

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Nové trendy v izolaci a detekci virových nukleových kyselin

Julie Baarová

Bakalářská práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

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

Jméno a příjmení: **Julie Baarová**
Osobní číslo: **C17140**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Nové trendy v izolaci a detekci virových nukleových kyselin**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. V úvodní části práce vypracujte jednoduchý přehled virů napadajících lidský organismus a jejich rozdělení dle formy uložení genetické informace (DNA, RNA). Jednu kapitolu věnujte popisu struktury DNA a RNA. Uveďte také, jakým způsobem se u virů genetická informace realizuje a jak viry v eukaryotních buňkách parazitují.
2. Formou kompilace vypracujte literární rešerši o metodách izolace a detekce virových nukleových kyselin používaných jak v praxi, tak i pro výzkumné účely.
3. V práci se také zaměřte na nové postupy izolace a detekce virové RNA, DNA vyvíjené pro výzkum i klinickou praxi. Zaměřte se na nové trendy publikované v odborných časopisech, v monografiích za období posledních 10 – 15 let. Zařadte i práce popisující mikroanalýzátory (μ TAS) a čipové technologie. Při práci s textem využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články a monografie publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Foma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultanti bakalářské práce: **Mgr. Denisa Smělá**
Katedra biologických a biochemických věd
Mgr. Nikola Mannová
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

Prohlašuji:

Práci s názvem Nové trendy v izolaci a detekci virových nukleových kyselin 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 16. 7. 2021

Julie Baarová v.r.

Ráda bych poděkovala vedoucí práce paní Mgr. Barboře Jankovičové, Ph.D. a konzultantkám Mgr. Denise Smělé a Mgr. Nikole Mannové za velmi vstřícný přístup, za věnovaný čas při konzultacích a za veškeré pomocné rady a nápady k vypracování bakalářské práce.

Také chci poděkovat partnerovi Ondřeji Klegovi za podporu a neustálé pozitivní povzbuzování v úspěšném dokončení studia, za nepřetržitou pomoc v naléhavých situacích, za empatické pochopení a klidný přístup v hektických podmínkách při vypracování bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na nové trendy v izolaci a detekci virových nukleových kyselin. Na začátku práce jsou uvedeny základní informace o struktuře viru, struktuře virových nukleových kyselin a replikaci virů. Následně jsou popsány dosavadní metody izolace a detekce nukleových kyselin virů. V poslední kapitole jsou uvedeny nové metody izolace a detekce, které byly vyvinuty primárně kvůli SARS-CoV-2.

KLÍČOVÁ SLOVA

Viry, virové nukleové kyseliny, izolace a detekce nukleových kyselin, nové trendy

TITLE

New trends in the isolation and detection of viral nucleic acids

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on new trends in the isolation and detection of viral nucleic acids. Thesis starts with basic information about the structure of the virus, the structure of viral nucleic acids and virus replication. Subsequently, current methods for isolation and detection of nucleic acids of viruses are described. The last chapter presents modern detection and isolation methods that were developed primarily for SARS-CoV-2.

KEYWORDS

Viruses, viral nucleic acids, isolation and detection of nucleic acids, new trends

Obsah

ÚVOD.....	9
1 VIRY	10
1.1 Struktura virů.....	10
1.2 Struktura nukleových kyselin	11
1.3 Virový replikační cyklus	15
1.3.1 Rozpoznání a vazba.....	15
1.3.2 Vstup do buňky	16
1.3.3 Replikace a syntéza proteinů.....	17
1.3.3.1 DNA viry	17
1.3.3.2 RNA viry.....	18
1.3.4 Uvolnění virionu z buňky.....	19
2 IZOLACE A DETEKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN	21
2.1 Izolace nukleových kyselin	21
2.1.1 Lyze virových částic.....	21
2.1.2 Extrakce nukleových kyselin.....	23
2.1.2.1 Chemická extrakce.....	23
2.1.2.2 Extrakce na pevné fázi.....	24
2.1.2.3 Automatizace extrakce nukleových kyselin	26
2.2 Detekce nukleových kyselin.....	26
2.2.1 PCR	27
2.2.2 Microarray	28
2.2.3 Sekvenování nové generace	29
2.2.4 Gelová elektroforéza	30
3 NOVÉ TRENDY	32
3.1 Nové trendy detekce NK.....	32
3.1.1 Clustery pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitív – CRISPR.....	32
3.1.2 Rychlý digitální přístup CRISPR – RADICA	34
3.2 Biosensory	34
3.3 Nové trendy izolace.....	35
3.3.1 MagaZorb	35

3.3.2	Purifikace celulózovým proužkem	36
3.4	Mikrofluidní zařízení.....	37
	ZÁVĚR.....	39
	SEZNAM OBRÁZKŮ	48
	SEZNAM TABULEK.....	49
	SEZNAM ZKRATEK.....	50

ÚVOD

Izolace a detekce virových nukleových kyselin jsou důležité kroky k zjištění přítomnosti a typu viru. Před detekcí je nejprve nutné nukleovou kyselinu z viru izolovat. Toho se docílí lyzí virové částice vedoucí k jejímu rozpadu, kdy je nukleové kyseliny následně možné extrahovat ze zbytku buněčného obsahu. Takto izolované nukleové kyseliny lze detekovat různými metodami.

Základní metody detekce jsou již zastaralé. Novými technologiemi lze docílit vylepšení všech kroků od izolace po detekci. V důsledku pandemie COVID-19 byly vyvinuty některé nové metody, které pomohly k identifikaci SARS-CoV-2.

Odvětví virologie, konkrétně detekce virů, se v dnešní době řadí mezi nejdůležitější a rychle se rozvíjející obory vzhledem k probíhající světové pandemii. Cílem je především vývoj rychlejších, levnějších, a účinnějších metod umožňujících včasnou detekci viru a efektivní léčbu proti viru.

1 Viry

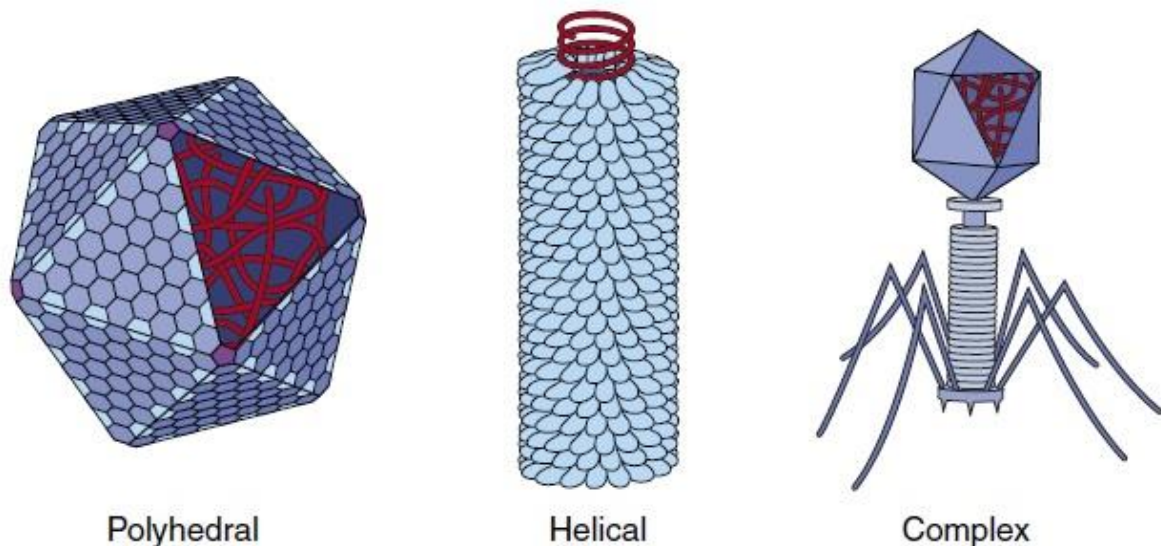
Viry jsou tvořeny virovou částicí nazývanou virion a můžeme je označit jako intracelulární parazity, jelikož napadají buňky. Nejsou to živé organismy, protože samotné částice nejsou metabolicky činné. Označujeme je jako aktivní nebo neaktivní. Pokud mluvíme o aktivní formě viru, jedná se o virion připojený k hostitelské buňce a dochází u něj k látkové přeměně a může se množit. U virionů neaktivní varianty nedochází k látkové přeměně a nemnoží se [1].

1.1 Struktura virů

Viry se vyskytují ve variabilních velikostech, tvarech a formách. Existují kulovité, tyčovitě, symetrické, asymetrické viry. Struktura viru je specificky navržena tak, aby chránila genom a doručovala jej do hostitelské buňky pro následnou replikaci [2].

Virion neboli virová částice se skládá z virového genomu obklopeného ochranným proteinovým obalem zvaným kapsida. Společně je označujeme jako nukleokapsida [1]. V některých případech je kapsida obalena lipidovou dvojvrstvou [3].

Kapsidu ochraňující genom můžeme rozlišit do 3 hlavních tvarů - polyhedrální, helikální a komplexní (Obr. 1). Polyhedrální kapsida (Obr. 1 vlevo) vzniká spojením několika trojúhelníkových ploch a tím vytváří skořápku pro genom uložený uvnitř. Pod mikroskopem se viriony tohoto typu mohou jevit jako kulaté. Tyto viry jsou pravidelné, s pevným tvarem a velikostí. Strukturu tohoto typu mají především DNA viry. Helikální kapsida (Obr. 1 uprostřed) obaluje dokola genom a vytváří spirálu, tzv. prodloužená nukleokapsida. Tyto viry jsou tvarově a velikostně variabilnější. Helikálního typu jsou především RNA viry. Komplexní kapsida je tvořena např. kombinací helikálního a polyhedrálního typu jako na Obr. 1 vpravo.



Obr. 1 Strukturální příklady kapsid. Převzato a upraveno z [1]. Polyhedral = polyhedrální, helical = helicální, coplex = komplexní.

Přítomností nebo naopak nepřítomností lipidové vrstvy kolem kapsidy rozdělujeme viriony na obalené a neobalené. Lipidová vrstva funguje jako štít před imunitním systémem [1].

V obalených virech je kapsida s virovým genomem obalena lipidovou vrstvou, která obsahuje bílkoviny [3]. Tyto viry jsou citlivé vůči pracím prostředkům, změnám pH, sušení a na vnějších površích dlouho nepřežijí.

Neobalené viry tuto strukturu nemají. Některé viry tím získávají výhodu v odolnosti proti dezinfekčním prostředkům př. alkohol, zředěné bělidlo, a ve zvýšení stability v životním prostředí. Jsou tedy obtížnější na odstranění např. z nemocničních povrchů [1].

Z biologického hlediska je nejdůležitější součástí viru jeho genom, protože obsahuje nukleové kyseliny (NK), které nesou nezbytné informace pro infekci a replikaci viru v hostiteli. Genom viru je tvořen vždy buď kyselinou deoxyribonukleovou (DNA) nebo kyselinou ribonukleovou (RNA). Takto rozlišujeme DNA viry a RNA viry [1].

1.2 Struktura nukleových kyselin

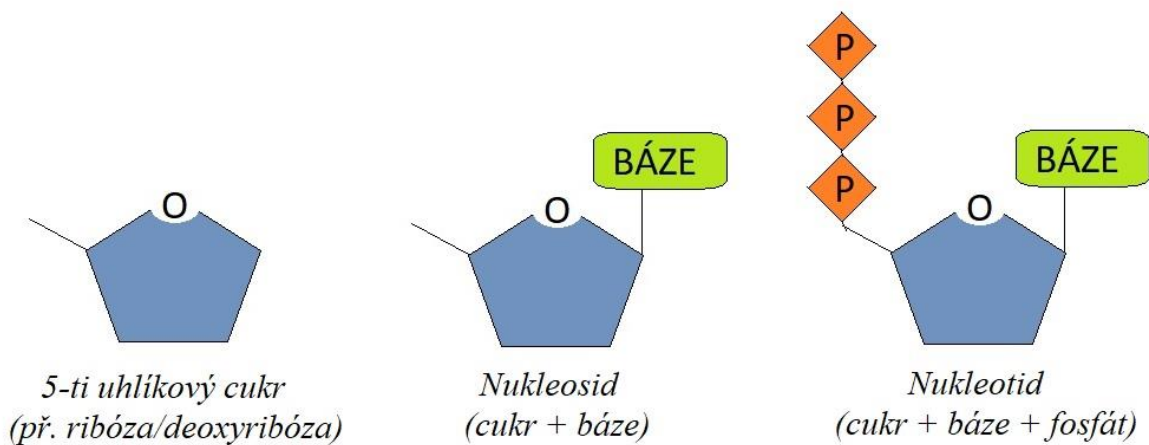
NK u virů může mít variabilní uspořádání, lineární nebo cirkulární. Zpravidla je u virů lineární organizace, avšak i zde najdeme výjimky jako například čeleď *Circoviridae* (DNA) nebo *Bunyaviridae* (RNA). V případě lineární virové DNA často dochází k dočasnému přechodu na cirkulární uspořádání, které je důležité pro replikaci viru [4].

Struktura nukleových kyselin je klíčem k pochopení tvorby nových NK. Je to proto, že jeden řetězec je šablonou pro mnoho dalších vláken. Základními stavebními kameny NK jsou nukleotidy. Jsou tvořeny z cukru, báze a tří fosfátových skupin (Obr. 2). Ribóza je cukr tvořící RNA a deoxyribóza tvoří DNA. Odlišující faktor deoxyribózy od ribózy je chybějící hydroxylová skupina na druhém uhlíku cukru. Existují čtyři báze používané při formování nukleových vláken. Tyto báze dělíme na purinové a pyrimidinové. DNA se liší tím, že obsahuje bázi thymin, místo kterého je v RNA uracil [1].

Základní 4 báze nukleotidů:

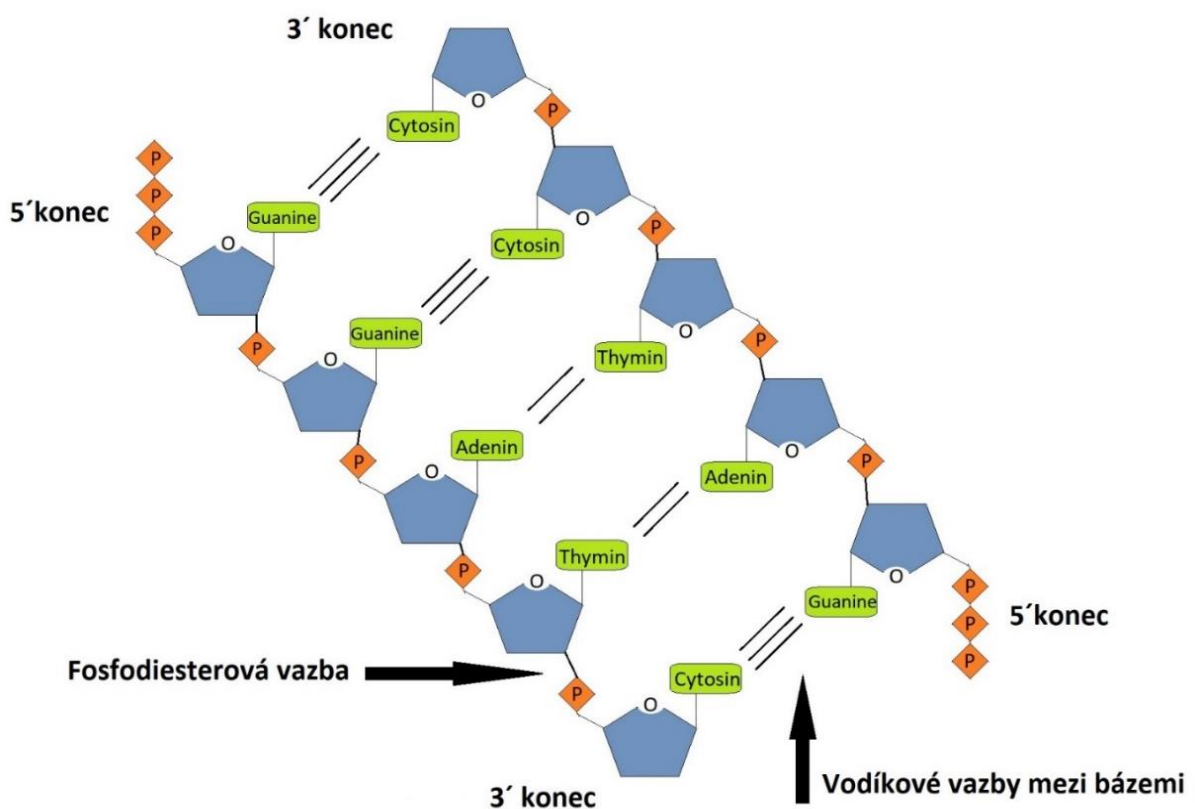
- adenin (A) a guanin (G) jsou purinové báze,
- thymin (T) v DNA, uracil (U) v RNA a cytosin (C) jsou pyrimidinové báze.

Nukleotidy jsou vázány mezi sebou fosfodiesterovou vazbou (Obr. 3), která spojuje OH skupinu ribózy nebo deoxyribózy jednoho nukleotidu a fosfátovou skupinu druhého nukleotidu [5]. Takto se vytvářejí dlouhé polynukleotidové řetězce. Včleněním do řetězce nukleotid ztrácí dva fosfáty a vzniká řetězec DNA nebo RNA sestávající z fosfo-cukerné páteře se všemi bázemi směřujícími na jednu stranu (Obr. 3).



Obr. 2 Struktura nukleotidů. Převzato a upraveno z [1].

Genom NK může být dvouvláknový, nejčastěji DNA viry (dsDNA – dvouvláknová DNA), nebo jednovláknový, obvykle RNA viry (ssRNA – jednovláknová RNA). U dvouvláknových NK se báze jednoho nukleotidu pomocí vodíkových vazeb spárují s bázemi druhého nukleotidu. Adenin se vždy páruje s thyminem nebo uracilem v RNA dvěma vodíkovými vazbami. Guanin se vždy páruje s cytosinem třemi vodíkovými vazbami (Obr. 3 Schéma spojování nukleotidů vodíkovými můstky. Převzato a upraveno z [1]. Toto pravidlo se označuje jako komplementarita bází.



Obr. 3 Schéma spojování nukleotidů vodíkovými můstky. Převzato a upraveno z [1].

Začátek řetězce nukleové kyseliny se nazývá 5' konec. Je tomu tak, protože cukr prvního nukleotidu má volný 5' uhlík, který není napojen na jiný nukleotid. Nové nukleotidy se přidávají na 3' uhlík ribózy, takže vlákno nukleové kyseliny roste směrem od 5' k 3' konci. Tato směrovost je zkrácena jako 5' → 3' (Obr. 3).

Polaritu vlákna v orientaci 5' → 3' označujeme jako kladnou, protože se čte ve vyhovujícím směru pro syntézu proteinů. Kladná orientace odpovídá uspořádání mRNA.

Opačnou, negativní orientaci řetězce označujeme jako komplementární, protože zapadá do spojení s kladným řetězcem.

V Tabulka 1 je příklad uspořádání bází a jejich konkrétní polarita. Kladná polarita DNA šablony odpovídá mRNA. DNA komplementární k šabloně má zápornou polaritu a páruje se s šablonou, viz Obr. 3

Právě složka mRNA je důležitý komponent pro replikaci viru v hostiteli. Čím rychleji je tvořena mRNA, tím rychleji se vytvářejí proteiny a jsou přetvářeny do nových virionů [1].

STRUKTURA	POLARITA	USPOŘÁDÁNÍ BÁZÍ
DNA šablona	KLADNÁ	5'-GGATC-3'
Komplementární vlákno	ZÁPORNÁ	3'- GGATC -5'
mRNA	KLADNÁ	5'-GGAUC-3'

Tabulka 1 Příklad uspořádání bází a polarita u specifických struktur virového cyklu.

Pandemie COVID-19 způsobená obaleným koronavirem SARS-CoV-2 jehož genom je tvořen ssRNA s pozitivní polaritou [6].

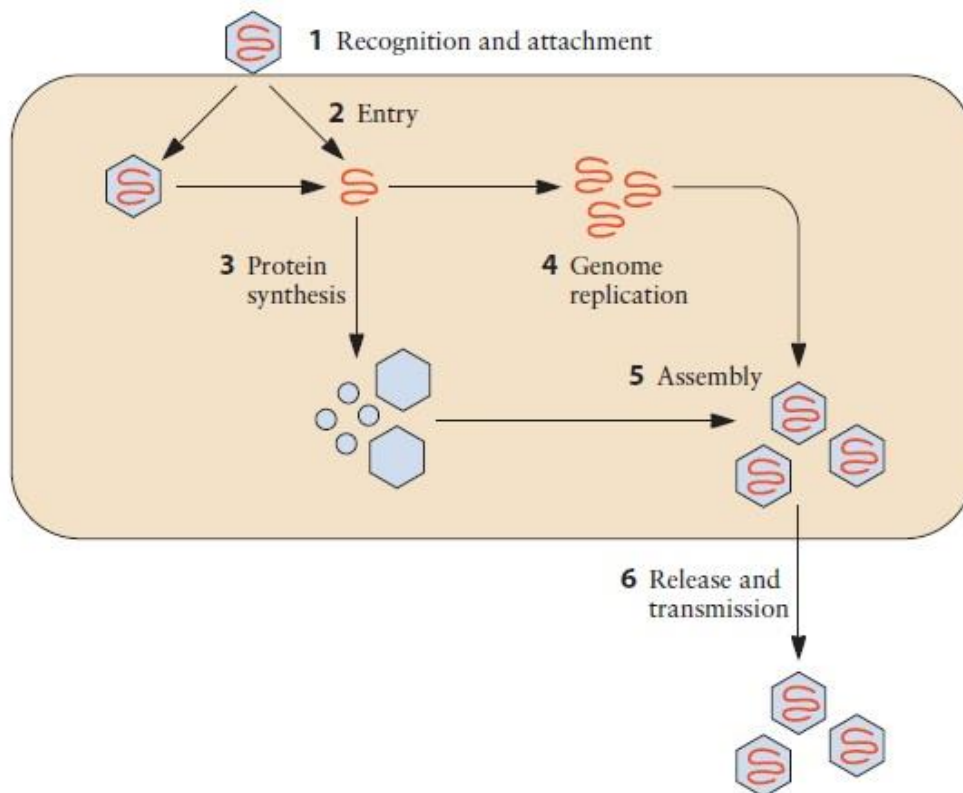
Při kladné polaritě dochází k translaci do jednotlivých polypeptidů přímo na ribozomech, v případě negativní polarity musí dojít nejprve k transkripci informací do podoby mRNA pomocí virové RNA transkriptázy. Uložení genetické informace ve formě RNA molekul je výjimečná vlastnost nalezená jenom u virů. Nepřítomnost systému upravujícího činnost RNA polymeráz pravděpodobně umožňuje RNA virům velký počet mutací. Tato variabilita přináší RNA virům výhodu v podobě jak snadného úniku imunitním mechanismům hostitele, tak jednoduchých mezidruhových přenosů [4].

Přesnost replikace DNA je vysoká, tedy mutace DNA virů jsou spíše vzácností. Toto je výhoda DNA virů, protože jsou stabilní a v hostiteli mohou přetrvávat po delší dobu. Také dokáží přesměrovat buňce vlastní enzymy a polymerázy na replikaci více virionů, čímž si zajišťují delší živostnost [1].

Genom můžeme u některých virů najít nesouvislý, ale tvořený separátními segmenty, kde každý segment kóduje určitý protein. V takovém případě mohou viry vytvářet nové kombinace a tím podpořit vznik různých nových variant [4].

1.3 Virový replikační cyklus

Základní cyklus virionů můžeme rozdělit do 6 částí (Obr. 4). Tento základní cyklus začíná rozpoznáním a připojením k hostitelské buňce, následuje vstup do buňky a využití enzymů hostitele k tvorbě virových proteinů, které později tvoří např. kapsidu viru. Dalším krokem je replikace virového genomu, jeho seskládání do kapsidy a uvolnění nového virionu z buňky, který infiltruje další buňky. Celý cyklus se poté znovu opakuje [7, 8].



Obr. 4 Základní cyklus replikace virionů. Převzato a upraveno z [6]. 1. Recognition and attachment = Rozpoznání a vazba, 2. Entry = vstup, 3. Protein synthesis = syntéza proteinů, 4. Genome replication = replikace genomu, 5. Assembly = sestavení, 6. Release and transmission = uvolnění a přenos.

1.3.1 Rozpoznání a vazba

První krok virového cyklu je rozpoznání a vazba virionů na hostitelskou buňku. K tomu je zapotřebí specifická interakce mezi proteiny na povrchu viru a receptorem na hostitelské buňce, jak ukazuje Obr. 4, část 1.

Protože jsou viry nepohyblivé, tak k interakci dochází náhodnou srážkou. Receptory hostitele mají často charakter sacharidů, glykolipidů nebo glykoproteinů, a v buněčném procesu hrají roli signalizace nebo přilnavosti. Viry využívají těchto receptorů jako místo připojení a vstupu do hostitelské buňky [7].

Viriony rozpoznávají několik typů receptorů pro vstup do specifických buněk [8]. Například v lipidovém obalu viru lidské chřipky (influenza A) je přítomen protein hemagglutinin, který se váže na kyselinu sialovou přítomnou na buněčném povrchu buňky hostitele [9].

1.3.2 Vstup do buňky

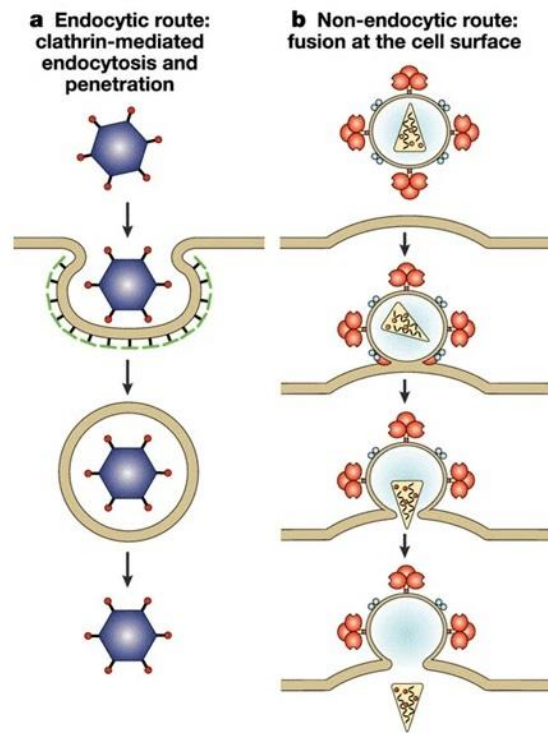
Po úspěšném připojení virionu na buňku hostitele následuje proces vniknutí do buňky (Obr. 4, část 2). Vstupem do buňky je virion zbaven ochranné kapsidy a odhaluje virový genom, dochází k tzv. uncoating, který může probíhat v cytoplazmě nebo v jádře buňky. Genom je následně replikován pomocí mechanismu hostitelské buňky.

Ke vstupu virionu do živočišné buňky existují dva mechanismy. Jednou z možností je fúze virové a hostitelské membrány a druhý způsob je endocytózou pomocí receptorů [7].

Obalené viriony pro vstup do buňky používají membránovou fúzi lipidové dvojvrstvy, která je zobrazená na Obr. 5 vpravo (b). K překonání tak vysoké kinetické bariéry je potřeba katalýza, kterou zajišťují proteiny přítomné v lipidovém obalu nebo v hostitelské membráně. Proteiny jsou stimulovány signálem (př. vazba protein – receptor) z buňky, kterou virion napadá, a procházejí konformačními změnami. Hydrofóbní segment nebo-li fúzní smyčka/fúzní peptid použije membránu buňky a virionu a stáhne obě membrány dohromady [10]. Tento způsob vniknutí do buňky je typický např. pro herpes simplex virus 1 a 2 [11].

Vstup do buňky pomocí receptorové endocytózy využívají jak obalené, tak i neobalené viriony [7]. Endocytóza je zprostředkována transmembránovým proteinem clathrinem. Po připojení k buňce se viriony přesouvají do oblasti hostitelské membrány, která obsahuje clathrin a jeho vázané ligandy na plazmatické straně membrány. Toto vede k vytvoření vezikulárního prostoru obaleného clathrinem a spouští se invaginace membrány. V buňce je takto vytvořen endocytotický váček (endozom). Vstup do buňky přes endocytózu má výhodu, že celý virus je pohlcen do buňky a zbytky virionu mimo hostitelskou buňku neupozorňují

imunitní odpověď [7]. Popsaný princip je lépe pochopitelný na Obr. 5 vlevo (a). Endocytóзовý vstup využívá např. virus chřipky [12].



Obr. 5 Vstup virionu do buňky endocytózou (a) nebo virovou fúzí (b). Převzato a upraveno z [12]. a) Endocytic route: clathrin mediated endocytosis and penetration = Endocytóзовá cesta: endocytóza a penetrace zprostředkovaná clathrinem; b) Non endocytic route: fusion at the cell surface = neendocytóзовá cesta: fúze na buněčném povrchu.

1.3.3 Replikace a syntéza proteinů

Struktura genomu určuje mechanismus, kterým jsou virové geny exprimovány a virové genomy replikovány [7]. Virový genom rozdělujeme do 2 kategorií, DNA a RNA, a každý genom je dále replikován svým způsobem.

Replikace virového genomu (Obr. 4, část 4) zajišťuje tvorbu kopií virionů a schopnost infikovat nové hostitele, tedy přežít [13]. Po vstupu do hostitelské buňky je dalším krokem v replikačním cyklu virů prezentace mRNA ribozomům buňky pro syntézu virových proteinů. Tyto proteiny pomáhají při replikaci genomu, kontrolují expresi genů a jsou strukturální složkou kapsidy a lipidových obalů (Obr. 4, část 3) [7].

1.3.3.1 DNA viry

K pochopení následujících procesů, které pracují s genetickou informací, je potřeba vysvětlit proces transkripce a translace. Transkripce představuje přepis genetické informace uložené v DNA do formy RNA, konkrétně mRNA. Transkripce probíhá v jádře buňky.

Translace znamená překlad informace z molekuly RNA, která byla vytvořena transkripcí, na proteinový řetězec. Tento proces probíhá na ribozomech.

Genomová DNA se dělí na dsDNA a ssDNA. Virový genetický materiál dsDNA je podobný tomu hostitelskému, a proto virus může využít buněčnou replikaci a proteinové syntetizační orgány. Replikace a genomová transkripce virové DNA probíhá v jádře buňky, kde jsou k dispozici vhodné syntetizační enzymy [7]. Některé viry využívají enzymy hostitele, jiné viry si vytváří své vlastní enzymy. DNA-dependentní DNA polymerázu (DdDp) využívá dsDNA, ssDNA si syntetizuje DNA-dependentní RNA polymerázu (DdRp) (Obr. 6) [13].

V jádře vyprodukovaná virová mRNA přechází do cytoplazmy a dochází k translaci na ribozomech. Translací mRNA ribozomy produkují virové proteiny, které se vrací do jádra buňky [7]. Po zpracování virové DNA určené pro vytvoření genomu nového virionu, je dále transkribována DNA, ze které jsou translací vytvořeny proteiny důležité pro strukturální komponenty virionu, např. kapsidy.

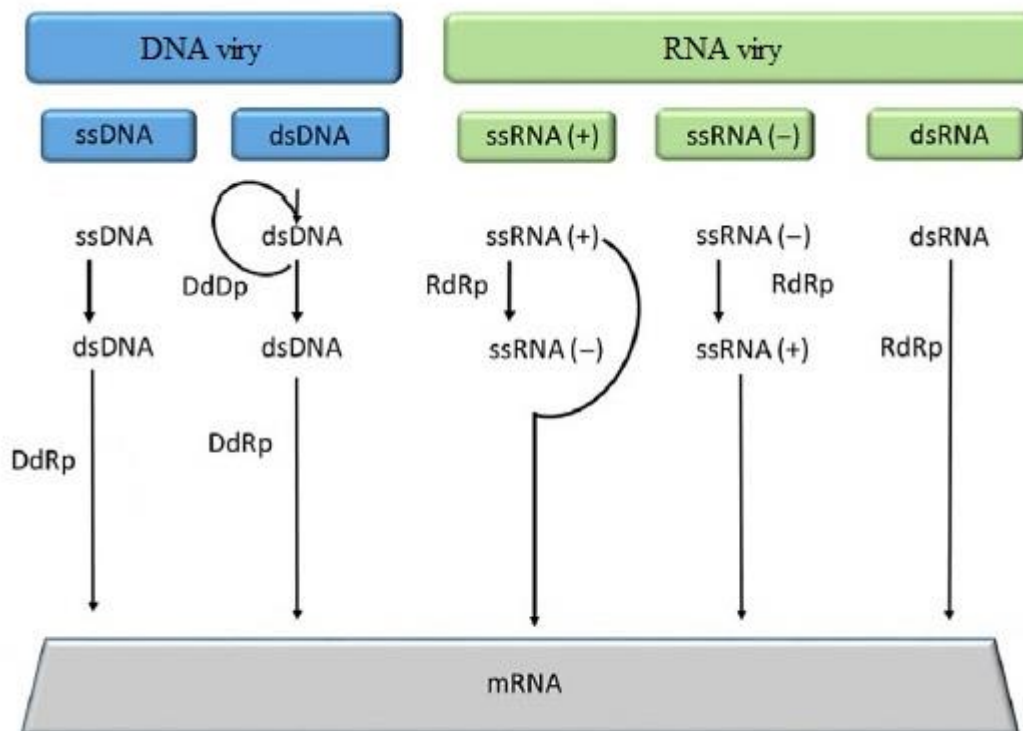
Viry s genomem ssDNA jej převedou pomocí hostitelských enzymů buňky na dsDNA, která je dále zpracována stejným postupem popsaným v předešlých odstavcích (Obr. 6) [13].

1.3.3.2 RNA viry

Genom RNA virů se rozděluje stejně jako u DNA na dsRNA a ssRNA, které využívají enzym RNA-dependentní RNA polymerázu [13]. Zároveň je důležité u RNA virů rozlišovat jejich polaritu, negativní a pozitivní, což udává způsob translace (Obr. 6) [7].

U genomu RNA virů s kladnou polaritou je stejná polarita jako u mRNA, a proto může být RNA prezentována přímo ribozomům k translaci a tvorbě virových proteinů [13]. Oproti tomu genom virů RNA s negativní polaritou má opačnou polaritu než mRNA. Pomocí enzymu RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRp) musí nejprve dojít k přeměně na RNA kladnou polaritu, kterou lze předložit ribozomům na translaci [9].

U některých RNA virů je mRNA již přítomna v hostitelské buňce ještě před napadením buňky, u jiných RNA a DNA virů je mRNA syntetizována právě vstupem do hostitelské buňky [13]. Pro lepší pochopení replikace DNA a RNA virů je přiložen Obr. 6.



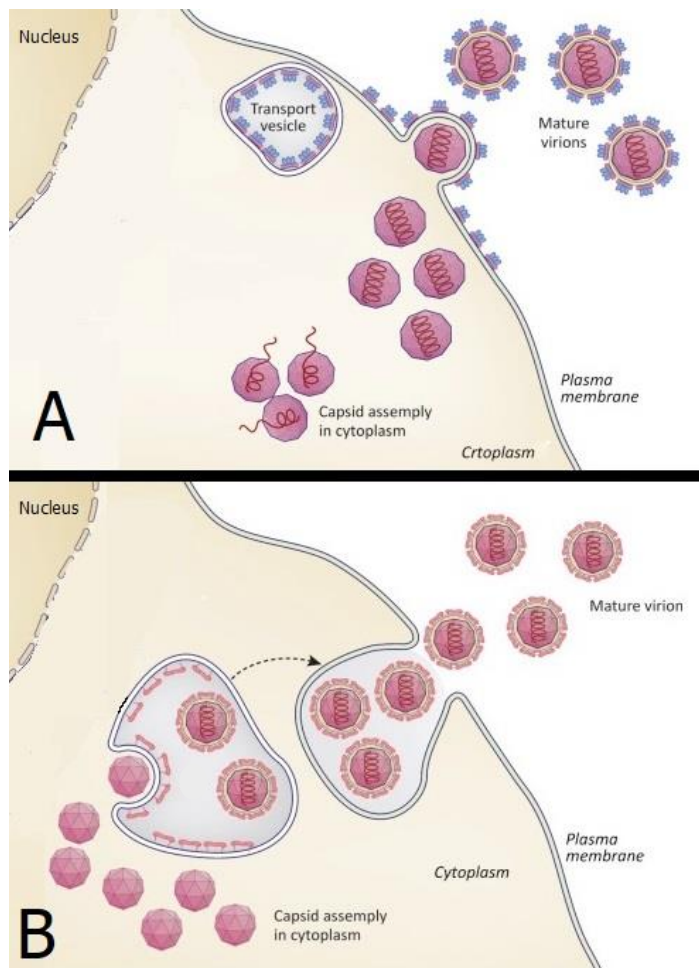
Obr. 6 Schéma replikace DNA a RNA virů. Převzato a upraveno z [12].

1.3.4 Uvolnění virionu z buňky

Viry využívají hostitelské organely k produkci tisíce kopií virového genomu a bílkovin v jedné buňce. Tyto struktury jsou v rámci buňky sestaveny dohromady a vzniká virion (Obr. 4, část 5). Nově vytvořený virion se uvolňuje pučením, exocytózou nebo buněčnou lyzí z hostitelské buňky (Obr. 4, část 6) [14].

U obalených virů dochází k uvolňování nových virionů pučením nebo exocytózou, protože potřebují získat lipidovou membránu. Nově vytvořená nukleokapsida se přesouvá do oblasti buněčné membrány, kde jsou vloženy glykosylované proteiny budoucího virového obalu. Kapsida je obalena membránou a pučením se oddělí od buňky (Obr. 7, A). Tímto způsobem se uvolňují viriony jednotlivě [15, 16]. Uvolnění exocytózou (Obr. 7 B) je postup podobný pučení. Odlišuje se pouze vytvořením nitrobuněčné vezikuly, která na svých okrajích obsahuje proteiny pro vytvoření lipidového obalu a uvnitř nese vzniklé viriony. Celý váček se přesouvá k buněčnému povrchu, kde jsou viriony poté uvolněny.

Neobalené viry opouští buňku její lyzí. Napadená buňka má díky virové replikaci narušené své normální metabolické procesy, což vede k její lyzi. Některé viry dokonce produkují proteiny, které stimulují buněčnou apoptózu k urychlení virového replikačního cyklu [16].



Obr. 7 Schéma uvolnění virionu z buňky pučením (A) nebo endocytózou (B). Převzato a upraveno z [15].
 Nucleus = jádro, mature virion = nový virion, plasma membrane = plazmatická membrána, cytoplasm = cytoplazma,
 capsid assembly in cytoplasm = sestavení kapsidu v cytoplasmě, transport vehicle = transportní vak.

2 Izolace a detekce nukleových kyselin

Při izolaci NK musí dojít nejprve k lyzi částic, ze kterých se poté extrahuje NK. Lyze částic a extrakce je obsáhlejším tématem, proto je rozdělena a více popsána v kapitole 2.1.1 a 2.1.2. Detekce NK může být provedena mnoha metodami. Ty nejzákladnější techniky jsou popsány v kapitole 2.2.

2.1 Izolace nukleových kyselin

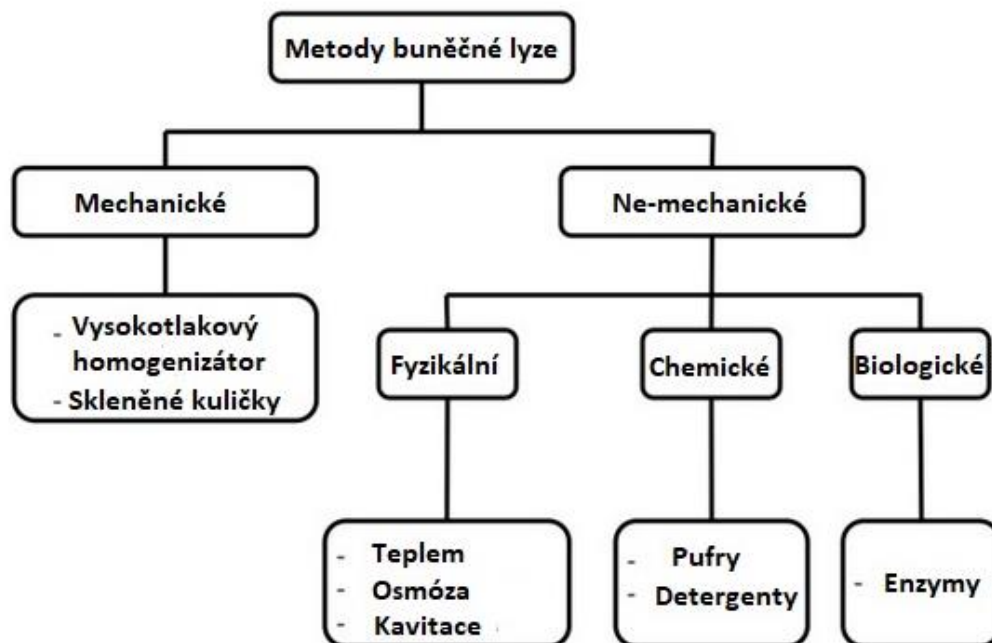
Mezi izolační metody NK se řadí extrakční metody, kterými se práce zabývá. Extrakce NK je klíčový krok v molekulární biologii, která se využívá v různých oblastech, jako například v lékařských a biologických vědách [17]. Na její provedení jsou kladeny základní požadavky jako:

- Jednoduchost, rychlost a vysoká specifita.
- není potřeba specializované vybavení, speciální znalosti a dovednosti.
- Výsledná NK by měla být čistá a jednoduše použitelná pro různé zvýrazňovací techniky.
- Činidla by měla být neškodná a příprava by měla odolat kontaminaci dalšími vzorky.
- Detekční limity jsou maximalizovány v případě malého objemu eluátu.
- V případě klinických vzorků eliminace potenciálních inhibitorů DNA polymerázy.
- Konečným cílem je čistá NK bez kontaminantů amplifikace [18, 19].

Příprava vzorku na extrakci NK zahrnuje dva kroky, lyze buňky a extrakce molekuly, v našem případě NK [20]. K buněčné lyzi dochází narušením buněčné membrány a odstraněním membránových proteinů a lipidů [17, 21].

2.1.1 Lyze virových částic

Metody pro lyzi virionů jsou podobné jako metody pro lyzi buněk obecně. Buněčnou lyzi můžeme provést chemickou, biologickou, mechanickou nebo fyzikální cestou (Obr. 8). Existuje několik variant těchto metod a každá má svou výhodu i nevýhodu. Například chemické a biologické metody jsou jednoduché a nenáročné na vybavení laboratoře, ale jejich reagentie mohou ovlivnit následující detekci. Naopak pro mechanické a fyzikální metody je potřeba specifické přístroje [17, 20].



Obr. 8 Schéma metod buněčné lyze. Převzato a upraveno z [22].

Chemickou lyzi můžeme způsobit pomocí pufrů a detergentů [22] př. sodná sůl dodecylsulfátu (SDS) [23] nebo oktylfenol ethoxylát (Triton-X 100) [24]. Detergenty jsou látky schopné rozrušit lipidové interakce v buněčné membráně. Membrána buněk se skládá z lipidové dvojvrstvy hydrofilních a hydrofobních molekul. Jednu lipidovou vrstvu tvoří hydrofobní část, na kterou jsou přímo napojeny hydrofilní molekuly. Buněčná membrána je tvořena ze dvou těchto lipidových vrstev. Hydrofilní molekuly směřují dovnitř nebo mimo buňku a hydrofobní část je uzavřena uvnitř membrány. Právě pufrů se využívají v tzv. alkalické lyzi, která využívá OH^- iontů ke změně pH a následné lyzi buněčné membrány. Buňka se rozpadá a dochází k lyzi.

Biologická metoda využívá enzymy, např. lysozym, zymoláza nebo proteáza. Výhodou enzymatické lyze je specifčnost enzymů, které můžeme využít na konkrétní rozklad.

Mechanickou cestou lyze dochází k rozpadu pomocí smykové síly. Mezi tyto metody patří vysokotlakový homogenizátor a metoda skleněných kuliček. Princip lyze pomocí homogenizátoru spočívá v protlačení buňky otvorem za použití vysokého tlaku. Metoda

skleněných kuliček zahrnuje jejich mísení s buněčnou suspenzí za vysokých rychlostí. Střetávání buněk s korálky způsobuje lyzi buněk a uvolnění jejich složek.

Fyzikální metody využívají vnější síly k porušení buněčné membrány, např.: teplem, osmózou, ultrazvukovými vlnami. Tepelná lyze nastává při opakovaném zmrazení a rozmrazení, čímž vzniká led na membráně buňky a rozkládá ji. Náhlou změnou koncentrace soli v prostředí kolem buňky dochází k tzv. osmotickému šoku a buněčná membrána se stane propustnou pro vodu. Nižší koncentrace soli v okolí buňky vede k nasávání vody do buňky, která následně praskne. Přístroj na lyzi buněk pomocí ultrazvukových vln se nazývá sonikátor. Princip sonikátoru spočívá v kavitaci, kdy se vytváří a následně protrhávají dutiny vytvořené snížením lokálního tlaku pomocí ultrazvukových vln [22, 25].

2.1.2 Extrakce nukleových kyselin

Tyto metody se dělí na extrakce chemické a extrakce na pevné fázi. Rozdělení je závislé na využívaných fázích, které se mezi sebou mísí. Chemické extrakce využívají dvě fáze v kapalném stavu, extrakce na pevnou fázi využívá jednu kapalnou fázi a druhou pevnou, na kterou dochází k vyextrahování NK.

2.1.2.1 Chemická extrakce

Chemické extrakce řadíme do tzv. extrakcí mezi kapalnými fázemi, protože jde vždy o dvě nemísitelné kapaliny. Mezi tyto metody patří např. fenol-chloroformová extrakce nebo alkalická extrakce. Někteří autoři do této skupiny zařazují také izolaci pomocí chloridu cesnatého s ethidium bromidem, jejichž princip popisují dále v práci [17, 20].

Princip velmi využívané fenol-chloroformové extrakce spočívá ve smíchání vzorku a roztoku fenol-chloroformu s následnou centrifugací. Obecně při oddělování NK je třeba inaktivovat buněčné nukleázy, což je možné právě organickými rozpouštědly. Fenol je hořlavá, toxická organická látka, která zcela neinhibuje aktivitu nukleáz. Tento problém lze jednoduše vyřešit kombinací fenolu, chloroformu a alkoholu. Centrifugací získáme rozdělení na vodnou (horní) a organickou (dolní) fázi. DNA je obsažena ve vodné fázi a přidáním ethanolu a isopropanolu docílíme jejího vysrážení ze supernatantu. Promytím 70 % ethanolem a odstředěním supernatantu se odstraní zbývající ethanol a isopropanol ze sražené DNA. Finální DNA se rozpustí v pufru nebo v destilované vodě [19, 26].

Pro extrakci RNA se fenol-chloroformová metoda využívá za použití guanidinium thiokyanátu. Tato jednkroková metoda byla popsána Chomczynskim a Sacchim [19, 26, 27]. Princip tohoto vylepšení spočívá ve využití kyselého roztoku thiokyanátu, fenolu a chloroformu, díky kterému je možné RNA oddělit od DNA. Proteiny a DNA zůstávají v organické fázi a RNA se oddělí do vodní fáze. K získání celkové RNA dosáhneme vysrážením pomocí isopropanolu [19, 26].

Alkalická extrakce se využívá k izolaci plazmidové DNA. Princip extrakce spočívá v denaturaci vysokomolekulární chromozomální DNA alkalickým roztokem (NaOH + SDS), zatímco kruhová plazmidová DNA zůstává nedotčena. Neutralizací se z chromozomální DNA vytvoří nerozpustná sraženina a po krátké centrifugaci plazmidovou DNA nacházíme v supernatantu. Takto připravená čistá DNA je vhodná pro méně citlivé detekce [17, 26].

Metoda za použití chloridu cesného (CsCl) a ethidium borimidu (EtBr) se používá již od roku 1950 pro izolaci NK [19]. Princip metody spočívá v rozdílu specifické hustoty látek. EtBr je interkalační látka, která zvýrazňuje a odděluje DNA molekuly dle svinutí. NK jsou koncentrovány centrifugací v gradientu EtBr-CsCl po precipitaci a resuspendaci v alkoholu. V nižší hustotě gradientu CsCl se hromadí kruhové molekuly s kovalentními vazbami, protože oproti lineárním molekulám v přepočtu na pár bází zahrnují méně EtBR [26]. Metoda je velmi citlivá a výsledkem je čistá DNA. Naopak mezi nevýhody metody patří časová náročnost, pracnost, finanční nákladnost a přítomnost EtBr jenž může ovlivnit následné detekce [17, 19].

2.1.2.2 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi patří mezi nejúčinnější techniky extrakce NK. Princip metody spočívá v kombinaci mobilní a stacionární (pevné) fáze, která odděluje specifický analyt z roztoku [17, 28]. Jako stacionární fáze se používá př. celulózový, skleněný nebo magnetický nosič, křemelina nebo silika gel [17], a mobilní fázi je obvykle kapalina [26]. Hlavním úkolem této metody je zakoncentrování, vyčištění vzorku, a jeho přenos z matrice do jiného rozpouštědla nebo do plynu. Tento postup byl vyvinut jako náhrada nebo doplněk pro extrakci kapalina-kapalina [29].

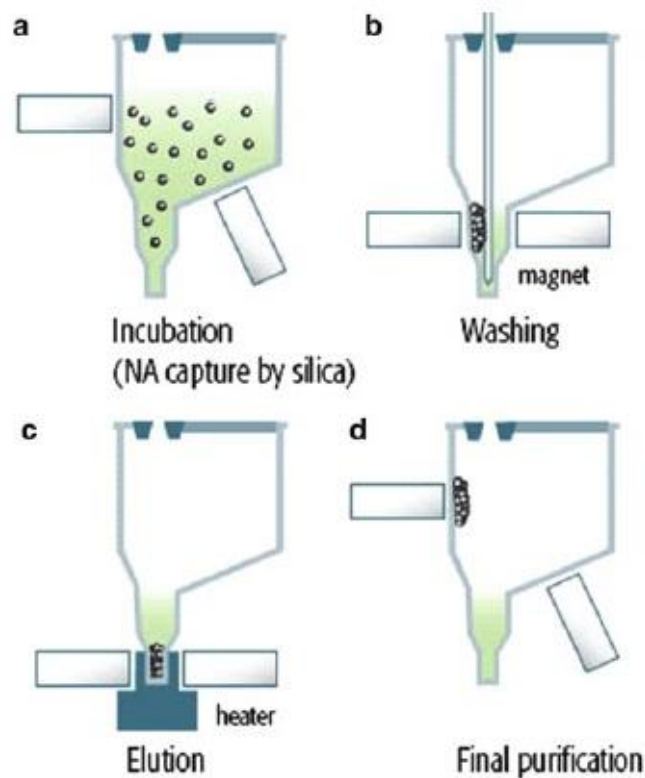
Již v roce 1979 bylo zjištěno, že křemičitany mají vysokou afinitu k DNA a tento princip je využíván ve všech nosičích obsahujících oxid křemičitý a chaotropní soli. Mezi tyto nosiče patří silikagel, křemelina a skleněný nosič, tvořený křemičitými,

pazourkovitými a borosilikátovými skelnými vlákny uspořádanými jako filtr [26]. Mechanismus této techniky závisí na vysoké afinitě záporně nabitých částic DNA ke kladně nabitému oxidu křemičitému. Molekuly DNA se v posledním kroku eluují v hypoosmotickém roztoku nebo v destilované vodě [17, 30, 31].

Provedení extrakce na pevné fázi je metoda tzv. spin-kolonky nebo technika magnetického nosiče. Extrakční metoda pomocí spin-kolonky využívá principu vazby na oxid křemičitý v koloně. Z lyzovaného vzorku se NK navážou ve spin-kolonce na pevnou fázi, kterou tvoří oxid křemičitý a kolona se poté centrifuguje. K promytí se přidá pufr a opět kolonu vložíme do centrifugy. Posledním krokem se NK eluují. Metodu spin-kolonky využívají komerční kyty.

Technika magnetického nosiče umožňuje extrakci jak genomové, plazmidové a mitochondriální DNA, tak i RNA ze složitých směsí pomocí hybridizace. K extrakci NK se využívají magnetické nosiče vytvořené z biopolymeru, který má afinitu k cílové NK. Například oxid železitý na povrchu modifikovaný dvojmocným kovem ($M = \text{Cd}, \text{Co}, \text{Cu}$) a hydroxidem sodným [26, 32]. Spojení magnetických částic s vhodným pufrovací systémem dokázalo zrychlení a zlepšení účinnosti extrakce [17].

Na Obr. 9 můžeme vidět schematický příklad extrakce pomocí magnetických částic. Do nádoby se pipetuje vzorek s přimíchanými magnetickými částicemi, které zachycují cílovou NK (a). Magnet se přikládá na stěnu nádoby a přitahuje veškerý magnetický materiál, čímž umožňuje očištění NK promývacími kroky (b). Zahřátím dochází k uvolnění NK z magnetických částic (c) a pomocí magnetu jsou z eluátu odstraněny magnetické nosiče (d). Tímto způsobem je DNA očištěna od buněčného odpadu. Metoda magnetických nosičů je velmi jednoduchá a efektivní. Jedna z výhod je vyhnutí se centrifugačním krokům, které jsou potřebné u spin-kolonek. [19, 32].



Obr. 9 Schématické zobrazení extrakce na magnetickou pevnou fázi. Převzato a upraveno z [19]. Incubarion (NA capture by silica) = Inkubace (NK zachyceny na magnet), Washing = promytí, Elution = eluce, Final purification = finální purifikace.

2.1.2.3 Automatizace extrakce nukleových kyselin

Automatizaci extrakce NK můžeme rozdělit do dvou druhů: poloautomatizované a automatizované metody. U poloautomatizovaných metod dochází ke zjednodušení díky možnosti extrakce více vzorků najednou. Automatizované extrakce jsou plně prováděny přístroji. Laborant pouze načte vzorky a spustí přístroj, který sám vzorky zpracuje. Pracovník v mezidobě může svůj čas věnovat dalšímu úkolu.

Výhodou automatizovaných metod je větší reprodukovatelnost díky přesné robotice oproti ručnímu pipetování, nižší pravděpodobnost záměny nebo kontaminace vzorků. Nevýhodou je dražší pořizovací cena než manuální metoda, nákladnější údržba a provoz [33].

2.2 Detekce nukleových kyselin

Následujícím postupem po vyextrahování nukleových kyselin je jejich detekce. V této kapitole jsou vysvětleny metody jako polymerázová řetězová reakce (PCR), elektroforéza, metoda sekvenování nové generace (NGS) a metoda microarray.

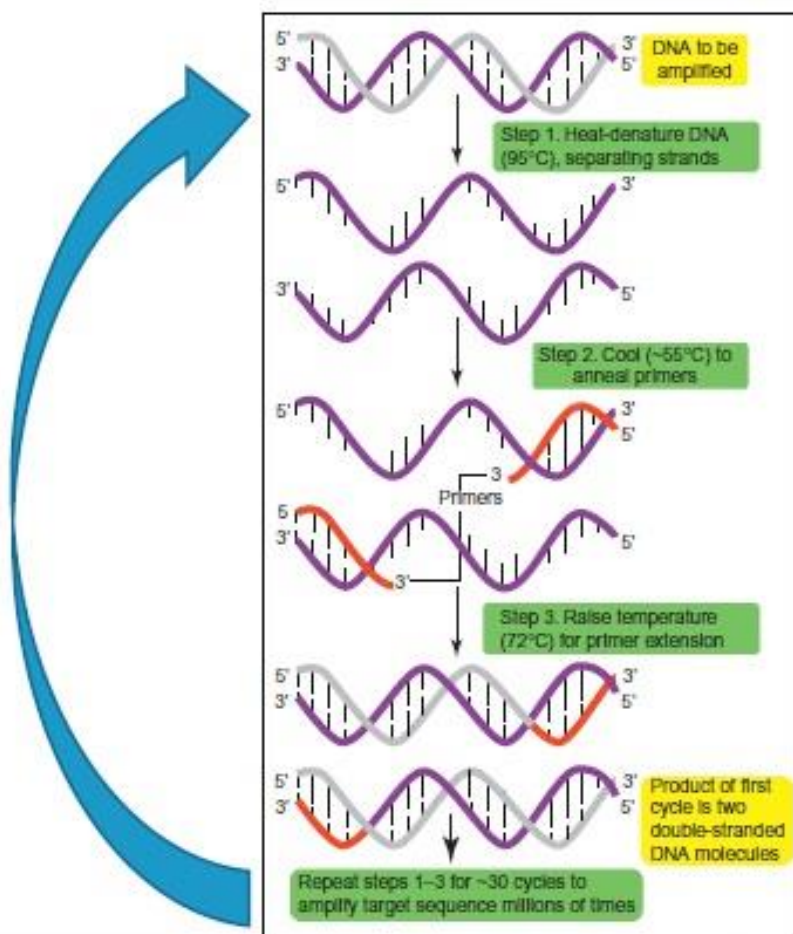
2.2.1 PCR

Technika PCR patří do kategorie termocyklických metod, tzn. že vyžadují teplený cyklus [35]. Je to nejvíce využívaná metoda detekce specifických sekvencí NK, a proto je považována za tzv. zlatý standard. Proces PCR metody spočívá v replikaci DNA. Tímto způsobem je DNA namnožena a díky tomu detekovatelná pomocí gelů nebo technik založených na fluorescenci. Postupně byly vyvinuty modifikované testy PCR, například tzv. reverzní transkripce s následnou PCR v reálném čase [35, 36].

Postup PCR metody zahrnuje 3 kroky, tavení DNA, cyklení a polymerace DNA. Tento postup je opakován 30–40krát, aby došlo k milionovému namnožení DNA. Prvním krokem jsou vlákna DNA rozdělena do jednovláknových molekul procesem přidání energie, která rozbíjí vodíkové vazby mezi nukleotidy protilehlých vláken. Tento postup probíhá při teplotě 94 - 95 °C po dobu 5 - 10 minut (Obr. 10, krok 1).

V druhém kroku PCR metody nastávají 3 fáze – denaturace, nasednutí primerů a prodloužení. Postup denaturace je podobný kroku tavení DNA. Rozdíl je v tom, že denaturační fáze trvá pouze 15 - 30 sekund při teplotě 95 °C. Následuje fáze nasednutí, při které se vážou malé molekuly DNA tzv. primery na oddělená vlákna DNA. Teplota žíhání bývá v rozmezí 45 – 65 °C. Poslední fáze prodloužení spočívá v syntéze, nového řetězce DNA začínajícího od 3' konce pomocí DNA polymerázy. Tento postup probíhá při teplotě 72 °C po dobu 60 s (Obr. 10, krok 2).

Polymerace je třetí a poslední krok PCR metody. Dochází ke konečnému prodloužení DNA při teplotě 4 °C (Obr. 10, krok 3). A celý proces se opět opakuje.



Obr. 10 Schéma detekce NK metodou PCR. Převzato a upraveno z [36].

2.2.2 Microarray

Technika, jež označujeme microarray představuje analýzu genové exprese. Princip metody microarray je založen na hybridizaci mezi dvěma vlákny DNA. Veškerá mRNA, je zkopírována do cDNA pomocí reverzní transkriptázy a poté použita k hybridizaci na známé sekvence DNA oligonukleotidů. Dochází ke specifickému párování komplementárních sekvencí NK vytvořením vodíkových vazeb mezi bázemi nukleotidů. Spojením čím většího počtu spárovaných bází v sekvenci, tím se vytvoří pevnější vazba mezi oběma vlákny. Promytím se odstraní nespojené sekvence a zůstávají pevně spárované sekvence, které jsou hybridizovány. Fluorescenčně označené cílové sekvence generují signál, který závisí na síle hybridizace. Ta je určena např. počtem párových bází [37–39].

2.2.3 Sekvenování nové generace

Revoluční metoda sekvenování nové generace (NGS) umožňuje analýzu směsí NK, které obsahují tisíce sekvencí a dochází k masivnímu paralelnímu sekvenování. Tato technologie se využívá k určení pořadí nukleotidů v NK [34, 40].

Princip NGS je obdobný metodě dle Sanger a pojmenování tzv. nové generace napovídá o vylepšení Sangerovy metody, např. v automatizaci, v druhé, třetí, čtvrté atd. generaci.

Sangerova metoda využívá modifikovanou PCR metodu k syntéze kopií NK, do nichž jsou začleněny kromě deoxyribonukleosidtrifosfátů i dideoxyribonukleosidtrifosfáty, které nemají – OH skupinu v poloze 3, kam by se mohl vázat další nukleotid v nově vznikajícím řetězci. Syntéza probíhá odděleně ve 4 zkumavkách, kdy každá obsahuje jiný dideoxyribonukleosidtrifosfát (A, T, G, C). Amplifikace produktu probíhá pomocí asymetrické PCR, která využívá pouze jeden primer, tím pádem probíhá jen na jednom řetězci NK, kam se tento primer specificky váže a kopie molekul NK nepřibývají exponenciální řadou. Ke stanovení sekvence NK slouží sekvenátor a detekce probíhá během kapilární elektroforézy a pomocí laserového detektoru [41].

NGS lze rozdělit do dvou podkategorií, sekvenování dle hybridizace a sekvenování dle syntézy. Princip sekvenování dle hybridizace se zakládá na využití známých sekvencí DNA, které byly hybridizovány s označenými markery. Opakovanou hybridizací a smýváním nehybridizované DNA je možné zjistit, zda fragmenty s označeným markerem odpovídají sekvenci DNA na filtru. Sekvenování dle syntézy probíhá opakovanými cykly syntézy nukleotidů a jejich začleňování do rostoucího řetězce.

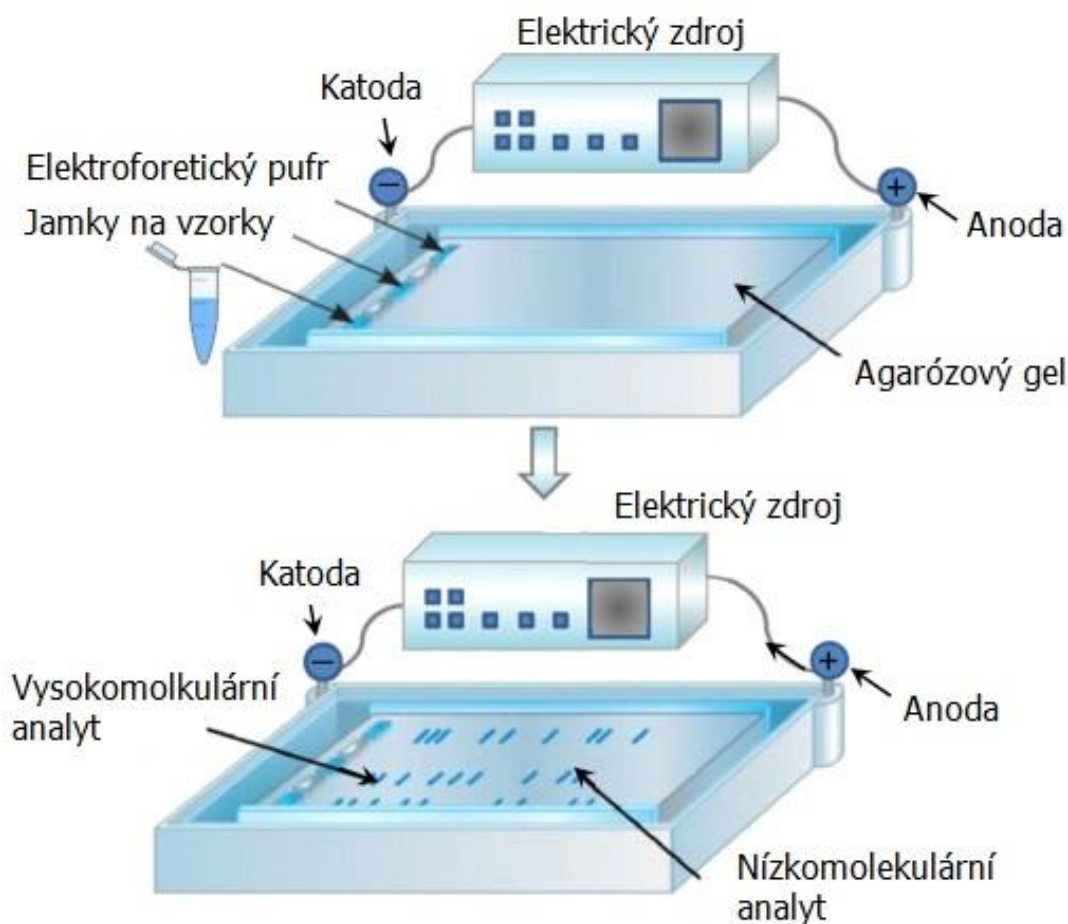
Nové vývoje konkrétně druhé generace přichází v podobně kratšího čtení bází a masivního sekvenování DNA, kterým se pokrývá případná chybovost v krátkém čtení. Třetí a čtvrtá generace sekvenování přichází se zpátečnickým delším čtením bází, ale zachovávají masivní sekvenování. Tímto se získá velké množství informací o primární sekvenci a nedochází k chybovému opakování prvků DNA. Třetí generace se také snaží o zavedení sekvenování dlouhých molekul DNA i RNA

Vylepšováním a zjednodušováním Sangerovy metody dochází k urychlení postupu a vyvinutí cenově výhodnějších technik [42, 43].

2.2.4 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která se využívá k separaci elektricky nabitých molekul v elektrickém poli. Nukleové kyseliny jsou přirozeně záporně nabitě molekuly, lze je tedy tímto způsobem rozdělit.

Elektroforetické dělení probíhá na nosiči, v gelu (Obr. 11), kterým může být agaróza nebo polyakrylamid. Agaróza je vhodné medium pro dělení větších fragmentů DNA, a naopak polyakrylamid menších molekul proteinů a DNA. Gel je ponořen do pufru, např. nejvíce používaný TAE pufr (Tris/Borate/EDTA, roztok složený z tris(hydroxymethyl)aminometanu, kyseliny borité a EDTA), který poskytuje ideální pH a ionty podporující vodivost roztoku.

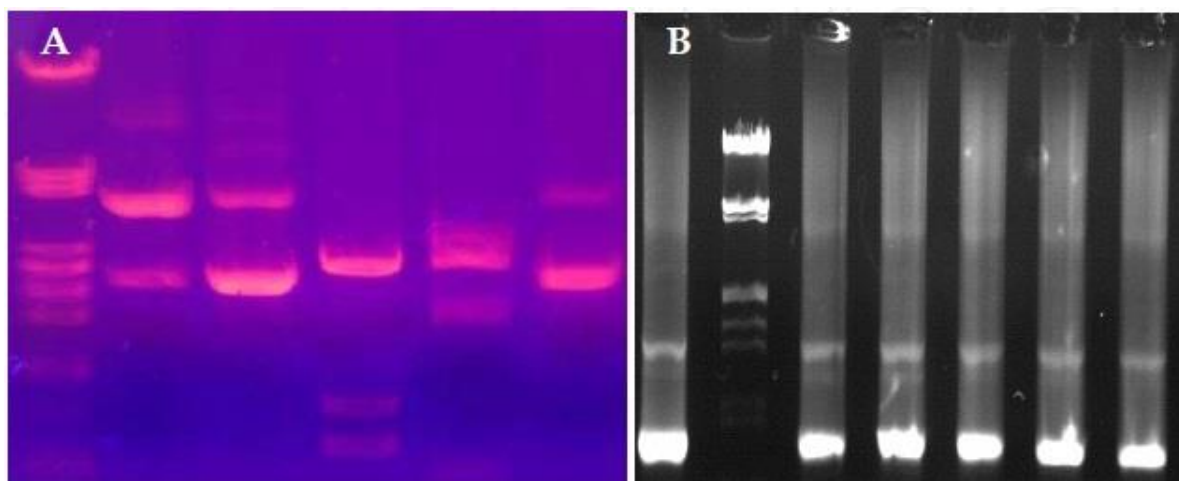


Obr. 11 Schématické provedení gelové elektroforézy. Převzato a upraveno z [44].

Celou soustavou protéká elektrický proud mezi anodou a katodou. Jak již bylo řečeno, NK jsou záporně nabitě molekuly a jejich pohyb směřuje od záporné katody ke kladné anodě. Separace NK gelovou elektroforézou probíhá na základě jejich velikosti. Hmotnostně větší

molekuly migrují pomaleji, než ty menší. Tímto způsobem se vytvoří separační sloupec (Obr. 12).

Po úspěšném rozdělení vizualizujeme separované NK pomocí činidel. Nejčastější používané činidlo při vizualizaci NK je EtBr. Gel je následně osvětlován UV lampou a získá se fluorescenční obraz, který je po vyfotografování černobílý (Obr. 12 [44–47]).



Obr. 12 Zobrazení separované NK gelovou elektroforézou. Vizualizace činidlem EtBr (A). Po osvětlení UV lampou a vyfotografování (B). Převzato a upraveno z [45].

3 Nové trendy

V této kapitole je uvedeno několik ověřených nových způsobů izolace a detekce NK, kterými jsou CRISPR, RADICA, biosensory, MagaZorb, purifikace celulózovým proužkem a mikrofluidní zařízení.

3.1 Nové trendy detekce NK

Mezi nové trendy detekce jsou zařazeny metoda clustery pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit – CRISPR, rapid digital crisper approach – RADICA, a biosensory.

3.1.1 Clustery pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit – CRISPR

Některé buňky mají specifický systém na ochranu před patogeny, který degraduje cizí NK, zaznamenává invazi (forma imunitní paměti) a detekuje stejné vetřelce při opakované infekci. Detekční metoda CRISPR využívá tento buněčný systém, který se skládá z opakujících se palindromických přímých sekvencí (CRISPR pole) a proteinů spojených s CRISPR (Cas). CRISPR pole je rozděleno specifickými sekvencemi zvanými spacers. Proteiny Cas zajišťují enzymatické štěpení cizorodých NK. Cas proteiny jsou děleny do tříd, typů a podtypů.

Technologie CRISPR a rozmanitost enzymů Cas spojených s CRISPR zajišťují editaci genomů a detekci nukleových kyselin [48, 49]. Ve spojitosti s pandemií COVID-19 byly vyvinuty techniky založené na CRISPR jako např. chemická analýza SHERLOCK-Covid [50], analýza STOP-Covid [51], AIOD-CRISPR analýza [52] nebo DETECTR příčného toku [53].

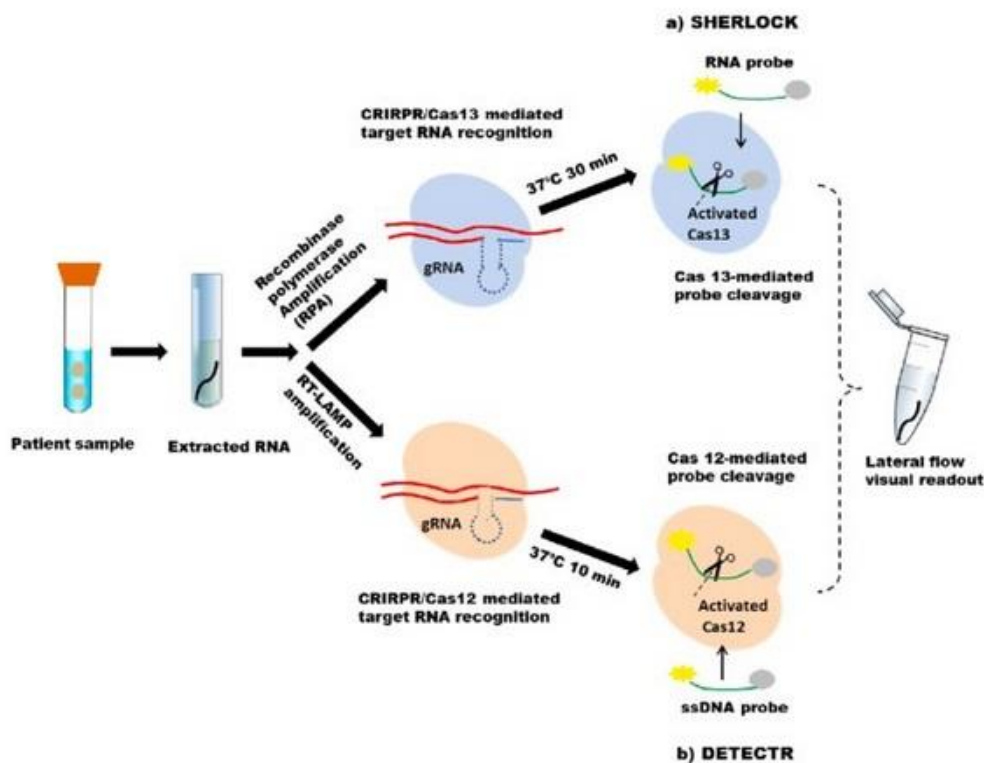
Metoda SHERLOCK využívá rekombinázové polymerázové amplifikace (RPA) a CRISPR-Cas13 fluorescenčního komplexu pro detekci NK. Krok SHERLOCK představuje T7 RNA polymerázu, která vytváří NK pro Cas13. Protein indukuje štěpení jednovláknové NK, následně je fluorescenční signál uvolněn a detekován. Metoda SHERLOCK poskytuje výsledek přítomnosti NK SARS-CoV-2 do 1 hodiny (Obr. 13) [50].

Metoda STOP-Covid využívá k detekci SARS-CoV-2 komplex AapCas12b-crRNA pro navázání souvisejících míst, které jsou na rozpoznávacích místech amplifikačních primerů v cílové sekvenci. Tento komplex je zaveden do roztoku, který obsahuje primery, izotermický amplifikační pufr, cílovou sekvenci a taurin. Aktivace komplexu AapCas12b v přítomnosti

viru potvrzuje aktivitu do dvou minut. Touto metodou je získán výsledek do 40 minut při použití fluorescenční indikace [51].

Analýza AIOD-CRISPR představuje zavedení dvojice crRNA, která umožňuje vznik Cas12a-crRNAkomplexu. Komplex dále reaguje s komponenty jako např. vazebný protein, primery, polymerázy a cílové sekvence. Po navázání komplexů Cas12a-cr-RNA na cílová místa, je aktivována endonukleáza Cas12a a následně štěpí přilehlé vazby [52].

CRISPR-Cas12a metoda nazvaná DETECTR využívá reverzní transkripci a izotermální amplifikaci (LAMP) pro extrahovaný vzorek. Cas12a spouští trans-štěpení NK. Přítomnost viru je potvrzena vedlejší aktivitou Cas12a, která štěpí reportérské molekuly. Signál se vizualizuje fluorescenčním zařízením (Obr. 13) [53].



Obr. 13 Schématické porovnání CRISPR metod. Horní schéma zobrazuje metodu SHERLOCK (a) spodní schéma zobrazuje metodu DETECTR (b). Převzato a upraveno z [54] Patient sample = vzorek od pacienta; extracted RNA = extrahovaná RNA; recombinase polymerase amplification (RPA) = rekombinázová polymerová amplifikace; CRISPR/Cas13 mediated target RNA recognition = CRISPR/Cas13 zprostředkovaný terč pro RNA rozpoznání; RNA probe = RNA sonda; Cas-13 mediated probe cleavage = Cas-13 štěpení zprostředkované sondy; RT-LAMP amplification = reverzní transkripce a izotermální amplifikace; lateral flow visual readout = vizuální indikace bočního toku.

3.1.2 Rychlý digitální přístup CRISPR – RADICA

Techniky molekulární diagnostiky pro SARS-CoV-2, které zahrnují systém CRISPR-Cas jsou citlivé metody pro detekci viru. Diagnostika na tomto podkladě však postrádá kvantifikační schopnost detekce. Vyvinutá technika RADICA pro detekci SARS-CoV-2 umožňuje kvalitativní i kvantitativní detekci. Metoda byla testována i na viru Epstein-Barrové a může být přizpůsobena na detekci jiných druhů virů.

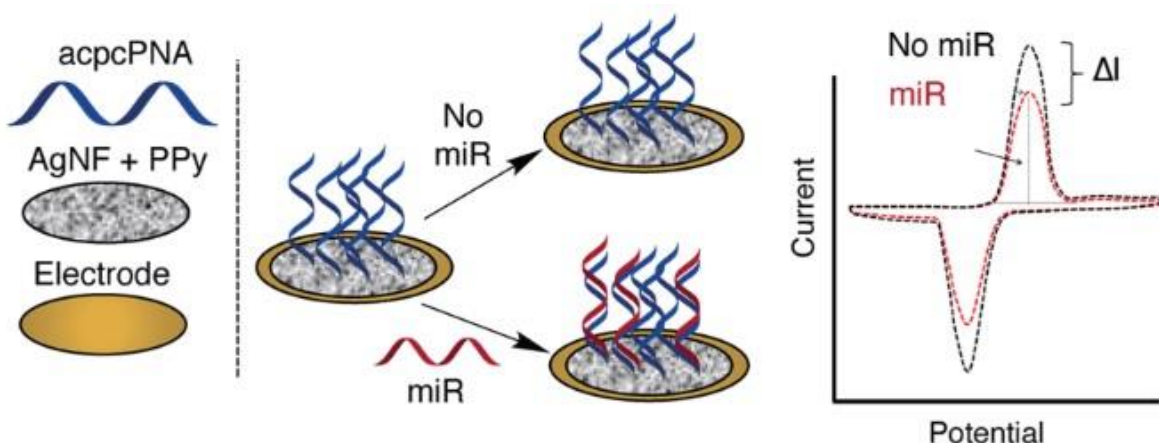
Tato technika kombinuje přesnost PCR metody, rychlost amplifikačních technik jako např. LAMP metoda a nástroj na úpravu genů CRISPR. Detekce probíhá na čipu a reakce je rozdělena do 10 000 sekcí. Protein Cas12a se využívá k identifikaci a vazbě na cílovou NK. Detekce probíhá fluorescenční metodou. Počet fluorescenčních oddílů odpovídá množství NK ve vzorku [55, 56].

3.2 Biosensory

Analogy DNA jsou nástroje využívány k vývoji různých typů biosensorů. Mezi nejznámější analogy patří LNA (uzamčená NK – analog RNA), PNA (peptidová NK) a PTO (fosforothiolát oligonukleotid). PNA je uměle syntetizovaný polymer. Báze nukleotidu jsou vázány na páteř karbonylovými vazbami. Protože PNA neobsahuje fosfátové skupiny je vazba mezi PNA a DNA silnější než DNA-DNA kvůli absenci elektrostatického odporu.

Biosensory jsou citlivé analytické zařízení převádějící fyzikální nebo chemický signál na jiný, lépe měřitelný. Rozpoznávací část tvoří prvek biologického původu, který přímo nebo nepřímo reaguje s cílovým analytem. Dojde k přeměně biologické reakce na měřitelný elektrický signál a zesilovač signál zesílí k možné detekci. Využití biosensorů se ve virologii používá k identifikaci NK [57, 58].

Například k detekci microRNA (miR) je využívána platforma založená na stříbrných nanotrakturách a systému pyrrolidiny PNA, který je tvořen D-prolyl-2-aminocyklopentanecarboxylové páteře (acpcPNA) (Obr. 14). Tento senzor se skládá z porézní stříbrné nanopěny (AgNF) potažené tenkou vrstvou polypyrrolu (PPY). Povlak je vodivý a obsahuje aminové skupiny k ukotvení PNA. Vysoká hustota aminových funkcí v pěnové struktuře umožňuje zachycení miR, čímž se zvýší citlivost. Oxidační proud AgNF ve fosfátovém pufru udává měřitelný signál, který je detekovatelný voltametrií.



Obr. 14 Schématické zobrazení příkladu biosensoru. Převzato a upraveno z [59]. Electrode = elektroda; miR = micro RNA.

3.3 Nové trendy izolace

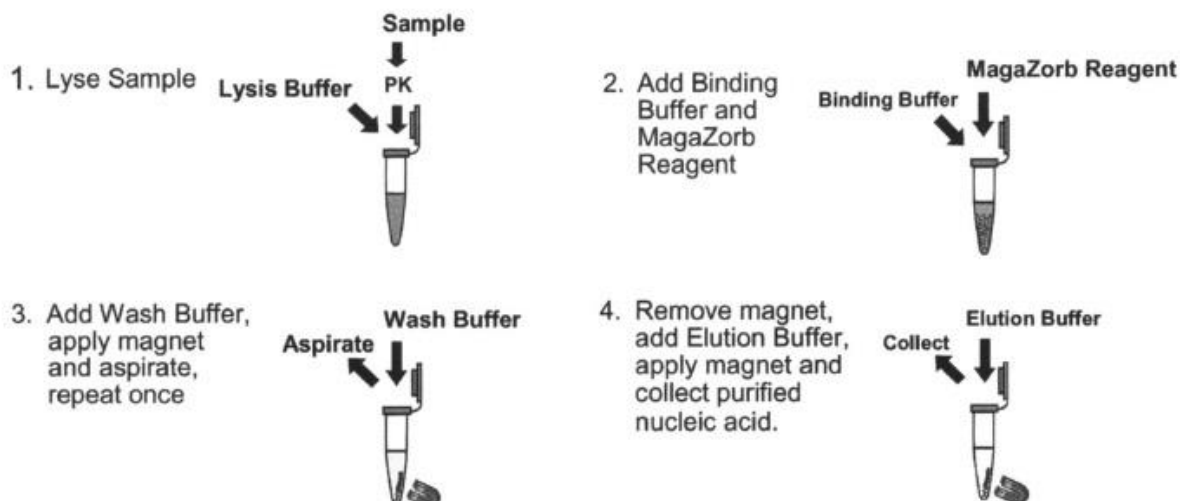
Nové trendy v oblasti izolace jsou metoda MagaZorb a technika purifikace celulózovým proužkem.

3.3.1 MagaZorb

MagaZorb je technika vyvinuta k účinné izolaci virových NK, která je důležitým krokem v diagnostice viru. Jednoduchost, rychlost, absence náročných zařízení nebo organických činidel patří mezi výhody této metody. K provedení metody je třeba mít k dispozici magnet. Z těchto důvodů metodu lze použít i v chudších zemích. Metodu lze použít v manuální, poloautomatizované nebo plně automatizované platformě.

Princip techniky je založen na specifické reakci mezi NK a proprietárními magnetizovatelnými částicemi v přítomnosti speciálně upravených pufrů. Metoda byla vymyšlena tak, aby reakce nebyla závislá na chotropních činidlech.

Následující postup popisuje Obr. 15. V prvním kroku se smíchá vzorek s pufrem určeným k lyzi buněk. Po lyzi buněk dochází k uvolnění NK, které se poté vážou na MagaZorb magnetizovatelné částice přidávané v druhém kroku. V třetím kroku se systém promývá pufrem na vodní bázi. Aplikací magnetu dochází k zadržení navázaných NK a odstranění pouze nežádoucích částic. Izolované NK se eluují elučním pufrem a jsou připravené na další analýzu [60].

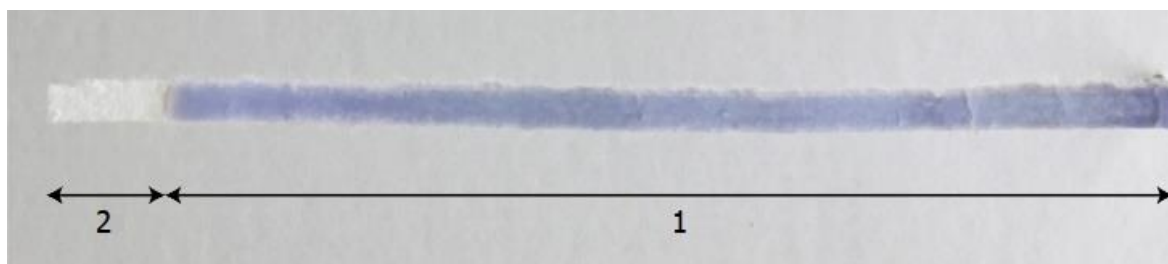


Obr. 15 Postup metody MagaZorb. Převzato a upraveno z [59]. 1. Lyse Sample = lyze vrozku, sample = vzorek, lysis buffer = pufr k lyzi; 2. Add binding buffer nd MagaZorb reagent = přidání pufru k vázání a MagaZorb reagentie, Bingin buffeř = pufr k vázání MagaZorb reagent = MagaZorb reagentie; 3. Add eash buffer, apply magnet ans aspirate, repeat once = přidání promývacího pufru, aplikace magnetu a spiratu, opakovat jednou, Wash buffeř = promývací pufr, aspirate = aspirát. 4. Remove magnet, add elution buffer, apply magnet and collect purified nucleic acid. Oddělat magnet, přidání elučního pufru, aplikace magnetu a sesbírání puřifikovaných NK, Elution buffeř = eluční pufr, collect = sesbírání.

3.3.2 Purifikace celulóovým proužkem

Tato metoda je jednoduchá, rychlá a není potřeba speciálních puřů nebo přístrojů na provedení purifikace. V závislosti na pandemii COVID-19 metodu lze provést v nelaboratorních podmínkách, např. na letišti. Princip purifikace NK je založen na vlastnostech celulózy. Celulóza má schopnost vázat NK z komplexního vzorku a následně po promytí je opět uvolnit. Proces purifikace je hotový do 30 sekund.

Využívá se celulóový proužek, který je rozdělen do dvou částí. Delší asi 50 mm dlouhá část je naimpregnována voskem, protože je určena pro držení proužku. Kratší část slouží k reakcím s NK. Obr. 16



Obr. 16 Celulóový proužek na purifikaci NK. Impregnovaná část (1), část na vázání NK (2). Převzato a upraveno z [60].

Postup práce je ve 3 krocích: namočení, promytí a amplifikace. Namocněním proužku do lyzátu dochází k navázání NK na celulókový povrch. Proužek dokáže nasát až 4 μ l vzorku. Poté je proužek ponořen do promývacího pufru, aby došlo k odstranění kontaminantů, které mohou ovlivnit amplifikační proces. V posledním kroku je proužek opět ponořen, tentokrát do amplifikační reakce, čímž dojde k eluci NK. Eluát je přenesen přímo k PCR reagentům s primery a může být následně detekován.

Výzkumná skupina zjistila, že k nejlepšímu promytí stačí proužek ponořit pětkrát do 10 mM TAE pufru. Čím větší kontaminace vzorku, tím je doporučeno vícekrát ponořit proužek do pufru. K nejlepším výsledkům amplifikace výzkum přišel ponořením proužku patnáctkrát [61].

3.4 Mikrofluidní zařízení

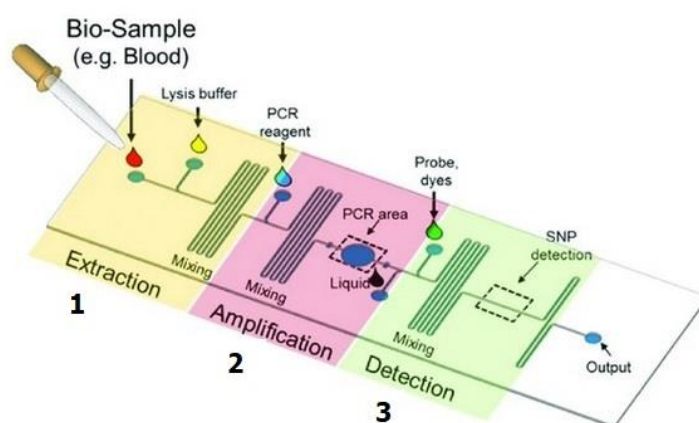
Tento trend zahrnuje celý postup identifikace NK, od extrakce po detekci. Miniaturizace je klíčový trend v moderních metodách. Miniaturizací systémů dochází k urychlení metody a zjednodušení práce. Technologie mikrofluidiky umožňuje výhodné zpracování vzorků nebo činidla malého objemu. Obecně mikrofluidní zařízení můžeme rozdělit dle principu: na základě kanálek nebo na základě papíru. Papírová mikrofluidika je vyrobena z celulózových nebo nitrocelulózových vláken, které vedou kapalinu absorpcí. Kanálkový systém může být vytvořen například 3D tiskárnou [62, 63].

Velká revoluce přichází s tzv. laboratoří na čipu (lab-on-chip = LOC) (Obr. 17), která představuje mikrosystém schopný pojmout celý proces v laboratoři do jednoho čipu. Toto je umožněno díky mikrofluidním kanálkům a aktivním a pasivním složkám jako např. filtry nebo směšovače.

LOC je multifunkční technologie zahrnující přípravu vzorku, vlastní reakci a detekci. Sekce přípravy vzorku (Obr. 17 krok 1) zahrnuje postup od lyze vzorku, jeho extrakci a očištění. Principy lyze a extrakce jsem zmiňovala v předešlé kapitole.

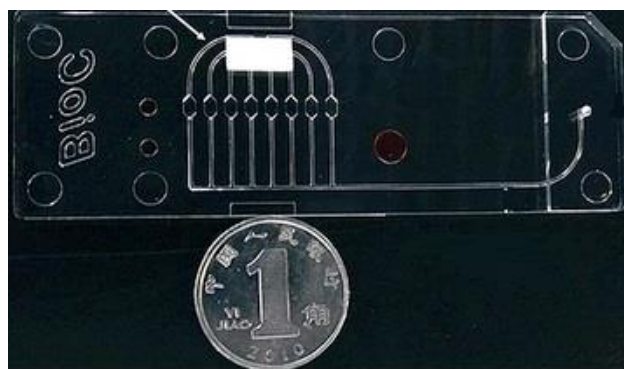
Amplifikace cílové sekvence (Obr. 17 krok 2) je důležitá při detekci stopových množství NK, čímž dojde ke zlepšení citlivosti a selektivity molekulární detekce. V tomto procesu se využívá metoda PCR, hybridizace a další, např. izotermální amplifikace.

Výsledná detekce signálu (Obr. 17, krok 3) probíhá fluorescenční, elektrochemickou nebo kolorimetrickou cestou. Nejvíce využívaná metoda k detekci signálu je fluorescenční technika. Její princip spočívá ve využití fluorescenčních barviv, u kterých po ozáření diodou vyzařující světlo s vlnovou délkou menší než 490 nm, dochází k emisi fluorescenčního záření. Elektrochemická detekce je založena na bázi elektrod. Iontově-membránový senzor udává posun křivky napětí, čímž získáváme výsledná data. Kolorimetrická detekční technika detekuje reakci kovových indikátorů, barviv nebo zlatých nanočástic s NK. Barevná změna je viditelná pouhým okem [62–66].



Obr. 17 Schématické zobrazení LOC. Převzato a upraveno z [63]. Extraction = extrakce; Amplification = amplifikace; Detection = detekce; bio-sample, e.g blood = biologický vzorek př, krev; lysis buffer = lyzující pufr; PCR reagent = PCR reagent; PCR are = PCR prostor; probe, dyes = sonda, barviva; mixing = míchání; output = výsledek.

Pro představu, jakou velikost má LOC a jak zásadní miniaturizaci touto technologií dochází, je přiložen Obr. 18, kde je viditelné porovnání s mincí. Je jasné, že objemy použitých vzorků a činidel jsou udávány v μl .



Obr. 18 Reálné porovnání LOC s mincí. Převzato a upraveno z [66].

V souvislosti s pandemií COVID-19 se stále vyvíjí nejlepší LOC zařízení pro rychlé a citlivé stanovení přítomnosti SARS-CoV-2.

Závěr

Na začátku práce jsou uvedené klíčové informace k pochopení základních principů nových metod izolace a detekce virových NK. Čtenář potřebuje nejdříve porozumět struktuře virů a NK. Struktura virů je popsána v kapitole **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, která obsahuje zahrnuje vzhled virionu a vnitřní složení, což představují NK. Struktura NK je popsána v následující kapitole **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Tato kapitola vysvětluje základní typy NK, jejich složení a princip vytváření vláken DNA a RNA. Dále je důležité pochopit replikační cyklus virionu, což je popsáno v kapitole **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, kde jsou vysvětleny jednotlivé replikační kroky a rozdíly v replikaci DNA a RNA virů.

Pro porovnání jsou v práci uvedeny v kapitole **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** stávající metody izolace a detekce NK. V kapitole **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** je vysvětleno jakým způsobem se z virionů izolují NK, které se dají následně detekovat. Základní metody detekce NK jsou PCR, microarray, sekvenování nové generace a elektroforéza. Jejich princip je formulován v kapitole 2.2.

Na závěr práce jsou uvedeny nové trendy v izolaci a detekci NK. Porovnání jednotlivých trendů není možné, protože každý má své přínosy a jsou založeny na různých principech. Miniaturizační trend má velkou výhodu v převedení všech laboratorních postupů od izolace až po detekci na malý čip za použití malých objemů vzorku a činidel. Detekční metoda STOP-Covid patří mezi CRISPR techniky. Byla vyvinuta v důsledku pandemie COVID-19 a umožňuje detekovat přítomnost SARS-CoV-2 do 40 minut. Jako další metoda pro detekci SARS-CoV-2 byla vyvinuta technika RADICA, která se vyznačuje kvalitativními a kvantitativními výsledky. Trend biosensorů umožňuje převedení na lépe detekovatelný signál. Technika MagaZorb využívaná k izolaci NK a metoda purifikace pomocí celulózového proužku se vyznačují v provedení bez použití nákladných přístrojů a jsou možné pro klinické využití v chudších zemích, popř. v terénu.

SEZNAM LITERATURY

- [1] KHARE, Reeti. *Guide to clinical and diagnostic virology*. Washington, DC: ASM Press, 2019. ISBN 978-1-55581-994-1.
- [2] ROSSMANN, M. G. a Venigalla B. RAO, ed. *Viral molecular machines*. New York: Springer, 2012. Advances in experimental medicine and biology, 726. ISBN 978-1-4614-0979-3.
- [3] MATEU, Mauricio G. *Structure and physics of viruses: an integrated textbook*. New York: Springer, 2013. ISBN 978-94-007-6551-1.
- [4] CELER, Vladimír a Vladimír CELER. *Obečná virologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2010. ISBN 978-80-87009-70-3.
- [5] GERCZEI FERNANDEZ, Timea a Scott PATTISON. *Biochemistry Laboratory Manual For Undergraduates: an Inquiry-Based Approach*. Berlin: De Gruyter Open, 2014. ISBN 978-3-11-041132-4.
- [6] ALEXANDERSEN, Soren, Anthony CHAMINGS a Tarka Raj BHATTA. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nature Communications* [online]. 2020, **11**(1), 6059 [vid. 2021-07-22]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-19883-7
- [7] GLICK, Bernard R., T. L. DELOVITCH a Cheryl L. PATTEN. *Medical biotechnology*. Washington, DC: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-705-3.
- [8] JONES, Jennifer E., Valerie LE SAGE a Seema S. LAKDAWALA. Viral and host heterogeneity and their effects on the viral life cycle. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, **19**(4), 272–282 [vid. 2021-05-19]. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-00449-9
- [9] SAMJI, Tasleem. Influenza A: understanding the viral life cycle. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2009, **82**(4), 153–159. ISSN 1551-4056.
- [10] HARRISON, Stephen C. Viral membrane fusion. *Virology* [online]. 2015, **479–480**, 498–507 [vid. 2021-05-19]. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2015.03.043
- [11] VALLBRACHT, Melina, Marija BACKOVIC, Barbara G. KLUPP, Felix A. REY a Thomas C. METTENLEITER. Common characteristics and unique features: A comparison of the fusion machinery of the alphaherpesviruses Pseudorabies virus and Herpes simplex virus. In: *Advances in Virus Research* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2021-06-07], s. 225–281. ISBN 978-0-12-818394-6. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aivir.2019.05.007
- [12] DECUZZI, P. a M. FERRARI. The Receptor-Mediated Endocytosis of Nonspherical Particles. *Biophysical Journal* [online]. 2008, **94**(10), 3790–3797 [vid. 2021-05-19]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.107.120238

- [13] RAMPERSAD, Sephra a Paula TENNANT. Replication and Expression Strategies of Viruses. In: *Viruses* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2021-05-21], s. 55–82. ISBN 978-0-12-811257-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811257-1.00003-6
- [14] MEHTA, S. C. a Ashutosh KAR. *Pharmaceutical pharmacology*. Tunbridge Wells, Kent: New Age Science, 2010. ISBN 978-1-906574-15-4.
- [15] PAYNE, Susan. Virus Interactions With the Cell. In: *Viruses* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2021-06-13], s. 23–35. ISBN 978-0-12-803109-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803109-4.00003-9
- [16] CANN, A.J. Replication of Viruses. In: *Encyclopedia of Virology* [online]. B.m.: Elsevier, 2008 [vid. 2021-06-13], s. 406–412. ISBN 978-0-12-374410-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012374410-4.00486-6
- [17] ALI, Nasir, Rita de Cássia Pontello RAMPAZZO, Alexandre Dias Tavares COSTA a Marco Aurelio KRIEGER. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International* [online]. 2017, **2017**, 1–13 [vid. 2021-05-29]. ISSN 2314-6133, 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2017/9306564
- [18] BOOM, R, C J SOL, M M SALIMANS, C L JANSEN, P M WERTHEIM-VAN DILLEN a J VAN DER NOORDAA. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1990, **28**(3), 495–503 [vid. 2021-05-31]. ISSN 0095-1137, 1098-660X. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.28.3.495-503.1990
- [19] SHIN, Jeong Hwan. Nucleic Acid Extraction Techniques. In: Yi-Wei TANG a Charles W. STRATTON, ed. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* [online]. Boston, MA: Springer US, 2013, s. 209–225. ISBN 978-1-4614-3970-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-3970-7_11
- [20] EMAUS, Miranda N., Marcelino VARONA, Derek R. EITZMANN, Shu-An HSIEH, Victoria R. ZEGER a Jared L. ANDERSON. Nucleic acid extraction: Fundamentals of sample preparation methodologies, current advancements, and future endeavors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **130**, 115985 [vid. 2021-05-29]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2020.115985
- [21] EL-ASHRAM, Saeed, Ibrahim AL NASR a Xun SUO. Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. *Biotechnology Reports* [online]. 2016, **12**, 33–39 [vid. 2021-05-29]. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2016.10.001
- [22] SHEHADUL ISLAM, Mohammed, Aditya ARYASOMAYAJULA a Ponnambalam SELVAGANAPATHY. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* [online]. 2017, **8**(3), 83 [vid. 2021-06-12]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi8030083
- [23] FLAENDER, Mélanie, Remco DEN DULK, Valentin FLEGEAU, Jérôme VENTOSA, Guillaume DELAPIERRE, Jean BERTHIER a Anne-Gaëlle BOURDAT. Grinding Lysis

- (GL): A microfluidic device for sample enrichment and mechanical lysis in one. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2018, **258**, 148–155 [vid. 2021-05-30]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2017.11.082
- [24] VIET-PHUONG LE, Anh, Dexing HUANG, Tony BLICK, Erik W. THOMPSON a Alexander DOBROVIC. An optimised direct lysis method for gene expression studies on low cell numbers. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1), 12859 [vid. 2021-05-30]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep12859
- [25] BROWN, Robert B a Julie AUDET. Current techniques for single-cell lysis. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2008, **5**(suppl_2) [vid. 2021-06-12]. ISSN 1742-5689, 1742-5662. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2008.0009.focus
- [26] TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, **2009**, 1–10 [vid. 2021-05-30]. ISSN 1110-7243, 1110-7251. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398
- [27] CHOMZYNSKI, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* [online]. 1987, **162**(1), 156–159 [vid. 2021-06-12]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1987.9999
- [28] ŻWIR-FERENC, Agata a Marek BIZIUK. Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2006, **15**(5).
- [29] POOLE, Colin F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2003, **22**(6), 362–373 [vid. 2021-05-31]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(03)00605-8
- [30] ESSER, Karl-Heinz, Wolfram H MARX a Thomas LISOWSKY. maxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods* [online]. 2006, **3**(1), i–ii [vid. 2021-06-01]. ISSN 1548-7091, 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth845
- [31] DEDERICH, D. A. Glass bead purification of plasmid template DNA for high throughput sequencing of mammalian genomes. *Nucleic Acids Research* [online]. 2002, **30**(7), 32e–332 [vid. 2021-05-31]. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/30.7.e32
- [32] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles: Sample Preparation. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(15), 2472–2485 [vid. 2021-06-01]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201300331
- [33] WIDEN, Raymond H. a Suzane SILBERT. Nucleic Acid Extraction in Diagnostic Virology. In: Michael J. LOEFFELHOLZ, Richard L. HODINKA, Stephen A. YOUNG a Benjamin A. PINSKY, ed. *Clinical Virology Manual* [online]. Washington, DC, USA: ASM Press, 2016 [vid. 2021-05-14], s. 117–128. ISBN 978-1-68367-069-8. Dostupné z: doi:10.1128/9781555819156.ch10

- [34] COURTNEY, Samantha J., Zachary R. STROMBERG a Jessica Z. KUBICEK-SUTHERLAND. Nucleic Acid-Based Sensing Techniques for Diagnostics and Surveillance of Influenza. *Biosensors* [online]. 2021, **11**(2), 47 [vid. 2021-06-21]. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios11020047
- [35] ZHAO, Yongxi, Xiaolei ZUO, Qian LI, Feng CHEN, Yan-Ru CHEN, Jinqi DENG, Da HAN, Changlong HAO, Fujian HUANG, Yanyi HUANG, Guoliang KE, Hua KUANG, Fan LI, Jiang LI, Min LI, Na LI, Zhenyu LIN, Dingbin LIU, Juwen LIU, Libing LIU, Xiaoguo LIU, Chunhua LU, Fang LUO, Xiuhai MAO, Jiashu SUN, Bo TANG, Fei WANG, Jianbin WANG, Lihua WANG, Shu WANG, Lingling WU, Zai-Sheng WU, Fan XIA, Chuanlai XU, Yang YANG, Bi-Feng YUAN, Quan YUAN, Chao ZHANG, Zhi ZHU, Chaoyong YANG, Xiao-Bing ZHANG, Huanghao YANG, Weihong TAN a Chunhai FAN. Nucleic Acids Analysis. *Science China Chemistry* [online]. 2021, **64**(2), 171–203 [vid. 2021-06-21]. ISSN 1674-7291, 1869-1870. Dostupné z: doi:10.1007/s11426-020-9864-7
- [36] HOLLISTER, Emily B., John P. BROOKS a Terry J. GENTRY. Nucleic Acid-Based Methods of Analysis. In: *Environmental Microbiology* [online]. B.m.: Elsevier, 2015 [vid. 2021-06-21], s. 271–305. ISBN 978-0-12-394626-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394626-3.00013-2
- [37] GILLESPIE, Simon. Current status of molecular microbiological techniques for the analysis of drinking water. In: *Molecular Microbial Diagnostic Methods* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2021-06-23], s. 39–58. ISBN 978-0-12-416999-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416999-9.00003-4
- [38] RASHID, Bushra, Tayyab HUSNAIN a Sheikh RIAZUDDIN. Genomic Approaches and Abiotic Stress Tolerance in Plants. In: *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance* [online]. B.m.: Elsevier, 2014 [vid. 2021-06-23], s. 1–37. ISBN 978-0-12-800876-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800876-8.00001-1
- [39] VAN DER VOSSSEN, J., B. KEIJSER, F. SCHUREN, A. NOCKER a R. MONTIJN. A comparison of molecular technologies and genotyping for tracing and strain characterization of *Campylobacter* isolates. In: *Tracing Pathogens in the Food Chain* [online]. B.m.: Elsevier, 2011 [vid. 2021-06-23], s. 263–274. ISBN 978-1-84569-496-8. Dostupné z: doi:10.1533/9780857090508.3.263
- [40] CORREIA, John J., ed. *Microtubules, in vitro*. 2. ed. Amsterdam Heidelberg: Elsevier, AP, 2013. Methods in cell biology, 115. ISBN 978-0-12-407757-7.
- [41] KODR, David, Cansu Pinar YENICE, Anna SIMONOVA, Dijana Pavlović SAFTIĆ, Radek POHL, Veronika SÝKOROVÁ, Mayreli ORTIZ, Luděk HAVRAN, Miroslav FOJTA, Zbigniew J. LESNIKOWSKI, Ciara K. O’SULLIVAN a Michal HOCEK. Carborane- or Metallacarborane-Linked Nucleotides for Redox Labeling. Orthogonal Multipotential Coding of all Four DNA Bases for Electrochemical Analysis and Sequencing. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2021, **143**(18), 7124–7134 [vid. 2021-07-07]. ISSN 0002-7863, 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.1c02222

- [42] SLATKO, Barton E., Andrew F. GARDNER a Frederick M. AUSUBEL. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 2018, **122**(1) [vid. 2021-06-25]. ISSN 1934-3639, 1934-3647. Dostupné z: doi:10.1002/cpmb.59
- [43] MACCANNELL, Duncan. Next Generation Sequencing in Clinical and Public Health Microbiology. *Clinical Microbiology Newsletter* [online]. 2016, **38**(21), 169–176 [vid. 2021-06-25]. ISSN 01964399. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinmicnews.2016.10.001
- [44] YLMAZ, Muhittin, Cem OZIC a Ihami GOK. Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. In: Sameh MAGDELDIN, ed. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* [online]. B.m.: InTech, 2012 [vid. 2021-06-25]. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné z: doi:10.5772/38654
- [45] KOPCHICK, John J., Bryan R. CULLEN a Dennis W. STACEY. Rapid analysis of small nucleic acid samples by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* [online]. 1981, **115**(2), 419–423 [vid. 2021-06-25]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(81)90027-0
- [46] BRADBURNE, C. Electrophoretic approaches to sample collection and preparation for nucleic acids analysis. In: *Biological Identification* [online]. B.m.: Elsevier, 2014 [vid. 2021-06-25], s. 355–369. ISBN 978-0-85709-501-5. Dostupné z: doi:10.1533/9780857099167.4.355
- [47] ISBIR, T., D. KIRAC, B. DEMIRCAN a B. DALAN. Gel Electrophoresis. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics* [online]. B.m.: Elsevier, 2013 [vid. 2021-06-25], s. 165–167. ISBN 978-0-08-096156-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00580-5
- [48] FREIJE, Catherine A. a Pardis C. SABETI. Detect and destroy: CRISPR-based technologies for the response against viruses. *Cell Host & Microbe* [online]. 2021, **29**(5), 689–703 [vid. 2021-07-08]. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2021.04.003
- [49] RAHMAN, Md. Rashidur, Md. Amjad HOSSAIN, Md. MOZIBULLAH, Fateh Al MUJIB, Afrina AFROSE, Md. SHAHED-AL-MAHMUD a Md. Aminul Islam APU. CRISPR is a useful biological tool for detecting nucleic acid of SARS-CoV-2 in human clinical samples. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2021, **140**, 111772 [vid. 2021-07-08]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2021.111772
- [50] KELLNER, Max J., Jeremy G. KOOB, Jonathan S. GOOTENBERG, Omar O. ABUDAYYEH a Feng ZHANG. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature Protocols* [online]. 2019, **14**(10), 2986–3012 [vid. 2021-07-08]. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/s41596-019-0210-2
- [51] JOUNG, Julia, Alim LADHA, Makoto SAITO, Michael SEGEL, Robert BRUNEAU, Mee-li W. HUANG, Nam-Gyun KIM, Xu YU, Jonathan LI, Bruce D. WALKER, Alexander L. GRENINGER, Keith R. JEROME, Jonathan S. GOOTENBERG, Omar O. ABUDAYYEH a Feng ZHANG. *Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK*

- diagnostics* [online]. preprint. B.m.: Infectious Diseases (except HIV/AIDS). 2020 [vid. 2021-07-08]. Dostupné z: doi:10.1101/2020.05.04.20091231
- [52] DING, Xiong, Kun YIN, Ziyue LI a Changchun LIU. *All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus* [online]. preprint. B.m.: Biochemistry. 2020 [vid. 2021-07-08]. Dostupné z: doi:10.1101/2020.03.19.998724
- [53] BROUGHTON, James P., Xianding DENG, Guixia YU, Clare L. FASCHING, Jasmeet SINGH, Jessica STREITHORST, Andrea GRANADOS, Alicia SOTOMAYOR-GONZALEZ, Kelsey ZORN, Allan GOPEZ, Elaine HSU, Wei GU, Steve MILLER, Chao-Yang PAN, Hugo GUEVARA, Debra A. WADFORD, Janice S. CHEN a Charles Y. CHIU. *Rapid Detection of 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Using a CRISPR-based DETECTR Lateral Flow Assay* [online]. preprint. B.m.: Infectious Diseases (except HIV/AIDS). 2020 [vid. 2021-07-08]. Dostupné z: doi:10.1101/2020.03.06.20032334
- [54] SULEMAN, Shariq, Sudheesh K. SHUKLA, Nitesh MALHOTRA, Shikandar D. BUKKITGAR, Nagaraj P. SHETTI, Roberto PILLOTON, Jagriti NARANG, Yen NEE TAN a Tejraj M. AMINABHAVI. Point of care detection of COVID-19: Advancement in biosensing and diagnostic methods. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2021, **414**, 128759 [vid. 2021-07-23]. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2021.128759
- [55] WU, Xiaolin, Joshua K. TAY, Chuan Keng GOH, Cheryl CHAN, Yie Hou LEE, Stacy L. SPRINGS, De Yun WANG, Kwok Seng LOH, Timothy K. LU a Hanry YU. Digital CRISPR-based method for the rapid detection and absolute quantification of nucleic acids. *Biomaterials* [online]. 2021, **274**, 120876 [vid. 2021-07-08]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2021.120876
- [56] WU, Xiaolin, Yie Hou LEE, Timothy K. LU a Hanry YU. *A Warm-start Digital CRISPR-based Method for the Quantitative Detection of Nucleic Acids* [online]. preprint. B.m.: Infectious Diseases (except HIV/AIDS). 2021 [vid. 2021-07-08]. Dostupné z: doi:10.1101/2021.06.10.21258725
- [57] SAADATI, Arezoo, Soodabeh HASSANPOUR, Miguel de la GUARDIA, Jafar MOSAFER, Mahmoud HASHEMZAIEI, Ahad MOKHTARZADEH a Behzad BARADARAN. Recent advances on application of peptide nucleic acids as a bioreceptor in biosensors development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **114**, 56–68 [vid. 2021-07-08]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.02.030
- [58] WANG, Joseph. DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review1This paper was a finalist for the Biosensors & Bioelectronics Award for the most original contribution to the Congress.1. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 1998, **13**(7–8), 757–762 [vid. 2021-07-08]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(98)00039-6

- [59] CADONI, Enrico, Alex MANICARDI a Annemieke MADDER. PNA-Based MicroRNA Detection Methodologies. *Molecules* [online]. 2020, **25**(6), 1296 [vid. 2021-07-22]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25061296
- [60] NARGESSI, Dokhi a Chin-Yih OU. MagaZorb: A Simple Tool for Rapid Isolation of Viral Nucleic Acids. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 2010, **201**(s1), S37–S41 [vid. 2021-07-08]. ISSN 0022-1899, 1537-6613. Dostupné z: doi:10.1086/650391
- [61] MASON, Michael G. a José R. BOTELLA. Rapid (30-second), equipment-free purification of nucleic acids using easy-to-make dipsticks. *Nature Protocols* [online]. 2020, **15**(11), 3663–3677 [vid. 2021-07-09]. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/s41596-020-0392-7
- [62] BASIRI, Arefeh, Arash HEIDARI, Melina Farshbaf NADI, Mohammad Taha Pahlevan FALLAHY, Sasan Salehi NEZAMABADI, Mohammadreza SEDIGHI, Amene SAGHAZADEH a Nima REZAEI. Microfluidic devices for detection of RNA viruses. *Reviews in Medical Virology* [online]. 2021, **31**(1), 1–11 [vid. 2021-07-07]. ISSN 1052-9276, 1099-1654. Dostupné z: doi:10.1002/rmv.2154
- [63] BRAGHERI, Francesca, Rebeca MARTÍNEZ VÁZQUEZ a Roberto OSELLAME. Microfluidics. In: *Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2021-07-07], s. 493–526. ISBN 978-0-12-817827-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-817827-0.00057-6
- [64] TARIM, E. Alperay, Betül KARAKUZU, Cemre OKSUZ, Oyku SARIGIL, Melike KIZILKAYA, Mahmoud Khatib A. A. AL-RUWEIDI, Huseyin Cagatay YALCIN, Engin OZCIVICI a H. Cumhur TEKIN. Microfluidic-based virus detection methods for respiratory diseases. *Emergent Materials* [online]. 2021, **4**(1), 143–168 [vid. 2021-07-07]. ISSN 2522-5731, 2522-574X. Dostupné z: doi:10.1007/s42247-021-00169-7
- [65] ZHANG, Lu, Baozhi DING, Qinghua CHEN, Qiang FENG, Ling LIN a Jiashu SUN. Point-of-care-testing of nucleic acids by microfluidics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2017, **94**, 106–116 [vid. 2021-07-07]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2017.07.013
- [66] ZHU, Hanliang, Zdenka FOHLEROVÁ, Jan PEKÁREK, Evgenia BASOVA a Pavel NEUŽIL. Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2020, **153**, 112041 [vid. 2021-07-08]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2020.112041

Seznam obrázků

Obr. 1	Strukturální příklady kapsid.....	11
Obr. 2	Struktura nukleotidů.....	12
Obr. 3	Schéma spojování nukleotidů vodíkovými můstky..	13
Obr. 4	Základní cyklus replikace virionů.....	15
Obr. 5	Vstup virionu do buňky endocytózou (a) nebo virovou fúzí (b).....	17
Obr. 6	Schéma replikace DNA a RNA virů.....	19
Obr. 7	Schéma uvolnění virionu z buňky pučením (A) nebo endocytózou (B).....	20
Obr. 8	Schéma metod buněčné lyze.....	22
Obr. 9	Schématické zobrazení extrakce na magnetickou pevnou fázi.....	26
Obr. 10	Schéma detekce NK metodou PCR.....	28
Obr. 11	Schématické provedení gelové elektroforézy.].....	30
Obr. 12	Zobrazení separované NK gelovou elektroforézou. Vizualizace činidlem EtBr (A). Po osvětlení UV lampou a vyfotografování (B).....	31
Obr. 13	Schématické porovnání CRISPR metod. Horní schéma zobrazuje metodu SHERLOCK (a) spodní schéma zobrazuje metodu DETECTR (b).	33
Obr. 14	Schématické zobrazení příkladu biosensoru.....	35
Obr. 15	Postup metody MagaZorb.....	36
Obr. 16	Celulózový proužek na purifikaci NK. Inpregnovaná část (1), část na vázání NK (2)	36
Obr. 17	Schématické zobrazení LOC.....	38
Obr. 18	Reálné porovnání LOC s mincí. Převzato a upraveno z [66].....	38

Seznam tabulek

Tabulka 1 Příklad uspořádání bází a polarita u specifických struktur virového cyklu.	14
---	----

Seznam zkratek

SARS-CoV-2 Koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem

DNA	Kyselina deoxyribonukleová
RNA	Ribonukleová kyselina
PCR	Polymerázová řetězová reakce
NK	Nukleová kyselina
CRISPR	Clustery pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice
RADICA	Rychlý digitální přístup CRISPR
mRNA	Messengerová RNA
ssRNA	Jednovláčková RNA
dsDNA	Dvouvláčková DNA
DdDp	DNA-dependentní DNA polymerázu
DdRp	DNA-dependentní RNA polymerázu
SDS	Sůl dodecylsulfátu
OH-	Hydroxidy
NaOH	Hydroxid sodný
CsCl	Chlorid cesný
EtBr	Ethidium borimidu
M	Kov
Cd	Kadmium
Co	Kobalt
Cu	Měď
NGS	Metoda sekvenování nové generace

S	Sekunda
cDNA	Fragmenty genomu určitého organismu
tzv.	Tak zvané
A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytozin
U	Uracil
EDTA	Kyselina ethylendiaminotetraoctová
UV	Ultrafialové
Cas	Proteiny spojené s CRISPR
RPA	Rekombinázové polymerázové amplifikace
PNA	Peptidová NK
LNA	Uzamčená NK – analog RNA
PTO	Fosforothiolát oligonukleotid
μl	Mikrolitr
mM	Milimol
LOC	Lab-on-chip
nm	Nanometr
miR	Mikro RNA
acpcPNA	D-prolyl-2- aminocyklopentanecarboxylové páteře
AgNF	Stříbrné nanopěny
3D	trojrozměrný

PPY polypyrrol