

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.



Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie

## **Modifikace metody real-time PCR a její využití k detekci mikroorganismů rodu *Bacillus***

Modification of real-time PCR method and its  
application for detection of microorganisms of the  
genus *Bacillus*

Lenka Hubálková

Praha 2008

Vedoucí práce: RNDr. Michal Kroča, Ph.D.  
Centrum biologické ochrany AČR, Těchonín

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a pod odborným vedením RNDr. Michala Kroči, Ph.D.

V Praze 4.9.2008

Lenka Hubálková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Michalu Kročovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za umožnění práce v laboratořích CBO Těchonín, Mgr. Lence Navrátilové za poskytnutí cenných rad, Mgr. Emě Ruzové za možnost získání užitečných zkušeností z výzkumné praxe, Lucii Kolínkové za laboratorní výpomoc a Lence Polidarové, Karolině Kramarzové a Jiřímu Dvořákovi za poskytnutí psychické podpory nezbytné pro sepsání této práce.

Má práce byla hrazena z následujících zdrojů:

Projekt obranného výzkumu MO č. TUO2004002 - Dálková detekce chemických a biologických látek v atmosféře (2006-2007)

Grant GAČR reg. č. 310/07/0226 - Studium interakce B-buněk s intracelulárním patogenem *Francisella tularensis* (2008)

## Abstract

The real-time polymerase chain reaction (PCR) is one of the most widely used techniques in modern molecular biology. This method is based on fluorescent monitoring of DNA amplification by using some detection system specific for reaction product. Since its development in the 1990s many different detection formats have been developed. These include dsDNA specific dyes, which are very simple and cheap, but not sufficiently specific, and various types of sequence-specific fluorescent oligonucleotide probes or modified primers, which provide a high-level of specificity, but are relatively expensive and require careful optimization of reaction conditions. An alternative approach to monitoring of real-time PCR reactions is presented in this study. Its function is based on the observation that guanine nucleotide can quench fluorescence of some fluorescent labels. The approach makes use of an oligonucleotide primer containing a labelled cytosine nucleotide at its 5' end. When such a primer is incorporated into the product of amplification, its fluorescence is quenched by the guanine nucleotide complementary to the modified cytosine. This system of "5' labelled primers" is easy and low-cost like the dsDNA specific dyes, but it is more specific, because non-specific products of amplification are not detected. Different variants of this system were tested with primer sequences targeted to DNA of model microorganism *Bacillus subtilis*. Detection limit 10 copies of template DNA per sample and standard curve with correlation coefficient higher than 0.98 was acquired with FAM-labelled primer. The principle of the method was finally applied to development of detection assay for dangerous pathogen *Bacillus anthracis*. Melting curve analysis showed that specific product was synthesized in samples containing DNA of *Bacillus anthracis* isolates, but not in samples containing DNA of other species. This technology simplifies the amplification assay and opens new possibilities for real-time PCR quantification.

Key words: quantitative real-time PCR, modified primers, guanine quenching, detection of microorganisms, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*

Klíčová slova: kvantitativní real-time PCR, modifikované primery, guaninové zhášení, detekce mikroorganismů, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*

# Obsah

1	Úvod.....	10
2	Přehled literatury .....	11
2.1	Základní principy technologie real-time PCR.....	11
2.1.1	Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí.....	11
2.1.2	Real-time monitorování PCR.....	13
2.1.3	Absolutní kvantifikace pomocí externích standardů.....	14
2.1.4	Real-time PCR vs. konvenční PCR .....	16
2.1.5	Analýza křivky tání.....	17
2.1.6	Multiplexní real-time PCR.....	18
2.2	Možnosti monitorování průběhu real-time PCR reakce .....	19
2.2.1	Principy generování signálu .....	19
2.2.2	Dostupné varianty detekčních systémů.....	22
2.2.3	Alternativní detekční systém prezentovaný v této práci.....	29
2.3	Antrax, biologické zbraně a real-time PCR.....	33
2.3.1	Patofyziologie a toxikologie antraxu .....	33
2.3.2	Význam antraxu v historii a v současnosti.....	36
2.3.3	<i>Bacillus anthracis</i> a jeho detekce pomocí real-time PCR .....	37
3	Materiál a metody.....	41
3.1	Celkové pojetí práce .....	41
3.2	Použité bakteriální kmeny a extrakce DNA.....	43
3.2.1	Kultivované bakteriální kmeny.....	43
3.2.2	Extrakce DNA.....	43
3.2.3	DNA <i>Bacillus anthracis</i> .....	44
3.3	Design primerů .....	45
3.4	Real-time PCR amplifikace.....	48
3.5	Gelová elektroforéza.....	53
3.6	Analytický software a vyhodnocování dat .....	53
3.6.1	LightCycler software .....	54
3.6.2	„Real-time PCR Calculator“ .....	54
3.6.3	Statistické vyhodnocování dat.....	58
4	Výsledky a diskuze.....	60
4.1	Nalezení vhodných sekvencí primerů .....	60

4.2	Ověření funkčnosti systému 5' značených primerů a optimalizace reakčních podmínek .....	63
4.3	Vliv počtu cytosinových nukleotidů na 5' konci primeru.....	65
4.4	Vliv značení různými fluorofory .....	66
4.5	Analýza křivky tání.....	68
4.6	Vyhodnocení spolehlivosti metody a srovnání se SYBR Green I .....	72
4.6.1	Detekční limit, linearita a opakovatelnost .....	72
4.6.2	Specifita.....	79
4.7	Detekce <i>Bacillus anthracis</i> .....	83
4.7.1	Specifita primerů.....	83
4.7.2	Kvantifikace .....	86
4.8	Srovnání s ostatními detekčními systémy.....	88
4.9	Srovnání se studií KURATA a spol. (2001).....	91
5	Souhrn.....	92
6	Seznam literatury .....	94
	Přílohy.....	107

## Seznam zkratek

A	adenin
<i>acpA</i>	acid phosphatase gene
AČR	Armáda České republiky
<i>alr</i>	D-alanine racemase gene
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	cytosin
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
<i>cap</i>	capsule biosynthesis protein gene
<i>capA</i>	capsule biosynthesis protein gene
<i>capB</i>	capsule biosynthesis protein gene
<i>capC</i>	capsule biosynthesis protein gene
C <sub>T</sub>	threshold cycle
Cy5	cyanine dye
<i>cya</i>	edema factor gene
CFU	colony-forming unit
CV	coefficient of variation
dA	deoxyadenosin
dC	deoxycytidin
dG	deoxyguanosin
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
dsDNA	double-strand deoxyribonucleic acid
FAM	fluorescein
5-FAM	5-carboxy-fluorescein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
G	guanin
<i>groEL</i>	chaperonin groEL gene
<i>gyrA</i>	$\alpha$ -subunit of gyrase enzyme gene
<i>gyrB</i>	$\beta$ -subunit of gyrase enzyme gene
iso-dC	5'-methylisocytosin
iso-dG	isoguanin



IL 1- $\beta$	interleukin 1- $\beta$
6-JOE	2,7-dimethoxy -4,5-dichloro-6-carboxy-fluorescein
<i>lef</i>	lethal factor gene
LUX	light upon extension
MAP	mitogen activated protein
MGB	minor groove binder
NTC	no template control
Obr.	obrázek
O.D.	optická denzita
<i>pag</i>	protective antigen gene
pagA	protective antigen gene
pb	pár bází
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
<i>plcR</i>	pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene
PLET	polymyxin lysozyme-EDTA thallos acetate
R <sup>2</sup>	koeficient determinace
rRNA	ribozomální RNA
<i>rpoB</i>	$\beta$ -subunit of RNA polymerase gene
<i>sap</i>	S-layer protein gene
SD	standard deviation
SNP	single nucleotide polymorphism
ssDNA	single-strand DNA
<i>sspE</i>	small acid-soluble spore protein gene
SspE	small acid-soluble spore protein
str.	strain
T	thymin, deoxythymidin
TAE	tris-acetyl EDTA
TAMRA	6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
<i>trpA</i>	tryptophan synthase subunit alpha gene
T <sub>m</sub>	melting temperature
TO	thiazole orange

UV	ultra violet
VBA	Visual Basic for Applications
<i>vrrA</i>	VNTR region gene
VTNR	variable number tandem repeat
WHO	World Health Organization
WTC	World Trade Center
<i>yxel</i>	penicillin-V-acylase gene

# 1 Úvod

Real-time PCR je moderní metoda molekulární biologie, která umožňuje rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku nukleové kyseliny. Stala se tak proto neocenitelným nástrojem pro detekci specifických mikroorganismů a diagnostiku infekčních, geneticky podmíněných i jiných typů onemocnění. Metoda je zdokonalením známé polymerázové řetězové reakce (PCR) vyvinuté Kary Mullisem a spolupracovníky v roce 1985, která umožňuje mnohonásobnou amplifikaci jakékoliv známé sekvence DNA v komplexním vzorku nukleových kyselin a tudíž její detekci. Real-time PCR navíc používá speciálních detekčních systémů, zpravidla fluorescenčních barviv či sond, více či méně specifických pro produkt amplifikace k monitorování jejího průběhu přímo během reakce (tzv. „v reálném čase“). Výhodou tohoto postupu je možnost kvantifikace – tzn. poměrně přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové sekvence DNA.

Jak už název mé diplomové práce napovídá, zabývám se modifikací metody real-time PCR. Konkrétně se jedná o alternativní způsob monitorování průběhu amplifikace. Od roku 1992, kdy byla metoda real-time PCR zavedena Higuchim a spolupracovníky, bylo publikováno mnoho variant detekčních systémů pro produkt PCR reakce, z nichž každá skýtá své výhody i nevýhody. Ve své diplomové práci prezentuji nový nápad na real-time PCR detekční systém, který zahrnuje výhody ostatních detekčních systémů a navíc vyniká svojí jednoduchostí a nízkými náklady. Jedná se o modifikované fluorescenčně značené primery, jejichž funkce je založena na změně intenzity fluorescence po interakci s guaninovým nukleotidem. Mým cílem je zjistit, zda tento detekční systém funguje, za jakých podmínek funguje, jestli je lepší či horší ve srovnání s ostatními dostupnými metodikami a zda je aplikovatelný v praxi.

Svou diplomovou práci jsem vypracovala v mikrobiologické laboratoři Centra biologické ochrany AČR v Těchoníně a je součástí projektu obranného výzkumu s názvem „Dálková detekce mikroorganismů“ financovaného Ministerstvem obrany ČR. Vzhledem k tomu, že výzkumná činnost této laboratoře je zaměřena na ochranu proti bioterorismu, prezentovaná inovace real-time PCR byla aplikována na vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro patogen *Bacillus anthracis*.

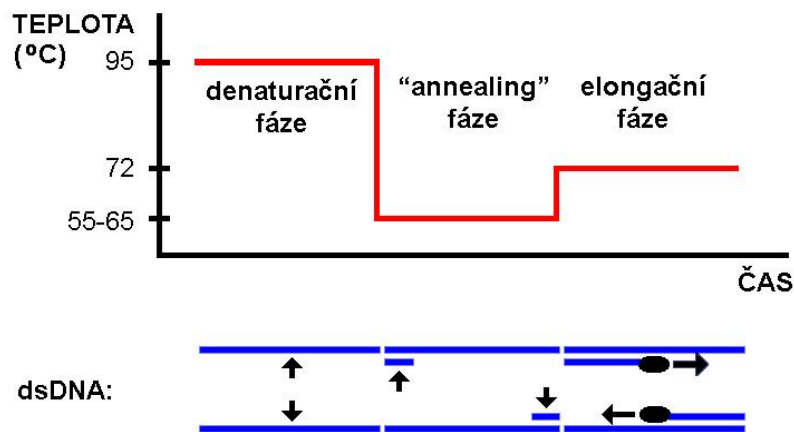
## 2 Přehled literatury

### 2.1 Základní principy technologie real-time PCR

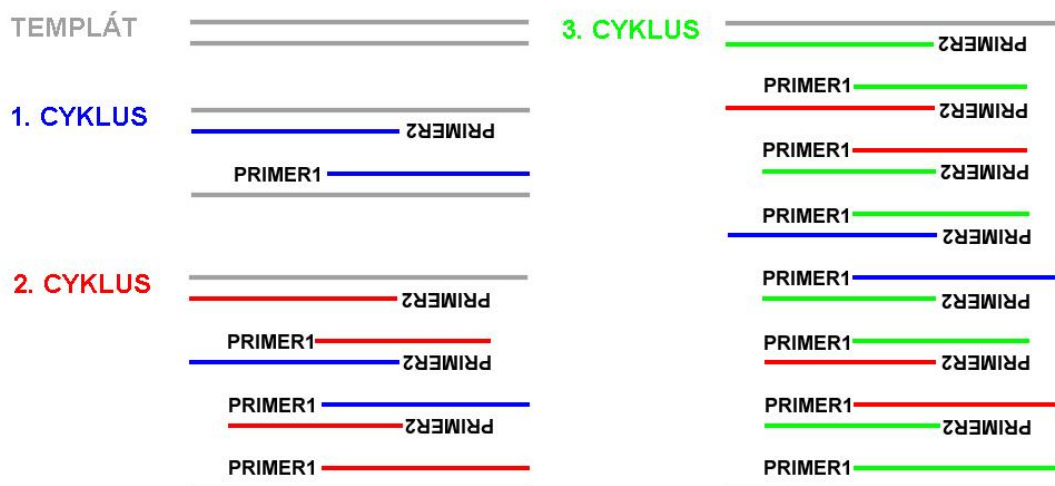
Metoda real-time PCR je zdokonalením původní polymerázové řetězové reakce (PCR). Je založena na monitorování průběhu PCR přímo během reakce (tzv. „v reálném čase“) pomocí fluorescenčních látek specifických pro produkt reakce. Výhodou tohoto postupu je možnost poměrně přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA.

#### 2.1.1 Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je sofistikovaná technologie, která umožňuje mnohonásobnou amplifikaci jakékoliv známé nukleotidové sekvence v komplexním vzorku nukleových kyselin a tudíž její detekci. Princip reakce je založen na opakované replikaci úseku DNA vymezeného specifickými primery pomocí termostabilní DNA polymerázy. V reakční směsi je obsažena templátová DNA, dva jednořetězcové oligonukleotidové primery ohraničující sekvenci, která má být amplifikována, termostabilní DNA polymeráza (obvykle *Taq* polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*), volné dNTP jednotky a pufr s  $Mg^{2+}$  ionty, které jsou kofaktorem DNA polymerázy. Reakce probíhá procesem teplotního cyklování (viz Obr. 1). Během každého cyklu je reakční směs nejprve zahřáta na vysokou teplotu (95°C), aby došlo k oddělení řetězců templátové dsDNA (denaturační fáze cyklu), která je poté snížena na hodnotu 55 – 65 °C dovolující hybridizaci primerů („annealing“ fáze) a nakonec je zvýšena na 72 °C, což je teplotní optimum pro *Taq* polymerázu, která prodlužuje primery podle komplementárního řetězce inkorporací dNTP jednotek (elongační fáze). Vytvořené dvouřetězcové molekuly (amplikony), které jsou z obou stran definovány sekvencemi použitých primerů, pak plní funkci templátu v dalším cyklu (viz Obr. 2). Mnohonásobným opakováním tohoto postupu (obvykle asi 50 cyklů) se počet amplikonů exponenciálně zvyšuje, jelikož během každého cyklu dochází k jeho zdvojnásobení. Uvedeným postupem zvaným konvenční PCR je možno nasyntetizovat a ve spojení s gelovou elektroforézou také detekovat jakýkoliv úsek DNA o alespoň částečně známé sekvenci (SAIKI *et al.* 1985, SAIKI *et al.* 1988).



**Obr 1: Teplotní průběh PCR cyklu.** Ve spodní části obrázku je schematicky znázorněno co se během cyklu děje s dvoušroubovicí DNA. Teplota je nejprve zvýšena asi na 95 °C, aby došlo k denaturaci templátové dsDNA. Poté je snížena na hodnotu umožňující hybridizaci primerů (55-65 °C). Během elongační fáze je teplota nastavena asi na 72°C což je obvyklé teplotní optimum *Taq* DNA polymerázy.



**Obr 2: Schematické znázornění průběhu PCR.** Barevné čáry symbolizují řetězec DNA nasyntetizovaný v příslušném stejnobarevně označeném cyklu. Nasyntetizované molekuly DNA (amplikony) plní funkci templátu v dalším cyklu. Během každého cyklu dochází ke zdvojnásobení počtu molekul produktu. Od 3. cyklu lze pozorovat vznik ampliconů definovaných z obou stran sekvencemi primerů.

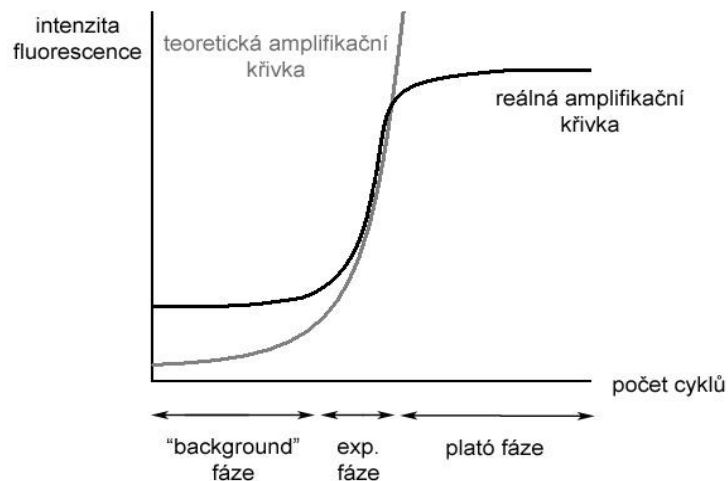
### 2.1.2 Real-time monitorování PCR

Real-time PCR se od konvenční PCR liší tím, že do reakční směsi je přidán fluorescenční detekční systém, který se více či méně specificky váže k syntetizovanému produktu, mění přítomnost intenzitu své fluorescence a podává tak zprávu o průběhu jeho amplifikace. Zpravidla se jedná o interkalační barviva, která fluoreskují po vazbě na dsDNA, fluorescenčně značené sondy, které se vážou ke specifické sekvenci uvnitř amplifikovaného regionu či různé typy modifikovaných fluorescenčně značených primerů.

V každém případě platí, že fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi. Vynesem hodnoty fluorescence proti pořadovému číslu příslušného cyklu dostaneme amplifikační křivku, z jejíhož průběhu je možné určit výchozí počet templátových molekul DNA (HIGUCHI *et al.* 1992, HIGUCHI *et al.* 1993).

Kdybychom teoreticky měli k dispozici dokonalý přístroj schopný změřit nekonečně malý fluorescenční signál a ideální podmínky reakce, při kterých by nedocházelo k její inhibici, amplifikační křivka by kopírovala tvar exponenciální funkce (viz Obr. 3). V reálu však takové podmínky neexistují, typická amplifikační křivka má proto sigmoidální tvar a lze ji rozdělit na 3 části. Během počátečních cyklů PCR se hodnota fluorescence nemění, jelikož amplifikovaného produktu je málo, signál poskytovaný detekčními systémy je slabý a nepřekračuje hodnotu pozadí systému („background“ fáze). Jak množství amplifikovaného produktu exponenciálně roste, signál v určitou chvíli překročí hodnotu fluorescenčního pozadí a křivka kopíruje tvar exponenciální funkce (exponenciální fáze). Po určité době dochází k inhibici PCR a systém se dostává do plató fáze, kdy se množství amplifikovaného produktu již nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní (HEID *et al.* 1996).

Kvantitativní informace je obsažena v exponenciální části křivky, která má obvykle rozsah pouze asi 4-8 cyklů. Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh („fluorescence threshold“) umístěný do této fáze, tím více kopií templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce (HIGUCHI *et al.* 1993, RUTLEDGE a CÔTÉ 2003).



**Obr. 3: Schematické znázornění průběhu amplifikační křivky.** Na obrázku je znázorněna také teoretická amplifikační křivka získaná v případě, že by nedocházelo k poklesu účinnosti amplifikace a neexistovala by fluorescence pozadí systému. Reální amplifikační křivka má díky těmto dvěma faktorům sigmoidální tvar (exp. fáze = exponenciální fáze).

### 2.1.3 Absolutní kvantifikace pomocí externích standardů

Kvantitativní real-time PCR je založena na matematické analýze průběhu amplifikačních křivek. Absolutní kvantifikace pomocí externích standardů je jedním z dostupných modelů a hodí se pro kvantitativní detekci mikroorganismů, jelikož přímo determinuje výchozí počet kopií cílových molekul. Využívá skutečnosti, že během exponenciální fáze PCR existuje kvantitativní vztah mezi množstvím produktu a výchozí koncentrací templátové DNA.

Základní rovnice popisující amplifikaci v exponenciální fázi PCR je:

$$N_c = N_0(1+E)^c, \quad (1)$$

kde  $N_c$  je počet amplifikovaných molekul v  $C$ -tém cyklu,  $N_0$  je výchozí počet templátových molekul a  $E$  je účinnost amplifikace („amplification efficiency“), přičemž platí, že  $0 \leq E \leq 1$ . Každý cyklus produkuje vzrůst v počtu amplifikovaných molekul ve vztahu k účinnosti amplifikace tak, že při  $E = 1$  (100 %) dochází k jeho zdvojení, a při  $E = 0$  nedochází k amplifikaci. Množství produktu ( $N_c$ ) přítomné po určitém počtu cyklů ( $C$ ) je dále závislé na  $N_0$ .

Matematická úprava rovnice (1) poskytuje vztah, na kterém je založena kvantifikace pomocí PCR:

$$N_0 = N_C / (1 + E)^C. \quad (2)$$

Ze známého množství  $N_C$  je tak možné vypočítat  $N_0$ , pokud známe účinnost amplifikace (RUTLEDGE a CÔTÉ 2003).

Absolutní kvantifikace pomocí externích standardů skýtá elegantní způsob pro stanovení  $N_0$ . Pracuje s hodnotou zvanou  $C_T$  („threshold cycle“), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí určitý fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce. Je založena na zjištění, že existuje lineární vztah mezi logaritmem výchozího počtu templátových kopií a  $C_T$  příslušné amplifikační křivky. Tento vztah lze snadno odvodit. Po stanovení fluorescenčního prahu se  $N_C$  stává konstantou a rovnici (2) lze upravit takto:

$$N_0 = N_{C_T} / (1 + E)^{C_T}, \quad (3)$$

kde  $N_{C_T}$  je počet amplikonů v prahovém cyklu  $C_T$ . Lineární vztah mezi logaritmem  $N_0$  a příslušným  $C_T$  lze získat linearizací rovnice (3):

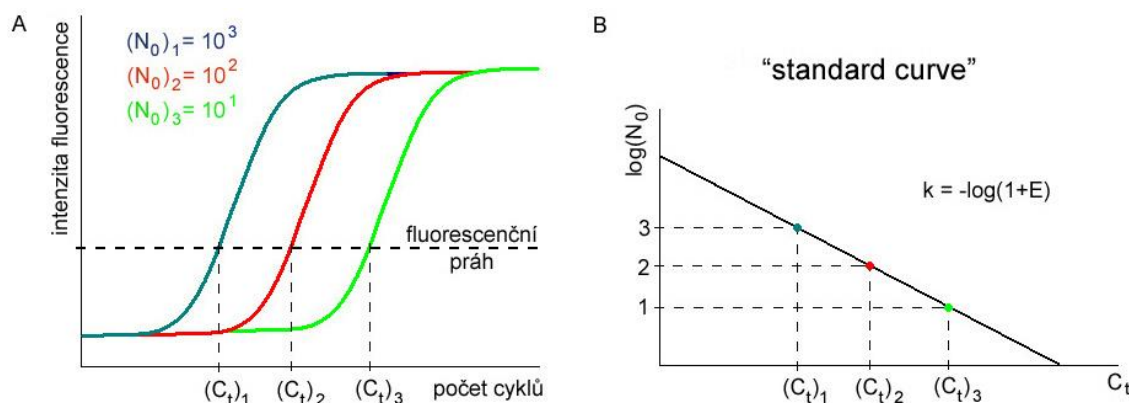
$$\log(N_0) = -C_T \log(1 + E) + \log(N_{C_T}). \quad (4)$$

Platí, že čím více kopií templátové DNA bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce, tím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, čili tím nižší vykazuje  $C_T$ . Pokud tedy amplifikujeme neznámý vzorek společně s diluční sérií standardů o známé koncentraci, můžeme s použitím lineární regresní analýzy sestavit kalibrační přímku („standard curve“), ze které lze odečíst počáteční koncentraci neznámého vzorku (viz Obr. 4). Pomocí její směrnice lze dále odhadnout účinnost amplifikace:

$$E = 10^{-k} - 1. \quad (5)$$



Ve většině aplikací se však používá pouze standardní křivka jako kalibrační křivka pro odhadnutí koncentrací neznámých vzorků (RUTLEDGE a CÔTÉ 2003).



**Obr. 4: Schematické znázornění konstrukce kalibrační přímky.** A: Amplifikační křivky fiktivní diluční série standardů s výchozími koncentracemi  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$ . B: Kalibrační přímka („standard curve“) ( $N_0$  = výchozí koncentrace;  $C_t$  = prahový cyklus).

#### 2.1.4 Real-time PCR vs. konvenční PCR

Do té doby, než byla metoda real-time PCR uvedena do praxe, používaly se k detekci a kvantifikaci specifické sekvence nukleových kyselin metody konvenční PCR – tzn. amplifikace specifického úseku jak je popsáno v kapitole 2.1.1 a detekce produktů po ukončení reakce, zpravidla prostřednictvím gelové elektroforézy. Právě detekce produktů reakce až po jejím ukončení, neboli tzv. „end-point“ analýza, je však omezením přesné kvantifikace. Teoreticky vzato by bylo možné stanovit výchozí počet kopií templátu s použitím vztahu (2), pokud bychom reakci zastavili v exponenciální fázi. Tato strategie však není příliš spolehlivá, protože i malá chyba v odhadu amplifikační účinnosti zapříčiní velké chyby ve výsledcích. Navíc je složité odhadnout, kdy je reakce ještě v exponenciální fázi, protože tato trvá pouze asi 4-8 cyklů z celkového počtu 30-50 (HEID *et al.* 1996).

Dalším důvodem proč konvenční PCR není vhodná pro kvantitativní detekci nukleových kyselin je nástup plató fáze. Bylo prokázáno, že hlavní příčinou zahájení této fáze PCR je akumulace určitého množství amplikonů, jejichž vlivem dochází k renaturaci DNA a nespecifické vazbě *Taq* polymerázy což vede k inhibici reakce. Množství molekul amplikonů přítomné v reakční směsi

po ukončení amplifikace v plató fázi je proto nezávislé na tom, kolik kopií templátové DNA bylo v reakční směsi přítomno na počátku reakce (KAINZ 2000).

### 2.1.5 Analýza křivky tání

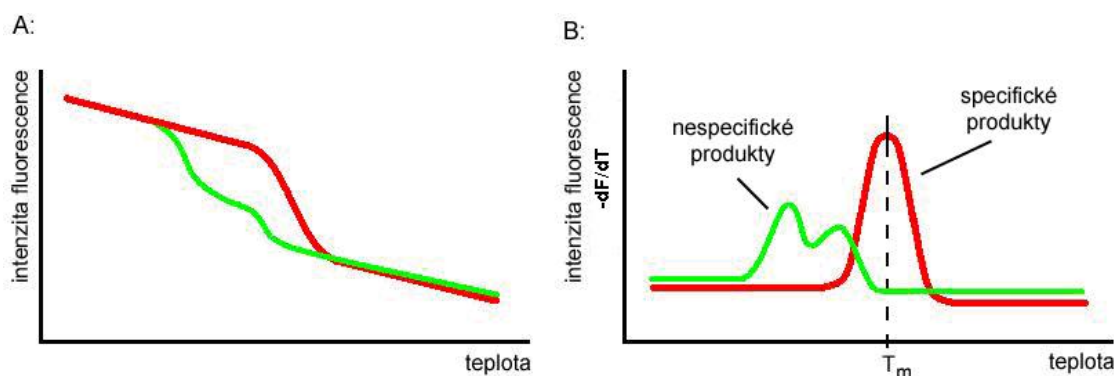
Analýza křivky tání je metoda, která se obvykle používá po ukončení real-time PCR reakce k odlišení povahy produktů PCR. Jedná se o alternativu ke gelové elektroforéze používané pro detekci produktů u konvenční PCR. Její výhodou je skutečnost, že není nutné manipulovat s produktem PCR reakce a riskovat tak kontaminaci laboratoře.

Jako tání DNA označujeme proces separace komplementárních řetězců dsDNA indukovaný zvyšováním teploty. Je způsobeno tím, že zvýšená teplota ruší vodíkové vazby mezi dusíkatými bázemi v dvoušroubovici DNA, která je následně destabilizována odpuzováním negativně nabitých fosfátových skupin. Tání DNA je kooperativní proces, kdy zhroucení jedné části molekuly rychle destabilizuje celý zbytek molekuly. Tento jev se prakticky projevuje tím, že DNA taje nejrychleji v určitém rozsahu teplot, blížících se tzv. teplotě tání  $T_m$  („melting temperature“), která je definována jako teplota, kdy přesně poloviční množství DNA ztratí svou dvouřetězcovou strukturu. Hodnota  $T_m$  je funkcí GC/AT poměru, délky a sekvence molekuly DNA, přičemž platí, že molekula bohatá na dG-dC páry taje při vyšší teplotě než molekula bohatá na dA-T páry a molekula s vyšším počtem pb taje při vyšší teplotě než molekula s nižším počtem pb (LODISH *et al.* 2004).

Tání DNA můžeme po skončení real-time PCR reakce při využití některých detekčních systémů monitorovat tak, že roztok dsDNA ochladíme na teplotu nižší než je očekávaná teplota tání produktů a postupně ohříváme na teplotu vyšší než je očekávaná  $T_m$  a měříme přitom fluorescenci. Pokud vyneseme naměřenou intenzitu fluorescence proti příslušné teplotě, dostaneme tzv. křivku tání, která náhle strmě klesá v okolí  $T_m$  (viz Obr. 5). Teplota v inflexním bodě křivky se rovná  $T_m$  a lze ji snadno zjistit zderivováním křivky tání, kde se v grafu objeví jako vrchol „peaku“ (RIRIE *et al.* 1997).

Je důležité poznamenat, že během PCR zpravidla dochází k syntéze produktu i v případě, že v reakční směsi není přítomna žádná templátová DNA, nebo je

přítomna cizorodá DNA, proti které nejsou zacílené primery. Může dojít k nescifické vazbě primerů a vzniku tzv. „primer-dimer“ artefaktů nebo amplifikaci určitých sekvencí cizorodé DNA. Takto vzniklým produktům se říká produkty nescifické a jsou charakteristické odlišnou, obvykle nižší teplotu tání než specifické produkty (viz Obr. 5) (RIRIE *et al.* 1997).



**Obr. 5: Schematické znázornění výstupu analýzy křivky tání.** A: Graf závislosti intenzity fluorescence na teplotě při jejím postupném zvyšování. Lze pozorovat nápadný pokles v oblasti  $T_m$ . B: Graf závislosti derivace intenzity fluorescence ( $-dF/dT$ ) na teplotě. Hodnota  $T_m$  odpovídá poloze vrcholu „peaku“ grafu.

Analýzu křivky tání lze využít ke dvěma účelům. Při použití dsDNA specifických interkalačních barviv a některých typů modifikovaných primerů, lze s její pomocí detekovat nescifické produkty amplifikace (RIRIE *et al.* 1997). Při použití některých typů oligonukleotidových sond lze detekovat přítomnost bodových mutací, jelikož nekomplementární sonda taje při nižší  $T_m$  než sonda plně komplementární (CAPLIN *et al.* 1999).

### 2.1.6 Multiplexní real-time PCR

Multiplexní real-time PCR se vyznačuje amplifikací více odlišných regionů současně v jedné reakční kyvetě. Každá ze simultánně běžících reakcí má svůj vlastní pár primerů a detekční fluorofor lišící se od ostatních maximem emisního spektra. Výhodou tohoto postupu je úspora času, reagensií a jistota rovnocenných reakčních podmínek pro jednotlivé amplifikace (WITTWER *et al.* 2001).

## 2.2 Možnosti monitorování průběhu real-time PCR reakce

Průběh PCR amplifikace lze monitorovat měřením intenzity fluorescence různých látek, které se více či méně specificky vážou na produkt amplifikace a mění přitom své fluorescenční vlastnosti. Používají se 3 typy takovýchto detekčních systémů - dsDNA specifická interkalační barviva, sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy a modifikované primery.

### 2.2.1 Principy generování signálu

Změna intenzity fluorescence po vazbě detekčního systému na produkt amplifikace je založena na 2 principech. Buď se jedná o přenos energie mezi dvěma fluorofory – tzv. FRET, nebo o interakce fluoroforů s nukleotidy.

#### 2.2.1.1 Přenos energie mezi fluorofory (FRET)

FRET („Fluorescence Resonance Energy Transfer“) je fotofyzikální jev, který nastává, pokud se dva fluorofory jejichž absorpční a emisní spektra se překrývají dostanou do těsné blízkosti. Energie excitovaného stavu donorového fluoroforu je přenesena prostřednictvím rezonančních dipól–dipól interakcí na akceptorový fluorofor, jehož absorpční spektrum se překrývá s emisním spektrem donorového fluoroforu. Výsledkem je pokles intenzity fluorescence donorové molekuly a vyzáření energie zachycené akceptorovou molekulou v podobě tepla (tzv. zhášení) nebo fluorescenčního záření o jiné vlnové délce (CARDULLO *et al.* 1988). Účinnost FRET je závislá na vzdálenosti fluoroforů a míře jejich spektrálního překryvu (MARRAS *et al.* 2002).

Real-time PCR detekční oligonukleotidy jsou obvykle značeny párem interaktivních fluoroforů, přičemž mohou nastat dvě situace. V prvním případě detekční systém využívá páru fluoreskujících fluoroforů a je navržen tak, že po interakci s cílovou molekulou DNA dochází k prostorovému přiblížení donorového a akceptorového fluoroforu umožňujícímu FRET a vyzáření energie akceptorové molekuly, která je měřena. V druhém případě je detekční oligonukleotid značen fluoreskujícím fluoroforem - tzv. reportérem („reporter“) a nefluoreskujícím zhášečem („quencher“), který pouze pohlcuje fluorescenci reportéru. V intaktním stavu jsou oba fluorofory drženy v těsné blízkosti a

dochází ke zhášení. Po interakci s cílovou molekulou pak dochází k jejich prostorovému oddělení a emisi fluorescence.

#### 2.2.1.2 Interakce s nukleotidy a nukleotidové zhášení

Bylo prokázáno, že samotné nukleotidy mají také určitou schopnost ovlivňovat svítivost fluorescenčních barviv. Typickým příkladem jsou interkalační barviva, která výrazně zvyšují intenzitu své fluorescence po vazbě na dsDNA (COSA *et al.* 2001). Jiným velmi důležitým efektem je změna svítivosti fluoroforu kovalentně vázaného na oligodeoxyribonukleotid v závislosti na sekvenci nukleotidů v jeho okolí, přičemž zpravidla se jedná naopak o zhášení jeho fluorescence (CARDULLO *et al.* 1988). Tento jev se nazývá nukleotidové zhášení a je podstatou funkce alternativních modifikovaných primerů prezentovaných v této práci.

Předpokládá se, že klíčovou roli v procesu nukleotidového zhášení hraje fotoindukovaný přenos elektronů mezi fluoroforem a nukleotidem. Tento předpoklad potvrzuje skutečnost, že účinnost zhášení koreluje s redoxními vlastnostmi jednotlivých nukleosidů: klesá v řadě deoxyguanosin, deoxyadenosin, deoxycytidin a deoxythymidin nepřímo úměrně s jejich stoupajícími redoxními potenciály (SEIDEL 1996). Purinové báze vykazují větší zhášecí účinnosti, než báze pyrimidinové (MARRAS *et al.* 2002)

Účinnost nukleotidového zhášení je ovlivněna sekvencí značeného oligonukleotidu, umístěním fluoroforu a jeho samotnou povahou. Nejlépe zhášejším nukleotidem je nukleotid guaninový (TORIMURA *et al.* 2001, MARRAS *et al.* 2002), který v této vlastnosti ostatní nukleotidy výrazně převyšuje. Ukázalo se, že fluorofor navázaný na 5' konci oligodeoxyribonukleotidu je zhášen po hybridizaci s komplementární sekvencí, pokud tato v jeho blízkosti obsahuje guanosin (KNEMEYER *et al.* 2000, CROCKETT a WITTWER 2001, KURATA *et al.* 2001, TORIMURA *et al.* 2001). Studie NAZARENKO a spol. (2002 b), která se podrobně zabývala efektem primární a sekundární struktury oligodeoxyribonukleotidů na fluorescenční vlastnosti navázaných barviv, prokázala, že spíše než samotný guaninový nukleotid má vysoký zhášecí efekt přítomnost dG-dC páru na tupém konci dsDNA, přičemž jakékoliv přesahy intenzitu tohoto zhášení snižují. Dále pak, že



**Tabulka 2: Zhášecí účinnosti jednotlivých nukleosidů v závislosti na povaze fluoroforu.**

A: Sekvence oligonukleotidů se kterými byla studie prováděna (F = fluorofor, N = příslušný nukleosid). B: Hodnoty účinností zhášení (%). Pozitivní hodnoty znamenají pokles fluorescence po hybridizaci, negativní hodnoty znamenají její nárůst (upraveno dle MARRAS *et al.* 2002).



**B**

Fluorofor	Excitační/emisní maximum (nm)	Adenosin	Cytidin	Guanosin	Thymidin
Alexa 350	351/441	5	-7	20	3
Pacific Blue	406/457	6	2	47	-4
Coumarin	436/475	13	14	17	15
Cy2	493/507	35	51	40	35
Alexa 488	494/517	-8	-13	-6	3
FAM	494/517	23	8	32	8
Alexa 430	430/535	18	31	46	25
TET	523/540	16	16	35	14
Alexa 532	526/551	9	3	29	3
HEX	538/554	62	56	69	65
Cy3	550/564	-47	-45	-46	-97
Alexa 546	556/570	39	35	57	34
TMR	555/577	9	11	20	11
Cy3.5	581/593	15	9	37	17
Alexa 568	577/599	4	4	-60	3
Texas red	584/603	22	11	8	11
Alexa 594	591/612	12	16	26	14
Alexa 633	629/645	18	21	30	15
Cy5	651/663	15	15	19	10
Cy5.5	675/687	15	15	17	18
Alexa 660	663/690	18	20	20	17
Alexa 680	679/702	15	16	17	17

## 2.2.2 Dostupné varianty detekčních systémů

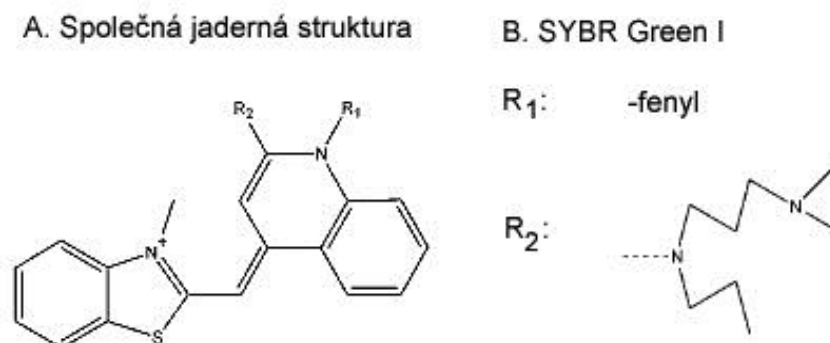
Jak již bylo zmíněno, existují 3 typy real-time PCR detekčních systémů a to interkalační barviva, značené oligonukleotidové sondy a modifikované primery.

### 2.2.2.1 Interkalační barviva

Interkalační barviva specifická pro dvouřetězcovou DNA představují nejlevnější a nejjednodušší způsob monitorování akumulace produktu během real-time PCR. Vyznačují se tím, že se specificky vážou k dsDNA (interkalací mezi štosy bází v dvoušroubovici DNA), přičemž výrazně zvyšují intenzitu své fluorescence. Vzhledem k tomu, že během PCR vzniká dvouřetězcový produkt, jehož množství zpravidla výrazně převyšuje počáteční množství dsDNA, lze pomocí interkalačních barviv poměrně spolehlivě sledovat průběh amplifikace

(HIGUCHI *et al.* 1993). Jejich předností je jednoduché, levné a všeobecně aplikovatelné použití a možnost realizovat analýzu křivky tání. Hlavní limitací je schopnost detekovat jakoukoliv dsDNA včetně nežádoucích produktů amplifikace a balastní DNA, a skutečnost, že neumožňují provádění multiplexní PCR (MORISSON *et al.* 1998).

V prvních real-time PCR experimentech se k detekci amplifikované sekvence používal ethidium bromid (HIGUCHI *et al.* 1992). Ten však interferuje s PCR a proto se dnes převážně používají asymetrická kyanidová barviva, z nichž nejpoužívanějším a nejlépe komerčně dostupným je SYBR Green I (WITTEWER *et al.* 1997). Jedná se o monomerní asymetrické kyanidové barvivo (viz Obr. 6), které se váže na dsDNA s 11-krát větší účinností než na ssDNA a zvyšuje přitom intenzitu emitovaného fluorescenčního záření asi 1000-krát. Barvivo je excitováno při 480 nm a emisní maximum má při 520 nm (blízké FAM). Váže se do malého žlábků dsDNA, což je příčinou určitých sekvenčně specifických změn v intenzitě fluorescence (u dA-T párů je intenzivnější než u dG-dC párů). (COSA *et al.* 2001).



**Obr. 6: Chemická struktura asymetrických kyanidových barviv** (upraveno podle Zipper *et al.* 2004).

#### 2.2.2.2 Značené oligonukleotidové sondy

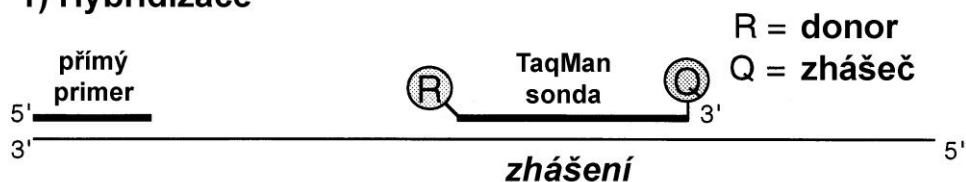
Značené oligonukleotidové sondy se vyznačují tím, že se specificky vážou k určitému úseku uvnitř amplifikované sekvence a mění přitom své fluorescenční vlastnosti prostřednictvím FRET. Jejich výhodou je značná specifita, jelikož do PCR je přidán další stupeň cílené detekce (první na úrovni primerů a druhý na úrovni hybridizace sondy) a možnost používat fluorofory s odlišnými emisními spektry k realizaci multiplexní PCR. Nevýhodou je naproti



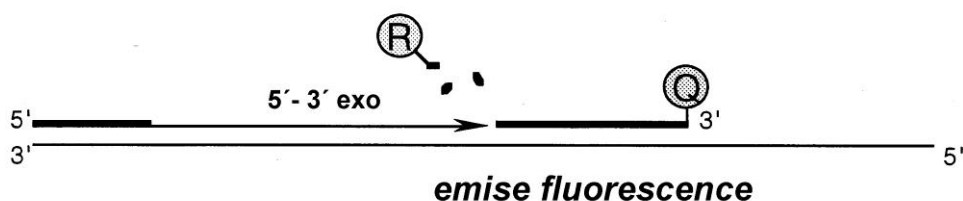
tomu finančně nákladná syntéza a nezbytnost složité optimalizace návrhu sekvencí a reakčních podmínek, jelikož princip jejich funkce je zpravidla založen na zaujmutí specifické sekundární struktury. Do reakční směsi je navíc přidán další oligonukleotid, který může interagovat s ostatními oligonukleotidy v systému, zvláště v případě multiplexní PCR (WITTEWERT *et al.* 1997). Nejpoužívanějšími typy značených oligonukleotidových sond jsou TaqMan sondy, FRET sondy a „Molecular Beacons“.

TaqMan technologie je založena na využití 5'→3' exonukleázové aktivity DNA polymerázy ke štěpení značené neprodlužovatelné hybridizační sondy (HOLLAND *et al.* 1991). Sonda je na koncích značena interaktivním párem reportér – zhášec a navržena tak, aby hybridizovala s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu (viz Obr. 7). V intaktním stavu je reportér držen v blízkosti zhášeče, který tak pohlcuje emitované fluorescenční záření. Pokud však sonda zhybridizuje s cílovou sekvencí, je během elongační fáze PCR štěpena prostřednictvím 5'→3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy, čímž dochází k prostorovému oddělení fluoroforu od zhášeče a emisi fluorescenčního záření (LEE *et al.* 1993, LIVAK *et al.* 1995). Nevýhodou TaqMan sond je jejich složitá syntéza ve smyslu značení oligonukleotidu dvojicí fluoroforů a nemožnost provádět analýzu křivky tání.

### 1) Hybridizace

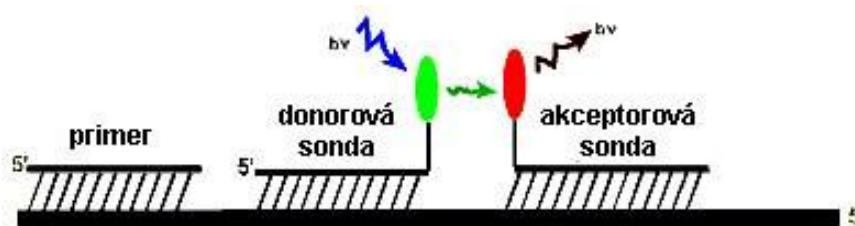


### 2) Elongace - štěpení sondy



Obr 7: Princip funkce TaqMan sond (5'-3' exo = 5'→3' exonukleázová aktivita)  
(upraveno dle LIVAK *et al.* 1995).

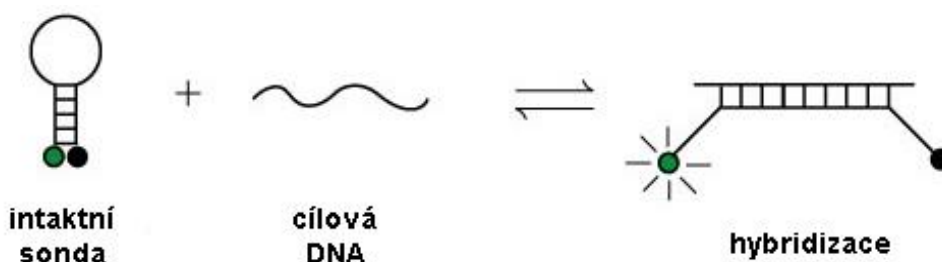
FRET sondy jsou detekční technikou vyvinutou speciálně pro přístroj LightCycler (<http://www.roche-applied-science.com>). Jejich systém se skládá ze dvou fluorescenčně značených oligonukleotidů, z nichž jeden je značen na 3' konci donorovým fluoroforem a druhý na 5' konci akceptorovým fluoroforem (viz Obr. 8). FRET sondy jsou konstruovány tak, aby hybridizovaly přilehle vedle sebe na templátovou DNA, kterou tvoří produkt PCR, a umožnily tak přenos energie mezi molekulami donor-akceptorového páru. Přístroj pak měří fluorescenční záření emitované akceptorovým fluoroforem (CAPLIN *et al.* 1999). Výhodou FRET sond je vysoká specifita detekce, protože k vyslání fluorescenčního signálu je nutná hybridizace 2 oligonukleotidů ve správné orientaci, jednodušší syntéza, protože každý oligonukleotid je značen jen jedním fluoroforem, a možnost detekce bodových mutací prostřednictvím analýzy křivky tání. Nevýhodou je složitá optimalizace a provedení metody, protože v reakční směsi je přítomno velké množství oligonukleotidů.



Obr. 8: Princip funkce FRET sond (upraveno dle CAPLIN *et al.* 1999).

„Molecular Beacons“ jsou oligonukleotidy s charakteristickou vlásenkovou strukturou, jejichž funkce je založena na změně sekundární struktury po vazbě na cílovou sekvenci (viz Obr. 9). „Smyčku“ vlásenky tvoří sekvence komplementární k určité sekvenci uvnitř amplifikovaného regionu. „Stonek“ vlásenky je formován navzájem komplementárními sekvencemi odlišnými od jakékoliv sekvence uvnitř amplifikovaného regionu. Na koncích je sonda značena reportérem a zhášedčem. V intaktním stavu je fluorescence reportéru zhášena, jelikož sonda má svou vlásenkovou strukturu a oba fluorofory jsou drženy v těsné blízkosti. Pokud však sonda zhybridizuje s cílovou sekvencí, dojde k prostorovému oddělení obou fluoroforů a inhibici zhášení (TYAGI a KRAMER 1996). Výhodou „Molecular Beacons“ je možnost detekce bodových mutací prostřednictvím analýzy křivky tání. Nevýhodou jsou vysoké nároky na

optimalizaci reakčních podmínek, jelikož sonda musí v určitých fázích PCR reakce zaujímat specifickou sekundární strukturu.

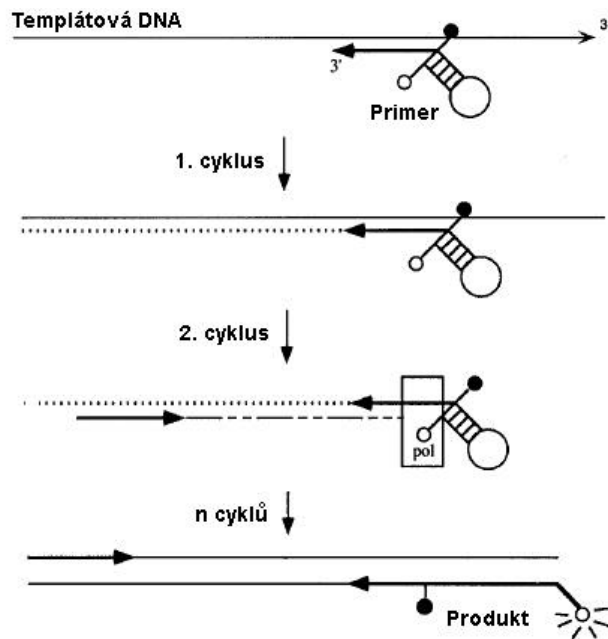


Obr. 9: Princip funkce „Molecular Beacons“ (upraveno dle TYAGI a KRAMER 1996).

### 2.2.2.3 Modifikované primery

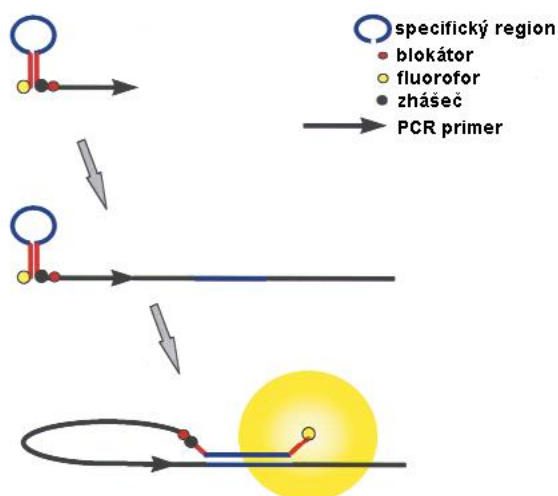
Modifikované primery jsou charakteristické tím, že mění intenzitu fluorescence v závislosti na inkorporaci do produktu PCR amplifikace. Jsou kompromisem mezi použitím interkalačních barviv a oligonukleotidových sond ve smyslu specifity detekce, jednoduchosti použití a finančních nákladů. Jsou zákonitě specifitější než interkalační barviva, jelikož nedetekují veškerou dsDNA přítomnou v reakční směsi, nýbrž jen produkt amplifikace. Nicméně jsou méně specifické než oligonukleotidové sondy, protože zacílená detekce probíhá pouze v jednom stupni, a to v kroku hybridizace primerů. Systémy modifikovaných primerů však zpravidla umožňují provádění analýzy křivky tání, čímž je do určité míry zajištěna kontrola specifity detekce. Za zmínku stojí Amplifluor primery, Škorpiónové primery a LUX primery.

NAZARENKO a spol. (1997) navrhli real-time PCR detekční metodu založenou na použití vlásenkových primerů značených interaktivním párem reportér – zhášec. Tyto tzv. Amplifluor primery jsou na svém 5' konci nastaveny vlásenkovou strukturou, která není komplementární s cílovou sekvencí DNA. K 5' konci vlásenky je navázán zhášec a na její opačný konec reportér. Pokud je takto modifikovaný primer v intaktním stavu a vlásenka je uzavřená, dochází ke zhášení. Pokud však dojde k jeho inkorporaci do produktu PCR, stává se primer v dalším cyklu templátem a jeho vlásenková struktura je otevřena prostřednictvím helikázové aktivity komplexu DNA polymerázy. Tím dochází k prostorovému oddělení obou fluoroforů a emisi fluorescence (viz Obr. 10).



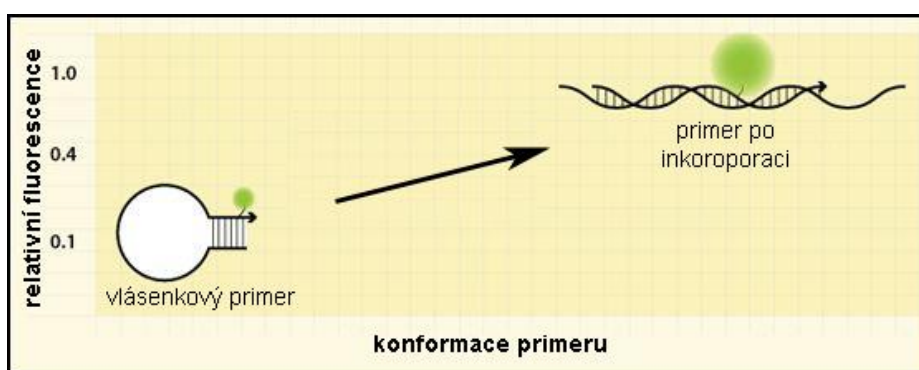
**Obr. 10: Princip funkce Amplifluor primerů** (pol = *Taq* DNA polymeráza)  
(upraveno dle NAZARENKO *et al.* 1997).

Škorpiónové primery („Scorpion primers“) byly navrženy WHITCOMBE a spol. (1999). Jedná se o modifikované primery, které mají na svém 5' konci navázanu sondu fungující na principu „Molecular Beacon“. Sonda je na koncích značena interaktivním párem reportér – zhášec a tvoří vlásenkovou strukturu, která je po hybridizaci s cílovou sekvencí otevřena (viz Obr. 11). Tyto primery se poněkud vymykají teším o modifikovaných primerech (jednoduchost, specifita), protože se vlastně jedná o stejný systém jako „Molecular Beacons“ s jediným rozdílem, že sonda je připojena rovnou k primeru a proto lépe „najde“ svůj templát.



**Obr. 11: Princip funkce Škorpiónových primerů** (upraveno dle WHITCOMBE *et al.* 1999).

Funkce LUX primerů („Light Upon Extension“) je oproti ostatním detekčním systémům založena na principu nukleotidového zhášení. Primery jsou značeny v blízkosti 3' konce fluorescenčním barvivem a v intaktním stavu tvoří vlásenkovou strukturu. V blízkosti 5' konce jsou pak vhodně umístěny guaninové nukleotidy, které zháší záření emitované fluoroforem na opačném konci vlásenky. Po inkorporaci do PCR produktu je vlásenková struktura otevřena, přičemž dochází k emisi fluorescence (viz Obr. 12). Výhodou LUX primerů je snížení finančních nákladů, jelikož k jejich funkci postačuje značení jedním barvivem (NAZARENKO *et al.* 2002 a).



Obr 12. Princip funkce LUX primerů (upraveno dle NAZARENKO *et al.* 2002 b).

#### 2.2.2.4 Další komerčně dostupné detekční systémy

Výše uvedené typy detekčních systémů jsou nejpoužívanějšími a v literatuře i na webových stránkách biotechnologických firem nejčastěji zmiňovanými variantami (WILHELM a PINGOUD 2003, KALTENBOECK a WANG 2005, ESPY *et al.* 2006, KUBISTA *et al.* 2006, <http://www.generi-biotech.com/>, <http://www.invitrogen.com>, <https://www.roche-applied-science.com/>). Pro představu stručně uvádím další typy detekčních systémů, které byly publikovány a některými výrobci komerčně zužitkovány. Patří mezi ně „MGB Eclipse“ sondy, „Light-up“ sondy, Plexor primery a BD Qzyme primery.

„MGB Eclipse“ sondy fungují na podobném principu jako „Molecular Beacons“. Liší se od nich přítomností ligandu malého žlábků dvoušroubovice DNA („Minor Groove Binder“), který zajišťuje efektivnější vazbu k templátu, a zdokonaleným účinnějším „Eclipse“ zhášečem (AFONINA *et al.* 2002, <http://www.apczech.cz>).

„Light-up“ sondy jsou peptidové nukleové kyseliny značené asymetrickým kyanidovým barvivem TO („thiazole orange“), pro které je charakteristické

zvyšování intenzity fluorescence po vazbě na dsDNA. Jejich výhodou je zjednodušení v podobě značení jediným fluoroforem (SVANVIK *et al.* 2000).

Funkce Plexor primerů je založena na použití nestandardních bází. Konkrétně se jedná o báze isoguanin (iso-dG) a 5'-methylisocytosin (iso-dC), které jsou vzájemně komplementární. Iso-dC je použit jako 5' koncový nukleotid primeru a naznačen fluoroforem. Do reakční směsi je dále přidán komplementární iso-dG, který je značen zhášečem. Po inkorporaci primeru a elongaci komplementárního řetězce je k 5' koncovému iso-dC dosyntetizován komplementární iso-dG kombinovaný se zhášečem, který pohlcuje fluorescenci fluoroforu (JOHNSON *et al.* 2004).

BD Qzyme primery jsou na svém 5' konci nastaveny sekvencí komplementární k sekvenci DNA-zyemu 10-23 (antisense). Během amplifikace dochází k syntéze kódujícího řetězce a vzniká produkt PCR obsahující katalytické místo DNA-zyemu 10-23. Do reakční směsi je dále přidán substrát značený reportérem a zhášečem, mezi nimiž se nachází restriční místo pro DNA-zym 10-23. Akumulací produktu s katalytickým místem dochází ke štěpení tohoto substrátu a emisi fluorescence (TODD *et al.* 2000).

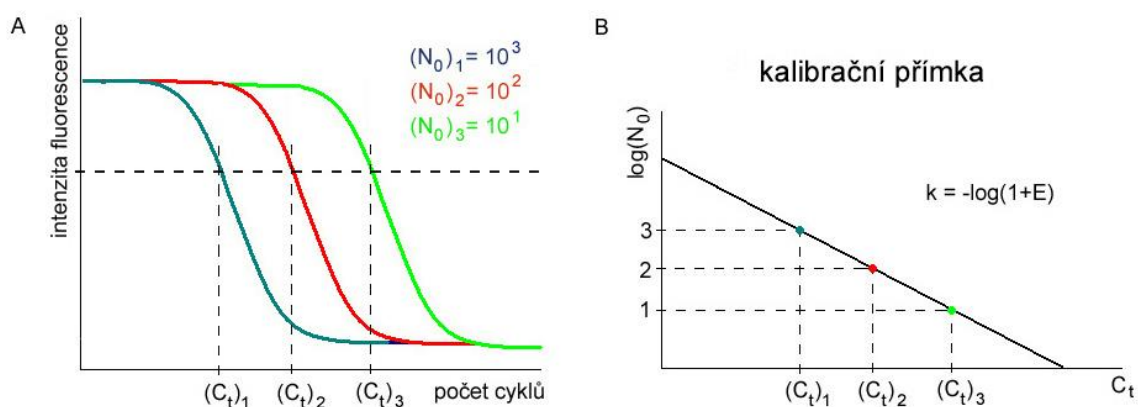
### **2.2.3 Alternativní detekční systém prezentovaný v této práci**

Z předchozích řádků je zřejmé, že dostupné detekční systémy buď vynikají pozitivními vlastnostmi jako je vysoká specifita detekce a možnost provádět analýzu křivky tání či multiplexní PCR, nicméně jejich použití je zároveň složité a finančně nákladné, nebo jsou naopak velice jednoduché a levné, ale na úkor toho vykazují nižší specifitu a nedovolují realizaci multiplexní PCR. Mou snahou bylo proto navrhnout nekomplikovaný, levný a přitom dostatečně specifický detekční systém, který by umožňoval analýzu křivky tání i provádění multiplexní PCR.

Navrhla jsem alternativní typ modifikovaných primerů, jejichž funkce je založena na využití guaninového zhášení. Sekvence jednoho z PCR primerů je navržena tak, aby na svém 5' konci obsahovala jeden nebo více cytosinových nukleotidů, přičemž 5' koncový nukleotid je značen fluoroforem citlivým ke guaninovému zhášení. Druhý primer může být použit nemodifikovaný. Změna intenzity fluorescence po inkorporaci modifikovaného primeru do produktu PCR je

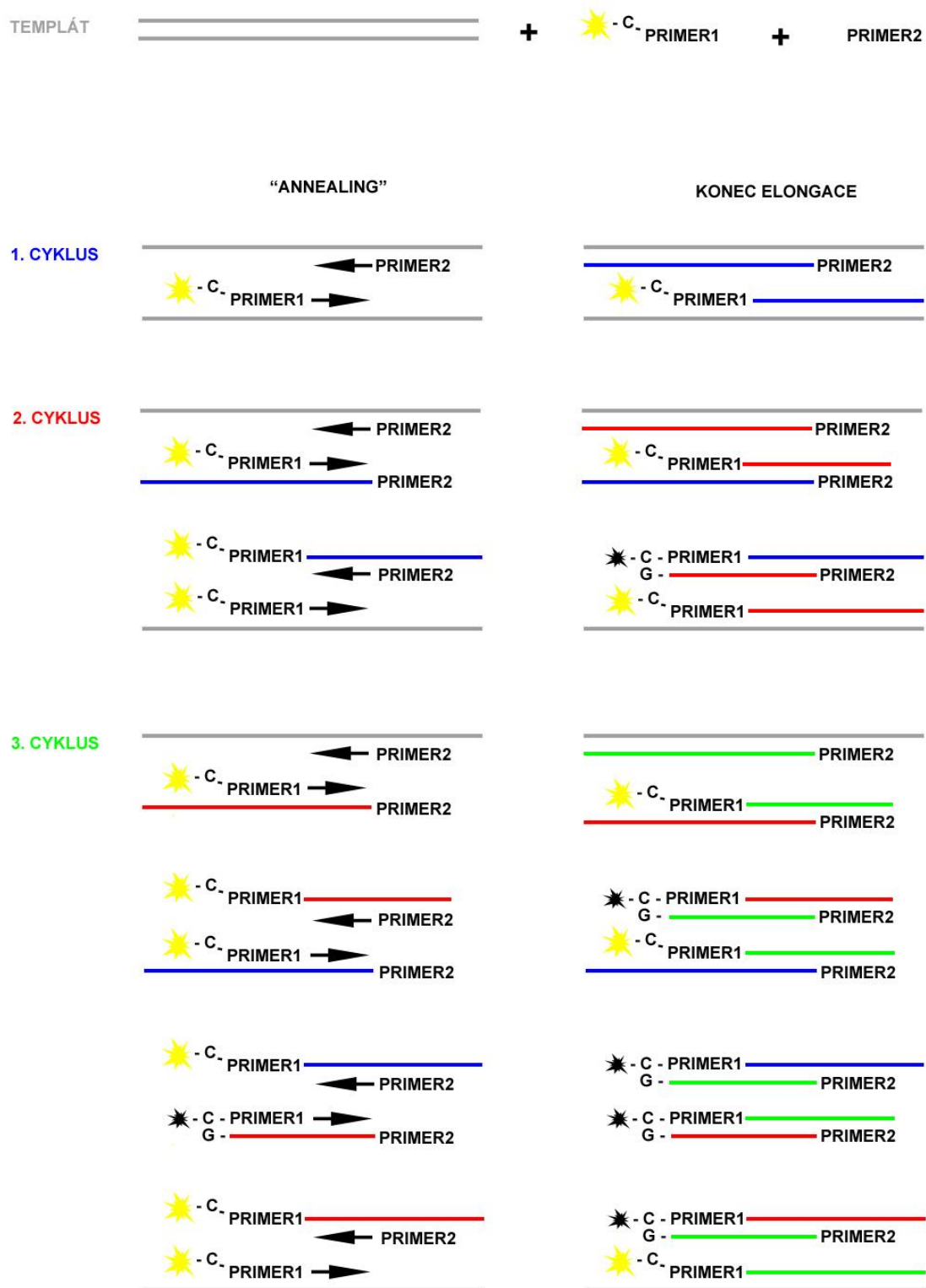
zapříčiněna zhášením fluorescenčního záření barviva prostřednictvím guaninových nukleotidů komplementárních k cytosinovým nukleotidům umístěným na jeho 5' konci. Teoreticky vzato by mělo být možné sekvenci jakéhokoli již navrženého primeru nastavit dC nekomplementárními k templátu, jelikož během několika prvních cyklů PCR dojde ke vzniku produktu (templátu pro další cykly), který již obsahuje dosyntetizované komplementární dG (viz Obr. 14). Pro jednotnost textu v dalších řádcích výše popsaný detekční systém nazývám „5' značené primery“.

Přepokladem je, že výstupem real-time PCR s použitím 5' značených primerů by měly být amplifikační křivky s klesající tendencí, jelikož interakcí primeru s produktem PCR dochází k poklesu fluorescence a nikoliv k jejímu vzrůstu, jak je běžné u většiny ostatních detekčních systémů. Z hlediska kvantifikace by však tato vlastnost systému 5' značených primerů neměla představovat problém. Stále platí pravidlo, že čím dříve amplifikační křivka začne rapidně klesat, čili čím dříve reakce vstoupí do exponenciální fáze, tím více výchozích kopií templátové DNA bylo přítomno na počátku reakce. Získaná kalibrační přímka by se ničím neměla lišit od kalibrační přímky dosažené s použitím běžných detekčních systémů (viz Obr. 13).



**Obr. 13: Teoretický předpoklad výstupu real-time PCR s použitím 5' značených primerů.**

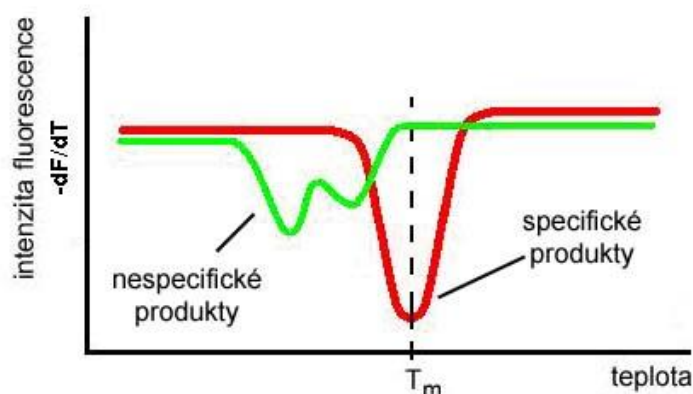
A: Amplifikační křivky by měly mít klesající tendenci. B: Kalibrační přímka by se ničím neměla lišit od běžné kalibrační přímky získané s použitím jiných detekčních systémů ( $N_0$  = výchozí koncentrace templátových molekul;  $C_t$  = prahový cyklus).



**Obr. 14: Schematické znázornění funkce systému 5' značených primerů.** Barevné čáry symbolizují řetězec DNA nasynthetizovaný v příslušném stejnobarevně označeném cyklu. Žlutá hvězdička symbolizuje svítící fluorofor, černá hvězdička symbolizuje fluorofor zhasený prostřednictvím dosynthetizování komplementárního guaninového nukleotidu. Z obrázku je zřejmé, že v každém cyklu vzrůstá frakce „zhasnutých“ molekul fluoroforu, která je úměrná množství nasynthetizovaného produktu PCR.



Systém 5' značených primerů byl navržen tak, aby umožňoval provádění analýzy křivky tání, ovšem opět s jistými rozdíly od běžných detekčních systémů. Fluorescence by měla v okolí  $T_m$  začít strmě stoupat, vlivem denaturace DNA a tudíž prostorového oddělení fluoroforu od zhášejících guaninových nukleotidů. Graf derivace křivky tání by následkem toho měl mít opačnou vertikální orientaci (viz Obr. 15).



**Obr. 15: Schematické znázornění předpokládaného výstupu analýzy křivky tání.** „Peaký“ grafu derivace křivky tání ( $-dF/dT$ ) by měly mít opačnou orientaci.

Co se týče multiplexní PCR, tak tuto metodiku by systém 5' značených primerů měl dovolovat při použití vhodných fluorescenčních barviv s odlišnými emisními spektry.

#### 2.2.3.1 Publikované detekční systémy založené na podobném principu

Jedinou dohledatelnou studií, ve které byl použit real-time PCR detekční systém fungující na obecně stejném principu jako systém 5' značených primerů je publikace KURATA a spol. (2001), která se zabývala možnostmi využití fluoroforu BODIPY® FL, jež je velmi citlivý ke guaninovému zhášení (viz Tabulku 1 na str. 21), ke kvantitativní detekci nukleových kyselin. Dílčí součástí této studie bylo i vyvinutí real-time PCR detekčního systému, kdy jeden z primerů na svém 5' konci obsahoval cytosinový nukleotid značený BODIPY® FL. Nevýhodou tohoto fluoroforu je však skutečnost, že není běžně komerčně dostupný ve firmách syntetizujících oligonukleotidy pro použití v real-time PCR diagnostice (<http://www.generi-biotech.com>, <https://www.tib-molbiol.com>).

Real-time PCR detekční systém založený na guaninovém zhášení dále představili CROCKETT a WITWER (2001), kteří ve své studii použili

oligonukleotidovou sondu, jejíž sekvence byla navržena tak, aby na svém 5' konci obsahovala cytosinový nukleotid modifikovaný fluoroforem FAM. Na principu nukleotidového zhášení dále fungují i výše zmíněné komerčně dostupné LUX primery (NAZARENKO *et al.* 2002 a).

## 2.3 Antrax, biologické zbraně a real-time PCR

Antrax, jinak též sněť slezinná neboli uhlák, je nebezpečné a často smrtelné infekční onemocnění dobytka i lidí způsobené půdní bakterií *Bacillus anthracis*. Jedná se o nepohyblivou, grampozitivní aerobní tyčinku 1,2 – 10 µm dlouhou a 0,5 – 2,5 µm širokou. Taxonomicky je řazen mezi bakteriální druhy rodu *Bacillus* (viz Tabulku 3), pro které je charakteristická tvorba endospor rezistentních k teple, chladu, radiaci, vysušení, UV záření a desinfekcím (DIXON *et al.* 1999).

**Tabulka 3: Taxonomické zařazení *Bacillus anthracis***

(upraveno dle <http://www.wikipedia.org>).

<b>Říše:</b>	<i>Prokaryotae</i>
<b>Oddělení:</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Třída:</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Řád:</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Čeleď:</b>	<i>Bacillaceae</i>
<b>Rod:</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Druh:</b>	<i>Bacillus anthracis</i>

### 2.3.1 Patofyziologie a toxikologie antraxu

K onemocnění sněti slezinnou dojde, pokud endospory *Bacillus anthracis* proniknou do organismu a vyklíčí v něm. Primárně se jedná o zoonózu býložravců, lidské infekce jsou následkem kontaktu s kontaminovanými zvířaty či jejich produkty. Nejsou známy případy přenosu z člověka na člověka (DIXON *et al.* 1999).

Dle místa vstupu infekce do organismu lze rozlišit 3 formy antraxu: kožní antrax, kdy endospory vnikají do organismu prostřednictvím poškození kůže, střevní antrax, který je následkem požití endospor, a plicní antrax, který je vyvolán jejich vdechnutím (viz Obr. 16). Nejčastějším typem infekce je kožní antrax.

(95 % případů), který je obvykle léčitelný. Pravděpodobnost úmrtí závisí na tom, jestli z lokální infekce vznikne infekce systémová. U kožního antraxu je tato pravděpodobnost velmi nízká (5 %), u střevního antraxu variabilní a u plicního antraxu naopak téměř 100 % (DIXON *et al.* 1999).

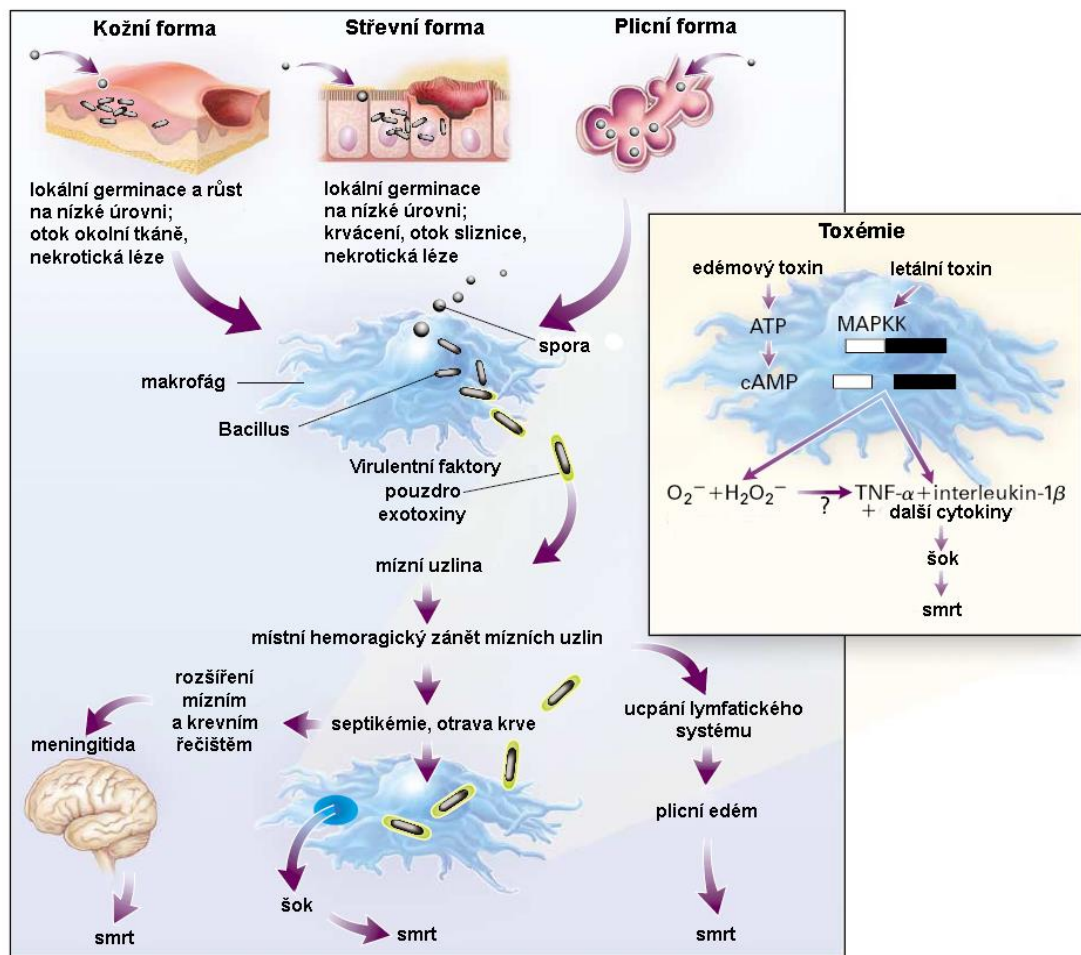
V případě kožního a střevního antraxu dochází nejprve ke klíčení spor v podkožním vazivu či epitelu střevní sliznice, které vede ke vzniku lokálního edému a nekrózy poškozené tkáně. Typickými příznaky kožního antraxu, které obvykle během několika dní samy vymizí, jsou načernalá léze v místě vniku infekce, která dala vznik názvu onemocnění (z řeckého „anthrakis“ = uhlí), a masivní otok v okolních tkáních. Následně může dojít k rozšíření vegetativních bakteriálních buněk do lymfatického systému a systémové infekci, která vrcholí masivním pomnožením buněk v krevním oběhu, kde jejich počet může vzrůst až na  $10^7 - 10^8 / \text{ml}$ , vznikem septického šoku a náhlým úmrtím. V případě plicního antraxu dochází přímo k pohlcení spor alveolárními makrofágy a vzniku systémové infekce v drtivé většině případů. Tato forma antraxu se nejprve projevuje příznaky připomínajícími běžná virová respirační onemocnění, což znesnadňuje včasnou diagnózu. Během 1 až 3 dnů pak dochází k hypoxii, sepsi a náhlému úmrtí. V některých případech může infekce vyústit i ve vznik plicního edému či meningitidy. Antrax je léčitelný antibiotiky, ale pouze pokud je infekce rozpoznána v časných stádiích nemoci (DIXON *et al.* 1999).

Patogenicita *Bacillus anthracis* je zajištěna dvěma virulentními faktory – sekretovanými exotoxiny a polypeptidovým pouzdrém, které jsou kódovány geny umístěnými na plasmidech pXO1 a pXO2. Exotoxiny se pravděpodobně uplatňují v inhibici imunitní odpovědi a pouzdro chrání vegetativní buňky před fagocytózou (DIXON *et al.* 1999).

Plazmid pXO1 (184,5 kb) nese geny *pagA*, *lef* a *cya*, které kódují složky sekretovaných exotoxinů – protektivní antigen, letální faktor a edémový faktor. Tyto tři komponenty dávají vznik dvěma typům exotoxinů – letálnímu toxinu a edémovému toxinu. Edémový toxin se skládá z protektivního antigenu, který se váže na specifické receptory a umožňuje vstup toxinu do buňky, a edémového faktoru, což je kalmodulin-dependentní adenylát cykláza. Zvýšená intracelulární hladina cAMP vede k narušení osmotické rovnováhy, které je příčinou charakteristického masivního otoku tkáně. Edémový toxin navíc inhibuje funkci neutrofilů. Letální toxin se skládá z protektivního antigenu a letálního faktoru.

Inhibuje MAP kinázovou signální dráhu a stimuluje makrofágy k produkci cytokinů TNF- $\alpha$  a IL1- $\beta$ . Aktivuje také dráhu oxidativního vzplanutí vedoucí k produkci reaktivních kyslíkových intermediátů, které mají cytotoxický účinek vůči makrofágům (EDWARDS *et al.* 2006). Množství plazmidu pXO1 se pohybuje v rozmezí 50 - 200 kopií na buňku (COKER *et al.* 2003).

Plazmid pXO2 (95,3 kb) nese tzv. cap region obsahující geny *capA*, *capB* a *capC*, které kódují enzymy uplatňující se v syntéze pouzdra z kyseliny poly-D-glutamylové. Toto pouzdro chrání bakteriální buňku před rozpoznáním složkami imunitního systému (EDWARDS *et al.* 2005). Vyskytuje se v počtu 10 – 30 kopií na buňku (COKER *et al.* 2003).



**Obr 16: Patofyziologie antraxu a virulentní faktory *Bacillus anthracis*.** Popis lze nalézt v textu (ATP = adenosintrifosfát, cAMP = cyklický adenosinmonofosfát, MAPKK = mitogen-activated protein kinase kinase, TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor  $\alpha$ ). (upraveno dle DIXON *et al.* 1999).

Pro virulenci *Bacillus anthracis* je nezbytná přítomnost obou plazmidů v buňce a ztráta některého z nich má za následek vznik atenuovaného kmene. Vakcíny proti antraxu jsou vyráběny právě s pomocí kmenů, které ztratily jeden nebo oba plazmidy. Pasteurův avirulentní kmen obsahuje plazmid pXO2 a postrádá plazmid pXO1. Může tedy vytvářet pouzdro, ale neprodukuje žádné exotoxiny. Sternův kmen, dnes často používaný jako vakcína, naopak obsahuje pouze plazmid pXO1. Buňky tudíž syntetizují exotoxiny, ale nemají pouzdro (DIXON *et al.* 1999).

### 2.3.2 Význam antraxu v historii a v současnosti

*Bacillus anthracis* je mikroorganismus nesporně velmi historicky významný, a to z několika hledisek. Do 19. století představovaly epidemie antraxu obrovský problém jak z hospodářského, tak z lékařského hlediska. Zmínky o jejich vypuknutí lze nalézt již ve starověkých biblických a římských textech. Antrax přinášel obrovské ztráty zemědělcům na dobytku a půdě a tisíce úmrtí zaměstnanců dobytkářských farem a jatek. Koncem 19. století posloužil *Bacillus anthracis* jako modelový mikroorganismus při několika důležitých výzkumných objevech. Robert Koch na základě experimentů s tímto mikroorganismem přinesl první důkaz, že bakterie mohou být původci některých onemocnění, a vytvořil známé postuláty o vztahu mezi specifickou bakterií a specifickou nemocí. Na jeho experimenty poté navázal Louis Pasteur, který vypěstoval atenuovaný kmen *Bacillus anthracis* a připravil tak první vakcínu (STERNBACH 2003).

Systematickým bojem proti této nemoci se jí podařilo potlačit natolik, že se dnes vyskytuje jen jako endemické onemocnění divoce žijící zvěře na několika málo místech na světě. Naproti tomu se však *Bacillus anthracis* stal díky své jednoduché kultivovatelnosti a výdrži endospor vděčnou surovinou pro výrobu biologických zbraní, přičemž jsou často používány kmeny vyšlechtěné nebo speciálně geneticky upravené za účelem odolnosti proti běžným vakcínám a antibiotikům (INGLESBY *et al.* 2002). Považuje se za prokázané, že biologické zbraně na bázi antraxu byly hromadně vyráběny v SSSR. V jednom ze zařízení na výrobu tohoto typu zbraní ve Sverdlovsku došlo roku 1979 k úniku patogenních spor *Bacillus anthracis*, jehož následkem bylo vypuknutí epidemie

gastrointestinálního a kožního antraxu mezi obyvateli města. Počet mrtvých je odhadován mezi 60–600 lidmi. Příhoda je známa jako „Sverdlovský incident“. Množství spor antraxu vyrobených v rámci ruských zbrojních programů se odhaduje v řádu stovek tun (INGLESBY *et al.* 2002).

Krátce po útoku na WTC a Pentagon 11. září 2001 byl *Bacillus anthracis* v USA použit při rozesílání tzv. antraxových dopisů, které způsobily 17 infekcí a vyžádaly si 5 lidských životů. Mezi adresáty patřili například významné politické osobnosti či novináři. Případy byly zaznamenány na území federálního distriktu District of Columbia a států New York a Florida (INGLESBY *et al.* 2002).

### 2.3.3 *Bacillus anthracis* a jeho detekce pomocí real-time PCR

Díky vysokému potenciálu použití *Bacillus anthracis* jako agens pro výrobu biologických zbraní a rychlému průběhu onemocnění v řadě případů končícího smrtí je nevyhnutelně nutné mít k dispozici rychlou a přesnou detekční techniku jak pro odhalení spor *Bacillus anthracis* v environmentálních vzorcích, tak pro odhalení vegetativních buněk ve vzorcích klinických.

Problém v identifikaci *Bacillus anthracis* spočívá v jeho genotypické příbuznosti s *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* a *Bacillus mycoides*, s nimiž tvoří tzv. „*Bacillus cereus* group“. Členové této skupiny vykazují extrémně vysoký stupeň genomické homologie, kterou dokázalo sekvenování 16S i 23S rRNA (ASH *et al.* 1991, ASH a COLLINS 1992), přičemž sekvenování 16S rRNA dokonce ukázalo 100 % sekvenční identitu mezi *Bacillus anthracis* a *Bacillus cereus*. Jednotlivé druhy „*Bacillus cereus* group“ se často liší pouze přítomností odlišných plazmidů kódujících případné virulentní faktory (TURNBULL *et al.* 1992). Dále bylo prokázáno, že mezi členy skupiny je možný konjugativní přenos těchto plazmidů (RUHFEL *et al.* 1984) a některé studie proto dokonce uvádějí, že se jedná o jeden jediný druh, jehož kmeny se odlišují jen přítomností virulentních faktorů, kódovaných horizontálně přenášenou plazmidovou DNA (HEGALSON *et al.* 2000).

Identifikaci *Bacillus anthracis* lze poměrně spolehlivě provést pomocí fenotypických charakteristik - narozdíl od ostatních členů skupiny je nepohyblivý, nehemolytický, citlivý k penicilinu, má typickou morfologii kolonií, je citlivý k lýze gama fágem a roste selektivně na tzv. PLET agaru. Jeho

přítomnost bývá dále potvrzována McFayedanovým barvením pouzdra (DIXON 1999). Přestože tyto techniky jsou poměrně přesné, předběžná identifikace založená na charakteristické morfologii kolonií a biochemickém testování poskytuje diagnózu po 12-24 hodinách, a definitivní identifikace vyžaduje další 1-2 dny testování. Cílem výzkumu v posledních letech je proto vyvinutí rychlých a spolehlivých detekčních technik pro *Bacillus anthracis*, přičemž PCR a real-time PCR v nich hrají podstatnou roli.

Markery používané pro PCR detekci *Bacillus anthracis* lze zhruba rozdělit na plazmidové a chromozomální. První studie zaměřené na vyvinutí PCR a real-time PCR detekčních testů používaly jako geny kódující virulentní faktory umístěné na plazmidech pXO1 a pXO2 (CARL *et al.* 1992, MAKINO *et al.* 1993), které jsou dodnes považovány za nejdůležitější markery vzhledem ke své specifitě pro virulentní kmeny *Bacillus anthracis* (HOFFMASTER *et al.* 2002). Existují však studie, dokládající že sekvence podobné sekvencím vyskytujícím se na plazmidech pXO1 a pXO2 lze nalézt také u ostatních členů „*Bacillus cereus* group“ (PANNUCCI *et al.* 2002 a, PANNUCCI *et al.* 2002 b, HOFFMASTER *et al.* 2004), a dále že existují také avirulentní kmeny *Bacillus anthracis* postrádající jeden nebo oba plazmidy (TURNBULL *et al.* 1992). S plazmidovými markery také není možná přesná kvantifikace, jelikož jejich počet v buňce může být variabilní.

V důsledku výše zmíněných negativ plazmidových markerů se mnoho výzkumných skupin zaměřilo na hledání vhodného chromozomálního markeru pro molekulární detekci *Bacillus anthracis*. K identifikaci ostatních bakteriálních druhů se obvykle jako markery používají sekvence 16S a 23S rRNA, což u *Bacillus anthracis* představuje problém vzhledem k homologii těchto sekvencí mezi členy „*Bacillus cereus* group“. PATRA a spol. (1996) proto navrhli diagnostický PCR test zacílený na chromozomální sekvenci Ba813 (její přesná funkce není známa). Jiná studie však prokázala, že marker Ba813 poskytuje falešné pozitivní výsledky i v případě několika kmenů *Bacillus cereus* (RAMISSE *et al.* 1999). JACKSON a spol. (1998) použili pro analýzu tkání z obětí Sverdlovského incidentu sekvenci *vrrA*, což je VNTR region specifický dokonce pro jednotlivé izoláty *Bacillus anthracis* (ANDERSEN *et al.* 1996). Jednalo se však o klasickou PCR a konečná identifikace vyžadovala provedení dodatečných analýz po ukončení amplifikace. CHEUN a spol. (2001)

s úspěchem použili jako marker gen *sap* kódující protein S-vrstvy buněčné stěny *Bacillus anthracis* (ETIENNE-TOUMELLIN *et al.* 1995). QI a spol. (2001) uvedli jako marker gen *rpoB*, který kóduje  $\beta$ -podjednotku RNA polymerázy, a je také často používaným markerem pro specifickou detekci bakteriálních mikroorganismů. Použití *rpoB* však také není úplně nejvhodnější, protože může poskytovat falešné pozitivní výsledky (ELLERBROK *et al.* 2002, ZASADA *et al.* 2006). Studie RANTAKOKKO-JALAVA a VILJANEN (2003) porovnávající různé publikované markery pro detekci *Bacillus anthracis* pomocí PCR prokázala, že chromozomální markery mohou poskytovat falešné pozitivní výsledky a že jediné opravdu specifické jsou plazmidové markery. Ve studii HURTLE a spol. (2004) byl úspěšně použit marker *gyrA*, což je gen kódující jednu z podjednotek bakteriální DNA gyrázy. EASTERDAY a spol. (2005) zavedli marker *plcR* (transkripční aktivátor virulentních faktorů), který je u *Bacillus anthracis* nefunkční, a proto by se mělo jednat o evolučně stabilní druhově specifický marker. KIM a spol. (2005) použili jako chromozomální marker gen kódující protein SspE potřebný pro sporulaci. REIMAN a spol. (2007) použili real-time PCR s primery zacílenými na genom gama fága, jež je specifický pro *Bacillus anthracis* a v době lytické fáze se vyskytuje ve vysokém počtu kopií na buňku. PARK a spol. (2007) použili jako diagnostické markery geny *gyrB* a *groEL* pro identifikaci a rozlišení členů „*Bacillus cereus* group“ pomocí multiplexní PCR. VAN ERT a spol. (2007) použili chromozomální SNP polymorfizmy pro TaqMan real-time PCR detekci kmene Ames, který byl použit při teroristických útocích v USA.

Plazmidové i chromozomální markery skýtají své výhody i nevýhody. Plazmidové markery jsou sice vysoce specifické pro virulentní kmeny *Bacillus anthracis*, nicméně díky horizontálnímu přenosu genetické informace se mohou dostat i do jiných bakteriálních druhů. Co se týče chromozomálních markerů, je zase obtížné najít sekvenci specifickou pro *Bacillus anthracis*, jelikož tento druh vykazuje extrémně vysoký stupeň genomické homologie s ostatními členy „*Bacillus cereus* group“. Obecně je doporučováno použití obou typů markerů najednou. Dle směrnic Světové zdravotnické organizace jsou pro PCR detekci *Bacillus anthracis* doporučovány páry primerů specifické pro gen *pagA* přítomný na plazmidu pXO1, gen *capB* přítomný na plazmidu pXO2 a gen *sap* přítomný na chromozomální DNA (TURBULL 1998).



V Příloze 1 je uveden vyčerpávající přehled většiny dohledatelných studií, které se zabývaly detekcí *Bacillus anthracis* pomocí konvenční nebo real-time PCR, spolu s použitým markerem a typem real-time PCR detekčního systému. Přehled byl vytvořen za prvé pro představu o používání jednotlivých markerů pro detekci *Bacillus anthracis* a za druhé pro představu o používání jednotlivých variant real-time PCR detekčních systémů. Detekční systém podobný systému 5' značených primerů navrženému v této práci ještě nebyl pro detekci patogenu *Bacillus anthracis* použit.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Celkové pojetí práce

Ve své diplomové práci prezentuji alternativní detekční systém pro monitorování průběhu real-time PCR reakce. Mým cílem je zjistit zda tento systém funguje, za jakých podmínek funguje, jestli je lepší či horší ve srovnání s ostatními dostupnými detekčními systémy a jestli je aplikovatelný v praxi. Za tímto účelem byla metodika 5' značených primerů nejprve optimalizována a testována v různých variantách s použitím primerů zacílených na DNA bakteriálního druhu *Bacillus subtilis*, protože se jedná o často používaný modelový mikroorganismus, který je osekvenovaný, a dobře se s ním pracuje, jelikož je nepatogenní. Poté byla vybrána nejlépe fungující varianta 5' značených primerů a modifikována k vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro patogen *Bacillus anthracis*.

Experimenty diplomové práce lze zhruba rozdělit do následujících kroků:

1. nalezení vhodných sekvencí primerů, se kterými by se dal systém 5' značených primerů zkoušet: Za tímto účelem bylo navrženo 6 párů nemodifikovaných primerů zacílených na DNA kmene *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, které byly nejprve otestovány s použitím interkalačního barviva SYBR Green I, protože je to jednoduchý detekční systém bez rizika zbytečných komplikací. Pro další experimenty byly vybrány sekvence páru primerů, který vykazoval nejlepší vlastnosti ve smyslu účinnosti amplifikace a specifity detekce.
2. ověření funkčnosti systému 5' značených primerů a optimalizace reakčních podmínek: Sekvence jednoho primeru z páru vybraného na základě testování pomocí SYBR Green I byla modifikována tak, aby se na jeho 5' konci vyskytoval jeden cytosinový nukleotid značený fluoroforem FAM. U takto navrženého oligonukleotidu bylo téměř jisté, že fluorescence barviva bude zhasena po inkorporaci do produktu PCR, jelikož podobný princip byl již použit ve studiích zabývajících se příbuznou tematikou (CROCKETT a WITTEWER 2001, KURATA *et al.* 2001). S použitím takto modifikovaného primeru spolu s nemodifikovaným protějškem byly optimalizovány reakční podmínky jako je například vhodná koncentrace primerů.

3. testování vlivu počtu cytosinových nukleotidů na 5' konci modifikovaného primeru na účinnost zhášení: Dále byla řešena otázka, jestli je míra zhášení zesílena pokud je na 5' konci primeru přítomno více cytosinových (a následně komplementárních guaninových) nukleotidů. Za účelem potvrzení této domněnky byla porovnávána míra zhášení při použití primerů značených fluoroforem FAM, které na svém 5' konci obsahovaly jeden, dva nebo tři cytosinové nukleotidy. Tento počet byl odvozen na základě studie NAZARENKO a spol. (2002 b).
4. testování možností použití různých fluoroforů: Aby bylo možné provádět multiplexní PCR je nutné mít k dispozici detekční systém způsobilý k použití fluoroforů s odlišnými maximy emisních spekter. Byla proto zkoumána schopnost 5' značených primerů detekovat produkt PCR amplifikace při značení fluorofory FAM, HEX a Cy5. Tyto fluorofory byly vybrány na základě výsledků studií TORIMURA a spol. (2001) a MARRAS a spol. (2002) (viz Tabulku 1 a 2 na str. 21 a 22) a vlnových délek jejich emisních maxim, které musí odpovídat detekčním kanálům použitého přístroje.
5. ověření zda se systémem dá provádět analýza křivky tání
6. vyhodnocení spolehlivosti metody a porovnání se SYBR Green I: U každého nového real-time PCR testu je nutné vyhodnotit jeho detekční limit, linearitu kalibrační přímky, opakovatelnost a specifitu (VAERMAN *et al.* 2004). Tyto parametry byly posouzeny pro systém 5' značených primerů a porovnány se stejnými parametry získanými při použití SYBR Green I v reakcích s odpovídajícími (ale nemodifikovanými) sekvencemi primerů.
7. vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro patogen *Bacillus anthracis*

## 3.2 Použité bakteriální kmeny a extrakce DNA

V diplomové práci byla použita DNA izolovaná z bakteriálních kmenů *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus thuringiensis* a *Escherichia coli*, které byly kultivovány na agarových mediích, a DNA několika izolátů *Bacillus anthracis*, přičemž v tomto případě jsem obdržela přímo vzorky vyizolované DNA, které byly připraveny v laboratořích Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i., Kamenná-Milín.

### 3.2.1 Kultivované bakteriální kmeny

Zmíněné kmeny *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus thuringiensis* a *Escherichia coli* byly dodány Českou sbírkou mikroorganismů PŘF MU, Brno. Jejich sbírková čísla jsou shrnuta v Tabulce 4.

Tabulka 4: Kultivované bakteriální kmeny.

Bakteriální kmen	Sbírkové číslo CCM	Číslo šarže
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	2217	011082853
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	1999	0606008016
<i>Bacillus thuringiensis</i>	19	1104965341
<i>Escherichia coli</i>	2024	010188706

Bakteriální kmeny byly kultivovány na agarovém mediu B10 (pepton 5 g, hovězí extrakt 3 g, MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,005 g, agar 20 g, destilovaná voda 1000 ml, pH 7,0) při 37 °C po dobu 12-18 hod. po masivním naočkování. V tomto intervalu se nachází maximální počet mikroorganismů v logaritmické fázi růstu, což umožňuje relativně nejpřesnější určení celkového počtu buněk v připravované suspenzi stanovením počtu CFU. Bakteriální kultura byla sbírána z agarové půdy kličkou a resuspendována v PBS. Koncentrace suspenze byla upravena na požadovanou optickou denzitu, měřenou na přístroji WPA Biowave CO8000 (WPA, Německo).

### 3.2.2 Extrakce DNA

DNA z kultivovaných bakteriálních kmenů byla extrahována s použitím izolačního kitu SIGMA GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (SIGMA-

ALDRICH CHEMIE GmbH, Německo, katalogové číslo NA2100), který je určen pro izolaci DNA z grampozitivních (*Bacillus*) i gramnegativních bakterií (*Escherichia coli*). Pro izolaci DNA z grampozitivních druhů je nutné použít kit v kombinaci s produktem SIGMA Lysozyme (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Německo, katalogové číslo L7651), pro rozrušení buněčných membrán. Funkce kitu je založena na vysrážení DNA ethanolem, jejím zachycení na kolonce se silikátovou membránou a odmytí nežádoucích složek. Tento postup zaručuje výtěžek DNA v dostatečné koncentraci a čistotě nutné pro použití v real-time PCR reakcích.

Při izolaci jsem postupovala přesně dle návodu doporučeného výrobcem. Vstupním vzorkem byl 1 ml buněčné suspenze o optické denzitě O.D. = 1,5 v případě druhů rodu *Bacillus* a O.D. = 1,0 v případě *Escherichia coli*. V tomto množství by mělo být obsaženo přibližně  $10^9$  buněk/ml (předem okulibrované měření O.D. a současným výsevem CFU).

### 3.2.3 DNA *Bacillus anthracis*

V závěru diplomové práce byl princip 5' značených primerů aplikován k vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro patogen *Bacillus anthracis*. Byly použity vzorky DNA *Bacillus anthracis* dodané Státním ústavem jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (Kamenná-Milín), které zde byly připraveny z kultur získaných ze sbírky Státního veterinárního ústavu v Hradci Králové (<http://www.svu-hk.cz/>). Byly použity 3 izoláty *Bacillus anthracis* pocházející z tkáňových vzorků a DNA izolovaná z vakcíny Antraxen, kterou vyrábí firma Bioveta Ivanovice s r.o. (<http://www.bioveta.cz/>). Tato vakcína je vyrobena ze Sternova kmene *Bacillus anthracis*, takže buňky by měly postrádat plazmid pXO2. Charakteristiky použitých izolátů jsou shrnuty v Tabulce 5.

**Tabulka 5: Charakteristiky použitých izolátů *Bacillus anthracis*.**

Číslo vzorku	Označení vzorku	Rok nálezu	Zdroj nálezu
76	<i>Bacillus anthracis</i> 45	1957	turecká kozina
84	<i>Bacillus anthracis</i> 1549	1958	etiopská kozina
88	<i>Bacillus anthracis</i> 726/1	1958	indonéská kozina
Antraxen (Bioveta Ivanovice s.r.o) – buňky postrádají plazmid pXO2			

### 3.3 Design primerů

Veškeré použité oligonukleotidy byly dodány firmou Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové (<http://www.generi-biotech.com/>).

#### 3.3.1.1 *Bacillus subtilis* specifické nemodifikované primery

Za účelem nalezení vhodných sekvencí primerů na kterých by se dal zkoušet alternativní detekční systém bylo navrženo 6 párů nemodifikovaných primerů specifických pro geny *alr*, *trpA* a *yxel* bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, které kódují racemázu alaninu, podjednotku tryptofan syntázy a enzym penicilin-V-acylázu.

Geny *alr*, *trpA* a *yxel* byly vybrány proto, že kódují esenciální proteiny, nezbytné pro přežití mikroorganismu, kde není předpoklad existence většího počtu bodových mutací u použitých izolátů v porovnání s dostupnými sekvencemi v databázích (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sekvence zmíněných genů byly staženy z databáze GenBank, a to z genomické sekvence kmene *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 s identifikačním číslem AL009126 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Primery byly navrženy s použitím počítačového programu Roche LightCycler Probe Design Software, Version 1.0 (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Tento program pracuje ve 3 odlišných modulech: první modul zvaný „Quantification“ je určen pro návrh setu primerů a FRET sond určeného pro kvantifikaci, druhý modul zvaný „Mutation“ je určen pro návrh setu primerů a FRET sond určeného pro detekci SNP polymorfizmů a třetí modul zvaný „Primers“ je určen pro návrh páru primerů pro použití interkalačního barviva SYBR Green I nebo konvenční PCR. Program umožňuje zadání požadovaných  $T_m$  primerů, koncentrací primerů, velikosti ampliconu a reakčních podmínek jako je koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů, koncentrace monovalentních kationtů a koncentrace dNTP jednotek. Výsledkem analýzy vložené sekvence je 50 párů primerů označených hodnotou „Score Value“, která vyjadřuje vhodnost použití daných sekvencí primerů pro PCR (čím pozitivnější, tím lepší). Pro design svých primerů jsem používala modul „Primers“ a implicitně zadané reakční podmínky. Pro každý region jsem vybrala dva páry primerů s nejlepšími hodnotami „Score Value“. Jejich sekvence jsou shrnuty v Tabulce 6.

**Tabulka 6: Sekvence a označení navržených nemodifikovaných primerů.**

Marker	Označení primeru	Sekvence
<i>alr</i>	BSalr1A	5´ - CAGTTGTGAAAGCAAACG -3´
	BSalr1AS	5´ - CGCCAAGCACCAATATAG -3´
	BSalr2A	5´ - GAGTATGACGTGACCTTAAC -3´
	BSalr2AS	5´ - TCTGAACTTCTTCCTCTGT -3´
<i>trpA</i>	BStrpA1A	5´ - CCGTGAACAGGTCATAAAG -3´
	BStrpA1AS	5´ - GCCATTGCATAATCCTCAAA -3´
	BStrpA2A	5´ - CGAGGGGTTTCGTCTA - 3´
	BStrpA2AS	5´ - CACTTCCCCTACTACGACA - 3´
<i>yxel</i>	BSyxl1A	5´ - GGTTTGTTCAGAGCTGTTTATT -3´
	BSyxl1AS	5´ - GTTGCACATCACGGAAGTA -3´
	BSyxl2A	5´ - ACAGTTTTACCGCTTCAC -3´
	BSyxl2AS	5´ - TTGGGTACATGCCATATAAAGT -3´

### 3.3.1.2 *Bacillus subtilis* specifické modifikované primery

Pro testování funkčnosti a spolehlivosti systému 5´ značených primerů byly použity sekvence primerů BStrpA2A a BStrpA2AS. V experimentech byla vždy použita modifikovaná verze primeru BStrpA2AS spolu s nemodifikovaným protějškem BStrpA2A. V případě modifikovaných primerů byl fluorofor k 5´ konci oligonukleotidu připojen fosforamiditovou vazbou s 6-uhlíkovým ramenem (<http://www.generi-biotech.com/>).

Za účelem otestování vlivu počtu cytosinových (a následně komplementárních guaninových) nukleotidů na 5´ konci značeného primeru na účinnost zhášení byly objednány 3 oligonukleotidy, které na svém 5´ konci obsahovaly jeden, dva nebo tři cytosinové nukleotidy, a zároveň byly na 5´ konci značeny fluoroforem FAM. Jejich sekvence jsou uvedeny v Tabulce 7.

**Tabulka 7: Sekvence modifikovaných primerů použité pro testování vlivu počtu cytosinových nukleotidů na 5´ konci značeného primeru.** Modifikace a sekvence nastavená k sekvenci primeru BStrpA2AS je zvýrazněna tučným písmem.

Označení primeru	Sekvence
BStrpA2C1FAM	5´ - <b>FAM</b> - CACTTCCCCTACTACGACA - 3´
BStrpA2C2FAM	5´ - <b>FAM</b> - <b>CC</b> ACTTCCCCTACTACGACA - 3´
BStrpA2C3FAM	5´ - <b>FAM</b> - <b>CCC</b> ACTTCCCCTACTACGACA - 3´

Za účelem otestování vlivu povahy fluoroforu navázaného na 5' konec primeru byly objednány další 2 oligonukleotidy značené na svém 5' konci fluorofory HEX a Cy5. Jejich sekvence jsou uvedeny v Tabulce 8.

**Tabulka 8: Sekvence a vlastnosti modifikovaných primerů použité pro testování vlivu povahy fluoroforu na 5' konci značeného primeru.** Modifikace a sekvence nastavená k sekvenci primeru BStrpA2AS je zvýrazněna tučným písmem. Sekvence primeru BStrpA2C3FAM je pro ucelenost uvedena podruhé.

Označení primeru	Sekvence	Excitační/emisní maximum (nm)
BStrpA2C3FAM	5' - <b>FAM</b> - CCCACTTCCCACTACGACA - 3	494/517
BStrpA2C3HEX	5' - <b>HEX</b> - CCCACTTCCCACTACGACA - 3'	538/554
BStrpA2C3Cy5	5' - <b>Cy5</b> - CCCACTTCCCACTACGACA - 3'	651/663

### 3.3.1.3 *Bacillus anthracis* specifické modifikované primery

V případě primerů určených pro detekci *Bacillus anthracis* byly použity sekvence primerů doporučené WHO (TURNBULL 1998). Jedná se o primery specifické pro marker *pagA* na plazmidu pXO1, marker *capB* na plazmidu pXO2 a chromozómalní marker *sap*. Sekvence objednaných oligonukleotidů jsou shrnuty v Tabulce 9. Z daného páru primerů byla vždy modifikována sekvence toho primeru, která se jevila vhodnější, jelikož na svém 5' konci nebo v jeho blízkosti již obsahovala cytosinové nukleotidy, popř. neobsahovala nukleotidy guaninové, které by mohly interagovat s konjugovaným barvivem.

**Tabulka 9: Sekvence primerů specifických pro *Bacillus anthracis*.** Modifikace a sekvence nastavená k sekvenci primeru doporučené WHO je zvýrazněna tučným písmem.

Marker	Označení primeru	Sekvence
<i>pagA</i> (pXO1)	BApagAFAM	5' - <b>FAM</b> - CCCTCCTAACACTAACGAAGTCG - 3'
	BApagAS	5' - GAGGTAGAAGGATATACGGT - 3'
<i>capB</i> (pXO2)	BAcapAFAM	5' - <b>FAM</b> - CCCTGAGCCATTAATCGATATG - 3'
	BAcapAS	5' - TCCCACTTACGTAATCTGAG - 3'
<i>sap</i> (chromozom)	BA <sup>sap</sup> AFAM	5' - <b>FAM</b> - CCCGCGTTTCTATGGCATCTCTTCT - 3'
	BA <sup>sap</sup> AS	5' - TTCTGAAGCTGGCGTTACAAAT - 3'



### 3.4 Real-time PCR amplifikace

Real-time PCR byla prováděna s pomocí přístroje Roche LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Německo, katalogové číslo 04484495001). Tento přístroj umožňuje provádění velmi rychlé PCR, protože ke kontrole reakčních teplot používá proudící horký vzduch místo tepelného bloku a vzorky jsou umísťovány do speciálních skleněných kapilárek, které díky vysokému poměru povrch/objem zajišťují mimořádně rychlý přenos tepla v reakční směsi. Emitované fluorescenční záření je možné měřit ve 3 detekčních kanálech s vlnovými délkami 530, 640 a 710 nm, což při použití vhodných fluoroforů umožňuje provádět multiplexní PCR. Po ukončení PCR amplifikace lze realizovat analýzu křivky tání.

#### 3.4.1.1 SYBR Green I real-time PCR (nemodifikované primery)

Pro namíchání reakční směsi o celkovém objemu 20  $\mu\text{l}$  byl použit LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo, katalogové číslo 03515885001), který obsahuje FastStart *Taq* DNA polymerázu, reakční pufr,  $\text{Mg}^{2+}$  kationty, směs dNTP jednotek, vodu vhodnou pro použití v PCR reakcích a interkalační barvivo SYBR Green I. Z těchto složek s výjimkou vody lze namíchat 5x koncentrovanou PCR směs. Reakční směs dále obsahovala pár nemodifikovaných primerů v koncentracích 0,5  $\mu\text{M}$  a templátovou DNA v koncentracích odpovídajících příslušnému experimentu (viz kapitolu Výsledky a diskuze). Přidávaná množství a finální koncentrace jednotlivých složek jsou shrnuty v Tabulce 10.

**Tabulka 10: Složení reakční směsi – SYBR Green I.**

Složka	Přidávané množství ( $\mu\text{l}$ )	Finální koncentrace
H <sub>2</sub> O	13	-
PCR směs	4	1x
Přímý primer (nemodifikovaný)	1	0,5 $\mu\text{M}$
Zpětný primer (nemodifikovaný)	1	0,5 $\mu\text{M}$
templátová DNA	1	dle experimentu
<b>celkový objem</b>	20	-

Nastavený teplotní profil je uveden v Tabulce 11. Fluorescence byla měřena na konci elongační fáze, kdy je syntetizovaná DNA v dvouřetězcovém stavu.

**Tabulka 11: Teplotní profil - SYBR Green I.**

Fáze		Teplota (°C)	Doba trvání
Počáteční denaturační fáze		95	10 min
Cyklus (45 x)	denaturace	95	10 s
	„annealing“	57	10 s
	elongace	72	15 s

#### 3.4.1.2 Real-time PCR s 5' značenými primery

Pro namíchání reakční směsi o celkovém objemu 20 µl byl použit LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo, katalogové číslo 03515575001), který obsahuje FastStart *Taq* DNA polymerázu, reakční pufr, Mg<sup>2+</sup> kationty, směs dNTP jednotek a vodu vhodnou pro použití v PCR reakcích. Tento kit je primárně určen pro použití v kombinaci s FRET sondami a obsahuje tedy všechny složky potřebné pro úspěšnou amplifikaci s výjimkou primerů, detekčního systému a templátové DNA. Rovněž umožňuje namíchání 5x koncentrované PCR směsi. Reakční směs dále obsahovala 5' značený primer spolu s nemodifikovaným protějškem v koncentracích 0,2 µM a templátovou DNA v koncentracích odpovídajících příslušnému experimentu (viz kapitolu Výsledky a diskuze). Přidávaná množství a finální koncentrace jednotlivých složek jsou shrnuty v Tabulce 12.

**Tabulka 12: Složení reakční směsi – 5' značené primery.**

Složka	Přidávané množství (µl)	Finální koncentrace
H <sub>2</sub> O	13	-
PCR směs	4	1x
Přímý primer (modifikovaný)	1	0,2 µM
Zpětný primer (nemodifikovaný)	1	0,2 µM
templátová DNA	1	dle experimentu
<b>celkový objem</b>	20	-

Teplotní profil se v případě 5' značených primerů poněkud lišil podle toho, ve kterých experimentech byl tento detekční systém používán. Při testování systému 5' značených primerů, kdy byly užívány *Bacillus subtilis* specifické primery (viz Tabulku 6 na str. 46) byl použit stejný teplotní profil jako při SYBR Green I real-time PCR, pouze s vyšším počtem cyklů (viz Tabulku 13). Vyšší počet cyklů byl zvolen z toho důvodu, aby amplifikační křivka dosáhla plató fáze i při nízkých výchozích koncentracích templátu, což bylo důležité pro kvantifikaci (viz dále).

**Tabulka 13: Teplotní profil - testování 5' značených primerů (detekce *Bacillus subtilis*).**

Fáze		Teplota (°C)			Doba trvání
Počáteční denaturační fáze		95			10 min
Cyklus (65 x)	denaturace	95			10 s
	„annealing“	57			10 s
	elongace	72			15 s

Při detekci *Bacillus anthracis* byl použit teplotní profil uvedený v Tabulce 14. Byl použit opět nižší počet cyklů, jelikož v případě těchto párů primerů jej nebylo potřeba pro dosažení plató fáze zvyšovat.

**Tabulka 14: Teplotní profil – detekce *Bacillus anthracis*.**

Fáze		Teplota (°C)			Doba trvání
Počáteční denaturační fáze		95			10 min
Cyklus (45 x)	denaturace	95			10 s
	„annealing“	<i>pagA</i>	<i>capB</i>	<i>sap</i>	10 s
		54	50	60	
elongace		72			15 s

Fluorescence byla měřena na konci „annealing“ fáze každého cyklu, kdy dochází k hybridizaci primerů a tudíž k přiblížení fluoroforu 5' značeného primeru ke komplementárnímu guaninovému nukleotidu.

#### 3.4.1.3 Optimalizační experimenty

Podotýkám, že výše uvedené parametry amplifikací jsou finální zoptimalizované hodnoty. U každého páru primerů byla optimalizována koncentrace primerů, „annealing“ teplota hybridizace primerů a žádoucí počet cyklů. Ostatní parametry byly nastaveny dle směrnic firmy Roche. Během optimalizačních experimentů bylo rovněž postupováno dle těchto směrnic (<https://www.roche-applied-science.com>).

Při optimalizaci koncentrací primerů byly testovány koncentrace 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,2  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$ ; 0,4  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$ , což je rozsah koncentrací obecně doporučovaný pro použití v PCR reakcích (KRAMER a COEN 2001).

Při optimalizaci „annealing“ teploty byly u každého páru primerů testovány 3 hodnoty a to teplota o 3  $^{\circ}\text{C}$  nižší než  $T_m$  primerů, teplota rovná  $T_m$  primerů (popř. průměrné  $T_m$  páru primerů) a teplota o 3  $^{\circ}\text{C}$  vyšší než  $T_m$  primerů.  $T_m$  primerů byly zjišťovány s pomocí programu OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

Při optimalizaci počtu cyklů byl nastaven takový počet, aby i při nízkých koncentracích templátové DNA (10 kopií / vzorek) amplifikační křivka dosáhla plató fáze, což bylo nezbytné pro úpravu křivek normalizací (viz dále).

Výsledky jednotlivých optimalizačních experimentů až na výjimky nejsou uvedeny, aby nedocházelo ke zbytečnému narůstání objemu diplomové práce.

#### 3.4.1.4 Analýza křivky tání

Po ukončení PCR reakce byla vždy provedena analýza křivky tání za účelem odlišení specifických a nespecifických produktů amplifikace. Reakční směs byla ochlazená na 65  $^{\circ}\text{C}$  a postupně vytemperována na 95  $^{\circ}\text{C}$  s rychlostí teplotní změny 0,15  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ . Tyto parametry byly totožné pro každý experiment nezávisle na povaze detekčního systému nebo detekované sekvence.

#### 3.4.1.5 NTC vzorky

V každém real-time PCR experimentu byl zařazen minimálně jeden vzorek bez obsahu templátové DNA jako kontrola pro vyloučení možnosti kontaminace

produktem předchozích reakcí. V kapitole Výsledky a diskuze jsou tyto vzorky označovány zkratkou NTC („no template control“).

#### 3.4.1.6 Příprava templátové DNA pro PCR

Kvalita a množství extrahované DNA byly ověřeny spektrofotometricky měřením absorbance (A) při 260 nm (absorbují nukleové kyseliny) a 280 nm (absorbují bílkoviny). Byla použita pouze DNA, která měla poměr  $A_{260}/A_{280}$  mezi 1,6 a 1,9. Nižší hodnota absorbance znamená znečištění proteiny, vyšší naopak kontaminaci nežádoucí RNA.

Roztok extrahované DNA byl vždy naředěn tak, aby obsahoval  $10^9$  kopií templátové DNA na ml, popř. dále ředěn dle potřeby jednotlivých experimentů (viz kapitolu Výsledky a diskuze). Koncentrace DNA byla stanovena pomocí spektrofotometrického měření absorbance při 260 nm ( $A_{260}$ ) a následujícího vztahu:

$$1 \text{ jednotka } A_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g dsDNA/ml.} \quad (6)$$

Obsažený počet kopií genomické DNA byl vypočítán na základě jejich molárních hmotností (viz Tabulku 15), které byly stanoveny na základě počtu párů bází dle vztahu:

$$M = (\text{počet párů bází}) \times 660 \text{ g/mol.} \quad (7)$$

**Tabulka 15: Velikosti genomu a molární hmotnosti DNA použitých kmenů.** Velikosti genomu byly převzaty z internetových stránek <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>.

Bakteriální kmen	Velikost genomu (Mpb)	Molární hmotnost (g/mol)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	4,2	$2,772 \times 10^9$
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	4,2	$2,772 \times 10^9$
<i>Bacillus thuringiensis</i>	5,2	$3,432 \times 10^9$
<i>Escherichia coli</i>	5,2	$3,432 \times 10^9$

V případě DNA *Bacillus anthracis* byla koncentrace obdržených vzorků natolik nízká, že se nedala spolehlivě stanovit prostřednictvím spektrofotometrického měření. Pro stanovení specifity detekce (viz kapitolu Výsledky a diskuze) byl

proto roztok DNA pouze 10-krát naředěn za účelem vyředění inhibitorů reakce. Pro vytvoření standardů pro kvantifikaci (viz kapitolu Výsledky a diskuze) byly použity produkty předchozích reakcí, jejichž koncentrace byla rovněž stanovena prostřednictvím spektrofotometrického měření  $A_{260}$  a vztahů (6) a (7). Tento postup je doporučovaný dle směrnic firmy Roche (<https://www.roche-applied-science.com>). Při výpočtech byla uvažována délka produktu PCR amplifikace genu *sap* uvedená v Tabulce 16.

### 3.5 Gelová elektroforéza

Pro potvrzení zda během amplifikace opravdu dochází ke vzniku produktu správné velikosti byla provedena gelová elektroforéza. Byl použit 1,5 % agarózový gel v TAE pufru připravený pomocí SIGMA Agarose For Routine Use (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Německo, katalogové číslo A-9539). Do jamek byla pipetována směs 1,5  $\mu$ l zaváděcího pufru SIGMA Gel Loading Solution (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Německo, katalogové číslo G-7654) a 6  $\mu$ l vzorku nebo 5  $\mu$ l markeru DNA Molecular Weight Marker 100 pb Ladder (AMRESCO Inc., USA, katalogové číslo 8180-250UL). Elektroforéza byla prováděna 50 min při napětí 6,5 V/cm a proudu 75 mA. Předpokládané délky produktů PCR jsou uvedeny v Tabulce 16.

**Tabulka 16: Předpokládané délky produktů PCR.** Hodnoty byly vypočítány s pomocí programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

	Marker	Pár primerů	Předpokládaná délka produktu PCR
Detekce <i>Bacillus subtilis</i>	<i>trpA</i>	BStrpA2A – BStrpA2AS	193 pb
	<i>trpA</i>	BStrpA2A – BStrpA2C3FAM	195 pb
Detekce <i>Bacillus anthracis</i>	<i>pagA</i>	BApagAC3FAM - BApagAS	599 pb
	<i>capB</i>	BAcapAC3FAM - BAcapAS	848 pb
	<i>sap</i>	BAsapAC3FAM - BAsapAS	641 pb

### 3.6 Analytický software a vyhodnocování dat

K analýze získaných amplifikačních křivek byl používán software dodaný výrobcem – LightCycler Software, Version 3 (dále jen „LightCycler software“)

(Roche Diagnostics GmbH, Německo) a vlastnoručně naprogramovaná aplikace programu Microsoft Excel, kterou jsem nazvala „Real-time PCR Calculator“, a jež je uložena na přiloženém CD spolu s ukázkovými soubory (viz Přílohu 5).

### 3.6.1 LightCycler software

LightCycler software umožňuje 2 způsoby výpočtu  $C_T$  – metodou druhé derivace a tzv. „Fit point“ metodou. Metoda druhé derivace určuje  $C_T$  jako bod, ve kterém má amplifikační křivka nejvyšší hodnotu druhé derivace, což je místo kde se amplifikační křivka „láme“ a vstupuje do exponenciální fáze. „Fit point“ metoda určuje  $C_T$  jako bod, kdy se přímka proložená několika body umístěnými do exponenciální fáze amplifikační křivky protne s ručně nastaveným fluorescenčním prahem. Obě metody jsou naneštěstí závislé na stoupajícím průběhu amplifikační křivky a software proto nebyl schopen vypočítat  $C_T$  z klesajících amplifikačních křivek získaných s použitím 5' značených primerů.

### 3.6.2 „Real-time PCR Calculator“

LightCycler software nicméně umožňuje export grafů v číselné formě uložené v textovém souboru (\*.txt), jehož obsah je možné importovat do tabulkového editoru a dále zpracovat. Abych mohla analyzovat svá data, naprogramovala jsem si aplikaci v tabulkovém editoru Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) pomocí programovacího jazyka VBA („Visual Basic for Applications“), který je součástí Excelu. Aplikace provádí výpočet  $C_T$  klasickým způsobem prostřednictvím absolutní kvantifikace pomocí externích standardů (viz kapitolu 2.1.3).

Před vlastním výpočtem  $C_T$  je možné provést 3 způsoby úprav amplifikačních křivek zvané „Vyhlazení“, „Vyrovnání“ a „Normalizace“, aby bylo dosaženo přesnějších výsledků (viz Obr. 17). Vzorce pro níže uvedené výpočty byly převzaty a upraveny dle publikace LARIONOV a spol. (2005).

Při použití úpravy „Vyhlazení“ je hodnota fluorescence v určitém cyklu amplifikační křivky rovna aritmetickému průměru hodnoty fluorescence naměřené v tomto cyklu, hodnoty fluorescence naměřené v cyklu předchozím a hodnoty fluorescence naměřené v cyklu následujícím dle vzorce:

$$X_i = \frac{x_{i-1} + x_i + x_{i+1}}{3}, \quad (8)$$

kde  $X_i$  se rovná „vyhlazené“ hodnotě fluorescence v cyklu  $i$ ,  $x_{i-1}$  se rovná hodnotě fluorescence naměřené v cyklu  $(i-1)$ ,  $x_i$  se rovná hodnotě fluorescence naměřené v cyklu  $i$  a  $x_{i+1}$  se rovná hodnotě fluorescence naměřené v cyklu  $(i+1)$ . Tato úprava slouží k potlačení nepřesností v měření fluorescence.

Při použití úpravy „Vyrovnání“ je od každého bodu amplifikační křivky v případě použití 5' značených primerů odečtena její maximální hodnota dle vzorce:

$$X_i = x_i - x_{\max}, \quad (9)$$

kde  $X_i$  se rovná „vyrovnané“ hodnotě fluorescence v cyklu  $i$ ,  $x_i$  se rovná hodnotě fluorescence naměřené v cyklu  $i$  a  $x_{\max}$  se rovná nejvyšší naměřené hodnotě fluorescence v průběhu amplifikační křivky. V případě použití SYBR Green I (nebo jakéhokoliv jiného detekčního systému jehož amplifikační křivky mají stoupající tendenci) pak minimální hodnota dle vzorce:

$$X_i = x_i - x_{\min}, \quad (10)$$

kde  $X_i$  se rovná „vyrovnané“ hodnotě fluorescence v cyklu  $i$ ,  $x_i$  se rovná hodnotě fluorescence naměřené v cyklu  $i$  a  $x_{\min}$  se rovná nejnižší naměřené hodnotě fluorescence v průběhu amplifikační křivky. Při vyrovnání se amplifikační křivky seřadí tak, aby začínaly v přibližně stejné hodnotě fluorescence. Tato úprava slouží k potlačení chyb v pipetování, které způsobují variabilitu v míře měřitelné fluorescence mezi jednotlivými vzorky.

Při použití úpravy „Normalizace“ je každý bod amplifikační křivky v případě 5' značených primerů vydělen minimální hodnotou amplifikační křivky dle vzorce:

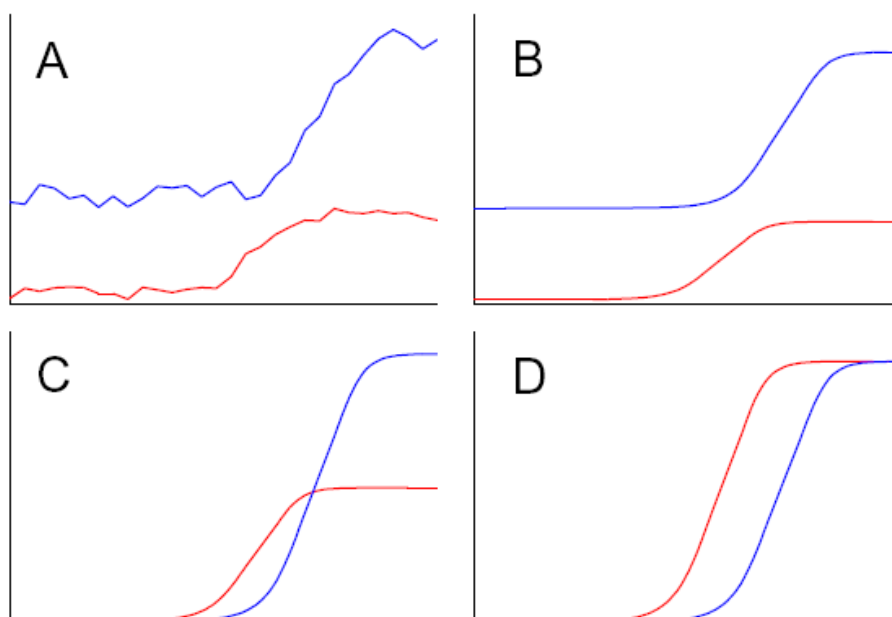
$$X_i = (-1) \frac{x_i}{x_{\min}}, \quad (11)$$



kde  $X_i$  se rovná „normalizované“ hodnotě fluorescence v cyklu  $i$ ,  $x_i$  se rovná hodnotě fluorescence naměřené v cyklu  $i$  a  $x_{\min}$  se rovná nejnižší naměřené hodnotě fluorescence v průběhu amplifikační křivky. V případě použití SYBR Green I (nebo jakéhokoliv jiného detekčního systému jehož amplifikační křivky mají stoupající tendenci) pak maximální hodnotou dle vzorce:

$$X_i = \frac{x_i}{x_{\max}}, \quad (12)$$

kde  $X_i$  se rovná „normalizované“ hodnotě fluorescence v cyklu  $i$ ,  $x_i$  se rovná hodnotě fluorescence naměřené v cyklu  $i$  a  $x_{\max}$  se rovná nejvyšší naměřené hodnotě fluorescence v průběhu amplifikační křivky. Při normalizaci jsou křivky upraveny tak, aby jejich maximální i minimální hodnota byly stejné. Tato úprava slouží k potlačení variability v účinnosti amplifikace mezi jednotlivými vzorky.

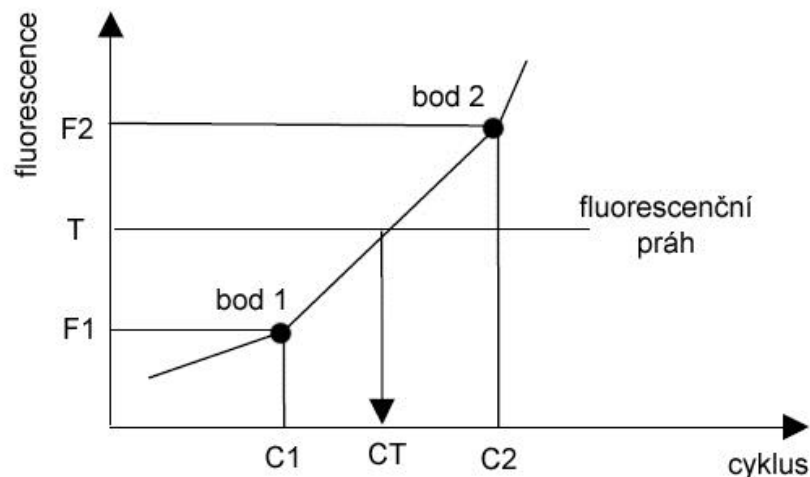


**Obr. 17: Schematické znázornění úprav amplifikačních křivek v aplikaci „Real-time PCR Calculator“.** A: Naměřené hodnoty fluorescence. B: Vyhlazení. C: Vyrovnaní. D: Normalizace (upraveno dle LARIONOV *et al.* 2005).

Aplikace „Real-time PCR Calculator“ počítá pro každou amplifikační křivku příslušnou hodnotu  $C_T$  dle následující rovnice:

$$C_T = C_1 + \frac{T - F_1}{F_2 - F_1}, \quad (13)$$

kdy  $T$  se rovná hodnotě fluorescence fluorescenčního prahu,  $F_1$  se rovná fluorescenci bodu amplifikační křivky ležícího nejbližě pod fluorescenčním prahem,  $C_1$  se rovná cyklu tohoto bodu a  $F_2$  se rovná fluorescenci bodu amplifikační křivky ležícího nejbližě nad fluorescenčním prahem. Zjednodušeně řečeno: aplikace najde 2 body amplifikační křivky, mezi kterými leží fluorescenční práh, těmito body proloží přímkou a vypočítá její průsečík s fluorescenčním prahem, jehož souřadnice na ose cyklů se rovná  $C_T$  (viz Obr. 18).

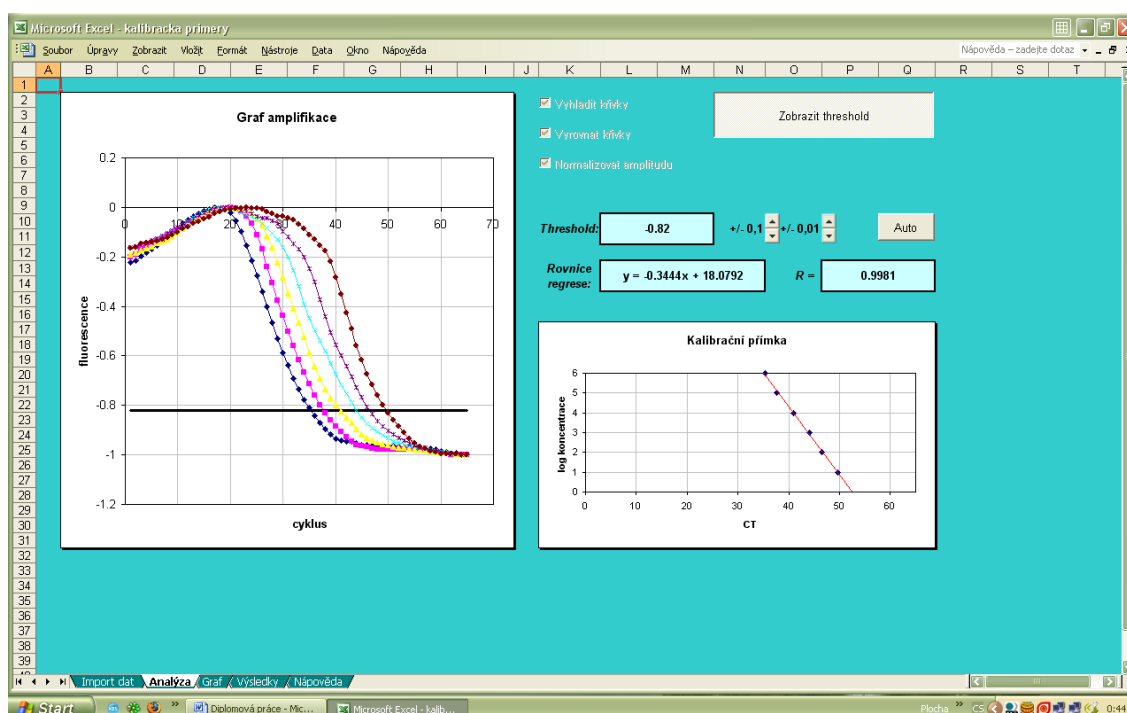


**Obr. 18: Schéma výpočtu  $C_T$  v aplikaci „Real-time PCR Calculator“**  
(upraveno dle LARIONOV *et al.* 2005).

Pokud je v analyzovaných vzorcích zahrnuta diluční série standardů o známé koncentraci, vytvoří aplikace kalibrační přímkou, vypočítá rovnici lineární regrese, hodnotu koeficientu determinace  $R^2$  a koncentrace neznámých vzorků. Umístění fluorescenčního prahu lze nastavit buď ručně, nebo automaticky do polohy nejvyššího  $R^2$  (LARIONOV *et al.* 2005).

Aplikace je rozdělena do 4 oddílů představovaných jednotlivými listy sešitu Excelu. V prvním oddíle zvaném „Import dat“ je možné načíst data z textového souboru vyexportovaného z LightCycler softwaru, změnit názvy jednotlivých vzorků, zadat jejich typ (neznámý, standardní nebo negativní), koncentrace

standardů a typ detekce (5' značené primery nebo SYBR Green I). Ve druhém oddíle zvaném „Analýza“ (viz Obr. 19) jsou znázorněny grafy amplifikace a kalibrační přímky. Dále je zde možné nastavit způsob úpravy amplifikačních křivek (Vyhlazení, Vyrovnání nebo Normalizace), popř. jejich kombinace, a polohu fluorescenčního prahu. Krom toho je vidět rovnice lineární regrese kalibrační přímky a příslušný koeficient determinace ( $R^2$ ). Třetí oddíl zvaný „Graf“ je tvořen listem typu graf a je na něm znázorněn graf amplifikace ve větší velikosti, s legendou a v podobě vhodné pro tisk. Ve čtvrtém oddíle zvaném „Výsledky“ jsou uvedeny výsledné koncentrace neznámých vzorků přehledně uspořádané do tabulky spolu s parametry experimentu a dalšími údaji rovněž v podobě vhodné pro tisk. V aplikaci je dále zařazen list „Nápověda“, který představuje dokumentaci k programu.



Obr 19: Oddíl „Analýza“ aplikace Real-time PCR Calculator.

### 3.6.3 Statistické vyhodnocování dat

Při zpracování výsledků mé diplomové práce byla vyhodnocována variabilita získaných výsledků a linearita kalibračních přímek. V obou případech byly použity vestavěné funkce tabulkového editoru Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA).

Variabilita výsledných  $C_T$  byla hodnocena prostřednictvím variačního koeficientu (CV), který je definován jako podíl směrodatné odchylky (SD) a aritmetického průměru naměřených hodnot a udává se v procentech. Platí, že čím nižší je CV, tím menší je variabilita množiny hodnot. Při výpočtech byly použity funkce STDEVA (pro výpočet směrodatné odchylky) a AVERAGEA (pro výpočet aritmetického průměru). Variační koeficient  $C_T$  získaných při opakování experimentů je při použití metody real-time PCR obvykle roven přibližně 1 % (VAERMAN *et al.* 2004).

V případě hodnocení linearity byla použita funkce LINREGRESE. Z jejích parametrů je ve výsledcích uváděna vždy rovnice lineární regrese a koeficient determinace  $R^2$ , který vyjadřuje míru korelace mezi odhadovanými a skutečnými hodnotami  $y$ .  $R^2$  může nabývat hodnot od 0 do 1. Pokud  $R^2 = 0$ , existuje v množině hodnot dokonalá korelace a mezi odhadem a skutečnými hodnotami  $y$  není žádný rozdíl. Pokud  $R^2 = 0$ , znamená to, že regresní rovnice nedokáže předpovídat hodnoty  $y$ . Kalibrační přímka správně zoptimalizované real-time PCR metody by měla mít koeficient determinace vyšší než 0,98.

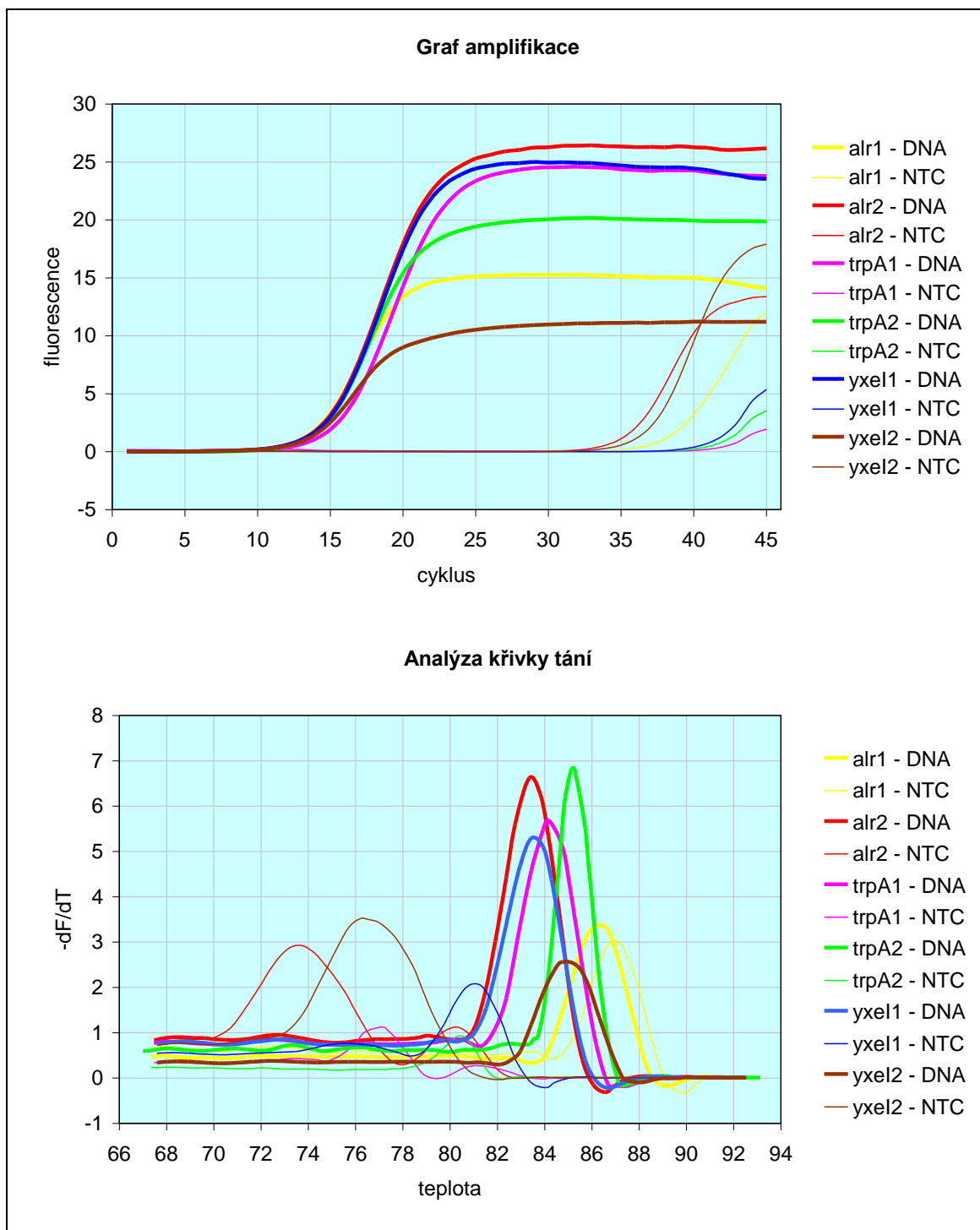
## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Nalezení vhodných sekvencí primerů

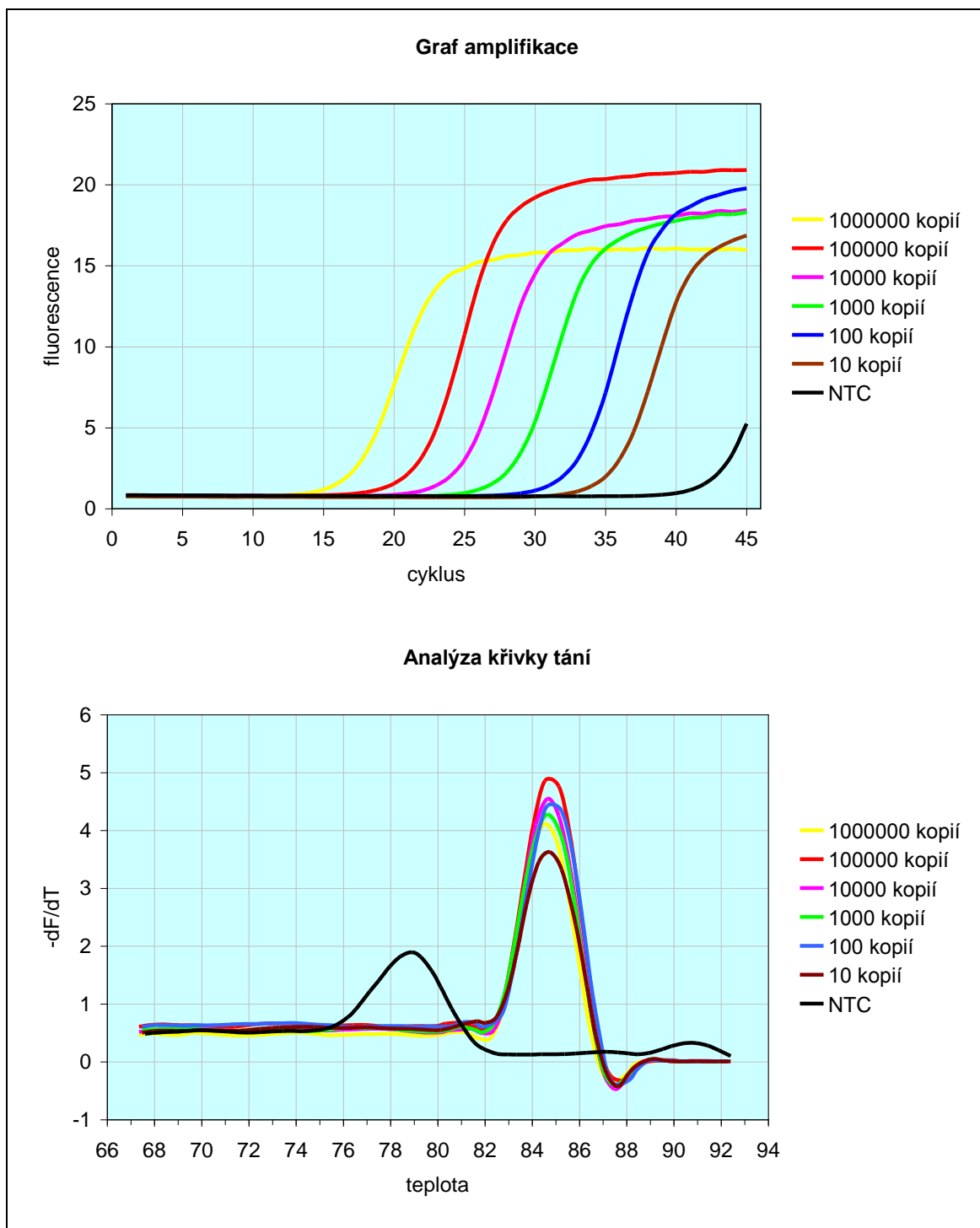
Za účelem najít opravdu kvalitní pár primerů, s jehož sekvencemi by se dal zkoušet alternativní detekční systém, bylo navrženo 6 párů nemodifikovaných primerů specifických pro geny *alr*, *trpA* a *yxel* (viz Tabulku 6 na str. 46) bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. Kvalita primerů byla nejprve prověřena s použitím interkalačního barviva SYBR Green I, protože se jedná o poměrně spolehlivý a hlavně jednoduchý detekční systém bez rizika zbytečných komplikací a nutnosti složitých optimalizačních pokusů. Kvalitní pár primerů by měl vykazovat co největší sklon exponenciální části amplifikační křivky (zhruba vyjadřuje účinnost amplifikace), co nejnižší hodnotu  $C_T$ , co nejlepší vlastnosti ve smyslu amplifikace kontrolních vzorků bez templátu a co nejnižší detekční limit (VAERMAN *et al.* 2004, <https://www.roche-applied-science.com>).

Na Obr. 20 jsou uvedeny výsledky real-time PCR experimentu, kdy bylo všech 6 párů primerů použito k amplifikaci DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (koncentrace  $10^6$  kopií/vzorek), aby bylo jasné zda jsou opravdu specifické, a kontrolních vzorků bez templátu (NTC) za účelem zjištění zda nedochází ke tvorbě „primer-dimer“ artefaktů. Všechny páry primerů vykazovaly podobné účinnosti amplifikace a téměř shodná  $C_T$  okolo 18. cyklu s  $CV = 5,26 \%$  (viz Přílohu 2). Ve schopnosti vytváření nespecifických produktů jako nejlepší jevíly páry primerů BStrpA1A-BStrpA1AS, BStrpA2A-BStrpA2AS a BSyxe11A-BSyxe11AS, které nežádoucích artefaktů tvořily nejméně.

Jednotlivé páry primerů byly dále testovány na detekční limit. Za tímto účelem byly amplifikovány diluční série vzorků s koncentracemi  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií templátové DNA na vzorek. Pro realizaci 5' značených primerů byly finálně vybrány sekvence páru primerů BStrpA2A-BStrpA2AS, jelikož jako jediný byl schopen detekovat specifickou sekvenci i ve vzorku, který obsahoval pouze 10 startovních kopií templátové DNA (viz Obr. 21), což je detekční limit, který by měla mít správně zoptimalizovaná real-time PCR metoda (VAERMAN *et al.* 2004).



**Obr. 20: Test kvality 6 párů nemodifikovaných primerů.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky experimentu, kdy bylo všech 6 párů použito k amplifikaci DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ( $10^6$  kopií / vzorek) a vzorků bez templátu (NTC). Jako detekční systém bylo použito barvivo SYBR Green I. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením a vyrovnáním. Všechny páry primerů byly schopny syntézy specifického produktu a víceméně se shodovaly v účinnosti amplifikace, jelikož vykazovaly téměř shodná  $C_T$  okolo 18. cyklu s  $CV = 5,26 \%$  (viz Přílohu 2), lišily se však ve schopnosti vytváření nespecifických produktů. V tomto smyslu se jako nejlepší jeví páry primerů BStrpA1A-BStrpA1AS, BStrpA2A-BStrpA2AS a BSyxe11A-BSyxe11AS. Páry primerů jsou označeny dle amplifikovaného regionu.



**Obr. 21: Detekční limit páru primerů BStrpA2A–BStrpA2AS.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky experimentu, kdy byl pár primerů BStrpA2A–BStrpA2AS, použit k amplifikaci diluční série DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* s koncentracemi  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií / vzorek. Jako detekční systém bylo použito interkalační barvivo SYBR Green I. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením a vyrovnáním. Tento pár primerů byl jako jediný schopen amplifikace specifického produktu i ve vzorku, který obsahoval pouze 10 kopií templátové DNA.

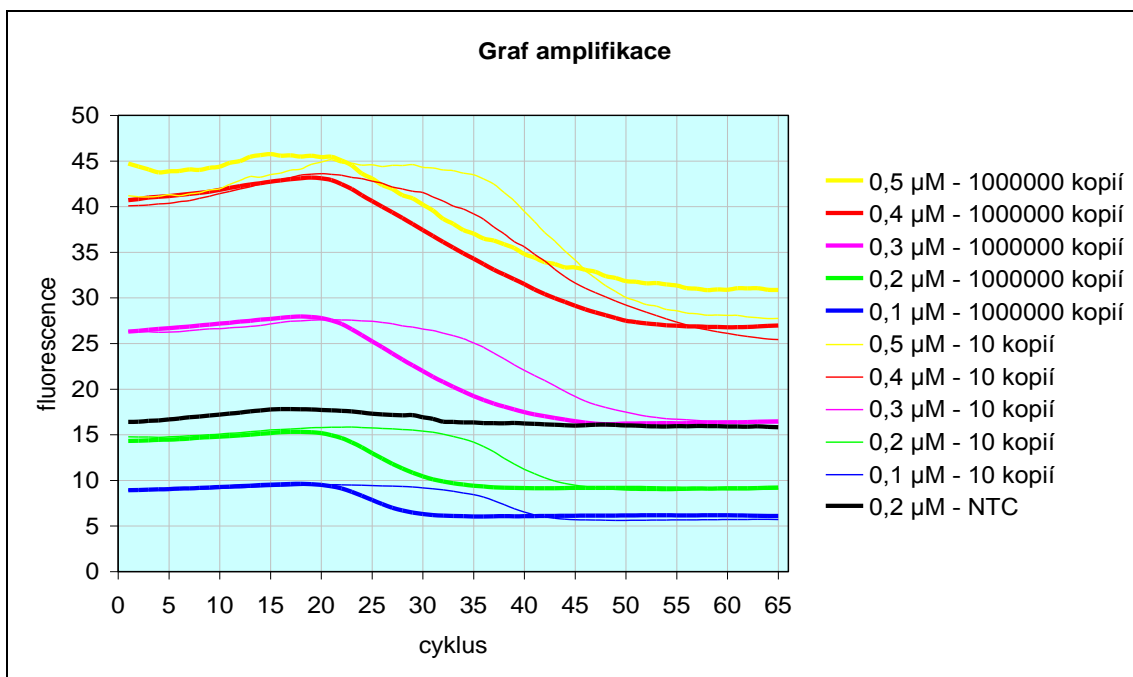
## 4.2 Ověření funkčnosti systému 5' značených primerů a optimalizace reakčních podmínek

Pro první experimenty zaměřené na ověření funkčnosti 5' značených primerů a optimalizaci reakčních podmínek byl použit pár primerů, u nějž byla sekvence jednoho primeru modifikována tak, aby se na jeho 5' konci vyskytoval 1 cytosinový nukleotid značený fluoroforem FAM. Podobně modifikovaný oligonukleotid byl již použit ve studiích s příbuznou tematikou a bylo tudíž téměř jisté, že fluorescence navázaného fluoroforu bude zhasána po inkorporaci do produktu PCR prostřednictvím komplementárního dG (CROCKETT a WITTEWER 2001, KURATA et al. 2001). K modifikaci byla vybrána sekvence primeru BStrpA2AS (viz Tabulku 6 na str. 46), jelikož sekvence primeru BStrpA2A v blízkosti 5' konce obsahuje guaninový nukleotid, který by mohl zhasat fluorescenci navázaného fluoroforu i v případě neinkorporovaného primeru. Primer BStrpA2AS na svém 5' konci již obsahuje dC, takže nebylo nutné pozměňovat jeho sekvenci. V prvotních experimentech byla tedy použita jeho značená varianta BStrpA2C1FAM spolu s nemodifikovaným protějškem BStrpA2A.

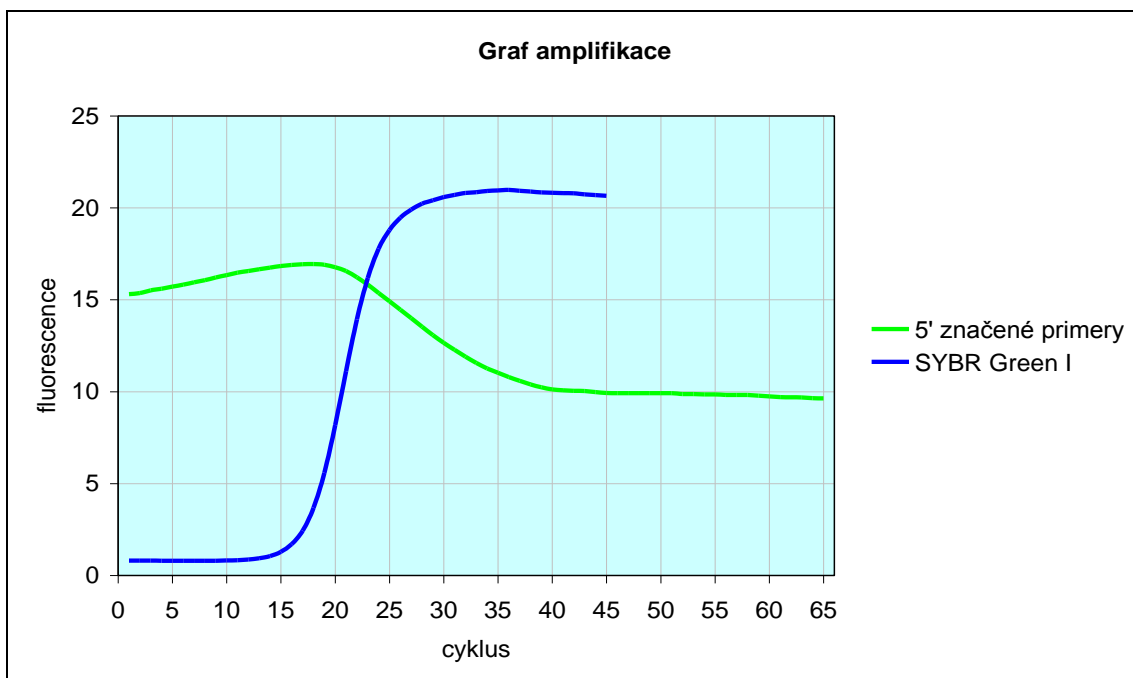
Bylo zjištěno, že během amplifikace opravdu dochází k poklesu fluorescence při vstupu reakce do exponenciální fáze. Co se týče optimalizačních experimentů, považuji za důležité zde uvést, že spolehlivost systému 5' značených primerů silně závisí na použité koncentraci primerů, což je logické, jelikož pokud tato bude příliš vysoká, pak nebude podstatná část primerů zakomponována do produktu amplifikace a míra zhasání nebude mít dostatečný detekovatelný rozsah. Za účelem zoptimalizovat koncentraci primerů byly porovnávány koncentrace 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5  $\mu\text{M}$  (viz Obr. 22). Při vyšších koncentracích (0,3; 0,4; a 0,5  $\mu\text{M}$ ) docházelo ke vzniku velmi nepřehledných amplifikačních křivek. Jako použitelné se naopak jevily koncentrace 0,1 a 0,2  $\mu\text{M}$ . V dalších experimentech byla používána koncentrace 0,2  $\mu\text{M}$ .

Na Obr. 23 je dále uveden detekovatelný rozsah změny intenzity fluorescence při použití 5' značených primerů ve srovnání se SYBR Green I. V případě 5' značených primerů je přibližně poloviční a srovnatelný s rozsahem změny intenzity fluorescence, který lze získat při použití oligonukleotidových sond.





**Obr. 22: Vliv použité koncentrace primerů na výstup metody 5' značených primerů.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky experimentu, kdy byl pár primerů BSN1C1FAM-BStrpA2S použit v různých koncentracích (viz legendu) k amplifikaci templátové DNA o koncentracích  $10^6$  a 10 kopií / vzorek. Nižší koncentrace templátu byla použita za účelem ověření, jestli při nízkých koncentracích primerů nedochází ke zvýšení detekčního limitu. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením. Při vyšších koncentracích primerů docházelo ke vzniku nepřehledných křivek. Jako použitelné se jeví koncentrace 0,1 a 0,2  $\mu\text{M}$ .

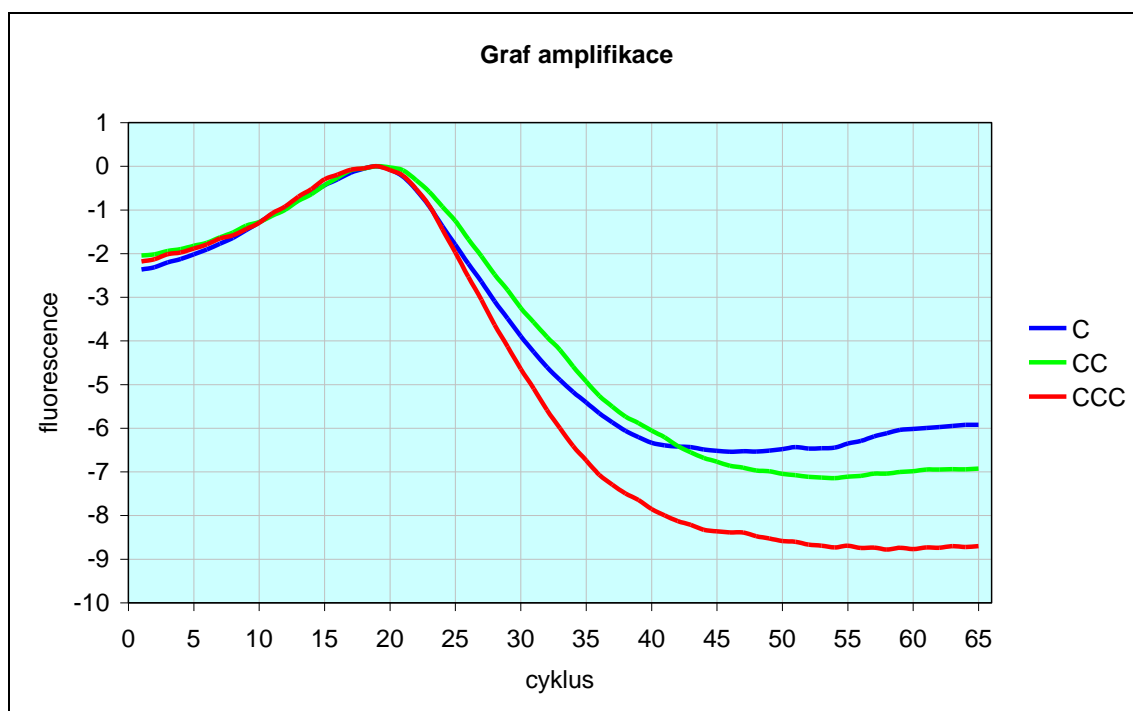


**Obr. 23: Detekovatelný rozsah změny intenzity fluorescence při použití 5' značených primerů ve srovnání se SYBR Green I.** Na obrázku jsou uvedeny amplifikační křivky získané s použitím 5' značených primerů (0,2  $\mu\text{M}$ ) a SYBR Green I. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením. Je patrné, že rozsah změny intenzity fluorescence je při použití 5' značených primerů přibližně poloviční.

### 4.3 Vliv počtu cytosinových nukleotidů na 5' konci primeru

Dále byla řešena otázka, zda je míra zhášení nějak ovlivněna počtem dC (čili komplementárních dG) na 5' konci primeru. Dle studie NAZARENKO a spol. (2002 b), je zhášení fluoroforu umístěného na 5' konci oligonukleotidu zvýšeno přítomností dG-dC páru umístěného v blízkosti tohoto fluoroforu, a to do vzdálenosti 3 pb. Teoreticky by tedy při větším počtu cytosinových nukleotidů, mělo být zhášení intenzivnější.

Za účelem potvrdit tuto domněnku byly porovnávány detekční schopnosti oligonukleotidů s jedním, dvěmi a třemi dC na 5' konci, čili primeru BStrpA2C1FAM použitého ve výše uvedených experimentech a dále primerů BStrpA2C2FAM a BStrpA2C3FAM (viz Obr. 24). Primer BStrpA2C3FAM vykazoval větší míru zhášení a větší sklon amplifikační křivky, než primery s nižším počtem dC. Stojí za zmínku, že přítomnost nukleotidů nekomentárních k templátu neměla negativní vliv na účinnost amplifikace.



**Obr. 24: Vliv počtu cytosinových nukleotidů na 5' konci primeru.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky experimentu, kdy byly páry primerů BStrpA2C1FAM-BStrpA2A (C), BStrpA2C2FAM-BStrpA2A (CC) a BStrpA2C3FAM- BStrpA2A (CCC) použity pro amplifikaci templátové DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* o koncentraci  $10^6$  kopií / vzorek. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením. NTC vzorky byly pro přehlednost vynechány. Z grafu je patrné, že intenzita zhášení byla o něco silnější při použití primeru BStrpA2C3FAM, který na svém 5' konci obsahoval 3 cytosinové nukleotidy.

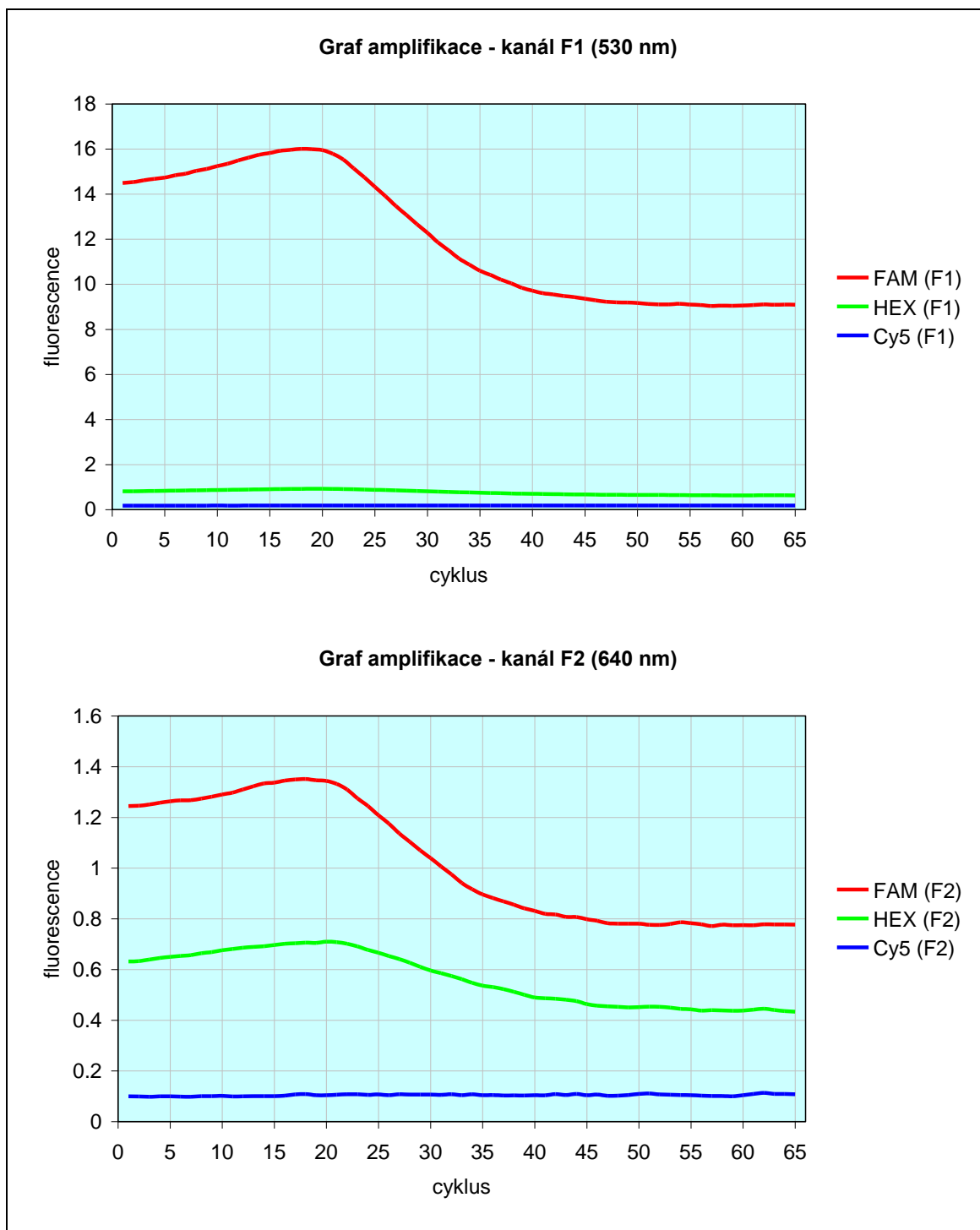
#### 4.4 Vliv značení různými fluorofory

Jedním z teoretických předpokladů metody 5' značených primerů je možnost provádět multiplexní PCR. Aby to bylo možné, je nutné najít fluorofory, které jsou citlivé ke guaninovému zhášení a zároveň mají natolik odlišná emisní spektra, aby jejich signál byl rozlišitelný použitým real-time PCR přístrojem.

Rozhodla jsem se vyzkoušet značení fluorofory FAM s emisním maximem 524 nm, HEX (554 nm) a Cy5 (663 nm), přičemž detekční kanály přístroje LightCycler mají vlnové délky 530 nm, 640 nm a 710 nm. Fluorofor FAM byl vybrán proto, že by měl být velmi citlivý ke zhášení prostřednictvím guaninového nukleotidu (viz Tabulky 1 a 2 na str. 21 a 22) a jedná se o fluorofor přímo určený pro 1. detekční kanál přístroje LightCycler. Fluorofor HEX byl vybrán proto, že by měl být také poměrně citlivý ke guaninovému zhášení (viz Tabulku 2 na str. 22), a jeho emisní maximum 554 nm by rovněž mělo být detekovatelné v 1. kanálu přístroje LightCycler. Fluorofor Cy5 sice není moc citlivý k tomuto zhášení, nicméně je nejcitlivější z fluoroforů detekovatelných ve 2. detekčním kanálu přístroje (viz Tabulku 2 na str. 22).

Z výsledků (viz Obr. 25) je patrné, že zhášení fluoroforu FAM funguje bez problémů. V případě fluoroforu HEX je pokles fluorescence detekovatelný navzdory předpokladům ve 2. detekčním kanálu, a to bohužel díky jeho hodnotě emisního maxima tak slabě, že se toto barvivo nedá pro účely 5' značených primerů na přístroji LightCycler vůbec použít. V případě fluoroforu Cy5 nebyl detekován žádný pokles fluorescence.

Z těchto výsledků vyvozují, že metodou 5' značených primerů nelze provádět multiplexní PCR na přístroji LightCycler s použitím testovaných typů fluoroforů, a to z toho důvodu, že fluorescenční barviva vykazující hodnoty emisních maxim vhodné pro 2. a 3. detekční kanál tohoto přístroje, nejsou dostatečně citlivá ke guaninovému zhášení. Multiplexní PCR by nicméně s tímto detekčním systémem bylo možné provádět s použitím jiných real-time PCR přístrojů, které mají detekční kanály schopné rozlišit fluorofory FAM a HEX (takové přístroje vyrábí například firma BioRad). Dalším fluoroforem, se kterým by systém 5' značených primerů mohl pracovat je barvivo 6-JOE, které je v kombinaci s FAM používáno pro multiplexní PCR s LUX primery, jejichž funkce je rovněž založena na principu nukleotidového zhášení.



**Obr. 25: Vliv značení různými fluorofory.** Na obrázku jsou uvedeny grafy amplifikací z prvního (F1) a druhého (F2) detekčního kanálu přístroje LightCycler při použití párů primerů BStrpA2C3FAM-BStrpA2A, BStrpA2C3HEX-BStrpA2A, BStrpA2C3Cy5-BStrpA2A k amplifikaci templátové DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ( $10^6$  kopií / vzorek). Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením. NTC vzorky pro přehlednost nezobrazeny. V kanálu F1 lze pozorovat výrazný pokles fluorescence v případě fluoroforu FAM. V kanálu F2 pak dále mírný pokles v případě fluoroforu HEX. V případě fluoroforu Cy5 nebyla detekována žádná změna.

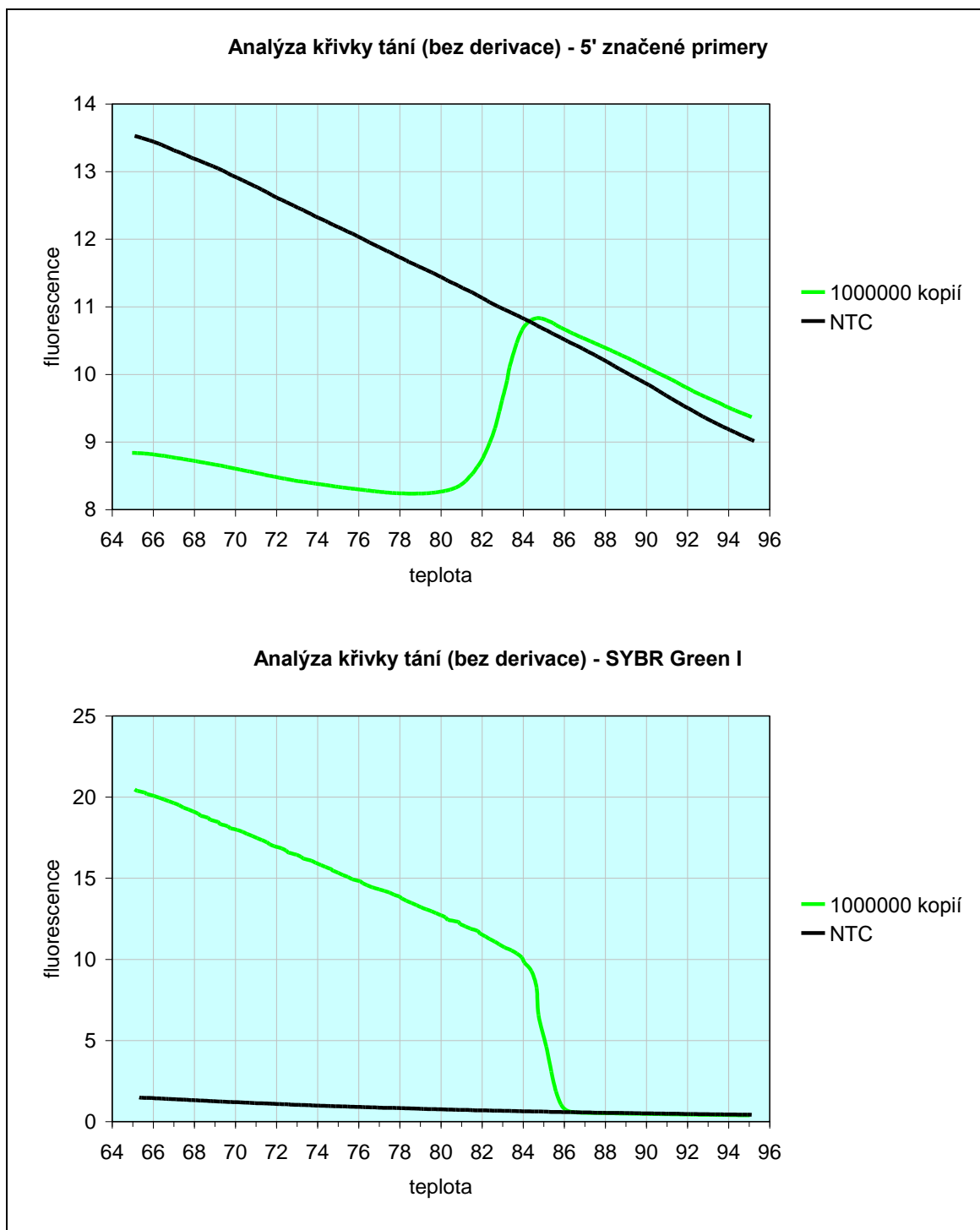
## 4.5 Analýza křivky tání

Specifita detekce je u real-time PCR zpravidla ověřována prostřednictvím analýzy křivky tání. Dobrý detekční systém by proto měl provedení této analýzy umožňovat. Systém 5' značených primerů byl navržen tak, aby byl schopen analýzy křivky tání, avšak s jistými odlišnostmi od obvyklých detekčních systémů. Fluorescence by při tání DNA měla začít náhle stoupat v okolí  $T_m$  následkem prostorového oddělení fluoroforu od zhášejících guaninových nukleotidů. Křivka tání by proto měla při teplotách blízkých  $T_m$  mít stoupající tendenci namísto klesající a graf druhé derivace křivky tání by rovněž měl mít opačnou vertikální orientaci - tzn. vrcholy „peaků“ by měly směřovat dolů.

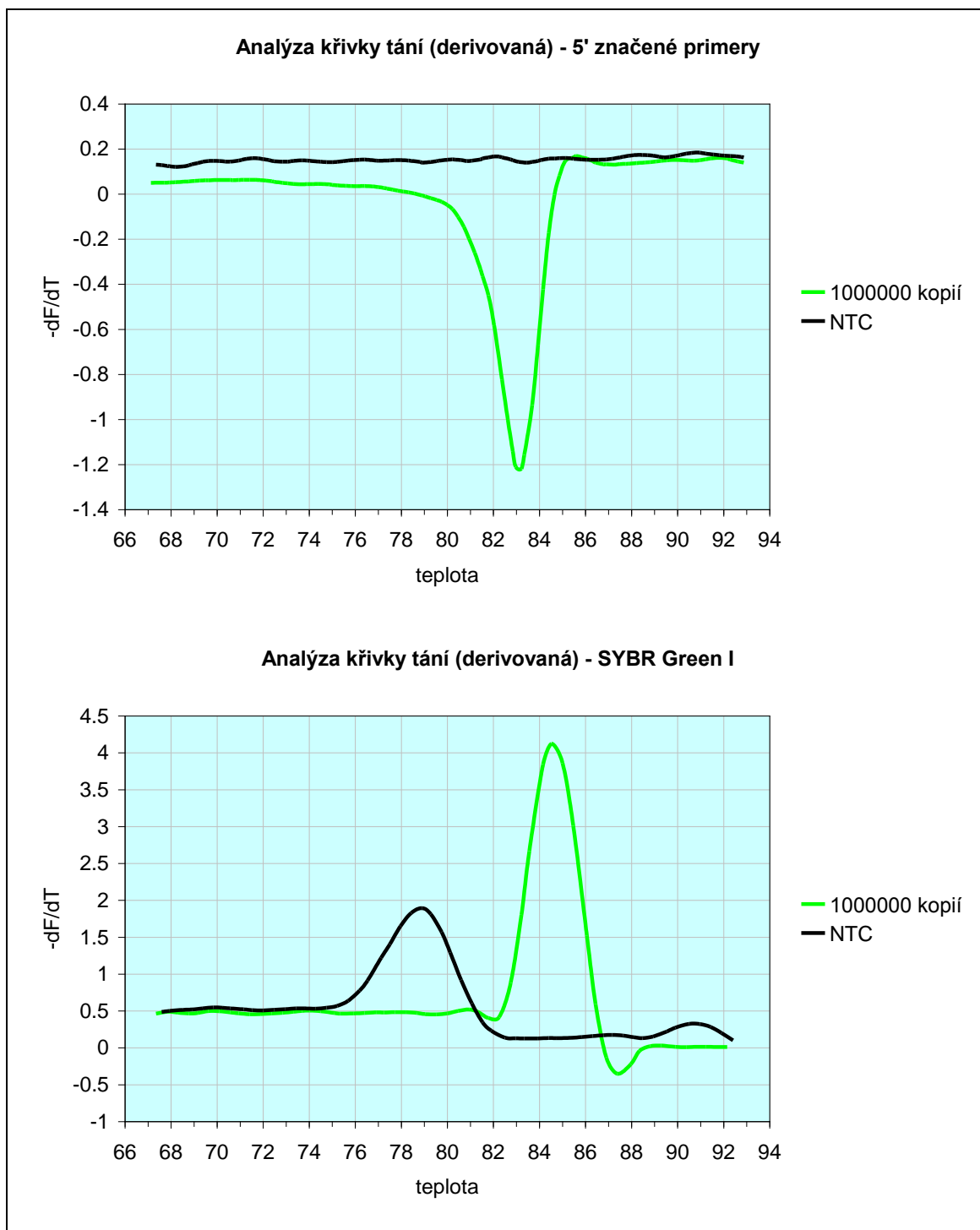
Na Obr. 26 a 27 jsou zobrazeny výstupy analýzy křivky tání při použití nejlépe fungující varianty 5' značených primerů (BStrpA2C3FAM-BStrpA2A) a SYBR Green I. Na Obr. 26 jsou znázorněny holé křivky tání, tzn. grafy závislosti naměřené fluorescence na teplotě. Z obrázku je patrné, že při použití 5' značených primerů fluorescence v okolí  $T_m$  opravdu strmě stoupá a při použití SYBR Green I naopak strmě klesá. Na Obr. 27 jsou znázorněny derivované křivky tání, tzn. grafy závislosti záporné hodnoty derivace křivky tání na teplotě. Z obrázku je patrné, že „peaky“ v případě 5' značených primerů mají opravdu opačnou vertikální orientaci ve srovnání se SYBR Green I.

$T_m$  produktu PCR je dle analýzy křivky tání v případě použití 5' značených primerů rovna 83,1 °C, v případě použití SYBR Green I pak 84,8 °C. Teoreticky by však teplota tání produktu PCR měla být při použití 5' značených primerů spíše o něco vyšší vlivem většího počtu dG-dC párů. Posun v naměřené hodnotě  $T_m$  je pravděpodobně způsoben odlišným principem funkce obou detekčních systémů. V případě SYBR Green I je k vyslání signálu nutné výrazné narušení dvouřetězcové struktury DNA, tzn. denaturace celé molekuly amplikonu. V případě 5' značených primerů k vyslání signálu naopak stačí prostorové oddělení fluoroforu, umístěného na 5' konci primeru, od zhášejících komplementárních guaninových nukleotidů, a tudíž „roztátí“ pouze koncových částí molekuly amplikonu, ke kterému dochází již při nižší teplotě.

Ráda bych poznamenala, že s analýzou křivky tání s pomocí 5' značených primerů si bez sebemenších problémů poradil LightCycler software dodaný výrobcem.

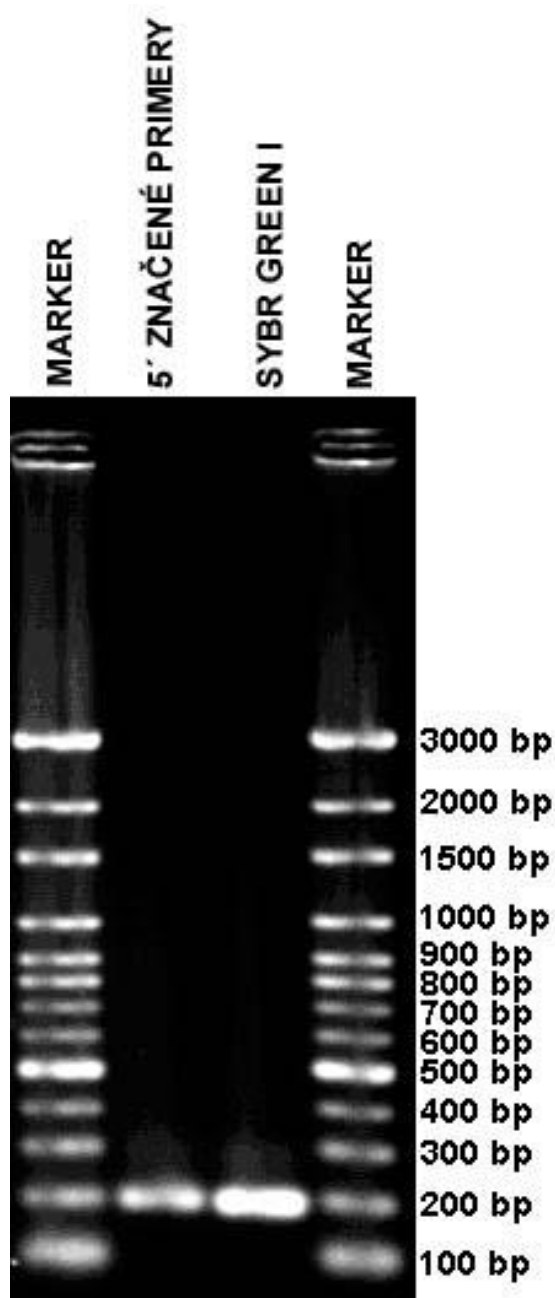


**Obr. 26: Analýza křivky tání (bez derivace) – 5' značené primery vs. SYBR Green I.** Na obrázku jsou uvedeny grafy křivek tání po amplifikaci vzorku o koncentraci templátové DNA  $10^6$  kopií / vzorek a vzorku bez obsahu templátové DNA (NTC). V případě 5' značených primerů fluorescence v okolí  $T_m$  strmě stoupá, v případě SYBR Green I naopak strmě klesá. Celková mírně klesající tendence křivek je dána závislostí fluorescence na teplotě (při zvyšování teploty samovolně klesá).



**Obr. 27: Analýza křivky tání (derivovaná) – 5' značené primery vs. SYBR Green I.** Na obrázku jsou uvedeny grafy derivovaných křivek tání po amplifikaci vzorku o koncentraci templátové DNA  $10^6$  kopií / vzorek a vzorku bez obsahu templátové DNA (NTC). V případě 5' značených primerů mají „peaky“ opačnou vertikální orientaci oproti SYBR Green I. Výsledná  $T_m$  produktu PCR je v případě použití 5' značených primerů rovna  $83,1\text{ }^\circ\text{C}$ , v případě použití SYBR Green I pak  $84,8\text{ }^\circ\text{C}$ . Posun v hodnotě  $T_m$  je pravděpodobně způsoben odlišným principem funkce obou detekčních systémů.

Za účelem ověření zda je analýza křivky tání spolehlivá, tzn. zda opravdu vzniká produkt správné velikosti, byla provedena gelová elektroforéza produktu PCR. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 28. Polohy proužků odpovídají předpokládaným velikostem produktů 195 pb pro 5' značené primery a 193 pb pro nemodifikovaný pár primerů.



**Obr. 28: Gelová elektroforéza produktů PCR reakce – testování metody 5' značených primerů.** V experimentu byl použit produkt PCR amplifikace templátové DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ( $10^6$  kopií / vzorek) při použití páru 5' značených primerů BStrpA2C3FAM-BStrpA2A a nemodifikovaných primerů BStrpA2AS-BStrpA2A v kombinaci se SYBR Green I. Polohy proužků odpovídají předpokládaným hodnotám (viz Tabulku 16 na str. 53).



## 4.6 Vyhodnocení spolehlivosti metody a srovnání se SYBR Green I

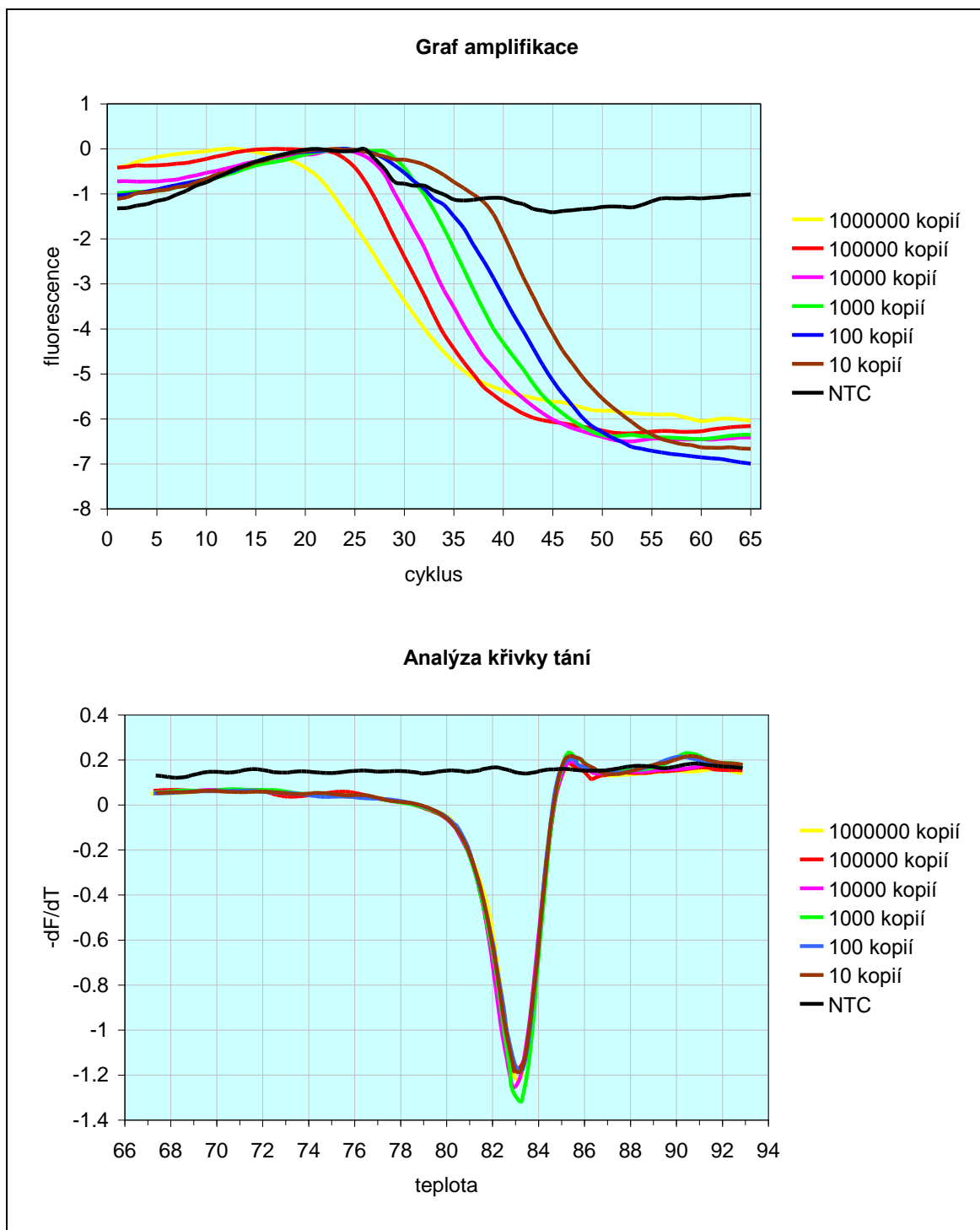
U každé real-time PCR metody je nutné vyhodnotit její detekční limit, linearitu kalibrační přímky, opakovatelnost a specifitu. Tyto parametry byly posouzeny pro real-time PCR s 5' značenými primery a porovnány se stejnými parametry získanými při použití SYBR Green I v real-time PCR reakcích s odpovídajícími (ale nemodifikovanými) sekvencemi primerů. V případě 5' značených primerů byly použity primery BStrpA2C3FAM-BStrpA2A, protože se jedná o variantu, která v předchozích experimentech vykazovala nejlepší vlastnosti.

### 4.6.1 Detekční limit, linearita a opakovatelnost

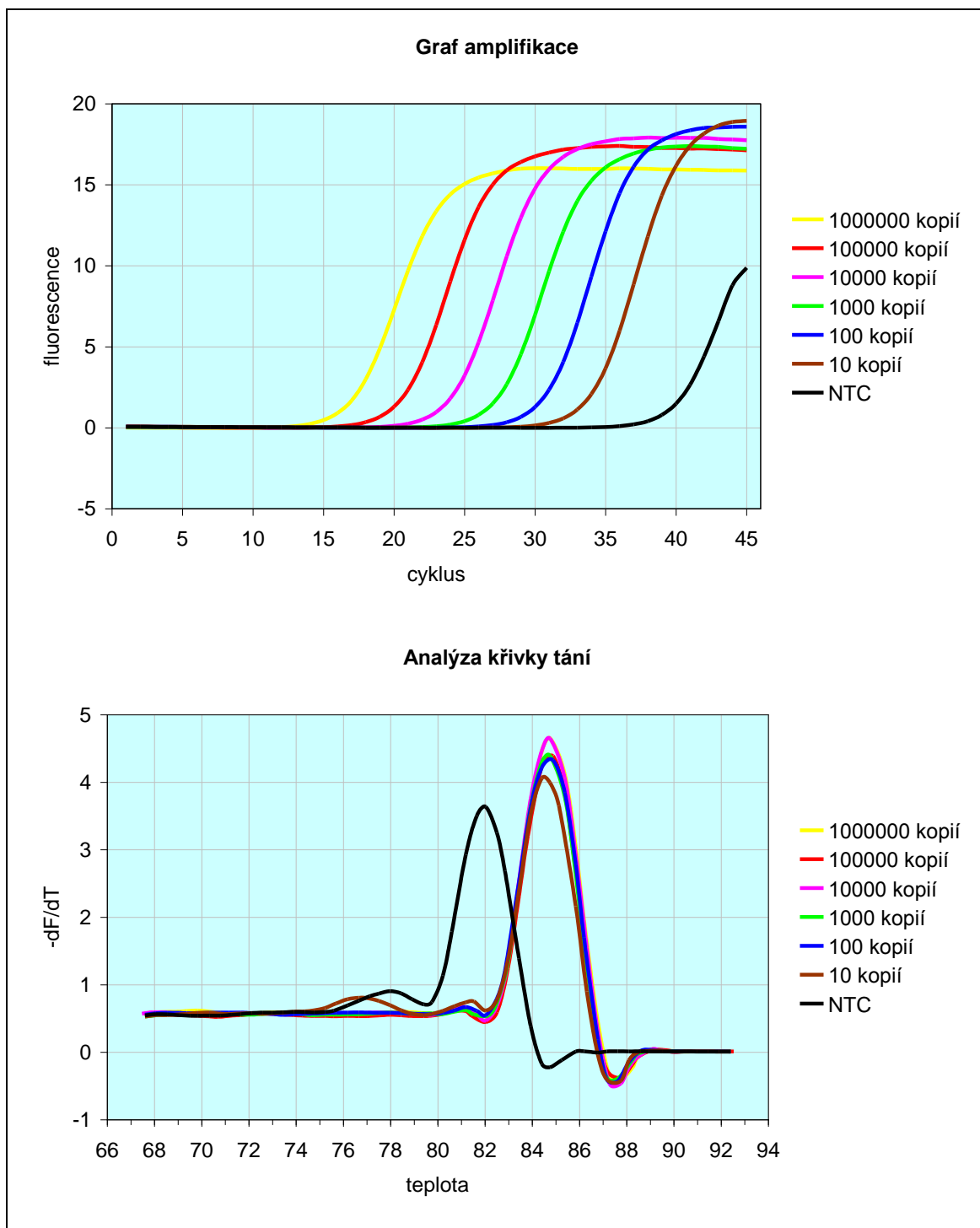
Za účelem vyhodnocení těchto parametrů bylo provedeno několik opakování amplifikace diluční série standardů o koncentracích templátové DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií na vzorek. Tato amplifikace byla provedena celkem 6-krát pro 5' značené primery a 6-krát pro SYBR Green I.

Detekční limit (citlivost detekce) je nejmenší množství templátové DNA, při kterém ještě dochází k amplifikaci specifického produktu. Dobrá real-time PCR metoda by měla mít detekční limit alespoň 10 kopií templátové DNA na vzorek (VAERMAN *et al.* 2004). V případě 5' značených primerů i SYBR Green I docházelo k syntéze specifického produktu v celém rozsahu koncentrací ve všech opakováních experimentu. Výsledky vybraných experimentů jsou uvedeny na Obr. 29 a 30.

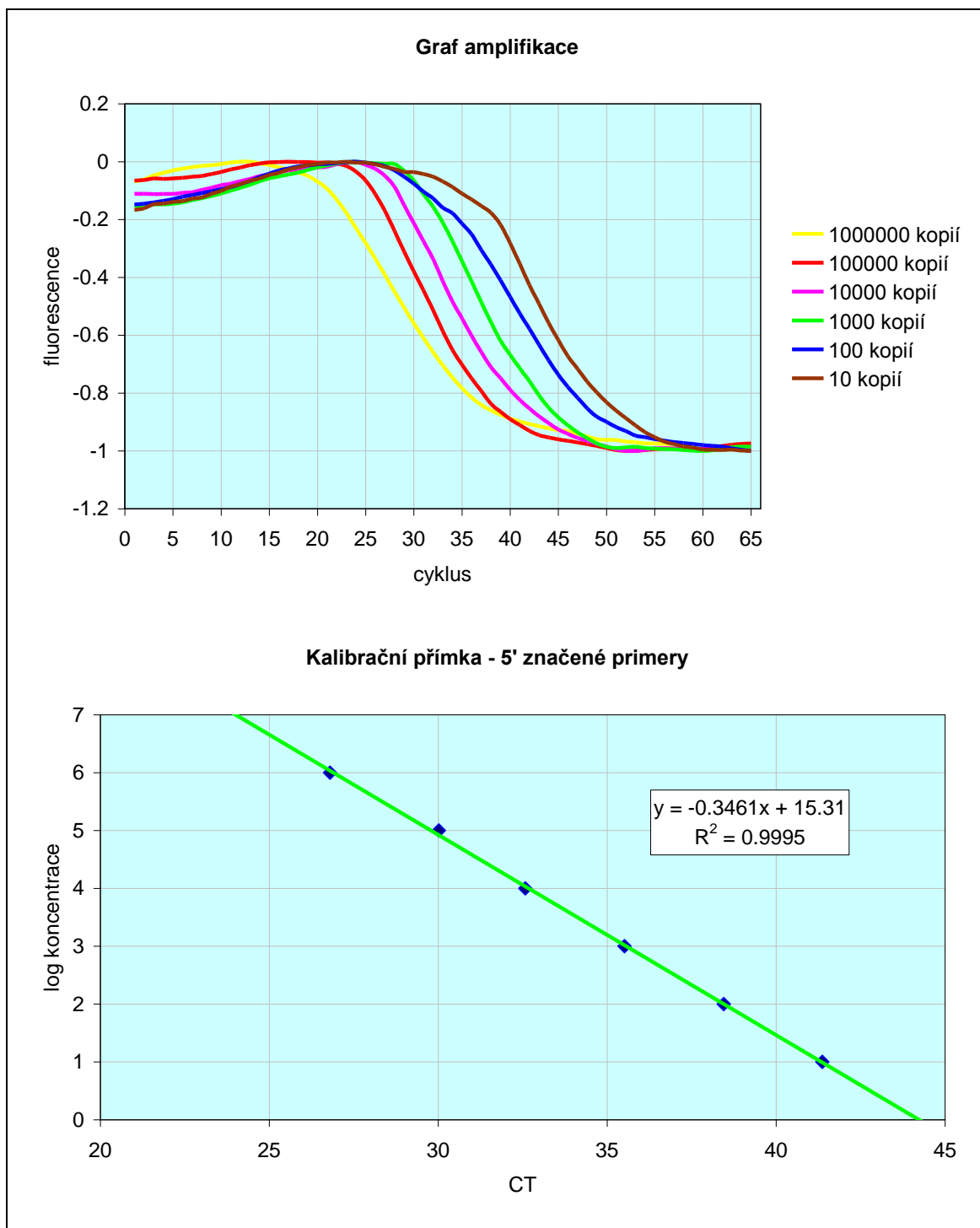
Kvantifikační schopnosti real-time PCR metody jsou determinovány linearitou kalibrační přímky získané vynesemím dekadických logaritmů koncentrací standardů oproti jejich  $C_T$ . Dobrá kvantitativní real-time PCR musí mít kalibrační přímku s koeficientem determinace vyšším než 0,98. Kalibrační přímky sestavené z výsledných  $C_T$  jednotlivých opakování amplifikací dilučních sérií vykazovaly koeficienty determinace 0,9981; 0,9907; 0,9995; 0,9866; 0,9946 a 0,9979 u 5' značených primerů a 0,9966; 0,9994; 0,9997; 0,9916; 0,9824 a 0,9804 u SYBR Green I (viz Přílohu 3) a v každém případě splňovaly žádané rozmezí. Výsledky vybraných experimentů jsou uvedeny na Obr. 31 a 32.



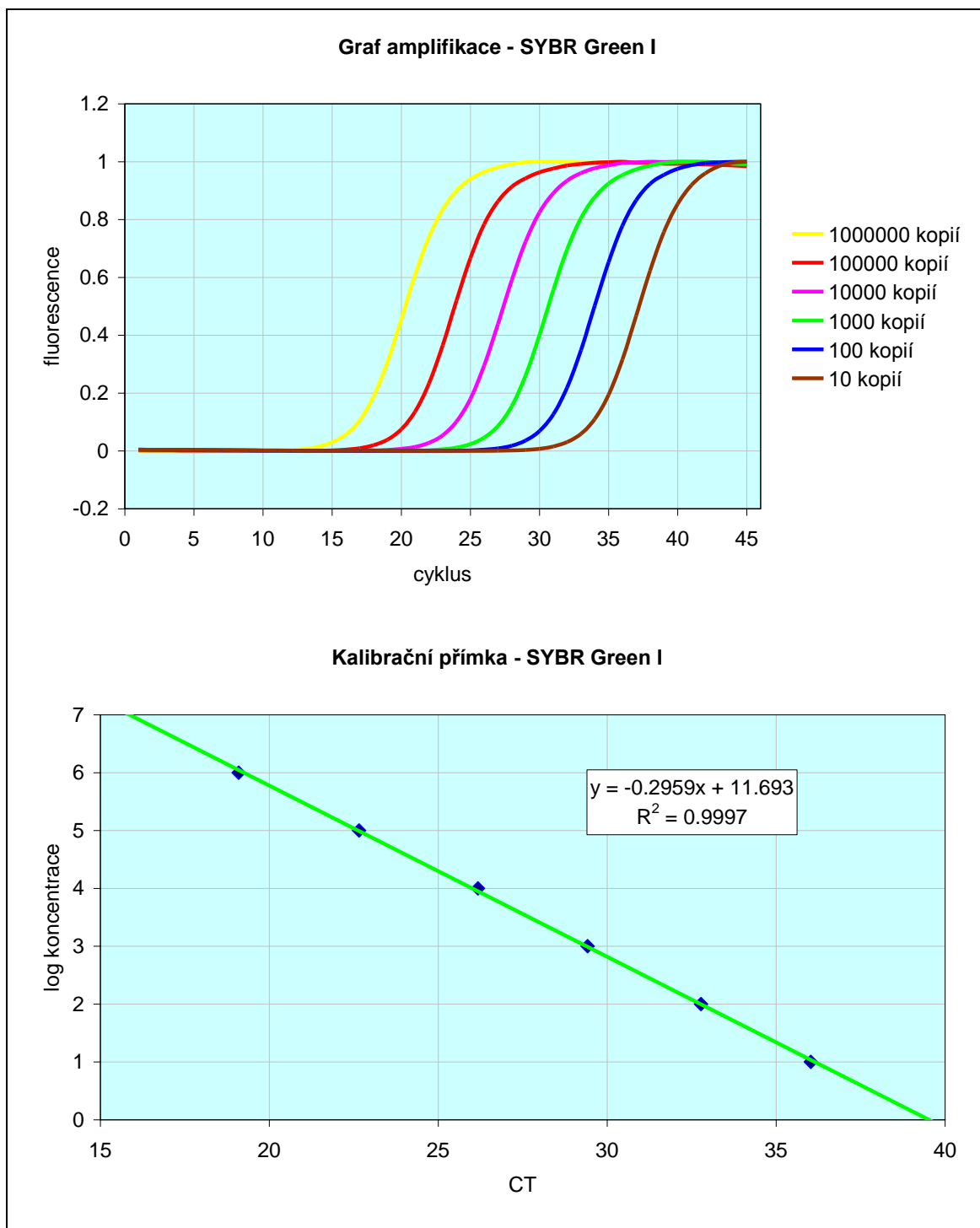
**Obr. 29: Detekční limit – 5' značené primery.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky experimentu, kdy byla amplifikována diluční série templatové DNA o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a 10 kopií / vzorek. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením a vyrovnaním. Z grafů je patrné, že docházelo k detekci specifické sekvence v celém rozsahu koncentrací.



**Obr. 30: Detekční limit – SYBR Green I.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky experimentu, kdy byla amplifikována diluční série templatové DNA o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a 10 kopií / vzorek. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením a vyrovnáním. Z grafů je patrné, že docházelo k detekci specifické sekvence v celém rozsahu koncentrací.



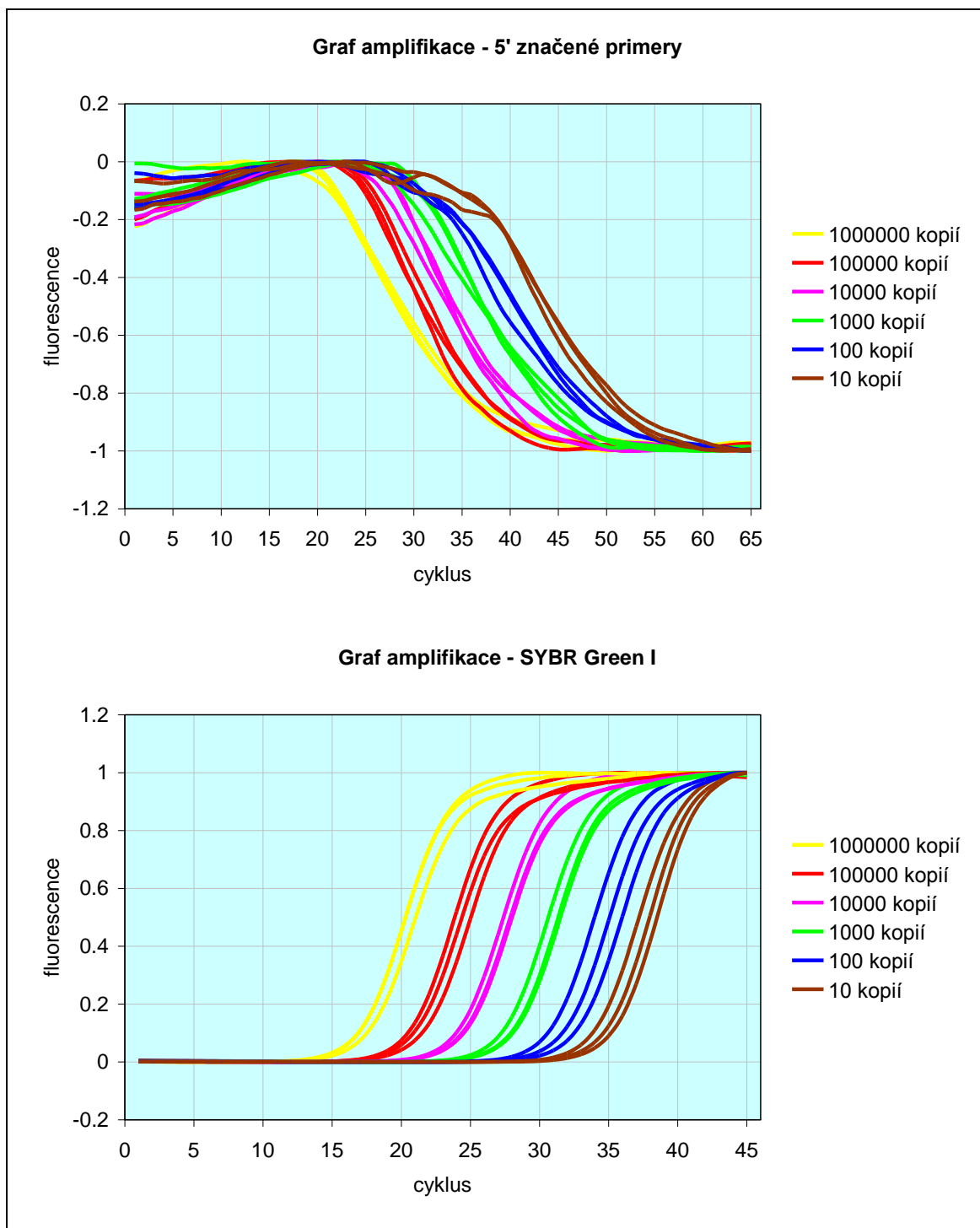
**Obr. 31: Kalibrační přímka – 5' značené primery.** Na obrázku je zobrazen graf amplifikace diluční série templátové DNA o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií / vzorek a získaná kalibrační přímka. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením, vyrováním a normalizací. NTC vzorek pro přehlednost vynechán. Poloha fluorescenčního prahu byla nastavena automaticky na  $T = -0,38$ . Byla získána kalibrační přímka s koeficientem determinace  $R^2$  vyšším než 0,98.



**Obr. 32: Kalibrační přímka – SYBR Green I.** Na obrázku je zobrazen graf amplifikace diluční série templátové DNA o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií / vzorek a získaná kalibrační přímka. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením, vyrovnáním a normalizací. NTC vzorek pro přehlednost vynechán. Poloha fluorescenčního prahu byla nastavena automaticky na  $T = 0,32$ . Byla získána kalibrační přímka s koeficientem determinace  $R^2$  vyšším než 0,98.

Opakovatelnost znamená schopnost metody podávat stále stejné výsledky při opakování pokusů. Pro metodu real-time PCR je vzhledem k její citlivosti charakteristické, že dochází k rozdílům v hodnotách naměřených  $C_T$  v závislosti na časovém období provádění experimentu. Je to způsobeno například rozdílným stavem použitých reagensů (částečná degradace primerů při jejich opakovaném zmrazování a rozmrazování), použitím odlišné pipety a pod. Pro real-time PCR je však zejména podstatné, aby kalibrační přímka, kterou je z výše uvedených důvodů vhodné sestavit znovu pro každý real-time PCR experiment, vždy vykazovala silnou korelaci mezi výchozím počtem kopií templátové DNA a naměřeným  $C_T$  ( $R^2 > 0,98$ ). Jak už bylo uvedeno v předchozím textu, tak v tomto směru vykazuje metoda 5' značených primerů velmi dobré vlastnosti.

Přesto je však vhodné vyhodnotit variabilitu  $C_T$  získaných pro jednotlivé koncentrace templátové DNA při opakování experimentů. V případě 5' značených primerů bylo dosaženo variačních koeficientů (CV) 3,16; 1,47; 2,53; 1,22; 2,42 a 1,59 %, v případě SYBR Green I pak 1,87; 2,12; 1,14; 1,06; 2,58 a 1,61 % (hodnoty odpovídají koncentracím  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií na vzorek, viz Přílohu 4). Správně zoptimalizovaná real-time PCR metoda by měla vykazovat variační koeficienty rovné přibližně 1% v rozsahu koncentrací  $10^2$  –  $10^5$  kopií na vzorek (VAERMAN *et al.* 2004). I přesto, že výše uvedené hodnoty jsou o něco vyšší, považuji variabilitu při opakování experimentů za nízkou a hlavně mezi oběma použitými metodami za srovnatelnou. Pro názornost jsou na Obr. 33 uvedeny výsledné grafy 3 opakovaní amplifikace diluční série sloučené do jednoho grafu.



**Obr. 33: Opakovatelnost metody – 5' značené primery vs. SYBR Green I.** Pro představu o opakovatelnosti obou metod jsou na obrázku zobrazeny grafy 3 amplifikací dilučních sérií vzorků s koncentracemi templátové DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií na vzorek sloučené do jednoho grafu. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením, vyrovnáním a normalizací. NTC vzorky pro přehlednost nezobrazeny.

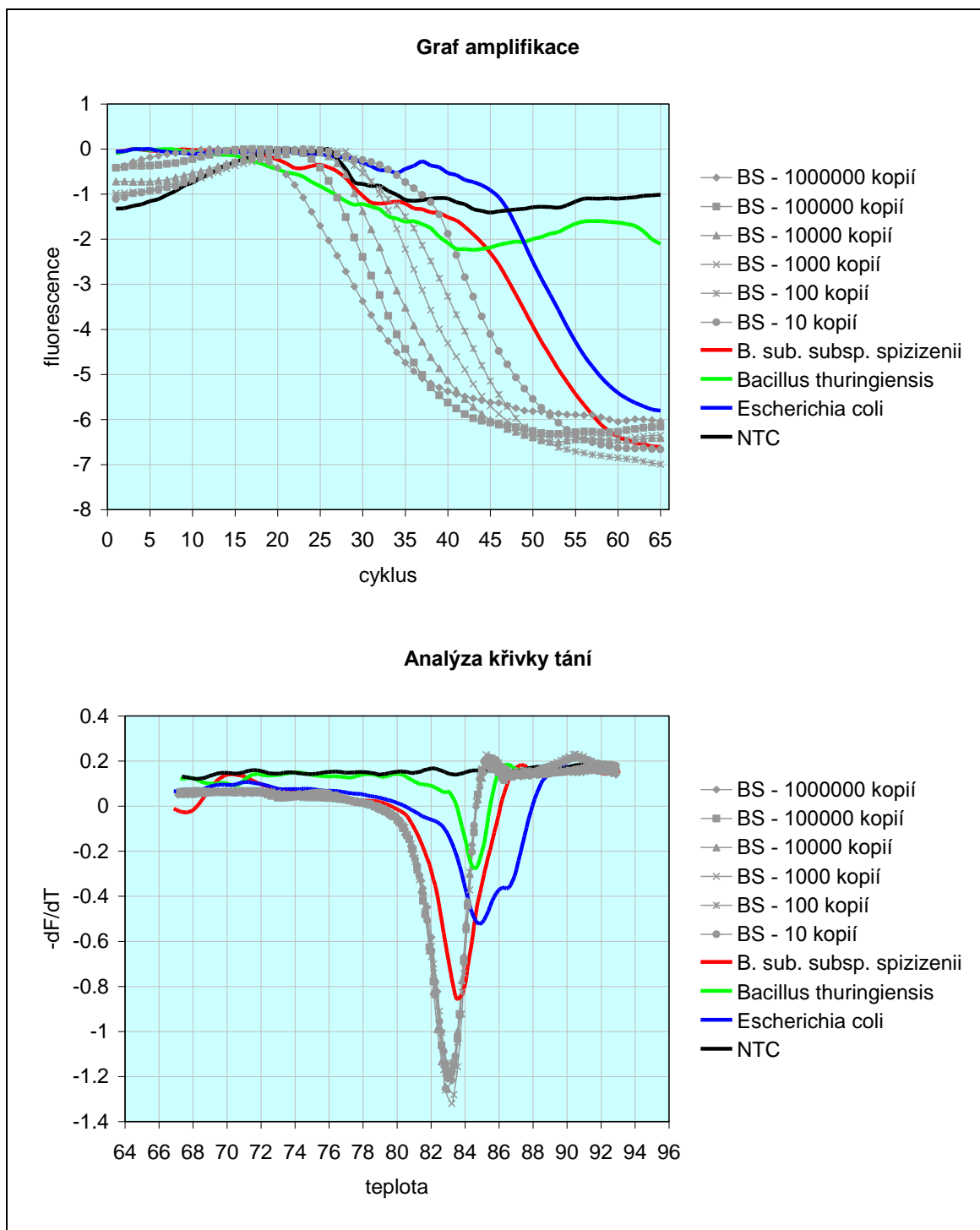
#### 4.6.2 Specifita

Specifitu u real-time PCR lze chápat na dvou úrovních. Metoda je specifická za prvé pokud nedochází ke zkřížené reaktivitě – tzn. k detekci DNA pocházející z jiných zdrojů a za druhé pokud nedochází k detekci nespecifických produktů amplifikace, jako jsou „primer-dimer“ artefakty, a balastní DNA.

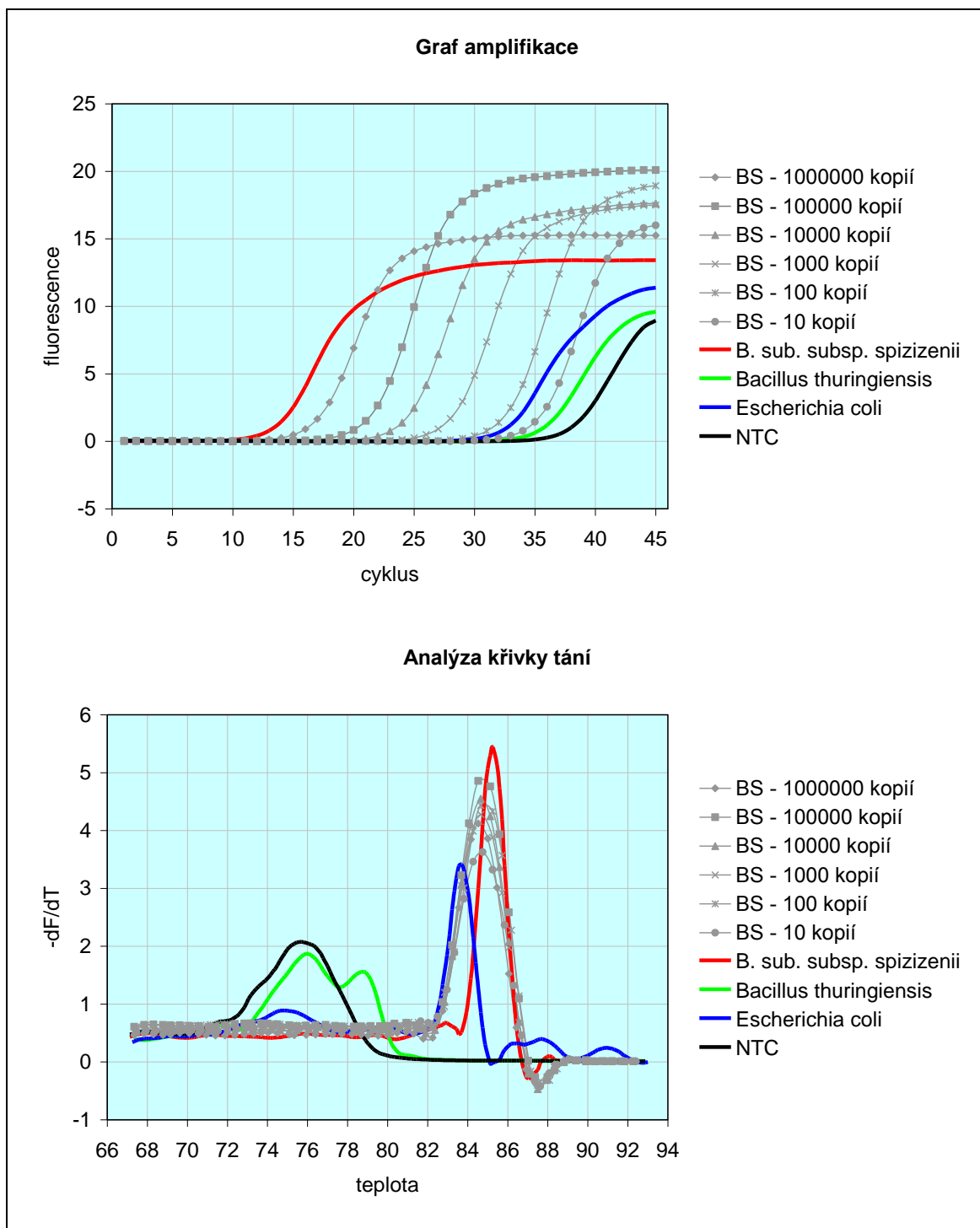
Za účelem prověření zkřížené reaktivity byla jako templát použita DNA kmenů *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, jako představitele odlišného kmene stejného druhu, *Bacillus thuringiensis*, jako představitele odlišného druhu stejného rodu, a *Escherichia coli*, jako představitele gramnegativních bakteriálních druhů (viz Obr. 34 a 35). Dle výsledků analýzy křivky tání u obou detekčních systémů nedocházelo ve vzorcích obsahujících cizorodou DNA ke vzniku specifických produktů, což naznačuje správně navržené sekvence primerů. Ve všech těchto vzorcích však docházelo k syntéze různých produktů nespecifických a tudíž ke vzniku amplifikačních křivek. V případě 5' značených primerů lze pozorovat vyšší specifitu oproti SYBR Green I co se týče detekce těchto nespecifických produktů, jelikož amplifikační křivky vzorků obsahujících cizorodou DNA, které přestože byly použity ve vysoké koncentraci  $10^6$  kopií templátu na vzorek, vykazovaly vždy vyšší  $C_T$  než nejnižší koncentrace (10 kopií / vzorek) diluční série vzorků obsahujících cílovou DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. Výrazný rozdíl v amplifikaci DNA kmene *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* mezi oběma detekčními systémy lze vysvětlit přísnějšími podmínkami pro hybridizaci v případě 5' značených primerů danými nižší použitou koncentrací primerů a přítomností nekomplementárních nukleotidů na 5' konci.

Za účelem prověření detekce nespecifických produktů, jako jsou „primer-dimer“ artefakty bylo amplifikováno několik vzorků bez templátové DNA, protože pokud v takových vzorcích vzniká nějaký produkt, tak musí jít právě o „primer-dimer“ artefakty. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 36. Je patrné, že v případě 5' značených primerů docházelo k detekci nespecifických produktů v menší míře než v případě SYBR Green I.

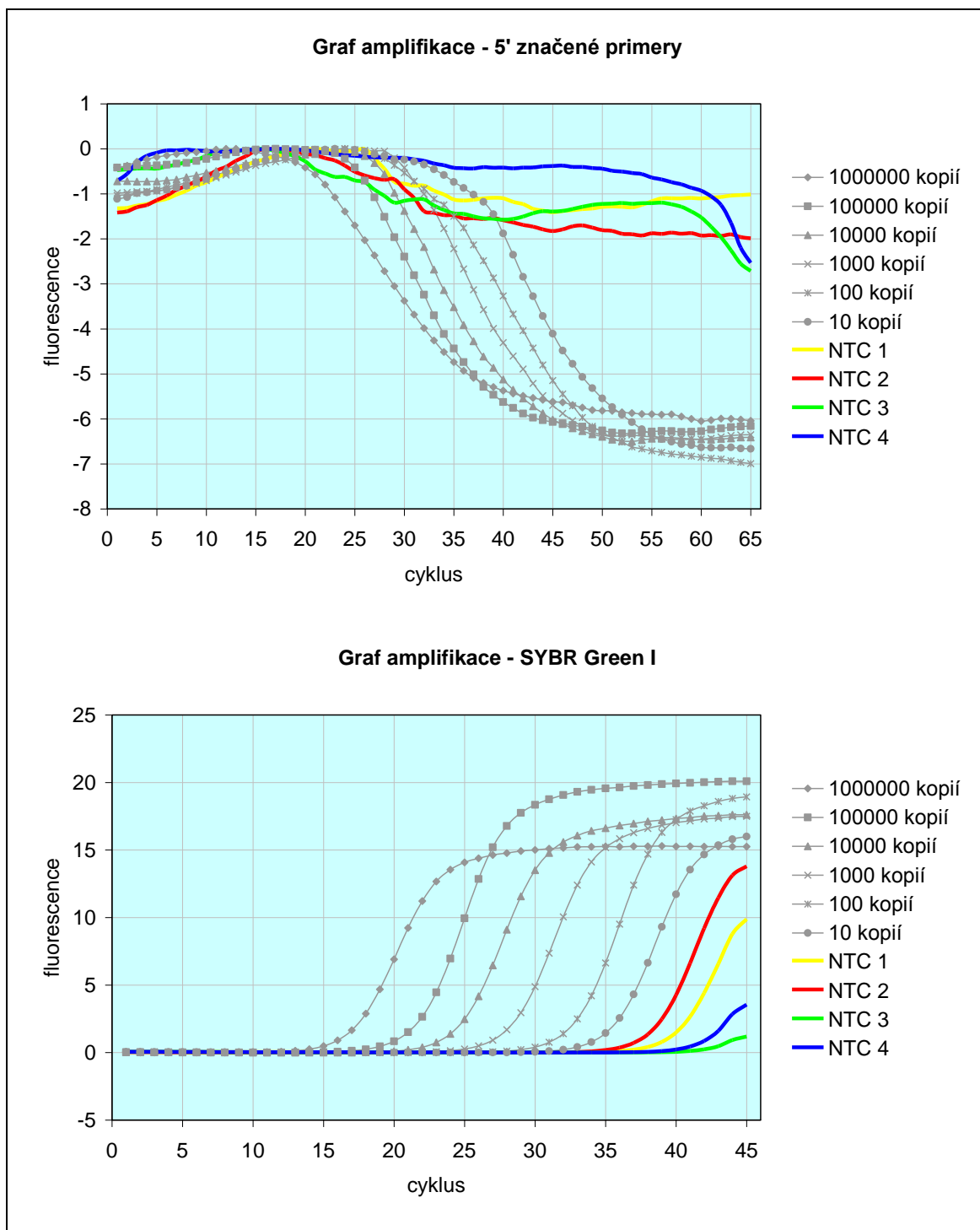




**Obr. 34: Amplifikace cizorodé DNA – 5' značené primery.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky amplifikace vzorků obsahujících DNA *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus thuringiensis* a *Escherichia coli* o koncentraci  $10^6$  kopií / vzorek. Pro názornost jsou v grafu dále zobrazeny amplifikační křivky diluční série DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (BS). Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením a vyrovnáním. U cizorodých kmenů nedocházelo dle analýzy křivky tání ke tvorbě specifických produktů, avšak docházelo ke tvorbě produktů nespecifických, přičemž  $C_T$  jejich amplifikačních křivek byla ve všech případech vyšší než hodnoty  $C_T$  vzorků diluční série vzorků obsahujících DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*.



**Obr. 35: Amplifikace cizorodé DNA – SYBR Green I.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky amplifikace vzorků obsahujících DNA *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus thuringiensis* a *Escherichia coli* o koncentraci  $10^6$  kopií / vzorek. Pro názornost jsou v grafu dále zobrazeny amplifikační křivky diluční série vzorků DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (BS). Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením a vyrovnáním. U cizorodých kmenů nedocházelo dle analýzy křivky tání ke tvorbě specifických produktů, avšak docházelo ke tvorbě produktů nespecifických, přičemž  $C_T$  jejich amplifikačních křivek byla v případě *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* a *Escherichia coli* nižší než  $C_T$  vzorku s nejnižší koncentrací DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*.



**Obr. 36: Amplifikace negativních kontrolních vzorků.** Na obrázku jsou uvedeny výsledky amplifikace 4 vzorků bez templátové DNA (NTC). Pro názornost jsou v grafu dále vidět amplifikační křivky diluční série vzorků DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (BS) o koncentracích 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> a 10<sup>1</sup> kopií / vzorek. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením a vyrovnáním. V případě 5' značených primerů docházelo k detekci nescifických produktů jako jsou „primer-dimer“ artefakty v menší míře než u SYBR Green I.

## 4.7 Detekce *Bacillus anthracis*

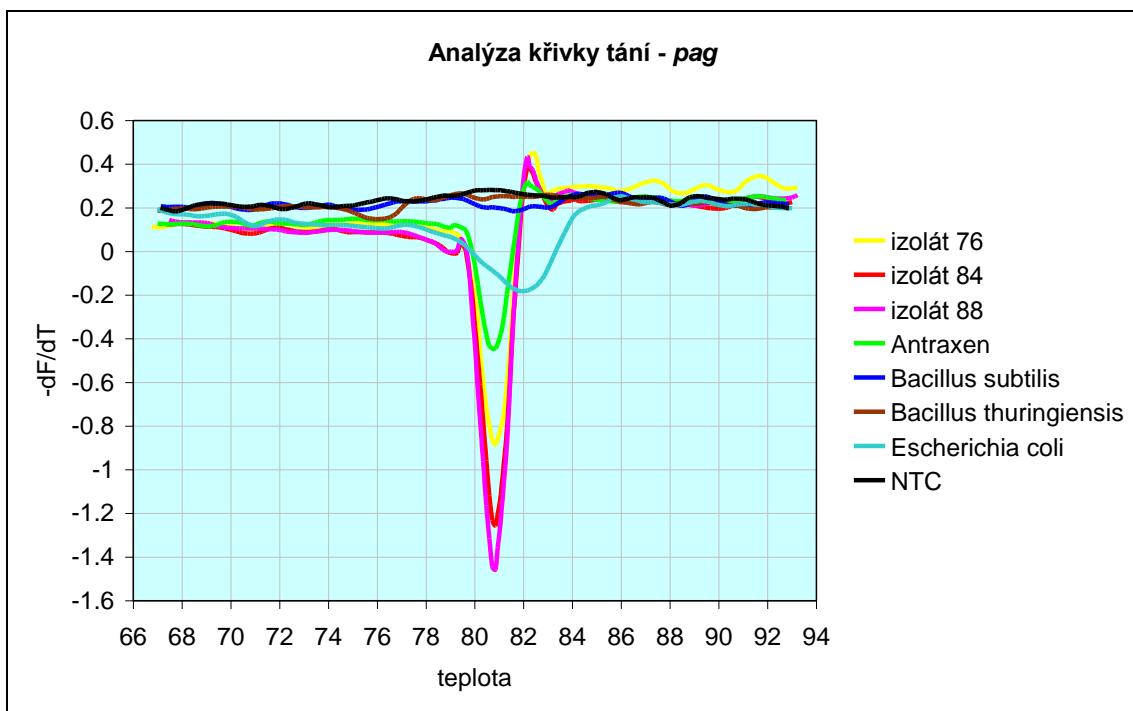
Metoda 5' značených primerů byla dále aplikována pro vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro patogen *Bacillus anthracis*. Obdobný detekční systém ještě nebyl k detekci tohoto patogenu použit (viz Přílohu 1). Byly využity sekvence 3 párů primerů doporučené Světovou zdravotnickou organizací pro detekci *Bacillus anthracis* pomocí PCR (TURNBULL 1998). Tyto páry primerů jsou specifické pro sekvence přítomné na plazmidu pXO1 (gen *pagA*), plazmidu pXO2 (gen *capB*) a chromozomální marker *sap*. Sekvence jednoho primeru z každého páru byla pozměněna tak, aby primer na svém 5' konci obsahoval 3 cytosinové nukleotidy a fluorofor FAM navázaný k 5' koncové fosfátové skupině, protože se jedná o variantu, která v předchozích experimentech vykazovala nejlepší vlastnosti. Druhý primer z každého páru byl opět použit nemodifikovaný. Sekvence primerů jsou shrnuty v Tabulce 10. Záměrně jsem použila již navržené sekvence primerů, abych prokázala, že systém 5' značených primerů se dá aplikovat na jakýkoliv existující pár primerů.

### 4.7.1 Specifita primerů

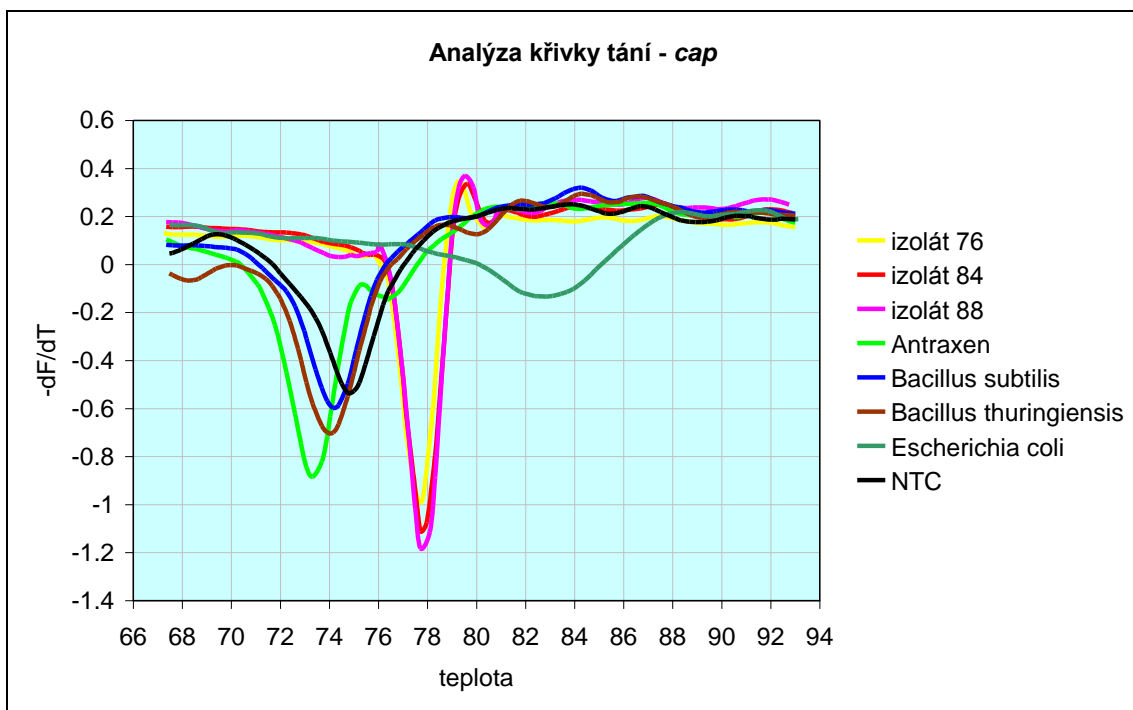
Specifita primerů, čili schopnost detekovat DNA *Bacillus anthracis* a nedetekovat cizorodou DNA, byla ověřována pomocí DNA 3 izolátů *Bacillus anthracis*, DNA izolované z vakcíny Antraxen a cizorodé DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, jako představitele dalšího druhu rodu *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis*, jako představitele dalšího druhu „*Bacillus cereus* group“ a *Escherichia coli*, jako představitele gramnegativních bakteriálních druhů.

Na Obr. 37, 38 a 39 jsou uvedeny výsledky analýz křivky tání po real-time PCR amplifikaci zmíněných bakteriálních kmenů při použití jednotlivých párů primerů. Je vidět, že všechny 3 páry primerů byly perfektně specifické. Stojí za povšimnutí, že v případě vakcíny Antraxen opravdu nebyl detekován plazmid pXO2 (viz Obr. 38).

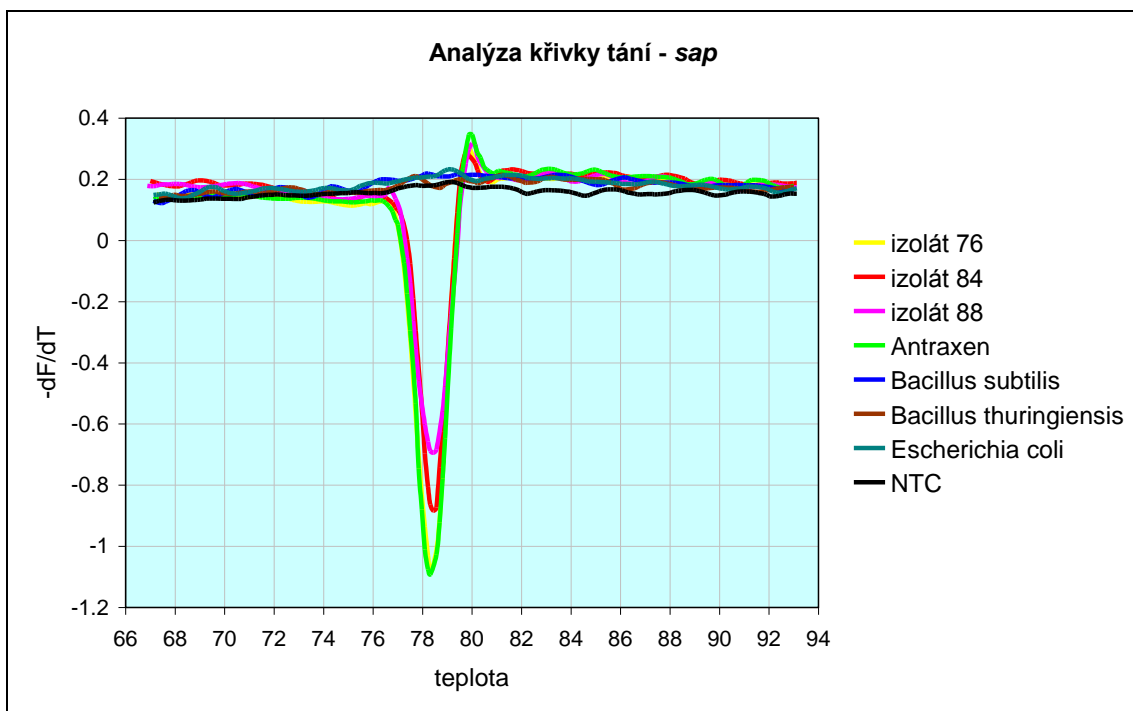
Za účelem ověření, jestli opravdu dochází k amplifikaci správných sekvencí, byla provedena elektroforetická analýza produktů PCR (viz Obr. 40). Polohy proužků odpovídají předpokládaným velikostem 599 pb pro marker *pagA*, 848 pb pro marker *capB* a 641 pb pro marker *sap*.



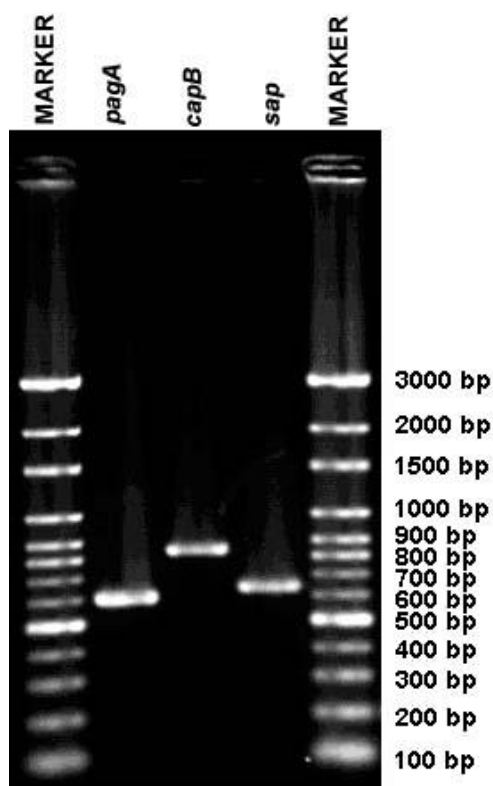
**Obr. 37: Specifita *pagA*-cílených primerů.** V případě všech 3 izolátů i DNA izolované z vakcíny Antraxen došlo k amplifikaci specifického produktu s teplotou tání 80,8 °C. V případě cizorodé DNA *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* a *Escherichia coli* nedocházelo k syntéze specifického produktu.



**Obr. 38: Specifita *capB*-cílených primerů.** V případě všech 3 izolátů došlo k amplifikaci specifického produktu s teplotou tání 78,9 °C. V případě cizorodé DNA *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* a *Escherichia coli* a rovněž DNA izolované z vakcíny Antraxen nedocházelo k syntéze specifického produktu.



**Obr. 39: Specifita *sap*-cílených primerů.** V případě všech 3 izolátů i DNA izolované z vakcíny Antraxen došlo k amplifikaci specifického produktu s teplotou tání 78,4 °C. V případě cizorodé DNA *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* a *Escherichia coli* nedocházelo k syntéze specifického produktu.



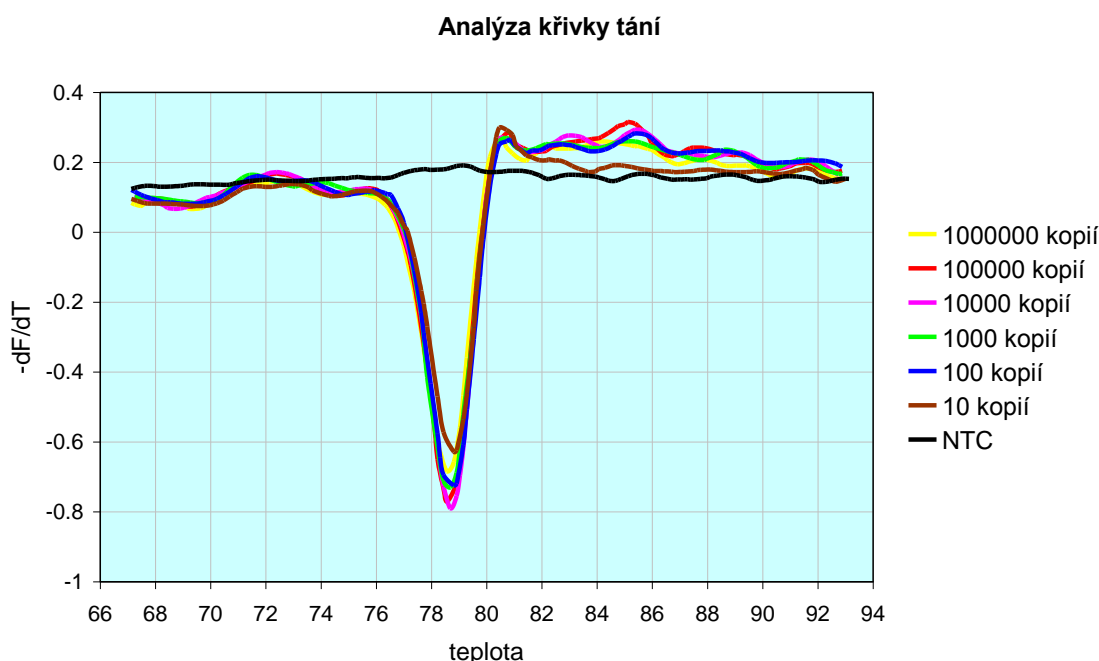
**Obr. 40: Elektroforéza produktů PCR.** Proužky leží v polohách odpovídajících předpokládaným velikostem ampliconů 599 pb pro marker *pagA*, 848 pb pro marker *capB* a 641 pb pro marker *sap*.

#### 4.7.2 Kvantifikace

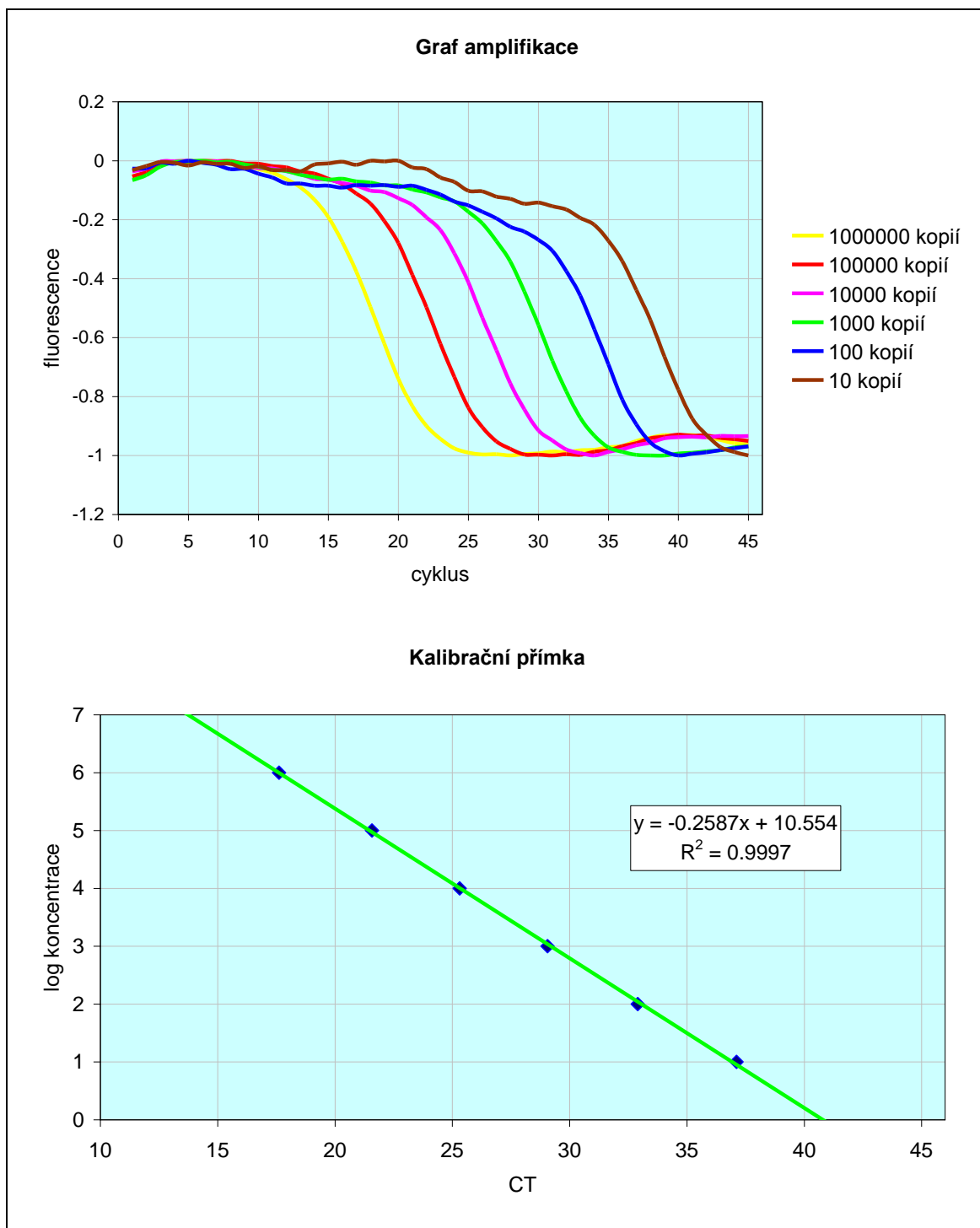
Jednou z výhod real-time PCR oproti konvenční PCR je schopnost kvantifikace. Výsledky analýzy křivky tání proto pro vyvinutí spolehlivé real-time PCR metody nestačí. Pro účely kvantifikace jsem si vybrala chromozomální marker *sap*, jelikož plazmidy se mohou v buňkách vyskytovat ve variabilním počtu kopií, nebo se buňkách nemusí vyskytovat vůbec.

Pro vytvoření standardu o známém počtu kopií byl použit vlastní amplifikát genu *sap* z předchozích reakcí, který byl naředěn na koncentraci  $10^9$  kopií / ml, čili  $10^6$  kopií na vzorek. Pro ověření kvantifikačních schopností (linearity) byla amplifikována diluční série tohoto standardu o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií na vzorek. V celém rozsahu koncentrací docházelo k amplifikaci specifického produktu (viz Obr. 41). Kalibrační přímka vykazovala koeficient determinace vyšší než 0,98 (viz Obr. 42).

Výše popsáný zoptimalizovaný real-time PCR detekční test pro *Bacillus anthracis* byl vytvořen pro případné budoucí potřeby laboratoří CBO Těchonín.



**Obr. 41: Detekční limit – marker *sap*.** Na obrázku je zobrazen výstup analýzy křivky tání po amplifikaci diluční série standardů pro marker *sap* o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií na vzorek. Z grafu je patrné, že v celém rozsahu koncentrací docházelo k syntéze specifického produktu.



**Obr. 42: Kvantitativní detekce *Bacillus anthracis*.** Na obrázku je zobrazen graf amplifikace diluční série standardů pro marker *sap* o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií na vzorek a získaná kalibrační přímka. Amplifikační křivky byly upraveny vyhlazením, vyrovnáním a normalizací. Poloha fluorescenčního prahu byla nastavena automaticky na  $T = -0,45$ . NTC vzorek pro přehlednost vynechán. Kalibrační přímka vykazuje vysokou hodnotu koeficientu determinace 0,9997.



## 4.8 Srovnání s ostatními detekčními systémy

Od zavedení metody real-time PCR bylo vyvinuto mnoho typů detekčních systémů pro monitorování průběhu amplifikace. Tyto zahrnují interkalační barviva, sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy a modifikované primery. Jednotlivé detekční systémy se liší svou specifitou, nároky na design sekvence oligonukleotidu a optimalizaci reakčních podmínek, finančními náklady a možnostmi provádět analýzu křivky tání a multiplexní PCR (viz Tabulku 17).

Interkalační barviva, jako je například SYBR Green I, představují nejjednodušší způsob sledování průběhu PCR, jelikož zvyšují intenzitu fluorescence po vazbě na dsDNA, která je produktem amplifikace. Tato barviva však nedetekují produkt amplifikace specificky, jelikož intenzita jejich fluorescence závisí na celkovém množství dsDNA přítomné v reakční směsi, která může zahrnovat kromě ampliconů také balastní DNA a „primer-dimer“ artefakty. Dále nejsou vhodná pro multiplexní detekci. Za účelem zdolání těchto stinných stránek se mnoho vědců zaměřilo na vyvinutí detekčních metod založených na použití sekvenčně specifických oligonukleotidových sond, jako jsou například TaqMan sondy, FRET sondy a „Molecular Beacons“. Tyto metody využívají změny intenzity fluorescence v důsledku změny sekundární struktury fluorescenčně značeného oligonukleotidu, který hybridizuje se specifickou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu. Oligonukleotidy jsou buď značeny reportérem a zhášečem (TaqMan sondy, „Molecular Beacons“), přičemž po hybridizaci s cílovou sekvencí dochází k jejich prostorovému oddělení a emisi fluorescence, nebo párem akceptorového a donorového fluoroforu (FRET sondy), přičemž po hybridizaci dochází k jejich přiblížení, umožnění přenosu energie a vyzáření fluorescenčního signálu. Metody využívající hybridizační sondy poskytují vysokou úroveň specifity a citlivosti, nicméně přítomnost dalšího oligonukleotidu v reakční směsi zvyšuje komplexitu systému a tudíž nároky na optimalizaci a finanční náklady. Některé typy sond, jako například TaqMan sondy, navíc neumožňují provádět analýzu křivky tání. Řešení skýtá použití modifikovaných značených primerů, kdy primer je zároveň detekčním systémem pro produkt reakce, a není tudíž nutné přidávat do reakční směsi další oligonukleotid, který by mohl interagovat s ostatními. Dosavadní dostupné typy modifikovaných primerů, jako jsou například Amplifluor primery,

Škorpiónové primery a LUX primery, jsou však stále poměrně náročné na design a optimalizaci systému, jelikož funkce primerů je opět založena na zaujmutí specifické sekundární struktury oligonukleotidu během různých fází PCR reakce. Vyvinutí plně zoptimalizovaného real-time PCR testu se proto často stává dlouhodobou úmornou prací ve stylu „pokus-omyl“.

**Tabulka 17: Srovnání dostupných detekčních systémů.** Jednotlivé detekční systémy se liší složitostí provedení (nároky na design a optimalizaci systému, finančními náklady) specifikou detekce a možnostmi provádět analýzu křivky tání a multiplexní PCR.

Detekční systém	Složitost provedení	Specifita detekce	Analýza křivky tání	Multiplexní PCR
<i>SYBR Green I</i>	nízká	nízká	ano	ne
<i>TaqMan sondy</i>	vysoká	vysoká	ne	ano
<i>FRET sondy</i>	vysoká	vysoká	ano	ano
„ <i>Molecular Beacons</i> “	vysoká	vysoká	ano	ano
<i>Amplifluor primery</i>	střední	střední	ano	ano
<i>Scorpion primery</i>	vysoká	vysoká	ano	ano
<i>LUX primery</i>	střední	střední	ano	ano

Z Tabulky 17 je zřejmé, že dostupné detekční systémy buď vynikají pozitivními vlastnostmi jako je vysoká specifita detekce a možnost provádět analýzu křivky tání a multiplexní PCR, nicméně zároveň jsou složité a finančně nákladné, nebo jsou naopak jednoduché a levné, ale za to méně specifické a nedovolují provádění multiplexní PCR. Předpokladem je, že systém 5' značených primerů by se měl jednoduchostí a finančními náklady vyrovnat interkalačním barvivům, ale zároveň by měl být specifitější, jelikož není detekována veškerá dvouřetězcová DNA přítomná v reakční směsi, a měl by umožňovat provádění analýzy křivky tání a multiplexní PCR.

Co se týče jednoduchosti provedení, tak v tomto směru je systém 5' značených primerů srovnatelný s použitím interkalačních barviv, jelikož stejně jako u interkalačních barviv k syntéze i detekci produktu PCR stačí pár primerů a není nutné do reakční směsi přidávat další oligonukleotid. Primery rovněž nemusí být nastaveny žádnou složitou sekvencí nekomplementární k templátu, k jejich funkci stačí, když je jeden z primerů na svém 5' konci značen fluoroforem a

jeho sekvence zároveň na 5' konci obsahuje alespoň jeden cytosinový nukleotid. Pro jejich funkci rovněž není nutné zaujmouti specifické sekundární struktury, což zjednodušuje optimalizaci reakčních podmínek.

Co se týče finančních nákladů tak je tento systém též srovnatelný s interkalačními barvivy a zcela jistě levnější než oligonukleotidové sondy, jelikož cenu výrazně snižuje použití guaninové báze místo zhášeče. Jako příklad v Tabulce 18 uvádím orientační srovnání finančních nákladů při použití TaqMan sond, FRET sond, SYBR Green I a 5' značených primerů.

**Tabulka 18: Porovnání finančních nákladů při použití TaqMan sond, FRET sond, SYBR Green I a 5' značených primerů.** Částky jsou uvedeny v Kč, byly dohledány na internetových stránkách <http://www.generi-biotech.com> a <http://www.sigmaaldrich.com/> a jsou pouze orientační. Ceny platí pro primery v množství 200 nmol, a sondy v množství 50 nmol, což je odpovídající poměr.

Složka	TaqMan sondy	FRET sondy	SYBR Green I	5' značené primery
<i>primer 1</i>	970,- Kč	970,- Kč	970,- Kč	5 430,- Kč
<i>primer 2</i>	970,- Kč	970,- Kč	970,- Kč	970,- Kč
<i>detekční systém</i>	16 895,- Kč	23 715,- Kč	4 684,- Kč	-
<b>CELKEM</b>	<b>18 835,- Kč</b>	<b>25 655,- Kč</b>	<b>6 624,- Kč</b>	<b>6 400,- Kč</b>

Co se týče specifity, vyznačuje se systém 5' značených primerů lepšími vlastnostmi než SYBR Green I, což prokázaly experimenty, ve kterých byly použity vzorky obsahující cizorodou DNA, popř. vzorky bez obsahu templátové DNA. V obou případech docházelo v případě SYBR Green I k vyšší úrovni detekce nespecifických produktů amplifikace a vzniku křivek, které hodnotami svých  $C_T$  zasahovaly mezi hodnoty  $C_T$ , získané po amplifikaci diluční série vzorků obsahujících specifickou templátovou DNA, což by v případě kontaminace mohlo způsobit nepřesnosti v kvantifikaci. V případě 5' značených primerů pak k takovéto amplifikaci nedocházelo.

Systém 5' značených primerů je v plné míře schopen analýzy křivky tání s přesností srovnatelnou se SYBR Green I či jinými typy modifikovaných primerů (NAZARENKO *et al.* 2002 a).

Co se týče možnosti provádění multiplexní PCR, tak systém 5' značených primerů má svá omezení. Jedná se o stejná omezení, jako v případě LUX

primerů, jejichž princip funkce je také založen na nukleotidovém zhášení. Účinnost tohoto zhášení totiž není stejná u všech fluoroforů (viz Tabulku 1 a 2 na str. 21 a 22). Nejlépe jsou zhášeny fluorofory emitující v zelených (495 – 570 nm) a žlutých (570 – 590 nm) vlnových délkách. Pro provádění multiplexní PCR je však nutné najít fluorofory, které jsou citlivé ke guaninovému zhášení a zároveň mají natolik odlišná emisní spektra, aby jejich signál byl rozlišitelný použitým real-time PCR přístrojem. Ne všechny real-time PCR přístroje však mají detekční kanály s takovými vlnovými délkami, aby byly schopny rozlišit různé fluorofory citlivé ke zhášení prostřednictvím guaninového nukleotidu.

#### **4.9 Srovnání se studií KURATA a spol. (2001)**

Jedinou dohledatelnou studií, kde byl použit real-time PCR detekční systém fungující na principu 5' značených primerů je studie KURATA a spol. (2001), která se zabývala možnostmi využití barviva BODIPY® FL, jež je velmi citlivé ke guaninovému zhášení (viz Tabulku 1 na str. 21), ke kvantitativní detekci nukleových kyselin. Dílčí součástí této studie bylo i vyvinutí real-time PCR detekčního systému, kdy jeden z primerů na svém 5' konci obsahoval cytosinový nukleotid modifikovaný fluoroforem BODIPY® FL. Nevýhodou fluoroforu BODIPY® FL je skutečnost, že takováto modifikace není běžně komerčně dostupná ve firmách syntetizujících oligonukleotidy pro použití v real-time PCR diagnostice (<http://www.generi-biotech.com>, <https://www.tib-molbiol.com>).

V publikaci bylo dosaženo detekčního limitu 10 kopií templátu na vzorek a lineární kalibrační přímky s koeficientem determinace vyšším než 0,99, což jsou výsledky srovnatelné s výsledky, kterých bylo dosaženo během mé diplomové práce s použitím fluoroforu FAM, který je narozdíl od BODIPY® FL často používaný a běžně komerčně dostupný.

## 5 Souhrn

Metoda real-time PCR je jednou z nejpoužívanějších technik molekulární biologie. Je založena na monitorování průběhu polymerázové řetězové reakce pomocí fluorescenčních látek specifických pro produkt amplifikace. Od počátku devadesátých let, kdy byla tato metoda uvedena do praxe, bylo publikováno mnoho variant takovýchto detekčních systémů, mezi nimiž jsou zahrnuta interkalační barviva specifická pro dvouřetězcovou DNA, jejichž výhodou je jednoduché provedení a nízké náklady, a různé typy sekvenčně specifických oligonukleotidových sond nebo modifikovaných primerů, které sice poskytují vysokou úroveň specifity, ale jsou finančně nákladné a náročné na optimalizaci reakčních podmínek. Má diplomová práce se zabývala alternativním detekčním systémem pro monitorování průběhu real-time PCR amplifikace. Tento detekční systém je zařaditelný do kategorie modifikovaných primerů a jeho funkce je založena na schopnosti guaninového nukleotidu zhášet fluorescenci barviv kovalentně vázaných na oligonukleotid. Jedná se o pár primerů, kdy jeden z primerů je modifikován tak, aby na svém 5' konci obsahoval cytosinový nukleotid značený fluorescenčním barvivem. Detekce produktu v průběhu PCR je zajištěna poklesem intenzity fluorescenčního záření prostřednictvím prostorového přiblížení barviva a guanosinu komplementárního ke značenému cytosinovému nukleotidu umístěnému na 5' konci primeru po inkorporaci do produktu PCR. Předpokladem je, že tento jednoduchý detekční systém by měl vykazovat vyšší specifitu než interkalační barviva, jelikož není detekována veškerá dvouřetězcová DNA přítomná v reakční směsi, měl by umožňovat provádění analýzy křivky tání a multiplexní PCR. Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda tento detekční systém funguje, za jakých podmínek funguje, jestli je lepší či horší ve srovnání s ostatními dostupnými metodikami a zda je aplikovatelný v praxi.

Během experimentů prováděných pomocí přístroje Roche LightCycler 1.5 byla funkčnost metodiky nejprve testována s použitím primerů specifických pro modelový mikroorganismus *Bacillus subtilis*. V průběhu optimalizačních experimentů bylo zjištěno, že vzhled amplifikačních křivek je silně ovlivněn užitou koncentrací 5' značených primerů, přičemž jako použitelné se jevíly koncentrace 0,1 a 0,2  $\mu\text{M}$ . Dále bylo zjištěno, že větší počet dC (a tudíž

komplementárních dG) na 5' konci sekvence primeru zvyšuje měřitelný rozsah změny intenzity fluorescence.

Za účelem ověření zda systém 5' značených primerů dovoluje použití fluoroforů s odlišnými emisními spektry a tudíž provádění multiplexní PCR, byla porovnávána schopnost guaninového nukleotidu zhášet fluorescenci barviv FAM, HEX a Cy5. Nejlépe zhášeným barvivem byl fluorofor FAM, v případě barviva Cy5, které je určeno pro 2. detekční kanál přístroje LightCycler, naopak nebyla detekována žádná změna. Vzhledem k tomu, že fluorofory vykazující hodnoty emisních maxim vhodné pro 2. a 3. detekční kanál přístroje LightCycler nejsou dostatečně citlivé ke guaninovému zhášení, nebylo možné metodou 5' značených primerů s použitím testovaných fluoroforů na tomto přístroji multiplexní PCR provádět.

Kalibrační přímka sestavená na základě výsledků  $C_T$  amplifikací diluční série standardů o známé koncentraci vykazovala vysoký stupeň linearitu ( $R^2 > 0,98$ ). Testy specifity dále prokázaly, že systém 5' značených primerů vykazuje lepší vlastnosti v porovnání s interkalačním barvivem SYBR Green I ve smyslu amplifikace cizorodé DNA a kontrolních vzorků bez templátu. Presentovaný detekční systém si také bez problémů poradil s analýzou křivky tání.

Nejlépe fungující varianta 5' značených primerů, čili modifikace jednoho z PCR primerů tak, aby na svém 5' konci obsahoval 3 cytosinové nukleotidy, z nichž poslední je značen barvivem FAM, byla aplikována pro vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro patogen *Bacillus anthracis*. Výsledky amplifikací různých izolátů *Bacillus anthracis* a cizorodé DNA při použití sekvencí primerů doporučených WHO prokázaly perfektní specifitu a také možnost aplikovat princip 5' značených primerů na jakékoliv již zavedené sekvence primerů. Real-time PCR detekční systém fungující na podobném principu nebyl ještě nikdy k detekci tohoto patogenu použit.

Na základě uvedených výsledků jsem dospěla k závěru, že systém 5' značených primerů je užitečnou finančně nenáročnou alternativou k dostupným typům real-time PCR detekčních systémů.

## 6 Seznam literatury

Afonina I.A., Reed M.W., Lusby E., Shishkina I.G., Belousov Y.S. (2002): Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *BioTechniques* 32: 940-949.

Alam S.I., Agarwal G.S., Kamboj D.V., Rai G.P., Singh L. (2003): Detection of spores of *Bacillus anthracis* from environment using polymerase chain reaction. *Indian journal of experimental biology* 41: 177-180.

Andersen G.L., Simchock J.M., Wilson K.H. (1996): Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *Journal of bacteriology* 178: 377-84.

Ash C., Collins M.D. (1992): Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS microbiology letters* 73: 75-80.

Ash C., Farrow J.A., Dorsh M., Stackebrandt E., Collins M.D. (1991) Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International journal of systematic bacteriology* 41: 343-346.

Bell C.A., Uhl J.R., Hadfield T.L., David J.C., Meyer R.F., Smith T.F., Cockerill F.R. 3rd (2002): Detection of *Bacillus anthracis* DNA by LightCycler PCR. *Journal of clinical microbiology* 40: 2897-2902.

Beyer W., Glöckner P., Otto J., Böhm R. (1995): A nested PCR method for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental samples collected from former tannery sites. *Microbiological research* 150: 179-186.

Bode E., Hurtle W., Norwood D. (2004): Real-Time PCR assay for a unique chromosomal sequence of *Bacillus anthracis*. *Journal of clinical microbiology* 42: 5825-5831.

Brightwell G., Pearce M., Leslie D. (1998): Development of internal controls for PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Molecular and cellular Probes* 12: 367-377.

Caplin B.E., Rasmussen R.P., Bernadr P.S., Wittwer C.T. (1999): The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. *Roche Biochemica* 1: 5-8

Cardullo R.A., Agraval S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E. (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 8790-8794.

Carl M., Hawkins R., Coulson N., Lowe J., Robertson D.L., Nelson W.M., Titball R.W., Woody J.N. (1992): Detection of spores of *Bacillus anthracis* using the polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases* 165: 1145-1148.

Coker P.R., Smith K.L., Fellows P.F., Rybachuck G., Kousoulas K.G., Hugh-Jones M.E. (2003): *Bacillus anthracis* virulence in Guinea Pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality. *Journal of clinical microbiology* 41: 1212-1218.

Cosa G., Focsaneanu K.S., McLean J.R.N., McNamee J.P., Scaiano J.C. (2001): Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochemistry and Photobiology* 73: 585-599.

Crockett A.O., Wittwer C.T. (2001): Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Analytical Biochemistry* 290: 89-97.

Dixon T.C., Meselson M., Guillemin J., Hanna P.C. (1999): Anthrax. *The New England journal of medicine* 341: 815-826.



Drago L., Lombardi A., Vecchi E.D., Gismondo M.R. (2002): Real-time PCR assay for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in clinical samples. *Journal of clinical microbiology* 40: 4399.

Dragon D.C., Bader D.E., Mitchell J., Woolen N. (2005): Natural dissemination of *Bacillus anthracis* spores in Northern Canada. *Applied and environmental microbiology* 71: 1610-1615.

Easterday W.R., Van Ert M.N., Simonson T.S., Wagner D.M., Kenefic L.J., Allender C.J., Keim P. (2005): Use of Single Nucleotide Polymorphisms in the *plcR* Gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *Journal of clinical microbiology* 43: 1995-1997.

Edwards K.A., Clancy H.A., Baeumner A.J. (2006): *Bacillus anthracis*: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods. *Analytical and bioanalytical chemistry* 384: 73-84.

Ellerbrok H., Natterman H., Ozel M., Beutin L., Appel B., Pauli G. (2002): Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS microbiology letters* 214: 51-59.

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblat J.E., Cockerill F.R. 3rd, Smith T.F. (2006): Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews* 19: 165-256.

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. 3rd, Smith T.F. (2002): Detection of vaccinia virus, herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and *Bacillus anthracis* by LightCycler polymerase chain reaction after autoclaving: implications for biosafety of bioterrorism agents. *Mayo Clinic proceedings* 77: 624-628.

Etienne-Toumelin I., Sirard J.C., Duflot E., Mock M., Fouet A. (1995). Characterization of the *Bacillus anthracis* S-layer: cloning and sequencing of the structural gene. *Journal of bacteriology* 177: 614-620.

Fasanella A., Losito S., Adone R., Ciuchini F., Trotta T., Altamura S.A., Chiocco D., Ippolito G. (2003): PCR assay to detect *Bacillus anthracis* spores in heat-treated specimens. *Journal of clinical microbiology* 41: 896-899.

Helgason E., Okstad O.A., Caudant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.B. (2000): *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Applied and environmental microbiology* 66: 2627-2630.

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996): Real-time quantitative PCR. *Genome research* 6: 986-994.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology* (Nature Publishing Company) 10: 413-417.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* (Nature Publishing Company) 11: 1026-1030.

Hoffmaster A.R., Meyer R.F., Bowen M.P., Marston C.K., Weyant R.S., Thurman K., Messenger S.L., Minor E.E., Winchell J.M., Rasmussen M.V., Newton B.R., Parker J.T., Morrill W.E., McKinney N., Barnett G.A., Sejvar J.J., Jernigan J.A., Perkins B.A., Popovic T. (2002): Evaluation and validation of real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging infectious Diseases* 8: 1178-1182.

Hoffmaster A.R., Ravel J., Rasko D.A., Chapman G.D., Chute M.D., Marston C.K., De B.K., Sacchi C.T., Fitzgerald C., Mayer L.W., Maiden M.C., Priest F.G., Barker M., Jiang L., Cer R.Z., Rilstone J., Peterson S.N., Weyant R.S.,

Galloway D.R., Read T.D., Popovic T., Fraser C.M. (2004): Identification of anthrax toxin genes in *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalational anthrax. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 8449-8454.

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 7276-7280.

Hurtle W., Bode E., Kulesh D.A., Kaplan R.S., Garrison J., Bridge D., House M., Frye M.S., Loveless B., Norwood D. (2004): Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. Journal of clinical microbiology 42: 179-185.

Cheun H.I., Makino S.I., Watarai M., Erdenebaatar J., Kawamoto K., Uchida I. (2003): Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR, Journal of applied microbiology 95: 728-733.

Cheun H.I., Makino S.I., Watarai M., Shirahata T., Uchida I., Takeshi K. (2001): A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. Journal of applied microbiology 91: 421-426.

Inglesby T.V., O'Toole T., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Friedlander A.M., Gerberding J., Hauer J., Hughes J., McDade J., Osterholm M.T., Parker G., Perl T.M., Russel P.K., Tonat K., Working Group on Civilian Biodefense (2002): Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. JAMA: the journal of the American Medical Association 287: 2236-2252.

Jackson P.J., Hugh-Jones M.E., Adair D.M., Green G., Hill K.K., Kuske C.R., Grindberg L.M., Abramova F.A., Keim P. (1998): PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: the presence of multiple

*Bacillus anthracis* strains in different victims. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 1224-1229.

Johns M., Harrington L., Titball R.W., Leslie D.L. (1994): Improved methods for the detection of *Bacillus anthracis* spores by the polymerase chain reaction. Letters in applied microbiology 18: 236-238.

Johnson S.C., Marshall D.J., Harms G., Miller C.M., Sherrill C.B., Beaty E.L., Lederer S.A., Roesch E.B., Madsen G., Hoffman G.L., Laessig R.H., Kopish G.J., Baker M.W., Benner S.A., Farrell P.M., Prudent J.R. (2004): Multiplexed genetic analysis using an expanded genetic alphabet. Clinical chemistry 50: 2019-2027.

Kainz P. (2000): The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations. Biochimica et biophysica acta 1494: 23-7.

Kaltenboeck B., Wang C. (2005): Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostics. Advances in clinical chemistry 40: 219-259.

Kenar L., Ortatagli M., Karayilanoglu T., Yaren H., Sen S. (2007): Comparison of real-time polymerase chain reaction and convention polymerase chain reaction methods for the rapid identification of *Bacillus anthracis*. Military medicine 172: 773-776.

Ko K.S., Kim J.M., Kim J.W., Jung B.Y., Kim W., Kim I.J., Kook Y.H. (2003): Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. Journal of clinical microbiology 41: 2908-2914.

Kim K., Seo J., Wheeler K., Park C., Kim D., Park S., Kim W. Chung S.I., Leighton T. (2005): Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. FEMS immunology and medical microbiology 43: 301-310.

Knemeyer J.P., Marmé N., Sauer M. (2000): Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level. *Analytical chemistry* 72: 3717-3724.

Kramer M.F., Coen M.D. (2001): Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Current protocols in molecular biology* Chapter 15: Unit 15.1.

Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspect of medicine* 27: 95-125.

Kurata S., Kanagawa T., Yamada K., Torimura M., Yokomaku T., Kamagata Y., Kurane R. (2001): Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using BODIPY<sup>®</sup> FL-labeled probe or primer. *Nucleic acids research* 29: e34.

Larionov A., Krause A., Miller W. (2005): A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 6: 62.

Lee M.A., Brightwell G., Leslie D., Bird H., Hamilton A. (1999): Fluorescent detection techniques for real-time multiplex strand specific detection of *Bacillus anthracis* using rapid-PCR. *Journal of applied microbiology* 87: 218-223.

Levi K., Higham J.L., Coates D., Hamlyn P.F. (2003): Molecular detection of anthrax spores on animal fibres. *Letters in applied microbiology* 36: 418-422.

Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Application* 4: 357-62.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J. (2004): *Molecular Cell Biology* – 5th ed. W. H. Freeman and Company, New York.

Makino S., Cheun H. (2003): Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *Journal of microbiological methods* 53: 141-147.

Makino S.I., Iinuma-Okada Y., Maryuama T., Ezaki T., Sasakawa C., Yoshikawa M. (1993): Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animals by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* 31: 547-551.

Marras S.A., Kramer F.R., Tyagi S. (2002): Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic acids research* 30: e122.

Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T. (1998): Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24: 954-962.

Moser M.J., Christensen D.R., Norwood D., Prudent J.R. (2006): Multiplexed Detection of Anthrax-Related Toxin Genes. *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 8: 89-96.

Nazarenko I.A., Bhatnagar S.K., Hohman R.J. (1997): A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic acids research* 25: 2516-2521.

Nazarenko I., Lowe B., Darfler M., Ikonomi P., Schuster D., Raschtchian A. (2002a): Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic acids research* 30: e37.

Nazarenko I., Pires R., Lowe B., Obaidy M., Rashtchian A. (2002b): Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the

fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic acids research* 30: 2089-2195.

Oggioni M.R., Meacci F., Carattoli A., Ciervo A., Orru G., Cassone A., Pozzi G. (2002), Protocol for real-time PCR identification of anthrax spores from nasal swabs after broth enrichment. *Journal of clinical microbiology* 40: 3956-3963.

Panning M., Kramme S., Petersen N., Drosten C. (2007): High-throughput screening for spores and vegetative forms of pathogenic *B. anthracis* by an internally controlled real-time PCR assay with automated DNA preparation. *Medical microbiology and immunology* 196: 41-50.

Pannucci J., Okinaka R.T., Sabin R., Kuske C.R. (2002a): *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *Journal of bacteriology* 184: 134-141.

Pannucci J., Okinaka R.T., Williams E., Sabin R., Ticknor L.O., Kuske C.R. (2002b): DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics* 3: 34.

Park S.H., Kim H.J., Kim J.H., Kim T.W., Kim H.Y. (2007): Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria multiplex PCR. *Journal of microbiology and biotechnology* 17: 1177-1182.

Patra G., Sylvestre P., Ramisse V., Thérasse J., Guesdon J.L. (1996): Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. *FEMS immunology and medical microbiology* 15: 223-231.

Patra G., Vaissaire J., Weber-Levy M., Le Doujet C., Mock M. (1998): Molecular characterization of *Bacillus strains* involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *Journal of clinical microbiology* 36: 3412-3414.

Patra G., Williams L.E., Qi Y., Rose S., Redkar R., Delvecchio V.G. (2002): Rapid genotyping of *Bacillus anthracis* strains by real-time polymerase chain reaction. *Annals of The New York Academy of Sciences* 969: 106-111.

Perdue M.L., Karns J., Higgins J., Van Kessel J.A. (2003): Detection and fate of *Bacillus anthracis* (Sterne) vegetative cells and spores added to bulk tank milk. *Journal of food protection* 66: 2348-54.

Qi Y., Patra G., Liang X., Williams L.E., Rose S., Redkar R.J., Del Vecchio V.G. (2001): Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and environmental microbiology* 67: 3720-3727.

Ramisse V., Patra G., Garrigue H., Guesdon J.L., Mock M. (1996): Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS microbiology letters* 145: 9-16.

Ramisse V., Patra G., Vaissaire J., Mock M. (1999): The Ba813 chromosomal DNA sequence effectively traces the whole *Bacillus anthracis* community. *Journal of applied microbiology* 87: 224-228.

Rantakokko-Jalava K., Viljanen M.K. (2003): Application of *Bacillus anthracis* PCR to simulated clinical samples. *Clinical microbiology and infection* 9: 1051-1056.

Reif T.C., Johns M., Pillai S.D., Carl M. (1994): Identification of capsule-forming *Bacillus anthracis* spores with the PCR and a novel dual-probe hybridization format. *Applied and environmental microbiology* 60: 1622-1625.

Reiman R.W., Atchley D.H., Voorhees K.J. (2007): Indirect detection of *Bacillus anthracis* using real-time PCR to detect amplified gamma phage DNA. *Journal of microbiological methods* 68: 651-653.



Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 245: 154-160.

Ruhfel R.E., Robillard N.J., Thorne C.B. (1984): Interspecies transduction of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B.cereus* and *B. thuringiensis*. *Journal of bacteriology* 157: 708-711.

Rutledge R.G., Côté C. (2003): Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic acids research* 31: e93.

Ryu C., Lee K., Yoo C., Seong W.K., Oh H.B. (2003): Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. *Microbiology and immunology* 47: 693-699.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

Seidel C.A.M. (1996): Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. *Journal of Physical Chemistry* 100: 5541-5553.

Skottman T., Piiparinen H., Hyytiäinen H., Mylly V., Skurnik M., Nikkari S. (2007): Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 26: 207-211.

Sternbach G. (2003): The history of anthrax. *The Journal of emergency medicine* 24: 463-467.

Svanvik N., Westman G., Wang D., Kubista M. (2000): Light-up probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution. *Analytical biochemistry* 281: 26-35.

Todd A.V., Fuery C.J., Impey H.L., Applegate T.L., Haughton M.A. (2000): DzyNA-PCR: Use of DNAzymes to detect and quantify nucleic acid sequences in real-time fluorescent format. *Clinical chemistry* 46: 625-630.

Torimura M., Kurata S., Yamada K., Yokomaku T., Kamagata Y., Kanagawa T., Kurane R. (2001): Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 17: 155-160.

Turnbull P.C.B. 1998: *Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Human and Animals - 3<sup>rd</sup> edition*. WHO/ECM/ZDI/98.6

Turnbull P.C., Hutson R.A., Ward M.J., Jones M.N., Quinn C.P., Finnie N.J., Duggleby C.J., Kramer J.M., Melling J (1992): *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *Journal of applied bacteriology* 72: 21-28.

Tyagi S., Kramer F.R. (1996): Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14: 303-308.

Ulrich M.P., Christensen D.R., Coyne S.R., Craw P.D., Henchal E.A., Sakai S.H., Swenson D., Tholath J., Tsai J., Weir A.F., Norwood D.A. (2006): Evaluation of the Cepheid GeneXpert system for detection *Bacillus anthracis*. *Journal of applied microbiology* 100: 1011-1016.

Vaerman J.L., Saussoy P., Ingargiola I. (2004): Evaluation of real-time PCR data. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 18: 212-214.

Van Ert M.N., Easterday W.R., Simonson T.S., U'Ren J.M., Pearson T., Kenefic L.J., Busch J.D., Huynh L.Y., Dukerich M., Trim C.B., Beaudry J., Welty-Bernard A., Read T., Fraser C.M., Ravel J., Keim P. (2007): Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain. *Journal of clinical microbiology* 45: 47-53.

Wittwer C.T., Hermann M.G., Gundry C.N., Elenitoba-Johnson K.S. (2001): Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25: 430-442.

Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22: 130-138.

Whitcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T., Little S. (1999): Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature biotechnology* 17: 804-807.

Wilhelm J., Pingoud A. (2003): Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 4: 1120-1128.

Zasada A.A., Gierczyński R., Raddadi N., Daffonchio D., Jagielski M. (2006): Some *Bacillus thuringiensis* strains share *rpoB* nucleotide polymorphisms also present in *Bacillus anthracis*. *Journal of clinical microbiology* 44: 1606-1607.

Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32: e103.

## **Přílohy**

**Příloha 1: Přehled studií, které se zabývaly detekcí *Bacillus anthracis* pomocí klasické PCR nebo real-time PCR.** V tabulce je uvedena reference odkazující na danou studii, použitý marker (amplifikovaný region genomu), typ PCR (klasická nebo real-time), použitý detekční systém (pouze u real-time PCR) a stručný popis účelu studie. Prázdné kolonky znamenají, že daný údaj nebyl dohledán. Studie jsou srovnány v chronologické posloupnosti.

Reference	Marker	Typ PCR	Detekční systém	Účel studie
CARL <i>et al.</i> 1992	<i>cya</i> (pXO1)	klasická		Představení PCR jako nové detekční techniky pro <i>B. anthracis</i> .
MAKINO <i>et al.</i> 1993	<i>capA</i> (pXO2)	klasická		Představení PCR jako nové detekční techniky pro <i>B. anthracis</i> .
JOHNS <i>et al.</i> 1994	<i>cya</i> (pXO1) <i>capA</i> (pXO2)	klasická		Vyvinutí PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> .
REIF <i>et al.</i> 1994	<i>capB</i> (pXO2)	klasická		Představení nového markeru pro PCR detekci <i>B. anthracis</i> .
BEYER <i>et al.</i> 1995	<i>pag</i> (pXO1) <i>capB</i> , <i>capC</i> (pXO2)	klasická		Vyvinutí PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> v environmentálních vzorcích.
PATRA <i>et al.</i> 1996	Ba813 (chromozom)	klasická		Představení nového markeru pro PCR detekci <i>B. anthracis</i> .
RAMISSE <i>et al.</i> 1996	<i>pag</i> , <i>cya</i> , <i>lef</i> (pXO1) cap region (pXO2) Ba813 (chromozom)	klasická		Vyvinutí multiplexního PCR detekčního testu pro <i>B. anthracis</i> .
BRIGHTWELL <i>et al.</i> 1998	<i>capC</i> (pXO2) Ba813 (chromozom)	klasická		Zavedení interních kontrol do PCR detekčního testu pro <i>B. anthracis</i> .
JACKSON <i>et al.</i> 1998	<i>pag</i> , <i>cya</i> , <i>lef</i> (pXO1) <i>capA</i> , <i>capB</i> , <i>capC</i> (pXO2) <i>vrrA</i> (chromozom)	klasická		Analýza tkání z obětí Sverdlovského incidentu. Použití nového markeru <i>vrrA</i> .
PATRA <i>et al.</i> 1998	<i>pag</i> , <i>cya</i> , <i>lef</i> (pXO1) cap region (pXO2) Ba813, <i>vrrA</i> (chromozom)	klasická		Analýza kmenů ze zvířecích epidemií antraxu ve Francii. Použití nového markeru <i>vrrA</i> .
LEE <i>et al.</i> 1999	<i>capC</i> (pXO2)	real-time	SYBR Gold	Představení nové detekční techniky (real-time PCR) pro <i>B. anthracis</i> .
CHEUN <i>et al.</i> 2001	<i>pag</i> (pXO1) <i>capA</i> (pXO2) Ba813, <i>sap</i> (chromozom)	klasická		Vyvinutí PCR detekčního testu schopného detekovat <i>B. anthracis</i> v mase a tkáňových vzorcích. Použití nového markeru <i>sap</i> .
MAKINO <i>et al.</i> 2001	<i>pag</i> (pXO1) cap region (pXO2)	real-time	SYBR Green I	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> ve vzduchu.
QI <i>et al.</i> 2001	<i>rpoB</i> (chromozom)	real-time	FRET sondy	Představení nového markeru pro PCR detekci <i>B. anthracis</i> .

BELL <i>et al.</i> 2002	<i>pagA</i> (pXO1) <i>capB</i> (pXO2)	real-time	FRET sondy	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro <i>B. anthracis</i> používajícího „rychlou PCR“ na přístroji LightCycler.
DRAGO <i>et al.</i> 2002	<i>rpoB</i> (chromozom)	real-time	FRET sondy	Použití markeru <i>rpoB</i> a real-time PCR pro detekci <i>B. anthracis</i> v klinických vzorcích.
ELLERBROK <i>et al.</i> 2002	pXO1 pXO2 <i>rpoB</i> (chromozom)	real-time	TaqMan sondy	Vyvinutí co nejrychlejšího detekčního testu pro <i>B. anthracis</i> .
ESPY <i>et al.</i> 2002	<i>pagA</i> (pXO1) <i>capB</i> (pXO2)	real-time	FRET sondy	Dokázat, že <i>B. anthracis</i> lze pomocí PCR detekovat i ve vzorcích, které prošly autoklávováním.
HOFFMASTER <i>et al.</i> 2002	pXO1, pXO2 Ba813	real-time	FRET sondy	Zhodnocení spolehlivosti metody detekce <i>B. anthracis</i> pomocí real-time PCR.
OGGIONI <i>et al.</i> 2002	<i>lef</i> (pXO1) <i>rpoB</i>	real-time	FRET sondy	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu schopného detekovat <i>B. anthracis</i> v klinických vzorcích.
PATRA <i>et al.</i> 2002	pXO1 pXO2 chromozom	real-time	FRET sondy	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro <i>B. anthracis</i> .
ALAM <i>et al.</i> 2003		klasická		Vyvinutí PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> v environmentálních vzorcích.
FASANELA <i>et al.</i> 2003	<i>pag</i> , <i>cya</i> , <i>lef</i> (pXO1) cap region (pXO2) Ba813 (chromozom)	klasická		Vyvinutí PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> v tepelně ošetřených vzorcích.
CHEUN <i>et al.</i> 2003	<i>pag</i> (pXO1) cap region (pXO2) <i>sap</i> (chromozom)	real-time	SYBR Green I	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> v půdních vzorcích.
KO <i>et al.</i> 2003	<i>cap</i> (pXO2) <i>rpoB</i> (chromozom)	klasická		Vylepšení primerů pro marker <i>rpoB</i> a vyvinutí multiplexního PCR detekčního testu pro <i>B. anthracis</i> .
LEVI <i>et al.</i> 2003	<i>acpA</i> (pXO2) 16S rRNA, Ba813 (chromozom)	klasická		Vyvinutí PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> ve vlně a hedvábí.
MAKINO a CHEUN 2003	<i>pag</i> (pXO1) cap region (pXO2)	real-time	SYBR Green I	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> ve vzduchu.

PERDUE <i>et al.</i> 2003	<i>pag</i> , <i>lef</i> (pXO1) <i>vrrA</i> (pXO2)	real-time		Vyvinutí real-time PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> v mléce.
RANTAKOKKO-JALAVA a VILJANEN 2003	<i>pag</i> , <i>lef</i> (pXO1) <i>rpoB</i> , Ba813 (chromozom)	klasická i real-time		Porovnání různých publikovaných PCR testů v souvislosti s aplikací na detekci <i>B. anthracis</i> v klinických vzorcích.
RYU <i>et al.</i> 2003	<i>pag</i> (pXO1) <i>cap</i> (pXO2) <i>sap</i> (chromozom)	real-time	TaqMan sondy	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu schopného detekovat spory <i>B. anthracis</i> v půdních vzorcích.
HURTLE <i>et al.</i> 2004	<i>gyrA</i> (chromozom)	real-time	TaqMan sondy	Představení nového markeru pro PCR detekci <i>B. anthracis</i> .
BODE <i>et al.</i> 2004	unikátní chromozomální sekvence	real-time	FRET sondy	Nalezení unikátní chromozomální sekvence, která by se dala použít jako marker pro detekci <i>B. anthracis</i> .
DRAGON <i>et al.</i> 2005	<i>lef</i> (pXO1)	real-time	SYBR Green I	Analýza rozsevu <i>B. anthracis</i> v severní Kanadě.
EASTERDAY <i>et al.</i> 2005	<i>plcR</i> (chromozom)	real-time	TaqMan sondy	Představení nového markeru pro PCR detekci <i>B. anthracis</i> .
KIM <i>et al.</i> 2005	pXO1, pXO2 <i>sspE</i> (chromozom)	real-time		Vyvinutí real-time PCR detekčního testu schopného odlišit <i>B. anthracis</i> od ostatních členů „ <i>Bacillus cereus</i> group“
MOSER <i>et al.</i> 2006	<i>pagA</i> , <i>cya</i> (pXO1) <i>capB</i> (pXO2)	real-time	Plexor primery	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro detekci <i>B. anthracis</i> , používajícího multiplexní reakci a nový detekční systém.
ULRICH <i>et al.</i> 2006	pXO1, pXO2	real-time		Zhodnocení možností využití přístroje Cepheid GeneXpert pro detekci <i>B. anthracis</i> .
CHRISTENSEN <i>et al.</i> 2006	<i>pag</i> , <i>cya</i> , <i>lef</i> (pXO1)	real-time	TaqMan sondy	Porovnání možností využití přístrojů R.A.P.I.D., LightCycler a SmartCycler pro detekci různých agens.
REIMANN <i>et al.</i> 2006	gama fág	real-time	SYBR Green I	Představení nového markeru pro PCR detekci <i>B. anthracis</i> .
KENAR <i>et al.</i> 2007	<i>pag</i> (pXO1)	klasická i real-time	TaqMan sondy	Porovnání citlivosti a specifity klasické a real-time PCR ve smyslu detekce <i>B. anthracis</i> .
PANNING <i>et al.</i> 2007	<i>pag</i> (pXO1) <i>rpoB</i> (chromozom)	real-time	TaqMan sondy FRET sondy	Vyvinutí vysokokapacitní detekční metody pro <i>B. anthracis</i> .
PARK <i>et al.</i> 2007	<i>gyrB</i> , <i>groEL</i> (chromozom)	klasická		Vyvinutí multiplexního PCR testu schopného odlišit jednotlivé členy „ <i>Bacillus cereus</i> group“. Použití nových markerů.
SKOTTMAN <i>et al.</i> 2007	<i>pag</i> (pXO1) <i>cap</i> region (pXO2)	real-time		Vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro detekci <i>B. anthracis</i> , <i>Francisella tularensis</i> a <i>Yersinia pestis</i> .
VAN ERT <i>et al.</i> 2007	chromozomální SNP polymorfizmy	real-time	TaqMan sondy	Vyvinutí real-time PCR detekčního testu pro detekci kmenu. Použití chromozomálních SNP polymorfizmů jako nových markerů.

**Příloha 2: Výsledky testu kvality 6 párů nemodifikovaných primerů.** V tabulce jsou uvedeny výsledky experimentu, kdy bylo 6 párů nemodifikovaných primerů (viz Tabulku 6 na str. 46) použito k amplifikaci DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (10<sup>6</sup> kopií / vzorek). Při výpočtu C<sub>T</sub> byly amplifikační křivky upraveny vyhlazením, vyrovnáním a normalizací. Poloha fluorescenčního prahu byla nastavena ručně na hodnotu T = 0,5. (SD = směrodatná odchylka, CV = variační koeficient, C<sub>T</sub> = prahový cyklus)

<b>Pár primerů</b>	<b>C<sub>T</sub></b>
BSalr1A - BSalr1AS	17,00
BSalr2A - BSalr2AS	18,59
BStrpA1A - BStrpA1AS	19,40
BStrpA2A - BStrpA2AS	17,92
BSyxe11A - BSyxe11AS	18,50
BSyxe12A - BSyxe12AS	17,01
<b>aritmetický průměr</b>	<b>18,07</b>
<b>SD</b>	<b>0,95</b>
<b>CV (%)</b>	<b>5,26</b>



**Příloha 3: Linearita kalibrační přímky – 5' značené primery vs. SYBR Green I.** V tabulce jsou uvedeny rovnice kalibračních přímek opakování amplifikací dilučních sérií templátové DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií / vzorek a příslušné koeficienty determinace. Křivky byly pro výpočet  $C_T$  upraveny vyhlazením, vyrovnáním a normalizací. Poloha fluorescenčního prahu byla nastavena automaticky na hodnotu nejvyššího  $R^2$  (koeficient determinace).

Detekční systém	Číslo opakování experimentu	Rovnice lineární regrese	Koeficient determinace $R^2$
5' značené primery	1.	$y = -0,4334x + 16,0790$	0,9981
	2.	$y = -0,3339x + 14,3535$	0,9907
	3.	$y = -0,3461x + 15,3095$	0,9995
	4.	$y = -0,3070x + 17,7359$	0,9866
	5.	$y = -0,3300x + 13,9460$	0,9946
	6.	$y = -0,3572x + 15,9927$	0,9979
SYBR Green I	1.	$y = -0,2714x + 9,6621$	0,9966
	2.	$y = -0,2891x + 11,3661$	0,9994
	3.	$y = -0,2959x + 11,693$	0,9997
	4.	$y = -0,2565x + 11,1431$	0,9916
	5.	$y = -0,2106x + 10,764$	0,9824
	6.	$y = -0,2241x + 10,6698$	0,9804

**Příloha 4: Výsledky testů reprodukovatelnosti.** V tabulce jsou uvedeny výsledky 6 opakování amplifikace diluční série templátové DNA *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* o koncentracích  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  a  $10^1$  kopií / vzorek s použitím páru 5' značených primerů BStrpA2A – BStrpA2C3FAM a páru nemodifikovaných primerů BStrpA2A – BStrpA2AS v kombinaci se SYBR Green I. Při výpočtu  $C_T$  byly amplifikační křivky upraveny vyhlazením, vyrovnaním a normalizací. Poloha fluorescenčního prahu byla nastavena na  $T = -0,5$  v případě 5' značených primerů a  $T = 0,5$  v případě SYBR Green I. (SD = směrodatná odchylka, CV = variační koeficient,  $C_T$  = prahový cyklus)

Detekční systém	Číslo opakování experimentu	$C_T$ (dle výchozích koncentrací)					
		$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$
5' značené primery	1.	28,53	30,97	33,58	36,14	38,94	43,88
	2.	28,27	30,76	33,91	37,26	38,94	43,88
	3.	28,92	31,82	34,29	37,21	40,57	43,13
	4.	29,37	31,68	32,28	36,93	40,77	43,94
	5.	26,74	30,94	33,13	36,37	38,53	42,50
	6.	28,49	31,64	34,64	36,79	40,12	42,50
	<b>průměr</b>	<b>28,39</b>	<b>31,30</b>	<b>33,64</b>	<b>36,78</b>	<b>39,65</b>	<b>43,31</b>
	<b>SD</b>	<b>0,90</b>	<b>0,46</b>	<b>0,85</b>	<b>0,45</b>	<b>0,96</b>	<b>0,69</b>
	<b>CV (%)</b>	<b>3,16</b>	<b>1,47</b>	<b>2,53</b>	<b>1,22</b>	<b>2,42</b>	<b>1,59</b>
SYBR Green I	1.	20,32	25,04	27,89	31,52	35,98	38,51
	2.	21,05	24,40	28,02	31,36	35,08	37,97
	3.	20,30	23,87	27,40	30,64	33,99	37,21
	4.	20,56	24,44	27,77	31,17	35,02	37,90
	5.	21,06	25,12	28,04	31,22	35,78	38,71
	6.	20,20	23,97	27,30	30,84	33,79	37,29
	<b>průměr</b>	<b>20,58</b>	<b>24,47</b>	<b>27,74</b>	<b>31,12</b>	<b>34,94</b>	<b>37,93</b>
	<b>SD</b>	<b>0,38</b>	<b>0,52</b>	<b>0,32</b>	<b>0,33</b>	<b>0,90</b>	<b>0,61</b>
	<b>CV (%)</b>	<b>1,87</b>	<b>2,12</b>	<b>1,14</b>	<b>1,06</b>	<b>2,58</b>	<b>1,61</b>

**Příloha 5: CD s aplikací „Real-time PCR Calculator“ a ukázkovými soubory.**