

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Eva Tarackezy

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Využití lights-on lights-off sond pro rozlišení variant
viru SARS-CoV-2**

Diplomová práce

Bc. Eva Tarackezy

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Eva VEČERKOVÁ
Osobní číslo: R210608
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Využití lights-on lights-off sond pro rozlišení variant viru SARS-CoV-2
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Vypracováním teoretické části diplomové práce studentka prokáže schopnost

- orientovat se v tématu možnosti rozlišení variant SARS-CoV-2,
- orientovat se v tématu DNA sond,
- pracovat s odbornými cizojazyčnými texty a
- řádně citovat.

V praktické části student prokáže schopnost samostatně:

- designovat sondy,
- napláňovat,
- provést a
- vyhodnotit laboratorní experiment.

Teoretickým cílem diplomové práce je sepsat rešerši problematiky DNA sond testujících více mutací v jediné zkumavce a současných možností rozlišení SARS-CoV-2 variant.

Praktickým cílem diplomové práce je navrhnout a otestovat Lights-on Lights-off sondy pro více mutací SARS-CoV-2 v jediné zkumavce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. Rice LM, Reis AH, Ronish B, Carver-Brown RK, Czajka JW, Gentile N, et al. Design of a single-tube, endpoint, linear-after-the-exponential-PCR assay for 17 pathogens associated with sepsis. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;114(2):457-69.
2. Carver-Brown RK, Reis AH, Jr., Rice LM, Czajka JW, Wangh LJ. Design and Construction of a Single-Tube, LATE-PCR, Multiplex Endpoint Assay with Lights-On/Lights-Off Probes for the Detection of Pathogens Associated with Sepsis. *J Pathog*. 2012;2012:424808.
3. Sirianni NM, Yuan H, Rice JE, Kaufman RS, Deng J, Fulton C, et al. Closed-Tube Barcoding. *Genome*. 2016;59(11):1049-61.
4. Rice JE, Reis AH, Rice LM, Carver-Brown RK, Wangh LJ. Fluorescent signatures for variable DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(21).
5. Rice LM, Reis AH, Jr., Wangh LJ. Virtual Barcoding using LATE-PCR and Lights-On/Lights-Off probes: identification of nematode species in a closed-tube reaction. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 2016;27(2):1358-63.
6. Naaum AM, Cusa M, Singh M, Bleicher Z, Elliott C, Goodhead IB, et al. Validation of FASTFISH-ID: A new commercial platform for rapid fish species authentication via universal closed-tube barcoding. *Food Research International*. 2021;141.
7. Tetrault SM, Rice JE, Wangh LJ, Sanchez JA. Single-Tube Mutation Scanning of The Epidermal Growth Factor Receptor Gene Using Multiplex LATE-PCR and Lights-On/Lights-Off Probes. *J Mol Biomark Diagn*. 2014;5(3):1000175.
8. Pierce KE, Peter H, Bachmann TT, Volpe C, Mistry R, Rice JE, et al. Rapid detection of TEM-type extended-spectrum β -lactamase (ESBL) mutations using lights-on/lights-off probes with single-stranded DNA amplification. *J Mol Diagn*. 2013;15(3):291-8.
9. Whitfield MG, Marras SAE, Warren RM, Van Rie A, Rice J, Wangh LJ, et al. Rapid Pyrazinamide Drug Susceptibility Testing using a Closed-Tube PCR Assay of the Entire *pncA* gene. *Sci Rep*. 2020;10(1):4234.

Vedoucí diplomové práce: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 26. října 2021
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2023

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

veškeré katedry

V Olomouci dne 2. listopadu 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Bc. Eva Tarackezy

Název práce: Využití lights-on lights-off sond pro rozlišení variant viru SARS-CoV-2

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: SARS-CoV-2, COVID-19, lights-on/lights-off sondy, LATE-PCR

Počet stran: 58

Počet příloh: 3

Jazyk: český

Souhrn

Pandemie onemocnění COVID-19 způsobeného virem SARS-CoV-2 ovlivnila celý svět a s jejími důsledky se společnost vyrovnává dodnes. Pro sledování evoluce viru a aktuálního stavu šíření v populaci je důležité určení sekvenčních variant SARS-CoV-2. Pro genotypizaci SARS-CoV-2 se využívá sekvenování, které je však ekonomicky, časově i personálně náročné. Druhým přístupem je cílené testování. Metody cíleného testování se snaží identifikovat jednu nebo více variant SARS-CoV-2.

Metodou, která by spojovala výhodu rychlosti cílené genotypizace a širší záběr sekvenování, se zabývá experimentální část této diplomové práce. Jedná se o Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR) s reverzní transkripcí s hybridizací se sondami lights-on/lights-off. V experimentální části práce byl proveden návrh primerů a lights-on/lights-off sond, jejich testování se syntetickými standardy – DNA fragmenty genu pro S1 protein u SARS-CoV-2 a úspěšné ověření specifity vazby sond na amplikony reálných vzorků RNA SARS-CoV-2. Na základě výsledků této práce bylo zjištěno, že tato metoda disponuje potenciálem odhalit všechny mutace v regionu vyhrazeném primery zleva a zprava. Srovnáním s databankou křivek tání jednotlivých variant SARS-CoV-2 by bylo možno určit konkrétní mutace přítomné ve vzorku a nové mutace by mohly být odhaleny podle nového profilu křivky tání a potvrzeny sekvenováním.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Eva Tarackezy

Title: Lights-on lights-off probes for genotyping of SARS-CoV-2

Type of thesis: Master thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacký University Olomouc

Supervisor: prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

The year of presentation: 2024

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, Lights-On/Lights-Off probes, LATE-PCR

Number of pages: 58

Number of appendices: 3

Language: Czech

SUMMARY

The pandemic of the disease COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus has affected the entire world, and society is still coping with its consequences today. In order to monitor the evolution of the virus and the current state of spread in the population, it is important to determine the sequence variants of SARS-CoV-2. Sequencing is used for SARS-CoV-2 genotyping, but it is economically demanding, time-intensive, and personnel-intensive. The second approach is targeted testing. Targeted testing methods try to identify one or several variants of SARS-CoV-2.

The experimental part of this diploma thesis deals with a method that would combine the advantage of the speed of targeted genotyping and the breadth of sequencing coverage. It is Linear After The Exponential-PCR (LATE-PCR) with reverse transcription with hybridization with Lights-On/Lights-Off probes. In the experimental part of the work, the design of primers and Lights-On/Lights-Off probes was carried out, their testing with synthetic standards – DNA fragments of the gene for the S1 protein in SARS-CoV-2 and the successful verification of the specificity of the binding of the probes to the amplicons of real RNA samples of SARS CoV-2. Based on the results of this work, it was found that this method has the potential to detect all mutations in the region reserved by the primers from the left and right. By comparing with a database of melting curves of individual

SARS-CoV-2 variants, it would be possible to determine the specific mutations present in the sample and new mutations could be detected according to the new melting curve profile and confirmed by sequencing.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. Mgr. Jiřího Drábka, PhD. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Bc . Tarackezy Eva

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu prof. Mgr. Jiřímu Drábkovi, PhD. za ochotné a odborné vedení, praktickou pomoc v laboratoři, velkou trpělivost a všechny čas, který mi věnoval při zpracovávání diplomové práce. Mé poděkování patří také členům Laboratoře experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny Univerzity Palackého v Olomouci za jejich ochotnou pomoc při práci v laboratoři.

Tato práce vznikla za podpory projektů LM2023033, LM2023053, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448, EF16_013/0001674, LM2023067, LX22NPO5102, TN02000109, CZ.02.01.01/00/22_008/0004644 a IGA LF UP 2023_006.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Koronaviry	3
3.2	SARS-CoV-2	3
3.2.1	Taxonomie SARS-CoV-2.....	3
3.2.2	Virologie SARS-CoV-2 a pandemie COVID-19	4
3.2.3	Organizace genomu SARS-CoV-2.....	5
3.2.4	Strukturní proteiny SARS-CoV-2	5
3.2.5	Mutace SARS-CoV-2.....	7
3.2.6	Varianty SARS-CoV-2.....	7
3.3	Rozlišení variant SARS-CoV-2	10
3.3.1	Sekvenování	10
3.3.2	Cílené testování pro detekci vybraných variant SARS-CoV-2	11
3.4	LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off.....	14
4	Materiál a metody.....	16
4.1	Biologický materiál.....	16
4.2	Použité chemikálie	16
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	17
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	18
4.4.1	Návrh primerů a sondy	18
4.4.2	Ověření funkčnosti primerů pomocí PCR v reálném čase	18
4.4.3	Optimalizace koncentrací lights-on/lights-off sond v reakci.....	19
4.4.4	Ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné	

syntetické standardy při LATE-PCR.....	21
4.4.5 Ověření reprodukovatelnosti a opakovatelnosti profilů získaných křivek tání při hybridizaci lights-on/lights-off sond na syntetické standardy SARS-CoV-2 při LATE-PCR.....	22
4.4.6 Test citlivosti při rozlišení varianty SARS-CoV-2 ve směsi.....	22
4.4.7 Test analyzovatelného limitu vstupní nukleové kyseliny (DNA standardu).....	25
4.4.8 Test rozlišení variant SARS-CoV-2 v reálných vzorcích metodou RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off	26
5 Výsledky.....	28
5.1 Návrh primerů a sond	28
5.2 Ověření funkčnosti primerů pomocí PCR v reálném čase.....	28
5.3 Optimalizace koncentrací lights-on/lights-off sond v reakci.....	29
5.3.1 Ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné syntetické standardy při LATE-PCR.....	30
5.3.2 Ověření reprodukovatelnosti a opakovatelnosti profilů získaných křivek tání při hybridizaci lights-on/lights-off sond na syntetické standardy SARS-CoV-2 při LATE-PCR.....	31
5.3.3 Test citlivosti při rozlišení varianty SARS-CoV-2 ve směsi.....	36
5.3.4 Test analyzovatelného limitu vstupní nukleové kyseliny (DNA standardu).....	39
5.3.5 Test rozlišení variant SARS-CoV-2 v reálných vzorcích metodou RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off	40
6 Diskuze.....	42
7 Závěr.....	45
8 Literatura	47
9 Přílohy	58

SEZNAM ZKRATEK

+ssRNA	jednořetězcové pozitivní vlákno RNA (positive-sense single-stranded RNA)
ACE2	angiotenzin-konvertující enzym 2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2)
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers for Disease Control and Prevention)
CE-IVD	výrobek vyhovující evropské směrnici o diagnostických zařízeních in vitro (IVDD 98/79/EC) s možností legální komercializace v EU (European In-Vitro Diagnostic Devices Directive)
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Ct	cyklus PCR, ve kterém je detekován nárůst fluorescence nad pozadím přirozené fluorescence (threshold cycle)
E protein	obalový (envelope) protein
ERGIC	membrána endoplazmatického retikula a Golgiho intermediárního kompartmentu (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment)
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
HCoV	lidský koronavirus (human coronavirus)
LATE	Linear-After-The-Exponential
M protein	membránový protein
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie s maticí asistovanou laserovou desorpací/ionizací a analyzátozem doby letu (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight)
MERS-CoV	koronavirus způsobující respirační syndrom Středního východu (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus)

N protein	nukleokapsidový protein
NC	negativní/beztemplátová kontrola (NC, Negative Control)
NGS	sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
nsps	nestructurální proteiny (nonstructural proteins)
ORF	otevřený čtecí rámec (Open Reading Frames)
pp1a	polypeptid1a
pp1b	polypeptid1b
RBD	vazebná doména receptoru (Receptor-Binding Domain)
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
S protein	spike protein
SARS-CoV	koronavirus způsobující těžký akutní respirační syndrom (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus)
SARS-CoV-2	koronavirus 2 způsobující těžký akutní respirační syndrom (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)
SNP	bodový polymorfismus (Single-Nucleotide Polymorphism)
TMPRSS2	transmembránová serinová proteáza (Transmembrane Serine Protease 2)
TRS	transkripční regulační sekvence
VOC	varianty SARS-CoV-2 vyvolávající obavy (Variants of Concern)
VOI	zájmové varianty SARS-CoV-2 (Variants of Interest)
UTR	nepřekládaná oblast (UnTranslated Region)
WGS	celogenomové sekvenování (Whole Genome Sequencing)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Multiple sequence alignment amplifikované oblasti syntetických standardů 2512, 2513 a 3081 s vyznačenými oblastmi, na které hybridizují příslušné lights-on/lights-off sondy.

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Amplifikační křivka syntetických standardů SARS-CoV-2 2512 a 2513 a negativní kontroly při použití kombinace primerů 2549 a 2550 při PCR v reálném čase.

Graf 2: Amplifikační křivka syntetického standardů SARS-CoV-2 2440 při použití dvojice primerů 2506 a 2539 a dvojice 2538 a 2539 při PCR v reálném čase.

Graf 3: Křivka tání lights-on/lights-off sond (2540-2548) o různých koncentracích při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2441.

Graf 4: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetické standardy SARS-CoV-2 2512, 2513 a 3081.

Graf 5: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 3081 v osmi opakováních, kanál FAM.

Graf 6: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2512 v osmi opakováních, kanál FAM.

Graf 7: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2512 v osmi opakováních, kanál Cy5.

Graf 8: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 3081 v osmi opakováních, kanál Cy5.

Graf 9: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) získané při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 3081 v průběhu několika dní (A, B, C), kanál Cy5.

Graf 10: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) získané při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2512 v průběhu několika dní (A, B, C), kanál Cy5.

Graf 11: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 3081 po LATE-PCR v triplicátu.

Graf 12: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2513 po LATE-PCR v duplikátu.

Graf 13: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na směs syntetických standardů SARS-CoV-2 3081 a 2513 v různých poměrech po LATE-PCR.

Graf 14: Amplifikační křivky diluční řady syntetického standardu SARS-CoV-2 3081 získané při LATE-PCR, ředění 10x.

Graf 15: Křivky tání lights-on/lights-off sond při hybridizaci na amplikony syntetického standardu SARS-CoV-2 3081 ředěného diluční řadou, ředění 10x.

Graf 16: Analýza křivek tání lights-on/lights-off sond při hybridizaci na amplikony reálných vzorků RNA po RT-LATE-PCR pomocí Difference Curve.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Reakční protokol pro ověření funkčnosti primerů při PCR v reálném čase.

Tabulka 2: Rozdílná koncentrace lights-on a lights-off sond v testu pro optimalizaci jejich koncentrací v reakční směsi.

Tabulka 3: Reakční protokol pro optimalizaci koncentrací lights-on a lights-off sond v reakční směsi.

Tabulka 4: Reakční směs na jednu reakci pro ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné syntetické standardy při LATE-PCR.

Tabulka 5: Nukleotidové sekvence a značení lights-on/lights-off sond – 1. sada.

Tabulka 6: Počet molekul syntetických standardů SARS-CoV-2 2513 a 3081 přidaných do reakce při přidávání standardů do reakce v rozdílných poměrech.

Tabulka 7: Počet molekul syntetického standardu SARS-CoV-2 3081 v 1 μ l, který se přidává do reakce; 10x ředění.

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro jednu reakci LATE-PCR a melting analýzu.

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off pro 96 vzorků.

1 ÚVOD

Koronaviry, dříve ne moc známé viry způsobující většinou jen běžné nachlazení, ale od roku 2019 pojem známý pro celý svět, a to ve spojení s pandemií onemocnění COVID-19. Původcem onemocnění COVID-19 je nový typ koronaviru – koronavirus 2 způsobující těžký akutní respirační syndrom (SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 je obalený RNA virus, jedná se o sedmý koronavir, o kterém je známo, že infikuje člověka.

Genom viru SARS-CoV-2 není neměnný. Bodovými mutacemi a insercemi/delecemi v genomu SARS-CoV-2 stále vznikají nové varianty. Rozdílné sekvenční varianty mají vliv na virulenci, rychlost šíření i antigenicitu viru.

Pro sledování aktuálního stavu šíření viru v populaci, dynamiky evoluce viru a vytváření předpovědí dalšího šíření viru je důležitá genotypizace SARS-CoV-2. Přístupy pro genotypizaci SARS-CoV-2 jsou dva: sekvenování nebo cílené testování pro identifikaci vybraných variant SARS-CoV-2. Sekvenování je časově i finančně náročné, ale umožňuje identifikaci nových dosud nepopsaných variant. Metody cíleného testování se snaží rozlišit od jedné varianty až po několik variant SARS-CoV-2 najednou. Jejich výhodou je časová nenáročnost a nižší náklady, ale u mnoha z nich může dojít k falešné negativitě - nezachycení nové varianty, na které daná metoda necílila nebo dokonce nezachycení viru, pokud došlo k mutaci v místě vazby 3' konce primeru.

Praktická část diplomové práce se zaměří na metodu, který by mohla spojovat výhodu širšího záběru sekvenování a rychlost cílené genotypizace. Touto metodou by mohla být Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off. Tato metoda se již úspěšně využívá například při skenování mutací v genu pro receptor epidermálního růstového faktoru u člověka či pro detekci patogenů spojených se sepsí. Praktická část se bude zabývat designem primerů a lights-on/lights-off sond pro amplifikaci části genu pro S1 protein SARS-CoV-2 při LATE-PCR s reverzní transkripcí a detekci mutací v amplikonu. Poté bude následovat ověření funkčnosti reagentů, optimalizace reakce a ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné syntetické standardy i reálné vzorky.

2 CÍLE PRÁCE

- 1 Zpracovat literární řešení současných možností rozlišení SARS-CoV-2 variant a problematiky DNA sond testujících více mutací v jediné zkumavce.
- 2 Navrhnout a otestovat lights-on/lights-off sondy pro více mutací SARS-CoV-2 v jediné zkumavce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Koronaviry

Koronaviry jsou rozšířenými patogeny lidí i obratlovců a mohou infikovat respirační, gastrointestinální, jaterní a centrální nervový systém. Jejich označení je odvozeno od tvaru virionů v elektronovém mikroskopu. Díky povrchovým proteinům (dlouhým 9-12 nm) se viriony jeví jako „koruna“ či „sluneční koróna“. Koronaviry jsou RNA viry z říše *Orthornavirae*, kmenu *Pisuviricota*, třídy *Pisoniviricetes*, řádu *Nidovirales*, čeledi *Coronaviridae* a podčeledi *Orthocoronavirinae*.

SARS-CoV-2 je původcem koronavirového onemocnění 2019 (COVID-19), které se poprvé objevilo na konci roku 2019 ve Wu-chanu v Číně (Gorbalenya *et al.*, 2020; Woo *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2020). Za původní místo propuknutí pandemie COVID-19 se považuje velkoobchodní trh s mořskými plody Wuhan Huanan (Chen *et al.*, 2020).

Až do propuknutí pandemie SARS-CoV-2 bylo známo šest koronavirů, které infikují člověka, z nichž čtyři: lidský koronavirus-229E (HCoV, human coronavirus), HCoV-OC43, HCoV-NL63 a HCoV-HKU1 způsobují mírné onemocnění horních cest dýchacích a pouze ve vzácných případech mohou u rizikových jedinců způsobit závažnější infekci. V letech 2002-2003 byl v provincii Guangdong v Číně identifikován koronavirus způsobující těžký akutní respirační syndrom (SARS-CoV, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus), který měl z 8000 klinických případů za následek 774 úmrtí (úmrtnost asi 10 %). Posledním známým koronavirem infikujícím člověka je koronavirus způsobující respirační syndrom Středního východu (MERS-CoV, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), který se poprvé vyskytl na Blízkém východě v roce 2012, způsobující těžké respirační onemocnění. Viry SARS-CoV i MERS-CoV jsou zoonotického původu (Fehr *et Perlman*, 2015; Chen *et al.*, 2020; Ns *et al.*, 2003).

3.2 SARS-CoV-2

3.2.1 Taxonomie SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 patří do řádu *Nidovirales*, čeledi *Coronaviridae*, podčeledi *Orthocoronavirinae*, rodu *Betacoronavirus* a podrodu *Sarbecovirus*. Podčeleď *Orthocoronavirinae* zahrnuje čtyři rody: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus a Deltacoronavirus. Evoluční analýza odhalila, že koronaviry z rodu *Alphacoronavirus* a *Betacoronavirus* pocházejí z hlodavců a netopýrů, avšak viry z rodu *Gammacoronavirus* a *Deltacoronavirus* pochází z druhů ptačích (Ge *et al.*, 2017; Loomba

et al., 2020).

Virus SARS-CoV-2 vykazuje 79,6% sekvenční podobnost s virem SARS-CoV (Cui *et al.*, 2019). Přestože od propuknutí pandemie uplynulo již několik let, přesný původ SARS-CoV-2 je stále předmětem studií. Starší studie ukazovaly na primární původ u netopýrů, novější studie Wang *et. al* (2024) popisuje vývoj SARS-CoV-2 přes hostitele následovně: norek, kočka, tygr, myš, křeček, pes, lev, gorila, leopard, netopýr a pangolin (Andersen *et al.*, 2020).

3.2.2 Virologie SARS-CoV-2 a pandemie COVID-19

SARS-CoV-2 je RNA virus, obalený lipidovou dvojrůstkou odvozenou od hostitelské membrány, s periferními a integrálními proteiny. Velikost virionů SARS-CoV-2 je v průměru 60-140 nm a jejich tvar je sférický s určitým pleomorfismem. Lipidová dvojrůstka zapouzdřuje šroubovitou nukleokapsidu obsahující virovou RNA (Kumar *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020).

Od prvních případů onemocnění COVID-19 v prosinci 2019 se virus rychle šířil a Čína dosáhla epidemického vrcholu v únoru 2020, kdy rostl počet nových nakažených v průměru o 3000 denně. Přestože byly v Číně zavedeny nevídaně přísné restriktce za účelem omezení šíření nákazy a počet nakažených začal klesat, došlo k šíření nákazy na mezinárodní úrovni. Onemocnění COVID-19 se nevyhnulo žádnému kontinentu a Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organization) oficiálně označila globální šíření onemocnění COVID-19 jako pandemii 11. března 2020. Celosvětově bylo hlášeno více než 774 milionů potvrzených případů nakažených COVID-19 a více než 7 milionů úmrtí (data k 3. 3. 2024), přičemž na úmrtnost mělo vliv mimo jiné i přetížení zdravotního systému v některých oblastech. Pandemie COVID-19 měla a stále má dalekosáhlé zdravotní, sociální i ekonomické dopady (Hu *et al.*, 2021; Chaurasia *et Ghose*, 2024; WHO, 2024).

V České republice se datuje začátek pandemie k 1. březnu 2020, kdy byl evidován první nakažený v ČR. První opatření proti šíření epidemie pak vláda ČR přijala 3. března 2020, o pár dní později byly uzavřeny školy a vyhlášen nouzový stav s řadou omezení pro všechny občany ČR. Následovalo mnoho dalších opatření i období s „uvolňováním“ restriktcí. V září 2020 byla ČR jednou z nejhůře zasažených zemí v Evropě v rámci počtu nakažených osob na milion obyvatel. Veškerá protiepidemická opatření byla definitivně zrušena 5. května 2022 (Fiala, 2020; Kašpar *et Švec*, 2022; Novinky.cz, 2020).

3.2.3 Organizace genomu SARS-CoV-2

Genom SARS-CoV-2 se skládá z jednoho nesegmentovaného vlákna pozitivní RNA (+ssRNA, positive-sense single-stranded RNA) o délce přibližně 30 kb. Genomová RNA obsahuje 5' čepičku (cap) a 3'-poly(A) konec a zahrnuje 15 otevřených čtecích rámců (ORF, Open Reading Frames). +ss RNA se využívá jako mRNA pro přímou translaci polyproteinového prekurzoru, který kóduje několik nestrukturálních proteinů (nsps, nonstructural proteins) včetně RNA-dependentní RNA polymerázy (Al-Qaaneh *et al.*, 2021; Fehr *et Perlman*, 2015; Chen *et al.*, 2020; Khailany *et al.*, 2020).

První ORF1a/b zaujímá asi dvě třetiny délky celého genomu. ORF1a/b na 5' konci kóduje 16 nsp. V závislosti na -1 posunové mutaci (tzv. frameshift) mezi ORF1a a ORF1b vzniká polypeptid1a (pp1a) nebo polypeptid1b (pp1b). Pp1a kóduje NSP1-NSP11 a pp1b odpovídá NSP12 až NSP16. V rámci nsps vznikají dvě cysteinové proteázy (proteáza podobná papainu (nsp3) a proteáza podobná chymotrypsinu (nsp5)), RNA-dependentní RNA polymeráza – RdRp (nsp12), helikáza (nsp13) a další, které se podílí na transkripci a replikaci SARS-CoV-2. V posledních 10 kb od 3' konce jsou kódovány čtyři strukturní proteiny: spike (S) – povrchový glykoprotein, membránový (M), obalový (E, envelope) a nukleokapsidový (N) protein a další ORF (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8b, ORF9a, ORF9b a ORF10) kódují doplňkové proteiny, které mají významnou roli v infekci a patogenezi SARS-CoV-2.

Na 5' konci je také vedoucí sekvence (sekvence, která předchází kódující sekvenci genu) a nepřekládaná oblast (UTR, UnTranslated region), jejíž sekvence, délka a sekundární struktura vlásenky ovlivňuje účinnost replikace a transkripce. Každému strukturnímu genu také předchází transkripční regulační sekvence (TRS), která je nutná pro jejich funkční expresi. UTR na 3' konci obsahuje struktury RNA klíčové pro replikaci virové RNA (Al-Qaaneh *et al.*, 2021; Fehr *et Perlman*, 2015; Chen *et al.*, 2020; Ravi *et al.*, 2022; Yadav *et al.*, 2021).

3.2.4 Strukturní proteiny SARS-CoV-2

Čtyři strukturní proteiny (S, E, M a N) jsou klíčové pro sestavení virionů a způsobení infekce.

S protein (~150 kDa) je fúzní membránový glykoprotein I. třídy sestávající se z 1273 aminokyselin. Jedná se o homotrimerní protein. Každý monomer je tvořen dvěma podjednotkami – S1 a S2. Podjednotka S1 zodpovídá za vazbu k receptoru hostitelské buňky

a podjednotka S2 za fúzi virové a buněčné membrány. S protein je klíčový pro vstup viru do hostitelské buňky, protože zprostředkovává vazbu na vstupní receptor – angiotenzin-konvertující enzym 2 (ACE2, Angiotensin-Converting Enzyme 2). S1 podjednotka má dvě funkční domény, N-koncovou a C-koncovou doménu. Za rozpoznání ACE2 zodpovídá oblast 211 aminokyselin (aminokyseliny 319-523) na C-koncové doméně S1 podjednotky, tzv. vazebná doména receptoru (RBD, Receptor-Binding Domain). Podobnost aminokyselinového složení RBD mezi SARS-CoV a SARS-CoV-2 je 73 %. Specifickým rysem pro SARS-CoV-2 je inserce čtyř aminokyselinový zbytků (PRRA, aminokyseliny 681-684) v místě spojení podjednotek S1 a S2. Tato inserce polybazického místa štěpení umožňuje štěpení furinem, což je hraje důležitou roli při virové infekčnosti. Proteolytické zpracování hostitelskými proteázami (u SARS-CoV-2 furinem, katepsinem L a transmembránovou serinovou proteázou – TMPRSS2, Transmembrane Serine Protease 2) je, stejně jako i u jiných koronaviřů, nutné pro vstup SARS-CoV-2 do buňky. Polybazické místo pro štěpení furinem může snižovat stabilitu proteinu SARS-CoV-2 S a usnadnit konformační adaptaci, která je nutná pro vazbu RBD na ACE2. Další jedinečnou vlastností S proteinu SARS-CoV-2 oproti SARS-CoV je přítomnost O-vázaných glykanů k S673, T678 a S686, které lemují místo štěpení. RBD je hlavním cílem neutralizujících protilátek při infekci a samotný S protein byl ve středu zájmu pro vývoj terapeutik a vakcín (Casalino *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020; Woo *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2021).

Proteiny E a M jsou malé transmembránové proteiny nutné pro morfogenezi, sestavení a pučení viru.

M protein (~25–30 kDa) je zastoupen nejhojněji v rámci strukturních proteinů. Má tři různé transmembránové domény. Homodimerní M protein je vyžadován pro sbalení genomu, váže se na nukleokapsidu a určuje definitivní tvar virionu (Dhama *et al.*, 2020; Yadav *et al.*, 2021).

E protein (~8,5 kDa) je nejmenším strukturním proteinem SARS-CoV-2 a společně s M proteinem je jednou z hlavních membránových složek. Zprostředkovává pučení, uvolňování virů a má podíl na virové patogenezi. V rámci hostitelské buňky funguje jako selektivní viroporin (iontový kanál) přes membránu endoplazmatického retikula a Golgiho intermediárního kompartmentu (ERGIC, endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment) (Hardenbrook *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2020).

N protein je hlavní proteinovou složkou uvnitř virionu a má několik funkcí. Je zodpovědný

za organizaci genomu do komplexu ribonukleoproteinu, dále inhibuje produkci interferonu β a moduluje tak přirozenou imunitní odpověď hostitelských buněk a je supresorem RNA interference, což je prospěšné pro virovou replikaci (Dhama *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Jahirul Islam *et al.*, 2023).

3.2.5 Mutace SARS-CoV-2

Genetická diverzita u SARS-CoV-2 je klíčová pro jeho fitness a patogenní potenciál. U SARS-CoV-2 jsou zdrojem genetické diverzity mutace, rekombinace a přeskupení. Rekombinace a přeskupení jsou důležitými mechanismy při mezidruhovém přenosu viru, protože dochází k vytvoření nových antigenních kombinací, které mohou vést k úspěšné adaptaci na nového hostitele (Rahimi *et al.*, 2021; Rehman *et al.*, 2020).

Pro evoluci SARS-CoV-2 v rámci jednoho hostitelského druhu jsou nejdůležitější mutace – bodové mutace a inserce/delece.

Mutace ovlivňují virulenci, rychlost šíření, antigenicitu a mohou snižovat míru neutralizace protilátkami získanými přirozenou infekcí nebo vakcinací. Průměrný počet mutací u SARS-CoV-2 je vypočten na 9×10^{-7} mutací na nukleotid za replikační cyklus. Rychlost mutací u SARS-CoV-2 je závislá na selektivním tlaku, přesnosti replikace a dalších faktorech souvisejících s hostitelem. V závislosti na podmínkách, ve kterých se virus replikuje, je průměrná míra 4×10^{-4} nukleotidových substitucí na místo za rok (Abbasian *et al.*, 2023; Chaurasia *et Ghose*, 2024; Chernyaeva *et al.*, 2023).

3.2.6 Varianty SARS-CoV-2

Protože se v průběhu pandemie COVID-19 objevilo vícero nových sekvenčních variant SARS-CoV-2, WHO a Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) začaly rozlišovat varianty SARS-CoV-2 mimo jiné na varianty vyvolávající obavy (VOC, Variants of Concern) a zájmové varianty (VOI, Variants of Interest) s úmyslem zacílit globální monitorování a výzkum. VOI mají specifické genetické markery, které byly spojeny se změnami vazby k receptoru, ovlivňují virulenci, snižují neutralizaci protilátkami získanými přirozenou infekcí nebo vakcinací a vyznačují se schopností vyhnout se detekci nebo snížení účinnosti terapeutik či očkování. VOC mají vlastnosti obdobné jako VOI, ale existuje u nich důkaz o zvýšeném přenosu.

Jednotlivé varianty SARS-CoV-2 jsou označovány více způsoby. Vědeckým označením je kombinace písmen a číslic. Pro zjednodušení začala WHO označovat jednotlivé varianty písmeny řecké abecedy (Hillary *et Ceasar*, 2023; Ravi *et al.*, 2022).

Na konci roku 2019 byly ve Wu-chanu v Číně hlášeny série případů pneumonií nejasného původu. Podle místa, kde se virus poprvé objevil, byl nazýván virus jako wuchanský či jednoduše nový koronavirus. Oficiálně byl virus SARS-CoV-2 pojmenován 11. února 2020 Mezinárodním výborem pro taxonomii. Ve srovnání s genomem primárního SARS-CoV-2 bylo v průběhu času nalezeno více než tisíc mutací a 17 z nich bylo popsáno jako vysokofrekvenčních (Gorbalenya *et al.*, 2020; Rahimi *et al.*, 2021).

Alfa varianta SARS-CoV-2 (B.1.1.7) byla poprvé objevena v listopadu 2020 ve Spojeném království, a proto bývá označována také jako „britská“. Ve virovém genomu se vyskytuje 17 mutací definujících linii B.1.1.7 z toho 8 mutací v oblasti kódující S protein (A69-70 delece, A144 delece, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H). Mutace N501Y v oblasti kódující RBD v S proteinu je hlavní determinantou zvýšeného přenosu varianty Alfa. Tato varianta se vyznačovala zvýšeným rizikem hospitalizace i vyšší úmrtností než u primárního SARS-CoV-2 (Galloway *et al.*, 2021; Grint *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

Beta varianta SARS-CoV-2 (B.1.351) byla poprvé zjištěna v Jižní Africe v říjnu 2020 a způsobila druhou vlnu epidemie COVID-19 v mnoha částech světa. Tato varianta je definována osmi mutacemi (L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y a A701V) v S proteinu, tři mutace (K417N, E484K a N501Y) jsou umístěné v oblasti RBD a stojí za zvýšenou afinitou k ACE2 receptorům (Tegally *et al.*, 2021).

Delta varianta SARS-CoV-2 (B.1.617.2) byla zodpovědná za druhou vlnu infekcí COVID-19 v Indii. Varianta delta poprvé detekována v říjnu 2020 a v květnu 2021 tvořila asi 90 % všech detekovaných variant SARS-CoV-2 v Indii. Během několika měsíců se rozšířila do 163 zemí a na začátku srpna 2021 představovala varianta delta 90 % cirkulujících variant SARS-CoV-2 na světě.

Varianta delta má 23 mutací ve srovnání s alfa variantou SARS-CoV-2. V S proteinu je osm substitucí (T19R, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R a D950N) a dvě delece (156 a 157 delece), přičemž substituce L452R a P681R jsou důvodem pro masivní rozšíření této varianty. Substituce P681R, arginin substituuje prolin na pozici 681, umožňuje ještě účinnější fúzi a integraci viru do cílových buněk než jiné varianty tím, že tato mutace optimalizuje místo pro štěpení furinem a umožňuje účinnější štěpení prekurzorového S proteinu na aktivované formy S1 a S2. Tato mutace je důležitá pro usnadnění přenosu této varianty mezi lidmi. Substituce L452R, nahrazení argininu za leucin na pozici 452, zvyšuje virovou infekčnost a účinnost fúze, stejně jako virovou replikaci. Mutace L452R zvyšuje

afinitu vazby S proteinu na receptor ACE2. Tato silnější vazba S proteinu na receptor ACE2 pomáhá vyhnout se vazbě protilátek stimulovaných vakcínou na S protein. Tato mutace také umožňuje viru uniknout CD8 T buňkám imunitního systému, které by mohly virus eradikovat a dochází tak k častějším reinfekcím u pacientů s předchozí infekcí jinou variantou SARS-CoV-2 než delta (He *et al.*, 2021; Hendaus *et Jomha*, 2021; Saberiyan *et al.*, 2022; Shiehzađegan *et al.*, 2021; Yang *et Shaman*, 2021).

V listopadu 2020 byla poprvé v Brazílii identifikována gamma varianta SARS-CoV-2 (P.1). Tato varianta má 10 mutací v S proteinu oproti primárnímu SARS-CoV-2 (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y a T1027I) z toho tři mutace jsou v oblasti RBD (N501Y, K417T a E484K) (Faria *et al.*, 2021).

Další varianta SARS-CoV-2 – omikron (B.1.1.529) byla identifikována v listopadu 2021 v Botswaně. Varianta omikron vyvolala novou vlnu infekcí po celém světě a na vrcholu „omikronové vlny“ byl přírůstek infekcí mnohem vyšší než u předchozích variant. Avšak infekce variantou omikron nezpůsobovaly tak závažný průběh onemocnění COVID-19 jako dřívější varianty. Varianta omikron se vyznačuje zvýšenou přenositelností, únikem neutralizačním protilátkám proti primárnímu SARS-CoV-2 a zvýšeným rizikem opětovné infekce.

Varianta omikron se od ostatních variant liší vysokým počtem mutací, které obsahuje (více než 50 mutací). V oblasti RBD obsahuje klíčové mutace pro zvýšení infekčnosti této varianty: S371L, G339D, S375F, S373P, K417N, N440K, S477N, G446S, E484A, T478K, Q493K, Q498R, G496S, N501Y a Y505H. Díky dalším mutacím v genomové oblasti se objevilo několik podvariant omikronu (například BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 a rekombinantní BA.1/BA.2) (Gu *et al.*, 2022; Chatterjee *et al.*, 2023; Pather *et al.*, 2023).

Protože virus SARS-CoV-2 neustále mutuje objevily se také další varianty: lambda (C.37), mu (B.1.621), epsilon (B.1.427 a B.1.429), zeta (B.1.1.28.2), eta (B.1.525), iota (B.1.526), theta (P.3), kappa (B.1.617.1) a nové varianty stále vznikají (Hillary *et Ceasar*, 2023; Xie *et al.*, 2021).

3.3 Rozlišení variant SARS-CoV-2

Rozdílné sekvenční varianty viru SARS-CoV-2 mají vliv na virulenci, antigenicitu, rychlost šíření, účinnost vakcinace a účinnost léčby neutralizačními protilátkami. Pro sledování aktuálního stavu, dynamiky evoluce viru, vytváření předpovědi šíření viru v populaci je důležité určení sekvenčních variant SARS-CoV-2.

Přístupy pro genotypizaci SARS-CoV-2 jsou dva: sekvenování nebo cílené testování pro identifikaci vybraných variant SARS-CoV-2.

3.3.1 Sekvenování

Celogenomové sekvenování (WGS, Whole Genome Sequencing) genomu SARS-CoV-2 především technologiemi sekvenování nové generace (NGS, Next Generation Sequencing) je základem pro monitorování, identifikaci nových variant a provádění fylogenetických studií. WGS bylo také zásadní pro první identifikaci a charakterizaci molekulární struktury SARS-CoV-2 a spolu s elektronovou mikroskopií a virovými kulturami umožnilo hlubší pochopení struktury viru a jeho mechanismů. Tyto znalosti daly základ pro vývoj cíleného testování, diagnostických metod a terapeutických strategií (Falzone *et al.*, 2021).

Pro prvotní sekvenování genomu SARS-CoV-2 byl využit přístup metagenomický, který umožňuje získat úplný genom bez předchozí znalosti sekvence. Sdílením získaných genomových sekvencí se mohly rozvíjet další metody WGS s cíleným přístupem, tj. založené na amplikonu. Získané genomové sekvence totiž umožnily návrh primerů, které amplifikují oblasti o délce 400 až 2500 párů bází. Amplikony se překrývají a mohou pokrýt celou sekvenci genomu. Cílené sekvenování je méně nákladné, umožňuje současné zpracování více vzorků pro jednotlivé běhy, čímž je efektivnější z hlediska časové a finanční nákladnosti. Pro WGS byly vyvinuty různé protokoly, které využívaly různých platforem, ale především se jednalo o Ion Torrent, Oxford Nanopore Technologies a Illumina (Berno *et al.*, 2022; Capobianchi *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020).

Jedna z nejrozšířenějších sad primerů, využívaných pro cílené sekvenování, je od společnosti ARTIC Network. Protokol ARTIC byl poprvé uvolněn pro veřejnost v lednu 2020 a od té doby byl několikrát aktualizován. Protokol ARTIC, stejně jako ostatní metody sekvenování založené na amplikonu, využívají pro navržení a implementaci specifických primerů metody polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) (Lambisia *et al.*, 2022).

Pro diagnostické účely je WGS nevhodné kvůli vysokým nákladům na analýzu, drahým

technologíím, potřebě vysoce kvalifikovaného personálu a časové náročnosti. Z těchto důvodů byla snaha o rozvoj dalších metod, a to nejen pro diagnostické účely, ale také pro rychlejší genotypizaci SARS-CoV-2, které by lépe umožňovaly sledování nových variant v populaci (Berno *et al.*, 2022).

3.3.2 Cílené testování pro detekci vybraných variant SARS-CoV-2

Ostatní metody, které nevyužívají WGS, cíleně testují již známé vybrané varianty či konkrétní mutace SARS-CoV-2. Metody s cíleným testováním jsou omezeny počtem variant, které umožňuje metoda testovat, ale nabízí rychlejší výsledek, nižší náklady a vyšší flexibilitu v personálním a technologickém vybavení laboratoří.

Většina metod pro cílenou detekci variant SARS-CoV-2 je založena na technikách amplifikace nukleových kyselin, které jsou schopny generovat výsledky v řádu hodin. Omezení těchto metod je dáno především požadavky na design potřebných primerů a sond, dále také počtem fluoroforů s nepřekrývajícími se spektry a počtem fluorescenčních kanálů v termocykléru. Tyto metody se zaměřují především na testování mutací – bodových polymorfismů (SNP, Single-Nucleotide Polymorphism) zejména v genu pro S protein, ale také v oblasti ORF1ab (RdRP) či v genech pro proteiny N a E (Colosimo *et al.*, 2022; Specchiarello *et al.*, 2023; Vanoni *et al.*, 2022).

Komerčně dostupné metody pro identifikaci variant SARS-CoV-2

Rychlou metodou pro identifikaci variant SARS-Cov-2 je „Simplexa® SARS-CoV-2 Variants Direct“ od společnosti Diasorin Molecular. Tato metoda využívá k určení varianty SARS-CoV-2 detekci mutací v S proteinu: 501Y, E484A, E484K, E484Q, L452R a F486V a koexistenci mutací G496S, Q498R a Y505H, které jsou spojeny s přítomností variant: alfa, beta, gamma, delta, epsilon, eta, iota, kappa a omicron. K provedení jsou potřeba vzorky z nasofaryngeálních a nosních výtěrů bez předchozí extrakce RNA. Metoda využívá RT-PCR v reálném čase, amplikony jsou detekovány specifickými fluorescenčními sondami (kanály 520, 560, 610) a analýzou křivky tání je určena varianta SARS-CoV-2. Pro provedení tohoto testu je potřeba přístroj LIAISON MDX s doprovodným softwarem. Výsledky testu jsou známy do dvou hodin (Eptaminitaki *et al.*, 2023).

Další metodou je „COVID-19 Variant Catcher“ a jeho aktualizovaná verze „COVID-19 Ultra Variant Catcher“ od společnosti Clonit. Tento test má certifikaci CE-IVD (European In-Vitro Diagnostic Devices Directive, tj. výrobek vyhovující evropské směrnici o diagnostických zařízeních in vitro (IVDD 98/79/EC) s možností legální komercializace

v EU). Jedná se o kvalitativní test založený na RT-PCR v reálném čase. „COVID-19 Variant Catcher“ umožňuje identifikaci mutace genu S HV 69-70del, E484K a N501Y pro rozlišení variant SARS-CoV-2 alfa, beta, gamma. Verze „COVID-19 Ultra Variant Catcher“ umožňuje rozlišení mutací L452R, E484K, E484Q a N501Y a rozlišuje kromě variant alfa, beta, gamma, také varianty delta a kappa. Nevýhodou je nutnost použití již extrahované RNA ze vzorků testovaných jako pozitivní na virus SARS-CoV-2 (COVID-19 Ultra Variant Catcher CE IVD – návod k použití; COVID-19 Variant Catcher CE IVD – návod k použití). Společnost Seegene Technologies vyvinula sérii testů „Novaplex SARS-CoV-2 Variants“ k detekci známých variant SARS-CoV-2. Tento test využívá multiplexní RT-PCR k detekci mutací genu pro S protein a současně potvrzuje přítomnost SARS-CoV-2 detekcí genu pro RdRp. Jednotlivé varianty testu jsou schopny detekovat tyto mutace: 69–70del, E484K, N501Y (varianta I); L452R, W152C, K417T a K417N (varianta II); L452R, P681R a K417N (varianta IV); L452Q, F490S, P681R a L452R (varianta V), L452Q, F450S, a R3 69–70del, E484A, N501Y (varianta VII). Na základě těchto mutací mohou testy rozlišovat varianty alfa, beta, gamma, delta, epsilon a varianta VII rozlišuje také omikron (BA.1, BA.2). Systém umožňuje automatickou extrakci (nutnost použití přístroje STARlet od Seegene), pro RT-PCR v reálném čase je potřeba termocyklér CRX96 Dx a software Seegene Viewer pro automatizovanou interpretaci. Tento test není založen na analýze křivky tání, ale využívá technologii MuDT™, která umožňuje detekci více cílů s individuálními hodnotami cyklu PCR, ve kterém byl detekován nárůst fluorescence nad pozadím přirozené fluorescence (Ct, threshold cycle). Technologie MuDT™ využívá změny fluorescenčních signálů mezi dvěma různými teplotami detekce a poskytuje „skutečnou“ hodnotu Ct. MuDT™ umožňuje genotypizaci čtyř SNP cílů v jedné zkumavce (Nielsen *et al.*, 2022; Specchiarello *et al.*, 2023).

Jedním z prvních komerčně dostupných testů pro kvalitativní detekci SARS-CoV-2 ve vzorcích horních cest dýchacích byl „TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit“ od společnosti ThermoFisher Scientific. Jedná se o multiplexní RT-PCR test založený na třech sadách primerů a sond specifických pro ORF1ab, N gen a S gen SARS-CoV-2. Tento test byl vyvinut pro rychlou diagnostiku onemocnění COVID-19, ale byl využit jako rychlá metoda pro screening na varianty alfa a omikron (BA.1). Sdílená mutace 69-70del u varianty alfa a omikron způsobuje selhání detekce cíle genu S v testu. Pokud ve vzorku došlo k detekci amplikonu pro ORF1ab a N protein, ale v důsledku mutace 69-70del nedošlo k amplifikaci u genu pro S protein, tak se tato kombinace výsledků nazývá selhání cíle

S genu (SGTF; S gene target failure) a znamená to, že vzorek obsahuje variantu SARS-CoV-2 alfa či omikron (Colosimo *et al.*, 2022; Specchiarello *et al.*, 2023; TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit – návod k použití).

Další metody pro identifikaci variant SARS-CoV-2

Pro identifikaci variant SARS-CoV-2 bylo vyvinuto mnoho dalších nekomerčních metod. Některé z těchto metod jsou zaměřeny pouze na detekci konkrétní zájmové mutace, která je charakteristická pro určitou variantu, jiné metody umožňují genotypizaci více variant SARS-CoV-2 najednou.

Barua *et al.* (2022) vyvinuli metodu pro detekci všech kmenů SARS-CoV-2 a současnou identifikaci varianty delta. K tomuto účelu využili sondy pro fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) s RT-PCR k identifikaci mutace T478K typické pro variantu delta. Výhodou této metody je možnost jejího provedení všemi hlavními značkami termocyklérů.

Multiplexní RT-PCR v reálném čase, která svými specifickými primery a sondami detekuje 9 mutací v oblasti genu pro RBD S proteinu – 69-70del, K417T, K417N, L452R, E484K, E484Q, N501Y, P681H a P681R, navrhl Chung *et al.* Tato metoda umožňuje detekci variant alfa, beta, gamma, delta a čtyř omikronových mutací na S proteinu (HV 69-70del, K417N, N501Y, P681H). Metoda byla poskytnuta široké veřejnosti a bylo tedy možné její rychlé nasazení v laboratořích (Chung *et al.*, 2022).

Vzhledem k stále nově vznikajícím variantám SARS-CoV-2 vyžaduje většina metod neustálé přizpůsobování, aby mohly být účinné i při detekci nových variant. Clark *et al.* představili metodu pro určení varianty SARS-CoV-2 na základě analýzy multiplexních fragmentů s rozdílnou velikostí a rozdílnou fluorescenční značkou. Zaměřili se na osm častých mutačních míst SARS-CoV-2. Metoda vykazovala podobnou přesnost jako WGS, navíc je adaptibilní a rychlá (2022).

Omezení v multiplexování, z důvodu omezeného počtu fluoroforů s nepřekrývajícími se spektry u všech metod založených na RT-PCR, překonává platforma vyvinutá Zhao *et al.* (2023), která kombinuje 17-plexní testy s hmotnostní spektrometrií s maticí asistovanou laserovou desorpčí/ionizací a analyzátozem doby letu (MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight). Protože metody založené na RT-PCR v kombinaci s hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF překonávají také riziko výpadku cíle a falešně negativních výsledků kvůli neshodám vazebného místa primeru/sondy, rozvíjelo tuto

metodu více výzkumných skupin. Platforma Zhao *et. al* umožňuje zacílení 14 různých mutačních míst v genu pro S protein, dále se zaměřuje na gen pro N protein, RdRp a gen ribonukleázy P (vnitřní kontrola k ověření přítomnosti nukleových kyselin). Touto metodou je možno rozlišit varianty delta a omikron (BA.1, BA.2, BA.5).

Další platformy pro diagnostiku a sledování variant SARS-CoV-2 využívají technologii CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), která mimo jiné poskytuje možnost sekvenčně specifické analýzy nukleových kyselin a v posledních letech byla široce používána při detekci patogenů. Platforma Welch *et. al* (2022) kombinuje diagnostiku na bázi CRISPR a mikrofluidiku. Umožňuje rozlišení nebo detekci 26 mutací v genu pro S protein a rozlišení mezi variantami alfa, beta, gamma, delta, epsilon a omikron.

3.4 LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off

Metoda LATE-PCR se sadami lights-on/lights-off sond, které hybridizují se svými cílovými jednovláknovými sekvencemi v širokém teplotním rozsahu, se využívá pro detekci mutací v rámci stovek nukleotidů. Sady sond s různými fluorescenčními barvami se dají v rámci jedné zkumavky kombinovat a umožňují analyzovat ještě delší jednovláknové cíle.

LATE-PCR je pokročilým typem nesymetrické PCR po účinnou produkci ampliconů jednovláknové DNA. V LATE-PCR se využívá pár primerů záměrně navržených pro použití v nestejných koncentracích – jeden primer je tzv. „limiting“ (limitující) a druhý „excess“ (v nadbytku). Pro nejvyšší účinnost reakce a specifity během exponenciální fáze LATE-PCR je nutné při návrhu primerů dodržet pravidlo ohledně teploty tání (T_t) limiting primeru (T_t^L) a excess primer (T_t^X): $T_t^L - T_t^X \geq 5 \text{ } ^\circ\text{C}$. V průběhu 30-70 teplotních cyklů je jednovláknových ampliconů 10-20x více oproti dvouvláknovým, které jsou produkovány jen v počátku amplifikace do doby vyčerpání limiting primeru.

Sondy lights-on/lights-off jsou páry hybridizačních sond. Sondy lights-off se skládají z cílové vazebné sekvence, jsou kratší než lights-on sondy a obsahují pouze zhášec sloužící k absorpci energie fluoroforu sousední sondy lights-on při navázání obou sond na cílovou sekvenci.

Každá sonda lights-on se skládá z cílové vazebné sekvence o ~20-35 nukleotidech, které mohou být na koncích ohraničeny 1-2 nukleotidy, aby se vytvářela vlásenka závislá na teplotě a stabilizovala se interakce fluoroforu na jednom konci a zhášeče na druhém konci lights-on sondy, když sonda není navázána na svou cílovou sekvenci. Sondy lights-on/lights-off jsou koncipovány tak, aby pokryly cílovou sekvenci ampliconu.

Při hybridizaci na cílovou sekvenci jsou fluorofor a zhášec na lights-on sondě od sebe pevně odděleny a fluorofor může emitovat signál silnější než v roztoku. Vazba lights-off sondy se zhášecem na cílovou sekvenci v bezprostřední blízkosti fluoroforu navázané lights-on sondy vypne fluorescenci této lights-on sondy.

Hlavní výhodou této metody je, že sondy lights-on/lights-off nehybridizují pouze se 100% kompatibilní cílovou sekvencí, ale sondy jsou tolerantní k chybnému párování. Přítomnost, byť jedné mutace v cílové sekvenci, ovlivní teplotu hybridizace sondy, což se projeví ve výsledném fluorescenčním vzorci, křivce, obryse. Fluorescenční obrys je kombinací signálu všech sond při kontinuálním měření fluorescence na konci LATE-PCR, když teplota klesne a opět se pomalu zvyšuje. Porovnáním získaného fluorescenčního obrysu se známými obrysy můžeme identifikovat variantu přítomnou ve vzorku.

Tato metoda umožňuje spolehlivou a robustní detekci mutací v cílovém amplikonu bez otevření zkumavky a použití sekvenování. Díky tomu byla již úspěšně využita pro testování citlivosti na pyrazinamid u člověka, detekci patogenů spojených se sepsí, identifikaci druhů ryb pomocí tzv. čárového kódování a dalších aplikacích (Carver-Brown *et al.*, 2012; Naam *et al.*, 2021; Pierce *et al.*, 2005; Rice *et al.*, 2012; Sirianni *et al.*, 2016; Tetrault *et al.*, 2014; Whitfield *et al.*, 2020).

Metoda LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off má potenciál odhalit všechny mutace, které se vyskytují v regionu vyhrazeném primery zleva a zprava. Stejně jako byla využita u jiných organismů pro jejich identifikaci, či pro rozlišení mutací v různých genech na základě srovnání specifické křivky tání s databankou křivek tání jednotlivých druhů organismu či variant genu, mohla by být uplatněna při rozlišování mutací v genomu SARS-CoV-2 a potažmo variant SARS-CoV-2. Výhodnou zájmovou oblastí pro určení mutací typických pro konkrétní varianty SARS-CoV-2 by byla oblast genu pro S protein, konkrétně S1 podjednotku, která obsahuje oblast kódující RBD zodpovídající za rozpoznání receptoru ACE2 hostitelských buněk a podléhající časté mutaci.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

K testování lights-on/lights-off sond byla použita RNA SARS-CoV-2 izolovaná z pozitivně testovaných patientských vzorků na virus SARS-CoV-2. Vzorky pocházejí od pacientů Fakultní nemocnice v Olomouci. Vzorky RNA byly dříve určeny sekvenováním a odpovídaly variantě SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) a jejím podvariantám (AY.7.1, AY.4, AY.43, AY.46.6, AY.121, AY.122, AY.127). Do doby analýzy byly vzorky uchovávány při teplotě -80 °C.

Dále byly pro testování lights-on/lights-off sond využity syntetické standardy – DNA fragmenty, vytvořené podle známé sekvence viru.

Pro testování první sady primerů a sond byl využit DNA fragment genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2 s lokálním označením 2512 (Invitrogen, 3170199); DNA fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s mutací odpovídající C23604G v genomu SARS-CoV-2 s lokálním označením 2513 (Invitrogen, 3170200); DNA fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s mutacemi odpovídajícími C23604G a C23557T v genomu SARS-CoV-2 s lokálním označením 3081 (Invitrogen, 90-992724233).

Pro testování druhé sady primerů a sond byly využity standardy: DNA fragment genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2 s lokálním označením 2440 (Invitrogen, 3110590); DNA fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s osmi SNP oproti 2440 s lokálním označením 2441 (Invitrogen, 3110591).

Sekvence použitých syntetických standardů jsou uvedeny v přílohách (viz Příloha 1).

4.2 Použité chemikálie

- Low-EDTA TE pufr (Affymetrix, 902979)
- TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, A15300)
- Primer 2549 (IDT, 230378821)
- Primer 2550 (IDT, 230378822)
- Primer 2538 (IDT, 230378810)
- Primer 2539 (IDT, 230378811)
- Primer 2506 (Generi Biotech, 2165E0)
- Sonda 2540 (IDT, 230378812)
- Sonda 2541 (IDT, 230378813)

- Sonda 2542 (IDT, 230378814)
- Sonda 2543 (IDT, 230378815)
- Sonda 2544 (IDT, 230378816)
- Sonda 2545 (IDT, 230378817)
- Sonda 2546 (IDT, 230378818)
- Sonda 2547 (IDT, 230378819)
- Sonda 2551 (IDT, 230378823)
- Sonda 2552 (IDT, 230378824)
- Sonda 2554 (IDT, 230378825)
- Sonda 2555 (IDT, 230378826)
- Sonda 2556 (IDT, 230378827)
- Sonda 2557 (IDT, 230378828)
- Sonda 2558 (IDT, 230378829)
- Sonda 2559 (IDT, 230378830)
- EvaGreen (LabMark, Biot31000)
- depcH₂O

Sekvence použitých primerů a sond jsou uvedeny v přílohách (viz Příloha 2 a 3).

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Laminární box Mars Safety Classe 2 (LaboGene)
- Centrifuga/vortex Combi-Spin (Biosan)
- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- Centrifuga Centrifuge 5430 (Eppendorf)
- Mrazák a chladnička (Gorenje)
- Termocyklér LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics)
- Hlubokomrazící box (New Brunswick)
- Termocyklér Real-Time PCR Detection System CFX96 C1000 Touch (Bio-Rad)
- Software Bio-Rad CFX Manager
- Software Precision Melt Analysis (Bio-Rad)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Návrh primerů a sondy

Návrh primerů vhodných k provedení LATE-PCR a lights-on/lights-off sond pro detekci mutací v regionu vyhrazeném primery zleva a zprava vycházel z doporučení a informací uvedených v publikacích od Carver-Brown *et al.* (2012), Naaum *et al.* (2021), Pierce *et al.* (2005), Rice *et al.* (2012), Sirianni *et al.* (2016), Tetrault *et al.* (2014), ale finální návrh lights-on/lights-off sond vycházel především z publikace od Whitfield *et al.* (2020).

Ke kontrole navržených primerů z hlediska tvorby primerových dimerů byl použit software PrimerDimer (dostupný na: <http://www.primer-dimer.com/>). Pro kontrolu správné pozice primerů v rámci S1 RNA byl prof. Mgr. Jiřím Drábkem, Ph.D. použit software Sequence Extractor (dostupný na: <https://www.bioinformatics.org/seqext/>).

Výjimkou byl primer 2506, který byl navržen Ph.D. studentem Rakeshem Rao.

4.4.2 Ověření funkčnosti primerů pomocí PCR v reálném čase

K ověření funkčnosti primerových párů pomocí PCR v reálném čase byla testována jejich schopnost amplifikace syntetických standardů 2512 a 2513 s primery 2549 a 2550; pro amplifikaci standardů 2440 a 2441 byla použita kombinace primerů 2538 a 2539 a kombinace primerů 2506 a 2539. Byla připravena reakční směs, která obsahovala TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (dále jen TaqPath MM), forward a reverse primer, fluorescenční barvivo EvaGreen, depcH₂O a odpovídající syntetický standard. PCR v reálném čase probíhala v termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad) dle reakčního protokolu (viz Tabulka č. 1).

Tabulka 1: Reakční protokol pro ověření funkčnosti primerů při PCR v reálném čase.

Krok PCR reakce	Počet cyklů	Teplota	Čas
RT inkubace	1	50 °C	15 min
Aktivace polymerázy a inaktivace reverzní transkriptázy	1	95 °C	2 min
Denaturace		95 °C	3 sekundy
Nasednutí primerů	48	55 °C	30 sekund
Syntéza DNA		72 °C	5 sekund
Příprava na analýzu		25 °C	60 sekund
Melting analýza		60 °C-90 °C	30 min

4.4.3 Optimalizace koncentrací lights-on/lights-off sond v reakci

K optimalizaci koncentrací lights-on/lights-off sond v reakci byly testovány dvě rozdílné koncentrace lights-on a lights-off sond. Byla připravena směs lights-on sond (2552, 2554, 2556, 2558), tj. sond s fluorescenčním barvivem a zhášečem, s označením PM686 a lights-off sond (2551, 2553, 2555, 2557, 2559), tj. sond pouze se zhášečem, s označením PM687 pro detekci a rozlišení mutace u amplikonu syntetických standardů 2512 a 2513. Obdobně byla připravena směs lights-on sond (2541, 2543, 2545, 2547) s označením PM688 a lights-off sond (2540, 2542, 2544, 2546, 2548) s označením PM689 pro detekci a rozlišení mutací u amplikonu syntetických standardů 2440 a 2441. Byly testovány dvě rozdílné koncentrace sond v reakční směsi (viz Tabulka č. 2) s odpovídajícími standardy a primery.

Tabulka 2: Rozdílná koncentrace lights-on a lights-off sond v testu pro optimalizaci jejich koncentrací v reakční směsi.

Sondy	Koncentrace	
	[$\mu\text{mol/l}$]	
	Varianta 1	Varianta 2
Lights-on	0,5	1,5
Lights-off	1,5	0,5

PCR v reálném čase probíhala v termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad) u první sady primerů a sond, pro druhou sadu sond a primerů byl využit termocyklér LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics). PCR v reálném čase proběhla dle reakčního protokolu (viz Tabulka č. 3). Fluorescence byla měřena v kanálech FAM, Cy5 a Tex 615. Vhodný kanál pro měření fluorescence u fluorescenčního barviva Cy3 vázaného na lights-on sondy 2543 a 2547 není v používaném termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad) k dispozici, takže tyto sondy nebyly nijak zahrnuty při vyhodnocení experimentu. Hodnocení experimentu bylo provedeno posouzením jednotlivých křivek tání po melting analýze.

Tabulka 3: Reakční protokol pro optimalizaci koncentrací lights-on a lights-off sond v reakční směsi.

Kroky PCR reakce	Počet cyklů	Teplota	Čas
RT inkubace	1	50 °C	15 min
Aktivace polymerázy a inaktivace reverzní transkriptázy	1	95 °C	2 min
Denaturace		95 °C	3 sekundy
Nasednutí primerů	45	55 °C	30 sekund
Syntéza DNA		72 °C	5 sekund
Příprava na analýzu		25 °C	60 sekund
Melting analýza		40 °C-90 °C	30 min

4.4.4 Ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné syntetické standardy při LATE-PCR

Při ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné syntetické standardy byla použita metoda LATE-PCR, která generuje velké množství kopií jednoho cílového řetězce genu S1 SARS-CoV-2, na který poté snadno hybridizují lights-on/lights-off sondy. LATE-PCR je nesymetrická PCR, při které se využívají rozdílné koncentrace limiting primeru 2549 (0,2 $\mu\text{mol/l}$) a excess primeru 2550 (1,0 $\mu\text{mol/l}$), aby se generoval v nadbytku jeden řetězec ampliconu. Byla připravena reakční směs, viz Tabulka č. 4. Do reakční směsi byly přidány syntetické standardy fragmentu genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s lokálním označením 2512, 2513 a 3081. Syntetický standard SARS-CoV-2 2512 obsahuje asi $3,0 \cdot 10^4$ molekul v 1 μl ; standard 2513 obsahuje asi $1,7 \cdot 10^4$ molekul v 1 μl a standard 3081 obsahuje $2,0 \cdot 10^4$ molekul v 1 μl . LATE-PCR běžela dle protokolu v Tabulce č.3 (viz kapitola 4.4.3) v termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad). Fluorescenční signál sond značených fluorescenčními barvivy FAM a Cy5 byl měřen v kanálech Cy5 a FAM, ale vyhodnocení proběhlo na základě signálu, které dávaly sondy s fluorescenční barvivem Cy5 v kanálu Cy5.

Tabulka 4: Reakční směs na jednu reakci pro ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné syntetické standardy při LATE-PCR.

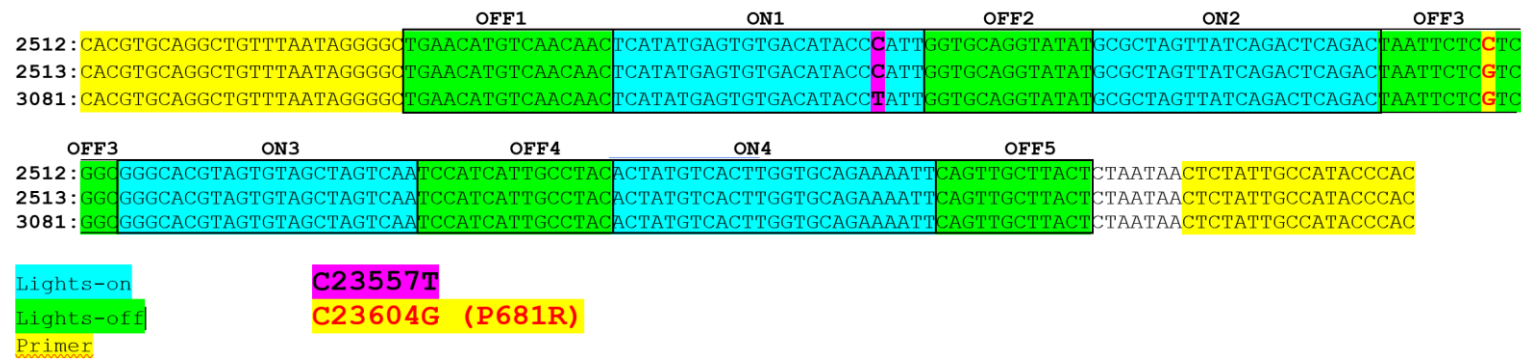
Složka	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Objem [μl]
depcH ₂ O			11,4
TaqPath MM	4x	1x	5,0
Primer 2550	100 $\mu\text{mol/l}$	1 $\mu\text{mol/l}$	0,2
Primer 2549	10 $\mu\text{mol/l}$	0,2 $\mu\text{mol/l}$	0,4
Lights-on PM686	2 $\mu\text{mol/l}$	0,15 $\mu\text{mol/l}$	1,5
Lights-off PM687	2 $\mu\text{mol/l}$	0,05 $\mu\text{mol/l}$	0,5
Syntetický standard SARS-CoV-2	20x	1x	1,0
Celkový objem			20,0

4.4.5 Ověření reprodukovatelnosti a opakovatelnosti profilů získaných křivek tání při hybridizaci lights-on/lights-off sond na syntetické standardy SARS-CoV-2 při LATE-PCR

Pro ověření reprodukovatelnosti a opakovatelnosti profilů získaných křivek tání při hybridizaci lights-on/lights-off sond při LATE-PCR byly použity syntetické standardy fragmentu genu S1 SARS-CoV-2 s lokálním označením 2512 a 3081. Při ověření opakovatelnosti byl experiment proveden v osmi opakováních. Pro ověření reprodukovatelnosti byl experiment proveden v duplikátech či triplikátech ve třech různých dnech. Reakční směsi byly připraveny podle Tabulky č. 4 (viz kapitola 4.4.4) a reakce běžela dle protokolu v Tabulce č.3 (viz kapitola 4.4.3) v termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad). Fluorescence byla měřena v kanálech Cy5 a FAM.

4.4.6 Test citlivosti při rozlišení varianty SARS-CoV-2 ve směsi

Pro test citlivosti při rozlišení varianty SARS-CoV-2 ve směsi byly použity syntetické standardy fragmentu genu S1 SARS-CoV-2 s lokálním označením 2513 a 3081, které se vzájemně odlišují jednou bodovou mutací, která je rozpoznávána hybridizací lights-on sondy 2552 (viz Obrázek č.1 a Tabulka č. 5). Multiple sequence alignment byl proveden pomocí softwaru T-COFFEE Multiple Sequence Alignment Server (dostupný na: <https://tcoffee.crg.eu/>)



Obrázek 1: Multiple sequence alignment amplifikované oblasti syntetických standardů 2512, 2513 a 3081 s vyznačenými oblastmi, na které hybridizují příslušné lights-on/lights-off sondy.

Upřesňující popis lights-on/lights-off sond označených v obrázku zkratkami OFFx a ONx je v Tabulce č. 5.

Tabulka 5: Nukleotidové sekvence a značení lights-on/lights-off sond – 1. sada.

Sonda	Lokální označení	5' modifikace	Sekvence 5'→3'	3' modifikace
Off 1	2551		TGAACATGTCAACAACa	BHQ2
On 1	2552	Cy5	aaTCATATGAGTGTGACATACCCATT	BHQ2
Off 2	2553		atGGTGCAGGTATAT	BHQ1
On 2	2554	FAM	aGCGCTAGTTATCAGACTCAGACt	BHQ1
Off 3	2555		TAATTCTCCTCGGcTa	BHQ2
On 3	2556	Cy5	ttGGGCACGTAGTGTAGCTAGTCAA	BHQ2
Off 4	2557		gTCCATCATTGCCTAC	BHQ1
On 4	2558	FAM	aACTATGTCACTTGGTGCAGAAAATT	BHQ1
Off 5	2559		atCAGTTGCTTACTat	BHQ1

Malá písmena u sekvencí označují nukleotidové neshody s cílovými sekvencemi.

Reakční směsi byly připraveny podle Tabulky č. 4 (viz kapitola 4.4.4), ale místo 1 μ l jednoho syntetického standardu SARS-CoV-2 byly do reakční směsi přidány syntetické standardy 2513 a 3081 v rozdílných poměrech (viz Tabulka č. 6). Syntetické standardy SARS-CoV-2 obsahují různý počet molekul v 1 μ l (syntetický standard SARS-CoV-2 2513 obsahuje asi $16,7 \cdot 10^3$ molekul v 1 μ l a standard 3081 obsahuje $20 \cdot 10^3$ molekul v 1 μ l), počet molekul přidávaných do reakce je uveden v Tabulce č. 6. Rozdílné množství standardů v 1 μ l nebylo záměrné, ale došlo k němu při přípravě pracovních roztoků ředěním zásobních roztoků o vysokých koncentracích standardu.

Tabulka 6: Počet molekul syntetických standardů SARS-CoV-2 2513 a 3081 přidanych do reakce při přidávání standardů do reakce v rozdílných poměrech.

Poměr standardů 3081:2513 v 1 μ l přidaném do reakce	Počet molekul standardu 3081 v reakci	Počet molekul standardu 2513 v reakci
1:0	$2 \cdot 10^4$	-
4:5	$8 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^4$
1:2	$6 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^4$
5:13	$5 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^4$
0:1	-	$1,7 \cdot 10^4$

LATE-PCR běžela dle protokolu v Tabulce č.3 (viz kapitola 4.4.3) v termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad). Vyhodnocení testu proběhlo na základě fluorescenčního signálu z kanálu Cy5.

4.4.7 Test analyzovatelného limitu vstupní nukleové kyseliny (DNA standardu)

Pro testování analyzovatelného limitu vstupní DNA byl použit syntetický standard SARS-CoV-2 3081 (obsahuje $2,0 \cdot 10^4$ molekul v 1 μ l). Byla připravena diluční řada v deph₂O o 10x ředění (viz Tabulka č.7). PCR reakční směs byla připravena dle Tabulky č.8. Do PCR reakční směsi bylo pipetováno po 1 μ l diluční řady syntetického standardu. Časový a teplotní průběh LATE-PCR je uveden v Tabulce č.3 (viz kapitola 4.4.3). Vyhodnocení proběhlo na základě fluorescenčního signálu z kanálu Cy5.

Tabulka 7: Počet molekul syntetického standardu SARS-CoV-2 3081 v 1 μl , který se přidává do reakce; 10x ředění.

Ředění	Počet molekul standardu v 1 μl
1	20000
10^{-1}	2000
10^{-2}	200
10^{-3}	20
10^{-4}	2

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro jednu reakci LATE-PCR a melting analýzu.

Složka	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Objem [μl]
depcH ₂ O			11,4
TaqPath MM	4x	1x	5,0
Primer 2550	100 $\mu\text{mol/l}$	1 $\mu\text{mol/l}$	0,2
Primer 2549	10 $\mu\text{mol/l}$	0,2 $\mu\text{mol/l}$	0,4
Lights-on PM686	2 $\mu\text{mol/l}$	0,15 $\mu\text{mol/l}$	1,5
Lights-off PM687	2 $\mu\text{mol/l}$	0,05 $\mu\text{mol/l}$	0,5
Celkový objem			19,0

4.4.8 Test rozlišení variant SARS-CoV-2 v reálných vzorcích metodou RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off

Test rozlišení variant SARS-CoV-2 při amplifikaci RNA z 96 reálných vzorků SARS-CoV-2 byl proveden metodou RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off (s lokálním označením 2551-2559).

Byla připravena reakční směs podle Tabulky č. 9. Reakční směs byla rozpipetována

do 96jamkové destičky po 11,5 μ l. Následně byl do každé jamky přidán 1 μ l vzorku RNA.

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off pro 96 vzorků.

Složka	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Objem [μ l]
depcH ₂ O			779,4
TaqPath MM	4x	1x	300,0
Primer 2550	100 μ mol/l	1 μ mol/l	12,0
Primer 2549	100 μ mol/l	0,2 μ mol/l	2,4
Lights-on PM686	25 μ mol/l	0,15 μ mol/l	7,2
Lights-off PM687	20 μ mol/l	0,05 μ mol/l	3,0
Celkový objem			1104,0

RT-LATE-PCR běžela dle reakčního protokolu v Tabulce č.3 (viz kapitola 4.4.3) v termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad). Fluorescence byla měřena v kanálech Cy5 a FAM, ale vyhodnocení proběhlo na základě fluorescenčního signálu z kanálu Cy5 pomocí softwaru Precision Melt Analysis (BioRad). Kvůli většímu souboru dat byly vzorky porovnávány na základě „Difference Curve“ (křivka rozdílu) a ne na základě křivek tání jako u předešlých experimentů.

5 Výsledky

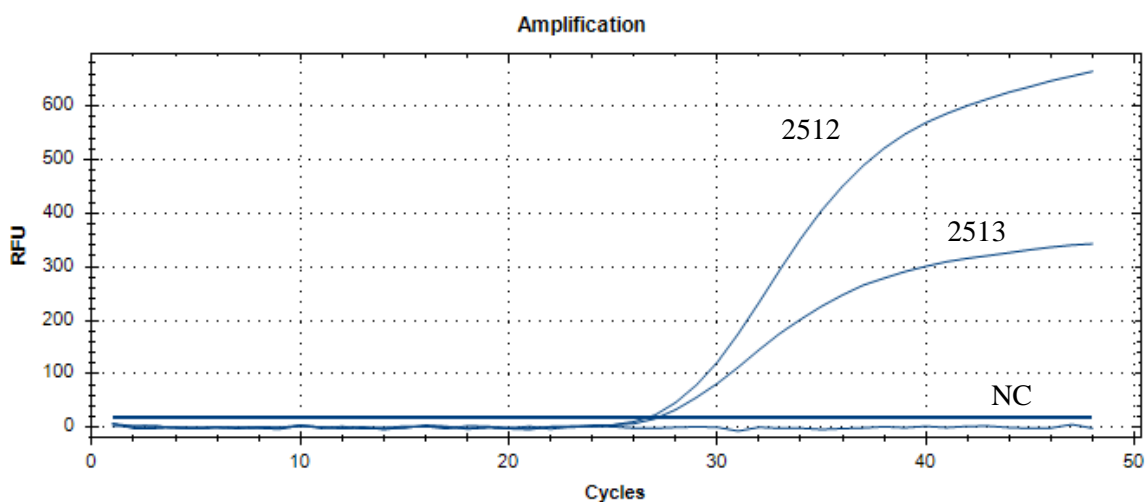
5.1 Návrh primerů a sond

Byly navrženy dvě sady primerů a lights-on/lights-off sond pro amplifikaci při reakci RT-LATE-PCR a detekci mutací v rámci amplikonů syntetických standardů – první sada primerů a sond 2512 a 2513 a druhá sada primerů a sond 2440 a 2441. Návrh primerů a sond se řídil především příkladem z publikace Tetrault et al. (2014). Návrhy byly upravovány tak, aby při kontrole pomocí softwaru PrimerDimer nebyly hlášeny problémy s dimerizací.

5.2 Ověření funkčnosti primerů pomocí PCR v reálném čase

Při ověřování funkčnosti primerů pomocí PCR v reálném čase byly amplifikované produkty detekovány pomocí interkalačního fluorescenčního barviva EvaGreen.

Došlo k amplifikaci syntetických standardů u všech primerových párů. Na Grafu č.1 lze vidět, že amplifikační křivky standardů SARS-CoV-2 2512 a 2513 mají sigmoidní tvar, zatímco u vzorku negativní/beztemplátové kontroly (NC, Negative Control) nedošlo k amplifikaci. Při amplifikaci syntetického standardu 2512 primery 2549 a 2550 byla Ct hodnota 26 a při amplifikaci standardu 2513 stejnými primery byla Ct hodnota 27.



Graf 1: Amplifikační křivka syntetických standardů SARS-CoV-2 2512 a 2513 a negativní kontroly při použití kombinace primerů 2549 a 2550 při PCR v reálném čase.

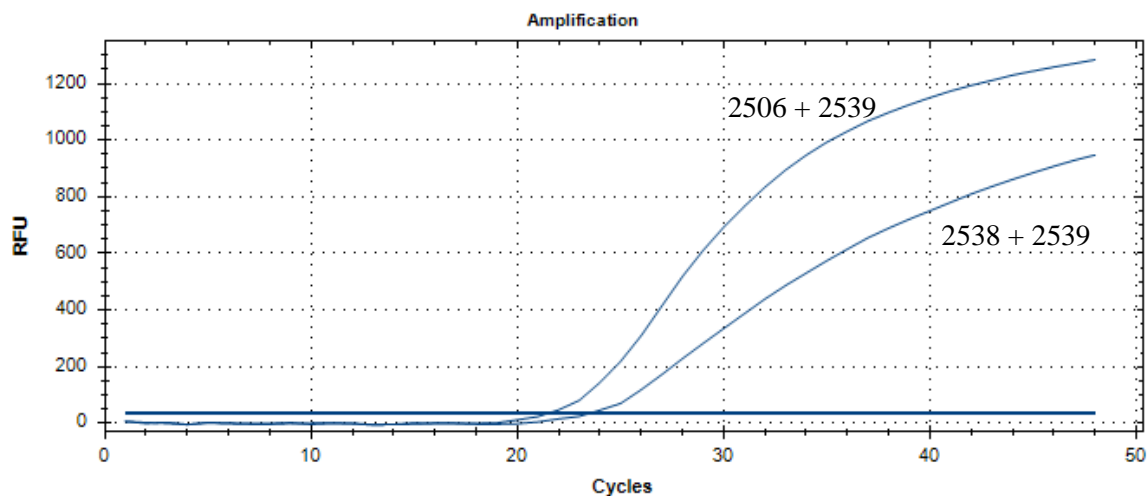
NC: negativní kontrola

2512 a 2513: syntetické standardy SARS-CoV-2 s lokálním označením 2512 a 2513

Na základě tohoto výsledku byla potvrzena funkčnost navržených primerů 2549 a 2550.

Pro účinnější amplifikaci standardu SARS-CoV-2 2440 byla lepší kombinace primerů 2506 a 2539 oproti dvojici 2538 a 2539 (došlo při jejich k použití k účinnější amplifikaci,

reflektované nižším Ct a vyšší fluorescencí v posledním cyklu, viz Graf č. 2), a proto byla kombinace primerů 2506 a 2539 následně využita pro další testování.



Graf 2: Amplifikační křivka syntetického standardů SARS-CoV-2 2440 při použití dvojice primerů 2506 a 2539 a dvojice 2538 a 2539 při PCR v reálném čase.

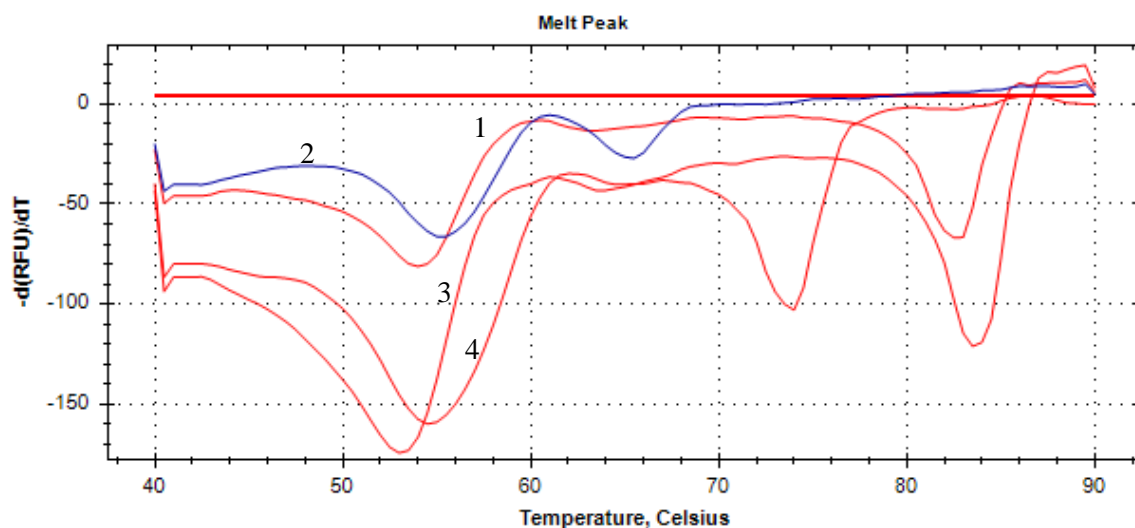
NC: negativní kontrola

2506 + 2539: primery pro amplifikaci syntetických standardů 2440 a 2441 s lokálním označením 2506 a 2539

2506 + 2539: primery pro amplifikaci syntetických standardů 2440 a 2441 s lokálním označením 2538 a 2539

5.3 Optimalizace koncentrací lights-on/lights-off sond v reakci

Při hodnocení optimální koncentrace sond v reakční směsi bylo, na základě rozdílných křivek tání u totožného syntetického standardu, zjištěno, že sada lights-on/lights-off sond (2540-2548) se neváže na amplikony syntetických standardů 2440 a 2441 specificky (viz Graf č. 3), a proto byla druhá sada primerů (2506 a 2539) a sond (2540-2548) z dalšího testování vyřazena.



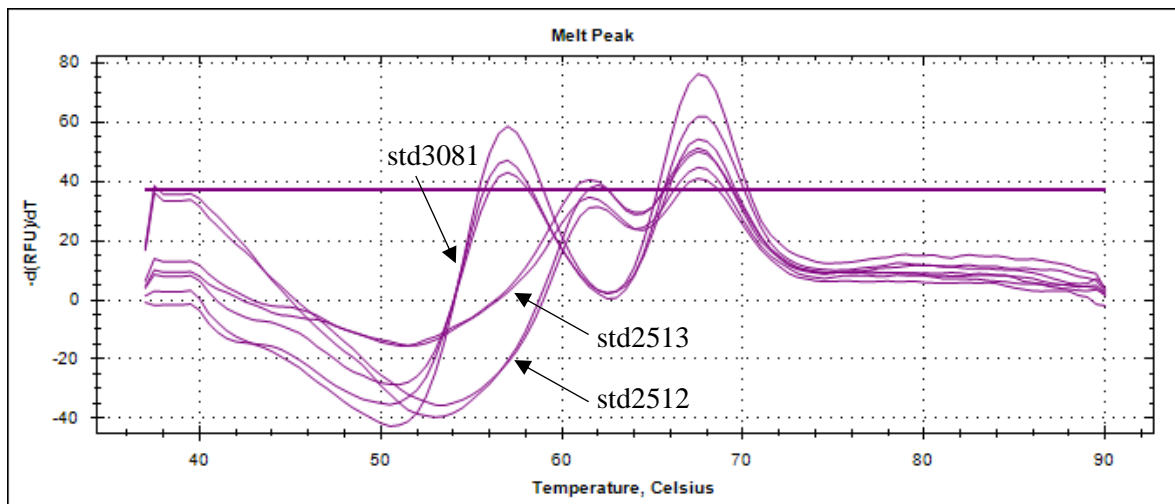
Graf 3: Křivka tání lights-on/lights-off sond (2540-2548) o různých koncentracích při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2441.

- 1, 4: lights-on sondy v koncentraci 0,15 $\mu\text{mol/l}$, lights-off sondy v koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$
 2, 3: lights-on sondy v koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$, lights-off sondy v koncentraci 0,15 $\mu\text{mol/l}$

U první sady lights-on/lights-off sond (2251-2559) se problém se specifitou neobjevil a srovnáním křivek tání s rozdílnými koncentracemi lights-on a lights-off sond bylo určeno, že lepší signál poskytují sondy lights-on PM686 v koncentraci 0,15 $\mu\text{mol/l}$ se sondami lights-off PM687 v koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ v reakční směsi; než sondy lights-on PM686 v koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ se sondami lights-off PM687 v koncentraci 0,15 $\mu\text{mol/l}$ v reakční směsi.

5.3.1 Ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné syntetické standardy při LATE-PCR

K ověření specifity signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné syntetické standardy SARS-CoV-2 byla použita metoda LATE-PCR. Lights-on/lights-off sondy hybridizovaly s amplikony syntetických standardů fragmentu genu pro S1 protein SARS-CoV-2 specificky a vykazovaly rozdílné profily křivky tání při hybridizaci u standardu 2512 (fragment genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2), standardu 2513 (fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovou mutací odpovídající C23604G v genomu SARS-CoV-2) a standardu 3081 (fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovými mutacemi odpovídajícími C23604G a C23557T v genomu SARS-CoV-2) (viz Graf č. 4).



Graf 4: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetické standardy SARS-CoV-2 2512, 2513 a 3081.

std2512: ampikon fragmentu genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2 s lokálním označením 2512; v duplikátu

std2513: ampikon fragmentu genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovou mutací odpovídající C23604G v genomu SARS-CoV-2 s lokálním označením 2513; v duplikátu

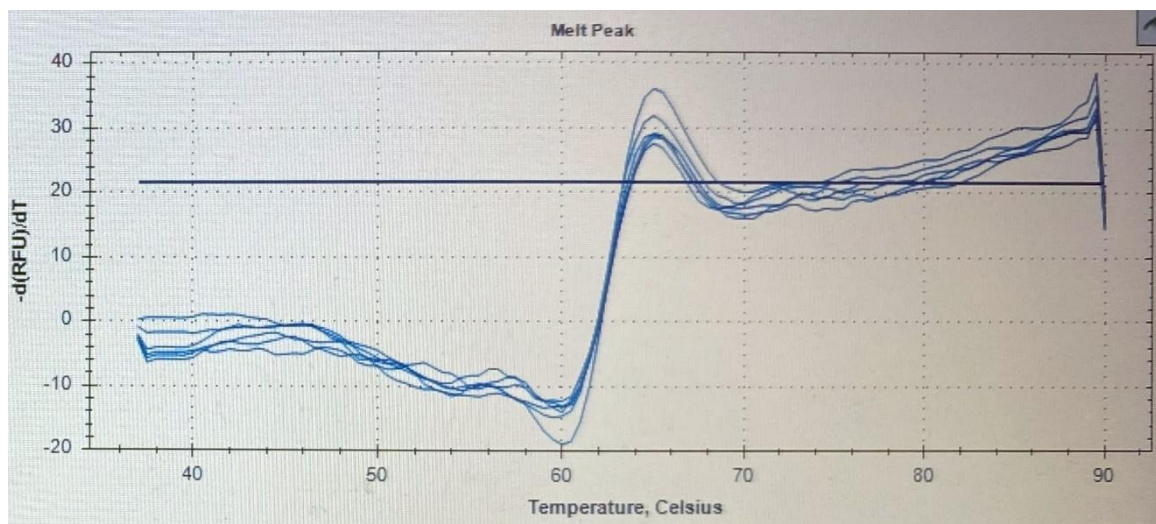
std3081: ampikon fragmentu genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovou mutací odpovídající C23604G a C23557T v genomu SARS-CoV-2 s lokálním označením 3081; v triplicátu

5.3.2 Ověření reprodukovatelnosti a opakovatelnosti profilů získaných křivek tání při hybridizaci lights-on/lights-off sond na syntetické standardy SARS-CoV-2 při LATE-PCR

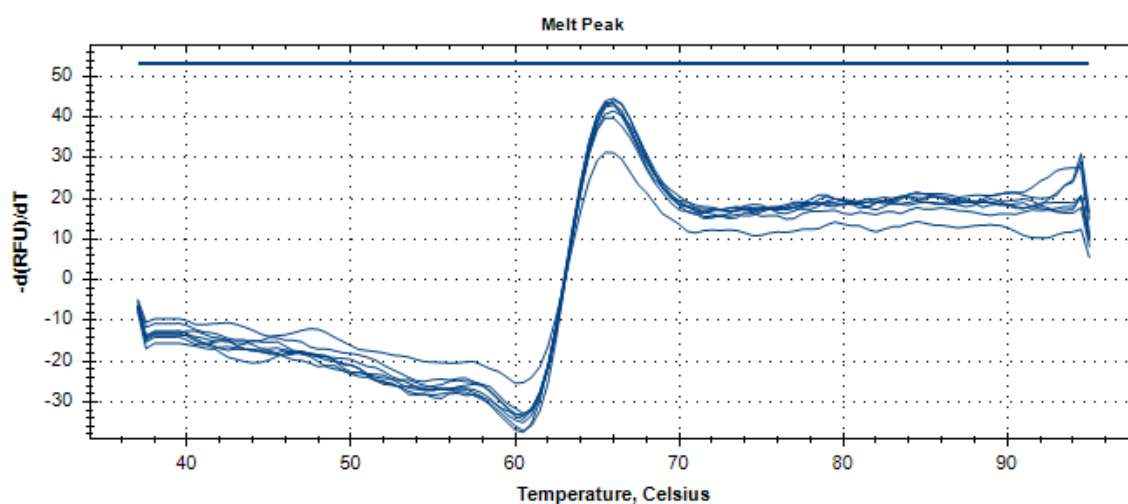
Pro ověření opakovatelnosti získaných výsledků byla provedena hybridizace lights-on/lights-off sond na syntetické standardy SARS-CoV-2 s lokálním označením 2512 a 3081 při LATE-PCR v osmi opakováních. Lights-on/lights-off sondy hybridizovaly s ampikony syntetických standardů fragmentu genu pro S1 protein SARS-CoV-2 specificky a vykazovaly rozdílné profily křivky tání při hybridizaci u standardu 2512 (fragment genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2) i u standardu 3081 (fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovými mutacemi odpovídajícími C23604G a C23557T v genomu SARS-CoV-2). Bodové mutace se vyskytují v oblasti ampikonu, pro kterou byly koncipovány sondy s fluorescenčním barvou Cy5, a proto výsledky detekujeme hlavně v tomto kanálu. V reakčních směsích jsou také lights-on sondy značeny fluorescenční barvou FAM, ale žádné bodové mutace v oblasti ampikonu, pro kterou byly koncipovány sondy s fluorescenčním barvou FAM, se v ampikonu standardů 2512 ani 3081 nenachází.

Díky tomu je profil křivek tání při hodnocení signálu z kanálu FAM pro standard 2512 i 3081 totožný (viz Graf č. 5, 6).

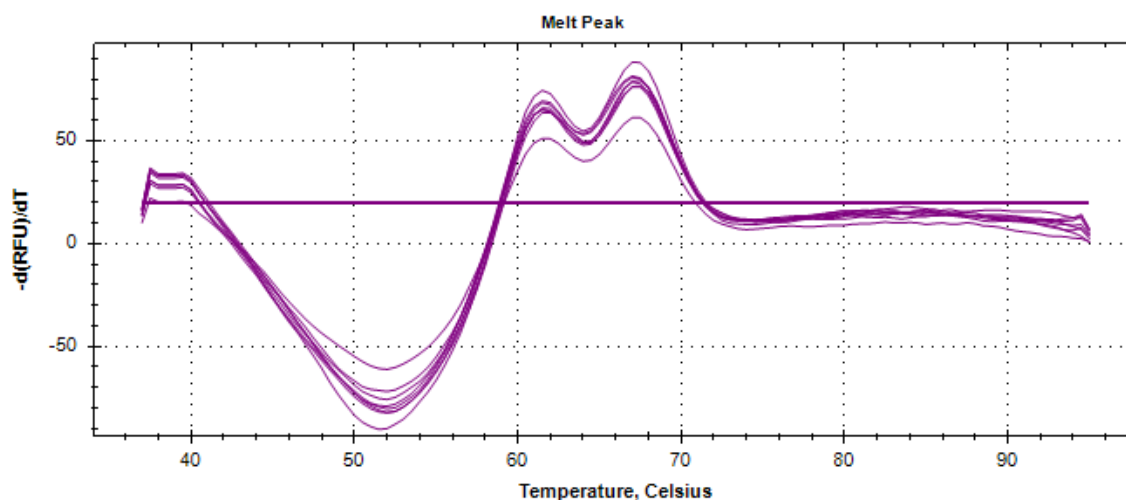
Odlíšnosti v profilech získaných křivek tání při osmi opakováních byly jen v rámci intenzity fluorescenčního signálu, ale nedošlo k posunu křivek (viz Graf č. 5, 6, 7, 8) a výsledky můžeme tedy označit za opakovatelné.



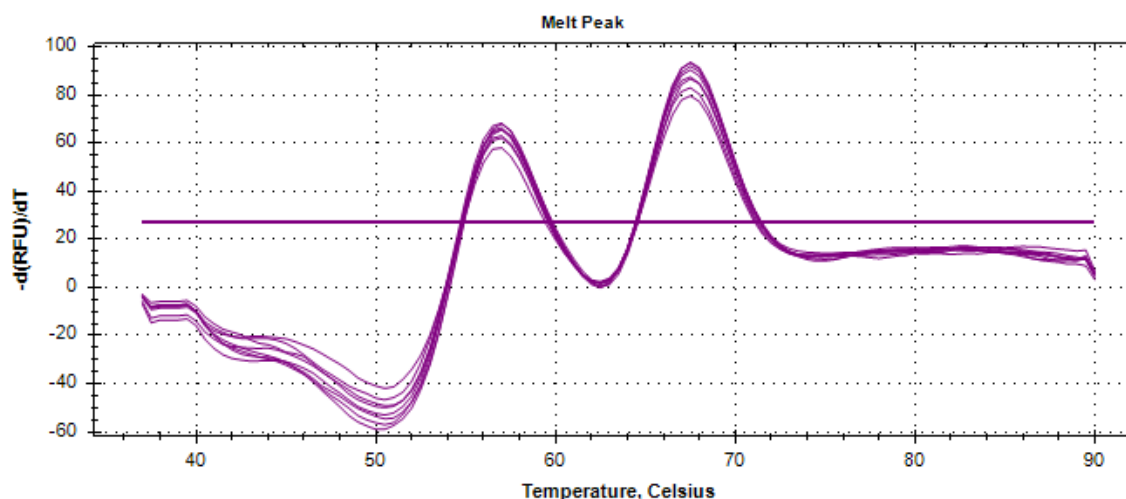
Graf 5: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 3081 v osmi opakováních, kanál FAM.



Graf 6: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2512 v osmi opakováních, kanál FAM.

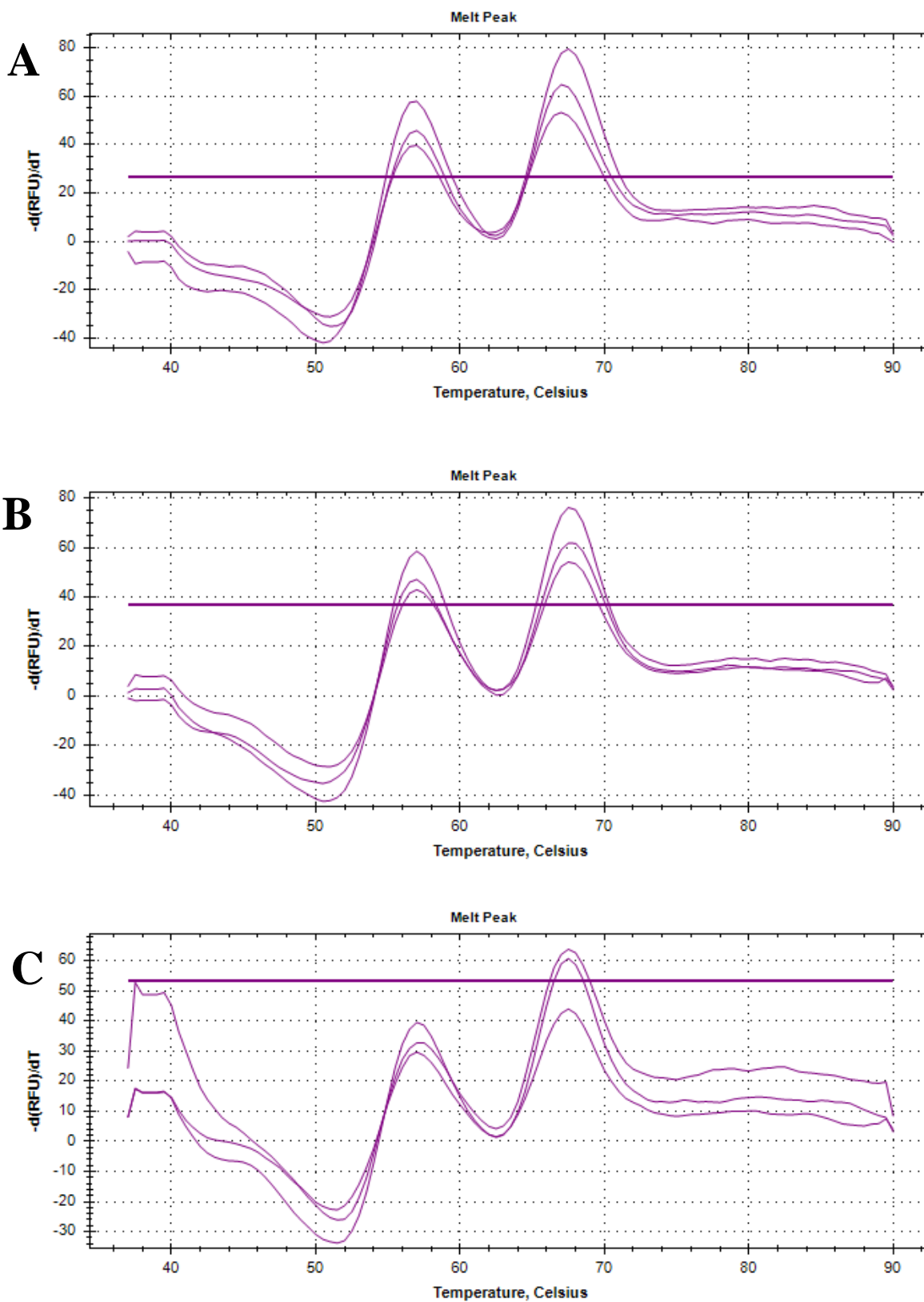


Graf 7: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2512 v osmi opakováních, kanál Cy5.

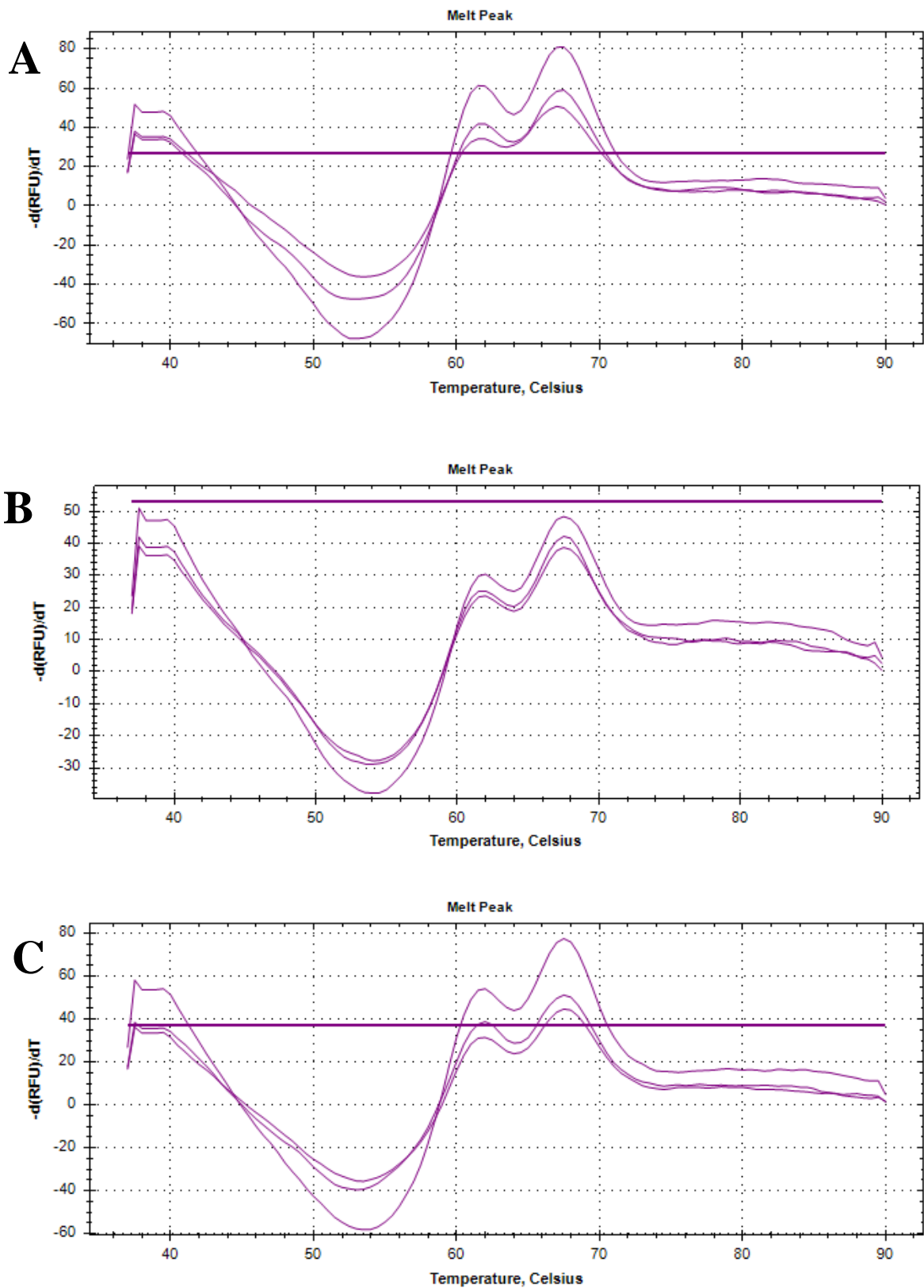


Graf 8: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 3081 v osmi opakováních, kanál Cy5.

Pro ověření reprodukovatelnosti získaných výsledků byla provedena hybridizace lights-on/lights-off sond na syntetické standardy SARS-CoV-2 s lokálním označením 2512 a 3081 při LATE-PCR v rozmezí několika dnů. Profily získaných křivek tání se signifikantně neodlišovaly (minima, stejně jako maxima byla při jednotných teplotách) a výsledky jsou tudíž reprodukovatelné (viz Graf č. 9 a 10).



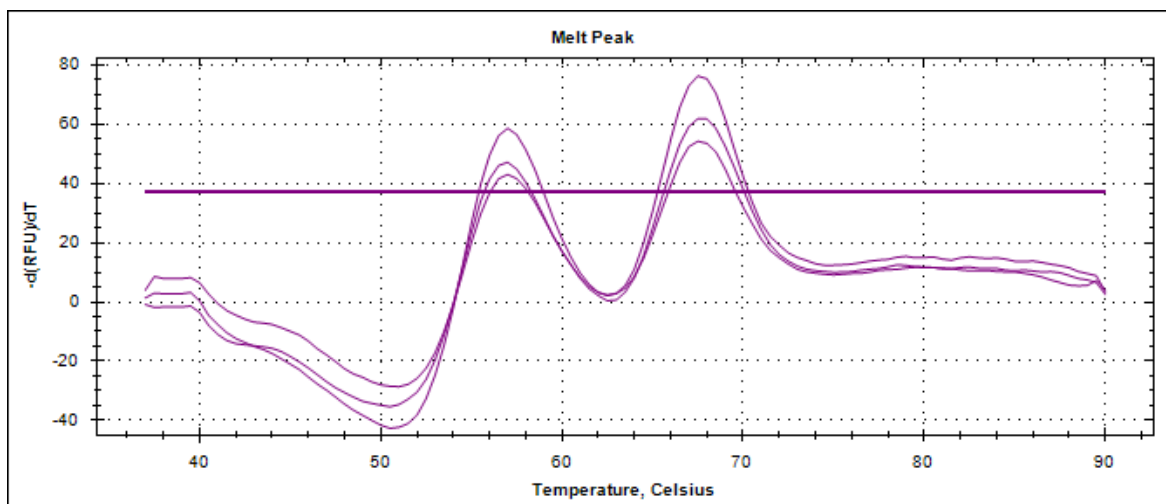
Graf 9: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) získané při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 3081 v průběhu několika dní (A, B, C), kanál Cy5.



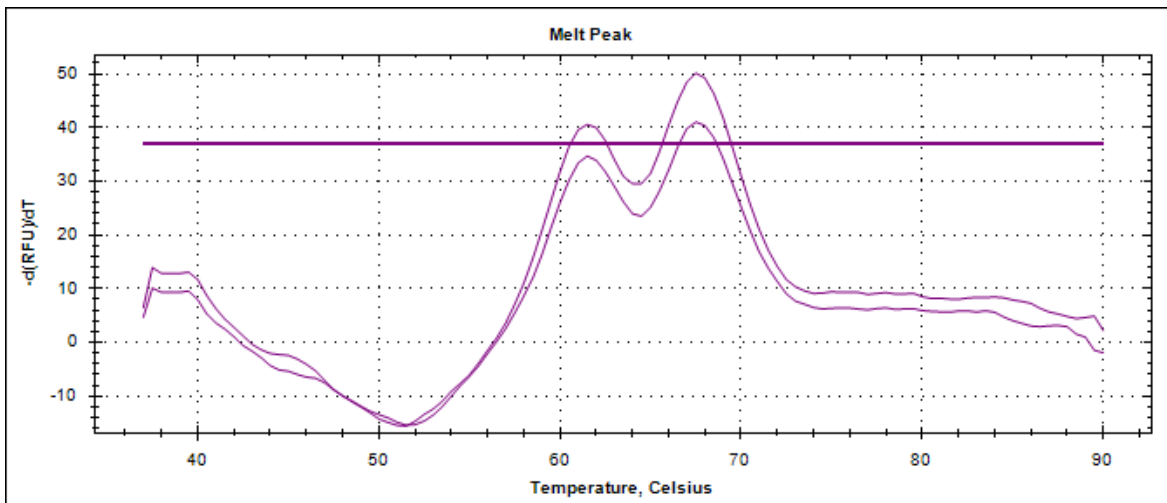
Graf 10: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) získané při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2512 v průběhu několika dní (A, B, C), kanál Cy5.

5.3.3 Test citlivosti při rozlišení varianty SARS-CoV-2 ve směsi

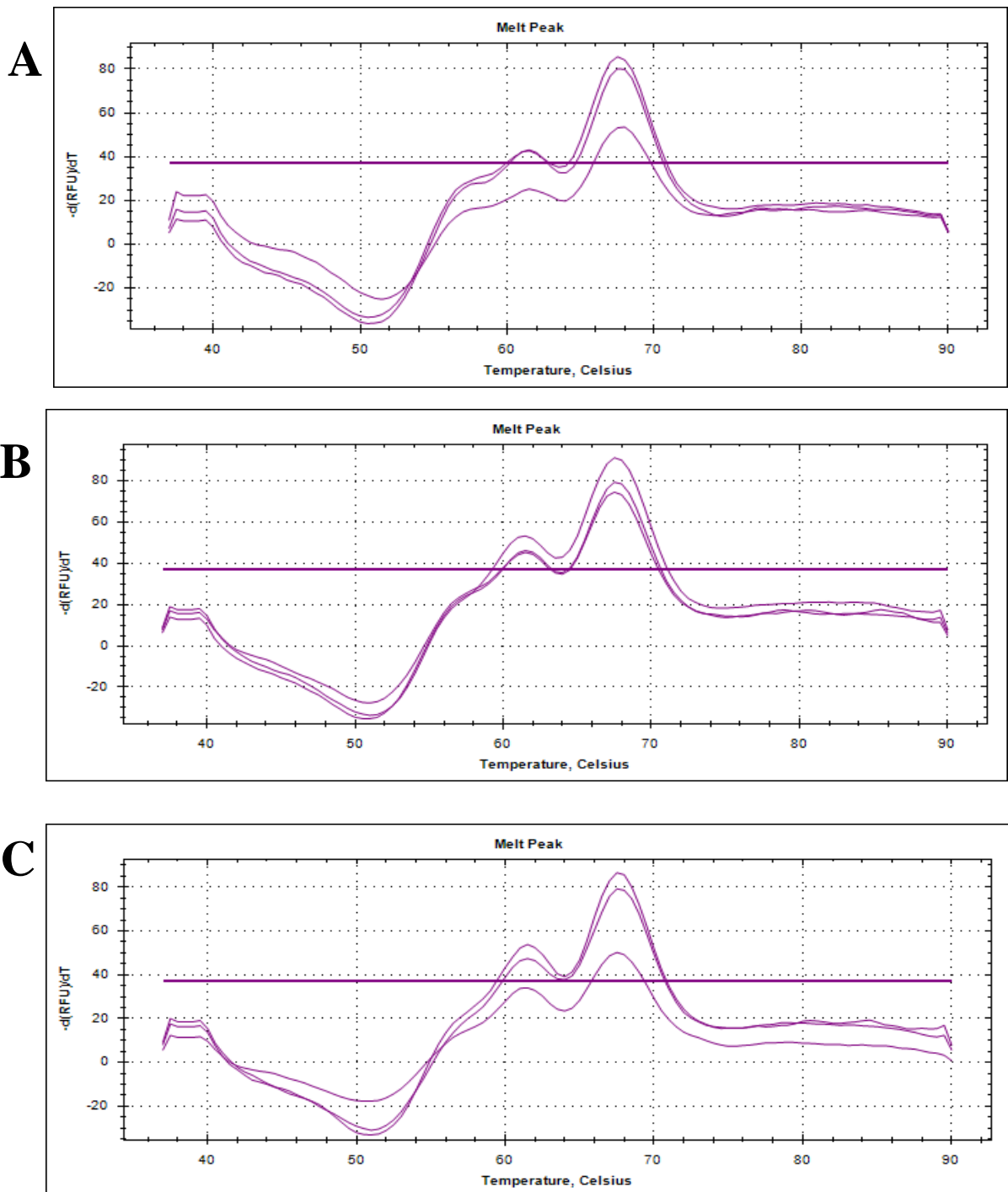
Pro test citlivosti při rozlišení varianty SARS-CoV-2 ve směsi byly použity syntetické standardy fragmentu genu S1 SARS-CoV-2 s lokálním označením 2513 a 3081, které se vzájemně odlišují jednou bodovou mutací C23557T. Při hodnocení výsledků byla sledována změna profilu křivek tání ve směsných vzorcích o rozdílných poměrech syntetických standardů ve srovnání s profily křivek tání u samostatných standardů SARS-CoV-2. S klesajícím zastoupením standardu 3081 a zvyšujícím se zastoupením standardu 2513 ve směsném vzorku se tvar křivky tání postupně přibližoval tvaru křivky tání u samostatného standardu 2513 (viz Graf č.11, 12 a 13). Profily křivek tání se u směsných vzorků se profilem jasně odlišovaly od křivek tání jednotlivých syntetických standardů i při směsném vzorku standardu 3081 a 2513 v poměru 5:13 (počet molekul v reakci: $5 \cdot 10^3$ molekul 3081 a $1,3 \cdot 10^4$ molekul 2513).



Graf 11: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 3081 po LATE-PCR v triplikátu.



Graf 12: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na syntetický standard SARS-CoV-2 2513 po LATE-PCR v duplikátu.



Graf 13: Křivky tání lights-on/lights-off sond (PM686 a PM687) při hybridizaci na směs syntetických standardů SARS-CoV-2 3081 a 2513 v různých poměrech po LATE-PCR.

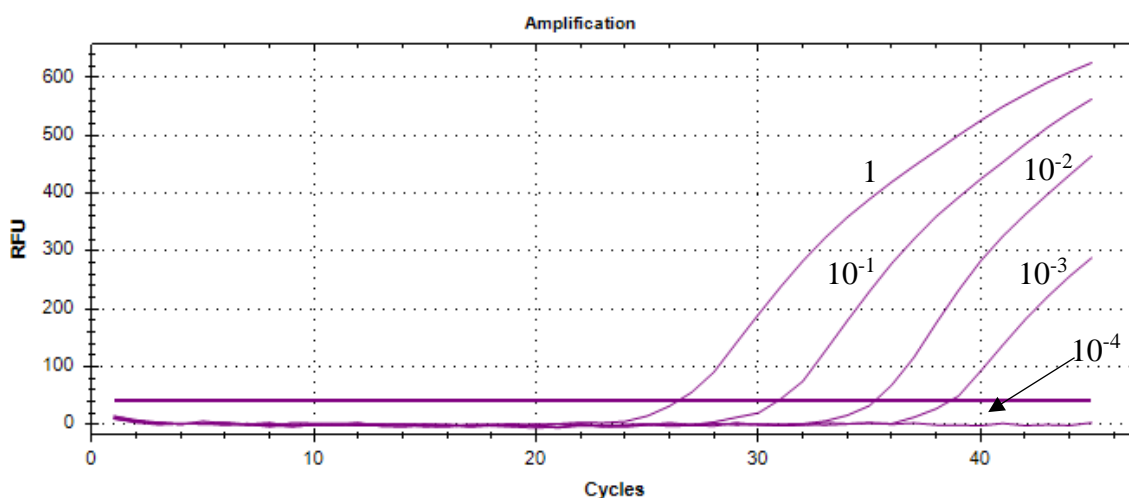
A: poměr standardů 3081 a 2513 přidaných do reakční směsi 4:5

B: poměr standardů 3081 a 2513 přidaných do reakční směsi 1:2

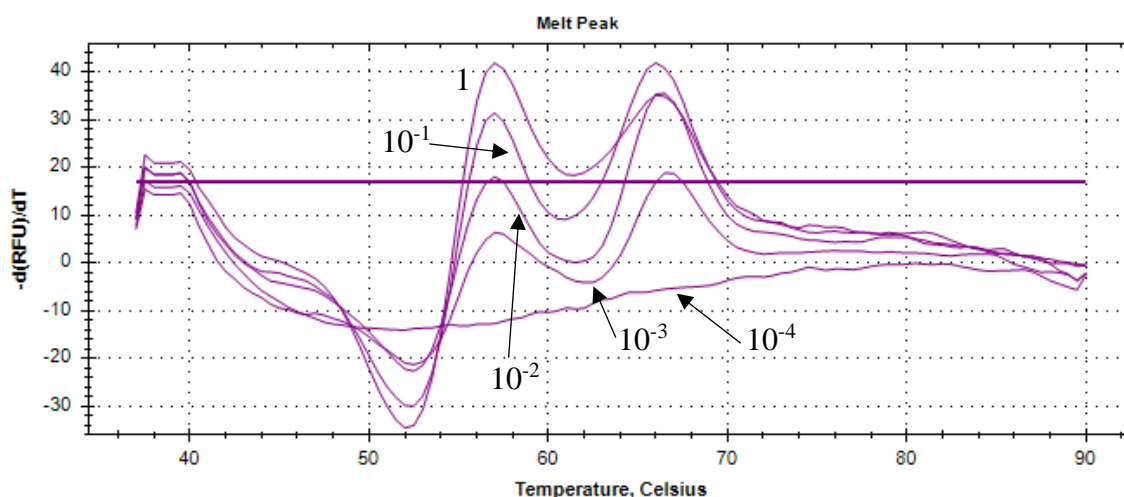
C: poměr standardů 3081 a 2513 přidaných do reakční směsi 5:13

5.3.4 Test analyzovatelného limitu vstupní nukleové kyseliny (DNA standardu)

Při testování analyzovatelného limitu vstupní DNA byl použit syntetický standard SARS-CoV-2 3081 (obsahuje $2,0 \cdot 10^4$ molekul v $1 \mu\text{l}$) v diluční řadě o 10x ředění. Na grafu č.14 vidíme, že amplifikace byla tím účinnější, čím méně zředěný byl vzorek. U vzorku s ředěním 10^{-4} k amplifikaci nedošlo vůbec. V grafu č. 15 lze vidět výsledek hybridizace lights-on/lights-off sond na amplikony syntetického standardu SARS-CoV-2 3081 ředěného diluční řadou. U vzorku s ředěním 10^{-4} není specifický signál sond, protože nedošlo k amplifikaci a sondy neměly k dispozici amplikony pro hybridizaci. U ostatních vzorků je obvyklý profil získaných křivek tání, při kterých byly změny jen v rámci intenzity fluorescenčního signálu, ale nedošlo k posunu křivek. Lze tedy říci, že analyzovatelný limit vstupní nukleové kyseliny (DNA standardu) je při ředění zásobního standardu 10^{-3} , což odpovídá 20 molekulám syntetického standardu SARS-CoV-2 3081 na $1 \mu\text{l}$.



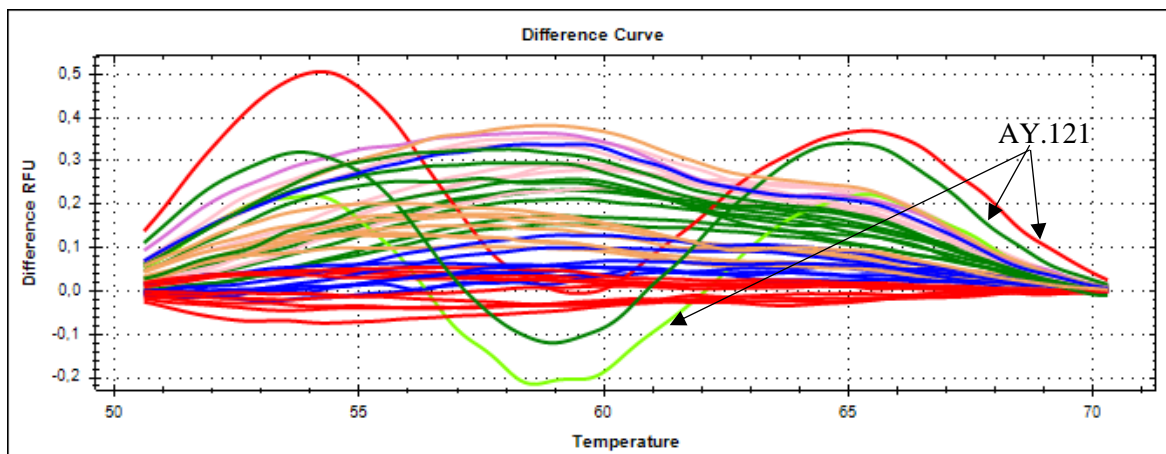
Graf 14: Amplifikační křivky diluční řady syntetického standardu SARS-CoV-2 3081 získané při LATE-PCR, ředění 10x.



Graf 15: Křivky tání lights-on/lights-off sond při hybridizaci na amplikony syntetického standardu SARS-CoV-2 3081 ředěného diluční řadou, ředění 10x.

5.3.5 Test rozlišení variant SARS-CoV-2 v reálných vzorcích metodou RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off

K ověření funkčnosti systému rozlišení variant SARS-CoV-2 při amplifikaci RNA SARS-CoV-2 z reálných vzorků metodou RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off byly použity vzorky odpovídající variantě SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) a její podvarianty (AY.7.1, AY.4, AY.43, AY.46.6, AY.121, AY.122, AY.127). U těchto variant se v námi amplifikované oblasti genu pro protein S1 SARS-CoV-2 objevuje jediná mutace C23557T přítomná u podvarianty delta AY.121. Pomocí softwaru Precision Melt Analysis (BioRad) byla naměřená fluorescence při hybridizaci sond lights-on/lights-off na jednovláknový produkt amplifikace analyzovaná pomocí „Difference Curve“. Z analýzy byly vyřazeny vzorky, u kterých nedošlo k amplifikaci RNA vzorku. „Difference Curve“ umožnila identifikovat a vizualizovat rozdíly mezi křivkami tání všech vzorků a jasně prokázala rozdíl křivek tání u třech vzorků RNA odpovídajícím podvariantě delta AY.121 (obsahují mutaci C23557T) oproti všem ostatním amplifikovaným vzorkům, které mutaci neobsahovaly (viz Graf. č 16).



Graf 16: Analýza křivek tání lights-on/lights-off sond při hybridizaci na amplicony reálných vzorků RNA po RT-LATE-PCR pomocí Difference Curve.

AY.121: tři vzorky SARS-CoV-2 odpovídající podvariantě delta AY.121 (obsahují mutaci C23557T).

Ostatní vzorky odpovídají variantě delta (B.1.617.2) a podvariantám delta (AY.7.1, AY.4, AY.43, AY.46.6, AY.122, AY.127 (v zájmové oblasti nemají žádnou mutaci a jejich sekvence je totožná)

6 Diskuze

Praktickým cílem diplomové práce byl návrh a otestování lights-on/lights-off sond testujících více mutací v jediné zkumavce pomocí metody RT-LATE-PCR.

Byla ověřována funkčnost první i druhé sady primerů a specifita vazby lights-on/lights-off sond. První sada lights-on/lights-off sond (2551-2559) hybridizovala s amplikony syntetických standardů fragmentu genu pro S1 protein SARS CoV-2 specificky a výsledkem byly rozdílné profily křivky tání při hybridizaci u standardu 2512 (fragment genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2), standardu 2513 (fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovou mutací odpovídající C23604G v genomu SARS-CoV-2) a standardu 3081 (fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovými mutacemi odpovídajícími C23604G a C23557T v genomu SARS-CoV-2). Bylo zjištěno, že druhá sada lights-on/lights-off sond (2540-2548) se neváže na amplikony syntetických standardů 2440 a 2441 specificky a byla z dalšího testování vyřazena. Druhá sada lights-on/lights-off sond (2540-2548) nevykazovala specifickou vazbu na amplikony syntetického standardu fragmentu genu pro S1 protein SARS-CoV-2, tudíž nemohla být použita pro další testování rozlišení DNA fragmentu genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2 2440 od DNA fragmentu genu pro S1 protein SARS-CoV-2 2441 s osmi bodovými mutacemi oproti 2440.

Při návrhu lights-on/lights-off sond podle předlohy Whitfield *et al.* (2020) bylo nutné navrhnout páry lights-on/lights-off sond, které budou hybridizovat s produkty RT-LATE-PCR v širokém teplotním rozsahu a pokryjí celou cílovou sekvenci při snížení teploty na konci amplifikace. U některých sond byla nutná úprava teploty tání sondy tím, že byly přidány nukleotidové neshody s cílovými sekvencemi. Sondy lights-on jsou kratší a lights-off delší. Sondy lights-on byly označeny fluoroforem a zhášečem na opačných koncích. Sondy lights-off obsahovaly pouze zhášeč na 3' konci. Tím, že jsou pro lights-on sondy využity dvě fluorescenční barvy detekované v rozdílných kanálech, výsledkem jsou dvě křivky tání, které svým jedinečným tvarem mohou odhalit mutace v rozdílných oblastech podél délky cíle. Jelikož je návrh takovýchto sond komplexní záležitostí a pro návrh lights-on/lights-off neexistuje software, došlo u druhé sady sond (2540-2548) pravděpodobně k přehlédnutí některého zásadního aspektu, který vedl k nesespecifické vazbě sond a bohužel z praktických důvodů nebylo možné provést redesign a nákup nových sond. Přesný důvod nesespecifické vazby druhé sady sond nebyl zkoumán a druhá sada lights-on/lights-off sond (2540-2548) byla z dalšího testování vyřazena.

Nepřítomnost vhodného kanálu pro měření fluorescence u fluorescenčního barviva Cy3 vázaného na lights-on sondy 2543 a 2547 v používaném termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad) neměla na experiment vliv, protože k určení nespecifické vazby sond byly využity sondy značené fluorescenčním barvivem Tex 615. Nepřítomnost vhodného kanálu pro měření fluorescence u fluorescenčního barviva Cy3 byla chybou designu, protože nebylo předem zkontrolováno, zdali používaný termocyklér CFX96 Touch (Bio-Rad) obsahuje vhodný kanál pro měření signálu tohoto fluorescenčního barviva.

Pro optimalizaci koncentrací lights-on/lights-off sond v reakční směsi vidíme v literatuře rozdílné přístupy. Carver-Brown *et al.* (2012), Tetrault *et al.* (2014) a Whitfield *et al.* (2020) měli koncentraci lights-off sond v reakční směsi nastavenou třikrát vyšší než koncentraci lights-on, aby bylo zaručeno, že každá navázaná sonda lights-on bude mít vedle sebe hybridizovanou sondu lights-off, která „zhasí“ signál vedlejší sondy lights-on. Rice *et al.*, (2012) namíchali reakční směs tak, že koncentrace lights-on sond byla stejná jako lights-off sond. V našich experimentech s první sadou lights-on/lights-off sond (2551-2559) se osvědčila výsledná koncentrace sond v poměru jako u novějších publikací Whitfielda, Carver-Browna a Tetraulta: 3:1, lights-on sond 0,15 $\mu\text{mol/l}$ a lights-off sond 0,05 $\mu\text{mol/l}$.

Při vyhodnocování experimentů byly použity křivky tání získané měřením fluorescence v kanálu pro fluorescenční barvivo Cy5, přestože první sada lights-on/lights-off sond (2551-2559) obsahuje také fluorescenční barvivo FAM. Stalo se tak z důvodu, že syntetické sondy SARS-CoV-2 2513 a 3081 i reálné vzorky RNA obsahovaly mutace v oblastech, pro které byly koncipovány sondy s fluorescenčním barvivem Cy5. Signál lights-on/lights-off sond v kanálu FAM jsme mohli také detekovat, ale pro syntetické sondy SARS-CoV-2 2513 a 3081 i reálné vzorky RNA bychom mohli sledovat stále stejný signál, protože se v oblastech koncipovaných pro sledování mutací pomocí sond s fluorescenčním značením FAM nenacházela žádná mutace.

Mutace v syntetickém standardu DNA fragmentu genu pro S1 protein SARS-CoV-2 odpovídající C23604G v genomu SARS-CoV-2 s lokálním označením 2513 je zodpovědná za substituci P681R, arginin substituuje prolin na pozici 681, která je typická pro variantu delta (Liu *et al.*, 2022). Pomocí metody LATE-PCR s hybridizací s lights-on/lights-off sondami na základě odlišného profilu křivek tání byly od sebe úspěšně odlišeny syntetické standardy 2512 (odpovídající fragmentu genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2) a 2513 (obsahující oproti standardu 2513 mutaci C23604G). Bohužel z časových důvodů nebyla možnost tento experiment zopakovat s reálnými vzorky a potvrdit tak schopnost

rozdílení mutace C23604G (odpovídající za substituci P681R) typické pro variantu delta od jiných variant SARS-CoV-2, které tuto mutaci neobsahují.

Schopnost rozlišit amplicon s mutací a bez mutace na základě odlišného profilu křivek tání po RT-LATE-PCR u reálného vzorku byla ověřena pomocí aktuálně dostupných reálných vzorků. Na základě odlišného profilu křivek tání po RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off byly rozlišeny tři vzorky obsahující podvariantu SARS-CoV-2 delta AY.121 (obsahuje mutaci C23604G a C23557T v amplifikované oblasti) od ostatních vzorků obsahujících SARS-CoV-2 variantu delta a subvarianty, které kromě mutace C23604G sdílené všemi vzorky žádnou další mutaci neobsahovaly.

Metoda LATE-PCR se sadami lights on/lights-off sond, které hybridizují se svými cílovými sekvencemi byla již úspěšně použita například při charakterizaci variant genu rpoB z *Mycobacterium tuberculosis*, sekvence v genu hlístic pro podjednotku 1 u mitochondriálního cytochromu C oxidázy, skenování mutací genu epidermálního růstového faktoru u člověka či například ke konstrukci diagnostických testů pro detekci patogenů spojených se sepsí (Carver-Brown *et al.*, 2012; Rice *et al.*, 2012; Tetrault *et al.*, 2014), ale doposud nebyla publikována žádná aplikace na SARS-CoV-2.

Prokázala jsem, že metoda LATE-PCR s hybridizací se sondami lights.on/lights-off má potenciál odhalit mutace v SARS-CoV-2, které se vyskytují v regionu vyhrazeném primery. Pro uplatnění této metody v praxi by bylo potřeba dalšího výzkumu s různorodými standardy i reálnými vzorky, které by obsahovaly větší množství mutací v regionu vyhrazeném primery pro získání databanky křivek tání jednotlivých mutací, a další ověření účinnosti této metody. Dále by bylo potřeba navrhnout nové sady primerů a lights-on/lights-off sond, které by pokryly větší část zájmové oblasti genu pro S protein a dalších oblastí genomu SARS-CoV-2.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo designovat a otestovat lights-on/lights-off sondy testující více mutací v oblasti vyhrazené primery zleva a zprava v genu pro S1 protein SARS-CoV-2 amplifikovaného pomocí metody RT-LATE-PCR v jediné zkumavce.

Byly navrženy dvě sady primerů a lights-on/lights-off sond v souladu s příkladem Tetrault *et al.* (2014) k detekci mutací v různých amplikonech fragmentů genu pro S1 protein SARS-CoV-2. Následně byla ověřena funkčnost primerů pomocí amplifikace odpovídajících syntetických DNA standardů. Funkčnost primerového páru s lokálním označením 2549 a 2550 byla potvrzena a v rámci druhé sady primerů byla účinnější amplifikace u primerového páru 2506 a 2539, a proto byl tento primerový pár použit pro další testování.

Při optimalizaci koncentrací lights-on/lights-off sond v reakci se ukázalo, že druhá sada sond, navržená pro detekci mutací v amplikonech syntetických standardů 2440 a 2441 pro gen S1 SARS-CoV-2 lišících se osmi bodovými mutacemi, se neváže na amplikon standardu specificky a z dalšího testování byla vyřazena. U první sady lights-on/lights-off sond bylo zjištěno, že lepší signál poskytují sondy lights-on v koncentraci 0,15 $\mu\text{mol/l}$ se sondami lights-off v koncentraci 0,05 $\mu\text{mol/l}$ v reakční směsi.

Byla ověřena specifita signálu lights-on/lights-off sond při hybridizaci na rozdílné amplikony syntetických standardů získaných při LATE-PCR. Specifita signálu lights-on/lights-off sond byla ověřena u standardu 2512 (fragment genu pro S1 protein u primárního SARS-CoV-2), standardu 2513 (fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovou mutací odpovídající C23604G v genomu SARS-CoV-2) a standardu 3081 (fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovými mutacemi odpovídajícími C23604G a C23557T v genomu SARS-CoV-2). Výsledky potvrdily, že metoda LATE-PCR s hybridizací lights-on/lights-off sond je reprodukovatelná i opakovatelná. Detekční limit metody byl 20 molekul syntetického standardu 3081 v 1 μl (fragment genu pro S1 protein SARS-CoV-2 s bodovými mutacemi odpovídajícími C23604G a C23557T v genomu SARS-CoV-2). Test citlivosti při rozlišení varianty SARS-CoV-2 ve směsi dvou syntetických standardů – fragmentu genu S1 SARS-CoV-2 s lokálním označením 2513 a 3081 vzájemně se odlišujícími jednou bodovou mutací C23557T ukázal, že je na základě odlišných profilů křivek tání možno odlišit směsný vzorek od vzorků s jednotlivými standardy i při poměru standardu 3081 a 2513 5:13 (počet molekul v reakci: $5 \cdot 10^3$ molekul

3081 a $1,3 \cdot 10^4$ molekul 2513).

Při testu rozlišení variant SARS-CoV-2 v reálných vzorcích obsahujících variantu SARS-CoV-2 delta a (B.1.617.2) a její podvarianty (AY.7.1, AY.4, AY.43, AY.46.6, AY.121, AY.122, AY.127) metodou RT-LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off byly v rámci 96 vzorků pomocí softwaru Precision Melt Analysis a při použití funkce „Difference Curve“ správně odlišeny jediné tři vzorky SARS-CoV-2 odpovídající podvariantě delta AY.121, která obsahuje jako jediná v cílové oblasti oproti ostatním vzorkům v genomu mutaci C23557T.

Metoda LATE-PCR s hybridizací se sondami lights-on/lights-off má potenciál odhalit mutace v SARS-CoV-2, které se vyskytují v regionu vyhrazeném primery. Pro reálné uplatnění navržených lights-on/lights-off sond by bylo potřeba dalšího testování se standardy i reálnými vzorky, které by obsahovaly větší množství mutací v zájmové oblasti. Pro rozlišování variant SARS-CoV-2 by bylo potřeba navrhnout nové sady primerů a lights-on/lights-off sond, které by pokryly větší část zájmové oblasti genu pro S protein a dalších oblastí genomu SARS-CoV-2.

8 Literatura

ABBASIAN, Mohammad H., Mohammadamin MAHMANZAR, Karim RAHIMIAN, Bahar MAHDAVI, Samaneh TOKHANBIGLI, Bahman MORADI, Mahsa M. SISAKHT, Youping DENG (2023): Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions. *Journal of Translational Medicine* 21: 152.

AL-QAANEH, Ayman M., Thamer ALSHAMMARI, Razan ALDAHAN, Hanan ALDOSSARY, Zahra A. ALKHALIFAH, J. Francis BORGIO (2021): Genome composition and genetic characterization of SARS-CoV-2. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28: 1978–1989.

ANDERSEN, Kristian G., Andrew RAMBAUT, W. Ian LIPKIN, Edward C. HOLMES, Robert F. GARRY (2020): The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* 26: 450-452.

COVID-19 Ultra Variant Catcher CE IVD. [online] [navštíveno 2024-03-03] Dostupné z: <https://www.szabo-scandic.com/en/covid-19-ultra-variant-catcher-ce-ivd>

COVID-19 Variant Catcher CE IVD. [online] [navštíveno 2024-03-03] Dostupné z: <https://www.szabo-scandic.com/en/covid-19-variant-catcher-ce-ivd>

TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit. [online] [navštíveno 2024-03-07] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A48067>

BARUA, Subarna, Jianfa BAI, Patrick J. KELLY, Gregg HANZLICEK, Lance NOLL, Calvin JOHNSON, Ji-Hang YIN, Chengming WANG (2022): Identification of the SARS-CoV-2 Delta variant C22995A using a high-resolution melting curve RT-FRET-PCR. *Emerging Microbes & Infections* 11: 14–17.

BERNO, Giulia, Lavinia FABENI, Giulia MATUSALI, Cesare E. M. GRUBER, Martina RUECA, Emanuela GIOMBINI, Anna R. GARBUGLIA (2022): SARS-CoV-2 Variants Identification: Overview of Molecular Existing Methods. *Pathogens* 11: 1058.

CAPOBIANCHI, M. R., M. RUECA, F. MESSINA, E. GIOMBINI, F. CARLETTI, F. COLAVITA, C. CASTILLETI, E. LALLE, L. BORDI, F. VAIRO, E. NICASTRI, G. IPPOLITO, C. E. M. GRUBER, B. BARTOLINI (2020): Molecular characterization of SARS-CoV-2 from the first case of COVID-19 in Italy. *Clinical Microbiology and Infection* 26: 954–956.

CARVER-BROWN, Rachel K., Arthur H. REIS, Lisa M. RICE, John W. CZAJKA,

Lawrence J. WANGH (2012): Design and Construction of a Single-Tube, LATE-PCR, Multiplex Endpoint Assay with Lights-On/Lights-Off Probes for the Detection of Pathogens Associated with Sepsis. *Journal of Pathogens* 2012: 424808.

CASALINO, Lorenzo, Zied GAIEB, Jory A. GOLDSMITH, Christy K. HJORTH, Abigail C. DOMMER, Aoife M. HARBISON, Carl A. FOGARTY, Emilia P. BARROS, Bryn C. TAYLOR, Jason S. MCLELLAN, Elisa FADDA, Rommie E. AMARO (2020): Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Central Science* 6: 1722–1734.

CLARK, Andrew E., Zhaohui WANG, Emily OSTMAN, Hui ZHENG, Huiyu YAO, Brandi CANTAREL, Mohammed KANCHWALA, Chao XING, Li CHEN, Pei IRWIN, Yan XU, Dwight OLIVER, Francesca M. LEE, Jeffrey R. GAGAN, Laura FILKINS, Alagaraju MUTHUKUMAR, Jason Y. PARK, Ravi SARODE, Jeffrey A. SORELLE (2022): Multiplex Fragment Analysis for Flexible Detection of All SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Clinical Chemistry* 68: 1042–1052.

COLOSIMO, Manuela, Pasquale MINCHELLA, Rossana TALLERICO, Ilenia TALOTTA, Cinzia PERONACE, Luca GALLELLI, Giulio DI MIZIO, Erika CIONE (2022): Comparison of Allplex™ 2019-nCoV and TaqPath™ COVID-19 Assays. *Reports* 5: 14.

CUI, Jie, Fang LI, Zheng-Li SHI (2019): Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews. Microbiology* 17: 181–192.

DHAMA, Kuldeep, Sharun KHAN, Ruchi TIWARI, Shubhankar SIRCAR, Sudipta BHAT, Yashpal S. MALIK, Karam P. SINGH, Wanpen CHAICUMPA, D. Katterine BONILLA-ALDANA, Alfonso J. RODRIGU MORALES (2020): Coronavirus Disease 2019–COVID-19. *Clinical Microbiology Reviews* 33.

EPTAMINITAKI, Giasemi C., Maria-Eleni PARAKATSELAKI, Chara PETROULAKI, Dimitra MARINOPOULOU, Anthi PITSIKAKI, Melpomeni TSELIU, Alexandros ZAFIROPOULOS, George SOURVINOS (2023): Rapid identification of SARS-CoV-2 variants: Validation of the simplexa SARS-CoV-2 variant direct assay. *Journal of Virological Methods* 319: 114759.

FALZONE, Luca, Giuseppe GATTUSO, Aristidis TSATSAKIS, Demetrios A. SPANDIDOS, Massimo LIBRA (2021): Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 47: 1–23.

FARIA, Nuno R., Thomas A. MELLAN, Charles WHITTAKER, Ingra M. CLARO, Darlan da S. CANDIDO, Swapnil MISHRA, Myuki A. E. CRISPIM, Flavia C. S. SALES, Iwona HAWRYLUK, John T. MCCRONE, Ruben J. G. HULSWIT, Lucas A. M. FRANCO, Mariana S. RAMUNDO, Jaqueline G. DE JESUS, Pamela S. ANDRADE, Thais M. COLETTI, Giulia M. FERREIRA, Camila A. M. SILVA, Erika R. MANULI, Rafael H. M. PEREIRA, Pedro S. PEIXOTO, Moritz U. G. KRAEMER, Nelson GABURO, Cecilia da C. CAMILO, Henrique HOELTGEBAUM, William M. SOUZA, Esmenia C. ROCHA, Leandro M. DE SOUZA, Mariana C. DE PINHO, Leonardo J. T. ARAUJO, Frederico S. V. MALTA, Aline B. DE LIMA, Joice do P. SILVA, Danielle A. G. ZAULI, Alessandro C. de S. FERREIRA, Ricardo P. SCHNEKENBERG, Daniel J. LAYDON, Patrick G. T. WALKER, Hannah M. SCHLÜTER, Ana L. P. DOS SANTOS, Maria S. VIDAL, Valentina S. DEL CARO, Rosinaldo M. F. FILHO, Helem M. DOS SANTOS, Renato S. AGUIAR, José L. PROENÇA-MODENA, Bruce NELSON, James A. HAY, Mélodie MONOD, Xenia MISCOURIDOU, Helen COUPLAND, Raphael SONABEND, Michaela VOLLMER, Axel GANDY, Carlos A. PRETE, Vitor H. NASCIMENTO, Marc A. SUCHARD, Thomas A. BOWDEN, Sergei L. K. POND, Chieh-Hsi WU, Oliver RATMANN, Neil M. FERGUSON, Christopher DYE, Nick J. LOMAN, Philippe LEMEY, Andrew RAMBAUT, Nelson A. FRAIJI, Maria do P. S. S. CARVALHO, Oliver G. PYBUS, Seth FLAXMAN, Samir BHATT, Ester C. SABINO (2021): Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 372: 815–821.

FEHR, Anthony R., Stanley PERLMAN (2015): Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses* 1282: 1–23.

FIALA, Adam (2020): Nouzový stav. Vláda zakázala akce s více než 30 lidmi, omezí se provoz restaurací po osmé večer. ČT24. [online] [navštíveno 2024-03-04] Dostupné z: <https://ct24.ceskatelevize.cz/clanek/domaci/nouzovy-stav-vlada-zakazala-akce-s-vice-nez-30-lidmi-omezi-se-provoz-restauraci-po-osme-vecer-52277>

GALLOWAY, Summer E., Prabasaj PAUL, Duncan R. MACCANNELL, Michael A. JOHANSSON, John T. BROOKS, Adam MACNEIL, Rachel B. SLAYTON, Suxiang TONG, Benjamin J. SILK, Gregory L. ARMSTRONG, Matthew BIGGERSTAFF, Vivien G. DUGAN (2021): Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 70: 95–99.

GE, Xing-Yi, Wei-Hong YANG, Ji-Hua ZHOU, Bei LI, Wei ZHANG, Zheng-Li SHI, Yun-Zhi ZHANG (2017): Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from

Yunnan, China. *Virology Journal* 14: 98.

GORBALENYA, Alexander E., Susan C. BAKER, Ralph S. BARIC, Raoul J. DE GROOT, Christian DROSTEN, Anastasia A. GULYAEVA, Bart L. HAAGMANS, Chris LAUBER, Andrey M. LEONTOVICH, Benjamin W. NEUMAN, Dmitry PENZAR, Stanley PERLMAN, Leo L. M. POON, Dmitry V. SAMBORSKIY, Igor A. SIDOROV, Isabel SOLA, John ZIEBUHR, CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (2020): The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology* 5: 536–544.

GRINT, Daniel J., Kevin WING, Catherine HOULIHAN, Hamish P. GIBBS, Stephen J. W. EVANS, Elizabeth WILLIAMSON, Helen I. MCDONALD, Krishnan BHASKARAN, David EVANS, Alex J. WALKER, George HICKMAN, Emily NIGHTINGALE, Anna SCHULTZE, Christopher T RENTSCH, Chris BATES, Jonathan COCKBURN, Helen J. CURTIS, Caroline E. MORTON, Sebastian BACON, Simon DAVY, Angel Y. S. WONG, Amir MEHRKAR, Laurie TOMLINSON, Ian J. DOUGLAS, Rohini MATHUR, Brian MACKENNA, Peter INGELSBY, Richard CROKER, John PARRY, Frank HESTER, Sam HARPER, Nicholas J. DEVITO, Will HULME, John TAZARE, Liam SMEETH, Ben GOLDACRE, Rosalind M. EGGO (2021): Severity of Severe Acute Respiratory System Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Alpha Variant (B.1.1.7) in England. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 75: e1120-e1127.

GU, Haogao, Pavithra KRISHNAN, Daisy Y. M. NG, Lydia D. J. CHANG, Gigi Y. Z. LIU, Samuel S. M. CHENG, Mani M. Y. HUI, Mathew C. Y. FAN, Jacob H. L. WAN, Leo H. K. LAU, Benjamin J. COWLING, Malik PEIRIS, Leo L. M. POON (2022): Probable Transmission of SARS-CoV-2 Omicron Variant in Quarantine Hotel, Hong Kong, China, November 2021. *Emerging Infectious Diseases* 28: 460–462.

HARDENBROOK, Nathan J., Peijun ZHANG (2022): A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Current Opinion in Virology* 52: 123–134.

HE, Xuemei, Cai HE, Weiqi HONG, Kang ZHANG, Xiawei WEI (2021): The challenges of COVID-19 Delta variant: Prevention and vaccine development. *MedComm* 2: 846–854.

HENDAUS, Mohamed A., Fatima A. JOMHA (2021): Delta variant of COVID-19: A simple explanation. *Qatar Medical Journal* 2021: 49.

HILLARY, Varghese E., Stanislaus A. CEASAR (2023): An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. *Heliyon* 9: e13952.

HU, Ben, Hua GUO, Peng ZHOU, Zheng-Li SHI (2021): Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* 19: 141–154.

CHATTERJEE, Srijan, Manojit BHATTACHARYA, Sagnik NAG, Kuldeep DHAMA, Chiranjib CHAKRABORTY (2023): A Detailed Overview of SARS-CoV-2 Omicron: Its Sub-Variants, Mutations and Pathophysiology, Clinical Characteristics, Immunological Landscape, Immune Escape, and Therapies. *Viruses* 15: 167.

CHAURASIA, Rajashree, Udayan GHOSE (2024): Genome-wide mutation frequency variation among SARS-CoV-2 variants and its effects on the untranslated regions. *The Nucleus*.

CHEN, Xin, Fatema KALYAR, Abrar A. CHUGHTAI, Chandini R. MACINTYRE (2024): Use of a risk assessment tool to determine the origin of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Risk Analysis*: 1-11.

CHEN, Yu, Qianyun LIU, Deyin GUO (2020): Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology* 92: 418–423.

CHERNYAEVA, Ekaterina N., Andrey A. AYGININ, Alexey V. KOSENKOV, Svetlana V. ROMANOVA, Anastasia V. TSYPKINA, Andrey R. LUPAREV, Ivan F. STETSENKO, Natalia I. GNUSAREVA, Alina D. MATSVAY, Yulia A. SAVOCHKINA, German A. SHIPULIN (2023): SARS-CoV-2 Recombination and Coinfection Events Identified in Clinical Samples in Russia. *Viruses* 15: 1660.

CHUNG, Hsing-Yi, Ming-Jr JIAN, Chih-Kai CHANG, Jung-Chung LIN, Kuo-Ming YEH, Chien-Wen CHEN, Shan-Shan HSIEH, Kuo-Sheng HUNG, Sheng-Hui TANG, Cherng-Lih PERNG, Feng-Yee CHANG, Chih-Hung WANG, Hung-Sheng SHANG (2022): Emergency SARS-CoV-2 Variants of Concern: Novel Multiplex Real-Time RT-PCR Assay for Rapid Detection and Surveillance. *Microbiology Spectrum* 10: e02513-21.

JAHIRUL ISLAM, Md., Nafisa NAWAL ISLAM, Md. SIDDIK ALOM, Mahmuda KABIR, Mohammad A. HALIM (2023): A review on structural, non-structural, and accessory proteins of SARS-CoV-2: Highlighting drug target sites. *Immunobiology* 228: 152302.

KAŠPAR, Mirko, Pavel ŠVEC (2022): Poslední opatření proti covidu skončila, respirační

už nejsou nikde povinné. Aktuálně.cz - Víte, co se právě děje. [online] [navštíveno 2024-03-05]. Dostupné z: <https://zpravy.aktualne.cz/domaci/platna-nova-opatreni-covid-koronavirus/r~efe8232e0d2711eba6f6ac1f6b220ee8/>

KHAILANY, Rozhgar A., Muhamad SAFDAR, Mehmet OZASLAN (2020): Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports* 19: 100682.

KUMAR, Swatantra, Rajni NYODU, Vimal K. MAURYA, Shailendra K. SAXENA (2020): Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In: Shailendra K. SAXENA (ed.): *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*, pp. 23–31, Springer, Singapore.

LAMBISIA, Arnold W., Khadija S. MOHAMMED, Timothy O. MAKORI, Leonard NDWIGA, Maureen W. MBURU, John M. MOROBE, Edidah O. MORAA, Jennifer MUSYOKI, Nickson MURUNGA, Jane N. MWANGI, D. James NOKES, Charles N. AGOTI, Lynette I. OCHOLA-OYIER, George GITHINJI (2022): Optimization of the SARS-CoV-2 ARTIC Network V4 Primers and Whole Genome Sequencing Protocol. *Frontiers in Medicine* 9.

LIU, Yang, Jianying LIU, Kenneth S. PLANTE, Jessica A. PLANTE, Xuping XIE, Xianwen ZHANG, Zhiqiang KU, Zhiqiang AN, Dionna SCHARTON, Craig SCHINDEWOLF, Steven G. WIDEN, Vineet D. MENACHERY, Pei-Yong SHI, Scott C. WEAVER (2022): The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature* 602: 294–299.

LOOMBA, Poonam, Chand WATTAL, Anita CHAKRAVARTI, Sanghmitra DUTTA, Mala CHABBRA, Pratibha KALE, Devjani DE, Shobha BROOR, Ekta GUPTA (2020): Can The March of COVID-19 be Halted. *Indian Journal of Medical Microbiology* 38: 128133.

NAAUM, Amanda M., Marine CUSA, Maleeka SINGH, Zoe BLEICHER, Christopher ELLIOTT, Ian B. GOODHEAD, Robert H. HANNER, Sarah J. HELYAR, Stefano MARIANI, John E. RICE, Lawrence J. WANGH, J. Aquiles SANCHEZ (2021): Validation of FASTFISH-ID: A new commercial platform for rapid fish species authentication via universal closed-tube barcoding. *Food Research International* 141: 110035.

NIELSEN, Marisa C., Rafael R. G. MACHADO, Brooke M. MITCHELL, Allan J. MCCONNELL, Nehad I. SAADA, Scott C. WEAVER, Ping REN (2022): A Comparison of Seegene Technologies Novaplex SARS-CoV-2 Variants I, II, and IV Assays with Spike

Gene Sequencing for Detection of Known Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants. *The Journal of Molecular Diagnostics* 24: 455–461.

NOVINKY.CZ (2020): ČR má opět nejvyšší přírůstky nakažených na počet obyvatel z okolních zemí. *Novinky.cz*. [online] [navštíveno 2024-03-01] Dostupné z: <https://www.novinky.cz/clanek/koronavirus-cr-ma-opet-ma-nejvyssi-prirustky-nakazenych-na-pocet-obyvatel-z-okolnich-zemi-40335274>

NS, Zhong, Zheng BJ, Li YM, Poon NONE, Xie ZH, Chan KH, Li PH, Tan SY, Chang Q, Xie JP, Liu XQ, Xu J, Li DX, Yuen KY, Peiris NONE, Guan Y (2003): Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet* (London, England) 362.

PATHER, Shanti, Shabir A. MADHI, Benjamin J. COWLING, Paul MOSS, Jeremy P. KAMIL, Sandra CIESEK, Alexander MUIK, Özlem TÜRECI (2023): SARS-CoV-2 Omicron variants: burden of disease, impact on vaccine effectiveness and need for variant-adapted vaccines. *Frontiers in Immunology* 14.

PIERCE, Kenneth E., J. Aquiles SANCHEZ, John E. RICE, Lawrence J. WANGH, Gregory A. PETSKO (2005): Linear-after-the-Exponential (LATE)-PCR: Primer Design Criteria for High Yields of Specific Single-Stranded DNA and Improved Real-Time Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 8609–8614.

RAHIMI, Azadeh, Azin MIRZAZADEH, Soheil TAVAKOLPOUR (2021): Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics* 113: 1221–1232.

RAVI, V., Sonal SAXENA, Pragyan S. PANDA (2022): Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian Journal of Medical Microbiology* 40: 182–186.

REHMAN, Saif U., Laiba SHAFIQUE, Awais IHSAN, Qingyou LIU (2020): Evolutionary Trajectory for the Emergence of Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Pathogens* 9: 240.

RICE, John E., Arthur H. REIS, Lisa M. RICE, Rachel K. CARVER-BROWN, Lawrence J. WANGH (2012): Fluorescent signatures for variable DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 40: e164.

SABERIYAN, Mohammadreza, Elham KARIMI, Zahra KHADEMI, Parvaneh MOVAHHED, Amir SAFI, Ameneh MEHRI-GHAHFARROKHI (2022): SARS-CoV-2:

phenotype, genotype, and characterization of different variants. *Cellular & Molecular Biology Letters* 27: 50.

SHIEHZADEGAN, Shayan, Nazanin ALAGHEMAND, Michael FOX, Vishwanath VENKETARAMAN (2021): Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19. *Clinics and Practice* 11: 778–784.

SIRIANNI, Nicky M., Huijun YUAN, John E. RICE, Ronit S. KAUFMAN, John DENG, Chandler FULTON, Lawrence J. WANGH (2016): Closed-Tube Barcoding. *Genome* 59: 1049–1061.

SPECCHIARELLO, Eliana, Giulia MATUSALI, Fabrizio CARLETTI, Cesare E. M. GRUBER, Lavinia FABENI, Claudia MINOSSE, Emanuela GIOMBINI, Martina RUECA, Fabrizio MAGGI, Alessandra AMENDOLA, Anna R. GARBUGLIA (2023): Detection of SARS-CoV-2 Variants via Different Diagnostics Assays Based on Single-Nucleotide Polymorphism Analysis. *Diagnostics* 13: 1573.

TEGALLY, Houriiyah, Eduan WILKINSON, Marta GIOVANETTI, Arash IRANZADEH, Vagner FONSECA, Jennifer GIANDHARI, Deelan DOOLABH, Sureshnee PILLAY, Emmanuel J. SAN, Nokukhanya MSOMI, Koleka MLISANA, Anne VON GOTTBERG, Sibongile WALAZA, Mushal ALLAM, Arshad ISMAIL, Thabo MOHALE, Allison J. GLASS, Susan ENGELBRECHT, Gert VAN ZYL, Wolfgang PREISER, Francesco PETRUCCIONE, Alex SIGAL, Diana HARDIE, Gert MARAIS, Nei-yuan HSIAO, Stephen KORSMAN, Mary-Ann DAVIES, Lynn TYERS, Innocent MUDAU, Denis YORK, Caroline MASLO, Dominique GOEDHALS, Shareef ABRAHAMS, Oluwakemi LAGUDA-AKINGBA, Arghavan ALISOLTANI-DEHKORDI, Adam GODZIK, Constantinos K. WIBMER, Bryan T. SEWELL, José LOURENÇO, Luiz C. J. ALCANTARA, Sergei L. KOSAKOVSKY POND, Steven WEAVER, Darren MARTIN, Richard J. LESSELLS, Jinal N. BHIMAN, Carolyn WILLIAMSON, Tulio DE OLIVEIRA (2021): Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592: 438-443.

TETRAULT, Shana M., John E. RICE, Lawrence J. WANGH a J. Aquiles SANCHEZ, 2014. Single-Tube Mutation Scanning of The Epidermal Growth Factor Receptor Gene Using Multiplex LATE-PCR and Lights-On/Lights-Off Probes. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis* 5: 1000175.

VANONI, Simone, Arnoldas MATULEVICIUS, Besard AVDIU, Giada

SCANTAMBURLO, Camilla ULEKLEIV, Pius M. BRZOSKA, Manohar R. FURTADO, Jelena D. M. FEENSTRA, Alain RICO, Manoj GANDHI, Elisabetta GIACOBazzi, Elisa MASI, Markus PAULMICHL, Charity NOFZIGER (2022): SARS-CoV-2 variants of concern surveillance including Omicron using RT-PCR-based genotyping offers comparable performance to whole genome sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12.

WALLS, Alexandra C., Young-Jun PARK, M. Alejandra TORTORICI, Abigail WALL, Andrew T. MCGUIRE, David VEESLER (2020): Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181: 281-292.e6.

WANG, Anyou (2024): Integrating Fréchet distance and AI reveals the evolutionary trajectory and origin of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology* 96: e29557.

WELCH, Nicole L., Meilin ZHU, Catherine HUA, Juliane WELLER, Marzieh E. MIRHASHEMI, Tien G. NGUYEN, Sreekar MANTENA, Matthew R. BAUER, Bennett-M. SHAW, Cheri M. ACKERMAN, Sri G. THAKKU, Megan W. TSE, Jared KEHE, Marie-Martine UWERA, Jacqueline S. EVERSLEY, Derek A. BIELWASKI, Graham MCGRATH, Joseph BRAIDT, Jeremy JOHNSON, Felecia CERRATO, Gage K. MORENO, Lydia A. KRASILNIKOVA, Brittany A. PETROS, Gabrielle L. GIONET, Ewa KING, Richard C. HUARD, Samantha K. JALBERT, Michael L. CLEARY, Nicholas A. FITZGERALD, Stacey B. GABRIEL, Glen R. GALLAGHER, Sandra C. SMOLE, Lawrence C. MADOFF, Catherine M. BROWN, Matthew W. KELLER, Malania M. WILSON, Marie K. KIRBY, John R. BARNES, Daniel J. PARK, Katherine J. SIDDLE, Christian T. HAPPI, Deborah T. HUNG, Michael SPRINGER, Bronwyn L. MACINNIS, Jacob E. LEMIEUX, Eric ROSENBERG, John A. BRANDA, Paul C. BLAINEY, Pardis C. SABETI, Cameron MYHRVOLD (2022): Multiplexed CRISPR-based microfluidic platform for clinical testing of respiratory viruses and identification of SARS-CoV-2 variants. *Nature Medicine* 28: 1083–1094.

WHITFIELD, Michael G., Salvatore A. E. MARRAS, Rob M. WARREN, Annelies VAN RIE, John RICE, Lawrence J. WANGH, Barry N. KREISWIRTH (2020): Rapid Pyrazinamide Drug Susceptibility Testing using a Closed-Tube PCR Assay of the Entire *pncA* gene. *Scientific Reports* 10: 4234.

WHO (2024): Coronavirus Disease (COVID-19) Epidemiological Updates and Monthly Operational Updates. [online] [navštíveno 2024-03-05] Dostupné

z: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>

WOO, Patrick C. Y., Raoul J. DE GROOT, Bart HAAGMANS, Susanna K. P. LAU, Benjamin W. NEUMAN, Stanley PERLMAN, Isabel SOLA, Lia van der HOEK, Antonio C. P. WONG, Shiou-Hwei YEH (2023): ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY* 104: 001843.

WOO, Patrick C. Y., Yi HUANG, Susanna K. P. LAU, Kwok-Yung YUEN (2010): Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses* 2: 1804–1820.

WU, Fan, Su ZHAO, Bin YU, Yan-Mei CHEN, Wen WANG, Zhi-Gang SONG, Yi HU, Zhao-Wu TAO, Jun-Hua TIAN, Yuan-Yuan PEI, Ming-Li YUAN, Yu-Ling ZHANG, Fa-Hui DAI, Yi LIU, Qi-Min WANG, Jiao-Jiao ZHENG, Lin XU, Edward C. HOLMES, Yong-Zhen ZHANG (2020): A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579: 265–269.

XIE, Xiaochun, Jian-Bao HAN, Guanqin MA, Xiao-Li FENG, Xiaohong LI, Qing-Cui ZOU, Zhong-Hua DENG, Jianxiong ZENG (2021): Emerging SARS-CoV-2 B.1.621/Mu variant is prominently resistant to inactivated vaccine-elicited antibodies. *Zoological Research* 42: 789.

YADAV, Rohitash, Jitendra K. CHAUDHARY, Neeraj JAIN, Pankaj K. CHAUDHARY, Supriya KHANRA, Puneet DHAMIJA, Ambika SHARMA, Ashish KUMAR, Shailendra HANDU (2021): Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells* 10: 821.

YANG, Wan, Jeffrey SHAMAN (2022): COVID-19 pandemic dynamics in India, the SARS-CoV-2 Delta variant and implications for vaccination. *Journal of The Royal Society Interface* 19.

ZHAO, Ziyuan, Liying SUN, Liqin WANG, Xiaodong LI, Junping PENG (2023): A multiplex method for detection of SARS-CoV-2 variants based on MALDI-TOF mass spectrometry. *Biosafety and Health* 5: 101–107.

ZHOU, Peng, Xing-Lou YANG, Xian-Guang WANG, Ben HU, Lei ZHANG, Wei ZHANG, Hao-Rui SI, Yan ZHU, Bei LI, Chao-Lin HUANG, Hui-Dong CHEN, Jing CHEN, Yun LUO, Hua GUO, Ren-Di JIANG, Mei-Qin LIU, Ying CHEN, Xu-Rui SHEN, Xi WANG, Xiao-Shuang ZHENG, Kai ZHAO, Quan-Jiao CHEN, Fei DENG, Lin-Lin LIU, Bing YAN, Fa-Xian ZHAN, Yan-Yi WANG, Geng-Fu XIAO, Zheng-Li SHI (2020): A pneumonia

outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579: 270–273.

ZHU, Na, Dingyu ZHANG, Wenling WANG, Xingwang LI, Bo YANG, Jingdong SONG, Xiang ZHAO, Baoying HUANG, Weifeng SHI, Roujian LU, Peihua NIU, Faxian ZHAN, Xuejun MA, Dayan WANG, Wenbo XU, Guizhen WU, George F. GAO, Wenjie TAN, CHINA NOVEL CORONAVIRUS INVESTIGATING AND RESEARCH TEAM (2020): A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine* 382: 727–733.

9 Přílohy

Příloha 1: Nukleotidové sekvence použitých syntetických standardů

Příloha 2: Nukleotidové sekvence použitých primerů a sond – 1. sada.

Příloha 3: Nukleotidové sekvence použitých primerů a sond – 2. sada.

Příloha 1: Nukleotidové sekvence použitých syntetických standardů

Označení	Sekvence (5'-3')
Syntetický standard 2512	TACTTCTAACCAGGTTGCTGTTCTTTATCAGGATGTTAACTGCACAGAAGTC CCTGTTGCTATTCATGCAGATCAACTTACTCCTACTTGGCGTGTTTATTCTA CAGGTTCTAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTTAATAGGGGGCTGAAC ATGTCAACAACCTCATATGAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGGTATATGCG CTAGTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTCGGCGGGGCACGTAGTGTAGCTA GTCAATCCATCATTGCCTACACTATGTCACTTGGTGCAGAAAATTCAGTTGC TTACTCTAATAACTCTATTGCCATACCCACAAATTTTACTATTAGTGTTACC ACAGAAATTCTACCAGTGTCTATGACCAAGACATCAGTAGATTGTACAATG TACATTTGTGGTGATTCAACTGAATGCAGCAATCTTTTGTGCAATATGGCA GTTTTTGTACACAATTAACCGTGCT
Syntetický standard 2513	TACTTCTAACCAGGTTGCTGTTCTTTATCAGGATGTTAACTGCACAGAAGTC CCTGTTGCTATTCATGCAGATCAACTTACTCCTACTTGGCGTGTTTATTCTA CAGGTTCTAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTTAATAGGGGGCTGAAC ATGTCAACAACCTCATATGAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGGTATATGCG CTAGTTATCAGACTCAGACTAATTCTCGTCGGCGGGGCACGTAGTGTAGCTA GTCAATCCATCATTGCCTACACTATGTCACTTGGTGCAGAAAATTCAGTTGC TTACTCTAATAACTCTATTGCCATACCCACAAATTTTACTATTAGTGTTACC ACAGAAATTCTACCAGTGTCTATGACCAAGACATCAGTAGATTGTACAATG TACATTTGTGGTGATTCAACTGAATGCAGCAATCTTTTGTGCAATATGGCA GTTTTTGTACACAATTAACCGTGCT
Syntetický standard 3081	GACATTACACCATGTTCTTTTGGTGGTGTGTCAGTGTATAACACCAGGAACA AATACTTCTAACCAGGTTGCTGTTCTTTATCAGGGTGTTAACTGCACAGAA GTCCCTGTTGCTATTCATGCAGATCAACTTACTCCTACTTGGCGTGTTTATT CTACAGGTTCTAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTTAATAGGGGGCTG AACATGTCAACAACCTCATATGAGTGTGACATACCTATTGGTGCAGGTATAT GCGCTAGTTATCAGACTCAGACTAATTCTCGTCGGCGGGGCACGTAGTGTAG CTAGTCAATCCATCATTGCCTACACTATGTCACTTGGTGCAGAAAATTCAGT TGCTTACTCTAATAACTCTATTGCCATACCCACAAATTTTACTATTAGTGTT ACCACAGAAATTCTACCAGTGTCTATGACCAAGACATCAGTAGATTGTACA ATGTACATTTGTGGTGATTCAA

Označení	Sekvence (5'-3')
Syntetický standard 2440	<p>GTCCTATATAATTCCGCATCATTTTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGT GTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCAG ATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGG GCAAACCTGGAAAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGAT TTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAAATTCTAACAATCTTGATTCTA AGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTC TAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAG GCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGGAAGGTTTTAATTGTTACT TTCCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTAC CAACCATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCAC CAGCAACTGTTTG</p>
Syntetický standard 2441	<p>TCCTATATAATTCCGCATCATTTTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTG aCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCAGA TTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGG CAAACCTGGAAAGtTTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTT TACAGGCTGgGTTATAGCTTGGAAATTCTAACAATCTTGATTCTAAG GTTGGTGGTAATTATAATTACCTGaATAGATTGTTTAGGAAGTCTA ATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGC CGGTAGCACAgCTTGTAATGGTGTGAAcGTTTTAATTGTTACTTTC CTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATcGTGTTGGTTACCAA CCATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTaTGAACCTTCTACATGCACCAGC AACTGTTTG</p>

Malým písmem jsou u syntetického standardu 2441 označeny SNP oproti standardu 2440.

Příloha 2: Nukleotidové sekvence použitých primerů a sond – 1. sada.

Označení	Směr	Sekvence (5'-3')	5' modifikace	3' modifikace
Primer 2549	F	CACGTGCAGGCTGTTT AATAGGGGC		
Primer 2550	R	GGGTGGGTATGGCAAT AGAG		
Sonda 2551		TGAACATGTCAACAAC a		BHQ-2
Sonda 2552		aaTCATATGAGTGTGAC ATACCCATT	Cy5	BHQ-2
Sonda 2553		atGGTGCAGGTATAT		BHQ-1
Sonda 2554		aGCGCTAGTTATCAGA CTCAGACt	FAM	BHQ-1
Sonda 2555		TAATTCTCCTCGGc _a		BHQ-2
Sonda 2556		ttGGGCACGTAGTGTAG CTAGTCAA	Cy5	BHQ-2
Sonda 2557		gTCCATCATTGCCTAC		BHQ-1
Sonda 2558		aACTATGTCACCTTGGTG CAGAAAATT	FAM	BHQ-1
Sonda 2559		atCAGTTGCTTACTat		BHQ-1

F: forward, R: reverse

Cy5 a FAM: fluorescenční barviva

BHQ-1 a BHQ-2: Black Hole Quencher-1 a Black Hole Quencher-2, zhášecí

Příloha 3: Nukleotidové sekvence použitých primerů a sond – 2. sada.

Označení	Směr	Sekvence (5'-3')	5' modifikace	3' modifikace
Primer 2538	F	GCGGCTTGATTCTAAG GTTGGTGG		
Primer 2539	R	TACTACTCTGTATGGT TGGTAACC		
Primer 2506	F	TCTAACAATCTTGATT CTAAG		
Sonda 2540		TTATAATTACCTGTAA		BHQ-2
Sonda 2541		tTAGATTGTTTAGGAAG TCTAATCTCAA	TEX 615	BHQ-2
Sonda 2542		tcACCTTTTGAGAGAGA		BHQ-2
Sonda 2543		TATTTCAACTGAAATC TATCta	Cy3	BHQ-2
Sonda 2544		AGGCCGGTAGCACACC T		BHQ-2
Sonda 2545		aaTGTAATGGTGTGAA GGTTTTAATT	TEX 615	BHQ-2
Sonda 2546		taGTTACTTTCCTTA		BHQ-2
Sonda 2547		ttCAATCATATGGTTTC CAAa	Cy3	BHQ-2
Sonda 2548		aaCCCACTAATGGTGTT		BHQ-2

F: forward, R: reverse

TEX 615 a Cy3: fluorescenční barviva

BHQ-2: Black Hole Quencher-2, zhášec