

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Diplomová práce

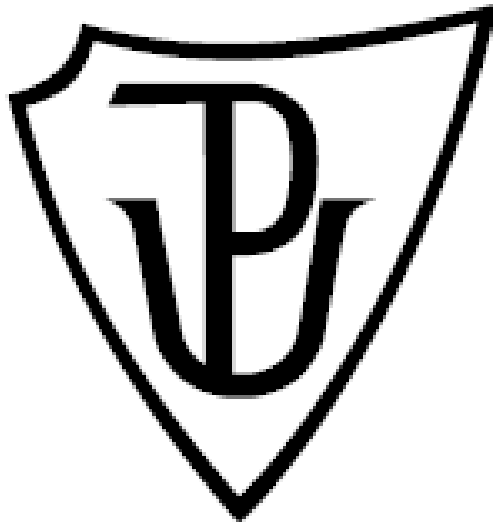
Olomouc 2016

Bc. Hana Crlíková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Stabilizace PCR reagensí při pokojové teplotě

Diplomová práce

Bc. Hana Crlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2016

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma „Stabilizace PCR reagensů při pokojové teplotě“ zpracovala osobně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne 25.7.2016

Bc. Hana Crlíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a připomínky, bez nichž by tato práce zcela jistě nevznikla a také bych ráda poděkovala paní Miroslavě Rabčanové a Veronice Holinkové, DiS., za jejich pomoc při práci v laboratoři. Mé díky patří i rodičům a sestře, kteří mi byli oporou.

Shrnutí

PCR analýza patří mezi jednu z nejčastěji využívaných metod molekulární biologie, avšak i tato metoda má určité limitace. Všechny používané reagensie musí být skladovány v mrazničce a mají jen omezený počet rozmrazení. DNA je konvenčně skladována v mrazničce jako reagensie používané při PCR reakci. Dnes ke standardnímu skladování existují i alternativní možnosti skladování DNA při pokojové teplotě ve formě FTA karty či ve formě vysušeného prášku (vysoušení DNA pomocí lyofilizace, sprejování za pokojové či snížené teploty). K alternativnímu způsobu skladování jak DNA, tak i reagensií používaných při PCR je možno použít tři sacharidy - trehalózu, pullulan a xanthan, u kterých byly prokázány protektivní účinky na proteiny či DNA skladovaných při pokojové teplotě.

V experimentální části byly prováděny testy inhibice. Na základě výsledků byly vybrány roztoky sacharidů pro testování stability. Během testování stability bylo zjištěno, že roztoky sacharidů nevykazují protektivní účinky vůči *Taq* polymeráze, proto byla k vysušené směsi dodána spolu s vodou při rehydrataci směsi. Testy stability probíhaly po dobu 16 týdnů. Bylo zjištěno, že nejlepší protektivní účinky vykazoval 0,8% roztok xanthanu a naopak nejhorší protektivní účinek vykazuje 4% roztok pullulanu, u kterého bylo již v týdnu 10 zaznamenáno zpoždění signálu natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu.

Summary

The PCR analysis is one of the most used methods in molecular biology in spite of its certain limitations. All reagents used during an analysis must be stored in a freezer and freeze-thaw cycles are limited. While DNA is usually stored in a refrigerator alongside reagents, there nowadays exist alternative room temperature storage methods such as FTA cards or dried DNA powder (prepared by lyophilisation, spray-drying, spray-freeze drying). Three saccharides – trehalose, xanthan and pullulan - can be used for alternative room temperature storage of DNA and reagents used in PCR analysis.

Inhibition testing was performed in the experimental part of the thesis. Saccharide solutions were chosen for stability testing based on the results obtained during inhibition testing. It was discovered that no saccharide solution had a protective effect towards *Taq* polymerase. Due to this fact, *Taq* polymerase was added to dried mixture with water during rehydration. Stability testing took 16 weeks and it was discovered that the best protective effect is achieved by 0.8% solution of xanthan, while the worst protective effect is produced by using 4% solution of pullulan, which by week 10 showed that the delay of signal has grown significantly, even beyond the scale of PCR protocol.

Obsah

1	Cíl práce	- 8 -
2	Úvod	- 9 -
3	Literární přehled	- 11 -
3.1	Molekulárně genetické CE-IVD testy	- 11 -
3.2	Složky PCR kitu	- 12 -
3.2.1	Nukleotidy	- 12 -
3.2.2	Hořčík, TrisCl	- 13 -
3.2.3	Primery.....	- 14 -
3.2.4	Polymerázy	- 14 -
3.2.5	<i>Taq</i> polymeráza	- 15 -
3.2.6	DNA	- 16 -
3.3	Skladování DNA.....	- 17 -
4	Aditiva	- 21 -
4.1	Trehalóza.....	- 21 -
4.1.1	Protektivní účinky	- 22 -
4.2	Pullulan.....	- 24 -
4.2.1	Protektivní účinky	- 25 -
4.3	Xanthan	- 26 -
4.3.1	Protektivní účinky	- 27 -
5	Experimentální část	- 29 -
5.1	Materiál	- 29 -
5.2	Příprava roztoků.....	- 29 -
5.3	Design experimentů	- 29 -
5.4	Real-time PCR	- 30 -
5.5	Vysoušení	- 31 -
5.6	Seznam použitých chemikálií	- 32 -
5.7	Přístrojové vybavení laboratoře.....	- 33 -
5.8	Seznam použitých pomůcek	- 33 -
6	Výsledky	- 35 -
6.1	Výsledky testu inhibice s nevysušenými reagensy.....	- 35 -
6.2	Výsledky testu inhibice s vysušenými reagensy	- 37 -
6.3	Výsledky testu stability	- 39 -
7	Diskuze	- 50 -
8	Závěr	- 53 -
9	Seznam použitých zkratk	- 54 -
10	Seznam použité literatury	- 55 -

1 Cíl práce

Cílem diplomové práce je 1) vypracovat literární rešerši na téma stabilizace PCR reagensů pro jejich uchování při pokojové teplotě a 2) otestovat aditiva PCR, které mohou zvýšit stabilitu reagensů bez negativního ovlivnění specifity, senzitivity a limitu detekce PCR.

V literárním přehledu jsou popsány možnosti uchování DNA při pokojové teplotě a vlastnosti tří vybraných stabilizačních biopolymerů (pullulanu, xanthanu, trehalózy), které jsou testovány v experimentální části.

V experimentální části diplomové práce jsou prováděny testy inhibice a testy stability PCR reagensů po přidání polysacharidů pullulanu, xanthanu, trehalózy jednotlivě či v jejich kombinaci. Vliv těchto aditiv je vyhodnocen pomocí metody real-time PCR v různých dobách uchovávání.

2 Úvod

Tato práce se zabývá stabilizací PCR (polymerase chain reaction) reagensí při pokojové teplotě. PCR je jednou z nejdůležitějších metod molekulární biologie používaných k *in vitro* amplifikaci DNA (Kermekchiev *et al.*, 2003). Přestože je metoda PCR hojně využívána, má své limity. Jedním z těchto limitů je nutnost během postupu několikrát pipetovat velmi malé objemy chemikálií. Většina chemikálií používaných při PCR je náchylná k degradaci, zvláště pokud nejsou tyto chemikálie správně skladovány. Chemikálie používané pro PCR analýzu jsou *Taq* polymeráza, $MgCl_2$, dNTPs, TrisCl pufr a vhodný pár primerů. Jednotivé chemikálie se od sebe liší svou stabilitou; nejméně stabilními či nejvíce senzitivními na počet rozmrazení a opětovného zamrazení je *Taq* polymeráza a primery. Dobu expirace zkracují: skladování při neoptimální teplotě, počet rozmrazení, přítomnost CO_2 a použité rozpouštědlo. Stabilita roztoku $MgCl_2$ je relativně vysoká, i když po kontaktu s CO_2 může docházet ke změnám pH a následně i k vysolování. Na stabilitu dNTPs má velký vliv jejich forma, jelikož jsou dodávány ve formě méně stabilních sodných či více stabilních lithiových solí. TrisCl pufr se skládá z Tris(hydroxymethyl)aminomethanu (pH 8,4) a KCl. Stabilita tohoto roztoku je relativně vysoká v porovnání s ostatními složkami PCR směsi. Stabilita primerů je relativně nízká; uvádí se, že počet rozmrazení by neměl být vyšší než tři pro zachování jejich funkce. Zároveň stabilitu ovlivňuje i rozpouštědlo - primery mohou být rozpuštěny ve vodě či TE pufru. Pokud jsou rozpuštěny v TE pufru, je stabilita primerů vyšší, jelikož nedochází k jejich kyselé hydrolyze a rozkladu DNázami. Pro dosažení maximální doby expirace skladujeme PCR reagensie při $-20^\circ C$ a minimalizujeme počet rozmrazení a následovného zamrazení.

Pro stabilitu DNA při dlouhodobém skladování jsou důležité podmínky skladování a stabilita těchto podmínek. Na kvalitu a stabilitu DNA má dále vliv přítomnost antikoagulantů a různých enzymů narušujících stabilitu DNA, dalším faktorem je teplota uchování vzorku. Ke vzorkům krve, ze kterých je následně extrahována DNA, je přidáno antikoagulační činidlo. EDTA je často využívané antikoagulans, jelikož inhibuje DNázy a neovlivňuje kvalitu extrahované DNA, avšak ovlivňuje koncentrace hořečnatých iontů u „downstream“ aplikací. Heparin není příliš

vhodný antikoagulans, jelikož se váže na DNA během purifikace a dokonce inhibuje *Taq* polymerázu během PCR reakce. Stabilitu DNA narušují i přítomné enzymy, jakými jsou nukleázy (exonukleázy či endonukleázy).

DNA je v současnosti možno uchovávat několika způsoby. Nejvíce používanou metodou pro uskladnění DNA je uchování v lednici či mrazničce. Způsob skladování je závislý i na době, po kterou je DNA skladována. Pro krátkodobé skladování je vhodné skladování v lednici, naopak pro dlouhodobé skladování je vhodné skladování jen v mrazničce. Tento přístup má určité nevýhody, jakými jsou náročnost na prostor a v nemalé míře i značná finanční zátěž (nákup mrazniček a záložního zdroje elektrické energie, měsíční platba elektrické energie). DNA je možné skladovat i ve vysušené formě při pokojové teplotě v podobě FTA karty, ve formě vysušeného prášku (vysoušení DNA pomocí lyofilizace, sprejování za pokojové či snížené teploty). Další možností jak uchovat vysušenou DNA či PCR reagentie (např. próby používané u real-time PCR či *Taq* polymerázy) při pokojové teplotě je skladování spolu se stabilizačním činidlem, nejčastěji se jako stabilizátory používají tři biopolymery – trehalóza, pullulan a xanthan (Zagon *et al.*, 2012, Nomura *et al.*, 2003, Noreña *et al.*, 2015).

3 Literární přehled

3.1 Molekulárně genetické CE-IVD testy

Molekulární diagnostika je rychle se vyvíjející oblast používaná k detekci celé řady geneticky podmíněných nemocí, virových a bakteriálních patogenů, ale i k forenzním (Ubertelli *et al.*, 2007). IVD (*in vitro* diagnóza/diagnostické) produkty jsou reagenty, přístroje a systémy využívané v diagnostice nemocí či k determinaci zdraví a následně k léčbě, zmírnění či prevenci onemocnění popř. následků onemocnění. Tyto produkty jsou využívány k odběru, přípravě a vyšetření vzorku. IVD produkty jsou klasifikovány do tří tříd na základě rizika a množství kontrol, které vyžadují. Třída I vyžaduje obecnou kontrolu produktů, třída II vyžaduje obecnou kontrolu, ale i speciální kontrolu a třída III vyžaduje obecnou kontrolu a zároveň schválení před uvedením na trh (<http://www.fda.gov>). IVD se provádí IVD přístroji za použití vhodných chemikálií. Přístroje využívané k této diagnostice musí splňovat přísná kritéria analýzy, bezpečnosti pro pacienta a pro obsluhu (Mannonen *et Riikonen*, 2006). Veškeré IVD produkty jsou regulovány direktivou EU 98/79/EC. To znamená, že musí projít certifikací a zkratka CE neboli „Conformité Européenne“ znamená schváleno EU. CE označení znamená, že výrobce prohlašuje, že produkt splňuje základní požadavky relevantní pro zdraví, bezpečnost a prostředí a může být legálně uvedený na trh v EU (<http://www.ce-marking.org>). CE-IVD certifikace garantuje, že všechny produkty, vyrobené v určitém časovém období, mají stejnou kvalitu a čistotu, a tím pádem vysokou reprodukovatelnost analýz a experimentů (Mannonen *et Riikonen*, 2006). Během CE-IVD certifikace dochází k validaci postupů používaných při analýzách, aby se prokázalo, že jsou vhodné k zamýšlenému využití a zároveň, že výsledky jsou reprodukovatelné, správné, specifické, senzitivní, s definovaným limitem detekce. Pokud je test kvantitativní, zjišťují se i informace o linearitě testu.

IVD se provádí podle pravidel určených ve standardním operačním postupu (SOP), jelikož výsledky jsou závislé na správném dodržení všech kroků při analýze, včetně použití vhodných chemikálií. SOP nepopisuje jen, jakým způsobem se má vzorek odebrat, zpracovat, analyzovat, ale i jakým způsobem se mají uchovávat jednotlivé chemikálie a jak se s nimi má manipulovat. Pro získání očekávaných výsledků je důležité, aby se zacházelo se vzorky a chemikáliemi vždy stejným způsobem. Na základě SOP je možné analyzovat vzorky v různých laboratořích za použití

stejných chemikálií, skladovaných stejným způsobem a získat srovnatelné výsledky (Tuck *et al.*, 2008).

Pokud se provádí velký počet analýz stejného typu, je výhodné použít pipetovací automat (Svec *et al.*, 2015). Zároveň by bylo výhodné vyvinout levný a zároveň jednoduchý systém, který by už předem obsahoval všechny reagentie potřebné k analýze, takže by se do každé zkumavky přidala už jen templátová DNA. Kritickým bodem takového systému je dlouhodobá stabilita reagentií. Jejich funkčnost musí být nezměněná po celou dobu do data expirace. Pro IVD vyšetření je požadovaná stabilita reagentií používaných pro analýzu minimálně 12 měsíců (Rombach *et al.*, 2014).

Důležitými parametry každé analytické reakce včetně PCR je senzitivita a specificita. Tyto parametry ovlivňuje genotypizační systém, templát a vlastnosti reagentií (Burgos *et al.*, 2002). Data získaná pomocí IVD analýzy musí být reprodukovatelná, proto si použité chemikálie a reagentie musí uchovat stejné vlastnosti od výroby po dobu, kdy jsou používány zákazníkem při analýzách. Samozřejmostí pro všechny tyto genotypizační soupravy (kity) či reagentie používané při analýzách je CE-IVD certifikace (Rabenau *et al.*, 2007).

3.2 Složky PCR kitu

Kity pro konvenční PCR analýzu většinou obsahují *Taq* polymerázu, MgCl₂, dNTPs, TrisCl pufr a vhodný pár primerů.

3.2.1 Nukleotidy

Roztok deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) obsahuje deoxyadenosin trifosfát (dATP), deoxycytosin trifosfát (dCTP), deoxyguanosin trifosfát (dGTP) a deoxythymidin trifosfát (dTTP). Deoxynukleotid trifosfáty jsou pomocí polymerázy inkorporovány do nově vznikajícího řetězce DNA. Nukleotidy jsou dodávány ve formě sodných či lithiových solí. Lithiové soli oproti sodným mají větší stabilitu i při opakovaném rozmrazování. Navíc je jejich sterilita zaručená po celou dobu až do expirace pomocí bakteriostatického působení lithia. Výhodou lithiových solí proti sodným je jejich vyšší rozpustnost. dGTP má tendenci precipitovat během zamrazení, což může vést ke změnám koncentrací jednotlivých nukleotidů v roztoku. Lithiové soli mají mnohem vyšší rozpustnost v ethanolu a na základě toho existuje

možnost je efektivně odstranit z roztoku pomocí precipitace ethanolem, aniž by zbylé nukleotidy vytvářely artefakty během sekvenace. Stabilita dNTPs je ovlivněna i formou, v jaké se nacházejí – jsou dodávány buď v lyofilizované formě nebo ve formě roztoku. dNTPs degradují disproporční reakcí, která je závislá na teplotě, ale i koncentraci. Roztoky dNTPs jsou stabilnější při teplotách nad 4°C a také jejich čistota je vyšší než u lyofilizovaných dNTPs, jelikož nedochází k tak rychlé degradaci na nukleosid mono- a di- fosfáty (www.bioline.com). dNTPs by měly být skladovány v mrazničce při -20°C a jejich koncentrace by měla být vyšší než 10 mM, jelikož se při nižších koncentracích výrazně snižuje jejich stabilita a dochází k narušení jejich struktury a po použití by neposkytovaly standardní výsledek. Ovšem i tyto chemikálie jsou ovlivněny rozmrazováním a opakovaným zamrazováním. Může docházet k hydrolýze fosfátové skupiny, proto se doporučuje rozpipetovat dNTPs do alikvotů a ty následně používat. Pokud se provádí více analýz v krátkém časovém úseku, je možné je uchovávat v lednici či při pokojové teplotě, jelikož bylo dokázáno, že i po dobu sedmi týdnů zůstává 95 % nukleotidů v trifosfátovém stavu, tzn. nedochází ke změnám v jejich struktuře a reaktivitě (<https://www.thermofisher.com>).

3.2.2 Hořčík, TrisCl

Taq polymeráza rozeznává jako svůj substrát jen deoxynukleotid trifosfáty či oligonukleotidy s navázanými hořečnatými ionty. Tyto hořečnaté ionty se váží na primery a stabilizují i dsDNA, a tím pádem velmi ovlivňují teplotu tání a teplotu hybridizace primerů. Neotevřený roztok se může skladovat až dva roky při -20°C (<http://www.ampliqon.com>). Koncentrace chloridu hořečnatého významně ovlivňuje specificitu a efektivitu PCR reakce. Dodává se ve formě vodného roztoku. Po otevření zkumavky dochází k reakci se vzdušným oxidem uhličitým, což vede ke změně pH roztoku a také k jeho vysolování (Danlu *et al.*, 2013). Výrobce uvádí, že by se roztok hořečnatých iontů neměl rozmrazovat více než pětkrát (<http://www.bioline.com>).

Další důležitou složkou je PCR pufr, který se skládá z TrisHCl (pH 8,4), popř. KCl či (NH₄)₂SO₄. Každý enzym vyžaduje své optimální podmínky (pH, iontová síla roztoku, kofaktory atd.) pro správné fungování. PCR pufr by se měl skladovat při -20°C po dobu až jednoho roku (Henegariu *et al.*, 1997).

3.2.3 Primery

Primery, stejně jako všechny ostatní složky PCR mixu, by se měly skladovat při -20°C pro dlouhodobé uchování (až pět let), ale primery mohou být skladovány i při 4°C po dobu až šesti měsíců. Primery jsou citlivé k rozmrazování a opětovnému zamrazování. Udává se, že pokud jsou rozmrazeny více než pětkrát, dochází k jejich degradaci. Stabilita primerů je výrazně ovlivněná i roztokem, v jakém jsou rozpuštěny. Pokud není potřeba skladovat primery po dlouhou dobu, je možné je rozpustit v destilované vodě, ovšem pokud je požadavek na dlouhodobé skladování, je TE pufr vhodnější. Pokud by se primery skladovaly v destilované autoklávované vodě po dobu několika let, mohlo by dojít k jejich degradaci, jelikož se ve vodě se rozpouští oxid uhličitý. Voda se tím stává kyselou a následně dochází ke kyselé hydrolyze primerů. Součástí TE pufru je EDTA, který slouží jako chelatační činidlo Mg^{2+} iontů, které využívá DNáza jako kofaktor. DNáza bez Mg^{2+} iontů jako kofaktoru nemá žádnou enzymatickou aktivitu a nemůže dojít k degradaci primerů. Navíc TE pufr zajišťuje stálou hodnotu pH a nedochází tedy ke kyselé hydrolyze primerů (Dieffenbach *et al.*, 1993).

3.2.4 DNA polymerázy

DNA polymeráza je enzym vyskytující se u všech organismů, kde tento enzym slouží k připojování jednotlivých nukleotidů během replikace či syntézy DNA molekuly. V PCR je hojně využívána termostabilní *Taq* polymeráza, vyskytující se u *Thermus aquaticus*, z něhož byla v roce 1976 vyizolována (Ferralli *et al.*, 2007). Dnes jsou na trhu dostupné různé modifikace toho enzymu. Jednou z modifikací je Hot start *Taq* polymeráza, která přináší sníženou aktivitu při nestrigentních teplotách, což vede k eliminaci vzniku nesespecifických produktů. V současné době jsou na trhu k zakoupení i jiné polymerázy jako např. *Pfu* DNA polymeráza izolovaná z *Pyrococcus furiosus*, *Pwo* DNA polymeráza z *Pyrococcus woesei*, *Tth* DNA polymeráza izolovaná z *Thermococcus thermophilus*, *Vent* DNA polymeráza izolovaná z *Thermococcus lithoralis* (Ppyun *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2016; Fujiwara *et al.*, 2016). *Taq* polymeráza, stejně jako ostatní typy polymeráz, se skladuje při -20°C . Stabilita a aktivita enzymu je ovlivněna nejen teplotou, při které je skladován, ale i počtem rozmrazení a zamrazení. Ideální je, aby enzym byl zamrazován méně než desetkrát (Nilsson *et al.*, 1997). V dnešní době je možno zakoupit variantu *Taq* polymerázy, Top *Taq* DNA polymerázu, kterou je možno

skladovat při 4°C díky Top *Taq* stabilizéru přítomného v pufru, ve kterém je polymeráza rozpuštěna (<https://www.qiagen.com>).

3.2.5 *Taq* polymeráza

Účinnost PCR amplifikace je ovlivněná velkým množstvím faktorů, kterými jsou např. délka úseku DNA, který se má amplifikovat, délka a sekvence primerů, složení pufrů, přítomnost nečistot obsažených ve vzorku a v neposlední řadě polymeráza. *Taq* DNA polymeráza je jednou z nejznámějších a nejčastěji používaných polymeráz. Ideálním výsledkem PCR je získání jednoho specifického produktu ve vysokém počtu kopií při minimálním počtu cyklů s minimálním počtem chyb polymerázy. Během syntézy DNA pomocí PCR metody může docházet ke dvěma nežádoucím jevům: a) primery nasednou na méně specifická místa na DNA a b) primery vytvářejí tzv. primerový dimer, kdy primery slouží sobě navzájem jako templáty. Pokud polymeráza nemá funkci hot-start, tak dochází k těmto nežádoucím reakcím okamžitě po smíchání všech PCR reagensů ještě před vložením zkumavek do termocykléru. Výsledkem je snížená specifita a snížený výtěžek PCR (Kermekchiev *et al.*, 2003).

Účinnost amplifikace *Taq* polymerázy se pohybuje mezi 36 % až 88 %. Přestože tato polymeráza dostačuje k mnoha PCR amplifikacím, jednou z největších nevýhod je, že postrádá korektorskou, tzv. „proofreading“, aktivitu a tím pádem vykazuje relativně nízkou přesnost replikace templátu při amplifikaci. Navíc se množství produktu snižuje se vzrůstající velikostí ampliconu nad 1 kb Arezi *et al.*, 2003). Hot-start verze polymeráz (mají sníženou nespecifickou amplifikaci při nestrigentních podmínkách. Počáteční inaktivace polymerázy se dosahuje protilátkovou nebo chemickou modifikací. Po vystavení hot-start polymerázy vysoké teplotě dochází k disociaci protilátek či kovalentně navázaných látek z aktivního místa polymerázy (Mohammed *et al.*, 2015) a tím k navrácení celkové enzymatické aktivity. Protilátkou inaktivovaná hot-start polymeráza vykazuje velkou přesnost a specifitu i při velmi nízkých koncentracích DNA (Spitaleri *et al.*, 2004). Nevýhodou tohoto typu polymerázy je případná kontaminace savčí DNA, jelikož protilátky pocházejí z hybridomových buněk (Hube *et al.*, 2005).

K chemické modifikaci *Taq* polymerázy pro hot-start jsou využívány malé organické sloučeniny, které inhibují aktivitu enzymu při nestrigentních podmínkách. Pro navrácení enzymatických vlastností *Taq* polymerázy musí dojít k odštěpení

modifikující molekuly za impulsu vysokou aktivační energií, a proto je nutné enzym vystavit na 15 minut teplotě 95°C (Louwrier *et al.*, 2005). Chemicky a protilátkami modifikované polymerázy vykazují podobnou efektivitu jako standardní *Taq* polymeráza (Arezi *et al.*, 2003), avšak efektivita amplifikace klesá při velikosti ampliconu nad 1 až 2 kb. Všeobecnou výhodou těchto nových polymeráz je, že dochází ke zvýšení citlivosti metody a zároveň poskytují menší množství nespecifických produktů (Kaboev *et al.*, 2000).

3.2.6 DNA

Přestože je molekula DNA stabilnější než např. bílkoviny, také podléhá degradaci. Kvalita DNA je výrazně ovlivněna zpracováním vzorku. Ke vzorkům krve, ze kterých je následně extrahována DNA, se musí přidat antikoagulační činidlo, jak již bylo zmíněno. Výběr antikoagulačního činidla může ovlivnit izolaci DNA či samotnou PCR reakci. Často používaná antikoagulační činidla jsou EDTA či heparin. EDTA inhibuje DNázy a neovlivňuje kvalitu extrahované DNA. Vychytává však hořčičnaté ionty, což může ovlivnit následné („downstream“) molekulárně genetické testy. Heparin není příliš vhodný antikoagulant, jelikož se váže na DNA během purifikace a inhibuje *Taq* polymerázu během PCR reakce (Kotikalapudi *et al.*, 2015). Biologické vzorky, ze kterých má být DNA extrahována, musí být skladovány a zpracovány v závislosti o jaký vzorek se jedná. Vzorky krve mohou být skladovány při 2 až 8°C po dobu několika dnů, aniž by došlo k degradaci DNA nebo při -20°C po dobu několika měsíců a následně může být DNA extrahována. Lidské či zvířecí tkáně musí být okamžitě zpracovány nebo zamrazeny při -20°C či -80°C, či mohou být fixovány pomocí pufovaného formalinu a DNA může být extrahována později (Ferrer *et al.*, 2007). Stabilitu DNA může narušit i přítomnost mnoha enzymů. Jedním z těchto enzymů jsou nukleázy, enzymy schopné degradovat dsDNA, ale i ssDNA. Mezi tyto enzymy se řadí nukleáza P1 pocházející od *Penicillium citrinum* degradující ssDNA na produkty s 5'-fosfátovými konci (Okado *et al.*, 2016). DNázy jsou enzymy, které snižují stabilitu DNA na základě narušení fosfodiesterové vazby v DNA. Mezi DNázy se řadí DNáza I, tento enzym štěpí ss i dsDNA za vzniku mono- a oligonukleotidů (Xiao *et al.*, 2016). Dále je stabilita DNA narušována nespecifickými exonukleázami fosfodiesterázami. Mezi tyto enzymy se řadí např. fosfodiesteráza I, která štěpí DNA ve směru 3' → 5' za vzniku nukleosid 5'-fosfátu a fosfodiesteráza II, která štěpí DNA ve směru 5' → 3' za vzniku nukleosid 3'-fosfátu (Kelso *et al.*, 2016).

Po úspěšné extrakci DNA je důležité i její skladování; pro dlouhodobé skladování DNA je nezbytné udržet optimální a neměnné podmínky. Vyizolovaná DNA může být skladována při 4°C po dobu několika týdnů. Pokud chceme skladovat DNA po dobu několika měsíců, musí být skladována -20°C. Pokud tato doba není dostačující, musí být DNA skladována při -80°C ve formě suspenze s etanolem. Nejběžnější metodou skladování DNA je zmrazení při -20°C. Na stabilitě DNA při skladování se podílejí i další faktory. Zároveň se musí při extrakci DNA volit správné pufrů o správné koncentraci iontů. DNA může být skladována ve formě roztoku či ve vysušené formě, pokud je skladována jako roztok může být rozpuštěna v „nuclease-free“ vodě či v TE pufru. TE pufr je vhodnější pro dlouhodobé skladování, jelikož inhibuje DNázy a navíc nedochází ke kyselé hydrolýze jako ve vodě (Kotikapudi *et al.*, 2015).

Pro PCR analýzu je nutná přítomnost vyextrahované DNA. Avšak získání DNA ze vzorku je časově i finančně náročné, skládá se z relativně mnoha kroků a tím dochází ke zvýšení možnosti kontaminace vzorku a navíc během zpracování vzorku může dojít ke ztrátám DNA. Na základě těchto poznatků byl vytvořen systém, pomocí kterého lze analyzovat přímo celý vzorek, např. neseparovanou krev. K této analýze se využívá přídavek DMSO (Sorensen *et al.*, 2016) nebo 0,2M roztoku trehalózy s 1M propan-1,2-diolem k analyzovanému vzorku (Utekal *et al.*, 2015).

3.3 Skladování DNA

Pro veškeré analýzy, které využívají DNA jako templát, je kritickým požadavkem kvalita DNA, z tohoto důvodu je velice důležité, aby se kvalita DNA neměnila během skladování (Post *et al.*, 1993). Jednou z možností jak získat DNA ze vzorku, je vysušit celý vzorek, skladovat ho a až následně z něj vyextrahovat DNA. Tato metoda je účinná u rostlinných vzorků, které se po odebrání v co nejkratší době vysuší pomocí tekutého dusíku (Chase *et al.*, 1991). Ovšem tento přístup je vhodný jen pro rostlinné vzorky a v dnešní době je důležité skladovat vzorky jak lidské, tak i zvířecí, a proto byla navržena alternativa k tomuto přístupu. Tou je extrakce DNA a její vysušení za vhodných podmínek. Tato metoda je mnohem méně náročná na prostor než konvenční způsob skladování DNA (Lou *et al.*, 2014).

Skladování DNA ve vysušeném stavu je alternativou ke standardnímu skladování v mrazničce. Důležitým krokem je dehydratace, při které dochází

ke snížení mobility molekul a zabraňuje se depurinaci, depyrimidinizaci, deaminaci a také se zabraňuje hydrolytickým reakcím, které by mohly vést k fragmentaci DNA. Většina DNáz či RNáz potřebuje ke svému působení přítomnost vody, pokud ale dojde k jejímu odstranění ze vzorku či DNA, jejich aktivita se výrazně sníží nebo zcela zastaví a nemůže docházet k poškození DNA či RNA (Lou *et al.*, 2014). Pokud chceme skladovat vysušenou DNA, jedním z nejdůležitějších kritérií je nízká relativní vlhkost v místnosti, kde je DNA skladována.

Pro přípravu vysušené DNA se využívají metody lyofilizace, sušení pomocí spreje, sušení pomocí spreje za snížené teploty a sušení na vzduchu (Kuo *et Hwang*, 2004). Slibnou metodou pro vysoušení DNA je lyofilizace, kde se využívá chlad a snížený tlak k vysušení vzorku. Vzorek je nejprve zmrazen, následně je tlak snížen a teplota zvýšena, což vede k sublimaci přibližně 95 % zmrazené vody. Poté následuje další zvýšení teploty, což vede k uvolnění přibližně 1 až 4 % zmrazené vody obsažené ve vzorku. Takto ošetřený vzorek obsahuje jen 1 až 4 % původně obsažené vody. Pokud je takto ošetřený vzorek skladován při pokojové teplotě za tmy a ve vakuu, nedochází k degradaci DNA ani po jednom roku (Lou *et al.*, 2014). Výhodou této metody je, že není nutné DNA vysoušet za zvýšené teploty, kdy by docházelo ke změnám ve struktuře a vlastnostech, plusem je vysoká stabilita prášku a jednoduché a zároveň rychlé rozpuštění získaného prášku. Avšak tato metoda má i určité nevýhody, ke kterým patří relativně dlouhá doba vysušení, nutnost speciálního vybavení, výsledný produkt je nutné balit buď ve vakuu nebo za přítomnosti inertního plynu a v neposlední řadě je nevýhodou i vysoká cena (de Vale Morais *et al.*, 2016).

Vhodným způsobem pro vysoušení DNA je sprejování. Během tohoto postupu dochází k vysušení a tvorby jemného prášku v jednom kroku. Pro tuto metodu jsou vhodné roztoky, emulze či suspenze proteinů, peptidů či DNA. DNA vysušená tímto způsobem se připravuje za přítomnosti dalších látek např. protaminu a lipidu (DNA vhodná pro genovou terapii) či v přítomnosti ethyl formátu či methylen chloridu (DNA vhodná k vakcinaci) (Walter *et al.*, 1999; Seville *et al.*, 2002). Tekutina prochází přes trysku pomocí stlačeného vzduchu či dusíku, ale inertní plyn není tak často využíván. Dochází k tvorbě malých kapiček, které se stříkají proti horkému plynu o teplotě 150°C, během toho dochází k odpaření vody z kapky a je následně získán prášek obsahující DNA a je obohacený o protektivní látky (Maa *et al.*, 1999; Gharsallaoui *et al.*, 2007). Takto připravená DNA je vhodná i ke genové terapii, kdy

se DNA může vložit do plasmidu *in vitro* či *in vivo*. Výhodou této metody je její rychlost, efektivnost a vhodnost i pro termolabilní látky. Avšak i tato metoda má určité nevýhody: počáteční investice do přístrojového vybavení jsou relativně vysoké a vlastnosti produktu závislé na podmínkách při vysoušení (Leung *et al.*, 2016).

Alternativou sprejování je vysoušení DNA pomocí sprejování při nízkých teplotách. Tento postup se liší od metody vysušení DNA pomocí spreje jen tím, že je roztok automaticky tlačěn přes trysku, která jemný aerosol stříká do tekutého dusíku. Tento aerosol je vysušen pomocí lyofilizace. Takto připravená DNA je vhodná ke genové terapii, ale přesto má tato metoda velkou nevýhodu, kdy u části DNA dochází ke změně struktury. Tato změna je způsobená stresem při procházení tryskou, či velkou změnou teploty během lyofilizace. Změna struktury je způsobená dvoukrokovou depurinací a eliminací, která vede k rozštípnutí fosfodiesterové kostry. Ovšem pokud se k roztoku DNA přidají protektivní látky jako např. disacharidy či polyoly, k těmto změnám nedochází (Kuo *et Hwang*, 2004).

Poslední alternativou vysušení DNA je vysoušení na vzduchu. Sušit na vzduchu můžeme celý rostlinný vzorek, ze kterého se bude až časem extrahovat DNA, nebo jakoukoli vyextrahovanou DNA. DNA získaná touto metodou nevykazuje degradaci či změny ve struktuře a je vhodná pro další analýzu. Sušení probíhá v exsikátoru, který je naplněný vodným hydroroskopickým činidlem, např. silikagelem. Tato metoda je metodicky i finančně nenáročná, avšak zdlouhavá a navíc může docházet k znečištění DNA během vysoušení (Chase *et Hills*, 1991).

Chemické matrice používané pro skladování DNA, RNA a proteinů do určité míry napodobují proces anhydrobiózy. Tento proces je známý u želvušek (*Tardigrada spp.*) a žábronožek (*Artemia spp.*), kde během určitého období dochází k téměř úplnému vysušení organismu a poté k jeho rehydrataci bez poškození buněk, DNA či proteinů (Crowe *et al.*, 1998). Jednou z matric dnes hojně využívanou jsou FTA karty. Tato matrix je tvořena makroporózní celulózą, která je ošetřena kyselinou močovou, detergentem a chelatačním činidlem. Buňky přenesené na FTA karty jsou lyzovány a přitom je DNA navázána na kartu a zakonzervována na ni. Pomocí chelatačního činidla dochází k vysušení DNA a také dochází ke snížení enzymatické aktivity přítomných enzymů. Bylo dokázáno, že takto skladovaná DNA je i po sedmi letech vhodná k analýzám a není degradovaná. Výhodou této metody je možnost skladování jak genomické, plasmidové, tak i intracelulární DNA, ale i DNA

z krve. Nevýhodou v současnosti využívaných systémů je to, že lze skladovat buď DNA, nebo RNA, ale ne oba typy molekul zároveň (Dobbs *et al.*, 2002).

Jedním z dalších možností skladování DNA, RNA či proteinů po dobu jednoho týdne při pokojové teplotě či po dobu jednoho roku v lednici je roztok Qiagen Allprotect Tissue Reagent. Tento roztok proniká přes membránu buňky a inaktivuje endogenní nukleázy, redukuje mikrobiální aktivitu a inaktivuje reaktivní kyslíkové radikály, takže poskytuje ochranu vzorku a zpomaluje jeho degradaci (Sherker *et al.*, 2013). Nevýhodou tohoto roztoku je to, že jeho přesné složení není známo.

Jedním ze slibných způsobů pro uchovávání DNA je přidání polyvinylalkoholu (PVA). Tento polymer je využíván v biomedicínských a farmaceutických aplikacích, ale také ve forenzních vědách (analýza střelného prachu a krevních skvrn na rukách). Pro forenzní účely se využívá 10% roztok PVA, který se nanese na ruce oběti, nechá se zaschnout a poté se sloupne film. Pokud se na tomto filmu nachází i krev, je možné tento kousek vystříhnout, z krve extrahovat DNA a následně ji analyzovat pomocí PCR analýzy. Výhodou polyvinylalkoholu je jeho netoxičita, neovlivňuje enzymatické reakce, udržuje dostatečné množství vody ve vzorku i v přítomnosti dehydratujících rozpouštědel a umožňuje tvorbu PVA-DNA nanočástic vhodných k dopravení genů či proteinů při léčbě. Při testování tohoto systému byla DNA napipetována do 96 jamkové destičky, převrstvena 1% roztokem PVA a vysušena přes noc při pokojové teplotě. Tento postup poskytuje stabilní DNA i po dvou letech (Ivanovova *et Kuzmina*, 2013).

Další alternativou pro pokojové skladování je využití DNASHells[®] od firmy Invitrogen. Tento způsob uchování DNA je založen na tom, že bude DNA stabilní při pokojové teplotě, pokud bude dostatečně čistá a ochráněná proti faktorům, které narušují její stabilitu, jakými jsou voda, kyslík, teplota a světlo. Na základě těchto poznatků byl vytvořen systém DNASHells[®]. DNA je zapouzdřena do malých, vodo-světlo-oxidačně rezistentních kovových kapslí. DNA je naplněna do DNASHells[®], následně vysušena ve vakuu a poté jsou vzorky zabaleny v ochranné inertní atmosféře. DNASHells[®] naplněné DNA byly skladovány při pokojové teplotě 1 měsíc a 18 měsíců a byly vystaveny i vysokým teplotám. Následně byly vzorky DNA skladované v DNASHells[®] porovnány s kontrolními vzorky, které byly skladovány buď v mrazničce při -20°C nebo v lednici při 4°C. Bylo potvrzeno, že vzorky skladované po dobu 18 měsíců nejevily degradaci DNA v porovnání s kontrolními vzorky. Aby byla odhadnuta stabilita toho systému při dlouhodobém skladování (delší než

18 měsíců), byl využit Arrheniův model. Arrheniova rovnice $k = A \cdot e^{-E_a/RT}$, kde A je preexponenciální faktor, E_a aktivační energie, R je plynová konstanta ($8,31 \text{ kJmol}^{-1}$) a T teplota (v kelvinech); vysvětluje, jaký vliv má teplota na spontánní chemický rozklad (Schuller *et al.*, 2004). Model je založen na tom, že teplota významně ovlivňuje mnoho procesů od molekulární kinetiky až po rychlost růstu bakterií. DNASHells[®] systém byl vystaven teplotě 76°C při 50% relativní vlhkosti po dobu 30 hodin, což na základě Arrheniova modelu odpovídá 100 letům při 25°C. U těchto vzorků nebyla zjištěna degradace DNA. Dále byl systém vystaven 76°C při relativní vlhkosti 50% po dobu 1 týdne a 1 měsíce, což na základě Arrheniova modelu odpovídá 500 a 2000 letům při 25°C. U těchto vzorků byla zjištěna degradace DNA již po jednom týdnu. Pokud se k DNA uchovávaných v DNASHells[®] přidá před vysušením trehalóza a tyto vzorky se vystaví teplotě 76°C při relativní vlhkosti 50% po dobu 1 měsíce, dochází jen k částečné degradaci DNA (Clermont *et al.*, 2014).

Arrheniův model dává přesné předpovědi, pokud hodnotíme pouze jednoduché chemické reakce (Clermont *et al.*, 2014). Faktory ovlivňující tento model jsou pH, vlhkost a koncentrace iontů těžkých kovů (Corradini *et Peleg*, 2007). Jakákoliv změna v teplotě vyvolá změnu v rychlosti degradace DNA. Z tohoto jsou výsledky zrychleného testování stability PCR reagensů za využití Arrheniova modelu spíše jen orientační (Willerslev *et al.*, 2004).

4 Aditiva

4.1 Trehalóza

Trehalóza (α -D-glukopyranosyl α -D-glukopyranosid) je neredukující disacharid, jehož dvě glukózové jednotky jsou spojeny α -1,1 glykosidickou vazbou (Elbein *et al.*, 2003). Tento cukr se vyskytuje ve formě dihydrátu a má nízkou hygroskopicitu (Ohtake *et Wang*, 2011). Je to bílý prášek bez zápachu, jehož roztok je o 45 % sladší než sacharóza (Wu *et al.*, 2015, Jain *et Roy*, 2009). Výhodou tohoto cukru je, že je netoxický a při kryoprezervaci neproniká do buňky (Sorokulova *et al.*, 2015).

Tento disacharid se vyskytuje u mnoha organismů jako jsou bakterie, kvasinky, houby, rostliny a bezobratlí (Wu *et al.*, 2015; Moussaid *et al.*, 2015). U prokaryot slouží jako zdroj uhlíku a strukturní komponenta. *Escherichia coli* syntetizuje trehalózu při vysoké osmolaritě. *Bacillus subtilis* využívá tento cukr jako zdroj uhlíku a nikoli jako osmoregulátor. U *Mycobacterium tuberculosis* či *Corynebacterium glutamicum* je součástí buněčné stěny (Jain *et Roy*, 2009).

Tento disacharid našel uplatnění v medicíně při zvyšování stability proteinů, monoklonálních protilátek a enzymů (Kaushik *et Bhat.*, 2003). Dalším odvětvím, kde dokázali trehalózu využít, je kosmetický průmysl, kde ji pro své hydratační a antioxidační vlastnosti přidávají do šampónů a krémů (Takeuchi *et Banno*, 1998; Yamashita, 2009). Dále našla uplatnění v potravinářském průmyslu jako obalový materiál pro vysušené potraviny, u kterých zabraňuje jejich degradaci (El-Sheshtawy *et al.*, 2015; Colaco *et Roser*, 1995).

4.1.1 Protektivní účinky

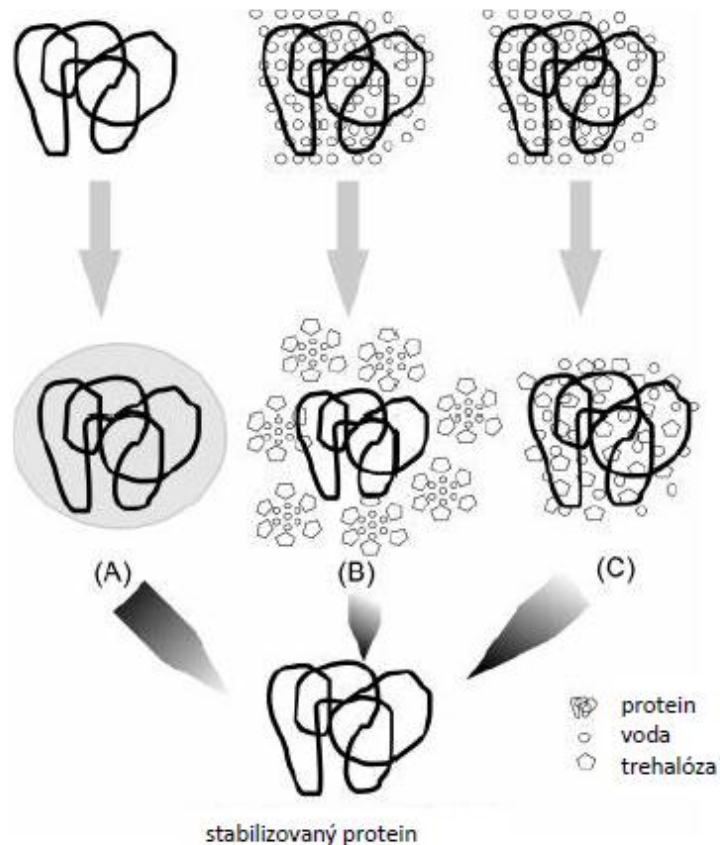
Trehalóza je známa pro své protektivní účinky, které jsou větší než u jakéhokoli jiného známého disacharidu (Wyatt *et al.*, 2015). Tento disacharid je schopný ochránit buňky před environmentálním stresem jakým je nadměrné sucho, teplo, zima či oxidace (El-Sheshtawy *et al.*, 2015). Trehalóza je známá tím, že má protektivní účinky na proteiny a lipidové membrány (Zheng *et al.*, 2015). Rostliny *Craterosigma plantagineum* a *Selaginella lepidophylla* obsahující více než 10 % trehalózy v sušině byly vystaveny teplotě 100 °C, plně vysušeny a následně skladovány při pokojové teplotě. Po rehydrataci se plně obnovila jejich aktivita a nebylo zaznamenáno žádné poškození buněk (Adams *et al.*, 1990). Tento cukr hraje centrální roli při přežívání organismů během chladných, teplých či suchých období nebo během osmotického stresu během kryptobiózy - období, kdy je metabolismus kompletně potlačen, a ochraňuje buňky i před chaotropním stresem způsobeným toluenem či etanolem (Zagon *et al.*, 2001; Bhaganna *et al.*, 2000).

Stabilizující účinek na DNA je vysvětlován pomocí tří teorií – „water replacement theory“, „glassy state theory“ (Zagon *et al.*, 2012) a „water layer hypothesis“ (Lins *et al.*, 2004). První teorie, „water replacement theory“, je založená na tom, že se trehalóza chová jako kosmotrop (Jain *et Roy*, 2009). Kosmotrop je látka, která vytváří silnější vazbu s molekulami vody, než jednotlivé molekuly vody mezi sebou a to vede tomu, že se voda váže přednostně na tuto látku a tím se naruší

solvatační obal kolem proteinu či DNA (Moelbert *et al.*, 2004). Pokud je kosmotrop přítomný v roztoku, voda se přednostně váže k němu a tím se sníží množství volné vody (viz obr. č. 1), vytvářející krystalky ledu, které by mohly poškodit membrány, proteiny či DNA. Pomocí dynamické molekulární studie bylo dokázáno, že přidání trehalózy do vody vede k dramatické reorganizaci vodíkových můstků. Trehalóza neinteraguje přímo s biomolekulou, ale bojuje s biomolekulou o dostupnou vodu v roztoku. Protektivní účinek trehalózy na biomakromolekuly je založen na redukci aktivity vody v roztoku (Jain *et Roy*, 2009).

Druhá teorie „glassy state theory“ je založená na tom, že cytoplasma zesklivatí, přechází do tzv. „glassy state“ (Burke, 1987). Tato hypotéza je široce přijímána pro vysvětlení protektivních účinků trehalózy. Během zesklivatění dochází ke zvyšování viskozity. Molekuly jsou zachyceny v tomto skle, nemůžou se volně pohybovat a díky tomu jsou stabilní i pod stresem (viz obr. č. 1) (Jain *et Roy*, 2009). Sklo tvořené jakoukoli látkou, může existovat v krystalické nebo amorfní formě. Krystalická forma má definovanou strukturu, stechiometrické složení a bod tání. Naopak amorfní forma nemá přesně definovanou strukturu. Teplota, při které se sklo mění zpět na roztok, se nazývá „glass transition temperature“ T_g (Buitink *et Leprince*, 2004). Trehalóza má v porovnání s maltózou, sacharózou či glukózou nejvyšší T_g . Samotná tvorba skla neochrání veškeré molekuly před degradací. K tomu je potřeba, aby trehalóza přímo reagovala s enzymy pomocí vodíkové vazby (Sun *et Davidson*, 1998).

Třetí teorie, „water layer hypothesis“, je založená na tom, že molekuly trehalózy vytvářejí obal kolem proteinu nebo DNA. Trehalózový obal vytváří vodíkové můstky s vodou zachycenou uvnitř obalu (viz obr. č. 1), tím redukuje množství vody, která reaguje s proteinem či DNA. Vzhledem k poklesu interakce vody s proteinem dochází ke zvýšení intraproteinových interakcí, které vedou ke stabilizaci nativní struktury proteinu. Dále bylo prokázáno, že trehalóza významně neredukuje konformační fluktuace proteinu v porovnání se systémem bez trehalózy (Liu *et al.*, 2005).



Obrázek č. 1: (a) „glassy state theory“ - trehalóza vytváří kolem proteinu obal, který zabraňuje abiotickému stresu, (b) „water layer hypothesis“ - trehalóza vytváří obal kolem proteinu a narušuje jeho solvatační obal, (c) „water replacement theory“ - dochází k vytvoření vodíkových můstků mezi trehalózou a molekulami vody, takže se méně molekul vody váže na protein (převzato z Jain *et al.*, 2009). Tyto tři teorie jsou aplikovatelné i na DNA (Zagon *et al.*, 2012).

4.2 Pullulan

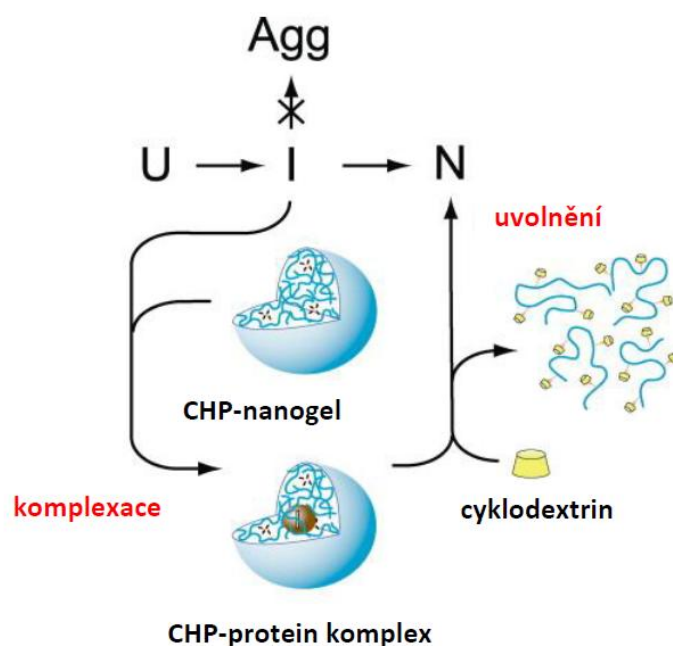
Velké množství mikroorganismů produkuje exopolysacharidy, které mohou zůstat přichycené k povrchu mikroorganismu ve formě amorfního slizu. Exopolysacharidy rozdělujeme na homopolysacharidy, tvořené jedním typem monosacharidů a heteropolysacharidy, tvořené více typy monosacharidů (Prajapati *et al.*, 2013). Dnes jsou intenzivně studovány tři exopolysacharidy – xanthan produkovaný *Xanthomonas campestris*, sukcinoglykan produkovaný *Rhizobium* a pullulan, který je produkovaný *Aureobasidium pullulans* (Singh *et al.*, 2008). Pullulan je neutrální lineární exopolysacharid (Rekha *et al.*, 2007). Tento polysacharid není rozvětvený a je dobře rozpustný jak ve studené, tak i teplé vodě. Skládá se z maltotriózových jednotek spojených pomocí α glykosidickými vazebami

(Nishimari *et al.*, 1991). Na konci řetězce se nacházejí v minoritě i tetrasacharidové jednotky jako jsou 6³- α -glukosylmaltotrióza a 6¹- α -maltotiosylglukóza (Catley, 1970). Pullulan je charakterizován strukturální flexibilitou a vysokou rozpustností díky pravidelnému střídání 1 \rightarrow 4 a 1 \rightarrow 6 glykosidické vazby (Singh *et al.*, 2008). Začíná se rozkládat při teplotě 280°C (Leathers, 2003). V závislosti na podmínkách v jakých roste *A. pullulans*, může mít pullulan molekulární hmotnost rovnou tisíci až dvěma milionům daltonů. Tento polysacharid je biodegradovatelný, neredukující, neproniká jím kyslík, není rozpustný v organických rozpouštědlech, je požitelný, není hygroskopický a po rozpuštění ve vodě vytváří průhledný film - viskózní roztok s adhezními vlastnostmi. Filmy vytvářené pullulanem jsou termostabilní a mají antistatické a elastické vlastnosti (Rekha *et Sharma*, 2007).

Pullulan je již 20 let využíván v potravinářském průmyslu (Rekha *et Sharma*, 2007). Využívá se jako obalový materiál na potraviny a někdy se nazývá jako „požitelný obal“, jelikož se konzumuje společně s obalenou potravinou. Pullulan slouží jako náhrada škrobu v jídlech i nápojích, aniž by byla změněna jejich chuť, konzistence a doba skladování (Cheng *et al.*, 2011). Dále se využívá v medicíně k cílenému dodání léků. Tento systém se osvědčil pro insulin, pullulanové nanočástice byly schopny ochránit insulin před enzymatickou degradací a zároveň zabránily agregaci insulinu (Aklyoshi *et al.*, 1998). Pullulan je dnes využíván ve farmakologickém průmyslu jako obalový materiál pro tablety, pilule či granule (Singh *et al.*, 2008).

4.2.1 Protektivní účinky

Pullulan je molekulárním chaperonem. Molekulární chaperony se vážou na protein a zabraňují jejich ireverzibilnímu shlukování. Pullulan zabraňuje nescifickému ireverzibilnímu shlukování proteinů, jelikož blokuje obnažené hydrofobní skupiny na proteinu, které slouží k agregaci proteinů, a napomáhá i tím skládání proteinu. Aby se pullulan choval jako bílkovinný chaperon, je nutné vytvořit amfifilní nanogel z cholesterolu a pullulanu (CHP). Hydrofobizovaný polysacharid spontánně vytváří hydrogelové nanočástice ve vodě pomocí intermolekulární asociace. Nanogely vytváří pevné komplexy s proteiny a enzymy rozpustnými ve vodě. Dokonce i tepelně denaturované proteiny se vážou na nanogel, kde dochází k jejich opětovnému složení do nativní formy a následně jsou tyto proteiny uvolněny z komplexu v nativní formě (viz obr. č. 2) (Nomura *et al.*, 2003).



Obrázek č. 2: Interakce CHP-nanogelu (cholesterolu a pullulanu) s rozvolněným proteinem a následně uvolnění z nanogelu v nativní formě, Agg – agregovaná forma proteinu, U – rozvolněná struktura proteinu, I – intermediální stav proteinu, N - nativní forma proteinu (převzato z Nomura *et al.*, 2003).

4.3 Xanthan

Xanthan byl objeven v 50. letech 20. století v Northern Regional Research Laboratories v USA. Pro své vlastnosti byl intenzivně studován a našel uplatnění v mnoha odvětvích. Je to mikrobiální extracelulární heteropolysacharid produkovaný *Xanthotomas campestris*. Tyto bakterie jsou gram negativní, mají polární flagelum a tyčinkovitý tvar (García-Ochoa *et al.*, 2000). Přestože je xanthan svým složením polysacharid, je nazýván gumou. Gumy jsou látky o vysoké molekulární hmotnosti s vysokou rozpustností ve vodě, kde vytváří gely či vysoce viskózní roztoky při nízkých koncentracích. Mnoho látek by se dalo označit za gumy, ale tento termín se běžně používá pro polysacharidy a jejich deriváty, které jsou produkovány rostlinami či mikroorganismy (Lopes *et al.*, 2015).

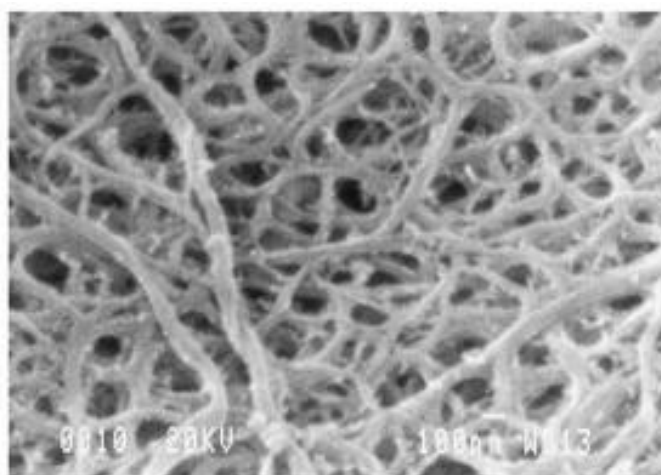
Xanthanová kostra se skládá ze tří až osmi monosacharidů, které mohou být rozvětvené. Přesné složení a rozvětvení závisí na podmínkách při produkci. Xanthanová guma se skládá z D-glukózy, D-manózy a D-glukoronové kyseliny (Borges *et Vendruscolo*, 2008). Primární kostra xanthanové gumy je tvořená β-D-glukózovými jednotkami spojených 1 → 4 glykosidickou vazbou, na C-3 každé druhé

glukózové jednotce v kostře se váže trisacharidový boční řetězec. Tento boční řetězec je tvořen glukuronovou kyselinou, která se váže 1 → 4 glykosidickou vazbou na terminální manózu a zároveň je navázána 1 → 2 glykosidickou vazbou k druhé manóze, která spojuje boční řetězec s kostrou (Jansson *et al.*, 1975). Manóza na začátku vedlejšího řetězce může být O-acetylovaná a manóza na konci bočního řetězce může být substituovaná pyruvátém. Sekundární struktura xanthanu se skládá z pěti helikálních otoček (Becker *et al.*, 1998).

Tato guma je stabilní ve velkém rozmezí pH hodnot, a z tohoto důvodu slouží jako emulgátor a zahušťovadlo. Zároveň je zcela biodegradovatelná a pro lidi nestravitelná, a proto se uplatnila v potravinářském průmyslu při snižování kalorické hodnoty potravin (Katzabauer, 1998). Ve farmaceutickém průmyslu je používána při výrobě tablet a její efekt je zpomalení uvolňování účinné látky do organismu (Talukdar *et al.*, 1995).

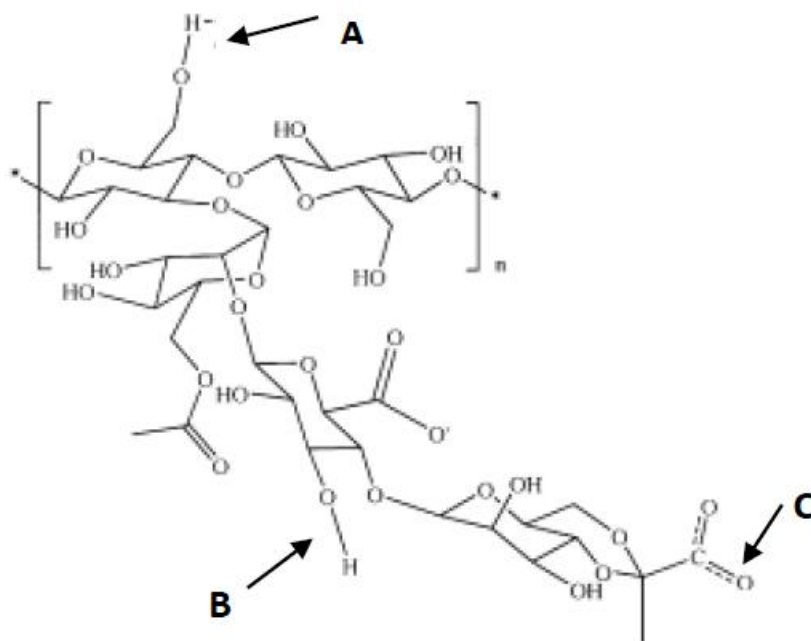
4.3.1 Protektivní účinky

Xanthan vytváří rozsáhlou síť v roztoku a tím zvyšuje jeho viskozitu (Rottava *et al.*, 2009), popř. může vytvářet i gel. Tyto polysacharidy jsou schopné adsorbovat kapičky vody díky hydrofilním residuím na svém povrchu a snižovat mezifázové pnutí a zachytit koloidní částice a stabilizovat disperzi. Koloidní částice jsou buď adsorbovány na povrchu, nebo jsou integrovány do síťové struktury (viz obr. č. 3) (Comba *et al.*, 2009). Xanthanové řetězce vytváří jeden, dva či tři helixy, které interagují s molekulou za vzniku komplexu (Bouyer *et al.*, 2013).



Obrázek č. 3: Vnitřní struktura xanthanového gelu pořízena elektronovým skenovacím mikroskopem při zvětšení 60 000x (převzato Dumitriu *et al.*, 1998).

Xanthanová guma je unikátní hydrokoloid, který je schopný stabilizovat emulze či suspenze škrobu pomocí vytvoření mikrogelových částic či nahromaděním xanthanových řetězců. Přidáním xanthanu se zvýší viskozita emulze či suspenze, zvýší se zgelovatění škrobu a dochází k interakci mezi gelatinovanými granulami a xanthanem. Xanthan interaguje se škrobem přítomným v roztoku pomocí neelektrostatických sil (viz obr. č. 4) (Noreña *et al.*, 2015). I při velmi nízkých koncentracích je roztok xanthanu velice viskózní, mobilita molekul DNA zachycených v roztoku se dramaticky snižuje, dochází k výraznému poklesu rychlosti chemických reakcí a to vede ke stabilizaci DNA (Rombach *et al.*, 2014).



Obrázek č. 4: Molekulární struktura xanthanu znázorňující možná místa interakce (A, B, C) s molekulami proteinu či DNA (převzato z Pongjanyakul *et Puttipatkhachorn*, 2007).

5 Experimentální část

5.1 Materiál

Pro experimentální část byla vybrána vyizolovaná DNA s referenčním číslem 12828, tato DNA pochází z buněčné linie HT-29. DNA byla skladována v mrazničce při -20°C.

5.2 Příprava roztoků

Jednotlivé roztoky trehalózy, pullulanu a xanthanu byly připraveny prostým rozpuštěním ve vodě za molekulárně biologických podmínek.

5.3 Design experimentů

Experiment byl rozdělen na dvě části: 1) na testování inhibice a 2) na testování stability. Při testování inhibice jsem zjišťovala, která koncentrace vykazuje minimální inhibici real-time PCR při zachování protektivních účinků. Vzestupné koncentrace aditiv byly nejprve testovány ihned po namíchání všech PCR reagensií. Poté byla PCR směs s DNA bez *Taq* polymerázy vysušena a po přidání vody a *Taq* polymerázy otestována pomocí real-time PCR.

V druhé části byly prováděny testy stability za zvolení dvou přístupů. Během prvního přístupu byly všechny vzorky najednou vysušeny a následně testovány po určitém časovém období. U druhého přístupu byly vzorky připravovány postupně a následně ve stejném čase otestovány. Každý z jednotlivých přístupů může vnést do testování určitou chybu (např. při použití reagensií z jiné šarže, příprava dalších roztoků sacharidů či použití přístrojů po určité časové prodlevě pro přípravu vzorků či jejich analýzu). Z tohoto důvodu byly v experimentální části provedeny obě tyto možnosti testování. Během testů stability byly vybrané koncentrace jednotlivých sacharidů či jejich kombinace společně s PCR mixem vysušeny ve vakuové odparce a následně skladovány za tmy v přítomnosti desikačního činidla. Přítomnost světla negativně ovlivňuje fluorescenční sondu, což by následně mohlo vést k falešně negativním výsledkům.

5.4 Real-time PCR

Real-time PCR je modifikací klasické PCR a postup je téměř identický jako u klasické PCR, jediným zásadním rozdílem mezi real-time PCR a klasickou PCR je přidání fluorescenční sondy do reakční směsi, které umožní vyhodnocení reakce v reálném čase na cykléru s fluorescenční detekcí. Pomocí fluorescenční sondy můžeme sledovat nárůst signálu během reakce a tím pádem i nárůst množství namnožené DNA v reakci.

Nejprve byla připravena reakční směs obsahující DNA, sacharid či jeho kombinace a následně byla provedena amplifikace dle definovaných podmínek za použití primerové směsi PM 408 a PM 337 (viz tab. č. 2 a 3).

1. Reakční směs byla připravena na chladicí podložce v 1,5ml mikrozkušavce dle tabulky č. 1, poté byla rozpipetována do jednotlivých 0,2ml PCR mikrozkušavek po 2 μ l. Pro PCR amplifikaci byly použity primerové směsi PM 408 a PM 337, sekvence primerů a způsob přípravy jsou uvedeny v tabulce č. 2 a 3.
2. K reakční směsi rozpipetované do 0,2ml PCR mikrozkušavek bylo připipetováno 8 μ l sacharidů (viz tab. č. 4)
3. Po napipetování reakční směsi a vzorku do mikrozkušavek pro PCR byla směs centrifugována a vzorky byly vloženy do termocykléru. Časový a teplotní profil real-time PCR je uveden v tabulce č. 5.

Tabulka č. 1: Jednotlivé složky reakční směsi pro real-time PCR.

<i>položka</i>	<i>koncentrace prac. roztoku</i>	<i>faktor ředění</i>	<i>konečná koncentrace</i>	<i>na 20 testů (μl)</i>
voda				91,47
PCR pufr	10x	10	1x	11,70
MgCl ₂	25 mM	16,6	1,5 mM	7,05
dNTPs	25 mM	125	0,2 mM	0,94
tween	1 %	100	0,01 %	1,17
PM 408	100/100/20 μ M	100	1/1/0,2 μ M	1,17
PM 337	45/45/9 μ M	150	0,3/0,3/0,06 μ M	0,78
Thermo <i>Taq</i> polymeráza	5 U/ μ l	100	0,05 U/ μ l	1,17
DNA	303 ng/ μ l	75	4 ng/ μ l	1,56
objem reakce	5 μ l		celkem	117,00

Tabulka č. 2: Nukleotidové sekvence primerové směsi PM 337 a poměr složek.

<i>primer</i>	<i>poměr</i>	<i>nukleotidové složení</i>
P 576	10 dílů	5' - TGTA AACGACGGCCAGTGCGCGAGCTCACCCAGAA - 3'
P 577	10 dílů	5' - CAGGAAACAGCTATGACCCTAACGTTTCGCCAGCCATA - 3'
P 574	2 díly	5' - TGTCCAGGTGAGCCAGGC - 3'

Tabulka č. 3: Nukleotidové sekvence primerové směsi PM 408 a poměr složek.

<i>primer</i>	<i>poměr</i>	<i>nukleotidové složení</i>
P 557	10 dílů	5' - AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA - 3'
P 678	10 dílů	5' - TCAGCAGCATCTCAGGGCCA - 3'
P 681	2 díly	5' - CCCATCAGTTTGAACAG - 3'

Tabulka č. 4: Použité sacharidy a jejich kombinace.

<i>sacharid</i>	<i>množství (μl)</i>
pullulan	8
trehalóza	8
xanthan	8

Tabulka č. 5: Časový a teplotní profil real-time PCR s PM 408 a PM 337.

<i>krok PCR</i>	<i>teplota</i>	<i>čas</i>	<i>opakování</i>
aktivace hot start polymerázy	95°C	15 min	1x
denaturace	95°C	15 s	50x
annealing	65°C	50 s	
elongace	72°C	20 s	
konec reakce	37°C	1 s	1x

5.5 Vysoušení

1. Reakční směs byla připravena na chladicí podložce v 1,5ml mikrozkušavce dle tab. č. 6, poté byla rozpipetována do jednotlivých 0,2ml PCR mikrozkušavek po 5 μl. Pro PCR amplifikaci byly použity primerové směsi PM 408 a PM 337, sekvence primerů a způsob přípravy jsou uvedeny v tabulce č. 2 a 3.
2. K reakční směsi rozpipetované do 0,2ml PCR mikrozkušavek bylo připipetováno 5 μl sacharidů či kombinace dvou sacharidů (viz tab. č. 7).
3. Po napipetování reakční směsi a vzorku do mikrozkušavek pro PCR byla směs centrifugována a vzorky byly vloženy do vakuové odparky, kde byly vysoušeny při 37°C.

4. Po vysušení vzorků ve vakuové odparce byly vzorky skladovány při pokojové teplotě v přítomnosti desikačního činidla a v obalu nepropouštějící světlo.
5. K vysušeným vzorkům byla napipetována směs vody a *Taq* polymerázy, směs byla rozpipetována po 9 μl (viz tab. č. 8).
6. Po napipetování směsi vody a *Taq* polymerázy ke vzorkům byla směs centrifugována a vzorky byly vloženy do termocykléru. Časový a teplotní profil real-time PCR znázorňuje tabulka č. 5.

Tabulka č. 6: Rozpis reakční směsi pro vysoušení.

<i>položka</i>	<i>koncentrace prac. roztoku</i>	<i>faktor ředění</i>	<i>konečná koncentrace</i>	<i>na 20 testů (μl)</i>
voda				92,64
PCR pufr	10x	10	1x	11,70
MgCl ₂	25 mM	16,6	1,5 mM	7,05
dNTPs	25 mM	125	0,2 mM	0,94
tween	1 %	100	0,01 %	1,17
PM 408	100/100/20 μM	100	1/1/0,2 μM	1,17
PM 337	45/45/9 μM	150	0,3/0,3/0,06 μM	0,78
DNA	303 ng/ μl	75	4 ng/ μl	1,56
objem reakce	5 μl		celkem	117,00

Tabulka č. 7: Použité sacharidy a jejich kombinace.

<i>sacharid</i>	<i>množství (μl)</i>	<i>sacharid</i>	<i>množství (μl)</i>
pullulan	5	-	-
trehalóza	5	-	-
xanthan	5	-	-
trehalóza	2,5	xanthan	2,5
pullulan	2,5	xanthan	2,5

Tabulka č. 8: Rozpis směsi vody a *Taq* polymerázy pro 10 vzorků.

<i>položka</i>	<i>množství (μl)</i>
voda	100
<i>Taq</i> polymeráza	2,1

5.6 Seznam použitých chemikálií

deionizovaná voda

Thermo-Start PCR buffer 10x (Thermo Scientific)

Magnesium chlorid 25mM (Thermo Scientific)

Thermo-Start *Taq* DNA polymerase 5U/μl (Thermo Scientific)

Tween 20 1%

Nuklelotidy dNTPs 25mM (Bioline)

PM 408

P 557 Sigma

P 678 Sigma

P 681 Sigma

PM 337

P 546 (Generi biotech) lot 1100z1

P 547 (Generi biotech) lot 1128t4

P 574 (Sigma)

Pullulan from *Aureobasidium pullulans*, CAS:9057-02-7 (Sigma Aldrich)

L(+)-Trehalose dihydrate, CAS:6138-23-4 (Sigma Aldrich)

Xanthan gum from *Xanthomonas campestris*, CAS:1138-66-2 (Sigma Aldrich)

ethanol 80%

DNA-ExitusPlus (AppliChem)

5.7 Přístrojové vybavení laboratoře

digitální váha Sartorius

NanoDrop Spectrophotometer ND-1000

vortex mixer (Labnet)

miniSpin centrifuga (Eppendorf)

mraznička (Gorenje)

laminární box Mars safet classe 2 (Trigon-plus)

Ligt cycler instrument II – I 480 (Roche)

stolní počítač

Centifuge 5430 (Eppendorf)

vakuová odparka Concentrator 5301 (Eppendorf)

5.8 Seznam použitých pomůcek

chladicí podložka

lihový fix

automatické pipety

mikrozkumavky: 1,5ml a 0,2ml

8-tube stripy a víčka na stripy

kádinka

ochranné rukavice

PCR mikrozkumavky

pinzeta

sterilní špičky

stojánek na mikrozkumavky

falkony

6 Výsledky

Byly připraveny různé roztoky sacharidů (viz tab. č. 9), které byly testovány pomocí real-time PCR. Tabulka znázorňuje připravené koncentrace sacharidů a následně jejich finální koncentrace po napipetování reakční směsi. Následně byla provedena další analýza, při které byly vzorky vysušeny. Po vysušení byly vzorky analyzovány pomocí real-time PCR a jako PCR kontrola byla vždy použita deionizovaná voda místo sacharidu (viz tab. č. 10, 11, 12, 13, 14, 15). Tyto hodnoty byly porovnány a následně byly vybrány koncentrace pro testování stability. Během testů stability bylo testováno, zda může být použita pro testy stability reakční směs obsahující všechny složky včetně *Taq* polymerázy. Avšak po přidání *Taq* polymerázy do směsi, která byla následně vysušena a poté analyzována, bylo pozorováno zpoždění signálu za kontrolou natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. Z tohoto důvodu směs obsahující *Taq* polymerázu před vysoušením nebyla použita pro testování stability.

Tabulka č. 9: Připravené roztoky sacharidů pro testování inhibice.

pullulan	<i>koncentrace [%]</i>							
<i>připravené koncentrace</i>	17,50	15,00	12,50	10,00	7,50	5,00	2,50	0,00
<i>finální koncentrace</i>	14,00	12,00	10,00	8,00	6,00	4,00	2,00	0,00
trehalóza								
<i>připravené koncentrace</i>	20,00	17,50	15,00	12,50	10,00	7,50	5,00	0,00
<i>finální koncentrace</i>	16,00	14,00	12,00	10,00	8,00	6,00	4,00	0,00
xanthan								
<i>připravené koncentrace</i>	20,00	10,00	5,00	2,50	1,25	0,70	0,33	0,00
<i>finální koncentrace</i>	16,00	8,00	4,00	2,00	1,00	0,50	0,25	0,00

6.1 Výsledky testu inhibice s nevysušenými reagensy

Prvním krokem při testech inhibice bylo testování nevysušené směsi a vyhodnocení získaných hodnot C_t jednotlivých roztoků. U roztoku pullulanu se se zvyšující koncentrací zvyšuje i hodnota C_t (viz tab. č. 10). Výrazné zvýšení hodnoty C_t bylo zjištěno u 10% koncentrace roztoku oproti nižším testovaným koncentracím.

Tabulka č. 10: Real-time PCR analýza roztoku pullulanu.

<i>koncentrace</i> [%]	C_t	C_t	C_t	C_t	\bar{C}_t	s
2	26,7	26,8	26,6	26,4	26,6	0,148
4	26,3	26,2	26,3	26,3	26,3	0,043
6	26,8	26,9	26,5	26,5	26,7	0,179
8	26,5	26,3	26,4	26,4	26,4	0,071
10	25,5	26,7	26,4	26,8	26,4	0,512
12	32,8	33,6	32,7	32,8	33,0	0,352
14	32,9	33,0	33,0	32,9	33,0	0,012
PCR kontrola (0)	26,8	27,1	27,0	26,7	26,9	0,160

C_t – cyklus prahu (cycle of treshold), \bar{C}_t – průměrná hodnota cyklu prahu, s – směrodatná odchylka

U 0,4% až 1% roztoků xanthanu bylo pozorováno, že se chovají jako enhancery PCR - hodnoty C_t jsou nižší než kontrolní C_t hodnota PCR kontroly, u 2% až 6% roztoku bylo zaznamenáno výrazné zvýšení hodnoty C_t oproti PCR kontrole (viz tab. č. 11).

Tabulka č. 11: Real-time PCR analýza roztoku xanthanu.

<i>koncentrace</i> [%]	C_t	C_t	C_t	C_t	\bar{C}_t	s
0,4	26,5	26,7	26,8	26,9	26,7	0,148
0,6	26,4	26,6	26,6	26,5	26,5	0,083
0,8	26,5	26,8	26,8	26,9	26,8	0,150
1,0	26,8	26,9	26,8	26,8	26,8	0,043
2,0	30,9	31,4	30,8	30,6	30,9	0,298
4,0	31,9	31,9	31,8	31,7	31,8	0,086
6,0	31,6	31,5	31,6	31,7	31,6	0,118
PCR kontrola (0)	27,2	26,8	27,0	27,2	27,0	0,169

C_t – cyklus prahu (cycle of treshold), \bar{C}_t – průměrná hodnota cyklu prahu, s – směrodatná odchylka

U 10% a 12% roztoku trehalózy bylo pozorováno, že se chovají jako enhancery PCR, hodnoty C_t jsou nižší než kontrolní hodnota C_t PCR kontroly. U 4% až 8%, 14% i 16% roztoku bylo zaznamenáno výrazné zvýšení hodnoty C_t oproti PCR kontrole (viz tab. č. 12).

Tabulka č. 12: Real-time PCR analýza roztoku trehalózy.

<i>koncentrace [%]</i>	C_t	C_t	C_t	C_t	\bar{C}_t	<i>s</i>
4	31,9	32,7	31,9	31,8	32,1	0,343
6	28,8	29,0	28,9	28,8	28,9	0,062
8	28,9	29,0	28,8	28,9	28,9	0,056
10	26,9	26,8	26,6	26,7	26,8	0,112
12	26,6	26,8	26,7	26,6	26,7	0,073
14	29,2	28,9	29,1	28,9	29,0	0,130
16	29,8	29,9	29,7	29,9	29,8	0,083
PCR kontrola (0)	27,3	27,0	27,0	27,2	27,1	0,135

C_t – cyklus prahu (cycle of treshold), \bar{C}_t – průměrná hodnota cyklu prahu, *s* – směrodatná odchylka

6.2 Výsledky testu inhibice s vysušenými reagensy

Při testování inhibice u roztoku pullulanu s nevysušenými reagensy bylo zjištěno, že hodnoty C_t vzrůstají se zvyšující se koncentrací roztoku. Avšak po vysušení bylo pozorováno, že 8% a 10% roztok pullulanu má nejnižší hodnoty C_t v porovnání s ostatními testovanými roztoky.

Tabulka č. 13: Real-time PCR analýza roztoku pullulanu.

<i>koncentrace [%]</i>	C_t	C_t	C_t	C_t	\bar{C}_t	<i>s</i>
2	27,8	27,7	27,8	27,6	27,7	0,083
4	27,9	27,5	27,8	27,8	27,8	0,150
6	27,9	27,6	27,9	27,8	27,8	0,122
8	26,5	26,4	26,2	26,3	26,4	0,112
10	26,7	26,8	26,4	25,5	26,3	0,507
12	33,2	33,3	33,2	33,1	33,2	0,071
14	33,0	33,2	33,3	33,2	33,2	0,109
PCR kontrola (0)	26,8	27,1	27,0	26,7	26,9	0,160

C_t – cyklus prahu (cycle of treshold), \bar{C}_t – průměrná hodnota cyklu prahu, *s* – směrodatná odchylka

Obdobně jako u testování inhibice s nevysušenými reagensy bylo zjištěno, že hodnoty C_t jsou nižší u 0,4% až 1% roztoku xanthhanu v porovnání s 2% až 6% roztokem (viz tab. č. 14).

Tabulka č. 14: Real-time PCR analýza roztoku xanthanu.

<i>koncentrace [%]</i>	C_t	C_t	C_t	C_t	\bar{C}_t	s
0,4	27,8	27,8	27,7	27,8	27,8	0,065
0,6	26,6	26,9	26,6	26,8	26,7	0,132
0,8	26,8	26,7	26,9	26,9	26,8	0,081
1,0	26,8	27,1	27,0	26,8	26,9	0,130
2,0	31,3	31,4	31,2	31,3	31,3	0,071
4,0	31,9	32,1	32,1	31,9	32,0	0,100
6,0	31,8	31,9	31,8	31,9	31,9	0,050
PCR kontrola (0)	29,8	30,0	29,9	30,0	29,9	0,083

C_t – cyklus prahu (cycle of treshold), \bar{C}_t – průměrná hodnota cyklu prahu, s – směrodatná odchylka

Obdobně jako u testování inhibice s nevysušenými reagenčními bylo pozorováno, že u 10% a 12% roztoku trehalózy jsou hodnoty C_t nižší v porovnání s ostatními získanými hodnotami C_t u 4% až 8%, 14% a 16% roztoku (viz tab. č. 15).

Tabulka č. 15: Real-time PCR analýza roztoku trehalózy.

<i>koncentrace [%]</i>	C_t	C_t	C_t	C_t	\bar{C}_t	s
4	32,3	32,0	32,1	32,4	32,2	0,158
6	29,2	29,3	28,9	29,0	29,1	0,158
8	28,8	29,3	29,2	28,8	29,0	0,228
10	26,9	26,7	26,8	26,8	26,8	0,071
12	26,7	26,7	26,8	26,5	26,7	0,109
14	29,1	29,9	30,3	30,2	29,9	0,471
16	29,9	29,8	30,0	30,3	30,0	0,187
PCR kontrola (0)	29,7	29,8	30,2	30	29,9	0,192

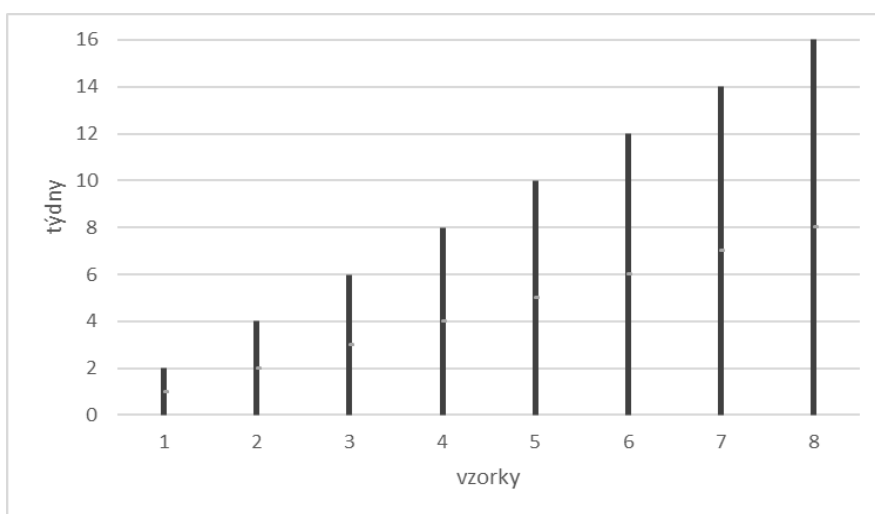
C_t – cyklus prahu (cycle of treshold), \bar{C}_t – průměrná hodnota cyklu prahu, s – směrodatná odchylka

Po provedení analýzy real-time PCR u všech vzorků bylo pro další testování vybráno 8 roztoků. Na základě hodnot C_t byly pro testování stability vybrány tyto sacharidy: pullulan 4% a 2%; xanthan; 0,4%, 0,6%, 0,8% a 1%; trehalóza 10% a 12%. Tyto roztoky byly testovány samostatně, ale i v kombinacích: trehalóza-xanthan a pullulan-xanthan.

6.3 Výsledky testu stability

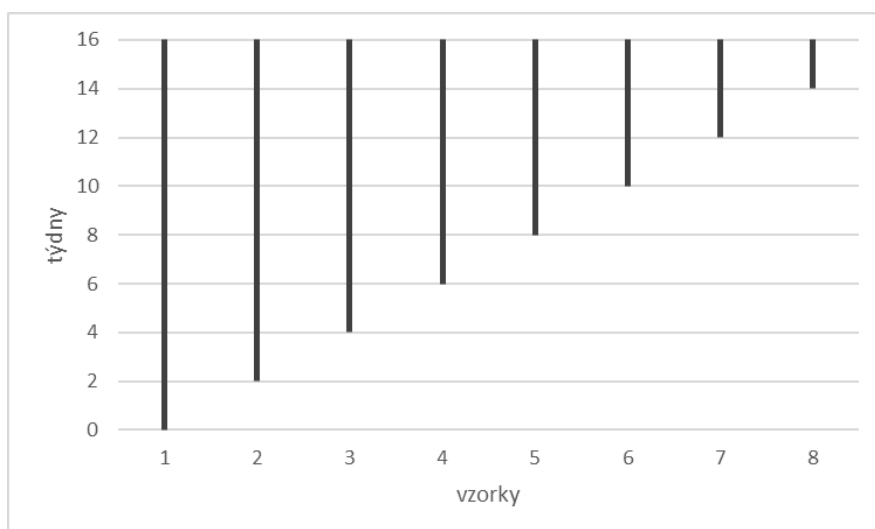
Testování stability bylo prováděno vždy po 2 týdnech, celková doba testování stability byla 16 týdnů. Pro testy stability byly zvoleny dva přístupy, přičemž během prvního přístupu byly všechny vzorky vysušeny zároveň a analýza byla prováděna postupně (viz graf. č. 1). Výsledky z této přípravy vzorků jsou uvedeny v tab. č. 16 a 17.

Graf č. 1: Schéma přípravy vzorků pro testování stability – první přístup.



Během druhého přístupu byly vzorky připravovány postupně a analýza byla provedena najednou (viz graf. č. 2), výsledky z této přípravy vzorků jsou uvedeny v tab. č. 18 a 19.

Graf č. 2: Schéma přípravy vzorků pro testování stability – druhý přístup.



V týdnu 2 byl analýzou vzorků shodně vyhodnocen 2% roztok pullulanu jako nejlepší protektivní agens, jehož hodnoty C_t byly rovny 25,7 a 25,8 (C_t hodnoty skladovací kontroly byly rovny 29,3 a 29,9; C_t hodnoty PCR kontroly 26,3 a 26,5) (viz tab. č. 16 a 18). V týdnu 4 byla provedena další analýza vzorků, během této doby bylo možné zaznamenat zvyšující se hodnoty C_t u vzorků v porovnání s druhým týdnem. Nejlepší protektivní účinek vykazoval 0,6% roztok xanthanu s C_t hodnotou 26,7 a 26,8 (C_t hodnoty skladovací kontroly byly rovny 30 a 29,8; C_t hodnoty PCR kontroly 26,7 a 26,5) (viz tab. č. 16 a 18). V týdnu 6 byl xanthan vyhodnocen jako nejlepší protektivní agens, ovšem prvním přístupem bylo zjištěno, že nejlepší je 1% roztok s C_t hodnotou 26,5 a druhým přístupem byl vyhodnocen jako nejlepší 0,6% roztok s C_t hodnotou 27,4 (C_t hodnoty skladovací kontroly byly rovny 30,1 a 30,1; C_t hodnoty PCR kontroly 26,9 a 26,7) (viz tab. č. 16 a 18). V týdnu 8 byl oběma přístupy vyhodnocen 0,6% roztok xanthanu jako nejlepší protektivní agens s C_t hodnotou 26,5 a 27,1 (C_t hodnoty skladovací kontroly byly rovny 37,8 a 37,8; C_t hodnoty PCR kontroly 26,6 a 26,5) (viz tab. č. 16 a 18). V týdnu 10 byl oběma přístupy vyhodnocen 1% roztok xanthanu jako nejlepší protektivní agens s C_t hodnotou 27,7 a 27,5. Zpoždění signálu u 4% roztoku pullulanu bylo natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu (C_t hodnoty skladovací kontroly byly rovny 38,3 a 38,6; C_t hodnoty PCR kontroly 26,4 a 26,4) (viz tab. č. 17 a 19). V týdnu 12 byl oběma přístupy vyhodnocen 1% roztoku xanthanu jako nejlepší protektivní agens s C_t hodnotou 28 a 28,1 (C_t hodnoty skladovací kontroly byly rovny 40,6 a 40,4; C_t hodnoty PCR kontroly 26,6 a 26,4) (viz tab. č. 17 a 19). Zpoždění signálu u 4% roztoku pullulanu bylo natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu.

V týdnu 14 byl prvním přístupem vyhodnocen jako nejlepší protektivní agens 2% roztok pullulanu s 0,6% roztokem xanthanu s C_t hodnotou 28,6 a druhým přístupem byl vyhodnocen jako nejlepší 4% roztok pullulanu v kombinaci s 0,4% roztokem xanthanu s C_t hodnotou 28,5 (C_t hodnoty skladovací kontroly byly rovny 42,6 a 42,5; C_t hodnoty PCR kontroly 26,6 a 26,4). Zpoždění signálu u 4% roztoku pullulanu, u 4% roztoku pullulanu s 0,8% roztokem xanthanu, u 4% roztoku pullulanu s 0,8% roztokem xanthanu, u 2% roztoku pullulanu s 0,8% roztokem xanthanu bylo natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. U 2% roztoku pullulanu s 0,6% roztokem xanthanu a u 2% roztoku pullulanu s 0,4% roztokem xanthanu připravených druhým přístupem bylo

detekováno zpoždění signálu natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu (viz tab. č. 17 a 19). V týdnu 16 byl 0,6% roztok xanthanu vyhodnocen jako nejlepší protektivní agens s C_t hodnotou 28,6 a 28,8 (C_t hodnoty skladovací kontroly byly rovny 44,9 a 44,9; C_t hodnoty PCR kontroly 26,7 a 26,7). Zpoždění signálu u směsi s 0,8% xanthanem, 12% trehalózou s 0,4% xanthanem, 10% trehalózou s 1% xanthanem bylo natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. U 1% roztoku xanthanu, u 4% roztoku pullulanu v kombinaci s 0,6% roztokem xanthanu připravených prvním přístupem bylo detekováno zpoždění signálu natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. U roztoku 4% pullulanu v kombinaci s 1% xanthanem připravených druhým přístupem bylo detekováno zpoždění signálu natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu (viz tab. č. 17 a 19).

Tabulka č. 16: Testy stability – první přístup.

sacharid	týden 2			týden 4			týden 6			týden 8		
	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s
T12%	27,3	1,1	0,319	28,7	2,2	0,987	29,9	3,0	1,401	29,7	3,1	0,826
T10%	26,5	0,2	0,440	29,3	2,8	1,225	29,7	2,8	1,817	28,7	2,1	0,952
P4%	25,3	1,0	0,656	28,1	1,6	2,028	30,3	3,4	0,415	30,1	3,5	0,399
P2%	25,7	-0,6	0,562	27,9	1,4	0,141	28,7	1,8	0,119	30,4	3,8	0,845
X1%	27,3	1,0	0,233	27,2	0,7	0,260	26,5	-0,4	0,383	28,9	2,3	0,043
X0,8%	27,8	1,5	0,112	27,5	1,0	1,407	28,0	1,1	0,867	28,2	1,6	2,216
X0,6%	26,7	0,4	0,381	26,7	0,2	0,110	27,2	0,3	0,434	26,5	-0,1	0,441
X0,4%	27,3	1,0	0,790	28,4	1,9	1,076	28,5	1,6	0,659	28,1	1,5	0,470
T12% X1%	27,3	1,0	0,226	27,0	0,5	1,022	27,9	1,0	1,023	27,4	0,8	1,274
T12% X0,8%	28,0	1,7	0,463	27,9	1,4	0,886	28,2	1,3	0,372	28,8	2,2	0,976
T12% X0,6%	28,2	1,9	1,329	29,8	3,3	0,500	29,4	2,5	0,336	29,6	3,0	0,335
T12% X0,4%	27,4	1,1	0,412	29,3	2,8	0,212	29,0	2,1	0,222	29,0	2,4	0,548
T10% X1%	27,6	1,3	1,350	28,6	2,1	0,190	28,4	1,5	0,349	30,8	4,2	0,615
T10% X0,8%	26,3	0,0	0,442	29,8	3,3	0,628	28,5	1,6	0,019	30,1	3,5	0,351
T10% X0,6%	28,8	2,5	1,911	28,8	2,3	0,736	28,7	1,8	0,079	29,1	2,5	0,286
T10% X0,4%	28,4	2,1	0,317	28,0	1,5	1,577	29,5	2,6	0,296	37,5	10,9	0,928
P4% X1%	26,6	0,3	0,086	27,5	1,0	0,891	29,8	2,9	0,866	28,6	2,0	0,819
P4% X0,8%	26,6	0,3	0,046	28,2	1,7	1,271	29,8	2,9	0,651	29,9	3,3	1,167
P4% X0,6%	26,5	0,2	0,164	30,8	4,3	2,547	30,2	3,3	0,897	28,1	1,5	0,815
P4% X0,4%	26,5	0,2	0,249	27,3	0,8	0,104	28,5	1,6	0,159	28,3	1,7	0,132
P2% X1%	26,2	-0,1	0,236	28,1	1,6	1,801	30,1	3,2	1,756	27,9	1,3	0,660
P2% X0,8%	26,4	0,1	0,461	26,8	0,3	0,482	28,3	1,4	1,104	29,2	2,6	0,293
P2% X0,6%	26,2	-0,1	0,140	27,2	0,7	0,700	29,7	2,8	0,615	29,9	3,3	0,147
P2% X0,4%	26,5	0,2	0,495	28,0	1,5	1,556	29,0	2,1	0,700	28,7	2,1	0,829
skl. kontrola	29,6	3,3	0,481	29,8	3,3	0,265	30,1	3,2	0,427	37,8	11,2	0,793
PCR kontrola	26,3	0,0	1,078	26,5	0,0	0,144	26,9	0,0	0,468	26,6	0,0	0,188

Ø Ct – průměrná hodnota prahového cyklu (threshold cycle), ΔCt – rozdíl v hodnotě prahového cyklu (threshold cycle), s – směrodatná odchylka,

skl. kontrola – skladovací kontrola

Tabulka č. 17: Testy stability – první přístup.

sacharid	týden 10			týden 12			týden 14			týden 16		
	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s
T12%	28,3	1,9	0,432	30,4	4,0	0,130	30,3	3,6	0,179	30,3	3,6	0,098
T10%	29,7	3,3	0,105	30,0	3,6	0,111	29,9	3,2	0,239	29,8	3,1	0,089
P4%	x	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
P2%	30,7	4,3	0,037	31,4	5,0	0,085	31,6	4,9	0,265	31,5	4,8	0,304
X1%	27,7	1,3	0,185	28,0	1,6	0,431	28,7	2,0	0,101	x	x	x
X0,8%	29,0	2,6	0,464	28,8	2,4	1,174	30,0	3,3	0,178	29,9	3,2	0,130
X0,6%	27,7	1,3	0,181	28,2	1,8	0,116	28,7	2,0	0,109	28,6	1,9	0,083
X0,4%	28,7	2,3	0,296	29,9	3,5	0,071	30,3	3,6	0,097	30,1	3,4	0,346
T12% X1%	29,7	3,3	0,200	29,7	3,3	0,082	29,6	2,9	0,091	29,9	3,2	0,282
T12% X0,8%	28,6	2,2	0,179	33,6	7,2	1,804	37,0	10,3	0,126	37,8	11,1	0,047
T12% X0,6%	29,5	3,1	0,236	32,9	6,5	0,769	33,3	6,6	0,254	34,0	7,3	0,179
T12% X0,4%	30,8	4,4	1,891	33,2	6,8	0,210	39,2	12,5	0,316	x	x	x
T10% X1%	35,5	9,1	0,652	38,5	12,1	0,337	39,3	12,6	0,622	x	x	x
T10% X0,8%	29,7	3,3	0,116	34,8	8,4	0,119	35,5	8,8	0,158	36,5	9,8	0,083
T10% X0,6%	28,8	2,4	0,039	30,0	3,6	0,273	30,7	4,0	0,312	32,2	5,5	0,335
T10% X0,4%	35,5	9,1	0,337	34,5	8,1	0,406	30,6	3,9	0,106	31,6	4,9	0,082
P4% X1%	28,6	2,2	1,748	37,0	10,6	0,468	35,6	8,9	0,180	37,6	10,9	0,183
P4% X0,8%	29,9	3,5	2,044	29,6	3,2	0,132	x	x	x	x	x	x
P4% X0,6%	28,6	2,2	0,209	30,1	3,7	0,212	36,6	9,9	0,301	x	x	x
P4% X0,4%	28,1	1,7	0,178	28,1	1,7	0,178	31,0	4,3	0,171	30,8	4,1	0,083
P2% X1%	27,7	1,3	0,711	27,8	1,4	0,103	28,9	2,2	0,173	29,0	2,3	0,135
P2% X0,8%	29,4	3,0	0,197	29,5	3,1	0,100	28,6	1,9	0,173	28,9	2,2	0,146
P2% X0,6%	31,8	5,4	0,551	32,8	6,4	0,057	29,7	3,0	0,229	30,3	3,6	0,097
P2% X0,4%	31,0	4,6	0,558	32,3	5,9	0,039	x	x	x	x	x	x
skl. kontrola	38,3	11,9	0,572	40,6	14,2	0,179	42,6	15,9	0,187	44,9	18,2	0,083
PCR kontrola	26,4	0,0	1,124	26,4	0,0	0,334	26,7	0,0	0,083	26,7	0,0	0,071

Ø Ct – průměrná hodnota prahového cyklu (threshold cycle), ΔCt – rozdíl v hodnotě prahového cyklu (threshold cycle), s – směrodatná odchylka,

skl. kontrola – skladovací kontrola

Tabulka č. 18: Testy stability – druhý přístup.

sacharid	týden 2			týden 4			týden 6			týden 8		
	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s
T12%	26,4	-0,1	0,300	29,7	3,0	0,112	28,5	1,8	0,283	29,7	3,2	0,192
T10%	25,9	-0,6	0,048	27,4	0,7	0,148	30,4	3,7	0,303	28,7	2,2	0,071
P4%	27,3	0,8	0,122	30,0	3,3	0,043	30,9	4,2	0,240	30,3	3,8	0,050
P2%	25,8	-0,7	0,219	27,6	0,9	0,224	27,5	0,8	0,122	30,3	3,8	0,192
X1%	27,7	1,2	0,112	27,8	1,1	0,109	27,5	0,8	0,061	27,1	0,6	0,112
X0,8%	26,9	0,4	0,091	27,1	0,4	0,235	27,2	0,5	0,349	28,9	2,4	0,339
X0,6%	27,7	1,2	0,132	26,8	0,1	0,096	27,4	0,7	0,115	27,1	0,6	0,268
X0,4%	29,8	3,3	0,065	27,8	1,1	0,043	27,5	0,8	0,080	29,9	3,4	0,114
T12% X1%	27,4	0,9	0,109	28,4	1,7	0,391	28,9	2,2	0,037	26,8	0,3	0,134
T12% X0,8%	28,0	1,5	0,229	30,0	3,3	0,043	28,4	1,7	0,525	28,3	1,8	0,293
T12% X0,6%	27,8	1,3	0,794	29,5	2,8	0,148	29,3	2,6	0,492	30,1	3,6	0,331
T12% X0,4%	27,4	0,9	0,411	28,7	2,0	0,122	28,9	2,2	0,190	29,6	3,1	0,862
T10% X1%	26,7	0,2	0,119	30,0	3,3	0,148	28,7	2,0	0,109	30,8	4,3	0,144
T10% X0,8%	26,6	0,1	0,321	28,7	2,0	0,238	28,5	1,8	0,096	29,6	3,1	0,273
T10% X0,6%	28,3	1,8	0,297	27,6	0,9	0,141	29,7	3,0	0,103	34,7	8,2	0,383
T10% X0,4%	26,7	0,2	0,109	30,0	3,3	0,043	29,7	3,0	0,464	28,8	2,3	0,192
P4% X1%	26,6	0,1	0,054	30,1	3,4	0,083	29,8	3,1	0,187	29,9	3,4	0,112
P4% X0,8%	26,7	0,2	0,109	27,2	0,5	0,268	30,1	3,4	0,258	28,8	2,3	0,217
P4% X0,6%	26,5	0,0	0,142	30,0	3,3	0,109	31,2	4,5	0,330	28,2	1,7	0,179
P4% X0,4%	26,3	-0,3	0,150	29,6	2,9	0,148	30,2	3,5	0,185	28,0	1,5	0,192
P2% X1%	26,3	-0,2	0,332	29,2	2,5	0,148	28,0	1,3	0,357	29,1	2,6	0,179
P2% X0,8%	26,2	-0,3	0,122	30,1	3,4	0,100	29,9	3,2	0,065	29,9	3,4	0,112
P2% X0,6%	26,5	0,0	0,217	30,0	3,3	0,109	28,7	2,0	0,350	28,9	2,4	0,112
P2% X0,4%	27,4	0,9	0,124	26,9	0,2	0,236	30,4	3,7	0,091	28,6	2,1	0,253
skl. kontrola	29,9	3,4	0,083	30,0	3,3	0,181	30,1	3,4	0,427	37,8	11,3	0,093
PCR kontrola	26,5	0,0	1,009	26,7	0,0	0,047	26,7	0,0	0,122	26,5	0,0	0,114

Ø Ct – průměrná hodnota prahového cyklu (threshold cycle), ΔCt – rozdíl v hodnotě prahového cyklu (threshold cycle), s – směrodatná odchylka,

skl. kontrola – skladovací kontrola

Tabulka č. 19: Testy stability – druhý přístup.

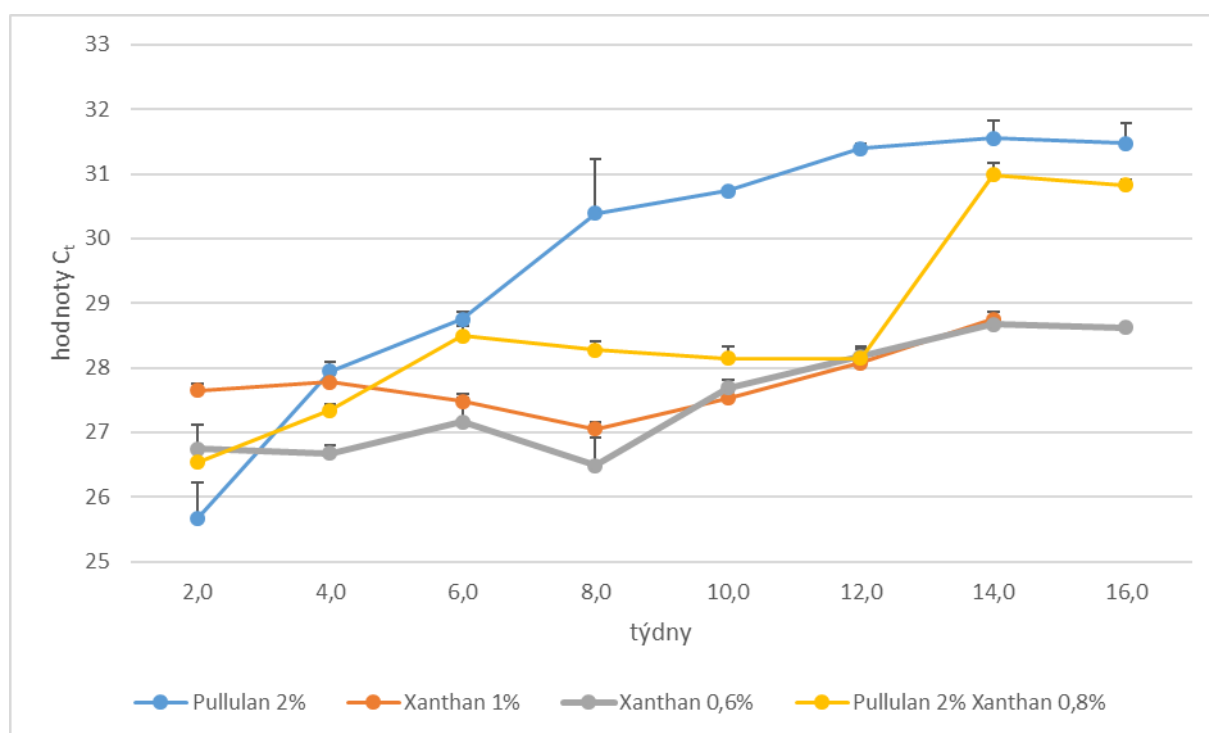
sacharid	týden 10			týden 12			týden 14			týden 16		
	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s	Ø Ct	ΔCt	s
T12%	28,4	2,0	0,112	30,1	3,5	0,149	30,3	3,7	0,148	30,2	3,5	0,109
T10%	29,7	3,3	0,130	29,9	3,3	0,083	29,9	3,3	0,187	30,2	3,5	0,112
P4%	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
P2%	31,8	5,4	0,112	31,4	4,8	0,093	32,2	5,6	0,341	30,6	3,9	0,252
X1%	27,5	1,1	0,109	28,1	1,5	0,214	28,8	2,2	0,112	30,0	3,3	0,187
X0,8%	30,2	3,8	0,772	28,9	2,3	1,193	30,4	3,8	0,119	x	x	x
X0,6%	27,6	1,2	0,145	28,2	1,6	0,114	28,7	2,1	0,162	28,8	2,1	0,074
X0,4%	28,0	1,6	0,561	30,0	3,4	0,148	30,2	3,6	0,109	30,2	3,5	0,369
T12% X1%	28,7	2,3	0,142	33,1	6,5	0,544	29,4	2,8	0,520	29,8	3,1	0,129
T12% X0,8%	28,6	2,2	0,504	33,3	6,7	0,767	36,5	9,9	0,050	37,6	10,9	0,160
T12% X0,6%	29,8	3,4	0,106	33,3	6,7	0,409	32,0	5,4	0,180	33,8	7,1	0,189
T12% X0,4%	28,9	2,5	0,228	38,5	11,9	0,187	39,9	13,3	0,093	x	x	x
T10% X1%	29,9	3,5	0,414	34,8	8,2	0,100	39,4	12,8	0,086	x	x	x
T10% X0,8%	29,6	3,2	0,288	30,0	3,4	0,149	36,4	9,8	1,718	36,5	9,8	0,187
T10% X0,6%	35,8	9,4	0,416	34,9	8,2	0,112	29,7	3,1	0,066	36,8	10,1	0,274
T10% X0,4%	28,9	2,5	0,228	37,1	10,5	0,524	35,6	9,0	0,201	37,8	11,1	0,270
P4% X1%	29,8	3,4	0,249	29,6	3,0	0,089	30,4	3,8	0,083	x	x	x
P4% X0,8%	28,7	2,3	0,109	30,0	3,4	0,041	x	x	x	x	x	x
P4% X0,6%	28,6	2,2	0,071	28,3	1,7	0,112	29,0	2,4	0,355	30,4	3,7	0,122
P4% X0,4%	28,5	2,1	0,269	28,7	2,1	0,083	28,5	1,9	0,083	29,3	2,6	0,439
P2% X1%	29,5	3,1	0,141	29,8	3,2	0,144	29,5	2,9	0,215	29,9	3,2	0,158
P2% X0,8%	31,3	4,9	0,083	32,8	6,2	0,054	x	x	x	x	x	x
P2% X0,6%	31,3	4,9	0,187	32,3	5,7	0,039	x	x	x	x	x	x
P2% X0,4%	31,2	4,8	0,496	30,4	3,8	0,192	x	x	x	x	x	x
skl. kontrola	38,6	12,2	0,131	40,4	13,8	0,071	42,5	15,9	0,192	44,9	18,2	0,130
PCR kontrola	26,4	0,0	1,118	26,6	0,0	0,130	26,6	0,0	0,130	26,7	0,0	0,050

Ø C_t – průměrná hodnota prahového cyklu (threshold cycle), ΔC_t – rozdíl v hodnotě prahového cyklu (threshold cycle), s – směrodatná odchylka,

skl. kontrola – skladovací kontrola

Graf č. 3 shrnuje nejlepší protektivní účinky sacharidů a jejich kombinací u prvního přístupu. Z tohoto grafu je patrné, že nejlepším protektivním agens v týdnu 2 byl 2% roztok pullulanu, v týdnech 4, 8 a 16 to byl 0,6% roztok xanthanu, v týdnech 6, 10 a 12 to byl 1% roztok xanthanu avšak v týdnu 16 bylo pozorováno zpoždění signálu u 1% roztoku xanthanu natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. V týdnu 14 byl nejlepším protektivním agens 2% roztok pullulanu v kombinaci s 0,8% roztokem xanthanu.

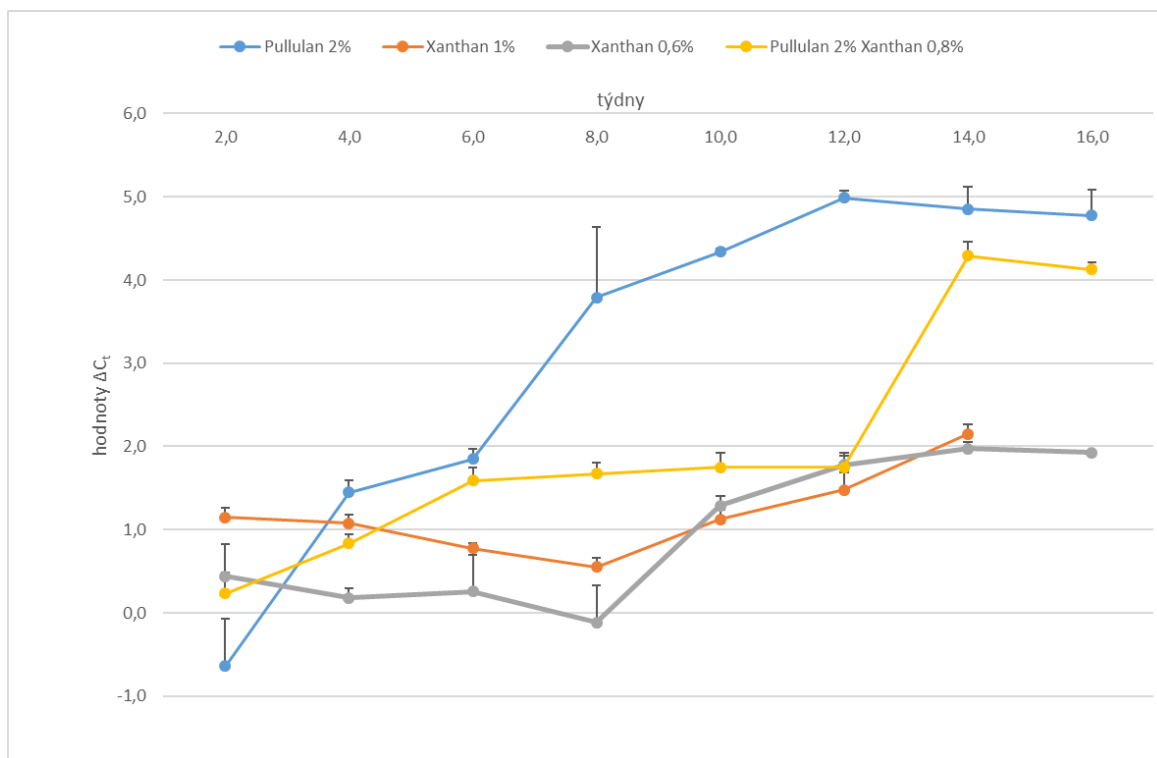
Graf č. 3: Vývoj hodnot C_t u sacharidů a jejich kombinací s nejlepším protektivním účinkem během testů stability – první přístup.



Graf. 4 zobrazuje vývoj hodnot ΔC_t u sacharidů či jejich kombinací připravených prvním způsobem, které vykazovaly nejlepší protektivní účinek v daném týdnu. U tohoto grafu je patrné, že nejlepším protektivním agens v týdnu 2 byl 2% roztok pullulanu a v tomto týdnu hodnota ΔC_t nabývá zápornou hodnotu. V týdnech 4, 8 a 16 byl nejlepším protektivním agens 0,6% roztok xanthanu, v týdnu 8 bylo pozorováno, že ΔC_t nabývá zápornou hodnotu. V týdnech 6, 10 a 12 byl nejlepším protektivním agens 1% roztok xanthanu, v týdnu 6 bylo pozorováno, že ΔC_t nabývá zápornou hodnotu. Avšak v týdnu 16 u 1% roztoku xanthanu bylo pozorováno zpoždění signálu natolik

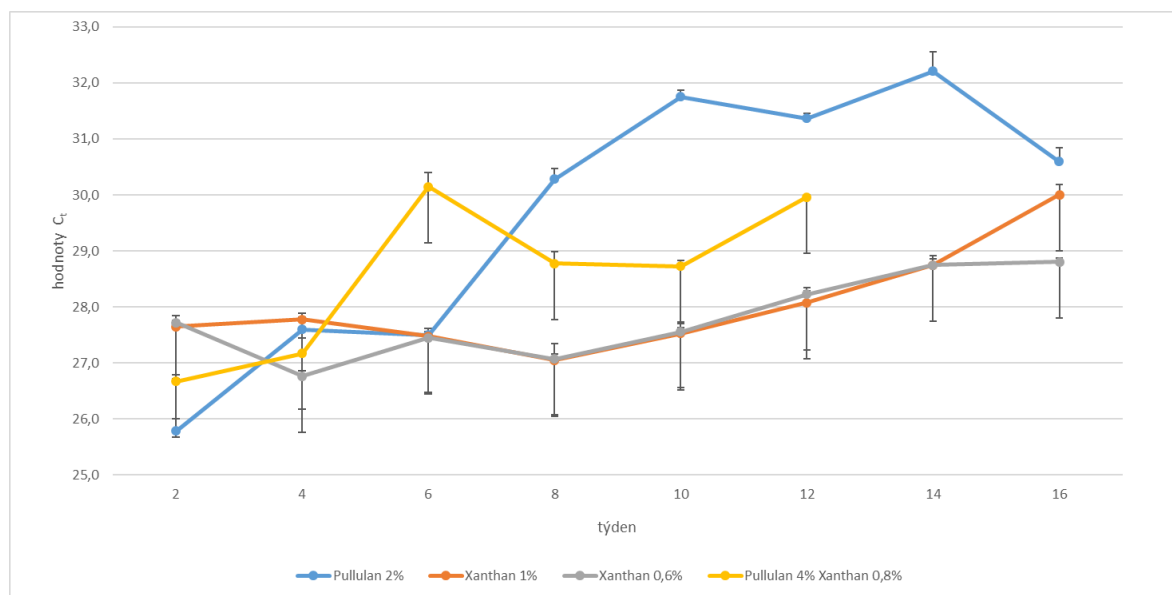
výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. V týdnu 14 byl nejlepší protektivní agens 2% roztok pullulanu v kombinaci s 0,8% roztokem xanthanu.

Graf č. 4: Vývoj hodnot ΔC_t u sacharidů a jejich kombinací s nejlepším protektivním účinkem během testů stability – první přístup.



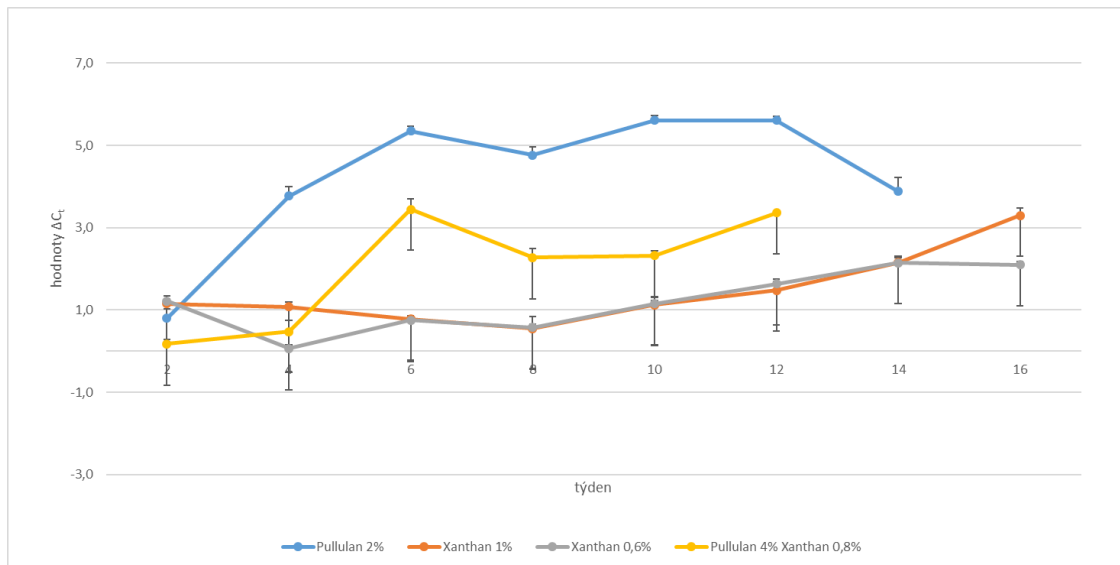
Graf č. 5 shrnuje nejlepší protektivní účinky sacharidů a jejich kombinací u druhého přístupu. Z tohoto grafu je patrné, že nejlepším protektivním agens v týdnu 2 byl 2% roztok pullulanu, týdnech 4, 6, 8 a 16 to byl 0,6% roztok xanthanu, v týdnech 10 a 12 to byl 1% roztok xanthanu, v týdnu 14 to byl 4% roztok pullulanu v kombinaci s 0,4% roztokem xanthanu.

Graf č. 5: Vývoj hodnot C_t u sacharidů a jejich kombinací s nejlepším protektivním účinkem během testů stability – druhý přístup.



Graf č. 6 zobrazuje vývoj hodnot ΔC_t u sacharidů či jejich kombinací připravených druhým způsobem, které vykazovaly nejlepší protektivní účinek v daném týdnu. U tohoto grafu je patrné, že nejlepším protektivním agens v týdnu 2 byl 2% roztok pullulanu a v tomto týdnu hodnota ΔC_t nabývá zápornou hodnotu. V týdnech 4, 6, 8 a 16 byl nejlepším protektivním agens 0,6% roztok xanthanu a hodnota ΔC_t nabývá kladnou hodnotu ve všech sledovaných týdnech. V týdnech 10 a 12 byl nejlepším protektivním agens 1% roztok xanthanu a hodnota ΔC_t nabývá kladnou hodnotu ve všech sledovaných týdnech. V týdnu 14 byl nejlepším protektivním agens 4% roztok pullulanu v kombinaci s 0,4% roztokem xanthanu, kde hodnota ΔC_t nabývá kladnou hodnotu ve všech sledovaných týdnech.

Graf č. 6: Vývoj hodnot ΔC_t u sacharidů a jejich kombinací s nejlepším protektivním účinkem během testů stability – druhý přístup.



7 Diskuze

Cílem experimentální části diplomové práce bylo najít vhodnou kombinaci a vhodnou koncentraci aditiv, které by stabilizovaly PCR reagentie pro skladování při pokojové teplotě.

Při testování inhibice byla používána Thermo *Taq* polymeráza. Během testů inhibice byly testovány dvě reakční směsi, jedna obsahující *Taq* polymerázu a druhá neobsahující *Taq* polymerázu. Po vysušení vzorků proběhla real-time PCR analýza. Ke vzorkům, jejichž reakční směs neobsahovala *Taq* polymerázu, byla přidána *Taq* polymeráza a voda. Ke vzorkům, jejichž směs již obsahovala *Taq* polymerázu, se přidala pouze voda. U vzorků, jejichž směs již obsahovala *Taq* polymerázu bylo pozorováno zpoždění signálu za kontrolou natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. Chua *et al.* (2011) ve své publikaci uvádí, že trehalóza je schopná stabilizovat směs obsahující vodu, DNA teplát a *GoTaq* DNA polymerázu po dobu 7 měsíců při 24 °C, avšak nevýhodou je nižší senzitivita než u klasicky provedené PCR. Na základě těchto poznatků pro prokázání protektivních účinků trehalózy či jiných testovaných sacharidů by bylo nutné otestovat všechny dostupné polymerázy a jejich modifikace. Z výsledků získaných v této práci bylo zjištěno, že ani trehalóza, pullulan nebo xanthan nevykazují protektivní účinky k Thermo *Taq* polymeráze.

Na základě získaných dat během testů inhibice bylo vybráno celkem 8 roztoků xanthanu, pullulanu a trehalózy, které byly dále analyzovány během testů stability, pullulan 2% a 4%; xanthan 0,4%; 0,6%, 0,8% a 1%; trehalóza 10% a 12%. Tyto roztoky byly testovány samostatně, a v kombinacích trehalóza-xanthan a pullulan-xanthan.

Při provádění testů stability bylo zjištěno, že testované koncentrace pullulanu 2% a 4%; xanthanu 0,4%; 0,6%, 0,8% a 1%; trehalózy 10% a 12% či jejich kombinace pullulan-xanthan a trehalóza-xanthan poskytují lepší výsledek v porovnání se skladovací kontrolou (jako skladovací kontrola byla používána reakční směs s vodou místo sacharidu). Ovšem od týdne 10 bylo zaznamenáno, že u některých sacharidů či jejich kombinací je zpoždění signálu za kontrolou natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. Konkrétně se jedná o 4% roztok pullulanu (od týdne 10 až do týdne 16), o 4% roztok pullulanu s 0,8% roztokem xanthanu, 4% roztok pullulanu s 0,8% roztokem xanthanu a

2% roztok pullulanu s 0,8% roztokem xanthanu (od týdne 14 až do týdne 16), 2% roztok pullulanu s 0,6% roztokem xanthanu a u 2% roztoku pullulanu s 0,4% roztokem xanthanu (pouze u vzorků připravených druhým přístupem, od týdne 14 až do týdne 16), o 0,8% roztok xanthanu, 12% roztok trehalózy s 0,4% roztokem xanthanu, 10% roztok trehalózy s 1% roztokem xanthanu (týden 16), o 1% roztoku xanthanu, u 4% roztoku pullulanu v kombinaci s 0,6% roztokem xanthanu (pouze u vzorků připravených prvním přístupem, týden 16), o 4% roztok pullulanu v kombinaci s 1% roztokem xanthanu (pouze u vzorků připravených druhým přístupem, týden 16).

Po porovnání všech získaných dat z prvního i druhého přístupu, bylo zjištěno, že nejlepším protektivním agens je xanthan. 0,6% roztok xanthanu byl vyhodnocen jako nejlepší protektant v týdnech 4, 8 a 16 u prvního přístupu a v týdnech 4, 6, 8 a 16 u druhého přístupu. Dále byl vyhodnocen 1% roztok xanthanu jako protektant v týdnech 6, 10 a 12 (avšak v týdnu 16 bylo pozorováno zpoždění signálu u 1% roztoku xanthanu natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu) u prvního přístupu a v týdnech 10 a 12 u druhého přístupu. Rombach *et al.* (2014) ve své publikaci uvedl, že roztok xanthanu je možno použít jako protektivní agens u fluorescenčně značených sond a primerů používaných při PCR analýzách. Jahanshahi-Anbuhi *et al.* (2014) ve své publikaci uvádí, že se roztok pullulanu chová jako protektivní agens vůči *Taq* DNA polymeráze i DNA po dobu 50 dní. Při testech stability nebylo prokázáno, že by pullulan stabilizoval *Taq* polymerázu, přestože byly použity shodné koncentrace (10% a 12% roztok). Avšak od týdne 10 (70 dní) nevykazoval již protektivní účinky. Na základě získaných dat byl 4% roztok pullulanu vyhodnocen jako nejhorší protektivní agens, jelikož od týdne 10 do týdne 16 bylo pozorováno zpoždění signálu natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu. Ačkoli byl v týdnu 2 u obou přístupů shodně vyhodnocen jako nejlepší protektivní agens.

V dnešní době jsou na trhu přítomné i komerčně dostupné kity pro stabilizaci DNA, jedním takovým je DNASTABLE®. Tento kit umožňuje krátkodobé skladování DNA v kapalně formě nebo dlouhodobé uchování DNA ve vysušené formě. Takto připravenou DNA je možno skladovat či zasílat při pokojové teplotě, následně takto připravené vzorky mohou být použity k „downstream“ aplikacím (<http://biomatrica.com>). Ivanova *et al.* Kuzmina (2013) ve své práci porovnávaly DNASTABLE® s trehalózou a polyvinylalkoholem. Z testů vyplynulo, že nejlepší

protektivní účinky na DNA po dobu dvou let má DNASTable® v porovnání s 10% roztokem trehalózy a 1% roztokem PVA. Ovšem v této práci se porovnávaly protektivní účinky na DNA, nikoliv na celou reakční směs používanou při PCR analýze.

Na základě získaných dat je možné usuzovat, že 4% roztok pullulanu vykazuje protektivní účinky do 10 týdnů, proto není vhodný pro dlouhodobé skladování reagentů a DNA. Pro průkazné ověření protektivních účinků 0,6% roztoku xanthanu by bylo vhodné prodloužit testy stability nejméně na jeden rok, avšak vzhledem k rozsahu této práce nebylo možné tato data získat. Alternativou ke klasickému přístupu by bylo možné využití Arrheniova modelu, jako byl použit Clermont *et al.* (2014), kde zkoumali protektivní účinky trehalózy.

8 Závěr

V rámci diplomové práce byla vypracována literární rešerše podle dostupné literatury na téma „Stabilizace PCR reagensů při pokojové teplotě“. V teoretické části byly zmíněny limitace reagensů používaných při PCR analýze. V této části byla zmíněna alternativní možnost skladování DNA při pokojové teplotě ve formě FTA karty či ve formě vysušeného prášku (vysoušení DNA pomocí lyofilizace, sprejování za pokojové či snížené teploty) ke klasickému skladování DNA v mrazničce. Dále byly zmíněné tři sacharidy – trehalóza, pullulan a xanthan, u kterých byly prokázány protektivní účinky na proteiny či DNA skladovaných při pokojové teplotě. S těmito třemi sacharidy byly prováděny testy inhibice a stability v experimentální části diplomové práce.

V experimentální části diplomové práce byly prováděny nejprve testy stability. Byla testována PCR směs obsahující *Taq* polymerázu, ale i PCR neobsahující *Taq* polymerázu. Na základě testů inhibice bylo odhaleno, že směs obsahující *Taq* polymerázu není vhodná pro testy stability. Celkově bylo připraveno vždy sedm roztoků od každého ze sacharidů a na základě výsledků z testů inhibice bylo vybráno 8 koncentrací - pullulan 4% a 2%; xanthan 1%; 0,8%, 0,6% a 0,4%; trehalóza 10% a 12%. Tyto roztoky byly testovány samostatně, ale i v kombinacích: trehalóza-xanthan a pullulan-xanthan. Testy stability odhalily, že po 16 týdnech skladování při pokojové teplotě a za tmy vykazuje nejlepší protektivní účinek 0,8% roztok xanthanu a naopak nejhorší protektivní účinek vykazuje 4% roztok pullulanu, u kterého již v týdnu 10 bylo zaznamenáno zpoždění signálu natolik výrazné, že se dostalo mimo detekční rozsah PCR protokolu.

9 Seznam použitých zkratk

DNA	deoxyribonukleotidová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	deoxynukleotid triosfátu
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleotidová kyselina (double stranded deoxyribonucleic acid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
IVD	<i>in vitro</i> diagnostika
IVD-CE	<i>in vitro</i> diagnostická certifikace
kb	kilobáze (kilobase)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PVA	polyvinylalkohol
RNA	ribonukleotidová kyselina (ribonucleic acid)
SOP	standardní operační postup (standard operating procedure)
ssDNA	jednořetězcová deoxyribonukleotidová kyselina (single stranded deoxyribonucleic acid)
TE pufr	Tris/EDTA pufr (Tris/EDTA buffer)

10 Seznam použité literatury

Adams R. P., Kendall E., Kartha K. K. (1990) Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18(2), 107-110.

Akiyoshi K., Kobayashi S., Shichibe S., Mix D., Baudys M., Kim S. W., Sunamoto J. (1998) Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin. *Journal of Controlled Release*, 54(3), 313-320.

Arezi B., Xing W., Sorge J. A., Hogrefe, H. H. (2003) Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Analytical biochemistry*, 321(2), 226-235.

Becker A., Katzen F., Pühler A., Ielpi, L. (1998) Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 145-152.

Bhaganna L. R., Volkens R. J. M., Bell A. N. W., Kluge K., Timson D. J., Ruijsenaars H. J., McGrath J. W. (2010) Hydrophobins substances induce water stress in microbial cells. *Microbial biotechnology*, 3(6), 701-716.

Borges, C. D., Vendruscolo C. T. (2008) Xanthan synthesized by strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: production, viscosity and chemical composition. *Bioscience Journal*, 23(4).

Bouyer E., Mekhloufi G., Huang N., Rosilio V., Agnely F. (2013) β -Lactoglobulin, gum arabic, and xanthan gum for emulsifying sweet almond oil: formulation and stabilization mechanisms of pharmaceutical emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 433, 77-87.

Buitink J., Leprince O. (2004) Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology*, 48(3), 215-228.

Burgos J. S., Ramírez C., Tenorio R., Sastre I., Bullido M. J. (2002) Influence of reagents formulation on real-time PCR parameters. *Molecular and cellular probes*, 16(4), 257-260.

Burke M. J. (1987) The glassy state and survival of anhydrous systems. *Membranes, metabolism and dry organisms*. Cornell University Press, Ithaca, NY, 359-365.

Catley B. J. (1970) Pullulan, a relationship between molecular weight and fine structure. *FEBS letters*, 10(3), 190-193.

Clermont D., Santoni S., Saker S., Gomard M., Gardais E., Bizet C. (2014) Assessment of DNA encapsulation, a new room-temperature DNA storage method. *Biopreservation and biobanking*, 12(3), 176-183.

Colaco C., Roser B. (1995) Trehalose-a multifunctional additive for food preservation. *Food packaging and preservation*. Springer US, 1994. p. 123-140.

Comba S., and Sethi R. (2009) Stabilization of highly concentrated suspensions of iron nanoparticles using shear-thinning gels of xanthan gum." *Water research* 43.15, 3717-3726.

Corradini M. G., Peleg, M. (2007) Shelf-life estimation from accelerated storage data. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 37-47.

Crowe, J. H., Carpenter J. F., Crowe L. M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 60(1), 73-103.

Danlu T., Trusler J. P. M, Vega-Maza D. (2013) Solubility of CO₂ in aqueous solutions of CaCl₂ or MgCl₂ and sythetis formation brine at temperature up to 423 K and pressure up to 40 MPa. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 58 (7), 2116-2124.

Dieffenbach C. W., Lowe T. M., Dveksler, G. S. (1993) General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*, 3(3), S30-S37.

do Vale Morais A. R., do Nascimento Alencar É., Júnior F. H. X., de Oliveira C. M., Marcelino H. R., Barratt G., Fessid H., Tabosa E. S., Elaissari, A. (2016) Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 503(1), 102-114.

Dobbs L. J., Madigan M. N., Carter A. B., Earls L. (2002) Use of FTA gene guard filter paper for the storage and transportation of tumor cells for molecular testing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 126(1), 56.

Dumitriu S., Chornet E. (1998) Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Advanced drug delivery reviews*,31(3), 223-246.

Elbein A. D., Pan Y. T., Pastuszak I., Carroll, D. (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.

El-Sheshtawy R. I., Sisy G. A., El-Nattat, W. S. (2015) Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 26-31.

Ferralli P., Egan J. D., Erickson F. L. (2007) Making Taq DNA polymerase in the undergraduate biology laboratory. *Bios*, 78(2), 69-74.

Ferrer I., Armstrong J., Capellari S., Parchi P., Arzberger T., Bell, J., Bogdanovic, N. (2007) Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain pathology*, 17(3), 297-303.

Fujiwara A., Kawato K., Kato, S., Yasukawa K., Hidese R., Fujiwara, S. (2016) Enzyme characteristics of an euryarchaeota specific helicase from *Thermococcus kodakarensis* and its application for noise reduction in PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-04116.

Garcia-Ochoa F., Santos V. E., Casas J. A., Gomez E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology advances*, 18(7), 549-579.

Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.

Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H. (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23(3), 504-511.

<http://biomatrica.com/dnastable.php> [citováno 2016-07-12, 16:30 EST]

<http://www.ampliqon.com/media/25844/25%20mm%20mgcl2.pdf> [citováno 2016-01-20, 15:30 EST]

http://www.bioline.com/us/downloads/dl/file/id/1191/the_definitive_guide_to_dntp.pdf [citováno 2016-01-21, 16:30 EST]

<http://www.bioline.com/us/mgcl2-solution.html> [citováno 2016-01-20, 15:30 EST]

<http://www.ce-marking.org/directive-9879ec-IVD-MD.html> [citováno 2016-04-2, 14:30 EST]

<http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/IVDRegulatoryAssistance/ucm123682.htm#2> [citováno 2016-04-2, 12:30 EST]

<https://www.qiagen.com/cz/shop/pcr/end-point-pcr-enzymes-and-kits/regular-pcr/toptaq-dna-polymerase/#orderinginformation> [citováno 2016-01-21, 17:30 EST]

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0191>[citováno 20. ledna 2016]

Hube F., Reverdiau P., lochmann S., Gruel Y. (2005) Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Molecular biotechnology*,31(1), 81-84.

Chase M. W., Hills H. H. (1991) Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, 215-220.

Cheng K. C., Demirci A., Catchmark J. M. (2011) Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(1), 29-44.

Chua A. L., Elina H. T., Lim B. H., Yean C. Y., Ravichandran M., Lalitha P. (2011) Development of a dry reagent-based triplex PCR for the detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae*. *Journal of medical microbiology*,60(4), 481-485.

Ivanova N. V., Kuzmina, M. L. (2013) Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature. *Molecular ecology resources*, 13(5), 890-898.

Jahanshahi-Anbuhi S., Pennings K., Leung V., Liu M., Carrasquilla C., Kannan B., Li Y., Pelton R., Brennan J. D., Filipe, C. D. (2014) Pullulan encapsulation of labile biomolecules to give stable bioassay tablets. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(24), 6155-6158.

Jain N. K., Roy I. (2009) Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 18(1), 24-36.

Jain N. K., Roy I. (2009) Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 18(1), 24-36.

Jansson P. E., Kenne L., Lindberg B. (1975) Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, 45(1), 275-282.

Kaboev O. K., Luchkina L. A., Treťiakov A. N., Bahrmand A. R. (2000) PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure). *Nucleic acids research*, 28(21), e94-e94.

Katzbauer B. (1998) Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1), 81-84.

Kaushik J. K., Bhat R. (2003) Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26458-26465.

Kelso G. F., Kazi, S. A. Harris S. J., Boysen R. I., Chowdhury J., Hearn M. T. (2016) Impact on monoclonal antibody production in murine hybridoma cell cultures of adenosine receptor antagonists and phosphodiesterase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(2), 540-544.

Kermekchiev M. B., Kirilova L. I., Vail E. E., Barnes W. M. (2009) Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic acids research*, gkn1055.

Kermekchiev M. B., Tzekov A., Barnes W. M. (2003) Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR. *Nucleic acids research*, 31(21), 6139-6147.

Knies J. L., Kingsolver J. G. (2010) Erroneous Arrhenius: modified Arrhenius model best explains the temperature dependence of ectotherm fitness. *The American Naturalist*, 176(2), 227.

Kotikalapudi, R., Patel R. K. (2015) Comparative Study of The Influence of EDTA and Sodium Heparin on Long Term Storage of Cattle DNA. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17(1), 181–186.

Kotikalapudi, R., Patel, R. K. (2015) Comparative Study of The Influence of EDTA and Sodium Heparin on Long Term Storage of Cattle DNA. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17(1), 181.

Kuo J. H. S., Hwang R. (2004) Preparation of DNA dry powder for non-viral gene delivery by spray-freeze drying: effect of protective agents (polyethyleneimine and sugars) on the stability of DNA. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(1), 27-33.

Leathers T. D. (2003) Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5-6), 468-473.

Leung S. S., Parumasivam T., Gao F. G., Carrigy N. B., Vehring R., Finlay W. H., Morales S., Britton W. J, Kutter E., Chan, H. K. (2016) Production of inhalation phage powders using spray freeze drying and spray drying techniques for treatment of respiratory infections. *Pharmaceutical Research*, 1-11.

Lins R. D., Pereira C. S., Hünenberger P. H. (2004) Trehalose–protein interaction in aqueous solution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(1), 177-186.

Liu R., Barkhordarian H., Emadi S., Park C. B., Sierks M. R. (2005) Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiology of disease*, 20(1), 74-81.

Lopes B., Lessa V. L., Silva B. M., Marco A. F., Schnitzler E., Lacerda L. G. (2015) Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of Food & Nutrition Research*, 54(3).

Lou J. J., Mirsadraei L., Sanchez D. E., Wilson R. W., Shabihkhani M., Lucey G. M., Wei B., Singer E. J., Marenikov S., Yong W. H. (2014) A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories. *Clinical biochemistry*, 47(4), 267-273.

Louwrier A., van der Valk A. (2005) Thermally reversible inactivation of Taq polymerase in an organic solvent for application in hot start PCR. *Enzyme and microbial technology*, 36(7), 947-952.

Maa Y. F., Nguyen P. A., Sweeney T., Shire S. J., Hsu C. C. (1999) Protein inhalation powders: spray drying vs spray freeze drying. *Pharmaceutical research*, 16(2), 249-254.

Mannonen S., Riikonen S. (2006) In Vitro Diagnostics (IVD) compliance and what it means in practice. *American Biotechnology Laboratory* 24.: 18.

McCord B., Opel K., Funes M., Zoppis S., Meadows Jantz L. (2011) An investigation of the effect of DNA degradation and inhibition on PCR amplification of single source and mixed forensic samples. *US Department of Justice*, 1-66.

Moelbert S., Normand B., De Los Rios P. (2004) Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophysical chemistry*, 112(1), 45-57.

Mohammed S., Birhan G., Admassu B., Shite A., Yeneneh H. (2015) Review on Polymerase Chain Reaction and its Diagnostic Merit Over Conventional Techniques in Animal Disease. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 7(5), 262-281.

Moussaid S., Domínguez-Ferreras A., Muñoz S., Aurag J., Sanjuán, J. (2015) Increased trehalose biosynthesis improves *Mesorhizobium ciceri* growth and symbiosis establishment in saline conditions. *Symbiosis*, 1-9.

Nilsson J., Bosnes M., Larsen F., Nygren P. A., Uhlen M., Lundeberg, J. (1997) Heat-mediated activation of affinity-immobilized Taq DNA polymerase. *Biotechniques*, 22(4), 744-751.

Nishinari K., Kohyama K., Williams P. A., Phillips G. O., Burchard W., Ogino K. (1991) Solution properties of pullulan. *Macromolecules*, 24(20), 5590-5593.

Nomura Y., Ikeda M., Yamaguchi N., Aoyama, Y., Akiyoshi K. (2003) Protein refolding assisted by self-assembled nanogels as novel artificial molecular chaperone. *FEBS letters*, 553(3), 271-276.

Noreña C. P. Z., Bayarri S., Costell E. (2015) Effects of Xanthan Gum Additions on the Viscoelasticity, Structure and Storage Stability Characteristics of Prebiotic Custard Desserts. *Food Biophysics*, 10(2), 116-128.

Ohtake S., Wang Y. J. (2011) Trehalose: current use and future applications. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(6), 2020-2053.

Okado N., Hasegawa K., Mizuhashi F., Lynch B. S., Vo T. D., Roberts A. S. (2016) Safety evaluation of nuclease P1 from *Penicillium citrinum*. *Food and Chemical Toxicology*, 88, 21-31.

Pongjanyakul T., Puttipatkhachorn S. (2007) Xanthan–alginate composite gel beads: molecular interaction and in vitro characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(1), 61-71.

Post R. J., Flook P. K., Millest A. L. (1993) Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical systematics and ecology*, 21(1), 85-92.

Ppyun H., Kim S. H., Youn M. H., Cho S. S., Kwon, K. M., Kweon D. H., & Kwon, S. T. (2016) Improved PCR performance and fidelity of double mutant Neq A523R/N540R DNA polymerase. *Enzyme and microbial technology*, 82, 197-204.

Prajapati V. D., Jani G. K., Khanda S. M. (2013) Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 540-549.

Rabenau H. F., Kessler H. H., Kortenbusch M., Steinhorst A., Raggam R. B., Berger A. (2007) Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *Journal of clinical virology*, 40(2), 93-98.

Rekha M. R., Sharma C. P. (2007) Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 20(2), 116-121.

Rombach M., Kosse D., Faltin B., Wadle S., Roth G., Zengerle R., von Stetten F. (2014) Real-time stability testing of air-dried primers and fluorogenic hydrolysis probes stabilized by trehalose and xanthan (vol 57, pg 151, 2014). *Biotechniques*, 57(4), 213-213.

Rottava I., Batesini G., Silva M. F., Lerin L., de Oliveira D., Padilha F. F., Toniazzo G., Mossi A., Cansian R., Luccio M., Treichel, H. (2009) Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 65-71.

Seville P. C., Kellaway I. W., Birchall J. C. (2002) Preparation of dry powder dispersions for non-viral gene delivery by freeze-drying and spray-drying. *The journal of gene medicine*, 4(4), 428-437.

Sherker A. R., Cherepanov V., Alvandi Z., Ramos R., Feld J. J. (2013) Optimal preservation of liver biopsy samples for downstream translational applications. *Hepatology International*, 7(2), 758-766.

Schuller S., Schilinsky P., Hauch J., Brabec C. J. (2004) Determination of the degradation constant of bulk heterojunction solar cells by accelerated lifetime measurements. *Applied Physics A*, 79(1), 37-40.

Singh R. S., Saini G. K., Kennedy J. F. (2008) Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 515-531.

Sorensen A., Berry C., Bruce D., Gahan M. E., Hughes-Stamm S., McNevin D. (2016) Direct-to-PCR tissue preservation for DNA profiling. *International journal of legal medicine*, 130(3), 607-613.

Sorokulova I., Olse, E., Vodyanoy V. (2015) Biopolymers for sample collection, protection, and preservation. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-10.

Spitaleri S., Piscitello D., Di Martin, D., Saravo L. (2004) Experimental procedures comparing the activity of different Taq polymerases. *Forensic science international*, 146, S167-S169.

Sun W. Q., Davidson P. (1998) Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: effects of phase separation and crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1425(1), 235-244.

Suomalainen, A., Syvänen A. C. (2000) Quantitative analysis of human DNA sequences by PCR and solid-phase minisequencing. *Molecular biotechnology*, 15(2), 123-131.

Svec D., Tichopad A., Novosadova V., Pfaffl M. W., Kubista M. (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9-16.

Takeuchi K., Banno N. (1998) New applications of trehalose and its potential applications in cosmetic products. *Fragrance Journal* 7:39 – 47

Talukdar M. M., Kinget R. (1995) Swelling and drug release behaviour of xanthan gum matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 120(1), 63-72.

Tuck M. K., Chan D. W., Chia D., Godwin A. K., Grizzle W. E., Krueger K. E., Rom W., Sanda M., Sorbara L., Stass S., Wang W. (2008) Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *Journal of proteome research*, 8(1), 113-117.

Ubertelli V., Josse C., Bauland F., Valat C. (2007) Fast development of CE IVD molecular diagnostic kits: Highly specific microarray kit for 49 cystic fibrosis mutations. *IRBM*, 28(5), 224-229.

Utekal P., Kocanda L., Matousek P., Wagner P., Bugajev V., Draber P. (2015) Real-time PCR-based genotyping from whole blood using Taq DNA polymerase and a buffer supplemented with 1, 2-propanediol and trehalose. *Journal of immunological methods*, 416, 178-182.

Walter E., Moelling K., Pavlovic J., Merkle H. P. (1999) Microencapsulation of DNA using poly (DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics. *Journal of Controlled Release*, 61(3), 361-374.

Willerslev E., Hansen A. J., Poinar H. N. (2004) Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(3), 141-147.

Wu T. T., Ko C. C., Chang S. W., Lin S. C., Shaw J. F. (2015) Selective oxidation of glucose for facilitated trehalose purification. *Process Biochemistry*, 50(6), 928-934.

Wyatt T. T., Leeuwen M. R., Golovina E. A., Hoekstra F. A., Kuenstner E. J., Palumbo E. A., Snyder N. L., Visagie C., Verkennis A., Hallsworth J. E., Wösten H. A. B., Dijksterhuis, J. (2015) Functionality and prevalence of trehalose-based oligosaccharides as novel compatible solutes in ascospores of *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) and other fungi. *Environmental microbiology*, 17(2), 395-411.

Xiao X., Wu T., Gu F., Zhao M. (2016) Generation of artificial sequence-specific nucleases via a preassembled inert-template. *Chemical Science* (7), 2051–2057.

Yamashita H. (2009) Inhibitive effect on odor formation and its application to cosmetics. *Skin Beauty* 41(3): 146 -151

Zagon J., Kurth S., Ehlers A., Linke B., Lampen A., Broll H. (2012) Preservation of primer and probes on “ready-to-use” 96-well microtiter plates: A step forward towards enhancing throughput and harmonization of real-time PCR applications in food and feed control. *Food Control*, 25(2), 709-716.

Zheng W., Wang Q., Bi Q. (2016) Construction, Expression, and Characterization of Recombinant Pfu DNA Polymerase in *Escherichia coli*. *The protein journal*, 1-9.

Zheng Z., Xu Y., Sun Y., Mei W., Ouyang, J. (2015) Biocatalytic Production of Trehalose from Maltose by Using Whole Cells of Permeabilized Recombinant *Escherichia coli*. *PloS one*, 10(10), e0140477.