

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Název diplomové práce: Modifikace metody real-time PCR a její využití k detekci mikroorganismů rodu *Bacillus*.

Autor diplomové práce: Lenka Hubálková

Oponentský posudek vypracoval: Mgr. Lukáš Červený, Ph.D.

Diplomová práce Lenky Hubálkové s názvem „Modifikace metody real-time PCR a její využití k detekci mikroorganismů rodu *Bacillus*“ je vypracována v českém jazyce na 114 stranách a obsahuje 18 tabulek, 42 obrázků a 5 příloh. Při vypracování úvodu a diskuse výsledků použila obdivuhodných 101 vědeckých prací zahraničních autorů. Po formální stránce je diplomová práce vypracována velice pečlivě, navíc přehledně, jasně a stručně. Grafika obrázků jde ruku v ruce s vysokým standardem textu a oceňuji i jejich tisk na kvalitnější papír. Pokud jde o obsahovou stránku diplomantka si vytyčila jako cíl práce vývoj alternativního systému PCR v reálném čase založeném na modifikaci PCR primerů na jejich 5'- konci cytosinem s připojeným fluoroforem a jeho otestování při detekci bakterií rodu *Bacillus*. Princip metody tkví ve schopnosti guaninu zhášet v průběhu amplifikace (po hybridizaci guaninu k cytosinu) fluorescenci emitovanou fluoroforem. V tomto bodě oceňuji snahu diplomantky najít nový v praxi aplikovatelný „nástroj“ pro detekci amplifikace DNA vzorku v reálném čase. Tuto snahu podtrhuje i to, že diplomantka sama vytvořila i software pro analýzu fluorescence vzorku v průběhu reakce, který kromě znalosti metodiky real-time PCR vyžadoval i aplikaci matematického a statistického aparátu (v kontextu s tématem práce to považuji za nadstandard). Důvodem byla neschopnost používaného softwaru dodávaného k přístroji LightCycler 1.5 firmy Roche analyzovat v čase se snižující fluorescenci vzorku, což je důsledkem samotného principu metody.

Výsledkem všeho snažení bylo vytvoření systému detekce fluorescence v průběhu reakce. Tento systém byl testován na citlivost, specifitu, opakovatelnost a navíc porovnán s real-time PCR provedenou za užití v dnešní době běžnějšího interkalačního barviva SYBR Green I. Diplomovou práci jako celek hodnotím velice pozitivně, kromě nápadu za ní stojí i velké množství práce a samozřejmě nemohu opomenout i to, že uvedené výsledky budou pravděpodobně prezentovány i jako výstup řešení grantů POV MO a GAČR.

Samozřejmě mám ale i několik výhrad a otázek:

Již na str. 10 diplomantka uvádí, že prezentuje nový nápad. Byl bych trochu zdrženlivější a mluvil bych o modifikaci publikované metody (např. Kurata et al.,

2001). Na str. 23 je uvedeno, že multiplexní reakce se SYBR Green I není možná (to není úplně pravda existují modifikace, které to umožňují Germer S. a Higuchi R., 1999). Dále chápu, že vzhledem k použitému zdroji peněz šlo primárně o vývoj identifikačního (spíše než v diplomové práci uváděného detekčního) systému pro *B.anthraxis*, takže kapitola věnovaná jemu a *Bacillus cereus* „group“ v tomto rozsahu byla celkem nutná. Nicméně nechápu, proč v úvodu nepadla ani zmínka o modelovém organismu *B.subtilis*, který jste posléze používali k optimalizaci (jde mi např. o porovnání genomů). Pak mám mírnou výhradu k výrazu „protějškem“ použitým ve větě na str. 41 „... s použitím takto modifikovaného primeru spolu s modifikovaným protějškem...“ Dalo by se zde s klidným srdcem držet zavedené angl. terminologie forward a reverse primer. V obr. 34 bych uvítal pozitivní kontrolu (tento obrázek vypadá jen jako nepovedená PCR).

Otázky:

- 1) Proč jste k optimalizaci používali *B.subtilis*? Ze skladby diplomové práce mi vyplývá, že cílem byla hlavně identifikace *B.anthraxis* a genomovou DNA izolovanou z tohoto mikroorganismu jste měli.
- 2) Má identifikace pomocí real-time PCR takový zásadní význam? V práci je uvedeno, že pomocí fenotypových znaků je identifikace poměrně přesná. A vezmu-li na vědomí, že real-time PCR je až konečným krokem identifikace (před tím musí proběhnout izolace z daného materiálu, kultivace, izolace DNA ...), nemám pocit, že by tato metoda něco ulehčovala.
- 3) Při používání 5'-fluorofor-Cyt systému jste „logicky“ kvůli fluorescenčnímu pozadí používali nižší koncentraci primerů (0,2 μ M) a v případě metody založené na detekci SYBR Green I byl koncentrace primerů v roztoku vyšší (0,5 μ M). Myslím, že závěr týkající se specifity vaší metody, založený na detekci nespecifických produktů (zjm. primer-dimer) je chybný. Díky větší koncentraci primerů může snáze docházet k jejich hybridizaci a tedy vzniku primer-dimer.
- 4) Používali jste nějakou referenční fluorescenční barvu? Nemám zkušenost s přístrojem firmy Roche, ale vím, že přístroje firem např. Applied Biosystems nebo Bio-rad vyžadují přítomnost referenční barvy, přičemž výsledná fluorescence je rozdíl detektoru a reference (ošetří se tím „kolísavý“ objem reakční směsi).
- 5) Uvedené grafy znázorňují vždy amplifikaci jednoho vzorku nebo je to průměr? V popisících obrázků by toto mělo být určitě uvedeno.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

6) U opakovatelnosti (Obr. 33) vidím tři křivky pro každou koncentraci DNA v rámci amplifikace diluční série. Ukazujete zde reprezentativní graf z několika reakcí nebo jste provedla jednu reakci v triplicátu (triplicitě)? V definici uvádíte, že opakovatelnost znamená schopnost metody podávat stále stejné výsledky při opakování pokusu v čase. Žádné časové srovnání zde nevidím.

7) Při identifikaci *B.anthraxis* pomocí primerů doporučených WHO je produktem PCR amplikony dlouhé *pagA* (599 pb), *capB* (848 pb), *sap* (641 pb). Opravdu jste v teplotním profilu nezměnili elongační čas? 72 °C po dobu 15 s mi při této délce produktu přijde málo.

Navrhuji hodnocení výborně.

V Hradci Králové 17.9.2008

Mgr. Lukáš Červený, Ph.D.

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Mgr. Lukáš Červený, Ph.D.
	Datum: 17.9.2008
Autor: Lenka Hubálková	
Název práce: Modifikace metody real-time PCR a její využití k detekci mikroorganismů rodu <i>Bacillus</i>	
Cíle práce 1) Vývoj alternativního systému PCR v reálném čase založeném na modifikaci PCR primerů na jejich 5'- konci cytosinem s připojeným fluoroforem a jeho otestování při detekci bakterií rodu <i>Bacillus</i>	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 114 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Odpovídající množství Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Diplomová práce Lenky Hubálkové s názvem „Modifikace metody real-time PCR a její využití k detekci mikroorganismů rodu <i>Bacillus</i> “ je vypracována v českém jazyce na 114 stranách a obsahuje 18 tabulek, 42 obrázků a 5 příloh. Při vypracování úvodu a diskuse výsledků použila obdivuhodných 101 vědeckých prací zahraničních autorů. Po formální stránce je diplomová práce vypracována velice pečlivě, navíc přehledně, jasně a stručně. Grafika obrázků jde ruku v ruce s vysokým standardem textu a oceňuji i jejich tisk na kvalitnější papír.	
Splnění cílů práce a celkové hodnocení: Pokud jde o obsahovou stránku diplomantka si vytyčila jako cíl práce vývoj alternativního systému PCR v reálném čase založeném na modifikaci PCR primerů na jejich 5'- konci cytosinem s připojeným fluoroforem a jeho otestování při detekci bakterií rodu <i>Bacillus</i> . Princip metody tkví ve schopnosti guaninu zhášet v průběhu amplifikace (po hybridizaci	

guaninu k cytosinu) fluorescenci emitovanou fluoroforem. V tomto bodě oceňuji snahu diplomantky najít nový v praxi aplikovatelný „nástroj“ pro detekci amplifikace DNA vzorku v reálném čase. Tuto snahu podtrhuje i to, že diplomantka sama vytvořila i software pro analýzu fluorescence vzorku v průběhu reakce, který kromě znalosti metodiky real-time PCR vyžadoval i aplikaci matematického a statistického aparátu (v kontextu s tématem práce to považuji za nadstandard). Důvodem byla neschopnost používaného softwaru dodávaného k přístroji LightCycler 1.5 firmy Roche analyzovat v čase se snižující fluorescenci vzorku, což je důsledkem samotného principu metody.

Výsledkem všeho snažení bylo vytvoření systému detekce fluorescence v průběhu reakce. Tento systém byl testován na citlivost, specifitu, opakovatelnost a navíc porovnán s real-time PCR provedenou za užití v dnešní době běžnějšího interkalačního barviva SYBR Green I. Diplomovou práci jako celek hodnotím velice pozitivně, kromě nápadu za ní stojí i velké množství práce a samozřejmě nemohu opomenout i to, že uvedené výsledky budou pravděpodobně prezentovány i jako výstup řešení grantů POV MO a GAČR.

Otázky a připomínky oponenta:

Již na str. 10 diplomantka uvádí, že prezentuje nový nápad. Byl bych trochu zdrženlivější a mluvil bych o modifikaci publikované metody (např. Kurata et al., 2001). Na str. 23 je uvedeno, že multiplexní reakce se SYBR Green I není možná (to není úplně pravda existují modifikace, které to umožňují Germer S. a Higuchi R., 1999). Dále chápu, že vzhledem k použitému zdroji peněz šlo primárně o vývoj identifikačního (spíše než v diplomové práci uváděného detekčního) systému pro *B.anthraxis*, takže kapitola věnovaná jemu a *Bacillus cereus* „group“ v tomto rozsahu byla celkem nutná. Nicméně nechápu, proč v úvodu nepadla ani zmínka o modelovém organismu *B.subtilis*, který jste posléze používali k optimalizaci (jde mi např. o porovnání genomů). Pak mám mírnou výhradu k výrazu „protějškem“ použitým ve větě na str. 41 „... s použitím takto modifikovaného primeru spolu s modifikovaným protějškem...“ Dalo by se zde s klidným srdcem držet zavedené angl. terminologie forward a reverse primer. V obr. 34 bych uvítal pozitivní kontrolu (tento obrázek vypadá jen jako nepovedená PCR).

Otázky:

1) Proč jste k optimalizaci používali *B.subtilis*? Ze skladby diplomové práce mi vyplývá, že cílem byla hlavně identifikace *B.anthraxis* a genomovou DNA izolovanou z tohoto mikroorganismu jste měli.

2) Má identifikace pomocí real-time PCR takový zásadní význam? V práci je uvedeno, že pomocí fenotypových znaků je identifikace poměrně přesná. A vezmu-li na vědomí, že real-time PCR je až konečným krokem identifikace (před tím musí proběhnout izolace z daného materiálu, kultivace, izolace DNA ...), nemám pocit, že by tato metoda něco ulehčovala.

3) Při používání 5'-fluorofor-Cyt systému jste „logicky“ kvůli fluorescenčnímu pozadí používali nižší koncentraci primerů (0,2 μ M) a v případě metody založené na detekci SYBR Green I byl koncentrace primerů v roztoku vyšší (0,5 μ M). Myslím, že závěr týkající se specifity vaší metody, založený na detekci nespecifických produktů (zjm. primer-dimer) je chybný. Díky větší koncentraci primerů může snáze docházet k jejich hybridizaci a tedy vzniku primer-dimer.

4) Používali jste nějakou referenční fluorescenční barvu? Nemám zkušenost s přístrojem firmy Roche, ale vím, že přístroje firem např. Applied Biosystems nebo Bio-rad vyžadují přítomnost referenční barvy, přičemž výsledná fluorescence je rozdíl detektoru a reference (ošetří se tím „kolísavý“ objem reakční směsi).

5) Uvedené grafy znázorňují vždy amplifikaci jednoho vzorku nebo je to průměr? V popisících obrázků by toto mělo být určitě uvedeno.

6) U opakovatelnosti (Obr. 33) vidím tři křivky pro každou koncentraci DNA v rámci

amplifikace diluční série. Ukazujete zde reprezentativní graf z několika reakcí nebo jste provedla jednu reakci v triplikátu (triplicitě)? V definici uvádíte, že opakovatelnost znamená schopnost metody podávat stále stejné výsledky při opakování pokusu v čase. Žádné časové srovnání zde nevidím.

7) Při identifikaci *B.anthraxis* pomocí primerů doporučených WHO jsou produktem PCR amplicony dlouhé *pagA* (599 pb), *capB* (848 pb), *sap* (641 pb). Opravdu jste v teplotním profilu nezměnili elongační čas? 72 °C po dobu 15 s mi při této délce produktů přijde málo.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

A yellow rectangular box redacting the signature of the reviewer.