

Posudek na diplomovou práci Bc. Ivany Koljenšic

**USING THE QUANTITATIVE DNA METHOD AS A SCREENING TOOL FOR EFFICIENT  
GENOTYPING OF SAMPLES IN FORENSIC DNA LABORATORY**

Katedra antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze  
Vedoucí práce: Mgr. Vlastimil Stenzl

Předkládaná práce, jež byla vypracována ve forenzní DNA laboratoři Kriminologického ústavu Praha, se zabývá možnostmi kvantifikace DNA před STR genotypizací. Vzhledem k citlivosti analýzy STR profilů ke vstupnímu množství DNA templátu je přesná kvantifikace vstupního materiálu pro úspěšnou STR analýzu klíčová.

Práce o rozsahu 79 stran je členěna do 7 hlavních kapitol a doplněna o *Shrnutí*, seznam prezentovaných obrázků (14), tabulek (14) a o výčet v textu použitých zkratk. Celá práce je napsána poměrně čtivě v anglickém jazyce s minimem překlepů.

Autorka začíná svou práci poněkud netradičně kapitolou *Cíle práce*, které jsou tři:

- Otestovat přesnost a opakovatelnost (accuracy and reproducibility) různých komerčních real-time PCR kvantifikačních kitů, přístrojů a přístupů se zaměřením na užití pro nízké kvantitativní množství DNA
- Ověřit, zda je na základě předchozích nálezů (pozn. oponenta: jakých???) možné zavést takovou (pozn. oponenta: jakou???) absolutní kvantitativní hodnotu pro používání ve forenzní DNA laboratoři
- Provést experimenty, kdy budou pomocí standardní DNA vytvořeny ředící řady, které pomohou zodpovědět otázky vztahu vstupního množství DNA a počtu alel úspěšně detekovaných různými PCR kity

U posledního cíle autorka vysvětluje význam absolutní kvantitativní hodnoty (tzv. cut off), čemuž by se vyhnula, kdyby použila standardní řazení kapitol a jako první kapitolu zařadila *Úvod*, nikoliv *Cíle*. Formulace jednotlivých cílů vůbec působí tak, jako by původně byla tato kapitola zařazena ZA *Úvod* a až později předsunuta.

Druhou kapitolu představuje *Úvod*, kde autorka na 19 stranách shrnuje problematiku kvantifikace DNA: popisuje metody kvantifikace se zaměřením na real-time PCR. Této metodě a zejména absolutní kvantifikaci je vyčleněn největší prostor; autorka diskutuje možnosti tvorby kalibračních křivek, zabývá se real-time PCR chemií a jejími principy. Zde poněkud nelogicky míchá výčet a popis základních typů detekční chemie jako jsou SYBR Green, PicoGreen, TaqMan sondy spolu s kompletními kity ~ systémy již komerčně sestavenými a určenými pro kvantifikaci DNA (např. AluQuant Human DNA Quantitation

System, Promega Corp.). Následná podkapitola „Real-time PCR platformy a kity“ je z části proto opakováním již jednou uvedeného.

Další kapitola „*Experimentální postupy*“ odpovídá svou náplní klasické kapitole „Materiál a metody“. Zde se můžeme seznámit se zásadami práce při zpracování biologického materiálu ve forenzní DNA laboratoři, s přístroji použitými v této práci, chemikáliemi a metodami izolace DNA. Následuje popis dvou postupů kvantifikace DNA, STR genotypizace za pomoci 4 genotypizačních kitů různých výrobců a finální vizualizace STR analýzy pomocí kapilární elektroforézy s popisem vzniku možných artefaktů v průběhu PCR amplifikace STR lokusů. Doporučila bych do budoucna vyvarovat se laboratorního slangu či nepřesných označení a místo toho používat již zavedenou terminologii (např. místo „košíček“, příp. „box“ použít „sběrná zkumavka“; místo „96-dírová destička“ raději „96-jamková destička“ atd.).

Vlastní výsledky jsou prezentovány na 23 stranách. Autorka adekvátním způsobem prezentuje získaná data, pro snazší orientaci používá tabulky a obrázky.

V první části se autorka zabývá optimalizací standardní křivky. Připravila ředící řadu DNA standardu o 8 koncentracích a pomocí kitu Quantifiler provedla 16 nezávislých měření na přístroji ABI PRISM 7900 HT a 4 měření na konkurenčním přístroji LightCycler 480. Zde mám tyto otázky:

1. Proč pouze 4 měření na přístroji LightCycler 480?
2. Proč se liší průměrné hodnoty Ct v tabulkách 4.1 a 4.2 (Ct ABI), když by v obou případech měly reprezentovat Ct měřené na stejném přístroji?

Dle hodnot uvedených v tabulce 4.3 autorka konstatuje, že při měření na obou testovaných přístrojích byly pozorovány jen „velmi malé rozdíly“. Data získaná na obou přístrojích (průměrné Ct hodnoty) však statisticky uchopena nebyla a dokonce, při použití párového Studentova t-testu zjistíme na hladině významnosti 0,05 statisticky významný rozdíl ( $P = 0,018$ ). Autorka též porovnávala hodnoty naměřené na ABI PRISM 7900 HT s hodnotami garantovanými výrobcem kitu Quantifiler a zjistila „velké rozdíly u Ct hodnot i hodnot směrodatných odchylek“ (opět ne statisticky podloženo). Uvedené rozdíly vysvětluje způsobem pipetování a použitím odlišných přístrojů.

Dále, autorka pro výpočet absolutních hodnot koncentrací DNA u dvou reálných vzorků DNA použila a porovnávala výsledky ze 3 druhů kalibračních křivek: 1) původní, 2) zprůměrovanou z více reakcí (tzv. směsná, pooled), 3) z jiné reakce s velmi odlišným Ct. Po porovnání dále používá tzv. směsnou kalibrační křivku.

Autorka uzavírá, že na základě získaných dat nelze udělat jednoznačné závěry ohledně prediktability kvantifikačních výsledků dosažených pomocí kitu Quantifiler pro nastavení cut off hodnoty.

Druhá část kapitoly *Výsledky* se zabývá vztahem mezi množstvím DNA templátu v reakci a kvalitou DNA profilu získaného po amplifikaci pomocí 4 komerčních kitů. Autorka prezentuje zajímavé zjištění a určitý rozpor v používání zavedených postupů, když dokládá,

že dva ze čtyř testovaných STR genotypizačních kitů vykazují spolehlivé výsledky ještě při vstupním množství DNA 62,2 pg/ul, zatímco kit Quantifiler na stanovování koncentrací DNA neumožňuje spolehlivě změřit množství DNA 65,2 pg.

Poslední část kapitoly *Výsledky* se zabývá stanovením vlivu změn v jednotlivých bodech kalibrační křivky na absolutní koncentraci DNA.

Následuje *Diskuze*, kde autorka rozebírá nutnost a konečně velmi kvalitně vysvětluje potřebu kvantifikace DNA před STR genotypizací. Získané výsledky porovnává se zahraniční literaturou.

K formálním neduhům předkládané práce patří opakování již dříve uvedených informací. Autorka se nevyvarovala nejednotnosti v terminologii, např. RT PCR vs. RT-PCR, fluoro metric vs. fluorometric atd. Dále, obrázky by měly být doprovázeny vysvětlivkami tak, aby čtenář nemusel listovat v textu v naději, že nějaké vysvětlení k obrázkům najde. Největší formální nedostatek představuje způsob citování literárních pramenů na konci práce v seznamu literatury. Kromě již tradiční chyby, jakou je nejednotnost citační formy, je nutno zmínit nepřesnost či neúplnost některých citací, která znemožňuje jejich zpětné vyhledání nebo jej v lepším případě velmi ztíží, a v několika případech nekompatibilitu odkazu v textu a v seznamu literatury (např. odlišné roky publikace). Autorka při vypracování závěrečného seznamu literatury používala abecedu jen jako přibližné vodítko, proč?

K práci mám další otázky:

1. Proč je při rozdělení vzorků na kategorie podle Ct hodnot hodnota 37 součástí dvou kategorií (str. 51)?
2. Vyvodí KÚ Praha na základě výsledků předkládané práce nějaké konkrétní závěry ve smyslu změny standardních postupů (SOP) a jaké?

S odhlédnutím od nezanedbatelných nedostatků ve způsobu citování použitých zdrojů, které by měla autorka opravit, se domnívám, že práce přes všechny další výtky splnila základní požadavky na diplomovou práci a proto ji doporučuji podmíněně k obhajobě a navrhuji hodnotit stupněm dobře.

V Praze dne 31. 5. 2011

RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.