



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

**Hledání optimálních podmínek izolačního postupu pro
přípravu templátového materiálu za účelem studia
genové exprese mesenchymálních stromálních buněk
pupečnickové tkáně**

Vypracovala: RNDr. Zora Nováková PhD.

Vedoucí práce: RNDr. Tibor Moško PhD.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Ribonukleová kyselina (RNA) je jednou z hlavních komponent systému regulace genové exprese, která probíhá v buňce jako odpověď na exogenní i endogenní stimuly. S rozvíjejícími se technikami molekulární biologie se stává tato molekula jedním z nejdůležitějších nástrojů pro analýzu genové exprese ve výzkumných, diagnostických i terapeutických postupech.

Na rozdíl od deoxyribonukleové kyseliny má RNA velmi nestabilní charakter a proto je její izolace technicky náročnější. Pro účely studia genové exprese musí splňovat purifikovaná RNA několik parametrů, mezi nimiž je nejdůležitější čistota. Použité izolační postupy tedy musí zajistit efektivní separaci RNA od ostatních buněčných komponent i izolačních chemikálií. V současnosti se nabízí několik technik pro izolaci RNA, z nichž nejběžněji používané jsou dva typy – izolace RNA kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform známá pod komerčním názvem TRIzol nebo TRI Reagent a extrakce RNA na pevné fázi neboli kolonová izolace. Tato studie shrnuje základní poznatky o povaze RNA jakožto biologické makromolekuly a popisuje postupy užívané pro její extrakci z biologického materiálu.

Spektrofotometrie patří k nejčastěji užívaným metodikám v medicínských a biologických laboratořích. Proto je při výběru měřících zařízení kladen důraz na rychlost, přesnost, spolehlivost a jednoduchost ovládání přístroje. Vývoj spektrofotometrických zařízení pokračuje směrem k zpřesnění měření a snížení nároků na množství měřeného vzorku. Usnadňuje tak provedení rozsáhlých studií a zpřesňuje jejich výsledek. Při používání spektrofotometrů je vhodné seznámit se s fyzikálními principy a konstrukčními dispozicemi používaných spektrofotometrů. Tyto znalosti nám mohou pomoci ke správnému použití přístroje a interpretaci získaných dat. Tato práce shrnuje fyzikální zákony a základní principy týkající se elektromagnetického záření a spektrofotometrie, studie dále nastiňuje obecné schéma konstrukce spektrofotometrů a kritické parametry pro měření koncentrace nukleových kyselin.

Cílem této studie bylo nalezení optimálních metodických postupů, které by poskytly dostatečné množství kvalitní RNA pro následnou analýzu genové exprese několika

desítek molekulárních markerů ve větším počtu buněčných vzorků mesenchymálních stromálních buněk.

Ve studii byly porovnány běžně užívané postupy izolace RNA určené pro následnou reversní transkripci. Testované metodiky zahrnovaly izolaci RNA kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform a extrakci na pevné fázi, celkem bylo porovnáváno sedm komerčních produktů. Hodnoceným parametrem byl výtěžek a čistota izolované RNA ve vztahu k množství zdrojového biologického materiálu.

Studie zahrnovala srovnání kvality měření dvou spektrofotometrických přístrojů NanoDrop ND-1000 a BioPhotometer Eppendorf v parametrech přesnosti měření koncentrace a čistoty RNA, rychlosti měření, minimálního objemu vzorku nezbytného pro měření a výpovědní hodnoty výstupních dat přístroje.

Srovnávací experimenty byly provedeny na sadě buněčných vzorků obsahujících různý počet mesenchymálních stromálních buněk a na komerčně získané purifikované RNA.

Výsledky studie ukázaly, že v případě vzorků s malým množstvím zdrojového materiálu poskytuje technika extrakce RNA na pevné fázi kvalitnější RNA než izolace roztokem TRI Reagent. Z porovnávaných izolačních postupů vykazovala nejvyšší výtěžky i čistotu RNA souprava ZR RNA MicroPrep.

Při porovnání spektrofotometrických přístrojů vykazoval přístroj NanoDrop lepší hodnoty všech posuzovaných parametrů; menší chybu a kratší dobu měření, spotřebu menšího množství vzorku pro měření a získání dat s větší výpovědní hodnotou.

V souhrnu byl pro plánovanou analýzu genové exprese zvolen izolační postup soupravou ZR RNA MicroPrep doplněný kvantifikací RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop.

Klíčová slova: izolace ribonukleové kyseliny, extrakce na pevné fázi, TRI Reagent Solution, spektrofotometrické měření koncentrace, analýza genové exprese

Abstract

Ribonucleic acid (RNA) is the main component of the regulation of gene expression in the cell. As the development of techniques of molecular biology proceeds, RNA becomes an important tool for the gene expression analysis in research as well as diagnostic approaches.

In contrast to deoxyribonucleic acid, RNA is very unstable and its isolation is tricky. RNA used for the gene expression analysis should fulfill several requirements focused especially on its purity. The isolation techniques should ensure effective separation of RNA from other cell components and chemicals used in the process. Currently, several methodologies are employed for the RNA isolation. The most common isolation is guanidine thiocyanate-phenol-chloroform combination called TRIzol or TRI Reagent and the extraction on solid phase so-called the column extraction. This study shows basic knowledge about macromolecule RNA and describes methodologies of RNA extraction from biological material.

Spectrophotometry is very common technique used in laboratories. Thus the spectrophotometer is considered according to its speed, accuracy and simplicity of utilization. New improved devices reveal higher accuracy and lower requirements for the sample volume and make huge analyses much easier and more accurate. Getting knowledge about the principle and construction of the device we can improve utilization of the device and interpret the data correctly. In this study basic physical laws and principles concerning electromagnetic radiation and spectrophotometry are described, moreover, the basic model of spectrophotometer and critical parameters for nucleic acid quantification are shown.

The aim of the study was to find the methodical approach for the isolation of unlimited amount of RNA of high quality suitable for high-throughput gene expression analysis of mesenchymal stromal cells.

In the study several isolation techniques were compared to gain RNA suitable for reverse transcription reaction. These include isolation with guanidine thiocyanate-phenol-

chloroform combination and column extraction. In total, yield and purity of RNA isolated by seven kits was compared in relation to the amount of cells used.

The study involved comparison of two spectrophotometric devices – NanoDrop ND-1000 and BioPhotometer Eppendorf. The accuracy of measurement of the concentration and the purity of RNA, speed, sample volume requirement and the weight of data acquired was compared between tested devices.

A set of cell samples containing various number of mesenchymal stromal cells and commercially available RNA were used for testing purposes.

The results of the study showed that in case of small cell number samples RNA isolated by column extraction is of higher quality than that isolated by TRI Reagent. From column-based kits the ZR RNA MicroPrep gave the best results – the highest yield and purity of isolated RNA.

From the spectrophotometric devices tested NanoDrop revealed smaller deviation of measurement, shorter time required for measurement, smaller sample volume requirement and higher weight of acquired data.

In summary, ZR RNA MicroPrep and NanoDrop spectrophotometer were selected for preparation of RNA samples suitable for gene expression analysis.

Keywords: isolation of ribonucleic acid, extraction on solid phase, TRI Reagent Solution, spectrophotometric concentration measurement, gene expression analysis

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses. cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2014

.....

Zora Nováková

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem osobám, které přispěly k sepsání této práce, především svému školiteli Tiborovi Moškovi a své kolzulantce Vladimíře Czernekové, a dále své rodině, Lence Rossmeislové, Ireně Vackové, Cyrilovi Bařinkovi a kolegům ze svého pracoviště za jejich soustavnou ochotu, pomoc a podporu.

Obsah

1	Úvod.....	11
1.1	RNA.....	11
1.1.1	Struktura RNA.....	12
1.1.2	Syntéza, regulace a degradace RNA	14
1.1.3	Funkce RNA.....	16
1.2	Techniky purifikace RNA.....	16
1.2.1	Zpracování RNA	17
1.2.2	Chromatografická separace RNA.....	18
1.2.3	Izolace RNA kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform	20
1.2.4	Extrakce RNA na pevné fázi	20
1.3	Spektrofotometrie	21
1.3.1	Charakteristika elektromagnetického záření	22
1.3.2	Fyzikální princip spektrofotometru	23
1.3.3	Konstrukce spektrofotometrů	25
1.3.4	Typy spektrofotometrů	28
1.3.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin	29
2	Cíle práce	33
3	Materiál a metody	34
3.1	Chemikálie	34
3.2	Izolační soupravy	34
3.3	Přístrojové vybavení	35
3.4	Příprava biologického materiálu.....	35
3.4.1	Kultivace buněk.....	35
3.4.2	Sklízení vzorků.....	35
3.4.3	Příprava ředící řady RNA.....	36
3.5	Izolace RNA	36

3.5.1	Izolace kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform	36
3.5.2	Extrakce na pevné fázi.....	36
3.6	Spektrofotometrické měření	38
3.6.1	Spektrofotometr NanoDrop ND-1000.....	38
3.6.2	Fotometr BioPhotometer Eppendorf	39
3.6.3	Zpracování dat	39
4	Výsledky	40
4.1	Srovnání měřících přístrojů	40
4.2	Srovnání metodických postupů izolace RNA.....	43
5	Diskuze.....	48
6	Závěr	53
7	Použitá literatura	55
8	Přílohy	60

Seznam použitých zkratek

μg	- mikrogram
μl	- mikrolitr
A	- absorbance
CCD	- „chargé-coupled device“ – zařízení s vázanými náboji
cDNA	- „complementary“ – komplementární deoxyribonukleová kyselina
CsCl	- cesium chlorid
D-MEM	- „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ – kultivační medium
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
DNáza	- deoxyribonukleáza
dsDNA	- „double strand“ – dvojitá deoxyribonukleová kyselina
EDTA	- ethylendiamintetraoctová kyselina
hnRNA	- „heterogenous nuclear“ - heterogenní jaderná ribonukleová kyselina
miRNA	- „micro“ – mikro ribonukleová kyselina
mRNA	- mediátorová ribonukleová kyselina
MSC	- „mesenchymal stromal cells“ – mesenchymální stromální buňky
PCR	- „polymerase chain reaction“ – polymerázová řetězová reakce
PBS	- „phosphate buffered saline“ – fosfátový pufr
RNA	- ribonukleová kyselina
RNáza	- ribonukleáza
rRNA	- ribosomální ribonukleová kyselina
RT-PCR	- reversní transkripce – polymerázová řetězová reakce
siRNA	- „small interfering“ – malá interferující ribonukleová kyselina
snRNA	- „small nuclear“ - malá jaderná ribonukleová kyselina
ssDNA	- „single strand“ – jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
TCEP	- „tris(2-carboxyethyl)phosphine“ – redukční činidlo
tRNA	- transferová ribonukleová kyselina
U	- „unit“ – enzymová jednotka
UV	- ultrafialový
xg	- násobek gravitačního zrychlení

1 Úvod

Nukleové kyseliny jsou nositelem genetické informace a mají zásadní význam pro osud buněk i jedince, respektive předurčují jejich fenotyp. Genetická informace je v deoxyribonukleové kyselině (DNA) uložená ve formě sekvence nukleotidů, tyto sekvence pak definují jednotlivé geny. Geny se fenotypově projevují pomocí procesu nazývaného genová exprese, při kterém jejich sekvence v DNA slouží jako templát (matrice) pro syntézu molekul ribonukleové kyseliny (RNA) označovanou jako transkripce. RNA dále funguje jako templát pro syntézu proteinů, kterou vykonávají velké ribonukleoproteinové komplexy - ribosomy. Tato transformace genetické informace z DNA přes RNA do podoby proteinu je naprosto obecným principem v živé přírodě – proto byla označena za takzvané „centrální dogma molekulární biologie“ (1).

Relevance molekuly RNA v rámci buněčných procesů je zřejmá. Následující statě poslouží čtenáři k seznámení se strukturou a funkcí RNA a k pochopení metodických postupů přípravy RNA pro využití v běžně používaných technikách stanovujících genovou expresi v buňkách.

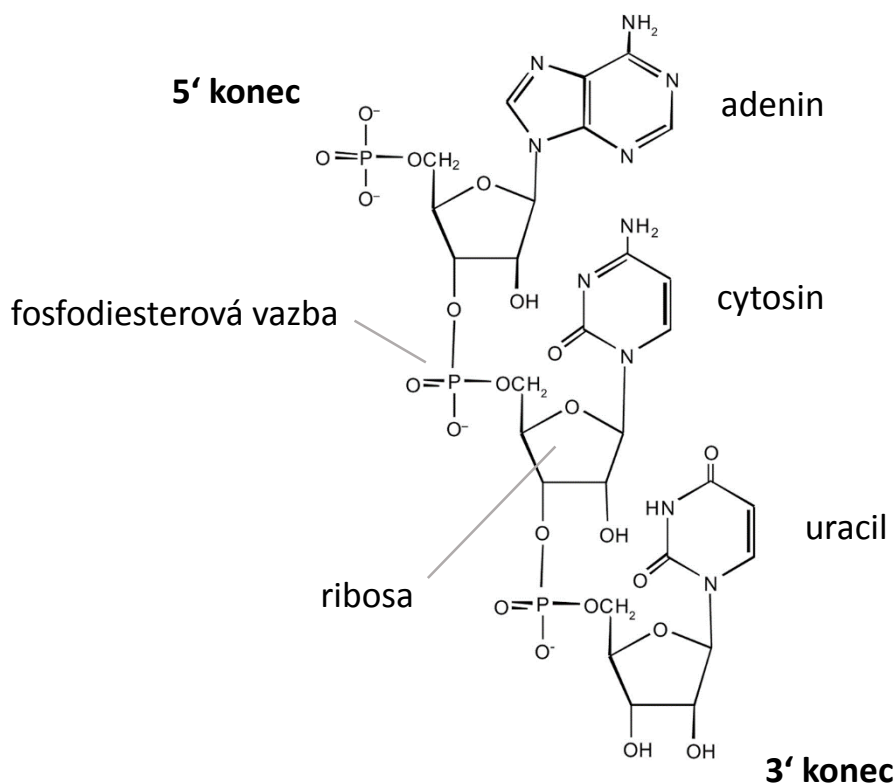
1.1 RNA

Proces, kterým vzniká RNA z DNA molekuly, se nazývá přepis (transkripce). Dochází tak k přenesení informace do jiného typu nukleové kyseliny, ale stále jsou ke kódování informace používány nukleotidy. Podle sekvence RNA na ribosomu pak následně vzniká polypeptidový řetězec, operace je řízena „genetickým kódem“, který určuje, jaká aminokyselina má být zařazena. Podle genetického kódu je každá aminokyselina v RNA zapsána sekvencí tří po sobě jdoucích nukleotidů. Proces syntézy proteinu podle sekvence RNA je označován jako přepis (translace). Celý proces genové exprese je složitě regulován a umožňuje, aby z jedné molekuly DNA vzniklo přepisem mnoho molekul RNA a následným překladem ještě více molekul proteinu. Buňka tak

může z jediné sekvence genu nasynthetizovat velké množství proteinu a gen se tak může v krátkém čase významně fenotypově projevit (2).

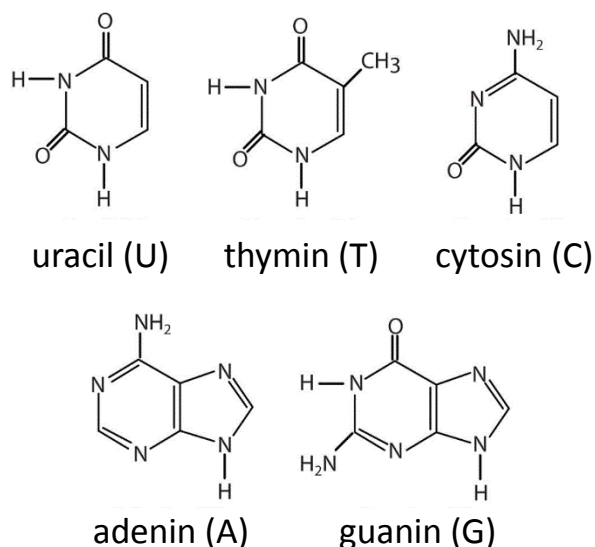
1.1.1 *Struktura RNA*

Struktura nukleových kyselin byla popsána v 50. letech 20. století celosvětově známými vědci Jamesem D. Watsonem a Francisem Crickem. Nukleové kyseliny jsou lineární polymerní makromolekuly složené ze čtyř druhů nukleotidů, které jsou propojeny fosfodiesterovými vazbami (obr. 1).



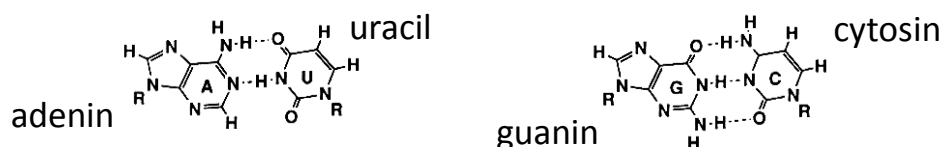
Obr. 1. Řetězec RNA tvořený bázemi, zavěšenými na molekulách ribosy, které jsou propojeny fosfodiesterovými vazbami. Převzato z Ball a kolektiv 2011 (3).

RNA je složena z ribonukleotidů adenosinu, guanosinu, cytidinu a uridinu. Všechny ribonukleotidy obsahují stejný monosacharid ribosu a fosfátovou skupinu, odlišují se v nukleové bázi visící na ribose. V RNA se vyskytují báze adenin, guanin, cytosin a uracil (obr. 2). Namísto ribosy obsahuje DNA deoxyribosu a báze uracil je nahrazena thyminem.



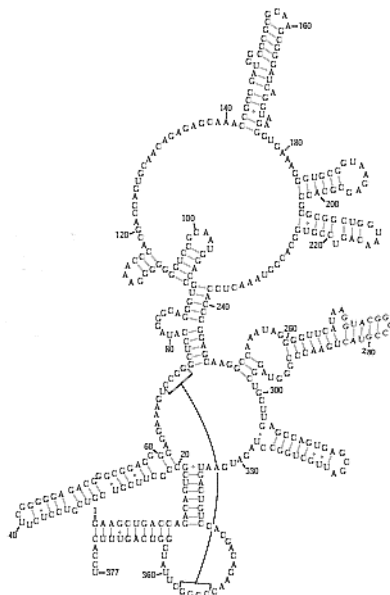
Obr. 2. Vzorce nukleových bází obsažených v DNA a RNA. Adenin a guanin jsou purinové báze, zatímco uracil, thymin a cytosin jsou pyrimidinové báze. Thymin se vyskytuje v DNA, uracil v RNA (oba se párují s adeninem). Převzato z Ball a kolektiv 2011 (3).

DNA se v buňce vyskytuje převážně ve formě dvoušroubovice, která vzniká nezávislými interakcemi nukleotidů na základě jejich komplementarity. Podle své komplementarity se tedy páruje adenin s thyminem a guanin s cytosinem. RNA existuje v buňce většinu času jako jednovláknová molekula, tedy nevytváří dvoušroubovici s jiným vláknem RNA, pouze při vlastní syntéze dochází k přechodnému stavu heteroduplexu RNA-DNA, který se velmi rychle rozpadá. Většina molekul RNA zaujímá pravotočivou helikální konformaci především díky patrovým interakcím mezi purinovými bázemi. Báze v RNA mají zachovanou schopnost interakce s komplementárními nukleotidy v opačné orientaci, což velmi často vede k vytváření takzvaných sekundárních struktur RNA, ve kterých se párují nukleotidy stejné molekuly (obr. 3). V rámci jedné molekuly tak vznikají vlásenky a smyčky (obr. 4). Díky tvorbě



Obr. 3. Párování komplementárních bází v RNA. Adenin (A) se páruje s uracilem (U) dvěma vodíkovými vazbami, guanin (G) se páruje s cytosinem (C) třemi vodíkovými vazbami. Převzato z Tinoco 1993 (4).

sekundárních struktur může RNA nabývat různých trojrozměrných tvarů. Struktura je navíc stabilizována dalšími vodíkovými můstky, které ovšem neodpovídají Watson-Crickovskému párování bází. Celková struktura RNA a DNA se tedy výrazně liší, ačkoli jejich základní kameny se ze tří čtvrtin shodují.



Obr. 4. Příklad sekundární struktury RNA tvořené vlásenkami a smyčkami. Převzato z Nelson a Cox 2008 (5).

1.1.2 *Syntéza, regulace a degradace RNA*

RNA je syntetizována enzymem RNA polymerázou, která rozvolňuje DNA dvoušroubovici, nasedá na jedno vlákno v místě genu a poté skládá a spojuje ribonukleotidy komplementární k sekvenci na kódujícím vláknu DNA do RNA řetězce. Interakce mezi nově syntetizovanou RNA a templátovou DNA však není dostatečně silná a RNA se z templátu uvolňuje. Zároveň je vytěšňována uzavíráním dvoušroubovice DNA za polymerázou a zůstává ve formě jednovláknové molekuly (transkripce genu probíhá jen na jednom vláknu). Na rozdíl od DNA molekul, které čítají zpravidla více než 250 milionů párů bází (odpovídá délce chromozomu), RNA molekuly jsou relativně malé (několik tisíc párů bází). RNA, stejně jako DNA, je skládána ve směru od 5' konce k 3' konci. RNA polymeráza vytváří RNA z ribonukleosidtrifosfátů, přičemž energie na tvorbu vazby pochází z jejich hydrolýzy. Na jeden templát může nasednout více

polymeráz a vzniká tak více kopií RNA z jednoho genu ve velice krátkém čase (až tisíc stejných kopií RNA za hodinu). Rychlost procesu je však na úkor kvality – RNA polymeráza produkuje výrazně větší množství chyb (chyba/10⁴ bází) než DNA polymeráza (chyba/10⁷ bází). Nicméně RNA neslouží k dlouhodobému uchování genetické informace, proto občasné chyby v její syntéze nezpůsobují velký problém (2).

V eukaryotických buňkách je RNA syntetizována v buněčném jádře. Vzniklá molekula (hnRNA – primární transkript) je v jádře dále procesována: na 5' konec je přidána čepička z metylguanositinu a 3' konec je naštěpen a posléze upraven enzymem, který provádí polyadenylaci 3' konce RNA (připojí poly-A sekvenci). Obě modifikace především slouží ke stabilizaci molekuly, dále napomáhají transportu z jádra a signalizují, že molekula RNA je intaktní (5). Před opuštěním jádra prochází RNA další úpravou zvanou sestřih. Z molekuly se vystřihují introny, které nemají kódující funkci, zbylé exony, které nesou informaci o sekvenci budoucího proteinu, se spojují do podoby mRNA, která je výrazně kratší než původní hnRNA. Sestřih provádí enzymy spliceosomy, které samy obsahují kromě proteinových podjednotek i RNA molekuly (snRNA). Na hranicích intronu a exonu se nachází několik nukleotidů značících tento přechod. Enzym je rozpozná a vyšťepí intronovou sekvenci v podobě smyčky. V procesu sestřihu probíhají variace, takže výsledkem mohou být mRNA s různým uspořádáním exonů. Tímto procesem nazývaným alternativní sestřih vznikají varianty proteinu nazývané isoformy. Tento postup přispívá ke komplexnosti a variabilitě celého procesu genové exprese. Upravená RNA je připravena na transport k ribosomům, které zahájí translaci. Jelikož ribosomy dokáží nasedat na molekulu RNA za sebou, z jedné molekuly RNA tak může vzniknout několik molekul proteinu.

Na rozdíl od DNA má RNA přechodný charakter, je nestabilní a v buňce je její dynamická syntéza a degradace využívána pro regulaci exprese proteinů. Existence eukaryotické RNA se počítá v řádu minut až hodin. Tuto dobu udává 3'-nepřekládaná oblast nacházející se v RNA za kódující sekvencí. Systém zajišťující odbourání RNA zahrnuje malé molekuly RNA (miRNA, siRNA), které fungují jako značky pro zastavení translace nebo pro enzymatické štěpení RNA. Ke štěpení dochází v cytoplasmatických P-tělískách (1). Enzymy degradující RNA se nazývají ribonukleázy (RNázy), jsou to

velmi odolné, stabilní a efektivní proteiny. Zaručují, že po naplnění doby svého života je RNA velmi rychle rozložena, regulují tak míru exprese daného genu v čase. Při práci s RNA v laboratorních podmínkách jsou však tyto enzymy hlavním činitelem nechtěné degradace vzorků.

1.1.3 Funkce RNA

Molekuly RNA jsou zapojené do průběhu a regulace mnoha buněčných procesů. Většina molekul RNA funguje jako nositelka informace o sekvenci proteinu, která migruje od DNA k ribosomu – tento typ označujeme jako mediátorovou RNA (informační RNA, mRNA).

Trojrozměrná struktura RNA však umožňuje i další funkce – strukturní a katalytické. Takové typy RNA nejsou překládány do sekvence proteinu, ale jsou samy konečným produktem. Ribosomální RNA (rRNA) je komponentou ribosomů a podílí na průběhu translace. Transferová RNA (tRNA) je adaptorová molekula zodpovědná při proteosyntéze za zavádění správných aminokyselin do centra ribosomu podle sekvence překládané mRNA. Pro její funkci je důležitá její sekundární struktura. Malé RNA (snRNA) jsou důležité při sestřihu hnRNA a při transportu vzniklých proteinů do buněčných organel, zatímco siRNA a miRNA jsou činitelem post-transkripční regulace. Molekuly RNA, které vykazují enzymatickou aktivitu, se nazývají ribozymy. Jsou součástí ribosomů, podílejí se na procesování dalších molekul RNA, například na sestřihu RNA, na replikaci virů nebo na syntéze tRNA.

Komplexnost funkcí RNA ukazuje na její mimořádnou důležitost pro všechny živé systémy. RNA je evolučně velmi stará struktura, která sehrála důležitou roli ve vývoji života na zemi.

1.2 Techniky purifikace RNA

Izolační a purifikační postupy pro získání nukleových kyselin prošly během 20. století výrazným vývojem.

Princip chromatografie byl objeven na začátku dvacátého století botanikem Mikhailem Tswettem, který zjistil, že se rostlinný extrakt z listů při průchodu sloupcem křídly rozdělí na několik pásů o různých barvách. Později byly chromatografické techniky aplikovány na DNA a následně na RNA. Izolace RNA byly prováděny také zonální ultracentrifugací v sacharosovém gradientu. Byla tak popsána ribosomální RNA, která je dodnes označována podle své rychlosti sedimentace. Současně se pro purifikaci RNA začal používat cesium chloridový hustotní gradient (CsCl gradient), díky němuž bylo možné separovat RNA od DNA (6). Postupně se vyvinuly další přístupy zahrnující použití detergentů a proteinázy K (7). V počátcích chemické izolace RNA pomocí silných denaturačních činidel se k deproteinizaci využíval fenol, později guanidin chlorid a guanidin thiokyanát v kombinaci s přečištěním v CsCl gradientu (8, 9). V osmdesátých letech 20. století byla metoda izolace RNA optimalizována pomocí kombinace guanidin thiokyanátu, fenolu a chloroformu. Tento krok znamenal přelom v dané oblasti, metoda umožnila izolovat velké množství vzorků při dosažení dobré čistoty a výtěžku i z malého množství zdrojového materiálu (10). Zdokonalená a zjednodušená metoda je s oblibou používána dodnes (11). Na přelomu 20. a 21. století se začala masivně využívat extrakce na pevné fázi díky lepší finanční dostupnosti a komercializaci v podobě mnoha variant souprav (kitů) od různých výrobců. Tato metoda postupně dosáhla podobných možností jako izolace chemickou cestou – za použití kolony je možné separovat RNA, DNA a proteiny z jednoho vzorku zároveň (12). Vývoj metodik extrakce RNA na pevné fázi došel již k oddělování jednotlivých typů RNA, např. miRNA (13). Technika extrakce RNA na pevné fázi je rychlá a jednoduchá metodika, její nevýhodou ovšem je nedokonalé oddělení DNA od RNA, což vede ke kontaminacím RNA vzorků genomickou DNA.

1.2.1 Zpracování RNA

Obecně se při purifikaci RNA využívá vlastnosti chemické interakce RNA s určitým povrchem. Existuje několik postupů pro extrakci RNA. Mezi všemi dominuje v současnosti extrakce na pevné fázi, kapalinová chromatografie a použití specifických chemikálií. Zatímco extrakce na pevné fázi se používá pro izolaci všech molekul RNA nebo určitého typu RNA (např. mRNA), chromatografie od sebe dokáže oddělit několik

typů případně molekul RNA. Frakcionačními technikami je možno rozdělit molekuly RNA podle velikosti, nukleotidového složení nebo sekvence.

Základním krokem každé purifikace nukleových kyselin je odstranění proteinů, které s nukleovou kyselinou interagují. Děje se tak chemickou cestou, např. směsí fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu, guanidium chloridem nebo guanidin isothiokyanátem, detergenty a vysokou koncentrací solí. Proteiny je možné odstranit též enzymaticky proteinázou K.

Izolovaná RNA je snadno enzymaticky degradovatelná nukleázami, proto se do vodných roztoků RNA přidávají inhibitory ribonukleáz (RNáz). Nejběžněji používaná je ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), která chelatuje dvojmocné kationty a brání tím aktivitě nukleáz. Často se využívá také vanadát v komplexu s ribonukleosidy (7). Navíc RNA není stabilní v zásaditém prostředí, rozpadá se na jednotlivé nukleotidy (1), proto je nutné dbát na správné pH roztoků během celého purifikačního procesu.

Mnoho aplikací vyžaduje izolaci RNA bez kontaminace DNA ze vzorku. Pro tento účel se využívá aktivity enzymu DNázy, která v poměrně krátkém čase rozštěpí DNA přítomnou ve vzorku.

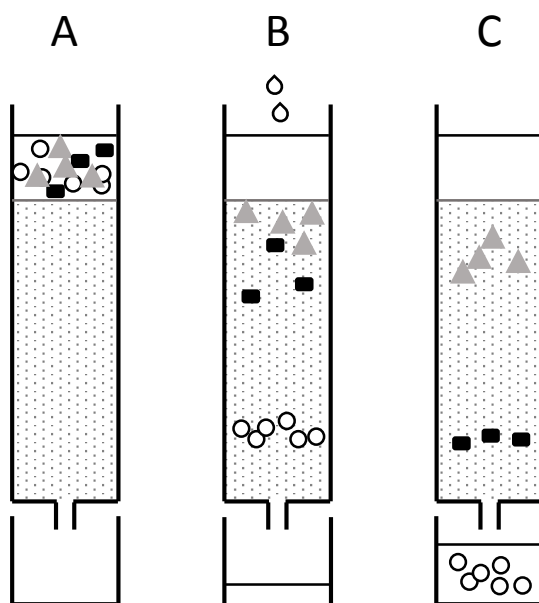
1.2.2 Chromatografická separace RNA

Chromatografické systémy jsou složeny ze dvou prvků – pevné (stacionární) a pohyblivé (mobilní) fáze. Pevná fáze se nepohybuje, bývá přichycena na podklad nebo vyplňuje určitý prostor, zatímco pohyblivá fáze prochází kolem pevné fáze, nese s sebou látky a umožňuje jejich interakci s pevnou fází. Různý stupeň jejich adsorpce na pevnou fází je podstatou separace jedné látky od druhé (obr. 5). Průchod látek kolonou je dále ovlivněn charakterem elučního roztoku, který se aplikuje na kolonu za vzorkem za účelem pohybu mobilní fáze a vymytí látek z kolony.

Součástí chromatografického systému bývá detektor, který umožňuje identifikaci separovaných látek vytvářejících takzvané vrcholy (v angl. orig. „peak“). Pro nukleové kyseliny se zpravidla využívá detekce absorbance v UV oblasti (14).

Pevná fáze kolon, na kterých se provádí chromatografická separace RNA, bývá zpravidla vyrobena ze silikonových, polymerních nebo agarosových částic. Na povrchu

těchto částic se nachází funkční chemické skupiny, které jsou zodpovědné za interakci RNA s pevnou fází, využívá se tedy především mechanismus iontoměničů, reversní fáze a afinitní interakce.



Obr. 5. Průběh chromatografického rozdělení tří látek ze směsného vzorku. (A) Látky rozpuštěné v rozpouštědle jsou umístěny na vrch chromatografické kolony, která je naplněna pevnou fází. (B) Přidáním elučního roztoku na vrch kolony započne separační proces. Látky neinteragující s pevnou fází prochází kolonou rychle, látky adsorbující se pohybují pomalu. (C) Nejrychleji putující látka, která neinteragovala s pevnou fází, vychází z kolony, slabě interagující látka již prošla větší částí kolony, silně interagující látka zůstává stále na počátku sloupce pevné fáze.

Nejvíce používaný případ chromatografické separace RNA je afinitní chromatografie mRNA skrze interakci poly-A konce RNA a poly-U sekvence kovalentně připojené na pevnou fází kolony. Zeslabení této interakce za účelem eluce se děje změnou iontové síly a teploty (15).

Zásadní problém při chromatografické separaci RNA molekul je udržení její stability během celého procesu. RNA velmi rychle podléhá degradaci RNázami, proto je nutné používat jejich inhibitory a pokud metoda umožní, celý proces provést za nízké teploty (4°C).

Chromatografická separace RNA přináší možnost rozlišení velmi podobných molekul a získání vzorků o vysoké čistotě. Nevýhodou této metody jsou vysoké finanční náklady a časová náročnost.

1.2.3 Izolace RNA kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform

Metoda je založena na chemické izolaci RNA. Díky své robustnosti může být zdrojovým materiálem jakýkoli biologický vzorek. Zdrojový materiál obsahující RNA je rozpuštěn v lyzačním roztoku obsahujícím guanidin thiokyanát a fenol o kyselém pH. Obě složky jsou velmi silné denaturanty, které lyzují buňky i kousky tkání a zajišťují odstranění proteinů z RNA. Do lyzovaného vzorku se přimíchá chloroform, vzorek se následně silně protřepe. Přítomnost organických látek a denaturačních činidel způsobí denaturaci proteinů, které se oddělí od nukleových kyselin centrifugací. Vznikají tři fáze – vrchní vodná obsahující RNA, spodní organická obsahující denaturované proteiny a mezifáze obsahující DNA. RNA ve vodné fázi je pečlivě odebrána, aby nedošlo ke kontaminaci z mezifáze, a následně je precipitována a oplachována alkoholy. Tento postup poskytuje kvalitní nedegradovanou RNA o velikosti 100 – 15 000 bází v dostatečné čistotě a množství i z malého množství zdrojového materiálu, navíc je možná paralelní izolace RNA, DNA a proteinů z jednoho vzorku. Velkou výhodou metody je deaktivace RNáz díky přítomnosti guanidin thiokyanátu během téměř celého postupu.

1.2.4 Extrakce RNA na pevné fázi

Tato metoda má podobné uspořádání jako klasická chromatografie – vzorek je rozpuštěn a vložen na kolonu naplněnou pevnou fází. Na rozdíl od kapalinové chromatografie, kde dochází k postupnému rozdělení jednotlivých složek vzorku, extrakce na pevné fázi probíhá v módu ANO/NE, tedy extrahovaná látka se na pevnou fázi naváže/nenaváže a dochází k hrubé purifikaci.

Nejprve se ekvilibruje kolona vhodným roztokem, aby pevná fáze získala schopnost vázat nukleovou kyselinu. Jedná se především o úpravu pH a konverzi funkčních skupin na povrchu pevné fáze. Poté je vzorek aplikován na kolonu a dochází k specifické vazbě

a adsorpci extrahované látky na pevnou fázi. Podmínky jsou nastaveny způsobem, aby se na pevnou fázi navázalo maximální možné množství extrahované látky a zároveň se ostatní složky vzorku vázaly s minimální účinností. Tento postup je snahou o co nejvyšší specifitu extrakce. Látky, které nejsou předmětem extrakce a přesto na pevnou fázi adherují, jsou v následujícím kroku odmyty promývacím pufrem, který zachovává interakci extrahované látky s pevnou fázi, ale oslabuje nescifické vazby. Složení promývacího pufru určuje čistotu extrahované látky a její výtěžek. Pokud je prioritní čistota vzorku, je používán silnější promývací pufr, který odmyje nescifické látky, ale také oslabí specifickou interakci a tím se sníží výtěžek. Pokud na čistotě izolace příliš nezáleží a důležitější je maximální výnos, kolona se promývá slabým roztokem. Po promývacím kroku je extrahovaná látka eluována z kolony roztokem, který zruší specifické interakce, látka se uvolní z pevné fáze a odchází z kolony.

Kolony pro extrakci na pevné fázi jsou dostupné v různých provedeních – kolony procesované centrifugací, volnou gravitační silou nebo podtlakem. Nejoblíbenější kolony, u kterých je kapalina protlačována centrifugací, se často označují pojmem „spin kolony“. Obvyklá kapacita kolon pro vzorek bývá 100 – 500 μl . Roztoky prochází kolonami poměrně snadno, v případě spin kolon postačuje centrifugační síla 10 000 \times g po dobu 1 minuty. V současné době jsou extrakční kolony komerčně dostupné v mnoha variacích a ve formě souprav, ve kterých jsou kromě kolon všechny potřebné roztoky. Izolace RNA tímto postupem je tedy rychlá a jednoduchá (14).

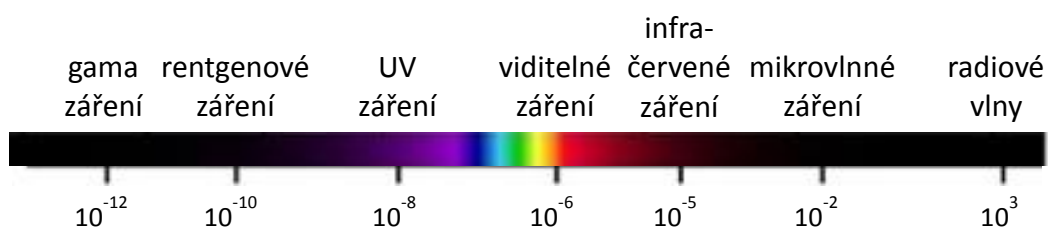
1.3 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je běžně užívaná metodika pro stanovení koncentrace látky v roztoku za pomoci měření absorpce záření o určitých vlnových délkách.

V medicínských a biologických oborech absorpční spektrofotometry slouží k měření absorpce záření obvykle v oblasti UV nebo viditelného spektra záření. Účelem měření bývá identifikace nebo kvantifikace biologických makromolekul, léčiv, organických a anorganických sloučenin a dalších látek.

1.3.1 Charakteristika elektromagnetického záření

Elektromagnetické záření je přirozenou součástí našeho světa. Určitou část z něj dokážeme rozpoznat našimi smysly a orgány – naše oči vnímají viditelnou oblast spektra ve formě světla a barev, naše kůže vnímá infračervené záření jako teplo a blízké UV záření jako podnět k tvorbě kožního pigmentu. Elektromagnetické záření má však výrazně širší spektrum než dokáže lidské tělo registrovat (obr. 6). Rozsah viditelného spektra odpovídá vlnovým délkám, pro které je lidské oko citlivé, zhruba 400 – 800 nm. UV záření má vyšší energii než viditelné záření, dokáže štěpit chemické vazby. UV záření zaujímá oblast 10 – 400 nm, z toho vakuové UV 10 - 190 nm, vzdálené UV 100 – 190 nm, střední UV 190 – 300 nm a blízké UV 300 – 400 nm.



Obr. 6. Spektrum elektromagnetického záření

Obecně je elektromagnetické záření charakterizováno několika fyzikálními veličinami, z nichž nejdůležitější je frekvence ν , vlnová délka λ , rychlost c a energie fotonu E (16). Vzájemné vztahy těchto veličin vyjadřují následující vzorce (h je Planckova konstanta):

$$\lambda = c/\nu$$

$$E = h \nu$$

Elektromagnetické záření dopadající na molekuly bývá zčásti absorbováno, molekuly zpravidla pohlcují jen určité vlnové délky záření. Pohlcení záření způsobuje přechod molekuly ze stavu základní energie (E_p) do stavu s vyšší energií (E_q) především přechodem mezi elektronovými energetickými hladinami. Rozdíl těchto energií (ΔE) vyjadřuje energii absorbovaných fotonů a je popsán vztahem:

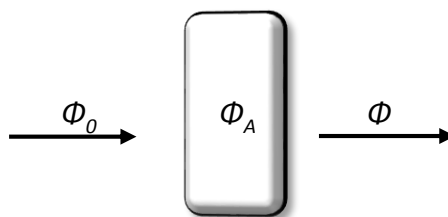
$$\Delta E = E_p - E_q = h \nu = h c / \lambda$$

kde c je rychlost světla.

Biologické makromolekuly obsahují velké množství aromatických jader, které absorbují záření v blízké UV oblasti. Dále v této oblasti absorbují také polynenasycené sloučeniny. Ve vzdálené UV oblasti absorbují nasycené sloučeniny a ve viditelné oblasti barevné látky.

1.3.2 Fyzikální princip spektrofotometru

Obecný princip absorpčních spektrofotometrů spočívá ve faktu, že pokud záření prochází prostředím, které ho absorbuje, klesá intenzita záření. Světelný proud vstupující do sledovaného prostředí se nazývá vstupující tok záření (Φ_0), z prostředí vychází vystupující zářivý tok (Φ), který je menší oproti vstupujícímu toku o absorbovaný zářivý tok Φ_A (obr. 7).



Obr. 7. Vstupující zářivý tok Φ_0 je po dopadu na absorbující látku zmenšen o absorbovaný zářivý tok Φ_A , z látky vychází vystupující zářivý tok Φ

Absorpční vlastnost látky tedy vyjadřuje poměr zářivých toků, který je označován pojmem propustnost τ (transmittance):

$$\tau = \Phi / \Phi_0$$

Běžněji se však setkáváme s veličinou absorbance (A), která má přímý vztah k propustnosti:

$$A = -\log \tau$$

Často se absorbance popisuje pomocí hodnot intenzity vstupujícího (I^0) a vystupujícího (I) záření:

$$A = \log(I^0/I)$$

Intenzita vystupujícího záření je dále ovlivněna délkou, kterou záření urazí k detektoru. Tento jev je popsán Lambertovým zákonem, tedy intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností (x):

$$A = b x$$

kde b označuje absorpční (extinkční) koeficient, který charakterizuje měřené molekuly a prostředí, v kterém existují (rozpouštědlo). Beerův zákon pak popisuje tuto veličinu blíže:

$$b = \varepsilon C$$

kde ε značí molární absorpční (extinkční) koeficient, tedy konstantu popisující absorbující látku, ve které je zahrnut index lomu (do určité molární koncentrace vzorku se index lomu roztoku vzorku považuje za prakticky shodný s indexem lomu samotného rozpouštědla). C vyjadřuje molární koncentraci měřené látky (17).

Běžněji se setkáváme s propojením dvou výše zmíněných zákonů do formy Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon C x$$

Zmíněný zákon tedy ukazuje, že absorbance látky závisí na jejím charakteru, koncentraci a na tloušťce měřeného vzorku.

Při opakovaném měření stejné látky při stejné vlnové délce a použití stejné kyvety jsou hodnoty ε a x stejné, proto je možné obě veličiny spojit do jediné konstanty úměrnosti k :

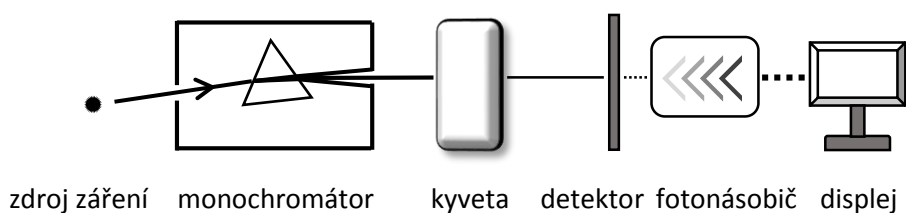
$$A = k c$$

Tyto zákony však platí obecně pouze za předpokladu, že molekuly spolu vzájemně neinteragují ani neagregují, měření je prováděno pomocí monochromatického záření a koncentrace měřené látky se pohybuje pod hranicí 10^{-2} mol/l. Vyšší koncentrace měřené

látky způsobuje ztrátu lineární závislosti v měření (18). V případě potřeby můžeme platnost Lambert-Beerova zákona ověřit pomocí kalibrační křivky vyjadřující závislost absorbance na koncentraci známé látky za předpokladu stabilní hodnoty x .

1.3.3 Konstrukce spektrofotometrů

Obecně se skládají spektrofotometry ze zdroje záření, monochromátoru, absorpčního prostředí (vzorku), detektoru a výstupního zařízení, přičemž vzorek bývá umístěn mezi detektorem a monochromátorem (obr. 8).

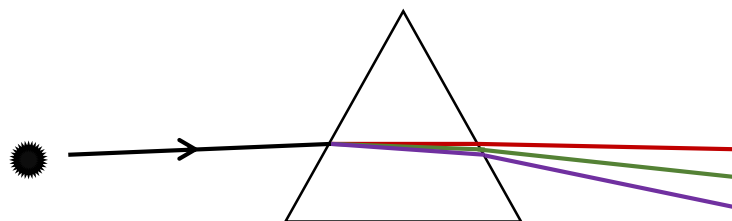


Obr. 8. Obecné schéma konstrukce absorpčního spektrofotometru

Jako zdroj záření jsou často využívány tepelné zdroje nebo výbojky. Za tepelné zdroje lze považovat tělesa rozžhavená procházejícím elektrickým proudem, žárovky s wolframovým nebo uhlíkovým vláknem a halogenové žárovky; tyto zdroje produkují záření ve viditelné nebo infračervené oblasti. Výbojky jsou v principu průhledné trubice naplněné určitým plynem. Na elektrody zavedené do trubice se vkládá napětí, což vyvolá tok elektronů a kationtů pocházejících z plynu a tím vzniká výboj. Srážky elektronů a molekul plynů vedou k ionizaci a excitaci dalších molekul. Přechod těchto molekul do základního stavu je pak spojen se zářením. Nízkotlaké výbojky (provozní tlak $< 10^2$ Pa) produkují ostré čárové spektrum a používají se ke kalibracím, středotlaké ($10^3 - 10^5$ Pa) a vysokotlaké ($> 10^5$ Pa) výbojky mají vyšší intenzitu záření a spojitě spektrum. Nejběžněji používané výbojky jsou plněny xenonem, rtutí nebo deuteriem a používají se pro měření v oblasti viditelného a blízkého UV záření. Pro měření ve vakuové UV oblasti se plní výbojky inertními plyny (19).

Polychromatické záření pocházející ze zdroje musí být před vstupem na vzorek převedeno na monochromatické záření. Rozdělení spektra záření podle vlnové délky zajišťuje monochromátor, který obsahuje tzv. rozkladný prvek, což je mřížka nebo hranol. Záření ze zdroje vstupuje do monochromátoru vstupní štěrbinou a kolimátorem je

upraveno na rovnoběžný svazek, který dopadá na hranol nebo mřížku. Záření vychází ven pod různými úhly v závislosti na vlnové délce, tedy záření o kratší vlnové délce se láme pod větším úhlem než záření s větší vlnovou délkou, pro lepší srozumitelnost viz obr. 9.



Obr. 9. Rozklad polychromatického záření v hranolu na spektrum monochromatického záření.

Rozložené záření je fokusováno pomocí kondenzoru do oblasti výstupní štěrbinou tak, aby touto štěrbinou procházelo monochromatické záření o určitém intervalu vlnových délek (velikost intervalu je zhruba 5 - 10 nm). Vlnová délka procházejícího záření je regulována vzájemnou polohou hranolu/mřížky, kondenzoru a výstupní štěrbinou, zpravidla se natáčí rozkladný prvek.

Hranol mívá zpravidla trojúhelníkovitý tvar a je vyroben z opticky transparentního materiálu nebo je vyplněný tekutinou. Lom světla je dán úhlem dopadu paprsku na hranol, indexem lomu materiálu, z kterého je hranol vyroben, a lámavým úhlem hranolu. Mřížku představuje destička z reflexního materiálu hustě pokrytá vrypy (10 – 3600 vrypů/mm), která při průchodu paprsků způsobuje jejich ohyb a odraz ústící v jejich interferenci. Monochromatické záření je produkováno nejvíce ve směru paprsků, jejichž dráhové zpoždění odpovídá celistvým násobkům vlnové délky.

Monochromatické záření prochází absorpčním prostředím, které je tvořeno rozpuštěným měřeným vzorkem v kyvetě. Kyvety mají zpravidla tvar hranolu s konstantní tloušťkou (rozmezí 0,1 – 5 cm, obvykle 1 cm) a planparalelními stěnami. Nádoby jsou vyráběny z různých materiálů, při výběru je třeba dbát, aby byl materiál propustný pro měřenou vlnovou délku. Pro měření v UV oblasti se využívá v současné době nejvíce plast propustný pro UV nebo křemenné sklo. Klasické sklo není možné použít, protože nepropouští záření o vlnové délce kratší 300 nm, využívá se tedy jen pro měření ve viditelné oblasti spektra. Součástí absorpčního prostředí je i rozpouštědlo,

u biologických makromolekul se zpravidla používá destilovaná voda, případně roztok solí o nízké koncentraci.

Detektor je obvykle spojen s elektronickým zařízením a slouží k převodu záření prošlého vzorkem na elektrický signál. Detektory jsou charakterizovány několika parametry: citlivostí, poměrem signálu a šumu, oblastí linearity a časovou odezvou. Z mnoha typů detektorů jsou ve spektrofotometrech používány převážně fotoemisní a mnohokanálové detektory. Fotodioda je jednoduchým typem fotoemisního detektoru (fotočlánek), na níž dochází k uvolňování elektronů vlivem dopadajících fotonů. Běžně používané jsou také fotonky, které fungují na principu vnějšího fotoelektrického jevu (dopadající světlo způsobuje emisi elektronů z elektrody) a vyžadují vnější napájecí zdroj. V absorpční spektrofotometrii jsou používány modré (pro záření < 600 nm) a červené (pro záření > 600 nm) fotonky. Fotonásobiče připojené za detektor pak na principu vyrážení sekundárních elektronů z dynod zvyšují poměr signálu a šumu a užívají se pro zesílení signálu u měření se slabou intenzitou záření. Signál z fotonásobiče je převáděn do výpočetního zařízení, přepočítán a na displeji je zobrazena hodnota absorbance, případně již vypočítané koncentrace vzorku. Jednoduché emisní detektory však mohou měřit pouze jednu nastavenou vlnovou délku, kterou je nutné postupně měnit. Naproti tomu mnohokanálové detektory umožňují proměření celého spektra ve stejném čase, jsou konstruovány z velkého počtu (několik set) malých fotodiod (15 – 50 μm) ve formě fotodiodových čipů (celková velikost 1 – 6 cm). Novější typy multikanálových detektorů obsahují CCD (charge-coupled device) čipy složené obvykle z 2048 součástek 14 μm širokých. Tyto čipy jsou podstatně citlivější než fotodiodové typy (20).

V souvislosti s instalovaným detektorem tedy jednodušší typy spektrofotometrů vyžadují ladění vlnové délky a měří pouze jednu vlnovou délku v daném čase, zatímco složitější přístroje proměřují celé spektrum záření najednou, většinou tedy UV nebo viditelnou oblast záření (19). Spektrofotometry jsou konstruovány jako jednopaprskové nebo dvoupaprskové. U běžnějšího jednopaprskového modelu se všechny vzorky vkládají do stejné optické dráhy, zatímco v případě dvoupaprskového typu se ve dvou optických drahách měří slepý vzorek zároveň se sledovaným vzorkem. Slepý vzorek představuje

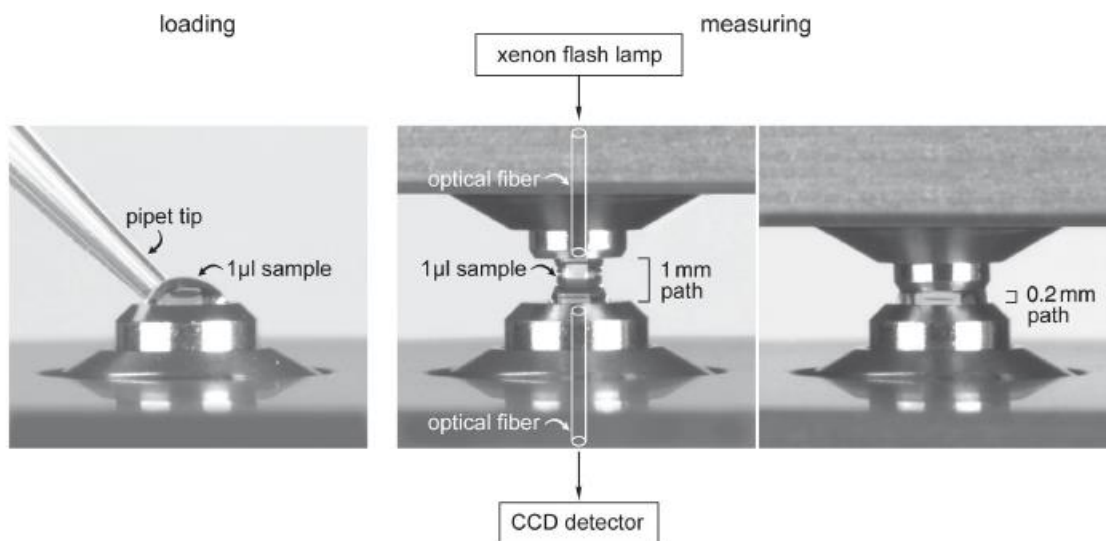
zpravidla samotné rozpouštědlo a používá se pro odečet jeho absorbance od sledované látky (tzv. „pozadí“ nebo „blank“; 21).

1.3.4 Typy spektrofotometrů

Zlatý standard v laboratořích představují klasické spektrofotometry měřící celé spektrum záření, tedy obvykle kombinaci UV a viditelné oblasti. Rozsah těchto přístrojů bývá až 190 – 1100 nm. Vzorky jsou měřeny v kyvetách, složitější přístroje mají zintegrováno i automatické podávání kyvet. Přístroje podávají přesné a dobře reprodukovatelné výsledky a poskytují univerzální využití, jejich nevýhodou je vysoká pořizovací cena, složitější a časově náročnější obsluha a nutnost použití kyvet a ředění vzorku.

Jednodušší variantu nabízí fotometry, které měří pouze několik předem definovaných vlnových délek. Výhoda těchto přístrojů spočívá v jednoduchosti, dobré skladnosti a nízké pořizovací ceně, řada těchto přístrojů má předdefinovány běžně používané metody, čímž se výrazně zjednodušuje použití personálem. Tyto přístroje ovšem nelze použít pro proměření spektra nebo optimalizaci metod závislou na změně nastavení vlnové délky.

V současné době vystupuje do popředí oblíbený typ spektrofotometru často označovaný jako „NanoDrop“ podle jména prvního výrobce. Tento přístroj měří vzorek v mikrolitrových objemech bez nutnosti užití kyvet (obr. 10). Vzorek je umístěn přímo mezi optické povrchy, které regulují výšku sloupce kapaliny (vzorku). Na tyto části přímo navazuje optické vlákno, které převádí světlo prošlé vzorkem na detektor (22). Výhoda tohoto typu spočívá ve schopnosti měření absorbance v objemu vzorku 1 μ l, navíc vzorek není nutné při měření ředit. Není též nutné používat kyvety, vzorek je v přímém kontaktu s optickými částmi a díky tomu nedochází ke zkreslování výsledku interferujícím světlem z okolního prostředí. Avšak pořizovací cena těchto modelů je poměrně vysoká.



Obr. 10. Vložení a měření vzorku v NanoDrop spektrofotometru. Převzato z Gallagher a Desjardins 2006 (22).

1.3.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin

Při spektrofotometrickém stanovení koncentrace látek se využívá absorpčního spektra a především absorpčního maxima. Absorpční spektrum je vynesení závislosti absorbance na vlnové délce. Nejvyšší hodnota absorbance se nazývá absorpční maximum. Pro měření se zpravidla využívá vlnová délka, při které studovaná látka silně absorbuje a interferující příměsi absorbují co nejméně. Tvar absorpčního spektra napomáhá identifikaci některých typů sloučenin.

Na rozdíl od měření koncentrace proteinů měření koncentrace nukleových kyselin nevyžaduje kalibraci měření metodou kalibrační křivky (molární absorpční koeficient ani velikost květy se nemění). Absorpční maximum nukleových kyselin se nachází v oblasti záření 260 nm, tedy v oblasti UV záření, proto se pro stanovení koncentrace nukleových kyselin používá metoda UV spektrofotometrie. Detailní informaci o absorpčním maximu jednotlivých nukleosidů přináší tabulka 1.

Tabulka 1. Absorpční maxima nukleosidů

Nukleosid	Absorpční maximum (nm)
adenosin	267
guanosin	248
cytidin	271
thymidin	267
uridin	262

Molární absorpční koeficient nukleových kyselin je známý (pro ds-DNA $0.020 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$, ss-DNA $0.027 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$, RNA $0.025 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$), proto je možné při standardním měření absorbance nukleových kyselin zředěných ve vodném roztoku vycházet z obecně užívaného vztahu bez použití kalibrace:

$A = 1$ odpovídá koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA

$A = 1$ odpovídá koncentraci 37 $\mu\text{g/ml}$ ssRNA

$A = 1$ odpovídá koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA

$A = 1$ odpovídá koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ oligonuklotidů

Koncentrace se tedy odvozuje přímou úměrou ze zmíněného vztahu pomocí absorbance rozpuštěného vzorku naměřené při 260 nm, pro názornost viz. příklad:

$A = 1$ 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA

$A_{\text{vzorek}} = 0,25$ x $\mu\text{g/ml}$ RNA

$$A_{\text{vzorek}}/A = x/40$$

$$x = 0,25/1 \cdot 40$$

$$\mathbf{x = 10 \mu\text{g/ml RNA}}$$

Při měření se obvykle zaznamenávají hodnoty absorbance v dalších dvou vlnových délkách, a to v 280 nm a 230 nm. Tyto údaje pomáhají stanovit množství kontaminantů ve vzorku. Poměr absorbancí při vlnových délkách 260 nm/280 nm by se měl pohybovat nad hranicí 1,8 pro DNA a v rozmezí 1,8 – 2 pro RNA (23). Poměr nižší než 1,75 ukazuje na kontaminaci proteiny, případně fenolem, který za určitých okolností absorbuje i při

270 nm (např. roztok TRI-solu a TriReagentu nebo fenol v ethanolu) a částečně se promítá i do hodnoty absorbance v 280 nm. Nukleotidy samy o sobě mají však velmi rozdílný poměr absorbancí 260/280 nm (viz. tabulka 2; 24), proto hodnota tohoto poměru u vzorků s nerovnoměrným zastoupením nukleotidů může být výrazně změněna tímto faktem, nikoli kontaminací. Výrazný rozdíl mezi poměrem pro thymin a poměrem pro uracil je důvodem vyšší hodnoty poměru 260/280 u RNA obecně. Zatímco v 260 nm je absorbance nukleových kyselin ve fázi plató a malá odchylka v řádu 1 nm naměřenou hodnotu příliš nezmění, v oblasti 280 nm i tak malá odchylka může výrazně změnit hodnotu absorbance, jelikož zde absorpční křivky strmě klesají. Proto se mohou hodnoty poměru 260/280 stejného vzorku měřené na dvou rozdílných přístrojích výrazně lišit až o 0,4. Navíc tento poměr může být ovlivněn i hodnotu pH měřeného roztoku, jak dokazuje změna poměru 260/280 u RNA z 1,5 na 2,0 způsobená zvýšením pH z hodnoty 5,4 na hodnoty 7.5-8.5 přidávkem 1-3 mM Na₂HPO₄ (25).

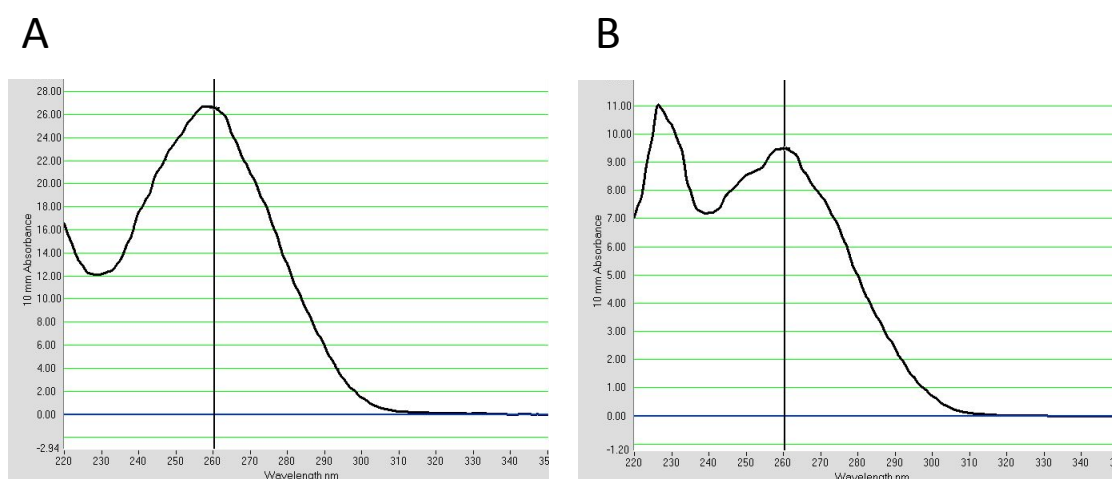
Tabulka 2. Hodnoty poměru 260/280 pro jednotlivé nukleotidy.

Nukleotid	Poměr 260/280
guanin	1,15
adenin	4,50
cytosin	1,51
uracil	4,00
thymin	1,47

Poměr vlnových délek 260 nm/230 nm vyjadřuje kontaminaci některými rozpouštědly použitými při izolačním postupu, např. fenolem (izolace RNA) nebo guanidinem-HCl (izolace DNA). Obecně se považuje za hraniční hodnotu poměru 260/230 u čistých vzorků číslo 1,5 pro DNA a 2,0 pro RNA. Nižší hodnoty poměru ukazují na kontaminaci fenolem, který má absorpční maximum při 211 nm a silně absorbuje i při 230 nm, případně guanidinem-HCl, který absorbuje při 230 nm (26). V oblasti 230 nm absorbují také sacharidy a EDTA.

Určité riziko v přesnosti měření představuje kontaminace guanidin thiokyanátem, který absorbuje při 230 nm i při 260 nm a falešně tak navyšuje absorpční maximum nukleových kyselin (27). Sloučenina se používá k lyzaci buněk při izolaci RNA.

Pro kontrolu správnosti měření a kvality vzorku napomáhá zobrazení celého absorpčního spektra vzorku. Tvar a hladkost křivky nám může napovědět, zda změřená hodnota absorbance skutečně náleží nukleové kyselině nebo kontaminaci (obr. 11).



Obr. 11. Absorpční spektrum RNA. Nukleové kyseliny mají absorpční maximum v 260 nm a charakteristický pokles absorbance v 230 nm. (A) Vzorek čisté RNA – křivka má hladký průběh s maximem v 260 nm. (B) Vzorek RNA kontaminované fenolem – fenol silně absorbuje v 230 nm a částečně v 270 nm – díky interferenci fenolu má vzorek v 230 nm vyšší absorbanci než čistá RNA. V 270 nm se vytváří „hrb“ vlivem fenolu.

2 Cíle práce

Tato práce si klade za úkol nalezení optimálních podmínek pro izolaci RNA, za kterých bude získáno dostatečné množství kvalitní RNA vhodné pro následnou analýzu genové exprese.

Specifické cíle jsou:

- srovnání postupů izolace RNA určené pro následnou reversní transkripci s ohledem na výtěžek a čistotu izolované RNA ve vztahu k množství zdrojového biologického materiálu (srovnání izolace kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform a extrakce na pevné fázi, celkové porovnání sedmi komerčních produktů)
- porovnání kvality měření dvou spektrofotometrických přístrojů (Nanodrop ND-1000 od firmy NanoDrop Technologies a BioPhotometer od firmy Eppendorf) v parametrech přesnosti měření koncentrace a čistoty RNA, rychlosti měření, minimálního objemu vzorku nezbytného pro měření a výpočetní hodnoty výstupních dat přístroje.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

2-merkaptoethanol	<i>Sigma, USA</i>
2-propanol	<i>Merck, USA</i>
accutase	<i>Millipore, USA</i>
deionizovaná voda pro molekulární biologii bez RNáz a DNáz	<i>Ambion, Life Technologies, USA</i>
D-MEM	<i>Gibco, Life Technologies, USA</i>
ethanol pro molekulární biologii	<i>Merck, USA</i>
fetální bovinní sérum	<i>PAA Laboratories, GE Healthcare, USA</i>
chloroform	<i>Sigma, USA</i>
insulin-transferrin-selenium	<i>Gibco, Life Technologies, USA</i>
Liberase TM	<i>Roche Diagnostics GmbH, Německo</i>
neesenciální aminokyseliny	<i>Gibco, Life Technologies, USA</i>
PBS	<i>Gibco, Life Technologies, USA</i>
penicillin/streptomycin	<i>Gibco, Life Technologies, USA</i>
RNase-Free DNase Set	<i>Qiagen, Nizozemí</i>
TRI Reagent Solution	<i>Ambion, Life Technologies, USA</i>

3.2 Izolační soupravy

NucleoSpin RNA II	<i>Macherey-Nagel, Německo</i>
NucleoSpin RNA XS	<i>Macherey-Nagel, Německo</i>
RNeasy Micro Kit	<i>Qiagen, Nizozemí</i>
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen, Nizozemí</i>
ZR RNA MicroPrep	<i>Zymo Research, USA</i>
ZR RNA MiniPrep	<i>Zymo Research, USA</i>

3.3 Přístrojové vybavení

centrifuga Eppendorf Centrifuge 5417R (*Eppendorf, Německo*)

fotometr BioPhotometer 8,5 mm (*Eppendorf-Netheler-Hina GmbH, Německo*)

inkubátor vzorků Block heater Stuart SBH130D (*Barloworld Scientific Limited, Velká Británie*)

kyvety UVette (*Eppendorf, Německo*)

pipety Eppendorf Research (*Eppendorf, Německo*)

software NanoDrop 1000 3.7 (*NanoDrop Technologies, USA*)

spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies, USA*)

vortex Genie 2 (*Scientific Industries, INC., USA*)

3.4 Příprava biologického materiálu

3.4.1 Kultivace buněk

Kultury mesenchymálních stromálních buněk byly připraveny derivací z pupečnickové tkáně koně pomocí směsi purifikovaných trávicích enzymů komerčně dostupných pod názvem Liberase TM. Primární buněčné kultury byly kultivovány v mediu složeném z D-MEM, 10% fetálního bovinního séra, neesenciálních aminokyselin, insulin-transferrin-selenium přídatku a antibiotik penicillin/streptomycin. Kultury byly udržovány v atmosféře 5% CO₂, 95% vlhkosti a při 37°C. Pasáž konfluentních kultur byla prováděna accutasou po oplachu PBS.

3.4.2 Sklizení vzorků

Po pasáži accutasou byl stanoven počet buněk ve vzorku pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Buňky určené pro izolaci RNA byly centrifugovány 4 minuty při 300xg, supernatant byl odebrán a peleta buněk byla zamrazena a uchovávána v -80°C do doby zpracování.

3.4.3 Příprava ředící řady RNA

Lyofilizovaná poly-A RNA od výrobce (součást izolační soupravy RNeasy Micro Kit) byla rozpuštěna ve vodě na koncentraci 1280 µg RNA/ml. Vzniklý roztok byl dále ředěn vodou na koncentrace: 640 µg/ml, 320 µg/ml, 160 µg/ml, 80 µg/ml, 20 µg/ml a 5 µg/ml. V průběhu ředění a měření byla rozpuštěná RNA uchovávána při 4°C.

3.5 Izolace RNA

3.5.1 Izolace kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform

Izolace RNA byla provedena podle instrukcí od výrobce. K rozmražené peletě buněk byl přidán 0,5 ml TRI Reagent Solution. Vzorek byl vortexován 30 vteřin a poté inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Ke vzorku bylo přidáno 75 µl chloroformu, vzorek byl následně vortexován 30 vteřin a inkubován 5-10 minut při pokojové teplotě. Vzorek byl centrifugován při 12 000xg 15 minut při 4°C. Z horní vodné fáze vytvořené centrifugací bylo odebráno 200 µl vzorku tak, že se špička nedotkla mezifáze. RNA byla precipitována přidáním 250 µl 2-propanolu ke vzorku, vzorek byl promíchán a inkubován 5-10 minut při pokojové teplotě. Vzorek byl centrifugován při 12 000xg 10 minut při 4°C, supernatant byl odebrán, peleta byla omyta 1 ml 75% ethanolu a centrifugována při 7500xg 5 minut při 4°C. Po odebrání supernatantu byla peleta vysušena volně proudícím vzduchem a rozpuštěna v 30 µl deionizované vody pro molekulární biologii. Pro dosažení úplného rozpuštění byl vzorek inkubován 10 minut při 60°C a poté zchlazen na 4°C.

3.5.2 Extrakce na pevné fázi

RNA byla extrahována ze vzorků pomocí šesti komerčních souprav vždy podle instrukcí od výrobce. Soupravy obsahovaly kolony s pevnou fází a roztoky na lyzaci, promývání a eluci vzorků. Celý postup byl prováděn při pokojové teplotě, eluovaná RNA byla ihned zchlazena na 4°C. Pokud není uvedeno jinak, aplikovaný roztok DNázy byl připraven rozpuštěním lyofilizované DNázy (1500 U) v 550 µl vody a následným ředěním 8x v roztoku „RDD“. Ve všech případech byla pro eluci použita vysoce čistá deionizovaná voda zbavená RNáz a DNáz.

Při použití NucleoSpin RNA II soupravy byla rozmražená peleta buněk lyzována v 350 µl lyzačního roztoku „RA1“ obsahujícím 1% 2-merkptoethanol. Vzorek byl vortexován 30 vteřin a centrifugován přes kolonu „NucleoSpin Filter“ při 11 000xg 1 minutu pro snížení viskozity vzorku. Následně bylo ke vzorku přidáno 350 µl 70% ethanolu, vzorek byl promíchán a aplikován na „NucleoSpin RNA II Column“ kolonu, která byla centrifugována při 11 000xg 1 minutu. Kolona byla omyta 350 µl MDB pufru a centrifugována při 11 000xg 1 minutu. Lyofilizovaná DNáza dodaná jako součást soupravy byla rozpuštěna podle návodu. Roztok DNázy byl dále 10x naředěn roztokem „Reaction Buffer for rDNase“, 95 µl ředěného roztoku DNázy bylo aplikováno na kolonu a inkubováno 20 minut. Kolona byla omyta 200 µl pufru „RA2“ a centrifugována při 11 000xg 1 minutu. Stejným postupem byla kolona omyta 600 µl a poté 250 µl pufru RA3. Na pevnou fázi kolony bylo aplikováno 60 µl vody a inkubováno 5 minut. RNA byla eluována z kolony centrifugací při 11 000xg 1 minutu.

Při použití NucleoSpin RNA XS soupravy byl postup izolace obdobný postupu popsaném pro NucleoSpin RNA II pouze s rozdílem v použitých objemech roztoků: pelety buněk byly lyzovány v 200 µl pufru „RA1“ obsahujícím 0,28% TCEP, ke vzorku bylo přidáno 200 µl 70% ethanolu, kolona byla omyta 100 µl „MDB“ pufru a následně bylo aplikováno 25 µl ředěné DNázy. Kolona byla omyta 100 µl pufru „RA2“ a 400 µl a 200 µl pufru „RA3“, RNA byla eluována 15 µl vody.

Vzorek izolovaný soupravou RNeasy Mini Kit byl lyzován v 550 µl pufru „RLT“ obsahujícím 1% 2-merkptoethanol, vortexován 30 vteřin a inkubován 10 minut. Po přidání 550 µl 70% ethanolu a promíchání byl vzorek aplikován na kolonu „RNeasy column“ a centrifugován při 10 000xg 1 minutu. Kolona byla omyta 350 µl pufru „RW1“, na kolonu bylo aplikováno 80 µl roztoku DNázy a inkubováno 20 minut. Kolona byla omyta 400 µl pufru „RW1“ a 500 µl pufru „RPE“, vždy pomocí centrifugace při 10 000xg 1 minutu. Kolona byla následně omyta 500 µl pufru „RPE“ a centrifugována při 10 000xg 2 minuty, poté byla kolona v suché zkumavce opět centrifugována při 18 000xg 1 minutu. Na kolonu bylo aplikováno 30 µl vody a inkubováno 5 minut, RNA byla eluována centrifugací při 10 000xg 1 minutu.

Izolace soupravou RNeasy Micro Kit probíhala podle stejného postupu jako izolace soupravou RNeasy Mini Kit s následujícími rozdíly: použitá kolona „RNeasy MinElute spin column“ byla místo druhého oplachu pufrům „RPE“ opláchnuta 80% ethanolem a kolona v suché zkumavce byla centrifugována při 18 000xg 5 minut. RNA byla eluována 15 μ l vody.

Izolační postup soupravou ZR RNA MiniPrep zahrnoval lyzaci pelety buněk v 400 μ l pufru „RNA Lysis Buffer“, vortexování 30 vteřin a následnou centrifugaci vzorku při 12 000xg 1 minutu. Supernatant byl aplikován na kolonu „Zymo-Spin IIC Column“ a centrifugován při 10 000xg 1 minutu. K proteklé frakci bylo přidáno 320 μ l 96% ethanolu a promícháno. Vzorek byl aplikován na kolonu „Zymo-Spin IIC Column“ a centrifugován při 12 000xg 1 minutu. Kolona byla omyta 400 μ l pufrům „RNA Wash Buffer“ a centrifugována při 12 000xg 1 minutu. Následně bylo na kolonu aplikováno 80 μ l DNázy ředěné v pufru „RNA Wash Buffer“ místo pufru „RDD“ a inkubováno 20 minut. Kolona byla centrifugována při 12 000xg 1 minutu, opláchnuta 400 μ l pufru „RNA Prep Buffer“ a následně 800 μ l a 400 μ l pufru „RNA Wash Buffer“, po každém oplachu byla provedena centrifugace při 12 000xg 1 minutu. Poté byla kolona opět centrifugována v prázdné zkumavce při 12 000xg 2 minuty. Na kolonu bylo aplikováno 30 μ l vody a inkubováno 5 minut. RNA byla eluována centrifugací při 12 000xg 1 minutu.

Izolační postup soupravou ZR RNA MicroPrep se shodoval s postupem užitým pro ZR RNA MiniPrep s několika rozdíly: na kolonu bylo aplikováno 30 μ l ředěné DNázy, RNA byla eluována 15 μ l vody.

3.6 Spektrofotometrické měření

3.6.1 Spektrofotometr NanoDrop ND-1000

Při spuštění byl spektrofotometr NanoDrop ND-1000 připojen k počítači, optické plochy byly očištěny vlhkým ubrouskem a následně na ně bylo pipetováno 1,3 μ l vody. Software NanoDrop 1000 3.7 byl spuštěn a přístroj inicializován. Ve výběru metod byla zvolena varianta měření RNA. Poté byla na optické části opět aplikována voda a měřena jako slepý vzorek. Následně byly měřeny jednotlivé vzorky, vždy s nanáškou na přístroj

1,3 μ l. Změřené vzorky byly otírány ubrouskem. Data na konci měření byla exportována ve formátu „full report“ pro zachování celého měřeného spektra.

3.6.2 Fotometr BioPhotometer Eppendorf

Po zapnutí přístroje byla zvolena metoda měření RNA. Slepý vzorek a vzorky RNA byly měřeny v plastové kyvetě v celkovém objemu 60 μ l. Pro měření všech vzorků izolovaných jednou soupravou byla vždy použita stejná kyveta, která byla mezi vzorky proplachována vodou. Vzorky byly pro měření ředěny vodou v různých poměrech podle své koncentrace. Hodnoty měřené koncentrace a absorbance v 230, 260, 280 a 320 nm byly zapisovány ručně.

3.6.3 Zpracování dat

Data byla zpracována v softwaru Microsoft Office Excel. Statistická analýza dat byla provedena v softwaru GraphPad Prism 6.0 pomocí Wilcoxonova neparametrického párového testu.

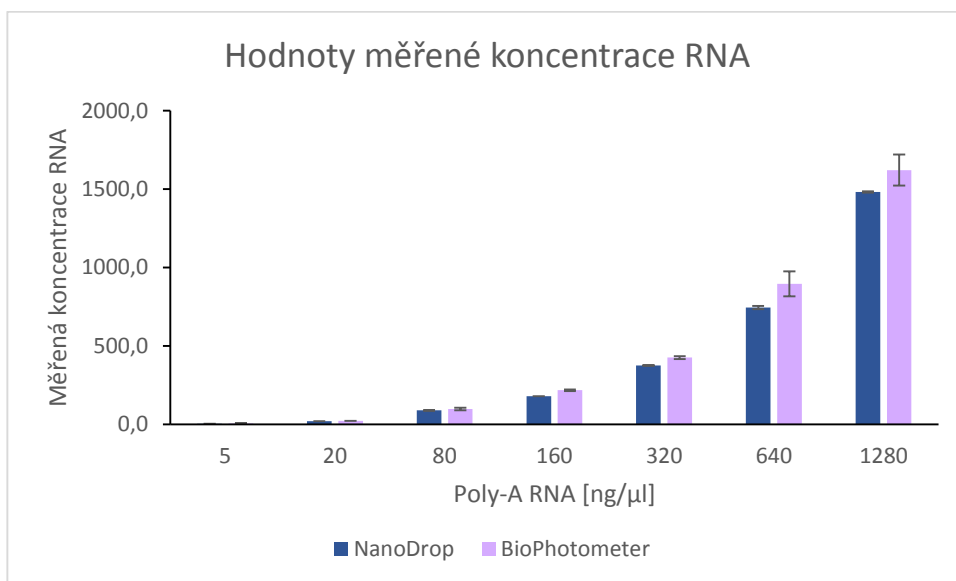
4 Výsledky

Cílem studie byla optimalizace přípravy RNA pro následnou analýzu genové exprese metodou RT-PCR. Zmíněná technika vyžaduje purifikovanou RNA o vysoké čistotě a přesně určené koncentraci. Pro tento účel byly porovnány dva spektrofotometrické přístroje v parametrech přesnosti měření koncentrace a čistoty RNA a ve výpovědní hodnotě měřených dat. Testovány byly přístroje NanoDrop ND-1000 a BioPhotometer Eppendorf (dále jen NanoDrop a BioPhotometer).

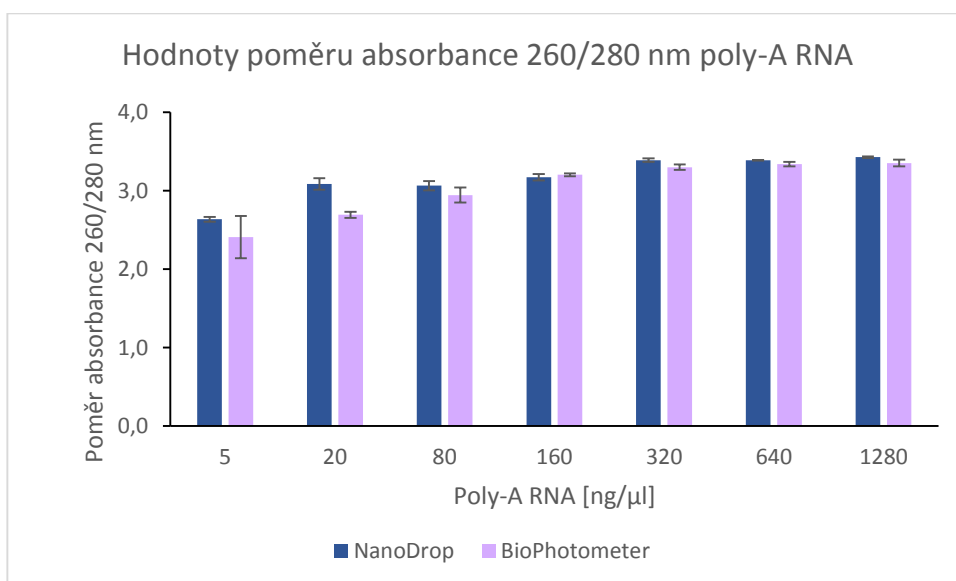
4.1 Srovnání měřících přístrojů

Srovnání bylo provedeno na ředící řadě připravené rozpuštěním lyofilizované poly-A RNA ve vodě na přibližnou koncentraci 1280 ng/μl. Ředící řada obsahovala vzorky o přibližné koncentraci 1280 ng/μl, 640 ng/μl, 320 ng/μl, 160 ng/μl, 80 ng/μl, 20 ng/μl, 5 ng/μl. Každý vzorek byl proměřen čtyřikrát oběma přístroji pro stanovení chyby měření. Statistická analýza provedená pomocí Wilcoxonova párového testu ukázala, že odchylky měření koncentrace poly-A RNA se mezi oběma přístroji na hladině významnosti 0,05 statisticky významně lišily (variační koeficient měření 0.01986 ± 0.0131 a 0.06623 ± 0.01809 pro přístroj NanoDrop, resp. BioPhotometer). Hodnoty měřené přístrojem BioPhotometer vykazovaly větší chybu měření než hodnoty získané přístrojem NanoDrop (obr. 12). Hrubá data měření jsou uvedena v příloze 1, číselné hodnoty měření použité v grafu jsou zobrazeny v příloze 2.

Statistická analýza hodnot poměru absorbancí 260/280 nm neukázala v tomto parametru statisticky významný rozdíl mezi odchylkami měření obou přístrojů (obr. 13). Číselné hodnoty měření jsou zobrazeny v příloze 3.

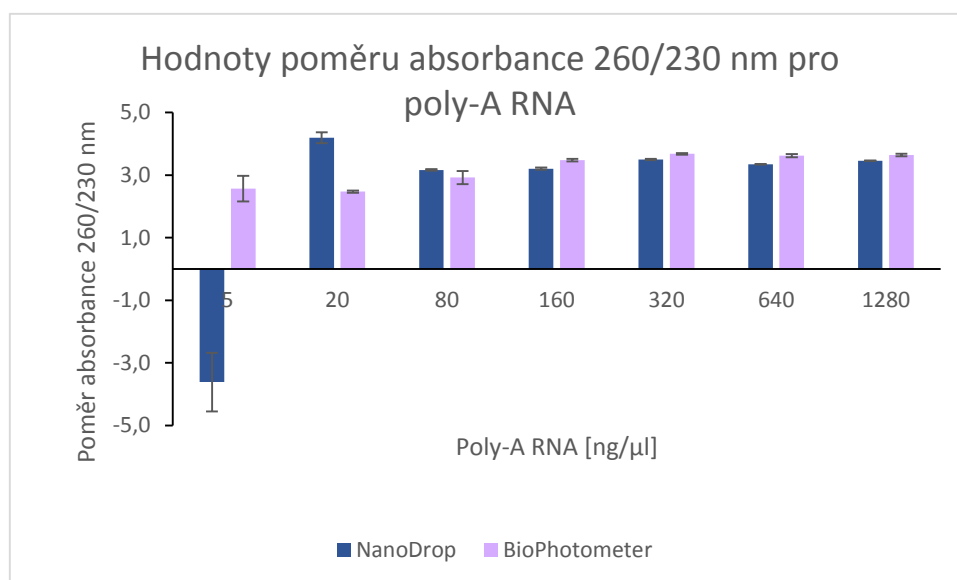


Obr. 12. Srovnání průměrných hodnot koncentrace RNA měřených přístroji NanoDrop a BioPhotometer ve vzorcích ředící řady poly-A RNA. V grafu zobrazeny směrodatné odchylky hodnot.



Obr. 13. Srovnání průměrných hodnot poměru absorbancí 260/280 nm RNA měřených přístroji NanoDrop a BioPhotometer ve vzorcích ředící řady poly-A RNA. V grafu zobrazeny směrodatné odchylky hodnot.

Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi odchylkami měření obou přístrojů v parametru poměru absorbancí 260/230 nm (obr. 14). Měřené hodnoty tohoto poměru se pohybovaly v rozmezí 2,5 – 4,2 s výjimkou měření nejméně koncentrovaného vzorku přístrojem NanoDrop, který měl zápornou hodnotu poměru. Číselné hodnoty měření jsou zobrazeny v příloze 4.

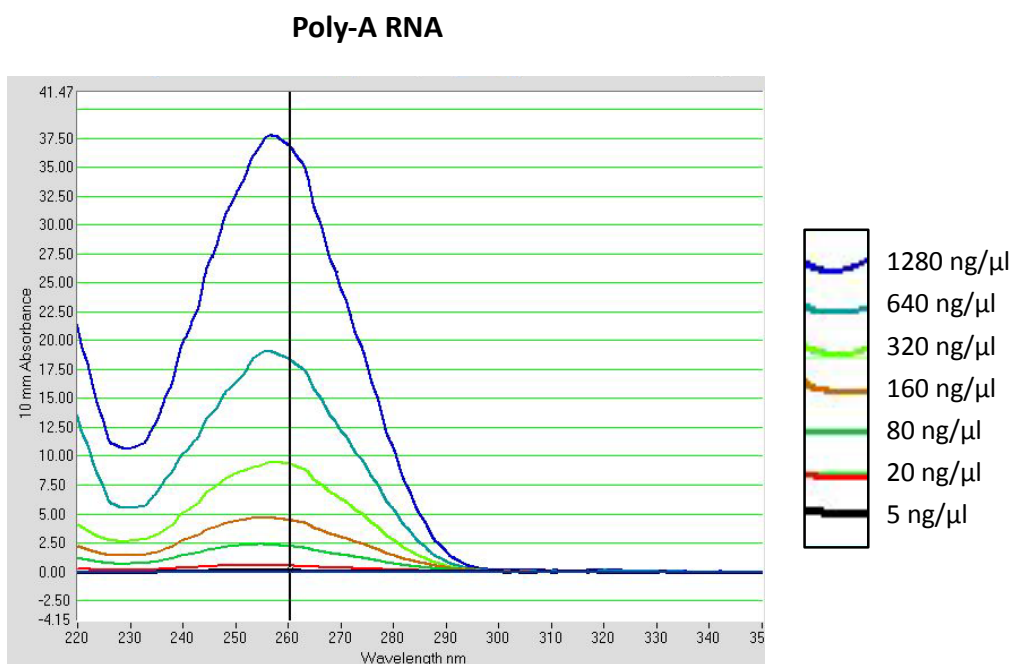


Obr. 14. Srovnání průměrných hodnot poměru absorbancí 260/230 nm RNA měřených přístroji NanoDrop a BioPhotometer ve vzorcích ředící řady poly-A RNA. V grafu zobrazeny směrodatné odchylky hodnot.

Srovnání časové náročnosti měření provedeného na přístrojích ukázalo výrazný rozdíl. Průměrná doba měření deseti vzorků na přístroji BioPhotometer trvala zhruba 23 minut, zatímco měření stejného počtu vzorků na přístroji NanoDrop trvalo zhruba 7 minut.

Objem vzorku použitý pro měření byl u přístroje NanoDrop konstantně 1,3 μl, zatímco u přístroje BioPhotometer se pohyboval v rozmezí 2,5 – 10 μl v závislosti na koncentraci RNA ve vzorku. Vzorky RNA byly pro účely měření ředěny tak, aby jejich absorpance spadala do měřicího rozsahu přístroje.

Přístroj NanoDrop umožňuje měření celého spektra vlnových délek v rozsahu 220-350 nm. Tato funkce byla využita pro zobrazení absorpčních křivek vzorků poly-A RNA použitých pro srovnání měření přístrojů (obr. 15).



Obr. 15. Absorpční křivky vzorků poly-A RNA měřené přístrojem NanoDrop.

4.2 Srovnání metodických postupů izolace RNA

Ve studii byly porovnány postupy izolace RNA za účelem získání maximálního výtěžku a čistoty purifikované RNA. Pro testování byly vybrány techniky izolace RNA kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform a extrakce na pevné fázi z důvodu rychlosti, robustnosti a jednoduchého technického provedení. Izolace kombinací denaturujících chemikálií byla provedena roztokem dostupným pod komerčním názvem TRI Reagent Solution (výrobce Ambion). Postup extrakce na pevné fázi byl testován šesti komerčními soupravami: NucleoSpin RNA II a NucleoSpin RNA XS (výrobce Macherey-Nagel), RNeasy Mini Kit a RNeasy Micro Kit (výrobce Qiagen) a ZR MiniPrep a ZR MicroPrep (výrobce Zymo Research). Popsané soupravy se řadí do dvou kategorií podle maximálního vazebného limitu kolony podle výrobce – uvedeno v závorce. Do kategorie „mini“ spadají soupravy: NucleoSpin RNA II (200 μg), RNeasy Mini Kit (100 μg) a ZR MiniPrep (25 μg), kategorie „micro“ obsahuje soupravy NucleoSpin RNA XS (110 μg), RNeasy Micro Kit (45 μg) a ZR MicroPrep (5 μg).

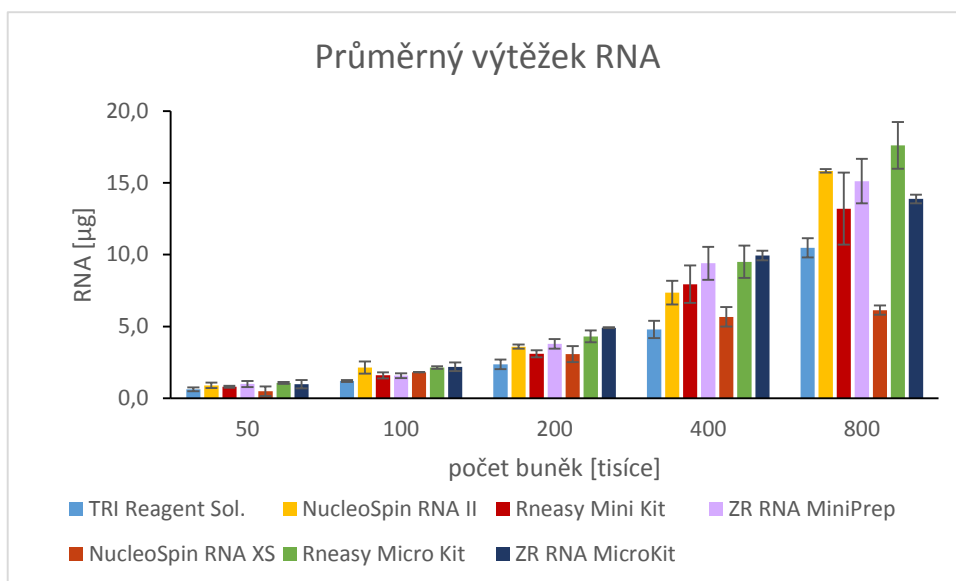
Testování izolace RNA bylo provedeno na mesenchymálních stromálních buňkách (MSC) izolovaných z tkáně koňského pupečníku. Po enzymatické digesci byly derivované primární kultury kultivovány *in vitro*. Pro porovnání výtěžků jednotlivých izolačních postupů bylo připraveno osmnáct sad vzorků obsahujících 50 000, 100 000, 200 000, 400 000 a 800 000 MSC. Pro každý typ testovaného postupu a soupravy byly použity kompletní sady buněčných vzorků, postup izolace RNA kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform a postup extrakce RNA soupravou NucleoSpin RNA II, RNeasy Mini Kit a ZR MiniPrep byl testován na třech sadách buněčných vzorků, zatímco extrakce soupravou NucleoSpin RNA XS, RNeasy Micro Kit a ZR MicroPrep byla testována pouze na dvou sadách z finančních důvodů.

Ve vzorcích purifikované RNA byla změřena její koncentrace a čistota spektrofotometricky a ze získaných hodnot byl vypočítán celkový výtěžek pro daný počet buněk. Originální hrubá data měření jsou uvedena v příloze 5 a 6.

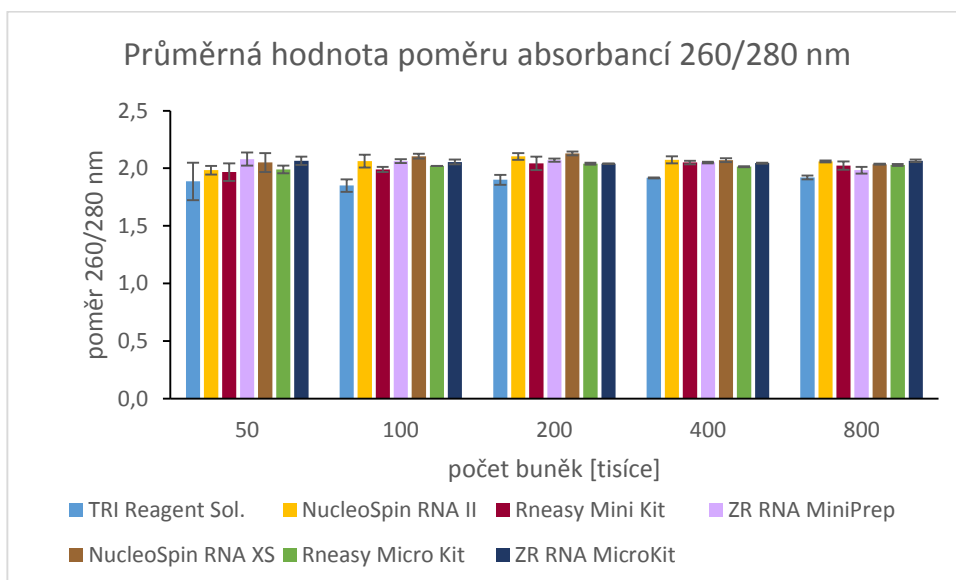
Z porovnávaných postupů izolace RNA vykazuje vesměs nejvyšší výtěžky souprava ZR MicroPrep kromě vzorku z nejvyššího množství buněk (800 000 buněk, obr. 16). V pořadí druhý nejvyšší výtěžek vykazuje souprava RNeasy Micro Kit, která ovšem dosahuje nejvyššího výtěžku ve vzorku z nejvyššího množství buněk. V pořadí třetí se v celkovém průměrném výtěžku umístila souprava ZR MiniPrep. Nejnižších výtěžků dosáhl postup izolace pomocí TRI Reagent Solution.

Přesné číselné hodnoty průměrných výtěžků jednotlivých vzorků ze všech postupů včetně hodnot standardních odchylek jsou uvedeny v příloze 7.

Průměrné hodnoty poměru absorbancí 260/280 nm dosáhly u všech vzorků extrahovaných na pevné fázi hranice 2,0. Pouze vzorky izolované pomocí TRI Reagent Solution dosáhly hodnoty poměru 260/280 nm 1,9 (obr. 16). Číselné hodnoty tohoto parametru a směrodatné odchylky jsou zaznamenány v příloze 8.

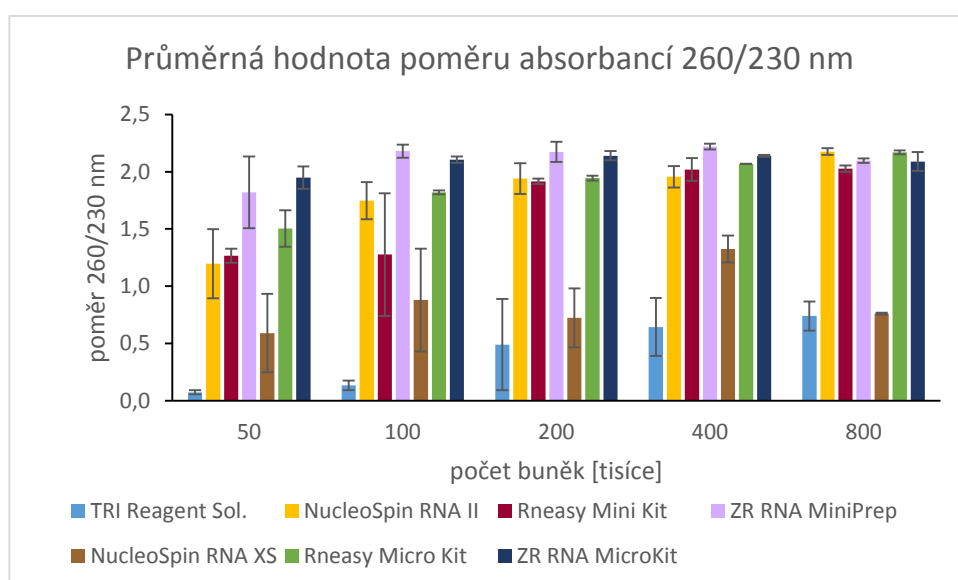


Obr. 16. Průměrný výtěžek RNA u jednotlivých izolačních postupů v závislosti na počtu buněk ve vzorku. Uvedené hodnoty byly měřeny pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000. V grafu zobrazeny směrodatné odchylky hodnot.



Obr. 16. Průměrná hodnota poměru absorbcí 260/280 nm RNA purifikované testovanými izolačními postupy z buněčných vzorků. Uvedené hodnoty byly měřeny pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000. V grafu zobrazeny směrodatné odchylky hodnot.

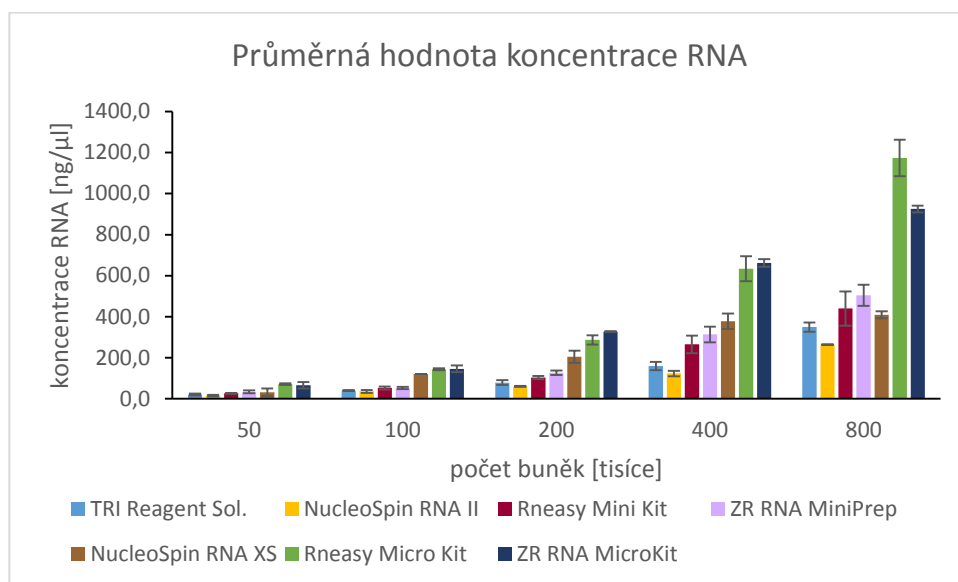
V průměrných hodnotách poměru absorbancí 260/230 nm purifikované RNA z buněčných vzorků se jednotlivé izolační postupy významně liší (obr. 17). Soupravy ZR RNA MiniPrep a ZR RNA MicroPrep vykazují průměrnou hodnotu 260/230 nm > 2,0 u většiny vzorků kromě vzorku s nejnižším počtem buněk (50 000 buněk), zatímco soupravy NucleoSpin RNA II a RNeasy Mini Kit dosahují průměrné hodnoty 2,0 pouze u vzorků s vyšším počtem buněk (400 000 buněk a 800 000 buněk). Vzorky RNA izolované pomocí TRI Reagent Solution a NucleoSpin RNA XS vykazují nízkou hodnotu poměru < 1,4. Číselné hodnoty tohoto parametru a směrodatné odchylky jsou zaznamenány v příloze 9.



Obr. 17. Průměrná hodnota poměru absorbancí 260/230 nm RNA purifikované testovanými izolačními postupy z buněčných vzorků. Uvedené hodnoty byly měřeny pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000. V grafu zobrazeny směrodatné odchylky hodnot.

Průměrná hodnota koncentrace izolované RNA se liší především mezi vzorky izolovanými „mini“ a „micro“ kategorií souprav. Sady vzorků pocházející z izolace sadou „micro“ souprav (NucleoSpin RNA XS, RNeasy Micro Kit a ZR RNA MicroPrep) přesahují hraniční hodnotu koncentrace RNA 100 ng/μl již ve vzorcích z 100 000 buněk, zatímco sady vzorků ze souprav v kategorii „mini“ přesahují tuto hodnotu koncentrace ve vzorcích 200 000 buněk (RNeasy Mini Kit a ZR RNA MiniPrep) nebo případně až

400 000 buněk (NucleoSpin RNA II), stejně tak i v případě TRI Reagent Solution (obr. 18). Číselné hodnoty tohoto parametru a směrodatné odchylky jsou zaznamenány v příloze 10.



Obr. 18. Průměrná hodnota poměru absorbancí 260/230 nm RNA purifikované testovanými izolačními postupy z buněčných vzorků. Uvedené hodnoty byly měřeny pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000. V grafu zobrazeny směrodatné odchylky hodnot.

Oproti přístroji BioPhotometer měří přístroj NanoDrop navíc celé spektrum vlnových délek v oblasti blízkého UV záření. Tato funkce byla využita pro zobrazení absorpčních křivek jednotlivých vzorků, viz příloha 11.

5 Diskuze

Studie se zabývá optimalizací přípravy RNA jakožto templátu pro následnou analýzu genové exprese mesenchymálních stromálních buněk derivovaných z tkáně koňského pupečníku pomocí metodiky RT-PCR. Tento metodický přístup vyžaduje zhodnocení dvou základních bodů projektu: množství a čistoty izolované RNA a přesnosti stanovení těchto hodnot.

Čistotu izolované RNA je možno stanovit několika postupy, spektrofotometrické metody jsou však nejvíce využívanými technikami vzhledem k časové a finanční nenáročnosti a přesnosti ve srovnání s použitím RNA čipů nebo separací izolované RNA v agarosovém gelu za denaturačních podmínek (28).

V současné době se ve stále větší míře používají spektrofotometry s moderní konstrukcí zahrnující převod záření optickými vlákny. Do studie bylo proto zahrnuto porovnání několika parametrů dvou typů spektrofotometrů – fotometru BioPhotometer s klasickou konstrukcí měření v kyvetách a spektrofotometru NanoDrop s konstrukcí měření vzorku mezi optickými plochami. Srovnávané parametry se týkaly chyby měření, rychlosti měření, minimálního objemu vzorku nutného pro měření a výpočetní hodnoty získaných dat.

Chyba měření byla stanovena jako směrodatná odchylka průměrné hodnoty získané opakovaným měřením stejného vzorku. Parametr byl zjišťován pro stanovení koncentrace jakožto i pro stanovení poměru absorbancí 260/280 nm a 260/230 nm, které určují čistotu RNA. Pro testování byla použita koncentrační řada vzniklá ředěním komerčně získané poly-A RNA. Statistická analýza prokázala statisticky významný rozdíl v odchylce měření koncentrace RNA mezi oběma přístroji, přičemž chyba měření byla větší u přístroje BioPhotometer. Rozdíl v chybě měření poměrů absorbancí 260/280 nm a 260/230 nm mezi přístroji byl statisticky významný. Větší chyba měření přístroje BioPhotometer je z části dána zřejmě samotnou konstrukcí. Možné zdroje chyb u měření v kyvetách pocházejí především z kyvety samotné. Měření je ovlivněno optickou kvalitou materiálu, z kterého je kyveta vyrobena. Častým problémem jsou vrypy a škrábance na skleněných kyvetách, případně nedokonalosti výlisu u plastových kyvet. Pro správné

měření musí mít květy přesně definovanou tloušťku. Dále může být měření zneřádněno díky rozptylu světla dopadajícího na prachové částice na povrchu květy (špinavé květy), případně přímo uvnitř vzorku, a také díky odrazu světla na stěně květy (29). Podstatná část chyby měření je však pravděpodobně způsobena nutností ředění vzorku při měření, které při sebepečlivější práci nikdy není absolutně přesné.

Měřené hodnoty poměru absorbcí 260/280 nm a 260/230 nm u vzorků poly-A RNA byly nezvykle vysoké – pohybovaly se v rozmezí 2,5 – 3,7. Hodnoty těchto poměrů jsou u buněčné RNA zpravidla 1,8 – 2, přičemž přítomnost kontaminantů ve vzorku hodnotu poměru snižuje. Možným vysvětlením tohoto jevu je nukleotidové složení testované RNA. Poly-A RNA je složena z jednoho typu nukleotidu – adeninu. Adenin má však vysokou absorbcí v 260 nm a jeho poměr absorbcí 260/280 nm nabývá hodnoty 4,5 (24). Případná technická chyba měření byla vyloučena faktem, že nezvyklé hodnoty byly měřeny ve všech vzorcích poly-A RNA oběma přístroji. Následné měření RNA z buněčných vzorků vykazovalo běžně očekávané hodnoty ~ 2.

Odhad doby potřebné pro měření vzorků ukázal více než trojnásobný rozdíl mezi srovnávanými přístroji, přičemž vzorky byly měřeny za kratší dobu na přístroji NanoDrop. Rozdíl v době měření je dán především nutností ředění vzorků a výplachu květy při měření na přístroji BioPhotometer. Při měření na přístroji NanoDrop je výměna vzorků rychlá – vyžaduje pouze osušení optických ploch od předchozího vzorku (22). Tento parametr hraje roli především v případě měření většího počtu vzorků. Časová prodleva způsobená měřením může zapříčinit zvýšenou míru degradace RNA. Pilotní experimenty ukázaly, že některé markery genové exprese mohou být stanoveny pouze v případě, kdy izolovaná RNA nebyla před přepsáním do cDNA zamrazena, proto jsou vzorky RNA po čas měření skladované ve 4°C.

V případech, kdy se množství RNA potřebné pro analýzu blíží množství získanému izolací (např. z důvodu malého množství zdrojového materiálu nebo nízkého výtěžku izolace), hraje roli při výběru přístroje i minimální množství RNA potřebné pro měření koncentrace a čistoty vzorku. NanoDrop vyžaduje pro měření minimální objem vzorku 1 µl. Na rozdíl od něj jsou vzorky v přístroji BioPhotometer měřeny v květách s minimálním objemem pro měření 50 µl. Vzhledem k omezenému objemu eluované

RNA je tedy nutné vzorky při tomto měření ředit ve vodě nebo pufru, přičemž ředící poměry jsou regulovány podle odhadované koncentrace vzorku tak, aby absorbance roztoku spadala do rozmezí 0,1 – 2, ve kterém platí Lambert-Beerův zákon. Obecně je optimální rozsah absorbance pro měření koncentrace látek 0,2 – 1, kdy relativní chyba měření je poměrně nízká (29). U vzorků s nízkou koncentrací RNA nastává problém s nedostatkem vzorku, u vysoce koncentrovaných vzorků naopak problém s vyšší chybou měření danou vyšším ředěním vzorku pro měření (určitý vliv na výsledek měření má i ředící roztok, respektive jeho pH; 30). Rozhodující je zde tloušťka měřené vrstvy vzorku – u přístroje BioPhotometer je to konstantní hodnota 10 mm daná tloušťkou kyvety. BioPhotometer má dynamický rozsah měření absorbance při vlnové délce 260 nm 0 – 2,6 (při použití plastové kyvety UVette; 31). NanoDrop ovšem umožňuje větší dynamický rozsah měření díky systému měření dvou tloušťek každého vzorku – 0,2 a 1 mm (32). Následně NanoDrop násobí měřenou absorbancí 50x, resp. 10x a zobrazí tak běžně užívanou hodnotu absorbance vzorku o tloušťce 1 cm. Tedy při měření stejné hodnoty absorbance vzorku postačuje padesátinásobně nižší koncentrace RNA v případě měření přístrojem NanoDrop ve srovnání s přístrojem BioPhotometer. Proto je možné přístrojem NanoDrop změřit výrazně vyšší koncentraci nukleových kyselin bez nutnosti ředění. Maximální koncentrace RNA měřitelná přístrojem NanoDrop je 3000 ng/μl. Ve srovnání s tím přístroj BioPhotometer dokáže měřit koncentraci do maximální hodnoty ~ 100 ng RNA/μl. Na měření přístrojem NanoDrop byl spotřebován objem 1,3 ul vzorku, zatímco pro měření přístrojem BioPhotometer bylo třeba 2,5 – 10 ul vzorku v závislosti na koncentraci RNA.

Konstrukce srovnávaných přístrojů se liší v spektru vlnových délek, které přístroj zaznamenává. NanoDrop je konstruován jako spektrofotometr, který měří celé spektrum záření, zatímco BioPhotometer jakožto fotometr zaznamenává pouze jednotlivé definované vlnové délky, v oblasti UV jsou to vlnové délky 230 nm, 260 nm, 280 nm a 320 nm. Z takto získaných dat je možné určit koncentraci a čistotu RNA ve vzorku. Hodnota absorbance v 320 nm se používá k normalizaci hodnot absorbance nukleových kyselin. Přesto možnost prohlédnutí celé absorpční křivky zobrazené spektrofotometrem přináší další informace. Z hladkosti absorpční křivky je možné odvodit charakter případné

kontaminace (organická látka, proteiny,...) a optimalizovat izolační postup pro odstranění nežádoucích kontaminantů. V případě použití extrakčních postupů pomocí guanidin thiokyanátu je vhodné kontrolovat hladkost absorpční křivky v oblasti 260 nm. Uvedené denaturační činidlo absorbuje v 260 nm a tak může kontaminace i malým množstvím této látky vést k falešně nadhodnoceným výsledkům. Tento efekt je patrný na izolátech soupravy NuleoSpin RNA XS (příloha 11). Na absorpčních křivkách RNA izolované TRI Reagent Solution je patrná kontaminace vzorků fenolem, která se často při tomto typu izolace vyskytuje (příloha 11). V případě měření poměru absorbancí 260/230 nm byly měřeny atypicky vysoké hodnoty. Kontrola spektra poly-A RNA neukázala žádné kontaminanty, pouze nezvykle strmý průběh křivky (obr. 15). Možnost sledování celé absorpční křivky tedy pomohla ke správné interpretaci měřených hodnot absorbance. Proto je z hlediska výpovědní hodnoty dat posuzován NanoDrop jako vhodnější model pro studii.

Metodiky zahrnující reversní transkripci vyžadují použití kvalitní vysoce purifikované RNA. Derivace a následná kultivace MSC je finančně a časově náročná operace, proto byl v této studii hledán postup izolace umožňující maximální výtěžek RNA z dostupného množství zdrojového buněčného materiálu. V současnosti se pro izolaci RNA používají především dvě techniky – izolace kombinací guanidin thiokyanát-fenol-chloroform a extrakce na pevné fázi neboli kolonová izolace. Posledně uvedený typ metody se velmi rychle vyvíjí, na trhu se objevují nové varianty souprav. Pro srovnání metod byl zvolen TRI Reagent Solution jakožto izolace kombinací chemických látek (tato kombinace je známá také pod komerčním názvem TRIzol) a šest souprav od třech výrobců spadajících podle svého maximálního vazebného limitu do kategorií „mini“ a „micro“ kolonových izolací. Účelem srovnání bylo nalezení postupu, který by vedl k dostatečně velkému výtěžku vysoce čisté RNA z co nejmenšího počtu buněk. Podle předpokladu by vzorek izolované RNA měl obsahovat zhruba 5 µg RNA o hodnotě 2,0 pro oba poměry absorbancí 260/280 nm a 260/230 nm a o minimální koncentraci 100 ng RNA/µl.

Nejvyšší výtěžek RNA byl získán izolací pomocí ZR RNA MicroPrep soupravy, díky které bylo izolováno z 200 000 buněk 4,91 µg RNA. Podobného výsledku dosáhla

souprava RNeasy Micro Kit (4,3 µg RNA). Uspokojivého výsledku bylo dosaženo pomocí souprav ZR RNA MiniPrep a NucleoSpin RNA II, kterými bylo izolováno požadované množství RNA ze 400 000 buněk (9,39 µg RNA, resp. 7,36 µg RNA). Požadovaná čistota v parametru poměru 260/280 nm byla splněna drtivou většinou vzorků s výjimkou izolátů TRI Reagent Solution metodou. Kontaminace fenolem v těchto vzorcích je patrná na absorpčních křivkách (příloha 11). Požadavek na poměr 260/230 nm větší než 2,0 byl splněn jen ve dvou případech souprav – ZR RNA MicroPrep a ZR RNA MiniPrep. Soupravy RNeasy Micro Kit, NucleoSpin RNA II a RNeasy Mini Kit vykazovaly poměr u většiny vzorků v rozmezí 1,9 – 2,0. Souprava NucleoSpin RNA XS a TRI Reagent Solution produkovaly RNA s velmi nízkým poměrem 260/230 nm, což ukazuje na kontaminaci guanidin thiokyanátem nebo fenolem. Požadované minimální koncentrace bylo dosaženo v kategorii „micro“ souprav již ve vzorcích z 100 000 buněk, v kategorii „mini“ souprav pak ve vzorcích 200 000 buněk, případně 400 000 buněk (NucleoSpin RNA II). Čistota RNA je důležitá především pro následný přepis do cDNA pomocí reverzní transkriptázy (33). Tento enzym je inhibován kontaminantami přítomnými z nedostatečně purifikované RNA, což vede ke snížení efektivity RT-PCR, ztrátě normalizace vzorků a následnému použití podlimitního množství templátu pro finální PCR reakci.

Doba nutná pro provedení izolačního postupu je pro všechny metody přibližně shodná, tento parametr proto nebyl posuzován.

Ačkoli izolace RNA pomocí TRI Reagent Solution je finančně výrazně výhodnější, tato metoda použitá pro izolaci z malého množství buněk produkuje RNA v nedostatečné čistotě.

Ze srovnání všech sledovaných parametrů vyplývá, že nejvhodnější soupravou pro izolaci RNA určené pro následnou analýzu genové exprese je ZR RNA MicroPrep. Parametry sledované v této studii však nepostihují plně případný stav degradace izolované RNA, proto by bylo vhodné otestovat izolovanou RNA ještě pomocí formaldehydového agarosového gelu (34) nebo pomocí RNA čipu.

6 Závěr

Náplní studie byla optimalizace techniky přípravy RNA pro následné použití v analýze genové exprese.

Ze sedmi testovaných izolačních postupů splňovala nejlépe požadavky následné analýzy souprava ZR RNA MicroPrep fungující na principu extrakce na pevné fázi.

Tato souprava měla mezi testovanými postupy nejvyšší výtěžky purifikované RNA, přičemž požadované množství RNA (~ 5 μg RNA) bylo získáno ze vzorku obsahujícího 200 000 buněk. Průměrná hodnota výtěžku ZR RNA MicroPrep soupravy z 200 000 buněk byla 4,91 μg RNA.

Vzorky RNA purifikované touto soupravou vykazovaly zároveň vysokou čistotu. Izolovaná RNA z 200 000 buněk dosahovala v parametru poměru absorbancí 260/280 nm průměrných hodnot 2,04 a u poměru absorbancí 260/230 nm průměrných hodnot 2,14; přesáhla tak požadovaný minimální limit obou poměrů 2,0.

Souprava ZR RNA MicroPrep RNA splnila i požadavek na minimální limit koncentrace izolované RNA (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$), průměrná hodnota koncentrace RNA izolované ze vzorku 200 000 buněk touto soupravou byla 327 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Spektrofotometrické přístroje NanoDrop ND-1000 a BioPhotometer Eppendorf byly porovnány ve čtyřech parametrech.

Přístroj NanoDrop vykazoval statisticky významně menší odchylky měření koncentrace RNA než přístroj BioPhotometer. V odchylkách měření poměrů absorbancí 260/280 nm a 260/230 nm se přístroje statisticky významně nelišily.

Porovnání doby trvání měření ukázalo velmi výrazný rozdíl mezi přístroji. 10 vzorků RNA bylo změřeno na přístroji NanoDrop za zhruba 7 minut, zatímco na přístroji BioPhotometer trvalo měření stejného počtu vzorků více než trojnásobnou dobu (23 minut).

Srovnání objemu vzorku potřebného pro měření ukázalo významný rozdíl mezi přístroji daný jejich konstrukcí a dynamickým rozsahem. Pro měření na přístroji

NanoDrop bylo třeba 1,3 μ l vzorku a vzorek nebylo třeba ředit. Při použití přístroje BioPhotometer bylo třeba minimálního objemu vzorku 2,5 – 10 μ l podle míry ředění vzorku nutné z důvodu malého měřicího rozsahu přístroje.

Oba přístroje při měření poskytovaly hodnoty absorbance při 260 nm, 280 nm a 230 nm a vypočtené koncentrace RNA. NanoDrop navíc umožňoval zobrazení absorbance celého spektra záření v rozsahu 220 – 350 nm. Tato informace pomohla k charakterizaci kontaminace vyskytující se v některých vzorcích, proto byl NanoDrop posuzován jako přístroj s větší výpovědní hodnotou dat.

V souhrnu byl pro stanovení koncentrace a čistoty RNA za účelem analýzy genové exprese z testovaných přístrojů vybrán přístroj NanoDrop z důvodu menší chyby a kratší doby měření, spotřeby menšího množství vzorku pro měření a získání dat s větší výpovědní hodnotou.

7 Použitá literatura

- (1) MURRAY, Robert K, BENDER, David A, BOTHAM, Kathleen M, KENNELZ, Peter J, RODWELL, Victor W a WEIL, P Anthony. *Harperova ilustrovaná biochemie*. Praha: Galén, 2012, ISBN 978-80-7262-907-7.
- (2) ALBERTS, Bruce, DENNIS, Bray, JOHNSON, Alexander, LEWIS, Julian, RAFF, Martin, ROBERTS, Keith a WALTER, Peter. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2.vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998, ISBN 80-902906-2-0.
- (3) BALL, David W, HILL, John W a SCOTT Rhonda J. *Introduction to Chemistry: General, Organic, and Biological* [online]. Unnamed Publisher, 2011. Dostupné z <http://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/index.html> [cit. 25. 4. 2014].
- (4) TINOCO, Ignacio Jr. *The RNA World: APPENDIX 1: Structures of Base Pairs Involving at Least Two Hydrogen Bonds* [online]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. Dostupné z http://jenalib.fli-leibniz.de/ImgLibDoc/nana/IMAGE_NANA.html [cit. 25. 4 2014].
- (5) NELSON, David L a COX, Michael M. *Principles of Biochemistry*. 5.vyd. New York: W. H. Freeman and Company, 2008, ISBN 978-0-7167-7108-1.
- (6) CHIRGWIN, John M, PRZYBYLA, Alan E, MACDONALD, Raymond J a RUTTER, William J. *Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease*. *Biochemistry* 18:5294–5299, 1979.

- (7) SAMBROOK, Joseph, FRITSCH, Edward F a MANIATIS, Thomas. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. vyd. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, ISBN 0-87969-309-6.
- (8) WILKINSON, Miles. *Essential Molecular Biology vol. I. A Practical Approach: Purification of RNA*. Oxford: IRL Press, 1991, ISBN 978-0-19-963111-7.
- (9) KINGSTON, Robert E, CHOMCZYNSKI, P a SACCHI, Nicoletta. *Current Protocols in Molecular Biology: Guanidine Methods for Total RNA Preparation*. John Wiley & Sons, 1996.
- (10) CHOMCZYNSKI, Piotr a SACCHI, Nicoletta. *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*. *Analytical Biochemistry* 162:156-159, 1987.
- (11) CHOMCZYNSKI, Piotr, WILFINGER, William and MACKEY, Karol. *eLS: Single-Step Method of Total RNA Isolation by Guanidine-Phenol Extraction* [online]. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. Dostupné z www.els.net [cit. 20. 4. 2014].
- (12) TOLOSA, Jorge M, SCHJENKEN, John E, CIVITI, Theodora D, CLIFTON, Vicki L a SMITH, Roger. *Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and proteins from the same sample*. *BioTechniques* 43:799-804, 2007.
- (13) RAJPUT, Sandeep K, DAVE, Vivek P, RAJPUT, Ankita, PANDEY, Hausila P, DATTA, Tirtha K a SINGH, Rakesh K. *A column-based rapid method for the simultaneous isolation of DNA, RNA, miRNA and proteins*. *Cell Biol. Int.* 36:779-783, 2012.

- (14) GJERDE, Douglas T, HOANG, Lee and HORNBY, David. *RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2009.
- (15) VOET, Donald a VOET, Judith G. *Biochemistry*. 4.vyd. Kendallville: John Wiley & Sons, 2011, ISBN 978-0470-57095-1.
- (16) FERENČÍK, Miroslav a ŠKÁRKA, Bohumil. *Biochemické laboratorne metódy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1981.
- (17) ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka II*. 4. uprav. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1988.
- (18) ČŮTA, František. *Instrumentální analýza*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- (19) PROSSER, Václav. *Experimentální metody biofyziky*. 1. vyd. Praha: Academia, 1989, ISBN 80-200-0059-3.
- (20) SKOOG, Douglas A, HOLLER F James a CROUCH Stanley R. *Principles of Instrumental Analysis*. 6. vyd. Belmont: Thomson, 2007, ISBN 9780495125709.
- (21) HRAZDIRA, Ivo, MORNSTEIN Vojtěch a ŠKORPÍKOVÁ Jiřina. *Základy biofyziky a zdravotnické techniky*. Brno: Neptun, 2006, ISBN 8086850013.
- (22) GALLAGHER, S R a DESJARDINS, P R. *Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. Current Protocols in Molecular Biology*. Upland: UVP, Inc., Wilmington: NanoDrop Technologies, Inc., 2006.

- (23) PRŮŠA, Richard. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. Praha: 2. lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED, 1997, ISBN 80-238-0940-7.
- (24) LEHNINGER, Albert L. *Biochemistry*. 2. vyd. New York: Worth Publishers, 1975.
- (25) WILFINGER, William W, MACKEY, Karol a CHOMCZYNSKI, Piotr. *Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity*. *BioTechniques* 22:474-481, 1997.
- (26) T009-Technical Bulletin. *260/280 and 260/230 Ratios* [online]. Wilmington: Thermo Fisher Scientific, 2008. Dostupné z <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> [cit. 21. 4. 2014].
- (27) HEPTINSTALL, John a RAPLEY Ralph. *The Nucleic Acid Protocols Handbook: Spectrophotometric Analysis of Nucleic Acids*. Totowa: Human Press Inc, 2000, ISBN 0-89603-459-3.
- (28) PERBAL, Bernard. *A Practical Guide to Molecular Cloning*. New York: John Wiley & Sons, 1988, ISBN 0-471-85071-3.
- (29) SCHWEDT, Georg. *The Essential Guide to Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 2005, ISBN 0471-97412-9.
- (30) SCHMID, Franz-Xaver. *Encyclopedia of Life Sciences: Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry* [online]. Macmillan Publishers Ltd, 2001. Dostupné z www.els.net [cit. 20. 4. 2014]

- (31) *BioPhotometer: Operating Manual* [online]. Hamburg: Eppendorf AG, 2000, B 6131 900.102-06/1002. Dostupné z <http://arboretum.harvard.edu/wp-content/uploads/Biophotometer-manual.pdf> [cit. 20. 4. 2014].
- (32) *NanoDrop 1000 Spectrophotometer. V3.7 User's Manual*. Wilmington: Thermo Fisher Scientific Inc., 2008.
- (33) BUSTIN, Stephen A. *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla: International University Line, 2004, ISBN 0-9636817-8-8.
- (34) BRYANT, Sian a MANNING, David L. *The Nucleic Acid Protocols Handbook: Formaldehyde Gel Electrophoresis of Total RNA*. Totowa: Human Press Inc, 2000, ISBN 0-89603-459-3.

8 Přílohy

Příloha 1

Hrubá data spektrofotometrického měření koncentrace poly-A RNA ve vzorcích ředící řady.

NanoDrop						
poly-A RNA [ng/μl]	koncentrace [ng/μl]	A260	A280	260/280	260/230	
5	5,01	0,125	0,048	2,62	-4,69	
5	3,8	0,095	0,007	12,84	-1,7	
5	4,69	0,117	0,044	2,68	-2,41	
5	4,61	0,115	0,044	2,61	-3,74	
20	20,8	0,52	0,171	3,03	4,18	
20	20,74	0,519	0,17	3,06	4,4	
20	21,13	0,528	0,165	3,21	3,92	
20	21,11	0,528	0,173	3,04	4,28	
80	90,63	2,266	0,75	3,02	3,19	
80	90,46	2,261	0,732	3,09	3,17	
80	89,37	2,234	0,745	3	3,12	
80	88,66	2,216	0,704	3,15	3,17	
160	179,53	4,488	1,42	3,16	3,2	
160	180,34	4,509	1,404	3,21	3,22	
160	179,91	4,498	1,445	3,11	3,15	
160	179,79	4,495	1,402	3,21	3,25	
320	375,4	9,385	2,76	3,4	3,46	
320	374,95	9,374	2,786	3,36	3,5	
320	373,53	9,338	2,766	3,38	3,51	
320	379,78	9,494	2,775	3,42	3,52	
640	742,03	18,551	5,473	3,39	3,36	
640	737,49	18,437	5,431	3,39	3,35	
640	738,71	18,468	5,452	3,39	3,34	
640	761,7	19,042	5,639	3,38	3,34	
1280	1483,1	37,078	10,883	3,41	3,46	
1280	1488,37	37,209	10,846	3,43	3,45	
1280	1477,44	36,936	10,769	3,43	3,46	
1280	1481,02	37,025	10,772	3,44	3,47	

BioPhotometer								
poly-A RNA [ng/μl]	koncentrace [ng/μl]	260/280	260/230	A230	A260	A280	A320	
5	6	2,5	3,2	0,01	0,03	0,010	0,000	
5	7	2,2	2,6	0,01	0,03	0,012	0,000	
5	7	2,8	2,4	0,01	0,03	0,011	0,000	

5	9	2,1	2,1	0,02	0,04	0,018	0,011
20	24	2,8	2,4	0,04	0,10	0,036	0,001
20	23	2,7	2,5	0,04	0,10	0,036	0,000
20	24	2,7	2,4	0,04	0,10	0,037	0,001
20	22	2,7	2,5	0,04	0,09	0,035	0,000
80	104	3,1	3,2	0,13	0,43	0,139	0,000
80	109	2,9	3,0	0,15	0,45	0,155	0,009
80	92	2,9	2,8	0,14	0,38	0,133	0,000
80	90	2,9	2,7	0,14	0,38	0,132	0,000
160	224	3,2	3,5	0,27	0,94	0,293	0,019
160	220	3,2	3,5	0,26	0,91	0,283	0,004
160	218	3,2	3,5	0,26	0,91	0,284	0,004
160	211	3,2	3,4	0,26	0,88	0,276	0,002
320	431	3,3	3,7	0,48	1,80	0,549	0,063
320	440	3,4	3,7	0,51	1,83	0,545	0,001
320	419	3,3	3,7	0,48	1,75	0,531	0,003
320	416	3,3	3,7	0,47	1,74	0,528	0,003
640	884	3,3	3,6	0,52	1,84	0,551	0,008
640	816	3,4	3,7	0,46	1,70	0,506	0,002
640	857	3,3	3,6	0,50	1,79	0,543	0,008
640	1027	3,4	3,7	0,58	2,14	0,637	0,001
1280	1788	3,3	3,6	0,52	1,86	0,567	0,003
1280	1584	3,4	3,7	0,45	1,65	0,490	0,001
1280	1531	3,4	3,6	0,44	1,60	0,471	0,002
1280	1584	3,4	3,7	0,45	1,65	0,490	0,002

Příloha 2

Tabulka průměrných hodnot koncentrace RNA měřené dvěma přístroji ve vzorcích ředící řady poly-A RNA. Hodnoty představují aritmetický průměr čtyř měření jednoho vzorku. Sm.odch. – směrodatná odchylka.

poly-A RNA [ng/μl]	Nanodrop		BioPhotometer	
	koncentrace [ng/μl]	sm. odch.	koncentrace [ng/μl]	sm. odch.
5	4,77	0,17	7,20	1,12
20	20,95	0,18	23,25	0,78
80	89,78	0,81	98,85	7,93
160	179,89	0,29	218,40	4,72
320	375,92	2,34	426,60	9,32
640	744,98	9,79	896,10	79,51
1280	1482,48	3,96	1621,80	98,35

Příloha 3

Tabulka průměrných hodnot poměru absorbancí 260/280 nm měřených dvěma přístroji ve vzorcích ředící řady poly-A RNA. Hodnoty představují aritmetický průměr čtyř měření jednoho vzorku. Sm.odch. – směrodatná odchylka.

poly-A RNA [ng/μl]	Nanodrop		BioPhotometer	
	260/280 nm	sm. odch.	260/280 nm	sm. odch.
5	2,64	0,03	2,41	0,27
20	3,09	0,07	2,69	0,04
80	3,07	0,06	2,95	0,10
160	3,17	0,04	3,20	0,02
320	3,39	0,02	3,30	0,04
640	3,39	0,00	3,34	0,03
1280	3,43	0,01	3,35	0,04

Příloha 4

Tabulka průměrných hodnot poměru absorbancí 260/230 nm měřených dvěma přístroji ve vzorcích ředící řady poly-A RNA. Hodnoty představují aritmetický průměr čtyř měření jednoho vzorku. Sm.odch. – směrodatná odchylka.

poly-A RNA [ng/μl]	Nanodrop		BioPhotometer	
	260/230 nm	sm. odch.	260/230 nm	sm. odch.
5	-3,61	0,94	2,57	0,41
20	4,20	0,18	2,48	0,04
80	3,16	0,03	2,92	0,21
160	3,21	0,04	3,48	0,04
320	3,50	0,02	3,68	0,02
640	3,35	0,01	3,62	0,05
1280	3,46	0,01	3,65	0,04

Příloha 5

Hrubá data spektrofotometrického měření koncentrace RNA v buněčných vzorcích přístrojem NanoDrop ND-1000.

TRI Reagent Solution						
exp.	počet buněk	koncentrace [ng/μl]	A260	A280	A260/280	A260/230
A	0	-0,46	-0,011	-0,015	0,76	0,53
	50 000	16,7	0,418	0,205	2,03	0,09
	100 000	36,47	0,912	0,477	1,91	0,08
	200 000	69,01	1,725	0,891	1,94	0,16
	400 000	131,38	3,285	1,714	1,92	0,34
	800 000	340,83	8,521	4,428	1,92	0,65
B	0	-0,76	-0,019	-0,028	0,67	-4,58
	50 000	18,42	0,46	0,233	1,97	0,05
	100 000	40,7	1,017	0,547	1,86	0,18
	200 000	72,63	1,816	0,946	1,92	0,26
	400 000	176,69	4,417	2,302	1,92	0,63
	800 000	379,55	9,489	4,984	1,9	0,92
C	0	-0,58	-0,015	-0,045	0,32	-0,42
	50 000	27,1	0,677	0,407	1,66	0,08
	100 000	42,21	1,055	0,593	1,78	0,14
	200 000	94,68	2,367	1,289	1,84	1,05
	400 000	171,26	4,281	2,24	1,91	0,96
	800 000	327,03	8,176	4,211	1,94	0,65

NucleoSpin RNA II						
exp.	počet buněk	koncentrace [ng/μl]	A260	A280	A260/280	A260/230
A	0	-0,32	-0,008	-0,029	0,27	0,32
	50 000	18,72	0,468	0,233	2,01	1,29
	100 000	44,88	1,122	0,559	2,01	1,92
	200 000	61,2	1,53	0,727	2,1	1,75
	400 000	127,5	3,187	1,526	2,09	1,84
	800 000	263,73	6,593	3,185	2,07	2,14
B	0	-0,65	-0,016	-0,022	0,73	0,62
	50 000	15,17	0,379	0,197	1,93	0,79
	100 000	33,95	0,849	0,415	2,04	1,79
	200 000	62,07	1,552	0,749	2,07	2,02
	400 000	136,58	3,415	1,625	2,1	1,96
	800 000	261,33	6,533	3,166	2,06	2,21
C	0	-0,04	-0,001	0,007	-0,13	0,06
	50 000	10,87	0,272	0,135	2,01	1,51
	100 000	27,76	0,694	0,324	2,14	1,53
	200 000	56,34	1,408	0,658	2,14	2,05
	400 000	103,9	2,598	1,277	2,03	2,07

800 000	266,32	6,658	3,241	2,05	2,18
---------	--------	-------	-------	------	------

RNeasy Mini Kit

exp.	počet buněk	koncentrace [ng/μl]	A260	A280	A260/280	A260/230
A	0	-0,45	-0,011	-0,009	1,21	0,48
	50 000	26,15	0,654	0,336	1,94	1,31
	100 000	57,01	1,425	0,713	2	0,52
	200 000	113,49	2,837	1,364	2,08	1,91
	400 000	206,38	5,159	2,507	2,06	1,88
	800 000	368,03	9,201	4,56	2,02	1,99
B	0	-0,15	-0,004	-0,009	0,41	0,28
	50 000	23,59	0,59	0,312	1,89	1,18
	100 000	58,98	1,475	0,75	1,96	1,64
	200 000	103,21	2,58	1,315	1,96	1,95
	400 000	310,9	7,773	3,837	2,03	2,08
	800 000	556,98	13,924	6,714	2,07	2,03
C	0	1,44	0,036	0,03	1,19	0,41
	50 000	29,3	0,733	0,355	2,07	1,31
	100 000	43,25	1,081	0,537	2,01	1,67
	200 000	93,34	2,333	1,119	2,09	1,89
	400 000	276,9	6,922	3,36	2,06	2,1
	800 000	395,23	9,881	4,992	1,98	2,06

ZR MiniPrep

exp.	počet buněk	koncentrace [ng/μl]	A260	A280	A260/280	A260/230
A	0	0,32	0,008	-0,015	-0,52	1,17
	50 000	30,08	0,752	0,362	2,08	2,08
	100 000	51,39	1,285	0,619	2,08	2,22
	200 000	126,48	3,162	1,519	2,08	2,05
	400 000	306,11	7,653	3,727	2,05	2,19
	800 000	465,83	11,646	5,87	1,98	2,11
B	0	0,26	0,006	-0,006	-1,01	1,05
	50 000	42,56	1,064	0,529	2,01	1,38
	100 000	59,59	1,49	0,721	2,07	2,22
	200 000	140,02	3,5	1,683	2,08	2,25
	400 000	270,54	6,763	3,282	2,06	2,25
	800 000	468,9	11,723	6,02	1,95	2,11
C	0	1,08	0,027	0,024	1,1	-43,41
	50 000	26,35	0,659	0,307	2,15	2
	100 000	45,75	1,144	0,562	2,04	2,1
	200 000	112,5	2,812	1,374	2,05	2,22
	400 000	362,81	9,07	4,442	2,04	2,22
	800 000	577,67	14,442	7,155	2,02	2,07

NuleoSpin RNA XS						
exp.	počet buněk	koncentrace [ng/μl]	A260	A280	A260/280	A260/230
A	0	-0,79	-0,02	-0,029	0,68	-6,14
	50 000	54,06	1,352	0,628	2,15	1,01
	100 000	119,39	2,985	1,436	2,08	1,43
	200 000	241,27	6,032	2,863	2,11	1,04
	400 000	423,52	10,588	5,163	2,05	1,18
	800 000	430,51	10,763	5,302	2,03	0,77
B	0	-0,37	-0,009	-0,027	0,34	-0,38
	50 000	9,71	0,243	0,125	1,95	0,17
	100 000	120,84	3,021	1,419	2,13	0,33
	200 000	167,39	4,185	1,943	2,15	0,41
	400 000	332,31	8,308	3,974	2,09	1,47
	800 000	387,44	9,686	4,749	2,04	0,75

RNeasy Micro Kit						
exp.	počet buněk	koncentrace [ng/μl]	A260	A280	A260/280	A260/230
A	0	0,06	0,001	-0,004	-0,32	0,51
	50 000	66,35	1,659	0,816	2,03	1,7
	100 000	137,14	3,428	1,695	2,02	1,84
	200 000	259,27	6,482	3,16	2,05	1,97
	400 000	558,63	13,966	6,949	2,01	2,07
	800 000	1065,25	26,631	13,048	2,04	2,19
B	0	-0,04	-0,001	-0,001	0,69	-0,11
	50 000	75	1,875	0,964	1,95	1,31
	100 000	148,91	3,723	1,839	2,02	1,8
	200 000	314,68	7,867	3,877	2,03	1,92
	400 000	708,61	17,715	8,768	2,02	2,07
	800 000	1282,41	32,06	15,851	2,02	2,15

ZR MicroPrep						
exp.	počet buněk	koncentrace [ng/μl]	A260	A280	A260/280	A260/230
A	50000	84,15	2,104	1,04	2,02	1,83
	100 000	165,61	4,14	1,995	2,08	2,14
	200 000	329,08	8,227	4,031	2,04	2,19
	400 000	685,46	17,136	8,4	2,04	2,15
	800 000	905,5	22,637	11,016	2,05	2,19
B	0	4,63	0,116	0,061	1,89	1,43
	50000	46,13	1,153	0,545	2,11	2,07
	100 000	126,07	3,152	1,551	2,03	2,07
	200 000	325,02	8,126	3,98	2,04	2,09
	400 000	639,65	15,991	7,805	2,05	2,13
	800 000	944,65	23,616	11,369	2,08	1,99

Příloha 6

Hrubá data spektrofotometrického měření koncentrace RNA v buněčných vzorcích přístrojem BioPhotometer.

TRI Reagent Solution

exp.	počet buněk	násobek ředění	výsledná koncentrace		A260/280	A260/230	A230	A260	A280	A320
			[ng/μl]							
A	0	6	0,0	-	-		0,005	0,001	0,001	0,003
	50 000	6	16,8		1,65	0,09	0,758	0,069	0,042	0,000
	100 000	6	39,0		1,75	0,07	2,292	0,164	0,094	0,000
	200 000	6	67,2		1,71	0,14	2,036	0,280	0,163	0,000
	400 000	6	132,0		1,73	0,31	1,759	0,551	0,318	0,001
	800 000	6	305,4		1,83	0,54	2,362	1,271	0,694	0,007
B	0	6	0,0	-	-		0,001	0,000	0,000	0,000
	50 000	6	33,0		1,31	0,07	2,016	0,136	0,104	0,071
	100 000	6	40,2		1,64	0,17	0,960	0,167	0,102	0,001
	200 000	6	69,6		1,69	0,27	1,080	0,290	0,172	0,002
	400 000	6	177,0		1,73	0,61	1,200	0,737	0,419	0,004
	800 000	6	386,4		1,83	0,90	1,783	1,611	0,882	0,024
C	0	6	0,0	-	-		0,001	0,001	0,001	0,001
	50 000	6	25,2		1,48	0,07	1,445	0,104	0,071	0,001
	100 000	6	42,6		1,61	0,13	1,409	0,177	0,110	0,001
	200 000	6	87,0		1,58	1,14	0,319	0,362	0,290	0,002
	400 000	6	172,8		1,70	0,80	0,897	0,721	0,423	0,004
	800 000	6	325,8		1,76	0,56	2,447	1,359	0,770	0,008

NucleoSpin RNA II

exp.	počet buněk	násobek ředění	výsledná koncentrace		A260/280	A260/230	A230	A260	A280	A320
			[ng/μl]							
A	0	6	2,4		1,53	4,50	0,002	0,009	0,006	0,001
	50 000	6	22,8		1,50	1,17	0,082	0,096	0,064	0,026
	100 000	6	44,4		1,67	1,72	0,107	0,185	0,111	0,017
	200 000	6	60,6		1,73	1,69	0,149	0,252	0,146	0,015
	400 000	6	123,0		1,86	1,85	0,277	0,511	0,274	0,006
	800 000	6	261,6		1,93	2,19	0,497	1,089	0,565	0,006
B	0	6	1,8		0,88	1,75	0,004	0,007	0,008	0,000
	50 000	6	18,6		1,48	0,80	0,097	0,078	0,053	0,017
	100 000	6	33,6		1,58	1,60	0,087	0,140	0,089	0,018
	200 000	6	62,4		1,78	1,95	0,133	0,259	0,146	0,006
	400 000	6	133,8		1,86	1,94	0,288	0,558	0,300	0,004
	800 000	6	255,6		1,94	2,27	0,470	1,066	0,550	0,004
C	0	6	4,2		1,30	0,52	0,034	0,018	0,014	0,002
	50 000	6	16,2		1,51	0,88	0,076	0,067	0,045	0,015

100 000	6	31,8	1,62	1,16	0,113	0,132	0,082	0,012
200 000	6	55,8	1,74	1,61	0,144	0,233	0,134	0,007
400 000	6	101,4	1,79	1,89	0,224	0,422	0,235	0,006
800 000	6	266,4	1,91	2,18	0,509	1,111	0,583	0,005

Rneasy Mini Kit

exp.	počet buněk	násobek ředění	výsledná koncentrace						
			[ng/μl]	A260/280	A260/230	A230	A260	A280	A320
A	0	6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	50 000	6	26,4	1,66	1,15	0,096	0,111	0,067	0,011
	100 000	6	55,2	1,82	1,49	0,476	0,231	0,127	0,011
	200 000	6	109,8	1,90	1,82	0,251	0,457	0,240	0,005
	400 000	6	201,0	1,91	1,87	0,449	0,838	0,439	0,014
	800 000	6	432,6	1,95	2,11	0,855	1,802	0,927	0,013
B	0	6	0,0	-	-	0,000	0,000	0,001	0,000
	50 000	6	24,0	1,60	1,11	0,090	0,100	0,062	0,013
	100 000	6	55,8	1,83	1,53	0,152	0,233	0,127	0,010
	200 000	6	98,4	1,88	1,88	0,217	0,409	0,217	0,008
	400 000	6	304,8	1,93	2,11	0,060	1,270	0,658	0,009
	800 000	6	535,2	1,98	2,09	1,067	2,230	1,127	0,006
C	0	6	0,0	-	-	0,000	0,001	0,001	0,000
	50 000	6	28,8	1,67	1,19	0,101	0,120	0,072	0,008
	100 000	6	42,6	1,76	1,56	0,114	0,178	0,101	0,009
	200 000	6	89,4	1,89	1,81	0,205	0,372	0,197	0,003
	400 000	6	264,0	1,95	2,12	0,520	1,100	0,565	0,009
	800 000	6	382,2	1,96	2,17	0,734	1,591	0,812	0,004

ZR MiniPrep

exp.	počet buněk	násobek ředění	výsledná koncentrace						
			[ng/μl]	A260/280	A260/230	A230	A260	A280	A320
A	0	6	0,0	-	-	0,000	0,000	0,002	0,000
	50 000	6	28,8	1,87	2,09	0,058	0,120	0,065	0,003
	100 000	6	54,0	1,92	2,21	0,101	0,224	0,117	0,002
	200 000	6	116,4	1,96	2,07	0,235	0,485	0,247	0,002
	400 000	6	299,4	2,00	2,29	0,545	1,247	0,623	0,001
	800 000	6	483,6	2,01	2,17	0,928	2,015	1,003	0,002
B	0	6	0,6	-	-	0,000	0,002	0,001	0,000
	50 000	6	52,2	1,52	1,21	1,179	0,217	0,143	0,058
	100 000	6	56,4	1,93	2,22	0,106	0,235	0,122	0,002
	200 000	6	131,4	1,96	2,27	0,242	0,548	0,280	0,004
	400 000	6	264,0	1,98	2,30	0,479	1,100	0,556	0,001
	800 000	6	494,4	2,00	2,25	0,916	2,061	1,029	0,002

C	0	6	1,2	0,72	1,67	0,003	0,005	0,007	0,001
	50 000	6	28,2	1,72	1,76	0,067	0,118	0,069	0,015
	100 000	6	46,8	1,78	1,91	0,102	0,195	0,110	0,017
	200 000	6	105,0	1,86	2,12	0,206	0,436	0,235	0,018
	400 000	6	343,2	1,98	2,28	0,626	1,430	0,722	0,009
	800 000	6	531,0	2,00	2,26	0,981	2,212	1,107	0,003

NucleoSpin XS

exp.	počet buněk	násobek ředění	výsledná koncentrace [ng/μl]	A260/280	A260/230	A230	A260	A280	A320
A	0	6	3,0	6,86	0,59	0,021	0,012	0,002	0,002
	50 000	6	55,8	1,84	0,94	0,248	0,234	0,127	0,016
	100 000	6	112,2	1,97	1,33	0,352	0,468	0,237	0,004
	200 000	6	241,2	1,96	0,99	1,013	1,004	0,512	0,014
	400 000	6	429,0	2,01	1,12	1,595	1,788	0,889	0,014
	800 000	12	865,2	1,28	-	-	1,803	1,406	0,981
B	0	6	3,0	4,54	0,62	0,021	0,013	0,003	0,002
	50 000	6	15,0	1,68	0,23	0,275	0,063	0,038	0,018
	100 000	6	113,4	1,97	0,27	1,739	0,473	0,240	0,009
	200 000	6	165,6	1,98	0,36	1,932	0,691	0,349	0,016
	400 000	6	314,4	1,96	1,43	0,918	1,309	0,669	0,013
	800 000	6	370,2	2,02	0,60	2,568	1,543	0,764	0,018

Rneasy Micro Kit

exp.	počet buněk	násobek ředění	výsledná koncentrace [ng/μl]	A260/280	A260/230	A230	A260	A280	A320
A	0	6	4,8	1,54	0,84	0,024	0,020	0,013	0,008
	50 000	6	69,6	1,76	1,52	0,190	0,289	0,164	0,022
	100 000	6	138,6	1,81	1,68	0,343	0,578	0,319	0,032
	200 000	6	250,8	1,87	1,92	0,545	1,046	0,560	0,018
	400 000	6	532,2	1,92	2,07	1,072	2,216	1,154	0,018
	800 000	12	1123,2	1,81	2,22	1,055	2,340	1,293	0,027
B	0	6	3,6	3,01	0,56	0,026	0,014	0,005	0,001
	50 000	6	87,0	1,60	1,17	0,311	0,363	0,227	0,069
	100 000	6	160,8	1,72	1,62	0,414	0,670	0,389	0,068
	200 000	6	307,2	1,91	1,88	0,682	1,281	0,672	0,016
	400 000	6	664,8	1,79	1,99	1,392	2,769	1,551	0,023
	800 000	12	1329,6	1,83	2,22	1,245	2,769	1,511	0,017

ZR MicroPrep

exp.	počet buněk	násobek ředění	výsledná koncentrace [ng/μl]	A260/280	A260/230	A230	A260	A280	A320

A	0	6	4,2	2,05	0,60	0,030	0,018	0,009	0,005
	50 000	6	83,4	1,74	1,83	0,189	0,346	0,199	0,021
	100 000	6	163,2	1,82	2,09	0,326	0,681	0,373	0,015
	200 000	6	324,0	1,87	2,22	0,608	0,349	0,721	0,019
	400 000	6	640,8	1,92	2,15	1,241	2,670	1,388	0,012
	800 000	12	915,6	1,92	2,23	0,858	1,909	0,993	0,010
B	0	6	7,8	1,41	0,78	0,041	0,032	0,023	0,017
	50 000	6	51,6	1,71	1,69	0,127	0,214	0,125	0,021
	100 000	6	120,0	1,78	1,94	0,258	0,500	0,282	0,020
	200 000	6	314,4	1,90	2,13	0,615	1,310	0,691	0,012
	400 000	6	604,8	1,99	2,13	1,182	2,521	1,266	0,010
	800 000	12	988,8	1,89	2,03	1,016	2,059	1,088	0,011

Příloha 7

Tabulka průměrných hodnot výtěžku RNA testovaných izolačních postupů ze tří resp. dvou nezávislých experimentů (horní, resp. spodní část tabulky). Hodnoty průměrného výtěžku jsou zvýrazněny barevnou škálou (sytě zelená – nejvyšší hodnoty, bílá – nejnižší hodnoty). Sm.odch. – směrodatná odchylka.

počet buněk	TRI Reagent Solution		NucleoSpin RNA II		RNeasy Mini Kit		ZR RNA MiniPrep	
	výtěžek [μg]	sm. odch.	výtěžek [μg]	sm. odch.	výtěžek [μg]	sm. odch.	výtěžek [μg]	sm. odch.
50 000	0,62	0,14	0,90	0,19	0,79	0,07	0,99	0,21
100 000	1,19	0,07	2,13	0,42	1,59	0,21	1,57	0,17
200 000	2,36	0,34	3,59	0,15	3,10	0,25	3,79	0,34
400 000	4,79	0,61	7,36	0,83	7,94	1,31	9,39	1,14
800 000	10,47	0,67	15,83	0,12	13,20	2,50	15,12	1,56

počet buněk	NucleoSpin RNA XS		RNeasy Micro Kit		ZR RNA MicroPrep	
	výtěžek [μg]	sm. odch.	výtěžek [μg]	sm. odch.	výtěžek [μg]	sm. odch.
50 000	0,48	0,33	1,06	0,06	0,98	0,29
100 000	1,80	0,01	2,15	0,09	2,19	0,30
200 000	3,06	0,55	4,30	0,42	4,91	0,03
400 000	5,67	0,68	9,50	1,12	9,94	0,34
800 000	6,13	0,32	17,61	1,63	13,88	0,29

Příloha 8

Tabulka průměrných hodnot poměru absorbancí 260/280 nm RNA purifikované testovanými izolačními postupy z buněčných vzorků ze tří resp. dvou nezávislých experimentů (horní, resp. spodní část tabulky). Hodnoty poměru 260/280 jsou zvýrazněny barevnou škálou (sytě zelená – nejvyšší hodnoty, bílá – nejnižší hodnoty). Sm.odch. – směrodatná odchylka.

počet buněk	TRI Reagent Solution		NucleoSpin RNA II		RNeasy Mini Kit		ZR RNA MiniPrep	
	260/280	sm. odch.	260/280	sm. odch.	260/280	sm. odch.	260/280	sm. odch.
50 000	1,89	0,16	1,98	0,04	1,97	0,08	2,08	0,06
100 000	1,85	0,05	2,06	0,06	1,99	0,02	2,06	0,02
200 000	1,90	0,04	2,10	0,03	2,04	0,06	2,07	0,01
400 000	1,92	0,00	2,07	0,03	2,05	0,01	2,05	0,01
800 000	1,92	0,02	2,06	0,01	2,02	0,04	1,98	0,03

počet buněk	NucleoSpin RNA XS		RNeasy Micro Kit		ZR RNA MicroPrep	
	260/280	sm. odch.	260/280	sm. odch.	260/280	sm. odch.
50 000	2,05	0,08	1,99	0,03	2,07	0,04
100 000	2,11	0,02	2,02	0,00	2,06	0,02
200 000	2,13	0,02	2,04	0,01	2,04	0,00
400 000	2,07	0,02	2,02	0,00	2,05	0,00
800 000	2,04	0,00	2,03	0,01	2,07	0,01

Příloha 9

Tabulka průměrných hodnot poměru absorbancí 260/230 nm RNA purifikované testovanými izolačními postupy z buněčných vzorků ze tří resp. dvou nezávislých experimentů (horní, resp. spodní část tabulky). Hodnoty poměru 260/230 jsou zvýrazněny barevnou škálou (sytě zelená – nejvyšší hodnoty, bílá – nejnižší hodnoty). Sm.odch. – směrodatná odchylka.

počet buněk	TRI Reagent Solution		NucleoSpin RNA II		RNeasy Mini Kit		ZR RNA MiniPrep	
	260/230	sm. odch.	260/230	sm. odch.	260/230	sm. odch.	260/230	sm. odch.
50 000	0,07	0,02	1,20	0,30	1,27	0,06	1,82	0,31
100 000	0,13	0,04	1,75	0,16	1,28	0,54	2,18	0,06
200 000	0,49	0,40	1,94	0,13	1,92	0,02	2,17	0,09
400 000	0,64	0,25	1,96	0,09	2,02	0,10	2,22	0,02
800 000	0,74	0,13	2,18	0,03	2,03	0,03	2,10	0,02

počet buněk	NucleoSpin RNA XS		RNeasy Micro Kit		ZR RNA MicroPrep	
	260/230	sm. odch.	260/230	sm. odch.	260/230	sm. odch.
50 000	0,59	0,34	1,51	0,16	1,95	0,10
100 000	0,88	0,45	1,82	0,02	2,11	0,03
200 000	0,73	0,26	1,95	0,02	2,14	0,04
400 000	1,33	0,12	2,07	0,00	2,14	0,01
800 000	0,76	0,01	2,17	0,02	2,09	0,08

Příloha 10

Tabulka průměrných hodnot koncentrace RNA (konc.) purifikované testovanými izolačními postupy z buněčných vzorků ze tří resp. dvou nezávislých experimentů (horní, resp. spodní část tabulky). Hodnoty koncentrace jsou zvýrazněny barevnou škálou (sytě zelená – nejvyšší hodnoty, bílá – nejnižší hodnoty). Sm.odch. – směrodatná odchylka.

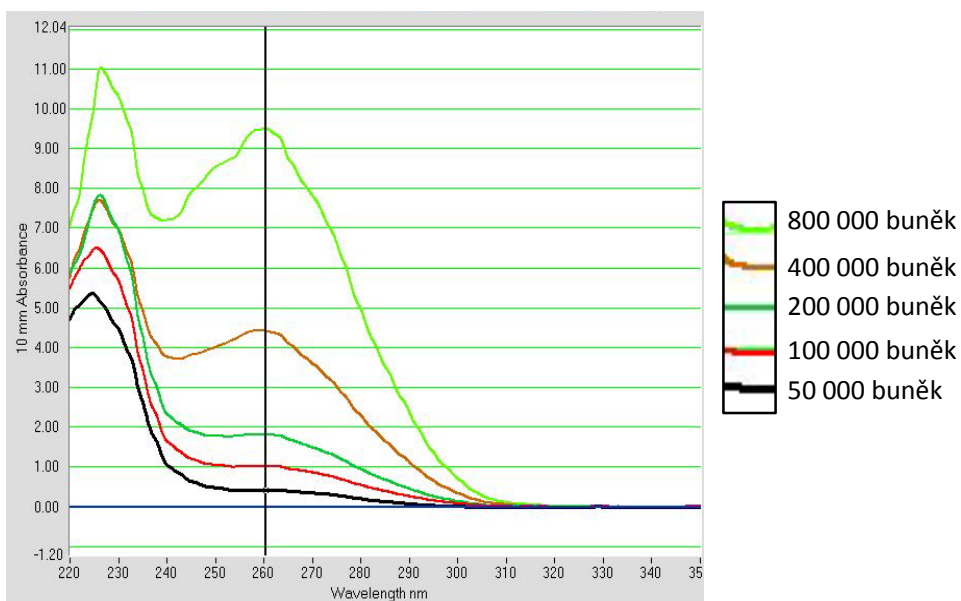
počet buněk	TRI Reagent Solution		NucleoSpin RNA II		RNeasy Mini Kit		ZR RNA MiniPrep	
	konc. [ng/μl]	sm. odch.	konc. [ng/μl]	sm. odch.	konc. [ng/μl]	sm. odch.	konc. [ng/μl]	sm. odch.
50 000	20,74	4,55	14,92	3,21	26,35	2,34	33,00	6,93
100 000	39,79	2,43	35,53	7,08	53,08	7,00	52,24	5,68
200 000	78,77	11,34	59,87	2,52	103,35	8,23	126,33	11,24
400 000	159,78	20,20	122,66	13,77	264,73	43,53	313,15	38,00
800 000	349,14	22,23	263,79	2,04	440,08	83,40	504,13	52,01

počet buněk	NucleoSpin RNA XS		RNeasy Micro Kit		ZR RNA MicroPrep	
	konc. [ng/μl]	sm. odch.	konc. [ng/μl]	sm. odch.	konc. [ng/μl]	sm. odch.
50 000	31,89	18,11	70,68	3,53	65,14	15,52
100 000	120,12	0,59	143,03	4,81	145,84	16,14
200 000	204,33	30,16	286,98	22,62	327,05	1,66
400 000	377,92	37,24	633,62	61,23	662,56	18,70
800 000	408,98	17,58	1173,83	88,66	925,08	15,98

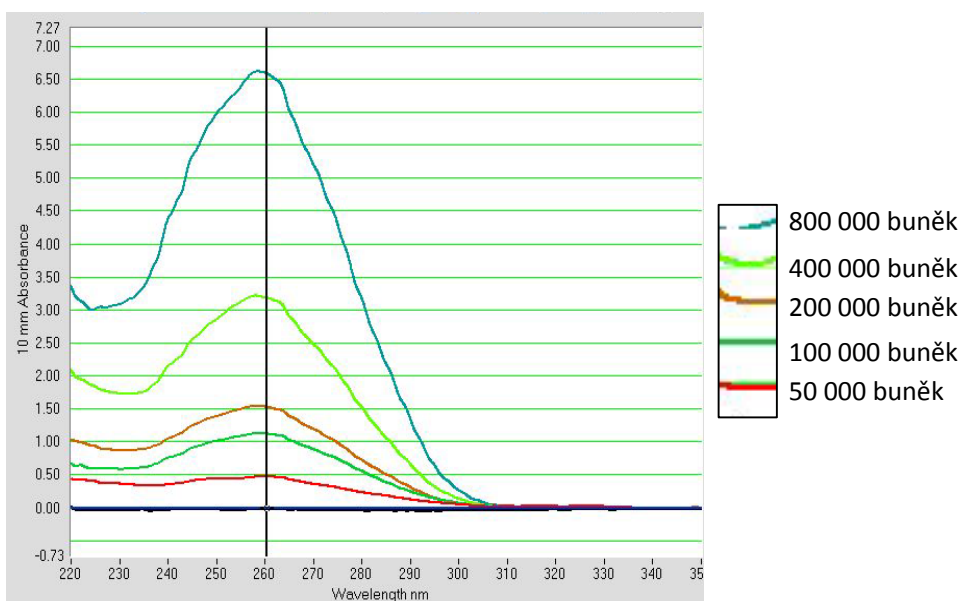
Příloha 11

Porovnání absorpčních křivek RNA buněčných vzorků izolovaných testovanými postupy. Absorbance byla měřena přístrojem NanoDrop a zobrazena v software NanoDrop 1000 3.7.

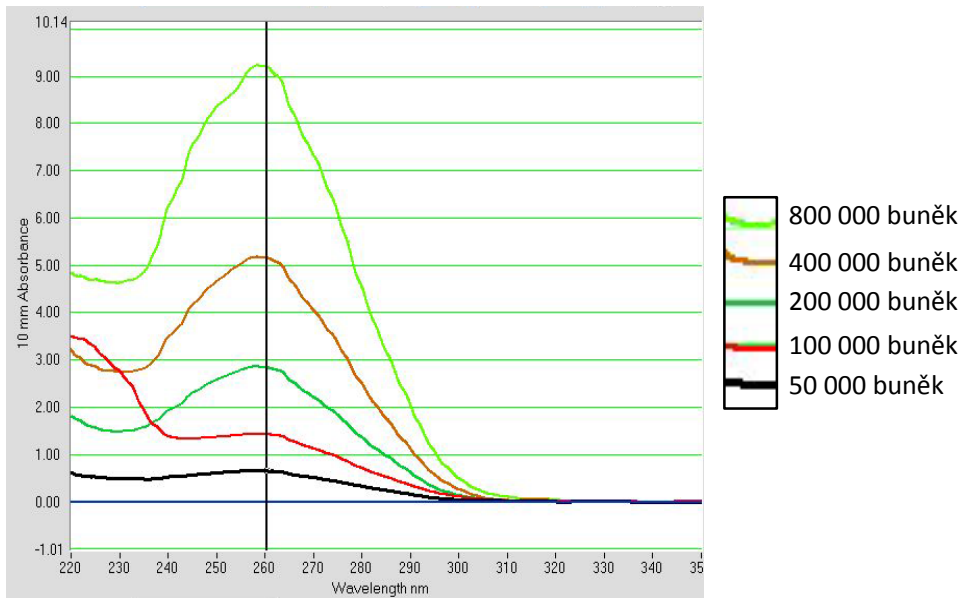
TRI Reagent Solution



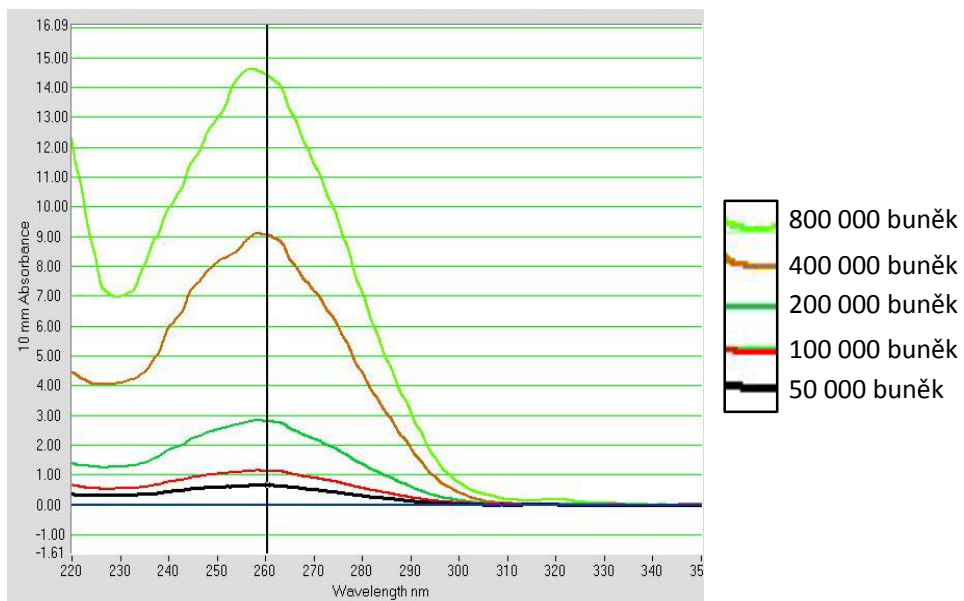
NucleoSpin RNA II



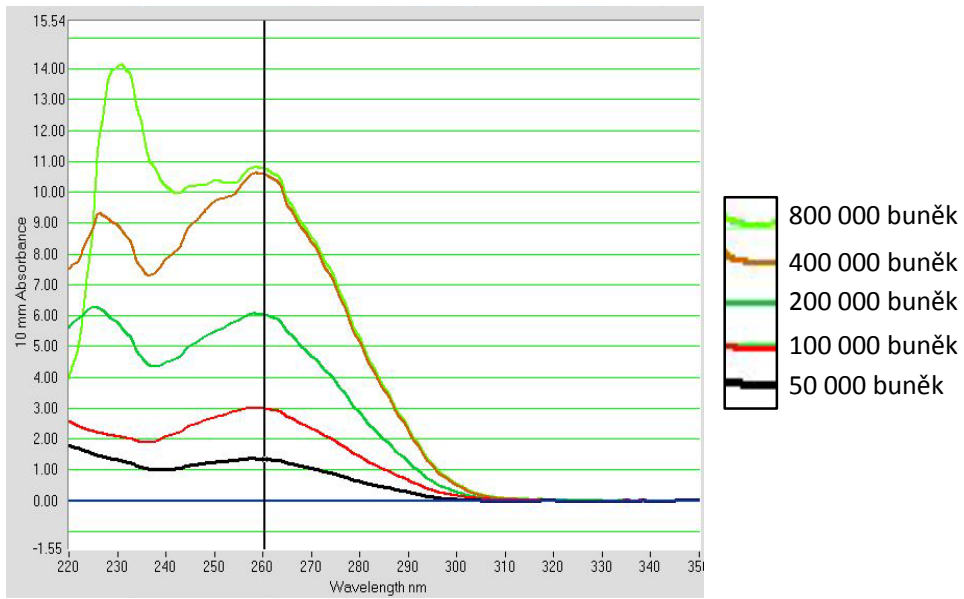
RNeasy Mini Kit



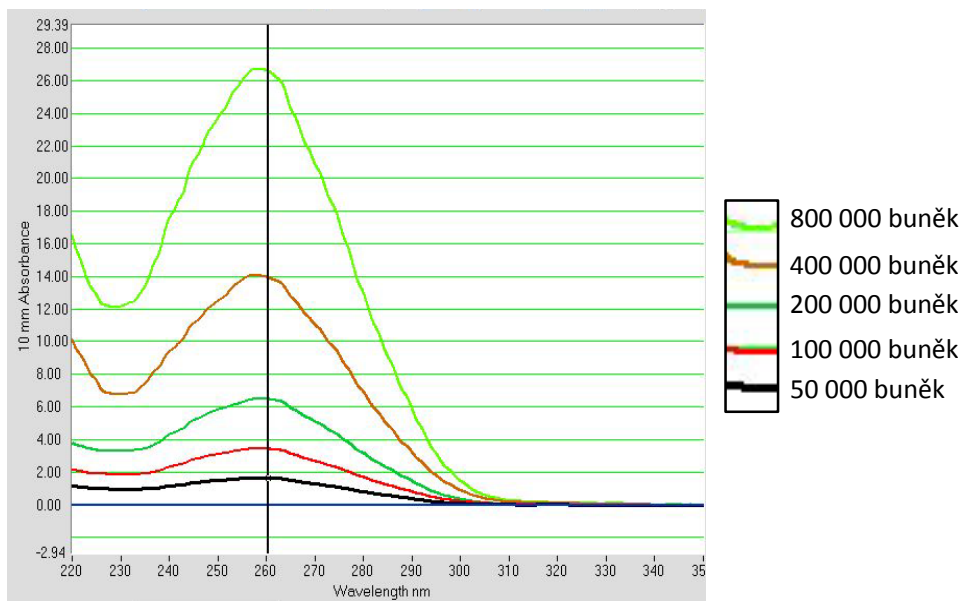
ZR RNA MiniPrep



NucleoSpin RNA XS



RNeasy Micro Kit



ZR RNA MicroPrep

