

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 2023

Králová V., 2023: 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] – 85 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 essay for quantification of sfRNA in sfRNA-transfected or TBEV-infected DAOY HTB 186 human neural cells was also performed. Interestingly, the qRT-PCR essay 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 essay 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.

V Českých Budějovicích: 7. 12. 2023

.....

Valentýna Králová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Pavlíně Věchtové, Ph.D. za trpělivost během mé práce v laboratoři, ochotu vysvětlení 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.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	TBEV	1
1.1.1	Taxonomie čeledi Flaviviridae	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	3
1.1.7	Příznaky infekce TBEV	4
1.2	Molekulární a genetická charakteristika TBEV	4
1.2.1	Stavba virionu	4
1.2.2	Životní cyklus TBEV	5
1.3	Subgenomická flavivirová RNA (sfRNA)	6
1.3.1	Vznik sfRNA	6
1.3.2	Funkce sfRNA	7
1.4	Metoda dot-blot	8
1.4.1	Obecný postup	8
1.4.2	Typy prób a zkoumaného vzorku	9
1.4.2.1	DNA próba	9
1.4.2.2	RNA próba	9
1.4.3	Způsoby značení DNA próby	10
1.4.3.1	Značení náhodnými primery	10
1.4.3.2	Nick translace	10
1.4.4	Typy reportérových molekul	11
1.4.4.1	Radioizotopy	11

1.4.4.2	Biotin	11
1.4.4.3	Pomocí dioxigeninu (DIG)	12
1.4.4.4	Značení prób pomocí fluorochromu	12
1.5	Metody detekce signálu značené próby	12
1.5.1	Radiografická detekce	13
1.5.2	Kolorimetrická detekce	13
1.5.3	Chemiluminiscenční detekce.....	13
1.5.4	Fluorescenční detekce	14
1.6	Metoda Northern blot.....	14
1.7	Denaturační agarózový-formaldehydový gel.....	14
2	Cíl práce.....	15
3	Metody.....	15
3.1	In vitro transkripce sfRNA	15
3.2	Transfekce buněčné linie DAOY HTB 186 s in vitro 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 amplikonů 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	24

3.12	Dot-blot.....	24
3.13	Northern blot	28
3.14	Elektroforetická separace RNA pomocí agarózového-formaldehydového denaturačního gelu	31
4	Výsledky	31
4.1	Kontrola účinnosti transfekce in vitro transkribovanou sfRNA v buněčné linii DAOY HTB 186 pomocí qRT-PCR.....	31
4.1.1	Optimalizace eseje qPCR dle publikace Schwaiger M. a Cassinotti P., 2003	32
4.1.2	Optimalizace vlastní qPCR eseje pro kvantifikaci sfRNA.....	42
4.2	Optimalizace metody dot blot pro detekci TBEV sfRNA.....	50
4.3	Northern blot	67
4.4	Elektroforetická separace RNA pomocí agarózového-formaldehydového denaturačního gelu.....	69
5	Diskuze	70
6	Závěr	78
7	Seznam použitých zdrojů.....	79

1 Úvod

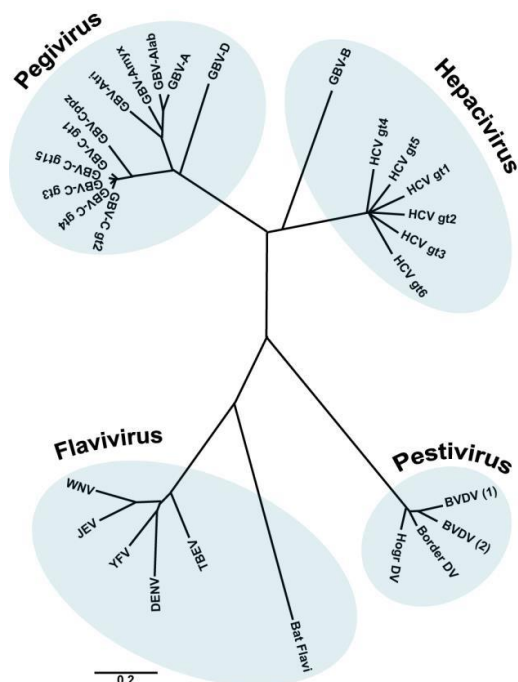
1.1 TBEV

Klíšťová encefalitida (TBE) je běžné lidské onemocnění způsobeno virem klíšťové encefalitidy (TBEV, z anglického tick borne encephalitis virus) a postihuje centrální nervový systém nakažených. 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* (klíště obecné) je krev sající pavoukovec. *I. ricinus* se přisává k celé řadě živočichů. Hostitelé *I. ricinus* jsou zástupci různých 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). TBEV se řadí do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus* (Labuda M. et al., 1996).

1.1.1 Taxonomie čeledi *Flaviviridae*

Čeď *Flaviviridae* se taxonomicky rozděluje do čtyř rodů a jsou to *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* a *Flavivirus* (Simmonds P. et al., 2017). Fylogenetické vztahy těchto rodů jsou znázorněny na Obr. 1 a Obr. 2. Rod *Hepacivirus* zahrnuje jeden z nejvýznamnějších lidských patogenů viru hepatitidy C, který celosvětově ročně nakazí 3-4 miliony lidí a asi 170 milionů lidí jsou chronicky infikováni s následným vývojem jaterní cirhózy a jaterní rakoviny (Mohd H. et al., 2013). *Pegivirus* je poslední objevený rod čeledi *Flaviviridae*, který patrně postrádá patogenitu (Stapleton J. T. et al., 2011). *Pestivirus* je jeden z rodů postihující převážně skot. Skot nakažený virem *Pestivirus* trpí převážně bovinní virovou diarreou a prasata trpí morem prasat (Schweizer M., Peterhans E., 2014). Čtvrtým rodem je *Flavivirus* který obsahuje více než 70 druhů virů. Mezi ty nejznámější patří virus žluté zimnice (YF), virus japonské encefalitidy (JEV), virus klíšťové encefalitidy (TBEV), dengue virus (DENV), virus západonilské horečky (WNV), Racio encefalický virus a virus St. Louise encefalitidy (Leyssen P. et al., 2000). *Flavivirus* se dále dělí podle typu přenašeče, a to na komáří, klíštětem přenesený a neznámého původu. První dva typy přenosů jsou charakteristické pro skupiny virů zahrnující lidské patogeny, zatímco poslední zahrnuje pouze pár virů, které byly izolovány z myši a netopýrů (Kuno G. et al., 1998). Primárními hostiteli prvních dvou typů virů jsou mořští ptáci a obratlovci, a to převážně hlodavci u nichž se infekce projeví od asymptotických až po závažné příznaky, mezi které patří hemoragická horečka nebo neurologické onemocnění.

Tyto primární hostitelé a příznaky jsou typické pro výše uvedené viry, především pro TBEV, YF, DENV, JEV a WNV (Simmonds P. *et al.*, 2017).



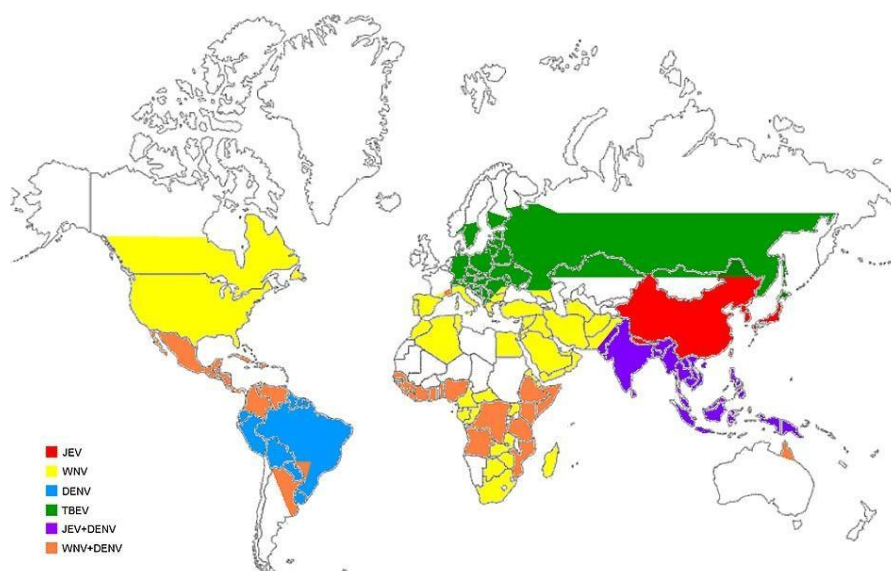
Obrázek 1: Fylogenetické vztahy čeledi *Flaviridae* (Romero-Brey I., Bartenschlager R., 2014).

1.1.2 Flaviviry

Flavivirus je malý virus, obalený a obsahující převážně jednovláknovou pozitivně nabitou genomickou RNA o velikosti přibližně 11 kb (Tamura T. *et al.*, 2019). Většina Flavivirů je přenášena infikovanými klíšťaty nebo komáry do savců jako jsou domácí i volně žijící zvířata, ale i člověk. Komáři jsou nejčastějším přenašečem většiny nemocí způsobené *Flaviviry*. V hostiteli poté způsobují dané nemoci (Gould E., Solomon T., 2008). Zástupci komáry přenášených *Flavivirů* jsou původci žluté zimnice, japonské encefalitidy, St. Louise encefalitidy, nemoci dengue a západonilské nemoci. U těchto nemocí je člověk konečným hostitelem. Klíšťata přenáší převážně TBEV, virus kjasanurského lesa a virus způsobující Omskou hemoragickou horečku (Gould E., Solomon T., 2008).

1.1.3 Rozšíření

Flaviviry jsou rozšířeny téměř po celém světě jejich rozšíření lze vidět na obr.2. Západonilská horečka je ze všech nemocí způsobených *Flaviviry* nejvíce rozšířena. JEV, jak již jméno napovídá se vyskytuje zejména v jihovýchodní Asii. Oblasti s nejvyšším počtem lidí nakažených DENV jsou tropy a subtropy (Stapleton J. T. *et al.*, 2011; Kuno G. *et al.*, 1998). TBEV je zejména rozšířena ve východní Evropě 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 u asi 95,6 % aminokyselinových sekvencí (Holzmann H. *et al.*, 1992). Existují další nedávno objevené subtypy, mezi ně patří Bajkalský subtyp a Himalájský subtyp (Dai X. *et al.*, 2018).

1.1.5 Rozšíření subtypů

Rozšíření subtypů znázorněno na Obr.3 a jejich nemonklatura 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). Znázornění na mapě lze vidět na obrázku 3, kde Evropský a Sibiřský subtyp jsou znázorněny zelenou barvou a Japonský subtyp barvou červenou (Sips G. J. *et al.*, 2012).

1.1.6 Přenos TBEV

V Evropě bylo rozpoznáno 8 druhů klíšťat řádu Ixodida, kteří jsou přenašeči TBEV. Nejběžnějším přenašečem Evropského subtypu TBEV je *I. ricinus*. Přenašečem pro Sibiřský a dálnovýchodní subtypy 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. 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. Jejich rozmístění na primárních hlodavčích hostitelích je shlukové. (Ličková M. *et al.*, 2020).

1.1.7 Příznaky infekce TBEV

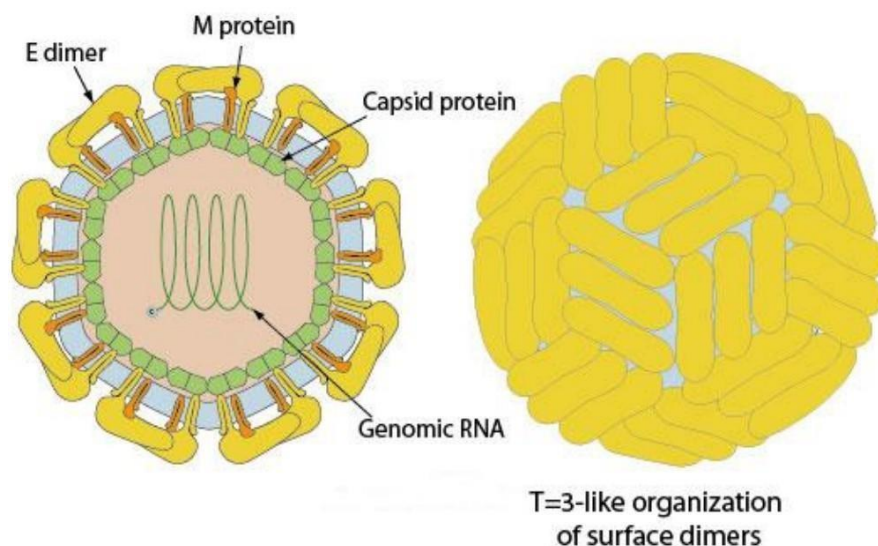
TBE je jedním z nejvýznamnějších onemocnění centrálního nervového systému člověka, způsobené patogenním TBEV. TBEV se do těla dostane kousnutím klíštěte (Bogovic P., Strle F., 2015)

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. Symptomy jsou malátnost, bolest zad a hlavy, nevolnost, celková vyčerpanost a horečka pohybující se od 38°C a 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 vznikají 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

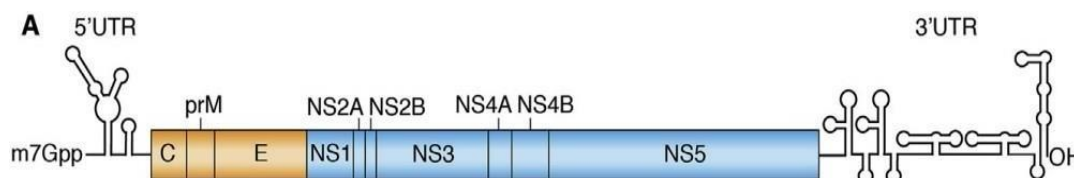
1.2.1 Stavba virionu

Virion je kulovitý o velikosti mezi 40–60 nm, obalen lipidovou vrstvou. Základní stavba virionu je znázorněna na obr. 3. Uvnitř virionu se nachází genom viru tvořen jedním vláknem RNA o pozitivní polaritě délce 11 kb (Mansfield K. L. *et al.*, 2009). Povrchové proteiny tvoří heterotetramery, které jsou uspořádány těsně vedle sebe a tvoří ikosahedrálně symetrický povrch virionu. Mezi povrchové proteiny virionu patří kapsidový (C), obalový (E) a membránový (M) protein. E protein má záhyb, který se chová jako antigen a zprostředkovává vazbu na hostitelské receptory (Mansfield K. L. *et al.*, 2009; Pulkkinen L. I. A. *et al.*, 2022).



Obrázek 3.: Struktura virionu viru klíšťové encefalidity (Mukhopadhyay M., Bhaumik P., 2016).

Struktura genomu TBEV je znázorněn na obr. 4. Genom obsahuje jeden otevřený čtecí rámeček (ORF) ohraničený nekódujícími úseky 5' o délce 131 nukleotidů a úsek 3' o délce od 31 do 728 nukleotidů. Tyto úseky pravděpodobně slouží k amplifikaci genomu, translaci nebo jeho sbalení v kapsidu. Samotný čtecí rámeček kóduje polyprotein o velikosti 3414 aminokyselin. Polyprotein je dále zpracován do tří strukturálních proteinů (C, E a M) a sedm 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 4.: Schéma genomu viru klíšťové encefalidity včetně strukturálních i nestrukturních proteinů (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 dochází k endocytóze a vstupu viru do buňky. Endocytóza způsobuje acidifikaci vnitřního prostoru buňky, kde 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 tvořených z endoplazmatického retikula (ER), kde virus pučí a poté pokračuje se svojí 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. Viriony jsou transportovány sekreční dráhou hostitelské buňky. 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 Subgenomická flavivirová RNA (sfRNA)

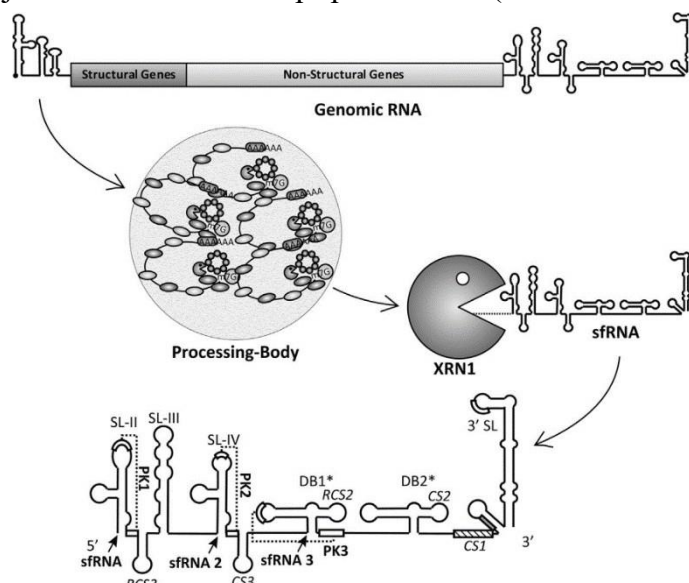
Čtecí rámeček genomové RNA (totRNA) je ohraničen 5'UTR a 3'UTR konci (Velay A. *et al.*, 2019). Na 3'UTR konci genomové RNA se nachází subgenomová flavivirová RNA, jež je znázorněn na obr.5. Délka sfRNA je závislá na délce genomového 3' UTR úseku konkrétního viru a pohybuje se v rozmezí 0,3 – 0,5 kb (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), virus zika (Akiyama B.M. *et al.*, 2016) a v 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 genomové RNA. Po uvolnění genomové RNA do cytoplazmy dochází k odstranění čepičky z 5'UTR konce genomové RNA pomocí enzymů odstraňujících čepičku (DCP1/DCP2) a helikázy. Dále nastává degradace čepičky hostitelskou exoribonukleázou XRN1, která štěpí genom od 5'UTR konce k 3'UTR konci (Villordo S. M. *et al.*, 2016; Clarke B. D. *et al.*, 2015). 3' UTR konec se skládá ze sekundárních struktur (Obr. 6.), jinak známých jako XRN1 rezistentní elementy (xrRNA). xrRNA elementy mají velikost 193 nukleotidů a spojují se do konstrukčních smyček (SL). Tyto části jsou důležité pro replikaci genomové RNA (Funk A. *et al.*, 2010). Sekundární struktury na 3'UTR konci; také umožňují nekompletní degradaci genomové RNA a tím vznik subgenomické RNA (sfRNA)

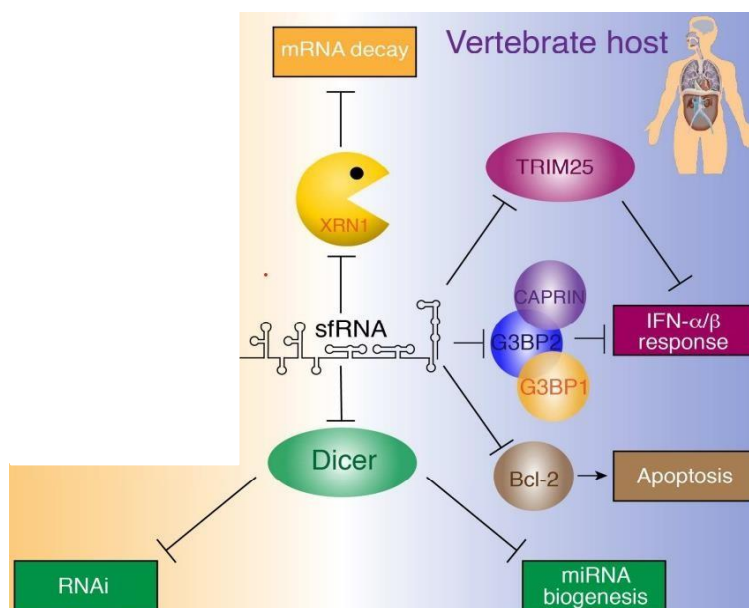
(Clarke B. D. *et al.*, 2015; Funk A. *et al.*, 2010). SL-II vyznačená na obr. 5. je tou sekundární strukturou způsobující zastavení XRN1 v případě TBEV (Clarke B. D. *et al.*, 2015).



Obrázek 5.: Proces vzniku sfRNA. Spodní část obrázku ukazuje strukturu 3'UTR se svými sekundárními a terciárními strukturami s místem vyznačení, kde se nachází sfRNA (Clarke B. D. *et al.*, 2015).

1.3.2 Funkce sfRNA

Jak již bylo řečeno, sfRNA potlačuje funkci XRN1 a endonukleázy Dicer (Slonchak A., Khromykh A. A., 2018). Dicer je endonukleáza z rodiny RNáz III, která hraje důležitou roli v procesu RNA interference buď při regulaci genomové exprese, degradaci endogenních miRNA prekurzorů na 21-23 nukleotidové miRNA nebo v dráze protivirové buněčné obrany štěpením exogenní virové dsRNA za vzniku siRNA. V obratlovcích 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 interferonu- α/β odpovědi nastane po napojení sfRNA na molekuly CAPRIN, G3BP2 a G3BP1. Neposledně je sfRNA zodpovědná za virovou patogenitu, hostitelskou adaptaci na virus a vznik nových patogenních kmenů (Slonchak A., Khromykh A. A., 2018).



Obrázek 6.: Upravené schéma vlivu siRNA 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 sekvencí proteinů nebo nukleových 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. Próby jsou použity k dokázání přítomnosti komplementární sekvence DNA, RNA, oligonukleotidů ve vzorku naneseného na membráně. Membrán je několik typů podle 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 (Chabraoui F. *et al.*, 1993).

Dot-blot metoda má použití i pro detekování antigenů, protilátkové aktivity na membráně nebo ji lze použít jako kvantitativní metodu pro určení antigenové koncentrace (Stott D. I., 1989). Jednou z dalších možností použití této metody je k identifikaci složek ve vzorcích a k identifikaci různých druhů mikroorganismů (Stott D. I., 2000).

1.4.1 Obecný postup

Pro zjednodušení bude následující popis omezen na detekci nukleových kyselin. Nejprve je vzorek nanesen na membránu buď nakápnutím nebo filtrací vzorku přes membránu pomocí vývěvy/vakuové pumpy, kde jsou vzorky nechány k zaschnutí. Vzorek nukleové

kyseliny musí být před nanesením denaturován, aby došlo k rozpojení dvouvlákna DNA nebo sekundárních struktur RNA, a sekvence nukleové kyseliny tak mohla být zcela přístupná hybridizaci próby. Vzorky v podobě teček (dot) se nechají zaschnout a pro pevné přilnutí vzorku na membránu dochází k imobilizaci nukleové kyseliny na membráně pomocí UV záření. Po imobilizaci vzorku na membráně dojde k prehybridizaci a poté k samotné hybridizaci. Prehybridizace slouží k blokaci nespecifických molekul na membráně i ve vzorku. Prehybridizace i hybridizace probíhají za zvýšené teploty a po určité době, zpravidla od 30 minut až po několik hodin. V hybridizačním roztoku se nachází značená próba. Poté dochází k promývání a k zobrazení hledaných RNA nebo DNA sekvencí, pomocí přímo značených prób (Bergmans H. E.W. & Gaastra, W., 1988; Brown T., 1993). V případě nepřímého značení próby např. biotinem nebo digoxigeninem, je dalším krokem blokace membrány nespecifickým blokovacím činidlem pro zamezení vzniku nespecifických interakcí protilátky nebo Streptavidinu s membránou nebo 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 prób a zkoumaného vzorku

Jak již bylo výše zmíněno próby slouží k detekci hledané DNA, RNA nebo oligonukleotidové sekvence. Existují hlavní typy prób a těmi jsou DNA, RNA a oligonukleotidové próby (Stott D. I., 1989). Níže jsou pouze uvedeny DNA a RNA próby.

1.4.2.1 DNA próba

Mezi nejpoužívanější DNA próby patří dvou-řetězcová kopy DNA (ds cDNA), genomová DNA (gDNA) nebo jednořetězcová DNA (ssDNA). dsDNA próba je méně termodynamicky stálá než RNA próba, což je třeba zohlednit při navrhování hybridizačních podmínek, jak bude 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. Jr., 2010).

1.4.3 Způsoby značení DNA próby

Každá z prób je značena pomocí molekul, které jsou dále detekovány. Přímo značené próby mohou být použity k přímé identifikaci nebo nepřímé. Při nepřímé detekci molekul se na próbu naváže molekula streptavidinu společně s konjugátem, který se následně detekuje. Následující podkapitoly uvádějí způsoby značení DNA prób používané v této studii. Mezi ostatní značení, které není níže zmíněno patří značení 5' konce, značení 3' konce a značení pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR).

1.4.3.1 Značení náhodnými primery

Metoda značení náhodnými primery pracuje se směsí malých sekvencí oligonukleotidů s náhodnými sekvencemi. Tyto primery nasedají na DNA templát na náhodných místech a slouží jako náhodné počátky replikace pro přítomnou DNA polymerázu, které v průběhu extenze začleňuje do nově vznikajícího komplementárního vlákna denaturovaný templát. Malé oligonukleotidové sekvence se během PCR reakce nakonec stanou součástí próby. Próby mohou být značeny radioaktivně nebo mohou být značené biotinem či dioxigeninem (DIG). Oligonukleotidové sekvence nejlépe nasedají na denaturovanou DNA, protože při značení dvou-řetězcové DNA dochází k 20krát až 30krát menší specifičnosti prób, než je tomu u denaturované DNA. Pro značení náhodnými primery je nejvhodnější velikost templátové DNA 200-2000 bází. Značení náhodnými primery obvykle trvá 10-30 minut (Farrell R. E. Jr., 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 4-5 nukleotidech DNA a provede rozštěpení vazby. V místech vazby DNázy I dochází k rozštěpení DNA ve struktuře její cukr-fosfátové vazbě 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 druhů nukleotidů a jeden z těchto nukleotidů je vázán buď přímo k reportérové molekule (většinou se jedno o některý typ fluoroforu) anebo k molekule specificky vázající pouze jeden typ protilátky nebo Streptavidin. Reakce značení nick translací obvykle trvá maximálně 1 hodinu (Farrell R. E. Jr., 2010).

1.4.4 Typy reportérových molekul

Próby lze značit několika druhy molekul, které slouží přímo jako reportérové molekuly aneb se jedná o specificky vázány konjugáty reportérových molekul s protilátkami či haptenem (např. avidinem/streptavidinem). Dále se tyto molekuly klasifikují na základě strategie značení prób, A) přímé značení B) nepřímé značení. Při přímém značení je próba značena přímo fluorochromem, zatímco při nepřímé detekci je próba značena haptenem, který je nutné dále detekovat konjugátem protilátky proti tomuto haptenu buď přímo s fluorochromem nebo enzymem umožňujícím kolorimetrickou či chemiluminiscenční detekci (Tijssen P., 1993). Mezi nejpoužívanější reportérové molekuly patří radioizotop, biotin, dioxigenin, fluorochrom, 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 se mohou značit protilátky i nukleotidové próby. Mezi nejčastěji použité radioizotopy pro značení nukleotidů patří například ^3H , ^{32}P , ^{35}S vyzařující β záření (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 mající navázanou kyselinu valerovou na tetrahydrothiofenový prstenec (PubChem [Internet], Biotin, 2004). Biotin je vodě-rozpustný 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 je Bio-11-dUTP3, který funguje jako analog deoxythymidintrifosfátu (dTTP). Bio v názvu znamená, že se jedná o molekulu s biotinem a 11 udává počet atomů mezi samotným biotinem a nukleosidovou složku molekuly. Biotin lze

značit několika způsoby, některé z nich jsou napsány v kapitole výše. Biotin se navazuje na streptavidin či avidin, které se dále navazují na konjugáty. Nejčastěji je streptavidin či avidin používán ve formě konjugátu s alkalickou fosfatázou (AP) a křenovou peroxidázou (HRP), jejichž přítomnost je možné detekovat smícháním s příslušným substrátem. Substráty navázané na AP či HRP lze detekovat pomocí chemiluminiscence či kolorimetrie. (Farrell R. E. Jr., 2010).

1.4.4.3 Pomocí dioxigeninu (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) (PubChem [Internet], Digitoxigenin, 2004).

Nejčastěji u značení pomocí značící molekule dioxigenin-dUTP (DIG-11-dUTP), která se dále navazuje na konjugáty. DNA próby lze značit dioxigeninem všemi metodami popsanými v kapitole výše kromě značení biotinem. RNA próby jsou syntetizovány *in vitro* transkripcí s průběžným syntetizováním DIG-11-dUTP. Detekováno pomocí chemiluminiscence, kolorimetrie či fluorescence (Farrell R. E. Jr., 2010).

1.4.4.4 Značení prób pomocí fluorochromu

Fluorochrom je molekula, jež po dopadu světla určité vlnové délky absorbuje energii z tohoto záření a okamžitě tuto energii ztratí emisí zářením o delší vlnové délce (Mullins J. M., 2009), podrobněji popsáno v kapitole níže.

Próby se značí pomocí FL-12-dUTP pro DNA a FL-12-UTP pro RNA. (Farrell R. E. Jr., 2010). Fluorochrom se váže na avidin nebo se přímo navazuje na DNA próbu. DNA próby lze značit fluorochromy pomocí všech metod popsaných v kapitole výše kromě značení biotinem. Značení fluorescenčními látkami je detekováno pomocí ultrafialového záření, které způsobí fluorescenci (Stott D. I., 1989, Farrell R. E. Jr., 2010).

1.5 Metody detekce signálu značené próby

Značící molekuly lze detekovat pomocí několik metod. V podkapitole níže jsou uvedeny některé z nich.

1.5.1 Radiografická detekce

Radiografická detekce používá rentgenový film k vizualizaci a kvantifikaci radioaktivních molekul. Principem radiografické detekce je, že foton světla, částice β nebo γ záření uvolněné z radioaktivní molekuly oxidují krystaly bromidu stříbrného, který se nachází na rentgenovém filmu. Oxidované molekuly bromidu stříbrného se následně redukují. Během redukce dochází ke vzniku stříbrného kovu, který na rentgenovém filmu vytváří obraz. Nejčastěji se používají dvojvrstvé rentgenové filmy, kterými se detekují β částice o veliké 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 k detekci stačí lidské oko nebo spektrofotometr (Wilson H. N., 1966). Kolorimetrická detekce se dělí dle konjugátu napojeného na streptavidin či avidin, a to na HRP systém a AP systém.

HRP systém – Jako substrát pro HRP se nejčastěji používá 3,3'-diaminobezidin (DAB), 4-chloro-1-naftol (PubChem [Internet], 4-Chloro-1-naphthol, 2004; Rodig S. J., 2019), 3-Amino-9-etylkrabozol ((PubChem [Internet], 3-Amino-9-etylkrabozol, 2004; Rodig S. J., 2019) a 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Frey A. *et.al.* 2000). Výsledná barva DAB je šedá až černá. Výsledná barva lze získat za přítomnosti H_2O_2 , kde HRP katalyzuje oxidaci substrátu za vzniku barevného produktu (Rodig S. J., 2019).

AP systém – Jako substrát pro AP se nejčastěji používá 5-bromo-4-chloro-indyl fosfát (BCIP) a chlorid nitrotetrazoliové modři (NBT). Pomocí několikanásobného značení lze na AP navázat několik druhů substrátů každý o jiné barvě (Blake M. S. *et al.*, 1984; Kurien B. T., Scofield R. H., 2003). 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 kontroly vývoje celé reakce (Samar K. K., 2014).

1.5.3 Chemiluminiscenční detekce

Chemiluminiscence je velmi citlivá optická 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 luminolem za vzniku excitované formy luminolu 3-aminoftalátu, který emituje záření o vlnové délce 425 nm. Vznikající fotony je možné detekovat pomocí dlouhé expozice citlivé CCD kamery. (Bronstein I., Olesen C. E. M., 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).

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, který se vrací do hladin o nižší energii – emituje elektromagnetického záření, jehož vlnová délka je vždy delší než vlnová délka záření molekulou absorbované. – Fluorescenční molekuly nebo sloučeniny využívané v biologickém nebo fyzikálním výzkumu samostatně jako fluorescenční barvivo nebo v konjugátu v próbách se nazývají se fluorochromy (Demchenko A.P. et al., 2009).

1.6 Metoda Northern blot

Metoda Northern blot poskytuje kvantitativní a kvalitativní výsledky o dané detekované RNA sekvenci (Farrell E. R., 1993). Metoda Northern blot je založená na detekci separovaných RNA sekvencí pomocí značených prób. Northern blot obvykle začíná s izolací RNA, její separací pomocí elektroforetického separace v gelu a přenosu separované RNA na membránu. RNA z gelu na membránu se přenesou tzv. difúzním blotováním (kapilárním, vakuovém či pomocí elektrického napětí). Membrána má výhodu v jednodušší manipulaci než gel a próby použité při následné hybridizaci procházejí membránou lépe. Membrána je hybridizována společně s próbou, kde následný postup je stejný jako u metody dot-blot popsaný výše (Lovatt D., Eberwine J., 2013).

1.7 Denaturační agarózový-formaldehydový gel

K elektroforetické separaci RNA může sloužit denaturační agarózový-formaldehydový gel, který denaturuje RNA a separuje jí dle její velikosti. Formaldehyd obsahující karbonyl skupinu slouží jako denaturační činidlo, jež vytváří Schiffovy báze s amino či imino

skupinami guaninu, adeninu a cytosinu. Schiffovy báze zapříčiní, že se nukleotidy spolu nespárují správně a tím udržují RNA v denaturovaném stavu. Denaturovaný stav je nestabilní, a tedy formaldehyd musí být stále přítomen v gelu, aby RNA zůstala denaturována (Rio D. C. 2015). Běžně používaným pufrům pro agarózový-formaldehydový denaturační gel je MOPS, který nereaguje s formaldehydem jako například Tris-HCl (Southern E. M. 2003).

2 Cíl práce

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

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

Optimalizovaný protokol pro metodu dot-blot byl následně použit pro optimalizaci detekce 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) a kontrolní plazmid nesoucí MBP pcDNA DEST40 HDVr MBP (obr.7.). In vitro transkripce byla provedena pomocí HiScript™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs®) dle protokolu výrobce.



Obrázek 7.: Schéma plazmidu pcDNA DEST40 obsahující Hypr (obsahující sRNA) a HDVr (obsahující MBP) inserty.

3.2 Transfekce buněčné linie DAOY HTB 186 s in vitro transkribovanou sRNA

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 % antibiotických 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 na mililitr (ml). Po 24 h minimálně 30 minut před samotnou transfekcí bylo buňkám vyměněno médium. Transfekce byla provedena za použití *PolyjetTM 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 minut. Po uplynutí inkubace byl transfekční mix pomalu nakapán do jamky k buňkám. Transfekce probíhala po dobu 48 hodin 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 bylo nasazeno 1,5 - 2 miliony buněk do kultivační lahvičky o kultivační ploše 25cm².

Druhý den bylo z obou kultivačních lahviček odstraněno médium a v jedné z lahviček bylo nahrazeno čerstvým médiem s přidavkem 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 přidavkem 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. Výsledná RNA byla rozpuštěna v 45 µl RNase free H₂O. Koncentrace izolované RNA byla změřena pomocí NanoPhotometer[®] Perl (Implen). Výsledný vzorek byl uskladněn při -80°C.

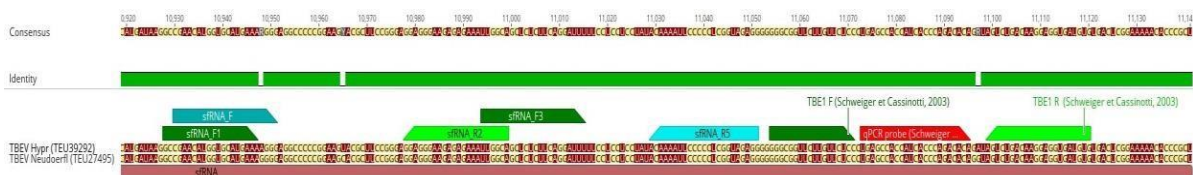
3.5 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA byl použit 1 µg RNA. Před vlastní syntézou cDNA bylo provedeno odstranění DNA molekul pomocí dsDNase (Thermo Fisher Scientific) dle protokolu výrobce. cDNA byla syntetizována pomocí ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis kit (New England Biolabs[®]) 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 sfRNA 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 II a II). Dále byly použity reakční mixy bez próby KAPA SYBR[®] FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) (Tab. IV a V) a qPCR 2× SYBR Master Mix (Top Bio) (Tab VI a VII). Každá qPCR byla provedena dle protokolu výrobce. Všechny qPCR reakce byly provedeny a

analyzovány v přístroji CFX96 Real-time PCR detection systém a software CFX Manager verze 3.0 (Bio-Rad).



Obrázek 8.: Schéma pozic primerů v siRNA sekvenci, jejichž detailnější informace jsou popsány v Tab.I.

Tab. I. Přehled prób a primerů a příslušných podmínek PCR pro přípravu reakčních směsí na qRT-PCR.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'	Kombinace primerů	Délka amplikonu [bp]	Annealingová teplota [°C]	Doba extenze [s]
sfRNA	F	CGAACATGGTGCA TGAAAAGGG	F×R5	122	57	20
	R5	CCTCTACCGAGGG GGAATTTTGT				
	F1	GCCGAACATGGTG CATGAAA	F1×R5	124	57	20
	F3	TTGGCAGCTCTCT TCAGGATTT	F3×R5	58	57	20
	R2	TGCCAATTTCTCT CTTCCCTCC	F×R2	70	57	20
	TBE1 F	GGGCGGTTCTTGT TCTCC	F×R	68	60	20
	TBE1 R	ACACATCACCTCC TTGTCAGACT				
	TBE-probe-WT	TGAGCCACCATCA CCCAGACACA				
MBP	F2	CCGCTGGGTGCCG TA	F2×R1	75	60	20
	R1	GACAGTCTGACGA CCGCTG				

V následujících tabulkách jsou uvedeny předpisy reakčních mixů a reakčních podmínek pro qRT-PCR esej s použitím TaqMan próby TBE-probe-WT (značené na 5' fluorochromem FAM a na 3' zhášecem 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 v kapitole 4.1.2.

Tab.II: 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 µl.

Činidlo	Množství [µl]
KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix	7,5
10 µM Foward primer	0,075 µl (50nM)
10 µM Reverzní primer	0,45 µl (300nM)
Templát RNA	4
10 µM próba	0,3
50× KAPA RT Mix	0,3
Nuclease free H₂O	Do 15 µl

Tab. III: 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
Reverzní transkripce	42	5	1
Aktivace enzymů	95	3	1
Denaturace	95	1	40
Annealing/extenze	60	0,5	

Tab. IV: 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 µl.

Činidlo	Množství [µl]
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2×) Universal	7,5
10µM Foward primer	0,075 (50nM)
10µM Reverzní primer	0,45 (300nM)
50× KAPA RT Mix	0,3
Templát RNA	4
Nuclease free H₂O	Do 15 µl

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

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Reverzní 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	

Tab. VI: Reakční mix pro qPCR s použitím 2× SYBR Master Mix (TopBio)

Činidlo	Množství [μl]	Množství [μl]
qPCR 2× SYBR Master Mix	12,5	12,5
50 μM Forward primer	1	0,125 μl (50nM)
50 μM Reverse primer	1	0,75 μl (300nM)
Templát DNA	0,02ng/μl – 0,02 μg/ μl	4
Nuclease free H ₂ O	Do 25 μl	Do 25 μl

Tab. VII: Reakční podmínky pro amplifikaci vzorků pomocí qPCR 2× SYBR Master Mix (TopBio)

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

3.7 Elektroforetická separace

Před použitím PCR produktu a značených práb 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 minut při 90 V z důvodu plynulejšího přechodu DNA z nanášecí jamky do struktury gelu a následně 45 až 90 minut při 120 V. Po ukončení elektroforézy byla separovaná DNA v gelu zobrazena v přítroji G-box Chemi XX6 (SYNGENE).

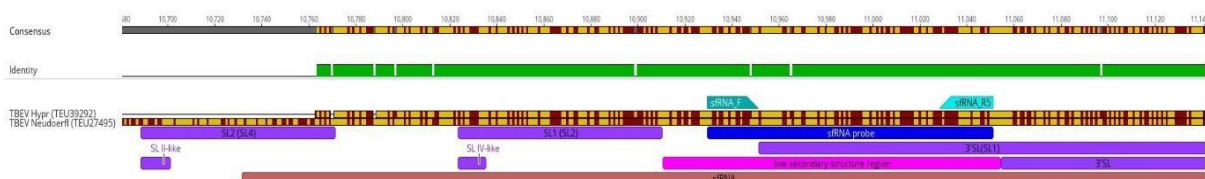
3.8 Izolace PCR produktů z gelu

Do předem zvážených 2ml mikrozkušavek byl vložen kousek gelu obsahující PCR produkt, který byl vykrojen pomocí vydezinfikovaného skalpelu na platformě opatřené UV lampou v přístroji G-box Chemi XX6 (SYNGENE). Zkušavka s gelem byla znovu zvážena, obě hmotnosti byly zapsány a byl vypočítán jejich rozdíl, který udával hmotnost gelu. Pro izolaci PCR produktů z gelu byl použit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). Izolace byla provedena dle protokolu výrobce. Koncentrace izolovaného PCR produktu byla změřena pomocí NanoPhotometer® Perl (Implen). Výsledné vzorky PCR produktů byly uskladněny při -20°C.

3.9 Syntéza ampliconů pro přípravu DNA prób

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

Navržení próby pro sRNA sekvenci bylo obtížné, protože sRNA obsahuje tzv. stem loop (SL) subdomény, které v sRNA tvoří sekundární struktury. Anotované SL struktury v obr.9 níže jsou odvozeny z již dříve predikovaných SL struktur příbuzných flavivirů (Pijlman G. P. *et al.*, 2008). Navržení próby do místa formování sekundární struktury by mohlo způsobit, že cílová sekvence sondy bude formovat tuto strukturu a tím přestane být přístupná pro hybridizaci próby. Próba použitá v této práci je znázorněna na obr.9.



Obrázek 9.: Schéma aligmentu sRNA TBEV Hypr a Neudorf s umístěním sRNA próby (tmavě modrá) a primerů použitých pro syntézu ampliconu pro výrobu této próby (tyrkysová). Fialová anotované úseky znázorňují umístění SL subdomén v 3'UTR a hnědý úsek znázorňuje umístění sRNA obou kmenů TBEV.

Tab. VIII. 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	AAAAGGTGCTGATAT TGATGCGT	292	56	30
	PAPOLA R	TACCCTGCAACCGTT AAGACT			
Actin β	Actβ F	TTGCTCCTCCTGAGC GCAAG	500	61	35
	Actβ R	ATGCTATCACCTCCC CTGTGTGG			
sfRNA	sfRNA F	CGAACATGGTGCATG AAAAGGG	122	57	20
	sfRNA R5	CCTCTACCGAGGGGG AATTTTGT			

Tab. IX: Reakční mix pro PCR s použitím One Taq Hot Start DNA polymerázu pro objem reakce 25 μl.

Činidlo	Množství [μl]
5× One Taq Standard Reaction Buffer	5
10 mM dNTPs	0,5
10 μM Forward primer	0,5
10 μM Reverse primer	0,5
Templat DNA	X
One Taq Hot Start DNA polymerase	0,125
Nuclease free H ₂ O	Do 25 μl

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

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iničiační 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	Množství [μ]
5× Q5 Reaction Buffer	5
10 mM dNTPs	0,5
10 μ M Forward primer	1,25
10 μ M Reverse primer	1,25
Templat DNA	X
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,1
5× Q5 High GC Enhancer	5
Nuclease free H ₂ O	Do 25 μ l

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

Krok	Teplota [$^{\circ}$]	Čas [s]	Počet cyklů
Iničiační 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

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/značící reakce). Sephadexu byl v poměru 0,05 g/800 μ l v vodě zbavené nukleáz pomocí diethyl pyrokarbonátu (DEPC H₂O) hydratován při 4 $^{\circ}$ C po dobu nejméně 45 minut. Poté byla suspenze promíchána a nanášena do ustrížené 1000 μ l pipetovací špičky s filtrem, která byla umístěna v 1,5 ml mikrozkušavky, čímž vznikla filtrační sestava pro přípravu přečišťovací sephadexové mikrokolony. Pro vytvoření sephadexového sloupečku bylo přidáno 400 μ l suspenze sephadexu, která byla protlačena přetlakem vytvořeným pomocí pipetovacího dudlíku, zatímco sephadexová matrice zůstala zachyceny na povrchu filtru pipetovací špičky, protlačená DEPC H₂O byla z mikrozkušavky vylita. Stejný postup byl ještě 2× opakován s 300 μ l a následně se 100 μ l sephadexové suspenze. Poté byla sephadexová mikrokolona centrifugována při 1000 \times g po dobu 2 minut. Pipetovací špička se vzniklým sloupcem sephadexové matrice byla přemístěna do nové 1,5 ml zkumavky. Na vzniklý sephadexový sloupeček byl nanášen vzorek. Sephadexová mikrokolona s nanášeným vzorkem byla centrifugována při 1000 \times g po dobu 2 minut. Na dně mikrozkušavky sephadexové

mikrokolony byl získán přečištěný PCR produkt či značená DNA próba. Dále byla změřena koncentrace přečištěného PCR produkt či DNA próby pomocí NanoPhotometer® Perl (Implen).

3.11 Příprava značených DNA prób

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

3.11.1 Nick translace

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

Tab. XIII: Reakční směs pro nick translaci (20 μ l)

Činidlo	Množství [μ l]
10 \times Nick Translation Buffer	2
0,1 M β -Mercaptoethanol	1
dNTPs na značení	2
1 mM značené dUTPs	0,4
DNA Polymeráza I	2
100 \times DNáza	0,5
\approx 1 μ g DNA próby	X
Nuclease free H ₂ O	Do 20 μ l

Směs byla inkubována 1 hodinu při 15 $^{\circ}$ C a enzymy byly inaktivovány 10 minut při 70 $^{\circ}$ C. Získané značené DNA próby byly před použitím v metodě dot-blot/Northern blot přečištěny SephadexTM G-50 Superfine (viz. kapitola 3.10).

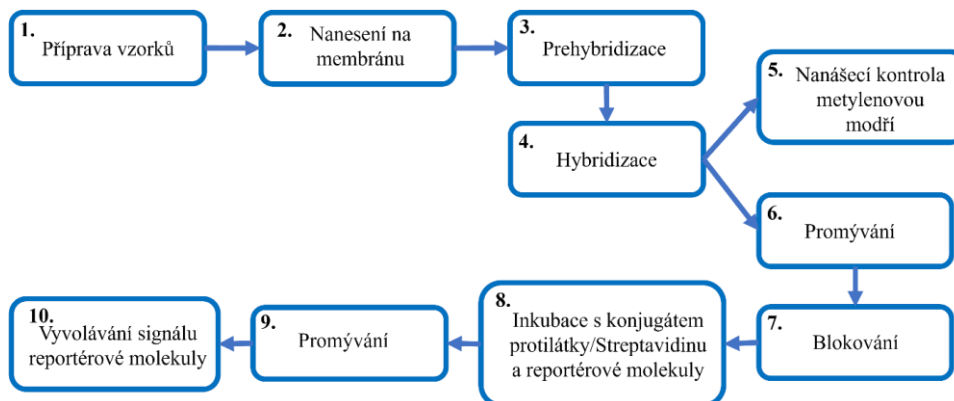
3.11.2 Značení náhodnými primery DecaLabelTM

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

3.12 Dot-blot

Metoda dot-blot byla provedena za použití několika různých protokolů, včetně jejich kombinací. Pro přehlednost je na obr.10. uvedeno základní schéma protokolu, po němž

následuje detailní popis jednotlivých kroků s přehledem reakčních podmínek a použitých pomůcek a chemikálií.



Obrázek 10.: Schéma postupných kroků provedených v metodě dot-blot.

1. Příprava vzorků

Potřebné množství nukleové kyseliny z každého vzorku bylo zředěno DEPC H₂O do finálního objemu 5 ul. Vzorky RNA byly denaturovány při 70°C a DNA vzorky při 95°C po dobu 3 minut a okamžitě zchlazeny na ledu.

Seznam a popis použitých vzorků:

a) RNA z buněčné linie A549 – jedná se o RNA z lidské buněčné linie, která byla získána 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 – jedná se o RNA z myší buněčné linie získána in vivo 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 transfekované sRNA nebo MBP – jedná se o 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 transfekované MBP – sloužící jako negativní kontrola transfekce (NK)

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

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

g) **DNA** – DNA z lidské buněčné linie A549 – DNA sloužící jako pozitivní kontrola detekce PAPOLA genu v DNA

- tato buněčná linie byla kultivována a DNA z ní izolována kolegy v laboratoři

h) **RNA z truchny obecné** – kontrola správné funkce detekce nanášecí kontroly za použití metylenové modři.

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

i) **Plazmid pUC19** – pUC19 Vector (New England BioLabs) - kontrola správné funkce detekce nanášecí kontroly za použití metylenové modři.

j) **Plazmid PcMV** - PcMV T-7-Hypr-Rluc T-7 NEBulider DH5 α – kontrola účinnosti hybridizace sRNA próby k sekvenci sRNA nesené plazmidem

k) **Transkribovaná sRNA nebo MBP** – připravené in vitro transkripcí popsané v kapitole 3.1 – kontrola účinnosti hybridizace sRNA a MBP práb

2. Nanesení vzorků na membránu

Vzorky byly naneseny na předvlhčenou nylonovou, nitrocelulóзовou nebo PVDF membránu ve formě kapky pomocí pipety. V případě, že byl některý vzorek nukleové kyseliny příliš zředěný, byla pro jeho nanesení v do objemu 5 ul, celá sada vzorků pro daný experiment nanesena na membránu pomocí Dot-Blotteru. Vzorky byly nechány lehce zaschnout a poté byly na membráně zafixovány pomocí UV záření v přístroji UVP crosslinker (Analytik Jena).

3. Prehybridizace

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

4. 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. Próba značená biotinem či DIG byla denaturována při 95°C po dobu 3 minut. Membrána byla inkubována s hybridizačním roztokem v hybridizační pídce za konstantní rotace při 42°C nebo 50°C po dobu 1 hodin až přes noc za konstantní rotace.

5. Nanášecí kontrola pomocí Metylenové modři

Část membrány s kontrolními vzorky určenými k detekci nanášecí kontroly byla ustříhnuta a promyta v 96 % etanolu po dobu 5-15 minut při pokojové teplotě (RT). Dále byla promyta v DEPC H₂O po dobu 3 minut při RT. Poté byla barvena roztokem metylové modři v 0,5M Na-acetátu (pH=5,2) po dobu 5-10 minut. Nakonec byla membrána promývána v DEPC H₂O, do momentu vyvolání fialové barvy 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.

6. Promývání po hybridizaci

Membrána byla nejprve promyta v 2×SSC a 1 % SDS v při RT po dobu 15 minut. 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 minut. Promývání probíhalo v hybridizační pídce za konstantní rotace

7. Blokování

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

8. 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 hodiny za konstantní rotace.

9. Promývání po navázání konjugátu

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

10. 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×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×), AbClonal) detekční roztok byl složen z 0,1 M Tris-HCl (pH=7,5) s 3,3'-diaminobenzidin tetrachlorid (DAB) (Roth) sloužící jako substrát. Kolorimetrická detekce pro AP (Streptavidin, Alkaline Phosphatase (2×), Vector Laboratories) byla provedena v AP vyvolávacím pufru (50mM MgCl₂, 100mM NaCl, 100mM Tris-Cl, 0,5 % Tween 20), s přídatkem 66 ul NBT (BioChemica) v 70 % DMSO a 33 ul BCIP (BioChemica) v 100 % DMSO na 10 ul.

3.13 Northern blot

Metoda Northern blot sloužila k odhalení zdroje nespecifické hybridizace s rRNA 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. Poté v 75 % etanolu a poté DEPC H₂O a nechány oschnout. Pro elektroforetickou separaci byl vytvořen 12 % polyakrylamidový separační gel se 4% močovinou (4,8g močoviny, 0,5 ml 10×TBE, 2 ml akrylamidu a doplněno DEPC vodou do 10 ml) o tloušťce 1 mm. Pro úplné rozpuštění močoviny bylo nutné roztok během přípravy zahřívát. Do zahřátého roztoku bylo přidáno 100μl 10 % peroxodisíranu amonného (APS) (SERVA) (vyrobeného těsně před přípravou roztoku a jeho nanesením mezi skla) a 7,5 μl 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 chladničce zabalen do vlhkých utěrek. Připravený gel byl umístěn do aparatury pro elektroforetickou separaci a vana byla zalita 0,5×TBE. Aparatura byla napojena na přívod proudu a zapnuta na 40 V na 10 minut. Mezitím byly připraveny vzorky, které byly smíchány s ekvivalentním objemem Gel loading bufferu II (Ambion, Applied Biosystems) denaturovány při 70°C po dobu 5 minut. Obdobným způsobem byl

denaturován referenční velikostní standard RiboRuler High Range RNA ladder (Thermo Fisher Scientific) smíchaný ekvivalentním objemem 2×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 minut. Po ukončení elektroforetické separace došlo k obarvení RNA v 70ml 0,5×TBE pufru s obsahem 2× koncentrovaného interkalačního barviva GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in water (Biotium). Obarvení gelu trvalo 30 minut 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 obojí ustriženo ve formátu odpovídajícím rozměrům gelu. Následně byly do elektroblotovací vany přidány 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 minut. 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, Rozpis obou experimentů je uveden v následujících tabulkách Tab XIV a Tab. XV.

Tab. XIV: Rozpis použitých roztoků, teploty a časů použitých v experimentu 1.

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 digoxigeninem		
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	Maleic acid buffer, Anti-Digoxigenin/Digoxigenin DyLight® 488 (Vector laboratories)	RT	60
Promytí 2	Maleic acid buffer + 0,3 % Tween 20	RT	4×7 a 2×15

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

Tab. XV: Rozpis použitých roztoků, teploty a časů použitých v experimentu 2.

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	3×10 a 1×15

RT – pokojová teplota

Signál reportérové molekuly byl vyvolán pomocí chemiluminiscenční detekce v případě experimentu 1. a kolorimetrické detekce včetně detekce signálu pro dokumentaci nanášecí kontroly pomocí metylové modři v případě experimentu 2.

3.14 Elektroforetická separace RNA pomocí agarózového-formaldehydového denaturačního gelu

Agarózová-formaldehydová denaturační elektroforetická separace sloužila ke kontrole a referenci správné separace RNA v polyakrylamidovém močovinném gelu použitého v metodě Northern blot.

Gel byl vyroben z 1,2 % agarózy rozpuštěné v DEPC H₂O v 500ml Erlenmayerově baňce a byla ochlazená na ~60°C. K ochlazené agaróze byl přidán 5×MOPS (40mM trihydrát octanu sodného, 90mM MOPS-Na, 20mM EDTA, pH=7) a 37 % formaldehyd pro dosažení konečných koncentrací 1×MOPS a 7 % formaldehyd. Připravený roztok byl přelit do vyčištěné formy na gel a byl zasunut hřebínek. Vzorky RNA byly smíchány se stejným objemem Gel Loading Buffer II (Thermo Fisher Scientific) a denaturovány při 70°C po dobu 5 minut a okamžitě schlazeny na ledu. Velikostní referenční standard RiboRuler High Range RNA ladder (Thermo Fisher Scientific), byl smíchán se stejným objemem 2X RNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) a denaturován stejným způsobem jako vzorky RNA. K denaturovaným vzorkům a velikostnímu referenčnímu standardu byl přidán GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000× in water (Biotim) v konečné koncentraci 1×. Připravené vzorky a velikostní referenční standard byly poté nepipetovány do jamek gelu, který byl předtím alespoň 20 minut ponořen do 1×MOPS pufru. Elektroforetická separace probíhala při 50 V po dobu 4 hodin. Fluorescenční signál barviva GelRed s RNA byl následně detekován pomocí G-box Chemi XX6 (SYNGENE).

4 Výsledky

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

Pro účely přípravy vzorku obsahujícího sfRNA pro metodu dot-blot bylo potřeba transfekovat buněčnou linii DAOY HTB 186 pomocí transkribované sfRNA, protože na rozdíl od přirozené infekce TBEV Hypr transfekovaná RNA obsahuje více sfRNA. Přítomnost většího množství sfRNA v transfekovaných buňkách bylo vhodné pro optimalizaci metody dot-blot. qRT-PCR esej sloužila k ověření přítomnosti sfRNA ve vzorcích použitých pro metodu dot-blot. V této práci byla použita ověřená qRT-PCR esej obsahující TaqMan proubo pro kvantifikaci sfRNA z publikace Schwaiger M. a Cassinotti P., 2003. Při použití zmíněné eseje bylo zjištěno, že nefunguje za podmínek uvedených v publikaci, která byla proto dále optimalizována a bylo nutno použít jiné qPCR kity s interkalačním barvivem

SYBR, bez použití TaqMan próby TBE-probe-WT. Nicméně ani při použití qPCR kitů s interkalačním barvivem SYBR nebylo dosaženo výsledků, které by umožnily věrohodnou kvantifikaci sfRNA. Dalším krokem bylo použití vlastních navržených primerů, s nimiž byla provedena následná optimalizace nové qPCR eseje

Tab. XVI: Seznam použitých templátů qRT-PCR.

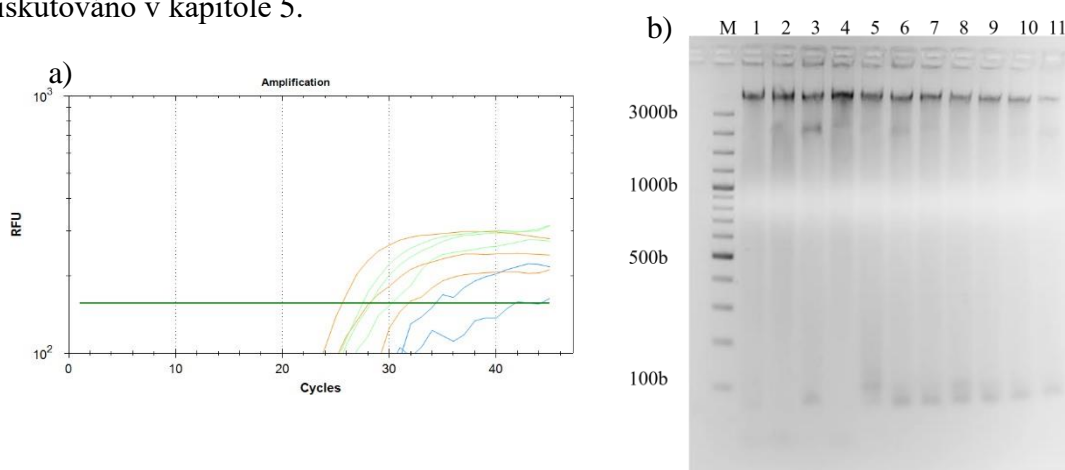
Templáty pro qRT-PCR	Názvy použité v legendách obrázků
cDNA a RNA z buněčné linie DAOY HTB 186 transfekované sfRNA	Transfekovaná sfRNA
cDNA a RNA z buněčné linie DAOY HTB 186 infikovaná virem TBEV Hypr	Infikovaná RNA
cDNA a RNA z buněčné linie DAOY HTB 186 infikovaná virem TBEV (mock kontrola infekce TBEV Hypr)	Negativní kontrola infekce
cDNA a RNA z transkribované sfRNA	Transkribovaná sfRNA
cDNA a RNA z transkribovaného MBP	Transkribované MBP
cDNA a RNA z buněčné linie DAOY HTB 186 transfekované MBP	Transfekované MBP
PCR produkt	Dle počtu kopií v reakci
Plazmid pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA	Dle počtu molekul v reakci pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA
Plazmid pcDNA DEST40 Hypr MBP	pcDNA DEST40 HDVr MBP
cDNA a RNA buněčné linie A549	RNA A549

4.1.1 Optimalizace eseje qPCR dle publikace Schwaiger M. a Cassinotti P., 2003

V následující kapitole byly porovnávány reakční mixy a byla provedena kontrola kontaminace použitých roztoků. Dále k zjištění účinnosti TBE1 primerů bylo potřeba použít ředící řadu templátu – nejprve byl použit plazmid pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA, který vytvářel na 3 % agarózovém gelu amplikony vyšších řádů ve formě tzv. žebříčku (několik produktů o různých velikostech), pravděpodobně protože plazmid pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA obsahuje repetitivní sekvence, tzv. aptamery a/nebo kvůli vzniku amplikonů vyšších řádů při použití plazmidu byl proveden s použitím pomoci desítkové ředící řady příslušného PCR produktu.

Kontrola transfekce buněk transkribovanou sfRNA a infekce buněk virem TBEV byla provedena pomocí qRT-PCR eseje za použití primerů a fluorescenční próby ze studie Schweiger, 2003. Použitý reakční mix byla KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems).

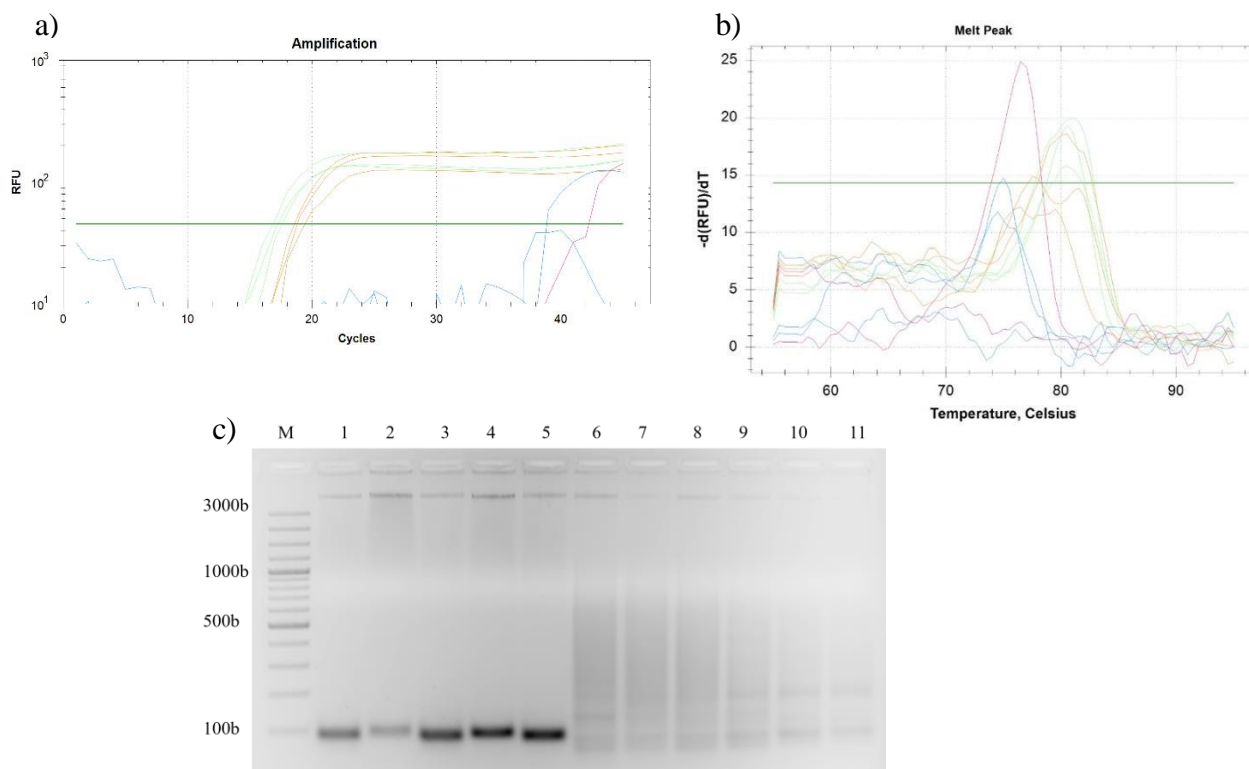
Výsledek elektroforetické separace produktů qPCR eseje na obr.11b) lze pozorovat vznik primer-dimerů nejen v NTC kontrole, ale také v reakci za přítomnosti templátu pro amplifikaci sfRNA. Patrný je také vznik PCR produktů o větší velikosti, jejichž přítomnost a formování je diskutováno v kapitole 5.



Obrázek 11.: a) Graf zobrazující výsledky analýzy amplifikace ampliconů vzorků v biologických i technických triplikátech s použitím KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit. NTC – růžová křivka, transfekovaná sfRNA 1 – oranžová křivka, transfekovaná sfRNA 2 – zelená křivka, transfekovaná sfRNA 3- modrá křivka. b) Výsledek elektroforetické separace ampliconů vzorků. KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit v 3 % agarózovém gelu. Jamky 1-2 NTC; 3-5 technický triplikát transfekované sfRNA 1; 6-8 technický triplikát transfekované sfRNA 2; 9-11 technický triplikát transfekované sfRNA 3. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenan v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

V následujícím experimentu byl použit kit KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems), který sloužil jako test, zdali je problém s formováním dimerů inherentním problémem primerů anebo zda by se tento problém dal odstranit použitím jiného qPCR kitu. Na obr. 12b) lze pozorovat přítomnost produktu amplifikace ve vzorcích NTC. S ohledem na délku ampliconu 68bp této qPCR eseje bylo obtížné odlišit specifický produkt od případných primer-dimer. Z tohoto důvodu byla tato qPCR esej provedena s použitím nového balení KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) a nově vytvořených pracovních roztoků primerů a PCR H₂O pro vyloučení možnosti přítomnosti kontaminace v použitých PCR

roztoků. Výsledek elektroforetické separace na obr.14 ilustruje, že problém v NTC kontrole jsou skutečně primer-dimery, a nikoliv přítomnost kontaminace.

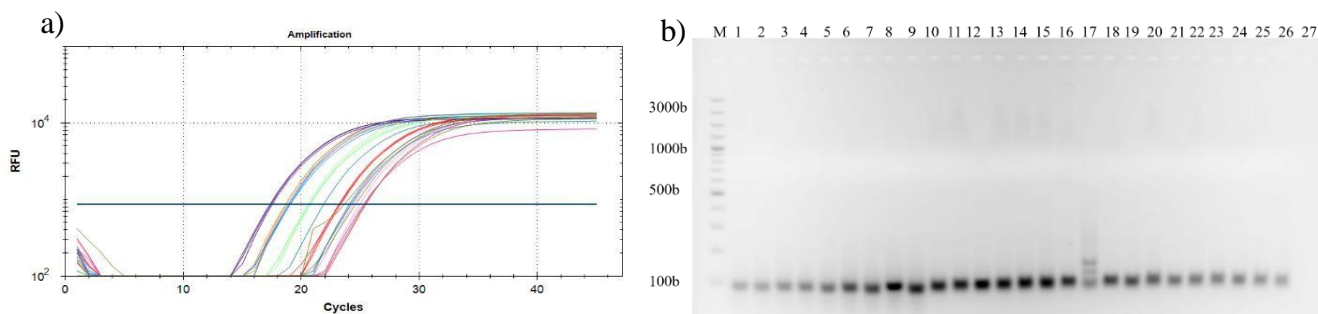


Obrázek 12.: a) Graf zobrazující výsledky analýzy amplifikace amplikonů vzorků s použitím KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka, Transfekovaná sfRNA 1 – oranžová křivka, Transfekovaná sfRNA 2 – zelená křivka, transfekovaná sfRNA 3 – modrá křivka. b) Graf zobrazující výsledky analýzy tání vznikajících amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) v rozsahu 55 °C až 99°C. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka, Transfekovaná sfRNA 1 – oranžová křivka, Transfekovaná sfRNA 2 – zelená křivka, transfekovaná sfRNA 3 – modrá křivka. b) Výsledek elektroforetické separace amplikonů qPCR eseje v 3% agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. Jamky 1-2 NTC; 3-5 transfekovaná sfRNA 1; 6-8 transfekovaná sfRNA 2; 9-11 transfekovaná sfRNA 3. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

Po vyloučení přítomnosti kontaminace v reakčním mixu qPCR bylo nutné zjistit, zda vznik primer-dimerů pozorovaný v NTC kontrole ovlivňuje účinnost qPCR reakce otestováním této qPCR eseje při použití pomoci desítkové ředící řady templátové DNA.

Dále byla otestována účinnost primerů s použitím pomoci desítkové ředící řady plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA a PCR produktu za použití KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems).

V následujícím experimentu byla jako templát použita ředící řada plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA pro test účinnosti primerů. Z následujícího obr.13., je zřejmé, že množství pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA se nemění se zvyšujícím se zředěním templátové DNA a potvrzuje tak velmi nízkou účinnost použitých primerů za těchto reakčních podmínek.

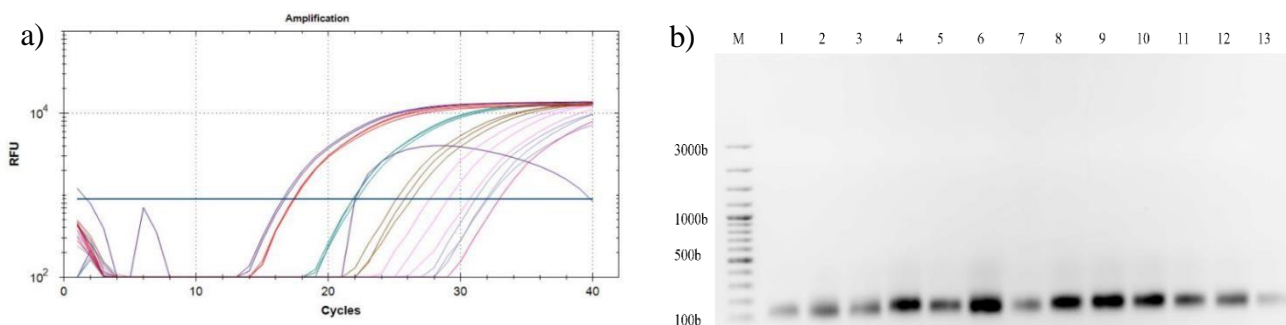


Obrázek 13.: a) Graf zobrazující výsledky analýzy amplifikace ampliconů vzorků s použitím KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka, transfekovaná sfRNA 1 – oranžová křivka, transfekovaná sfRNA 2 – zelená křivka, transfekovaná sfRNA 3 – modrá křivka, nejnížší ředění pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA (75 000c/μl) – tmavě modrá křivka, 7 500 c/μl – červená křivka, 750 c/μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, 75 c/μl – hnědozelená křivka, nejvyšší ředění 7,5 c/μl – světle fialová křivka. Výsledek elektroforetické separace ampliconů pomocí desítkové ředící řady pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA vytvořených KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) v 3 % agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. Jamky **1-3** transfekovaná sfRNA 1; **4-6** transfekovaná sfRNA 2; **7-9** transfekovaná sfRNA 3; Ředící řada plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA uvedená od nejnížšího po nejvyšší ředění: Jamky **10-12** 75 000 molekul (c)/μl; **13-15** 7 500 c/μl; **16-18** 750 c/μl; **19, 20, 22** 75 c/μl; **23-26** 7,5 c/μl; **21, 27** NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

Experimenty níže sloužily jako potvrzení, zda reakční mix KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) neobsahuje kontaminaci a zároveň sloužily jako test účinnosti primerů.

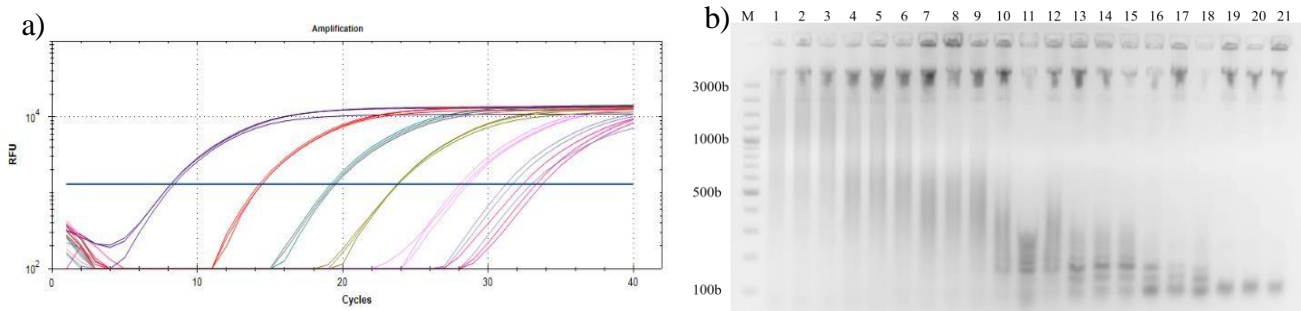
V následujícím experimentu bylo použito nové balení qPCR reakčního mixu a nově vytvořené pracovní roztoky primerů pro vyloučení podezření na přítomnost vnesení kontaminace vqPCR reakčním mixu. Templátem byla ředící řada pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA. Na obrázku 14b) lze stále pozorovat přítomnost produktu amplifikace v NTC kontrolách, nicméně použitím nových chemikálií byla vyloučena možnost formování těchto produktů amplifikace díky přítomnosti kontaminace a je patrné, že se skutečně jedná o primer-dimery rozestup fluorescenčních křivek jednotlivých ředění templátu na obr.14a) indikuje, že účinnost TBE1 primerů je neuspokojující. Vzniklé PCR produkty byly vyřezány a izolovány z gelu pomocí

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu (Macherey-Nagel) a použity pro vytvoření pomoci desítkové ředící řady templátu k testování účinnosti primerů v následujícím qPCR



Obrázek 14.: a) Graf zobrazující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR ve vzorcích pomoci desítkové ředící řady pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA s použitím KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: 750 000 c/μl – tmavě modrá křivka, 75 000 c/μl – červená křivka, 7 500 c/μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, 75 c/μl – hnědozelená křivka, 7,5 c/μl – světle fialová křivka. b) Výsledek elektroforetické separace amplikonů qRT-PCR pomoci desítkové ředící řady pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA v 3% agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: jamky **1-2** 750 000 molekul (c)/μl; **3-4** 75 000 c/μl; **5-6** 7 500 c/μl; **7-8** 750 c/μl; **9-10** 75 c/μl; **11-12** 7,5 c/μl **13** NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

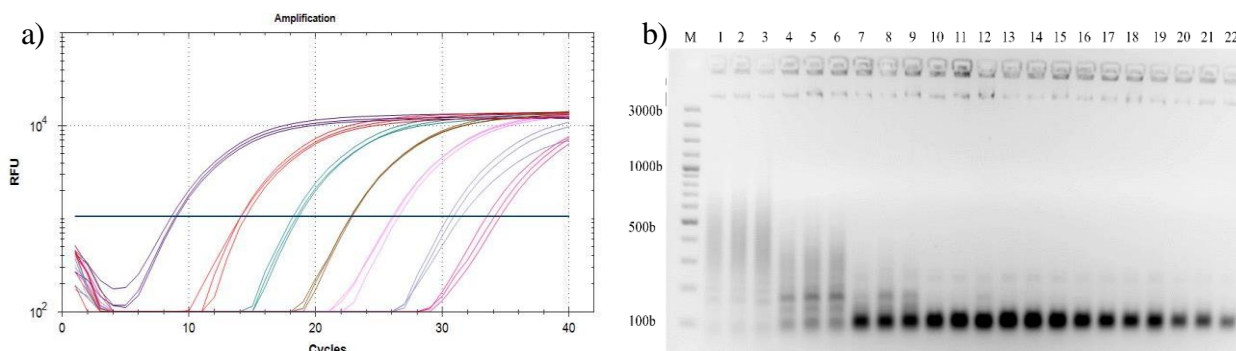
V následující qPCR esaji došlo k opakování testu účinnosti primerů. V tomto experimentu byl nahrazen templátový plazmid za PCR produkt získaný izolací amplikonů z qPCR předchozího experimentu z agarózového gelu po jejich elektroforetické separaci. Pro vyloučení možnosti zanesení kontaminace z použité TaqMan próby byl použit nový alikvót próby a zcela nové zásobní roztoky všech qPCR chemikálií. Na obr.15 lze pozorovat, že templát v podobě PCR produktu vykazoval výraznější tendenci k formování amplikonů vyššího řádu typických pro repetitivní DNA nebo DNA tvořící sekundární struktury v porovnání s templátem ve formě plazmidové DNA. Navíc lze pozorovat inhibici amplifikace při použití PCR produktu o nízkém ředění.



Obrázek 15.: a) Graf zobrazující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR v PCR produktu s použitím KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po

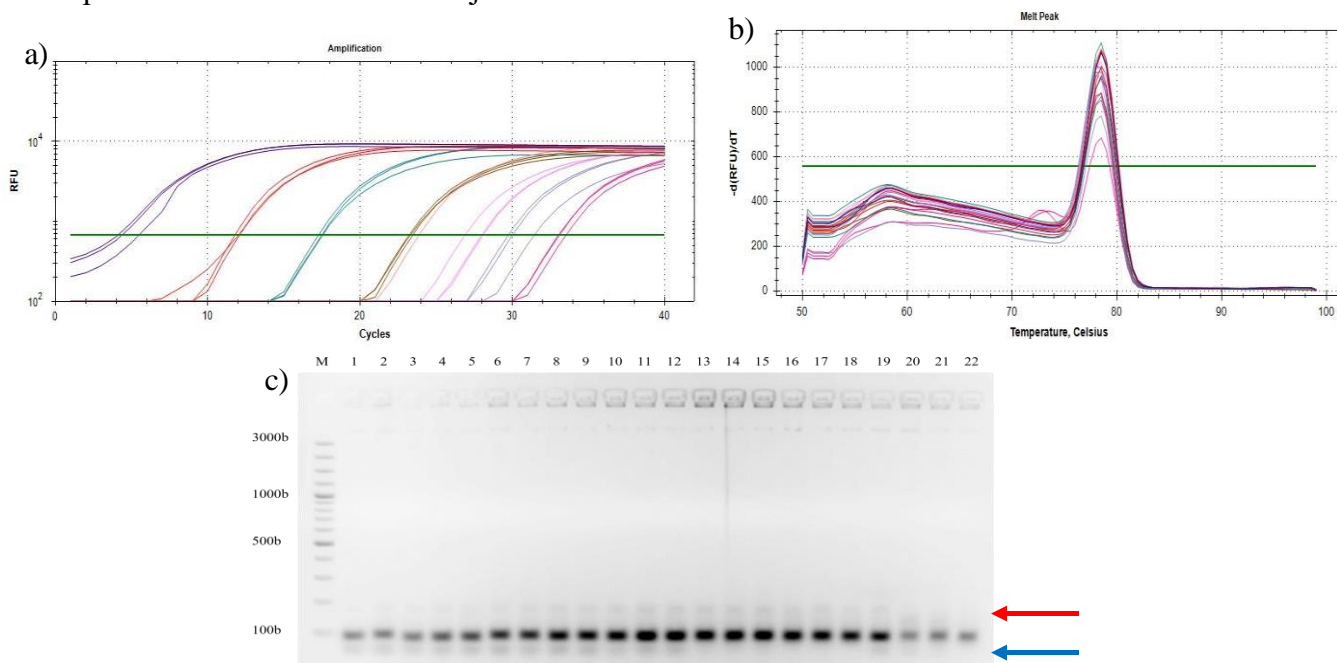
nejvyšší ředění: $8,1583 \times 10^{10}$ kopií/ μl – tmavě modrá křivka, $8,1583 \times 10^9$ kopií/ μl – červená křivka, $8,1583 \times 10^8$ kopií/ μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $8,1583 \times 10^7$ kopií/ μl – hnědozelená křivka, $8,1583 \times 10^6$ kopií/ μl – světle fialová křivka, nejvyšší ředění $8,1583 \times 10^5$ kopií/ μl – modrošedá křivka. b) Výsledek elektroforetické separace amplikonů pomocí desítkové ředící řady PCR produktu v 3 % agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: Jamky **1-3** $8,1583 \times 10^{10}$ kopií/ μl ; **4-6** $8,1583 \times 10^9$ kopií/ μl ; **7-9** $8,1583 \times 10^8$ kopií/ μl ; **10-12** $8,1583 \times 10^7$ kopií/ μl ; **13-15** $8,1583 \times 10^6$ kopií/ μl ; **16-18** $8,1583 \times 10^5$ kopií/ μl ; **19-21** NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

Z důvodu vzniku amplikonů vyšších řádů bylo v následujícím experimentu použit PCR produkt vzniklý amplifikací plazmidu pcDNA DET40 TBEV Hypr sRNA pomocí vysoce procesivní Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy (New England BioLabs), která by měla být schopna syntetizovat amplikony s vysokou přesností a pracovat i se strukturně komplikovanými templáty. Obr.16b) ilustruje, že formování amplikonů vyšších řádů se omezit nepodařilo. 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 beztemplátové kontroly v jamkách 19-22.



Obrázek 16.: a) Graf zobrazující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR v ředící řadě PCR produktu s použitím KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2 \times) Kit. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: $1,2237 \times 10^9$ kopií/ μl – tmavě modrá křivka, $1,2237 \times 10^8$ kopií/ μl – červená křivka, $1,2237 \times 10^7$ kopií/ μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $1,2237 \times 10^6$ kopií/ μl – hnědozelená křivka, $1,2237 \times 10^5$ kopií/ μl – světle fialová křivka, nejvyšší ředění $1,2237 \times 10^4$ kopií/ μl – modrošedá křivka. b) Výsledek elektroforetické separace amplikonů pomocí desítkové ředící řady PCR produktu v 3% agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: Jamky **1-3** $1,2237 \times 10^9$ kopií/ μl ; **4-6** $1,2237 \times 10^8$ kopií/ μl ; **7-9** $1,2237 \times 10^7$ kopií/ μl ; **10-12** $1,2237 \times 10^6$ kopií/ μl ; **13-15** $1,2237 \times 10^5$ kopií/ μl ; **16-18** $1,2237 \times 10^4$ kopií/ μl ; **19-22** NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

V následujícím experimentu pro test účinnosti primerů byl použit reakční mix qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). Cílem tohoto experimentu bylo otestovat vliv různých qPCR kitů na eficienti testovaných primerů byl použit stejný PCR produkt jako v předchozím experimentu (obr.16). Z výsledků experimentu na obr.17 lze pozorovat výrazné snížení formování amplikonů vyšších řádů (viz. červená šipka na obr.17c)), nikoliv však jejich úplné vymizení. Obdobně jako v předchozím experimentu lze pozorovat inhibici amplifikace se zvyšující se koncentrací templátu v reakci a přítomnost primer-dimerů, které mají různé velikosti (viz. modrá šipka v obr.17c)), jejichž abundance negativně koreluje s abundancí specifického amplikonu. Na základě těchto výsledků, nicméně stále nelze posoudit, zda je signál v místě specifického amplikonu ve vzorcích s templátem tvořen pouze specifickým amplikonem anebo zda se jedná o kombinaci signálu ze specifického amplikonu a primer-dimerů, které lze pozorovat ve vzorcích NTC v jamkách 19-22.

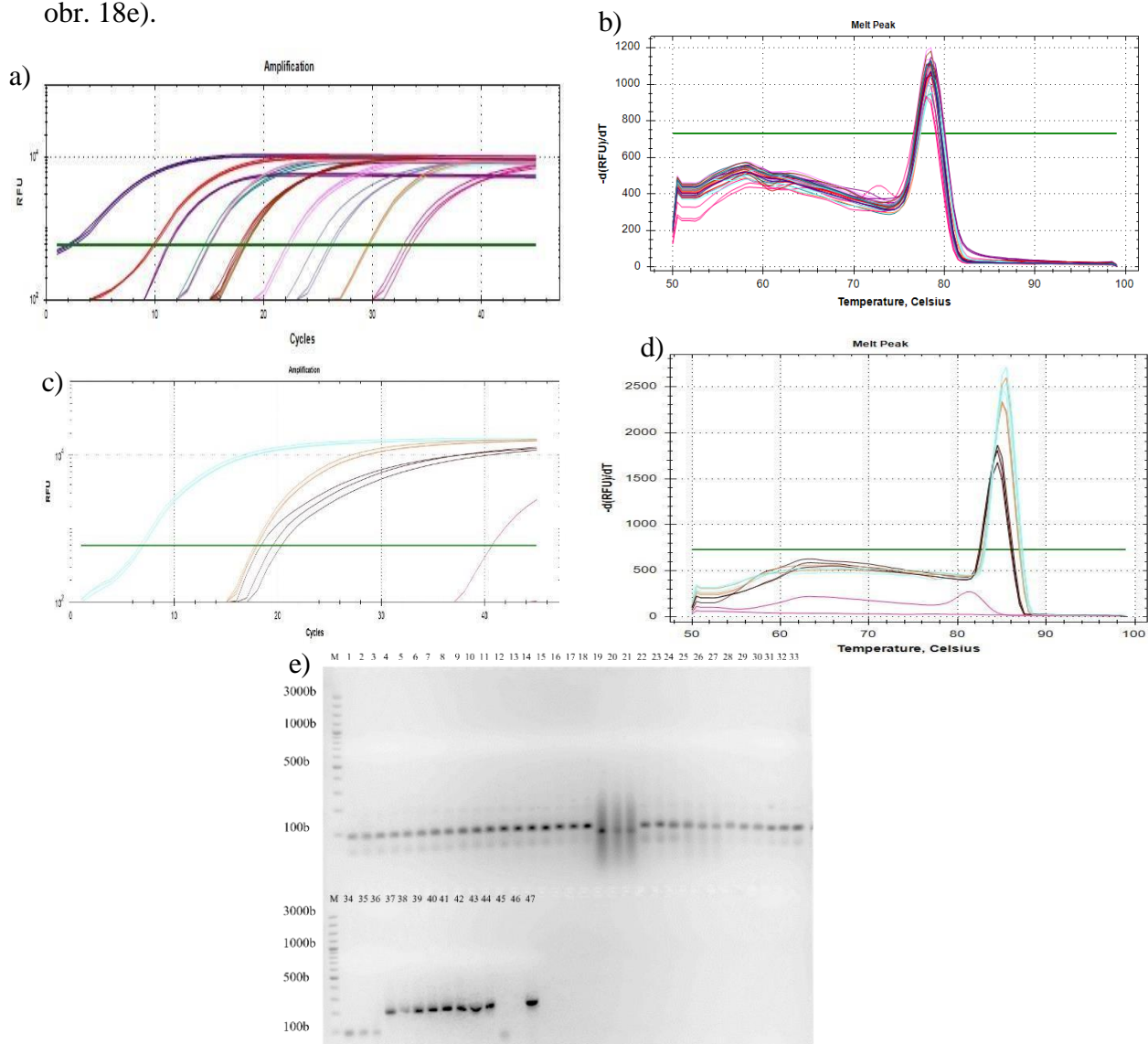


Obrázek 17.: a) Graf zobrazující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR v ředící řadě PCR produktu s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: $1,2237 \times 10^9$ kopií/ μ l – tmavě modrá křivka, $1,2237 \times 10^8$ kopií/ μ l – červená křivka, $1,2237 \times 10^7$ kopií/ μ l – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $1,2237 \times 10^6$ kopií/ μ l – hnědozelená křivka, $1,2237 \times 10^5$ kopií/ μ l – světle fialová křivka, nejvyšší ředění $1,2237 \times 10^4$ kopií/ μ l – modrošedá křivka. b) Graf zobrazující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR v ředící řadě PCR produktu s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). NTC – růžová křivka. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: $1,2237 \times 10^9$ kopií/ μ l – tmavě modrá křivka, $1,2237 \times 10^8$ kopií/ μ l – červená křivka, $1,2237 \times 10^7$ kopií/ μ l – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $1,2237 \times 10^6$ kopií/ μ l – hnědozelená křivka, $1,2237 \times 10^5$ kopií/ μ l – světle fialová křivka, nejvyšší ředění $1,2237 \times 10^4$ kopií/ μ l – modrošedá křivka. c) Výsledek elektroforetické separace amplikonů pomocí desítkové ředící řady PCR produktu v 3% agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: Jamky **1-3** $1,2237 \times 10^9$ kopií/ μ l; **4-6** $1,2237 \times 10^8$ kopií/ μ l; **7-9** $1,2237 \times 10^7$ kopií/ μ l; **10-12** $1,2237 \times 10^6$ kopií/ μ l; **13-15** $1,2237 \times 10^5$ kopií/ μ l; **16-18** $1,2237 \times 10^4$ kopií/ μ l; **19-22** NTC.

Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu.

Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

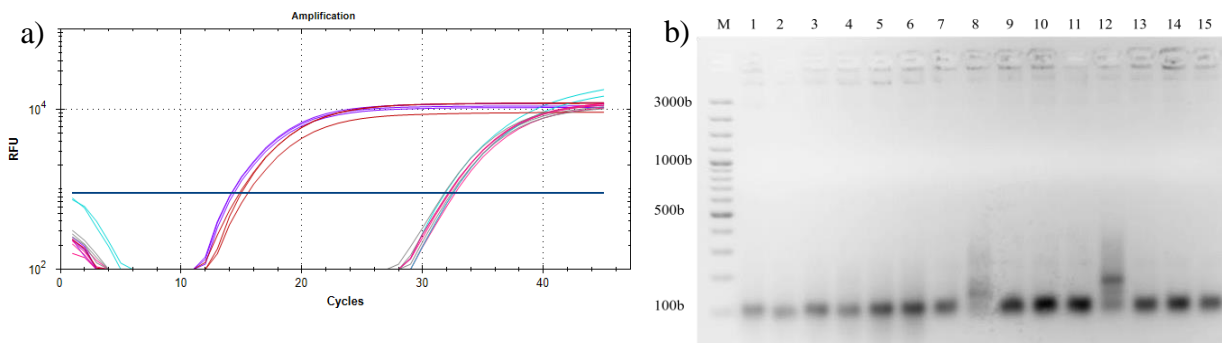
V následujícím experimentu byly použity MBP primery, které sloužily jako kontroly kontaminace reakčního mixu. Jako templát pro TBE1 primery byla použita ředící řada PCR produktu z předchozího experimentu a cDNA z transkribované sfRNA a MBP, transfekované sfRNA a MBP a pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA $7,5 \times 10^6$ c/μl a templáty pro MBP F2×R1 primery byly transkribované a transfekované MBP, pcDNA DEST40 HDVr MBP $7,5 \times 10^7$ c/μl. Z výsledků (obr.18) lze usoudit, že reakční mix kontaminovaný není, protože se tvorba primer-dimerů v qPCR nevytváří za použití MBP primerů. Tvorba dimerů či nespecifických produktů je převážně tvořena nespecifickým annealingem TBE1 primerů viz obr. 18e).



Obrázek 18.: a) Graf zobrazující výsledky analýzy amplicikace ampliconů qRT-PCR v ředící řadě PCR produktu a ostatních vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) pro TBE1 primery. Templátem byla ředící řada PCR produktu, cDNA z transkribované sfRNA a MBP, transfekované sfRNA a MBP. Všechny

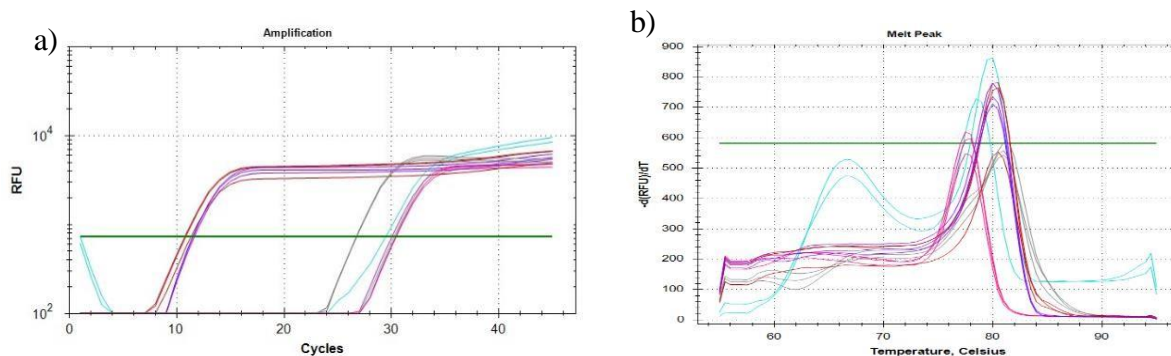
vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: $1,2237 \times 10^9$ kopií/μl – tmavě modrá křivka, $1,2237 \times 10^8$ kopií/μl – červená křivka, $1,2237 \times 10^7$ kopií/μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $1,2237 \times 10^6$ kopií/μl – hnědozelená křivka, $1,2237 \times 10^5$ kopií/μl – světle fialová křivka, $1,2237 \times 10^4$ kopií/μl – modrošedá křivka, transkribovaná sfRNA – tmavě zelená křivka, transkribované MBP – světle tyrkysová křivka, transfekovaná sfRNA – světle růžová křivka, transfekované MBP – světle hnědá křivka, pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA $7,5 \times 10^6$ c/μl – tmavě červená křivka. b) Graf zobrazující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR v ředící řadě PCR produktu a ostatních vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C pro TBE1 primery. Templátem byla ředící řada PCR produktu, cDNA z transkribované sfRNA a MBP, transfekované sfRNA a MBP. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: $1,2237 \times 10^9$ kopií/μl – tmavě modrá křivka, $1,2237 \times 10^8$ kopií/μl – červená křivka, $1,2237 \times 10^7$ kopií/μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $1,2237 \times 10^6$ kopií/μl – hnědozelená křivka, $1,2237 \times 10^5$ kopií/μl – světle fialová křivka, $1,2237 \times 10^4$ kopií/μl – modrošedá křivka, transkribovaná sfRNA – tmavě zelená křivka, transkribované MBP – světle tyrkysová křivka, transfekovaná sfRNA – světle růžová křivka, transfekované MBP – světle hnědá křivka, pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA $7,5 \times 10^6$ c/μl – tmavě červená křivka. c) Graf zobrazující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) pro MBP primery NTC – růžová křivka. Transkribované MBP – tyrkysová křivka, transfekované MBP – světlé hnědá křivka, pcDNA DEST40 HDVr MBP $7,5 \times 10^7$ c/μl. – tmavě hnědá křivka. d) Graf zobrazující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C pro MBP primery NTC – růžová křivka. Transkribované MBP – tyrkysová křivka, transfekované MBP – světlé hnědá křivka, pcDNA DEST40 HDVr MBP $7,5 \times 10^7$ c/μl. – tmavě hnědá křivka. e) Výsledek elektroforetické separace amplikonů pomocí desítkové ředící řady PCR produktu a ostatních vzorků v 3 % agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. Ředící řada PCR produktu uvedená od nejnižšího po nejvyšší ředění: Jamky pro TBE1 primery: **1-3** $1,2237 \times 10^9$ kopií/μl; **4-6** $1,2237 \times 10^8$ kopií/μl; **7-9** $1,2237 \times 10^7$ kopií/μl; **10-12** $1,2237 \times 10^6$ kopií/μl; **13-15** $1,2237 \times 10^5$ kopií/μl; **16-18** $1,2237 \times 10^4$ kopií/μl; **19-21** transkribovaná sfRNA; **22-24** transkribované MBP; **25-27** transfekovaná sfRNA; **28-30** transfekované MBP; **31-33** pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA $7,5 \times 10^6$ c/μl; **34-36** NTC; pro MBP F2×R1 primery **37-39** transkribované MBP; **40-42** transfekované MBP; **43,44,47** pcDNA DEST40 HDVr MBP $7,5 \times 10^7$ c/μl; **45-46** NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

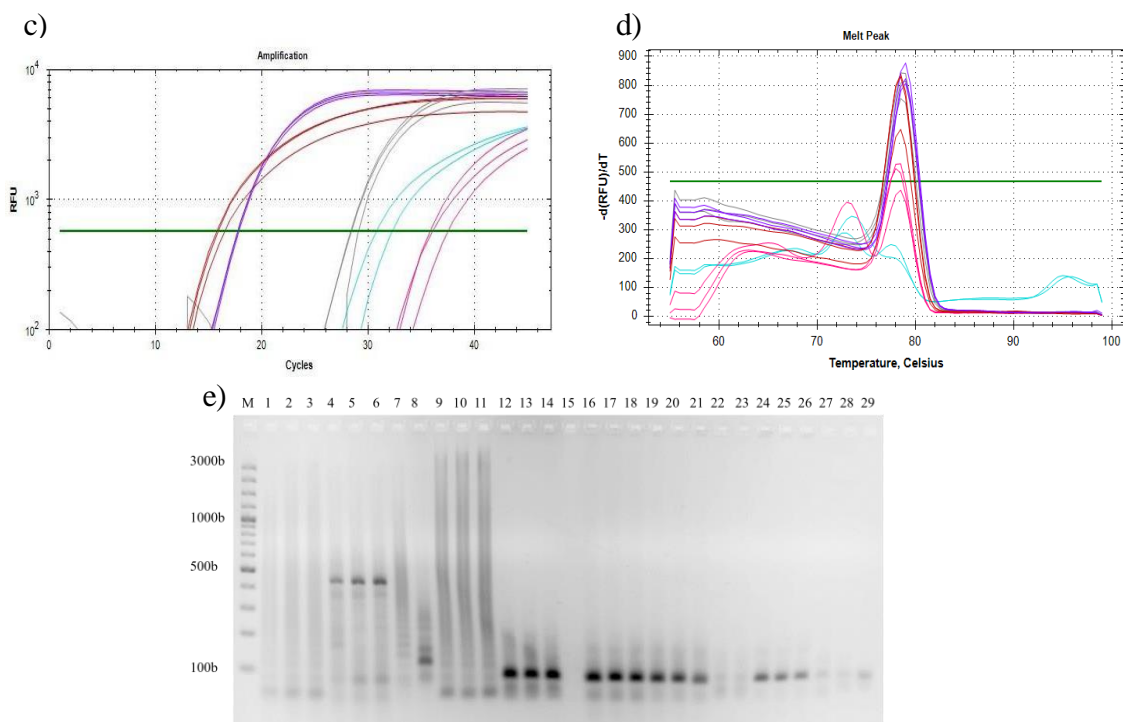
Z výsledků předchozího experimentu (obr.16) bylo formulována hypotéza, že tvorba nespecifických produktů může způsobovat TaqMan próba TBE-probe-WT. Proto byla v následujícím experimentu TaqMan próba použita jako templát což mělo sloužit k zjištění, zda samotná přítomnost próby způsobuje vznik pozorované nespecifické amplifikace v této qRT-PCR eseji. Dalším použitým templátem byly RNA z infikované buněčné linie DAOY HTB 186 virem TBEV, RNA z neinfikované buněčné linie DAOY HTB 186 (negativní kontrola infekce) a pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA $7,5 \times 10^6$ a reakčním mixem KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Na obr.19b) lze pozorovat vlastnost próby TBE-probe-WT vytvářet dimery.



Obrázek 19.: a) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace ampliconů qRT-PCR ve vzorcích s použitím KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Všechny vzorky jsou v technických triplicátech. NTC – růžová křivka, infikovaná RNA – tmavě fialová křivka, negativní kontrola infekce – šedá křivka, TaqMan próba TBE-probe-WT – tmavě tyrkysová křivka, pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA 7,5×10⁶ c/μl – tmavě červená křivka. b) Výsledek elektroforetické separace ampliconů vzorků v 3 % agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplicátech. Jamky **1-3** infikovaná sřRNA; **4-6** negativní kontrola infekce, **7-8** TBE-probe WT, **9-11** pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA 7,5×10⁶, **12-15** NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

V následujícím experimentu byla jako templát použita TaqMan próba TBE-probe-WT společně se stejnými templáty jako v předchozím experimentu. Použití jiných qPCR reakčních mixů používaných pro kvantifikaci pomocí barviva sybr (KAPA SYBR[®] FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) a qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio)) sloužilo k ověření, zda tato TaqMan próba vytváří dimery a nespecifické produkty. Na obr.20 a) a c) lze pozorovat vytvořené primer-dimery v TBE-probe-WT a na obr 20 e) lze pozorovat velké množství nespecifických produktů při použití KAPA SYBR[®] FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Na základě těchto výsledků byla esej ze studie Schwaiger, 2003 zavržena pro kvantifikaci sřRNA v transfekované/infikované buněčné linii DAOY HTB 186 transkribovanou sřRNA/virem TBEV použitých v této práci.





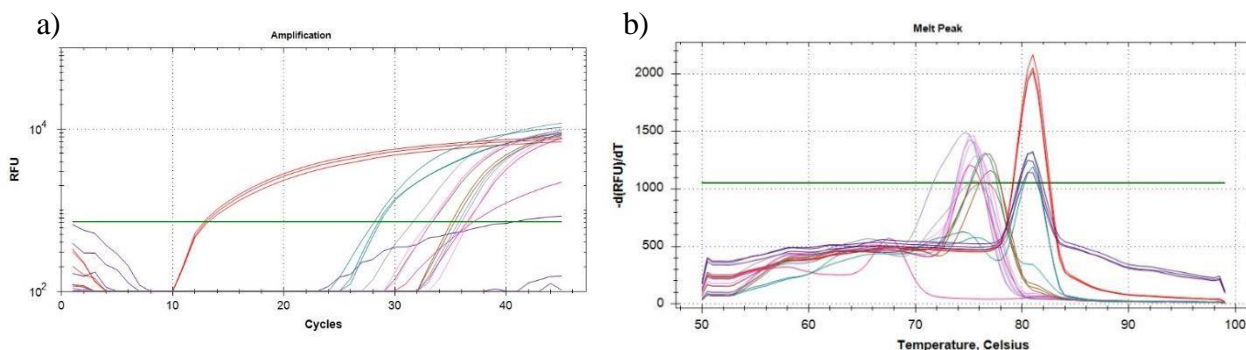
Obrázek 20.: a) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka, infikovaná RNA – fialová křivka, negativní kontrola infekce – šedá křivka, TaqMan próba TBE-probe-WT – tmavě tyrkysová křivka, pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA $7,5 \times 10^6$ c/ μ l – tmavě červená křivka. b) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) v rozsahu 55 °C až 99 °C. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka, infikovaná RNA – fialová křivka, negativní kontrola infekce – šedá křivka, TaqMan próba TBE-probe-WT – tmavě tyrkysová křivka, pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA $7,5 \times 10^6$ c/ μ l – tmavě červená křivka c) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). NTC – růžová křivka, infikovaná RNA – fialová křivka, negativní kontrola infekce – šedá křivka, TaqMan próba TBE-probe-WT – tmavě tyrkysová křivka, pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA $7,5 \times 10^6$ c/ μ l – tmavě červená křivka. d) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 55 °C až 99 °C. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. NTC – růžová křivka, infikovaná RNA – fialová křivka, negativní kontrola infekce – šedá křivka, TaqMan próba TBE-probe-WT – tmavě tyrkysová křivka, pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA $7,5 \times 10^6$ c/ μ l – tmavě červená křivka. e) Výsledek elektroforetické separace amplikonů vzorků v 3 % agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických triplikátech. Jamky **1-14** KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) a jamky **16-29** qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). **1-3** infikovaná sřRNA; **4-6** negativní kontrola infekce, **7-8** TaqMan próba TBE-probe-WT, **9-11** pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA $7,5 \times 10^6$, **12-14** NTC. **16-18** infikovaná sřRNA; **19-21** negativní kontrola infekce, **22-23** TaqMan próba TBE-probe-WT, **24-26** pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA $7,5 \times 10^6$, **27-29** NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

4.1.2 Optimalizace vlastní qPCR eseje pro kvantifikaci sřRNA

Z důvodu neuspokojující účinnosti eseje publikované ve studii Schwaiger M. a Cassinotti P., 2002, umožňující věrnou kvantifikaci sřRNA ve vzorcích, byly navrženy vlastní

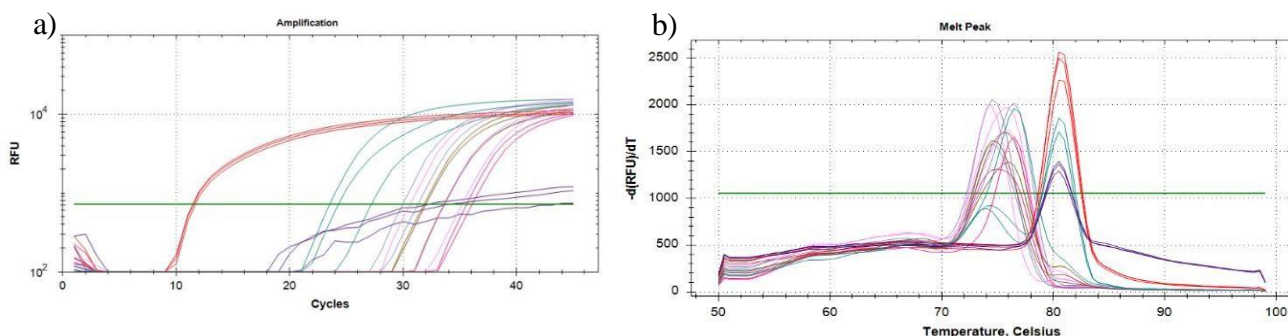
páry primerů. Celkem byly navrženy 4 páry primerů, ale z důvodu malé délky amplikonů párů F3×R5 a F×R2, znemožňující odlišení specifických amplikonů od primer-dimerů, budou prezentovány pouze výsledky s použitím 2 párů primerů F×R5 a F1×R5. Z výsledků porovnávající účinnost a specificitu práce dvou qPCR reakčních mixů pro kvantifikaci DNA pomocí fluorescenčního barviva SYBR byly nejlepší výsledky získány při použití qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio), proto byl tento kit použit pro testování práce a účinnosti obou testovaných párů primerů.

V následujícím experimentu byla použita koncentrace primerů 300nM v kombinaci F1×R5. Templátem byla ředící řada plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA. V tomto experimentu bylo vyzkoušeno, zda námi navržené primery budou vytvářet v NTC kontrolách dimery a nespecifické produkty. Dále byla provedena elektroforetická separace, ale z důvodu nepřidání referenčního velikostního standardu do jamky 3 % agarózového gelu nemohou tyto výsledky být prezentovány. Na obr.21 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 tento pár primerů byl vybrán pro další optimalizace.



Obrázek 21.: a) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). Všechny vzorky jsou v technických triplicátech. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^7$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^6$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – hnědozelená křivka, 7 500 c/μl – světle fialová křivka, 750 c/μl – modrošedá křivka. b) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s různou koncentrací pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^7$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^6$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – hnědozelená křivka, 7 500 c/μl – světle fialová křivka, 750 c/μl – modrošedá křivka.

V následujícím experimentu byla použita koncentrace primerů 300nM v kombinaci F×R5. Templátem byla ředící řada plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA. V tomto experimentu bylo vyzkoušeno, zda námi navržené primery budou vytvářet v NTC kontrolách dimery a nespecifické produkty. Dále byla provedena elektroforetická separace, ale z důvodu nepřidání referenčního velikostního standardu do jamky 3 % agarózového gelu nemohou tyto výsledky být prezentovány. Na obr. 22. lze pozorovat tvorbu dimerů ve všech koncentracích plazmidu kromě tří nejvyšších. Dále lze pozorovat tvorby dimerů NTC kontrole.



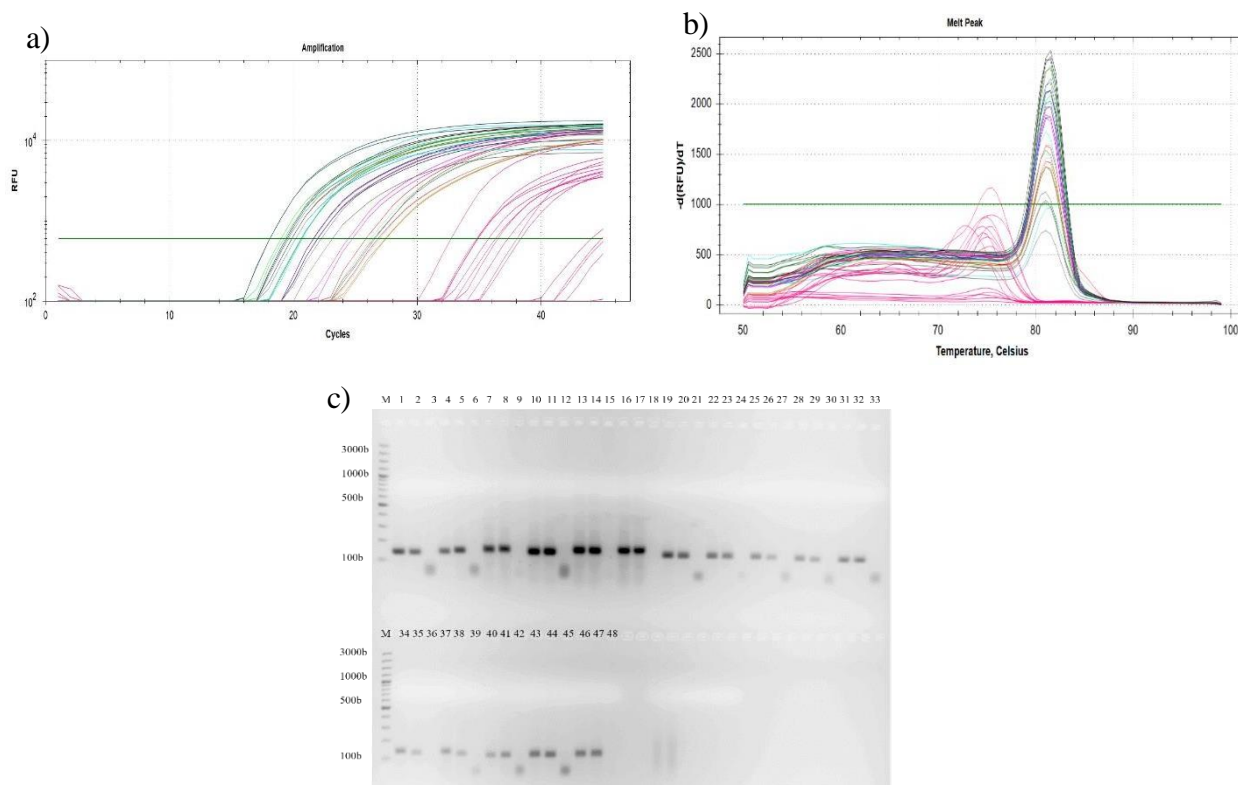
Obrázek 22.: a) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). Všechny vzorky jsou v technických triplicátech. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sřRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^7$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^6$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – hnědozelená křivka, 7 500 c/μl – světle fialová křivka, 750 c/μl – modrošedá křivka. b) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s různou koncentrací pcDNA DEST40 TBEV Hypr sřRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sřRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^7$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^6$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená) křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – hnědozelená křivka, 7 500 c/μl – světle fialová křivka, 750 c/μl – modrošedá křivka.

V následujícím experimentu byla provedena optimalizace koncentrací vybraného páru primerů F1×R5, jejíž kombinace jsou znázorněny v Tab. XVII. Tento experiment sloužil k otestování, v jakých kombinacích koncentrací primery vytvářejí amplikony neobsahující dimery či nespecifické produkty. Templátem byla cDNA z RNA infikované buněčné linie DAOY HTB 186 virem TBEV Hypr.

Tab. XVII: Znázornění kombinací koncentrací F1×R5 primerů.

		R5			
		300 nM	200 nM	100 nM	50 nM
F1	300 nM	-	300×200	300×100	300×50
	200 nM	200×300	200×200	200×100	200×50
	100 nM	100×300	100×200	100×100	100×50
	50 nM	50×300	50×200	50×100	50×50

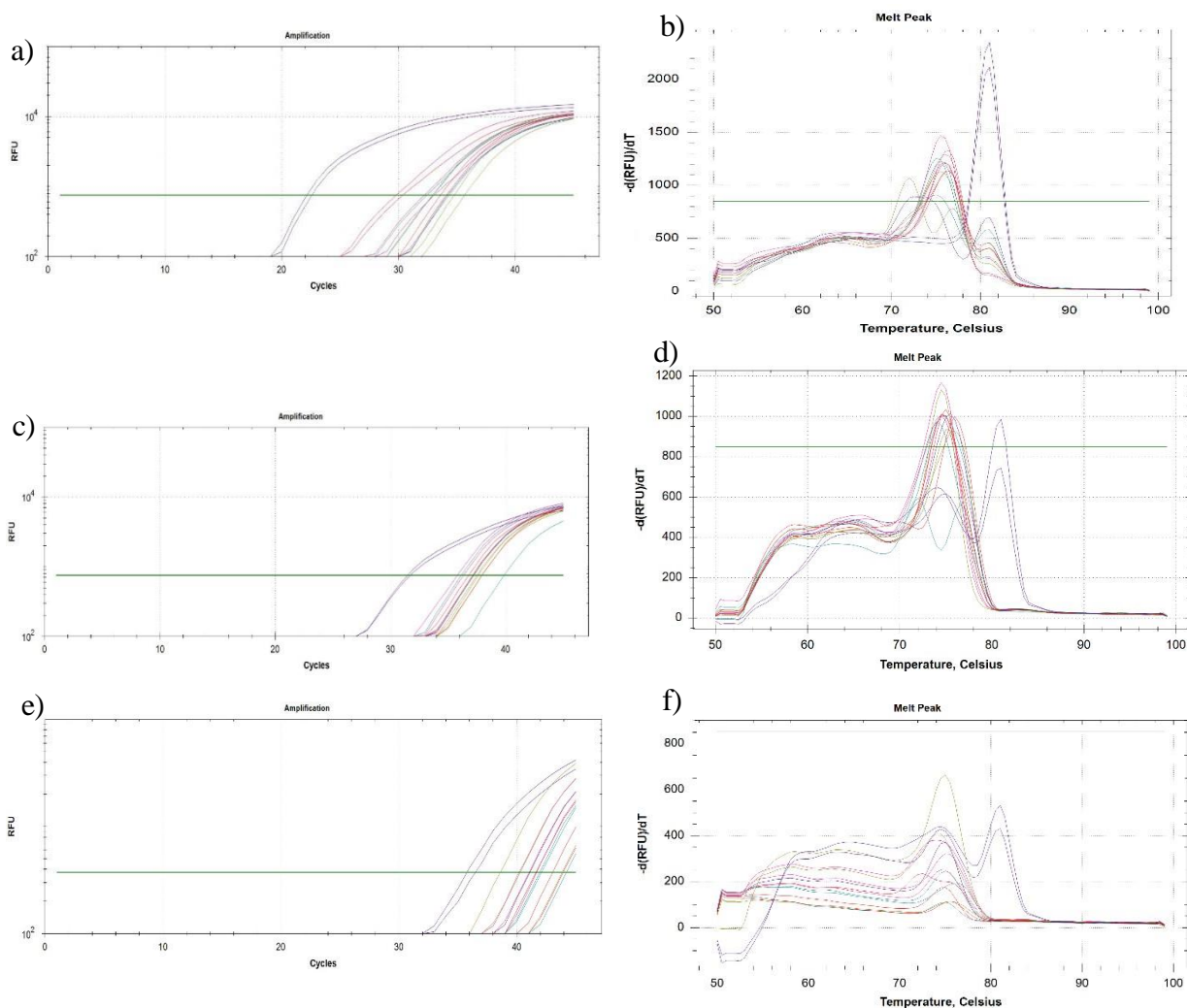
Z následujícího obr.23 vyplývá, že nevhodnější dále používané kombinace koncentrací byly F1 200nM × R5 200nM, F1 200nM × R5 100nM a F1 200nM × R5 50nM z důvodu, že v NTC se nevytváří dimery či nescifické produkty. Zmíněné kombinace koncentrací jsou v Tab. XVII znázorněny modrou barvou, které byly dále využity v dalších experimentech.

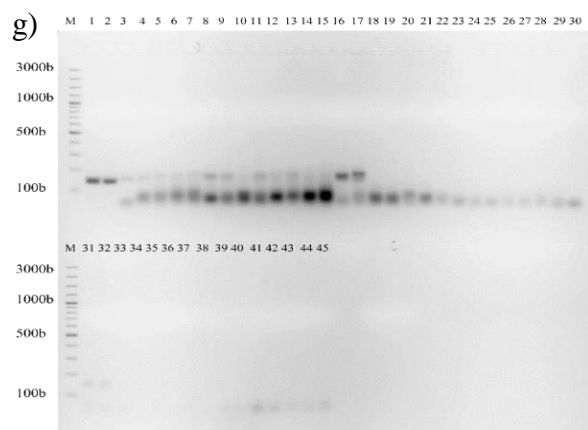


Obrázek 23.: a) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR ve vzorcích s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). Všechny vzorky jsou v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka pro všechny kombinace, F1 300nM × R5 200nM – černá křivka, F1 300nM × R5 100nM – tmavě modrá křivka, F1 300nM × R5 50nM – červená křivka, F1 200nM × R5 200nM – hnědá křivka, F1 200nM × R5 100nM – světle fialová křivka, F1 200nM × R5 50nM – světle šedá křivka, F1 200nM × R5 300nM – světle zelená křivka, F1 100nM × R5 300nM – vínová křivka, F1 100nM × R5 200nM – světle modrá, F1 100nM × R5 100nM – tmavě fialová křivka, F1 100nM × R5 50nM – tmavě oranžová křivka, F1 50nM × R5 300nM – tmavě šedá křivka, F1 50nM × R5 200nM – tmavě zelená křivka, F1 50nM × R5 100nM – tyrkysová křivka, F1 50nM × R5 50nM – zelenošedá křivka. b) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR ve vzorcích obsahující rozdílné kombinace koncentrací primerů a s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C. Všechny vzorky jsou v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka pro všechny kombinace, F1 300nM × R5 200nM – černá křivka, F1 300nM × R5 100nM – tmavě modrá křivka, F1 300nM × R5 50nM – červená křivka, F1 200nM × R5 200nM – hnědá křivka, F1 200nM × R5 100nM – světle fialová křivka, F1 200nM × R5 50nM – světle šedá křivka, F1 200nM × R5 300nM – světle zelená křivka, F1 100nM × R5 300nM – vínová křivka, F1 100nM × R5 200nM – světle modrá, F1 100nM × R5 100nM – tmavě fialová křivka, F1 100nM × R5 50nM – tmavě oranžová křivka, F1 50nM × R5 300nM – tmavě šedá křivka, F1 50nM × R5 200nM – tmavě zelená křivka, F1 50nM × R5 100nM – tyrkysová křivka, F1 50nM × R5 50nM – zelenošedá křivka. c) Výsledek elektroforetické separace amplikonů vzorků v 3 % agarózovém gelu. Všechny vzorky jsou v technických duplikátech, kromě NTC. Jamky 1-2 F1 300nM × R5 200nM; 3 NTC pro F1 300nM × R5 200nM; 4-5 F1 300nM × R5 100nM; 6 NTC pro F1 300nM × R5 100nM; 7-8 F1 300nM × R5 50nM; 9 NTC pro F1 300nM × R5 50nM; 10-11 F1 200nM × R5 200nM; 12 NTC pro F1 200nM × R5 200nM; 13-14 F1 200nM × R5 100nM; 15 NTC pro F1 200nM × R5 100nM; 16-17 F1 200nM × R5 50nM; 18 NTC pro F1 200nM × R5 50nM; 19-20 F1 200nM × R5 300nM; 21 NTC pro F1 200nM × R5 300nM; 22-23

F1 100nM × R5 300nM; **24** NTC pro F1 100nM × R5 300nM; **25-26** F1 100nM × R5 200nM; **27** NTC pro F1 100nM × R5 200nM; **28-29** F1 100nM × R5 300nM; **30** NTC pro F1 100nM × R5 300nM; **31-32** F1 100nM × R5 100nM; **33** NTC pro F1 100nM × R5 100nM; **34-35** F1 100nM × R5 50nM; **36** NTC pro F1 100nM × R5 50nM; **37-38** F1 50nM × R5 300nM; **39** NTC pro F1 50nM × R5 300nM; **40-41** F1 50nM × R5 200nM; **42** NTC pro F1 50nM × R5 200nM; **43-44** F1 50nM × R5 100nM; **45** NTC pro F1 50nM × R5 100nM; **46-47** F1 50nM × R5 50nM; **48** NTC pro F1 50nM × R5 50nM. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

V následujícím experimentu byly vybrány kombinace koncentrací F1×R5 z předešlého experimentu použity s ředící řadou plazmidu pcDNA DEST40 Hypr sŕRNA jako templát. Ředící řada plazmidu sloužila ke kontrole účinnosti primerů. Na obr.24 lze pozorovat, že kombinace koncentrací primerů F1 200nM × R5 200nM a F1 200nM × R5 100nM se nejlépe navazují na koncentraci $7,5 \times 10^6$ c/μl plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sŕRNA u ostatních koncentrací se vytvářejí dimery či nespecifické produkty, které se vytvářejí i v NTC kontrole. Poslední kombinace primerů F1 200nM × R5 50nM se nedokázala na plazmid vůbec nesyntetizovat, nedošlo k vzniku amplikonů viz. výsledky obr.24 e) a f).



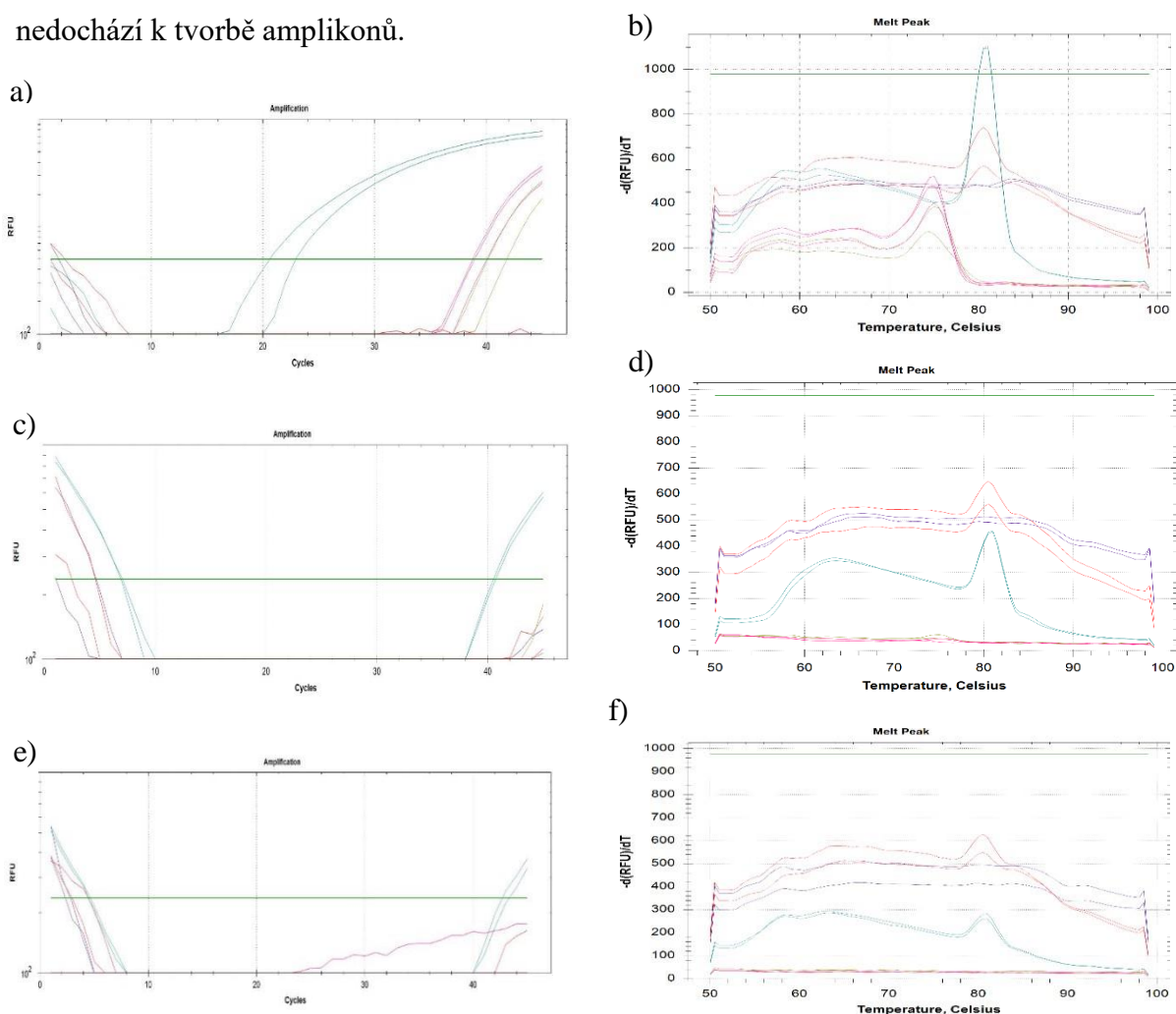


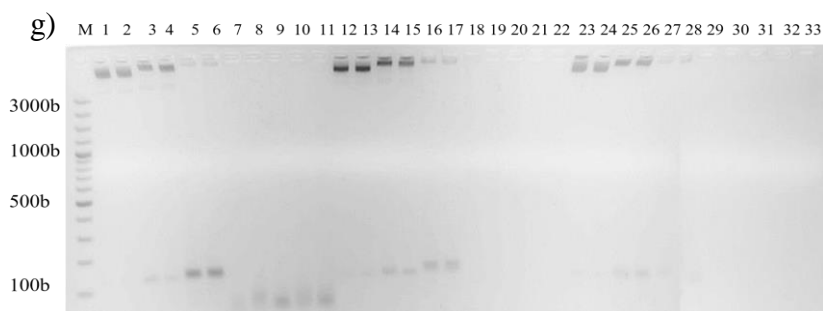
Obrázek 24.: a) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinace primerů F1 200nM × R5 200nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^6$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená), 7 500 c/μl – hnědozelená křivka, 75 c/μl – světle fialová křivka. b) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinace primerů F1 200nM × R5 200nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^6$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená), 7 500 c/μl – hnědozelená křivka, 75 c/μl – světle fialová křivka. c) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinací koncentrací primerů F1 200nM × R5 100nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^6$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená), 7 500 c/μl – hnědozelená křivka, 75 c/μl – světle fialová křivka. d) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinací koncentrací primerů F1 200nM × R5 100nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^6$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená), 7 500 c/μl – hnědozelená křivka, 75 c/μl – světle fialová křivka. e) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace vznikajících amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinací koncentrací primerů F1 200nM × R5 50nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^6$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená), 7 500 c/μl – hnědozelená křivka, 75 c/μl – světle fialová křivka. f) Graf znázorňující výsledky analýzy tání vznikajících amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinací koncentrací primerů sRNA F1 200nM × sRNA R5 50nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^6$ c/μl – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^5$ c/μl – červená křivka, $7,5 \times 10^4$ c/μl – smaragdová (tmavě zelená), 7 500 c/μl – hnědozelená křivka, 75 c/μl – světle fialová křivka. g) Výsledek elektroforetické separace amplikonů pomocí desítkové ředící řady pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA v 3 % agarózovém gelu. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. Jamky 1- 15 F1 200nM × R5 200nM, 16-30 F1 200nM × R5 100nM, 31-45 F1 200nM × sRNA R5 50nM. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: 1-2 $7,5 \times 10^6$ c/μl; 3-4

7,5×10⁵c/μl; **5-6** 7,5×10⁴c/μl; **7-8** 7 500c/μl; **9-10** 750c/μl; **11-12** 75c/μl; **13-15** NTC; **16-17** 7,5×10⁶c/μl; **18-19** 7,5×10⁵c/μl; **20-21** 7,5×10⁴c/μl; **22-23** 7 500c/μl; **24-25** 750c/μl; **26-27** 75c/μl; **28-30** NTC; **31-32** 7,5×10⁶c/μl;

33-34 $7,5 \times 10^5 \text{c}/\mu\text{l}$; **35-36** $7,5 \times 10^4 \text{c}/\mu\text{l}$; **37-38** $7\,500 \text{c}/\mu\text{l}$; **39-40** $750 \text{c}/\mu\text{l}$; **41-42** $75 \text{c}/\mu\text{l}$; **43-45** NTC. Referenčním velikostním standardem (M) byl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) gelu. Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

V následujícím experimentu byly použity stejné kombinace koncentrací primerů a stejný reakční mix jako v předešlém experimentu. Dále byly použity vyšší koncentrace plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA, nejvyšší koncentrace byla $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$ a nejnižší $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$, protože v předchozím experimentu v nižších koncentracích plazmidu vznikaly dimery či nescifické produkty a u kombinace primerů sfRNA F1 200nm \times R5 50nm nedošlo k žádné amplifikaci. Vyšší koncentrace plazmidu měla zajistit tvorbu amplikonů a tím ověřit eficienti primerů. Na obr.25a), b) a g) lze pozorovat, že napojení kombinace koncentrací primerů F1 200nM \times R5 200nM nejlépe nasedají na koncentraci pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$ v dalších koncentracích se převážně vytvářejí dimery a nescifické produkty. Na obr.25c), d), e), f) a g) lze pozorovat, že kombinace koncentrací primerů F1 200nM \times R5 100nM a F1 200nM \times R5 50nM se nemají takřka na co syntetizovat a nedochází k tvorbě amplikonů.





Obrázek 25.: a) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinace primerů F1 200nM × R5 200nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$ – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$ – červená křivka, $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$ – smaragdová (tmavě zelená), $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$ – hnědozelená křivka. b) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinace primerů F1 200nM × R5 200nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$ – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$ – červená křivka, $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$ – smaragdová (tmavě zelená), $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$ – hnědozelená křivka c) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinaci koncentrací primerů F1 200nM × R5 100nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$ – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$ – červená křivka, $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$ – smaragdová (tmavě zelená), $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$ – hnědozelená křivka d) Graf znázorňující výsledky analýzy tání amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinaci koncentrací primerů sRNA F1 200nM × R5 100nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$ – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$ – červená křivka, $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$ – smaragdová (tmavě zelená), $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$ – hnědozelená křivka e) Graf znázorňující výsledky analýzy amplifikace vznikajících amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinaci koncentrací primerů sRNA F1 200nM × sRNA R5 50nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$ – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$ – červená křivka, $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$ – smaragdová (tmavě zelená), $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$ – hnědozelená křivka f) Graf znázorňující výsledky tání vznikajících amplikonů qRT-PCR v ředící řadě pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) v rozsahu 50 °C až 99 °C a za použití kombinaci koncentrací primerů sRNA F1 200nM × sRNA R5 50nM. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. NTC – růžová křivka. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$ – tmavě modrá křivka, $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$ – červená křivka, $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$ – smaragdová (tmavě zelená), $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$ – hnědozelená křivka g) Výsledek elektroforetické separace amplikonů pomocí desítkové ředící řady pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA v 3 % agarózovém gelu. Všechny vzorky byly v technických duplikátech, kromě NTC. Jamky **1-11** F1 200nM × R5 200nM, **12-22** F1 200nM × R5 100nM, **23-33** F1 200nM × R5 50nM. Ředící řada plazmidu pcDNA DEST TBEV Hypr sRNA je uvedena od nejnižšího po nejvyšší ředění: **1-2** $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$; **3-4** $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$; **5-6** $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$; **7-8** $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$; **9-11** NTC; **12-13** $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$; **14-15** $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$; **16-17** $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$; **18-19** $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$; **20-22** NTC; **23-24** $7,5 \times 10^9 \text{c}/\mu\text{l}$; **25-26** $7,5 \times 10^8 \text{c}/\mu\text{l}$; **27-28** $7,5 \times 10^7 \text{c}/\mu\text{l}$; **29-30** $7,5 \times 10^6 \text{c}/\mu\text{l}$; **31-33** 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) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl

vyvolán a zaznamenan v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

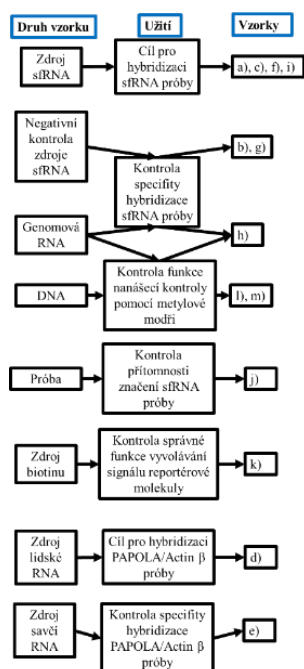
4.2 Optimalizace metody dot blot pro detekci TBEV sfRNA

Informací o struktuře a funkci sfRNA flavivirů přenášených klíšťaty a její roli v patogenezi vy hostitelských buňkách je velmi málo. Detailní popis sfRNA lze nalézt ve studiích zabývajících komáry přenášených flavivirů (DENV, WNV a zika virus). Tato bakalářská práce se zaměřuje na klíšťaty přenášeným flavivirem 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 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 sekvenci sfRNA. Tyto vzorky byly použity jako cíle pro hybridizaci DNA próby získané PCR amplifikací úseku sfRNA z plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr 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 transkribovanou z téhož plazmidu. Dalším cílem testované hybridizační próby pak byl použit 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 PAPOLA a actin β gen. Schéma v následujícím obr.26. znázorňuje seznam vzorků a jejich užití v metodě dot-blot. V tabulce Tab.XVIII je popsán původ použitých vzorků a jejich zástupný symbol používaný v této práci V tabulkách XIX – XXVI jsou uvedeny roztoky a jejich složení pro jednotlivé kroky metody dot-blot vč. jejich zástupných symbolů použitých při popisu jednotlivých experimentů provedených v rámci optimalizace metody dot blot v této práci.



Obrázek 26.: Schéma přehledněji znázorňující druhy použitých vzorků uvedených v tabulce XVIII., jejich úlohu během optimalizace metody dot-blot a jejich příslušné symboly v podobě písmen abecedy použité pro popis jednotlivých experimentů provedených v rámci optimalizace metody dot-blot

Tab.XVIII: Seznam a popis použitých vzorků v metodě dot-blot

Symbol	Popis vzorku	Použitá zkratka v popisu výsledků
a)	RNA z buněčné linie DAOY HTB 186 transfekované sfRNA	Transfek. sfRNA
b)	NK (RNA z buněčné linie DAOY HTB 186 transfekované MBP)	NK
c)	RNA z infikované buněčné linie DAOY HTB 186 TBEV	Infikovaná sfRNA
d)	RNA z buněčné linie A549	RNA A549
e)	RNA z buněčné linie PMJ2-R	RNA PMJ2-R
f)	Transkribovaná sfRNA	Transkrib. sfRNA
g)	Transkribovaná MBP	Transkrib. MBP
h)	RNA izolovaná z truchny obecné	RNA truchna
i)	PcMV T-7-Hypr-Rluc T-7 NEBulider DH5 α	PcMV
j)	Próba	Próba
k)	Konjugát lektinu GSL-1 s biotinem (Griffonia Simplicifolia Lectin I), pozitivní kontrola detekce signálu reportérové molekuly	GSL-1
l)	DNA z lidské buněčné linie A549	DNA
m)	pUC19 Vector (New England BioLabs)	pUC

Tab XIX: Roztok pro promytí membrány po nanesení vzorků

Symbol	Roztok použitý pro promytí 1
a)	2 \times SSC

Tab.XX: Roztoky použité pro prehybridizaci.

Prehybridizace	
Symbol	Použité prehybridizační roztoky
a)	100mM NaCl, 1 % SDS, 50 % formamid, 10% dextran, salmon sperm (Kumar J.S. <i>et.al.</i> , 2013)
b)	5×SSC, 5×denhardt, 50 % formamid, 1 % SDS, 100µg/µl salmon sperm (Brown T. a Mackey K., 2001)
c)	SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich)

Tab.XXI: Hybridizační roztoky a množství použité próby.

Hybridizace	
Symbol	Použité hybridizační roztoky
a)	1mM EDTA, 5 % SDS, salmon sperm, próba (Kumar J.S. <i>et.al.</i> , 2013)
b)	5×SSC, 5×denhardt, 50 % formamid 1 % SDS, 100µg/µl salmon sperm (Brown T. a Mackey K., 2001)
c)	SigmaPerfect/Hyb Hybridization Buffer (Sigma-Aldrich)
Přidané množství próby do hybridizačního roztoku	
d)	50 ng
e)	100 ng
f)	200 ng

Tab.XXII: Promývací roztoky po hybridizaci.

Symbol	Roztoky použité při promytí 2
a)	2×SSC, 1 % SDS 0,2×SSC, 0,1 % SDS
b)	2×SSC, 1 % SDS

Tab.XXIII: Blokovací roztoky.

Symbol	Použité blokovací roztoky
a)	3 % BSA, 50mM Tris-HCl (pH=7,5), 150mM NaOH
b)	3 % BSA, 1×TBS, 0,1 % Tween

Tab XXIV: Roztoky pro navázání konjugátu a druhy a poměry přidaného konjugátu do roztoku.

Symbol	Použité roztoky pro navázání konjugátu
a)	0,1M NaCl, 0,05% Triton X-100, 1M TRIS (pH=7,5), 3 % BSA, 2mM MgCl ₂
b)	3 % BSA, 1×TBS, 0,1 % Tween 20
	Druhy konjugátu a jejich ředění
c)	Streptavidin-HRP Concentrated (100×) (1/3000)
d)	Streptavidin, Alkaline Phosphatase (2×) (1/1000)
e)	Streptavidin-HRP Concentrated (100×) (1/1000)
f)	Streptavidin-HRP Concentrated (100×) (1/5000)

Tab. XXV: Promývací roztoky po navázání konjugátu.

Symbol	Roztoky použité při promytí 3
a)	0,1M NaCl, 0,05% TRITON, 1M TRIS (pH=7,5), 3 % BSA, 2mM MgCl ₂
	0,1 M TRIS/HCl (pH=9,5), 0,1M NaCl, 50mM MgCl ₂ ,
b)	1×TBS, 0,1 % Tween 20
c)	1×TBS, 0,1 % Tween 20
	0,2×SSC, 1 % SDS

Tab. XXVI: Promývací roztok pro odmytí chemiluminiscenčního substrátu

Symbol	Roztoky použité při promytí 4
a)	1×TBS + 0,1 % Tween 20

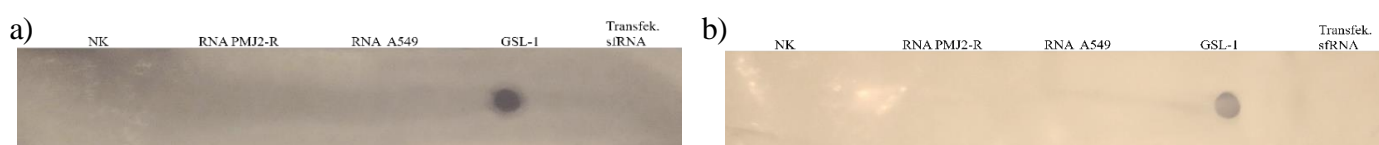
Tabulky XXVII – XXXI znázorňují jednotlivé experimenty, kde byly použity různé kombinace použitých chemikálií a reakčních podmínek

V experimentu 8. byla provedena detekce nanášecí kontroly pomocí metylenové modři po vyvolání signálu reportérové molekuly na membráně. Od experimentu 9. až do posledního experimentu byla prováděna nanášecí kontrola pomocí metylenové modři po hybridizaci a vždy po vyvolání signálu reportérové molekuly. Pro ověření přítomnosti nukleové kyseliny na membráně detekcí nanášecí kontroly metylenovou modří ihned po hybridizaci byla RNA z buněčné linie A549 či RNA z infikované buněčné linie DAYO HTB 186 s virem TBEV nanesena na membránu v duplikátu.

Tab. XXVII: Rozpisy jednotlivých kroků experimentu 1., 2. a 3. chronologicky za sebou. V tabulce jsou uvedeny všechny proměnné, které byly v jednotlivých experimentech upravovány, vč. inkubačních dob a teplot jednotlivých kroků, složení pufrů nebo způsobů detekce reportérové molekuly.

	1.experiment			2.experiment			3.experiment		
Materiál/chemikálie									
Použité vzorky	a), b), d), e)			a), b), d), e)			a), b), d), e), k)		
Množství RNA [ng]	500			500			500		
Množství GSL-1	NA			NA			5 000		
Typ membrány	Nylon			Nylon			Nylon a nitrocelulóza		
Předvlhčení membrány	NA			DEPC H ₂ O			NA		
Použitá próba	PAPOLA			PAPOLA			PAPOLA		
Množství próby [ng]	NA			NA			100		
Reakční podmínky									
	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]
Promytí 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Prehybridizace	a)	42	60	b)	42	60	b)	42	60
Hybridizace	a), d)	42	300	b), d)	42	O/N	b), d)	42	O/N
Promytí 2	a)	RT/ 50	15/15	a)	RT/50	15/15	a)	RT/ 50	15/15
Blokování	a)	RT	10	b)	RT	30	b)	RT	30
Navázání konjugátu	a), c)	RT	60	b), d)	RT	60	b), d)	RT	60
Promytí 3	a)	RT	2×7	b)	RT	3×10	b)	RT	3×10
Promytí 4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA – nepřítomno/nepoužito; RT – pokojová teplota; O/N – přes noc



Obrázek 27.: Zobrazení signálu reportérové molekuly AP na membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí BCIP a NBT. a) nylonová membrána, b) nitrocelulózoová membrána

Experiment 1.- Metoda dot-blot byla provedena dle článku Kumar J. S. *et.al.*, 2013 s modifikacemi složení promývacích roztoků po hybridizaci. Denaturace RNA při 70°C 5 min. Výsledky nebyly fotograficky zaznamenány z důvodu absence jakéhokoliv signálu po vyvolání reportérové molekuly.

Experiment 2.- Fixace vzorků UV zářením, denaturace próby při 95°C po dobu 5 minut a RNA vzorků při 70°C po dobu 5 min. Fixace a denaturace vzorků a próby poté probíhala ve

všech následujících experimentech. Z důvodu absence hybridizačního signálu nejsou výsledky dokumentovány.

Experiment 3. – V tomto experimentu byla vyzkoušena nitrocelulózová membrána a byla přidána pozitivní kontrola detekce reportérové molekuly konjugát lektinu GSL-1 s biotinem viz. obr.27.

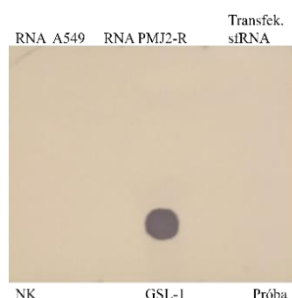
Reportérové molekuly na membránách experimentů 1., 2. a 3. byly vyvolávány kolorimetricky – u experimentů 1. a 2. nebyl detekován žádný signál a u experimentu 3. byla detekována pouze pozitivní kontrola protokolu pro vyvolávání reportérové molekuly GSL-1.

V experimentu 2. došlo ke změně pre/hybridizačního pufru a byl použit streptavidin-AP reportérový systém místo streptavidin-HRP, který byl použit v experimentu 1. Použitím jiného pre/hybridizačního pufru detekce reportérové molekuly nebyla úspěšná. Žádný detekovatelný signál v experimentu 2. mohl být způsoben lidskou chybou. V experimentu 3. byl použit stejný postup jako v experimentu 2. s výjimkou přidání reportérové molekuly konjugát lektinu GSL-1 s biotinem, který se podařilo detekovat pomocí kolorimetrické detekce.

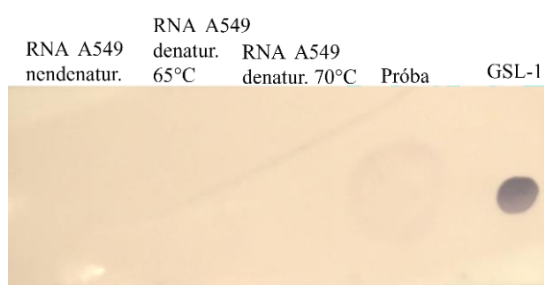
Tab. XXVIII: Rozpis jednotlivých kroků experimentu 4., 5., a 6. chronologicky za sebou. V tabulce jsou uvedeny všechny proměnné, které byly v jednotlivých experimentech upravovány, vč. inkubačních dob a teplot jednotlivých kroků, složení pufrů nebo způsobů detekce reportérové molekuly.

	4.experiment			5.experiment			6.experiment		
Materiál/chemikálie									
Použité vzorky	a), b), d), e), j), k)			d), j), k)			a), b), d), e), j), k), l)		
Množství RNA [ng]	500			500			500		
Množství GSL-1	2000			2000			2000		
Typ membrány	Nylon			Nylon			Nylon		
Předvlhčení membrány	NA			NA			1×TBS, 0,1 % Tween 20 při RT 10 min		
Použitá próba	PAPOLA			PAPOLA			PAPOLA a actin β		
Množství próby [ng]	70			100			200		
Reakční podmínky									
	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]
Promytí 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Prehybridizace	b)	42	60	b)	42	60	c)	42	60
Hybridizace	b), e)	42	O/N	b), f)	42	O/N	c), f)	42	O/N
Promytí 2	a)	RT/50	15/15	a)	RT/50	15/15	a)	RT/ 42	15/15
Blokování	b)	RT	30	b)	RT	30	b)	RT	30
Navázání konjugátu	b), d)	RT	60	b), d)	RT	60	b), d)	RT	60
Promytí 3	b)	RT	3×10	b)	RT	3×10	b)	RT	3×10
Promytí 4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

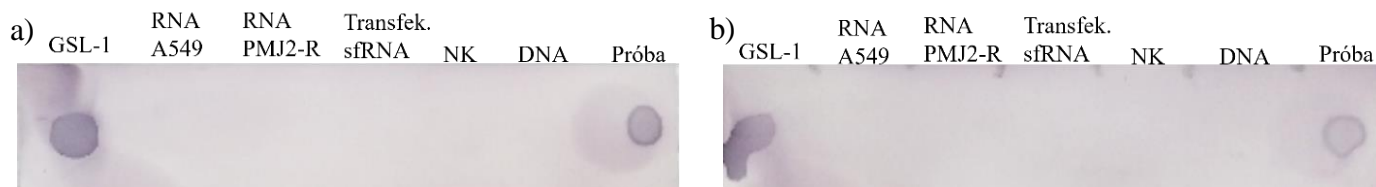
NA – nepřítomno/nepoužito; RT – pokojová teplota; O/N – přes noc



Obrázek 28.: Zobrazení signálu reportérové molekuly AP na membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí BCIP/NBT.



Obrázek 29.: Zobrazení signálu reportérové molekuly AP na membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí BCIP/NBT.



Obrázek 30.: a) Zobrazení signálu reportérové molekuly AP na membráně vyvolaného kolorimetrickou detekci pomocí BCIP/NBT při detekci transkriptů PAPOLA genu. b) Zobrazení signálu reportérové molekuly AP na membráně vyvolaného kolorimetrickou detekci pomocí BCIP/NBT při detekci transkriptů actin β genu.

Doplňující komentáře a hodnocení k experimentům:

Experiment 4. - Z důvodu absence signálu u vzorků dokazujících úspěšnou hybridizaci próby v 3. experimentu bylo v dalším experimentu (experiment č.4) použito dvojnásobné množství próby **Doplňující komentáře a hodnocení k experimentům:**

Experiment 4. - Z důvodu absence signálu u vzorků dokazujících úspěšnou hybridizaci próby v 3. experimentu bylo v dalším experimentu (experiment č.4) použito dvojnásobné množství próby viz. obr.28.

Experiment 5. – V tomto experimentu bylo dále navýšeno množství próby a zároveň byla provedena zkouška denaturace RNA izolované z buněčné linie A549. viz obr.29.

Experiment 6. – Membrána byla předvlhčena v $1 \times$ TBS, 0,1 % Tween 20 při RT po dobu 10 min a byla snížena teplota promývání po hybridizaci. Dále byla přidána DNA jako kontrola detekce transkriptu PAPOLA genu v DNA vzorku, která byla denaturována při 95°C po době 5 min viz. obr.30. Z důvodu absence jakéhokoliv hybridizačního signálu v dosavadních experimentech byla v následujících experimentech nahrazena sonda pro detekci transkriptů PAPOLA genu sondou pro detekci transkriptů actinu β genu, běžněji používaného jako interní kontrola studií expresních profilů nebo hybridizačních technik.

Reportérové molekuly na membránách experimentů 4., 5. a 6. byly vyvolávány kolorimetricky. V experimentu 4. byla detekována pozitivní kontrola reportérové molekuly (GSL-1). V experimentu 5. byla detekována próba společně s pozitivní kontrolou GSL-1. V experimentu 6. byla detekována próba společně s pozitivní kontrolou GSL-1 pro oba detekované transkripty genů (PAPOLA a actin β).

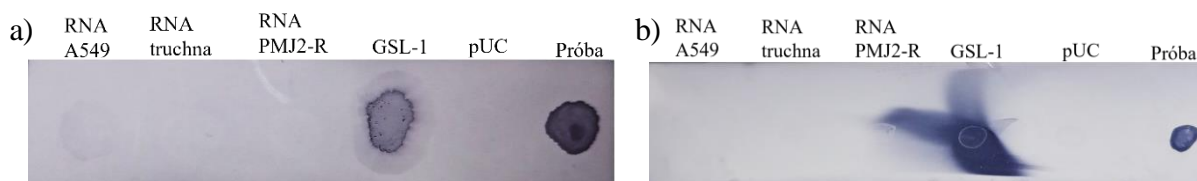
V experimentu 4. bylo přidáno vyšší množství próby na membránu a zkrácením doby hybridizace ani tato změna nevedla k detekci specifického hybridizačního signálu. V experimentu 5. bylo nadále zvýšeno množství próby na membránu, která následně použitím stejného postupu jako v experimentu 4. byla kolorimetricky detekována. V experimentu 6. byl

následně použit jiný pre/hybridizační roztok s jehož pomocí detekovatelný signál próby byl intenzivnější.

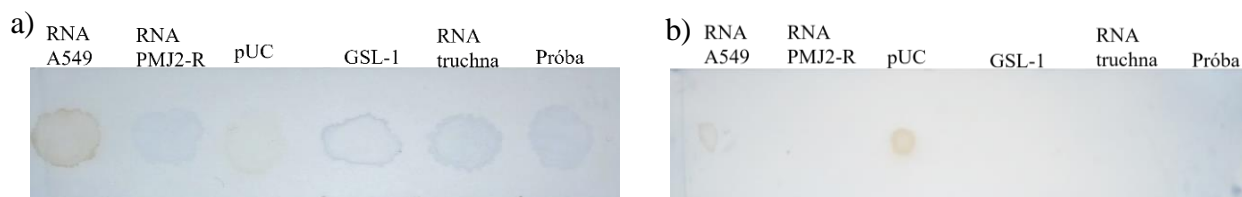
Tab. XXIX: Rozpisy jednotlivých kroků experimentu 7., 8. a 9. chronologicky za sebou. V tabulce jsou uvedeny všechny proměnné, které byly v jednotlivých experimentech upravovány, vč. inkubačních dob a teplot jednotlivých kroků, složení pufrů nebo způsobů detekce reportérové molekuly.

	7.experiment			8.experiment			9.experiment		
Materiál/chemikálie									
Použité vzorky	d), e), h), j), k), m)			d), e), h), j), k), m)			d), e), h), j), k), m)		
Množství RNA [ng]	500			500			500		
Množství GSL-1	2000			1000			100		
Typ membrány	Nylon a PVDF			Nylon a PVDF			Nylon a nitrocelulóza		
Předvlhčení membrány	Nylon: DEPC H ₂ O, PVDF: 96 % etanol, 20 % etanol s 2×SSC			NA			DEPC H ₂ O		
Použitá próba	actin β			actin β			actin β		
Množství próby [ng]	200			60			60		
Reakční podmínky									
	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]
Promytí 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	a)	RT	10
Prehybridizace	c)	42	60	c)	42	60	c)	42	60
Hybridizace	c), f)	42	150	c), f)	42	150	c), f)	42	O/N
Promytí 2	b)	RT/42	15/15	b)	RT/ 42	15/15	b)	RT/42	15/15
Blokování	b)	RT	30	b)	RT	30	b)	RT	30
Navázání konjugátu	b), d)	RT	60	b), e)	RT	60	b), e)	RT	60
Promytí 3	b)	RT	3×10	b)	RT	3×10	b)	RT	3×10
Promytí 4	NA	NA	NA	a)	RT	3×10	NA	NA	NA

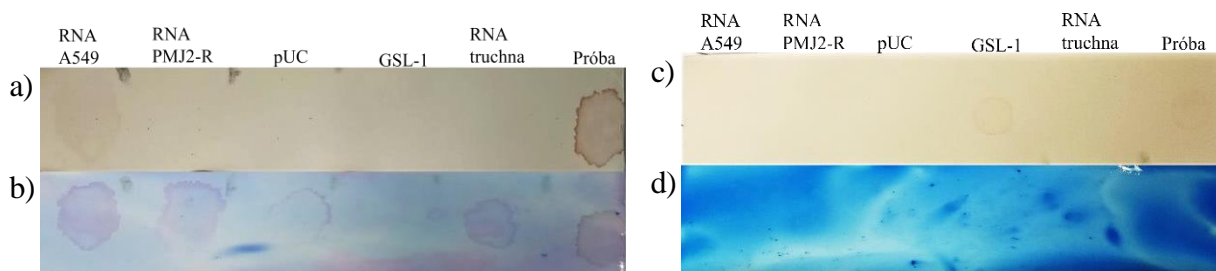
NA – nepřítomno/nepoužito; RT – pokojová teplota; O/N – přes noc



Obrázek 31.: a) Zobrazení signálu reportérové molekuly AP na nylonové membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí BCIP/NBT. b) Zobrazení signálu reportérové molekuly AP na PVDF membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí BCIP/ NBT.



Obrázek 32.: a) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na nylonové membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekcí (pomocí lumilolu), kolorimetrickou detekcí (pomocí DAB) a nanášecí kontrolou (pomocí metylenové modři). b) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na PVDF membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekcí (pomocí lumilolu), kolorimetrickou detekcí (pomocí DAB) a nanášecí kontrolou (pomocí metylenové modři).



Obrázek 33.: a) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na nylonové membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí DAB b) Zobrazení signálu RNA na nylonové membráně vyvolaného nanášecí kontrolou pomocí metylenové modři c) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na nitrocelulóзовé membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí DAB. d) Zobrazení signálu RNA na nitrocelulóзовé membráně vyvolaného nanášecí kontrolou pomocí metylenové modři.

Doplňující komentáře a hodnocení k experimentům:

Experiment 7. – Membrány byly předvlhčeny v roztocích popsanych v Tab. XXVII. Byla porovnávana nylonová s PVDF membránou viz. výsledky na obr.31. Na obr.31. lze vidět, že na nylonové membráně se výsledný signál rozpíjí, zatímco na PVDF membráně je výsledný signál ve formě malých puntíků, z nichž signál difundoval dále do okolí v případě příliš intenzivního signálu. Z tohoto důvodu bylo v následujícím experimentu použito menší množství vzorků GSL-1 a próby. Reportérové molekuly na obou membránách (nylon, PVDF) experimentu 7. byly vyvolávány kolorimetricky – byla detekována pozitivní kontrola detekce reportérové molekuly GSL-1 a próba.

Experiment 8. – V tomto experimentu byly použity stejné membrány a vzorky jako v předchozím experimentu. Došlo k přidání menšího množství GSL-1 a próby. Dále byla provedena chemiluminiscenční a kolorimetrická detekce. Po vyvolání reportérové molekuly byla provedena nanášecí kontrola viz. výsledky na obr. 32. Reportérové molekuly na obou membránách (nylon, PVDF) experimentu 8. byly vyvolávány chemiluminiscenčně – byly detekovány signály RNA A549, RNA PMJ2-R, GSL-1 a próby; Kolorimetricky – byly detekovány GSL-1 a próby pro obě membrány. Nanášecí kontrola po vyvolání signálu

reportérové molekuly – došlo k detekci hybridizačního signálu ve všech vzorcích RNA nanesených na membráně. Intenzita signálu byla nižší na PVDF membráně v porovnání s nylonovou membránou.

Experiment 9. – V tomto experimentu byla porovnáována nylonová s nitrocelulózovou membránou, jež byly po nanesení vzorků promyty dle Tab. XXVII. Dále bylo sníženo množství próby v hybridizačním roztoku a provedena Nanášecí kontrola po hybridizaci a po vyvolání signálu reportérové molekuly viz výsledky na obr.33. Reportérové molekuly na obou membránách (nylon, nitrocelulóza) experimentu 9. byly vyvolávány kolorimetricky – byly detekovány signály RNA A549 a GSL-1. Nanášecí kontrola po hybridizaci – byl detekovaný signál RNA A549 pro obě membrány (nylon, nitrocelulóza). Nanášecí kontrola po vyvolání reportérové molekuly – byly detekovány všechny RNA na nylonové membráně a nitrocelulózové membráně s velmi nízkou intenzitou hybridizačního signálu

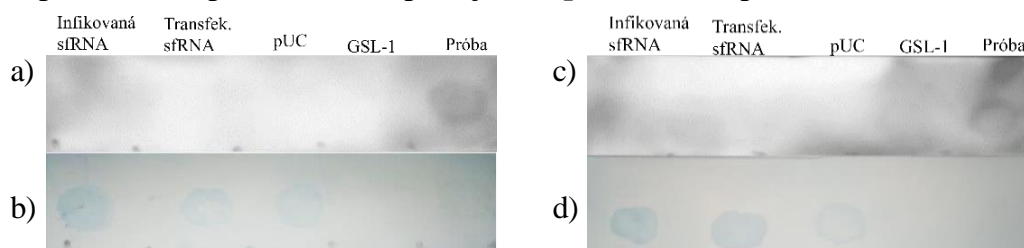
V experimentu 7. byla snížena teplota promývání po hybridizaci na 42 °C a snížena doba hybridizace na 150 minut, těmito změnami byla zvýšena intenzita signálu GSL-1 a próby na nylonové a PVDF membráně. V experimentu 8. bylo pouze sníženo množství přidaného GSL-1 a próby na membránu (nylonová a PVDF) a byl detekován streptavidin-HRP reportérový systém. Použitím streptavidin-HRP reportérový systém a snížením množstvím GSL-1 a próby na membránu pomohlo k detekci hybridizačního signálu v RNA A549. Po vyvolání reportérové molekuly v experimentu 8. byla provedena nanášecí kontrola z důvodu obav o degradaci RNA vzorků a její možné odmývání během metody dot-blot. Během experimentu 7. a 8. bylo na PVDF membráně pozorováno rozlítí vysoce intenzivního signálu nebo naopak malá intenzita během kolorimetrické detekci či nanášecí kontrole. Ze zmíněných důvodů byla k dalším optimalizacím vybrána nylonová membrána.

V experimentu 9. byly použity stejné reakční podmínky jako v experimentu 8. s výjimkou doby hybridizace, která byla přes noc a použitím nylonové a nitrocelulózové membrány. Hybridizací přes noc intenzita signálu zůstala stejná. Z důvodu jasnějších výsledků na nylonové membráně byla pak použita v následujících experimentech.

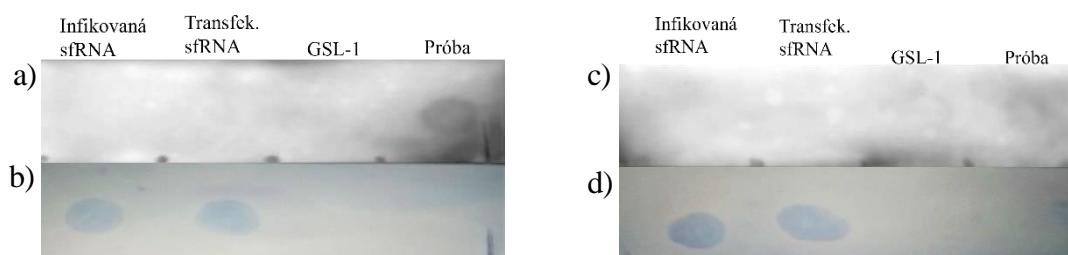
Tab. XXX: Rozpisy jednotlivých kroků experimentu 10., 11. a 12. chronologicky za sebou. V tabulce jsou uvedeny všechny proměnné, které byly v jednotlivých experimentech upravovány, vč. Inkubačních dob a teplot jednotlivých kroků, složení pufrů nebo způsobů detekce reportérové molekuly.

	10.experiment			11.experiment			12.experiment		
Materiál/chemikálie									
Použité vzorky	a), c), j), k), m)			a), c), j), k)			a), c), j), k)		
Množství RNA [ng]	500			500			500		
Množství GSL-1	10			20			20		
Typ membrány	Nylon			Nylon			Nylon		
Předvlhčení membrány	DEPC H ₂ O			DEPC H ₂ O			DEPC H ₂ O		
Použitá próba	sfRNA, actin β			sfRNA, actin β			PAPOLA, sfRNA, actin β		
Množství próby [ng]	50			25			25		
Reakční podmínky									
	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]
Promytí 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Prehybridizace	b)	42	60	b)	42	60	b)	42	30
Hybridizace	c), f)	42	150	c), f)	42	150	c), f)	42	150
Promytí 2	b)	RT/ 42	15/15	b)	RT/42	15/15	b)	RT/42	15/15
Blokování	b)	RT	30	b)	RT	30	b)	RT	30
Navázání konjugátu	b), e)	RT	60	b), c)	RT	60	b), f)	RT	60
Promytí 3	b)	RT	5×10	b)	RT	5×10	c)	RT	2×10/ 2×10
Promytí 4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

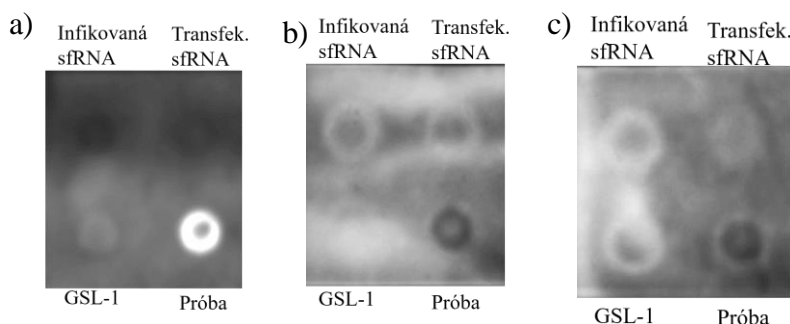
NA – nepřítomno/nepoužito; RT – pokojová teplota; O/N – přes noc



Obrázek 34.: a) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekci pomocí luminolu při s detekci transkriptů sfRNA. b) Zobrazení signálu RNA na membráně vyvolaného nanášení kontrolou pomocí metylenové modří při detekci transkriptů sfRNA. c) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekci pomocí luminolu pro detekci transkriptů actin β genu. d) Zobrazení signálu RNA na membráně vyvolaného nanášení kontrolou pomocí metylenové modří při detekci transkriptů actin β genu.



Obrázek 35.: a) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekci pomocí luminolu při detekci transkriptů sfRNA. b) Zobrazení signálu RNA na membráně vyvolaného nanášečí kontrolou pomocí metylenové modří při detekci transkriptů sfRNA. c) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekci pomocí luminolu při detekci transkriptů actin β genu. d) Zobrazení signálu RNA na membráně vyvolaného nanášečí kontrolou pomocí metylenové modří při detekci transkriptů actin β genu.



Obrázek 36.: a) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekci pomocí luminolu při detekci transkriptů PAPOLA genu. b) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekci pomocí luminolu při detekci transkriptů sfRNA. c) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného chemiluminiscenční detekci pomocí luminolu při detekci transkriptů actin β genu.

Experiment 10. – Po úspěšné kolorimetrické detekci transkriptů genu actin β ve vzorku RNA A549 byla provedena detekce sfRNA sekvence, kde gen actin β sloužil jako kontrola metody dot-blot viz obr.34. Reportérové molekuly na membránách experimentu 10. byly vyvolávány chemiluminiscenčně – byl detekován hybridizační signál próby pro detekci transkriptů sfRNA i interní kontroly actin β gen). Nanášečí kontrola po hybridizaci a po vyvolání signálu reportérové molekuly – byly detekovány signály transfekované sfRNA a infikované sfRNA a plazmidu pUC19 na obou membránách.

Experiment 11. – Po neúspěšné chemiluminiscenční detekci transkriptů sfRNA a genu actin β v transfekované sfRNA bylo v tomto experimentu zmenšené množství konjugátu v roztoku z 1/1000 na 1/3000 viz. obr. 35. Reportérové molekuly na membránách experimentu 11. byly vyvolávány chemiluminiscenčně – byla detekována pozitivní kontrola detekce reportérové molekuly GSL-1 a hybridizační signál próby pro obě detekované sekvence (sfRNA a actin β

gen). Nanášecí kontrola po hybridizaci a po vyvolání reportérové molekuly– byly detekovány signály transfekované a infikované sfRNA na obou membránách.

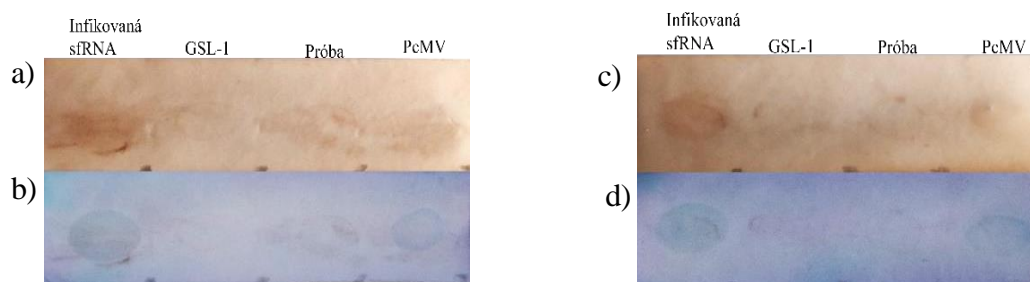
Experiment 12. – Po neúspěšné chemiluminiscenční detekci transkriptů sfRNA a genu actin β v transfekované sfRNA bylo v tomto experimentu dále sníženo množství konjugátu z 1/3000 na 1/5000 v roztoku viz výsledky na obr.36. Dále jako kontrola byla přidána detekce PAPOLA genu. Reportérové molekuly na membránách experimentu 12. byly vyvolávány chemiluminiscenčně – na membráně po hybridizaci se sondou interní kontroly proti transkriptům PAPOLA genu byl detekován hybridizační signál ve vzorcích infikovaná a transfekovaná sfRNA a GSL-1. Na membránách po hybridizaci se sondami pro sfRNA a actin β byly detekovány signály ze všech použitých vzorcích. Nanášecí kontrola po hybridizaci a po vyvolání signálu reportérové molekuly– byly detekovány signály transfekované a infikované sfRNA na všech membránách. Výsledek detekce nanášecí kontroly není přiložen.

V experimentu 10. bylo znovu snížena doba hybridizace na 150 minut zbylý postup byl stejný jako v experimentu 9. V experimentu 11. bylo použito vyšší množství konjugátu v roztoku, což vedlo k intenzivnějším signálům. V experimentu 12. bylo použito vyšší množství konjugátu v roztoku, což vedlo k intenzivnějším signálům.

Tab. XXXI: Rozpisy jednotlivých kroků experimentu 13., 14., a 15. chronologicky za sebou. V tabulce jsou uvedeny všechny proměnné, které byly v jednotlivých experimentech upravovány, vč. Inkubačních dob a teplot jednotlivých kroků, složení pufrů nebo způsobů detekce reportérové molekuly.

	13.experiment			14.experiment			15.experiment		
Materiál/chemikálie									
Použité vzorky	c), i), j), k)			c), j), k)			a), b), f), g), j), k)		
Množství RNA [ng]	15 000			15 000; 10 000; 5 000			22 000		
Množství GSL-1	20			20			20		
Typ membrány	Nylon			Nylon			Nylon		
Předvlhčení membrány	DEPC H ₂ O			DEPC H ₂ O			DEPC H ₂ O		
Použitá próba	sfRNA, actin β			sfRNA, actin β			sfRNA, actin β		
Množství próby [ng]	25			5; 15; 25			25		
Reakční podmínky									
	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]	Roztok	Teplota [°]	Čas [min]
Promytí 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Prehybridizace	b)	42	30	b)	42	30	b)	42	30
Hybridizace	c), f)	42	150	c), f)	42	150	b), f)	42	150
Promytí 2	b)	RT/42	15/15	b)	RT/42	15/15	b)	RT/42	15/15
Blokování	b)	RT	30	b)	RT	30	b)	RT	30
Navázání konjugátu	b), c)	RT	60	b), f)	RT	60	b), f)	RT	60
Promytí 3	b)	RT	6×5 a 1×10	b)	RT	6×5 a 1×10	c)	RT	4×5 a 1×10
Promytí 4	a)	RT	3×10	a)	RT	3×10	a)	RT	3×10

NA – nepřítomno/nepoužito; RT – pokojová teplota; O/N – přes noc



Obrázek 37.: a) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí DAB při detekci transkriptů sfRNA. b) Zobrazení signálu RNA na membráně vyvolaného nanášečí kontrolou pomocí metylenové modří při detekci transkriptů sfRNA. c) Zobrazení signálu reportérové molekuly HRP na membráně vyvolaného kolorimetrickou detekcí pomocí DAB při detekci transkriptu genu actin β. d) Zobrazení signálu RNA na membráně vyvolaného nanášečí kontrolou pomocí metylenové modří při detekci transkriptu genu actin β.

po vyvolání reportérové molekuly – byly detekovány hybridizační signály ve vzorcích infikované sfRNA a plazmidu PcMV na obou membránách.

Experiment 14. – Po úspěšné kolorimetrické detekci sfRNA ve vzorcích infikované sfRNA pomocí kolorimetrie bylo dále v tomto experimentu otestováno množství infikované sfRNA (15 µg, 10 µg a 5 µg) a próby (5 ng, 15ng, 25ng) na membránách viz. obr.38. Reportérové molekuly na membránách experimentu 14. byly vyvolávány chemiluminiscenčně – byla detekována infikovaná sfRNA v množství 15 µg a 10 µg a próba v množství 15ng a 25ng na obou membránách (sfRNA a actin β). Dále byly vyvolávány kolorimetricky – byla detekována pozitivní kontrola GSL-1 a próba na obou membránách (po hybridizaci s próbami proti sfRNA i actin β). Nanášecí kontrola po hybridizaci a po vyvolání reportérové molekuly – byla detekována infikovaná sfRNA ve všech množstvích na obou membránách (sfRNA a actin β).

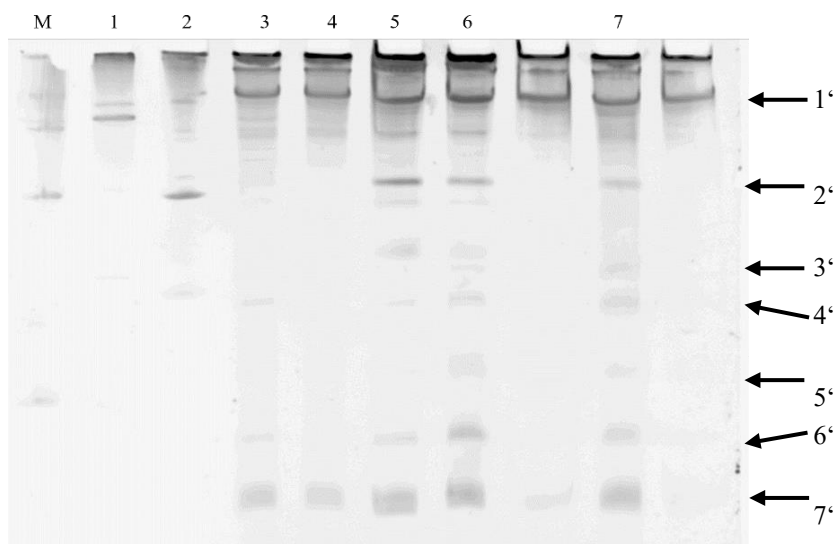
Experiment 15. – V tomto experimentu bylo navýšené množství transfekované sfRNA na 22 µg. Dále byly použity vzorky transfekované a transkribované MBP jako negativní kontroly. K pozitivním kontrolám byla přidána transkribovaná sfRNA viz. výsledky na obr.39. Reportérové molekuly na membránách experimentu 15. byly vyvolávány chemiluminiscenčně – byly detekované všechny vzorky na obou membránách (sfRNA a actin β) i negativní kontroly, signály vzorků GSL-1 a próby byly velmi výrazné. Dále byly vyvolávány kolorimetricky – Pro sfRNA sekvenci bylo možné detekovat transfekovanou a transkribovanou sfRNA a GSL-1. Dále bylo detekované transkribované MBP (negativní kontrola a značí nespecifický signál tvořený během hybridizace) a próba, které byly méně výrazné. Pro actin β gen bylo detekováno GSL-1, próba a transkribovaná sfRNA. Signál transkribované MBP byl méně patrný (značí nespecifický signál tvořený během hybridizace). Nanášecí kontrola po hybridizaci a po vyvolání reportérové molekuly – byly detekovány všechny RNA vzorky na obou membránách (sfRNA a actin β).

V experimentu 13. bylo sníženo množství konjugátu v roztoku oproti experimentu 12 a tím byl zajištěn intenzivnější signál vzorku infikovaná sfRNA. V experimentu 14. byl proveden stejný postup jako v experimentu 13. a byl proveden test množství vzorku infikované sfRNA a próby na membráně, kde stejným postupem byl detekován hybridizační signál próby a signály ve vzorcích infikované sfRNA. V experimentu 15. byl proveden stejný postup akorát byly přidány negativní kontroly, které byly detekovatelné (sfRNA próbu a próbu actinu β).

4.3 Northern blot

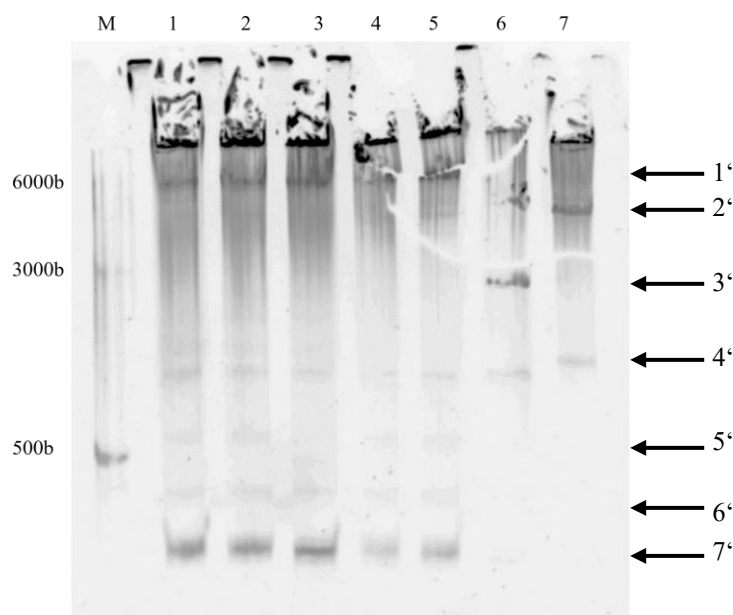
Cílem metody Northern blot bylo identifikovat neselektivní signály a signály v negativní kontrole pozorované v metodě dot-blot. Díky separaci celkové RNA v denaturačním gelu a její přenesení na membránu by tak mohlo být možné zjistit, zdali je próba vázána neselektivně ke všem molekulám RNA ve vzorku negativní kontroly anebo je tato vazba omezena na konkrétní populaci molekul RNA.

V následujícím experimentu byla provedena separace RNA ve 12% polyakrylamidovém denaturačním gelu se 4% močovinou. Separovaná RNA byla přenesena na membránu pomocí elektroblotu a byla použita próba značená Anti-Digoxigenin/Digoxigenin DyLight® 488 (Vector laboratories) (v poměru 1/3000) a reportérové molekuly Streptavidin-HRP Concentrated (100×) vyvolané chemiluminiscenčně a kolorimetricky viz. kapitola 3.13. Po vyvolání reportérové molekuly byla provedena nanášecí kontrola pomocí metylenové modři. Northern blot sloužil k detekci sfRNA ve vzorcích (RNA z infikované buněčné linie DAOY TBEV Hypr sfRNA a transfekovaná a transkribovaná sfRNA) a k odhalení případných neselektivních hybridizačních vazeb ve vzorcích RNA z negativní kontroly infekce, RNA z buněčné linie A549, transfekované a transkribované MBP). Separace RNA z testovaných vzorků sloužila k přesné identifikaci zdroje neselektivních signálů. Na obr.40 lze pozorovat výsledek úspěšné separace RNA z testovaných vzorků. Gel byl následně obarven fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000× in water (Biotium) o finální koncentraci 2×. Použitý referenční velikostní standard (M) byl RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Scientific), který byl detekován, ale z důvodu jeho velikostního rozsahu (6000b – 200b) nedošlo k dostatečné separaci pro rozlišení fragmentů RNA větších velikostí. Dále lze z obr.40 pozorovat již zmíněné separované RNA na 5,8S rRNA, 5S rRNA a do čtyř tRNA, které jsou vyznačeny šipkami a popsány v obrázku. Po provedení elektroblotu, provedení hybridizace s sfRNA proubou a vyvolání signálu reportérové molekuly chemiluminiscenčně i kolorimetricky nedošlo k detekci žádného hybridizačního signálu. Ani po vyvolání signálu nanášecí kontroly pomocí metylenové modři nebyl detekován žádný signál.



Obrázek 40.: Výsledek elektroforetické separace RNA v denaturačním 12% polyakrylamidovém gelu s 4 % močovinou. Jamky **1** transkribované MBP; **2** transkribovaná sfRNA, **3** transfekované MBP; **4** transfekované sfRNA; **5** RNA z buněčné linie A549; **6** negativní kontrola infekce; **7** RNA z infikované buněčné linie DAOY HTB 186 s virem TBEV. Proužky **1'** 5,8S rRNA; **2'** 5S rRNA; **3'** tRNA; **4'** tRNA; **5'** tRNA; **6'** tRNA; **7'** tRNA. Vizualizovaný pomocí fluorescenčního interkalačního barviva GelRed Nucleic Acid Stain 10000× in water (Biotium). Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

Z důvodu absence hybridizačního signálu i signálu nanášecí kontroly v předchozím experimentu bylo provedeno několik změn v použitém protokolu metody Northern blot. (viz kapitola 3.13, Tab. XV). Hlavními změnami protokolu použitým v tomto experimentu byly teploty během pre/hybridizace, použití biotinem značené próby a vyvolání signálu reportérové molekuly pouze kolorimetrickou detekcí s použitím reportérového systému streptavidin-HRP (streptavidin-HRP konjugát ředěný v poměru 1/5000) následovaná detekcí signálu nanášecí kontroly. Na obr.38 lze pozorovat separaci všech RNA (RNA z infikované buněčné linie DAOY HTB 186 virem TBEV Hypr, RNA z negativní kontroly infekce, RNA z buněčné linie PMJ2-R, transfekované a transkribované sfRNA a MBP) v 12% polyakrylamidovém 4% močovinném gelu, který byl obarven GelRed Nucleic Acid Stain 10000× in water (Biotium) o koncentraci 2×. Na obr.41 lze pozorovat intenzivnější separaci RNA oproti předešlému experimentu. Vizualizovaná RNA lze rozdělit do 5,8S rRNA, 5S rRNA a do tří tRNA, které jsou na obr.41 znázorněny šipkami a popsány v popisku obrázku. Reportérové molekuly na membráně byly vyvolávány kolorimetricky a došlo pouze k detekci signálu próby, která byla na membránu nanesena po hybridizaci membrány pro kontrolu funkce vyvolávání signálu reportérové molekuly. Dále bylo provedeno vyvolání signálu nanášecí kontroly pomocí metylenové modři, které bylo tentokrát úspěšné. Z důvodu přítomnosti velmi slabého signálu nanášecí kontroly a nízké kvality fotodokumentace není tento výsledek v práci uveden.

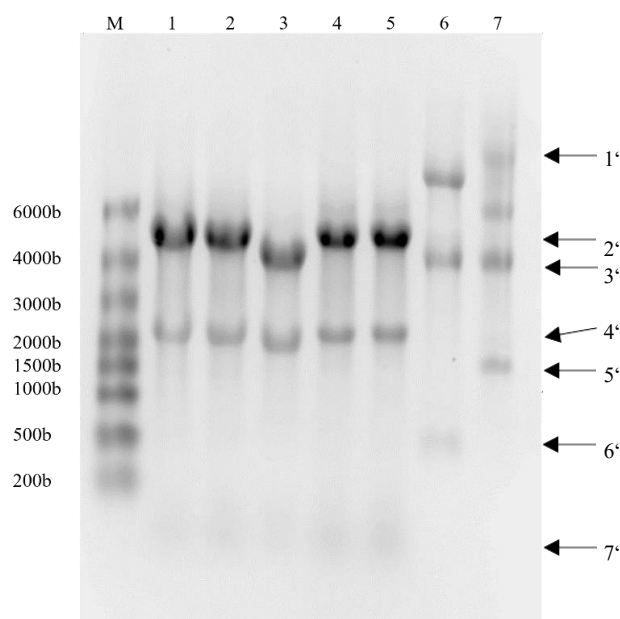


Obrázek 41.: Výsledek elektroforetické separace RNA v denaturačním 12% polyakrylamidovém gelu s 4% močovinou. Jamky **1** RNA z infikované buněčné linie DAOY HTB 186 virem TBEV; **2** negativní kontrola infekce, **3** RNA z buněčné linie PMJ2-R; **4** transfekované sfRNA; **5** transfekované MBP; **6** transkribovaná sfRNA; **7** transkribované MBP. Proužky **1'** 5,8S rRNA; **2'** 5,8S rRNA pro transkribované MBP; **3'** 5,8S rRNA pro transkribované sfRNA **4'** 5S rRNA; **5'** tRNA; **6'** tRNA; **7'** tRNA. Referenční velikostní standard (M) byl RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Scientific). Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

4.4 Elektroforetická separace RNA pomocí agarózového-formaldehydového denaturačního gelu.

Agarózový-formaldehydový denaturační gel sloužil k ověření výsledků elektroforetické separace RNA a velikostního standardu pomocí 12% polyakrylamidového 4% močovinného denaturačního gelu.

V následujícím experimentu byl použit agarózový-formaldehydový denaturační gel, který byl ponořen do 1×MOPS. Použitými vzorky byly RNA z infikované buněčné linie DAOY HTB 186 virem TBEV Hypr, RNA z negativní kontroly infekce, RNA z buněčné linie PMJ2-R, transfekované a transkribované sfRNA a MBP, ke kterým byl přidán GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) o konečné koncentraci 2×. Na obr.42 lze pozorovat separované RNA, které lze rozdělit do 28S rRNA, 18S rRNA, 5,8 rRNA a 5S rRNA, jejich umístění je znázorněno šipkami a popsáno v popisku obrázku. Na obr. 42 lze pozorovat 5,8 rRNA a 5S rRNA jako táhlé „šmouhy“. Dále lze pozorovat správnou separaci referenčního velikostního standardu, jež se nepovedlo v kapitole 4.3.



Obrázek 42.: Výsledek elektroforetické separace RNA v agarózovém-formaldehydovém denaturačním gelu. Jamky **1** RNA z infikované buněčné linie DAOY HTB 186 s virem TBEV; **2** RNA z negativní kontroly infekce; **3** RNA z buněčné linie PMJ2-R; **4** transfekovaná sfRNA; **5** transfekované MBP; **6** transkribovaná sfRNA; **7** transkribované MBP. Proužky **1'** 28S rRNA pro jamky **6-7**; **2'** 28S rRNA pro jamky **1-5**; **3'** 18S rRNA pro jamky **6-7**; **4'** 18S rRNA pro jamky **1-5**; **5'** 5,8 a 5S rRNA pro jamku **7**; **6'** 5,8 a 5S rRNA pro jamku **6**; **7'** 5,8 a 5S rRNA pro jamky **1-5**. Referenční velikostní standard (M) byl RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Scientific). Přítomná DNA byla nabarvena fluorescenčním interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water (Biotium) a fluorescenční signál barviva GelRed navázaného na DNA byl vyvolán a zaznamenán v přístroji G-BOX Chemi XX6 (SYNEGENE).

5 Diskuze

TBEV (čeleď *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*) 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 TBE také YF, japonská encefalitida, dengue a západonilská horečka. 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*, klíšťaty přenášených flavivirů (TBEV) tento detailní popis chybí (Slonchak A., 2022).

sfRNA byla detekována například v YF (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 cílem 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 pokus navrhnout sfRNA próbu, kterou by bylo možné hybridizovat, což není jednoduché, protože sfRNA, jak již bylo dříve zmíněno, vytváří spoustu 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 si vzorky RNA, které prokazatelně obsahují sfRNA, a to tedy RNA z sfRNA-transfekované DAOY HTB 186 buněčné linie, protože jak již bylo zmíněno, transfekované buňky obsahují více sfRNA než 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 ze sfRNA-transfekovaných a TBEV-infikovaných buněk opravdu obsahují sfRNA a v jakém množství.

Množství sfRNA v transfekované buněčné linii DAOY HTB 186 transkribovanou sfRNA a RNA z infikované buněčné linie DAOY HTB 186 virem TBEV bylo ověřeno qRT-PCR esejí s TaqMan proubou publikovanou ve studii Schwaiger M., Cassinotti P., 2003, kde jako primery sloužily TBE1 F a R. Pro qRT-PCR jako pozitivní kontroly sloužila transkribovaná sfRNA a pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA. Ve studii byla navržena qRT-PCR esej pro souběžnou kvantifikaci sfRNA čtyř studovaných kmenů viru TBEV. Z výsledků studie, nicméně není jasné, zdali byla specifická a účinnost qRT-PCR ověřována pomocí elektroforetické separace. V této práci byly výsledky kvantifikace sfRNA TBEV Hypr následně ověřovány elektroforetickou separací. Z výsledků elektroforetické separace na obr.16 vyplývá, že tato qRT-PCR esej není vhodná pro kvantifikaci sfRNA ve vzorcích RNA připravených v této práci, protože použitím čistého PCR produktu a reakčního mixu se tvorba primer-dimerů neomezila, proto musela být ověřena účinnost primerů.

Účinnost primerů byla ověřována pomocí desítkové pomoci desítkové ředící řady plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sRNA a PCR produktu viz. obr.13 až obr.17. Výsledek testování účinnosti této eseje za použití tohoto plazmidu lze pozorovat na obr.13, kde lze vidět, že kvantifikační křivky jsou blízko sebe, množství ampliconu se tedy se zvyšujícím se množstvím vstupního templátu mění jen minimálně a tím pádem i účinnost primerů je naprosto nevyhovující k použití této eseje pro věrohodnou kvantifikaci sRNA. Při použití PCR produktu jako templát lze na obr.15 pozorovat kvantifikační křivky, jež naznačovaly zvýšenou účinnost primerů. Nicméně po elektroforetické separaci bylo z výsledků zřejmé, že fluorescence vypočtená z kvantifikačních křivek vůbec nepochází ze specifického ampliconu. Existuje několik hypotéz, proč qRT-PCR esej pro kvantifikaci sRNA ze studie Schwaiger, 2003 vykazovala tak nízkou účinnost amplifikace templátové cDNA. Narozdíl od doporučení byla v této bakalářské práci použita sonda kombinující značení pomocí FAM fluoroforu s BHQ1 (Black Hole Quencher 1) zhasedlem, namísto TAMRA zhasedla použitého ve studii Schwaiger M., Cassinotti P., 2003. Kombinace sonda značená kombinací fluoroforu FAM a BHQ1 zhasedla je standardně používána v naší laboratoři a byla úspěšně používána pro kvantifikaci TBEV ve zkoumaných vzorcích (Helmová R. *et.al.*, 2020). Dále ve studii Schwaiger M., Cassinotti P., 2003 byl použit TaqMan qRT-PCR reakční mixu TaqMan one-step RT-PCR Mastermix Reagents Kit Applied Biosystems (Foster City, CA), zatímco v této práci byl použit KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems). Je tedy možné, že použití doporučeného reakčního mixu by mohlo vést ke zvýšení účinnosti této eseje. 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 použití pro tuto eseje došlo k tak výraznému snížení účinnosti amplifikace. Následně byly v této práci vyzkoušeny reakční mixy obsahující interkalační barvivo SYBR KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (KAPA Biosystems) a qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio). Na základě získaných výsledků bylo zřejmé, že qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) amplifikuje templátovou cDNA/PCR produkt s mnohem větší účinností než druhý testovaný kit. Na obr.20 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 (TopBio). Navíc bylo možné ve výsledcích amplifikace s použitím qPCR 2×SYBR Master Mix (TopBio) pozorovat i přítomnost primer-dimerů v qPCR reakci s přidáním TaqMan próby TBE-probe-WT jako templátu, což bylo původně naplánováno jako postup k odhalení možné kontaminace

v roztoku TaqMan próby s použitím obou porovnávaných qPCR reakčních mixů (viz obr. 19 a 20). Výše uvedená pozorování naznačují že tato esej není použitelná pro kvantifikaci sfRNA v testovaných vzorcích v této práci z důvodu špatné kombinace fluoroforu a zhášedla, která se může u různých templátů nebo práb během reakce chovat odlišně což může mít i vliv na výslednou účinnost amplifikací. Dalším možným důvodem snížené účinnosti PCR může být použití jiného reakčního mixu v porovnání se studií Schwaiger M., Cassinotti P., 2003. Tuto hypotézu je možné ověřit pouze vyzkoušením reakčního mixu použitého v této publikaci.

Z důvodu neuspokojivých výsledků eseje pro kvantifikaci sfRNA pomocí qRT-PCR z publikace Schwaiger M., Cassinotti P., 2003 byla nadále vyzkoušena a optimalizována vlastní qRT-PCR esej pro kvantifikaci sfRNA. Z několika nově navržených párů primerů byl testován pár F×R5, který byl použit také pro syntézu amplikonu pro přípravu hybridizační próby. Důvodem pro vybrání toho páru primerů byla délka amplikonu, který by se dal následně odlišit od případně vznikajících primer-dimerů, což usnadnilo hodnocení účinnosti qRT-PCR eseje. V této práci byly testovány dva páry primerů – F×R5 a F1×R5 jejich amplifikaci lze pozorovat na obr.21 a 22. Na těchto obrázcích, kde byla templátem desítková ředící řada plazmidu pcDNADEST40 TBEV Hypr sfRNA, lze pozorovat tvorbu více dimerů v NTC kontrole pro F×R5 primery. F1×R5 primery byly vybrány pro další optimalizace i přesto že v jedné reakci NTC kontroly byl pozorován vznik primer-dimerů naznačující možnost nižší účinnosti amplifikace z důvodu tendence tvořit primer-dimery. Výsledkem bylo, že ani tyto primery nejsou vhodné kandidáty na kvantifikaci sfRNA, protože k úspěšné amplifikaci specifického produktu docházelo jen při nejvyšší koncentraci desítkového ředění templátové DNA plazmidu pcDNA DEST40 TBEV Hypr sfRNA. Ve všech následujících ředění templátového plazmidu nebyly primery schopny efektivní vazby na templát, což lze usuzovat mimo jiné na základě přítomnosti primer-dimerů dokumentace elektroforetické separace amplikonů této eseje na obr. 24g). 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 úspěšný a efektivní nasedání primerů v průběhu qRT-PCR.

První experiment metody dot-blot byl proveden dle publikace Kumar J.S. *et.al.* (2013). Po provedení tohoto experimentu nebyl detekován žádný hybridizační signál nejspíše z důvodu, že autoři této studie byly zaměřeni na detekci DNA vzorků pomocí DNA próby. Tato práce se soustředí na detekci RNA vzorků pomocí DNA próby. Dalším možným důvodem neúspěchu mohli být změny provedené v protokolu, a to tedy použití jiných promývacích roztoků po hybridizaci, kde v tomto experimentu bylo přidáno menší množství

SDS činidla a to 0,1 %, které je doporučeno (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, protože v láhvi s již připraveným roztokem byla objevena plíseň.

V druhém experimentu metody dot-blot byl použit formamidový pre/hybridizační roztok z článku Brown T. a Mackey K., (2001). Použití formamidu při hybridizaci umožňuje snížit teplotu hybridizací, což sníží možné riziko degradace RNA ve zkoumaném vzorku. Při použití formamidového pre/hybridizačního roztoku byla detekována pozitivní kontrola detekce reportérové molekuly (GSI-1) a próby (kromě experimentu 2., kde byla absence signálu nejspíše způsobena lidskou chybou). 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 transkriptu actin β próby ve vzorcích RNA izolovaných z lidské buněčné linie A549, která byla detekována kolorimetricky streptavidin-HRP reportérovým systémem na nylon membráně viz. výsledky obr.33.

Další možnou optimalizací bylo porovnání různých typů hybridizačních membrán. V této práci byly testovány celkem 3 typy membrán nylon membrána Zeta-Probe® Blotting Membranes (Bio-Rad), nitrocelulózová membrána Trans-Blot® Transfer Medium (Bio-Rad) a PVDF Transfer Membrane (Thermo Fisher Scientific). Jejich společným využitím je v metodě Western blot (Kurien B. T., Scofield R. H., 2015). Nylon 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 možnost pouze třikrát hybridizovat s próbou (Brown T., 1993). Nevýhody pozorovány u nitrocelulózové a PVDF membrány byly stejné, a to při kolorimetrické detekci a nanášecí kontrole, kdy intenzita signálu byla menší oproti nylon membráně, na které signál byl intenzivnější a po vysušení signál nevymizel. Mezi nevýhody pozorovanými na nylon membráně bylo roztáhnutí dotu na větší plochu, čímž se intenzita signálu snížila minimálně, a proto byla vybrána k další optimalizaci.

Dále byly otestovány různé druhy značení DNA próby, a to značení prób nick translací (Kato A. *et.al.*, 2006) nebo značením náhodných primerů pomocí Biotin DecaLabel DNA labeling kit (Thermo Fisher Scientific). Tento test byl inspirován diplomovou prací Hany Pejšové (Pejšová H., 2020), která pozorovala, že signál z nick translace byl intenzivnější než signál značení náhodných primerů. V této práci byl pozorován opak, a tedy více intenzivní

bylo značení náhodnými primery (není zaznamenáváno ve výsledcích). Vyšší intenzita značení náhodnými primery byla nejspíše dána délkou próby, a to 124bp, která byla kratší než délka 298bp próby Hany Pejšové. Pro nick translaci doporučená délka DNA próby je 300bp a výše a konečná délka próby by se měla pohybovat mezi 100 - 200bp (Balmain A. *et.al.*, 1979). Próba navržená v této práci byla na tolik krátká, že nick translace nebyla schopná ji specificky a efektivně naznačit, což mohlo dát za výsledek vhodnějšího použití značení pomocí náhodných primerů.

Dalším pozorováním byla rozdílná intenzita signálu transkriptu „housekeeping“ genu actin β a sfRNA. V této práci bylo pozorováno, že signál transkriptu actin β genu v TBEV-infikované buněčné linii DAOY HTB 186 byl více intenzivnější při chemiluminiscenční i kolorimetrické detekci viz, výsledky na obr. 38 a 39. Próby použité při detekci transkriptu actin β genu byly delší a mohly být značeny nick translací, zatímco próby pro detekci transkriptu sfRNA byly značeny náhodnými primery. Z důvodu použití jinak dlouhých prób a jiného značení by bylo do budoucna dobré tyto skutečnosti sjednotit a pro obě detekce použít stejně dlouhé próby a stejný způsob značení.

Další optimalizací provedenou v metodě dot-blot byla teplota pre/hybridizačního a promývacího kroku. Teplota 42 °C pro pre/hybridizaci převzata z publikace Kumar J. S, 2013, kde byl použit DNA-DNA hybrid. V této práci byl však použit DNA-RNA hybrid, jehož doporučená teplota pro hybridizaci je vyšší a to 68°C (Zhou J. C., 2015). V experimentech v této práci byla vybrána nižší teplota než doporučená z důvodu obav z možné degradace RNA vzorků při vyšších teplotách. Vyšší teploty a tím i možné vymývání prób z membrán na začátku metody dot-blot mohlo způsobit, že nebyl detekován hybridizační signál próby.

V této práci byla použita próba značena biotinem, která se detekovala reportérovým systémem streptavidin-HRP a streptavidin-AP. Při použití reportérového systému streptavidin-HRP bylo možné detekovat signál sfRNA próby v TBEV-infikované DAOY HTB 186 buněčné linii a zároveň v negativní kontrole MBP-transfekované DAOY HTB 186 buněčné linii, které lze pozorovat na obr.39. Možným důvodem vzniku nespecifického signálu bylo použití biotinem značené próby, protože biotin je organická molekula, která se volně vyskytuje. Biotin je vodě rozpustný vitamin B7 napomáhající metabolismu živin (Raghu S., Sunita P., 2023). Místo volně se vyskytujícího biotinu jako reportérová molekula byl v metodě Northern blot vyzkoušen DIG v reportérovém systému DIG-AntiDIG, jež v diplomové práci Hany Pejšové (Pejšová H., 2020) měl více nespecifických signálů než biotinem značená próba. V této práci za použití DIG-AntiDIG reportérového systému nebyly detekovány žádné signály, důvody jsou diskutovány níže.

Jak již bylo zmíněno v metodě dot-blot na obr.39 byla detekována sfRNA pomocí chemiluminiscenční i kolorimetrické detekce v negativních kontrolách, a to v RNA z MBP-transfekované DAOY HTB 186 buněčné linie a v transkribované MBP. Metoda Northern blot byla využita k zjištění, na jaké molekuly RNA v našich vzorcích (sfRNA-transfekovaných/TBEV-infikovaných) z lidské DAOY HTB 186 buněčné linie se použita próba váže.

Nespecifické hybridizační signály sfRNA 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 sfRNA 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 a 4 % močovinou je standardně používán pro aplikace vyžadující vysoké rozlišení separace RNA (Green M. R., Sambrook J., 2021), který byl úspěšně otestován pro detekci sfRNA výzkumnou skupinou prof. Esther Schnettler laboratoře Tropicke medicíny Institutu Bermadra Notche, Hamburk, Německo (nepublikovaná data).

V průběhu testování tohoto převzatého protokolu nebyl získán žádný pozitivní hybridizační signál. Na obr.40 lze pozorovat 12 % polyakrylamidový 4 % močovinný gel po elektroforetické separaci a lze vidět, že se RNA separovala do 5,8 rRNA, 5S rRNA a čtyř tRNA. Referenční velikostní standard, který kvůli svému rozsahu (6000bp až 200bp) nebyl dostatečně separován byl detekován s nedostatečnou separací na rozlišitelné fragmenty RNA větších velikostí. 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 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, zatímco běžně je doporučovaná hybridizační a promývací teplota pro DNA próby 42°C (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 doporučené nylon membrány Hybond N+ (Amshram) byla použita nylon membrána Zeta-Probe® Blotting Membranes (Bio-Rad), která byla v této práci úspěšně otestována při metodě dot-blot. S vysokou pravděpodobností bylo hlavním důvodem neúspěchu příprava a značení hybridizační próby.

Na rozdíl od převzatého protokolu, který používal značení próby pomocí PCR byla pro značení próby v této práci použita metoda nick translace, která, jak již bylo diskutováno výše, není vhodnou metodou pro značení prób kratších než 300bp. Krátké próby značené nick translací byly rozštípeny na malé nukleotidové zbytky, které poté během přečištění pomocí Sephadex™ G-50 Superfine ulpěly na filtrační kolonce. Velikost DNA by měla být větší než 20bp (Tijssen P., 1993). Z tohoto důvodu by bylo vhodné v budoucnu použít způsob značení doporučený v převzatém protokolu.

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 neúspěchu výsledků metody 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 otestovaný postup, kterým byl získán pozitivní hybridizační signál v metodě dot-blot s použitím próby značené biotinem. Na obr.41 lze pozorovat 12% polyakrylamidový 4% močovinnový gel po elektroforetické separaci a lze vidět, že separace RNA proběhla v pořádku. RNA se separovala na 5,8 rRNA, 5S rRNA a tři tRNA. Hybridizační signál byl detekován pomocí kolorimetrické detekce streptavidin-HRP reportérového systému, kde byl detekován pouze signál próby. Po vyvolání reportérové molekuly byla provedena nanášecí kontrola pomocí metylenové modři jejíž výsledkem byla detekce signálu všech zmíněných RNA. Bohužel ani v tomto 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. Ověření správné separace pomocí tohoto protokolu a integrity testovaných RNA vzorků pak bylo dodatečně ověřováno pomocí standardně používané elektroforetické separace v agarózovém-formaldehydovém denaturačním gelu, jejíž výsledky jsou dokumentovány v obr.42. Na obr.42 lze pozorovat separaci RNA do 28S rRNA, 18S rRNA a 5,8 a 5S rRNA, což nám dává jasný obraz toho, jak by měla být RNA na gelu separovaná.

6 Závěr

Pro ověření přítomnosti a množství sfRNA ve vzorcích použitých pro optimalizaci metody dot-blot byla použita esej qRT-PCR 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. Pro správnou kvantifikaci sfRNA v esejí qRT-PCR je potřeba nově navržených primerů a jejich otestování. Tato práce se zaměřovala na optimalizaci detekce sfRNA metodou dot-blot. V průběhu práce se díky sérii pokusů testujících různé reakční podmínky, chemikálie nebo membrán podařilo docílit úspěšné detekce pozitivního hybridizačního signálu prób pro detekci interní kontroly transkriptů „housekeeping“ genů PAPOLA a actin 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 2 opakování nedošlo k detekci pozitivního hybridizačního signálu. Ověření správné separace vzorků RNA v polyakrylamidovém denaturačním gelu bylo úspěšně provedeno separací těchto vzorků v agarózovém-formaldehydovém denaturačním gelu.

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.
- 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*, vol 4. Humana Press. 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 E. R., 1993, *The Northern Blot*, In: Farrell E.R., *RNA Methodologies*, Academic Press, 9, 158-173, ISBN: 978-0-12-249700-1.
- Farrell R. E. Jr., (2010). *Nucleic Acid Probe Technology*. In: Farrell R. E. Jr., *RNA Methodologies, Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, 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 Melian 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),
- 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.

- 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.
- 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 Rao 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.
- Labuda M., Austyn J. M., Žuffová E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysý J., Nattall P. A., (1996). *Importance of Localized Skin Infection in Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission. Virology*, 219(2), 357–366.
- 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 Havlíková 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).
- Lovatt D., Eberwine J., (2013), *Northern Blotting*, In: Maloy S., Hughes K., Brenner's *Encyclopedia of Genetics*, 5, 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.
- 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.
- 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 BUĎĚJOVICÍCH. Přírodovědecká fakulta.
- 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.
- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; (2004-). PubChem Compound Summary for CID 171548, Biotin; [cited 2023 Nov. 5].
- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; (2004-). PubChem Compound Summary for CID 4369270, Digitoxigenin; [cited 2023 Nov. 5].

- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 11787, 4-Chloro-1-naphthol; [cited 2023 Nov. 10].
- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 8588, 3-Amino-9-ethylcarbazole; [cited 2023 Nov. 10].
- 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.
- Rio D. C., (2015). *Denaturation and Electrophoresis of RNA with Formaldehyd*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(2), 219-222.
- 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., Sterba 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: *Sword Diagnostics, Reseach gate*, 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.

- 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.
- Southern E. M., (2003). *Gel Electrophoresis of RNA in Denaturing Formaldehyde Agarose Gels*. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, ISBN: 978-0-47-001590-2
- 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.
- 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*. In: *Current protocols in immunology, Appendix*, 3, A.3J.1–A.3J.10.
- Wages J. M., (2005). *Immunoassays*. In: *Encyclopedia of Analytical Science, NUCLEIC ACIDS*, 2, 408–417. ISBN: 978-0-12-369397-6.
- Wilson H. N., (1966). *ABSORPTIOMETRY AND "COLORIMETRIC ANALYSIS."* *An Approach to Chemical Analysis*, 222–259.
- 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.