	Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce	69
Graf 21	Znázornění relativní směrodatné odchylky sloupcovými grafy pro všechny typy DNA stanovené pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce	69
Graf 22	Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce.	70
Graf 23	Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce.....	71
Graf 24	Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce	71
Graf 25	Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí fluorimetrického stanovení.....	73
Graf 26	Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin linearizovaného plazmidu pomocí fluorimetrického stanovení.....	74
Graf 27	Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí fluorimetrického stanovení.....	74
Graf 28	Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí fluorimetrického stanovení.....	75

Graf 29 Znázornění relativní směrodatné odchylky sloupcovými grafy pro všechny typy DNA stanovené pomocí fluorimetrického stanovení.....	75
Graf 30 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí fluorimetrického stanovení.....	76
Graf 31 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin linearizovaného plazmidu pomocí fluorimetrického stanovení.....	76
Graf 32 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí fluorimetrického stanovení.....	77
Graf 33 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí fluorimetrického stanovení.....	77
Graf 34 Krabicový graf reprezentující naměřené Ct hodnoty jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí metody real-time PCR.....	79
Graf 35 Krabicový graf reprezentující naměřené Ct hodnoty jednotlivých koncentračních hladin lineárního plazmidu pomocí metody real-time PCR	79
Graf 36 Krabicový graf reprezentující naměřené Ct hodnoty jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí metody real-time PCR	80
Graf 37 Porovnání metod pomocí bodového grafu v závislosti průměrné naměřené koncentrace na předpokládané koncentraci genomové DNA.....	82
Graf 38 Porovnání metod pomocí bodového grafu v závislosti průměrné naměřené koncentrace na předpokládané koncentraci linearizovaného plazmidu.....	83
Graf 39 Porovnání metod pomocí bodového grafu v závislosti průměrné naměřené koncentrace na předpokládané koncentraci cirkulárního plazmidu.....	83
Graf 40 Porovnání metod pomocí bodového grafu v závislosti průměrné naměřené koncentrace na předpokládané koncentraci oligonukleotidu.....	84

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANOVA – Analysis of variance – Analýza rozptylu

Ct – Threshold cycle – Cyklus prahu

DMSO – Dimethylsulfoxid

DNA – 2- deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – Dvouvláknová DNA

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid – Ethylendiamintetraoctová kyselina

FAM – Carboxyfluorescein – Fluorescenční barvivo

FNR – False negative rate – Četnost falešně negativních výsledků

FRET – Förster resonance energy transfer – Försterův rezonanční přenos energie

GMO – Geneticky modifikovaný organismus

LOD – Limit of detection – Limit detekce

LOQ – Limit of quantification – Limit kvantifikace

PCR – Polymerase chain reaction – Polymerázová řetězová reakce

qPCR – Quantitative polymerase chain reaction – Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RNA – Ribonukleová kyselina

RXN – Reaction – Reakce

SD – Směrodatná odchylka

ssDNA – Jednovláknová DNA

Taq – *Thermus aquaticus*

TE – Tris/EDTA (pufr)

tRNA – Transferová ribonukleová kyselina

UV/VIS – Ultrafialové / Viditelné (záření)

L – Linearizovaný plazmid

P – Cirkulární plazmid

G – Genomová DNA

N – Oligonukleotid

ÚVOD

Stanovení obsahu nukleových kyselin ve vzorcích je nejen v molekulární biologii běžnou záležitostí. Informace o koncentraci DNA či RNA je zapotřebí pro správný průběh následných pokročilých analytických metod, proto musí být postupy pro jejich kvantifikaci dostatečně spolehlivé a přesné. Roztoky s nukleovými kyselinami by neměly obsahovat žádné interferující látky, je tedy třeba stanovovat také jejich čistotu. V laboratořích se nejčastěji používají metody spektrofotometrické, fluorimetrické a real-time PCR. Právě tato stanovení jsou porovnávána v diplomové práci, a to na čtyřech různých typech DNA, konkrétně na genomové DNA, linearizovaném plazmidu, cirkulárním plazmidu a oligonukleotidu. Metody jsou komparovány jak z hlediska výkonnostních parametrů, tak s ohledem na praktické požadavky jako jsou cena, spotřeba vzorku či reagensů apod. Nejvhodnější způsob měření kvantity nukleových kyselin není znám, i proto se tímto tématem diplomová práce zabývá a může tak pomoci při zavádění interních laboratorních protokolů. Zároveň také ověřuje funkčnost všech použitých metod.

1 TEORETICKÁ ČÁST

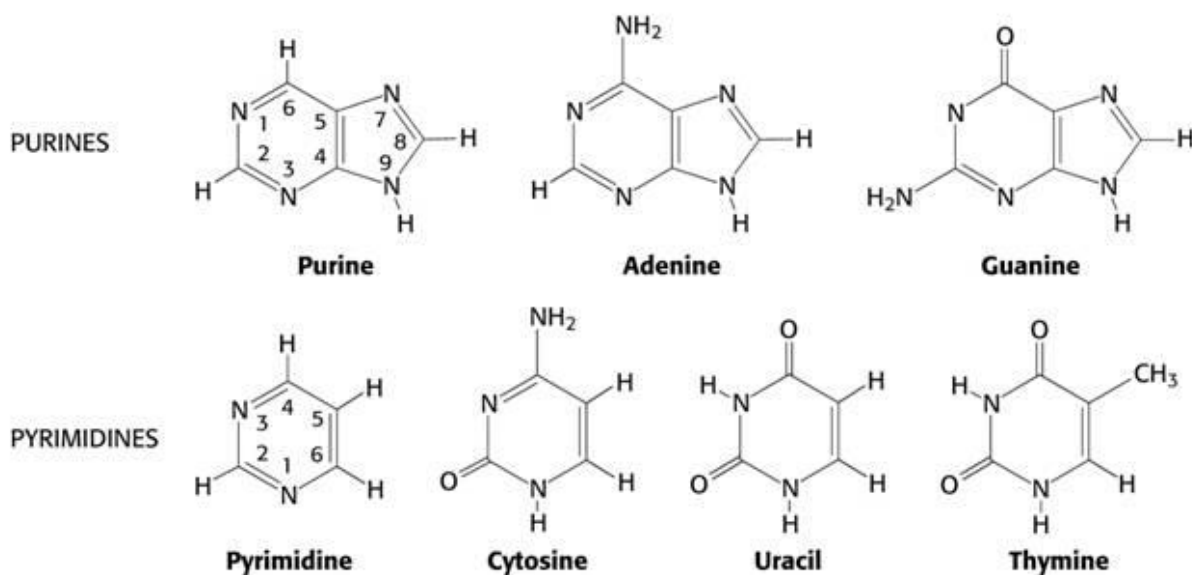
1.1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny patří mezi biopolymery, tedy přírodní makromolekulární látky, které jsou spolu s proteiny základními složkami všech živých soustav, všech buněk i virů. Slouží k uchování, přenosu a expresi genetické informace. Přeneseně tedy určují průběh biosyntézy bílkovin v buňkách (Rosypal 2006).

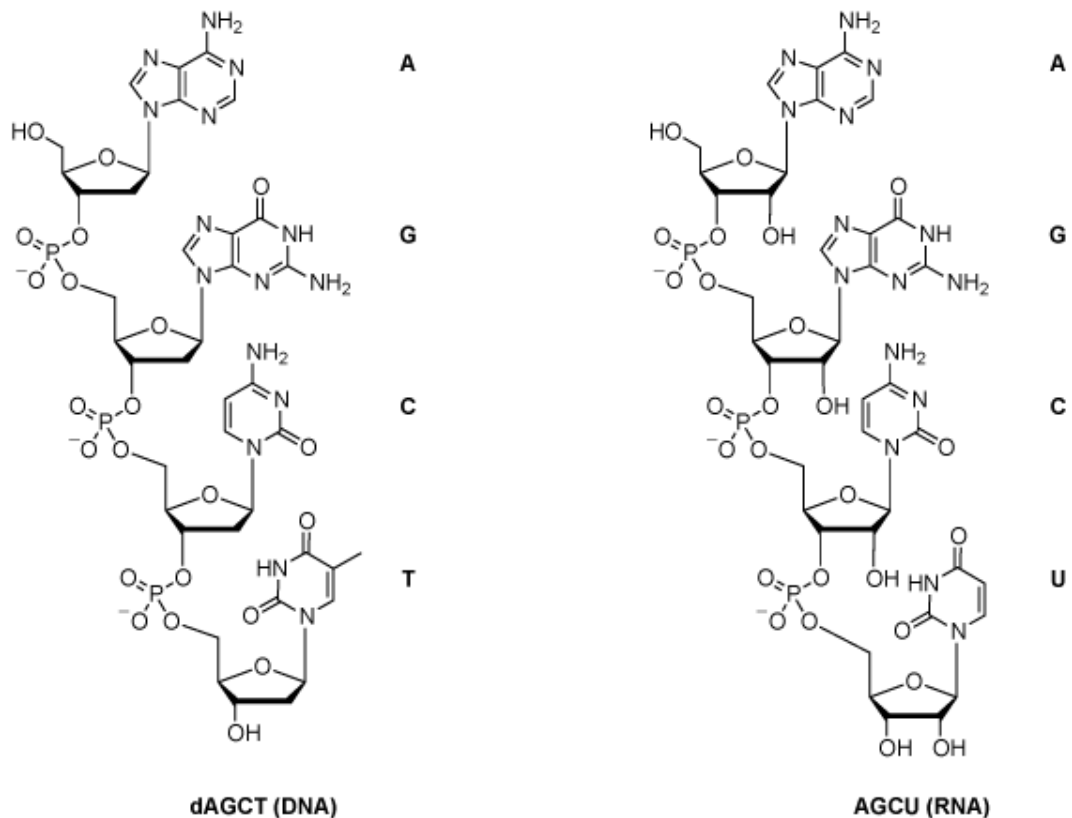
1.1.1 Struktura nukleových kyselin

Monomery nukleových kyselin jsou nukleotidy. Ty jsou tvořeny vždy spojením dusíkaté báze – purinové a pyrimidinové deriváty, pětiuhlíkaté cukerné složky – pentózy a kyseliny fosforečné. Pentózou je buď 2'-deoxy- β -D-ribóza v případě kyseliny deoxyribonukleové (DNA), v případě ribonukleové kyseliny (RNA) je to β -D-ribóza. Pro označení atomů na cukerném zbytku se používá číslování s čárkami postupně směrem od báze, jejíž atomy pro odlišení označeny nejsou (Štípek 1997; Rosypal 2006).

Na cukr se v pozici 5' esterovou vazbou váže zbytek kyseliny fosforečné, v poloze 1' pak báze pomocí N-glykosidické vazby. Běžnými dusíkatými bázemi u DNA jsou adenin, guanin, thymin a cytosin. U RNA je thymin nahrazen uracilem. V poloze 3' je pentóza spojena přes sousední kyselinu fosforečnou k vedlejší pentóze. Vzniká tak vlákno polynukleotidů (Bansal 2003).



Obrázek 1 Strukturální vzorce dusíkatých bází (Biochemické publikace Orion nedatováno)

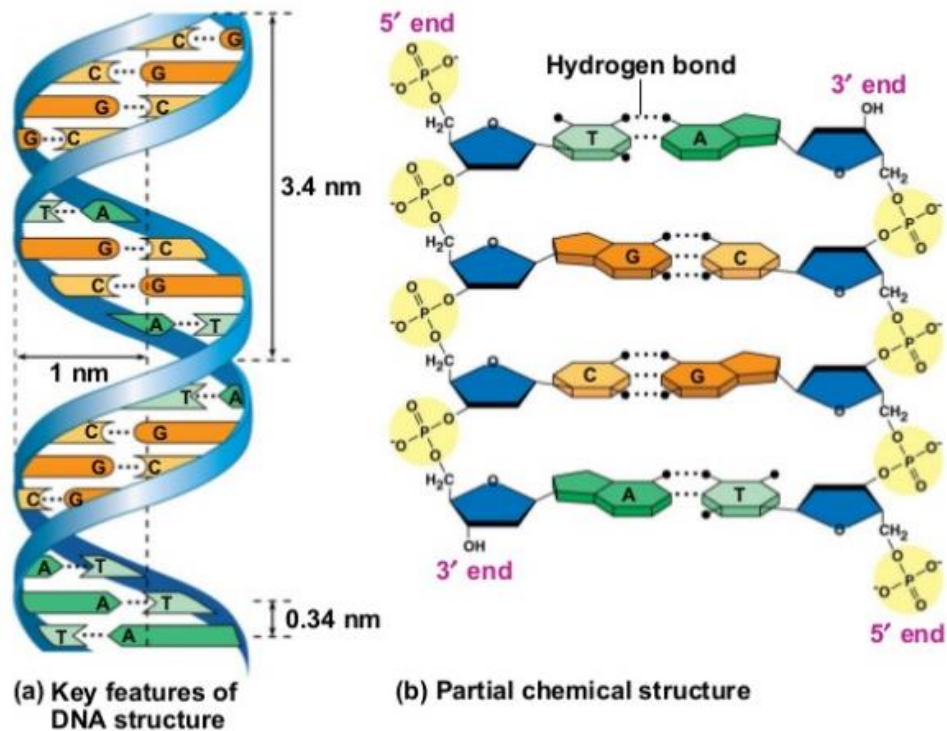


Obrázek 2 Porovnání molekulární struktury DNA a RNA (Biology 2016)

Dvě polynukleotidová vlákna vytváří nejčastěji pravotočivou dvoušroubovici, vlákna jsou potom uspořádána antiparalelně. Označení antiparalelní nám říká, že směry jejich cukr – fosfátových koster vedou opačně. Tímto jsou také dané odlišně polarizované konce molekuly DNA, a to 3' konec a 5' konec. Mezi bázemi protějších vláken dochází ke slabým vazebným interakcím, konkrétně k vazbám vodíkovými můstky. Tato vazba je oproti kovalentní vazbě asi 20 – 30× slabší. Vodíkovými můstky se k sobě váží vždy dvě komplementární báze, jedna purinová, druhá pyrimidinová. Adenin se spojuje dvěma vodíkovými vazbami s thyminem nebo uracilem, třemi potom cytosin s guaninem. Jiné kombinace bází by silně deformovaly tvar dvoušroubovice, proto se v živých organismech spíše nevyskytují. Na vnějším povrchu dvoušroubovice rozeznáváme malý a velký žlábek. V těchto místech jsou báze vystaveny vnějšímu prostředí a jsou s ním schopny interagovat (Rosypal 2006; Watson a Crick 1953; Bansal 2003).

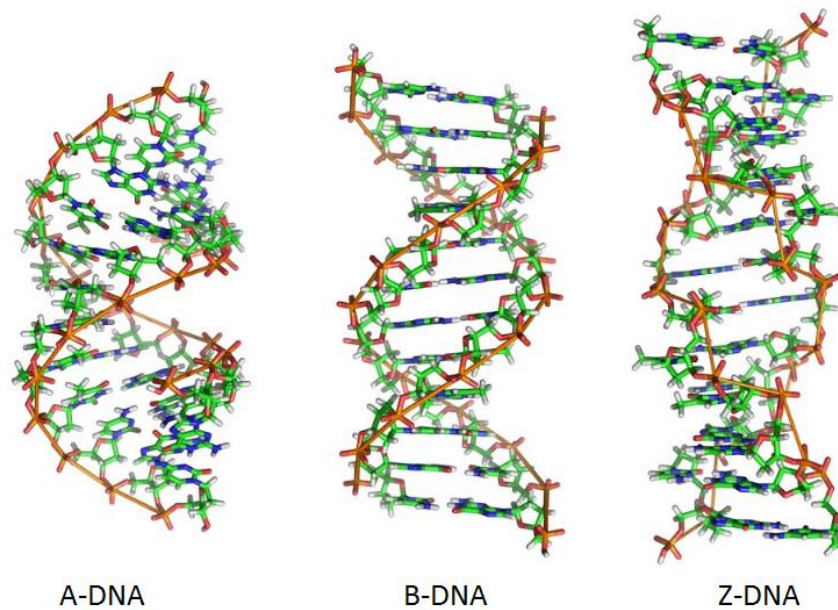
Kromě vodíkových můstků podporuje stabilitu nukleových kyselin také další typ interakcí, tzv. stohování neboli stacking. Páry bází interagují vzájemně ve vertikálním směru pomocí π -elektronů na aromatických cyklech bází. Mezi další stabilizující mechanismy patří

působení kationtů. Ty redukuje elektrostatičkovou sílu záporně nabitých fosfátových skupin v pentafosfátových kostrách. Pevnost zajišťuje také hydrofobní prostředí uvnitř dvoušroubovice, které je tvořeno nepolárními bázemi. Do okolního hydrofilního prostředí jsou pak exponovány nabité fosfáty (Rosypal 2006, 2003; Bansal 2003).



Obrázek 3 Uspořádání dvouřetězcové DNA (Slide share 2015)

Nejběžnější uspořádání DNA je tzv. B-forma DNA. Jde o pravotočivou strukturu s průměrem asi 2 nm, která se vyznačuje charakteristickým kolmým uspořádáním bází vůči ose dvoušroubovice. Na jednu otáčku připadá cca 10,5 párů bází. Kromě této pravotočivé B-formy DNA, jsou ještě dvě další význačné struktury. Jednou z nich je A-forma, je také pravotočivá, ale širší a poněkud plošší. Má vyšší sklon párů bází vůči ose dvoušroubovice, v jednom závitě je 11 párů bází a uvnitř vzniká výrazná axiální dutina. Třetí biologicky významné uspořádání je Z-konformace. Oproti předchozím formám je levotočivá, opakují se v ní vždy dva páry bází a má schodovitou strukturu. Jednomu závitě náleží 12 párů bází a konformace závisí na vyšší iontové síle prostředí. Celkově jsou přechody mezi konformacemi závislé právě na iontové síle a také vlhkosti (Leslie et al. 1980; Bansal 2003; Points et al. 2012).



Obrázek 4 Biologicky významné konformace DNA (Biological exceptions 2013)

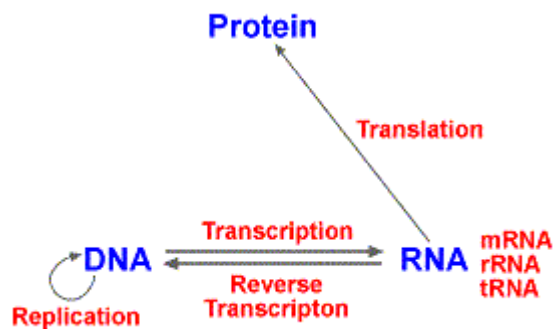
Prostorová struktura syntetizovaných jednovláknových oligonukleotidů není přesně definována. Jejich uspořádání silně závisí na pH a liší se u jednotlivých typů bází i jednotlivých nukleotidů. Podle rentgenových snímků mají tvar pravotočivé dvoušroubovice s tím, že thyminové báze nestohují (Saenger 1984).

1.1.2 Význam DNA

Deoxyribonukleová kyselina je nositelkou genetické informace všech organismů, ale i některých virů, u nich je však někdy nahrazena RNA. RNA však chybí jakékoliv reparativní mechanismy, často tak viry mutují. DNA je oproti tomu mnohem stabilnější a schopna vlastních oprav. Ve své struktuře kóduje a předurčuje vývoj a vlastnosti celého organismu. Genetickou informací je v podstatě podmíněna existence všech buněčných struktur i biomolekul. Jedná se o k životu nezbytnou látku. Bez ní přežijí buňky jen omezenou dobu, nejsou schopny vyrábět si důležité bílkoviny, proto jsou časem opotřebovány, poškozovány a musí být z těla odstraněny jako např. erythrocyty (Rosypal 2006; Points et al. 2012).

DNA se obvykle vyskytuje v lineárních chromozomech u eukaryot, v cirkulárních chromozomech nebo plazmidové DNA u prokaryot. Sada chromozomů v buňce tvoří genom. Lidský genom má přibližně 3,2 miliardy párů bází, které jsou uspořádané do 46 chromozomů. Informace v DNA je uložena v konkrétních úsecích, genech. Genetická informace je uplatňována podle centrálního dogmatu molekulární biologie. Během transkripce se informace kódovaná v genu, sekvence nukleotidů, přepisuje do komplementární sekvence

RNA. Obvykle se pak tato kopie RNA překládá do sekvence aminokyselin pro výrobu konkrétních proteinů, tento krok je nazýván translací. Další možností buňky je zkopírování genetické informace v procesu zvaném replikace DNA. Velká část genomu se však nepřepisuje v RNA a není součástí žádného genu. Jedná se o tzv. nekódující DNA a její role není dostatečně objasněna, často ale pomáhá regulovat expresi okolních genů (Vondrejs 2003; Points et al. 2012).



Obrázek 5 Centrální dogma molekulární biologie (DNA Basics of structure and analysis 1998)

1.1.3 Typy DNA

Z hlediska umístění dělíme DNA na jadernou a mimochromozomální.

1. Jaderná (chromozomální)

Většina DNA se nachází uvnitř eukaryotického buněčného jádra. Spolu s histony a dalšími proteiny tvoří chromozomy. Ty jsou pozorovatelné již světelným mikroskopem, nejvíce při buněčném dělení, a slouží k rovnoměrnému rozdělení genetické informace do dceřiných buněk (Alberts 2004).

2. Mimochromozomální

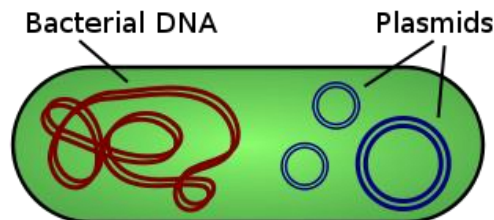
Jádro buňky však není jediným místem uchování DNA. Existuje také mitochondriální či plastidová DNA. V mitochondriích jde o cirkulární strukturu DNA a geny, které kóduje, se podílí na jejich enzymatickém vybavení a protesyntetickém aparátu. Genetická informace pak neobsahuje introny a je značně komprimována. U prokaryotických organismů se pak DNA nachází volně v cytoplazmě buď ve formě plazmidu, nebo je součástí cirkulárních bakteriálních chromozomů – nukleoidů (Alberts 2004; Rosypal 2006).

Pro data ke zpracování této diplomové práce bylo využito těchto druhů DNA:

1. Cirkulární plazmidová DNA

Jak již bylo naznačeno, jde o poměrně malou typicky kruhovou molekulu DNA, která je schopná replikace. Tato kruhová struktura, však snadno přechází ve struktury sekundární, potažmo terciální, a to v podobě dodatečného šroubovicového vinutí již existující dvoušroubovice, tzv. nadšroubovicového neboli supercoiling. Tento jev má řadu regulačních rolí a jiných funkcí. Vliv těchto konformací může mít také vliv na absorpční či fluorescenční vlastnosti a také na homogenitu roztoků obsahující plazmid (Kato et al. 2011; Vondrejs 2003).

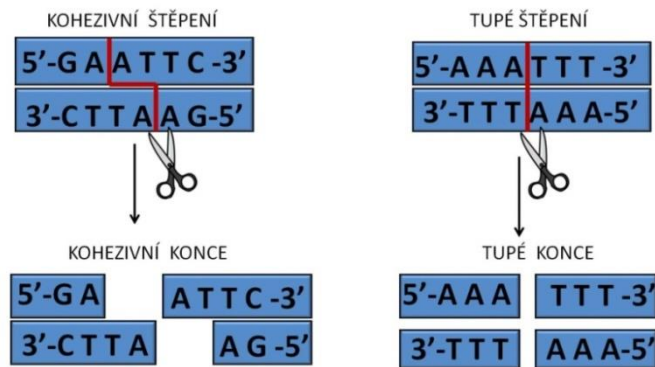
Velikost tohoto typu DNA se pohybuje od 1 do asi 200 kbp, přičemž počet identických plazmidů v jedné buňce se může pohybovat od jedné do tisíců. Nese genetickou informaci prokaryotických organismů, ale můžeme ji nalézt i u některých eukaryot. Je umístěna volně v cytoplazmě. Plazmidová DNA často obsahuje geny pro rezistenci k antibiotikům nebo pro virulenční faktory. Umožňuje přijímat genetickou informaci jiných organismů, ačkoliv není jejich potomkem, jde o tzv. horizontální genový transfer (Vondrejs 2003; Witz a Stasiak 2010).



Obrázek 6 Znárodnění bakteriální a plazmidové DNA (Biology blog 2011)

2. Linearizovaná plazmidová DNA

Linearizací plazmidu rozumíme otevření jeho kruhové struktury a využívá se především u klonování. Plazmidovou DNA otevíráme, pokud chceme do jeho sekvence vložit cizí DNA, tzv. insert. Pomocí restričních endonukleáz se štěpí v daném místě jeho kruhová molekula. Vzniklé konce pak mohou být buď tupé nebo ostré, kohezivní, lepivé. U klonování se využívá vzniklých lepivých konců, které jsou schopny reasociace s jinými fragmenty. Linearizací plazmidů se ruší veškeré sekundární/terciální struktury (Vondrejs 2003; Hatina a Sykes 1999; Kato et al. 2011).



Obrázek 7 Případy štěpení restrikními endonukleázami (LAB Guide 2014)

3. Genomová DNA

Toto označení nese jaderná DNA, která zahrnuje soubor všech genů daného organismu, tedy genom. Jejich velikost se různě liší, pro představu nejmenší genomy mají většinou viry, již od 5 kbp, největší pak rostliny, až po 149 Gbp. Genomová DNA v sobě zahrnuje kódující i nekódující úseky. Získává se izolací přímo z buněk, chromozomů či klonováním celé nebo části sekvence této DNA (Points et al. 2012).

4. Oligonukleotid

Jedná se o krátkou jednovláčkovou DNA. V případě oligonukleotidů pojmem „krátkou“ rozumíme několik desítek nukleotidů. Nejčastěji se užívají jako primery při sekvenování či polymerázové řetězové reakci (PCR). Nasedají na jednořetězcovou templátovou DNA a určují odkud má DNA-polymeráza začít syntetizovat komplementární vlákno (Vondrejs 2003).

1.2 Kvantitativní stanovení nukleových kyselin

V molekulární biologii je kvantifikace nukleových kyselin naprosto běžná. Spolehlivé metody pro stanovení přesné koncentrace DNA či RNA jsou nezbytné pro četné biologické aplikace od tradičních molekulárně biologických metod jako je například restrikční analýza, Southern blotting a PCR. Modernější uplatnění nacházíme u kvantifikace vzorků z geneticky modifikovaných organismů (GMO), detekce DNA v lécích vyrobených z rekombinantních organismů, případně u lékařských diagnóz virů a rakovin. Nejčastěji se provádí za účelem stanovení průměrných koncentrací DNA nebo RNA, pomáhá zjistit, zda je nukleová kyselina ve vzorku vůbec přítomná, ale určuje i její čistotu. Reakce, kde se využívají nukleové kyseliny, vyžadují pro správný průběh a optimální výkon konkrétní množství DNA či RNA a zároveň nepřítomnost jakýchkoli interferujících látek. V praxi je používáno více metod, ale jejich aplikace není univerzální. Proto se tato diplomová práce zabývá jejich vzájemným porovnáním (Li et al. 2014; Šmarda et al. 2005; Káš et al. 2005).

Nejpoužívanějšími metodami pro stanovení koncentrace DNA/RNA jsou spektrofotometrické stanovení, fluorimetrické stanovení v přítomnosti DNA/RNA barviva a také metoda real-time PCR s interkalačními barvivy. Můžeme se setkat například také s metodou dot/slot hybridizace, ale ta se v současné době příliš nepoužívá (Li et al. 2014).

1.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin

Spektrofotometrie je založena na interakci analyzovaného roztoku s elektromagnetickým zářením, kdy částice vzorku absorbují část tohoto záření. Díky absorpci fotonu dochází ke změně energie molekuly a excitaci elektronů do vyšší energetické vrstvy. Zbytek záření potom prochází roztokem a je detekováno přístrojem. Intenzitu absorpce látek rozpuštěných v roztoku lze měřit spektrofotometrem. Množství světla, ať už pohlceného, odraženého, či propuštěného určitým roztokem je závislé jak na koncentraci dané látky, tak na vlnové délce záření. Intenzita prošlého světla (I_0) je logicky vždy menší než intenzita světla, kterému je látka vystavena (I). Toto „zeslabení“ intenzity popisuje veličina zvaná transmitance (T). Nabývá hodnot od 0 do 1, přičemž nule odpovídá situace, kdy je veškeré světlo pohlceno a jedné, kdy není žádné záření zachyceno roztokem, tudíž veškeré prošlo skrz analyzovaný vzorek (Navrátil a Rosina 2005; Hrazdira a Mornstein 2001; Gore 2000).

$$T = \frac{I}{I_0}$$

T ... transmittance

I ... intenzita světla, které prošlo vzorkem

I_0 ... intenzita světla aplikovaného na vzorek

Kromě transmittance se ve spektrofotometrii častěji setkáváme s fyzikální veličinou zvanou absorbance (A). Zjednodušeně řečeno vyjadřuje schopnost molekul dané látky pohlcovat elektromagnetické záření o určité vlnové délce. Z důvodu exponenciálního úbytku intenzity světla po průchodu záření látkou je ve vzorci použita logaritmická funkce (Navrátil a Rosina 2005; Gore 2000).

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\log T$$

A ... absorbance

Kvantifikace pomocí spektrofotometrického měření je založená na Lambert-Beerově zákoně, který popisuje vztah mezi absorbancí a koncentrací dané látky (Rosina 2013).

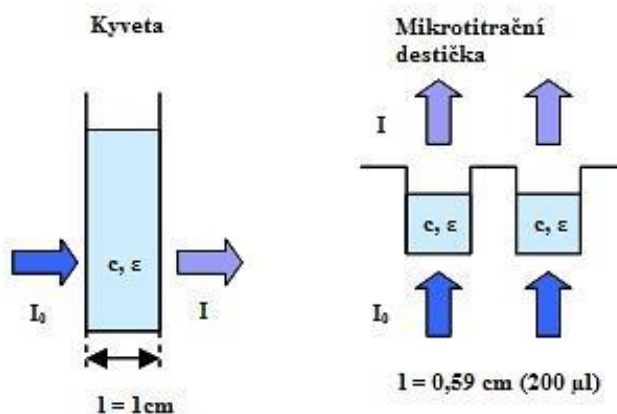
$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \times l \times c$$

A_λ ... absorbance při určité vlnové délce

ε_λ ... molární absorpční koeficient pro určitou vlnovou délku [$l \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

l ... délka (tloušťka) kyvety [cm]

c ... koncentrace vzorku

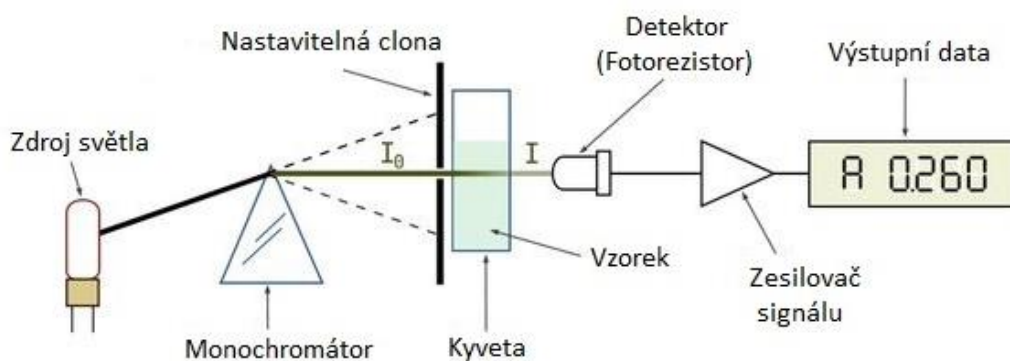


Obrázek 8 Znázornění absorpce světla roztokem v kyvetě a v mikrotitrační destičce (upraveno dle Biotek 2009)

V případě aplikace monochromatického světla je při stálé koncentraci vzorku během celého měření a při použití stejného rozpouštědla a konstantní délce kyvety Lambert-Beerův zákon platný a použitelný. Je však limitován, a to např. fluorescencí nebo fosforescencí vzorku, případně rozptylem světla na nečistotách přítomných v roztoku apod. Přesto patří mezi nejužívanější a nejspolehlivější metody určení koncentrace látek v roztoku (Rosina 2013; Navrátil a Rosina 2005).

Nejběžnějším přístrojem pro fotometrická měření je spektrofotometr. Skládá se ze zdroje záření, kterým je nejčastěji deuteriová výbojka pro měření v UV oblasti nebo halogenové lampy pro oblast viditelného světla. Za žárovkou bývá sada čoček a zrcadel pro usměrnění paprsku na monochromátor. Tím je např. difrakční mřížka, která rozkládá polychromatické světlo na jednotlivé složky a odděluje tak paprsek konkrétní vlnové délky od ostatních. Takto vytvořené monochromatické záření prochází vzorkem a jeho intenzita je měřena detektorem. Následuje výstupní zařízení s případným softwarem pro podrobnou analýzu dat (Hrazdira a Mornstein 2001; Králová 2001).

Vzorky vkládáme do spektrofotometru různě, existují přístroje kyvetové nebo kapkové. Právě kapkové jsou vhodné i pro měření stopových vzorků, pro kvantifikaci stačí pouhý 1 μl . Pro simultánní analýzu více vzorků jsou pak vhodné přístroje „platereaderové“, kam se vkládá vícejamková destička (Hrazdira a Mornstein 2001).



Obrázek 9 Příklad uspořádání kyvetového spektrofotometru s jeho základními částmi (upraveno dle Instructables 2011)

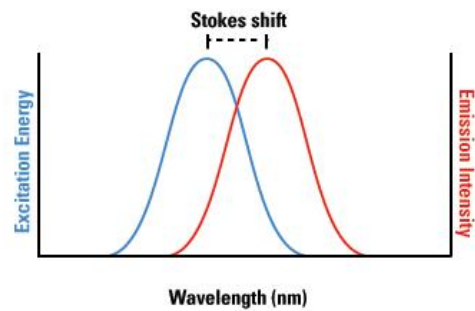
Grafickým vyjádřením závislosti absorpce nebo energie na vlnové délce elektromagnetického záření procházejícího přes roztok dané látky je tzv. absorpční spektrum. Popisuje vlastnosti prostředí a je charakteristické svým tvarem a polohou maxima, kterého se při kvantifikačních metodách využívá (Hrazdira a Mornstein 2001; Gore 2000).

Nukleové kyseliny obsahují konjugované dvojně vazby, které jsou obsaženy v purinových a pyrimidinových kruzích. Tyto dvojně vazby mají absorpční maximum při 260 nm, proto je intenzita absorbance při této vlnové délce přímo úměrná koncentraci nukleových kyselin. Pro zjištění čistoty vzorků je vhodné měřit také absorbanci při 280 nm, případně 230 nm. Nukleové kyseliny jsou totiž často kontaminovány proteiny či fenolickými a jinými interferujícími látkami, díky použitým metodám jejich extrakce a izolace z buněk. Při vlnové délce 280 nm tedy detekujeme znečištění proteiny a při 230 nm fenolickými látkami. Čistotu vzorku pak lze posoudit poměrem absorbancí při 260 nm a 280 nm, případně 230 nm (Li et al. 2014; Navrátil a Rosina 2005).

Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin je nejčastěji používaná technika. Mezi její výhody patří snadný postup, finanční dostupnost a nízká spotřeba materiálu (u kapkových přístrojů dokonce minimální spotřeba materiálu). Metoda však bývá nedostatečná pro měření nízkých koncentrací dvouřetězcové DNA. Pro správné vyhodnocení je také třeba mít dostatečně čisté vzorky, jelikož nerozlišuje mezi nukleotidy, jednořetězcovou DNA, RNA, či některými kontaminujícími látkami a na jejich přítomnost tak neupozorní (Li et al. 2014; Šmarda et al. 2005).

1.2.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace NK

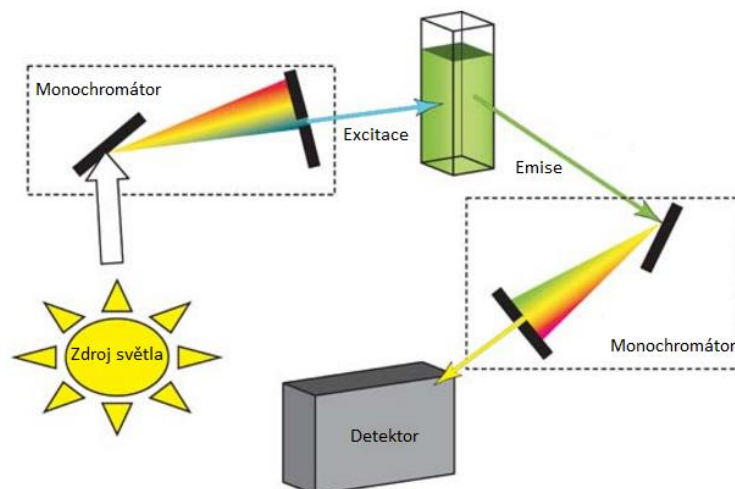
Fluorimetrie je založena na fotoluminiscenci, která je vyvolána buď účinkem dopadajícího záření, nebo dopadajících částic. Fluoreskující látka je pomocí monochromatického světla excitována, tím některý elektron nabyde vyšší energie a přesune se do vyšší energetické hladiny. Atom je však takto nestabilní, proto se při přechodu zpět do základního energetického stavu vyzáří část energie ve formě fotonů, které jsme schopni detekovat a změřit, a část ve formě vibrační energie – tepla. Toto emitované sekundární záření je nazýváno fluorescencí a je charakterizováno vyzářením energie ve velmi krátké době, přibližně 10^{-9} až 10^{-6} s. Nejčastěji fluorescenci pozorujeme u organických látek, především u sloučenin obsahující aromatické cykly. Energie emitovaného záření je vždy nižší než energie záření excitačního, emitované světlo má tedy vždy větší vlnovou délku a naopak. Rozdílem excitačního a emisního maxima je jev zvaný Stokesův posun a bývá definován pro každý fluorochrom (Li et al. 2014; Hrazdira a Mornstein 2001; Káš et al. 2005).



Obrázek 10 Znárodnění Stokesova posunu (Thermo Fisher Scientific nedatováno)

Fluorimetrická metoda je druhým nejužívanějším způsobem měření koncentrace nukleových kyselin. Stanovuje se specifická fluorescence barviva, fluoroforu, které se specificky váže k molekulám DNA (RNA) a fluoreskuje po excitaci. Intenzita fluorescence odpovídá množství navázaného barviva, toto množství pak odpovídá množství molekul, ke kterému se fluorofor váže. Koncentrace DNA vzorků pak může být vypočtena porovnáním dat se standardní křivkou vyrobenou z referenčních roztoků o známé koncentraci DNA. Tato metoda je schopná měřit správně koncentraci nukleových kyselin i ve směsi s proteiny, ale na kontaminanty opět neupozorní. Často se doporučuje kombinovat fluorimetrii a spektrofotometrii pro přesné a citlivé stanovení (Rengarajan et al. 2002; Rosina 2013; Kopecká et al. 1995).

Fluorimetry používají nejčastěji vysokotlaké výbojky jako zdroje budícího záření. Toto světlo prochází excitačním monochromátorem a dopadá na vzorek v kyvetě nebo v destičce. Detekováno a měřeno je potom záření emisní – oddělené emisním monochromátorem (Hrazdira a Mornstein 2001).



Obrázek 11 Příklad instrumentace kyvetového (spektr)fluorimetru (upraveno dle Openstax CNX 2011)

Nejběžněji užívanými fluorofory pro kvantifikaci nukleových kyselin jsou ethidium bromid, Hoescht 33258, PicoGreen, SYBR Green I, OliGreen a další (Rengarajan et al. 2002).

V experimentální části této diplomové práce byly použity následující dva fluorofory:

1. PicoGreen

Tento fluorofor selektivně váže dvouvláknovou dsDNA, jeho excitační maximum je 485 nm, emisní 535 nm. Vykazuje vysokou afinitu k DNA, je proto možné pozorovat mimořádně vysoký vzestup fluorescence po jeho navázání na DNA. Pozadí je přitom takřka zanedbatelné, nevázaný fluorofor prakticky nefluoreskuje. PicoGreen je velmi stabilní na světle, což umožňuje delší expoziční časy a vyšší flexibilitu testu. Další výhodou je jednoduchost použití a kompatibilita se standardními spektrofluorimetry (ANON. 2008a; Rengarajan et al. 2002).

2. OliGreen

Toto vysoce citlivé zelené barvivo je určeno ke stanovení koncentrace oligonukleotidů a jednovláknové ssDNA. Vlnová délka excitace je 500 nm, emise 525 nm. Mezi jeho výhody patří kromě citlivosti také přesnost, široký pracovní rozsah a snadné provedení experimentu v běžných fluorimetrech či spektrofluorimetrech (ANON. 2008b).

Oproti fotometrickým metodám má spektrofluorimetrie vyšší specifitu, v úvahu je totiž bráno kromě absorpčního (excitačního) spektra také emisní spektrum dané látky, navíc je fluorimetrie považována za jednu z nejcitlivějších molekulárních technik pro měření koncentrace DNA a nabývá proto na popularitě. Nevýhodou je vyšší finanční náročnost a složitější postup. Metoda je také velmi citlivá na změny pH, polaritu nebo iontové síly fluorescenčních činidel, dále na přítomnost tzv. zhášeců, které jsou zodpovědné za sestup excitovaného elektronu na nižší energetickou hladinu, aniž by byl vyzářen foton (Káš et al. 2005; Hrazdira a Mornstein 2001).

1.2.3 Real-time PCR (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce je postup založený na principu klasické PCR, ale oproti ní umožňuje kvantifikaci v reálném čase (Šmarda et al. 2005).

Klasická PCR je metoda rychlého zmnožení – amplifikace určitého úseku DNA. Amplifikovaný úsek, templát, je ohraničen oligonukleotidy, tzv. primery, které jsou většinou 20 až 25 nukleotidů dlouhé. Komplementárně nasedají na konce vybraného úseku a právě od nich začíná syntéza DNA. Tu provádí termostabilní DNA polymeráza, nejčastěji

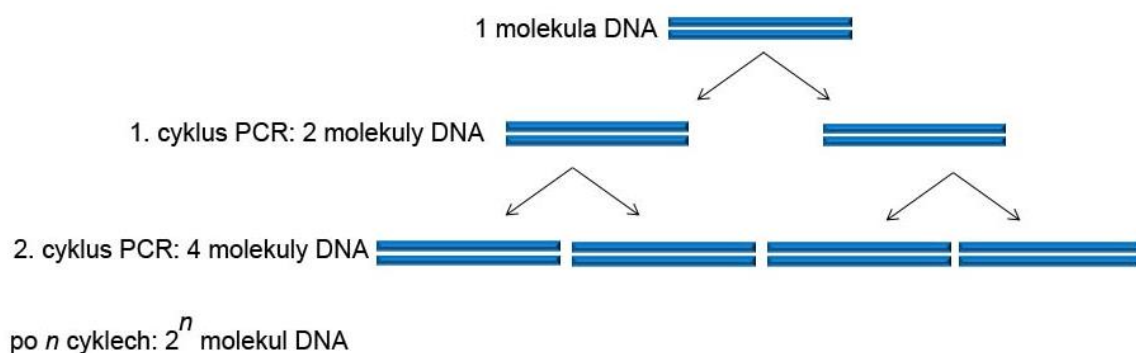
Taq polymeráza, která pochází z bakterie *Thermus aquaticus*. Při reakci se využívá přístroje termocykléru, který zajišťuje cyklické změny teplot, což umožňuje denaturaci DNA, nasednutí primerů a syntézu řetězců DNA. Právě opakování těchto tří kroků je základem PCR. Dostatečné amplifikace je dosaženo obvykle po 30 – 35 cyklech (Kopecká et al. 1995; Pelt-Verkuil et al. 2010).

1) **Denaturace DNA** – dvouvláknová DNA je zahřívána na teplotu okolo 95°C po dobu 5 – 30 s, dochází tak k rozvolnění dvoušroubovice vlivem narušení vodíkových vazeb a vznikají dvě jednovláknové DNA.

2) **Hybridizace s primery** – teplota je snížena obvykle na 50 – 65°C, kdy nasedají primery na specifická místa jednovláknových DNA.

3) **Syntéza DNA (elongace)** – teplota závisí na použité DNA polymeráze, přičemž pro Taq je optimálních 72 – 80°C. DNA polymeráza se váže na dvouvláknové úseky DNA – primer a syntetizuje komplementární vlákno k původní molekule DNA od 5' ke 3' konci. Při syntéze vzniká z jednořetězcové molekuly dvouřetězcová (Šmarda et al. 2005; Pelt-Verkuil et al. 2010).

Dvouvláknová DNA je následnou denaturací separována na dvě jednovláknové molekuly, které jsou v dalším kole syntézy DNA polymerázou opět doplněny na dvouřetězcové. Dochází tedy k exponenciálnímu nárůstu počtu molekul (Šmarda et al. 2005).



Obrázek 12 Exponenciální nárůst počtu molekul DNA během PCR cyklů (LAB Guide 2014)

Důležitými složkami reakční směsi jsou kromě zmíněné templátové DNA, primerů a DNA polymerázy, také stavební jednotky pro syntézu řetězců – deoxynukleosidtrifosfáty, dále pufr a soli pro zajištění vhodné iontové síly. Důležité jsou především Mg^{2+} soli, které slouží také jako kofaktor polymerázy. Při nadměrně vysokých koncentracích Mg^{2+} iontů

vznikají nespecifické produkty, při příliš nízkých je dosaženo nižších výtěžků. Koncentrace těchto iontů je proto pro správný průběh PCR zásadní. Pro snadnější průběh reakce je možné přidávat další aditiva jako je např. glycerol nebo Triton X. Purifikovanou a sterilní vodou se potom doplní reakční směs na požadovaný objem (Káš et al. 2005; Pelt-Verkuil et al. 2010; Mullis et al. 1986).

Na rozdíl od klasické PCR, kde je analyzován až výsledný produkt např. pomocí agarózové elektroforézy, se při qPCR zaznamenává každý cyklus PCR ve skutečném čase. Pro tento záznam se využívá principu fluorescence a fluorescenčních sond, které se specificky nebo nespecificky váží k amplifikované DNA. Fluorescence je vyzařována až po navázání sondy na DNA, volný substrát prakticky nefluoreskuje. Intenzita záření je přímo úměrná množství DNA přítomné ve vzorku. Běžně je qPCR prováděna v destičkách o 96 jamkách, přičemž fluorescence je zaznamenávána v každé jamce zvlášť (Pelt-Verkuil et al. 2010; Arul et al. 2012).

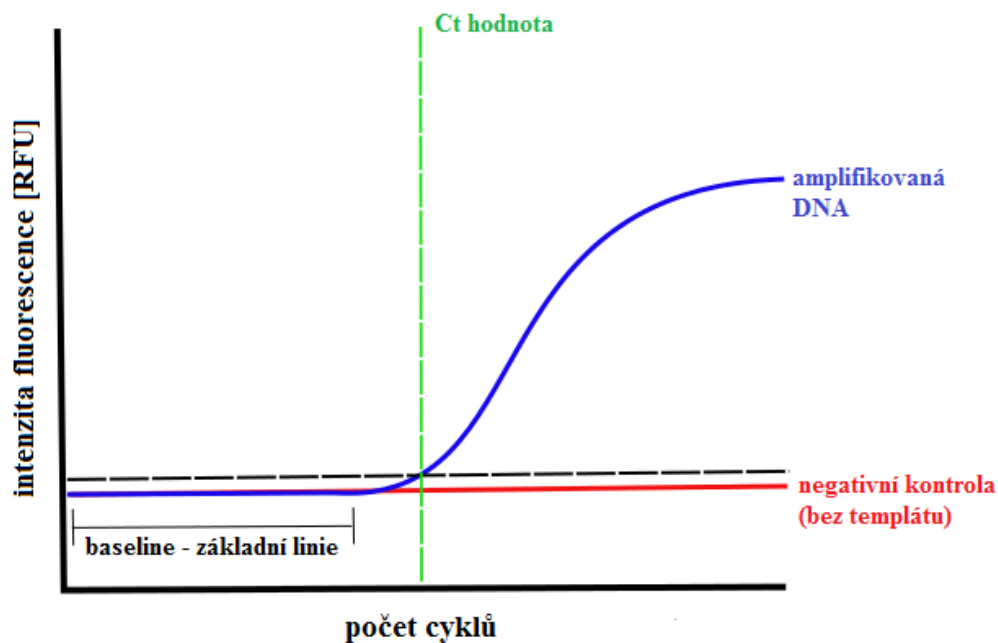
Fluorescenční sondy rozdělujeme na nespecifické a specifické, podle charakteru jejich vazby k DNA. Nespecifickými sondami jsou tzv. interkalační fluorescenční barviva (např. nejčastěji používaný SYBR Green), která se váží na jakýkoli úsek DNA. Oproti tomu specifické sondy se váží pouze k určitému produktu, tedy specificky ke konkrétnímu úseku. Detekci fluorescence ovlivňují u sond také molekuly zhaščeče (Šmarda et al. 2005).

Průběh a kinetiku qPCR reakce je možné rozdělit do třech fází:

- 1) Exponenciální fáze – množství syntetizované DNA je na takovém stupni, že fluorescence přesahuje pozadí a díky tomu je zachycena detektorem. Za ideálních podmínek je nárůst počtu molekul DNA 2^n , přičemž n odpovídá pořadí cyklu.
- 2) Lineární fáze – v tomto stádiu dochází ke strmému nárůstu intenzity fluorescence, množství templátu je na vysoké úrovni.
- 3) „Plateau“ fáze – přes přítomnost velkého množství templátové DNA se kinetika reakce zpomaluje, některé komponenty reakční směsi mohly být spotřebovány, a dochází tak k únavě reakce. Pro kvantifikaci se této fáze nevyužívá, velikost fluorescence neodpovídá koncentraci DNA (Arul et al. 2012; Pelt-Verkuil et al. 2010; Šmarda et al. 2005).

Pro kvantifikaci DNA pomocí qPCR je důležitá hodnota Ct – „threshold cycle“ neboli prahová fluorescence. Udává nám, při kterém cyklu dochází k překročení intenzity

fluorescence nad zvolenou prahovou hodnotu. Jedná se o relativní míru koncentrace cíle PCR reakce. Přitom čím vyšší je hodnota Ct, tím méně bylo výchozí templátové DNA v reakci a naopak. Důležité je uvědomit si, že předchozí dvě metody mají lineární závislost odezvy přístroje na koncentraci DNA, kdežto u qPCR jde o nepřímou úměru mezi hodnotami Ct a logaritmovanou koncentrací (Šmarda et al. 2005).



Obrázek 13 Průběh a kinetika qPCR reakce (upraveno dle Porterfield 2016)

Metoda qPCR je velice citlivá. Oproti spektrofotometrickým a fluorimetrickým metodám je vztah mezi koncentrací DNA a odezvou přístroje logaritmický. Jedná se také o metodu finančně i časově náročnější. Je nezbytné znát konkrétní sekvenci daného úseku DNA pro použití vhodných primerů a tento úsek navíc nesmí být příliš dlouhý. Jedná se tedy o metodu vysoce specifickou tím, že se pomocí qPCR amplifikuje pouze určitá sekvence DNA, je tak velice složité, někdy takřka nemožné určit kvantitu celkové DNA. Důležitý je i bezchybný postup provedení. Přesnost qPCR může ovlivňovat řada faktorů, které mohou být součástí přípravy reakční směsi, přípravy vzorků nebo přímo nevhodně zvolenou sekvencí primerů. Další chyby mohou být v nepřesnosti pipetování, špatném promíchání směsi, přítomnosti kontaminantů nebo PCR inhibitorů (fenol, proteiny...) apod. Je proto vhodné stanovovat vzorky simultánně v několika opakováních, nejčastěji v triplikátech, a porovnat jejich Ct hodnoty (Šmarda et al. 2005; Li et al. 2014; Pelt-Verkuil et al. 2010).

1.3 Výkonnostní parametry metod

Základním a nejdůležitějším úkolem při provádění analytických měření je prověřit, zda analytická metoda a její instrumentace fungují tak, jak se očekává. Zda je metoda použitelná pro zamýšlené využití a poskytuje v určité laboratoři výsledky a výkonnostní parametry, které je možné využít v praxi s očekávanou mírou kvality. Takovéto ověřování se nazývá validace a potvrzuje, že je metoda vhodná pro danou aplikaci a je způsobilá zvládnout požadavky na ní kladené. Hlavním cílem validace je zajištění a zabezpečení kvality v laboratoři. Zvyšování jakosti a přesnosti výsledků měření zlepšuje bezpečnost práce, ochranu zdraví a snižuje cenu za zbytečné opakování (Plzák a Milde 2015; Friedecký et al. 2010).

V praxi se validace metody provádí běžně, nejčastěji při jejím zavádění, kdy je to dokonce povinností. Obvykle ověřované parametry pro validaci analytické metody jsou správnost, přesnost, specifita a selektivita, limit detekce, limit kvantifikace, linearita měření, rozsah metody a robustnost, v závislosti na charakteru a účelu konkrétního postupu. Důkaz o splnění požadavků na danou, již zavedenou, metodu prověřující vyjmenované výkonnostní charakteristiky se nazývá verifikací. Mimo validace a verifikace se parametry v laboratoři stanovují také za účelem porovnání několika metod, pro zjištění nejvhodnějšího interního postupu jako je to v případě této diplomové práce (Friedecký et al. 2010; Pohanka 2010).

Všechny parametry se získávají experimenty a vyhodnocením experimentálních dat. Tato diplomová práce porovnává metody z hlediska jejich rozsahu, limitu detekce a stanovitelnosti, linearity a preciznosti, resp. opakovatelnosti. Vypsané charakteristiky jsou přiblížené v následujícím textu.

1.3.1 Limit detekce (LOD)

LOD je definován jako nejnižší koncentrace analytu, která může být metodou detekována – identifikována na stanovené úrovni spolehlivosti. To znamená, při jaké skutečné koncentraci překročíme kritickou hodnotu významně odlišnou od nuly (Suchánek 2009).

Je nutné rozlišovat mezi detekční mezí přístroje a metody. LOD přístroje většinou vychází z proměření tzv. slepých vzorků, u kterých je vynechán celý postup přípravy vzorků, nebo na základě poměru odezvy přístroje k vlastnímu šumu např. v chromatografii. Pro získání LOD metody je třeba vycházet z celého měřícího postupu analýzy vzorků (Plzák a Milde 2015).

Odhad LOD (i LOQ) se nejčastěji počítá násobením směrodatné odchylky (SD) patričním faktorem. Vhodné vzorky pro výpočet směrodatné odchylky jsou buď slepé vzorky, tzn. matrice, která neobsahuje stanovovanou složku, což je vhodné především pro metody spektrofotometrické nebo spektroskopické. Pro chromatografické techniky aj. je třeba překrýt šum pomocí tzv. zkušebních vzorků, které mají koncentraci analytu o něco vyšší než je předpokládaný LOD. Třetí možností jsou slepé vzorky reagensů, které pokud neprošly celým procesem přípravy jako stanovované vzorky, svědčí pouze o LOD/LOQ přístroje. Směrodatná odchylka se obvykle získává v krátkém časovém intervalu, provedením nejméně deseti opakování měření stejným analytikem, na stejném zařízení ve stejné laboratoři a v krátkém časovém intervalu, tedy za podmínek opakovatelnosti (Plzák a Milde 2015; Friedecký et al. 2010).

Pro běžné účely obvykle postačuje zjistit úroveň, kdy se detekce stává problematickou, tedy pouze přibližnou hodnotu LOD. K tomu je vhodné využít výpočet (Plzák a Milde 2015):

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{SD}$$

LOD ... limit detekce

SD ... směrodatná odchylka měření vhodných slepých vzorků

Hodnota 3,3 je odvozena z pravděpodobností falešně pozitivních (α) a falešně negativních chyb (β). Definice LOD je proces, který se sestává ze dvou kroků. Prvním z nich je zjištění hodnoty „kritické úrovně“. Tato hodnota je nastavena tak, aby pravděpodobnost, že získaný výsledek překročil kritickou úroveň, nebyla větší než α , pokud vzorek neobsahoval žádný analyt, a nebyla menší než β , pokud byl analyt ve vzorku přítomen. Mez detekce má označovat pravou koncentraci, pro kterou je počet α i β pro danou kritickou mez přijatelný. Pro volbu apriorních pravděpodobností α i β jsou doporučeny hodnoty 0,05 čili 5 %. Pokud je tedy falešná chyba rovna 0,05, kritická úroveň potom odpovídá $1,64 \times \text{SD}$, přičemž 1,64 je hodnota odpovídající nekonečnému počet stupňů volnosti a hladině významnosti chyb rovné 0,05. Z těchto úvah potom vyplývá, že když je $\alpha = \beta = 0,05$, pak je zaokrouhlené číslo 3,3 ($1,64 + 1,64$) použito jako faktor pro násobení směrodatné odchylky (Plzák a Milde 2011; Suchánek 2009).

1.3.2 Limit kvantifikace (LOQ)

LOQ neboli mez stanovitelnosti je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s přijatelnou spolehlivostí kvantifikovat. Terminologie týkající se LOD a LOQ však bývá někdy obtížná, liší se totiž mezi jednotlivými obory. Např. ISO používá obecný termín „minimální detekovatelná hodnota redukované stavové proměnné“, v chemii je zase znám pojem „minimální detekovatelná redukováná koncentrace“, a jejich definice odpovídají LOD i LOQ (Plzák a Milde 2015, 2011; Český normalizační institut 1998).

LOQ není definována statisticky, ale konvenčně jako hodnota koncentrace analytu, při které je nejistota stanovení vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (SD) rovna předem určené hodnotě (doporučení podle IUPAC 10 %). Pak platí, že:

$$\text{LOQ} = k_Q \times \text{SD}$$

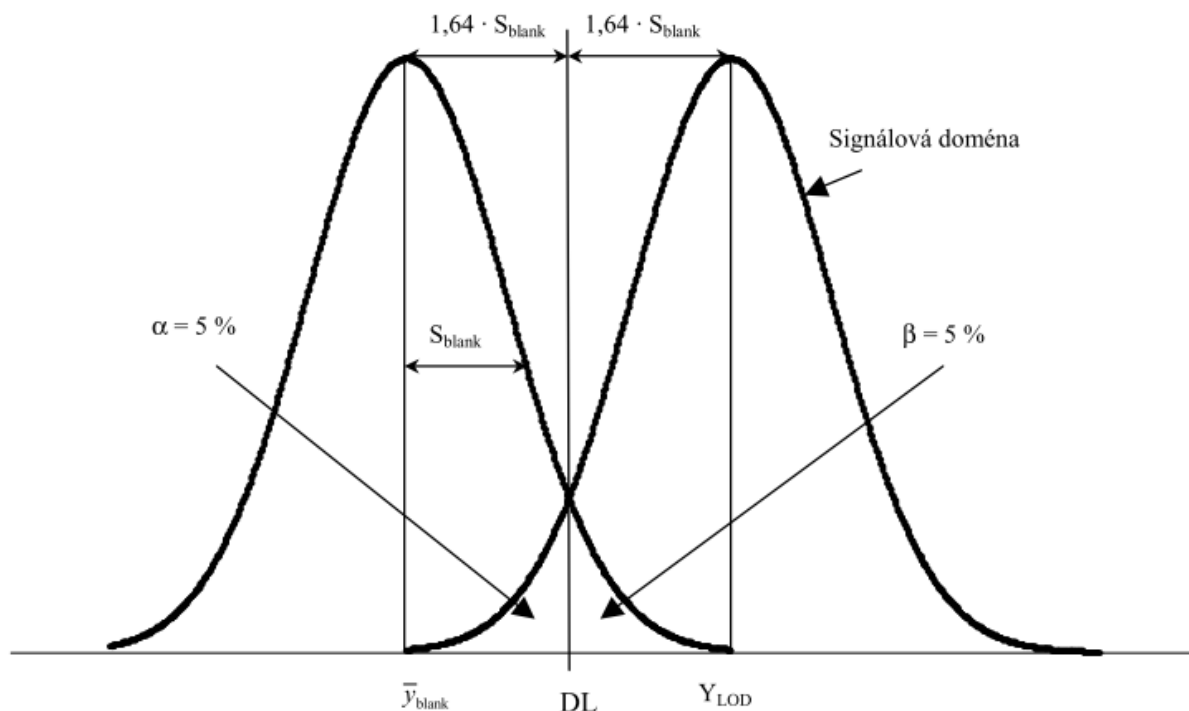
LOQ ... limit kvantifikace

k_Q ... koeficient (standardem dle IUPAC 10)

SD ... směrodatná odchylka měření vhodných vzorků

Přičemž k_Q je koeficient, jehož převrácená hodnota je rovna zvolené hodnotě relativní směrodatné odchylky měření vhodných vzorků, tedy hodnotě 10 (Plzák a Milde 2011; Český normalizační institut 1998).

Nutné je poznamenat, že i přes 10 opakování měření slepých vzorků jsou směrodatné odchylky proměnlivé, proto odhady LOD/LOQ jsou stále jen hodnoty orientační. Stanovované analyty tedy vyžadují k jejich průkazu dostatečné koncentrace nad hranicí LOD/LOQ. Pokud vzorky obsahují často velmi nízké koncentrace analytu, je doporučeno sledovat tyto meze pravidelně (Pohanka 2010; Friedecký et al. 2010).



Obrázek 14 Grafické znázornění odhadu meze detekce (LOD) (Suchánek 2009)

Vysvětlivky: y_{blank} je průměrná hodnota signálu slepého vzorku;

S_{blank} je směrodatná odchylka opakovaného měření slepého vzorku;

α , β jsou chyby I. a II. druhu;

DL je rozhodovací mez (cut-off);

Y_{LOD} je signál odpovídající mezi detekce.

1.3.3 Linearita

Tento parametr je chápán jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou přístroje a koncentrací stanovovaného analytu. Ověřuje, zda je tento vztah lineární. Jedná se tedy o schopnost dané metody poskytnout výsledky měření přímo úměrné ke koncentraci analytu. Těsnost vzájemné závislosti – korelaci těchto dvou proměnných charakterizuje Pearsonův korelační koeficient (R), konkrétně jeho druhá mocnina (R^2). Nabývá hodnoty 0 až 1, přičemž čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných „těsnější“, potažmo korelace vyšší. Hodnota R^2 by přitom neměla klesnout pod 0,97. Je výhodné, když je metoda lineární v celém pracovním rozsahu (Suchánek 2009; Loco et al. 2002).

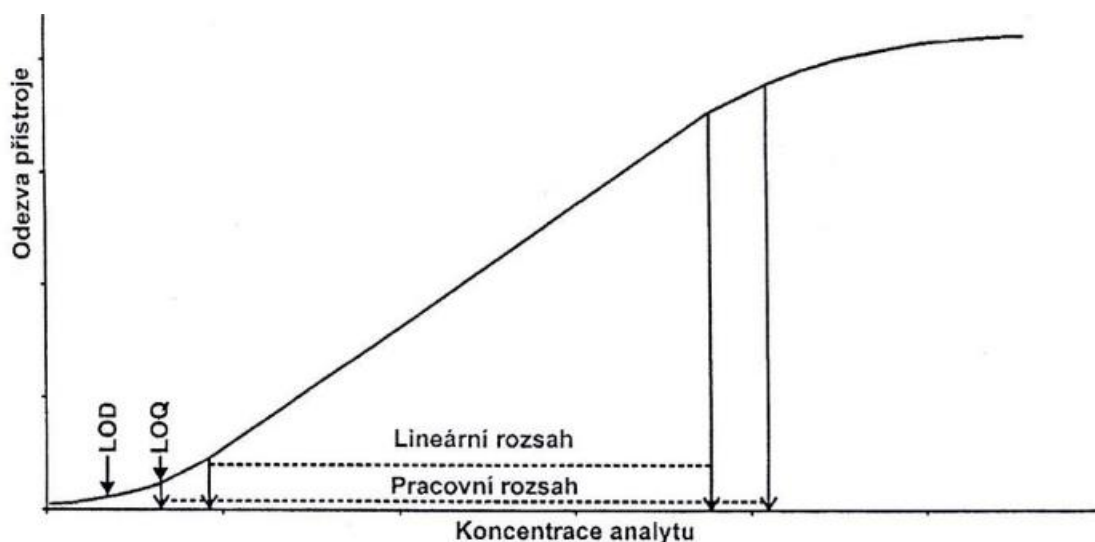
Linearita je nejčastěji hodnocena pomocí lineární regrese. Je vhodné ji posuzovat alespoň v pěti koncentračních bodech, přičemž by se měření mělo opakovat. Základním výstupem je grafické znázornění korelační přímky, korelační koeficient R^2 a rovnice regrese obsahující směrnici a intercept – hodnotu pravděpodobnosti průchodu počátkem. Výsledky mohou být případně podloženy grafem s odchylkami experimentálních

bodů od přímky, tzv. rezidui, díky kterému je možné odhadnout některé trendy během měření (Pohanka 2010; Plzák a Milde 2015).

1.3.4 Pracovní rozsah

Pracovním rozsahem se rozumí interval mezi nejnižším a nejvyšším obsahem analytu, ve kterém poskytuje metoda výsledky s přijatelnou nejistotou. Za spodní hranici je běžně brána hodnota meze stanovitelnosti. Shora je pak ohraničován koncentrací, při které se projevují významné anomálie citlivosti měření. Příkladem takové anomálie může být ohyb kalibrační křivky, tzv. plató efekt při příliš vysokých hodnotách absorbance ve spektroskopii (Pohanka 2010; Plzák a Milde 2015).

Pro měření pracovního rozsahu se používají kalibrační standardy s koncentracemi, které překračují alespoň o 10 % (někdy i o 20 %) předpokládaný interval metody. Hodnoceno je nejprve vizuálně grafické zpracování. Horní hranice bývá zachycena již pouhým okem. Konkrétnější ohraničení je získáno pomocí regresní analýzy a grafem reziduí. Dalšími možnostmi je statistické hodnocení pomocí nástrojů „goodness of fit“ aj. Pracovní rozsah je obecně rozsáhlejší než rozsah lineární. Pro účinnost metody však nemusí být vztah mezi odezvou přístroje a koncentrací dokonale lineární (Plzák a Milde 2015; Friedecký et al. 2010).



Obrázek 15 Kalibrační křivka s uvedením lineárního rozsahu, pracovního rozsahu, meze stanovitelnosti a meze detekce (Kand'ár et al. 2016)

1.3.5 Preciznost

Preciznost, ve starší literatuře známá pod pojmem přesnost, je míra shody mezi nezávislými výsledky analýz provedených za předem specifikovaných podmínek. Nemá

žádný vztah ke skutečné – správné hodnotě, ale závisí na rozdělení náhodných chyb. Obvykle se vyjadřuje pomocí statistických parametrů, které popisují rozptyl výsledků. Typicky jde o směrodatnou odchylku nebo relativní směrodatnou odchylku, které jsou vypočteny z dat získaných z opakovaného měření vhodného materiálu a za daných podmínek. Volba takových podmínek je podstatným aspektem hodnocení preciznosti měření, určují totiž druh tohoto parametru. Cílem měření je stanovit typickou variabilitu, nikoliv nejmenší. Existují dvě krajní možnosti hodnocení preciznosti, a to opakovatelnost a reprodukovatelnost. Pro validaci metody je obvykle potřeba obou těchto charakteristik (Friedecký et al. 2010; Suchánek 2009; Pohanka 2010).

Opakovatelnost měření neboli preciznost za podmínek opakovatelnosti vyjadřuje těsnost shody výsledků nezávislých měření stejného analytu, pomocí stejné metody, provedené na stejném přístroji, na stejném místě, stejným pracovníkem a za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Jedná se o vlastnost metody, nikoliv výstupních dat, a očekává se u ní nejmenší kolísání mezi výsledky (Plzák a Milde 2015; Suchánek 2009).

U reprodukovatelnosti se naopak čeká největší variabilita výsledků. Poukazuje na míru souhlasu mezi výstupy měření stejného analytu ve vzorcích, kdy jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek, ale stejnou metodou. Změněnými podmínkami je použitý přístroj, laborant, místo i čas. Většinou se stanovuje míra kolísání mezi laboratořemi (Pohanka 2010).

Mezi opakovatelností a reprodukovatelností je možné stanovovat ještě tzv. mezilehlou preciznost. Poskytuje odhad kolísání mezi těmito dvěma extrémy, pokud se měření provádí v jedné laboratoři. Je třeba uvádět přesné podmínky. Cílem je získat odhad preciznosti, který by odrážel všechny zdroje kolísání, které se během rutinního používání v jedné laboratoři může vyskytnout. Někdy se pro mezilehlou preciznost používá termín vnitrolaboratorní reprodukovatelnost (Plzák a Milde 2015).

Obecně je preciznost závislá na koncentraci, je proto vhodné ji stanovovat na koncentrační řadě v určitém rozsahu a částečně přes tento rozsah. Pomocí toho je zjištěn vztah mezi koncentrací analytu a precizností. Pokud je koncentrace měřené veličiny dostatečně nad detekčním limitem, je preciznost často úměrná koncentraci analytu, proto je v těchto případech snazší a vhodnější vyjádřit tento parametr relativní směrodatnou odchylkou. Relativní směrodatná odchylka totiž bývá víceméně konstantní v celém daném rozsahu (Plzák a Milde 2015; Pohanka 2010).

Pro vyhodnocení této charakteristiky metod je třeba dostatečného počtu opakovaných měření, přičemž opakování by měla být nezávislá, tedy provedení opakování celého měřicího postupu od přípravy vzorků po jejich analýzu. Typicky se jedná o 6 – 15 opakování, ale počty se liší zdroj od zdroje. Udává se také možnost nejméně devíti měření ve stanoveném rozsahu, tedy tři analýzy na třech úrovních. Směrodatné odchyly je také možné doplnit jinými experimentálními statistikami, jako je např. analýza rozptylu (ANOVA) (Friedecký et al. 2010; Plzák a Milde 2015).

V experimentální části této diplomové práce byly splněny pouze podmínky opakovatelnosti, tedy měření stejným analytikem, na stejném zařízení, ve stejné laboratoři, za stejných podmínek a v krátkém časovém úseku. Částečně byly dodrženy také předpoklady pro mezilehlou preciznost. Pro rozšíření oblasti porovnávání metod a získání většího množství dat byly experimenty navrženy i pro měření v různých dnech, jiné podmínky však měněny nebyly.

2 Cíle práce

Tato práce má za cíl porovnat spektrofotometrické a fluorescenční metody z hlediska limitu detekce, limitu kvantifikace, linearity, rozsahu měření a preciznosti, resp. opakovatelnosti. Pro doplnění bude využita i metoda real-time PCR. Metody budou aplikovány na koncentrační řady čtyř typů DNA a ze získaných dat se stanoví jednotlivé výkonnostní parametry.

Dílčí cíle:

- 1) Připravit koncentrační řady genomové DNA, cirkulárního plazmidu, linearizovaného plazmidu a syntetizovaného oligonukletidu.
- 2) Za podmínek opakovatelnosti získat ze všech vzorků „hrubá“ data pomocí spektrofotometrických metod (kapkové, kyvetové a destičkové uspořádání), metody fuorimetrické a real-time PCR.
- 3) Z naměřených dat získat pomocí výpočtů naměřené koncentrace (mimo real-time PCR).
- 4) Stanovit výkonnostní parametry metod s ohledem na různé typy DNA.
- 5) Porovnat tyto metody navzájem.

Nejprve budou proměřeny koncentrační řady čtyř typů DNA. Ze získaných dat se stanoví jednotlivé výkonnostní parametry podle aktuálních moderních postupů. Tyto charakteristiky budou hodnoceny jak na úrovni „hrubých“ dat z přístroje, tak po jejich přepočtu na naměřené koncentrace. Hodnoty se také porovnají s předpokládanými koncentracemi, které byly ověřeny a přejaty z evidence vzorků společnosti GENERI BIOTECH s.r.o. Poté budou metody komparovány mezi sebou. Dalším možným cílem je zjištění, zda jsou jednotlivá stanovení ovlivňována různou strukturou DNA, či nikoliv. Tento další rozměr porovnání dat je umožněn díky analýze různých typů DNA.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Metodika

3.1.1 Testovaný materiál a příprava ředících řad vzorků

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, pro porovnání jednotlivých metod byly vybrány tyto čtyři typy DNA:

- Genomová DNA
- Linearizovaný plazmid
- Cirkulární plazmid
- Oligonukleotid

Počáteční koncentrace vzorků byly přejaty z evidence vzorků GENERI BIOTECH s.r.o. Ty byly zjištěny interními postupy založenými na spektrofotometrickém měření. Pro cíl této práce – srovnání metod, byla tato koncentrace považována pouze za předpokládanou koncentraci, cílem nebylo určení skutečné koncentrace.

3.1.1.1 Použité roztoky

- původní vzorky:
 - genomová DNA (200 ng/μl)
 - linearizovaný plazmid (4,23 ng/μl)
 - cirkulární plazmid (81,49 ng/μl)
 - oligonukleotid (100 μM ~ 542,7 ng/μl)
- low EDTA TE pufr

3.1.1.2 Laboratorní vybavení

- laminární box (Fatran)
- automatické mikropipety různých objemů (Eppendorf)
- špičky pro automatickou mikropipetu o různých objemech (Eppendorf)
- zamrazovací zkumavky se šroubovacím víčkem o objemu 2 μl
- třepačka vortex typ V – 1 plus (Biosan Ltd.)
- minicentrifuga (P-LAB a.s)

3.1.1.3 Postup

- 1) Podle výrobci udávaných rozsahů měření jednotlivých přístrojů byl připraven design experimentů pro všechny typy DNA. Koncentrace a ředění byly voleny tak, aby bylo dosaženo hodnot i za limity těchto metod, a mohla tak být ověřena data předkládaná v manuálech. Zároveň musel být brán ohled na původní množství vzorků.
- 2) Pro každou metodu byl pomocí předchozích optimalizací postupů zvolen vhodný objem DNA.
- 3) Poté byla vypočtena ředící řada pro tvorbu nižších koncentrací jednotlivých typů.
- 4) Vzorky byly ředěny v low EDTA TE pufru a připravovány do speciálních zamrazovacích zkumavek se šroubovacím víčkem. Jednotlivé alikvoty byly připraveny současně, přičemž pro jeden koncentrační bod byl připraven jeden alikvot, a to pro všechny metody. Objem alikvotů nebyl nikdy nižší než 300 μ l.
- 5) Připravené roztoky byly důkladně promíchány na třepačce a krátce stočeny ve stolní centrifuze.
- 6) Zkumavky byly důkladně popsány, přeneseny do krabičky a zamraženy.

Následující tabulka prezentuje analyzované koncentrační rozsahy podle typů DNA. U metod, u kterých se předpokládal větší pracovní rozsah, byl ředící faktor 2 nahrazen v nižších koncentracích faktorem 5. Dle principů použitých metod byly vzorky ředěny také do „reakcí“, konkrétně pro spektrofotometrické měření v kyvetě, destičce a fluorimetrii 20krát, pro qPCR 4krát.

Genomová DNA		
Konc. [ng/μl]	Metoda	
200	Spektrofotometrie	Kapka
100		Kyveta
50		Destička
25	Fluorimetrie	
12,5		
6,25	PCR	
1,25		
0,25		
0,05		
0,01		
2,00E-03		
4,00E-04		
8,00E-05		
1,60E-05		
Linearizovaný plazmid		
Konc. [ng/μl]	Metoda	
4,23	Spektrofotometrie	Kapka
2,12		Kyveta
1,06		Destička
0,21	Fluorimetrie	
0,04		
8,5E-03	PCR	
1,69E-03		
3,39E-04		
6,77E-05		
1,35E-05		
2,71E-06		
5,42E-07		
Cirkulární plazmid		
Konc. [ng/μl]	Metoda	
81,49	Spektrofotometrie	Kapka
40,75		Kyveta
20,37		Destička
10,19	Fluorimetrie	
5,09		
2,55	PCR	
0,51		
0,10		
0,02		
4,07E-03		
8,15E-04		
1,63E-04		
3,26E-05		
6,52E-06		
1,30E-06		
2,61E-07		
5,22E-08		
1,04E-08		
2,09E-09		
Oligonukleotid		
Konc. [ng/μl]	Metoda	
542,70	Spektrofotometrie	Kapka
271,35		Kyveta
135,68		Destička
67,84	Fluorimetrie	
33,92		
16,96	PCR	
8,48		
1,70		
0,34		
0,07		
0,01		
2,71E-03		
5,43E-04		
1,09E-04		

Tabulka 1 Měřené koncentrační rozsahy jednotlivých typů DNA vyznačené světle šedou barvou

3.1.2 Spektrofotometrické stanovení DNA v kapce

3.1.2.1 Použité roztoky

- připravené ředící řady vzorků jednotlivých typů DNA
- low EDTA TE pufr
- sterilizovaná a ultračistá voda

3.1.2.2 Laboratorní vybavení

- UV-VIS Spektrofotometr Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific)

Tento spektrofotometr je určen převážně pro stanovení koncentrace a čistoty DNA, RNA či proteinových vzorků. Dávkovaný objem vzorku pro kapkovou metodu je od 0,5 do 2 μ l. Spodní limit detekce přístroje je udáván jako 2 ng/ μ l dsDNA, horní limit 15 000 ng/ μ l dsDNA a kromě detekčního okénka pro kapku má také standardní kyvetový prostor. Nanodrop 2000c je vybaven pulzní xenonovou lampou, díky níž má rozpětí vlnových délek 190 až 840 nm. Součástí je software s předdefinovanými metodami pro měření nukleových kyselin, proteinů aj., ale umožňuje také nastavení postupu s vlastními parametry. K měření byl využit modul pro měření nukleových kyselin, který snímá vlnové délky pro ně vhodné – 260 nm, 280 nm a 320 nm. Obsahuje také korekci základní linie, kdy je nulová hodnota automaticky nastavena na hodnotu absorbance vzorku při 340 nm (Thermo Fisher Scientific nedatováno).



Obrázek 16 Spektrofotometr Nanodrop 2000c (Labtech nedatováno)

- automatické mikropipety o objemu 10 μ l (Eppendorf)
- špičky pro automatickou mikropipetu o objemu 10 μ l (Eppendorf)
- buničina
- třepačka vortex typ V – 1 plus (Biosan Ltd.)
- minicentrifuga (P-LAB a.s)
- stojany na mikroskopavky

3.1.2.3 Postup

- 1) Předem připravené vzorky byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.
- 2) Poté byl spuštěn počítač a software Nanodropu 2000c, kde byl nastaven modul pro nukleové kyseliny.
- 3) Detekční okénko přístroje bylo otřeno a očištěno ultračistou vodou na buničině. Poté byly dávkovány 2 μ l low EDTA TE pufru, změřeny a nastaveny jako pozadí. Kapka byla osušena do buničiny. Tento krok byl opakován vždy po proměření řady jednotlivých typů DNA.
- 4) Po slepém vzorku byly dávkovány vlastní vzorky, vždy po 2 μ l, od bodu s nejnižší koncentrací po nejvyšší. Kapka byla vždy pouze osušena buničinou. Pro měření dsDNA, tedy plazmidů a genomové DNA byl v modulu použit faktor 50, pro ssDNA – oligonukleotid, faktor 33. Každý vzorek byl dávkován třikrát a pokaždé změřen.
- 5) Celý tento postup byl zopakován ve třech různých dnech. Bylo tak získáno 9 hodnot pro každý bod ředění každého typu DNA.
- 6) Pro vyhodnocení směrodatné odchylky slepého vzorku byl nadávkován a změřen low EDTA TE pufr 30 \times .
- 7) Veškerá data byla následně exportována ze softwaru do tabulkového formátu Excel pro další zpracování a hodnocení.

3.1.3 Spektrofotometrické stanovení DNA v kyvetě

3.1.3.1 Použité roztoky

- připravené ředící řady vzorků jednotlivých typů DNA
- low EDTA TE pufr
- 100% ethanol
- sterilizovaná a ultračistá voda

3.1.3.2 Laboratorní vybavení

- UV-VIS Spektrofotometr Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) – viz 3.1.2.2
- spektrofotometrická skleněná kyveta o objemu 400 μ l (Hellma Analytics)
- plastové mikrozkušavky o objemu 500 μ l (Eppendorf)
- automatické mikropipety o objemu 1000 μ l (Eppendorf)
- špičky pro automatickou mikropipetu o objemu 1000 μ l (Eppendorf)
- buničina
- třepačka vortex typ V – 1 plus (Biosan Ltd.)
- minicentrifuga Z 100 M (Hermle)

3.1.3.3 Postup

- 1) Předem připravené vzorky byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.
- 2) Do stojánku byly připraveny mikrozkušavky a veškeré vzorky byly 20 \times ředěny na konečný objem 400 μ l. Od každé koncentrace byly připraveny tři vzorky pro měření.
- 3) Poté byl spuštěn počítač a software Nanodropu 2000c, kde byl nastaven modul pro nukleové kyseliny a systém přepnut na měření v kyvetě.
- 4) Kyveta byla vypláchnuta ethanolem, poté třikrát ultračistou vodou a třikrát low EDTA TE pufrém. Okraje a detekční okna kyvety byly otřeny a očištěny buničinou.
- 5) Po promývacích krocích bylo dávkováno 400 μ l low EDTA TE pufr pro proměření a nastavení pozadí.
- 6) Slepý vzorek byl odstraněn a dále byly dávkovány vzorky, vždy po 400 μ l, od nejnižší koncentrace po nejvyšší. Vzorek byl vždy odsán pipetou z kyvety a dávkoval se další koncentrační bod. Mezi jednotlivými typy DNA byla kyveta promyta stejným způsobem jako v předešlém kroku. Pro měření oligonukleotidu byl v modulu změněn faktor 50 pro dsDNA na faktor 33 pro ssDNA.
- 7) Absorbance každého roztoku byla změřena třikrát a hodnoty zprůměrovány.
- 8) Celý tento postup byl zopakován ve třech různých dnech. Bylo tak získáno 9 hodnot pro každý bod ředění každého typu DNA.
- 9) Pro vyhodnocení směrodatné odchylky slepého vzorku byl nadávkován a změřen low EDTA TE pufr 30 \times .
- 10) Veškerá data byla následně exportována ze softwaru do tabulkového formátu Excel pro další zpracování a hodnocení.

3.1.4 Spektrofotometrické stanovení DNA v destičce

3.1.4.1 Použité roztoky

- připravené ředící řady vzorků jednotlivých typů DNA
- low EDTA TE pufr

3.1.4.2 Laboratorní vybavení

- Infinite® 200 PRO series (Tecan Group Ltd.)

Jedná se o multirežimový destičkový a kyvetový přístroj s přístupem k celé řadě detekčních metod s použitím buď Quad4 monochromátoru nebo technologií na bázi filtrů. Uživatelé si mohou vybrat požadované moduly a vytvořit si postup analýzy podle vlastních preferencí a požadavků. Infinite 200 PRO má vysokou citlivost, umožňuje měření v multiplexech a v různých typech mikrotitračních destiček (6 až 384jamkové). Pro dostatečný výkon ve všech režimech detekce využívá pokročilé optiky a detektory s vysokým výkonem, optimalizované pro potřeby fluorescence, luminiscence a absorbance. Přístroj má možnosti horního i spodního „čtení“ destičky, „čtení“ z více míst jedné jamky, umí regulovat teplotu, nastavovat časový posun mezi měřeními, míchat destičku uvnitř přístroje aj. Jako zdroj záření je zde umístěna UV xenonová výbojka, rozpětí vlnových délek pro měření absorbance má 230 – 1000 nm, pro fluorescenci je rozdílná horní hranice – 850 nm. Software i-Control patřící k přístroji je snadný a přehledný pro tvorbu vlastního skriptu pro jednotlivá měření (ANON. nedatováno; Tecan Group Ltd. nedatováno).



Obrázek 17 Infinite® 200 PRO series (Manuál Infinite® 200 PRO nedatováno)

- laminární box (Maneko)
- plastová 96jamková destička (Corning)
- automatické mikropipety o různých objemech (Eppendorf)
- špičky pro automatické mikropipety o různých objemech (Eppendorf)
- třepačka vortex VX100 (Labnet)
- stolní centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- stojany na mikroskopické skleničky

3.1.4.3 Postup

- 1) Předem připravené vzorky byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepačce a krátce stočeny ve stolní centrifuze.
- 2) Dále byl spuštěn přístroj Infinite 200 PRO, k němu připojený počítač a program i-Control.
- 3) Poté byla pipetována 96jamková destička. Nejprve se pipetovalo 190 μ l low EDTA TE pufru pro proměření pozadí, které se následně odčítalo od hodnot absorbance roztoků se vzorkem. Skript pro měření byl po předchozí optimalizaci metody nastaven na měření absorbance při 260 nm, na měření shora a čtení z více míst jamky na XY-line (5 \times 5, tj. 9 bodů celkem).
- 4) Následovalo přidání 10 μ l vzorku do každé jamky, vzorek byl tedy zředěn 20 \times . Každý koncentrační bod byl dávkován v triplicátu a byl pipetován a změřen třikrát. Hodnoty ze tří měření jednoho vzorku byly zprůměrovány pro sjednocení výstupů všech metod (mimo qPCR). Do skriptu bylo přidáno míchání destičky po dobu 30 s orbitálně a 30 s lineárně, jinak byl ponechán jako v předchozím kroku.
- 5) Celý tento postup byl zopakován ve třech různých dnech, výstupem bylo tedy 9 hodnot pro každý bod ředění každého typu DNA.
- 6) Pro vyhodnocení směrodatné odchylky slepého vzorku byly pipetovány 3 různé destičky a každá byla proměřena dvakrát. Hodnoty absorbance z těchto dvou měření od sebe byly odečteny a až z těchto dat se počítala SD.
- 7) Veškerá data byla automaticky exportována a řazena do sešitu v Excelu.

3.1.5 Fluorimetrické stanovení DNA

3.1.5.1 Použité roztoky

- připravené ředící řady vzorků jednotlivých typů DNA
- low EDTA TE pufr

- pro stanovení dvoušroubovicové DNA (oba typy plazmidů, genomová DNA):
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
 - PicoGreen dsDNA reagent rozpuštěný v DMSO (1 ml)
 - 20× zředěný TE pufr (25 ml)
 - λDNA standard 100 µg/ml (1 ml)
- pro stanovení jednořetězcové DNA (oligonukleotid):
Quant-iT OliGreen ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
 - OliGreen ssDNA reagent rozpuštěný v DMSO (1 ml)
 - 20× zředěný TE pufr (25 ml)
 - standard oligonukleotidu 100 µg/ml (1 ml)
- sterilizovaná a ultračistá voda

3.1.5.2 Laboratorní vybavení

- Infinite® 200 PRO series (Tecan Group Ltd.) viz 3.1.4.2
- laminární box (Maneko)
- plastová 96jamková PCR destička (Corning)
- automatické mikropipety o různých objemech (Eppendorf)
- špičky pro automatické mikropipety o různých objemech (Eppendorf)
- třepačka vortex VX100 (Labnet)
- stolní centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- mikrozkušavky o objemu 200 µl (Eppendorf)
- zkumavky o objemu 50 a 25 ml
- stojany na mikrozkušavky a zkumavky
- alobal pro ochranu před světlem

3.1.5.3 Postup

- 1) Předem připravené vzorky byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepačce a krátce stočeny ve stolní centrifuze.
- 2) Jednotlivé reagentie byly vyjmuty z lednice a vytemperovány na pokojovou teplotu, přičemž reagenty byly uchovávány v temném prostředí.
- 3) Do mikrozkušavek byly připraveny vzorky, které se ředily v poměru 30 µl vzorku a 270 µl low EDTA TE pufru.
- 4) TE pufr, který byl součástí kitu, se naředil 20× ultračistou vodou. Počítáno bylo s 200 µl jako celkovým objemem jamky + rezerva.

- 5) Reagenty byly zředěny 1:200 naředěným TE pufrům z kitu. Počítáno bylo se spotřebou reagentu 100 µl na jamku + rezerva. Zkumavka s takto připraveným roztokem reagentu byla obalena alobalem a chráněna před světlem do doby pipetování destičky.
- 6) Dále byly připraveny dvě kalibrační řady ze standardů, které byly součástí kitů. Navrženy byly tak, aby se co nejvíce bodů prolínalo s teoretickým rozsahem vzorků.
- 7) Poté byla pipetována destička, nejprve 100 µl zředěného vzorku nebo bodu kalibrační řady, dále pak 100 µl připraveného roztoku reagentu. Každý koncentrační bod byl dávkován do tří jamek.
- 8) V jamce byl vždy celý roztok promíchán a celá destička se nechala inkubovat 3 – 5 minut v temném prostředí.
- 9) Pro měření fluorescence byl použit přístroj Infinite 200 PRO, který byl spuštěn min. 15 minut před měřením. K odečtu hodnot byl použit software i-Control nainstalovaný na ovládacím PC.
- 10) Ve skriptu pro měření bylo po předchozí optimalizaci metody měření nastaveno míchání po dobu 30 s orbitální, 30 s lineární. Měření fluorescence pro PicoGreen při vlnové délce excitace 485 nm a emise 535 nm, pro OliGreen při vlnové délce excitace 500 nm a emise 520 nm. Čtení jamek bylo nastaveno na shora a měření více míst v jamce na XY-line (5×5, tj. 9 bodů celkem). Připravené roztoky byly proměřeny třikrát a hodnoty z těchto tří měření byly zprůměrovány.
- 11) Celý tento postup byl zopakován ve třech různých dnech, výstupem bylo tedy 9 hodnot pro každý bod ředění každého typu DNA.
- 12) Pro vyhodnocení směrodatné odchylky slepého vzorku byla proměřena destička, kde se do každé jamky pipetovalo 100 µl reagentu a 100 µl low EDTA TE pufru.
- 13) Veškerá data byla automaticky exportována do sešitu v Excelu.

3.1.6 Stanovení DNA pomocí metody real-time PCR

3.1.6.1 Použité roztoky

- připravené ředící řady vzorků jednotlivých typů DNA
- mastermix I
 - 10× koncentrovaná qPCR assay hCCL2_Q4 (GENERI BIOTECH s.r.o.)
 - mastermix gb Easy (GENERI BIOTECH s.r.o.)
 - sterilizovaná a ultračistá voda
- sterilizovaná a ultračistá voda jako negativní kontrola

3.1.6.2 Laboratorní vybavení

- termocykler CFX96 Touch (Bio-Rad spol s.r.o.)

Jedná se o silný, přesný a flexibilní real-time PCR detekční systém. Tento přístroj je šestikanálový (pět barev a FRET kanál). Spojuje v sobě pokročilou optickou technologii s přesným řízením teploty, umožňuje tak citlivou a spolehlivou detekci pro singleplexové i multiplexové reakce. Má také integrovanou LCD dotykovou obrazovku a vnitřní software CFX Manager (BIO-RAD nedatováno).



Obrázek 18 Termocykler CFX96 Touch (BIO-RAD nedatováno)

- PCR box (BioAir instruments)
- plastová 96jamková PCR destička (Thermo Fisher Scientific)
- stojánek na PCR destičku
- fólie pro zakrytí PCR destičky (Thermo Fisher Scientific)
- hladítko na fólii
- třepačka vortex VX100 (Labnet)
- minicentrifuga (P-LAB a.s)
- stolní centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- automatické mikropipety různých objemů (Eppendorf)
- mikrozkuhavky různých objemů (Eppendorf)
- stojany na mikrozkuhavky
- nůžky

3.1.6.3 Postup

- 1) Předem připravené vzorky byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepačce a krátce stočeny ve stolní centrifuze.
- 2) V PCR boxu byla připravena kompletní qPCR assay smícháním roztoku 10× koncentrované assaye (200 µl), mastermixu gb Easy (1000 µl) a vody (400 µl).
- 3) Zhotovená assay byla dispenzována na PCR destičku do jednotlivých jamek po 16 µl.
- 4) K assayi na destičce byly pipetovány připravené ředící řady vzorků, negativní kontroly (vody) po 4 µl, každý bod vždy v triplicátu. Celkový objem reakční směsi v každé jamce byl tedy 20 µl.
- 5) Pipetováno bylo postupně devět destiček.
- 6) Každá destička byla přelepena fólií, hladítkem uhlazena a zbavena případných bublin vzduchu. Překrývající rohy fólie se odstříhly, destička byla krátce stočena v centrifuze.
- 7) Destička byla vložena do termocykleru a nastaveným programem byl 2step_UNI, jehož kroky vypadají takto:

95°C	3 min	
95°C	10 sec	}
60°C	20 sec	
		50×
- Sledovány byly pouze FAM kanály.
- 8) Po skončení programu byla destička vyjmuta z cykleru a vložena do odpadu.
- 9) Veškerá data byla hodnocena v softwaru CFX Manager a exportována do sešitu v Excelu.

3.1.7 Zpracování a analýza dat

K hodnocení dat byl využit matematický software R (R Core Team a R Foundation for Statistical Computing 2016), který se specializuje na statistiku. Jedná se o open-source program se skriptovacím jazykem. V něm byly generovány krabicové a sloupcové grafy. Pro vytvoření bodových grafů a jednoduché výpočty byl využit Excel z kancelářského softwaru Microsoft Office 2010.

3.1.7.1 Krabicový graf

Výsledky z měření jednotlivých koncentračních bodů jsou prezentovány formou krabicového grafu (boxplotu), kde v našem případě každý bod reprezentuje devět hodnot, tedy výsledky třech měření ve třech různých dnech. Grafy byly připraveny v prostředí R. Na ose x je zobrazená předpokládaná koncentrace (u qPCR jde o dekadický logaritmus předpokládané koncentrace), na ose y je potom odezva příslušného přístroje.

3.1.7.2 Směrodatná odchylka slepého vzorku (Plzák a Milde 2015)

Z hodnot získaných z proměření slepých vzorků byly pro jednotlivé metody vypočteny směrodatné odchylky pomocí vzorce:

$$SD_{\text{blanku}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \text{AVG})^2}{n - 1}}$$

SD_{blanku} ... směrodatná odchylka slepého vzorku

x_i ... hodnota absorbance blanku (z 1. až 30. měření)

AVG ... průměrná hodnota absorbance blanku

n ... počet měření

3.1.7.3 Limit detekce a limit kvantifikace (Plzák a Milde 2015, 2011)

Limity detekce a kvantifikace byly stanoveny pomocí následujících výpočtů:

$$\text{LOD} = 3,3 \times SD_{\text{blanku}}$$

LOD ... limit detekce

SD_{blanku} ... směrodatná odchylka blanku

$$LOQ = 10 \times SD_{\text{blanku}}$$

LOQ ... limit kvantifikace

SD_{blanku} ... směrodatná odchylka blanku

LOD, potažmo LOQ metody PCR je celkově obtížnější stanovit a existuje pro to několik způsobů. Navíc se stírá rozdíl mezi nimi a tak je tento parametr hodnocen pouze jako LOD. V případě této diplomové práce bylo využito techniky ohraničení spodního rozsahu pomocí četnosti FNR (false negative rate) – falešně negativních výsledků (Broeders et al. 2014). Pro tento způsob je nutné, aby negativní kontroly neposkytovaly žádný měřitelný signál, a to s maximální chybou 5 %, což bylo v tomto případě splněno. Každý koncentrační bod byl proměřen celkem 27krát – v triplikátu v devíti destičkách. U vzorků s příliš nízkými koncentracemi, tedy teoreticky pod LOD, nebylo získáno vždy 27 hodnot, ale méně, jevíly se tedy jako negativní. Do tabulky byl proto uveden počet negativních reakcí a vypočtena byla četnost takovýchto výsledků. Ta by měla dosahovat maximální hodnoty 0,05 (chyba 5 %) pro koncentrační hladiny nad LOD. Výpočet četnosti FNR je naznačen v této rovnici:

$$FNR = [x - (x - x_0)]/x$$

FNR... četnost falešně negativních výsledků

x ... celkový počet hodnot

x_0 ... počet negativních hodnot

3.1.7.4 Opakovatelnost (Suchánek 2009; Plzák a Milde 2015)

Opakovatelnost je zobrazena a hodnocena v podobě relativních směrodatných odchylek měření ve sloupcových grafech, kde se případně projeví některé trendy měření. Směrodatnými odchylkami jsou také doplněny grafy pro linearitu, znázorněné chybovými úsečkami. V programu „R“ byly nejprve vypočteny SD z devíti hodnot pomocí funkce, z nich potom RSD pomocí vzorce:

$$RSD = \frac{SD}{\text{průměr A (nebo RFU)}}$$

RSD ... relativní směrodatná odchylka

SD ... směrodatná odchylka měření

3.1.7.5 Linearita

Tento parametr byl hodnocen v podobě bodového grafu a jeho proložením přímkou lineární regrese. Kontrolován byl také pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu (R^2) získaného z průměrovaných hodnot měřené veličiny pro jednotlivé koncentrační body. R^2 byl vypočten v Excelu a ověřován od nejnižší koncentrace nad LOQ, přičemž jeho hodnota nesměla klesnout pod 0,97.

3.1.7.6 Přepočet hrubých dat na koncentrace

Data z Nanodropu 2000c byla pouze zkontrolována a přejata ze softwaru přístroje. Pro získání koncentrací z analýzy vzorků pomocí destičkové metody bylo využito vzorce, kterého lze užít, pokud neznáme molární absorpční koeficient:

$$c = \frac{A \times f \times \text{ředění}}{0,59}$$

c ... koncentrace

A ... absorbance

f ... faktor pro násobení nukleových kyselin (pro dsDNA = 50, pro ssDNA = 33)

0,59 ... výška hladiny v jamce, která odpovídá 200 μ l

Pro přepočet koncentrací u fluorimetrie byly připraveny kalibrační řady ze standardů z používaných kitů. Naměřené hodnoty RFU vzorků byly potom dosazeny za y do rovnice regrese daných kalibračních přímek.

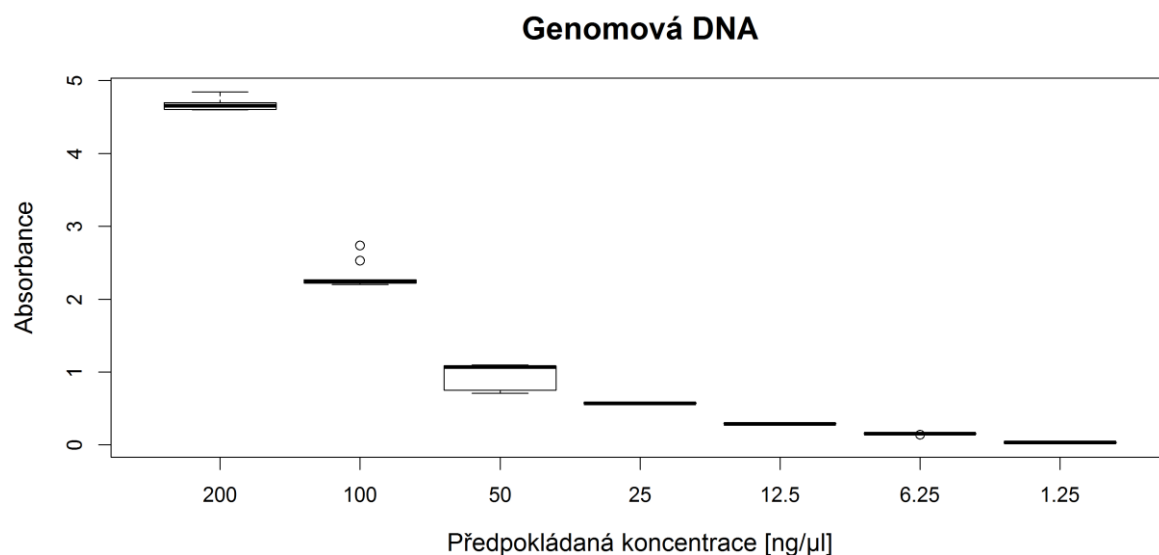
3.2 Výsledky

V této kapitole budou postupně představeny výsledné grafy a výpočty pro každou metodu zvlášť. Členění prezentace výsledků je stejné jako v kapitole 3.1.7, kde byly postupně popsány zpracování a analýza dat.

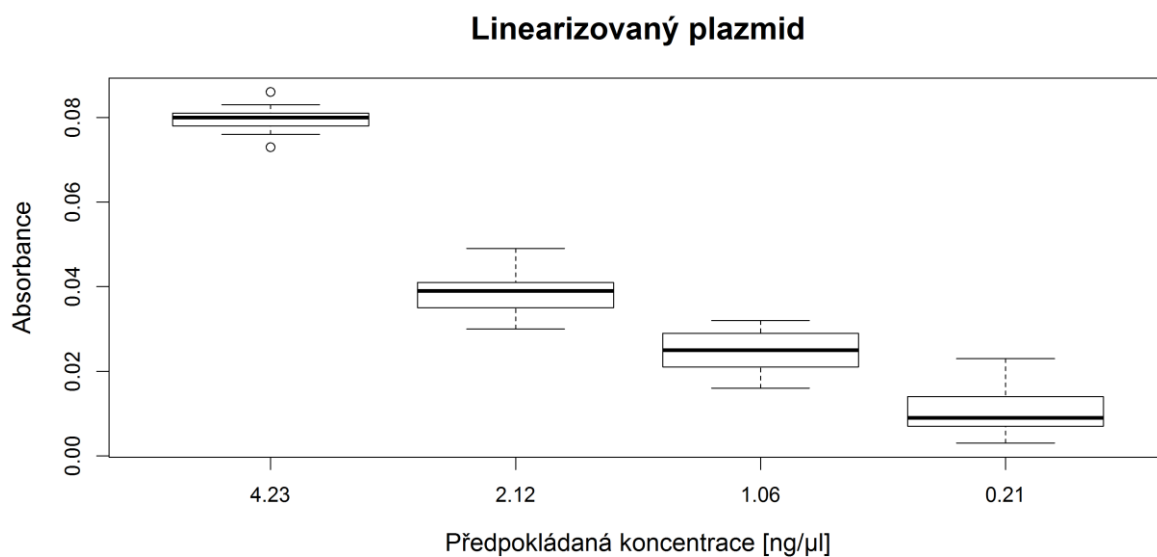
3.2.1 Spektrofotometrické stanovení DNA v kapce

Pro uvedení do tématu a snazší orientaci čtenáře jsou jako první prezentovány krabicové grafy, kde každý koncentrační bod je složen z devíti hodnot. Generovány byly ve statistickém prostředí „R“. Graf 1 je zobrazením pro genomovou DNA, Graf 2 pro linearizovaný plazmid, Graf 3 pro cirkulární plazmid a Graf 4 pro oligonukleotid, ty všechny stanovené pomocí spektrofotometrického stanovení DNA v kapce.

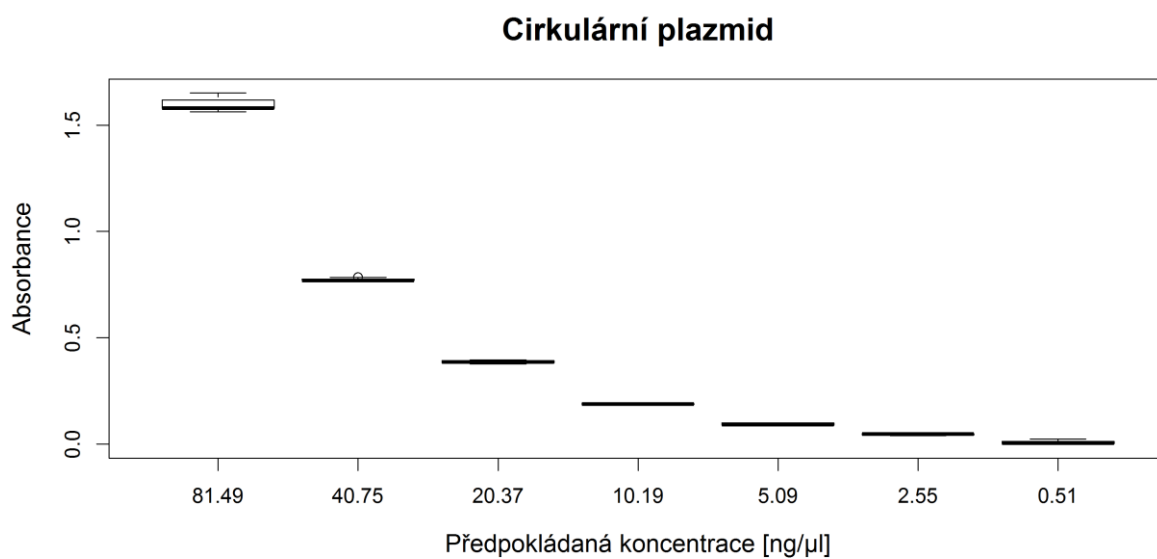
Pro tuto metodu byly stanoveny limity detekce a kvantifikace ze směrodatné odchylky slepého vzorku. Její hodnota je 0,005. Z tohoto údaje byl následně vypočten LOD, který měl hodnotu absorpance 0,017, LOQ 0,051. V krabicových grafech jsou zobrazeny všechny měřené koncentrační body. V případě genomové DNA byl poslední bod pod LOQ i LOD, u obou plazmidů poslední dva body. U oligonukleotidu poskytovaly signál veškeré koncentrační hladiny, nebyl u něho tedy ohraničen pracovní rozsah metody vůbec.



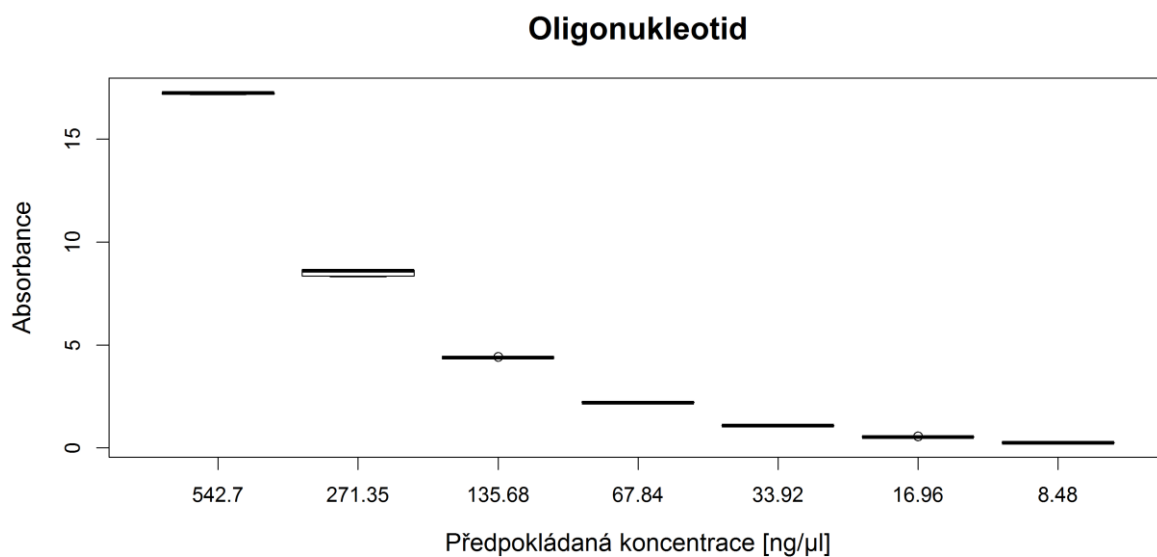
Graf 1 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorpance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce (n = 9). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě poslední bod byl již pod LOD.



Graf 2 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin linearizovaného plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce ($n = 9$). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě poslední dva body byly již pod LOD.

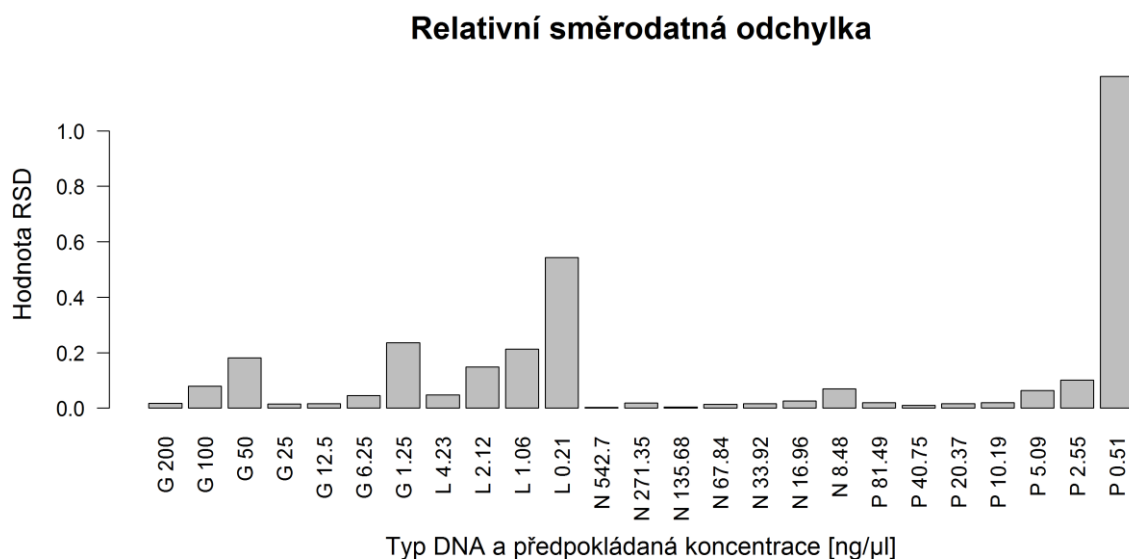


Graf 3 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce ($n = 9$). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě poslední dva body byly již pod LOD.



Graf 4 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce ($n = 9$). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, všechny byly nad LOD.

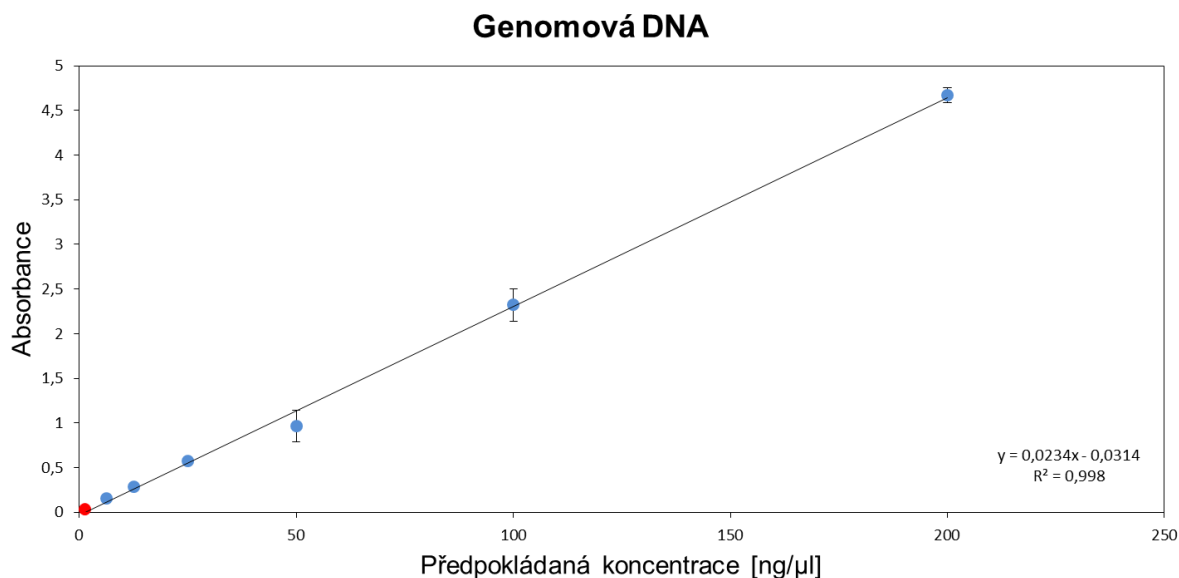
Opakovatelnost této metody je zobrazena pomocí relativních směrodatných odchylek (Graf 5) použitou metodikou z kapitoly 3.1.7.4. Písmeny jsou zjednodušeny jednotlivé typy DNA: G značí genomovou DNA, L je linearizovaný plazmid, N oligonukleotid a P je plazmid cirkulární. U všech těchto typů se objevuje trend měření – čím nižší koncentrace DNA, tím vyšší RSD.



Graf 5 Znázornění relativní směrodatné odchylky sloupcovými grafy pro všechny typy DNA stanovené pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce ($n = 9$); (G – genomová DNA, L – linearizovaný plazmid, N – oligonukleotid, P – cirkulární plazmid).

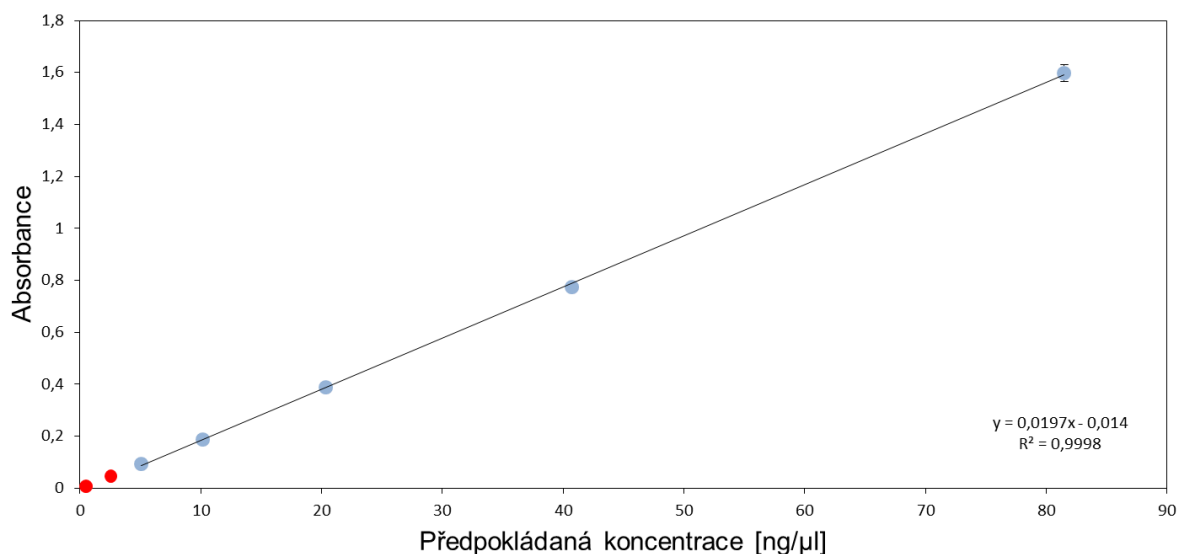
Z devíti hodnot absorbance byl vypočten průměr a směrodatné odchylky. Tyto hodnoty byly vyneseny do bodového grafu vytvořeného v Excelu. Lineární body jsou zbarveny modře a protnuty spojnicí trendu, vložena je také rovnice regrese s hodnotou Pearsonova korelačního koeficientu. Body mimo lineární rozsah (vysoké koncentrace) a také mimo limity detekce a kvantifikace (nízké koncentrace) jsou označeny červenou barvou. V každé koncentrační hladině jsou také zobrazeny chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku z devíti nezávislých měření.

Všechny změřené koncentrační body splňují podmínky linearity, druhá mocnina Pearsonova korelačního koeficientu je vyšší než 0,97. Linearita genomové DNA je snížena díky jednomu koncentračnímu bodu (50 ng/μl), zároveň jeho směrodatná odchylka zobrazená pomocí chybových úseček je největší. Stejného jevu si můžeme všimnout u hodnocení předchozího parametru, opakovatelnosti, kde RSD nesplňuje daný trend měření. Svou roli zde patrně sehrál lidský faktor nebo přítomnost interferencí.



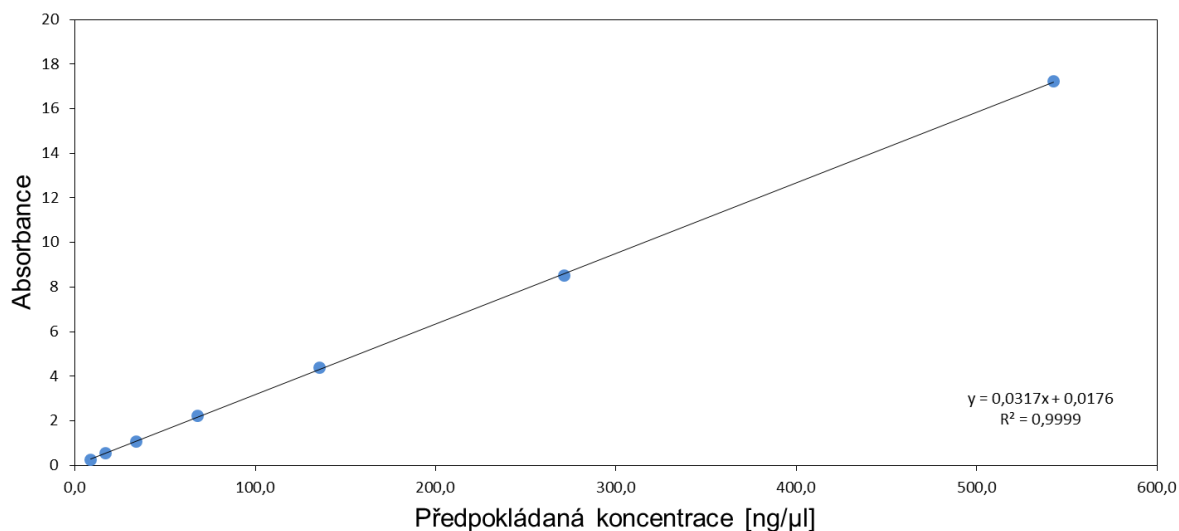
Graf 6 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce (n = 9). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

Cirkulární plazmid



Graf 7 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce ($n = 9$). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

Oligonukleotid



Graf 8 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kapce ($n = 9$). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

V následující tabulce (Tabulka 2) je ověřena linearita pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu (R^2). Počítána byla od nejnižšího koncentračního bodu nad LOQ především proto, aby byla určena linearita také shora, zdola je ohraničena LOQ. Mezní hodnota R^2 byla stanovena jako 0,97, přičemž R^2 následujících hladin se musely dále snižovat. U linearizovaného plazmidu nemohla být linearita hodnocena z důvodu nedostatečného počtu koncentračních bodů nad LOQ.

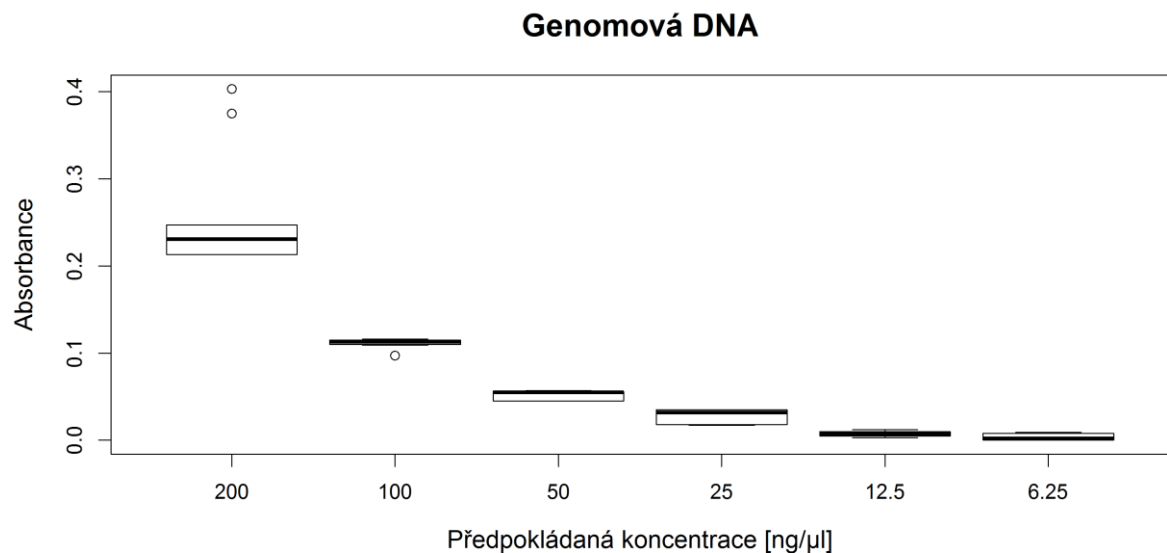
Předpokládaná koncentrace	R^2 od nejnižší koncentrace nad LOQ
Genomová DNA	
200	0,998
100	0,990
50	0,991
25	0,999
12,5	
6,25	
Cirkulární plazmid	
81,49	0,999
40,75	0,999
20,37	0,999
10,19	
5,09	
Oligonukleotid	
542,7	0,999
271,35	0,999
135,68	0,999
67,84	0,999
33,92	0,999
16,96	
8,48	

Tabulka 2 Ověření linearity měření a určení případné horní hraniční hodnoty pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu u spektrofotometrické kapkové metody stanovení DNA

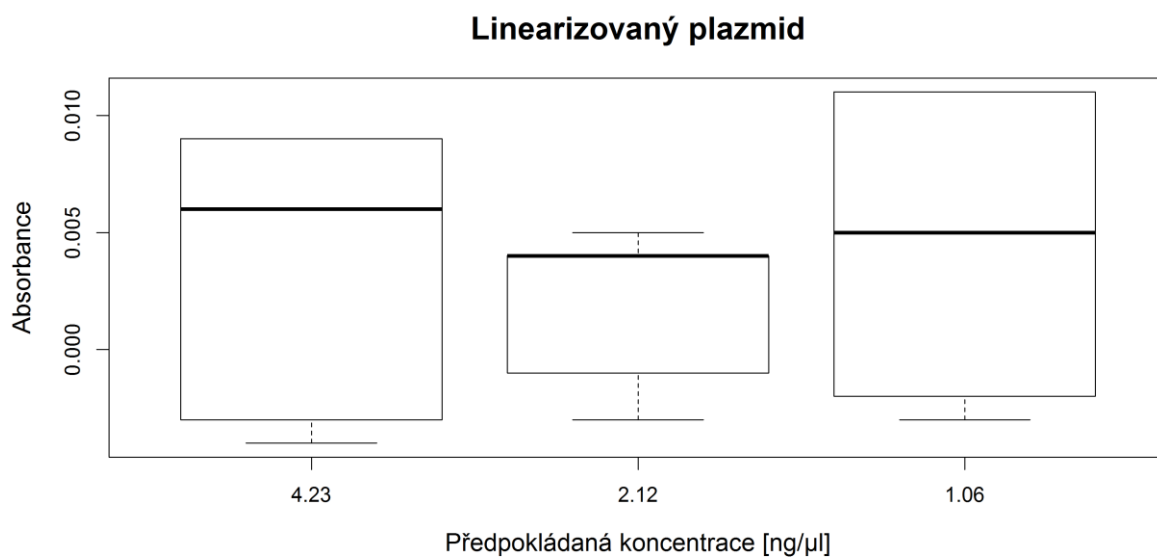
3.2.2 Spektrofotometrické stanovení DNA v kyvetě

Krabicové grafy pro jednotlivé typy DNA analyzované pomocí spektrofotometrické metody v kyvetě jsou představeny na následujících stranách (Graf 9 až 12).

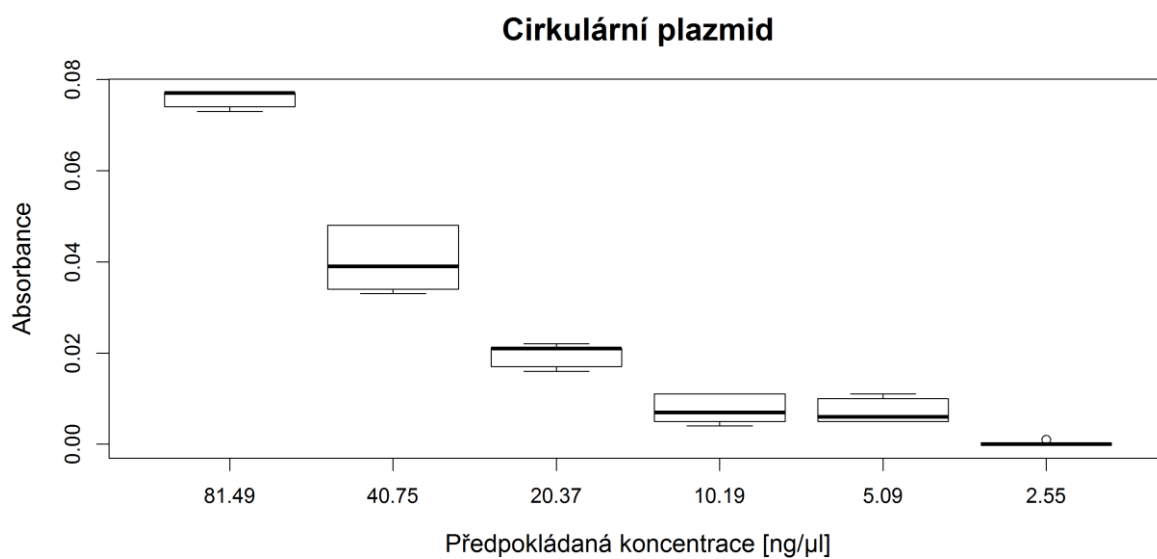
Směrodatná odchylka slepého vzorku proměřeného 30krát byla 0,0017. LOD měl hodnotu absorbance 0,0057, LOQ 0,017. V grafech jsou prezentovány všechny měřené koncentrační hladiny. U genomové DNA byly poslední dva body mimo LOQ i LOD, linearizovaný plazmid neposkytoval žádný měřitelný signál absorbance nad LOD. U cirkulárního plazmidu byly poslední tři ředící body pod LOQ i LOD a u oligonukleotidu pouze poslední bod.



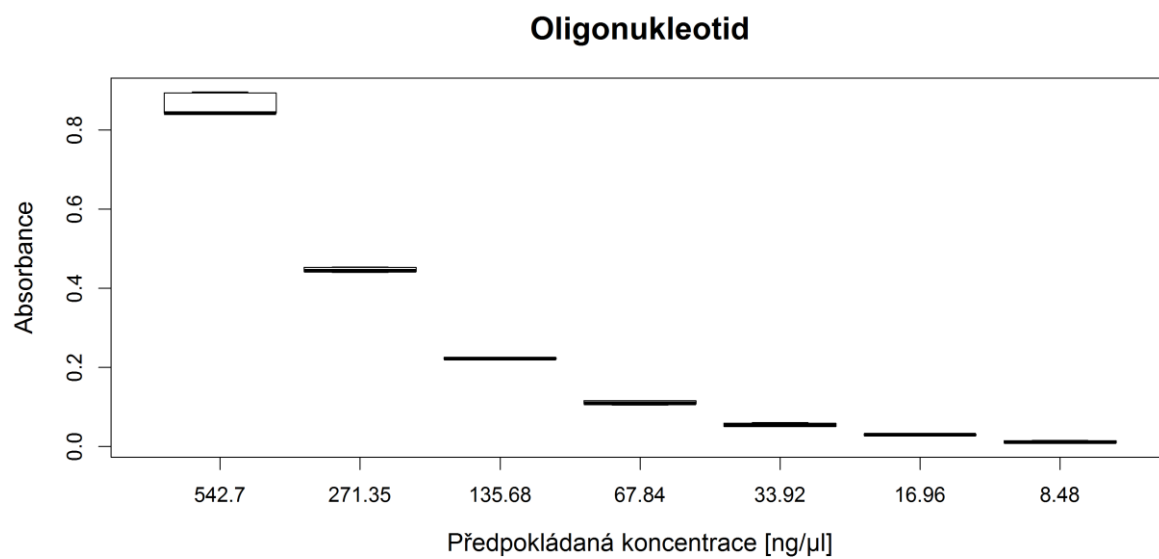
Graf 9 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě ($n = 9$). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě poslední dva body byly již pod LOD.



Graf 10 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin linearizovaného plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě (n = 9). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě byly všechny pod LOD.



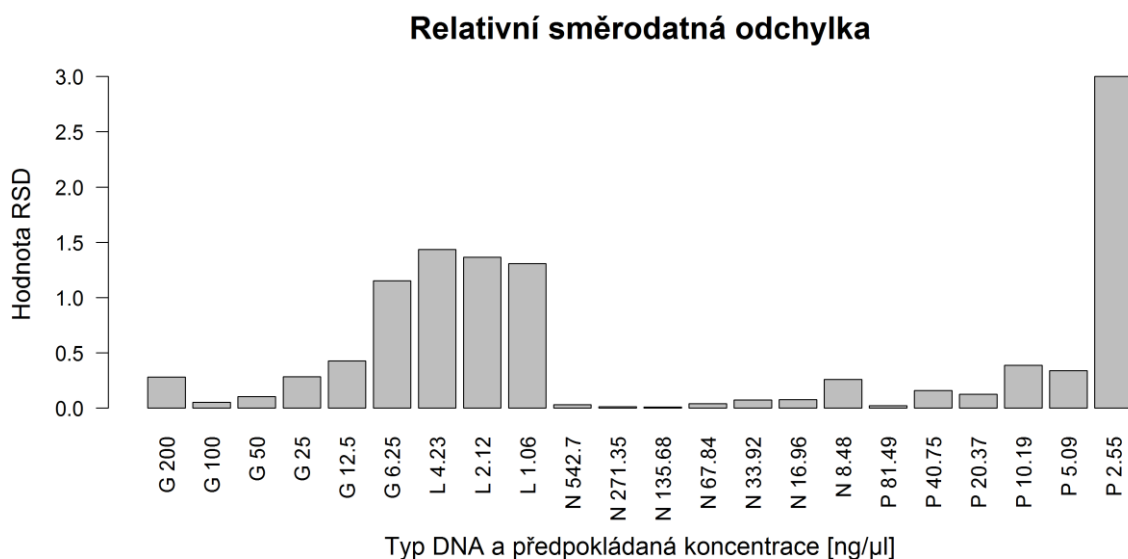
Graf 11 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě (n = 9). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě byly poslední tři pod LOD.



Graf 12 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě (n = 9). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě byl poslední pod LOD.

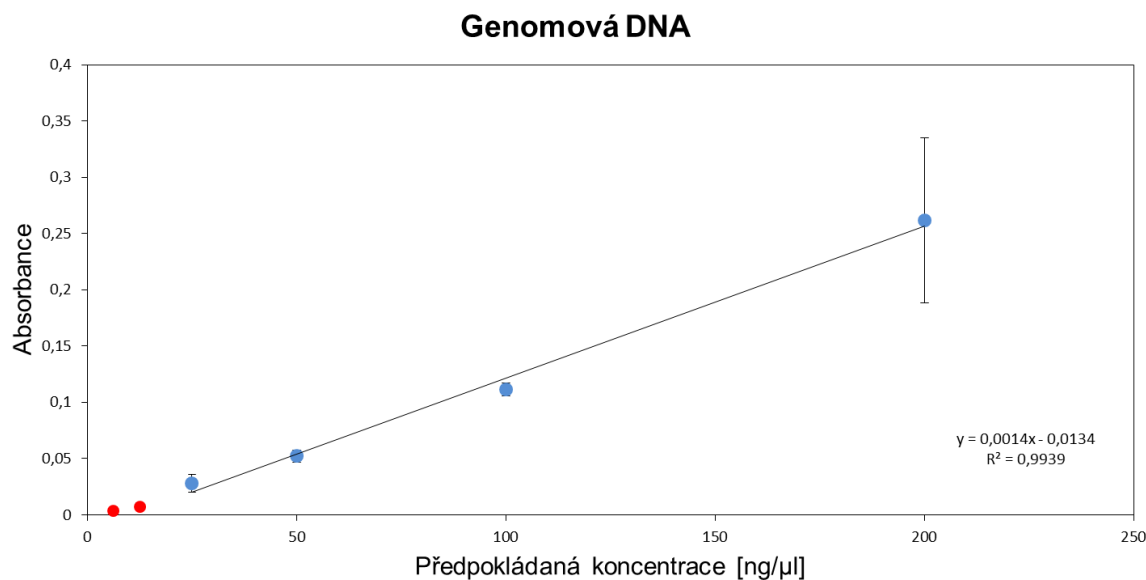
Ve sloupcovém grafu (Graf 13) generovaném také v prostředí „R“ je zobrazena relativní směrodatná odchylka měření pro hodnocení parametru opakovatelnosti spektrofotometrické kyvetové metody. Z tohoto i z předchozích krabicových grafů je patrné, že linearizovaný plazmid stanovený touto metodou nemůže být hodnocen z hlediska žádného ze stanovovaných výkonnostních parametrů, proto je v nadcházejícím znázornění linearity vynechán.

Minimální hodnoty RSD jsou viditelné u oligonukleotidu. Díky tomu se jeví kyvetová spektrofotometrická metoda jako velmi vhodná pro opakovatelné a precizní výsledky měření tohoto typu DNA. Odchyly měření u ostatních typů DNA jsou viditelně vyšší než u mikroobjemového stanovení DNA v kapce. Lze zde tedy uvažovat o ovlivnění metody strukturou DNA.

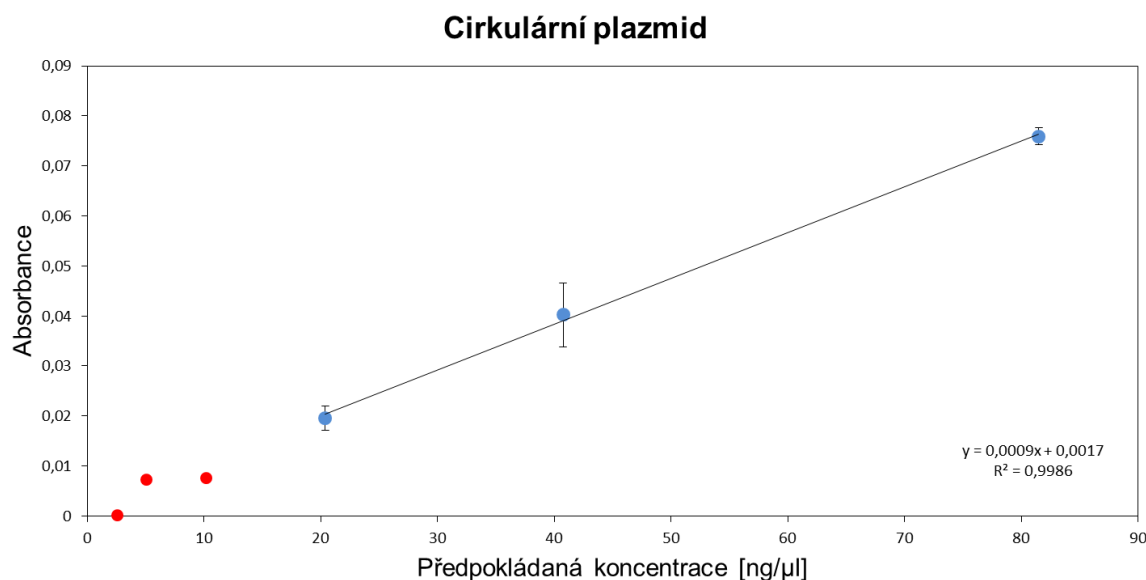


Graf 13 Znázornění relativní směrodatné odchylky sloupcovými grafy pro všechny typy DNA stanovené pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě (n = 9); (G – genomová DNA, L – linearizovaný plazmid, N – oligonukleotid, P – cirkulární plazmid)

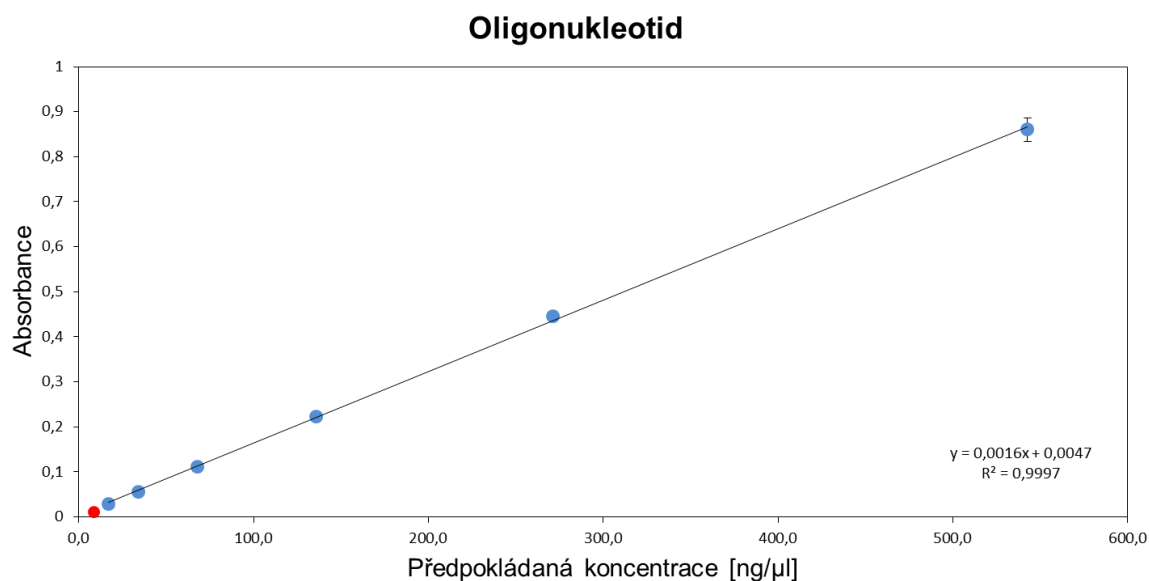
Linearita měření jednotlivých typů DNA pomocí spektrofotometrického stanovení obsahu DNA v kyvetě je zobrazena bodovými grafy s lineární regresí (Graf 14, 15 a 16). Všechny naměřené koncentrační hladiny mají lineární průběh.



Graf 14 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě ($n = 9$). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.



Graf 15 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě ($n = 9$). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.



Graf 16 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí spektrofotometrického stanovení v kyvetě (n = 9). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

Tabulka 3 zobrazuje druhou mocninu Pearsonova korelačního koeficientu pro tuto metodu, pro jednotlivé typy DNA (mimo linearizovaný plazmid) a jednotlivé koncentrační body.

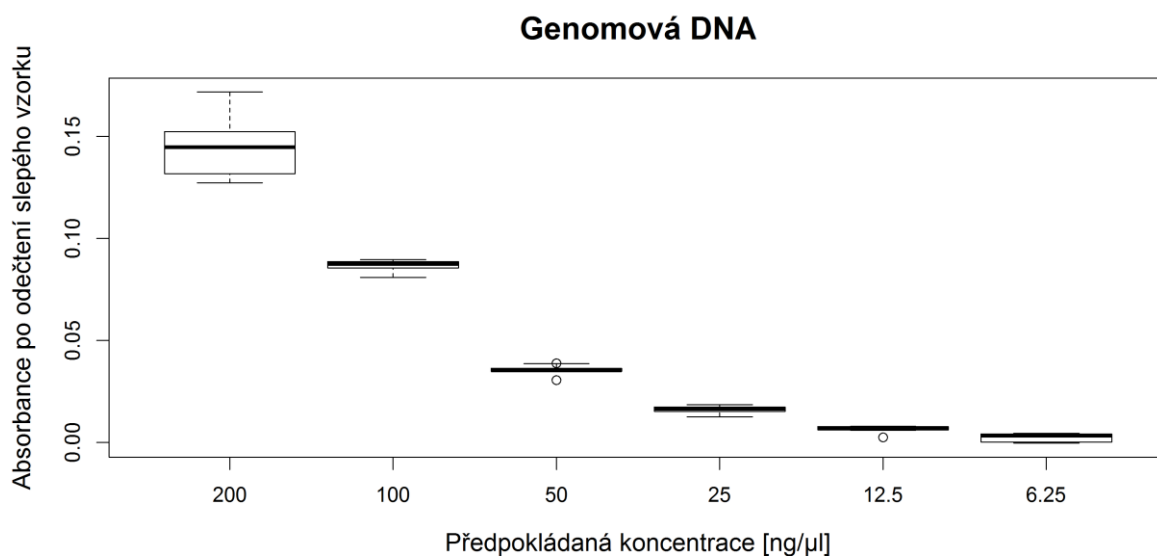
Předpokládaná koncentrace	R ² od nejnižší koncentrace nad LOQ
Genomová DNA	
200	0,994
100	0,998
50	
25	
Cirkulární plazmid	
81,49	0,999
40,75	
20,37	
Oligonukleotid	
542,7	0,999
271,35	0,999
135,68	0,999
67,84	0,999
33,92	
16,96	

Tabulka 3 Ověření linearity měření a určení případné horní hraniční hodnoty pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu u spektrofotometrické destičkové metody stanovení DNA

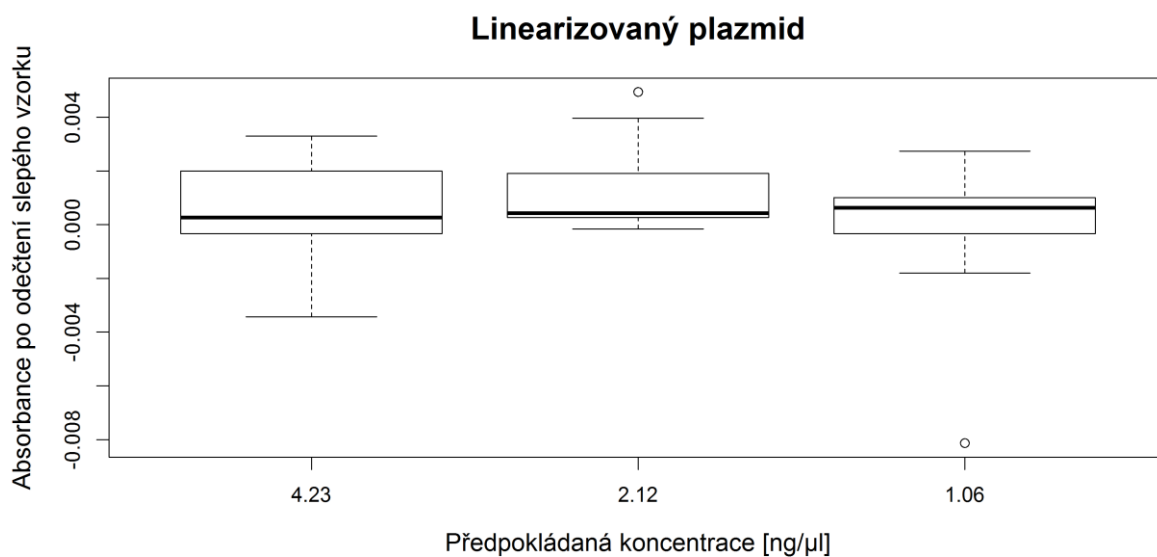
3.2.3 Spektrofotometrické stanovení DNA v destičce

V následujících krabicových grafech jsou představeny výsledky destičkové spektrofotometrické metody. Každý koncentrační bod je složen z 9 hodnot. V případě tohoto stanovení nelze zadat automatickou korekci pozadí v přístroji, proto hodnoty vynesené na ose x odpovídají naměřené absorbanci po odečtení slepého vzorku.

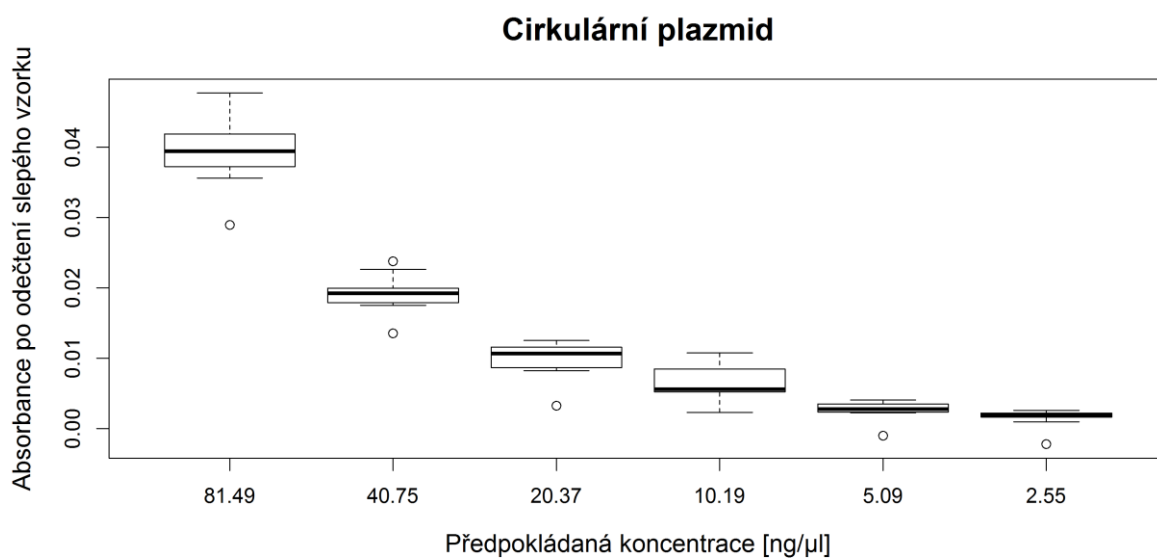
Pro toto stanovení je hodnota směrodatné odchylky slepého vzorku 0,0015. Získána byla pomocí metodiky popsané v postupu v kapitole 3.1.4. LOD odpovídá hodnotě absorbance 0,0048 a LOQ 0,015. V grafech jsou zobrazeny všechny měřené koncentrační body. V případě genomové DNA jsou již poslední dva pod LOQ i LOD, u linearizovaného plazmidu byly, stejně jako při kyvetovém spektrofotometrickém stanovení, všechny body pod LOD. Linearizovaný plazmid nemohl být opět žádnou výkonnostní charakteristikou hodnocen. Cirkulární plazmid byl změřen pouze v prvních dvou koncentračních hladinách a u oligonukleotidu byl pouze poslední bod pod LOQ i LOD.



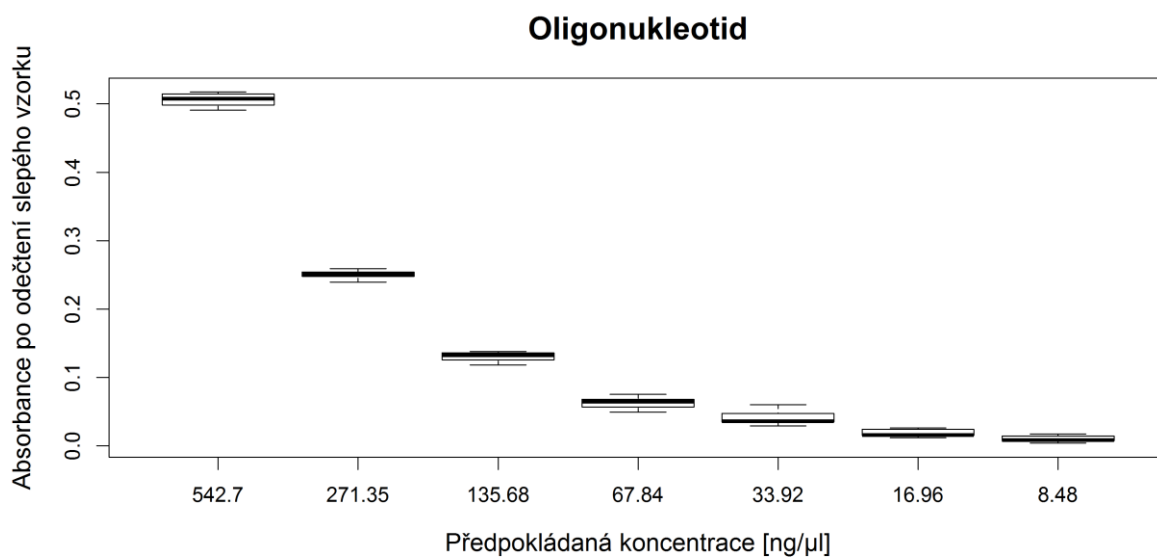
Graf 17 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce ($n = 9$). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě poslední dva body byly již pod LOD.



Graf 18 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce (n = 9). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě byly všechny pod LOD.

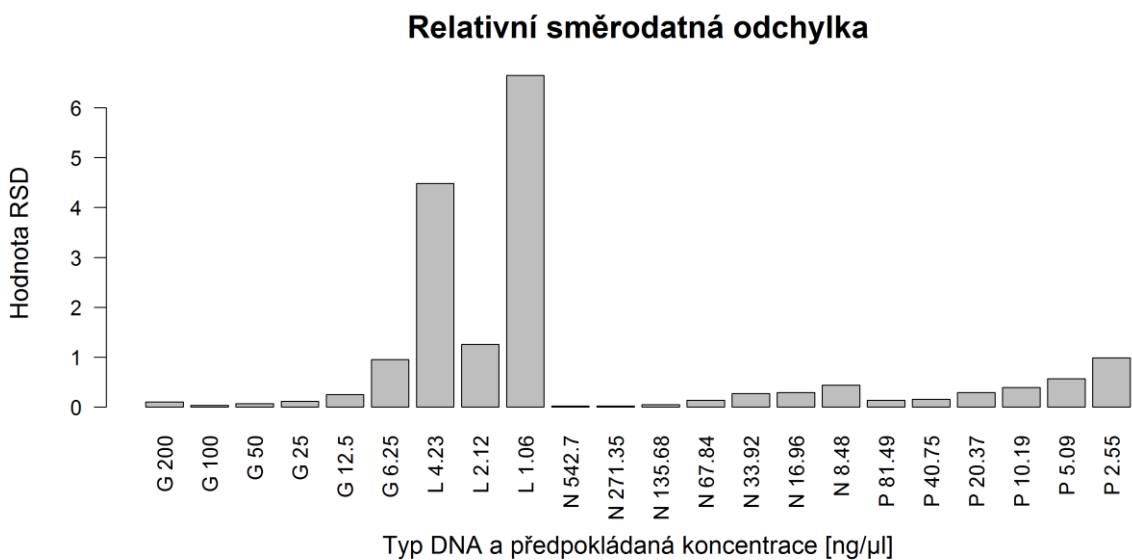


Graf 19 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce (n = 9). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě pouze první dva jsou nad LOD.



Graf 20 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce (n = 9). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační body, v tomto případě poslední bod byl již pod LOD.

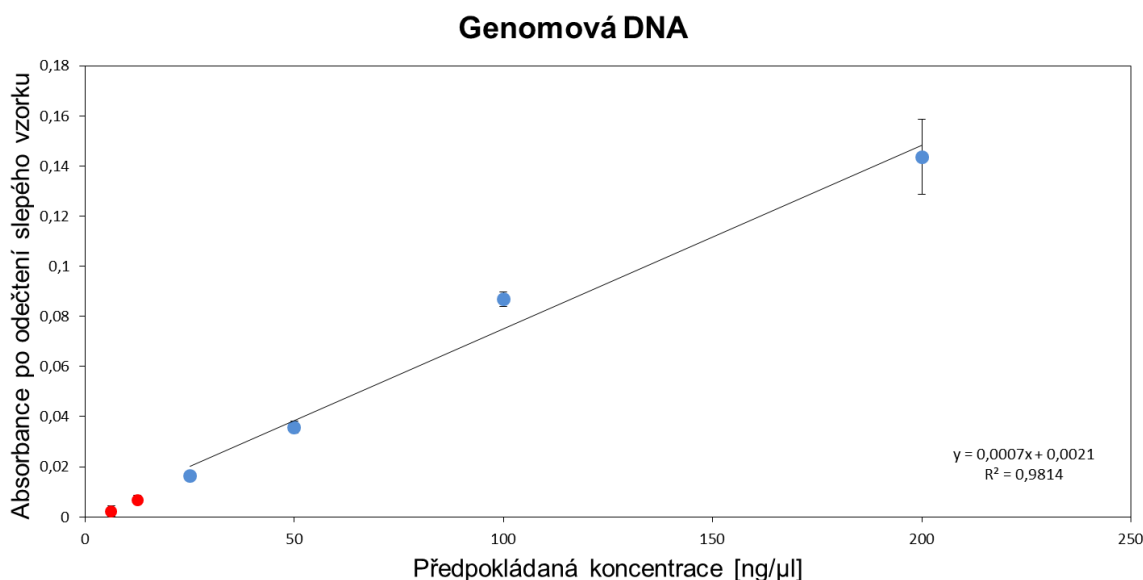
Relativní směrodatnou odchylku prezentující preciznost/opakovatelnost spektrofotometrické destičkové metody představuje Graf 21.



Graf 21 Znázornění relativní směrodatné odchylky sloupcovými grafy pro všechny typy DNA stanovené pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce (n = 9); (G – genomová DNA, L – linearizovaný plazmid, N – oligonukleotid, P – cirkulární plazmid)

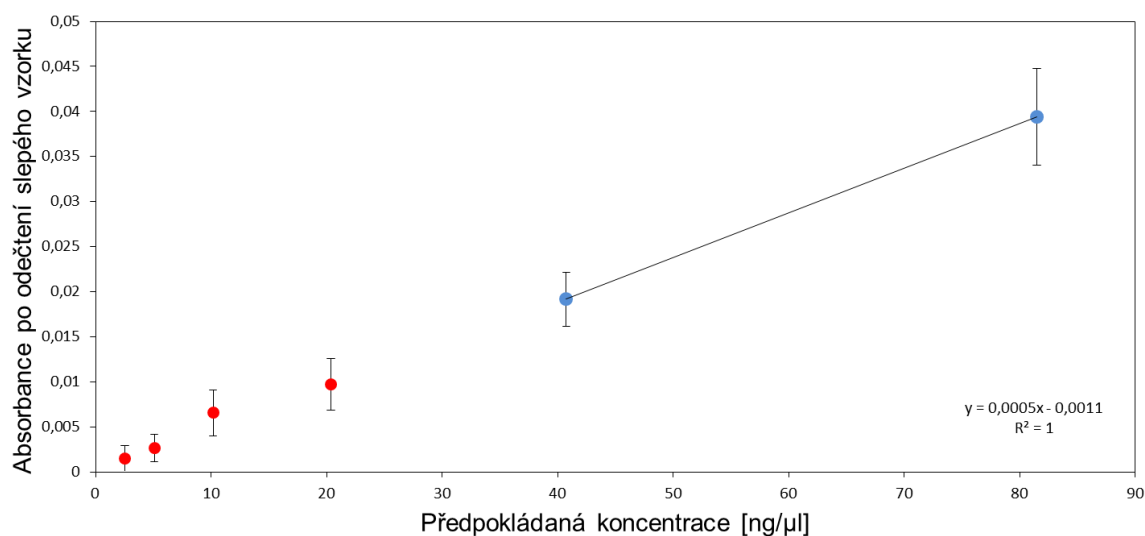
Grafy 22, 23 a 24 zobrazují linearitu měření jednotlivých typů DNA stanovených spektrofotometrickou metodou v destičce, zároveň obsahují směrodatné odchylky v podobě chybových úseček každé koncentrační hladiny.

Podmínky linearity u genomové DNA byly splněny. Z grafu znázorňující linearitu oligonukleotidu (Graf 24) a zároveň z grafu pro opakovatelnost (Graf 21) je patrné, že hodnoty SD i RSD jsou velmi nízké, navíc druhá mocnina Pearsonova korelačního koeficientu se hodně blíží jedné. Lze tedy opět uvažovat o vhodnosti této metody ke stanovení oligonukleotidů. U cirkulárního plazmidu byly změřeny pouze dvě koncentrační hladiny, hodnota R^2 mezi dvěma body bude vždy rovna jedné. Proto z hlediska linearity nemůžeme porovnávat ani tento typ DNA.



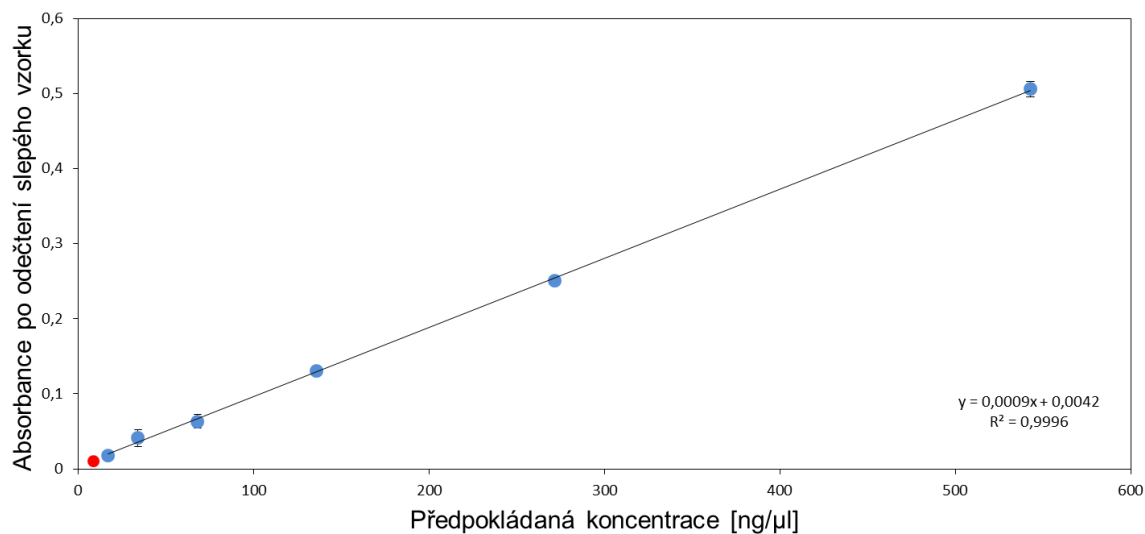
Graf 22 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce ($n = 9$). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

Cirkulární plazmid



Graf 23 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce (n = 9). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

Oligonukleotid



Graf 24 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce (n = 9). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

Druhá mocnina Pearsonova korelačního koeficientu počítaná od nejnižší koncentrace nad LOQ je ověřena v následující tabulce. Oba plazmidy nemohly být z hlediska tohoto parametru – linearity hodnoceny. Počet bodů nad LOQ je buď příliš nízký, nebo nejsou žádné body nad LOQ.

Předpokládaná koncentrace	R^2 od nejnižší koncentrace nad LOQ
Genomová DNA	
200	0,981
100	0,996
50	
25	
Oligonukleotid	
542,7	0,999
271,35	0,999
135,68	0,993
67,84	0,960
33,92	
16,96	

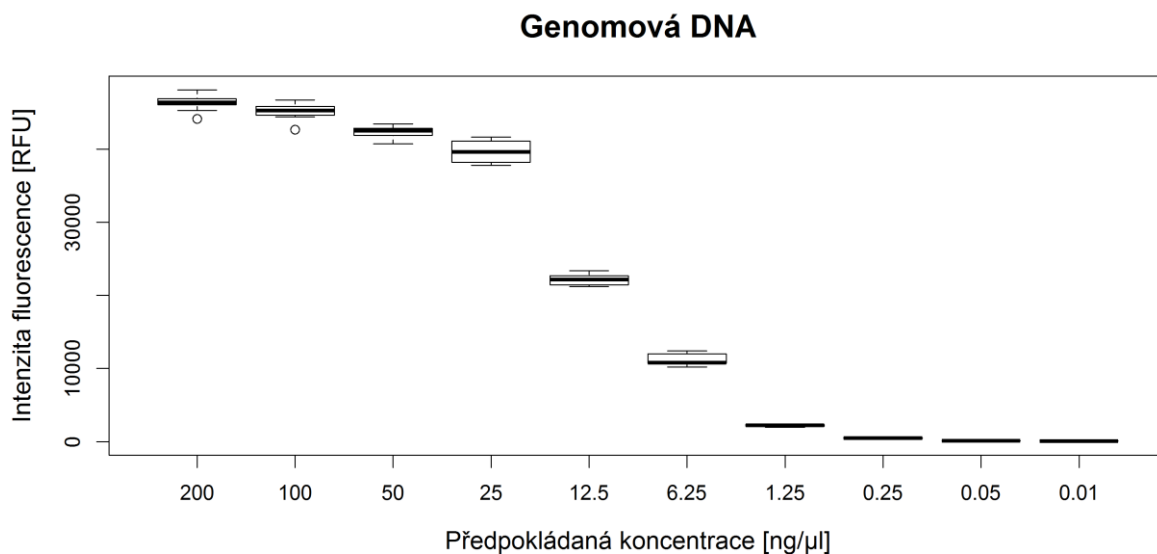
Tabulka 4 Ověření linearity měření a určení případné horní hraniční hodnoty pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu u spektrofotometrické kyvetové metody stanovení DNA

3.2.4 Fluorimetrické stanovení DNA

Pro uvedení dat kvantifikace DNA pomocí fluorimetrického stanovení následují krabicové grafy jednotlivých typů DNA.

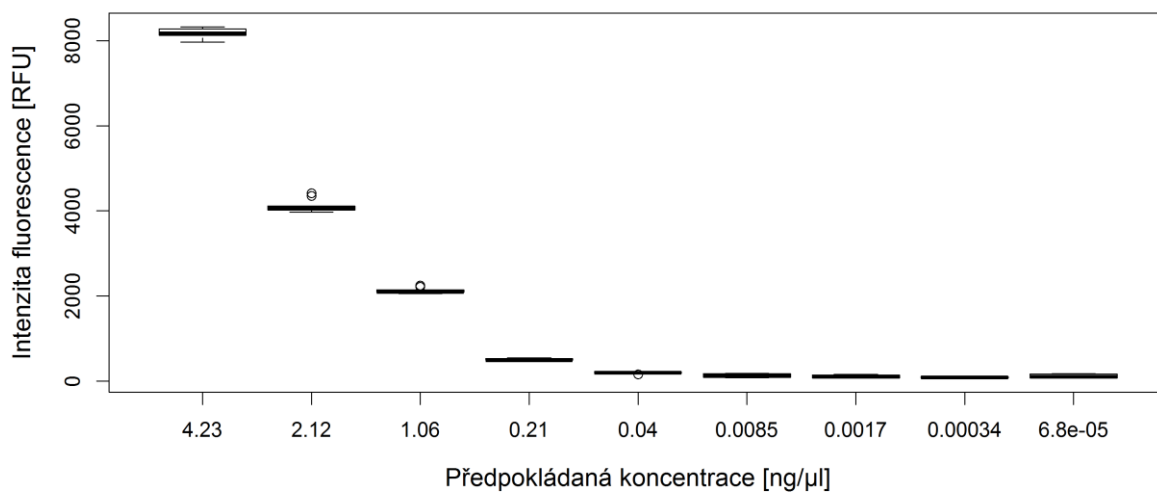
V grafech pro genomovou DNA, cirkulární plazmid a oligonukleotid jsou pro větší přehlednost ponechány pouze tři koncentrační hladiny, které byly zobrazeny na stejné úrovni, nebyla u nich pozorována žádná změna v úrovni RFU. U linearizovaného plazmidu byly ponechány všechny hodnoty, jelikož nebylo měřeno tolik koncentračních bodů.

Směrodatná odchylka slepého vzorku byla vypočtena po napipetování a proměření celé mikrotitrační destičky. Jeho hodnota byla 26,29 RFU. Z toho byl odvozen LOD s hodnotou 86,74 RFU a LOQ 262,86 RFU. Hraniční hodnotou, tedy poslední koncentrací nad LOQ, byla v případě genomové DNA koncentrace 0,25 ng/μl, v případě linearizovaného plazmidu 0,21 ng/μl, cirkulárního plazmidu 0,51 ng/μl a oligonukleotidu 0,34 ng/μl.



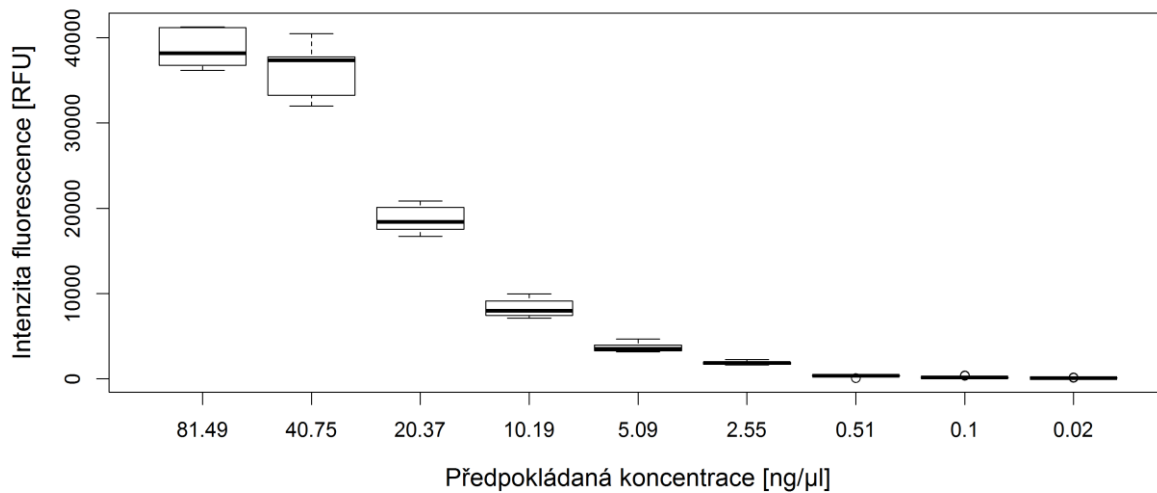
Graf 25 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí fluorimetrického stanovení (n = 9). Zobrazeny jsou všechny body nad LOD spolu se třemi posledními hladinami, kde nebyla pozorována již žádná změna v úrovni RFU.

Linearizovaný plazmid

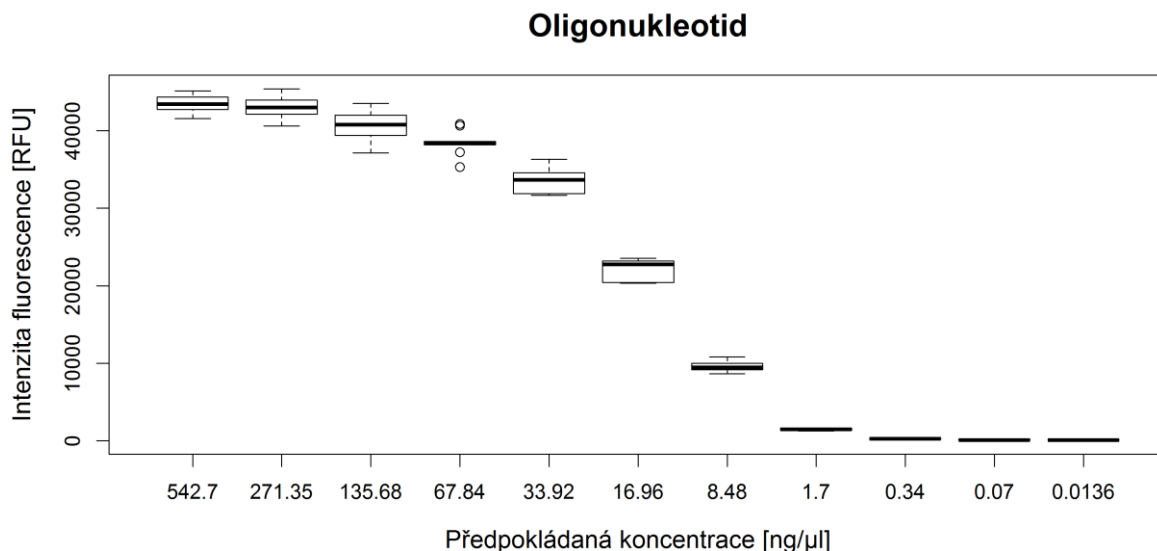


Graf 26 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin linearizovaného plazmidu pomocí fluorimetrického stanovení (n = 9). Zobrazeny jsou všechny měřené body, z toho jsou pouze první čtyři nad LOD.

Cirkulární plazmid

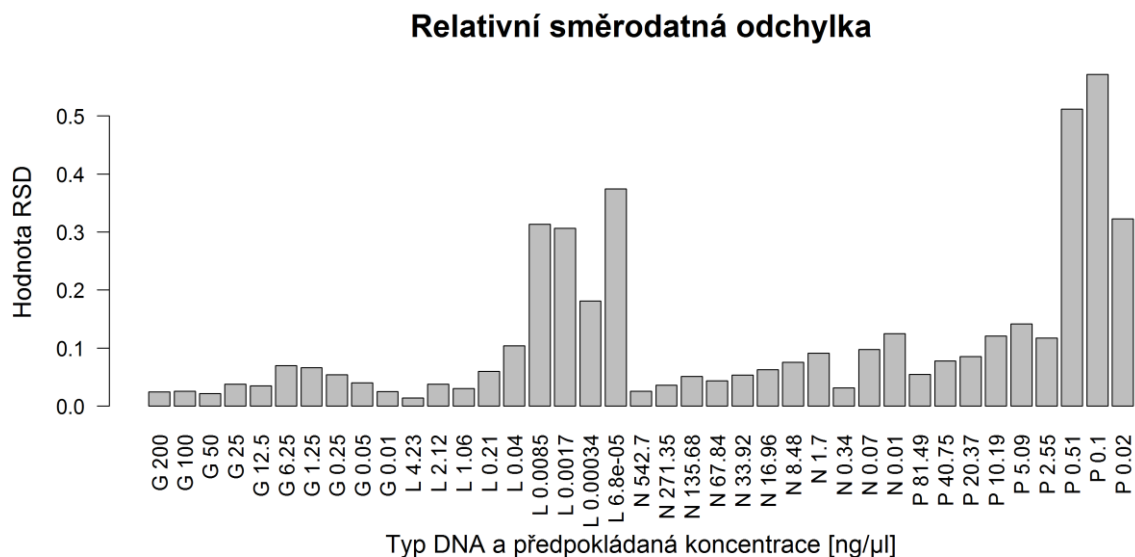


Graf 27 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí fluorimetrického stanovení (n = 9). Zobrazeny jsou všechny body nad LOD spolu se třemi posledními hladinami, kde nebyla pozorována již žádná změna v úrovni RFU.



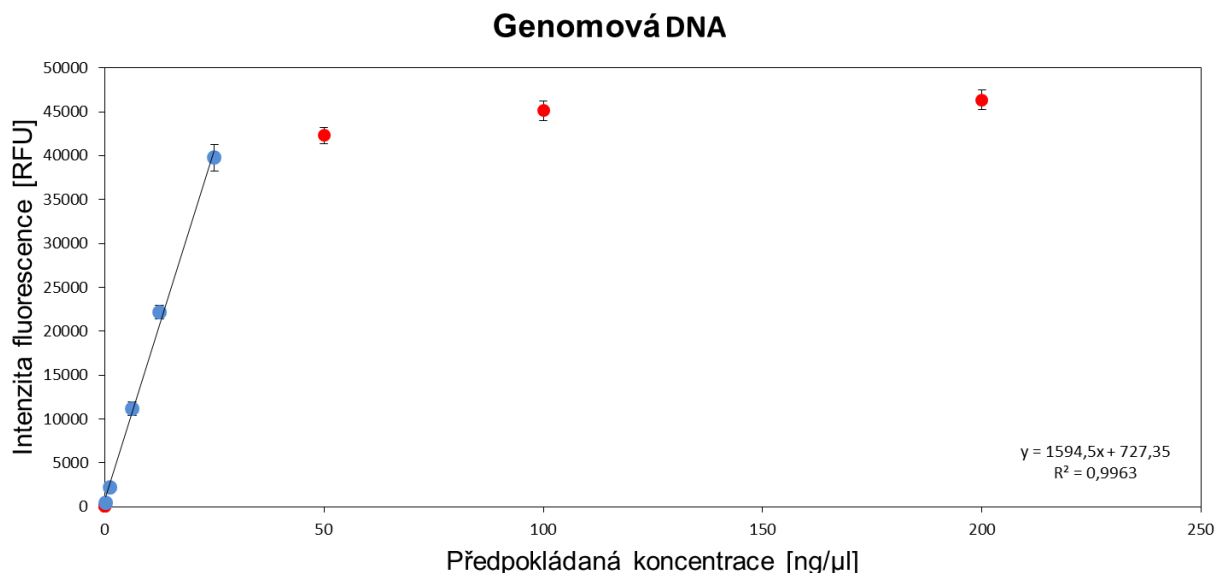
Graf 28 Krabicový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí fluorimetrického stanovení (n = 9). Zobrazeny jsou všechny body nad LOD spolu se třemi posledními hladinami, kde nebyla pozorována již žádná změna v úrovni RFU.

Opakovatelnost je zobrazena pomocí RSD ve sloupcovém grafu (Graf 29). Pro větší přehlednost a sjednocení dat byl graf generován se stejným počtem koncentračních hladin jako krabicové grafy.

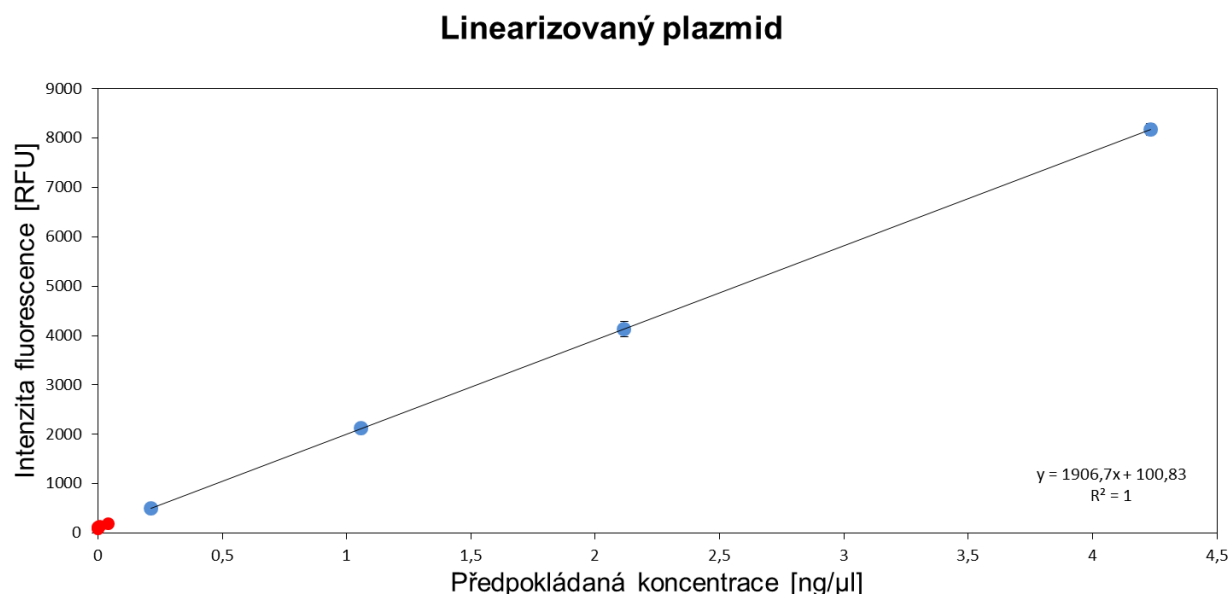


Graf 29 Znázornění relativní směrodatné odchylky sloupcovými grafy pro všechny typy DNA stanovené pomocí fluorimetrického stanovení (n = 9); (G – genomová DNA, L – linearizovaný plazmid, N – oligonukleotid, P – cirkulární plazmid). Zobrazené koncentrační hladiny jsou sjednoceny s krabicovými grafy.

Lineární regrese jednotlivých typů DNA kvantifikovaných fluorimetrickou metodou je zobrazena v následujících bodových grafech s barevným odlišením pracovního a lineárního rozsahu včetně chybových úseček znázorňujících směrodatné odchylky. Všechny změřené koncentrační body jsou lineární, hodnota R^2 je vyšší než 0,97, u oligonukleotidu však těsně.

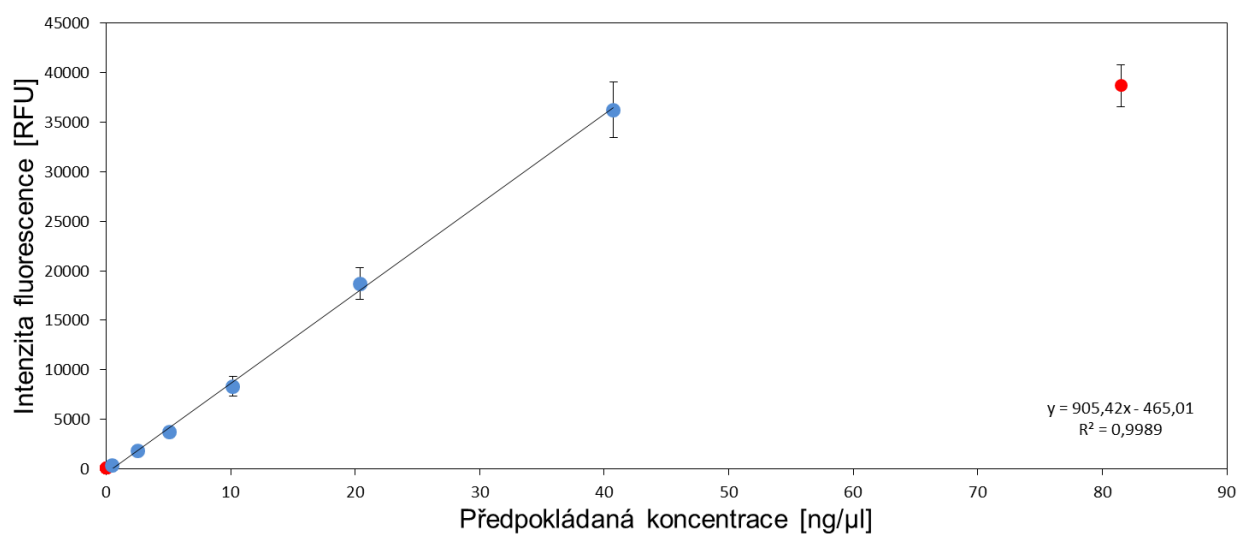


Graf 30 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí fluorimetrického stanovení ($n = 9$). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.



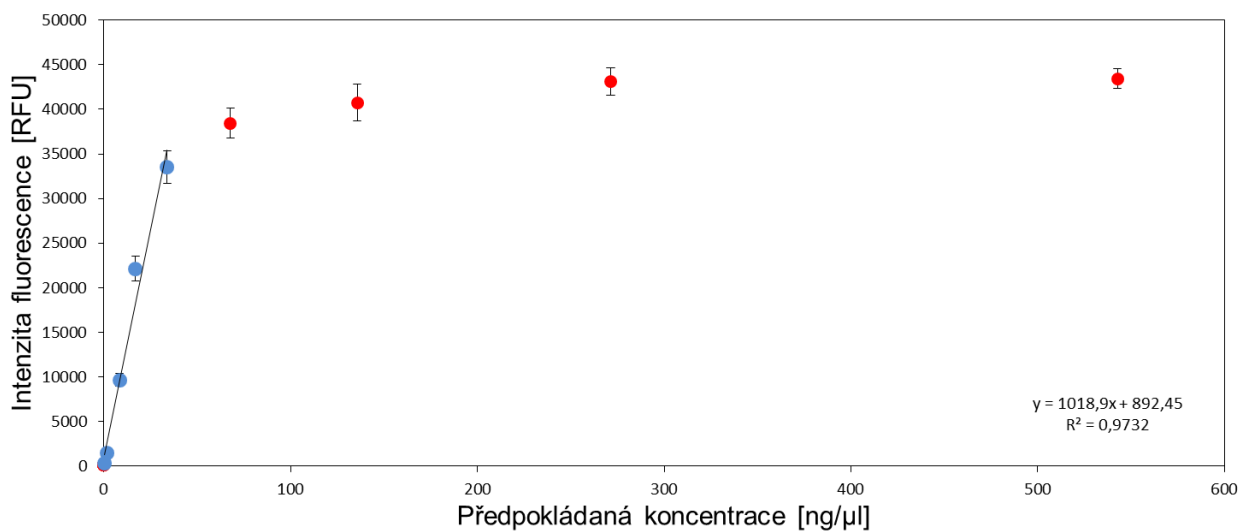
Graf 31 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin linearizovaného plazmidu pomocí fluorimetrického stanovení ($n = 9$). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

Cirkulární plazmid



Graf 32 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí fluorimetrického stanovení (n = 9). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

Oligonukleotid



Graf 33 Bodový graf reprezentující naměřené hodnoty RFU jednotlivých koncentračních hladin oligonukleotidu pomocí fluorimetrického stanovení (n = 9). Modrou barvou jsou zobrazeny body v lineárním rozsahu, červeně body mimo tento rozsah a pod LOD nebo LOQ. Chybové úsečky u každého bodu znázorňují směrodatné odchylky devíti měření.

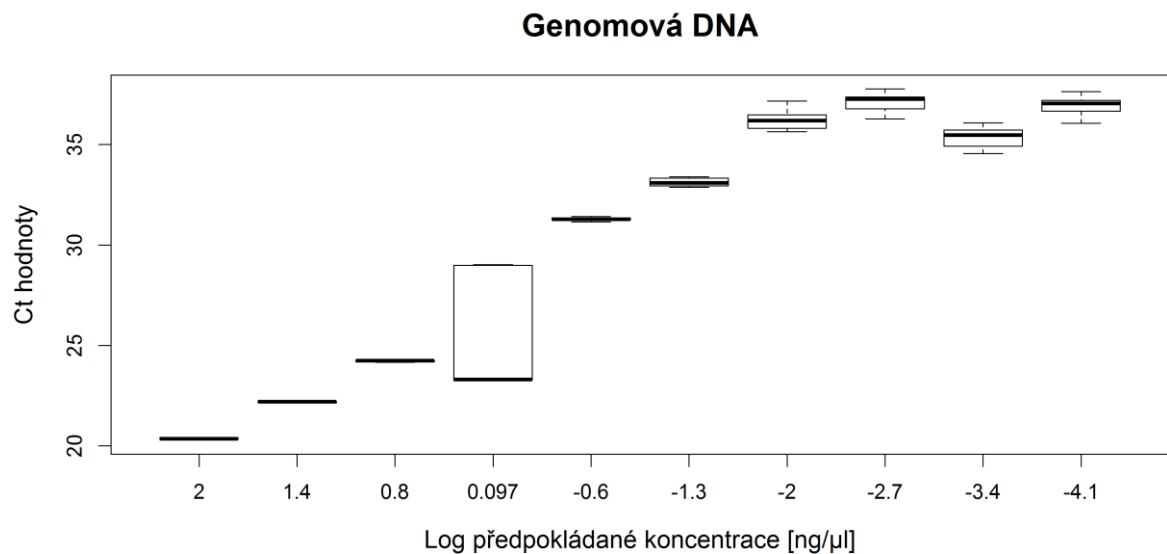
V následující tabulce je počítána hodnota R^2 od nejnižší koncentrace nad LOQ. V případě fluorimetrického stanovení DNA bylo toto ověření R^2 nejužitečnější. U fluorimetrie jako jediné byl ohraničen lineární rozsah i shora. Vyloučeny byly body s hodnotami nižšími než 0,97, přičemž hodnoty nadcházejících bodů se musely nadále snižovat.

Předpokládaná koncentrace	R^2 od nejnižší koncentrace nad LOQ
Genomová DNA	
200	0,523
100	0,668
50	0,832
25	0,996
12,5	0,999
6,25	0,999
1,25	
0,25	
Linearizovaný plazmid	
4,23	0,999
2,12	0,999
1,06	
0,21	
Cirkulární plazmid	
81,49	0,853
40,75	0,999
20,37	0,996
10,19	0,997
5,09	
2,55	
Oligonukleotid	
542,7	0,432
271,35	0,552
135,68	0,679
67,84	0,842
33,92	0,973
16,96	0,996
8,48	0,998
1,70	
0,34	

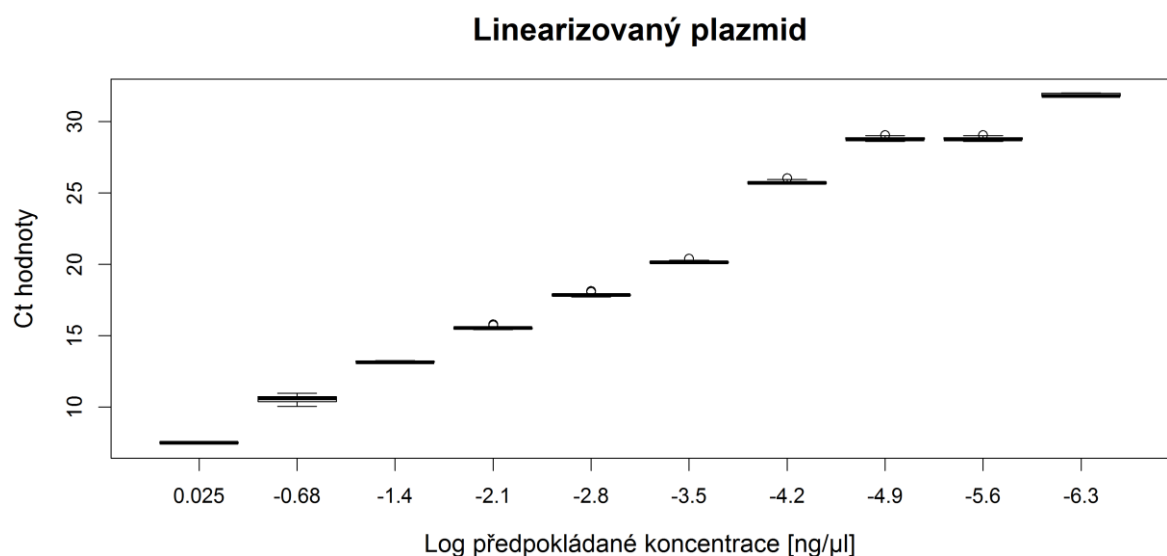
Tabulka 5 Ověření linearitu měření a určení případné horní hraniční hodnoty pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu u fluorimetrické metody stanovení DNA

3.2.5 Stanovení DNA pomocí metody real-time PCR

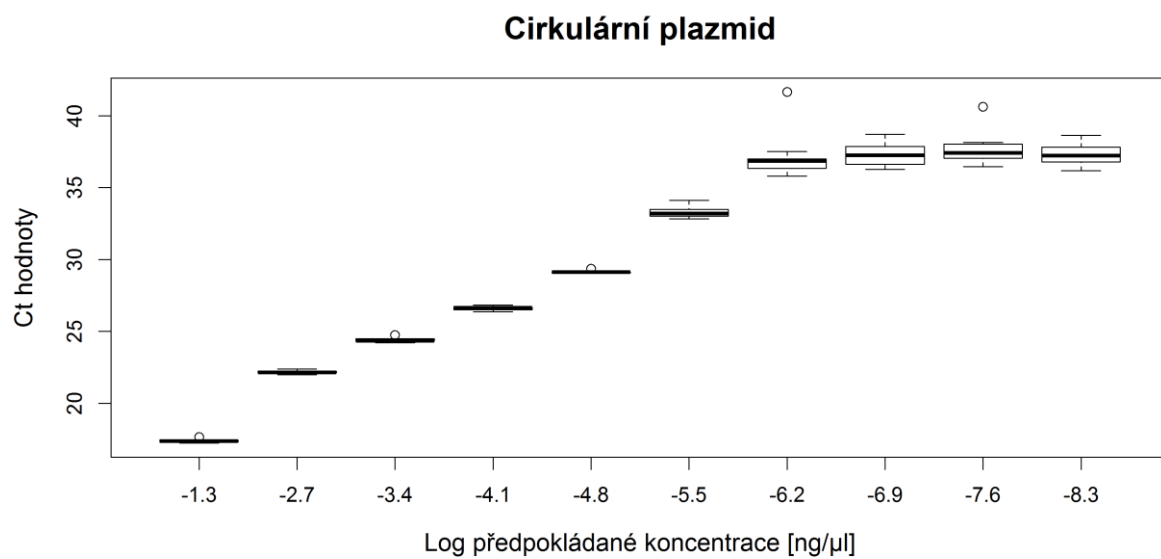
Následující krabicové grafy (Graf 34 až 36) reprezentují měření jednotlivých typů DNA pomocí metody qPCR. Na ose x je vyneseno dekadický logaritmus předpokládaných koncentrací, na ose y získané Ct hodnoty. Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační hladiny. Každý bod je složen z 27 hodnot nezávislých měření. Jedná se o individuální reakci v každé jamce se vzorkem, v triplicátu v devíti destičkách, nelze proto hodnoty sjednotit do devíti jako v předchozích případech.



Graf 34 Krabicový graf reprezentující naměřené Ct hodnoty jednotlivých koncentračních hladin genomové DNA pomocí metody real-time PCR ($n = 27$). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační hladiny.



Graf 35 Krabicový graf reprezentující naměřené Ct hodnoty jednotlivých koncentračních hladin lineárního plazmidu pomocí metody real-time PCR ($n = 27$). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační hladiny.



Graf 36 Krabicový graf reprezentující naměřené Ct hodnoty jednotlivých koncentračních hladin cirkulárního plazmidu pomocí metody real-time PCR (n = 27). Zobrazeny jsou všechny měřené koncentrační hladiny.

Tabulka 6 představuje LOD metody qPCR pro jednotlivé typy DNA. Ke každé koncentrační hladině jsou uvedeny počty celkových a negativních reakcí. Z nich byl vypočten FNR neboli četnost falešně negativních výsledků. Jsou-li jeho hodnoty vyšší než 0,05 (5% chyba), pak jsou tyto body pod LOD, potažmo LOQ. Pro propojení qPCR s ostatními metodami je v tabulce také uvedena druhá mocnina Pearsonova korelačního koeficientu, díky které lze posuzovat také linearitu, v tomto případě je však počítána od nejvyšší koncentrace.

U genomové DNA je variabilita výsledků měření v bodě odpovídající 1,25 ng/μl poměrně výrazná, linearita této metody je tedy značně ovlivněna a lze předpokládat možnou přítomnost interferujících látek ve vzorku. Plazmidy jsou v naměřených koncentračních hladinách lineární.

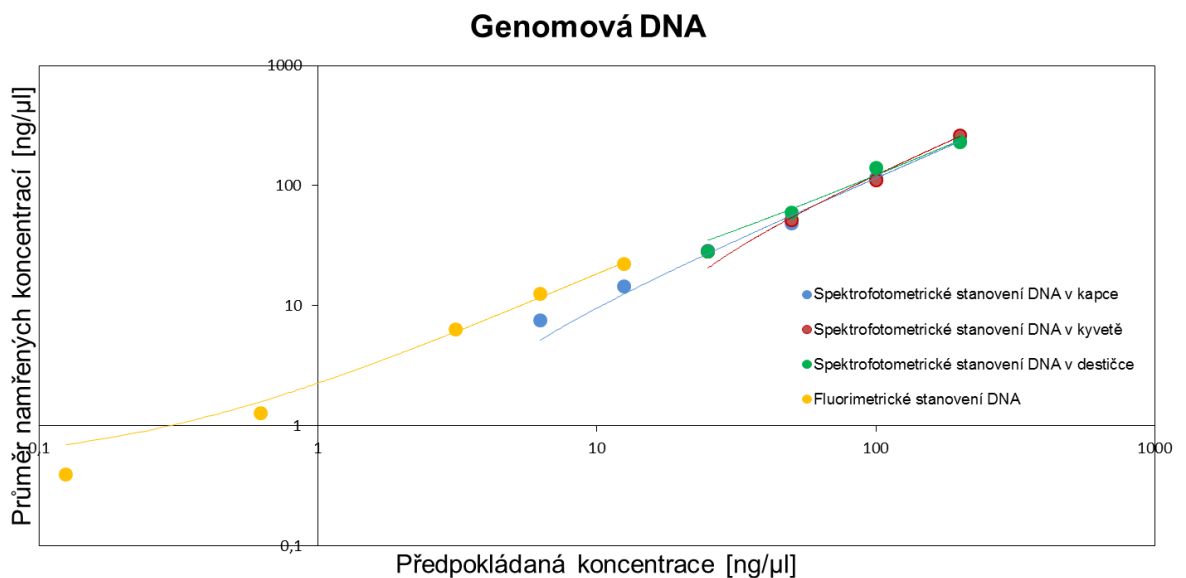
Předpokládaná koncentrace	Logaritmus předpokládané koncentrace	Celkem RXN	Negativní RXN	FNR	R ² od nejvyšší koncentrace
Genomová DNA					
100	2,000	27	0	0	
25	1,398	27	0	0	
6,25	0,796	27	0	0	0,999
1,25	0,097	27	0	0	0,993
0,25	-0,602	27	0	0	0,940
0,05	-1,301	27	0	0	0,967
0,01	-2,000	24	3	0,111	0,980
0,002	-2,699	20	7	0,259	0,979
4,00E-04	-3,398	26	1	0,037	0,927
8,00E-05	-4,097	22	5	0,185	0,908
Linearizovaný plazmid					
1,06	0,025	27	0	0	
0,21	-0,678	27	0	0	
0,042	-1,377	27	0	0	0,998
0,008	-2,097	27	0	0	0,996
1,69E-03	-2,772	27	0	0	0,997
3,39E-04	-3,470	27	0	0	0,997
6,77E-05	-4,169	27	0	0	0,998
1,35E-05	-4,870	27	0	0	0,998
2,71E-06	-5,567	27	0	0	0,998
5,42E-07	-6,266	27	0	0	0,997
Cirkulární plazmid					
0,05	-1,301	27	0	0	
0,002	-2,699	27	0	0	
4,00E-04	-3,398	27	0	0	0,999
8,00E-05	-4,097	27	0	0	0,999
1,60E-05	-4,796	27	0	0	0,999
3,20E-06	-5,495	27	0	0	0,987
6,40E-07	-6,194	25	2	0,074	0,981
1,28E-07	-6,893	19	8	0,296	0,983
2,56E-08	-7,592	11	16	0,593	0,972
5,12E-09	-8,291	11	16	0,593	0,943

Tabulka 6 Stanovení limitu detekce pomocí FNR a ověření linearity pomocí druhé mocniny Pearsonova korelačního koeficientu

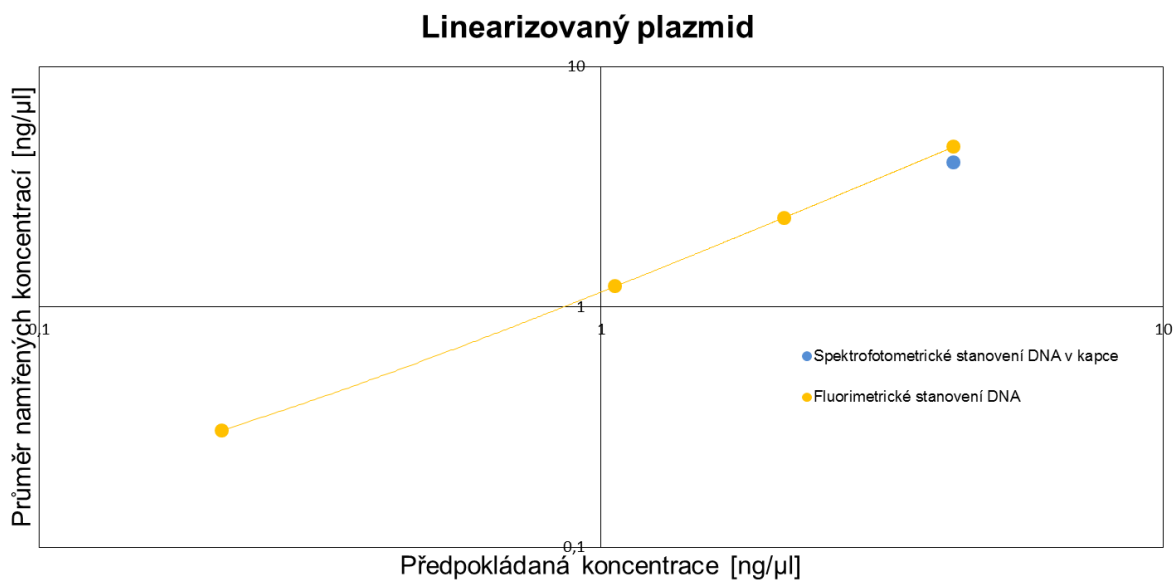
3.2.6 Porovnání metod

Z hlediska jednotlivých typů DNA byly pro porovnání použitých metod kvantifikace DNA vytvořeny závislosti předpokládaných koncentrací na průměrných hodnotách naměřených koncentrací. Výsledky z jednotlivých stanovení byly vyneseny do bodového grafu a protnuty lineární regresí. Osy jsou v logaritmickém měřítku pro lepší přehlednost a jasnost výsledků. Viditelné jsou tak rozdíly v pracovních rozsazích, ale i případné trendy měření jako je nadhodnocování koncentrací oproti předpokládaným apod.

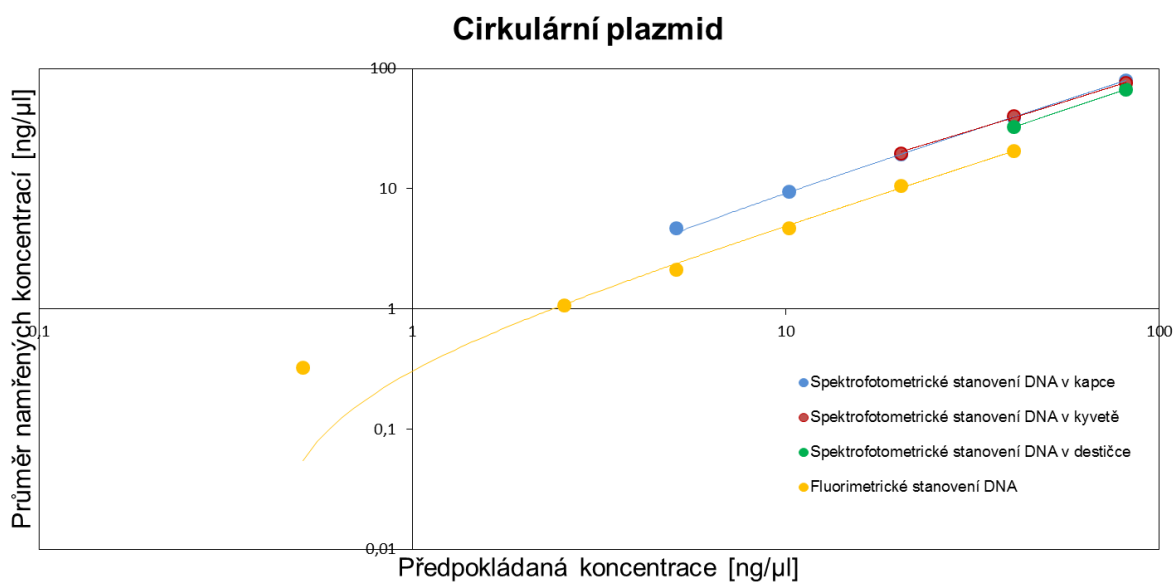
V grafech není uvedena metoda real-time PCR, jelikož jejími konečnými výstupy jsou Ct hodnoty nikoliv naměřené koncentrace. Z výsledků uvedených v kapitole 3.2.5 je však jednoznačné, že je daleko citlivější a má širší pracovní rozsah pokrývající o mnoho nižší koncentrace než ostatní metody.



Graf 37 Porovnání metod pomocí bodového grafu v závislosti průměrné naměřené koncentrace na předpokládané koncentraci genomové DNA. Body jsou proloženy lineární regresí a osy jsou zobrazeny v logaritmickém měřítku.

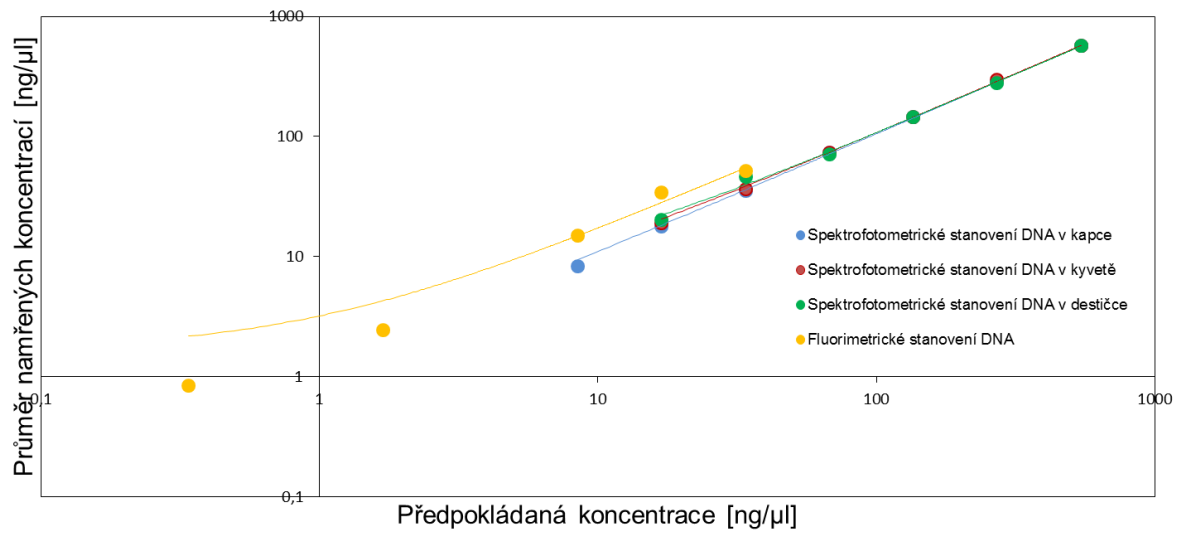


Graf 38 Porovnání metod pomocí bodového grafu v závislosti průměrné naměřené koncentrace na předpokládané koncentraci linearizovaného plazmidu. Body jsou proloženy lineární regresí a osy jsou zobrazeny v logaritmickém měřítku.



Graf 39 Porovnání metod pomocí bodového grafu v závislosti průměrné naměřené koncentrace na předpokládané koncentraci cirkulárního plazmidu. Body jsou proloženy lineární regresí a osy jsou zobrazeny v logaritmickém měřítku.

Oligonukleotid



Graf 40 Porovnání metod pomocí bodového grafu v závislosti průměrné naměřené koncentrace na předpokládané koncentraci oligonukleotidu. Body jsou proloženy lineární regresí a osy jsou zobrazeny v logaritmickém měřítku.

4 Diskuze a závěry

Záměrem této diplomové práce bylo navzájem porovnat výkonnostní parametry metod pro kvantifikaci DNA, které jsou založené na spektrofotometrii, fluorimetrii a real-time PCR metodě. Porovnání bylo provedeno na čtyřech typech DNA. Veškeré stanovené cíle vytyčené v kapitole 2 byly splněny.

U všech spektrofotometrických metod nebyl ohraničen pracovní rozsah shora v oblasti nejvyšších koncentrací. Je tedy možné, že by metody byly aplikovatelné i na koncentrace vyšší než použité v této práci. V praxi se však se vzorky s takto vysokou koncentrací často nesetkáváme.

Mikroobjemové stanovení v kapce dosáhlo nejlepších výsledků z hlediska pracovního rozsahu, opakovatelnosti i linearity, a to napříč všemi typy DNA v námi nastavených koncentračních hladinách. Linearita a opakovatelnost u genomové DNA byla snížena díky jednomu bodu (50 ng/μl), jehož variabilita byla výrazně vyšší, pravděpodobně díky lidskému faktoru nebo přítomnosti interferující látky.

V rámci metod založených na měření absorbance v kyvetě a destičce jsou díky velkému měřicímu objemu roztoky 20krát ředěny. Patrně i z tohoto důvodu je pracovní rozsah těchto stanovení omezenější oproti kapkové metodě. V případě linearizovaného plazmidu nebyl dokonce ani jeden měřený koncentrační bod nad LOQ ani LOD. Cirkulární plazmid byl zase stanoven v destičce pouze ve dvou koncentračních bodech. Syntetický oligonukleotid oproti tomu poskytoval u obou těchto metod nejvíce lineární odezvu a zároveň nejnížší směrodatné odchylky měření. Vysvětlením takových výstupů by mohla být např. velikost oligonukleotidů. Tím, že jde o syntetické látky s mnohem menší molekulou, které jsou dobře rozpustné, lze z nich připravit homogenní roztok. Díky tomu je možné analýzou dosáhnout lepších výsledků než v případě genomové DNA či plazmidů, které se z důvodu své větší velikosti mohou shlukovat do agregátů a tvořit tak roztoky méně homogenní.

Obě metody jsou, v porovnání s kapkovou, časově náročnější, pracnější i nákladnější, a to nejen z hlediska spotřeby reagensů a vzorku, ale i instrumentace. Proto by kvantifikace genomové DNA a plazmidů pomocí spektrofotometrického stanovení v destičce bylo vhodné využít v případě potřeby měření velkého množství vzorků, případně měření v multiplexech. Kyveta se pak hodí spíše jako metoda srovnávací a ověřovací. Obě by však mohly být doporučeny ke stanovení koncentrace oligonukleotidů. Pro vyšší koncentrace DNA (cca od

1 ng/μl a výše) je tedy neúčinnější spektrofotometrická metoda měření obsahu DNA v kapce s ohledem na všechny hodnocené výkonnostní charakteristiky. V laboratořích je často využívána pro rychlost a nenáročnost postupu. Její hlavní výhodou je především nízká spotřeba vzorku, což může být právě v případě stanovení nukleových kyselin zásadní parametr pro volbu metody.

Fluorimetrická metoda zdaleka nedosáhla takové citlivosti, jaká byla uváděna výrobcem použitých souprav. Podle očekávaného pracovního rozsahu, který měl být nejširší ze všech metod, bylo proměřeno 14 koncentrační hladin, ale nad LOQ jich bylo pouze 6. Pro ověření správného způsobu měření bylo postupováno přesně podle designu experimentu na zkušební ředící řadě uváděné v manuálu (ANON. 2008a, ANON. 2008b), přesto nebylo dosaženo stejných výsledků. Větší citlivost nebyla získána ani změnou skriptovacích parametrů na spektrofluorimetru (úprava pozadí, gainu).

Dalším jevem, který se vyskytl v případě fluorimetrické metody, byly výraznější rozdíly výsledků oproti jiným metodám. V případě cirkulárního plazmidu byly výsledné hodnoty koncentrací poloviční až pětinové. Možným vysvětlením by mohlo být použití standardu pro přípravu kalibrační řady z dodávaného kitu, kterým je gDNA. Podle několika textů je vhodné pro stanovení plazmidů použít právě plazmid jako standard (ANON. 2008a; Levy et al. 2000). Jak již bylo zmíněno, získání takového standardu je ale často obtížné. Dalším možným výkladem by mohly být sekundární/terciální konformace, které plazmidy často zaujímají. Právě díky nim se nemohou fluorofory účinně vázat na celou molekulu nebo mohou být příliš blízko sebe a tím se navzájem zhášet (Kato et al. 2011; Witz a Stasiak 2010).

Fluorimetrické stanovení jednotlivých koncentrací oligonukleotidů vedlo naopak k nadhodnocení naměřených koncentrací oligonukleotidu oproti těm předpokládaným, příp. výsledkům ze spektrofotometrických metod. Vysvětlením by mohlo být opět použití nevhodného standardu pro přípravu kalibračních řad (ANON. 2008b). V našem případě byl použit standard, který byl součástí kitu s OliGreenem.

S ohledem na hodnocené výkonnostní charakteristiky a náročnější postup shledáváme využití fluorimetrické metody možným především pro měření koncentrací, které jsou pod mezemi spektrofotometrických stanovení. Oproti ostatním metodám jde o postup pracnější, časově náročnější a nákladný z hlediska spotřeb i instrumentace.

Kvantitativní PCR (qPCR) má jednoznačně největší citlivost a pracovní rozsah, který pokrývá řádově nižší koncentrace DNA než ostatní metody. Analýza a interpretace dat je však poměrně složitá. Tím, že je v reakci analyzován pouze určitý úsek DNA o známé sekvenci, není metoda vhodná pro zjištění koncentrace celkové DNA. V případě lidské genomové DNA se pracovní rozsah qPCR překrývá s fluorimetrickou metodou. Jedna kopie lidské genomové DNA odpovídá zhruba 3 miliardám párů bazí a vytváří tak dostatečnou „hmotu“, aby i relativně nízké koncentrace byly měřitelné. Oproti tomu u plazmidů jedna kopie odpovídá několika tisícům bazí a rozdíl oproti lidské genomové DNA je až 6 řádů. U tohoto typu DNA má qPCR daleko vyšší senzitivitu a širší pracovní rozsah. qPCR je časově i finančně poměrně náročná, ale pro stanovení velmi nízkých koncentrací prakticky nenahraditelná.

Při hodnocení parametru opakovatelnosti se obecně projevil trend, který lze popsat tak, že čím nižší byla koncentrace DNA, tím byla vyšší směrodatná odchylka měření. Zároveň je však důležité uvědomit si, že čím vyšší koncentrace DNA, tím více se může projevit vliv látek pocházejících z izolačních postupů, případně i původních zdrojů DNA.

Pro komplexní porovnání metod by bylo vhodné dalších experimentů za podmínek reprodukovatelnosti – provedením analýz na jiném přístroji, jiným analytikem v jiné laboratoři. Vhodné by bylo také porovnání výsledků s jinými soupravami pro fluorimetrické stanovení.

Důležitost správné a citlivé kvantifikace nabývá významu obzvláště tam, kde jsou tyto výsledky podkladem pro navazující analytické metody, které jsou ale řádově nákladnější než samotné stanovení obsahu DNA, např. sekvenování nové generace. Proto je žádoucí se tomuto tématu nadále věnovat.

5 Seznam literatury

ALBERTS, Bruce, 2004. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, 2. vyd. 2.vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing. ISBN 80-902906-2-0.

ANON., 2008a. Quant-i(TM) PicoGreen (R) dsDNA Reagent and Kits [online]. 1–7. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp07581.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/255B64D4-BE8C-4D29-B870-C99B31F7185D>

ANON., 2008b. Quant-iT™ OliGreen® ssDNA Reagent and Kit. 1–7.

ANON., nedatováno. Infinite® 200 PRO multimode microplate readers.

ARUL, A. Sri Kennath J., Sonika VERMA a A. Sri Sennath J. ARUL, 2012. *Polymerase Chain Reaction Expedition Of A Ubiquitous Tool*. B.m.: LAP LAMBERT Academic Publishing. ISBN 9783659194139.

BANSAL, Manju, 2003. *DNA structure: Revisiting the Watson-Crick double helix*. 2003. ISBN 00113891 (ISSN).

BROEDERS, S., I. HUBER, L. GROHMANN, G. BERBEN, I. TAVERNIERS, M. MAZZARA, N. ROOSENS a D. MORISSET, 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 37(2), 115–126 [vid. 2017-04-17]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2014.03.008

ČESKÝ NORMALIZAČNÍ INSTITUT, 1998. *ČSN ISO 11843-1 - Detekční schopnost - Část 1: Termíny a definice* [online] [vid. 2017-05-01]. Dostupné z: http://www.normservis.cz/download/view/csn/01/53814/53814_nahled.htm

FRIEDECKÝ, Bedřich, Luděk ŠPRONGL, Josef KRATOCHVÍLA a Zbyněk PLZÁK, 2010. *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*.

GORE, Michael G., 2000. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. B.m.: Oxford University Press. ISBN 9780199638123.

HATINA, Jiří a Bryan. SYKES, 1999. *Lékařská genetika: problémy a přístupy*. B.m.: Academia. ISBN 8020007008.

HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN, 2001. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. B.m.: Neptun. ISBN 9788090289611.

KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ, 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. B.m.: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 8070805862.

KATO, Takema, Hidehito INAGAKI, Maoqing TONG, Hiroshi KOGO, Tamae OHYE, Kouji YAMADA, Makiko TSUTSUMI, Beverly S EMANUEL a Hiroki KURAHASHI, 2011. DNA secondary structure is influenced by genetic variation and alters susceptibility to de novo translocation. *Molecular Cytogenetics* [online]. 4(1), 18 [vid. 2017-04-18]. ISSN 1755-8166. Dostupné z: doi:10.1186/1755-8166-4-18

KOPECKÁ, Marie., Augustin SVOBODA, Miroslav GABRIEL, Roman JANISCH, Jiří ADLER, Iva POKORNÁ, Oldřich NEČAS a Jan ŠMARDA, 1995. *Lékařská biologie: Praktická cvičení. Část 2, Genetika*. B.m.: Masarykova univerzita. ISBN 802101072X.

- KRÁLOVÁ, Blanka, 2001. *Bioanalytické metody*. B.m.: Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie. ISBN 9788070804490.
- LESLIE, A.G.W., Struther ARNOTT, Rengaswami CHANDRASEKARAN a R.L. RATLIFF, 1980. Polymorphism of DNA double helices. *Journal of Molecular Biology* [online]. B.m.: Academic Press, 143(1), 49–72. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(80)90124-2
- LI, Xiaofei, Yuhua WU, Li ZHANG, Yinglong CAO, Yunjing LI, Jun LI, Li ZHU a Gang WU, 2014. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Analytical Biochemistry* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 451(1), 18–24. ISSN 10960309. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2014.01.016
- LOCO, Joris Van, Marc ELSKENS, Christophe CROUX a Hedwig BEERNAERT, 2002. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accred Qual Assur* [online]. 7, 281–285 [vid. 2017-04-17]. Dostupné z: doi:10.1007/s00769-002-0487-6
- MULLIS, K, F FALOONA, S SCHARF, R SAIKI, G HORN a H ERLICH, 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* [online]. B.m.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 51 Pt 1, 263–73 [vid. 2017-01-31]. ISSN 0091-7451. Dostupné z: doi:10.1101/SQB.1986.051.01.032
- NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA, 2005. *Medicínská biofyzika*. B.m.: Grada. ISBN 9788024711522.
- PELT-VERKUIL, Elizabeth van, Alex van. BELKUM a John P. HAYS, 2010. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. B.m.: Springer. ISBN 9789048175796.
- PLZÁK, Zbyněk a David MILDE, 2011. *Metodický list 7 - Detekční schopnost analytické metody, mez detekce, mez stanovitelnosti*.
- PLZÁK, Zbyněk a David MILDE, 2015. *Kvalimetrie, 20. Vhodnost analytických metod pro daný účel (Přeloženo z The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Second Edition 2014)*. Praha: Eurachem - ČR. ISBN 978-80-86322-00-1.
- POHANKA, Miroslav, 2010. Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy*. 2, 60–63.
- POINTS, Key, Bruce R KORF a Mira B IRONS, 2012. *DNA Structure and Function* [online]. ISBN 9781118537671. Dostupné z: doi:9780080571737
- R CORE TEAM a R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2016. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [online]. 2016. Dostupné z: <https://www.r-project.org/>
- RENGARAJAN, Kalpana, Stephen M CRISTOL, Milan MEHTA a John M NICKERSON, 2002. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Molecular vision*. 8(September), 416–421. ISSN 1090-0535.
- ROSINA, Jozef, 2013. *Biofyzika : pro zdravotnické a biomedicínské obory*. B.m.: Grada. ISBN 9788024742373.

- ROSYPAL, Stanislav, 2003. *Nový přehled biologie*. B.m.: Scientia. ISBN 8071832685.
- ROSYPAL, Stanislav, 2006. *Úvod do molekulární biologie*. ISBN 80-902562-5-2.
- SAENGER, Wolfram, 1984. *Principles of Nucleic Acid Structure* [online]. ISBN 978-0-387-90761-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4612-5190-3
- SUCHÁNEK, Miloslav, 2009. *Kvalimetrie, 16. Statistické metody v metrologii a analytické chemii*. Praha: Eurachem - ČR. ISBN 80-86322-04-1.
- ŠMARDA, Jan, Doškař JIŘÍ, Pantůček ROMAN, Růžičková VLADISLAVA a Koptíková JANA, 2005. *Metody molekulární biologie*. B.m.: Masarykova univerzita. ISBN 8021038411.
- ŠTÍPEK, Stanislav, 1997. *Stručná biochemie: uchování a exprese genetické informace: učební texty*. B.m.: Medprint. ISBN 8090203620.
- TECAN GROUP LTD., nedatováno. *Infinite® 200 PRO* [online] [vid. 2017-03-12]. Dostupné z: http://diagnostics.tecan.com/products/reader_and_washer/microplate_readers/infinite_200_pro
- THERMO FISHER SCIENTIFIC, nedatováno. *Spektrofotometr NANODROP ND-2000/2000c, Návod k obsluze*.
- VONDREJS, Vladimír, 2003. *Genové inženýrství III*. B.m.: Karolinum. ISBN 8024605864.
- WATSON, James D a Francis H C CRICK, 1953. *Molecular structure of nucleic acids* [online]. 1953. ISBN 0226284158. Dostupné z: doi:10.1097/BLO.0b013e3181468780
- WITZ, Guillaume a Andrzej STASIAK, 2010. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic acids research* [online]. B.m.: Oxford University Press, 4., 38(7), 2119–33 [vid. 2017-05-04]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp1161

6 Zdroje použitých obrázků

Obrázek 1

Nukleové kyseliny. In: *Biochemické publikace Orion* [online]. [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/10-Nukleov%C3%A9%20kyseliny/10-NuklKys.htm

Obrázek 2

Why is DNA double stranded and RNA single stranded? In: *Biology* [online]. 2016 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://biology.stackexchange.com/questions/44218/why-is-dna-double-stranded-and-rna-single-stranded>

Obrázek 3

The molecular basis of inheritance. In: *Slide share* [online]. 2015 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://www.slideshare.net/veneethmathew/16-lecture-dna>

Obrázek 4

DNA is as easy as A, B, Z. In: *Biological exceptions* [online]. 2013 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://biologicalexceptions.blogspot.cz/2013/10/dna-is-as-easy-as-b-z.html>

Obrázek 5

Central Dogma. In: *DNA Basics of structure and analysis* [online]. 1998 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <https://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc731/dna/dna1.htm>

Obrázek 6

Top 10: Biotechnology. In: *My biology blog* [online]. 2011 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://lenalow-sbi4u.blogspot.cz/2011/10/top-10-biotechnology.html>

Obrázek 7

Tradiční klonování (subklonování). In: *LAB Guide* [online]. 2014 [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://labguide.cz/tradicni-klonovani-subklonovani/>

Obrázek 8

Multi-Volume Analysis of Nucleic Acids Using the Epoch™ Spectrophotometer System. In: *BioTek* [online]. 2009 [cit. 2017-03-17]. Dostupné z: <http://www.biotek.com/resources/application-notes/multi-volume-analysis-of-nucleic-acids-using-the-epoch-spectrophotometer-system/> (popisky upraveny autorkou DP)

Obrázek 9

A simple DIY spectrophotometer. In: *Instructables* [online]. 2011 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://www.instructables.com/id/A-simple-DIY-spectrophotometer/> (popisky upraveny autorkou DP)

Obrázek 10

Fluorescent Probes. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2017-03-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>

Obrázek 11

The Application of Fluorescence Spectroscopy in the Mercury Ion Detection. In: *Openstax CNX* [online]. 2011 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://cnx.org/contents/QisAdlV2@1/The-Application-of-Fluorescenc> (popisky upraveny autorkou DP)

Obrázek 12

PCR. In: *LAB Guide* [online]. 2014 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/pcr/>

Obrázek 13

PORTERFIELD, Andrew. What Is a Ct Value? In: *Bitesize Bio* [online]. 2016 [cit. 2017-03-17]. Dostupné z: <http://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>

Obrázek 14

SUCHÁNEK, Miloslav, 2009. *Kvalimetrie, 16. Statistické metody v metrologii a analytické chemii*. Praha: Eurachem - ČR. ISBN 80-86322-04-1.

Obrázek 15

KANĎÁR, Roman, Pavla KRÁLOVCOVÁ a Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, 2016. *Učební skripta - Laboratorní cvičení z obecné a klinické biochemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, FCHT. ISBN 978-80-7395-958-6.

Obrázek 16

NanoDrop ND2000c: Spectrophotometer w. cuvette. In: *Labtech.com* [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <https://www.labtech.com/nanodrop-nd2000c-spectrophotometer-w-cuvette>

Obrázek 17

TECAN GROUP LTD., nedatováno. *Manuál Infinite® 200 PRO* [online] [vid. 2017-03-12]. Dostupné z: http://diagnostics.tecan.com/products/reader_and_washer/microplate_readers/infinite_200_pro

Obrázek 18

CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. In: *BIO-RAD* [online]. 2017 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-us/product/cfx96-touch-real-time-pcr-detection-system>