

Posudek na diplomovou práci Bc. Evy Herzogové

## **KVANTIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN POMOCÍ TAQMAN® SOND – MOŽNOSTI A LIMITY S OHLEDEM NA ZPŮSOB ODBĚRU, STÁŘÍ A KVALITU VZORKU LIDSKÝCH TKÁNÍ**

Katedra antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze  
Školitel: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.

Kvantitativní real-time PCR (QPCR) je metoda umožňující vysoce senzitivní a vysoce specifickou detekci a kvantifikaci nukleových kyselin (NK) ve vzorku. Přednosti a potenciál této metody jsou však zároveň jejími limity. Při správném = optimálním provedení lze pomocí QPCR kvantitativně odlišit rozdíl odpovídající jedné buňce. Je zajímavé sledovat chronologický vývoj pokynů a návodů, jak technicky pracovat a jak data analyzovat – co bylo považováno za správný postup pře 5 či 10 lety je dnes zcela nevyhovující, neboť se poznání o detailních principech fungování této metody rozšířilo a jsou známa úskalí, problémy a chyby, které postupy akceptovatelné dříve doprovázejí či přímo generují. Diplomová práce Evy Herzogové si klade za cíl blíže konkretizovat některé faktory, jež přispívají ke generování falešných výsledků a vedou k chybným závěrům. Bezchybná kvantifikace nukleových kyselin začíná okamžikem odběru biologického materiálu, pokračuje zpracováním vzorku, izolací DNA či RNA, jejich skladováním, u RNA se přidává reverzní transkripce, a teprve poté se dostává ke slovu samotná QPCR a vše, co souvisí přímo s ní: vhodný výběr primerů a sond, příprava reakce, teplotní cyklus, výběr vhodné endogenní kontroly/kontrol a práce s nimi, generování hrubých dat, jejich úprava, a po aplikaci patřičných vzorců získání hodnoty relativního množství dané NK.

Konkrétními cíli Bc. Evy Herzogové pak bylo:

- otestovat vliv antikoagulačních činidel (EDTA, heparin, citrát sodný, CPDA) na expresi vybraných genů imunologického spektra, degradaci jejich RNA
- ověřit vliv doby od odběru do zpracování vzorku na kvantitu a kvalitu mRNA
- otestovat vhodnost vybraných, komerčně dodávaných master mixů pro použití na přístroji LC 480

Eva pracovala samostatně, většinu problémů v průběhu řešení dokázala sama identifikovat a podílela se aktivně na jejich odstranění, často konzultovala. Práce byla i jakousi výzvou ve smyslu toho, jak aplikovat intraobservační chybu měření na získaná data, což se ukázalo být oříškem, který zřejmě širokou „real-time“ veřejnost vůbec netrápí – zde bych vyzdvihla snahu autorky zapojit se do hledání způsobu, jak jej rozlousknout. Jako jedinou drobnou vadu na kráse předkládané DP bych viděla fakt, že se nepodařilo nasbírat data od většího počtu jedinců, což vzhledem k evidentní interindividuální variabilitě v expresi některých genů mohlo přispět k tomu, že data neodhalila nějaký významnější profil v expresi daných genů.

Cíle stanovené v diplomové práci byly splněny. Část získaných dat bude rozšířena a stane se základem pro publikaci v mezinárodním impaktovém časopise.

Předkládaná diplomová práce splňuje veškeré požadavky na diplomové práce kladené, práci proto doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení výborně.

V Praze dne 3. 9. 2014

RNDr. Pavlína Čejková