

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ  
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**BRNO 2015**

**LENKA DRATVOVÁ**



**Metody izolace a archivace DNA z živočišných tkání**  
Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*  
prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

*Vypracovala:*  
Lenka Dratvová



### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: *Metody izolace a archivace DNA z živočišných tkání* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji prof. RNDr. Aleši Knollovi za vedení mé bakalářské práce, dále Ing. Čěňku Horeckému za pomoc při práci v laboratoři a při zpracování výsledků praktické části. Děkuji také své rodině a příteli za podporu v průběhu celého studia.

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce na téma Metody izolace a archivace DNA z živočišných tkání se nejprve zabývá různými vzorky živočišných tkání vhodnými pro efektivní izolaci DNA. Dále jsou zde popsány vybrané jednoduché i moderní metody izolace DNA. Práce se zabývá také možnostmi krátkodobého a dlouhodobého uchovávání DNA s popisem vybraných konkrétních archivačních metod.

Dále jsou metody izolace DNA porovnány z hlediska kvality, kvantity, pracnosti, časové a finanční náročnosti. Taktéž jsou na závěr zhodnoceny jednotlivé metody archivace.

Práce obsahuje i praktickou část, která se věnuje izolaci DNA především z živočišných produktů (mléko a mléčné výrobky, krev, maso a masné výrobky), ale i jiných biologických tkání. Postup a výsledky jsou zpracovány v kapitolách Materiál a metodika a Výsledky a diskuze.

Klíčová slova: DNA, izolace, archivace DNA, živočišné tkáně, živočišné produkty

## **Abstract**

In bachelor thesis methods of isolation and archiving of DNA from animal tissues I deal with different samples of animal tissues suitable for efficient isolation of DNA. It selected simple and modern methods of DNA isolation. The work also deals with the possibility of short-term and long-term storage of DNA with a description of the selected archival methods.

The method of DNA compared in terms of quality, quantity, and labour, time and monetary perspectives. The individual methods of archiving are also evaluated at the end of the work.

The work also includes a practical part, which deals with the isolation of DNA mainly from animal products (milk and milk products, blood, meat and meat products), but also other biological tissues. The procedure and results are presented in chapters "Material and Methods", and "Results and Discussion".

Keys words: DNA, isolation, DNA storage, animal tissue, animal products

## OBSAH

1 ÚVOD .....	9
2 CÍL PRÁCE .....	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
3.1 Historie izolace DNA.....	11
3.2 Tkáně vhodné k izolaci DNA .....	11
3.2.1 Izolace DNA z různých živočišných tkání.....	12
3.2.2 Izolace z živočišných produktů.....	13
3.3 Izolace DNA .....	13
3.3.1 Jednoduché izolační metody.....	13
3.3.2 Moderní metody.....	14
3.4 Elektroforéza.....	20
3.4.1 Gelová elektroforéza.....	21
3.5 Měření koncentrace a čistoty DNA .....	24
3.6 Srovnání metod izolace DNA .....	25
3.7 Archivace DNA.....	25
3.7.1 Krátkodobá archivace .....	26
3.7.2 Dlouhodobá archivace .....	27
3.7.3 Chitosan .....	27
3.7.4 FTA <sup>®</sup> karta .....	28
3.7.5 Technologie METTINUM <sup>®</sup> .....	29
4 MATERIÁL A METODIKA.....	31
4.1 Odběr vzorků .....	31
4.1.1 Mléko a mléčné výrobky .....	31
4.1.2 Krev, maso a masné výrobky .....	31
4.1.3 Různé biologické vzorky .....	31

4.2 Izolace DNA .....	32
4.2.1 Izolace DNA z mléka a mléčných výrobků pomocí Genomic DNA Mini Kitu .....	32
4.2.2 Izolace z mléka pomocí Column DNA Lego Kitu.....	32
4.2.3 Izolace DNA z krve, masa a masných výrobků pomocí Genomic DNA Mini Kitu .....	33
4.2.4 Izolace DNA z různých biologických vzorků pomocí GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kitu .....	33
4.3 Elektroforéza.....	34
4.4 Ověření kvality izolované DNA .....	35
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
5.1 Koncentrace a čistota DNA .....	39
6 ZÁVĚR .....	42
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	43
7.1 Tištěné zdroje.....	43
7.2 Internetové zdroje .....	44
8 SEZNAM OBRÁZKŮ.....	47
9 SEZNAM ZKRATEK.....	48



## 1 ÚVOD

Izolace z čerstvých neporušených tkání poskytuje většinou velmi dobré výsledky z hlediska výtěžku a kvality DNA. Někdy je však třeba získat vzorek DNA i ze staré či nějakým způsobem poškozené tkáně. V dnešní době je možné provést většinu analýz pomocí speciálních moderních kitů, určených pro izolaci z konkrétních vzorků za poskytnutí výborných výsledků. Velice zajímavé může být zkoumání výsledků izolace DNA ze zpracovaných produktů živočišného původu. Na výsledcích se odrazí veškeré technologické postupy zpracování původní tkáně, jako je mechanické porušení, působení vysokých teplot či přídavky různých látek. Všechny tyto faktory mají vliv na degradaci struktury deoxyribonukleové kyseliny a určují výslednou kvalitu izolované DNA. V praxi mohou být tyto analýzy využity například při kontrole kvality potravin živočišného původu.

Od roku 1869, kdy švýcarský lékař Friedrich Miescher poprvé úspěšně izoloval lidskou DNA z hnisu, uplynulo již mnoho času a výzkum v této oblasti přinesl přinesl obrovský pokrok v používané metodice. Postupy se zrychlovaly a specializovaly, což vedlo k tomu, že v dnešní době je možné izolovat DNA prakticky z každé tkáně obsahující živé buňky. Máme k dispozici několik automatizovaných metod, usnadňujících práci v laboratoři a zajišťujících dostatek materiálu pro následné analýzy.

Rovněž výsledky práce je možné rychle a kvalitně ověřit pomocí moderních technologií. Pro zjišťování výtěžku a celistvosti DNA slouží elektroforéza a pro měření koncentrace a čistoty izolátu se používá spektrofotometrických technik.

Výběr vhodné izolační techniky a ověření kvality a čistoty je však vždy jen prvním krokem ve většině praktických postupů. Pokud nemáme možnost získaný izolát v nejbližší době použít a analyzovat, je třeba vzorek vhodně skladovat. Volba vhodné archivační techniky umožní mít vzorek k dispozici, kdykoli je možné pro potřeby dalšího zkoumání. Stejně jako oblast izolace, i postupy skladování se v průběhu času výrazně zdokonalovaly a dnes již máme k dispozici speciální techniky, uchovávající DNA po velmi dlouhou dobu bez případné degradace.

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem mojí bakalářské práce je popsat principy různých metod izolace živočišné DNA, běžně používaných v laboratořích molekulární genetiky. Kromě izolačních metod se mám zaměřit i na způsoby následné archivace izolovaných vzorků DNA. Na základě poznatků z literatury v obou případech zhodnotím a porovnáím výsledky jednotlivých metod z různých hledisek.

V práci se budu zabývat i výběrem živočišných tkání, vhodných pro možnosti izolace DNA za poskytnutí optimálních výsledků. Po dohodě s vedoucím byla práce rozšířena o praktickou část, ve které provedu a porovnáím výsledky izolace DNA z různých biologických vzorků a živočišných produktů.

## **3 LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **3.1 Historie izolace DNA**

První izolaci DNA v historii uskutečnil v roce 1869 švýcarský lékař Friedrich Miescher. V rámci svého experimentu se pokoušel izolovat buňky z lymfatických uzlin, ale nedařilo se mu získat lymfocyty v dostatečném množství. Zkusil tedy lymfocyty získat z hnisu ze shromážděných chirurgických obvazů.

Miescher zkoumal různé typy proteinů tvořících leukocyty a zjistil, že jsou proteiny hlavními složkami buněčné cytoplazmy. Během svých experimentů zaznamenal, že látka vysrážená z roztoku po přidání kyseliny, se přidáním zásady znovu rozpustí. Takto se mu vůbec poprvé podařilo získat surovou sraženinu DNA. K oddělení DNA od proteinů ze svých vzorků buněčných extraktů vyvinul Miescher nový protokol popisující oddělení buněčného jádra z cytoplazmy a následné izolace DNA. Tento postup však neposkytoval dostatečné množství materiálu potřebného pro využití v dalších analýzách. Miescher tedy k získání většího množství čistých jader vytvořil druhý protokol, který jeho žák Richard Altman později pojmenoval „nukleová kyselina“. (Siun Chee Tan a Beow Chin Yiap, 2009)

Po Miescherově úspěšné izolaci DNA z buněk následovalo mnoho dalších vědců, kteří se snažili přinést nové poznatky v problematice izolace DNA pomocí různých nových postupů. Základní laboratorní postup při extrakci DNA byl založen na principu centrifugace v hustotním gradientu. Meselson a Stahl tuto metodu použili v roce 1958 k prokázání semikonzervativnosti DNA. Některé později vyvinuté metody využívaly rozdílných rozpustností chromozomální DNA, plazmidů a proteinů v alkalickém pufru.

### **3.2 Tkáně vhodné k izolaci DNA**

DNA je možné izolovat prakticky z každé živočišné tkáně, která obsahuje živé buňky. V případě velmi malých organismů můžeme k izolaci použít i celého jedince. Je zde však větší riziko kontaminace nežádoucími látkami, jako jsou parazité, symbionti či částičky potravy. V případě obojživelníků a malých druhů ptáků je vhodná izolace z krve. Izolace z krve je vhodná i u savců, je však potřeba větší množství krve. Dalším

vhodným výchozím materiálem u malých savců je tkáň z čerstvé ledviny nebo svaloviny. Jako výchozí materiál lze použít i například chlup nebo trus, zde je však zapotřebí již využít speciální a obtížnější techniky. Ve velmi specifických podmínkách, zamezujících jakékoli kontaminaci, je možné izolovat DNA i z velice starých vzorků, jako jsou fosilie nebo hmyz ukrytý v jantaru. (Zima et al. 2004)

### 3.2.1 Izolace DNA z různých živočišných tkání

K nejspolehlivějším zdrojům velkého množství kvalitní a čisté DNA patří krev. Jak již bylo uvedeno výše, izolace z krve je vhodná především v případě obojživelníků a ptáků, u savců je třeba použít větší množství.

Opravdu velké výtěžky čisté DNA nám poskytuje prakticky každá z běžných tkání, zvláště pokud je k dispozici čerstvý vzorek. Jedná se například o tkáň srdeční, plicní, jaterní, ledvinovou či mozkovou. Jako výchozí materiál je však možné použít i kousek části těla, jako je myší ocas nebo králičí ucho. V tomto případě je však třeba větší množství tkáně a výtěžek není tak velký, jako při izolaci z vnitřních orgánů. DNA je možné izolovat i z chlupů nebo žíní, je však zapotřebí mít k dispozici více chlupových cibulek.

**Tabulka č. 1: Typické výtěžky genomové DNA z různých zdrojů (BIOGEN Praha s.r.o., 2015)**

Zdroj	Množství	Výtěžek (μg)
Savčí krev	200 μl	4 – 6
Myší srdce	10 mg	10 – 15
Myší ocas	0,5 cm	8 – 10
Kryší játra	10 mg	10 – 20
Kryší slezina	5 mg	20 – 30
Kryší ledvina	10 mg	25 – 30
Králičí ucho	20 mg	5 – 10

### **3.2.2 Izolace z živočišných produktů**

DNA je možné izolovat i z různých produktů živočišné výroby a potravin obecně. Je však třeba brát v potaz veškeré technologické postupy při výrobě, mezi které patří mechanické narušení původních tkání, působení vysokých teplot, vaření nebo naopak mražení, dále solení či přidání jiných látek, ovlivňujících vlastnosti původní tkáně. Všechny tyto kroky mají velký vliv na strukturu výchozí tkáně, podílejí se tedy i na degradaci nukleových kyselin. Při izolaci je tak možné získat pouze krátké fragmenty DNA, které nemusí být vhodné pro následné analýzy a uplatňují se jen ve vybraných metodách, nevyžadujících vysokou specifitu. Dalším faktorem ovlivňujícím výsledek izolace mohou být například kontaminace produktů různými bakteriemi či plísněmi.

V praxi slouží molekulární metody k odhalování podvodů a nesprávného složení potravin, jako je například nahrazení dražšího druhu masa levnějším.

## **3.3 Izolace DNA**

Vhodnou metodu pro izolaci DNA zvolíme na základě několika různých faktorů, ke kterým patří vlastnosti výchozí tkáně, potřebné množství a molekulová hmotnost DNA, dostatečná čistota vhodná pro další využití a v neposlední řadě i časová a finanční náročnost. Bez ohledu na to, jakou metodu zvolíme, postupujeme při izolaci genomové DNA v několika určitých krocích.

Prvním krokem je homogenizace vzorku, nezbytná především v případě tužších materiálů. V závislosti na velikosti a charakteru vzorku může být provedena pomocí třecí misky s tloučkem, případně s pomocí tekutého dusíku. Další možností je homogenizace vzorku přímo ve zkumavce, a to buď ručně nebo s pomocí speciálních homogenizačních mlýnů. Následuje lýze buněk, separace od proteinů, tuků a RNA.

### **3.3.1 Jednoduché izolační metody**

#### **3.3.1.1. Vsolování a vysolování**

Vsolování a vysolování patří mezi jedny z nejjednodušších metod pro izolaci

nukleových kyselin. Je založena na principu změny rozpustnosti molekul DNA v závislosti na změně koncentrace iontů v roztoku tak, že s rostoucí koncentrací iontů rozpustnost nejprve roste a DNA se do roztoku vsoluje. Po dosažení maxima začne rozpustnost molekuly klesat a tím se DNA z roztoku vysoluje.

Nejčastěji používanou solí k vysolování je síran amonný, vyznačující se mimořádně velkou rozpustností, která se příliš nemění s teplotou. Při izolaci nukleových kyselin je vhodné takové množství síranu amonného, které odpovídá 30% množství potřebného ke vzniku nasyceného roztoku, při vyšším nasycení (rozmezí 30 až 75%) se již sráží většina proteinů. (Káš et al., 2005)

Vysolovací metoda je snadná, rychlá, bezpečná, levná a poskytuje vysoce kvalitní DNA. (Turtinen a Juran, 1998).

### **3.3.1.2 Srážení organickými rozpouštědly**

Srážení organickými rozpouštědly je poměrně stará metoda, která se v dnešní době již příliš nepoužívá a je postupně nahrazována modernějšími separačními technikami.

Používají se nepolární, vodou mísitelná organická rozpouštědla, snižující dielektrickou konstantu prostředí, čímž snižují rozpustnost a přispívají k vysrážení biopolymeru. V případě srážení nukleových kyselin se nejčastěji využívá srážení koncentrovaným ethanolem, tzv. ethanolové srážení, které má výhodu v tom, že již není potřeba provádět dialýzu. Kromě ethanolu se používá aceton, isopropanol, methanol, propanol a diethyleter. Srážení by mělo probíhat při nízkých teplotách (kolem 0°C), jinak hrozí denaturace vysrážených proteinů. (Káš et al., 2005)

## **3.3.2 Moderní metody**

### **3.3.2.1 Chelex**

Chelex je pryskyřice tvořena ze styren divinylbenzen kopolymeru obsahující párové iminodiacetátové ionty, které zde vystupují jako chelátory, mající schopnost navázat polyvalentní kovové ionty. Afinita chelexu k těžkým kovům, jako je  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , se zvyšuje v alkalickém prostředí, což je důležité kvůli faktu, že tyto ionty

mohou za vysokých teplot (95 – 100°C) poškodit DNA. Podstatné je především vyvázání  $Mg^{2+}$  iontů z roztoku, čímž se zabrání aktivaci endonukleáz, uvolněných při lýze buněk. Přítomnost hořčičných iontů jako jejich kofaktorů, je pro enzymatickou aktivitu endonukleáz nezbytná, po jejich inaktivaci již nemohou DNA napadat a izolát je stabilizován. (Čapková Frydrychová et al., 2013) V praxi je možné se nejčastěji setkat s iontoměničovou pryskyřicí Chelex-100.

Izolace DNA pomocí chelexu je velmi jednoduchá, rychlá, poměrně levná a účinná metoda nevyžadující použití organických rozpouštědel. Nejčastěji je tato metoda spojována s oblastí forenzní genetiky, kdy se DNA izoluje například ze zaschlých krevních vzorků, tkání, vlasů, kostí, vzorků slin ulpěných například na cigaretovém nedopalku nebo z bukálních stěrů. Nevýhodou této techniky je, že při ní nejsou z roztoku odstraňovány inhibitory, je tedy možné ji použít pouze v případě vzorků s malým množstvím inhibitorů. (Šimková, 2012) Výhodou je naopak minimální riziko kontaminace vzorku, celý proces extrakce se totiž provádí pouze v jedné zkumavce.

Prvním krokem při izolaci DNA pomocí Chelexu je fyzická homogenizace vzorku, po které následuje destrukce a degradace buněčných membrán, dále denaturace DNA alkalickým prostředím a vysokou teplotou. Po následné centrifugaci suspenze dojde k oddělení pryskyřice chelexu a zbytků buněčných komponent od izolátu obsahujícího genetický materiál. Takto izolovaná DNA může být dále využita pro PCR amplifikaci. (Čapková Frydrychová et al., 2013)

Zkoumání účinnosti metody se věnovali Suenaga a Nakamura (2004), kteří si pro extrakci DNA z lidských vlasů zvolili tři různé metody, kromě Chelexu použili QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit a ISOHAIR<sup>®</sup>. Při izolaci DNA z barvených vlasů pomocí Chelexu obsahovala extrahovaná DNA pouze malé množství inhibitorů PCR. Tuto metodu jako výchozí pro následné použití materiálu pro PCR autoři doporučují i z hlediska její jednoduchosti a nenákladnosti.

### **3.3.2.2 Fenol-chloroformová extrakce**

Fenol-chloroformová extrakce patří ke starším metodám izolace nukleových kyselin, stále se však hojně používá, nejčastěji v případě separace DNA, RNA a proteinů. Fenol zde vystupuje jako organické rozpouštědlo oddělující proteiny od nukleových kyselin, zatímco chloroform proteiny denaturuje, rozpouští tuky a podílí se

na oddělení jednotlivých fází. (Bártová, 2011)

Jedná se o metodu založenou na extrakci z kapaliny do kapaliny, při které přechází rozpuštěná látka z jedné kapalně fáze do druhé. Rozdílné kapalně fáze jsou zde představovány vodou nebo vodným roztokem a organickým, vodou nemísitelným, rozpouštědlem, přičemž účinnost metody je závislá na rozdílu rozpustností separované látky v obou použitých rozpouštědlech. Směsi buněk jsou tedy na základě rozdílné rozpustnosti molekul odděleny do dvou rozdílných nemísitelných fází.

Při samotné izolaci nukleových kyselin se nejprve do vodného roztoku lyzovaných buněk nebo zhomogenizované tkáně přidá odpovídající množství fenol-chloroformu a důkladně se smísí. Vzhledem k faktu, že se fenol a chloroform nemísí s vodou, dojde k vytvoření dvou fází, spodní organické a horní vodné fáze. Důkladné promíchání směsi vede k denaturaci proteinů a jejich vysrážení. Následnou centrifugací dojde ke koncentraci vzniklé sraženiny v místě fázového rozhraní těžší organické fáze a lehčí vodné fáze. Pokud byl pro extrakci použit fenol ekvilibrovaný neutrálním nebo alkalickým puforem, zůstávají nukleové kyseliny, tedy DNA i RNA, ve vodné fázi. V případě použití kyselého fenolu DNA přechází do organické fáze a ve vodné tedy zůstává pouze RNA. Tohoto faktu se využívá pro izolaci samotné RNA. (Šmarda et al., 2008) Z vodné fáze je DNA získána vysrážení ethanolem a následně rozpustí ve vodě.

Směs fenolu a chloroformu denaturuje proteiny s větší účinností, než fenol samotný. Obvykle používaný poměr objemu fenolu ku chloroformu je 1:1 a 5:1. Do směsi se často pro zabránění tvorby pěny přidává ještě isoamylalkohol, a to obvykle v poměru 24 dílů chloroformu ku jednomu dílu isoamylakoholu. K redukci účinku nukleáz se používá guanidinových solí. (Zumbo, 2012)

Izolace DNA za použití fenol-chloroformové extrakce poskytuje vysoký výnos DNA o vysoké kvalitě. Nevýhodou je velká časová náročnost této techniky a také práce s nebezpečnými chemikáliemi.

### **3.3.2.3 Magnetické částice**

Mezi technologie užívané k izolaci nukleových kyselin, které jsou mezi odbornou veřejností více rozšířené, patří metody založené na magnetických částicích (nebo také paramagnetické částice). Svě uplatnění nacházejí v řadě biomedicínských a biotechnologických oborů, konkrétně se využívají například k zobrazování pomocí



magnetické rezonance, dále pro cílený transport léčiv, při magnetofekci, k reparaci tkání, magnetickému značení buněk a k izolaci biomolekul. (Vlčnovská et al., 2012) V lékařství mají další velký význam při separaci kmenových a nádorových buněk, detekci mikrobiálních patogenů a pro imunomagnetické stanovení významných analytů.

Jedná se o částice s kovovým jádrem, které je běžně tvořeno oxidy železa, především maghemitem ( $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) nebo magnetitem ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), další variantou je například zlato. Jádro magnetických částic je obaleno vrstvou s velmi specifickým povrchem, který je možné upravit podle charakteru izolované molekuly. Magnetické částice mají rozpětí velikostí od 5 nm do 100  $\mu\text{m}$ , což se opět upravuje podle izolované molekuly. Částice o velikosti 5 – 50 nm se používají k izolaci proteinů, 20 – 450 nm k izolaci nukleových kyselin a virů a velikost 10-100  $\mu\text{m}$  slouží k izolaci buněk. (Hůska et al., 2008)

Princip metody se odvíjí od fyzikálně-chemických vlastností částic, které jsou schopny navázat bioreaktivní molekuly díky reakci na vnější magnetické pole. V praxi to probíhá tak, že se magnetické částice přidají ke vzorku a dojde k navázání cílených molekul. Následně dojde pomocí magnetu k přitáhnutí takto modifikovaných částic ke stěně zkumavky a zbylý roztok s nenavázanými látkami je odstraněn. Po promytí dojde k uvolnění částic s navázanými molekulami do přidaného roztoku a následně díky různým krokům proběhne oddělení navázaných molekul od magnetických částic. Takto byly získány samostatné cílené molekuly, vhodné pro použití k dalším analýzám. (Hůska et al., 2008)

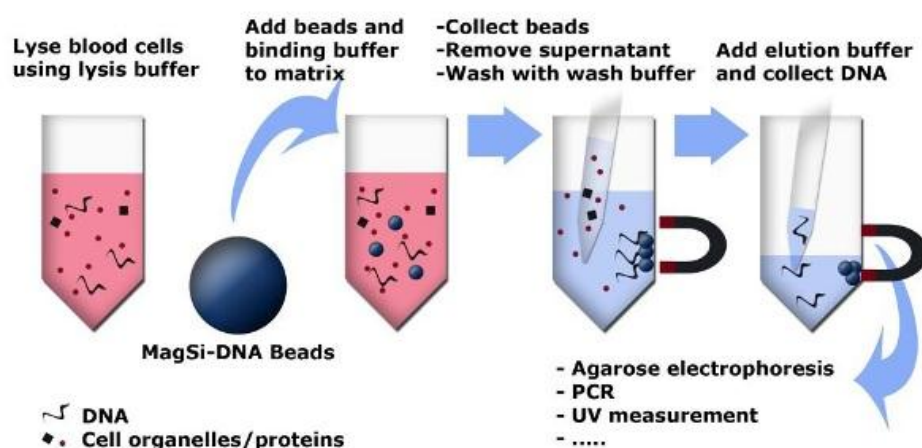
Výhodou této metody izolace je, že vzorek nemusí být složitě upravovaný, jak tomu bývá u jiných konvenčních metod. Tím se celý proces izolace cílených biomolekul výrazně urychlí a zároveň se snižuje riziko jejich případného poškození. (Hůska et al., 2008) Separace biomolekul pomocí magnetických částic jsou velmi rychlé, snadné a jsou schopny genetický materiál či jiné biomolekuly izolovat s velkou citlivostí a spolehlivostí.

Amagliani et al. (2003) použil metodu založenou na magnetických částicích pro přímou detekci bakterie *Listeria monocytogenes* z mléka. Celý proces izolace bakteriální DNA, včetně vyhodnocení pomocí gelové elektroforézy a PCR, jim trval pouhý jeden den. To dokazuje, že metoda je výrazně méně časově náročná, než klasické metody využívané pro detekci bakterie *Listeria monocytogenes*, které vyžadují alespoň jeden týden. Vzhledem k tomu, že metoda nevyžaduje zařazení fenol-chloroformové

extrakce, je také bezpečnější a snadnější. Využití technik fungujících na principu magnetických částic, je vhodné pro automatizované systémy, minimalizuje potřebu manuální práce.

Trachtová a Rittich (2011) použili magnetické mikročástice k izolaci genomové DNA z různých mléčných a probiotických výrobků. Množství a kvalita izolované DNA byla následně ověřena spektrofotometricky, s využitím PCR amplifikace, gelové elektroforézy a PCR v reálném čase. Magnetické mikročástice nijak neovlivňovaly průběh amplifikace ani kvantifikace DNA v případě PCR v reálném čase. Metoda byla hodnocena jako vhodná pro použití při izolaci z daných produktů a ze všech vzorků byla genomová DNA izolována v dostatečném množství a čistotě a kvalitě pro následné použití v PCR.

V dnešní době je již možné na trhu sehnat několik přístrojů od různých společností, které kombinují funkci izolace biomolekul s jejich detekcí na základě jejich kvantifikace nebo interakce s jinými biomolekulami. Tyto přístroje buď využívají pro značení přímo ferromagnetické částice, nebo spojují využití magnetických částic v kombinaci s jinou detekční metodou, jako je fluorescence nebo chemiluminescence. Je možné, že se již v blízké budoucnosti dočkáme využití magnetických částic v různých testech jako detekčních sond, kde by techniky značení, jako je fluorescence, chemiluminescence nebo radiace, úplně nahradily. (Saiyed et al., 2003)



Obrázek č. 1: Schématické znázornění izolace DNA z krve pomocí magnetických částic (AZoNano.com, 2013)

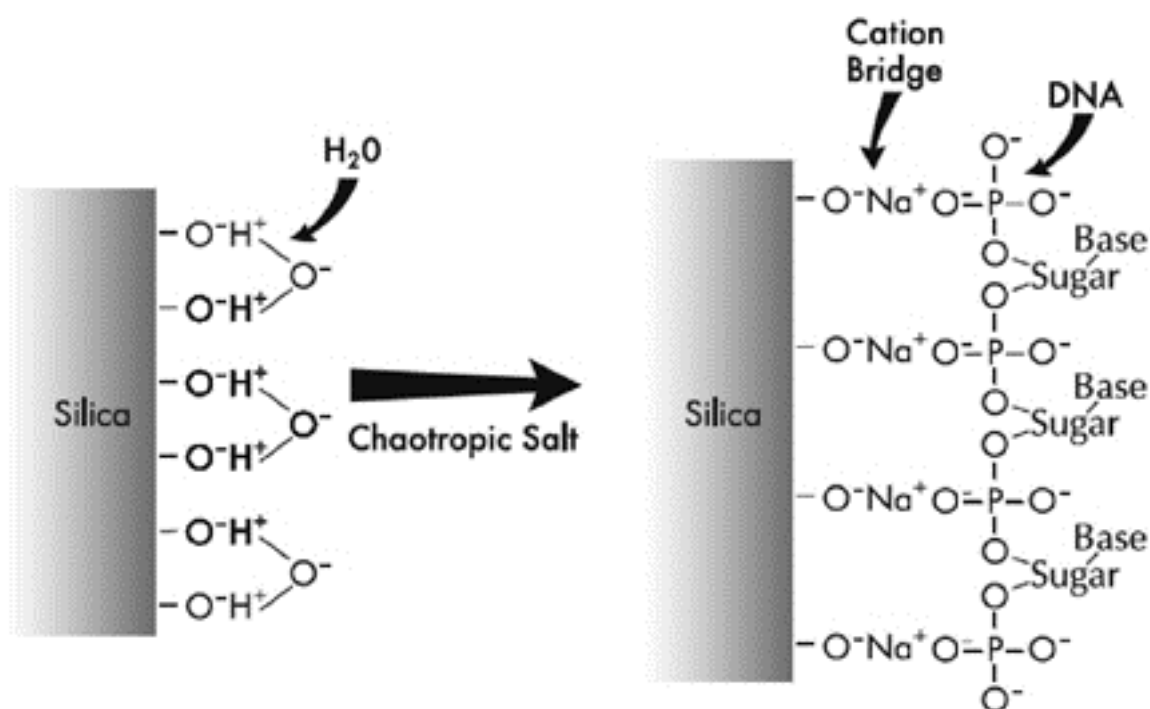
#### 3.3.2.4 Adsorpce na silikát

Metoda je založena na selektivní adsorpci nukleových kyselin na membránu silikagelu za přítomnosti vysokých koncentrací chaotropních solí. Za použití optimalizovaných pufrů v postupu lýzy je zaručeno, že dojde k adsorpci pouze DNA a buněčné proteiny spolu s metabolity zůstanou v roztoku, ze kterého jsou následně vyplaveny. Jedná se o jednodušší a účinnější systém, než v případě jiných metod, založených na principu srážení nebo extrakce. DNA je ze silikagelu získána za použití pufru s nízkým obsahem soli. Tato metoda nevyžaduje použití alkoholového srážení.

Nejprve se do roztoku obsahujícího lyzovanou buňku přidá chaotropní sůl a suspenze silikátových částic. Následným důkladným protřepáním směsi dojde k ulpívání DNA na silikátových částicích. Všechny ostatní sloučeniny zůstanou rozpuštěné v roztoku a po odstředění a usazení částic na dně je možné roztok odstanit odsátím. Následuje opětovné přidání pufru s chaotropními solemi a znovu se směs odstředí a odsaje přebytečný roztok. Na částicích zůstane navázaná čistá DNA. Z povrchu částic DNA uvolníme přidáním vody nebo vhodného pufru již bez obsahu chaotropních solí. Po odstředění a usazení již samotných silikátových částic na dně získáme čistý roztok DNA. (Ústav biologie LF UP, 2015)

Pro izolaci DNA se využívají hydratované silikátové částice připravené zahříváním oxidu křemičitého v roztoku hydroxidu sodného nebo hydroxidu draselného v molárním poměru od 2:1 do 10:1 po dobu alespoň 48 hodin. DNA se naváže na anorganickou částici a je uvolňována do teplé vody. Navázání je zde zajištěno díky vysoké afinitě na záporně nabitou DNA ke kladně nabitým silikátovým částicím. Sodík zde jako kationt pomáhá přitahovat negativně nabitý kyslík fosfátové skupiny nukleové kyseliny. Při vysokém obsahu solí, a tedy pH vyšším než 7, rozbíjí sodné kationty vodíkové vazby velmi vodíkem a kyslíkem. Pevně navázaná DNA je důkladně promývána a dojde k odstranění veškerých nečistot. Následuje eluce pročištěných molekul DNA při nízkém obsahu solí (pH je nižší než 7) pomocí TE (Tris-EDTA pufr) pufru nebo destilované vody. (Siun Chee Tan a Beow Chin Yiap, 2009)

Kromě silikátových částic lze k izolaci DNA použít i nitrocelulóзовé nebo polyamidové (nylonové) membrány, jejich nevýhodou je však nižší specifita. Tyto materiály se často používají jako pevná fáze pro přenos nukleových kyselin. Polyamidové nosiče jsou oproti nitrocelulóзовým odolnější a nukleové částice vážou nevratně. (Siun Chee Tan a Beow Chin Yiap, 2009)



Obrázek č. 2: Znárodnění principu navázání DNA na silikát v přítomnosti chaotropních solí (bioenergy.asu.edu, 2007)

### 3.4 Elektroforéza

Elektroforéza je jednou z nejpoužívanějších separačních technik pro izolaci a analýzu nukleových kyselin v molekulární biologii. Funguje na principu pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem záporného náboje jsou fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitým elektrodě-anodě. (Šmarda et al., 2008).

Jedná se o velmi rychlou a levnou metodu, který umožňuje separovat jak velmi malé množství, tak velké množství nukleových kyselin.

Elektroforéza se může podle různých hledisek rozdělovat na několik typů. Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme elektroforézu horizontální, vertikální a kapilárovou. Horizontální a vertikální elektroforéza mají deskové uspořádání, v případě kapilární elektroforézy se gel nachází uvnitř kapiláry. (Šmarda et al., 2008) Kapilárová separace se v dnešní době využívá při analýze DNA pomocí kapilárových sekvenátorů, které hrály důležitou roli při odhalení sekvence lidského

genomu.

### **3.4.1 Gelová elektroforéza**

V roce 1937 švédský biochemik Arne Tiselius poprvé popsal princip využití elektroforézy k separaci proteinů. Tehdy použil tzv. volnou elektroforézu, neboli elektroforézu volného rozhraní, která se prováděla uvnitř trubice ve tvaru U. Docházelo při ní však k míchání putujících proteinů, což vyžadovalo použití velkého množství vzorku a složité přístroje. Z toho důvodu tato metoda nahrazena elektroforézou na nosiči neboli zónovou elektroforézou, při které se vzorek pohybuje na pevném podkladu. (Káš et al., 2005)

Elektroforéza se tedy neprovádí přímo v roztoku, ale na vhodném nosiči, který bývá nejčastěji ve formě gelu. Gel může být tvořen různými látkami, často využívané jsou agaróza a polyakrylamid. Tyto sloučeniny vytvářejí složitou síť polymerních molekul s póry, jejichž velikost závisí na složení roztoku a koncentraci polymeru. (Šmarda et al., 2008) Při gelové elektroforéze se velké molekuly opoždují oproti molekulám malým, gel zde zcela vyplňuje vymezený prostor.

Dalším kritériem, podle kterého se elektroforetické metody dělí, je tedy charakter nosného média. Podle něj rozlišujeme čtyři základní metody elektroforézy, a to elektroforézu na polyakrylamidovém, agarózovém, škrobovém a acetylcelulózovém gelu.

#### **3.4.1.1 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE)**

Technika PAGE využívá k separaci molekul jejich náboj i jejich velikost. Polyakrylamidový gel se připravuje kopolymerací monomeru akrylamidu a N,N'-metylen-bisakrylamidu „BIS“ v roztoku pufru za přítomnosti peroxidisíranu nebo riboflavinu, které zde fungují jako iniciátory. Vzájemný poměr monomerů výrazně ovlivňuje fyzikální vlastnosti gelu. Důležitou úlohu zde hraje také tetramethyldiamin „TEMED“ nebo dimethylaminopropionitril „DMPN“ jako stabilizátory volných radikálů. Tento gel je průhledný, inertní, mechanicky pevný a strukturně je tvořen otevřenými póry určité velikosti, které obsahují kapalinu s pufrem. V případě, že velikost pórů zhruba odpovídá velikosti molekul proteinu, pak se tyto molekuly při

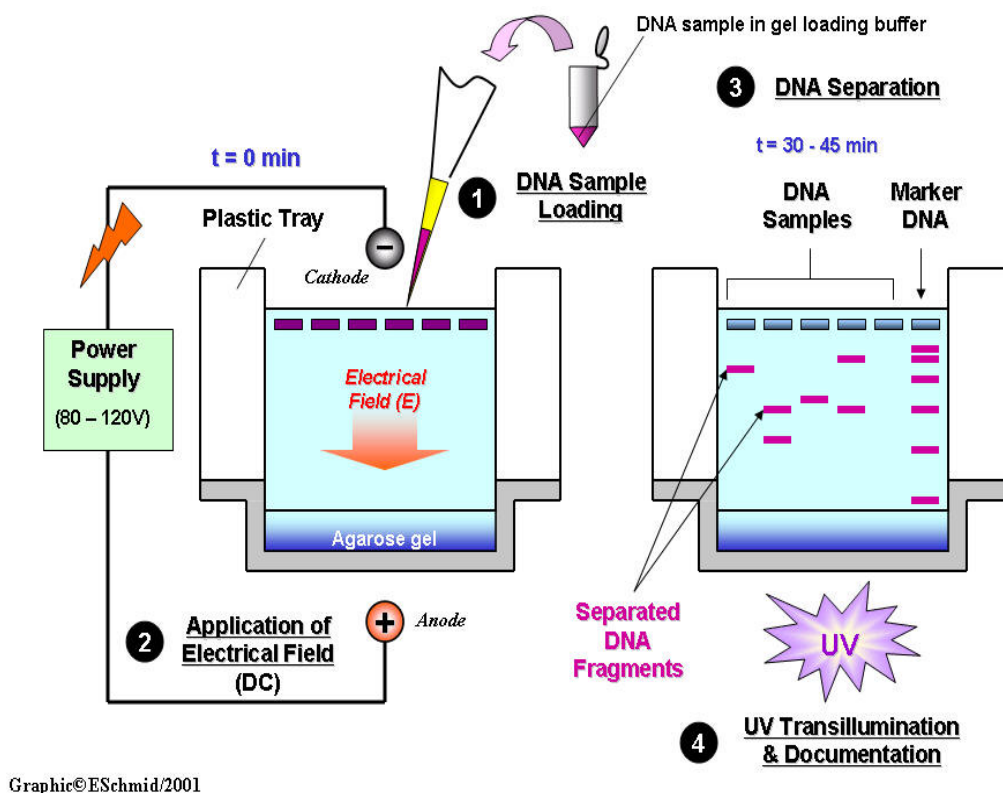
průchodu gelem setkájí s odporem, což vede k jejich rozdělení podle své velikosti. (Káš et al., 2005) Nevýhodou metody je vysoká toxicita akrylamidu.

### 3.4.1.2 Elektroforéza na agarózovém gelu (AGE)

Metoda využívající agarózový gel separuje molekuly pouze na základě jejich elektrického náboje. Agaróza je polysacharid izolovaný z mořských řas a gel se připravuje tak, že se zahřívá směs agarózy a pufru nalije do připravené formy, vloží se hřeben a gel se nechá ztuhnout. Koncentrace agarózy může být různá, často se využívá 1% a 3%. Po ztuhnutí gelu se hřeben vytáhne a do vzniklých jamek se pipetují jednotlivé vzorky. (Zima et al., 2004)

Agarózové gely se využívají především pro separaci molekul nukleových kyselin o velikostech v rozmezí od 100 bp do 50 kb. (Šmarda et al., 2008)

Mezi výhody agarózového gelu patří jeho snadná příprava v laboratoři a velké rozmezí velikostí molekul DNA, které je možné touto metodou dělit. Nevýhodou je vysoká cena.



Obrázek č. 3: Schéma agarózové gelové elektroforézy (Schmid E.,2001)

#### **3.4.1.3 Elektroforéza na škrobovém gelu (SGE)**

Tato metoda umožňuje separovat proteiny na základě jejich celkového náboje a velikosti. Při přípravě škrobu se uvařená směs hydrolyzovaného škrobu s pufrem nalije do připravené formy a nechá ztuhnout. Hydrolyzovaný škrob je možné buď vyrobit přímo v laboratoři nebo zakoupit komerčně dostupný, čímž se však metoda značně prodraží. Koncentrace škrobu, která se pohybuje obvykle v rozmezí 11 – 13%, přímo ovlivňuje velikost pórů v gelu. Co se týče koncentrací pufrů, gelový bývá asi desetkrát zředěnější než než elektrodotový, koncentraci je třeba regulovat na základě síly přiváděného elektrického proudu. Škrobová elektroforéza může být vertikální nebo horizontální. Ačkoli je horizontální v současnosti rozšířenější, má nevýhodu v podobě tzv. elektrodekantace, což je jev, kdy proteiny o vysoké molekulové hmotnosti po určité době klesají na spodní stranu gelu. Důsledkem je jejich nízká koncentrace v horních vrstvách. (Šmarda et al., 2008)

#### **3.4.1.4 Elektroforéza na acetylcelulózovém gelu (CAGE)**

Tato elektroforéza funguje na principu separace na základě celkového náboje proteinových molekul. K dispozici jsou na trhu komerčně vyráběné gelové listy, které se před samotnou elektroforézou namočí do příslušného pufru. Mezi výhody této metody patří minimální množství tkáně, vysoká reprodukovatelnost experimentů a také krátká doba vlastní elektroforézy. Nevýhodou je však velikost pórů v gelu, které způsobují elektroendosmózu, při které se zvyšuje mobilita kationtů a naopak se snižuje nebo dokonce zastavuje pohyblivost aniontů. Další nevýhodou jsou vyšší náklady při využití prefabrikovaných gelů. (Šmarda et al., 2008)

#### **3.4.1.5 Barvení**

Aby bylo možné vidět proužky jednotlivých látek vzniklé při elektroforetickém dělení, je třeba je před samotným procesem obarvit. V případě proteinů dojde přímo k obarvení samotného gelu ponořením do roztoku obsahujícího alkohol a barvivo Coomassie modř (Coomassie Brilliant Blue, CBB R-250). V tomto roztoku dojde jednak k denaturaci a fixaci proteinů, dále dochází k vytvoření komplexů barvivo-protein. K odstranění přebytečného barviva se používá například vymývání gelu

kyselým roztokem. K barvení proteinů je dále možné použít barvivo amidočern (Amido Black 10B). Další, citlivější, možností je barvení stříbrem, které funguje na principu redukce stříbrného iontu formaldehydem na kovové stříbro v alkalickém prostředí uhličitanu sodného. (Káš et al., 2005) Barvení stříbrem se používá pro detekci molekul DNA izolovaných v polyakrylamidových gelech.

Ke zviditelnění molekul DNA se nejčastěji používá ethidiumbromid, který po začlenění mezi sousední páry bází vytváří s DNA komplex. Po osvětlení ultrafialovým světlem tento komplex červeně fluoreskuje. Barvivo ethidiumbromid je rovněž vhodné pro barvení RNA, intenzita výchozího zabarvení je však nižší. Kromě ethidiumbromidu se pro obarvení nukleových kyselin používá skupina fluorescenčních kyaninových barviv, která nese komerční označení SYBR. (Šmarda et al., 2008)

### **3.5 Měření koncentrace a čistoty DNA**

Běžně se pro měření koncentrace a čistoty získané DNA používají dvě metody. Pokud se podaří získat velmi čistý vzorek pouze s malým obsahem nečistot, jako jsou proteiny, fenol nebo agaróza, je spektrofotometrické měření za použití UV světla velmi přesné a jednoduché. Pokud však máme k dispozici pouze malé množství izolované DNA (méně než 25 mg/l), nebo je vzorek kontaminován velkým množstvím nečistot, může být koncentrace DNA zjištěna z intenzity fluorescence emitované ethidiumbromidem po srovnání s řadou standardních vzorků DNA o koncentraci od 0,5 do 50 mg/l. Tímto způsobem může být získáno opravdu velmi malé množství DNA, a to 1 – 5 ng. (Průša, 1997)

Před samotnou spektrofotometrií je třeba vzorek nejprve naředit destilovanou vodou. Měření následně probíhá při vlnových délkách 260 a 280 nm, díky čemuž je možné zhodnotit čistotu vzorku DNA. Čistota izolované DNA by měla mít optimálně poměr 1,8. Hodnoty nižší nebo vyšší značí výraznější kontaminaci DNA. (Průša, 1997) Pro měření koncentrace a čistoty nukleových kyselin slouží specializované přístroje, mezi něž patří například NanoDrop 2000. Jedná se o mikroobjemový spektrofotometr, umožňující měření vzorků i o velmi malých objemech (od 0,5  $\mu$ l). Další jeho výhodou je velice krátká doba měření, která je nižší než 5 sekund. Na přístroji, jehož spektrální rozsah je 190-840 nm, je možné měřit koncentraci DNA, RNA a čistotu vzorku, přičemž je možné naměřená data exportovat do grafů a tabulek. (LAB MARK, 2015)



### 3.6 Srovnání metod izolace DNA

Přestože jsou jednoduché izolační techniky obecně rychlé, jednoduché na provedení, velice levné a poskytují většinou dostatek kvalitní DNA, postupně se od nich ustupuje a jsou v praxi nahrazovány moderními izolačními technikami.

Z hlediska časové náročnosti a pracnosti poskytují moderní izolační techniky podobné výsledky. Obecně se o nich dá říci, že jsou rychlé, pohodlné a jednoduché. Výjimku tvoří starší metoda fenol-chloroformové extrakce, která je zdlouhavá a pracná. Naopak co se týče výtěžku izolované DNA, má fenol-chloroformová extrakce velmi dobré výsledky. Poskytuje opravdu velké množství DNA, což je i důvod, proč se stále používá. Dobré výsledky má izolace DNA pomocí silika kolon a již menší výtěžek lze získat pomocí magnetických částic. Rovněž izolace pomocí Chelexu 100 poskytuje relativně málo DNA, na případně provedení PCR reakce je to však ještě dostačující.

Další předností fenol-chloroformové metody je izolace velmi čisté DNA. Je však třeba dávat pozor na případné znečištění v průběhu samotné izolace. Také metody založené na adsorpci na silikát poskytují díky minimalizaci případné kontaminace velmi čistou DNA. Dobré výsledky jsou i v případě magnetických částic. DNA o velmi nízké čistotě poskytuje metoda Chelex 100. Toto negativum však vyvažuje fakt, že pro její provedení je dostačující opravdu velmi malé množství výchozího materiálu, čehož se využívá ve forenzní biologii.

Z hlediska finanční náročnosti je bezpochyby nejvýhodnější extrakce fenolem a chloroformem. Poměrně levné je i použití Chelexu či silika kolon. Naopak metody využívající magnetických částic jsou velmi drahé, zvláště jedná-li se o automatizované metody.

Srovnáním manuálních a automatizovaných metod se zabýval Banzola et al. (2008), který izoloval nukleové kyseliny ze séra pro potřeby analýzy fetální DNA. Výsledky manuálních i automatizovaných metod byly téměř shodné, automatizované metody však mají velkou výhodu ve vysoké reprodukovatelnosti a pohodlném provedení.

### 3.7 Archivace DNA

Metody optimalizující uchování vzorků izolované DNA jsou v posledních

letech velice diskutovaným tématem. Přestože je čistá DNA za předpokladu skladování v suchu relativně stabilní, vykazuje velkou citlivost na vlhkost, která může způsobit hydrolyzu molekul. Dále je také velmi citlivá na působení různých činitelů, mezi které patří DNázy, ionizující a ultrafialové záření, volné radikály a mnoho jiných podmínek, způsobujících destabilizaci molekul DNA.

Zachování DNA je nezbytným procesem v různorodých oblastech a široké škále oborů, jako je farmacie, forenzní genetika, biologie a také provoz bank s biologickými a genetickými materiály. Přestože všechny tyto oblasti používají pro uchovávání DNA termín konzervace, který spočívá v udržení chemické a fyzikální integrity molekul DNA, specifické podmínky a také vyhlídky vědců z odlišných oborů se mohou výrazně lišit. Pro představu, pro farmaceutický průmysl je důležité uchovat stabilní vzorek po dobu přibližně 2 let, zatímco v evoluční biologii se časový rámec měří již ve stovkách milionů let. Rozdíl se však nenachází pouze v délce uchovávání, důležitou roli hrají i kritéria posuzování stability molekul DNA. (Anchordoquy a Molina, 2007)

Existuje několik studií, které zcela definují optimální podmínky pro uchovávání DNA. Obecně ze srovnání výsledků různých skladovacích procesů vyplývá, že uchovávání DNA v chladu je lepší. Při výběru vhodné techniky skladování je však nutné brát v potaz různá kritéria, jako je zvolená metodika izolace DNA, integrita skladovacích podmínek a v neposlední řadě také principy technik, pro které budou uchovávané vzorky DNA dále využívány. (Baust, 2008) Pro různé aplikace mohou být naprosto odlišné požadavky na minimální kvalitu a množství DNA.

Izolovanou DNA je možné uchovávat krátkodobě při pokojové teplotě na suché pevné matrici. Pokud je potřeba vzorky skladovat po dobu několika měsíců, doporučuje se teplota  $-20^{\circ}\text{C}$  a pro potřeby dlouhodobého uchovávání se používá teplot  $-80^{\circ}\text{C}$  nebo i  $-196^{\circ}\text{C}$  (skladování v kapalném dusíku). Jako skladovací médium může sloužit voda, TE (Tris-EDTA puf) nebo může být DNA uchovávána po vysrážení 70% ethanolem.

### **3.7.1 Krátkodobá archivace**

Pro potřeby krátkodobé archivace DNA se používá teplota  $4^{\circ}\text{C}$ , a to po dobu obvykle několik dní či týdnů. Krátkodobá archivace je často využívána při běžné laboratorní praxi, kdy se vzorky uchovávají v chladničce pro využití v různých analýzách.

### 3.7.2 Dlouhodobá archivace

Mezi techniky dlouhodobé archivace patří například uchovávání DNA při  $-20^{\circ}$ , což odpovídá teplotě v mrazničce. Další možností je uchování DNA vysrážené v ethanolu při  $-80^{\circ}\text{C}$ , které sice zajistí stabilitu DNA po dlouhou dobu, ale má nevýhodu v následné přípravě vzorku k použití. Ta zahrnuje izolaci z ethanolu, převedení do vodního pufru a kvantifikaci DNA. (Anchordoquy a Molina, 2007)

Skladování vzorků při teplotách  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  poskytuje dostatečné podmínky pro uchování vzorků DNA v závislosti na jeho množství a kvalitě po takovou dobu, jakou je třeba. Při těchto teplotách však není možné zajistit tak dlouhodobé a kvalitní skladování, jako při uchovávání v kapalném dusíku. (Baust, 2008)

V případě dvou metod, skladování za pokojové teploty v suchém stavu a kryokonzervaci při teplotě  $-196^{\circ}\text{C}$  v kapalném dusíku, se uplatňuje stejný mechanismus, kdy se DNA uchovává ve skelném stavu. V tomto stavu molekuly DNA ztrácejí schopnost difundovat a pohyb protonů je téměř zastaví, čímž se zabrání chemické a nukleázové degradaci vzorku. Pokud v případě skladování v "suchém stavu" dojde ke zvýšení vlhkosti nebo se zvýší teplota tak, že přesáhne hodnotu skelného přechodu vody, obnoví se pohyblivost a reaktivita protonů a může dojít k poškození uchovávané DNA. (Baust, 2008)

Mezi nevýhody dlouhodobého uchovávání DNA při teplotách  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  patří velmi vysoké náklady spojené s udržováním takových podmínek, zvláště pokud se jedná o uchovávání velkého množství vzorků. Finančně méně nákladnou metodou se jeví uchovávání vzorků DNA za pokojové teploty v dehydratované formě. (Anchordoquy a Molina, 2007)

### 3.7.3 Chitosan

Chitosan, který se získává deacetylací chitinu, patří mezi přírodní polymery. Při archivaci se využívá jeho schopnosti měnit strukturu pro optimální adsorpci DNA. Mezi jeho nevýhody patří hydrofóbnost, horší mechanické vlastnosti a vysoké pH, které se mění v závislosti na jeho mechanických vlastnostech. (Başer et al., 2010)

K jeho přednostem patří stabilita a biodegradabilita. V případě, že se chitosan sloučí s kyselinou, dochází ve vodě k tvorbě rozpustných solí, které díky silně pozitivnímu náboji výborně váží záporně nabitě molekuly DNA. Mezi chitosanem

a navázanou DNA vznikne silná vazba, která molekulu nukleové kyseliny chrání před degradací.

Dalším pozitivem je fakt, že se chitosan řadí mezi biologicky obnovitelné a lehce odbouratelné zdroje. Jedná se o bezpečný, netoxický materiál šetrný k životnímu prostředí. (Hirano, 1999)

### **3.7.4 FTA<sup>®</sup> karta**

Metoda archivace DNA pomocí FTA<sup>®</sup> karet byla patentována roku 1993. Slouží k přemístění vzorku tekutého biologického materiálu z místa odběru do laboratoře nebo jako médium pro dlouhodobější skladování vzorků tělních tekutin za pokojové teploty. Tato metoda má však řadu nevýhod, mezi něž patří omezená garance dostatečného množství vzorku pro následnou izolaci, dále náchylnost ke kontaminaci cizorodou DNA působením vnějších vlivů při dlouhodobé archivaci. FTA<sup>®</sup> karty se v praxi využívají především k uchování primárních vzorků tělních tekutin, jako je krev nebo sliny. Uchovávat přímo izolovanou DNA lze samozřejmě také, je k tomu však třeba použít vzorek o vysoké koncentraci DNA. (Kukla et al., 2013)

Jedná se o komerčně dostupné produkty v podobě papírků napuštěných činidlem, které vzhledem připomínají archivační karty. Tyto karty byly v minulosti používány v oblasti humánní forenzní biologie a fungují na principu uchování vzorku DNA na papírku po jednoduchém promytí a odplavení nečistot. Mezi přednosti FTA<sup>®</sup> karet patří jejich praktický formát, který umožňuje prostorově nenáročné skladování v laboratoři za pokojové teploty a především jednoduchý transport vzorků DNA, které je možné uchované na kartě jednoduše zaslat třeba poštou. Díky tomu se mnoha vědcům podařilo shromáždit opravdu rozsáhlé sbírky vzorků DNA. (Smith a Burgoyne, 2004) Uchovávání vzorků na kartovém nosiči s sebou však nese i řadu nevýhod. Karty neposkytují pro vzorky dostatečnou ochranu před vnějšími vlivy a jsou proto náchylnější ke kontaminaci nebo dokonce degradaci. Před případnou analýzou je DNA třeba z nosiče nejprve uvolnit a purifikovat, přičemž ne vždy se podaří získat dostatek použitelné DNA. (METTINUM, 2013)

### 3.7.5 Technologie METTINUM®

Jedná se o velice "mladou" technologii, která byla registrována roku 2013. Pozoruhodným faktem je, že se jedná o český vynález, jehož autorem je MUDr. Pavel Kukla. Technologie je prezentována jako využitelná především pro uchovávání vzorků lidské DNA, lze ji však použít k archivaci DNA nejrůznějšího původu, což by mohlo znamenat velký pokrok v řadě medicínských a vědních oborů.

Hlavní předností je možnost uchovávání vzorků za pokojové teploty bez potřeby jakéhokoli mrazení a nezávisle na přívodu elektrické energie. Náklady na uchovávání vzorků jsou tedy minimální. DNA je uchovávána takovým způsobem, aby k jejímu následnému použití v různých analýzách nebylo třeba žádných příprav (READY-2B-TESTED). Způsob uložení zároveň zamezuje vlivu vnějších podmínek na DNA, a je tedy zabráněno jakékoli kontaminaci. Oproti všem ostatním běžně používaným a výše uvedeným technikám, jako je uchovávání za pokojové teploty v plastových zkumavkách, FTA® kartám nebo zamrazování vzorků, přináší tato metoda velké množství výhod. Mezi další výhody této metody se řadí malý rozměr archivační jednotky, který nepřesahuje 30x30x10 mm. Vzorky archivované technikou METTINUM® je možné uchovávat po neomezeně dlouho dobu a je dokonce možné opatřit datový modul čipem, sloužícím k bezkontaktní identifikaci vzorku a následnému propojení s elektronickými systémy. (METTINUM, 2013)

Na neomezenou dobu skladování má vliv především anhydrobiotická stabilizace vzorku DNA. Jedná se o stav způsobený nedostatkem vody, jejíž podíl klesne pod určitou kritickou mez, což znemožňuje pohyb molekul a dojde k zastavení většiny biochemických procesů.

Datové nosiče pro uchování vzorků jsou koncipovány modulárně a DNA je v nich uložena mezi dvěma vypouklými skly, chráněnými hermeticky uzavřeným ochranným plastovým pouzdrem. Jak již bylo uvedeno výše, datové moduly jsou vybaveny čipem a také optickým modulem s mikrofilmem, na něj je možné uložit různé informace, jako je DNA profil vzorku, fotografie obličeje, otisky prstů či rentgenový snímek. I tyto datové nosiče jsou chráněny v hermeticky uzavřeném plastovém pouzdře. Pro usnadnění čtení informací o vzorku byl vyvinut návrh robotického systému pro automatizovanou obsluhu. Jeho součástí je čtečka RFID čipů, umožňující načtení veškerých informací o vzorku, uložených v datovém modulu. Dále je systém opatřen skenovací mikrokamerou pro grafické naskenování informací z mikrofilmu, přičemž osvětlení zde zajišťují LED

diody. Manipulaci s archivačními médii zajišťují dvě úchopná ramena, který vzorek předají k dalšímu zpracování v laboratoři. (Kukla et al., 2013)

## **4 MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Odběr vzorků**

Vybrala jsem si pro srovnání různé živočišné produkty a další biologické vzorky. Část vzorků jsem si obstarala sama a část vzorků pocházelo z banky biologického material oddělení genetiky Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat Mendelovy univerzity v Brně.

#### **4.1.1 Mléko a mléčné výrobky**

Zvolila jsem si různé mléčné výrobky, jednalo se o čerstvé kozí a kravské mléko, UHT mléko, kefir, bílý jogurt, jogurt Activia, tavený sýr, tvrdý sýr a hermelín. Trvanlivé výrobky byly zakoupeny jeden den před provedením izolace a uchovány v chladničce. Před odchodem do laboratoře byla v případě tekutých výrobků část odlita do jednorázových plastových zkumavek, u tuhých výrobků byla část uchována v uzavíratelném PVC sáčku.

#### **4.1.2 Krev, maso a masné výrobky**

Vzorky z prasečí krve, hovězího masa, masa z lososa a kuřecího lunch meatu byly uchovávány v mrazáku banky biologických vzorků. Paštika byla uchovávána v chladničce a před odchodem do laboratoře byla část oddělena do uzavíratelného PVC sáčku.

#### **4.1.3 Různé biologické vzorky**

Pro izolace DNA z různých biologických vzorků jsem použila výhradně vzorky, které byly k dispozici na Ústavu fyziologie, morfologie a genetiky zvířat Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně.

Vzorek bukální sliznice jsem použila svůj. Před odběrem bylo třeba dvě hodiny nejíst a nepít, aby nedošlo ke zkreslení výsledku. Odběr proběhl pomocí odběrového kartáčku, a to otíráním o sliznici dutiny ústní. Na štětičkách kartáčku ulpěly buňky,

sloužící jako zdroj nukleových kyselin.

## **4.2 Izolace DNA**

### **4.2.1 Izolace DNA z mléka a mléčných výrobků pomocí Genomic DNA Mini Kitu**

Vzorky mléka a mléčných výrobků (č. 1 – 9) kolonkovou metodou pomocí Genomic DNA Mini Kitu (Geneaid Biotech, Ltd., New Taipei City, Taiwan). Z každého tuhého vzorku bylo naváženo 30 mg tkáně a vloženo do 1,5 ml zkumavky. Bylo přidáno 200  $\mu$ l pufru GT a pomocí homogenizační tyčinky byla tkáň co rozdrvena. Poté bylo přidáno 20  $\mu$ l proteinázy K, směs byla zvortexována a inkubovala se v termálním bloku vyhřátém na 60°C po dobu 30 minut. Během inkubace bylo třeba vzorky občas vortexovat. Z tekutých vzorků bylo odebráno po 1 ml do 1,5 ml zkumavky a proběhla inkubace při 55°C v termálním bloku. Poté proběhla centrifugace (5 600 rpm; 4 minuty). Pipetou bylo odebráno 200  $\mu$ l spodní frakce a přepipetováno do čisté 1,5 zkumavky, do které bylo následně přidáno 40  $\mu$ l proteinázy K.

Poté bylo do všech vzorků přidáno 200  $\mu$ l pufru GBT, směs byla zvortexována a poté byla inkubována v termálním bloku vyhřátém na 60°C po dobu 20 minut. Ke vzorku bylo přidáno 200  $\mu$ l ethanolu (pro vysrážení nukleových kyselin) a směs byla zvortexována po dobu 10 sekund. Následně byla směs přepipetována do kolony a centrifugována (8 200 rpm; 1 minuta). Po vylití odpadu z centrifugační zkumavky a navrácení kolony bylo napipetováno 400  $\mu$ l pufru W1, následovala centrifugace (8 200 rpm; 1 minuta). Po vylití odpadu a vrácení kolony bylo napipetováno 600  $\mu$ l promývacího pufru WB a proběhla centrifugace (8 200 rpm; 1 minuta). Po vylití odpadu a vrácení kolony byla zkumavka dodatečně centrifugována (13 000 rpm; 3 minuty), aby se odstranily zbytky ethanolu. Poté byla kolona umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky a bylo do ní přidáno 100  $\mu$ l elučního pufru (Elution buffer). Vzorek byl inkubován po dobu 5 minut při pokojové teplotě a centrifugován (8 000 rpm; 1 minuta).

### **4.2.2 Izolace z mléka pomocí Column DNA Lego Kitu**

Vzorky č. 10 – 12 byly izolovány kolonkovou metodou pomocí Column DNA Lego Kitu (Top-Bio, s.r.o., Praha, Česká republika). V termálním bloku, rozeřátém na



55°C, byl ohřát 1 ml mléka v 1,5 ml zkumavce. Následovala centrifugace při (5600 rpm; 4 minuty). Došlo k odstranění tuku z mléka, který se usadil v horní části vzorku mléka. Pipetou bylo odebráno 200 µl spodní frakce a přepipetováno do čisté 1,5 ml zkumavky. K suspenzi byly přidány tři díly, tedy 600 µl DNA vazebného pufru L1. Směs byla 10 minut inkubována při pokojové teplotě za jemného míchání každé 2 minuty a poté byl vzorek centrifugován (6000 rpm; 30 sekund). Supernatant byl převeden do kolonky na sběrné zkumavce a set byl umístěn do rotoru centrifugy a centrifugován (13 000; 1 minuta). Roztok prošlý filtrem kolonky byl odstraněn a kolonka byla umístěna na stejnou sběrnou zkumavku, poté bylo přidáno 700 µl pufru Wash buffer a set byl centrifugován (13 000; 1 minuta). Roztok prošlý filtrem kolonky byl odstraněn a bylo přidáno 500 µl pufru Wash buffer, poté byl set centrifugován (13 000; 1 minuta). Roztok prošlý filtrem kolonky byl opět odstraněn a kolonka byla centrifugována (13 000; 1 minuta), aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru. Kolonka s navázanou DNA byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a do kolonky bylo vpraveno 50 µl elučního pufru (Elution buffer). Po dvou minutách byl kolonkový set centrifugován (13 000; 1 minuta). V tomto kroku došlo k uvolnění DNA z kolony a její kumulaci ve sběrné zkumavce.

#### **4.2.3 Izolace DNA z krve, masa a masných výrobků pomocí Genomic DNA Mini Kitu**

Vzorky krve, masa a masných výrobků byly izolovány kolonkovou metodou pomocí Genomic DNA Mini Kitu (Geneaid Biotech, Ltd., New Taipei City, Taiwan). Postup byl shodný s postupem izolace DNA v případě tuhých mléčných výrobků.

#### **4.2.4 Izolace DNA z různých biologických vzorků pomocí GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kitu**

Vzorky různých biologických vzorků číslo 1 – 16 byly izolovány pomocí GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kitu (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, USA). Počáteční kroky při izolaci z krve byly odlišné oproti postupu při izolaci z jiných biologických vzorků. Do 1,5 ml zkumavky bylo napipetováno 200 µl pufru LS-C a 20 µl proteinázy K. Směs byla 15 sekund vortexována a následně po dobu 10 minut inkubována v termálním bloku vyhřátém na 55°C.

U ostatních vzorků bylo nejprve odváženo 25 mg tkáně. Poté bylo přidáno 20  $\mu$ l proteinázy K a 180  $\mu$ l pufru LS-T. Po zvortexování se směs inkubovala v termálním bloku vyhřátém na 55°C, dokud se tkáň ve zkumavkách úplně nezorpusila. Po přidání 200  $\mu$ l pufru LS-C byl vzorek 15 sekund vortexován a poté se inkuboval po dobu 10 minut v termálním bloku vyhřátém na 70°C.

Další kroky již byly pro krev i ostatní vzorky společné. Do připravené kolony se napipetovalo 500  $\mu$ l pufru CPS a následně proběhla centrifugace (13 000 rpm; 1 minuta). Po vylití odpadu z centrifugační zkumavky byla kolona vrácena zpět do zkumavky. K lyzátu bylo přidáno 200  $\mu$ l ethanolu a směs byla vortexována po dobu 10 sekund. Získaná směs byla aplikována do připravené kolony a proběhla centrifugace (8 200 rpm; 1 minuta). Po vylití odpadu z centrifugační zkumavky byla kolona vrácena zpět a bylo do ní napipetováno 500  $\mu$ l pufru WS. Poté proběhla centrifugace (8 200 rpm; 1 minuta). Po vylití odpadu z centrifugační zkumavky byla kolona vrácena zpět a bylo do ní opět napipetováno 500  $\mu$ l pufru WS, proběhla centrifugace (13 000 rpm; 3 minuty). Po vylití odpadu z centrifugační zkumavky byla kolona vrácena zpět a proběhla centrifugace (13 000 rpm; 1 minuta). Kolonka byla umístěna do čisté 2 ml zkumavky a bylo do ní napipetováno 100  $\mu$ l ES pufru, následně proběhla inkubace při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po inkubaci byla směs centrifugována (8 200 rpm; 1 minuta).

### **4.3 Elektroforéza**

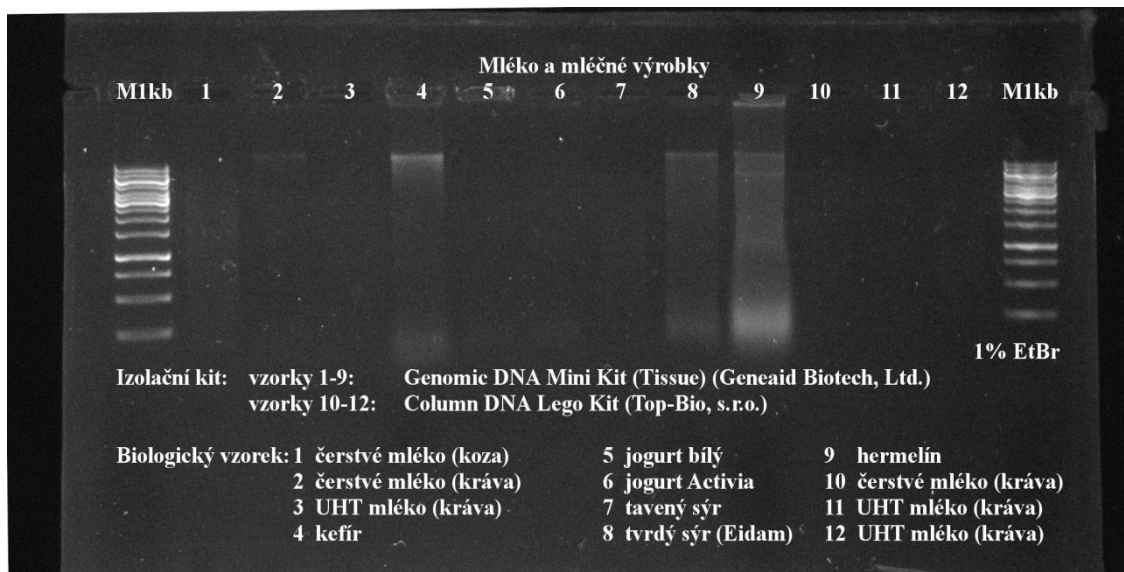
Pro kontrolu přítomnosti DNA byla použita gelová agarózová elektroforéza. Byl připraven 1% agarózový gel. Do erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 0,6 g agarózy a zalito 60 ml elektroforetického pufru TBE (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA). Po uvaření bylo do homogenizovaného a ochlazeného roztoku přidáno 12  $\mu$ l ethidium bromidu (Top-Bio, s.r.o., Praha, Česká republika) a vše bylo nalito do připravené elektroforetické misky. Do misky byl umístěn hřeben, který vytvořil v gelu po jeho ztuhnutí jamky. Miska s gelem byla umístěna do elektroforetické vany s TBE pufrům a byl vytažen hřeben. Po smíchání 5  $\mu$ l markeru Gene Ruler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) a 5  $\mu$ l z každého izolátu DNA s 1  $\mu$ l nanášecího pufru (40% sacharóza, 0,25% bromfenolová modř) byly vzorky nanášeny pipetou do jednotlivých jamek. K elektroforetické vaně byl připojen zdroj

stejnoseměrného napětí tak, aby DNA putovala k anodě s napětím 5V/cm. Elektroforéza běžela 30 minut, poté byl gel umístěn na UV transiluminátor Electronic UV Transilluminator (Ultra LUM Inc., Claremont, USA) a pro pořízení fotografií gelů byl použit fotoaparát Canon Power Shot G6.

#### **4.4 Ověření kvality izolované DNA**

Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA). Po zahřátí a nastavení přístroje bylo na spodní rameno napipetováno 2  $\mu$ l elučního pufru příslušného itolačního kitu a po přiklopení horního ramene přístroje se provedla kalibrace, po které následovalo očištění přístroje buničitou vatou. Při měření jednotlivých izolátů se také napipetovalo vždy 2  $\mu$ l DNA a po přiklopení horního ramene proběho měření. Kvalita izolace je dána z poměru absorbancí A260/A280, který by měl odpovídat hodnotě zhruba 1,8. Hodnota nižší než 1,7 značí znečištění DNA proteiny, organickými látkami nebo vzorek obsahuje nízkou koncentraci DNA, hodnota vyšší než 1,9 ukazuje DNA znečištěnou RNA nebo organickými látkami. Kvantita DNA je vyjádřena v nanogramech obsažených v jednom mikrolitru (ng/ $\mu$ l).

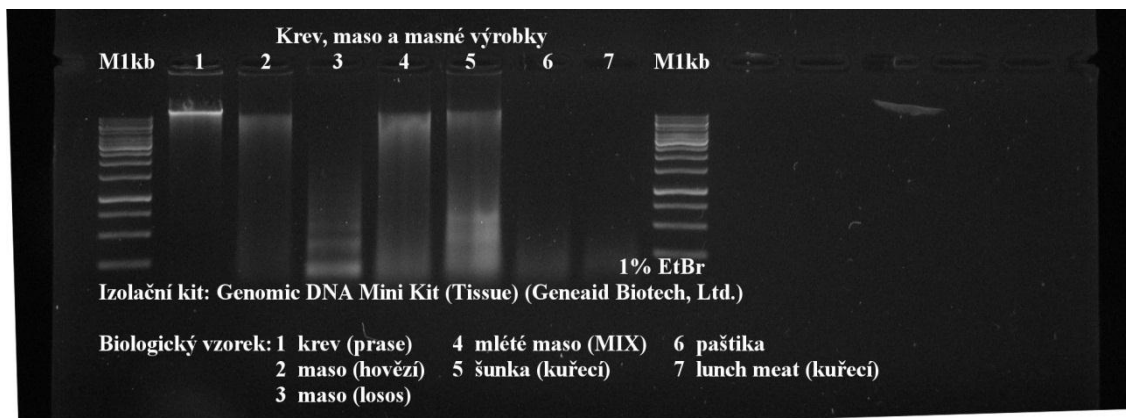
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek č. 4: DNA izolovaná z mléka a mléčných výrobků

Izolace DNA z mléka a mléčných výrobků byla provedena a ověřena dle postupu uvedeném v kapitole Materiál a metodika. Vzorky číslo 1 – 9 byly izolovány pomocí Genomic DNA Mini Kitu (Geneaid Biotech, Ltd., New Taipei City, Taiwan), vzorky 10 – 12 byly pro srovnání izolovány pomocí Column DNA Lego Kitu (Top-Bio, s.r.o., Praha, Česká republika).

V případě vzorků čerstvého a UHT mléka byla koncentrace izolované DNA velmi nízká a je patrný pouze smír, nejlépe se izolace zdařila ze vzorku č. 2, tedy čerstvého kravského mléka. Poměrně dobrý výsledek byl získán v případě kefiru, což je pravděpodobně způsobeno bohatou kefirovou kulturou. Naopak v případě obou bílých jogurtů je opět patrný pouze lehký smír. K degradaci DNA došlo při technologickém zpracování, zahrnujícím homogenizaci mléka a především následnou pasteraci při teplotě 85 – 95°C po dobu několika vteřin. Obdobný výsledek jako jogurty, měl i tavený sýr, který je při výrobě vystaven vysokému tlaku a teplotě 120°C. V případě vzorku DNA izolované z eidamu je již kromě smíru patrný i proužek čisté DNA. Podobně je tomu i u hermelínu, u kterého byla DNA izolována z kousku obsahujícího kromě vnitřní části i plíšňový povrch.



Obrázek č. 5: DNA izolovaná z krve, masa a masných výrobků

Vzorky krve, masa a masných výrobků byly izolovány pomocí Genomic DNA Mini Kitu (Geneaid Biotech, Ltd., New Taipei City, Taiwan). Z krve se podařilo izolovat velké množství čisté DNA, která se na gelu projevila jako výrazný proužek. Nezpracované hovězí maso rovněž poskytlo dobrý výsledek, který byl však o něco horší než v případě krve. Důvodem může být porušení buněk při opakovaném mražení a rozmrazování. Vzorek DNA izolované z lososa se projevil pouze v podobě smíru. Maso z lososa bylo na Ústavu fyziologie, morfologie a genetiky zvířat uloženo po dobu několika let, přičemž opětovné mražení a rozmrazování se mohlo podepsat na celistvosti DNA. DNA izolovaná z mixu mletého masa a kuřecí šunky vykazovala minimální celistvost, na gelu se projevila především jako smír. V případě mletého masa hrál největší roli technologický postup výroby, kdy došlo k mechanickému narušení buněk. To samé platí u kuřecí šunky, kde je třeba ještě zmínit nízký podíl čistých svalových bílkovin, který o mnoho nepřesahuje 10% obsahu. Nejhorší výsledek u izolované DNA je vidět u paštiky a lunch meatu, u kterých je znát pouze velmi lehký smír. U paštiky na to má vliv kromě mechanické poškozování mletím především sterilizace a tepelné ošetření tlakem, v případě lunch meatu hraje roli tepelné opracování a následná konzervace. Dalším důvodem je samotný podíl kuřecího masa.



Obrázek č. 6: DNA izolovaná z různých biologických vzorků

Vzorky různých biologických vzorků číslo 1 – 16 byly izolovány pomocí GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kitu (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, USA). První dva vzorky DNA byly izolovány z těl bráněnky (*Hermetia illucens*) a bzučivky zelené (*Lucilia sericata*). V obou případech byla získána poměrně čistá DNA a hustý smír. Vzhledem k tomu, že se izolace prováděla z celých čerstvých těl, byly výsledky ovlivněny obsahem bakterií ve střevech hmyzu, v nemalé části se také může jednat o RNA. Izolovaná DNA z kočičího chlupu se projevila v podobě velmi tenkého proužku čisté DNA. U vepřové šunky je kromě smíru rovněž patrný tenký proužek nepoškozené DNA. Vzorky číslo 5 – 8 dopadly téměř stejně, ve všech případech byla vyizolována degradovaná DNA, která se projevila v podobě lehkého smíru. U obou typů granulí došlo k degradaci DNA technologickým postupem při výrobě, dalším důvodem nekvalitního výtěžku je podíl masa vzhledem k ostatním složkám. Z dětské přesnídávky se nepodařilo izolovat žádnou DNA. Kromě technologického postupu výroby zde hraje roli především fakt, že v přesnídávce jako hlavní surovina dominují brambory s vysokým obsahem škrobu. Koňské žinč, stejně jako maso z jesetera, měly poměrně dobrý výtěžek izolované DNA, zato v případě masa z lososa se opět projevila

jen smír degradované DNA. V případě vzorku masa z kachny divoké se již kromě lehkého smíru objevil tenká proužek čisté DNA. Velmi dobrý výsledek izolace byl u vepřového a hovězího masa a jednoznačně největší množství nejčistší DNA bylo izolováno ze stěru bukální sliznice.

## 5.1 Koncentrace a čistota DNA

Měření koncentrace a čistoty izolované DNA proběhlo na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

**Tabulka č. 2: Koncentrace a čistota DNA izolovaná z mléka a mléčných výrobků**

Vzorek	Koncentrace DNA (ng/μl)	Čistota DNA (A260/A280)
Čerstvé mléko (kozí)	3,8	1,87
Čerstvé mléko (kravské)	2,4	2,12
UHT mléko	2,1	2,06
Kefír	16,4	1,42
Jogurt bílý	13,6	1,64
Jogurt Activia	8,9	1,78
Tavený sýr	1,3	1,97
Tvrký sýr (eidam)	5,4	1,86
Hermelín	95	1,82
UHT mléko polotučné	2,6	1,89
UHT mléko	7,2	1,86
Čerstvé mléko (kravské)	5,5	2,01

Většina vzorků vykazovala velmi nízkou koncentraci DNA, výjimkou byl pouze hermelín s hodnotou 95 ng/μl. Vzorek hermelínu byl odebrán včetně povrchu,

obsahujícího ušlechtilou plíseň *Penicillium candidum* či kulturu *Lactobacillus bulgaricus*.

Kvalita (čistota) DNA byla dána z poměru absorbancí 260/280 a měla by odpovídat hodnotě zhruba 1,8. Výrazně nižší čistota byla zjištěna u vzorků kefíru a bílého jogurtu, naopak hodnoty vyšší byly naměřeny v případě obou vzorků čerstvého kravského mléka, UHT mléka izolovaného pomocí Genomic DNA Mini Kitu (Geneaid Biotech, Ltd., New Taipei City, Taiwan) a taveného sýru. Důvodem byla buď nízká koncentrace genomové DNA (v případě jogurtu a kefíru mohl být výsledek ovlivněn DNA izolovanou z obsažených kultur) nebo znečištění proteiny či jinými organickými látkami. U vyšších hodnot byla DNA pravděpodobně znečištěna RNA.

Izolací z mléčných a probiotických výrobků se zabývali i Trachtová a Rittich (2011). Ti si však zvolili metodu za použití magnetických mikročástic. Bohužel, jediný vzorek, který se shodoval i s mým výběrem byl bílý jogurt Activia. Touto metodou se jim podařilo získat podstatně vyšší množství izolované DNA (25 ng/μl), čistota DNA 1,8 se téměř shodovala s mojí.

**Tabulka č. 3: Koncentrace a čistota DNA izolované z krve, masa a masných výrobků**

Vzorek	Koncentrace DNA (ng/μl)	Čistota DNA (A260/A280)
Krev (prasečí)	22,5	2,14
Maso (hovězí)	26,1	2,36
Maso (losos)	21,3	2,37
Mleté maso (mix)	62,1	2,06
Šunka (kuřecí)	131,6	1,97
Paštika	18,7	2,18
Lunch meat (kuřecí)	31,7	1,89

Ze souboru vzorků izolovaných z krve, masa a masných výrobků dopadla z hlediska koncentrace DNA nejlépe kuřecí šunka, ostatní vzorky obsahovaly poměrně malé množství.

Nejvyšší čistota izolované DNA byla naměřena u kuřecího lunch meatu, a to



1,89. U všech ostatních vzorků se poměry pohybovaly okolo hodnoty 2, v případě hovězího a lososího masa byla tato hodnota výrazně překročena. Důvodem mohlo být opět znečištění RNA nebo organickými látkami.

## 6 ZÁVĚR

V práci jsou popsány a srovnány vybrané jednoduché i moderní izolační metody běžně využívané v laboratořích. Přestože je po srovnání z různých hledisek možné některé techniky vyzdvihnout nad ostatní, vždy je třeba zvolený postup přizpůsobit charakteru vzorku tkáně a zvolit takovou metodu, která poskytne dostatečně kvalitní vzorek pro případně následné analýzy. Automatizace izolačních metod vede k jednodušším, pohodlnějším a rychlejším postupům, nese s sebou však i výrazné zvýšení finančních nákladů, díky čemuž se stále využívají složitější postupy klasických metod, jako je například fenol-chloroformová extrakce. V literárním přehledu také popisují princip a různé typy elektroforézy a metodu měření koncentrace a čistoty DNA.

Dále jsem se zabývala způsoby archivace DNA. Po krátkém přehledu využití krátkodobé a dlouhodobé izolace DNA jsem popsala vybrané techniky, běžně k uchovávání DNA používané. Jednalo se o dva tradiční způsoby archivace, a to na FTA<sup>®</sup> kartách a pomocí chitosanu. Třetí zvolená technika, METTINUM<sup>®</sup>, je velmi mladá, avšak svými přednostmi ve srovnání s ostatními metodami archivace by mohla znamenat velký pokrok z hlediska dlouhodobého uchovávání DNA.

Při vlastní práci v laboratoři jsem k izolaci DNA využila tři různých komerčně dostupných izolačních kitů. Provedla jsem izolace DNA z různých biologických vzorků, především jsem se však zaměřila na porovnání výsledků izolace z mléka a mléčných výrobků a krve, masa a masných výrobků. Technologické postupy při výrobě živočišných produktů, případně i následný způsob a délka skladování značně ovlivnily kvalitu izolované DNA. Není tedy nijak překvapivé, že ze všech vybraných vzorků dopadla nejlépe krev, nezpracované druhy masa a izolace ze stěrů bukální sliznice.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

### 7.1 Tištěné zdroje

AMAGLIANI G., BRANDI G., OMICCIOLI E., CASIERE A., BRUCE I. J., MAGNANI M., 2003: Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR. *Food Microbiology*, 21: 597-603.

ANCHORDOQUY T. J., MOLINA M. C., 2007: Preservation of DNA. *Cell Preservation Technology*, 5 (4): 180-188.

BANZOLA I., KAUFMANN I., LAPAIRE O., HAHN S., HOLZGREVE W., 2008: Isolation of serum nucleic acids for fetal DNA analysis: comparison of manual and automated extraction methods. *Prenatal diagnosis*, 28: 1227-1231.

BAŞER B., DEMIREL G. B., CAYKARA T., 2010: DNA Adsorption on Poly (N,N-dimethylacrylamide) - Grafted Chitosan Hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, (120): 1420-1425.

BAUST J. G., 2008: Strategies for the Storage of DNA. *Biopreservations and biobanking*, 6 (4): 251-252.

HIRANO S., 1999: Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*, (48): 732-734.

HŮSKA D., BALOUN J., TRNKOVÁ L., ADAM V., KIZEK R., 2008: Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHEMagazín*, 18 (3): 14-15.

KÁŠ J., KODÍČEK M., VALENTOVÁ O., 2005: *Laboratorní techniky biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 258 s. ISBN 80-7080-586-2.

KUKLA P., VANĚK D., DUBSKÁ J., 2013: METTINUM - systém pro dlouhodobou archivaci vzorků DNA a dalších biometrických znaků. *CHEMagazín*, 23 (5): 10-11.

PRŮŠA R., 1997: Základy analytických metod v klinické molekulární biologii. Univerzita Karlova, Praha, 45 s. ISBN 80-238-0940-7.

SIUN CHEE TAN, BEOW CHIN YIAP, 2009: DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2009: 1-10.

SMITH L. M., BURGOYNE L. A., 2004: Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. *BMC Ecology*, 4 (4): 1-11.

SUENAGA E., NAKAMURA H., 2004: Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *Journal of Chromatography B*, (820): 137-141.

ŠIMKOVÁ H., 2012: *Breviář forenzní genetiky*. Tribun EU, Brno, 212 s.

ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J., 2005: *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 188 s.

TRACHTOVÁ Š., RITTICH B., 2011: Izolace DNA z mléčných a probiotických výrobků pomocí magnetických mikročástic. *Mlékařské listy*, 7-10.

TURTINEN L. W., JURAN B. D., 1998: Protein Salting-Out Method Applied to Genomic DNA Isolation from Fish Whole Blood. *BioTechniques*, 24 (2): 238-239.

ZIMA J., MACHOLÁN M., MUNCLINGER P., PIÁLEK J., 2004: Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha, 239 s. ISBN 80-246-0795-6.

## 7.2 Internetové zdroje

AZoNano: *Schematic representation of DNA extraction from blood using MagSi-DNA beads*. In: azonano.com [online]. 2013 [cit. 2015-4-3]. Dostupné z: [http://www.azonano.com/images/Article\\_Images/ImageForArticle\\_3459%281%29.jpg](http://www.azonano.com/images/Article_Images/ImageForArticle_3459%281%29.jpg)

BÁRTOVÁ E.: *Izolace DNA*. In: mmp.vfu.cz [online]. 2011 [cit. 2015-3-8].  
Dostupné z: [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-izolace\\_dna&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-izolace_dna&lang=cz)

BIOGEN: *Typické výtěžky genomové DNA z různých zdrojů*. In: biogen.cz [online]. 2015 [cit. 2015-2-10]. Dostupné z: <http://biogen.cz/genejet-kity-pro-purifikaci-genomove-DNA>

Center for bioenergy and Photosynthesis: *DNA Binding to silica in the presence of chaotropic salt*. In: bioenergy.asu.edu [online]. 2007 [cit. 2015-4-3]. Dostupné z: [http://bioenergy.asu.edu/photosyn/courses/bio\\_343/lab/fig2-3.jpg](http://bioenergy.asu.edu/photosyn/courses/bio_343/lab/fig2-3.jpg)

ČAPKOVÁ FRYDRYCHOVÁ R., SÝKOROVÁ M., ŠÍCHOVÁ J., BROŽ V.: *Ekotech: Kurz základních metod molekulární biochemie*. In: alfa.bc.cas.cz [online]. [cit. 2015-2-15]. Dostupné z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/ZMMB4.pdf>

SCHMID E.: *Principle of the agarose gel electrophoresis method*. In: classroom.sdmesa.edu [online]. 2001 [cit. 2015-4-3]. Dostupné z: <http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab12%201.jpg>

LAB MARK: *Nanodrop 2000* [online]. 2015 [cit. 2015-2-7]. Dostupné z: <http://www.labmark.cz/spektrofotometry-fluorometry-bioprosesory/nanodrop-2000/>

SAIYED Z. M., TELANG S. D., RAMCHAND C.N.: *Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine*. In: biomagres.cz [online]. 2003 [cit. 2015-3-6]. Dostupné z: <http://www.biomagres.com/content/1/1/2>

VLČNOVSKÁ M., ŠMERKOVÁ K., DOSTÁLOVÁ S., SOCHOR J., KIZEK R.,: *Izolace DNA pomocí magnetizovaných částic a jejich využití v diagnostice nádorových onemocnění*. In: www.linkos.cz [online]. 2012 [cit. 2015-3-5].  
Dostupné z: <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/5518/>

ZUMBO P.: *Phenol-chloroform Extraction*. In: psychology.med.cornell.edu [online]. 2012 [cit. 2015-3-8]. Dostupné z: [http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/zumbos\\_documents/DOCUMENTS.html](http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/zumbos_documents/DOCUMENTS.html)

Izolace nukleových kyselin. In: biologie.upol.cz [online]. [cit. 2015-3-20]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>

## **8 SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek č. 1: Schématické znázornění izolace DNA z krve pomocí magnetických částic.

Obrázek č. 2: Znázornění principu navázání DNA na silikát v přítomnosti chaotropních solí.

Obrázek č. 3: Schéma agarózové gelové elektroforézy.

Obrázek č. 4: DNA izolovaná z mléka a mléčných výrobků.

Obrázek č. 5: DNA izolovaná z krve, masa a masných výrobků.

Obrázek č. 6: DNA izolovaná z různých biologických vzorků.

## **9 SEZNAM ZKRATEK**

CPS - roztok k přípravě kolony (z anglického Column Preparation Solution)

DNA - deoxyribonukleová kyselina (z anglického DeoxyriboNucleic acid)

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina (z anglického Ethylenediaminetetraacetic acid)

ES - vymývací roztok (z anglického Elution Solution)

LS-C - lyzační roztok C (z anglického Lysis Solution C)

LS-T - lyzační roztok T (z anglického Lysis Solution T)

PCR - polymerázová řetězcová reakce (z anglického Polymerase Chain Reaction)

RNA - ribonukleová kyselina (z anglického RiboNucleon Acid)

UHT - velmi vysoká teplota (z anglického Ultra High Temperature)

UV - ultrafialové (z anglického Ultra Violet)

WS - promývací roztok (z anglického Wash Solution)