

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití modifikovaných oligonukleotidů jako specifických blokátorů PCR

Bc. Lenka Bubnová

Diplomová práce

2018

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Bubnová**
Osobní číslo: **C16473**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Využití modifikovaných oligonukleotidů jako specifických blokátorů PCR**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

- 1) Syntéza oligonukleotidů a typy modifikací
- 2) Potenciální modifikace oligonukleotidů chránící před exonukleázovou aktivitou
- 3) Real-time PCR

Experimentální část:

- 1) Vliv fosforothioátových oligonukleotidů na real-time PCR
- 2) Vliv O-Me-RNA oligonukleotidů na real-time PCR

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.

Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Pavel Flidr

GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

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



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích

Bc. Lenka Bubnová

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat PharmDr. Antonínu Librovi, Ph.D. a Mgr. Pavlovi Flídrovi za jejich vedení, odborné rady a vřelý přístup a pomoc, kterou mi poskytli v průběhu vypracování této práce a také ostatním zaměstnancům společnosti GENERI BIOTECH, s.r.o. Neméně významný dík patří též mé rodině, partnerovi a přátelům za jejich lásku, čas, podporu a důvěru, kterou do mě vkládali a které se mi dostalo, kdykoliv to bylo třeba.

ANOTACE

Tato práce se zabývá použitím různě modifikovaných oligonukleotidů jako specifických blokátorů PCR. Oligonukleotidy tvoří součást PCR reakční směsi a je sledován jejich vliv na průběh PCR reakce. Studovanými modifikacemi jsou fosforothioáty, 2'-O-Me-RNA, peptidové nukleové kyseliny a oligonukleotidy s 5'C18 spacerem.

KLÍČOVÁ SLOVA

PCR reakce, oligonukleotidy, modifikace, inhibice, fosforothioáty, 2'-O-Me-RNA, peptidové nukleové kyseliny, 5'C18 spacer

TITLE

Application of modified oligonucleotides as specific PCR blockers

ANNOTATION

The work deals with modified oligonucleotides as specific PCR blockers. Oligonucleotides are contained in PCR reaction mix and their effect during PCR reaction is monitored. Studied modifications are phosphorothioates, 2'-O-Me-RNA, peptide nucleic acids and oligonucleotides with 5'C18 spacer.

KEY WORDS

PCR reaction, oligonucleotides, modifications, inhibition, phosphorothioates, 2'-O-Me-RNA, peptide nucleic acids, 5'C18 spacer

OBSAH

0	ÚVOD	19
1	TEORETICKÁ ČÁST	21
1.1	Polymerázová řetězová reakce	21
1.1.1	Princip a provedení PCR.....	21
1.1.2	Real-Time PCR.....	23
1.2	Oligonukleotidy, jejich syntéza a modifikace	27
1.2.1	Syntéza oligonukleotidů	27
1.2.2	Modifikace oligonukleotidů.....	32
1.2.3	Potenciální modifikace oligonukleotidů chránící před exonukleázovou aktivitou.	33
2	CÍL PRÁCE	37
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	Metodika	38
3.1.1	Testované oligonukleotidy.....	38
3.1.2	Test inhibice různých koncentrací oligonukleotidů v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu	39
3.1.3	Test specifity inhibice vybraných oligonukleotidů na 2 různých systémech ve 2 koncentracích templátu	42
3.1.4	Test specifity inhibice vybraných oligonukleotidů na 4 různých systémech ..	46
3.1.5	Test inhibice oligonukleotidu PNA_GB_003 připravený pomocí pipetovací stanice	49
3.1.6	Zpracování a analýza dat	52
3.2	Výsledky	54
3.2.1	Fosforothioáty	54
3.2.2	2'O-Me-RNA.....	67
3.2.3	PNA	72
3.2.4	5' C18 spacer	77

4	DISKUZE A ZÁVĚR	82
5	POUŽITÁ LITERATURA	84
6	ZDROJE POUŽITÝCH OBRÁZKŮ.....	87
7	PŘÍLOHY	89
7.1	Naměřené Ct hodnoty	89
7.2	Vypočítané ΔCt a $\Delta\Delta Ct$ hodnoty.....	98

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 První cyklus PCR amplifikace	22
Obrázek 2 Exponenciální nárůst PCR produktů	22
Obrázek 3 Porovnání ideální a reálné amplifikace během qPCR	25
Obrázek 4 Průběh a kinetika qPCR	25
Obrázek 5 Struktura oligonukleotidu.....	27
Obrázek 6 Struktura fosforamiditových monomerů s ochrannými skupinami	29
Obrázek 7 Schéma fosforamiditové syntézy	31
Obrázek 8 Některé možné modifikace nukleotidu.....	33
Obrázek 9 Fosfodiesterová a fosforothioátová vazba	34
Obrázek 10 Struktura 2'-O-Methyl-RNA nukleotidu	35
Obrázek 11 Chemická struktura PNA a DNA	35
Obrázek 12 Různé pozice C18 spaceru uvnitř molekuly.....	36
Obrázek 13 Umístění vybraných oligonukleotidů v sekvenci templátové DNA.....	38
Obrázek 14 Schéma destičky pro test inhibice oligonukleotidů.....	41
Obrázek 15 Schéma destičky pro test specifity inhibice na 2 systémech se 2 různými koncentracemi templátu.....	45
Obrázek 16 Schéma destičky pro test specifity inhibice oligonukleotidu PNA_GB_003.....	45
Obrázek 17 Schéma destičky pro test specifity inhibice ve 4 různých systémech.	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled všech testovaných oligonukleotidů včetně jejich modifikací, typu purifikace, sekvence, délky a orientace.....	38
Tabulka 2 Oligonukleotidy a jejich měřené koncentrace. Měřeno v teplotním gradientu ve 2 různých koncentracích templátu.....	39
Tabulka 3 Oligonukleotidy a jejich měřené koncentrace pro test specifity inhibice. Měřeno na 2 různých systémech ve 2 různých koncentracích templátu.....	42
Tabulka 4 Pipetované objemy master mixu I, oligonukleotidu a vody pro jednotlivé alikvóty.....	51
Tabulka 5 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	89
Tabulka 6 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	89
Tabulka 7 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	89
Tabulka 8 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	89
Tabulka 9 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice na 4 systémech, systém hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.....	90
Tabulka 10 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice na 4 systémech, systém mGusb_Q2 a mSurf_Q1. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.....	90
Tabulka 11 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	90
Tabulka 12 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	90

Tabulka 13 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	90
Tabulka 14 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l	91
Tabulka 15 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice na 4 systémech, systém hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.....	91
Tabulka 16 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice na 4 systémech, systém mGusb_Q2 a mSurf_Q1. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.....	91
Tabulka 17 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U9 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l ..	91
Tabulka 18 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U9 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	91
Tabulka 19 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U9 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	92
Tabulka 20 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U7 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l	92
Tabulka 21 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U7 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l	92
Tabulka 22 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U6 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l ..	92
Tabulka 23 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U6 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.....	92

Tabulka 24 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U6 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	93
Tabulka 25 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U5 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	93
Tabulka 26 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U5 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	93
Tabulka 27 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P1 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l ..	93
Tabulka 28 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P1-A1 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l ..	94
Tabulka 29 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P2 v rámci testu inhibice, 1. měření Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	94
Tabulka 30 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P2 v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	94
Tabulka 31 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P5 v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	94
Tabulka 32 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P5 v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	95
Tabulka 33 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	95
Tabulka 34 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	95
Tabulka 35 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice připraveného robotickou pipetovací stanicí. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	95

Tabulka 36 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice připraveného robotickou pipetovací stanicí. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	96
Tabulka 37 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l	96
Tabulka 38 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l.	96
Tabulka 39 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_004 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l	96
Tabulka 40 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1531R3 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l ...	97
Tabulka 41 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1531R4 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l ..	97
Tabulka 42 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1531R5 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l ..	97
Tabulka 43 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1531R6 v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 2×10^2 kopií/ μ l ...	98
Tabulka 44 Δ Ct hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1932Z1 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	98
Tabulka 45 Průměrné $\Delta\Delta$ Ct hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice.	98
Tabulka 46 Průměrné $\Delta\Delta$ Ct hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice pro 3 různé systémy.	98
Tabulka 47 Δ Ct hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1932Z0 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	99
Tabulka 48 Průměrné $\Delta\Delta$ Ct hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice.	99
Tabulka 49 Průměrné $\Delta\Delta$ Ct hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice pro 3 různé systémy.	99

Tabulka 50 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1932U9 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	99
Tabulka 51 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U9 v rámci testu specifity inhibice.....	99
Tabulka 52 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U7 v rámci testu specifity inhibice.....	100
Tabulka 53 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1932U6 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	100
Tabulka 54 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U6 v rámci testu specifity inhibice.....	100
Tabulka 55 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu v rámci testu specifity inhibice.	100
Tabulka 56 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P1 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	101
Tabulka 57 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P1-A1 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	101
Tabulka 58 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P2 v teplotním gradientu při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.....	101
Tabulka 59 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P2 v teplotním gradientu při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.....	101
Tabulka 60 $\Delta\Delta C_t$ hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P5 v teplotním gradientu při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.....	102
Tabulka 61 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P5 v teplotním gradientu při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.....	102
Tabulka 62 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 v teplotním gradientu při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.....	102
Tabulka 63 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 v teplotním gradientu při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.....	102
Tabulka 64 Průměrné ΔC_t hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice připraveného robotickou pipetovací stanicí.	103

Tabulka 65 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu specifity inhibice.	103
Tabulka 66 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_004 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	103
Tabulka 67 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1531R3 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	103
Tabulka 68 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1531R4 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	104
Tabulka 69 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1531R5 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	104
Tabulka 70 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1531R6 v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu.	104

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	55
Graf 2 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	55
Graf 3 Průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice.	56
Graf 4 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	57
Graf 5 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	58
Graf 6 Průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice.	59
Graf 7 Průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice pro 4 různé systémy.	60
Graf 8 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U9 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	61
Graf 9 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U9 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	61
Graf 10 Průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U9 v rámci testu specifity inhibice.	62
Graf 11 Průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U7 v rámci testu specifity inhibice.	63
Graf 12 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U6 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	64
Graf 13 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U6 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	65
Graf 14 Průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U6 v rámci testu specifity inhibice.	66
Graf 15 Průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U5 v rámci testu specifity inhibice.	67

Graf 16 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	68
Graf 17 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	68
Graf 18 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P1-A1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	69
Graf 19 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P1-A1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	69
Graf 20 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P2 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	70
Graf 21 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P2 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	70
Graf 22 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P5 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	71
Graf 23 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P5 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	71
Graf 24 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	72
Graf 25 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	73
Graf 26 Průměrné ΔC_t hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice připraveného pomocí robotické pipetovací stanice.	74
Graf 27 Průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu specifity inhibice.	75
Graf 28 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_004 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	76
Graf 29 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_004 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	76
Graf 30 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R3 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	77

Graf 31 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R3 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	78
Graf 32 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R4 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	78
Graf 33 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R4 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	79
Graf 34 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R5 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	79
Graf 35 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R5 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	80
Graf 36 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R6 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.	80
Graf 37 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R6 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.	81

SEZNAM ZKRATEK

- AS – antisense orientace oligonukleotidu
- bp – páry bází (z angl. „base pairs“)
- Ct – prahový cyklus (z angl. „cycle treshold“)
- Δ Ct – rozdíl Ct hodnoty určité koncentrace oligonukleotidu a Ct hodnoty nulové koncentrace oligonukleotidu
- $\Delta\Delta$ Ct – rozdíl Δ Ct hodnot 2 různých systémů
- CPG – porézní sklo (z angl. „controlled pored glass“)
- DMT – 4,4-dimethoxytrityl
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l
- hCCL2 – gen pro lidský chemokinový (C-C motiv) ligand 2
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- IDT – Integrated DNA Technologies
- L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l
- MPPS – makroporézní polyester
- mAngptl3 – gen pro myší Angiopoetin-like protein 3
- mGusb – gen pro myší glukuronoxidázu beta
- mSurf1 – gen pro myší surfait gen 1
- O1 – oligonukleotid 1392Z0
- O2 – oligonukleotid 1392Z1
- PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. „polymerase chain reaction“)
- PNA – peptidová nukleová kyselina (z angl. „peptide nucleic acid“)
- PNP – polynukleotidová fosforyláza
- qPCR – kvantitativní PCR (z angl. „quantitative PCR“)
- RNA – ribonukleová kyselina
- tRNA – transferová RNA
- S – sense orientace oligonukleotidu

0 ÚVOD

Polymerázová řetězová reakce (PCR) představuje jeden ze základních nástrojů nejen molekulární biologie. Od jejího objevu Karym B. Mullisem v roce 1983 prošla řadou inovací a obměn. Jednou z nejvýznamnějších modifikací PCR je reakce je tzv. kvantitativní real-time PCR, která kromě namnožení vybrané sekvence nukleové kyseliny umožňuje i kvantitativní hodnocení v reálném čase.

PCR reakce je do určité míry velmi specifická. Při použití čistého vzorku templátové DNA, správných primerů a polymeráz a probíhající za optimálních podmínek dokáže velmi účinně namnožit vybrané sekvence. Ne vždy je ale tato podmínka splněna, vzorky jsou často tvořeny složitými matricemi, a tak je PCR ovlivňována různými dalšími látkami, a to převážně ve smyslu negativním, inhibujícím.

PCR může být inhibována specificky nebo nespecificky. Specifickou inhibicí se rozumí taková inhibice, která je závislá na sekvencích templátové DNA nebo primerů. V případě nespecifické inhibice pak nehrají sekvence templátu nebo primerů žádnou roli.

Tato práce se zabývá modifikovanými oligonukleotidy, které mají potenciál sloužit jako specifické inhibitory PCR. Na různých systémech bude ověřeno, zda-li opravdu dokáží PCR reakci inhibovat a pokud ano, tak jestli se jedná o inhibici specifickou.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR; z angl. *Polymerase-Chain Reaction*) je účinný nástroj používaný k rychlému namnožení (amplifikace) konkrétní nukleotidové sekvence DNA v prostředí *in vitro*. Světu byla představena v roce 1983 Karym B. Mullisem, který za ní v roce 1993 obdržel Nobelovu cenu (Šmarda, 2005; Mullis, 1994). V dnešní době je nezastupitelnou a jednou z nejpoužívanějších metod molekulární biologie.

1.1.1 Princip a provedení PCR

Metoda PCR vychází z přirozeného procesu buněčné replikace DNA, přičemž „podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy“ (Šmarda, 2005, s. 73).

Vybraná nukleotidová sekvence je ohraničena dvěma krátkými (obvykle nukleotidovými sekvencemi, tzv. primery, kdy každý z primerů nasedá na protilehlé vlákno mateřské DNA. Na primery jsou pak pomocí DNA-polymerázy připojovány další nukleotidy a dochází k syntéze nových vláken dle templátové sekvence.

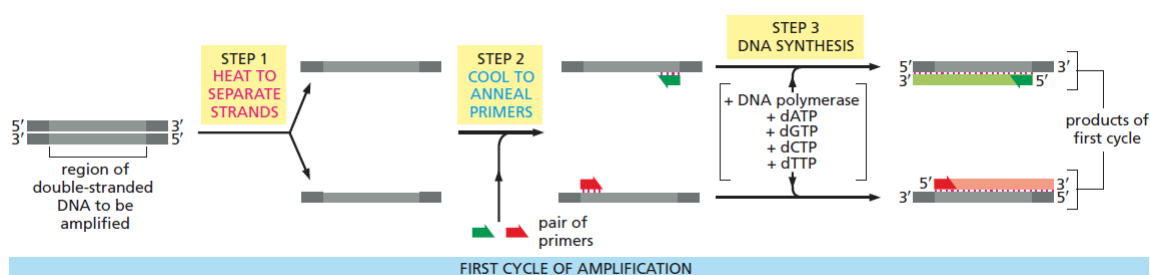
DNA-polymerázy používané pro PCR jsou izolované z termofilních mikroorganismů kvůli jejich stabilitě a odolnosti vůči vysokým teplotám. Nejznámější takovou termostabilní polymerázou je *Taq* Polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, jejíž teplotní optimum je 80 °C a odolává tak teplotě, při které dvouřetězcová DNA denaturuje (Chien, 1976). Další hojně používanou termostabilní polymerázou je *Pfu* DNA-polymeráza izolovaná z organismu *Pyrococcus furiosus* (Dorak, 2006).

Celý proces PCR je rozdělen do opakujících se cyklů, během kterých dochází k exponenciálnímu nárůstu množství PCR produktu (2^n , kde n je počet cyklů). Každý z cyklů je tvořen 3 základními kroky odrážející jednotlivé reakční děje s jiným teplotním optimumem (Šmarda, 2005):

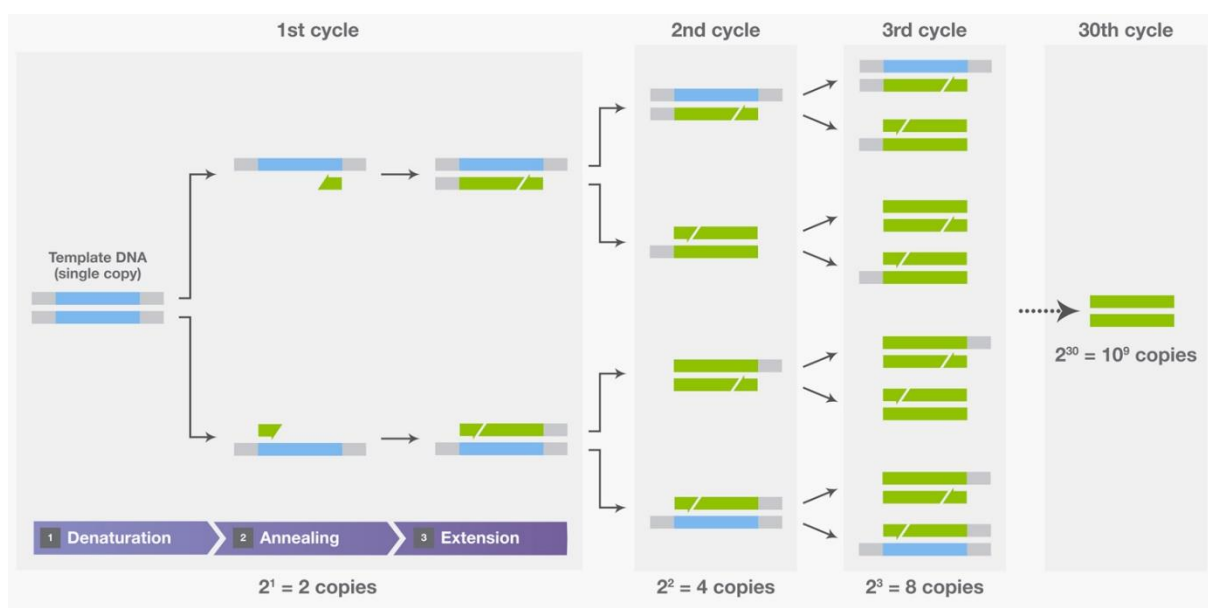
1. **Denaturace.** Při teplotě přibližně při 94 °C dochází k rozvolnění dvoušroubovice DNA a vznikají 2 samostatná vlákna. Důležitou roli hraje denaturace během prvního cyklu, proto je DNA zahřívána na vyšší teplotu po delší dobu (cca 2-5 min). Během

dalších cyklů je doba denaturace zkrácena na několik sekund, čímž se tolik nezatěžuje DNA-polymeráza a je možné provést větší počet cyklů.

2. **Nasednutí primerů** (tzv. annealing). Primery jsou komplementárně navázány na rozvolněná vlákna DNA. Teplota annealingu je volena v závislosti na použitých primerech (nesmí být větší, než je bot tání primerů). V dnešní době existuje řada nástrojů umožňujících podle různých algoritmů vypočítat ideální teplotu annealingu přímo pro konkrétní primery. Obvykle se tato teplota pohybuje přibližně mezi 30-65 °C (Rychlik, 1990).
3. **Syntéza DNA** (tzv. elongace). DNA-polymeráza nasedá na vlákno s hybridizovaným primerem a dle templátu syntetizuje nové vlákno DNA. Teplota tohoto kroku by měla odpovídat teplotnímu optimu použité DNA-polymerázy, přičemž bývá mezi 65-75 °C.



Obrázek 1 První cyklus PCR amplifikace (Alberts, 2014, s. 337).



Obrázek 2 Exponenciální nárůst PCR produktů (Thermo Fisher Scientific, nedatováno)

Výsledným produktem PCR reakce jsou tzv. amplikony, což jsou úseky DNA o přesně definované délce (desítky až tisíce párů bazí).

Reakční směsi pro PCR obsahují kromě již zmiňovaných primerů, polymeráz a templátu také nukleotidy, které slouží jako základní stavební jednotky pro syntézu DNA vláken, a ionty, především Mg^{2+} sloužící jako kofaktor DNA-polymeráz. Vodné prostředí je poté zajištěno pufrům.

Vlastní PCR reakce probíhají ve speciálních zařízeních zvaných termocykléry. Jsou to jakési teplotní inkubátory umožňující velmi rychlé a přesné změny teploty v různých časových intervalech dle nastaveného programu.

PCR představuje univerzální metodu pro takové sekvence DNA, u nichž známe alespoň počátek a konec. Nicméně je nutné, vzhledem k různorodosti použitých primerů a DNA-polymeráz, optimalizovat jednotlivé reakční podmínky, jako je teplota a doba jednotlivých kroků cyklu, koncentrace vstupního templátu, koncentrace hořčičných iontů atd (Šmarda, 2005).

1.1.2 Real-Time PCR

Real-Time PCR, pro své nejčastější použití nazývaná také kvantitativní PCR (qPCR), umožňuje sledovat množství vznikajícího produktu během jednotlivých cyklů v reálném čase bez nutnosti analyzovat výtěžek např. gelovou elektroforézou, jako je tomu u klasické PCR.

Detekce v real-time PCR:

V současnosti existuje mnoho metod, jak detekovat množství vznikající DNA. Jak uvádí Šmarda (2005) „Pro kvantitativní detekci produktu v průběhu PCR existují tři obecné metody založené na použití:

- interkalačního barviva vázající se na DNA,
- fluorescenčně značených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu,
- fluorescenčně značených primerů.“

Příkladem interkalačního barviva je fluorescenční kyanové barvivo SYBR® Green I (Molecular Probes Inc., Life Technologies Corporation), jež emituje zelené světlo ($\lambda_{max} = 520$ nm). Barvivo se váže na malý žlábek dsDNA molekuly a fluorescenčně aktivní je až po navázání na DNA. Jak roste množství amplikonů, zvyšuje se i množství barviva vázajícího se na DNA a tím roste množství emitované fluorescence. Dalším interkalačním

barvivem je dříve používaný ethidium bromid. Interkalační barviva, na rozdíl od fluorescenčních značek, se váží na DNA nespecificky, což může negativně ovlivnit výsledek PCR. Naopak, jejich výhodou je univerzální použití a lepší cenová dostupnost.

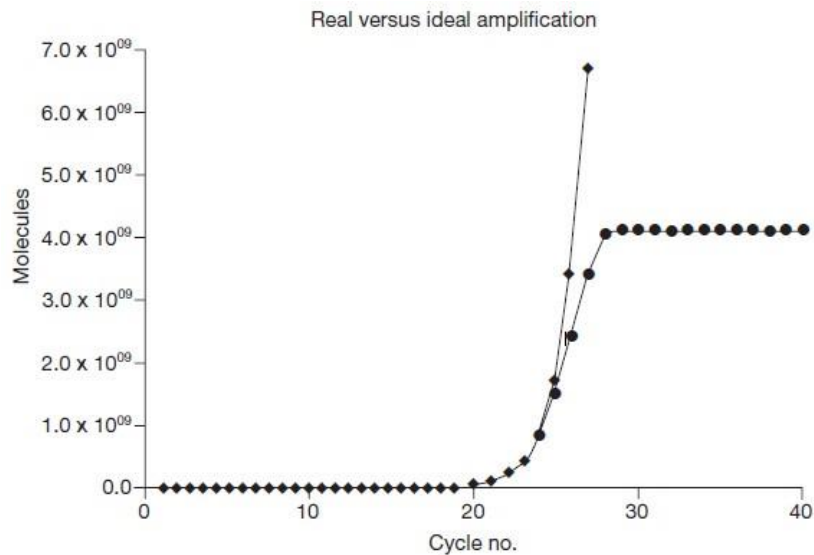
Jako fluorescenční značky primerů a sond se používají molekuly fluoroforů. Tyto molekuly jsou po předchozí absorpci světla určité vlnové délky schopné emitovat do svého okolí záření jiné (vyšší) vlnové délky.

Primer nebo sonda může být značena samotným fluoroforem nebo dvojicí fluorofor a tzv. zhášec, spojené krátkou sekvencí DNA. Ta drží obě molekuly blízko u sebe, přičemž zhášec přejímá energii fluoroforu a rozptyluje ji do okolí ve formě tepla nebo světla. Pokud je ale jedna z molekul od druhé oddálena (např. spojovací sekvence je degradována 5'-3' exonukleázovou aktivitou *Taq* polymerázy, případně je hybridizací s templátem rozvolněna do jiné konformace), zhášení fluoroforu je ukončeno a dochází k emisi fluorescence. Příkladem takových systémů jsou sondy TaqMan® (Roche Molecular Diagnostics a Applied Biosystems, nyní součást Thermo Fisher Scientific), sondy Molecular Beacons („molekulární majáky“), nebo např. bifunkční molekuly Scorpions® (Sigma-Aldrich, nyní Merck). Zhášení fluoroforu probíhá ve vzdálenostech 10 – 100 Å, což odpovídá vzdálenosti 1 – 5 nukleotidů. (The Polymerase Chain Reaction, 2005; Šmarda, 2005; Navarro, 2015; Mackay, 2002)

Kinetika qPCR reakce:

Průběh PCR je možné rozdělit do následujících fází:

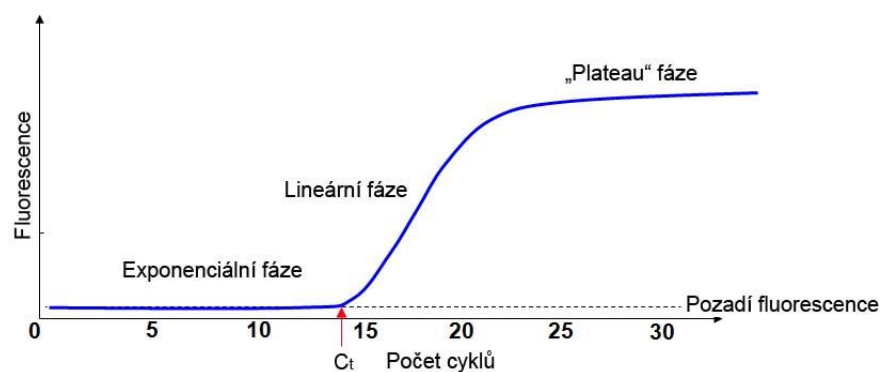
1. Fáze základní linie. Během této fáze dochází k prvním amplifikacím DNA, nicméně množství fluorescence je stále ještě nízké a nepřesahuje úroveň pozadí.
2. Exponenciální fáze. Dochází k exponenciálnímu nárůstu DNA a množství fluorescence nad práh pozadí. Fluorescence je již zaznamenávána detektorem. V ideálním případě (100% účinnost reakce) vznikají z každé molekuly templátu 2 nová vlákna DNA. Reálně ale není toto pravidlo splněno a amplifikační křivka se tak postupně mění z exponenciální na lineární (viz Obrázek 3).



Obrázek 3 Porovnání ideální a reálné amplifikace během qPCR (Dorak, 2006, s. 8).

3. Lineární fáze. Během této fáze dochází ke strmému nárůstu fluorescence, množství DNA je na vysoké úrovni.
4. Fáze plató. Z reakční směsi jsou postupně vyčerpávány jednotlivé komponenty, což má za následek výrazné zpomalení reakce. Vzhledem k tomu, že množství udávané fluorescence nemusí odpovídat reálnému množství přítomné DNA, je tato fáze nevhodná pro kvantifikaci.

(Šmarda, 2005; Dorak, 2006; Real-time PCR, 2014)



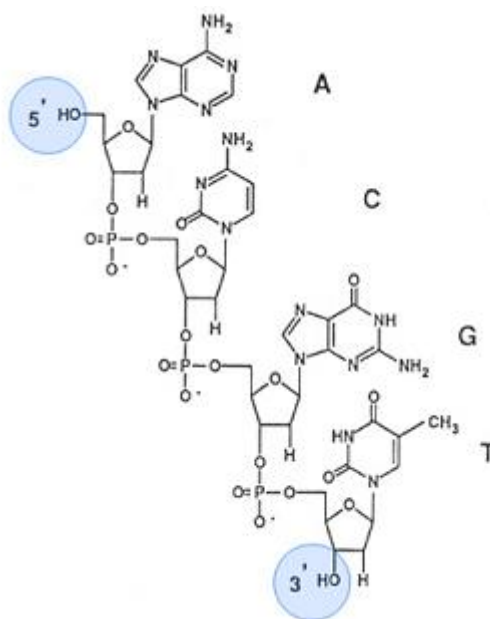
Obrázek 4 Průběh a kinetika qPCR (Real-time PCR, 2014)

Důležitým bodem v průběhu PCR reakce je číslo cyklu, během kterého fluorescence překročila práh pozadí a je již snímána detektorem. Tento bod označujeme jako C_t hodnotu

(z angl. „*cycle threshold*“), neboli prahová fluorescence. Ct hodnota částečně odráží množství DNA, které bylo původně ve vzorku. Čím více templátu je přítomno, tím rychleji narůstá fluorescence a tím dříve ji detektor zaznamená. Obecně tedy platí: čím nižší Ct hodnota, tím více vstupní DNA bylo ve vzorku a naopak. DNA s Ct hodnotou větší jak 38 můžeme považovat za kontaminaci. (What Is a Ct Value?, 2017)

1.2 Oligonukleotidy, jejich syntéza a modifikace

Oligonukleotidy jsou krátké a přesně definované sekvence nukleotidů (přibližně 20 až 30 bází) spojené fosfodiesterovou vazbou. Ta vzniká kondenzací hydroxyly fosfátové skupiny na 5' konci cukru jednoho nukleotidu a hydroxyly na 3' konci druhého nukleotidu. Jedná se o krátké úseky DNA, které postrádají koncové fosfátové skupiny. Struktura oligonukleotidu tvořeného 4 bázemi A (adenin), C (cytosin), G (guanin) a T (thymin) je znázorněna na Obrázku 5.



Obrázek 5 Struktura oligonukleotidu (Standard oligo structure, 2010)

Oligonukleotidy jsou používány napříč technologiemi molekulární biologie, kde se uplatňují především jako primery pro PCR. Kromě vědy a výzkumu se oligonukleotidy uplatňují také v medicíně, a to především v diagnostice a genové terapii, dále pak v genovém inženýrství, farmacii nebo ve forenzních vědách. Oligonukleotidy jsou syntetizovány tak, aby ve vzorcích prostřednictvím hybridizace rozpoznávaly komplementární sekvence nukleových kyselin. Využívají se jak samotné oligonukleotidy, tak i nukleotidy s různými modifikacemi. (Rehmann, 2004; Chemical Synthesis of Oligonucleotides, b.r.)

1.2.1 Syntéza oligonukleotidů

První syntézy oligonukleotidů probíhaly ve vodném prostředí, později pak na pevné fázi a byly založené na fosfotriesterových, nebo H-fosfonátových reakcích. Ačkoliv ještě stále mohou nacházet uplatnění (především při syntézách různých analogů), většina moderních syntéz je založena na reakcích s fosforamiditami (fosforamiditová syntéza). (Rehmann, 2004)

V dnešní době je velmi oblíbená komerční syntéza oligonukleotidů dle přání a potřeb zákazníka, kdy je zákazníkovi syntetizována požadovaná sekvence, případně i další modifikace. V současnosti se na trhu nachází mnoho společností zabývajících se individuální syntézou oligonukleotidů, jako je např. Integrated DNA Technologies (IDT), Invitrogen, Merck (dříve Sigma-Aldrich) a další (Rehmann, 2004). Zástupcem na českém trhu je pak Generi Biotech.

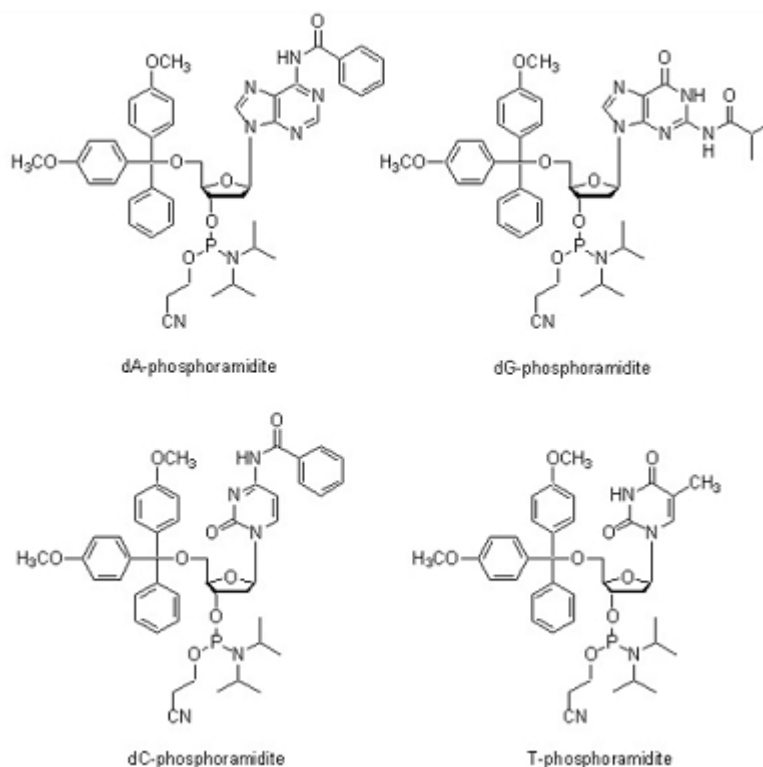
Fosforamiditová syntéza

Fosforamiditová syntéza je v současnosti nejpoužívanější metodou pro chemickou syntézu oligonukleotidů. Touto metodou je možné syntetizovat jak nemodifikované, tak i modifikované oligonukleotidy s délkou více jak 200 nukleotidů. (Rehmann, 2004)

Podstatou fosforamiditové syntézy je prodlužování řetězce postupným připojováním fosforamiditových monomerů. Jedná se o deriváty nukleotidů, jejichž reaktivní skupiny jsou chráněny proti případným vedlejším reakcím a napomáhají tak správné syntéze řetězce. Postupem času bylo vyvinuto několik metod a možností, jak chránit reaktivní skupiny, ale dnes se používají výhradně ty, které navrhl Khorana a kolektiv v roce 1963 (Schaller, 1963; Amarnath, 1977):

- Hydroxylová skupina na 5'C ribózy je chráněna 4,4-dimethoxytritylovou skupinou (DMT), která je labilní v kyselém prostředí.
- Exocyklické aminové skupiny jednotlivých bází jsou chráněny různými činidly: benzoyl je používán na ochranu adenin i cytosinu, acyl je vhodný pouze pro cytosin a guanin je chráněn isobutyrylem. Jelikož thymin ve své struktuře neobsahuje žádný exocyklický amin, není potřeba jej chránit.
- Hydroxylová skupina na 3'C ribózy je fosforylována, přičemž na ochranu vzniklé fosfátové skupiny se nejlépe osvědčil diisopropylamin a 2-cyanoethyl.

Chránicí skupiny jsou odstraněny v rámci syntézy (DMT), případně až na konci, kdy je již plně syntetizovaný řetězec oligonukleotidů. Struktura fosforamiditů s ochrannými skupinami je znázorněna na Obrázku 6.



Obrázek 6 Struktura fosforamiditových monomerů s ochrannými skupinami (Standard oligo structure, 2010)

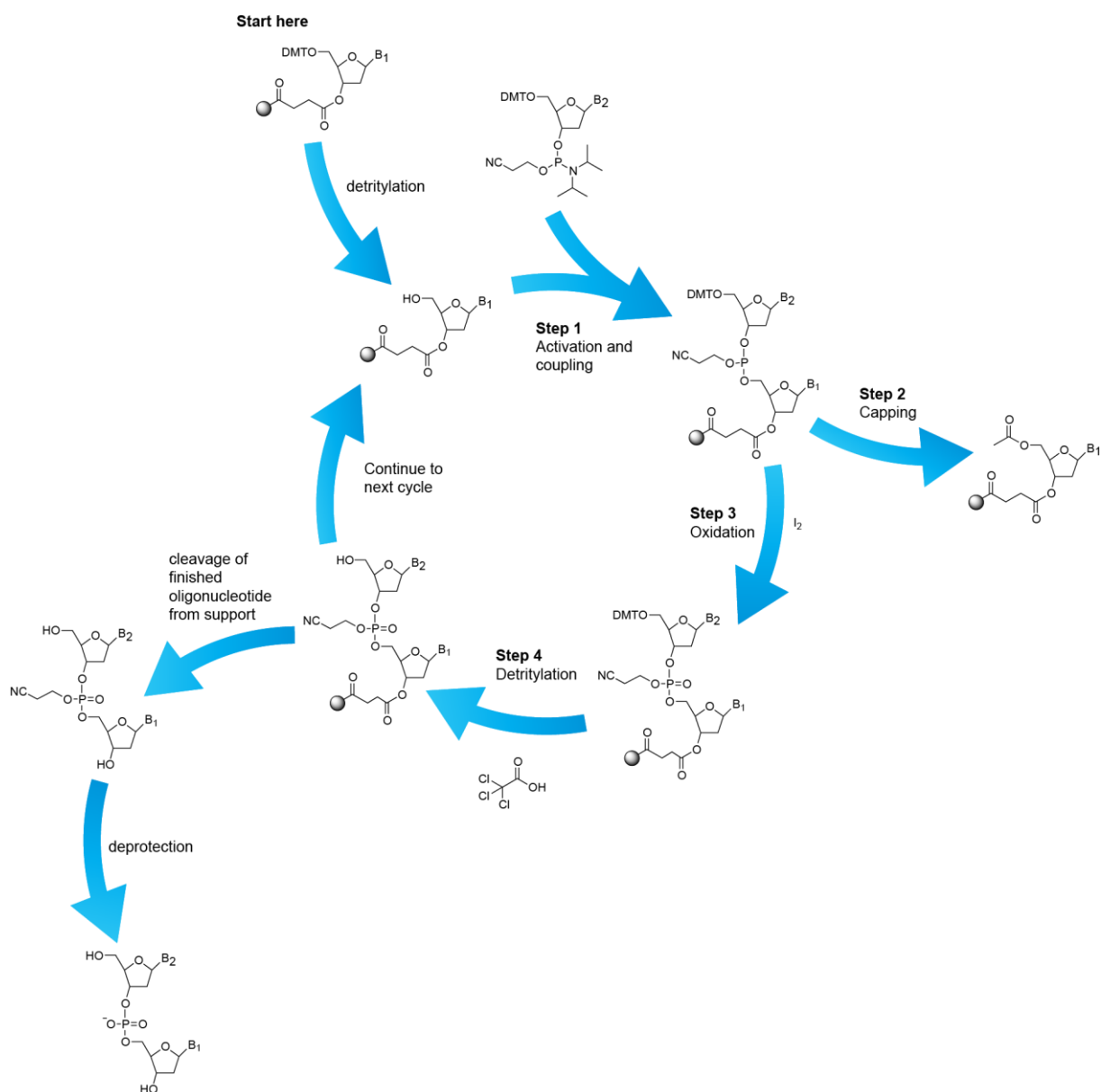
Syntéza oligonukleotidů probíhá na pevné fázi. Tou je nejčastěji porézní sklo (controlled pore glass – CPG) nebo makroporézní polystyren (MPPS). Na tuto pevnou je fázi je přes molekulární linker napojen počáteční (3'-terminální) nukleotid. (Rehmann, 2004) Vazba je tvořena reaktivní skupinou linkeru a 3' hydroxylem, přičemž celá syntéza probíhá ve směru $3' \rightarrow 5'$. (Chemical Synthesis of Oligonucleotides, b.r.)

Celý proces fosforamiditové syntézy je možné rozdělit do 4 kroků, které se cyklicky opakují. Jedná se o odblokování (detritylace), coupling, capping a oxidace. Během odblokování dochází působením kyseliny trichloroctové k odstranění 5'-DMT protektivní skupiny z již navázaného nukleotidu. Tím je odhalen reaktivní 5' hydroxyl, na který je možné v dalším kroku (coupling) navázat další nukleotid, resp. fosforamidit. Vazba fosforamiditu na volný hydroxyl vyžaduje přítomnost tetrazolu, díky kterému dochází k vytvoření tetrazolylového meziprojektu, který pak reaguje s volným hydroxylem za vytvoření dvojice nukleotidů spojených fosfit-triesterovou vazbou. Nezaregované 5' hydroxylové skupiny jsou během cappingu acylovány, čímž je zabráněno reaktivitě v dalším cyklu. Prodlužování tohoto řetězce by totiž vedlo k nespecifickým produktům s chybějící bází. Dalším krokem cyklu je oxidace fosfit-triesterové vazby na stabilnější fosfotriesterovou vazbu pomocí jódu. Fosfotriesterová

vazba zůstává chráněna cyanomethylem proti případným vedlejším reakcím. Po oxidaci následuje opět první krok syntézy, detritylace posledního navázaného nukleotidu.

V této fázi je možné navázat další fosforamidit a pokračovat tak v syntéze, nebo v případě, že jsou již navázány všechny nukleotidy ze sekvence, tuto syntézu ukončit. Nejprve je oligonukleotid působením hydroxidu amonného uvolněn z pevné fáze a poté je roztok s volnými oligonukleotidy zahříván. Tím dochází k postupnému rozrušení vazeb mezi chránícími skupinami a oligonukleotidem. Cyanoethyl a benzoylové skupiny chránící adenin a cytosin jsou uvolněny rychle, ale isobutyryl chránící guanin je vůči hydrolyze rezistentnější, proto je nutné roztok zahřívát po delší dobu. (Solid-phase oligonucleotide synthesis, 2005) Schéma celého procesu je znázorněno na Obrázku 7.

Syntetizované oligonukleotidy je potřeba před další aplikací přecistit, nejčastěji pomocí HPLC. (Rehmann, 2004; Chemical Synthesis of Oligonucleotides, b.r.)



Obrázek 7 Schéma fosforamiditové syntézy (Figure 1 | The phosphoramidite oligonucleotide synthesis cycle, b.r.)

Enzymatická syntéza

Kromě výše zmíněných chemických metod je možné oligonukleotidy syntetizovat také enzymaticky. První možností bylo použití pankreatické RNázy, která je za určitých specifikovaných podmínek schopna mezi nukleosid-2',3'-cyklickým fosfátem a nechráněným nukleosidem vytvořit internukleotidovou 3'–5' vazbu a syntetizovat tak krátké oligonukleotidy.

Větší rozvoj enzymatické syntézy nastal s objevem enzymu polynukleotidové fosforylázy (PNP), která v přímém směru katalyzuje přeměnu nukleosid 5'-difosfát na ribonukleotid. PNP velice těžko připojuje pouze jediný nukleosid 5'-difosfát, nicméně tento

problém byl vyřešen protektivní skupinou na 3' hydroxyly. Bohužel, tato metoda nikdy optimalizována pro syntézu delších oligonukleotidů.

Další možností, jak syntetizovat delší řetězec oligonukleotidů, je využít spojovací aktivity RNA ligázy a spojit vícero kratších oligonukleotidů v jeden delší řetězec. I u této metody je nutné ochránit 3' hydroxylovou skupinu. (Hogrefe, 2013)

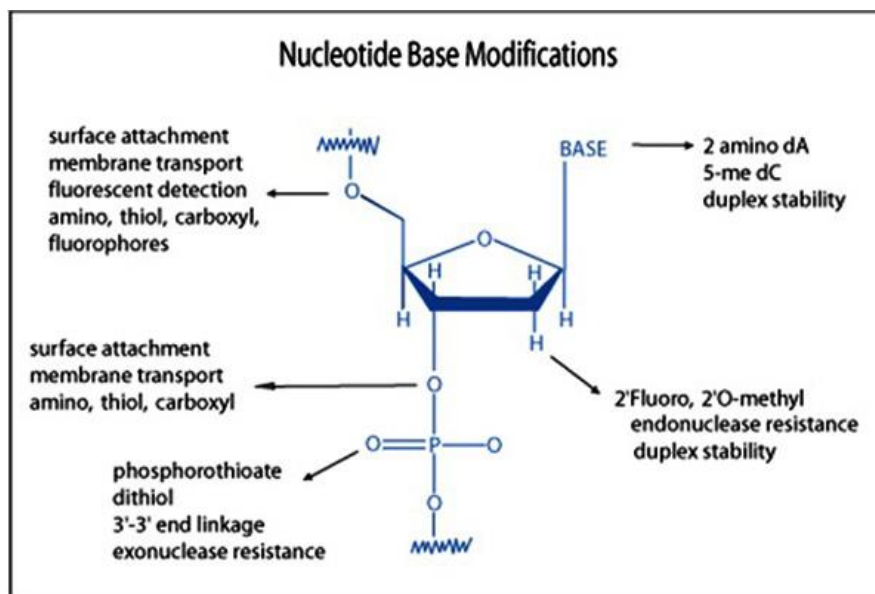
Automatizace syntéz

První oligonukleotidy byly syntetizovány manuálně. Na přelomu 80. a 90. let minulého století ale uvedla firma Applied Biosystems (dnes součást Thermo Fisher Scientific) přístroj schopný automatické syntézy oligonukleotidů, DNA/RNA synthesizer model 394. Od té doby prošly syntezátory velkým rozvojem a dnes je možné si vybrat z několika modelů různých firem. Převážná většina přístrojů syntetizuje oligonukleotidy prostřednictvím fosforamiditové metody. (Rehmann, 2004)

1.2.2 Modifikace oligonukleotidů

Syntetické oligonukleotidy, jak již bylo zmíněno výše, jsou široce využívány na poli molekulární biologie, především jako různé primery nebo sondy. Ve své přirozené podobě mají standardní vlastnosti, které jsou dány především jejich strukturou. Někdy je ale výhodné některé z těchto vlastností potlačit, nebo naopak posílit. Toho můžeme docílit prostřednictvím různých modifikací. Výsledkem tak může být například větší stabilita komplexu po hybridizaci, rezistence vůči nukleázové aktivitě polymeráz nebo možnost připojit oligonukleotid na různé povrchy. Modifikovat můžeme cukr-fosfátovou kostru na 3' nebo 5' konci i jednotlivé báze. Některé z možných modifikací a jejich umístění ve struktuře oligonukleotidu jsou znázorněny na Obrázku 8.

Modifikované oligonukleotidy jsou stejně jako nemodifikované komerčně dostupné a jejich syntéza často vychází z fosforamiditové metody. (Oligo Modifications for Increased Duplex Stability & Nuclease Resistance, 2018).



Obrázek 8 Některé možné modifikace nukleotidu (Oligo Modifications for Increased Duplex Stability & Nuclease Resistance, 2018)

1.2.3 Potenciální modifikace oligonukleotidů chránící před exonukleázovou aktivitou

Některé DNA polymerázy jsou schopné vlákna DNA nejen syntetizovat, ale také rozkládat (mají tzv. nukleázovou aktivitu). Rozlišujeme 2 typy nukleázové aktivity, a to podle toho, jestli degradace začíná na konci sekvence – tzv. exonukleázová aktivita, nebo uvnitř sekvence – tzv. endonukleázová aktivita. Exonukleázová aktivita je možná ve dvou směrech:

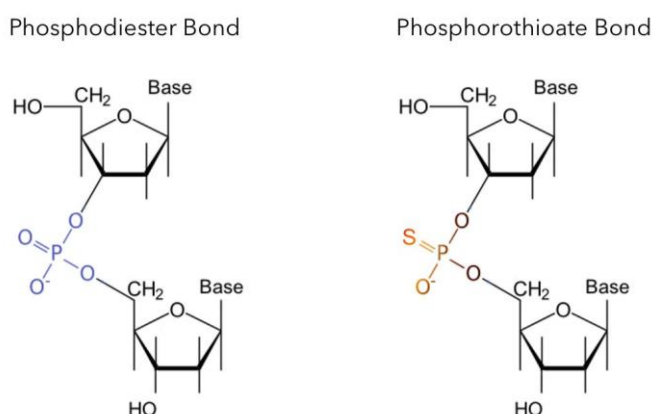
1. 3'-5' exonukleázová aktivita je nukleázová aktivita proti směru syntézy. Polymeráza tak zpětně degraduje řetězec, který nasyntetizovala. Tohoto jevu polymeráza využívá při opravách špatně inkorporovaných nukleotidů (tzv. „proofreading“).
2. 5'-3' exonukleázová aktivita je aktivita ve směru syntézy. Polymeráza je schopná degradovat již nasyntetizovaný řetězec a místo něho syntetizovat jiný.

Níže jsou popsány modifikace, které chrání nahybridizované oligonukleotidy před exonukleázovou aktivitou polymerázy a mají tedy potenciál inhibovat PCR reakci. Popsány jsou pouze modifikace relevantní pro vypracování této práce.

Fosforothioáty

Fosforothioáty jsou oligonukleotidy, v jejichž fosfodiesterové vazbě je jeden z ne vazebných kyslíků nahrazen za síru. Takto modifikovaná mezinukleotidová vazba je

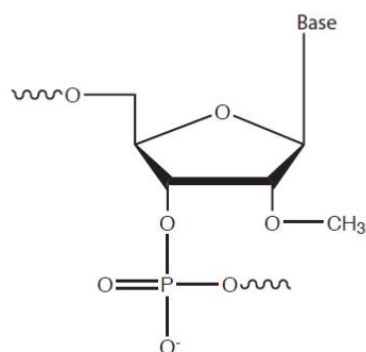
rezistentní vůči nukleázové degradaci, zároveň ale mají tyto oligonukleotidy, v porovnání s oligonukleotidy obsahující fosfodiesterovou vazbou, nižší afinitu vůči cílové sekvenci. Je možné modifikovat pouze vybrané vazby (vznikají tak tzv. „smíšené fosforothioáty“) nebo všechny možné vazby v oligonukleotidu (tzv. „čistý fosforothioát“). Zároveň je možné tuto modifikaci kombinovat s některými dalšími modifikacemi, např. s 2'-O-Me modifikací. (Modifikace oligo, 2018; Oligo Modifications for Increased Duplex Stability & Nuclease Resistance, 2018; Oligo modifications that block nuclease degradation, 2018)



Obrázek 9 Fosfodiesterová a fosforothioátová vazba (Know Your Oligo Mod: Phosphorothioate Bonds, 2018)

2'-O-Methyl-RNA

V případě, že není potřeba zachovat hydroxy skupinu na 2'C cukru, je možné pro zvýšení nukleázové rezistence nahradit vodík této skupiny za methyl. Přirozeně se tato modifikace vyskytuje jako pstranskripční modifikace RNA, např. u tRNA a jiných malých RNA molekul. Synteticky modifikované 2'-O-Me-RNA oligonukleotidy jsou chemicky i teplotně stabilnější než samotné RNA molekuly. Tuto modifikaci je možné doplnit také fosforothioátovou vazbou (tzv. „chimérické oligonukleotidy“), čímž je nukleázová rezistence ještě více umocněna. Používá se především pro antisense aplikace. (Oligo Modifications for Increased Duplex Stability & Nuclease Resistance, 2018)

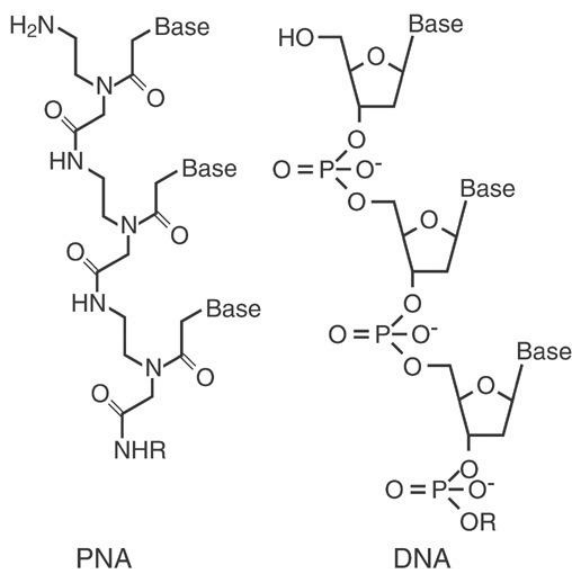


Obrázek 10 Struktura 2'-O-Methyl-RNA nukleotidu (Figure 2. 2'-O-Methyl RNA, 2018)

Peptidová nukleová kyselina

Peptidová nukleová kyselina (PNA) je uměle syntetizovaný polymer, strukturně podobný nukleovým kyselinám. Cukr-fosfátová kostra nukleových kyselin je nahrazena opakujícími se jednotkami N-(2-aminoethyl)-glycinu navzájem spojených peptidovou vazbou. Každá glycinová jednotka nese jednu ze čtyř dusíkatých bází, jako je tomu u nukleových kyselin, a díky tomu je možné PNA s nimi na základě komplementarity hybridizovat.

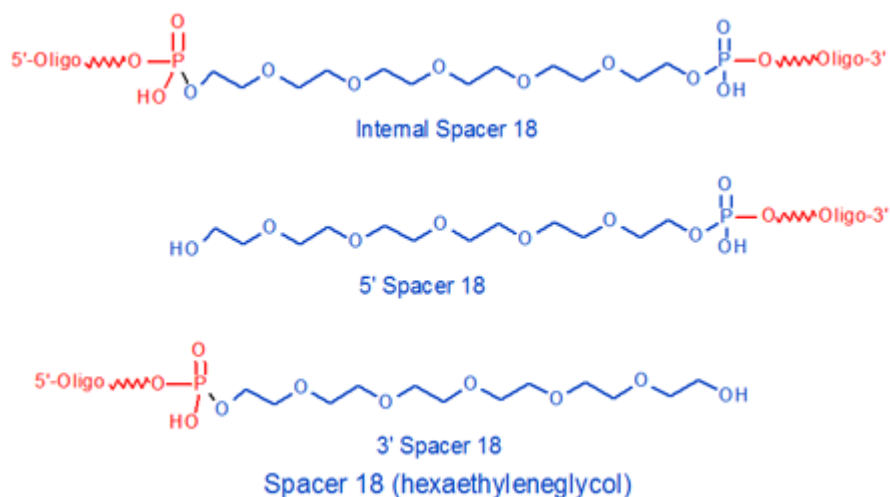
PNA-DNA duplexy jsou oproti odpovídajícím DNA-DNA duplexům mnohem stabilnější a zároveň DNA polymerázy nedokáží PNA rozpoznat jako primer. Díky tomu mají vysoký potenciál specificky snižovat efektivitu PCR. Tento jev je znám jako „PNA zprostředkovaný PCR clamping“. (PNA PCR Blockers, 2018)



Obrázek 11 Chemická struktura PNA a DNA (Leukemia, 2004)

C18 spacer

C18 spacer je molekula hexaethylen glykolu, tvořená 12 atomy uhlíku a 6 atomy kyslíku. Jako taková může být inkorporována na libovolné místo uvnitř oligonukleotidu (tzv. interní C18 spacer), nebo na jeden z jeho konců. Poté hovoříme o 5' C18 spaceru (navázaný na 5' konec oligonukleotidu) a 3' C18 spaceru (navázaný na 3' konec oligonukleotidu). Spacery obecně slouží především pro připevnění oligonukleotidu k povrchu, nebo na tvorbu různých větvení a smyček. 3' spacery mohou zároveň sloužit jako stérická zábrana exonukleázové a polymerázové aktivity. (C18 spacer, 2018; Spacer C18 Oligo Modifications, 2018)



Obrázek 12 Různé pozice C18 spaceru uvnitř molekuly. (Spacer-18-(hexaethyleneglycol), 2018)

2 CÍL PRÁCE

Tato práce má za cíl zjistit, zda některá z modifikací oligonukleotidů má vliv na průběh PCR reakce, resp. zda-li tuto reakci specificky inhibuje. Tento jev je sledován prostřednictvím real-time PCR, kdy se případná inhibice projeví sníženou intenzitou fluorescenčního signálu. Testovanými modifikovanými oligonukleotidy jsou fosforothioáty, 2'-*O*-Methyl-RNA, peptidová nukleová kyselina (PNA) a oligonukleotidy s 5' C18 spacerem. Oligonukleotidy jsou testovány v různých koncentracích, za různých teplot a v prostředí 2 koncentrací templátové DNA.

Přestože primárními sledovanými parametry je vliv typu modifikace a koncentrace oligonukleotidu v různých prostředích templátu, byly v práci testovány oligonukleotidy s různě dlouhými sekvencemi a různou orientací, jako další z možných vlivů na inhibici PCR. Sledován byl také případný vliv způsobu purifikace použitý při přípravě oligonukleotidů.

Dílčí cíle:

1. Zjistit, zda-li mají modifikované oligonukleotidy inhibující účinek na PCR reakci.
2. Pomocí různých systémů odhalit, zda-li je tato inhibice specifická, či nikoliv.
3. Zhodnotit výsledky inhibice mezi jednotlivými oligonukleotidy i v rámci typů modifikace.
4. Pro oligonukleotidy s pozitivním výsledkem specifické inhibice získat statisticky hodnotitelná data.

Nejprve budou proměřeny různé koncentrace oligonukleotidů v teplotním gradientu a za různých koncentrací templátové DNA. V případě pozitivní inhibice budou vybrané koncentrace oligonukleotidu proměřeny také v prostředí dalších nespecifických systémů, které umožní odhalit specifitu inhibice. Pro oligonukleotidy s pozitivním výsledkem inhibice budou získány data, která mohou být statisticky zhodnocena.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

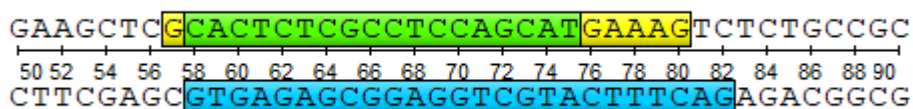
3.1 Metodika

3.1.1 Testované oligonukleotidy

V následující Tabulce 1 je uveden seznam všech testovaných oligonukleotidů, včetně typu modifikace, způsobu purifikace, sekvence, délky (počet bází) a orientace. Pod pojmem „standardní“ purifikace se rozumí, že oligonukleotid je zbaven pouze chemických nečistot, tj. chránících skupin a přebytku solí. (Purifikace oligo, 2018) Obrázek 13 pak znázorňuje umístění vybraných oligonukleotidů v sekvenci templátové DNA.

Oligonukl.	Modifikace	Purifikace	Sekvence	Délka	Orient.
1392Z1	Fosforothioáty*	HPLC	GACTTTCATGCTGGAGGCGAGAGTG	25	AS
1392Z0	Fosforothioáty*	HPLC	GACTTTCATGCTGGAGGCG	19	AS
1392U9	Fosforothioáty*	HPLC	GACTTTCATGCTGGAG	16	AS
1392U7	Fosforothioáty*	standardní	GACTTTCATGCTGGAGGCGAGAGTG	25	AS
1392U6	Fosforothioáty*	standardní	GACTTTCATGCTGGAGGCG	19	AS
1392U5	Fosforothioáty*	standardní	GACTTTCATGCTGGAG	16	AS
1410P1	O-Me-RNA*	standardní	UCGCCUCCAGCAUGAAAG	18	S
1410P1-A1	O-Me-RNA*	HPLC	UCGCCUCCAGCAUGAAAG	18	S
1410P2	O-Me-RNA*	standardní	GCACUCUCGCCUCCAGCAUGAAAG	24	S
1410P5	O-Me-RNA*	standardní	CUUUCAUGCUGGAGGCGAGAGUGC	24	AS
PNA_GB_003	PNA	HPLC	CACTCTCGCCTCCAGCAT	18	S
PNA_GB_004	PNA	HPLC	CTCGCCTCCAGC	12	S
1531R3	5' C18*	standardní	GACTTTCATGCTGGAGGCGAGAGTG	25	AS
1531R4	5' C18*	standardní	GACTTTCATGCTGGAGGCG	19	AS
1531R5	5' C18*	standardní	CACTCTCGCCTCCAGCATGAAAGTC	25	S
1531R6	5' C18*	standardní	CGCCTCCAGCATGAAAGTC	19	S

Tabulka 1 Přehled všech testovaných oligonukleotidů včetně jejich modifikací, typu purifikace, sekvence, délky a orientace. Oligonukleotidy označené * mají navíc 3'-amino C7 spacer modifikaci. (S – sense, AS – antisense)



Obrázek 13 Umístění vybraných oligonukleotidů v sekvenci templátové DNA. Žlutá – oligonukleotid 1410P2, zelená – oligonukleotid PNA_GB_003, modrá – oligonukleotid 1392Z1 s 1531R3 (Vlastní tvorba)

3.1.2 Test inhibice různých koncentrací oligonukleotidů v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu

V následující tabulce jsou uvedeny veškeré oligonukleotidy, které byly tímto způsobem testovány, včetně všech jejich měřených koncentrací.

		Koncentrace templátu 2E5 kopií/μl							Koncentrace templátu 2E2 kopií/μl																	
Koncentrace oligonukleotidu [nM]		0	12,5	25	50	100	200	400								0	12,5	25	50	100	200	400				
Oligonukleotid	1932 Z0	•	•	•	•	•	•	•								•	•	•	•	•	•	•				
	1932 Z1	•		•	•	•	•	•								•		•	•	•	•	•				
	1932 U6	•		•	•	•	•	•								•		•	•	•	•	•				
	1932 U9	•		•	•	•	•	•								•		•	•	•	•	•				
Koncentrace oligonukleotidu [nM]		0	10	25	64	160	250	400	500	1000	2000	4000	0	10	25	64	160	250	400							
Oligonukleotid	1410 P1	•	•	•	•	•	•	•					•	•	•	•	•	•	•							
	1410 P1-A1	•	•	•	•	•	•	•					•	•	•	•	•	•	•							
	1410 P2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•							
	1410 P5	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•							
Koncentrace oligonukleotidu [nM]		0	25	50	100	200	400	600	800	1000								0	25	50	100	200	400	600	800	1000
Oligon.	PNA_GB_003	•	•	•	•	•	•	•	•	•								•	•	•	•	•	•	•	•	•
	PNA_GB_004	•	•	•	•	•	•	•										•	•	•	•	•	•			
Koncentrace oligonukleotidu [nM]		0	200	400	600	800	1000								0	200	400	600	800	1000						
Oligonukleotid	1531 R3	•	•	•	•	•	•								•	•	•	•	•	•						
	1531 R4	•	•	•	•	•	•								•	•	•	•	•	•						
	1531 R5	•	•	•	•	•	•								•	•	•	•	•	•						
	1531 R6	•	•	•	•	•	•								•	•	•	•	•	•						

Tabulka 2 Oligonukleotidy a jejich měřené koncentrace (označeno tečkou). Měřeno v teplotním gradientu ve 2 různých koncentracích templátu.

Testované systémy

hCCL2_Q1:

- Templát: G096 (Generi Biotech)
- Forward primer: hCCL2_Q1#1, 0599T6 (Generi Biotech)

- Reverse primer: hCCL2_Q1#2, 0599T7 (Generi Biotech)
- Sonda: hCCL2_Q1#P, 0603M0, značení FAM-BHQ1 (Generi Biotech)

Použité reagensie a roztoky

- Mix GB 4 mM (Generi Biotech)
- Zásobní roztok templátové DNA
- Zásobní roztoky oligonukleotidů (Generi Biotech)
- Zásobní roztoky forward a reverse primerů
- Zásobní roztok sondy
- Ultračistá a sterilizovaná voda (Generi Biotech)

Laboratorní vybavení a pomůcky

- Laminární box
- Termocyklér CFX96 Touch™ Systém a příslušný software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad)
- Velkoobjemová laboratorní centrifuga Eppendorf 5810 (Eppendorf)
- Minicentrifuga Z 100 M (HERMLE Labortechnik)
- Třepačka Vortex V-1 plus (Biosan)
- Plastová 96 jamková PCR destička (Thermo Fisher Scientific)
- Stojánek na PCR destičku
- Krycí fólie na PCR destičku (Thermo Fisher Scientific)
- Hladítko na krycí fólii
- Automatické mikropipety různých objemů (Eppendorf)
- Pipetovací špičky PCR clean s duálním filtrem různých objemů (Eppendorf)
- Zamrazovací mikrozkuřavky
- Mikrozkuřavky různých objemů
- Stojany na mikrozkuřavky
- Nůžky

Postup

1. Veškeré reagensie byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.

2. V rámci přípravy první reakce byl zásobní roztok templátu o koncentraci 1×10^7 kopií/ μl (odpovídá 2×10^5 kopií/ μl v reakci) naředěn na koncentraci 1×10^4 kopií/ μl (odpovídá 2×10^2 kopií/ μl v reakci). Během dalších reakcí byl tento krok přeskočen a použit již naředěný templát.
3. Ředěním zásobního roztoku oligonukleotidu byla připravena koncentrační řada složená z 5 vybraných koncentrací oligonukleotidu. Naředěné oligonukleotidy byly promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.
4. Smícháním 566,8 μl vody, forward a reverse primerů oba po 25 μl , 16,7 μl sondy a 833,5 μl Mixu GB 4nM byl připraven master mix I. Připravený master mix I byl promíchán na třepačce a krátce stočen v minicentrifuze.
5. Dále byly připraveny 2 alikvóty master mixu II o dvou různých koncentracích templátu. Každý alikvót byl připraven smícháním 698,5 μl master mixu I a 15,9 μl templátu o příslušné koncentraci. Oba připravené alikvóty master mixu II byly promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.
6. Každý alikvót master mixu II byl po 113,4 μl rozpipetován do 6 mikrozkušavek, ke kterým bylo přidáno po 12,6 μl oligonukleotidu o dané koncentraci nebo vody jako negativní kontrola. Veškeré mikrozkušavky byly promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.
7. Každá mikrozkušavka byla rozpipetována po 20 μl na PCR destičku s vynecháním druhého a předposledního řádku tak, aby každý sloupec obsahoval jednu koncentraci oligonukleotidu, příp. vody. Schéma rozpipetování mikrozkušavek na destičku je znázorněno na Obrázku 13.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Templát 2×10^5 kopií/ μl					Templát 2×10^2 kopií/ μl						
		0	C1	C2	C3	C4	C5	0	C1	C2	C3	C4	C5
A	65,0 °C
B	64,5 °C												
C	63,3 °C
D	61,4 °C
E	59,0 °C
F	57,0 °C
G	55,7 °C												
H	55,0 °C

Obrázek 14 Schéma destičky pro test inhibice oligonukleotidů. C1 - C5 představují jednotlivé koncentrace oligonukleotidu, přičemž C1 je nejvyšší koncentrace a C5 je nejnižší koncentrace. Zaplněné jamky jsou označeny tečkou. (Vlastní tvorba)

8. Destička byla přelepena PCR folií, hladítkem uhlazena a přebytečné konce folie byly nůžkami odříznuty. Destička byla krátce stočena v centrifuze a vložena do cykléru.
9. Byl spuštěn software Bio-Rad CFX Manager a v něm byl vybrán a spuštěn PCR program s teplotním gradientem:

Název programu: 2step_G2

95 °C	3 min		
95 °C	10 sec	50x	←
55 – 65 °C	20 sec		

Kanály: QuickPlate_96 well_SYBR Only

Skenovací mód: SYBR/FAM Only

10. Po ukončení PCR programu byla destička vyjmuta ze cykléru a zlikvidována.
11. Získaná data byla hodnocena v softwaru a exportována do sešitu Excel pro další zpracování.
12. Nařaděné oligonukleotidy a nespotřebované chemikálie byly zamrazeny pro další použití.

3.1.3 Test specifity inhibice vybraných oligonukleotidů na 2 různých systémech ve 2 koncentracích templátu

Testované oligonukleotidy

V následující tabulce jsou uvedeny veškeré oligonukleotidy, které byly tímto způsobem testovány, včetně všech jejich měřených koncentrací.

Koncentrace [nM]		9,6	24	26	60	64	100	150	160	200	400	600	800
Oligonukleotid	1932 Z0			•		•			•		•		
	1932 Z1	•	•		•			•					
	1932 U5					•			•		•		
	1932 U6					•			•		•		
	1932 U7		•		•			•					
	1932 U9			•		•			•		•		
	PNA_GB_003							•			•	•	•

Tabulka 3 Oligonukleotidy a jejich měřené koncentrace (označeno tečkou) pro test specifity inhibice. Měřeno na 2 různých systémech ve 2 různých koncentracích templátu.

Testované systémy

hCCL2_Q1:

- Templát: G096 (Generi Biotech)
- Forward primer: hCCL2_Q1#1, 0599T6 (Generi Biotech)
- Reverse primer: hCCL2_Q1#2, 0599T7 (Generi Biotech)
- Sonda: hCCL2_Q1#P, 0603M0, značení FAM-BHQ1 (Generi Biotech)

mAngptl3_Q2:

- Templát: G111 (Generi Biotech)
- Forward primer: mAngptl3_Q2#1, 0601A9 (Generi Biotech)
- Reverse primer: mAngptl3_Q2#2, 0601B0 (Generi Biotech)
- Sonda: mAngptl3_Q2#P, 0607N2, značení FAM-BHQ1 (Generi Biotech)

Použité reagensie a roztoky

- Mix GB 4 mM (Generi Biotech)
- Zásobní roztoky templátové DNA
- Zásobní roztoky oligonukleotidů (Generi Biotech)
- Zásobní roztoky forward a reverse primerů
- Zásobní roztok sondy
- Ultračistá a sterilizovaná voda (Generi Biotech)

Laboratorní vybavení a pomůcky

- Laminární box
- Termocyklér CFX96 Touch™ Systém a příslušný software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad)
- Velkoobjemová laboratorní centrifuga Eppendorf 5810 (Eppendorf)
- Minicentrifuga Z 100 M (HERMLE Labortechnik)
- Třepačka Vortex V-1 plus (Biosan)
- Plastová 96 jamková PCR destička (Thermo Fisher Scientific)
- Stojánek na PCR destičku
- Krycí fólie na PCR destičku (Thermo Fisher Scientific)
- Hladítko na krycí fólii

- Automatické mikropipety různých objemů (Eppendorf)
- Pipetovací špičky PCR clean s duálním filtrem různých objemů (Eppendorf)
- Zamrazovací mikrozkuřavky
- Mikrozkuřavky různých objemů
- Stojany na mikrozkuřavky
- Nůžky

Postup

1. Veškeré reagenty byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.
2. V rámci přípravy první reakce byl zásobní roztok templátu systému mAngptl3-Q2 o koncentraci 1×10^7 kopií/ μl (odpovídá 1×10^5 kopií/ μl v reakci) naředěn na koncentraci 1×10^4 kopií/ μl (odpovídá 1×10^2 kopií/ μl v reakci). Během dalších reakcí byl tento krok přeskočen a použit již naředěný templát. Pro systém hCCL2_Q1 byl použit již naředěný templát z předchozích testů inhibice (viz kap. 2.1.1.).
3. Ředěním zásobního roztoku oligonukleotidu byly připraveny vybrané koncentrace 2 oligonukleotidů, naředěné oligonukleotidy byly promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.
4. Smícháním 517,6 μl vody a 1078,3 μl Mixu GB 4 mM byl připraven master mix I. Připravený master mix I byl promíchán na třepačce a krátce stočen v minicentrifuze.
5. Master mix I byl po 383,6 μl rozdělen na 4 alikvóty master mixu II. Do každého alikvótu bylo přidáno po 7,8 μl forward i reverse primeru a 5,2 μl sondy příslušného systému a 10,4 μl templátu o dané koncentraci tak, aby vznikly celkem 2 systémy, každý s 2 různými koncentracemi templátu. Připravené alikvóty master mixu II byly promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze
6. Jednotlivé alikvóty master mixu II byly po 16 μl rozpipetovány do 4 sektorů PCR destičky, jak je znázorněno na Obrázku 14.
7. Na destičku byly poté po 4 μl rozpipetovány jednotlivé koncentrace oligonukleotidů, případně vody jako negativní kontroly, a to tak, aby každý řádek obsahoval jeden oligonukleotid o dané koncentraci (příp. vodu), viz. Obrázek 14. Pro oligonukleotid PNA_GB_003 bylo vytvořeno mírně odlišné pipetovací schéma, kdy byly zaplňovány pouze řádky B-G, viz Obrázek 15. Celkový objem reakční směsi v jamce byl 20 μl .

Každá koncentrace oligonuklotidu obou systémů i koncentrací templátu byla měřena v triplikátu.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		systém hCCL2_Q1						systém mAngptl3_Q2					
		Templát 2E2 kopii/μl			Templát 2E5 kopii/μl			Templát 2E2 kopii/μl			Templát 2E5 kopii/μl		
A	O1, C1												
B	O1, C2												
C	O1, C3												
D	O1, C4												
E	0												
F	O2, C1												
G	O2, C2												
H	O2, C3												

Obrázek 15 Schéma destičky pro test specifity inhibice na 2 systémech se 2 různými koncentracemi templátu. O1 - oligonukleotid 1, O2 - oligonukleotid 2, C1-C4 - jednotlivé koncentrace oligonukleotidů. (Vlastní tvorba)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		systém hCCL2_Q1						systém mAngptl3_Q2					
		Templát 2E2 kopii/μl			Templát 2E5 kopii/μl			Templát 2E2 kopii/μl			Templát 2E5 kopii/μl		
A													
B	800 nM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
C	600 nM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
D	400 nM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
E	200 nM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
F	100 nM	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
G	0	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
H													

Obrázek 16 Schéma destičky pro test specifity inhibice oligonukleotidu PNA_GB_003. Zaplňované jamky jsou znázorněny tečkou. (Vlastní tvorba)

- Připravená destička byla přelepena PCR folií, hladítkem uhlazena a přebytečné konce folie byly nůžkami odstřiženy. Destička byla stočena v centrifuze a vložena do cykléru.
- Byl spuštěn příslušný software Bio-Rad CFX Manager a v něm byl vybrán a spuštěn následující PCR program:

Název programu: 2step_30

95 °C	3 min		
95 °C	10 sec	←	50x
60 °C	30 sec		

Kanály: QuickPlate_96 well_SYBR Only

Skenovací mód: SYBR/FAM Only

10. Po ukončení PCR programu byla destička vyjmuta ze cykléru a zlikvidována.
11. Získaná data byla hodnocena v softwaru a exportována do sešitu Excel pro další zpracování.
12. Nařaděné oligonukleotidy a nespotřebované chemikálie byly zamraženy pro další použití

3.1.4 Test specifity inhibice vybraných oligonukleotidů na 4 různých systémech

Testované oligonukleotidy

- 1392Z0 v koncentracích 10, 26, 64 a 160 nM
- 1392Z1 v koncentracích 64, 160 a 400 nM

Testované systémy

hCCL2_Q1:

- Templát: G096 (human) (Generi Biotech)
- Forward primer: hCCL2_Q1#1, 0599T6 (Generi Biotech)
- Reverse primer: hCCL2_Q1#2, 0599T7 (Generi Biotech)
- Sonda: hCCL2_Q1#P, 0603M0, značení FAM-BHQ1 (Generi Biotech)

mAngptl3_Q2:

- Templát: G111 (mouse) (Generi Biotech)
- Forward primer: mAngptl3_Q2#1, 0601A9 (Generi Biotech)
- Reverse primer: mAngptl3_Q2#2, 0601B0 (Generi Biotech)
- Sonda: mAngptl3_Q2#P, 0607N2, značení FAM-BHQ1 (Generi Biotech)

mSurf1_Q1:

- Templát: G130 (Generi Biotech)
- Forward primer: mSurf1_Q1#1, 0419M6 (Generi Biotech)
- Reverse primer: mSurf1_Q1#2, 0419M7 (Generi Biotech)
- Sonda: mSurf1_Q1#P, 0424Z5, značení FAM-BHQ1 (Generi Biotech)

mGusb_Q2:

- Templát: G107 (Generi Biotech)
- Forward primer: mGusb_Q2#1, 0604A1 (Generi Biotech)
- Reverse primer: mGusb_Q2#2, 0604A2 (Generi Biotech)
- Sonda: mGusb_Q2#P, 0607P7, značení FAM-BHQ1 (Generi Biotech)

Použité reagensie a roztoky

- Mix GB 4 mM (Generi Biotech)
- Zásobní roztoky templátové DNA
- Zásobní roztoky oligonukleotidů (Generi Biotech)
- Zásobní roztoky forward a reverse primerů
- Zásobní roztok sondy
- Ultračistá a sterilizovaná voda (Generi Biotech)

Laboratorní vybavení a pomůcky

- Laminární box
- Termocyklér CFX96 Touch™ Systém a příslušný software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad)
- Velkoobjemová laboratorní centrifuga Eppendorf 5810 (Eppendorf)
- Minicentrifuga Z 100 M (HERMLE Labortechnik)
- Třepačka Vortex V-1 plus (Biosan)
- Plastová 96 jamková PCR destička (Thermo Fisher Scientific)
- Stojánek na PCR destičku
- Krycí fólie na PCR destičku (Thermo Fisher Scientific)
- Hladítko na krycí fólii
- Automatické mikropipety různých objemů (Eppendorf)
- Pipetovací špičky PCR clean s duálním filtrem různých objemů (Eppendorf)
- Zamrazovací mikrozkušavky
- Mikrozkušavky různých objemů
- Stojany na mikrozkušavky
- Nůžky

Postup

1. Veškeré reagenty byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepače a krátce stočeny v minicentrifuze.
2. Ředěním zásobních roztoků byly připraveny vybrané koncentrace oligonukleotidů. Naředěné oligonukleotidy byly promíchány na třepače a krátce stočeny v minicentrifuze.
3. Smícháním 517,6 μl vody a 1078,3 μl Mixu GB 4nM byl připraven master mix I. Připravený master mix I byl promíchán na třepače a krátce stočen v minicentrifuze.
4. Master mix I byl po 383,6 μl rozdělen na 4 alikvóty master mixu II, pro každý systém 1 alikvót. Do každého alikvótu bylo přidáno po 7,8 μl forward i reverse primeru, 5,2 μl sondy a 10,4 μl tempátu o koncentraci 1×10^7 , vše příslušného systému. Připravené alikvóty master mixu II byly promíchány na třepače a krátce stočeny v minicentrifuze.
5. Jednotlivé alikvóty master mixu II byly po 16 μl rozpipetovány do 4 sektorů PCR destičky, jak je znázorněno na Obrázku 16.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Systém hCCL2_Q1			Systém mAngplt3_Q1			Systém mSurf1_Q1			Systém Gusb_Q2		
A	O1, 160 nM												
B	O1, 64 nM												
C	O1, 26 nM												
D	O1, 10 nM												
E	0												
F	O2, 400 nM												
G	O2, 160 nM												
H	O2, 64 nM												

Obrázek 17 Schéma destičky pro test specifity inhibice ve 4 různých systémech. O1 - oligonukleotid 1392Z0, O2 - oligonukleotid 1392Z1. (Vlastní tvorba)

6. Na destičku byly poté po 4 μl rozpipetovány jednotlivé koncentrace oligonukleotidů, případně vody jako negativní kontroly, a to tak, aby každý řádek obsahoval jeden oligonukleotid o dané koncentraci, příp. vodu (viz. Obrázek 16). Celkový objem reakční směsi v jamce byl tedy 20 μl . Každá koncentrace oligonukleotidu jednotlivých systémů byla měřena v triplicátu.
7. Připravená destička byla přelepena PCR folií, hladítkem uhlazena a přebytečné konce folie byly nůžkami odštířeny. Destička byla stočena v centrifuze a vložena do cykléru.
8. Byl spuštěn příslušný software Bio-Rad CFX Manager a v něm byl vybrán a spuštěn následující PCR program:

Název programu: 2step_30

95 °C	3 min	
95 °C	10 sec	← 50x
60 °C	30 sec	

Kanály: QuickPlate_96 well_SYBR Only

Skenovací mód: SYBR/FAM Only

- Po ukončení PCR programu byla destička vyjmuta ze cykléru a zlikvidována.
- Získaná data byla hodnocena v softwaru a exportována do sešitu Excel pro další zpracování.
- Nářaděné oligonukleotidy a nespotebované chemikálie byly zamrazeny pro další použití

3.1.5 Test inhibice oligonukleotidu PNA_GB_003 připravený pomocí pipetovací stanice

Testovaný oligonukleotid:

- PNA_GB_003 o koncentracích 0, 100, 200, 400, 600 a 800 nM

Testované systémy

hCCL2_Q1:

- Templát: G096 (Generi Biotech)
- Forward primer: hCCL2_Q1#1, 0599T6 (Generi Biotech)
- Reverse primer: hCCL2_Q1#2, 0599T7 (Generi Biotech)
- Sonda: hCCL2_Q1#P, 0603M0, značení FAM-BHQ1 (Generi Biotech)

Použité reagenty a roztoky

- Mix GB 4 mM (Generi Biotech)
- Zásobní roztok templátové DNA
- Zásobní roztok oligonukleotidu (Generi Biotech)
- Zásobní roztoky forward a reverse primerů
- Zásobní roztok sondy

- Ultračistá a sterilizovaná voda (Generi Biotech)

Laboratorní vybavení a pomůcky

- Laminární box
- Pipetovací stanice
- Termocyklér CFX96 Touch™ Systém a příslušný software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad)
- Velkoobjemová laboratorní centrifuga Eppendorf 5810 (Eppendorf)
- Minicentrifuga Z 100 M (HERMLE Labortechnik)
- Třepačka Vortex V-1 plus (Biosan)
- Plastová 96 jamková PCR destička (Thermo Fisher Scientific)
- Stojánek na PCR destičku
- Krycí fólie na PCR destičku (Thermo Fisher Scientific)
- Hladítko na krycí fólii
- Automatické mikropipety různých objemů (Eppendorf)
- Pipetovací špičky PCR clean s duálním filtrem různých objemů (Eppendorf)
- Zamrazovací mikrozkuhavky
- Mikrozkuhavky různých objemů
- Stojany na mikrozkuhavky
- Nůžky

Postup

1. Veškeré reagenty byly vyjmuty z mrazáku, vytemperovány na pokojovou teplotu, promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.
2. Zásobní roztok templátu o koncentraci 1×10^7 kopií/ μl byl naředěn na koncentraci 8×10^5 kopií/ μl (odpovídá 2×10^5 kopií/ μl v reakci) a 8×10^2 kopií/ μl (odpovídá 2×10^2 kopií/ μl v reakci). Naředěný templát byl promíchán na třepačce a krátce stočen v minicentrifuze.
3. Z obou roztoků templátu bylo odpipetováno 500 μl do další mikrozkuhavky. Vznikly tak celkem 4 vzorky templátu.
4. Zásobní roztok oligonukleotidu byl naředěn na koncentraci 5 μM . Naředěný roztok oligonukleotid byl promíchán na třepačce a krátce stočen v minicentrifuze.

5. Smícháním 121,7 μl vody, po 36,5 μl forward a reverse primerů, 24,3 μl sondy a 1217,2 μl Mixu GB 4nM byl připraven master mix I. Připravený master mix I byl promíchán na třepačce a krátce stočen v minicentrifuze.
6. Master mix I byl rozdělen na 6 alikvótů a do každého alikvótu byl přidán naředěný oligonukleotid a voda. Pipetované objemy master mixu I, oligonukleotidu a vody pro každý alikvót jsou uvedeny v Tabulce 4. Připravené alikvóty master mixu II byly promíchány na třepačce a krátce stočeny v minicentrifuze.

Alikvót	1	2	3	4	5	6
Koncentrace [nM]	0	100	200	400	600	800
Master mix I [μl]	342,0	171,0	171,0	342,0	171,0	171,0
Oligonukleotid [μl]	0	5,8	11,6	46,4	34,8	46,4
Voda [μl]	93	40,6	34,8	46,4	11,6	0

Tabulka 4 Pipetované objemy master mixu I, oligonukleotidu a vody pro jednotlivé alikvóty.

7. Z alikvótů s koncentracemi oligonukleotidu 0 nM a 400 nM bylo odpipetováno 207,0 μl do další mikrozkušavky. Vzniklo tak celkem 8 vzorků s blokátorovým oligonukleotidem.
8. Vzorky s blokátorovým oligonukleotidem a 2 různé koncentrace templátu byly vloženy do vybraných pozic pipetovací stanice.
9. Do stanice byla vložena PCR destička a byl zapnut program qPCR_Optimalizace06, dle kterého stanice rozpipetovala reagentie na destičku tak, že každý vzorek byl proměřen celkem 6x pro každou koncentraci templátu. Alikvóty oligonukleotidů o koncentraci 0 nM a 400 nM, které byly dle bodu 7 rozděleny na 2 vzorky, byly proměřeny celkem 12. Celkový objem v každé jamce byl 20 μl .
10. Napipetovaná destička byla přelepena PCR folií, hladítkem uhlazena a přebytečné konce folie byly nůžkami odštířeny. Destička byla stočena v centrifuze a vložena do cykléru.
11. Na počítači byl spuštěn příslušný software Bio-Rad CFX Manager a v něm byl vybrán a spuštěn následující PCR program:

Název programu: 2step_UNI

95 °C	3 min		
95 °C	10 sec		50x
60 °C	20 sec		

Kanály: QuickPlate_96 well_SYBR Only

Skenovací mód: SYBR/FAM Only

12. Po ukončení PCR programu byla destička vyjmuta ze cykléru a zlikvidována.
13. Získaná data byla hodnocena v softwaru a exportována do sešitu Excel pro další zpracování.
14. Připravené vzorky byly zlikvidovány a nespotřebované chemikálie byly zamrazeny pro další použití.

3.1.6 Zpracování a analýza dat

Výstupními daty ze všech měření softwarově určené Ct hodnoty. Ct hodnoty byly v prostředí softwaru cykléru zkorigovány na jednotnou ručně nastavenou prahovou hodnotu fluorescence 50,0. Následně byly zkorigované Ct hodnoty exportovány do prostředí Excel kancelářského softwaru Microsoft Office 365, kde s nimi bylo dále pracováno.

Test inhibice různých koncentrací oligonukleotidů v teplotním gradientu a 2 koncentracích templátu

Z exportovaných zkorigovaných Ct hodnot byly pro každou koncentraci oligonukleotidu a pro každou teplotu vypočteny ΔCt hodnoty, které vznikly odečtením Ct hodnoty neinhibované reakce (nulová koncentrace oligonukleotidu) od Ct hodnoty příslušné koncentrace oligonukleotidu. Z vypočtených ΔCt hodnoty byl poté sestrojen bodový graf, znázorňující závislost těchto hodnot na teplotě.

Grafy jsou prezentovány v kapitole 3.2 Výsledky, původní Ct hodnoty i vypočtené ΔCt hodnoty jsou poté uvedeny v příloze. Veškeré výpočty a tvorba grafů byly prováděny v prostředí Excel.

Test specificity inhibice vybraných oligonukleotidů na různých systémech

Z exportovaných Ct hodnot byla pro každou koncentraci oligonukleotidu vypočtena hodnota $\Delta \Delta Ct$, představující rozdíl ΔCt hodnoty systému hCCI2_Q1 a ΔCt hodnoty druhého systému. $\Delta \Delta Ct$ hodnota představuje, jako v předchozím testu, rozdíl Ct hodnoty reakce bez oligonukleotidu a Ct hodnoty příslušné koncentrace oligonukleotidu.

Pro každou koncentraci oligonukleotidu bylo vytvořeno celkem 81 $\Delta \Delta Ct$ hodnot tvořené různými kombinacemi Ct hodnot z jednotlivých triplikátů. Ze všech těchto 81 hodnot byla

následně pomocí aritmetického průměru vypočtena průměrná $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnota, včetně směrodatné odchylky.

V kapitole 3.2 Výsledky jsou prostřednictvím sloupcových grafů prezentovány průměrné $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty i příslušné směrodatné odchylky. V příloze jsou prezentovány původní Ct hodnoty i vypočítané $\Delta\Delta\text{Ct}$ hodnoty. Veškeré výpočty a tvorba grafů byly prováděny v prostředí Excel.

Test inhibice oligonukleotidu PNA_GB_003 připravený pomocí robotické pipetovací stanice

Z exportovaných dat bylo pro koncentrace oligonukleotidu 100, 200, 600 a 800 nM vypočteno celkem 72 ΔCt hodnot, tvořené vždy různými kombinacemi původních Ct hodnot. ΔCt hodnoty představují, jak již bylo zmíněno, rozdíl inhibované a neinhibované reakce. Vzhledem k tomu, že pro koncentraci 400 nM bylo provedeno dvakrát více měření, než u ostatních koncentrací (nezahrnuje nulovou koncentraci jako negativní kontrolu), bylo u těchto koncentrací vypočteno i 2x více ΔCt hodnot, celkem tedy 144.

Jako u předchozího testu, byla ze všech ΔCt hodnot pro jednotlivé koncentrace vypočtena průměrná ΔCt hodnota, včetně směrodatné odchylky.

V kapitole 3.2 Výsledky jsou prostřednictvím sloupcového grafu prezentovány průměrné ΔCt hodnoty včetně příslušných směrodatných odchylek. Veškeré výpočty a tvorba grafů byly prováděny v prostředí Excel.

3.2 Výsledky

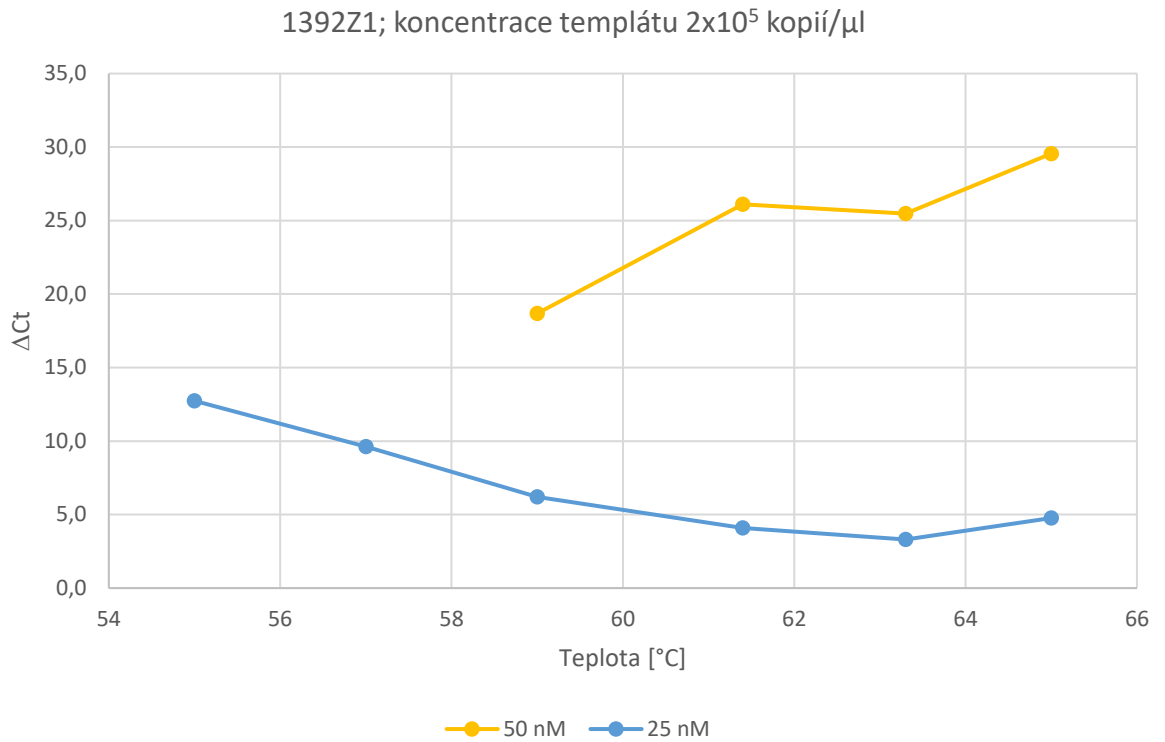
V této kapitole jsou prezentovány výsledky všech měření. Členění prezentace výsledků je odlišné od předchozích kapitol, výsledky jsou prezentovány postupně dle jednotlivých oligonukleotidů, rozdělených do kategorií dle typu modifikace, jak je uvedeno v Tabulce 1. Tento způsob byl zvolen záměrně z důvodu lepší přehlednosti všech výsledků pro daný oligonukleotid.

3.2.1 Fosforothioáty

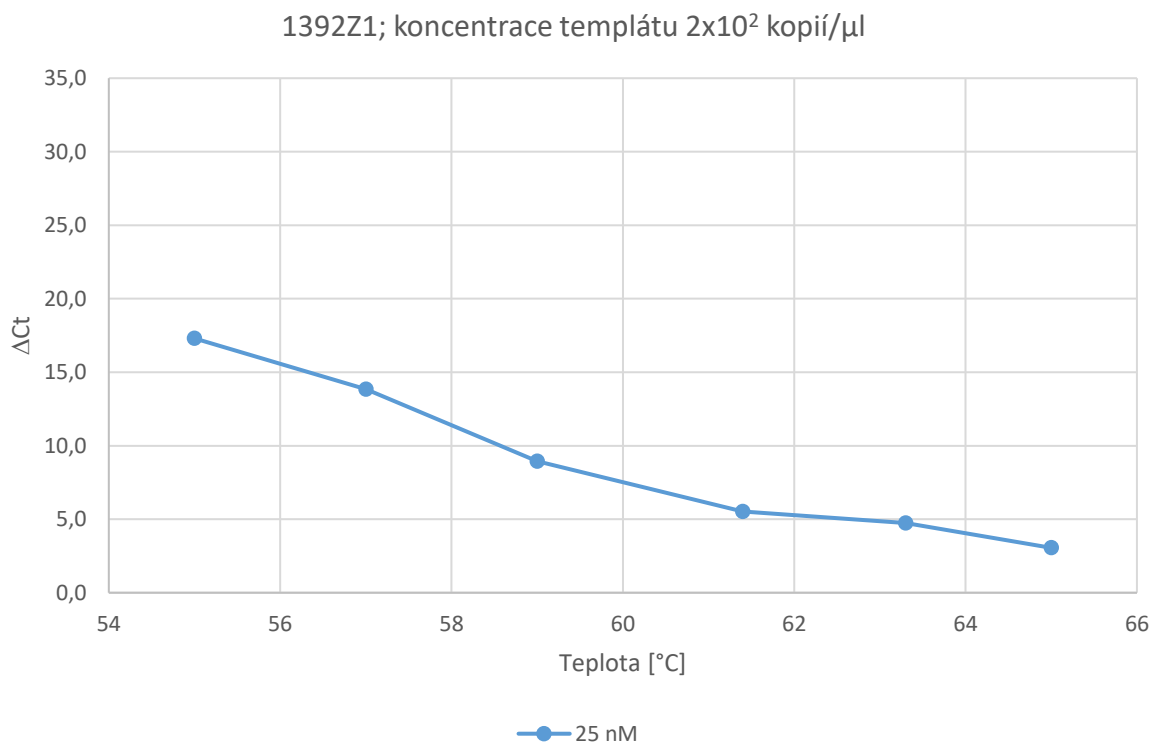
Oligonukleotid s délkou sekvence 25 bází, HPLC purifikace (1932Z1)

U tohoto oligonukleotidu byla nejprve otestována inhibice různých koncentrací oligonukleotidu (25 – 400 nM) v teplotním gradientu 55-65 °C a ve 2 koncentracích templátové DNA.

Grafy 1 a 2 prezentují závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu na teplotě, přičemž pro každou koncentraci templátu byl sestaven samostatný graf. Signál byl získán pouze u koncentrací 25 nM (pro obě koncentrace templátu v plném rozsahu teplot) a 50 nM (pouze pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l a pouze u vybraných teplot). Na základě těchto výsledků je patrné, že oligonukleotid inhiboval PCR reakci.



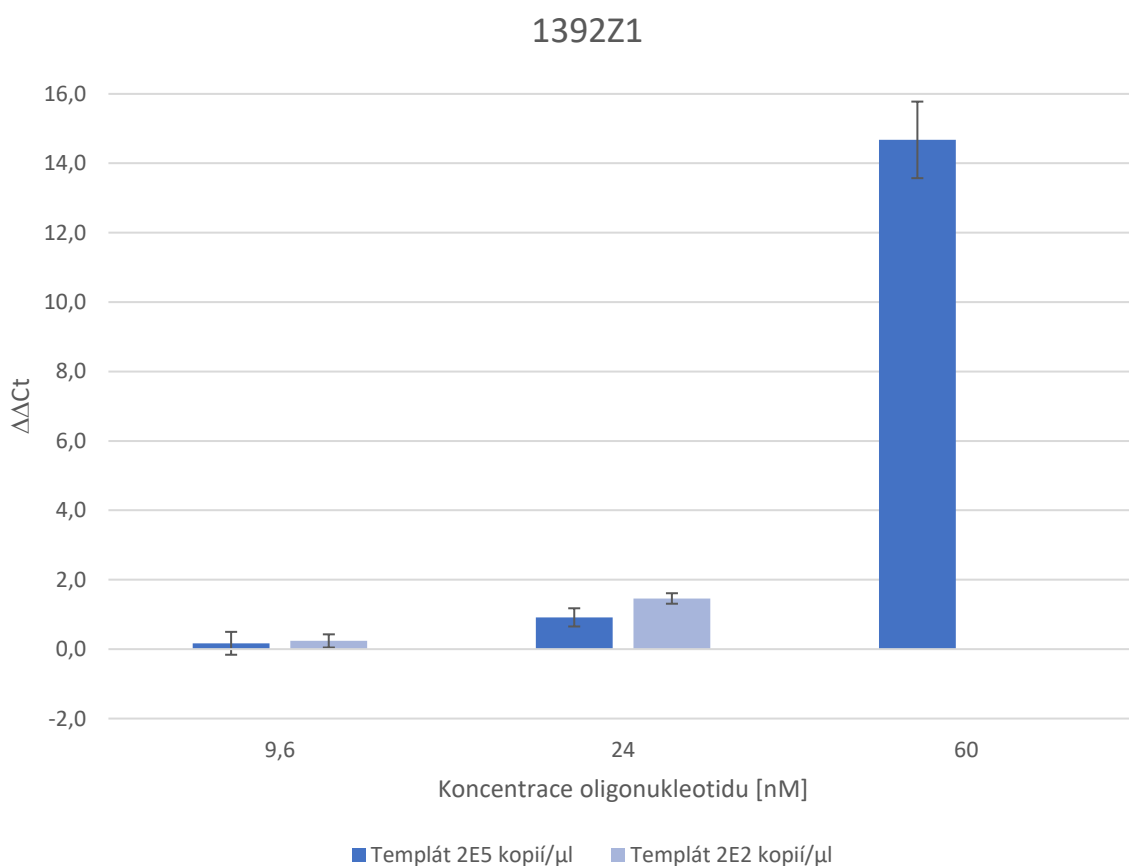
Graf 1 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.



Graf 2 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Vzhledem k výsledkům testu inhibice byla u tohoto oligonukleotidu otestována specifita inhibice, a to na systémech hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2 (nespecifický systém). Pro tento test byly zvoleny nižší koncentrace oligonukleotidu 9,6 – 150 nM.

Následující Graf 3 znázorňuje průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu pro 2 koncentrace templátu. Signál byl získán pouze u koncentrací 9,6 – 60 nM při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l a 9,6 – 24 nM při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l. Směrodatné odchylky jsou prezentovány jako chybové úsečky jednotlivých bodů. Výrazné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty byly naměřeny pouze u koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l u koncentrace oligonukleotidu 60 nM, což ukazuje na specifickou inhibici, ale v případě ostatních koncentrací se jedná o inhibici nespecifickou.

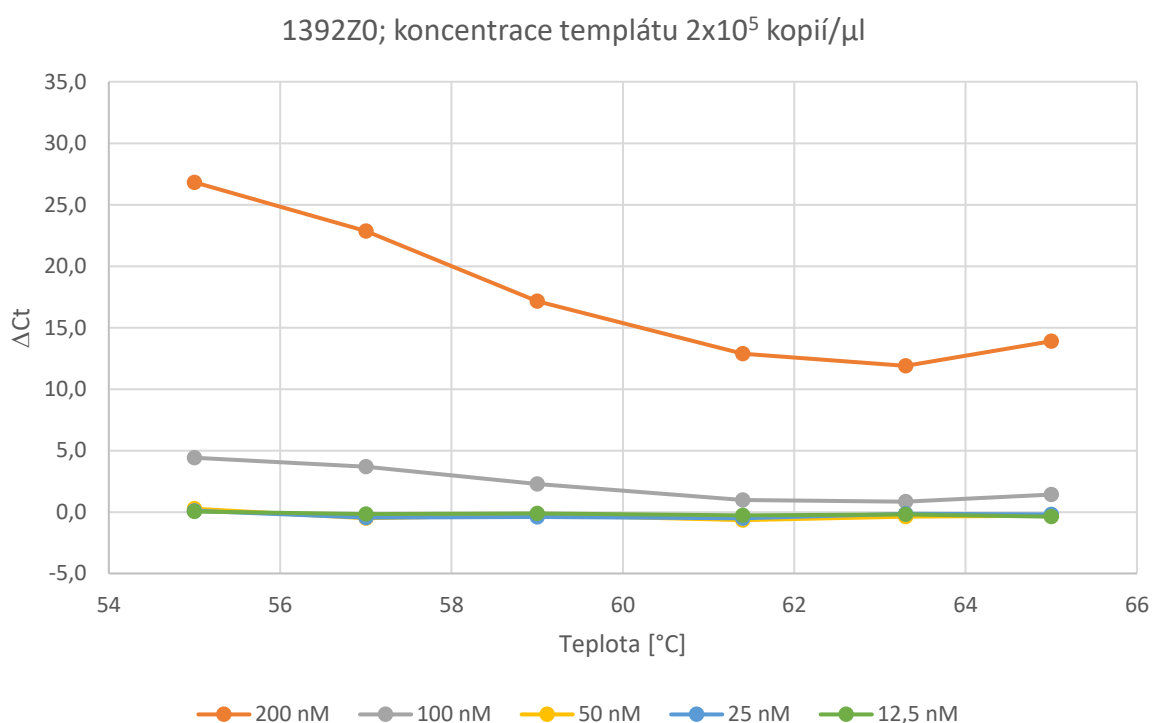


Graf 3 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

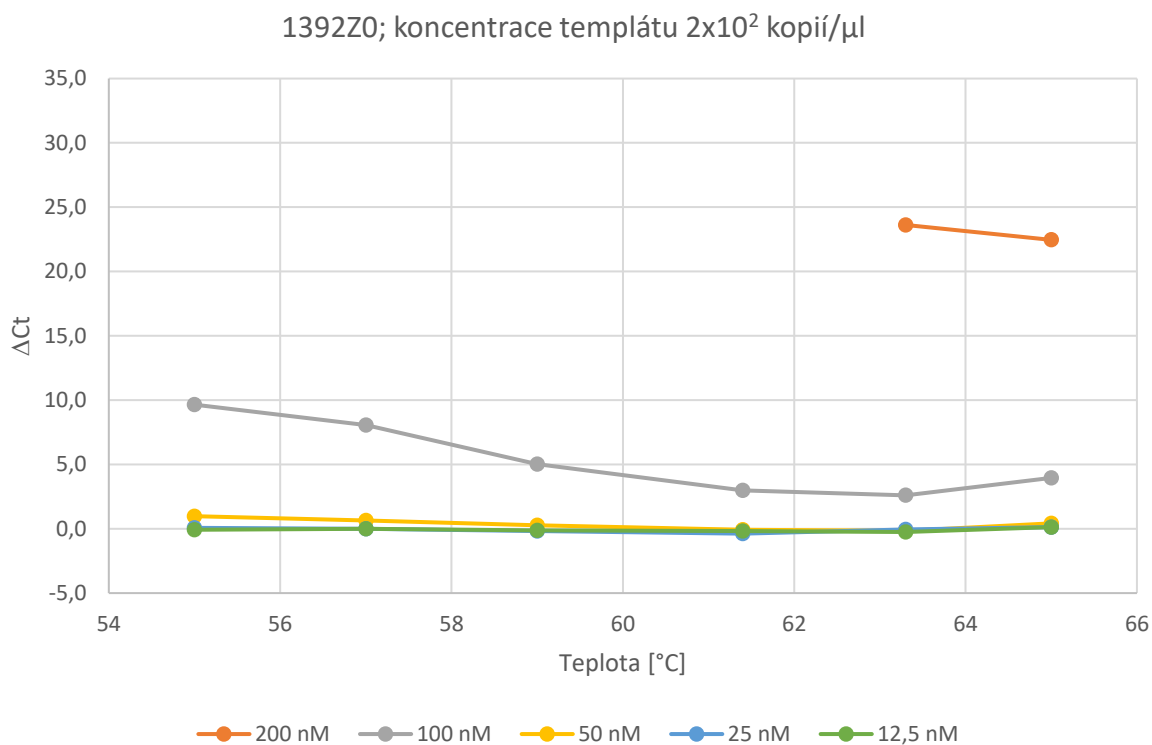
Oligonukleotid s délkou sekvence 19 bází, HPLC purifikace (1932Z0)

U tohoto oligonukleotidu byla TAKÉ nejprve otestována inhibice různých koncentrací oligonukleotidu (12,5 – 400 nM) v teplotním gradientu 55-65 °C a ve 2 koncentracích templátové DNA.

Grafy 4 a 5 prezentují závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu na teplotě, přičemž pro každou koncentraci templátu byl sestaven samostatný graf. Zobrazeny jsou pouze koncentrace 12,5 – 200 nM, neboť pro koncentraci 400 nM nebyl získán žádný signál. Z absence signálu a rozdílů mezi ΔC_t hodnotami jednotlivých koncentrací lze usuzovat na inhibici PCR reakce.



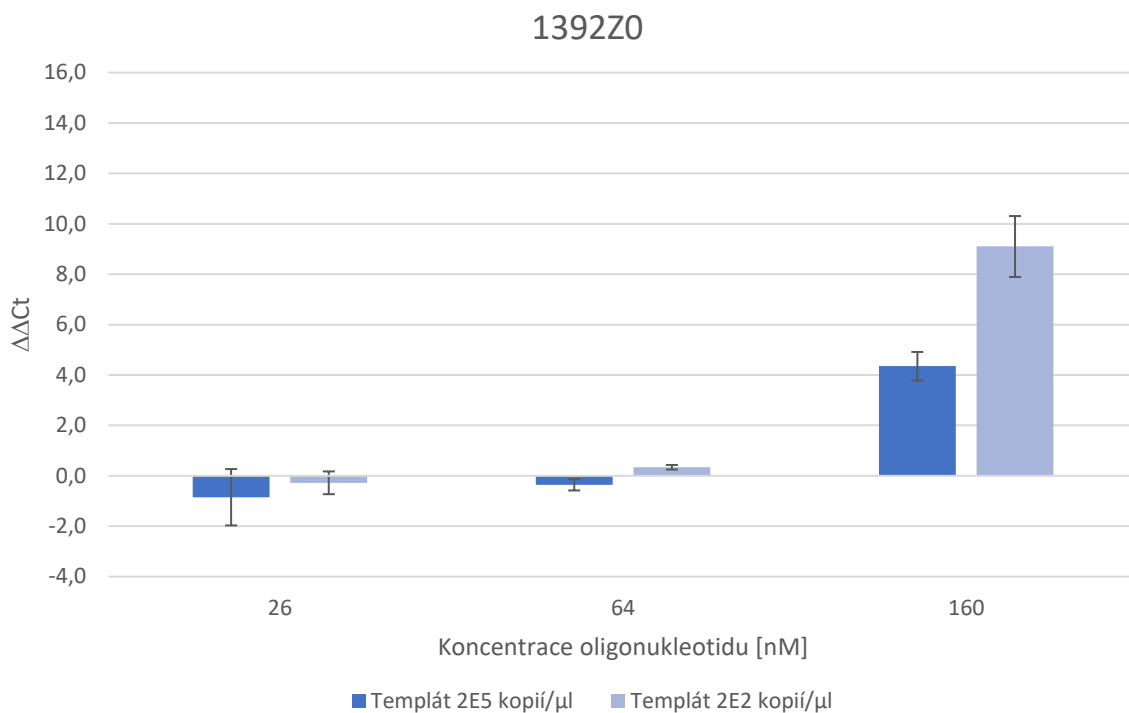
Graf 4 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.



Graf 5 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Vzhledem k výsledkům testu inhibice byla u tohoto oligonukleotidu otestována specifita inhibice, a to na systémech hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2 (nespecifický systém). V následujícím Grafu 6 jsou prezentovány průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu (26 – 400 nM) pro 2 koncentrace templátu. Směrodatné odchylky jsou prezentovány jako chybové úsečky jednotlivých bodů.

Zobrazeny jsou pouze koncentrace 26 – 160 nM, neboť u koncentrace 400 nM nebyl získán žádný signál. Z grafu je patrné, že vyšší $\Delta\Delta C_t$ byly zjištěny pouze v případě nižší koncentrace templátu u koncentrace oligonukleotidu 160 nM, jedná se tedy spíše o inhibici nescifickou.

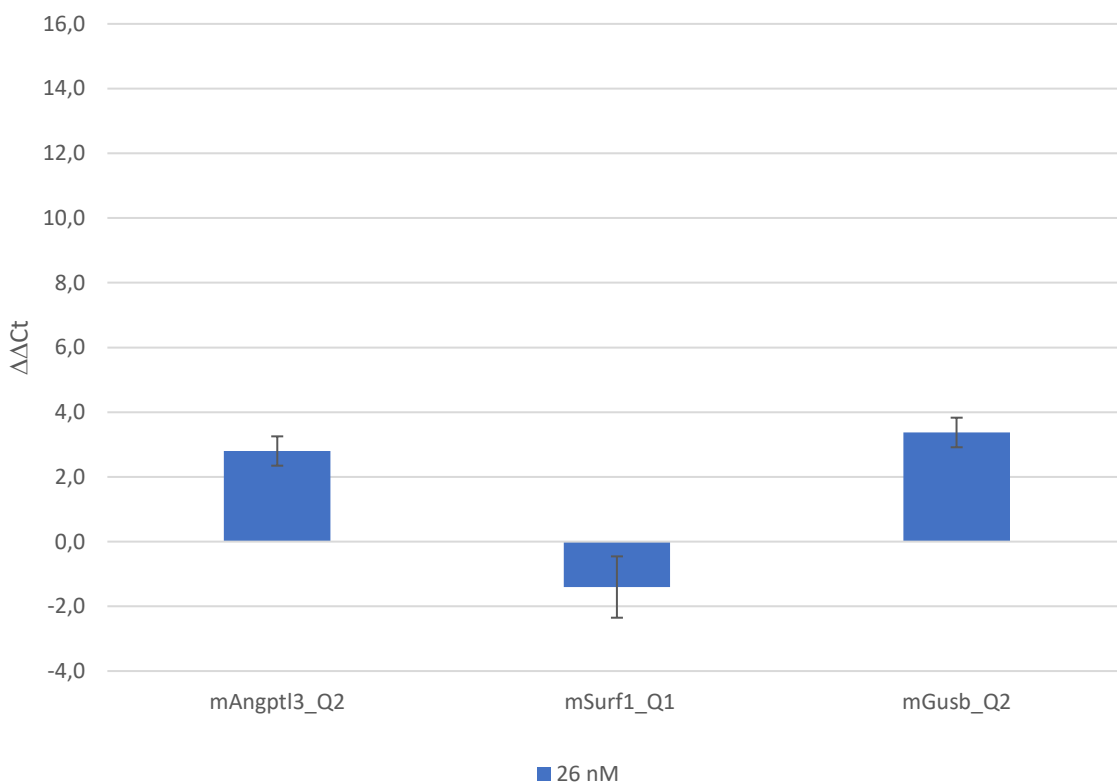


Graf 6 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

Na základě výsledku předchozího testu byla specifita inhibice otestována ještě jednou, tentokrát s přidáním dalších 2 nespecifických systémů. Celkem byly otestovány 4 systémy, 1 specifický hCCL2_Q1 a 3 nespecifické: mAngptl3_Q2, mSurf1_Q1 a mGusb_Q2. Oligonukleotid byl testován ve stejném rozsahu koncentrací, jako u předchozího testu, tedy 26 – 400 nM.

V následujícím Grafu 7 jsou znázorněny výsledné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky z tohoto testu. Směrodatné odchylky jsou prezentovány jako chybové úsečky jednotlivých bodů. Zobrazena je pouze koncentrace 26 nM, pro ostatní koncentrace nebyl získán žádný signál. Z grafu je patrné, že oligonukleotid inhiboval reakci nezávisle na použitém systému, jedná se tedy o inhibici nespecifickou.

1392Z0; 4 systémy



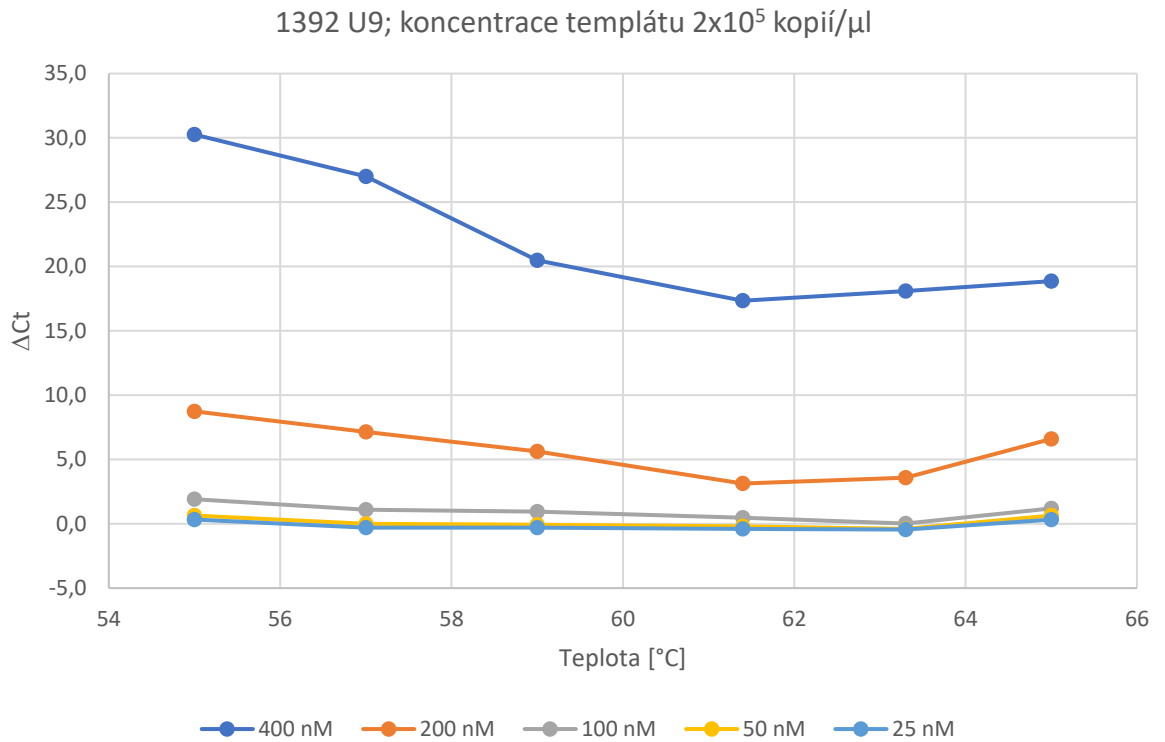
Graf 7 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice pro 4 různé systémy. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

Oligonukleotid s délkou sekvenec 16 bází, HPLC purifikace (1932U9)

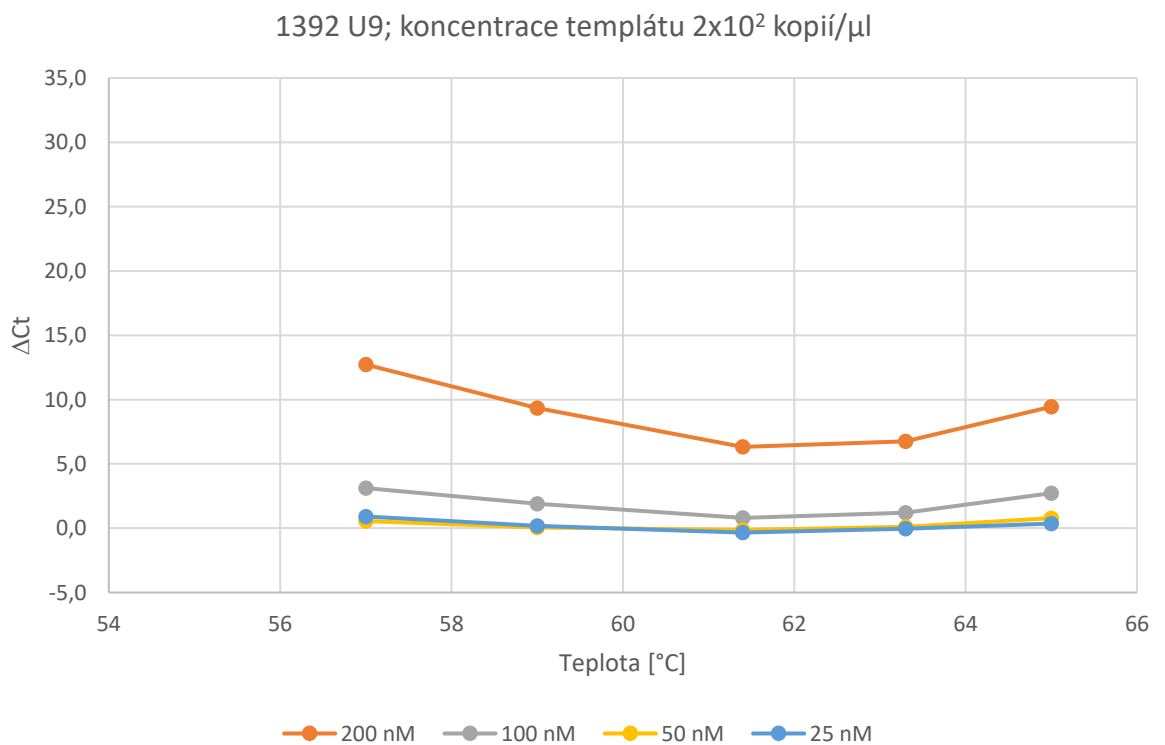
U tohoto oligonukleotidu byla nejprve otestována inhibice různých koncentrací oligonukleotidu (25 – 400 nM) v teplotním gradientu 55-65 °C a ve 2 koncentracích templátové DNA.

Grafy 8 a 9 prezentují závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu na teplotě, přičemž pro každou koncentraci templátu byl sestaven samostatný graf.

V případě koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l jsou obrazy pouze koncentrace 25 – 200 nM, neboť pro koncentraci 400 nM nebyl získán žádný signál. Pro teplotu 55 °C stejné koncentrace templátu byly získány extrémní ΔC_t hodnoty, které byly vyřazeny z hodnocení. V obou grafech lze vidět inhibici PCR reakce, která roste s koncentrací oligonukleotidu. V případě nižší koncentrace templátu je tato inhibice ještě výraznější.



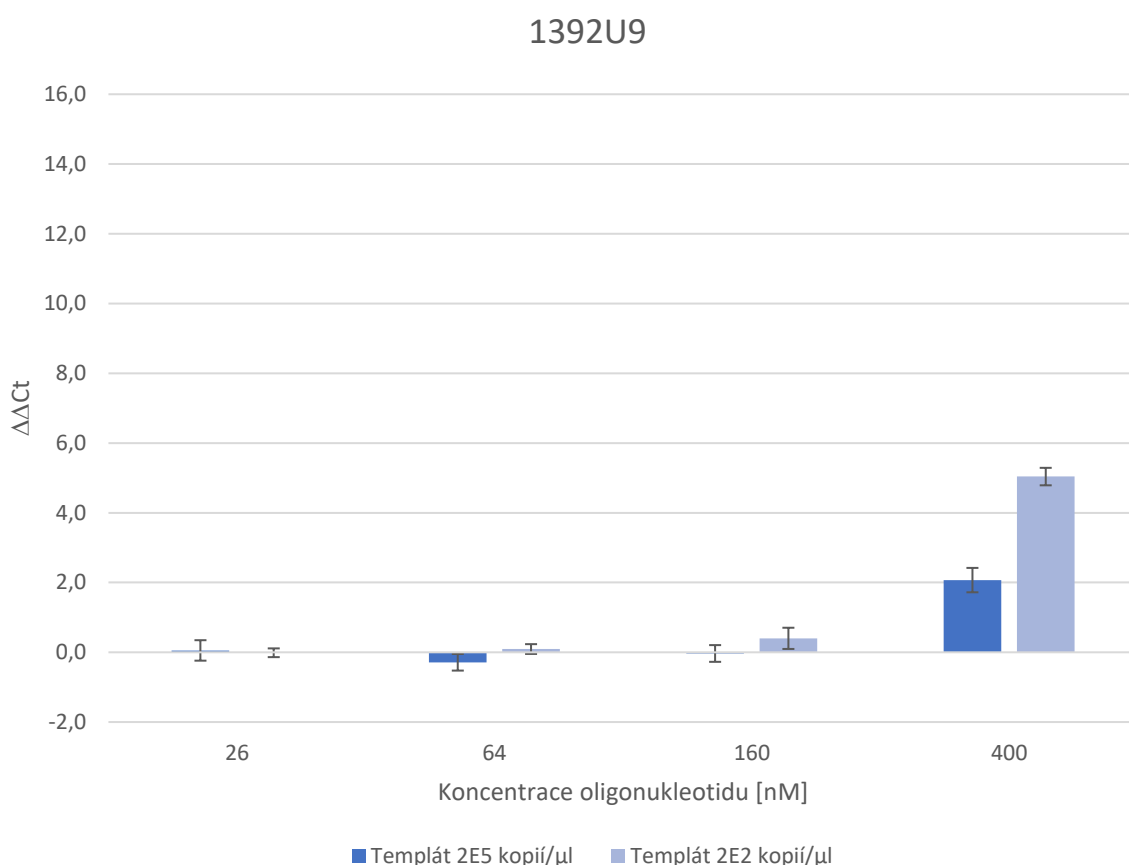
Graf 8 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U9 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.



Graf 9 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U9 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Vzhledem k výsledkům testu inhibice byla u tohoto oligonukleotidu otestována specifita inhibice, a to na systémech hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2 (nespecifický systém). V následujícím Grafu 10 jsou prezentovány průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu (26 – 400 nM) pro 2 koncentrace templátu. Směrodatné odchylky jsou prezentovány jako chybové úsečky jednotlivých bodů.

Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací oligonukleotidu se zvyšují i $\Delta\Delta Ct$ hodnoty, nicméně se nejedná o významný rozdíl, tento oligonukleotid tedy inhibuje reakci nespecificky.

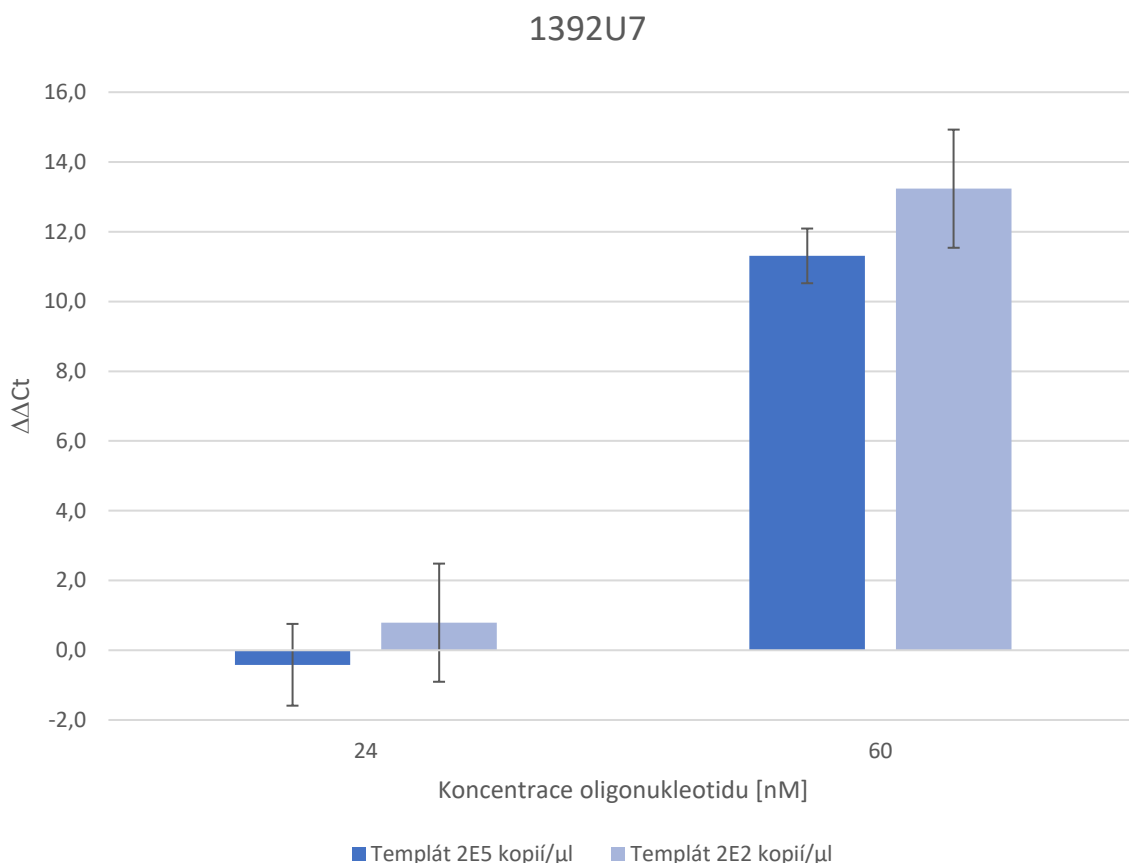


Graf 10 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U9 v rámci testu specifity inhibice. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

Oligonukleotid s délkou sekvence 25 bází, standardní purifikace (1932U7)

Na základě výsledků testů u předchozích oligonukleotidů s HPLC purifikací byl u tohoto oligonukleotidu vynechán obecný test inhibice a byla u něj otestována pouze specifita inhibice. Testované systémy byly stejné jako u předchozích oligonukleotidů. Pro test byly vybrány koncentrace oligonukleotidu 24, 60 a 150 nM.

Výsledné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty jsou prezentovány v Grafu 11, chybové úsečky pak představují velikost směrodatné odchylky. Zobrazeny jsou pouze koncentrace 24 a 60 nM, neboť u koncentrace 150 nM nebyl získán žádný signál. Z grafu je patrné, že v případě koncentrace oligonukleotidu 60 nM se jedná o inhibici specifickou, ale u vyšších koncentrací (150 nM) inhibuje tento oligonukleotid reakci nespecificky.



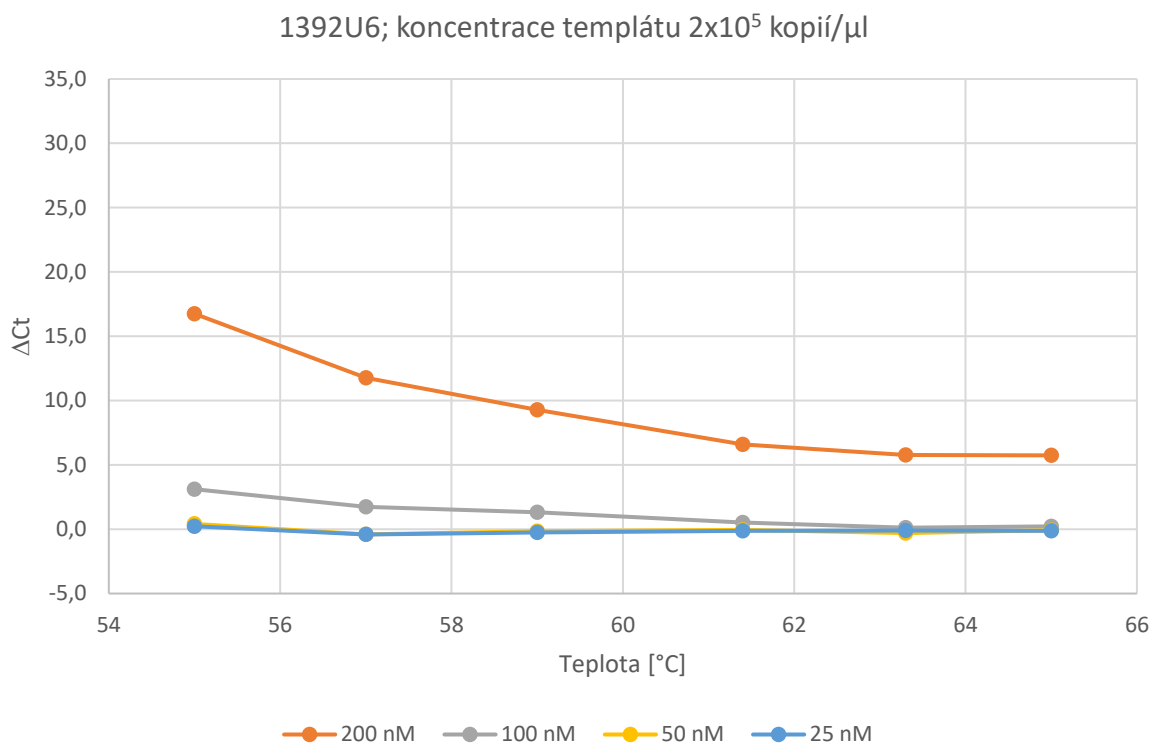
Graf 11 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U7 v rámci testu specifity inhibice. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

Oligonukleotid s délkou sekvence 19 bází, standardní purifikace (1932U6)

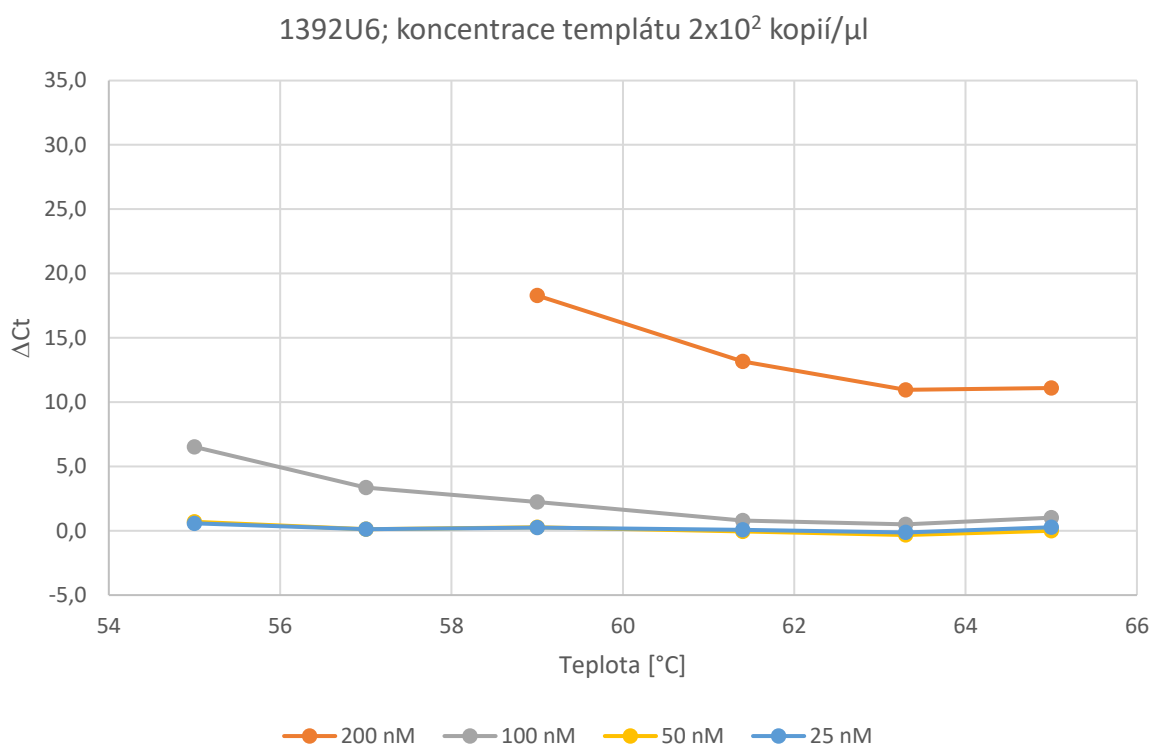
U tohoto oligonukleotidu byla nejprve otestována inhibice různých koncentrací oligonukleotidu (25 – 400 nM) v teplotním gradientu 55-65 °C a ve 2 koncentracích templátové DNA.

Grafy 12 a 13 prezentují závislost ΔCt hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu na teplotě, přičemž pro každou koncentraci templátu byl sestaven samostatný graf. Zobrazeny

jsou pouze koncentrace 25 – 200 nM, neboť pro koncentraci 400 nM nebyl získán žádný signál. Z výsledků je patrné, že oligonukleotid inhibuje reakci.



Graf 12 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U6 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

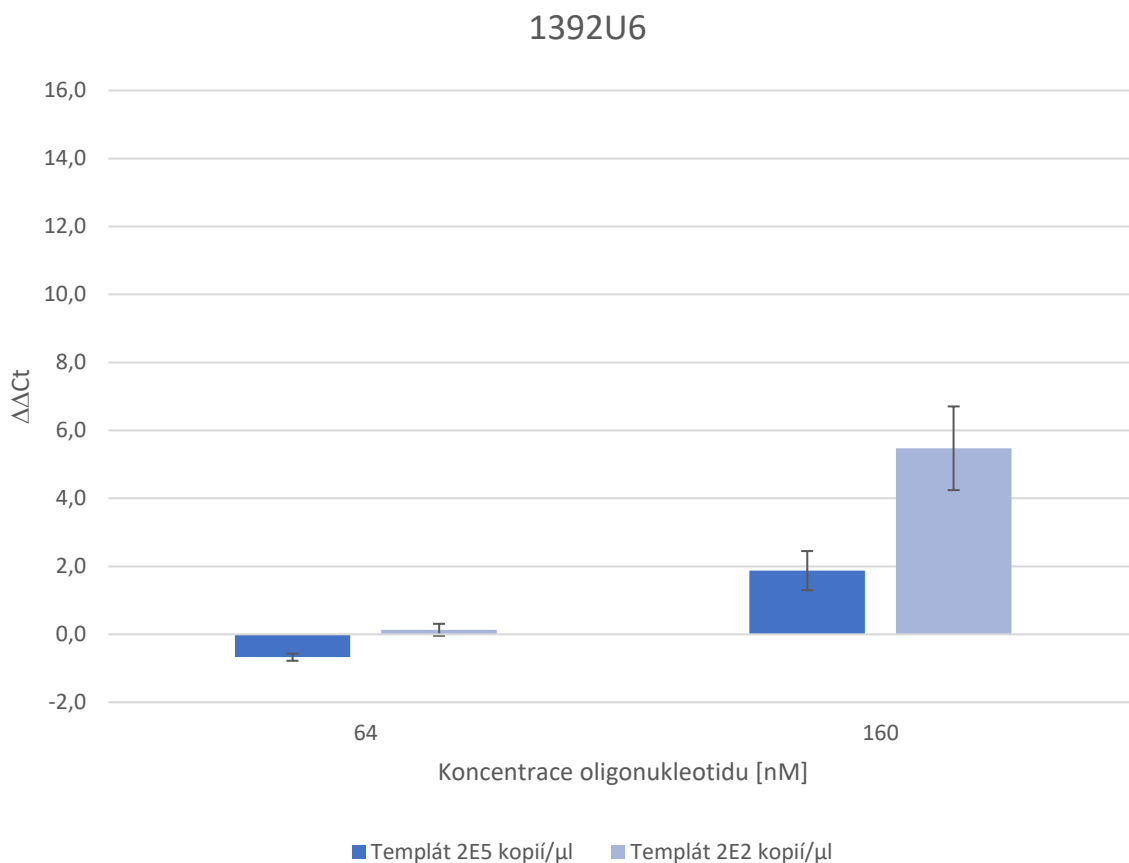


Graf 13 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U6 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Vzhledem k výsledkům testu inhibice byla u tohoto oligonukleotidu otestována také specifita inhibice, a to na systémech hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2 (nespecifický systém).

V následujícím Grafu 14 jsou prezentovány průměrné $\Delta \Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu (64, 160 a 400 nM) pro 2 koncentrace templátu. Směrodatné odchylky jsou prezentovány jako chybové úsečky jednotlivých bodů.

V grafu jsou prezentovány pouze koncentrace 64 a 160 nM, neboť u koncentrace 400 nM nebyl získán potřebný signál. Z výsledků je patrné, že oligonukleotid inhibuje reakci nespecificky.

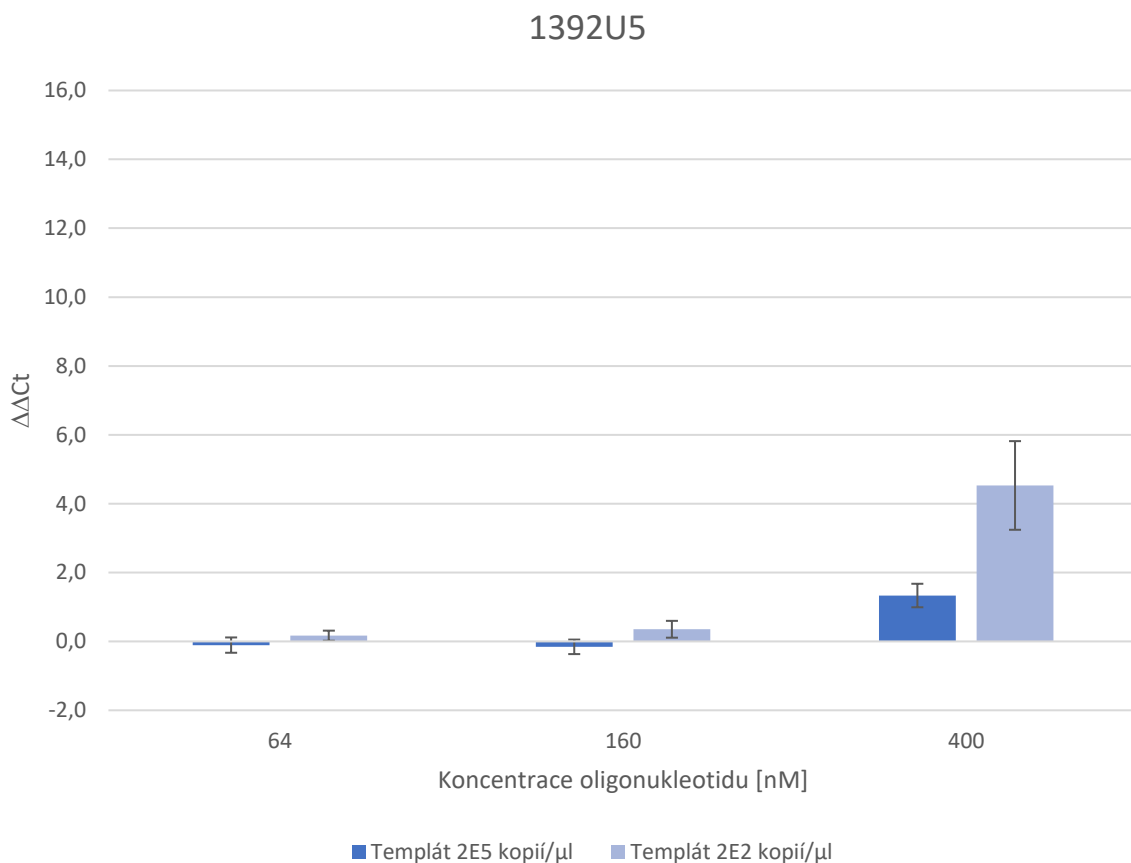


Graf 14 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U6 v rámci testu specifity inhibice. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

Oligonukleotid s délkou sekvence 16 bází, standardní purifikace (1932U5)

Stejně jako v případě oligonukleotidu 1932U7 byl u tohoto oligonukleotidu vynechán obecný test inhibice a byla u něj otestována pouze specifita inhibice. Testované systémy byly stejné jako u předchozích oligonukleotidů. Pro test byly vybrány koncentrace oligonukleotidu 64, 160 a 400 nM.

Výsledné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty jsou prezentovány v Grafu 15, chybové úsečky pak představují velikost směrodatné odchylky. Jak je patrné z grafu, u žádné koncentrace nebyly naměřené významné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty, jedná se tedy o nespecificky inhibující nukleotid.



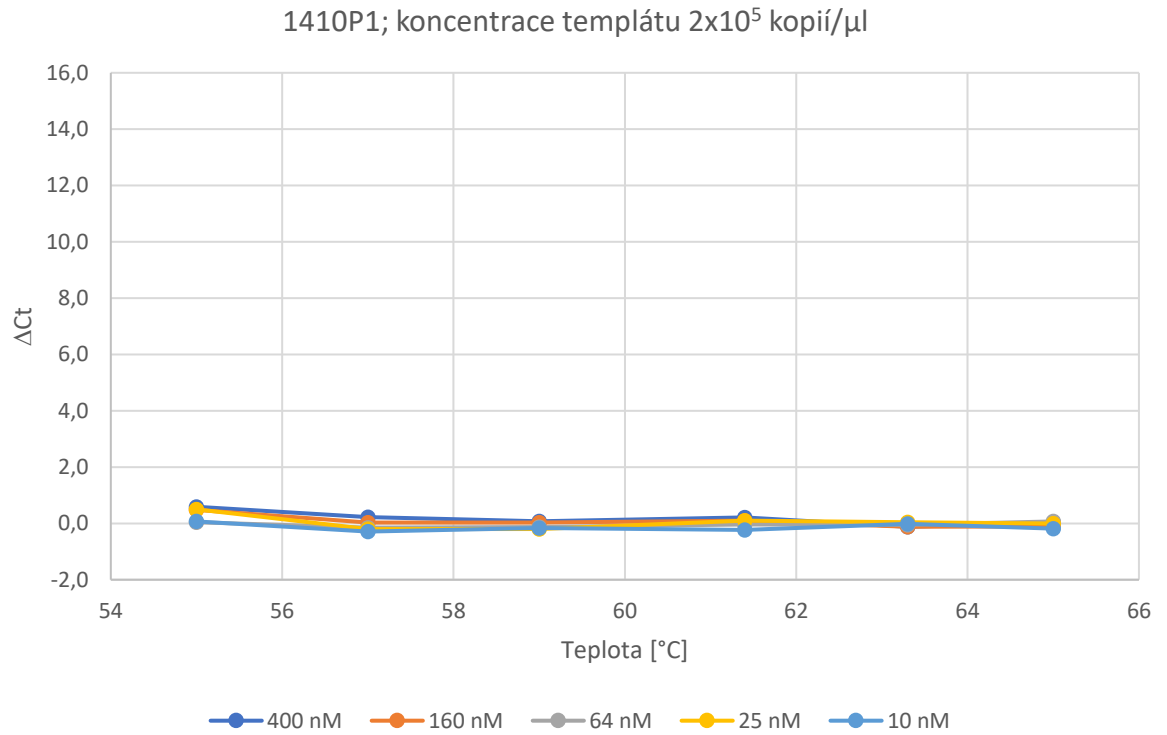
Graf 15 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U5 v rámci testu specifity inhibice. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

3.2.2 2'O-Me-RNA

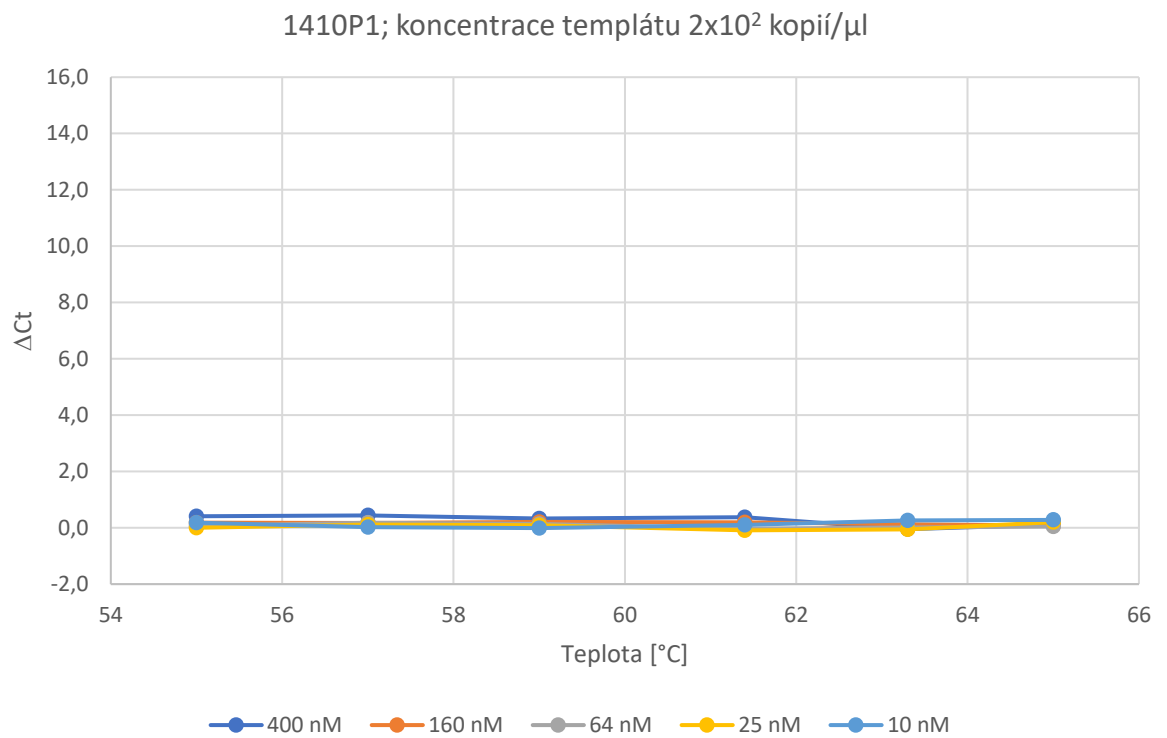
U oligonukleotidů s touto modifikací byla otestována pouze obecná inhibice různých koncentrací oligonukleotidů (10 – 400 nM u oligonukleotidů s kratší sekvencí a 10 – 4000 nM u oligonukleotidů s delší sekvencí) v teplotním gradientu 55-65 °C a ve 2 koncentracích templátové DNA.

Grafy 16 - 23 prezentují závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu na teplotě, přičemž pro každou koncentraci templátu byl sestaven samostatný graf. Z grafů je patrné, že větší inhibiční efekt je pozorován u oligonukleotidů s delší nukleotidovou sekvencí než u oligonukleotidů s kratší sekvencí, ale i přesto se nejedná o významný inhibiční efekt.

Oligonukleotid s délkou sekvence 18 bází, sense orientace, standardní purifikace (1410P1)

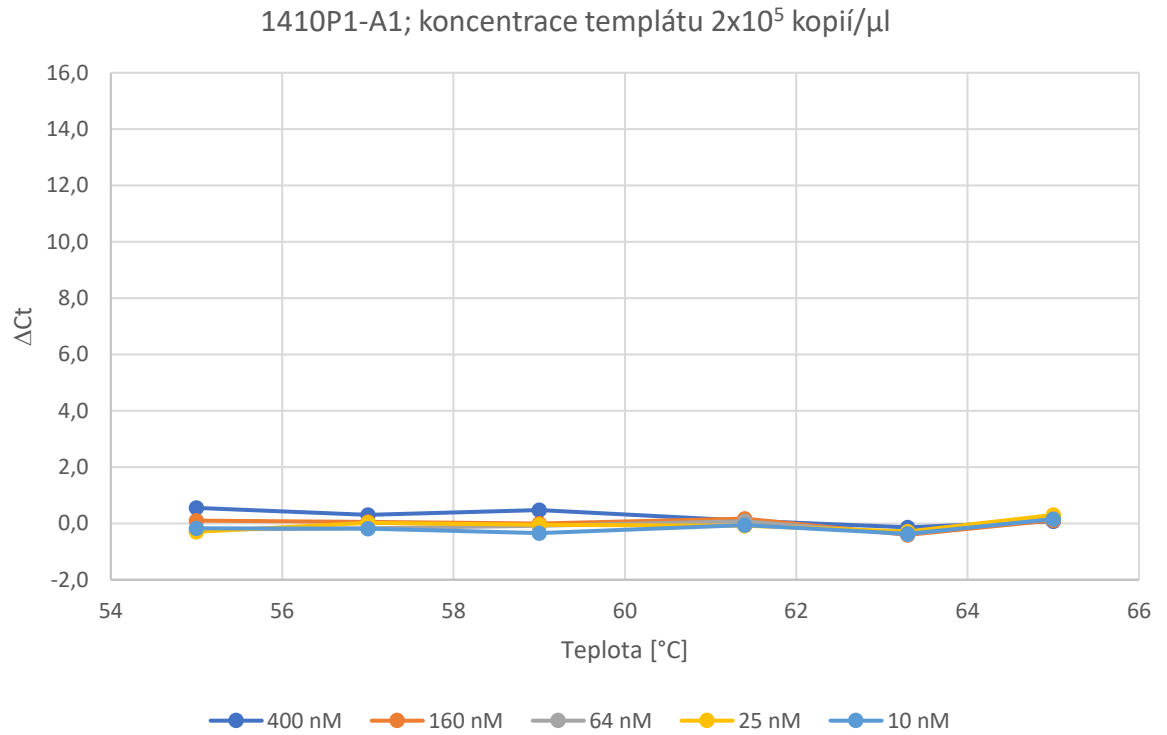


Graf 16 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

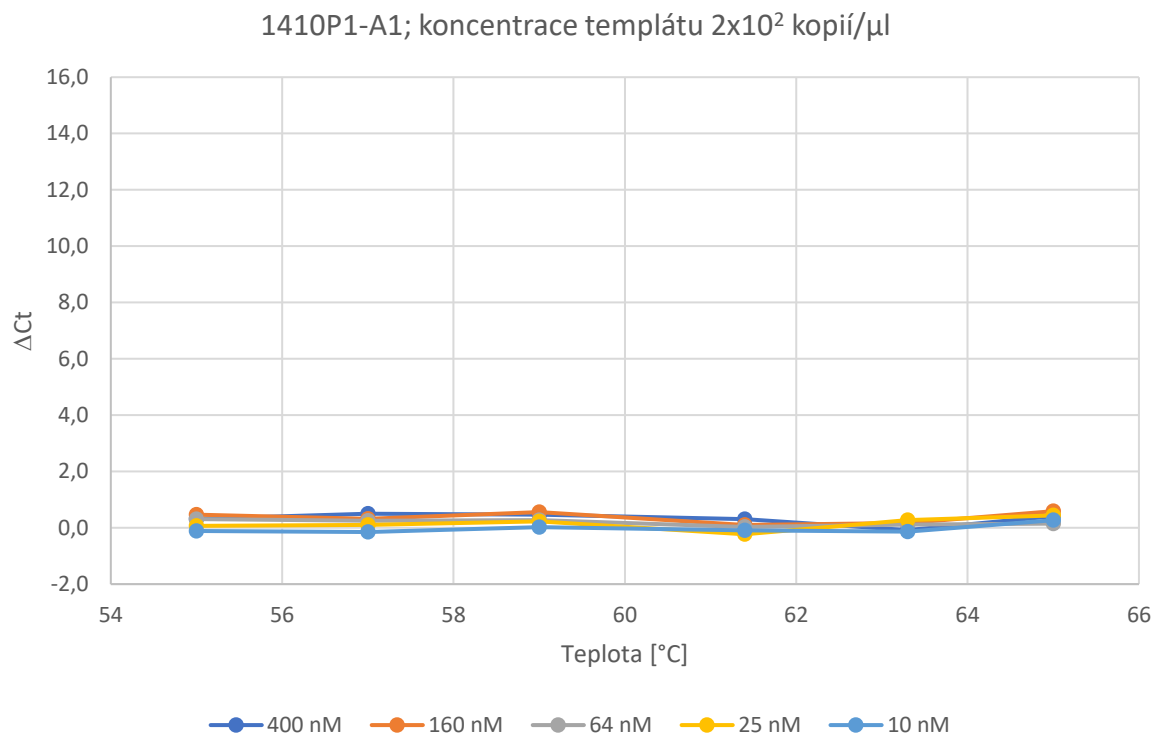


Graf 17 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Oligonukleotid s délkou sekvence 18 bází, sense orientace, HPLC purifikace (1410P1 - A1)

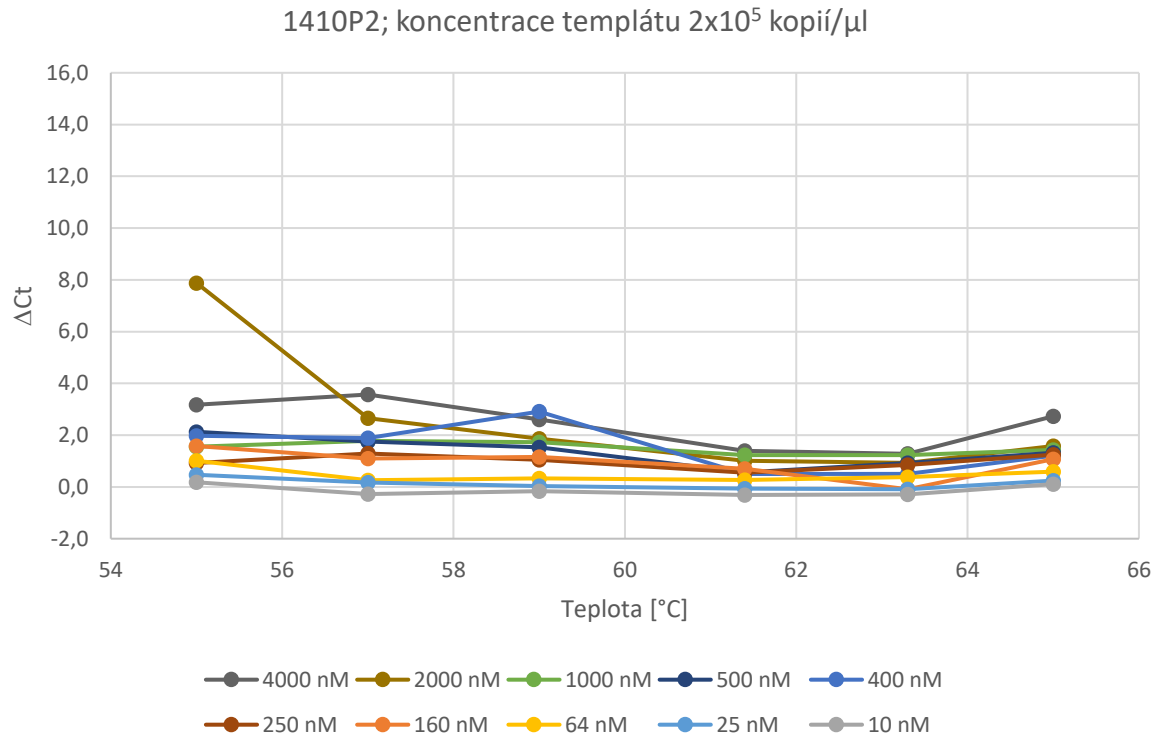


Graf 18 Závislost Δ Ct hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P1-A1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

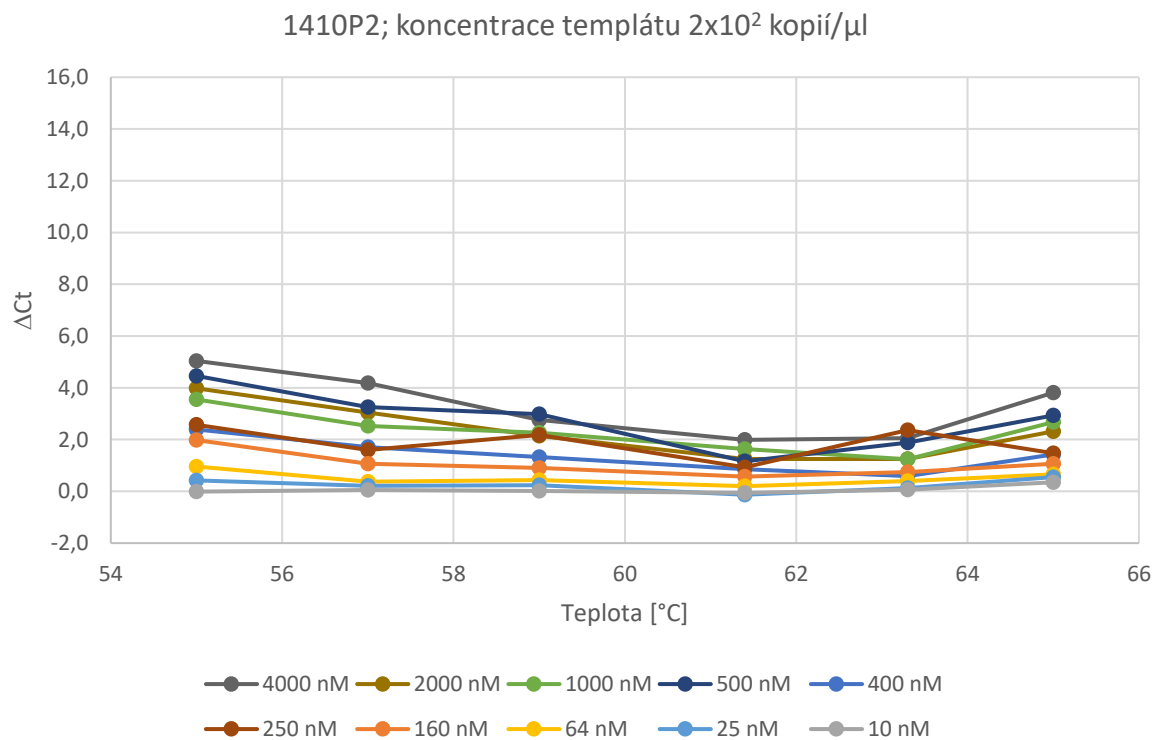


Graf 19 Závislost Δ Ct hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P1-A1 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Oligonukleotid s délkou sekvence 24 bází, sense orientace, standardní purifikace (1410P2)

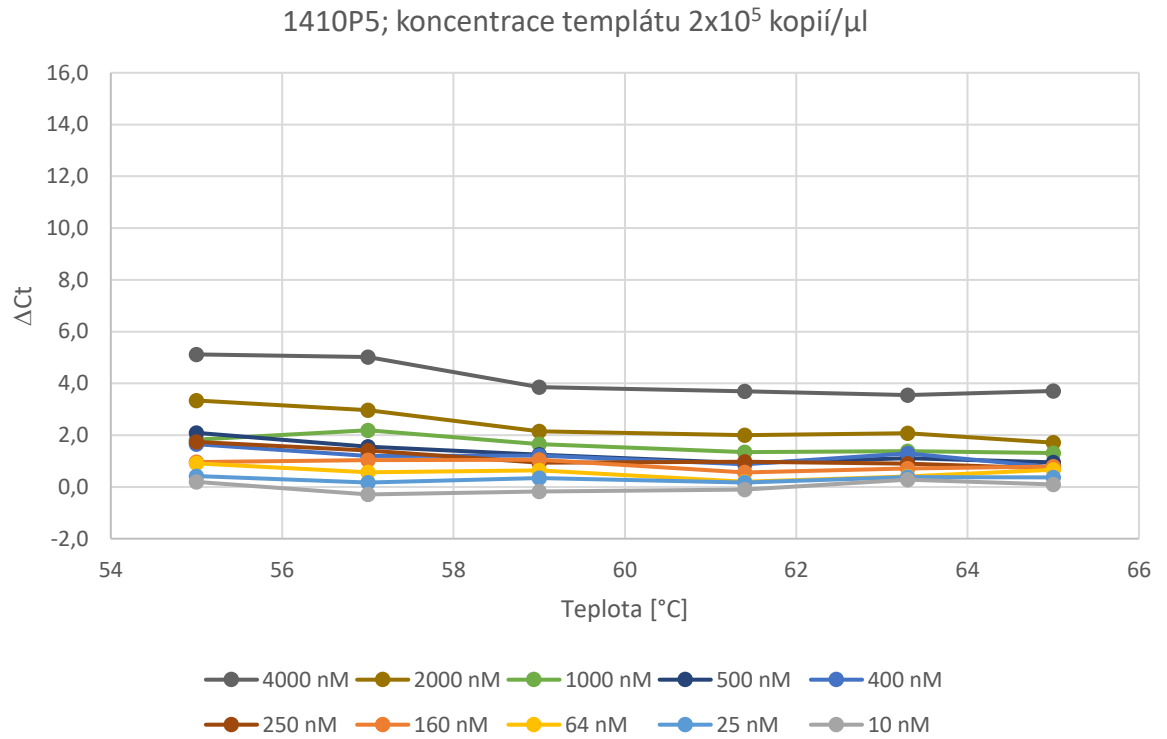


Graf 20 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P2 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

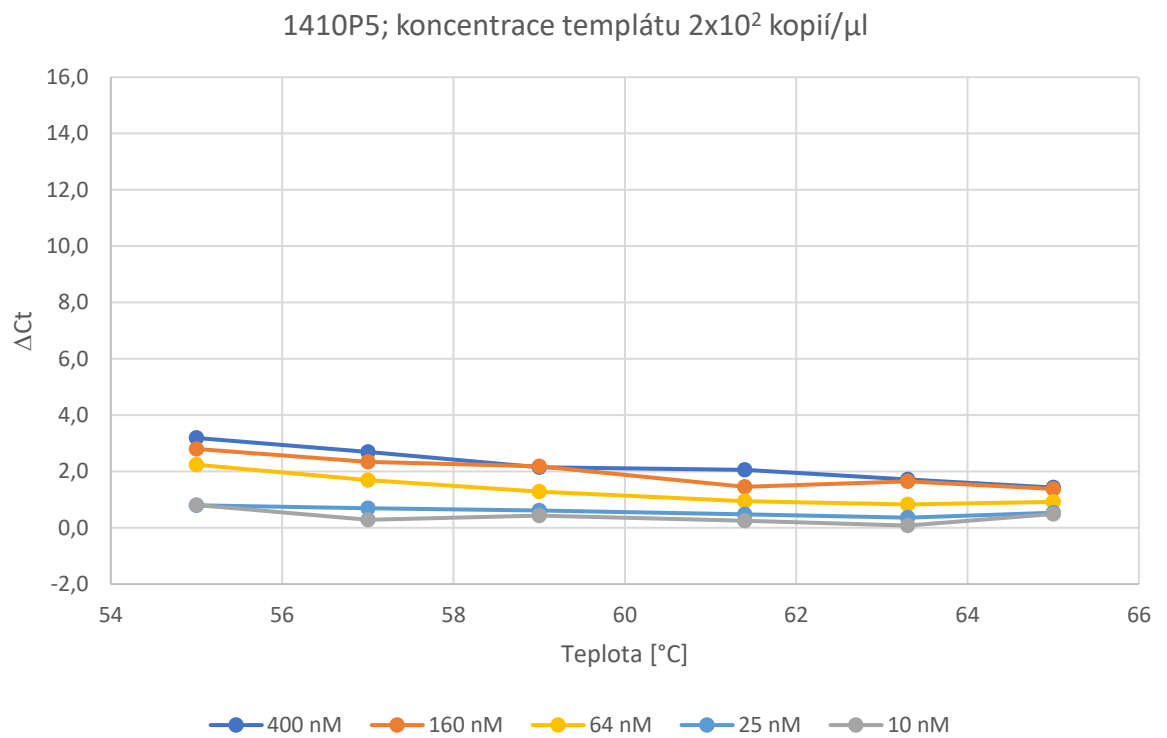


Graf 21 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P2 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Oligonukleotid s délkou sekvence 24 bází, antisense orientace, stand. purifikace (1410P5)



Graf 22 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P5 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.



Graf 23 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1410P5 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

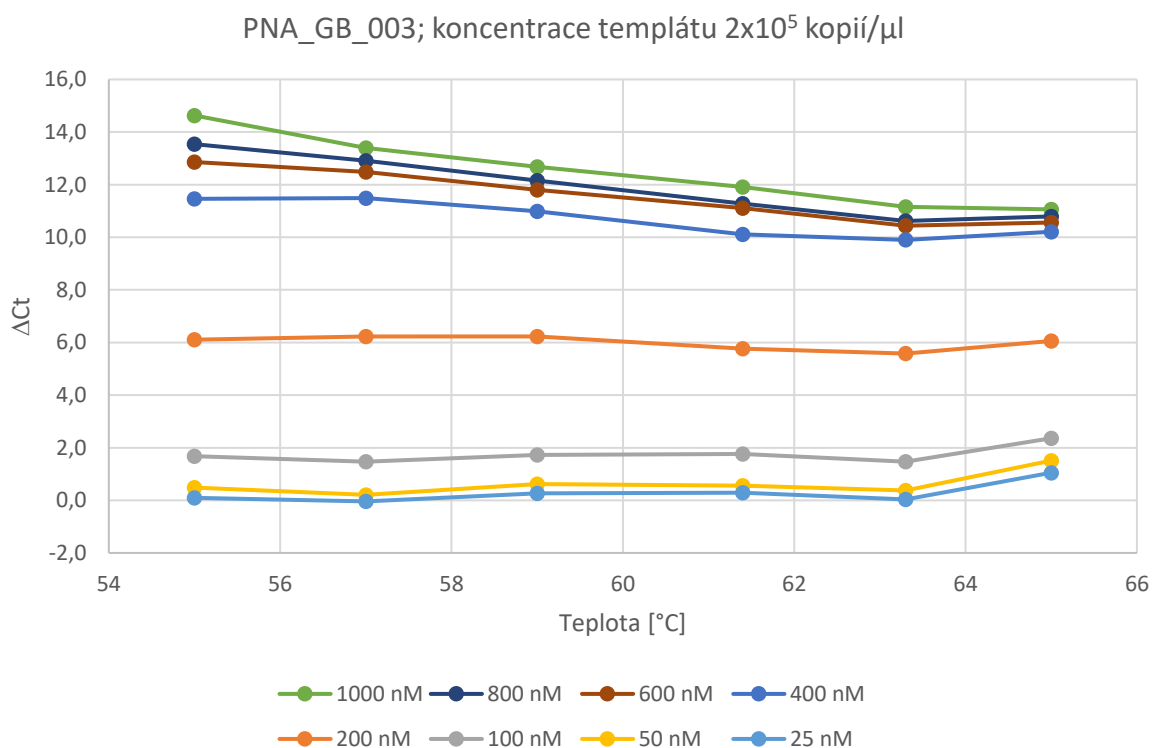
3.2.3 PNA

PNA s délkou sekvence 18 bází (PNA_GB_003)

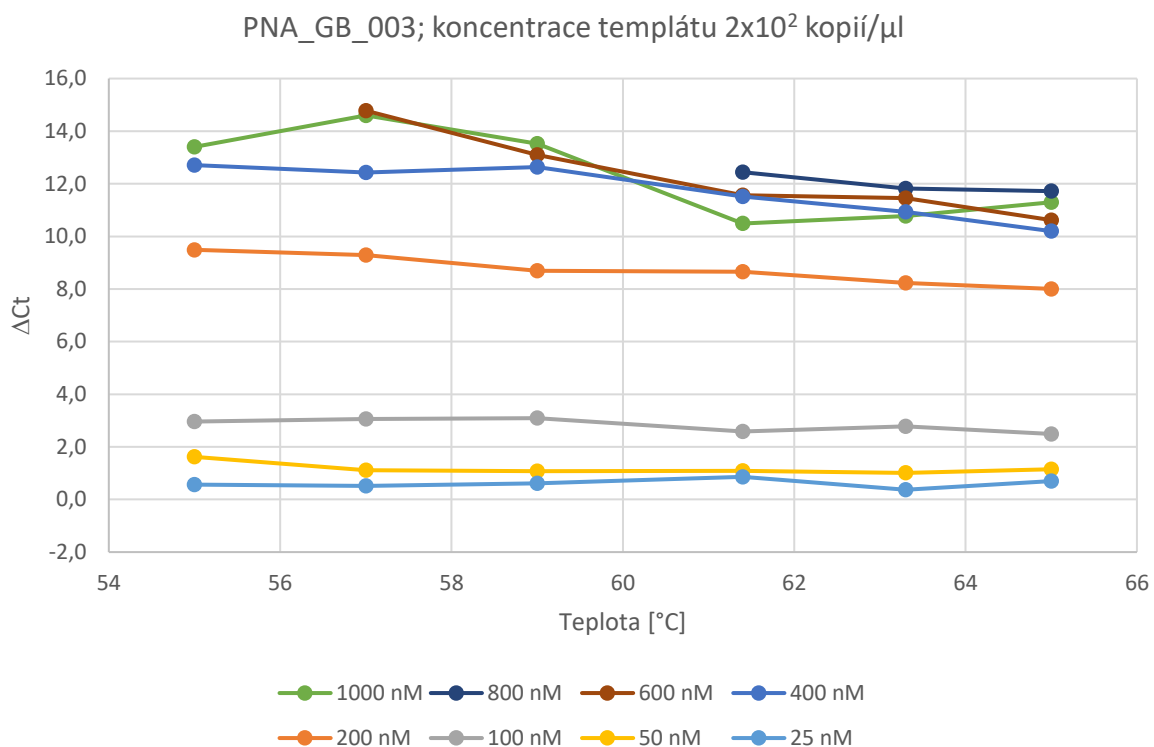
U tohoto oligonukleotidu byla nejprve otestována inhibice různých koncentrací oligonukleotidu (25 – 1000 nM) v teplotním gradientu 55-65 °C a ve 2 koncentracích templátové DNA.

Grafy 24 a 25 prezentují závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu na teplotě, přičemž pro každou koncentraci templátu byl sestaven samostatný graf.

Z grafů je patrné, že s rostoucí koncentrací oligonukleotidu roste i míra inhibice PCR reakce. Nejvýraznější vliv inhibice je v případě koncentrace oligonukleotidu 400 nM. V případě koncentrací oligonukleotidu větších než 400 nM lze pozorovat podobné výsledky inhibice, jev zvýšení inhibice při zvýšení koncentrace oligonukleotidu přestává být výrazný.



Graf 24 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

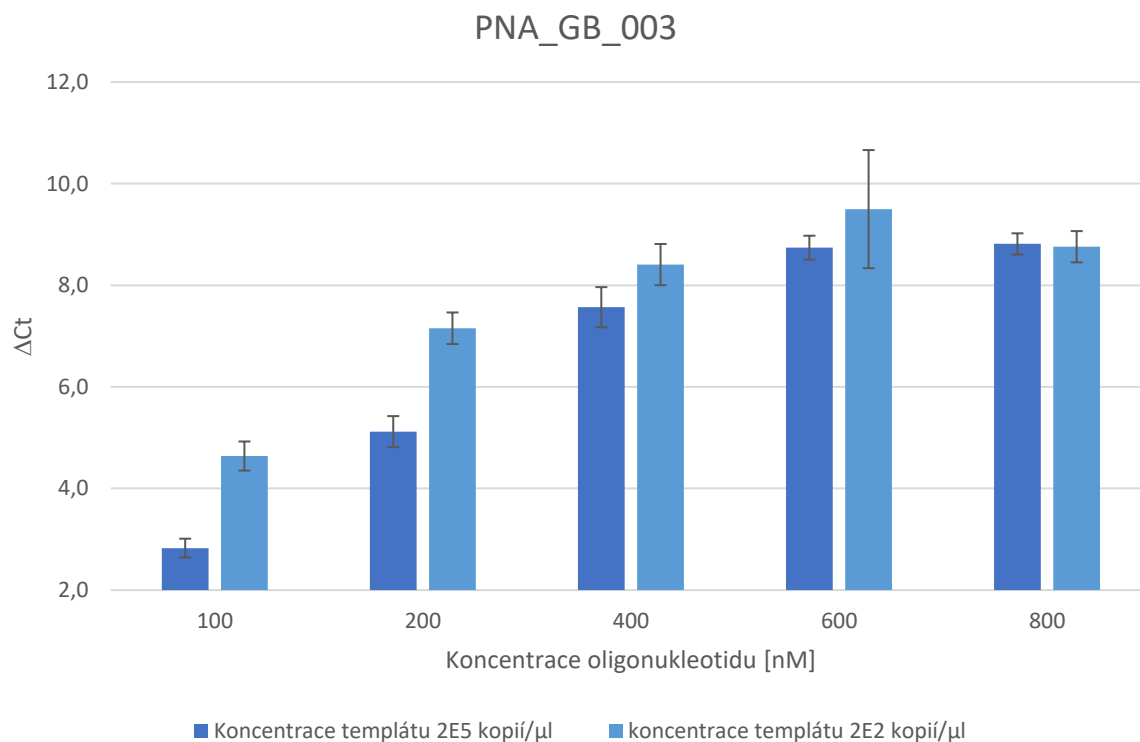


Graf 25 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Test inhibice tohoto oligonukleotidu byl proveden ještě jednou, tentokrát pouze ve vybraných koncentracích 100 – 800 nM (pro každou koncentraci minimálně 6 měření), při teplotě 60 °C a připraven byl za pomoci robotické pipetovací stanice.

Následující Graf 26 znázorňuje velikost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu pro 2 koncentrace templátu. Chybové úsečky pak prezentují směrodatné odchylky těchto hodnot.

Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací oligonukleotidu roste i míra inhibice a nejvýznamnější vliv na inhibici reakce je patrný v případě koncentrace 600 nM. Obecně lze pozorovat vyšší ΔC_t hodnoty pro koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

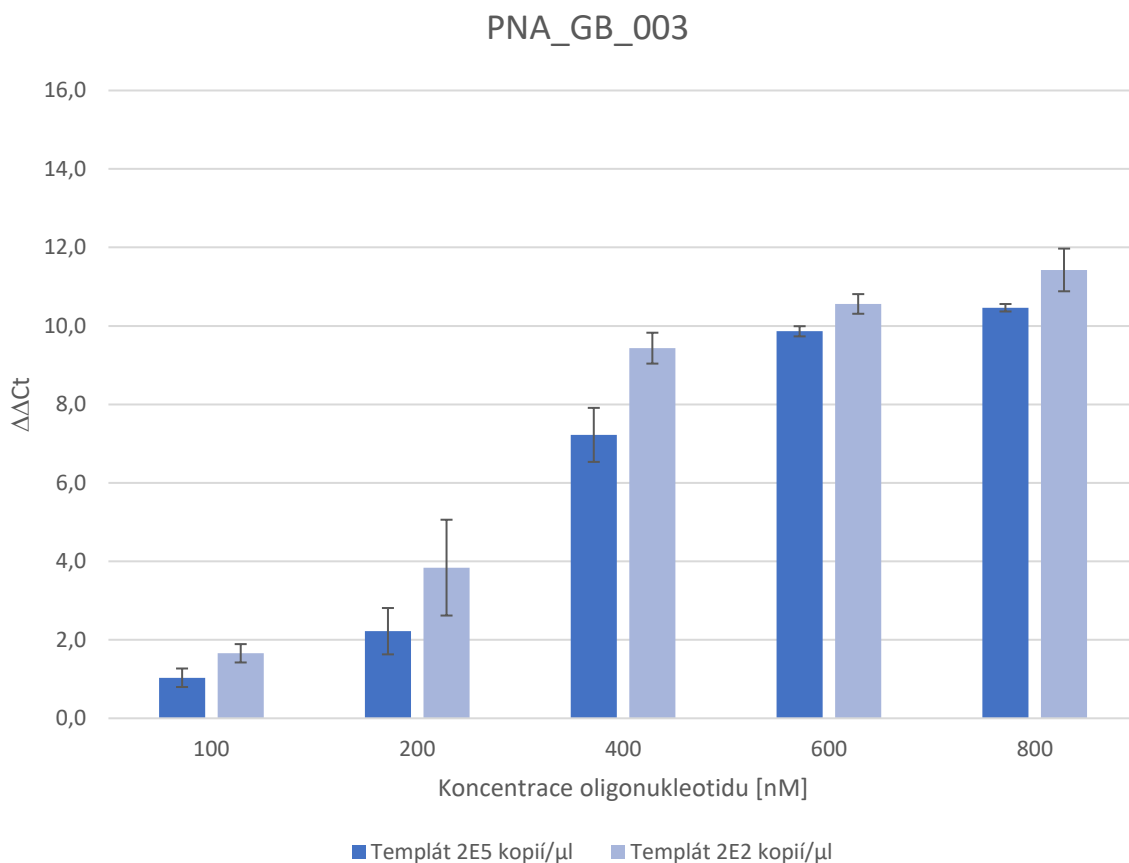


Graf 26 Průměrné ΔC_t hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice připraveného pomocí robotické pipetovací stanice. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

Vzhledem k výsledkům testu inhibice byla u tohoto oligonukleotidu otestována také specifita inhibice, a to na systémech hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2 (nespecifický systém), jako u předchozích oligonukleotidů.

V následujícím Grafu 27 jsou prezentovány průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu (100 – 800 nM) pro 2 koncentrace templátu. Směrodatné odchylky jsou prezentovány jako chybové úsečky jednotlivých bodů.

Z grafu je patrné, že u vyšších koncentrací oligonukleotidu pozorujeme vyšší $\Delta\Delta C_t$ hodnoty, a to u obou koncentrací templátové DNA. Tento oligonukleotid tedy inhibuje reakci specificky.



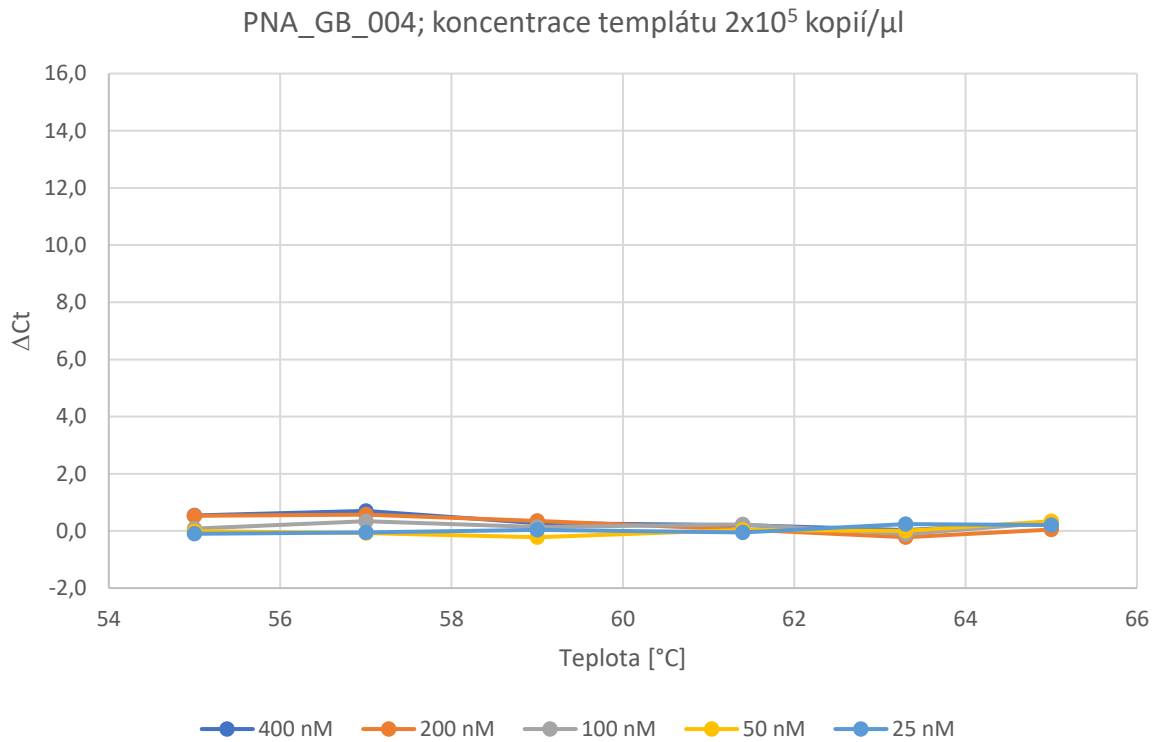
Graf 27 Průměrné $\Delta\Delta C_t$ hodnoty jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu specifity inhibice. Chybové úsečky znázorňují velikost směrodatné odchylky.

PNA s délkou sekvence 12 bází (PNA_GB_004)

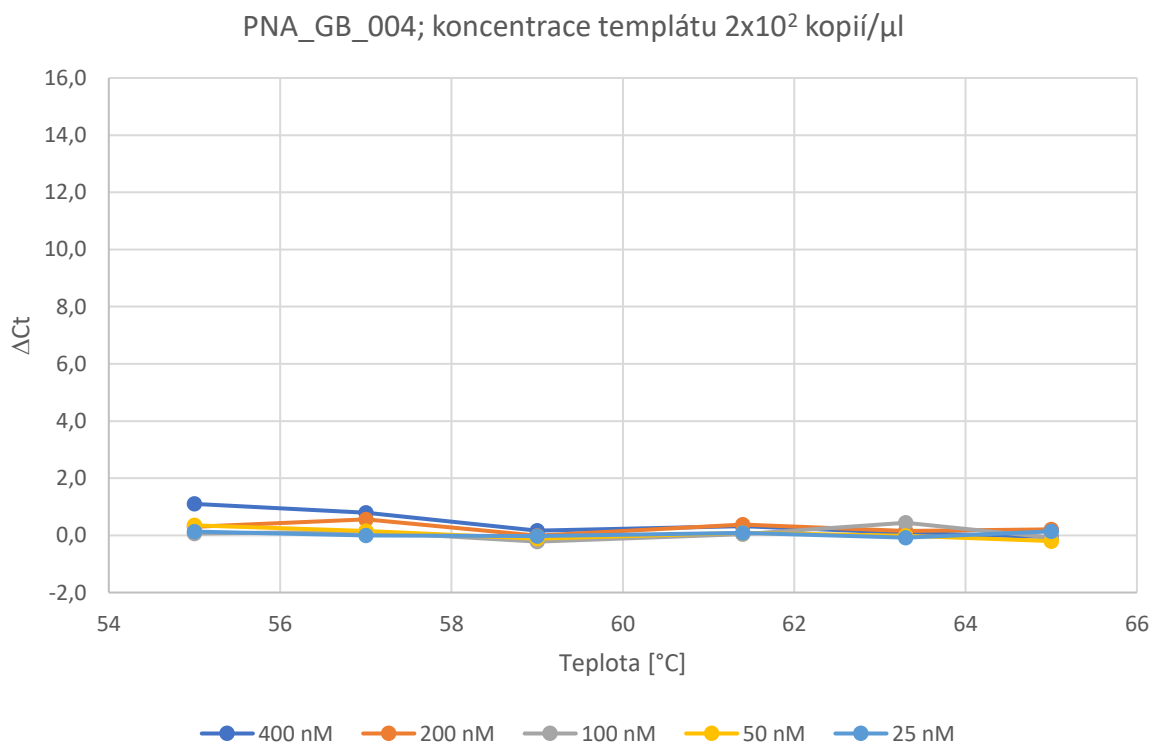
U tohoto oligonukleotidu byla otestována inhibice různých koncentrací oligonukleotidu (25 – 1000 nM) v teplotním gradientu 55-65 °C a ve 2 koncentracích templátové DNA.

Grafy 28 a 29 prezentují závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu na teplotě, přičemž pro každou koncentraci templátu byl sestaven samostatný graf.

Z grafů je patrné, že (na rozdíl od předchozího oligonukleotidu) nemá tento oligonukleotid výrazný inhibiční vliv na PCR reakci.



Graf 28 Závislost Δ Ct hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_004 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.



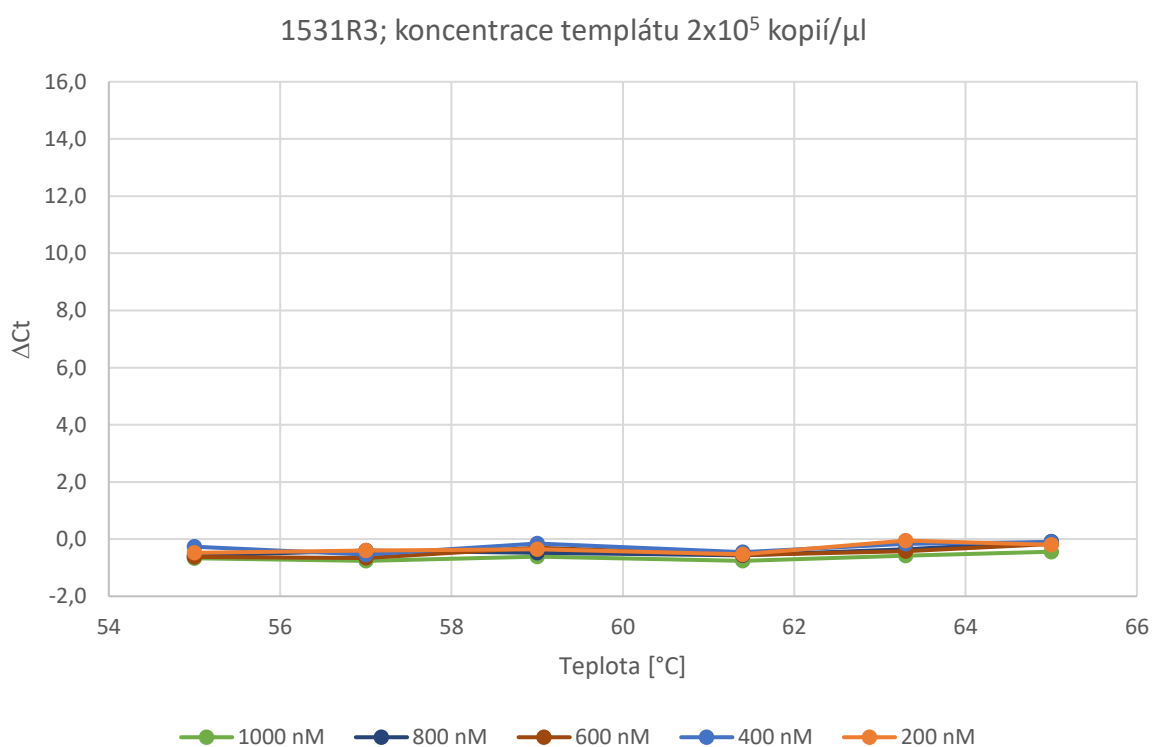
Graf 29 Závislost Δ Ct hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_004 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

3.2.4 5' C18 spacer

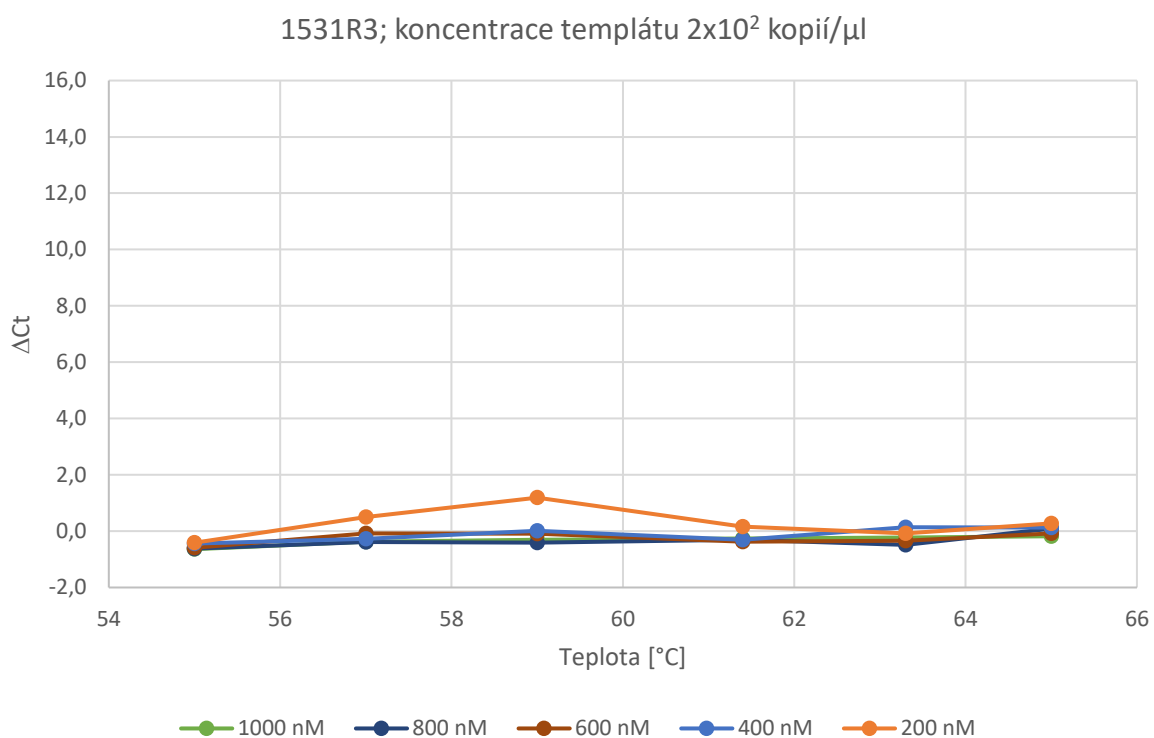
Stejně jako v případě 2'O-Me-RNA, byla u oligonukleotidů s touto modifikací otestována pouze obecná inhibice různých koncentrací oligonukleotidů (200 – 1000 nM) v teplotním gradientu 55-65 °C a ve 2 koncentracích templátové DNA.

Grafy 30 - 37 prezentují závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidů na teplotě, přičemž pro každou koncentraci templátu byl sestaven samostatný graf. Z grafů je patrné, že žádný z oligonukleotidů s touto modifikací nemá žádný výrazný inhibiční vliv na PCR reakci.

Oligonukleotid s délkou sekvence 25 bází, antisense orientace (1531R3)

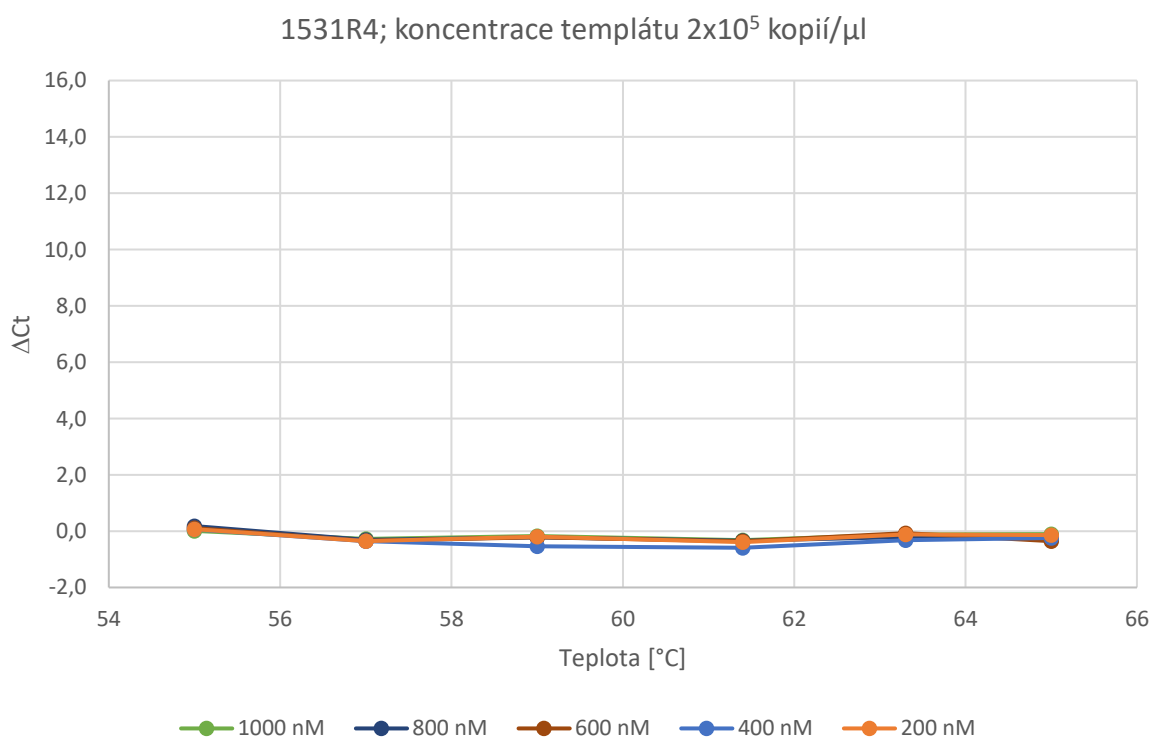


Graf 30 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R3 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

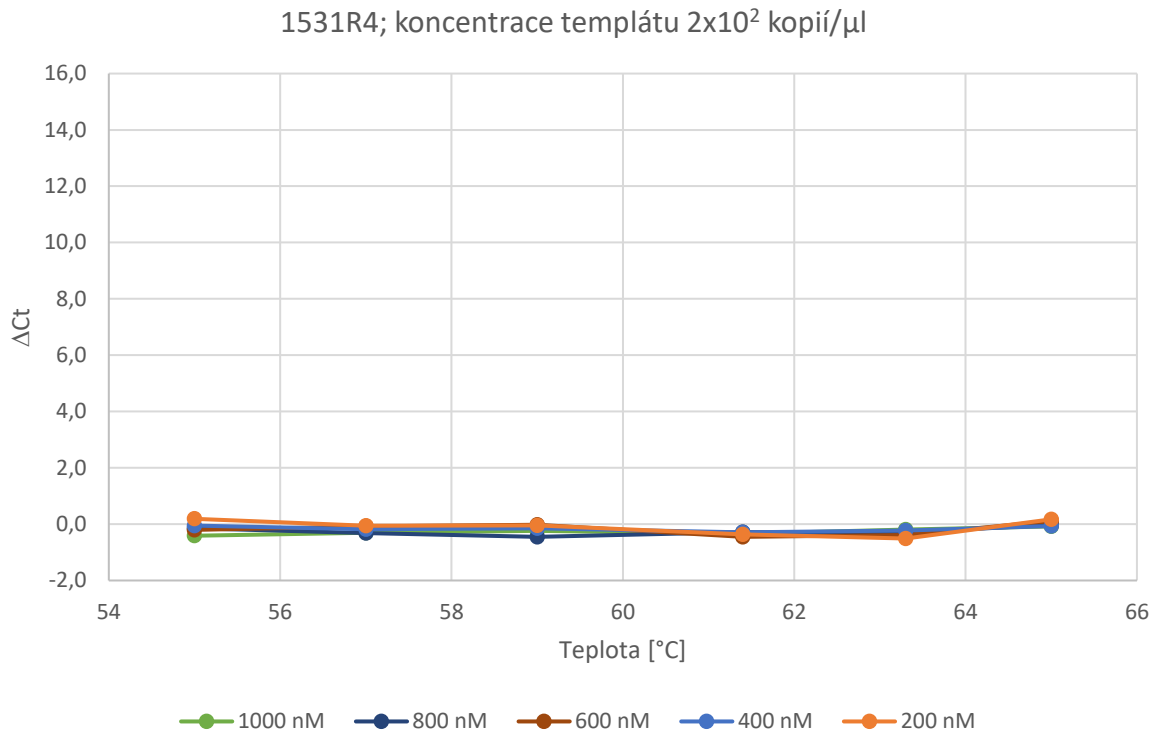


Graf 31 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R3 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Oligonukleotid s délkou sekvence 19 bází, antisense orientace (1531R4)

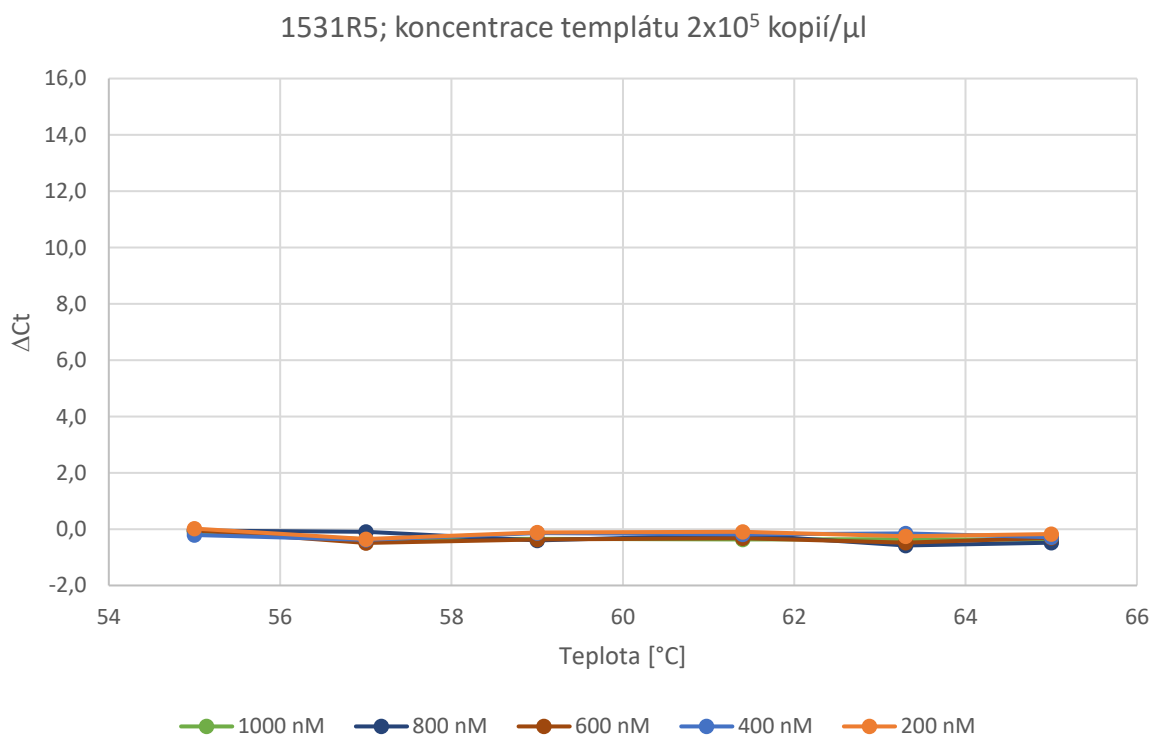


Graf 32 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R4 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

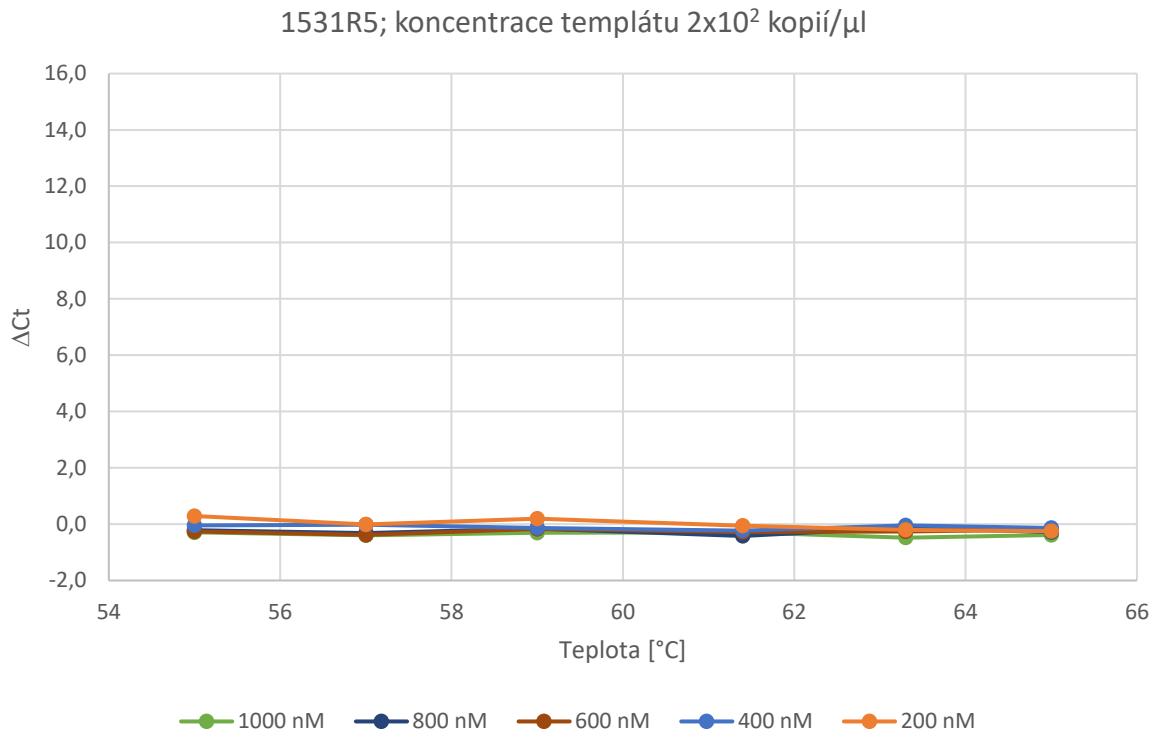


Graf 33 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R4 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Oligonukleotid s délkou sekvence 25 bází, sense orientace 1531 R5

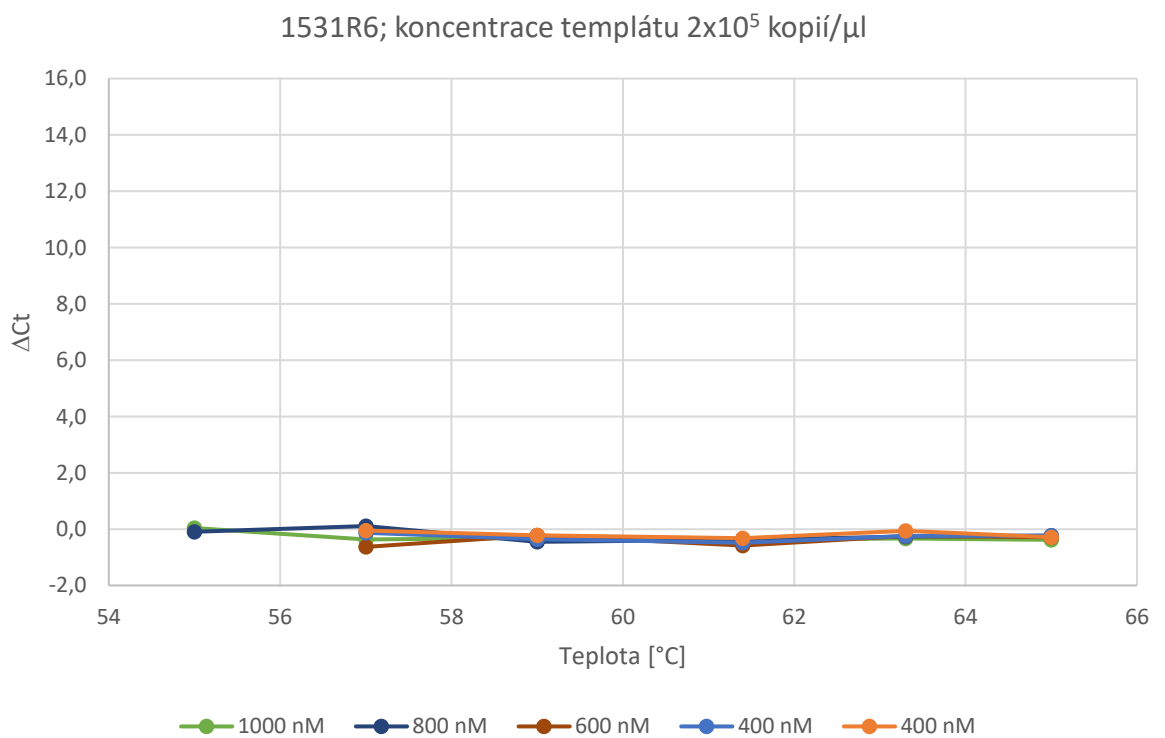


Graf 34 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R5 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

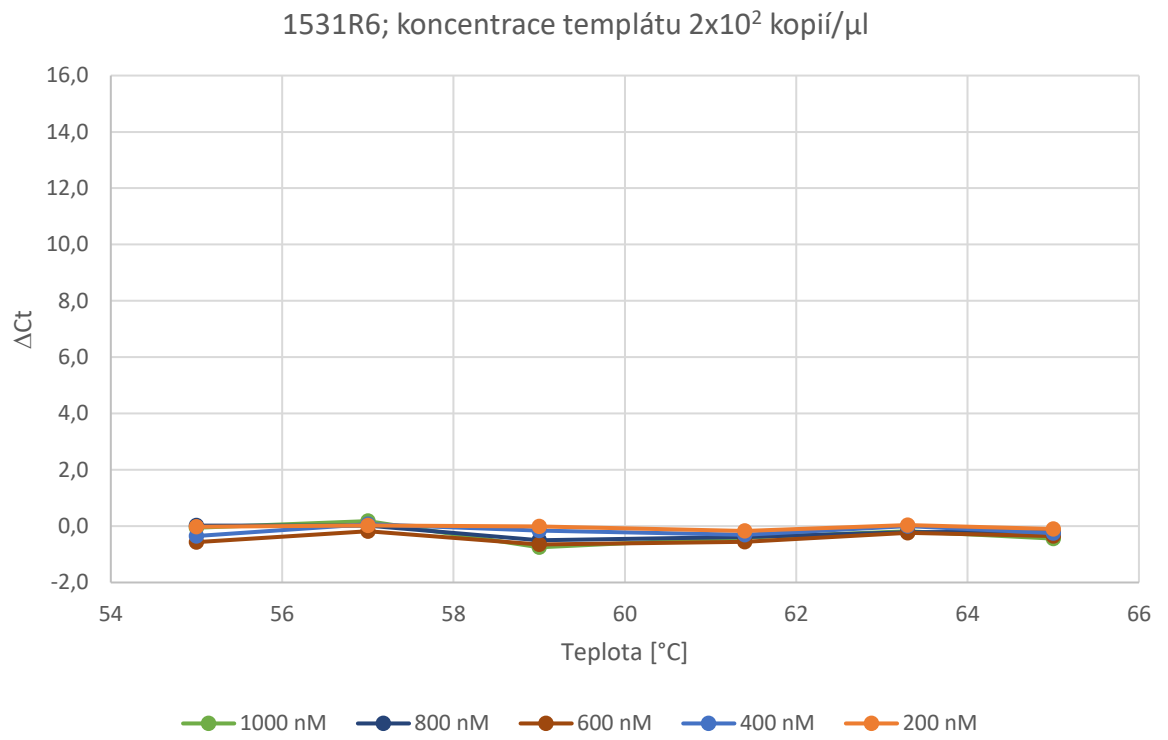


Graf 35 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R5 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Oligonukleotid s délkou sekvence 19 bází, sense orientace (1531R6)



Graf 36 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R6 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.



Graf 37 Závislost ΔC_t hodnot jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1531R6 na teplotě při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

4 DISKUZE A ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit, zda-li některé z modifikovaných oligonukleotidů dokáží specificky inhibovat PCR reakci. Testovanými oligonukleotidy byly fosforothioáty, 2'-O-Methyl-RNA, peptidová nukleová kyselina (PNA) a oligonukleotidy s 5' C18 spacerem. Sledován byl případný pokles fluorescenčního signálu v rámci real-time PCR reakce, doprovázený zvýšením prahové Ct hodnoty. Na různých systémech pak bylo otestováno, zda-li jsou inhibice oligonukleotidů specifické, či nikoliv.

První testovanou skupinou modifikovaných oligonukleotidů byly oligonukleotidy s fosforothioátovými vazbami. U této skupiny bylo zjištěno, že oligonukleotidy jsou schopné inhibovat, až úplně blokovat PCR reakce. Napříč všemi oligonukleotidy lze pozorovat, že míra inhibice (až úplná blokace) je větší s rostoucí délkou sekvence, s rostoucí koncentrací oligonukleotidů a s rostoucí reakční teplotou, přičemž byly pozorovány mírně lepší výsledky pro reakce s nižší koncentrací templátové DNA než s koncentrací vyšší. Úplnou blokaci PCR reakce lze pozorovat u nejvyšších koncentrací oligonukleotidů a nejméně výrazněji je u oligonukleotidů s nejdelší sekvencí. U kratších oligonukleotidů a s nižší koncentrací pak pozorujeme spíše inhibici PCR. Nicméně prostřednictvím testů specifity bylo prokázáno, že fosforothioáty inhibují reakci nespécificky. Jak můžeme vidět na výsledcích pro oligonukleotidy se střední délkou sekvence, typ purifikace nemá zásadní vliv na inhibici PCR. Vzhledem k tomu, že všechny oligonukleotidy z této skupiny byly připraveny s antisense orientací, nelze u nich porovnat vliv orientace oligonukleotidu na inhibici PCR.

Druhou skupinou testovaných oligonukleotidů byly 2'-O-Me-RNA oligonukleotidy. Z této skupiny poskytovaly lepší výsledky oligonukleotidy s delší sekvencí než oligonukleotidy s kratší sekvencí, avšak nejednalo se o zvlášť významnou inhibici. Proto u žádného oligonukleotidu z této skupiny nebyla testována specifita inhibice. Vzhledem k tomu, že oligonukleotidy s kratšími sekvencemi neinhibovaly reakci, nelze u nich porovnat vliv způsobu purifikace. U oligonukleotidů s delší sekvencí lze pozorovat, že při použití antisense orientace oligonukleotidu došlo k mírnému zlepšení závislosti ΔCt hodnot na teplotě.

Vzhledem k přechozím výsledkům byly do této diplomové práce zařazeny další oligonukleotidy, a to peptidová nukleová kyselina a oligonukleotidy s 18-ti atomovým spacerem na 5' konci.

U oligonukleotidu PNA_GB_003 (oligonukleotid s delší sekvencí) byla pozorována inhibice PCR reakce, která se zvyšovala s narůstající koncentrací oligonukleotidu.

Nejvýraznější efekt na inhibici měla koncentrace oligonukleotidu 400 nM. U koncentrací vyšších jak 400 nM pak nebyl jev zvyšování inhibice s rostoucí koncentrací oligonukleotidu tak výrazný. U vyšších koncentrací oligonukleotidu poté můžeme pozorovat u vyšších teplot mírné zlepšení inhibice PCR (vyšší ΔC_t). Test inhibice byl u tohoto oligonukleotidu připraven ručním pipetováním (viz předchozí výsledky) a poté také za pomoci robotické pipetovací stanice. Tento test poskytoval oproti ručnímu pipetování celkové nižší ΔC hodnoty. Jak později ukázal test inhibice na jiném systému, inhibuje tento oligonukleotid reakci specificky. Kromě výše zmíněného oligonukleotidu byl testován také oligonukleotid s kratší sekvencí (PNA_GB_004). U tohoto oligonukleotidu však, vzhledem k předchozímu oligonukleotidu, nebyla pozorována žádná významná míra inhibice. Na rozdíl od fosforothioátů, poskytovaly PNA lepší výsledky v reakcích s vyšší koncentrací templátu. Protože oba oligonukleotidy byly purifikovány pomocí HPLC a jsou orientovány ve stejném směru (oba mají sense orientaci), nelze u nich porovnat vliv těchto parametrů na inhibici PCR.

Poslední testovanou skupinou oligonukleotidů byly oligonukleotidy s 5' C18 spacerem. Testy pro tyto oligonukleotidy však neodhalily významnou míru inhibice, resp. reakce nebyla téměř vůbec inhibována. Nelze tedy u nich porovnat vliv výše probíraných parametrů na inhibici PCR, jako teplota, koncentrace oligonukleotidu a templátvé DNA, délka sekvence a její orientace nebo typ purifikace.

Cíl práce nejlépe splnila peptidová nukleová kyselina s délkou sekvence 18 párů bází (PNA_GB_003), která ze všech oligonukleotidů poskytovala nejlepší výsledky specifické inhibice. U ostatních oligonukleotidů nebylo dosaženo významně dobrých výsledků inhibice, případně reakci inhibovaly nesespecificky, proto u nich nebyl důvod přistupovat k dalším dílčím cílům této práce.

Výše zmíněný oligonukleotid PNA_GB_003 by bylo vhodné podrobit dalším analýzám, a to především analýzám s dalšími systémy. Zároveň by bylo vhodné zjistit příčinu tak velkého rozdílu výsledků v rámci obou PNA oligonukleotidů.

5 POUŽITÁ LITERATURA

ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Karen HOPKIN, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2014. *Essential cell biology*. 4th ed. New York: Garland Science. ISBN 978-081-5344-544.

AMARNATH, V. a A. D. BROOM, 1977. Chemical synthesis of oligonucleotides. *Chemical Reviews* [online]. **77**(2), 183-217 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1021/cr60306a002. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr60306a002>

C18 spacer, 2018. *Dharmacon* [online]. Dharmacon, a Horizon Discovery Group Co. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: http://dharmacon.horizondiscovery.com/uploadedFiles/Products/Custom_Synthesis/_modifications-details/unit-structure-c18spacer.html

DORAK, M, ed., 2006. *Real-time PCR*. Hoboken: Taylor & Francis. ISBN 0203967313.

Figure 1 | The phosphoramidite oligonucleotide synthesis cycle, b.r. In: *ATDBio* [online]. [cit. 2018-02-06]. Dostupné z: <https://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>

Figure 2. 2'-O-Methyl RNA, 2018. In: *Integrated DNA Technologies* [online]. Integrated DNA Technologies, Inc. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/using-antisense-technologies-to-modulate-noncoding-rna-function>

HOGREFE, Richard I., Brea MIDTHUNE a Alexandre LEBEDEV, 2013. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis. *Israel Journal of Chemistry* [online]. **53**(6-7), 326-349 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1002/ijch.201300032. ISSN 00212148. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijch.201300032>

Chemical Synthesis of Oligonucleotides, b.r. In: *Integrated DNA Technologies* [online]. [cit. 2018-02-05]. Dostupné z: http://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/technical-report/chemical-synthesis-of-oligos.pdf?sfvrsn=40483407_8

CHIEN, Alice, David EDGAR a John TRELA, 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*. **127**(3), 1550-1557. ISSN 0021-9193.

Know Your Oligo Mod: Phosphorothioate Bonds, 2018. In: *LGC Biosearch Technologies* [online]. USA: LGC Biosearch Technologies [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: <http://blog.biosearchtech.com/know-your-oligo-mod-phosphorothioate-bonds>

Leukemia [online], 2004. **18**(5) [cit. 2018-04-01]. ISSN 0887-6924.

MACKAY, I. M., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* [online]. **30**(6), 1292-1305 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1093/nar/30.6.1292. ISSN 13624962. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/30.6.1292>

Modifikace oligo, 2018. *Generi Biotech* [online]. Hradec Králové: GENERI BIOTECH, s.r.o. [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/modifikace-oligo/>

MULLIS, Kary B., 1994. The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*. **33**(12), 1209-1213. DOI: 10.1002/anie.199412091. ISSN 0570-0833. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.199412091>

NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M.J. CASTAÑO a J. SOLERA, 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. **439**, 231-250 [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017. ISSN 00098981. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898114004483>

Oligo Modifications for Increased Duplex Stability & Nuclease Resistance, 2018. In: *Gene Link™* [online]. V3.1. Hawthorne, NY: Gene Link™ [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: <http://www.genelink.com/literature/ps/duplexstability.pdf>

Oligo modifications that block nuclease degradation, 2018. *Integrated DNA Technologies* [online]. Integrated DNA Technologies, Inc. [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/modification-highlight-modifications-that-block-nuclease-degradation>

PNA PCR Blockers, 2018. In: *PNA Bio* [online]. California: PNA Bio Inc. [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: https://www.pnabio.com/products/PCR_blocker.htm

Purifikace oligo, 2018. *Generi Biotech* [online]. Hradec Králové: GENERI BIOTECH, s.r.o. [cit. 2018-04-06]. Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/oligo-purifikace/>

Real-time PCR, 2014. In: *LabGuide* [online]. [cit. 2017-12-05]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

REHMANN, Jill, 2004. Nucleic Acids. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 5th ed. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience. ISBN 9780471238966.

RYCHLIK, W., W.J. SPENCER a R.E. RHOADS, 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*. **18**(21), 6409-6412. DOI: 10.1093/nar/18.21.6409. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/18.21.6409>

SCHALLER, H., G. WEIMANN, B. LERCH a H. G. KHORANA, 1963. Studies on Polynucleotides. XXIV. 1 The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4). 2 Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3' Phosphates 3. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **85**(23), 3821-3827 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1021/ja00906a021. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00906a021>

Solid-phase oligonucleotide synthesis, 2005. *ATDBio: Oligo synthesis expert* [online]. United Kingdom: ATDBio Ltd. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>

Spacer C18 Oligo Modifications, 2018. *Gene Link* [online]. Gene Link™ [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: http://www.genelink.com/newsite/products/mod_detail.asp?modid=19

Spacer-18-(hexaethylenglycol), 2018. In: *Gene Link* [online]. Gene Link™ [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: http://www.genelink.com/newsite/products/mod_detail.asp?modid=19

Standard oligo structure, 2010. In: *Bioneer* [online]. Bioneer Corporation [cit. 2018-02-01]. Dostupné z: <https://us.bioneer.com/support/faqs.aspx>

ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ, 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.

The Polymerase Chain Reaction, 2005. CLARK, David. *Molecular biology: [understanding the genetic revolution]*. 1st edition. Amsterdam [u.a.]: Elsevier, s. 634 - 661. ISBN 0121755517.

What Is a Ct Value?, 2017. *Bitesize Bio* [online]. Science Squared [cit. 2018-02-01]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>

6 ZDROJE POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1

ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Karen HOPKIN, Alexander D JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER, 2014. *Essential cell biology*. 4th ed. New York: Garland Science. ISBN 978-081-5344-544.

Obrázek 2

Three steps of PCR, b.r. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2017-12-05]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>

Obrázek 3

DORAK, M Tefik, ed., 2006. *Real-time PCR*. Hoboken: Taylor & Francis. ISBN 0203967313.

Obrázek 4

Real-time PCR, 2014. In: *LabGuide* [online]. [cit. 2017-12-05]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

Obrázek 5

Standard oligo structure. In: *Bioneer* [online]. Bioneer Corporation, 2010 [cit. 2018-02-01]. Dostupné z: <https://us.bioneer.com/support/faqs.aspx>

Obrázek 6

Fig.2. In: *Bioneer* [online]. Bioneer Corporation, 2010 [cit. 2018-02-06]. Dostupné z: <https://us.bioneer.com/support/faqs.aspx>

Obrázek 7

Figure 1 | The phosphoramidite oligonucleotide synthesis cycle. In: *ATDBio* [online]. [cit. 2018-02-06]. Dostupné z: <https://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>

Obrázek 8

Oligo Modifications for Increased Duplex Stability & Nuclease Resistance, 2018. In: *Gene Link™* [online]. V3.1. Hawthorne, NY: Gene Link™ [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: <http://www.genelink.com/literature/ps/duplexstability.pdf>

Obrázek 9

Know Your Oligo Mod: Phosphorothioate Bonds. In: LGC Biosearch Technologies [online]. USA: LGC Biosearch Technologies, 2018 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: <http://blog.biosearchtech.com/know-your-oligo-mod-phosphorothioate-bonds>

Obrázek 10

Figure 2. 2'-O-Methyl RNA. In: Integrated DNA Technologies [online]. Integrated DNA Technologies, ©2018, Mar 29, 2013. Revised/updated Oct 28, 2015 [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/using-antisense-technologies-to-modulate-noncoding-rna-function>

Obrázek 11

VAN DER BURG, M, T S POULSEN, S P HUNGER, H B BEVERLOO, E M E SMIT, K VANG-NIELSEN, A W LANGERAK a J J M VAN DONGEN. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia [online]. 2004, 18(5), 895-908 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1038/sj.leu.2403340. ISSN 0887-6924. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/2403340>

Obrázek 12

Spacer-18-(hexaethylenglycol). In: Gene Link [online]. Gene Link™, ©2018 [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: http://www.genelink.com/newsite/products/mod_detail.asp?modid=19

Obrázek 13

Vlastní tvorba.

Obrázek 14

Vlastní tvorba.

Obrázek 15

Vlastní tvorba.

Obrázek 16

Vlastní tvorba.

Obrázek 17

Vlastní tvorba.

7 PŘÍLOHY

7.1 Naměřené Ct hodnoty

Fosforothioáty

1932 Z1

Ct	H-0	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-0	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	16,88	N/A	N/A	N/A	49,61	21,69	26,20	N/A	N/A	N/A	N/A	26,89
63,3	16,67	N/A	N/A	N/A	44,45	20,51	26,04	N/A	N/A	N/A	N/A	31,17
61,4	16,80	N/A	N/A	N/A	44,82	21,49	26,00	N/A	N/A	N/A	N/A	32,17
59,0	16,58	N/A	N/A	N/A	N/A	22,82	26,01	N/A	N/A	N/A	N/A	35,61
57,0	16,59	N/A	N/A	N/A	N/A	27,02	25,99	N/A	N/A	N/A	N/A	40,28
55,0	16,59	N/A	N/A	N/A	N/A	30,43	26,18	N/A	N/A	N/A	N/A	43,48

Tabulka 5 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

Ct	H-0	H-50	H-25	L-0	L-50	L-25
65,0	16,46	42,84	21,18	26,33	N/A	31,75
63,3	16,35	39,54	19,12	26,08	N/A	30,45
61,4	16,40	40,58	19,87	25,91	N/A	30,81
59,0	16,21	34,89	22,36	25,82	N/A	34,11
57,0	16,33	N/A	25,14	26,07	N/A	39,45
55,0	16,72	N/A	28,36	26,32	N/A	N/A

Tabulka 6 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

hCCL2_Q1	H-0	H-9,6	H-24	H-60	H-150	L-0	L-9,6	L-24	L-60	L-150
Ct 1	16,07	15,9	16,99	35,73	N/A	26,08	26,09	27,90	N/A	N/A
Ct 2	16,12	15,84	17,04	37,41	N/A	26,19	25,75	27,68	N/A	N/A
Ct 3	15,82	15,79	17,12	36,15	N/A	26,06	26,04	27,76	N/A	N/A

Tabulka 7 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

mAngptl3_Q2	H-0	H-9,6	H-24	H-60	H-150	L-0	L-9,6	L-24	L-60	L-150
Ct 1	15,79	15,79	16,23	23,17	N/A	25,99	25,57	26,00	38,95	N/A
Ct 2	15,55	15,33	16,19	21,35	N/A	25,86	25,41	26,11	36,22	N/A
Ct 3	16,08	15,74	16,29	21,62	N/A	25,81	25,52	26,18	36,70	N/A

Tabulka 8 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

Systém	hCCL2_Q1				mAngptl3_Q2				
	Konc. olig. [nM]	0	64	160	400	0	64	160	400
Ct 1	16,2	N/A	N/A	N/A	15,88	41,14	N/A	N/A	
Ct 2	15,86	N/A	N/A	N/A	16,06	42,78	N/A	N/A	
Ct 3	15,85	N/A	N/A	N/A	16,05	45,03	N/A	N/A	

Tabulka 9 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice na 4 systémech, systém hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/μl.

Systém	mGusb_Q2				mSurf1_Q1				
	Konc. olig. [nM]	0	64	160	400	0	64	160	400
Ct 1	15,07	42,28	N/A	N/A	16,39	N/A	N/A	N/A	
Ct 2	15,15	41,74	N/A	N/A	16,11	N/A	N/A	N/A	
Ct 3	15,26	43,84	N/A	N/A	16,47	N/A	N/A	N/A	

Tabulka 10 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice na 4 systémech, systém mGusb_Q2 a mSurf1_Q1. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/μl.

1932 Z0

Ct	H-0	H-200	H-100	H-50	H-25	H-12,5	L-0	L-200	L-100	L-50	L-25	L-12,5
65,0	16,31	26,34	17,10	16,00	16,12	15,93	25,93	N/A	30,05	26,36	26,06	26,06
63,3	16,06	25,67	16,50	15,67	15,91	15,87	25,73	48,19	28,78	25,57	25,67	25,48
61,4	16,17	26,57	16,65	15,51	15,66	15,90	25,67	49,29	29,08	25,60	25,29	25,50
59,0	16,04	30,87	17,73	15,79	15,63	15,92	25,59	N/A	31,24	25,87	25,42	25,47
57,0	16,03	36,47	18,73	15,51	15,58	15,85	25,76	N/A	34,21	26,40	25,75	25,77
55,0	16,08	42,90	20,14	16,35	16,18	16,12	25,93	N/A	36,60	26,91	26,00	25,86

Tabulka 11 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

Ct	H-0	H-400	H-200	H-100	L-0	L-400	L-200	L-100
65,0	16,46	N/A	34,21	18,52	26,33	N/A	N/A	30,11
63,3	16,35	N/A	30,52	17,59	26,08	N/A	N/A	28,23
61,4	16,40	N/A	31,78	17,90	25,91	N/A	N/A	28,47
59,0	16,21	N/A	35,67	19,10	25,82	N/A	N/A	30,22
57,0	16,33	N/A	41,59	21,01	26,07	N/A	N/A	33,72
55,0	16,72	N/A	N/A	21,49	26,32	N/A	N/A	34,95

Tabulka 12 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 (1. řádek; v nM) v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec; ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

hCCL2_Q1	H-0	H-26	H-64	H-160	H-400	L-0	L-26	L-64	L-160	L-400
Ct 1	16,18	16,19	16,06	24,55	N/A	26,03	26,12	26,35	38,78	N/A
Ct 2	16,19	16,04	16,27	23,51	N/A	25,89	26,04	26,47	39,85	N/A
Ct 3	16,13	16,01	16,04	23,66	N/A	25,97	25,14	26,33	40,80	N/A

Tabulka 13 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

mAngptl3_Q2	H-0	H-26	H-64	H-160	H-400	L-0	L-26	L-64	L-160	L-400
Ct 1	15,44	15,38	15,56	18,51	N/A	25,56	25,73	25,66	31,47	N/A
Ct 2	15,46	15,47	15,96	19,17	N/A	25,60	25,60	25,68	29,33	N/A
Ct 3	N/A	17,79	26,43	43,49	N/A	25,53	25,65	25,64	30,18	N/A

Tabulka 14 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L). Červeně zvýrazněné hodnoty byly kvůli své extrémnosti vyřazeny z dalších výpočtů.

Systém	hCCL2_Q1					mAngptl3_Q2				
	Konc. olig. [nM]	0	26	64	160	400	0	26	64	160
Ct 1	16,2	20,04	N/A	N/A	N/A	15,88	17,53	33,16	N/A	N/A
Ct 2	15,86	20,38	N/A	N/A	N/A	16,06	17,64	31,56	N/A	N/A
Ct 3	15,85	20,97	N/A	N/A	N/A	16,05	17,9	35,21	N/A	N/A

Tabulka 15 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice na 4 systémech, systém hCCL2_Q1 a mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/μl.

Systém	mGusb_Q2					mSurfl_Q1				
	Konc. olig. [nM]	0	26	64	160	400	0	26	64	160
Ct 1	15,07	16,16	32,26	N/A	N/A	16,39	21,04	N/A	N/A	N/A
Ct 2	15,15	16,16	34,78	N/A	N/A	16,11	22,73	N/A	N/A	N/A
Ct 3	15,26	16,52	31,28	N/A	N/A	16,47	22,89	N/A	N/A	N/A

Tabulka 16 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice na 4 systémech, systém mGusb_Q2 a mSurfl_Q1. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/μl.

1932 U9

Ct	H-0	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-0	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	16,78	35,65	23,37	17,97	17,42	17,10	26,41	N/A	35,84	29,13	27,19	26,77
63,3	16,89	34,97	20,46	16,91	16,49	16,44	26,09	N/A	32,84	27,29	26,21	26,05
61,4	16,74	34,08	19,87	17,22	16,53	16,33	26,22	N/A	32,54	27,02	26,08	25,88
59,0	16,60	37,07	22,22	17,55	16,52	16,31	26,06	N/A	35,40	27,95	26,13	26,24
57,0	16,79	43,78	23,94	17,89	16,78	16,50	26,06	N/A	38,78	29,18	26,62	26,97
55,0	16,64	46,90	25,38	18,55	17,28	16,97	37,71	N/A	N/A	29,61	26,70	26,76

Tabulka 17 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U9 (1. řádek; v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

hCCL2_Q1	H-0	H-26	H-64	H-160	H-400	L-0	L-26	L-64	L-160	L-400
Ct 1	16,11	15,88	15,82	16,12	19,25	25,90	25,92	26,05	26,53	N/A
Ct 2	16,06	15,77	15,94	16,11	18,78	25,94	25,79	25,97	25,97	32,83
Ct 3	16,13	16,02	15,81	15,88	19,43	25,75	25,87	25,95	25,99	32,84

Tabulka 18 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U9 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

mAngptl3_Q2	H-0	H-26	H-64	H-160	H-400	L-0	L-26	L-64	L-160	L-400
Ct 1	15,75	15,59	15,93	16,00	16,97	25,74	25,72	25,66	25,82	27,91
Ct 2	16,06	15,66	16,19	16,05	16,93	25,77	25,67	25,90	25,54	27,35
Ct 3	16,24	16,01	16,06	15,91	17,10	25,69	25,84	25,74	25,54	27,74

Tabulka 19 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U9 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1932 U7

hCCL2_Q1	H-0	H-24	H-60	H-150	L-0	L-24	L-60	L-150
Ct 1	16,07	16,28	30,45	N/A	26,08	27,08	48,95	N/A
Ct 2	16,12	16,20	31,15	N/A	26,19	26,90	45,57	N/A
Ct 3	15,82	16,72	30,93	N/A	26,06	27,25	N/A	N/A

Tabulka 20 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U7 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

mAngptl3_Q2	H-0	H-24	H-60	H-150	L-0	L-24	L-60	L-150
Ct 1	15,79	15,95	18,72	N/A	25,99	25,95	33,84	N/A
Ct 2	15,55	15,71	19,01	N/A	25,86	26,13	33,71	N/A
Ct 3	16,08	18,20	20,29	N/A	25,81	26,11	33,86	N/A

Tabulka 21 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U7 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1932 U6

Ct	H-0	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-0	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	16,44	N/A	22,18	16,67	16,36	16,31	26,11	N/A	37,20	27,12	26,12	26,37
63,3	16,37	N/A	22,13	16,49	16,08	16,28	26,05	N/A	37,01	26,55	25,72	25,92
61,4	16,30	N/A	22,89	16,82	16,24	16,17	25,86	N/A	39,03	26,65	25,80	25,94
59,0	16,26	N/A	25,53	17,58	16,11	16,01	25,62	N/A	43,91	27,87	25,89	25,86
57,0	16,53	N/A	28,31	18,26	16,13	16,12	26,01	N/A	N/A	29,37	26,13	26,13
55,0	16,32	N/A	33,07	19,43	16,73	16,55	26,09	N/A	N/A	32,61	26,79	26,67

Tabulka 22 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U6 (1. řádek; v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

hCCL2_Q1	H-0	H-64	H-160	H-400	L-0	L-64	L-160	L-400
Ct 1	16,18	16,09	21,68	N/A	26,03	26,12	35,59	N/A
Ct 2	16,19	16,12	20,71	N/A	25,89	26,06	35,30	N/A
Ct 3	16,13	16,10	21,96	N/A	25,97	26,03	35,70	N/A

Tabulka 23 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U6 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

mAngptl3_Q2	H-0	H-64	H-160	H-400	L-0	L-64	L-160	L-400
Ct 1	15,44	15,96	19,07	36,93	25,56	25,54	29,03	N/A
Ct 2	15,46	16,16	18,65	N/A	25,60	25,34	28,58	N/A
Ct 3	N/A	N/A	N/A	N/A	25,53	25,73	31,36	N/A

Tabulka 24 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U6 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1932 U5

hCCL2_Q1	H-0	H-64	H-160	H-400	L-0	L-64	L-160	L-400
Ct 1	16,11	15,98	15,96	18,24	25,9	26,03	26,25	31,07
Ct 2	16,06	16,02	16,03	17,61	25,94	26,04	25,85	30,09
Ct 3	16,13	16,18	15,97	17,89	25,75	26,07	26,36	33,14

Tabulka 25 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U5 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

mAngptl3_Q2	H-0	H-64	H-160	H-400	L-0	L-64	L-160	L-400
Ct 1	15,75	16,08	16,06	16,38	25,74	25,59	25,63	26,56
Ct 2	16,06	16,1	16,11	16,6	25,77	25,8	25,76	26,76
Ct 3	16,24	16,07	16,01	16,51	25,69	25,86	25,62	27

Tabulka 26 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1392U5 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

2'O-Me-RNA

1410 P1

Ct	H-0	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10	L-0	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10
65,0	16,24	16,27	16,13	16,31	16,24	16,05	26,31	26,42	26,39	26,36	26,51	26,59
63,3	16,15	16,03	16,03	16,10	16,19	16,13	26,22	26,17	26,35	26,23	26,16	26,48
61,4	16,01	16,22	16,11	15,97	16,11	15,78	25,97	26,35	26,16	25,94	25,88	26,07
59,0	16,21	16,28	16,24	16,08	16,01	16,05	26,13	26,46	26,34	26,27	26,22	26,12
57,0	16,25	16,47	16,28	16,10	16,05	15,96	26,07	26,51	26,24	26,25	26,18	26,09
55,0	16,05	16,64	16,53	16,09	16,55	16,12	26,18	26,59	26,36	26,25	26,18	26,36

Tabulka 27 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P1 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1410 P1-A1

Ct	H-0	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10	L-0	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10
65,0	16,25	16,33	16,36	16,50	16,55	16,40	26,43	26,84	27,02	26,58	26,87	26,70
63,3	16,47	16,33	16,06	16,08	16,18	16,10	26,38	26,30	26,55	26,50	26,65	26,24
61,4	16,16	16,26	16,33	16,23	16,08	16,10	26,27	26,58	26,37	26,30	26,04	26,18
59,0	16,29	16,76	16,29	16,21	16,24	15,94	26,26	26,73	26,82	26,53	26,49	26,28
57,0	16,34	16,64	16,39	16,17	16,36	16,15	26,25	26,75	26,57	26,50	26,35	26,10
55,0	16,49	17,04	16,59	16,27	16,19	16,31	26,48	26,80	26,95	26,79	26,55	26,37

Tabulka 28 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P1-A1 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1410 P2

Ct	H-0	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10	L-0	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10
65,0	16,06	17,27	17,13	16,65	16,30	16,17	26,46	27,88	27,52	27,12	27,01	26,81
63,3	16,11	16,62	16,02	16,49	16,02	15,82	26,26	26,85	27,00	26,66	26,38	26,32
61,4	16,10	16,60	16,80	16,37	16,04	15,79	26,21	27,07	26,78	26,41	26,08	26,15
59,0	16,02	18,93	17,18	16,35	16,05	15,85	26,29	27,61	27,20	26,73	26,53	26,31
57,0	15,99	17,88	17,09	16,25	16,16	15,72	26,38	28,09	27,45	26,75	26,59	26,43
55,0	15,85	17,83	17,43	16,86	16,32	16,03	26,31	28,70	28,29	27,27	26,73	26,30

Tabulka 29 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P2 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

Ct	H-0	H-4000	H-2000	H-1000	H-500	H-250	L-0	L-4000	L-2000	L-1000	L-500	L-250
65,0	15,99	18,72	17,57	17,42	17,31	17,23	26,41	30,22	28,73	29,08	29,34	27,88
63,3	15,88	17,16	16,81	17,11	16,80	16,73	26,13	28,18	27,38	27,37	28,01	28,49
61,4	16,13	17,52	17,14	17,36	16,69	16,68	26,10	28,09	27,35	27,74	27,26	27,03
59,0	16,13	18,74	17,99	17,86	17,66	17,18	26,10	28,86	28,24	28,37	29,08	28,28
57,0	16,01	19,58	18,67	17,79	17,76	17,30	26,26	30,44	29,31	28,79	29,51	27,86
55,0	16,95	20,13	24,83	18,51	19,08	17,88	26,40	31,44	30,38	29,95	30,86	28,97

Tabulka 30 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P2 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1410 P5

Ct	H-0	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10	L-0	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10
65,0	16,09	16,85	16,88	16,76	16,46	16,18	26,60	28,03	27,98	27,52	27,13	27,09
63,3	15,82	17,12	16,54	16,23	16,20	16,10	26,39	28,11	28,04	27,22	26,75	26,47
61,4	16,11	16,99	16,67	16,31	16,28	16,01	26,28	28,34	27,74	27,22	26,76	26,53
59,0	15,97	17,18	17,02	16,61	16,31	15,79	26,34	28,49	28,52	27,63	26,96	26,77
57,0	16,29	17,49	17,32	16,85	16,46	16,00	26,23	28,93	28,57	27,92	26,92	26,52
55,0	16,13	17,78	17,09	17,04	16,55	16,32	26,21	29,40	29,01	28,45	27,01	27,02

Tabulka 31 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P5 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

Ct	0	400	160	64	25	10
65,0	16,28	19,99	17,99	17,59	17,23	16,99
63,3	16,01	19,56	18,08	17,39	17,12	16,91
61,4	16,04	19,73	18,04	17,38	16,96	17,01
59,0	16,22	20,07	18,37	17,88	17,47	17,16
57,0	16,07	21,09	19,03	18,26	17,62	17,48
55,0	16,15	21,27	19,49	17,98	18,24	17,89

Tabulka 32 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1410P5 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/μl.

PNA

PNA_GB_003

Ct	H-0	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-0	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	15,55	25,78	21,46	17,91	17,06	16,60	26,79	36,49	33,98	29,28	27,94	27,49
63,3	16,20	26,28	21,57	17,67	16,57	16,24	26,40	37,34	34,09	29,18	27,41	26,77
61,4	15,88	26,22	21,39	17,64	16,44	16,17	26,29	38,26	34,15	28,88	27,38	27,15
59,0	16,20	27,19	22,18	17,93	16,82	16,46	26,44	38,19	34,74	29,53	27,51	27,05
57,0	16,42	27,55	22,13	17,89	16,63	16,38	26,44	38,57	35,06	29,50	27,55	26,96
55,0	16,36	28,19	22,18	18,04	16,85	16,46	26,61	39,32	35,15	29,57	28,23	27,17

Tabulka 33 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 1. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

Ct	H-0	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-0	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	16,25	27,31	27,04	26,81	26,43	22,46	26,59	37,89	38,31	37,21	37,29	35,41
63,3	16,14	27,30	26,76	26,58	25,86	21,93	26,29	37,06	38,11	37,74	37,21	35,07
61,4	16,10	28,01	27,38	27,21	25,99	22,13	26,18	36,67	38,62	37,75	37,24	35,63
59,0	16,22	28,90	28,37	28,02	27,20	22,70	26,36	39,88	N/A	39,46	39,89	35,45
57,0	16,22	29,62	29,13	28,70	28,07	22,96	26,38	40,98	38,42	41,16	39,12	36,34
55,0	16,51	31,14	30,05	29,37	27,60	22,90	26,48	39,88	N/A	N/A	N/A	36,92

Tabulka 34 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice, 2. měření. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

Konc. olig. [nM]	0	100	200	400	600	800		
Ct 1	16,62	16,34	19,15	21,46	23,58	23,64	25,06	25,13
Ct 2	16,24	16,68	19,22	21,60	24,09	23,50	25,43	25,27
Ct 3	16,29	16,42	19,40	21,79	24,28	24,04	25,16	25,37
Ct 4	16,29	16,55	19,30	21,99	24,50	24,47	25,41	25,40
Ct 5	16,45	16,26	19,29	21,34	23,93	23,64	25,02	25,07
Ct 6	16,54	16,75	19,32	21,25	24,54	24,05	25,08	25,36

Tabulka 35 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice připraveného robotickou pipetovací stanicí. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^5 kopií/μl.

Konc. olig. [nM]	0	100	200	400	600	800		
Ct 1	27,40	27,29	32,28	34,13	35,86	35,53	36,04	35,77
Ct 2	27,20	27,45	31,77	34,15	35,10	35,11	37,04	36,00
Ct 3	27,29	27,26	32,29	34,77	36,09	36,15	36,34	36,06
Ct 4	27,62	27,28	31,76	34,59	35,64	35,86	35,60	36,01
Ct 5	27,73	27,24	32,04	34,70	36,11	36,19	36,88	36,61
Ct 6	27,12	27,29	31,78	34,67	35,47	35,95	39,18	36,19

Tabulka 36 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 v rámci testu inhibice připraveného robotickou pipetovací stanicí. Měřeno pro koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

hCCL2_Q1	H-0	H-100	H-200	H-400	H-600	H-800	L-0	L-100	L-200	L-400	L-600	L-800
Ct 1	15,87	17,10	17,30	23,45	25,76	26,47	26,31	28,08	30,16	35,22	36,67	37,17
Ct 2	16,00	16,94	18,47	23,55	25,94	26,35	26,25	27,65	31,63	35,93	37,22	37,52
Ct 3	15,90	16,61	18,59	22,06	25,69	26,49	26,14	27,62	28,67	36,08	36,86	38,42

Tabulka 37 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém hCCL2_Q1. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l (H) a 2×10^2 kopií/ μ l (L).

mAngptl3_Q2	H-0	H-100	H-200	H-400	H-600	H-800	L-0	L-100	L-200	L-400	L-600	L-800
Ct 1	16,15	16,02	16,21	16,06	16,15	16,25	26,05	25,90	26,09	26,05	26,08	26,12
Ct 2	16,21	16,09	16,11	16,11	16,24	16,20	25,96	25,82	26,09	25,97	26,14	25,98
Ct 3	16,22	16,25	16,19	16,03	16,22	16,28	25,90	25,87	25,97	26,12	26,06	25,94

Tabulka 38 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_003 (1. řádek; v nM) v rámci testu specifity inhibice na 2 systémech, systém mAngptl3_Q2. Měřeno pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l (H) a 2×10^2 kopií/ μ l (L).

PNA_GB_004

Ct	H-0	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-0	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	16,17	16,46	16,22	16,46	16,51	16,38	26,83	26,77	27,04	26,75	26,63	26,97
63,3	16,17	16,20	15,95	16,06	16,17	16,41	26,50	26,59	26,65	26,94	26,49	26,42
61,4	16,04	16,25	16,09	16,27	16,08	15,99	26,21	26,53	26,59	26,25	26,30	26,30
59,0	16,13	16,40	16,48	16,27	15,91	16,17	26,58	26,75	26,57	26,36	26,47	26,55
57,0	16,04	16,74	16,61	16,38	15,96	15,99	26,37	27,16	26,93	26,50	26,52	26,37
55,0	16,26	16,80	16,79	16,34	16,25	16,16	26,58	27,68	26,88	26,64	26,93	26,71

Tabulka 39 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu PNA_GB_004 (1. řádek; v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l (H) a 2×10^2 kopií/ μ l (L).

5'C18 spacer

1531 R3

Ct	H-0	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-0	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	16,63	16,19	16,54	16,46	16,53	16,43	27,05	26,87	27,14	26,97	27,18	27,32
63,3	16,60	16,02	16,24	16,18	16,44	16,55	27,01	26,78	26,52	26,67	27,15	26,93
61,4	16,85	16,09	16,28	16,29	16,39	16,32	26,89	26,63	26,59	26,52	26,59	27,05
59,0	16,71	16,10	16,23	16,41	16,56	16,35	26,90	26,59	26,49	26,81	26,91	28,09
57,0	16,86	16,10	16,46	16,20	16,32	16,46	26,82	26,45	26,43	26,74	26,55	27,32
55,0	16,95	16,28	16,37	16,33	16,68	16,47	27,18	26,54	26,56	26,59	26,74	26,77

Tabulka 40 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1531R3 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1531 R4

Ct	H-0	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-0	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	16,48	16,38	16,29	16,13	16,24	16,34	26,90	26,82	26,88	27,01	26,83	27,07
63,3	16,23	16,11	16,02	16,16	15,91	16,11	26,88	26,69	26,58	26,49	26,66	26,37
61,4	16,49	16,17	16,15	16,13	15,90	16,10	26,70	26,36	26,42	26,25	26,41	26,34
59,0	16,38	16,21	16,16	16,16	15,84	16,18	26,80	26,56	26,35	26,78	26,65	26,76
57,0	16,42	16,14	16,11	16,08	16,06	16,06	26,65	26,35	26,33	26,57	26,47	26,59
55,0	16,14	16,15	16,32	16,25	16,20	16,21	26,81	26,40	26,66	26,61	26,76	27,00

Tabulka 41 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1531R4 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1531 R5

Ct	H-0	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-0	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	16,57	16,19	16,09	16,26	16,28	16,40	26,95	26,56	26,67	26,76	26,82	26,70
63,3	16,53	16,18	15,95	16,05	16,38	16,28	26,63	26,15	26,51	26,37	26,59	26,43
61,4	16,32	15,95	16,12	16,00	16,14	16,23	26,63	26,34	26,21	26,35	26,40	26,58
59,0	16,38	16,04	15,98	16,01	16,24	16,26	26,66	26,35	26,50	26,49	26,52	26,85
57,0	16,45	16,10	16,36	15,96	16,07	16,10	26,63	26,23	26,31	26,25	26,61	26,62
55,0	16,27	16,16	16,22	16,23	16,06	16,29	26,70	26,41	26,49	26,44	26,66	26,99

Tabulka 42 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1531R5 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2×10^5 kopií/μl (H) a 2×10^2 kopií/μl (L).

1531 R6

Ct	H-0	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-0	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	16,65	16,27	16,42	16,36	16,42	16,36	27,26	26,82	27,07	26,91	27,01	27,16
63,3	16,50	16,17	16,24	16,26	16,26	16,44	26,94	26,76	26,73	26,70	26,94	26,98
61,4	16,61	16,24	16,23	16,03	16,13	16,29	26,91	26,50	26,53	26,36	26,61	26,74
59,0	16,54	16,23	16,09	16,32	16,19	16,32	27,17	26,42	26,67	26,52	27,01	27,16
57,0	16,46	16,09	16,57	15,83	16,33	16,41	26,74	26,92	26,76	26,56	26,81	26,77
55,0	16,52	16,56	16,43	27,11	26,72	26,95	27,01	26,95	27,03	26,44	26,66	26,99

Tabulka 43 Naměřené Ct hodnoty pro jednotlivé koncentrace oligonukleotidu 1531R6 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice. Měřeno v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a pro koncentrace templátu 2x10⁵ kopií/μl (H) a 2x10² kopií/μl (L).

7.2 Vypočítané ΔCt a ΔΔCt hodnoty

Fosforothioáty

1932 Z1

ΔCt	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	N/A	N/A	N/A	29,56	4,77	N/A	N/A	N/A	N/A	3,06
63,3	N/A	N/A	N/A	25,49	3,31	N/A	N/A	N/A	N/A	4,75
61,4	N/A	N/A	N/A	26,10	4,08	N/A	N/A	N/A	N/A	5,54
59,0	N/A	N/A	N/A	18,68	6,20	N/A	N/A	N/A	N/A	8,95
57,0	N/A	N/A	N/A	N/A	9,62	N/A	N/A	N/A	N/A	13,84
55,0	N/A	N/A	N/A	N/A	12,74	N/A	N/A	N/A	N/A	17,30

Tabulka 44 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1932Z1 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H – koncentrace templátu 2x10⁵ kopií/μl, L - koncentrace templátu 2x10² kopií/μl).

Konc. olig. [nM]	H-9,6	H-24	H-60	H-150	L-9,6	L-24	L-60	L-150
ΔΔCt prům	0,17	0,92	14,68	N/A	0,24	1,46	N/A	N/A
SD	0,33	0,26	1,10	N/A	0,19	0,15	N/A	N/A

Tabulka 45 Průměrné ΔΔCt hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice. (H – koncentrace templátu 2x10⁵ kopií/ul, L – koncentrace templátu 2x10² kopií/ul).

Systém	mAngptl3_Q2				mSurf1_Q1				mGusb_Q2			
	26	64	160	400	26	64	160	400	26	64	160	400
ΔΔCt prům.	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SD	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabulka 46 Průměrné ΔΔCt hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z1 v rámci testu specifity inhibice pro 3 různé systémy.

1932 Z0

ΔCt	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	H-12,5	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25	L-12,5
65,0	N/A	13,89	1,43	-0,31	-0,19	-0,38	N/A	N/A	3,95	0,43	0,13	0,13
63,3	N/A	11,89	0,84	-0,39	-0,15	-0,19	N/A	22,46	2,60	-0,16	-0,06	-0,25
61,4	N/A	12,89	0,99	-0,66	-0,51	-0,27	N/A	23,62	2,99	-0,07	-0,38	-0,17
59,0	N/A	17,15	2,29	-0,25	-0,41	-0,12	N/A	N/A	5,03	0,28	-0,17	-0,12
57,0	N/A	22,85	3,69	-0,52	-0,45	-0,18	N/A	N/A	8,05	0,64	-0,01	0,01
55,0	N/A	26,82	4,42	0,27	0,10	0,04	N/A	N/A	9,65	0,98	0,07	-0,07

Tabulka 47 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1932Z0 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H - koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L - koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l)

Konc. olig. [nM]	H-26	H-64	H-160	H-400	L-26	L-64	L-160	L-400
$\Delta\Delta Ct$ prům.	-0,85	-0,35	4,35	N/A	-0,28	0,34	9,10	N/A
SD	1,12	0,23	0,57	N/A	0,45	0,09	1,21	N/A

Tabulka 48 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 (1. řádek, v nM) v rámci testu specifity inhibice. (H - koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L - koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l)

Systém	mAngptl3_Q2				mSurf1_Q1				mGusb_Q2			
	Konc. olig. [nM]	26	64	160	400	26	64	160	400	26	64	160
$\Delta\Delta Ct$ prům.	2,80	N/A	N/A	N/A	-1,40	N/A	N/A	N/A	3,37	N/A	N/A	N/A
SD	0,45	N/A	N/A	N/A	0,95	N/A	N/A	N/A	0,46	N/A	N/A	N/A

Tabulka 49 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392Z0 v rámci testu specifity inhibice pro 3 různé systémy.

1932 U9

ΔCt	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	18,87	6,59	1,19	0,64	0,32	N/A	9,43	2,72	0,78	0,36
63,3	18,08	3,57	0,02	-0,40	-0,45	N/A	6,75	1,20	0,12	-0,04
61,4	17,34	3,13	0,48	-0,21	-0,41	N/A	6,32	0,80	-0,14	-0,34
59,0	20,47	5,62	0,95	-0,08	-0,29	N/A	9,34	1,89	0,07	0,18
57,0	26,99	7,15	1,10	-0,01	-0,29	N/A	12,72	3,12	0,56	0,91
55,0	30,26	8,74	1,91	0,64	0,33	N/A	N/A	-8,10	-11,01	-10,95

Tabulka 50 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1932U9 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l). Červeně zvýrazněné hodnoty byly kvůli své extrémnosti vyřazeny z dalších výpočtů.

Konc. olig. [nM]	H-26	H-64	H-160	H-400	L-26	L-64	L-160	L-400
$\Delta\Delta Ct$ prům.	0,05	-0,29	-0,03	2,07	-0,01	0,09	0,40	5,04
SD	0,29	0,24	0,24	0,35	0,13	0,14	0,30	0,25

Tabulka 51 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U9 v rámci testu specifity inhibice. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l).

1932 U7

Konc. olig. [nM]	H-24	H-60	H-150	L-24	L-60	L-150
$\Delta\Delta Ct$ prům	-0,42	11,31	N/A	0,79	13,23	N/A
SD	1,17	0,78	N/A	1,69	1,69	N/A

Tabulka 52 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U7 v rámci testu specifity inhibice. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l).

1932 U6

ΔCt	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	N/A	5,74	0,23	-0,08	-0,13	N/A	11,09	1,01	0,01	0,26
63,3	N/A	5,76	0,12	-0,29	-0,09	N/A	10,96	0,50	-0,33	-0,13
61,4	N/A	6,59	0,52	-0,06	-0,13	N/A	13,17	0,79	-0,06	0,08
59,0	N/A	9,27	1,32	-0,15	-0,25	N/A	18,29	2,25	0,27	0,24
57,0	N/A	11,78	1,73	-0,40	-0,41	N/A	N/A	3,36	0,12	0,12
55,0	N/A	16,75	3,11	0,41	0,230	N/A	N/A	6,52	0,70	0,58

Tabulka 53 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1932U6 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátů. (H - koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L - koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l)

Konc. olig. [nM]	H-64	H-160	H-400	L-64	L-160	L-400
$\Delta\Delta Ct$ prům.	-0,67	1,87	N/A	0,13	5,47	N/A
SD	0,10	0,58	N/A	0,18	1,23	N/A

Tabulka 54 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu 1392U6 v rámci testu specifity inhibice. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l).

1932 U5

Konc. olig. [nM]	H-64	H-160	H-400	L-64	L-160	L-400
$\Delta\Delta Ct$ prům	-0,11	-0,16	1,33	0,17	0,35	4,53
SD	0,22	0,21	0,34	0,15	0,24	1,29

Tabulka 55 Průměrné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty a směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu v rámci testu specifity inhibice. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l).

2'O-Me-RNA

1410 P1

ΔCt	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10	L-400	L-160	L-64	L-25	L-10
65,0	0,03	-0,11	0,07	0,00	-0,19	0,11	0,08	0,05	0,20	0,28
63,3	-0,12	-0,12	-0,05	0,04	-0,02	-0,05	0,13	0,01	-0,06	0,26
61,4	0,21	0,10	-0,04	0,10	-0,23	0,38	0,19	-0,03	-0,09	0,10
59,0	0,07	0,03	-0,13	-0,20	-0,16	0,33	0,21	0,14	0,09	-0,01
57,0	0,22	0,03	-0,15	-0,20	-0,29	0,44	0,17	0,18	0,11	0,02
55,0	0,59	0,48	0,04	0,50	0,07	0,41	0,18	0,07	0,00	0,18

Tabulka 56 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P1 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H - koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L - koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l)

1410 P1-A1

ΔCt	H-400	H-160	H-64	H-25	H-10	L-400	L-160	L-64	L-25	L-10
65,0	0,08	0,11	0,25	0,30	0,15	0,41	0,59	0,15	0,44	0,27
63,3	-0,14	-0,41	-0,39	-0,29	-0,37	-0,08	0,17	0,12	0,27	-0,14
61,4	0,10	0,17	0,07	-0,08	-0,06	0,31	0,10	0,03	-0,23	-0,09
59,0	0,47	0,00	-0,08	-0,05	-0,35	0,47	0,56	0,27	0,23	0,02
57,0	0,30	0,05	-0,17	0,02	-0,19	0,50	0,32	0,25	0,10	-0,15
55,0	0,55	0,10	-0,22	-0,30	-0,18	0,32	0,47	0,31	0,07	-0,11

Tabulka 57 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P1-A1 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l).

1410 P2

ΔCt	4000	2000	1000	500	400	250	160	64	25	10
65,0	2,73	1,58	1,43	1,32	1,21	1,24	1,07	0,59	0,24	0,11
63,3	1,28	0,93	1,23	0,92	0,51	0,85	-0,09	0,38	-0,09	-0,29
61,4	1,39	1,01	1,23	0,56	0,50	0,55	0,70	0,27	-0,06	-0,31
59,0	2,61	1,86	1,73	1,53	2,91	1,05	1,16	0,33	0,03	-0,17
57,0	3,57	2,66	1,78	1,75	1,89	1,29	1,10	0,26	0,17	-0,27
55,0	3,18	7,88	1,56	2,13	1,98	0,93	1,58	1,01	0,47	0,18

Tabulka 58 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P2 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

ΔCt	4000	2000	1000	500	400	250	160	64	25	10
65,0	3,81	2,32	2,67	2,93	1,42	1,47	1,06	0,66	0,55	0,35
63,3	2,05	1,25	1,24	1,88	0,59	2,36	0,74	0,40	0,12	0,06
61,4	1,99	1,25	1,64	1,16	0,86	0,93	0,57	0,20	-0,13	-0,06
59,0	2,76	2,14	2,27	2,98	1,32	2,18	0,91	0,44	0,24	0,02
57,0	4,18	3,05	2,53	3,25	1,71	1,60	1,07	0,37	0,21	0,05
55,0	5,04	3,98	3,55	4,46	2,39	2,57	1,98	0,96	0,42	-0,01

Tabulka 59 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P2 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

1410 P5

ΔC_t	4000	2000	1000	500	400	250	160	64	25	10
65,0	3,71	1,71	1,31	0,95	0,76	0,71	0,79	0,67	0,37	0,09
63,3	3,55	2,07	1,38	1,11	1,30	0,90	0,72	0,41	0,38	0,28
61,4	3,69	2,00	1,34	0,92	0,88	0,97	0,56	0,20	0,17	-0,10
59,0	3,85	2,15	1,66	1,25	1,21	0,94	1,05	0,64	0,34	-0,18
57,0	5,02	2,96	2,19	1,55	1,20	1,41	1,03	0,56	0,17	-0,29
55,0	5,12	3,34	1,83	2,09	1,65	1,74	0,96	0,91	0,42	0,19

Tabulka 60 $\Delta\Delta C_t$ hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P5 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

ΔC_t	400	160	64	25	10
65,0	1,43	1,38	0,92	0,53	0,49
63,3	1,72	1,65	0,83	0,36	0,08
61,4	2,06	1,46	0,94	0,48	0,25
59,0	2,15	2,18	1,29	0,62	0,43
57,0	2,70	2,34	1,69	0,69	0,29
55,0	3,19	2,80	2,24	0,80	0,81

Tabulka 61 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1410P5 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

PNA

PNA_GB_003

ΔC_t	1000	800	600	400	200	100	50	25
65,0	11,06	10,79	10,56	10,21	6,06	2,36	1,51	1,05
63,3	11,16	10,62	10,44	9,90	5,58	1,47	0,37	0,04
61,4	11,91	11,28	11,11	10,12	5,77	1,76	0,56	0,29
59,0	12,68	12,15	11,80	10,99	6,23	1,73	0,62	0,26
57,0	13,40	12,91	12,48	11,49	6,23	1,47	0,21	-0,04
55,0	14,63	13,54	12,86	11,46	6,11	1,68	0,49	0,10

Tabulka 62 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) při koncentraci templátu 2×10^5 kopií/ μ l.

ΔC_t	1000	800	600	400	200	100	50	25
65,0	11,30	11,72	10,62	10,20	8,01	2,49	1,15	0,70
63,3	10,77	11,82	11,45	10,93	8,24	2,78	1,01	0,37
61,4	10,49	12,44	11,57	11,52	8,66	2,59	1,09	0,86
59,0	13,52	N/A	13,10	12,64	8,70	3,09	1,07	0,61
57,0	14,60	12,04	14,78	12,44	9,29	3,06	1,11	0,52
55,0	13,40	N/A	N/A	2,13	1,98	0,93	1,58	0,47

Tabulka 63 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) při koncentraci templátu 2×10^2 kopií/ μ l.

Konc. olig. [nM]	H-100	H-200	H-400	H-600	H-800	L-100	L-200	L-400	L-600	L-800
ΔCt prům.	2,83	5,12	7,57	8,74	8,81	4,64	7,15	8,41	9,50	8,76
SD	0,18	0,31	0,39	0,24	0,21	0,29	0,31	0,41	1,16	0,31

Tabulka 64 Průměrné ΔCt hodnoty a směrodatné odchytky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 (1. řádek, v nM) v rámci testu inhibice připraveného robotickou pipetovací stanicí. (H – koncentrace templátu 2x10⁵ kopií/μl, L – koncentrace templátu 2x10² kopií/μl)

Konc. olig. [nM]	H-100	H-200	H-400	H-600	H-800	L-100	L-200	L-400	L-600	L-800
ΔΔCt prům.	1,03	2,22	7,22	9,86	10,46	1,66	3,84	9,43	10,56	11,43
SD	0,24	0,59	0,69	0,13	0,10	0,23	1,22	0,39	0,25	0,54

Tabulka 65 Průměrné ΔΔCt hodnoty a směrodatné odchytky jednotlivých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_003 (1. řádek, v nM) v rámci testu specifity inhibice. (H – koncentrace templátu 2x10⁵ kopií/μl, L – koncentrace templátu 2x10² kopií/μl).

PNA_GB_004

ΔCt	H-400	H-200	H-100	H-50	H-25	L-400	L-200	L-100	L-50	L-25
65,0	0,29	0,05	0,29	0,34	0,21	-0,06	0,21	-0,08	-0,20	0,14
63,3	0,03	-0,22	-0,11	0,00	0,24	0,09	0,15	0,44	-0,01	-0,08
61,4	0,21	0,05	0,23	0,04	-0,05	0,32	0,38	0,04	0,09	0,09
59,0	0,27	0,35	0,14	-0,22	0,04	0,17	-0,01	-0,22	-0,11	-0,03
57,0	0,70	0,57	0,34	-0,08	-0,05	0,79	0,56	0,13	0,15	0,00
55,0	0,54	0,53	0,08	-0,01	-0,10	1,10	0,30	0,06	0,35	0,13

Tabulka 66 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu PNA_GB_004 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H – koncentrace templátu 2x10⁵ kopií/μl, L – koncentrace templátu 2x10² kopií/μl).

5'C18 spacer

1531 R3

ΔCt	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	-0,44	-0,09	-0,17	-0,10	-0,20	-0,18	0,09	-0,08	0,13	0,27
63,3	-0,58	-0,36	-0,42	-0,16	-0,05	-0,23	-0,49	-0,34	0,14	-0,08
61,4	-0,76	-0,57	-0,56	-0,46	-0,53	-0,26	-0,30	-0,37	-0,30	0,16
59,0	-0,61	-0,48	-0,30	-0,15	-0,36	-0,31	-0,41	-0,09	0,01	1,19
57,0	-0,76	-0,40	-0,66	-0,54	-0,40	-0,37	-0,39	-0,08	-0,27	0,50
55,0	-0,67	-0,58	-0,62	-0,27	-0,48	-0,64	-0,62	-0,59	-0,44	-0,41

Tabulka 67 ΔCt hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1531R3 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H – koncentrace templátu 2x10⁵ kopií/μl, L – koncentrace templátu 2x10² kopií/μl).

1531 R4

ΔC_t	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	-0,10	-0,19	-0,35	-0,24	-0,14	-0,08	-0,02	0,11	-0,07	0,17
63,3	-0,12	-0,21	-0,07	-0,32	-0,12	-0,19	-0,30	-0,39	-0,22	-0,51
61,4	-0,32	-0,34	-0,36	-0,59	-0,39	-0,34	-0,28	-0,45	-0,29	-0,36
59,0	-0,17	-0,22	-0,22	-0,54	-0,20	-0,24	-0,45	-0,02	-0,15	-0,04
57,0	-0,28	-0,31	-0,34	-0,36	-0,36	-0,30	-0,32	-0,08	-0,18	-0,06
55,0	0,01	0,18	0,11	0,06	0,07	-0,41	-0,15	-0,20	-0,05	0,19

Tabulka 68 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1531R4 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l).

1531R5

ΔC_t	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	-0,38	-0,48	-0,31	-0,29	-0,17	-0,39	-0,28	-0,19	-0,13	-0,25
63,3	-0,35	-0,58	-0,48	-0,15	-0,25	-0,48	-0,12	-0,26	-0,04	-0,20
61,4	-0,37	-0,20	-0,32	-0,18	-0,09	-0,29	-0,42	-0,28	-0,23	-0,05
59,0	-0,34	-0,40	-0,37	-0,14	-0,12	-0,31	-0,16	-0,17	-0,14	0,19
57,0	-0,35	-0,09	-0,49	-0,38	-0,35	-0,40	-0,32	-0,38	-0,02	-0,01
55,0	-0,11	-0,05	-0,04	-0,21	0,02	-0,29	-0,21	-0,26	-0,04	0,29

Tabulka 69 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1531R5 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l).

1531R6

ΔC_t	H-1000	H-800	H-600	H-400	H-200	L-1000	L-800	L-600	L-400	L-200
65,0	-0,38	-0,23	-0,29	-0,23	-0,29	-0,44	-0,19	-0,35	-0,25	-0,10
63,3	-0,33	-0,26	-0,24	-0,24	-0,06	-0,18	-0,21	-0,24	0,00	0,04
61,4	-0,37	-0,38	-0,58	-0,48	-0,32	-0,41	-0,38	-0,55	-0,30	-0,17
59,0	-0,31	-0,45	-0,22	-0,35	-0,22	-0,75	-0,50	-0,65	-0,16	-0,01
57,0	-0,37	0,11	-0,63	-0,13	-0,05	0,18	0,02	-0,18	0,07	0,03
55,0	0,04	-0,09	10,59	10,20	10,43	-0,06	0,02	-0,57	-0,35	-0,02

Tabulka 70 ΔC_t hodnoty testu inhibice různých koncentrací oligonukleotidu 1531R6 (1. řádek, v nM) v teplotním gradientu (1. sloupec, ve °C) a 2 koncentracích templátu. (H – koncentrace templátu 2×10^5 kopií/ μ l, L – koncentrace templátu 2×10^2 kopií/ μ l).