

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Bufková

**TECHNOLOGIE DIGITÁLNÍ POLYMERÁZOVÉ  
ŘETĚZOVÉ REAKCE (dPCR): PŘEHLED TECHNOLOGIÍ  
A MOŽNOSTI VYUŽITÍ V GENOMICKÉ ANALÝZE**

Digital polymerase chain reaction (dPCR): technology  
overview and utility in genomic analysis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Marek Minárik, Ph.D.

Praha 2017

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. května 2017

## Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli RNDr. Marku Minárikovi, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady, trpělivost a vstřícnost při konzultacích. Dále děkuji své rodině, která mi byla během celého studia velkou oporou.

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	6
<b>1. Úvod</b> .....	7
1.1 Cíl práce.....	7
<b>2. Historie</b> .....	8
<b>3. Charakterizace templátové DNA</b> .....	11
3.1. Chemické složení a struktura DNA .....	11
3.2. Fyzikální vlastnosti DNA .....	11
3.3. Výpočty hmotnostní bilance templátové DNA .....	12
3.4. Vstupní kvalita DNA.....	13
<b>4. Polymerázová řetězová reakce</b> .....	15
4.1. Princip klasické PCR.....	15
4.2. Detekce produktu PCR reakce.....	18
4.2.1. Detekce produktu pomocí interkalačního barviva.....	18
4.2.2. Detekce produktu na principu TaqMan sond .....	19
4.2.3. Detekce produktu s využitím FRET sond .....	20
<b>5. Digitální polymerázová řetězová reakce (dPCR)</b> .....	22
5.1. Princip digitální PCR.....	22
5.2. Poissonova distribuce DNA .....	23
5.3. Porovnání PCR a dPCR.....	24
<b>6. Experimentální variace dPCR</b> .....	26
6.1. Emulzní formát.....	26
6.2. Formát dPCR na mikrotitrační destičce .....	30
6.3. Mikrofluidní formát.....	30
6.4. Porovnání komerčně dostupných přístrojů .....	33
<b>7. Aplikace dPCR</b> .....	34

7.1. Kvantifikace cílové DNA .....	34
7.1.1. Detekce a kvantifikace DNA .....	34
7.1.2. Využití kvantifikace pomocí dPCR v oblasti forenzní analýzy .....	36
7.1.3 Kvantifikace genové exprese .....	36
7.2. Prenatální vyšetření plodu .....	37
7.2.1. Detekce aneuploidií .....	37
7.2.2. Prenatální neinvazivní diagnostika pomocí dPCR .....	38
7.3. Onkologická diagnostika .....	39
7.3.1. Detekce somatických mutací ve tkáňových vzorcích .....	40
7.3.2. Analýza cirkulující nádorové DNA .....	40
<b>8. Experimentální část .....</b>	<b>43</b>
8.1. Materiál .....	43
8.1.1. Chemický materiál .....	43
8.1.2. Laboratorní a přístrojové vybavení .....	44
8.2. Pracovní postup .....	44
8.2.1. Příprava mastermixu .....	44
8.2.2. Příprava ředící řady .....	45
8.2.3. Příprava mikrokapek .....	46
8.2.4. Amplifikace a výsledná detekce .....	48
8.3. Výsledky a diskuse .....	49
8.3.1. Příprava mikropipetkové emulze .....	49
8.3.2. Digitální PCR a odečet výsledných produktů amplifikace .....	50
8.4. Shrnutí .....	59
<b>9. Závěr .....</b>	<b>60</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>61</b>

## Seznam zkratek

<b>APC</b>	adenomatosis polyposis coli
<b>cdPCR</b>	chamber based digital polymerase chain reaction, mikrofluidní formát polymerázové řetězové reakce
<b>cfDNA</b>	cell – free DNA, mimobuněčná cirkulující DNA
<b>ctDNA</b>	circulating tumor DNA, cirkulující tumorová DNA
<b>dATP</b>	deoxyadenintrifosfát
<b>dCTP</b>	deoxycytosintrifosfát
<b>ddPCR</b>	droplet digital polymerase chain reaction, emulzní formát polymerázové řetězové reakce
<b>dGTP</b>	deoxyguanintrifosfát
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>dPCR</b>	digital polymerase chain reaction, digitální polymerázová řetězová reakce
<b>dsDNA</b>	double – stranded DNA, dvouvláknová DNA
<b>dTTP</b>	deoxythymintrifosfát
<b>FRET</b>	Försterův rezonanční přenos energie
<b>kb</b>	kilobáse
<b>KRAS</b>	Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog
<b>miRNA</b>	micro RNA
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
<b>qPCR</b>	quantification polymerase chain reaction, kvantifikační polymerázová řetězová reakce
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>TRIS</b>	tris (hydroxymethyl) aminomethan

# 1. Úvod

Pro vyšetření na molekulární úrovni bylo nutné do 90. let minulého století zapotřebí získat velké množství vzorku obsahující molekuly DNA, které se mohly replikovat pouze v živém organismu (*in vivo*) [1]. Vyizolovaná DNA z odebraného materiálu musela být před další analýzou namnožena v bakteriálním plasmidu. Již od 80. let však byla představena metoda zvaná polymerázová řetězová reakce (**P**olymerase **C**hain **R**eaction), která umožnila namnožení nebo - li amplifikaci malého množství DNA pomocí umělé replikace s periodickým cyklováním reakčních teplot a využitím termostabilní polymerázy *in vitro*, která zcela změnila nejen oblast genetiky, ale v důsledku i mnoho dalších oborů jako je biologie, biotechnologie, medicína a další.

Metoda PCR, která se rychle stala nedílnou součástí rutinního použití laboratorních vyšetření i základním nástrojem genetického výzkumu, zaznamenala za dobu své existence minimálně dvě zásadní etapy metodického a přístrojového vylepšení. Prvním převratným mezníkem bylo představení kvantitativní PCR (qPCR) na počátku 90. let, která otevřela zcela nové možnosti sledování genové exprese a citlivé detekce DNA mutací [2]. Za druhý mezník v historii PCR lze považovat vynález digitální PCR, jejíž téma se snažím ve své práci přiblížit. Tato metodika amplifikace z jediné molekuly původní DNA, která je založena na nových možnostech mikrofluidní instrumentace vyvíjené od počátku 21. století, umožnila výrazné zvýšení analytické citlivosti detekce mutací a možnosti kvantifikace bez nutnosti externí kalibrace.

Začátek práce věnuji krátkému pohledu do historie PCR, také vysvětlení principu PCR a především dPCR, včetně základních rozdílů mezi oběma metodami. Dále se zabývám přístrojovým vybavením a především se zaměřuji na experimentální variace dPCR. Závěrem představím ukázkou praktického provedení digitální PCR pro detekci nízkého zastoupení mutantní DNA frakce.

## 1.1 Cíl práce

Cílem práce je v první řadě podání ucelených informací o principech a přístrojových variantách provedení dPCR. V návaznosti na tuto úvodní teoretickou část je dalším cílem praktické otestování, zda emulzní digitální PCR dokáže detekovat i minoritně zastoupenou DNA mutaci na modelovém případě vzorku odvozeného od solidního nádoru.

## 2. Historie

Struktura deoxyribonukleové kyseliny byla poprvé představena v publikaci J. D. Watsona a F. H. C. Cricka vydána 25. dubna 1953 [3]. Podařilo se jim nejen definovat strukturu DNA, ale také nastínili mechanismus, jakým dochází k předání genetické informace z mateřských buněk do dceřiných kopírováním komplementárního řetězce podle původní předlohy.

S definovanou strukturou nukleových kyselin přišla postupně celá řada dalších významných objevů, na jejichž základě mohla být následně definována PCR reakce. V roce 1957 došlo skupinou Arthura Kornbergra k objevu DNA – polymerázy [4]. Následně v dubnu roku 1969 získal Thomas D. Brock první termostabilní DNA – polymerázu, tu využívaly bakterie obývající horká vřídla Yellowstone národního parku [5]. Poté v lednu 1970 izoloval H. Klenow upravenou verzi DNA – polymerázy I z *E. Coli*, jedná se o polymerázu, která se vykazuje 3' → 5' exonukleázovou aktivitou, ale postrádá 5' → 3' exonukleázovou aktivitu [6]. Tzn. že celková aktivita této DNA – polymerázy spíše podporuje syntézu DNA a její případnou opravu, než její degradaci.

První pokusy a základní princip popsala v roce 1971 skupina Kjelle Kleppera [7,8]. Kleppe během své vědecké činnosti, kdy pracoval společně s doktorem Harem Gobindem Khoranou, popsal jako první princip metody velmi podobné polymerázové řetězové reakci, tedy princip replikace specifického úseku DNA in vitro. Nicméně ve svém experimentu využíval pouze jednoho oligonukleotidu (primeru), v důsledku toho nedocházelo k rozvinutí exponenciálního nárůstu cílového PCR produktu.

Počátky objevení metody PCR tak, jak ji známe dnes, se datují teprve na začátku 90. let 20. století [1]. Za objevitele této metody se obecně považuje americký biochemik doktor Kary Banks Mullis, který v této době pracoval pro kalifornskou biotechnologickou spol Cetus Corporation [9]. Vzhledem k tomu, že se společnost zabývala automatickou výrobou průmyslových mikroorganismů a následně jejich klonováním, byl Dr. Kary Mullis najat jako vědecký pracovník, který se zabýval především syntézou a dalším využitím jednořetězcových krátkých úseků DNA zvaných oligonukleotidy. Pro vytvoření postupu syntézy těchto krátkých úseků spojil několik metod, které byly známi již dříve.



Nově syntetizované oligonukleotidy našly své uplatnění hlavně jako primery pro sekvenování genů DNA [10].



**Obr. 1.1** Kary Banks Mullis. Převzato z [11].

Dr. Kary Mullis jako první přišel na postup, kde je k syntéze určitého segmentu genomu použito dvou primerů [10]. Každý z takto připravených primerů byl komplementární právě k jednomu řetězci DNA. Amplifikoval se tedy úsek DNA, který se nacházel přesně mezi takto vloženými primery. Další novinkou jeho postupu bylo znovupoužití produktu předcházející reakce jako templátové vlákno reakce právě následující. Tím umožnil vzniku řetězové reakce. Díky tomuto postupu bylo možné zmnožení DNA in vitro, bez přítomnosti živého organismu. Na jaře roku 1983 Dr. Kary Mullis poprvé takto připravenými oligonukleotidovými sondami detekoval mutaci, která způsobuje nemoc srpkovité anémie. První úspěšná analýza produktů PCR byla provedena biochemickou metodou Southern blotting na podzim roku 1984 [12]. Za objev metody pro amplifikace DNA in vitro získal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii [13].

Digitální polymerázová řetězová reakce byla poprvé zmíněna v roce 1992 skupinou P. Sykese, jež popisovala kvantifikaci leukemických buněk na základě limitního ředění výchozího vzorku [14]. V květnu roku 1997 byl poprvé zaveden Brownem pojem digitální mikrofluidní PCR, ve své práci se jeho skupina snažila o detekci templátové DNA v měřítku nanolitřů pomocí skleněných mikrokapilár [15]. Velmi rychle se ukázalo, že dPCR je vhodnou metodou k detekci buněk s onkologickým potenciálem, neboť v roce 1999 v práci Berta Vogelsteina a Kennetha W. Kinzlera byla dPCR testována jako vhodná detekční a kvantifikační metoda ve výzkumu kolorektálního karcinomu, kdy se jeho skupině povedlo kvantifikovat KRAS mutaci ze stolice pacientů trpící kolorektálním karcinomem pomocí dPCR [16]. Následně došlo k podstatně masivnějšímu rozvoji této metody. Například v roce 2003 byl využit nový formát dPCR tzv. BEAMing

(beads, emulsions, amplification and magnetics), což je metoda, jež využívá navázání výchozího analytu na emulzi mikrokuliček, na nichž poté probíhá amplifikace každého templátu zvlášť, kuličky jsou následně izolovány a separovány na základě svých magnetických vlastností [17].

První společnost, která se začala zabývat automatizací a především výrobou a distribucí prvotního komerčního přístrojového vybavení dPCR v podobě čipů byla v roce 2006 společnost Fluidigm Corporation [18]. S dalším významným milníkem přišla společnost QuantaLife. Jedná se o společnost, která uvedla na trh roku 2011 první dostupný komerční přístroj umožňující analýzu vzorku pomocí techniky emulzní dPCR. V prosinci roku 2011 byla QuantaLife koupena společností Bio – Rad Laboratories, jejíž cílem bylo vyvinout v budoucnu levnější a jednodušší analytickou metodu, bez použití drahých čipů nebo laserů, tuto myšlenku se jim povedlo dále rozvinout, když v roce 2017, kdy došlo k převzetí společnosti RainDance, též vyvíjející dPCR v emulzním formátu.

### **3. Charakterizace templátové DNA**

#### **3.1. Chemické složení a struktura DNA**

Základním vstupním materiálem dPCR je deoxyribonukleová kyselina (DNA, z angl. deoxyribonucleic acid) [19]. DNA je makromolekula, která má podobu vlákna. Její monomerní jednotka je tvořena cukernou složkou pentosou (2 – deoxy – D – ribosa) vyskytující se v cyklické formě, čtyřmi dusíkovými bázemi, dvěma purinovými (guanin, adenin) nebo dvěma pyrimidinovými (cytosin, thymin) a kyselinou trihydrogenfosforečnou. Molekuly DNA jsou tvořeny dvěma takovými vlákny. Ty jsou vzájemně propojeny vodíkovými můstky, jež se vytváří mezi tzv. komplementárními bázemi, přičemž dva vodíkové můstky spojují adenin a thymin a tři vodíkové vazby spojují guanin a cytosin. Takto spojená protilehlá vlákna vytváří konečnou podobu levotočivé dvoušroubovice.

Nejvyšší možnou strukturou DNA je její uspořádání do jednotlivých chromozomů, jež jsou přítomny v jádře každé buňky živého organismu. Lidské tělní buňky obsahují 2 sady chromosomů (jednu od otce a jednu od matky), jsou tedy diploidní a tvoří je 46 chromosomů. Jediné lidské haploidní buňky jsou buňky pohlavní, ty obsahují pouze jednu sadu po 23 chromosomech.

Velký vliv na konečný výsledek mají dva důležité parametry, jsou jimi koncentrace a kvalita výchozí matrice.

#### **3.2. Fyzikální vlastnosti DNA**

Díky přítomnosti fosforečnanových skupin je DNA při pH 7 záporně nabitá a vyznačuje se polárním charakterem, což je důvodem její rozpustnosti v polárních rozpouštědlech, jako je například voda. Při pH kolem 4,5 DNA přechází do organické fáze. Tohoto jevu je využíváno v postupech oddělení DNA od RNA, která při tomto pH zůstává ve vodné fázi. Rozvolnění dvoušroubovice lze snadno docílit tzv. denaturací. Denaturaci je možno provádět zvýšením teploty zhruba na 95 °C, přidáním zásaditého roztoku o pH větším než 9 nebo snížením iontové síly roztoku. DNA (hlavně base) absorbuje v UV oblasti, kde se její absorpční maximum je při vlnové délce 260 nm.

### 3.3. Výpočty hmotnostní bilance templátové DNA

DNA patří mezi polymerní sloučeniny s velmi vysokou molární hmotností, ta se v případě nukleotidu na dvouvláknové DNA rovná 650 Da (g/mol). Hmotnost 1 molu nukleotidů na dvouvláknové DNA tak činí 650 g. Pro zjištění hmotnosti DNA fragmentu o délce  $n$  – nukleotidů (bp), lze použít následující vzorec:

$$m_{FR} = n \cdot M \quad (3.1)$$

kde  $m_{FR}$  je hmotnost DNA fragmentu o délce  $n$  – nukleotidů [g],  $n$  velikost fragmentu DNA [bp],  $M$  molární hmotnost dsDNA nukleotidu [650 Da].

Pro výpočet počtu kopií (molekul) DNA ve vzorky se užívá následující rovnice:

$$\text{počet kopií} = (m_{vz} \cdot N_A) / (n \cdot M) \quad (3.2)$$

kde *počet kopií* [molekul DNA],  $m_{vz}$  hmotnost vzorku [g],  $N_A$  Avogadrova konstanta [ $6,022 \cdot 10^{23}$  molekul/mol],  $n$  velikost fragmentu DNA [bp],  $M$  molární hmotnost dsDNA nukleotidu [650 Da].

Hmotnost DNA v jedné buňce vyjadřuje následující rovnice:

$$m_B = (\text{počet kopií} \cdot n \cdot M) / (N_A) \quad (3.3)$$

Kde  $m_B$  je hmotnost DNA v jedné buňce [g], *počet kopií* [molekul DNA],  $n$  velikost fragmentu DNA [bp],  $M$  molární hmotnost dsDNA nukleotidu [650 Da],  $N_A$  Avogadrova konstanta [ $6,022 \cdot 10^{23}$  molekul/mol].

Pro lepší názornost lze vzorce využít v následujících příkladech:

1. Kolik kopií DNA fragmentu o velikosti 4,7 kb je ve 200 ng vzorku? K výpočtu byla využita rovnice 3.2.

$$\text{počet kopií} = \frac{m_{vz} \cdot N_A}{n \cdot M} = \frac{200 \cdot 10^{-9} \cdot 6,022 \cdot 10^{23}}{4700 \cdot 650} = 3,94 \cdot 10^{10} \text{ DNA molekul}$$

2. Jaká je hmotnost DNA v jedné buňce? Přičemž víme, že se v buňce nachází 3 miliardy bází a počet DNA kopií jsou 2. K výpočtu byla využita rovnice 3.3.

$$m_B = \frac{\text{počet kopií} \cdot n \cdot M}{N_A} = \frac{2 \cdot 3 \cdot 10^9 \cdot 650}{6,022 \cdot 10^{23}} = 6,48 \cdot 10^{-12} \text{ g}$$

3. Jaká je hmotnost DNA, kterou lze očekávat v 1  $\mu$ l krve? Přičemž víme, že 1 ml krve dospělého člověka obsahuje  $5 \cdot 10^6 - 10 \cdot 10^6$  bílých krvinek /leukocytů).

$$m_{\text{DNA},1} = 6,48 \cdot 10^{-12} \cdot 5 \cdot 10^3 = 3,24 \cdot 10^{-8} \text{ g} = 32,4 \text{ ng}$$

$$m_{\text{DNA},2} = 6,48 \cdot 10^{-12} \cdot 10 \cdot 10^3 = 6,48 \cdot 10^{-8} \text{ g} = 64,8 \text{ ng}$$

### 3.4. Vstupní kvalita DNA

Metoda dPCR pracuje na molekulární úrovni, která zajišťuje vysokou citlivost, tudíž jsou nároky na kvalitu templátové DNA vysoké. Je nutné zajistit, aby proces samotné izolace a purifikace templátové DNA nebyl degradační a získaná DNA byla v nativním stavu. Důležité požadavky na vstupní DNA jsou shrnuty v následujících bodech:

#### 1. Fragmentace DNA

Vysoká degradace templátové DNA je častým problémem u archivovaných vzorků, především u vzorků izolovaných z formalínem fixovaných parafinových bločků, kde může docházet k fragmentaci DNA díky použití špatného fixačního činidla [20]. Za další hojně fragmentované matrice se obecně považují velmi staré či forenzní vzorky. Fragmentace DNA může být způsobena autolýzou, kdy dochází k rozkladu biologického materiálu v důsledku teploty či radiačního záření nebo se může jednat o bakteriální či mikrobiální degradaci. Všechny tyto procesy snižují účinnost PCR reakce, proto byly vypracovány mnohé speciální postupy práce jak analyzovat degradovatelnou DNA pomocí PCR.

#### 2. Inhibice PCR chemickými látkami

Pro správný průběh dPCR je nutné z velmi složitých obvykle fyziologických matric získat purifikovanou DNA [21]. Díky této složité matici může být průběh analýzy narušen celou řadou chemických látek, tzv. inhibitorů, které mohou být jednak izolované spolu s templátovou DNA, ale také se do reakční směsi mohou dostat i při úpravě analytu nebo vzorkovacím procesem. Míra inhibice závisí na mnoha faktorech, hlavním je druh a koncentrace inhibitoru, dále závisí na typu použité DNA – polymerázy nebo délce a složení templátové DNA. Inhibitory mohou reakci zcela zastavit, výrazně snížit její účinnost nebo citlivost, resp. mohou být konečně PCR produkty vyhodnoceny jako

falešně negativní. Tyto chemické látky se obecně váží buď na DNA – polymerázu, čímž ji mohou denaturovat nebo jinak degradovat a bránit tak její katalytické aktivitě. Inhibitory také mohou chelátovat hořčnaté ionty a tak nepřímo snižovat aktivitu DNA – polymerázy. Dále se mohou vázat na templátovou DNA, kdy může docházet k její degradaci nebo navázání inhibitoru na cílovou sekvenci. Mezi hlavní inhibitory patří například bilirubin, formaldehyd, Hem, kyselina fytová, melanin, heparin, vápenaté ionty, ethanol a mnoho dalších.

### **3. Kontaminace DNA pocházející z jiného zdroje**

Nejčastěji se analyt znehodnotí díky kontaminovaným laboratorním pomůckám (pipety, plast). Další možností znehodnocení je použití znečištěných či expirovaných chemikálií do výchozí reakční směsi. K předcházení těchto druhů kontaminací by mělo být využito dostatečných sterilizačních metod.

## 4. Polymerázová řetězová reakce

Metoda PCR slouží k výraznému namnožení neboli amplifikaci určitého specifického úseku DNA využívající procesu replikace. K samotné reakci postačuje velmi malé množství výchozího vzorku, tzn. že pro provedení analýzy stačí mít teoreticky k dispozici pouze jedinou molekulu DNA templátu. Je tedy zřejmé, že pokud stačí k provedení měření pouze takovéto malé množství výchozího analytu, je nutné dbát na dodržení přísných pravidel čistoty prostředí, použitých chemikálií a laboratorních komponent. Musíme mít stále na paměti, že ke kontaminaci jakoukoliv jinou nežádoucí molekulou DNA, může dojít velmi jednoduše a přitom to zcela zásadně ovlivní konečný produkt reakce.

### 4.1. Princip klasické PCR

Do reakční směsi pro praktické provedení PCR je nutné zajistit všechny komponenty, které jsou v buňkách běžně přítomny a zajišťují průběh DNA replikace [22]. Jedná se především o DNA – polymerázu. Ta musí být dostatečně stabilní, hlavně při vyšších teplotách, neboť by již v denaturační fázi docházelo k deaktivaci její enzymové aktivity počáteční vysokou teplotou. Dále to jsou primery, krátké řetězce oligonukleotidů, jež se podle pravidel komplementarity váží na matrici DNA. U PCR se využívají tzv. reverse a forward primer, jež přesně vyznačují úsek na matrici, který je amplifikován. Délka primerů se obvykle pohybuje v rozmezí 18 – 28 bází [12]. V neposlední řadě je nutná přítomnost směsi volných deoxynukleotidtrifosfátů dATP, dTTP, dCTP a dGTP patřících mezi základní stavební prvky DNA. Dále je nutné mít k dispozici templátovou molekulu DNA. Ta slouží jako předloha pro úsek, který má být amplifikován. Může se jednat o vzorek tělních tekutin (nejčastěji krev, tekutý výplach, pankreatická šťáva, plicní výpotek apod.), tkání, případně jiného materiálu. Reakce se musí provádět ve vhodně pufovaném prostředí, nejběžněji používaný pufr je o koncentraci 100 mmol/l Tris – HCl o pH 8,3 nebo 500 mmol/l KCl. Poslední součástí reakční směsi jsou hořčnaté ionty, které slouží jako kofaktory DNA - polymerázy. Koncentrace všech těchto komponentů musí být správně zvolena. Například nízká koncentrace primerů nebo dusíkatých bází vede k předčasnému ukončení reakce. Nízká koncentrace hořčnatých iontů vede ke snížené aktivitě DNA – polymerázy. Vysoká koncentrace hořčnatých iontů a deoxynukleotidtrifosfátů vede naopak k velkému

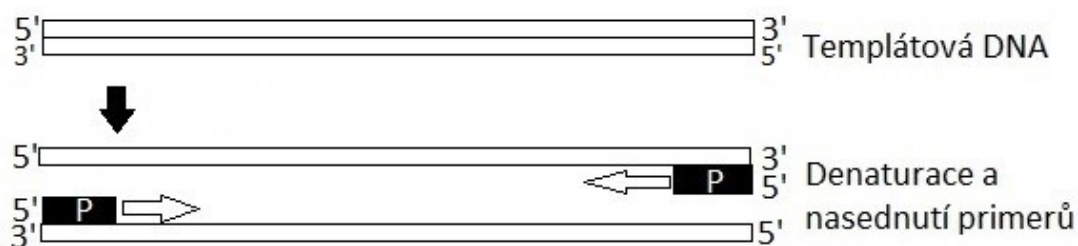
výskytu špatně přiřazených bází, jež neodpovídají základním pravidlům komplementarity.

### 1. krok - denaturace výchozího templátu:

Prvním krokem této metody je denaturace DNA, neboť je důležité dvoušroubovici rozdělit na její jednotlivá vlákna. Denaturace materiálu probíhá při zahřátí asi na 95 °C po dobu 20 až 30 sekund.

### 2. krok - nasednutí primerů (annealing):

Následně dochází k nasednutí primerů. Tento krok bývá označován jako annealing. Jako primery se používají speciálně uměle syntetizované krátké úseky bází, které jsou komplementární ke koncovým částem amplifikované části templátové DNA. Základním požadavkem pro správný průběh PCR reakce je znalost alespoň pár bází koncové oblasti úseku produktu, který chceme amplifikovat. Tento krok je uskutečňován v teplotním rozmezí od 50 °C do 65 °C po dobu 20 až 40 sekund. Jak teplota, tak doba působení je závislá na typu primerů a specifické sekvenci, na kterou nasedají.

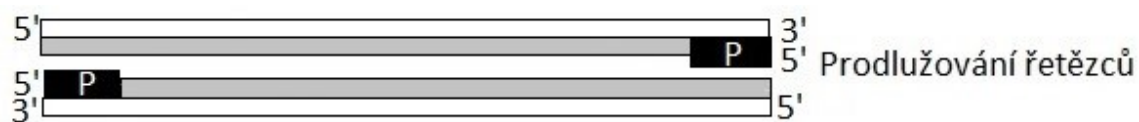


**Obr. 4.2** Schématické zobrazení prvního kroku PCR – denaturace templátové DNA a druhého kroku PCR – nasednutí primerů (vyobrazeny černě).

### 3. krok – prodlužování řetězce (elongation):

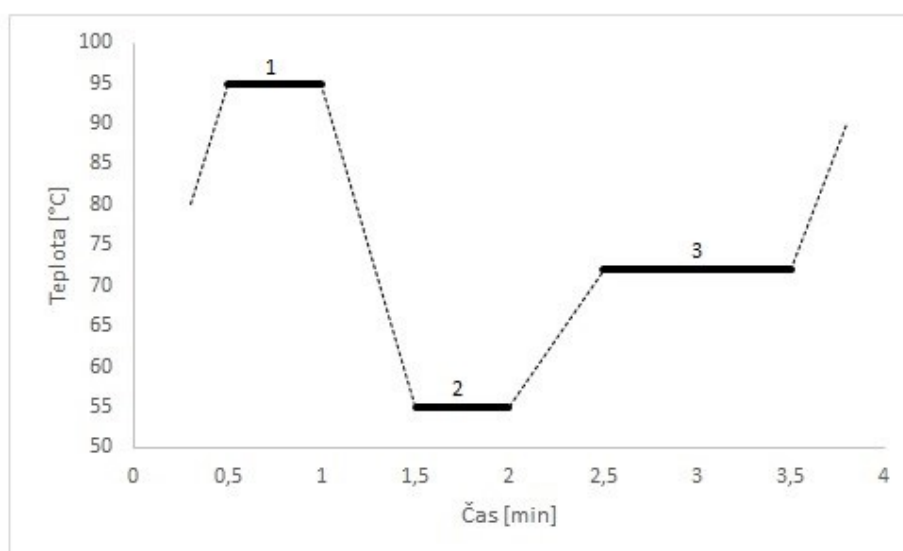
Posledním krokem je prodlužování cílového produktu, neboli tzv. elongation, kdy se amplifikovaný úsek prodlužuje pomocí specifických enzymů, z nichž je nejdůležitější DNA - polymeráza. Závěrečný postup se odehrává v teplotním rozmezí mezi 68 °C až 72 °C. I tento krok je teplotně závislý na druhu specifické sekvence. Doba posledního kroku by měla být dostatečně dlouhá, aby došlo k úplnému nasyntetizování cílového produktu. Čas samotné syntézy tedy závisí na délce produktu a jeho koncentraci. Úplného ukončení reakce je dosaženo zchlazením směsi zhruba na 4 °C.





**Obr. 4.3.** Schématické zobrazení třetího kroku PCR – prodlužování řetězců (nové řetězce jsou označeny šedě, původní templátová DNA je vyobrazena bíle a primery jsou označeny černě).

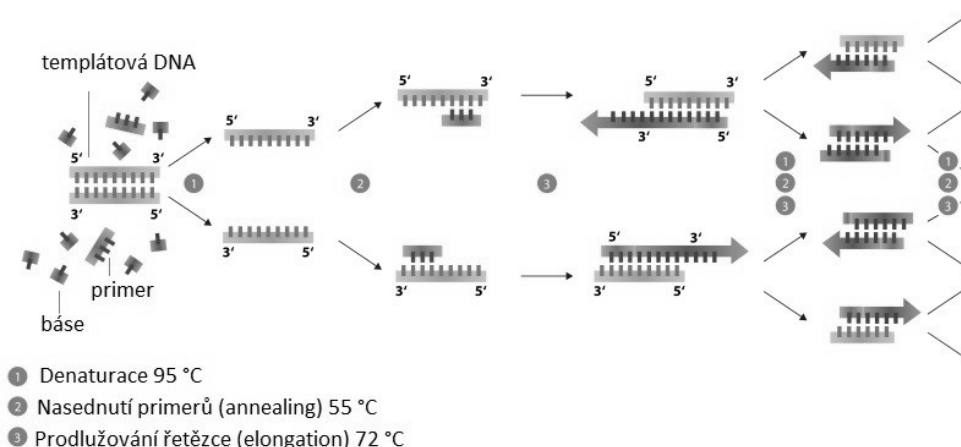
Tyto tři základní kroky se při praktickém provádění reakce PCR cyklicky opakují, abychom dostali co největší množství cílového amplifikovaného produktu v čisté formě. Nejčastěji se proces opakuje v rozmezí odpovídající zhruba 25 až 35 cyklům. Počet cyklů závisí na koncentraci templátové DNA a na množství konečného produktu [22,23].



**Obr. 4.4** Grafické znázornění střídání jednotlivých teplot v průběhu amplifikace.

Vyznačená oblast číslo 1 představuje denaturaci výchozí DNA při 95 °C po dobu 30 sekund. Část vyznačená číslem 2 zobrazuje annealing probíhající při 55 °C po dobu 30 sekund. Poslední vyznačená oblast číslo 3 představuje elongation, jež se uskutečňuje při 72 °C po dobu 1 minuty. Tyto tři základní teplotní změny se během amplifikace cyklicky opakují.

Vzhledem k tomu, že při opakování jednotlivých cyklů slouží jako templáty produkty, které vznikly v cyklu předešlém, je patrné, že nabývání produktu ve směsi se řídí exponenciální závislostí. Při  $n$  cyklickém opakování z jedné molekuly templátové DNA je možno získat až  $2^n$  požadovaného vzorku [13].



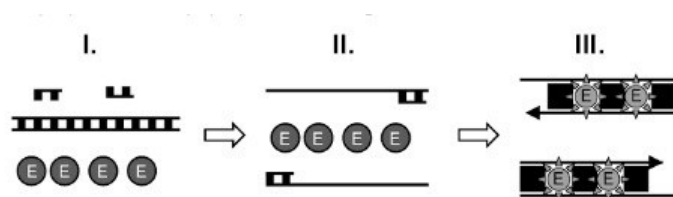
**Obr. 4.5** Schéma exponenciálního růstu PCR produktu. Převzato a upraveno z [24].

PCR metoda má mnoho využití v nejrůznějších aplikacích molekulární genetiky a biologie [12]. Mezi nejdůležitější využití PCR patří amplifikace templátové DNA kdy je namnožený úsek dále využíván např. k sekvenování. PCR se též používá k detekci DNA mutací, k diagnostice infekčních onemocnění, určení přítomnosti a typizaci patogenních bakterií a virů v organismu nebo ve forenzní genetice a v mnoha dalších aplikacích.

## 4.2. Detekce produktu PCR reakce

### 4.2.1. Detekce produktu pomocí interkalačního barviva

K označení amplifikovaného úseku DNA se používají tzv. interkalační barviva, jež se reversibilně vážou na jednotlivé nově vzniklé dvoušroubovice DNA [23]. Intenzita emitovaného záření fluorescenčních sond stoupá po navázání na jednotlivé fragmenty DNA.



**Obr. 4.6** Schéma vizualizace PCR produktu pomocí interkalačních barviv. V I. fázi se nachází templát DNA, primery a interkalační barvivo (značené písmenem E) na počátku PCR reakce. V II. fázi dochází k denaturaci výchozí DNA následované nasednutím primerů. V III. fázi došlo k vmezeření interkalačního barviva do vlákna DNA, díky čemuž konečný PCR produkt emituje příslušné záření. Převzato a upraveno z [25].

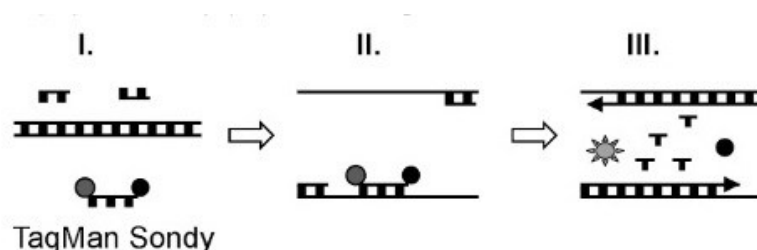
Nejběžněji používané interkalační barvivo, jež se váže reverzibilně a nespecificky je SYBR Green I [23,26]. Pohlcuje světlo o vlnové délce 480 nm a po navázání na DNA fragment emituje světlo o vlnové délce 520 nm. Optimalizace pro využití tohoto barviva je velmi jednoduchá, poměrně citlivá a oproti jiným metodám relativně cenově dostupná. Další výhodou je, že se dá velmi snadno porovnávat ze standardními publikovanými měřeními, které probíhají při stejných experimentálních podmínkách. Při těchto publikačních měřeních se jako standard obvykle využívá fluorescein, který má emisní fluorescenční spektrum velmi blízké SYBR Green I [27]. Nenavázaný SYBR Green I emituje velmi nízké hodnoty fluorescence, po navázání se stává silně fluoreskující a hodnoty emitujícího záření jsou úměrné koncentraci produktu. Nevýhodou tohoto barviva je fakt, že detekuje veškerou DNA přítomnou v reakční směsi, respektive reaguje i na přítomnost nespecifických produktů PCR. Díky tomu se dnes dává přednost i jiným později vyvinutým metodám detekce.

#### **4.2.2. Detekce produktu na principu TaqMan sond**

Mezi další pokročilejší detekční techniky řadíme metodu tzv. TaqMan assay [23]. Tento test je založen na exonukleázové aktivitě Taq polymerázy ve směru 5' → 3'. Pro správný průběh detekce je nutné uměle připravit fluoreskující sondy komplementární k vznikajícím fragmentům DNA. Aktivace sond nastává po začátku amplifikace DNA, kdy sondy hybridizují s nově vznikajícími fragmenty. Tato připravené sondy se skládají z jednotlivých oligonukleotidů. Na jednom konci obsahují tzv. reportér, který představují různá fluorescenční barviva (fluorofory) a na druhém konci obsahuje tzv. quencher (zhášec). Nenavázaná sonda ani sonda, jež obsahuje oba konce, fluorescenční záření neemituje. Sonda fluoreskuje až poté co ji Taq polymeráza rozštěpí a fluorescence reportéru není zhášena ani nijak jinak redukována zhášečem. Nejběžněji se tato detekční metoda využívá k detekci bodových mutací.

K detekci mutagenního PCR produktu se obvykle používají dvě sondy, kdy jedna sonda rozeznává mutovaný úsek DNA (tzv. mutant PCR product) a druhá úsek DNA, jež danou mutaci neobsahuje (tzv. wild PCR product) [16]. Každý typ takto připravené sondy se označuje jinak barevným fluoroforem pro snadnější rozeznání příslušných produktů v reakčních jamkách. První typ sondy je poté komplementární k potenciálně mutagenním sekvencím DNA a druhý typ sondy označí všechny přítomné nukleové kyseliny v jednotlivých jamkách, které se nejeví jako mutagenní. Z uvedeného kontextu tedy

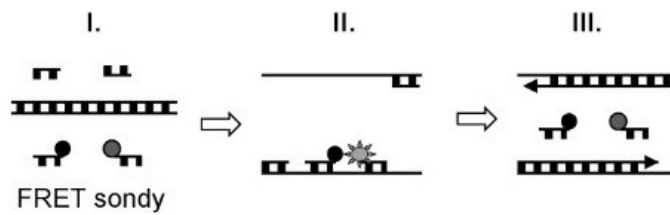
vyplývá, že pokud není v reakčních jamkách přítomen výchozí analyt, komora nebude vydávat žádné záření. Dále je nutné si uvědomit, že pokud výchozí vzorek obsahuje velké množství mutagenních sekvencí, intenzita fluorescence by byla příliš vysoká a je tedy nutné metodu detekce koncipovat obráceně, tedy fluorescenčně označit nemutagenní části DNA.



**Obr. 4.7** Schéma vizualizace PCR produktu pomocí TaqMan sondy. I. fáze zobrazuje templátové vlákno DNA, primery a TaqMan sondu na počátku PCR reakce. Ve II. fázi dochází k denaturaci výchozího vlákna DNA, nasednutí primerů a k hybridizaci vlákna DNA s TaqMan sondou. III. fáze zobrazuje rozštěpení sondy, kdy dochází k uvolnění zhášeče (označeno černě) a emitaci záření (vyznačeno šedě). Převzato a upraveno z [25].

#### 4.2.3. Detekce produktu s využitím FRET sond

Další používanou detekcí je metoda FRET, neboli Försterův rezonanční přenos energie (často též označována jako fluorescenční rezonanční přenos energie) [28]. FRET využívá nezářivého přenosu energie z chemické struktury označované jako donor na strukturu označovanou jako akceptor. Po excitaci donoru, excitačním světlem, jež je charakteristické pro danou molekulu, tento donor emituje záření, které zachytí akceptor. Ten přejde do excitovaného stavu a při přechodu do základního stavu opět emituje charakteristické záření. Toto záření zachytí detektor a dojde k jeho vyhodnocení na základě intenzity emitovaného světla. Pokud jsou molekuly donoru a akceptoru v přesně definované blízkosti (například po specifické hybridizaci na cílovou molekulu detekované DNA) dochází ke správnému přenosu emitovaného záření a následné emisi světla akceptorem.



**Obr. 4.8** Schéma vizualizace PCR produktu pomocí FRET sondy. V I. fázi je přítomno templátové vlákno DNA, primery a FRET sondy na začátku PCR reakce. Ve II. fázi dochází k denaturaci templátového vlákna DNA, nasednutí primerů a hybridizaci FRET sond. III. fáze zobrazuje nově vytvořené fragmenty DNA a sondy po proběhlé PCR reakci. Převzato a upraveno z [25].

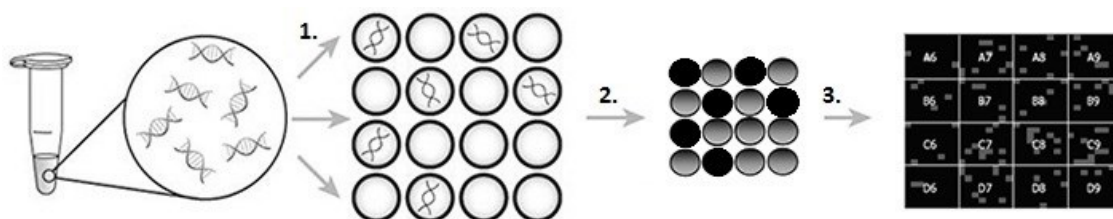
## 5. Digitální polymerázová řetězová reakce (dPCR)

Na úvod je vhodné podotknout, že digitální PCR není zcela samostatnou metodou, která by nahradila v plném rozsahu klasicky pojatou PCR. Jedná se spíše o zefektivněné stávající podoby této metody, vyzdvižení a především využití významných benefitů, jež by mohly přispět ke snadné a rychlé analýze s ještě vyšší citlivostí a specifičností.

### 5.1. Princip digitální PCR

Digitální PCR je založena na základních principech klasické PCR (viz. kap. 4.1. Princip klasické PCR). Základní myšlenkou dPCR je rozdělení výchozího vzorku na dostatečné množství dílčích reaktorů, ve kterých probíhá odděleně amplifikace vždy z právě jedné molekuly DNA [18]. V praxi se jedná o rozdělení na stovky až tisíce zcela individuálních vzorků, které se umístí do jednotlivých testovacích jamek, někdy též označovaných jako reakční komory [29]. Podle typu dPCR jsou vzorky pipetovány mikrokapilárami do jamek umístěných na malém digitálním mikročipu nebo se vzorek upraví tak, aby vytvářel emulzi olejových mikrokapek [13]. Díky tomuto rozdělení a vhodné detekci jsme nejen schopni určit, zda – li se v původním vzorku vyskytuje například hledaná mutagenní sekvence, ale jsme především schopni vzorek přímo kvantifikovat bez nutnosti použití kalibrační závislosti. Vzhledem k tomu, že dPCR pracuje na molekulární úrovni, jedná se o vysoce citlivou metodu. Citlivost metody ovlivňuje počet jamek a rychlost DNA – polymerázy, pokud bychom použili destičky s obsahem tisíce reakčních komor, můžeme dosáhnout až 0,1% meze citlivosti detekce [16].

Jednotlivé kroky probíhají prakticky stejně nebo velmi podobně jako je tomu u klasického provedení PCR. V prvním kroku se původní vzorek naředí a postupně umístí do jednotlivých jamek, ve kterých už bývá připravená zbylá reakční směs, jež je obvykle stejná jako u konvenční PCR. Ředění vzorku je nutné provést tak, aby se v každé reakční komoře vyskytovala nejlépe maximálně jedna molekula výchozího templátu. Samotná amplifikace poté probíhá vždy v každé jednotlivé jamce nebo mikrokapce zvlášť. Počet opakování cyklů potřebných pro dostatečné namnožení cílového produktu se u dPCR pohybuje okolo 60 cyklů [16]. Poté nastává fáze detekce požadovaného produktu.



**Obr. 5.9** Schématické znázornění principu dPCR. V 1. kroku je vyzolovaná a řádně purifikovaná matrice DNA distribuována do jednotlivých PCR reakčních jamek. Ve 2. kroku dochází k navázání detekční značky, přičemž černě označené jamky představují pozitivní vzorky a šedě zabarvené komory značí negativní vzorky. Ve 3. kroku je zobrazena možnost výsledné detekce. Převzato a upraveno z [30].

## 5.2. Poissonova distribuce DNA

Nejdůležitějším a zároveň i nejtěžším úkolem při vývoji vhodné optimalizace dPCR je zajištění homogenní distribuce původního templátu DNA do jednotlivých jamek tak, aby každá obsahovala právě jedinou molekulu výchozí DNA [25]. Pro popis distribuce jednotlivých molekul DNA v poli použitých mikro – reaktorů se používají speciální algoritmy, jež vychází z tzv. Poissonovy distribuce, která popisuje pravděpodobnost s jakou se vyskytuje právě jeden templát v každé reakční jamce. Tato pravděpodobnost závisí na dvou parametrech. Prvním z nich je koncentrace výchozí DNA, přičemž se zvyšující koncentrací DNA se pravděpodobnost výskytu jednoho templátu v jedné jamce zvyšuje. Dále tento parametr závisí na počtu jednotlivých kompartmentů, kdy se zvyšujícím počtem mikro - reaktorů se zvyšuje pravděpodobnost, že na právě jednu jamku připadne jedna molekula DNA.

Pro výpočty se užívá symbol  $\lambda$ , který značí odhad průměrného počtu kopií v jednotlivých jamkách, ve kterých je zároveň objem reakční směsi stejný, což je při použití vhodné instrumentace dPCR velmi snadno splnitelnou podmínkou [31].  $\lambda$  představuje poměr celkového objemu reakční směsi ve všech jamkách ( $m$ ) a počtu jednotlivých jamek ( $n$ ). Jedná se o velmi důležitý údaj, který zároveň vyjadřuje přesnost odhadu počtu kopií DNA. Do výpočtů je dále zahrnut i počet pozitivně reagujících jamek ( $k$ ). Poté je koncentrace cílových molekul DNA dána těmito rovnicemi:

Odhad počtu kopií:

$$\lambda = m/n \quad (5.4.)$$

Při použití počtu pozitivních jamek:

$$\lambda = -\ln(1 - k/n) \quad (5.5.)$$

Výhodou takto zavedených vzorců je jejich možné využití pro všechny platformy dPCR. Konstanty  $k$  a  $n$  lze takto použít, neboť se v případě dPCR jedná o binomickou distribuci [31].

### 5.3. Porovnání PCR a dPCR

Klasické pojetí PCR vykazuje spoustu shodných jak kladných tak záporných vlastností jako digitální PCR. Dalšími důležitými fakty, jež se využívají v postupném zdokonalování technik a vědeckém výzkumu jsou rozdíly mezi těmito metodami, které přehledně zobrazuje Tab. 5.1.

Základním rozdílem je technika provedení, jež byla zmíněna již na začátku této kapitoly, především vysoké nároky na přístrojové vybavení u dPCR. Zatímco pro klasickou PCR lze dnes pořídit termocyklér za cenu v řádu 100.000 až 150.000 Kč, pořízení zařízení dedikované pro dPCR je v řádu 500.000 Kč a více<sup>1</sup>.

Jednou z hlavních předností dPCR je absolutní kvantifikace vzorku. To znamená, že není potřeba oproti konvenčnímu provedení PCR připravovat standardní vzorky a pomocí nich proměřovat a sestavovat kalibrační řadu, s níž by musel být analyt porovnán.

Další výhodou je vysoká citlivost u detekce DNA mutací, kdy počet nemutovaných molekul (wild type) DNA převládá nad vyšetřovanými mutovanými DNA molekulami, a proto je pravděpodobnost nasednutí primerů v druhém kroku klasické PCR na tuto zdravou část DNA mnohem větší. Díky tomu může u klasické PCR docházet přednostně k amplifikaci wild type DNA oproti mutovanému templátu, který tak nemusí být zachycen. Tento problém přednostní amplifikace nemutovaného DNA templátu je při dPCR eliminován, neboť jednotlivé templáty jsou od sebe odděleny a PCR reakce probíhá v každé jednotlivé reakční jamce zvlášť.

---

<sup>1</sup> Odhad aktuálních cen v době sepisování práce.



**Tabulka 5.1** Stručný přehled porovnání dPCR a PCR. Převzato a upraveno z [13].

	<b>Klasická PCR</b>	<b>Digitální PCR</b>
<b>Celkový přehled</b>	Stanovení celkového množství výsledného produktu	Kvantifikace počtu pozitivních a negativních frakcí daného vzorku, tím je umožněno stanovení absolutního počtu kopií
<b>Výsledek</b>	Relativně kvantitativní	Absolutně kvantitativní
<b>Hlavní výhody</b>	1. Relativně nízké náklady	1. Není nutnost kalibrace 2. Přímá úměra mezi počtem replikátů a přesností celkové kvantifikace

## 6. Experimentální variace dPCR

Díky řadě pokroků se digitální PCR stala dnes již skoro zcela zautomatizovanou metodou. Současně používané experimentální variace vycházejí z možnosti miniaturizace, neboť základním předpokladem dPCR je rozdělení amplifikovaného DNA templátu až do stovek objemů o velikosti nanolitřů [32].

Přístrojové variace dPCR tak můžeme rozdělit na dvě základní skupiny. První skupinou je technika používaná pro běžná standardní stanovení pomocí dPCR [25]. Do druhé skupiny patří přístroje používané primárně ke kvantifikaci výchozího materiálu, kde se vyhodnocení provádí přímo na vhodných amplifikačních čípech pomocí speciálního vyhodnocovacího systému, bez nutnosti kalibrace. Celkový objem analyzovaných vzorků pipetovaných na jednotlivé mikročipy, který je srovnatelný s klasickou PCR reakcí, obvykle činí kolem 5 – 100  $\mu\text{l}$  [25].

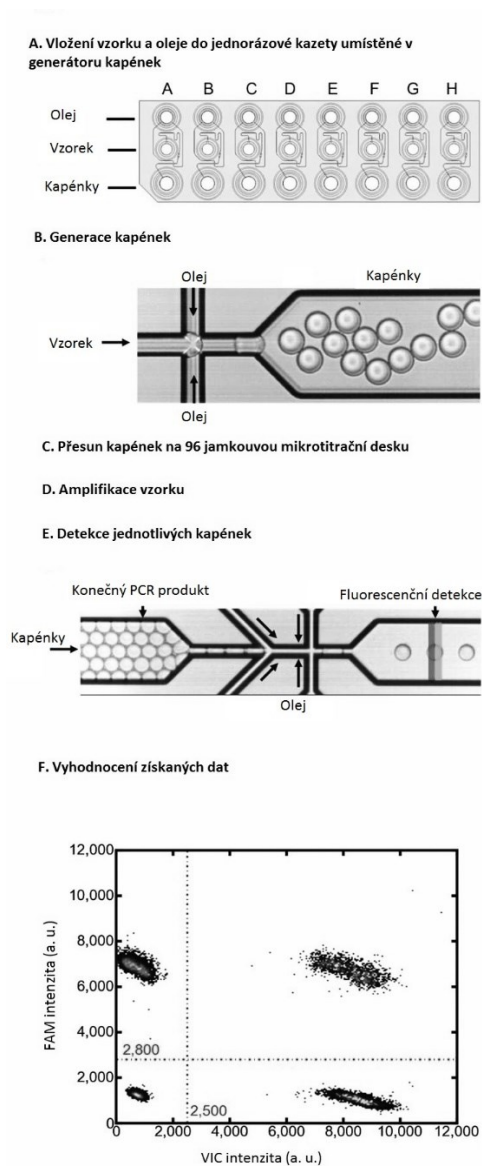
### 6.1. Emulzní formát

Metodika emulzní digitální PCR (droplet digital PCR, ddPCR) byla jednou z prvních představených. Jejím základem je příprava emulze z výchozího materiálu v generátoru kapének [25]. DNA templát tak může být rozdělen až na několik tisíc mikrokapiček o velikosti jednotek nanolitřů [33].

ddPCR je možno použít jak pro amplifikaci cílové molekuly DNA tak i jako velmi přesnou a citlivou detekční metodu spojenou s následnou kvantifikací výchozího materiálu, kdy je mnohonásobně přesnější, než je použití klasické real – time PCR [34].

Vzorek je nutné před pipetováním do přístroje smíchat s vodou, olejem a chemickými stabilizátory [18]. Následně je tato emulze opatrně umístěna do přístroje, který ji smíchá s dalšími potřebnými chemickými reagenty stabilizující povrchově aktivní látky a poté v přítomnosti vakua rozptýlí v podobě velmi drobných kapének [34]. Mikrokapky musí být produkovány v uniformní velikosti během celého procesu a to dokonce i v případě mírného teplotního kolísání v průběhu jejich generace. Navíc kapičky nesmí během manipulace, v průběhu transportů pomocí mikrotrubic, ani při následném vyhodnocení prskat nebo dokonce splývat. Dnešní vypracované postupy umožňují rozdělit 20  $\mu\text{l}$  vzorku a výchozích reagentů do asi 20 000 monodisperzních mikrokapek, přičemž generátor umí vytvořit až 1000 kapek za sekundu [34]. Ty jsou systémem

mikrotrubiček transportovány do jednotlivých jamek na obvykle 96 jamkové mikrotitrační PCR destičky umístěné v termocykléru. Na mikrodestičkách jsou již připravené všechny potřebné reagenty nezbytné pro správný průběh amplifikace a také vhodná detekční barviva. Zde následně probíhá amplifikace templátu v každé samotné kapence jednotlivě. Před vyhodnocením jsou jednotlivé kapky opět pomocí systému mikrotrubiček nasávány a samostatně velmi opatrně a pomalu posouvány směrem k detektoru. Ten je zároveň i fotonásobičem příchozího signálu, jež je následně vyhodnocen a zaznamenán. Většina vyhodnocovacích zařízení obvykle reaguje na určité fluorescenční zabarvení jednotlivých jamek, které jsou podle určité barvy tříděny detektorem jako pozitivní nebo negativní [33]. Velmi hojně je využívána například již dříve zmíněná detekční technika TaqMan test [34]. V neposlední řadě je tedy součástí instrumentace emulzní dPCR i speciální mikrofluidní čtecí technika označovaná jako tzv. microdroplet reader. Ten funguje podobně jako průtokový cytometr a po ukončení amplifikace signály vydávající jednotlivými mikroreaktory individuálně vyhodnotí [18,25].

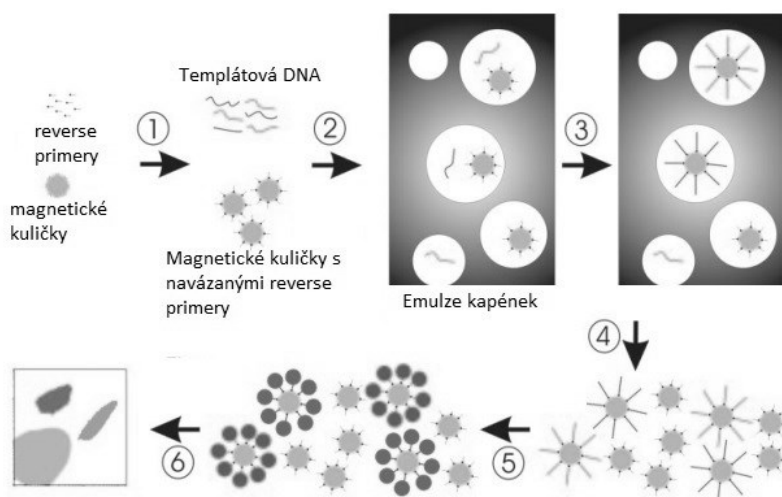


**Obr. 6.10** Vyobrazení základních kroků při analýze pomocí ddPCR. Převzato a upraveno z [34].

Například v přístroji společnosti QuantaLife (dnes Bio – Rad) trvá generace vzorku do mikrotitrační destičky obsahující 96 mikrokapek zhruba 25 minut, přičemž lze analyzovat až tři série těchto destiček najednou [18]. Zařízení RainDance (od letošního roku též součástí Bio – Rad) generuje a následně detekuje až milion kapek o velikosti pikolitrů. Velkou výhodou je také to, že manipulace se vzorkem ze strany pracovníka laboratoře je minimální. Veškeré pipetování, generování kapiček, jejich transport a následnou analýzu stroj obstará bez vynaložení lidské práce zcela sám v závislosti na zvoleném programu.

Podle studie probíhající na univerzitách ve Starsbourgeru a Paříži dokázali vědci zachytit jednu mutaci KRAS genu mezi 200 000 KRAS genech nemutagenního původu.

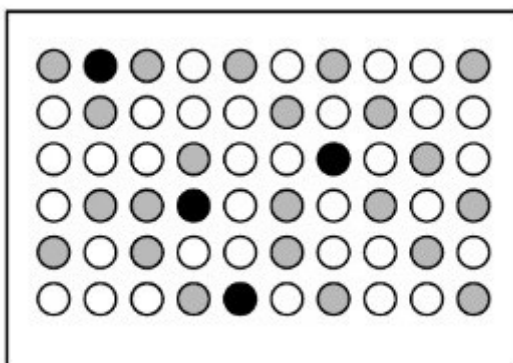
Zvláštním formátem emulzní dPCR je tzv. BEAMing formát (**b**eads, **e**mulsion, **a**mplification and **m**agnetics) [13,17]. Jedná se o technologii, která kombinuje emulzní dPCR a mikrokuličky s magnetickými vlastnostmi. Princip metody je schematicky znázorněn na Obr. 6.11. Směs obsahující všechny potřebné komponenty pro správný průběh PCR reakce, magnetické kuličky s navázaným reverse primerem a templátovou DNA se smíchá společně s olejovým detergentem a dojde k vytvoření mikroemulze tak, že v ideálním případě jedna kapénka obsahuje vždy jednu templátovou molekulu DNA a jednu magnetickou kuličku. Matrice se zachytí na reverse primer na povrchu magnetické kuličky a v následujícím procesu tepelného cyklování dochází k její amplifikaci, kdy každá nově zreplikovaná dvoušroubovice DNA je opět přichycena ke kuličce. Poté je pomocí magnetu směs očištěna od kapének mikroemulze, ve kterých amplifikace neproběhla. Detekce je uskutečněna po vhodném fluorescenčním značení, které barevně odliší wild PCR produkt od mutagenního PCR produktu (viz. kap. 4.2. Detekce produktu). Nakonec je tedy každá kulička přečtena digitálním detekčním zařízením, pracujícím na basi průtokového cytometru. Díky separaci pomocí magnetu tato technologie také umožňuje využití kuliček s navázanou DNA v další řadě experimentů.



**Obr. 6.11** Princip metody BEAMing. 1. krok – navázání reverse primeru a templátu na magnetické kuličky. 2. krok – vytvoření mikroemulze. 3. krok – PCR cyklus. 4. krok – přečištění kuliček pomocí magnetu. 5. krok – navázání fluorescenční sondy. 6. krok – detekce průtokovým cytometrem. Převzato a upraveno z [17].

## 6.2. Formát dPCR na mikrotitrační destičce

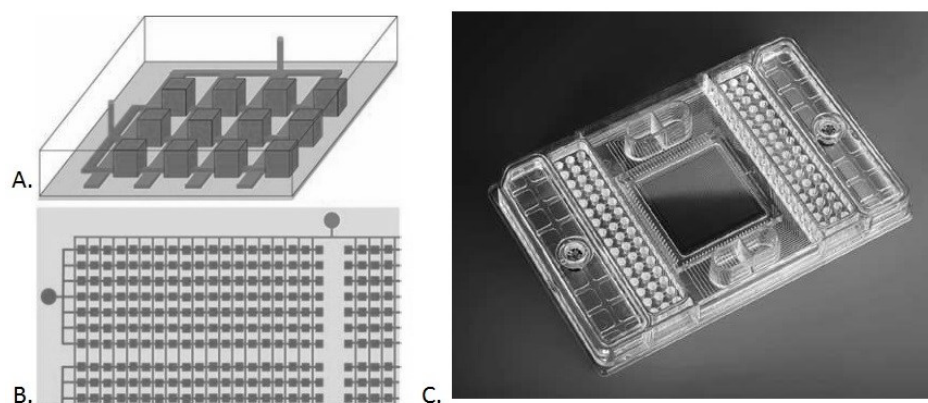
Formát na podkladu miniaturní mikrotitrační destičky využívají přístroje QuantStudio společnosti Thermo Fisher (dříve Life Technologies) [35]. Obecně tento systém obsahuje snadno vyměnitelné mikrotitrační destičky, které standardně obsahují 96 nebo 384 jamek, do nichž je postupně pipetován zředěný vzorek a chemické reagentie. Ty jsou poté vloženy do termocykléru, kde proběhne proces amplifikace. Následně jsou PCR produkty detekovány většinou na basi již dříve zmíněné TaqMan sondy digitálním čtecím zařízením, možné schematicky znázorněné vyhodnocení je zobrazeno na Obr. 6.12. Nejmodernější přístroj tohoto typu QuantStudio™ 3D, umožňuje průběh až 12 228 paralelních PCR reakcí [36]. Díky vyjímatelným platformám je výhodou tohoto přístroje možnost opakovaného zanalyzování mikrotitrační destičky, pokud se prvotní čtení jeví jako špatné, což například u přístroje pro ddPCR RainDance není možné [37].



**Obr. 6.12** Schématické znázornění plochy mikrotitrační PCR destičky po vyhodnocení čtecím zařízením. Bílá barva označuje jamky bez přítomnosti templátové DNA. Šedá barva vyobrazuje negativní výsledek. V mikroreaktorech označených černě úspěšně proběhla PCR. Převzato a upraveno z [25].

## 6.3. Mikrofluidní formát

O amplifikaci, detekci a celkovou analýzu vzorku, která by probíhala na jednom malém kompaktním čipu je v posledních letech velký zájem. Metody PCR založené na provedení analýzy v těchto velmi malých rozměrech, bývají také označovány jako mikrofluidní formát PCR nebo také jednodušeji jako tzv. laboratoř na čipu [38].



**Obr. 6.13** Schématické znázornění mikrofluidního čipu. **Obr. A.** vyobrazuje detailní záběr čipu, kde šedé krychle znázorňují jednotlivé reakční komory. Na **Obr. B.** je zachycena větší část čipu, kde horizontálně tmavě šedé plochy představují jednotlivé reakční komory a mikroventily, jež přivádějí ke komorám vzorek, jsou znázorněny vertikálně. Převzato a upraveno z [39]. **Obr. C.** je fotografie čipu vyrobeného společností Fluidigm Corporation. Převzato a upraveno z [40].

Základem mikrofluidní dPCR je tzv. mikrofluidní čip nebo platforma, která je vyobrazena na Obr. 6.13. Tento čip obsahuje velké množství jednotlivých komor, proto se tato technika označuje jako *chambre based dPCR*, zkráceně potom *cdPCR* [39,41].

I tento formát dPCR spojený s vhodnou fluorescenční technikou detekce a za předpokladu užití Poissonovy statistiky lze použít pro absolutní kvantifikaci DNA v původním vzorku [39]. Obecně je tedy možné konstatovat, že analýzu pomocí PCR uskutečněnou na mikrofluidním čipu lze využít všude, kde je potřeba dosáhnout velmi rychlé amplifikace nepatrně velkých vzorků nukleových kyselin [38].

Společnost Fluidigm jako první nabídla přístroj, který podle zvoleného programu míchal vzorky s potřebnými chemickými reagensy, jež následně pipetoval do jednotlivých jamek čipů [18]. Zároveň obsahoval i termocyklér a jednoduché detekční zařízení vyhodnocující zda došlo v dané jamce ke správné amplifikaci či nikoliv. Později vyvinutý BioMark HD Systém sledoval i průběh amplifikace, vyhodnocoval jednotlivé vzorky a poskytoval data, přičemž zároveň eliminoval falešně pozitivní výsledky. Základem obou těchto přístrojů je mikrofluidní čip, na kterém probíhá samotná amplifikace a později i detekce výsledného produktu. Čip umožňuje provést až 800

amplifikací a obsahuje běžně několik desítek až stovek jamek, ve kterých je již připravená primární reakční směs.

Vzorek je pipetován do hlavního průtokového kanálu mikrofluidního čipu společně s olejem, který původní vzorek rozdělí na jednotlivé templáty [42]. Na čipu jsou přítomny samostatné vstupy do velkého množství jednotlivých PCR reakčních komor, které spojuje značný počet rozvodných kanálků. Obrovské množství komor zároveň umožňuje stejně velký počet paralelních stanovení. V roce 2011 byl vyroben mikrofluidní čip, jež obsahoval dokonce až jeden milion reakčních komor o objemu v řádu pikolitru, s hustotou 440 000 probíhajících PCR reakcí na 1 cm<sup>2</sup> [42]. Na mikrofluidní čip je aplikován pneumatický nebo hydraulický tlak, který vzorek jednak promísí s důležitými reakčními činidly a zároveň jsou membrány mezi komorami a rozvodnými kanálky vychýleny a vytváří tak jakési velmi malé ventily. Pomocí kapilárních sil nebo mikropump je vzorek těmito mikroventily rozveden do jednotlivých PCR reakčních komor po celé ploše čipu [38]. Přičemž jeden takto vytvořený mikroventil, může náhodně rozdělit mezi jednotlivé komory až tisíc vzorků o objemech pouhých několik nanolitru. V reakčních komorách následně probíhá amplifikace templátu. Po zmnožení DNA jsou jednotlivé komůrky v závislosti na svém obsahu obvykle zbarveny fluorescenčními barvami. Poté již vhodná detekční technika opět každou reakční komoru jednotlivě vyhodnotí [39,42].

V současné době je cdPCR formát o něco málo komerčně dostupnější [41]. Nicméně finanční náročnost technicky jednodušší emulzní PCR oproti mikrofluidní PCR je obecně přijatelnější a výhodnější. Nový formát ddPCR je schopný generovat až 20 000 jednotlivých mikrokapiček jednotlivých vzorků, což je asi 25 násobek 765 komůrek, které obvykle komerčně dostupná mikrofluidní deska obsahuje.



#### 6.4. Porovnání komerčně dostupných přístrojů

**Tabulka 6.2** Porovnání komerčně dostupných přístrojů pro dPCR. Převzato a upraveno z [18].

Prodejce	Název přístroje	Počet reakčních komor	Počet vzorků, objem komor	Celkový objem vzorku	qPCR	Detekce
Fluidigm Corporation	BioMark HD	765	9 180, 6 nl	4 µl	Ano	5 barev pro 5 vzorků
	EPI	770	36 960, 0,85 nl	2 µl	Ne	5 barev pro 5 vzorků
Thermo Fisher (dříve Life Technologies)	OpenArray RealTime PCR Systém and QuantStudio 12K	64	3 072, 33 nl	100 µl	Ano	2 barvy pro 2 vzorky
Bio – Rad Laboratories (dříve QuantaLife)	QX100 ddPCR Systém	16 000 mikrokapek	1 344 000, 1 nl	9 µl	Ne	2 barvy pro 2 vzorky
Bio – Rad Laboratories (dříve RainDance Technologies)	RainDrop Digital PCR	10 000 000 mikrokapek	80 000 00, 5 pl	5 – 50 µl	Ne	2 barvy pro 10 vzorků

## 7. Aplikace dPCR

Metoda dPCR má velmi široké analytické uplatnění a můžeme ji zařadit mezi základní techniky molekulární biologie. Její využití je možné všude, kde je potřeba manipulovat ať už s molekulou RNA nebo častěji s molekulou DNA a to v celé řadě různých biologicko – chemických disciplín.

### 7.1. Kvantifikace cílové DNA

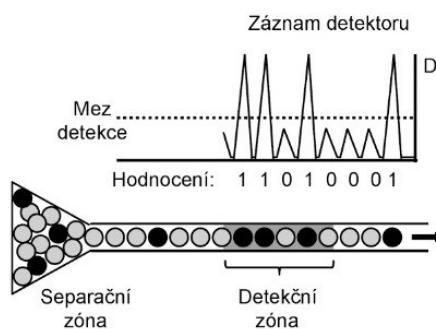
#### 7.1.1. Detekce a kvantifikace DNA

Nejrozšířenější aplikací dPCR je určování počtu molekul DNA v původním vzorku pomocí již dříve popsané absolutní kvantifikace.

Cílová sekvence v podobě vzorku je rozdělena do velkého množství jednotlivých jamek, komůrek nebo kapiček. Následně probíhá v těchto oddělených částech PCR amplifikace. To znamená, že v závislosti na rozdělení analytu do dílčích jamek získáme paralelně několik desítek až tisíc kvantitativních výsledků. Do jednotlivých segmentů je také přidána značka obvykle na bázi fluorescence (viz. kap. 4.2. Detekce produktu PCR reakce), jež následně vydává pozitivní nebo negativní signál na základě obsahu analytu. Fakt, že v každé individuální jamce mohou být teoreticky přítomny dvě nebo i více cílových molekul je při vyhodnocení výsledků zohledněno pomocí Poissonova rozdělovacího koeficientu (viz kap. 5.2. Poissonova distribuce DNA). Další výhodou je skutečnost, že dPCR oproti real - time PCR, která slouží rovněž ke kvantifikaci produktu, nezávisí na konečném počtu cyklů. Díky tomu není nárůst produktu exponenciální, ale řídí se závislostí přímo úměrnou a tedy je následně možné určit kvantifikaci absolutní. Z toho vyplývá, že při použití této metody není nutné na rozdíl od qPCR, analyzovat kalibrační vzorky a následně sestrojovat ředící křivku. To šetří nejen čas pracovníků laboratoří, ale i značné množství jejich finančních prostředků [13].

Při kvantifikaci dPCR se hodnotí pomocí vhodné detekční techniky, zda – li daný mikroreaktor vydává pozitivní nebo negativní signál, což svědčí o přítomnosti nebo naopak nepřítomnosti templátové sekvence DNA v jamce [21]. Například na Obr. 7.14 je možno vidět, že pokud amplifikace v dané jamce proběhla úspěšně, je tato jamka detektorem vyhodnocena jako pozitivní, neboť vydává fluorescenční signál a následně je jí přiřazeno číslo 1. Pokud amplifikace neproběhla nebo jamka vydává signál, jež je pod mezí detekce daného detektoru, je mikroreaktor vyhodnocen programem jako negativní

a následně mu je přiřazeno číslo 0. Právě díky takovému přiřazení čísel a jednotlivému vyhodnocování každé individuální jamky zvlášť, se tato metoda nazývá digitální. Výsledek se následně vyjadřuje jako aditivní součet číslic 1 a 0, které zároveň vyjadřují počet kopií molekul DNA, vztažených k určité objemové jednotce. Po jednoduchém sečtení pozitivních a negativních signálů pomocí vhodné vyhodnocovací a detekční techniky lze určit absolutní počet molekul DNA v původním vzorku [25,43].



**Obr. 7.14** Schématické znázornění detekce. Obrázek nahoře znázorňuje výstup detektoru, který jednotlivým vzorkům přiřazuje 1, pokud se jedná o pozitivní signál a 0 pokud se jedná o signál negativní na základě hodnoty tzv. meze detekce. Obrázek dole zobrazuje konkrétní příklad detekce používaný při ddPCR, kdy jsou jednotlivé kapénky detekovány v detekční zóně detektoru. Černé kapénky znázorňují pozitivní výsledek a šedé představují výsledek negativní. Převzato a upraveno z [25].

V roce 1992 byla jako jedna z prvních publikována studie, která popisovala absolutní kvantifikaci DNA pomocí digitální PCR s následným využitím Poissonovy statistiky [14]. Detekována a kvantifikována byla DNA v osmi vzorcích protilátky patřící do rodiny imunoglobulinů, jejichž těžký řetězec (IgH) nesl gen odvozený z leukemických klonů od pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukémií, oproti protilátce obsahující geny z fyziologického klonu T – lymfocytů, B - lymfocytů a velkého množství dalších buněk, které se v krvi pacienta přirozeně nachází. Díky onkologickému potenciálu lymfocytů u konkrétního nemocného, došlo ke specifické změně IgH genu a ten se tak stal ideálním markerem, sloužící k rozlišení přítomnosti leukemických klonů od zcela fyziologického materiálu. Ukázalo se, že dPCR je při použití vhodného vnějšího nebo vnitřního standardu ve velké míře kompatibilní s celou řadou dalších detekčních technik, které její citlivost ještě více zvyšují. Například velmi vhodně zvolená koncepce

kvantifikace vzorku v uvedené publikaci byla optimalizovaná i pro velmi nízké koncentrace DNA tak, že dvě potenciálně leukemické protilátky byly detekovány mezi až 160 000 neleukemickými genomy.

### **7.1.2. Využití kvantifikace pomocí dPCR v oblasti forenzní analýzy**

dPCR se v rámci forenzní analýzy využívá především v oblasti tzv. forenzní genetiky [12]. Jedná se o odvětví, ve kterém jsou vzorky obsahující DNA podrobovány metodami molekulární biologie základním genetickým testům. Může se jednat o testy kriminalistického charakteru, kdy jde především o vzorky nalezeny na místě trestných činů. Dále mohou být testovány vzorky ustanovující příbuznost, zde se jedná hlavně o testy paternity (testy otcovství) nebo testům identifikačního rázu, kdy je možné identifikovat jakéhokoliv jedince na základě jeho DNA. Mezi nejběžněji testované vzorky patří krev, vlasy, sperma, sliny, pot, kůže ale také žvýkačky, nedopalky od cigaret, zubní kartáčky nebo použité nádoby. Všechny tyto vzorky mohou sloužit jako důkazní materiál v soudních sporech.

Díky zlepšení přesnosti měření dPCR oproti konvenčně používané qPCR, se ve forenzní oblasti dPCR využívá hlavně ke kvantifikaci velmi malého množství templátové DNA nebo – li pro tzv. analysis on low copy DNA samples [44]. Komplikací forenzních vzorků je nejenom jejich malé množství, které je obvykle pod mezí detekce, ale také značná míra degradace nebo přítomnost inhibitorů PCR [45]. Analýza forenzního vzorku běžně používanými metodami qPCR trvá 12 - 36 hodin, spojení automatizovaného systému mikrofluidního formátu dPCR s kapilární elektroforézou dobu analýzy zkrátilo na 1 – 2 hodiny [46].

### **7.1.3 Kvantifikace genové exprese**

Během genové exprese dochází k převedení genové informace do struktury proteinu. Pokud je původní DNA pozměněna, nastane změna v genové expresi, to v konečném důsledku může dát za vznik zcela odlišnému proteinu, který může v organismu vyvolat velmi závažné klinické problémy. Změna genové exprese je tak velmi nápomocným nástrojem, jež může poukazovat na vznik celé řady případných onemocnění, respektive mutací v DNA. Přičemž digitální PCR umožňuje tyto změny objevit a následně kvantifikovat.

Ke kvantifikaci takovéto genové exprese se dnes v rutinní klinické praxi používá metoda tzv. kvantitativní PCR s odečtem signálu na principu interkalace (Sybr Green) nebo TaqMan sond (viz. kap. 4.2.1. Detekce produktu pomocí interkalačního barviva a kap. 4.2.2. Detekce produktu na principu TaqMan sond) [18]. Pro dPCR lze využít stejné primery a sondy jako pro qPCR, avšak tato metoda má mnohem vyšší citlivost i přesnost. Při užití qPCR není možné rozlišit rozdíly genové exprese menší než je jeho dvojnásobek, tzn. že identifikace potenciálně mutagenní alely, jež se vyskytuje v genomu s frekvencí menší než 1 % je velmi obtížné. Je tomu tak, protože při použití konvenční qPCR, tato metoda detekuje i alely s velmi podobnými sekvencemi jaké má alela mutagenní, což vede ke špatnému výsledku kvantifikace. Oproti tomu dPCR zachytí již méně než 30 % rozdílů v genové expresi, přičemž dokáže rozlišit, zda se mutagenní sekvence vyskytuje v pěti ze šesti kopií DNA. Současně dokáže identifikovat jednu mutantní alelu mezi tisíci alelami wild type.

Konkrétní aplikací je například kvantifikace exprese genu APC [47]. Snížení exprese tohoto genu o polovinu může vést k rozvoji familiární adenomatózní polypózy. Dále byla dPCR využita ke stanovení poměru mutagenní a wild type alel genové exprese genu BRAF, jež je spojený s rakovinou vaječnicků.

## **7.2. Prenatální vyšetření plodu**

### **7.2.1. Detekce aneuploidii**

Dalším odvětvím, v němž je možné využít dPCR je prenatální diagnostika, neboť genetické testy používané pro testování plodu v prenatálním období vyžadují rychlou a velmi přesnou diagnostiku na molekulární úrovni. Ta se týká hlavně včasného odhalení závažných vrozených vad, jako jsou chromosomální aberace nebo neléčitelná genetická poškození u nenarozených jedinců. Screeningové vyšetření pomáhá stanovit biochemické markery, jejichž vyšší hladina by během těhotenství mohla poukazovat na poškození plodu. Možný průkaz dané nemoci může nejen pomoci budoucím rodičům v rozhodnutí o dalším postupu, ale také umožní plánovat vhodnou prenatální i postnatální léčbu novorozenců.

Chromosomální aneuploidie je genetické onemocnění, které obvykle poškozuje všechny buňky daného jedince [48]. Dochází zde k nadbytku nebo naopak absenci určitého homologního chromosomu. K danému poškození může dojít během meiózy, kde

se jedná především o nesprávné rozejití chromosomů nebo chromatid k opačným pólům buňky nebo během mitózy, kdy se jedná o vznik tzv. mozaiky.

dPCR se využívá například jak k testování nejznámější trisomie chromosomu 21, která zapříčiňuje Downův syndrom, tak umožňuje prenatalní testování celé palety dalších, dnes již hojně se vyskytujících aneuploidií [49]. Nejběžněji používanými metodami, kterými je možné získat fetální genetický materiál je aminocentéza (odběr plodové vody) nebo choriocentéza (biopsie trofoblastu). Standardním postupem při testování takto získaných vzorků je sestavení karyotypu. Hlavním problémem při sestavení karyotypu je přílišná časová náročnost mezi odběrem vzorku a samotným výsledkem, ta se pohybuje až okolo dvou týdnů. Výhodou při použití dPCR je její nezávislost na pohlaví a schopnost detekce i při výskytu chromozomální mozaiky nebo kontaminovaného materiálu mateřskou DNA. Navíc můžeme s její pomocí dosáhnout mnohem přesnější kvantifikace DNA obsažené ve vzorku než při použití kvantifikační PCR (qPCR). I přestože jsou nově zaváděné metody jako dPCR oproti tradičnímu postupu rychlejší a citlivější, mají své podstatné limity. Komplikací může představovat skutečnost, že se nedá v jednom kroku provést samotná amplifikace a následná detekce, ta se provádí až následně například pomocí gelové elektroforézy.

### **7.2.2. Prenatální neinvazivní diagnostika pomocí dPCR**

Již v předcházející kapitole jsou zmíněny velmi invazivní způsoby odběru fetálních vzorků pro prenatalní diagnostiku jako je aminocentéza nebo choriocentéza. Zajímavým a zcela neinvazivním materiálem vhodným k testování rizik spojených se vznikem chromosomální aberací jsou fetální cirkulující molekuly nukleových kyselin (ctDNA) plodu přítomné v krevním oběhu matky [49].

Největším problémem je minoritní zastoupení ctDNA plodu v krvi matky [43]. Díky tomu, že dPCR potřebuje malé množství vzorku je velmi vhodnou detekční metodou pro tento typ stanovení. Ukázalo se, že již na počátku prvního trimestru těhotenství fetální ctDNA plodu tvoří 10 % všech nukleových kyselin cirkulujících v krevním řečišti matky. Vzhledem k tomu, že jeden mililitr krve obsahuje zhruba 1000 ctDNA, je možné zachytit pomocí dPCR již 2 % fetální ctDNA, které obsahují aneuploidie. Nicméně k zachycení tak malého počtu ctDNA je potřeba velkého množství výchozího materiálu, kdy výzkumy hovoří až o 100 mililitrech plazmy, které je nutné matce odebrat. I přes tento problém

představuje dPCR v porovnání s ostatními dostupnými metodami časově a finančně vhodnější alternativu využitelnou k vyšetření fetální cirkulující krve plodu v době těhotenství.

### **7.3. Onkologická diagnostika**

Mezi nejčastěji využívanou diagnostiku, která se provádí pomocí metody dPCR patří detekce mutagenních sekvencí DNA [13]. Digitální PCR je vhodnou analytickou metodou pro určení diagnostiky, prognózy a průběhu samotného onemocnění, neboť je možné ji použít pro určení typu konkrétního nádoru. Tím je umožněno poskytnout pacientovi ještě více efektivní léčbu. Popřípadě může být využita k farmakogenetickému vyšetření, kdy se dají stanovit genetické predispozice jednoho konkrétního pacienta k lékové odpovědi na daný medikament, který je vytvořený nemocnému přímo na míru. Následně se pomocí této metody může stanovit účinnost daného léčiva nebo jeho toxicita vzhledem ke zdravotnímu stavu pacienta.

dPCR má také velké uplatnění v dalších metodách detekce u různých konkrétních typech onkologických onemocnění [13]:

#### **1. detekce genů spojených s maligními transformacemi**

Genomové amplifikace, jež jsou součástí genomu každé nádorové buňky, vedou ke zvýšené produkci velmi specifických onkogenů, které zároveň slouží jako rakovinné markery a jsou průkazem onkologického bujení v organismu. Tyto onkogeny ovlivňují celou řadu pochodů v nádorech a jejich citlivá detekce hraje velmi významnou roli v další diagnostice, která umožňuje větší cílenost následné léčby.

#### **2. detekce poškození minoritně zastoupených nukleových kyselin ve vzorku**

Vzhledem k tomu, že se jedná o nukleové kyseliny s nízkou četností, je stanovení běžnými metodami velmi obtížné. Analyzovatelný materiál, v němž se vyskytuje hledaná mutagenní sekvence, je zde zastoupen v podstatně malém množství. Problém tedy nastává třeba u analytů odebíraných metodou biopsie nebo krevních vzorků. V těchto analytech se nachází velké množství zdravé tkáně nebo je žádaný vzorek naředěn.

### 3. Stanovení hladiny cirkulující RNA (miRNA)

Cirkulující RNA může být jeden z onkologických markerů, proto je využitelná k diagnostice onkologických onemocnění. Díky dPCR jsme schopni absolutní kvantifikace miRNA, která je opět k dispozici velmi často v malých množstvích.

#### **7.3.1. Detekce somatických mutací ve tkáňových vzorcích**

Histopatologické vyšetření tkáňového materiálu odebíraného z nádoru je základním vyšetřením, které se při podezření na onkologický nález provádí. Tkáň je odebírána nejčastěji ve formátu tzv. biopsie. V posledních letech se součástí histopatologického vyšetření stává vyšetření molekulárních markerů neboli somatických mutací DNA, které mají klinický význam pro určení stavu a dalšího vývoje daného onkologického onemocnění [50].

#### **7.3.2. Analýza cirkulující nádorové DNA**

Charakteristika nádorů v jednotlivých ložiscích na molekulární úrovni je relativně omezená, neboť složení nádoru se může měnit v závislosti na postupu onemocnění a probíhající léčbě [51]. Výše uvedená tkáňová biopsie tak poskytuje informace jen o malé části nádoru, který může obsahovat celou paletu nejrůznějších mutací v pevně dané odběrové době. Neumožňuje tedy zkoumat vývoj onemocnění v reálném čase. K tomu je nutné provést další invazivní biopsii, která představuje podstatnou zátěž pro pacienta. Navíc je v mnoha případech odběr hodně obtížný a někdy i téměř nebo vůbec nemožný [50]. Proto se vědci snaží o vypracování metod, které by umožnily detekovat nádorovou DNA bez použití invazivní biopsie. Nejlepší volbou pro tento typ detekce je detekce přítomnosti určitých biomarkerů vyšetřením cirkulující nádorové DNA (circulating – tumor DNA, ctDNA) uvolňované do periferního krevního oběhu pacienta, pro který se vžil název tzv. tekutá biopsie (liquid biopsy) [51].

Velkou výhodou tekuté biopsie je téměř neinvazivní monitorování onkologického onemocnění po celou dobu léčby, ale také umožňuje sledování vývoje karcinomu v reálném čase, určení jeho genotypu nebo předpověď dalšího rozvoje onemocnění [52]. V neposlední řadě také umožňuje určit rizika spojená s následnou možností léčby, kdy se může vytvořit další řada nových mutací.



Neinvazivnost této metody spočívá hlavně v možnosti odebrání a vyšetření volně se vyskytujících nádorových molekul DNA, které uvolňují v podobě jednotlivých fragmentů do krevního oběhu umírající nádorové buňky [50]. Děje se tak nejen přímo z krevní plazmy, ale dnešní vypracované metodiky se snaží cílit na ještě méně zatěžující vzorek, kterým je moč. Krevní plazma je velmi dynamické medium, jež nám podává různé informace na molekulární úrovni o zdravotním stavu nemocného. V těchto vzorcích můžeme detekovat cirkulující nukleové kyseliny, které mohou představovat molekulární onkologické biomarkery a mohou být ukazatelem ve sledování progresu a terapeutického účinku léčiv. Tyto biomarkery mohou představovat volně cirkulující molekuly microRNA (miRNA) nebo především molekuly DNA [43,51,52]. V krevní plazmě se ovšem nevyskytují pouze cirkulující DNA z nádorové tkáně, ale i DNA z transplantovaných orgánů nebo plodu v době těhotenství, kdy se tato DNA využívají k neinvazivním prenatalním testům (viz. kap. 7.2.2. Prenatální neinvazivní diagnostika pomocí dPCR) [43]. Největším problémem při vyšetření se tedy stává velmi nízká koncentrace těchto fragmentů. Navíc je určité množství z krevního oběhu odstraňováno buňkami imunitního systému a tak ctDNA vydrží v krvi mnohem kratší dobu (asi jen několik hodin) než je tomu u jiných biomarkerů [50].

Díky použití dPCR jsme schopni ve vzorcích zachytit a dále amplifikovat minoritně se vyskytující ctDNA nebo miRNA, které mohou svědčit o rozvoji onkologického onemocnění [43,51]. Limit citlivé detekce dPCR se v tomto případě pohybuje pod 0,01% mutovaných alel [51]. Například jedna kopie ctDNA produkovaná nádorem způsobeným KRAS mutací, může být zachycena i v obsahu 200 000 nenádorových molekul DNA. I miRNA mají určitý potenciál v oblasti průkazu rakovinného bujení. Ukazuje se, že pomocí dPCR můžeme kvantitativně zhodnotit obsah miRNA v plazmě plic. Některé výzkumy prokazují, že u vzorků plazmy pacientů s karcinomem plic se vyskytuje miRNA v daleko větší míře. Dále použití emulzní dPCR u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic umožňuje predikovat vývoje rezistence na terapeutika až několik týdnů dopředu, a tím zefektivňuje plánování léčby pacientů [43,51].

V současné době je publikována řada studií, ve kterých byla studována mez detekce ctDNA [53]. Testovaná skupina obsahovala 640 onkologických pacientů z různými typy nádorů. Detekovatelná hladina ctDNA byla zachycena u více než 75 %

pacientů s rozvinutou rakovinou hlavy a krku, močového měchýře, tlustého střeva, vaječníku, slinivky, prsu, melanomu a hepatocelulárních buněk. U karcinomu mozku, ledvin, prostaty a štítné žlázy byla detekovatelná hranice menší než 50%. Je tedy patrné, že množství ctDNA je závislé nejen na stupni rozvinutí onemocnění, ale i na typu postižené tkáně.

Velmi brzy se ukázalo, že díky své velké citlivosti se pro detekci ctDNA jeví různé obdoby dPCR, které jsou schopny zachytit nízké koncentrace ctDNA již v úplném počátku vzniku rakovinného bujení jako velmi vhodná metoda [50]. I v tomto případě má využití dPCR své stinné stránky a to hlavně poměrně velkou finanční a technologickou náročnost. Vzhledem k tomu, že se jedná o relativně novou metodou, je v současné době jen relativně málo publikovaných studií, jež jsou ve většina případů provedené na malém počtu pacientů. Navíc hladina a specifita ctDNA se s rozdílností onemocnění může značně lišit. I přesto se dPCR v oblasti detekce ctDNA velmi rychle vyvíjí a v budoucnu lze očekávat, že se může stát běžnou rutinní analytickou metodou pro detekci onkologických onemocnění, která doplní nebo úplně nahradí a především zpřesní dnes běžně používanou klasickou formu biopsie a zobrazovací techniky.

## 8. Experimentální část

Hlavním úkolem experimentální části této práce bylo praktické ověření funkčnosti ddPCR, kdy byly pomocí této metody detekovány frakce málo časté somatické mutace v nadbytku nemutovaného materiálu. Jedná se o aplikaci, která se v poslední době dostává do popředí zájmu výzkumu v oblasti nádorové genomiky, především v oblasti detekce somatických DNA mutací jako prediktorů léčebné odpovědi (viz. kap. 7.3. Onkologická diagnostika). Jako modelový systém byla zvolena somatická mutace genu INSR (insulin receptor) ve velkém nadbytku wild type templátu. Jedná se o bodovou záměnu, kdy je guanin nahrazen cytosinem. Gen INSR patří do skupiny tyrosinkinásových receptorů, nachází se na vnějším povrchu membrány buněk a je tvořen tetramerem obsahující dvě podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$ , jeho ligandem je insulin [54]. Databáze COSMIC udává nejčastější výskyt této mutace u 5,5 % karcinomu kůže, dále asi 3,85 % u karcinomu tenkého střeva, 3,13 % u karcinomu endometria, 2,95 % u karcinomu tlustého střeva, 2,55 % u karcinomu žaludku, 1,36 % u karcinomu biliárního traktu [55]. Modelový případ imituje situaci, kdy je tato mutace vyšetřována např. z bioptického materiálu získaného ze zažívacího traktu v průběhu endoskopického vyšetření. V těchto případech vzorek obsahuje významné množství nemutovaných buněk pocházejících z okolního zdravého tkáňového epitelu. Relativní zastoupení mutovaných buněk je tak často pod úrovní 1%. Testované vzorky, pocházející z INSR mutantních nádorových buněčných linií, byly připraveny tak, aby obsahovaly mutantní frakci v rozmezí od 1 % až do 0,01%, pro které z důvodu nedostatečné citlivosti nelze použít většinu rutinně používaných metod mutační detekce (např. DNA sekvenování, DNA hybridizace sond, alelicky-specifická real-time PCR, apod.). K detekci mutantní DNA ve vzorku byla využita emulzní dPCR, jejíž princip je popsán v kap. 6.1. Emulzní formát.

### 8.1. Materiál

#### 8.1.1. Chemický materiál

- Droplet PCR Supermix no dUTP (katalogové číslo 1863026)
- Primery
  - Forward primer - SNP34 fw 01 (CAGGAGAATGGCGTAAAC)
  - Reverse primer - SNP34 rv 01 (CTCACATTGCTATAAAGA ACTATC)
- Sonda wild type (HEX) – HEX G SNP34 01 (TACAGTGAGCGAAGATGGCG)

- Sonda mutant (FAM) – FAM C SNP34 01 (TACAGTGAGCCCAAGATGGCG)
- Voda (RNase free)
- Wild type templát ( $c = 10^4$  kopií/ $\mu$ l)
- Mutant templát ( $c = 4 \cdot 10^2$  kopií/ $\mu$ l)
- Emulzní olej (katalogové číslo 1863005)

### **8.1.2. Laboratorní a přístrojové vybavení**

- Stojánek na mikrozkušavky
- Pipety s příslušnými objemovými rozsahy
- Špičky k pipetám
- Eppendorfovy zkumavky 1,5 ml
- Mikrotitrační destička
- Cartridge
- Vortex WM – 10
- Droplet Digital™ PCR Systém QX 200™ (Bio – Rad)
- Thermal Cycler C1000 Touch™ (Bio – Rad)

## **8.2. Pracovní postup**

### **8.2.1. Příprava mastermixu**

Nejdříve byl dle následující Tab. 8.3 připraven mastermix, nebo –li směs většiny komponent nutných pro reakci, do které se následně pouze přidá templátová DNA. Mikrozkušavka byla následně promíchána na vortexu.

**Tab. 8.3** Příprava mastermixu.

<b>Reagencie</b>	<b>Koncentrace v zásobní mikrozkuhavce [μmol/l]</b>	<b>Koncentrace v mastermixu [nmol/l]</b>	<b>Pipetovaný objem [μl]</b>
Primery (forward a reverse)	10	400	8
Sonda – wild type	10	200	4
Sonda – mutant	10	200	4
Droplet PCR supermix bez dUTP	-	-	100
Voda (RNase free)	5	0,1	4

### 8.2.2. Příprava ředící řady

Do stojánku bylo umístěno a popsáno šest mikrozkuhvek, do kterých byla připravena dle Tab 8.4 ředící řada tak, že do všech šesti mikrozkuhvek byl nejdříve napipetován příslušný uvedený objem TE – LPA roztoku. Do první mikrozkuhvy bylo pipetováno 50 μl výchozího mutant templátu, vzorek byl promíchán na vortexu a poté bylo odebráno 50 μl vzorku, který byl následně přenesen do druhé mikrozkuhvy. Odtud bylo po promíchání na vortexu opět přeneseno 50 μl do třetí zkuhvy. Tento postup byl aplikován na všech šest mikrozkuhvek.

**Tab. 8.4** Příprava ředící řady.

Mikrozkumavka č.: zastoupení mutant templátu	Objem TE – LPA [ $\mu$ l]	50 $\mu$ l přenášených z mikrozkumavky
1: MUT 1 %	150	Zásobní roztok
2: MUT 0,25 %	150	Mikrozkumavka č. 1
3: MUT 0,1 %	75	Mikrozkumavka č. 2
4: MUT 0,05 %	50	Mikrozkumavka č. 3
5: MUT 0,025 %	50	Mikrozkumavka č. 4
6: MUT 0,01 %	75	Mikrozkumavka č. 5

### 8.2.3. Příprava mikrokapek

Do stojánku byla umístěna mikrotitrační destička o osmi jamkách. Označení všech reakčních jamek je zobrazeno na Tab. 8.5. Do první mikrojamky bylo pipetováno 14,4  $\mu$ l mastermix a 9,6  $\mu$ l vody (RNase free). Následně bylo ze zásobního roztoku přidáno 33,6  $\mu$ l wild type templátu do mastermix a mikrozkumavka byla promíchána na vortexu. Do druhé až osmé reakční jamky bylo pipetováno 18,4  $\mu$ l takto připraveného mastermix. Poté bylo pipetováno 4,6  $\mu$ l vody (RNase free) do druhé reakční jamky. Do třetí až osmé reakční jamky bylo pipetováno 4,6  $\mu$ l příslušného mutant templátu připraveného ředící řadou v kap. 8.2.2. Příprava ředící řady. Objemy příslušných reagensů přidávaných do jednotlivých jamek jsou shrnuty v Tab. 8.6.

**Tab. 8.5** Označení jednotlivých reakčních jamek.

Reakční jamka č. 1	Reakční jamka č. 2	Reakční jamka č. 3	Reakční jamka č. 4	Reakční jamka č. 5	Reakční jamka č. 6	Reakční jamka č. 7	Reakční jamka č. 8
NTC (negativní kontrola)	WT (wild type)	1 % MUT	0,25 % MUT	0,1 % MUT	0,05 % MUT	0,025 % MUT	0,01 % MUT

**Tab. 8.6** Reagencie a objemy v příslušných jamkách.

Jamka č.	Označení jamky	Objem mastermix [μl]	Objem mastermix + WT [μl]	Objem vody (RNA free) [μl]	Zkumavka z ředící řady č.; objem [μl]
1	NTC	14,4	-	9,6	-
2	WT	-	18,4	4,6	-
3	1 % MUT	-	18,4	-	1; 4,6
4	0,25 % MUT	-	18,4	-	2; 4,6
5	0,1 % MUT	-	18,4	-	3; 4,6
6	0,05 % MUT	-	18,4	-	4; 4,6
7	0,025 % MUT	-	18,4	-	5; 4,6
8	0,01 % MUT	-	18,4	-	6; 4,6

Poté byly všechny reakční jamky uzavřeny a promíchány na vortexu. Následně bylo z každé reakční jamky pipetováno 20 μl vzorku do jamek označených „sample“ umístěných v cartridge (Obr. 8.15 A). Vzorky je nutné pipetovat velmi opatrně a pipetu vždy zmáčknout pouze do 1. polohy, aby bylo zabráněno vytvoření bublin. Do nejspodnější řady jamek na cartridge označené „oil“ bylo pipetováno 70 μl emulzního oleje. Přes reakční jamky cartridge byla umístěna gumička a takto připravená cartridge byla umístěna do emulgátoru mikrokapek, které byly vytvořeny v první řadě označené „droplets“ (Obr. 8.15 B). Poté bylo z reakčních jamek opatrně pipetováno 40 μl mikrokapek na mikrotitrační destičku. Na ní byl umístěn alobalový plát, který byl následně zataven.



**Obr. 8.15** Obr. A. Fotografie cartridge. Obr. B. Cartridge zabezpečená gumičkou umístěná v emulgátoru kapek.

#### 8.2.4. Amplifikace a výsledná detekce

Mikrotitrační destička byla vložena do termocykléru, na kterém byl nastaven protokol dle Tab. 8.7.

**Tab. 8.7** Nastavení termocykléru.

Program	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Aktivace	95	10 minut	1 cyklus
Denaturace	94	30 sekund	40 cyklů, rychlost 2,5 °C/s
Annealing	59	1 minuta	
Denaturace	98	10 minut	1 cyklus
Zchlazení	4	∞	-

Po skončení procesu tepelné cyklace byla mikrotitrační destička vložena do detekčního zařízení Droplet Reader, kde došlo k analýze jednotlivých vzorků (Obr. 8.16).



**Obr. 8.16** Droplet Reader (fotografie vlevo). Mikrotitrační destička se zataveným alobalovým plátem umístěná v Droplet Readeru (fotografie vpravo).



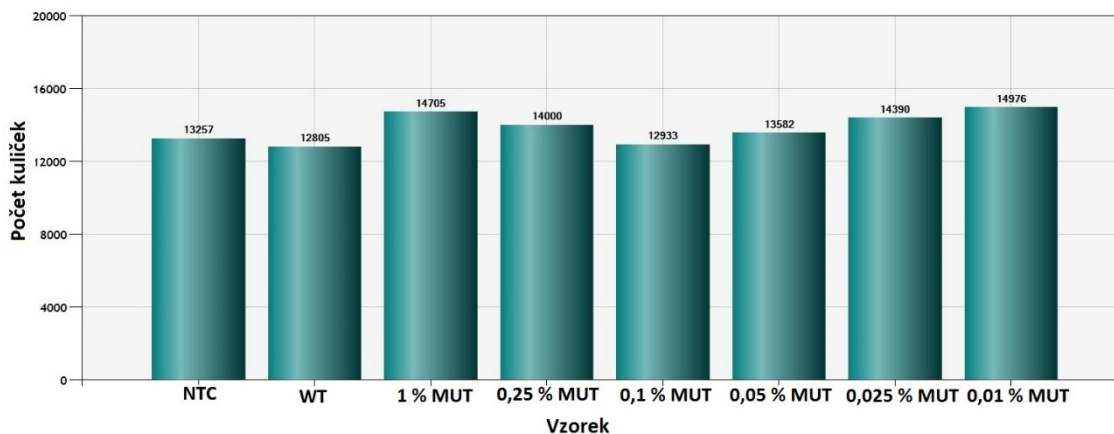
### **8.3. Výsledky a diskuse**

Metoda emulzní digitální PCR je jednou z uživatelsky nejlépe propracovaných verzí provedení digitální PCR. Protokol přípravy emulze obsahující PCR reakční směs, vlastní termocyklickou reakci i následný odečet produktu je relativně jednoduchý a probíhá postupně v několika zařízeních. Obdobně, jako u všech formátů digitální PCR jsou citlivost a lineární rozsah dány celkovým počtem reakčních objemů, které jsou použity. V daném případě je to tedy celkový počet emulzních mikrokapek, které jsou pro každý měřený vzorek vygenerovány.

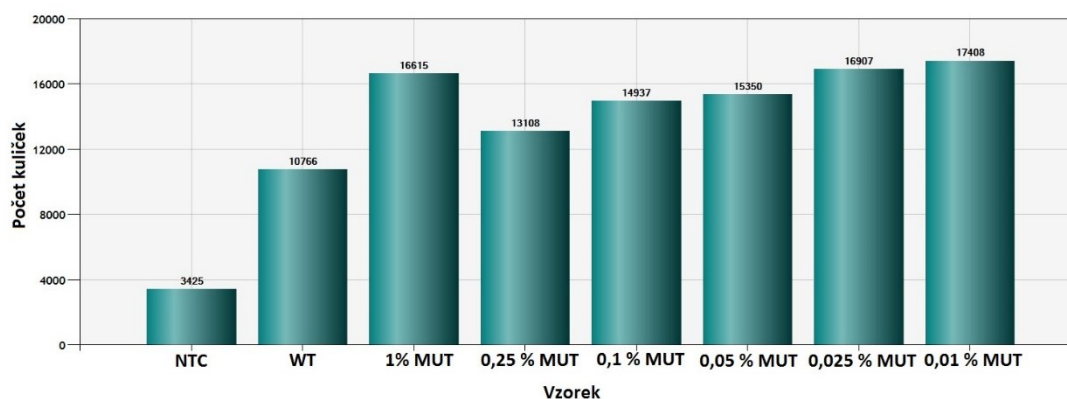
#### **8.3.1. Příprava mikropénkované emulze**

Z pohledu uživatele je rozhodujícím krokem manipulace s emulzní směsí tak, aby během ní nedošlo k poškození a destrukci mikrokapek. Celkový počet generovaných mikrokapek vyhodnocuje čtecí zařízení pro každý měřený vzorek. Pro měření prováděná v této práci jsou výsledky vyobrazeny na Obr. 8.17 a Obr. 8.18. Je zřejmé, že referenční sada vzorků (měřeno s asistencí zkušeného laboratorního pracovníka) vykazuje v průměru vyšší počet mikrokapek na každý vzorek (13 831 mikrokapek) a zároveň, že relativní odchylka počtu mezi jednotlivými vzorky je nižší (5 %) ve srovnání se vzorky s testovací řady (měřeno bez asistence). V testovací řadě byl průměrný počet mikrokapek 13565 a relativní odchylka mezi vzorky 32 %.

Nižší počet mikrokapek u sady testovacího měření především u vzorků NTC (snížení počtu mikrokapek o 75 % oproti průměrné hodnotě) a WT (snížení počtu mikrokapek o 21 % oproti průměrné hodnotě) byl z části způsoben nepřesným pipetováním, kdy pravděpodobně zůstala velká část vzorku ve špičce, dále mohlo dojít během manipulace s emulzními kapkami k jejich poškození. Celkový počet všech mikrokapek v testovací řadě, který byl v průměru o 2 % nižší ve srovnání s referenční řadou měření však nepředstavoval zásadní překážku pro výsledky ddPCR pokusů.



**Obr. 8.17** Graf zobrazující celkový počet kuliček v jednotlivých vzorcích pro referenční sadu měření.



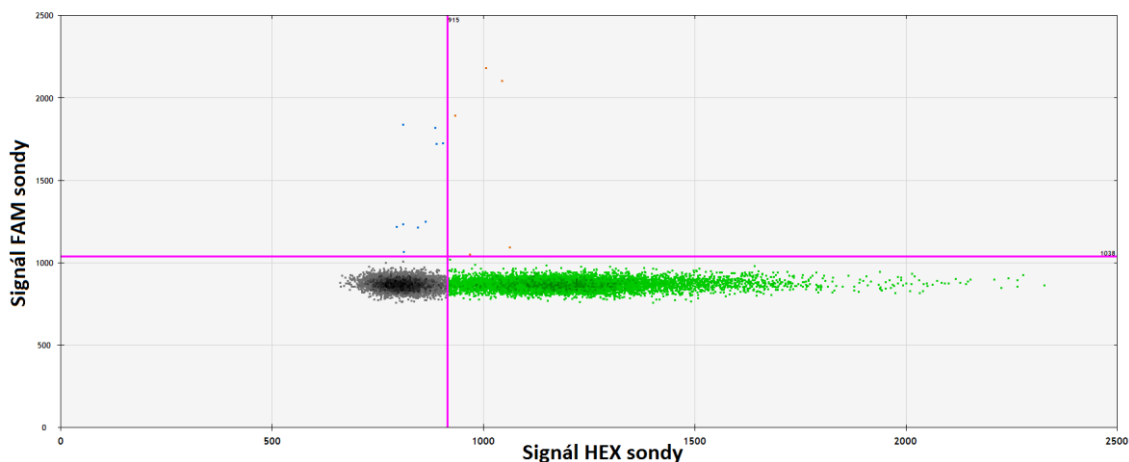
**Obr. 8.18** Graf zobrazující celkový počet kuliček v jednotlivých vzorcích pro testovací sadu měření.

### 8.3.2. Digitální PCR a odečet výsledných produktů amplifikace

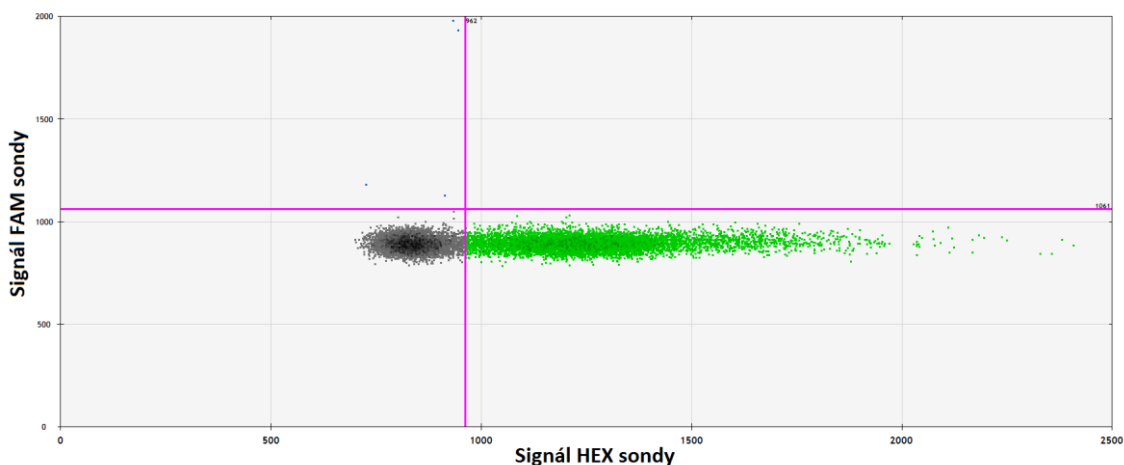
V testované aplikaci detekce somatické mutace ve vzorku nádorové tkáně je základním předpokladem citlivost použité metody umožňující detekci nízkého procenta mutovaných alel v nadbytku alel nemutovaných. Vzhledem k tomu, že při dPCR metodě je výchozí vzorek zředěn na úroveň jednotlivých molekul výchozího templátu, dochází k odstranění vlivu pozadí nemutovaného (wild type) templátu a mutantní DNA je amplifikována odděleně od nemutované DNA.

Výsledky prováděných experimentů jsou shrnuty na Obr. 8.19 až Obr. 8.24. K detekci byla navržena TaqMan sonda komplementární s mutovanou alelou značena fluorescenční značkou FAM (6 - fluorescein amidite) a sonda hybridizující

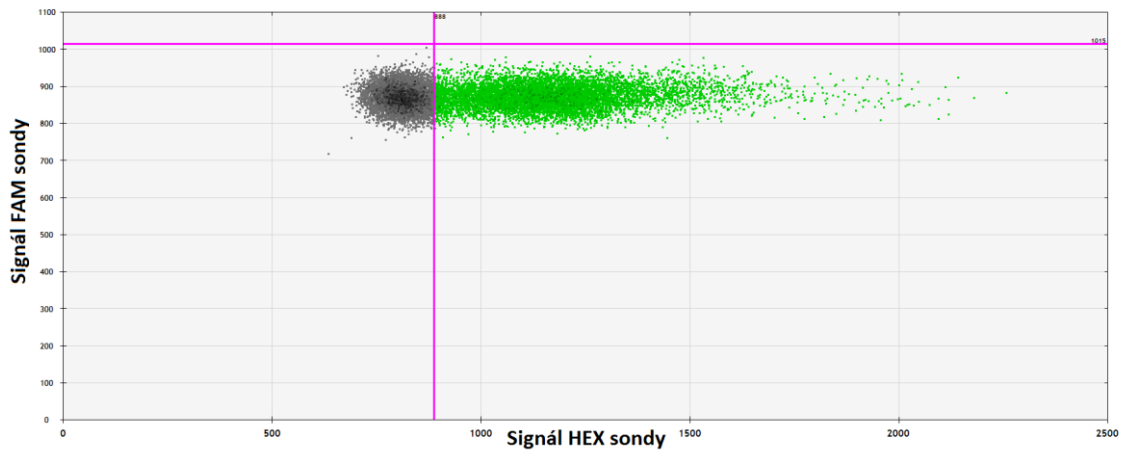
s nemutovanou (wild type) alelou značena fluorescenční značkou HEX (hexachloro - fluorescein). Na Obr. 8.25 jsou vyobrazeny četnosti pozitivních mikrokapek pro všechny vyšetřované vzorky na obou fluorescenčních kanálech.



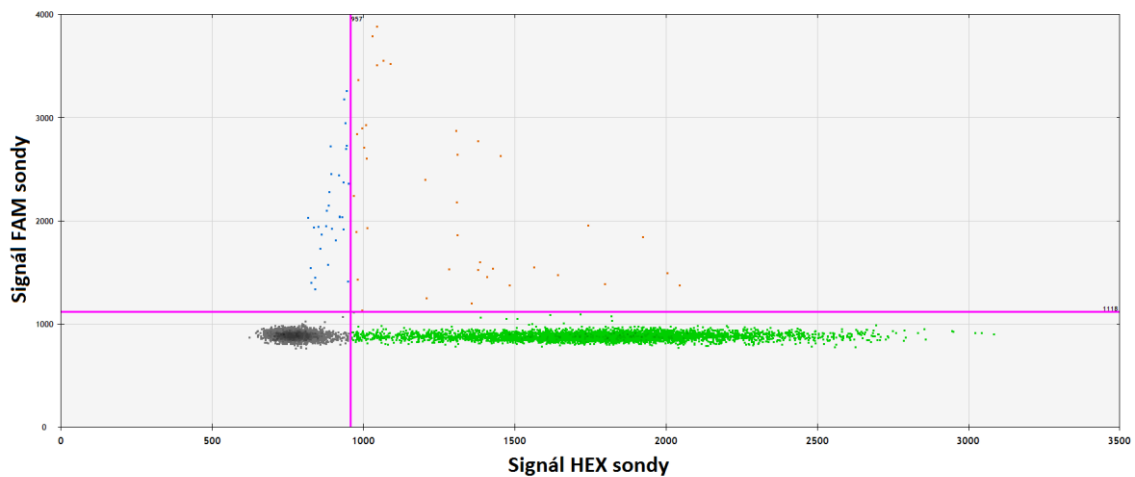
**Obr. 8.19** 2D graf schematicky zobrazující celkové výsledky testovacího měření pro 1 % MUT vzorek. Černá barva představuje negativní výsledek (8170 kuliček), zelená barva zobrazuje pozitivitu jen na wild type templát (8428 kuliček), modrá barva značí pozitivitu jen na mutant templát (13 kuliček) a oranžová barva zobrazuje pozitivní výsledek na přítomnost wild type templátu i mutant templátu (4 kuličky).



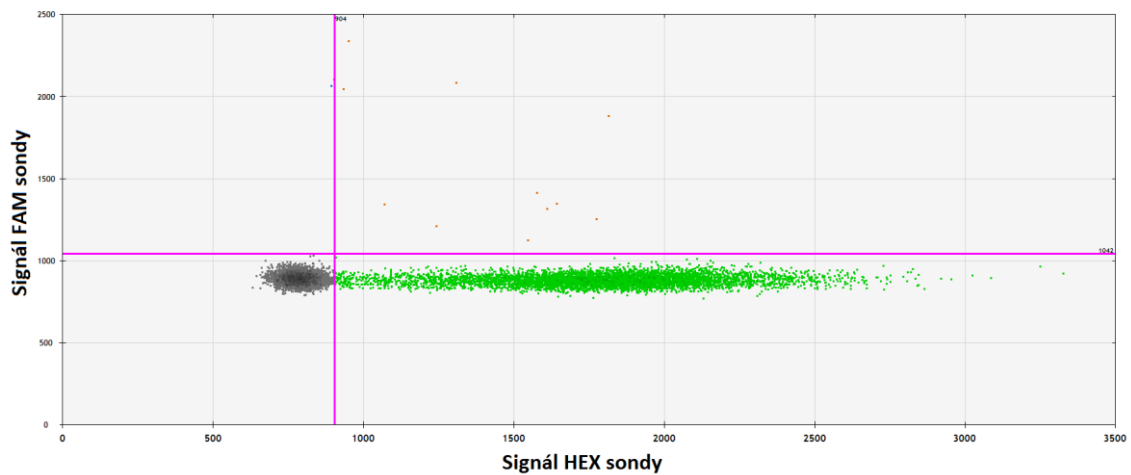
**Obr. 8.20** 2D graf schematicky zobrazující celkové výsledky testovacího měření pro 0,1 % MUT vzorek. Černá barva představuje negativní výsledek (7393 kuliček), zelená barva zobrazuje pozitivitu jen na wild type templát (7530 kuliček), modrá barva značí pozitivitu jen na mutant templát (8 kuliček) a oranžová barva zobrazuje pozitivní výsledek na přítomnost wild type templátu i mutant templátu (6 kuliček).



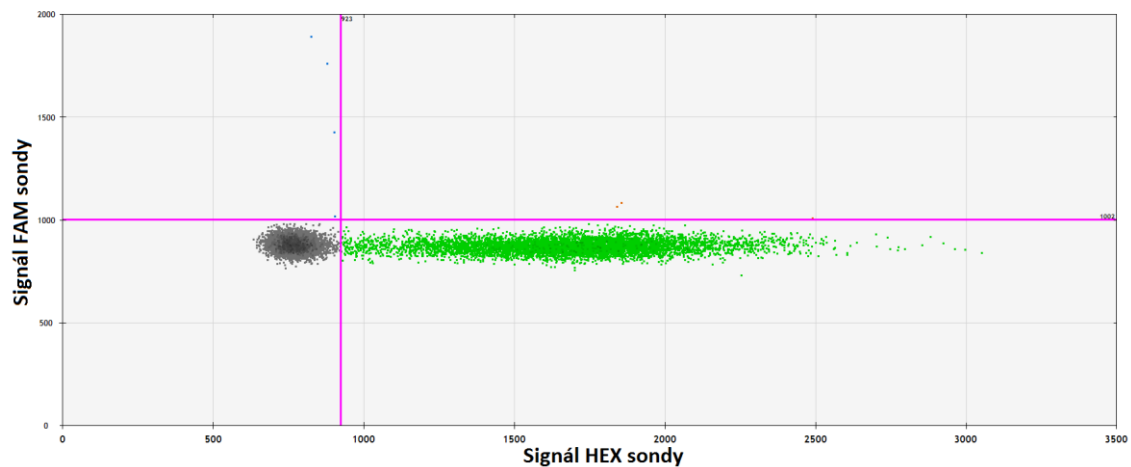
**Obr. 8.21** 2D graf schematicky zobrazující celkové výsledky testovacího měření pro 0,01 % MUT vzorek. Černá barva představuje negativní výsledek (8233 kuliček), zelená barva zobrazuje pozitivitu jen na wild type templát (9175 kuliček), modrá barva značí pozitivitu jen na mutant templát (0 kuliček) a oranžová barva zobrazuje pozitivní výsledek na přítomnost wild type templátu i mutant templátu (0 kuliček).



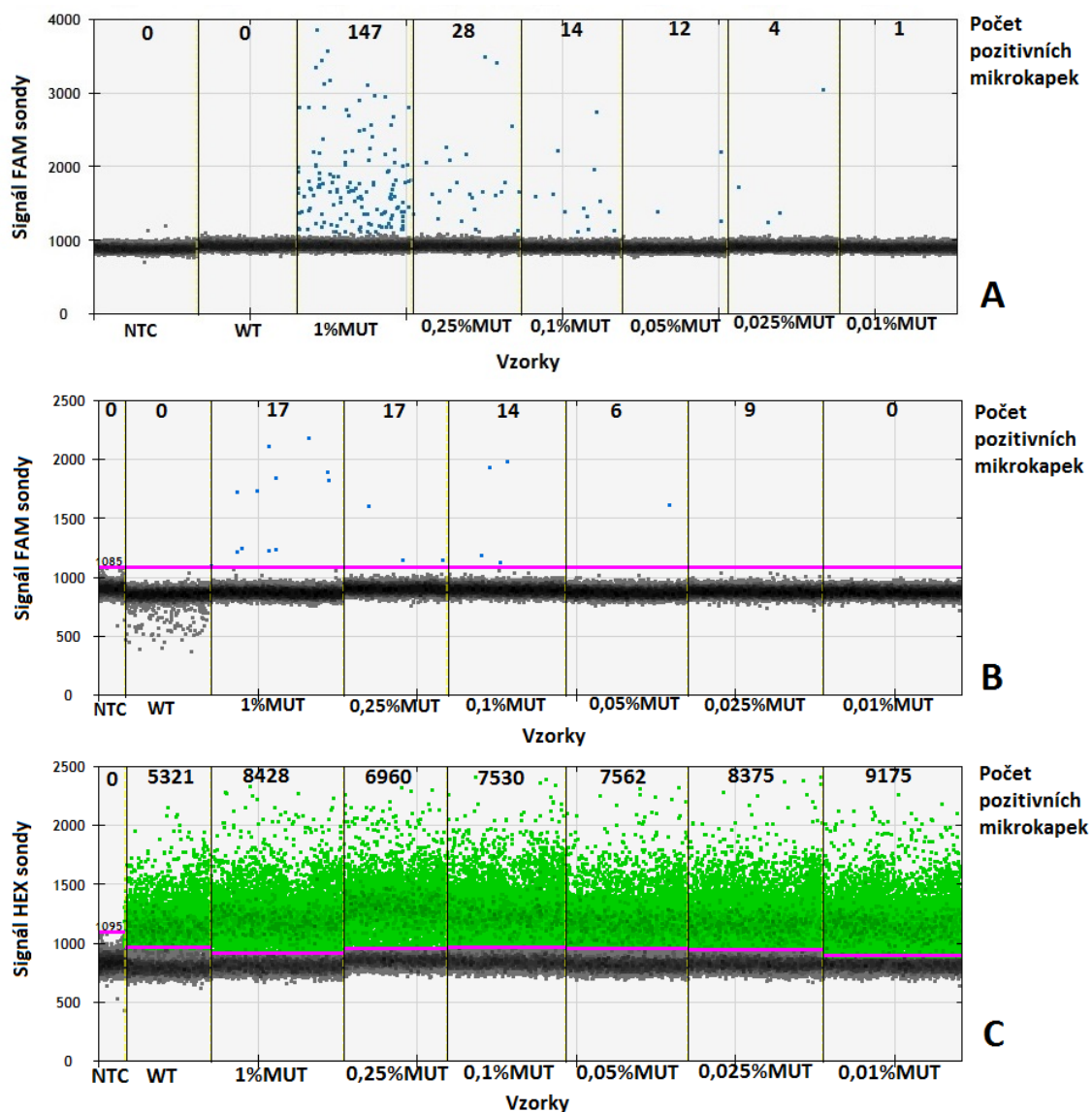
**Obr. 8.22** 2D graf schematicky zobrazující celkové výsledky referenčního měření pro 1 % MUT vzorek. Černá barva představuje negativní výsledek (6676 kuliček), zelená barva zobrazuje pozitivitu jen na wild type templát (7882 kuliček), modrá barva značí pozitivitu jen na mutant templát (76 kuliček) a oranžová barva zobrazuje pozitivní výsledek na přítomnost wild type templátu i mutant templátu (71 kuliček).



**Obr. 8.23** 2D graf schematicky zobrazující celkové výsledky referenčního měření pro 0,1 % MUT vzorek. Černá barva představuje negativní výsledek (6265 kuliček), zelená barva zobrazuje pozitivitu jen na wild type templát (6654 kuliček), modrá barva značí pozitivitu jen na mutant templát (6 kuliček) a oranžová barva zobrazuje pozitivní výsledek na přítomnost wild type templátu i mutant templátu (8 kuliček).



**Obr. 8.24** 2D graf schematicky zobrazující celkové výsledky referenčního měření pro 0,01 % MUT vzorek. Černá barva představuje negativní výsledek (6979 kuliček), zelená barva zobrazuje pozitivitu jen na wild type templát (7996 kuliček), modrá barva značí pozitivitu jen na mutant templát (1 kulička) a oranžová barva zobrazuje pozitivní výsledek na přítomnost wild type templátu i mutant templátu (0 kuliček).



**Obr. 8.25 Graf A** schematicky zobrazuje počet mutovaných alel (vyznačeny modře) u referenční sady měření. **Graf B** schematicky zobrazuje počet mutovaných alel (vyznačeny modře) v jednotlivých vzorcích pro testovacího měření. **Graf C** schematicky zobrazuje počet nemutovaných alel (vyznačeny zeleně) v jednotlivých vzorcích u testovací sady měření.

Na předchozím Obr. 8.25 je vidět, že u relativně vyšších mutantních frakcí (1 % a 0,25 %) lze pozorovat výrazné odchytky pro referenční (A) a testovací řadu (B). Zatímco referenční vzorek s mutantní frakcí 1 % vykazoval 147 FAM-pozitivních (mutantních) mikrokapek, u testovacího vzorku s 1 % mutantní frakcí to bylo jenom 17 pozitivních mikrokapek. Rozdíl byl o něco menší u 0,25 % (28 mikrokapek vs. 17

mikrokapek). Četnosti FAM - pozitivních kapek byly u vzorků s nižší mutantní frakcí srovnatelné. Důvodem je pravděpodobně náhodná chyba při pipetování a manipulaci vzorků v testovací řadě, kdy vzorky s mutantními frakcemi 1 % a 0,25 % byly prvními, které byly pipetovány.

V následující Tab. 8.8 jsou shrnuty výsledky měření včetně přepočteného zastoupení nemutované frakce v měřeném vzorku.

**Tab. 8.8** Srovnání počtu kuliček a procentuální zastoupení mutované alely oproti nemutované alela v jednotlivých vzorcích.

Vzorek	Referenční měření			Testovací měření		
	Mutant	Wild type	Zastoupení mutant ve WT	Mutant	Wild type	Zastoupení mutant ve WT
NTC	0	2	0,00%	0	0	0,00%
WT	0	6864	0,00%	0	5321	0,00%
1%MUT	147	7882	1,87%	17	8428	0,20%
0,25%MUT	28	7562	0,37%	17	6960	0,24%
0,1%MUT	14	6654	0,21%	14	7530	0,19%
0,05%MUT	12	7002	0,17%	6	7562	0,08%
0,025%MUT	4	7457	0,05%	9	8375	0,11%
0,01%MUT	1	7996	0,01%	0	9175	0,00%

Z tohoto přehledu lze vyčíst, že se podařilo v referenčním měření zachytit až 0,01 % mutovaných sekvencí v 99,99 % nadbytku nemutovaných alel, což zhruba představuje zachycení 1 mutované alely na pozadí 7996 nemutovaných alel. Testovací měření dokázalo zhruba zachytit 0,08 % mutovaných sekvencí v 99,92 % nadbytku sekvencí nemutovaných, což představuje 6 mutantních alel na pozadí 7562 wild type alel.

Současně je možné si povšimnout, že procento zastoupení mutantní alely je u většiny vzorků vyšší, než je jeho teoretická hodnota. Distribuce molekul DNA do jednotlivých vzorků v praktickém experimentu není rovnoměrná. Tzn., že do jedné mikrokapénky emulze se tak mohou dostat dvě nebo i více molekul DNA. Jak už bylo

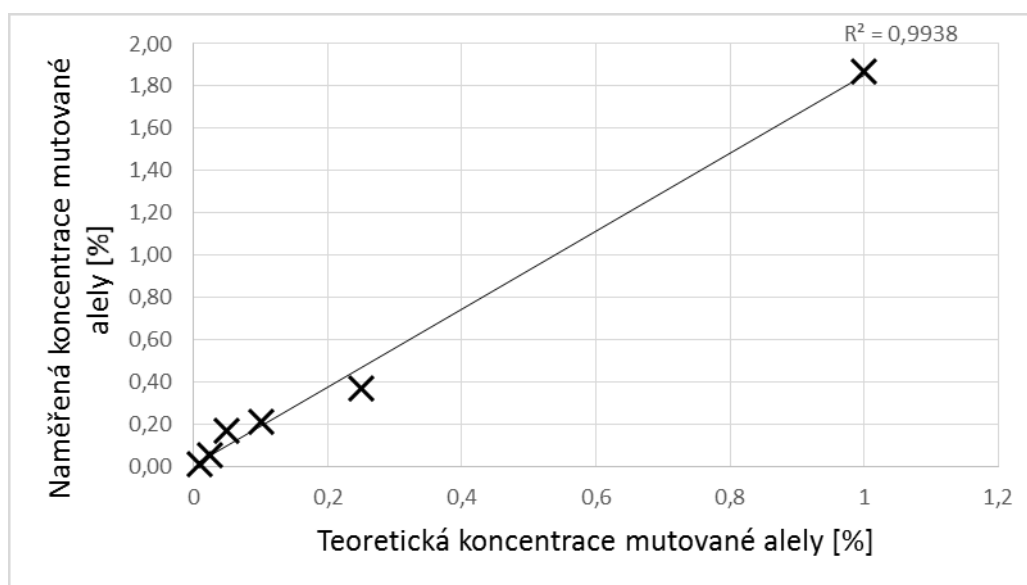
řečeno wild type DNA je ve vzorku velké množství oproti mutované alele, je tedy pravděpodobnější, že právě molekuly DNA tohoto templátu mají v jednotlivých kapkách emulze dvě a více kopií. Díky tomu je celkové zastoupení mutant DNA vztaženo na podhodnocené množství wild type a procento zastoupení mutantní alely o něco málo vzroste. Tento problém je v praxi zohledněn a následně řešen pomocí Poissonovské distribuce. U vzorků testovacího měření, které udávají procento zastoupení mutované alely nižší než je jeho teoretická hodnota, nejpravděpodobněji došlo k nepřesnému pipetování, kdy nebyl do titrační jamky vnesen celý objem všech mikrokuliček nebo vlivem špatné manipulace mohla být část kuliček obsahující i mutovanou alelu poškozena.

**Tab. 8.9** Koncentrace templátu v jednotlivých vzorcích.

		Referenční měření	Testovací měření
Vzorek	Typ templátu	Koncentrace DNA (kopie/ $\mu$ l)	Koncentrace DNA (kopie/ $\mu$ l)
NTC	Mutant	0	0
	Wild type	0,18	0
WT	Mutant	0	0
	Wild type	903	802
1 % MUT	Mutant	11,8	1,5
	Wild type	916	833
0,25 % MUT	Mutant	2,4	1,2
	Wild type	917	893
0,1 % MUT	Mutant	1,3	1,1
	Wild type	852	826
0,05 % MUT	Mutant	1	0,46
	Wild type	854	799
0,025 % MUT	Mutant	0,33	0,63
	Wild type	859	805
0,01 % MUT	Mutant	0,08	0
	Wild type	898	881



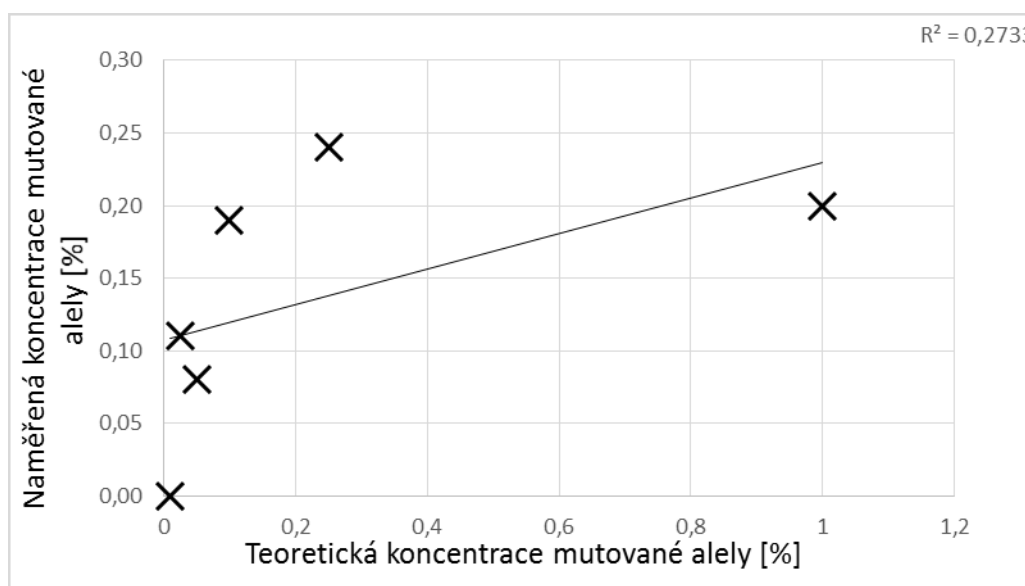
Následující Obr. 8.26 a Obr. 8.27 zobrazují kalibrační křivku mutantní frakce sestavenou jako hodnoty naměřené frakce pro jednotlivé připravené vzorky. V případě referenční sady (Obr. 8.26) je kalibrační křivka lineární s hodnotou regresního koeficientu 99,38 %. Pro testovací sadu měření (Obr. 8.27) je linearita relativně horší, především v důsledku výše zmíněných odchylek pro vzorky s 1 % resp. 0,25 % mutantní frakcí. Jak již bylo zmíněno, jedná se pravděpodobně o chyby pipetování, případně chyby související s poškozením mikrokapek. Jistý vliv může mít i několik dalších faktorů, jako například stav použitých chemikálií, především stáří emulzního oleje, které má zásadní vliv na stabilitu kapek.



**Obr. 8.26** Graf zachycující závislost naměřené koncentrace mutované alely na teoretické koncentraci mutované alely pro referenční měření.

**Tab. 8.10** Koncentrace mutované alely a relativní směrodatná odchylka pro referenční měření.

Vzorek	Teoretická koncentrace mutované alely [%]	Naměřená koncentrace mutované alely [%]	Odchylka [%]
1%MUT	1	1,87	30,31
0,25%MUT	0,25	0,37	19,35
0,1%MUT	0,1	0,21	35,48
0,05%MUT	0,05	0,17	54,55
0,025%MUT	0,025	0,05	36,71
0,01%MUT	0,01	0,01	0,00



**Obr. 8.27** Graf zachycující závislost naměřené koncentrace mutované alely na teoretické koncentraci mutované alely pro testovací měření.

**Tab. 8.11** Koncentrace mutované alely a relativní směrodatná odchylka pro testovací měření.

<b>Vzorek</b>	<b>Teoretická koncentrace mutované alely [%]</b>	<b>Naměřená koncentrace mutované alely [%]</b>	<b>Odchylka [%]</b>
1%MUT	1	0,20	66,67
0,25%MUT	0,25	0,24	2,04
0,1%MUT	0,1	0,19	31,03
0,05%MUT	0,05	0,08	23,08
0,025%MUT	0,025	0,11	62,96
0,01%MUT	0,01	0,00	100,00

#### **8.4. Shrnutí**

Výsledek praktické části práce lze shrnout do několika hlavních bodů:

1. Podařilo se provést experimenty zaměřené na stanovení přítomnosti nízké frakce mutace na modelovém systému somatické bodové mutace genu INSR
2. Pro celkem 8 testovacích vzorků byl úspěšně proveden postup přípravy emulze, provedení PCR amplifikační reakce a následný odečet pozitivit jednotlivých emulzních mikrokapek
3. Způsob přípravy a následná manipulace s připravenou emulzí je stěžejním krokem celého postupu, který může zásadním způsobem ovlivnit úspěšnost i účinnost celé metody.
4. V uvedeném případě došlo v důsledku nedostatečných zkušeností u dvou vzorků v testovací sadě měření k odchýlkám oproti referenčním měřením prováděným za asistence zkušeného laboratorního technika. Tyto odchylky lze vysvětlit především chybami v pipetování a neopatrné manipulaci s emulzí.
5. Lze předpokládat, že opakované provádění této metodiky bude mít za následek zlepšení zručnosti a tím i zvýšení kvality získaných výsledků.

## 9. Závěr

Především v důsledku časně komercializace a dostupnosti hned několika konkurenčních platforem na trhu si digitální polymerázová řetězová reakce od doby svého uvedení našla uplatnění v řadě zásadních aplikací v genetice, molekulární biologii, medicíně a dalších příbuzných disciplínách a to jak ve výzkumných projektech, tak dnes již i v běžné rutinní praxi. Z hlediska uživatele se jedná o poměrně jednoduchou, rychlou a velmi citlivou metodu. Výše uvedené bylo detailně popsáno v teoretické části této práce.

I přes všechny nesporné výhody, má samozřejmě dPCR analýza celou řadu jistých metodických úskalí, jejichž zvládnutí je klíčové pro dosažení přesných výsledků. Jak bylo demonstrováno v experimentální části práce, je v případě emulzního formátu dPCR jedním z takových šetrná manipulace s emulzí. Pouze tak lze udržet maximální dostatečný počet mikrokapeček pro následné spolehlivé výsledky analýzy.

## Seznam použité literatury

- [1] M. Hoff, DNA Amplification and Detection Made Simple (Relatively), PLoS Biol. 4 (2006).
- [2] P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson, D.H. Gelfand, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (1991) 7276–7280.
- [3] J.D. Watson, F.H. Crick, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid, Nature. 171 (1953) 737–738.
- [4] N. Kresge, R.D. Simoni, R.L. Hill, Arthur Kornberg's Discovery of DNA Polymerase I, J. Biol. Chem. 280 (2005) e46–e46.
- [5] T.D. Brock, H. Freeze, *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile, J. Bacteriol. 98 (1969) 289–297.
- [6] H. Klenow, I. Henningsen, Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 65 (1970) 168–175.
- [7] K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, H.G. Khorana, Studies on polynucleotides, J. Mol. Biol. 56 (1971) 341–361.
- [8] A. Panet, H.G. Khorana, Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication, J. Biol. Chem. 249 (1974) 5213–5221.
- [9] M. Hlobilová, Využití metod molekulární biologie při zkoumání kvality potravin, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, bakalářská práce.
- [10] K.B. Mullis, The unusual origin of the polymerase chain reaction, Sci. Am. 262 (1990) 56–61, 64–65.
- [11] <http://rachenmay.angelfire.com/mullis.html> (5. března 2017).
- [12] L. Dvořáková, Využití metod PCR ve forenzní genetické analýze, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Katedra antropologie a genetiky člověka, bakalářská práce.
- [13] R. Hrstka, T. Kolářová, E. Michalová, B. Vojtěšek, Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi, Klin Onkol. 2014, 69–74.
- [14] P.J. Sykes, S.H. Neoh, M.J. Brisco, E. Hughes, J. Condon, A.A. Morley, Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution, BioTechniques. 13 (1992) 444–449.
- [15] O. Kalinina, I. Lebedeva, J. Brown, J. Silver, Nanoliter scale PCR with TaqMan detection., Nucleic Acids Res. 25 (1997) 1999–2004.
- [16] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Digital PCR, Proc. Natl. Acad. Sci. 96 (1999) 9236–9241.
- [17] D. Dressman, H. Yan, G. Traverso, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 8817–8822.
- [18] M. Baker, Digital PCR hits its stride, Nat. Methods. 9 (2012) 541–544.
- [19] S. Rozsypal, Úvod do molekulární biologie, díl první, Brno (2006).
- [20] E.M. Golenberg, A. Bickel, P. Weihs, Effect of highly fragmented DNA on PCR., Nucleic Acids Res. 24 (1996) 5026–5033.
- [21] T. Sovová, J. Ovesná, Inhibice PCR a její detekce, Bioprospect Bull. Biotechnol. Spol. V Čes. Republice Slov. Republice. 24 (2014) 95–98.

- [22] T.C. Lorenz, Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies, *J. Vis. Exp. JoVE.* (2012) e3998.
- [23] M.A. Valasek, J.J. Repa, The power of real-time PCR, *Adv. Physiol. Educ.* 29 (2005) 151–159.
- [24] <https://www.thinglink.com/scene/764167700015480833> (8. dubna 2017).
- [25] M. Beránek, *Molekulární genetika pro bioanalytiky*, Karolinum 2016.
- [26] F. Ponchel, C. Toomes, K. Bransfield, F.T. Leong, S.H. Douglas, S.L. Field, S.M. Bell, V. Combaret, A. Puisieux, A.J. Mighell, P.A. Robinson, C.F. Inglehearn, J.D. Isaacs, A.F. Markham, Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions, *BMC Biotechnol.* 3 (2003) 1–13.
- [27] M. Dvořáková, *Základní principy a využití kvantitativní PCR s ohledem na onkologickou diagnostiku*, Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, bakalářská práce.
- [28] E. Matoulková, B. Vojtěšek, Detection of Protein-protein Interactions by FRET and BRET Methods, *Klin. Onkol.* 27 (2014) S82–S86.
- [29] <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/31405/title/Prime-Time-for-Digital-PCR/> (4. července 2016).
- [30] <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/digital-pcr.html> (14. dubna 2017).
- [31] J.F. Huggett, C.A. Foy, V. Benes, K. Emslie, J.A. Garson, R. Haynes, J. Hellemans, M. Kubista, R.D. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, S.A. Bustin, The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments, *Clin. Chem.* 59 (2013) 892–902.
- [32] S.O. Sundberg, C.T. Wittwer, C. Gao, B.K. Gale, Spinning disk platform for microfluidic digital polymerase chain reaction, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1546–1550.
- [33] G.S. Brunetto, R. Massoud, E.C. Leibovitch, B. Caruso, K. Johnson, J. Ohayon, K. Fenton, I. Cortese, S. Jacobson, Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patients and identification of viral mutations, *J. Neurovirol.* 20 (2014) 341–351.
- [34] B.J. Hindson, K.D. Ness, D.A. Masquelier, P. Belgrader, N.J. Heredia, A.J. Makarewicz, I.J. Bright, M.Y. Lucero, A.L. Hiddessen, T.C. Legler, T.K. Kitano, M.R. Hodel, J.F. Petersen, P.W. Wyatt, E.R. Steenblock, P.H. Shah, L.J. Bousse, C.B. Troup, J.C. Mellen, D.K. Wittmann, N.G. Erndt, T.H. Cauley, R.T. Koehler, A.P. So, S. Dube, K.A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D.P. Stumbo, S.P. Hodges, S. Romine, F.P. Milanovich, H.E. White, J.F. Regan, G.A. Karlin-Neumann, C.M. Hindson, S. Saxonov, B.W. Colston, High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8604–8610.
- [35] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4471134> (10. dubna 2017).
- [36] <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/quantstudio-qpcr-product-portfolio.html> (10. dubna 2017).
- [37] <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/154784-Count-Your-Nucleic-Acids-with-These-Digital-PCR-Systems/> (13. dubna 2017).

- [38] C. Zhang, D. Xing, Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 4223–4237.
- [39] E.A. Ottesen, J.W. Hong, S.R. Quake, J.R. Leadbetter, Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria, *Science.* 314 (2006) 1464–1467.
- [40] M. Baker, Clever PCR: more genotyping, smaller volumes, *Nat. Methods.* 7 (2010) 351–356.
- [41] L.B. Pinheiro, V.A. Coleman, C.M. Hindson, J. Herrmann, B.J. Hindson, S. Bhat, K.R. Emslie, Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1003–1011.
- [42] K.A. Heyries, C. Tropini, M. VanInsberghe, C. Doolin, O.I. Petriv, A. Singhal, K. Leung, C.B. Hughesman, C.L. Hansen, Megapixel digital PCR, *Nat. Methods.* 8 (2011) 649–651.
- [43] I. Hudecova, Digital PCR analysis of circulating nucleic acids, *Clin. Biochem.* 48 (2015) 948–956.
- [44] A.S. Whale, S. Cowen, C.A. Foy, J.F. Huggett, Methods for Applying Accurate Digital PCR Analysis on Low Copy DNA Samples, *PLOS ONE.* 8 (2013) e58177.
- [45] K.L. Swango, W.R. Hudlow, M.D. Timken, M.R. Buoncristiani, Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 35–45.
- [46] K.M. Horsman, J.M. Bienvenue, K.R. Blasier, J.P. Landers, Forensic DNA analysis on microfluidic devices: a review, *J. Forensic Sci.* 52 (2007) 784–799.
- [47] G. Pohl, I.-M. Shih, Principle and applications of digital PCR, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4 (2004) 41–47.
- [48] B. Otová, R. Mihalová, *Základy biologie a genetiky člověka*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2012.
- [49] H.C. Fan, S.R. Quake, Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7576–7579.
- [50] E. Ondroušková, R. Hrstka, Circulating Tumor DNA in Blood and Its Utilization as a Potential Biomarker for Cancer, *Klin. Onkol.* 28 (2015) 2S69-2S74.
- [51] L. Benešová, B. Belšánová, T. Hálková, V. Melniková, M. Levý, L. Lipská, M. Pešek, O. Fiala, J. Pudil, P. Mináriková, M. Zavoral, M. Ryska, M. Minárik, M.G. Erlander, Naše zkušenosti s tekutou biopsií s využitím vzorků plazmy a moči onkologických pacientů, *Sborník Abstrakt XXXIX Brněnsých Onkol. Dnů XXXIX Konf. Nelékařské Zdr. Pr. Klin Onkol 2015.* 28 (Suppl 1): S149.
- [52] [https://www.genomac.cz/cz/storage/3-4\\_2015\\_PragueONCO.pdf](https://www.genomac.cz/cz/storage/3-4_2015_PragueONCO.pdf) (18. listopadu 2016).
- [53] C. Bettegowda, M. Sausen, R.J. Leary, I. Kinde, Y. Wang, N. Agrawal, B.R. Bartlett, H. Wang, B. Lubber, R.M. Alani, E.S. Antonarakis, N.S. Azad, A. Bardelli, H. Brem, J.L. Cameron, C.C. Lee, L.A. Fecher, G.L. Gallia, P. Gibbs, D. Le, R.L. Giuntoli, M. Goggins, M.D. Hogarty, M. Holdhoff, S.-M. Hong, Y. Jiao, H.H. Juhl, J.J. Kim, G. Siravegna, D.A. Laheru, C. Lauricella, M. Lim, E.J. Lipson, S.K.N. Marie, G.J. Netto, K.S. Oliner, A. Olivi, L. Olsson, G.J. Riggins, A. Sartore-Bianchi, K. Schmidt, I.-M. Shih, S.M. Oba-Shinjo, S. Siena, D. Theodorescu, J. Tie, T.T. Harkins, S. Veronese, T.-L. Wang, J.D. Weingart, C.L. Wolfgang, L.D. Wood, D. Xing, R.H. Hruban, J. Wu, P.J. Allen, C.M. Schmidt, M.A. Choti, V.E. Velculescu, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, N. Papadopoulos, L.A. Diaz, Detection of Circulating

Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 224ra24.

[54] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3643> (30. dubna 2017).

[55] <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=INSR#mut>s (30. dubna 2017).