

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Monika Pešková

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

DETEKCE KONTAMINACE BUNĚČNÝCH LINÍÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Monika Pešková

Vedoucí práce: Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D

2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

DETECTION OF CELL LINE CONTAMINATION

DIPLOMA THESIS

Author: Bc. Monika Pešková

Supervisor: Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Pešková**
Osobní číslo: **C18492**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Detekce kontaminace buněčných linií**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- Rešerše na téma metody druhová identifikace
- Profilování pomocí mtDNA
- Fragmentační analýza DNA

Experimentální část:

- Zavedení metody fragmentační analýzy DNA pro určení druhu
- Návrh a značení primerů
- Optimalizace multiplexní PCR
- Fragmentační analýza – vyhodnocení dat

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Dle zadání vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Monika Pešková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Vojtěchu Vojtěchovi Vejvodovi, Ph.D za vybrání tématu a odborné vedení. Také bych chtěla poděkovat za jeho trpělivost, pomoc a za poskytnutí odborných a užitečných rad.

Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřena na metody detekce kontaminace buněčných linií. První část je věnována teoretickým předpokladům na téma PCR, kapilární elektroforéza a DNA barcoding. Experimentální část se zabývá optimalizací multiplexní PCR reakce.

Klíčová slova: DNA, mtDNA, multiplexní PCR, DNA barcoding, kontaminace, buněčná linie.

Summary

This diploma thesis is focused on methods of detection of cell line contamination. The first part is devoted to the theoretical background of PCR, capillary electrophoresis and DNA barcoding. The experimental part deals with optimization of multiplex PCR reaction.

Keywords: DNA, mtDNA, multiplex PCR reaction, DNA barcoding, contamination, cell line.

Obsah

1. ÚVOD.....	15
2. TEORETICKÁ ČÁST	17
2.1 DRUHOVÁ IDENTIFIKACE.....	17
2.2. DETEKCE KONTAMINACE BUNĚČNÝCH LINÍ	18
2.2.1 Izolace DNA	19
2.2.2 Polymerázová řetězová reakce.....	19
2.2.2.1 Real time PCR	21
2.2.2.2 Reverzní transkriptázová PCR.....	23
2.2.2.3 Nested PCR.....	25
2.2.2.4 Multiplexní PCR.....	25
2.2.3 Kapilární elektroforéza	26
2.2.3.1 Fragmentační analýza	26
2.2.3.2 Sekvenační analýza.....	26
2.3 DNA BARCODING	28
2.3.1 Mitochondriální DNA.....	29
2.3.1.1 Detekce a identifikace na základě mtDNA.....	32
2.3.2 Cytochrom c oxidáza	32
2.3.2.1 Využití COI v molekulárních metodách.....	33
2.4 BUNĚČNÉ LINIE	34
2.4.1 Použité buněčné linie	36
2.4.1.1 J774.....	36
2.4.1.2 VERO.....	36
2.4.1.3 MDBK	36
2.4.1.4 NIH3T3	36
3. CÍLE PRÁCE.....	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A OSTATNÍ	39
4.2 IZOLACE DNA.....	39
4.2.1 Stanovení koncentrace získané genomové DNA.....	40
4.3 NÁVRH A ZNAČENÍ PRIMERŮ PRO FRAGMENTAČNÍ ANALÝZU COI ..	42

4.3.1	Ověření funkčnosti primerů	43
4.3.2	Primer mix	45
4.4	OPTIMALIZACE SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI.....	47
4.4.1	Složení reakční směsi.....	47
4.4.2	Objem reakce	48
4.5	KONCENTRACE TEMPLÁTOVÉ DNA	48
4.5.1	Detekční limit	49
4.6	OPTIMALIZACE TEPLOTNÍHO PROFILU	50
4.6.1	Teplotní profil	50
4.7	PCR REAKCE.....	51
4.7.1	Příklady používaných primer mixů.....	52
4.8	ANALÝZA PCR PRODUKTŮ	53
4.9	PCR SMÍŠENÝCH VZORKŮ	53
4.10	VLIV ADITIV NA PCR REAKCI.....	54
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	55
5.1	NÁVRH A ZNAČENÍ PRIMERŮ PRO FRAGMENTAČNÍ ANALÝZU COI .	55
5.2	OPTIMALIZACE SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI.....	56
5.3	OPTIMALIZACE TEPLOTNÍHO PROFILU	58
5.4	PCR REAKCE.....	58
5.5	PCR SMÍŠENÝCH VZORKŮ	59
5.6	VLIV ADITIV NA PCR REAKCI.....	60
5.7	FINÁLNÍ SLOŽENÍ PCR REAKCE	60
5.7.1	Primer mix:	60
5.7.2	Reakční směs:	60
5.7.3	Teplotní profil:	61
6.	ZÁVĚR	62
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63

Seznam použitých zkratek

PCR	polymerázová řetězová reakce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální DNA
COI	cytochrom c oxidáza
ATP	adenosintrifosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	reverzní transkriptázová PCR
cDNA	komplementární DNA
DMSO	dimethylsulfoxid
BSA	hovězí sérový albumin

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma polymerázové řetězové reakce.....	21
Obrázek 2: Asymetrická kyaninová barviva.....	22
Obrázek 3: Schéma reverzní transkriptázové PCR.....	24
Obrázek 4: Sangerova metoda pro sekvenování DNA.....	27
Obrázek 5: Postup identifikace organismu pomocí DNA barcodingu.....	29
Obrázek 6: Mitochondriální dýchací řetězec.....	30
Obrázek 7: Mitochondriální genom.....	30
Obrázek 8: Cytochrom c oxidáza.....	33
Obrázek 9: Snímek morfolgie buněk na nosiči na bázi hydrogelu za pomoci elektronového mikroskopu.....	35
Obrázek 10: Schématický postup izolace DNA.....	41
Obrázek 11: Ukázka místa nasednutí primerů u mtDNA vepře.....	46
Obrázek 12: Srovnání elektroforeogramů multiplexní PCR nejvyššího (A) a nejnižšího (B) ředění templátové DNA (mix tur, myš, krysa, člověk, vepř).....	57
Obrázek 13: Výsledky prvního testu fragmentační analýzy COI.....	59
Obrázek 14: Výsledek fragmentační analýzy smíšeného vzorku buněčné linie NIH3T3 a linie WBF.....	59
Obrázek 15: Výsledný elektroforeogram závěrečné fragmentační analýzy pro multiplexní PCR, kde se povedlo detekovat všechny templátové DNA, tj. DNA pro vepře, myš, krysu, kočkodana, tura a člověka. IC=interní kontrola.....	61

Seznam tabulek

Tabulka 1: Srovnání lidské jaderné a mitochondriální DNA.....	31
Tabulka 2: Tabulka primerů a očekávaných velikostí fragmentů pro fragmentační COI analýzu.....	44
Tabulka 3: Způsob přípravy výchozího primer mixu, který jsme použili k počátečnímu ověření metody.....	45
Tabulka 4: Postup pro ředění templátové DNA ke zjištění detekčního limitu.....	49
Tabulka 5: Počáteční teplotní profil.....	50
Tabulka 6: Výsledný teplotní profil.....	51
Tabulka 7: Příklad primer mixu obsahující jednu dvojici primerů určen pro monoplexní PCR pro templátovou DNA člověka.....	52
Tabulka 8: Příklad primer mixu obsahující kombinaci primerů pro 4 systémy určen k multiplexní PCR.....	52

Tabulka 9: Příklad primer mixu obsahující kombinaci primerů pro 7 systémů určen k multiplexní PCR.	53
Tabulka 10: Příprava finální směsi DNA.....	54
Tabulka 11: Používané primery v průběhu experimentální práce.	55
Tabulka 12: Výsledný teplotní profil.	58
Tabulka 13: Finální složení primer mixu (FPM3).	60
Tabulka 14: Výsledný teplotní profil.	61

1. ÚVOD

Buněčné linie jsou v současné době hojně používány jako modelový systém v biomedicinském výzkumu. Nachází využití nejen v experimentální oblasti, ale také v oblasti výroby, např. získání monoklonálních protilátek. Důležitá je jejich častá kontrola kvality, aby došlo k případnému včasnému odhalení kontaminace, která představuje vysoké riziko pro výsledky laboratorních výsledků. Pravděpodobnost kontaminace se zvyšuje na pracovištích, jež používají buněčné linie po dlouhou dobu, řádově několik let, a tam, kde buněčné linie nepocházejí z ověřených zdrojů.

V dnešní době existuje řada metod, kterými lze ověřit identitu buněčné linie a předejít tak použití kontaminované linie a jejímu šíření. Jednou z hlavních metod je analýza STR polymorfismů, prováděná pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a následná fragmentační analýza na sekvenátoru (kapilární elektroforéza), čímž získáme DNA profil (fingerprinting) jedince nebo buněčné linie. V našem případě bylo využito nikoliv STR sekvencí vyskytujících se na genomové DNA, ale délkového polymorfismu pro mitochondriální cytochrom c oxidázu (COI). Kdy délkový polymorfismus vzniká vhodným návrhem primerů, které jsou specifické pro každý druh. Naše metoda tedy není určena k identifikaci jedince, nýbrž k určení druhu případně druhů v daném vzorku. Pro produkci nejen terapeutických proteinů se využívají buněčné linie různých druhů. Pokud by vznikla kultura, obsahující směs několika druhů, bylo by velmi obtížné určit ji pomocí STR analýzy, je-li linie kontaminována, nehledě na to, že STR analýza je kromě několika málo druhů (komerčně kůň, tur, pes, jako tzv. in-house metoda pro myš a kočku) komerčně dostupná především pro lidské buňky. Potřeba analyzovat i směsné vzorky vedla k multiplexní metodě, schopné rozlišit jednotlivé vybrané druhy na základě délky PCR produktu (*Cooper, 2007*).

Metodu by bylo tedy možno využít pro kontrolu kvality – kontaminace buněčných linií, ale bylo by možno ji využít i např. v potravinářství nebo forenzních vědách, kde by jednoduchá analýza směsí mohla pomoci při následných analýzách.

Tato metoda je založena na analýze DNA a je často používána např. v lékařství a farmaceutickém průmyslu (produkční buněčné linie). Důležité je její správné nastavení a optimalizace, což bylo také cílem experimentální části této diplomové práce. Optimalizace spočívá v hledání ideálních podmínek pro co nejpřesnější výsledky identifikace buněčných linií a jejich kontaminací. Výhodou této analýzy je existence důvěryhodných databází mitochondriálních genomů, které jsou volně přístupné na internetu a slouží k identifikaci druhu. Příkladem takové databáze je GenBank. K vyhledání sekvenčně podobných záznamů může být použit program BLAST.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 DRUHOVÁ IDENTIFIKACE

V dnešní době je spousta dostupných způsobů identifikace a autentizace druhů. Do nedávna nejčastějším způsobem druhové identifikace bylo rozpoznávání na základě morfologických znaků, které nebylo vůbec přesné. Dnes jsou známy metody zahrnující např. různé formy elektroforézy a použití imunitního séra při difúzi na agarovém gelu. Tyto způsoby jsou však založeny na vzorci exprese proteinů a mají tu nevýhodu, že proteiny jsou po vaření denaturovány, čímž dojde ke změně vzorce elektroforézy. Imunitní séra také často vykazují mezidruhovou reaktivitu (*Rastogi, 2007*).

Proto se přešlo k daleko citlivější a spolehlivější metodě a tou je identifikace a autentizace druhů na základě analýzy deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (*Rastogi, 2007*). Ve srovnání s bílkovinami je DNA přítomna ve všech tkáních, je odolnější vůči průmyslovým procesům a zůstává neporušená i při vyšších teplotách. Co se týče použití mitochondriální DNA (mtDNA) versus jaderné DNA, je mnohem snadnější a výhodnější vyextrahovat mtDNA, neboť se v organismu vyskytuje ve větším počtu kopií, což zvyšuje citlivost a lze jí získat z velmi malého vzorku tkáně neporušenou. Také má široký popis v databázích sekvencí DNA, proto je tedy mtDNA vhodnější pro identifikaci druhů (*Cottenet, 2020*).

Další důležitou roli v určování druhů hrají tzv. DNA markery, jež identifikují variace nukleotidové sekvence genomu, které mohou zvýraznit mezidruhovou a vnitrodruhovou identifikaci. Díky velkému počtu a stabilitě mají vysoký informační potenciál. Analýza polymorfních DNA markerů se používá v mnoha aplikacích zahrnující hodnocení a charakterizaci genetické variace, konstrukci molekulárních map a selekci pomocí markerů.

DNA markery vyvinuté z mitochondriálního genomu byly navrženy jako tzv. čárový kód DNA (barcoding), což je standardní oblast genomu vyznačující se vysokou mezidruhovou a nízkou vnitrodruhovou variabilitou (*Scarano, 2014*). Nejčastěji používaným a standardním čárovým kódem (neboli DNA markerem) pro téměř všechna zvířata je mitochondriální sekvence kódující podjednotku I enzymu cytochrom c oxidázy (*Chao, 2014*).

Když to shrneme, tak požadovanými vlastnostmi pro výběr vhodného DNA markeru jsou: nízká vnitrodruhová a vysoká mezidruhová variabilita, marker by měl být univerzálně reprodukovatelný pro různé taxony, což znamená, že by měla existovat

vysoká úspěšnost amplifikace a sekvenování, nejlépe s univerzální sadou primerů PCR. Dále je žádoucí, aby marker byl dostatečně krátký a mohl být sekvenován v jednom čtení. Krátkostí se rozumí délka menší nežli 700 bp (bp = párů bází). Delší fragmenty mohou být také sekvenovány, nicméně to je časově i finančně náročnější. Marker by se měl v genomu nacházet ve velkém počtu kopií, čím větší je počet kopií, tím větší je šance, že nalezneme nějaký nepoškozený (Kowalska, 2019).

2.2. DETEKCE KONTAMINACE BUNĚČNÝCH LINIÍ

Kontinuální buněčné linie jsou široce používaným nástrojem ve výzkumných laboratořích po celém světě. Tyto buněčné linie jsou často vyměňovány mezi laboratořemi bez záruky jejich skutečného původu. Několikrát bylo v odborných časopisech poukazováno na to, že takové praktiky jsou zdrojem kontaminací a nově většina renomovaných časopisů vyžaduje před publikací článku, aby byla pravost linie doložena (Masters, 2001). Jejich názvy a veškeré záznamy o nich jsou často chybně zapsány nebo zkráceny. Také je věnováno málo úsilí v laboratořích k vyloučení kontaminace buněčných linií jinými buněčnými liniemi. Ve skutečnosti vědci věnují více pozornosti kontaminaci mikroorganismy. Na rozdíl od bakteriální a plísňové kontaminace je křížová kontaminace jinými buněčnými liniemi špatně detekovatelná. Morfologie a chování buněk v kultuře může zůstat beze změny. To platí také pro kontaminaci mykoplazmou, jež také není snadno detekovatelná, nicméně v posledních letech bylo zveřejněno několik dokumentů o falšování údajů ohledně této kontaminace a vědci si na ni dávají pozor. Naopak literatura o křížové kontaminaci buněk je omezena co do množství a vědecká komunita dostatečně nereaguje na problémy spojené s tímto druhem kontaminace (Parodi, 2002).

V roce 1957 byla křížová kontaminace detekována experimenty v odvětví karyologie, transplantace a hemaglutinace (Parodi, 2002). Krátké tandemové opakované profilování (STR analýza) nabízí řešení pro omezený počet druhů, zejména lidí a nově u myší, standardní metodou pro identifikaci druhů buněčných linií je enzymový polymorfismus, který byl objeven v roce 1966. Isoenzymologie má však své nevýhody, je to náročné a interpretace dat je často obtížná. Dále je citlivost detekce pro křížovou kontaminaci nízká. Vyžaduje to velké množství přítomné kontaminující látky a křížová kontaminace v těsně příbuzných druzích může být nezjištěna (Cooper, 2007). V nedávné době byla však vynalezena metoda polymerázových řetězových reakcí, která

se stala běžně rozšířenou a používanou metodou detekce kontaminace a identifikace buněčných linií. Pro přesnost a reprodukovatelnost vědeckého výzkumu jsou klíčové druhy buněčných linií a detekce křížové kontaminace.

Tento způsob detekce zahrnuje několik postupů. Prvním z nich je izolace samotné DNA, následuje zmnožení DNA metodou PCR, poté přichází na řadu fragmentační analýza pomocí kapilární nebo gelové elektroforézy a vše je zakončeno interpretací a porovnáním výsledků s referenčními profily (*Parodi, 2002*).

2.2.1 Izolace DNA

Účinná izolace DNA je důležitá pro molekulární metody. Dnes existuje mnoho technik a postupů, nejčastěji se však používají komerčně dostupné soupravy založené na adsorpci DNA na pevnou fázi a její následnou eluci, které ve většině případů obsahují lyzační pufr, enzym proteinázu K a RNAázy. Po zbavení se nežádoucích komponent se buněčný lyzát přenesse na kolonku, DNA adheruje na silikátový povrch kolonky, a poté je promývacími kroky eluována (*Thatcher, 2018*).

2.2.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je v molekulární biologii asi nejpoužívanější metodou, jejíž základem je tzv. amplifikace neboli zmnožení požadovaného fragmentu DNA v jednoduché enzymatické reakci (*Jalali, 2017*). Tato metoda byla popsána již v roce 1971, ale až v roce 1983 ji Kary Mullis byl schopen realizovat. O deset let později za tento vynález obdržel Nobelovu cenu (*Valones, 2009*). Dnes má tato metoda uplatnění nejen v oboru molekulární biologie, ale i v kriminalistice či potravinářském průmyslu k odhalení patogenů.

PCR způsobila revoluci ve vědě díky své schopnosti z malého množství DNA (teoreticky jedné kopie) získat velké množství identických kopií dostatečných pro analýzu. Dříve jediným způsobem jak amplifikovat DNA bylo využití bakterií. Byl to velice časově náročný proces zahrnující přenesení části DNA do plazmidu nebo jiného vektoru, transformaci kombinované DNA do bakteriální buňky, růst velkého množství bakterií a opětovné čištění fragmentu DNA z bakterií (*Clark, 2019*).

Samotná PCR vyžaduje přítomnost několika komponent, mezi které patří templátová DNA, primery, volné nukleotidy, enzym DNA polymeráza a pufr. Jako templát slouží DNA o známé sekvenci, kterou je třeba amplifikovat. Většinou se jedná o

úsek velký v rozmezí od 100 do 1000 bp. Další nezbytnou komponentou jsou tzv. primery. Primery jsou krátké jednovláknové oligonukleotidové sekvence, které musí být komplementární k templátové DNA. Nasednutím na templát vymezují oblast, která se bude amplifikovat a jak velký produkt bude vznikat. Primery se používají ve dvojicích, každá dvojice obsahuje přímý a reverzní primer. Jejich délka bývá nejčastěji 16-20 bp. Každá nově syntetizovaná DNA se stává šablonou pro další replikaci, čímž se vytváří řetězová reakce a dochází k exponenciálnímu růstu počtu nových kopií DNA. DNA polymeráza je klíčovým enzymem replikující DNA, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku produktu PCR (Maheaswari, 2016). Vzhledem k tomu, že PCR postup zahrnuje několik kroků s vysokými teplotami, je vyžadováno, aby DNA polymeráza byla tepelně odolná.

Termostabilní polymerázy byly izolovány z termofilních bakterií, nejčastěji z *Thermus aquaticus*, odtud vznikl název *Taq* polymeráza. Jejich polymerázy zůstávají aktivní i při vyšších teplotách, než je teplota při denaturaci, což umožňuje provést PCR bez nutnosti přidání *Taq* polymerázy po každém cyklu (Caetano-Anollés, 2013).

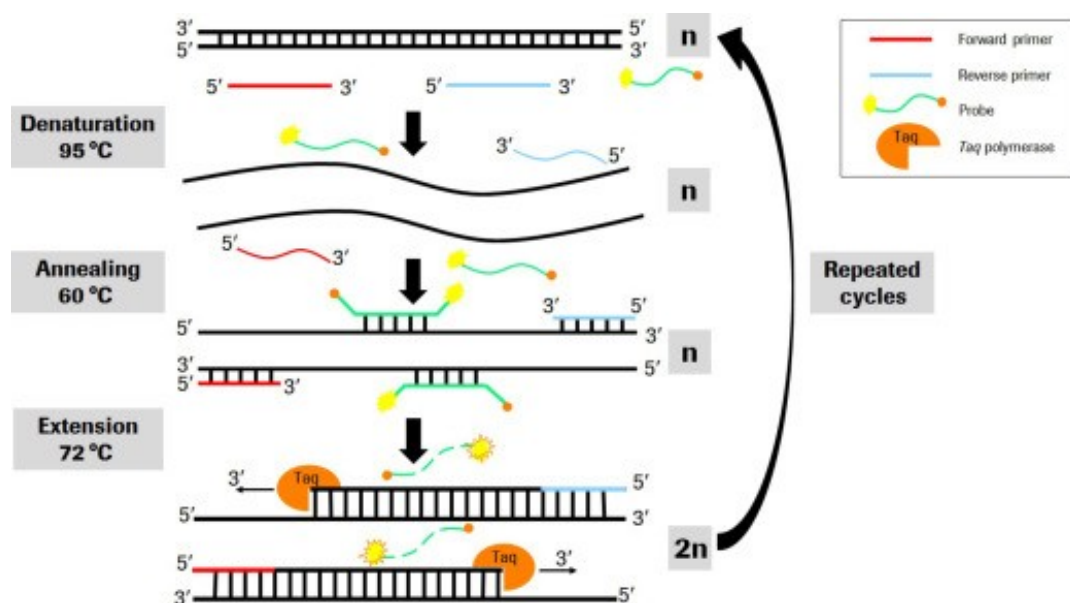
V dnešní době se připravují polymerázy rekombinační. Existují ale i další polymerázy např. *Pfu* polymeráza z bakterií *Pyrococcus furiosus*, která se používá, když je požadována vyšší přesnost, protože má schopnost korektury (proof-reading polymerase). Dále je také známá polymeráza *Tli* izolovaná z *Thermococcus litoralis*, tato polymeráza má rovněž korektivní vlastnosti (Clark, 2019).

Prvním krokem v PCR je smíchání všech výše zmíněných reakčních komponent, templátová DNA, dva primery potřebné k zahájení syntézy, *Taq* polymeráza, nukleotidy dodávány ve formě deoxynukleosid trifosfátů a pufr, který obsahuje vhodné koncentrace iontů a pH a zajišťuje tak optimální podmínky reakce. Samotná metoda se potom skládá ze tří na sebe navazujících kroků. Prvním z nich je tzv. denaturace, kdy dochází k rozdělení dvouvláknové DNA na jednoduché řetězce. Tento proces probíhá za teploty přibližně 95 °C, dochází při něm k rozvolňování vodíkových vazeb, jež drží obě komplementární vlákna pohromadě. Trvá asi 15-30 sekund. Ve druhém kroku nazývaném annealing dochází k poklesu teploty přibližně na 60 °C. Tato teplota se udržuje po dobu 15-60 sekund. Pro tento krok je charakteristické nasedání primerů na specifická místa již denaturované (jednovláknové) DNA. Posledním krokem je tzv. elongace, kde hlavní roli hraje termostabilní polymeráza. Teplota se zvýší obvykle na hodnotu 72 °C. Při své optimální teplotě DNA polymeráza používá volné nukleotidy k prodlužování neboli elongaci nového komplementárního řetězce DNA. Při tomto

kroku obvykle postačuje 1 minuta na 1000 bp (Clark, 2019). Obecně se celý tento proces tří kroků (obr. 1) cyklicky opakuje přibližně 40× v zařízení zvaném termocyklér. Následuje vizualizace nových produktů pomocí elektroforézy (Maheaswari, 2016).

Neexistuje však jedna univerzální sada podmínek, za které by proběhly všechny reakce PCR. V závislosti na potřebě je nutno celý proces optimalizovat, ať už změnami koncentrací jednotlivých komponent či změnami v teplotním profilu. Často se za účelem zlepšení PCR produktů a navýšení kvantity produktů používají tzv. aditiva. Aditiva pomáhají zlepšovat funkce polymerázy a zlepšují specifitu reakce. Nejčastěji používanými aditivy jsou glycerol, betain, formamid, dimethylsulfoxid (DMSO), hovězí sérový albumin (BSA) a polyethylenglykol (Jurišić, 2016).

Hlavními výhodami PCR jsou snadnost kvantifikace, rychlost analýzy, vysoká citlivost a přesnost, reprodukovatelnost a snížené riziko kontaminace (Maheaswari, 2016).



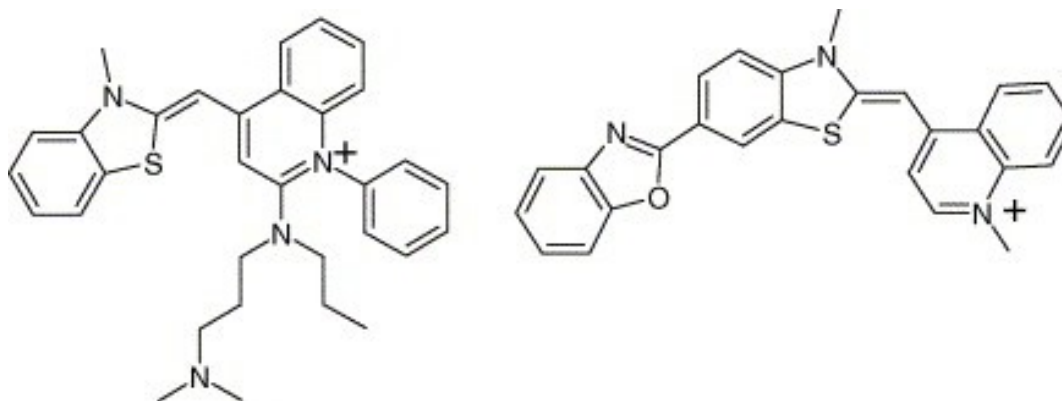
Obrázek 1: Schéma polymerázové řetězové reakce (Engstrom-Melnyk, 2015).

2.2.2.1 Real time PCR

Na rozdíl od tradiční PCR, kde samotná detekce a analýza produktů probíhá až po dokončení cyklování pomocí elektroforézy, tak u real time PCR (PCR v reálném čase) probíhá současně amplifikace i detekce, což přináší daleko přesnější a rychlejší výsledky (Engstrom-Melnyk, 2015). Real time PCR vyžaduje termocyklér s optickým systémem zachycujícím fluorescenci a počítač se softwarem schopným zachytit data.

Emise fluorescence je přímo úměrná množství produktu PCR generovaného fluorescenčními barvivy nebo sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami. Hodnoty se zaznamenávají po každém cyklu (Valones, 2009).

Existuje celá řada komerčně dostupných fluorescenčních barviv DNA, nejznámějšími jsou ethidiumbromid, YO-PRO-1, SYBR® Green I, SYBR® Gold, SYTO, BEBO a BOXTO a EvaGreen (obr. 2). Nejběžněji používaným je SYBR® Green I, což je asymetrické kyaninové barvivo se dvěma pozitivními náboji za standardních reakčních podmínek PCR přispívajících k jeho vysoké vazebné afinitě k DNA. Výsledný komplex DNA-barvivo absorbuje modré světlo (497 nm) a emituje zelené světlo (520 nm). V poslední době několik autorů popsalo, že barvivo EvaGreen a určité barvy SYTO jsou dokonce stabilnější a citlivější než SYBR® Green I pro kvantifikaci DNA pomocí real time PCR. Nežádoucím účinkem může být tvorba nespecifických produktů, mezi které se řadí například dimery primerů. Fluorescenční barviva emitují fluorescenční záření v přítomnosti jakékoliv dvouřetězcové DNA, mohlo by dojít k nesprávným kvantifikacím PCR produktu. Proto je vhodné na závěr PCR analýzy provést analýzu křivky tání. Tato analýza spočívá v aplikaci tepla na vzorek a sledování emise fluorescence. Teplota denaturace DNA je znázorněna jako prudký pokles fluorescenčního signálu v důsledku disociace barviva. Nespecifické produkty denaturují při nižších teplotách než produkty specifické, porovnáním těchto teplot lze rozpoznat, o jaký produkt se jedná.



Obrázek 2: Asymetrická kyaninová barviva. Vlevo SYBR® Green I, vpravo BOXTO (Kubista, 2006).

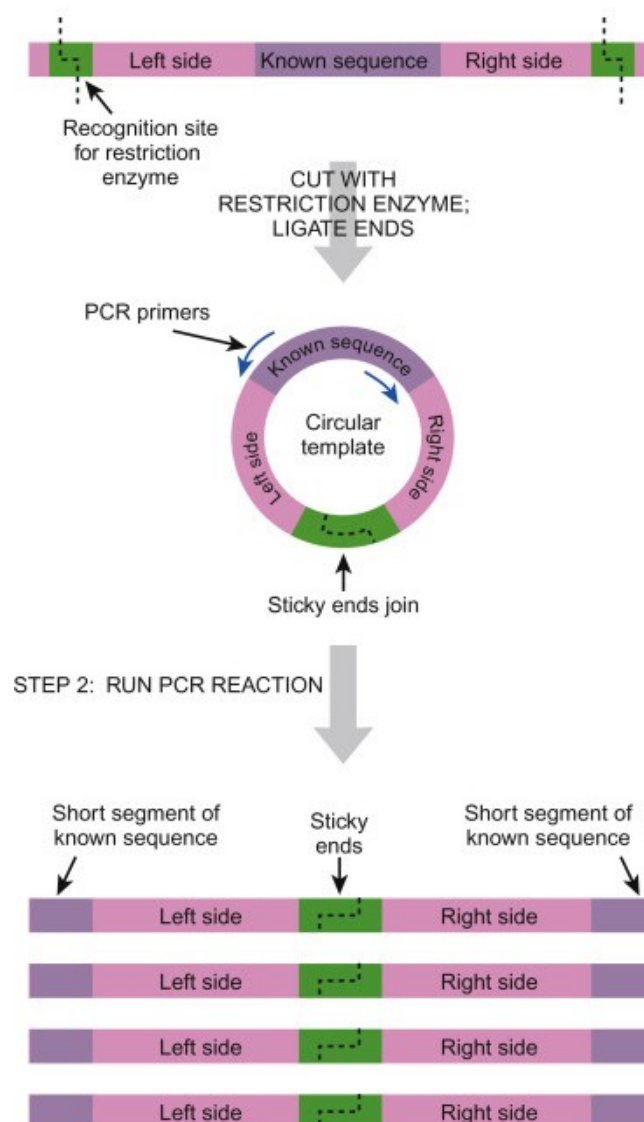
Náklady na použití barviv jsou daleko nižší než náklady na oligonukleotidové sondy. Sondami se rozumí malé fluorescenční molekuly zvané fluorofory navázané na oligonukleotidy. V dnešní době jsou nejvíce rozšířené tzv. TaqMan sondy. Na 5' konci sondy se nachází tzv. reportér (dárce) a na 3' konci je ukotven tzv. zhášec (akceptor). Reportér absorbuje energii ze světla a dostává se tím do excitovaného stavu. Proces návratu do základního stavu je doprovázen emisí energie jako fluorescence. Toto emitované světlo od dárce má nižší energii a frekvenci a delší vlnovou délku než absorbované světlo a může být přeneseno na akceptor (Navarro, 2015). Neporušené sondy nevyzařují fluorescenci, protože jsou vázány (zhášeny). K vytvoření fluorescenčního signálu musí nastat dvě události. Nejprve musí sonda navázat na komplementární vlákno v DNA při 60 °C. A poté při této teplotě musí dojít za pomoci termostabilní DNA polymerázy k odštěpení reportéru na 5' konci, přičemž dojde k oddělení fluorescenčního barviva od zhášecího barviva. Zhášec je uvolňován z fluoroforu, který nyní po excitaci fluoreskuje. Fluorescence je přímo úměrná množství amplifikovaného specifického produktu (Valones, 2009). Na rozdíl od kvantifikace pomocí barviv jako je SYBR® Green I, je detekce s využitím hybridizačních/hydrolyzačních sond sekvenčně specifická. Dokáže tedy odrušit detekci nespecifických PCR produktů. Záleží tedy na designu reakce, kdy je vhodnější a ekonomičtější použití nespecifické detekce pomocí např. SYBR® Green I a kdy využít PCR sondy.

2.2.2.2 Reverzní transkriptázová PCR

Reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR) je dostatečně citlivá metoda, aby umožnila detekci a kvantifikaci RNA z jediné buňky (Álvarez-Fernández, 2013). RNA templát je nejdříve převeden do kruhu na komplementární DNA (cDNA) za pomoci enzymu reverzní transkriptáza. cDNA později slouží jako templát pro amplifikaci pomocí PCR. RT-PCR lze provádět v jednom nebo dvou krocích. Jednostupňová RT-PCR kombinuje reverzní transkripci i PCR reakci ve stejné zkumavce. Při dvoustupňové RT-PCR probíhají kroky odděleně ve dvou zkumavkách, nově syntetizovaná cDNA je převedena do druhé zkumavky pro reakci PCR. Obě metody mají své výhody i nevýhody, jednostupňová RT-PCR se snadněji nastavuje a jsou ideální pro vysoce výkonný screenig, dvoustupňová RT-PCR je ideální pro detekci vícero informací z jednoho vzorku (Jalali, 2017).

Jak již bylo zmíněno, k vytvoření kruhu se používá reverzní transkriptáza, což je restriční enzym. Rozpoznává sekvenci šesti bází. Tento enzym rozštěpí RNA před a za známou oblastí. Výsledný fragment bude mít známou sekvenci uprostřed a z obou stran ohraničenou neznámou sekvencí. Oba konce fragmentu mají kompatibilní konce, které se snadno na sebe navážou, vznikne tak kruh DNA. Syntéza nové DNA probíhá kolem kruhu ve směru hodinových ručiček od jednoho primeru a proti směru hodinových ručiček od druhého primeru. Vzniká segment, který obsahuje část DNA vpravo a část DNA vlevo od původní známé oblasti (obr. 3) (Clark, 2019).

Reverzní transkriptáza je enzym, který byl nalezen v retrovirech a je schopný přeměňovat genom nacházející se v retrovirové částici jako RNA na DNA. Tato DNA pak může být integrována do genomu hostitele. Na tomto principu funguje např. virus HIV. Léky ke snížení postupu nemoci blokují právě zmíněnou reverzní transkriptázu (Clark, 2019).



Obrázek 3: Schéma reverzní transkriptázové PCR (Clark, 2019).

2.2.2.3 Nested PCR

V nested PCR (vnořená PCR) se používají dva páry primerů. Jeden pár primerů se používá v prvním kole amplifikace PCR, který běžně obsahuje 15-30 cyklů. Produkty prvního kola amplifikace slouží jako templát pro druhé kolo amplifikace za pomoci druhé sady primerů (*Shen, 2019*). Účelem vnořené PCR je zvýšit citlivost metody. To je docíleno opakovanou dvoukrokovou amplifikací. Druhým účelem je zvýšení specifčnosti, které je dosaženo nasednutím druhé sady primerů na sekvence vytvořené v prvním kole. Vzniklé amplikony z prvního kroku obsahující nespecifické vazby nejsou znovu ve druhém kole amplifikovány.

Hlavní nevýhodou této metody je zvýšené riziko kontaminace. Ke kontaminaci nejčastěji dochází během přenosu produktů z prvního kola do druhé zkumavky (*Marmioli, 2007*).

2.2.2.4 Multiplexní PCR

Další variantou PCR je tzv. multiplexní PCR. V multiplexní PCR jsou zapotřebí dvě nebo více sad primerů určených pro amplifikaci různých cílů ve stejné PCR reakci. Pomocí této techniky lze tedy v jedné zkumavce amplifikovat více než jednu cílovou sekvenci ve vzorku. Primery použité v multiplexních reakcích musí být vybírány velmi pečlivě. Měly by mít podobné teploty tání a nesmí být vzájemně komplementární. Velikosti amplikonu by měly být dostatečně odlišné, aby při vizualizaci gelovou nebo kapilární elektroforézou vytvářely odlišné pruhy. Výhodou této metody je, že jednu sadu primerů lze použít jako vnitřní kontrolu, což vylučuje možnost falešných pozitiv nebo negativ.

Ačkoli použití multiplexní PCR snižuje náklady a čas, je daleko komplikovanější na vývoj a často je i méně citlivá než PCR s jedním párem primerů (*Shen, 2019*). Pokud se jedná o velké množství primerů, může vyžadovat obtížnou optimalizaci. Představuje však důležitou techniku pro vysoce výkonné analýzy, často je používána v potravinářském průmyslu pro analýzu potravin, kde je často nutné testovat přítomnost různých toxických látek v jednom vzorku (*Marmioli, 2007*) nebo ve forenzních kitech pro analýzu humánních vzorků (*Butler, 2015*).

2.2.3 Kapilární elektroforéza

Elektroforéza je hlavní metodou separace DNA v molekulární biologii. Často používanou je kapilární elektroforéza, která je lepší než např. klasická desková gelová elektroforéza, protože nabízí vysoké rozlišení, vysokou citlivost a možnost automatizace. Na druhou stranu není vhodná pro preparativní účely. Kapiláry jsou dostupné ve velkém množství průměru a délek. Kapilární elektroforéza je kompatibilní s řadou detekčních metod, jako je absorbance, laserem indukovaná fluorescence, hmotností spektrometrie a další. Typickými aplikacemi jsou sekvenování DNA, separace DNA v analýzách délkových polymorfismů, SSCP (polymorfismus konformace jednovláknové DNA) nebo RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) (Heller, 2001).

2.2.3.1 Fragmentační analýza

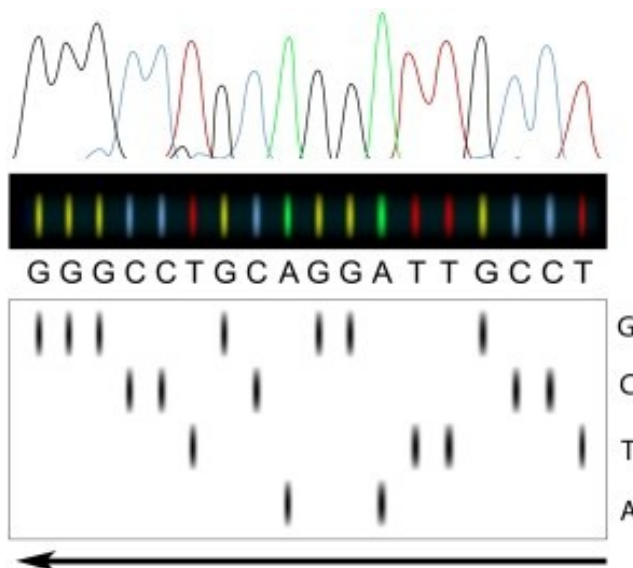
Během PCR se do namnožených fragmentů DNA začleňují fluorescenčně značené primery, které později umožňují detekci jednovláknové DNA pomocí kapilární elektroforézy a fluorescenčního detektoru. Tyto fragmenty je nutno elektroforeticky rozdělit, např. pomocí výše zmíněné kapilární elektroforézy, kde se jednotlivé amplikony rozdělí podle jejich celkové délky. Při průchodu kapilárou naplněnou polyakrylamidem a elektroforetickým pufrům se jednotlivé fragmenty oddělí podle jejich molekulové hmotnosti a rozdílné rychlosti migrace v elektrickém poli. Nakonec projdou detektorem. V této části jsou elektrony ve fluoroforech excitovány laserem a při návratu do základního stavu emitují záření o různých vlnových délkách, které je zachyceno analyzátoři. Výsledkem této metody je získání DNA profilu. Záznam, který získáme, se nazývá elektroforeogram, jež obsahuje různě velké píky. Elektroforeogram nám poskytuje informace o intenzitě fluorescenčního záření v závislosti na velikosti fragmentu a pohybu těchto fragmentů v čase. Rychleji se pohybují fragmenty kratší a pomaleji delší (Taylor, 2016).

2.2.3.2 Sekvenační analýza

V současnosti používanou technologii pro sekvenování vyvinul v sedmdesátých letech Frederick Sanger. Metoda sekvenování hraje v dnešní době zásadní roli. Schopnost znát „čtyřpísmennou“ sekvenci jakéhokoli genu nebo segmentu DNA je nezbytná pro provádění výzkumu a analýzy genetiky jednotlivců, organismů, rostlin a

zvířat. Sekvenční analýza nachází uplatnění v mnoha oborech, např. v molekulární biologii, diagnostických odděleních pro různé choroby a vrozené vady, forenzní biologii a další (Shimasaki, 2014).

Pomocí sekvenční analýzy se stanovuje primární struktura DNA, tj. přesné pořadí čtyř nukleotidů-thymin, adenin, guanin, cytosin. K odlišení jednotlivých nukleotidů se používají různé fluorescenční barvy specifické pro daný nukleotid. Obvykle je thymin značen červeně, adenin zeleně, guanin žlutě a cytosin modře (obr. 4) (Butler, 2004).



Obrázek 4: Sangerova metoda pro sekvenování DNA. Znázornění separace jednotlivých značených fragmentů jako elektroforeogram (nahore) a jako čtyřdráhový gel (dole), kde je pro každý nukleotid zvláštní dráha (Shimasaki, 2014).

Sangerova metoda sekvenování do nedávna byla postačující, nicméně během projektu lidského genomu, kdy byl přečten první lidský genom, tato metoda narazila na limitace Sangerova sekvenování a bylo potřeba vynalézt nové technologie s vyšší výkonností a přesností, nižšími náklady a menší pracností. Což se vědcům povedlo a dnes tu máme sekvenátory druhé generace, které umožňují masivní paralelní sekvenování až tisíce molekul DNA současně. Předchozí sekvenátory byly schopné detekovat DNA báze postupně jednu po druhé, ale i tak se stále využívají, např. pro sekvenování PCR produktů.

Ačkoli všechny dostupné technologie sekvenování druhé generace (next generation sequencing-NGS) využívají rozdílné chemické složení, tak společně sdílejí tyto kroky: izolaci DNA a přípravu templátu, sekvenování a detekci inkorporovaných oligonukleotidů a samotnou závěrečnou analýzu. Na trhu dnes dominují tyto tři

platformy: Roche 454 Genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer a Life Technologies SOLiD System (Koubková, 2014).

2.3 DNA BARCODING

Diverzita života je základem veškerého biologického výzkumu. Ve skutečnosti byl dosud identifikován pouze zlomek všech živých organismů na světě. Samotná identifikace má různá omezení, např. fenotypová plasticita a genotypová variace mohou vést k nesprávným identifikacím. Morfologické klíče jsou často účinné jen pouze v určitém stadiu života nebo pohlaví, takže jedince nelze správně určit. Tato omezení však vedla k vývoji nového přístupu k určování totožnosti organismů. Jedním z nich byla identifikace na základě DNA. V roce 2003 byl Hebertem navrhnout tzv. DNA barcoding (Kowalska, 2019).

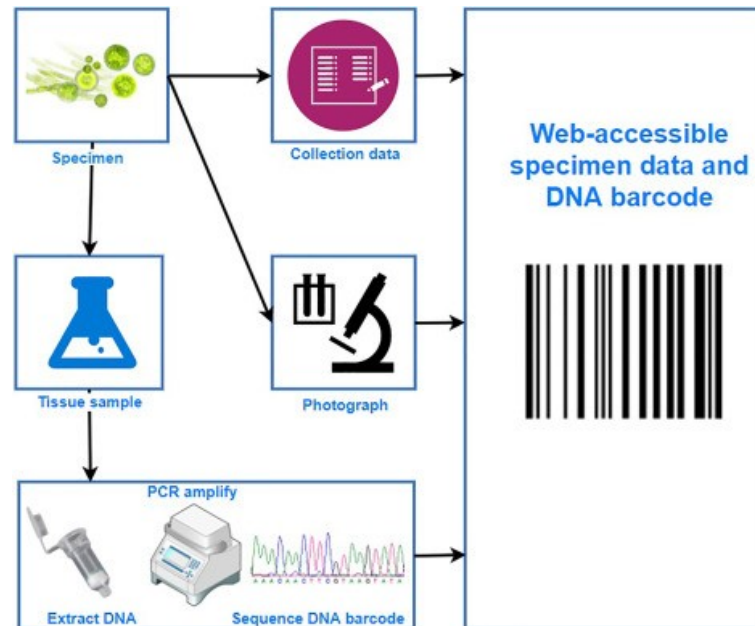
Čárový kód, poprvé navržený vědci z University of Guelph v Ontariu v Kanadě, je taxonomická metoda, která používá krátký genetický marker v DNA organismu k identifikaci konkrétního druhu organismu. Krátká genetická sekvence ze standardní části genomu účinně pracuje na identifikaci druhu způsobem, jakým skener supermarketů rozlišuje produkty pomocí černých proužků kódu. Odtud vznikl název „čárový kód DNA“. Tyto čárové kódy se ve velmi malé míře liší u jedinců stejného druhu. Obvykle je drobná variace oblasti čárového kódu DNA uvnitř druhu triviální ve srovnání s rozdíly mezi druhy.

Sekvence DNA využívané v tzv. čárovém kódu jsou relativně krátké vzhledem k celému genomu, lze je získat levně a rychle. Jako standardní čárový kód pro téměř všechna zvířata slouží sekvence mitochondriální podjednotky I cytochrom c oxidázy. Sekvence COI obsahuje 648 párů bází ve většině skupin (Chao, 2014).

Identifikace druhů pomocí čárového kódu DNA začíná na samotném vzorku, kdy se z něho konkrétním postupem izoluje DNA. Následuje amplifikace oblasti čárového kódu pomocí PCR, a poté následuje sekvenace. Získaná sekvence je reprezentací jedinečné a druhově specifické série čtyř nukleotidů, tj. adeninu, cytosinu, guaninu a thyminu označených řadou písmen ACGT. Posledním krokem v identifikaci je porovnávání získaných sekvencí s referenčními databázemi (obr. 5). Pokud se daný organismus již v databázi vyskytuje, je ihned určen, pakliže je tomu naopak, je automaticky přiřazen k nejbližšímu příbuznému druhu. V současné době existují dvě hlavní databáze obsahující DNA čárové sekvence, jedná se o GenBank a BOLD.

Referenční databáze GenBank obsahuje již přes 200 milionů sekvencí z různých organismů.

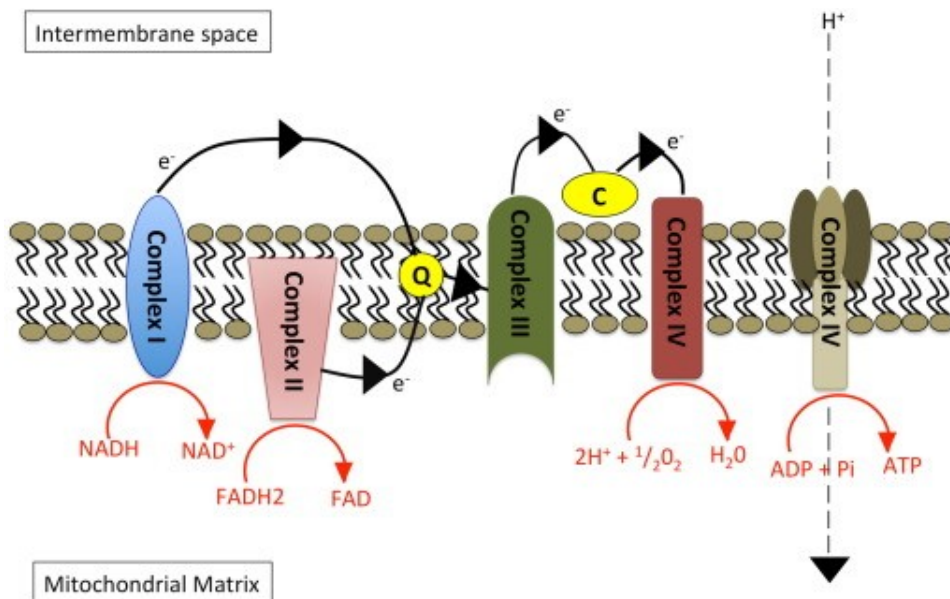
Obecně vývoj DNA barcodingu pomohl taxonomickému výzkumu a má velkou hodnotu, protože zjišťování a porovnávání rozmanitosti organismů hraje stále důležitější roli při kontrole a detekci různých invazivních druhů, identifikaci organismů pro monitorování životního prostředí, testování komerčních a potravinových produktů a další (Kowalska, 2019).



Obrázek 5: Postup identifikace organismu pomocí DNA barcodingu (Kowalska, 2019).

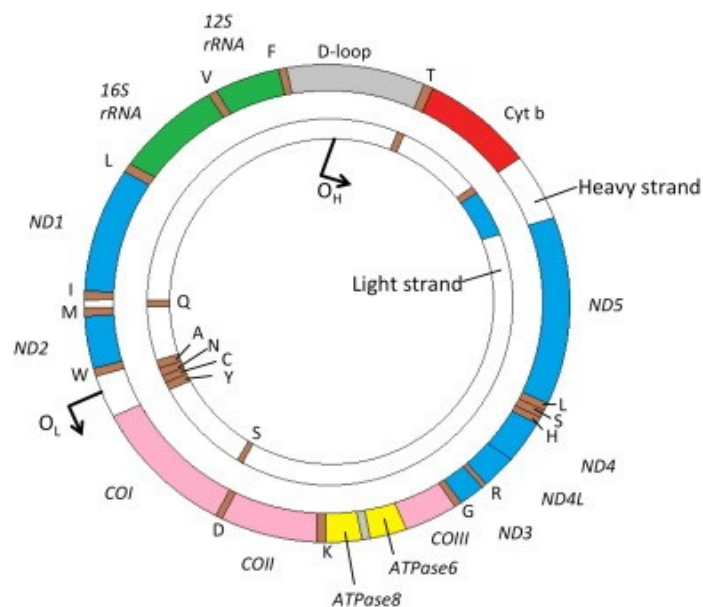
2.3.1 Mitochondriální DNA

Mitochondrie jsou orgány eukaryotických buněk, hrají ústřední roli v jejich metabolismu, apoptóze, nemoci a stárnutí. Jsou místem oxidační fosforylace, která je nezbytná pro produkci adenosintrifosfátu (ATP), jež slouží jako zdroj energie (Boore, 1999). Ústřední cestou oxidační fosforylace je mitochondriální respirační řetězec, který se skládá přibližně ze sta proteinů seskupených do specifických komplexů na vnitřní mitochondriální membráně (obr. 6) (Keogh, 2015).



Obrázek 6: Mitochondriální dýchací řetězec (Keogh, 2015).

Lidská mtDNA je cirkulární dvouvláknová molekula o délce 16 569 párů bází, která se skládá z kódující oblasti, jež obsahuje sekvenční pro 13 podjednotek oxidačního fosforylačního systému, 2 ribozomální RNA (rRNA), 22 přenosových RNA (tRNA), a z nekódujícího regionu nazývaný vytěšňovací smyčka (Pakendorf, 2005). První řetězec se nazývá těžké vlákno (H vlákno) a druhý lehké vlákno (L vlákno), první je bohatý na guaniny a druhý na cytosiny (obr. 7) (Keogh, 2015).



Obrázek 7: Mitochondriální genom. Těžké vlákno-heavy strand, lehké vlákno-L strand (Keogh, 2015).

MtDNA je přítomna ve velkém počtu kopií v buňce, nikoliv však v jádře, ale uvnitř organel vytvářejících energii-mitochondriích. Průměrná somatická buňka má pouze dvě kopie jakéhokoli jaderného genu nebo segmentu DNA, zatímco mtDNA je v ní obsažena ve stovkách až tisících kopiích, což zvyšuje citlivost detekce této DNA. Pokud totiž máte vzorek uložen nestandardním způsobem, dochází k degradaci DNA. Pokud ale máte výrazně více kopií mtDNA, máte větší šanci, že získáte neporušenou molekulu vhodnou k analýze. Této skutečnosti se využívá i u forenzních vzorků a v antropologickém a evolučním výzkumu (*Pakendorf, 2005*).

Tato vlastnost spolu s extranukleární cytoplazmatickou lokalizací usnadňuje získání mtDNA pro analýzu a identifikaci jedinců. Důležitý rozdíl mezi jadernou a mtDNA spočívá ve vzorci dědičnosti, mitochondrie, a tedy mtDNA, pocházejí z vajíčka matky jedince s malým nebo žádným příspěvkem od otce, zatímco jaderná DNA je kombinací DNA obou rodičů. Proto jaderná DNA prochází rekombinací s každou generací, zatímco mtDNA představuje pouze mateřský rodový původ jedince (tabulka 1) (*Butler, 1998*). Dále se liší také ve své organizaci, jaderná DNA je spojena histonovými komplexy, kdežto mtDNA je umístěna na vnitřní mitochondriální membráně a je spojena s několika proteiny vytvářející vlastní nukleoid. Mezi proteiny se řadí např. DNA polymerázová podjednotka gama 1 (*Keogh, 2015*).

U zvířat je mtDNA obvykle malý genom, stejně jako u člověka, který obsahuje též 37 genů. Je však možné, že se u nich najde i mnohem větší mitochondriální genom, to ale znamená pouhý produkt duplikace částí mtDNA, nikoliv změnu obsahu genu (*Boore, 1999*).

Tabulka 1: Srovnání lidské jaderné a mitochondriální DNA (*Butler, 1998*).

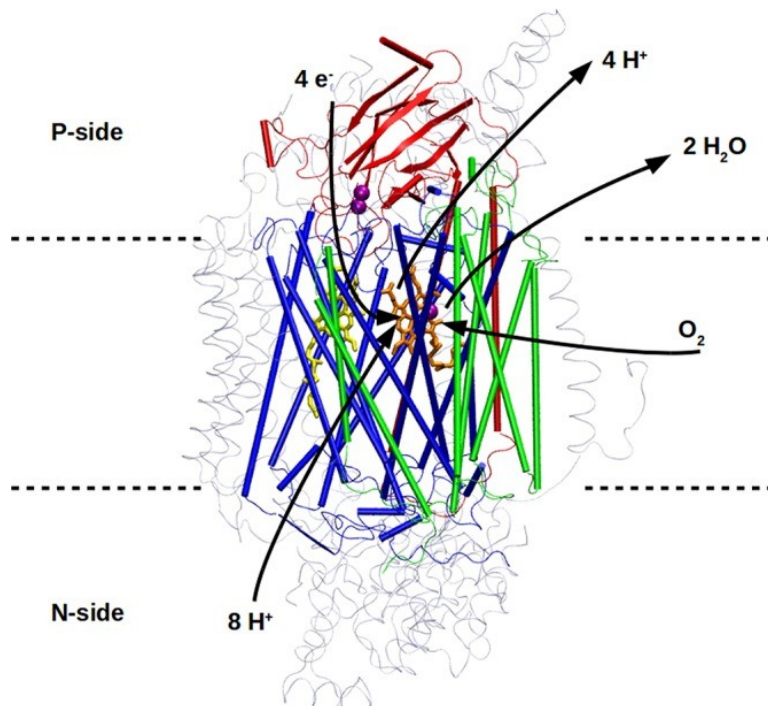
vlastnosti	jaderná DNA	mitochondriální DNA
velikost	3 miliardy bp	16 569 bp
kopie na buňku	2	může být > 1000
struktura	lineární; zabalené v chromozomech	cirkulární
zdeděno od	otec a matka	matka
generační rekombinace	ano	ne
míra mutace	nízká	vysoká

2.3.1.1 Detekce a identifikace na základě mtDNA

V dnešní době existuje již mnoho metod, jak identifikovat druh a jedince pomocí mtDNA. Nejznámější a nejčastější metodou je metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). Vyvinuly se také různé další automatizované sekvenční postupy a separační techniky, které pomáhají snížit náklady a čas analýzy. Mezi takové techniky patří např. kapilární elektroforéza, screeningové techniky, pod které spadají sekvenčně specifické oligonukleotidové typizace a minisequencing. Dále denaturační elektroforéza na gradientovém gelu, jež slouží jako vynikající metoda pro porovnání dvou vzorků (Butler, 1998).

2.3.2 Cytochrom c oxidáza

Cytochrom c oxidáza je terminální enzym dýchacího řetězce v mitochondriích. V tomto řetězci dochází k přesunu volných elektronů od dárce (cytochrom c) k akceptoru (molekulární kyslík) a výsledným produktem je voda. COI hraje důležitou roli v řízení aerobní produkce energie (Ygodina, 2014). Bakteriální COI se skládá pouze ze 3-4 podjednotek, zatímco COI v eukaryotických buňkách obsahuje 13 podjednotek. Tři největší podjednotky (I-III) jsou velmi podobné podjednotkám z bakteriální COI, tvoří katalytické jádro enzymu a katalyzují transport elektronů z cytochromu c na kyslík a čerpání protonů. Podjednotky I-III eukaryotické COI jsou kódovány mtDNA, zbylé podjednotky COI jsou kódovány jadernou DNA a jsou pevně vázány na podjednotky I-III (obr. 8) (Kadenbach, 2015).



Obrázek 8: Cytochrom *c* oxidáza. Modrá, červená a zelená barva znázorňuje podjednotky I-III. Šedá barva znázorňuje deset jaderně kódovaných podjednotek. Rovněž jsou vyznačeny hranice dvojvrstvy lipidů tečkovanou čarou. Šipky představují dráhy elektronů, protonů a kyslíku (Wikström, 2018).

2.3.2.1 Využití COI v molekulárních metodách

V systematické taxonomii je jedním z nejunikátnějších a nejslibnějších nástrojů pro identifikaci druhů DNA čárový kód, který je široce přijímán jako nový koncept v taxonomii. Mitochondriální gen kódující podjednotku I cytochrom *c* oxidázy, což je fragment o velikosti přibližně 650 bp, byl *Herbertem et al.* (2003) navržen jako univerzální čárový kód. Díky odlišným sekvencím kódujících COI jsme schopni v dnešní době rozlišit úzce spřízněné kmeny všech živočišných kmenů. Tyto sekvence se vyznačují vysokou mezidruhovou variabilitou a nízkou vnitrodruhovou variabilitou (*Mondal, 2020*).

Standardní sekvence pro COI však není vhodná pro identifikaci druhů rostlin, protože u nich se většinou sekvence pro COI nevyskytuje. Výjimkou jsou červené řasy, kde lze výše uvedený postup aplikovat. U ostatních rostlin nedochází k úspěšné amplifikaci chtěného fragmentu, vědci proto začali používat chloroplastovou DNA. Ta se v rostlinách vyskytuje ve větším počtu kopií (*Kowalska, 2019*).

2.4 BUNĚČNÉ LINIE

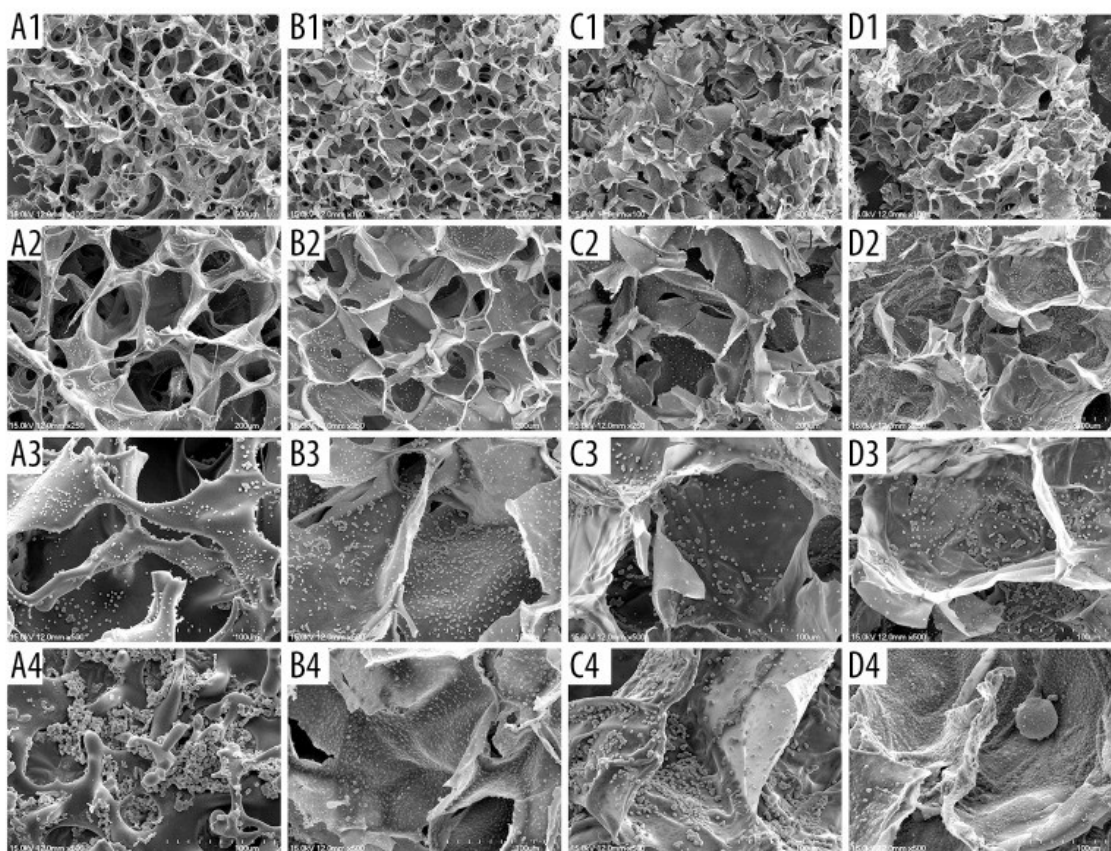
Buněčné linie jsou všude přítomné nástroje pro experimentální biomedicínský výzkum. První buněčné linie byly izolované z myši v roce 1943. Avšak nejznámějším milníkem spojovaný s buněčnými liniemi je rok 1951 a objevení HeLa buněk, které byly izolované z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacksové. Od té doby roste svět buněčných linií exponenciálně, a to nejen z hlediska jejich počtu, ale i z hlediska jejich variability. Dalším důležitým rokem je rok 1975, kdy byly vynalezeny tzv. hybridní linie, v roce 1981 byly odvozeny linie z myších embryonálních kmenových buněk a v roce 1998 z lidských embryonálních kmenových buněk. A nakonec se dostáváme k vývoji indukovaných pluripotentních kmenových buněk, jež byly vyvinuty v roce 2006 (*Bairoch, 2018*).

Buněčné linie jsou kultury živočišných buněk, které se mohou opakovaně množit, některé i neomezeně. Vycházejí z primárních buněčných kultur, které jsou izolovány přímo z tkání nebo orgánů. Primární kultury úzce napodobují chování buněk *in vivo*. Obvykle se v experimentech používají během několika dnů, neboť mají krátkou životnost. Pomocí tzv. pasážování, kdy je část primární kultury přenesena do nového média, se dostáváme ke vzniku sekundárních buněčných kultur (*Bols, 2011*). Procesem transformace sekundárních buněčných kultur, kdy dojde ke změnám růstových vlastností, se můžeme dostat až k buněčným liniím, které mají neomezenou životnost a schopnost neomezeného dělení. Takovéto linie mohou být také izolovány z živé nádorové tkáně. Příkladem takovýchto linií jsou např. HeLa buňky. Tyto buněčné linie však mají tendenci se v průběhu času měnit (*Verma, 2014*).

Existuje mnoho druhů způsobů kultivace buněčných linií, avšak nejaktuálnějším nejprohnanějším tématem je trojrozměrná (3D) kultivace. Dvourozměrná (2D) kultivace, je metoda, jež je používána od počátku 20. století, která hraje zásadní roli ve výzkumu, ale má mnoho omezení v důsledku 2D modelů. Buňky v tomto typu kultivace nepřesně reprezentují tkáňové buňky *in vitro*. Metoda 3D kultivace ukázala zlepšení ve studiích zaměřených na morfologii, monitorování počtu buněk, proliferaci, reakci na podněty, diferenciaci, metabolismus léčiv a syntézu proteinů. To vše je způsobeno schopností 3D kultur modelovat buňku *in vivo* při kultivaci *in vitro*. 3D kultivace má mnoho aplikací, používá se např. ve výzkumu rakoviny a kmenových buněk (*Jensen, 2020*). Bylo vytvořeno hned několik metod 3D kultivace, kultivace pomocí skafoldů,

matricových gelů a metoda visuté kapky, z nichž každá má své výhody a omezení (Gamerith, 2017).

Skafoldy se rozumí nosič na bázi hydrogelu nebo na tvrdém polymerním materiálu. Hydrogely jsou univerzální a jedinečné díky své schopnosti napodobovat extracelulární matici. Existují přírodní i syntetické hydrogely, přičemž přírodní gely se běžně vyrábějí z přírodních polymerů, jako je fibrinogen, kyselina hyaluronová, kolagen, želatina a chitosan (obr. 9). Syntetické polymery se obvykle vyrábějí ze syntetických polymerů vyrobených z polyethylenglykolu, kyseliny polymléčné nebo z polyvinylacetátu (Jensen, 2020).



Obrázek 9: Snímek morfologie buněk na nosiči na bázi hydrogelu za pomoci elektronového mikroskopu. (A) hedvábný fibroin; (B) hedvábný fibroin/chitosan; (C) hedvábný fibroin/želatina; (D) hedvábný fibroin/chitosan/želatina; (1) 3. den, zvětšeno 100x; (2) 3. den, zvětšeno 250x; (3) 3. den, zvětšeno 500x; (4) 7. den, zvětšeno 500x (Li, 2017).

2.4.1 Použité buněčné linie

2.4.1.1 J774

J774 je myší makrofágová buněčná linie, která se používá jako model pro studium infekce *M. tuberculosis*. Je to jedna z nejčastěji používaných myších buněčných linií a nejsnadněji dostupných (Andreu, 2017). Makrofágy jsou tkáňové imunitní buňky. Jsou vysoce pohyblivé, schopné chemotaxe a pohlcení patogenů. Stimulují imunitní systém prezentací antigenů lymfocytům. Díky těmto schopnostem linie makrofágů slouží jako modelové systémy. Jdou snadno udržovat a lze s nimi snadno geneticky manipulovat (Lam, 2009).

Buňky J774, jsou adherentní, pomalu migrující buňky se schopností fagocytózy. Exprimují některé makrofágové markery, jako jsou molekuly třídy CD23, CD86 a MHC-I (Gabrilovac, 2011).

2.4.1.2 VERO

VERO buňky jsou tkáňová buněčná linie odvozená z opičích ledvinných epiteliálních buněk kočkodana zeleného (Murayama, 2016). Tato buněčná linie je citlivá na různé typy virů, ale i na některé bakteriální toxiny včetně toxinů podobných Shiga (nebo „Vero“). VERO buňky mají pseudo-diploidní karyotyp a nejsou tumorigenní, pokud nejsou rozsáhle pasážovány. Díky těmto vlastnostem jsou VERO buňky používány při různých činnostech proti infekčním onemocněním, slouží jako biologický materiál ve výzkumných laboratořích, diagnostický nástroj v klinických laboratořích a také jako buněčný substrát pro lidské vakcíny ve farmaceutickém průmyslu (Sakuma, 2018).

2.4.1.3 MDBK

MDBK buňky jsou buněčné linie odvozené z ledvinných epiteliálních buněk tura domácího. Slouží jako systém pro kultivaci viru infekční bovinní rinotracheitidy, což je rozšířené virové onemocnění skotu (Hulyanych, 2016).

2.4.1.4 NIH3T3

NIH3T3 je imortalizovaná myší embryonální fibroblastová buněčná linie, u které byl odhalen téměř tetraploidní karyotyp se 75 chromozomy. Tyto buňky jsou vhodné pro DNA transfekci a pro studium transformace (Leibiger, 2012).

3. CÍLE PRÁCE

1. Rešerše na téma metody druhové identifikace.
2. Zavedení metody fragmentační analýzy DNA pro určení druhu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této diplomové práce je zavedení a optimalizace metody fragmentační analýzy DNA pro určení druhu. Důležitými dílčími úkoly je najít vhodné primery, zoptimalizovat multiplexní PCR a správně vyhodnotit data fragmentační analýzy. Optimalizací multiplexní PCR se rozumí nastavení správných koncentrací všech komponentů PCR reakce, přidání různých aditiv, upravení teplotního profilu a počtu cyklů, aby se amplifikovalo vše potřebné a reakce tak mohla proběhnout za optimálních podmínek. Součástí této práce byla také izolace lidské DNA a ověření metody na monoplexu.

V experimentální části jsme vycházeli z článku: *Species identification in cell culture: A two-pronged molecular approach (Cooper, 2007)*. V tomto článku byl navržen postup pro detekci mezidruhovú kontaminace. Jedná se o test multiplexní PCR, který rychle identifikuje nejběžnější druhy buněčných kultur a je schopný identifikovat křížové kontaminace mezi těmito druhy. V této metodě byly produkty PCR vizualizovány na prefabrikovaných gelech obarvených ethidium bromidem. Cílem PCR je oblast, často popisovanou jako „oblast čárového kódu“, amplifikovaná pomocí univerzální směsi primerů zaměřené na konzervované sekvence cytochrom c oxidázy I. Primery byly navrženy tak, aby fungovaly v testu multiplexní PCR a generovaly amplikony specifické velikosti pro každý vybraný druh.

Koncovkou této metody je gelová elektroforéza, která může v některých případech být trochu komplikovanější na přesný odečet velikosti produktu. Dalším problémem do budoucna by byla případná automatizace separace.

Proto jsme se rozhodli v rámci diplomové práce tuto metodu zásadně přepracovat a převést její koncovku na kapilární elektroforézu. Jelikož se zde využívá detekce pomocí fluorescenčně značených primerů, bylo od počátku jasné, že bude nutná kompletní optimalizace metody (uzpůsobení kompletně jiné chemii). Dalo se sice vycházet ze sekvence primerů, jejichž specifitu jsme ověřili v databázi pomocí programů sady BLAST, BioEdit 5 a CloneManager. Ale bylo nutné primery naznačit fluorescenční značkou a optimalizovat složení multiplexní PCR a metodu separace.

4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A OSTATNÍ

Gb Elite PCR Master Mix a gb BASIC PCR Master Mix (*Generi Biotech*)

Kit pro izolaci DNA z tkání (*Generi Biotech*)

PCR primery - oligonukleotidy – (*Generi Biotech*)

Fluorescenčně značené oligonukleotidy (*Generi Biotech*)

Různé druhy primer mixů (připravené dle uvedených tabulek)

DNA z buněčných linií J774, WBF, NIH3T3, MDBK, VERO, DNA izolovaná z jater vepře, lidská DNA izolovaná z bukálního stěru, DNA tura domácího izolovaná ze vzorků tkáně)

IWA (demineralizovaná voda) - Watek

Aditiva: betain, DMSO (dimethylsulfoxid), BSA (hovězí sérový albumin)

Centrifuga Hermle a Centrifuga BioSan LMC 3000

Real-time cyklér CFX Connect, BIO RAD

PCR cyklér T100, Bio-RAD

Sekvenátor ABI PRISM 3100 Avant, ABI

Vortex, BioSan

Pipety, špičky a mikrozkuřavky, Eppendorf

Automatické pipety, Eppendorf

Laminární box MB-120 - Labox

Spektrofotometr Nanodrop ND 1000, Thermo

4.2 IZOLACE DNA

Pro izolaci genomové DNA byl v této diplomové práci použit komerčně dostupný kit pro izolaci DNA z tkání (Kit for isolation of DNA from tissues-Generi Biotech), který probíhá na kolonce se silikagelovou membránou. Pomocí tohoto kitu jsme schopni získat vysoce čistou genomovou DNA z různých typů lidských či zvířecích tkání a buněčných kultur.

Pro vzorek lidské DNA jsme využili bukální stěr. Tento odběr je rychlý, bezbolestný a lze jej provádět kdekoliv. Po celou dobu je nutno dodržovat zásady čisté a sterilní práce, aby nedošlo ke kontaminaci. Samotný stěr se provádí za pomoci tyčinky, která je zakončena kartáčkem. Pro úspěšný odběr je vhodné přiměřeným tlakem a krouživým pohybem otírat sliznice obou tváří alespoň po dobu jedné minuty. Poté je

kartáček vložen do zkumavky zkrácen tak, aby bylo možné zkumavku uzavřít. Zkumavku je nezbytné řádně označit.

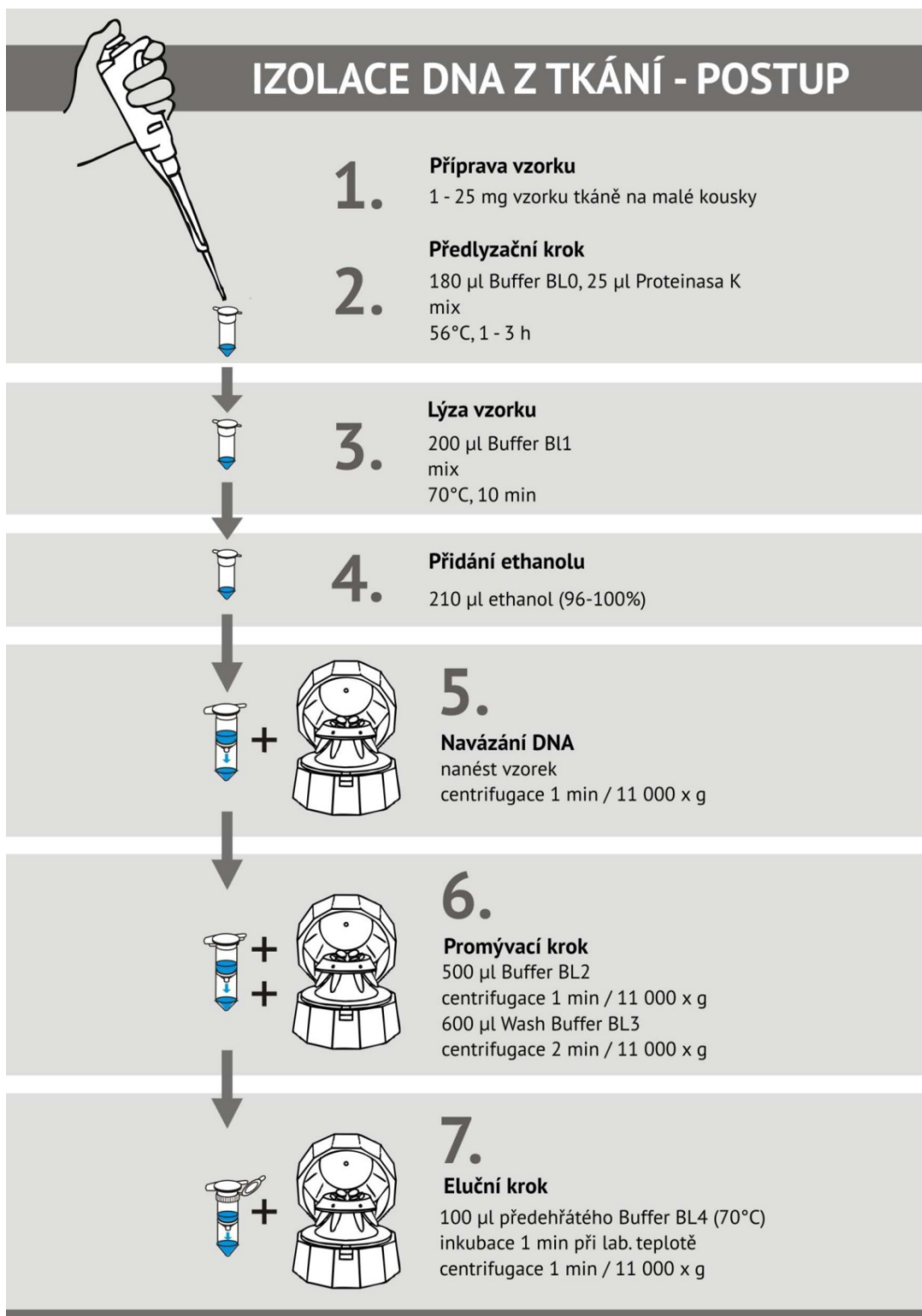
Samotná izolace DNA pomocí kitu byla snadná a probíhala již podle standardizovaného a ověřeného postupu (obr. 10). Poté byl ke vzorku do zkumavky napipetován pufr BL0 a Proteináza K a vše bylo řádně promícháno ve vortexu. Tyto dvě látky mají na starosti lýzu buněk, dochází k narušení buněčné stěny a uvolnění obsahu buňky, tedy i DNA. Promíchaný roztok byl inkubován v termostatu po dobu 1-3 h při teplotě 56°C. Následně byl kartáček odstraněn, přidán pufr BL1 a promíchán. Následovalo opět vložení do termostatu na 10 minut při teplotě 70°C. Poté je vhodné zkumavku se vzorkem krátce stočit (3000 x g, 5 s) a přidat ethanol, díky kterému se DNA naváže na kolonku za specifických podmínek a opět krátce stočit. Takto připravený a řádně promíchaný roztok byl napipetován na kolonku ve sběrné zkumavce a centrifugován (11 000 x g, 1 min). Kolonka s již navázanou DNA byla vložena do nové sběrné zkumavky a promyta pomocí dvou pufrů BL2 a BL3, které sloužily k odstranění nečistot. Po posledním promytí byla sběrná zkumavka odstraněna a kolonka byla vložena do nové a řádně označené zkumavky. Na střed zkumavky byl pipetován eluční roztok BL4, který byl předem přehřátý na 70 °C. Následovala inkubace po dobu jedné minuty při laboratorní teplotě. Posledním krokem byla opět centrifugace. Takto jsme získali genomovou DNA, kterou jsme používali v dalších částech experimentu.

Obdobně byla provedena izolace DNA z dalších vzorků (buněčné kultury, dostupné vzorky tkání).

4.2.1 Stanovení koncentrace získané genomové DNA

Koncentraci získané DNA jsme měřili pomocí kapkového spektrofotometru NanoDrop 1000 UV. Jedná se o mikroobjemový spektrofotometr umožňující měření vzorku o velmi malých objemech. Výsledná hodnota koncentrace je vyjádřena v nanogramech na jeden mikrolitr (ng/μl).

Tento přístroj dokáže nejen změřit koncentraci, ale dokáže i za pomoci poměrů absorbancí vlnových délek provést standardní kontrolu kvality/čistoty získané DNA.



Obrázek 10: Schématický postup izolace DNA (manuál izolačního kitu - Generi Biotech).

4.3 NÁVRH A ZNAČENÍ PRIMERŮ PRO FRAGMENTAČNÍ ANALÝZU COI

PCR je skvělá technika, ale pokud nejsou primery správně navrženy, může selhat. Primery musí být dostatečně dlouhé, aby se mohly vázat na specifickou část cílové DNA. Specifičnost primerů je jednou z jejich nejdůležitějších charakteristik. Typické primery mají délku mezi 18 a 22 nukleotidy. Pravděpodobnost navázání primeru na náhodou sekvenci se snižuje se zvyšováním jeho délky. Je dobré se vyhnout tomu, aby primery neobsahovaly tzv. palindromy, což jsou úseky DNA, které se čtou z obou dvou stran stejně. V dnešní době jsou už vyvinuté různé počítačové programy s cílem pomoci při návrhu primerů PCR (Clark, 2019).

Sekvence použitých primerů v multiplexních reakcích v této diplomové práci vychází z původního návrhu vědců z již zmiňovaného článku (Cooper, 2007), kde je navržen multiplex pro detekci 14 nejčastěji používaných druhů (tabulka 2). Sekvence však byla upravena a bylo provedeno značení tzv. forward primerů pomocí fluorescenčních značek (barvivem FAM), tak aby bylo možno fragmenty detekovat na sekvenátoru. Správnost návrhu primerů byla ověřena v programech BLAST a CloneMAnager, tak aby bylo dosaženo druhové specifity a aby primery v reakci neposkytovaly nespecifické produkty vlivem komplementarity mezi sebou, případně vlivem sekundárních struktur.

My jsme měli k dispozici pouze některá DNA z uvedených živočišných druhů, konkrétně DNA z člověka, vepře, myši, kočkodana, tura a krysy. Pro další ověření je plánována příprava univerzálního arteficiárního DNA standardu, který by poskytoval templát pro všechny testované druhy. Jelikož se nám v průběhu diplomové práce nepodařilo sehnat vzorky všech testovaných druhů (pozn. zde jsme se snažili získat vzorky buněčných linií nebo tkání pocházející ze zvířat, nicméně buď neúspěšně, nebo s nedostatečnou úspěšností izolace, kvality izolátu, která ale byla prováděna pracovníky laboratoře).

Naše multiplexní PCR také obsahuje interní pozitivní kontrolu, to je sada primerů, která poskytuje PCR produkt v případě přítomnosti mtDNA. Pokud produkt nevzniká, buď vzorek neobsahuje amplifikovatelnou DNA, nebo obsahuje inhibitory PCR.

4.3.1 Ověření funkčnosti primerů

Pro ověření funkčnosti navržených primerů byla provedena ověřovací reakce, kde jednotlivé sady primerů byly amplifikovány v singlplexní PCR a separovány na kapilární elektroforéze.

Pro prvotní pokus byla zvolena koncentrace primerů v PCR reakci v rozsahu 100-400 nM. Všechny primery byly na 5' konci značeny fluorescenční značkou FAM.

Tímto pokusem jsme ověřili:

- PCR primery fungují s daným teplotním
- Separace a detekce pomocí kapilární elektroforézy je za daných podmínek možná
- Ověřili jsme, že použitá chemie poskytuje kladný výsledek.

Z pochopitelných důvodů experiment nemohl poskytnout vyvážené výsledky, jelikož nebyly optimalizovány reakční podmínky. Nicméně pro prvotní ověření byl považován za dostačující, jelikož s každým testovaným singlplexem a odpovídající teplotní DNA jsme získali PCR produkt očekávané velikosti.

Fluorofor je molekula, která je schopná po osvětlení světlem o určité vlnové délce absorbovat energii záření a okamžitě ji přeměnit na emisní záření o delší vlnové délce. Fluorofor bývá k primeru připojen kovalentní vazbou a slouží jako značka k detekci. Nejčastěji používaným fluoroforem je právě 6-karboxyfluorescein, tzv. FAM (*Huygens, 2006*).

Dalšími kroky byla optimalizace singlplexních reakcí, kdy byly optimalizovány:

- Teplotní profil
- Složení PCR směsi
- Koncentrace primerů
- Jednoduché multiplexy – ověření podmínek v prostředí multiplexu
- Test aditiv
- Stanovení detekčního limitu

Všechny tyto optimalizace probíhaly iteračně, ale pro přehlednost jsou zde rozděleny v následujících kapitolách do jednotlivých celků.

Finální složení multiplexní PCR je vždy určitým kompromisem, protože nikdy nelze vyhovět všem jednotlivým požadavkům každého systému.

Tabulka 2: Tabulka primerů a očekávaných velikostí fragmentů pro fragmentační COI analýzu (GeneriBiotech). IC = interní kontrola. Všechny forward primery jsou značeny na 5' konci flourescenční značkou FAM.

velikost ampliconu	druh	název	sekvence
460	vepř	Sus-F	CTACTATCCCTGCCAGTT
		Sus-R	GAATAGGAAGATGAAGCCC
391	člověk	Homo-F	TAGACATCGTACTACACGACACG
		Homo-R	TCCAGGTTTATGGAGGGTTC
341	kočka	Felis-F	TATTGCCATTCTACCGGGGTG
		Felis-R	ACGTTATATTGACTCCTACAAACATAATC
315	křeček	Cricetulus-F	ACTAACCCGTTCTTCGCATTC
		Cricetulus-R	GCGTAGGCGAACGGAAGTATC
287	makak	Macaca-F	CCCACCCAGTTCAACTAAGC
		Macaca-R	AATGGTGAAGGATGGGTCG
267	ovce	Ovis -F	CGATACACGGGCTTACTTCAGG
		Ovis-R	AAATACAGCTCCTATTGATAAT
243	kůň	Equus-F	CTGCCCTAAGCCTCCTAAT
		Equus-R	AGAAGTAGGAATGATGGGGG
222	kočkodan	Ceratop-F	CTTCTTTCTGCTGCTAATG
		Ceratop-R	TTTGATACTGGGATATGGCG
196	krysa	Rattus-F	CGGCCACCCAGAAGTGTACATC
		Rattus-R	GGCTCGGGTGTCTACATCTAGG
172	pes	Canis-F	GAACTAGGTCAGCCCGTACTT
		Canis-R	TTCGGGGGAATGCCATGTC
150	myš	Mus-F	ATTACAGCCGTACGCTCCTAT
		Mus-R	CCCAAAGAATCAGAACAGATGC
136	králík	Orynt-F	CGCCTATACAATATGAAATACTGTT
		Orynt-R	TGTGGTTGTTAGTTCAATAGTCT
117	koza	Capra-F	ATATCAATCGGGTTTCTAGGATTTATT
		Capra-R	AGTTGGGATAGCGATAATTATGGTAGT
102	tur	Bos-F	GCTATTCCAACCGGGTAAAAGTC
		Bos-R	GAAATAAAGCCTAGGGCTCAC
70	IC	IC-F	CGGGGAATYAGGGTTCGATTC
		IC-R	GCCTGCTGCCTTCCTCCTTKGATG

4.3.2 Primer mix

Do PCR reakcí nebyly primery přidávány jako jednotlivé komponenty, ale jako naředěné směsi primerů – primer mix. Buď připravené pro jeden systém (tedy jeden pár primerů) nebo připravené pro různě složité multiplexy. V následující tabulce uvádíme sekvence jako příklad výchozího primer mixu a způsob jeho přípravy, kdy primer mix se připravoval 5,25× koncentrovaný vzhledem k tomu, že dojde k jeho naředění v reakční směsi (viz následující kapitola).

Tabulka 3: Způsob přípravy výchozího primer mixu, který jsme použili k počátečnímu ověření metody.

druh/PCR systém	zásobní koncentrace primeru (nM)	5,25× koncentrovaný primer (nM)	ředit (×krát)	objem obou primerů (μl)	pipetovaný objem každého primeru (μl)
vepř	100000	1050	95,238	21	10,5
člověk	100000	525	190,48	10,5	5,25
kočka	100000	1050	95,238	21	10,5
křeček	100000	1050	95,238	21	10,5
makak	100000	2100	47,619	42	21
ovce	100000	1050	95,238	21	10,5
kůň	100000	1050	95,238	21	10,5
kočkodan	100000	2100	47,619	42	21
krysa	100000	525	190,48	10,5	5,25
pes	100000	1050	95,238	21	10,5
myš	100000	735	136,05	14,7	7,35
králík	100000	1050	95,238	21	10,5
koza	100000	1050	95,238	21	10,5
tur	100000	1050	95,238	21	10,5
IC	100000	210	476,19	4,2	2,1
Voda					687,1

Na následující stránce se nachází jeden z možných náhledů srovnání, kam nasedají primery konkrétně u mtDNA vepře.

```

              7080      7090      7100      7110      7120      7130      7140
Sus scrofa mitochondrion, comp .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sus_FW agtactaatcacagcogtaactacttctactatccctgccagttctagcagctggcattactatactactg
Sus_RevC                               CTACTATCCCTGCCAGTT-----

              7150      7160      7170      7180      7190      7200      7210
Sus scrofa mitochondrion, comp .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sus_FW acagacogcaacctgaaacacaaaccttttttgatccagcagggtggtggagaccctatcctttatcaaacact
Sus_RevC -----

              7220      7230      7240      7250      7260      7270      7280
Sus scrofa mitochondrion, comp .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sus_FW tgttctgatttttoggacacccagaagtatatacttctcatcttaccaggattoggaataatctccacat
Sus_RevC -----

              7290      7300      7310      7320      7330      7340      7350
Sus scrofa mitochondrion, comp .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sus_FW tgtaacctactattcaggtaaaaaagaaccaatttggatataaggcatagtagtagagccataatgtccatt
Sus_RevC -----

              7360      7370      7380      7390      7400      7410      7420
Sus scrofa mitochondrion, comp .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sus_FW ggattcttaggttttattgtatgggctcacccacataattcacogtaggaatagaogtagataccogagcat
Sus_RevC -----

              7430      7440      7450      7460      7470      7480      7490
Sus scrofa mitochondrion, comp .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sus_FW actttacatctgctacaataatcattgctattcccactggagtaaaagtatttagttgattagctaccct
Sus_RevC -----

              7500      7510      7520      7530      7540      7550      7560
Sus scrofa mitochondrion, comp .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sus_FW gcaoggggcaatattaaaatgacaccogcaatactatgagctctgggcttcctcttccattcacogta
Sus_RevC -----GGGCTTCATCTTCCTATTC-----

```

Obrázek 11: Ukázka místa nasednutí primerů u mtDNA vepře.

4.4 OPTIMALIZACE SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

4.4.1 Složení reakční směsi

Jako výchozí složení reakční směsi jsme použili komerční PCR master mix, který obsahuje vše potřebné kromě primerů a templátu. Primery byly přidávány v podobě primeru mixu, kdy koncentrace primerů byla nastavena dle požadovaných podmínek.

Poslední komponenta byla izolovaná DNA, které se přidávalo množství odpovídající přibližně 2 ng, pokud nebylo cílem reakce jiná koncentrace.

Výchozí složení PCR reakce

Gb Elite PCR Master Mix	9,19 μ l
Primer mix	3,81 μ l
DNA	2,3 μ l
Voda	doplnit do 20 μ l

V našich experimentech jsme tedy používali master mixy, jež byly komerčně vyráběny firmou Generi Biotech. Konkrétně se jedná o gb Elite PCR Master Mix a gb BASIC PCR Master Mix. Tyto master mixy byly již ověřené a obsahovaly všechny potřebné komponenty pro PCR reakci, a proto je nebylo potřeba optimalizovat. Skládají se z *Taq* DNA polymerázy, reakčního pufru, DTP, $MgCl_2$ a aditiv zabraňujících inhibici PCR reakce. Je vhodný pro použití k PCR nebo real-time PCR v kombinaci s fluorescenčně značenými sondami (*Generi Biotech*).

Jednotlivé primery byly taktéž dodány firmou Generi Biotech.

Vhodné složení a poměr reakční směsi jsou velice důležitými parametry PCR reakce. Např. vysoké množství templátové DNA může zkreslovat finální výsledky. Pokud je templátové DNA ve vzorku mnoho, může docházet k inhibici produktů PCR a pokud je templátové DNA málo, může dojít ke snížení kvantity produktů (*Generi Biotech*).

V naší práci byly vyzkoušeny celkem dva master mixy, prvním z nich a častěji využívaným byl gbElite PCR Master Mix. Druhým vyzkoušeným master mixem byl gb BASIC PCR Master Mix. gb Elite PCR Master Mix je vhodný pro použití v PCR nebo real-time PCR v kombinaci s fluorescenčně značenými sondami. Je vhodný pro aplikace vyžadující vysokou citlivost a efektivitu. Jeho výhodou je zvýšená odolnost proti PCR inhibitorům. gb BASIC PCR Master Mix je vhodný především pro end-point PCR

analýzu, jeho výhodou je zvýšená odolnost proti PCR inhibitorům. Další výhodou je také jeho cena (*Generi Biotech*).

Jako vhodnější se v našich experimentech ukázal gb Elite PCR Master Mix, který v multiplexních reakcích poskytoval oproti levnějšímu gb BASIC PCR Master Mix lepší výsledky, což je určitě způsobeno jeho složením, které je i dle výrobce vhodnější pro složitější reakce, což multiplexní reakce bezesporu je.

4.4.2 Objem reakce

Počáteční objem reakce byl 20 μ l. Dle zkušeností laboratoře lze multiplexní reakce provádět i v objemech 3 μ l, což se zdá téměř neuvěřitelné (interní sdělení). Tato praxe je léty ověřená a šetří poměrně drahou komerční chemii právě forenzních kitů.

My jsme zkusili zmenšit objem reakce na 10 μ l, jelikož pro další zpracování se využívá pouze 0,5 μ l a tedy 95 % vzorku zůstává pro reanalýzu a posléze je vyhozeno.

Reakční objem 10 μ l poskytoval srovnatelné výsledky jako 20 μ l. Další zmenšování objemu by již působilo komplikace při pipetování a mohlo by vnášet další negativní vlivy, proto jsme se spokojili s tímto polovičním snížením.

Optimalizovaný objem reakce

Reakční směs:

gbElite PCR Master Mix	3,06 μ l
Primer mix	1,27 μ l
DNA mix	2,3 μ
Voda	doplnit do 10 μ l

4.5 KONCENTRACE TEMPLÁTOVÉ DNA

Koncentrace templátové DNA může výrazně ovlivnit průběh reakce. Abychom dosáhli optimálních podmínek, zkoušeli jsme různé kombinace reakčních složek a různá ředění templátové DNA (*Butler, 2010*).

Testovali jsme rozsah, který byl blízko od očekávané hodnoty (1-2 ng na reakci) vzdálen 2 \times . Pokud by metoda fungovala ve všech testovaných koncentracích, byla by i do určité míry robustní a nebyla by příliš citlivá na vstupní množství DNA, což může být důležité např. u forenzních vzorků. V případě detekce kontaminace buněčné linie se dá očekávat dostatečné množství DNA, ale je otázkou, jak velké množství bude kontaminující složky. Proto byl proveden i experiment popsáný v bodu 4.5.1.

Jako nejvhodnější se po provedení experimentů jevila koncentrace DNA 0,25 ng/μl, tedy přibližně 1 ng DNA v reakci. Což je i ve shodě např. s forenzními kity AmpFLSTR™ od firmy Thermo (*ThermoFisher*).

Nicméně metoda je schopna detekovat i nižší koncentrace, což je pro detekci kontaminací důležité. Viz následující odstavec.

4.5.1 Detekční limit

Detekční limit je definován jako nejnížší možná koncentrace vzorku, která může být danou metodou detekována (*Kim, 2019*).

V našem případě jsme použili směsnou i jednotlivou templátovou DNA pro vepře, člověka, kočkodana, tura a krysu. Výchozí koncentrace jednotlivých DNA templátů byly 0,25 ng/μl, které byly následně ředěny podle tabulky 4.

Tabulka 4: Postup pro ředění templátové DNA ke zjištění detekčního limitu.

ředění templátové DNA		
ředění	koncentrace (pg/μl)	množství v reakci (pg)
1x	250	575
5x	50	115
25x	10	23
125x	2	4,6
625x	0,4	0,9
3125x	0,08	0,2

U všech jednotlivých templátových DNA jsme získali signál i pro nejnížší ředění.

Ve směsném vzorku templátové DNA jsme zachytili pro všechny použité templátové DNA i nejnížší koncentraci.

4.6 OPTIMALIZACE TEPLOTNÍHO PROFILU

4.6.1 Teplotní profil

Pro úvodní reakci PCR jsme vycházeli z teplotní profilu uvedeného v tabulce 5. Prvním krokem byla fáze denaturační, která probíhala při 95 °C po dobu 5 minut. Při ní došlo k rozpadnutí vodíkových můstků mezi vlákna DNA a k jejímu rozdělení. Druhým krokem byl tzv. annealing, jež probíhal při teplotě 60 °C. Během tohoto procesu nasedaly primery na specifická místa DNA. Celý tento proces měl 45 cyklů. Posledním krokem byla fáze elongační, pro kterou byla zvolena teplota 72 °C a doba 7 minut. Při ní došlo k dosyntetizování vzniklých řetězců.

Tabulka 5: Počáteční teplotní profil (*Generi Biotech*).

počáteční teplotní profil		
95 °C	5 min	
95 °C	30 s	45x
60 °C	15 s	
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	
12 °C	ad finitum	

Správná optimalizace teplotního profilu je taktéž velice důležitá, aby došlo ke správné amplifikaci. Pro každou ze tří fází (denaturace, annealing a elongace) PCR reakce je vhodná jiná teplota. Záleží na druhu použití primerů. Primery do PCR reakce dáváme vždy po dvojicích, máme tzv. forward primer, který značíme „F“ a reverse primer, který značíme „R“. Primery při amplifikaci nasedají na DNA komplementárně. Při annealingu je zvláště důležité zvolit vhodnou teplotu, neboť při příliš nízké teplotě mohou nasedat primery i na sekvence, k nimž jsou komplementární jen z části a vytváří pak nespecifické produkty, které jsou nežádoucí. Naopak příliš vysoká teplota brání primerům nasednutí na DNA a produktu se vytvoří malé množství. Během poslední fáze PCR dochází k navázání volných nukleotidů a syntéze nových řetězců. Prodlužování řetězce probíhá nejčastěji při teplotách 65-75 °C. Počet cyklů se pohybuje okolo 40 opakování. Po určité době však dojde k vyčerpání reakčních komponent a zastaví se syntetizace nových vláken (*Generi Biotech*).

V naší experimentální práci jsme nejprve použili teplotní profil, který je uvedený v tabulce 5.

Současně s optimalizací teplotního profilu jsme museli začít i s optimalizací koncentrací DNA templátů a primerů.

Nejprve jsme snížili teplotu úplně posledního kroku z 12 °C na 8 °C, což nemá vliv na PCR reakci, jedná se spíše o kosmetickou úpravu. Následovalo snížení celkového počtu cyklů ze 45 na 40, neboť jsme získávali zbytečně vysoké výtěžky PCR produktu i přesto, že docházelo současně k optimalizacím koncentrace DNA. Vysoké výtěžky se projevily jako příliš vysoké píky na elektroforeogramu a komplikovaly správnou separaci DNA fragmentů. Větší ředění PCR reakce se nám nezdálo vhodné, neboť by mohlo docházet ke ztrátě slabších píků, případně k chybě ředění.

Stále jsme ale v odezvě získávali balastní píky. To bylo dáno vysokým signálem, proto jsme ještě snížili celkový počet cyklů až na 35, aby nám nevznikalo tolik PCR produktu. Tím se nám povedlo eliminovat všechny balastní píky. U multiplexních PCR reakcí, kde jsme zkoušeli ředit templátovou DNA, jsme museli cykly zase opět navýšit na 40, protože jsme začali ztrácet signály pro některou DNA. To je nejspíše dáno kompeticí jednotlivých systémů a limitního množství polymerázy. Další optimalizace byly provedeny, tak aby byl získán, co neoptimálnější signál bez balastních píků a aby reakce probíhala v uspokojivém čase.

Po optimalizaci podmínek reakce (odzkoušeno na monoplexech i multiplexech) jsme získali výsledný teplotní profil.

Tabulka 6: *Výsledný teplotní profil.*

výsledný teplotní profil		
95°C	5 min	
95°C	30 s	35x
60°C	15 s	
72°C	30 s	
72°C	7 min	
8 °C	ad finitum	

4.7 PCR REAKCE

Nejzásadnější složkou multiplexní reakce je asi množství primerů. Během našeho experimentu jsme zkoušeli různá složení primer mixů. Primer mixy obsahovaly dvojice primerů (monoplexní PCR pouze pro naše zvolená templátová DNA). Složitější kombinace primerů pro 2-6 systémů (jednoduché multiplexy) až po složitý multiplex 15 sad primerů včetně interní kontroly.

Zkoušeli jsme různé kombinace a různé koncentrace. Nejvhodnějším primer mixem byl FPM3, jehož složení je uvedeno v kapitole 5.7 Finální složení reakční směsi.

Jelikož metoda je primárně určena pro detekci kontaminace v buněčných kulturách, nepředpokládá se složitá směs templátové DNA. Očekáváme směs maximálně 2-3 druhů. Proto ani my jsme nikdy nepoužili směs DNA pro všechny druhy.

Pokud v multiplexní PCR některý systém poskytoval nižší pík v porovnání s ostatními systémy, bylo potřeba většinou navýšit koncentraci primeru (to je nejčastější u systémů, které poskytují delší PCR produkt), případně lehce (10 s) prodloužit elongační fázi PCR.

Ale i pokud směs obsahovala mix 6 druhů, poskytoval výsledný mix výsledky srovnatelné s monoplexními reakcemi.

4.7.1 Příklady používaných primer mixů

V této kapitole jsou uvedeny některé příklady primer mixů. V příkladech je zahrnut jak primer mix používaný v monoplexu (primer mix 1), tak i primer mix používaný v multiplexu (FPM1, FPM2).

Tabulka 7: Příklad primer mixu obsahující jednu dvojici primerů určen pro monoplexní PCR pro templátovou DNA člověka.

primer mix 1		
druh	název	koncentrace primeru (μM)
člověk	Homo-F	100
	Homo-R	100

Tabulka 8: Příklad primer mixu obsahující kombinaci primerů pro 4 systémy určen k multiplexní PCR.

FPM1			
druh	název	koncentrace v primer mixu (nM)	koncentrace v reakci (nM)
kočkodan	Ceratrop-F	300	57,1
	Ceratrop-R	300	57,1
tur	Bos-F	300	57,1
	Bos-R	300	57,1
myš	Mus-F	300	57,1
	Mus-R	300	57,1
krysa	Rattus-F	300	57,1
	Rattus-R	300	57,1

Tabulka 9: Příklad primer mixu obsahující kombinaci primerů pro 7 systémů určen k multiplexní PCR.

FPM2			
druh	název	koncentrace v primer mixu (nM)	koncentrace v reakci (nM)
kočkodan	Ceratrop-F	171,4	32,7
	Ceratrop-R	171,4	32,7
tur	Bos-F	171,4	32,7
	Bos-R	171,4	32,7
myš	Mus-F	171,4	32,7
	Mus-R	171,4	32,7
krysa	Rattus-F	171,4	32,7
	Rattus-R	171,4	32,7
IC	IC-F	171,4	32,7
	IC-R	171,4	32,7
vepř	Sus-F	171,4	32,7
	Sus-R	171,4	32,7
člověk	Homo-F	75	14,3
	Homo-R	75	14,3

4.8 ANALÝZA PCR PRODUKTŮ

Výsledným produktem PCR reakce jsou amplikony o různé délce charakteristické pro určitý druh. Amplikony byly na základě své délky rozděleny na sekvenátoru fungujícím na principu kapilární elektroforézy. Na analýzu bylo vždy spotřebováno 9,5 μ l vzorku, z čehož 0,5 μ l tvořil samotný produkt PCR a 9 μ l tvořil LIZ, což je vysoce deionizovaný dimethylformamid a DNA fluorescenční standard. Naměřená data byla zaznamenána do počítače, pomocí těchto dat a získaného elektroforeogramu jsme byli schopni srovnáním s referenčními profily určit, o jaké DNA se jednalo a odhalit případné kontaminace.

4.9 PCR SMÍŠENÝCH VZORKŮ

V této práci jsme také zkoušeli analyzovat smíšené vzorky. Zkoušeli jsme směs různých druhů o stejné koncentraci (viz tabulka 10), kde se nám povedlo detekovat všechny templátové DNA ve směsi (vepř, člověk, kočkodan, tur, myš). Dalším příkladem směsi je např. směs myší buněčné linie NIH3T3 a linie WBF. Tento vzorek

byl analyzován za účelem vyhodnocení schopnosti multiplexní PCR detekovat i stopová množství cizí DNA. Buněčná linie WBF zde vystupovala jako kontaminant.

Tabulka 10: Příprava finální směsi DNA.

DNA mix 1			
druh	c (ng/μl)	c finální (ng/μl)	V pipetovaný (μl)
vepř	31,4	0,25	1,8
člověk	25	0,25	2,3
kočkodan	26	0,25	2,2
tur	14	0,25	4,1
myš	10,2	0,25	5,6
voda			213,9

4.10 VLIV ADITIV NA PCR REAKCI

Abychom zvýšili specifitu reakce a kvantitu výsledného produktu, přidali jsme do reakční směsi aditiva. Použili jsme tři různá aditiva: betain, DMSO a BSA. Dalším přínosným účelem aditiv je napomoci funkci DNA polymerázy.

Betain (trimethylglycin) jsme v našich PCR reakcích použili v koncentracích 0,5 M až 3,75 M. Jeho hlavním účinkem je snižování teploty tání nukleových kyselin, pomáhá k oddělování řetězců DNA a má termostabilizační efekt na DNA polymerázu.

DMSO byl do reakce přidáván v rozmezí 1-10 %. Vyplácí se u sekvencí bohatých na G a C nukleotidy. Ruší vodíkové vazby a díky tomu redukuje vznik sekundárních struktur templátu.

Schopností BSA aditiva je neutralizovat inhibitory polymerázy, mezi které patří např. hemin, melanin nebo ionty železa. V původním master mixu gb Elite PCR Master Mix již obsažen je, navýšením jeho koncentrace jsme se snažili snížit inhibici DNA polymerázy a zvýšit kvantitu získaných produktů.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

V této kapitole budou shrnuty všechny výsledky a získané poznatky. Na závěr bude vybrána metoda, která se nám nejvíce osvědčila a kterou by bylo možné dále rozvíjet.

5.1 NÁVRH A ZNAČENÍ PRIMERŮ PRO FRAGMENTAČNÍ ANALÝZU COI

Používali jsme tyto druhy primerů, ze kterých jsme vytvářeli různé primer mixy.

Tabulka 11: Používané primery v průběhu experimentální práce. (F):forward primery (značené). (R): reverse primery (neznačené).

velikost amplikonu	druh	název	kód	primery
460	vepř	Sus-F	1123G4	CTACTATCCCTGCCAGTT
		Sus-R	1123H9	GAATAGGAAGATGAAGCCC
391	člověk	Homo-F	1123G5	TAGACATCGTACTACACGACACG
		Homo-R	1123I0	TCCAGGTTTATGGAGGGTTC
222	kočkodan	Ceratop-F	1123H1	CTTCTTTCCTGCTGCTAATG
		Ceratop-R	1123I6	TTTGATACTGGGATATGGCG
196	potkan	Rattus-F	1123H2	CGGCCACCCAGAAGTGTACATC
		Rattus-R	1123I7	GGCTCGGGTGTCTACATCTAGG
150	myš	Mus-F	1123H4	ATTACAGCCGTACGCTCCTAT
		Mus-R	1123I9	CCCAAAGAATCAGAACAGATGC
102	tur	Bos-F	1123H7	GCTATTCCAACCGGGGTAAAAGTC
		Bos-R	1123J2	GAAAATAAAGCCTAGGGCTCAC
70	IC	IC-F	1123H8	CGGGGAATYAGGGTTCGATTC
		IC-R	1123J3	GCCTGCTGCCTTCCTTCCTTKGATG

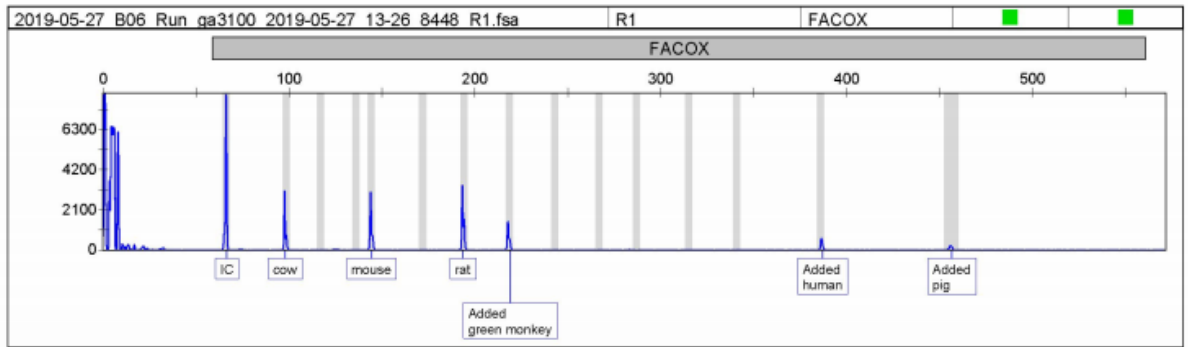
5.2 OPTIMALIZACE SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

V našem experimentu jsme vycházeli z původní studie a počáteční reakční směs měla takové složení, jak již bylo uvedeno v kapitole 4.4 Optimalizace složení reakční směsi. Zjistili jsme, že poměr byl zvolený správně, nicméně nám zůstávalo zbytečně mnoho odpadu, což z ekonomického hlediska nebylo ideální, proto jsme množství reakčních složek snížili. Výsledné složení reakční směsi je tedy:

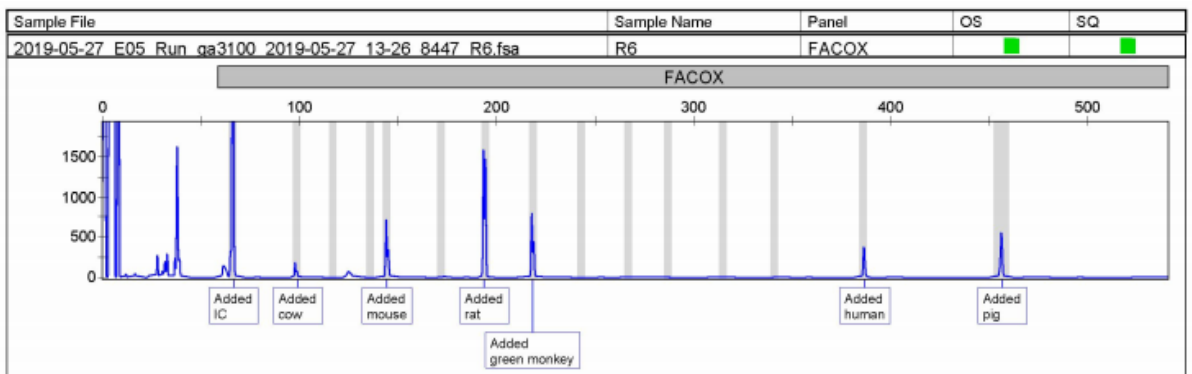
Gb Elite PCR Master Mix	3,06 μ l
Primer mix	1,27 μ l
DNA	2,3 μ l
Voda	do 10 μ l.

Prvním pokusem bylo ředění templátové DNA a tím tedy zjišťování, jak moc je metoda citlivá. Ředění probíhalo podle výše zmíněné tabulky 4. Všechna vyzkoušená ředění dávala dobré výsledky, tudíž metoda se dá považovat za robustní. Nejnižší koncentraci, kterou jsme byli schopni detekovat, byla koncentrace 0,08 pg/ μ l, což je neuvěřitelně nízká koncentrace. Metoda je tedy velice citlivá a dokáže zachytit již stopové množství DNA. Abychom však získávali produkty o vhodné výsledné kvantitě, zůstali jsme u ředění templátové DNA na přibližnou koncentraci 0,25 ng/ μ l.

A



B



Obrázek 12: Srovnání elektroforeogramů multiplexní PCR nejvyššího (A) a nejnižšího (B) ředění templátové DNA (mix tur, myš, krysa, člověk, vepř).

Také jsme zkusili použití dvou master mixů, prvním z nich byl gb Elite PCR Master Mix a druhým gb BASIC Master Mix. Žádný rozdíl nebyl znatelný, zůstali jsme tedy u původního gb Elite Master Mix, který by měl být vhodnější pro komplexní matrice.

5.3 OPTIMALIZACE TEPLOTNÍHO PROFILU

Pro úvodní reakce jsme využili teplotní profil, který byl již přednastaven a vychází z původního zmiňovaného článku. Bohužel jsme narazili na situace, kdy nám metoda nechodila vůbec. Nebo jsme získávali enormní píky a výsledné produkty PCR se tak nedaly správně kvantifikovat. U mnoho pokusů nám také vznikaly balastní píky. To vše bylo potřeba eliminovat, a také jsme získávali příliš vysoký signál. Následovalo tedy snížení počtu cyklů ze 45 na 40, aby nám nevznikalo tolik PCR produktu. A protože metoda je skutečně velmi citlivá, dokázali jsme detekovat templátovou DNA o koncentraci pouze 0,08 pg/μl, zkusili jsme snížit počet cyklů na 35.

Prováděli jsme také prodlužování elongačního času z 30 na 45 sekund, to ovšem neposkytlo rozdílné výsledky, vrátili jsme se proto k původnímu.

Tabulka 12: Výsledný teplotní profil.

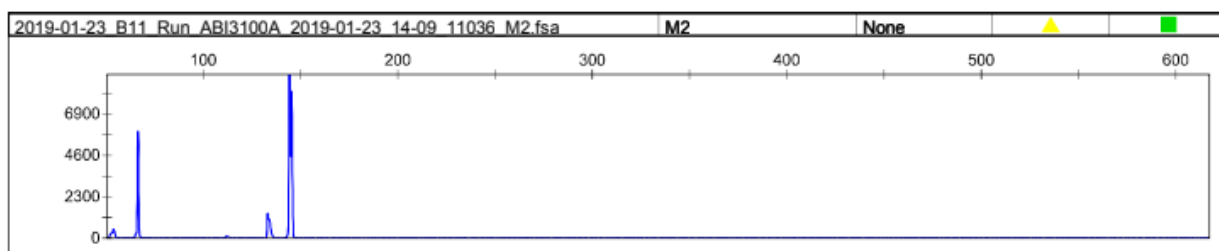
Výsledný teplotní profil		
95°C	5 min	
95°C	30 s	35x
60°C	15 s	
72°C	30 s	
72°C	7 min	
8 °C	ad finitum	

U multiplexních PCR reakcí, kde jsme zkoušeli ředit templátovou DNA, jsme museli cykly zase opět navýšit na 40, protože jsme začali ztrácet signály pro vepřové a lidské DNA.

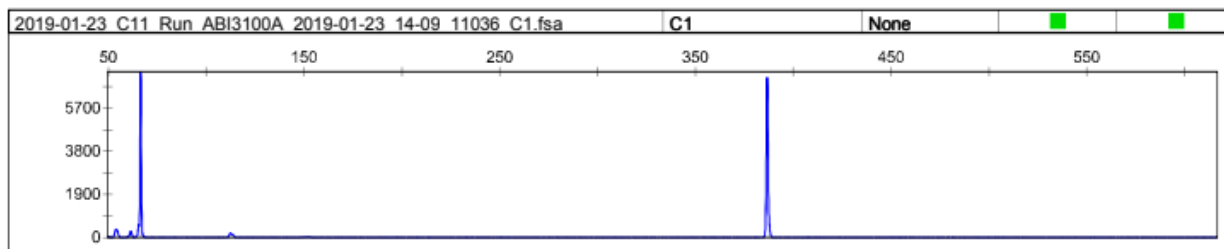
5.4 PCR REAKCE

Úvodní PCR reakce byla multiplexní PCR, ověřovali jsme, zda metoda vůbec funguje. K ověření jsme použili dvě templátové DNA, myší a lidskou. Pro obě DNA jsme zkusili 2 koncentrace, první koncentrace byla 2 ng/μl a druhá 4 ng/μl. Dále jsme použili gb Elite Master Mix a mix všech dvojic primerů. Zjistili jsme, že metoda funguje, ale je potřeba ji optimalizovat. Získali jsme tyto výsledky:

A



B



Obrázek 13: Výsledky prvního testu fragmentační analýzy COI. (A) pro myší DNA. (B) pro lidskou DNA. Získaná velikost amplikonu pro myší DNA 147 bp a pro lidskou DNA 389 bp. První pik je IC o velikosti 70 bp.

5.5 PCR SMÍŠENÝCH VZORKŮ

Jak již bylo zmíněno, metoda PCR je velice citlivá. Pomocí ní dokážeme detekovat i velmi malé množství DNA. To se nám povedlo ověřit i v analýze smíšených vzorků. Kdy jsme měli k dispozici směs myší buněčné linie NIH3T3 a linie WBF, kde buněčná linie WBF vystupovala jako kontaminant. Povedlo se nám detekovat obě DNA. Amplikon pro myší DNA měl velikost 146 bp a pro krysí DNA měl velikost 194 bp.



Obrázek 14: Výsledek fragmentační analýzy smíšeného vzorku buněčné linie NIH3T3 a linie WBF.

Dále byly zkoušeny komplexní směsi (viz např. limit detekce), kde bylo použito více různých templátových DNA o stejných koncentracích.

5.6 VLIV ADITIV NA PCR REAKCI

Testovali jsme tři různá aditiva: DMSO, betain a BSA. Žádné z těchto aditiv nemělo zásadní vliv na průběh reakce, a proto ve finálním složení reakční směsi není obsaženo. Pokud bychom však i tak měli vybrat nejvhodnější aditivum pro naši výslednou multiplexní PCR reakci, vybrali bychom DMSO. Nejlepšího výsledku jsme dosáhli při přidavku 0,1 μ l 10% DMSO, což činí 13 % DMSO v reakci.

5.7 FINÁLNÍ SLOŽENÍ PCR REAKCE

V této kapitole je uvedeno optimální a finální složení PCR reakce a její výsledky. Metodu se nám povedlo zavést a byla odzkoušena jako multiplexní PCR s mixem DNA templátů.

5.7.1 Primer mix:

Tabulka 13: Finální složení primer mixu (FPM3).

druh	název	koncentrace v primer mixu (nM)	koncentrace v reakci (nM)
vepř	Sus-F	1050	200
	Sus-R	1050	200
člověk	Homo-F	525	100
	Homor-R	525	100
kočkodan	Ceratop-F	525	100
	Ceratop-R	525	100
krysa	Rattus-F	525	100
	Rattus-R	525	100
myš	Mus-F	525	100
	Mus-R	525	100
tur	Bos-F	525	100
	Bos-R	525	100
IC	IC-F	525	100
	IC-R	525	100
Voda			

5.7.2 Reakční směs:

3,06 μ l gb Elite PCR Master Mix

1,27 μ l primer mix

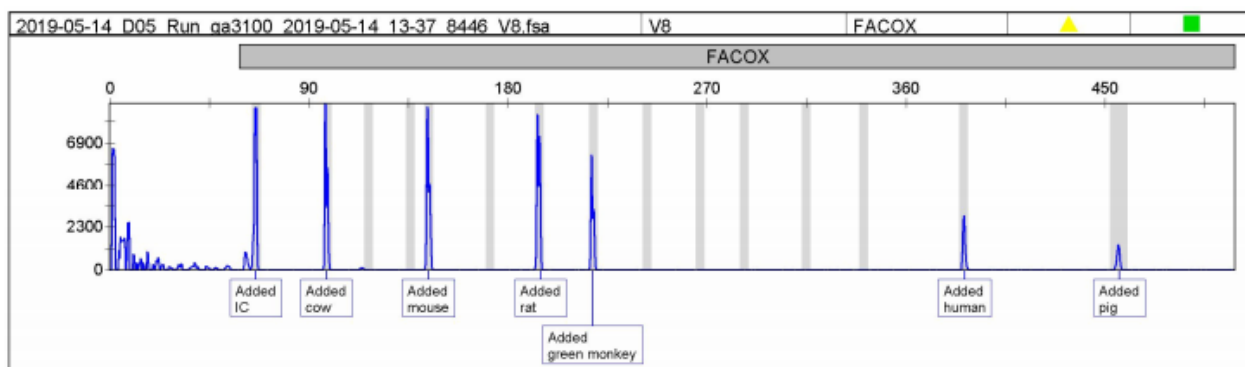
2,3 μ l DNA

3,37 μ l voda

5.7.3 Teplotní profil:

Tabulka 14: Výsledný teplotní profil.

Výsledný teplotní profil		
95°C	5 min	
95°C	30 s	35x
60°C	15 s	
72°C	30 s	
72°C	7 min	
8 °C	ad finitum	



Obrázek 15: Výsledný elektroforeogram závěrečné fragmentační analýzy pro multiplexní PCR, kde se povedlo detekovat všechny templátové DNA, tj. DNA pro vepře, myš, krysu, kočkodana, tura a člověka. IC=interní kontrola.

Věřím, že tento experiment byl velice přínosný a tato metoda bude moci být hojně využívána v mnoha oborech, neboť kontaminace vzorků v různých zařízeních je běžnou součástí.

Bylo dokázáno, že k míchání nebo kontaminaci buněčných linií v laboratořích dochází hodně často (18-30 %). Bohužel kontaminace je pro laboratoře velmi nežádoucí a pouhým okem není ve většině případů detekovatelná. Je proto vyžadován laboratorní test (Das, 2019). A právě jeden z možných testů se nám v této diplomové práci povedlo zavést a optimalizovat.

Hlavní výhodou této multiplexní PCR je rychlost, jednoduchost a spolehlivost. Na rozdíl např. od gelové elektroforézy, která je časově náročná a lze v jedné reakci identifikovat malé množství vzorků. K rychlé detekci více mikroorganismů v jedné reakci je nutná současná amplifikace více než jednoho lokusu a to nám právě umožňuje již zmiňovaná multiplexní PCR, ve které je několik specifických sad primerů spojeno do jednoho testu PCR (Settanni, 2007).

6. ZÁVĚR

Zavedení detekční metody pro analýzu směsných vzorků, obsahujících DNA různých druhů se nám podařilo. Metoda je primárně určena pro analýzu kontaminace buněčných linií, kde vstupní materiál obsahuje poměrně dobře charakterizovatelnou matici, ale pravděpodobně by se dala využít i pro analýzy jiných materiálů. Určitě by našla uplatnění i v potravinářství, kdy je občas nutné analyzovat složení např. mletých mas. Jestli skutečně obsahuje hovězí maso nebo naopak neobsahuje vepřové, což zase může vadit určitým skupinám osob.

Optimalizace o převedení metody pro separaci na kapilární elektroforézu proběhla zdárně, nicméně v průběhu diplomové práce se nám nepodařilo opatřit všechny reálné reprezentativní vzorky všech potenciálně testovatelných druhů. U této práce bude ještě potřeba provést v následujících letech ověření s reálnými vzorky, případně připravit umělý DNA standard, který by ověřil celý multiplex.

Metoda je rychlá, relativně levná a její kapacita je závislá především na přístrojovém vybavení, neboť ji lze poměrně jednoduše automatizovat. Kapacita sekvenátorů se pohybuje ve stovkách vzorků denně, podobně tedy i kapacita PCR cyklérů. Jedinou slabinou zůstává izolace DNA, která je povětšinou stále prováděna ručně nebo na automatech s nízkou kapacitou vzorků. Nízký detekční limit reakce je výborný pro detekce kontaminací v přítomnosti nadbytku jiné DNA. Což vyvinutá metoda splňuje. Dále metoda umožňuje multiplexní detekci smíšených vzorků, kdy se nám podařilo detekovat 6 různých templátů současně.

Věřím, že tato metoda bude přínosná nejen pro laboratoře Generi Biotech, ale najde uplatnění i v jiných laboratořích.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Rastogi G., Dharne M. S., Walujkar S., Kumar A. et al.: Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science*. 2007, 76(4), s. 666-674. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.02.006.
2. Cottenet G., Blancpain C., Chuah P. F., Cavin C.: Evaluation and application of a next generation sequencing approach for meat species identification. *Food Control*. 2020, 110(4), s. 82-86. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.107003.
3. Scarano D., Rao R.: DNA Markers for Food Products Authentication. *Diversity*. 2014, 6(3), s. 579-596. DOI: 10.3390/d6030579.
4. Chao Z., Liao J., Liang Z., Huang S. et al.: Cytochrome C oxidase subunit I barcodes provide an efficient tool for Jinqian Baihua She (*Bungarus parvus*) authentication. *Pharmacognosy Magazine*. 2014, 10(40), s. 449-457. DOI: 10.4103/0973-1296.141816.
5. Pakendorf B., Stoneking M.: MITOCHONDRIAL DNA AND HUMAN EVOLUTION. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2005, 6(1), s. 165-183. DOI: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162249.
6. Boore J. L.: Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 1999, 27(8), s. 1767-1780. DOI: 10.1093/nar/27.8.1767.
7. Keogh M. J., Chinnery P. F.: Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2015, 1847(11), s. 1401-1411. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2015.05.015.
8. Butler J. M., Levin B. C.: Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends in Biotechnology*. 1998, 16(4), s. 158-162. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01173-1.
9. Ygodina T. V., Kirichenko A., Konstantinov A. A.: Cation Binding Site of cytochrome c oxidase: Progress report. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014, 1837(7), s. 1188-1195. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2014.02.025
10. Kadenbach B., Hüttemann M.: The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*. 2015, 24(8), s. 64-76. DOI: 10.1016/j.mito.2015.07.002.
11. Wikström M., Krab K., Sharma V.: Oxygen Activation and Energy Conservation by Cytochrome c Oxidase. *Chemical Reviews*. 2018, 118(5), s. 2469-2490. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00664.

12. Mondal D., Mandal N.: Molecular phylogeny of mitochondrial DNA: Shrimp species identification by multiplex and real-time PCR. *Food Control*. 2020, 108(4), s. 182-190. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106868.
13. Kowalska Z., Pniewski F., Latała A.: DNA barcoding – A new device in phycologist's toolbox. *Ecohydrology & Hydrobiology*. 2019, 19(3), s. 417-427. DOI: 10.1016/j.ecohyd.2019.01.002.
14. Chao Z., Liao J., Liang Z., Huang S. et al.: Cytochrome C oxidase subunit I barcodes provide an efficient tool for Jinqian Baihua She (*Bungarus parvus*) authentication. *Pharmacognosy Magazine*. 2014, 10(40), s. 449-457. DOI: 10.4103/0973-1296.141816.
15. Jalali M., Zaborowska J., Jalali M.: The Polymerase Chain Reaction. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2017, 20(2), s. 1-18. DOI: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1.
16. Valones M. A. A., Guimarães R. L., Brandão L. A. C., de Souza P. R. E. et al.: Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009, 40(1), s. 1-11. DOI: 10.1590/S1517-83822009000100001.
17. Clark D. P., Pazdernik N. J., McGehee M. R.: Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biology*. 2019, 62(4), s. 168-198. DOI: 10.1016/B978-0-12-813288-3.00006-9.
18. Maheaswari R., Kshirsagar J. T., Lavanya N.: Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2016, 20(2), s. 128-135. DOI: 10.4103/0972-124X.176391.
19. Caetano-Anollés D.: Polymerase Chain Reaction. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2013, 26(6), s. 392-395. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01186-4.
20. Engstrom-Melnyk J., Rodriguez P. L., Peraud O., Hein R. C.: Clinical Applications of Quantitative Real-Time PCR in Virology. *Current and Emerging Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections*. 2015, 64(2), s. 161-197. DOI: 10.1016/bs.mim.2015.04.005.
21. Navarro E., Serrano-Heras E., Castaño M. J., Solera J.: Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2015, 439(6), s. 231-250. DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
22. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006, 27(2-3), s. 95-125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

23. Álvarez-Fernández R.: Explanatory Chapter. *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*. 2013, 20(2), s. 1-21. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X.
24. Shen CH.-H.: Amplification of Nucleic Acids. *Diagnostic Molecular Biology*. 2019, 62(4), s. 215-247. DOI: 10.1016/B978-0-12-802823-0.00009-2.
25. Marmiroli N., Maestri E.: Polymerase chain reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis*. 2007,120(8), s. 147-187. DOI: 10.1016/B978-044452843-8/50007-9.
26. Parodi B., Aresu O., Bini D., Lorenzini R. et al.: Species Identification and Confirmation of Human and Animal Cell Lines: A PCR-Based Method. *BioTechniques*. 2002, 32(2), s. 432-440. DOI: 10.2144/02322rr05.
27. Thatcher S. A: Nucleic Acid Isolation. *Principles and Applications of Molecular Diagnostics*. 2018, 41(6), s. 35-46. DOI: 10.1016/B978-0-12-816061-9.00003-5.
28. Heller C.: Principles of DNA separation with capillary electrophoresis. *Electrophoresis*.2001, 22(1), s. 629-643. DOI:10.1002/1522-2683(200102)22:4<629::AID-ELPS629>3.0.CO;2-S.
29. Taylor D., Powers D.: Teaching artificial intelligence to read electropherograms. *Forensic Science International: Genetics*. 2016, 25(4), s. 10-18. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.07.013.
30. Shimasaki C.: Understanding Biotechnology Product Sectors. *Biotechnology Entrepreneurship*. 2014, 18(2), s. 113-138. DOI: 10.1016/B978-0-12-404730-3.00009-9.
31. Butler J. M., Buel E., Crivellente F., Mccord B. R.: Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *ELECTROPHORESIS*.. 2004, 25(1011), s. 1397-1412. DOI: 10.1002/elps.200305822.
32. Koubková L., Vojtíšek B., Vyzula R.: *Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi*. Regionální centrum aplikované molekulární onkologie. 2014.
33. Andreu N., Phelan J., de Sessions P. F., Cliff J. M. et al: Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Scientific Reports*. 2017, 7(1), s. 22-42. DOI: 10.1038/srep42225.
34. Lam J., Herant M., DemboM., Heinrich V.: Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages. *Biophysical Journal*. 2009, 96(1), s. 248-254. DOI: 10.1529/biophysj.108.139154.

35. Gabrilovac J., Čupić B., Živković E., Horvat L. et al.: Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line. *Immunobiology*. 2011, 216(1-2), s. 132-144. DOI: 10.1016/j.imbio.2010.06.005.
36. Murayama A., Sugiyama N., Wakita T., Kato T.: Completion of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle in Vero Cells Derived from Monkey Kidney. *MBio*. 2016, 7(3), s. 16-27. DOI: 10.1128/mBio.00273-16.
37. Sakuma Ch., Sekizuka T., Kuroda M., Kasai F. et al.: Novel endogenous simian retroviral integrations in Vero cells: implications for quality control of a human vaccine cell substrate. *Scientific Reports*. 2018, 8(1), s. 644-648. DOI: 10.1038/s41598-017-18934-2.
38. Hulyanych M., Nedosekov V., Sobko Y.: Determination of Cultural Conditions of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Strain "BM". *Annals of Agrarian Sciencee*. 2016, 14(3), s. 201-204. DOI: 10.1016/j.aasci.2016.08.004.
39. Leibiger Ch., Kosyakova N., Mkrtychyan H., Glej M. et al.: First Molecular Cytogenetic High Resolution Characterization of the NIH 3T3 Cell Line by Murine Multicolor Banding. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012, 61(4), s. 306-312. DOI: 10.1369/0022155413476868.
40. Bairoch A.: The Cellosaurus and Cell-Line Knowledge Resource. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*. 2018, 29(2), s. 25-38. DOI: 10.7171/jbt.18-2902-002.
41. Bols N. C., Kawano A., Lee L. E. J.: CELLULAR, MOLECULAR, GENOMICS, AND BIOMEDICAL APPROACHES | Culture of Fish Cell Lines. *Encyclopedia of Fish Physiology*. 2011, 28(4), s. 1965-1970. DOI: 10.1016/B978-0-12-374553-8.00253-7.
42. Verma A.: Animal Tissue Culture. *Animal Biotechnology*. 2014, 62(2), s. 211-231. DOI: 10.1016/B978-0-12-416002-6.00012-2.
43. Jensen C., Teng Y.: Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020, 7(1), s. 33-40. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00033.
44. Gamerith G., Rainer J., Huber J. M., Hackl H. et al.: 3D-cultivation of NSCLC cell lines induce gene expression alterations of key cancer-associated pathways and mimic in-vivo conditions. *Oncotarget*. 2017, 8(68), s. 112 647-112 661. DOI: 10.18632/oncotarget.22636.

45. Li J., Wang Q., Gu Y., Zhu Y. et al.: Production of Composite Scaffold Containing Silk Fibroin, Chitosan, and Gelatin for 3D Cell Culture and Bone Tissue Regeneration. *Medical Science Monitor*. 2017, 23(8), s. 5 311-5 320. DOI: 10.12659/MSM.905085.
46. Cooper J. K., Sykes G., King S., Cottrill K. et al.: Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2007, 43(10), s. 344-351. DOI: 10.1007/s11626-007-9060-2.
47. Jurišić V., Obradović J., Tošić N., Pavlović S. et al.: Effects of DMSO, glycerol, betaine and their combinations in detecting single nucleotide polymorphisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene promoter sequence in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, 128(4), s. 275-279. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.05.010.
48. Masters J. R., Thomson J. A., Daly-Burns B., Reid Y.A. et al.: Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, 98(14), s. 8 012-8 017. DOI: 10.1073/pnas.121616198.
49. Butler J. M.: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. 2010, Elsevier Academic Press, San Diego.
50. Kim M.-J., Kim H.-Y.: A fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of pork, chicken, and beef in commercial processed meat products. *LWT*. 2019, 114 (2), 108-116 . DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108390.
51. Generi Biotech: Kit for isolation of DNA from tissues. 2015, katalogové číslo 3101-050, 3101-100.
52. Generi Biotech: gb Basic PCR Master Mix. 2001 [27.6. 2020]. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/gb-basic-pcr-master-mix/>.
53. Generi Biotech: gb Elite PCR Master Mix. 2001 [28.6. 2020]. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/gb-elite-pcr-master-mix/>
54. Thermofisher: AmpFLSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit. 2006 [28.6. 2020]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4486467#/4486467>.
55. Das A., Xu L., Jia W.: Development of conventional and real time PCR assays for rapid species authentication of mammalian cell lines commonly used in veterinary diagnostic laboratories. *Research in Veterinary Science*. 2019, 126(4), s. 170-177. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.08.029.

56. Settanni L., Corsetti A.: The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, 69(1), s. 1-22. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.12.008.
57. Huygens F., Inman-Bamber J., Nimmo R., Munckhof W. et al.: Staphylococcus aureus Genotyping Using Novel Real-Time PCR Formats. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, 44(10), s. 3712-3719. DOI: 10.1128/JCM.00843-06.