

Jiho česká univerzita v českých Budějovicích  
Zdravotní sociální fakulta

## **Optimalizace parametrů polymerázové a zové reakce**

Bakalářská práce

Autor práce: Magda Vojtová  
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslava Kohoutová, Ph.D

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

## Abstrakt

**Polymerase Chain Reaction (PCR)** je molekulárn biologická metoda, jejím cílem je namnožení neboli amplifikace požadovaného úseku DNA. Jedná se o velice citlivou a specifickou techniku. Nov vzniklé modifikace pracující na principu PCR techniky jsou nepostradatelné především pro diagnostiku u kterých virových, bakteriálních, nádorových, ale i geneticky podmíněných onemocnění.

Cílem mé bakalářské práce je, pochopit celý systém této techniky, popsat její jednotlivé složky, postup a princip. Hlavním úkolem mé práce bylo optimalizovat metodu tak, aby její specifická vlastnost, přesnost a její výstředek byl co nejvyšší a dostatečný k dalšímu výzkumu a analýze. Všechny optimalizační kroky byly prováděny při amplifikaci cDNA (*Spinacia oleracea*) pro geny kódující proteiny PsbR a PsbQ z fotosystému II vybraných rostlin, sloužící zejména pro výzkum fotosyntézy. Díky poznatkům získaným během jednotlivých optimalizačních experimentů je možné odpovědět, které kroky jsou pro správnou amplifikaci genů fotosyntetických proteinů přínosné a kterým je nutné se vyhnout.

Amplifikace proteinu PsbQ byla zaměřena na optimalizaci chemickými vlivy, naopak amplifikace proteinu PsbR byla optimalizována vlivy fyzikálními. Cílové faktory sloužící pro zlepšení výstřednosti PCR produktu spočívaly v případě chemických vlivů v rozdílných koncentracích jednotlivých základních složek reakční směsi, tedy výchozí DNA, Taq DNA polymerázy, dNTP, primerech a hořelivých iontech. Navýšení výstřednosti amplifikace fyzikálními vlivy bylo zaměřeno především na optimalizaci počtu cyklů, nastavení správné teploty annealingu a času extenze.

V praktické části bakalářské práce uvádím celou sérii výsledných gelů s jasným závěrem, které podmínky pro amplifikaci produktu byly nejvhodnější a které naopak přinášely amplifikaci problémy.

Správně nastavená metoda byla analyzována elektroforeticky, a to sledováním ostrosti odpovídajícího pásma a vzniku falešně negativních i falešně pozitivních výsledků.

Pro minimalizaci nežádoucích produktů byly experimentálně ustanoveny pro amplifikaci proteinu PsbQ za nejvhodnější následující parametry: nejnižší koncentrace DNA a to 0,01 µg/µl, pro Taq DNA polymerázu výsledná aktivita 0,05 U/µl. Vyšší hodnoty obou složek přinášejí při amplifikaci vznik sekundárních produktů omezujících dostatečný výtěk reakce. Nutnost optimalizace pro amplifikaci každého genu potvrzuje vyhledání správné koncentrace dNTP. Jako neoptimální koncentrace byla zvolena 0,2 mM, jen jednou tak vysoká hladina je již pro reakci inhibiční. Koncentrace použitých primerů se jeví jako přímo úměrné, tzn. čím vyšší hladiny v rozmezí 0,1-2 µM byly použity, tím bylo ve sledované oblasti 446 bp dosaženo vyššího výtěku výsledného produktu. Studie zaměřené na ustanovení správné koncentrace hořčičných iontů upozorují na nižší hladiny než 1,5 mM, které přinášejí na reakci maximální inhibiční, všechny vyšší hladiny garantují kvalitní výtěk amplifikace. Stejně závazné bylo docíleno i v případě amplifikace genu PsbQ.

Rovněž i principy optimalizace PCR fyzikálními vlivy a to proteinu PsbR se opíraly o poznatky získané z vědecké literatury zaměřené na tuto problematiku. Ideální teplota annealingu byla 63° C, jednoznačné zesílení amplifikace pak přineslo navyšování počtu cyklů. Teprve až po 30 proběhlých cyklech PCR reakce zaručuje ve sledované oblasti 290 bp vznik silného bandu. Kvalitní amplifikaci pak také zajišťuje 2 minuty dlouhá extenze, kratší doba zaručuje získání správného nebo jen nízkého výtěku.

Všechny optimalizované parametry byly využity pro analýzu několika neznámých vzorků, v kterých se měla zjistit přítomnost popsáných genů PsbR, PsbQ a tím potvrdit správnost optimalizace PCR techniky pro zkoumané geny. Výsledky optimalizace budou použity jako výchozí protokol v laboratorii pro amplifikaci obou genů.

**Klíčová slova:** polymerázová řetězová reakce, amplifikace DNA, optimalizace PCR

## Abstract

The polymerase chain reaction (PCR), is a molecular biological method, which is capable to amplify a particular DNA sequence. Above all, there are recently appeared modifications working on the principle of PCR, which became indispensable not only for the diagnosis of some viral, bacterial and tumoral, but also for the diagnosis of genetically conditioned diseases.

The duty of my bachelor thesis is to understand the whole system of this technology, to describe its individual parts, process and principle. The main task of my work was to optimize PCR, in order to achieve its highest specificity, accuracy and yields of PCR products, which would be sufficient for next research and analysis. All optimization steps of amplification were done using cDNA (*Spinacia oleracea*) of proteins PsbR and PsbQ from photosystem II of higher plants.

Instead of PsbR, which amplification was optimized with physical impacts, PsbQ protein was optimized using chemical factors. In the case of these chemical factors used to improve PCR product yields that were different concentrations of individual elemental components as: DNA template, Taq DNA polymerase, dNTPs, primers and magnesium ions. For physical impacts the increase of amplification yields was concentrated primarily on optimization of number of cycles, the right temperature of annealing and the time of extension

In the practical part of this bachelor thesis I present the whole set of resulting gels, with the clear conclusion, which conditions for amplification of PCR products were the most suitable, and which on the contrary were problematical.

The well adjusted method was analyzed using the electrophoretic division. Namely it was observation of sharpness of corresponding band and the formation of negative or falsely positive results.

For the minimisation of undesirable products were experimentally determined for amplification of PsbQ gene as the most appropriate the following parameters: the lowest concentration of DNA (0.001  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), for Taq DNA polymerase the resulting activity 0.05 U/ $\mu\text{l}$ . The higher values of both components bring during the amplification

formation of secondary products, which restrict the yields of reaction. The finding of the right concentration of dNTPs confirms the need of optimization for amplification of each gene. As the most suitable concentration was chosen 0.2 mM, only twice higher levels of this concentration inhibit the reaction. The concentrations of used primers were corresponding to direct proportion, it means that the higher the levels 0,1-2  $\mu$ M were used, the higher the yields of PCR products were obtained in observed 446 bp band. Some publications focused on the evaluation of the right concentration of magnesium ions warn us about the fact that the levels lower than 1.5 mM inhibit the reaction. All higher levels guarantee high-quality yields of amplification. The same conclusion was reached in the case of amplification of the PsbQ gene.

Also the principles of optimization of amplification of PsbR gene were based on findings obtained from scientific literature focused on this problematic. The ideal temperature of annealing was 63 °C, indisputed intensification of amplification was accomplished owing to the increase of number of cycles. At least 30 cycles of PCR reaction were sufficient enough to ensure the formation of enough intense 290 bp band. The high-quality amplification was also ensured by 2 minutes long extension, shorter time resulted in none or low yield.

All optimized parameters were used for analysis of several unknown samples, where the presence of above mentioned genes ó PsbR, PsbQ had to be ascertained and thus confirmed the optimization of PCR method for investigated genes. The results of optimization will be used in the laboratory like starting protocol.

**Keywords:** PCR, amplification of DNA, optimization of PCR

## **Prohlá-ení**

Prohla-uji, že svoji bakalá skou práci jsem vypracoval(a) samostatn ě pouze s použitím pramen ů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohla-uji, že v souladu s § 47b zákona . 111/1998 Sb. v platném zn ění souhlasím se zve ejn ěním své bakalá ské práce, a to ů v nezkrácené podob ě ů v ůprav ě vzniklé vypu-ť ěním vyzna ěných ástí archivovaných fakultou ů elektronickou cestou ve ve ejn ě p ěístupné ásti databáze STAG provozované Jiho ěskou univerzitou v ěeských Bud jovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifika ní práce. Souhlasím dále s tím, aby toutěľ elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona . 111/1998 Sb. zve ejn ěny posudky ěkolitele a oponent ů práce i záznam o pr ěb ěhu a výsledku obhajoby kvalifika ní práce. Rovn ěľ souhlasím s porovnáním textu mé kvalifika ní práce s databází kvalifika ních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysoko-ľolských kvalifika ních prací a systémem na odhalování plagiát ů .

V ěeských Bud jovicích dne 3. 5. 2013

.....

Magda Vojtová

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala paní Mgr. Jaroslavu Kohoutové Ph. D. za odborné vedení, podnětné rady a za umožnění praktického seznámení s počítačovým vybavením PCR laboratoře. Nejen za cenné informace také děkuji Mgr. Jiřímu Hellerovi.

Velký dík za podporu při studiu a psaní této práce patří bezesporu i mému manželovi.

## Seznam použitých zkratk

A	adenin
ATP	adenosintrifosfát
bp	pár bází
C	cytosin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
dCTP	deoxycytidintrifosfát
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
dATP	deoxyadenozintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	ethidium bromid
G	guanin
GMO	geneticky modifikovaný organizmus
dGTP	deoxyguanozintrifosfát
kb	kilobáze
kDA	kilodalton
mM	milimol
Mg <sup>2+</sup>	ho e naté ionty
mRNA	mitochondriální ribonukleová kyselina
ng	nanogram
OH skupina	hydroxilová skupina
PCR	polymerázová et zová reakce
RFLP	stanovení polymorfizmu délky restrik ních fragment
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzn transkriptázová PCR
RW primer	reverse primer



T	thymin
ssDNA	jedno et zcová deoxyribonukleová kyselina
dTTP	deoxythymidintrifosfát
T <sub>a</sub>	teplota annealingu
T <sub>m</sub>	teplota topení
U/ $\mu$ l	jednotka enzymové aktivity
UV	ultrafialové záření
$\mu$ l	mikrolitr
$\mu$ M	mikromol
V	volt

# Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1. Předmluva	11
2. Úvod	12
2.1 Vývoj PCR	12
2.2 Využití PCR	14
3. Optimalizace metody	18
3.1 Optimalizace chemickými vlivy	19
3.2 Optimalizace fyzikálními vlivy	23
4. Detekce a analýza výsledného produktu	25
5. PRAKTICKÁ ČÁST	26
5.1 Metodika práce	26
5.2 Reakční směs pro optimalizaci amplifikace PsbQ genu	32
5.3 Teplotní - časové profily pro optimalizaci amplifikace PsbR genu	36
6. Výsledky	38
6.1 Výsledky optimalizace amplifikace PsbQ genu	38
6.2 Výsledky optimalizace amplifikace PsbR genu	42
7. Diskuze	47
8. Závěr	51
9. Použitá literatura a odborné zdroje	52
10. Přílohy	58

# 1. Předmluva

Devadesátá léta minulého století znamenají především pro klinické laboratorie obrovský rozvoj přístrojové techniky. Jedná se o analyzátory nabízející širokou škálu principiálně odlišných kvalitativních a kvantitativních technik s vysokou citlivostí, velkým detekovatelným rozsahem celé řady biologických materiálů, a to i s ikterickými i hemolytickými artefakty. Pro laboranty pak znamenají snazší zpracovatelnost materiálů, rychlejší analýzu a pro lékaře rychleji dostupný výsledek. Tyto automatické analyzátory jsou součástí především velkých centrálních laboratorií, které se stávají jakousi továrnou na výsledky. Vždy mi ale zajímalo, co přecházelo, než se tyto metodiky staly tak dokonalými, jak bylo třeba je zoptimalizovat a nastavit tak, aby byly dostatečně citlivé, specifické a spolehlivé.

Právě proto se jednoznačným cílem mé bakalářské práce stala technika optimalizace poměrně mladé laboratorní metody polymerázové řetězové reakce. Technikou optimalizace jsem se zabývala na pracovišti Ústavu fyzikální biologie v Nových Hradech, od roku 2012 Ústavu komplexních systémů, skládající se z několika úseků odlišných laboratorií. Jedná se například o Laboratorii aplikované systémové biologie zabývající se výzkumem komplexních systémů v přírodní oblasti. Dleřitým pracovištěm tohoto výzkumného ústavu je i certifikovaná Laboratorní tkáň ových kultur, pracující na komerčních zakázkách a výzkumných projektech v oblasti biokompability materiálů a léčebných účinků probiotik.

Mým pracovištěm pro získání zkušeností v metodě PCR se stala Laboratorní makromolekulární struktury a dynamiky. Ta se věnuje studiu membránových a ve vodě rozpustných makromolekulárních komplexů a práce laboranta v tomto úseku se týká především přípravu rekombinantních proteinů, jejich purifikaci a krystalizaci.

## 2. Úvod

Polymerázová reakce je jednou z metod molekulární biologie používaných k namnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA. Jedná se o enzymatickou amplifikaci molekuly DNA, v cyklické reakci o třech teplotních fázích, která pracuje na podobném principu jako replikace (zdvojení) molekuly DNA in vivo (5).

### 2.1 Vývoj PCR

Když v roce 1993 Kary Mullis přebíral Nobelovu cenu z rukou vědeckého krále za objev roku a realizaci polymerázové reakce (PCR), charakterizoval svůj nápad, desetileté úsilí a realizaci této metody jako šťastnou náhodou, vdecké naivity a série šťastných omylů (8).

Na vývoji nové techniky začal Mullis pracovat v roce 1983, je znám jako vdec v kalifornské společnosti Cetus Corporation a jeho ideální myšlenka tkvěla ve využití principu duplikace dvojřetězce DNA, která po miliony let přenáší genetickou informaci v rozsahu dané specifické sekvence. Prvním krokem bylo právě její rozpuštění, které Mullis se svými spolupracovníky zajistili denaturací teplem (8, 28).

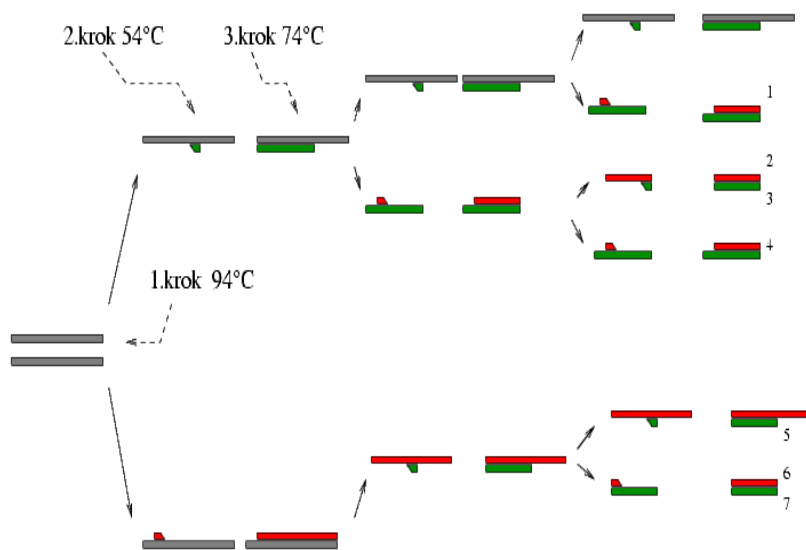
Tato fáze probíhající při teplotě 94 °C způsobuje rozvolnění vodíkových mostků spojující báze komplementárních nukleotidů, což vede k rozpuštění dvojřetězce DNA (dsDNA) na jednu řetězovou DNA (ssDNA) (15).

Pro další fázi této technologie vyvinul několik postupů a látek, které se samy o sobě používaly již dříve. Jednalo se o využití DNA polymerázy a oligonukleotidů, které byly používány v molekulární biologii již v 70. letech 20. století. (7).

Pro označení sekvencí bazí DNA kódující pořadovanou specifickou informaci použil zmíněné oligonukleotidy jako tzv. primery, což jsou synteticky vyrobené sekvence bazí, které jsou komplementární právě svým sledem bazí. První primer, který nasedá na 5' konec genu je označován jako 5' primer, forward primer. Druhý primer nasedající na 3' konec genu je označován jako 3' primer, reverse primer. Primery tedy ohraničí úsek DNA, který má být amplifikován.

Proces, probíhající při snížené teplotě v rozmezí 40-72° C, při kterém dochází k navázání primeru, je druhou fází metody a je označován jako annealing (5).

Pak již stačilo k této směsi jednovláknových molekul DNA s nasednutými primery přidat základní stavební kameny, tj. nukleotidy a enzym DNA polymerázu a za zvýšené teploty došlo k prodloužení primeru podle výchozího templátu. Z prvních dvou sekvencí vznikají tedy této fází dvě identické kopie (28). Cyklickým opakováním těchto fází a využitím získané, zkopírované DNA z prvního kola pro amplifikaci v kole druhém, zajistil Kary Mullis cyklické chování reakce, odtud termín polymerázová metoda reakce (8).



Obr. 1 Kroky polymerázové metody reakce

(Zdroj: <http://robotika.cz/articles/gerda>)

A pokud do reakce vstoupí teoreticky jen jedna molekula DNA, po 30 cyklech lze získat až 1 073 741 824 ampliconů (5).

První lánek popisující technologickou ideu PCR byl vydán v roce 1985 časopisem Science, bohužel, redakcími ostatních prestižních časopisů byla technologie PCR označena jako příliš neoriginální, metodická a časově náročná (15).

Technologie byla automatizována až sestavením prvního termocykleru zvaného *Mr Cycle* firmou Cetus Corporation (27). V roce 1986 nastává další průlom ve vývoji PCR metody a to objevením termorezistentní DNA polymerázy z bakterie *Thermus aquaticus*, odolné i teplotám 104°C (teplotní optimum annealingu je 72°C). Do této doby byl termolabilní enzym DNA polymeráza izolovaný z bakterie *E.coli* dodáván do reakce s každým začínajícím cyklem. I přes tyto významné kroky ve vývoji byla metoda patentována až v únoru roku 1987 (15).

Rozhodujícím rokem pro další vývoj a praktické uplatnění je rok 1993. Společnost Cetus prodává patentová práva PCR metody společnosti ROCHE Diagnostics (pозději LaRoche), která tímto okamžikem zakládá v USA ROCHE Molecular Diagnostics (RMD), INC a ta se stává bez pochyb držitelkou vedoucího postavení v technologii a v know-how PCR techniky (8). V současné době je nepostradatelnou metodou nejen v biologických a lékařských vědách, ale i v kriminalistice a archeologii (29).

## 2.2 Využití PCR

Metoda polymerázové řetězové reakce patří dnes mezi primární metody molekulární a biologické genetiky. Jedná se o dnes nejpoužívanější molekulárně-biologickou metodu a to pro svou vysokou citlivost, specifitu a rychlost (24). Nutno podotknout, že především díky řadě modifikací odvozených od principu PCR nahrazuje tato metoda čím dál častěji techniky sloužící k detekci azyonemoci. Mezi oblíbené modifikace vznikající od roku 1989 patří stanovení polymorfizmu délky restrikčních

fragment u produkt PCR (PCR-RFLP), nested PCR, reverzn transkrip ní PCR (RT-PCR) nebo metoda sloufící ke kvantifikaci tzv. Real-time PCR, ale i dal-í modifikace (15).

Tyto dokonalé techniky založené na principu PCR našly uplatn ní nejen ve výzkumu, analýze DNA, klonování, archeologii ale i v kontrole kvality potravin, zem d lství, kriminalistice, veterinární medicín a dal-ích d lefitých oborech (29).

Revoluci však zp sobily hlavn v humánní medicín . Lékařský výzkum a medicína profituje z PCR p edev-ím ve dvou oblastech a to v detekci infek ních onemocn ní a odhalování zm n mutací v genech, také v oblasti detekce vrozených vývojových vad a d dí ných onemocn ní. Principem t chto vy-et ení je tedy amplifikace DNA, RNA ale také stanovení genové exprese, d lefité pro identifikaci subtyp chorob.

Je naprosto z ejmé, že metod PCR p ípadá zásadní role v ur ení p esné diagnózy a v mnoha p ípadech i správn zvolené lé by (31). Jelikož umohl uje diagnostikovat onemocn ní v jeho nej asn j-ích fázi a je schopna specifického pr kazu a aktuálního rozsahu reprodukce viru v organismu, napomáhá tak stanovit diagnózu a zahájit lé bu je-t v preklinickém stádiu infek ního onemocn ní (8). A tím, že dokáže detekci i jediné bu ky v kolonii  $10^6$  normálních zdravých bun k, je d lefitá pro v asný záchyt zhoubného onemocn ní nebo pro detekci tzv. zbytkové populace nádoru (12).

Od založení PCR techniky ub hlo bezmála 30 let a během této doby získala p edev-ím díky ROCHE Diagnostics adu vysoce citlivých, specifických a hlavn rychlých kvantitativních test (8). Vyjmenovávat všechny onemocn ní, která jsou diagnostikována metodou PCR a jejími modifikacemi, by bylo velmi zdlouhavé, je d lefité podotknout, že n která vy-et ení jsou provád na jen jedním pracovi-tem v republice a jsou fládána i léka i ze zahrani í. Mezi taková vy-et ení pat í například neurofibromatóza typu I a II, syndrom dlouhého QT intervalu nebo maligní hypertemie, které jsou provád ny pouze ve FN Brno, Laborato í molekulární diagnostiky. V t-ina vy-et ení je však zcela rutinní zálefitostí například mikrobiologické, virologické nebo genetické laborato e (31).

Takovými rutinními vyšetřeními jsou především ta, která nemohou být nahrazena běžnými metodami, jako je například kultivace. Jsou to především detekce u kterých bakterií. Mezi nejčastěji patří detekce genů *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, mykobakterie, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* a další (11).

Velkou detekovatelnou skupinou díky amplifikaci RNA jsou viry. Lze stanovit například jako je *Herpes simplex*, virus Epstein - Barrové, *Varicella zoster*, adenoviry a širokou skupinu lidských papilomavirů, která byla ještě poměrně nedávno diagnostikována imunochemicky. Standardně detekovatelné jsou i respirační viry, virové meningitidy a virové hepatitidy (17). Musím zde zdůraznit, že obrovského vývoje dosáhl i screening HIV, který lze touto technikou analyzovat již od roku 1994, navíc v roce 2002 je uveden na trh test na HIV, jehož analytická citlivost je již 50 kopií RNA/ml (8, 18).

Další detekovatelnou skupinou pomocí PCR metody jsou i mykotická onemocnění, mezi nejčastěji stanovované druhy hub patří například *Pneumocystis jirovecii*, *Candida* a *Aspergillus* (17). Onemocnění způsobená tímto původci se mohla pomocí PCR techniky stanovovat od roku 1992, kdy jsou komerčně nabízeny jednotlivým pracovištím (8). Určení *Cytomegalovira* metodou ELISA bylo také nahrazeno, protože jeho detekce v plazmě PCR technikou je mnohem citlivější a lze ho stanovit u pacienta, u kterého ještě onemocnění není rozvinuto a pacient je ještě bez klinických příznaků.

Zdůrazňuji, že PCR technika provede případně infekčního agens v ádech za několik hodin ve srovnání s kultivací, která může trvat až 48 hodin. Navíc potřeba vzorku pro PCR techniku je ve srovnání s kultivací ale i jinou běžně používanou metodou opravdu minimální (3). PCR testy nahrazují i metody, u kterých se čekalo určitou dobu, často až několik týdnů na vzestup titru odpovídajících protilátek, běžně u klinicky rozvinutého onemocnění (8). Stejně tak jako vytěsňuje taková vyšetření, jako je kultivace krevních kultur, nahrazuje i řadu barvicích, mikroskopických technik, což je důkazem například mikroskopický případ obarvených *Mycobacterií tuberculosis* při klinickém podezření tuberkulózy a tuberkulózní meningitidy. První PCR test pro diagnostiku této choroby byl komerčně dostupný již v roce 1996 (30).



Obrovského rozvoje a využití získala i metodika vyšetřující abnormality v prenatální diagnostice, jako jsou vrozené malformace, mentální retardace, Down v, Edward v, Patau v a Turner v syndrom. PCR se stává spolehlivou technikou a nahrazuje cytogenetická vyšetření v této oblasti od roku 1990. Detekuje chromozomální aneuploidie vyšetřením chromozomu 21, 18, 13, X a Y. Metodiky jsou rychlé, nákladně efektivní, nevyžadují vysoce kvalifikované pracovníky a výsledky podávající v rozmezí 24 - 68 hodin (1).

Velký význam má PCR metoda pro hematologii, a ufl jsou to detekce chronické myeloidní leukémie, vyšetření HLA systému, genové exprese krvácivých stav , atd. (17).

Budoucnost PCR techniky je v ad obor stále otev ená, jist se do káme daleko citliv j-ích test , kterými rychleji diagnostikujeme adu chorob (15). Dojde k objasn ní genetické podstaty onemocn ní jako je nap . hypertenze, alergie a dal-í.

V sou asné dob je ale pouflití jednotlivých PCR technik p edev-ím kvantitativních zna n limitujících. I p es jejich nesmírny p ínos v oblasti kvality metody, její citlivosti, rychlosti, má metoda krajní dynamický rozsah m ení a mezi jednotlivými laboratorními pracovi-í je velká rozmanitost principiáln odli-ných PCR technik, což nedovoluje vzájemnou porovnatelnost (31).

### 3. Optimalizace metody

Cílem optimalizace metody je nastavit její parametry tak, abychom získali naamplifikovaný produkt co nejvyšší kvality a kvantity, postačující pro další zpracování. Dalším cílem optimalizace metody je nastavit metodu tak, aby se stala dokonale reprodukovatelnou v sérii, zabránit vzniku nežádoucích sekundárních metabolitů ovlivňujících kvalitu a množství výsledného produktu. A docílit, aby se metoda stala specifickou, přesnou (bez falešně pozitivních / negativních výsledků) a co nejvíce citlivou.

Optimalizace PCR metody spoívá v experimentálním působení chemických a fyzikálních vlivů na jednotlivé složky reakční směsi a fáze PCR reakce (15).

Bohužel, neexistuje jediný soubor podmínek, který by byl optimální pro všechny nebo alespoň většinu PCR reakcí. Závisí od typu jednotlivých složek - velikosti genu, vlastností primerů, kvality DNA atd. Nedostatečná optimalizace vyústí ve velké problémy amplifikace, jako je její nízká účinnost, přítomnost nespecifických pásem nebo rozmazání pozadí, tvorba tzv. primer-dimerů. Detekce a analýza produktu po ukončení amplifikace je pak nejistá, metoda se stává téměř nereprodukovatelnou a vyřazuje další metodiky pro přesnou kvantifikaci produktu (19).

Optimalizace chemickými vlivy spoívá v sérii variabilních koncentrací jednotlivých složek reakční směsi. Vzhledem k tomu, že mezi jednotlivými složkami MasterMixu dochází ke složitým interakcím a jejich paleta použití je tak široká, je nepravděpodobné, že jeden soubor podmínek by byl optimální pro všechny amplifikace (2, 22).

K optimalizaci fyzikálními vlivy přistupujeme teprve po namíchání reakční směsi a spoívá v nastavení podmínek v programu termocykleru. Jedná se především o variabilitu teplot fází denaturace, annealingu, extenze, jejich doby trvání a jejich celkovém počtu. Výsledný produkt může být negativně ovlivněn také typem termocykleru, druhem použitých mikrozkumavek, použitím aditiv atd. (5).

Tato kapitola by měla představit souhrn nejpoužívanějších optimalizačních postupů a principů, které byly objeveny studii v souvislosti s optimalizací PCR metody za praxe klíčové.

### 3.1 Optimalizace chemickými vlivy

Reakční roztok pro PCR metodu je označován jako tzv. MasterMix, jeho základní reakční složky, bez kterých by žádná PCR neprobíhala, jsou: DNA nebo RNA templát, primery, DNA polymeráza, ty i deoxyribonukleozidtrifosfáty, označovány jako dNTP mix a reakční roztok obsahující ho e naté ionty. Samozřejmě může navíc obsahovat různé přísady, jako jsou aditiva, která omezují vznik neřádných sekundárních produktů (DMSO) nebo mohou zlepšovat podmínky pro správnou činnost DNA polymerázy (glycerol), ale aditiva může být například upravováno i pH MasterMixu. Záměrem použít těchto látek je tedy zvýšení výtěžku a specifity reakce (5).

Jak již bylo uvedeno, typickým postupem optimalizace metody chemickými vlivy je změnit jednu nebo více koncentrací složek základní reakční směsi, o kterých je známo, že přispívají k nejlepšímu výsledku reakce. Vysoko na seznamu optimalizačních parametrů je koncentrace ho e natých iontů (22).

Ionty ho e naté jsou nejdůležitější složkou základního reakčního roztoku, ovlivňují specifitu i výtěžek amplifikace, do reakce jsou vkládány v roztoku  $MgCl_2$  (Taq polymeráza),  $MgSO_4$  (Pfu polymeráza) a jsou potřebné pro udržení enzymatické aktivity DNA polymerázy. Obvyklá finální koncentrace ho e natých iontů v PCR bývá 1 - 5 mM, ta bývá navíc ještě závislá na kombinaci DNA templát a primer, a proto je zpravidla koncentrace ho e natých iontů vždy optimalizována (5).

Ionty ho e naté obvykle nebývají součástí základního reakčního roztoku dodávaného výrobcem DNA polymerázy, ale jsou dodány jako samostatný roztok, což usnadňuje přípravu sady reakcí lišících se koncentrací  $Mg^{2+}$  (23).

V případě jejich nízké koncentrace v reakčním roztoku zpravidla PCR reakce vůbec neprobíhá, nebo je její výtěžek nedostatečný. Naopak při příliš vysoké koncentraci

reakce probíhá rychle, ale je charakterizována rozmazanými nebo zmnofněnými bandy na gelu a to díky amplifikaci nespécifických produktů. Jejich detekce je pak velmi obtížná a metoda se stává méně specifickou (20).

Pokud musíme v reakci zachovat vyšší hladiny hoře natých iontů, musíme navýšit i množství dNTP nebo snížit množství DNA polymerázy. Jelikož jsou účinky těchto látek na sobě zcela závislé, není jednoduché nastavit koncentrace jednotlivých složek tak, aby jejich funkce ve směsi byly zachovány (5).

Situace při optimalizaci je komplikovaná i v případě nastavení správné koncentrace roztoku dNTP. Jeho základní stavební složky dATP, dGTP, dCTP a dTTP jsou vyráběny komerčně a mohou být přidávány do směsi buď jednotlivě, nebo jako směs v ekvimolárních množstvích. Roztok dNTP má negativní náboj a při fyziologickém pH 7,2 má schopnost vázat jednomocné a dvojmocné kationty včetně hoře natých iontů (16, 32). Jelikož vysoké koncentrace dNTP působí na amplifikaci inhibičně a to tak, že zvyšují pravděpodobnost tvorby nespécifických produktů, je lépe udržovat nižší koncentrace dNTP v roztoku, které garantují nejvyšší přesnost PCR produktu. Pokud je při optimalizaci nezbytná jejich vyšší koncentrace, tzn. koncentrace vyšší než 200  $\mu\text{M}$  je lépe ji kompenzovat vyššími hladinami obou primerů (4).

A právě díky primerům lze pro optimalizaci metody podniknout snad nejvíce optimalizačních kroků. Výběr primerů a způsob jejich použití značně ovlivňuje specifčnost a účinnost PCR metody (33). Kritickým bodem je teplota a čas fáze annealingu a extenze ovlivňující kvantitu výsledného produktu, která bude podrobněji rozebrána v kapitole optimalizace fyzikálními vlivy. Pro úspěšné fungování primerů je ale zapotřebí určit jejich správnou délku, ta by měla být v rozmezí 18-30 bazí, jejich menší množství, například 15 by způsobila vyšší pravděpodobnost přilnutí na více, než jedné doplňkové stránce v rámci genomu, což může vést k zesílení nespécifických produktů. Primer by neměl mít na 3' konci více jak tři guaniny nebo cytosiny. Báze nacházející se na 5' konci primeru jsou méně dleňtité. U pár primerů musí být hlavně kontrolována komplementarita pomocí vhodného počítačového softwaru (6).

Koncentrace primerů v amplifikační reakci je v t-ínou v rozmezí 0,5 ó 5 mM. Ve správně zoptimalizované metodě je vřdy jejich nadbytek; p řlí– vysoká koncentrace v–ak zp sobuje nahromadění nespecifických produktů, z d vod hybridizace primerů na nespecifických místech. Naopak nířlí koncentrace mohou zap ínit nedostatek primerů v reakci a vedou k nířlímu vřt řku PCR produktu nebo m řle reakce dokonce selhat (4).

Pro optimální výkon PCR a to zejména z hlediska reprodukovatelnosti a k zisku dostatečného vřt řku je d řlířtá vazba DNA polymerázy (34). Její teplotní optimum musí být vzhledem k teplotě denaturace, extenze a annealingu velmi rozsáhlé. Denaturace probřhající p í teplotách okolo 90° C funkci v t–iny enzym zcela deaktivuje. Právě pro tyto ú ely je pouřříván enzym Taq DNA polymeráza, izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*, řlijící v termálních pramenech, jejíř teplotní optimum je 75° C a polo as inaktivace p í 95° C je afl 40 minut. Je koenzymem majícím pouze 5' 3' polymerázovou aktivitu a postrádá 3' 5' exonukleázovou aktivitu, z tohoto d vodou nemá enzym možnost opravovat chyby vzniklé p í replikaci (24). Kromě Taq DNA polymerázy jsou dnes dostupné i Pfu a Pwo polymerázy pocházející z bakterií *Pyrococcus furiosus* a *Pyrococcus woesei*, mající navíc také 3' 5' exonukleázovou aktivitu, díky ní právě dochází k opravě chybně inkorporovaných deoxynukleotidů. Bohuřel, mají ale nířlí schopnost syntetizovat dlouhé úseky DNA.

V současné době výrobci polymeráz nabřzejí tzv. rekombinantní polymerázy, jejichř výroba je zalořena na zanesení genu požadované polymerázy do buněk bakterií *Escherichia coli*, kde nastává jejich exprese a daný protein je následovně izolován a purifikován (28, 32).

Přesnost DNA polymerázy, tzn. míra správného zařazení nukleotidů, závisí na mnoha dalřích faktorech, jako koncentrace hoře natých iontů, koncentrace dNTP nebo pH reakční směsi. Obvyklá koncentrace DNA polymerázy je v rozmezí 0,5-5 U (10). P í p řlí– nířké koncentraci vzniká málo PCR produktu, naopak pouřřijeme-li její nadměrné množství, m řleme o ekávat tvorbu nespecifických produktů, tedy snířlení vřt řku řládoucí DNA (5). Nicméně zahraniční studie z roku 2011 navrhuje pouřřití

vyšších koncentrací DNA polymerázy pro zlepšení výnosu produktu v případech, kdy dochází k amplifikaci poškozené DNA nebo v reakcích obsahující velké množství inhibitor (22). Mezi takové inhibitory patří látky již obsažené ve zkumavce s biologickým materiálem, jako je například EDTA nebo samotný heparin ve vzorku krve. Samotným inhibitorem PCR reakce je ale šetrākō v-ech GMO laborato í ale i dal-ích pracovi- a tím je kontaminace (5).

Z tohoto důvodu se templátová DNA přidává do reakční směsi jako poslední. Jako vzorek DNA pro PCR techniku můžeme použít jakoukoliv DNA vyextrahovanou z buněk nebo hrubý buněčný extrakt. DNA může pocházet z první tkáně, ale i z buněk archivovaných několik desítek let, například mikroskopických preparátů fixovaných formalínem a zalitých do parafínu, mohou být využity i mnohem starší vzorky, například z fosílií (32, 14).

Existuje celá řada extrakčních metod, jejichž společným cílem je uvolnit DNA, vzorek pevnit, případně je ztuhnut. Například obtížné je získávání a čištění DNA z léčivých rostlin vzhledem k tomu, že obsahují řadu sekundárních metabolitů jako jsou terpeny, alkaloidy, polyfenoly, tzn. látky, které degradují kvalitu DNA a tím i snižují výnos PCR reakce (9).

Množství templátové DNA vložené do reakční směsi ovlivňuje výtěžek i specifitu reakce, pokud je v reakci příliš málo DNA například méně než 0,01 ng, výsledkem reakce je minimální zisk amplifikace, pokud vložíme do reakce velké množství vodní DNA například více než 1000 ng nebo DNA s vysokou molekulární hmotností, lze okamžitě tento problém diagnostikovat. Na gelu jsou proušky rozmazané, špatně detekovatelné a samozřejmě nacházíme řadu sekundárních produktů (22).

## 3.2 Optimalizace fyzikálními vlivy

Stejně tak jako při optimalizaci PCR metody pomocí chemických faktorů lze provést řadu optimalizačních kroků pomocí fyzikálních vlivů.

Většinu z nich můžeme podniknout teprve po namíchání základní reakční směsi, tzv. MasterMixu, jsou to především jednotlivé fáze PCR cyklu ale i jejich samotný počet. Jedná se především o teplotní a časový profil fází denaturace, annealingu, extenze a finální extenze (5). Reakční objem, zamrazování a rozmrazování vzorku, typ a značka termocykleru, druh PCR mikrokumavek, přidání barev pro kvalitnější vizualizaci produktu na agarózovém gelu, ale jak jsem se přesvědčila i samotná fotodokumentace, představují širokou paletu možností pro optimalizaci metody PCR a úspěšnou detekci jejich produktu (24). V tomto pohledu použiji opět výsledky studií vztahující se k problematice optimalizace PCR metody, které jsem nastudovala, přidala jsem se jim a pokusila jsem se je ověřit v praktické části. Týkají se především jednotlivých časových a teplotních fází cyklu PCR metody.

Po prvotní denaturaci, která obvykle probíhá při teplotách 92-95° C, nastává tzv. fáze annealingu, neboli fáze hybridizace primerů, pro kterou je důležité zvolit správnou teplotu i čas. Teplota tání ( $T_m$ ), je udána výrobcem a pohybuje se v rozmezí 55° C až 65° C (6, 24). Pro stanovení  $T_m$  je používána řada vzorců, například:  $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4 \times (C+G)$ , kde A, T, C a G představují počet zastoupení příslušných bazí v použitém primeru. (29). Od takto vypočítané  $T_m$  teploty se zpravidla odečítá 1 - 10° C. Jelikož slouží jako hrubý odhad, správná  $T_m$  musí být vždy optimalizována sadou teplot blízké teplotě vypočtu. Takto empiricky určená teplota, která je označována jako  $T_a$ , je teprve vhodná pro použití k annealingu, pro který je zapotřebí zvolit i správný čas (trvání doby annealingu). Ten je řízen počtem koncentrací templátové DNA. Zpravidla postačuje doba 20 až 40 sekund (6).

Třetí fází cyklu PCR reakce je extenze. Teplotu pro extenzi primerů určuje použitá DNA polymeráza, obvykle je v oblasti 72 °C a dobu trvání extenze určuje délka produktu. Zpravidla je to 1 minuta na 1 kb amplifikovaného produktu (24).

Všeobecné studie vztahující se k problematice délky trvání jednotlivých fází potvrzují, že rychlosti denaturace, annealingu a extenze vyžadují relativně minimální množství času, jedná se spíše o desítky sekund. Příliš dlouhé rychlosti by byly neekonomické pro účinnost Taq DNA polymerázy. Všechny se ale shodují, že delší rychlosti těchto fází jsou důležitější pro efektivní zesílení a získání většího množství produktu (22).

Tyto tři zmíněné fáze se několikrát opakují v cyklech a jejich počet vychází z počáteční koncentrace výchozí templátové DNA. Při analytické PCR se běžně používá 25 - 30 cyklů, nejvíce však 40. Při vyšším počtu cyklů se zvyšuje množství a složitost nescifických sekundárních produktů, příliš málo cyklů zase garantuje nízký nebo dokonce žádný výnos reakce (10).

V neposlední řadě výsledek PCR závisí na typu a značce termocykleru (26). PCR, která byla optimalizována jedním typem termocykleru, nezaručuje dosažení stejných výsledků na jiném typu (21).



## 4. Detekce a analýza výsledného produktu

Nejast j-ími a nejlevn j-ími technikami pro vizualizaci jsou barvy integrující s DNA, které po excitaci UV světlem fluoreskují- například ethidium bromid (EtBr), jedná se o látku silně karcinogenní a mutagenní a práce s ní vyžaduje dodržování určitých bezpečnostních pravidel. Novější nekarzinogenní barvy jsou tzv. SYBR Green (SIGMA-ALDRICH) nebo EZ vision (KRD) (25, 29).

Nejast již se PCR produkt analyzuje pomocí elektroforetické separace po obarvení ethidiem bromidem v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Při elektroforéze se produkty dělí podle velikosti náboje a své relativní molekulové hmotnosti, přičemž DNA migruje od katody směrem k anodě. Jednotlivé DNA produkty se řadí na gelu podle své velikosti (délky). Rychlost pohybu DNA fragment závisí právě na vlastnostech DNA, na koncentraci gelu a přivedeném napětí (19).

## 5. PRAKTICKÁ ČÁST

### 5.1 Metodika práce

#### 5.1.1 Použitý materiál

AGARÓZA	(AMBRESCO)
EDTA	(DUCHEVA)
ETIDIUM BROMID	(SIGMA)
KYSELINA OCTOVÁ	(PENTA)
PCR REAKTIVY SLOŽKY:	
dNTP	(TOP-BIO)
PRIMERS	(SIGMA)
TAQ DNA POLYMERÁZA	(TOP- BIO)
TRIS	(DUCHEVA)
Low range LADDER	(FERMENTAS TERMOFISHER)
High range LADDER	(FERMENTAS TERMOFISHER)
EZ VISION ONE	(AMBRESCO)

#### 5.1.2 Zásobní roztoky

ETIDIUM BROMID 10 mg/ml (v temnu, 4°C)

50 X TAE a TRIS-ACETÁTOVÝ TLUMIVÝ ROZTOK:

TRIS 2,00 mol/dm<sup>3</sup>

EDTA 0,05 mol/dm<sup>3</sup>

pH 7,8 (ledovou kyselinou octovou)

#### 5.1.3 Nanášeč pufr (5 x koncentrován)

MASSRULER DNA DYE (FERMENTAS TERMOFISHER)

#### 5.1.4 Technická vybavení

FLOW BOX HELA FLOW 30  
VÝROBNÍK LEDU AF 100  
P EDVÁŤKY 440-33  
pH ELEKTRODA Sen Tix 41  
VORTEX Mr 100  
MASTER® pro- Overview-Links  
TRANSLUMINÁTOR  
ELEKTROFORETICKÁ APARATURA  
MIKROVLNÁ TROUBA  
SADA MECHANICKÝCH PIPET  
FOTOAPARÁT

CONCEPT  
SCOTSMAN  
KERN  
WTW  
HEIDOLPH  
EPPENDORF  
TRIGON plus  
CLEAVER Scientific Ltd  
CONCEPT  
EPPENDORF Research  
SONNY

### 5.1.5 Specifikace GMO laborato e

Ve které analýzy prováděné pro potřeby této bakalářské práce probíhaly na pracovišti JU v Nových Hradech, jedná se o tzv. GMO laborato e 1. kategorie rizika, v jejichž provozu je nutné dodržovat speciální řád.

Tak jako probíhá před každým vstupem do laborato e jakéhokoli pracoviště –kolení bezpečnostních pravidel o možných rizicích při práci s biologickým i toxickým materiálem, tak i já bych se ráda v tomto popisu zmínila o problematice práce v PCR laborato i. Jedná se o stejné zásady jako v každé laborato i pracující s infekčním materiálem, jelikož tzv. rekombinantní DNA považujeme za jakýsi druh nebezpečného materiálu.

Velkým rizikem při práci s DNA a celé PCR techniky je jakákoli kontaminace, ať už exogenní nebo neznámou DNA. Jelikož je PCR technika velice citlivá a specifická, dojde při ní v případě amplifikace kontaminovaného vzorku k namnožení i té neřádné DNA. Výsledkem takové reakce je vznik sekundárních produktů.

Pro minimalizaci těchto neřádných produktů jsou doporučovány standardní postupy, jako je pouhívání UV světla za účelem dezinfekce pracovních ploch, práce se vzorky probíhá ve flow boxu, pouhítí jednorázových rukavic je naprostou samozřejmostí, striktní pouhítí sady pipet určených pouze pro PCR techniku a přidání DNA vzorku do základní reakční směsi jako poslední, v případě sebemenší pochybnosti o kontaminaci vzorku je zapotřebí celý experiment zopakovat.

### 5.1.6 Reakční směs

Reakční složky jsou uchovávány v mrazáku při  $-20^{\circ}\text{C}$  v nízkých objemech a byly rozmrazeny těsně před pipetováním reakční směsi. Postup, při kterém jsem namíchala základní reakční roztok tzv. Master Mix, musel vždy dodržovat určitá pravidla:

1. reagentie se pipetovaly po pečlivém rozmrazení a promíchání
2. vzorek DNA byl přidán jako poslední pro minimalizaci rizik kontaminace

3. celá reakční směs byla uložena v předem vychlazeném stojánku ležícím na ledové tůči.

Pro optimalizaci chemickými vlivy byla napipetována vždy určitá série vzorků lišících se koncentracemi jednotlivých chemických složek reakční směsi.

Pro optimalizaci metody fyzikálními vlivy byly koncentrace reakčních směsí ve všech vzorcích stejné, rozdílné byly teplotní časové profily. Jedná se o vyhledávání co nejlepších podmínek pro amplifikaci a to po termocyklu, teplotou annealingu a času extenze.

### 5.1.7 PCR reakce o termocyklu

Ihned po namíchání reakčních směsí jsem vzorky vložila do termocyklu. Použitý termocykl má teplotní rozsah je 4 - 99° C, s možnou odchylkou 0,2° C, s nastavitelným teplotním gradientem v rozsahu 30 - 99° C, kterého jsem využívala především pro optimalizaci teploty annealingu (viz příloha 1). Teplotní blok se vzorky je ohříván za 1 vteřinu o 4° C, rychlost ochlazování je 3° C za 1 vteřinu (13). Požadovaný program se nastavuje manuálně, pro každou fázi cyklu tedy: úvodní denaturaci, denaturaci, nasednutí primer (annealing), pro extenzi a finální extenzi musí být nastavena požadovaná teplota a čas zvlášť. Tyto časové a teplotní profily uvádím v metodice.

### 5.1.8 Elektroforetická separace

Analýza PCR produktu je prováděna pomocí horizontální elektroforézy. Ihned po ukonění PCR reakce musí být ke vzorkům přidán tzv. nanášeč pufru. K 10 µl analyzovaného vzorku jsem vždy přidala 2 µl tohoto pufru a nanasla na gel. Teprve s tímto pufrem mohou být vzorky dále analyzovány elektroforézou nebo uchovávány několik dní při 4° C.

Pro analýzu PCR produkt jsem používala agarózový gel, pro jehož výrobu slouží pufr připraven ze zásobního roztoku 50 x TAE, který jsem naředila destilovanou vodou v poměru 1:50, roztok pro každý gel jsem připravila vždyerstvý. Podle potřebné výsledné koncentrace agarózového gelu jsem navážila na předváškách agarózu. Pro optimalizaci protein jsem vyžívala 1,3 % (0,91 g agarózy) a 0,7 % (0,49 g agarózy) jejich koncentrace byla volena podle velikosti fragment amplifikovaných genů. Naváženou agarózu jsem vysypala do Erlenmayerovy banky, přidala jsem potřebný objem 1 x TAE roztoku, zahřívala v mikrovlnné troubě až do jejího úplného rozpuštění (2-3 min.). Během pozvolného ochlazení roztoku agarózy na 60°C jsem si sestavila elektroforetickou aparaturu. Po vychlazení jsem agarózu nalila do aparatury s předávkem 5 µl zásobního roztoku EtBr (amplifikace *PsbQ* genu) a nechala tuhnout cca 45 minut. Pro optimalizaci PCR pro amplifikaci genu *PsbR* fyzikálními vlivy jsem jako barvicí techniku naamplifikovaných produktů vyžívala netoxickou, komerčně vyrobenou barvu Ez- Vision One, která již obsahuje nanášeč pufru a při její použití se během přípravy gelu pro elektroforézu již nemusí přidávat EtBr. Barva EZ-Vision One se přidává ke každému vzorku ve stejném množství jako nanášeč pufru (2 µl ku 10 µl).

Po dokonalém ztuhnutí gelu jsem z nich opatrně vyjmula hřebíček, po kterém zůstaly v gelu jamky pro nanášení vzorků (viz příloha . 3). Gel jsem vložila do elektroforetické vany a přečvrstvila ho 1x TAE roztokem, cca 2-3 mm. Do prvních jamek jsem pipetovala tzv. ladder, (obsahuje DNA fragmenty známé velikosti a slouží pro kontrolu velikosti PCR produktů), jeho velikost jsem volila podle očekávané velikosti množeného genu. Po nanášení vzorků jsem elektroforézu napojila na elektrické napětí (100V) po dobu cca 25 - 30 minut (viz příloha . 4).

### 5.1.9 PCR detekce - vizualizace

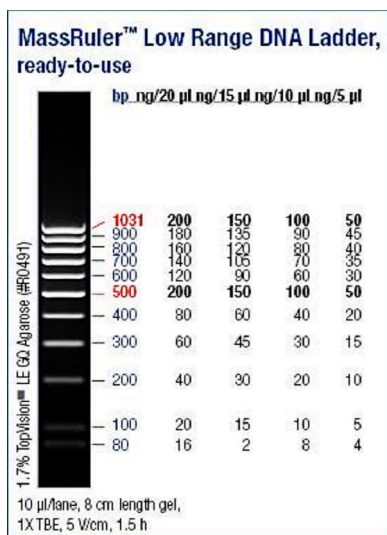
K detekci produktů slouží EtBr nebo EZ-Vision One, které se vážou na DNA a po vystavení UV světla oranžově /modře fluoreskují. Vzniklé produkty včetně ladderu vidíme na gelu v podobě ostrých a velkých proušků (band), (viz příloha . 5, 6). Pozitivní výsledek v případě optimalizace při amplifikaci proteinu *PsbR* je PCR produkt

o velikosti 290 bp a pro amplifikaci genu *PsbQ* je to 446 bp. K jejich identifikaci slouží porovnání velikostí bp s ladderem.

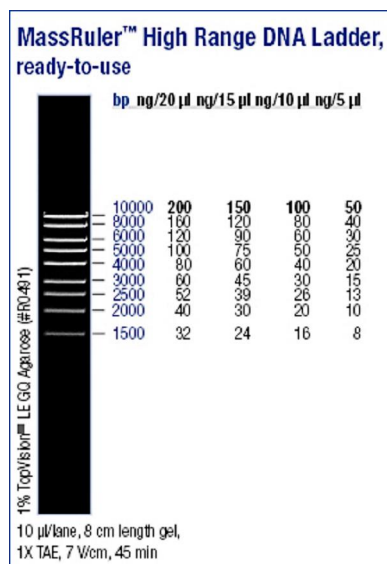
Samozřejmě standardně provedené metody je, že výsledný gel neobsahuje žádné další sekundární proušky, je-li jsou známkou špatně nastavených koncentrací jednotlivých složek reakční směsi, nesprávně zvoleného teplotního profilu, n kterých fází PCR reakce nebo mohou být také známkou kontaminace, n které složky reakční směsi. V těchto případech je třeba metodu opakovat a správně optimalizovat.

V kapitole 5.2 a 5.3 tak uvádím kroky použité pro optimalizaci při amplifikaci proteinů *PsbR* a *PsbQ*. U každého typu optimalizace je uvedena tabulka s reakčními složením vzorků, v případě optimalizace chemickými vlivy jsou vždy uvedeny tři rozdílné koncentrace složky, kterou je právě amplifikace optimalizována. Dále je uvedena tabulka s teplotním profilem, který je dleřitý především v případě optimalizace fyzikálními vlivy. Výsledkem každé optimalizace je elektroforetický gel, který byl pro detekci uřitou v této práci fotodokumentován. Jako důkaz toho, že metoda je dokonale zoptimalizována, je u obou druhů genů provedena amplifikace ve více neznámých vzorcích s různým typem DNA.

**Ladder** - Low Range Ladder, High Range Ladder



**Obr. .2:** Low Range ladder



**Obr. .3:** High Range ladder

(Zdroj: www.thermoscientific.com)

## 5.2 Reakční směs pro optimalizaci amplifikace PsbQ genu

Templátová DNA: - protein PsbQ (17kDa) vektor pET28b+ + PsbQ gen

- základní konc.: 35 ng/  $\mu$ l (jednotka na potřebnou koncentraci)

- velikost PsbQ sekvence: 446 bp

Poufleté primery: - PsbQ/SO/NcoIFW,  $T_m^\circ = 75,1^\circ \text{C}$

- PsbQ/SO/BamHIRW,  $T_m^\circ = 70,5^\circ \text{C}$

Poufletá teplota anealingu:  $67^\circ \text{C}$  a zjištění na optimalizaci teplot 64,7-  $71,6^\circ \text{C}$

### Teplotní - asový profil PCR pro optimalizaci amplifikace genu PsbQ proteinu:

Tab. . 1: Teplotní - asový profil amplifikace genu PsbQ proteinu.

	<b>Teplota</b>	<b>Doba</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Úvodní denaturace</b>	94° C	3 min.	1
<b>Denaturace</b>	94° C	30 s	
<b>Nasednutí primer</b>	67° C	30 s	30
<b>Extenze</b>	72° C	1 min.	
<b>Finální extenze</b>	72° C	10 min.	1
<b>Ochlazení</b>	4° C		



### 5.2.1 Koncentrace výchozí DNA

Obsah reakčních složek v 10 µl:

**Tab. . 2:** Reakční směs pro optimalizaci koncentrace výchozí DNA.

íslo vzorku (zásobní koncentrace)	1	2	3	Výsledné koncentrace
10 x reakční pufr s 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl	1 µl	1 µl	1,5 mM
dNTP (10 mM)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 mM
forward primer FW (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µM
reverse primer RW (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µM
Taq DNA polymeráza (5 U /µl)	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	(0,05 U/µl)
Templátová DNA (35 ng/ µl)	1µl z (100µg/µl)	1 µl z (0,1 µg/µl)	1µl z (10µg/µl)	10- 0,01- 1 µg/ µl
Dest.H <sub>2</sub> O	5,7 µl	5,7 µl	5,7 µl	

### 5.2.2 Koncetrace Taq DNA polymerázy

Obsah reakčních složek v 10 µl:

**Tab. . 3:** Reakční směs pro optimalizaci koncentrace Taq polymerázy.

íslo vzorku (zásobní koncentrace)	1	2	3	Výsledné koncentrace
10 x reakční pufr s 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl	1 µl	1 µl	1,5 mM
dNTP (10 mM)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 mM
forward primer FW (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µM
reverse primer RW (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µM
Taq DNA polymeráza (5 U/µl)	0,1 µl	0,5 µl	1 µl	2,5 U (0,05-0,25-0,5 U/ µl)
Templátová DNA (0,1 µg/µl)	1 ul	1 ul	1 ul	0,01 µg/µl
Dest.H <sub>2</sub> O	5,7 µl	5,3 µl	4,8 µl	

### 5.2.3 Koncentrace primer .

Obsah reakčních složek v 10 µl:

**Tab. . 4:** Reakční směs pro optimalizaci koncentrace primer .

íslo vzorku (zásobní koncentrace)	1	2	3	Výsledné koncentrace
10 x reakční pufr s 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl	1 µl	1µl	1,5 mM
dNTP (10 mM)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 mM
forward primer FM (10 µM)	<b>0,1 µl</b>	<b>1 µl</b>	<b>2 µl</b>	<b>0,1-1,0-0,5 µM</b>
reverse primer RM (10 µM)	<b>0,1 µl</b>	<b>1 µl</b>	<b>2 µl</b>	<b>0,1-1,0-0,5 µM</b>
Taq DNA polymeráza (5 U/µl)	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	2,5 U (0,05 U/µl)
Templátová DNA (0,1 µg/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	0,01 µg/µl
Dest.H <sub>2</sub> O	7,5 µl	5,7 µl	3,7 µl	

### 5.2.4 Koncentrace dNTP

Obsah reakčních složek v 10 µl:

**Tab. . 5:** Reakční směs pro optimalizaci koncentrace dNTP.

íslo vzorku (zásobní koncentrace)	1	2	3	Výsledné koncentrace
10 x reakční pufr s 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl	1 µl	1µl	1,5 mM
dNTP (10 mM)	<b>0,05 µl</b>	<b>0,2 µl</b>	<b>0,4 µl</b>	<b>0,05-0,2-0,4 mM</b>
forward primer FM (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	1,0µM
reverse primer RM (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	1,0µM
Taq DNA polymeráza (5 U/ µl)	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	2,5 U (0,05 U/µl)
Templátová DNA (0,1 µg/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	0,01 µg/µl
Dest.H <sub>2</sub> O	5,85 µl	5,7 µl	5,5 µl	

## 5.2.5 Koncentrace MgCl<sub>2</sub>

### Příprava MasterMixu:

**Tab. 6:** Složení Mastermixu pro optimalizaci koncentrace ho e natých iont .

<b>10 x reak ní pufr bez MgCl<sub>2</sub></b>	40 µl
<b>dNTP (10 mM)</b>	8 µl
<b>forward primer FM (10 µM)</b>	40 µl
<b>reverse primer RM (10 µM)</b>	40 µl
<b>Taq DNA polymeráza (5 U/ µl)</b>	4 µl
<b>Templátová DNA (0,01 µg/ µl)</b>	8 µl
<b>Dest.H<sub>2</sub>O</b>	268 µl
<b>Celkový objem</b>	408 µl

**Tab. 7:** Reak ní směs pro optimalizaci koncentrace ho e natých iont .

<b>Vzorek</b>	<b>MasterMix</b>	<b>25 mM MgCl<sub>2</sub></b>	<b>PCR H<sub>2</sub>O</b>	<b>Finální konc. MgCl<sub>2</sub></b>
1	42 µl	1 µl	7 µl	0,5 mM
2	42 µl	2 µl	6 µl	1,0 mM
3	42 µl	3 µl	5 µl	1,5 mM
4	42 µl	4 µl	4 µl	2,0 mM
5	42 µl	5 µl	3 µl	2,5 mM
6	42 µl	6 µl	2 µl	3,0 mM

Získaný PCR produkt se analyzoval pomocí elektroforetického dělení v 1,3 % agarózovém gelu s přidavkem etidium bromidu pod UV světlem.

## 5.3 Teplotní - časové profily pro optimalizaci amplifikace PsbR genu

Templátová DNA: - protein PsbR (10kDa) - cDNA  
- základní koncentrace: 10ng/μl ( edeno na 0,5 μg/μl)  
- velikost PsbR sekvence: 290 bp

Poufité primery: - PsbR/ SO/ NcoIFW,  $T_m^\circ = 65.9^\circ\text{C}$   
- PsbR/ SO/ BamH1RW,  $T_m^\circ = 66.9^\circ\text{C}$

### Reakční směs PCR pro optimalizaci amplifikace genu PsbR :

Obsah reakčních složek v 60 μl:

**Tab. . 8:** Reakční směs PCR pro optimalizaci amplifikace genu PsbR.

<b>zásobní koncentrace</b>		<b>výsledné koncentrace</b>
<b>10 x reakční pufr s 15 mM MgCl<sub>2</sub></b>	6 μl	1,5 mM
<b>dNTP (10 mM)</b>	1,2 μl	0,2mM
<b>forward primer FM (10 μM)</b>	6 μl	1,0μM
<b>reverse primer RM (10 μM)</b>	6 μl	1,0μM
<b>Taq DNA polymeráza (5 U/μl)</b>	0,6 μl	2,5 U (0,05 U/μl)
<b>Templátová DNA (0,5 μg/μl)</b>	1,2 μl	0,01μg/μl
<b>Dest.H<sub>2</sub>O</b>	39,0 μl	

### 5.3.1 Počet cyklů, teplota annealingu

**Tab. 10:** Teplotní časový profil pro optimalizaci počtu cyklů a teploty annealingu.

	<b>Teplota</b>	<b>Doba</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Úvodní denaturace</b>	94° C	3 min.	1
<b>Denaturace</b>	94° C	30 s	
<b>Nasednutí primer</b>	<b>60° C, 61° C, 62° C, 63° C, 65° C</b>	30 s	<b>20, 25, 30</b>
<b>Extenze</b>	72° C	2 min	
<b>Finální extenze</b>	72° C	10 min.	1
<b>Ochlazení</b>	4° C		

Získaný PCR produkt se analyzoval pomocí elektroforetického dělení v 0,7 % agarózovém gelu s přísadkou EZ-Vision One pod UV světlem.

### 5.3.2 Čas extenze, teplota annealingu

**Tab. 9:** Teplotní časový profil pro optimalizaci času extenze a teploty annealingu.

	<b>Teplota</b>	<b>Doba</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Úvodní denaturace</b>	94° C	3 min.	1
<b>Denaturace</b>	94° C	30 s	
<b>Nasednutí primer</b>	<b>60° C, 61° C, 62° C, 63° C, 65° C</b>	30 s	<b>30</b>
<b>Extenze</b>	72° C	<b>30 s, 1 min., 1,5 min., 2 min.</b>	
<b>Finální extenze</b>	72° C	10 min.	1
<b>Ochlazení</b>	4° C		

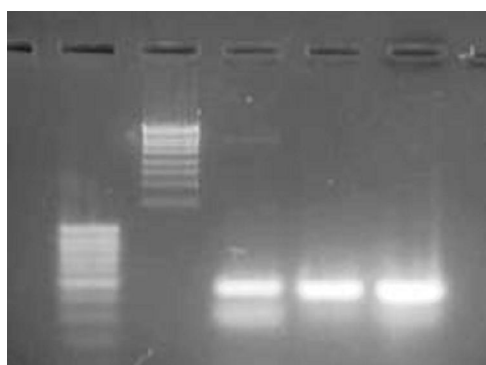
Získaný PCR produkt se analyzoval pomocí elektroforetického dělení v 0,7 % agarózovém gelu s přísadkou EZ-Vision One pod UV světlem.

## 6. Výsledky

### 6.1 Výsledky optimalizace amplifikace genu PsbQ

- ← PsbQ 446 bp  
← nespecifický produkt

#### 6.1.1 Optimalizace koncentrace DNA



1. Low Range ladder
2. High Range ladder
3. DNA, c= 10 µg/ ul
4. DNA, c= 0,01 µg/ ul
5. DNA, c= 1 µg/ ul



1. 2. 3. 4. 5.

**Obr. . 4:** Optimalizace koncentrace DNA

(Zdroj: vlastní foto)

#### 6.1.2 Optimalizace koncentrace Taq polymerázy



1. Low Range ladder
2. High Range ladder
3. Taq polymeráza 0,05 U/ µl
4. Taq polymeráza 0,25 U/ µl
5. Taq polymeráza 0,5 U/ µl

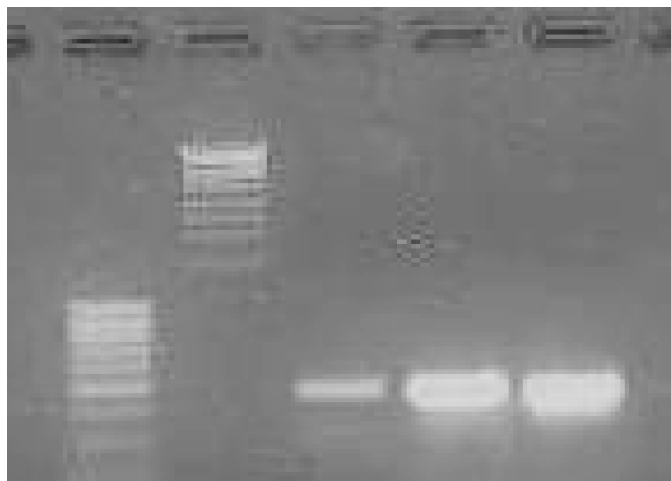


1. 2. 3. 4. 5.

**Obr. . 5:** Optimalizace koncentrace Taq polymerázy.

(Zdroj: vlastní foto)

### 6.1.3 Optimalizace koncentrace primer



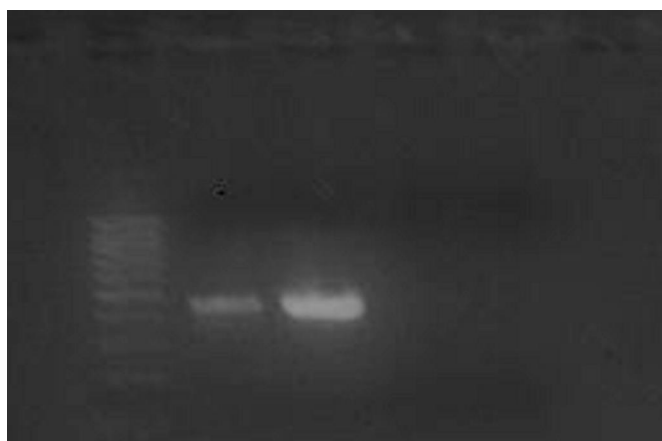
1. Low Range ladder
2. High Range ladder
3. RW, FW, c = 0,1  $\mu$ M
- 4. RW, FW, c = 1  $\mu$ M**
5. RW, FW, c = 2  $\mu$ M



1. 2. 3. 4. 5.

**Obr. . 6:** Optimalizace koncentrace primer  
(Zdroj: vlastní foto)

### 6.1.4 Optimalizace koncentrace dNTP



1. Low Range ladder
2. dNTP, c = 0,05 mM
- 3. dNTP, c = 0,2 mM**
4. dNTP, c = 0,4 mM



1. 2. 3. 4.

**Obr. . 7:** Optimalizace koncentrace dNTP  
(Zdroj: vlastní foto)

### 6.1.5 Optimalizace koncentrace ho e natých iont



**Obr. .8:** Optimalizace koncentrace ho e natých iont .  
(Zdroj: vlastní foto)

- |  |  |
|--|--|
| 1. Low Range ladder                    | <b>5. MgCl<sub>2</sub>, c = 2,0 mM</b> |
| 2. MgCl <sub>2</sub> , c = 0,5 mM      | <b>6. MgCl<sub>2</sub>, c = 2,5 mM</b> |
| 3. MgCl <sub>2</sub> , c = 1,0 mM      | <b>7. MgCl<sub>2</sub>, c = 3,0 mM</b> |
| <b>4. MgCl<sub>2</sub>, c = 1,5 mM</b> |  |

### 6.1.6 Navržený protokol pro amplifikaci genu PsbQ

Obsah reak ních slofek v 10 µl:

**Tab. . 11:** Optimalizovaná reak ní sm s pro amplifikaci genu PsbQ proteinu u rozdílných vzork .

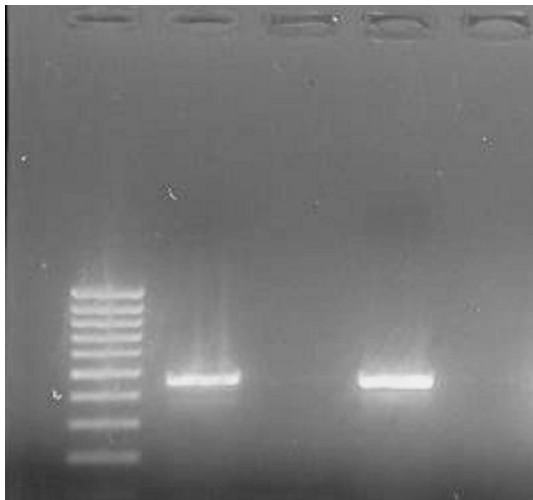
<b>Zásobní koncentrace</b>	<b>PCR v 10ul</b>	<b>Výsledná koncentrace</b>
<b>10 x reak ní pufr s 15 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1 µl	1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>dNTP (10 mM)</b>	0,2 µl	0,2 mM
<b>forward primer FM (10 µM)</b>	1 µl	1 µM
<b>reverse primer RM (10 µM)</b>	1 µl	1 µM
<b>Taq DNA polymeráza (5 U/ µl)</b>	0,1 µl	2,5 U ( 0,05 U/µl)
<b>Templátová DNA (10 ng/ µl)</b>	1 µl	0,01 µg/ ul
<b>Dest.H<sub>2</sub>O</b>	5,7 µl	



Teplotní - asový profil PCR:

**Tab. . 12:** Teplotní - asový profil pro amplifikaci genu PsbQ proteinu u rozdílných vzorků .

	<b>Teplota</b>	<b>Doba</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Úvodní denaturace</b>	94°C	3 min.	1
<b>Denaturace</b>	94°C	30 s	
<b>Nasednutí primer</b>	67°C	30 s	30
<b>Extenze</b>	72°C	1 min	
<b>Finální extenze</b>	72°C	10 min.	1
<b>Ochlazení</b>	4°C		



1. Low Range ladder
2. **26 B** (obsahuje gen PsbQ)
3. pMAL (neobsahuje gen PsbQ)
4. **JR 2592**(obsahuje gen PsbQ)
5. 100BC(neobsahuje gen PsbQ)



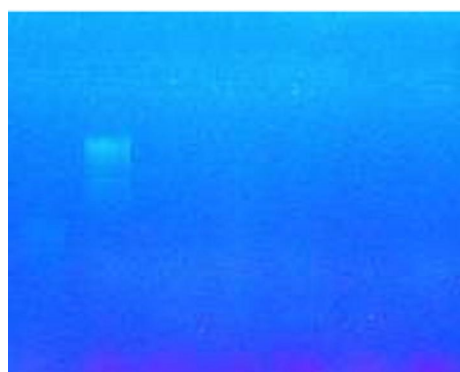
1. 2. 3. 4. 5.

**Obr. . 9:** Neznámé vzorky DNA.  
(Zdroj: vlastní foto)

## 6.2 Výsledky optimalizace amplifikace PsbR genu

- ← PsbR 290 bp  
← nespecifický produkt

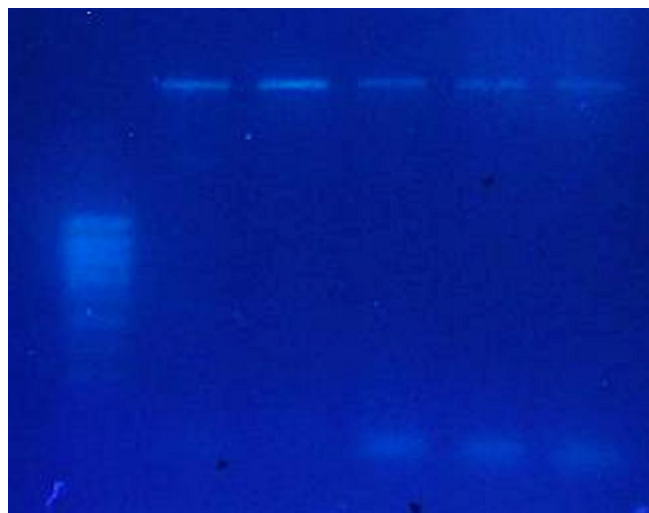
### 6.2.1 Optimalizace po tu cykl , teploty annealingu



1. Low Range ladder
2.  $t = 60^{\circ}\text{C}$
3.  $t = 61^{\circ}\text{C}$
4.  $t = 62^{\circ}\text{C}$
5.  $t = 63^{\circ}\text{C}$
6.  $t = 65^{\circ}\text{C}$

1. 2. 3. 4. 5. 6.

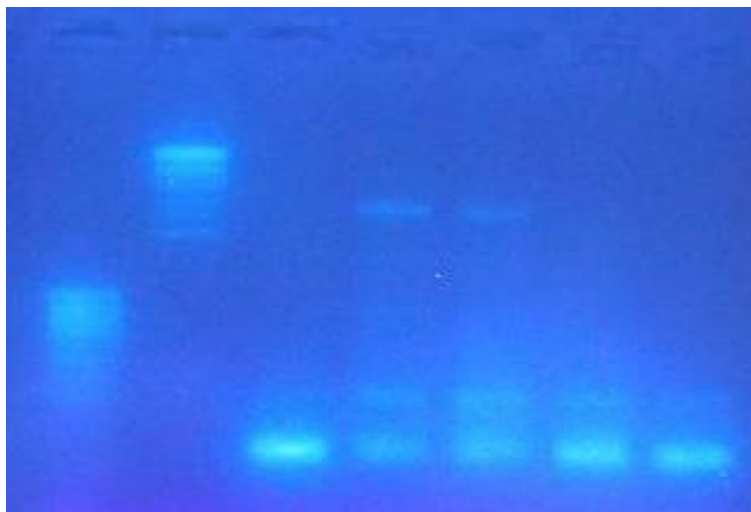
**Obr. . 10:** Po et cykl : 20, gradient teplot  
(Zdroj: vlastní foto)



1. Low Range ladder
2.  $t = 60^{\circ}\text{C}$
3.  $t = 61^{\circ}\text{C}$
4.  $t = 62^{\circ}\text{C}$
5.  $t = 63^{\circ}\text{C}$
6.  $t = 65^{\circ}\text{C}$

1. 2. 3. 4. 5. 6.

**Obr. . 11 :** Po et cykl :25, gradient teplot.  
(Zdroj: vlastní foto)

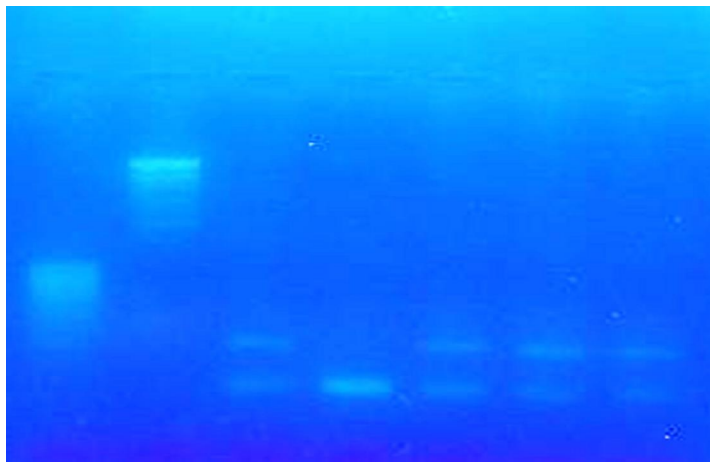


1. Low Range ladder
2. High Range ladder
3.  $t = 60^{\circ}\text{C}$
4.  $t = 61^{\circ}\text{C}$
5.  $t = 62^{\circ}\text{C}$
6.  $t = 63^{\circ}\text{C}$
7.  $t = 65^{\circ}\text{C}$

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.

**Obr. . 12 :** Počet cyklů : 30, gradient teplot.  
(Zdroj: vlastní foto)

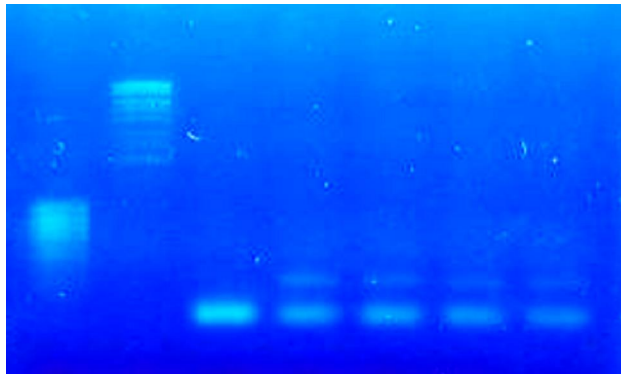
### 6.2.2 Optimalizace času extenze, teploty annealingu.



1. Low Range ladder
2. High Range ladder
3.  $t = 60^{\circ}\text{C}$
4.  $t = 61^{\circ}\text{C}$
5.  $t = 62^{\circ}\text{C}$
6.  $t = 63^{\circ}\text{C}$
7.  $t = 65^{\circ}\text{C}$

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.

**Obr. . 13:** čas extenze: 30s, gradient teplot.  
(Zdroj: vlastní foto)

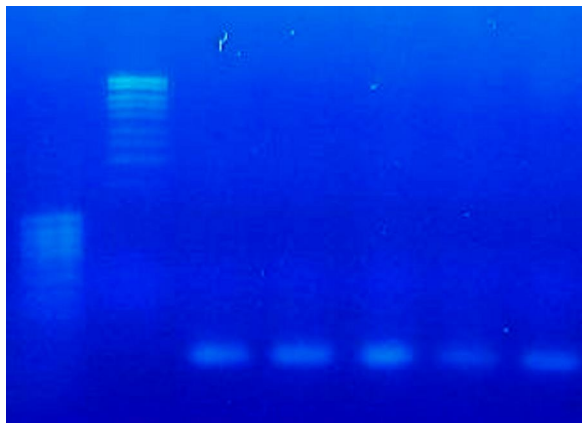


1. Low Range ladder
2. High Range ladder
3.  $t = 60^{\circ} \text{C}$
4.  $t = 61^{\circ} \text{C}$
5.  $t = 62^{\circ} \text{C}$
6.  $t = 63^{\circ} \text{C}$
7.  $t = 65^{\circ} \text{C}$



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.

**Obr. .14:** as extenze 1 min., gradient teplot.  
(Zdroj: vlastní foto)

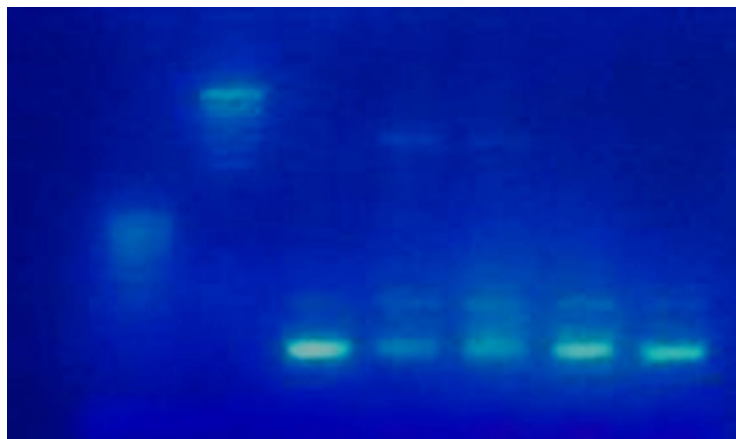


1. Low Range ladder
2. High Range ladder
3.  $t = 60^{\circ} \text{C}$
4.  $t = 61^{\circ} \text{C}$
5.  $t = 62^{\circ} \text{C}$
6.  $t = 63^{\circ} \text{C}$
7.  $t = 65^{\circ} \text{C}$



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.

**Obr. .15:** as extenze: 1,5 min., gradient teplot.  
(Zdroj: vlastní foto)



1. Low Range ladder
2. High Range ladder
3.  $t = 60^{\circ} \text{C}$
4.  $t = 61^{\circ} \text{C}$
5.  $t = 62^{\circ} \text{C}$
6.  $t = 63^{\circ} \text{C}$
7.  $t = 65^{\circ} \text{C}$

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.

**Obr. . 16:** as extenze: 2 min., gradient teplot.  
(Zdroj: vlastní foto)

### 6.2.3 Navržený protokol pro amplifikaci genu PsbR

Obsah reakčních složek v 10  $\mu\text{l}$ :

**Tab. . 13:** Reakční směs pro amplifikaci genu PsbR proteinu u rozdílných vzorků.

	PCR v 10 $\mu\text{l}$	Výsledná koncentrace
10 x reakční pufr s 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu\text{l}$	1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP (10 mM)	0,2 $\mu\text{l}$	0,2 mM
forward primer FM (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
reverse primer RM (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
Taq DNA polymeráza (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,1 $\mu\text{l}$	2,5 U ( 0,05 U/ $\mu\text{l}$ )
Templátová DNA (10 ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$ (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Dest.H <sub>2</sub> O	5,7 $\mu\text{l}$	

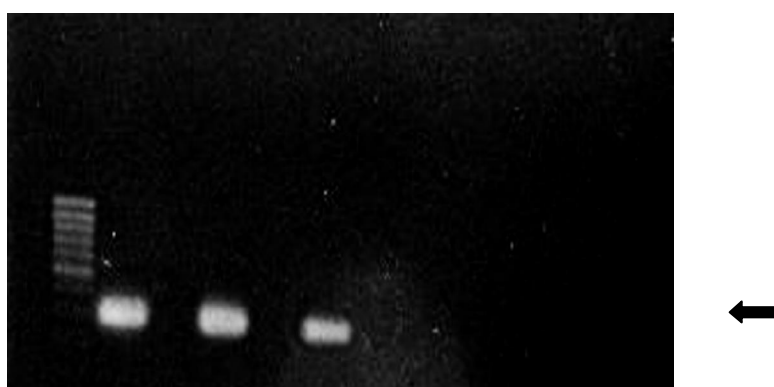
Teplotní asový profil PCR:

**Tab. . 14:** Optimalizovaný teplotní asový profil pro amplifikaci genu PsbR proteinu u rozdílných vzorků .

	<b>Teplota</b>	<b>Doba</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Úvodní denaturace</b>	94° C	3 min.	1
<b>Denaturace</b>	94° C	30 s	
<b>Nasednutí primer</b>	63° C	30 s	30
<b>Extenze</b>	72° C	2 min	
<b>Finální extenze</b>	72° C	10 min.	1
<b>Ochlazení</b>	4° C		

Vzorky pro amplifikaci genu PsbR proteinu:

1. Low Range ladder
2. **HispbR v pBluescript**, (obsahuje gen PsbR)
4. **pET41a + pbluescript**, (obsahuje gen PsbR)
6. **HsiPsbR 2**, (obsahuje gen PsbR)
8. vector pMAL , (bez přítomnosti genu PsbR proteinu)
10. vector pCAL, (bez přítomnosti genu PsbR proteinu)
12. vector JR2592, (bez přítomnosti genu PsbR proteinu)



1. 2. 4. 6. 8. 10. 12.  
**Obr. . 17:** Neznámé vzorky DNA.  
(Zdroj: vlastní foto)

## 7. Diskuze

Cílem práce bylo optimalizovat PCR metodu pro dvě bílkoviny různé velikosti, popsat vliv chemických a fyzikálních faktorů na průběh reakce PCR a porovnat s dostupnými literárními zdroji a z výsledků navrhnout protokol, který se bude využívat pro amplifikaci sledovaných genů.

Cílem optimalizace amplifikace jakéhokoli genu pomocí PCR je získat PCR produkt v co nejkratší době, nejlepší kvalitě, nejvyšší výťažnosti a s nejnižší finanční zátěží. Jednotlivé výsledky optimalizace chemickými a fyzikálními vlivy je nutno porovnat a vybrat nejvhodnější pro každý amplifikovaný gen. Na výsledek mají vliv i mnohé jiné faktory, které nebylo možné ani v této práci předvídat a které musíme brát do úvahy v běžné laboratorní, hlavně zdravotnické praxi (variabilita lidského genomu).

Modelovými geny byly geny fotosyntetických proteinů PsbR a PsbQ. Vliv chemických vlivů byl sledován při amplifikaci genu PsbQ (446bp), vliv fyzikálních faktorů při amplifikaci genu proteinu PsbR (290bp).

Optimalizace PCR metody pro amplifikaci genu PsbQ spočívala v analýze vlivu rozdílné koncentrace jednotlivých složek reakční směsi (Taq DNA polymeráza, DNA, horenaté ionty, dNTP, primery). Výsledky optimalizace vhodné koncentrace DNA a Taq DNA polymerázy se zcela shodovaly s výsledky studie z roku 2011 publikované v časopise *Genetics and Molecular Research* (22). Jako nejvhodnější koncentrace se zcela jasně potvrdily dávky nejnižší. Pro DNA to je koncentrace 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , vyšší koncentrace, přesněji 1,0 a 10,0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , způsobují vznik sekundárních produktů projevujících se nejenom výskytem PCR produktu s menší velikostí, ale i rozmazáním výsledného bandu (obr. 4). V případě Taq DNA polymerázy, byla stanovena nejvhodnější rovněž nejnižší koncentrace vyjádřená enzymovou aktivitou 0,05 U/ $\mu\text{l}$ .

Čím větší množství polymerázy bylo použito, tím více vzniká sekundárních produktů (obr. 5) a potvrzuje se nutnost kompenzace ostatními složkami, například vyššími hladinami horenatých iontů, jak upozorňuje v již zmíněné studii Rosli (22).

Celou sadu optimalizačních kroků lze provést v případě použitých primerů (T<sub>a</sub>, koncentrace, počet nukleotidů). V případě použitých primerů pro PsbQ gen nebyly

zkoušené různé velikosti a koncentrace oligonukleotidů, ale jenom koncentrace ufl navržených primerů. Jejich koncentrace byly přímo úměrné množství vzniklého PCR produktu (obr. 6).

Následujícím krokem byla optimalizace množství dNTP, u které se výsledky shodují s Bereczkiho studií z roku 2007 (4). Autor upozoruje na nebezpečí vzniku sekundárních produktů při použití vyšších hodnot. V případě amplifikace proteinu PsbQ jsou vyšší hodnoty (0,4 mM) příčinou celkové selhání reakce. Snížíme-li ale inhibiční množství dNTP na polovinu, tedy na koncentraci 0,2 mM, získáváme zcela ostrý band bez nežádoucích produktů (obr. 7).

Posledním krokem byla optimalizace koncentrací iontů a zde jsou výsledky zcela shodné se všemi studiemi vztahující se jejich optimalizaci. Zcela vyloučeny byly koncentrace menší než 1,5 mM (obr. 8), zde reakce vůbec neproběhly. Naopak množství větší než 1,5 mM garantují kvalitní proběhnutí reakce s dostatečně amplifikovaným produktem. Používání vyšších množství  $MgCl_2$  je ale pro laboratorně neudržitelné a zbytečné. Optimalizace však musí být provedena vzhledem k výskytu pozitivních výsledků v případě některých PCR reakcí i s nižší koncentrací horečnatých iontů, naopak v některých případech je pro získání PCR produktu nutné koncentraci zvýšit. Na základě výsledků optimalizace byly navrženy podmínky pro amplifikaci genu PsbQ (tab. 11) a vyzkoušeny pro analýzu různých vzorků DNA (obr. 9). Analýza odpovídá skutečnosti - přítomnost genu PsbQ se potvrdila ve vzorcích DNA (26 B, JR 2592) a nebyly získány žádné vedlejší produkty.

Vliv fyzikálních faktorů byl zkoumán u amplifikace genu PsbR, jehož velikost je jenom 290 bp, s čím souvisí i značné problémy týkající se návrhu primerů a vizualizace PCR produktu. Gely byly analyzovány pomocí fluorescenční barvy EZ-Vision One, která nemá karcinogenní účinky, ale nevýhodou je nižší citlivost, než je citlivost karcinogenního EtBR. Z hlediska bezpečnosti práce a ochrany zdraví je však její užití vhodné, a proto byl protokol pro PsbR optimalizován s jejím použitím.

Při optimalizaci amplifikace genu PsbR byly sledovány vlivy  $T_a$ , počet cyklů a délka extenze. Klíčovými faktory úspěšnosti PCR reakce je její správně nastavená teplota annealingu ( $T_a$ ). I když pro její výpočet existuje spousta rovnic a vzorců,



z výsledků optimalizace teploty je zřejmé, že výpočty jsou vždy jen orientační a vhodnou teplotu této fáze je třeba vždy ověřit experimentálně. Proto jsem díky teplotně nastavitelnému gradientu u pouhiváňého termocyklu (viz. příloha 2) vyhledávala nejlepší teplotu i v případě optimalizace počtu cyklů a času extenze. Z výsledků vyplývá (obr. 12 a 16), že neoptimální teplota pro fázi nasednutí primerů je teplota 63°C.

Nejjednodušší možností jak získat maximální množství amplifikovaného produktu je navýšení počtu cyklů. Například Innis (10) připouští, že jejich nízký počet může být nedostatečný, naopak vyšší počet může způsobit i nárůst sekundárních produktů. K naprosto stejnému závěru jsem dospěla i já v případě amplifikace genu *PsbR*. 20 cyklů (obr. 10) PCR reakce bylo naprosto nedostačující, nevzniká žádný produkt a ani navýšení o 5 cyklů (obr. 11) nepřináší žádné zesílení v oblasti amplifikovaného genu, pouze dochází ke vzniku sekundárních produktů. Optimální výsledek však přichází při 30 opakovaných cyklech (obr. 12). U všech teplot s výjimkou teploty 60°C vzniká poměrně intenzivní band v oblasti 290 bp. Jelikož je amplifikace opět doprovázena poměrně intenzivními sekundárními produkty, počet cyklů jsem nenavýšovala a nejvhodnějším jsem určila 30 cyklů PCR reakce.

Dalším krokem při vyhledávání nejlepších podmínek pro amplifikaci proteinu *PsbR* bylo určení vhodného času extenze. Po 30 sekundách dlouhé extenzi se objevují velmi slabé proušky u všech teplot s výjimkou teploty 61°C. Opět je ale amplifikace doprovázena neřádnými produkty (obr. 13). Jednu minutu dlouhá extenze již přináší drobné zesílení, ale jak v primárním *PsbR* produktu, tak i v sekundárních produktech (obr. 14). Proto optimalizace byla vyzkoušena i v případě 1,5 minuty. Ta ale přináší neekvivalentní výsledek, je doprovázena poměrně intenzivními neřádnými proušky bez přítomnosti genu *PsbR* (obr. 15). Poměrně silné odezvy bylo dosaženo až při dvou minutové extenzi. Při ní vznikají u všech teplot slabé bandy *PsbR* proteinu, doprovázeny opět neřádnými produkty (obr. 16). Jelikož je požadovaný gen u dvouminutové extenze naamplifikován u všech teplot, je právě tento čas zvolen jako neoptimální. Na základě optimalizace byl navržen teplotně časový profil PCR reakce

a analyzovány různé vzorky DNA (obr. 17). V DNA (HispsbR v pBluescript, pET41a + pbluescript, HisPsbR 2) byla přítomnost PsbR genu potvrzena bez výskytu sekundárních produktů.

Během zkoumání fyzikálních vlivů se ukázalo, že je nutno provést optimalizaci koncentrace primerů a předpokládáme nutnost navržení nových primerů, jelikož objevení sekundárních produktů je příliš časté, a dokonce vznikají i u cyklů, při kterých se neamplifikuje gen PsbR. Po analýze sekundárních produktů v oblasti kolem 1000 bp pomocí automatického sekvenátoru se ukázalo, že primery nasedají nespecificky na tu část cDNA ze 5'-konce. Při analýze vzorků sice sekundární produkty nevznikají, ale v praxi je nutno minimalizovat falešně pozitivní výsledky i na méně kvalitní DNA (v našem případě cDNA ze 5'-konce) a na dané problematice se bude dále pokračovat a optimalizovat jak chemické tak i fyzikální faktory.

## 8. Závěr

Tato bakalářská práce se ve své teoretické části zabývá historickými, užitelskými a optimalizačními metodickými aspekty polymerázové kópné reakce.

I přesto, jak je PCR relativně mladá metoda, je zejména díky svým modifikacím nejpoužívanější molekulární genetickou technikou.

Vývoj metod principiálně podobných PCR metod jde neustále dopředu, a proto usuzují, že do budoucna bude vyúfilit této metody zejména pak v klinických laboratořích je to rozsáhlejší a bude používat díky svým kvalitám tedy rychlosti, specifitě a citlivosti mnoho výhod, jak pro lékaře, tak i pacienta. A to zejména pak ve správně a rychle zvolené diagnóze a vhodně nastavené léčbě.

Praktická část slouží jako přehled klíčových optimalizačních kroků směřujících k vyhledání těch nejlepších podmínek pro dokonalou amplifikaci genů P<sub>sb</sub>R a P<sub>sb</sub>Q, vedoucí k co nejvyššímu zisku kvalitní DNA.

Jelikož i nepatrný rozdíl v koncentraci určitých chemických složek reakční směsi nebo i rozdíl teploty 1 °C v určité teplotní fázi reakce může metodě spíše ublížit i dokonce zastavit, zdá se, že potěba vyhledání těch nejlepších podmínek pro PCR je naprosto samozřejmá, a uží se jedná o jakýkoliv gen.

## 9. Použitá literatura a odborné zdroje

(1.) ATEF, Shereen H., Sawsan S. HAFEZ, Nermein H. MAHMOUD a Sanaa M. HELMY. Prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using QF-PCR: the Egyptian study. *Journal of prenatal medicine*. 2011, ro . 5, . 4, s. 83-89.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3399051/>

(2.) BARTLETT, John M.S. a David STIRLING. *PCR protocols*. 2. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2003, s. 545. ISBN 978-089-6036-277.

(3.) BOECKH, Michael, MeeiLi HUANG, James FERRENBURG, Terry STEVENS-AYERS, Laurence STENSLAND, W. Garrett NICHOLS a Lawrence COREY. Optimization of Quantitative Detection of Cytomegalovirus DNA in Plasma by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, ro . 42, . 3, s. 1142-1148. ISSN 0095-1137.

Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.3.1142-1148.2004>

(4.) BEREZKI, Laszlo, Gyongyi KIS, Eniko BAGDI a Laszlo KRENACS. Optimization of PCR amplification for B- and T-cell clonality analysis on formalin-fixed and paraffin-embedded samples. *Pathology Oncology Research*. 2007, ro . 13, . 3, s. 209-214.

Dostupné z: <http://por.hu/2007/13/3/0209/0209a.pdf>

(5.) IKO<sup>TM</sup>, Stefan, Juraj, KOPPEL a Mária, KANTÍKOVÁ. *Polymerázová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike*. Košice: SAV Košice, 2001, s. 203, ISBN 80-968-618-0-8.

- (6.) DIRK, Löffert, Susan KARGER, Margaret BERKNKOPF, Nicole SEIP a Jie KANG. PCR optimization: primer design. *Qiagen News*. 1997, . 5, s. 1-4.  
Dostupné z: <http://www.docstoc.com/docs/46535792/PCR-optimization-primer-design>
- (7.) DVOŘÁKOVÁ, Lenka. *Využití metod PCR ve forenzní genetické analýze* [online]. Praha, 2011 [cit. 2013-03-15].  
Dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/biologie/antropologie/aktuality/szz/bakalarske-prace-jaro-2011/dvorakova/bc-dvorakova.pdf>. Bakalářská práce. UK Praha, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Halina Týmková.
- (8.) ENGLI<sup>TM</sup> Miroslav. ROCHE Diagnostics: na okraji dvou vývojí PCR. *Labor Aktuell*. 2003, . 3, s. 13-14.  
Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0303/pcr.pdf>
- (9.) HASAN, Saba, Jyoti PRAKASH, Abhinav VASHISHTHA, Agnivesh SHARMA, Kuldeep SRIVASTAVA, Faizuddin SAGAR, Nausheen KHAN, Keshav DWIVEDI, Payal JAIN, Saransh SHUKLA, Swati Prakash GUPTA a Saumya MISHRA. Optimization of DNA extraction from seeds and leaf tissues of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum indicum*) for polymerase chain reaction. *Bioinformation*. 2012, ro . 8, . 5, s. 225-228. ISSN 09738894.  
Dostupné z: <http://www.bioinformation.net/008/97320630008225.htm>
- (10.) INNIS, Michael A. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990, s. 482 . ISBN 01-237-2181-4.
- (11.) KAUFMAN, Abigail C., Craig E. GREENE a Royal A. MCGRAW. Optimization of Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Borrelia burgdorferi* in Biologic Specimens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1993, ro . 5, . 4, s. 548-554. ISSN 1040-6387.  
Dostupné z: <http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879300500408>

- (12.) KLENER, Pavel. 10 mezník v rozvoji onkologie (Profi). *Sanquis* [online]. 2009 [cit. 2013-03-17].  
Dostupné z: <http://www.sanquis.cz/index2.php?linkID=art2626>.
- (13.) Mastercycler® nexus. *Eppendorf* [online]. [cit. 2013-03-28].  
Dostupné z:  
<http://www.eppendorfhof.cz/int/index.php?l=242&sitemap=4.1&pb=6f8733957053fe0f&action=support&contentid=1&catalognode=88879>
- (14.) PANÍK, Peter. Organizácia DNA. *Bioweb* [online]. 2003 [cit. 2013-03-02].  
Dostupné z: <http://bioweb.genezis.eu/?cat=11&file=dna>
- (15.) PAVLÍK, Emil. Molekulární biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku: část 3. *Labor Aktuell - odborný archiv* [online]. 1999 [cit. 2013-03-19].  
Dostupné z: [www.roche-diagnostics.cz/casopisy/archiv/vybrane\\_odborne.aspx](http://www.roche-diagnostics.cz/casopisy/archiv/vybrane_odborne.aspx)
- (16.) PELT-VERKUIL, Elizabeth van, Alex van BELKUM a John P. HAYS. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Dordrecht: Springer, 2008, s. 325, ISBN 9781402062414.
- (17.) PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1, vyd. Praha: Grada, 2012, 192 s. ISBN 978-802-4734-606.
- (18.) POWLEDGE, Tabitha M. The polymerase chain reaction. *AJP: Advances in Physiology Education*. 2004, roč. 28, čís. 2, s. 44-50. ISSN 1043-4046.
- (19.) PRŮMA, Richard. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. 1. vyd. Praha: Lambda Bio-Med, 1997, 45 s. ISBN 80-238-0940-7.

(20.) QUINTAES, Bianca Ramalho, Nilma CINTRA LEALI, Liane MOURA FALAVINA REIS a Ernesto HOFERI. Optimization of randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction for molecular typing of Salmonella enterica serovar Typhi. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2004, ro . 37, . 2, s. 143-147. ISSN 0037-8682.

Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-868220040002000006&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-868220040002000006&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

(21.) RICE, George. Polymerase chain reaction: (PCR). MONTANA STATE UNIVERSITY. *PCR* [online]. 2006 [cit. 2013-03-11].

Dostupné z: [http://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/genomics/pcr.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html)

(22.) ROSLI, M.K.A., A.S. ZAMZURIADA, S.M.F. SYED-SHABTHAR, M.C. MAHANI, O. ABAS-MAZNI a B.M. MD-ZAIN. Methodology Optimization of PCR conditions to amplify Cyt b, COI and 12S rRNA gene fragments of Malayan gaur (*Bos gaurus hubbacki*) mtDNA. *Genetics and Molecular Research*. 2011, ro . 10, . 4, s. 2554-2568. ISSN 16765680.

Dostupné z: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2011/vol10-4/pdf/gmr1077.pdf>

(23.) ROUX, Kenneth H. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009, ro . 4, . 4,s.1-7. ISSN 1559-6095.

Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.ip66>

(24.) RUMML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAŠES. *Genové infenýrství*. 1. vyd. Praha: VITČHT, 2002, 270 s. ISBN 80-708-0499-8.

(25.) SALAVA, Jaroslav, David NOVOTNÝ a Ivana POLIČENSKÁ. *Detekce Fusarium langsethiae molekulárními metodami*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010, s. 21. ISBN 978-80-7427-062-8.

(26.) SCHODER, Dagmar, Alois SCHMALWIESER, Günther SCHAUBERGER, Matthias KUHN, Jeffrey HOORFAR a Martin WAGNER. Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clinical Chemistry*. 2003, ro . 49, . 6, s. 960-963.

Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/49/6/960.long>

(27.) Smithsonian Videohistory Collection (2004): The history of PCR (RU 9577).  
Smithsonia Institution.

Dostupné z: [http://siarchives.si.edu/resarch/videohistory\\_catalog9577.html](http://siarchives.si.edu/resarch/videohistory_catalog9577.html)

(28.) STORCHOVÁ, Zuzana. Molekuly na povel IV.: Z mála mnoho není totéž jako z komára velbloud. *Vesmír*. 1998, ro . 77, . 8, s. 444-446. ISSN 1214-4029.

(29.) MĀRDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

(30.) TAKAHASHI, Teruyuki, Masato TAMURA a Toshiaki TAKASU. The PCR-Based Diagnosis of Central Nervous System Tuberculosis: Up to Date. *Tuberculosis Research and Treatment*. 2012, ro . 2012, s. 1-17. ISSN 2090-150x.

Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/trt/2012/831292/>

(31.) VALÁTKOVÁ, Iveta. Laborato molekulární diagnostiky. *Nemocni ní listy*. 2006, ro . 7, . 4.

Dostupné z: [www.molekulara.cz/o-nas/clanek](http://www.molekulara.cz/o-nas/clanek)

(32.) VODRÁFIKA, Zden k. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1999, s. ISBN 80-200-0600-1.



(33.) WANG, Xiaowei, Athanasia SPANDIDOS, Huajun WANG a Brian SEED.  
PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012  
update. *Nucleic Acids Research*. 2011, ro . 40, s. 1144-1149. ISSN 0305-1048.  
Dostupné z: <http://www.nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gkr1013>

(34.) XU, Wentao, Zhifang ZHAI, Kunlun HUANG, Nan ZHANG, Yanfang YUAN,  
Ying SHANG, a Yunbo LUO. A novel universal primer-Multiplex-PCR method with  
sequencing gel electrophoresis analysis. *PLoS One*. 2012, ro . 7, . 1, s. 1-10.  
Dostupné z:  
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0022900>

## 10. P ílohy



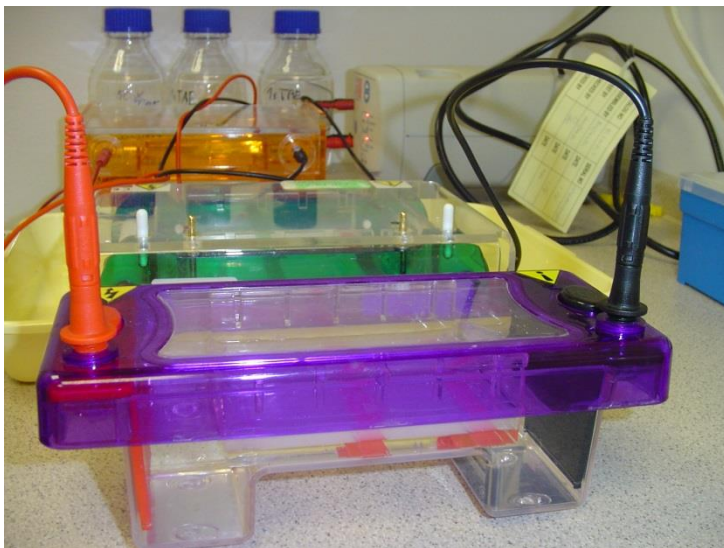
P íloha . 1: Termocykler- Eppendorf (vapo. protect ).  
(Zdroj: vlastní foto)



P íloha . 2: Termocykler-vzorky, (teplotní gradient).  
(Zdroj: vlastní foto)



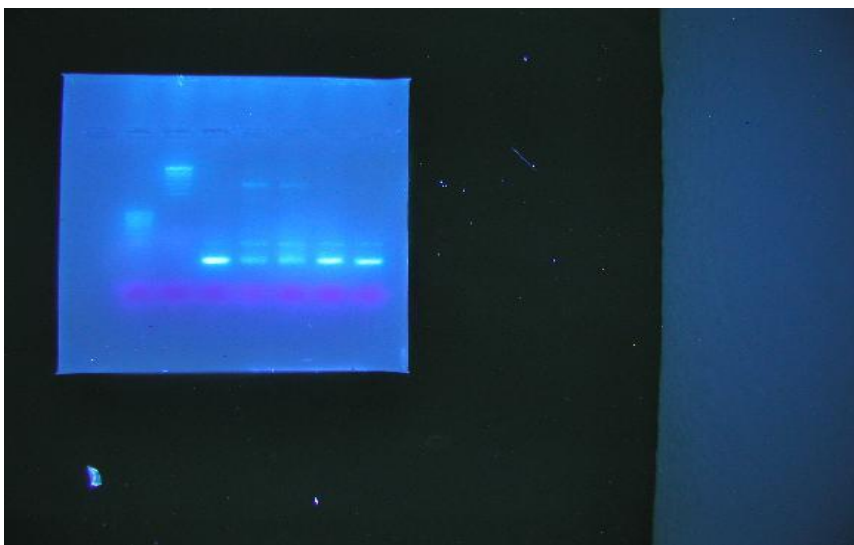
P íloha . 3: Agarózový gel v elektroforetické van .  
(Zdroj: vlastní foto)



P íloha . 4: Horizontální elektroforéza pro analýzu DNA vzork .  
(Zdroj: vlastní foto)



Příloha . 5: Gel pod UV světlem při použití barvy EtBr.  
(Zdroj: vlastní foto)



Příloha . 6: Gel pod UV světlem při použití EZ Vision One.  
(Zdroj: vlastní foto)