

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Laboratoř růstových regulátorů



**Využití HOPE fixace pro uchování buněk pro RNA a DNA  
extrakci**

## **Diplomová práce**

Autor:	<b>Bc. Nela Svobodová</b>
Studijní program:	N1501
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Dr. Ing. Eva Kriegová
Konzultant práce:	Ing. Regina Fillerová
Termín odevzdání práce:	4.5.2015

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala paní Dr. Ing. Evě Kriegové, za odborné vedení mé práce a poskytnutí cenných rad a informací. Poděkování patří také Ing. Regině Fillerové a Mgr. Kristýně Sloupenské za realizaci experimentální části a cenné rady.

Práce vznikla za finanční podpory grantu Univerzity Palackého LF\_UP\_2015\_009.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Bc. Nela Svobodová
Název práce	Využití HOPE fixace pro uchování buněk pro RNA a DNA extrakci
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav imunologie, Lékařská fakulta
Vedoucí práce	Dr. Ing. Eva Kriegová
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>V současnosti je uskladnění biologického materiálu bez degradace nukleových kyselin nepostradatelný krok pro získání reprezentativního vzorku s reprodukovatelnými výsledky a využitím v klinických aplikacích. V této práci byly srovnány různé techniky fixace buněk pomocí HOPE činidla se současně používanými technikami uskladnění při <math>-80^{\circ}\text{C}</math>, v protektivním činidle RNAlateru a použití čerstvého materiálu. Z takto uskladněného materiálu byla následně izolována RNA a DNA, a jejich kvalita ověřena v klinických aplikacích (reverzní transkripce, kvantitativní RT-PCR, Nanodrop 1000, genotypizace). Nová technika HOPE fixace ukázala, že je vhodná pro uskladnění biologického materiálu a že může být slibnou alternativou pro často používanou techniku fixace, jako je biologický materiál uskladněný při <math>-80^{\circ}\text{C}</math>. Dále poskytuje komplexní využití ve výzkumu a rutinní diagnostice.</p>
Klíčová slova	HOPE fixace, RNA a DNA extrakce, reverzní transkripce, polymerázová řetězová reakce
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Bc. Nela Svobodová
Title	Using HOPE fixation for preserving cells for extraction of RNA and DNA
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Immunology, Faculty of Medicine
Supervisor	Dr. Ing. Eva Kriegová
The year of presentation	2015
Abstrakt	Currently, the storage of biological material without the degradation of nucleic acids is indispensable step for obtaining a representative sample with reproducible results and use in clinical applications. In this work, different techniques of fixation were compared: HOPE fixation with frequently used techniques of storage at -80°C in RNAlater reagent and storage of fresh biological material. Biological material was subsequently used for RNA and DNA extraction, and their quality was checked in clinical applications (reverse transcription, quantitative RT-PCR, Nanodrop 1000, genotyping). New technique HOPE fixation showed its suitability for the storage of biological material and may be a promising alternative technique for a frequently used technique of fixation, such as storage of the biological material at -80°C. It also provides comprehensive utilization in research and routine diagnostics.
Keywords	HOPE fixation, RNA and DNA extraction, reverse transcription, polymerase chain reaction
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	7
SEZNAM TABULEK .....	8
1 ÚVOD .....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Biologický materiál .....	10
2.1.1 Odběr materiálu.....	10
3 FIXACE.....	12
3.1 Historie fixace.....	13
3.1.1 Formaldehydová fixace .....	13
3.2 Novodobá fixativa .....	14
3.2.1 RNAlater.....	14
3.2.2 HOPE fixace.....	15
4 NUKLEOVÉ KYSELINY .....	18
5 METODY .....	20
5.1 Reverzní transkripce .....	20
5.2 qPCR .....	22
5.3 Real-Time PCR .....	22
6 LEIDENSKÁ MUTACE.....	24
6.1 Cíle práce.....	26
7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
7.1 Materiál .....	27
7.1.1 Biologický materiál.....	27
7.1.2 Přístrojové vybavení .....	27
7.1.3 Chemikálie .....	27
7.1.4 Pomůcky .....	28
7.1.5 Příprava vzorků .....	29
7.2 FIXACE .....	31
7.3 DNA .....	33
7.4 RNA .....	41
7.5 Vyhodnocení .....	46
8 VÝSLEDKY .....	47
9 DISKUSE .....	53
10 ZÁVĚR.....	56
11 LITERATURA.....	57
12 POUŽITÉ ZKRATKY .....	61

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1 Zkumavky VACUETTE® s EDTA
- Obrázek 2 Obecné schéma uložení tkáně nebo buněk do RNAlateru pro mRNA izolaci
- Obrázek 3 Schéma centrální dogmy molekulární genetiky
- Obrázek 4 Schéma Anchored oligo dT primerů pro reverzní transkripci
- Obrázek 5 Schéma přípravy reverzní transkripce a qPCR
- Obrázek 6 Znázornění qPCR procedury s využitím fluorescenčně značených sond
- Obrázek 7 Schéma navázání APC na aktivní aminokyselinu Faktoru V a následné štěpení Faktoru V na dvě inaktivní formy Faktoru Vi
- Obrázek 8 Rozdělení buněčných populací na tři fáze
- Obrázek 9 Schéma HOPE fixace
- Obrázek 10 Schéma izolace DNA pomocí izolačního kitu Quick-gDNA MiniPrep
- Obrázek 11 Horní a dolní rameno Nanodropu 1000
- Obrázek 12 Podstavec dolního ramena pro nanášení Blanku a vzorku
- Obrázek 13 Vzlínající se vzorek mezi horním a dolním podstavcem ramena Nanodropu 1000
- Obrázek 14 Čištění ramen Nanodropu 1000 buničinou
- Obrázek 15 Pozitivní signál z kanálu Green pro sondu FAM
- Obrázek 16 Pozitivní signál z kanálu Yellow pro sondu HEX
- Obrázek 17 Pozitivní signál z kanálu Green i Yellow
- Obrázek 18 Schéma izolace RNA pomocí izolačního kitu Direct-zol -RNA™ MiniPrep
- Obrázek 19 Metoda druhé derivace
- Obrázek 20 Stanovení genotypu DNA u vzorků fixovaných různými technikami
- Obrázek 21 Relativní exprese mRNA stanovené metodou druhé derivace pro vzorky fixované různými technikami
- Obrázek 22 Relativní exprese mRNA pro vzorky fixované různými technikami

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Srovnání metod FFPE, FTS a HOPE fixace
Tabulka 2	Rozdělení vzorků do triplikátů podle různých technik fixace pro RNA a DNA izolaci
Tabulka 3	Ředění DNA vodou v PCR čistotě na 25ng/μl
Tabulka 4	Teplotní profil Real-Time PCR
Tabulka 5	Reagencie pro Template primer mix
Tabulka 6	Reagencie pro RT MIX
Tabulka 7	Reakční mix pro qPCR
Tabulka 8	Teplotní profil pro qPCR
Tabulka 9	Koncentrace a čistota DNA pro vzorky fixované různými technikami
Tabulka 10	Stanovené genotypy a signály z kanálu Green a Yellow pro vzorky fixované různými technikami
Tabulka 11	Koncentrace a čistota RNA pro vzorky fixované různými technikami
Tabulka 12	Relativní koncentrace a Take off point pro jednotlivé vzorky fixované různými technikami



# 1 ÚVOD

Biologický materiál má omezenou dobu použití pro klinické aplikace, a proto je do budoucnosti důležité dbát na jeho efektivní možnosti uskladnění. V současnosti se v medicínských, výzkumných a diagnostických zařízeních používají různé druhy fixace biologického materiálu, z nichž nejznámější je formaldehydová fixace nebo uchování biologického materiálu při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tato práce se zabývá porovnáním výhod a nedostatků nedávno zavedené techniky fixace buněk pomocí HOPE činidla a se současně používanými technikami uskladnění biologického materiálu při  $-80^{\circ}\text{C}$ , v protektivním činidle RNAlateru a použití čerstvého materiálu.

HOPE fixace je novodobá technika používaná pro uskladnění biologického materiálu pomocí HOPE činidla, které má protektivní účinek vůči dalším dehydratačním a degradačním krokům a následně dochází k zalití biologického materiálu nízkotajícím parafinem. Biologický materiál uskladněný v parafinu vydrží několik let při  $4^{\circ}\text{C}$  a pro klinické aplikace je zdrojem materiálu pro izolaci RNA a DNA o vysoké kvalitě. Z takto různě uskladněného biologického materiálu byla pro srovnání technik fixace provedena extrakce nukleových kyselin a jejich kvalita ověřena v klinických aplikacích (reverzní transkripce, kvantitativní RT-PCR, Nanodrop 1000, genotypizace).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Biologický materiál

Mezi nejčastěji používaný biologický materiál sloužící k vyšetření v humánní medicíně patří krev, moč, stolice, bronchoalveolární lavážní tekutina, další materiál jako jsou tkáně a orgány získané při operacích tzv. biopsií.

V této práci byla použita plná nesrážlivá krev jako biologický materiál pro izolaci buněk a jejich následnou fixaci a extrakci nukleových kyselin.

#### 2.1.1 Odběr materiálu

Odběr biologického materiálu je součástí nejen rutinních vyšetření u lékaře, ale také se provádí jako běžná metoda ve výzkumných zařízeních.

Odběr biologického materiálu je prvním krokem potřebným k získání reprezentativního vzorku bez obsahu kontaminantů a dalších nežádoucích stop. Technika odběru vzorku je zvolena tak, aby odběr byl co nejšetrnější a nejrychlejší vůči pacientovi a také vůči samotnému vzorku, tedy aby byla zachována ultrastruktura buněk a nedocházelo k autolytickým procesům. Jelikož odebraný vzorek se může dlouhým stáním při pokojové teplotě znehodnotit, je potřeba aby vzorek podle jeho původu (tkáň, krev atd.) byl uchován a zpracován podle potřeby jeho dalšího využití.

Pro odběr plné nesrážlivé krve se používají odběrové zkumavky VACUETTE® (Obr. 1) s EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina = koagulační činidlo), které vyváže vápenaté ionty a tím blokuje koagulační kaskádu. Místo, ve kterém dochází ke zpracování vzorku je laboratoř, která splňuje požadavky pro tyto účely. Mezi nezbytné požadavky patří: dobré osvětlení, klimatizovaný prostor, vybavení pracovními stoly se sedacím nábytkem, úložné prostory pro laboratorní pomůcky a chemikálie, rozvod vody, elektřiny a plynu.

Součástí laboratoře pro zajištění jejího dobrého chodu je také dobře proškolený personál dodržující veškerá pravidla ochrany a bezpečnosti zdraví při práci (Jirkovská, 2009).



Obr. 1: Zkumavky VACUETTE® s EDTA (přepřacováno podle [www.dialab.cz](http://www.dialab.cz))

### 3 FIXACE

Po odebrání vzorku je potřeba zachovat jeho strukturu buněk ve stavu, který co nejlépe připomíná situaci v živém organismu (Maňáková & Seichertová, 2001). Po odebrání vzorku dochází k přerušení veškerých regulačních mechanismů mezi buňkami, k zastavení přívodu kyslíku, živin a naopak odvádění metabolitů z buňky ven, vzniklých při chemických reakcích. V buňkách pak dochází k dezorganizaci buněčného metabolismu. Aktivními činiteli v buňkách se stanou jejich vlastní enzymy, které narušují buňku svou nekoordinovanou činností a způsobují samonatravení buňky (autolýzu). Pokročilá autolýza vzorek znehodnocuje natolik, že ho nelze dále analyzovat. Proto je nutné vzorky fixovat, aby došlo k zastavení těchto destruktivních procesů, které narušují prostředí buňky (Jirkovská, 2009).

Dalším účelem fixace je konzervace buněk a zastavení růstu bakterií a plísní. Nevhodnou fixací může dojít k ovlivnění chemických vlastností struktury proteinů, antigenů a aktivity enzymů nebo fyzikálních vlastností jako jsou změny propustnosti biomembrán, transformace cytoplasmy apod. V posledních letech došlo k hledání nových alternativních látek a postupů fixace biologických materiálů, které se vyznačují dobrými vlastnostmi především k zachování makromolekul, antigeních determinant, RNA, DNA a proteinů. Jako ideální fixační činidlo se očekává látka, která předá biologickému materiálu pevnost pro jeho následné zpracování, odolnost komponentám materiálu před rozkladem, hnilobou a autolýzou. Do nedávna nebylo nalezeno žádné ideální fixativum, které by splňovalo všechny tyto předpoklady, zachovávalo buněčnou morfologii a přitom neměnilo složení vzorku tak, že by měnilo reaktivitu chemických skupin a tím bránilo detekci určitých látek. Z tohoto důvodu je potřebné více se věnovat této problematice a najít vhodný postup nebo fixaci, která by splňovala všechny tyto parametry anebo alespoň spojovala většinu výhod všech fixativ (Hewitt et al. 2008).

## 3.1 Historie fixace

### 3.1.1 Formaldehydová fixace

Mezi nejznámější a pravděpodobně nejpoužívanější fixační činidlo biologických materiálů patří formaldehyd. Formaldehyd jako první objevil Alexander Butlerov v roce 1859 a od té doby byly zkoumány jeho účinky a možné využití. Nejdříve byl formaldehyd zkoumán jeho vodný roztok Ferdinandem Blumem, který ho zředil na 4% koncentraci. Blum objevil jeho možné účinky jako antiseptikum a na základě jeho podobnosti a alkoholem, který se tehdy používal v histologii pro uchování tkání, zahájil pozoruhodnou kariéru v experimentální medicíně, v níž byl první osobou na světě, který používal formaldehyd jako fixativum a zároveň objasnil chemické chování formaldehydu (Fox et al. 1985).

Formaldehydová fixace je tedy známa už několik desetiletí a od počátku 20. století formaldehyd využívají patologické laboratoře po celém světě díky jeho komfortní manipulaci, přesnosti a cenové dostupnosti. Ovšem doposud bylo provedeno jen několik studií zaměřených na fyzikální a chemické aspekty formaldehydu, které nejsou příliš do budoucna přívětivé pro uchování biologického materiálu (Thavarajah et al. 2012).

V dnešní době se používá tradiční metoda fixace s 10% koncentrací formaldehydu a následné zalití do parafinu. Nicméně formaldehyd díky svým toxickým vlastnostem a škodlivostí vůči životnímu prostředí čelí výrazným kritikám. Navíc dlouhodobé skladování ve formaldehydu způsobuje oxidaci reaktivních skupin peptidů a tím je činí stabilnější a hůře odstranitelné promytím v alkoholu či vodě (Glennner, 1957).

Problémy spojené s formaldehydovou fixací jsou tedy spojené zejména se zdravotními riziky, degradací RNA a DNA, zesíťováním proteinů zejména fosfoproteinů a ztrátou antigeních determinant. Celková míra změn v daném vzorku indukovaná formaldehydem je závislá na koncentraci, pH a teplotě fixativa. S rostoucí teplotou a koncentrací činidla roste degradace a uchovatelnost nukleových kyselin.

Zdravotní rizika spojené s používáním formaldehydu hrozí především v rozvojových zemích, kde nemají klimatizované místnosti a formaldehydové páry tak mohou působit na dýchací orgány, oči apod. Dnes se při práci s formaldehydem používají speciální rukavice a ochranné pomůcky, ale i přesto existuje potencionální nebezpečí, a to při přenosu většího množství vzorků (tkání) do větších nádob s formaldehydem a jeho následné rozlití v patologické laboratoři. Mezi nejžádanější fixativa patří formaldehyd právě díky své finanční dostupnosti, snadné manipulaci a přípravě. Ovšem negativa v případě formaldehydu výrazně převažují nad jeho pozitivy, a proto pokrok klinických přístupů směřuje k zavedení rutinních fixačních metod,

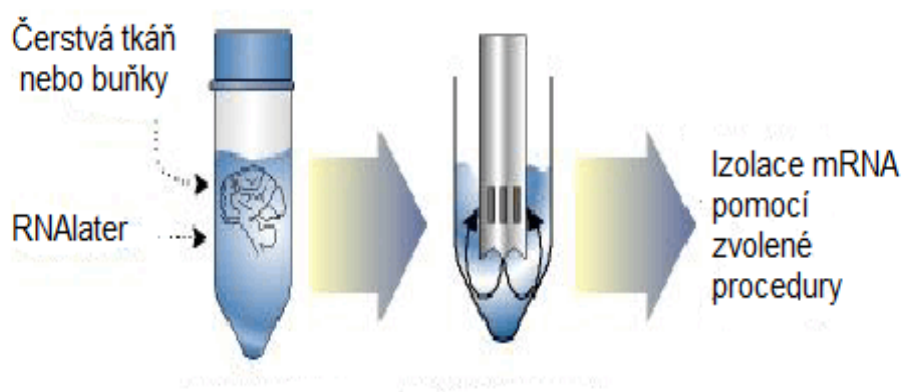
kteře budou zajiřřovat dostatečnou ochranu a kvalitu nukleov3ch kyselin a protein3ch pro molekul3rnn3 anal3zu v diagnostice (Tokuda et al. 1990, Noguchiet et al. 1997).

## 3.2 Novodob3 fixativa

### 3.2.1 RNAlater

RNAlater je protektivn3 sloučenina chr3n3c3 buněčnou RNA, kteř3 slouží k uskladn3n3 vzorku (tk3ně, buněk apod.) ihned po jeho z3sk3n3. D3ky moŹnosti uloŹen3 vzorku ihned do RNAlateru n3m toto fixativum ušetř3 čas a ztr3tu d3leŹit3ch komponent biologick3ho materi3lu b3hem dlouh3ho st3n3 např. na s3le nebo před zmraŹov3n3m v tekut3m dus3ku apod. RNAlater rychle pron3k3 do tk3n3, čímŹ ji stabilizuje a chr3n3. Při pouŹit3 RNAlateru je d3leŹit3, aby biologick3 materi3l byl zcela ponořen do tekutiny, uv3d3

se do p3tkr3t v3tř3ho objemu neŹ je vzorek (www.lifetechnologies.com, Obr. 2). Uskladn3n3 v RNAlateru lze rozdělit podle doby p3soben3 RNAlateru. Pokud se jedn3 o den, vydrŹ3 vzorek při laboratorn3 teplot3, pokud se jedn3 o t3dny a m3s3ce uloŹ3 se vzorek v RNAlateru do -20°C.



Obr. 2: Obecn3 sch3ma uloŹen3 tk3n3 nebo buněk do RNAlateru pro mRNA izolaci (www.lifetechnologies.com)

Skladov3n3 biologick3ho materi3lu v RNAlateru neruř3 molekul3rnn3 ani histologick3 anal3zy. D3ky jeho netoxick3m vlastnostem pŹekon3v3 fixaci formaldehydem a ve srovn3n3 s čerstv3 zmraŹen3mi vzorky je u n3j v3hodou, Źe se nemus3 rozmrazovat a tud3Ź u n3j nedojde k zbytečn3 degradaci RNA. V3hodou je tedy rychl3 pŹenos genetick3ho materi3lu do RNAlateru, nen3ročné skladov3n3, snadn3 manipulace a pŹedevř3m netoxick3 vlastnosti (Florell et al. 2001).

### **3.2.2 HOPE fixace**

Je to několik let, kdy byla objevena HOPE fixace (**H**epes glutamic acid buffer mediated **O**rganic solvent **P**rotection **E**ffect). Jedná se o novou nadějnou techniku, která se svým pracovním postupem podobá klasické formaldehydové fixaci (Braun et al. 2011).

#### **3.2.2.1 Popis HOPE fixace**

Jedná se o fixaci, která využívá ochranné činidlo tzv. HOPE solution, aceton jako jediné dehydratační činidlo a nízkotající parafin přehřátý na 52 - 54°C (Vollmer et al. 2006). U každé fixace je cílem chránit vzorek a stabilizovat jej pro dlouhodobé uchování a následné klinické aplikace. Při HOPE fixaci se proto využívá nejdříve HOPE solution, do kterého jsou čerstvé vzorky ponořeny a inkubovány zpravidla přes noc. HOPE solution je hyperosmolární sloučenina, která má ve svém složení směs aminokyselin o různých koncentracích (10 – 100 mM) a vykazuje pH o 5,8 – 6,4 při pokojové teplotě. Cílem ponoření vzorku do HOPE solution je jeho pronikání difuzí do vzorku a ochrana před následujícími kroky. Následnými kroky jsou totiž dehydratace pomocí organického acetonu, který svým působením vysráží většinu HOPE solution a ponechá jen nepatrný zbytek pro další ochranu a kroky fixace. Díky HOPE solution dochází i k rychlejšímu zpřístupnění průniku acetonu do vzorku, a tak je jeho dehydratační účinek společně s denaturačním účinkem rychlejší a nedochází k rozsáhle denaturaci, naopak slouží k zachování vysoké kvality RNA, DNA a antigenních struktur. Dalším krokem fixace je zalití vzorků přehřátým nízkotajícím parafinem a inkubace přes noc při 60°C. Infiltrací parafinu do vzorku se zaručí odstranění acetonu a zbytku HOPE solution, který má zde poslední ochranné účinky (Oler et al. 2001).

#### **3.2.2.2 Studium HOPE fixace, FFPE a FTS**

HOPE fixace byla v několika studiích zkoumána a srovnávána s dalšími druhy fixace biologického materiálu, a to s nejčastěji používanou formaldehydovou fixací (formalin fixation and paraffin embedding = FFPE) a s uskladněním čerstvých vzorků při -80°C (fresh frozen tissue=FTS) (Uhlir et al. 2004). V těchto studiích se autoři zaměřovali především na výhody a nevýhody HOPE fixace s ohledem na výsledky molekulárních analýz jako jsou (H&E barvení, fluorescenční in situ hybridizace, DNA a RNA extrakce, kvantitativní RT-PCR, proteinová extrakce a western blotting) (Braun et al. 2011).

Význam veškerých fixací spočívá v umožnění vytvoření rozsáhlých biobank (úložišť) po celém světě, které obsahují nemalé množství vzorků, s nimiž se i po dlouholetém uskladnění pracuje. Následně mají využití v klinických aplikacích, kde by měli poskytovat reprodukovatelné výsledky jak pro výzkum, tak pro diagnostiku. Díky vytvoření biobank a následných internetových databází, které obsahují klinické informace o daných vzorcích, je zaručen rozvoj ve výzkumných organizacích nejen v jednom státě, ale celosvětově. To vše je nutné k získání povědomí v rámci této problematiky a také k rostoucímu zájmu a požadavkům na skladování biologického materiálu (Troyer, 2008). HOPE fixace proto nabízí úplně nový a na uskladnění nenáročný směr fixace se značnými výhodami oproti FFPE a srovnatelnými výsledky s FTS.

Ze studií srovnávající všechny aspekty těchto fixačních metod vyplývá, že obecně nejvíce používaná technika fixace je FTS z důvodu jejího největšího použití v širokém spektru molekulárních analýz. Nevýhodou této techniky je složitější manipulace a poměrně vyšší ekonomické náklady na uskladnění. Co se týče výsledků z molekulárních analýz, tak FTS poskytuje nejhorší výsledky z hlediska morfologie vzorku díky vytvoření zmrzlých artefaktů narušujících histologickou kvalitu a interferujícího pozadí (Desciak & Maloney, 2000). Naopak FTS poskytuje nepřekonatelné výsledky z hlediska kvality a množství extrahované RNA, DNA a proteinů. FFPE patří mezi nepoužívanější metody z hlediska snadné manipulace, finanční nenáročnosti a díky vysoce automatizovanému protokolu. V morfologii vzorku svou kvalitou překonává FTS, ale díky degradaci nukleových kyselin je další molekulární analýza FFPE vzorků velmi omezená.

HOPE fixace je jedna z málo technik, která má potenciál k překonání problémů spojených s FFPE a FTS. Co se týče výsledků z barvení a imunohistochemie vzorku, tak HOPE fixace poskytuje podobně kvalitní výsledky jako FFPE. Z hlediska kvality a množství extrahované RNA, DNA a kvality proteinů, poskytuje HOPE fixace srovnatelné výsledky s FTS. Dále finanční náročnost je značně nižší než u FTS, ale mírně vyšší než u FFPE, srovnání těchto metod je shrnuto viz Tab. 1.

Závěrem lze říci, že srovnávací studie provedené paralelně na vzorcích FFPE, FTS a HOPE, skutečně poskytují důvěryhodné a pro HOPE fixaci pozitivní výsledky. HOPE fixace proto slibuje úspěšné využití v diagnostice a výzkumu pro potenciální uložení vzorků (Braun et al. 2011).



Tab. 1: Srovnání metod FFPE, FTS a HOPE fixace

Kritéria	HOPE fixace	FFPE	FTS
Ekonomická náročnost	++	+	+++
Délka protokolu	+++	++	+
Morfologická kvalita	+++	+++	+
Kvalita a množství RNA a DNA	+++	+	+++
Využití pro klinické aplikace	+++	+	+++

\*+ nejnižší, ++ střední, +++ nejvyšší

### 3.2.2.3 Úskalí HOPE fixace

HOPE činidlo obsahuje nepatrné množství (0,03%) azidu sodného ( $\text{NaN}_3$ ), který v tomto množství není stanoven jako nebezpečný, ale i tak jeho toxicita v tomto množství nebyla doposud prozkoumána. Proto se z důvodu bezpečnosti doporučuje pracovat v ochranných rukavicích.

Dalším možným problémem spojeným s HOPE fixací je neúplná denaturace strukturálních proteinů, enzymů a nukleových kyselin, což znamená, že takto fixovaný materiál nesplňuje základní požadavek pro fixaci a to, umrtvení virů, prionů, mikroorganismů, mykobakterií apod. Materiál může obsahovat tyto nežádoucí složky, a proto může být považován za stále infekční materiál, se kterým je nutno zacházet s patřičnou opatrností. Mezi další úskalí této techniky patří stále neautomatizovaný protokol, který se může v různých institucích i studiích lišit. Tato technika fixace je také značně zdlouhavější než u předchozích zmíněných technik. Dále nebyly provedeny studie sledující dobu uskladnění delší než 6 let, což je do budoucna ještě další výzvou pro prozkoumání (Oleret et al. 2001, Braun et al. 2011).

## 4 NUKLEOVÉ KYSELINY

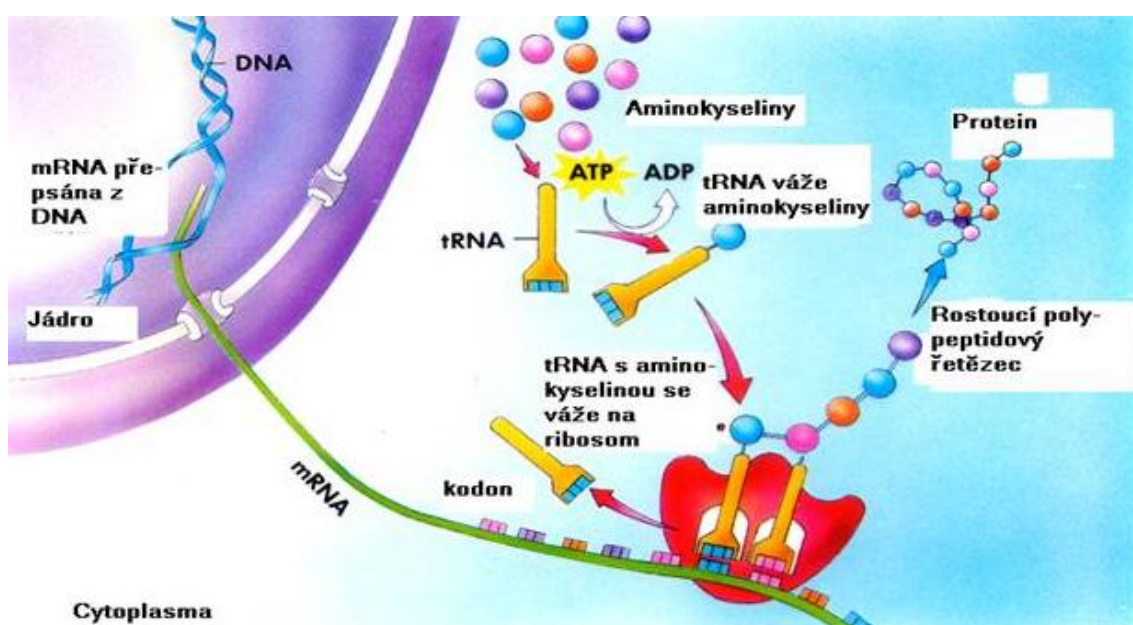
DNA je biologická makromolekula – polymer v podobě řetězce nukleotidů. Struktura DNA má charakter dvouvláknové prostorové spirály vytvářející prostor o průměru 2 až 3 nm. Směr vláken DNA má charakter pravotočivé šroubovice s opakovaným střídáním molekul cukru deoxyribosy a kyseliny fosforečné spojené esterickou vazbou. Ke každé molekule cukru je navázána dusíkatá báze směřující dovnitř spirály DNA. Dusíkaté báze dělíme na puriny a pyrimidiny. Mezi puriny patří adenin a guanin. Pyrimidiny jsou cytosin a thymin. Vazba mezi bázemi je zprostředkována vodíkovými můstky. Párování bazí mezi sebou je určeno z důvodů prostorových a fyzikálně-chemických následovně: adenin – thymin A-T, cytosin – guanin C-G. Z toho vyplývá, že párování dusíkatých bazí je striktně určeno, ale jejich uspořádání po spirále DNA je různé, a tím vzniká obrovský počet kombinací. Pořadí bazí po celé délce spirály DNA pak určuje tok genetické informace označované jako sekvence nukleotidů (Vacek, 1995). Molekula kyseliny ribonukleové se od DNA liší tím, že je tvořena jedním vláknem nukleotidů. Cukr deoxyribosa je nahrazena ribosou a dusíkatá báze thymin je zastoupena uracilem. Podle funkce rozlišujeme tři typy RNA: transferová, mediátorová a ribozomová.

Mediátorová RNA je ze všech nejdůležitější, je totiž nositelkou genetické informace z jádra, kde dochází k replikaci DNA a k přepisu pomocí specifických enzymů do mRNA procesem transkripce. Následně mRNA prodělává posttranskripční sestřih, kterým je upravena do výsledné mRNA, která putuje do cytoplasmy, kde pomocí tRNA a rRNA dochází k proteosyntéze, což je základním dogmatem molekulární genetiky (Obr. 3). Proteiny následně podléhají dalším posttranslačním modifikacím, kterými se upravují do své finální podoby, tak aby plnily různé enzymatické a stavební funkce (Vacek, 1995).

DNA i RNA jsou zásadním nástrojem řady klinických aplikací. Přímá diagnostika DNA zjišťuje, zda testovaná DNA nese či nese mutaci analyzovaného genu. K tomu se využívá především technika PCR (polymerázová řetězová reakce) založená na amplifikaci cílové sekvence DNA pomocí specificky navržených primerů. Metoda PCR umožňuje vizualizaci a analýzu studovaného genu. V nepřímé diagnostice DNA se využívají vazebné markery, což jsou polymorfní sekvence DNA vyskytující se v celém genomu. Tyto markery jsou součástí haplotypového bloku, u něhož můžeme sledovat segregaci alel studovaného genu z rodičů na potomky.

K technikám využívaným v nepřímé diagnostice patří převážně sekvenační technologie nové generace (454 ROCHE, Illumina). Postupy pro analýzu a přípravu DNA rovněž zahrnují fragmentaci molekul DNA, cílené mutagenese, ligaci, amplifikaci a celé řady dalších technik prováděných v podmínkách in vitro. (Cederbaum et al.1984).

V této práci byly izolovány RNA a DNA z různě fixovaných vzorků pro následné klinické aplikace. Jelikož samotná RNA je nestabilní z důvodu přirozené lability a existence aktivních ribonukleáz, tak se RNA přepisuje metodou reverzní transkripce do stabilnější formy cDNA (komplementární DNA, obsahující jen kódující sekvence), která byla v této práci následně využita ke sledování genové exprese pomocí RT-qPCR.

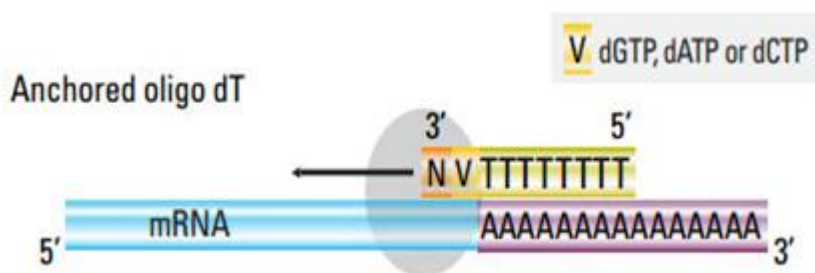


Obr. 3: Schéma centrální dogmy molekulární genetiky (přepřacováno dle [www.ciselniky.dasta.mzcr.cz](http://www.ciselniky.dasta.mzcr.cz))

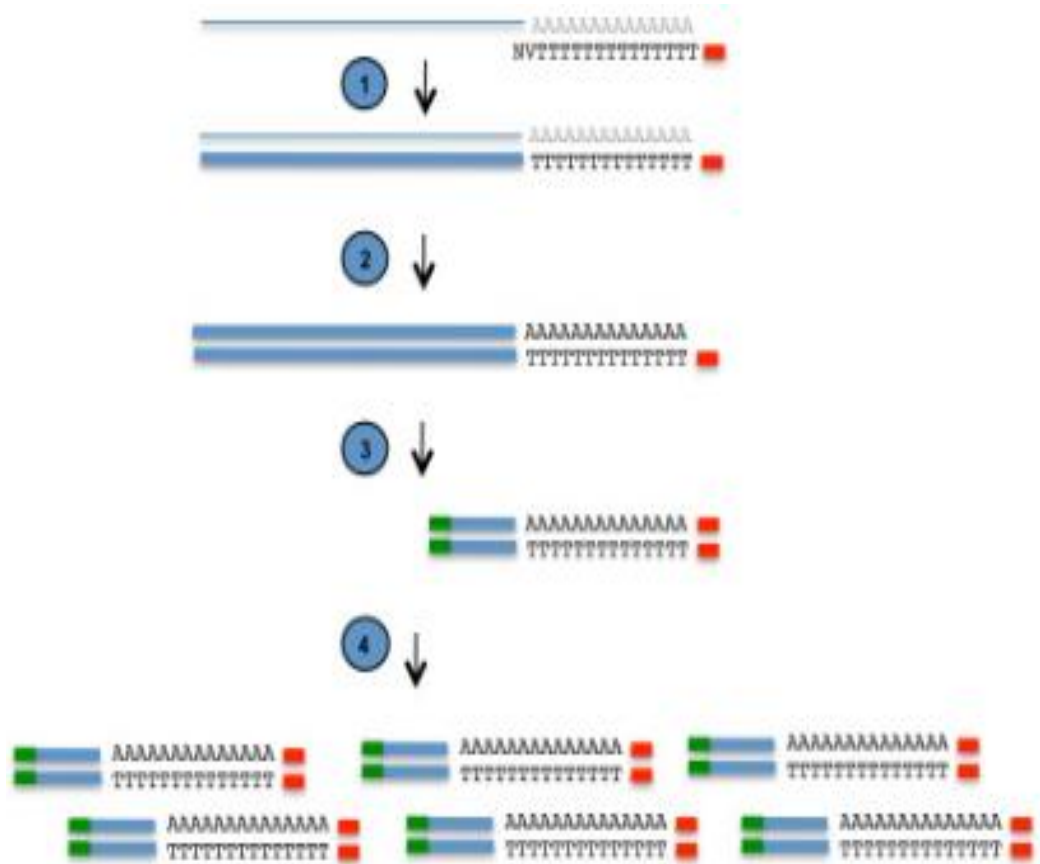
## 5 METODY

### 5.1 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces opačný k přepisování genetické informace. Za normálních okolností dochází ve všech organismech k přepisu deoxyribonukleové kyseliny DNA do ribonukleové kyseliny RNA. V případě reverzní transkripce dochází k přepisu z RNA do DNA (cDNA). Tento proces je uskutečněn díky enzymu reversní transkriptáza, která má zachovalou polymerázovou aktivitu. V této práci byla syntetizována cDNA z mRNA, která podléhá posttranskripční modifikaci – polyadenylaci. Procesem polyadenylace byly na 3' konec mRNA navázány adeninové nukleotidové sekvence, které usnadňují transport mRNA z jádra do cytoplazmy, větší stabilitu mRNA a také navázání oligo (dT) primerů. Následně získaná cDNA sloužila k amplifikaci pomocí PCR (Obr. 5), ([www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)). V této práci byl použit Anchored oligo dT, který se váže na poly-A konec mRNA a má ještě na konci dva nukleotidy „VN“, kde V je dA, dC, nebo dG a N je dA, dC, dG nebo dT (Obr. 4). Následně takto připravená cDNA je doporučena pro použití v qPCR. ([www.lifetechnologies.cz](http://www.lifetechnologies.cz), Bustin, 2004).



Obr. 4 : Schéma Anchored oligo dT primerů pro reverzní transkripce (přepřacováno dle [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com))



Obr. 5: Schéma reverzní transkripce a qPCR (přepřacováno dle [www.wordpress.com](http://www.wordpress.com))

## 5.2 qPCR

Polymerázová řetězová reakce je založena na replikaci nukleových kyselin, které jsou základním molekulárním dogmatem všech živých organismů.

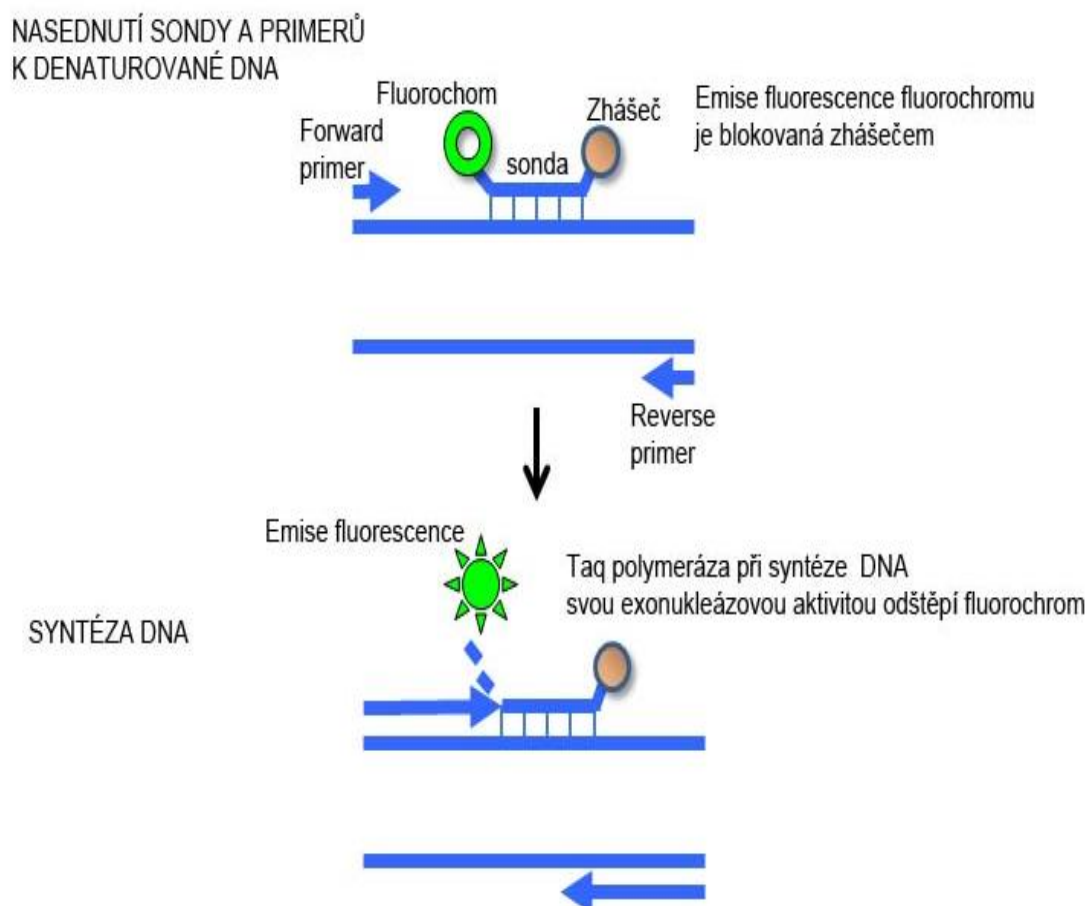
PCR je technika sloužící pro amplifikaci DNA sekvencí v *in vitro* podmínkách. Metoda byla v roce 1985 navržena a pojmenována panem Mullisem a jeho pracovním kolektivem (Mullis&Fallona, 1987). Samotnou reakci realizuje enzym DNA polymeráza, která syntetizuje komplementární vlákno DNA na základě templátu ve směru 5'-3' konec. V reakční směsi se dále nacházejí deoxynukleotidy, primery a pufr obsahující ionty  $Mg^{2+}$ . Reakce probíhají v zařízení nazývaném termocykler, který je schopný měnit teplotu automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Tímto způsobem může vzniknout až miliarda kopií amplifikované molekuly. Počet syntetizovaných molekul produktu se vypočítá podle vztahu  $2^n$  ( $n$ = počet cyklů). V první fázi dochází k denaturaci dvouřetězcové molekuly DNA při teplotě 94°C. Vlivem denaturace dochází k rozvolnění vodíkových můstků mezi jednotlivými vlákny DNA a vznikají dvě samostatná DNA vlákna. Následující krok je umožněn díky snížení teploty termocyklu na 50-65°C, což je optimální teplota pro nasedání krátkých oligonukleotidu (primerů) na jednotlivé úseky DNA, které chceme kvantifikovat. Po nasednutí primerů, které ohraničují začátek a konec úseku pro kvantifikaci, dochází v termocykleru k dalšímu zvýšení teploty (65-75°C), které je vhodné k syntéze nových řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy. V této fázi dochází k exponenciálnímu nárůstu produktu.

## 5.3 Real-Time PCR

Technologií RT-PCR je možné sledovat množství vznikajícího produktu v reálném čase pomocí záznamu fluorescenčního signálu pomocí specifických oligonukleotidových sond.

Tyto sondy, též nazývány jako fluorescenční reportérové sondy nasedají během syntézy nových vláken na jednovláknovou DNA. Proto, aby byl nárůst DNA zaznamenán detektorem v termocykleru, má sonda speciální strukturu, kterou je komplementární k danému úseku DNA a zároveň na jednom konci obsahuje tzv. fluorofor (R) a na druhém konci tzv. zhášec (Q). Blízká vzdálenost mezi fluoroforem a zhášecem na sondě zabránění šíření fluorescence emitované z fluoroforu. Zhášec zachytává fluorescenci a zabraňuje jejímu šíření do okolí. Důsledkem exonukleázové aktivity DNA polymerázy ve směru 5'-3' konci, dojde k nejen syntéze nového vlákna, ale také k narušení blízkosti fluoroforu od zhášec, který se odštěpí a tím pádem při excitaci laserem dojde k uvolnění emitujícího záření z fluoroforu zaznamenaném

detektorem v každém cyklu (Obr. 6), (Peccoud et al. 1996, Liu et al. 2002, Gupta et al. 2003). Ke správnému vyhodnocení kvantifikace cDNA a genotypizace DNA pro vzorky fixované různými technikami byla v této práci použita technika Real-Time qPCR (RT-qPCR).



Obr. 6: Znázornění qPCR procedury s využitím fluorescenčně značených sond (přepřacováno podle [www.labguide.cz](http://www.labguide.cz))

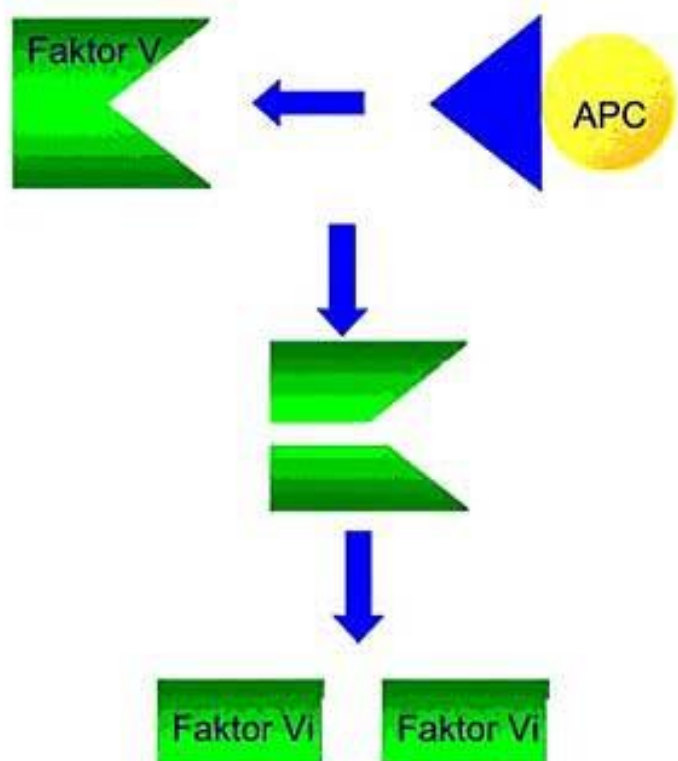
## 6 LEIDENSKÁ MUTACE

Pro ověření, zda DNA získaná z různých technik fixace dosahuje dostatečné kvality pro další klinické aplikace byla v této práci provedena detekce mutace G1691A v genu kódujícím Faktor V technologií Real-time PCR na přístroji Rotor Gene Q. Faktor V je součástí koagulační kaskády, která zajišťuje tvorbu trombu (sraženiny). Faktor V je nezbytný k aktivaci protrombinu na trombin, který vzápětí aktivuje fibrinogen na fibrin a dojde k vytvoření koagulační sítě, která pomocí krevních destiček, vápenatých iontů a dalších faktorů je stabilizována k vytvoření nerozpustné zátky. Tento mechanismus je udržován v rovnováze pomocí proteinu C (aktivovaný protein C =APC), který se váže na konkrétní aminokyselinu ve faktoru V a inhibuje jeho funkci tak, aby nedocházelo k trombotickým stavům (Obr. 7).

Leidenská mutace je mutace ve faktoru V, která způsobuje záměnu aminokyseliny guaninu za adenin v pozici G1691A. V důsledku této mutace se nemůže navázat protein C na aminokyselinovou sekvenci faktoru V koagulační kaskády a nedojde k jeho inhibici. Dochází tak k nadměrné tvorbě trombu v žilách a při utržení trombu od stěny endotelu může dojít k plicní embolii, která je příčinou náhlých úmrtí při nedostatečně rychlém odhalení. Leidenská mutace je získané autozomálně dominantní dědičné onemocnění, které nemá úplnou penetraci. Onemocnění se tedy může projevovat s různou intenzitou u homozygotů a heterozygotů. Homozygoti, kteří mají obě dvě zděděné alely genu faktoru V mutované, mají několikanásobně vyšší riziko tvorby trombů oproti heterozygotům s jednou mutovanou alelou tohoto genu.

Další rizika přispívající k rozvoji této nemoci jsou kouření, hormonální antikoncepce, těhotenství, operace apod. Proto je důležité diagnostikovat tuto mutaci u těhotných žen, žen používajících antikoncepci a u těch, kteří mají záznam této trombofilie v rodinné anamnéze (Schambect et al. 1997, Eichinger et al. 2002, Bloemenkamp et al. 1995, Kujovich 2011).





Obr. 7: Schéma navázání APC na aktivní aminokyselinu Faktoru V a následné štěpení Faktoru V na dvě inaktivní formy (přepřacováno podle [www.ismaap.org](http://www.ismaap.org))

## 6.1 Cíle práce

Teoretická část diplomové práce se zabývá možnostmi uskladnění biologického materiálu pomocí různých technik fixace. Hlavním zaměřením této práce je popsání novodobé techniky uskladnění biologického materiálu pomocí HOPE činidla a srovnání této fixace s nejčastěji používanými technikami fixace z různých studií, které převážně srovnávají HOPE fixaci s formaldehydovou fixací a skladováním biologického materiálu při  $-80^{\circ}\text{C}$ . V metodické části se tato práce zabývá použitými metodami (reverzní transkripce, kvantitativní RT-PCR, genotypizace).

Cílem této práce bylo srovnání nové techniky fixace buněk pomocí HOPE činidla se současně používanými technikami uskladnění biologického materiálu, jako jsou skladování při  $-80^{\circ}\text{C}$ , v protektivním činidle RNAlateru a použití čerstvého materiálu. Z takto uskladněného materiálu byla následně izolována RNA a DNA a jejich kvalita ověřena v klinických aplikacích (kvantitativní RT-PCR, Nanodrop 1000, genotypizace).

Závěrem bylo provedeno srovnání těchto technik skladování biologického materiálu pro RNA a DNA extrakci a jejich možnost použití pro klinické aplikace.

# 7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 7.1 Materiál

### 7.1.1 Biologický materiál

Vlastní plná nesrážlivá krev byla odebrána do zkumavek s protisrážlivým činidlem EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) v odběrové místnosti Ústavu imunologie FNOL vyškoleným personálem.

### 7.1.2 Přístrojové vybavení

Stolní centrifuga nechlazená-Hermle (BioTech)

Inkubátor (Robbins Scientific)

Třepačka BIOSAN VORTEX V-1 plus (Biosan)

Termoblok (Boekel scientific)

Termocykler (Eppendorf)

Box s laminárním prouděním (Thermo Scientific)

Rotor Gene Q (Qiagen)

Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)

### 7.1.3 Chemikálie

Použité kity:

Izolační kit Direct-zol -RNA™ MiniPrep (Zymo Research)

Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche)

Izolační kit Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research)

Detekční souprava QGENEFV (IAB)

Chemikálie:

Fosfátový pufr (PBS), (Exbio Olomouc s.r.o.)

Flotační činidlo (Ficoll), (Sigma Aldrich)

Voda v PCR čistotě (5Prime)

MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific)

PCR pufr (Thermo Scientific)

Start™ TaqDNA polymeráza (Thermo Scientific)

Primery (East Port)

TaqMan SONDY (Roche)  
Parafin (DCS Labline)  
Aceton (mikroCHEM)  
Isopropanol (SERVA)  
RNAlater (Life Technologies)  
HOPE solution (DCS Labline)  
Ethanol 99,8% (Lach-Ner)  
RNase inhibitor (Lab Mark)  
TRI reagent (Sigma Aldrich)

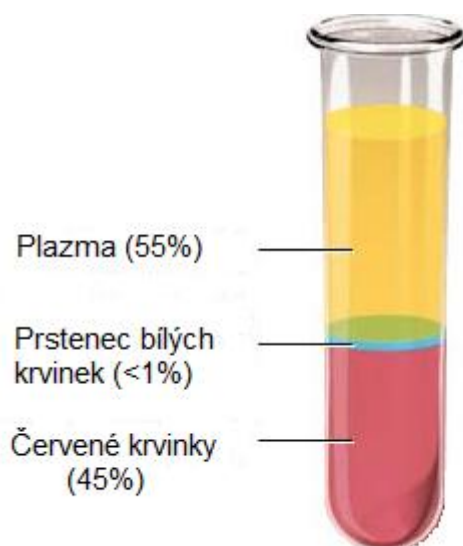
#### **7.1.4 Pomůcky**

Odběrové Zkumavky s EDTA 9 ml (Geiner bio-one)  
Zkumavky skleněné 9ml (GAMA)  
Zkumavky plastové 50 ml (SARSTEDT)  
Stojánek na zkumavky (SARSTEDT)  
Pipety, špičky, mikrozukavky plastové 2 ml (Eppendorf)  
Stojánek na mikrozukavky PP (Fisher Scientific)  
Buničina (Chemos CZ)  
Pasteurovy pipety (Ratiolab)  
Vinylové rukavice (Kimberly Clark)  
LoBind Tube (Eppendorf)  
Proužek 8 PCR mikrozukavek, PP (Verkon)  
Kryostojánek na mikrozukavky (Verkon)  
0,1ml stripy s víčky pro Rotor-Gene (IAB)  
Zásobník PCR – Cooler (Qiagen)

### 7.1.5 Příprava vzorků

Z plné nesrážlivé krve (72 ml) byla izolovány bílé krvinky za pomoci stabilizátoru pH fosfátového pufru (PBS) a pomoci flotačního činidla (Ficoll).

Zkumavky s krví byly rozděleny na 16 alikvotů o stejném množství a zředěny stejným množstvím PBS. Do 32 nových zkumavek bylo přidáno 64 ml Ficollu (2ml do každé). Poté směs krve s PBS byla navrstvena do zkumavek s ficolem (stejně množství do každé zkumavky). Dále byly vzorky centrifugovány 10 min/1500 otáček, a poté 10min/3000 otáček. Centrifugací byla směs rozdělena podle hustoty na dvě fáze (červené krvinky a ficoll s prstencem bílých krvinek), přičemž námi požadovaná fáze (prsteneček bílých krvinek) se nachází uprostřed viz. Obr. 8. Následně byly tyto prstence odebrány ze všech zkumavek do čtyř 50 ml zkumavek. Odebrané prstence byly stočeny 10min/4000 otáček. Po odstranění supernatantu byl pelet buněk rozsuspendován v 36 ml PBS. Směs byla rozdělena na 18 alikvotů (o objemu 2 ml) do 2 ml eppendorfek (9 alikvotů pro RNA izolaci a 9 alikvotů pro DNA izolaci) a stočeny 10min/4000 otáček. Supernatant byl opět vylit a izolované buňky byly rozděleny do triplikátů pro jednotlivé metody fixace (Tab. 2).



Obr. 8: Rozdělení buněčných populací na tři fáze (přepřacováno podle [www.ajurvedske-lazne.cz](http://www.ajurvedske-lazne.cz))

Tab. 2: Rozdělení vzorků do triplikátů podle různých technik fixace pro RNA a DNA izolaci

Počet vzorků	Vzorky pro RNA izolaci	Vzorky pro DNA izolaci
1	HOPE 1	HOPE 1
2	HOPE 2	HOPE 2
3	HOPE 3	HOPE 3
4	RNAlater 1	bb čerstvé 1
5	RNAlater 2	bb čerstvé 2
6	RNAlater 3	bb čerstvé 3
7	bb zmražené 1	bb zmražené 1
8	bb zmražené 2	bb zmražené 2
9	bb zmražené 3	bb zmražené 3

## 7.2 FIXACE

Pro fixaci byly použity bílé krvinky izolované dle předcházejícího postupu a následně byly fixovány různými technikami.

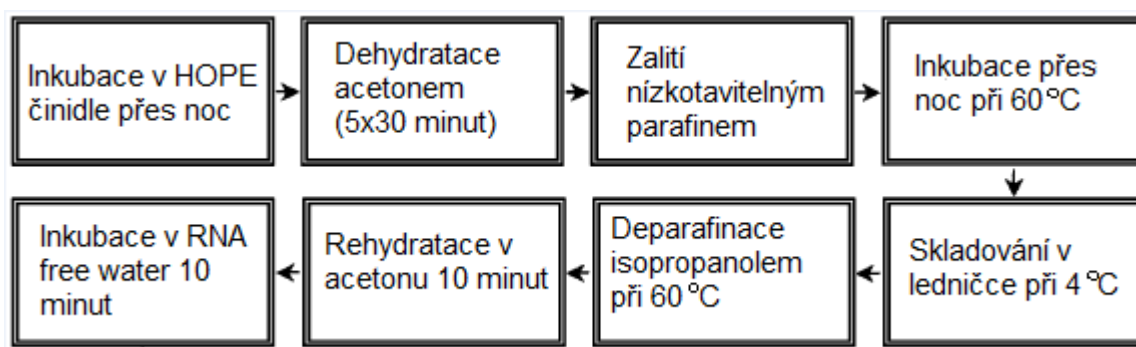
### Fixace pomocí HOPE činidla

Buňky v HOPE činidle byly ponechány přes noc (16-20 hod) v ledničce. Po inkubaci byly stočeny 10 min/4000 otáček a supernatant byl vylit.

Následně byla provedena dehydratace přidáním 1 ml acetonu (4°C) do každé 2 ml mikrozkušavky po dobu 30 minut. Po inkubaci v acetonu byly buňky stočeny 10 min/4000 otáček, supernatant byl vylit a celý krok s dehydratací byl opakován 5x. Následně byl přidán nízkotavící parafin (54-60°C) do každé mikrozkušavky a buňky byly inkubovány přes noc při 60°C. Další den byly vzorky ponechány na stole, aby se ochladily na laboratorní teplotu a dále byly uskladněny v lednici (4°C).

Pro klinické aplikace bylo potřeba odstranit parafin následujícím postupem:

Nejdříve byla provedena inkubace (30 min) v přehřátém isopropanolu (60°C), během inkubace byly vzorky krátce zvortexovány. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 10 min/4000 otáček a krok byl opakován do úplného odstranění parafinu. Následně byly buňky rehydratovány inkubací 10 minut v 70 % acetonu. Po inkubaci v acetonu byly vzorky stočeny, supernatant odstraněn a přidána RNA free voda, ve které byly vzorky inkubovány 10 minut (postup znázorněn viz. Obr. 9). Poté byly vzorky opět stočeny a supernatant odstraněn. Vzorky byly následně použity pro izolaci RNA a DNA (viz. kapitola DNA a RNA izolace).



Obr. 9: Schéma HOPE fixace (přepřacováno podle Olert et al. 2001)

### **Fixace pomocí RNAlater**

Tři alikvoty peletu bílých krvinek získané z izolace, byly resuspendovány ve 200  $\mu$ l RNAlateru (3x200  $\mu$ l) a ponechány 1 den v lednici a následný den uloženy do -20°C.

### **Fixace buněk v -80°C**

Šest alikvotů samotného peletu bílých krvinek bylo uskladněno při -80°C.

### **Buňky bez fixace**

Zbylé tři alikvoty získané z izolace bílých krvinek byly ihned použity pro izolaci DNA.



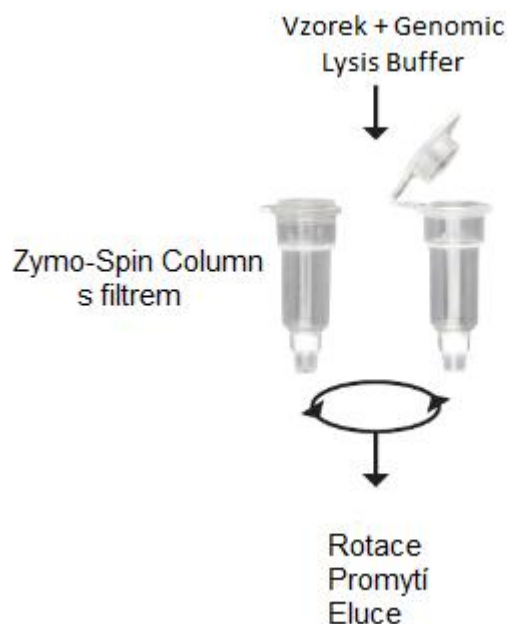
## 7.3 DNA

V této práci byla izolována DNA ze vzorků uskladněných pomocí HOPE činidla, buněk uskladněných při  $-80^{\circ}\text{C}$  a buněk čerstvých bez fixace. Izolace byla provedena pomocí izolačního kitu Quick-gDNA MiniPrep. Následně byla změřena koncentrace a čistota DNA pomocí Nanodrop 1000 a provedena genotypizace pomocí RT-qPCR.

### Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí izolačního kitu Quick-gDNA MiniPrep. Jedná se o jednoduchý postup pro rychlou izolaci celkové DNA. Pro izolaci DNA stačí přidat speciálně navržený lyzační pufr zajišťující lýzu buněk a provést následné centrifugační a promývací kroky, které zajistí purifikaci DNA. V tomto izolačním kitu se využívají purifikační kolonky (Zymo-Spin Column) obsahující filtr, na něhož se zachycují DNA a nečistoty. Kolonka s filtrem je vždy zasunuta do mikrozkušavky (Collection tube), do které se eluují nečistoty.

Pro izolaci DNA byly použity triplikáty buněk fixovaných v HOPE činidle, buňky uskladněné při  $-80^{\circ}\text{C}$  a buňky čerstvě izolované bez fixace. V prvním kroku izolace byly buňky 5-15 minut inkubovány s Genomic Lysis Buffer při pokojové teplotě. Během inkubace byla směs promíchána 4-6 s. Směs byla následně přenesena do kolonky s filtrem, který byl zasunut do mikrozkušavky. Poté byla směs stočena (všechny centrifugační kroky byly provedeny při  $10\,000\text{g}/1\text{ min}$ ) a průtok byl vylit. Filtr byl přenesen do nové mikrozkušavky a bylo přidáno  $200\ \mu\text{l}$  DNA PreWash Buffer a stočeno. Průtok byl opět vylit a filtr byl přenesen do nové mikrozkušavky. Následně bylo přidáno  $500\ \mu\text{l}$  g-DNA Wash Buffer a stočeno. Filtr byl opět přenesen do nové mikrozkušavky a k němu bylo přidáno  $50\ \mu\text{l}$  DNase/RNase-Free vody. Směs byla inkubována, a poté stočena 30 s při maximálních otáčkách a eluovaná DNA byla uchovávána při  $-20^{\circ}\text{C}$  (schématicky znázorněno viz. Obr.10).



Obr. 10: Schéma izolace DNA pomocí izolačního kitu Quick-gDNA MiniPrep  
(přepřacováno podle [www.zymoresearch.com](http://www.zymoresearch.com))

### Koncentrace a čistota DNA

Kvantifikační metody DNA se obecně rozdělují na specifické a nespecifické. Nespecifické metody jsou založené na kvantifikaci veškeré DNA ve vzorku bez ohledu na její specifitu a metody specifické jsou založeny na kvantifikaci konkrétní sekvence DNA. Jako nespecifická metoda v této práci byl použit Nanodrop 1000 a jako specifická metoda real-time PCR.

Nanodrop 1000 je unikátní UV-VIS spektrofotometr s patentovanou technologií, který pracuje s velmi malým množstvím vzorku (2  $\mu$ l). Nanodrop nepoužívá pro dávkování vzorku kyvety ani kapiláry, ale přímé dávkování vzorku na snímací zařízení. Vzorek vzlíná mezi dvěma rameny spektrofotometru a umožňuje pomocí optických vláken a povrchového napětí měření koncentrace DNA. DNA nejvíce absorbuje světelné záření o vlnové délce 260 nm, proto míra absorbance značí množství DNA v roztoku. Při měření koncentrace DNA se také měří míra kontaminace, která je založena na měření absorpčního maxima bílkovin při použití světelného záření o vlnové délce 280 nm. Stanovení míry kontaminace je na základě měření poměru absorbance při 260 nm a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Čistota DNA by se měla pohybovat mezi hodnotami 1,8-2,0. Při hodnotách nižších jak 1,7 se doporučuje DNA znovu purifikovat. Nanodrop je schopen měřit až při koncentraci 3700 ng /  $\mu$ l (dsDNA) bez ředění vzorku (Kočárek, 2007, [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)).

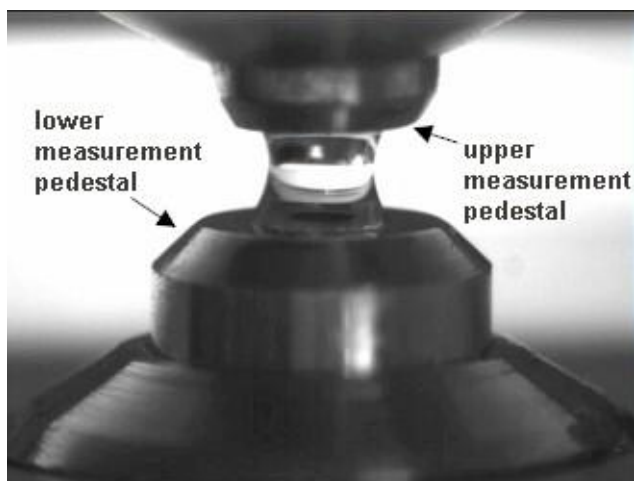
Před měřením na Nanodropu 1000 byly všechny vzorky DNA vytemperovány na laboratorní teplotu, krátce promíchány a stočeny. Pro měření bylo potřeba nejdříve nastavit software na počítači, který je kompatibilní s Nanodrop 1000. V softwaru bylo nastaveno měření koncentrace nukleových kyselin a následně bylo na dolní rameno Nanodropu 1000 napipetováno 5 ul vody s PCR čistotou pro nastavení jako Blank. Po přivření horního ramena s dolním, bylo v počítači nastaveno měření Blanku a po změření mohly být ramena Nanodropu 1000 znovu otevřeny a utřeny buničinou. Následně na dolní podstavec ramena mohly být aplikovány vždy 2 ul vzorku s DNA a mohlo se pokračovat v měření (Obr. 11-14).



Obr.11: Horní a dolní rameno Nanodropu 1000 (manuál Nanodrop 1000)



Obr. 12: Podstavec dolního ramena pro nanášení Blanku a vzorku (manuál Nanodrop 1000)



Obr. 13: Vzlínající se vzorek mezi horním a dolním podstavcem ramena Nanodropu 1000 (manuál Nanodrop 1000)

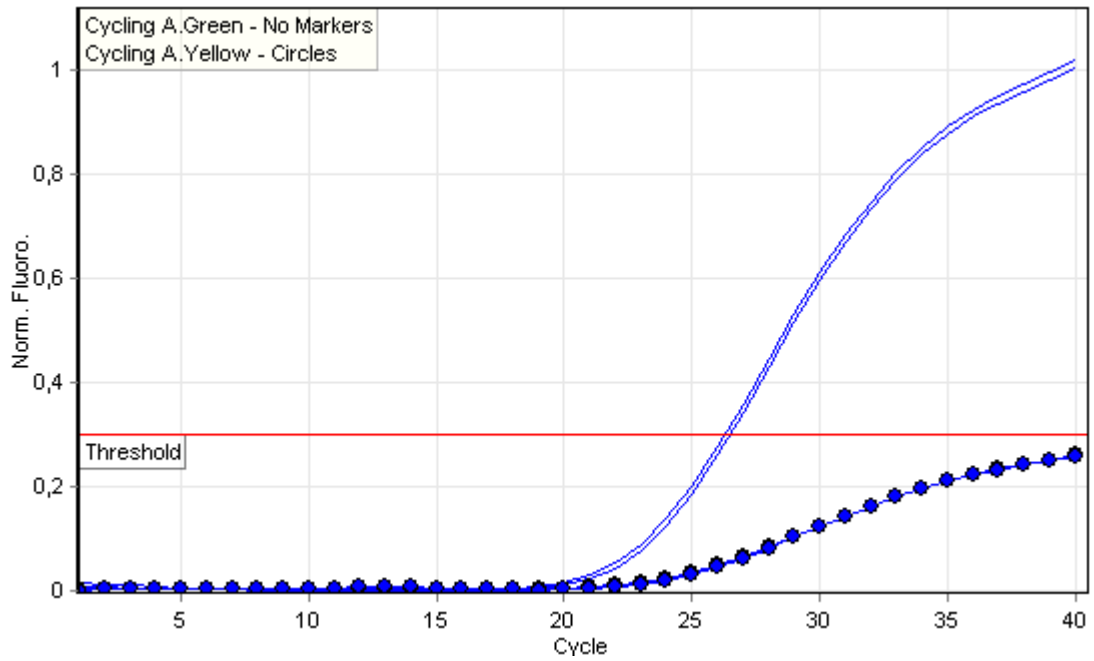


Obr. 14: Čištění ramen Nanodropu 1000 buničinou po každém měření (manuál Nanodrop 1000)

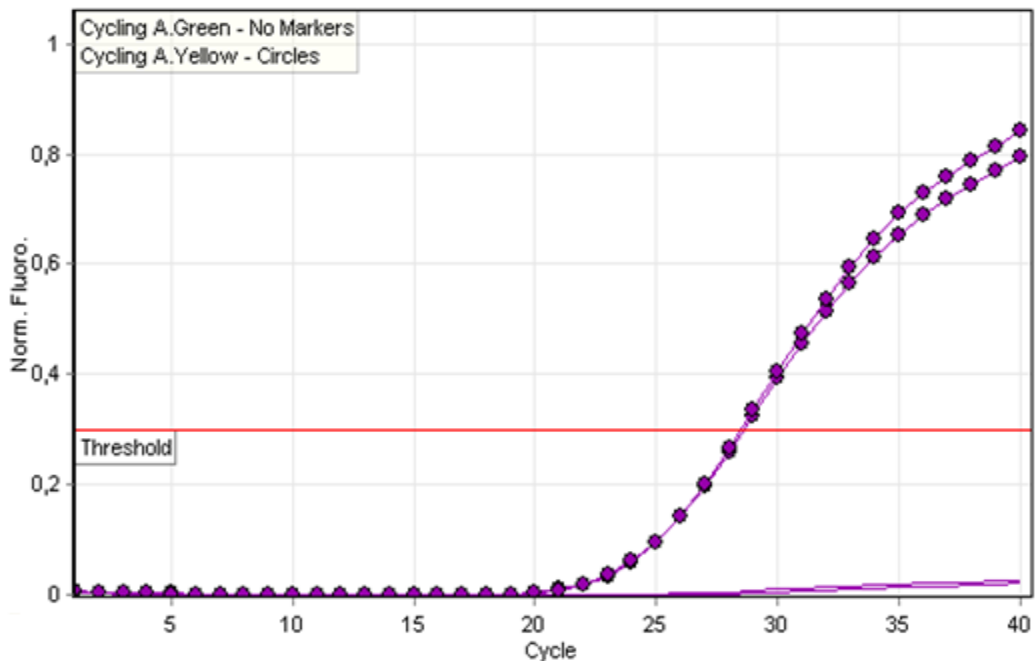
## Genotypizace

Pro genotypizaci DNA byla v této práci použita detekční souprava QGENEFV pro detekci mutace G1691A v genu pro faktor V (Leidenská mutace) pomocí Real-Time PCR na přístroji Rotor Gene Q. Měření bylo provedeno v triplikátech u vzorků fixovaných různými technikami (buňky uskladněné pomocí HOPE činidla, buňky zmražené a buňky čerstvé bez fixace).

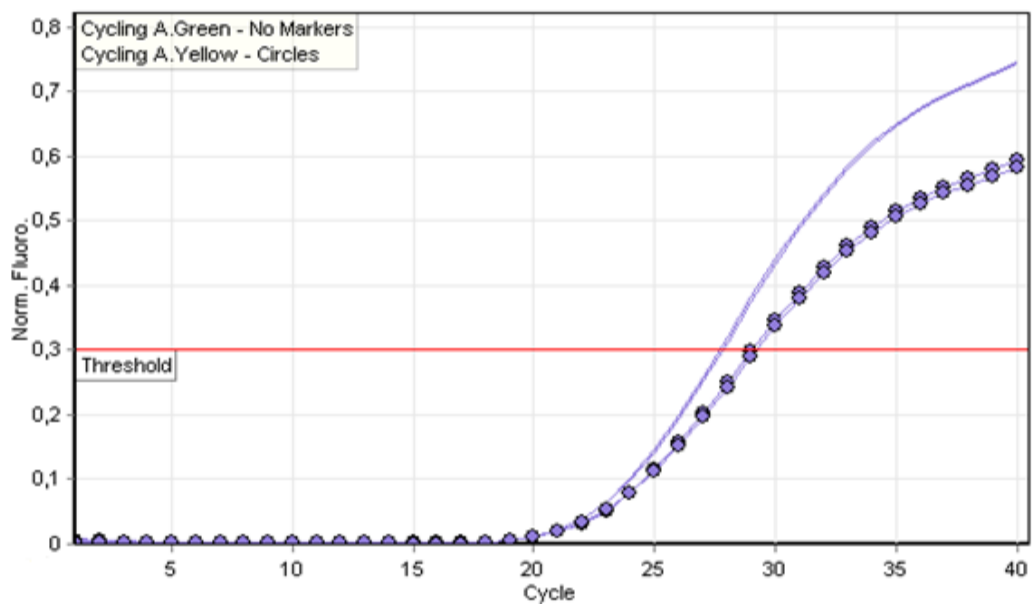
Principem tohoto postupu je amplifikace úseku nukleotidové sekvence, která byla vymezena použitím sekvenčně specifických primerů pomocí Real-Time PCR. S narůstajícím časem roste množství PCR produktu pomocí nasedání TagMan sond. Podle toho jaká alela genu se ve vzorku nachází, nasedají dvě různé sondy. Sonda FAM, nasedá na nemutovanou alelu (alela A, Wild Type) a poskytuje pozitivní fluorescenční signál ze zeleného kanálu (s rozsahem vlnových délek 470-510 nm, Green kanál), kdežto sonda HEX nasedá na mutovanou alelu genu (alela G) a poskytuje pozitivní fluorescenční signál ze žlutého kanálu (s rozsahem vlnových délek 530-555 nm, Yellow kanál). Tedy signál z kanálu Green poskytuje informaci o přítomnosti nemutované alely (Wild Type – v grafu netečkovaný signál, homozygot, Obr. 15) a signál z Yellow kanálu ukazuje na přítomnost mutantní alely (mutant – v grafu tečkovaný signál, homozygot, Obr. 16). U heterozygota, který obsahuje jak mutovanou tak nemutovanou variantu genu (alely AG), dochází k nasednutí obou typů sond (FAM i HEX) do oblasti genu a signál bude pozitivní v obou kanálech (Yellow i Green, tečkovaný i netečkovaný signál, heterozygot, Obr. 17).



Obr. 15: Pozitivní signál z kanálu Green pro sondu FAM (netečkovaný signál, homozygot, přepracováno dle manuálu QGENEFV, IAB)



Obr. 16: Pozitivní signál z kanálu Yellow pro sondu HEX (tečkovaný signál, homozygot, přepracováno dle manuálu QGENEFV, IAB)



Obr. 17: Pozitivní signál z kanálu Green i Yellow (netečkovaný i tečkovaný signál, heterozygot, přepracováno dle manuálu QGENEFV, IAB)

Před genotypizací byly nejdříve všechny DNA a MasterMix rozmrazeny při 4°C v chladících bločcích, poté promíchány a stočeny. DNA vzorky podle doporučení použitého kitu byly naředěny na 25 ng/μl (Tab. 3). Do zkumavek o objemu 0,1 ml bylo napipetováno 13 μl MasterMixu a následně byly ke každému mixu přidány 2 μl DNA/H<sub>2</sub>O jednotlivých vzorků získaných z různých druhů fixace. Jako referenční materiál byly použity 3 vzorky se známým genotypem. Dohromady byla RT-qPCR provedena s 15 μl směsi při teplotním profilu viz. Tab. 8.

Tab. 3: Ředění DNA vodou v PCR čistotě na 25 ng/μl

Vzorek	Koncentrace (ng/μl)	DNA (μl)	H <sub>2</sub> O (μl)
HOPE 1	43,5	11,5	8,5
HOPE 2	68,5	7,3	12,7
HOPE 3	97,6	5,1	14,9
bb čerstvé 1	47,9	10,4	9,6
bb čerstvé 2	51,6	9,7	10,3
bb čerstvé 3	52,7	9,5	10,5
bb zmražené 1	24,1	20,0	0,0
bb zmražené 2	58,8	8,5	11,5
bb zmražené 3	16,0	20,0	0,0

Tab. 4: Teplotní profil Real-Time PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	15s	35, snímání Green, Yellow
Nasedání primerů a syntéza DNA	62	30s	



## 7.4 RNA

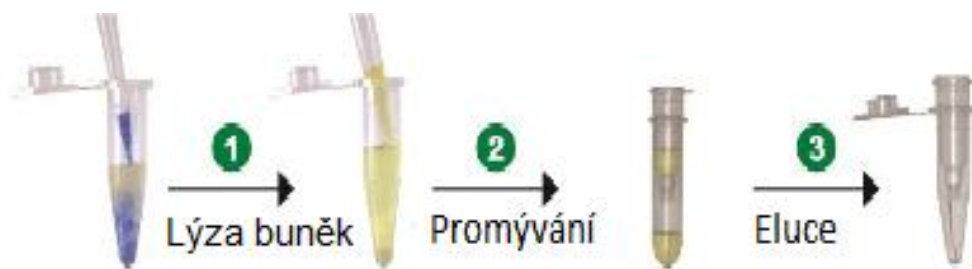
V této práci byla RNA izolována ze vzorků zalitých v RNAlateru, z buněk uskladněných pomocí HOPE činidla a buněk zmražených v  $-80^{\circ}\text{C}$ . Byl použit izolační kit Direct-zol-RNA<sup>TM</sup> MiniPrep. Následně byla provedena reverzní transkripce a kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR).

### Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí izolačního kitu Direct-zol -RNA<sup>TM</sup> MiniPrep. Metoda je založena na rychlé a efektivní izolaci RNA pomocí TRI reagentu s následnými centrifugačními a promývacími kroky. Izolace RNA probíhá na kolonkách (Zymo-Spin Column), které obsahují filtr, na který se RNA a nečistoty zachycují. Kolonka s filtrem je vždy zasunuta do mikrozkuřavky (Collection tube), do které se eluují nečistoty. Nečistoty jsou z filtru odstraněny postupnými promývacími kroky a výsledná RNA je z filtru eluována pomocí DNase/RNase-free vody ( $95^{\circ}\text{C}$ ). Všechny použité reagenty kromě DNase/RNase-free Water byly vytemperované na laboratorní teplotu.

Pro izolaci RNA byly použity triplikáty buněk fixovaných pomocí HOPE činidla, buňky skladované v RNAlateru a buňky uskladněné při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Prvním krokem byla inkubace peletu buněk s 600  $\mu\text{l}$  TRI reagentu po dobu 5 minut při pokojové teplotě. TRI reagent je sloučenina na bázi fenolu a zajišťuje dokonalou lýzu buněk. Následně byly vzorky stočeny (všechny centrifugační kroky byly provedeny při 12 000g/1min). Supernatant byl přenesen do mikrozkuřavky (LoBind Tube) a k němu bylo přidáno stejné množství ethanolu. Vzorky byly krátce zvortexovány a množství směsi (2x600  $\mu\text{l}$ ) bylo přeneseno do kolonky s filtrem a stočeno. Filtr se zachycenou RNA byl přenesen do nové mikrozkuřavky (Collection tube). RNA zachycená na filtru byla přečištěna 400  $\mu\text{l}$  Direct-zol RNA Pre wash, vzorek byl stočen a průtok vylit (opakováno 2x).

Následně bylo přidáno 700  $\mu\text{l}$  RNA Wash Buffer, stočeno a vylito. Následovalo stočení, tentokrát po dobu 2 minut. Filtr byl přenesen do nové LoBind Tube a RNA z filtru byla eluována centrifugací při maximálních otáčkách pomocí 100  $\mu\text{l}$  přehřáté (na  $95^{\circ}\text{C}$ ) DNase/RNase-free vody. K získanému supernatantu byly přidány 2  $\mu\text{l}$  RNase inhibitoru, který zabraňuje štěpení nestabilní RNA. Získaná RNA byla uchovávána při  $-80^{\circ}\text{C}$  (schématicky znázorněno v Obr. 18).



Obr. 18 : Schéma izolace RNA pomocí izolačního kitu Direct-zol -RNA™ MiniPrep  
(přepracováno podle [www.zymoresearch.com](http://www.zymoresearch.com))

### Koncentrace a čistota RNA

Koncentrace a čistota RNA byla měřena na Nanodrop 1000 (viz. popsaná metoda v kapitole koncentrace a čistota DNA). Koncentrace a čistota RNA byly měřeny u vzorků, u nichž byla použita reverzní transkripce pro přepsání RNA do cDNA (Tab.10).

Před měřením na Nanodropu 1000 byly všechny vzorky s RNA uchovávány na ledu. Pro měření bylo potřeba nejdříve nastavit software na počítači, který je kompatibilní s Nanodrop 1000. V softwaru bylo nastaveno měření koncentrace nukleových kyselin a následně bylo na dolní rameno Nanodropu 1000 napipetováno 5 ul vody s PCR čistotou pro nastavení jako Blank. Po přivření horního ramena s dolním, bylo v počítači nastaveno měření Blanku a po změření mohla být ramena Nanodropu 1000 znovu otevřena a utřena buničinou. Následně na dolní podstavec ramena mohly být aplikovány vždy 2 ul vzorku s RNA (Obr. 11-14).

## Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kitu pro vzorky s izolovanou RNA z různých technik fixace (fixované pomocí HOPE činidla, RNAlateru a buňky zmražené). Reverzní transkripce spočívala v přípravě dvou základních mixů: Template primer mix a RT MIX (Tab. 5 a 6). Všechny reagenty včetně izolované RNA byly udržovány na ledě nebo chladících podstavcích, aby se zabránilo jejich poškození a před jejich použitím byly všechny řádně zvortexovány a stočeny, kromě enzymu Transcriptor Reverse Transcriptase a izolované RNA.

Nejdříve byl připraven Template primer mix. Template primer mix obsahoval 1  $\mu$ l Anchored-oligo (dT) a 7  $\mu$ l vody v PCR čistotě. Celkové množství Template primer mixu na jednu reakci bylo 8  $\mu$ l. Template Primer mix byl rozpipetován po 8  $\mu$ l do 0,2  $\mu$ l PCR zkumavek, do nichž dále bylo napipetováno 5  $\mu$ l izolované RNA z různě fixovaných vzorků. PCR zkumavky se směsí byly krátce stočeny, a inkubovány v termocykleru po dobu 10 minut při 65°C.

Mezitím byl připraven RT MIX, který obsahoval 4  $\mu$ l Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5x koncentrovaný), 0,5  $\mu$ l Protector RNase Inhibitoru (40 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l Deoxynucleotide Mixu (10 mM) a 0,5  $\mu$ l Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/  $\mu$ l). Na 1 reakci tedy připadalo celkem 7  $\mu$ l RT MIXU. Po zahřátí v termocykleru byly PCR zkumavky přeneseny ihned po dobu 5 minut na led. Po ochlazení na ledě bylo do každé PCR zkumavky přidáno 7  $\mu$ l RT MIXU a PCR zkumavky byly opět krátce stočeny. Následně byly PCR zkumavky vloženy do termocykleru na 65 minut. Termocykler byl nastaven 60 minut na 50°C a zbylých 5 minut byl nastaven na 85°C pro inaktivaci enzymu. Konečným produktem reverzní transkripce byla cDNA z různě fixovaných vzorků, která byla skladována při -20°C.

## Real-Time kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR)

Kvantitativní PCR byla provedena s cDNA získanou z reverzní transkripce a genová exprese byla měřena v triplicátech. Základem této reakce bylo vytvoření mixu, skládajícího se z H<sub>2</sub>O v PCR čistotě, pufru o vhodném složení, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer L, Primer R, sondy a Thermo-Start™ TaqDNA polymerázy. Poměr jednotlivých složek byl dán na základě výrobce primerů a sond (Tab. 7).

Do zkumavek o objemu 0,1 µl bylo napipetováno 20 µl reakčního mixu a následně bylo do zkumavek ke každému mixu přidáno 5 µl cDNA jednotlivých vzorků z různých fixací. Dohromady byla qPCR provedena s 25 µl směsi při teplotním profilu daném Thermo-Start™ TaqDNA polymerázou (Tab. 8).

Výsledkem qPCR bylo srovnání míry mRNA exprese genu PSMB2 u vzorků fixovaných různými technikami popsány výše.

Tab. 5: Reagencie pro Template primer mix

Template primer mix	
Reagencie	1 reakce (µl)
Anchored oligo (dT)	7,0
Voda v PCR čistotě	1,0
Celkem	8,0

Tab. 6: Reagencie pro RT MIX

RT MIX	
Reagencie	1 reakce (µl)
Deoxynucleotide mix, 10 mM	2,0
Protector RNase inhibitor, 40 U/µl	0,5
Transcriptor reverse transcriptase	0,5
Transcriptor reverse transcriptase reaction Buffer, 5 xconc.	4,0
Celkem	7,0

Tab. 7: Reakční mix pro qPCR

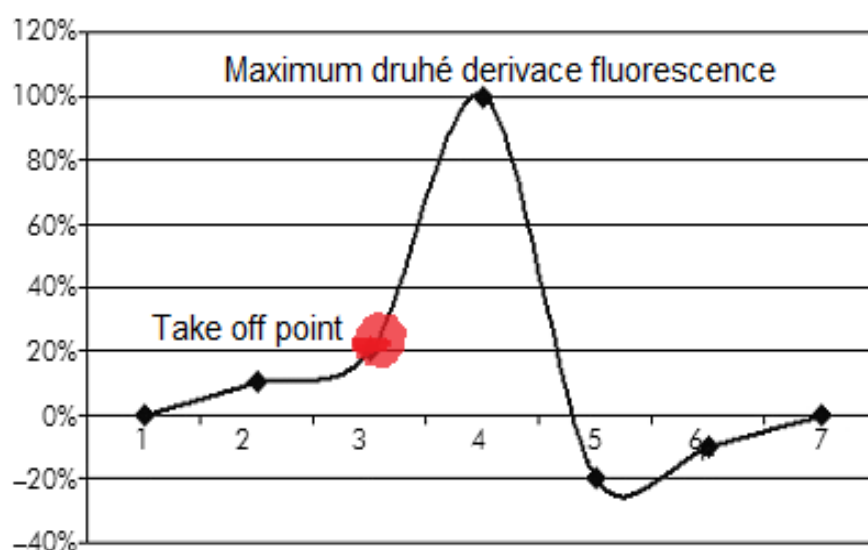
Reakční mix			
Reagencie	1 reakce (μl)	reagencie	1 reakce (μl)
H <sub>2</sub> O	7,8	Primer L	2,25
10xAB pufr	2,5	Primer R	2,25
10 mM dNTPs	1	Sonda	0,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3,5	Thermo-Start™ TaqDNA polymeráza	0,2
celkem	20 μl		

Tab. 8: Teplotní profil pro qPCR

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	15 min	1
Denaturace	94	30 s	40
Nasedání primerů	60	45 s	
Syntéza DNA	72	60 s	

## 7.5 Vyhodnocení

Pro srovnání výtěžnosti a kvality různých fixačních technik byla porovnána mRNA exprese genu PSMB2 s využitím techniky RT-PCR. Vyhodnocení výsledků z RT-qPCR bylo provedeno pomocí softwaru Rotor Gene 2.0.2 metodou druhé derivace (Obr. 19, relativní kvantifikace). Graficky bylo znázorněno porovnání relativní mRNA exprese PSMB2 u vzorků fixovaných různými technikami (Obr. 22).



Obr. 19 : Metoda druhé derivace (přepřacováno dle manuálu Rotor Gene Q, Qiagen)

## 8 VÝSLEDKY

### Koncentrace a čistota DNA

Koncentrace a čistota DNA byla měřena na Nanodrop 1000 pro vzorky fixované pomocí HOPE činidla, buňky uskladněné při -80°C a čerstvě izolované buňky bez fixace.

Z Tab. 9 je patrné, že v průměru nejvyšší množství DNA obsahovaly vzorky fixované HOPE činidlem. Co se týče čistoty DNA, tak všechny vzorky dosahovaly potřebné čistoty (přesahující hodnotu 1,7) pro následné klinické aplikace.

Tab. 9: Koncentrace a čistota DNA pro vzorky fixované různými technikami

Vzorky	Koncentrace DNA (ng/μl)	Průměrná koncentrace DNA (ng/μl)	Čistota
HOPE 1	43,5	69,8	1,8
HOPE 2	68,5		1,9
HOPE 3	97,6		1,8
bb čerstvé 1	47,9	50,7	1,8
bb čerstvé 2	51,6		1,9
bb čerstvé 3	52,7		1,9
bb zmražené 1	24,1	32,3	1,9
bb zmražené 2	58,8		1,8
bb zmražené 3	16,0		1,9




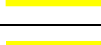
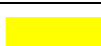




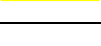
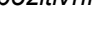

## Genotypizace

Pro genotypizaci DNA byl použit kit pro detekci mutace G1691A v genu pro faktor V pomocí Real-Time PCR na přístroji Rotor Gene Q.

Jako standardy byly použity vzorky se známým genotypem. Z Tab. 10 je patrné, že standard s genotypem GG je homozygot s pozitivní reakcí z kanálu Green (barva zelená v Obr. 20, Wild Type), standard s genotypem AG je heterozygot s pozitivní reakcí z kanálu Green i Yellow (barva modrá v Obr. 20, obsahuje běžnou i mutovanou variantu genu), standard s genotypem AA je homozygot s pozitivní reakcí z kanálu Yellow (barva červená v Obr. 20, obě varianty genu obsahují mutaci).

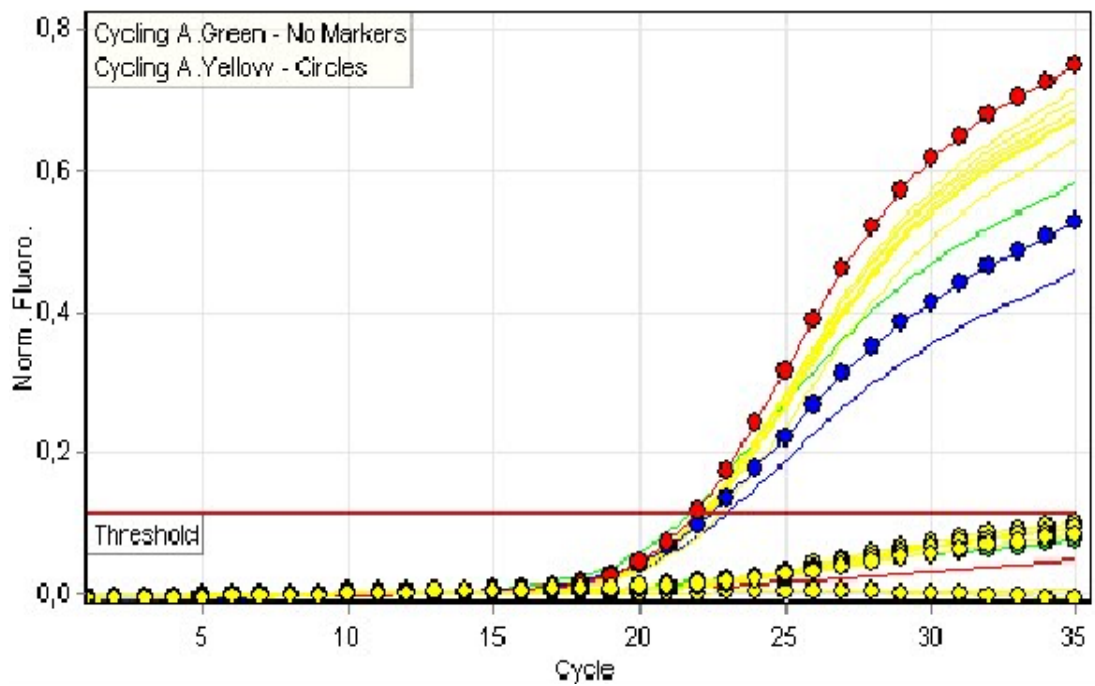
Bylo zjištěno, že vzorek DNA fixovaný různými technikami (barva žlutá v Obr. 20 a Tab. 10) je homozygot GG (Wild Type) s pozitivní reakcí z kanálu Green.

Tab. 10: Stanovené genotypy a signály z kanálu Green a Yellow pro vzorky fixované různými technikami

Barva	Vzorek	Genotyp	Signál z kanálu Green	Signál z kanálu Yellow
	Standard 1	Wild Type GG	+	-
	Standard 2	Heterozygot AG	+	+
	Standard 3	Matunt AA	-	+
	HOPE 1	Wild Type GG	+	-
	HOPE 2	Wild Type GG	+	-
	HOPE 3	Wild Type GG	+	-
	bb čerstvé 1	Wild Type GG	+	-
	bb čerstvé 2	Wild Type GG	+	-
	bb čerstvé 3	Wild Type GG	+	-
	bb zmražené 1	Wild Type GG	+	-
	bb zmražené 2	Wild Type GG	+	-
	bb zmražené 3	Wild Type GG	+	-

\*  
+ pozitivní signál, - negativní signál





Obr. 20: Stanovení genotypu DNA u vzorků fixovaných různými technikami (barva žlutá=naše vzorky s pozitivním signálem z kanálu Green, červená barva=standard, homozygot s pozitivním signálem z kanálu Yellow, modrá barva=standard, heterozygot s pozitivním signálem z kanálu Green i Yellow)

## Koncentrace a čistota RNA

Koncentrace a čistota RNA byla měřena na Nanodrop 1000 pro vzorky, z kterých byla přepisována mRNA do cDNA (Tab. 12). Z Tab. 12 je patrné, že nejvyšší koncentraci RNA obsahovaly vzorky uskladněné při -80°C. Co se týče čistoty RNA, jen vzorky fixované pomocí HOPE činidla poskytovaly potřebnou hodnotu čistoty vyšší než 1,7.

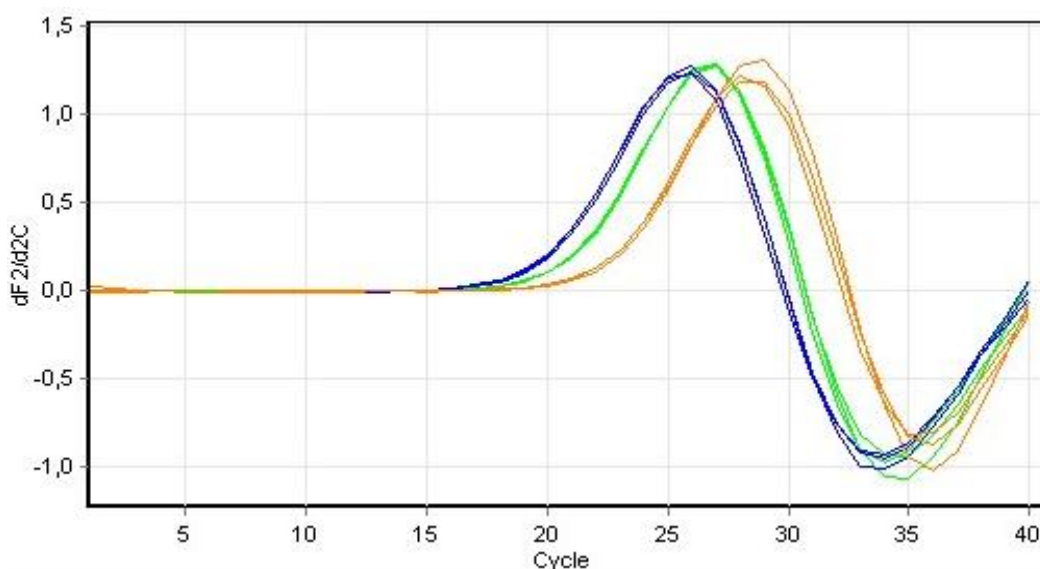
Tab. 11: Koncentrace a čistota RNA pro vzorky fixované různými technikami

Vzorky	Koncentrace RNA (ng/μl)	Čistota
HOPE	39,3	1,7
bb zmražené	110,0	1,4
RNAlater	34,5	1,5

## Relativní mRNA exprese genu PSMB2 vzorků fixovaných různými technikami










Vyhodnocení výsledků z RT-qPCR bylo provedeno pomocí softwaru Rotor Gene 2.0.2 metodou druhé derivace, přičemž byl graficky stanoven také off point pro jednotlivé vzorky fixované různými technikami (Obr. 21). Dále byla stanovena relativní koncentrace jednotlivých vzorků (Tab. 11).

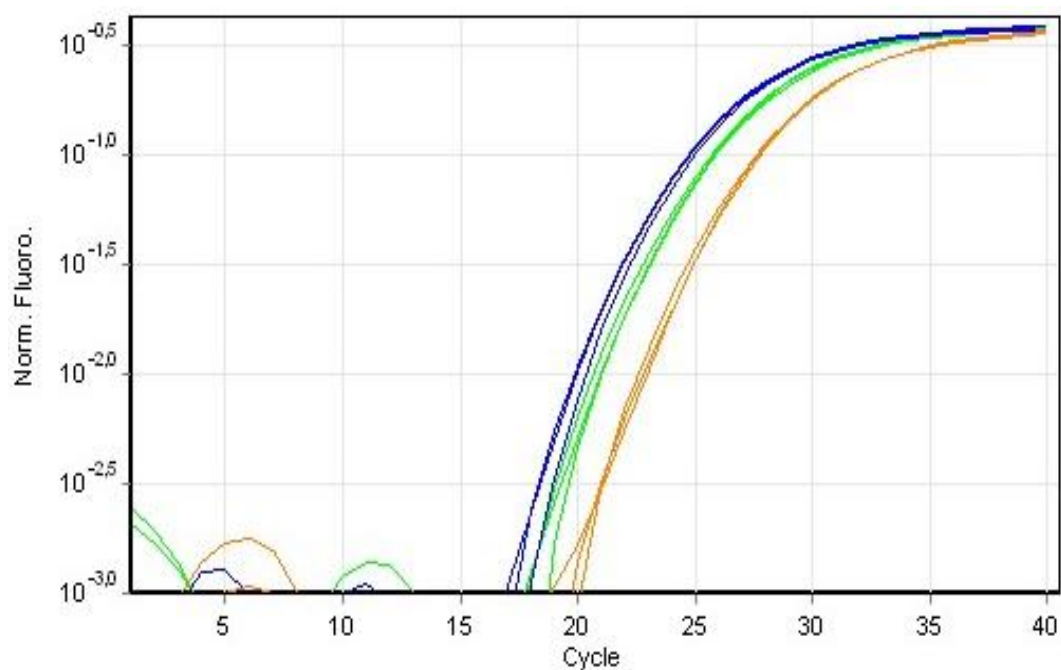
V Tab. 11 byly srovnány relativní koncentrace mRNA získané z různě fixovaných vzorků, přičemž z tabulky je patrné, že buňky uskladněné při  $-80^{\circ}\text{C}$  obsahují 1,8 x vyšší koncentraci mRNA než buňky fixované v HOPE činidle. Buňky fixované v HOPE činidle obsahují přibližně 2x větší koncentraci než buňky uskladněné v RNeasy jak lze také vidět v Tab. 9. Z Obr. 22 je patrné, že nejvyšší relativní expresi mRNA genu PSMB2 měli buňky uskladněné při  $-80^{\circ}\text{C}$ , pak buňky fixované pomocí HOPE činidla a nakonec buňky uskladněné v RNeasy.



Obr. 21 : Relativní exprese mRNA stanovené metodou druhé derivace pro vzorky fixované různými technikami (modrá=bb zmražené, zelená=HOPE fixace, oranžová=bb v RNeasy)

Tab. 12: Relativní koncentrace a Take off point pro jednotlivé vzorky fixované různými technikami

Barva	Vzorek	Take off point	Relativní koncentrace	Průměr relativní koncentrace
	HOPE 1	22,0	1,05	1,00
	HOPE 2	22,1	1,00	
	HOPE 3	22,2	0,95	
	bb zmražené 1	21,1	1,69	1,76
	bb zmražené 2	21,0	1,79	
	bb zmražené 3	21,0	1,79	
	RNAlater	23,7	0,43	0,41
	RNAlater	23,7	0,43	
	RNAlater	24,0	0,37	



Obr. 22: Relativní exprese mRNA pro vzorky fixované různými technikami (modrá=bb zamražené, zelená=HOPE fixace, oranžová=bb v RNAlater)

## 9 DISKUSE

Uskladnění biologického materiálu bez degradace nukleových kyselin pro jejich následnou izolaci a použití v molekulárních analýzách je nepostradatelný krok pro získání reprezentativního vzorku s reprodukovatelnými výsledky. V současnosti jsou používány různé techniky k uskladnění biologického materiálu, a proto je nezbytné si zvolit nejoptimálnější techniku, která umožní izolaci kvalitní nedegradované RNA a DNA vhodné pro jejich následné použití v klinických aplikacích.

Cílem této práce bylo izolovat buňky z plné nesrážlivé krve a následně je uskladnit podle vybraných fixačních postupů (HOPE fixovaný materiál zalitý v parafinu, biologický materiál uložený při  $-80^{\circ}\text{C}$ , biologický materiál zalitý v protektivním činidle RNAlateru a čerstvě použitý biologický materiál). Takto uložený biologický materiál byl následně připraven pro RNA a DNA izolaci. U izolované RNA z jednotlivých vzorků fixovaných různými technikami byla měřena koncentrace a čistota RNA pomocí Nanodrop 1000 a dále mRNA byla přepsána pomocí reverzní transkripce do cDNA, u které byla měřena mRNA relativní exprese genu PSMB2 pomocí RT-qPCR. U izolované DNA pro jednotlivé vzorky fixované různými technikami byla měřena koncentrace a čistota DNA pomocí Nanodrop 1000 a stanoven genotyp pro Leidenskou mutaci pomocí RT-qPCR. Dalším cílem bylo zjistit, zda HOPE fixovaný materiál zalitý v parafinu při srovnání se zvolenými fixačními metodami poskytuje srovnatelné či odlišné výsledky.

Pro srovnání koncentrace a čistoty DNA z jednotlivých vzorků uskladněných různými způsoby (HOPE fixovaný materiál zalitý v parafinu, biologický materiál uložený při  $-80^{\circ}\text{C}$  a čerstvě použitý biologický materiál) byl použit Nanodrop 1000, přičemž v průměru nejvyšší koncentraci DNA měly vzorky fixované HOPE technikou, nižší koncentraci měl čerstvý biologický materiál a nejnižší koncentraci měl biologický materiál uskladněný při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Co se týče čistoty DNA, tak všechny vzorky dosahovaly potřebné čistoty (přesahující hodnotu 1,7), která je vhodná pro použití v dalších klinických aplikacích. Podle Braun et al. (2011) a dalších studií je rovněž integrita DNA srovnatelná u vzorků fixovaných HOPE technikou s biologickým materiálem uskladněným při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Dále byla kvalita DNA ověřena v RT-qPCR pro detekci mutace G1691A v genu kódujícím Faktor V (Leidenská mutace). Stanovení genotypu u vzorků fixovaných různými technikami bylo úspěšné a ukázalo se, že všechny studované metody jsou vhodné pro získání DNA, která splňuje nároky na kvalitu i čistotu pro použití v této klinické aplikaci (RT-qPCR).

Dále byla ověřována kvalita a koncentrace RNA u vzorků fixovaných různými technikami. Výsledky měření ukázaly, že vzorky fixované HOPE technikou mají 1,8 x nižší koncentraci RNA než biologický materiál uskladněný při -80°C. Naproti tomu vzorky fixované HOPE technikou vykazovaly přibližně 2x vyšší koncentraci než biologický materiál zalitý v protektivním činidle RNAlateru. Dle Micke et al. (2006) je příčinou vysoké integrity a výtěžnosti RNA u vzorků uskladněných při -80°C jejich okamžité a rychlé zmrazení. Současně ale i popřel, že by doba stání vzorků na ledu ovlivňovala kvalitu RNA při přepravě do biobanky. Nižší exprese RNA u biologického materiálu zalitého v protektivním činidle RNAlateru jsou dle Micke et al. (2006) v rozporu s ostatními studii, přičemž v jeho studii byla prokázána největší variabilita hladin genové exprese u takto uskladněného materiálu, a to jak ve srovnání v různých časových bodech, tak v odchylce mezi opakováním experimentu.

Pro porovnání vzorků fixovaných různými technikami byla ještě změřena jejich koncentrace a čistota RNA pomocí Nanodrop 1000. Bylo zjištěno, že nejvyšší koncentraci RNA má biologický materiál uskladněný při -80°C a to 2x více než zbylé dvě techniky fixace. Vzorky fixované HOPE technikou vykazovaly o něco vyšší hodnotu koncentrace RNA než vzorky zalité v RNAlateru. Co se týče čistoty RNA, tak jen vzorky fixované HOPE technikou přesahovaly doporučenou hodnotu 1,7. Ostatní dvě techniky nesplnily požadavek na čistotu RNA, což mohlo být způsobeno kontaminací vzorků během rozmrazování či analýzy.

Vzorky fixované HOPE technikou byly srovnávány také v publikaci Olerta et al. (2001), který takto fixované vzorky použil nejen pro zachování nukleových kyselin, ale i pro histologické barvení. Zjistil, že vzorky fixované HOPE technikou vykazují vysokou zachovalost antigenních struktur a morfologických detailů, které jsou vhodné zejména pro patologickou diagnostiku. Současně vzorky fixované HOPE technikou vykazovaly vysokou kvalitu nukleových kyselin po dobu 5 let bez významného snížení kvality či výtěžnosti. Ve studii Vollmera et al. (2006) byla HOPE technika také ověřována a bylo zjištěno, že HOPE technika chrání nukleové kyseliny a proteiny nejméně po dobu 8 let a dále umožňuje použití v běžných molekulárních technikách jako je PCR, RT-PCR, northern-blot a western-blot. Volmer et al. (2006) použil také HOPE vzorky pro imunohistochemii a zjistil stejně tak jako Olert et al. (2001), že vykazují vysokou morfologickou kvalitu, což naznačuje, že HOPE technika je ideální alternativní technika fixace pro moderní molekulární patologii. Dále byla HOPE technika testována i ve studii Marwitz et al. (2011), který takto fixoval buňky bronchoalveolární laváže (HOPE-BAL). Marwitz et al. (2011) zjistil, že HOPE fixace BAL umožňuje zachování RNA a bílkovin ve formě vhodné pro molekulární online aplikace jako je například *in situ* hybridizace, qPCR, microarray analýza, dvourozměrná

gelová elektroforéza a hmotnostní spektrometrie. Také zjistil, že další výhodou HOPE-BAL je dlouhodobá skladovatelnost při zachování biomolekul významně déle než u biologického materiálu uskladněného při  $-80^{\circ}\text{C}$ , a že HOPE-BAL kombinuje snadnou manipulaci ve formě parafinových bločků s použitím HOPE-BAL v těchto technikách téměř bez omezení.

HOPE technika ukázala, že je skutečně nadějnou technikou fixace biologického materiálu, a že poskytuje srovnatelné výsledky s biologickým materiálem uskladněným při  $-80^{\circ}\text{C}$ . V několika studiích byla HOPE technika studována především pro srovnání s technikou FFPE. Přičemž se ukázalo, že HOPE technika má mnohem vyšší stupeň uchovatelnosti nukleových kyselin, proteinů a antigeních struktur. Díky těmto kladným výsledkům je HOPE technika ideálním alternativním způsobem fixace biologického materiálu ať už pro rutinní záležitosti a použití v klinických aplikacích, tak pro molekulární patologii. Díky možnosti uskladnění HOPE fixovaného materiálu v parafinových bločcích, poskytuje tato technika snadnou manipulaci a nenáročnou ekonomickou uskladnění. Do budoucna pro použití HOPE techniky by bylo potřeba ještě optimalizovat protokol, který se v několika studiích významně liší a vyzkoušet kvalitu nukleových kyselin, proteinů a antigeních struktur u déle takto skladovaného biologického materiálu s využitím HOPE techniky.

## 10 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsme paralelně srovnávali jednotlivé techniky uskladnění biologického materiálu (HOPE fixovaný materiál zalitý v parafinu, biologický materiál uskladněný při  $-80^{\circ}\text{C}$ , biologický materiál zalitý v protektivním činidle RNAlateru a čerstvě zpracovaný biologický materiál) pro RNA a DNA izolaci a jejich následné použití v klinických aplikacích (reverzní transkripce, kvantitativní RT-PCR, Nanodrop 1000, genotypizace).

Závěrem lze říci, že HOPE fixovaný materiál zalitý v parafinu poskytoval srovnatelné výsledky (v kvalitě a množství extrahované RNA a DNA) jak s biologickým materiálem uskladněným při  $-80^{\circ}\text{C}$ , tak s čerstvě zpracovaným biologickým materiálem. HOPE technika poskytla lepší výsledky ve srovnání s biologickým materiálem zalitým v protektivním činidle RNAlateru. Rovněž použití v klinických aplikacích bylo srovnatelné s biologickým materiálem uskladněným při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Srovnání nové techniky HOPE fixace s běžnými fixačními technikami ukázalo, že tato metoda je vhodná pro uskladnění biologického materiálu, a že může být slibnou alternativou pro často používanou techniku fixace jako je biologický materiál uskladněný při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Díky kladným výsledkům je HOPE technika ideálním alternativním způsobem fixace biologického materiálu, ať už pro rutinní záležitosti a použití v klinických aplikacích, tak pro molekulární patologii. Díky možnosti uskladnění HOPE fixovaného materiálu v parafinových bločcích, poskytuje tato technika snadnou manipulaci a nenáročnou ekonomickou uskladnění po mnoho let.



# 11 LITERATURA

- Jirkovská M. (2006): Histologická technika. Nakladatelství Galén, Praha, p 16-18
- Vacek Z. (1995): Histologie a histologická technika. PROTISK Slavkov, Brno, p 33
- Maňáková E., Seichertová A. (2001): Metody v histologii. Nakladatelství Karolinum, Praha, p 7 – 9
- Kočárek E. (2007): Molekulární biologie v medicíně. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno, p 50
- Oler J., Wiedorn K.H., Goldmann T., Kühl H., Mehraein Y., Scherthan H., Niketeghad F., Vollmer E., Müller A.M., Müller-Navia J. (2001): HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract.* 197(12): 823-6
- Braun M., Menon R., Nikolov P., Kirsten R., Petersen K., Schilling D., Schott C., Gündisch S., Fend F., Becker K.F., Perner S. (2011): The HOPE fixation technique--a promising alternative to common prostate cancer biobanking approaches. *BMC Cancer.* 11: 511
- Marwitz S., Abdullah M., Vock C., Fine J.S., Visvanathan S., Gaede K.I., Hauber H.P., Zabel P., Goldmann T. (2011): HOPE-BAL: improved molecular diagnostics by application of a novel technique for fixation and paraffin embedding. *J Histochem Cytochem.* 59(6): 601-14
- Uhlig U., Uhlig S., Branscheid D., Zabel P., Vollmer E., Goldmann T. (2004): HOPE technique enables Western blot analysis from paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract.* 200(6): 469-72
- Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J., Roller P.P. (1985): Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* 33(8): 845-53

- Glenner G.G. (1957): The histochemical demonstration of indole derivatives by the rosindole reaction of E. Fischer. *J Histochem Cytochem.* 5(3): 297-304
- Hewitt S.M., Lewis F.A., Cao Y., Conrad R.C., Cronin M., Danenberg K.D., Goralski T.J., Langmore J.P., Raja R.G., Williams P.M., Palma J.F., Warrington J.A. (2008): Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 132(12): 1929-35
- Vollmer E., Galle J., Lang D.S., Loeschke S., Schultz H., Goldmann T. (2006): The HOPE technique opens up a multitude of new possibilities in pathology. *Rom J Morphol Embryol.* 47(1): 15-9
- Thavarajah R., Mudimbaimannar V.K., Elizabeth J., Rao U.K., Ranganathan K. (2012): Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 16(3): 400-5
- Noguchi M., Furuya S., Takeuchi T., Hirohashi S. (1997): Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol Int.* 47(10): 685-91
- Tokuda Y., Nakamura T., Satonaka K., Maeda S., Doi K., Baba S., Sugiyama T. (1990): Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J Clin Pathol.* 43(9): 748-51
- Florell S.R., Coffin C.M., Holden J.A., Zimmermann J.W., Gerwels J.W., Summers B.K., Jones D.A., Leachman S.A. (2001): Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. *Mod Pathol.* 14(2): 116-28
- Wiedorn K.H., Olert J., Stacy R.A., Goldmann T., Kühl H., Matthus J., Vollmer E., Bosse A. (2002): HOPE--a new fixing technique enables preservation and extraction of high molecular weight DNA and RNA of > 20 kb from paraffin-embedded tissues. Hapes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect. *Pathol Res Pract.* 198(11): 735-40

- Peccoud J., Jacob C. (1996): Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys J.* 71(1): 101-8
- Liu W., Saint D.A. (2002): Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun.* 294(2): 347-53
- Liu, W., Saint D.A. (2002): A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics. *Analytical Biochemistry* 302: 52–59
- Bustin S. (2004): *A-Z of Quantitative PCR.* IUL Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, California, p 88-92
- Schambeck C.M., Schwender S., Haubitz I., Geisen U.E., Grossmann R.E., Keller F. (1997): Selective screening for the Factor V Leiden mutation: is it advisable prior to the prescription of oral contraceptives? *Thromb Haemost.* 78(6): 1480-3
- Eichinger S., Weltermann A., Mannhalter C., Minar E., Bialonczyk C., Hirschl M., Schönauer V., Lechner K., Kyrle P.A. (2002): The risk of recurrent venous thromboembolism in heterozygous carriers of factor V Leiden and a first spontaneous venous thromboembolism. *Arch Intern Med.* 162(20): 2357-60
- Bloemenkamp K.W., Rosendaal F.R., Helmerhorst F.M., Büller H.R., Vandenbroucke J.P. (1995): Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet.* 346(8990): 1593-6
- Kujovich J.L. (2011): Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med.* 13(1): 1-16
- Cederbaum S.D., Fareed G.C., Lovett M.A., Shapiro L.J. (1984): Recombinant DNA in Medicine. *West J Med.* 141(2): 210–222
- Gupta R.S., Hillemann D., Kubica T., Zissel G., Quernheim J.M., Galle J., Vollme E., Goldmann T. (2003): HOPE-Fixation Enables Improved PCR-Based

Detection and Differentiation of Mycobacterium tuberculosis Complex in Paraffin-Embedded Tissues. *Pathol. Res. Pract.* 199: 619–623

- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymol.* 155: 335-350
- Desciak B.E., Maloney M.E. (2000): Artefacts in frozen section preparation. *Dermatol.Surg.* 26: 500-504
- Micke P., Ohshima M., Tahmasebpoor S., Ren Z.P., Östman A., Pontén F., Botling J. (2006): Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimen. *Laboratory Investigation* 86, 202-211

Internetové zdroje:

[www.dialab.cz](http://www.dialab.cz)

[www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

[www.ciselniky.dasta.mzcr.cz](http://www.ciselniky.dasta.mzcr.cz)

[www.wordpress.com](http://www.wordpress.com)

[www.labguide.cz](http://www.labguide.cz)

[www.ismaap.org](http://www.ismaap.org)

[www.ajurvedske-lazne.cz](http://www.ajurvedske-lazne.cz)

[www.zymoresearch.com](http://www.zymoresearch.com)

[www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)

## 12 POUŽITÉ ZKRATKY

bb	buňky
RNA	ribonukleové kyseliny
DNA	deoxyribonukleové kyseliny
rRNA	ribozomální ribonukleové kyseliny
tRNA	transferové ribonukleové kyseliny
mRNA	mediátorové ribonukleové kyseliny
cDNA	kopírovaná DNA
pH	vodíkový exponent (anglicky potential of hydrogen)
HOPE	z anglického překladu <b>H</b> epes glutamic acid buffer mediated <b>O</b> rganic solvent <b>P</b> rotection <b>E</b> ffect
FFPE	Formaldehydem fixovaná tkáň zalitá parafinem (z anglického překladu <b>f</b> ormalin <b>f</b> ixation and <b>p</b> araffin <b>e</b> mbedding)
FTS	čerstvě zmražená tkáň (z anglického překladu <b>f</b> resh <b>f</b> rozen <b>t</b> issue)
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RT-qPCR	real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce
APC	aktivovaný protein C
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
PBS	pH fosfátový pufr
Ficoll	flotační činidlo
BAL	bronchoalveolární laváž
HOPE-BAL	HOPE fixovaná bronchoalveolární laváž