

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mihaela ŠKULJ

**DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV V
BAKTERIJI *ESCHERICHIA COLI***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mihaela ŠKULJ

**DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV V BAKTERIJI
*ESCHERICHIA COLI***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF PLASMID COPY NUMBER IN
*ESCHERICHIA COLI***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na katedri za mikrobiologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Eksperimentalno delo je potekalo na dveh lokacijah: na Oddelku za nove tehnologije, program Biofarmacevtika v farmacevtski družbi Lek na lokaciji Kemijskega inštituta v Ljubljani in na Oddelku za molekularno biologijo, program Biofarmacevtika v farmacevtski družbi Lek na lokaciji v Mengšu.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorja pa doc. dr. Viktorja Menarta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Blagajana Herzog-Velikonja
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Viktor Menart
Lek farmacevtska družba d.d., Biofarmacevtika, Nove tehnologije

Član: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

7.4.2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mihaela Škulj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579:576.851.49(043.2)=863
KG	<i>E. coli</i> , določanje števila kopij plazmidov, ŠKP, agarozna gelska elektroforeza, PCR v realnem času, kvantitativni PCR
AV	ŠKULJ, Mihaela
SA	GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica) / MENART Viktor (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2006
IN	DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV V BAKTERIJI <i>ESCHERICHIA COLI</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XVI, 85 str., 24 pregl., 24 sl., 2 pril., 57 vir.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	Namen diplomskega dela je bil preiskusiti, optimizirati in ovrednotiti metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR) za določanje povprečnega števila kopij plazmidov v vzorcih kultur bakterije <i>Escherichia coli</i>. Pri optimizaciji smo preiskusili različne začetne oligonukleotide in sonde, različno kemijo (TaqMan in SYBR Green) in različno obdelavo vzorcev. Dokazali smo, da je najustreznejši nespecifični način zaznave s SYBR Green kemijo, izbrali smo ustrezne začetne oligonukleotide ter določili, da je 10-minutno gretje na 95°C in shranjevanje z zamrzovanjem na -20°C najprimernejši način predobdelave vzorcev za analizo s qPCR. Kot referenčno metodo smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo in barvanje DNA z etidijevim bromidom. Metodi smo ovrednotili glede na točnost, ponovljivost, mejo zaznave, območje linearnosti in kvantifikacije, robustnost, tehnično zahtevnost izvedbe in ceno. Ugotovili smo, da ima metoda qPCR večjo točnost (97%) in večjo ponovljivost, koeficient variacije za izolirano DNA je 7 % in za realne bakterijske vzorce 9 %. Metoda qPCR ima 100000-krat večjo občutljivost in 1000-krat širše območje kvantifikacije. Poleg tega omogoča tudi pregledovanje večjega števila vzorcev ob bistveno manjši količini vzorca. Tehnično je zahtevnejša od referenčne metode, predvsem v začetnih fazah optimizacije in pri kasnejši obdelavi podatkov, pa tudi dražja, kar je njena največja omejitev, vendar ima zaradi naštetih prednosti velik potencial za širšo uporabo.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDK 579:576.851.49(043.2)=863

CX *E. coli*, plasmid copy number determination, PCN, agarose gel electrophoresis, real time PCR, quantitative PCR, qPCR

AU ŠKULJ, Mihaela

AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor) / MENART Viktor (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biological Department

PY 2006

TI DETERMINATION OF PLASMID COPY NUMBER IN *ESCHERICHIA COLI*

DT Graduation Thesis (Univesity studies)

NO XVI, 85 p., 24 tab., 24 fig., 2 ann., 57 ref.

LA sl

AL sl / en

AB The aim of this graduation thesis was to examine, optimize and evaluate the quantitative polymerase chain reaction method (qPCR) for determining the average plasmid copy number in samples from *Escherichia coli* cultures. Various primers and probes as well as chemistries (TaqMan and SYBR Green) and sample treatments were tested to determine the most optimal qPCR assay. The use of non-specific detection with SYBR Green was shown to be the most suitable. The choice of adequate primers was than made and the most suitable pre-treatment of samples for qPCR analysis was determined (i.e. heating the samples at 95°C for 10 minutes and storage at -20°C). Agarose gel electrophoresis with DNA staining by ethidium bromide was used as the reference method. In order to evaluate both methods the following parameters were compared: accuracy, reproducibility, detection limits, linearity and quantification range, ruggedness, technical requirements and cost. The qPCR method was shown to have higher accuracy (97 %), and higher reproducibility with a coefficient of variation for isolated DNA 7 % and for real bacterial samples 9 %. It has a 100,000-fold higher sensitivity and 1,000-fold broader quantification range, allows the examination of a greater number of samples and requires smaller sample amount. It is technically more demanding than the reference method, especially in the starting phase of the optimization and in data processing. The biggest limitation of the qPCR method is its high cost. However, the above-listed advantages confirm its strong potential for broader application.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key word documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	XI
Kazalo prilog	XII
Okrajšave in simboli	XIII
Slovar manj znanih izrazov	XV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 POSREDNE METODE ZA DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV	3
2.2 NEPOSREDNE METODE ZA DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV	4
2.2.1 Centrifugiranje v gradientu cezijevega klorida (CsCl)	4
2.2.2 Kapilarna elektroforeza	4
2.2.3 »Metoda vrenja (boiling method)«	5
2.2.4 Visokotlačna tekočinska kromatografija	6
2.2.5 Metode, ki temeljijo na hibridizaciji nukleinskih kislin	6
2.2.5.1 Hibridizacija po Southernu	6
2.2.5.2 Hibridizacija točkovnega odtisa (dot blot)	7
2.2.5.3 Sendvič hibridizacija	7
2.2.6 Kompetitivni PCR	8
2.2.7 Agarozna gelska elektroforeza	8
2.2.8 Agarozna gelska elektroforeza v pulzirajočem polju	12
2.2.9 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	13
2.2.9.1 Zgodovina PCR v realnem času	13
2.2.9.2 Verižna reakcija s polimerazo	14
2.2.9.3 Kvantitativni PCR	15
2.2.9.4 PCR v realnem času	15
2.2.9.5 Načini zaznavanja	16
2.2.9.6 Inštrumenti	19
2.2.9.7 Interpretacija rezultatov	20

2.2.9.8	Analiza podatkov	22
2.2.9.9	PCR v realnem času, prednosti in slabosti	24
2.2.9.10	Možnosti uporabe	26
2.2.9.11	Priprava vzorcev za qPCR	26
2.2.9.12	Ovrednotenje metode PCR v realnem času	27
2.2.9.12.1	Točnost	27
2.2.9.12.2	Ponovljivost	28
2.2.9.12.3	Meja zaznave	28
2.2.9.12.4	Območje linearnosti	28
2.2.9.12.5	Območje kvantifikacije	28
2.2.9.12.6	Robustnost	28
3	MATERIAL IN METODE	29
3.1	SEV, KI SMO GA UPORABLJALI ZA DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV Z AGAROSNO GELSKO ELEKTROFOREZO IN qPCR	29
3.2	DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV Z AGAROSNO GELSKO ELEKTROFOREZO	29
3.2.1	Vzorci	29
3.2.2	Metoda	30
3.2.3	Obdelava podatkov	30
3.3	DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	31
3.3.1	Material in metode	31
3.3.1.1	Inštrument in reagenti	31
3.3.1.2	Vzorci	33
3.3.1.3	Priprava reakcij	34
3.3.1.4	Potek reakcij	36
3.3.1.5	Obdelava podatkov	36
3.3.2	Optimizacija metode qPCR	39
3.3.2.1	Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond za amplikon na nekodirajoči regij	39
3.3.2.2	Izbira ustreznih amplikonov (kodirajoča/nekodirajoča regija)	40
3.3.2.3	Priprava vzorcev bakterijske kulture po odvzemu iz fermentorja	40
3.3.2.4	Priprava referenčnega materiala	42
3.3.2.4.1	Priprava referenčnega materiala na osnovi izračunanih vrednosti	42
3.3.2.4.2	Priprava referenčnega materiala na osnovi prekrivanja amplifikacijskih krivulj	43

3.3.2.4.3	Zmanjšanje kontaminacije plazmidne DNA s kromosomsko in obratno	44
3.3.2.4.3.1	Izolacija plazmidne DNA	44
3.3.2.4.3.2	Izolacija kromosomske DNA	44
3.3.2.4.3.3	Čiščenje plazmidne DNA s CIM-diski	45
3.3.2.4.3.4	Čiščenje plazmidne DNA iz gela	45
3.3.3	Določanje števila kopij plazmidov pri realnih vzorcih	46
3.3.3.1	Vzorci	46
3.3.3.2	Metoda	46
3.3.3.3	Obdelava podatkov	46
3.3.4	Ovrednotevnje metode qPCR	47
3.3.4.1	Točnost in ponovljivost	47
3.3.4.2	Specifičnost	47
3.3.4.3	Meje zaznave in kvantifikacije	47
3.3.4.4	Območje linearnosti in kvantifikacije	48
3.3.4.5	Robustnost	48
4	REZULTATI	49
4.1	DOLOČANJE POVPREČNEGA ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV Z AGAROSNO GELSKO ELEKTROFOREZO (REFERENČNA METODA)	49
4.2	DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	51
4.2.1	Optimizacija metode qPCR	51
4.2.1.1	Optimizacija koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond za amplikon na nekodirajoči regiji	51
4.2.1.2	Izbira ustreznih amplikonov (kodirajoča/nekodirajoča regija)	54
4.2.1.3	Obdelava vzorcev bakterijske kulture po odvzemu iz fermentorja	56
4.2.1.4	Priprava referenčnega materiala	59
4.2.1.4.1	Priprava referenčnega materiala na osnovi izračunanih vrednosti	59
4.2.1.4.2	Priprava referenčnega materiala na osnovi prekrivanja amplifikacijskih krivulj	60
4.2.1.5	Čiščenje plazmidne DNA s CIM-diski	62
4.2.2	Določanje števila kopij plazmidov pri realnih vzorcih	62
4.2.3	Ovrednotevnje metode qPCR	64
4.2.3.1	Točnost	64
4.2.3.2	Specifičnost	65
4.2.3.3	Meje zaznave in kvantifikacije	66
4.2.3.4	Območje linearnosti in območje kvantifikacije	66

4.2.3.6	Robustnost	67
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	68
5.1	RAZPRAVA	68
5.1	SKLEPI	76
6	POVZETEK	78
7	VIRI	81
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Prikazi različnih načinov predobdelave vzorcev <i>E. coli</i> za kasnejšo kvantitativno analizo s qPCR	27
Preglednica 2:	Začetni oligonukleotidi in sonde za TaqMan kemijo	32
Preglednica 3:	Začetni oligonukleotidi za SYBR Green kemijo	32
Preglednica 4:	Količine komponent reakcijske mešanice za eno reakcijo	35
Preglednica 5:	Količine komponent reakcijske mešanice za IPC kontrolo za eno reakcijo	36
Preglednica 6:	Pogoji pomnoževanja za SYBR Green in TaqMan kemijo	36
Preglednica 7:	Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov za TaqMan kemijo	39
Preglednica 8:	Izračun ŠKP z agarozno gelsko elektroforezo z upoštevanjem vseh vrednosti gelov A in B in treh različnih osvetlitev	49
Preglednica 9:	Izračun ŠKP z agarozno gelsko elektroforezo z upoštevanjem izbranih vrednosti gelov A in B in treh različnih osvetlitev	49
Preglednica 10:	Tm za amplikone na kodirajoči in nekodirajoči regiji plazmidne in kromosomske DNA	54
Preglednica 11:	Razlike v Ct vrednostih med z RNazo obdelanimi in neobdelanimi vzorci (TaqMan kemija)	55
Preglednica 12:	Razlike v Ct vrednostih med z RNazo obdelanimi in neobdelanimi vzorci (SYBR Green kemija)	55
Preglednica 13:	Odstopanje različno obdelanih vzorcev od regresijske premice	58
Preglednica 14:	Izračunana in določena razmerja med kromosomsko in plazmidno DNA	59
Preglednica 15:	Določeno število kopij plazmidov v referenčnem materialu (kromosom:plazmid)	60
Preglednica 16:	Določeno število kopij plazmidov v referenčnem materialu (bakterija:plazmid)	61
Preglednica 17:	Določanje števila kopij plazmidov pri realnih vzorcih	63
Preglednica 18:	Povprečne vrednosti ŠKP za obdelane vzorce 1, 2, 4 in 5	63
Preglednica 19:	Povprečno odstopanje eksperimentalno določenega ŠKP od izbranega razmerja v območju kvantifikacije za referenčni material	64
Preglednica 20:	Koeficienti variacije za izolirano kromosomsko DNA in bakterije	65
Preglednica 21:	Primejava agarozne gelske elektroforeze in qPCR	79
Preglednica 22:	Tekoče gojišče LBP/kan30 medij	Priloga B

Preglednica 23: Tekoče gojišče LBPG/kan30 medij

Priloga B

Preglednica 24: Tekoče produkcijsko gojišče GYSP + 0,4 mM IPTG za
produkcijo v bioreaktorju

Priloga B

KAZALO SLIK

Slika 1:	Verižna reakcija s polimerazo	14
Sliki 2A in 2B:	Krivulji pomnoževanja vzorca (amplifikacijski krivulji)	16
Slika 3:	Pomnoževanje DNA z uporabo fluorescentnega označevalca SYBR Green	17
Slika 4:	Princip fluorescentnega resonančnega prenosa energije (FRET)	18
Slika 5:	Pomnoževanje DNA z uporabo TaqMan kemije	19
Sliki 6A in 6B:	Amplifikacijska krivulja in talilna krivulja	20
Slika 7:	Standardna krivulja	22
Slika 8:	Slika ploščice	34
Slika 9:	Obdelava vzorcev po odvzemu iz fermentorja	41
Slika 10:	Slika gela A	50
Slika 11:	Primerjava Ct vrednosti različnih koncentracij 3' in 5' začetnih oligonukleotidov za amplikon na kromosomu	51
Slika 12:	Primerjava Ct vrednosti različnih koncentracij 3' in 5' začetnih oligonukleotidov za amplikon na plazmidu	52
Slika 13:	Primerjava Ct vrednosti različnih koncentracij sond za amplikon na kromosomu in plazmidu	53
Slika 14:	Primerjava fluorescence različnih koncentracij sond za amplikon na kromosomu in plazmidu	53
Slika 15:	Razlike v Ct vrednostih med z RNazo obdelanimi in neobdelanimi vzorci (TaqMan kemija)	55
Slika 16:	Razlike v Ct vrednostih med z RNazo obdelanimi in neobdelanimi vzorci (SYBR Green kemija)	56
Slika 17:	Razlike v Ct vrednostih plazmidne DNA različno obdelane bakterijske kulture iz fermentorja	57
Slika 18:	Razlike v Ct vrednostih kromosomske DNA različno obdelane bakterijske kulture iz fermentorja	57
Sliki 19A in 19B:	Odstopanje razmerja kromosom:plazmid različno obdelanih vzorcev od regresijske premice v dveh različnih gojiščih	58
Slika 20:	Določeno število kopij plazmidov v referenčnem materialu (krom.:plaz.)	60
Slika 21:	Določeno število kopij plazmidov v referenčnem materialu (bakt.:plaz.)	61
Slika 22:	Čiščenje plazmidne DNA s CIM-diski	62
Slika 23:	Prikaz poteka analize od gojenja vzorcev do izračuna ŠKP	63
Slika 24:	Določanje ŠKP s qPCR	69

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam aparatov

Priloga B: Sestave gojišč

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp:	bazni par
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
CCC:	dodatno zvita oblika plazmida (angl.: covalently closed circle)
CIM:	kolona z monolitnim kromatografskim nosilcem, ki ima za osnovo CIM disk (angl.: Convective Interaction Media)
CsCl:	cezijev klorid
Ct (threshold cycle):	cikel v katerem amplifikacijska krivulja seka prazno vradnost
CV:	koeficient variacije
$\Delta\Delta Ct$:	delta delta Ct
DNA:	deoksiribonukleinska kislina
dNTP:	deksiribonukleotid trifosfat
E:	učinkovitost pomnoževanja
ELISA:	encimsko imunski test (angl.: enzyme-linked immunosorbent assay)
EtBr:	etidijev bromid
FAM:	fluorescentno barvilo 6-karboksifluorescein, reporter
FIA:	»flow injection analysis«
FRET:	fluorescence resonance energy transfer-princip fluorescentnega
G/C:	gvanin/citozin
GYSP:	gojišče z glavnimi komponentami glukoza, kvasni ekstrakt, sol in fiton
HPLC:	visokotlačna tekočinska kromatografija
IPC:	interna pozitivna kontrola
Kbp:	kilo bazni par
KOH:	kalijev hidroksid
LBP/kan30:	Luria-Bretani s fitonom in kanamicinom 30 mg/ml
LBPG/kan30:	Luria-Bretani s fitonom, glukozo in kanamicinom 30mg/ml
MBK:	mikrobiološka komora
MGB:	»Minor Groove Binder« (molekula, ki je vezana na 3'koncu sonde in je nefluorescentni dušilec)
MgSO ₄ :	magnezijev sulfat
mRNA:	informacijska ribonukleinska kislina (angl.: messenger RNA)
NaCl:	natrijev klorid
NaI:	natrijev jodid
NCBI:	National Center of Biotechnology Information
NTC:	non template control-negativna kontrolna reakcija
OC:	oblika plazmida odprti krog (angl.: open circle)
OD:	optična gostota (angl.: optical density)
PCR:	verižna reakcija s polimerazo (angl.: polimeraze chain rection)
PFGE:	pulsed field gel electrophoresys-gelska elektroforeza v pulzirajočem polju
qPCR:	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl.: quantitative polimeraze chain reaction)
R ² :	korelacijski koeficient
RLU:	relativne svetlobne enote (angl.: relative fluorescence unit)
Rn:	relativne enote fluorescence
RNaza:	encim za ragrađnjo RNA

ROX:	fluorescentno barvilo 6-karboksi-X-rodamin, pasivna referenca
SD:	standardna deviacija
SYBR Green:	barvilo za zaznavanje PCRproduktov
ŠKP:	število kopij plazmidov
TAMRA:	fluorescentno barvilo karboksitetrametilrodamin, dušilec
TaqMan:	tip kemije za zaznavanje PCR produktov, ki vključuje specifično fluorescentno označeno sondo in začetne oligonukleotide
Taq polimeraza:	polimeraza iz bakterije <i>Thermus aquaticus</i>
	resonančnega prenosa energije
Tm:	temperatura pri kateri je 50% DNA v obliki enojne verige

SLOVAR MANJ ZNANIH IZRAZOV

amplifikacija:	pomnoževanje
amplifikacijska krivulja:	krivulja, ki prikazuje potek pomnoževanja DNA v času
amplikon:	odsek DNA, ki ga pomnožujemo s PCR
bazna linija:	cikli, v katerih se fluorescentni signal akumulira, vendar jakost fluorescence še ne doseže praga detekcije
Ct:	cikel v katerem fluorescenca preseže prazno vrednost
talilna krivulja:	krivulja ki prikazuje odvisnost fluorescence od temperature pri denaturaciji dvoverižne DNA; Iz nje odčitamo T _m (temperaturo taljenja).
dušilec:	barvilo, ki v bližini donorskega barvila sprejema njegovo energijo in s tem duši fluorescenco
hibridni dupleks:	produkt hibridizacije
hibridizacija:	parjenje dveh enoverižnih nukleinskih kislin po principu komplementarnosti
interkalacija:	vgrajevanja barvila v dvoverižno DNA
kalibrator:	znana količina DNA glede na katero s primerjavo Ct vrednosti umerimo ostale vzorce, kot standard pa jo lahko nanesemo na vsako PCR ploščico
matrična DNA:	DNA, ki jo pomnožujemo
multikomponentni graf barvil:	graf, ki prikazuje fluorescence vseh barvil tekom PCR reakcije
pasivna referenca:	barvilo, ki se uporablja za korekcijo nihanja fluorescence, ki izvira iz »šuma« aparata
referenčni gen:	gen glede na katerega relativno primerjamo število kopij gena v vzorcu pri relativni kvantifikaciji
referenčni material:	material pripravljen iz znanih razmerij med referenčnim in iskanim genom s pomočjo katerega določamo točnost metode
reporter:	donorsko barvilo, ki po ekscitaciji oddaja energijo v obliki fluorescence
qPCR:	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času; namesto qPCR se uporablja tudi real-time PCR
sonda:	kratek oligonukleotid z vezanim barvilom, ki se specifično veže na odsek DNA, ki ga pomnožujemo; Polimeraza zaradi eksonukleazne funkcije sondo razcepi in na ta način sproži fluorescenco, s pomočjo katere določamo količino PCR produktov.
standardna DNA:	DNA znane količine s katero pripravimo standardno krivuljo
standardna krivulja:	krivulja, ki prikazuje razmerje med Ct vrednostmi in logaritemskimi vrednostmi količin standardne DNA
transformacija:	vnos DNA v bakterijsko celico brez sodelovanja drugih organizmov

vektor:	molekula DNA, ki je prirejena za prenos tuje DNA v celico; običajno plazmid ali fag
začetni oligonukleotid:	kratek oligonukleotid, ki se specifično veže na 5' ali 3' konec DNA

1 UVOD

V zadnjem času je v farmaciji vse bolj pomembna proizvodnja rekombinantnih učinkovin, ki jih uporabljamo kot terapijke in cepiva. Biotehnoška proizvodnja nam omogoča lažje in cenejše pridobivanje terapevtskih proteinov kot klasični postopki, ker jih na ta način lahko proizvajamo v večjih količinah (Shin in sod., 1997). Tako proizvajamo mnoga zdravila, kot so humani inzulin, eritropoetin, interferon, filgrastim in mnoge druge.

Gen za rekombinantni protein največkrat vključimo v plazmid, tega pa vstavimo v bakterijske celice. Da bi bila produkcija terapevtskega proteina na celico čim večja, je pomembno, da izberemo bakterijski sev, vektor in rastne pogoje s katerimi dosežemo čim večjo akumulacijo želenega proteina. Plazmidi, ki jih uporabljamo kot vektorje, so v ta namen konstruirani tako, da z učinkovito transkripcijo zagotavljajo nastajanje velikega števila informacijskih RNA za tarčni protein. Imajo močne promotorje in učinkovita vezavna mesta za ribosome, ki omogočajo visoko ekspresijo tarčnega proteina v celici. Poleg navedenega lahko produkcijo proteinov povečamo s povečanjem števila kopij plazmidov, ki imajo gen za terapevtski protein (Schendel in sod., 1989; Morino in sod., 1988). Po drugi strani lahko visoko število plazmidov v celici prinaša določene slabosti. S pretiranim povečevanjem števila kopij plazmidov produkcija rekombinantnega proteina več ne narašča sorazmerno, ampak celo upada (Carrier in sod., 1998). Intenzivna transkripcija lahko moti normalno replikacijo plazmidne DNA. Pri zelo velikem številu kopij plazmidov (nad 2000) lahko pride do smrti celice zaradi motenj pomnoževanja celične DNA ali zaradi toksičnosti tarčnega proteina (Schendel in sod., 1989). Poleg tega visoko število kopij plazmidov za celico predstavlja dodatno obremenitev, ki lahko privede do upada rasti celic. Celice s plazmidi rastejo počasneje kot celice brez njih, v primeru velikega števila kopij pa se lahko rast in delitev popolnoma zaustavita (Seo in Bailey, 1985). Z naraščanjem števila kopij plazmidov lahko upade tudi ekspresija tarčnega gena (Peretti in Bailey, 1987). Da bi dosegli čim večjo učinkovitost pri produkciji rekombinantnega proteina moramo zagotoviti optimalno število kopij plazmidov (Nordström in Uhlin, 1992).

Na število plazmidov v celici vpliva tudi njihova segregacijska stabilnost. V primeru, da je v celici število kopij plazmidov visoko, je velika verjetnost, da bo to število visoko tudi v hčerinskih celicah. Če med procesom gojenja naraste število celic brez plazmidov, lahko te prerastejo celice s plazmidi, saj podvojevanje in ekspresija plazmidov porabljata vire in energijo, kar lahko povzroči zmanjšanje rasti celic. Kultura, ki vsebuje veliko število celic brez plazmidov, bo tako imela manjšo produktivnost. Poleg tega je število kopij plazmidov

odvisno tudi od različnih dejavnikov v celici in okolju (gojišče). Pomembna je na primer rast celic, saj je pri počasneje rastočih celicah število plazmidov višje. Velik vpliv ima v povezavi s tem tudi sestava rastnega gojišča (povzeto po Schmidt in sod., 1996).

Kot vidimo, je število kopij plazmidov v proizvodnji rekombinantnih učinkovin zelo pomemben dejavnik, zato je razvoj hitrih, enostavnih in zanesljivih metod za njegovo določanje velikega pomena. Danes so na voljo mnoge metode za določanje števila kopij plazmidov, ki pa imajo določene pomanjkljivosti. V tem diplomskem delu smo se zato odločili za preverjanje možnosti uporabe kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času v ta namen.

2 PREGLED OBJAV

Za določanje števila kopij plazmidov so bile razvite številne posredne in neposredne metode. Posredne temeljijo na določanju funkcije proteinov, katerih genski zapis se nahaja na plazmidu (Schendel in sod., 1989; Coronado in sod., 1994). Neposredne metode pa temeljijo na določanju neposrednega števila kopij plazmidov. Pri slednjih moramo ponavadi najprej ločiti plazmidno DNA od kromosomske.

Med neposredne metode, pri katerih za kvantifikacijo uporabljamo celokupno celično DNA, sodita hibridizacija točkovnega odtisa (Hinnebusch in Barbour, 1992; Schendell in sod., 1989) in sendvič hibridizacija (Kropela in sod., 1987). Pogostejše pa so metode, pri katerih moramo kromosomsko in plazmidno DNA najprej ločiti. Sem sodijo: centrifugiranje v gradientu CsCl (Shepard in Polisky, 1979), HPLC (Copella in sod., 1986), gelska elektroforeza (Projan in sod., 1983), hibridizacija po Southernu (Ollson in sod., 1993; Hinnebusch in Barbour, 1992), kapilarna elektroforeza (Schmidt in sod., 1996; Breuer in sod., 1998), metoda vrenja (Ivanov in Bachvarov, 1986) in kompetitivna verižna reakcija s polimerazo (Trefault in sod., 2002).

V literaturi pa za določanje števila kopij plazmidov že zasledimo tudi kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (Lee in sod., 2005; Lovatt, 2002; Providenti in sod., 2005).

2.1 POSREDNE METODE ZA DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV

Pri posrednih metodah za določanje števila kopij plazmidov kvantificiramo protein, ki je kodiran na plazmidu, katerega število kopij določamo. Pogosto določamo aktivnost encima, ker pa nanjo vplivajo mnogi dejavniki, le redko obstaja linearno razmerje med aktivnostjo encima in številom kopij plazmidov (Schmidt in sod., 1996). Pogosto se gen za indikatorski protein vstavi v gen za tarčni protein, tako da kot končni produkt nastane fuzijski protein. Pri tem pogosto prihaja do napak zaradi različne kinetike obeh encimov ali različne hitrosti denaturacije proteinov (fuzijski protein ima lahko manjšo specifično aktivnost kot nativni protein, lahko pa pride tudi do njegove hitrejše razgradnje) (Schendel in sod., 1989).

Schendel s sodelavci (1989) je razvil metodo, pri kateri določamo število kopij plazmidov posredno preko ekspresije indikatorskega gena. Pripravimo indikatorski vektor pri katerem je transkripcija indikatorskega gena pod kontrolo istega promotorja kot transkripcija tarčnega gena za rekombinantni protein. Gen za indikatorski protein pri tem ni vstavljen v

gen za tarčni protein, ampak leži poleg njega (zaradi tega ne nastane fuzijski protein, temveč pride do nastanka dveh različnih proteinov). Avtorji so kot indikator v plazmid vgradili gen za alkalno fosfatazo. Njeno aktivnost so zaznavali "on-line" z metodo FIA (flow injection analysis) med rastjo celic. S poskusi so dokazali dobro korelacijo med številom kopij plazmidov in specifično aktivnostjo alkalne fosfataze (Schendel in sod., 1989).

Nekoliko drugačno metodo je opisal Coronado s sodelavci (1994). V vektorski plazmid so vstavili gen za luciferazo. Po gojenju so celičnim ekstraktom dodali luciferin in z luminometrom pri 560 nm izmerili emisijo svetlobe. Specifično encimatsko aktivnost so podali v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Število kopij plazmidov (ŠKP) so določili iz razmerja med RLU in optično gostoto celic pri 600 nm (OD_{600}). S to metodo lahko natančno določamo število kopij plazmidov do 30, pri višjih ŠKP pa njihovo število podcenimo, ker pride pri zelo visokih ŠKP (500 in več) do zasičenja sintetskega aparata ali tolerance celice za protein (Coronado in sod., 1994).

2.2 NEPOSREDNE METODE ZA DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV

2.2.1 Centrifugiranje v gradientu cezijevega klorida (CsCl)

Gre za eno starejših metod, ki temelji na centrifugiranju celotnega celičnega lizata ali pa očiščene DNA v gradientu CsCl, ki vsebuje interkalirajoče barvilo etidijev bromid (EtBr). Problem metode je v tem, da omogoča le zaznavanje plazmidov, ki se nahajajo v dodatno zviti krožni obliki (CCC oblika). S centrifugiranjem pri visoki hitrosti lahko ločimo kromosomsko DNA od plazmidne. Tu predstavljajo problem prelomi plazmida in delovanje nespecifičnih endonukleaz, ki lahko povzročijo, da plazmidno DNA zaznamo v enakih pasovih kot kromosomsko DNA. Podobno velja za centrifugiranje v saharoznem gradientu.

Centrifugiranje v CsCl daje zanesljive rezultate pri določanju ŠKP v primeru, ko se plazmid in kromosom močno razlikujeta glede na sestavo baznih parov (Shepard in Polisky, 1979; Weisblum in sod., 1979; Weaver in sod., 1993).

2.2.2 Kapilarna elektroforeza

Število kopij plazmidov lahko določamo tudi s kapilarno elektroforezo. V literaturi zasledimo dva različna pristopa.

Schmidt s sodelavci (1996) opisuje metodo za določanje števila kopij plazmidov, pri kateri je potrebna izolacija plazmidne DNA (najlažje s komercialnim kitom) in določanje njene koncentracije s kapilarno elektroforezo na osnovi standardne krivulje. Število kopij so določali v znanem številu celic, in sicer na podlagi optične gostote.

Ker poznamo število celic iz katerih smo izolirali plazmidno DNA, njeno maso (m) in koncentracijo (c), lahko izračunamo število kopij plazmidov po Enačbi 1:

$$\text{ŠKP} = \frac{c \times pDNA}{m \times pDNA} / \text{št.celic} \quad (1)$$

Prednost metode je njena hitrost, saj celoten postopek lahko izvedemo v 30 minutah (Schmidt in sod., 1996).

Breuer in sodelavci (1998) pa opisujejo metodo, pri kateri število kopij plazmidov določajo s pomočjo notranjega standarda znane koncentracije. Tudi pri tej metodi je potrebna izolacija plazmidne DNA. Ob izolaciji dodamo tudi interni standard znane koncentracije, saj na ta način izničimo izgube do katerih pride ob izolaciji DNA. Plazmid in standard nato lineariziramo z restriktijsko endonukleazo. Vzorec ločimo s kapilarno elektroforezo. Ker poznamo koncentracijo notranjega standarda (st), lahko količino plazmida v vzorcu izračunamo po Enačbi 2, število kopij plazmidov pa nato izračunamo po Enačbi 3:

$$\text{Kolicina } pDNA = \frac{\text{izmerjena } pDNA}{\text{izmerjen notranji } st} \times \text{kolicina } st. \text{ v vzorcu} \quad (2)$$

$$\text{ŠKP} = \frac{\text{št. bp } kDNA \times \text{kolicina } pDNA \text{ v vzorcu}}{\text{št. bp } pDNA \times \text{kolicina } kDNA \text{ v vzorcu}} \quad (3)$$

Problem je slaba občutljivost zaznavanja z merjenjem UV absorbcije pri 260 nm, kar Schmidt s sodelavci rešuje z uporabo interkalirajočih fluorescentnih barvil in lasersko indukcijo fluorescence (Schmidt in sod., 1996).

2.2.3 »Metoda vrenja (boiling method)«

Metoda ne zahteva predhodnega ločevanja plazmidne in kromosomske DNA. Temelji na označevanju celic s [H^3]-timidinom. Izvedemo lizo celic z dodatkom lizocima in 40 sekund držimo v vreli vodi. Lizat centrifugiramo, pri čemer ostane plazmidna DNA v

supernatantu, kromosomska pa v peletu. Plazmidno DNA oborimo in izmerimo [H^3] radioaktivnost obeh peletov. ŠKP izračunamo po Enačbi 4:

$$\check{SKP} = \frac{G_s \times R_1}{G_p \times R_2} \quad (4)$$

G_s je velikost kromosomske DNA (v Daltonih), G_p je velikost plazmidne DNA, R_1 je radioaktivnost plazmidne frakcije, R_2 pa radioaktivnost kromosomske frakcije.

Prednost metode je v tem, da ni potrebna izolacija celokupne celične DNA in ločevanje na plazmidno in kromosomsko, saj na ta način ohranimo njuno dejansko razmerje v celici in prihranimo čas in stroške izolacije. Poleg tega metode ponavadi temeljijo na ločevanju različnih oblik plazmidne DNA, pri čemer pa ni zagotovila, da DNA med procesom izolacije prvotno obliko resnično ohrani. Metodo opisujejo kot hitro, enostavno in ponovljivo (Ivanov in Bachvarov, 1986), vendar za delo z radioaktivnim materialom rabimo poseben laboratorij. Tudi sicer se v praksi izogibamo uporabi radioaktivnih izotopov.

2.2.4 Visokotlačna tekočinska kromatografija

Za ločevanje plazmidne in kromosomske DNA lahko uporabljamo tudi visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Plazmidno DNA nato določimo na osnovi UV absorbcije pri 260 nm. Katera DNA se nahaja v posameznih vrhovih ugotovimo s pomočjo ločevanja frakcij na agaroznem gelu (Copella in sod., 1986).

2.2.5 Metode, ki temeljijo na hibridizaciji nukleinskih kislin

2.2.5.1 Hibridizacija po Southernu

Gre za metodo, pri kateri fragmente DNA po ločevanju na agaroznem gelu prenesemo na nosilec in jih hibridiziramo z označenimi sondami. Najprej izvedemo alkalno denaturacijo dvoverižne DNA, kar povzroči njeno fragmentacijo in olajša prenos na membrano, hkrati pa omogoči kasnejšo tvorbo hibridnih dupleksov med DNA in sondo. Pred prenosom gel nevtraliziramo in preprečimo nadaljno hidrolizo molekul DNA. DNA prenesemo na membrano in izvedemo hibridizacijo, nato pa z nosilca speremo nespecifično vezane sonde. Na koncu zaznavamo sonde glede na način označevanja (označevanje z

radioaktivnimi izotopi, fluorescentno označevanje, označevanje z alkalno fosfatazo ali digoksinom) (Herzog-Velikonja, 2000).

V literaturi zasledimo uporabo hibridizacije po Southernu tudi za določanje števila kopij plazmidov. Ollson in sodelavci (1992) so sondo označili z metodo potovanja zareze (»nick translation«) z radioaktivnim označevalcem. Celotno celično DNA so razrezali z restrikcijskimi endonukleazami, kar je omogočilo ločevanje pasov kromosomske in plazmidne DNA. Število kopij plazmidov so izračunali iz razmerja signala med obema pasovoma (Ollson in sod., 1993).

Podoben postopek sta uporabila Hinnebusch in Barbour (1992). Celokupno celično DNA sta razrezala z restrikcijskimi endonukleazami in po elektroforezi prenesla na membrano. Sonde specifične za kromosomsko in plazmidno DNA sta označevala z naključnimi začetnimi oligonukleotidi (random primering), produkte pa zaznavala z avtoradiografijo. Število kopij plazmidov sta določila iz razmerja med kromosomsko in plazmidno DNA (Hinnebusch in Barbour, 1992).

2.2.5.2 Hibridizacija točkovnega odtisa (dot blot)

Hibridizacija točkovnega odtisa je metoda prenosa in imobilizacije DNA na membrani in je predpriprava za hibridizacijo, s katero določamo relativno količino tarčne sekvence v seriji vzorcev DNA. Pri hibridizaciji točkovnega odtisa naneseemo celotno nefrakcionirano denaturirano DNA na nitrocelulozno ali najlonsko membrano (ni predhodnega ločevanja fragmentov DNA na agaroznem gelu kot pri hibridizaciji po Southernu) (Brown, 2003).

Hinnenbuch in Barbour (1992) sta metodo uporabila za določanje števila kopij plazmidov. Celotno celično DNA, ki se sprostí iz celice s segrevanjem na 100°C v NaI, sta po denaturaciji prenesla na nitrocelulozno membrano. Izvedla sta hibridizacijo s specifično označeno sondo. Membrano sta sprala, nato pa zaznavala produkte. Sonde sta označevala z metodo potovanja zareze (»nick translation«) z radioaktivnim označevalcem. (Hinnebusch in Barbour, 1992; Schendell in sod., 1989). Število kopij plazmidov sta določila iz razmerja kromosomske in plazmidne DNA (Hinnebusch in Barbour, 1992).

2.2.5.3 Sendvič hibridizacija

Sendvič hibridizacija je metoda s katero zaznavamo in kvantificiramo različne gene v vzorcih, kjer ni potrebno predhodno ločevanje plazmidne in kromosomske DNA. Celice

liziramo in na ta način sprostimo DNA iz celice. V raztopino dodamo dve sondi (lovilec in detektor), ki se specifično vežeta na tarčno DNA. Lovilec jo imobilizira na trdnem nosilcu, s pomočjo detektorja, ki je označen z markerjem (encim, radioaktivni označevalec) pa po hibridizaciji zaznamo tarčno DNA.

Omenjeno metodo so za določanje števila kopij plazmidov uporabili Korpela in sodelavci (1987). Vstavili so različna gena iz tarčnega plazmida v plazmidno DNA, ki so jo uporabili kot sondo in v fag M13, ki so ga uporabili kot lovilec. Fag (lovilec) so na obeh koncih vezali na membrano, kot sondo (detektor) pa so uporabili radioaktivno označeno plazmidno DNA. Sonda in lovilec sta se specifično vezala na tarčno plazmidno DNA. Število kopij plazmidov so podali kot število kopij na kromosom, ki so ga tudi določili s hibridizacijo (Kropela in sod., 1987).

2.2.6 Kompetitivni PCR

Kompetitivni PCR je metoda, pri kateri poleg vzorca (tarčna DNA) v reakcijo dodamo interni standard (nevtralna DNA), ki s tarčno DNA tekmuje za vezavo začetnih oligonukleotidov in ostale reagentne. PCR produkti, ki nastanejo pri pomnoževanju internega standarda so drugačne velikosti od tistih, ki nastanejo pri pomnoževanju tarčne DNA. Ker poznamo količino internega standarda, ki smo ga dodali v reakcijo, lahko na podlagi tega določimo količino tarčne DNA.

Omenjeno metodo so za določanje števila kopij plazmidov uporabili Trefault in sodelavci (2002). Kompetitivno DNA so pripravili s kloniranjem fragmentov kromosomske in plazmidne DNA v plazmidni vektor. Na izbrana fragmenta se specifično vežejo izbrani začetni oligonukleotidi. Pripravili so ločeni reakciji za tarčno plazmidno DNA in kromosomsko DNA s kompetitivno DNA. Po amplifikaciji so produkte ločili na agaroznem gelu, iz razmerja med tarčno in kompetitivno DNA so določili količino tarčne DNA. Število kopij plazmidov so določili iz razmerja med plazmidno in kromosomsko DNA (Trefault in sod., 2002).

2.2.7 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je standardna metoda za ločevanje, zaznavanje in čiščenje različnih oblik DNA na osnovi molekulske mase in konformacije.

Agaroz je linearni polimer s ponavljajočim dimerom D-galaktoze in 3,6-anhidro-L-galaktoze. Za pripravo gela jo s segrevanjem raztopimo v elektroforetskem pufu. Z ohlajanjem raztopine se tvori gel, katerega gostota, to je premreženost, določa kako velike DNA molekule bomo lahko ločevali. Z agaroznimi geli lahko v električnem polju ločujemo molekule velike od 0,1 kbp do približno 50 kbp. Hitrost potovanja molekul je odvisna od velikosti DNA, njene oblike, koncentracije agaroze, napetosti električnega polja, sestave elektroforetskega pufra ter interkalirajočih barvil.

Krajše molekule DNA hitreje potujejo skozi pore v gelu, ker imajo manjši upor. Molekule enake dolžine in različne oblike pa potujejo skozi gel različno hitro. Najhitreje potuje dodatno zvita krožna molekula (CCC-covalently closed circle), nekoliko počasneje linearna, najpočasneje pa molekula v sproščeni obliki (OC-open circle). Na hitrost potovanja vpliva tudi koncentracija agaroze, saj v gostejših gelih molekule potujejo počasneje. Pri nizki napetosti je hitrost potovanja linearne DNA proti anodi sorazmerna z uporabljenimi jakostjo električnega polja. Pri višjih jakostih pa se začnejo veliki fragmenti gibati hitreje in njihovo ločevanje je slabše.

Na potovanje vpliva tudi sestava pufra. Če v pufu ni ionov, skozi gel ne teče tok in molekule se ne premikajo. Preveč ionov pa povzroči veliko električno prevodnost gela in sprošča se veliko toplote, ki lahko raztali gel. Etidijev bromid z vgrajevanjem v DNA zmanjša mobilnost molekul za približno 15 %.

Na hitrost potovanja v gelu ne vplivata nukleotidno zaporedje in temperatura, pri kateri teče elektroforeza. Paziti moramo le, da ne presežemo temperature tališča gela (Herzog-Velikonja, 2000).

Pri kvantifikaciji nukleinskih kislin z agarozno gelsko elektroforezo lahko pride do velikih napak, če metode ne izvajamo pravilno.

Ribeiro s sodelavci (1989) opozarja na številne dejavnike na katere moramo biti pozorni, da bi s to metodo pridobili čimbolj zanesljive rezultate. Pomembno je, da je gel enake debeline in homogen, kar dosežemo s počasnim ohlajanjem. Priporočljivo je, da naredimo predhodni poskus, s katerim preverimo, ali je velikost por v gelu primerna in ali sta ustrezna koncentracija vzorca in pogoji barvanja. Med jamicami z vzorci lahko pustimo prazne jamice in na ta način preprečimo mešanje vzorcev, prazne jamice pa nam služijo tudi za korekcijo fluorescence ozadja. Elektroforeza mora teči dlje časa, da se posamezni pasovi dobro ločijo. Pomembno je enakomerno osvetljevanje gela. Če uporabljamo fotografsko kamero moramo paziti, da je negativ čist in nepoškodovan. Pomembno je tudi,

da poskus izvajamo pri enakih eksperimentalnih pogojih, kot jih predpisuje proizvajalec in da uporabljamo film v njegovem linearnem območju (Ribeiro in sod., 1989).

Zaradi sposobnosti ločevanja različnih velikosti DNA je agarozna gelska elektroforeza pomembna metoda za določanje števila kopij plazmidov. V diplomskem delu smo jo uporabili kot referenčno metodo metode qPCR pri določanju števila kopij plazmidov.

Pri določanju števila kopij plazmidov z agarozno gelsko elektroforezo pripravimo celični lizat (vzorec je lahko celoten celični lizat, celotna izolirana DNA, ali pa DNA razrezana z restrikcijsko endonukleazo), ki ga nanese na gel, izvedemo elektroforezo, gel obarvamo z etidijevim bromidom, na koncu pa gel ovrednotimo s fluorescentno denzitometrijo. Na ta način ugotovimo razmerje med plazmidno in kromosomsko DNA. Razmerje lahko uporabimo za izračun števila kopij plazmidov na ekvivalent kromosoma ali pa njihovo število v celici, če je znana količina kromosomske DNA na celico.

Iz podatkov o fluorescenci dobimo podatek o številu kopij plazmidov s pomočjo Enačbe 5:

$$C_p = \frac{D_p \times M_c}{D_c \times M_p} \quad (5)$$

C_p pomeni št. kopij plazmidov na celico, D_p in D_c sta količini plazmidne in kromosomske DNA na gelu, M_p je molekulska masa plazmidne, M_c pa molekulska masa celotne kromosomske DNA v celici (Projan in sod., 1983).

Projan in sodelavci (1983) so opisali metodo pri kateri na gel nanašamo celoten celični lizat. Prednost uporabe celotnih celičnih lizatov je v tem, da se izognemo razlikam zaradi različno učinkovite izolacije plazmidne in kromosomske DNA.

Na ponovljivost metode vpliva veliko parametrov kot so: »lovljenje« plazmidne DNA v kromosomsko, kinetika barvanja/razbarvanja kot funkcija koncentracije EtBr ali DNA, fluorescentni signal kot funkcija količine DNA, vpliv oblike molekul na vezavo EtBr na DNA.

Plazmidna DNA se lahko ujame v večjo in viskoznejšo kromosomsko DNA. Zaradi tega ne potuje v svoje značilno območje, ocena plazmidne DNA pa je zaradi tega nižja. Hibridizacija po Southernu in radioaktivno označevane plazmidov sta pokazala da se v kromosomsko DNA ujame minimalna količina plazmidne DNA (do 5 %).

Pri izvajanju metode gel najprej obarvamo z EtBr, nato pa ga razbarvamo, da ni motenj zaradi fluorescence ozadja. Najboljše rezultate dobimo, če je čas razbarvanja med 30 in 120 minutami. V primeru, ko razbarvanje poteka manj časa ostane ozadje obarvano, v primeru, da poteka dlje časa, pa pride do delnega razbarvanja DNA.

Pomembna je tudi količina DNA. Količine med 15 in 700 ng imajo linearen odziv. Pri manjših količinah je fluorescenca večja kot bi bila pravilna, pri večjih pa je manjša kot bi bila pravilna.

Stopnja vezave EtBr je odvisna tudi od oblike DNA. Linearna in sproščena oblika fluorescirata z enako jakostjo, dodatno zvita plazmidna DNA pa 1,36-krat manj. Zaradi tega moramo pasove, ki vsebujejo CCC oblike plazmidov, pomnožiti s korekcijskim faktorjem (1,36).

Projan s sodelavci (1983) je na osnovi zgoraj opisanih možnosti napak ocenil variabilnost rezultatov na ± 20 %. Obstajata tudi spodnja in zgornja meja velikosti in števila kopij plazmidov, ki jih lahko merimo. Opisana metoda se je uporabljala za plazmide velikosti 4,2-27 kb in za število kopij med 12 in 880 na celico.

Ugodnejše je podajanje ŠKP na celico, vendar je to zaradi zamudnega določanja števila celic s štetjem na ploščah bolj problematično. Avtorji zaradi tega raje podajajo število kopij plazmidov na ekvivalent kromosoma, kot število kopij na celico. Takšen pristop pa lahko pripelje do napak, saj se vsebnosti plazmidne in kromosomske DNA v celici spreminjata pod različnimi ravnimi pogoji, predvsem pa neodvisno druga od druge (Projan in sod., 1983).

Pushnova s sodelavci (2000) je opisala nekoliko spremenjeno metodo agarozne gelske elektroforeze za določanje števila kopij plazmidov, predvsem v smislu obdelave podatkov. Tudi v tem primeru gre za izolacijo celokupne celične DNA in njene ločitve na gelu.

Po gojenju so izvedli lizo celic, lizat serijsko dvakrat redčili, ga prenesli na agarozni gel in izvedli elektroforezo. Po končani elektroforezi so gel slikali s polaroidnim filmom, tega pa denzitometrirali.

Za izračun števila kopij plazmidov so uporabili le tiste vrednosti, pri katerih sta bili plazmidna in kromosomska DNA v svojem linearnem območju. Ugotovili so, da se območji linearnosti za plazmid in kromosom med seboj razlikujeta in lahko ležita znotraj različnih redčitev. Linearna območja za plazmid se razlikujejo celo med različnimi konformacijami in med različnim številom kopij plazmidov v vzorcu. Pri računanju predstavlja problem tudi dejstvo, da so pri enaki redčitvi pasovi na gelu ki vsebujejo kromosomsko DNA ponavadi bolj nasičeni kot tisti, ki vsebujejo plazmidno DNA. Zaradi

tega lahko precenimo količino plazmidne DNA v vzorcu v primeru, da kvantificiramo plazmidno in kromosomsko DNA pri enaki redčitvi.

Za izračun so najprej določili t.i. prirejene vrednosti, pri katerih gre za vrednosti površine vrhov posamezne redčitve pomnožene z ustreznim dilucijskim faktorjem. Linearno območje so določili z računanjem kvocienta med prirejeno vrednostjo vsake redčitve in prirejeno vrednostjo predhodne redčitve. Za izračun ŠKP so uporabili tiste vrednosti, pri katerih razlike niso bile večje od 20 %.

Izračunali so povprečje celokupne genomske in plazmidne DNA, iz njunega razmerja pa število kopij plazmidov po že prej omenjeni enačbi (glej Enačbo 1).

Ponovljivost metode so ocenili na 10 % (Pushnova in sod., 2000).

Lee in sodelavci (1993) so pri izračunu števila kopij plazmidov upoštevali število kopij na celico in ne na kromosom. Število celic v znanem volumnu so določili s pomočjo Coulter counter-ja. Izolirali so plazmidno DNA iz znanega volumna kulture in jo ločili z elektroforezo. Kot standard so dodali DNA znane velikosti in količine. Količino plazmidne DNA so določili glede na znano količino standardne DNA. Ker so poznali velikost plazmidne DNA so lahko izračunali število kopij plazmidov. Število kopij so delili s številom celic in izračunali povprečno število kopij plazmidov na celico.

Poskus so izvedli z uporabo lineariziranih in nelineariziranih plazmidov. V primeru nelineariziranih plazmidov so zaradi slabše vgradnje EtBr v CCC obliko le to pomnožili s faktorjem 1,41 in na ta način izenačili fluorescenco vseh oblik plazmidne DNA (Lee in sod., 1993).

2.2.8 Agarozna gelska elektroforeza v pulzirajočem polju

Za ločevanje molekul večjih od 50 kbp uporabljamo agarozno gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE). Tako velike molekule pri agarozni gelski elektroforezi v električnem polju s stalno smerjo potujejo z navidezno enako hitrostjo. Če se smer električnega polja periodično spreminja, morajo molekule ob vsaki zamenjavi spremeniti smer potovanja. Večje molekule se počasneje preusmerjajo, zato lahko pri takšnih pogojih ločimo tudi fragmente velike do 10 Mbp (Herzog-Velikonja, 2000).

Fahnert in sodelavci (2000) so to metodo uporabili za določanje števila kopij plazmidov. Plazmidno in kromosomsko DNA so razrezali z restrikcijskimi encimi. Plazmidno DNA so na ta način linearizirali, kromosomsko pa so razrezali na fragmente in jo uporabili kot standard. Število kopij plazmidov so določili iz razmerja intenzitete fluorescence in

velikosti fragmentov plazmidne in kromosomske DNA, ter števila fragmentov kromosomske DNA. Ponovljivost metode so ocenili na 15 %. Prednost te metode je možnost uporabe za plazmide, ki se močno razlikujejo v velikosti in številu kopij (Fahnert in sod., 2000).

2.2.9 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

V novejših virih kot potencialno metodo za določanje števila kopij plazmidov zasledimo kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (Lee in sod., 2005; Providenti in sod., 2005).

2.2.9.1 Zgodovina PCR v realnem času

Začetki verižne reakcije s polimerazo segajo v leto 1971, ko je Kleppe s sodelavci objavil članek, v katerem opisuje pomnoževanje specifične molekule DNA z DNA polimerazo. Rutinska uporaba metode se je takrat zdela zelo oddaljena zaradi visoke cene, nedostopnosti kemikalij in inštrumentov. Že konec 80. let pa je postal PCR ena osnovnih laboratorijskih tehnik zaradi svoje enostavnosti in uporabnosti (Edwards in sod., 2004).

Kary B. Mullis je leta 1983 razvil PCR metodo in leta 1993 zanj prejel Nobelovo nagrado. Razvoj metode se je nadaljeval in leta 1992 je Higuchi opisal novo metodo PCR v realnem času, s katero lahko zaznavamo pomnoževanje DNA tekom reakcije. V reakcijo klasičnega PCR je vključil fluorescentno barvilo etidijev bromid, vzorec pa je med pomnoževanjem obseval z UV lučjo. Z merjenjem fluorescence s kamero je tako lahko spremljal pomnoževanje DNA v realnem času (PE Biosystems).

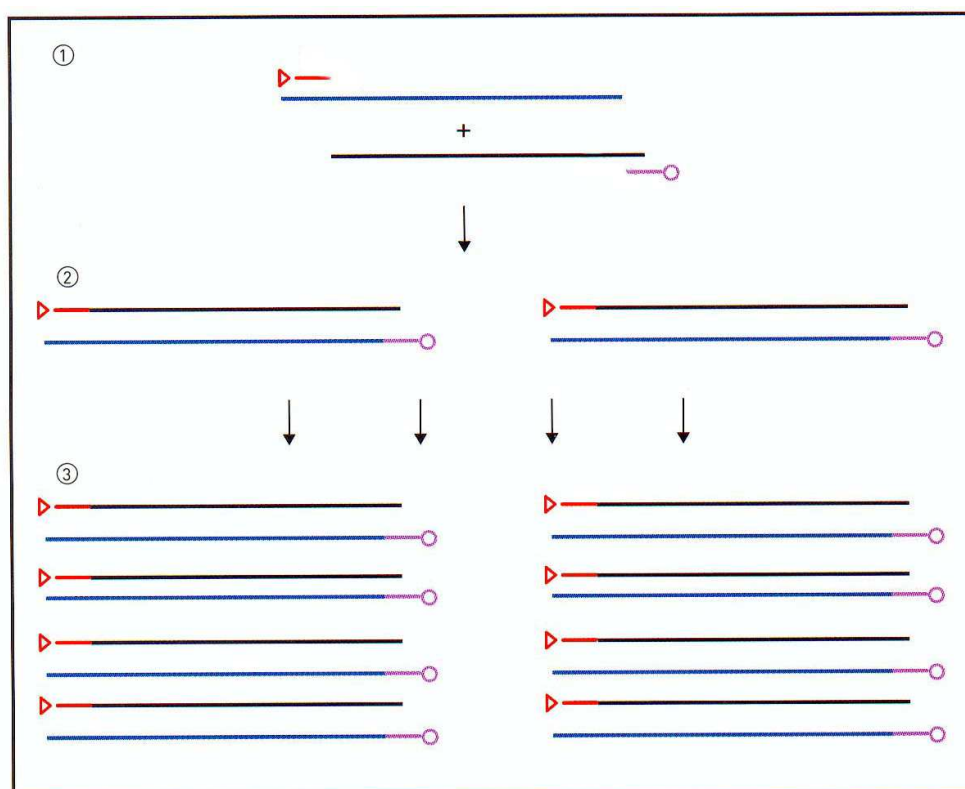
Razvoj je tekel v smeri sprotnega merjenja fluorescence. Raziskovalci so dokazali, da je kinetika fluorescence EtBr direktno povezana z začetno količino DNA, ki se pomnožuje (kinetični PCR). Problem metode pa je bila nespecifičnost vezave EtBr. Večjo specifičnost pa je prineslo odkritje s fluorofori označenih sond za zaznavanje akumulacije produktov in s tem povečalo uporabnost metode (Edwards in sod., 2004).

Prvi komercialni inštrument za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času se je na trgu pojavil leta 1996, danes pa je na voljo mnogo aparatov in kemikalij različnih proizvajalcev. Iz leta v leto pa narašča tudi njihova uporaba, kar prikazuje podatek, da je bilo v letu 2004 objavljenih 43 % več člankov ki vsebujejo besede »real-time PCR« kot leto prej (Valasek in Repa, 2005).

2.2.9.2 Verižna reakcija s polimerazo

PCR je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA.

Reakcijsko zmes sestavljajo matrična DNA, kratki začetni oligonukleotidi s katerimi omejimo odsek, ki ga pomnožujemo, DNA polimeraza (najpogosteje temperaturno odporna *Taq* polimeraza), deoksiribonukleozid-trifosfati in pufer. Reakcija poteka ciklično. V prvi stopnji s segrevanjem (~95°C) razklenemo dvoverižno matrično DNA (stopnja denaturacije). Nato temperaturo znižamo (na 40-60°C), kar omogoči vezavo začetnih oligonukleotidov (stopnja prileganja). V tretji stopnji pa temperaturo povišamo na 72°C, kar je optimum delovanja polimeraze (stopnja podaljševanja). Ta izgradi novo komplementarno DNA v smeri 5'→3'. Nova DNA nato služi kot matrica za nadaljnje pomnoževanje. Običajno število ciklov pomnoževanja je 20-40. Vsaka kombinacija matrične DNA in začetnih oligonukleotidov pri klasičnem PCR zahteva svoje pogoje reakcije.



Slika 1: Verižna reakcija s polimerazo. Stopnja 1: Denaturacija in prileganje začetnih oligonukleotidov. Stopnja 2: Sinteza komplementarnih verig. Stopnja 3: Eksponentno pomnoževanje verig.

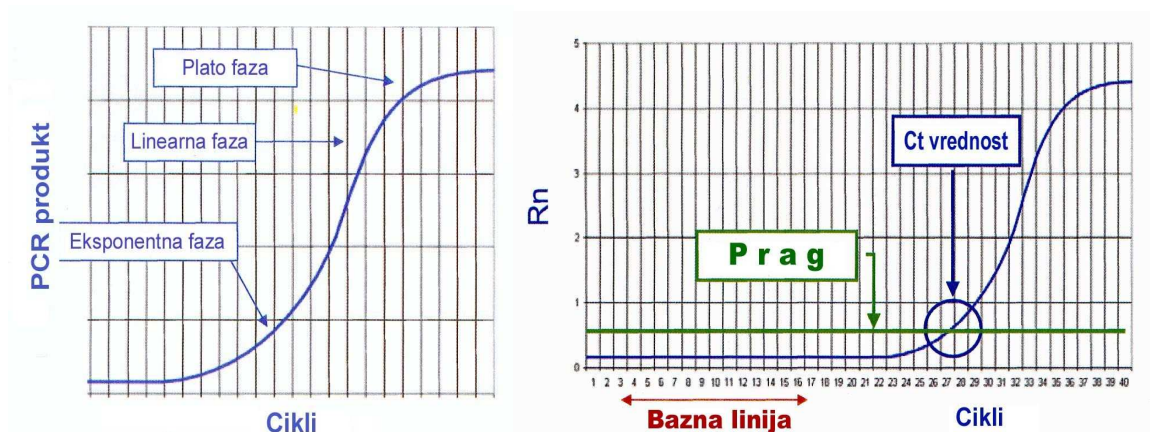
2.2.9.3 Kvantitativni PCR

Pri običajnem PCR poteka zaznavanje produktov po končanem pomnoževanju, navadno z elektroforetsko ločbo produktov na agaroznem gelu. V primeru, da nas zanima le prisotnost določenega odseka DNA, ali pa ločevanje segmentov za nadaljnje analize to zadostuje. Če želimo določiti količino tarčne DNA v preiskovanem vzorcu, pa se pojavi problem. Teoretično se število kopij želenega odseka v vsakem ciklu podvoji. Teoretičnemu izkoristku pa se dejanski približa le v začetnih ciklih, ko količina produkta narašča eksponentno. Kasneje se reakcija upočasnjuje zaradi porabe sestavin, manjše učinkovitosti polimeraze in raznih drugih razlogov. Reakcija na koncu doseže plato fazo, ko količina produkta ne narašča več. Samo v eksponentni fazi lahko iz količine produkta sklepamo na začetno število kopij matrice v vzorcu. To pa pomeni pomembno omejitev običajnega PCR, kjer poteka zaznavanje po končanem pomnoževanju (Arko, 2004).

2.2.9.4 PCR v realnem času

PCR v realnem času predstavlja nadgradnjo običajnega PCR. Omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Pomnoževanje in zaznavanje tu potekata sočasno.

PCR lahko razdelimo v štiri faze: začetno, zgodnjo eksponentno, eksponentno in fazo platoja (Sliki 2A in 2B). Med začetno fazo (prvih 10 do 15 ciklov) je fluorescenca produkta nižja od fluorescence ozadja. V tej fazi določimo bazno linijo. V zgodnji eksponentni fazi fluorescenca produkta preseže fluorescenco ozadja. Tu določimo linijo prazne vrednosti (threshold), ki predstavlja intenziteto fluorescence, ki je značilno različna od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko krivulja preseže linijo prazne vrednosti (Ct vrednost). Med eksponentno fazo je pomnoževanje optimalno in z vsakim ciklom se v idealnih reakcijskih pogojih količina produkta podvoji (pri 100 % učinkovitosti pomnoževanja). Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Po končanem pomnoževanju nam na osnovi izmerjenih vrednosti računalnik poda amplifikacijsko krivuljo, ki prikazuje odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. V zadnji plato fazi pa se pomnoževanje prekine, zaradi porabe reagentov in upada aktivnosti encima. Na tem nivoju podatki o fluorescenci niso več uporabni za kvantitativno analizo (Wong in Medrano, 2005; Arko, 2004).



Sliki 2A in 2B: Krivulja pomnoževanja vzorca (amplifikacijska krivulja), z oznakami posameznih pojmov, ki jih uporabljamo pri qPCR.

Z absolutno kvantifikacijo lahko iz standardne krivulje s primerjavo Ct vrednosti vzorca s Ct vrednostmi standardov z znano količino kopij molekul, določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu.

Rezultate lahko določamo tudi z relativno kvantifikacijo. Podajamo jih kot razmerja med tarčnim in referenčnim amplikonom v istem in različnih vzorcih. Določimo jih iz razlik v Ct vrednostih in upoštevanja učinkovitosti pomnoževanja posameznih amplikonov.

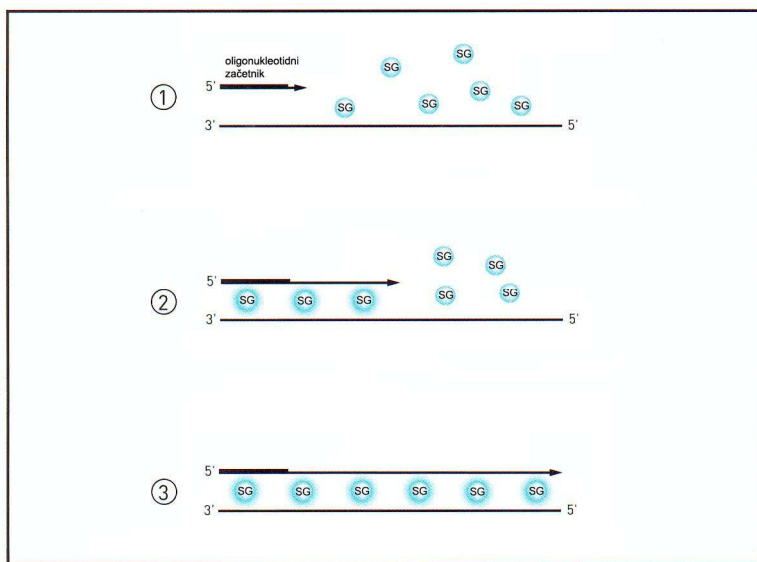
2.2.9.5 Načini zaznavanja

Načinov za zaznavanje produktov je več, lahko pa jih razdelimo v dve skupini, glede na to, ali z njimi zaznavamo samo specifični produkt, ali pa uporabljamo nespecifične označevalce, s katerimi zaznavamo vse dvojne vijačnice.

Nespecifični načini zaznavanja:

Sem sodijo interkalirajoča barvila kot npr.: EtBr, SYBR Green I idr. Danes se uporablja predvsem slednje. SYBR Green je nespecifično interkalirajoče barvilo, ki se veže v dvoverižno DNA. Njegova fluorescenca v nevezani obliki je 1000× manjša od tiste v vezani obliki. Do ojačanja fluorescence pride med podaljševanjem, med denaturacijo pa se ta zopet zmanjša. Zaradi tega se meritve fluorescence izvajajo na koncu stopnje podaljševanja. Prednost interkalirajočih barvil je nizka cena, saj jih lahko uporabljamo s katerimikoli začetnimi oligonukleotidi na pripadajoči tarčni molekuli. Problematična pa je nizka specifičnost, saj fluorescirajo tudi nespecifični produkti in dimeri začetnikov. Specifičnost lahko povečamo s spremljanjem talilne krivulje (melting curve), saj se ta

razlikuje med različnimi amplikoni zaradi njihove različne dolžine in nukleotidne sestave. Problem predstavlja tudi večja fluorescenca daljših ampilkonov, kar otežuje primerjavo različnih ampilkonov med sabo (Arya in sod., 2005; Bustin, 2004).

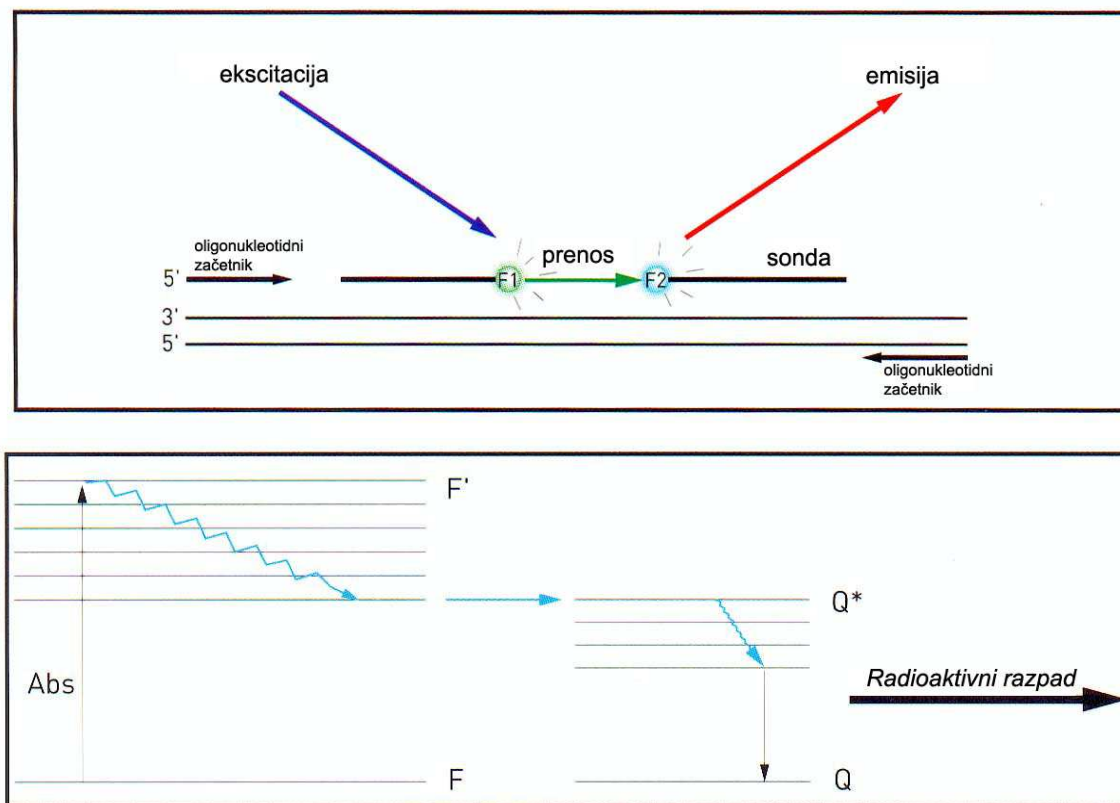


Slika 3: Pomnoževanje DNA z uporabo fluorescentnega označevalca SYBR Green (SG) (prikaz pomnoževanja ene verige DNA) Stopnja 1: Prileganje začetnih oligonukleotidov na denaturirano DNA, SYBR Green prost v raztopini. Stopnji 2 in 3: Podaljševanje in postopna vezava SYBR Green-a v dvojno vijačnico.

Specifični načini zaznavanja:

Uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala pri vseh izkoriščamo princip fluorescentnega resonančnega prenosa energije (FRET: fluorescence resonance energy transfer) od donorske (reportersko barvilo) na akceptorsko molekulo (dušilec). Učinkovitost prenosa je odvisna od spektralnih lastnosti, od razdalje med obema molekulama (Försterjeva razdalja) in od prekrivanja absorpcijskega spektra akceptorske molekule in emisijskega spektra donorske molekule. Do dušenja signala reporterskega barvila pride v primeru, ko sta molekuli oddaljeni manj kot 100 Å (0,1 nm). Ekscitacija donorskega barvila povzroči prenos energije, na akceptorsko barvilo, ki oddaja energijo (Slika 4). Donorska molekula (reporter) pa se vrne v osnovno stanje in zato ne oddaja fluorescence. Ko se razdalja med molekulama poveča, prenos energije med donorejem in akceptorjem ni več mogoč. V tem primeru donor (reporter) v vzbujenem stanju oddaja energijo v obliki fluorescence, ki jo merimo. Glede na način povečevanja razdalje med donorjem in akceptorjem ločimo različne specifične kemije (hidrolizirajoče sonde, hibridizirajoče sonde,...) (Bustin, 2004; Eurogentec, 2004).

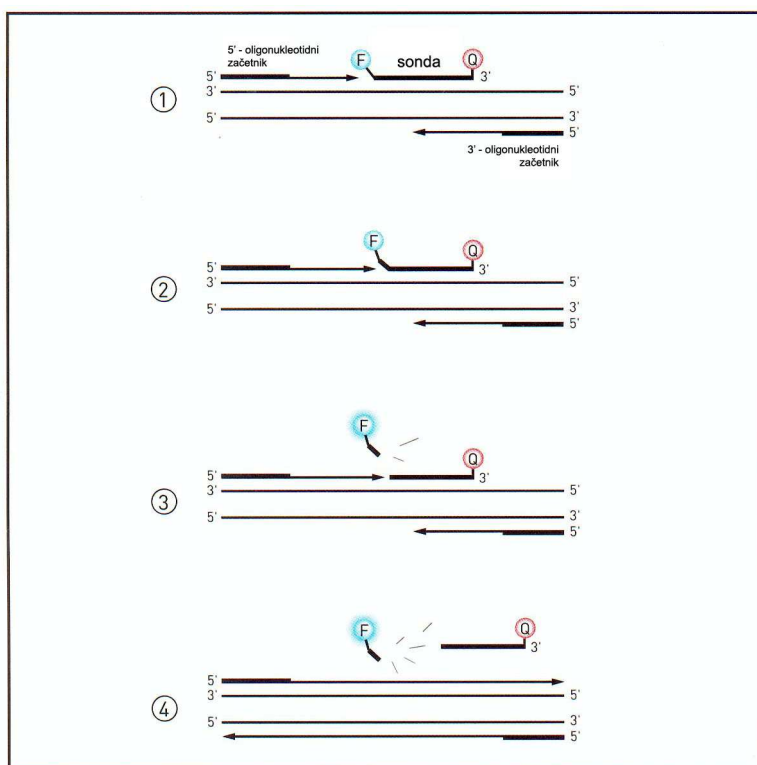
Kot akceptorje lahko uporabimo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo (Bustin, 2004).



Slika 4: Princip fluorescentnega resonančnega prenosa energije (FRET). Ekscitacija donorskega barvila in prenos energije na akceptorsko barvilo, ki energijo oddaja v obliki fluorescence ali toplote.

TaqMan kemija (Hidrolizirajoče sonde)

Za TaqMan kemijo potrebujemo poleg dveh začetnih oligonukleotidov še tretji oligonukleotid-sondo (Slika 5). Sonda je enoverižni oligonukleotidni fragment, ki se komplementarno prilega eni verigi amplikona, ki ga pomnožujemo. Na 5' koncu je označena z reporterskim fluorescentnim barvilom (FAM, VIC, JOE), na 3' koncu pa z dušilcem, ki je lahko fluorescentno bavilo (TAMRA) ali pa nefluorescentni dušilec. Pri intaktni sondi prihaja do fluorescentnega resonančnega prenosa energije iz reporterskega barvila na dušilec. Po prileganju in začetku podaljševanja povzroči 5' eksonukleazna aktivnost polimeraze hidrolizo sonde, obe barvili pa se sprostita v raztopino. Ko sta barvili ločeni pride do ireverzibilnega porasta fluorescence reporterja (FAM). Fluorescenca reporterja tako narašča sorazmerno z nastajanjem PCR produkta. (Arko, 2004; Heid in sod., 1996; Eurogentec, 2004).



Slika 5: Pomnoževanje DNA z uporabo TaqMan kemije. Stopnji 1 in 2: Prileganje oligonukleotidov, sonda je intaktna, prenos energije iz reportreja (F) na dušilec (Q). Stopnja 3: Zaradi 5' nukleazne aktivnosti polimeraze prihaja do hidrolize sonde in sproščanja fluorescence. Stopnja 4: Popolna hidroliza sonde, nadaljevanje podaljševanja in sproščanje fluorescence.

Pri TaqMan kemiji ločimo dva tipa sond. TAMRA TaqMan sonde, kjer je dušilec fluorescentno barvilo in MGB TaqMan sonde kjer je dušilec nefluorescentno barvilo. MGB sonde vsebujejo tudi dodatno molekulo MGB (minor groove binder), ki stabilizira zadnjih 5-6 baznih parov na 3' koncu sonde. TAMRA TaqMan sonde so dolge med 20-30 baznih parov (bp), MGB TaqMan sonde pa so do 10 nukleotidov krajše. Zaradi krajše dolžine MGB sond in posledično krajših amplikonov z njimi dosežemo boljše učinkovitosti pomnoževanja. MGB sonde imajo tudi 7-10°C višje temperature prileganja od začetnih oligonukleotidov in so zato bolj specifične.

2.2.9.6 Inštrumenti

Ključnega pomena pri metodi PCR v realnem času je sposobnost zaznavanja fluorescentnega signala med reakcijo.

Naprave so sestavljene iz »termocycler-ja« in iz optičnega dela. Termocikler omogoča sam potek reakcije. Vzdrževati mora enako temperaturo v vseh luknjicah na ploščici, kar doseže s termoblokom, ali pa s kroženjem toplega zraka.

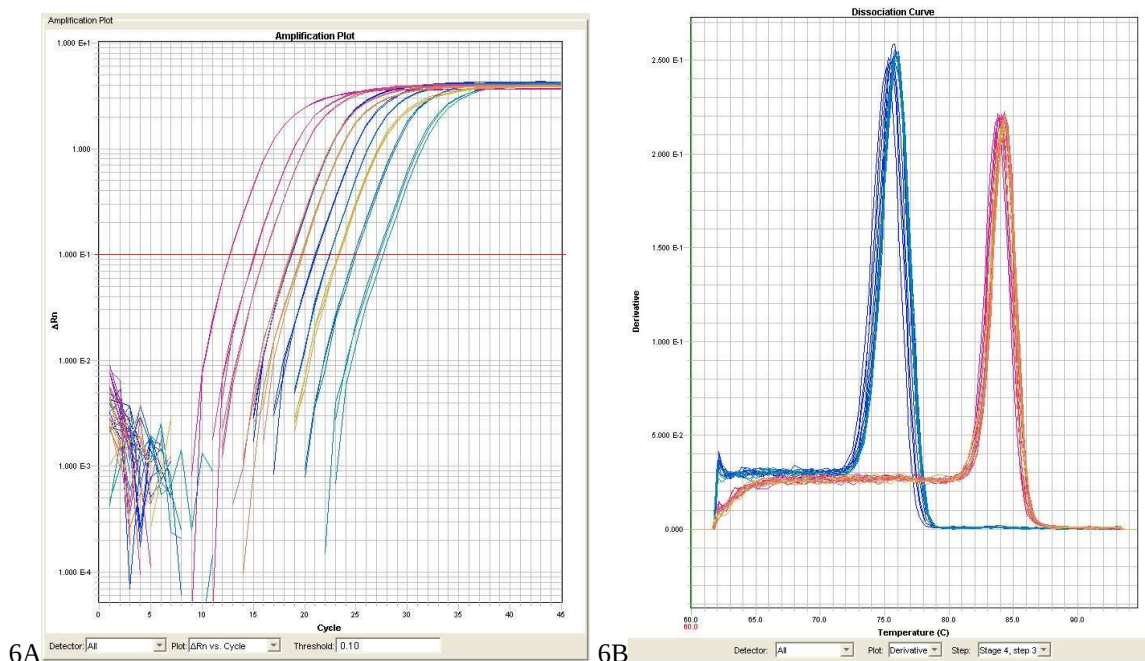
Optični del je sestavljen iz dela, ki omogoča ekscitacijo fluorescentnih barvil in pa iz fotodetektorja, ki emitirano svetlobo zaznava.

Poleg tega potrebujemo ustrezen računalniški sistem in program za zbiranje in obdelavo podatkov (Valasek in Repa, 2005).

2.2.9.7 Interpretacija rezultatov

Med procesom pomnoževanja računalnik zbira podatke o fluorescenci in jih s pomočjo programa na koncu prikaže v grafični obliki. Amplifikacijska krivulja (Slika 6A) nam prikazuje podatke o kinetiki pomnoževanja tarčne sekvence, talilna krivulja (Slika 6B) pa podatke o lastnostih končnega produkta pomnoževanja.

Surove podatke nato obdelamo na različne načine glede na tip podatkov in glede na naše potrebe.



Slika 6A: Amplifikacijska krivulja (amplification plot) z vrisano linijo fluorescentnega praga

Slika 6B: Talilna krivulja (dissociation curve) za dva različna amplikona

Za interpretacijo surovih podatkov moramo poznati naslednje parametre:

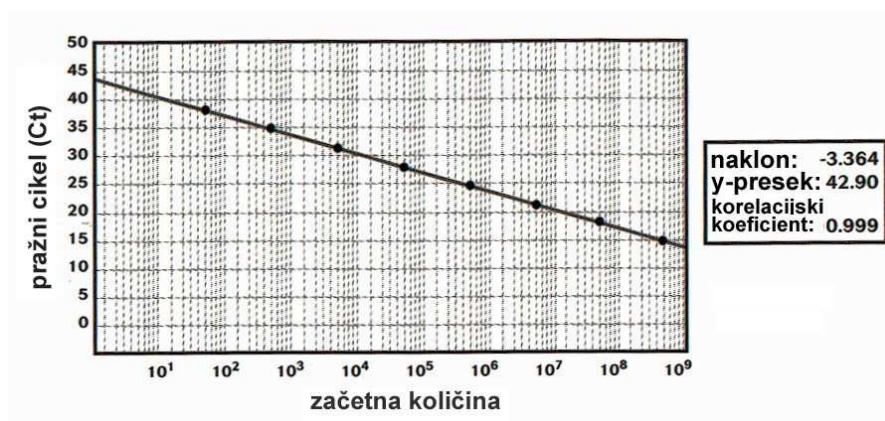
- bazna linija: število ciklov reakcije, pri katerih jakost fluorescence še ne doseže praga detekcije. Bazna linija mora odstraniti fluorescenco ozadja, ne sme pa biti na področju, kjer se amplifikacijski signal začne dvigati nad njo. Računalnik jo avtomatično nastavi 1-2 cikla pred prvo amplifikacijsko krivuljo, lahko pa jo ročno spremenimo.

- ΔR_n : R_n je normaliziran reporterski signal in predstavlja razmerje med signalom reporterskega barvila in pasivne reference. Pasivna referenca se uporablja za normalizacijo signala reporterskega barvila. Z njo korigiramo nihanja fluorescentnega signala, ki ne izvira iz PCR ampak iz fluorescence ozadja (komponente reakcije, plastika, prašni delci...). Najpogosteje se uporablja barvilo ROX. ΔR_n je razlika med emisijo fluorescence produkta (R_n) in fluorescentnim signalom bazne linije. Tako R_n kot ΔR_n se povečujeta tekom reakcije dokler ta ne doseže plato faze.
- Pražna vrednost (threshold): je vrednost, pri kateri amplifikacijski signal preseže signal ozadja. Nastavljena mora biti na spodnjem delu eksponentnega dela krivulje. Avtomatsko jo izračuna računalnik kot 10-kratno standardno deviacijo povprečnega signala bazne linije, lahko pa jo nastavimo tudi ročno.
- C_t vrednost (threshold cikel): je cikel v katerem fluorescenca vzorca preseže linijo prazne vrednosti. Na osnovi C_t vrednosti primerjamo podatke med seboj, uporabimo pa jih tudi za nadaljnjo obdelavo podatkov. C_t vrednost je obratnosorazmerna z začetnim številom kopij matrice, torej več začetnega vzorca pomeni nižji cikel pri katerem fluorescenca vzorca preseže fluorescenco ozadja. C_t se vedno nahaja na spodnjem eksponentnem delu krivulje, ko še ni omejitev pomnoževanja zaradi pomanjkanja reagentov in zmanjšanja aktivnosti polimeraze.
- Standardna krivulja: podana je kot log začetne količine vzorca v odvisnosti od C_t . Pripravimo jo z redčitveno vrsto znanih koncentracij standarda. Iz nje dobimo mnoge podatke o poteku PCR reakcije, kot so naklon krivulje, Y-presek in korelacijski koeficient.

Iz naklona krivulje lahko določimo učinkovitost pomnoževanja (pri naklonu -3.32 je učinkovitost pomnoževanja 100 %).

Korelacijski koeficient (R^2) je mera prileganja. Pove nam, kako dobro se meritve prilegajo idealni krivulji (idealen je 1), ki je v tem primeru premica.

Y-presek je točka, v kateri standardna krivulja seka y os. Odraža teoretično mejo zaznave. Teoretično lahko s to metodo zaznamo tudi eno samo kopijo gena, v praksi pa je najnižja vrednost, ki jo zanesljivo določimo 5 kopij (Invitrogen, 2003; Wong in sod., 2005; Arya in sod., 2005; Valasek in Repa, 2005; Arko, 2004; Heid in sod., 1996).



Slika 7: Standardna krivulja ($y=kx+n$, kjer k pomeni naklon, n pa presek z y osjo)

2.2.9.8 Analiza podatkov

Za analizo podatkov se uporabljata dve metodi: absolutna in relativna kvantifikacija.

Absolutna kvantifikacija se uporablja v primeru, ko nas zanima točno število kopij gena. Pri tem načinu analize kvantificiramo gen iz vzorca s pomočjo standardne krivulje. To pridobimo s serijskim redčenjem standarda znane koncentracije. Standardna krivulja odraža linearno razmerje med Ct vrednostmi in logaritemskimi vrednostmi količin standardne DNA in omogoča določitev koncentracij neznane DNA v vzorcu na podlagi njene Ct vrednosti. Metoda predvideva, da sta učinkovitosti pomnoževanja amplikona v vzorcu in standardu enaki. Pomembno je tudi, da koncentracija vzorčne DNA leži znotraj območja koncentracij, ki ga zajamemo z redčitvami standarda in da je v območju, ki ga lahko zanesljivo kvantificiramo (Wong in Medrano, 2005).

Kot standard se najpogosteje uporablja plazmid, ki vsebuje tarčno sekvenco. Druga možnost je uporaba sintetičnih oligonukleotidov za celoten amplikon (do 100 bp). Možna pa je tudi uporaba DNA celične linije z znanim številom kopij gena, ki ga pomnožujemo v vzorcu (Arya in sod., 2005).

V literaturi zasledimo za določanje ŠKP uporabo absolutne kvantifikacije (Lee in sod., 2005).

Z relativno kvantifikacijo določimo razmerje med številom kopij gena, ki ga analiziramo in referenčnim genom. Prednost metode je, da ne potrebujemo absolutne standardne krivulje ampak rezultate izračunamo z matematičnimi enačbami iz Ct vrednosti in učinkovitosti pomnoževanja. Za izračun je na voljo več poti (Wong in Medrano, 2005). Različne relativne kvantifikacije so opisali Wong in Medrano (2005), Livak in Schmittgen (2001), Arya in sod. (2005).

- Metoda $\Delta\Delta Ct$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Pri tej metodi število kopij/količino gena v vzorcu normaliziramo glede na eno kopijo/enoto količine referenčnega gena. Uporabimo tudi kalibratorski vzorec, glede na katerega primerjamo vsak neznani vzorec. Če enak kalibrator nanese in analiziramo na vsaki ploščici, nam omogoča primerjavo vzorcev med različnimi ploščicami. Metoda predpostavlja 100 % učinkovitost pomnoževanja obeh ampliconov v vzorcu in kalibratorju, razmerje pa izračunamo s pomočjo Enačbe 6:

$$razmerje = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (6)$$

pri čemer velja: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{vzorca}) - \Delta Ct(\text{kalibratorja})$, ΔCt pa je razlika Ct vrednosti med tarčnim in referenčnim genom.

Pri uporabi te metode morata biti učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena enaki (Ayra in sod., 2005). To lahko enostavno določimo s ugotavljanjem variiranja ΔCt (tarčni gen-referenčni gen) pri različnih redčitvah vzorca. Če je naklon krivulje manjši od 0,1 lahko uporabimo $\Delta\Delta Ct$ metodo.

- Metoda $\Delta\Delta Ct$ z eksperimentalno določeno učinkovitostjo pomnoževanja

V primeru, da sta učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena enaki, vendar nižji od 100 %, za izračun uporabimo eksperimentalno določeno učinkovitost pomnoževanja (E), razmerje pa izračunamo po Enačbi 7:

$$razmerje = E^{-\Delta\Delta Ct} \quad (7)$$

- Pfaffl-ov model kvantifikacije

V primeru, da učinkovitosti pomnoževanja ampliconov tarčnega in referenčnega gena nista enaki lahko uporabimo Pfaffl-ov model kvantifikacije, ki upošteva različne učinkovitosti pomnoževanja (Wong in Medrano, 2005).

Rezultatov ne predstavljamo kot gole Ct vrednosti, ker je iz njih izračunana variacija napačna. Predstavljamo jih kot števila kopij tarčnega gena. (Livak in Schmittgen, 2001, Schmittgen in sod., 2000).

Učinkovitost pomnoževanja:

Tako pri uporabi absolutne kot relativne kvantifikacije je zelo pomembna učinkovitost pomnoževanja. V idealnih razmerah je učinkovitost pomnoževanja 100 %, kar pomeni, da z vsakim ciklom dobimo dvakrat več produkta. Pogosto pa je učinkovitost pomnoževanja manjša, kar lahko privede do napak pri obdelavi podatkov, če tega dejstva ne upoštevamo. Na ta način lahko precenimo začetne količine DNA v vzorcu. Učinkovitost pomnoževanja ponavadi izračunamo iz podatkov pridobljenih z absolutno ali relativno standardno krivuljo po Enačbi 8:

$$E = [10^{(-1/\text{naklon krivulje})}] - 1 \quad (8)$$

Na učinkovitost pomnoževanja lahko vplivajo dolžina, sekundarna zgradba, razmerje G/C v amplikonu, pogoji reakcije (temperatura, čas), uporaba neustreznih koncentracij reagentov (Mg, soli), nekvalitetni encimi, čistost vzorca. Prisotnost pospeševalcev reakcije pa lahko povzroči učinkovitost, ki je večja od 100 %. Kot dobre učinkovitosti pomnoževanja smatramo tiste med 90 in 110 % (Wong in Medrano, 2005; Heid in sod., 1996; Invitrogen).

Za absolutno kvantifikacijo potrebujemo zanesljivo standardno krivuljo, ki jo moramo izdelati za vsako ploščico. Pri relativni kvantifikaciji pa je primerjava podatkov (Ct) možna le znotraj ene ploščice. Če želimo med seboj primerjati različne ploščice, moramo v vsako vključiti tudi kalibratorski vzorec.

2.2.9.9 PCR v realnem času, prednosti in slabosti

Tehnologija PCR v realnem času ponuja številne možnosti uporabe v biologiji, medicini, farmaciji, veterini, biotehnologiji in forenziki. Njena uporaba močno narašča, saj postaja dostopna tudi za manjše raziskovalne laboratorije. Na področju kvantifikacije nukleinskih kislin nadomešča do sedaj uporabljane metode kot so hibridizacija po Northernu in Southernu, HPLC, PCR-ELISA, in situ hibridizacija, gelska elektroforeza idr., saj ima pred omenjenimi metodami številne prednosti. Metoda daje hkrati kvalitativno in kvantitativno informacijo. Metoda ne zahteva dodatne obdelave vzorcev po pomnoževanju, kot je npr. ločevanje amplikonov na gelu. Na ta način se močno zmanjša možnost kontaminacije s PCR produkti. Ima zelo široko dinamično območje (7-8 log enot kopij matrice), kar omogoča primerjavo vzorcev z zelo različnimi količinami DNA (Bustin, 2005; Heid in sod., 1996, Arko, 2005). Sama reakcija pomnoževanja poteče zelo hitro (30 min-2 h)

(Valasek in Repa, 2005). Omogoča analizo velikega števila vzorcev hkrati. Tehnologijo lahko tudi avtomatiziramo (Heid in sod., 1996).

Metoda ima veliko občutljivost (teoretično lahko zaznamo že eno samo kopijo gena) in ponovljivost (koeficient variacije za Ct je $< 2 \%$) (Arya in sod., 2005; Arko, 2005).

Metoda ima veliko manjše koeficiente variacije (CV, ki ga določimo pri izračunanem ŠKP je za SYBR Green 14,2 %, za TaqMan pa 24 %) v primerjavi z drugimi metodami (gelska denzitometrija 44,9 %, hibridizacija 45,1 %) (Wong in Medrano, 2005).

Kljub veliki uveljavljenosti pa ima real-time PCR metoda številne omejitve. Inštrumenti in kemikalije, ki jih potrebujemo, so dragi. Velika je občutljivost na različne inhibitorje reakcije, ki so pogosti v bioloških vzorcih (hemoglobin, urea, različni organski in fenolni inhibitorji idr.). Inštrumenti in kemikalije različnih proizvajalcev niso vedno kompatibilni. Poglavitni problem pa ne predstavljajo tehnološke omejitve metode, temveč ta često izvira iz napak operaterjev. Gre za neustrezno nastavitev poskusov, napačno analizo podatkov, prenaplgjeno zaključevanje poskusa in nepravilno analizo rezultatov (Valasek in Repa, 2005).

Za doseganje rezultatov je potrebno zagotoviti specifičnost začetnih oligonukleotidov, optimizirati njihove koncentracije in preveriti ali nastajajo njihovi dimeri. Potrebno je tudi vizualno pregledovanje amplifikacijskih in talilnih krivulj. Problem lahko predstavljajo tudi komercialni kiti, saj sta njihova sestava in možna variiranja v sestavi popolnoma odvisni od proizvajalca. Pomembna je tudi ustrezna nastavitev prazne vrednosti, izvajanje več paralelk (tri) za vzorec, ponavljanje poskusov in uporaba negativne kontrole (NTC-non template control).

Za primerljivost rezultatov znotraj in med laboratoriji bi bilo potrebno uvesti standardne postopke dela in protokole za izvedbo poskusov. Tako bi dosegli večjo primerljivost, kontrolo in ponovljivost rezultatov (Bustin 2005).

Tehnologija PCR v realnem času je tako zanesljiva, kolikor je zanesljiva njena kontrola in zagotavljanje kakovosti. Tu gre za kakovost standardov, standardnih krivulj, »housekeeping« genov idr. Nujna je optimizacija in evaluacija vsakega novega poskusa glede na prejšnje. Brez tega se napake in nezanesljivi podatki hitro kopičijo (Arya in sod., 2005).

2.2.9.10 Možnosti uporabe

PCR v realnem času lahko uporabljamo na vseh področjih, kjer je potrebna kvantifikacija nukleinskih kislin. Z njo lahko dokaj enostavno, zanesljivo in hitro določimo število kopij DNA in RNA v vzorcih.

V medicini je pomembna za diagnostiko predvsem tistih patogenov, ki jih je težko ali nemogoče gojiti. Pomembno vlogo ima pri spremljanju uspešnosti zdravljenja, napovedovanju poteka bolezni, prognozi in ugotavljanju rezistence na zdravila. Prednost metode pred klasičnimi je večja občutljivost ter hitrejša in enostavnejša pridobivanje rezultatov. Pri izbiri neustreznega amplikona lahko pridobimo lažno pozitivne ali negativne rezultate. Problem pa je tudi v tem, da zaznavamo tako mrtve, kot žive patogene. S to metodo lahko ugotavljamo tudi spremembe v številu kopij genov, izražanju genov, translokacije, inverzije in tudi točkaste mutacije. To je pomembno pri diagnostiki malignih obolenj.

Pri razvoju zdravil ima spremljanje genskega izražanja veliko vlogo pri odkrivanju novih tarč za zdravila ter pri preverjanju učinkovitosti in toksičnosti učinkovin.

Pri biotehnološki proizvodnji zdravil ima qPCR pomembno vlogo pri kvantifikaciji kontaminantov v celičnih linijah, ki jih uporabljamo za pridobivanje zdravil, v sestavinah medija za kulture in tudi v končnih produktih (npr: preverjanje prisotnosti retrovirusov v živih vakcinah). Z njim si pomagamo pri izbiri celične linije, v kateri je število kopij plazmidne DNA za proizvodnjo učinkovine stabilno. Pri razvoju genske terapije lahko ugotavljamo uspešnost prenosa v tarčne celice, porazdelitev v ostala tkiva in izražanje terapevtskega gena.

V prehranbeni industriji je pomembna pri zaznavanju mikrobov, parazitov in gensko spremenjenih organizmov.

Z nadaljnjim razvojem bodo aparature za real-time PCR postale cenejše in bolj mobilne, kar bo omogočilo uporabo na terenu in večjo dostopnost metodologije tudi za manjše laboratorije (Valasek in Repa, 2005; Arko, 2005; Lovatt, 2002).

2.2.9.11 Priprava vzorcev za qPCR

Pri uporabi kvantitativne verižne reakcije s polimerazo kot vzorec najpogosteje uporabljamo izolirano DNA. Pri določanju števila kopij plazmidov pa je pomembno, da se izognemo izolaciji, ker je slabo ponovljiva, poleg tega pa lahko spremeni razmerje med plazmidno in kromosomsko DNA. V literaturi zasledimo uporabo celih bakterijskih celic, ki pa jih moramo po odvzemu iz fermentorja pred analizo s qPCR ustrezno obdelati. V

našem interesu je, da je obdelava vzorcev čim bolj enostavna (direktna uporaba celic s kratko predobdelavo).

Preglednica 1: Prikazi različnih načinov predobdelave vzorcev *E. coli* za kasnejšo kvantitativno analizo s qPCR, povzeto po literaturi.

1. Jacobsen in sod., 2005	Vzorke obdelamo 10 min na 95°C →centrifugiramo 5 min na 13,000×g→uporabimo za qPCR .
2. Bischoff in sod., 2005	Bakterije shranimo na -20°C→suspenzijo centrifugiramo 10 min na 15,000×g, resuspendiramo v 200 µl 4 % Chelex 100 in segrejemo na 95°C 15 min (supernatant uporabimo za qPCR).
3. Chapman in sod., 2001	Bakterijam odstranimo gojišče→inkubiramo 10 min na 95°C →zamrznemo na -20°C →centrifugiramo pri 15,000×g 10 min (supernatant uporabimo za qPCR).
4. Morsczek in sod., 2004	Pozamezne kolonije obdelamo na 95°C 10min.
5. Ó. Mahony in Hill, 2002	Bakterijam odstranimo gojišče→denaturiramo→centrifugiramo→uporabimo za qPCR.
6. Padmakumar in Varadarajan, 2002	Uporabimo neobdelane bakterije.
7. Tao in sod., 2005	Kulturo inkubiramo na 99°C 10 min →centrifugiramo (supernatant uporabimo za qPCR).
8. Tao in sod., 2005	Celice liziramo→ centrifugiramo pri 12'000×g→suprenatant inkubiramo na 99°C 10 min.
9. Abolmaaty in sod., 1989	Celice tretiramo PCR pufru ločeno z lizocimom ali proteinazo K in pa z lizocimom in proteinazo K (najprej lizocim na 25°C 15 min, nato proteinaza K na 55°C 60 min). Lizirane celice nato segrejemo na 99,5°C 10 min. Rezultati so pokazali, da za direktno pomnoževanje sproščene DNA tretiranje z encimi nima prednosti v primerjavi z segrevanjem v PCR pufru. V primeru, da uporabimo encime se sprosti več DNA, encimi pa nato delno inhibirajo PCR, tudi po inaktivaciji na 99,5°C.

Iz preglednice je razvidno, da različni avtorji uporabljajo različne pristope, od popolnoma neobdelanih celic, toplotno obdelanih celic, ki so lahko centrifugirane ali pa ne in pa celic, ki so obdelane z encimi. Vidimo, da je najpogostejša toplotna obdelava celic na 95°C ali 99°C, 10 ali 15 min.

2.2.9.12 Ovrednotenje metode PCR v realnem času

Povzeto po Miller in Crowther (2000)

2.2.9.12.1 Točnost

Točnost metode je podana s tem, kako dobro se približamo pravi vrednosti.

2.2.9.12.2 Ponovljivost

Mera za ponovljivost je širina sipanja posameznih meritev okoli srednje vrednosti. Numerično jo podajmo s SD ali CV (%).

2.2.9.12.3 Meja zaznave

Meja zaznave analitske metode je najnižja količina analita, ki jo lahko zaznamo, vendar pa ji še ne moremo določiti točne vrednosti.

2.2.9.12.4 Območje linearnosti

Območje linearnosti je območje, kjer je proporcionalna zveza med koncentracijo analita in signalom.

2.2.9.12.5 Območje kvantifikacije

Območje kvantifikacije analitske metode je območje, kjer analit lahko kvantificiramo z ustrežno točnostjo in natančnostjo.

2.2.9.12.6 Robustnost

Robustnost metode je njena neobčutljivost na manjše vplive iz okolja, ki jih umetno variiramo (npr. manjša nihanja v temperaturi-metoda neobčutljiva na manjše temperaturne spremembe).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SEV, KI SMO GA UPORABLJALI ZA DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV Z AGAROSNO GELSKO ELEKTROFOREZO IN qPCR

Uporabljali smo bakterijski sev *E. coli* BL21(DE3) s plazmidom pET9a-Fopt5. *E. coli* BL21 (Novagen) je komercialni sev z genotipom F' ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3). Sev ima na kromosomu zapis za T7 RNA polimerazo, ki je pod kontrolo lac promotorja. Indukcija ekspresije tako poteka z IPTG ali laktozo. Sev je transformiran s komercialnom plazmidom pET9a (Novagen). Na plazmidu je kodirajoča sekvenca za rekombinantni protein pod kontrolo T7 promotorja (inducira ga T7 RNA polimeraza, ki je kodirana na kromosomu), vsebuje pa tudi zapis za kanamicinsko rezistenco (*kan^R*) (Novagen, pET system manual). Polimeraza povzroči transkripcijo tarčnega gena za rekombinantni protein, ki je prilagojen za ekspresijo v *E. coli*.

Bakterije smo gojili v stresani kulturi 16-20 ur, v gojiščih LBP/kan30 (gojišče LB s fitonom in kanamicinom 30 mg/ml) in LBPG/kan30 (gojišče LB s fitonom, glukozo in kanamicinom 30mg/ml) pri 25°C in 30°C ter 160 rpm. Proti koncu gojenja smo spremljali optično gostoto (OD); ko je kultura dosegla OD₆₀₀=10, smo vzorec odvzeli in zamrznili. Ta sev smo uporabili za določanje števila kopij plazmidov z agarozno gelsko elektroforezo in z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

Pod enakimi pogoji smo gojili bakterijski sev *E. coli* BL21(DE3) brez plazmida, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo.

3.2 DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV Z AGAROSNO GELSKO ELEKTROFOREZO

3.2.1 Vzorci

Vzorci štirih bakterijskih kultur (gojišče LBP/kan30 pri 25°C in 30°C, gojišče LBPG/kan30 pri 25°C in 30°C) smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo. Za kvantifikacijo smo izbrali tistega, ki je imel na gelu najbolj ostre in jasno ločene lise. Najbolj primeren za kvantifikacijo je bil vzorec gojen v gojišču LBP/kan30 pri temperaturi 25°C, zato smo ga uporabili za določanje števila kopij plazmidov. Kulture je pripravila Karmen Čerkić.

3.2.2 Metoda

Povprečno število kopij plazmidne DNA na rekombinantno bakterijsko celico smo določili z agarozno gelsko elektroforezo z modifikacijo protokola, ki ga je opisal Projan (1983). Najprej smo pripravili celični lizat. V 1,5 ml centrifugirko smo odpipetirali 100 µl kulture ($OD_{578}=30$), jo centrifugirali in odlili supernatant. Dodali smo 100 µl pufru za lizo (Za 10 ml pufru potrebujemo: 20 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; 20 % saharoze z 5 mg Lizocima in 1 ng RNaze). Po dodatku pufru smo vsebino premešali in inkubirali 30 min pri 37°C. Dodali smo 100 µl 2 % SDS in 1 min mešali na vibracijskem mešalniku. Mešanico smo inkubirali 5 min pri 37°C, nato pa smo dodali 1,5 µl Proteinaze K (20 mg/ml) in inkubirali 30 min pri 37°C. Na koncu smo dodali 200 µl pufru za sledenje vzorca na elektroforezi.

Celični lizat smo pripravili v dveh paralelkah. Iz vsake paralelke smo nanesti v žepke 0,8 % agaroznega gela v dveh paralelkah po 10, 20, 30, 40, 50 µl lizata.

Elektroforezo smo izvajali štiri ure pri napetosti 65 V. Po končani elektroforezi smo gel barvali z etidijevim bromidom (0,5 mg/l) eno uro, nato pa smo ga razbarvali z 1 mM $MgSO_4$ 20 min.

Po elektroforezi smo gel analizirali z denzitometrom (Gel Doc, Bio Rad). Vsakega od obeh gelov (A in B) pri treh različnih intenzitetah osvetlitve označenih kot A1, A2, A3 in B1, B2, B3. Osvetlitve B2 in B3 v izračunu nismo upoštevali zaradi premočne osvetlitve. Vsako liso smo ročno označili na računalniku (program Quantity One), ta pa je izračunal denzitometrični signal za posamezne lise. Elektroforezo sem izvedla s pomočjo Jelke Lenarčič.

3.2.3 Obdelava podatkov

Denzitometrične vrednosti vseh treh oblik plazmidne DNA smo sešteli. Število kopij plazmidov na kromosom smo izračunali po Enačbi 9:

$$\text{ŠKP} = \frac{C_p \times M_c}{C_c \times M_p} \quad (9)$$

kjer ŠKP pomeni število kopij plazmidov na kromosom, C_p in C_c sta količini plazmidne in kromosomske DNA na gelu (trace OD × mm), M_p je molekulska masa plazmidne, M_c pa molekulska masa kromosomske DNA. Izračunali smo povprečno vrednost ŠKP za paralelki nanosa in posamezno osvetlitev gela.

ŠKP smo izračunali tudi tako, da smo vrednost za CCC (dodatno zvito) obliko plazmida pred seštevanjem denzitometričnih signalov za plazmid pomnožili s korekcijskim faktorjem 1,36, kot navaja Projan (1983).

Za izračun števila kopij smo upoštevali vse pridobljene podatke o fluorescenci, v drugem primeru pa smo izkjučili tiste podatke, kjer so vrednosti zaradi premočnega signala preveč odstopale.

3.3 DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

3.3.1 Material in metode

3.3.1.1 Inštrument in reagenti

Verižno reakcijo s polimerazo v realnem času smo izvajali na inštrumentu ABI Prism[®] 7900HT Sequence detection system (Applied Biosystems). Za zaznavanje nastalega PCR produkta v realnem času smo uporabljali dve kemiji.

TaqMan kemija

Uporabljali smo s fluorescentnim barvilom označene hidrolizirajoče sonde. Za pripravo reakcij smo uporabljali TaqMan[®] Universal Master Mix (Applied Biosystems). Ta že vsebuje AmlpiTaq gold[®] DNA polimerazo, dNTP, pasivno referenco ROX, encim Uracil-DNA N-Glikozilazo (UNG), ki preprečuje kontaminacijo s PCR produkti in optimizirane komponente pufra. V reakcijsko mešanico smo dodajali le specifične začetne oligonukleotide in sonde za plazmid ali kromosom (Preglednica 2). Uporabljali smo začetne oligonukleotide in sonde, ki se vežejo na kodirajoči regiji (načrtovala Petra Slanc) in take, ki se vežejo na nekodirajoči regiji (načrtovala Veronika Okršlar). Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov je bil uporabljen program Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) in priporočila za načrtovanje oligonukleotidov (Chemistry Guide, Applied Biosystems). Preverili smo sekundarne strukture izbranih oligonukleotidov, možen nastanek dimerov oligonukleotidnih začetnikov in specifičnost s primerjavo podatkov v bazi GeneBank in poravnavo sekvenc z orodjem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) v NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi in sonde za TaqMan kemijo (kjer bp pomeni bazni par)

TaqMan kemija	5' zač. oligonukleotid velikost (bp)	3' zač. oligonukleotid velikost (bp)	sonda velikost (bp) tip, barvilo	amplikon velikost (bp)
kodirajoča regija plazmid	20	21	21 TAMRA, FAM	103
kodirajoča regija kromosom	18	17	27 TAMRA, FAM	149
nekodirajoča regija plazmid	18	17	16 MGB, FAM	94
nekodirajoča regija kromosom	21	20	14 MGB, FAM	87

Legenda

- MGB (minor groove binder) je molekula, ki je vezana na 3' koncu sonde. MGB sonda je zato lahko krajša, temperatura prileganja je 10°C višja kot za začetne oligonukleotide in je zato bolj specifična. Amplikoni so krajši, zato je učinkovitost pomnoževanja boljša.
- TAMRA je fluorescentno barvilo in služi kot dušilec. TAMRA sonde so daljše od MGB sond.
- FAM je fluorescentno barvilo, reporter.

SYBR Green kemija

V primeru uporabe SYBR Green kemije pa smo uporabljali SYBR Green[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems). Ta že vsebuje fluorescentno barvilo SYBR Green[®] I, AmpiTaq gold[®] DNA polimerazo, dNTP, pasivno referenco ROX, encim Uracil-DNA N-Glikozilazo (UNG) in optimizirane komponente pufra. V reakcijsko mešanico smo dodajali specifične začetne oligonukleotide za plazmid in kromosom (Preglednica 3).

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za SYBR Green kemijo

SYBR Green kemija	5' začetni oligonukleotid velikost (bp)	3' začetni oligonukleotid velikost (bp)	amplikon velikost (bp)
kodirajoča regija plazmid	20	21	103
kodirajoča regija kromosom	18	17	149
nekodirajoča regija plazmid	18	17	94
nekodirajoča regija kromosom	21	20	87

3.3.1.2 Vzorci

Izolirana plazmidna DNA

V začetnih poskusih smo uporabljali plazmidno DNA izolirano iz seva *E. coli* BL21(DE3) pET9a-Fopt5 (glej 3.1) po protokolu iz kita Qia prep Spin Miniprep kit.

Kasneje smo zaradi kontaminacije plazmidne DNA s kromosomalno izolacijo plazmidne DNA ponovili. Izolirali smo jo po protokolu: Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits. S to izolacijo smo pridobili bolj čisto plazmidno DNA, ki smo jo uporabili za nadaljnje poskuse.

Izolirana kromosomska DNA

Uporabljali smo kromosomsko DNA izolirano po protokolu kita Genomic Prep, Cell and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Zaradi kontaminacije s plazmidno DNA smo izolacijo kromosomske DNA ponovili iz bakterijske kulture brez plazmida (negativna kontrola, glej 3.1) na enak način.

Izolacijo plazmidne in kromosomske DNA smo izvajali: Karmen Čerkić, Špela Jalen in jaz.

Bakterijski vzorci

Za izbiro ustreznih amplikonov (glej 3.3.2.2) smo uporabili bakterijski kulturi gojeni pri 25°C 12 ur in 25°C 16 ur. Po gojenju smo pripravili dva tipa vzorcev. Prve smo tretirali z RNazo 1 uro pri 37°C in 15 min pri 96°C (vzorci 1), druge pa smo obdelali na enak način brez RNaze (vzorci 2).

Vzorci je predhodno pripravila Karmen Čerkić.

Za izbiro najustreznejše obdelave bakterijskih vzorcev po odvzemu iz fermentorja za kvantifikacijo s qPCR pa smo uporabljali vzorce, kot je opisano v poglavju 3.2.2.3.

Referenčni material

Pripravili smo dva tipa referenčnega materiala, enega z mešanjem izolirane kromosomske in izolirane plazmidne DNA, drugega pa z mešanjem bakterijskih celic brez plazmida (vsebujejo kromosomsko ne pa tudi plazmidne DNA) in izolirane plazmidne DNA.

3.3.1.3 Priprava reakcij

Delo

Delo je potekalo v mikrobiološki komori (MBK) in laminariju. Laminarij smo pred delom dekontaminirali z UV lučjo, delovno površino in orodje smo razkuževali s 70 % izopropanolom, pipete smo pred vsako uporabo obdelali s sredstvom za razgradnjo DNA (DNA Remover, Minerva).

Priprava bakterijskih vzorcev in izoliranih nukleinskih kislin je potekala v MBK, priprava reakcijskih mešanic in dodajanje vzorec pa v laminariju (na ta način smo se izognili navzkrižnim kontaminacijam).

Priprava vzorcev

Uporabljali smo ABI Prism reakcijske ploščice s 384 jamicami (max. volumen reakcije 20 μ l).



Slika 8: Slika ploščice (ABI prismTM Optical 384-Well Clear Optical Reaction Plate with barcode)

Izolirano plazmidno in kromosomsko DNA smo serijsko 10 $\times$ redčili (10 μ l vzorca in 90 μ l avtoklavirane vode) od začetne koncentracije 100 ng/ μ l pa do 10⁶ $\times$ redčenih vzorcev (0,1 pg/ μ l).

Bakterijske vzorce smo po odvzemu iz fermentorja obdelali (glej 3.2.2.3) in zamrznili. Pred uporabo pa smo jih po odtaljevanju serijsko redčili do 10⁶ $\times$. Bakterije smo redčili v večjih volumnih in sicer 100 μ l vzorca in 900 μ l avtoklavirane vode.

Priprava reakcijskih mešanic

Volumen reakcijskih mešanic z dodanim vzorcem na ploščici je bil 10 μ l. Vsak vzorec smo na ploščico nanašali v treh paralelkah. Reakcije so potekale v ločenih jamicah za amplikon na plazmidu in amplikon na kromosomu. Sestavine za 10 μ l reakcijo so prikazane v Preglednici 4 (različno pri uporabi TaqMan in SYBR Green kemije).

Preglednica 4: Količine komponent reakcijske mešanice za eno reakcijo (V=10 µl)

	TaqMan [µl]	SYBR Green [µl]
master mix (2×)	5	5
5'začetni oligonukleotid (10 µM)	0,9	0,1
3'začetni oligonukleotid (10 µM)	0,9	0,1
sonda (10 µM)	0,2	/
avtoklavirana H ₂ O	/	1,8
vzorec	3	3

Glede na število vzorcev smo ustrezno količino reakcijske mešanice pripravili v 1,5 ml centrifugirkah v katerih smo zmešali predpripravljen »Master Mix«, začetne oligonukleotide in sonde (TaqMan kemija) za specifičen amplikon.

Reakcijsko mešanico smo nato razdelili v 0,2 ml centrifugirke za tri reakcije in dodali vzorec. V luknjice na ploščici smo nanašali po 9 µl reakcijske mešanice in vzorca v treh paralelkah po prej pripravljeni shemi ploščice.

Pomembno pri pripravi vzorcev je njihova homogenost, zato smo pri pripravi vzorcev, reakcijskih mešanic, razdeljevanjem reakcijskih mešanic in vzorcev te vedno dobro premešali na vibracijskem mešalu. Vzorce pa smo predhodno tudi centrifugirali pri nizkih obratih, da so se kapljice razpršene po stenah mikrocetrifugirk posedle na dno. Na homogenost smo bili posebno pozorni pri delu z bakterijami, ker se te zaradi velikosti hitro usedajo.

Kontrole

Negativna kontrolna reakcija (NTC-no template control)

Pripravili smo jih enako, kot je opisano v poglavju 3.3.1.3.-Priprava reakcijskih mešanic, samo da smo namesto vzorca v reakcijsko mešanico dodali avtoklavirano vodo. NTC je kontrola za kontaminacijo z izolirano DNA in bakterijami med delom, v primeru SYBR Green kemije pa tudi pokazatelj nastajanja dimerov začetnih oligonukleotidov.

IPC (internal positive control)

IPC je kontrola inhibicije pomnoževanja. Z IPC kontrolo smo ugotavljali vpliv koncentracije vzorca na pomnoževanje referenčne DNA iz kita (IPC DNA). Uporabljali smo kit TaqMan[®] Exogenous Internal Positive Control Reagents (Applied Biosystems). Reakcijsko mešanico smo pripravili kot je navedeno v Preglednici 5. Uporabili smo jo za določitev koncentracije bakterij, ki jo lahko dodamo v reakcijo in ne povzroča inhibicije pomnoževanja in pri pripravi referenčnega materiala.

Preglednica 5: Količine komponent reakcijske mešanice za IPC kontrolo za eno reakcijo (V=10 µl)

	IPC kontrola [µl]
master mix (2×)	5
IPC mix 10× (začetna oligonukleotida, sonda)	1
IPC DNA 50×	0,2
avtoklavirana H ₂ O	0,8
vzorec	3

Negativna kontrola

Negativna kontrola je bil bakterijski sev brez plazmida (glej 3.1). Uporabili smo jo za preverjanje specifičnosti začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje amplikona na nekodirajoči regiji plazmida in za pripravo referenčnih materialov.

3.3.1.4 Potek reakcij

Tako pri uporabi TaqMan kot SYBR Green kemije smo uporabljali univerzalne pogoje pomnoževanja, ki so podani v Preglednici 6.

Preglednica 6: Pogoji pomnoževanja za SYBR Green in TaqMan kemijo

TaqMan kemija oz. SYBR Green kemija				dodatno SYBR Green kemija		
začetni koraki		45 ciklov		faza disociacije		
aktivacija nukleaze UNG	aktivacija AmpliTaq Gold [®] DNA polimeraze	denaturacija	prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje			
2 min 50°C	10 min 95°C	15 s 95°C	1min 60°C	15 s 95°C	15 s 60°C	15 s 95°C

Število uporabljenih ciklov je bilo vedno 45. Pri uporabi SYBR Green kemije smo dodali fazo disociacije za eksperimentalno pridobitev talilne krivulje.

3.3.1.5 Obdelava podatkov

Po izvedbi reakcije nam računalniški program SDS 2.2. poda grafično predstavitev pomnoževanja vzorcev.

Rezultate smo analizirali tako, da smo izbrali avtomatsko nastavitev bazne linije in ročno določili linijo prazne vrednosti (threshold) v spodnjem eksponentnem delu krivulje pomnoževanja. Pri uporabi barvila SYBR Green je bila linija prazne vrednosti vedno 0,1, pri TaqMan kemiji pa 0,3 in 0,6 relativnih enot fluorescence za oligonukleotide, ki prilegajo na kodirajočih regijah. Preverili smo krivuljo pomnoževanja, pravilnost

multikomponentnega grafa barvil ter Ct vrednosti (glede na referenčno sliko v navodilih za inštrument). V primeru uporabe SYBR Green kemije pa smo preverili, če imajo talilne krivulje vrh pri isti temperaturi. V primeru večjih odstopanj smo tako reakcijo izključili iz nadaljnje obdelave podatkov.

Določene Ct vrednosti smo nato prenesli v program Microsoft Excel za nadaljnjo obdelavo. Iz surovih Ct vrednosti in upoštevanjem faktorja redčenja vzorca smo iz naklona relativne standardne krivulje določili učinkovitost pomnoževanja, ki smo jo izračunali po Enačbi 10. Iz surovih Ct vrednosti smo izračunali tudi povprečja Ct, SD in koeficient variacije Ct vrednosti (CV), ki smo ga izračunali po Enačbi 11:

$$E = [10^{(-1/\text{naklon})}] - 1 \quad (10)$$

Skala od 0 do 1; 1 pomeni 100 % učinkovitost pomnoževanja; 0 pomeni, da ni pomnoževanja.

$$CV(\%) = \frac{\overline{Ct} \times 100}{SD} \quad (11)$$

Relativna kvantifikacija

Razmerja amplikonov kromosom:plazmid v referenčnih materialih smo izračunali po prej opisani $\Delta\Delta Ct$ metodi (relativna kvantifikacija) z upoštevanjem eksperimentalno določene učinkovitosti pomnoževanja. Pogoji za to metodo je enaka učinkovitost pomnoževanja amplikona na kromosomu in plazmidu ter izbrani kalibrator. V našem primeru je bila količina kromosomske DNA/bakterij v reakciji konstantna, zato smo pri izračunu upoštevali učinkovitost pomnoževanja plazmida (Enačba 13). Za kalibrator smo uporabili referenčni material z razmerjem kromosom:plazmid/bakterija:plazmid = 1:1. Razmerja in SD smo izračunali po User Bulletin 2 (Applied Biosystems).

V primeru bakterijskih vzorcev (model za fermentorski vzorec) učinkovitosti pomnoževanja za kromosomsko in plazmidno DNA niso bile enake, zato smo uporabili metodo po Pfaffl-u (2002), ki upošteva različno učinkovitost pomnoževanja posameznih amplikonov in kalibratorja (Enačba 12).

Izpeljava enačb:

Osnovna enačba (Enačba 12) upošteva različne učinkovitosti pomnoževanja za vsakega izmed amplikonov, ki jih pomnožujemo. Ostale enačbe (Enačbi 13 in 14) pa so njene poenostavitve. Pri Enačbi 13 sta enaki količina in učinkovitost pomnoževanja kromosomske DNA pri vzorcu in referenci, zato se del enačbe okrajša. Pri Enačbi 14, pa so učinkovitosti pomnoževanja vseh amplikonov enake in sto odstotne, zato za učinkovitost (E) vzamemo vrednost 2. V primeru enake učinkovitosti, ki ni sto odstotna pa lahko

uporabimo eksperimentalno določeno učinkovitost pomnoževanja (Enačba 15). Enačbe lahko uporabimo tudi brez upoštevanega kalibratorja.

$$\text{ŠKP} = \frac{(E_{\text{krom}})^{Ct \text{ vzorca}}}{(E_{\text{plaz}})^{Ct \text{ vzorca}}} \bigg/ \frac{(E_{\text{krom}})^{Ct \text{ ref}}}{(E_{\text{plaz}})^{Ct \text{ ref}}} \quad (12)$$

vzorec – realen vzorec bakterijske kulture kateri želimo določiti ŠKP

ref – referenčni material, npr.. bakterija:plazmid = 1:1

$$\text{ŠKP} = \frac{(E_{\text{plaz}})^{Ct \text{ ref}}}{(E_{\text{plaz}})^{Ct \text{ vzorca}}} \quad (13)$$

ref – referenčni material, npr.:bakterija:plazmid = 1:1

vzorec – ostali pripravljeni referenčni materiali

$$\begin{aligned} \text{ŠKP} &= \frac{(2_{\text{krom}})^{Ct \text{ vzorca}}}{(2_{\text{plaz}})^{Ct \text{ vzorca}}} \bigg/ \frac{(2_{\text{krom}})^{Ct \text{ ref}}}{(2_{\text{plaz}})^{Ct \text{ ref}}} \\ &= (2^{Ct \text{ krom}-Ct \text{ plaz}})_{\text{vzorec}} / (2^{Ct \text{ krom}-Ct \text{ plaz}})_{\text{ref}} \\ &= (2^{\Delta Ct \text{ vzorec}}) / (2^{\Delta Ct \text{ ref}}) \\ &= (2^{\Delta Ct \text{ vzorec}-\Delta Ct \text{ ref}}) \\ &= 2^{\Delta \Delta Ct} \end{aligned} \quad (14)$$

$$\text{ŠKP} = E_x^{\Delta \Delta Ct} \quad (15)$$

E_x – določena učinkovitost pomnoževanja

Primer: določena učinkovitost pomnoževanja je 90 % ($E_x=1,9$)

$$\text{ŠKP} = 1,9^{\Delta \Delta Ct}$$

Oceno prisotnosti kromosomske DNA v plazmidni in obratno smo določili po Enačbi 16:

$$\text{Delež} = 2^{-\Delta Ct} \quad (16)$$

Absolutna kvantifikacija

V primeru absolutne kvantifikacije smo pripravili standardno krivuljo iz izračunanega števila kopij plazmidov oziroma kromosomov v programu SDS. Za neznane vzorce določimo število kopij iz standardne krivulje.

3.3.2 Optimizacija metode qPCR

3.3.2.1 Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond za amplikon na nekodirajoči regiji

TaqMan kemija

Da dosežemo čim večjo učinkovitost pomnoževanja, moramo optimizirati pogoje reakcije. V reakcijah smo uporabljali komercialni »master mix« in univerzalne pogoje pomnoževanja. Edini parameter, ki smo ga optimizirali sami, so bile koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond. Kot matrico smo uporabili izolirano plazmidno in kromosomsko DNA. Optimizirali smo le koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond, ki se vežejo na amplikon na nekodirajoči regiji.

Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov

Neodvisno smo spreminjali koncentracije 5' in 3' začetnih oligonukleotidov in preverili kombinacije koncentracij prikazanih v Preglednici 7. Koncentracijo sonde smo ohranjali nespremenjeno (200 nM). Preverili smo spreminjanje Ct vrednosti in učinkovitost pomnoževanja amplikona (Enačba 10).

Preglednica 7: Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov za TaqMan kemijo

konc 5' zač. oligonukleotida/ konc. 3' zač. oligonukleotida	900 nM	600 nM	300 nM
900 nM	900/900	900/600	900/300
600 nM	600/900	600/600	600/300
300 nM	300/900	300/600	300/300

Optimizacija koncentracije sond

Preverili smo tudi vpliv različnih koncentracij sond na pomnoževanje plazmidne in kromosomske DNA (Ct vrednosti, jakost fluorescence in učinkovitost pomnoževanja). Koncentracije 5' in 3' začetnih oligonukleotidov so bile 900 nM, preverili pa smo naslednje koncentracije sond: 150, 200, 250 in 300 nM.

SYBR Green kemija

Uporabili smo priporočeno koncentracijo začetnih oligonukleotidov 100 nM (Applied Biosystems). Preverili smo nastajanje nespecifičnih produktov in dimerov začetnih oligonukleotidov s talilno krivuljo in NTC kontrolo. Določili smo T_m (temperatura pri

kateri je 50 % DNA v obliki enojne verige) specifičnih amplikonov in učinkovitost pomnoževanja po Enačbi 10.

3.3.2.2 Izbira ustreznih amplikonov (kodirajoča/nekodirajoča regija)

V predhodnih poskusih, v katerih so uporabili amplikon na kodirajočih regijah, so bile določene vrednosti ŠKP nepričakovano visoke (Veronika Okršlar, Simona Jevševar) in zelo variabilne (Petra Slanc). Trend povečevanja ŠKP vrednosti med fermentacijo je bil v skladu s povečevanjem koncentracije nastalega proteina določenega z ELISA testom (ustno Simona Jevševar). Vzorci bakterij v preliminarnem poskusu predhodno niso bili toplotno inaktivirani.

Primerjali smo pomnoževanje amplikonov na kodirajoči in nekodirajoči regiji plazmidne in kromosomske DNA. Kot vzorce (glej 3.3.1.3) smo uporabili z RNazo obdelane (vzorci 1) in kontrolne bakterijske vzorce, ki so bili obdelani na enak način vendar brez RNaze (vzorci 2) in pripravili reakcije primerjalno na eni ploščici. Uporabili smo 4 različne koncentracije bakterij ($10\times$, $10^2\times$, $10^3\times$, $10^4\times$ redčene vzorce). Določili smo spremembo vrednosti Ct pri vzorcih tretiranih z RNazo, glede na kontrolne vzorce za kromosom in plazmid. Poskus smo naredili z uporabo TaqMan in SYBR Green kemije.

3.3.2.3 Priprava vzorcev bakterijske kulture po odvzemu iz fermentorja

Priprava fermentacije

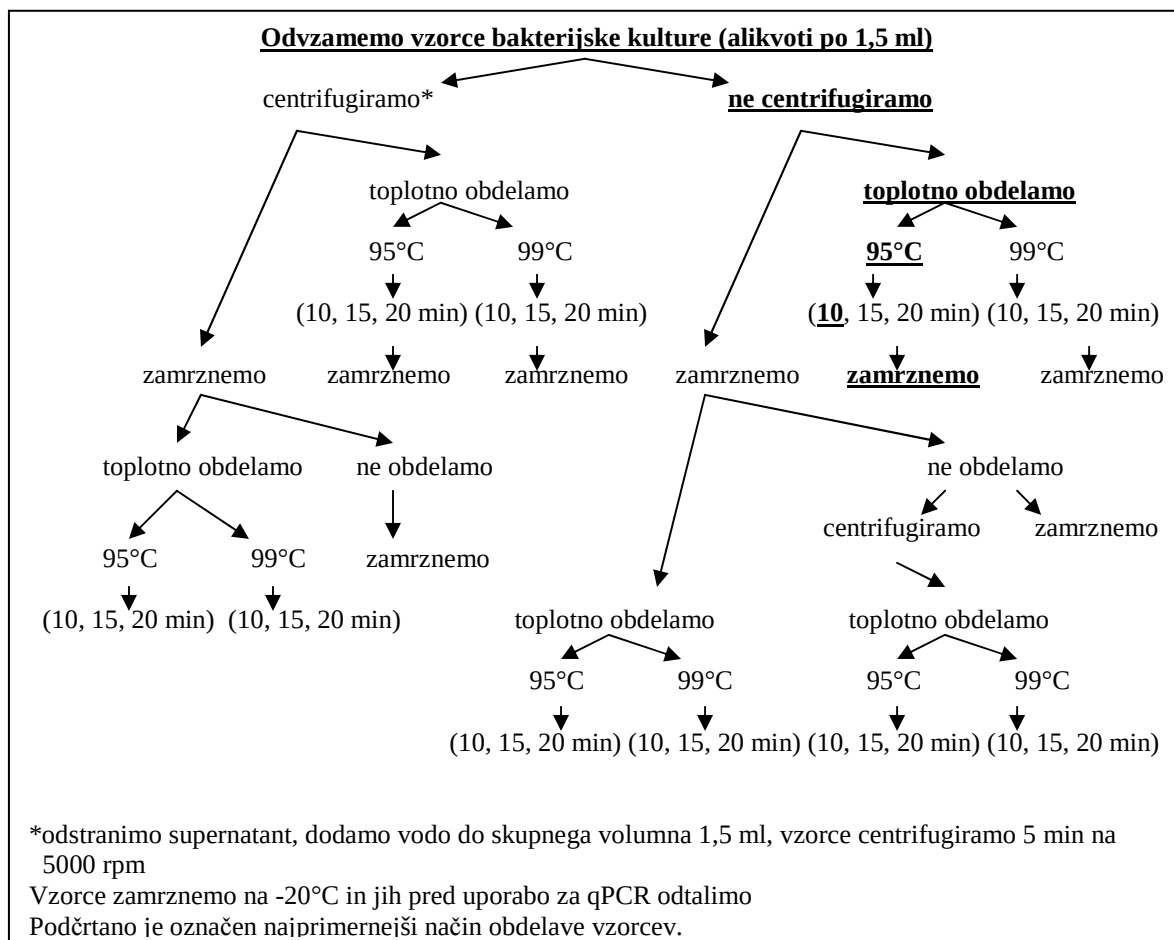
Fermentacijo je izvedla Špela Jalen. Fermentacija je potekala v 7L Applikon fermentorju. Pripravila je 200 ml inokuluma za 4L fermentacijskega gojišča GYSP (glukoza, kvas, sol in fiton) in 200 ml inokuluma za 4L fermentacijskega gojišča LYSP.

Za pripravo inokuluma je v 100 ml LBPG/kan30 gojišča dodala 0,4 ml kulture *E. coli* BL21 (DE3) pET9a-Fopt5, ki jo je vzela iz celične banke in odtalila na ledu. Kultura se je stresala 14 ur pri 160 rpm in 25°C, do OD_{600nm} 3-5. Fermentacija je tekla pri temperaturi 25°C, 400 rpm in skupnem volumnu 4,20 l. Areacija je bila manj kot 1. Pogoji gojenja so bili za obe gojišči enaki.

Obdelava vzorcev

Vzorce smo odvzeli iz dveh fermentorjev z različnima gojiščema (GYSP in LYSP). Odvzeli smo jih po 21,5 urah gojenja in jih obdelali kot prikazuje Slika 9. Vzorce smo zamrznili na -20°C, saj takojšnja analiza s qPCR ni mogoča. Vse različno obdelane vzorce

bakterijske kulture iz enega gojišča smo nanesti na isto ploščico. Poskus smo izvedli z začetnimi oligonukleotidi za amplikon na kodirajoči in nekodirajoči regiji, uporabili pa smo SYBR Green kemijo.



Slika 9: Obdelava vzorcev po odvzemu iz fermentorja

Zanimalo nas je, kako različne obdelave vplivajo na Ct vrednosti plazmida in kromosoma, kdaj je Ct vrednost najnižja in katere obdelave vplivajo enako na kromosomsko in plazmidno DNA (se ohranja razmerje). S Pearsonovo korelacijo smo poskušali ugotoviti, katere obdelave ležijo na regresijski premici s korelacijskim koeficientom blizu 1 ($R^2=1$).

3.3.2.4 Priprava referenčnega materiala

3.3.2.4.1 Priprava referenčnega materiala na osnovi izračunanih vrednosti

Za pripravo referenčnega materiala smo najprej izračunali maso kromosomske in plazmidne DNA po Enačbi 17, nato pa smo iz koncentracije raztopine izračunali število kopij kromosomske in plazmidne DNA:

Za kromosomsko DNA:

$$m_k = (\text{število nukleotidov}) \times (\text{povprečna masa nukleotida})$$

$$m_k = 4800000 \text{ bp} \times 1,096 \times 10^{-21} \text{ g/bp}$$

$$m_k = 4,9 \times 10^{-15} \text{ g (masa kromosomske DNA)}$$

Za plazmidno DNA:

$$m_p = (\text{število nukleotidov}) \times (\text{povprečna masa nukleotida})$$

$$m_p = 4836 \text{ bp} \times 1,096 \times 10^{-21} \text{ g/bp}$$

$$m_p = 4,96 \times 10^{-18} \text{ g (masa plazmidne DNA)} \quad (17)$$

Referenčni material smo pripravili tako, da smo izbrali tisti dve redčitvi kromosomske in plazmidne DNA, kjer je bilo število kopij kromosoma in plazmida približno enako (razmerje 1:1). Kromosomsko (ustrezno redčitev) in plazmidno DNA (ustrezno redčitev) smo združili v naslednjih razmerjih 1:1, 1:50, 1:100, 1:150 in jih kot vzorec dodali v reakcije ločeno za kvantifikacijo kromosoma in plazmida (2 tipa reakcij: začetna oligonukleotida za plazmid + združen vzorec, začetna oligonukleotida za kromosom + združen vzorec). Uporabili smo SYBR Green kemijo.

Rezultate smo analizirali z relativno kvantifikacijo in sicer z $\Delta\Delta C_t$ metodo z upoštevanom eksperimentalno določeno učinkovitostjo pomnoževanja (Enačba 15).

Poskus smo ponovili tako, da smo pripravili razmerja kromosom:plazmid = 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000. Referenčni material smo v tem primeru v reakcijo vnesli na dva načina. Pri prvem smo kromosomsko in plazmidno DNA združili in vnesli v reakcijo (enako kot v prvem poskusu), pri drugem pa smo ju v reakcijo vnesli ločeno (2 tipa reakcij: začetna oligonukleotida za plazmid + plazmidna DNA, začetna oligonukleotida za kromosom + kromosomska DNA). Količini plazmidne in kromosomske DNA sta bili v ločenih reakcijah enaki kot njuni količini v združenem vzorcu. V združenem vzorcu je bila večja celokupna količina DNA.

Ker smo želeli ugotoviti, ali izoliran plazmid vsebuje primesi kromosomske DNA in obratno, smo pripravili referenčni material v razmerju kromosom:plazmid = 1:1000. V reakcijo smo vnesli plazmidno in kromosomsko DNA ločeno in vsako analizirali za kromosom in plazmid (4 tipi reakcij: začetna oligonukleotida za plazmid + plazmidna DNA, začetna oligonukleotida za plazmid + kromosomska DNA, začetna oligonukleotida za kromosom + kromosomska DNA, začetna oligonukleotida za kromosom + plazmidna DNA).

3.3.2.4.2 Priprava referenčnega materiala na osnovi prekrivanja amplifikacijskih krivulj

Zaradi ugotovljene kontaminacije plazmidne DNA s kromosomsko DNA referenčnega materiala (združen vzorec) razmerij višjih kot kromosom:plazmid = 1:100 nismo mogli pripraviti. Zaradi kontaminacije tudi izračunano število kopij plazmidne in kromosomske DNA ni bilo dovolj točno. Zato smo se odločili za določitev razmerja kromosom:plazmid = 1:1 s prekrivanjem krivulj na amplifikacijskem grafu. To je mogoče kadar se oba amplikona pomnožujeta z enako učinkovitostjo. V tem primeru enaka Ct vrednost pomeni enako (različna velikost amplikonov pri Sybr Green kemiji) začetno število kopij. Zaradi različne velikosti amplikonov se fluorescenca ob vezavi barvila SYBR green nekoliko razlikuje. V našem primeru je razlika v velikosti odbeh amplikonov majhna (7 bp).

Referenčni material kromosomska:plazmidna DNA

Zaradi ugotovljene kontaminacije smo kromosomsko in plazmidno DNA ponovno izolirali (glej 3.2.2.4.3.) in jo pripravili v razmerjih 1:1, 1:10, 1:50, 1:75, 1:100, 1:125, 1:150, 1:200, 1:250, 1:1000. Količina kromosomske DNA je bila pri vseh razmerjih enaka, povečevali pa smo število plazmidov (uporaba ustreznih redčitev). Zaradi še vedno prisotne kontaminacije plazmida s kromosomsko DNA (100:1), za določitev območja kvantifikacije kromosomske in plazmidne DNA nismo združili skupaj. Število kopij plazmida smo določili z relativno kvantifikacijo ($\Delta\Delta C_t$ metodo), kjer smo uporabili eksperimentalno določeno učinkovitost pomnoževanja za plazmid in kot kalibrator razmerje 1:1.

Referenčni material bakterije:plazmidna DNA (model za realni vzorec)

Na enak način kot smo pripravili razmerja kromosom:plazmid smo pripravili tudi razmerja bakterija:plazmid. S prekrivanjem krivulj na amplifikacijskem grafu smo določili razmerje 1:1 za bakterijo *E. coli* brez plazmida in izoliran plazmid in nato pripravili razmerja 1:1, 1:10, 1:50, 1:75, 1:100, 1:125, 1:150, 1:200, 1:250, 1:1000. Uporabili smo samo ločene

reakcije za bakterijo in plazmid. Za določitev območja kvantifikacije metode smo uporabili IPC kontrolo (internal positive control). Na ta način smo preverili, kolikšna količina DNA in bakterij v združenem vzorcu v reakciji povzroči inhibicijo in katerega razmerja na ta način ne bi več mogli določiti. Kalibrator je bilo razmerje bakterija:plazmid = 1:1.

3.3.2.4.3 Zmanjšanje kontaminacije plazmidne DNA s kromosomsko in obratno

Z namenom, da bi zmanjšali kontaminacijo kromosomske DNA v vzorcih izolirane plazmidne DNA in obratno, smo plazmidno in kromosomsko DNA ponovno izolirali. Kromosomsko DNA smo izolirali iz bakterij brez plazmida, plazmidno pa smo poskušali dodatno očistiti kromosomske DNA s CIM-diski in z ekstrakcijo iz agaroznega gela.

3.3.2.4.3.1 Izolacija plazmidne DNA

V 10 $\times$ po 100 ml LBPG/kan30 smo nacepili 400 μ l celične suspenzije iz banke sevov shranjene na -70°C . Prekonočno kulturo smo gojili na 30°C in 160 rpm. Naslednji dan smo centrifugirali po 10 ml kulture na 5000 rpm 5 min.

Plazmidno DNA smo izolirali po protokolu: Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits. Za izolacijo smo uporabili 500 ml prekonočne kulture. Pri izolaciji sta mi pomagala Vanja Smilović in Špela Jalen.

Plazmidno DNA smo analizirali z 1 % agarozno gelsko elektroforezo pri 100 V eno uro (na gel smo nanесли standard lambda DNA/HindIII). Koncentracijo in čistost plazmidne DNA pa smo določili s spektrofotometričnim merjenjem absorbance pri $\lambda_{260\text{nm}}$ na spektrofotometru, izmerili smo tudi absorbanco pri $\lambda_{280\text{nm}}$. Iz razmerja med absorbancami $\lambda_{260\text{nm}}/\lambda_{280\text{nm}}$ smo ocenili čistost plazmidne DNA (za zelo čisto DNA mora biti razmerje med 1,7 in 2,1).

S qPCR smo ugotovili delež prisotne kromosomske DNA (Enačba 16).

3.3.2.4.3.2 Izolacija kromosomske DNA

V 50 ml LBPG smo nacepili 50 μ l celične suspenzije *E. coli* BL21 (DE3) (negativna kontrola) iz banke sevov shranjene na -70°C . Gojili smo preko noči na 25°C in 160 rpm. Naslednji dan smo centrifugirali po 1 ml kulture na 10000 rpm 2 min. Kromosomsko DNA smo izolirali po protokolu kita Genomic Prep, Cell and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) Izolirano kromosomsko DNA smo analizirali z 1 %

agarozno gelsko elektroforezo pri 100 V 2 uri (na gel smo nanesti standard lambda DNA/HindIII). Pri izolaciji sta mi pomagali Karmen Čerkič in Špela Jalen.

S qPCR smo ugotovili delež prisotne plazmidne DNA (Enačba 16).

3.3.2.4.3.3 Čiščenje plazmidne DNA s CIM-diski

Plazmidno DNA smo čistili na aparatu HPLC KNAUER IEC z uporabo monolitne kolone s kromatografskim nosilcem CIM[®]DEAE (Convective Interaction Media). Diameter diska je bil 16 mm, debelina pa 3 mm. V kolono smo vstavili dva diska s skupnim volumnom 0,68 ml. Pred ločbo smo kolono očistili z 0,5M KOH in jo ekvilibrirali s pufrom A, pufrom B in zopet pufrom A (pufer A = 20 mM TRIS/HCl, pH=7,4; pufer B = 20 mM TRIS/HCl; 1M NaCl, pH=7,4).

Vzpostavili smo gradient pufera B v 30 volumnih kolone (približno 20 ml pufera B → trajanje ločbe 20 min.) Pretok pufera preko kolone je bil 1 ml/min. Merili smo pri 260 nm. Kot vzorec smo nanesti izolirano plazmidno DNA (glej 3.2.2.5.1) Na kolono smo nanesti 700 µl plazmidne DNA s koncentracijo 1 mg/ml.

Čiščenje temelji na ionsko izmenjevalni kromatografiji. Spiranje plazmidne DNA povzroči visokokonzentriran NaCl, ki z DNA tekmuje za vezavo na kolono. Spiranje smo pričakovali in dosegli pri 70 % pufera B. Po končanem spiranju smo izvedli elektroforezo pri 100 V 30 min. Analizirali smo vzorce frakcij, kjer so bili vrhovi na kromatogramu. Ugotovili smo, da največji vrh predstavlja plazmidno DNA, ki pa se počasi spira do zadnje frakcije.

Čiščenje smo ponovili na enak način, le da smo nekoliko spremenili pufer B in podaljšali čas vzpostavljanja gradienta in izpiranja s 100 % pufera B. Koncentracijo NaCl smo povečali, da bi dosegli hitrejše spiranje plazmidne DNA (vse tri oblike se sperejo naenkrat), čas spiranja pa smo podaljšali, da bi se sprala tudi kromosomska DNA, ki je na kolono močnejše vezana zaradi velikosti in posledične večje količine negativnih nabojev.

Na kolono smo nanesti 750 µl plazmidne DNA s koncentracijo 1 mg/ml.

Pri čiščenju plazmidne DNA s CIM-diski mi je pomagala Menči Drole.

3.3.2.4.3.4 Čiščenje plazmidne DNA iz gela

Uporabili smo E-gel (1.2 % agarozni gel; Invitrogen). Elektroforeza je tekla pri 65 V 40 min.

Lise ustrezne velikosti, ki so vsebovale CCC obliko plazmidne DNA smo izrezali iz gela. DNA smo iz gela eluirali s kitom: Promega[®] SV Gel and PCR Clean-Up System.

3.3.3 Določanje števila kopij plazmidov pri realnih vzorcih

3.3.3.1 Vzorci

Kot vzorce smo uporabili bakterijski sev *E.coli* BL21(DE3) z rekombinantnim plazmidom pET9a-Fopt5 (glej 3.1). Bakterije smo gojili pri 25°C v gojišču LBP/kan30 do OD₆₀₀=10 v petih paralelkah. Po odvzemu smo jih toplotno obdelali 10 min na 95°C (glej 3.3.2.3.). ŠKP smo določili tudi pri enakih vzorcih s katerimi smo ŠKP predhodno določili z agarozno gelsko elektroforezo. Ti vzorci niso bili toplotno obdelani.

3.3.3.2 Metoda

Ko smo z optimizacijo metode določili vse parametre izvedbe reakcije, smo število kopij plazmidov določili pri realnih vzorcih. Uporabili smo SYBR Green kemijo, začetne oligonukleotide, ki se vežejo na nekodirajoči regiji, in standardne pogoje reakcije (glej poglavje 3.3.1.4.). Reakcijske mešanice smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.3.1.3., le da smo vzeli 2,5 µl vzorca, preostali volumen pa smo dopolnili z vodo. Na ploščico smo nanесли referenčni material: negativno kontrolo (glej 3.1.) in izolirano plazmidno DNA v razmerju 1:1 (2,5 µl 10³× redčene bakterijske kulture in 0,5 µl 10³× redčene izolirane plazmidne DNA s koncentracijo 20 pg/µl).

3.3.3.3 Obdelava podatkov

Za vse vzorce smo pripravili serijo redčitev (10³×, 5·10³×, 10⁴×, 5·10⁴×). Učinkovitost pomnoževanja smo določili iz relativne standardne krivulje za plazmid in kromosom vsakega vzorca posebej (Enačba 10). Za določitev učinkovitosti smo izbrali standardno krivuljo s številom točk, pri kateri je bil korelacijski koeficient najvišji (nad 0,99). Število kopij plazmidov smo v tem primeru zaradi neenakih učinkovitosti pomnoževanja za kromosomsko in plazmidno DNA izračunali po Pfafflov-em modelu (Enačba 12). ŠKP smo določili pri štirih redčitvah vzorca (pri vsaki paralelki po tri redčitve). Za vsak vzorec smo izračunali ŠKP kot povprečje različnih redčitev vzorca.

Učinkovitosti pomnoževanja smo določili tudi za izolirano plazmidno DNA in negativno kontrolo.

3.3.4 Ovrednotevnje metode qPCR

3.3.4.1 Točnost in ponovljivost

Točnost metode smo določali z referenčnim materialom. Plazmidno in kromosomsko DNA ter plazmidno DNA in bakterije smo združili v izbranih razmerjih. Nato smo ta razmerja določili s qPCR in izračunali po $\Delta\Delta C_t$ metodi z eksperimentalno določeno učinkovitostjo pomnoževanja plazmida. V odstotkih smo podali odstopanje povprečno določenega ŠKP od pripravljenega razmerja za celotno območje kvantifikacije od 1:1 do 1:250.

Ponovljivost metode smo določili s standardno deviacijo treh paralelk in koeficientom variacije za C_t vrednosti in določenega ŠKP znotraj ene ploščice (intrassay coefficient of variation) in med osmimi različnimi ploščicami (interassay coefficient of variation).

Nekateri avtorji ponovljivost metode določajo samo na podlagi C_t vrednosti, kar pa je sporno (glej rezultate in razpravo). Takšno določanje ponovljivosti je napačno, saj so C_t logaritemske vrednosti in podajo napačno oceno variabilnosti.

3.3.4.2 Specifičnost

Specifično vezavo začetnih oligonukleotidov in sond smo preverili s poravnavo sekvenc z orodjem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) v NCBI (National Center of Biotechnology Information). Poleg tega smo bakterije, ki plazmida ne vsebujejo (negativna kontrola) pomnoževali z začetniki, ki se specifično vežejo na plazmidno DNA.

Specifičnost smo pri uporabi SYBR Green kemije ugotavljali tudi s pregledovanjem talilnih krivulj. Vsak specifičen amplikon ima svojo značilno T_m . Z NTC (no template control), pri kateri smo v reakcijo namesto vzorca dodali vodo, smo preverili nastanek dimerov začetnih oligonukleotidov.

3.3.4.3 Meje zaznave in kvantifikacije

Pripravili smo serijo redčitev za plazmidno in kromosomsko DNA, v razponu 10 log enot (od koncentriranega-100 ng/ μ l do $10^9\times$ redčenega vzorca, kar je v našem primeru pomenilo od $6\cdot 10^{10}$ do 0 kopij DNA). S qPCR smo določali prisotnost vzorcev v jamicah.

Za določitev meje zaznave bakterijske kulture smo pripravili serijo redčitev v razponu 7 log enot (od koncentrirane do $10^7\times$ redčene kulture OD=10). Možnost inhibicije pomnoževanja smo preverjali s pomočjo IPC (interna pozitivna kontrola).

Za mejo zaznave smo določili tisto redčitev (količino DNA oz. bakterij), kjer smo v vseh paralelkah še zaznali pomnoževanje. Za spodnjo mejo kvantifikacije pa redčitev ko koeficient variacije Ct treh paralelk ni bil večji od 1 % za kromosom oziroma plazmid ter 2 % za bakterije. Za zgornjo mejo kvantifikacije smo določil tisto količino DNA in bakterij v reakciji, ko se že znatno pojavi inhibicija.

3.3.4.4 Območje linearnosti in kvantifikacije

Območje linearnosti smo določali iz standardne krivulje. Kot linearno smo določili tisto območje, kjer so se točke prilegale premici in je bil korelacijski koeficient 0,99 ($R^2 \geq 0,99$). Naklon standardnih krivulj je bil med 3.2 in 3.9, kar ustreza učinkovitosti pomnoževanja 105 % in 80 %.

V realnih vzorcih sta bakterijska in plazmidna DNA v isti celici, zato smo tudi z referenčnimi materiali (kromosom:plazmid, bakterija:plazmid =1:1, 1:10, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:1000) potrdili območje kvantifikacije.

ŠKP na kromosom, ki ga v bakterijskih kulturah realnih vzorcev pričakujemo, je 1:25 do 1:250.

3.3.4.5 Robustnost

Za oceno robustnosti (občutljivost na manjše, vendar namerno uporabljene spremembe pri razvoju metode) smo pregledali kateri parametri so se med razvojem metode spreminjali.

Tekom eksperimentalnega dela smo večkrat zamenjali kemikalije, poskuse smo ponavljali ob različnih dnevih, uporabili smo večkrat izolirano DNA, bakterije smo gojili v različnih gojiščih.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE POVPREČNEGA ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV Z AGAROSNO GELSKO ELEKTROFOREZO (REFERENČNA METODA)

Določeno število ŠKP z agarosno gelsko elektroforezo prikazujeta Preglednici 8 in 9.

Preglednica 8: Izračun ŠKP z agarosno gelsko elektroforezo z upoštevanjem vseh vrednosti gelov A in B in treh različnih osvetlitev (A1, A2, A3)

	GEL A1	GEL A2	GEL A3	GEL B1
PCN (nanos 10 μ L)	96 $\pm$ 21	84 $\pm$ 20	73 $\pm$ 11	73 $\pm$ 0
PCN (nanos 20 μ L)	94 $\pm$ 8	79 $\pm$ 6	85 $\pm$ 2	68 $\pm$ 11
PCN (nanos 30 μ L)	91 $\pm$ 5	61 $\pm$ 5	66 $\pm$ 3	85 $\pm$ 4
PCN (nanos 40 μ L)	132 $\pm$ 0	66 $\pm$ 13	86 $\pm$ 1	/
PCN (nanos 50 μ L)	132 $\pm$ 6	88 $\pm$ 4	95 $\pm$ 5	/
PCN povprečje	86 $\pm$ 20 CV=23 %			

(upoštevani faktor 1,36)*	GEL A1	GEL A2	GEL A3	GEL B1
PCN (nanos 10 μ L)	127 $\pm$ 27	112 $\pm$ 26	96 $\pm$ 16	96 $\pm$ 1
PCN (nanos 20 μ L)	121 $\pm$ 10	102 $\pm$ 8	108 $\pm$ 1	88 $\pm$ 15
PCN (nanos 30 μ L)	112 $\pm$ 6	76 $\pm$ 7	81 $\pm$ 3	108 $\pm$ 5
PCN (nanos 40 μ L)	169 $\pm$ 3	83 $\pm$ 21	108 $\pm$ 3	/
PCN (nanos 50 μ L)	171 $\pm$ 3	99 $\pm$ 12	106 $\pm$ 11	/
PCN povprečje	109 $\pm$ 26 CV=24 %			

*1,36 je korekcijski faktor, s katerim pomnožimo vrednosti za CCC obliko plazmida, ker ima po vezavi EtBr nižjo fluorescenco od ostalih dveh oblik

CV (brez faktorja)= 23 %; CV (s faktorjem)= 24 %

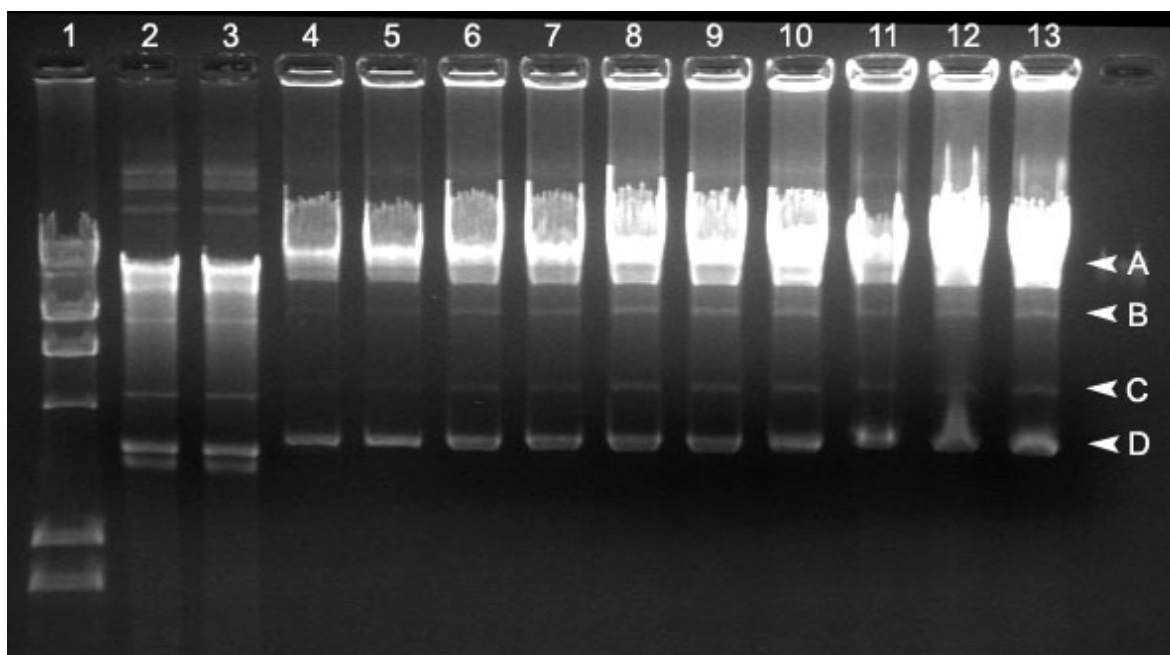
Preglednica 9: Izračun ŠKP z agarosno gelsko elektroforezo z upoštevanjem izbranih vrednosti gelov A in B in treh različnih osvetlitev (A1, A2, A3); izločene so meritve, ki znatno odstopajo (»outliers«)

	GEL A1	GEL A2	GEL A3	GEL B1
PCN (nanos 10 μ L)	96 $\pm$ 21	84 $\pm$ 20	73 $\pm$ 11	73 $\pm$ 0
PCN (nanos 20 μ L)	94 $\pm$ 8	79 $\pm$ 6	85 $\pm$ 2	68 $\pm$ 11
PCN (nanos 30 μ L)	91 $\pm$ 5	61 $\pm$ 5	/	85 $\pm$ 4
PCN (nanos 40 μ L)	/	/	86 $\pm$ 1	/
PCN (nanos 50 μ L)	/	88 $\pm$ 4	95 $\pm$ 5	/
PCN povprečje	83 $\pm$ 11 CV=13 %			

(upoštevani faktor 1,36)*	GEL A1	GEL A2	GEL A3	GEL B1
PCN (nanos 10 μ L)	127 $\pm$ 27	112 $\pm$ 26	96 $\pm$ 16	96 $\pm$ 1
PCN (nanos 20 μ L)	121 $\pm$ 10	102 $\pm$ 8	108 $\pm$ 1	88 $\pm$ 15
PCN (nanos 30 μ L)	112 $\pm$ 6	76 $\pm$ 7	/	108 $\pm$ 5
PCN (nanos 40 μ L)	/	/	108 $\pm$ 3	/
PCN (nanos 50 μ L)	/	99 $\pm$ 12	106 $\pm$ 11	/
PCN povprečje	104 $\pm$ 13 CV=13 %			

*1,36 je korekcijski faktor, s katerim pomnožimo vrednosti za CCC obliko plazmida, ker ima po vezavi EtBr nižjo fluorescenco od ostalih dveh oblik

CV (brez faktorja)=13 %; CV (s faktorjem)=13 %



Slika 10: Slika gela A, ki smo ga denzitometrirali za določitev ŠKP; pri čemer je v jamici št. 1 λ DNA, 2 in 3 sta standarda za plazmid, 4 - 13 pa so vzorci (4 in 5 nanos 10 μ l; 6 in 7 20 μ l; 8 in 9 30 μ l; 10 in 11 40 μ l; 12 in 13 50 μ l). S črko A je označena kromosomska DNA, B je oblika plazmida odprti krog, C je linearna oblika, D pa CCC oblika plazmidne DNA.

Pri določanju števila kopij plazmidov z agarozno gelsko elektroforezo smo ob upoštevanju vseh žepkov na gelu število kopij plazmidov določili do 23 % natančno (CV=23) (Preglednica 1). V primeru, ko smo v izračun vključili le izbrane žepke (nismo upoštevali žepkov, ki so odstopali zaradi premočnega signala in tistih pri katerih je DNA »ušla ven«) pa smo število kopij plazmidov določili do 13 % natančno (CV=13) (Preglednica 2).

Določeno število kopij plazmidov se v nobenem od obeh primerov (upoštevanje vseh in upoštevanje izbranih vrednosti) ni bistveno razlikovalo in je znašalo okrog 100 kopij. Velike pa so bile razlike v variabilnosti. Ugotovili smo, da ima velik vpliv na določitev števila kopij korekcijski faktor, ki ga moramo pri izračunu ŠKP upoštevati, saj v nasprotnem primeru dobimo 20 % nižje vrednosti (ŠKP z upoštevanjem faktorja je okrog 100 kopij, brez upoštevanja pa 80 kopij).

4.2 DOLOČANJE ŠTEVILA KOPIJ PLAZMIDOV S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO

4.2.1 Optimizacija metode qPCR

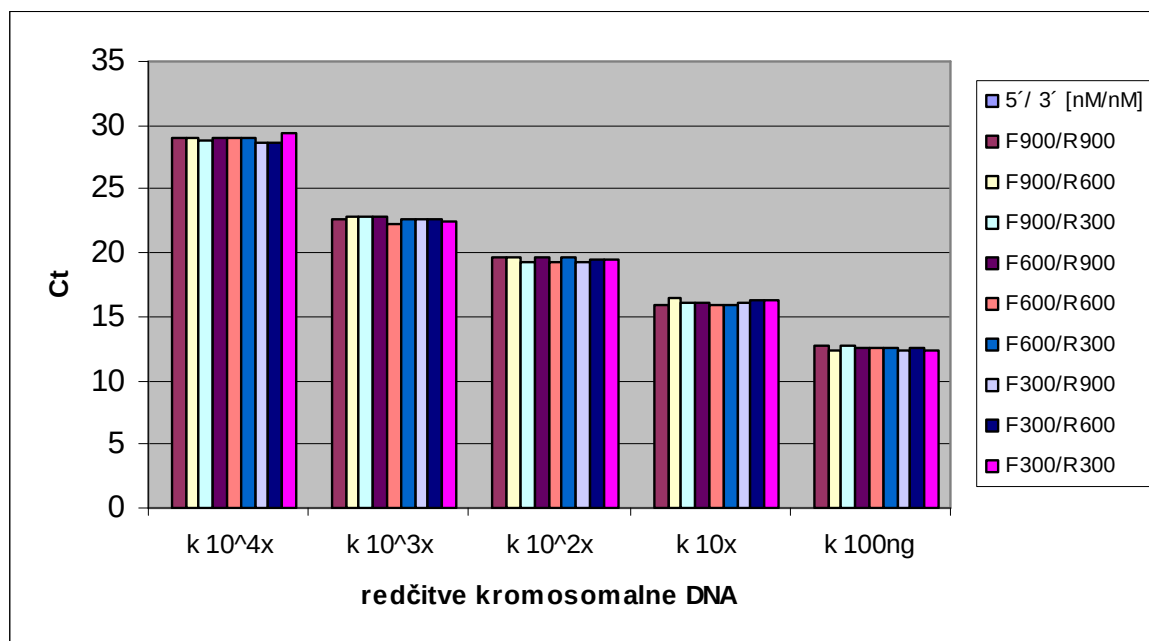
4.2.1.1 Optimizacija koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond za ampikon na nekodirajoči regiji

TaqMan kemija

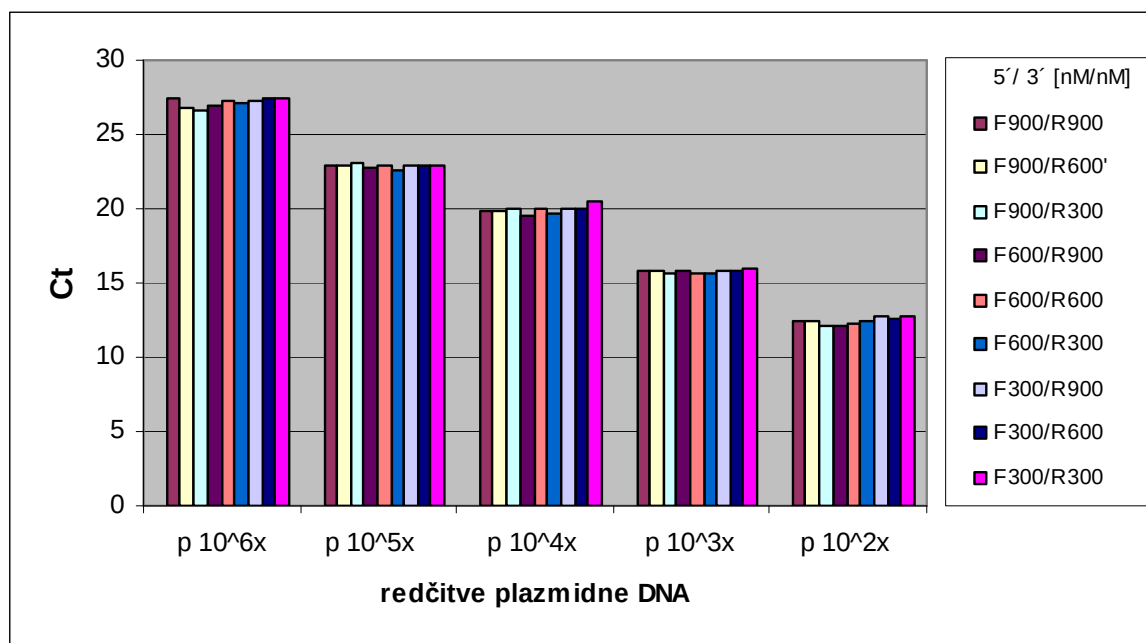
Optimizirali smo koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond za nekodirajoči regiji na plazmidu in kromosomu in tako dosegli optimalne pogoje pomnoževanja.

Optimizacija koncentracij začetnih oligonukleotidov

S primerjavo Ct vrednosti vidimo, da sprememba koncentracij začetnih oligonukleotidov nima vpliva na pomnoževanje DNA (Slika 11 in Slika 12), saj so razlike v Ct vrednostih manjše od enega cikla.



Slika 11: Primerjava Ct vrednosti različnih koncentracij 3' in 5' začetnih oligonukleotidov za ampikon na kromosomu (pri čemer sta 3' in 5' oznaki za začetna oligonukleotida, ki se vežeta na 3' in 5' konciji; F je 5' forward, R pa 3' reverse začetni oligonukleotid; 900, 600, 300 so oznake koncentracij [nM]).



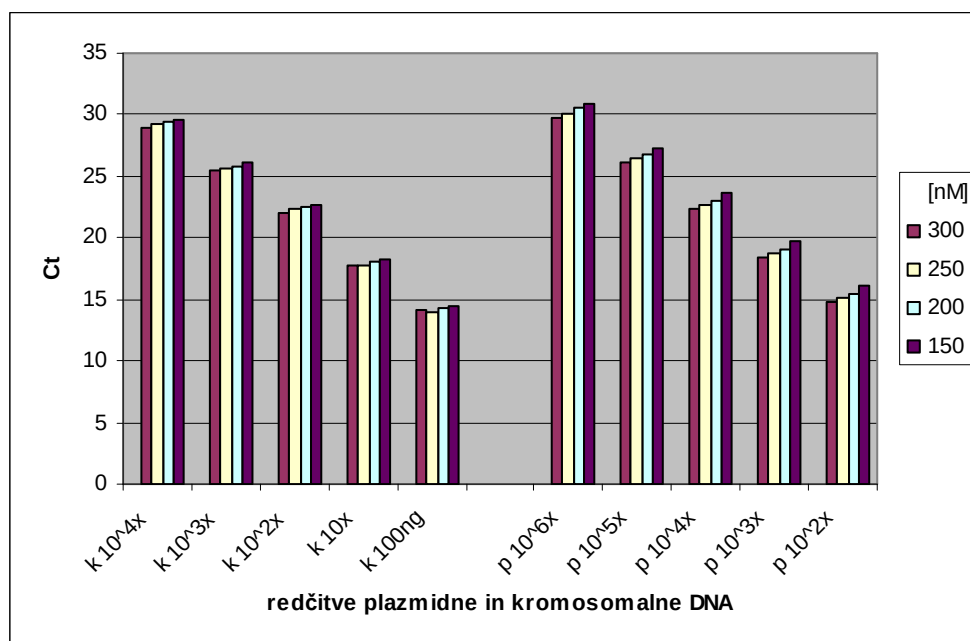
Slika 12: Primerjava Ct vrednosti različnih koncentracij 3' in 5' začetnih oligonukleotidov za ampikon na plazmidu (pri čemer sta 3' in 5' oznaki za začetna oligonukleotida, ki se vežeta na 3' in 5' koncih; F je 5' forward, R pa 3' reverse začetni oligonukleotid; 900, 600, 300 so oznake koncentracij [nM])

Izračunane učinkovitosti pomnoževanja se pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov med seboj skoraj ne razlikujejo. Za kromosom znašajo 101 % in za plazmid 88 %.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da tako pri kromosomu, kot pri plazmidu spreminjanje koncentracij začetnih oligonukleotidov ne vpliva na učinkovitost pomnoževanja DNA.

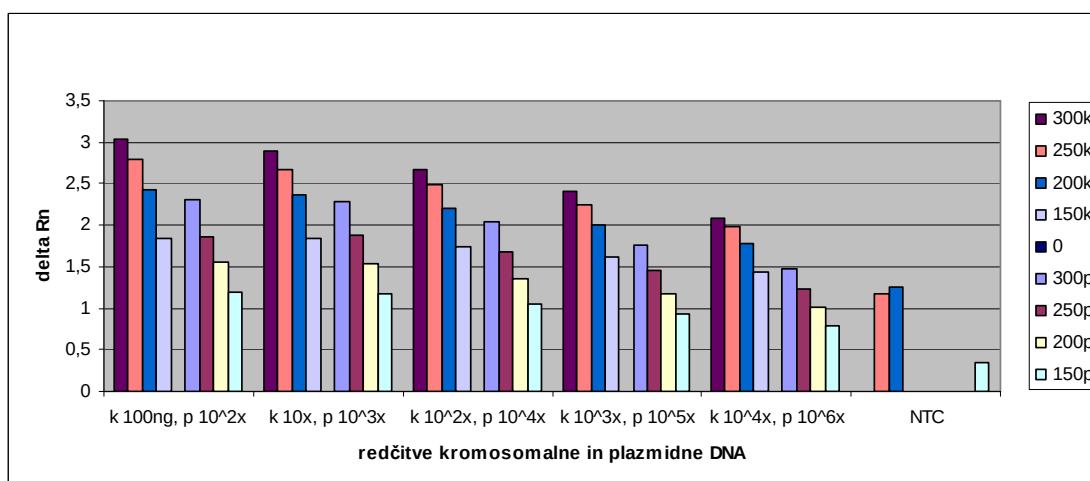
Optimizacija koncentracije sond

Če med seboj primerjamo Ct vrednosti, pa vidimo, da se z zviševanjem koncentracije sonde Ct vrednost znižuje (razlika med 150 in 300 nM je pri kromosomu 0,5 cikla, pri plazmidu pa 1 cikel). To pomeni, da prenizke koncentracije sonde predstavljajo omejitveni dejavnik pri pomnoževanju DNA. V literaturi zasledimo, da so priporočene koncentracije sonde 200 nM in 250 nM (Applied Biosystems). V našem primeru je Ct vrednost najnižja, če uporabimo koncentracijo sonde 300 nM (Slika 13).



Slika 13: Primerjava Ct vrednosti različnih koncentracij sond za ampikon na kromosomu in plazmidu (pri čemer je k kromosomska DNA, p pa plazmidna DNA)

Pri uporabi sond je pomembna tudi fluorescenca, ki je veliko večja pri kromosomu, kot pri plazmidu (Slika 14). Če želimo oba primerjati med seboj (z relativno kvantifikacijo) morata biti fluorescenci približno enaki. Če bi hoteli izenačiti fluorescenco, bi morali uporabiti nižjo koncentracijo sond pri kromosomu (npr.: pri kromosomu bi vzeli koncentracijo sonde 200 nM, pri plazmidu pa 300 nM). Izberemo kompromis med jakostjo fluorescence in Ct vrednostjo, kar lahko storimo, če je sprememba manj kot 1 cikel.



Slika 14: Primerjava fluorescence različnih koncentracij sond za ampikon na kromosomu in plazmidu (pri čemer je k kromosomska DNA, p plazmidna DNA, NTC negativna kontrolna reakcija, delta Rn pa razlika relativnih enot fluorescence)

Pri spreminjanju koncentracij sond smo določili učinkovitost pomnoževanja za kromosomsko DNA 84 %, za plazmidno DNA pa 85 %, kar je za koretno izvedbo nadaljnjih poskusov dovolj dobro (dobra je že učinkovitost pomnoževanja nad 80 %).

SYBR Green kemija

S pregledovanjem talilnih krivulj smo ugotovili, da nespecifični produkti in dimeri pri koncentraciji začetnih oligonukleotidov 100 nM ne nastajajo. Talilne temperature (T_m) za posamezne amplikone so prikazane v Preglednici 10.

Preglednica 10: T_m za amplikone na kodirajoči in nekodirajoči regiji plazmidne in kromosomske DNA

	Kromosomska DNA	Plazmidna DNA
kodirajoča regija	80,0°C	85,2°C
nekodirajoča regija	75, 2°C	83,4°C

Razlike v T_m za posamezen amplikon so manj kot 1°C.

V jakosti fluorescence zaradi različne dolžine amplikonov ni bistvenih razlik (amplikon na plazmidu je dolg 94 bp, na kromosomu pa 87 bp), zato ju lahko primerjamo med seboj.

Iz naklona relativne standardne krivulje smo določili učinkovitosti pomnoževanja, ki je za izoliran kromosom (prva izolacija) in plazmid (prva izolacija) približno enaka (85 %).

Iz rezultatov vidimo, da lahko namesto TaqMan kemije uporabljamo SYBR Green kemijo, saj ne prihaja do nastanka nespecifičnih produktov in dimerov začetnih oligonukleotidov, učinkovitosti pomnoževanja so dobre, razlike v fluorescenci zaradi razlike v dolžini amplikonov pa zanemarljive.

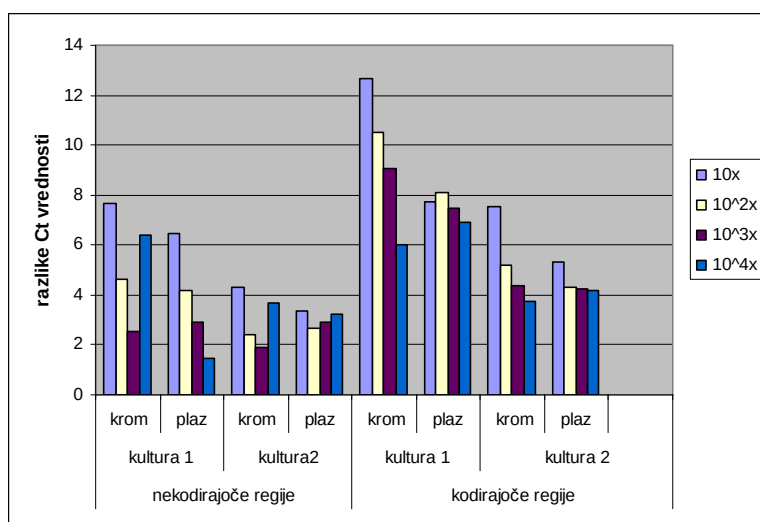
4.2.1.2 Izbira ustreznih amplikonov (kodirajoča/nekodirajoča regija)

TaqMan kemija

Z obdelavo bakterijskih vzorcev z RNazo smo s primerjavo C_t vrednosti ugotovili, da je pri amplikonih na kodirajoči in nekodirajoči regiji C_t nižji pri bakterijskih vzorcih neobdelanih z RNazo, po obdelavi pa se C_t zviša (Preglednica 11, Slika 15). To pomeni, da je pri neobdelanih vzorcih več izhodnega materiala, ki se pomnožuje. Vidimo, da so razlike v C_t vrednostih večje pri pomnoževanju amplikonov na kodirajoči regiji kot na nekodirajoči regiji (razlika 2-4 cikle), kar pomeni da obstaja možnost vezave začetnih oligonukleotidov in sond na mRNA.

Preglednica 11: Razlike v Ct vrednostih med z RNazo obdelanimi in neobdelanimi vzorci (TaqMan kemija)

	kromosom (razlike med obd. in neobd. vzorci)	plazmid (razlike med obd. in neobd. vzorci)
začetni oligonukleotidi (nekod. regija)	2-8	1-7
začetni oligonukleotidi (kod. regija)	4-14	4-8



Slika 15: Razlike v Ct vrednostih med z RNazo obdelanimi in neobdelanimi vzorci (TaqMan kemija)

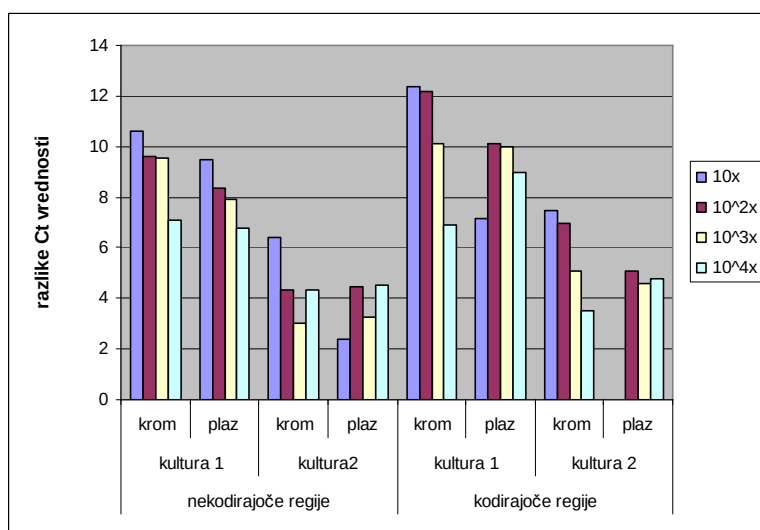
Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo uporabljali začetne oligonukleotide in sonde, ki se vežejo na nekodirajočo regijo DNA, ker na ta način izločimo možnost vezave sond in začetnih oligonukleotidov na mRNA.

SYBR Green kemija

Pri uporabi SYBR Green kemije so razlike v Ct vrednostih vzorcev obdelanih in neobdelanih z RNazo med začetniki, ki se vežejo na kodirajoči in nekodirajoči regiji manjše, kot pri uporabi TaqMan kemije (razloga za to ne poznamo). To prikazujeta Preglednica 12 in Slika 16.

Preglednica 12: Razlike v Ct vrednostih med z RNazo obdelanimi in neobdelanimi vzorci (SYBR Green kemija)

	kromosom (razlike med obd. in neobd. vzorci)	plazmid (razlike med obd. in neobd. vzorci)
začetni oligonukleotidi (nekod. regija)	4-11	2-10
začetni oligonukleotidi (kod. regija)	4-12	5-10



Slika 16: Razlike v Ct vrednostih med z RNazo obdelanimi (kultura 1) in neobdelanimi vzorci (kultura 2) (SYBR Green kemija)

Pri uporabi začetnih oligonukleotidov za kodirajočo regijo ni bistvenih razlik v Ct vrednostih pri uporabi TaqMan in SYBR Green kemije. Ob uporabi začetnikov za nekodirajočo regijo pa so razlike v Ct vrednostih tako pri obdelanih kot pri neobdelanih vzorcih nižje. V primeru uporabe SYBR Green kemije so razlike v Ct vrednostih med amplikoni bolj primerljive (razlika 1-2 cikla).

Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo uporabljali SYBR Green kemijo.

4.2.1.3 Obdelava vzorcev bakterijske kulture po odvzemu iz fermentorja

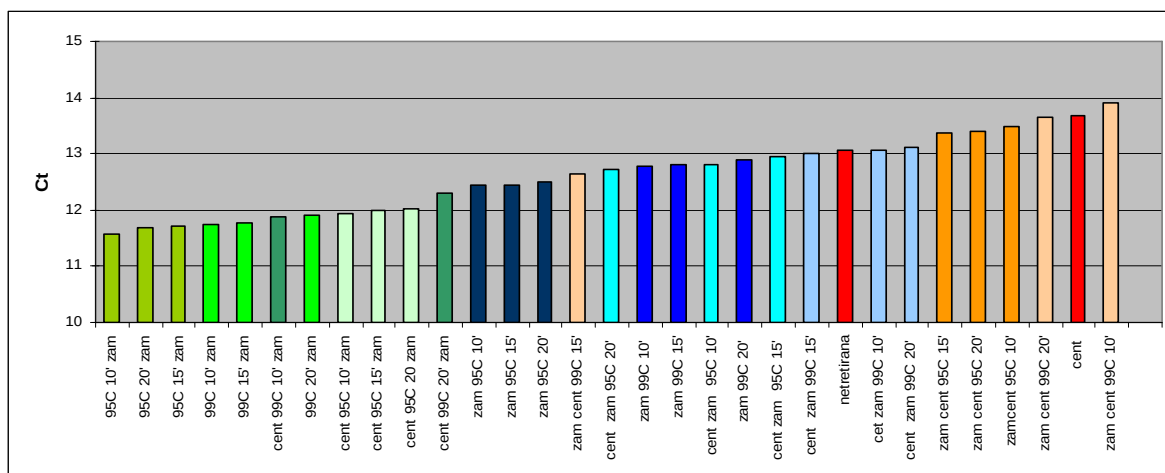
Želeli smo ugotoviti najprimernejši (najenostavnejši) način predhodne obdelave vzorcev iz fermentorja. V poskusih smo uporabljali SYBR Green kemijo.

Ugotovili smo, da predhodna obdelava vzorcev močno vpliva na pomnoževanje DNA. Ct vrednosti za plazmid prikazuje Slika 17, za kromosom pa Slika 18. Vidimo, da so razlike v Ct vrednostih zaradi različne predhodne obdelave večje, pri plazmidni (tudi do 20 ciklov) kot pri kromosomski DNA (do 3 cikle).

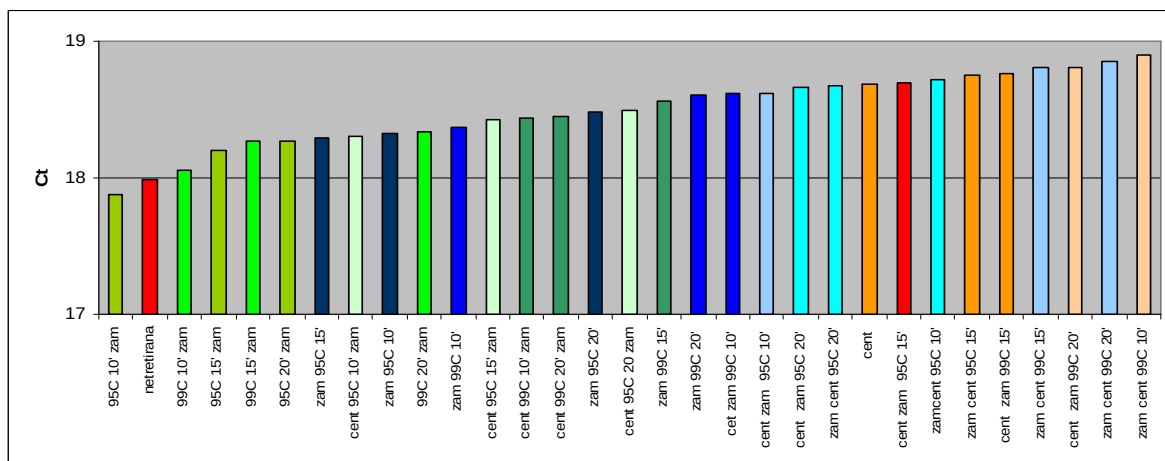
Najnižji Ct smo določili v vzorcih, ki so bili najprej toplotno obdelani in nato zamrznjeni. Poleg tega so se bolje obnesli necentrifugirani vzorci. Pri centrifugiranju se bakterije namreč združijo v skupke in jih težko enakomerno resuspendiramo, kar lahko povzroči neenakomerno količino bakterij v posameznih PCR reakcijah (v posameznih jamicah). To privede do velike variabilnosti rezultatov. V primeru da centrifugiramo manj časa, ali pa uporabimo manj obratov, pa se lahko zgodi, da z odlivanjem supernatanta odlijemo tudi del bakterij, kar ima za posledico višje vrednosti Ct.

Takojšnje zamrzovanje in kasnejša toplotna obdelava dajeta slabše rezultate. Najslabše rezultate pa smo dobili, če smo vzorce najprej zamrznili, nato centrifugirali in nazadnje toplotno obdelali.

Ugotovili smo, da imajo nižje Ct vrednosti vzorci obdelani na 95 °C, trajanje časovne obdelave pa na Ct vrednosti bistveno ne vpliva. Enaka obdelava bakterijskih kultur iz obeh gojišč je v obeh gojiščih dala enake rezultate (Sliki 17 in 18).



Slika 17: Razlike Ct vrednosti plazmidne DNA različno obdelane bakterijske kulture iz fermentorja z gojiščem GYSP (SYBR Green)

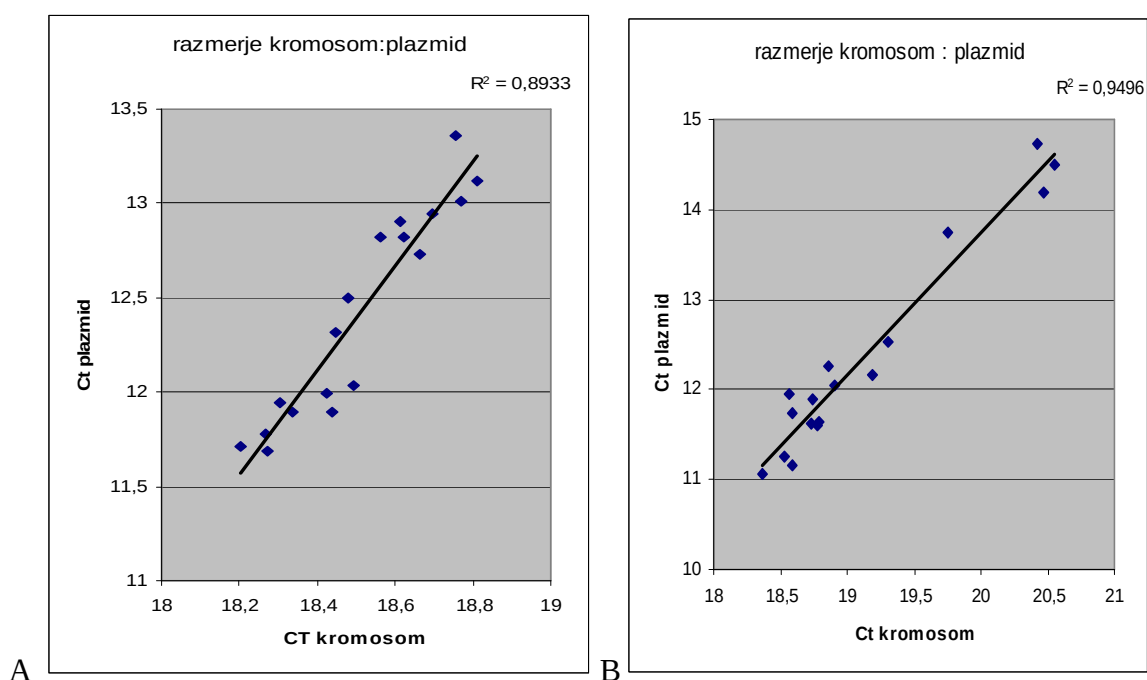


Slika 18: Razlike Ct vrednosti kromosomske DNA različno obdelane bakterijske kulture iz fermentorja z gojiščem GYSP (SYBR Green)

Preverili smo tudi ali z vsako od teh obdelav enako vplivamo na kromosomsko in plazmidno DNA, to je enako sproščanje iz celic, ali katera mogoče propada hitreje,... Ugotovili smo, da se v primeru nekaterih obdelav kromosomska in plazmidna DNA obnašata drugače (odstopanje od regresijske premice). Zaradi tega so te obdelave manj primerne (Preglednica 13 in Sliki 19A, 19B).

Preglednica 13: Odstopanje različno obdelanih vzorcev od regresijske premice

vzorci, ki bolj odstopajo od regresijske premice	vzorci, ki manj odstopajo od regresijske premice
neobdelana	95°C
neobdelana zamrznjena	99°C
zamrznjena 95°C	centrifugirana 95°C
zamrznjena 99°C	centrifugirana 99°C
centrifugirana zamrznjena 95°C	
centrifugirana zamrznjena 99°C	
zamrznjena centrifugirana 95°C	
zamrznjena centrifugirana 99°C	



Sliki 19A in 19B: Odstopanje razmerja kromosom:plazmid različno obdelanih vzorcev od regresijske premice v dveh različnih gojiščih (slika A gojišče LYSP, slika B pa gojišče GYSP). V obeh primerih smo uporabili $10^3 \times$ redčene vzorce. Sliki prikazujeta vzorce, ki manj odstopajo od regresijske premice

Iz slik vidimo (Sliki 19A in 19B), da različne obdelave različno vplivajo na kromosomsko in plazmidno DNA. V primeru, ko smo vzorce po odvzemu iz gojišča obdelali 10 min na 95°C, je bilo odstopanje od regresijske premice majhno, kar kaže na to, da ta način obdelave vpliva enako na kromosomsko in plazmidno DNA. S takšno obdelavo smo dosegli tudi najnižje Ct vrednosti (glej Sliki 17 in 18). Zato smo se odločili, da se vzorce po dovedenju obdelajo 10 min na 95°C in nato zamrzne na -20°C.

4.2.1.4 Priprava referenčnega materiala

4.2.1.4.1 Priprava referenčnega materiala na osnovi izračunanih vrednosti

Iz izračunanega števila kopij plazmida in kromosoma na določen volumen smo razmerje 1:1 dobili z mešanjem neredčene kromosomske DNA (100 ng) in $10^3\times$ redčene plazmidne DNA (0,1 ng).

Referenčni material smo pripravili z razmerji kromosomske in plazmidne DNA: 1:1, 1:50, 1:100, 1:150, obe DNA pa smo združili v isti jamici. Tako z absolutno kot z relativno kvantifikacijo pa smo v tem primeru določili razmerja 1:1, 1:5, 1:9, 1:9.

Ker je prišlo do tako velikih odstopanj, smo poskus ponovili, tako da smo plazmidno in kromosomsko DNA združili v isti jamici poleg tega pa smo pripravili reakcije za obe DNA v ločenih jamicah. Pripravili smo razmerja 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000.

Določena razmerja v primeru združenega vzorca (kromosom in plazmid v isti jamici) niso bila enaka izračunanim v primeru ločenih reakcij pa so se ujemala (Preglednica 14). Iz vnosa plazmidne in kromosomske DNA v ločeni reakciji smo sklepali da je izolirana plazmidna DNA verjetno kontaminirana s kromosomsko in obratno.

Preglednica 14: Izračunana in določena razmerja med kromosomsko in plazmidno DNA

Izračunano razmerje	1:1	1:10	1:100	1:1000
Določeno razmerje (kromosom + plazmid v isti jamici)	1:1	1:2	1:6,	1:10
Določeno razmerje (kromosom, plazmid v ločenih jamicah)	1:1	1:11	1:93	1:979

Ko smo v reakcijo ločeno vnesli plazmidno in kromosomsko DNA in oba vzorca testirali na prisotnost plazmidne in kromosomske DNA, smo potrdili kontaminacijo.

Ocenili smo, da je bila kontaminacija plazmida s kromosomom okrog 4 % (glede na število kopij), kontaminacija kromosoma s plazmidom pa 44 % (glede na število kopij).

S ponovno izolacijo kromosomske DNA iz seva *E. coli* brez plazmida (negativna kontrola) smo dobili čisto plazmidno DNA (kontaminacija s plazmidom je bila zanemarljiva).

Pri ponovni izolaciji plazmidne DNA ravno tako nismo dosegli ustrezne čistosti, zato smo jo dodatno čistili na gelu. Ugotovljena kontaminacija plazmidne DNA s kromosomsko po čiščenju na gelu je bila okrog 1 % (kar pomeni eno kopijo kromosoma na sto kopij plazmida).

Čiščenje s CIM-diski ni pripomoglo k odstranitvi kromosomske DNA iz izolirane plazmidne DNA.

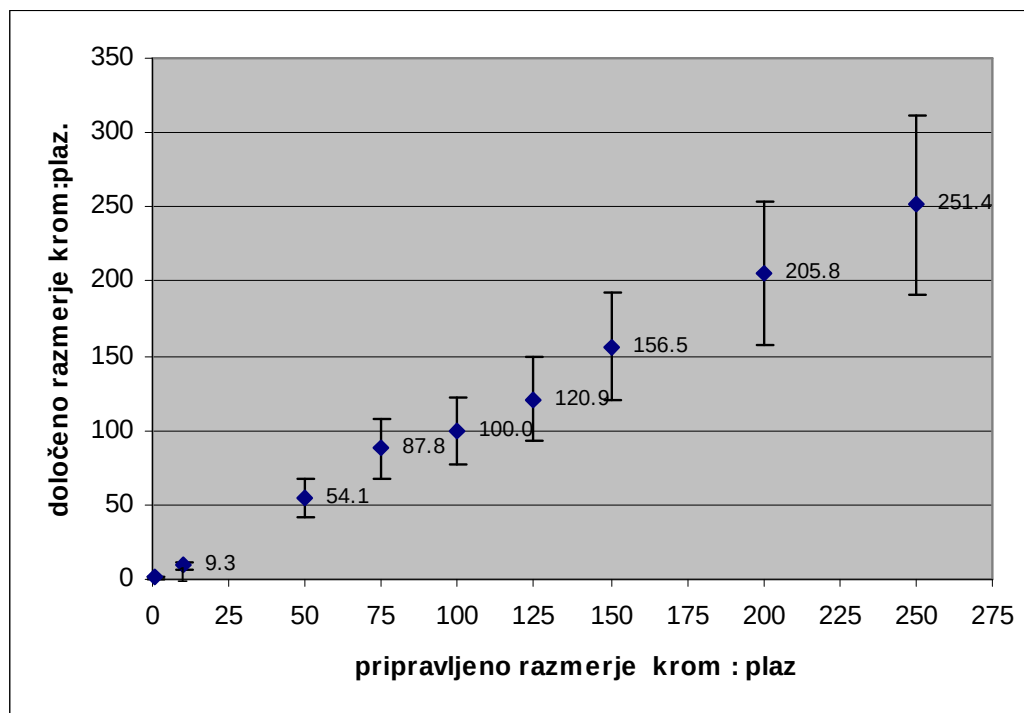
4.2.1.4.2 Priprava referenčnega materiala na osnovi prekrivanja amplifikacijskih krivulj

Referenčni material: izolirana kromosomska DNA; izolirana plazmidna DNA

Referenčni material smo ponovno pripravili z novo izolirano plazmidno DNA, ki je vsebovala manj kromosomske DNA. Kromosomsko in plazmidno DNA smo pripravili v razmerjih 1:1, 1:10, 1:50, 1:75, 1:100, 1:125, 1:150, 1:200, 1:250, 1:1000 in določili kot prikazujeta Slika 13 in Preglednica 8. Pri nižjih razmerjih do (1:100) smo dobili enak rezultat, ne glede na to ali sta bila kromosomska DNA in plazmidna DNA pomešani ali ločeni. Referenčnega materiala 1:1000 nismo uspeli pripraviti, verjetno zaradi prevelike količine DNA v reakciji in pojava inhibicije (vzeti bi morali vsaj 10× bolj redčene količine). Ugotovljeno število kopij in standardne deviacije prikazujeta Preglednica 15 in Slika 20:

Preglednica 15: Določeno število kopij plazmidov v referenčnem materialu (ločena kromosom:plazmid)

razmerje k:p	1:1	1:10	1:50	1:75	1:100	1:125	1:150	1:200	1:250
določeno ŠKP	1	9	54	87	100	120	156	205	251
SD (ŠKP)	0,08	0,74	3,00	6,92	9,33	7,40	14,00	16,07	12,89
CV (%) (ŠKP)	8,11	7,96	5,54	7,89	9,33	6,12	8,95	7,81	5,13
SD (Ct)	0,07	0,06	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06
CV (%) (Ct)	0,35	0,38	0,19	0,50	0,61	0,61	0,54	0,55	0,23



Slika 20: Določeno število kopij plazmidov in SD v referenčnem materialu (kromosom:plazmid)

Povprečen koeficient variabilnosti, ki smo ga določili pri določanju ŠKP je bil 7,7 %.

Referenčni material: cele bakterije; izolirana plazmidna DNA

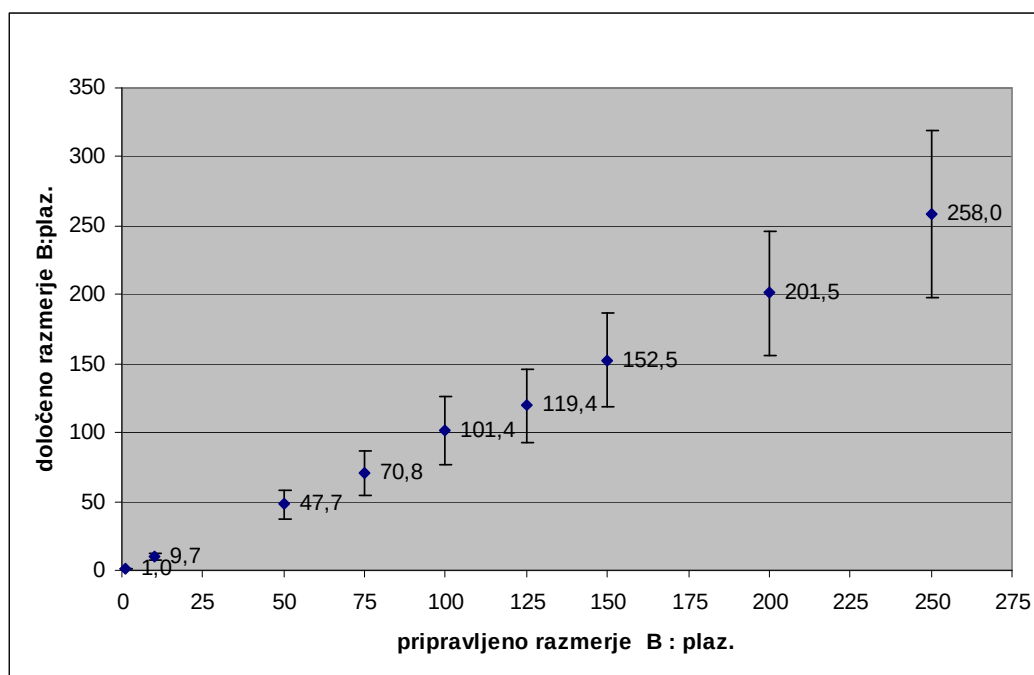
Razmerje 1:1 smo za netransformirano bakterijo *E. coli* in plazmid, določili z mešanjem 2,5 µl 10³× redčene bakterije in 1 µl 10⁶× redčene plazmidne DNA.

Pripravili smo ju v razmerjih 1:1, 1:10, 1:50, 1:75, 1:100, 1:125, 1:150, 1:200, 1:250, 1:1000 in določili kot je prikazano v Preglednici 16 in na Sliki 19.

S kontrolno DNA (IPC internal pozitive control) smo ugotovili, da pri 10³× redčenih vzorcih ni bilo inhibicije, zato smo uporabljali te koncentracije. Pri vzorcih redčenih 10⁴× in več je ponovljivost določenih Ct vrednosti za bakterijo slaba.

Preglednica 16: Določeno število kopij plazmidov v referenčnem materialu (bakterija:plazmid)

razmerje B:p	1:1	1:10	1:50	1:75	1:100	1:125	1:150	1:200	1:250
Določeno ŠKP	1	10	48	71	101	119	153	202	258
SD (ŠKP)	0.22	2.17	10.56	15.87	25.00	26.34	33.70	45.18	60.63
CV (%) (ŠKP)	22.13	22.40	22.13	22.42	24.65	22.06	22.10	22.42	23.50
SD (Ct)	0,03	0,20	0,11	0,11	0,19	0,22	0,20	0,32	0,24
CV (%) (Ct)	0,14	0,87	0,50	0,52	1,02	1,0	0,92	1,50	1,22



Slika 21: Določeno število kopij plazmidov in SD v referenčnem materialu (bakterija:plazmid)

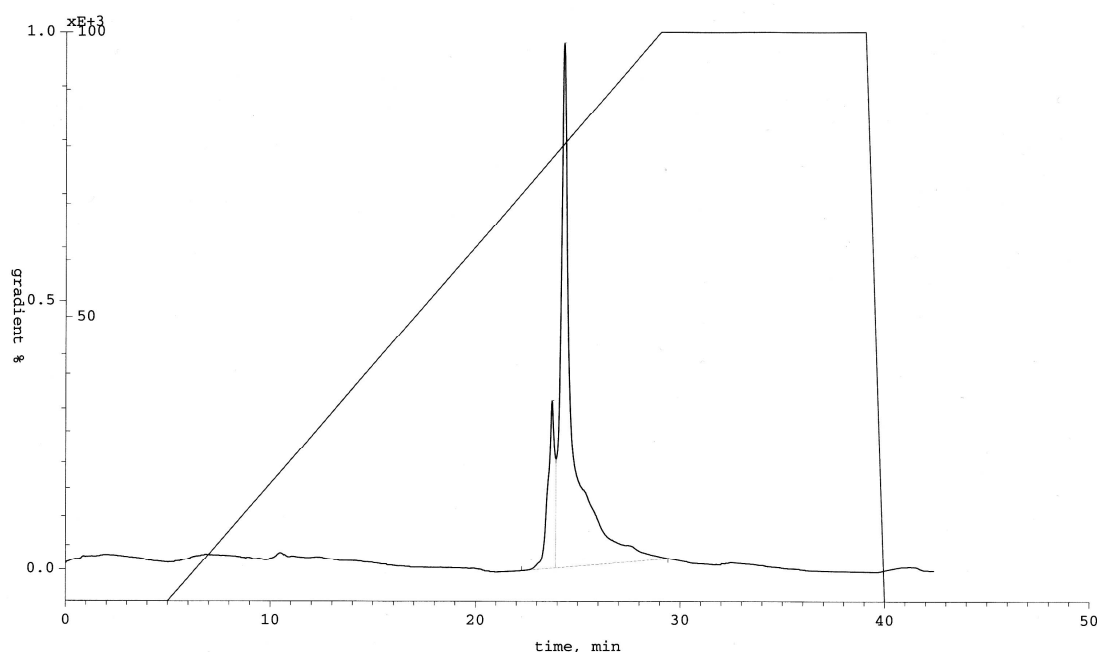
Povprečen koeficient variabilnosti, ki smo ga določili pri določanju ŠKP je bil 22.7 %.

Tako v primeru izoliranega kromosoma kot bakterij smo se približali izbranim razmerjem med genomsko in plazmidno DNA. V primeru bakterij pa je bil koeficient variabilnosti (23 %) veliko večji kot v primeru izoliranega kromosoma (8 %).

4.2.1.5 Čiščenje plazmidne DNA s CIM-diski

Izolirali smo 2 ml plazmidne DNA s koncentracijo 1 mg/ml in čistosti ($\lambda_{260}/\lambda_{280} = 1,73$).

Po čiščenju s CIM-diski smo prisotnost plazmidne DNA v posameznih frakcijah določili z agarozno gelsko elektroforezo. Ugotovili smo, da se je plazmidna DNA eluirala pri 70 % gradientu NaCl (najvišji vrh na kromatogramu), kar prikazuje Slika 22.



Slika 22: Čiščenje plazmidne DNA s CIM-diski

S čiščenjem plazmidne DNA s CIM-diski nam ni uspelo dodatno odstraniti kromosomske DNA. V tem primeru je šlo za preliminarne poskuse, potrebne pa bi bile še dodatne raziskave, s katerimi bi bolj zanesljivo ugotovili uporabnost metode za ta namen.

4.2.2 Določanje števila kopij plazmidov pri realnih vzorcih

Določali smo število kopij plazmidov za dva tipa vzorcev: vzorce, ki smo jih po gojenju toplotno obdelali na 95°C 10 min (glej 4.2.1.3) in toplotno neobdelane vzorce, ki smo jih kvantificirali tudi z agarozno gelsko elektroforezo. Postopek prikazuje Slika 23, rezultati pa so prikazani v Preglednicah 17 in 18.

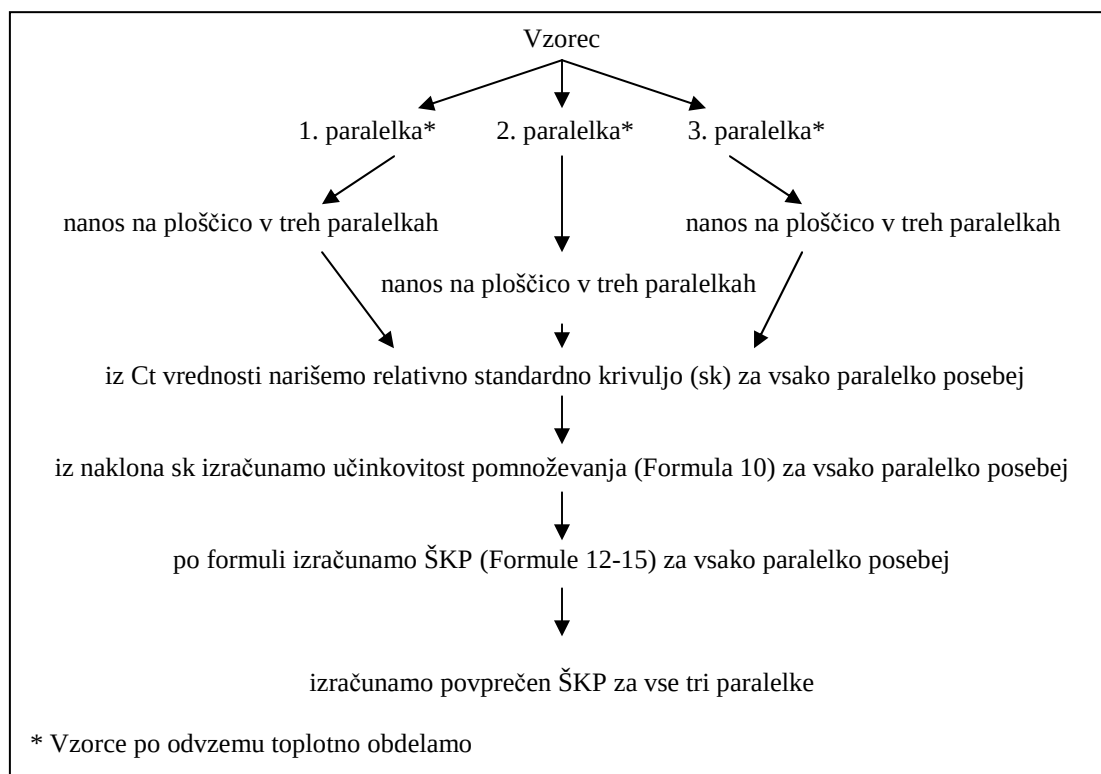
Preglednica 17: Določanje števila kopij plazmidov pri realnih vzorcih (pet neodvisnih stresanih kultur, ki so bile pred analizo toplotno obdelane in toplotno neobdelan vzorec, katerega smo predhodno analizirali z gelsko elektroforezo. Vse vzorce smo analizirali v treh paralelkah.)

vzorec	Povprečno ŠKP $\pm$ povprečna SD (povprečen CV %)(za tri paralelke)
obdelan vzorec 1	$81 \pm 3 \%$ (4 %)
obdelan vzorec 2	$92 \pm 7 \%$ (7 %)
obdelan vzorec 3*	$51 \pm 4 \%$ (7 %)
obdelan vzorec 4	$99 \pm 8 \%$ (8 %)
obdelan vzorec 5	$99 \pm 9 \%$ (%)
neobdelan vzorec	$63 \pm 5 \%$ (8 %)

* vzorca pri računanju povprečja nismo upoštevali zaradi velikega odstopanja od ostalih.

Preglednica 18: Povprečne vrednosti ŠKP za obdelane vzorce 1, 2, 4 in 5

	Povprečno ŠKP $\pm$ povprečna SD (povprečen CV %)
obdelani vzorci 1, 2, 4 in 5	$93 \pm 7 \%$



Slika 23: Prikaz poteka od gojenja vzorcev do izračuna ŠKP

Z referenčno metodo agarozno gelsko elektroforezo smo določili ŠKP 109 kopij. Za iste vzorce smo s qPCR določili 62 kopij plazmida (Ti vzorci niso bili toplotno obdelani, poleg tega pa je bila analiza s qPCR narejena nekaj mesecev kasneje kot analiza z gelsko elektroforezo. Tudi ti dve dejstvi bi lahko vplivali na veliko razliko pri določitvi ŠKP z

obema metodama). V primeru, ko smo vzorce toplotno obdelali, pa smo določili v povprečju 94 kopij plazmida na kromosom (v izračunu nismo upoštevali vzorca št. 3 zaradi velikega odstopanja od ostalih štirih vzorcev). Variabilnost, ki smo jo določili s qPCR je znašala največ do 9 %, kar je veliko boljše od variabilnosti določene z agarozno gelsko elektroforezo, ki znaša 23 %.

Ob določanju števila kopij plazmidov s qPCR smo naleteli na problem zaradi velikega vpliva učinkovitosti pomnoževanja (E) na določeno ŠKP, kar smo upoštevali pri izračunu. ŠKP plazmidov smo izračunali po Enačbi 12, brez upoštevanega kalibratorja.

4.2.3 Ovrednotenje metode qPCR

4.2.3.1 Točnost in ponovljivost

Povprečno odstopanje eksperimentalno določenega ŠKP od izbranega razmerja v območju kvantifikacije od 1:1 do 1:250 je bilo za referenčni material kromosom : plazmid 5,4 % in bakterija : plazmid 3,1 %, kar prikazuje Preglednica 19.

Preglednica 19: Povprečno odstopanje eksperimentalno določenega ŠKP od izbranega razmerja v območju kvantifikacije od 1:1 do 1:250 za referenčni material

razmerje	1:1	1:10	1:50	1:75	1:100	1:125	1:150	1:200	1:250
določen ŠKP kromosom:plazmid	1	9	54	88	100	121	157	206	251
% odstopanja		7.0	8.2	17.1	0.0	3.3	4.3	2.9	0.5
določen ŠKP bakterija:plazmid	1	10	48	78	101	119	153	202	258
% odstopanja		3.1	4.5	5.6	1.4	4.5	1.7	0.7	3.2

Povprečni koeficienti variacije (CV) za referenčni material kromosom:plazmid je bil 7,7 % in bakterija: plazmid 22,7 % za območje kvantifikacije 1:1 do 1:250. SD in CV vrednosti za Ct in ŠKP treh paralelk posameznih referenčnih materialov so podane v Preglednicah 15 in 16. CV za ŠKP in Ct vrednosti osmih različnih ploščic (testov) so podane v Preglednici 20.

Preglednica 20: Koeficienti variacije za izolirano kromosomsko DNA in bakterije izračunani po $\Delta\Delta C_t$ metodi iz surovih C_t vrednosti z eksperimentalno določeno učinkovitostjo pomnoževanja

Številka ploščice	CV (kromosom) ŠKP	CV (kromosom) surove C_t vrednosti	CV (bakterije) ŠKP	CV (bakterije) surove C_t vrednosti
Ploščica 1	14,8*	0,65		
Ploščica 2	9,8	0,61		
Ploščica 3	11,7	0,71	33	1,48
Ploščica 4	7,7	0,56	24,66	1,33
Ploščica 5	7,7	0,49		
Ploščica 6			22,7	0,95
povprečje	9,2	0,59	24,7	1,41

*ploščice 1 in ploščice 3 (le za bakterije) pri računanju povprečja nismo upoštevali zaradi velikega odstopanja od ostalih

Vidimo, da se izračunani koeficienti variacije močno razlikujejo glede na to ali jih računamo iz določenega ŠKP ali iz surovih C_t vrednosti (pri ŠKP 9 % in 25 %, pri surovih C_t vrednostih pa 0,6 % in 1,4 %), kar nam prikaže različne ocene ponovljivosti metode. Pravilnejše je računanje CV iz vrednosti ŠKP, saj gre pri C_t za logaritemske vrednosti, ki nam podajo napačno oceno variabilnosti.

Ob določanju števila kopij pri realnih vzorcih, smo določili CV nižji od 9 % (Preglednica 17).

Iz rezultatov vidimo, da so se odstopanja od izračunanega ŠKP močno razlikovala glede na to ali smo pomnoževali izolirano kromosomsko DNA ali bakterije. V primeru bakterij je bila ponovljivost manjša. Vzrok za to bi lahko bila slabša ponovljivost pipetiranja bakterij. Poleg tega je bilo zaradi nizke koncentracije bakterij v referenčnem materialu veliko sipanje, kar ima za posledico večjo variabilnost rezultatov. Zaradi tega bi morali za referenčni material izbrati višjo koncentracijo bakterij. Variabilnost bi lahko zmanjšali tudi s povečanjem volumna komponent, ki jih pipetiramo. Ob določanju števila kopij plazmidov pri realnih bakterijskih vzorcih, pa smo določili koncentracijo bakterij v linearnem območju kvantifikacije in dosegli manjšo variabilnost rezultatov (<9 %).

4.2.3.2 Specifičnost

S poravnavo sekvenc smo potrdili specifično in selektivno vezavo oligonukleotidov na plazmid, katerega ŠKP smo določali in vezavo na kromosom *E. coli*.

S preverjanjem z negativno kontrolo smo dokazali, da se začetni oligonukleotidi vežejo le na plazmidno in ne tudi kromosomsko DNA, saj signala v primeru bakterij, ki ne vsebujejo plazmida (negativna kontrola) z uporabo začetnikov specifičnih za plazmid nismo zaznali. Tudi z uporabo SYBR Green kemije smo pri pomnoževanju dosegli visoko specifičnost, saj smo ob pregledovanju talilnih krivulj določili vrh z značilno T_m posameznega amplikona (Preglednica 3). Večkrat je bila težava okužba z bakterijo *E. coli* med delom, saj smo v jamici v kateri je bila NTC (non template control) zaznali pomnoževanje. V tem primeru so bile C_t vrednosti visoke (35), zato okužba ni vplivala na rezultat. V primeru okužbe smo na talilni krivulji za kromosom zaznali dva vrhova z rahlo različnima T_m . S pregledovanjem talilnih krivulj za NTC kontrole smo ugotovili, da dimeri začetnih oligonukleotidov ne nastajajo.

4.3.3.3 Meje zaznave in kvantifikacije

Iz pripravljenih serij redčitev za plazmid in kromosom v razponu 10 log enot smo določili, da je zanesljiva meja zaznave 60 kopij. Zaznali smo tudi nižje število kopij, vendar zaradi stohastičnega efekta pri pipetiranju niso bile vse tri paralelke pozitivne. Za mejo kvantifikacije smo vzeli $100\times$ bolj koncentrirne vzorce (6000 kopij) kot za mejo zaznave, ker ni več prihajalo do sipanje C_t vrednosti ($CV \leq 1\%$).

Ko smo v reakcijo vnesli 100 ng DNA (6×10^{10} kopij), se je ta vedno uspešno pomnožila, vendar se je pojavila inhibicija. Inhibicije zagotovo ni bilo pri 1 ng DNA v reakciji (6×10^8 kopij), zato smo to količino (število kopij) DNA določili za zgornjo mejo kvantifikacije.

V primeru določanja mej zaznave bakterijske kulture ($OD=10$) smo zaznali pomnoževanje pri $10^6\times$ redčenem vzorcu. Sipanje C_t vrednosti pri bakterijah je bilo večje kot pri izoliranem kromosomu in plazmidu. Za mejo kvantifikacije smo vzeli $10^4\times$ redčen vzorec oz. ko je bil CV C_t vrednosti manjši kot 2 %.

Zaradi prevelike koncentracije vzorca in ne dovolj razredčenih komponent gojišča je prihajalo do inhibicije pomnoževanja vključno z $10\times$ redčenimi vzorci, zato smo za mejo kvantifikacije določili $10^2\times$ redčen vzorec.

4.2.3.4 Območje linearnosti in območje kvantifikacije

V primeru izoliranega plazmida in kromosoma smo linearen odziv določili v razponu 5 log enot (od 6×10^3 do 6×10^8 kopij), v primeru bakterij pa 2 log enoti (od 10^2 do $10^4\times$ redčeni bakterijski vzorci $OD_{600}=10$, to je približno 10^8 bakterij na ml).

Referenčne materiale smo pripravili iz $10^4\times$ redčenih bakterijskih vzorcev in potrdili območje kvantifikacije za ŠKP od 1:1 do 1:250. Še vedno je bilo prisotno sipanje zato bi variabilnost lahko zmanjšali z uporabo $10^3\times$ redčenega vzorca. Enako območje smo potrdili z referenčnim materialom kromosom : plazmid.

Razmerja 1:1000 nismo uspeli določiti najverjetneje zaradi prevelike koncentracije DNA v reakciji in pojava inhibicije.

Za optimalno kvantifikacijo je potrebno bakterijski vzorec ($OD_{600}=10$) redčiti $10^3\times$ ali $10^4\times$.

4.2.3.6 Robustnost

Parametri, ki so se tekom eksperimentalnega dela spreminjali so bili:

- zamenjava kemikalije Master Mix različni lot-i in uporaba kemikalij različnih proizvajalcev
- izvajanje poskusov ob različnih dnevih
- uporaba različnih vzorcev: večkrat izolirana DNA in različno pripravljeni bakterijski vzorci, uporaba različnih gojišč za gojenje bakterij

Za oceno robustnosti metode podajamo CV za ŠKP in Ct vrednosti med različnimi ploščicami.

Ugotovili smo, da zgornji parametri ne vplivajo na metodo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Danes uporabljajo za določanje števila kopij plazmidov številne metode, večina izmed njih pa ima majhno ponovljivost, zahteva velike količine biološkega materiala in je primerna le za ozko dinamično območje (Lee, 2005; Schmitt, 1995). Zato želijo razviti nove, boljše metode.

Do sedaj uporabljane metode za določanje števila kopij plazmidov so centrifugiranje v gradientu CsCl (Weisblum, 1979), agarozna gelska elektroforeza (Projan, 1983), HPLC (Coppela, 1987), kapilarna elektroforeza (Schmidt, 1995), metode, ki temeljijo na hibridizaciji nukleinskih kislin (Ollson, 1993; Hinnebusch, 1992) in na določanju aktivnosti reporterskih proteinov (Schendel, 1989).

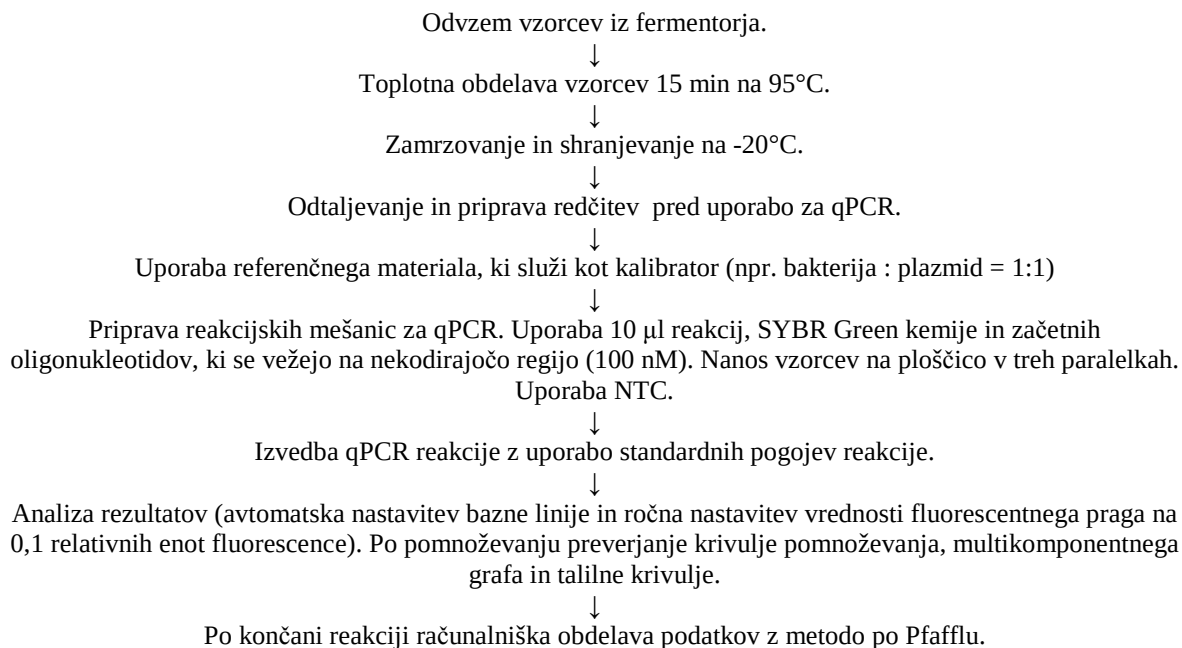
Ustrezna metoda za določanje števila kopij plazmidov je tudi kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času. Metoda se uporablja na mnogih področjih zaznavanja in kvantifikacije genov, v literaturi pa v zadnjem času zasledimo tudi njeno uporabo za določanje števila kopij plazmidov (Lovatt, 2002; Lee, 2005; Providenti, 2005).

V diplomskem delu smo skušali ugotoviti, ali bi metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času lahko uporabljali za določanje števila kopij plazmidov, predvsem pa, ali ima kakšne prednosti pred agarozno gelsko elektroforezo.

Kot referenčno metodo smo uporabljali agarozno gelsko elektroforezo, ki je splošno uveljavljena metoda za določanje števila kopij plazmidov. Njena izvedba je enostavna in poceni. Za izvedbo celotnega postopka obstajajo protokoli, kar omogoča primerljivost rezultatov med različnimi laboratoriji. Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času pa se za razliko od prej omenjene metode šele začenja uporabljati za določanje števila kopij plazmidov, zaradi tega sta potrebni optimizacija in ovrednotenje te nove metode. Pri optimizaciji metode smo se osredotočili predvsem na izbiro ustreznih začetnih oligonukleotidov, kemije (TaqMan in SYBR Green), pripravo referenčnega materiala in obdelavo fermentorskih vzorcev za kvantifikacijo s qPCR. Za ovrednotenje pa smo s pomočjo pridobljenih podatkov obe metodi primerjali med seboj glede na naslednje parametre: točnost, ponovljivost, specifičnost, meja zaznave in kvantifikacije, območje linearnosti in kvantifikacije, robustnost, tehnična zahtevnost izvedbe in cena.

Pripravili smo protokol izvedbe metode od odvzema vzorcev pa do končnega izračuna števila kopij plazmidov (od 1 do 250 kopij) (Slika 24).

Slika 24: Določanje števila kopij plazmidov s qPCR (od 1 do 250 kopij)



Po končanem gojenju v fermentorju ali pa v vmesnih fazah odvzamemo bakterijske vzorce, pri katerih želimo določiti število kopij plazmidov. Pred analizo s qPCR jih moramo ustrezno obdelati. V literaturi največkrat zasledimo toplotne obdelave vzorcev na 95°C 10 min. (Jacobsen, 2005; Chapman, 2005; Morzsek, 2004), 95°C 15 min. (Bischiff, 2005), 99°C 10 min. (Tao, 2005; Abolmaaty, 1989) in 99°C 15. min (O'Mahony, 2002).

S preverjanjem ustreznosti toplotnih obdelav smo prišli do podobnih zaključkov kot zgoraj navedeni avtorji. Ugotovili smo, da je najprimernejša obdelava vzorcev na 95°C 15 min, saj ima enak vpliv na kromosomsko in plazmidno DNA, z njo pa dobimo najnižje Ct vrednosti. Tako obdelane vzorce nato shranimo na -20°C, saj takojšnja analiza s qPCR običajno ni mogoča.

Pred analizo je bakterijske vzorce potrebno ustrezno redčiti, saj pride pri preveliki koncentraciji bakterij do inhibicije reakcije (Providenti in sodelavci so pri pomnoževanju bakterijskih vzorcev dosegli 20 % nižje učinkovitosti pomnoževanja kot pri izolirani DNA,

najverjetneje zaradi prisotnosti inhibitorjev v reakciji (Providenti, 2005). Inhibiciji pa se lahko izognemo z večjim redčenjem vzorca. Ugotovili smo, da je najprimernejša koncentracija bakterij ($OD_{600}=10$) v območju od $10^2\times$ do $10^4\times$ redčenih vzorcev, kar pomeni približno 10^8 bakterij na ml.

Ko imamo ustrezno redčene vzorce, pripravimo reakcije za qPCR. Med potekom dela smo optimizirali pripravo reakcij z izbiro ustrezne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond, ustreznih amplikonov in tipa kemije (TaqMan, SYBR Green kemija).

Preizkusili smo specifični način označevanja s TaqMan kemijo, kjer smo se osredotočili predvsem na optimizacijo koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond. V literaturi avtorji pogosto omenjajo pomembnost optimizacije začetnih oligonukleotidov in sond (eurogenetic, 2004; Edwards, 2004; Bustin, 2004; Applied Biosystems, 2004), saj previsoke koncentracije povzročijo nastanek nespecifičnih produktov, prenizke pa predstavljajo omejitveni dejavnik. Zasledimo pa tudi podatke, da lahko brez optimizacije koncentracij dosežemo dobre učinkovitosti pomnoževanja nad 80 % (Bustin, 2005).

Ugotovili smo, da spreminjanje koncentracij začetnih oligonukleotidov pri TaqMan kemiji ne vpliva na pomnoževanje DNA (razlika Ct vrednosti je bila manjša od enega cikla), zato smo uporabljali priporočeno koncentracijo 900 nM (Applied Biosystems, 2004).

Pri optimizaciji koncentracije sond pa smo najnižje vrednosti Ct dosegli s koncentracijo sonde 300 nM. Kljub temu smo se odločili za uporabo koncentracije 200 nM, saj je prednost višje koncentracije premajhna, da bi opravičila povečanje stroškov pri njeni uporabi. Poleg tega je uporaba nižjih koncentracij pomembna, saj na ta način znižamo celotno fluorescenco ozadja in koncentracijo oligonukleotidov (Bustin, 2004).

Pri uporabi sond, ki se vežejo na nekodirajočo regijo, smo zaznali različno jakost fluorescence med sondo, ki se veže na amplikon kromosomske DNA in tisto, ki se veže na amplikon plazmidne DNA. Pri kromosomu bi zato morali uporabiti nižje koncentracije sond. Tega ne moremo storiti, saj nižja koncentracija pomeni omejitveni dejavnik pomnoževanja. Zato izberemo kompromis med jakostjo fluorescence in Ct vrednostjo.

Nekateri avtorji uporabljajo za določanje števila kopij plazmidov s qPCR nespecifičen način označevanja s SYBR Green kemijo (Lee, 2005; Providenti, 2005), ki smo ga preverili tudi mi. Na ta način znižamo stroške reakcije, izognemo pa se tudi razlikam v

fluorescenci med različnimi sondami. Ugotovili smo, da ne prihaja do nastajanja nespecifičnih produktov in dimerov začetnih oligonukleotidov. Amplikona, ki smo ju primerjali med sabo sta približno enako dolga, učinkovitost pomnoževanja pa je enaka. Če ti pogoji ne bi bili izpolnjeni, uporaba SYBR Green kemije ne bi bila priporočljiva (Ayra, 2005; Bustin, 2004). Poleg tega smo uporabljali 10 µl reakcije in tako na ta način dodatno znižali stroške reakcije.

Ob izbiri ustreznih amplikonov (na kodirajoči in na nekodirajoči regiji), smo se odločili za izbiro amplikona na nekodirajoči regiji. Vzrok za to je bila domneva, da pri amplikonu na kodirajoči regiji prihaja do vezave začetnih oligonukleotidov in sond (v primeru TaqMan kemije) tudi na mRNA (razlike v Ct vrednostih med vzorci tretiranimi in netretiranimi z RNazo). Razlike v Ct vrednostih smo zaznali tudi pri pomnoževanju amplikona na nekodirajoči regiji DNA, vendar pa so bile te razlike manjše. Predvidevamo, da je vzrok zanje vpliv RNaze na DNA. Na razlike v pomnoževanju iste tarčne DNA ob uporabi različnih začetnih oligonukleotidov opozarja tudi Providenti (Providenti, 2005).

Zaradi navedenih ugotovitev v zvezi z optimizacijo priprave reakcij smo se odločili za uporabo SYBR Green kemije in začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na nekodirajoči regiji. Uporabili smo koncentracijo začetnih oligonukleotidov 100 nM (priporočena koncentracija: Applied Biosystems, 2004).

Na ploščico smo vsak vzorec nanašali v treh paralelkah, saj smo tako lahko določili variabilnost Ct vrednosti.

V literaturi za določanje kopij plazmidov s qPCR zasledimo relativno kvantifikacijo ($\Delta\Delta C_t$ metodo) (Providenti, 2005) in absolutno kvantifikacijo z izolirano kromosomsko in plazmidno DNA (Lee, 2005). Predhodni poskusi so pokazali (Petra Slanc), da je izolacija kromosomske in plazmidne DNA iz celice različno učinkovita in bi zato s principom absolutne kvantifikacije dobili netočen rezultat in zelo variabilne rezultate. Zato smo se odločili za princip relativne kvantifikacije, kjer smo določali število plazmidov na kromosom (ali, če izrazimo natančneje: število amplikonov plazmida na amplikon kromosoma). Uporabili smo relativno kvantifikacijo. Zaradi kompleksnih vzorcev (bakterije v PCR reakciji) in s tem prisotnosti inhibitorjev/ojačevalcev, smo za določitev pravilnega razmerja upoštevali učinkovitost pomnoževanja amplikonov, ki smo ga določili v reakciji s tem vzorcem. Metoda $\Delta\Delta C_t$, kot je opisana v User Bulletin 2 (Applied Biosystems) predpostavlja 100 % učinkovitost pomnoževanja amplikonov (enačba $2^{\Delta\Delta C_t}$), kar pa v primeru, da temu ni tako, vodi v precenitev razmerja.

Prednost te metode je uporaba kalibratorja. Zanimajo nas spremembe v ŠKP med fermentacijo in primerljivost med fermentacijami. Kot je opisano pri izbiri kemije in amplikonov, je absolutno razmerje težko določiti zaradi različnega vpliva fluorescence (sond in SYBR Green), razlik v učinkovitosti pomnoževanja amplikona na plazmidu in kromosomu, koncentracij vzorcev itd. Kalibrator omogoča umeritev naštetih spremenljivk in pomembno vpliva k ponovljivosti in robustnosti metode.

Število kopij plazmidov smo določali med 1 in 250 kopijami.

Po pripravi protokola izvedbe metode in njeni optimizaciji, smo metodo ovrednotili in jo primerjali z referenčno metodo-gelsko elektroforezo. Primerjali smo ju glede točnosti, specifičnosti, meje zaznave in kvantifikacije, območje linearnosti in kvantifikacije, robustnosti, tehnične zahtevnosti izvedbe in cene.

Določali smo točnost in ponovljivost metode qPCR. Točnosti smo ocenili na 96 %.

Ob določanju ponovljivosti metode iz števila kopij plazmidov je CV znašal od 7 % do 9 % (7 % v primeru kromosomske DNA in 9 % v primeru realnih bakterijskih vzorcev). Podobne podatke o ponovljivosti zasledimo tudi v literaturi in sicer: 10,7 % (Lee, 2005), 13,5 % (Schmittgen, 2003), <15 % (Providenti, 2005), 14,2 – 24 % (Schmittgen, 2000) in 23 % (Gentle, 2001). Pri določanju ponovljivosti iz surovih Ct vrednosti pa je bil CV veliko manjši: med 0,5 % in 1,3 %. Takšno ponovljivost (1-2 %) navajajo številni avtorji (Heid, 1996; Valasek, 2005; Arya, 2005; Arko, 2004; Providenti, 2005), vendar pa nam predstavljanje ponovljivosti iz Ct vrednosti poda napačne ocene in se ga je potrebno izogibati (Schmittgen, 2000).

Pri določanju ponovljivosti smo opazili razlike med kromosomi in bakterijami. Vzrok za manjšo ponovljivost pri bakterijah bi lahko bilo težje pipetiranje majhnih volumnov bakterij (v reakciji uporabimo 3 μ l vzorca) in pa uporaba prenizke koncentracije bakterij ($10^4\times$ redčene bakterije), saj je prišlo do sipanja. Uporabiti bi morali višjo koncentracijo bakterij ($10^3\times$). Ponovljivost pa bi lahko povečali tudi z uporabo večjega volumna reakcije.

Referenčno metodo smo izvajali po protokolu podobnem tistemu, ki ga je opisal Projan (1983). Ponovljivost, ki smo jo določili ob upoštevanju vseh paralelek, je bila 23 %, kar se sklada s podatki v literaturi (Projan, 1983). V primeru, ko smo upoštevali le izbrane nanose, pa smo z referenčno metodo dosegli bistveno večjo ponovljivost rezultatov (13 %). Večjo ponovljivost ob določanju števila kopij plazmidov z agarozno gelsko elektroforezo sta dosegla Pushnova in Lee, ki sta uporabila nekoliko drugačen protokol. Pushnova je

določila ponovljivost 10 % in točnost pa 90 % (Pushnova, 2000), Lee s sodelavci pa je določil ponovljivost 13 % (Lee, 2005).

Pri metodi qPCR smo določili tudi veliko specifičnost in selektivnost vezave začetnih oligonukleotidov in specifičnost SYBR Green kemije (ni prihajalo do nastanka nespecifičnih produktov in dimerov začetnih oligonukleotidov).

Pri referenčni metodi je specifičnost manjša, saj pride do vgradnje interkalacijskega barvila v celotno prisotno dvovertično DNA. V primeru okužbe tako zaznamo tudi tujo DNA. Specifičnost tu temelji na molekularni masi. V primeru okužbe z *E. coli* pa je kromosomska DNA tuje bakterije enako velika kot DNA v preiskovanem vzorcu. Zaradi računanja števila kopij plazmidov na kromosom, lahko število kopij v tem primeru podcenimo.

Glede primerljivosti rezultatov obeh metod smo naleteli na problem. Z agarozno gelsko elektroforezo določamo razmerje med plazmidno in kromosomsko DNA glede na molekularno maso, pri qPCR pa glede na število amplikonov. Načeloma se na plazmidni in kromosomski DNA nahaja po en amplikon, ki ga pomnožujemo. Ker pa v celici stalno nastajajo replikacijske vilice, je amplikonov v resnici več. V literaturi lahko celo zasledimo podatek, da se pri *E. coli* geni, ki se nahajajo v bližini ori mesta v celici prisotni v 4-8× več kopijah kot tisti, ki ležijo na terminalnem koncu podvojevanja (Rocha, 2004). V primeru, da je pomnoževanje plazmidne DNA enako učinkovito, se razmerje med njima ohranja, v nasprotnem primeru pa lahko podcenimo število kopij plazmidov v celicah (pomembno v eksponentni fazi rasti bakterij). Pri agarozni elektroforezi med seboj primerjamo mase, zato lahko količino kromosomske DNA precenimo največ za dvakrat.

Določali smo meje zaznave in kvantifikacije metode. V literaturi zasledimo, da lahko kvantificiramo med 1 in 10^{10} kopij gena (Edwards, 2004). Teoretično torej lahko določimo že eno samo kopijo gena, vendar različni avtorji kot najnižje število navajajo pet kopij (Ayra, 2005; Arko, 2004; Valasek, 2005). S poskusi smo mejo zaznave nedvoumno določili pri 60 kopijah gena (kar predstavlja 0,3 pg DNA).

Kot območje kvantifikacije za PCR v realnem času v literaturi navajajo 4 (Schmittgen 2000), 5 (Lee, 2005; Wong, 2005; Valasek, 2005; Heid, 1996) ali 6 log enot (Bustin, 2004). S poskusi smo za izolirano DNA določili območje kvantifikacije 5 log enot (6000 in 6×10^{10} kopijami DNA), za bakterije s številom kopij plazmidov do 250 pa 2 log enoti (med $10^2 \times - 10^4 \times$ redčenimi vzorci).

V primeru gelske elektroforeze je spodnja meja zaznave nukleinskih kislin 10 ng (Herzog-Velikonja, 2000). Območje linearnosti pa je v območju med 15 in 700 ng DNA (Projan, 1983) kar je približno 100 kratna razlika med koncentracijami. Pushnova (2000) in Lee (2005) pa sta območje linearnosti določila za 8 kratno razliko koncentracij. V naših poskusih smo uporabljali vzorce, ki so imeli 5 kratno razliko koncentracij.

Gelska elektroforeza zahteva veliko večjo količino vzorca za posamezno reakcijo (minimalno 10 ng, običajno pa 2,5 µg), medtem ko za qPCR zadošča že 0,1 pg (običajno 0,6 ng) (Lee, 2005).

Za oceno robustnosti smo pregledali kateri parametri so se med razvojem metode spreminjali, kot na primer: zamenjava kemikalije Master Mix, izvajanje poskusov ob različnih dnevih, uporaba različnih vzorcev gojenih v različnih gojiščih. Ugotovili smo, da zgornji parametri ne vplivajo na variabilnost rezultatov (variabilnost Ct vrednosti istih vzorcev med ploščicami je bila največ 1,5 %).

Glede tehnične zahtevnosti izvedbe kvantitativne verižne reakcije s polimerazo je problem v tem, da je metoda razmeroma nova in zaradi tega ne obstajajo standardi za uporabo, metode za analizo, ustaljeni protokoli dela, in podajanja rezultatov (Bustin, 2005). Zaradi tega je potrebno za vsako novo uporabo optimizirati pogoje reakcije, kar vzame veliko časa. Ko so znani vsi parametri, lahko postopek izvajamo rutinsko.

Pri pregledovanju večjega števila vzorcev lahko postopek avtomatiziramo (avtomatsko pipetiranje), kar močno zmanjša zahtevnost in čas priprave ploščice. Časovno dolgotrajna je tudi obdelava rezultatov, ki pa jo poenostavimo v primeru rutinske obdelave (vzorce na ploščico vedno nanašamo v iste luknjice in uporabimo prirejen računalniški program s pomočjo katerega bistveno hitreje obdelamo rezultate). Zahtevnost priprave same ploščice je odvisna od načina kvantifikacije, saj moramo ob uporabi absolutne kvantifikacije nanašati tudi vzorce za določitev standardne krivulje. Celoten postopek od priprave vzorcev do analize rezultatov lahko izvedemo v enem dnevu (3 ure za pripravo ploščice, 2 uri PCR, 3 ure za obdelavo rezultatov), v primeru, da imamo natančno izdelan načrt dela. Potreben je tudi izurjen operater, saj največ napak pri rezultatih nastane zaradi napak osebe, ki izvaja analizo (Wong, 2005).

Agarozna gelska elektroforeza je tehnično manj zahtevna. Potrebna je priprava gela in vzorcev, izvedba elektroforeze, denzitometrija gela in analiza rezultatov. Tudi v tem primeru postopek zaključimo v enem dnevu. Težave se lahko pojavijo pri sami pripravi

gela (pomembno je, da je homogen in s ponovljivo kvaliteto), saj neustrezna priprava gela hitro privede do napak. Problem predstavlja tudi uporaba EtBr za označevanje DNA zaradi njegove kancerogenosti.

Pri PCR v realnem času predstavlja veliko omejitev visoka cena inštrumenta in reagentov (master mix, začetni oligonukleotidi in sonde). Strošek lahko nekoliko zmanjšamo z uporabo nespecifičnega načina zaznavanja, saj tu ne uporabljamo sond, porabimo pa tudi manjše količine začetnih oligonukleotidov. Poleg tega lahko uporabljamo manjše reakcijske volumne (namesto 20 μ l uporabimo 10 μ l). Pri izvajanju postopka je zaželeno, da so posamezne faze dela med seboj prostorsko ločene, saj na ta način zmanjšamo verjetnost kontaminacije. Za delo potrebujemo tudi usposobljene operaterje. Izračunali so, da strošek na posamezno reakcijo znaša 4,50 \$. Od tega predstavlja 10 % cena operaterja, 15-30 % laboratorijski material (ploščice, tipsi, epruvetke,...), vzdrževanje in servisiranje aparata pa 10-20 % (Grove, 1999). V prihodnosti pa bo z razvojem tehnologije verjetno prišlo do znižanja cen, tako da bodo aparature dostopne tudi manjšim laboratorijem (Valasek, 2005).

Pri gelski elektroforezi so stroški veliko manjši. Potrebujemo elektroforezo, denzitometer in kemikalije.

Ocenjujemo, da lahko z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času dosežemo večjo točnost (96 %) kot z uporabo agarozne gelske elektroforeze (90 %). Pri analizi bakterijskih vzorcev je ponovljivost večja kot ponovljivost primerjalne metode ($CV < 9$ %). Z izolirano DNA smo dosegli manjšo variabilnost ($CV = 7$ %), ki bi se ji verjetno lahko približali tudi pri analizi bakterij z nekoliko spremenjenim delom in pogoji reakcije (višja koncentracija bakterij, previdnejše pipetiranje, povečanje volumna reakcije). To potrjujejo tudi podatki v literaturi (Lee, 2005; Schmittgen, 2003; Providenti, 2005). Ugotovili smo, da ima metoda qPCR nižjo mejo zaznave, $10^5 \times$ večjo občutljivost in $10^3 \times$ večje območje kvantifikacije od referenčne metode. Poleg tega lahko z njo naenkrat pregledamo večje število vzorcev (pri metodi izvedeni na način opisan v tej diplomski nalogi 10) kot z elektroforezo (pri metodi izvedeni na način opisan v tej diplomski nalogi 1), za kvantifikacijo pa potrebujemo veliko manjše količine vzorca ($10^3 \times$ manj). Optimizacija izvedbe metode qPCR in analize rezultatov zahteva veliko časa, ko pa je zaključena in uvedena, jo lahko izvajamo rutinsko. Čas izvedbe metode in obdelave rezultatov je pri obeh metodah približno enak (en dan). Pomembno omejitev metode qPCR predstavlja visoka cena, ki ponavadi odloča o njeni uporabi.

Vsi naštetí razlogi kažejo na velik potencial uporabe kvantitativne verižne reakcije s polimerazo za določanje povprečnega števila kopij plazmidov, saj bi bilo z njo določanje tako veliko hitrejše in bolj zanesljivo.

5.1 SKLEPI

- Z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času lahko dosežemo večjo točnost (96 %), kot z uporabo agarozne gelske elektroforeze (90 %).
- Pri analizi bakterijskih vzorcev je ponovljivost qPCR večja (CV<9 %) kot ponovljivost agarozne gelske elektroforeze (CV=23 %). Z izolirano DNA pa smo dosegli večjo ponovljivost (CV=7 %), ki bi se ji verjetno lahko približali tudi pri analizi bakterij, z nekoliko spremenjenim delom in pogoji reakcije (višja koncentracija bakterij, previdnejše pipetiranje, povečanje volumna reakcije).
- Ugotovili smo, da ima metoda qPCR nižjo mejo zaznave (zaznamo že 60 kopij plazmida), $10^5\times$ večjo občutljivost (zaznamo že pg količine DNA, z elektroforezo ng količine) in $10^3\times$ večje območje kvantifikacije 5 log enot (za izolirano DNA) in 2 log enoti (za bakterije) od referenčne metode (okrog 100 kratna razlika med redčitvami).
- S qPCR lahko naenkrat analiziramo večje število vzorcev (pri metodi izvedeni na način opisan v tej diplomski naligi 10) kot z elektroforezo (pri metodi izvedeni na način opisan v tej diplomski nalogi 1), za kvantifikacijo pa potrebujemo veliko manjše količine vzorca ($10^3\times$ manj).
- Optimizacija izvedbe metode qPCR in analize rezultatov je zahteven in dolgotrajen postopek, ko pa je zaključena, metodo lahko izvajamo kot rutinski postopek, ki tehnično ni bistveno bolj zahteven od izvedbe agarozne gelske elektroforeze.
- Čas izvedbe metode in obdelave rezultatov je pri obeh metodah približno enak (en dan).
- Pomembno omejitev metode qPCR predstavlja visoka cena, ki ponavadi odloča o njeni uporabi. Velik strošek predstavlja tako sama aparatura, kot tudi kemikalije.

Stroške lahko nekoliko zmanjšamo z uporabo nespecifičnega načina zaznavnja s SYBR green kemijo in manjših volumnov reakcij.

Vsi naštet razlogi kažejo na velik potencial uporabe kvantitativne verižne reakcije s polimerazo za določanje števila kopij plazmidov, saj bi bilo z njo določanje bolj zanesljivo in pri velikem številu vzorcev tudi hitrejše.

6 POVZETEK

V današnjem času postaja vse pomembnejša proizvodnja rekombinantnih učinkovin, ki jih uporabljamo kot terapije in cepiva. Na ta način lahko proizvedemo velike količine terapevtikov, proizvodnja pa je tudi cenejša. Za vnos genov rekombinantnih proteinov v celice kot vektorje najpogosteje uporabljamo plazmide. Za čim večjo produkcijo želenega proteina je pomembno, da v celici vzpostavimo in vzdržujemo primerno število kopij plazmidov. Zaradi pomembnosti določanja števila kopij plazmidov (ŠKP) je razvoj hitrih, enostavnih in zanesljivih metod za njegovo določanje velikega pomena. Danes so na voljo mnoge metode, ki pa imajo določene pomanjkljivosti. V tem diplomskem delu smo se zato odločili za preverjanje možnosti uporabe kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) v ta namen. Osredotočili smo se predvsem na optimizacijo metode in njeno ovrednotenje.

Število kopij plazmidov smo najprej določili z referenčno metodo agarozno gelsko elektroforezo, ki se že dalj časa rutinsko uporablja v ta namen. Pri določanju ŠKP s qPCR pa smo tekom poskusov izbrali ustrezni amplikon, preverili uporabo dveh različnih kemij (specifične TaqMan in nespecifične SYBR Green kemije), optimizirali koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond, pripravili referenčni material, s katerim smo določali točnost metode (pomešani kromosomska in plazmidna DNA v različnih razmerjih ter pomešane bakterijske celice in plazmidna DNA v različnih razmerjih), določili najustreznejšo obdelavo vzorcev po odvzemu iz fermentorja, na koncu pa smo število kopij določili tudi na realnih vzorcih (stresana bakterijska kultura). Obe metodi smo nato primerjali glede na naslednje parametre: točnost, ponovljivost, specifičnost, meje zaznave in kvantifikacije, območje linearnosti in kvantifikacije, robustnost, tehnična zahtevnost izvedbe in cena.

Pri optimizaciji metode qPCR smo izbrali amplikon na nekodirajoči regiji plazmidne in kromosomske DNA, ker preliminarni poskusi nakazujejo, da pri kodirajoči regiji verjetno prihaja tudi do vezave začetnih oligonukleotidov in sond na mRNA. Pri optimizaciji začetnih oligonukleotidov in sond smo se odločili za koncentracije začetnikov 900 nM in sonde 200 nM. Pri nespecifični SYBR Green kemiji smo dokazali, da ne prihaja do nastanka nespecifičnih produktov, razlike v dolžini amplikonov pa tudi ne doprinesejo k razlikam v fluorescenci, zato smo se zaradi nižje cene odločili zanjo. Pri pripravi referenčnega materiala smo naleteli na težave zaradi slabe čistosti kromosomske in plazmidne DNA, uspeli pa smo pripraviti referenčni material v razmerjih od 1:1 do 1:250.

Kot najprimernejšo obdelavo vzorcev po odvzemu iz fermentorja smo določili toplotno obdelavo 10 min na 95°C brez centrifugiranja vzorcev in takojšnje shranjevanje vzorcev na -20°C. Pri takšni obdelavi smo določili najnižje Ct vrednosti, imela pa je tudi enak vpliv na plazmidno in kromosomsko DNA.

Povprečno število kopij plazmidov na celico, ki smo ga določili je bilo pri obeh metodah okoli 100 (agarozna gelska elektroforeza 104, qPCR 93). Pri metodi qPCR smo točnost ocenili na 96 %, pri elektroforezi 90 %; ponovljivost na 7 % za referenčni material iz izolirane DNA, na 22 % za referenčni material iz bakterijskih celic in manj kot na <9 % za realne bakterijske vzorce; pri elektroforezi 24 %. Dokazali smo tudi veliko specifičnost qPCR metode saj je prihajalo do specifične vezave začetnih oligonukleotidov in sond, ni pa prihajalo do nastanka nespecifičnih produktov in dimerov začetnih oligonukleotidov (preverjanje talilne temperature-Tm). Za mejo zaznave smo določili 60 kopij DNA, kar pomeni pg količine DNA, pri elektroforezi pa potrebujemo ng količine. Območje linearnosti in kvantifikacije smo pri izolirani DNA določili v razponu 5 log enot, pri bakterijah pa 2 log enoti, pri elektroforezi pa to območje predstavlja okrog 100 kratna razlika med redčitvami. Število vzorcev, ki jih lahko pregledamo naenkrat s qPCR je 10, z elektroforezo pa lahko pregledamo 1 vzorec naenkrat (pri metodi izvedeni na način opisan v tej diplomski nalogi).

S primerjavo obeh metod smo ugotovili, da ima metoda qPCR glede na agarozno gelsko elektroforezo večjo točnost, večjo ponovljivost, večjo občutljivost in večje območje kvantifikacije. Poleg tega omogoča pregledovanje večjega števila vzorcev naenkrat in zahteva manjše količine vzorca. Od referenčne metode pa je tehnično zahtevnejša, predvsem v začetnih fazah optimizacije in pri kasnejši obdelavi podatkov. Največjo omejitev metode predstavlja visoka cena, ki omejuje njeno uporabo (Preglednica 21).

	elektroforeza	qPCR
točnost	90 %	96 %
ponovljivost	24 %	7 % za izolirano DNA, <9 % za bakterije
specifičnost	nizka	visoka
meje zaznave	10 ng DNA	0,1 pg DNA
območje kvantifikacije	100× razlika med redčitvami	2-5 log enot
tehnična zahtevnost	majhna	velika
cena	nizka	visoka

Preglednica 21: Primerjava agarozne gelske elektroforeze in qPCR

Naštete ugotovitve pa vseeno kažejo na velik potencial uporabe qPCR za določanje števila kopij plazmidov.

VIRI

- Abolmaaty A., El-Shemy M.G., Khallaf M.F., Levin R.E. 1998. Effect of lysing methods and their variables on the yield of *Escherichia coli* O157: H7 DNA and its PCR amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 34, 2: 133-141
- Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in medicini. *Farmacevtski Vestnik*, 55: 215-220
- Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R.H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review Of Molecular Diagnostics*, 5, 2: 209-219
- Bischoff C., Lüthy J., Altwegg M., Baggi F. 2005. Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR. *Journal Of Microbiological Methods*, 61, 3: 335-341
- Breuer S., Marzban G., Cserjan-Puschman M., Dürschmid E., Bayer K. 1998. Off-line quantitative monitoring of plasmid copy number in bacterial fermentation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 19, 14: 2474-2478
- Brown T. 2001. Dot and Slot Blotting of DNA V: Current protocols in molecular Biology. 2001. John Wiley & Sons, 2003, <http://www.3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/104554809/HOME>, 2005
- Bustin S.A. (ed.) 2004. A-Z of Quantitative PCR. LaYolla, International university line: 882 str.
- Bustin S.A. 2005. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Review Of Molecular Diagnostics*, 5, 4: 493-498
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal Of Molecular Endocrinology*, 34, 3: 597-601
- Carrier T., Jones K.L., Keasling J.D. 1998. mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. *Biotechnology And Bioengineering*, 59, 6: 666-672
- Chapman P.A., Ellin M., Ashton R., Shafique W. 2001. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *International Journal Of Food Microbiology*, 68, 1-2: 11-20
- Coppella S.J., Acheson C.M., Dhurjati P. 1987. Measurement of copy number using HPLC. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 5: 646-647

- Coronado C., Vázquez M.E., Cebolla A., Palomares A.J. 1994. Use of Firefly Luciferase Gene for Plasmid Copy Number Determination. *Plasmid*, 32: 336-341
- Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.). 2004. Real-time PCR an essential guide. Norfolk, Horizon bioscience: 346 str.
- Fahnert B., Geuther R., Hoffmeier C., Roth M. 2000. Improved determination method for plasmid copy number using pulsed field gel electrophoresis. *BioTechniques*, 28, 1: 26-28, 30
- Gentle A., Anastasopoulos F., McBrien N.A. 2001. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques*, 31, 3: 502-508
- Grove D.S. 1999. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems division 7700 sequence detector. *Methods and reviews*: 1-10
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 10: 986-994
- Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije-teoretični del. Ljubljana, Študentska založba: 104 str.
- Hinnebusch J., Barbour A.G. 1992. Linear- and circular-plasmid copy numbers in *Borrelia burgdorferi*. *Journal Of Bacteriology*, 174, 16: 5251-5257
- Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes And Immunity*, 6, 4: 279-284
- Ivanov I.G., Bachvarov D.R. 1987. Determination of plasmid copy number by the "boiling" method. *Analytical Biochemistry*, 165, 1: 137-141
- Jacobsen N.R., Bogdanovich T., Skurnik M., Lübeck P.S., Ahrens P., Hoorfar J. 2005. A real-time PCR assay for the specific identification of serotype O:9 of *Yersinia enterocolitica*. *Journal Of Microbiological Methods*, 63, 2: 151-156
- Korpela K., Buchert P., Söderlund H. 1987. Determination of plasmid copy number with nucleic acid sandwich hybridization. *Journal of Biotechnology*, 5, 4: 267-277
- Lee C.L., Wei O.W.D.S., Kah Weng Oh S. 2006. Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *Journal of Microbiological Methods*:
- Lee S.Y., Mermelstein L.D., Papoutsakis E.T. 1993. Determination of plasmid copy number and stability in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 3: 319-323

- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods and reviews*, 25, 4: 402-408
- Lovatt A. 2002. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *Journal Of Biotechnology*, 82, 3: 279-300
- Melveger A.J. 2000. Statistics in the pharmaceutical analysis laboratory. V: *Analytical chemistry in a GMP environment*. Miller J.M., Crowther J.B. (eds). New York, John Wiley & Sons: 77-103
- Morino T., Morita M., Seya K., Sukenaga Y., Kato K., Nakamura T. 1988. Construction of a runaway vector and its use for a high-level expression of a cloned human superoxide dismutase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, 2: 170 – 175
- Morsczeck C., Langendörfer D., Schierholz J.M. 2004. A quantitative real-time PCR assay for the detection of tetR of Tn10 in *Escherichia coli* using SYBR Green and the Opticon. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59: 217-227
- Nordström K., Uhlin B.E. 1992. Runaway-replication plasmids as tools to produce large quantities of proteins from cloned genes in bacteria. *Bio/Technology*, 10, 6: 661-666
- Olsson T., Ekwall K., Ruusala T. 1993. The silent P mating type locus in fission yeast contains two autonomously replicating sequences. *Nucleic Acids Research*, 21, 4: 855-861
- O'mahony J., Hill C. 2002. A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *Journal Of Microbiological Methods*, 51, 3: 283-293
- Padmakumar V.C., Varadarajan R. 2003. A gradient PCR-based screen for use in site-directed mutagenesis. *Analytical Biochemistry*, 314, 2: 310-315
- Peretti S.W., Bailey J.E., Lee J.J. 1989. Transcription from plasmid genes, macromolecular stability, and cell-specific productivity in *Escherichia coli* carrying copy number mutant plasmids. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 7: 902-908
- Projan S.J., Carleton S., Novick R.P. 1983. Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid*, 9, 2: 182-190
- Providenti M.A., O'brien J.M., Ewing R.J., Paterson E.S., Smith M.L. 2006. The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*:
- Pushnova E.A., Geier M., Zhu Y.S. 2000. A.n easy and accurate agarose gel assay for quantitation of bacterial plasmid copy numbers. *Analytical Biochemistry*, 284, 1: 70-76

- Qiagen plasmid purification handbook. Protocol: Plasmid or cosmid DNA purification using qiagen plasmid mini and maxi kits. 2003: 16-20
- Eurogentec, 2004. Q&Q PCR booklet-0304-V1: 64 str
- Quick reference guide. Real-time qPCR and qRT-PCR protocols. Invitrogen. 2003: 56 str
- Ribeiro E.A., Larcom L.L., Miller D.P. 1989. Quantitative fluorescence of DNA-intercalated ethidium bromide on agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 181, 2: 197-208
- Rocha E.P.C. 2004. The replication-related organization of bacterial genomes. *Microbiology*, 150: 1609-1627
- Schendel F.J., Baude E.J., Flickinger M.C. 1989. Determination of protein expression and plasmid copy number from cloned genes in *Escherichia coli* by flow injection analysis using an enzyme indicator vector. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 8: 1023-1036
- Schmidt T., Friehs K., Flaschel E. 1996. Rapid determination of plasmid copy number. *Journal Of Biotechnology*, 49: 219-229
- Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A., Mills A.G., Gorn V., Singer M.J., Reed M.W. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry*, 285, 2: 194-204
- Seo J., Bailey J.E. 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 12: 1668-1674
- Shepard H.M., Polisky M. 1979. Measurement of plasmid copy number. *Methods in Enzymology*, 68: 503-513
- Shin C.S., Hong M.S., Bae C.S., Lee J. 1997. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2. *Biotechnology Progress*, 13, 3: 249-257
- Tao L., Jackson R.E., Rouviere P.E., Cheng Q. 2005. Isolation of chromosomal mutations that affect carotenoid production in *Escherichia coli*: mutations alter copy number of ColE1-type plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 1: 227-233
- TB055: pET systems manual, 11th edition, 2006, Novagen, jan. 2006, <http://www.merckbiosciences.co.uk/product/TB055>, feb. 2006
- Trefault N., Clément P., Manzano M., Pieper D.H., González B. 2002. The copy number of the catabolic plasmid pJP4 affects growth of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) on 3-chlorobenzoate. *FEMS Microbiology Letters*, 212, 1: 95-100

- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances In Physiology Education*, 29, 3: 151-159
- Weaver K.E., Clewell D.B., An F. 1993. Identification, characterization, and nucleotide sequence of a region of *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive plasmid pAD1 capable of autonomous replication. *Journal Of Bacteriology*, 175, 7: 1900-1909
- Weisblum B., Graham M.Y., Gryczan T., Dubnau D. 1979. Plasmid copy number control: isolation and characterization of high-copy-number mutants of plasmid pE194. *Journal Of Bacteriology*, 137, 1: 635-643
- Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39, 1: 75-85

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za pomoč, pregled in dopolnitve, ter prof. dr. Darji Žgur-Bertok za skrbno recenzijo in doplonila.

Hvala somentorju doc. dr. Viktorju Menartu, ki je od vsega začetka sodeloval pri oblikovanju osnutka naloge, za strokovne nasvete, usmerjanje, vzpodbujanje, vsestransko pomoč in za ves vložen trud pri pregledovanju tega diplomskega dela.

Posebna zahvala gre dr. Veroniki Okršlar, ki me je usmerala, vzpodbujala in mi z izkušnjami in nasveti pomagala skozi celoten proces nastajanja tega diplomskega dela.

Hvala tudi kolektivu Oddelka za nove tehnologije na Kemijskem inštitutu: Jelki Lenarčič, Karmen Čerkić, Vanji Smiloviću, Špeli Jalen, in Menči Drole, ki so mi nesebično pomagali pri pripravi vorcev in izvedbi nekaterih poskusov.

Na koncu bi se rada zahvalila vsem svojim domačim, predvsem staršema za vso njuno brezmejno pomoč in podporo. Prav posebna zahvala pa gre Tomažu, ki me je vseskozi podpiral, spodbujal in mi stal ob strani.

Priloga A

SEZNAM APARATOV

Aparat za qPCR in potrošni material
ABI Prism [®] 7900HT Sequence detection system (Applied Biosystems)
ABI prism [™] Optical 384-Well Clear Optical Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems)
Komore
Zaščitna mikrobiološka komora M 12 (Iskra PIO)
Laminarij: PCR workstation (Labcaire)
Centrifuge
Centrifuge 5417C (Eppendorf)
Centrifuge 5810R (Eppendorf)
Vibracijska mešala
Vibromix 114 (Tehnica)
Pipete in nastavki za pipete
Eppendorf reference pipette 0.1-2.5µl, 0.5-10.0 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
Ep TIPS Reloads (PCR clean)

Priloga B

SESTAVE GOJIŠČ

Tekoče gojišče LBPG/kan30 medij:

LBP/kan30			
Sestavina	Proizvajalec	Kataloška številka	Količina
fiton	Beckton Dickinson	211 906 (43 11 906)	10 g/l
kvasni ekstrakt	Beckton Dickinson	212 730 (0 127 00)	5 g/l
NaCl	Sigma	S-9888	10 g/l
demi voda	dodamo demi vodo do maksimalno 1/5 volumna		
PO STERILIZACIJI aseptičen dodatek v laminariju			
koncentrirana raztopina	končna koncentracija na 1 l		
kanamicin 30 mg/l	30 mg/l (1 ml/1000 ml)		

Tekoče gojišče LBPG/kan30 medij:

LBPG/kan30 medij			
Sestavina	Proizvajalec	Kataloška številka	Količina
fiton	Beckton Dickinson	211 906 (43 11 906)	10 g/l
kvasni ekstrakt	Beckton Dickinson	212 730 (0 127 00)	5 g/l
NaCl	Sigma	S-9888	10 g/l
demi voda	dodamo demi vodo do maksimalno 1/5 volumna		
PO STERILIZACIJI aseptičen dodatek v laminariju			
koncentrirana raztopina	končna koncentracija na 1 l		
glukoza 500 g/l	2.5 g/l (5 ml/1000 ml)		
kanamicin 30 mg/l	30 mg/l (1 ml/1000 ml)		

Tekoče produkcijsko gojišče GYSP + 0.4 mM IPTG za produkcijo v bioreaktorju:

medij GYSP + IPTG				
Sestavina	Proizvajalec	Kataloška številka	Količina	Zatehta za 4000 ml
fiton	Beckton Dickinson	211 906 (43 11 906)	20 g/l	80 g
kvasni ekstrakt	Beckton Dickinson	212 730 (0 127 00)	5 g/l	20 g
NaCl	Sigma	S-9888	10 g/l	40 g
demi voda				do 3500 ml
Antifoam 204	Sigma	A-6426	0.1 ml/l	0.4 ml
PO STERILIZACIJI aseptičen dodatek, tik pred inokulacijo				
koncentrirana raztopina	končna koncentracija na 1 l	končna koncentracija na 1 l	Zatehta za 4000 ml	
glukoza 500 g/l	10 g/l (20 ml/1000 ml)	10 g/l (20 ml/1000 ml)	80 ml	
IPTG 0.4 M	0.4 mM (1 ml/1000 ml)	0.4 mM (1 ml/1000 ml)	4 ml	
kovine v sledovih	(10 ml/1000 ml)	(10 ml/1000 ml)	40 ml	