

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2015**

**Bc. Eva Hrušková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Testování teplotní uniformity termocyklérů pomocí  
analýzy teploty tání stejného amplikonu**

**Diplomová práce**

**Bc. Eva Hrušková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

**Vedoucí práce: Doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. Mgr. Jiřího Drábka, Ph. D., a že jsem zde uvedla všechny zdroje, ze kterých jsem čerpala.

V Olomouci 22. 04. 2015

.....

Podpis

## Souhrn

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR) patří k nejčastějším metodám užívaným v biologickém výzkumu. Všechny výzkumné oblasti jako medicína, veterinářství, forenzní výzkum, potravinářství a další jsou dnes na této metodě závislé. Obecně je PCR založena na cyklických změnách teploty, proto jsou na teplotní uniformitu termocykléru, přesnost a správnost výsledků kladeny přísné požadavky. Pro zaručení správné funkce a splnění akreditačních požadavků laboratoře (ISO 15189, ISO 17025) je nutno termocykléry pravidelně kalibrovat akreditovanými kalibračními laboratořemi. Ty však často nejsou vybaveny pro kalibraci termocyklérů s uzavřenou konstrukcí jako v případě LightCycler® 480 II nebo Rotor-Gene 3000™, proto je třeba vyhledat jinou metodu.

Teoretická část této diplomové práce je zaměřena na zdůvodnění důležitosti kalibrace termocyklérů a přehled dostupných kalibračních metod. V praktické části je porovnávána teplota tání ( $T_m$ ) stejné amplifikované sekvence DNA v termocyklérech dostupných v Laboratoři experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Dále je hodnoceno, zda uniformita těchto přístrojů odpovídá parametrům deklarovaným výrobcem a parametrům vyžadovaným dle akreditace. Součástí této části je vytváření prototypu přenosné soupravy pro kalibraci termocyklérů typu LightCycler®.

## Summary

The quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) is one of the most common methods used in biological research. All fields of research like medicine, veterinary, forensic research, the food industry and others, depend on this method these days. In general, PCR is based on the temperature changes, so the defined requirements are set on the temperature uniformity of thermocyclers, precision and accuracy of results. To assure the proper function and to fulfill accreditation requirements of laboratory (ISO 15189, ISO 17025), it is necessary to calibrate thermocyclers regularly by accredited calibration laboratories. However, they are sometimes not equipped for the calibration of closed construction thermocyclers like LightCycler<sup>®</sup> 480 II or Rotor-Gene 3000<sup>™</sup>, so the different method has to be found.

The theoretical part of the diploma thesis is focused on the justifying of the thermocyclers calibration importance and summary of the available calibration methods. Within the practical part, the melting temperature ( $T_m$ ) of the same amplified sequence in thermocyclers present in the Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc is compared. Furthermore, the parameters declared by the manufacturers and the fulfilment of accreditation requirements for the temperature block uniformity are evaluated. One part of this thesis concerns development of the portable calibration kit for calibration of LightCycler<sup>®</sup>-typed thermocyclers.

### **Poděkování:**

Chtěla bych tímto poděkovat doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, PhD. za odborné vedení mé diplomové práce a za cenné rady a připomínky při její realizaci. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janě Vrbkové, PhD. za neocenitelnou pomoc se statistickým vyhodnocením experimentálních dat. Děkuji paní Miroslavě Rabčanové a Veronice Holinkové, DiS. za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji mé rodině a příteli za podporu.

Tato práce byla podpořena granty IGA\_LF\_2015 a LO1304.

## Obsah:

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY .....	2
2.1	Termocyklér v PCR diagnostice.....	2
2.1.1	Historie .....	2
2.1.2	Typy termocyklérů .....	2
2.1.3	Design termocyklérů .....	3
2.2	Zdroje variability v PCR a jejich důsledky .....	8
2.3	Požadavky kontrolních orgánů .....	11
2.3.1	Akreditace .....	11
2.3.2	ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.....	12
2.3.3	ČSN EN ISO 15189-ed.2:2013 .....	12
2.3.4	Metrologické parametry měření .....	13
2.4	Kalibrace termocyklérů, kalibrační parametry a metody .....	14
2.4.1	Kalibrační parametry .....	14
2.4.2	Metody kalibrace.....	15
2.5	Analýza teploty tání a její využití pro kalibraci .....	16
2.5.1	Klasická analýza křivky tání .....	17
2.5.2	High Resolution Melting analýza (HRM) analýza.....	18
2.5.3	Využití melting analýzy pro kalibraci .....	19
3	CÍLE PRÁCE .....	22
4	MATERIÁL .....	23
4.1	Přístrojové vybavení a pomůcky .....	23
4.1.1	Přístroje .....	23
4.1.2	Pomůcky.....	24
4.2	Spotřební materiál .....	25
4.3	Software.....	25

4.4	Reagencie .....	26
4.5	Vzorky .....	26
5	METODA .....	27
5.1	Návrh primerů .....	27
5.2	Laboratorní protokol.....	27
5.3	Program PCR běhu.....	31
6	VÝSLEDKY.....	33
7	DISKUZE.....	63
8	ZÁVĚR.....	67
9	LITERATURA.....	68
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	72
11	PŘÍLOHY .....	74



# 1 ÚVOD

Termocyklér je přístroj užívaný k amplifikaci vzorků deoxyribonukleových (DNA) a ribonukleových (RNA) kyselin pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Podle uživatelem naprogramovaných teplotních a časových údajů termocyklér cyklicky zvyšuje a snižuje teplotu reakční směsi ve vyhřívacím bloku, čímž umožňuje tvorbu milionů kopií podle vzoru specifické sekvence nukleové kyseliny. Amplifikovaný genetický materiál může být dále použit v mnohých návazných procesech jako je klonování, sekvenování, genotypizace anebo sloužit jako výstup sám o sobě.

Při výběru vhodného termocykléru pro specifickou metodu nebo skupinu metod je třeba zvážit mnohá kritéria - od množství používaných vzorků po požadovanou rychlost a citlivost reakce. Mohlo by se zdát, že dnes jsou již na trhu jen kvalitní a precizní přístroje, které dokáží provést PCR přesně, citlivě a rychle. Ovšem existuje řada parametrů cykléru, které ovlivňují průběh reakce a které následně mohou ovlivnit výsledek. Mohou změnit senzitivitu a specifitu metody, což může vést k opožděnému vydání výsledků z důvodu neshod v duplikátech a následného opakování reakce nebo dokonce k vydání špatného, falešně pozitivního nebo falešně negativního výsledku. V případě testování klinických vzorků to může vést ke špatné diagnóze, prognóze nebo predikci a tím k ohrožení života pacienta.

Tato diplomová práce se zabývá testováním teplotní uniformity termocyklérů, což je jejich zásadní parametr. Pro toto testování využívá metodu PCR - je prováděno pomocí analýzy teploty tání stejného amplikonu.

## 2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

### 2.1 Termocyklér v PCR diagnostice

#### 2.1.1 Historie

Když byla Karym Mullisem v roce 1983 objevena PCR (Mullis a kol., 1986), byla ihned předpovězena její užitečnost pro genetickou analýzu. První přístroje k provádění PCR reakcí fungovaly na principu tří nádob s kapalinou vyhřátou na danou teplotu. Uživatel v určitých časových intervalech zkumavky se vzorky manuálně přenášel z nádoby do nádoby, což bylo značně nepohodlné a zdlouhavé.

První automatizovaný prototyp cykléru, Mr. Cycler, byl sestaven v roce 1985. Tento cyklér však byl automatizován jen částečně – uživatel musel po každém cyklu přidat nový enzym, protože vysoká teplota polymerázu zdenaturovala. Při tomto postupu však vznikalo stále mnoho nepřesností a bylo zde velké riziko kontaminace. Naštěstí v raných fázích „PCR revoluce“ byla firmou Cetus objevena termostabilní DNA polymeráza – *Thermus aquaticus* (*Taq*) polymeráza (Saiki a kol., 1988). Ve stejném roce biotechnologická firma PerkinElmer uvedla na trh programovatelný termocyklér schopný regulovat teplotu reakce. Tyto inovace minimalizovaly vliv lidského faktoru a snížily riziko kontaminace, což z PCR učinilo metodu rutinně používanou v laboratořích. Postupně se začaly již vyrábět i komerční soupravy předmíchaných reagensů – kity (URL: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/24547/title/Mr--Cycle--An-Automated-PCR-Prototype/>) [cit.2014-10-15]).

Detekce genetických polymorfismů se díky PCR stala mnohem jednodušším procesem. Oproti dříve používaným metodám jako délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP), PCR umožňuje „extrakci“ specifického lokusu genomu a produkuje dostatečná kvanta nukleové kyseliny pro další analýzy (Wittwer a kol., 2010).

#### 2.1.2 Typy termocyklérů

**Standardní termocykléry** využívají vyjímatelné vyhřívací bloky konstruované pro umístění multijamkových destiček nebo stripů zkumavek. Izolovaná DNA se smísí s PCR reagensy a po amplifikaci v tomto cykléru se úspěšnost PCR potvrzuje na gelu pomocí elektroforézy s využitím barviva ethidium bromid. Tato metoda je efektivní, vysoce specifická, citlivá a relativně levná. Má však omezenou rozlišovací schopnost – různé molekuly nukleové kyseliny o stejné molekulové hmotnosti se nedají rozlišit, protože migrují stejnou rychlostí.

Navíc při otevření zkumavky hrozí riziko kontaminace okolního prostředí amplikonem (Sluijter a kol., 2003). Nevýhodou je také nemožnost automatizace, obtížná kvantifikace, rozlišení pouze na základě velikosti produktu a nízké dynamické rozmezí (Mackay, 2010).

**Real-time PCR termocykléry** jsou schopné v reálném čase měřit fluorescenci interkalačních barviv nebo značených sond hybridizovaných na DNA (Higuchi a kol., 1992). To znamená, že překonávají omezení standardního cykléru a gelové elektroforézy a monitorují změny fluorescence po celou dobu běhu PCR reakce. Po každém cyklu lze vyhodnotit množství vytvořeného amplikonu. Pomocí kalibračních křivek pak lze kvantifikovat počáteční množství templátové DNA. Tyto cykléry jsou využívány při kvantitativních genetických analýzách exprese, analýzách jednonukleotidových polymorfismů (SNP), variability počtu kopií (CNV) a podobně (Williams, 2010).

### 2.1.3 Design termocyklérů

Vývoj designu termocyklérů šel od objevu PCR rychle kupředu, bylo navrženo a vyrobeno mnoho různých typů a modelů. Vylepšován byl však nejen design, ale také techniky vyhřívání a chlazení a postupně byly vynalezeny i různé kontrolní mechanismy teploty (Span a kol., 2013).

U všech termocyklérů je jedním z nejdůležitějších faktorů efektivní způsob zahřívání a chlazení vzorků. Toho je dosahováno výměnou tepla, která může probíhat vedením (kondukce), sáláním (radiace) nebo prouděním (konvekce). Pro výrobu bloků regulujících změny teploty jsou běžně využívány vodivé materiály jako hliník nebo stříbro, které změn teplot dosahují kontaktem mezi vzorkem a materiálem. Jiné, tzv. pasivní vzduchové nebo vodní termocykléry, neobsahují vyhřívací články. Voda nebo vzduch je vyhřívána vně termocykléru a poté vedena do přístroje, kde cirkuluje a zahřívá vzorky – teplo je zde přenášeno prouděním (URL: <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/14354/title/High-Throughput-Thermocyclers/>> [cit. 2014-10-17]).

S potřebou designu rychlejších termocyklérů byly vynalezeny termocykléry využívající Peltierova efektu.

#### **Peltierovy termocykléry**

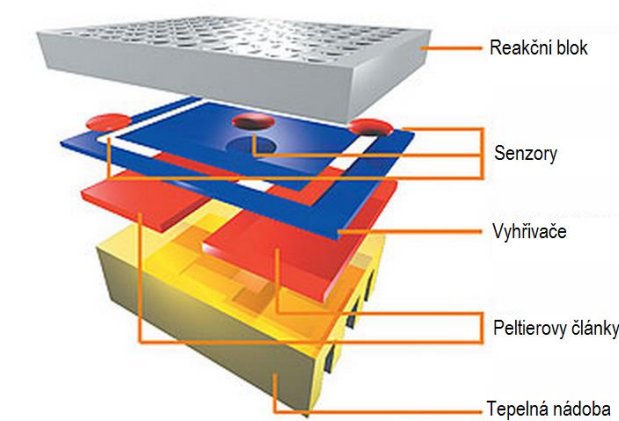
Peltierův jev byl pojmenován po francouzi Jeanu Peltierovi, který v roce 1834 zjistil, že pokud stejnosměrný elektrický proud v elektrickém obvodu prochází přes dva různé kovy (například tellur a bismut), je vzniklá odporová vyhřívací energie pumpována od anody ke katodě a jedna styčná plocha se ochlazuje a druhá zahřívá bez potřeby chladičů nebo kompresorů. Princip

Peltierova článku tedy je, že zahřívá i chladí zároveň v závislosti na tom, jak je elektrický proud do článků veden. Díky tomu tyto články mohou velice rychle přecházet z vyhřívání na chlazení a naopak (URL:<[http://www.globalspec.com/learnmore/labware\\_scientific\\_instruments/thermal\\_processing/thermal\\_cyclers](http://www.globalspec.com/learnmore/labware_scientific_instruments/thermal_processing/thermal_cyclers)>[cit. 2014-11-03]).

Objev Peltierovy technologie a její aplikace do termocyklérů vedly k vylepšení způsobu vyhřívání a chlazení vzorků bez nutnosti kontaktu s kapalinou nebo vzduchem. Peltierovy pumpy jsou zabudovány uvnitř bloků, což znamená, že jsou bloky snadno měnitelné (URL:<<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/19131/title/Up-On-Blocks--A-Profile-Of-Thermal-Cyclers-With-Interchangeable-Blocks/>>[cit. 2013-10-19]).

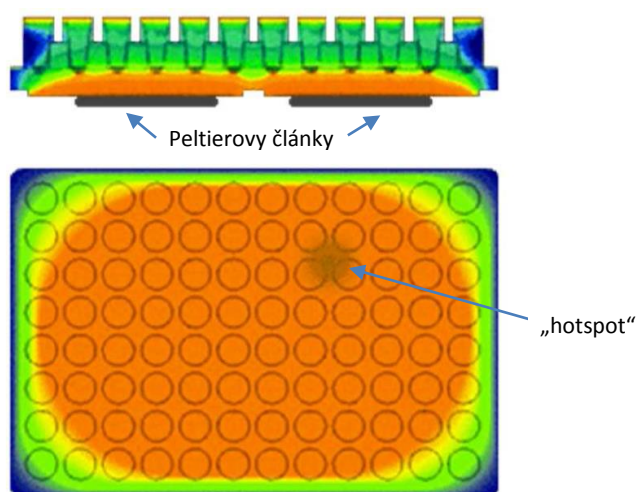
Termocykléry jsou designovány pro práci s relativně malým množstvím vzorků (jedna nebo dvě mikrodestičky), což umožňuje udržení uniformní teploty ve všech vzorcích. Tyto termocykléry pracují většinou jen s jednou velikostí destičky (často 96 nebo 384 jamek), někdy je možné jejich střídání. I když se stále vyvíjejí nové technologie, které rapidně snižují délku PCR běhu, termocykléry na bázi Peltierových pump jsou stále nejčastější (URL:<[http://www.globalspec.com/learnmore/labware\\_scientific\\_instruments/thermal\\_processing/thermal\\_cyclers](http://www.globalspec.com/learnmore/labware_scientific_instruments/thermal_processing/thermal_cyclers)>[cit.2014-11-04]).

Většina těchto termocyklérů je navržena podle typické patrové konstrukce (Obr. 1). Místo, kde se vkládají vzorky, se nazývá reakční blok. Pod blokem jsou umístěny teplotní senzory, které monitorují vstup do teplotního kontrolního mechanismu. Ten pak reguluje teplo generované vyhřívačem a Peltierovým článkem. V průběhu vyhřívání je teplo z vyhřívače a Peltierova článku transportováno do reakčního bloku a poté přes stěny reakčních zkumavek do reagentů uvnitř. V průběhu chlazení je reakční blok Peltierovým článkem ochlazován a na druhé straně generuje teplo, které je vedeno do tepelné nádoby a pak přes větrák ventilováno do prostředí (Span a kol., 2013).



Obr. 1: Konstrukce Peltierových termocyklérů (upraveno dle URL:<[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)> [cit.2015-04-04])

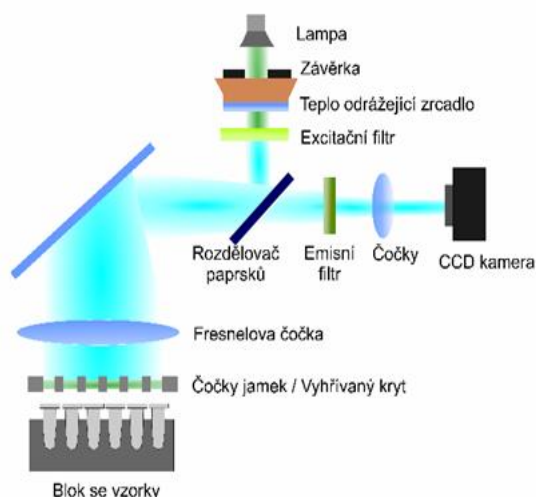
Teplotní přesnost (uniformita) v rámci těchto 96jamkových bloků se pohybuje okolo 0,5 °C. Vzorky je zde doporučeno umísťovat do středních pozic, protože se udává, že Peltierovy články hřejí nejvíce uprostřed a směrem k okrajům průměrná výhřevná teplota slábne (Obr. 2).



Obr. 2: Umístění Peltierových článků pod vzorky; teplotní mapa reakčního bloku – oranžová uprostřed nejteplejší, modrá na okrajích nejchladnější. Tmavě lokální teplotní maximum, „hotspot“ (upraveno dle URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-16])

Tyto rozdíly v teplotách mohou vést k méně specifickému nasedání primerů a k nestejněmné emisi fluorescence u stejných vzorků. Navíc se objevují i tzv. „hotspots“ s vysokou teplotou (viz tmavá skvrna na Obr. 2). Tyto problémy následně mohou vést k falešné negativitě či falešné pozitivitě PCR reakce a nesprávnému výsledku vyšetření patientských vzorků.

Co se týče optické přesnosti těchto cyklérů, problémem je poměrně dlouhá optická cesta. Světlo z optické lampy jde přes závěrku, teplo odrážející zrcadlo a excitační filtr na rozdělovač paprsků, který ho 2 x láme, a po průchodu Fresnelovou čočkou (má při podobných parametrech a stejném použitém materiálu podstatně nižší hmotnost než běžná čočka, protože jsou z ní odstraněny ty části, které se nepodílejí přímo na lomu paprsků) a vyhřívaným krytem přichází do jednotlivých vzorků. Odtud je odraženo emitované světlo z fluorescence a po odrazech, průchodem přes emisní filtr a čočku, je detekováno zařízením s vázanými náboji – CCD kamerou (Obr. 3) (URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-16]).



Obr. 3: Optický systém Peltierova termocykléru (překresleno dle URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)> [cit. 2015-01-15])

Z důvodu tak komplexního systému jsou tato zařízení náchylná k chybám a vyžadují pravidelnou kalibraci. Občas jsou pro kompenzaci odchylek vyžadována i pasivní referenční barviva jako karboxy-X-rhodamin (ROX).

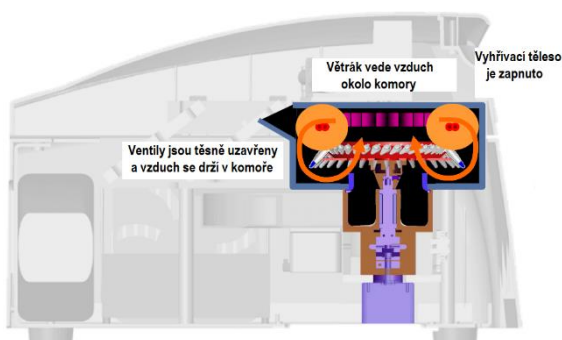
### Rotační termocykléry (Rotor-Gene)

Tyto termocykléry nevyužívají Peltierových článků. Vyhřívání a chlazení je dosahováno rychlým prouděním vzduchu v reakční komoře. Zkumavky rotují rychlostí 400 otáček za minutu, takže procházejí okolo excitační a detekční optiky každých 150 milisekund (v případě Rotor-Gene Q), což umožňuje vysokorychlostní sběr dat. Jako excitační zařízení je využito 4 až

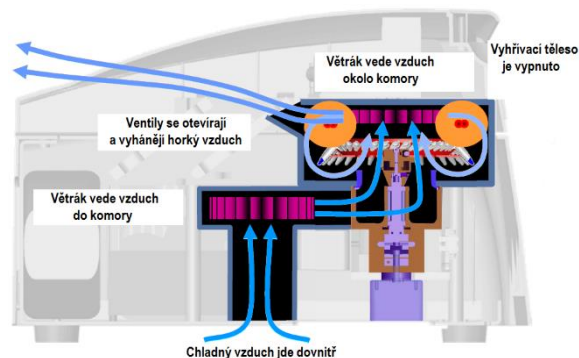
6 oddělených světlo emitujících diod (LED) v kombinaci s šesti různými detekčními filtry propouštějícími emitované světlo k citlivému fotonásobičovému detektoru. Díky rotačnímu principu není třeba vzorky před samotnou PCR centrifugovat, odstředivá síla drží reagentie na dně zkumavky a odstraní případné bubliny (URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18]).

Každá zkumavka tedy rotuje v reakční komoře. Při zahřívání (Obr. 4) jsou ventily komory těsně uzavřeny a vyhřívací těleso se zapíná. Vyhřívaný vzduch cirkuluje okolo rotujících zkumavek a vyhřívá je. Při chlazení (Obr. 5) se naopak ventily otevírají a zapíná se ventilátor. Chladný vzduch z okolního prostředí je nasáván zespod a horký vzduch je vytlačován z komory ven.

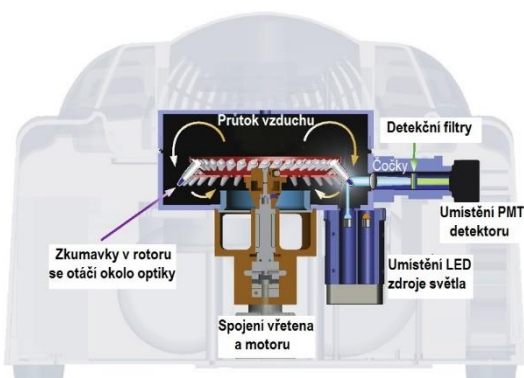
Rotační design na bázi centrifugy předurčuje tyto PCR termocykléry k vysoké přesnosti a univerzálnosti. Tím, že každá zkumavka rotuje v komoře v proudícím vzduchu, jsou vzorky udržovány při stejné teplotě i při jejich rychlých změnách (Obr. 6). I detekce emitovaného světla je velice rychlá. Když se zkumavka dostane k detekční optice, vzorek je LED diodou ozářen a emisní fluorescenční signál je rychle pomocí fotonásobičového detektoru sbírán z jednoduché a krátké optické dráhy (Obr. 7) (URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18]).



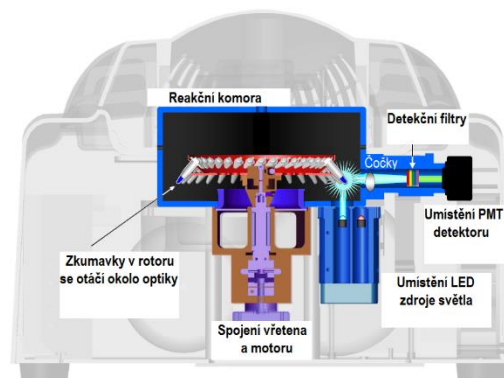
Obr. 4: Zahřívací fáze rotačního termocykléru (upraveno dle URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18])



Obr. 5: Chladicí fáze rotačního termocykléru (upraveno dle URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18])



Obr. 6: Příčný řez Rotor-Genem Q – rotace zkumavek v reakční komůrce (URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18])



Obr. 7: Příčný řez Rotor-Genem Q – detekce fluorescenčního signálu (upraveno dle URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18])

Také jsou zde eliminovány variace mezi vzorky a okrajové efekty, kterým se nedá vyhnout u klasických blokových termocyklérů z důvodu teplotního gradientu v rámci bloku a komplexních optických drah. U těchto přístrojů není třeba používat pasivní ROX referenční barvivo. Nevýhodou je, že například Rotor-Gene nemá možnost uložení vzorků při 4 °C přes noc před další analýzou, jak je možno u ostatních.

## 2.2 Zdroje variability v PCR a jejich důsledky

Jak již bylo řečeno, PCR je nejčastější metodou v molekulární biologii. Sama o sobě významně ovlivnila výzkum a vývoj v oborech jako biochemie, medicína, bioinženýrství a v dalších. Selhání PCR tedy může mít fatální následky například při vydání nesprávných výsledků vyšetření pacientů. Optimalizovaná PCR naopak vylepší výnos PCR i reprodukovatelnost mezi reakcemi, zatímco redukuje amplifikaci nespécifického produktu.

Řada variabilit, které ovlivňují DNA amplifikaci, je často maskována relativně vysokou úspěšností PCR experimentů. Výsledky PCR jsou však ovlivněny množstvím vnějších i vnitřních faktorů. Mezi vnitřní faktory patří například design primerů.

**Primery** by měly být dlouhé 17 – 28 bází, kdy guanin (G) a cytosin (C) by měly tvořit 50 – 60 % primeru a zbytek adenin (A) a thymin (T). Primery by měly končit G nebo C nebo GC nebo CG, což zabrání vlátí konců a zvýší účinnost nasednutí. Teplota tání primerů by měla být v rozmezí 55 – 80 °C, kdy musí mít oba blízké  $T_m$ . 3' konce primerů by neměly být navzájem komplementární, protože by se tvořily primerové dimery preferenčně před jiným produktem, a také by neměl primer obsahovat komplementární sekvence sám se sebou, aby v sekundární struktuře netvořil vlásenky (Strachan a Read, 1999).

Koncentrace každého z primerů v běžné PCR reakci je okolo 100 – 500 nM. Zvýšená koncentrace primerů může vylepšit výtěžek PCR reakce a může být považována za určitou cestu optimalizace. Příliš vysoká koncentrace primerů může vést k nespécifickým reakcím nebo naopak k inhibici reakce.

Dalším faktorem je čistota primerů. V průběhu syntézy oligonukleotidů jsou báze individuálně přidávány ve směru 3' → 5' do rostoucího řetězce do doby, než je sekvence kompletní. V tomto okamžiku jsou oligonukleotidy odštěpeny z pevného podkladu a odsoleny pro další použití. V průběhu syntézy nicméně mohou nastat chyby, což vede ke kratším oligonukleotidům nebo k oligonukleotidům s nesprávnými nukleotidy (URL:<bitesizebio.com>[cit.2014-11-05]).



**Taq polymeráza** je do reakce přidávána v rozmezí koncentrací 0,4 – 2,0 U/25 µl. Pokud je enzymu nadbytek, dochází k nespecifické amplifikaci a je zvýrazněno pozadí reakce. Nedostatek *Taq* polymerázy naopak snižuje pozadí, ale v extrémně malých množstvích vůbec nedojde k amplifikaci. *Taq* polymeráza navíc nemá 3' → 5' exonukleázovou aktivitu, tzv. korektorskou funkci, což může způsobit vysokou chybovost reakce (Eckert a Kunkel, 1991).

**Nukleotidy** jsou přidávány ve formě deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP) v množství 20 – 200 µM. Směs složená ze 4 nukleotidů (A, T, C, G) ve stejné koncentraci minimalizuje chybné inkorporace. Pokud je koncentrace nukleotidů nízká, dochází ke zvýšení specifity a přesnosti PCR. Koncentrace nukleotidů a dvoumocného hořčíku jsou závislé veličiny. Nejobvyklejší optimální koncentrací pro 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> je 200 µM dNTP (Eckert a Kunkel, 1991).

**Templátová DNA** je většinou přidávána do reakce v množství 0,005 – 1,0 µg. Citlivost a reprodukovatelnost PCR reakce ovlivňuje čistota templátu, takže je třeba ji zbavit všech možných inhibitorů reakce. Důležitá je také homogenita vzorku (Kennedy a Oswald, 2011).

**Plasty použité v PCR** (mikrozkumavky, stripy, destičky) mohou mít také vliv na variabilitu PCR. Nerovnoměrná tloušťka stěny zkumavky může mít vliv na přenos tepla, adheze na stěnu zkumavky nebo uvolňování inhibitorů PCR z plastů mohou mít vliv na účinnost PCR a v plastech může být z výroby amplifikovatelná DNA. Zdrojem kontaminace plastů může být také nedostatečně účinné autoklávování. Může tak docházet ke kontaminacím citlivé PCR reakce fragmenty zbytkové DNA a k následnému vzniku nespecifických produktů v reakci (Suyama a Kawaharasaki, 2013). Je proto pro klinické využití doporučováno používat přímo od výrobců certifikované plasty na jedno použití.

Co se týče pipet, je také lepší používat originální špičky než autoklávované. Navíc běžně využívané špičky s filtrem autoklávovat nelze. Dále je nutná pravidelná kalibrace všech používaných pipet. Při pipetování je většinou doporučováno vzorky alikvotovat a následně pipetovat pomocí multikanálové pipety. Je tak omezen počet kroků pipetování a rozmrazování a snižuje se riziko kontaminace vzorků.

Pochopení výše zmíněných variabilit vede ke sladění PCR přístroje s metodou. Drtivá většina PCR optimalizací je prováděna jen s ohledem na templátovou DNA a primery. Málo pozornosti bylo dosud věnováno vlivu variability zkumavek a termocykléru.

**Termocykléry** jsou navrženy tak, aby po zahřátí na definovanou teplotu uměly tuto teplotu udržet po definovanou dobu. I když to zní jednoduše, ne vždy jsou tyto požadavky splněny, co se týče přesnosti a uniformity. Termocykléry s masivními vyhřívacími bloky jsou více uniformní, ale relativně pomalé. Termocykléry s nižší hmotností bloků jsou rychlejší, ale kvůli své rychlosti

také méně kontrolovatelné, co se týče přesahů nastavené teploty. Takže potom budou mít dva stejné termocykléry rozdílné přesahy teplot a různě dlouhá trvání nastavené teploty (čím delší přesah, tím kratší trvání nastavené teploty) (Span a kol., 2013).

Obecně v termocyklérech založených na vyhřívacím bloku může být vysoká rychlost změny teploty příčinou neuniformity a nekontrolovatelných přesahů. Takže při výběru termocykléru je nutno zvážit, zda je prioritou rychlost nebo uniformita.

Teplotní výkon termocyklérů je závislý na konstrukci bloku, typu a kvalitě užívaných komponent, rozdílech v technickém designu, počtu senzorů a kontrolních mechanismech řízení teploty. U různých modelů stejné značky je většinou očekáváno, že fungují stejně, a různá sériová čísla stejného modelu by měla fungovat jako identické kopie. Termocykléry však vykazují variabilitu mezi různými značkami, mezi modely stejné značky, mezi jednotlivými sériovými čísly stejného modelu a také dokonce v rámci jednoho termocykléru. Každý termocyklér totiž má unikátní teplotní profil (Span a kol., 2013).

Vnější variabilita termocykléru je důvodem, proč PCR vykazující správné výsledky na určitém cykléru na jiném nefunguje, nebo vede k jiným výsledkům. Vnitřní variabilita termocykléru je důvodem, proč se liší výsledky stejných vzorků v různých jamkách během jednoho běhu na stejném termocykléru.

Falešná negativita je extrémně nebezpečná v případě, že vede k nesprávným závěrům, nesprávné diagnóze nebo neadekvátnímu léčení. Falešná negativita může vést například k tomu, že je pacient diagnostikován jako zdravý, zatímco může být v ohrožení života. Výsledky však nemusejí být pouze falešně negativní, PCR může být pouze méně účinná nebo méně citlivá. Například v případě profilování exprese pomocí qPCR může být špatně určena nadměrná nebo naopak nedostatečná regulace genu. Takovéto méně účinné PCR, které mají nižší výtěžek PCR produktu, také mohou vést k určení nižšího počtu rakovinných buněk u minimální reziduální choroby při leukémii a ke klinickému rozhodnutí neposkytnout sekundární chemoterapii, která by ve skutečnosti pacientovi pomohla (Span a kol., 2013).

Variabilita v různých fázích PCR má odlišné dopady na její výsledky. Variabilita v denaturační fázi, jejímž cílem je rozpletení dvouvláknové DNA na dvě jednovláknové, je nejčastější příčinou falešně negativních výsledků. Denaturace DNA probíhá okolo 95 °C, kdy je *Taq* polymeráza postupně inaktivována. Takže přesah cílové teploty několika stupni (cca na 98 °C), může rychle vést k negativním výsledkům, protože je polymeráza inaktivována již před detekovatelnými hladinami amplikonu. Jestliže je teplota denaturační fáze naopak příliš nízká, denaturace vůbec nenastane nebo je značně omezena a nedojde k amplifikaci (Span

a kol., 2013). Zde je však nutno podotknout, že u současných termocyklérů není přesah několika stupňů až tak reálný, neboť výrobci deklarují maximální přesahy teplot v rozmezí 0,1 - 0,5 °C. Ve fázi nasedání primerů (annealing), která probíhá při teplotě v rozmezí 45 až 70 °C, je důležitá specificita nasednutí. Nasednutí na správnou cílovou sekvenci je vysoce závislé na teplotě a na koncentraci solí. Nižší teplota annealingu může vést k falešné pozitivě výsledků. Čím vyšší teplota, tím vyšší specificita, čehož je využíváno v metodě Touchdown PCR (Hecker a Roux, 1996), kdy je teplota annealingu postupně snižována po každém cyklu. Takže teplota této fáze je důležitá pro správné nasednutí, ale není to hlavní kritický bod PCR ovlivňující celkové výsledky, jelikož primery nasedají ve větším teplotním rozsahu. V elongační fázi dochází za pomoci *Taq* polymerázy k syntéze nového vlákna DNA z nasednutého primeru. Elongace je necitlivá k teplotní variabilitě termocyklérů, protože probíhá ve velkém teplotním rozsahu. Pouze by však mohlo dojít k různým výtěžkům v každé jamce, což je obvykle v PCR programu kompenzováno delšími časy (Span a kol., 2013).

## **2.3 Požadavky kontrolních orgánů**

Zdravotnické laboratoře musí splňovat přísné požadavky – musí vyhovovat akreditačním normám ČSN EN ISO 15189 ed.2:2013 (popř. ČSN EN ISO/IEC 17025:2005), což kromě jiného znamená, že musí mít kalibrované přístroje a validované metody a postupy.

### **2.3.1 Akreditace**

Akreditace je jak status laboratoře, tak proces jejího získávání. Jako status akreditace poskytuje potvrzení, že laboratoř splňuje požadavky kvality určené akreditační společností (URL:<[www.apa.org](http://www.apa.org)>[cit. 2014-12-11]), což je v případě České republiky Český institut pro akreditaci.

Akreditací laboratoř potvrzuje svou nezávislost, objektivnost a odbornou způsobilost vykonávat činnost, pro kterou je určena. Prokázáním akreditace laboratoř potvrdí úroveň poskytovaných služeb, profesionalitu zaměstnanců a technické zabezpečení své činnosti. V některých případech je akreditace nutnou podmínkou k tomu, aby bylo povoleno vyšetření provádět (podmínkou k autorizaci). Dalším přínosem je ekonomický efekt, kdy zákazníci rozlišují mezi akreditovanými a neakreditovanými laboratořemi (URL:<[www.cai.cz/](http://www.cai.cz/)>[cit. 2014-12-11]).

### **2.3.2 ČSN EN ISO/IEC 17025:2005**

Norma ISO 17025:2005 (Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří) udává požadavky na systém řízení zkušební a kalibrační laboratoře v oblasti kvality a administrativních a technických systémů. Laboratoř splňující tuto normu je způsobilá a schopná dosahovat technicky platných výsledků (ČSN EN ISO/IEC 17025).

Co se týče zařízení, laboratoř musí mít veškeré potřebné prostředky pro vzorkování, měřicí a zkušební zařízení požadované pro správné provádění zkoušek. Zařízení a jeho software používané při zkoušení musí být schopno dosahovat požadované správnosti a musí být ve shodě se specifikacemi, které se vztahují k příslušným zkouškám. Pro klíčové veličiny nebo hodnoty přístrojů musí být v případě, že mají tyto parametry významný vliv na výsledky, zavedeny kalibrační programy. Před uvedením do provozu musí být zařízení kalibrováno nebo zkontrolováno, aby bylo zajištěno, že splňuje požadavky uvedené ve specifikaci laboratoře a vyhovuje příslušným specifikacím norem. Veškeré zařízení používané pro zkoušení, včetně zařízení pro podpůrná měření, významně ovlivňují přesnost nebo platnost výsledků a zkoušek, kalibraci nebo vzorkování, musí být před uvedením do provozu kalibrováno. Laboratoř musí mít zaveden program a postup pro kalibraci svého zařízení (ČSN EN ISO/IEC 17025).

### **2.3.3 ČSN EN ISO 15189-ed.2:2013**

ISO 15189-ed.2:2013 (Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na jakost a způsobilost) je českou verzí evropské normy EN ISO 15189:2012 a má stejný status jako oficiální verze. Norma vychází z ISO/IEC 17025 a ISO 9001 a navíc uvádí požadavky na způsobilost a kvalitu, které jsou specifické pro zdravotnické laboratoře. Laboratoř splňující tuto normu je připravena plnit požadavky všech pacientů i klinického personálu odpovědného za tyto pacienty. Služby zdravotnické laboratoře zahrnují organizaci příjmu, identifikaci a přípravu pacienta, odběr, dopravu, skladování, zpracování a vyšetřování klinických vzorků, následné ověření, interpretaci, předkládání zpráv a poradenskou činnost a navíc hodnocení bezpečnosti a etiky práce zdravotnické laboratoře (ČSN EN ISO 15189).

Norma ČSN EN ISO 15189 je rozdělena na dva hlavní typy požadavků – požadavky na management a technické (odborné, laboratorní) požadavky. Pro tuto diplomovou práci je nejdůležitější odstavec technických požadavků 5.6 Zabezpečení kvality postupů vyšetření, kde je kladen důraz na systém interního řízení kvality, který ověřuje dosažení zamýšlené kvality výsledků, a na určení nejistoty výsledků. Zde je dle normy nutno vzít v úvahu všechny možné složky nejistoty. Programy kalibrace měřicích systémů a ověřování správnosti musí být

navrženy a provedeny tak, aby byla zajištěna návaznost výsledků na SI jednotky nebo odkazem na přírodní konstantu nebo stanovenou referenční hodnotu. Pokud není nic z toho možné nebo vhodné, musí být použity jiné prostředky jak potvrdit spolehlivost výsledků. K těmto způsobům náleží například účast ve vhodném programu mezilaboratorního porovnávání, použití vhodných referenčních materiálů certifikovaných pro charakterizaci materiálu, vyšetření nebo kalibrace jiným postupem, měření poměru nebo reciproké hodnoty, vzájemné odsouhlasení standardů nebo postupů, které jsou jasně stanoveny, specifikovány a charakterizovány všemi zúčastněnými stranami, dokumentace údajů o činidlech, postupech nebo systému vyšetření, jestliže návaznost je uváděna dodavatelem nebo výrobcem (ČSN EN ISO 15189).

### 2.3.4 Metrologické parametry měření

**Kalibrace** je proces, kterým je stanovena odpověď nástroje na nastavené podmínky (Saunders a kol., 2001). Je to za specifických podmínek zajištění těsného vztahu mezi hodnotami veličin uvedenými pomocí měřicího přístroje nebo měřicím systémem, nebo hodnotami reprezentovanými materiálovým měřením, a odpovídajícími hodnotami realizovanými mezinárodním sledovatelným referenčním standardem. Sledovatelnost je zaručena užitím mezinárodních sledovatelných referenčních standardů, vypočtenou nepřesností kalibrace a faktem, že kalibrace jsou prováděny ISO 17025 akreditovanými kalibračními laboratořemi. Kalibrace nezahrnuje „adjustment“ (seřízení).

**Správnost měření** („measurement trueness“) je blízkost shody průměrné hodnoty z opakovaných měření s referenční hodnotou.

**Přesnost měření** („measurement precission“) je blízkost shody naměřených hodnot v opakovaných měřeních při specifických podmínkách.

**Nejistota měření** („measurement uncertainty“) je spojena s výsledkem měření. Charakterizuje rozptyl hodnot, který přispívá ke kvantitě měřených hodnot.

**Chyba měření** („measurement error“) je rozdíl mezi měřenou hodnotou a pravou (referenční) hodnotou. Chyba může být rozdělena na systémovou a náhodnou. Systémová chyba zvaná „bias“ zůstává konstantní během opakování měření; náhodná chyba zvaná „deviace“ se mění během opakování měření.

**Metrologická návaznost** (sledovatelnost, „masurement traceability“) je vlastnost měření, kdy je výsledek odvozen od referenčního standardu přes nepřerušovaný řetězec kalibrací. Každá kalibrace k vyššímu etalonu přispívá k nepřesnosti měření. (URL:<[www.bipm.org](http://www.bipm.org)>[cit. 2014-11-10]).

## 2.4 Kalibrace termocyklérů, kalibrační parametry a metody

Jak již bylo řečeno, variabilitě termocyklérů se věnuje velmi málo pozornosti, přestože se dá říci, že každý termocyklér má svůj vlastní teplotní profil. Uniformní teplota je však velice důležitá pro průběh PCR reakce, protože nedostatečná denaturace a nesprávná hybridizační teplota mohou způsobit snížení specifity (falešná pozitivita), snížení senzitivity (falešná negativita) a změny v detekčním limitu. Dalším důsledkem také může být nereprodukovatelnost metody. Kalibrace termocyklérů je důležitá pro splnění předepsaných požadavků, pro zlepšení výnosu PCR a pro ověření používaných reagensů.

### 2.4.1 Kalibrační parametry

Existuje mnoho kalibračních parametrů termocykléru (Obr. 8). České ekvivalenty názvů nejsou vžité, proto jsou zde používány anglické termíny:

**ramp rate** - rychlost nahřívání nebo chlazení, rychlost nájezdu,

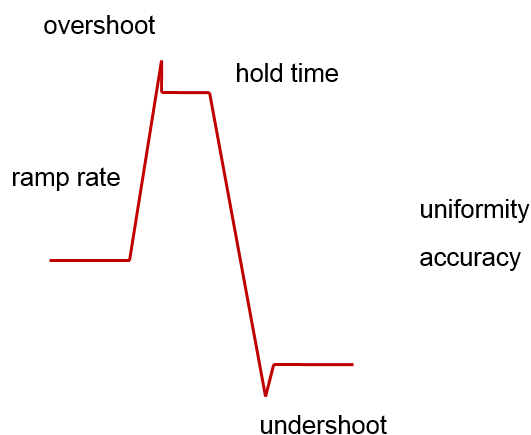
**overshoot** - přesah nad nastavenou teplotu v průběhu nájezdu na vyšší teplotu,

**hold time** - doba trvání nastavené teploty po jejím dosažení,

**undershoot** - pokles pod nastavenou teplotu v průběhu nájezdu na nižší teplotu,

**uniformity** - rozdíl v teplotě mezi nejteplejší a nejchladnější jamkou v reakčním bloku v definovaném momentě v čase, uniformita,

**accuracy** - rozdíl mezi průměrnou teplotou bloku a nastavenou teplotou v definovaném momentě času, přesnost.



Obr. 8: Kalibrační parametry termocykléru

## 2.4.2 Metody kalibrace

Ideální kalibrace by měla měřit všechny kalibrační parametry, měla by být provedena dynamickým způsobem, protože PCR je dynamickým (nestatickým) procesem. Dále by měla být prováděna v reprezentativním počtu jamek cykléru, při kontrolovaných podmínkách prostředí a kvalifikovaným a trénovaným personálem.

Kalibrace je prováděna akreditovanými kalibračními laboratořemi. Existuje několik způsobů kalibrace termocyklérů.

### **CYCLERtest®**

Firma CYCLERtest® je výrobcem systému kalibrace termocykléru. CYCLERtest umožňuje laboratořím nastavit termocykléry podle specifikací a následně produkovat reprodukovatelné věrohodné a technicky validované PCR výsledky. Je schopen kalibrovat téměř jakýkoliv termocyklér od základních PCR termocyklérů po pokročilejší qPCR termocykléry. Kalibrace termocyklérů jsou prováděny pomocí nástrojů mobilního systému získání teploty (Mobile Temperature Acquisition System, MTAS) servisními inženýry v místě laboratoře. MTAS provádí verifikaci s detailními informacemi o výkonu PCR nástroje v průběhu reakce. Tato metoda je založena na 15 teplotních sondách, které jsou umístěny do 15 vybraných jamek. MTAS nabízí validace pro mnoho modelů termocyklérů včetně řady LightCycler®.

Kromě tohoto kalibračního systému CYCLERtest také nabízí DRIFTCON kalibrační systém pro koncového uživatele, který provádí kalibraci sám. DRIFTCON je systém monitoringu teplotních posunů termocyklérů, které měří pomocí většinou 16 teplotních senzorů umístěných v cykléru během PCR reakce.

Oba tyto systémy měří stejné teplotní charakteristiky - přesnost, uniformitu, přesahy teploty, rychlost změn teploty a trvání teploty, jen výsledky prezentují odlišně. Díky detailnímu popisu je pak uživatel schopen modifikovat PCR program na cykléru tak, že výsledné termální profily dvou různých termocyklérů budou stejné (URL:<[www.cyclertest.com](http://www.cyclertest.com)>[cit. 2014-11-06]).

### **Automatická teplotní kalibrace Rotor-Gene 3000™**

Cyklér Rotor-Gene 3000™ (RG) užívá patentované kalibrační rotory pro určení absolutní teploty uvnitř zkumavek v průběhu otáčení rotoru. Kalibrační rotor je dodáván s pevně fixovanými 0,1ml zkumavkami naplněnými homogenní směsí. Kalibrace se provádí tak, že rotor je umístěn do RG a spustí se teplotní program (program tání templátu, „melting“). Teplota je měřena ve třech různých fázích reakce v celém rozsahu operací. Kalibrační zpráva je automaticky generována a poslána e-mailem do centra validace. Pokud je vyžadována teplotní kalibrace, je

zpětně odeslán soubor, jehož načtení softwarem automaticky recalibruje termocyklér (manuál Rotor-Gene 3000™).

### **Rotor-Disc™ OTV Kit (Qiagen)**

Rotor-Disc™ OTV (Optická Teplotní Verifikace) Kit slouží pro verifikaci teplotní přesnosti Rotor-Gene® real-time PCR cyklérů. Optická teplotní verifikace je metoda, která verifikuje teplotu ve zkumavkách Rotor-Gene. Není zde nutná přítomnost servisních techniků stejně jako v předchozí metodě. Tento kit však oproti automatické teplotní kalibraci obsahuje zapečetěný OTV Rotor-Disc obsahující tekuté fluorescenční krystaly kompatibilní s RG 3000 a RG-Q/6000, CD se soubory a příručku.

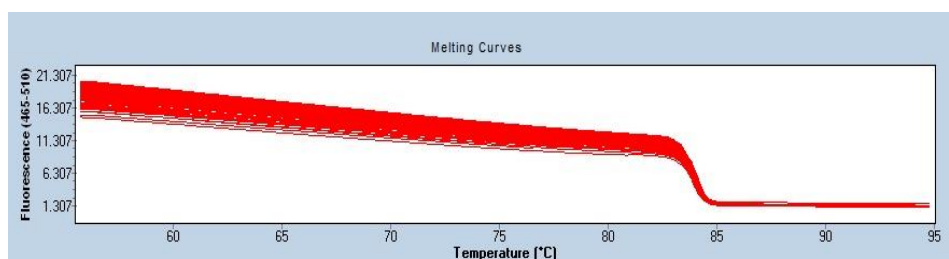
Rotor-Disc OTV Kit využívá optické vlastnosti 3 termochromických tekutých krystalů (TLC) jako referenci absolutní teploty. Když jsou TLC zahřívány, mění se z neprůhledné na transparentní barvu při dosažení přesných teplot (50, 75, 90 °C). TLC samy o sobě nefluoreskují, je tedy nezbytné překrýt excitační zdroj rozptylovacím hranolem, takže změny barvy krystalů mohou být detekovány optickým systémem Rotor-Gene. TLC jsou pod svou tranziční teplotou neprůhledné a odrážejí světlo. Když se vnitřní teplota dostane na tranziční bod TLC, stanou se transparentními a světlo více prochází přes vzorek než je odráženo k detektoru, což vede ke snížení fluorescence. Změna ve fluorescenci je poté využita k rozeznání přesné tranzice teploty každého TLC. Teplotní tranzice zobrazena Rotor-Gene cyklérem je srovnána s teplotou kódovanou v OTV sériovém čísle. Pokud je přístroj mimo teplotní specifikace dané výrobcem, provede se automatická úprava (Rotor-Disc OTV Handbook).

## **2.5 Analýza teploty tání a její využití pro kalibraci**

Analýza křivky tání („melting analýza“) je metoda analýzy ampliconů generovaných klasickou PCR nebo qPCR. Během zvyšování teploty je dvouvláknová DNA postupně rozplétána na jednovláknovou v závislosti na délce sekvence a obsahu GC bází. Takže tato analýza charakterizuje vzorky DNA hlavně na základě jejich sekvence.

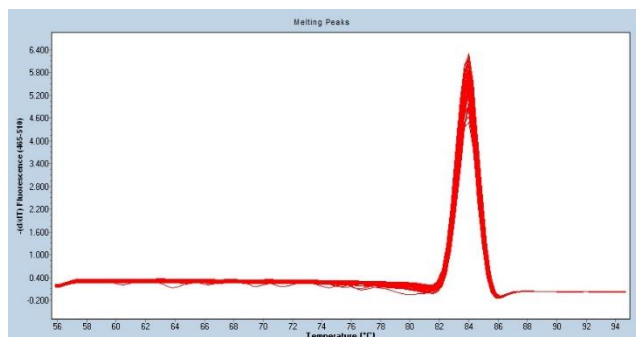


Během disociace dvouvláknové DNA (dsDNA) je uvolňováno interkalační barvivo, čímž je snižována vyzařovaná fluorescence (Obr. 9) (Ririe a kol., 1997).



Obr. 9: Křivka tání stejné DNA v 96 jamkách LC<sup>®</sup> 480II-II - závislost normalizované fluorescence na teplotě (generováno programem LightCycler<sup>®</sup> 480 Software)

Analýza  $T_m$  poskytuje křivku tání („meltcurve, melting-curve“), která je charakterizována závislostí normalizované fluorescence na teplotě. Tuto křivku lze derivací převést na vrchol křivky (pík) tání („meltpeak, melting-peak“), který je definován jako závislost první záporné derivace relativní fluorescenční jednotky (rfu) na čase (Obr. 10). Ze vzniklého píku lze jednoduše odečíst teplotu tání („melting temperature“,  $T_m$ ) nukleové kyseliny.  $T_m$  je charakterizována jako teplota, kdy je 50 % amplifikované DNA ve dvouvláknové struktuře a 50 % v jednovláknové struktuře (Ririe a kol., 1997).



Obr. 10: Pík tání DNA - závislost první záporné derivace rfu na čase (generováno programem LightCycler<sup>®</sup> 480 Software)

### 2.5.1 Klasická analýza křivky tání

Klasická analýza křivky tání monitoruje rozdíly v teplotě tání o 1 °C a více. Tuto analýzu lze provést s jakýmkoliv qPCR cyklem pomocí barviva SYBR Green. Používá se hlavně pro rozeznání heteroduplexů, primerových dimerů a dalších nespecifických produktů. Cyklery s lepší možností kontroly teploty a rychlejšími teplotními nájezdy (např. LightCycler<sup>®</sup> z roku 1997) a interkalační činidla, která se rovnoměrně vmezeřují do DNA šroubovice (např. Syto9,

LCGreen, EvaGreen) (Wittwer a kol., 1997a, 1997b; Wittwer a Kusukawa, 2004) umožnily zpřesnění monitoringu  $T_m$  na hodnoty pod 0,5 °C.

Mohou být sledovány křivky tání inerkalovaných fluoroforů do duplexů PCR produktů nebo křivky tání sond hybridizovaných na jedno PCR vlákno. V obou případech lze křivky tání održet bez otevření zkumavky, protože jsou všechna barviva nebo sondy přidávány před začátkem PCR. Pro průběžný monitoring PCR se nejčastěji používá barvivo SYBR Green<sup>®</sup> I, které specificky fluoreskuje v přítomnosti dsDNA. Když je vzorek zahříván, rapidní snížení fluorescence indikuje denuraci (tání PCR produktu). Hybridizaci lze měřit průběžně během amplifikace, obvykle jsou však křivky tání získány až po skončení PCR. Proto analýza křivky tání nevyžaduje qPCR cyklér a po skončení PCR mohou být zkumavky přeneseny do detekčního přístroje pro další analýzu (Wittwer a kol., 2010).

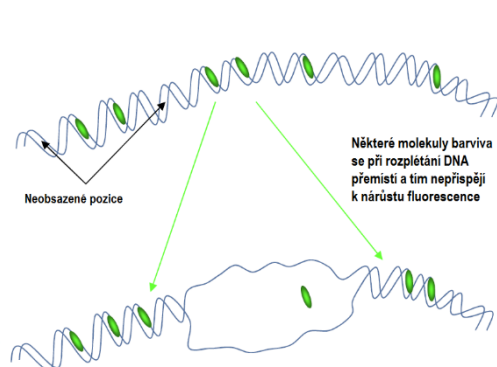
Teplota tání PCR produktu závisí na obsahu GC, délce a sekvenci a je obvykle monitorována asymetrickými kyaninovými barvivy SYBR Green I nebo LCGreen Plus. Tato barviva mají dva pozitivní náboje a váží se do malého žlábků negativně nabitě dsDNA. SYBR Green I byl poprvé použit v real time PCR pro kvantifikaci v roce 1997 (Wittwer a kol., 1997a, 1997b). Brzy nato byl SYBR Green I použit pro analýzu křivky tání PCR produktu po amplifikaci (Ririe a kol., 1997). Rozdílné PCR produkty mají rozdílné teploty tání, což umožnilo jednoduchou metodu analýzy v uzavřených zkumavkách.

### **2.5.2 High Resolution Melting analýza (HRM) analýza**

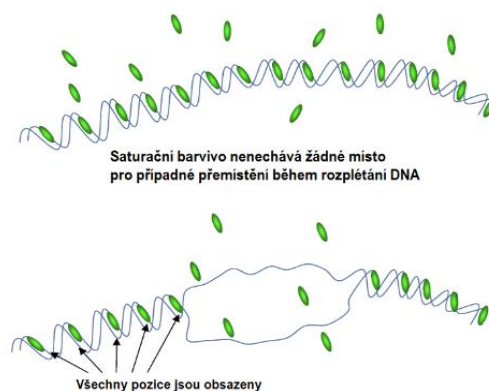
HRM analýza, analýza křivky tání s vysokým rozlišením, byla poprvé uvedena v roce 2003 (Wittwer a kol., 2003; Gundry a kol., 2003). Tato analýza byla rychle aplikována, ale co se týče termínu „HRM“, neexistuje žádná přesná definice (Li a kol., 2014). Dle firmy Qiagen HRM monitoruje rozdíly v teplotě tání menší než 0,5 °C. Tato metoda už vyžaduje speciální přístroje a software. Na rozdíl od klasické analýzy křivky tání zde nelze využít barviva SYBR Green I, protože je to barvivo nesaturační. Je nutné ho přidávat v nízkých koncentracích, protože při vysokých koncentracích inhibuje samotnou PCR reakci.

Z tohoto důvodu tedy nejsou obsazena všechna vazebná místa pro barvivo a při denaturaci DNA se mohou uvolněné molekuly barviva přemístit na jiné místo dvoušroubovice, čímž nedojde k vyžáření odpovídající fluorescence (Obr. 11) (URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18]).

HRM analýza tedy vyžaduje tzv. saturační barviva, LCGreen I, EvaGreen, Syto 9, kterých se může přidávat vyšší koncentrace, protože reakci neinhibují. Po uvolnění molekul z dvoušroubovice při denaturaci už nemůže dojít k opětovnému navázání, protože k tomu není prostor (všechna vazebná místa jsou obsazená) (Obr. 12) (Gundry a kol., 2003).



Obr. 11: Nesaturační barvivo SYBR Green I (upraveno dle URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18])



Obr. 12: Saturační barvivo EvaGreen (upraveno dle URL:<[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)>[cit. 2014-11-18])

$T_m$  PCR produktu je užitečný parametr, ale obecně je to pouze jeden bod na křivce tání.

V kompletní křivce tání je obsaženo mnohem více informací.

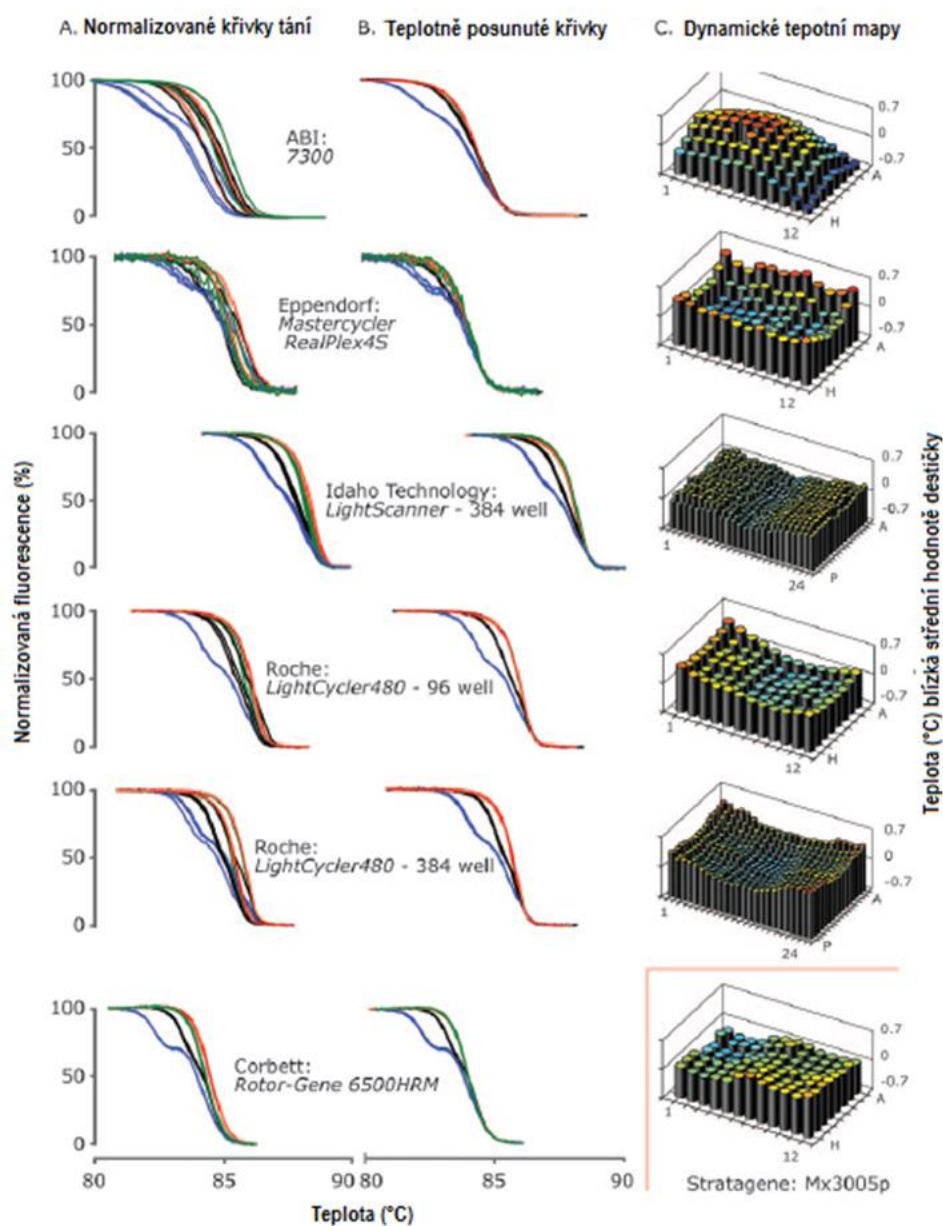
Fluorescenční analýza křivky tání s vysokým rozlišením byla poprvé provedena s fluorescenčně značenými primery, které amplifikovaly 113 bp dlouhý amplicon  $\beta$ -globinu, který obsahuje S, C a E jednobázové varianty hemoglobinu. Všechny homozygoty (AA, SS, CC a EE) a heterozygoty (SC, SE, CE) lze od sebe rozlišit. Homozygoti byli rozlišeni pozicí píku tání a všichni heterozygoti se lišili tvarem křivky (Gundry a kol., 2003).

HRM analýza je také používána pro rozlišení jednobázových (bodových) variant, malých inzercí nebo delecí (Wittwer a kol., 2003).

### 2.5.3 Využití melting analýzy pro kalibraci

Jak již bylo řečeno, analýza křivky tání nebo HRM analýza se dá využít pro mnoho aplikací. Jeden z poměrně nových způsobů využití je kontrola teplotní přesnosti a homogenity vyhřívacího bloku termocyklérů.

Například Herrmann a kol. (2007) porovnávali jednotlivé PCR cykly pomocí analýzy křivky tání 110 bp dlouhého úseku DNA genu pro beta-globin (*HBB*). Pro čtyři genotypy (wild-type, homozygot *HBB* c. 20A>T, heterozygot *HBB* c.20A>T, heterozygot *HBB* c. 20A>T a dvojitý heterozygot *HBB* c. (9C>T; 20A>T)) byly provedeny klasické analýzy křivky tání na sedmi rozdílných PCR termocyklérech (Applied Biosystems 7300, Corbett Life Sciences Rotor-Gene 6500HRM, Eppendorf Mastercycler RealPlex4S, Idaho Technology LightScanner (384 jamek), Roche LightCycler® 480 (96 a 384 jamek) a Stratagene Mx3005p) při rychlosti změny teploty 0,61 °C/s s barvivu LCGreen (SYBR Green I pro Stratagene Mx3005p) (Obr. 13).



Obr. 13: Normalizované křivky tání (A.), teplotně posunutě křivky (B.) a dynamické teplotní mapy (C.) měřených termocyklérů (upraveno dle Herrmann a kol., 2007)

Dále Keyserling a kol. (2011) využili HRM analýzu pro testování funkčnosti qPCR nástrojů, kdy v přítomnosti EvaGreen barviva amplifikovali 256 bp dlouhý úsek genu glutathion-S-transferázy (GST) theta a následně spustili 4 x analýzu křivky tání v každé jamce Chromo4 real-time PCR cykléru. Poté použili MTAS jako referenční metodu. Následně metody porovnali a dosáhli velice uspokojivých výsledků, kdy jejich výsledky korelovaly s MTAS metodou. Zdůraznili však výhodu HRM, která měří všechny pozice jamek bloku, protože oproti MTAS našli jamku s extrémní teplotou mimo vybraných 15 jamek bloku.

V roce 2014 Li a kol. porovnávali termocykléry z pohledu přesnosti genotypizace. Po amplifikaci 4 produktů různé délky (51, 100, 272, 547 bp), které však všechny obsahovaly stejnou nukleotidovou variantu genu *CPS1* lidské genomické DNA, spustili HRM analýzu s rychlostí změny teploty 0,1 °C/s. Takto testovali 10 termocyklérů a zjistili, že přesnost genotypizace se mění v závislosti na typu zvoleného přístroje a délkou PCR produktu.

Výhodou melting analýzy pro kalibraci je oproti jiným zmiňovaným měření teploty v každé jamce (zkumavce) termocykléru, rychlost a skutečnost, že není třeba zapojovat speciální soupravy se sondami, které navíc nejsou kompatibilní se všemi termocykléry.

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce je:

- sepsat rešerši o nutnosti kalibrace termocyklérů pro splnění akreditačních norem laboratoří klinické PCR diagnostiky,
- představit využití analýzy křivky tání pro kontrolu uniformity termocyklérů a srovnat tuto metodu s jinými kalibračními metodami.

Cílem praktické části této diplomové práce je:

- pomocí série PCR pokusů odpovědět otázku, zda teplotní uniformita všech cyklérů LEM ÚMTM (LightCycler<sup>®</sup> 480 System, LightCycler<sup>®</sup> Nano Real-Time PCR System, Rotor-Gene 3000<sup>™</sup>) odpovídá parametrům deklarovaným výrobcem a parametrům vyžadovaným dle akreditace,
- srovnat své výsledky s výsledky kalibrací cykléru, provedenými kalibrační laboratoří,
- srovnat, zda jsou mezi cykléry signifikantní rozdíly,
- vytvořit prototyp kalibrační soupravy, která by byla přenosná a standardizovaná (která by ze zdrojů nejistoty měření odstranila chybu pipetování).

## 4 MATERIÁL

### 4.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

#### 4.1.1 Přístroje

**Cobas 4800 System** - plně automatizovaný systém přípravy vzorku izolované nukleové kyseliny z primární zkušavky propojen s real-time PCR technologií pro amplifikaci a detekci. Systém je složený z **cobas x 480** izolátoru a **cobas z 480** analyzátoru (URL:<[www.hpvl6and18.com](http://www.hpvl6and18.com)>[cit. 2014-10-25], URL:<[usdiagnostics.roche.com](http://usdiagnostics.roche.com)>[cit. 2014-10-25]). Pro tento pokus byl použit pouze **cobas z analyzátor** (Cat #: 50502). Excitační filtry jsou zde 465 nm, 498 nm, 540 nm, 610 nm, 680 nm. Detekční filtry 510 nm, 580 nm, 610 nm, 645 nm, 670 nm, 700 nm (Manuál Cobas 4800 System).

**LightCycler® 480 System** – vysoce výkonná PCR platforma existující v 96 a 384jamkovém formátu. **LightCycler® 480 Instrument II** je rychlý vysokokapacitní destičkový real-time cyklér (URL:<[lifescience.roche.com](http://lifescience.roche.com)>[cit. 2014-12-11]). Pro pokus byly použity dva tyto přístroje (Cat # 26971, Cat # 35329). Excitace 390 – 710 nm, excitační filtry jsou zde 440 nm, 465 nm, 498 nm, 533 nm, 618 nm. Detekční filtry 488 nm, 510 nm, 580 nm, 610 nm, 640 nm, 660 nm (Manuál LightCycler® 480 System).

**LightCycler® Nano System** – nejmenší a nejtíšší real-time PCR systém na trhu. **LightCycler® Nano Instrument** je real-time cyklér pro zkušavkové metody do 32 vzorků na jeden běh. Vyhřívání a chlazení je založeno na Peltierových člancích s podporou vyhřívání víka. Excitace je prováděna pomocí LED diod s filtry propouštějících světlo o 500 nm, kdy je schopné excitovat všechny fluorofory běžně užívané v qPCR. Detekce fluorescence je při 510 – 750 nm. Teplotní uniformita je výrobcem uváděna  $\pm 0,1$  °C a teplotní přesnost  $\pm 0,25$  °C (Manuál LightCycler® Nano System).

**Rotor-Gene 3000™** – real-time DNA detekční systém s multifiltrovým systémem detekujícím všechny chemismy jako SYBRGreen, dvoubarevné sondy a sondy vázající se do malého žlábků DNA („minor groove binder“, MGB), rezonanční přenos fluorescenční energie („Fluorescence Resonance Energy Transfer“, FRET) a molekulární vlásenky. User-friendly software. MeltCurve Analysis – po amplifikaci jsou vzorky zahřáté a změna ve fluorescenční energii je monitorována a generuje křivku tání. První centrifugační real-time amplifikační systém, oddělené světelné zdroje, maximální teplotní uniformita – vzorky rotují při 500 rpm bez variability v teplotě mezi vzorky, extrémně krátký hold time, není třeba pasivních ROX

referenčních barviv. Nabízené standardy jsou 36jamkový rotor pro vkládání jednotlivých zkumavek a 72jamkový rotor pro 4zkumavkové stripy. Všechny 72 vzorků lze detekovat v jedné otáčce v průběhu 0,15 sekundy. Je zde teplotní uniformita  $\pm 0,01$  °C, teplotní správnost (accuracy)  $\pm 0,5$  °C, teplotní přesnost (precision)  $\pm 0,1$  °C. Excitační vlnové délky jsou zde 470 nm, 530 nm, 585 nm, 625 nm. Detekční filtry jsou pásmové 510 nm, 555 nm, 610 nm a vysokopropustné 660 nm, 580 nm, 610 nm (Manuál Rotor-Gene 3000™).

Box Biohazard Mars Safety Classe 2 (LaboGene)

Odstředivka Centrifuge 5430 (Eppendorf)

Odstředivka FVL-2400N, Combi-Spin (BioSan)

Odstředivka MiniSpin (Eppendorf)

Vortex Mixer (Labnet International)

Chladnička (Liebherr)

Mraznička (Gorenje)

#### **4.1.2 Pomůcky**

Pipeta Research® Plus 0,1 – 2,5 µl (Eppendorf)

Pipeta Research® Plus 0,5 – 10,0 µl (Eppendorf)

Pipeta Research® Plus 2,0 – 20,0 µl (Eppendorf)

Pipeta Research® Plus 10,0 – 100,0 µl (Eppendorf)

Pipeta Research® Plus 20,0 – 200,0 µl (Eppendorf)

Pipeta Research® Plus 100,0 – 1000,0 µl (Eppendorf)

8kanálová pipeta Research® Plus 10 – 100 µl (Eppendorf)

12kanálová pipeta Research® Plus 0,5 – 10,0 µl (Eppendorf)

Stojan na pipety (Eppendorf)

Stojan na odpad

Chladicí destička malá

Chladicí destička velká

Chladicí destička pro RG



## **4.2 Spotřební materiál**

Screw lab tubes ST-050 (Axygen)  
Screw lab tubes SCO-B (Axygen)  
Mikrozkumavky 1,5 ml (P-lab)  
EU 0.1ml 8-tube strip (BIOplastisc)  
Destičky PCR Plate – průhledné (LabMark)  
Adhezivní fólie na PCR destičky (BIOplastics)  
Stripy – LC<sup>®</sup> Nano (Roche)  
Stripy – Rotor-Gene (T319-4N 0.1 ml Tube and Cap)  
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)  
Špičky dual filter 10 µl (Eppendorf)  
Špičky dual filter 20 µl (Eppendorf)  
Špičky dual filter 100 µl (Eppendorf)  
Špičky dual filter 200 µl (Eppendorf)  
Špičky dual filter 1000 µl (Eppendorf)  
Rukavice Powder-FREE 200 6-7 S (SemperMed)  
Sáčky na odpad

## **4.3 Software**

LightCycler<sup>®</sup> 480 Software, Version 1.5  
LightCycler<sup>®</sup> Nano Software  
Rotor-Gene6  
Microsoft Office Excel  
Microsoft Office Word  
STATISTICA, ver. 12 (StatSoft, Inc., USA)

## 4.4 Reagencie

DEPC Treated Water (Ambion)

10 x PCR pufr (ThermoScientific)

25mM roztok MgCl<sub>2</sub> (ThermoScientific)

Thermo-Start *Taq* DNA Polymerase 5 U/μl (ThermoScientific)

EvaGreen Dye, 20X in water (Biotinum)

25 mM dNTPs – dNTP Set (4 x 25μmol) (Bioline)

PM 210 = 0,1 mM směs primerů č. 402 (tcattcattctgctggccct) a 403 (ggccgtttaactaccttg) v poměru 1:1 (GeneriBiotech)

Chill-out™ Liquid Wax (BioRad)

## 4.5 Vzorky

Ve všech pokusech sledování uniformity cyklérů a jejich následného porovnávání (Cíl 1, Cíl 2 a Cíl 3) byla použita DNA s označením MG 9815. MG 9815 byla izolována z lidské krve. Spektrofotometricky zjištěná koncentrace této DNA byla 101,9 ng/μl a čistota A260/280 byla 1,66.

V pokusech vytváření prototypu kalibrační soupravy (Cíl 4) byla použita DNA s označením MG 10901. Tato DNA byla izolována z lidské krve. Spektrofotometricky zjištěná koncentrace této DNA byla 473,2 ng/μl a čistota A260/280 byla 1,72.

Vzorky byly získány s informovaným souhlasem odebírané osoby.

## 5 METODA

### 5.1 Návrh primerů

Primerová směs PM 210 byla navržena doc. Mgr. Jiřím Drábkem, Ph.D. pomocí programu FastPCR ([primerdigital.com/fastpcr.html](http://primerdigital.com/fastpcr.html)). Je složena z primerů s označením 402 a 403, syntetizovaných firmou Generi-Biotech s.r.o. Tyto primery byly původně navrženy pro amplifikaci 120 bp dlouhé fragilní oblasti dlouhého raménka lidského chromozómu 16 následně byly vyhodnoceny jako vhodné pro tento experiment při použití se standardní (wildtype) DNA MG 9815.

#### Sekvence

Forward (402): tcattcattctgctggccct (63,0 °C)

Reverse (403): ggccgtttaactaccttg (56,5 °C)

>chr16:78675446+78675565 120bp TCATTCATTCTGCTGGCCCT  
GGCCGTTTAACTACCTCTTG

TCATTCATTCTGCTGGCCCTaaatagtagaaggaagggaacatgaaaggagccttcatctgttttctgcagatgcc  
cggctcgtggtaaccaagCAAGAGGTAGTTAAACGGCC (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>)

### 5.2 Laboratorní protokol

Všechny reagenty a vzorky použité v těchto experimentech byly skladovány v mrazničce při - 80 °C. Po vyjmutí byly plně rozmrazeny při pokojové teplotě, zvortexovány a stočeny na centrifuze. Maximální počet rozmrazení nepřesáhl 4. Všechny reagenty byly udržovány v chladicích stojácích, reagenty obzvláště náchylné ke změnám teploty (jako *Taq* DNA polymeráza) byly udržovány v mrazničce i po dobu práce a rozmrazeny pouze na dobu nezbytně nutnou pro jejich napipetování.

#### **Postup pro Cíl 1, Cíl 2 a Cíl 3:**

Z reagentů byl pro každý pokus připraven nový PCR master mix vždy v množství odpovídajícím počtu reakčních jamek daného termocykléru. PCR master mix byl také udržován na chladicím stojánku po celou dobu pipetování.

Výpočet ředícího faktoru:

$$\text{počet jamek} \times \text{faktor chyby pipetování} \times \text{pipetovaný objem} = \text{celkový objem PCR master mixu}$$

Rozpis pipetování reagensií pro 96jamkový formát (LC<sup>®</sup> 480 II-I, LC<sup>®</sup> 480 II-II, cobas z):

$96 \times 1,17 \times 10 \times 1,17 = 1314$  (2 x chyba pipetování kvůli dvěma rozpipetovávacím krokům)

Reagencie	Ředěno	Objem
H <sub>2</sub> O		950,1 μl
10 xPCR	10 x	131 μl
MgCl <sub>2</sub>	8,35 x	158 μl
25mM dNTPs	125 x	10,5 μl
ThermoTaq	100 x	13,1 μl
EvaGreen	40 x	32,9 μl
PM 210	100 x	13,1 μl
DNA MG 9815	250 x	5,3 μl
Celkem		1314 μl

Reagencie byly v uvedených objemech smíchány a rozpipetovány po 93,6 μl do stripu dvanácti zkumavek. Pomocí 12kanálové pipety následně pipetovány do všech jamek v destičce po 10 μl.

Rozpis pipetování reagensií pro 32jamkový formát (LightCycler<sup>®</sup> Nano):

$32 \times 1,17 \times 10 = 375$

Reagencie	Ředěno	Objem
H <sub>2</sub> O		270,6 μl
10 xPCR	10 x	37,5 μl
MgCl <sub>2</sub>	8,35 x	44,8 μl
25mM dNTPs	125 x	3 μl
ThermoTaq	100 x	3,8 μl
EvaGreen	40 x	9,4 μl
PM 210	100 x	3,8 μl
DNA MG 9815	250 x	1,5 μl
Celkem		375 μl

Reagencie byly v uvedených objemech smíchány a pomocí automatické pipety rozpipetovány do čtyř 8zkumavkových stripů po 10 μl.

Rozpis pipetování reagensií pro 72jamkový formát (RG 3000™):

$$72 \times 1,17 \times 10 = 842,4$$

Reagencie	Ředěno	Objem
H <sub>2</sub> O		610 µl
10 xPCR	10 x	84,3 µl
MgCl <sub>2</sub>	8,35 x	100,1 µl
25mM dNTPs	125 x	6,7 µl
ThermoTaq	100 x	8,4 µl
EvaGreen	40 x	21,1 µl
PM 210	100 x	8,4 µl
DNA MG 9815	250 x	3,4 µl
Celkem		842,4 µl

Reagencie byly v uvedených objemech smíchány a pomocí automatické pipety rozpipetovány do osmnácti 4zkumavkových stripů po 10 µl.

**Postup pro testování vlivu schématu pipetování na teplotní profil termocykléru:**

Z reagensií byl pro použití každé pipety připraven nový PCR master mix v množství odpovídajícím počtu reakčních jamek termocykléru LightCycler® 480 II-II. PCR master mix byl také udržován na chladicím stojánku po celou dobu pipetování.

Rozpis pipetování reagensií pro 96jamkový formát (LC® 480 II-II):

$$96 \times 1,17 \times 10 \times 1,17 = 1314 \text{ (2 x chyba pipetování kvůli dvěma rozpipetovávacím krokům)}$$

Reagencie	Ředěno	Objem
H <sub>2</sub> O		950,1 µl
10 xPCR	10 x	131 µl
MgCl <sub>2</sub>	8,35 x	158 µl
25mM dNTPs	125 x	10,5 µl
ThermoTaq	100 x	13,1 µl
EvaGreen	40 x	32,9 µl
PM 210	100 x	13,1 µl
DNA MG 9815	250 x	5,3 µl
Celkem		1314 µl

12kanálová pipeta: Reagencie byly v uvedených objemech smíchány a rozpipetovány po 93,6  $\mu$ l do stripu dvanácti zkumavek. Pomocí 12kanálové pipety následně shora dolů pipetovány do všech jamek v destičce po 10  $\mu$ l. Program FRA.

8kanálová pipeta: Reagencie byly v uvedených objemech smíchány a rozpipetovány po 140,4  $\mu$ l do stripu osmi zkumavek. Pomocí 8kanálové pipety následně zleva doprava pipetovány do všech jamek v plátku po 10  $\mu$ l. Program FRA.

#### **Postup pro Cíl 4:**

Z reagentů byl pro obě destičky připraven nový PCR master mix v množství odpovídajícím počtu reakčních jamek termocykléru LightCycler<sup>®</sup> 480 II-II. PCR master mix byl také udržován na chladicím stojánku po celou dobu pipetování.

#### Rozpis pipetování reagentů pro 96jamkový formát (LC<sup>®</sup> 480 II-II):

96 x 1,17 x 10 x 1,17 = 1314 (2 x chyba pipetování kvůli dvěma rozpipetovávacím krokům)

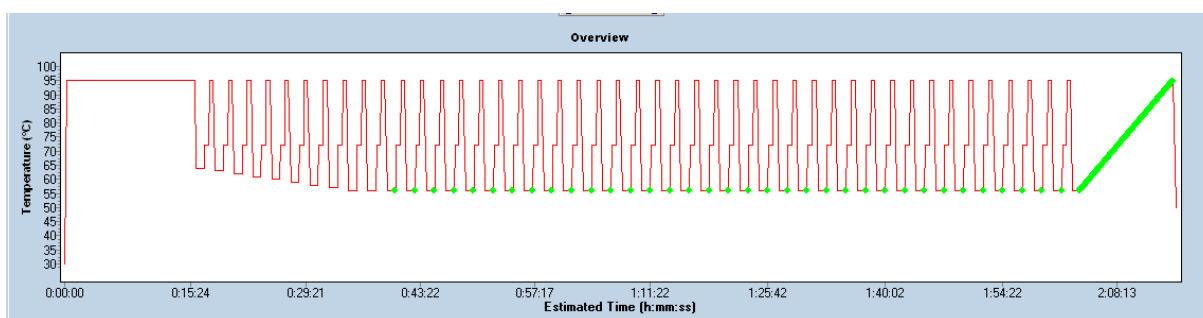
Reagencie	Ředěno	Objem
H <sub>2</sub> O		954,3 $\mu$ l
10 xPCR	10 x	131 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	8,35 x	158 $\mu$ l
25mM dNTPs	125 x	10,5 $\mu$ l
ThermoTaq	100 x	13,1 $\mu$ l
EvaGreen	40 x	32,9 $\mu$ l
PM 210	100 x	13,1 $\mu$ l
DNA MG 10901	1183 x	1,1 $\mu$ l
Celkem		1314 $\mu$ l

Prototyp 1: Reagencie byly v uvedených objemech smíchány a rozpipetovány po 100  $\mu$ l do dvanácti zkumavek a byl spuštěn PCR program FRA. Poté byl obsah zkumavek smíchán dohromady, řádně promíchán na vortexu, stočen na centrifuze a pomocí 12kanálové pipety rozpipetován do všech jamek v destičce po 10  $\mu$ l. Každá jamka byla překryta 10  $\mu$ l tekutého parafinu a byl spuštěn program Melting. Tento program byl pak následně spouštěn v určitých intervalech (2., 3., 4., 15., 22., 30. a 36. den) a destička byla mezitím skladována při pokojové teplotě ve tmě.

Prototyp 2: Reagencie byly v uvedených objemech smíchány a rozpipetovány po 100  $\mu$ l do dvanácti zkumavek a byl spuštěn PCR program FRA. Poté byl obsah zkumavek smíchán dohromady, řádně promíchán a přečištěn pomocí kolonek s křemíkovou membránou (QIAquick PCR Purification Kit). Byl přidán 40 x EvaGreen a 10 x PCR pufr, následovalo další řádné promíchání na vortexu a pomocí 12kanálové pipety byl obsah zkumavky rozpipetován do všech jamek v destičce po 10  $\mu$ l. Každá jamka byla překryta 10  $\mu$ l tekutého parafinu a byl spuštěn program Melting. Tento program byl pak následně spouštěn v určitých intervalech (2., 3., 4., 15., 22., 30. a 36. den) a destička byla mezitím skladována při pokojové teplotě ve tmě.

### 5.3 Program PCR běhu

Program FRA (Obr. 14):

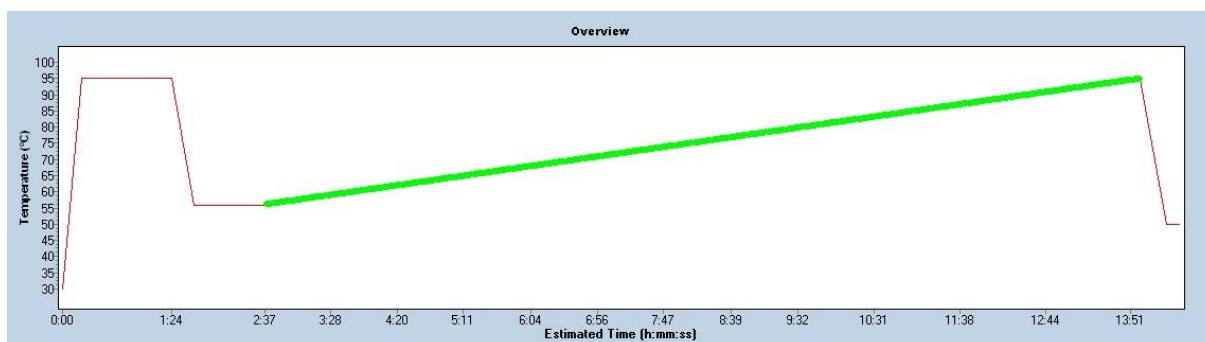


Obr. 14: Průběh PCR programu FRA (generováno programem LightCycler® 480 Software)

Program	Počet cyklů	°C	hh:mm:ss	°C/s	Pozn.
<i>Denaturation</i>	1	95	00:15:00	4,4	
<i>PCR TouchDown</i>	10	95	00:00:15	4,4	
		65	00:00:50	2,2	(Sec Target 56 °C, 1 °C Step Size)
		72	00:00:20	4,4	
<i>PCR Amplification</i>	35	95	00:00:15	4,4	
		56	00:00:50	2,2	(Single Acquisition Mode)
		72	00:00:20	4,4	
<i>Drop down before melt</i>	1	95	00:00:10	4,4	
		56	00:00:45	2,2	
<i>Melting</i>		95	continuous	0,6	(Acquisition (per °C) 10)
<i>Parking</i>		50	00:00:01	2,2	

Program Melting (Obr. 15):

<u>Program</u>	<u>Počet cyklů</u>	<u>°C</u>	<u>hh:mm:ss</u>	<u>°C/s</u>	<u>Pozn.</u>
<i>Drop down before melt</i>		95	00:01:00	4,4	
		56	00:00:45	2,2	
<i>Melting</i>		95	continuous	0,6	(Acquisition (per °C) 10)
<i>Parking</i>		50	00:00:01	2,2	



Obr. 15: Program PCR běhu Melting (generováno programem LightCycler® 480 Software)



## 6 VÝSLEDKY

### Cíl 1

*Pomocí série PCR pokusů odpovědět otázku, zda teplotní uniformita všech cyklérů LEM ÚMTM (LightCycler® 480 System, LightCycler® Nano Real-Time PCR System, Cobas 4800 System a Rotor-Gene 3000™) odpovídá parametrům deklarovaným výrobcem a parametrům vyžadovaným dle akreditace.*

### Výsledky 1

Pro testování uniformity termocyklérů byla použita analýza křivky tání ( $T_m$  calling, Melting analysis), kde byla hodnocena variabilita teploty tání DNA v rámci celého termocykléru. Každý termocyklér byl testován třikrát, kdy byl pokaždé vytvořen nový master mix.

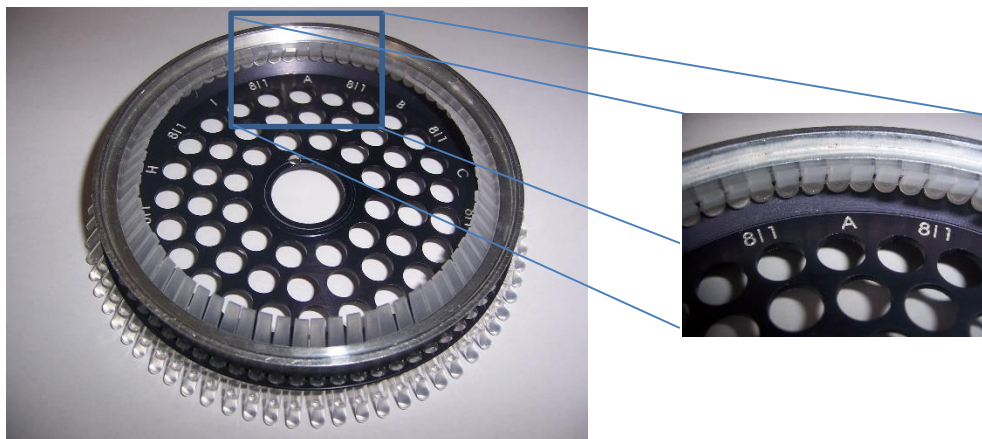
Poněvadž až na přístroj Cobas nebyly splněny předpoklady použití analýzy rozptylu (Analysis of variation, ANOVA) - normalita dat a homoskedasticita (ekvivalence rozptylů), byla data analyzována neparametrickými metodami (Kruskalův-Wallisův test). Při splnění všech předpokladů, což nastalo pouze v případě přístroje Cobas z analyzátor, byla ANOVA použita. Hladina významnosti byla stanovena na 5 %.

Data jsou prezentována prostřednictvím sumárních charakteristik (průměr, směrodatná odchylka, rozpětí, kvartily). Ke grafické reprezentaci dat byly využity spojnicové grafy, krabicové grafy a wafer ploty.

Statistická analýza byla provedena v programu STATISTICA, ver. 12 (StatSoft, Inc., USA).

- **Rotor-Gene 3000™**

Rotor je tvořen 8 sektory (A – I), každý sektor má 8 pozic (1 - 8), celkem 72 pozic (Obr. 16).



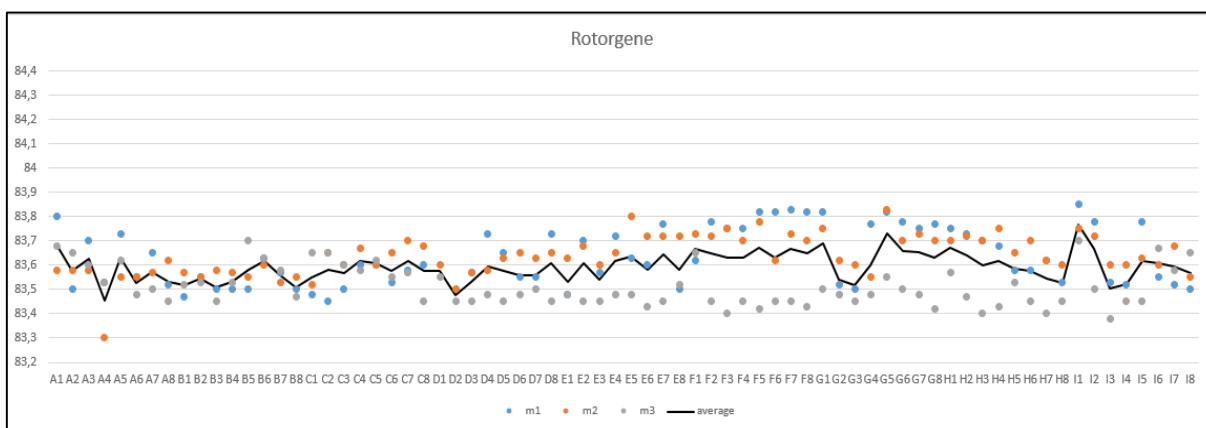
Obr. 16: Rozložení jamek na obvodu rotoru cykléru Rotor-Gene 3000™, detail

V tabulce (Tab. I) jsou uvedeny sumární charakteristiky pro jednotlivá měření samostatně – rotor je hodnocen jako celek bez rozlišení pozice jamky.

Tab. I: Sumární tabulka hodnot jednotlivých měření na cykléru Rotor-Gene 3000™

m	Počet měření (N)	Aritmetický průměr	Medián	Minimum	Maximum	První kvartil	Druhý kvartil	Rozpětí (max - min)	Mezikvartilové rozpětí (3. - 1. kvartil)	Směrodatná odchylka
m1	70	83,634	83,600	83,450	83,850	83,530	83,750	0,400	0,220	0,118
m2	72	83,639	83,630	83,300	83,830	83,580	83,700	0,530	0,120	0,084
m3	72	83,511	83,480	83,380	83,700	83,450	83,570	0,320	0,120	0,082

Sumární charakteristiky (aritmetický průměr a směrodatná odchylka) pro jednotlivé pozice, kdy opakovaná měření tvoří náhodný výběr, se nacházejí na listu Rotor-Gene 3000™ (Příloha 1). Na obrázku (Obr. 17) lze vidět rozložení  $T_m$  jednotlivých měření ve všech jamkách a jejich průměrnou hodnotu (spojnice).



Obr. 17: Teploty tání DNA v jednotlivých jamkách při třech měřeních (m1, m2, m3) na cykléru RotorGene 3000 (osa x – pozice jamky, osa y – naměřená  $T_m$ )

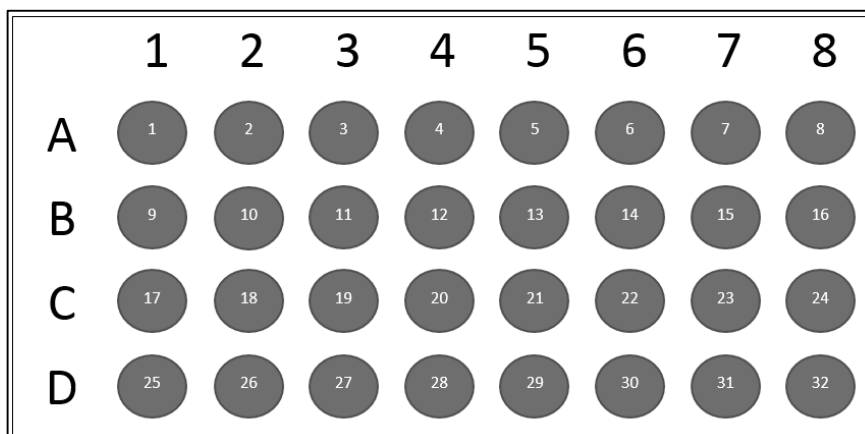
V sektoru D na pozicích 1 a 2 chybí první měření z důvodu nedovření zkumavky a následnému odparu obsahu. U Rotor-Gene 3000™ nebyl odhalen statisticky významný rozdíl  $T_m$  DNA v jednotlivých jamkách rotoru (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0.9657). Ve třech měřeních však lze na některých pozicích (př. A4 nebo I1) pozorovat opakovaně vychýlené hodnoty (Obr. 17), což může značit určitou závislost rozmístění jamek (však ne statisticky významnou).

Na listu Rotor-Gene 3000™ (Příloha 1) je znázorněno, jak vypadají průměrné hodnoty naměřených teplot a směrodatné odchylky vzhledem k pozicím na destičce. Vyšší průměrné teploty a současně vyšší rozptyl hodnot je pozorován v sektoru F, G a H, ne ovšem na všech pozicích.

Přístroj lze považovat za uniformní a vyhovující, protože splňuje požadavky akreditačních orgánů na uniformitu  $\pm 0,5$  °C. V porovnání s tvrzením výrobce, že teplotní uniformita je  $\pm 0,01$  °C, jsou však námi naměřené hodnoty  $\pm 0,2$  °C (Tab. I) velice neuspokojivé.

- **LightCycler® Nano**

Reakční destička je tvořena 4 řádky (A - D) a 8 sloupci (1 - 8), celkem 32 pozic (Obr. 18):



Obr. 18: Rozložení jamek cykléru LightCycler® Nano

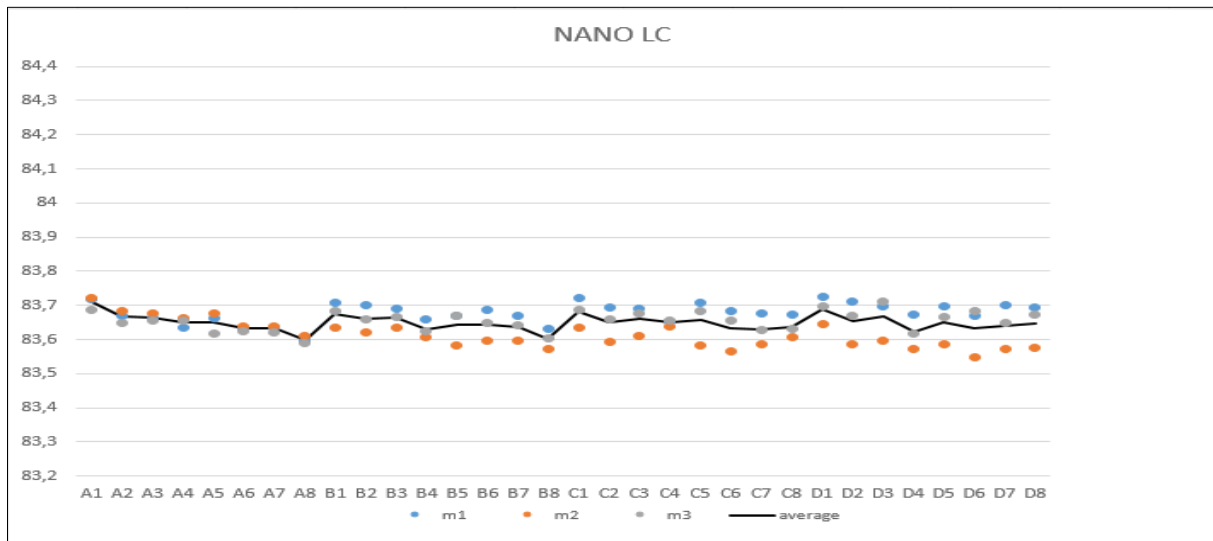
V tabulce (Tab. II) jsou uvedeny sumární charakteristiky pro jednotlivá měření samostatně – destička je hodnocena jako celek bez rozlišení pozice jamky.

Tab. II: Sumární tabulka hodnot jednotlivých měření na cykléru LightCycler® Nano

m	Počet měření (N)	Aritmetický průměr	Medián	Minimum	Maximum	První kvartil	Druhý kvartil	Rozpětí (max - min)	Mezikvartilové rozpětí (3. - 1. kvartil)	Směrodatná odchylka
m1	32	83,679	83,680	83,597	83,724	83,664	83,701	0,127	0,037	0,030
m2	32	83,614	83,607	83,548	83,722	83,585	83,639	0,174	0,055	0,040
m3	32	83,655	83,657	83,589	83,711	83,630	83,674	0,122	0,045	0,028

Sumární charakteristiky (aritmetický průměr a směrodatná odchylka) pro jednotlivé pozice, kdy opakovaná měření tvoří náhodný výběr, se nacházejí na listu LightCycler® Nano (Příloha 2).

Na obrázku (Obr. 19) lze vidět rozložení  $T_m$  jednotlivých měření ve všech jamkách a jejich průměrnou hodnotu (spojnice).

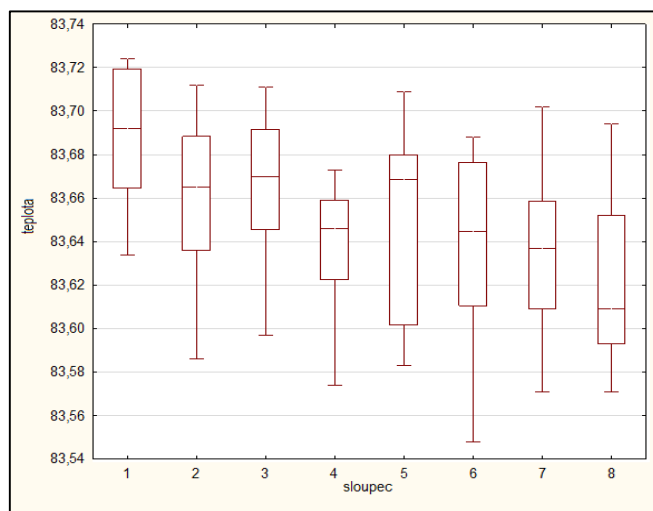


Obr. 19: Teploty tání DNA v jednotlivých jamkách při třech měřeních (m1, m2, m3) na cykléru LightCycler® Nano (osa x – pozice jamky, osa y – průměrná  $T_m$ )

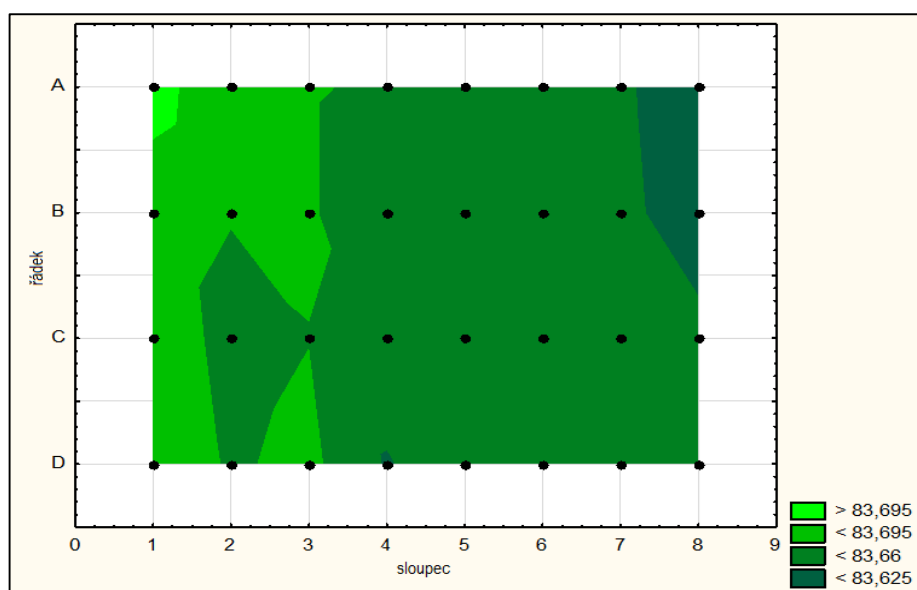
U LightCycler® Nano nebyl odhalen statisticky významný rozdíl  $T_m$  DNA v jednotlivých jamkách destičky (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value=0,6269). Pokud je zanedbán vliv řádků, potom je vliv pozice ve sloupci statisticky významný (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value=0,0035). V tomto případě se liší statisticky významně (násobné porovnávání, Tukeyho test) teplota v 1. sloupci a 7. sloupci ( $p$ -value=0,0428) a teplota v 1. sloupci a 8. sloupci ( $p$ -value=0,004).

Pokud je naopak zanedbán vliv pozice ve sloupci, teplota se vzhledem k pozici v řádku statisticky významně neliší (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value=0,8407).

V krabicovém grafu (Obr. 20) lze pozorovat postupně klesající teplotu ve sloupcích směrem doprava. Podobný trend znázorňuje i wafer plot průměrných hodnot (Obr. 21).

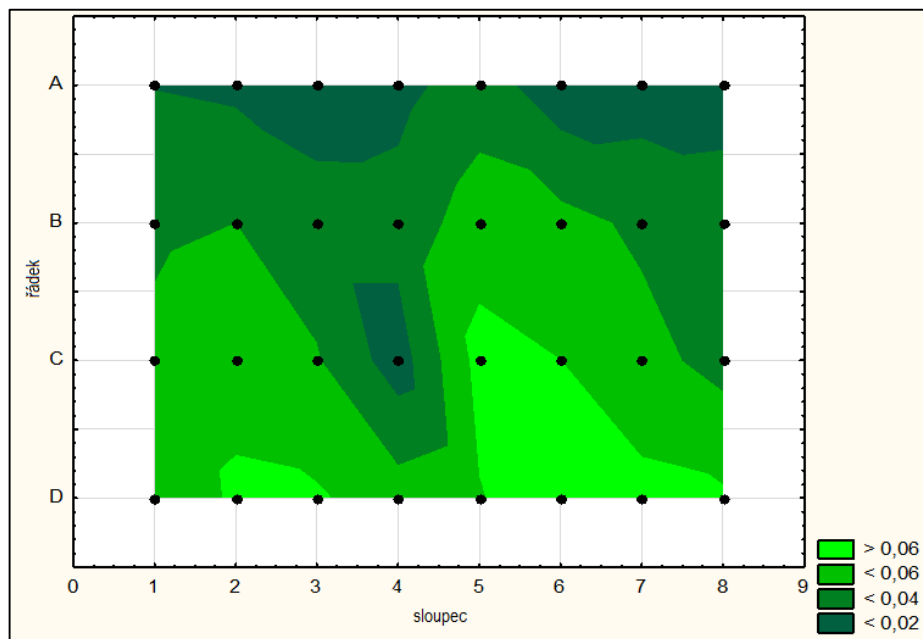


Obr. 20: Krabicový graf naměřených teplot vzhledem k pozici ve sloupcích (LightCycler® Nano)

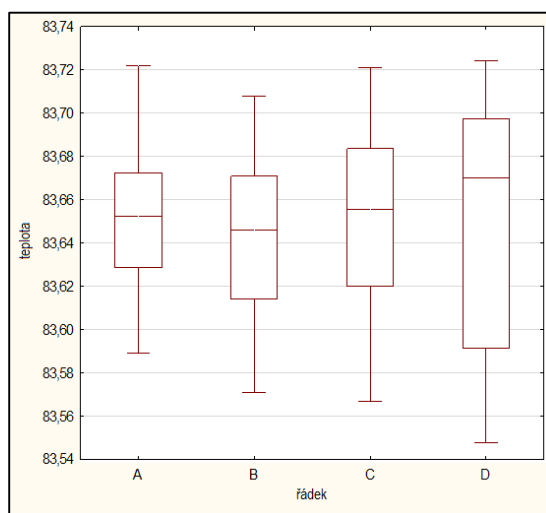


Obr. 21: Wafer plot průměrných teplot všech měření (•) vzhledem k pozici na destičce (LightCycler® Nano)

Největší kolísání hodnot mezi jednotlivými měřeními lze z wafer plotu směrodatných odchylek (Obr. 22) i z krabicového grafu (Obr. 23) pozorovat v řádcích C a D.



Obr. 22: Wafer plot směrodatných odchylek teplot naměřených teplot (•) vzhledem k pozici na destičce (LightCycler® Nano)



Obr. 23: Krabicový graf naměřených teplot vzhledem k pozici v řádcích (LightCycler® Nano)

Výrobce deklarovaná teplotní uniformita  $\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  byla u tohoto termocykléru splněna, protože teploty nepřesáhly odchylku větší než  $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tab. II), což vyhovuje i požadavkům pro akreditaci.

- **LightCycler® 480 II-I**

Reakční destička je tvořena 8 řádky (A - H) a 12 sloupci (1 - 12), celkem 96 pozic (Obr. 24):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

Obr. 24: Rozložení jamek cykléru LightCycler® 480 II-I

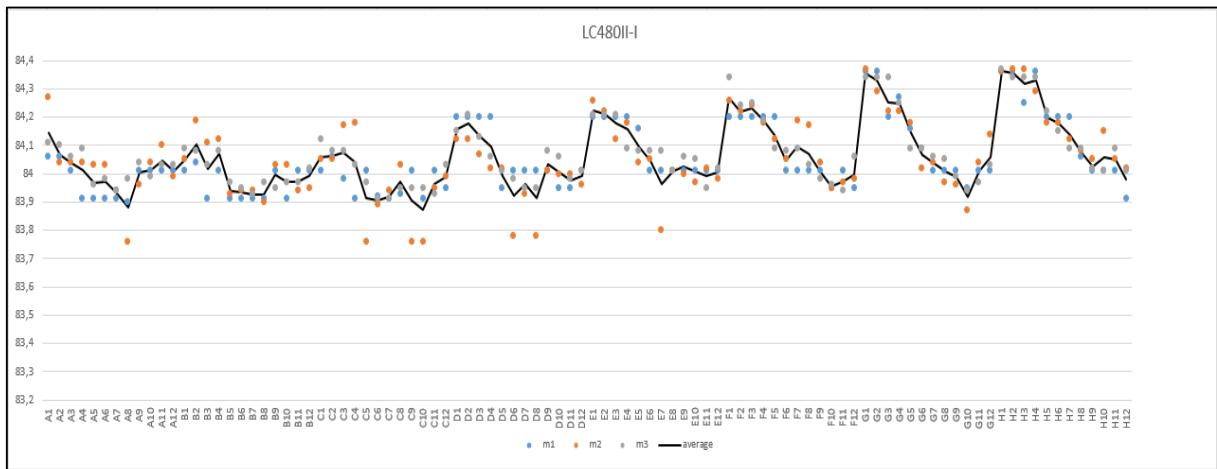
V tabulce (Tab. III) jsou uvedeny sumární charakteristiky pro jednotlivá měření samostatně – destička je hodnocena jako celek bez rozlišení pozice jamky.

Tab. III: Sumární tabulka hodnot jednotlivých měření na cykléru LightCycler® 480 II-I

m	Počet měření (N)	Aritmetický průměr	Medián	Minimum	Maximum	První kvartil	Druhý kvartil	Rozpětí (max - min)	Mezikvartilové rozpětí (3. - 1. kvartil)	Směrodatná odchylka
m1	96	84,051	84,010	83,900	84,360	83,965	84,180	0,460	0,215	0,123
m2	96	84,055	84,040	83,760	84,370	83,970	84,160	0,610	0,190	0,140
m3	96	84,069	84,055	83,910	84,370	83,980	84,090	0,460	0,110	0,116

Sumární charakteristiky (aritmetický průměr a směrodatná odchylka) pro jednotlivé pozice, kdy opakovaná měření tvoří náhodný výběr, se nacházejí na listu LightCycler® 480 II-I (Příloha 3).

Na obrázku (Obr. 25) lze vidět rozložení  $T_m$  jednotlivých měření ve všech jamkách a jejich průměrnou hodnotu (spojnice).

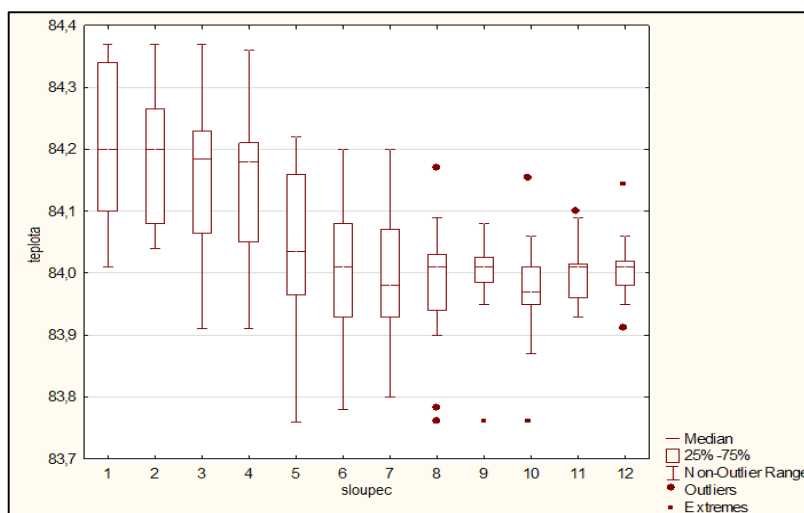


Obr. 25: Teploty tání DNA v jednotlivých jamkách při třech měřeních (m1, m2, m3) na cykléru LightCycler® 480 II-I (osa x – pozice jamky, osa y – průměrná  $T_m$ )

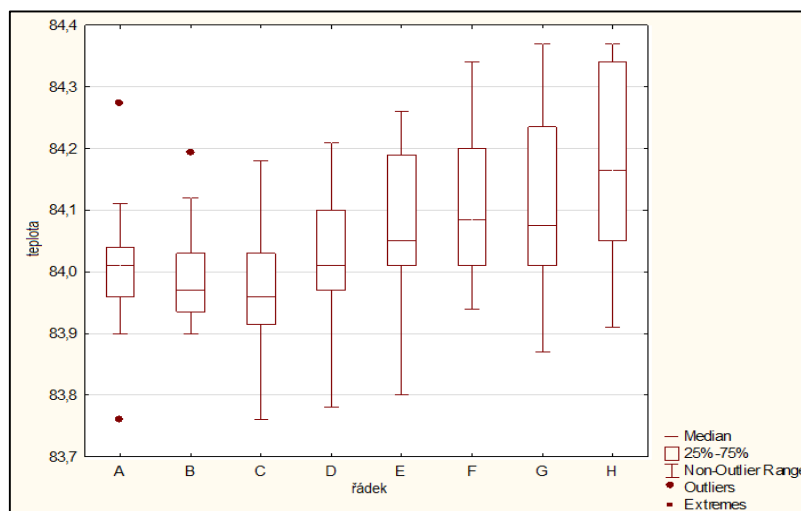
U LightCycler® 480II-I byl odhalen statisticky významný rozdíl  $T_m$  DNA v jednotlivých jamkách destičky, v řádcích i ve sloupcích (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value < 0,0001). Pokud je zanedbán vliv pozice ve sloupci, liší se statisticky významně (násobné porovnávání, Tukeyho test) většinou teplota v řádcích v 1. polovině od řádků v 2. polovině destičky. Pokud naopak zanedbáme vliv pozice v řádku, liší se statisticky významně (násobné porovnávání, Tukeyho test) většinou teplota v 1. třetině sloupců od teploty sloupců v 2. a 3. třetině destičky (červená čísla v tabulce LightCycler® 480 II-I (Příloha 3)).



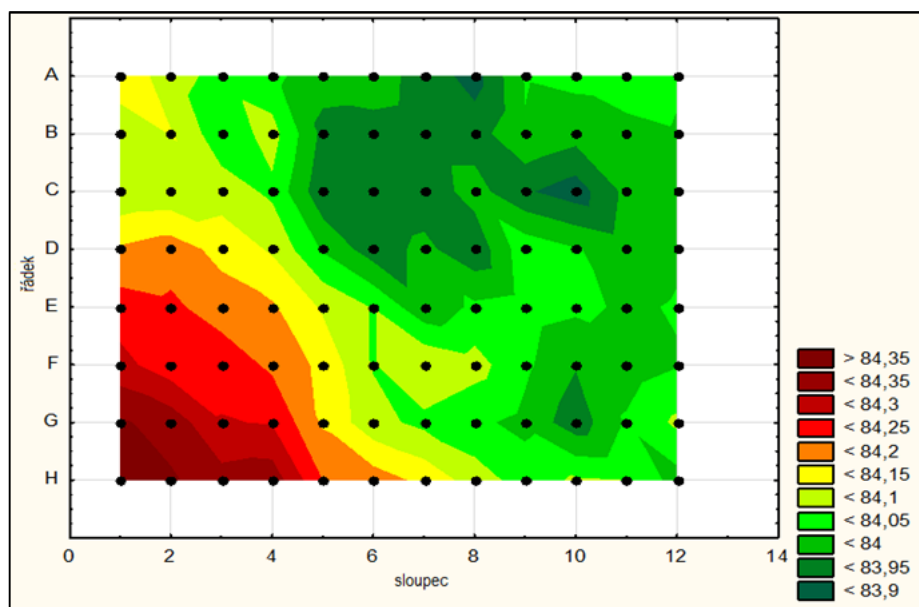
V krabicových grafech (Obr. 26, Obr. 27) lze pozorovat, že teplota ve sloupcích postupně klesá a od 8. sloupce se ustaluje (mizí vliv vyšších hodnot v levém dolním rohu destičky), zatímco teplota v řádcích od C roste. Podobný trend je vidět na wafer plotu průměrných hodnot (Obr. 28). Z bodového grafu (Obr. 25), krabicových grafů a wafer plotu směrodatných odchylek (Obr. 29) je patrné, že se na některých pozicích objevují extrémní hodnoty.



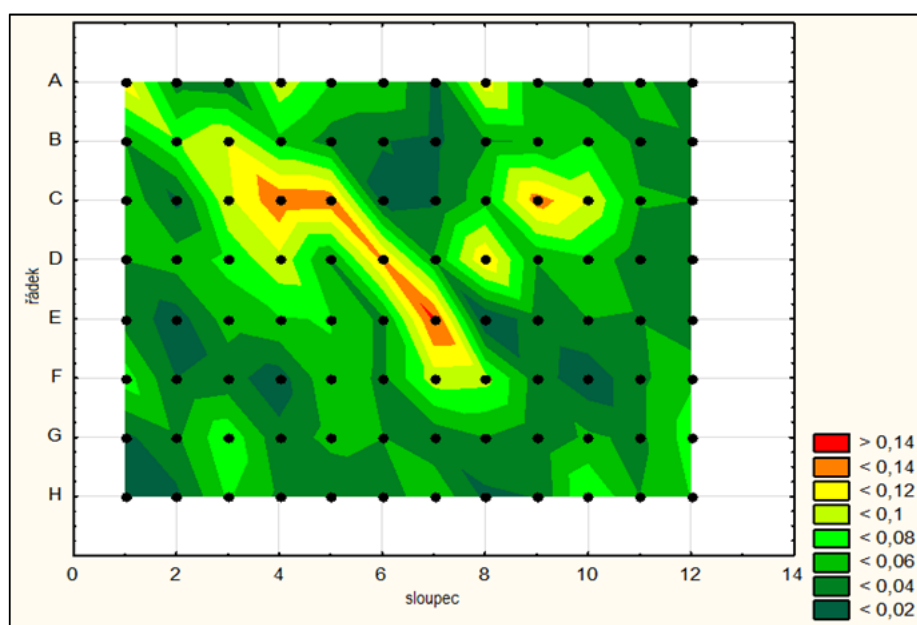
Obr. 26: Krabicový graf naměřených teplot vzhledem k pozici ve sloupcích (LightCycler® 480 II-I)



Obr. 27: Krabicový graf naměřených teplot vzhledem k pozici v řádcích (LightCycler® 480 II-I)



Obr. 28: Wafer plot průměrných teplot všech měření (•) vzhledem k pozici na destičce (LightCycler® 480 II-I)



Obr. 29: Wafer plot směrodatných odchylek teplot naměřených teplot (•) vzhledem k pozici na destičce (LightCycler® 480 II-I)

V případě 96jamkového termocykléru LightCycler® 480 II-I byla průměrná teplota o cca 0,5 °C vyšší než průměrná teplota předchozích dvou přístrojů (Tab. III). Jelikož výrobce neudává povolenou odchylku teplot nelze zhodnotit, zda přístroj odpovídá parametrům deklarovaným výrobcem. Co se ale týče povolené odchylky  $\pm 0,5$  °C pro akreditaci, tento cyklér opět vyhovuje.

- **LightCycler® 480 II-II**

Reakční destička je tvořena 8 řádky (A - H) a 12 sloupci (1 - 12), celkem 96 pozic (Obr. 30):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

Obr. 30: Rozložení jamek cykléru LightCycler® 480 II-I

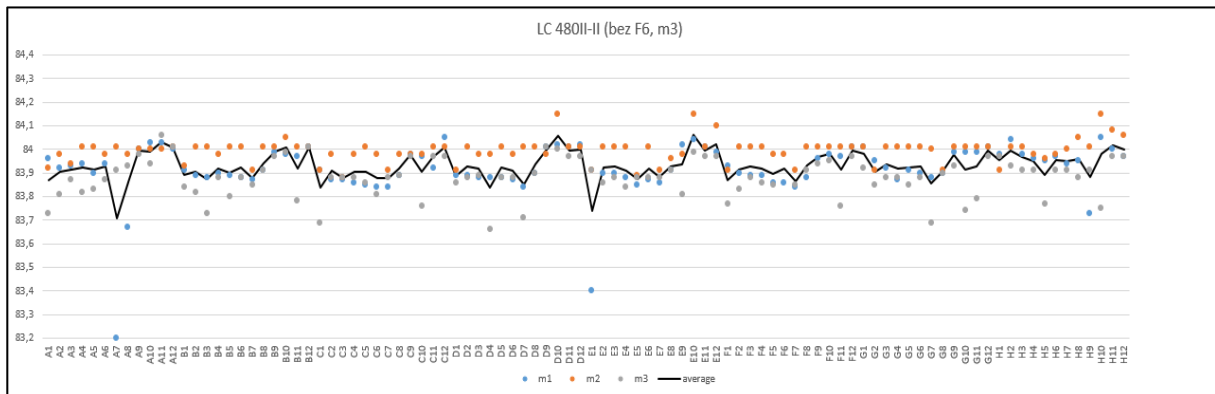
V tabulce (Tab. IV) jsou uvedeny sumární charakteristiky pro jednotlivá měření samostatně – destička je hodnocena jako celek bez rozlišení pozice jamky.

Tab. IV: Sumární tabulka hodnot jednotlivých měření na cykléru LightCycler® 480 II-II

m	Počet měření (N)	Aritmetický průměr	Medián	Minimum	Maximum	První kvartil	Druhý kvartil	Rozpětí (max - min)	Mezikvartilové rozpětí (3. - 1. kvartil)	Směrodatná odchylka
m1	96	83,916	83,915	83,200	84,050	83,880	83,985	0,850	0,105	0,114
m2	96	83,993	84,010	83,880	84,150	83,980	84,010	0,270	0,030	0,050
m3	95	83,885	83,880	83,660	84,060	83,840	83,940	0,400	0,100	0,081

Sumární charakteristiky (aritmetický průměr a směrodatná odchylka) pro jednotlivé pozice, kdy opakovaná měření tvoří náhodný výběr, se nacházejí na listu LightCycler® 480 II-II (Příloha 4).

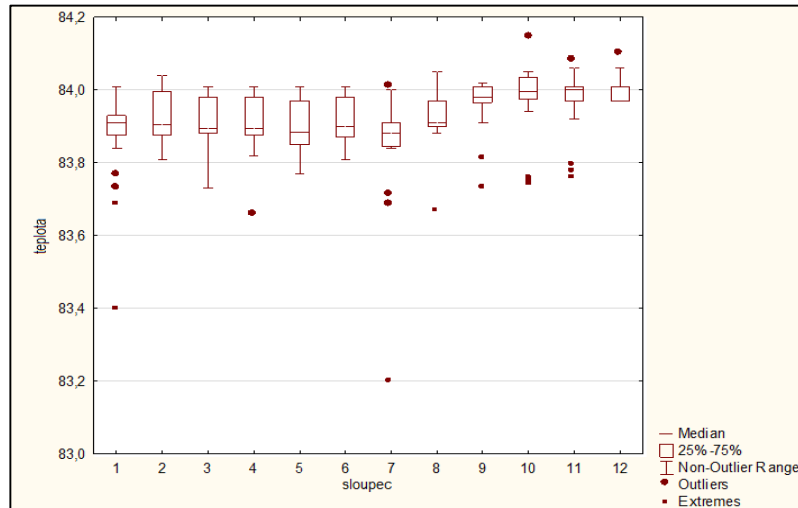
Na obrázku (Obr. 31) lze vidět rozložení  $T_m$  jednotlivých měření ve všech jamkách a jejich průměrnou hodnotu (spojnice).



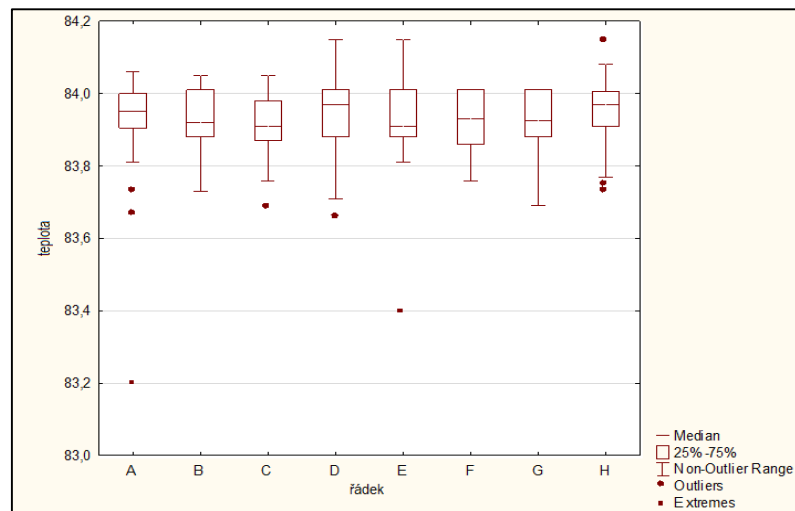
Obr. 31: Teploty tání DNA v jednotlivých jamkách při třech měřeních (m1, m2, m3) na cykléru LightCycler® 480 II-II (osa x – pozice jamky, osa y – průměrná  $T_m$ )

Na pozici F6 bylo odstraněno třetí měření z důvodu extrémní hodnoty (neznámý vliv ve zkumavce). U LightCycler® 480 II-II nebyl odhalen statisticky významný rozdíl teploty tání DNA v jednotlivých jamkách destičky (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value=0,1560). Pokud je zanedbán vliv řádku, vliv sloupce je statisticky významný (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value < 0,0001). Z tabulky výsledků Tukeyho HSD testu pro násobná porovnávání (viz LightCycler® 480 II-II – Příloha 4) je zřejmé, že se liší zejména sloupce 10, 11 a 12 od 1. sloupce a také 12. sloupec od 4. a 5. sloupce.

Sloupec 7 vybočuje naměřenými teplotami rovněž z řady. Výsledky mohou být ovlivněny odlehlými hodnotami, přesto je však vidět, že ve vzdálenějších sloupcích jsou naměřeny teploty vyšší (Obr. 32). Pokud je naopak zanedbán vliv pozice ve sloupci, teplota se vzhledem k pozici v řádku statisticky významně neliší (Kruskalův-Wallisův test,  $p\text{-value}=0,3621$ ), jak lze vidět i z krabicového grafu naměřených teplot vzhledem k pozici v řádcích (Obr. 33).

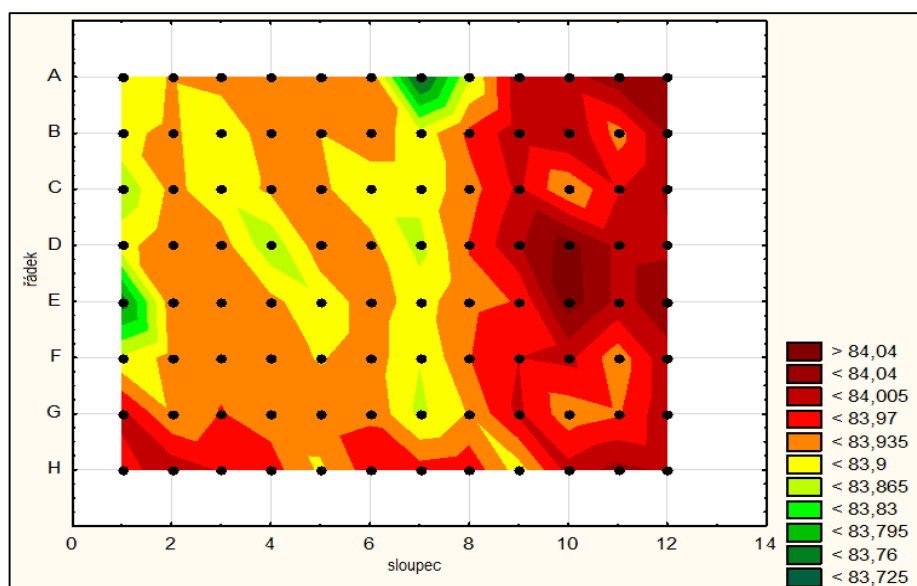


Obr. 32: Krabicový graf naměřených teplot vzhledem k pozici ve sloupcích (LightCycler® 480 II-II)

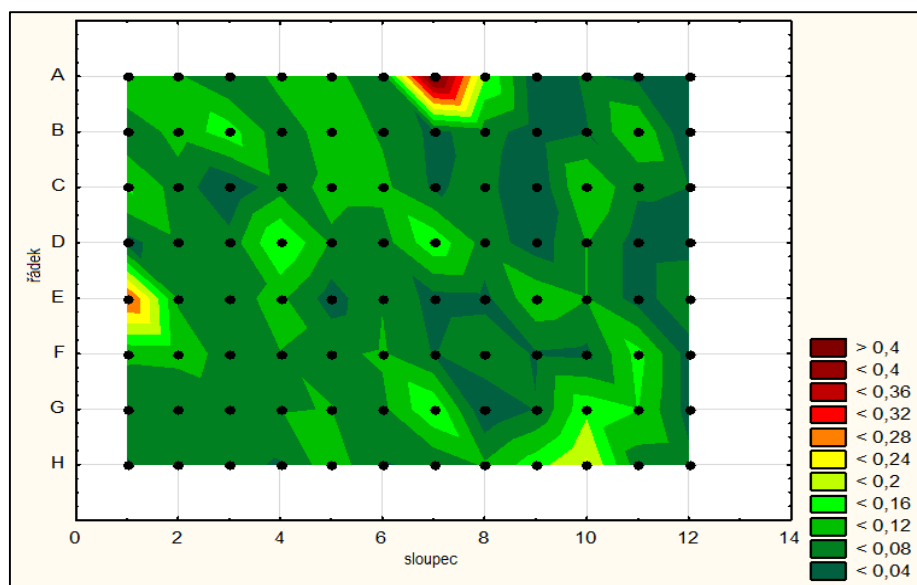


Obr. 33: Krabicový graf naměřených teplot vzhledem k pozici v řádcích (LightCycler® 480 II-II)

Výsledky z násobných porovnávání lze dobře vidět i na wafer plotu pro průměrné hodnoty (Obr. 34). Jak výsledky ovlivňují odlehlé hodnoty je zase vidět na grafu pro směrodatné odchylky (nejnižší naměřené hodnoty na pozicích E1 a A7) (Obr. 35).



Obr. 34: Wafer plot průměrných teplot všech měření (•) vzhledem k pozici na destičce (LightCycler® 480 II-II)



Obr. 35: Wafer plot směrodatných odchylek naměřených teplot všech měření (•) vzhledem k pozici na destičce (LightCycler® 480 II-II)

Akreditační požadavky nebyly splněny pouze u prvního měření, kdy rozdíl průměrné hodnoty a minima byl větší než 0,5 °C. Tento výsledek je však ovlivněn extrémní teplotou, která se již dále neopakovala.

- Cobas

Reakční destička je tvořena 8 řádky (A - H) a 12 sloupci (1 - 12), celkem 96 pozic (Obr. 36):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

Obr. 36: Rozložení jamek cykléru Cobas

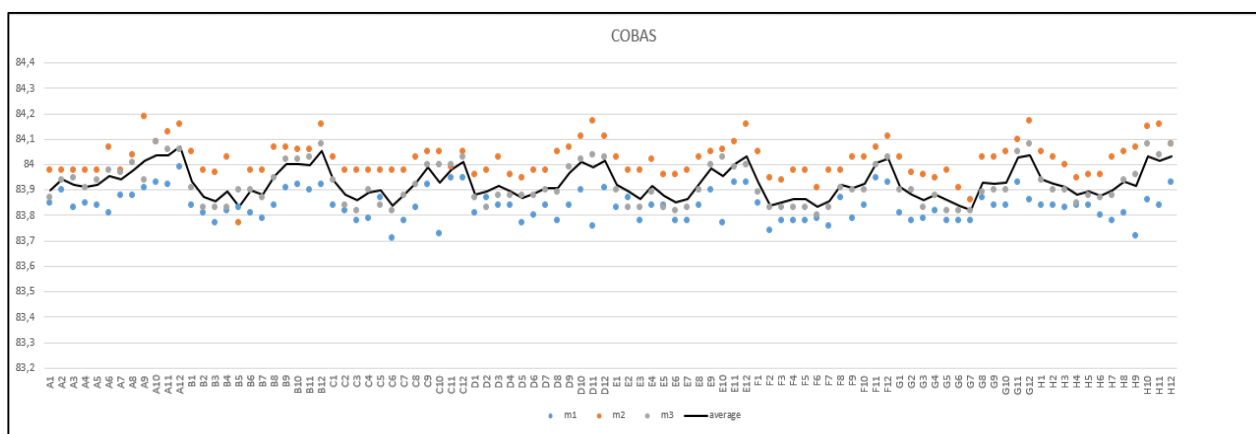
V tabulce (Tab. V) jsou uvedeny sumární charakteristiky pro jednotlivá měření samostatně – destička je hodnocena jako celek bez rozlišení pozice jamky.

Tab. V: Sumární tabulka hodnot jednotlivých měření na cykléru Cobas

m	Počet měření (N)	Aritmetický průměr	Medián	Minimum	Maximum	První kvartil	Druhý kvartil	Rozpětí (max - min)	Mezikvartilové rozpětí (3. - 1. kvartil)	Směrodatná odchylka
m1	96	83,838	83,840	83,710	83,990	83,790	83,870	0,280	0,080	0,058
m2	96	84,021	84,030	83,770	84,190	83,980	84,060	0,420	0,080	0,070
m3	96	83,922	83,900	83,800	84,090	83,860	84,000	0,290	0,140	0,080

Sumární charakteristiky (aritmetický průměr a směrodatná odchylka) pro jednotlivé pozice, kdy opakovaná měření tvoří náhodný výběr, se nacházejí na listu Cobas (Příloha 5).

Na obrázku (Obr. 37) lze vidět rozložení  $T_m$  jednotlivých měření ve všech jamkách a jejich průměrnou hodnotu (spojnice).

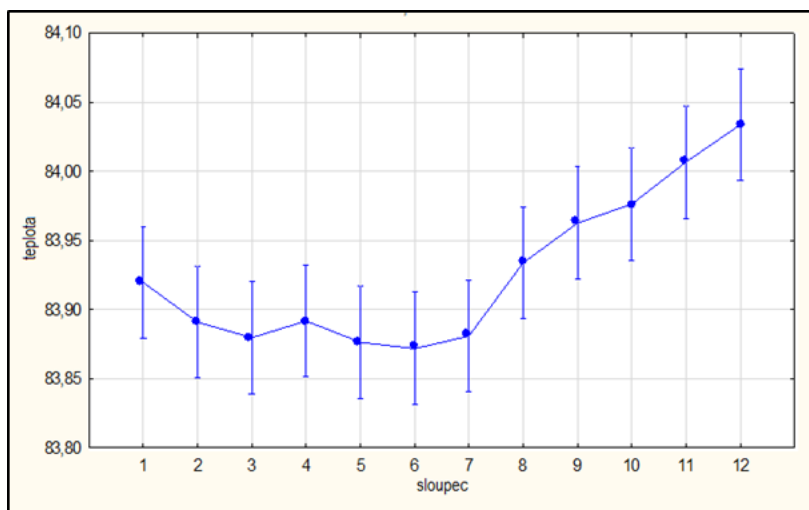


Obr. 37: Teploty tání DNA v jednotlivých jamkách při třech měřeních (m1, m2, m3) na cykléru Cobas (osa x – pozice jamky, osa y – průměrná  $T_m$ )

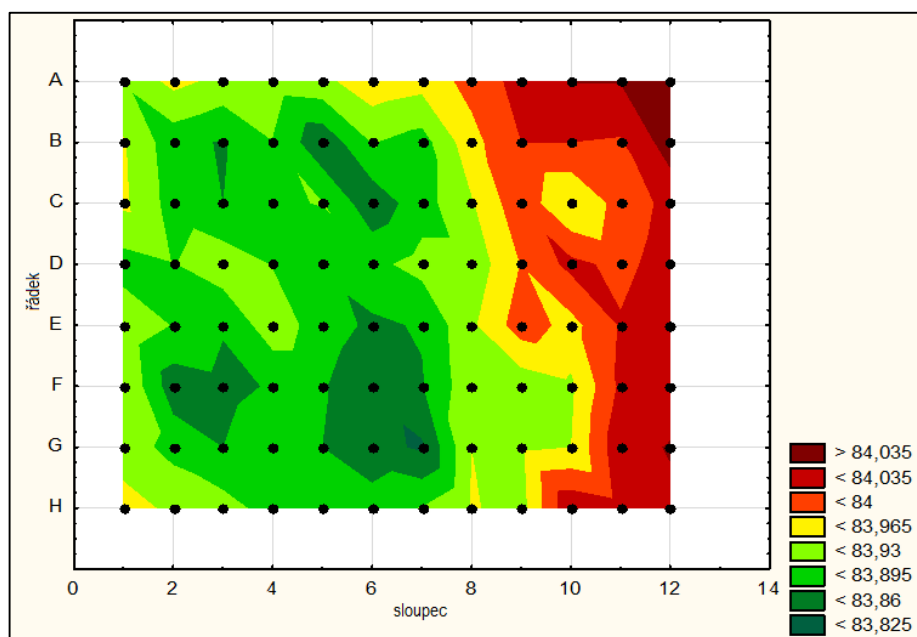
Jelikož byly splněny podmínky, mohl být použit test ANOVA. U Cobasu nebyl odhalen statisticky významný rozdíl  $T_m$  DNA v jednotlivých jamkách destičky (ANOVA, p-value=1). Pokud je zanedbán vliv řádku, vliv sloupce je pak statisticky významný (ANOVA, p-value < 0,0001). V tomto případě se signifikantně liší teplota ve sloupcích 1 - 8 od teploty ve sloupcích 10 - 12 (Tukeyho test, Příloha 5).



Tento trend je vidět i v grafu odhadu střední hodnoty metodou nejmenších čtverců (Obr. 38) a ve wafer plotu průměrných hodnot (Obr. 39).

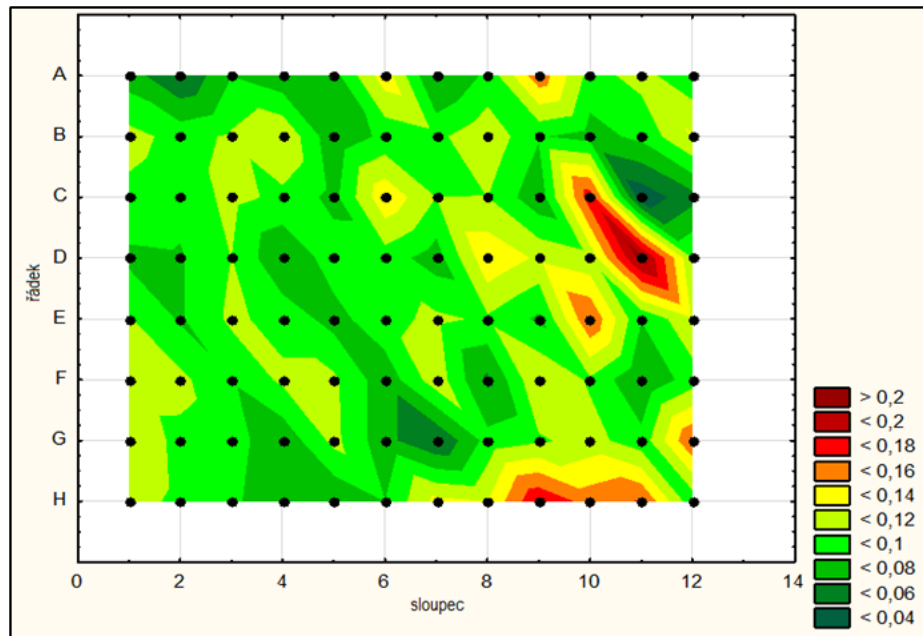


Obr. 38: Graf odhadu střední hodnoty metodou nejmenších čtverců ve sloupcích (Cobas)



Obr. 39: Wafer plot průměrných hodnot všech měření vzhledem k pozici na destičce (Cobas)

Pokud je naopak zanedbán vliv pozice ve sloupci, teplota se vzhledem k pozici v řádku statisticky významně neliší (ANOVA, p-value=0,17374). Jak výsledky ovlivňují odlehle hodnoty je zase vidět na wafer plotu pro směrodatné odchylky, kdy nejnižší naměřené hodnoty se nacházejí na pozicích D11 a H9) (Obr. 40).

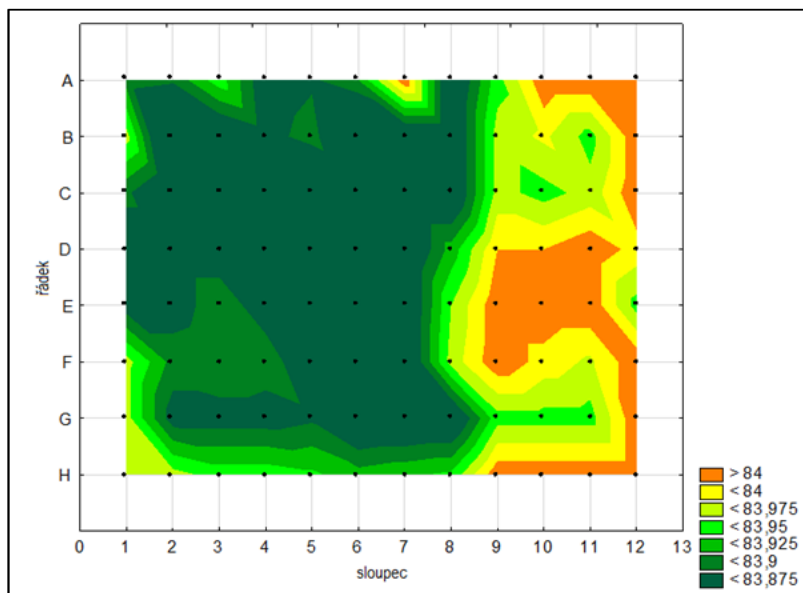


Obr. 40: Wafer plot směrodatných odchylek teplot naměřených teplot (•) vzhledem k pozici na destičce (Cobas)

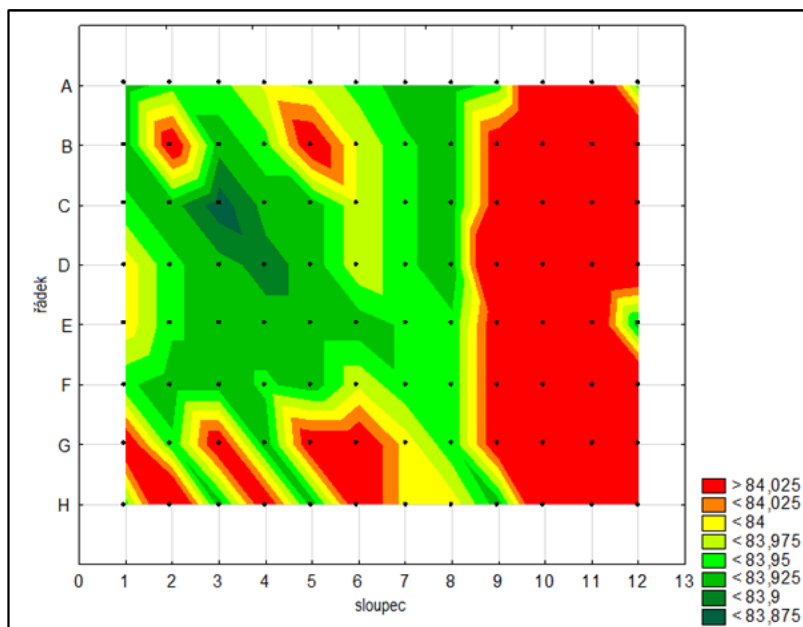
Tento přístroj opět neměl výrobcem uvedeny povolené odchylky, proto nebylo možné zhodnotit splnění parametrů deklarovaných výrobcem. Požadavky pro akreditaci však byly splněny, cyklér nepřesahuje odchylky  $\pm 0,5$  °C.

- **Schéma pipetování**

Pro potvrzení, že schéma pipetování nemá tak velký význam, byly provedeny další pokusy, kde se porovnávalo použití 12kanálové pipety a pipetování po řádcích s použitím 8kanálové pipety a pipetování po sloupcích. Ve wafer plotech z tohoto pokusu (Obr. 41, Obr. 42) lze pozorovat velice podobný teplotní profil – teplota se po mírném poklesu opět zvyšovala směrem doprava.

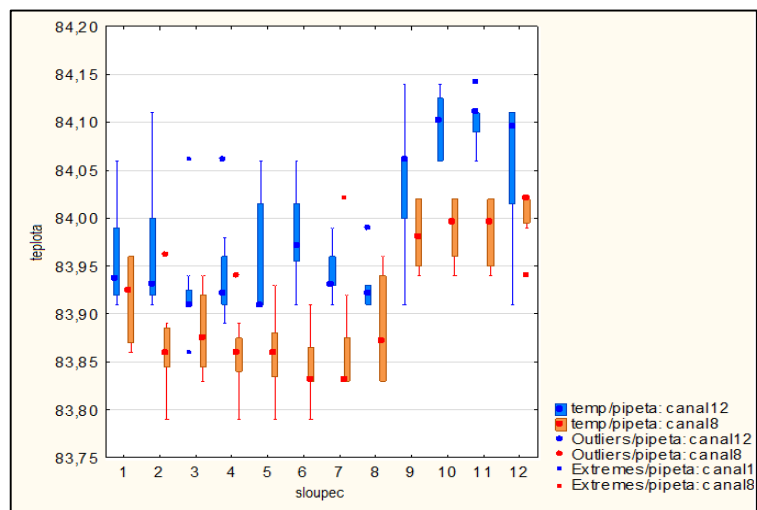


Obr. 41: Wafer plot destičky pipetované 8kanálovou pipetou (LightCycler® 480 II-II)

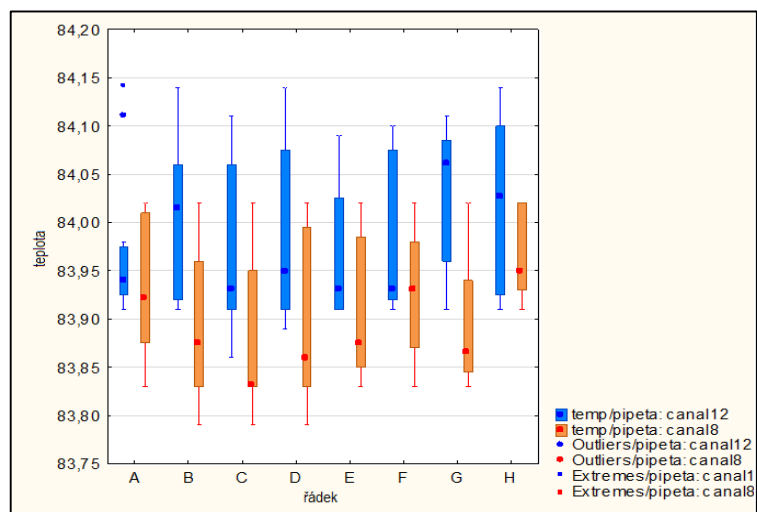


Obr. 42: Wafer plot destičky pipetované 12kanálovou pipetou (LightCycler® 480 II-II)

Tento trend lze pozorovat i v krabicových grafech průměrných teplot ve sloupcích (Obr. 43), zatímco v řádcích (Obr. 44) toto pozorovat nelze. Pro analýzu byl použit Kruskalův-Wallisův test, který odhalil statisticky významný vliv sloupců u obou pipet, takže z toho lze vyvodit, že zde na schématu pipetování opravdu nezáleží.



Obr. 43: Boxplot průměrných teplot ve sloupcích destičky pipetované 12kanalovou (modrá) a 8kanalovou (oranžová) pipetou (LightCycler® 480 II-II)



Obr. 44: Boxplot průměrných teplot v řádcích destičky pipetované 12kanalovou (modrá) a 8kanalovou (oranžová) pipetou (LightCycler® 480 II-II)

**Cíl 2:** Srovnat své výsledky s výsledky kalibrací cykléru, provedenými kalibrační laboratoří.

## Výsledky 2

Jelikož kalibrace cyklérů typu LightCycler® neprovádí v ČR žádná kalibrační laboratoř a firma Roche nabízí „validaci“ cykléru, která je drahá a ČIA na ni nahlíží stejně jako na funkční test provedený samotnou laboratoří, LEM nemá k dispozici výsledky kalibrací cyklérů LightCycler® 480, LightCycler® Nano a Cobas. Jediné kalibrační protokoly k dispozici jsou od firmy GeneTica (BioTech) pro RG 3000™. Při této kalibraci se používá výše zmiňovaný OTV kit a ve výstupním kalibračním protokolu je pouze potvrzen správný chod přístroje pomocí tabulky (Tab. VI):

Tab. VI: Tabulka potvrzení správnosti chodu Rotor-Gene 3000™ vydaná firmou GeneTica (BioTech), pokud přístroj vyhovuje („Conforms“) požadavkům

Temperature	Status
50,0°C	Conforms
75,0°C	Conforms
95,0°C	Conforms

Pokud však přístroj nevyhovuje, je vydána tabulka (Tab. VII) a je třeba přístroj „adjustovat“:

Tab. VII: Tabulka potvrzení správnosti chodu Rotor-Gene 3000™ vydaná firmou GeneTica (BioTech), pokud je vyžadováno upřesnění přístroje („Adjustment Recommended“)

Temperature	Status	Amount
50,0°C	Conforms	
75,0°C	Conforms	
95,0°C	Adjustment Recommended	-0,7°C

V tomto případě se teplota liší o 0,7 °C, což je dle specifikací vyšší než firmou deklarovaná a akreditačním orgánem povolená odchylka 0,5 °C. Tato odchylka se však objevila pouze při měření jedné teploty a nesvědčí nic o uniformitě přístroje, protože toto měření nerozlišuje jednotlivé pozice na rotoru.

Naše měření zase nedetekuje případnou chybu cykléru při určité teplotě a navíc bylo provedeno až 5 let poté, co se tato odchylka objevila. Proto tedy nelze tato dvě měření porovnávat mezi sebou – každým se měří něco jiného.

V případě analýzy teploty tání stejného amplikonu by měla být  $T_m$  DNA ve všech jamkách destičky stejná. Je zde však potřeba zajistit homogenitu pipetovaného roztoku ve všech jamkách, abychom vyřadili další vlivy, které by mohly teplotu v jednotlivých jamkách ovlivnit. Tento problém byl řešen v rámci Cíle 4.

**Cíl 3:** *Srovnat, zda jsou mezi cykléry signifikantní rozdíly.*

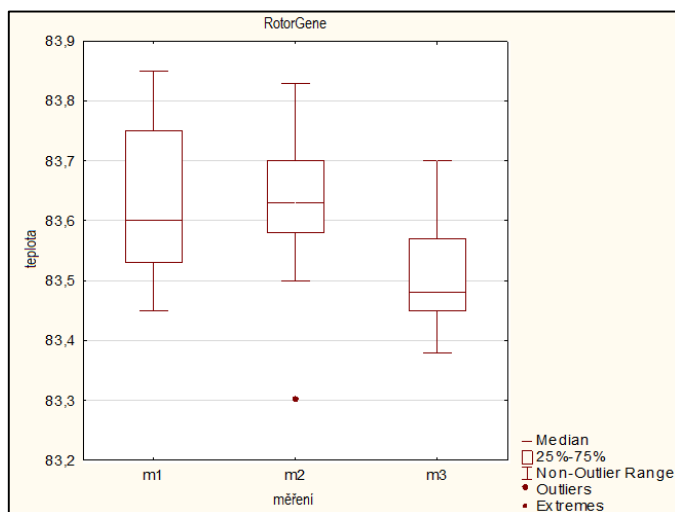
### **Výsledky 3:**

Srovnání mělo smysl provést pro každé měření samostatně. Vzhledem k rozdílné konstrukci přístrojů nelze jako faktor uvažovat pozici jamky, ale pouze typ přístroje. Protože nebyly splněny předpoklady použití analýzy rozptylu (ANOVA) - normalita dat a homoskedasticita (ekvivalence rozptylů), byla data analyzována neparametrickými metodami (Kruskalův-Wallisův test) a následně násobně porovnávána (Tukeyho test). Porovnávány byly přístroje mezi sebou pro jednotlivá měření i tři měření mezi sebou pro každý přístroj.

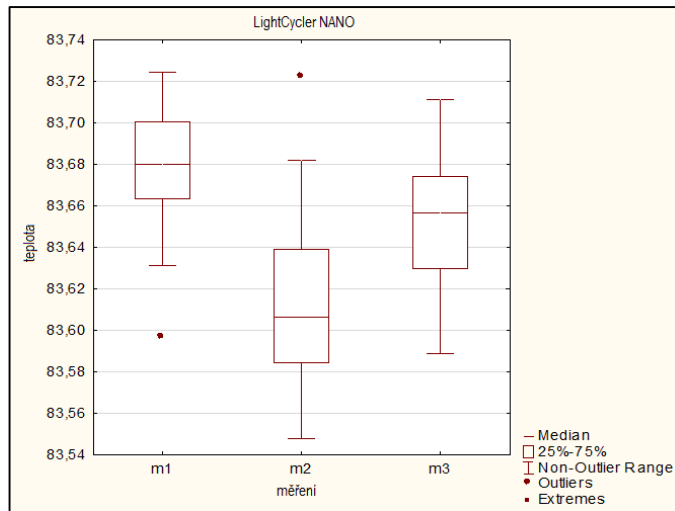
### **Srovnání distribuce teplot pro jednotlivé přístroje vzhledem k pořadí měření**

Kromě přístroje LightCycler<sup>®</sup> 480 II-I (Obr. 47) jsou u všech přístrojů distribuce naměřených teplot statisticky významně mezi jednotlivými měřeními odlišné. Tabulky statistik a násobných porovnání jsou uvedeny v tabulce Cykléry (Příloha 7). Mimo jiné z nich vyplývá, že se liší všechna měření od sebe navzájem pro přístroje LightCycler<sup>®</sup> Nano (Obr. 46), LightCycler<sup>®</sup> 480 II-II (Obr. 48) a COBAS (Obr. 49), jen u přístroje Rotor-Gene 3000<sup>™</sup> (Obr. 45) je významně odlišné pouze 3. měření od ostatních dvou. Odlišnost distribucí teplot mezi měřeními pro jednotlivé přístroje je důvodem, proč pro srovnání přístrojů nebyly hned použity všechny hodnoty (ze všech jamek a ze všech 3 měření), ale nejdříve byla analýza provedena pro každé ze 3 měření samostatně.

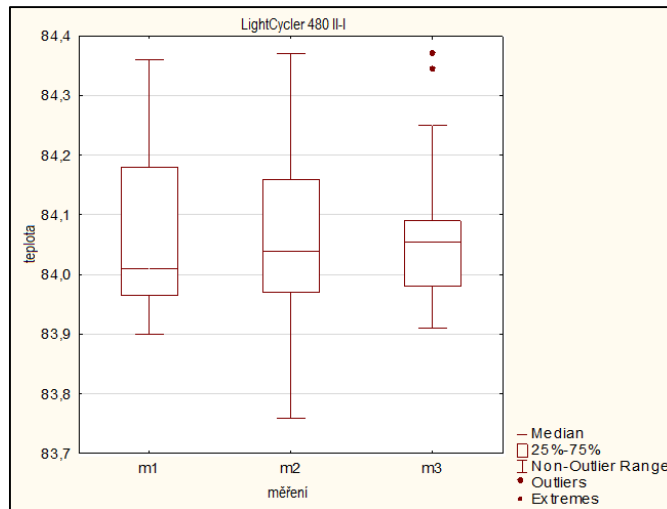
Na listu summaryMM (Příloha 8) jsou souhrnně uvedeny charakteristiky pro rozdělení dat dle přístrojů a měření.



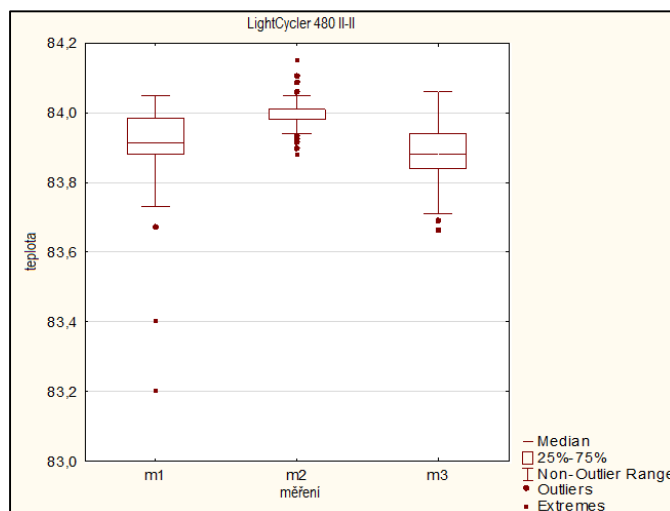
Obr. 45: Krabicový graf naměřených teplot na přístroji RotorGene 3000 ve všech měřeních



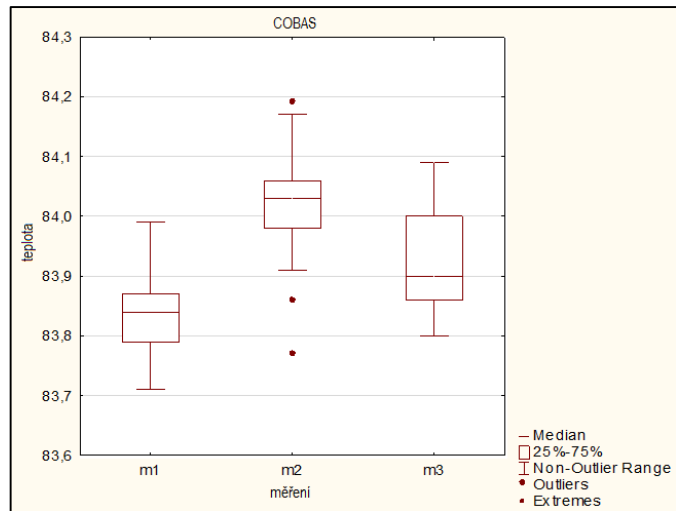
Obr. 46: Krabicový graf naměřených teplot na přístroji LightCycler® Nano ve všech měřeních



Obr. 47: Krabicový graf naměřených teplot na přístroji LightCycler® 480 II-I ve všech měřeních



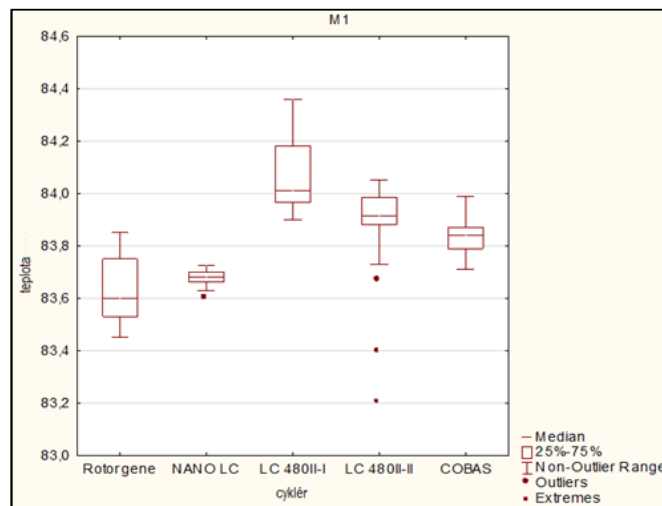
Obr. 48: Krabicový graf naměřených teplot na přístroji LightCycler® 480 II-II ve všech měřeních



Obr. 49: Krabicový graf naměřených teplot na přístroji Cobas ve všech měřeních

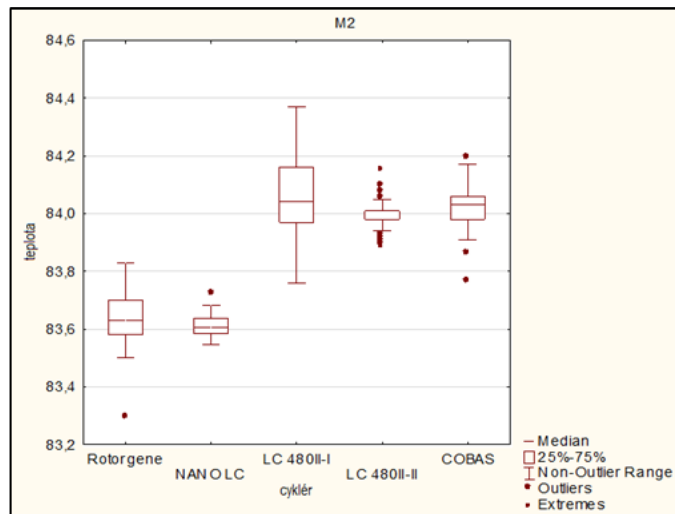
### Srovnání distribuce teplot pro jednotlivá měření

Srovnáním přístrojů ve třech měřeních lze pozorovat odlišnost teploty tání stejného amplikonu v různých přístrojích. Tabulky statistik a násobných porovnání jsou uvedeny v tabulce M123 (Příloha 6). Veškerá měření poskytují statisticky významně odlišné výsledky s následujícími výjimkami: distribuce teplot mezi Rotor-Gene 3000™ a LightCycler® Nano se významně neliší v prvním měření (Obr. 50) - medián je postupně 83,60 a 83,68 °C, v druhém měření (Obr. 51) - medián je postupně 83,63 a 83,60 °C, ani ve třetím (Obr. 52) - medián je postupně 83,48 a 83,66 °C. Ve třetím měření se také neliší Cobas a LightCycler® 480 II-II (medián je postupně 83,90 a 83,88 °C).

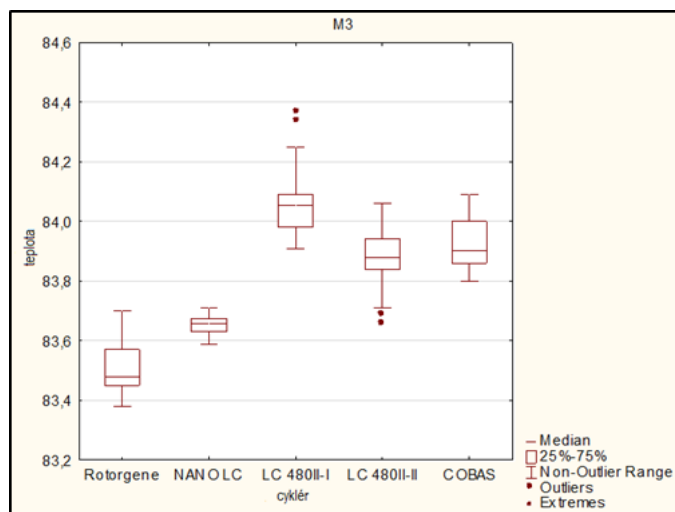


Obr. 50: Krabicový graf naměřených teplot v měření 1 (M1) ve všech přístrojích



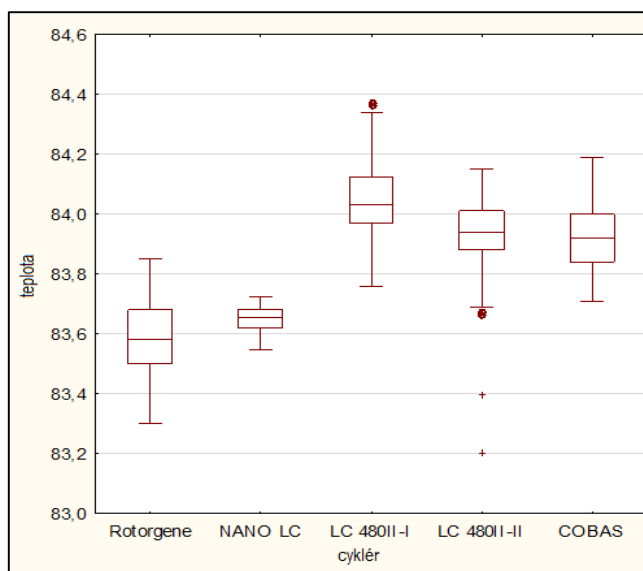


Obr. 51: Krabicový graf naměřených teplot v měření 1 (M2) ve všech přístrojích



Obr. 52: Krabicový graf naměřených teplot v měření 1 (M3) ve všech přístrojích

Pořadí měření nehraje roli při celkovém porovnávání přístrojů, proto byly naměřené teploty ze všech tří měření spojeny do jednoho krabicového grafu (Obr. 53), ze kterého lze pozorovat průměrné rozložení teplot tání stejného amplikonu ve všech přístrojích. Přístroje se mezi sebou statisticky významně liší (Kruskalův-Wallisův test,  $p\text{-value} < 0.0001$ ) s výjimkou srovnání Rotor-Gene 3000™ a LightCycler® Nano (násobné porovnávání, Tukeyho test,  $p\text{-value} = 1$ ).



Obr. 53: Krabicový graf všech cyklérů ze všech tří měření dohromady

Pro porovnání cyklérů mezi sebou bylo jako měřítko zvoleno IQR (mezikvartilové rozpětí, 3. minus 1. kvartil), což znamená oblast krabicového grafu, kde se vyskytuje 50 % hodnot nejbližších mediánu (střední hodnota, 2. kvartil). Z tohoto hodnocení nejlépe vyšel LightCycler® Nano (Tab. VIII), který měl průměrné IQR nejnižší. Těsně ho následoval LightCycler® 480 II-II, poté Cobas, Rotor-Gene3000™ a poslední byl LightCycler® 480 II-I.

Druhým parametrem pro hodnocení byl zvolen rozdíl naměřeného maxima a minima, což definuje uniformitu. Z tohoto hodnocení nejlépe vyšel opět LightCycler® Nano. Následoval ho Cobas, poté Rotor-Gene3000™, LightCycler® 480 II-II a těsně posledním byl LightCycler® 480 II-I.

Tab. VIII: Hodnocení termocykléru od nejnižší variability (°C)

	Q25	Medián	Q75	IQR	pořadí	Min	Sm. odch.	Max	Max-Min	pořadí
RG 3000™	83,52	83,57	83,67	0,15	4	83,38	83,59	83,79	0,42	3
LC® Nano	83,63	83,65	83,67	0,05	1	83,58	83,65	83,72	0,14	1
LC® 480 II-I	83,97	84,04	84,14	0,17	5	83,86	84,06	84,37	0,51	5
LC® 480 II-II	83,90	83,94	83,98	0,08	2	83,58	83,93	84,09	0,51	4
COBAS	83,88	83,92	83,98	0,10	3	83,76	83,93	84,09	0,33	2

Q25 – první kvartil, dělí 25 % nejnižších hodnot od 75 % nejvyšších

medián – druhý kvartil, dělí 50 % nejnižších hodnot od 50 % nejvyšších

Q75 – třetí kvartil, dělí 75 % nejnižších hodnot od 25 % nejvyšších

IQR – mezikvartilové rozpětí, rovno  $Q75 - Q25$

**Cíl 4:** *Vytvořit prototyp kalibrační soupravy, která by byla přenosná a standardizovaná (která by odstranila chybu pipetování ze zdrojů nejistoty měření).*

Pro vytvoření takovéto kalibrační soupravy je třeba mít opravdu homogenní směs ve všech zkumavkách, aby byla jistota, že změny nejsou ovlivněny nehomogenitou směsi a pipetováním takovéto směsi. Pokusy na porovnávání cyklérů byly prováděly s klasicky vytvořeným master mixem s DNA pro PCR běžně využívanou v laboratoři. Takovýto postup dává uspokojujivé výsledky a je schválen akreditačním institutem. Pokud však chceme být přesnější co se týče homogenity rozložení reakční směsi do jednotlivých jamek, je lepší využít již amplifikovaný úsek, který je ve směsi v mnohonásobném nadbytku a proto je jednodušší ho do jamek rozdělit rovnoměrně. Může však docházet k degradaci DNA nebo k interferenci fluorescenčního signálu s některou z použitých složek směsi, proto je otázka, zda amplikon před pipetováním do jednotlivých jamek přechistit, nebo lze pouze rozpipetovat.

Proto byly porovnávány dva způsoby přípravy kalibrační soupravy a následně testovány po různých časových intervalech (viz Laboratorní protokol).

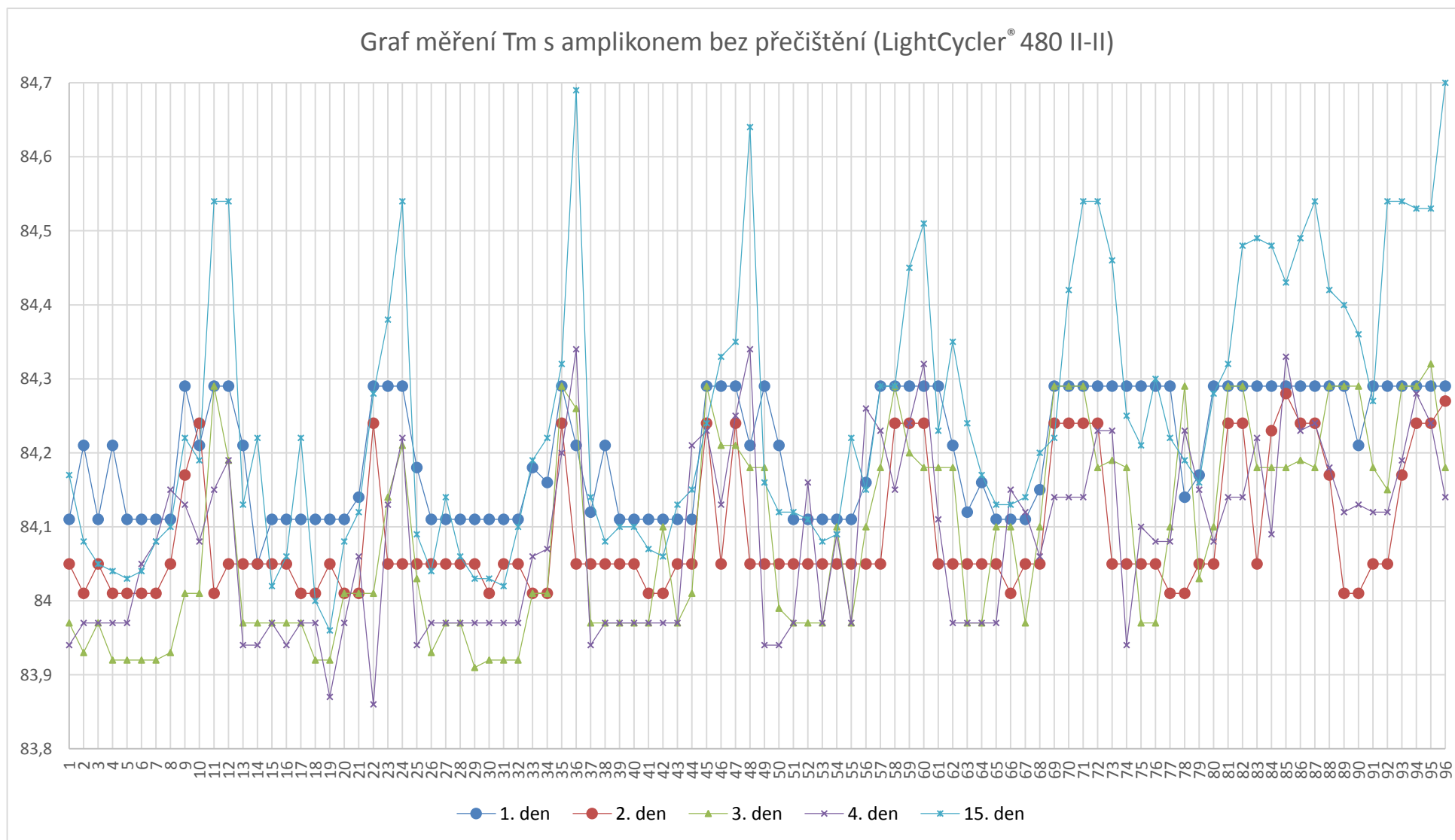
#### **Výsledky 4:**

Co se týče prototypu kalibrační soupravy připraveného bez přečištění (Graf 1), lze pozorovat občasné výkyvy v teplotě jednotlivých jamek. Jamky viditelně odpařené byly z hodnocení vyřazeny. Od 22. dne od přípravy destičky začaly výkyvy přesahovat výrobcem povolenou odchylku od průměru  $\pm 0,5$  °C (Tab. IX), což by již znamenalo falešnou pozitivitu našeho „kalibračního“ systému. Znamenalo by to, že termocyklér nesplňuje požadavek uniformity a nevyhovuje specifikacím. Jelikož se teploty v jamkách výrazně mění s časem a nekorelují spolu při jednotlivých měřeních, tento způsob přípravy prototypu kalibrační soupravy nelze označit jako vhodný.

Tab. IX: Tabulka průměrných  $T_m$  a z nich vypočtených údajů pro prototyp bez přečištění

	1. den	2. den	3. den	4. den	15. den	22.den_A	22.den_B	30. den	36. den
Průměr	84,20	84,09	84,09	84,08	84,25	84,33	84,40	84,60	84,82
Sm. odch.	0,08	0,09	0,13	0,12	0,18	0,24	0,24	0,25	0,25
Minimum	84,05	84,01	83,91	83,86	83,96	84,01	84,05	84,16	84,18
Maximum	84,29	84,28	84,32	84,34	84,70	85,42	85,32	85,35	85,52
Min-průměr	0,15	0,08	0,18	0,22	0,29	0,32	0,35	0,44	0,64
Max-průměr	0,09	0,19	0,23	0,26	0,45	1,09	0,92	0,75	0,70

Graf 1: Závislost naměřené teploty v jednotlivých jamkách LightCycler® 480 II-II na pozici v na destičce (1., 2., 3., 4. a 15. den) bez přečištění

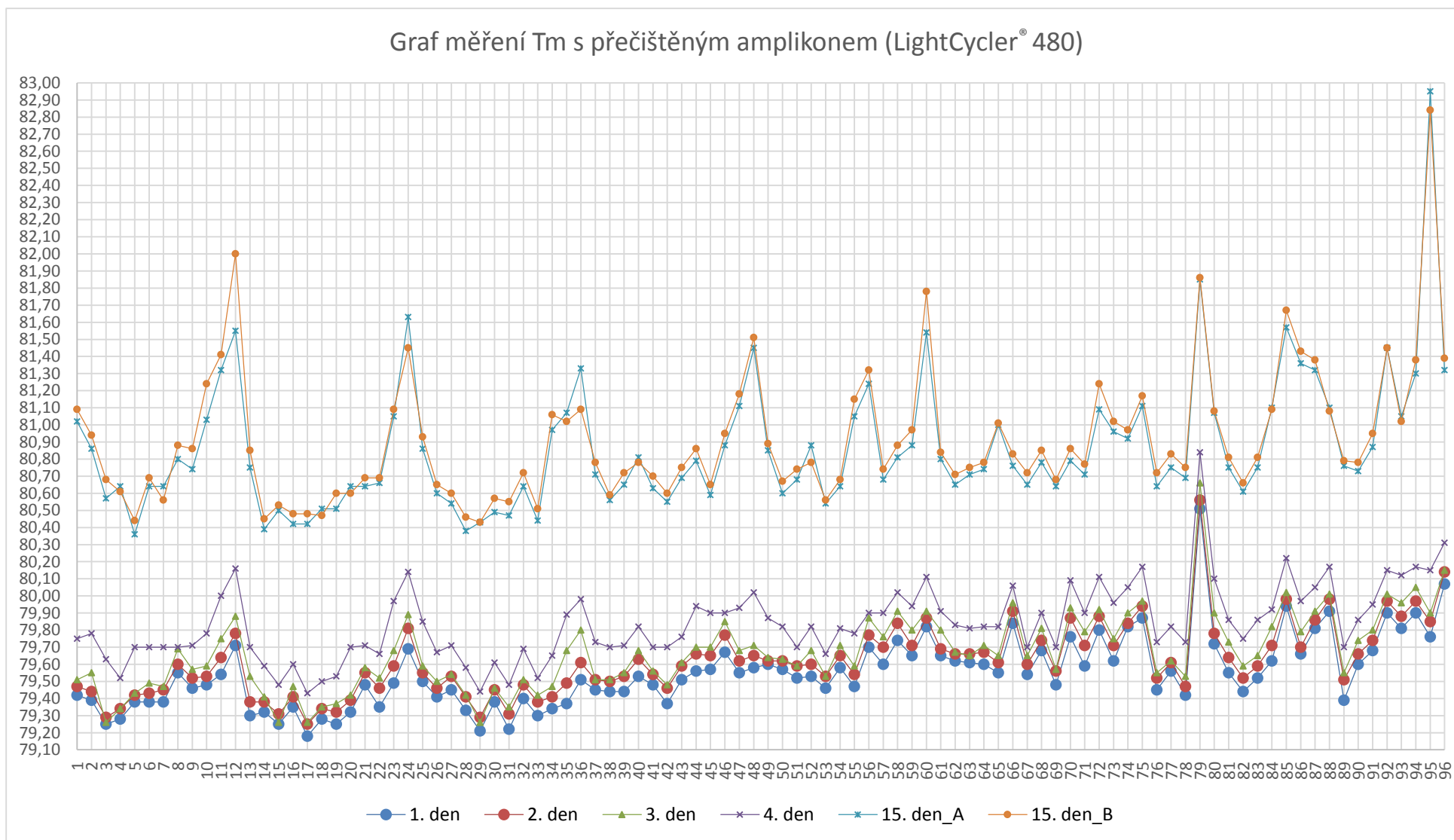


Co se týče prototypu kalibrační soupravy připraveného s přečištěním (Graf 2), lze také pozorovat občasné výkyvy v teplotě jednotlivých jamek. Jamky viditelně odpařené byly opět z hodnocení vyřazeny. Již od 1. dne od přípravy destičky přesahovaly výrobcem povolenou odchylku  $\pm 0,5$  °C (Tab. X), což by již znamenalo, že termocyklér nesplňuje uniformitu a nevyhovuje specifikacím. Oproti prototypu bez přečištění však běhy po sobě následující měly stále stejný trend, pouze se průměrná hodnota s každým dnem zvyšovala. Tento způsob přípravy prototypu kalibrační soupravy opět nelze označit jako plně vhodný.

Tab. X: Tabulka průměrných  $T_m$  a z nich vypočtených údajů pro prototyp s přečištěním

	1. den	2. den	3. den	4. den	15.den_A	15.den_B	22. den	30. den	36. den
Průměr	79,55	79,62	79,67	79,84	80,86	80,91	81,70	82,87	83,82
Sm. odch.	0,21	0,21	0,22	0,22	0,38	0,38	0,43	0,72	0,98
Minimum	79,18	79,25	79,26	79,43	80,36	80,43	81,09	81,98	82,72
Maximum	80,51	80,56	80,66	80,84	82,95	82,84	83,83	85,39	87,41
Min-průměr	0,37	0,37	0,41	0,41	0,50	0,48	0,61	0,89	1,10
Max-průměr	0,96	0,94	0,99	1,00	2,09	1,93	2,13	2,52	3,59

Graf 2: Závislost naměřené teploty v jednotlivých jamkách LightCycler® 480 II-II na pozici v na destičce (1., 2., 3., 4. a 2x 15. den) s přečištěním



## 7 DISKUZE

Při hodnocení cyklérů metodou analýzy teploty tání stejného amplikonu byla zjištěna variabilita teploty v jednotlivých jamkách. Cykléry vykazovaly variabilitu v teplotním profilu, v rozptylu hodnot v rámci destičky (rotoru) i v průměrné teplotě. U Peltierových termocyklérů bylo předpokládáno, že rozmístění teplot v jednotlivých jamkách bude korelovat s tvarem vyhřívače v destičce, tzn. že nejteplejší jamky budou uprostřed destičky a po okrajích budou jamky chladnější. Tato hypotéza však potvrzena nebyla, jak je zobrazeno pomocí wafer plotů. U některých cyklérů se teplota zvyšuje ve sloupcích směrem doprava (viz LightCycler® 480 II-II a Cobas), u některých naopak (LightCycler® Nano, LightCycler® 480 II-I). Zde by se dalo namítnout, že se tímto způsobem projevuje schéma pipetování. Jelikož však byly všechny 96jamkové desky pipetovány stejným postupem, tzn. 12kanálovou pipetou shora dolů, musely by mít při měření naší metodou stejný teplotní profil (například LightCycler® 480 II-I a LightCycler® 480 II-II), což se neprokázalo. Další pokusy, které porovnávaly použití 12kanálové pipety (a pipetování po řádcích) s použitím 8kanálové pipety (a pipetování po sloupcích) ukázaly, že teplotní profil není pipetovacím schématem ovlivněn a stále dochází k mírnému snížení teploty směrem doprava, následovanému jejím zvýšením.

U přístroje Rotor-Gene 3000™ byla pomocí našeho měření zjištěna homogenita horší než bylo deklarováno výrobcem. Příčinou rozdílu by mohlo být, že mastermix nebyl do zkumavek v rotoru pipetován multikanálovou pipetou, ale jednotlivě, takže pipetování trvalo delší dobu než u 96jamkových destiček. Neukázal se však trend, který by naznačoval postupnou degradaci mastermixu nebo nárůst nežádoucích jevů ve zkumavce (vznik sekundární struktury, nespecifická aktivita *Taq* polymerázy při pokojové teplotě) v průběhu pipetování. Pokud by se jednalo o nehomogenitu směsi, tzn. že by pokaždé byly do špičky nabrány nestejně koncentrace složek, tak by se obdobný jev projevil i u destičkového cykléru LightCycler® Nano.

Z porovnávání cyklérů mezi sebou pomocí mezikvartilového rozpětí nejlépe vyšel LightCycler® Nano (Tab. VIII), který měl průměrné IQR nejnižší. Těsně ho následoval LightCycler® 480 II-II, poté Cobas, Rotor-Gene 3000™ a poslední byl LightCycler® 480 II-I. Pokud však byly cykléry porovnány z hlediska naměřeného minima a maxima (a jejich rozdílu), pořadí bylo pozměněné - opět „vyhrál“ LightCycler NANO, za ním se však umístil Cobas, poté Rotor-Gene 3000™ a nakonec v těsném závěsu za sebou LightCycler® 480 II-II a LightCycler® 480 II-I. Z těchto údajů lze vyčíst, že celkově nejlepším cyklérem byl LightCycler® Nano. Dalo by se polemizovat, že LightCycler® Nano má malý počet jamek a z toho vyplývá rychlé pipetování

jednokanálovou pipetou a nasazení reakce do cykléru. Nicméně vliv pipetování se neprojevil v žádném z našich pokusů.

Ve studii porovnávání termocyklérů z roku 2007 (Herrmann a kol., 2007) autoři hodnotili 16 přístrojů stejnou metodou - analýzou křivky tání, ale pouze dva přístroje, Rotor-Gene 3000™ a LightCycler® 480 byly shodné s námi použitými. U přístroje Rotor-Gene 3000™ naměřili teplotní rozptyl 0,19 °C. Ani tato hodnota nespĺňuje parametry deklarované výrobcem, ale je podstatně lepší než námi naměřené rozpětí hodnot 0,42 °C. Tento rozdíl lze odůvodnit extrémními hodnotami, které se v případě Rotor-Gene 3000™ občas vyskytovaly v průběhu našich měření.

U přístroje LightCycler® 480 Herrmann a kol. (2007) naměřili rozpětí hodnot 0,64 °C. V případě našich cyklérů LightCycler® 480 II-I a LightCycler® 480 II-II byly hodnoty okolo 0,51 °C, což je hodnota srovnatelnější, než v případě našeho a Herrmannova měření Rotor-Gene 3000™. Pokud se však zaměříme na teplotní profil celé 96jamkové destičky, jsou teplotní mapy našeho měření (Obr. 28 a Obr. 34) rozdílné od mapy zmíněné studie (Obr. 13). Takže by se dalo potvrdit tvrzení ze začátku této práce, že přístroje stejných výrobců i stejného typu se navzájem mezi sebou liší v teplotním profilu i v uniformitě.

Nemůžeme potvrdit tvrzení Herrmanna a kol. (2007), že směrodatná odchylka průměrných teplot cyklérů založených na cirkulaci vzduchu je výrazně nižší než u cyklérů Peltierových. V našem případě je výrazně lepší přístroj LightCycler® Nano než Rotor-Gene 3000™. Je možné, že vývoj Peltierových cyklérů od roku 2007 pokročil natolik, že LightCycler® Nano a Cobas předčí svými parametry námi použitý Rotor-Gene 3000™, který již může mít opotřebením zhoršené parametry, než byly původně. Navíc již existuje nový typ karuselového cykléru s cirkulací vzduchu, Rotor-Gene Q, který by již pravděpodobně vykazoval vyšší teplotní uniformitu. Tento cyklér jsme však neměli pro testování k dispozici.

Referenční metoda k porovnání našich výsledků by mohla být například MTAS (Mobile Temperature Acquisition System). Obdobné srovnání mezi měřeními teploty tání ve všech jamkách a výběrovým měřením 15 sondami v 15 jamkách použili ve své studii Von Keyserling a kol. (2011). Přestože teploty spolu korelovaly, určení nejteplejší či nejchladnější pozice se lišilo, což je dáno designem pokusu, kdy metoda MTAS neměří všechny jamky. To jen potvrzuje, že pro určení teplotních neuniformit je nutno měřit všechny jamky, aby bylo možno správně nakalibrovat přístroj.

Naše měření jsme mohli porovnat s externím měřením jen u přístroje Rotor-Gene 3000™, který byl OTV Kitem otestován firmou GeneTica (BioTech). OTV Kit měří stejně jako v našem



případě teplotu ve všech jamkách, měří však ve třech různých teplotách. V průběhu servisních testování cykléru Rotor-Gene 3000<sup>TM</sup> se stalo pouze v jednom případě, že nastavená teplota 95 °C nekorelovala s naměřenými hodnotami, tj. byla odchýlena o 0,7 °C (Tab. VII). Tato hodnota je však míněna pro všechny jamky – předpokládá se uniformita. Navíc je v OTV Kitu zaručena homogenita obsahu jamek rotoru, proto se v tomto testu nerozlišuje pozice v jamce. Proto nemůžeme dělat závěry z neschopnosti naší metody tuto odchýlenou hodnotu odhalit - každá metoda měří něco jiného.

Při vytváření prototypu kalibrační soupravy byla homogenita obsahu jamek zaručena rozpipetováním amplikonu. Stabilita výsledků měřených naším systémem byla testována opakováním programu „Melting“ s časovým odstupem a skladováním destičky ve tmě a při pokojové teplotě. V prvním případě, kdy směs nebyla před rozpipetováním přečištěna, teplota tání DNA v jednotlivých jamkách byla první 4 dny poměrně stabilní, poté začala narůstat (Graf 1) – začaly se objevovat extrémní hodnoty - pravděpodobně vypařováním některých jamek. Z toho se dá usoudit, že dřívější pokusy nedostatečně stanovily potřebnou tloušťku vrstvy parafinu (10 µl). Pokusy, které nejsou součástí této práce, však také ukázaly, že větší vrstva parafinu (např. 20 µl) nijak neovlivnila výšku píku ani  $T_m$ , proto by se měla používat zesílená vrstva nebo vrstva z jiného materiálu. Pokud by při pokojové teplotě docházelo k postupné degradaci DNA, tak by se jinak úzký pík tání rozšířil a jeho hodnota stala nejednoznačnou. Tento jev jsme však nepozorovali.

Teploty v jamkách se výrazně měnily s časem a nekorelovaly spolu při jednotlivých měřeních. Směrodatná odchylka se s postupem času zvyšovala, 36. den měření však byla pouze 0,25 °C (Tab. IX).

V druhém případě, kdy směs byla před rozpipetováním přečištěna, se teplota měnila ve stejném trendu (vždy však v každé jamce rostla - Graf 2) dokonce i po 36 dnech. To znamená, že ve všech jamkách se projevuje stejný fenomén (obsah jednotlivých jamek je stabilní vůči ostatním). Směrodatná odchylka však byla u přečištěných amplikonů od začátku vyšší (Tab. X), dokonce se hned první den měření blížila odchylce 36. dne měření prvního prototypu.

Tyto experimenty 4. cíle by se daly uzavřít tak, že je pravděpodobně třeba použít větší množství překryvného parafinu nebo vymyslet jinou alternativu, aby se obsah jamek nemohl odpařit. Ani jeden z prototypů zatím nelze označit jako vyhovující pro kalibraci teplotní uniformity termocyklérů v delším časovém rozpětí. Z grafu (Graf 2) můžeme usoudit, že přečištěním se mastermix stabilizuje – jsou odstraněny vlivy, které způsobují náhodné změny v jamkách při opakovaných měřeních. Co se však týče směrodatné odchylky, byla hned od začátku měření

větší než u nepřečištěné směsi. To mohlo být způsobeno přidáním 10 x PCR pufru a barviva EvaGreen až po přečištění a jejich nedostatečného promíchání a tím pádem nerovnoměrného rozdělení do jednotlivých jamek. Dostatečné promíchání, tzn. lepší homogenizace, může být snazší při zvýšení objemu v jamkách. Také by bylo možné zvážit využití systému jako jednorázovou pomůcku k okamžitému použití: Reakční směs by byla připravena dle návodu s přečištěním (je stabilnější) a následným přidáním 10 x PCR pufru a barviva EvaGreen. Po řádném promíchání by se pipetovalo do stripu 12 zkumavek. Pro zajištění lepší homogenity by se tedy pipetoval vyšší objem a také by se mohla zkumavka s reakční směsí po napipetování každé jamky promíchat. Následně by směs byla teprve rozpipetována do celé destičky a překryta prafinem. Pro lepší stabilitu by se směs mohla zamrazit nebo nechat při pokojové teplotě, v tomto případě by však pravděpodobně měla nižší trvanlivost – postupem času by nejspíše směs v destičce degradovala.

## 8 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla testována teplotní uniformita termocyklérů umístěných v Laboratoři experimentální medicíny (ÚMTM). Testování bylo prováděno pomocí analýzy teploty tání stejného amplikonu.

Bylo potvrzeno, že všechny termocykléry této laboratoře splňují požadavky na akreditované metody. Některé termocykléry však nesouhlasí s parametry deklarovanými výrobcem.

Při porovnání termocyklérů mezi sebou se ukázalo, že se liší svým teplotním rozptylem, teplotním profilem a uniformitou (podle IQR z měření nejlépe vyšel LightCycler<sup>®</sup> Nano, těsně ho následoval LightCycler<sup>®</sup> 480 II-II, poté Cobas, Rotor-Gene 3000<sup>™</sup> a poslední byl LightCycler<sup>®</sup> 480 II-I; z hlediska celkového rozptylu bylo pořadí LightCycler<sup>®</sup> Nano, Cobas, Rotor-Gene 3000<sup>™</sup>, LightCycler<sup>®</sup> 480 II-II a LightCycler<sup>®</sup> 480 II-I).

Byly navrženy prototypy kalibrační soupravy, která by byla přenosná a odstranila by chybu pipetování. Prototyp byl připraven a opakovaně testován po dobu delší než 1 měsíc. Ukázalo se, že opakované použití kalibrační soupravy vede ke zkresleným výsledkům, nejspíše způsobeným odparem reakční směsi. Pokud by kalibrační souprava měla sloužit pro opakované použití, tak je třeba vyzkoušet větší vrstvu parafinu v jamkách, anebo zkoušet další možnosti přípravy soupravy.

## 9 LITERATURA

- ECKERT, K.A., KUNKEL, T.A.: DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl.*, 1991;1(1):17-24.
- GUNDRY, C.N., VANDERSTEEN, J.G., REED, G.H., PRYOR, R.J., CHEN, J., WITTWER, C.T.: Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for diferentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*, 2003;49(3):369-406.
- HECKER, K.H., ROUX, K.H.: High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*, 1996;20(3):478-85.
- HERRMANN, M.G., DURTSCHI, J.D., WITTWER, C.T., VOELKERDING, K.V.: Expanded instrument comparision of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem*, 2007;53(8):1544-8.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH P.S., GRIFFITH, R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*, 1992;10(4):413-7.
- KENNEDY, S., OSWALD, N.: PCR troubleshooting: the template DNA. In: KENNEDY, S., OSWALD, N.: PCR troubleshooting and optimizatou: the essential guide. Caister Academic Press, 2011.
- LI, M., ZHOU, L., PALAIS, R.A., WITTWER, C.T.: Genotyping accuracy of high-resolution DNA melting instruments. *Clin Chem*, 2014;60(6):864-72.
- MACKAY, I.M.: Polymerase chain reaction and respiratory viruses. In: BUSTIN, S.A.: The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications. New York: Cambridge University Press, 2010.

- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986;51 Pt 1:263-73.
- RIRIE, K.M., RASMUSSEN, R.P., WITTEWER, C.T.: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 1997;245(2):154-60.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988;239(4839):487-91.
- SAUNDERS, G.C., DUKES, J., PARKES, H.C., CORNETT, J.H.: Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses. *Clin Chem*, 2001;47(1):47-55.
- SLUIJTER, J.P.G., SMEETS, M.B., PASTERKAMP, G., DE KLEIJN, D.P.V.: Methods in molecular cardiology: quantitative real-time polymerase chain reaction. *Neth Heart J*, 2003;11(10):401-4.
- SPAN, M., VERBLAKT, M., HENDRIKX, T.: Thermocycler Calibration and Analytical Assay Validation. In: NOLAN, T, BUSTIN, S.A.: PCR Technology: Current Innovations, Third Edition. Florida: CRC Press, 2013.
- SUYAMA, T., KAWAHARASAKI, M.: Decomposition of waste DNA with extended autoclaving under unsaturated steam. *Biotechniques*, 2013;55(6):296-9.
- STRACHAN, T., READ, A.P.: PCR, DNA sequencing and *in vitro* mutagenesis. In: STRACHAN, T., READ, A.P.: Human Molecular Genetics. 2nd edition. New York: Wiley-Liss, 1999.

VON KEYSERLING, H., BERGMANN, T., WIESEL, M., KAUFMANN, A.M.: The use of melting curves as a novel approach for validation of real-time PCR instruments. *Biotechniques*, 2011;51(3):179-84.

WILLIAMS, M.: Real-time polymerase chain reaction. In: BUSTIN, S.A.: *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*. New York: Cambridge University Press, 2010.

WITTWER, C.T., HERRMANN, M.G., MOSS, A.A., RASMUSSEN, R.P.: Continuous florescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 1997;22(1):130-1, 134-8.

WITTWER, C.T., KUSUKAWA, N. (2004): Real-time PCR. In: PERSING, D.H.: *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington, D.C.: ASM Press, c1993.

WITTWER, C.T., RASMUSSEN, R.P., RIRIE, K.M.: Rapid polymerase chain reaction and melting analysis. In: BUSTIN, S.A.: *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*. New York: Cambridge University Press, 2010.

WITTWER, C.T., REED, G.H., GUNDRY, C.N., VANDERSTEEN, J.G., PRYOR, R.J.: High-resolution melting genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*, 2003;49(6 Pt 1):853-60.

WITTWER, C.T., RIRIE, K.M., ANDREW, R.V., DAVID, D.A., GUNDRY, R.A., BALIS, U.J.: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 1997;22(1):176-81.

ČSN EN ISO 15189

ČSN EN ISO/IEC 17025

Manuál Cobas 4800 System

Manuál LightCycler® 480 System

Manuál LightCycler® Nano System

Manuál Rotor-Gene 3000™

Rotor-Disc OTV Handbook

<http://bitesizebio.com>

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>

<http://lifescience.roche.com>

<http://primerdigital.com/fastpcr.html>

<http://usdiagnostics.roche.com>

<http://www.apa.org>

<http://www.bio-rad.com>

<http://www.bipm.org>

<http://www.cai.cz>

<http://www.cyclertest.com>

[http://www.globalspec.com/learnmore/labware\\_scientific\\_instruments/thermal\\_processing/thermal\\_cyclers](http://www.globalspec.com/learnmore/labware_scientific_instruments/thermal_processing/thermal_cyclers)

<http://www.hpv16and18.com>

<http://www.qiagen.com>

<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/14354/title/High-Throughput-Thermocyclers/>

<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/19131/title/Up-On-Blocks--A-Profile-Of-Thermal-Cyclers-With-Interchangeable-Blocks/>

<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/24547/title/Mr--Cycle--An-Automated-PCR-Prototype/>

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Dusíkatá báze adenin
ANOVA	Analýza rozptylu - „Analysis of variance“
bp	Párů bází - „Base-pair“
C	Dusíkatá báze cytosin
CCD	Zařízení s vázanými náboji - „Charge-coupled device“
CNV	Variabilita počtu kopií - „Copy-number variation“
CPS1	Karbamoylfosfát syntasa - „Carbamoyl-phosphate synthase 1“
ČSN	Česká technická norma (dříve Československá norma)
EN	Evropská norma
DNA	Deoxyribonukleová kyselina - „Deoxyribonucleic acid“
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát - „Deoxyribonucleotide triphosphate“
dsDNA	Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina - „Double-stranded deoxyribonucleic acid“
FRA	Fragilní
FRET	Rezonanční přenos fluorescenční energie - „Fluorescence Resonance Energy Transfer“
G	Dusíkatá báze guanin
GST	Glutathion-S-transferáza
HBB	Hemoglobin beta, beta-globin - „Hemoglobin-beta“
HRM	Tání s vysokým rozlišením - „High Resolution Melting“
HSD	„Honest Significant Difference“
IEC	Mezinárodní elektrotechnická komise - „International Electrotechnical Commission“
IQR	Mezikvartilové rozpětí – „Interquartile range“
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci – „International Organization of Standardization“
LC	LightCycler



LED	Dioda emitující světlo - „Light-Emitting Diode“
LEM	Laboratoř experimentální medicíny
MG	Řada vzorků laboratoře molekulární genetiky
MGB	Sonda vázající se do malého žlábků - „Minor groove binder“
MTAS	Mobilní systém získání teploty - „Mobile Temperature Acquisition System“
OTV	Optická teplotní verifikace - „Optical temperature verification“
PCR	Polymerázová řetězová reakce - „Polymerase-chain reaction“
PM	Primerová směs - „Primer Mix“
PMT	Fotonásobič - „Photomultiplier tube“
Q (25, 75)	Kvartil - „Quartile“
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase - „Quantitative real-time polymerase-chain reaction“
RFLP	Délkový polymorfismus restrikčních fragmentů - „Restriction fragment length polymorphism“
rfu	Relativní fluorescenční jednotky - „Relative fluorescence units“
RG	Rotor-Gene
RNA	Ribonukleová kyselina - „Ribonucleic acid“
ROX	Pasivní referenční barva - „Carboxy-X-Rhodamine“
SI	Mezinárodní soustava jednotek - „Le Système International d'Unités“
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus - „Single Nucleotide Polymorphism“
T	Dusíkatá báze thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticum</i>
TLC	Termochromické tekuté krystaly - „Thermochromic Liquid Crystals“
T <sub>m</sub>	Teplota tání (DNA) - „Melting temperature“
U	Dusíkatá báze uracil
ÚMTM (IMTM)	Ústav molekulární a translační medicíny - „Institute of Molecular and Translational Medicine“

# 11 PŘÍLOHY

Příloha 1: Rotor-Gene 3000™

Pozice	m1	m2	m3	průměr	Sm. od.
A1	83,8	83,58	83,68	83,69	0,11
A2	83,5	83,58	83,65	83,58	0,08
A3	83,7	83,58	83,6	83,63	0,06
A4	83,53	83,3	83,53	83,45	0,13
A5	83,73	83,55	83,62	83,63	0,09
A6	83,55	83,55	83,48	83,53	0,04
A7	83,65	83,57	83,5	83,57	0,08
A8	83,52	83,62	83,45	83,53	0,09
B1	83,47	83,57	83,52	83,52	0,05
B2	83,55	83,55	83,53	83,54	0,01
B3	83,5	83,58	83,45	83,51	0,07
B4	83,5	83,57	83,53	83,53	0,04
B5	83,5	83,55	83,7	83,58	0,1
B6	83,63	83,6	83,63	83,62	0,02
B7	83,57	83,53	83,58	83,56	0,03
B8	83,5	83,55	83,47	83,51	0,04
C1	83,48	83,52	83,65	83,55	0,09
C2	83,45	83,65	83,65	83,58	0,12
C3	83,5	83,6	83,6	83,57	0,06
C4	83,6	83,67	83,58	83,62	0,05
C5	83,6	83,6	83,62	83,61	0,01
C6	83,53	83,65	83,55	83,58	0,07
C7	83,58	83,7	83,57	83,62	0,07
C8	83,6	83,68	83,45	83,58	0,12
D1	-	83,6	83,55	83,58	0,04
D2	-	83,5	83,45	83,48	0,04
D3	83,57	83,57	83,45	83,53	0,07
D4	83,73	83,58	83,48	83,6	0,13
D5	83,65	83,63	83,45	83,58	0,11
D6	83,55	83,65	83,48	83,56	0,09
D7	83,55	83,63	83,5	83,56	0,07
D8	83,73	83,65	83,45	83,61	0,14
E1	83,48	83,63	83,48	83,53	0,09
E2	83,7	83,68	83,45	83,61	0,14
E3	83,57	83,6	83,45	83,54	0,08
E4	83,72	83,65	83,48	83,62	0,12

Pozice	m1	m2	m3	průměr	Sm. od.
E5	83,63	83,8	83,48	83,64	0,16
E6	83,6	83,72	83,43	83,58	0,15
E7	83,77	83,72	83,45	83,65	0,17
E8	83,5	83,72	83,52	83,58	0,12
F1	83,62	83,73	83,65	83,67	0,06
F2	83,78	83,72	83,45	83,65	0,18
F3	83,75	83,75	83,4	83,63	0,2
F4	83,75	83,7	83,45	83,63	0,16
F5	83,82	83,78	83,42	83,67	0,22
F6	83,82	83,62	83,45	83,63	0,19
F7	83,83	83,73	83,45	83,67	0,2
F8	83,82	83,7	83,43	83,65	0,2
G1	83,82	83,75	83,5	83,69	0,17
G2	83,52	83,62	83,48	83,54	0,07
G3	83,5	83,6	83,45	83,52	0,08
G4	83,77	83,55	83,48	83,6	0,15
G5	83,82	83,83	83,55	83,73	0,16
G6	83,78	83,7	83,5	83,66	0,14
G7	83,75	83,73	83,48	83,65	0,15
G8	83,77	83,7	83,42	83,63	0,19
H1	83,75	83,7	83,57	83,67	0,09
H2	83,73	83,72	83,47	83,64	0,15
H3	83,7	83,7	83,4	83,6	0,17
H4	83,68	83,75	83,43	83,62	0,17
H5	83,58	83,65	83,53	83,59	0,06
H6	83,58	83,7	83,45	83,58	0,13
H7	83,62	83,62	83,4	83,55	0,13
H8	83,53	83,6	83,45	83,53	0,08
I1	83,85	83,75	83,7	83,77	0,08
I2	83,78	83,72	83,5	83,67	0,15
I3	83,53	83,6	83,38	83,5	0,11
I4	83,52	83,6	83,45	83,52	0,08
I5	83,78	83,63	83,45	83,62	0,17
I6	83,55	83,6	83,67	83,6	0,06
I7	83,52	83,68	83,58	83,59	0,08
I8	83,5	83,55	83,65	83,57	0,08

## Příloha 2: LightCycler® Nano

Pozice	Průměr	Sm. od.
A1	83,71	0,02
A2	83,67	0,02
A3	83,66	0,01
A4	83,65	0,01
A5	83,65	0,03
A6	83,63	0,01
A7	83,63	0,01
A8	83,60	0,01
B1	83,68	0,04
B2	83,66	0,04
B3	83,66	0,03
B4	83,63	0,03
B5	83,64	0,05
B6	83,64	0,05
B7	83,64	0,04
B8	83,60	0,03
C1	83,68	0,04
C2	83,65	0,05
C3	83,66	0,04
C4	83,65	0,01
C5	83,66	0,07
C6	83,63	0,06
C7	83,63	0,05
C8	83,64	0,03
D1	83,69	0,04
D2	83,66	0,06
D3	83,67	0,06
D4	83,62	0,05
D5	83,65	0,06
D6	83,63	0,08
D7	83,64	0,07
D8	83,65	0,06

**Příloha 3: LightCycler® 480 II-I**

Pozice	Průměr	Sm. od.
A1	84,15	0,11
A2	84,07	0,03
A3	84,04	0,03
A4	84,01	0,09
A5	83,97	0,06
A6	83,97	0,06
A7	83,93	0,02
A8	83,88	0,11
A9	84,00	0,04
A10	84,01	0,03
A11	84,05	0,05
A12	84,01	0,02
B1	84,05	0,04
B2	84,10	0,08
B3	84,02	0,10
B4	84,07	0,06
B5	83,94	0,03
B6	83,93	0,02
B7	83,93	0,02
B8	83,93	0,04
B9	84,00	0,04
B10	83,97	0,06
B11	83,97	0,04
B12	83,99	0,04
C1	84,06	0,06
C2	84,06	0,02
C3	84,08	0,10
C4	84,04	0,14
C5	83,91	0,13
C6	83,91	0,02
C7	83,92	0,02
C8	83,97	0,05
C9	83,91	0,13
C10	83,87	0,10
C11	83,96	0,04
C12	83,99	0,04
D1	84,16	0,04
D2	84,18	0,05
D3	84,13	0,07
D4	84,09	0,09
D5	83,99	0,04
D6	83,92	0,13
D7	83,96	0,04
D8	83,91	0,12
D9	84,03	0,04
D10	84,00	0,06
D11	83,98	0,03
D12	83,99	0,03

Pozice	Průměr	Sm. od.
E1	84,22	0,03
E2	84,21	0,01
E3	84,18	0,05
E4	84,16	0,06
E5	84,09	0,06
E6	84,05	0,04
E7	83,96	0,15
E8	84,01	0,00
E9	84,02	0,03
E10	84,01	0,04
E11	83,99	0,04
E12	84,00	0,02
F1	84,27	0,07
F2	84,22	0,02
F3	84,23	0,03
F4	84,19	0,01
F5	84,14	0,06
F6	84,05	0,04
F7	84,10	0,09
F8	84,07	0,09
F9	84,01	0,03
F10	83,95	0,01
F11	83,97	0,04
F12	84,00	0,06
G1	84,36	0,02
G2	84,33	0,04
G3	84,25	0,08
G4	84,25	0,03
G5	84,14	0,05
G6	84,07	0,04
G7	84,04	0,03
G8	84,01	0,04
G9	83,99	0,03
G10	83,92	0,04
G11	84,01	0,04
G12	84,06	0,07
H1	84,36	0,01
H2	84,36	0,02
H3	84,32	0,06
H4	84,33	0,04
H5	84,20	0,02
H6	84,18	0,03
H7	84,14	0,06
H8	84,08	0,02
H9	84,03	0,02
H10	84,06	0,08
H11	84,05	0,04
H12	83,98	0,06



**Příloha 4: LightCycler® 480 II-II**

Pozice	Průměr	Sm. od.
A1	83,87	0,12
A2	83,90	0,09
A3	83,91	0,04
A4	83,92	0,10
A5	83,91	0,09
A6	83,93	0,06
A7	83,71	0,44
A8	83,86	0,17
A9	83,99	0,01
A10	83,99	0,05
A11	84,03	0,03
A12	84,01	0,01
B1	83,89	0,05
B2	83,91	0,10
B3	83,87	0,14
B4	83,92	0,05
B5	83,90	0,11
B6	83,92	0,08
B7	83,88	0,03
B8	83,94	0,06
B9	83,99	0,02
B10	84,01	0,04
B11	83,92	0,12
B12	84,01	0,00
C1	83,84	0,13
C2	83,91	0,06
C3	83,88	0,01
C4	83,91	0,06
C5	83,91	0,09
C6	83,88	0,09
C7	83,88	0,04
C8	83,92	0,05
C9	83,98	0,01
C10	83,90	0,12
C11	83,97	0,05
C12	84,01	0,04
D1	83,89	0,03
D2	83,93	0,07
D3	83,92	0,06
D4	83,84	0,16
D5	83,92	0,08
D6	83,91	0,06
D7	83,85	0,15
D8	83,94	0,06
D9	84,00	0,02
D10	84,06	0,08
D11	84,00	0,02
D12	84,00	0,03

Pozice	Průměr	Sm. od.
E1	83,74	0,29
E2	83,92	0,08
E3	83,93	0,07
E4	83,91	0,09
E5	83,87	0,02
E6	83,92	0,08
E7	83,88	0,03
E8	83,93	0,03
E9	83,94	0,11
E10	84,06	0,08
E11	84,00	0,02
E12	84,02	0,07
F1	83,87	0,09
F2	83,91	0,09
F3	83,93	0,07
F4	83,92	0,08
F5	83,90	0,07
F6	83,92	0,08
F7	83,87	0,04
F8	83,93	0,07
F9	83,97	0,04
F10	83,98	0,03
F11	83,91	0,13
F12	84,00	0,02
G1	83,98	0,05
G2	83,90	0,05
G3	83,94	0,07
G4	83,92	0,08
G5	83,92	0,08
G6	83,93	0,07
G7	83,86	0,16
G8	83,90	0,01
G9	83,98	0,04
G10	83,91	0,15
G11	83,93	0,12
G12	84,00	0,02
H1	83,95	0,04
H2	83,99	0,06
H3	83,97	0,05
H4	83,95	0,04
H5	83,89	0,11
H6	83,95	0,04
H7	83,95	0,05
H8	83,96	0,09
H9	83,88	0,14
H10	83,98	0,21
H11	84,02	0,06
H12	84,00	0,05

	col	{1} (83,879)	{2} (83,922)	{3} (83,918)	{4} (83,911)	{5} (83,904)	{6} (83,920)	{7} (83,859)	{8} (83,923)	{9} (83,966)	{10} (83,987)	{11} (83,971)	{12} (84,005)
1	1		0,916461	0,963879	0,990894	0,999110	0,943755	0,999897	0,911201	0,072097	0,005490	0,039720	0,000327
2	2	0,916461		1,000000	1,000000	0,999946	1,000000	0,474374	1,000000	0,921508	0,463544	0,839132	0,114254
3	3	0,963879	1,000000		1,000000	0,999998	1,000000	0,606617	1,000000	0,846751	0,340592	0,732858	0,069002
4	4	0,990894	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,761769	1,000000	0,712864	0,214056	0,573534	0,034352
5	5	0,999110	0,999946	0,999998	1,000000		0,999985	0,900039	0,999932	0,518207	0,109759	0,379848	0,013563
6	6	0,943755	1,000000	1,000000	1,000000	0,999985		0,546293	1,000000	0,901244	0,428772	0,809581	0,102078
7	7	0,999897	0,474374	0,606617	0,761769	0,900039	0,546293		0,463544	0,006170	0,000250	0,002837	0,000025
8	8	0,911201	1,000000	1,000000	1,000000	0,999932	1,000000	0,463544		0,926346	0,474374	0,846751	0,118893
9	9	0,072097	0,921508	0,846751	0,712864	0,518207	0,901244	0,006170	0,926346		0,999845	1,000000	0,960952
10	10	0,005490	0,463544	0,340592	0,214056	0,109759	0,428772	0,000250	0,474374	0,999845		0,999993	0,999957
11	11	0,039720	0,839132	0,732858	0,573534	0,379848	0,809581	0,002837	0,846751	1,000000	0,999993		0,987585
12	12	0,000327	0,114254	0,069002	0,034352	0,013563	0,102078	0,000025	0,118893	0,960952	0,999957	0,987585	

	1 (R:109,79)	2 (R:128,85)	3 (R:123,77)	4 (R:118,35)	5 (R:107,42)	6 (R:120,09)	7 (R:92,188)	8 (R:133,71)	9 (R:182,02)	10 (R:199,33)	11 (R:189,56)	12 (R:221,92)
1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,169725	0,012272	0,057407	0,000189
2	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,215404	0,744450	0,006772
3	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,992932	0,106322	0,398046	0,002768
4	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,519730	0,047840	0,195159	0,001018
5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,121850	0,008236	0,040028	0,000116
6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,695979	0,070406	0,271909	0,001724
7	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,011691	0,000511	0,003179	0,000004
8	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,406568	1,000000	0,015288
9	0,169725	1,000000	0,992932	0,519730	0,121850	0,695979	0,011691	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
10	0,012272	0,215404	0,106322	0,047840	0,008236	0,070406	0,000511	0,406568	1,000000		1,000000	1,000000
11	0,057407	0,744450	0,398046	0,195159	0,040028	0,271909	0,003179	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
12	0,000189	0,006772	0,002768	0,001018	0,000116	0,001724	0,000004	0,015288	1,000000	1,000000	1,000000	

**Příloha 5: Cobas**

Pozice	Průměr	Sm. od.	Pozice	Průměr	Sm. od.
A1	83,90	0,07	E1	83,92	0,10
A2	83,94	0,04	E2	83,89	0,08
A3	83,92	0,08	E3	83,86	0,10
A4	83,91	0,07	E4	83,92	0,09
A5	83,92	0,07	E5	83,88	0,07
A6	83,95	0,13	E6	83,85	0,09
A7	83,94	0,06	E7	83,86	0,10
A8	83,98	0,09	E8	83,92	0,10
A9	84,01	0,15	E9	83,98	0,08
A10	84,04	0,09	E10	83,95	0,16
A11	84,04	0,11	E11	84,00	0,08
A12	84,07	0,09	E12	84,03	0,12
B1	83,93	0,11	F1	83,93	0,11
B2	83,87	0,09	F2	83,84	0,11
B3	83,86	0,10	F3	83,85	0,08
B4	83,89	0,12	F4	83,86	0,10
B5	83,83	0,07	F5	83,86	0,10
B6	83,90	0,09	F6	83,83	0,07
B7	83,88	0,10	F7	83,86	0,11
B8	83,95	0,12	F8	83,92	0,06
B9	84,00	0,08	F9	83,91	0,12
B10	84,00	0,07	F10	83,92	0,10
B11	84,00	0,09	F11	84,01	0,06
B12	84,05	0,12	F12	84,02	0,09
C1	83,94	0,10	G1	83,91	0,11
C2	83,88	0,09	G2	83,88	0,10
C3	83,86	0,11	G3	83,86	0,09
C4	83,89	0,10	G4	83,88	0,07
C5	83,90	0,07	G5	83,86	0,11
C6	83,84	0,14	G6	83,84	0,07
C7	83,88	0,10	G7	83,82	0,04
C8	83,93	0,10	G8	83,93	0,09
C9	83,99	0,07	G9	83,92	0,10
C10	83,93	0,17	G10	83,93	0,11
C11	83,98	0,03	G11	84,03	0,09
C12	84,01	0,05	G12	84,04	0,16
D1	83,88	0,08	H1	83,94	0,11
D2	83,89	0,08	H2	83,92	0,10
D3	83,92	0,10	H3	83,91	0,09
D4	83,89	0,06	H4	83,88	0,06
D5	83,87	0,09	H5	83,89	0,06
D6	83,89	0,09	H6	83,88	0,08
D7	83,91	0,07	H7	83,90	0,13
D8	83,91	0,14	H8	83,93	0,12
D9	83,97	0,12	H9	83,92	0,18
D10	84,01	0,11	H10	84,03	0,15
D11	83,99	0,21	H11	84,01	0,16
D12	84,02	0,10	H12	84,03	0,09



## Příloha 6: M123

		m=m1 Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: machine Kruskal-Wallis test: H ( 4, N= 390) =298,8168 p =0,000			
Depend.: value	Code	Valid (N)	Sum of (Ranks)	Mean (Rank)	
RG 3000™	101	70	3987,50	56,9643	
LC® Nano	102	32	1987,50	62,1094	
LC® 480II-I	103	96	30965,50	322,5573	
LC® 480II-II	104	96	23504,50	244,8385	
COBAS	105	96	15800,00	164,5833	

		m=m1 Multiple Comparisons p values (2-tailed); value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: machine Kruskal-Wallis test: H ( 4, N= 390) =298,8168 p =0,000				
Depend.: value	RG 3000™ (R:56,964)	LC® Nano (R:62,109)	LC® 480II-I (R:322,56)	LC® 480II-II (R:244,84)	COBAS (R:164,58)	
RG 3000™		1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	
LC® Nano	1,000000		0,000000	0,000000	0,000085	
LC® 480II-I	0,000000	0,000000		0,000018	0,000000	
LC® 480II-II	0,000000	0,000000	0,000018		0,000008	
COBAS	0,000000	0,000085	0,000000	0,000008		

		m=m2 Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: machine Kruskal-Wallis test: H ( 4, N= 392) =239,1583 p =0,000			
Depend.: value	Code	Valid (N)	Sum of (Ranks)	Mean (Rank)	
RG 3000™	101	72	4034,50	56,0347	
LC® Nano	102	32	1447,00	45,2188	
LC® 480II-I	103	96	26179,00	272,6979	
LC® 480II-II	104	96	21232,00	221,1667	
COBAS	105	96	24135,50	251,4115	

	m=m2 Multiple Comparisons p values (2-tailed); value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: machine Kruskal-Wallis test: H ( 4, N= 392) =239,1583 p =0,000				
Depend.: value	RG 3000™ (R:56,035)	LC® Nano (R:45,219)	LC® 480II-I (R:272,70)	LC® 480II-II (R:221,17)	COBAS (R:251,41)
RG 3000™		1,000000	0,000000	0,000000	0,000000
LC® Nano	1,000000		0,000000	0,000000	0,000000
LC® 480II-I	0,000000	0,000000		0,016274	1,000000
LC® 480II-II	0,000000	0,000000	0,016274		0,644052
COBAS	0,000000	0,000000	1,000000	0,644052	

	m=m3 Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: machine Kruskal-Wallis test: H ( 4, N= 391) =300,6760 p =0,000			
Depend.: value	Code	Valid (N)	Sum of (Ranks)	Mean (Rank)
RG 3000™	101	72	2825,50	39,2431
LC® Nano	102	32	2661,50	83,1719
LC® 480II-I	103	96	31160,00	324,5833
LC® 480II-II	104	95	18529,00	195,0421
COBAS	105	96	21460,00	223,5417

	m=m3 Multiple Comparisons p values (2-tailed); value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: machine Kruskal-Wallis test: H ( 4, N= 391) =300,6760 p =0,000				
Depend.: value	RG 3000™ (R:39,243)	LC® Nano (R:83,172)	LC® 480II-I (R:324,58)	LC® 480II-II (R:195,04)	COBAS (R:223,54)
RG 3000™		0,673242	0,000000	0,000000	0,000000
LC® Nano	0,673242		0,000000	0,000013	0,000000
LC® 480II-I	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000
LC® 480II-II	0,000000	0,000013	0,000000		0,814172
COBAS	0,000000	0,000000	0,000000	0,814172	

## Příloha 7: Cykléry

machine= RG 3000™ Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 214) =65,26298 p =,0000				
Depend.: value	Code	Valid (N)	Sum of (Ranks)	Mean (Rank)
m1	101	70	8886,500	126,9500
m2	102	72	9809,500	136,2431
m3	103	72	4309,000	59,8472

machine= RG 3000™ Multiple Comparisons p values (2- tailed); value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 214) =65,26298 p =,0000			
Depend.: value	m1 (R:126,95)	m2 (R:136,24)	m3 (R:59,847)
m1		1,000000	0,000000
m2	1,000000		0,000000
m3	0,000000	0,000000	

machine= LC® Nano Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 96) =35,77957 p =,0000				
Depend.: value	Code	Valid (N)	Sum of (Ranks)	Mean (Rank)
m1	101	32	2185,000	68,28125
m2	102	32	856,500	26,76563
m3	103	32	1614,500	50,45313

machine= LC® Nano Multiple Comparisons p values (2- tailed); value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 96) =35,77957 p =,0000			
Depend.: value	m1 (R:68,281)	m2 (R:26,766)	m3 (R:50,453)
m1		0,000000	0,031404
m2	0,000000		0,002012
m3	0,031404	0,002012	

machine= LC® 480II-I Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 288) =3,388922 p =,1837				
Depend.: value	Code	Valid (N)	Sum of (Ranks)	Mean (Rank)
m1	101	96	12711,50	132,4115
m2	102	96	14117,00	147,0521
m3	103	96	14787,50	154,0365

machine= LC® 480II-I Multiple Comparisons p values (2- tailed); value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 288) =3,388922 p =,1837			
Depend.: value	m1 (R:132,41)	m2 (R:147,05)	m3 (R:154,04)
m1		0,669741	0,216074
m2	0,669741		1,000000
m3	0,216074	1,000000	

machine= LC® 480II-II Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 287) =102,6082 p =0,000				
Depend.: value	Code	Valid (N)	Sum of (Ranks)	Mean (Rank)
m1	101	96	12736,00	132,6667
m2	102	96	20073,50	209,0990
m3	103	95	8518,50	89,6684

machine= LC® 480II-II Multiple Comparisons p values (2- tailed); value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 287) =102,6082 p =0,000			
Depend.: value	m1 (R:132,67)	m2 (R:209,10)	m3 (R:89,668)
m1		0,000000	0,001031
m2	0,000000		0,000000
m3	0,001031	0,000000	

machine=COBAS Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 288) =153,4328 p =0,000				
Depend.: value	Code	Valid (N)	Sum of (Ranks)	Mean (Rank)
m1	101	96	6871,00	71,5729
m2	102	96	21140,50	220,2135
m3	103	96	13604,50	141,7135

machine=COBAS Multiple Comparisons p values (2- tailed); value (Spreadsheet166) Independent (grouping) variable: m Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 288) =153,4328 p =0,000			
Depend.: value	m1 (R:71,573)	m2 (R:220,21)	m3 (R:141,71)
m1		0,000000	0,000000
m2	0,000000		0,000000
m3	0,000000	0,000000	

## Příloha 8: MM summary

	value (Means)	Confiden ce (- 95%)	Confiden ce (+95%)	value (N)	value (Std.Dev.)	value (Minimu m)	value (Maximu m)	value (Q25)	value (Median)	value (Q75)
m1	83,86016	83,84233	83,87799	390	0,179061	83,20000	84,36000			
RG 3000™	83,63443	83,60621	83,66265	70	0,118354	83,45000	83,85000	83,53000	83,60000	83,75000
LC® Nano	83,67850	83,66771	83,68929	32	0,029924	83,59700	83,72400	83,66350	83,68000	83,70050
LC® 480 II-I	84,05125	84,02628	84,07622	96	0,123248	83,90000	84,36000	83,96500	84,01000	84,18000
LC® 480 II-II	83,91646	83,89340	83,93952	96	0,113805	83,20000	84,05000	83,88000	83,91500	83,98500
COBAS	83,83792	83,82607	83,84976	96	0,058452	83,71000	83,99000	83,79000	83,84000	83,87000
m2	83,91915	83,89969	83,93861	392	0,195995	83,30000	84,37000			
RG 3000™	83,63903	83,61928	83,65878	72	0,084038	83,30000	83,83000	83,58000	83,63000	83,70000
LC® Nano	83,61428	83,59988	83,62868	32	0,039933	83,54800	83,72200	83,58450	83,60650	83,63900
LC® 480 II-I	84,05490	84,02661	84,08318	96	0,139616	83,76000	84,37000	83,97000	84,04000	84,16000
LC® 480 II-II	83,99333	83,98327	84,00339	96	0,049644	83,88000	84,15000	83,98000	84,01000	84,01000
COBAS	84,02094	84,00673	84,03515	96	0,070129	83,77000	84,19000	83,98000	84,03000	84,06000
m3	83,85060	83,82941	83,87179	391	0,213090	83,38000	84,37000			
RG 3000™	83,51083	83,49158	83,53009	72	0,081944	83,38000	83,70000	83,45000	83,48000	83,57000
LC® Nano	83,65453	83,64428	83,66478	32	0,028420	83,58900	83,71100	83,62950	83,65650	83,67400
LC® 480 II-I	84,06938	84,04596	84,09279	96	0,115547	83,91000	84,37000	83,98000	84,05500	84,09000
LC® 480 II-II	83,88095	83,86450	83,89740	95	0,080755	83,66000	84,06000	83,84000	83,88000	83,94000
COBAS	83,92198	83,90571	83,93825	96	0,080284	83,80000	84,09000	83,86000	83,90000	84,00000
All Groups	83,87669	83,86530	83,88807	1173	0,198717	83,20000	84,37000			