

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Detekce viru afrického moru prasat pomocí supermagnetických nanočástic

**Ondřej Rychlý
Jihomoravský kraj**

Brno 2021

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Detekce viru afrického moru prasat pomocí supermagnetických nanočástic

Detection of African Swine Fever Virus Using Supermagnetic Nanoparticles

Autor: Ondřej Rychlý

Škola: Gymnázium Brno, třída Kapitána Jaroše, příspěvková
organizace, tř. Kpt. Jaroše 1829/14, 658 70 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Prof. Ing. René Kizek, DrSc., MBA

Brno 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 12. 3. 2021

Poděkování

Děkuji svému školiteli profesoru Renému Kizekovi za odborné vedení této práce, za poskytnutí prostoru a laboratorního materiálu v jeho firmě Prevention Medicals, s.r.o., a rady při zpracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Ivě Kubištové, Ph.D. díky níž jsem se k této práci dostal.

Mé poděkování patří také Mgr. Petře Vašíčkové, Ph.D. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, která pro moji práci poskytla vzorky PCR produktů a virové DNA.

Zvláštní poděkování patří panu RNDr. Josefovi Růžičkovi, za vytvoření a spravování laboratorního informačního systému a jeho statistických modulů.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK v rámci projektu NANO VIR JCMM 277/2020.



jihomoravský kraj

Anotace

Tato práce se zabývá virem afrického moru prasat a metodami detekce tohoto viru. Cílem práce je ověřit funkčnost zachycení nukleové kyseliny za využití supermagnetických nanočástic pro detekci viru afrického moru prasat. Výzkumem v této oblasti můžeme přispět k vytvoření nové, rychlejší a jednodušší detekční metody. Toho chceme docílit pomocí elektrochemických metod. V práci používáme dvě různé metody, lineární voltametrii a chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzu.

Klíčová slova

africký mor prasat; elektrochemická detekce nukleových kyselin; nanočástice; virus; virus afrického moru prasat

Annotation

This work is about the African swine fever virus and its detection methods. The goal of this work is to verify the functionality of the detection of the African swine fever virus using nucleic acid capture on super-magnetic nanoparticles. By research in this area, we can contribute to the development of new, faster and simpler detection method. We want to achieve it using electrochemical methods. We use two different methods in this work, linear sweep voltammetry and chronopotentiometric stripping analysis.

Keywords

African swine fever; African swine fever virus; Electrochemical detection of nucleic acid; nanoparticles; Virus

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP	africký mor prasat
Au-SPION	zlatem modifikované supermagnetické nanočástice oxidu železitého
CPSA	chronopotenciometric stripping analysis
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EU	Evropská unie
FAT	fluorescent antibody test
fPCR	PCR fragment
gDNA	genomová DNA z kuřecích erytrocytů
HMDE	hanging mercury drop electrode
LAMP	loop-mediated isothermal amplification
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
PCR	polymerase chain reaction
ROC	receiver operating characteristic
rPCR	PCR v reálném čase
SPION	supermagnetické nanočástice oxidu železitého
VAMP	virus afrického moru prasat
vDNA	DNA viru afrického moru prasat

OBSAH

Úvod.....	8
1 Cíl práce.....	9
2 Literární přehled.....	10
2.1 Africký mor prasat.....	10
2.2 Vlastnosti viru Afrického moru prasat.....	10
2.3 Klinické příznaky onemocnění.....	10
2.4 Přenos viru AMP.....	11
2.5 Rozšíření AMP.....	12
2.6 Protiepidemická opatření proti šíření AMP.....	14
2.7 Elektrochemická detekce nukleových kyselin.....	14
3 Současné metody detekce viru AMP.....	15
3.1 PCR.....	15
3.2 LAMP.....	15
3.3 Prokázání přítomnosti viru pomocí přítomnosti jeho protilátek.....	15
4 Materiály a metody.....	16
4.1 Materiál.....	16
4.1.1 Příprava fosfátového pufru (pH 7; 0,15 M).....	17
4.1.2 Příprava Acetátového pufru (pH 5; 0,2 M).....	17
4.1.3 Příprava McIlvainova pufru (pH 5,9; 0,2 M).....	17
4.1.4 Příprava supemagnetických nanočástic Fe ₂ O ₃	17
4.1.5 Modifikace SPION zlatem.....	18
4.2 Elektrochemické měření.....	18
4.2.1 Voltametrie.....	19
4.2.2 Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza.....	19
4.2.3 Technika adsorpčního přenosu.....	20
4.3 Statické zpracování dat.....	21
5 Výsledky.....	22
5.1 Elektrochemické stanovení DNA.....	22
5.1.1 Voltametrická analýza nukleové kyseliny AMP.....	23
5.1.2 CPSA analýza nukleové kyseliny AMP.....	24
5.1.2.1 Měření výšky signálu píku H při různých velikostech proudu.....	24

5.1.2.2 Měření závislosti výšky signálu píku H na době trvání analýzy.....	25
5.1.2.3 Měření závislosti výšky signálu píku H na koncentraci DNA.....	25
5.1.2.4 Shrnutí výsledků z měření pomocí CPSA.....	26
5.2 Optimalizace vazby na částice.....	26
5.3 Optimalizace uvolnění DNA z částic.....	27
5.4 Určení přítomnosti DNA ve vzorku.....	29
5.4.1 Selektivita a senzitivita CPSA analýzy gDNA.....	29
5.4.2 Senzitivita a selektivita stanovení gDNA a vDNA po vazbě na Au-SPION.....	30
6 Diskuse.....	33
7 závěr.....	35
8 Použitá literatura.....	36

Úvod

Viry jsou hrozbou v podobě nebezpečných onemocnění u člověka i u ostatních živočichů. Výskyt virů může mít vliv i na ekonomiku a funkčnost společnosti, jak například ukazuje i právě probíhající pandemie onemocnění COVID-19 způsobená virem SARS-CoV-2. Základní podmínkou pro úspěšné zastavení virů je identifikace nakažených jedinců a jejich následná izolace. Proto je potřeba hledat snadné a rychlé způsoby, jak testovat přítomnost virů.

Africký mor prasat (AMP) se vyznačuje vysokou letalitou dosahující až 100 % u vnímavých jedinců. Onemocnění se projevuje hemoragickou horečkou, cyanotickými skvrnami na kůži a krvácením na sliznicích a orgánech. V Evropě nemá AMP takové dopady na ekonomiku a na hospodářský průmysl, protože se zde vyskytuje především mezi divokými prasaty. I přesto zde za celou dobu výskytu AMP (do 18.6. 2020) na nákazu uhynulo, nebo bylo utraceno celkem 1 383 372 prasat.^[1] V Asii je situace výrazně jiná, neboť AMP se zde vyskytuje především v chovech domácích prasat. Za celou dobu výskytu (do 18.6. 2020) AMP zde v souvislosti s nákazou uhynulo nebo bylo utraceno 6 733 791 kusů.^[1] Na AMP v současné době neexistuje vakcína^[2], a proto je v boji s ním jeho rychlá a včasná identifikace jedinou zbraní. V ohniscích výskytu se často musí přistupovat k likvidaci chovů, které byly nákaze AMP vystaveny. Výskyty ohnisek AMP mají tedy velké socioekonomické dopady. Proto je potřebné na AMP najít snadnou a rychlou metodu detekce vhodnou pro práci přímo v terénu (na farmách).

1 CÍL PRÁCE

Všechny v současné době používané detekční metody tohoto viru vyžadují laboratorní zázemí a vzorky lze odebírat pouze z uhynulých nebo utracených prasat. Většina současných metod také vyžaduje amplifikaci virové DNA, což je hlavní důvod, proč jsou tak náročné, pomalé a nákladné. Proto je cílem naší práce ověřit funkčnost části detekční metody využívající pozlacené Au-SPION nanočástice, jako povrch pro přímou detekci přítomnosti DNA viru afrického moru prasat. Výzkumem v této oblasti můžeme přispět k vytvoření nové, rychlejší a jednodušší detekční metody. Toho chceme docílit pomocí elektrochemických metod.

Cílem práce je ověřit funkčnost zachycení nukleové kyseliny za využití paramagnetických nanočástic pro detekci viru afrického moru prasat. Pro dosažení tohoto cíle byly navrženy následující podcíle:

1. Vypracovat přehled literatury zaměřený na téma detekce AMP
2. Optimalizovat metodu detekce DNA za využití různých elektrochemických metod
3. Optimalizovat způsoby vazby DNA na magnetické částice
4. Optimalizovat uvolnění DNA z magnetických částic
5. Aplikovat navržený způsob detekce na PCR fragment z reálných vzorků
6. Aplikovat optimalizovaný přístup na analýzu reálných vzorků
7. Matematicky a statisticky zpracovat a vyhodnotit získaná data

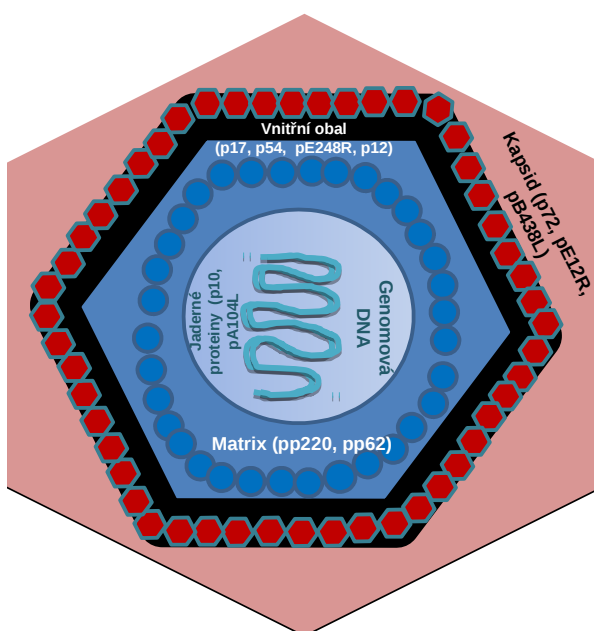
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Africký mor prasat

AMP je nebezpečné onemocnění s vysokou letalitou (až 100 %), které se vyskytuje v populacích domácích a divokých prasat. Jedná se o virové onemocnění způsobené virem afrického moru prasat (VAMP)

2.2 Vlastnosti viru Afrického moru prasat

Virus AMP je DNA obalený virus z čeledi Asfarviridae. Replikuje se v cytoplazmě nakažených buněk. Jeho nukleoproteinové jádro má průměr 70 – 100 nm a vnější obálka jeho virionu pak 175 – 215 nm. Genom viru AMP se skládá z jedné molekuly dvouvláknové DNA a obsahuje 170 – 194 tisíc párů bází^[3], které kódují více než 150 proteinů.^[4]



Obr. 1: Zjednodušené schéma viru afrického moru prasat. Genomová nukleová kyselina (DNA) s jadernými proteiny. Matrix je tvořen proteiny pp220 a pp62, vnější obal je tvořen p17, p54, pE248R a p12. Kapsida je tvořena p72, pE12R a pB438L

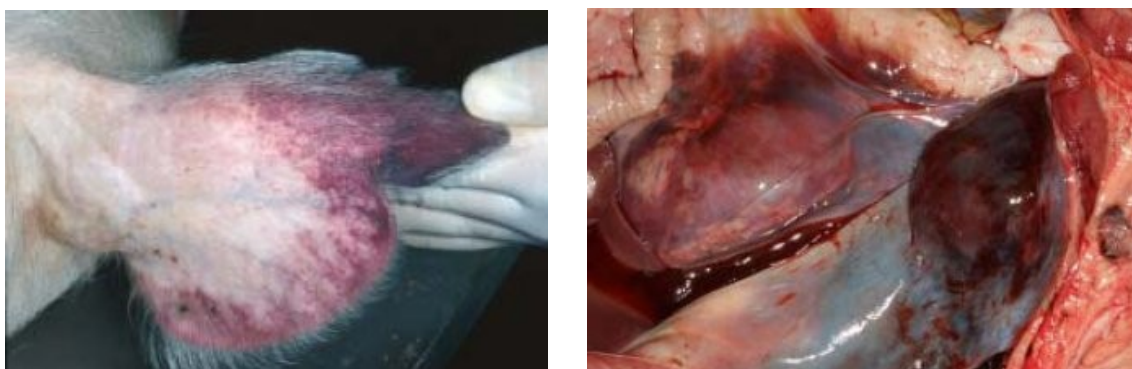
Dokáže přežít dlouho dobu na materiálech biologického původu. Proto často bývají zdrojem nákazy nedostatečně tepelně upravené potraviny obsahující vepřové maso. Virus dobře odolává chladu. V chlazeném masu přežívá až několik týdnů. Naopak špatně snáší vyšší teploty, při 60 °C je inaktivován za 20 min.^[5]

2.3 Klinické příznaky onemocnění

AMP má celou řadu klinických příznaků, které závisí na typu viru, plemeni zvířete, ale i jeho tělesné kondici. Mezi příznaky u prasete domácího a prasete divokého nejsou žádné rozdíly.

U prasete savanového onemocnění probíhá zcela bezpříznakově. Více virulentní kmeny viru, tedy kmeny s vyšší schopností vyvolat onemocnění, vyvolávají závažnější příznaky.^[6] Příznaky se objevují po uplynutí inkubační doby, která činí 4 – 19 dnů.

Mluvíme o několika formách průběhu onemocnění. Preakutní formě, která má velice rychlý průběh, následovaný náhlým úhynem. Akutní formě s rychlým průběhem a úhynem zvířete, který nastává do několika dnů. Chronické formě, která probíhá velice pozvolna a zvíře ji často přežije. Akutní a preakutní formy onemocnění se projevují vysokou horečkou s tělesnou teplotou pohybující se mezi 40 až 42 °C, zažívacími potížemi, přestáním přijímání potravy, poruchami dýchání a hlavně krvácením v kůži a vnitřních orgánech. Samice mohou zmetat. Krvácení může způsobovat výskyt cyanotických ložisek, která můžeme pozorovat jako skvrny na kůži zejména v oblasti končetin, ušních boltců, břicha a hrudníku. (Obr. 2) U akutní formy nastává úmrtí po 4 – 10 dnech od výskytu příznaků. U preakutní formy může docházet k náhlému úhynu i před objevením prvních příznaků.^[5] U méně virulentních kmenů způsobujících chronickou formu nemoci se objevují jen mírnější příznaky v podobě zvýšené teploty, skleslosti a nechuti k přijímání potravy. Tyto příznaky lze snadno považovat za příznaky jiných onemocnění, a proto nemusí na AMP vůbec vzniknout podezření. Prasata, která prodělají tento průběh onemocnění, nebo ho překonají asymptomaticky, se mohou stát přenašečem viru.^[5]



Obr. 2: Projevy AMP: krvácení na ušních boltcích a vnitřní krvácení v oblasti ledvin

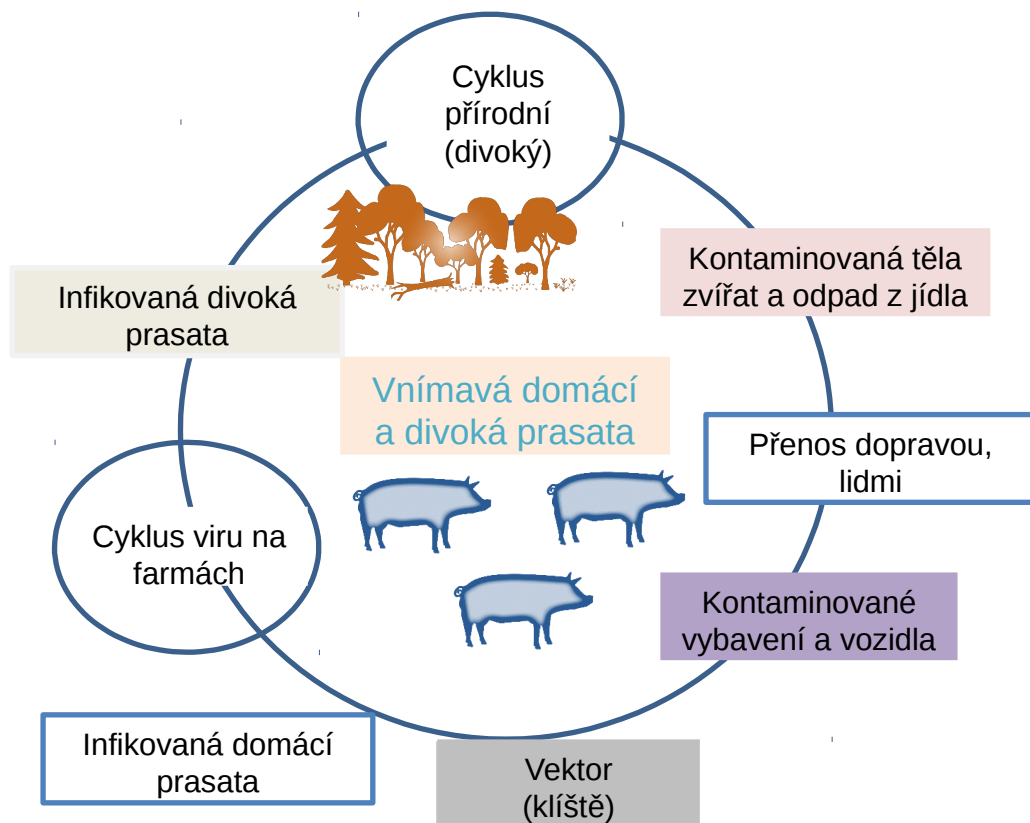
Dostupné pod licencí Public Domain z https://en.wikipedia.org/wiki/File:African_swine_fever_ears.jpg a https://commons.wikimedia.org/wiki/File:African_swine_fever_necropsy.jpg

2.4 Přenos viru AMP

Virus se šíří bez rozdílu mezi prasaty divokými i domácími. Virus se přenáší vystavením zdravého jedince zdroji nákazy. To může být virus přítomný ve vepřovém mase a dalších potravinách. Aby nedošlo k nákaze prasat, nikdy by se neměly vyhazovat zbytky jídla do volné přírody nebo je využívat pro výživu zvířat. Nákazu může také způsobit pobyt zvířete v prostorách, kde dříve byl nakažený jedinec. (Obr. 3) K přenosu často dochází také při vystavení zdravého jedince zvířeti, které prodělalo chronickou či asymptomatickou formu onemocnění.

AMP se může přenášet i pomocí mezipřenašeče, tzv. vektoru, kterým je klíštěák rodu *Ornithodoros*. Klíštěák se nakazí virem přísátím se na nakažené zvíře. (Obr. 3) Virus se v něm

následně množí stejně jako v praseti a v některých případech může být pro klíšťáka infekce i fatální. Infikovaný klíšťák následně přeneše infekci na doposud zdravé prase. Tomuto lze bránit ještě hůře, než přímému přenosu.^[5]



Obr. 3: Pravděpodobný cyklus přenosu viru afrického moru prasat. S přirozeným cyklem cirkulace viru v divoké populaci, na jatkách, stravovacím systému a farmách.

2.5 Rozšíření AMP

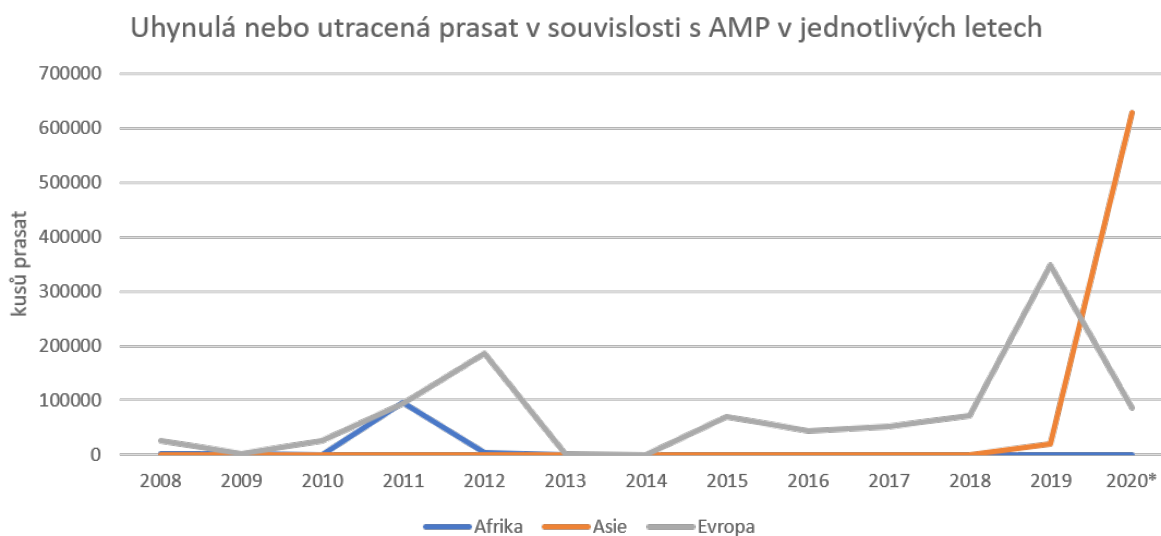
Virus pochází z Afriky, kde se vyskytuje v praseti savanovém (*Phacochoerus africanus*), ovšem jen jako asymptomatický.^[5] Kvůli globalizaci byl ale přenesen na prase domácí, u kterého má v drtivé většině případů fatální průběh. Proto jsou v místech jeho výskytu zaváděna protiepidemická opatření². Přesto se však, zejména v minulých letech, vyskytla ohniska nemoci v Evropě, kde v souvislosti s virem uhynulo, nebo bylo utraceno 1 383 372 zvířat¹. Ještě horší situace je v Asii, kde v souvislosti s virem uhynulo již 6 733 791 prasat.^[1]

V minulosti byla mimoafrická ohniska spíše vzácností. V druhé polovině 20. století se několik ohnisek objevilo ve Španělsku a Portugalsku a ojedinělé případy také v Belgii, Francii, na Maltě, v Nizozemsku a Itálii. Ty se však vždy, až na výjimku, kterou je italský ostrov Sardinie, kde má onemocnění endemický výskyt, podařilo potlačit. A to hlavně díky různým protinákazovým opatřením.^[5] V dubnu 2007 se AMP opět objevil mimo Afriku, a sice v Gruzii. Odtud se následně rozšířil do Ruska, Arménie, Ázerbájdžánu, na Ukrajinu, do Běloruska, Estonska, Litvy, Lotyšska a Polska. V roce 2017 se AMP objevil i v České republice.^[5]

Počty hlášených případů afrického moru prasat v Evropě														
	2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020	
	domácí	divoké	domácí	divoké	domácí	divoké	domácí	divoké	domácí	divoké	domácí	divoké	domácí	divoké
Belgie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	163	0	479	0	0
Bulharsko	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	41	78	38	44
Česko	0	0	0	0	0	0	0	202	0	28	0	0	0	0
Estonsko	0	41	18	723	6	1052	3	637	0	231	0	71	0	0
Itálie	40	70	16	76	22	166	18	110	25	67	1	26	0	0
Litva	6	45	13	111	19	303	30	1328	51	1446	19	403	0	0
Lotyšsko	32	148	10	753	3	865	8	947	10	685	1	290	1789	66
Maďarsko	0	0	0	0	0	0	0	0	0	138	0	1239	0	643
Polsko	2	31	1	53	20	80	81	741	109	2443	48	1909	0	1318
Rumunsko	0	0	0	0	0	0	2	0	1164	182	1555	543	7	6400
Slovensko	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	15	2	21
Srbsko	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	58	6
Ukrajina	chybí relevantní údaje						124	37	105	41	39	10	112	3
Celkem	80	335	58	1716	70	2466	266	4002	1465	5429	1733	5063	2006	8501

Obr. 4: Tabulka hlášených případů AMP napříč Evropou. Data převzata z FAO v letech 2014 – 2020.

V grafu (Obr. 5) vidíme jednotlivé epidemie AMP. Dobře viditelné jsou zejména epidemie v Evropě v letech 2012 a 2019, kdy se VAMP vyskytoval zejména u prasete divokého. Epidemie z roku 2011 v Africe byla způsobena dovezením západních prasat domácích za účelem vytvoření chovů. Kvůli běžnému výskytu VAMP v populaci prasat na africkém kontinentu však byla tato zvířata rychle nakažena a následně uhynula. Zatažení AMP do Asie v roce 2019 se projevilo výraznými úhyny ve zdejších chovech. Asijská epidemie stále probíhá a doposud se ji nedaří zastavit ani zpomalit.



Obr. 5: Graf zobrazující roční počet prasat nakažených AMP pro jednotlivé kontinenty. Data převzata od FAO (2008 – 2020).

2.6 Protiepidemická opatření proti šíření AMP

Vzhledem k tomu, že neexistuje žádná léčba ani očkování, jsou opatření bránící šíření AMP jedinou možností, jak proti tomuto viru bojovat. Kvůli vysoké nakažlivosti je při zjištění výskytu AMP v chovu nařízena jeho likvidace. V případě výskytu ohniska viru v populaci divokých prasat, byly v minulosti vedeny rozsáhlé operace, které měly za cíl likvidaci veškerých divokých prasat v dané oblasti. Další opatření zavedená ve státech EU jsou: zákaz

dovozu prasat a tepelně nezpracovaných výrobků z vepřového masa z oblastí s výskytem nákazy, opatření bránící divoce žijícím prasatům vniknutí do hospodářských chovů, pravidelná kontrola zdravotního stavu zvířat, zjištění příčin při výskytu náhlého úhynu nebo zmateného chování zvířat v chovu či dezinfekce prostor, ve kterých se chovaná prasata vyskytují.^[5]

2.7 Elektrochemická detekce nukleových kyselin

Elektrochemie je odvětví chemie, které se zabývá procesy probíhající mezi elektrodami a elektrolytem. Můžeme se zabývat tím, jaké procesy jsou vyvolány při puštění proudu mezi elektrodami nebo naopak tím, jak probíhající procesy ovlivní protékající proud. Díky tomu, že jsem schopni měřit i velice malé změny v protékajícím proudu (v řádech μA a nA), mohou být elektrochemické metody využívány k velmi citlivé detekci analytu.

Elektrochemická detekce nukleových kyselin je založená na redoxních vlastnostech nukleových bází.^[7] Skoro do konce 50. let minulého století byly nukleové kyseliny považované za elektrochemicky inertní a příliš velké, aby je bylo možné analyzovat pomocí elektrochemie. V roce 1958 Prof. Emil Paleček zjistil, že nukleové báze adenin a cytosin se elektrochemicky redukují.^[8, 9] Typické redukční signály adeninu a cytosinu^[10] jsou pozorovatelné jako signál s maximem v oblasti okolo $-1,3\text{ V}$.^[11] Kromě toho Prof. Trnková popsala detailní chování guaninu, který se na rtuťové elektrodě nejdříve redukuje v negativním potenciálu a vytvořený produkt se následně oxiduje. V roce 1986 Irena Postbieglová s Prof. Palečkem navrhla techniku adsorpčního přenosu, kdy je nukleová kyselina ve formě malé kapky (3-10 μl) akumulovaná na pracovní elektrodu. Metoda umožnila výrazné zvýšení senzitivity a selektivity elektrochemické detekce.^[12-14] Později Brett a další navrhli elektrochemickou analýzu nukleových kyselin na pevných elektrodách (uhlíkových), kde bylo již možné rozlišit všechny báze nukleových kyselin (A, C, T, G).^[15, 16]

3 SOUČASNÉ METODY DETEKCE VIRU AMP

K detekci viru VAMP se v současné době používá celá řada metod. Pro většinu z nich je nutná amplifikace virové DNA, aby bylo možno VAMP v daném vzorku identifikovat. To vyžaduje laboratorní zázemí a zásadně prodlužuje čas potřebný pro zjištění přítomnosti viru ve vzorku.

3.1 PCR

K amplifikaci DNA se u AMP, ale i celé řady jiných virů používá polymerázová řetězová reakce, anglicky polymerase chain reaction (PCR). Při PCR dochází k mnohonásobnému zmnožení úseku DNA, který musí být označen primery. Pro virovou detekci jsou vybírány a následně množeny takové úseky, které jsou pro daný virus specifické. Tedy k jejich amplifikaci dojde jen tehdy, pokud je ve vzorku skutečně DNA daného viru. PCR je založena na cyklickém opakování tří kroků. Denaturace, při které se zvýšením teploty na 94 – 98 °C dvoušroubovice DNA rozvolní na jednovláknovou DNA. Následuje nasednutí primerů, které probíhá při teplotě 50 – 65 °C. Třetím krokem je samotná syntéza DNA za pomoci polymerázy, kdy vznikají komplementární vlákna k původním vláknům DNA.^[17] Vlastní detekci amplifikované DNA pak lze provést celou řadou způsobů. Příkladem je analýza sekvence DNA, po které je jasně vidět, zda je hledaná sekvence ve vzorku přítomna. K sekvenování bývá často používána elektroforéza na agarózovém gelu. Další, a v současnosti nejpoužívanější, metodou detekce virů pomocí PCR je prokázání přítomnosti amplifikované sekvence přímo v průběhu PCR reakce. Mluvíme o tzv. real-time PCR (rPCR), tedy PCR v reálném čase. rPCR funguje většinou díky navázání cílených fluorescenčních oligonukleotidových sond na hledaný úsek DNA. Fluorescenční sonda je již snadno detekovatelná. Pro detekci VAMP pomocí rPCR je hojně využíván TaqMan test, který dosahuje limitu detekce při 7 µl vzorku.^[18, 19]

3.2 LAMP

Další používanou metodou amplifikace DNA pro následnou detekci viru je loop-mediated isothermal amplification (LAMP), česky smyčkou zprostředkovaná isotermální amplifikace. Její výhoda spočívá ve stálé teplotě při amplifikaci, takže k jejímu provedení není potřeba termocykler. Pro detekci VAMP byla vyvinuta metoda používající LAMP, která amplifikací cílila na gen VP37. Ten je pro VAMP specifický. Tato metoda dosahuje limitu detekce u 330 kopií zmíněného genu.^[20]

3.3 Prokázání přítomnosti viru pomocí přítomnosti jeho protilátek

Přítomnost protilátek může dokázat přítomnost viru v organismu. Metod detekce protilátek proti AMP existuje celá řada, například fluorescenční test na protilátky, fluorescent antibody test (FAT), či antigenový test ELISA, obě tyto metody jsou ovšem méně citlivé než výše zmíněné testy a mohou vyjít falešně pozitivně i za přítomnosti jiných virů způsobujících jiná onemocnění.^[21]

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Materiál

Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), v ACS čistotě (např: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl, acetát sodný, kyselina octová, monohydrát kyseliny citronové, hydroxid amonný, tetrahydrogenboritan sodný, amoniak, nonahydrát dusičitanu železitého, hydroxid amonný, kyselina zlatitá, kyselina tetrachlorzlatitá, citrát trisodný). K rozpouštění chemikálií, ředění vzorků apod. byla používána výhradně deionizovaná voda s rezistivitou $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ čištěná pomocí ELGA LC197 biofiltru (dále jen voda).

Byla použita řada biologických vzorků, pro vzorky obsahující nukleové kyseliny bylo použito:

Kuřecí DNA z erytrocytů (gDNA). Ze zásobního roztoku kuřecí DNA o koncentraci $100 \mu\text{g/ml}$ bylo ředěním vodou vytvořeno 20 vzorků gDNA o různých koncentracích (100, 10, 1 a $0 \mu\text{g/ml}$). Vzorkům byla přidělena náhodná čísla.

PCR fragment (fPCR) VAMP o velikosti 250 bp (base pairs; párů bází) připravený pomocí primerů KING R (5' GAT ACC ACA AGA TC(AG) GCC GT 3') a KING F (5' CTG CTC ATG GTA TCA ATC TTA TCG A 3'), po úvodní denaturaci při $95 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 4 min probíhaly PCR cykly $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 sec; $58 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 sec; $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min, během amplifikace proběhlo 35 cyklů. Výsledný fragment včetně primerů byl:

```
CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGATAAGTTTCCATCAAAGTTCTGCAGCTCTT
ACATACCCTTCCACTACGGAGGCAATGCAATTAACCCCGATGATCCGGGT
GCGATGATGATTACCTTTGCTTTGAAGCCACGGGAGGAATACCAACCCAGTGG
TCATATTAACGTATCCAGAGCAAGAGAATTTTATATTAGTTGGGACACGGATT
ACGTGGGGTCTACTACTACGGCRGATCTTGTGGTATC
```

Genomová DNA VAMP (vDNA), která byla získána izolací a purifikací z buněčné kultury. Vzorek byl poskytnut Výzkumným ústavem veterinárního lékařství. vDNA bylo za účelem určení koncentrace pomocí spektrometrie nejdříve určena absorbance při vlnové délce 260 nm. Ta byla rovna 1,81. Podle absorbance při 260 nm lze dopočítat koncentraci daného vzorku DNA. Koncentrace vzorku byla stanovena na $90,5 \mu\text{g/ml}$. Vzorec pro výpočet koncentrace dvouřetězcové DNA z absorbance při 260 nm, kde a je absorbance a x je koncentrace DNA:

$$50a = x$$

Pro přípravu vzorků a práci s nimi byly používány mikrozkuřavky, pipetové špičky a jiný laboratorní plast od značky EPPENDORF. K přípravě vzorků a pro následná měření byly použity přístroje AUTOLAB 101 kombinaci s VA Stand 663, Biosan Multi-Rotator RS-60, ultrazvuková lázeň VWR USC-TH, ThermoMixer F1.5, VOLTCRAFT PH-100 ATC pH-metr, magnetická míchačka Eppendorf.

4.1.1 Příprava fosfátového pufru (pH 7; 0,15 M)

Naváží se 0,6674 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a rozpustí se ve vodě v odměrné baňce o objemu 25 ml. Následně se naváží 0,585 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a také se rozpustí ve vodě v odměrné baňce o objemu 25 ml. Poté se naváží 0,4383 g NaCl a převede se do odměrné baňky o objemu 25 ml. Do ní se pak přidá 14,45 ml roztoku Na_2HPO_4 a baňka se doplní roztokem NaH_2PO_4 po rysku, přidá se tedy 10,55 ml roztoku. Hodnota pH se ověří pomocí pH-metru.

4.1.2 Příprava Acetátového pufru (pH 5; 0,2 M)

Naváží se 11,048 g acetátu sodného a 3,922 g kyseliny octové, tyto dvě složky se převedou do odměrné baňky o objemu 1000 ml a rozpustí se ve vodě. Hodnota pH se zkontroluje pomocí pH-metru.

4.1.3 Příprava McIlvainova pufru (pH 5,9; 0,2 M)

Naváží se 21,011 g monohydrátu kyseliny citronové a rozpustí se ve vodě v odměrné baňce o objemu 1000 ml. Následně se naváží 35,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a rozpustí se ve vodě v odměrné baňce o objemu 1000 ml. Poté se do odměrné baňky o objemu 1000 ml přelije 680 ml roztoku Na_2HPO_4 , baňka se doplní po rysku roztokem kys. citronové, přidá se tedy 320 ml. Hodnota pH se ověří pomocí pH-metru a případně se upraví přidáním kyseliny, resp. bazické složky pufru.

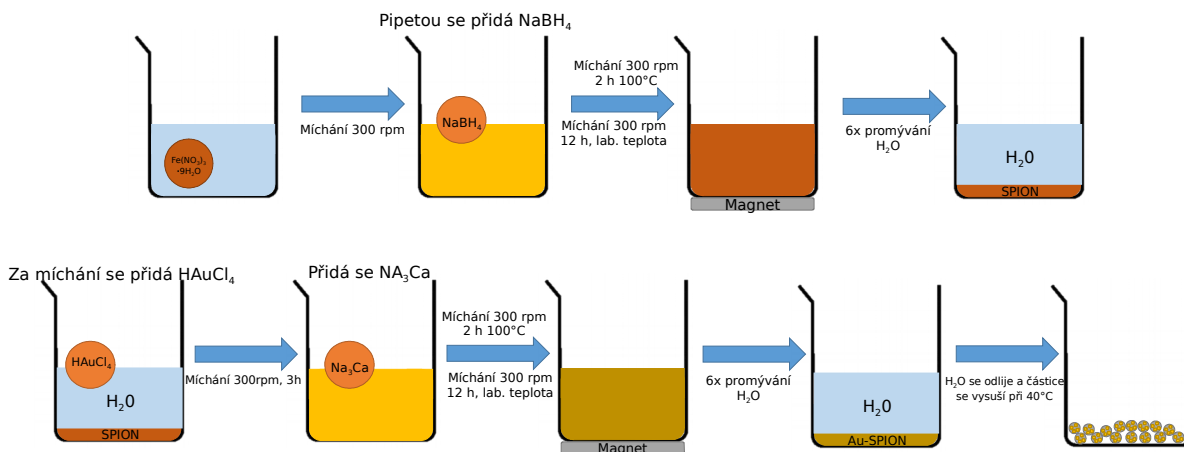
4.1.4 Příprava supemagnetických nanočástic Fe_2O_3

Pro přípravu částic je nutné připravit 3,5% roztok NH_3 . Do falkonky (50 ml) se napipetuje 2,8 ml 25% hydroxidu amonného a doplní se vodou na objem 20 ml, čili přidá se 17,2 ml vody. Do jednorázové plastové navažovací lodičky se naváží 0,4 g tetrahydroboritanu sodného. Tato navážka se převede do falkonky s 3,5% roztokem amoniaku a v tomto se rozpustí. Pipetou se odebere roztok z falkonky a opláchne se navažovací lodička, aby na ní nezůstala chemikálie. Na navažovací jednorázovou plastovou lodičku se naváží 2,992 g dusičnanu železitého nonahydrátu. Do kádinky o objemu 250 ml se odměří 160 ml vody a kádinka se umístí na magnetickou míchačku, do kádinky se vloží míchadélko a zapne se míchání při 300 rpm. Navážka dusičnanu železitého nonahydrátu se přesype do kádinky s vodou. Aby byla převedena celá navážka, nabere se pipetou roztok v kádince a váženka se opatrně opláchne tak, aby na ní nic nezůstalo. Za stálého míchání se nechá rozpustit. Dále se naředí roztok hydroxidu amonného na koncentraci 3,5 % a to tak, že se použije koncentrovaný roztok 25% hydroxidu amonného. Do kádinky, kde se míchá dusičnan železitý rozpuštěný ve vodě, se postupně napipetuje 20 ml rozpuštěného tetrahydroboritanu v 3,5% amoniaku. Ihned po přidavku rozpuštěného tetrahydroboritanu probíhá reakce a roztok se mění v tmavě hnědý. Kádinka se přikryje hodinovým sklíčkem. Míchá se 5 minut a poté se nastaví ohřev na 100°C . Zahřívá se za stálého míchání po dobu 2 hodin. Poté se vypne zahřívání a míchání probíhá do dalšího dne (alespoň 12 hodin). Následující den

se míchání zastaví, pomocí magnetu se vyndá magnetické míchadélko. Částice se separují magnetem a třikrát se promyjí vodou. Promytí se provede tak, že se na dno kádinky z vnější strany přiloží magnet a čeká se, až se magnetické částice usadí. Roztok se vylije. Magnet se odstraní a pomocí stříčky se částice propláchnou vodou. Nakonec jsou v kádince pouze separované částice bez roztoku. Takto jsou částice připravené pro modifikaci zlatem.

4.1.5 Modifikace SPION zlatem

Pro modifikaci částic zlatem je potřeba připravit 1mM roztok kyseliny zlatité. Na navažovací plastovou váženku se naváží 0,0158 g HAuCl_4 , navážka se převede do falkonky (50 ml) a rozpustí se ve 40 ml vody. Roztok se uchovává v chladu a temnu. Následně je potřeba připravit roztok citrátu trisodného. Do mikrozkušavky Eppendorf se naváží (1,5 ml) 0,265 g citrátu trisodného dihydrát a rozpustí v 10 ml vody. Roztok se uchovává v chladu. Do kádinky k promytým separovaným částicím SPION se vloží míchadélko. Za míchání se přidá k částicím 40 ml roztoku kyseliny tetrachlorozlatité o koncentraci 1 mM. Míchání probíhá 3 hodiny při 300 rpm, kdy je kádinka zakrytá hodinovým sklíčkem. Po třech hodinách se přidá 1 ml roztoku citrátu trisodného dihydrátu. Po zakrytí hodinovým sklíčkem se pokračuje v míchání do dalšího dne, tedy minimálně 12 hodin, při laboratorní teplotě a 300 rpm. Další den se částice separují magnetem a třikrát promyjí vodou. Po třetím promytí se částice separují a roztok se odlije. Samotné částice v kádince se dají sušit na magnetickou míchačku, na které se nastaví teplota 40 °C.



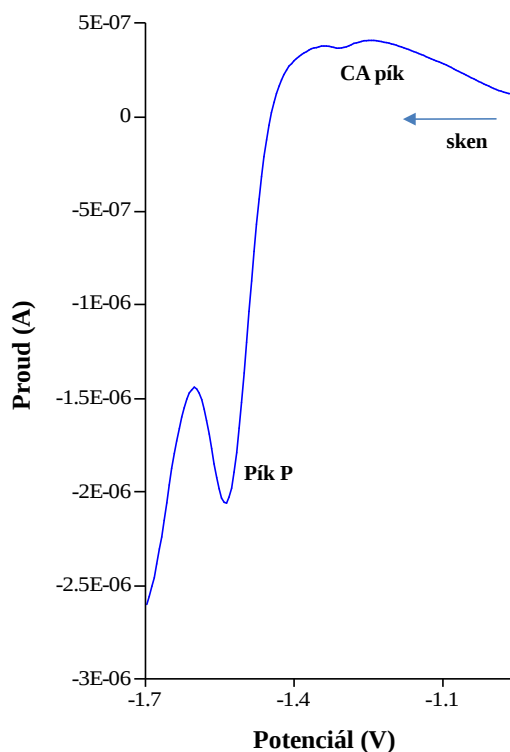
Obr. 6: Schéma přípravy Au-SPION nanočástic pro zachycení DNA. Ionty železa jsou za míchání redukovány borohydridem. Vytvořené nanočástice jsou zachyceny na magnet a následně promyty. Modifikace povrchu bylo provedeno přidávkem kyseliny chlorozlatité a následně modifikován citronanem sodným. Modifikované nanočástice jsou promyty a vysušeny.

4.2 Elektrochemické měření

Elektrochemické měření probíhala na elektrochemickém analyzátoru AUTOLAB 101 ve spojení 663 VA Stand. Na něm bylo použito tří elektrodové zapojení, ve kterém byla pracovní elektroda kapka rtuti (hanging mercury drop electrode, HMDE) o povrchu 0,4 mm², referenční elektroda Ag/AgCl/3 M KCl a pomocná grafitová elektroda. Jako elektrolyt byl použit pufr, pro různá měření se pufrы lišily.

4.2.1 Voltametrie

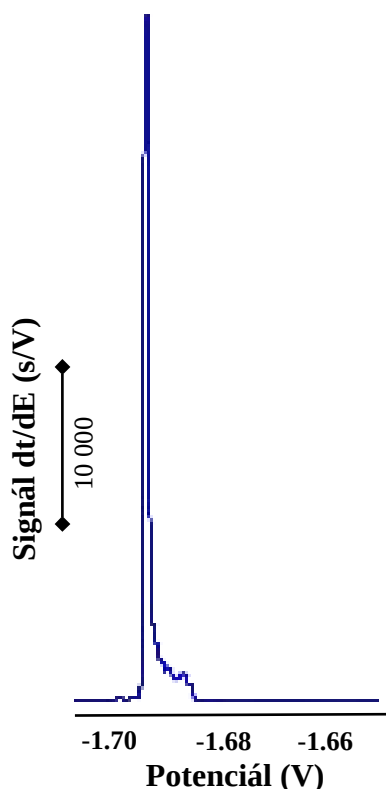
Voltametrie je jednou z elektrochemických metod, kterou lze spolehlivě prokázat přítomnost nukleových kyselin. Detekce nukleových kyselin pomocí voltametrie je založena na redoxních vlastnostech nukleových bází.^[7] Při voltametrii protéká proud mezi pracovní a pomocnou elektrodou a měří se potenciál na referenční elektrodě. Z naměřených hodnot potenciálu je vytvořena voltametrická křivka. Křivka může být charakteristická pro přítomnost specifických látek v elektrolytu. (Obr. 7) Elektrolytem, ve kterém probíhá analýza je acetátový pufr (pH 5, 0,2M).



Obr. 7: Typická DPV křivka zobrazující píky CA a P při voltametrickém měření vzorku DNA (1 µg/ml). Acetátový pufr, pH 5,0, rychlost polarizace 25 mV/s, doba akumulace 120 s. Měření probíhalo v elektrochemické nádobce.

4.2.2 Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza

Druhou elektrochemickou metodou, která umožňuje detekci nukleových kyselin, je chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza (chronopotentiometric stripping analysis, CPSA). Při CPSA dochází působením konstantního proudu ke katalytické reakci nukleových kyselin v elektrolytu. Průběhem reakce dochází ke změně napětí na elektrodách. Vzniklá křivka vyobrazuje závislost napětí (potenciálu) na čase reakce.^[22] Derivací převrácené křivky (tedy t/E) je pak výsledný signál, tedy závislost $\delta t/\delta E$ na potenciálu. (Obr. 8) Pík H, který zde za přítomnosti nukleových kyselin vzniká při potenciálu $-1,75$ V se tvoří i při minimálních koncentracích. CPSA analýza DNA probíhá v prostředí McIlvaina pufru (pH 5,9).

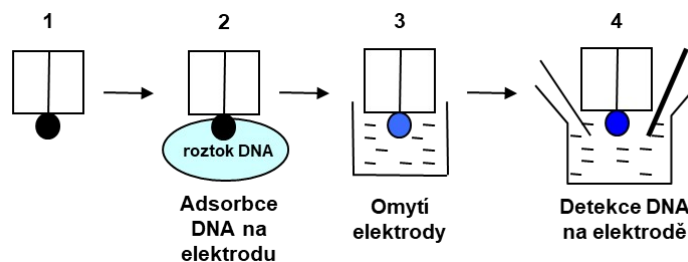


Obr. 8 :Typická CPSA křivka zobrazující pík H DNA (1 $\mu\text{g/ml}$). McIlvanovův pufr, pH 5,9; doba akumulace 60 s; aplikovaný proud 5 μA a doba měření 120 s. Měření probíhalo v elektrochemické nádobce.

4.2.3 Technika adsorpčního přenosu

Při měření technikou adsorpčního přenosu je kapka vzorku nanесena na parafilm. Pracovní elektroda je ponořena přímo do vzorku a je ponechán určitý čas (čas akumulace), aby se DNA ze vzorku adsorbovala přímo na povrch pracovní elektrody. Následně je modifikovaná elektroda opláchnuta, aby se odmyly nenavázané nízkomolekulární látky. Následné měření

probíhá již jako při běžné voltametrii.^[12-14] (Obr. 9) Výhodou techniky adsorpčního přenosu je možnost použití výrazně nižšího množství vzorku (pouze 5 µl).



Obr. 9 Typické schéma přenosové techniky pro analýzu DNA. 1 – nemodifikovaná pracovní elektroda; 2 – pracovní elektroda je modifikována DNA; 3 – odstranění nenavázaných molekul na pracovní elektrodu; 4 – přemístění modifikované elektrody do měřící nádoby

4.3 Statické zpracování dat

Všechna data byla nahrána do laboratorního informačního systému QuinsLab, kde byla následně zpracována a vyhodnocena. Každý vzorek byl měřen $n = 3$. K následnému vyhodnocení byl použit průměr z naměřených hodnot. Úspěšnost detekce metody byla posuzována na základě tzv. ROC (Receiver Operating Characteristic) křivky, která ukazuje závislost pravděpodobnosti falešně pozitivního výsledku na pravděpodobnosti skutečně pozitivního výsledku. Čím lépe se výsledná plocha pod křivkou blíží jedné, tím spolehlivější daná detekční metoda je.^[23]

K vizualizaci rozdělení hodnot při měření více skupin vzorků (např. měření dvaceti vzorků rozdělených do čtyř skupin podle koncentrace) používáme tzv. boxploty, neboli krabicové grafy. Boxploty zobrazují medián v dané skupině vzorků a následně rozptyl od této hodnoty u jednotlivých měření. „Krabice“ okolo mediánu vymezují druhý a třetí kvartil, tedy 50 % hodnot, z každé strany mediánu 25 %.^[24] To znamená, že čím je „krabice“ kolem průměru menší, tím více jsou hodnoty v dané skupině vzorků konzistentní, a tedy je dané měření spolehlivější.

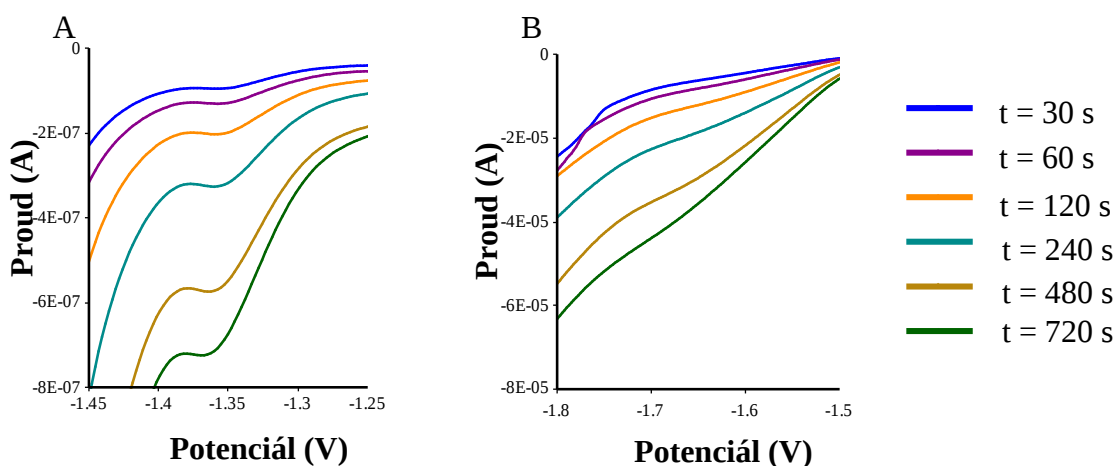
U jednotlivých detekčních metod jsme zjišťovali i limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). LOD určuje množství vzorku, při kterém jsme schopni danou látku ve vzorku detekovat. LOD se rovná trojnásobku šumu, tedy hodnotě při nulové koncentraci. LOQ určuje množství vzorku, při kterém jsme schopni z naměřených hodnot určit množství dané látky ve vzorku. LOQ se rovná pětinásobku šumu, tedy hodnotě při nulové koncentraci.

5 VÝSLEDKY

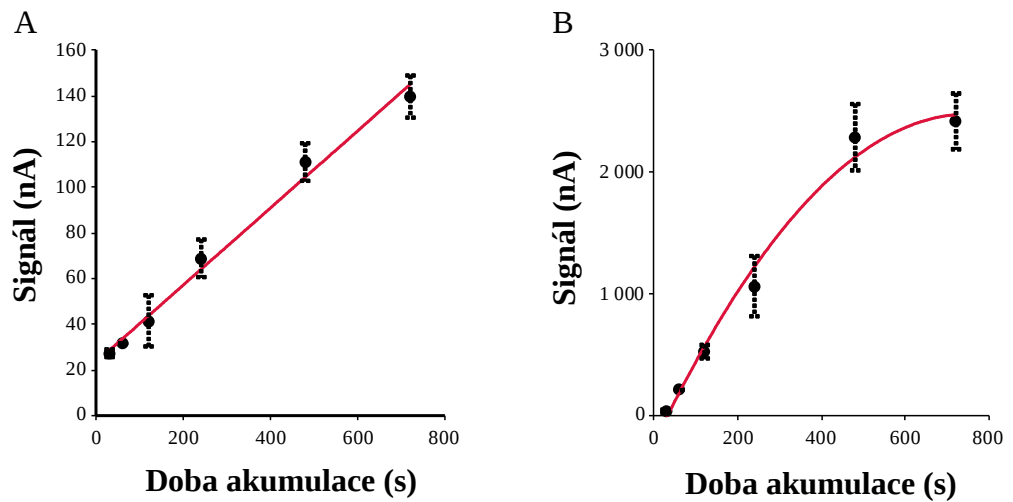
5.1 Elektrochemické stanovení DNA

Elektrochemická analýza nukleových kyselin je dlouhodobě studována. Pro naší práci jsme vycházeli z dříve publikovaných výsledků profesorem Palečkem.^[7-9, 12-14] Vzorek obsahující nukleovou kyselinu byl aplikován do elektrochemické nádoby s acetátovým pufrům (pH 5,0). Na voltamogramech byly pozorovány redoxní signály adeninu a cytosinu při potenciálu kolem $-1,3$ V. Pro zvýšení senzitivity byla pro analýzu nukleové kyseliny využita technika adsorpčního přenosu. Křivka vznikající za přítomnosti DNA (10 mg/ml) v analytu se vyznačuje zejména dvěma píky. Pík CA vznikající při potenciálu $-1,3$ V, který je vyvolán redoxní reakcí cytosinu a adeninu. Druhým signálem je katalytický pík P vznikající při potenciálu $-1,5$ V. Vzniklé signály tedy dokazují přítomnost dvou bází nukleových kyselin. Dokazují tedy přítomnost nukleových kyselin, v tomto případě DNA.^[8-11]

Pro optimalizaci techniky adsorpčního přenosu byla vytvořena závislost výšky signálů píků CA a P na době akumulace kapky vzorku (10 μ l) na elektrodu. Vzorky fPCR VAMP o koncentraci 1 μ g/ml byly měřeny 30, 60, 120, 240, 480, 720 s. Bylo zjištěno, že s dobou akumulace roste výška obou signálů. (Obr.10) Z naměřených hodnot byla vytvořena křivka, z které jsme odvodili, že při akumulaci delší než 12 min již signál neroste. (Obr. 11)

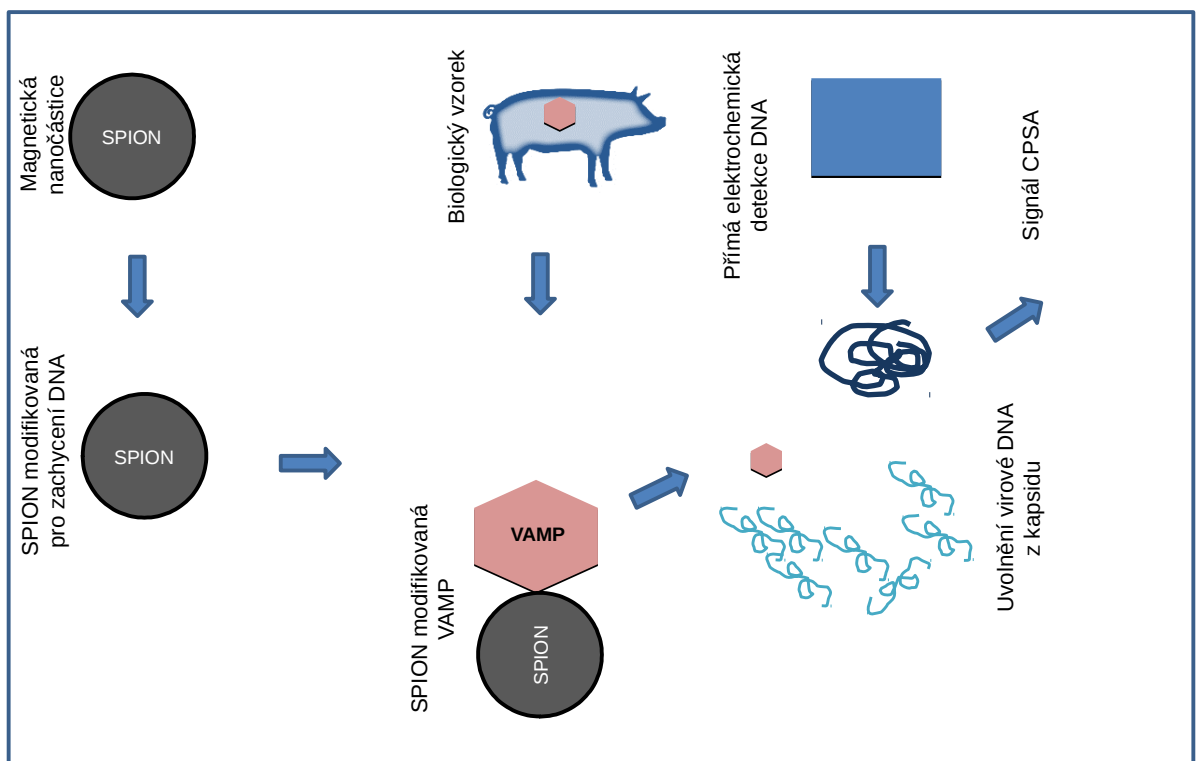


Obr. 10: Změna výšky a tvaru píků CA (A) a P (B) s dobou akumulace vzorku na elektrodu



Obr. 11: Závislost výšky píků CA (A) a P (B) na době akumulace vzorku na elektrodu

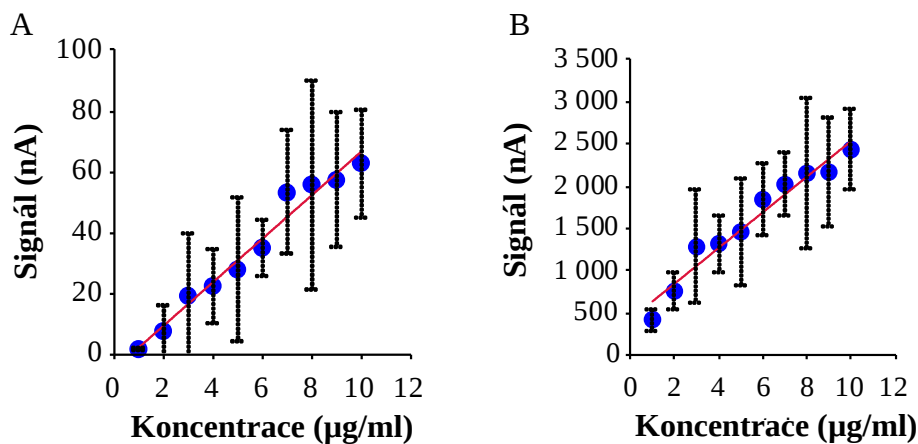
Vzorek obsahující nukleovou kyselinu byl akumulován přímo na povrch pracovní elektrody. Po určeném čase jsou nenaadsorbované molekuly odmyty. Následně je nukleovou kyselinou modifikovaná elektroda přenesena do acetátového pufru. Na voltametrickém záznamu byly získány signály kolem potenciálu $-1,35$ V pro CA pík a $-1,55$ pro P pík.



Obr. 12: Schéma elektrochemické detekce VAMP. Magnetické částice SPION vykazují dobrou interakci s DNA. Zachycená DNA je následně uvolněna a elektrochemicky identifikována.

5.1.1 Voltametrická analýza nukleové kyseliny AMP

Byly připraveny vzorky fPCR o různých koncentracích (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 $\mu\text{g/ml}$) ty byly voltametricky měřeny za pomoci techniky adsorpčního přenosu při době akumulace 120 s. U píků CA i P s rostoucí koncentrací rostl signál. Závislost výšky signálu obou píků byla lineárně závislá na koncentraci fPCR ve vzorku. (Obr. 13) Signály píků se pohybovaly u píku CA okolo potenciálu $-1,35\text{ V}$ a u píku P $-1,55\text{ V}$. Bylo dosaženo detekčního limitu 200 fmol v 5 μl vzorku.



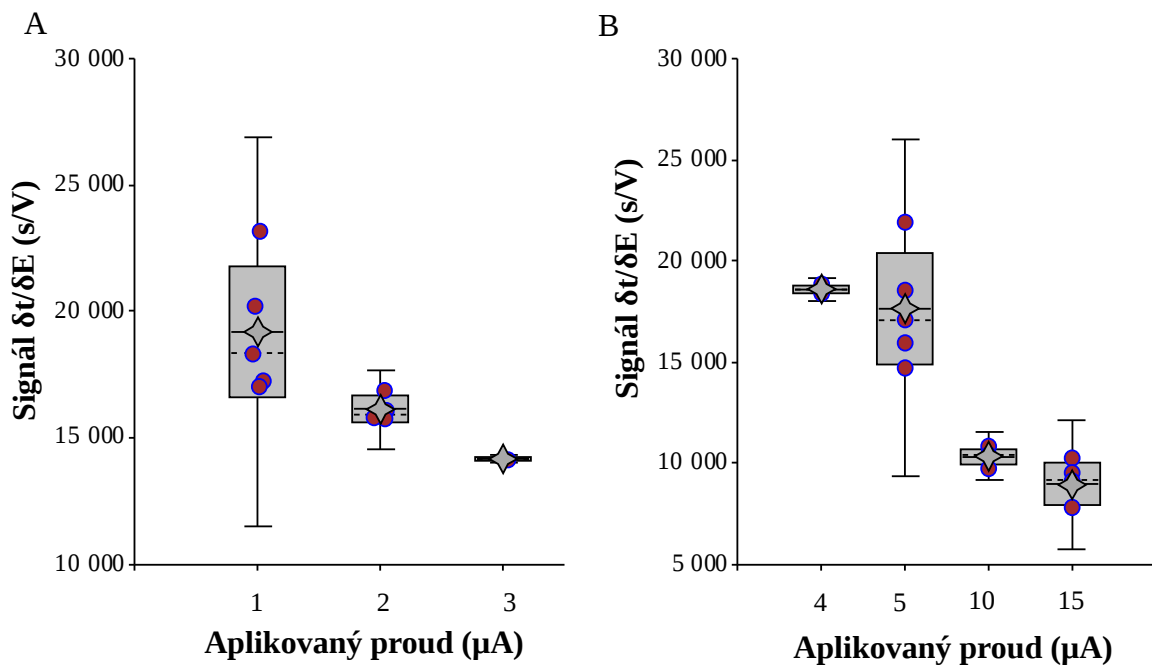
Obr. 13: Závislost výšky signálů píků CA (A) a P (B) na koncentraci PCR fragmentu VAMP

5.1.2 CPSA analýza nukleové kyseliny AMP

Provedli jsem řasu experimentálních měření, abychom zjistili, jaké parametry CPSA ovlivňují detekci DNA. Zjistili jsme, že výška píku H a to, zda pík vůbec vznikne je ovlivněno třemi faktory. Jsou jimi velikost proudu použitého pro analýzu, délka trvání analýzy a koncentrace DNA.

5.1.2.1 Měření výšky signálu píku H při různých velikostech proudu

Byly změřeny různé koncentrace DNA při rozdílných aplikovaných proudech. Byla měřena závislost výšky signálu na velikosti aplikovaného proudu. Byly použity vzorky DNA o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ při čase trvání analýzy 360 s pro vzorky s proudem 1, 2 a 3 μA a 180 s pro vzorky měřené s proudem 4, 5, 10 a 15 μA . Zjistili jsme, že u různých koncentrací DNA jsou vhodné jiné proudy pro získání signálu píku H. Při použití vyššího proudu jsme přicházeli o citlivost a zejména u nižších koncentrací DNA pík H u příliš vysokých proudů vůbec nevznikal. (Obr. 14) Zjistili jsme, že pro koncentrace $<10\text{ }\mu\text{g/ml}$ DNA je ideální proud o velikosti 10 μA . Tyto koncentrace bychom mohli očekávat u reálných vzorků, proto jsem dále měřili s proudem 10 μA .

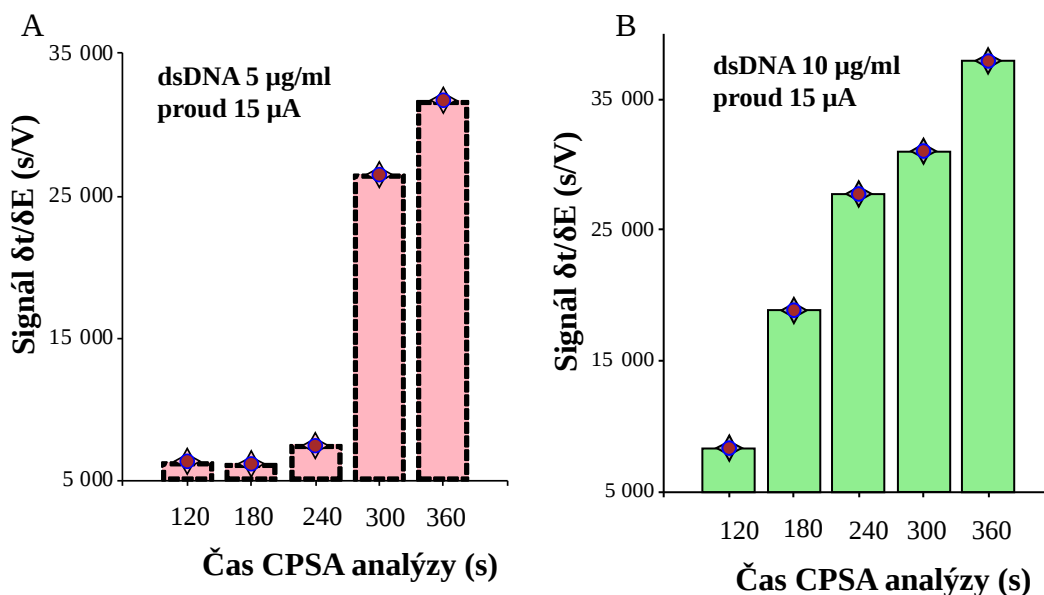


Obr. 14: Změny signálu píku H při různých aplikovaných proudech při časech měření 360s (A) a 180 s (B)

5.1.2.2 Měření závislosti výšky signálu píku H na době trvání analýzy

Druhým faktorem ovlivňující výsledný signál byla délka trvání analýzy. Při příliš krátkém čase měření byla změna potenciálu v čase tak malá, že po následné derivaci nebyl získán pík.

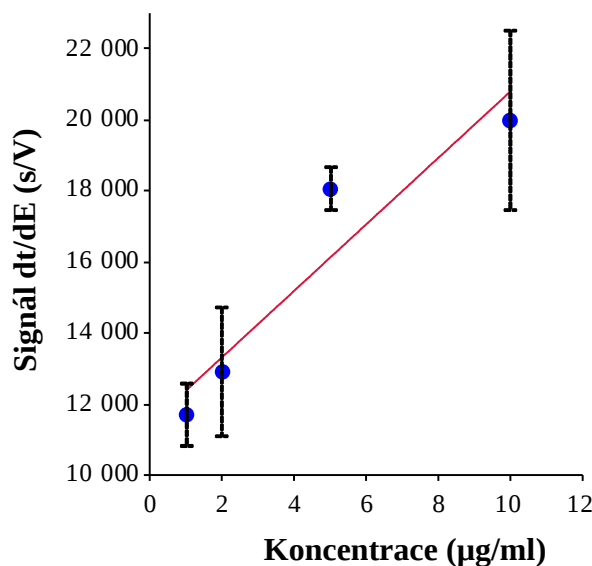
Vytvořili jsme závislost výšky signálu píku H na době trvání analýzy. (Obr. 15) Měření probíhala při 15 μA na vzorcích o koncentraci 10 μg/ml DNA. Měření probíhala při dobách trvání analýzy 120, 180, 240, 300 a 360 s. Zjistili jsme, že minimální čas pro řádné proběhnutí reakce, tedy řádné vykreslení píku, je 180 s či 240 s. Při prodlužování času analýzy se sice dále zvyšoval signál, nicméně jsme již nepozorovali žádné zlepšení v citlivosti, akorát se zbytečně prodlužoval doba nutná ke změření jednoho vzorku.



Obr. 15: Změna signálu píku H v závislosti na čase měření pro vzorky DNA o koncentracích 5 µg/ml (A) a 10 µg/ml (B)

5.1.2.3 Měření závislosti výšky signálu píku H na koncentraci DNA

Třetím faktorem ovlivňující výsledek je koncentrace DNA. Obecně platí, že zachováme-li pro všechna měření stejný proud a čas, s rostoucí koncentrací DNA se bude zvyšovat signál píku H. Pro pochopení chování signálu píku H jsme z hodnot změřených při analýze s parametry ($I = 10 \mu\text{A}$; $t = 180 \text{ s}$) vytvořili závislost výšky signálu na koncentraci DNA ve vzorku pro koncentrace 1 – 10 µg/ml DNA. Vzorky byly měřeny v prostředí McIlvaina pufru (pH 5,9, 2 ml). Vzniklá závislost výšky signálu na koncentraci se jevila jako lineární ($y = 139,01x + 2085,49$). (Obr. 16)



Obr. 16: Závislost výšky signálu píku H na koncentraci DNA v analytu

5.1.2.4 Shrnutí výsledků z měření pomocí CPSA

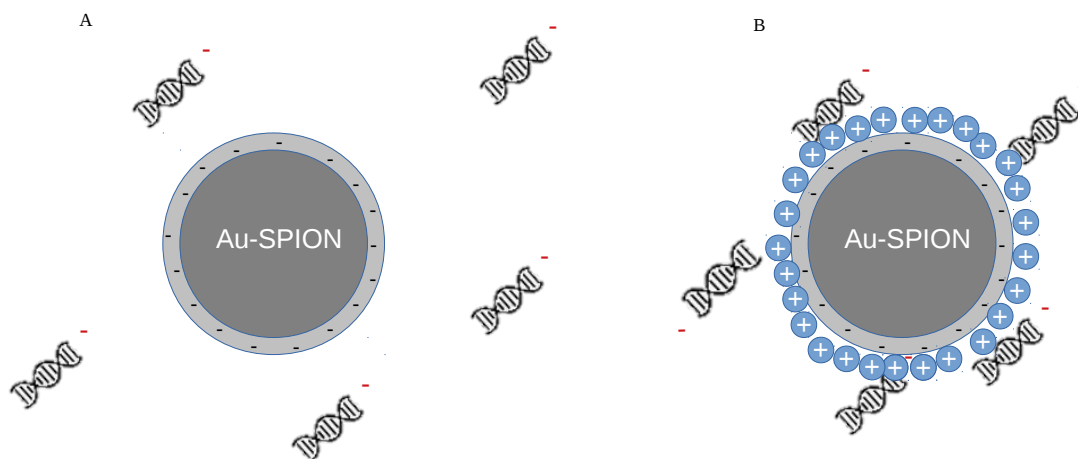
Zjistili jsme, že CPSA se ukázala být vhodnou metodou pro prokázání přítomnosti DNA v elektrolytu, neboť reakce vytvářející pík H začíná i při velice nízkých koncentracích DNA v analytu (50 pmol/l). Při použití techniky adsorpčního přenosu v kombinaci s CPSA, jsme byli schopni dosáhnout detekčního limitu 20 fmol v 10 μ l vzorku.

5.2 Optimalizace vazby na částice

Abychom urychlili a zjednodušili detekci viru, chceme použít metodu přímé detekce, tedy takovou, která by nevyžadovala amplifikaci virové DNA. Používáme supermagnetické nanočástice jako povrch pro zachycení viru, respektive jeho DNA. Pro účely této práce, navazujeme na Au-SPION pouze DNA, abychom ověřili vazbu DNA na částice a následnou funkčnost elektrochemických metod pro detekci. Pro úspěšnou vazbu negativně nabitě DNA na negativně nabitý povrch částic jsou částice nejprve modifikovány Na^+ ionty z fosfátového pufru a povrch částic má tedy výsledně kladný náboj. Na takovýto povrch se pak snadno váží nukleové kyseliny či protilátky, které mají záporný náboj.^[25] (Obr. 17)

Zkoumali jsme úspěšnost vazby při různých podmínkách. Za účelem urychlení modifikace jsme zkoumali dobu nutnou pro modifikaci částic. Byly sledovány různé doby interakce (30, 60, 120, 180, 300 s) při relativně vysoké koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Signál DNA byl patrný již při době modifikace elektrody 60 s. Účelem naší metody je detekce nukleové kyseliny z viru. Pro tento účel je vyžadována citlivost, řádově menší než 10 $\mu\text{g/ml}$. Proto byla metoda déle optimalizována při delších časech interakce DNA s částicemi (5, 15, 30 a 60 min). Maximálního signálu nukleových kyselin bylo dosaženo při 30 min. Při delší době interakce již nedocházelo k žádné další vazbě DNA na Au-SPION. Na základě těchto pokusů jsme stanovili tento standardní operační postup pro vazbu DNA na Au-SPION:

5 mg Au-SPION bylo promícháno s 1 ml fosfátového pufru (pH 7.0, 0,2 M). Z důvodu rozrušení agregátů byla směs umístěna na 20 minut do ultrazvukové lázně (25 °C, 45 kHz). Homogenizované částice se rozdělily do mikrozkušavek po 100 μl , tedy v každé mikrozkušavce bylo 500 μg Au-SPION. Zkušavky byly umístěny na neodymový magnet a roztok byl odpipetován. Do každé mikrozkušavky s 500 μg nanočástic bylo přidáno 500 μl vzorku. Za účelem navázání DNA ze vzorků na Au-SPION nanočástice byly zkušavky umístěny na 30 min do multirotátoru při 25 °C, 50 rpm a 15 s vibračním pulsem každých 20 s.



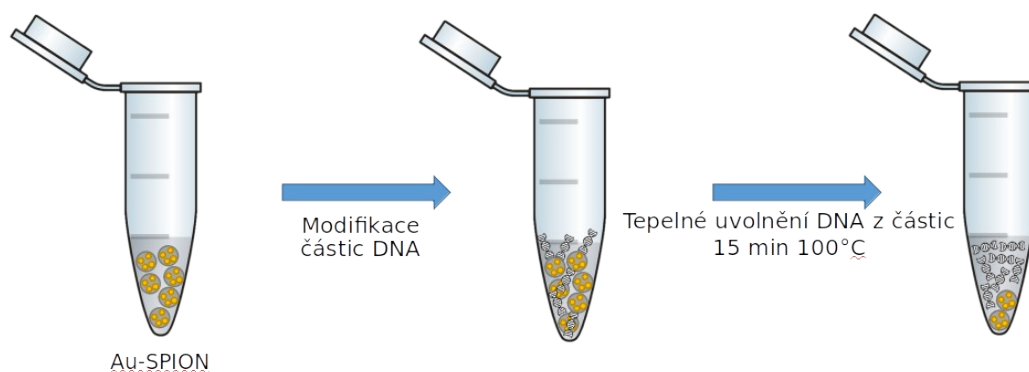
Obr. 17: Schéma vazby DNA nebo protilátek na částice modifikované kationty Na^+ (B) V případě, že částice nebudou modifikovány Na^+ kationty, DNA ani protilátky se nebudou moci navázat (A)

5.3 Optimalizace uvolnění DNA z částic

Abychom se zbavili nežádoucích látek, které mohou být obsaženy ve vzorku, je nutné Au-SPIION s navázaným virem, popřípadě DNA, promýt. Tím se ujistíme, že ve vzorku zůstanou pouze částice a to, co je na nich navázáno. Magnetické vlastnosti částic zásadně zjednodušují promývací krok. Po promytí je z viru na částicích uvolněna nukleová kyselina viru. Je-li tedy ve vzorku nukleová kyselina, můžeme s jistotou tvrdit, že pochází právě z VAMP.

Byly zkoumány podmínky pro uvolnění DNA z částic. Zkoumali jsme různé časy tepelného uvolnění DNA při 100 °C. Při 300 rpm byly sledovány časy 5, 15, 30 a 60 min. Maximální signál nukleových kyselin, tedy čas za který se z Au-SPIION uvolní všechna DNA byl stanoven na 15 min. Za účelem urychlení uvolnění byly vyzkoušeny i kratší časy (60, 120, 180 a 300 s) při vyšších otáčkách (1000 rpm). U tohot pokusu bylo maximálního výsledku dosaženo při 300 s. Signál zde byl však značně horšího, než při 15 min a 300 rpm. S ohledem na zachování citlivosti detekční metody jsme proto dále pracovali s uvolněním při 300 rpm a 15 min. Na základě těchto výsledků byl stanoven následující standardní operační postup pro promytí a následné uvolnění DNA z částic:

Zkumavky se umístí na magnet a odebere se tekutina. K promývání používáme fosfátový pufr (pH 7,0, 0,2 M) 500 μl . Zkumavka se umístí na třepačku (25 °C, 90 s, 300 rpm). Tento promývací proces se opakuje celkem třikrát. DNA je uvolněna pomocí tepla do elučního pufru. K částicím je přidáno 50 μl McIlvainaova pufru (pH 5,9) pro měření CPSA nebo acetátového pufru (pH 7), když chceme vzorky měřit voltametrií. Zkumavky jsou umístěny do termomixeru. Uvolnění probíhalo po dobu 15 min při 100 °C a míchání 350 rpm. Při tepelném uvolnění může dojít k rozdělení DNA na kratší úseky. To ovšem nijak neovlivní možnost úseky DNA následně detekovat. Roztok pufru s DNA uvolněné z částic je pomocí neodýmového magnetu oddělen od částic a přepipetován do nových zkumavek.



Obr. 18: Navázání DNA na Au-SPION nanočástice a po promytí následné uvolnění DNA z částic

5.4 Určení přítomnosti DNA ve vzorku

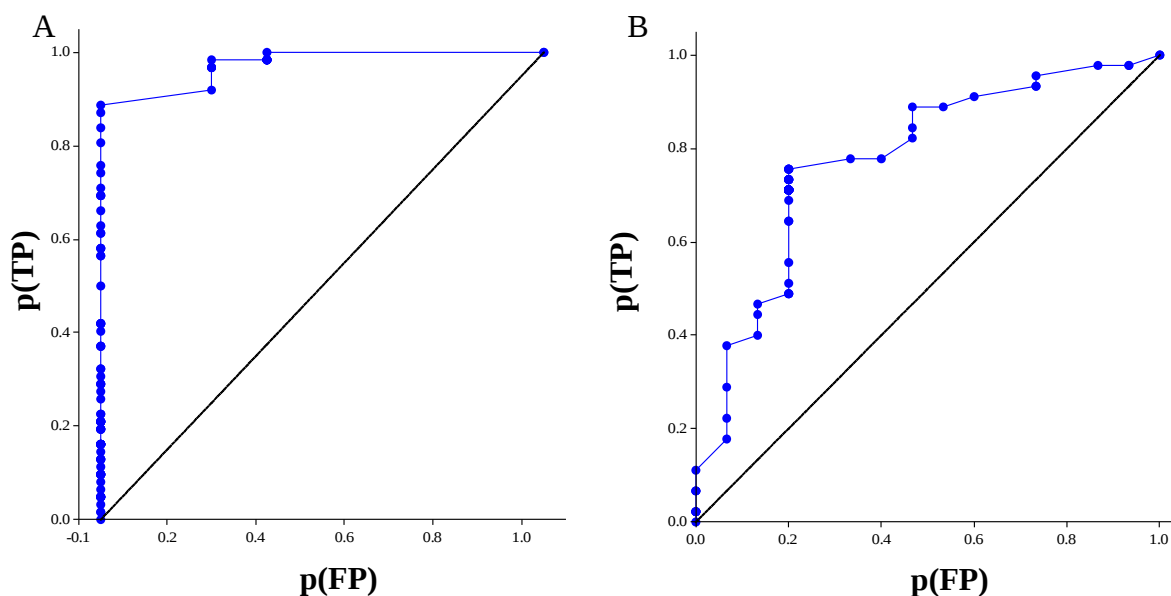
Pro ověření naší detekční metody je klíčová citlivá detekce nukleových kyselin. Proto jsme pro ověření jeho spolehlivosti a citlivosti navrhli řadu experimentů.

5.4.1 Selektivita a senzitivita CPSA analýzy gDNA

Nejprve jsme provedli experiment s gDNA. Pro ověření spolehlivosti rozpoznání pozitivních vzorků (s obsahem DNA) od negativních vzorků (bez obsahu DNA). Z hodnot naměřených pro jednotlivé vzorky byly vytvořeny průměry, ty byly následně zpracovány do ROC křivek, které nám ukazují, s jakou jistotou jsme schopni odlišit pozitivní vzorky od negativních vzorků.

Ze zásobního roztoku gDNA o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ bylo ředěním vodou vytvořeno 20 vzorků gDNA o různých koncentracích (100, 10, 1 a 0 $\mu\text{g/ml}$). Vzorkům byla přidělena náhodná čísla. Vzorky byly měřeny pomocí CPSA při proudu 10 μA a době trvání analýzy 180 s. Elektrolyt byla směs McIlvainova pufru (pH 5,9 1800 μl) a vzorku (200 μl). Přidáním vzorku k pufru byly tedy výsledné koncentrace zředěny na 10; 1; 0,1 a u $\mu\text{g/ml}$ DNA. Po každém měření byl vyměněn pufr za nový a elektrody omyty roztokem ethanolu (70%) a následně opláchnuty vodou. Zjistili jsme, že u vzorků bez přítomnosti DNA nebyl pozorován žádný signál. Při aplikování proudu 10, 5 μA . V případě, že jsme aplikovali DNA (100 $\mu\text{g/ml}$) byl získány signály při potenciálu $-1,7$ V při všech testovaných aplikovaných prouděch. Při koncentraci DNA 10 $\mu\text{g/ml}$ se signál vyskytoval u potenciálu $-1,75$ V u všech testovaných proudů. Při koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$ se pak signál pohyboval okolo potenciálu $-1,85$ V.

U měření vzorku v nádobce jsme z naměřených hodnot byli schopni jasně rozlišit mezi negativními a pozitivními vzorky (100%). U negativních vzorků nedocházelo k reakci a vzniku píku H. U pozitivních vzorků se pík objevoval ve 100 %. Určení, do jaké skupiny vzorků podle koncentrace (10; 1; 0,1 $\mu\text{g/ml}$) vzorek patří se na základě výšky signálu nepodařilo, nicméně skupinu vzorku bylo možné určit na základě potenciálu u kterého pík H vznikal. (Obr. 19)



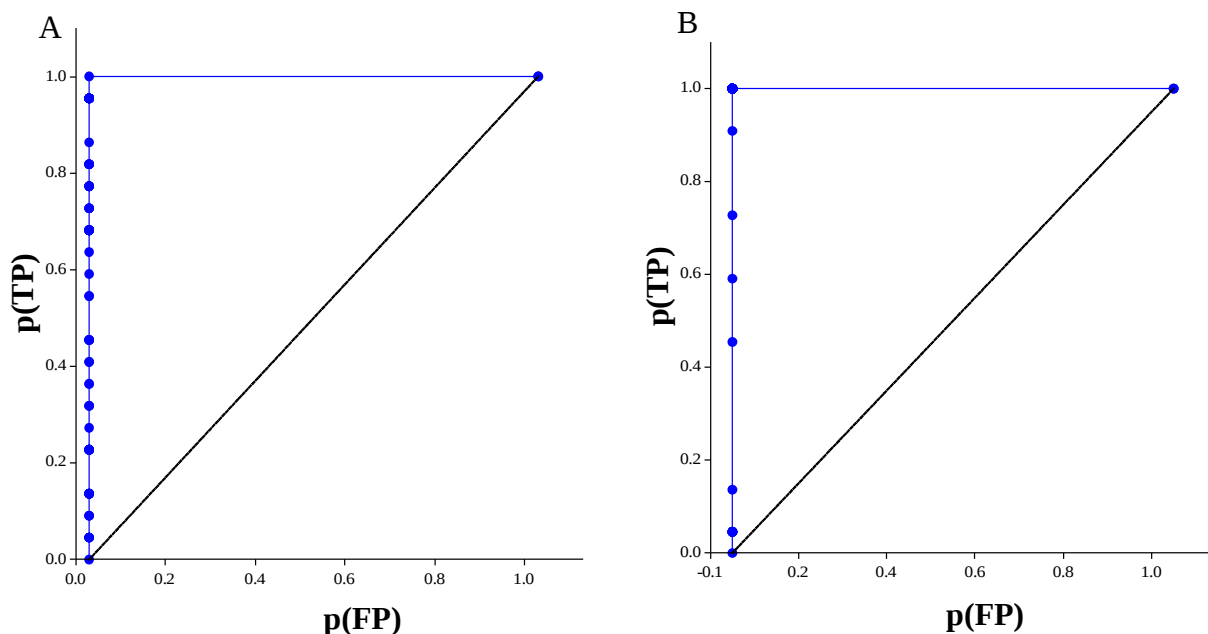
Obr. 19: ROC křivky ukazující specifitu měření na základě na základě výšky signálu píku H (A) a na základě potenciálu u kterého se pík H objevuje (B).

5.4.2 Senzitivita a selektivita stanovení gDNA a vDNA po vazbě na Au-SPION

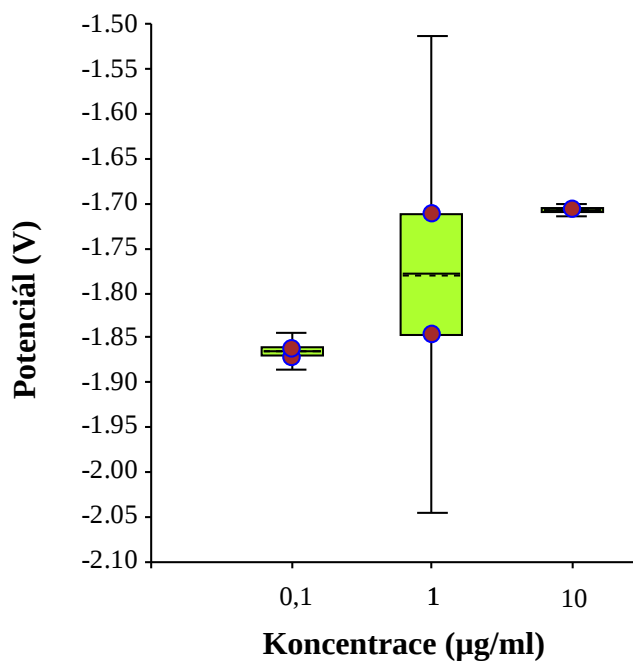
Následně bylo třeba ověřit, zda jsme schopni DNA detekovat i po vazbě na Au-SPION. Pokus byl nejprve proveden na gDNA. Stejný experiment byl následně proveden i s vDNA. Cílem tohoto experimentu bylo rozpoznat negativní vzorky, tedy vzorky neobsahující žádnou DNA od vzorků pozitivních, tedy vzorků s DNA. Z hodnot naměřených pro jednotlivé vzorky ($n = 10$) byly vytvořeny průměry, ty byly následně zpracovány do ROC křivek, které nám ukazují, s jakou jistotou jsme schopni odlišit pozitivní vzorky od negativních.

Bylo připraveno celkem 10 vzorků gDNA nebo vDNA v koncentracích (10; 1; 0,1 a 0 $\mu\text{g/ml}$ DNA). Každému vzorku bylo přiřazeno náhodné číslo. Podle výše zmíněných postupů byly připraveny Au-SPION. Ty byly podle výše zmíněného postupu modifikovány vzorky s gDNA a vDNA. Částice byly podle výše zmíněného postupu promyty a následně z nich byla DNA uvolněna. Vzorky byly měřeny pomocí CPSA s použitím metody adsorpčního přenosu. Elektroda byla modifikována kapkou vzorku o objemu 5 μl po dobu 60 s. Následná analýza probíhala po dobu 180 s při proudu 10 μA v McIlvainově pufru (pH 5,9). Každý vzorek byl měřen celkem třikrát a pro následné vyhodnocení byl použit průměr těchto hodnot.

Po navázání vzorků s gDNA na Au-SPION jsme se 100% úspěšností byli schopni rozlišit negativní vzorky od pozitivních. (Obr. 20) Změna potenciálu, u kterého H pík vzniká u jednotlivých skupin vzorků již nebyla tak patrná jako u měření v nádobce, bylo ale možné stále rozlišit vzorky s nejvyšší koncentrací (10 $\mu\text{g/ml}$), u kterých signál vznikal u potenciálu $-1,7$ V, od vzorků s nejmenší koncentrací (0,1 $\mu\text{g/ml}$), u kterých signál vznikal u potenciálu $-1,85$ V. (Obr. 21)



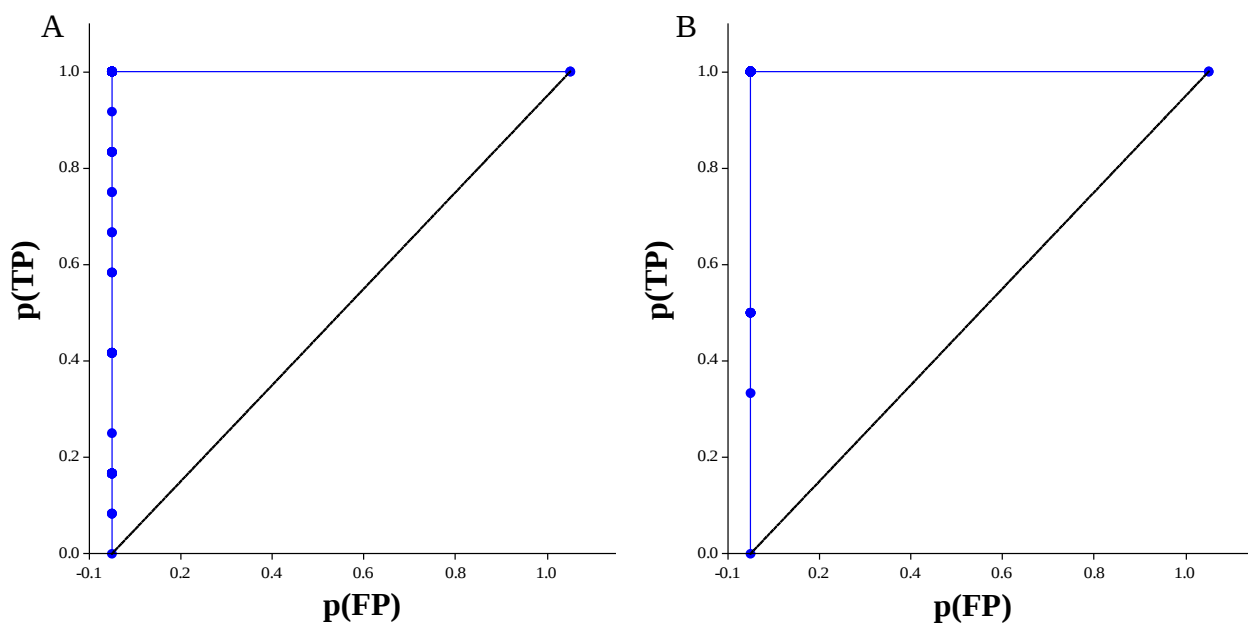
Obr. 20: ROC křivky ukazující specifitu měření na základě na základě výšky signálu píku H (A) a na základě potenciálu u kterého se pík H objevuje (B) pro měření na kuřecí DNA po vazbě na Au-SPION



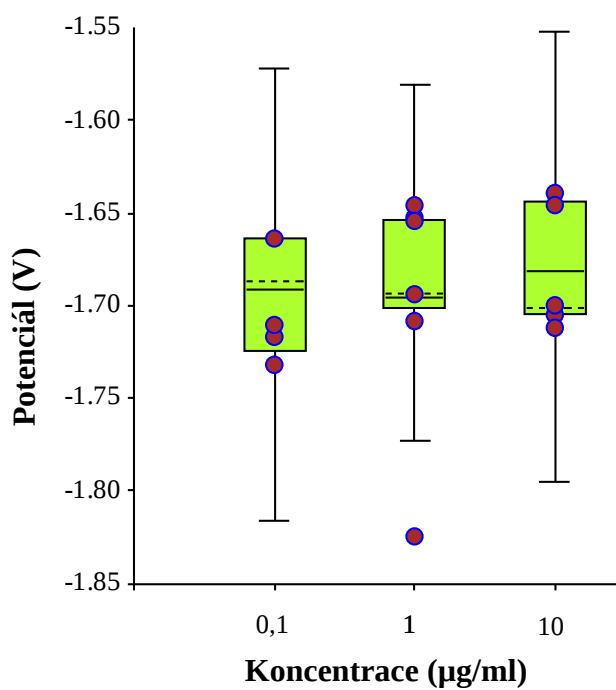
Obr. 21: Změna potenciálu u kterého se H pík vyskytuje mezi jednotlivými skupinami vzorků pro měření na kuřecí DNA po vazbě na Au-SPION

U vzorků vDNA jsme byly schopni se 100% úspěšností rozlišit negativní vzorky od pozitivních (Obr. 22), avšak rozpoznání, do jaké skupiny daný vzorek patří již nebylo možné. (Obr. 23) Signál píku H vznikl u všech skupin pozitivních vzorků u potenciálu $-1,7$ V. Tímto jsme dokázali, že jsme schopni spolehlivě rozlišit pozitivní vzorky od vzorků negativních, tudíž tato část naší metody pro detekci VAMP je zjevně spolehlivá, neboť jsme dosahovali stoprocentních výsledků.

Obr. 22: ROC křivky ukazující specifitu měření na základě na základě výšky signálu píku H (A) a na základě potenciálu u kterého se pík H objevuje (B) pro měření na DNA AMPV po vazbě na Au-SPION



Obr. 23: Změna potenciálu, u kterého se H pík vyskytuje mezi jednotlivými skupinami vzorků pro měření na DNA AMPV po vazbě na Au-SPION



6 DISKUSE

VAMP se přirozeně vyskytuje na africkém kontinentu v praseti savanovém (*Phacochoerus africanus*) a to bez symptomů onemocnění. Populace prasete savanového tak slouží jako rezervoár tohoto viru. Byl zaznamenán přenos VAMP na vektora, kterým je klíšťák rodu *Ornithodoros*.² Takto se patrně virus rozšířil na ostatní druhy prasat. U některých kmenů VAMP může u zvířat po prodělání onemocnění vznikat přirozená imunita,^[26] nicméně vzhledem k velice vysoké letalitě AMP není tato skutečnost řádně prozkoumána.

Mimo Afriku se AMP objevil naposledy v roce 2007 v Gruzii a od té doby se ho v Evropě a Asii nepodařilo zcela vymýtit. Na obrázku 5 můžeme vidět jednotlivé epidemie v Evropě, při kterých se AMP vyskytoval zejména u prasat divokých. Díky rozsáhlým protiepidemickým opatřením se zde vždy povedlo dostat epidemii pod kontrolu. Oproti tomu v Asii, zejména pak v Číně a Vietnamu, kde se AMP vyskytl ve větší míře od roku 2019 se toto onemocnění šíří ohromnou rychlostí a způsobuje obrovské ztráty v podobě úhynu celých chovů.^[1] Příčinou tohoto masivního šíření mohou být podmínky snadného kontaktu mezi zvířaty v porovnání s evropskými chovy, které právě kvůli šíření AMP podléhají přísným regulacím.^[5] U nás se brání v šíření AMP řadou protiepidemických opatření. Ty zahrnují dezinfekční režimy, zákaz vstupu nepovolaných osob do chovů, Likvidaci zvířat, která se dostala do styku s nakaženými jedinci. To v praxi znamená, že v případě výskytu AMP v chovu je celý chov zlikvidován.² Toto opatření je ovšem hůře proveditelné u volně žijících prasat divokých, což mělo za následek masivní odlovy a likvidaci divočáků v letech 2017 a 2018.^[27]

Rychlá a jednoznačná identifikace nakažených zvířat je v současnosti jednou z mála možností v boji s AMP. VAMP je také hledán v potravinách, neboť ty mohou ukazovat na nakažené chovy a v případě, že se dostanou do potravy zvířat, mohou být také zdrojem zavlečení infekce a vznik nových ohnisek nákazy.^[5]

V současnosti je nejpoužívanější detekce pomocí PCR a rPCR, ta ovšem vyžaduje odběr správného vzorku, následně izolaci a amplifikaci nukleových kyselin, což je časově a technicky náročný proces. Proto je potřeba hledat nové, rychlejší a jednodušší detekční metody.^[18,19]

Pro detekci VAMP existují i jiné elektrochemické metody, které využívají změny vlastností křemenného krystalu, v případě přítomnosti virových proteinů. Tyto metody osahují řádově stejných detekčních limitů,^[28-31] jsou nicméně založeny na elektrochemických vlastnostech proteinů obsažených na obalu viru. Metody detekce na základě prokázání přítomnosti DNA nicméně bývají obecně spolehlivější. Tyto metody navíc vždy vyžadují dobře vybavené laboratorní zázemí a časově nejsou rychlejší než detekce pomocí PCR testů. Oproti tomu naše metoda má potenciál při dalším vývoji fungovat i v terénu.

V této práci jsem se zabýval elektrochemickou detekcí, která by mohla přinést zjednodušení detekčních metod. Virovou nukleovou kyselinu zde analyzujeme přímo, bez nutnosti amplifikace. K tomu jsme využívali metody identifikace nukleové kyseliny voltametrií a CPSA. Autoři Paleček, Fojta a další při voltametrické analýze DNA pozorovali signál při

potenciálu -1,3 V, který je způsobený redukcí cytosinu a adeninu. Dále Fojta pozoroval katalytický signál P při potenciálu -1,5 V. Všechny tyto signály bylo možné potvrdit jak na gDNA, PCR tak vDNA. Pro zvýšení citlivosti detekce DNA by mohla být vhodná CPSA pro měření katalytického vylučování vodíku ze základního elektrolytu.^[12] Typický signál DNA (pík H) vzniká kolem potenciálu -1,75 V. Oproti tomu naše metoda má potenciál při dalším vývoji být použitelná i v terénu.

7 ZÁVĚR

Podářilo se ověřit schopnost zachycení DNA na Au-SPION. Vytvořený komplex umožnil pročištění vzorku od nežádoucích látek a následně analyzovat zachycenou DNA. Při použití metody adsorpčního přenosu (akumulace kapky o objemu 5 μ l na elektrodu po dobu 60 s) v kombinaci s měřením CPSA (proud použitý při analýze byl 10 μ A a doba trvání analýzy 180 s) jsem dosáhl nízkého detekčního limitu DNA (20 fmol v 5 μ l).

Prokázali jsme užitečnost elektrochemických metod pro detekci nukleových kyselin. Zejména pak chronopotenciometrická analýza se ukázala jako velice citlivá díky vzniku katalytické reakci (pík H). Další rozvoj této metody by mohl přinést zvýšení citlivosti a rychlosti detekce VAMP.

Další prací v této oblasti by mohla vzniknout spolehlivá metoda pro detekci VAMP, která by nevyžadovala amplifikaci nukleových kyselin. Metoda by mohla být prováděna s hůře vybaveným a eventuálně i žádným laboratorním zázemím. Jen tím, že není potřeba amplifikace nukleové kyseliny, se doba potřebná pro detekci virové DNA výrazně zkrátí. Když by se nám povedlo optimalizovat naši metodu tak, aby mohla být provedena na 3D tištěném čipu čas detekce by se ještě zkrátil.

Slibné výsledky této práce vybízejí k dalšímu rozvoji zde popsané metody. Nabízí se výzkum a optimalizace vazby VAMP na protilátku na Au-SPION, což by nás o další krok přiblížilo k zavedení selektivnější detekční metody tohoto viru. Tím bychom přispěli v boji s šířením nákazy AMP, neboť v časná detekce je v zamezení šíření nemoci.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] African Swine Fever (ASF) Report N°47: 2016 – 2020 / World Organisation for Animal Health [online]. 2020 [cit. 2020-10-11] Dostupné z: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/information-on-aquatic-and-terrestrial-animal-diseases/african-swine-fever/reports-on-asf/>
- [2] Blome, S., Gabriel, C. and Beer, M., 2013. Pathogenesis of African Swine Fever in Domestic Pigs and European Wild Boar. *Virus Research*, 173(1), pp.122-130.
- [3] Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F. and Escribano, J.M., 2018. ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae. *Journal of General Virology*, 99(5), pp.613-614.
- [4] Gallardo, C., Sánchez, E.G., Pérez-Núñez, D., Nogal, M., de León, P., Carrascosa, Á.L., Nieto, R., Soler, A., Arias, M.L. and Revilla, Y., 2018. African Swine Fever Virus (ASFV) Protection Mediated by NH/P68 and NH/P68 Recombinant Live-attenuated Viruses. *Vaccine*, 36(19), pp.2694-2704.
- [5] Fakta o AMP / Africký mor prasat [online]. 2017 [cit. 2020-10-13] Dostupné z: <http://www.africkymorprasat.cz/fakta-o-amp>
- [6] Wang, N., Zhao, D., Wang, J., Zhang, Y., Wang, M., Gao, Y., Li, F., Wang, J., Bu, Z., Rao, Z. and Wang, X., 2019. Architecture of African Swine Fever Virus and Implications for Viral Assembly. *Science*, 366(6465), pp.640-644.
- [7] Paleček, E. and Jelen, F., 2002. Electrochemistry of Nucleic Acids and Development of DNA Sensors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 32(3), pp.261-270.
- [8] Paleček, E., 1960. Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, 188(4751), pp.656-657.
- [9] Paleček, E., Ostatná, V. and Pechan, Z., 2014. Fifty Five Years of Nucleic Acid Electrochemistry. *Chemické Listy*, 108(5), pp.490-499.
- [10] Trnkova, E., Studničková, M. and Paleček, E., 1980. 360-Electrochemical Behaviour of Guanine and Its Derivatives. I. Fast Cyclic Voltammetry of Guanosine and Calf Thymus DNA. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 7(4), pp.643-658.
- [11] Boussicault, F. and Robert, M., 2008. Electron Transfer in DNA and in DNA-related Biological Processes. *Electrochemical Insights. Chemical Reviews*, 108(7), pp.2622-2645.

- [12] Paleček, E. and Postbieglová, I., 1986. Adsorptive Stripping Voltammetry of Biomacromolecules with Transfer of the adsorbed Layer. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 214(1-2), pp.359-371.
- [13] Paleček, E., 1988. New Trends in Electrochemical Analysis of Nucleic Acids. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 20(1-3), pp.179-194.
- [14] Paleček, E., Fojta, M., Jelen, F. and Vetterl, V., 2007. Electrochemical Analysis of Nucleic Acids. *Encyclopedia of Electrochemistry: 2007*, pp.365-427.
- [15] Oliveira-Brett, A.M., Piedade, J.A.P., Silva, L.D. and Diculescu, V.C., 2004. Voltammetric Determination of All DNA Nucleotides. *Analytical biochemistry*, 332(2), pp.321-329.
- [16] Brett, C.M., Brett, A.M.O. and Serrano, S.H., 1994. On the Adsorption and Electrochemical Oxidation of DNA at Glassy Carbon Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 366(1-2), pp.225-231.
- [17] Tellier, R., Bukh, J., Emerson, S.U. and Purcell, R.H., 2003. Long PCR Amplification of Large Fragments of Viral Genomes. *PCR Protocols*, pp.167-172.
- [18] King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D. and Drew, T.W., 2003. Development of a TaqMan® PCR Assay with Internal Amplification Control for the Detection of African Swine Fever Virus. *Journal of Virological Methods*, 107(1), pp.53-61.
- [19] Agüero, M., Fernández, J., Romero, L., Mascaraque, C.S., Arias, M. and Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2003. Highly Sensitive PCR Assay for Routine Diagnosis of African Swine Fever Virus in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), pp.4431-4434.
- [20] James, H.E., Ebert, K., McGonigle, R., Reid, S.M., Boonham, N., Tomlinson, J.A., Hutchings, G.H., Denyer, M., Oura, C.A., Dukes, J.P. and King, D.P., 2010. Detection of African Swine Fever Virus by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Journal of Virological Methods*, 164(1-2), pp.68-74.
- [21] Oura, C.A.L., Edwards, L. and Batten, C.A., 2013. Virological diagnosis of African Swine Fever—Comparative Study of Available Tests. *Virus Research*, 173(1), pp.150-158.
- [22] Jagner, D. and Graneli, A., 1976. Potentiometric Stripping Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 83, pp.19-26.
- [23] Fawcett, T., 2006. Introduction to Receiver Operator Curves. *Pattern Recognit. Lett*, 27, pp.861-874.

- [24] Frigge, M., Hoaglin, D.C. and Iglewicz, B., 1989. Some Implementations of the Boxplot. *The American Statistician*, 43(1), pp.50-54.
- [25] Yue, H., Shin, J.M., Tegafaw, T., Han, H.S., Chae, K.S., Chang, Y. and Lee, G.H., 2020. Magnetic Separation of Nucleic Acids from Various Biological Samples Using Silica-coated Iron Oxide Nanobeads. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(12), pp.1-12.
- [26] Oura, C.A.L., Denyer, M.S., Takamatsu, H. and Parkhouse, R.M.E., 2005. In Vivo Depletion of CD8⁺ T Lymphocytes Abrogates Protective Immunity to African Swine Fever Virus. *Journal of General Virology*, 86(9), pp.2445-2450.
- [27] Proďlalová, J., Václavek, P., Barták, P., Celer, V., Šatrán, P. and Faldyna, M., Africký mor prasat z pohledu epizootologie. Online Dostupné z: https://www.svujihlava.cz/intranet/publikace/VET_03_19_VI.pdf
- [28] Stiene, M. and Bilitewski, U., 1997. Electrochemical Detection of African Swine Fever Virus in Pig Serum With a Competitive Separation Flow Injection Analysis-immunoassay. *Analyst*, 122(2), pp.155-159.
- [29] Uttenthaler, E., Kößlinger, C. and Drost, S., 1998. Quartz Crystal Biosensor for Detection of the African Swine Fever Disease. *Analytica Chimica Acta*, 362(1), pp.91-100.
- [30] Uttenthaler, E., Kößlinger, C. and Drost, S., 1998. Characterization of Immobilization Methods for African Swine Fever Virus Protein and Antibodies with a Piezoelectric Immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 13(12), pp.1279-1286.
- [31] Abad, J.M., Pariente, F., Hernandez, L. and Lorenzo, E., 1998. A Quartz Crystal Microbalance Assay for Detection of Antibodies Against the Recombinant African Swine Fever Virus Attachment Protein p12 in Swine Serum. *Analytica Chimica Acta*, 368(3), pp.183-189.