

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Optimalizace detekce sfRNA viru klíšťové encefalitidy v RNA z
hostitelských buněk pomocí hybridizačních technik**

Bakalářská práce

Valentýna Králová

Školitel: RNDr. Pavlína Věchtová, Ph.D.

České Budějovice 2024

Králová V., 2024: Optimalizace detekce sfRNA viru klíšťové encefalitidy v RNA z hostitelských buněk pomocí hybridizačních technik [Optimizing the detection of tick-borne encephalitis virus sfRNA in host cells RNA using hybridization techniques Bachelor thesis, in Czech] – 66 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovic, Czech Republic

Anotation

This study focuses on the optimization of dot-blot method for detection of sfRNA in RNA isolated from sfRNA-transfected or TBEV-infected DAOY HTB-186 human neural cells. The optimization led to successful detection of sfRNA hybridization signal. However, unspecific hybridization signal in negative control were observed and attempts to remove it failed to improve signal specificity or unspecific hybridization signal source identity using northern blot. The optimization of qRT-PCR assay for quantification of sfRNA in sfRNA-transfected or TBEV-infected DAOY HTB-186 human neural cells was also performed. Interestingly, the qRT-PCR assay adopted from Schwaiger M., Cassinotti P., 2003 failed to perform efficiently using qRT-PCR chemistry established for qRT-PCR essays in our laboratory and thus could not be used for reliable quantification of sfRNA in samples used in this work. Attempts to design custom qPCR assay for sfRNA quantification also failed to work most probably due to difficult secondary structures formed in the sfRNA structure.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice:

.....

Valentýna Králová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Pavlíně Věchtové, Ph.D. za trpělivost během mé práce v laboratoři, ochotu vysvětlit teorie potřebné k vykonání mé laboratorní práce a za poskytnutí cenných rad při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře aplikované biochemie za skvělé pracovní prostředí. Dále bych také měla poděkovat mým blízkým a známým, kteří mi byli velkou oporou v mém dosavadním studiu.

1	Úvod	1
1.1	<i>Orthoflavivirus encephalitidis</i>	1
1.1.1	Taxonomie čeledi <i>Flaviviridae</i>	1
1.1.2	Flaviviry	2
1.1.3	Rozšíření	2
1.1.4	Subtypy TBEV	3
1.1.5	Rozšíření subtypů	3
1.1.6	Přenos TBEV	4
1.1.7	Příznaky infekce TBEV	4
1.2	Molekulární a genetická charakteristika TBEV	5
1.2.1	Stavba virionu	5
1.2.2	Životní cyklus TBEV	6
1.3	Subgenomová flavivirová RNA (sfRNA)	6
1.3.1	Vznik sfRNA	7
1.3.2	Funkce sfRNA	7
1.4	Metoda dot-blot	8
1.4.1	Obecný postup	9
1.4.2	Typy prób a zkoumaného vzorku	9
1.4.2.1	DNA próba	9
1.4.2.2	RNA próba	10
1.4.3	Způsoby značení DNA próby	10
1.4.3.1	Značení náhodnými primery	10
1.4.3.2	Nick translace	10
1.4.3.3	Značení pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR)	11
1.4.4	Typy reportérových molekul	11
1.4.4.1	Radioizotopy	11
1.4.4.2	Biotin	12

1.4.4.3	Digoxigenin (DIG).....	12
1.4.4.4	Fluorochrom.....	13
1.5	Metody detekce signálu značené próby.....	13
1.5.1	Radiografická detekce.....	13
1.5.2	Kolorimetrická detekce.....	13
1.5.3	Chemiluminiscenční detekce	14
1.5.4	Fluorescenční detekce.....	14
1.6	Metoda Northern blot.....	15
2	Cíl práce.....	15
3	Metody.....	16
3.1	<i>In vitro</i> transkripce sfRNA.....	16
3.2	Transfekce buněčné linie DAOY HTB-186 <i>in vitro</i> transkribovanou sfRNA.....	16
3.3	Infekce buněčné linie DAOY-HTB 186 virem TBEV Hypr.....	17
3.4	Izolace RNA	17
3.5	Syntéza cDNA.....	17
3.6	Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR).....	17
3.7	Elektroforetická separace	20
3.8	Izolace PCR produktů z gelu	21
3.9	Syntéza ampliconů pro přípravu DNA prób	21
3.10	Přečištění produktů enzymatických reakcí pomocí Sephadex TM G-50 Superfine.....	23
3.11	Příprava značených DNA prób.....	24
3.11.1	Nick translace.....	24
3.11.2	Značení náhodnými primery DecaLabel TM	25
3.12	Dot-blot	25
3.13	Northern blot.....	29

4	Výsledky	31
4.1	Kontrola účinnosti transfekce <i>in vitro</i> transkribovanou sfRNA v buněčné linii DAOY HTB-186 pomocí qRT-PCR.	31
4.1.1	Optimalizace qRT-PCR eseje dle publikace Schwaiger M. a Cassinotti P., 2003	32
4.1.2	Optimalizace vlastní qPCR eseje pro kvantifikaci sfRNA	36
4.2	Optimalizace metody dot-blot pro detekci TBEV sfRNA	39
4.3	Northern blot.....	46
5	Diskuze.....	48
6	Závěr.....	54
7	Seznam použitých zdrojů.....	57

1 Úvod

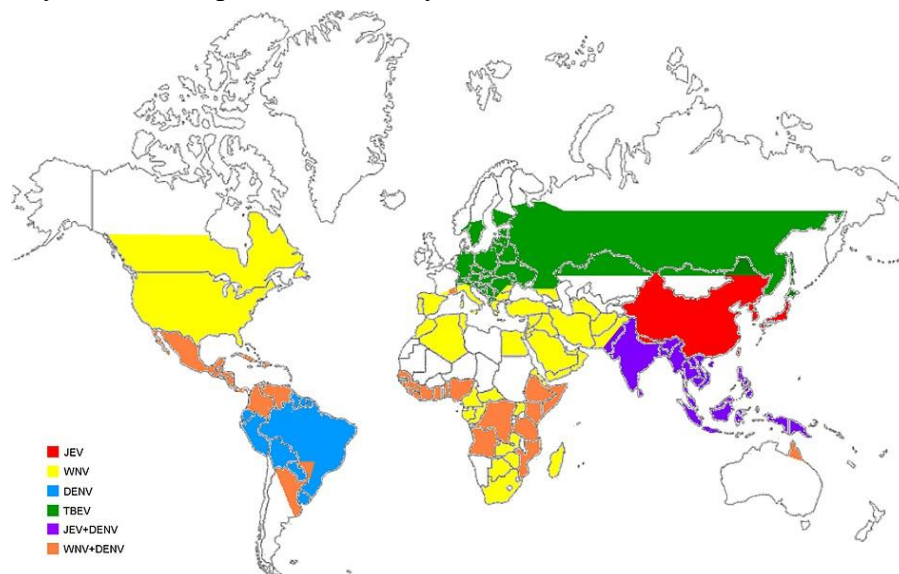
1.1 *Orthoflavivirus encephalitis*

Klíšťová encefalitida (TBE) je běžné lidské onemocnění způsobené virem klíšťové encefalitidy (TBEV, z anglického tick-borne encephalitis virus) a postihuje centrální nervový systém nakažených. Virus klíšťové encefalitidy získal v roce 2023 nové taxonomické pojmenování *Orthoflavivirus encephalitis* dle publikace Postler T. S. *et al.*, 2023. TBEV se dle redefinice klasifikace čeledi *Flaviviridae* řadí do rodu *Orthoflavivirus* (Postler T. S. *et al.*, 2023). Zmíněná publikace nezakazuje použití zkratky TBEV pro virus klíšťové encefalitidy, která bude pro označení tohoto viru použita v celé této práci. Virus jako první popsal primář Dr. Hans Schneider již v roce 1931 (Schneider H., 1931). Onemocnění zasahuje velkou část Evropy, severní Asie a Číny. Klíště obecné *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) je primárním přenašečem Evropského subtypu TBEV (Kaiser R., 2016). *I. ricinus* je krev sající pavoukovec, jehož hostitelem je celá řada obratlovců z tříd plazů, ptáků a savců. Jedním z hostitelů *I. ricinus* může být i člověk, na kterého klíště může přenést TBE (Medlock J. M. *et al.*, 2013).

1.1.1 Taxonomie čeledi *Flaviviridae*

Čeď *Flaviviridae* se taxonomicky rozděluje do čtyř rodů; *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* a *Orthoflavivirus* (Simmonds P. *et al.*, 2017; Postler T. S. *et al.*, 2023). Fylogenetické vztahy těchto rodů jsou znázorněny na Obr. 1. Rod *Hepacivirus* zahrnuje jeden z nejvýznamnějších lidských patogenů viru hepatitidy C, který celosvětově ročně nakazí 3-4 miliony lidí a asi 170 milionů lidí je chronicky infikovaných s následným vývojem jaterní cirhózy a rakoviny jater (Mohd H. *et al.*, 2013). *Pegivirus* je poslední objevený rod čeledi *Flaviviridae*, který patrně postrádá patogenitu (Stapleton J. T. *et al.*, 2011). Zástupci rodu *Pestivirus* infikují převážně skot, u nějž se po nákaze vyvíjí bovinní virová diarrhea. U prasat se po infekci těmito viry vyvíjí prasečí mor (Schweizer M., Peterhans E., 2014). Čtvrtým rodem je *Flavivirus*, který obsahuje více než 70 druhů virů. Mezi ty nejznámější patří virus žluté zimnice (YFV), virus japonské encefalitidy (JEV), virus klíšťové encefalitidy (TBEV), dengue virus (DENV), virus západonilské horečky (WNV), Rocio virus (ROCV) a virus St. Louise encefalitidy (SLEV) (Leyssen P. *et al.*, 2000). Zástupci čeledi *Orthoflavivirus* se dále dělí podle typu přenašeče, a to na komáří, klíštětem přenesené a neznámého původu. První dva typy jsou charakteristické pro skupiny virů zahrnujících lidské patogeny, zatímco poslední zahrnuje pouze několik virů, které byly izolovány z myši a netopýrů (Kuno G. *et al.*, 1998; Postler T. S. *et al.*, 2023). Primárními hostiteli prvních dvou typů virů jsou mořští ptáci a

jsou tropy a subtropy (Stapleton J. T. *et al.*, 2011; Kuno G. *et al.*, 1998). TBEV je zejména rozšířena ve východní Evropě a střední až východní Asii.



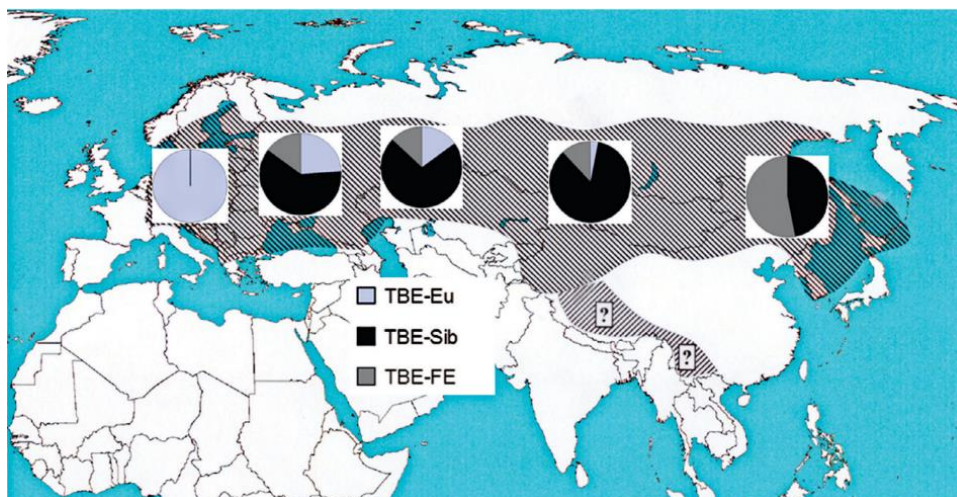
Obrázek 2.: Rozšíření nejvýznamnějších *Flavivirů* (Sips G. J. *et al.*, 2012).

1.1.4 Subtypy TBEV

TBEV je dělen do tří hlavních subtypů. Těmito subtypy jsou Evropský, Sibiřský a dálnovýchodní subtyp. Evropský a dálnovýchodní subtyp jsou fylogeneticky příbuznější, jelikož jsou shodné ve zhruba 95,6 % na úrovni aminokyselinové sekvence (Holzmann H. *et al.*, 1992). Existují další dva nedávno objevené subtypy, mezi něž patří Bajkalský subtyp, který se oddělil od Sibiřského subtypu a druhý je Himalájský subtyp (Dai X. *et al.*, 2018).

1.1.5 Rozšíření subtypů

Rozšíření tří hlavních subtypů je znázorněno na obr. 3 a jejich nomenklatura je klasifikována na základě názvu oblasti rozšíření. Evropský subtyp se nejvíce vyskytuje ve střední a západní Evropě, západním Uralu a Sibiři. Sibiřský subtyp se vyskytuje zejména v Rusku, v pobaltských státech a severním Finsku. Dálnovýchodní subtyp se nejčastěji objevuje ve východním Rusku a dálném východě, a to převážně v Japonsku (Mansfield K. L. *et al.*, 2009). Bajkalský subtyp se nejvíce vyskytuje v okolí Bajkalského jezera v Rusku. Himalájský subtyp se nejčastěji vyskytuje v oblasti Tibetské náhorní plošiny v Číně (Dai X. *et al.*, 2018). Geografické rozšíření jednotlivých subtypů lze vidět na obr. 3, kde je Evropský subtyp znázorněn světle modrou barvou Sibiřský subtyp znázorněn černou barvou a Japonský subtyp barvou šedou (Lindquist L., 2014).



Obrázek 3.: Rozšíření tří hlavních subtypů TBEV (Lindquist L., 2014).

1.1.6 Přenos TBEV

V Evropě bylo rozpoznáno 8 druhů klíšťat řádu *Ixodida*, přenášejících TBEV. Nejběžnějším přenašečem Evropského subtypu TBEV je *I. ricinus*. Přenašečem pro Sibiřský a dálnovýchodní subtyp je *Ixodes persulcatus* (Klíště sibiřské) (Kollaritsch H. *et al.*, 2012).

Klíště se nakazí TBEV od již nakaženého hostitele nebo jiného nakaženého klíštěte vyskytujícího se na stejném hostiteli během sání. V těle klíštěte se poté virus pomnoží a pomocí jeho kousnutí nakazí jiného obratlovce, včetně člověka. Přenos z klíštěte na jiné klíště probíhá na stejném hostiteli, především mezi nymfami a larvami klíšťat. Během sání je rozmístění více klíšťat na jednom hostiteli z řádu hlodavců nenáhodné k tendenci formování shluků (Ličková M. *et al.*, 2020).

1.1.7 Příznaky infekce TBEV

TBE je jedním z nejvýznamnějších onemocnění centrálního nervového systému člověka, způsobené patogenním TBEV (Bogovic P., Strle F., 2015).

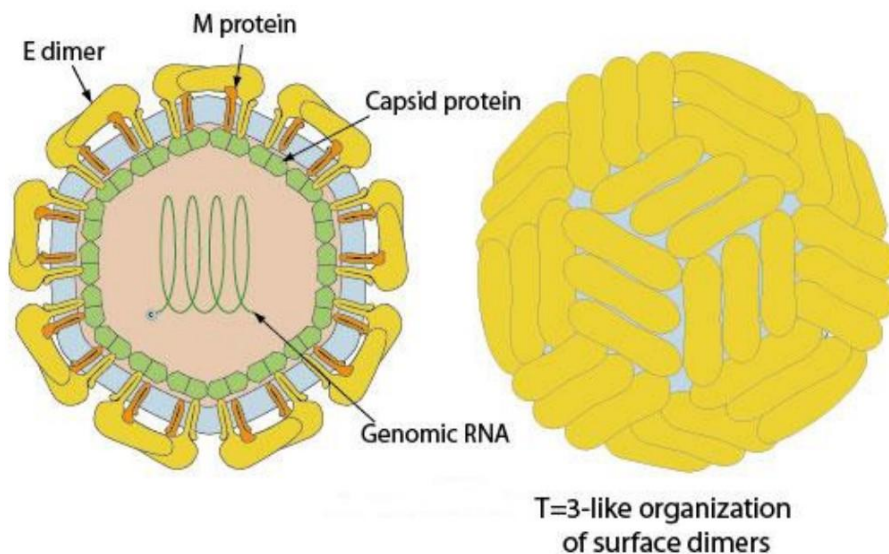
TBEV je do hostitele přenášen v průběhu sání klíštěte již několik minut po přisátí klíštěte k hostiteli (Lindquist L. *et al.*, 2008). Po infekci TBEV nastává bezpříznaková fáze, tzv. inkubační doba trvající 4-28 dní. První příznaková fáze trvá 1-8 dní. Při této fázi nastávají symptomy podobající se symptomům chřipky. Typickými symptomy jsou malátnost, bolest zad a hlavy, nevolnost, celková vyčerpanost a horečka pohybující se od 38 °C výše (Hombach J. *et al.*, 2017). Dále nastává období bez zvýšené teploty a většinou i bez dalších příznaků, které trvá zpravidla 20 dní. Následně nastává druhá infekční fáze, při které dojde k náhlému zvýšení teploty a objevují se příznaky závažnější než v první infekční fázi. U 50 % případů se vyvíjí onemocnění centrální nervové soustavy jako jsou meningitida s pleocytózou. U dalších

asi 40 % případů jsou příznaky závažnější, zahrnující encefalitidu, paralýzu a/nebo otupělost. Meningoencefalomyelitida označována také jako nejhorší příznaková nemoc TBEV se vyskytuje přibližně u 10 % pacientů většinou staršího věku. Například paralýza se objeví mezi pěti a deseti dny od začátku druhé fáze, která se nejčastěji vyskytuje v oblasti ramen. Riziko dlouhodobých následků se zvyšuje se závažností onemocnění (Hombach J. *et al.*, 2017).

1.2 Molekulární a genetická charakteristika TBEV

1.2.1 Stavba virionu

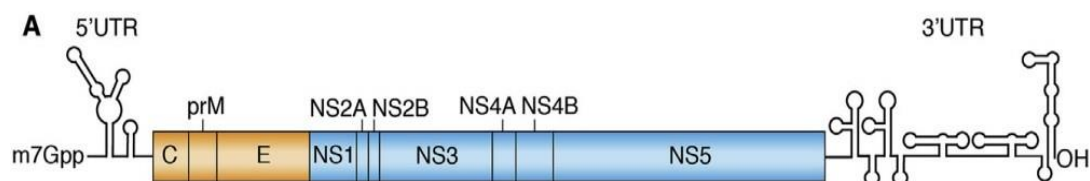
Virion TBEV je kulovitý o velikosti mezi 40–60 nm, obalený lipidovou vrstvou. Základní stavba virionu je znázorněna na obr. 4. Uvnitř virionu se nachází genom viru tvořený jedním vláknem RNA o pozitivní polaritě a délce 11 kb (Mansfield K. L. *et al.*, 2009). Povrchové proteiny tvoří heterotetramery, které jsou uspořádány těsně vedle sebe a tvoří ikosaedrálně symetrický povrch virionu. Mezi povrchové proteiny virionu patří kapsidový (C), obalový (E) a membránový (M) protein. E protein má ve své struktuře antigenní záhyb zprostředkovávající vazbu na hostitelské receptory (Mansfield K. L. *et al.*, 2009; Pulkkinen L. I. A. *et al.*, 2022).



Obrázek 4.: Struktura virionu viru klíšťové encefalitidy (Mukhopadhyay M., Bhaumik P., 2016).

Struktura genomu TBEV je znázorněn na obr. 5. Genom obsahuje jeden otevřený čtecí rámeček (ORF) ohraničený nekódujícími úseky na 5' konci o délce 131 nukleotidů (nt) a 3' konci o délce od 31 do 728 nt. Tyto úseky pravděpodobně slouží k amplifikaci genomu, translaci a/nebo jeho sbalení v kapsidě. Samotný čtecí rámeček kóduje polyprotein o velikosti 3414 aminokyselin. Polyprotein je dále zpracován do tří strukturálních proteinů (C, E a M) a sedmi nestrukturních (NS) proteinů (Velay A. *et al.*, 2019). Mezi NS proteiny patří NS1

(glykoprotein), NS2A, NS2B (součást proteázy), NS3 (proteáza, helikáza), NS4A, NS4B a NS5 (RNA-dependentní polymeráza) (Mansfield K. L. *et al.*, 2009).



Obrázek 5.: Schéma genomu viru klíšťové encefalitidy s vyznačenými strukturními a nestruturními proteiny (Slonchak A., Khromykh A. A., 2018).

1.2.2 Životní cyklus TBEV

Počáteční infekce a replikace viru probíhá v kožních buňkách hostitele v místě kousnutí klíštětem (Hombach J. *et al.*, 2017). Do buněk CNS, které jsou cílovými kompetentními buňkami infekce a propagace TBEV, je virus z místa přisátí klíštěte přenesen buňkami imunitního systému (Fares M. *et al.*, 2020). Protein E interaguje s buněčnými receptory a zprostředkovává fúzi viru a buněčné membrány. E proteiny se vyskytují volně na povrchu viru společně s fúzním peptidem. Po rozpoznání receptoru na povrchu hostitelské buňky dochází k endocytóze a vstupu viru do buňky. Následkem endocytózy dochází k acidifikaci vnitřního prostoru buňky, které způsobí nevratnou konformační změnu endozomu. Fúzní peptid je následně nasměrován k endozomální membráně, což vede ke splynutí peptidu s endozomální membránou a uvolnění infekčního virového genomu do cytoplazmy. Replikace viru probíhá ve váčcích vytvořených z endoplazmatického retikula (ER), kterými virus pučí a poté pokračuje v transportu sekreční dráhou. Sestavení viru nastává v ER, kde kapsidový protein (C) sbalí genom RNA do nukleokapsidů. Nastává sestavení virového obalu, jež obsahuje prekurzory pro proteiny M a E. Tyto proteiny pučí z nukleokapsidu do lumenu ER, což vede k tvorbě nezralých, neinfekčních virionů. Poté jsou prekurzory přeměněny na protein M, čímž vyzraje virion. Infekční zralé viriony se uvolňují z buňky fúzí transportních váčků s plazmatickou membránou hostitelské buňky (Velay A. *et al.*, 2019).

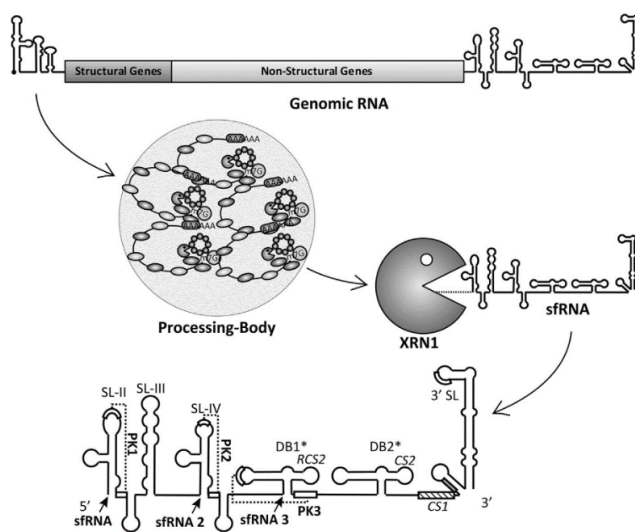
1.3 Subgenomová flavivirová RNA (sfRNA)

Čtecí rámec gRNA je ohraničen netranslatovanými úseky (untranslated region, UTR) 5'UTR a 3'UTR (Velay A. *et al.*, 2019). Součástí 3'UTR je sfRNA, jež je znázorněna na obr. 6. Délka sfRNA je závislá na délce genomového 3' UTR konkrétního viru a pohybuje se v rozmezí 0,3 – 0,5 kb (Silva P. A. G. C. *et al.*, 2010).

sfRNA se nachází v genomu většiny *Flavivirů* jako je například WNV nebo YFV. Dále se sfRNA vyskytuje v genomu viru encefalitidy Murray Valley (MVE), DENV (Pijlman G. P. *et al.*, 2008), viru Zika (Akiyama B. M. *et al.*, 2016) a TBEV (Sakai M. *et al.*, 2015).

1.3.1 Vznik sfRNA

V průběhu infekce viru dochází ke vstupu viru do buňky s následnou expresí virového polyproteinu a replikací jeho gRNA. Po uvolnění gRNA do cytoplasmy dochází k odstranění čepičky z 5'UTR gRNA pomocí enzymů odstraňujících čepičku (DCP1/DCP2) a helikázy. Dále nastává degradace čepičky hostitelskou exoribonukleázou XRN1, která štěpí genom od 5'UTR k 3'UTR (Villordo S. M. *et al.*, 2016; Clarke B. D. *et al.*, 2015). 3' UTR se skládá ze sekundárních struktur (Obr. 6.), jinak známých jako XRN1 rezistentní elementy (xrRNA). xrRNA elementy mají velikost 193 nt a spojují se do konstrukčních smyček (SL). Tyto části jsou důležité pro replikaci gRNA (Funk A. *et al.*, 2010). Sekundární struktury v 3'UTR také umožňují nekompletní degradaci gRNA a tím vznik sfRNA (Clarke B. D. *et al.*, 2015; Funk A. *et al.*, 2010). SL-II vyznačená na obr. 6. je sekundární struktura způsobující zastavení XRN1 v případě TBEV (Clarke B. D. *et al.*, 2015).

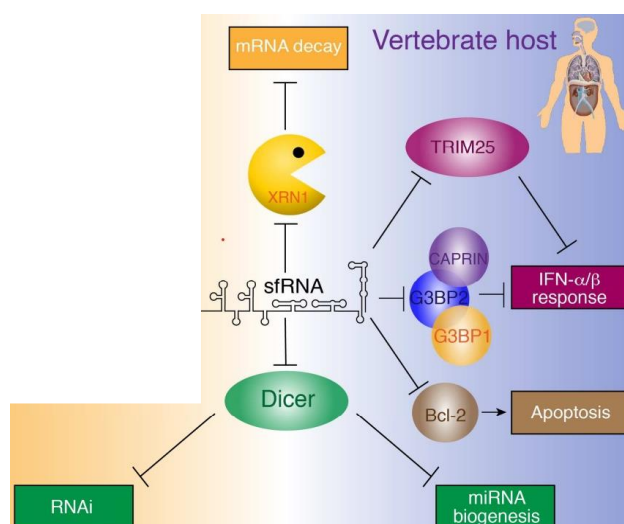


Obrázek 6.: Proces vzniku sfRNA. Spodní část obrázku ukazuje strukturu 3'UTR se svými sekundárními a terciárními strukturami a se šipkou označující umístění sfRNA (Clarke B. D. *et al.*, 2015).

1.3.2 Funkce sfRNA

Jak již bylo řečeno, sfRNA zabraňuje štěpení gRNA TBEV aktivitou XRN1 a endonukleázy Dicer. Dicer je endonukleáza z rodiny RNáz III, která hraje důležitou roli v procesu RNA interference buď při regulaci genové exprese, degradaci endogenních miRNA prekurzorů na 21-23 nukleotidové miRNA nebo v dráze protivirové buněčné obrany štěpením exogenní virové dsRNA za vzniku siRNA. U obratlovců sfRNA způsobuje inhibici interferon-

α/β odpovědi a indukuje apoptózu. Inhibice interferonu- α/β je zprostředkována spojením s TRIM 25. TRIM 25 je RNA vázající protein a je součástí signální dráhy aktivující imunitní odpověď na infekci. Další možnost inhibice odpovědi interferonu- α/β nastává po napojení sfRNA na molekuly CAPRIN, G3BP2 a G3BP1. V neposlední řadě je sfRNA zodpovědná za virovou patogenitu, hostitelskou adaptaci na virus a vznik nových patogenních kmenů (Slonchak A., Khromykh A. A., 2018).



Obrázek 7.: Upravené schéma vlivu sfRNA na hostitele (Slonchak A., Khromykh A. A., 2018).

1.4 Metoda dot-blot

Metoda dot-blot je jednoduchá, kvalitativní, ale i semikvantitativní a rychlá diagnostická metoda používaná k detekci specifických proteinových nebo nukleotidových sekvencí ve zkoumaném vzorku. Metoda je použitelná pro velké množství vzorků (Henry Sum M. S. *et al.*, 2017; Stott D. I., 1989). Metoda dot-blot, stejně jako další hybridizační techniky, funguje na principu specifické vazby segmentů nukleových kyselin, tzv. prób nebo protilátek ke komplementární molekule nukleové kyseliny nebo k proteinu ve studovaném vzorku. Próby jsou používány k průkazu přítomnosti komplementární sekvence DNA, RNA nebo oligonukleotidů ve vzorku naneseném na membráně. Membrán je několik typů v závislosti na typu polymeru použitého pro jejich výrobu. Pro účely hybridizačních technik se nejčastěji používají nitrocelulózová (Stott D. I., 1989), nylonová (Reed K. C., Mann D. A., 1985) a polyvinyliden difluoridová membrána (PVDF) (Chabraoui F. *et al.*, 1993).

Metodu dot-blot lze využít i k detekci antigenů, protilátkové aktivity na membráně nebo ji lze použít jako kvantitativní metodu pro určení koncentrace antigenů (Stott D. I., 1989). Jednou z dalších možností použití této metody je také identifikace různých druhů mikroorganismů (Stott D. I., 2000).

1.4.1 Obecný postup

Pro zjednodušení bude následující popis omezen na detekci nukleových kyselin. Nejprve musí být vzorek nukleové kyseliny před nanesením denaturován, aby došlo k rozpojení dvouvlákna DNA nebo sekundárních struktur RNA, a sekvence nukleové kyseliny tak mohla být zcela přístupná hybridizačnímu procesu. Poté je vzorek nanesen na membránu buď nakápnutím nebo filtrací vzorku přes membránu pomocí vývěvy/vakuové pumpy, kde jsou vzorky nechány k zaschnutí. Vzorky v podobě teček (dot) se nechají zaschnout a pro pevné přilnutí nukleové kyseliny na membránu dochází k její imobilizaci na membráně pomocí UV záření. Po imobilizaci dojde k prehybridizaci a poté k samotné hybridizačnímu procesu. Prehybridizace slouží k blokadě nespecifických molekul na membráně i ve vzorku ke kterým se značená sonda nebo konjugát reportérové molekuly může nespecificky vázat a vytvářet tak nespecifický signál. Prehybridizace i hybridizace probíhají za zvýšené teploty a po určité době, zpravidla od 30 min až po několik hodin. V hybridizačním roztoku se nachází značená sonda. Poté dochází k promývání a k zobrazení hledaných RNA nebo DNA sekvencí, pomocí přímo značených sond (Bergmans H. E.W. *et al.*, 1988; Brown T., 1993). V případě nepřímého značení sondy nukleotidy vázanými s hapteny, např. biotinem nebo digoxigeninem (DIG) (podrobněji popsány níže), je dalším krokem blokadě membrány nespecifickým blokovacím činidlem pro zamezení vzniku nespecifických interakcí protilátky nebo streptavidinu (podrobněji popsán níže) s membránou či zkoumaným vzorkem. Následuje převrstvení membrány konjugátem reportérové molekuly s protilátkou nebo streptavidinem a poté následuje zobrazení signálu dle typu reportérové molekuly (Stott D. I., 2000).

1.4.2 Typy sond a zkoumaného vzorku

Jak již bylo výše zmíněno, sondy slouží k detekci hledané DNA, RNA nebo oligonukleotidové sekvence. Sondy se dělí v závislosti na typu a délce nukleové kyseliny na DNA, RNA a oligonukleotidové sondy (Stott D. I., 1989). Níže jsou uvedeny pouze DNA a RNA sondy.

1.4.2.1 DNA sonda

Mezi nejpoužívanější DNA sondy patří dvou-řetězcová kopy DNA (ds cDNA) nebo jedno-řetězcová DNA (ssDNA). dsDNA sonda je méně termodynamicky stálá než RNA sonda, což je třeba zohlednit při navrhování hybridizačních podmínek, jak je uvedeno v následujících kapitolách.

1.4.2.2 RNA próba

RNA próby jsou syntetizovány *in vitro* transkripcí z linearizovaného, plazmidového, templátového DNA řetězce pomocí DNA-dependentní RNA polymerázy, která zahajuje RNA syntézu v místě promotorů na linearizovaných plazmidech (Altar C. A. *et al.*, 1989; Wages J. M., 2005). Výhodou RNA próby je, že vytváří vysoce stabilní vazbu s cílovou molekulou. Jejich nevýhodou je, že dochází častěji ke vzniku nespecifických vazeb a tím se vytváří nespecifické pozadí během detekce (Farrell R. E., 2010).

1.4.3 Způsoby značení DNA próby

Každá z prób je značena pomocí molekul, jejichž přítomnost lze následně detekovat přímými i nepřímými technikami. Přímou značenou próbu mohou být použity k přímé identifikaci. Při nepřímé detekci se na próbu naváže molekula se schopností specifické vazby na značící molekulu navázanou v próbě. Tato molekula je vázána v konjugátu s reportérovou molekulou, jejíž přítomnost lze následně detekovat vhodnou technikou. Následující podkapitoly uvádějí způsoby značení DNA prób používaných v této studii. Mezi ostatní značení, které není níže zmíněno patří značení 5' a 3' konce.

1.4.3.1 Značení náhodnými primery

Metoda značení náhodnými primery pracuje se směsí krátkých sekvencí oligonukleotidů (primerů) s náhodnými sekvencemi. Tyto primery nasedají na DNA templát na náhodných místech a slouží jako náhodné počátky replikace pro přítomnou DNA polymerázu, která v průběhu extenze začleňuje do nově vznikajícího komplementárního vlákna značené nukleotidy. Značené nukleotidy jsou součástí směsi s ostatními volnými neznačenými nukleotidy. Oligonukleotidy se tedy během značící PCR reakce stanou součástí próby. Próby mohou být značeny radioaktivně, pomocí haptenu, nebo fluorochromů. Pro značení náhodnými primery je nejvhodnější velikost templátové DNA 200-2000 bází. Značení náhodnými primery obvykle trvá 10-30 min (Farrell R. E., 2010).

1.4.3.2 Nick translace

Značení pomocí nick translace byla jedna z prvních metod použitých pro značení DNA. Nick translace je založená na náhodném nasedání DNázy I na DNA. DNáza I se při velmi nízkých koncentracích připojí asi na 4-5ti nukleotidech DNA a provede rozštěpení cukr-fosfátové vazby ve struktuře DNA za vzniku volné 5'-PO skupiny a 3'-OH skupiny, která

může následně fungovat jako 3' konec primeru. Následně dochází k uplatnění přítomné DNA polymerázy I, která je schopná se navázat na vzniklé volné 3' konce a při zapojení její 5'→3' exonukleázové aktivity začleňuje volné nukleotidy přítomné v reakčním roztoku v průběhu extenze nového komplementárního DNA řetězce. Směs volných nukleotidů obsahuje všechny 4 druhy nukleotidů a jeden z těchto nukleotidů je vázán buď přímo k reportérové molekule (většinou se jedná o některý typ fluorochromu nebo radionuklidu inkorporovaného ve struktuře nukleotidu) anebo k molekule specificky vázající pouze jeden typ protilátky nebo streptavidin. Reakce značení nick translací obvykle trvá maximálně 1 h (Farrell R. E., 2010).

1.4.3.3 Značení pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR)

Tato metoda se používá převážně pro syntézu prób, kde je k dispozici velmi malé množství templátové DNA pro přípravu próby. PCR produkty jsou značeny většinou již během syntézy PCR amplikonu. PCR značení je v dnešní době velmi využíváno. Jeho výhodami jsou rychlost, specifita a efektivita reakce (Farrell R. E., 2010).

1.4.4 Typy reportérových molekul

Próby lze značit několika druhy molekul, které slouží přímo jako reportérové molekuly nebo se jedná o specificky vázané konjugáty reportérových molekul s protilátkami či proteinem specificky vázajícím konkrétní haptenu (např. avidinem/streptavidinem). Z tohoto důvodu lze tyto molekuly použít dle strategie značení prób pro přímé nebo nepřímé značení. Při přímém značení je próba značena přímo fluorochromem, popř. radionuklidem, zatímco při nepřímé detekci je próba značena haptenu, který je nutné dále detekovat konjugátem protilátky nebo specificky vázajícího proteinu proti tomuto haptenu, který je vázaný buď přímo s fluorochromem nebo enzymem umožňujícím kolorimetrickou či chemiluminiscenční detekci (Tijssen P., 1993). Mezi nejpoužívanější reportérové molekuly patří radioizotopy, biotin, DIG a fluorochromy, které jsou popsány níže.

1.4.4.1 Radioizotopy

Radioizotop je nestabilní atomové jádro, jež emituje energii částicové radiace v několika formách. Mezi ně patří α , β záření a elektromagnetická radiace ve formě γ záření nebo radiační záření (Bavelaar B. M. *et al.*, 2018). Radioizotopem mohou být značeny protilátky i nukleotidové próby. Mezi nejčastěji použité radioizotopy pro značení nukleotidů patří například ^3H , ^{32}P , ^{35}S vyzařující β záření. Výhoda značení radioizotopy spočívá

v možnosti dlouhé expozice (1-2 týdny) a zároveň je to nejcitlivější metoda značení. Hlavní nevýhoda značení radioizotopy je zdravotní riziko spojené s expozicí radioaktivnímu záření a při použití tohoto typu značení je tedy třeba dbát předepsaných bezpečnostních opatření a dodržovat je v celém průběhu práce s těmito izotopy. Radioizotopy jsou detekovány pomocí autoradiografie, která je popsána v kapitole 1.5.1 (Stott D. I., 1989; Tijssen P., 1993).

1.4.4.2 Biotin

Biotin je organická heterobicyklická molekula skládající se z 2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazolu a navázanou kyselinou valerovou na tetrahydrothiofenový prsteneček (Altaf M., Stoeckli-Evans H., 2013). Biotin je hydrofilní esenciální vitamín B7, který napomáhá metabolismu proteinu, sacharidů a tuků, je také součástí syntézy mastných kyselin, glukózy a aminokyselin (Raghu S., Sunita P., 2023).

Nejvíce je používán nukleotid s biotinem Bio-11-dUTP3, který funguje jako analog deoxythymidintrifosfátu (dTTP). Bio v názvu znamená, že se jedná o molekulu s biotinem a číslo 11 udává počet atomů mezi samotným biotinem a nukleosidovou částí molekuly. Biotinem lze značit několika způsoby, z nichž některé jsou uvedeny v kapitole 1.4.3. Biotin je specificky vázán streptavidinem či avidinem, které jsou používány nejčastěji ve formě konjugátu s některou z reportérových molekul, jako je alkalická fosfatáza (AP) nebo křenová peroxidáza (HRP) či fluorochrom, jejichž přítomnost je možné detekovat příslušným substrátem nebo detekci fluorescenčního záření (viz níže) (Farrell R. E., 2010).

1.4.4.3 Digoxigenin (DIG)

DIG je 5 β -kardinalit s hydroxidovými substituenty v pozicích 3 β -, 12 β - a 14 β -, což jsou steroidní hydroxidy. V molekule je nadále dvojná vazba v místě C(20) - C(22) (Kessle C., 1991).

Nejvíce je používán nukleotid dUTP s DIG ve tvaru DIG-11-dUTP, který lze následně detekovat anti-DIG-protilátkami konjugovanými s HRP, AP či fluorochromem. DIGem lze značit několika způsoby, z nichž některé jsou uvedeny v kapitole 1.4.3. DIG je specificky vázán anti-DIG protilátkou, která je vázána v konjugátu s reportérovými molekulami AP a HRP. Konjugát je následně možné detekovat reakcí s příslušným substrátem nebo detekci fluorescenčního záření (viz níže) (Farrell R. E., 2010).

1.4.4.4 Fluorochrom

Fluorochrom je molekula, jež je schopná excitace po absorpci elektromagnetického záření určité vlnové délky s následnou emisí záření o delší vlnové délce (Mullins J. M., 2009), podrobněji popsáno v kapitole 1.5.4.

Pro účely značení fluorescenčních prób je fluorochrom konjugován s nukleotidem nebo pro nepřímé značení prób s avidinem, streptavidinem nebo protilátkou. Fluorochromy jsou používány nejčastěji ve vazbě FL-12-dUTP pro značení DNA a FL-12-UTP pro RNA. Fluorochromem lze značit několika způsoby, z nichž některé jsou uvedeny v kapitole 1.4.3 (Farrell R. E., 2010).

1.5 Metody detekce signálu značené próby

Značící molekuly lze detekovat pomocí několika metod. Níže jsou uvedeny některé z nich.

1.5.1 Radiografická detekce

Princip radiografické detekce spočívá v zachytu fotonů světla, částice β nebo γ záření uvolněných při rozpadu radioaktivního prvku na fotosenzitivních filmech pokrytých krystaly bromidu stříbrného. Oxidované molekuly bromidu stříbrného se následně redukují za vzniku kovového stříbra. Nejčastěji se používají dvouvrstvé rentgenové filmy, kterými jsou detekovány β částice o vysoké energii, jež jsou emitovány například ^{32}P (Voytas D., Ke N., 2002).

1.5.2 Kolorimetrická detekce

Kolorimetrická detekce je jednoduchá a rychlá metoda u níž je vyhodnocení přítomnosti a intenzity signálu provedeno vizuálně pomocí lidského oka nebo spektrofotometricky (Wilson H. N., 1966). Během kolorimetrické detekce dochází k reakci reportérové molekuly se substrátem, po jehož rozštěpení vzniká viditelný produkt (Seo Y., 2005). Kolorimetrická detekce se dělí dle druhu reportérové molekuly, ke které je protilátka, avidin nebo streptavidin vázána na HRP a AP systém.

HRP systém – Jako substrát pro HRP se nejčastěji používá 3,3'-diaminobezidín (DAB), 4-chloro-1-naftol, 3-Amino-9-etylkrabozol (Rodig S J., 2019; Vazquez-Alvarado M. *et al.*, 2023) a 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Frey A. *et al.*, 2000). Štěpení substrátu

probíhá za přítomnosti H_2O_2 , kde HRP katalyzuje oxidaci substrátu za vzniku viditelného produktu (Rodig S J., 2019). Barva vznikajícího štěpného produktu je hnědá až černá.

AP systém – Jako substrát pro AP se nejčastěji používá 5-bromo-4-chloro-indyl fosfát (BCIP) a chlorid nitrotetrazoliové modři (NBT). AP během reakce se substrátem hydrolyzuje BCIP za vzniku indoxylu, který je oxidován NBT a dochází ke vzniku indigové barvy. NBT je redukováno za vzniku diformazanu, který je modrý. Kombinací indigové a modré barvy vzniká fialovo-modrý barevný produkt. Reakce AP s BCIP a NBT nemá rychlý průběh, což vytváří možnost lepší kontroly nad vývojem celé reakce (Samar K. K., 2014). Pomocí několikanásobného značení lze AP postupně konjugovat s různými substráty, kdy každý štěpný produkt má jinou barvu (Blake M. S. *et al.*, 1984; Kurien B. T. *et al.*, 2003).

1.5.3 Chemiluminiscenční detekce

Chemiluminiscenční detekce je velmi citlivá metoda, při které fotony světla spontánně vystupují z probíhající chemické reakce substrátu, která je katalyzována konjugáty HRP a AP (Samar K. K., 2014). Nejčastěji používanými substráty pro chemiluminiscenční detekci pomocí HRP jsou luminoly a podobné cyklické diacylhydrazidy. V přítomnosti peroxidu vodíku HRP reaguje s luminolem za vzniku excitované formy luminolu 3-aminofthalátu, který emituje záření o vlnové délce 425 nm. Vznikající fotony je možné detekovat pomocí dlouhé expozice citlivé CCD kamery (Bronstein I. *et al.*, 1995). Nejcitlivějšími substráty pro AP jsou 3-(2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3"-fosforyloxy)fenyl-1,2-dioxetan (AMPPD) a analog 5-chloro-derivátu (CSPD). AP defosforyluje substráty za vzniku fenoxidového meziprojektu (Kricka L. J., 1996). Detaily reakce AP se substráty nejsou uvedeny, jelikož chemiluminiscenční detekce pro tento konjugát nebyla v této práci prováděna.

1.5.4 Fluorescenční detekce

Fluorescenční detekce je snadná a velmi citlivá metoda využívající schopnosti některých sloučenin emitovat fluorescenční záření následkem ozáření a absorpce excitujícího elektromagnetického záření. Při ozáření těchto sloučenin, nejčastěji ultrafialovým zářením, dochází k excitaci valenčních elektronů do vyšších energetických hladin odkud se elektrony okamžitě vrací zpátky do hladin o nižší energii. Elektron vracející se do hladin o nižší energii emituje elektromagnetické záření, jehož vlnová délka je vždy delší než vlnová délka záření molekulou absorbované. Fluorescenční molekuly využívané v biologickém nebo fyzikálním

výzkumu samostatně jako fluorescenční barvivo nebo v konjugátu či v próbách se nazývají fluorochromy (Demchenko A. P. *et al.*, 2009).

1.6 Metoda Northern blot

Metoda Northern blot poskytuje kvantitativní a kvalitativní informace o studované molekule RNA (Farrell E. R., 1993). Metoda Northern blot je založená na detekci separovaných RNA molekul pomocí značených prób. Northern blot obvykle začíná izolací RNA, její elektroforetickou separací v denaturačním gelu a přenosu separované RNA na membránu. Mezi nejčastěji používané gely na separaci RNA patří denaturační močovinový polyakrylamidový gel s vysokým rozlišením RNA fragmentů až 1 nt (Green M. R., Sambrook J., 2021) zatímco u denaturačního agarózového gelu je rozlišení RNA fragmentů počítáno v nižších desítkách 30 nt (Green M. R., Sambrook J., 2022). RNA z gelu na membránu je přenášena tzv. difúzním blotováním (kapilárním, vakuovým) či pomocí stejnosměrného elektrického proudu. Následně dochází k inkubaci membrány s próbou, která se váže na cílovou molekulu. Následný postup je stejný jako u metody dot-blot popsany výše v kapitole 1.4 (Lovatt D., Eberwine J., 2013).

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo optimalizovat senzitivitu a specificitu signálu značené próby proti sfRNA v buněčné linii DAOY HTB-186 transfekované sfRNA a infikované TBEV Hypr.

Konkrétními cíli bylo zavedení a optimalizace protokolu metody dot-blot pomocí hybridizační próby zacílené proti transkriptům lidského „housekeeping“ genu poly (A) polymeráza alfa (PAPOLA) a Aktin β , v jejichž struktuře se nenachází žádné komplikované repetitivní sekvence s tendencí k formování sekundárních struktur.

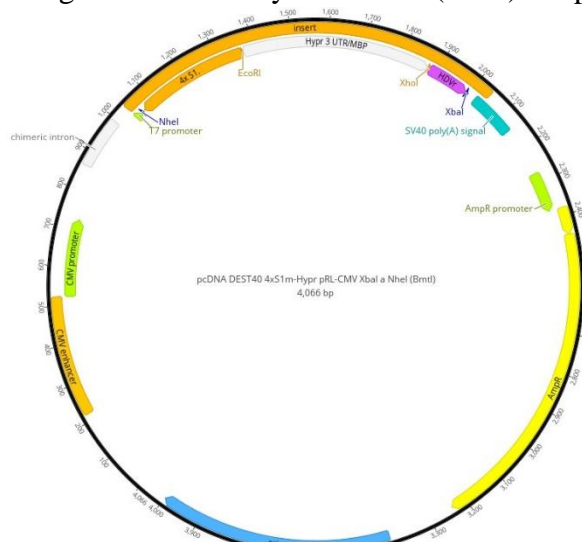
Dalším cílem byla aplikace optimalizovaného protokolu metody dot-blot k detekci sfRNA TBEV Hypr v RNA získané z buněčné linie DAOY HTB-186 transfekované sfRNA nebo infikované TBEV Hypr.

Doprovodným cílem byla optimalizace metody qRT-PCR k ověření přítomnosti a množství sfRNA v buněčné linii DAOY HTB-186 transfekované sfRNA nebo infikované TBEV Hypr.

3 Metody

3.1 *In vitro* transkripce sfRNA

In vitro transkripce sfRNA probíhala za použití pcDNA DEST40 plazmidu obsahujícího 3' UTR konec genomu TBEV Hypr (obr. 8) (dále jen sfRNA plazmid) a kontrolní plazmid nesoucí MBP pcDNA DEST40 HDVr MBP (obr. 8). *In vitro* transkripce byla provedena pomocí HiScript™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB) dle protokolu výrobce.



Obrázek 8.: Schéma plazmidu pcDNA DEST40 obsahující Hypr (obsahující sfRNA) a HDVr (obsahující MBP) inserty.

3.2 Transfekce buněčné linie DAOY HTB-186 s *in vitro* transkribovanou sfRNA

K transfekci byla použita buněčná linie lidského meduloblastomu (DAOY HTB-186). Buněčná linie DAOY HTB-186 byla získána z biopsie nádoru odstraněného ze zadní dutiny lebeční čtyřletého jedince (Jacobsen P. F. *et al.*, 1985). Buněčná kultura byla kultivována v DMEM s nízkým obsahem glukózy a přidavkem 10% fetálního bovinního séra (FBS), 1% L-alanyl-L-glutamin, a 1% směsi antibiotik a antimykotik (Amphotericin B 0,25 µg/ml, Penicilin G 100 units/ml, Streptomycin 100 µg/ml) (dále jen médium) při 37°C a 5% CO₂.

Buňky byly nasazeny 24 h před transfekcí na 6-jamkový panel v koncentraci 500 000 buněk/ml v 1 ml média. Po 24 h minimálně 30 min před samotnou transfekcí bylo buňkám vyměněno medium. Transfekce byla provedena za použití *Polyjet™ In vitro* DNA Transfection Reagent (SignaGen Laboratories) dle protokolu výrobce. Pro každou jamku 6-jamkového panelu byla připravena transfekční směs následujícím způsobem: 1 µg transkribované RNA bylo smícháno se 100 µl DMEM s vysokým obsahem glukózy. Dále bylo smícháno 3 µl transfekčního reagens se 100 µl DMEM s vysokým obsahem glukózy. Nakonec byla směs DMEM s transfekčním reagens přimíchána ke směsi DMEM s transkribovanou RNA v tomto pořadí a výsledný mix byl inkubován při pokojové teplotě po dobu 10-15 min

Po uplynutí inkubace byl transfekční mix pomalu nakapán do jamky k buňkám. Transfekce probíhala po dobu 48 h při 37°C v inkubátoru s atmosférou syčenou 5% CO₂. Po uplynutí inkubace byly transfekované buňky sklizeny a použity pro izolaci RNA. Izolace RNA proběhla dle protokolu uvedeného v kapitole 3.4.

3.3 Infekce buněčné linie DAOY-HTB 186 virem TBEV Hypr

K infekci virem TBEV kmene Hypr byla použita buněčná linie DAOY-HTB 186. Den před infekcí byly nasazeny 2 miliony buněk do kultivační lahvičky o kultivační ploše 25 cm². Druhý den bylo z obou kultivačních lahviček odstraněno médium. Do jedné z lahviček bylo přidáno čerstvé médium s přídatkem virové suspenze lyzátu buněk infikovaných virem TBEV Hypr ve finální koncentraci 5 virových částic na 1 milion buněk (5 MOI). Do druhé kultivační lahvičky bylo přidáno čerstvé médium s přídatkem stejného objemu lyzátu neinfikované buněčné kultury, která byla použita ke kultivaci TBEV Hypr, tzv. mock kontrola sloužící k odečtu efektu přítomnosti samotného lyzátu buněk na tkáňovou kulturu v průběhu infekce. Následná izolace RNA z infikovaných a neinfikovaných buněk proběhla dle protokolu uvedeného v kapitole 3.4.

3.4 Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí RNA Blue činidla (Top-Bio) dle pokynů výrobce. Získaná RNA byla rozpuštěna v 50 µl RNase free H₂O. Koncentrace izolované RNA byla změřena pomocí NanoPhotometer[®] Perl (Implen) a následně uskladněna při -80 °C.

3.5 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA byl použit 1 µg RNA. Před vlastní syntézou cDNA bylo provedeno odstranění DNA, k jejíž společné izolaci běžně dochází při izolaci RNA, pomocí dsDNase (Thermo Fisher Scientific) dle protokolu výrobce. cDNA byla syntetizována pomocí ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis kit (NEB) dle protokolu výrobce. K syntéze cDNA byl použit Random Primer Mix.

3.6 Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR esej s fluorescenční próbou k ověření účinnosti transfekce sRNA nebo infekce TBEV Hypr v buněčné linii DAYO HTB 186 byla provedena dle protokolu z

publikace Schwaiger M., Cassinotti P., 2003 pomocí KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) (Tab I a II).

Tab. I: Reakční mix pro qRT-PCR s použitím KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) (KAPA Biosystem). Předpis daný výrobcem byl přepočten na finální reakční objem 15 μ l.

Činidlo	Objem [μl]
KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix	7,5
10μM Forward primer	0,075 (50nM)
10μM Reverse primer	0,45 (300nM)
Templátová RNA	X (0,1 μ g)
10μM próba	0,3
50× KAPA RT Mix	0,3
Nuclease free H₂O	Do 15 μ l

Tab. II: Reakční podmínky pro amplifikaci vzorků pomocí KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems).

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Reverse transkripce	42	5	1
Aktivace enzymů	95	3	1
Denaturace	95	1	40
Annealing/extenze	60	0,5	

Dále byly použity reakční mixy bez próby KAPA SYBR[®] FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) (Tab. III a IV) a qPCR 2× SYBR Master Mix (Top-Bio) (Tab V a VI). Každá qPCR byla provedena dle protokolu výrobce.

Tab. III: Reakční mix pro qRT-PCR s použitím KAPA SYBR[®] FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) (KAPA Biosystems). Předpis daný výrobcem byl přepočten na finální reakční objem 15 μ l.

Činidlo	Objem [μl]
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2×) Universal	7,5
10μM Forward primer	0,075 (50nM)
10μM Reverse primer	0,45 (300nM)
50× KAPA RT Mix	0,3
Templátová RNA	X (0,1 μ g)
Nuclease free H₂O	Do 15 μ l

Tab. IV: Reakční podmínky pro amplifikaci vzorků pomocí KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2×) Universal (KAPA Biosystems).

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Reverse transkripce	42	5	1
Aktivace enzymů	95	3	1
Denaturace	95	1	40
Annealing/extenze	60	0,5	
Tání	50–99	Navyšování o 0,5 °C/ 30 s	

Tab. V: Reakční mix pro qPCR s použitím 2× SYBR Master Mix (Top-Bio)

Činidlo	Objem [μl]	Objem [μl]
qPCR 2× SYBR Master Mix	12,5	12,5
50μM Forward primer	1	0,125 (50nM)
50μM Reverse primer	1	0,75 (300nM)
Templátová DNA	X (1 μg)	4
Nuclease free H ₂ O	Do 25 μl	Do 25 μl

Tab. VI: Reakční podmínky pro amplifikaci vzorků pomocí qPCR 2× SYBR Master Mix (Top-Bio)

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Iniciační denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	10 s	40-45
Annealing	57-60	10 s	
Extenze	72	20-30 s/kb	
Tání	50–99	Navyšování o 0,5 °C/ 30 s	

Finální koncentrace a teploty nasedání primerů byly stanoveny autorem primerů. V případě vlastních primerů byly teploty nasedání primerů vypočteny fyzikálním modelem používaným nástrojem Oligo Analyzer tool (IDT DNA) a dále ověřeny experimentálně. Použitá finální koncentrace těchto primerů byla 300nM a v případě potřeby optimalizace účinnosti primerů byly hodnoty finální koncentrace vybrány dle výsledků optimalizačních experimentů. Optimalizace eseje pro kvantifikaci sRNA pomocí qPCR byla předmětem této práce a její výstupy jsou podrobně popsány v kapitole výsledky (4.1). Všechny qPCR reakce byly provedeny a analyzovány v přístroji CFX96 Real-time PCR detection systém pomocí software CFX Manager verze 3.0 (Bio-Rad).

Schéma pozic primerů v sRNA sekvenci jsou zobrazeny v obr. 9. Další vlastnosti primerů jsou popsány v Tab VII a Tab. VIII.



Obrázek 9.: Schéma pozic primerů v sfRNA sekvenci.

Tab. VII. Přehled prób a primerů pro přípravu reakčních směsí qRT-PCR.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'
sfRNA	sfRNA_F	CGAACATGGTGCATGAAAAGGG
	sfRNA_R5	CCTCTACCGAGGGGGAATTTTGT
	sfRNA_F1	GCCGAACATGGTGCATGAAA
	sfRNA_F3	TTGGCAGCTCTCTTCAGGATTT
	sfRNA_R2	TGCCAATTTCTCTCTTCCCTCC
	TBE1 F	GGGCGGTTCTTGTCTCC
	TBE1 R	ACACATCACCTCCTTGTCAGACT
	TBE-probe-WT	TGAGCCACCATCACCCAGACACA
MBP	MBP_F2	CCGCTGGGTGCCGTA
	MBP_R1	GACAGTCTGACGACCGCTG

Tab. VIII. Přehled kombinací primerů a příslušných podmínek PCR pro přípravu reakčních směsí qRT-PCR.

Kombinace primerů	Délka amplikonu [bp]	Annealingová teplota [°C]	Doba extenze [s]
sfRNA_F × sfRNA_R5	122	57	20
sfRNA_F1 × sfRNA_R5	124	57	20
sfRNA_F3 × sfRNA_R5	58	57	20
sfRNA_F × sfRNA_R2	70	57	20
TBE1 F × TBE1 R	68	60	20
MBP_F2 × MBP_R1	75	60	20

V předchozích tabulkách jsou uvedeny předpisy reakčních mixů a reakčních podmínek pro qRT-PCR esej s použitím TaqMan próby TBE-probe-WT (značené 5' FAM a 3' BHQ1) a párem primerů TBE1 F a TBE1 R dle publikace Schwaiger M., Cassinotti P., 2003. Koncentrace a reakční podmínky ostatních primerů byly předmětem optimalizací uvedených v kapitole 4.1.2.

3.7 Elektroforetická separace

Před použitím PCR produktu a značených prób v dalších experimentech došlo k jejich kontrole elektroforetickou separací v 3% agarózovém gelu. Vzorky byly smíchány s 6×

DNA-loading buffer obsahujícím fluorescenční interkalační barvivo GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in water (Biotium). GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) byl použit jako velikostní referenční standard. Elektroforetická separace probíhala 10 min při 90 V z důvodu plynulejšího přechodu DNA z nanášecí jamky do struktury gelu a následně 45 až 90 min při 120 V. Po ukončení elektroforézy byla separovaná DNA v gelu zobrazena v přístroji G-box Chemi XX6 (SYNGENE).

3.8 Izolace PCR produktů z gelu

PCR produkt byl vykrojen z agarózového gelu po elektroforetické separaci pomocí vydezinfikovaného skalpelu na platformě opatřené UV lampou v přístroji G-box Chemi XX6 (SYNGENE). Pro izolaci PCR produktů z gelu byl použit NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup kit (Macherey-Nagel). Izolace byla provedena dle protokolu výrobce. Koncentrace izolovaného PCR produktu byla změřena pomocí NanoPhotometer® Perl (Implen). Izolované PCR produkty byly uskladněny při -20 °C.

3.9 Syntéza amplikonů pro přípravu DNA prób

Amplikony pro přípravu DNA prób komplementárních k lidskému genu PAPOLA, Aktin β a sRNA byly připraveny pomocí OneTaq® Hot Start DNA polymeráza (NEB) (Tab. IX) a Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymeráza (NEB) (Tab. XI). Všechny PCR probíhaly dle pokynů výrobce příslušných Taq polymeráz v přístrojích T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) nebo Biometra TRIO (Analytik Jena).

Tab. IX: Reakční mix pro PCR s použitím One Taq Hot Start DNA polymerázy pro objem reakce 25 μ l.

Činidlo	Objem [μ l]
5× One Taq Standard Reakční pufr	5
10mM dNTPs	0,5
10μM Forward primer	0,5
10μM Reverse primer	0,5
Templátová DNA	X (1 μ g)
One Taq Hot Start DNA polymeráza	0,125
Nuclease free H₂O	Do 25 μ l

Tab. X: Reakční podmínky pro amplifikaci PCR produktů pomocí One Taq Hot Start DNA polymerázy

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciační denaturace/aktivace enzymů	94	30	1
Denaturace	94	30	30
Annealing	45-68	15-30	
Extenze	68	1 min/kb	
Finální extenze	68	5	1

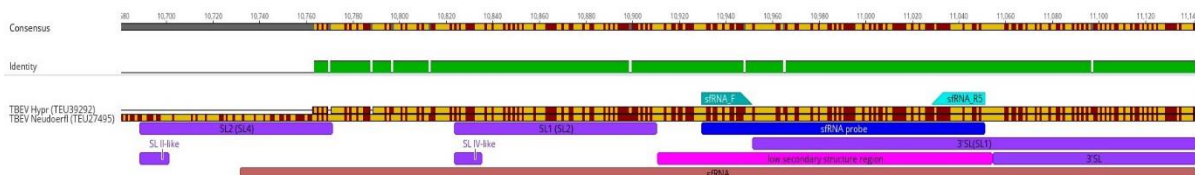
Tab. XI: Reakční mix pro PCR s použitím Q5 High-Fidelity DNA polymerázu pro reakční objem 25 μ l.

Činidlo	Objem [μ l]
5×Q5 Reakční pufr	5
10mM dNTPs	0,5
10 μ M Forward primer	1,25
10 μ M Reverse primer	1,25
Templátová DNA	X (1 ng–1 μ g)
Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza	0,1
5× Q5 High GC Enhancer	5
Nuclease free H ₂ O	Do 25 μ l

Tab. XII: Reakční podmínky pro amplifikaci PCR produktů pomocí Q5 High-Fidelity DNA polymerázy

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciační denaturace/aktivace enzymů	98	30	1
Denaturace	98	5-10	30
Annealing	50-72	20-30	
Extenze	72	20-30/kb	
Finální extenze	72	2	1

Navržení próby pro sfRNA sekvenci bylo obtížné, protože sfRNA obsahuje tzv. stem loop (SL) subdomény, které v sfRNA tvoří sekundární struktury. Anotované SL struktury v obr. 10 níže jsou odvozeny z již dříve predikovaných SL struktur příbuzných flavivirů (Pijlman G. P. *et al.*, 2008). Navržení próby v místě formování sekundární struktury by mohlo způsobit, že cílová sekvence próby bude formovat tuto strukturu a tím přestane být přístupná pro hybridizaci próby. Próba použitá v této práci je znázorněna na obr. 10. Přehled primerů je znázorněn v Tab XIII.



Obrázek 10.: Schéma alignmentu sfRNA TBEV Hypr a Neudorfl s umístěním sfRNA próby (tmavě modrá) a primerů použitých pro syntézu amplikonu pro přípravu této próby (tyrkysová). Fialově anotované úseky znázorňují umístění SL subdomén v 3'UTR a hnědý úsek znázorňuje umístění sfRNA obou kmenů TBEV.

Tab. XIII. Přehled primerů a příslušných podmínek PCR pro přípravu amplikonů pro značení hybridizačních prób

Gen	Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'	Délka amplikonu [bp]	Annealingová teplota [°C]	Doba extenze [s]
PAPOLA	PAPOLA F	AAAAGGTGCTGA TATTGATGCGT	292	56	30
	PAPOLA R	TACCCTGCAACC GTAAAGACT			
Aktin β	Actβ F	TTGCTCCTCCTG AGCGCAAG	500	61	35
	Actβ R	ATGCTATCACCT CCCCTGTGTGG			
sfRNA	sfRNA_F	CGAACATGGTGC ATGAAAAGGG	122	57	20
	sfRNA_R5	CCTCTACCGAGG GGGAATTTTGT			
	TBE1 F	GGGCGGTTCTTG TTCTCC	68	60	20
	TBE1 R	ACACATCACCTC CTTGTCAGACT			

3.10 Přečištění produktů enzymatických reakcí pomocí Sephadex™ G-50 Superfine

K přečištění PCR produktů a značených DNA prób byl použit Sephadex™ G-50 Superfine, dle následujícího protokolu s předpisem pro přečištění jednoho vzorku (PCR produktu/značené próby). Sephadex byl smíchan s vodou zbavenou nukleáz (DEPC H₂O) v poměru 0,05 g/800 μl a hydratován při 4 °C po dobu nejméně 45 min. Poté byla suspenze promíchána a nanášena do uštířené 1000 μl pipetovací špičky s filtrem, která byla umístěna v 1,5 ml mikrozkuřavce, čímž vznikla filtrační sestava pro přípravu přečišťovací sephadexové mikrokolony. Pro vytvoření sephadexového sloupečku bylo přidáno 400 μl suspenze Sephadexu, která byla protlačena přetlakem vytvořeným pomocí pipetovacího dudlíku, zatímco sephadexová matrice zůstala zachycena na povrchu filtru pipetovací špičky.

Protlačená DEPC H₂O byla z mikrozkušavky vylita. Stejný postup byl ještě 2× opakován s 300 µl a následně se 100 µl sephadexové suspenze. Poté byla sephadexová mikrokolona centrifugována při 1000 × g po dobu 2 min. Pipetovací špička se vzniklým sloupečkem sephadexové matrice byla přemístěna do nové 1,5 ml zkumavky. Na vzniklý sephadexový sloupeček byl nanesen vzorek. Sephadexová mikrokolona s naneseným vzorkem byla centrifugována při 1000 × g po dobu 2 min. Na dně mikrozkušavky sephadexové mikrokolony byl získán přečištěný PCR produkt či značená DNA próba. Koncentrace přečištěného PCR produktu či DNA próby byla změřena pomocí NanoPhotometer® Perl (Implen).

3.11 Příprava značených DNA prób

Značené DNA próby byly používány v metodě dot-blot. Ke značení DNA byly použity metody nick translace a značení náhodnými primery.

3.11.1 Nick translace

Nick translace sloužila ke značení prób biotinem či DIGem Reakční směs pro nick translaci byla připravena dle Tab. XIV. Příprava reakční směsi a následné inkubace byly provedeny dle publikace Kato A. *et al.*, 2006.

Tab. XIV: Reakční směs pro nick translaci (20 µl)

Činidlo	Množství [µl]
10× Nick Translation pufr	2
0,1M β-Mercaptoethanol	1
dNTPs	2
1mM biotin-dUTPs	0,4
DNA Polymeráza I	2
100× DNáza	0,5
~1 µg DNA	X
Nuclease free H₂O	Do 20 µl

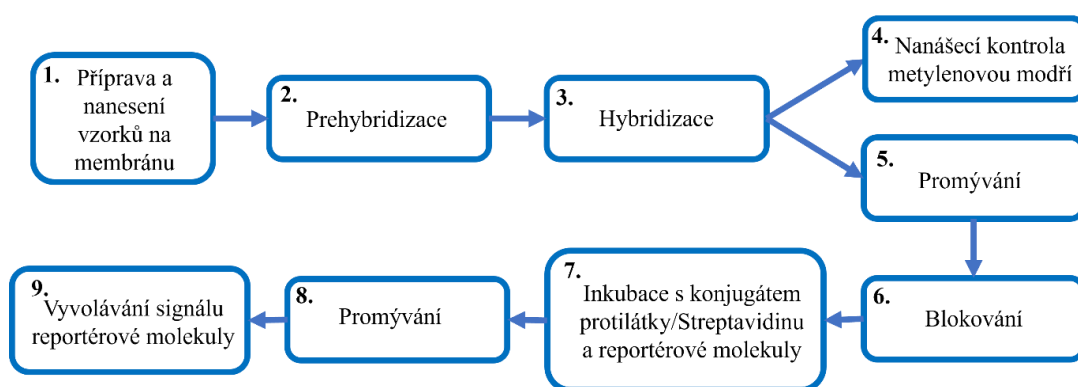
Směs byla inkubována 1 h při 15 °C s následnou inaktivací enzymů 10 min při 70 °C. Reakční směs byla přečištěna metodou Sephadex™ G-50 Superfine (viz kapitola 3.10).

3.11.2 Značení náhodnými primery DecaLabel™

Značení náhodnými primery bylo provedeno pomocí Biotin DecaLabel DNA labeling kit (Thermo Fisher Scientific) dle pokynů výrobce. Ke značení bylo použito 1 µg příslušného amplikonu.

3.12 Dot-blot

Metoda dot-blot byla provedena za použití několika různých protokolů, včetně jejich kombinací. Pro přehlednost je na obr. 11 uvedeno základní schéma protokolu, po němž následuje detailní popis jednotlivých kroků s přehledem reakčních podmínek a použitých pomůcek a chemikálií.

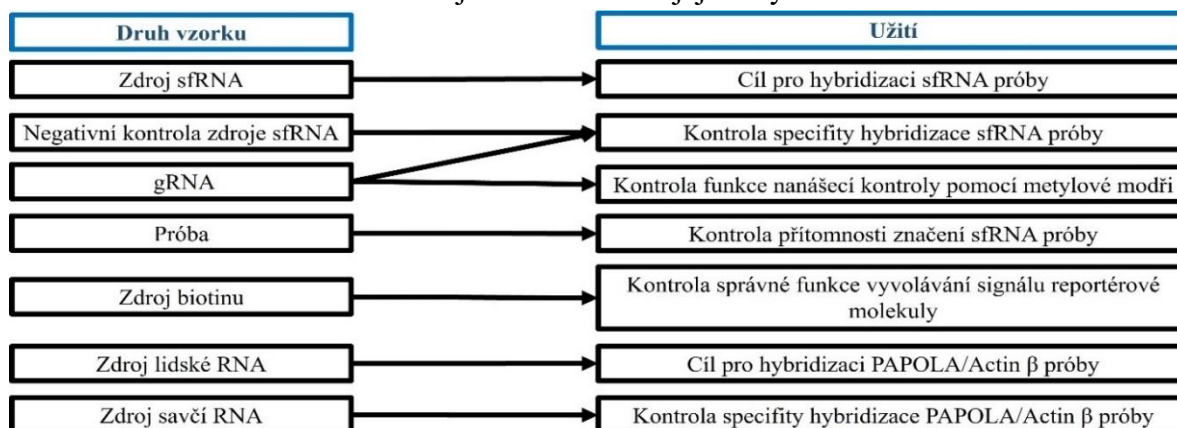


Obrázek 11.: Schéma postupu metody dot-blot.

1. Příprava vzorků a nanesení vzorků na membránu

Potřebné množství nukleové kyseliny z každého vzorku bylo zředěno DEPC H₂O do finálního objemu 5 µl. Vzorky byly nanесeny přímo na předvlhčenou nylonovou, nitrocelulóзовou nebo PVDF membránu pomocí pipety. Pro velmi zředěné vzorky byl pro jejich nanесení na membránu použit Dot-Blotter (Clever Scientific Ltd). V případě použití Dot-Blotteru bylo nutné vzorky zředit DEPC H₂O do finálního objemu 25-100 µl. Vzorky RNA byly před nanесením denaturovány při 70 °C a DNA vzorky při 95 °C obojí po dobu 3 min a okamžitě zchlazeny na ledu. Vzorky po nanесení byly nechány lehce zaschnout a poté byly na membráně zafixovány pomocí UV záření v přístroji UVP crosslinker (Analytik Jena).

Schéma v obr. 12 znázorňuje druh vzorků a jejich význam v metodě dot-blot.



Obrázek 12.: Schéma přehledněji znázorňující druhy použitých vzorků uvedených níže a jejich úlohu během optimalizace metody dot-blot.

Seznam a popis použitých vzorků a v závorce uvedený zástupný zkrácený název používaný v této práci:

a) RNA z buněčné linie A549 (RNA A549) – RNA z lidské buněčné linie, získané z rakovinné plicní tkáně z vyňatého nádoru 58letého muže (Sundararajan R. *et al.*, 2014).

- tato linie byla kultivována kolegy v laboratoři, kteří mi poskytli buněčnou peletu 3× promytou PBS pro izolaci RNA.

b) RNA z buněčné linie PMJ2-R (RNA PMJ2-R) – RNA z myší buněčné linie získána infekcí C57BL/6 myši s J2 retrovirem nesoucím v-raf a v-myc onkogeny (Rusanov A. L. *et al.*, 2021).

-tato linie byla kultivována kolegy v laboratoři, kteří mi poskytli buněčnou peletu 3× promytou PBS pro izolaci RNA.

c) RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 (RNA DAOY) – RNA z lidské buněčné linie získané z biopsie nádoru odstraněného ze zadní dutiny lebeční čtyřletého jedince (Jacobsen P.F. *et al.*, 1985), jejíž kultivace je popsána v kapitole 3.2.

d) RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 infikovaná virem TBEV (infikovaná TBEV) – příprava popsána v kapitole 3.3.

e) RNA z negativní kontroly infekce buněčné linie DAOY HTB-186 virem TBEV (NK) – příprava je popsána v kapitole 3.3.

f) RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 transfekovaná sfRNA (transfek. sfRNA) – příprava je popsána v kapitole 3.2.

g) RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 transfekované MBP (transfek. MBP) – negativní kontrola transfekce, její příprava je popsána v kapitole 3.2.

h) Próba – kontrola správného značení próby a jeho stability za podmínek použitých v metodě dot-blot.

i) Konjugát lektinu GSL-1 s biotinem ((Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I (GSL I, BSL I), Biotinylated; Vector Laboratories) (**GSL-1**) – kontrola správné funkce detekce signálu reportérové molekuly biotinu.

j) RNA z trnuchy obecné (RNA trnucha) – kontrola správné funkce detekce nanášecí kontroly za použití metylenové modři.

- tato RNA byla izolována kolegy v laboratoř ze vzorků tkáně Trnuchy obecné používané v jiných projektech laboratoře.

k) Plazmid pUC19 (pUC) – pUC19 Vector (NEB) - kontrola správné funkce detekce nanášecí kontroly za použití metylenové modři.

l) Plazmid PcMV (PcMV) - PcMV T-7-Hypr-Rluc T-7 NEBulider DH5 α – kontrola účinnosti hybridizace sfRNA próby k sekvenci sfRNA nesené plazmidem.

m) Transkribovaná sfRNA nebo MBP (transkrib. sfRNA/MBP) – připravené *in vitro* transkripcí popsané v kapitole 3.1, kontrola účinnosti hybridizace sfRNA a MBP prób

2. Prehybridizace

Prehybridizace membrány se vzorky probíhala v 50ml centrifugační zkumavce v hybridizační pícce za konstantní rotace při 42 °C či 50 °C po dobu 30-60 min za konstantní rotace.

3. Hybridizace

Hybridizace byla provedena v hybridizačním roztoku, který byl připraven smícháním prehybridizačního roztoku s roztokem denaturované próby nebo byl vyroben roztok, který se svým složením lišil od prehybridizačního. Složení těchto roztoků bylo předmětem optimalizace a jejich konkrétní složení je uvedeno v kapitole výsledky (4.2). Próba značená biotinem či DIG byla denaturována při 95 °C po dobu 3 min. Membrána byla inkubována s hybridizačním roztokem v hybridizační pícce za konstantní rotace při 42 °C nebo 50 °C po dobu 1 h až přes noc za konstantní rotace.

4. Nanášecí kontrola pomocí Metylenové modři a GelRedu

Část membrány s kontrolními vzorky určenými k detekci nanášecí kontroly byla odstřížena a promyta v 96% etanolu po dobu 5-15 min při pokojové teplotě (RT). Dále byla

promyta v DEPC H₂O po dobu 3 min při RT. Poté byla barvena roztokem metylenové modři v 0,5M Na-acetátu (pH=5,2) po dobu 5-10 min. Nakonec byla membrána promývána v DEPC H₂O, do momentu vzniku fialového signálu v místě s nanesenou nukleovou kyselinou. Nanášecí kontrola proběhla po hybridizaci s použitím duplikátů testovaných vzorků a také s ostatními vzorky na membráně po vyvolání signálu reportérové molekuly.

Nanášecí kontrola po vyvolání signálu reportérové molekuly byla provedena pomocí 2× koncentrovaného interkalačního barviva GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in water (Biotium). Obarvení membrány trvalo 10 min a poté byl fluorescenční signál barviva GelRed s RNA na membráně detekován v G-box Chemi XX6 (SYNGENE).

5. Promývání po hybridizaci

Membrána byla nejprve promyta v 2×SSC a 1% SDS při RT po dobu 15 min Druhý promývací krok byl proveden v 0,2×SSC, 0,1% SDS nebo 2×SSC a 1% SDS při 42 či 50 °C po dobu 15 min. Promývání probíhalo v hybridizační pídce za konstantní rotace.

6. Blokování

Blokování membrány probíhalo v blokovacím roztoku při pokojové teplotě po dobu 10 až 30 min za konstantní rotace.

7. Inkubace s konjugátem protilátky/Streptavidinu a reportérové molekuly

Konjugát streptavidinu s HRP nebo AP byl zředěn 1:1000–1:5000 v čerstvém blokovacím roztoku. Inkubace membrány v blokovacím roztoku s konjugátem byla provedena při pokojové teplotě po dobu 1 h za konstantní rotace.

8. Promývání po navázání konjugátu

Promytí membrány od nenavázaného konjugátu probíhalo v promývacím roztoku při pokojové teplotě ve 3-6ti krocích trvajících 5-10 min za konstantní rotace.

9. Vyvolání signálu reportérové molekuly

Detekce přítomnosti reportérové molekuly bylo provedeno kombinací chemiluminiscenční a kolorimetrické detekce. V některých případech došlo k vyvolávání signálu pouze pomocí kolorimetrické detekce. Membrána byla nejprve inkubována v chemiluminiscenčním substrátu Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) a po

zaznamenání luminiscenčního signálu v přístroji G: Box Chemi XX6 (Syngene) byl substrát odmyt v $1\times$ TBS + 0,1% Tween 20 po dobu 3×10 min při RT. Signál reportérové molekuly byl doplňkově vyvolán pomocí kolorimetrické detekce pro HRP (Streptavidin-HRP Concentrated (100 \times), AbClonal). Detekční roztok byl složen z 0,1M Tris-HCl (pH=7,5) s 3,3'-diaminobenzidin tetrachlorid (DAB) (Roth) sloužící jako substrát. Kolorimetrická detekce pro AP (Streptavidin, Alkaline Phosphatase (2 \times), Vector Laboratories) byla provedena v AP vyvolávacím pufru (50mM MgCl₂, 100mM NaCl, 100mM Tris-Cl, 0,5% Tween 20, pH=9,5), s přídavkem 66 μ l NBT (BioChemica) v 70% DMSO a 33 μ l BCIP (BioChemica) ve 100% DMSO na 10 μ l AP vyvolávacího pufru.

3.13 Northern blot

Metoda Northern blot sloužila k odhalení zdroje nespecifické hybridizace sRNA próby pozorované v metodě dot-blot.

K vytvoření polyakrylamidových močovinných gelů a elektroforetické separaci byl použit mini-Protean Tetra Cell vertikální elektroforetický systém (BioRad). Před samotnou výrobou gelu byly všechny části aparatury, které přichází do přímého kontaktu s gelem (hřebínky, skla, těsnící pryže) namočený v 0,1% SDS, následně v 75% etanolu a DEPC H₂O a nechány oschnout. Pro elektroforetickou separaci byl vytvořen 12% polyakrylamidový separační gel se 4% močovinou (4,8 g močoviny, 0,5 ml $10\times$ TBE, 2 ml akrylamidu a doplněno DEPC H₂O do 10 ml) o tloušťce 1 mm. Pro úplné rozpuštění močoviny bylo nutné roztok během přípravy zahřívát. Do zahřátého roztoku bylo přidáno 100 μ l 10% peroxodisíranu amonného (APS) (SERVA) (vyrobeného těsně před přípravou roztoku a jeho nanesením mezi skla) a 7,5 μ l N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diaminu (TEMED) (SERVA). Poté byla směs přemístěna do předem vysušené aparatury a byl vložen hřebínek. Polymerizovaný gel byl ihned použit nebo byl umístěn v chladniče, zabalen do papírových utěrek navlhčených DEPC H₂O. Připravený gel byl umístěn do aparatury pro elektroforetickou separaci a vana byla zalita $0,5\times$ TBE. Aparatura byla napojena do zdroje stejnosměrného elektrického proudu a nastavena na 40 V na 10 min. Mezitím byly připraveny vzorky, které byly smíchány s ekvivalentním objemem Gel loading bufferu II (Ambion, Applied Biosystems) a denaturovány při 70 °C po dobu 5 min. Obdobným způsobem byl denaturován referenční velikostní standard RiboRuler High Range RNA ladder (Thermo Fisher Scientific) smíchaný s ekvivalentním objemem $2\times$ RNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific). Denaturované vzorky a velikostní referenční standard byly následně pipetovány do jamek gelu. Elektroforetická separace následně probíhala při 150 V po dobu 90 min. Po ukončení elektroforetické separace došlo k obarvení

RNA v 70 ml 0,5×TBE pufru s obsahem 2× koncentrovaného interkalačního barviva GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in water (Biotium). Obarvení gelu trvalo 30 min a poté byl fluorescenční signál barviva GelRed s RNA v gelu detekován v G-box Chemi XX6 (SYNGENE). Po zdokumentování signálu fluorescence následovalo elektroblotování separované RNA na membránu. Pro elektroblotování byly předvlhčeny 4 blotovací papíry v 0,5×TBE a nylonová membrána a obojí uštířeno ve formátu odpovídajícímu rozměrům gelu. Následně byly do elektroblotovací vany umístěny předvlhčené blotovací papíry a na ně byla položena nylonová membrána Zeta-Probe® Blotting Membranes (Bio-Rad), na kterou byl opatrně položen gel. Gel byl nadále zakryt dalšími dvěma blotovacími papíry. Po každé přidané vrstvě byly odstraněny případné přebytečné bubliny, které mohly mezi těmito vrstvami ulpět. Nakonec byla elektroblotovací vana uzamčena a vložena do Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) při 15 V (max 300 mA) na 30 min. Po elektroblotování byla provedena kontrola úspěšnosti přenosu RNA na membránu detekcí fluorescenčního signálu barviva GelRed s RNA v gelu v přístroji G-box Chemi XX6 (SYNGENE). Poté byly použity dva různé postupy na prehybridizaci, hybridizaci, promytí membrány, blokování membrány, navazování konjugátu, promytí (viz Tab XV a Tab. XVI).

Tab. XV: Přehled použitých roztoků, inkubačních doba a teplot v metodě Northern blot při použití DIG-značené próby.

1. experiment			
Krok	Roztok	Teplota [°C]	Čas [min]
Prehybridizace	SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich)	68	60
Hybridizace	SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich)	68	O/N
Próba	Značená DIGem		
Promytí 1	2×SSC, 0,1% SDS	RT	3×15
	0,1×SSC, 0,1% SDS	50	2×20
	Maleic acid buffer + 0,3% Tween 20	RT	10
Blokace membrány	Maleic acid buffer	RT	60
Navázání konjugátu	DIG-HRP	RT	60
Promytí 2	Maleic acid buffer + 0,3% Tween 20	RT	4×7, 2×15

Maleic acid buffer (100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH=7,5); **RT** – pokojová teplota; **O/N**

– přes noc

Tab. XVI: Přehled použitých roztoků, inkubačních dob a teplot v metodě Northern blot při použití biotinem značené próby.

2. experiment			
Krok	Roztok	Teplota [°C]	Čas [min]
Prehybridizace	SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich)	42	30
Hybridizace	SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich)	42	150
Próba	Značená biotinem		
Promytí 1	2×SSC, 1% SDS	RT/42	15/15
Blokace membrány	3% BSA, 1×TBS, 0,1% Tween 20	RT	30
Navázání konjugátu	3% BSA, 1×TBS, 0,1% Tween 20 s Streptavidin-HRP Concentrated (100×) 1/5000	RT	60
Promytí 2	1×TBS, 0,1% Tween 20	RT	4×5, 2×10

RT – pokojová teplota

Po provedení všech kroků zmíněný v tabulkách XVI a XVII byla provedena chemiluminiscenční (pouze experiment 1.) a kolorimetrická detekce.

4 Výsledky

4.1 Kontrola účinnosti transfekce *in vitro* transkribovanou sfRNA v buněčné linii DAOY HTB-186 pomocí qRT-PCR.

Pro účely zavedení a optimalizace metody dot-blot byly připraveny vzorky RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 transfekované *in vitro* transkribovanou sfRNA. Na rozdíl od přirozené infekce TBEV Hypr lze transfekcí transkribované sfRNA do buněk docílit vyššího podílu sfRNA v získaném RNA vzorku a je možné tak detekovat intenzivnější hybridizační signál pro potřeby optimalizace metody dot-blot. Seznam použitých templátů qRT-PCR všech experimentů je zaznamenán v Tab. XVII.

Tab. XVII: Seznam použitých templátů qRT-PCR.

Templáty pro qRT-PCR	Názvy použité v legendách obrázků
cDNA a RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 transfekované sfRNA	Transfekovaná sfRNA
cDNA a RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 infikovaná virem TBEV Hypr	Infikovaná RNA
cDNA a RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 infikovaná virem TBEV (mock kontrola infekce TBEV Hypr)	Negativní kontrola infekce
cDNA a RNA z transkribované sfRNA	Transkribovaná sfRNA
PCR produkt	Dle počtu kopií v reakci
Plazmid sfRNA	Dle počtu molekul v reakci plazmidu sfRNA
cDNA a RNA z buněčné linie A549	RNA A549

qRT-PCR byla použita k ověření přítomnosti a kvantity sfRNA v těchto vzorcích. Ověřený protokol pro kvantifikaci sfRNA byl převzat z publikace Schwaiger M. a Cassinotti P., 2003 využívající TaqMan qRT-PCR esej. Z důvodu pozastavení výroby TaqMan® One-Step qRT-PCR Master Mix Reagents Kitu (Thermo Fisher Scientific) použitého v publikaci bylo nutné využít alternativní reagentie KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (Kapa Biosystems), rutinně používaného v naší laboratoři. Během replikování esej za použití testovaných vzorků RNA bylo zjištěno, že účinnost kvantifikace sfRNA je naprosto nevyhovující za podmínek uvedených v publikaci. Proto bylo nutné tuto esej podrobit dalším optimalizacím popsaným v následující kapitole.

4.1.1 Optimalizace qRT-PCR esej dle publikace Schwaiger M. a Cassinotti P., 2003

Stanovení kvantifikace sfRNA bylo provedeno pomocí KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). V dokumentaci výsledků elektroforetické separace PCR produktů této qRT-PCR esej na obr. 13a) lze pozorovat vznik primer-dimerů nejen v beztemplátové kontrole (NTC), ale také v reakci za přítomnosti templátu. Patrný je také vznik PCR produktů větších, než je očekávaná velikost specifického ampliconu a jejichž přítomnost a formování je diskutováno v kapitole 0.

Pro vyloučení možného vlivu použitých PCR reagentií na účinnost primerů byl následně použit KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Vyhodnocením elektroforetické separace na obr. 13b) je možné pozorovat přítomnost produktu nespecifické amplifikace ve vzorcích NTC. S ohledem na délku ampliconu 68 bp této qRT-PCR esej bylo obtížné odlišit signál specifického produktu

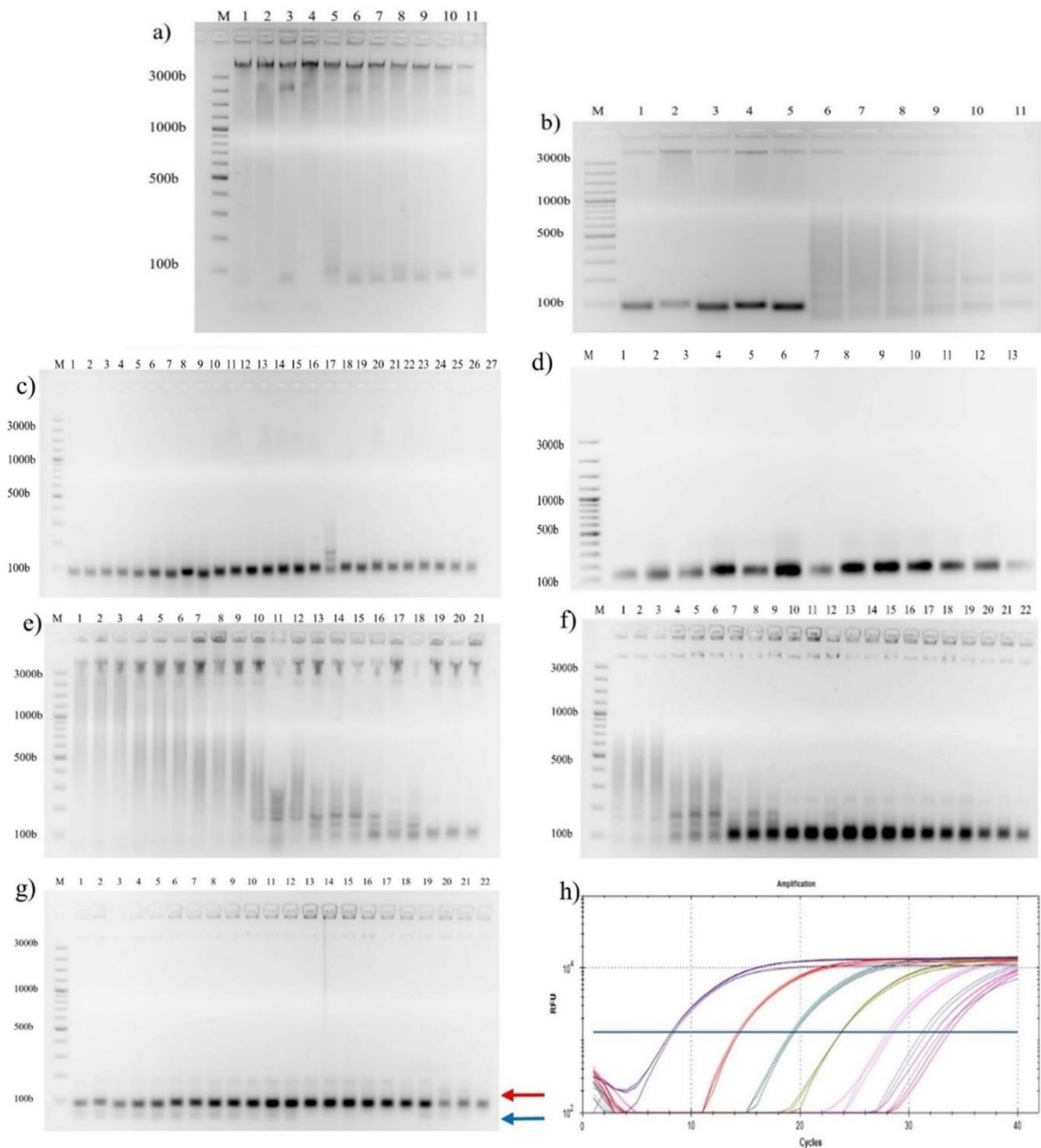
vzniklého amplifikací domnělé kontaminace v PCR reagentech od signálu případných primer-dimerů. Použití nových balení PCR reagentů přítomnost kontaminace vyvrátilo. Na fotodokumentaci výsledku elektroforetické separace na obr. 13c) lze pozorovat, že amplikonem v NTC jsou skutečně primer-dimery.

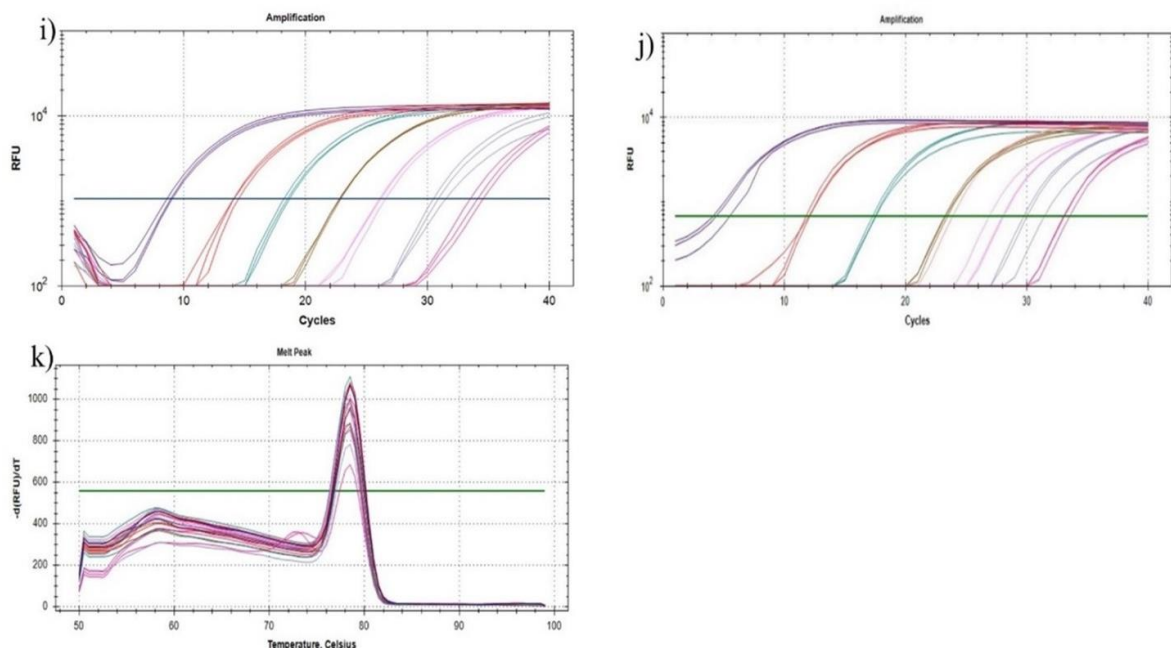
Pro stanovení účinnosti primerů z publikace Schweiger a Cassinotti, 2023 (dále jen TBE1 primerů) byla použita desítková ředící řada plazmidu sfRNA za použití KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Výsledek elektroforetické separace produktů této qRT-PCR je zobrazen na obr. 13d). Z výsledků je zřejmé, že účinnost amplifikace ani finální množství amplikonu neodpovídají vstupnímu množství templátové DNA a potvrzují tak velmi nízkou účinnost použitých primerů za těchto reakčních podmínek. Dalším možným důvodem vzniku amplikonů vyšších řádů ve formě tzv. žebříčku (několik produktů o různých velikostech) je přítomnost repetitivních elementů, tzv. Aptamerů v sfRNA plazmidu, které typicky amplifikaci amplikonů vyšších řádů způsobují (Tolle F. *et al.*, 2014).

Proto byl následně jako templát použit specifický amplikon izolovaný z agarózového gelu po elektroforetické separaci qRT-PCR reakce. Vzniklé PCR produkty byly vyřezány a izolovány z gelu pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu (Macherey-Nagel) a použity pro vytvoření desítkové ředící řady templátu k testování účinnosti TBE1 primerů. Nejprve byl použit KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Výsledky PCR při použití tohoto kitu jsou zobrazeny na obr. 13e), f), h) a i). Na obr. 13e) a h) lze pozorovat, že templát vykazoval výraznější tendenci k formování amplikonů vyšších řádů typických pro repetitivní DNA nebo DNA tvořící sekundární struktury v porovnání s templátem ve formě plazmidové DNA. Navíc lze pozorovat nízkou účinnost amplifikace při použití PCR produktu o nízkém ředění. Při použití PCR produktu získaného amplifikací plazmidu sfRNA pomocí vysoce procesivní a přesné Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy (NEB), schopné amplifikovat i strukturně komplikované templáty, se specificitu qRT-PCR zvýšit nepodařilo (obr. 13e) a i)). S ohledem na délku amplikonu pak nelze zjistit, zda jsou nejabundantnější amplikony tvořeny pouze specifickým PCR produktem anebo se jedná o kombinaci signálu z PCR produktu a primer-dimerů, jejichž přítomnost lze pozorovat v reakcích NTC v jamkách 19-22 obr. 13f).

Nízká účinnost qRT-PCR v dosavadních experimentech vedla k podezření na nevyhovující kvalitu polymerázy používané v PCR reagentech od společnosti KAPA Biosystems. Proto byl v následném experimentu použit qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio). Výsledky PCR s použitím tohoto kitu jsou dokumentovány na obr. 13j), g) a k), kde lze

pozorovat výrazné snížení tendence k formování amplikonů vyšších řádů (červená šipka na obr. 13g)), nikoliv však jejich úplné vymizení. Obdobně jako v předchozím experimentu lze pozorovat sníženou účinnost amplifikace se snižující se koncentrací templátu v reakci a přítomnost primer-dimerů o různých velikostech (viz modrá šipka v obr. 13g)). Abundance primer-dimerů navíc negativně koreluje s abundancí specifického amplikonu. Na základě těchto výsledků, nicméně stále nelze posoudit, zda je signál v místě očekávaného specifického amplikonu ve vzorcích s templátem tvořen pouze specifickým amplikonem anebo se jedná o kombinaci signálu ze specifického amplikonu a primer-dimerů, které lze pozorovat ve vzorcích NTC v jamkách 19-22 obr. 13g).



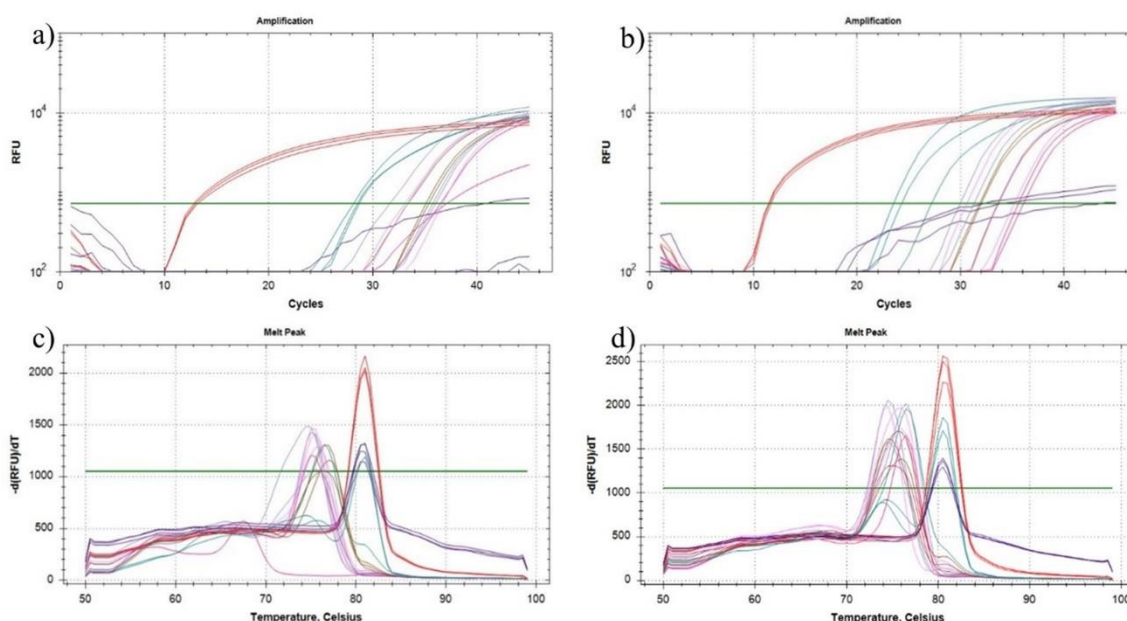


Obrázek 13.: a) – g) Výsledky elektroforetické separace amplikonů sRNA za použití různých templátů a qPCR reagensií. Ve všech případech probíhala separace v 3% agarózovém gelu za použití referenčního velikostního standardu GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) (M). Separovaná DNA je nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a vizualizována v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE). Použité reagensie: a), c), d), e), f) KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). g) qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio). a), b) Templáty: Biologické a technické triplikáty RNA z sRNA transfekované DAOY HTB-186 buněčné linie. Pořadí vzorků: 1-2 NTC; 3-5 transfekovaná sRNA 1; 6-8 transfekovaná sRNA 2; 9-11 transfekovaná sRNA 3. c) Templáty: technické triplikáty desítkové ředící řady plasmidu sRNA. Jamky 1-3 transfekovaná sRNA 1; 4-6 transfekovaná sRNA 2; 7-9 transfekovaná sRNA 3. Pořadí vzorků desítkové ředící řady templátové DNA je uvedeno v rozsahu $7,5 \times 10^4$ - $7,5 \times 10^1$ kopií/ μ l (c/ μ l), následovaná duplikátem NTC. d) Templáty: technické triplikáty desítkové ředící řady plasmidu sRNA. Pořadí vzorků desítkové ředící řady templátové DNA je uvedeno v rozsahu $7,5 \times 10^5$ - $7,5$ c/ μ l, následovaná monoplikátem NTC. e) Templáty: technické triplikáty desítkové ředící řady PCR produktu. Pořadí vzorků desítkové ředící řady PCR produktu je uvedeno v rozsahu $8,1583 \times 10^{10}$ - $8,1583 \times 10^5$ c/ μ l, následovaná triplikátem NTC. f), g) Templáty: technické triplikáty desítkové ředící řady PCR produktu. Pořadí vzorků desítkové ředící řady PCR produktu je uvedeno v rozsahu $1,2237 \times 10^9$ - $1,2237 \times 10^4$ c/ μ l, následována triplikátem NTC. h) – j) Grafy zobrazující kvantitativní analýzu fluorescence vznikajících amplikonů technických triplikátů desítkové ředící řady PCR produktu s použitím 2 různých qRT PCR reagensií. Použité qRT-PCR reagensie: h), i) KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). j) qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio). h), i), j) Triplikát NTC – růžová křivka. Pořadí vzorků ředící řady templátové DNA je uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění a je rozlišeno barvou příslušné křivky: $1,2237 \times 10^9$ c/ μ l – tmavě modrá, 10^8 – červená, 10^7 – tmavě zelená (dále jen smaragdová), 10^6 – hnědozelená, 10^5 – světle fialová, $1,2237 \times 10^4$ c/ μ l – modrošedá. k) Graf zobrazující analýzu tání vznikajících amplikonů technických triplikátů desítkové ředící řady PCR produktu s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio) v rozsahu 50 °C až 99 °C. Triplikát NTC – růžová křivka. Pořadí vzorků ředící řady templátové DNA je uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění a je rozlišeno barvou příslušné křivky: $1,2237 \times 10^9$ c/ μ l – tmavě modrá, 10^8 – červená, 10^7 – smaragdová, 10^6 – hnědozelená, 10^5 – světle fialová, $1,2237 \times 10^4$ c/ μ l – modrošedá.

4.1.2 Optimalizace vlastní qPCR eseje pro kvantifikaci sfRNA

Z důvodu neuspokojivé účinnosti eseje publikované ve studii Schwaiger M. a Cassinotti P., 2002, umožňující věrohodnou kvantifikaci sfRNA ve vzorcích, byly navrženy vlastní páry primerů. Celkem byly navrženy 4 páry primerů, ale z důvodu malé délky ampliconů párů primerů sfRNA_F3 × sfRNA_R5 a sfRNA_F × sfRNA_R2 (58 bp a 70 bp), znemožňující odlišení specifických ampliconů od primer-dimerů, budou prezentovány pouze výsledky s použitím dvou párů primerů sfRNA_F × sfRNA_R5 a sfRNA_F1 × sfRNA_R5 o délce ampliconu 122 bp a 124 bp a finální koncentraci 300nM. Z výsledků porovnávacích účinnost a specifitu práce dvou qPCR reakčních mixů pro kvantifikaci DNA pomocí fluorescenčního barviva SYBR byly nejlepší výsledky získány při použití qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio). Proto byl tento kit použit pro testování práce a účinnosti obou testovaných párů primerů. Templátem byla ředící řada plazmidu sfRNA.

Z důvodu špatné kvality fotografie výsledku elektroforetické separace qPCR produktů není tento výsledek prezentován a specifita amplifikace je proto dokumentována pomocí grafu analýzy tání qPCR. Obr. 14a) a 14c) zobrazují pár primerů sfRNA_F1 × sfRNA_R5 a obr. 14b) a 14d) zobrazují výsledky analýzy tání qRT-PCR za použití páru primerů sfRNA_F × sfRNA_R5. Na obr. 14c) lze pozorovat, tvorbu dimerů v ředící řadě plazmidu kromě tří nejvyšších koncentrací. Dále lze pozorovat, že se v NTC kontrole vytvořily dimery pouze v jednom technickém opakování, proto byl pár primerů sfRNA_F1 × sfRNA_R5 vybrán pro další optimalizace.



Obrázek 14.: a) a b) Grafy zobrazující kvantitativní analýzu fluorescence vznikajících ampliconů technických triplikátů desítkové ředící řady plazmidu sfRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio). Triplikát NTC – růžová křivka. Pořadí vzorků ředící řady templátové DNA je uvedeno od nejnižšího po nejvyšší ředění a

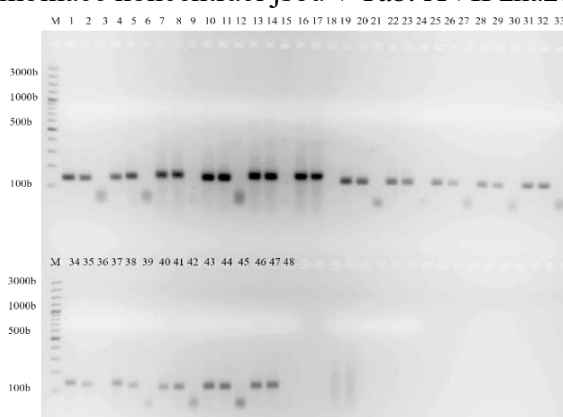
je rozlišeno barvou příslušné křivky: $7,5 \times 10^7$ c/μl – tmavě modrá 10^6 – červená, 10^5 – smaragdová, 10^4 – hnědozelená, 10^3 – světle fialová 10^2 c/μl – modrošedá. **c)** a **d)** Grafy zobrazující výsledky analýzy tání vznikajících amplikonů technických triplikátů desítkové ředící řady plazmidu sfRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio) Triplikát NTC – růžová křivka. Pořadí ředící řady vzorků templátové DNA je uvedeno od nejnižšího po nejvyšší ředění a je rozlišeno barvou příslušné křivky: $7,5 \times 10^7$ c/μl – tmavě modrá, 10^6 – červená, 10^5 – smaragdová, 10^4 – hnědozelená, 10^3 – světle fialová, 10^2 c/μl – modrošedá.

Vybraný pár primerů sfRNA_F1 × sfRNA_R5 byl podroben testu účinnosti při použití různých koncentrací obou primerů. Matice znázorňující testované kombinace koncentrací obou primerů je uvedena v Tab. XVIII. Templátem byla cDNA z RNA infikované buněčné linie DAOY HTB-186 virem TBEV Hypr.

Tab. XVIII: Matice kombinací testovaných koncentrací sfRNA_F1 × sfRNA_R5 primerů.

		sfRNA_R5			
		300nM	200nM	100nM	50nM
sfRNA_F1	300nM	-	300×200	300×100	300×50
	200nM	200×300	200×200	200×100	200×50
	100nM	100×300	100×200	100×100	100×50
	50nM	50×300	50×200	50×100	50×50

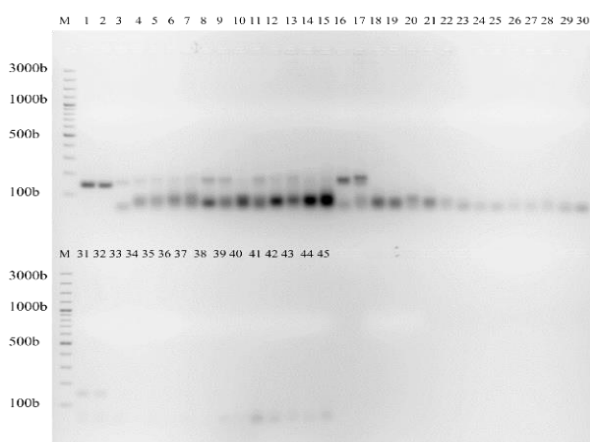
Z obr. 15 vyplývá, že nejvhodnější kombinace koncentrací byla sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 200nM, sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 100nM a sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 50nM na základě absence dimerů v NTC a nespecifických produktů v reakcích s templátem. Zmíněné kombinace koncentrací jsou v Tab. XVII znázorněny modrou barvou.



Obrázek 15.: Výsledek elektroforetické separace amplikonů technických duplikátů infikované RNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio). Monoplikát NTC se vždy nachází v jamce vpravo pro nadepsanou kombinaci koncentrací primerů. První nadepsaný primer je sfRNA_F1 a druhý sfRNA_R5: Jamky **1-2** 300nM × 200nM; **4-5** 300nM × 100nM; **7-8** 300nM × 50nM; **10-11** 200nM × 200nM; **13-14** 200nM × 100nM; **16-17** 200nM × 50nM; **19-20** 200nM × 300nM; **22-23** 100nM × 300nM; **25-26** 100nM × 200nM; **28-29** 100nM × 300nM; **31-32** 100nM × 100nM; **34-35** 100nM × 50nM; **37-38** 50nM × 300nM; **40-41** 50nM × 200nM; **43-44** 50nM × 100nM; **46-47** 50nM × 50nM. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem

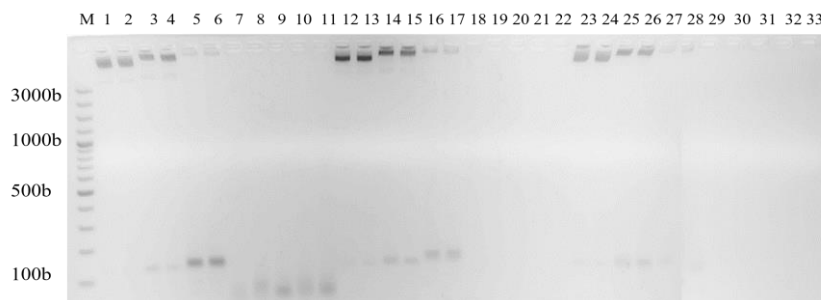
GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) jehož fluorescenční signál byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

Účinnost párů primerů sfRNA_F1 × sfRNA_R5 o vybraných kombinacích koncentrací byla testována amplifikací sfRNA amplikonu s templátem ředící řady plazmidu sfRNA. Na obr. 16 lze pozorovat, že při kombinaci koncentrací primerů sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 200nM a sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 100nM se primery nejlépe váží na templát o koncentraci $7,5 \times 10^6$ c/μl. V případě zbývajících koncentrací dochází k tvorbě nespecifických produktů a dimerů, kdy lze formování dimerů pozorovat i v NTC. Při použití kombinace koncentrací sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 50nM nedošlo ke vzniku žádného amplikonu (příloha obr. 24e) a f).



Obrázek 16.: Výsledek elektroforetické separace amplikonů technických duplikátů desítkové ředící řady plazmidu sfRNA v 3% agarózovém gelu. Jamky **1-15** sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 200nM, **16-30** sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 100nM, **31-45** sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 50nM. Pořadí vzorků desítkové ředící řady templátové DNA pro každou kombinaci koncentrací primerů je uvedeno v rozsahu $7,5 \times 10^6$ - 10^1 c/μl, následované duplikátem NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) jehož fluorescenční signál byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

Zvýšení účinnosti nebylo pozorováno ani při použití vyšších koncentrací použitého templátu (viz obr. 17).



Obrázek 17.: Výsledek elektroforetické separace amplikonů technických duplikátů desítkové ředící řady plazmidu sfRNA a monoplikátu NTC v 3% agarózovém gelu. Jamky **1-11** sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 200nM, **12-22** sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 100nM, **23-33** sfRNA_F1 200nM × sfRNA_R5 50nM. Pořadí desítkové ředící řady templátové DNA pro všechny kombinace koncentrací primerů je

uvedeno v rozsahu: $7,5 \times 10^9 - 10^6$ c/ μ l, následované duplikátem NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) jehož fluorescenční signál byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

4.2 Optimalizace metody dot-blot pro detekci TBEV sfRNA

Informací o struktuře a funkci sfRNA flavivirů přenášených klíšťaty a její roli v patogenezi v hostitelských buňkách je velmi málo. Detailní popis sfRNA lze nalézt ve studiích zabývajících se komáry přenášenými *flaviviry* (DENV, WNV a ZIKV). Tato bakalářská práce se zaměřuje na klíšťaty přenášený *Orthoflavivirus* TBEV. Konkrétním cílem této práce byla optimalizace detekce sfRNA TBEV hybridizačními technikami. Takto optimalizovanou esej by následně bylo možné použít pro detekci sfRNA v různých typech vzorků, které by vyžadovaly ověření přítomnosti sfRNA např. pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace a zároveň by umožnily lokalizaci hybridizačního signálu sfRNA v hostitelské buňce.

Během optimalizace detekce sfRNA pomocí metody dot-blot v této práci byly použity vzorky nukleových kyselin z různých zdrojů obsahujících sfRNA. Tyto vzorky byly použity jako cíle pro hybridizaci DNA próby získané PCR amplifikací úseku sfRNA z plasmidu sfRNA vytvořeného v naší laboratoři. Kromě přirozené formy sfRNA vzniklé po infekci TBEV v hostitelské buňce byla pro účely optimalizace detekce sfRNA použita RNA z buněčné linie DAOY HTB-186 sfRNA transfekované sfRNA transkribované z téhož plasmidu. Dalším cílem testované hybridizační próby pak byl samotný plazmid nesoucí sfRNA.

Účelem optimalizace bylo docílit detekce specifického hybridizačního signálu, kterého se nepodařilo docílit v diplomové práci Mgr. Hany Pejšové (Pejšová H., 2020).

Pro kontrolu funkce metody dot-blot byly použity próby pro detekci přítomnosti transkriptů genů PAPOLA a Aktin β ve studovaných vzorcích RNA. V tabulce Tab. XIX jsou popsány jednotlivé kroky společně se všemi testovanými roztoky, inkubačními teplotami a časy.

Tab XIX.: Seznam jednotlivých kroků metody dot-blot společně s použitými chemikáliemi a reakčními podmínkami. Chemikálie a reakční podmínky poskytující nejlepší výsledky jsou vyznačeny modře.

Krok	Roztok	Teploty [°C]	Čas [min]
Promytí 1	2×SSC	RT	10
Prehybridizace	100mM NaCl, 1% SDS, 50% formamid, 10% dextran, salmon sperm (Kumar J. S. <i>et al.</i> , 2013)	42	60
	5×SSC, 5×denhardt, 50% formamid, 1% SDS, 100 µg/µl salmon sperm (Brown T. a Mackey K., 2001)	42	60
	SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich)	42	30
Hybridizace	1mM EDTA, 5% SDS, salmon sperm, próba (Kumar J. S. <i>et al.</i> , 2013)	42	O/N
	5×SSC, 5×denhardt, 50% formamid 1% SDS, 100 µg/µl salmon sperm (Brown T. a Mackey K., 2001)	42	O/N
	SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich)	42	150
Promytí 2	2×SSC, 1% SDS a 0,2×SSC, 0,1% SDS	RT a 50	15/15
	2×SSC, 1% SDS	RT/42	15/15
Blokace membrány	3% BSA, 50mM Tris-HCl (pH=7,5), 150mM NaOH	RT	10 až 30
	3% BSA, 1×TBS, 0,1% Tween 20	RT	30
Navázání konjugátu	0,1M NaCl, 0,05% Triton X-100, 1M TRIS (pH=7,5), 3% BSA, 2mM MgCl ₂	RT	60
	3% BSA, 1×TBS, 0,1% Tween 20	RT	60
Promytí 3	0,1M NaCl, 0,05% TRITON, 1M TRIS (pH=7,5), 3% BSA, 2mM MgCl ₂ a 0,1M TRIS/HCl (pH=9,5), 0,1M NaCl, 50mM MgCl ₂ ,	RT	2×7, 2×7
	1×TBS, 0,1% Tween 20 a 0,2×SSC, 1% SDS	RT	2×10, 2×10
	1×TBS + 0,1% Tween 20	RT	3×10
Promytí 4	1×TBS + 0,1% Tween 20	RT	3×10

Promytí 1: promytí membrány po nanesení vzorků; **Promytí 2:** promytí membrány po hybridizaci; **Promytí 3:** promytí membrány po navázání konjugátu; **Promytí 4:** promytí membrány pro odstranění chemiluminiscenčního substrátu; **RT:** pokojová teplota; **O/N:** přes noc.

V Tab. XX jsou popsány množství próby a druhy konjugátů a použité ředění.

Tab XX.: Množství próby a druhy použitých konjugátů s různými ředěními testované v průběhu optimalizace metody dot-blot. Vybraná množství próby a dva konjugáty s nejvhodnějšími ředěními jsou vyznačeny modře.

Množství použité próby	60 ng; 100 ng; 200 ng
Druhy konjugátu a jejich ředění	Streptavidin, Alkaline Phosphatase (2×) (1/1000) a (1/5000); Streptavidin-HRP Concentrated (100×) (1/1000), (1/3000) a (1/5000)

Denaturace RNA vzorků probíhala při 70 °C po dobu 5 min a denaturace prób probíhala při 95 °C po dobu 5 min. Součástí optimalizace bylo testování nejvhodnějšího množství RNA nanesené na membránu a množství značené próby. Z testovaných množství 5 µg, 10 µg, 15 µg, 30 µg RNA byly nejlepší výsledky získány s 15 µg RNA a v případě značené próby z testovaných množství 100 ng, 50 ng, 25 ng, 15 ng byly nejlepší výsledky získány s 15 ng próby.

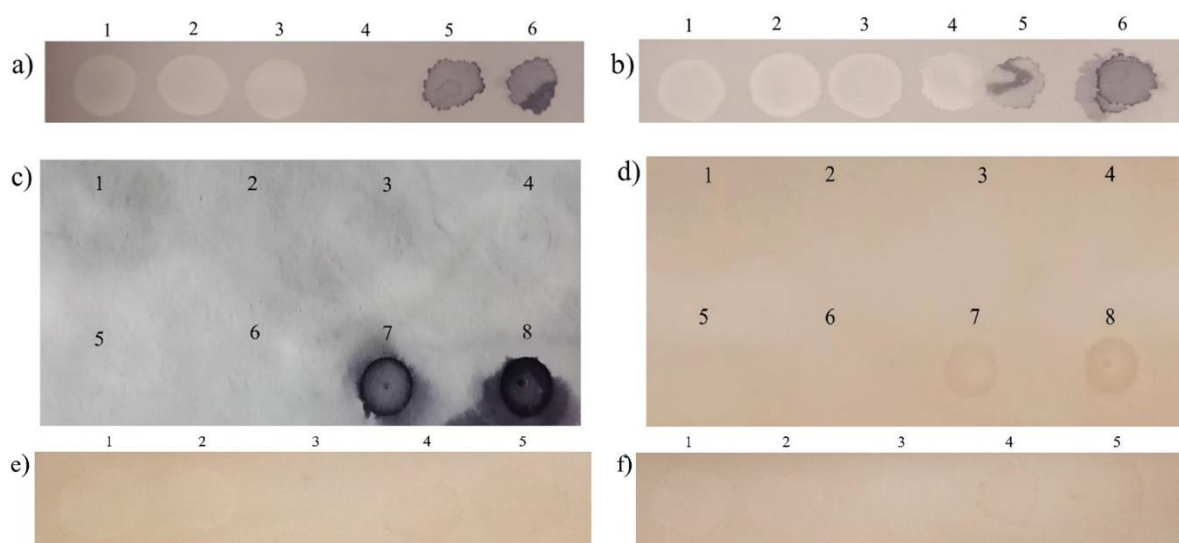
Použitím zvýrazněných chemikálií, teplot a časů ve všech krocích dot-blotu znázorněných v Tab. XIX a XX byl detekován specifický signál na nylonové membráně pomocí kolorimetrické detekce.

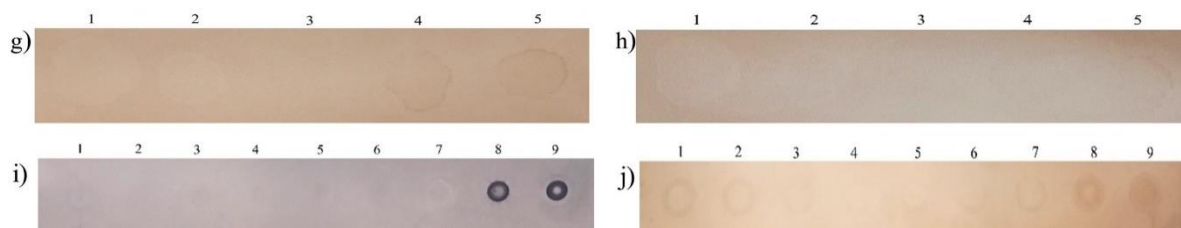
Po jednom z opakování metody dot-blot prováděného z důvodu statistického podpoření získaných výsledků došlo na membráně v místech se vzorky RNA DAOY k detekci inverzního signálu (viz obr. 18a) a b)). Přítomnost inverzního signálu je běžně spojována s přesycením nukleovou kyselinou ze vzorku s následnou akumulací reportérové molekuly, a tedy předčasnou deplecí substrátu při chemiluminiscenční detekci hybridizačního signálu. V případě kolorimetrické detekce je vznik tohoto fenoménu vyloučený. Pro vyloučení vlivu nahromadění velkého množství RNA způsobujícího nepřístupnost vazebných míst pro hybridizaci byla v následujících experimentech použita ředící řada RNA DAOY HTB-186 a detekce transkriptu genu Aktin β. Při výchozím optimalizačním experimentu byly k detekci próby použity konjugáty AP-streptavidin a HRP-streptavidin v ředěních 1/5000 (viz obr. 18c) a d)). Na obr. 18c) a d) lze vidět, že nedošlo k detekci specifického signálu. Z tohoto důvodu byla otestována řada tří různých ředění konjugátu HRP-streptavidin (viz obr. 18e), f) a g)). Na obr. 18e), f) a g) lze znovu pozorovat vznik inverzního signálu. Proto bylo pro následující opakování a optimalizaci experimentu vybráno ředění konjugátu 1/5000 vytvářející nejvyšší kontrast v porovnání s pozadím.

Na základě opakované detekce inverzních signálů byla hypotéza přesycení vzorku zavržena a v následujících experimentech byla provedena kontrola přítomnosti možné

kontaminace ve vzorcích RNA, která mohla být do vzorku RNA izolována společně s RNA při neúčinné extrakci RNA z buněčné linie. Z tohoto důvodu byla RNA před následujícím experimentem přečištěna pomocí NucleoSpin RNA mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel). Z přečištěné RNA byla vytvořena ředící řada a metodou dot-blot provedena hybridizace s použitím próby Aktin β s následnou kolorimetrickou detekcí navázaného konjugátu HRP-streptavidin při ředění 1/5000. Na obr. 18h) lze opět pozorovat vznik inverzních signálů. Pro porovnání a otestování účinnosti přečištění RNA byla část vzorku nepřečištěné RNA DAOY HTB-186 přečištěna opětovnou izolací pomocí RNA Blue v kombinaci s precipitací RNA pomocí isopropanol-NaCl, jehož použití by mělo snížit množství společně precipitovaných kontaminujících molekul v porovnání se standardně používanou kombinací acetátu sodného a etanolu. Tento vzorek byl opět použit pro detekci transkriptu genu Aktin β metodou dot-blot za podmínek použitých v předcházejícím experimentu.

Výsledek porovnání obou experimentu za použití RNA přečištěných dvěma různými metodami lze pozorovat na obr. 18i) a j). V tomto experimentu byly porovnávány dva kolorimetrické detekční systémy a to AP-streptavidin a HRP-streptavidin. Z výsledků na obr. 18i) lze pozorovat kolorimetrickou detekci konjugátu AP-streptavidin (1/5000) a navíc lze pozorovat i vyšší intenzitu signálu a vyšší míru pozadí, než je tomu u konjugátu HRP-streptavidin (viz obr. 18j)). Dále lze na obr. 18i) pozorovat výsledné specifické hybridizační signály vzorků RNA DAOY HTB-186 v množstvích 200 až 500 ng, které při použití konjugátu HRP-streptavidin nejsou tak intenzivní. Pozorovaný hybridizační signál má stále nízkou intenzitu a v následujících experimentech bude potřeba jeho intenzitu zvýšit např. amplifikací signálu použitím sekundárního či terciárního konjugátu.





Obrázek 18.: Výsledky kolorimetrické detekce při použití různých prób, konjugátů a systémů detekce **a)** konjugát AP-streptavidin (1/5000) sfRNA **b)** konjugát AP-streptavidin (1/5000) při detekci transkriptu Aktinu β . **c)** konjugát AP-streptavidin (1/5000). **d)** konjugát HRP-streptavidin (1/5000). **e) – g)** porovnání různých ředění konjugátu HRP-streptavidin. **e)** 1/1000, **f)** 1/3000, **g)** 1/5000. **h)** konjugát HRP-streptavidin (1/5000) za použití přečištěné RNA DAOY pomocí NucleoSpin RNA mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel). **i)** konjugát AP-streptavidin (1/5000) za použití znovu izolované RNA pomocí RNA Blue. **j)** konjugát HRP-streptavidin (1/5000) za použití znovu izolované RNA pomocí RNA Blue. Použité vzorky: **a), b)** 1 infikovaná TBEV 30 μ g; 2 NK 30 μ g; 3 RNA DAOY 30 μ g; 4 transkrib. sfRNA 1 μ g; 5 GSL-1 (800 \times zředěný); 6 próba 15 ng. **c) d)** 1 RNA DAOY 0,1 μ g; 2 RNA DAOY 1 μ g; 3 RNA DAOY 10 μ g; 4 RNA DAOY 20 μ g; 5 RNA DAOY 30 μ g; 6 transkrib. sfRNA; 7 GSL-1 (800 \times zředěný); 8 Próba 15 ng. **e), f), g), h)** 1 RNA DAOY 5 μ g; 2 RNA DAOY 0,5 μ g; 3 RNA DAOY 0,05 μ g; 4 GSL-1 (800 \times zředěný); 5 Próba 15 ng. **i), j)** 1 RNA DAOY 0,05 μ g; 2 RNA DAOY 0,1 μ g; 3 RNA DAOY 0,2 μ g; 4 RNA DAOY 0,3 μ g; 5 RNA DAOY 0,4 μ g; 6 RNA DAOY 0,5 μ g; 7 RNA DAOY 5 μ g; 8 GSL-1 (800 \times zředěný); 9 Próba 15 ng.

Po detekci specifického signálu po opětovné izolaci RNA DAOY HTB-186 došlo k vyhodnocení čistoty a koncentrace RNA získaným přečištěním oběma metodami a v porovnání s nepřečištěným vzorkem. Měření kvality a kvantity všech RNA vzorků proběhlo spektrofotometricky pomocí NanoPhotometer[®] Perl (Implen) a fluorescenčně pomocí Qubit[™] RNA High Sensitivity (HS) assay kit v přístroji Qubit[™] Fluorometer (Invitrogen). NanoPhotometer[®] Perl (Implen) měří koncentraci vzorku na základě absorpce části emitovaného elektromagnetického záření procházejícího vzorkem (spektrofotometricky), zatímco Qubit[™] Fluorometer (Invitrogen) měří koncentraci samotné RNA ve vzorku a funguje na základě detekce fluorescenčního záření emitovaného konjugátu fluorescenčně značené protilátky specificky vázající pouze RNA. Kvantifikace RNA ve vzorku je odvozena z hodnot fluorescence a známé koncentrace RNA standardu s hodnotami fluorescence neznámého vzorku. Z Tab. XXI lze vyčíst čistotu RNA vzorku nepřečištěného, přečištěného pomocí NucleoSpin RNA mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel) a opětovně izolovaného pomocí RNA Blue (Top-Bio). Dále z Tab. XXI vyplývá, že koncentrace RNA vzorků změřená pomocí NanoPhotometer[®] Perl (Implen) je vyšší oproti Qubit[™] Fluorometer (Invitrogen) a že nejčistší je vzorek přečištěný kitem a nejméně vzorek opětovně izolovaný pomocí RNA Blue.

Tab. XXI: Porovnání měření koncentrace RNA DAOY HTB-186 vzorků v závislosti na čistotě a použitém přístroji.

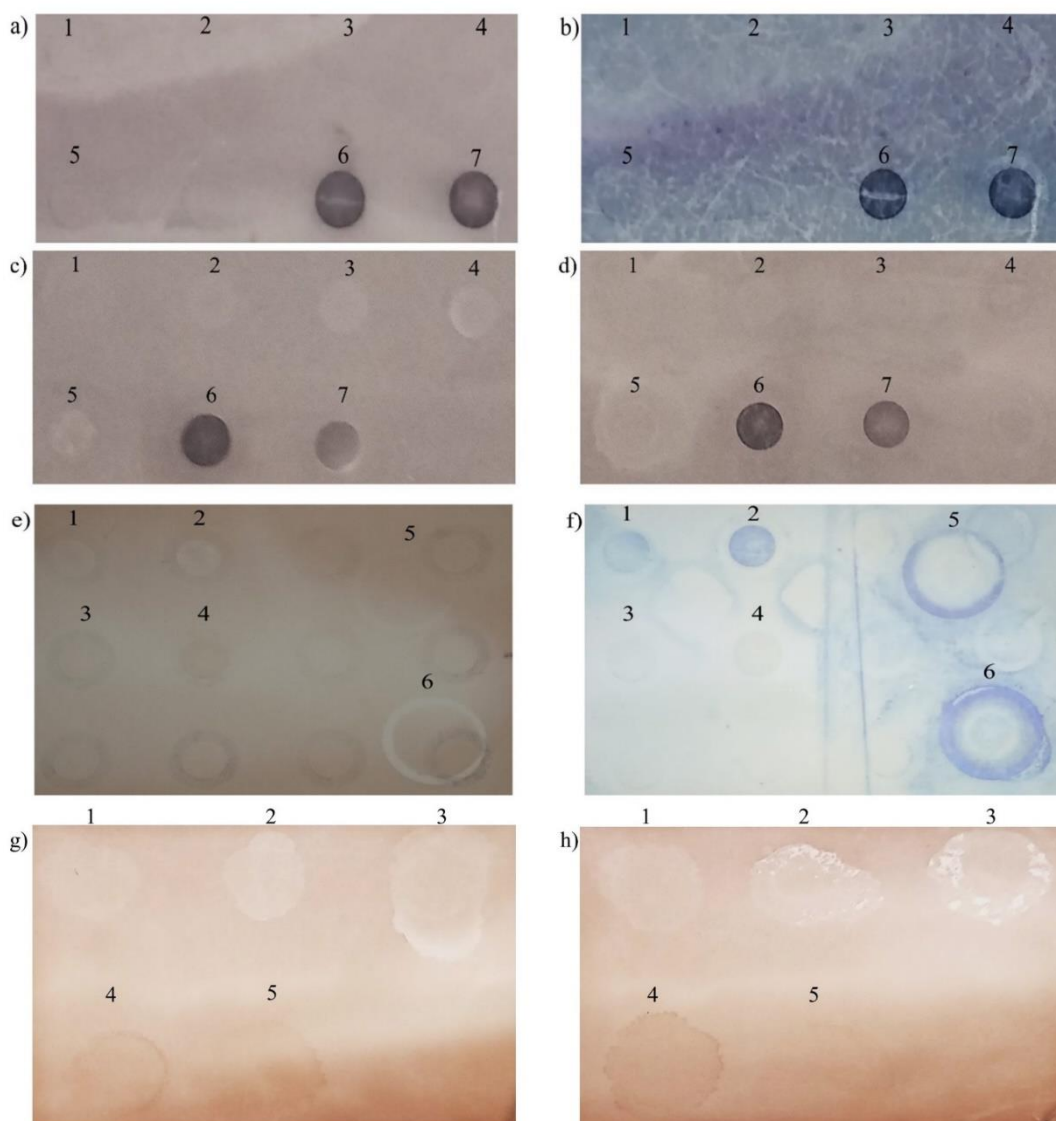
Vzorky	Qubit™ Fluorometer (Invitrogen)	NanoPhotometer® Perl (Implen)		
	Koncentrace [ng/μl]	Koncentrace [ng/μl]	A _{260/280}	A _{260/230}
RNA nepřečištěná	8530	9070	1,762	2,467
RNA přečištěná pomocí NucleoSpin RNA	1340	1500	1,765	2,000
RNA re-izolovaná pomocí RNA Blue	7340	8090	1,650	1,833

Další možným opatřením pro odstranění kontaminací ve vzorku RNA DAOY HTB-186 a zvýšení intenzity hybridizačního signálu bylo použití „alkalického“ nanášení RNA vzorků na nylonovou membránu dle protokolu uvedeného v publikaci Morita K. *et al.*, 1991, jež je vypsán níže. Použitým vzorkem pro optimalizace metody dot-blot za použití alkalického nanášení byla RNA DAOY HTB-186 v různých množstvích a dále vzorky infikovaná TBEV, negativní kontrola infekce a pozitivní kontroly (GSL-1 a próba). K RNA vzorkům a pozitivním kontrolám bylo dle publikace Morita K. *et al.*, 1991 přidáno 10 μl 2M octanu amonného. Takto připravené vzorky byly nanášeny na nylonovou membránu, jež byla následně promyta v 1M octanu amonném při RT po dobu 5 min, ponořena do 0,5M NaOH a 1,5M NaCl při RT po dobu 10 min a následně neutralizována v 0,5M Tris-HCl (pH=7,5) a 1,5M NaCl při RT po dobu 5 min. Nakonec byly vzorky fixovány na membráně pomocí UV záření v přístroji UVP crosslinker (Analytik Jena) po dobu 3 min. Pro optimalizaci čistoty RNA vzorků byly použity próby Aktin β a sRNA, které byly značeny pomocí náhodných primerů a použitými konjugáty byly AP-streptavidin (1/5000) a HRP-streptavidin (1/5000), které byly detekovány kolorimetricky a následně byla provedena nanášecí kontrola pomocí metylenové modři. Nejprve proběhl test účinnosti alkalického nanášení za použití RNA DAOY HTB-186, próby Aktin β a kolorimetrické detekce konjugátu AP-streptavidin (1/5000). Z výsledků prezentovaných na obr. 19a) a b) je patrná absence hybridizačního signálu i signálu po detekci nanášecí kontroly pomocí metylenové modři. Z tohoto důvodu došlo k modifikaci některých podmínek protokolu. Konkrétně došlo ke snížení koncentrací složek obsažených v alkalickém pufru z původního 0,5M NaOH a 1,5M NaCl na 10mM NaOH a 30mM NaCl. Fixace vzorků na membráně pomocí UV proběhla ihned po jejich nanášení na membránu pomocí UV záření v přístroji UVP crosslinker (Analytik Jena) po dobu 1 min, a nikoliv až po promytí membrány v alkalickém roztoku, jak je uvedeno ve zdrojové publikaci. Hodnocení účinku alkalického nanášení lze provést porovnáním výsledků metody

dot-blot pomocí alkalického nanášení na obr. 19c) a výsledků metody dot-blot pomocí protokolu získaného v průběhu optimalizace metody dot-blot v této práci na obr. 19d). Na obou membránách obr. 19c) a d) bylo nanášeno 15 a 30 μg RNA a použitá próba pro detekci Aktinu β . Na rozdíl od absence signálu na membráně po provedení standardní metody dot-blot (viz obr. 19d), lze po provedení dot-blotu s alkalickým nanášením vzorku vidět přítomnost velmi slabých hybridizačních signálů v místech nanášení RNA vzorků. Zároveň lze pozorovat vznik částečných inverzních signálů u vzorků s vyšším množstvím nanášené RNA na membráně projevující se světlými oblastmi prosvítajícími v místech tmavého pozitivního hybridizačního signálu. Tento fenomén je možné pozorovat na obr. 19c) na místě vzorku 5, kde je nanášena RNA v nejvyšším množství ze všech RNA vzorků nanášených na membráně a poukazuje na pravděpodobnou přítomnost zbytkových kontaminací i po dodatečném přečištění RNA vzorku.

V následujícím experimentu byl použit konjugát HRP-streptavidin (1/5000) a byl otestován větší nanášecí otvor pro porovnání intenzity signálů s dosavadně používaným Dot-Blotterem (Cleaver Scientific Ltd) (obr. 19e) a f)). Na obr. 19f) lze pozorovat signál vzniklý nanášecí kontrolou RNA vzorků. Výsledky tohoto experimentu zároveň dokazují, že použitím příliš vysoké koncentrace NaOH v alkalickém pufru pro nanášení vzorku pravděpodobně způsobuje degradaci RNA molekul, které následně nejsou schopné vázat barvivo používané k detekci nanášecí kontroly. Porovnáním fotografií membrán po detekci nanášecí kontroly na obr. 19b) a f) je zřetelně vidět absence signálu nanášecí kontroly při použití alkalického pufru o koncentraci NaOH 0,5M (obr. 19b)) v porovnání s 10mM NaOH v alkalickém pufru použitým při následujícím opakování metody dot-blot (obr. 19f)).

V následujícím experimentu byl proveden test, zda-li „alkalické“ nanášení re-izolovaných RNA vzorků zamezí vzniku nespecifických signálů a zároveň došlo k nanášení vzorků na membránu ve vrstvách. Vrstvy byly tvořeny pipetováním celkového množství vzorku po několika menších kapkách na jedno místo na membráně. Během nanášení byla každá nanášená kapka ponechána zaschnout. Výsledek zmíněného experimentu lze pozorovat na obr. 19g) a h). Na obr. 19g) lze pozorovat, že po kolorimetrické detekci sfRNA ve vzorku RNA DAOY HTB-186, který neobsahuje cílovou molekulu sfRNA próby byl detekován pozitivní hybridizační signál. Původ tohoto nespecifického signálu byl dále předmětem zkoumání v metodě Northern blot.



Obrázek 19.: a), c), d), e), g), h) Výsledek kolorimetrické detekce při použití různých konjugátů, vzorků a typů nanášení vzorků a) AP-streptavidin (1/5000) b),f) Výsledky nanášecí kontroly vzorků RNA pomocí metylenové modři. c) konjugát AP-streptavidin (1/5000) a alkalické nanášení. d) konjugát AP-streptavidin (1/5000) a bez použití alkalického nanášení. e) konjugát HRP-streptavidin (1/5000). g) konjugát HRP-streptavidin (1/5000) při detekci sfRNA. h) konjugát HRP-streptavidin (1/5000) při detekci transkriptu Aktinu β . Použité vzorky: a), b) RNA DAOY (1-5) 1 50 ng, 2 500 ng, 3 5 μ g, 4 15 μ g, 5 30 μ g. 6 GSL-1 (800 \times zředěný), 7 próba 15 ng. c) a d) RNA DAOY (1-5) 1 300 ng, 2 500 ng, 3 5 μ g, 4 15 μ g, 5 30 μ g, 6 GSL-1 (800 \times zředěný), 7 Próba 15 ng. e) a f) RNA DAOY (1, 2, 5, 6) 1, 5 15 μ g, 2,6 30 μ g, 3 GSL-1 (800 \times zředěný), 4 Próba 15 ng.. g) a h) 1 infikovaná TBEV 15 μ g; 2 NK 15 μ g; 3 RNA DAOY 15 μ g; 4 GSL-1 (800 \times zředěný); 6 próba 15 ng.

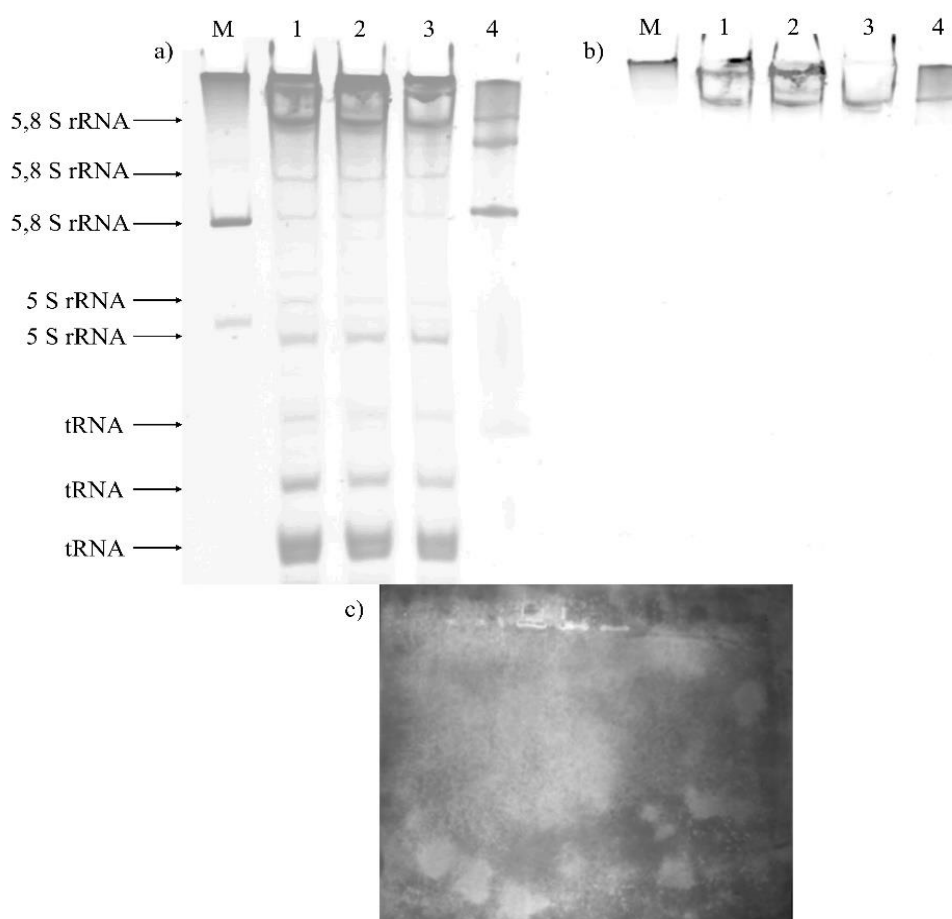
4.3 Northern blot

Cílem metody Northern blot bylo identifikovat nespecifické signály v negativní kontrole pozorované v metodě dot-blot. Díky separaci celkové RNA v denaturačním gelu a jejímu přenosu na membránu by tak mohlo být možné zjistit, zdali je próba vázána neselektivně ke

všem molekulám RNA ve vzorku negativní kontroly anebo je tato vazba omezena na konkrétní populaci molekul RNA.

Několikanásobné opakování experimentu s použitím různého množství RNA ve vstupním vzorku, změnou napětí a dob elektroforetické separace a elektroblottingu nebo ředění protilátek a způsobů detekce použitého konjugátu nepřispěly k detekci pozitivního hybridizačního signálu.

Na obr. 20a) lze pozorovat separaci RNA na denaturačním 12% polyakrylamidovém gelu se 4% močovinou, který byl obarven 2× koncentrovaným interkalačním barvivem GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in water (Biotium). Po následném blotování došlo k opětovné detekci RNA. Z výsledku prezentovaném na obr. 20b) lze konstatovat, že došlo k přenosu separované RNA z gelu. Absence hybridizačního signálu po kolorimetrické detekci a následně i absence signálu po detekci vyvolání signálu nanášecí kontroly na membráně dokumentované na obr. 20c) ovšem naznačuje že mohlo dojít k totální degradaci RNA nebo k jejímu přenosu mimo membránu.



Obrázek 20.: a), b) Výsledky elektroforetické separace RNA v 12% polyakrylamidovém gelu se 4% močovinou, barvené pomocí 2× koncentrovaného interkalačního barviva GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in water (Biotium). a) fotodokumentace signálu RNA před blotováním b) fotodokumentace signálu RNA po blotování. c) Výsledek vyvolání signálu nanášecí kontroly RNA vzorků na membráně po kolorimetrické detekci pomocí

interkalačního barviva GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in water (Biotium). Použité vzorky: **a)**, **b)**, **c)** 1 infikovaná TBEV, **2** negativní kontrola infekce, **3** RNA DAOY, **4** transkribovaná sfRNA.

5 Diskuze

TBEV (čeleď *Flaviviridae*, rodu *Orthoflavivirus*) je patogenní a neurotropní RNA-virus způsobující až 12 000 případů nakažení TBE ročně (Bondaryuk A. N. *et al.*, 2023). Do čeledi *Flaviviridae* patří společně s TBEV také YFV, JEV, DENV a WNV. Kromě preventivních opatření zahrnujících nošení ochranného oblečení, brzké odstranění přisátého klíštěte nebo zamezení konzumace nepasterovaného mléka, se pacienti nakažení TBE léčí pouze aktivní imunizací (Kubinski M. *et al.*, 2020).

U většiny *Flavivirů* byla objevena přítomnost malé nekódující sRNA označované jako sfRNA, která vzniká nekompletní degradací *Flavivirové* gRNA pomocí XRN1 (Clarke B. D. *et al.*, 2015). Akumulovaná sfRNA interaguje s hostitelskými buněčnými proteiny a tím zabraňuje RNA interferenci, správnému rozpadu buněčné RNA a inhibuje interferonovou odpověď (MacFadden A., 2018). sfRNA je detailně popsána u komáry přenášených *flavivirů*. V případě klíšťaty přenášených flavivirů (TBEV) tento detailní popis chybí (Slonchak A., 2022).

sfRNA byla detekována například v YFV (Silva P. A. G. C. *et al.*, 2010), WNV (Funk A. *et al.*, 2010) a JEV (Fan Y. H. *et al.*, 2011). Žádná z těchto publikací se nezabývá popisem a detekcí sfRNA v TBEV. V naší laboratoři se o detekci TBEV sfRNA pokusila Hana Pejšová pomocí metody *in situ* imunofluorescence ve své diplomové práci (Pejšová H., 2020), ale nepodařilo se jí získat specifický signál. V této práci bylo jedním z cílů optimalizovat detekci sfRNA ve zkoumaných vzorcích tak, aby došlo k odstranění signálů způsobených nespecifickou hybridizací sfRNA próby, pomocí jednoduché hybridizační techniky dot-blot. Prvním krokem bylo navržení sfRNA próby, která by byla schopná spolehlivě hybridizovat k cílové molekule ve vzorku RNA, což není jednoduché, protože sfRNA, jak již bylo dříve zmíněno, vytváří několik sekundárních struktur. Próba musela být navržena mezi SL2 a SL3 oblasti 3'UTR TBEV, kde se nachází oblast s nejmenší pravděpodobností tvorby sekundárních struktur, jejichž přítomnost ve struktuře sfRNA by bránila hybridizaci s próbou.

Pro účely optimalizace metody dot-blot bylo nutno připravit vzorky RNA, které prokazatelně obsahují sfRNA. Konkrétně byla izolována RNA z sfRNA-transfekované DAOY HTB 186 buněčné linie, protože, jak již bylo zmíněno, transfekované buňky obsahují více sfRNA než buňky TBEV-infikované. Nicméně buňky transfekované sfRNA nepředstavují přirozený stav výskytu sfRNA. Z tohoto důvodu bylo potřeba připravit i buňky TBEV-infikované.

Pro správnou optimalizaci metody dot-blot bylo nutné nejprve ověřit qRT-PCR esejí, zda RNA z sfRNA-transfekovaných a TBEV-infikovaných buněk opravdu obsahuje sfRNA a v jakém množství. Přítomnost a kvantifikace transkriptů ve sledovaném vzorku jsou standardně ověřovány prostřednictvím qPCR. Esej pro kvantifikaci sfRNA byla již dříve použita a publikována v práci Schwaiger M., Cassinotti P., 2003. Z tohoto důvodu bylo v plánu tuto esej otestovat a použít pro ověření přítomnosti a množství sfRNA ve vzorcích RNA připravených pro optimalizaci metody dot-blot, pocházejících z buněčné linie DAOY HTB 186 jednak transfekované transkribovanou sfRNA a také infikované virem TBEV, kmene Hypr. Na rozdíl od původního protokolu pro tuto esej bylo nutné použít jiný one-step qRT-PCR kit z důvodu pozastavení výroby kitu původně předepsaného v publikaci. Pozitivními kontrolami pro qRT-PCR byly *in vitro* transkribovaná sfRNA a plazmid sfRNA.

Série experimentů provedených v této bakalářské práci zaměřených na replikaci výsledků publikovaných v původní studii nicméně nepřinesla očekávané výsledky. Přestože výsledky založené na pouhém vyhodnocení kvantitativních dat z qRT-PCR analýzy byly porovnatelné s výsledky z původní studie, následná analýza tání (pouze v případě použití qPCR kitů obsahujících fluorescenční barvivo SYBR, tj. bez použití TaqMan próby) a vyhodnocení elektroforetické separace PCR produktů této qRT-PCR prokázaly přítomnost výrazné nespecifické amplifikace ve všech testovaných vzorcích, a to včetně vzorků pozitivních kontrol a NTC (viz obr. 13g, i) a k)). Z výsledků prezentovaných ve zdrojové studii, nicméně není jasné, zdali byla specifická a účinnost této qRT-PCR esej taktéž ověřována pomocí analýzy tání a elektroforetické separace. Nelze tedy posoudit, zda jsou výsledky ve zdrojové publikaci založeny na ověřené a fungující kvantitativní analýze anebo byla tato esej použita bez kontroly její efieience na rozdíl od této bakalářské práce.

Účinnost primerů z této qRT-PCR esej byla ověřována pomocí desítkové ředící řady plazmidu sfRNA a PCR produktu (viz obr. 13d) až obr. 13k)). Na obr. 13h) lze vidět, že kvantifikační křivky qRT-PCR vzniklé amplifikací ředící řady plazmidové DNA nejsou v požadovaném rozestupu, množství amplikonu se tedy se zvyšujícím se množstvím vstupního templátu mění jen minimálně. Takový profil analýzy fluorescence je typickým projevem nízké účinnosti nasedání primerů, která logicky vyúsťuje v nízkou účinnost amplifikace testované qRT-PCR esej. Testováním účinnosti esej při použití ředící řady PCR produktu (viz obr. 13e) a 13h)) vznikaly kvantifikační křivky, jež naznačovaly vyšší účinnost primerů než jak tomu bylo při použití templátu sfRNA plazmidu. Nicméně po elektroforetické separaci bylo z výsledků zřejmé, že fluorescence vypočtená z kvantifikačních křivek vůbec nepochází ze syntézy specifického amplikonu (viz obr 13e)).

Další proměnnou použitou v této eseji v porovnání se zdrojovou publikací Schwaiger M., Cassinotti P., 2003 bylo použití TaqMan próby kombinující značení pomocí FAM fluoroforu s BHQ1 (Black Hole Quencher 1) zhasědlem, namísto zhasědla TAMRA. Kombinace fluoroforu FAM a BHQ1 zhasědla je standardně používána pro syntézu TaqMan prób v naší laboratoři a byla úspěšně použita pro kvantifikaci TBEV ve zkoumaných vzorcích (Helmová R. *et al.*, 2020). Nebyl tedy důvod domnívat se, že použití jiné než doporučené kombinace fluoroforu a zhasědla by mohlo ovlivnit jakoukoliv qPCR esej.

Z důvodu přerušení výroby one-step qRT-PCR reagensů TaqMan one-step RT-PCR Mastermix Reagents Kit (Applied Biosystems) použitého ve zdrojové publikaci také nelze vyloučit možnost neúčinnosti této eseje následkem použití jiných qPCR reagensů. Nicméně reakční mix KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) je úspěšně používán v naší laboratoři pro jiné TaqMan qRT-PCR eseje a nebyl tedy důvod se domnívat, že by při jeho použití pro tuto esej došlo k tak výraznému snížení účinnosti amplifikace.

Pro vyloučení vlivu PCR reagensů na účinnost reakce byly v této práci vyzkoušeny reakční mixy obsahující interkalační barvivo SYBR Green I KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) a qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio). Na základě získaných výsledků bylo zřejmé, že qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio) amplifikuje templátovou cDNA/PCR produkt s mnohem vyšší účinností než druhý testovaný kit. Na obr. 27 lze pozorovat tvorbu většího množství nespecifických produktů při použití KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) v porovnání s qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio).

Mezi další možné faktory, které mohou ovlivnit účinnost qRT-PCR eseje je one-step a two-step konfigurace qRT-PCR. V této práci byly použity dva one-step kity (KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) a KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems)) a jeden two-step přístup kombinující RT kitem ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis kit (NEB) a qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio)) qRT-PCR. Z přílohy na obr. 27 lze pozorovat, že two-step qRT-PCR esej má vyšší účinnost než zbývající dva one-step qRT-PCR eseje. Bohužel zmíněné výsledky nelze spolehlivě porovnat, protože firma Top-Bio nemá ve svém portfoliu one-step qRT-PCR kit, pomocí kterého by se dala porovnat stejná polymeráza ve one-step a two-step konfiguraci. Výsledky získané v této práci jsou v rozporu s výsledky prezentované v publikacích Picard-Meyer E. *et al.*, 2015 a Wacker M. J. *et al.*, 2005, kde zjistili, že one-step qRT-PCR kity mají vyšší sensitivitu a ve většině případů i specifitu než

testované qRT-PCR v two-step konfiguraci. Obě publikace ovšem nejsou uvedeny výsledky elektroforetické separace a analýzy tání pro kontrolu specifity qRT-PCR. Z tohoto důvodu nelze z publikací jednoznačně říct jaká je specifita, a tedy účinnost daných qRT-PCR esejí. V publikaci Picard-Meyer E. *et al.*, 2015 uvádějí vznik primer-dimerů při nižších koncentracích vstupních vzorků, nicméně jejich tvrzení není podloženo prezentací experimentálních podkladů.

Při qPCR zaměřených na odhalení možné přítomnosti kontaminace v PCR chemikáliích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (Top-Bio) navíc bylo možné pozorovat i přítomnost primer-dimerů v reakci s přidavkem TaqMan próby TBE-probe-WT jako templátu. Stejného výsledku bylo dosaženo s použitím obou porovnávaných qPCR reakčních mixů (příloha obr. 27b) a 27d) až 27g)). Dalším možným důvodem snížené účinnosti qPCR může být použití jiného reakčního mixu v porovnání se studií Schwaiger M., Cassinotti P., 2003. Ověření těchto hypotéz je možné provést pouze vyzkoušením identicky značené TaqMan próby a reakčního mixu použitého ve zdrojové publikaci.

Z důvodu neuspokojivých výsledků qRT-PCR esej pro kvantifikaci sfRNA převzaté z publikace Schwaiger M., Cassinotti P., 2003 byla nadále vytvořena a optimalizována vlastní qRT-PCR esej pro kvantifikaci sfRNA. V této práci byly testovány dva páry primerů, sfRNA_F × sfRNA_R5 a sfRNA_F1 × sfRNA_R5, z nichž pár primerů sfRNA_F × sfRNA_R5 byl původně navrhnout a použit pro syntézu amplikonu pro přípravu jedné z hybridizačních prób k detekci sfRNA. Jedním z hlavních kritérií při výběru primerů pro qPCR esej byla délka amplikonu. qRT-PCR esej převzatá z práce Schwaiger M., Cassinotti P., 2003 neumožňovala věrohodnou analýzu účinnosti z důvodu malé velikosti amplikonu a následného překryvu jeho signálu se signálem vznikajících primer-dimerů. Velikost amplikonů tvořených vybranými páry primerů je (122 bp a 124 bp) což umožňuje jejich snadné odlišení od případných vznikajících primer-dimerů.

Účinnost amplifikace obou vybraných párů primerů lze pozorovat na obr. 14 kde vidíme výsledky amplifikace desítkové ředící řady plazmidu sfRNA. Intenzivnější tvorbu dimerů lze pozorovat v NTC reakci s použitím páru primerů sfRNA_F × sfRNA_R5. Pro další optimalizace byl tedy vybrán pár primerů sfRNA_F1 × sfRNA_R5 i přesto že v jedné ze 2 NTC reakcí byl pozorován vznik primer-dimerů naznačující možnou nižší účinnost amplifikace. Výsledky testování účinnosti sfRNA_F1 × sfRNA_R5 páru primerů amplifikací desítkové ředící řady templátu ukazují že k úspěšné amplifikaci specifického produktu docházelo jen při nejvyšší koncentraci desítkového ředění templátové DNA plazmidu sfRNA. Ve všech následujících ředění templátového plazmidu nebyly primery schopny efektivní

vazby na templát, což lze usuzovat mimo jiné na základě přítomnosti primer-dimerů z dokumentace elektroforetické separace amplikonů této eseje na obr. 16. Podobně jako v případě návrhu hybridizační próby ani návrh primerů pro kvantifikaci sfRNA není jednoduchým úkolem z důvodu tvorby složitých sekundárních struktur v sfRNA, které omezují volbu míst vhodných pro úspěšné a efektivní nasedání primerů v průběhu qRT-PCR. Proto by bylo vhodné vyzkoušet navrhnout primery i próbu komplementární k jiným úsekům sfRNA struktury.

První experiment metody dot-blot byl proveden dle publikace Kumar J. S. *et al.*, 2013. Po provedení tohoto experimentu nebyl detekován žádný hybridizační signál. Jedním z důvodů může být design experimentu optimalizovaný pro detekci hybridu DNA-DNA, tj. použití DNA próby k detekci cílové molekuly ve vzorku DNA. Tato práce se soustředí na detekci cílové molekuly RNA pomocí DNA próby. Dalším možným důvodem neúspěchu mohly být změny provedené v protokolu. Konkrétně se jedná o použití jiných promývacích roztoků po hybridizaci, kde v tomto experimentu bylo použito 0,1% SDS činidla doporučené v publikaci Josefsen K. *et al.*, 2011 místo 10% SDS použité v publikaci Kumar J. S. *et al.*, 2013. Dále byl použit jiný blokovací a promývací roztok po navázání konjugátu.

Následovala optimalizace teploty pre/hybridizačního a promývacího kroku. V publikaci Kumar J. S. *et al.*, 2013 byla použita teplota 42 °C standardně doporučována pro vznik DNA-DNA hybridu. V této práci bylo cílem vytvořit podmínky pro vznik DNA-RNA hybridu. Standardně je teplota pro vytvoření DNA-RNA hybridu nastavována na 68 °C (Zhou J. C., 2015), nicméně v experimentech v této práci byla vybrána teplota nižší než doporučená z důvodu obav z možné degradace RNA vzorků a destabilizace vazby próby na cílovou RNA při vyšších teplotách. Vyšší teplota a tím i možné vymývání próby z membrán při prvních provedených experimentech metodou dot-blot mohlo způsobit, že nebyl detekován hybridizační signál próby.

V následujícím experimentu metody dot-blot byl použit formamidový pre/hybridizační roztok z publikace Brown T. a Mackey K., 2001. Použití formamidu při hybridizaci umožňuje snížit teplotu hybridizace, což sníží možné riziko degradace RNA ve zkoumaném vzorku. Při použití formamidového pre/hybridizačního roztoku byla detekována pouze pozitivní kontrola detekce biotinu. Pro účely optimalizace metody dot-blot byl použit zdroj biotinu ve formě konjugátu s lektinem Gsl-1-biotin. Vznik signálu v místě nanesení této kontroly pak mělo prokázat úspěšnost a účinnost vazby biotinu se Streptavidinem po vazbě s konjugátem Streptavidin-HRP (alternativně Streptavidin-AP) a zároveň kontrolu úspěšnosti vyvolání signálu reportérové molekuly chemiluminiscenční nebo kolorimetrickou detekcí.

Hybridizační signál próby transkriptu PAPOLA genu se nepodařilo detekovat, což mohlo být způsobeno nevhodným složením pre/hybridizačního roztoku. Tento závěr se podařilo potvrdit použitím komerčně vyrobeného hybridizačního pufru PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich). Použitím tohoto komerčně dostupného hybridizačního pufru byl úspěšně detekován hybridizační signál po vazbě próby na transkripty genu Aktin β ve vzorcích RNA izolovaných z lidské buněčné linie A549 a jejíž signál byl detekován kolorimetricky streptavidin-HRP reportérovým systémem na nylonové membráně (viz příloha obr. 28).

Další možnou optimalizací bylo porovnání různých typů hybridizačních membrán. V této práci byly testovány celkem 3 typy membrán; nylonová membrána Zeta-Probe® Blotting Membranes (Bio-Rad), nitrocelulózová membrána Trans-Blot® Transfer Medium (Bio-Rad) a PVDF Transfer Membrane (Thermo Fisher Scientific). Všechny zmíněné membrány jsou používány v metodě Western blot (Kurien B. T., Scofield R. H., 2015). Nylonová a nitrocelulózová membrána se nejčastěji používají v metodách Southern blot a Northern blot (Bhat A. I., Rao G. P., 2020). Mezi nevýhody nitrocelulózové membrány patří její křehkost po vysušení a omezená možnost jejího opakovaného použití (Brown T., 1993). Nitrocelulózová a PVDF membrána obě vykazovaly nižší citlivost při vyvolávání nanášecí kontroly pomocí methylenové modři, kdy intenzita pozorovaného signálu přítomné nukleové kyseliny byla menší oproti nylonové membráně. Navíc byla trvanlivost tohoto signálu u nitrocelulózové a PVDF membrány překvapivě omezena pouze na dobu do úplného vysušení obou membrán, zatímco v případě nylonové membrány tento signál přetrval i po úplném vysušení membrány. Nevýhodou nylonové membrány bylo výraznější rozpětí kapky s naneseným vzorkem (viz obr. 28). Tento problém se dal vyřešit použitím Dot-Blotteru (Clever Scientific Ltd). Ze všech výše uvedených důvodů byla proto nylonová membrána vybrána jako nejvhodnější nosné médium pro metodu dot-blot.

Dále byly otestovány různé druhy značení DNA próby, a to značení prób nick translací (Kato A. *et al.*, 2006) nebo značení náhodnými primery pomocí Biotin DecaLabel DNA labeling kit (Thermo Fisher Scientific). Tento test byl inspirován diplomovou prací Hany Pejšové (Pejšová H., 2020), která pozorovala, že signál próby značené nick translací byl intenzivnější než signál značení náhodnými primery. V této práci byl pozorován opak, tj. vyšší intenzitu poskytovala sonda značená náhodnými primery. Tento rozpor ve výsledcích byl nejspíše dán délkou próby 124 bp (sfRNA_F1 \times sfRNA_R5) a próby 68 bp (TBE1 F \times TBE1 R) použitými v této práci v porovnání s délkou 298 bp próby Hany Pejšové. Doporučená minimální délka DNA próby pro značení nick translací je 300 bp a konečná délka próby by se měla pohybovat mezi 100–200 bp (Balmain A. *et al.*, 1979). Próba navržená v této práci byla

natolik krátká, že nick translace během značení naštipala již tak poměrně krátký amplikon na příliš krátké fragmenty, které následně nebyly schopné efektivně hybridizovat k cílové molekule RNA. Při porovnání účinnosti značení těmito dvěma metodami se právě z tohoto důvodu mohla zdát účinnější právě metoda značení pomocí náhodných primerů.

Dalším pozorováním byla rozdílná intenzita signálu transkriptu „housekeeping“ genu Aktin β a sRNA při porovnání různých způsobů detekce signálu reportérové molekuly. V této práci bylo pozorováno, že signál transkriptu Aktin β genu v TBEV-infikované buněčné linii DAOY HTB 186 byl intenzivnější při chemiluminiscenční než při kolorimetrické detekci viz příloha na obr. 29. Próby použité pro detekci transkriptů genu Aktin β byly delší a mohly být značeny nick translací, zatímco próby pro detekci sRNA byly značeny náhodnými primery. Z důvodu použití různě dlouhých prób, a tedy nutnosti použít jiný způsob značení nelze experimenty s použitím těchto dvou prób efektivně porovnat. Do budoucna by bylo vhodné tyto parametry sjednotit a v zájmu porovnatelnosti obou experimentů použít stejně dlouhé próby a stejný způsob značení. Tímto by bylo možné získat i konzistentní intenzitu signálu při porovnávání různých typů detekce signálu reportérových molekul u obou prób.

Jedním z posledních problémů pozorovaných v souvislosti s optimalizacemi prováděnými v metodě dot-blot byla čistota použité RNA izolované z buněčné linie DAOY HTB-186. Při přípravě jednoho ze série vzorků RNA pro optimalizaci metody dot-blot bylo použito velké množství vstupního materiálu v porovnání s předcházejícími vzorky a po jejich použití a kolorimetrické detekci došlo na jejich místě ke vzniku inverzních signálů. Hypotéza zdůvodňující nepřítomnost hybridizačního signálu způsobená překryvem vazebného místa příliš velkým množstvím přítomné celkové RNA byla zavržena na základě inverzních signálů získaných z experimentu s použitím ředící řady tohoto RNA vzorku. Hypotéza vysvětlující vznik inverzního signálu přítomností kontaminací ve vzorku RNA překrývajících vazebné místo pro próbu byla ověřena přečištěním RNA pomocí NucleoSpin RNA mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel). Přetrvávající přítomnost inverzních signálů i po přečištění RNA byla motivací pro otestování přečištění RNA opětovnou izolací pomocí RNA Blue. Po tomto typu přečištění se podařilo přítomnost inverzních signálů po kolorimetrické detekci eliminovat i když k úspěšné detekci hybridizačního signálu přečištění nepřispělo. Na základě tohoto porovnání lze uzavřít, že vznik inverzních signálů po kolorimetrické detekci může vzniknout neefektivní izolací RNA způsobující přítomnost kontaminujících proteinů nebo spíše polysacharidů a podtrhuje důležitost volby efektivního způsobu izolace nukleové kyseliny v závislosti na typu vstupního vzorku a nutnost důsledné analýzy kvality purifikované nukleové kyseliny pro metodu dot-blot. Výsledek porovnání kvality RNA po opětovné

purifikaci pomocí NucleoSpin RNA mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel) a RNA Blue (Top-Bio) jasně prokazuje, že spektrofotometrické hodnocení je nedostačující pro posouzení přítomnosti kontaminantů bránících efektivní hybridizaci. Je tedy nutné již na začátku experimentu volit protokol pro izolaci nukleové kyseliny ověřený pro daný typ vstupního materiálu. S výhodou lze také využít modifikací izolačního protokolu snižujícího pravděpodobnost společné izolace kontaminujících polysacharidů, jako v této práci, kde bylo v porovnání se standardním protokolem pro precipitaci RNA pomocí směsi isopropanol, Na-Acetat využita precipitace směsí isopropanol, NaCl (Lever M. A. *et al.*, 2015).

Jelikož se nepovedlo jednoznačně detekovat sRNA metodou dot-blot byla proto použita metoda Northern blot. Metoda Northern blot byla prováděna v době získání prvního hybridizačního signálu metodou dot-blot, kde byl detekován i nespecifický signál. Nicméně později po neúspěšně provedené metodě Northern blot nebylo možné opětovně dosáhnout pozitivních hybridizačních signálů ani metodou dot-blot a veškerá pozornost byla soustředěna na optimalizace zaměřené na opětovnou detekci pozitivního hybridizačního signálu. Z tohoto důvodu nezbýval prostor pro možnou optimalizaci metody Northern blot.

Nespecifické hybridizační signály sRNA próby pozorované v negativní kontrole použité při metodě dot-blot byly motivací pro provedení metody Northern blot. Cílem této metody byla možnost odhalení identity molekul RNA zodpovědných za nespecifickou hybridizaci sRNA próby po separaci RNA v testovaných vzorcích za denaturačních podmínek s následnou detekcí hybridizačního signálu po přenosu separované RNA na membránu. Protokol pro metodu Northern blot s použitím 12% polyakrylamidového gelu se 4% močovinou je standardně používán pro aplikace vyžadující vysoké rozlišení separace RNA (Green M. R., Sambrook J., 2021), který byl úspěšně otestován pro detekci sRNA výzkumnou skupinou prof. Esther Schnettler laboratoře Tropické medicíny Institutu Bermadra Notche, Hamburk, Německo (nepublikovaná data).

V průběhu testování tohoto převzatého protokolu nebyl získán žádný pozitivní hybridizační signál. Na obr. 30 lze pozorovat 12% polyakrylamidový gel se 4% močovinou po elektroforetické separaci a lze vidět, že se RNA separovala do 5,8 S rRNA, 5 S rRNA a čtyř tRNA. Dále proběhlo elektroblotování, pre/hybridizace, promývání, blokace, navázání reportérové molekuly dle protokolu publikace Green M. R., Sambrook J., 2021 s určitými změnami diskutovanými dále. Poté proběhla chemiluminiscenční a kolorimetrická detekce při kterých nebyl detekován žádný signál. Po vyvolání signálu reportérové molekuly byla provedena nanášecí kontrola pomocí metylenové modři, při které nebyl detekován žádný hybridizační signál. Absenci hybridizačního signálu po provedení protokolu metody Northern

blot lze vysvětlit použitím nestandardních podmínek a/nebo odchýlení se od některých doporučení z předepsaného protokolu. Jedná se například o teplotu hybridizace a promývání 68°C/50°C doporučená protokolem (Chou C. C., 2004). Doporučeným hybridizačním roztokem pro próbu značenou DIG v převzatém protokolu byl ExpressHyb™ Hybridization Solution (Clontech Laboratories), zatímco hybridizační pufr zvolený v postupu použitého v této práci byl SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich), který byl použit i v protokolu metody dot-blot v této práci a s nímž byl úspěšně detekován pozitivní hybridizační signál. Podobně, došlo k odchýlení od použití doporučené membrány. Namísto doporučované nylonové membrány hybond N+ (Amshram) byla použita nylonová membrána Zeta-Probe® Blotting Membranes (Bio-Rad), která byla v této práci úspěšně otestována při metodě dot-blot. Dalším možným důvodem neúspěchu mohl být neefektivní přenos RNA z gelu na membránu při elektroblottingu, což mohlo být způsobeno nedostatečným nebo nevyrovnaným výkonem elektroblotovacího zařízení Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Místo komerčního blotovacího pufru předepsaného výrobcem blotovacího zařízení byl použit pufr předepsaný zdrojovým protokolem vytvořeným výzkumnou skupinou prof. Esther Schnettler. Pozitivní výsledky získané používáním nekomerčních pufrů ostatními členy laboratoře ale tuto hypotézu nepodporují. Dalším možným důvodem neúspěchu je možná degradace RNA vzorků v průběhu blotování nebo mohlo dojít k přenosu RNA skrz membránu do filtračních papírů blotovacího sendviče. Přenos RNA na membránu by bylo možné ověřit pomocí barveného velikostního standardu, který nebyl v době výskytu tohoto problému a následných optimalizací metody k dispozici.

Detekce sfRNA metodou Northern blot byla již dříve provedena v publikacích zabývajících se studiem sfRNA u flavivirů YFV a MVE (Pijlman P. G. *et al.*, 2008) a JEV (Fan Y. H. *et al.*, 2011). Detekce sfRNA v sfRNA-transfekovaných a TBEV-infikovaných buňkách bylo vyzkoušeno Pejšovou H., 2020. V publikaci Pijlman P. G. *et al.*, 2008 byla sfRNA v YFV a MVE detekována pomocí radioizotopů ³²P a za použití již zmíněné Hybond N+ membrány (Amshram) a ExpressHyb™ hybridization Solution (Clontech Laboratories). V článku Fan Y. H. *et al.*, 2011 byla sfRNA v JEV detekována pomocí DIG značené próby, metodou značení 3' konců. V publikaci Fan Y. H. *et al.*, 2011 ovšem není popsán postup metody Northern blot použitý pro detekci sfRNA v JEV a nelze tedy získat veškeré informace potřebné pro odhalení možných příčin neúspěšného přenosu RNA při metodě Northern blot v této bakalářské práci.

Z důvodu vyloučení možnosti nefunkčního protokolu značení a/nebo detekce hybridizačního signálu próby značené pomocí DIG byl v následujícím experimentu metody

Northern blot otestován postup, kterým byl získán pozitivní hybridizační signál v metodě dot-blot s použitím próby značené biotinem. Na obr. 31 lze pozorovat 12% polyakrylamidový gel se 4% močovinou po elektroforetické separaci a lze vidět, že separace RNA proběhla v pořádku. Z celkové RNA došlo k úspěšné separaci 5,8 S rRNA, 5 S rRNA a tří tRNA, zatímco zbývající vysokomolekulární RNA zůstala neseparována na počátku separační dráhy, tak jak je typické pro separaci RNA v denzitním polyakrylamidovém gelu s vysokým rozlišením (např. Huang Q. *et al.*, 2014; Mishima E. *et al.*, 2015). Hybridizační signál byl detekován pomocí kolorimetrické detekce reportérového systému streptavidin-HRP, kde byl detekován pouze signál próby nanesené na membráně v roli pozitivní kontroly detekce biotinu. Po vyvolání reportérové molekuly byla provedena nanášecí kontrola pomocí metylenové modři jejímž výsledkem byla detekce signálu všech zmíněných RNA (viz obr. 31b)). Bohužel ani v případě použití tohoto postupu se nepodařilo získat pozitivní hybridizační signál a bude proto nejspíše nutné optimalizovat postup metody Northern blot před samotnou hybridizací a vyvoláváním hybridizačního signálu.

6 Závěr

Tato práce se zaměřovala na optimalizaci detekce sfRNA metodou dot-blot. V průběhu práce se díky sérii pokusů testujících různé reakční podmínky, chemikálie nebo membrány podařilo docílit pozitivního hybridizačního signálu prób navržených k detekci interní kontroly transkriptů „housekeeping“ genů PAPOLA a aktin β i hybridizačního signálu sfRNA v testovaných vzorcích. Z důvodu přítomnosti nespecifického hybridizačního signálu pozorovaného ve vzorcích negativní kontroly bude nutné v optimalizaci metody dot-blot pokračovat. Pro identifikaci nespecifického signálu v metodě dot-blot byla RNA před nanesením na membránu a hybridizací separována v denaturačním polyakrylamidovém gelu s močovinou. Metoda Northern blot byla provedena dle zavedeného protokolu, ale ani po několika opakování nedošlo k detekci pozitivního hybridizačního signálu.

Pro ověření přítomnosti a množství sfRNA ve vzorcích použitých pro optimalizaci metody dot-blot byla použita qRT-PCR esej z publikace Schwaiger M., Cassinotti P., 2003. Při použití této eseje pro kvantifikaci sfRNA v testovaných vzorcích byla pozorována překvapivě velmi nízká účinnost amplifikace a nepodařilo se jí uspokojivě zvýšit ani sérií optimalizačních experimentů s použitím různých reakčních mixů, změnami koncentrací PCR chemikálií nebo za různých reakčních podmínek. Selhaly i pokusy vytvořit a optimalizovat vlastní qPCR esej pro kvantifikaci sfRNA. Účinnost reakce byla vždy velmi nízká i při testování různých párů primerů. Zdá se, že sekundární struktury tvořící se ve struktuře sfRNA

mohou být jednou z hlavních příčin neúspěchů při pokusech o návrh primerů schopných efektivně amplifikovat sfRNA a získat tak použitelnou esej pro kvantifikaci sfRNA pomocí qRT-PCR. Na základě výše uvedených skutečností tedy nelze zavedenou qRT-PCR vytvořenou v publikaci Schwaiger M., Cassinotti P., 2003 použít pro kvantifikaci sfRNA ve vzorcích používaných v naší laboratoři. Pro správnou kvantifikaci sfRNA pomocí qRT-PCR bude nejspíše potřeba použít nově navržených primerů a jejich otestování.

7 Seznam použitých zdrojů

- Akiyama B. M., Laurence H. M., Massey A. R., Costantino D. A., Xie X., Yang Y., Kieft J. S., (2016). *Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. Science*, 354(6316), 1148–1152.
- Altaf M., Stoeckli-Evans H., (2013). *Chiral one – and two-dimensional silver(I)-biotin coordination polymers. Acta crystallographica. Section C. Crystal structure communications*, 69(Pt 2), 127–137.
- Altar C. A., Ryan S, Abood M., Eberwine J. H., (1989). *In Situ mRNA hybridization: Standard Procedures and Novel Approaches Methods in Neurosciences*, 238–281.
- Balmain A., Birnie G. D., (1979). *Nick translation of mammalian DNA. Biochimica et biophysica acta*, 561(1), 155–166.
- Bavelaar B. M., Lee B. Q., Gill M. R., Falzone M., Vallis K. A., (2018), *Subcellular Targeting of Theranostic Radionuclides, Frontiers in Pharmacology*, 9, 996.
- Bergmans H. E. W., Gaastra W., (1988). *Dot-Blot hybridization Method*. In: Walker J. M. et al., *New Nucleic Acid Techniques Methods in Molecular Biology. Humana Press*, 4, 385-390, ISBN: 978-1-59259-491-7.
- Bhat A. I., Rao G. P., (2020). *Production of Virus-Resistant Plants Through Transgenic Approaches In: Characterization of Plant Viruses. Springer Protocols handbooks*, 491-510, ISBN: 978-0716-0334-5.
- Blake M. S, Johnston K. H., Russell-Jones G. J., Gotschlich E. C., (1984). *A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. Analytical biochemistry*, 136(1), 175–179.
- Bogovic P., Strle F., (2015). *Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. World Journal of Clinical Cases*, 3(5), 430-441.

- Bondaryuk A. N., Kulakova N. V., Belykh O. I., Bukin Y. S., (2023). *Dates and Rates of Tick-Borne Encephalitis Virus-The Slowest Changing Tick-Borne Flavivirus. International journal of molecular sciences*, 24(3), 2921.
- Bronstein I., Olesen C. E. M., (1995). *Detection Methods Using Chemiluminescence. Molecular Methods for Virus Detection*, 147–174.
- Brown T., (1993). *Dot and Slot Blotting of DNA. Current Protocols in Molecular Biology*, 21(1), 15–20.
- Brown T., Mackey K., (2001). *Analysis of RNA by Northern and Slot-Blot hybridization. Current Protocols in Neuroscience*, 15(1), 5.17.1–5.17.17.
- Clarke B. D., Roby J. A., Slonchak A., Khromykh A. A., (2015). *Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. Virus Research*, 206, 53–61.
- Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J., (2018). *A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. Emerging Microbes & Infections*, 7(1).
- Demchenko A. P. *et al.*, (2009). *Fluorescence Detection Techniques* In: Demchenko A.P., *Introduction to Fluorescence Sensing. Springer*, 3, 65-66, ISBN: 978-1-4020-9003-5.
- Fan Y. H., Nadar M., Chen C. C., Weng C. C., Lin Y. T., Chang R. Y., (2011). *Small noncoding RNA modulates japanese encephalitis virus replication and translation in trans. Virology Journal*, 8, 492.
- Fares M., Cochet-Bernoin M., Gonzalez G., Montero-Menei C. N., Blanchet O., Benchoua A., Boissart C., Lecollinet S., Richardson J., Haddad N., Couplier M., (2020). *Pathological modeling of TBEV infection reveals differential innate immune responses in human neurons and astrocytes that correlate with their susceptibility to infection. Journal of neuroinflammation*, 17(1), 76.
- Farrell R. E., (1993). *The Northern Blot*, In: Farrell R. E., *RNA Methodologies. Academic Press*, 158-173, ISBN: 978-0-12-249700-1.
- Farrell R. E., (2010). *Nucleic Acid Probe Technology*. In: Farrell R. E., *RNA Methodologies. Academic Press*, 4, 261–282. ISBN: 978-0-12374-727-3.
- Frey A., Meckelein B., Externest D., Schmidt M. A., (2000). *A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays*, 233(1-2), 47–56.

- Funk A., Truong K., Nagasaki T., Torres S, Floden N., Balmori M. E., Khromykh A. A., (2010). *RNA Structures Required for Production of Subgenomic Flavivirus RNA*. *Journal of Virology*, 84(21), 11407–11417.
- Gould E., Solomon T., (2008). *Pathogenic flaviviruses*. *The Lancet*, 371(9611), 500–509.
- Green M. R., Sambrook J., (2021). *Separation of RNA according to Size: Electrophoresis of RNA through Denaturing Urea Polyacrylamide Gels*. *Cold Spring harbor protocols*, 2021(1).
- Green M. R., Sambrook J., (2022). *Separation of RNA according to Size: Electrophoresis of RNA through Agarose Gels Containing Formaldehyde*. *Cold Spring Harbor protocols*, 2022(2).
- Helmová R., Hönig V., Tykalová H., Palus M., Bell-Sakyi L., Grubhoffer L., (2020). *Tick-Borne Encephalitis Virus Adaptation in Different host Environments and Existence of Quasispecies Viruses*, 12(8), 902.
- Henry Sum M. S., Yee S. F., Eng L., Poili E., Lamdin J., (2017). *Development of an Indirect ELISA and Dot-Blot Assay for Serological Detection of Rice Tungro Disease*. *BioMed Research International*, 2017, 1–7.
- Holzmann H., Vorobyova M. S., Ladyzhenskaya I. P., Ferenczi E., Kundi M., Kunz C., Heinz F. X., (1992). *Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes* *Vaccine*, 10(5), 345–349.
- Hombach J., Barrett D. T. A., Kollaritsch H., (2017). *Tickborne Encephalitis Vaccines*, In: Ploktin A. S, Orenstein W., Offit A. P., Edwards M. K., *Plotkin's Vaccines*. Elsevier, 7, 1080-1094.e5, ISBN: 978-0-323-35761-6.
- Huang Q., Mao Z., Li S., Hu J., Zhu Y., (2014). *A non-radioactive method for small RNA detection by northern blotting*. *Rice (New York, N.Y.)*, 7(1), 26.
- Chabraoui F., Derrington E. A., Mallie-Didier F., Confavreux C., Quincy C., Caudie C., (1993). *Dot-blot immunodetection of antibodies against GM1 and other gangliosides on PVDF-P membranes*. *Journal of Immunological Methods*, 165(2), 225–230.
- Chou C. C., Chen C. H., Lee T. T., Peck K., (2004). *Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression*. *Nucleic acids research*, 32(12), e99.
- Jacobsen P. F., Jenkyn D. J., Papadimitriou J. M., (1985). *Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice*. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 44(5), 472–485.

- Josefsen K., Nielsen H., (2011). *Northern blotting analysis. Methods in molecular biology* (Clifton N. J.), 703, 87–105.
- Kaiser R., (2016). *Frühsommermeningoenzephalitis. Nervenarztl*, 87(6), 667-680.
- Kato A., Albert P. S., Vega J. M., Birchler J. A., (2006). *Sensitive fluorescence in situ hybridization signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation. Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, 81(2-3), 71–78.
- Kessle C., (1991). *The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology--a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. Molecular and cellular probes*, 5(3), 161–205.
- Kollaritsch H., Paulke-Korinek M., Holzmann H., Hombach J., Bjorvatn B., Barrett A., (2012). *Vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis. Expert Review of Vaccines*, 11(9), 1103–1119.
- Kricka L. J., (1996). *CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY. Immunoassay*, 337–353.
- Kubinski M., Beicht J., Gerlach T., Volz A., Sutter G., Rimmelzwaan G. F., (2020). *Tick-Borne Encephalitis Virus: A Quest for Better Vaccines against a Virus on the Rise. Vaccines*, 8(3), 451.
- Kumar J. S., Parida M., Lakshmana R. P. V., (2013). *Development & evaluation of biotinylated DNA probe for clinical diagnosis of chikungunya infection in patients' acute phase serum & CSF samples. The Indian Journal of Medical Research*, 138, 117-124.
- Kuno G., Chang G.-J. J., Tsuchiya K. R., Karabatsos N., Cropp C. B., (1998). *Phylogeny of the Genus Flavivirus. Journal of Virology*, 72(1), 73–83.
- Kurien B. T., Scofield R. H., (2003). *Protein blotting: a review. Journal of immunological methods*, 274(1-2), 1–15.
- Kurien B. T., Scofield R. H., (2015). *Western blotting: an introduction. Methods in molecular biology* (Clifton, N. J.), 1312, 17–30.
- Lever M. A., Torti A., Eickenbusch P., Michaud A. B., Šantl-Temkiv T., Jørgensen B. B., (2015). *A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. Frontiers in microbiology*, 6, 476.
- Leyssen P., De Clercq E., Neyts J., (2000). *Perspectives for the Treatment of Infections with Flaviviridae. Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 67–82.

- Ličková M., Fumačová H. S., Sláviková M., Slovák M., Drexler J. F., Klempa B., (2020). *Dermacentor reticulatus* is a vector of tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Diseases*, 11(4).
- Lindquist L., (2014). *Tick-borne encephalitis. Handbook of clinical neurology*, 123, 531–559.
- Lindquist L., Vapalahti O., (2008). *Tick-borne encephalitis. Lancet (London, England)*, 371(9627), 1861–1871.
- Lovatt D., Eberwine J., (2013). *Northern Blotting*, In: Maloy S, Hughes K., *Brenner's Encyclopedia of Genetics, Academic Press*, 2, 105-107, ISBN: 978-0-08-096156-9.
- MacFadden A., O'Donoghue Z., Silva P. A. G. C., Chapman E. G., Olsthoorn R. C., Sterken M. G., Pijlman G. P., Bredenbeek P. J., Kieft J. S., (2018). *Mechanism and structural diversity of exoribonuclease-resistant RNA structures in flaviviral RNAs. Nature communications*, 9(1), 119.
- Mansfield K. L., Johnson N., Phipps L. P., Stephenson J. R., Fooks A. R., Solomon T., (2009). *Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. Journal of General Virology*, 90(8), 1781–1794.
- Medlock J. M., Hansford K. M., Bormane A., (2013). *Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe. Parasites Vectors*, 6, 1.
- Mishima E., Jinno D., Akiyama Y., Itoh K., Nankumo S., Shima H., Kikuchi K., Takeuchi Y., Elkordy A., Suzuki T., Niizuma K., Ito S., Tomioka Y., Abe T., (2015). *Immuno-Northern Blotting: Detection of RNA Modifications by Using Antibodies against Modified Nucleosides. PloS one*, 10(11), e0143756.
- Mohd H. K., Groeger J., Flaxman A. D., Wiersma S. T., (2013). *Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology*, 57(4), 1333–1342.
- Morita K., Tanaka M., Igarashi A., (1991). *Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. Journal of clinical microbiology*, 29(10), 2107–2110.
- Mukhopadhyay M., Bhaumik P., (2016). *3D perception of maximum density zone on Ramachandran plots for Zika virus protein structures. International Journal of Advanced Research*. 4. 1076-1086.
- Mullins J. M., (2010). *Fluorochromes: Properties and Characteristics* In: Oliver C., Jamur M. C., *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 588, 123–134. ISBN: 978-1-59745-324-0.

- Pejšová H., (2020). *Subgenomic flaviviral RNA and its role in host cells*. Č. Budějovice. diplomová práce (Mgr.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta.
- Picard-Meyer E., Peytavin de Garam C., Schereffer J. L., Marchal C., Robardet E., Cliquet F., (2015). *Cross-platform evaluation of commercial real-time SYBR green RT-PCR kits for sensitive and rapid detection of European bat Lyssavirus type 1*. *BioMed research international*, 2015, 839518.
- Pijlman G. P., Funk A., Kondratieva N., Leung J., Torres S, van der Aa L., Liu W. J., Palmenberg A. C., Shi P. Y., Hall R. A., Khromykh A. A., (2008). *A highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity*. *Cell host & Microbe*, 4(6), 579–591.
- Postler T. S., Beer M., Blitvich B. J., Bukh J., de Lamballerie X., Drexler J. F., Imrie A., Kapoor A., Karganova G. G., Lemey P., Lohmann V., Simmonds P., Smith D. B., Stapleton J. T., Kuhn J. H., (2023). *Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae*. *Archives of virology*, 168(9), 224.
- Pulkkinen L. I. A., Barrass S. V., Domanska A., Överby A. K., Anastasina M., Butcher S. J., (2022). *Molecular Organisation of Tick-Borne Encephalitis Virus*. *Viruses*, 14(4), 792.
- Raghu S, Sunita P., (2023). *Preparation, characterization and in vitro anticancer efficacy of biotin-conjugated, silibinin loaded bovine serum albumin nanoparticles*. *Food Bioscience*, 56, 103150.
- Reed K. C., Mann D. A., (1985). *Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes*. *Nucleic Acids Research*, 13(20), 7207–7221.
- Rodig S. J., (2019). *Detecting horseradish Peroxidase-Labeled Cells*. *Cold Spring harbor protocols*, 2019(4).
- Romero-Brey I., Bartenschlager R., (2014). *Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses*. *Viruses*, 6(7), 2826–2857.
- Rusanov A. L., Kozhin P. M., Tikhonova O. V., Zgoda V. G., Loginov D. S, Chlastáková A., Selinger M., Štěrba J., Grubhoffer L., Luzgina N. G., (2021). *Proteome Profiling of PMJ2-R and Primary Peritoneal Macrophages*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 6323.
- Sakai M., Muto M., Hirano M., Kariwa H., Yoshii K., (2015). *Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR*. *Virus Research*, 203, 36–40.

- Samar K. K., (2014). *BiomedRecent Advances in Immunoassays*, In: Samar K. K., *Sword Diagnostic*. 12-35, ISBN: 978-1500552312.
- Schneider H., (1931). *Über epidemische akute Meningitis serosa*. *Wien Klin Wochenschr*. 44.
- Schwaiger M., Cassinotti P., (2003). *Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA*. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 27(2), 136–145.
- Schweizer M., Peterhans E., (2014). *Pestiviruses*. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2(1), 141–163.
- Seo Y., (2005). *IMMUNOASSAYS, TECHNIQUES, Enzyme Immunoassay*, In: Worsfold P., Townshend A., Poole C., *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, 2, 344-352, ISBN: 978-0-12-369397-6.
- Silva P. A. G. C., Pereira C. F., Dalebout T. J., Spaan W. J. M., Bredenbeek P. J., (2010). *An RNA Pseudoknot Is Required for Production of Yellow Fever Virus Subgenomic RNA by the host Nuclease XRNI*. *Journal of Virology*, 84(21), 11395–11406.
- Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E. A., Meyers G., Monath T., (2017). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae*. *Journal of General Virology*, 98(1), 2–3.
- Sips G. J., Wilschut J., Smit J. M., (2012). *Neuroinvasive flavivirus infections*. *Reviews in medical virology*, 22(2), 69–87.
- Slonchak A., Khromykh A. A., (2018). *Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research*. *Antiviral Research*. 159, 13–25.
- Slonchak A., Parry R., Pullinger B., Sng J. D. J., Wang X., Buck T. F., Torres F. J., Harrison J. J., Colmant A. M. G., Hobson-Peters J., Hall R. A., Tuplin A., Khromykh A. A., (2022). *Structural analysis of 3'UTRs in insect flaviviruses reveals novel determinants of sfRNA biogenesis and provides new insights into flavivirus evolution*. *Nature communications*, 13(1), 1279.
- Stapleton J. T., Fong S., Muerhoff A. S., Bukh J., Simmonds P., (2011). *The GB viruses: 350–2. a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae*. *Journal of General Virology*, 92(2), 233–246.
- Stott D. I., (1989). *Immunoblotting and dot-blotting*. *Journal of Immunological Methods*, 119(2), 153–187.

- Stott D. I., (2000). *Immunoblotting, Dot-Blotting, and ELISPOT Assays: Methods and Applications*. *Journal of Immunoassay*, 21(2-3), 273–296.
- Sundararajan R., Salameh T., Camarillo I. G., Prabu R. R., Natarajan A., Sankaranarayanan K., (2014). *Irreversible electroporation: a drug-free cancer treatment*. *Electroporation-Based Therapies for Cancer*. Elsevier, 219–243.
- Tamura T., Igarashi M., Enkhbold B., Suzuki T., Okamatsu M., Ono C., Matsuura Y., (2019). *In vivo dynamics of reporter Flaviviridae viruses*. *Journal of Virology*, 93(22).
- Tijssen P., (1993). *Labeling of probes and their detection* In: P. Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, 24, 269-374, ISBN: 978-0-4448-9886-9.
- Tolle F., Wilke J., Wengel J., Mayer G., (2014). *By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX*. *PloS one*, 9(12), e114693.
- Vazquez-Alvarado M., Vanasupa S., Herrera Valdez E., Pama A. M., Crowder M. J., Vanasupa L., Martinez N. W., Martinez A. W., (2023). *Evaluation of chromogenic substrates for horseradish peroxidase on paper-based microfluidic devices*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 377, 133028.
- Velay A., Paz M., Cesbron M., Gantner P., Solis M., Soulier E., Fafi-Kremer S, (2019). *Tick-borne encephalitis virus: molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen*. *Critical Reviews in Microbiology*, 1–22.
- Villordo S. M., Carballeda J. M., Filomatori C. V., Gamarnik A. V., (2016). *RNA Structure Duplications and Flavivirus host Adaptation*. *Trends in Microbiology*, 24(4), 270–283.
- Voytas D., Ke N., (2002). *Detection and quantitation of radiolabeled proteins and DNA in gels and blots*. *Current protocols in immunology*. Appendix, 3, A.3J.1–A.3J.10.
- Wacker M. J., Godard M. P., (2005). *Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III*. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 16(3), 266–271.
- Wages J. M., (2005). *NUCLEIC ACIDS | Immunoassays* In: Worsfold P., Townshend A., Poole C., *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, 2, 408–417. ISBN: 978-0-12-369397-6.
- Wilson H. N., (1966). *ABSORPTIOMETRY AND "COLORIMETRIC ANALYSIS"*, In: Wilson H. N., *An Approach to Chemical Analysis*. Pergamon, 222–259. ISBN: 978-0-08-011543-6.

Zhou J. C., Feller B., Hinsberg B., Sethi G., Feldstein P., Hihath J., Marco M., Knoesen A., Miller R., (2015). *Immobilization-mediated reduction in melting temperatures of DNA–DNA and DNA–RNA hybrids: Immobilized DNA probe hybridization studied by SPR. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 481, 72–79.