



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POUŽITÍ PCR V REÁLNÉM ČASE PRO CHARAKTERIZACI NOSIČŮ POUŽÍVANÝCH PRO IZOLACI DNA

APPLICATIONS OF REAL-TIME PCR FOR CHARACTERIZATION PARTICLES SUITABLE FOR DNA ISOLATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martina Ondřejková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1052/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Martina Ondřejková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Použití PCR v reálném čase pro charakterizaci nosičů používaných pro izolaci DNA

Zadání diplomové práce:

Vypracování literárního přehledu na téma magnetických nosičů a jejich využití v molekulární biotechnologii, zejména s ohledem na jejich biokompatibilitu. Zavedení metody pro ověření úrovně enkapsulace magnetických jader nano- a mikročástic vhodných pro aplikace v molekulární diagnostice, zejména pro izolaci DNA z různých typů komplexních vzorků.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Martina Ondřejková
student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Teoretická časť diplomovej práce bola zameraná na magnetické nosiče zložené z magnetického jadra pokrytého polymérnou vrstvou, využívané prevažne v medicínskych, molekulárno-biologických a biochemických aplikáciach. Enkapsulácia jadra je pre uvedené aplikácie podstatná z dôvodu zníženia nešpecifickej adsorpcie proteínov, zvýšenia biokompatibility a nožnej funkcionalizácie magnetických nosičov.

V experimentálnej časti práce bola amplifikovaná DNA (*E.coli*) pomocou polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase (PCR v reálnom čase) v prítomnosti magnetických nosičov pokrytých kopolymérom polyhydroxymetakrylátom-glycidylmetakrylátom (P(HEMA-co-GMA)) s obsahom alebo bez obsahu karboxylových funkčných skupín. Inhibičný efekt magnetických nosičov rôznej koncentrácie v PCR zmesi bol vyhodnocovaný z hodnôt parametrov kalibračných priamok získaných regresnou analýzou. Prítomnosť špecifického produktu PCR bola overovaná agarózovou gélovou elektroforézou. Väčšina magnetických nosičov bez obsahu karboxylových skupín zhášala fluorescenciu v rozsahu koncentrácií 2,0 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi, inhibícia amplifikácie DNA sa nepreukázala a sú teda biokompatibilné. Magnetické nosiče s obsahom karboxylových skupín zhášali fluorescenciu už pri nižších koncentráciách, v rozsahu 0,4 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi. Bola preukázaná ich inhibícia amplifikácie v rozsahu koncentrácií 2,0 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi, od koncentrácie 0,8 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi inhibícia nenastala a nosiče sú biokompatibilné. Výsledky nezáviseli od charakteristických vlastností magnetických nosičov ale od prítomnosti karboxylových skupín na povrchu nosiča a stupňa pokrytia magnetického jadra polymérom. PCR v reálnom čase sa preukázala ako účinný nástroj pre štúdium enkapsulácie magnetického jadra a vplyvu funkčných skupín na povrchu polymérnej vrstvy.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

magnetické nosiče, PCR v reálnom čase, izolácia DNA, pokrytie magnetického jadra

ABSTRACT

The theoretical part of the diploma thesis was focused on core-shell type magnetic carriers, used mainly in medical, molecular-biological and biochemical applications. Encapsulation of the core is essential for these applications due to the decrease of non-specific protein adsorption, increase of biocompatibility and the possible functionalization of magnetic carriers.

In the experimental part, the DNA (*E. coli*) was amplified by real-time PCR in the presence of poly(hydroxymethacrylate-co-glycidylmethacrylate) (P(HEMA-co-GMA)) magnetic carriers with/without carboxyl groups. The inhibitory effect of different concentrations of magnetic carriers in the PCR mixture was evaluated from the calibration curve parameter values obtained by regression analysis. The presence of a specific PCR product was verified by agarose gel electrophoresis. Most of magnetic carriers without carboxyl groups extinguished the fluorescence in the concentration range of 2,0 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in the PCR mixture, without inhibition of DNA amplification - the carriers were biocompatible. Magnetic carriers with carboxyl groups extinguished the fluorescence in the lower concentration range (0,4 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in the PCR mixture). Their inhibition of amplification was in the concentration range of 2,0 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in the PCR mixture, from the concentration 0,8 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in the PCR mixture, the inhibition did not occur and the carriers were biocompatible. The results do not depend on the characteristic properties of the magnetic carriers but on the presence of the carboxyl groups on the surface of the carrier and the degree of coverage of the magnetic core by the polymer. Real-time PCR has become an effective tool for studying magnetic core encapsulation and the influence of functional groups on the surface of the polymeric layer.

KEYWORDS

magnetic carriers, real-time PCR, DNA isolation, magnetic core covering

ONDREJKOVÁ, M. *Použití PCR v reálném čase pro charakterizaci nosičů používaných pro izolaci DNA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 68 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som sa touto cestou poďakovala svojej vedúcej diplomovej práce Ing. Štěpánke Trachtovej, PhD. za trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala, predané skúsenosti a cenné rady. Poďakovanie patrí aj doc. RNDr. Alene Španovej, CSc. za pomoc a rady pri praktickej časti.

OBSAH

ABSTRAKT	3
KLÚČOVÉ SLOVÁ	3
ABSTRACT	4
KEYWORDS	4
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1 Magnetické nosiče	9
2.1.1 Magnetické jadro	10
2.1.1.1 Magnetické vlastnosti	10
2.1.2 Enkapsulácia magnetických jadier	13
2.1.2.1 Materiál používaný na enkapsuláciu	14
2.1.2.2 Funkcionalizácia nosičov	15
2.1.3 Metódy prípravy magnetických nosičov	15
2.1.4 Využitie magnetických nosičov	16
2.1.4.1 <i>In vitro</i> aplikácie	16
2.1.4.2 <i>In vivo</i> aplikácie	18
2.1.5 Štúdium vlastností magnetických nosičov	19
2.1.5.1 Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase	20
2.1.5.1.1 Interkalačné farbivá	21
2.1.5.1.2 Absolútna kvantifikácia	21
2.1.5.1.3 Analýza kriviek topenia	24
3. CIEĽ PRÁCE	26
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
4.1 Materiál	27
4.1.1 Bakteriálna DNA	27
4.1.2 Magnetické nosiče	27
4.1.3 Komponenty pre PCR v reálnom čase	28
4.1.3.1 Chemikálie pre agarózovú gélovú elektroforézu	29
4.1.4 Prístroje a pomôcky	29
4.2 Metódy	29
4.2.1 PCR v reálnom čase	29
4.2.2 Agarózová gélová elektroforéza	30
4.2.2.1 Príprava gélu pre agarózovú gélovú elektroforézu	31
4.2.2.2 Nanášanie vzoriek na agarózový gél	31
4.2.2.3 Priebeh elektroforézy	31
5. VÝSLEDKY A DISKUSIA	32
5.1 PCR v reálnom čase	32
5.1.1 Amplifikačné krivky	32

5.1.2	Analýza kriviek topenia	42
5.2	Agarózová gélová elektroforéza	44
5.3	Porovnanie charakteristických vlastností magnetických nosičov s výsledkami z PCR v reálnom čase	53
6.	ZÁVER.....	56
	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	57
7.	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	58

1. ÚVOD

Magnetické nosiče sa využívajú kvôli ich reakciám na vonkajšie podnety. Využíva sa hlavne ich reakcia na intenzitu magnetického poľa. Predmetom záujmu sú prevažne superparamagnetické nosiče, ktoré vykazujú magnetické vlastnosti len v prítomnosti magnetického poľa. Zo štruktúrneho hľadiska je známych niekoľko typov magnetických nosičov. Pre biochemické, molekulárno-biologické a medicínske aplikácie sú používané prevažne magnetické nosiče zložené z magnetického jadra enkapsulovaného v nemagnetickom, najčastejšie polymérnom matrici. Enkapsulácia magnetického jadra je výhodná z viacerých dôvodov. Pre zachovanie superparamagnetických vlastností je podstatné zníženie schopnosti tvorby zhukov a znížená oxidácia magnetického materiálu. Pre molekulárno-biologické a medicínske aplikácie je podstatná ich biokompatibilita, nízka nešpecifická adsorpcia proteínov a prítomnosť funkčných skupín. Uvedené vlastnosti sa závisia od výberu materiálu použitého na enkapsuláciu a od stupňa pokrytia magnetického jadra. Povrch magnetických nosičov môže byť dodatočne funkcionalizovaný chemickými funkčnými skupinami, afinitnými ligandami, oligonukleotidmi alebo protilátkami. Modifikácia povrchu nosičov je uskutočnená s ohľadom na ich potencionálne využitie. Štruktúra a vlastnosti magnetických nosičov závisia aj od zvolenej metódy ich prípravy.

Magnetické nosiče sú využívané hlavne pre *in vitro* aplikácie, ktoré zahŕňajú extrakciu na pevnej fáze a totálne mikroanalytické systémy. Pred reálnym využitím magnetických nosičov je vhodné uskutočniť štúdium ich vlastností. Štúdium zahŕňa charakterizáciu veľkosti, štruktúry a chemického zloženia magnetického jadra, štruktúry polymérneho povrchu, veľkosti a tvaru nosičov a funkcionalizácie. Vzhľadom na to, že sú magnetické nosiče využívané pre *in vitro* aj *in vivo* aplikácie, je nutné uskutočniť testovanie biokompatibility. *In vitro* testovanie je uprednostňované pred *in vivo* testovaním. PCR v reálnom čase sa pre svoju citlivosť na inhibítory syntézy DNA stala účinným nástrojom testovania biokompatibility magnetických nosičov.

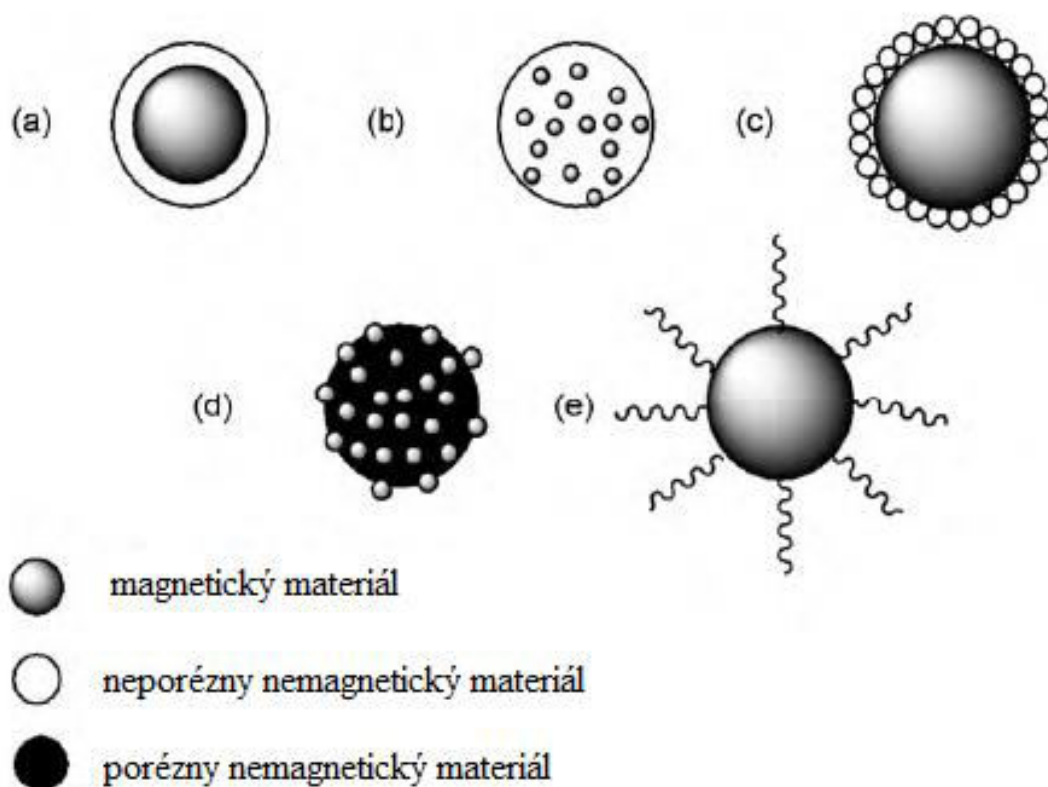
Predmetom štúdia boli magnetické nosiče P(HEMA-*co*-GMA) s alebo bez obsahu karboxylových funkčných skupín. Výsledky PCR v reálnom čase poskytujú informácie o miere enkapsulácie magnetických jadier a vplyve funkčných skupín na amplifikáciu DNA polymerázovou reťazovou reakciou.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Magnetické nosiče

V roku 1973 tím P. J. Robinsona po prvý krát použil magnetické nosiče v biotechnologickej aplikácii [1]. Od tej doby postupne narastá trend v skúmaní vlastností, syntézy a použitia magnetických nosičov v prevažne biochemických, medicínskych a molekulárno-biologických aplikáciách.

Magnetické nosiče sú zložené z dvoch častí, magnetickej a nemagnetickej, najčastejšie polymérnej časti. Ich spojením získavajú magnetické nosiče vlastnosti oboch materiálov [2]. Zo štruktúrneho hľadiska môžeme nosiče rozdeliť na niekoľko typov (Obr. 1).



Obr. 1: Základné typy magnetických nosičov. Upravené podľa [3]

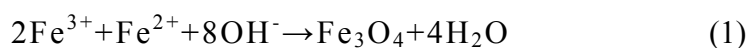
Prvý typ nosičov (Obr. 1a) obsahuje magnetické jadro enkapsulované vo vrstve neporézneho nemagnetického materiálu. Druhý typ (Obr. 1b) obsahuje heterogénne rozptýlené magnetické častice v neporéznom matrici, pričom je možné dosiahnuť aj homogénne rozptýlenie častíc [2]. Na Obr. 1c je zobrazené magnetické jadro pokryté nemagnetickými neporéznymi časticami. Tretí typ je známy aj v obrátenej štruktúre, kde jadro tvorí polymérny materiál a na povrchu sa nachádzajú magnetické častice [4]. Odstránením nemagnetického jadra vznikajú duté magnetické nosiče [2]. Štvrtý typ (Obr. 1d) obsahuje magnetické častice v poréznom nemagnetickom matrici. Posledný typ (Obr. 1e) pripomína prvý typ magnetických nosičov, avšak magnetické jadro je pokryté polymérnymi reťazcami pripomínajúcimi vlásoknice [4].

V predkladanej záverečnej práci bol testovaný prvý typ magnetických nosičov (Obr. 1a) s enkapsulovaným magnetickým jadrom, ktorý je najčastejšie využívaný pre biochemické, molekulárno-biologické a medicínske aplikácie.

2.1.1 Magnetické jadro

Pre svoju vysokú hodnotu magnetického nasýtenia sú čisté kovy (Ni, Co, Fe) zdanlivo najvýhodnejším materiálom pre prípravu magnetických jadier. Ich nevýhodou je však vysoká citlivosť na oxidáciu a toxicita [5, 6]. Preto sú preferovaným magnetickým materiálom ferity, pre ich jednoduchosť prípravy, odolnosť voči oxidáciám, biokompatibilitu a priaznivú cenu [7]. Chemický vzorec feritov je vyjadrený ako $MO \cdot Fe_2O_3$, pričom $M = Co, Cu, Mn, Fe$ atď. [8]. Vlastnosti feritov závisia od ich chemického zloženia, tvaru, veľkosti, stupňa kryštalizácie [2].

Ferit známy ako magnetit obsahuje $M = Fe$. Magnetit (Fe_3O_4) je čierny feromagnetický oxid železa s inverznou spinelovou štruktúrou obsahujúci železnaté a železité ióny [8]. Je najčastejšie pripravený alkalickou koprecipitáciou Fe^{2+} a Fe^{3+} solí [4], ktorú môžeme vyjadriť uvedenou rovnicou (1).



Schopnosť vytvárať kryštáliky magnetitu majú aj niektoré baktérie, pochádzajúce zo sedimentov z mora, napr. *Magnetospirillum magneticum* (AMB-1). Spomenutá baktéria vytvára intracelulárne magnetické nanočastice s veľkosťou 50 až 100 nm [9, 10].

Z magnetitu ako prekursora je možné vytvoriť maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$), načervenalý čiernohnedý feromagnetický oxid železa. Jeho vlastnosti sú podobné magnetitu [9] a vďaka jeho podobnosti s magnetitom je zaraďovaný medzi ferity, napriek jeho odlišnému zloženiu. Maghemit je pripravovaný oxidáciou magnetitu za použitia peroxidu vodíka [12], alebo dusičnanu železitého [13] ako oxidačného činidla. Maghemit je stabilnejší ako magnetit a preto je pre biologické aplikácie vhodnejší. Výhodou magnetitu a maghemitu je ich vysoká hodnotu nasýtenia magnetizácie ($80-100 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$), čo je o dva rády vyššie ako iné oxidy kovov [9]. Magnetické jadro určuje magnetické vlastnosti nosičov.

2.1.1.1 Magnetické vlastnosti

Magnetická susceptibilita (χ_m) popisuje chovanie materiálu v prítomnosti vonkajšieho magnetického poľa a môžeme ju vyjadriť uvedenou rovnicou (2).

$$\chi_m = \frac{M}{H} \quad (2)$$

Kde M je stupeň magnetizácie a H je intenzita magnetického poľa [4].

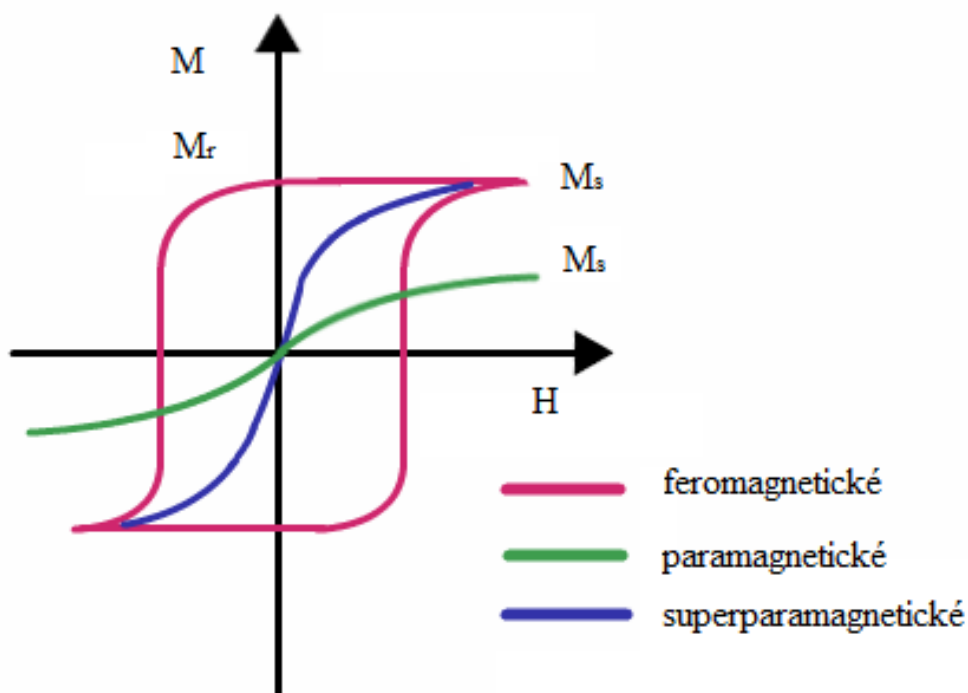
Podľa hodnoty magnetickej susceptibility delíme látky do troch základných skupín [14]:

- diamagnetické - $\chi_m \approx 10^{-6}$
- paramagnetické - $\chi_m = 0$ až 0,01
- feromagnetické - $\chi_m \approx 10^6$

Diamagnetické a paramagnetické látky sú pre magnetický tok prestupné a za normálnych podmienok majú hodnotu magnetického nasýtenia (M_s) veľmi nízku. Vykazujú lineárnu závislosť magnetizácie na intenzite magnetického poľa, ktorú môžeme vyjadriť ako (3) [4]

$$M = \chi_m H . \quad (3)$$

Feromagnetické látky je možné magneticky nasýtiť, navyše vykazujú remanentnú (zbytkovú) magnetizáciu (M_r) . Závislosť magnetizácie na intenzite magnetického poľa je vyjadrená hysteréznou krivkou [4]. Remanentná magnetizácia je priesečník hysteréznej krivky so zvislou osou magnetizácie (Obr. 2).



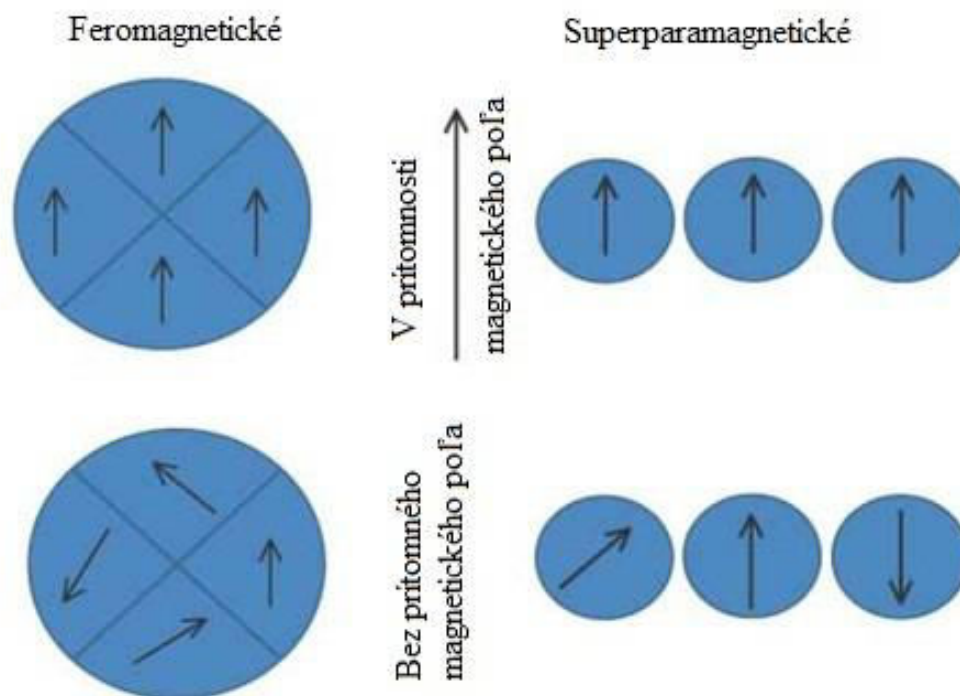
Obr. 2: Graf závislosti magnetizácie na intenzite magnetického poľa s vyznačenými krivkami magnetizácie pre paramagnetické, superparamagnetické a feromagnetické materiály. Upravené podľa [15]

Superparamagnetické látky majú kombináciu paramagnetických a feromagnetických vlastností. Tak ako u feromagnetických látok je ich magnetizácia po dosiahnutí magnetického nasýtenia konštantná. Na druhú stranu, tak ako paramagnetické látky nevykazujú hysterézný charakter a nemajú remanentnú magnetizáciu [4].

Magnetické správanie je zapríčinené spontánnou orientáciou nekompensovaných

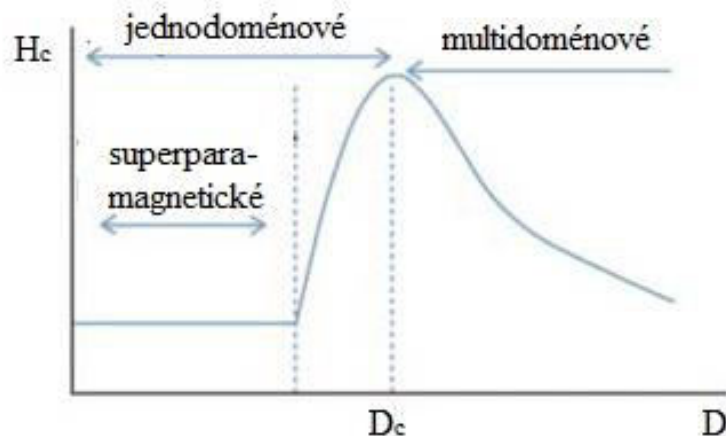
magnetických momentov atómov do magnetických domén v prítomnosti magnetického poľa. Väčšie častice sú multidoménové, obsahujú viac domén opačných spinov. Domény sú oddelené doménovými stenami. Menšie častice obsahujú len jednu doménu. Tvorba doménových stien je energeticky výhodná od takzvaného kritického priemeru častíc (D_c), ktorý závisí od chemického zloženia a tvaru magnetického materiálu [2].

Po vložení častíc do magnetického poľa sa spiny jednodoménočných častíc orientujú jedným smerom. Väčšie častice túto schopnosť nemajú, čím sa stanú prestupnými pre magnetický tok – feromagnetickými. Menšie častice sú vďaka obsahu jednej domény superparamagnetické [2, 16]. Orientácia spinov častíc rôznych veľkostí je názorne popísaná na Obr. 3.



Obr. 3: Správanie častíc odlišných veľkostí v prítomnosti a bez prítomnosti magnetického poľa. Upravené podľa [16]

Superparamagnetické vlastnosti nezávisia len od obsahu domén. Ďalším dôležitým parametrom magnetických častíc je ich schopnosť odolávať demagnetizácii, takzvaná koercivita (H_c). Malé jednodoménočné častice majú takmer nulovú koercivitu a sú teda superparamagnetické. S veľkosťou jednodoménočných častíc rastie ich hodnota koercivity. Multidoménočné častice vykazujú koercivitu za každých okolností [17]. Závislosť koercivity na priemere magnetických častíc je zobrazená na Obr. 4.



Obr. 4: Graf závislosti koerziivity (H_c) na priemere magnetických častíc (D) s vyznačeným kritickým priemerom magnetických častíc (D_c). Upravené podľa [16]

Vo všeobecnosti, superparamagnetické vlastnosti vykazujú kryštály oxidov železa s priemerom menším ako 30 nm. Tieto kryštály sú nazývané superparamagnetické nanočastice oxidov železa („superparamagnetic iron oxide nanoparticles – SPION“) [4]. Superparamagnetické častice sú po odstránení magnetického poľa relatívne jednoducho dispergovateľné. Rovnako dokážu vo vode alebo v nepolárnych roztokoch vytvárať koloidné disperzie - magnetické fluidné systémy [8].

Výhodou magnetických jednodoménových nanočastíc je ich spomínaná takmer nulová koerzivita, remanentná magnetizácia a schopnosť tvoriť koloidné disperzie. Ďalšou výhodou je, že v prípade naviazania molekúl na ich povrch, majú na tieto nulový vplyv. Nevýhodou je ich menšia magnetická sila, ktorá hlavne vo viskózných systémoch môže byť problematická. Pri použití magnetických častíc na separačné techniky, tieto trvajú až desiatky minút. Z časového hľadiska je výhodnejšie používanie väčších častíc [2].

2.1.2 Enkapsulácia magnetických jadier

K enkapsulácii magnetických častíc sa pristupuje z mnohých dôvodov. Jedným z nich je prevencia proti agregáciám. Vo všeobecnosti, samotné SPION agregujú na základe dipólových interakcií a ich veľkého pomeru povrchu k objemu. Agregáciou strácajú svoje superparamagnetické vlastnosti a schopnosť tvorby koloidných systémov [18].

Ako bolo už spomenuté, ferity resp. oxidy železa sú menej náchylné na oxidáciu. Prítomnosť Fe^{2+} v magnetite môže zapríčiniť oxidáciu na hematit ($\alpha-Fe_2O_3$), ktorý je nemagnetický [19]. Bolo dokázané, že enkapsulované magnetické častice sú stabilnejšie voči oxidáciám v porovnaní so samotnými magnetickými časticami [20].

Magnetické častice tvorené oxidmi železa sú relatívne bezpečné, netoxické a dobre tolerovateľné pri použití *in vivo* [8]. Avšak, napríklad častice feritu kobaltnatého sú genotoxické pre tkanivá pečene [21]. Pri použití magnetických nosičov v medicínskych aplikáciách enkapsulácia bráni priamemu styku magnetických častíc a ľudského tela, čím sa znižuje ich potenciólna toxicita [22].

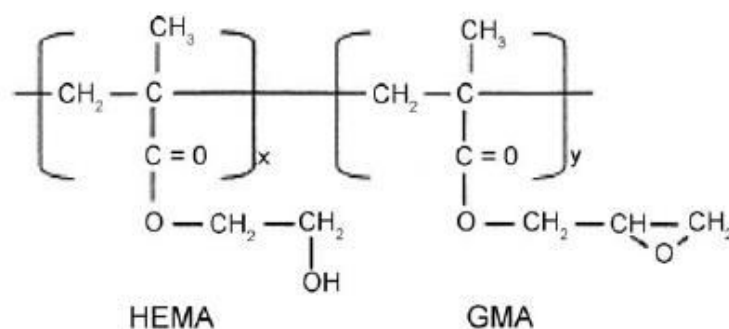
Ďalším parametrom je nutnosť nízkej nešpecifickej adsorpcie proteínov. Táto skutočnosť je veľmi dôležitá pri použití magnetických nosičov *in vivo*. Enkapsulácia bráni fagocytujúcim bunkám označiť magnetické nosiče ako cudzí materiál a tie vďaka tomu dlhšie cirkulujú v krvnom obeh [23].

Enkapsulácia magnetických častíc nezabezpečí len ich biokompatibilitu, ale aj lepšiu reálnu využiteľnosť. Hydroxylové skupiny samotných častíc oxidov železa majú nízku schopnosť viazať nukleové kyseliny alebo liečivá [20]. Pokrytím polymérnym matrixom s obsahom hydroxylových funkčných skupín sa zvýši množstvo naviazanej substancie [19]. Navyše polymér zabezpečí rovnaký náboj na povrchu častice, čím sa tieto stávajú stabilnejšími v koloidných disperziách [24].

2.1.2.1 Materiál používaný na enkapsuláciu

Pre pokrytie magnetických častíc je využívaný celý rad organických a anorganických materiálov. Najviac využívané sú prírodné a syntetické polyméry s obsahom funkčných skupín. Historicky najčastejšie používaným polymérom je polystyrén. Nevýhodami polystyrénu sú napríklad náročná chemická modifikácia špecifickými ligandami a nešpecifická absorpcia proteínov. Nevýhody polystyrénu viedli k myšlienke použitia polyhydroxyetylmetakrylátu (P(HEMA)) pre pokrytie magnetických častíc [4]. P(HEMA) je spojený s objavom mäkkých kontaktných šošoviek vedcom O. Wichterlem. Polymér je známy svojou mechanickou stabilitou, netoxickosťou, biokompatibilitou a nízkou nešpecifickou adsorpciou proteínov [25]. Hydroxylová skupina hydroxymetakrylátu zabezpečuje hydrofilnosť P(HEMA) a zároveň umožňuje chemické modifikácie. Kopolymerizáciou 2-hydroxyetylmetakrylátu s inými monomérmi vznikajú kopolyméry rozličných fyzikálnych a chemických vlastností [26].

Schopnosť P(HEMA) vytvárať kopolyméry bola využitá na prípravu magnetických nosičov s obsahom kopolyméru polyhydroxyetylmetakrylát-glycidylmetakrylátu (P(HEMA-co-GMA)) (Obr. 5) [27]. Epoxy skupina glycidylmetakrylátu taktiež umožňuje jeho chemické modifikácie [26].



Obr. 5: Štruktúrny vzorec kopolyméru hydroxyetylmetakrylátu-glycidylmetakrylátu [28]

Medzi ďalšie biokompatibilné polyméry patrí napríklad polyvinylalkohol [29], dextrans [30] a kyselina mliečna [4].

2.1.2.2 Funkcionalizácia nosičov

Ako bolo spomenuté, už samotným pokrytím magnetickej častice polymérom je táto funkcionizovaná, napr. $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ a $-\text{NH}_2$ skupinami. Funkčné skupiny určujú chemické vlastnosti, akými sú hydrofóbnosť alebo hydrofilnosť či afinita [31].

Funkcionalizáciou sa magnetické nosiče stávajú lepšie využiteľné pre biologické aplikácie. Pre žiadúcu špecifickú väzbu proteínov na nosič je využívaná couplingová reakcia medzi funkčnými skupinami nosiča a $-\text{NH}_2$ alebo $-\text{SH}$ skupinami proteínov za prítomnosti couplingového činidla (glutaraldehydu, karbodiimidu atď.) [31]. Proteíny sa viažu na hydrofóbný povrch nosičov [32]. Rovnako je možné povrch magnetického nosiča modifikovať afinitnými ligandami ako napríklad biotín, histidín alebo streptavidín [31], pričom napríklad trypsín [33], gelatín [34] alebo glutathion [35] sú dostupné pri komerčne používaných magnetických nosičoch. Nosiče modifikované protilátkami sú používané na izoláciu buniek tvoriacich antigén, pričom izolácia prebieha na základe špecifickej imunochemickej reakcie. Značenie magnetických nosičov oligonukleotidmi je používané pre separáciu a purifikáciu špecifických nukleových kyselín párovaním bází [36]. Možnosti funkcionizácie sú tiež schématicky zobrazené na Obr. 6, v kapitole ponímajúcej o *in vitro* aplikáciach magnetických nosičov.

V prípade P(HEMA-*co*-GMA) je možné prítomnú hydroxylovú skupinu oxidovať na karboxylovú skupinu v kyslom prostredí vodného roztoku magnanistanu draselného [37]. Vzhľadom na to, že hydrofilný povrch P(HEMA-*co*-GMA) nosiča má negatívny náboj, tak ako DNA, nebola predpokladaná využiteľnosť magnetických nosičov pre tento účel [8]. Napriek tomu boli magnetické nosiče s obsahom karboxylových skupín úspešne využité na izoláciu produktov PCR [38], plazmidovej DNA [39] a bakteriálnej DNA z rôznych komplexných vzoriek [37, 40, 41].

2.1.3 Metódy prípravy magnetických nosičov

Zvolená metóda prípravy magnetických nosičov sa odvíja od toho, aký typ nosiča chceme dosiahnuť. Neexistuje univerzálna metóda pre všetky typy nosičov, ktorá zároveň zabezpečí všetky požadované vlastnosti nosiča ako sú dôkladná enkapsulácia magnetického jadra, úplná biokompatibilita, žiaduca veľkosť a monodisperznosť. Afinita použitého monoméru alebo polyméru k magnetickému jadrú závisí od funkčných skupín, elektrostatických interakcií a reakčného prostredia [4]. Vo všeobecnosti sú známe tri základné metódy prípravy nosičov:

- syntéza z predpripraveného polyméru a magnetických častíc,
- syntéza v polymérnom matrice,
- syntéza polyméru v prítomnosti magnetických častíc [2, 4].

Pod prvú metódu spadajú techniky zvané separácia fáz, odparovanie rozpúšťadla, premena roztoku na gél („*sol-gel transition*“) a „*layer-by-layer*“ technika. Pre prípravu magnetických nosičov s obsahom magnetického jadra pokrytého polymérnou vrstvou je možné tiež využiť „*layer-by-layer*“ techniku. Princípom je pokrývanie magnetického jadra viacerými vrstvami polyméru, založené na elektrostatických interakciách. Thünemann a kol. úspešne pokryli magnetické jadrá z maghemitu vrstvou polyetylénimínu a následne blokovým kopolymérom polyetylénoxid-polyglutámovou kyselinou [42].

Druhá metóda je založená na tvorbe kryštálov oxidov železa priamo v polymérnom matrici. Najčastejšie je využívaná alkalická koprecipitácia železitých a železnatých solí, ktorá je sa používa aj pri syntéze samotných magnetických jadier. Výhodou je, že prípravou magnetických častíc *in-situ* v polymérnom matrici táto limituje veľkosť vytváraných magnetických častíc. Vďaka tomu je zabezpečená lepšia uniformita ako v prípade prípravy samotných častíc mimo polymérny matrix. V prípade magnetických nosičov s magnetickým jadrom v polymérnom matrici prebieha najprv samotná syntéza magnetických častíc v roztoku polyméru a následne po ukončení syntézy sú tieto pokryté vrstvou polyméru [2].

Vo všeobecnosti sú techniky syntézy polyméru v prítomnosti magnetických častíc delené na suspenzné, emulzné, miniemulzné, mikroemulzné a disperzné. Je dôležité si uvedomiť, že magnetické častice majú vplyv na reakčnú kinetiku, zrážanie polyméru a celkovú stabilitu systému. Rovnako je podstatné, aby magnetické častice mali vyššiu afinitu k monomérom tvoriacim polyméry ako k ostatným zložkám systému (emulgátory, stabilizátory). Pre magnetické nosiče s obsahom magnetického jadra pokrytého polymérnou vrstvou je úspešne využívanou technikou disperzná polymerizácia. Výhodou tejto techniky je získanie mikročastíc jednotných rozmerov a jednoduchosť ich prípravy. Najdôležitejším parametrom pre disperznú polymerizáciu je výber vhodného reakčného média, v ktorom je použitý monomér rozpustný a magnetické častice so vznikajúcim polymérom sú nerozpustné. Zahriatím polymerizačnej zmesi dochádza k rozkladu iniciátora a postupnému vzniku oligomérov. Oligoméry vytvárajú reťazce, ktoré pri prekročení kritickej dĺžky reťazca vytvárajú zhluky. Počas tvorby zhukov dochádza k adsorpcií stabilizátora na vznikajúcich primárnych magnetických nosičoch. V prípade, že je tvorba nových primárnych nosičov dokončená, nastáva postupné zväčšovanie vytvorených nosičov a získavanie ich uniformnej veľkosti [4].

Disperzná polymerizácia bola použitá pre prípravu neporéznych magnetických nosičov s magnetickým jadrom tvoreným maghemitom a polymérnou vrstvou tvorenou kopolymérom P(HEMA-*co*-GMA). Polymerizačná zmes bola tvorená monomérmi 2-hydroxyethylmetakrylátom (HEMA) a glycidylmetakrylátom (GMA) v zmesi toluénu s 2-metylpropan-1-olom, koloidnými nanočasticami magnetitu alebo maghemitu pokrytými kyselinou olejovou, stabilizátorom aceto-butyrátom celulózy a iniciátorom reakcie dibenzoylperoxidom. Polymerizácia prebieha počas 16 hodín, pri 70 °C [40, 43].

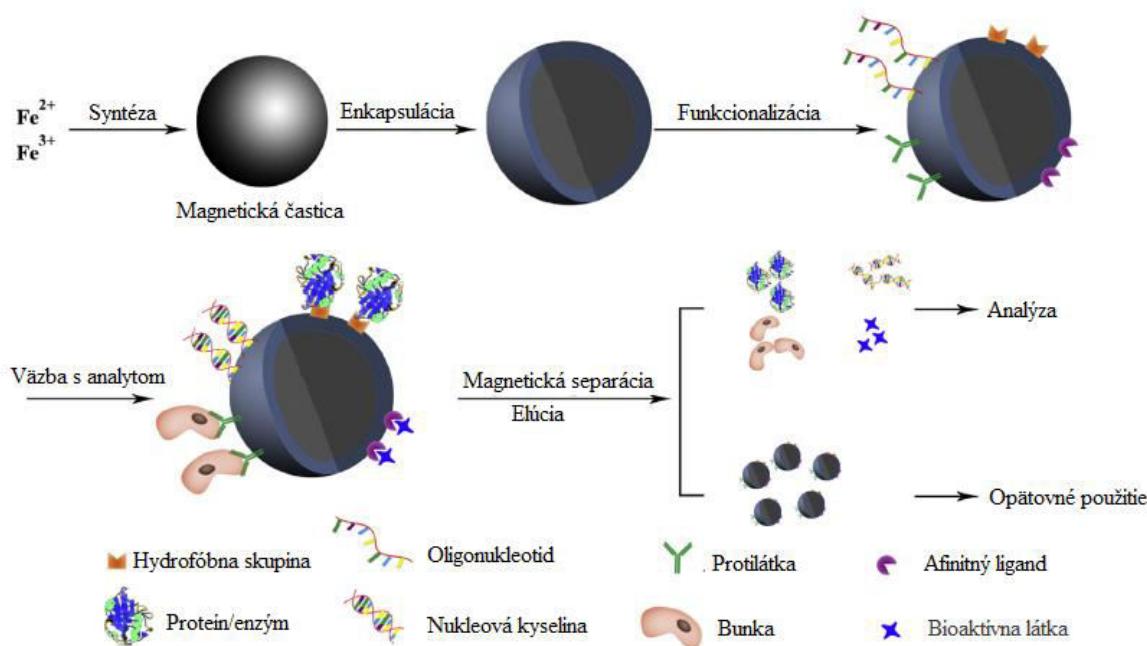
2.1.4 Využitie magnetických nosičov

Základné rozdelenie využitia magnetických nosičov pre biologické a medicínske aplikácie je použitie *in vivo* a *in vitro*. Magnetické nosiče sú používané hlavne pre *in vitro* aplikácie zahŕňajúce izoláciu a zakoncentrovanie buniek a biomolekúl (DNA, proteíny atď.) a totálne mikroanalytické systémy. Medzi *in vivo* aplikácie patrí magnetická rezonancia („*magnetic resonance imaging – MRI*“), transport liečiv a hypertermia.

2.1.4.1 *In vitro* aplikácie

Správna príprava vzoriek je pre samotnú analýzu nevyhnutný krok, ktorý pri nesprávnom

prevedení môže ovplyvniť celkové výsledky. Biologické vzorky sú často komplexné a obsahujú veľmi malé množstvo analytu. Preto okrem samotnej izolácie analytu zo vzorky je dôležité jeho zakoncentrovanie. Izoláciou a zakoncentrovaním sa zníži vplyv možných interferujúcich látok prítomných vo vzorke [44]. Bežne používané techniky prípravy vzoriek zahŕňajú elektroforézu [45], ultrafiltráciu [46], zrážanie [47] alebo extrakčné techniky [48]. Každá z týchto techník má svoje výhody a nevýhody. Napríklad klasická izolácia DNA fenol-chlóroformovou extrakciou a následnou precipitáciou etanolom je zdĺhavá, hlavne pri príprave veľkého množstva vzoriek [8]. Navyše pri extrakcii DNA z komplexných vzoriek môže nastať súčasná extrakcia interferujúcich látok spolu s DNA, čím je ovplyvnená amplifikácia v PCR [49]. Riešením je použitie chromatografických techník alebo extrakcie na pevnej fáze („*solid-phase extraction* – SPE“). Gélová permeačná chromatografia a iónovovymenná chromatografia je o niečo zdĺhavejšia a komplikovanejšia ako SPE [8]. Magnetické nosiče v SPE sú používané ako alternatíva konvenčných sorbentov, ktoré nie vždy prinesú uspokojivé výsledky [44]. Na Obr. 6 je zobrazená schéma od syntézy magnetických častíc až po použitie v SPE pre rôzne analyty.



Obr. 6: Schématické zobrazenie prípravy magnetických nosičov a ich využitia v SPE. Upravené podľa [31]

SPE techniky sú delené na priame a nepriame. Pri priamej technike sú magnetické nosiče ponechané v médiu so separovateľnými zložkami počas určitého času. Analyt sa naviaže na nosiče a vzniká komplex nosič-analyt. Pri nepriamej technike sa napr. bunka naviaže na primárnu protilátku. Po pridaní magnetických nosičov s naviazanou sekundárnou protilátkou bunka reaguje na sekundárnu protilátku na nosiči, v dôsledku vyššej afinity. Pri oboch metódach je vzniknutý komplex nosič-analyt separovaný magnetickým poľom a následne je analyt eluovaný do nového vodného roztoku rozpúšťadla [2, 31].

Magnetické nosiče môžu byť využívané aj v totálnych mikroanalytických systémoch, kam

spadajú napríklad laboratórium na čipe („*lab-on-chip*“), mikrofluidné systémy alebo biosenzory. Tieto zariadenia a systémy majú malé rozmery a odolnú, automatizovanú mechaniku. Sú ľahko prenosné a nie sú drahé, čo ich predurčuje na použitie v diagnostike a nanomedicíne [18]. Magnetické nosiče v mikroanalytických systémoch zlepšujú limity detekcie, citlivosť a skracujú čas analýzy [3].

2.1.4.2 *In vivo* aplikácie

Magnetická rezonancia patrí medzi efektívne zobrazovacie techniky používané v diagnostike, klinickej medicíne a biomedicínskom výskume [2]. S MRI dokážeme odlíšiť zdravé tkanivá od patologických. Dôležitou súčasťou MRI sú kontrastné látky, ktoré slúžia na skrátenie relaxačných časov okolitých protónov. Na základe relaxačných procesov sú kontrastné látky delené na T1 a T2. SPION majú schopnosť skrátiť čas T2 relaxácie [50]. Najpoužívanejšie sú nosiče s jadrom z magnetitu, pokryté vrstvou dextránu [51] alebo silikónu [7]. Superparamagnetické nosiče sú vhodné napríklad pre detekciu metastáz v nezväčšených lymfatických uzlinách. Zdravé tkanivo vykazuje signál, zatiaľ čo metastázy zostanú nezobrazené [52]. Z ekonomických dôvodov nie sú kontrastné látky s obsahom SPION v MRI až tak využívané [53]. Avšak ferumumoxytol s obsahom SPION, ktorý je používaný na liečbu anémie pacientov s chronickou renálnou insuficienciou je použiteľný aj ako kontrastná látka pri diagnostike pankreatitídy [54].

Napriek súčasným terapeutickým a diagnostickým možnostiam v Európe narastá počet úmrtí na rakovinu. Systémovo aplikovaná chemoterapia nezabezpečí dostatočnú koncentráciu liečiva v mieste výskytu tumoru a navyše má negatívny vplyv na celý organizmus. Magnetické nosiče sú sľubným riešením riadeného transportu liečiv v organizme. Riadeným transportom je možné liečiť rakovinu aj vysoko cytotoxickými látkami [53]. Po intravenózne aplikácii sú častice pomocou vonkajšieho magnetického poľa dopravené na určené miesto [55]. Krátko po ich akumulácii na určenom mieste sa molekuly liečiva postupne uvoľňujú [56]. Sú známe tri rôzne mechanizmy uvoľňovania liečiv z magnetických nosičov - difúzia, postupné odbúravanie a napučíavanie nasledované difúziou. Difúzia znamená rozpúšťanie molekúl liečiva v telesných tekutinách a ich uvoľnenie z nosičov. Postupné odbúravanie nastáva, keď je vysokomolekulárny polymér s obsahom liečiv postupne hydrolyzovaný. Pre napučíavanie sú používané vysušené nosiče, ktoré v tele následne uvoľnia liečivo difúziou [57,58]. Nevýhodou použitia magnetických nosičov je, že ich transport a uvoľňovanie liečiva z nich nie je vždy jednoduché [53].

Hypertermia spočíva v zahriatí kancerózneho tkaniva pomocou vonkajšieho magnetického poľa na teplotu 42 až 46 °C. Bunky patologického tkaniva sú narušené a následne aplikovaná chemoterapia a rádioterapia je účinnejšia. Problémom hypertermie je komplikované selektívne zahriatie patologického tkaniva bez narušenia okolitých tkanív. Riešením je použitie magnetických nosičov akumulovaných v tkanive tumoru [59]. Vzhľadom na schopnosť magnetických nosičov transportovať a uvoľňovať liečivá na určenom mieste, je táto využiteľná v spojení s hypertermiou. Nosiče s obsahom chemoterapeutika sú zhriate pomocou vonkajšieho magnetického poľa, čo robí chemoterapiu účinnejšou. Tento spôsob terapie je veľmi účinný pre ohraničené nádory [60, 61].

2.1.5 Štúdium vlastností magnetických nosičov

Magnetické vlastnosti nosičov sú vyhodnocované supravodivým kvantovým magnetometrom [62]. Získané magnetizačné krivky (Obr. 2) potvrdia alebo vyvrátia požadované superparamagnetické vlastnosti. Magnetizačné krivky slúžia aj pre vyhodnotenie veľkosti kryštálov oxidov železa prítomných v nosiči [63]. Veľkosť a štruktúru kryštálov môžeme určiť aj rontgenovou difrakciou [64]. Polymér na povrchu magnetickej častice môže skomplikovať identifikáciu kryštálov oxidov železa touto metódou [65]. Širokouglová difrakcia slúži na charakterizáciu kryštalických štruktúr magnetickej časti aj polymérnej časti nosiča, naopak málouhlová difrakcia slúži na sledovanie pórov poréznych polymérov nosiča [66]. Nevýhodou rontgenovej difrakcie je nemožnosť odlíšenia maghemitu od magnetitu, kvôli ich zhodnej inverznej spinelovej štruktúre [67]. Pre odlíšenie magnetitu od maghemitu je využívaná Mössbauerova spektroskopia [64]. Fotoelektrónová spektroskopia alebo energeticky disperzná röntgenová spektroskopia slúži na určenie chemického zloženia magnetického materiálu [31].

Najviac využívanou metódou pre charakterizáciu veľkosti a tvaru magnetických častíc alebo magnetických nosičov je transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) a skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM). TEM poskytuje snímky s vyšším rozlíšením ako SEM [64]. Zo snímok môžeme vypočítať priemernú hodnotu priemeru nosiča D_n (4) a priemernú hodnotu hmotnosti nosiča D_w (5),

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i} \quad (4)$$

$$D_w = \frac{\sum N_i D_i^4}{\sum N_i D_i^3} \quad (5)$$

kde N_i je počet častíc s veľkosťou D_i . Z priemernej hodnoty priemeru a priemernej hodnoty hmotnosti získame index polydisperzity PDI (6) [40].

$$PDI = \frac{D_w}{D_n} \quad (6)$$

Ak sa hodnota PDI pohybuje v rozmedzí od 1,00 do 1,05 je systém považovaný za monodisperzný [40]. Uniformita vo veľkosti a tvare nosičov má vplyv na ich magnetické vlastnosti [31].

V prípade dodatočnej funkcionalizácie je táto rovnako overovaná. Napríklad v prípade použitia streptavidínu ako afinitného ligandu je tento detekovaný v použitom roztoku UV spektrofotometriou pred a po imobilizácií na magnetické nosiče [68]. Pri chemickej funkcionalizácií magnetických nosičov –COOH skupinami, sú tieto stanovené titračne [40].

Magnetické nosiče sú ďalej sledované s ohľadom na ich využitie v *in vivo* a *in vitro* aplikáciach. *In vitro* štúdie sú preferované pred *in vivo* štúdiami z dôvodu ich jednoduchosti, priaznivej ceny, dostupnosti a etiky ich použitia [69]. PCR v reálnom čase sa stala účinnou metódou pre *in vitro* štúdium vplyvu magnetických nosičov na syntézu DNA. V prípade

prítomnosti inhibítorov PCR je znížená efektívnosť amplifikácie, ktorá môže viesť až k falošne negatívnym výsledkom [70]. Ióny železa majú preukázateľne negatívny vplyv na PCR, preto sa pri nedostatočnej enkapsulácii magnetického jadra ovplyvňuje priebeh a citlivosť PCR [71, 72].

2.1.5.1 Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) patrí medzi najvýznamnejšie techniky používané v molekulárnej biológii. V PCR sa využíva schopnosť DNA polymerázy syntetizovať nové vybrané úseky DNA z pôvodného malého množstva DNA alebo RNA (pri RNA je nutné použiť reverznú transkriptázu, na tvorbu komplementárnej DNA) [73].

PCR vyžaduje niekoľko komponentov:

- DNA templát - obsahuje DNA fragment, ktorý má byť amplifikovaný
- primery- krátke úseky jednovláknovej DNA
- DNA polymeráza – termostabilná DNA polymeráza (*Taq* DNA polymeráza, *Pfu* DNA polymeráza), pre svoju exonukleázovú aktivitu vyžaduje horečnaté ióny
- deoxynukleotid trifosfáty (dNTPs) - stavebné kamene k syntéze DNA amplikónu [73, 74].

DNA polymeráza býva často zmiešaná spolu s nukleotidmi, horečnatými iónmi, stabilizátormi v roztoku zvanom master mix [73].

PCR reakcia je založená na troch základných krokoch:

1. krok – denaturácia, počas ktorej z dvojitých DNA vzniká jednovláknová. Prebieha zvyčajne pri 95 °C.
2. krok – hybridizácia, pri ktorej primery nasadajú na DNA templát. Zvolená teplota závisí od teploty topenia primerov, najčastejšie sa pohybuje medzi 45 až 60 °C.
3. krok – elongácia, počas ktorej DNA polymeráza vytvára komplementárne vlákno nasadaním nukleotidov za 3' koniec primerov. Prebieha pri 72 °C [73, 74].

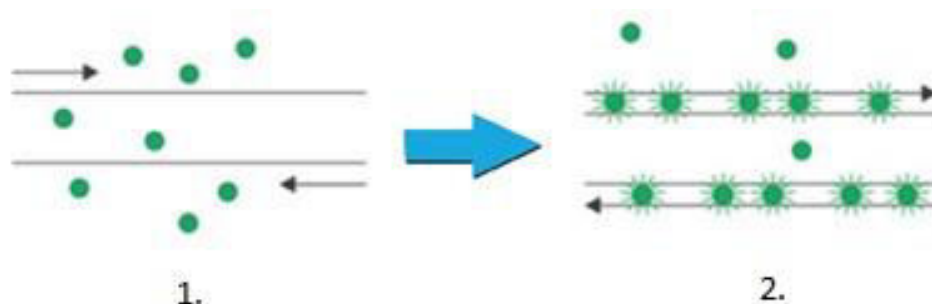
Všetky kroky sú cyklicky zopakované asi 40 krát. Počet cyklov sa odvíja od požadovaného množstva PCR produktu, od počiatočného množstva kópií a účinnosti amplifikácie. Množstvo PCR produktu rastie exponenciálne, pokiaľ nedosiahne tzv. plató fázu, v ktorej sa množstvo amplifikovanej DNA nemení [73]. Vhodné je použitie predĺženej denaturácie v prvom cykle a predĺženej elongácie pri poslednom cykle. Predĺžená denaturácia zabezpečí kompletnú denaturáciu templátu, avšak príliš dlhá denaturácia môže spôsobiť stratu enzymatickej aktivity DNA polymerázy. Predĺžená elongácia slúži na dosyntetizovanie neúplných amplikónov [75].

Pri konvenčnej PCR prebieha detekcia a kvantifikácia PCR produktu až po skončení PCR napr. pomocou gélovej elektroforézy. Naopak pri PCR v reálnom čase („*real-time PCR*“) je množstvo PCR produktu merané po každom cykle [73]. Detekcia PCR produktu prebieha vďaka prítomnosti fluorescenčnej molekuly v PCR zmesi. S rastúcim množstvom DNA stúpa fluorescenčný signál. Fluorescenčné látky môžu byť použité vo forme farbív viažúcich sa na

DNA (SYBR Green I, SYTO-9), fluorescenčne značených primerov (AmpliFluor, LUX, Scorpions) alebo fluorescenčne značených sond (TaqMan, molekulárne majáky). Najčastejšie používané je DNA viažuce farbivo SYBR Green I alebo fluorescenčne značená sonda TaqMan [76].

2.1.5.1.1 Interkalačné farbivá

Interkalačné farbivá sa nešpecificky viažu na akúkoľvek dsDNA. Samotné farbivo v roztoku emituje malé množstvo fluorescence, avšak po väzbe s dsDNA fluorescencia vzrastie 1000 násobne. Navyše fluorescenčný signál priamo úmerne rastie s množstvom amplifikovanej DNA [73, 77]. Princíp fungovania farbiva interkalačného farbiva SYBR Green I je schématicky zobrazený na Obr. 7.



Obr. 7: Princíp fungovania farbiva SYBR Green I. V 1. kroku farbivo emituje minimálne žiarenie. V 2. kroku sa počas syntézy nových vlákien interkaluje do dsDNA [73]

Vo všeobecnosti, výhodou fluorescenčných farbív je ich jednoduché použitie. Fluorescenčné sondy a primery musia byť špeciálne nadizajnované a nie sú univerzálne použiteľné. Ďalšou výhodou je, že fluorescenčné farbivá sú lacnejšie ako sondy. Poslednou výhodou je ich použitie na takzvanú analýzu kriviek topenia („*melt-curve analysis*“) [76].

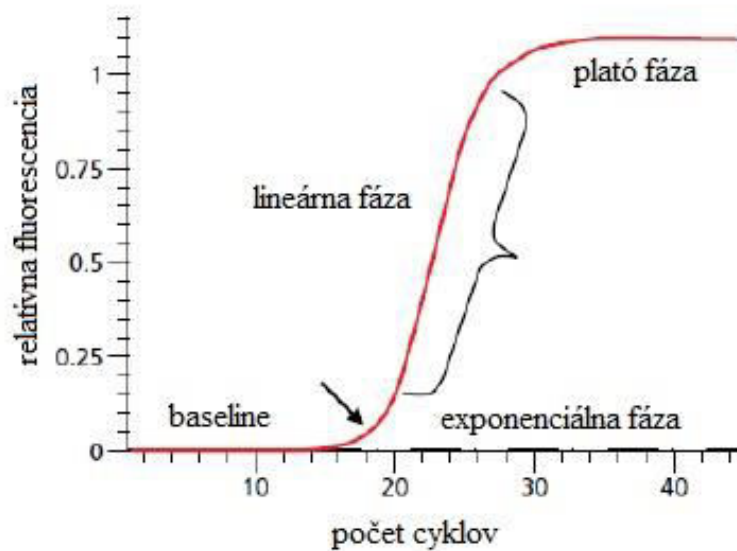
Hlavnou nevýhodou fluorescenčných farbív je ich nešpecifická väzba na akúkoľvek dvojvlákovú DNA, čím je ovplyvnená presnosť kvantifikácie. Ďalšou nevýhodou je nemožnosť použitia v multiplexnej PCR, pretože nedokážeme odlišiť fluorescenčný signál odlišných amplikónov prítomných v PCR zmesi [76].

Od prvého použitia interkalačného farbiva SYBR Green I v PCR v reálnom čase [78] bolo využívaných niekoľko typov interkalačných farbív, medzi ktoré patrí napríklad SYTO-9. V porovnaní so SYBR Green I je SYTO-9 použiteľné v širšom rozsahu koncentrácií bez toho aby inhibovalo PCR reakciu. Pri analýze kriviek topenia nemá koncentrácia SYTO-9 v PCR zmesi taký vplyv na výsledný tvar kriviek ako interkalačné farbivo SYBR Green I [79].

2.1.5.1.2 Absolútna kvantifikácia

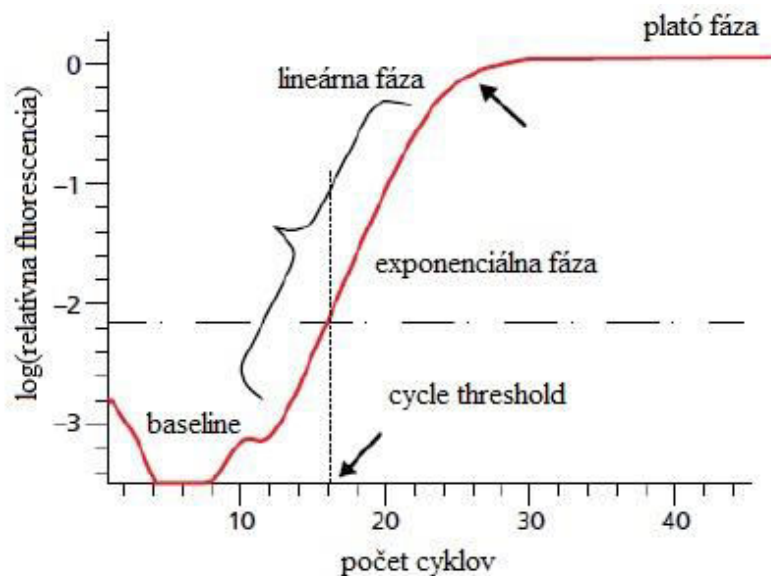
Priebeh PCR vyjadrujú amplifikačné krivky (Obr. 8), zostrojené vynesением detekovanej fluorescence v príslušnom cykle. Amplifikačné krivky môžeme rozdeliť na 4 časti:

1. Fáza pozadia („baseline“) – intenzita fluorescencie nedosahuje detekovateľné hodnoty.
2. Exponenciálna fáza – počet amplikónov dosiahne prah detekcie, inak zvaný ako „threshold cycle“ (C_T). Od tohto momentu množstvo amplikónov exponenciálne rastie.
3. Lineárna fáza – reakčná rýchlosť sa znižuje v dôsledku klesajúcej koncentrácie dostupnej DNA polymerázy.
4. Plató fáza – množstvo amplifikovanej DNA sa nemení, reakcia dosiahla svoje maximum [73].



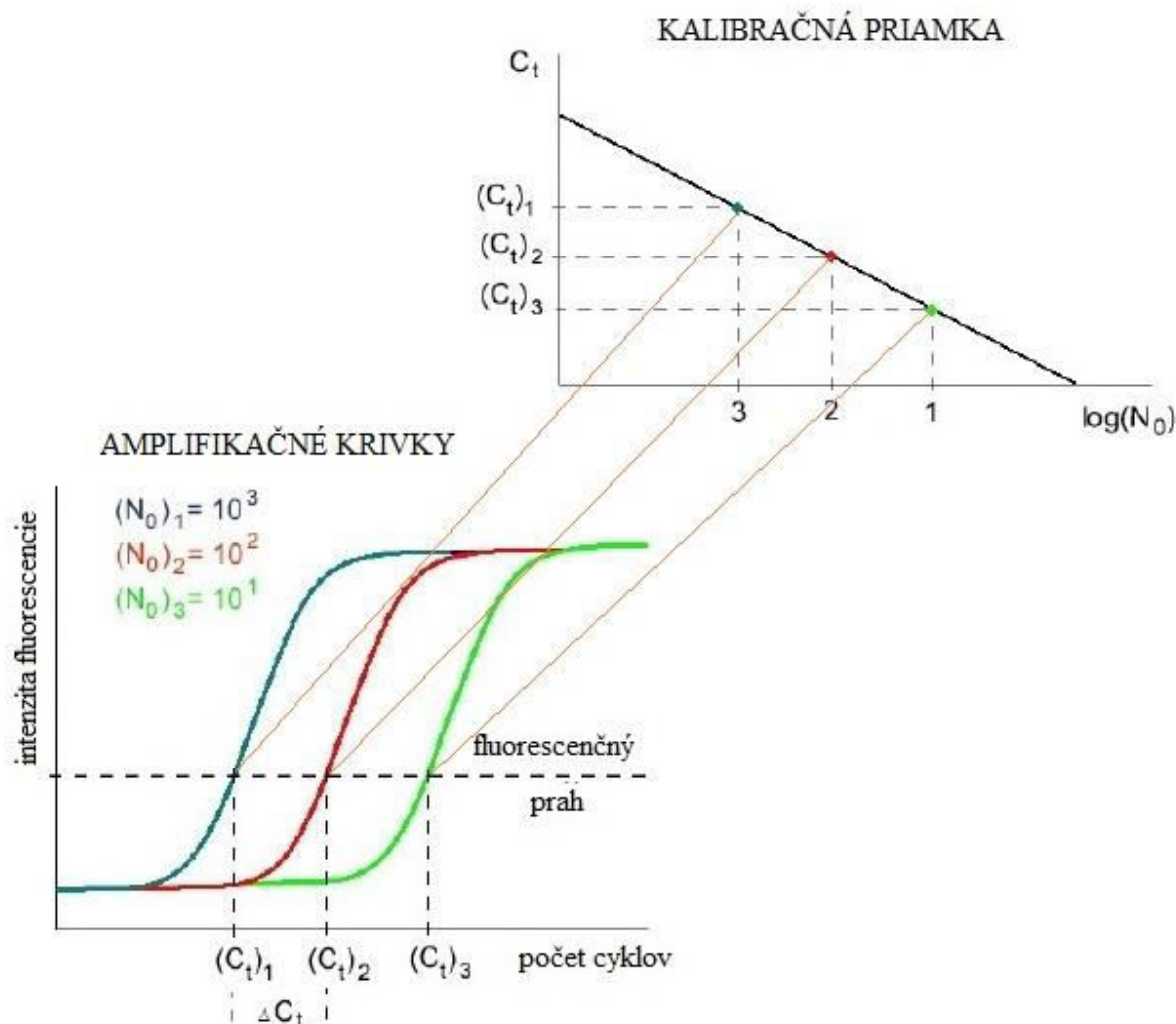
Obr. 8: Štandardná krivka amplifikácie. Upravené podľa [77]

Pre kvantifikáciu je najdôležitejšia spomínaná hodnota C_T . Hodnotu C_T získame zo závislosti zlogaritmovanej hodnoty relatívnej fluorescencie proti príslušnému cyklu (Obr. 9).



Obr. 9: Semi-log krivka amplifikácie. Upravené podľa [77]

Hodnota C_T je následne použitá pre relatívnu alebo absolútnu kvantifikáciu. Pri relatívnej kvantifikácii je zisťovaný rozdiel v hodnote C_T medzi neznámou vzorkou a referenčnou vzorkou. Pri absolútnej kvantifikácii je zisťované počiatkové množstvo DNA v neznámej vzorke. Pre absolútnu kvantifikáciu je nutné neznámu vzorku amplifikovať súčasne so sériou štandardov so známou koncentráciou. Zo série štandardov získame lineárnou regresiou kalibračnú priamku („*standard curve*“) [73]. Kalibračná priamka je zostrojená zo závislosti hodnôt C_T na zlogaritmovanej východzej koncentracii štandardov (Obr. 10).



Obr. 10: Zobrazenie tvorby kalibračnej priamky pre metódu absolútnej kvantifikácie. Upravené podľa [77]

Pre relevantné výsledky absolútnej kvantifikácie je nutné použitie aspoň troch, najlepšie piatich až desiatich sériových riedení [77]. Štatisticky získané hodnoty parametrov kalibračnej priamky sú porovnávané s optimálnymi hodnotami parametrov, uvedenými v Tab. 1

Tab. 1: Parametre charakterizujúce kalibračnú priamku [80, 81]

Parametre charakterizujúce kalibračnú priamku	Optimálne hodnoty parametrov
Sklon kalibračnej priamky (M)	-3,9 až -3,0
Korelačný koeficient (R^2)	$\pm 0,99$
Reakčná účinnosť ($r. e.$)	80 - 110%

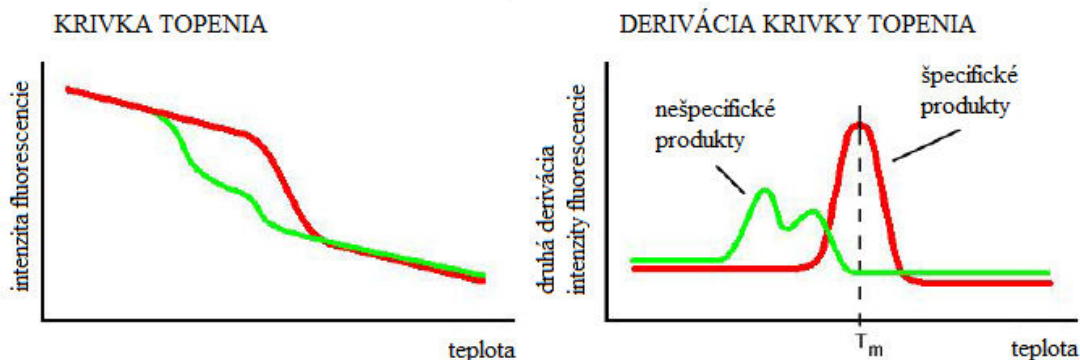
V rovnici kalibračnej priamky vo formáte $y = -bx + a$, parameter b vyjadruje sklon kalibračnej priamky („slope“) [82]. Reakčná účinnosť („efficiency“) je stanovovaná zo sklonu kalibračnej priamky pomocou uvedenej rovnice (6) [80]:

$$r. e. = 10^{\left(-\frac{1}{M}\right)} - 1 \quad (7)$$

Ak je hodnota $M = -3,33$, tak $r. e.$ bola 100%, z čoho vyplýva, že počet PCR produktov sa každým cyklom zdvojnásobil [81]. Pri štúdiu vplyvu magnetických nosičov pomocou PCR v reálnom čase sú sledované a vyhodnocované hodnoty parametrov kalibračných priamok a porovnávané s optimálnymi hodnotami v Tab. 2.

2.1.5.1.3 Analýza kriviek topenia

Analýza kriviek topenia je spojená s použitím fluorescenčných farbív a je vykonaná po PCR reakcii. Produkt PCR je postupne zahrievaný, čím je dsDNA denaturovaná. Denaturáciou sa uvoľňuje naviazané interkalačné farbivo a klesá hodnota fluorescence [73]. Deriváciou krivky topenia získame teplotu topenia produktov PCR (T_m) (Obr. 11).



Obr. 11: Analýza kriviek topenia. Upravené podľa [77]

Porovnaním teplôt topenia PCR produktov neznámych vzoriek s pozitívnou kontrolou získame informáciu o prítomnosti špecifických alebo nešpecifických produktov PCR vo vzorke. Ak je vo vzorkách prítomný len špecifický PCR produkt, analýza kriviek topenia obsahuje len jeden pík. V negatívnej kontrole vznikajú píky s nízkou intenzitou fluorescence, ktoré zvyčajne poukazujú na diméry primerov. Túto skutočnosť je vhodné potvrdiť agarózovou gélovou elektroforézou [77].

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce je štúdium enkapsulácie magnetických jadier nano- a mikročastíc vhodných pre aplikácie v molekulárnej diagnostike, hlavne pre izoláciu DNA z rôznych komplexných vzoriek. Funkčnosť častíc, respektíve stupeň pokrytia ich magnetických jadier vybraným polymérom a teda schopnosť negatívne ovplyvňovať syntézu DNA, bude testovaná pomocou polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriálna DNA

- *Escherichia coli* (D4889) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

4.1.2 Magnetické nosiče

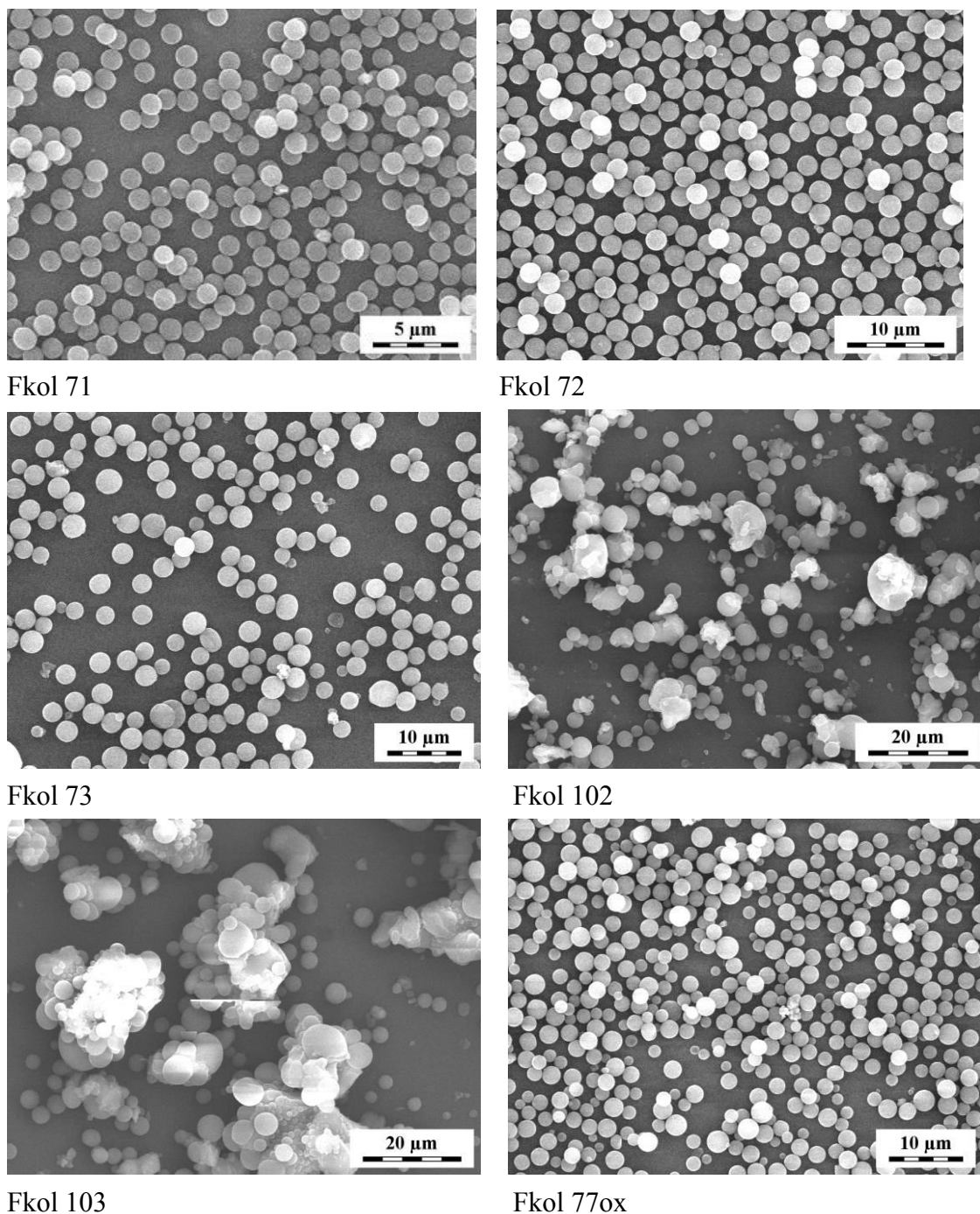
Magnetické nosiče boli pripravené Ing. Horákom, Csc. na Ústave makromolekulárnej chémie AV ČR v Prahe. Ich vlastnosti sú uvedené v Tab. 2.

Tab. 2: Charakteristické vlastnosti použitých nosičov

Magnetický nosič	Polymér	Fe (hm. %)	PDI	D_n (μm)	D_w (nm)	-COOH (mM/g)
Fkol 71	P(HEMA -co- GMA)	1,57	1,02	1,20	1,22	-
Fkol 72		0,72	1,01	2,16	2,18	-
Fkol 73		8,36	1,08	2,67	2,88	-
Fkol 102		13,46	1,17	3,11	3,64	-
Fkol 103		20,50	1,33	3,72	4,95	-
Fkol 77ox		10,02	1,09	2,23	2,42	0,76

Legenda: PDI – index polydisperzity, D_n – počet nosičov priemernej veľkosti, D_w – hmotnosť nosičov priemernej veľkosti, -COOH – karboxylová skupina

Snímky magnetických nosičov uvedené na Obr. 12, vytvorené pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu boli dodané Ing. Horákom.



Obr. 12: Snímky magnetických nosičov $P(\text{HEMA-co-GMA})$ vytvorené skenovacím elektrónovým mikroskopom

4.1.3 Komponenty pre PCR v reálnom čase

- SYTO-9 qPCR 2× Master Mix (dvakrát koncentrovaný: 150mM Tris-HCl (pH 8,8; 25°C); 40mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,02% Tween 20; 5mM MgCl_2 ; 400μM dATP; 400μM dCTP; 400μM dGTP; 400μM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonálna protilátka anti-Taq (38nM); farbivo SYTO-9; stabilizátory a aditíva) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery špecifické pre doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub) [82] (Generi Biotech,

Hradec Králové, ČR)

- Voda pre PCR (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.3.1 Chemikálie pre agarózovú gélovú elektroforézu

- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báza (Serva, Heidelberg, Nemecko)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Serva, Heidelberg, Nemecko)
- Chemikálie boli použité na prípravu 5x koncentrovaného TBE tlmivého roztoku (54 g Tris-HCl; 27,5 g H₃BO₃; 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); doplnené na 1000 ml destilovanou vodou), ktorý sa pred použitím 10x zriedi destilovanou vodou
- Agaróza (Serva, Heidelberg, Nemecko)
- Nanášací (stop) tlmivý roztok (Top-Bio, Praha, ČR)
- Štandard 100 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

4.1.4 Prístroje a pomôcky

- Mikropipety Discovery HTL rôznych objemov (PZ HTL, Varšava, Poľsko)
- Mikropipety Finnpiette F1 a F2 rôznych objemov (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- DNA/RNA UV box (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Centrifúga FVL-2400N Combi-Spin/Vortex (bioSan, Riga, Litva)
- Cycler Rotor-gene 6000 (Corbett Life Science, Concord, USA)
- Transluminátor EB-20E (Ultra Lum, Claremount, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu OWL (Own Scientific, Woburn, USA)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Easy-Cast, model OSP-300 (Own Scientific, Woburn, USA)
- Fotoaparát (Fuji FinePix X10)
- Laboratórne sklo a umelohmotné laboratórne pomôcky

4.2 Metódy

4.2.1 PCR v reálnom čase

PCR v reálnom čase bola použitá k overeniu biokompatibility testovaných magnetických nosičov. Ak nedošlo k amplifikácii použitej DNA, tak magnetické nosiče amplifikáciu inhibujú alebo dochádza k zhasaniu fluorescencie týmito nosičmi. Pomocou PCR v reálnom čase získame kalibračnú priamku spolu s parametrami, pomocou ktorých dokážeme prebehnutú reakciu zhodnotiť.

1. Pred pipetovaním boli roztoky temperované na laboratórnu teplotu a krátko zcentrifugované.
2. Do vychladeného chladiaceho bločka boli rozložené stripy a pipetované sady PCR

zmesí, ktoré boli pripravované v dvoch paralelách pre každú koncentráciu DNA ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ – $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, desiatkové riedenie). Poradie a objemy komponentov sú uvedené v Tab. 3.

Tab. 3: Zloženie zmesi pre PCR v reálnom čase

Poradie komponenta	Komponent	Objem [μl]
1.	voda pre PCR	9,5
2.	SYTO-9 qPCR 2× Master Mix	12,5
3.	primer F_eub	1,0
4.	primer R_eub	1,0
5.	DNA matrica	1,0
Celkový objem PCR zmesi		25

- Rovnakým spôsobom boli pripravené sady PCR zmesí s obsahom nosičov, kde boli pipetované roztoky s koncentráciou $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ alebo $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ alebo $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Boli pipetované objemy 0,5; 1,0; 2,5; 5 μl nosičov, pričom objem vody pre PCR bol upravený tak, aby PCR zmes mala celkový objem 25 μl .
- Rovnakým spôsobom bola pripravená v dvoch paralelách negatívna kontrola, kde DNA bola nahradená rovnakým objemom vody pre PCR. Stripy boli umiestnené do rotora a zaistené. Po vložení do cycleru bol tento spustený podľa programu uvedeného v Tab. 4.

Tab. 4: Amplifikačný program pre PCR v reálnom čase vrátane Melt analýzy

Číslo kroku	Krok	Amplifikačný program
1	Predĺžená denaturácia DNA v prvom cykle	95 °C/5 min
2	Denaturácia DNA	95 °C/30 s
3	Hybridizácia primerov	55 °C/30 s
4	Syntéza nových reťazcov DNA	72 °C/30 s
5	Dosyntetizovanie DNA v poslednom cykle	72 °C/5 min
Počet cyklov (krok 2 – 4)		30
6	Melt analýza	50 – 99 °C/5 s pre každý °C

4.2.2 Agarózová gélová elektroforéza

Agarózová gélová elektroforéza bola použitá k overeniu prítomnosti špecifických produktov PCR. Pre detekciu produktov PCR (fragmentov o dĺžke 466 bp) boli pripravené 1,8% gély.

4.2.2.1 Príprava gélu pre agarózovú gelovú elektroforézu

1. Asi 1,8 g agarózy bolo navážených do Erlenmayerovej banky a zmiešaných so 100 ml 0,5x TBE tlmivého roztoku.
2. Zmes bola rozvarená v mikrovlnnej rúre, do úplného rozpustenia agarózy.
3. Roztok bol ochladený na asi 60 °C a naliaty do elektroforetickej vaničky s hrebienkom tak, aby sa zamedzilo vzniku bublín. Vanička musí byť vo vodorovnej polohe.
4. Gel sa nechal počas 30 minút ztuhnúť pri laboratórnej teplote.
5. Po stuhnutí gélu bol hrebienok opatrne vybratý.

4.2.2.2 Nanášanie vzoriek na agarózový gél

1. Obsah každého stripu (25 µl) bol zmiešaný s 5 µl nanášacieho tlmivého roztoku.
2. Zmes z každého stripu bola postupne pipetovaná do komôrok, pričom na každý agarózový gél bolo nanesené 5 µl štandardu Malamité 100 bp.
3. Gél bol vložený do elektroforetickej vane a zaliaty 0,5x koncentrovaným TBE tlmivým roztokom asi do výšky 2-3 mm nad agarózový gél. Elektroforetická vaňa musí byť zapojená tak, aby záporne nabitá DNA migrovala smerom k anóde.

4.2.2.3 Priebeh elektroforézy

1. Bol zapnutý zdroj elektrického napätia (60 V) a separácia prebiehala, kým nanášací pufor nedomigroval asi do 2/3 dĺžky agarózového gélu.
2. Po skončení bol agarózový gél vybratý z vane a uložený do roztoku ethidiumbromidu (0,5 µg/ml) na 30 minút.
3. Zafarbený gél bol pozorovaný pomocou UV svetla transluminátora a zdokumentovaný fotoaparátom.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

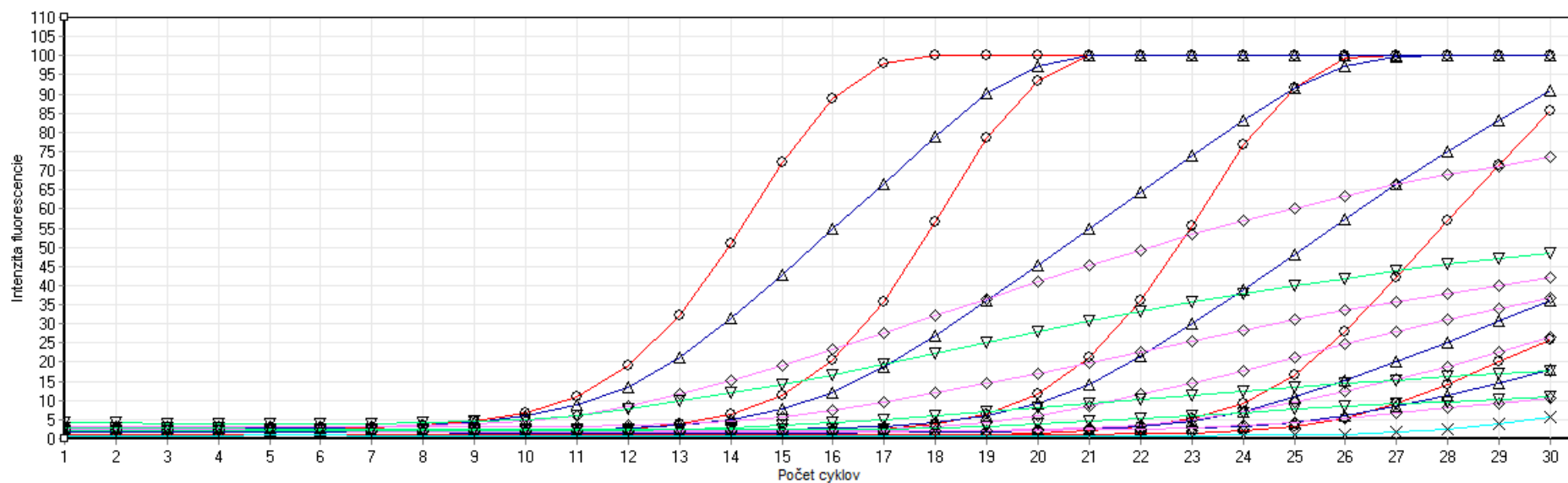
5.1 PCR v reálnom čase

Boli pripravené PCR zmesi s obsahom DNA *E. coli* ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ – $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, desiatkové riedenie) a primerov špecifických pre doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub) [82]. Zmesi boli pripravené bez obsahu magnetických nosičov a s obsahom magnetických nosičov o zvolených koncentráciách. Pre každý typ nosičov boli uskutočnené 3 merania. Prvé meranie bolo s použitím zásobného roztoku magnetických nosičov s koncentráciou $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, druhé meranie s roztokom s koncentráciou $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a tretie meranie s roztokom s koncentráciou $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Do výsledkov bola uvádzaná výsledná hodnota koncentrácie magnetických nosičov v PCR zmesi.

Analýza prístrojom Rotor-Gene 6000 bola zložená z dvoch častí. Prvou bolo priame sledovanie amplifikácie počas polymerázovej reťazovej reakcie použitím fluorescenčného farbiva SYTO-9 prítomného v PCR zmesi, ktorého výsledkom sú amplifikačné krivky. Druhá časť bola analýza kriviek topenia, takzvaná melt analýza.

5.1.1 Amplifikačné krivky

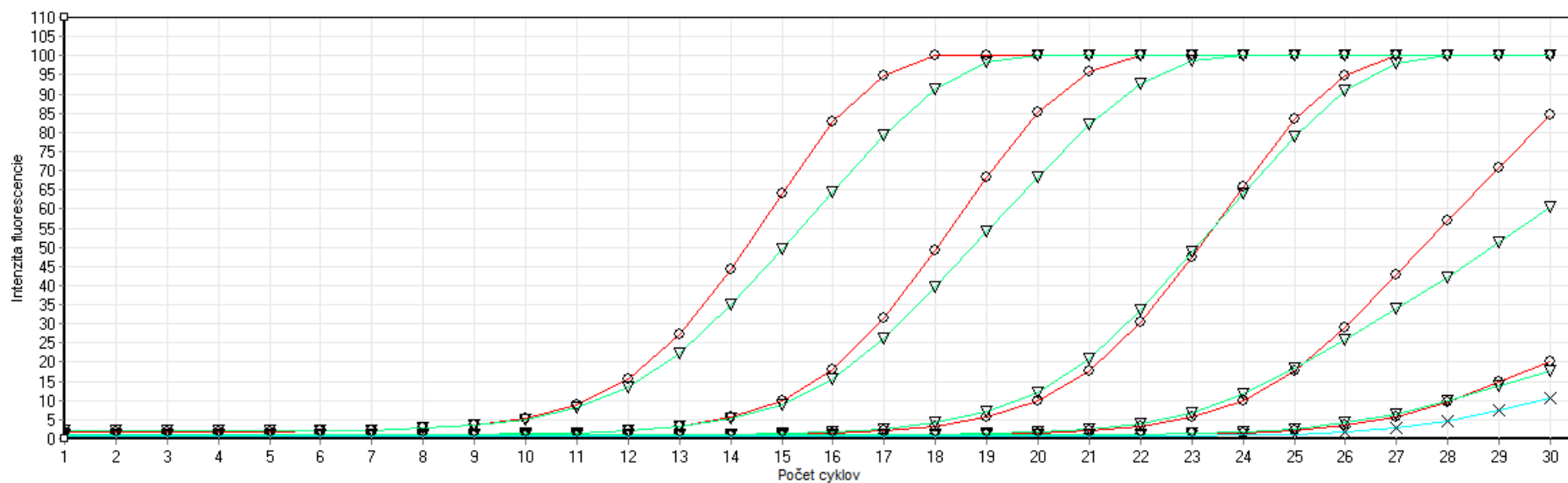
Získané amplifikačné krivky vyjadrujú intenzitu fluorescencie v závislosti na príslušnom cykle. Amplifikačné krivky PCR zmesí bez magnetických nosičov boli porovnávané s amplifikačnými krivkami PCR zmesí s rôznou koncentráciou magnetických nosičov. Pre prehľadnosť boli uvedené amplifikačné krivky vybraných koncentrácií tak, aby sa neprekrývali. Po zvážení boli vynechané amplifikačné krivky pre $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ DNA *E.coli* z dôvodu získania presnejších výsledkov. Ako príklad sú na Obr. 13 a Obr. 14 uvedené amplifikačné krivky pre prvé a druhé meranie s nosičmi Fkol 71.



Značenie kriviek: \circ 0 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, \triangle 0,8 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, \diamond 2,0 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, ∇ 4,0 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, \times neg. kontrola

Obr. 13: Závislosť amplifikácie DNA *E.coli* (100 ng. μl^{-1} – 10 pg. μl^{-1}) na množstve Fkol 71 nosičov v PCR zmesi (prvé meranie)

Obr. 13 uvádza amplifikačné krivky prvého merania, po amplifikácií DNA bez obsahu nosičov v PCR zmesi a s obsahom nosičov Fkol 71 v PCR zmesi. Amplifikačné krivky po amplifikácií DNA bez obsahu nosičov boli takmer zhodné s amplifikačnými krivkami s obsahom 0,4 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi, preto boli na obrázku vynechané. Od koncentrácie 0,8 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi dochádza k zvýšeniu sklonu amplifikačných kriviek, pričom pri koncentrácií 4,0 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi boli amplifikačné krivky s koncentráciou DNA 100 pg μl^{-1} a 10 pg μl^{-1} vynechané, pretože ich hodnota intenzity fluorescencie bola veľmi nízka. Z obrázku vyplýva, že nosiče Fkol 71 majú vplyv na detekovanú intenzitu fluorescencie a je možný ich vplyv na amplifikáciu DNA *E.coli*.



Značenie kriviek: \circ 0 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, ∇ 0,4 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, \times neg. kontrola

Obr. 14: Závislosť amplifikácie DNA *E.coli* ($100 \text{ ng. } \mu\text{l}^{-1} - 10 \text{ pg. } \mu\text{l}^{-1}$) na množstve Fkol 71 nosičov v PCR zmesi (druhé meranie)

Na Obr. 14 sa nachádzajú amplifikačné krivky druhého merania po amplifikácií DNA bez obsahu nosičov v PCR zmesi a s nosičmi Fkol 71 v PCR zmesi. Vzhľadom na to, že amplifikačné krivky s obsahom častíc kopírujú alebo takmer kopírujú amplifikačné krivky bez obsahu častíc, boli ako príklad uvedené len amplifikačné krivky s najvyšším obsahom častíc. Z amplifikačných kriviek vyplýva, že Fkol 71 nosiče koncentrácie nižšej ako $0,4 \mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi nemajú vplyv na intenzitu fluorescencie resp. na amplifikáciu DNA *E.coli*.

Pretože pri druhom meraní nemala najvyššia koncentrácia Fkol 71 nosičov vplyv na intenzitu fluorescencie, nie je príklad amplifikačných kriviek z tretieho merania uvedený.

Amplifikačné krivky boli štatisticky vyhodnocované metódou tzv. absolútnej kvantifikácie. Z hodnôt C_T boli pomocou softvéru prístroja Rotor-Gene 6000 získané hodnoty parametrov - reakčnej účinnosti (*r. e.*), sklonu amplifikačných kriviek (*M*) a korelačného koeficientu (R^2). Pretože bolo meranie prevedené v dvoch paralelách, bolo možné vypočítať aritmetický priemer a smerodajnú odchýlku v programe EXCEL. Získané hodnoty parametrov kalibračnej krivky boli porovnávané s jej optimálnymi hodnotami uvedenými v Tab. 1. Jednoznačne nevyhovujúce hodnoty sledovaných parametrov boli vyznačené načerveno, hodnoty, ktoré s ohľadom na smerodajné odchýlky nie sú jednoznačne nevyhovujúce, sú vyznačené naoranžovo. Rovnako boli získané a spracované hodnoty pre každé uskutočnené meranie. Vypočítané hodnoty kalibračných priamok sú uvedené v Tab. 5 až 10.

Tab. 5: Vypočítané hodnoty parametrov kalibračných priamok pri rôznej koncentrácii magnetických nosičov Fkol 71

Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	r. e. (%)	M	R^2
1	0	83,5±0,5	-3,8±0,0	1,00±0,0
	0,4	82,5±0,5	-3,8±0,0	1,00±0,0
	0,8	84,0±1,0	-3,8±0,0	1,00±0,0
	2,0	195,0±105,0	-2,7±1,0	0,73±0,3
	4,0	88,0±2,0	-3,7±0,1	0,99±0,0
2	0	81,0±1,0	-3,9±0,1	1,00±0,0
	0,04	82,0±1,0	-3,9±0,1	1,00±0,0
	0,08	83,0±0,0	-3,7±0,0	1,00±0,0
	0,2	85,0±0,0	-3,7±0,0	1,00±0,0
	0,4	89,5±0,5	-3,6±0,0	1,00±0,0
3	0	83,0±0,0	-3,8±0,0	0,99±0,0
	0,004	86,0±1,0	-3,7±0,0	0,99±0,0
	0,008	87,0±1,0	-3,7±0,0	1,00±0,0
	0,02	89,0±0,0	-3,6±0,0	0,99±0,0
	0,04	91,5±0,5	-3,6±0,1	0,99±0,0

Legenda: *r. e.* – reakčná účinnosť, *M* – sklon kalibračnej priamky, R^2 – korelačný koeficient

Z prvého merania pre nosiče Fkol 71 je viditeľná zmena hodnôt všetkých parametrov kalibračnej priamky, pri koncentrácii nosičov 2,0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi. Naopak pri koncentraciách 4,0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi boli hodnoty parametrov optimálne. Odchýlka parametrov pri koncentrácii 2,0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi je pravdepodobne spôsobená prídavkom väčšieho množstva nosičov pri ich pipetovaní, z dôvodu nedostatočného premiešania suspenzie nosičov (nosiče sedimentujú). Túto skutočnosť potvrdzuje nie len zachovanie optimálnych parametrov kalibračnej priamky pri vyššej koncentrácii nosičov, ale aj vysoké hodnoty smerodajných odchýlok pri koncentrácii 2,0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi.

Magnetické nosiče Fkol 71 pri koncentráciach 0,4 až 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi nemali významný vplyv na detekovanú fluorescenciu.

Hodnoty parametrov druhého a tretieho merania spĺňajú rozsah optimálnych hodnôt a teda nosiče Fkol 71 v koncentráciach 0,004 až 0,4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi nemali významný vplyv na detekovanú fluorescenciu.

Z hodnôt parametrov kalibračných priamok pre magnetické nosiče Fkol 71 vyplýva, že tieto nemajú vplyv na intenzitu fluorescencie, respektíve na amplifikáciu bakteriálnej DNA. Z toho je možné usúdiť kvalitné pokrytie polymérom.

Tab. 6: Vypočítané hodnoty parametrov kalibračných priamok pri rôznej koncentrácii magnetických nosičov Fkol 72

Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	r. e. (%)	M	R ²
1	0	103,0±2,0	-3,4±0,1	0,99±0,0
	0,4	97,0±10,0	-3,7±0,1	0,96±0,0
	0,8	93,5±6,5	-3,6±0,2	0,95±0,0
	2,0	123,5±6,5	-3,0±0,2	0,84±0,1
	4,0	81,0±13,0	-4,0±0,5	0,92±0,0
2	0	102,5±5,5	-3,2±0,1	0,98±0,0
	0,04	108,5±6,5	-3,2±0,2	0,98±0,0
	0,08	108,0±4,0	-3,2±0,1	0,97±0,0
	0,2	111,0±0,0	-3,1±0,0	0,98±0,0
	0,4	119,5±0,5	-2,9±0,0	0,97±0,0
3	0	87,5±0,5	-3,7±0,0	0,97±0,0
	0,004	92,0±3,0	-3,6±0,1	0,97±0,0
	0,008	92,0±1,0	-3,6±0,1	0,97±0,0
	0,02	90,5±0,5	-3,6±0,0	0,97±0,0
	0,04	92,0±0,0	-3,5±0,0	0,96±0,0

Legenda: r. e. – reakčná účinnosť, M – sklon kalibračnej priamky, R² – korelačný koeficient

Pri prvom meraní nosičov Fkol 72 dochádzalo k postupnému poklesu parametra R², avšak do hodnoty koncentrácie 0,8 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi boli ostatné hodnoty sledovaných parametrov optimálne. Od koncentrácie 2,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi nastala významná zmena hodnôt všetkých sledovaných parametrov. Pri koncentracii 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi parametre kalibračnej priamky po zohľadnení smerodajných odchýlok nespĺňajú optimálne hodnoty. Pri pohľade na smerodajné odchýlky je zrejmé, že výsledky parametrov kalibračnej priamky boli ovplyvnené nepresným prídavkom magnetických nosičov do PCR zmesi, z dôvodu ich sedimentácie. Zo získaných výsledkov pre prvé meranie vyplýva, že magnetické nosiče Fkol 72 majú významný vplyv na intenzitu fluorescencie, respektíve na

amplifikáciu bakteriálnej DNA len pri koncentráciach 2,0 až 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi.

Druhé meranie poukazuje na určitý vplyv magnetických nosičov na detekovanú fluorescenciu od koncentrácie 0,04 až 0,4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi. Avšak pri prvom meraní sa významný vplyv pri koncentrácií 0,4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi a dokonca ani pri koncentrácií 0,8 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi nepreukázal. Smerodajné odchýlky pri koncentrácií 0,4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi druhého merania nie sú zvlášť významné. Rozdiely sú pravdepodobne spôsobené nesprávnym pipetovaním DNA do PCR zmesi, z dôvodu jej sedimentácie a teda magnetický nosiče v koncentráciach 0,04 až 0,4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi nemajú významný vplyv na detekovanú fluorescenciu.

Tretie meranie nespĺňa optimálne hodnoty parametra R^2 , avšak hodnoty parametra *r. e.* sa pohybujú v rozmedzí $87,5\pm 0,5$ % pre kalibračné priamky bez obsahu nosičov po $92,0\pm 0,0$ % pre kalibračné priamky s najvyššou koncentráciou 0,04 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi a teda spĺňajú optimálne hodnoty. Taktiež hodnoty *M* sa nijak zásadne nemenili a boli optimálne. Magnetické nosiče v koncentráciach 0,004 až 0,04 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi nemajú významný vplyv na detekovanú fluorescenciu.

Z hodnôt parametrov kalibračných priamok pre magnetické nosiče Fkol 71 vyplýva, že tieto majú vplyv na intenzitu detekovanej fluorescencie, respektíve na amplifikáciu bakteriálnej DNA v koncentráciach 2,0 až 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi.

Tab. 7: Vypočítané hodnoty parametrov kalibračných priamok pri rôznej koncentrácii magnetických nosičov Fkol 73

Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	r. e. (%)	M	R^2
1	0	102,5±3,5	-3,4±0,1	0,99±0,0
	0,4	96,5±1,5	-3,6±0,1	0,99±0,0
	0,8	91,5±2,5	-3,7±0,2	0,93±0,1
	2,0	75,0±17,0	-4,3±0,8	0,99±0,0
	4,0	67,0±8,0	-4,6±0,5	0,99±0,0
2	0	92,0±1,0	-3,6±0,1	1,00±0,0
	0,04	96,0±1,0	-3,4±0,0	0,99±0,0
	0,08	97,0±0,0	-3,4±0,0	1,00±0,0
	0,2	102,0±1,0	-3,3±0,0	0,99±0,0
	0,4	106,0±0,0	-3,2±0,0	0,99±0,0
3	0	88,5±0,5	-3,6±0,0	1,00±0,0
	0,004	95,5±6,5	-3,5±0,2	0,99±0,0
	0,008	90,5±0,5	-3,6±0,0	1,00±0,0
	0,02	91,0±2,0	-3,6±0,1	1,00±0,0
	0,04	96,0±1,0	-3,5±0,1	1,00±0,0

Legenda: *r. e.* – reakčná účinnosť, *M* – sklon kalibračnej priamky, R^2 – korelačný koeficient

Prvé meranie s použitím nosičov Fkol 73 vyznačuje pokles parametra R^2 pri koncentrácií $0,8 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi z hodnoty $0,99$ na hodnotu $0,93$, pričom parametre *M* a *r. e.* splňali optimálne hodnoty. Pri koncentrácií $2,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi nastal pokles hodnoty parametra *r. e.* z $91,5\pm 2,5 \%$ na $75,0\pm 17,0 \%$ a rovnako poklesla hodnota parametra *M* z $-3,7\pm 0,2$ na $-4,3\pm 0,8$, pričom hodnota R^2 vzrástla na optimálnu. Hodnota R^2 má optimálnu hodnotu, pretože kalibračné priamky boli zostrojená z menej ako pôvodných piatich koncentrácií DNA. Dôvodom bolo, že hodnota C_T pre najnižšiu koncentráciu DNA nebola detekovateľná. Pri pohľade na smerodajné odchýlky koncentrácií $2,0$ a $4,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi je zrejmé, že výsledky parametrov kalibračnej priamky boli ovplyvnené nepresným prídavkom magnetických nosičov do PCR zmesi, z dôvodu ich sedimentácie. Z výsledkov je možné usúdiť, že významný vplyv na intenzitu fluorescencie, resp. na amplifikáciu bakteriálnej DNA bol len pri koncentráciách $2,0$ až $4,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi.

Pri druhom a treťom meraní magnetických nosičov Fkol 73 nebol dokázaný významný vplyv na intenzitu fluorescencie resp. amplifikáciu DNA - hodnoty všetkých parametrov boli optimálne.

Z hodnôt parametrov kalibračných kriviek pre magnetické nosiče Fkol 73 vyplýva, že tieto majú vplyv na intenzitu detekovanej fluorescencie, resp. na amplifikáciu bakteriálnej DNA v koncentráciách $2,0$ až $4,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi.

Tab. 8: Vypočítané hodnoty parametrov kalibračných priamok pri rôznej koncentrácií magnetických nosičov Fkol 102

Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	r. e. (%)	M	R^2
1	0	$83,5\pm 0,0$	$-3,9\pm 0,0$	$1,00\pm 0,0$
	0,4	$82,0\pm 0,0$	$-3,9\pm 0,0$	$1,00\pm 0,0$
	0,8	$83,0\pm 0,0$	$-3,9\pm 0,0$	$1,00\pm 0,0$
	2,0	$79,0\pm 2,0$	$-4,0\pm 0,1$	$1,00\pm 0,0$
	4,0	$72,5\pm 1,5$	$-4,2\pm 0,1$	$1,00\pm 0,0$
2	0	$118,5\pm 1,5$	$-3,1\pm 0,0$	$0,99\pm 0,0$
	0,04	$119,5\pm 0,5$	$-3,1\pm 0,1$	$0,98\pm 0,0$
	0,08	$118,0\pm 0,0$	$-3,1\pm 0,1$	$0,98\pm 0,0$
	0,2	$115,0\pm 2,0$	$-3,2\pm 0,1$	$0,99\pm 0,0$
	0,4	$121,5\pm 1,5$	$-3,0\pm 0,0$	$0,98\pm 0,0$
3	0	$89,5\pm 1,5$	$-3,5\pm 0,1$	$1,00\pm 0,0$
	0,004	$90,5\pm 1,5$	$-3,6\pm 0,1$	$1,00\pm 0,0$
	0,008	$91,0\pm 0,0$	$-3,6\pm 0,0$	$1,00\pm 0,0$
	0,02	$93,5\pm 0,5$	$-3,5\pm 0,0$	$1,00\pm 0,0$
	0,04	$99,0\pm 2,0$	$-3,4\pm 0,1$	$1,00\pm 0,0$

Legenda: r. e. – reakčná účinnosť, M – sklon kalibračnej priamky, R^2 – korelačný koeficient

Pri prvom meraní s použitím magnetických nosičov Fkol 102 nastal pokles parametrov *r. e.* a *M* pri koncentrácií 2,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi. Pri zohľadnení smerodajnej odchýlky tohto merania nie je inhibícia fluorescencie jednoznačná, ale opäť sa predpokladá sedimentácia magnetických nosičov, a teda tieto pri koncentrácií 2,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi tieto majú významný vplyv na detekovanú fluorescenciu. Pri koncentrácií 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi parametre *r.e.* a *M* nespĺňajú optimálne hodnoty a teda majú významný vplyv na detekovanú fluorescenciu. Počas prvého merania sa hodnota parametra R^2 nemenila.

Pri druhom meraní je zrejmé, že *r. e.* kalibračných priamok s nulovou koncentráciou nosičov nespĺňa optimálne hodnoty. Vysoká hodnota účinnosti reakcie môže nastať z rôznych dôvodov [84]. Zhodnotením amplifikačných kriviek, kriviek topenia a výsledkov agarózovej gélovej elektroforézy vyplynulo, že nepresnosť merania bola spôsobená nesprávnym pipetovaním DNA do PCR zmesi.

Pri treťom meraní boli hodnoty parametrov kalibračnej priamky optimálne.

Napriek tomu, že druhé meranie nie je možné spoľahlivo zhodnotiť, z výsledkov prvého merania pre magnetické nosiče Fkol 102 je zrejmý ich vplyv na intenzitu detekovanej fluorescencie, resp. na amplifikáciu bakteriálnej DNA v koncentráciách 2,0 až 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi.

Tab. 9: Vypočítané hodnoty parametrov kalibračných priamok pri rôznej koncentrácii magnetických nosičov Fkol 103

Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	r. e. (%)	M	R^2
1	0	83,5±3,5	-3,8±0,1	0,99±0,0
	0,4	81,0±1,0	-3,9±0,1	0,98±0,0
	0,8	83,0±1,0	-3,8±0,0	1,00±0,0
	2,0	77,0±1,0	-4,1±0,0	0,99±0,0
	4,0	106,0±29,0	-3,4±0,7	0,72±0,3
2	0	87,0±0,0	-3,7±0,0	1,00±0,0
	0,04	86,0±0,0	-3,7±0,0	1,00±0,0
	0,08	83,0±4,0	-3,9±0,2	1,00±0,0
	0,2	86,0±1,0	-3,7±0,0	1,00±0,0
	0,4	88,0±1,0	-3,7±0,1	1,00±0,0
3	0	86,5±0,5	-3,7±0,0	1,00±0,0
	0,004	89,0±4,0	-3,6±0,1	1,00±0,0
	0,008	86,0±0,0	-3,6±0,0	1,00±0,0
	0,02	90,0±0,0	-3,6±0,0	1,00±0,0
	0,04	90,0±0,0	-3,6±0,0	1,00±0,0

Legenda: *r. e.* – reakčná účinnosť, *M* – sklon kalibračnej priamky, R^2 – korelačný koeficient

Pri prvom meraní s použitím magnetických nosičov Fkol 103 nespĺňali optimálne hodnoty parametre *r. e.* a *M* pri koncentrácií 2,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi, pričom hodnota R^2 bola optimálna. Pri koncentrácií 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi nastala významná zmena všetkých parametrov kalibračnej priamky. Zohľadnením smerodajných odchýlok by optimálne parametre jednoznačne nespĺňala len hodnota R^2 , ale vzhľadom na to, že kalibračné priamky koncentrácie 2,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi nespĺňajú optimálne hodnoty, sa predpokladá vplyv na intenzitu fluorescence aj pri koncentrácií 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi. Odchýlky boli spôsobené sedimentáciou častíc pri pipetovaní.

Pri druhom meraní boli splnené optimálne hodnoty parametrov kalibračnej priamky, okrem koncentrácie 0,08 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi. Vzhľadom na výsledky pri ostatných koncentráciách sa nepredpokladá vplyv magnetických nosičov na detekovanú fluorescenciu, jedná sa o odchýlku merania.

Pri treťom meraní sa vplyv magnetických nosičov na intenzitu detekovanej fluorescence nepreukázal a všetky parametre kalibračnej priamky mali optimálne hodnoty.

Z uvedeného vyplýva, že magnetické nosiče Fkol 103 majú vplyv na intenzitu detekovanej fluorescence, resp. na amplifikáciu bakteriálnej DNA len v koncentráciách 2,0 až 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi.

Tab. 10: Vypočítané hodnoty parametrov kalibračných priamok pri rôznej koncentrácií magnetických častíc Fkol 77ox

Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	r. e. (%)	M	R^2
1	0	103,0±0,5	-3,4±0,0	0,99±0,0
	0,4	70,5±14,5	-4,7±0,9	0,96±0,0
	0,8	X	X	X
	2,0	X	X	X
	4,0	X	X	X
2	0	77,0±1,0	-4,1±0,1	1,00±0,0
	0,04	81,0±1,0	-3,9±0,0	1,00±0,0
	0,08	81,5±0,5	-3,9±0,0	1,00±0,0
	0,2	80,0±0,0	-3,9±0,0	1,00±0,0
	0,4	93,0±12,0	-3,6±0,4	0,97±0,0
3	0	87,5±0,5	-3,7±0,1	0,97±0,0
	0,004	92,0±3,0	-3,6±0,1	0,97±0,0
	0,008	92,0±1,0	-3,6±0,1	0,97±0,0
	0,02	90,5±0,5	-3,6±0,0	0,97±0,0
	0,04	92,0±0,0	-3,5±0,0	0,96±0,0

Legenda: *r. e.* – reakčná účinnosť, *M* – sklon kalibračnej priamky, R^2 – korelačný koeficient, *X* – parametre kalibračných priamok neboli vyhodnotiteľné

Pri prvom meraní nespĺňali optimálne hodnoty všetkých parametrov kalibračnej priamky od koncentrácie $0,4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi. Pri pohľade sa smerodajné odchýlky je opäť zrejماً sedimentácia nosičov počas pipetovania. Od koncentrácie $0,8 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi bola inhibícia detekovanej fluorescence také značná, že program cycleru Rotor-Gene 6000 nedokázal zostaviť kalibračnú priamku.

Pri druhom meraní parameter r , e , a M kalibračných priamok s nulovou koncentráciou nosičov nespĺňa optimálne hodnoty. Od koncentrácie $0,04$ do $0,2$ nosičov v PCR zmesi boli optimálne hodnoty všetkých parametrov splnené. V prípade kalibačných priamok bez obsahu nosičov sa jedná o odchýlku, z dôvodu nesprávneho pipetovania DNA [85]. Od koncentrácie $0,04$ po $0,2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi bola podmienka optimálnych hodnôt všetkých parametrov kalibračnej priamky splnená. Zároveň hodnoty parametrov r , e , a M nevzrástli do takej miery, že by sa táto skutočnosť dala považovať za vplyv nosičov na získané hodnoty parametrov. Pri koncentrácií $0,4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi je zrejماً významná zmena hodnotených parametrov, pričom parametre M a R^2 už nespĺňali optimálne hodnoty, tak ako pri prvom meraní.

Pri treťom meraní nebola splnená optimálna hodnota R^2 ale hodnoty r , e , a M spĺňajú optimálne hodnoty. Taktiež sa hodnoty M a r , e , sa nijak zásadne nemenili. Magnetické nosiče Fkol 77 ox v koncentráciách $0,004$ až $0,04 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi nemajú významný vplyv na detekovanú fluorescenciu.

Z uvedeného vyplýva, že magnetické nosiče Fkol 77ox majú vplyv na intenzitu detekovanej fluorescence, resp. na amplifikáciu bakteriálnej DNA len v koncentráciách $0,4$ až $4,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi. Pretože nosiče Fkol 77ox sú ako jediné funkcionalizované karboxylovou skupinou, predpokladá sa práve jej vplyv na intenzitu detekovanej fluorescence, respektíve na amplifikáciu bakteriálnej DNA.

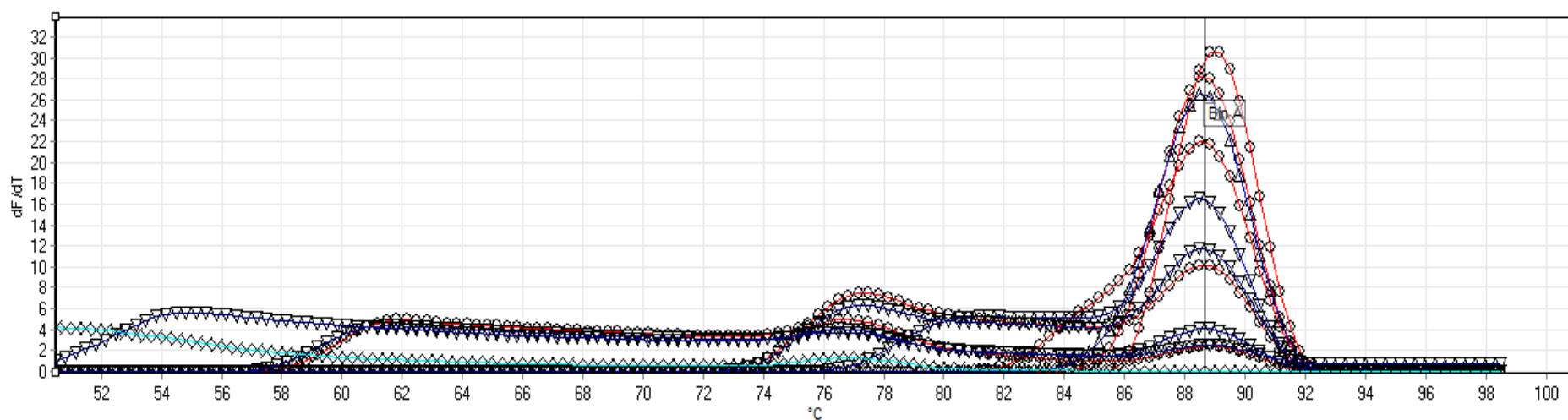
Na základe záverov z výsledkov hodnôt parametrov kalibračných priamok môžeme magnetické nosiče rozdeliť do troch skupín uvedených v Tab. 11.

Tab. 11: Rozdelenie magnetických nosičov do troch skupín na základe rozsahu koncentrácií nosičov v PCR zmesi zháňajúcich fluorescenciu

Magnetický nosič	Rozsah koncentrácie nosičov v PCR zmesi zháňajúcich fluorescenciu ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	Miera vplyvu nosičov na detekovanú fluorescenciu
Fkol 71	-	nízka
Fkol 72	2,0 – 4,0	stredná
Fkol 73		
Fkol 102		
Fkol 103	0,4 – 4,0	vysoká
Fkol 77ox		

5.1.2 Analýza kriviek topenia

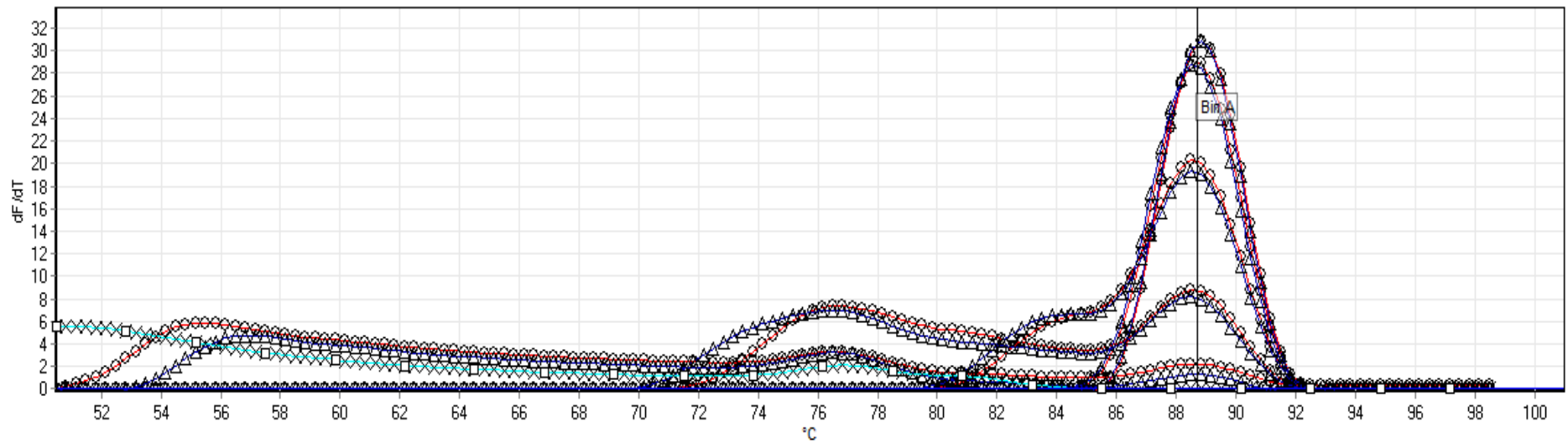
Posledným krokom každého merania bola analýza kriviek topenia, takzvaná melt analýza. Slúži na odlíšenie špecifických a nešpecifických produktov PCR. Pre prehľadnosť boli uvedené krivky topenia bez prítomnosti nosičov, s koncentráciou nosičov $0,8 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ PCR zmesi a negatívna kontrola na Obr. 15 a krivky topenia bez prítomnosti nosičov, s koncentráciou nosičov $0,08 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ PCR zmesi a negatívna kontrola na Obr. 16 pre magnetické nosiče Fkol 71.



Značenie kriviek: \circ $0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, \triangle $0,8 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, \times neg. kontrola

Obr. 15: Melt analýza DNA *E.coli* ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1} - 10 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) prvého merania magnetických nosičov Fkol 71

Melt analýza slúžila pre potvrdenie prítomnosti bakteriálnej DNA (*E. coli*) a vylúčenie nožnej kontaminácie PCR zmesi. Obr. 15 potvrdzuje prítomnosť bakteriálnej DNA, pričom teplota topenia špecifického PCR produktu bola približne $88,7 \text{ }^\circ\text{C}$. Je možné taktiež pozorovať pokles výšky pík kriviek s obsahom magnetických nosičov s koncentráciou $0,8 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ PCR zmesi v porovnaní s výškou pík kriviek bez obsahu nosičov. Ďalej je možné pozorovať aj detekciu nešpecifických produktov PCR, pravdepodobne dimérov primerov.



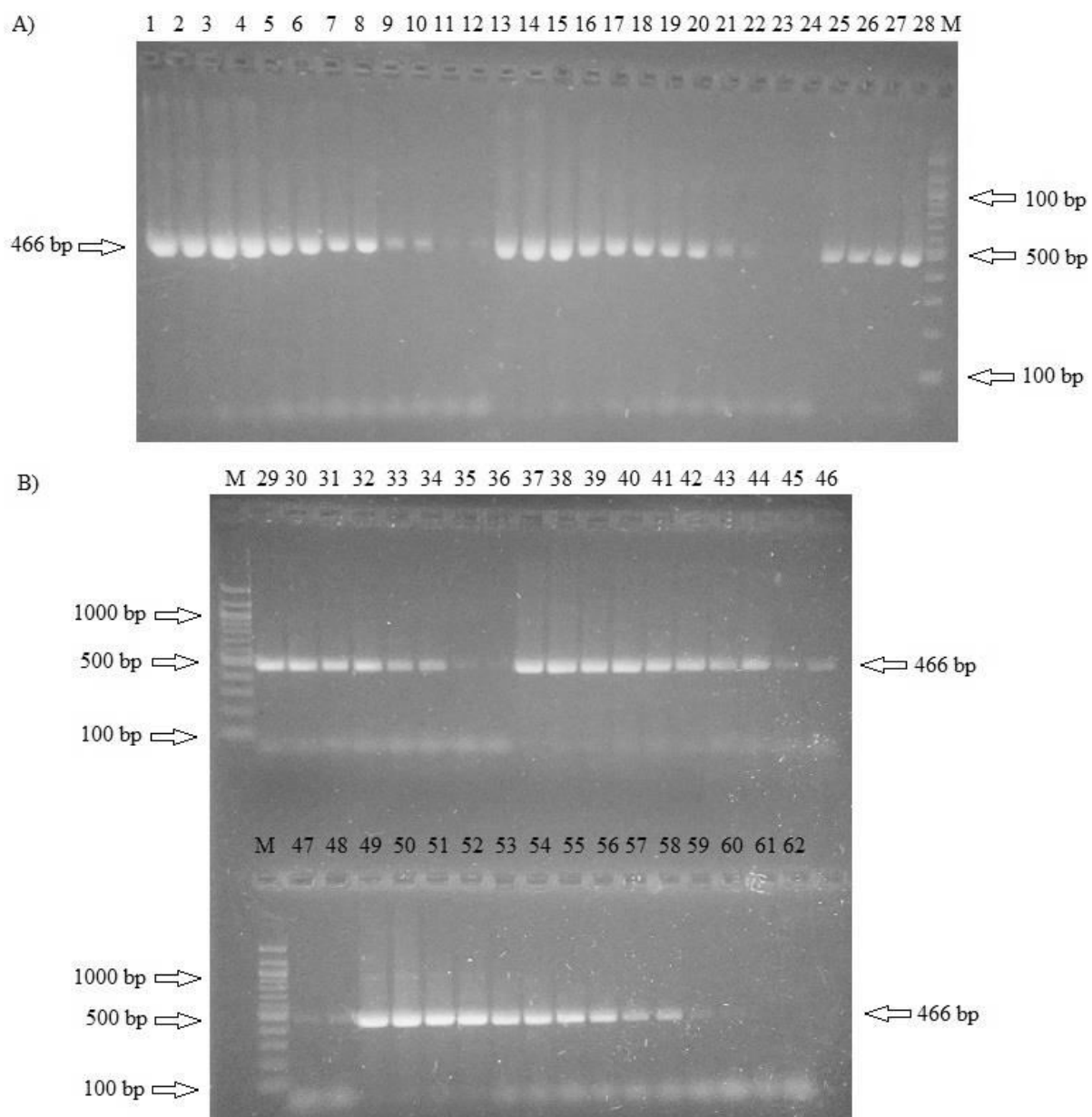
Značenie kriviek: \circ $0 \mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, \triangle $0,08 \mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov, \times neg. kontrola

Obr. 16: Melt analýza DNA *E.coli* ($100 \text{ ng. } \mu\text{l}^{-1} - 10 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$) druhého merania magnetických nosičov Fkol 71

Na Obr. 16 sú uvedené krivky topenia z druhého merania magnetických nosičov Fkol 71. Na rozdiel od predchádzajúceho obrázka (Obr. 15), o rád nižšia koncentrácia magnetických nosičov nemala vplyv na výšku píku kriviek topenia. Teplota topenia špecifického PCR produktu bola opäť približne $88,7 \text{ } ^\circ\text{C}$, rovnako sú pozorované aj nešpecifické PCR produkty, pravdepodobne diméry primerov.

5.2 Agarózová gélová elektroforéza

Z výsledkov parametrov kalibračnej krivky je od určitej koncentrácie magnetických nosičov, zrejmy ich vplyv na detekovanú fluorescenciu. Pre potvrdenie prítomnosti resp. neprítomnosti špecifického PCR produktu bola uskutočnená agarózová gélová elektroforéza (Obr. 10). Veľkosť špecifického produktu PCR má byť 466 bp.



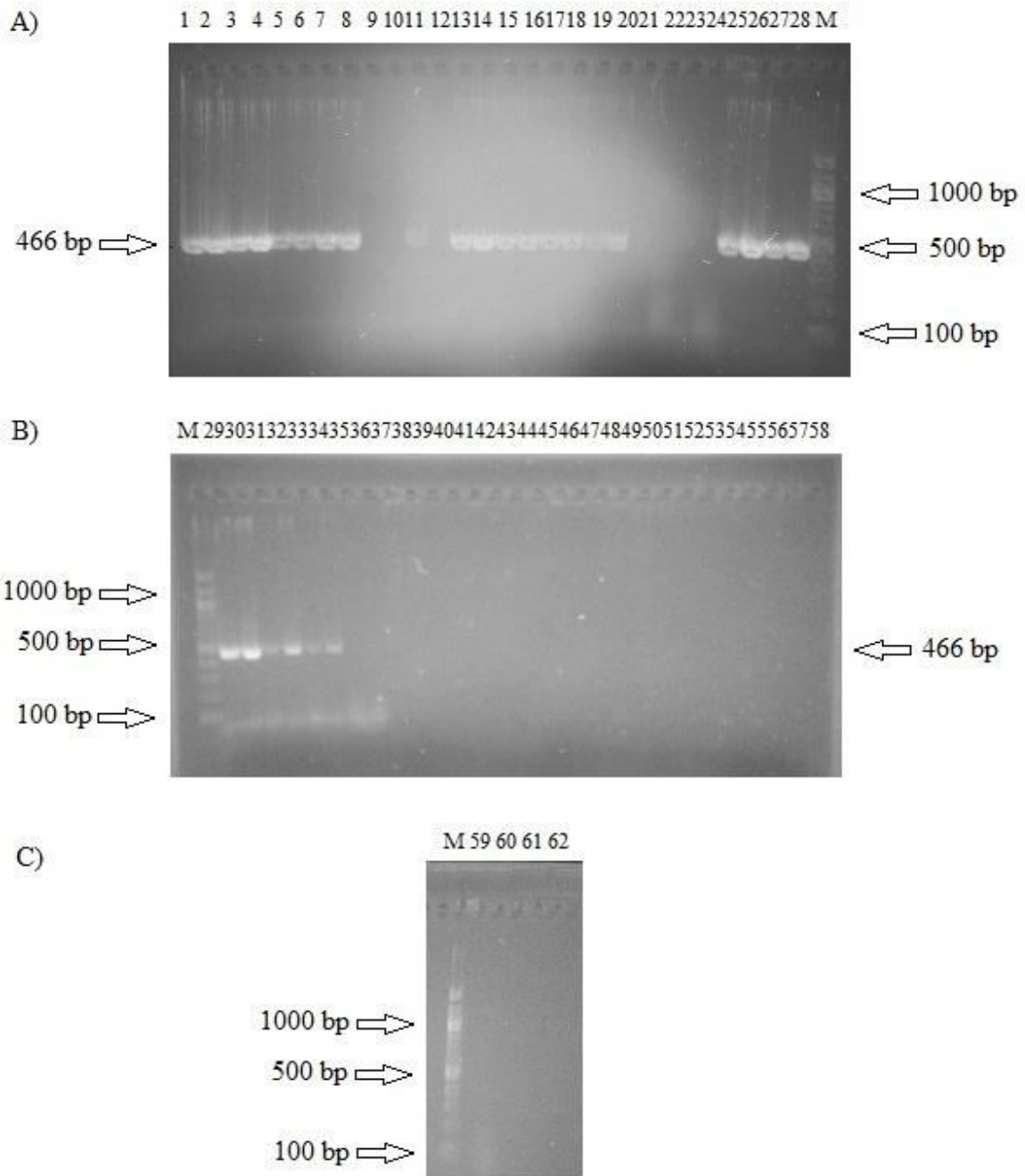
Obr. 17: Príklad agarózovej gélovej elektroforézy – detekcia špecifického produktu PCR po amplifikácii bez prítomnosti a v prítomnosti magnetických nosičov Fkol 102

Tab. 12: Schéma nanosenia vzoriek na agarózové gély (Obr. 17) a výsledky detekcie špecifického produktu PCR (466 bp)

Gél	Beh	Koncentrácia DNA	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$)	Detekcia špecifického produktu PCR
A)	1; 2	100 ng. μl^{-1}	0	+
	3; 4	10 ng. μl^{-1}	0	+
	5; 6	1 ng. μl^{-1}	0	+
	7; 8	100 pg μl^{-1}	0	+
	9; 10	10 pg μl^{-1}	0	+
	11; 12	1 pg μl^{-1}	0	+
	13; 14	100 ng. μl^{-1}	0,4	+
	15; 16	10 ng. μl^{-1}	0,4	+
	17; 18	1 ng. μl^{-1}	0,4	+
	19; 20	100 pg μl^{-1}	0,4	+
	21; 22	10 pg μl^{-1}	0,4	+
	23; 24	1 pg μl^{-1}	0,4	+
	25; 26	100 ng. μl^{-1}	0,8	+
	27; 28	10 ng. μl^{-1}	0,8	+
	M	DNA štandard 100 bp		
B)	29; 30	1 ng. μl^{-1}	0,8	+
	31; 32	100 pg μl^{-1}	0,8	+
	33; 34	10 pg μl^{-1}	0,8	+
	35; 36	1 pg μl^{-1}	0,8	+
	37; 38	100 ng. μl^{-1}	2,0	+
	39; 40	10 ng. μl^{-1}	2,0	+
	41; 42	1 ng. μl^{-1}	2,0	+
	43; 44	100 pg μl^{-1}	2,0	+
	45; 46	10 pg μl^{-1}	2,0	+
	47; 48	1 pg μl^{-1}	2,0	+
	49; 50	100 ng. μl^{-1}	4,0	+
	51; 52	10 ng. μl^{-1}	4,0	+
	53; 54	1 ng. μl^{-1}	4,0	+
	55; 56	100 pg μl^{-1}	4,0	+
	57; 58	10 pg μl^{-1}	4,0	+
	59; 60	1 pg μl^{-1}	4,0	+
	61; 62	0	0	-
M	DNA štandard 100 bp			

Legenda: + detekovaný špecifický produkt PCR, - nedetekovaný špecifický produkt PCR

Z Obr. 17 zobrazujúceho agarózovú gélovú elektroforézu nosičov Fkol 102 vyplýva, že intenzita detekovaného špecifického produktu PCR závisí od koncentrácie DNA pipetovanej do PCR zmesi (Tab. 12). So znižujúcou sa koncentráciou DNA sa zvyšovala tvorba nešpecifického produktu PCR – dimérov primerov. Pri porovnaní výsledkov z PCR zmesi bez nosičov (beh 1 až 12) s výsledkami s najvyššou koncentráciou 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi (beh 49 až 60) je zrejmé, že magnetické nosiče nemajú vplyv na amplifikáciu špecifického ale aj nešpecifického produktu PCR.



Obr. 18: Príklad agarózovej gélovej elektroforézy – detekcia špecifického produktu PCR po amplifikácii bez prítomnosti a v prítomnosti magnetických nosičov Fkol 77ox

Tab. 13: Schéma nanosenia vzoriek na agarózové gély (Obr. 18) a výsledky detekcie špecifického produktu PCR (466 bp)

Gél	Beh	Koncentrácia DNA	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$)	Detekcia špecifického produktu PCR
A)	1; 2	100 ng. μl^{-1}	0	+
	3; 4	10 ng. μl^{-1}	0	+
	5; 6	1 ng. μl^{-1}	0	+
	7; 8	100 pg μl^{-1}	0	+
	9; 10	10 pg μl^{-1}	0	-
	11; 12	1 pg μl^{-1}	0	+
	13; 14	100 ng. μl^{-1}	0,4	+
	15; 16	10 ng. μl^{-1}	0,4	+
	17; 18	1 ng. μl^{-1}	0,4	+
	19; 20	100 pg μl^{-1}	0,4	+
	21; 22	10 pg μl^{-1}	0,4	-
	23; 24	1 pg μl^{-1}	0,4	-
	25; 26	100 ng. μl^{-1}	0,8	+
	27; 28	10 ng. μl^{-1}	0,8	+
	M	DNA štandard 100 bp		
B)	29; 30	1 ng. μl^{-1}	0,8	+
	31; 32	100 pg μl^{-1}	0,8	+
	33; 34	10 pg μl^{-1}	0,8	+
	35; 36	1 pg μl^{-1}	0,8	-
	37; 38	100 ng. μl^{-1}	2,0	-
	39; 40	10 ng. μl^{-1}	2,0	-
	41; 42	1 ng. μl^{-1}	2,0	-
	43; 44	100 pg μl^{-1}	2,0	-
	45; 46	10 pg μl^{-1}	2,0	-
	47; 48	1 pg μl^{-1}	2,0	-
	49; 50	100 ng. μl^{-1}	4,0	-
	51; 52	10 ng. μl^{-1}	4,0	-
	53; 54	1 ng. μl^{-1}	4,0	-
	55; 56	100 pg μl^{-1}	4,0	-
	57; 58	10 pg μl^{-1}	4,0	-
M	DNA štandard 100 bp			

Legenda: + detekovaný špecifický produkt PCR, - nedetekovaný špecifický produkt PCR

Tab. 14: Schéma nanosenia vzoriek na agarózové gély (Obr. 18) a výsledky detekcie špecifického produktu PCR (466 bp)

Gél	Beh	Koncentrácia DNA	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$)	Detekcia špecifického produktu PCR
C)	59; 60	1 pg μl^{-1}	4,0	-
	61; 62	0	0	-
	M	DNA štandard 100 bp		

Legenda: + detekovaný špecifický produkt PCR, - nedetekovaný špecifický produkt PCR

Na Obr. 18 je zobrazená agarózová gélová elektroforéza nosičov Fkol 77ox, kde môžeme na detekovaných špecifických produktoch PCR (466 bp) pozorovať mierne odchýlky v pipetovaní, čo sa prejavilo v zhoršenej detekcii pri koncentráciách 10 a 1 pg. μl^{-1} DNA v PCR zmesi (Tab. 13). Pri koncentráciách 2,0 a 4,0 $\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi neboli špecifické ani nešpecifické produkty PCR detekované vôbec a teda nosiče Fkol 77ox mali vplyv na amplifikáciu DNA.

Výsledky detekcie špecifického produktu PCR pomocou agarózovej gélovej elektroforézy boli porovnávané s výsledkami z PCR v reálnom čase (Tab. 15 až 18). Ak špecifický produkt nebol pomocou agarózovej gélovej elektroforézy detekovaný, DNA nebola amplifikovaná a magnetické nosiče sú inhibítormi amplifikácie DNA. Ak bol špecifický produkt pomocou agarózovej gélovej elektroforézy detekovaný, nastalo zhášanie fluorescence magnetickými nosičmi.

Tab. 15: Vplyv magnetických nosičov Fkol 71 na zhášanie fluorescence a amplifikáciu špecifického PCR produktu

Magnetický nosič	Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	Zhášanie fluorescence	Detekcia špecifického produktu PCR
Fkol 71	1	0	-	+
		0,4	-	+
		0,8	-	+
		2,0	-	+
		4,0	-	+
	2	0	-	+
		0,04	-	+
		0,08	-	+
		0,2	-	+
		0,4	-	+
	3	0	-	+
		0,004	-	+
		0,008	-	+
		0,02	-	+
		0,04	-	+

Legenda: + detekovaný špecifický produkt PCR (466 bp)/zaznamenané zhášanie fluorescence vplyvom prítomnosti nosiča v PCR zmesi, - nedetekovaný špecifický produkt PCR (466 bp)/zhášanie fluorescence vplyvom prítomnosti nosiča v PCR zmesi nebolo zaznamenané

Tab. 16: Vplyv magnetických nosičov Fkol 72 a Fkol 73 na zhášanie fluorescence a amplifikáciu špecifického PCR produktu

Magnetický nosič	Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g}, \mu\text{l}^{-1}$)	Zhášanie fluorescence	Detekcia špecifického produktu PCR
Fkol 72	1	0	-	+
		0,4	-	+
		0,8	-	+
		2,0	+	+
		4,0	+	+
	2	0	-	+
		0,04	-	+
		0,08	-	+
		0,2	-	+
		0,4	-	+
	3	0	-	+
		0,004	-	+
		0,008	-	+
		0,02	-	+
		0,04	-	+
Fkol 73	1	0	-	+
		0,4	-	+
		0,8	-	+
		2,0	+	+
		4,0	+	+
	2	0	-	+
		0,04	-	+
		0,08	-	+
		0,2	-	+
		0,4	-	+
	3	0	-	+
		0,004	-	+
		0,008	-	+
		0,02	-	+
		0,04	-	+

Legenda: + detekovaný špecifický produkt PCR (466 bp)/zaznamenané zhášanie fluorescence vplyvom prítomnosti nosiča v PCR zmesi, - nedetekovaný špecifický produkt PCR (466 bp)/zhášanie fluorescence vplyvom prítomnosti nosiča v PCR zmesi nebolo zaznamenané

Tab. 17: Vplyv magnetických nosičov Fkol 102 a Fkol 103 na zhášanie fluorescence a amplifikáciu špecifického PCR produktu

Magnetický nosič	Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$)	Zhášanie fluorescence	Detekcia špecifického produktu PCR
Fkol 102	1	0	-	+
		0,4	-	+
		0,8	-	+
		2,0	+	+
		4,0	+	+
	2	0	-	+
		0,04	-	+
		0,08	-	+
		0,2	-	+
		0,4	-	+
	3	0	-	+
		0,004	-	+
		0,008	-	+
		0,02	-	+
		0,04	-	+
Fkol 103	1	0	-	+
		0,4	-	+
		0,8	-	+
		2,0	+	+
		4,0	+	+
	2	0	-	+
		0,04	-	+
		0,08	-	+
		0,2	-	+
		0,4	-	+
	3	0	-	+
		0,004	-	+
		0,008	-	+
		0,02	-	+
		0,04	-	+

Legenda: + detekovaný špecifický produkt PCR (466 bp)/zaznamenané zhášanie fluorescence vplyvom prítomnosti nosiča v PCR zmesi, - nedetekovaný špecifický produkt PCR (466 bp)/zhášanie fluorescence vplyvom prítomnosti nosiča v PCR zmesi nebolo zaznamenané

Tab. 18: Vplyv magnetických nosičov Fkol 71 na zhášanie fluorescence a amplifikáciu špecifického PCR produktu

Magnetický nosič	Číslo merania	Koncentrácia nosičov v PCR zmesi ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	Zhášanie fluorescence	Detekcia špecifického produktu PCR
Fkol 77 ox	1	0	-	+
		0,4	+	+
		0,8	+	+
		2,0	+	-
		4,0	+	-
	2	0	-	+
		0,04	-	+
		0,08	-	+
		0,2	-	+
		0,4	+	+
	3	0	-	+
		0,004	-	+
		0,008	-	+
		0,02	-	+
		0,04	-	+

Legenda: + detekovaný špecifický produkt PCR (466 bp)/zaznamenané zhášanie fluorescence vplyvom prítomnosti nosiča v PCR zmesi, - nedetekovaný špecifický produkt PCR (466 bp) /zhášanie fluorescence vplyvom prítomnosti nosiča v PCR zmesi nebolo zaznamenané

Výsledky v Tab. 15 vyjadrujú vplyv magnetických nosičov Fkol 71 na zhášanie fluorescence a amplifikáciu špecifického produktu PCR. Z výsledkov parametrov kalibračných priamok z PCR v reálnom čase vyplynulo, že k zhášaniu fluorescence nedochádza. Amplifikáciu špecifického produktu PCR potvrdila agarózová gélová elektroforéza.

V Tab. 16 sú uvedené výsledky pre magnetické nosiče Fkol 72 a Fkol 73. Rovnako Fkol 72 a Fkol 73 nosiče zhášali fluorescenciu v rozsahu koncentrácií 2,0 – 4,0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ v PCR zmesi. Taktiež oba typy nosičov nemali vplyv na amplifikáciu špecifického produktu PCR.

V Tab. 17 sú uvedené výsledky pre magnetické nosiče Fkol 102 a Fkol 103. Výsledky sú totožné s magnetickými nosičmi Fkol 72 a Fkol 73. Zhášanie fluorescence nastalo v koncentráciách 2,0 – 4,0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi a nedochádzalo k inhibícií amplifikácie špecifického produktu PCR.

Výsledky posledného typu magnetických nosičov Fkol 77ox sú uvedené v Tab. 18. Tieto nosiče ako jediní vplývali nie len na zhášanie fluorescence v rozsahu koncentrácií 0,4 – 4,0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nosičov v PCR zmesi ale v rozsahu koncentrácií 2,0 – 4,0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ dokonca inhibovali amplifikáciu špecifického produktu PCR.

5.3 Porovnanie charakteristických vlastností magnetických nosičov s výsledkami z PCR v reálnom čase

Ako prvý bol posudzovaný vplyv hmotnostného podielu železa (%) v magnetických nosičoch na zhášanie fluorescencie, respektíve amplifikáciu špecifického produktu PCR. Typy magnetických nosičov boli na základe ich hmotnostného podielu železa (%) zoradené v Tab. 19 vzostupne.

Tab. 19: Porovnanie rozsahu koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu s ich hmotnostným podielom železa (%)

Magnetický nosič	Fe (hm. %)	Rozsah koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
Fkol 72	0,72	2,0 – 4,0
Fkol 71	1,57	-
Fkol 73	8,36	2,0 – 4,0
Fkol 77ox	10,02	0,4 – 4,0
Fkol 102	13,46	2,0 – 4,0
Fkol 103	20,50	2,0 – 4,0

Vzhľadom na to, že nosiče Fkol 103 majú najvyšší obsah železa ale zhášajú fluorescenciu len v rozsahu koncentrácií 2,0 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, nepredpokladá sa významný vplyv hmotnostného podielu železa (%) nosiča na zhášanie fluorescencie, respektíve amplifikáciu špecifického produktu PCR.

Ďalším posudzovaným parametrom bol index polydisperzity (*PDI*). So zvyšujúcou sa hodnotou indexu klesá uniformita častíc. Ak sa hodnota *PDI* pohybuje v rozmedzí 1,00 až 1,05 sú nosiče monodisperzné. Typy magnetických nosičov boli na základe ich *PDI* zoradené v Tab. 20 vzostupne.

Tab. 20: Porovnanie rozsahu koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu s ich indexom polydisperzity (*PDI*)

Magnetický nosič	<i>PDI</i>	Rozsah koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
Fkol 72	1,01	2,0 – 4,0
Fkol 71	1,02	-
Fkol 73	1,08	2,0 – 4,0
Fkol 77ox	1,09	0,4 – 4,0
Fkol 102	1,17	2,0 – 4,0
Fkol 103	1,33	2,0 – 4,0

Nosiče Fkol 103 majú najvyšší index polydisperzity, ale zhášajú fluorescenciu len v rozsahu koncentrácií 2,0 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, a preto sa nepredpokladá významný vplyv *PDI* nosiča na zhášanie fluorescencie, respektíve amplifikáciu špecifického produktu PCR.

Tretím posudzovaným parametrom bola hodnota D_n vyjadrujúca priemerný počet nosičov priemernej veľkosti. Typy magnetických nosičov boli na základe ich D_n zoradené v tabuľke vzostupne (Tab. 21). Vzhľadom na to, že sa poradie na základe parametru D_n (priemerná hmotnosť nosičov priemernej veľkosti) zhodovalo s poradím podľa parametru D_w , parameter D_w hodnotený nebol.

Tab. 21: Porovnanie rozsahu koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu s ich hodnotou D_n

Magnetický nosič	D_n (μm)	Rozsah koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
Fkol 71	1,20	-
Fkol 72	2,16	2,0 – 4,0
Fkol 77ox	2,23	0,4 – 4,0
Fkol 73	2,67	2,0 – 4,0
Fkol 102	3,11	2,0 – 4,0
Fkol 103	3,72	2,0 – 4,0

Vzhľadom na to, že nosiče Fkol 103 majú najvyšší obsah železa ale zhášajú fluorescenciu len v rozsahu koncentrácií 2,0 – 4,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, nepredpokladá sa významný vplyv hmotnostného podielu železa (%) nosiča na zhášanie fluorescencie, respektíve amplifikáciu špecifického produktu PCR.

Posledným uvádzaním parametrom je obsah karboxylových skupín. Ako jediné obsahovali karboxylové skupiny magnetické nosiče Fkol 77ox (Tab. 22).

Tab. 22: Porovnanie rozsahu koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu s ich obsahom karboxylových skupín

Magnetický nosič	-COOH (mM/g)	Rozsah koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
Fkol 71	-	-
Fkol 72	-	2,0 – 4,0
Fkol 73	-	2,0 – 4,0
Fkol 102	-	2,0 – 4,0
Fkol 103	-	2,0 – 4,0
Fkol 77ox	0,76	0,4 – 4,0

Z Tab. 22 vyplýva, že významný vplyv na zhášanie fluorescencie má práve prítomnosť karboxylových skupín na povrchu nosiča. Zhášanie fluorescencie prítomnosťou karboxylových skupín môže byť spôsobené naviazaním fluorescenčného farbiva SYTO-9 na povrch nosiča. Avšak, štruktúra farbiva SYTO-9 nebola doteraz objasnená, preto je zložité popísať inhibičný mechanizmus v PCR reakcií [79]. Vzhľadom na to, že nosiče Fkol 77ox okrem zhášania fluorescencie tiež inhibovali amplifikáciu, predpokladá sa nešpecifická adsorpcia proteínu, respektíve DNA polymerázy na povrch nosiča s obsahom karboxylových skupín [27]. Nešpecifická adsorpcia proteínov karboxylovými skupinami na povrchu nosiča bola popísaná v predchádzajúcich štúdiách [86, 87]. Rovnako bolo zistené, že s množstvom karboxylových skupín rastie miera inhibície PCR [86, 88].

Z fotografií zo skenovacieho elektrónového mikroskopu uvedených na Obr. 12 je možné posúdiť schopnosť nosičov vytvárať zhluky. Okrem častíc Fkol 102 a Fkol 103 použité magnetické nosiče zhluky nijak zvlášť netvorili. Agregáty nosičov Fkol 103 sú väčšie ako nosičov Fkol 102. Magnetické nosiče Fkol 77ox mali ako jediné negatívny vplyv na amplifikáciu DNA a zároveň neagregujú, čo znamená, že schopnosť nosičov vytvárať zhluky nemá vplyv na amplifikáciu DNA.

Z porovnávania charakteristických vlastností magnetických nosičov so získanými

výsledkami vyplynulo, že hmotnostný podiel železa, schopnosť tvoriť zhluky, PDI , D_n a D_w magnetického nosiča nemajú vplyv na zhášanie fluorescence, respektíve amplifikáciu DNA. Zhodný výsledok rozsahu koncentrácie nosičov v PCR zmesi zhášajúcich fluorescenciu ($2,0 - 4,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) pre nosiče Fkol 72, Fkol 73, Fkol 102 a Fkol 102, bez ohľadu na ich charakteristické vlastnosti dokazuje vplyv nosičov na zhášanie fluorescence, respektíve amplifikáciu DNA v závislosti na stupni pokrytia magnetického jadra polymérom. Rovnako bol dokázaný vplyv prítomnosti karboxylovových skupín na povrchu nosiča, čo sa prejavilo pri nosičoch Fkol 77ox nie len zhášaním fluorescence, ale aj inhibíciou amplifikácie produktu PCR. PCR v reálnom čase je teda účinná metóda pre stanovenie vplyvu karboxylových skupín a stupňa pokrytia magnetického jadra polymérom, a je vhodná pre *in vitro* štúdium biokompatibility magnetických nosičov.

6. ZÁVER

Teoretická časť diplomovej práce pojednáva o magnetických nosičoch zložených z magnetického jadra pokrytého polymérnou vrstvou. Okrem popisu magnetických vlastností jadra je zameraná na vplyv enkapsulácie na celkové vlastnosti nosiča. Najväčšia pozornosť je venovaná vplyvu na biokompatibilitu a funkcionalizáciu povrchu nosiča. Práca taktiež popisuje možnosti syntézy a využitia magnetických nosičov v *in vivo* a *in vitro* aplikáciach. Práve *in vitro* testovanie biokompatibility je uprednostňované pred *in vivo* testovaním. Polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase je vzhľadom na svoju citlivosť úspešne použiteľná pre testovanie biokompatibility, respektíve enkapsulácie magnetického jadra a vplyvu funkčných skupín na DNA počas amplifikácie.

V experimentálnej časti boli prídavkom rôznej koncentrácie nosičov do PCR zmesi testované magnetické nosiče Fkol 71, Fkol 72., Fkol 73, Fkol 102, Fkol 103 bez obsahu karboxylových skupín a Fkol 77ox s obsahom karboxylových skupín. Na základe výsledkov z PCR v reálnom čase boli magnetické nosiče rozdelené do troch skupín. Nosiče Fkol 71 nemali významný vplyv na detekovanú fluorescenciu, naopak nosiče Fkol 72, Fkol 73, Fkol 102, Fkol 103 mali významný vplyv. Nosiče Fkol 77ox veľmi významne vplývali na intenzitu fluorescencie a ako jediné inhibovali amplifikáciu špecifického produktu PCR. Vzhľadom na to, že magnetické nosiče Fkol 77ox ako jediné obsahovali karboxylovú skupinu, predpokladá sa jej vplyv na zhášanie fluorescencie, respektíve na amplifikáciu DNA. Pri porovnávaní rozsahu koncentrácie magnetických nosičov zhášajúcich fluorescenciu s ich známymi charakteristickými vlastnosťami a snímkami zo SEM vyplynulo, že okrem prítomnosti karboxylovej skupiny na povrchu nosiča má vplyv na zhášanie fluorescencie stupeň pokrytia magnetického jadra polymérom. PCR v reálnom čase sa preukázala ako účinná metóda pre štúdium stupňa pokrytia magnetického jadra a zároveň vplyvu karboxylových skupín s ohľadom na biokompatibilitu nosičov.

Uvedené magnetické nosiče P(HEMA-*co*-GMA) bez obsahu karboxylových skupín sú dostatočne pokryté a v testovaných koncentráciách nemajú vplyv na amplifikáciu DNA a teda ich prítomnosť v PCR zmesi po extrakcii na pevnej fáze nie je pre konvenčnú PCR nežiadúca. Prítomnosť magnetických nosičov s obsahom karboxylových skupín je vzhľadom na ich inhibíciu amplifikácie menej vhodná.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

bp – pár bází

D_n – priemerná hodnota priemeru nosiča

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dATP – deoxyadenozín trifosfát

dCTP – deoxycytidín trifosfát

dGTP – deoxyguanozín trifosfát

dNTPs – deoxynukleotid trifosfáty

dTTP – deoxytimidín trifosfát

D_w – priemerná hodnota hmotnosti nosiča

EDTA – etyléndiamintetraoctová kyselina

H – intenzita magnetického poľa

H_c - koercivita

M – sklon kalibračnej priamky

M – stupeň magnetizácie

M_r – remanentná magnetizácia

MRI – magnetická rezonancia

M_s – magnetické nasýtenie

PCR – polymerázová reťazová reakcia

PDI – index polydisperzity

Pfu DNA polymeráza - termostabilný enzým izolovaný z mikroorganizmu *Pyrococcus furiosus*

P(HEMA) – polyhydroxyetylmetakrylát

P(HEMA-*co*-GMA) – kopolymér polyhydroxymetakrylát-glycidylmetakrylát

qPCR – PCR v reálnom čase

r. e. – účinnosť reakcie

R^2 – korelačný koeficient

SEM – skenovacia elektrónová mikroskopia

SPION – superparamagnetické nanočastice oxidov železa

Taq DNA polymeráza – termostabilný enzým izolovaný z mikroorganizmu *Thermus aquaticus*

TBE - tris-borát-EDTA tlmivý roztok

TEM – transmisná elektrónová mikroskopia

T_m – teplota topenia

UV – ultrafialové žiarenie

χ_m - magnetická susceptibilita

7. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] ROBINSON, P. J., P. DUNNILL a M. D. LILLY. The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 1973, **15**(3), 603-606. DOI: 10.1002/bit.260150318. ISSN 0006-3592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260150318>
- [2] PHILIPPOVA, Olga, Anna BARABANOVA, Vyacheslav MOLCHANOV a Alexei KHOKHLOV. Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. *European Polymer Journal*. 2011, 2011, **47**(4), 542-559. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2010.11.006. ISSN 00143057. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305710004350>
- [3] AGUILAR-ARTEAGA, K., J.A. RODRIGUEZ a E. BARRADO. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2010, **674**(2), 157-165. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267010008366>
- [4] HORÁK, Daniel, Michal BABIČ, Hana MACKOVÁ a Milan J. BENEŠ. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*. 2007, **30**(11), 1751-1772. DOI: 10.1002/jssc.200700088. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700088>
- [5] MA, Zhiya a Huizhou LIU. Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology*. 2007, **5**(1-2), 1-10. DOI: 10.1016/j.cpart.2006.11.001. ISSN 16722515. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1672251507000024>
- [6] INDIRA, T. K. a P. K. LAKSHMI. Magnetic nanoparticles—A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2009, **3**(2), 1035-1042.
- [7] HÄFELI, U., W. SCHÜTT, J. TELLER a M. ZBOROWSKI. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. 1. New York: Plenum Press, 1997. ISBN 978-0-306-45687-9.
- [8] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science*. 2013, **36**(15), 2472-2485. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>
- [9] CORNELL, R. M. a U. SCHWERTMANN. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. 1. vyd. Weinheim: VCH Publishers, 1996. ISBN 3527285768.
- [10] MATSUNAGA, Tadashi a Shinji KAMIYA. Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

1987, **26**(4), -. DOI: 10.1007/BF00256663. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00256663>

[11] MATSUNAGA, Tadashi a Toshifumi SAKAGUCHI. Molecular mechanism of magnet formation in bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2000, **90**(1), 1-13. DOI: 10.1016/S1389-1723(00)80001-8. ISSN 13891723. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172300800018>

[12] PILGRIMM, H. *Superparamagnetic particles, process for their manufacture and usage*. USA. US 5928958 A Patentový spis. Zapsáno 27.7.1995.

[13] BEE, A., R. MASSART a S. NEVEU. Synthesis of very fine maghemite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1995, **149**(1-2), 6-9. DOI: 10.1016/0304-8853(95)00317-7. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304885395003177>

[14] Classification of Magnetism. *NPTEL* [online]. Creative Commons Attribution-ShareAlike [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: http://nptel.ac.in/courses/113104005/lecture29a/29_4.htm

[15] Paramagnetism. *Tutorvista* [online]. NCS Pearson [cit. 2017-01-13]. Dostupné z: <http://physics.tutorvista.com/electricity-and-magnetism/paramagnetism.html>

[16] DAVE, Shivang R. a Xiaohu GAO. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2009, **1**(6), 583-609. DOI: 10.1002/wnan.51. ISSN 19395116. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/wnan.51>

[17] LESLIE-PELECKY, Diandra L. a Reuben D. RIEKE. Magnetic Properties of Nanostructured Materials. *Chemistry of Materials*. 1996, **8**(8), 1770-1783. DOI: 10.1021/cm960077f. ISSN 0897-4756. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm960077f>

[18] JAMSHAD, Talha, Ernandes Taveira Tenório NETO, Mohamed M. EISSA, Nadia ZINE, Marcos Hiroiuiqui KUNITA, Abdelhamid Errachid EL-SALHI a Abdelhamid ELAISSARI. Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, **79**(76), 344-362. DOI: 10.1016/j.trac.2015.10.022. ISSN 01659936. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615300467>

[19] KARIMI, Z., L. KARIMI a H. SHOKROLLAHI. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, **33**(5), 2465-2475. DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.045. ISSN 09284931. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113000581>

[20] HONG, Ruo-Yu, Jian-Hua LI, Shi-Zhong ZHANG, Hong-Zhong LI, Ying ZHENG, Jian-min DING a Dong-Guang WEI. Preparation and characterization of silica-coated Fe₃O₄

nanoparticles used as precursor of ferrofluids. *Applied Surface Science*. 2009, **255**(6), 3485-3492. DOI: 10.1016/j.apsusc.2008.09.071. ISSN 01694332. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433208020801>

[21] HWANG, D. W., D. S. LEE a S. KIM. Gene Expression Profiles for Genotoxic Effects of Silica-Free and Silica-Coated Cobalt Ferrite Nanoparticles. *Journal of Nuclear Medicine*. 2012, **53**(1), 106-112. DOI: 10.2967/jnumed.111.088443. ISSN 0161-5505. Dostupné také z: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.111.088443>

[22] Magnetic Particles for Biomedical Applications. NARAYAN, R. *Biomedical Materials*. 1. vyd. , Springer US, 2009, s. 477-491. ISBN 978-0-387-84871-6.

[23] MOLDAY, Robert S. a Donald MACKENZIE. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *Journal of Immunological Methods*. 1982, **52**(3), 353-367. DOI: 10.1016/0022-1759(82)90007-2. ISSN 00221759. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175982900072>

[24] NEUBERGER, Tobias, Bernhard SCHÖPF, Heinrich HOFMANN, Margarete HOFMANN a Brigitte VON RECHENBERG. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, **293**(1), 483-496. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.01.064. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885305001137>

[25] WICHTERLE, O. a D. LÍM. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*. 1960-1-9, **185**(4706), 117-118. DOI: 10.1038/185117a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/185117a0>

[26] PÉREZ, J.P. Hervás, E. LÓPEZ-CABARCOS a B. LÓPEZ-RUIZ. The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors. *Biomolecular Engineering*. 2006, **23**(5), 233-245. DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.06.003. ISSN 13890344. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034406000700>

[27] TRACHTOVA, Stepanka, Alena . SPANOVA, Daniel HORAK, Hana KOZAKOVA a Bohuslav RITTICH. Real-Time Polymerase Chain Reaction as a Tool for Evaluation of Magnetic Poly(Glycidyl methacrylate)-Based Microspheres in Molecular Diagnostics. *Current Pharmaceutical Design*. 2016, **22**(5), 639-646. DOI: 10.2174/1381612822666151228105006. ISSN 13816128. Dostupné také z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>

[28] BAYRAMOĞLU, Gülay, Sinan AKGÖL, Adnan BULUT, Adil DENIZLI a M YAKUP ARICA. Covalent immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, **14**(2), 117-126. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00170-5. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X02001705>

[29] BERGEMANN, C, D MÜLLER-SCHULTE, J OSTER, L À BRASSARD a A.S LÜBBE. Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1999, **194**(1-3), 45-52. DOI: 10.1016/S0304-8853(98)00554-X. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030488539800554X>

[30] GRÜTTNER, Cordula a Joachim TELLER. New types of silica-fortified magnetic nanoparticles as tools for molecular biology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1999, **194**(1-3), 8-15. DOI: 10.1016/S0304-8853(98)00561-7. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885398005617>

[31] HE, Jincan, Meiyong HUANG, Dongmei WANG, Zhuomin ZHANG a Gongke LI. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, **101**, 84-101. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.017. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708514002088>

[32] CHEN, Dong-Hwang a Szu-Han WU. Synthesis of Nickel Nanoparticles in Water-in-Oil Microemulsions. *Chemistry of Materials*. 2000, **12**(5), 1354-1360. DOI: 10.1021/cm991167y. ISSN 0897-4756. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm991167y>

[33] SUN, Liangliang, Yihan LI, Ping YANG, Guijie ZHU a Norman J. DOVICH. High efficiency and quantitatively reproducible protein digestion by trypsin-immobilized magnetic microspheres. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1220**(1), 68-74. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.11.050. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311017511>

[34] ELZOGHBY, Ahmed O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *Journal of Controlled Release*. 2013, **172**(3), 1075-1091. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.09.019. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365913008079>

[35] YANG, Peilun, Baocun ZHU, Jie ZHAO, Haiqin YU, Liangguo YAN, Qin WEI a Bin DU. A novel reusable glutathione-modified magnetic fluorescent nanosensor for highly sensitive determination and removal of Cu²⁺. *Inorganica Chimica Acta*. 2013, **408**, 120-125. DOI: 10.1016/j.ica.2013.09.010. ISSN 00201693. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169313004842>

[36] COLOMBO, Miriam, Susana CARREGAL-ROMERO, Maria F. CASULA, et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*. 2012, **41**(11), 4306-4334. DOI: 10.1039/c2cs15337h. ISSN 0306-0012. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cs15337h>

[37] KŘÍŽOVÁ, Jana, Alena ŠPANOVÁ, Bohuslav RITTICH a Daniel HORÁK. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of*

Chromatography A. 2005, **1064**(2), 247-253. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.014. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304022551>

[38] DEANGELIS, Margaret M., David G. WANG a Trevor L. HAWKINS. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research.* 1995, **23**(22), 4742-4743. DOI: 10.1093/nar/23.22.4742. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/23.22.4742>

[39] SKOWRONSKI, E. W., N. ARMSTRONG, G. ANDERSEN, M. MACHT a P. M. MCCREADY. Magnetic, microplate-format plasmid isolation protocol for high-yield, sequencing-grade DNA. *Biotechniques.* 2000, **29**(4), 786-788. ISSN 1940-9818.

[40] HORÁK, Daniel, Bohuslav RITTICH a Alena ŠPANOVÁ. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2007, **311**(1), 249-254. DOI: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1157. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885306025418>

[41] RITTICH, Bohuslav, Alena ŠPANOVÁ, Petr ŠÁLEK, Petra NĚMCOVÁ, Štěpánka TRACHTOVÁ a Daniel HORÁK. Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethylene glycol)-NaCl water solutions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2009, **321**(10), 1667-1670. DOI: 10.1016/j.jmmm.2009.02.110. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885309001784>

[42] THÜNEMANN, Andreas F., Dagmar SCHÜTT, Lutz KAUFNER, Ulrich PISON a Helmuth MÖHWALD. Maghemite Nanoparticles Protectively Coated with Poly(ethylene imine) and Poly(ethylene oxide)- b lock -poly(glutamic acid). *Langmuir.* 2006, **22**(5), 2351-2357. DOI: 10.1021/la052990d. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la052990d>

[43] HORÁK, Daniel, Nataliya SEMENYUK a František LEDNICKÝ. Effect of the reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in the presence of a ferrofluid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* 2003, **41**(12), 1848-1863. DOI: 10.1002/pola.10728. ISSN 0887624x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.10728>

[44] WIERUCKA, Marta a Marek BIZIUK. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2014, **59**, 50-58. DOI: 10.1016/j.trac.2014.04.007. ISSN 01659936. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993614001022>

[45] JIANG, Ting-Fu, Ting-Ting LIANG, Yuan-Hong WANG, Wen-Hui ZHANG a Zhi-Hua LV. Immobilized capillary tyrosinase microreactor for inhibitor screening in natural extracts by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2013, **84**, 36-40. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.05.023. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708513002240>

- [46] LESKINEN, S. D., M. BROWNELL, D. V. LIM a V. J. HARWOOD. Hollow-Fiber Ultrafiltration and PCR Detection of Human-Associated Genetic Markers from Various Types of Surface Water in Florida. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, **76**(12), 4116-4117. DOI: 10.1128/AEM.00025-10. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00025-10>
- [47] ZHAO, Xu, Kaishun BI, Xiaofan WANG, et al. A UFLC–MS/MS method coupled with one-step protein precipitation for determination of docetaxel in rat plasma: Comparative pharmacokinetic study of modified nanostructured lipid carrier. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, **83**, 202-208. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.05.025. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708513002264>
- [48] DOYLE, J. J. a J. L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987, 19, 11-15.
- [49] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, **113**(5), 1014-1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- [50] SHOKROLLAHI, H., A. KHORRAMDIN a Gh. ISAPOUR. Magnetic resonance imaging by using nano-magnetic particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2014, **369**, 176-183. DOI: 10.1016/j.jmmm.2014.06.023. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885314005459>
- [51] BACH-GANSMO, T., A. FALHVIK, A. ERICSSON a A. HEMMINGSSON. Superparamagnetic iron oxid for liver imaging. Comparison among three different preparations. *Investigative Radiology*. 1994, **29**(3), 339-344.
- [52] HORÁK, Daniel, Michal BABIČ, Pavla JENDELOVÁ, et al. Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009, **321**(10), 1539-1547. DOI: 10.1016/j.jmmm.2009.02.082. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885309001504>
- [53] TIETZE, Rainer, Jan ZALOGA, Harald UNTERWEGER, et al. Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015, **468**(3), 463-470. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.022. ISSN 0006291x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15304125>
- [54] GAGLIA, Jason L., Mukesh HARISINGHANI, Iman AGANJ, Gregory R. WOJTKIEWICZ, Sandeep HEDGIRE, Christophe BENOIST, Diane MATHIS a Ralph WEISSLEDER. Noninvasive mapping of pancreatic inflammation in recent-onset type-1 diabetes patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, **112**(7), 2139-2144. DOI: 10.1073/pnas.1424993112. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1424993112>
- [55] LÜBBE, Andreas S., Christian BERGEMANN, Jeffery BROCK a David G. MCCLURE. Physiological aspects in magnetic drug-targeting. *Journal of Magnetism and Magnetic*

Materials. 1999, **194**(1-3), 149-155. DOI: 10.1016/S0304-8853(98)00574-5. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885398005745>

[56] LEACH, J. H. *Magnetic Targeted Drug Delivery*. Virginiach Tech Department of Electrical and Computer Engineering, 2002.

[57] BATYCKY, Richard P., Justin HANES, Robert LANGER a David A. EDWARDS. A Theoretical Model of Erosion and Macromolecular Drug Release from Biodegrading Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997, **86**(12), 1464-1477. DOI: 10.1021/js9604117. ISSN 00223549. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915504395>

[58] BRAZEL, Christopher S. a Nikolaos A. PEPPAS. Modeling of drug release from Swellable polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000, **49**(1), 47-58. DOI: 10.1016/S0939-6411(99)00058-2. ISSN 09396411. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641199000582>

[59] GELBRICH, Thorsten, Gernot U. MARTEN a Annette M. SCHMIDT. Reversible thermoflocculation of magnetic core-shell particles induced by remote magnetic heating. *Polymer*. 2010, **51**(13), 2818-2824. DOI: 10.1016/j.polymer.2010.02.032. ISSN 00323861. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386110001709>

[60] SALVATORE, Joseph R., Joanne HARRINGTON a Thomas KUMMET. Phase I clinical study of a static magnetic field combined with anti-neoplastic chemotherapy in the treatment of human malignancy: Initial safety and toxicity data. *Bioelectromagnetics*. 2003, **24**(7), 524-527. DOI: 10.1002/bem.10149. ISSN 0197-8462. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bem.10149>

[61] BABINCOVÁ, M., D. LESZCZYNSKA, P. SOURIVONG, P. BABINEC a J. LESZCZYNSKI. Principles of magnetodynamic chemotherapy. *Medical Hypotheses*. 2004, **62**(3), 375-377. DOI: 10.1016/j.mehy.2003.10.003. ISSN 03069877. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987703003475>

[62] LU, An-Hui, E. L. SALABAS a Ferdi SCHÜTH. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, **46**(8), 1222-1244. DOI: 10.1002/anie.200602866. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200602866>

[63] LYON, Jennifer L., David A. FLEMING, Matthew B. STONE, Peter SCHIFFER a Mary Elizabeth WILLIAMS. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. *Nano Letters*. 2004, **4**(4), 719-723. DOI: 10.1021/nl035253f. ISSN 1530-6984. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl035253f>

[64] PANG, Yean Ling, Steven LIM, Hwai Chyuan ONG a Wen Tong CHONG. Research progress on iron oxide-based magnetic materials: Synthesis techniques and photocatalytic applications. *Ceramics International*. 2016, **42**(1), 9-34. DOI: 10.1016/j.ceramint.2015.08.144. ISSN 02728842. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272884215016703>

[65] POLLERT, E., K. KNÍŽEK, M. MARYŠKO, K. ZÁVĚTA, A. LANČOK, J. BOHÁČEK, D. HORÁK a M. BABIČ. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres containing

maghemite prepared by emulsion polymerization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2006, **306**(2), 241-247. DOI: 10.1016/j.jmmm.2006.03.069. ISSN 03048853. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885306006342>

[66] KE, Fei, Ling-Guang QIU, Yu-Peng YUAN, Xia JIANG a Jun-Fa ZHU. Fe₃O₄@MOF core-shell magnetic microspheres with a designable metal-organic framework shell. *Journal of Materials Chemistry*. 2012, **22**(19), 9497-. DOI: 10.1039/c2jm31167d. ISSN 0959-9428. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2jm31167d>

[67] SHYLESH, Sankaranarayanapillai, Volker SCHÜNEMANN a Werner R. THIEL. Magnetically Separable Nanocatalysts: Bridges between Homogeneous and Heterogeneous Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010, **49**(20), 3428-3459. DOI: 10.1002/anie.200905684. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200905684>

[68] HORÁK, Daniel, Alena ŠPANOVÁ, Jana TVRDÍKOVÁ a Bohuslav RITTICH. Streptavidin-modified magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) microspheres for selective isolation of bacterial DNA. *European Polymer Journal*. 2011, **47**(5), 1090-1096. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.02.007. ISSN 00143057. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305711000607>

[69] The biocompatibility and toxicity of magnetic particles. *Magnetic cell separation*. London: Elsevier, 2008, s. 163-223. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, v. 32. ISBN 978-0-444-52754-7.

[70] TRACHTOVÁ, Štěpánka, Hana ZAPLETALOVÁ, Alena ŠPANOVÁ, Daniel HORÁK, Hana KOLÁŘOVÁ a Bohuslav RITTICH. The Evaluation of Magnetic Polymethacrylate-based Microspheres Used for Solid Phase DNA Micro-Extraction. *Chromatography*. 2015, **2**(2), 156-166. DOI: 10.3390/chromatography2020156. ISSN 2227-9075. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2227-9075/2/2/156/>

[71] AL-SOUD, W. A. a P. RADSTROM. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, **39**(2), 485-493. DOI: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.39.2.485-493.2001>

[72] ŠPANOVÁ, Alena, Bohuslav RITTICH, Daniel HORÁK, Jiří LENFELD, Jana PRODĚLALOVÁ, Jana SUČIKOVÁ a Soňa ŠTRUMCOVÁ. Immunomagnetic separation and detection of Salmonella cells using newly designed carriers. *Journal of Chromatography A*. 2003, **1009**(1-2), 215-221. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00431-X. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730300431X>

[73] *PCR Technologies: A Technical Guide* [online]. Sigma-Aldrich Co., 2014 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/pcr-technologies-guide.pdf

[74] Polymerase Chain Reaction (PCR). *NCBI* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

[75] LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (63), -. DOI: 10.3791/3998. ISSN 1940-087x. Dostupné také z: <http://www.jove.com/video/3998/>

[76] *Real-Time PCR Applications Guide* [online]. Bio-Rad Laboratories, 2006 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>

[77] TRACHTOVÁ, Š. *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – úloha č. 4*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ZS 2014–2015.

[78] WITWERT, C. T., M. G. HERRMANN, A. A. MOSS a R. P. RASMUSSEN. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997, **22**(1), 134-138.

[79] MONIS, Paul T., Steven GIGLIO a Christopher P. SAINT. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry*. 2005, **340**(1), 24-34. DOI: 10.1016/j.ab.2005.01.046. ISSN 00032697. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269705000904>

[80] TRACHTOVÁ, Štěpánka, Ondřej KAMAN, Alena ŠPANOVÁ, Pavel VEVERKA, Emil POLLERT a Bohuslav RITTICH. Silica-coated La_{0.75}Sr_{0.25}MnO₃ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation. *Journal of Separation Science*. 2011, **34**(21), 3077-3082. DOI: 10.1002/jssc.201100442. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201100442>

[81] BALAMURUGAN, V., A. SEN, G. VENKATESAN, V. YADAV, V. BHANOT, V. BHANUPRAKASH a R. K. SINGH. Application of Semi-quantitative M Gene-Based Hydrolysis Probe (TaqMan) Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Peste des petits ruminants Virus in the Clinical Samples for Investigation into Clinical Prevalence of Disease. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2010, **57**(6), 383-395. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2010.01160.x. ISSN 18651674. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1865-1682.2010.01160.x>

[82] BUSTIN, S. A., V. BENES, J. A. GARSON, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009, **55**(4), 611-622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797. ISSN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.112797>

[83] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Assays To Identify and Quantify Fecal Bifidobacterium Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, **71**(5), 2318-2324. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2318-2324.2005. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.5.2318-2324.2005>

[84] DORAK, Mehmed Tevfik. Real-Time PCR: Practical Issues and Troubleshooting. Miami (Florida): Florida International University, 2011, 70 s. Dostupné také z: <http://www.dorak.info/mobgam2011.pdf>

[85] Poor Efficiency of PCR. ThermoFisher Scientific [online]. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>

[86] KOUBKOVÁ, Jana, Petr MÜLLER, Helena HLÍDKOVÁ, Zdeněk PLICHTA, Vladimír PROKS, Bořivoj VOJTĚŠEK a Daniel HORÁK. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres for protein capture. *New Biotechnology*. 2014, **31**(5), 482-491. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.06.004. ISSN 18716784. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678414015064>

[87] HORÁK, Daniel, Helena HLÍDKOVÁ, Štěpánka TRACHTOVÁ, Miroslav ŠLOUF, Bohuslav RITTICH a Alena ŠPANOVÁ. Evaluation of poly(ethylene glycol)-coated monodispersed magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(glycidyl methacrylate) microspheres by PCR. *European Polymer Journal*. 2015, **68**, 687-696. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.03.036. ISSN 00143057. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305715001718>

[88] HORÁK, Daniel, Helena HLÍDKOVÁ, Mohamed HIRAOUI, Myriam TAVERNA, Vladimír PROKS, Eliška MÁZL CHÁNOVÁ, Claire SMADJA a Zdenka KUČEROVÁ. Monodisperse Carboxyl-Functionalized Poly(Ethylene Glycol)-Coated Magnetic Poly(Glycidyl Methacrylate) Microspheres: Application to the Immunocapture of β -Amyloid Peptides. *Macromolecular Bioscience*. 2014, **14**(11), 1590-1599. DOI: 10.1002/mabi.201400249. ISSN 16165187. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201400249>