



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Optimalizace amplifikace DNA izolované z bukalních stěrů pro účely sekvenování

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ
LABORANT**

Autor: Kristýna Roštíková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Optimalizace amplifikace DNA izolované z bukálních stěrů pro účely sekvenování jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 3.5. 2022

.....

podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost a cenné rady při zpracovávání této práce. Také bych ráda poděkovala své rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Optimalizace amplifikace DNA izolované z bukálních stěrů pro účely sekvenování

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala problematikou odběru primárních vzorků DNA z bukální sliznice, ideální délkou a optimálními podmínkami skladování a následnou analýzou těchto vzorků.

V teoretické části jsem se věnovala preanalytické fázi laboratorního vyšetření. Tedy způsobům odběru vzorků a typem materiálu, který se nejčastěji využívá pro izolaci DNA v molekulárně biologické laboratoři. Následně jsem se zaměřila na samotné metody, jenž se využívají pro analýzu DNA. Jednalo se o izolaci DNA, metody amplifikace DNA, elektroforézu nukleových kyselin a sekvenování DNA.

V praktické části jsem zpracovala 42 odebraných vzorků. Nejprve jsem ze vzorků izolovala DNA, u které jsem změřila její koncentraci a čistotu. Poté jsem u těchto vzorků provedla elektroforézu a na základě jejích výsledků jsem se rozhodla, které vzorky budu dále zpracovávat pomocí PCR. Následně jsem elektroforézou zjistila, zda u vzorků proběhla amplifikace DNA. Nakonec jsem vybrala vzorky, které jsem odeslala na sekvenování.

Závěrem mé bakalářské práce bylo zjištění optimální délky a podmínek skladování vzorků z bukální sliznice. Dále jak tyto parametry ovlivňují kvalitu, čistotu a množství DNA. K tomu jsem využila výsledky, které jsem získala během analýzy vzorků. Tato práce dokázala, že nejlepší možností je vzorky uchovávat v chladničkové teplotě a provést jejich analýzu v nejkratší možné době.

Klíčová slova

Primární vzorek; bukální stěr; podmínky skladování; izolace DNA; elektroforéza; PCR; sekvenování

Optimization of DNA amplification isolated from buccal swabs for sequencing purposes

Abstract

In my bachelor's thesis I dealt with the issue of taking primary DNA samples from the buccal mucosa, the ideal length and optimal conditions and subsequent analysis of these samples.

In the theoretical part, I focused on the preanalytical phase of the laboratory examination. It was about, the methods of sampling and the type of material that is most often used used for DNA isolation in the molecular biological laboratory. Subsequently, I focused on the methods themselves, which are used for DNA analysis. These included DNA isolation, DNA amplification methods, nucleic acid electrophoresis and DNA sequencing.

In the practical part, I processed 42 samples. First, I isolated DNA from the samples and measured its concentration and purity. Then I performed electrophoresis in these samples and based on its results I decided which samples I would process further by PCR. Subsequently, I determined by electrophoresis whether DNA was amplified in the samples. Finally, I selected samples that I sent for sequencing.

The conclusion of my bachelor thesis was to determine the optimal length and storage conditions of samples from the buccal mucosa. Furthermore, how these parameters affect the quality, purity and quantity of DNA. To do this, I used the results I obtained during the analysis of samples. This work proved that the best option is to store the samples in a refrigerator temperature and perform their analysis in the shortest possible time.

Key words

Primary sample; buccal swab; storage conditions; DNA isolation; electrophoresis; PCR; sequencing

Obsah

Úvod	8
1. Molekulárně biologická laboratoř	9
1.1 Preanalytická fáze	9
1.2 Žádanky	10
1.3 Biologický materiál	10
2. Izolace DNA	12
2.1 Oddělení kontaminujících látek organickou extrakcí a enzym. štěpením.....	12
2.2 Využití iontoměničové chromatografie k izolaci DNA z bun. extraktu	13
3. Metody amplifikace DNA	14
3.1 PCR	14
3.1.1 Princip metody	14
3.2 Kvalitativní PCR v reálném čase	15
4. Elektroforéza nukleových kyselin	17
4.1 Gelová elektroforéza	17
4.2 Pulzní gelová elektroforéza.....	18
4.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza.....	18
4.4 Kapilární elektroforéza.....	19
5. Sekvenování DNA.....	20
5.1 Sangerova metoda	20
5.1.1 Automatické sekvenování DNA	21
5.2 Maxam-Gilbertova metoda	21
5.3 Sekvenování nové generace	21
6. Cíl práce	23
7. Metodika.....	24
7.1 Odběr vzorků.....	24
7.2 Izolace DNA.....	24
7.2.1 Lýza vzorku	25
7.2.2 Přidání ethanolu a navázání DNA	26
7.2.3 Promývací krok.....	26
7.2.4 Eluční krok.....	27
7.3 Koncentrace DNA získané z bukálních stěrů.....	27
7.4 Měření čistoty DNA	28
7.5 Elektroforéza izolované DNA z bukálních stěrů	29
7.5.1 Pracovní postup přípravy vzorků pro elektroforézu DNA.....	29

7.6	Polymerázová řetězová reakce	30
7.6.1	Pracovní postup přípravy vzorků pro PCR reakci	31
7.7	Enzymatické pročištění PCR produktů	33
7.8	Příprava na sekvenaci.....	33
8.	Výsledky	35
8.1	Izolace DNA, změřená koncentrace a absorbance	35
8.2	Výsledky elektroforézy v gelu po izolaci DNA	40
8.3	Výsledky elektroforézy v gelu po proběhlé PCR reakci	42
8.4	Výsledky sekvenování izolované DNA	43
9.	Diskuze.....	46
10.	Závěr.....	50
11.	Seznam použitých zdrojů.....	51
12.	Seznam tabulek a obrázků.....	55
13.	Seznam zkratk.....	57

Úvod

Molekulární biologie studuje vztah struktury a interakci biomakromolekul k funkcím a vlastnostem živých soustav (Rosypal, 2006).

Pro molekulárně biologická vyšetření se většinou používají nukleové kyseliny. Je velmi důležité získat dostatečné množství kvalitní a čisté DNA. Bukální stěr bývá jako primární vzorek používán zejména pro snadnost odběru, ovšem kvalita a množství DNA nebývá vždy dostatečná.

Pro kvalitu výsledků laboratorních vyšetření je velmi důležitá preanalytická fáze, ve které hraje roli mnoho proměnných. Důležité je poučení pacienta, kterému je vzorek odebíráný, ale také dodržení sterilních podmínek při odběru, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku.

Dále záleží na výběru metody izolace vzorku. Jsou různé společnosti, které nabízejí řadu kitů pro izolaci DNA a každá společnost a každý kit deklaruje odlišnou hodnotu izolace DNA. Množství izolované DNA tato kvalita, pak ovlivňuje úspěch amplifikace DNA a její další analýzu.

1. Molekulárně biologická laboratoř

Laboratoř molekulární biologie se zabývá analýzou biologicky významných molekul. Tyto molekuly nesou a následně uskutečňují genetickou informaci. Jedná se o nukleové kyseliny a bílkoviny. DNA je převážně izolována z periferní krve, bukalních stěrů nebo choriových klků, které se využívají v prenatální diagnostice. Laboratoře bývají vybaveny přístroji pro izolaci nukleových kyselin, elektroforézu DNA, PCR, a další (Vaše laboratoře, 2019).

1.1 Preanalytická fáze

Cílem laboratorního vyšetření je získání spolehlivého výsledku. Takového výsledku je možné dosáhnout pouze v případě, že jsou dodrženy veškeré podmínky před samotným vyšetřením (Benáková, 2022).

Preanalytická fáze zahrnuje veškeré procesy před analytickým stanovením. Začíná tím, že se ošetřující lékař pacienta rozhodne pro ordinaci určitého laboratorního testu. Je jí možno ovlivnit prostřednictvím informovanosti pacienta a ošetřujícího lékaře a odběrového personálu. Cílem je minimalizovat chyby a dosáhnout minimální preanalytické variability. Preanalytickou fázi můžeme rozdělit na mimolaboratorní a laboratorní (Benáková, 2022).

Mimolaboratorní preanalytická fáze zahrnuje přípravu pacienta před odběrem biologického materiálu, která závisí na informovanosti a disciplinovanosti pacienta. Dále vlastní odběr, jenž ovlivňuje odběrový personál, identifikaci biologického materiálu včetně dalších povinných údajů a jeho transport do laboratoře, který závisí na odběrovém personálu a na transportní službě (Benáková, 2022).

Laboratorní preanalytická fáze zahrnuje registr vzorku, případnou centrifugaci, skladování vzorku a přípravu před vlastním stanovením. Laboratorní preanalytická fáze a analytická fáze tvoří podle statistik jen čtvrtinu času z celkové doby od ordinace laboratorního vyšetření do dodání výsledku zpět žadateli (Benáková, 2022).

Analytická fáze je však zcela závislá na laboratoři a řídí se dodržováním postupů správné laboratorní praxe. Důležitá je také postanalytická fáze, která zahrnuje správnou klinickou interpretaci laboratorních výsledků (Benáková, 2022).

1.2 Žádanky

Základním požadovaným listem je žádanka. Zasláná žádanka je považována za smlouvu mezi lékařem a laboratoří s požadavkem provést označená vyšetření. Pro laboratoř je žádanka základním dokumentem pro prokázání požadované zdravotní péče zdravotním pojišťovně. Zadavatel je povinen na žadance přesně specifikovat druh požadovaného vyšetření a časovou naléhavost vyšetření (Tichý, 2022).

Další povinné údaje na žadance:

- Identifikační údaje pacienta: jméno a příjmení, číslo pojištěnce, rodné číslo, kód pacientovy diagnózy a účel vyšetření. U cizích státních příslušníků identifikační číslo místo rodného čísla (Tichý, 2022).
- Název subjektu, oddělení, kontaktní adresa, telefonický kontakt a IČP požadujícího pracoviště. Dále také jméno lékaře a odběrového pracovníka (Tichý, 2022).
- Informace týkající se odebraného biologického materiálu: datum a čas odběru, typ odebraného materiálu, popřípadě také anatomickou specifikaci místa odběru (Tichý, 2022).

Odběrové nádoby s biologickým materiálem musí být také označeny identifikačními údaji pacienta (jméno a příjmení, číslo pojištěnce, rok narození) a informací o materiálu, tedy o jaký materiál se jedná a kdy byl odebrán (Tichý, 2022).

Za správnost vyplnění žádanky zodpovídá sestra nebo jiný pracovník pověřený lékařem indikujícím vyšetření. Lékař potvrzuje správnost údajů na žadance svým podpisem. Je důležité, aby všechny údaje byly vyplněny čitelně. Pokud žádanka chybí, základní údaje jsou nečitelné nebo není možné jednoznačně identifikovat biologický materiál, má laboratoř oprávnění odmítnout provést požadované vyšetření (Lonský, 2021).

1.3 Biologický materiál

Molekulárně biologické analýzy nukleových kyselin patří k laboratorním metodám, které umožňují u řady lidských chorob jejich rychlou diagnostiku, pomáhají při predikci vhodné terapie a kontrolují účinnost léčebného procesu. Výpovědní hodnota výsledku DNA analýzy je do značné míry závislá na typu použitého biologického materiálu a vlastnostech extraktu nukleové kyseliny (Beránek et al., 2012).

K biologickým materiálům pro vyšetření lidské DNA patří vzorky nesrážlivé žilní krve ve standardních odběrových zkumavkách nebo ve formě krevních skvrn vsáknutých do vrstvy vhodného nosiče. Běžně se používají také sternální punkáty, zejména pro DNA diagnostiku v onkohematologii, bioptické vzorky příslušné tkáně (nejčastěji jaterní, plicní nebo střevní), chirurgické resekáty pro vyšetření DNA v onkologii, plodová voda pro prenatální diagnostiku (Beránek et al., 2012).

K molekulárně biologickému vyšetření lze DNA získat i z jiných, biologických materiálů. Mezi tyto materiály patří biologické tekutiny jako je moč, sliny, bronchoalveolární laváž, pleurální výpotky, ejakulát, cervikální hlen, krevní plazma a krevní sérum. Zdrojem DNA mohou být také vzorky stolice, stěry z bukalní sliznice, vlasy nebo nehty. Výběr materiálu závisí na jeho dostupnosti a na účelu prováděné DNA analýzy (Beránek et al., 2012).

Primární vzorky biologického materiálu musí být do laboratoře dodávány ve sterilních jednorázových odběrových nádobkách nebo zkumavkách. Dále je nutné dbát na přepravu vzorků do laboratoře. Během transportu je nutné, zabezpečit vzorek tak, aby nemohlo dojít k rozliti, potřísnění biologickým materiálem nebo jinému znehodnocení vzorku (Lonský, 2021).

Veškerá vyšetření biologického materiálu lze provést pouze na základě informovaného souhlasu pacienta. K vyšetření je možné přijmout vzorek s informovaným souhlasem, pokud obsahuje všechny potřebné údaje dle požadavků (Žižková, 2021).

2. Izolace DNA

Většina metod molekulární biologie obsahuje práci s deoxyribonukleovými kyselinami (DNA) a ribonukleovými kyselinami (RNA). Izolace DNA je proces extrakce DNA z různých zdrojů. Metody používané k izolaci DNA jsou závislé na zdroji, věku a velikosti vzorku. Metod izolace DNA je velké množství. Tyto metody se liší podle typu molekuly, kterou chceme izolovat (např.: genomová DNA, plazmidová, virová), podle stupně požadované čistoty a kvality, a také podle zdroje DNA. Obecně mají tyto metody za cíl oddělit DNA přítomnou v jádru buňky od ostatních buněčných složek (Žurovec et al., 1999).

Zdroje pro izolaci DNA jsou velmi rozmanité. V zásadě lze izolovat DNA od jakéhokoli živého nebo mrtvého organismu. Běžné zdroje pro izolaci DNA zahrnují plnou krev, vlasy, spermie, kosti, nehty, tkáně, krevní skvrny, sliny, bukalní výtěry, epitelální buňky, moč, papírové karty používané pro odběr vzorků, bakterie, zvířecí tkáně nebo rostliny (Bártová, 2014).

Metody extrakce musí být upraveny tak, aby mohly účinně purifikovat DNA z různých zdrojů. Důležitým faktorem je velikost vzorku. Pokud je vzorek malý (např.: sperma nebo jediný vlas), musí se metoda lišit od metody použité k izolaci DNA z několika miligramů tkáně nebo mililitrů krve (Encyclopedia.com, 2018).

Existuje celá řada postupů, kterými můžeme oddělit DNA ze směsi. Izolace DNA obvykle začíná rozpadem tkáně nebo buněk. Tento proces je nezbytný pro destrukci proteinových struktur a umožňuje uvolnění nukleových kyselin z jádra (Encyclopedia.com, 2018).

2.1 Oddělení kontaminujících látek organickou extrakcí a enzym. štěpením

Proteiny se z buněčného extraktu odstraňují standardním způsobem tak, že se přidá fenol nebo směs fenolu a chloroformu v poměru 1:1. Tato organická rozpouštědla srážejí proteiny, ale nukleové kyseliny (DNA a RNA) ponechávají ve vodném roztoku. Smícháme-li opatrně buněčný extrakt s rozpouštědlem a vrstvy následně oddělíme centrifugací, sražené proteinové molekuly se ve formě bílé koagulované sraženiny objeví na rozhraní mezi vodou a organickou vrstvou. Vodný roztok nukleových kyselin potom můžeme odstranit pipetou (Brown, 2007).

Podíl proteinů může být v některých buněčných extraktech tak velký, že jedna fenolová extrakce k úplné izolaci nukleových kyselin nestačí. Tento problém jde vyřešit tím, že se

provede několik fenolových extrakcí po sobě, což však není vhodné z důvodu, že každé smíchání a každá centrifugace vedou k degradaci určitého množství DNA. Řešení nabízí postup, při němž před fenolovou extrakcí k buněčnému extraktu přidáme proteinázu. Tento enzym rozloží polypeptidy na menší jednotky, které pak lze fenolovou extrakcí mnohem snadněji odstranit (Beránek 2016).

Některé molekuly RNA, zvláště mediátorová RNA, jsou odstraněny fenolovou extrakcí, ale většina jich spolu s DNA zůstává ve vodné vrstvě. RNA lze účinně odstranit jedine enzymaticky, a to pomocí ribonukleázy, která tyto molekuly rychle degraduje na ribonukleotidové podjednotky (Brown, 2007).

2.2 Využití iontoměničové chromatografie k izolaci DNA z bun. extraktu

K rozdělení směsi chemikálií na jednotlivé součásti biochemici vymyslely různé metody využívající rozdílů v elektrickém náboji. Jednou z těchto metod je iontoměničová chromatografie, která rozděluje molekuly na základě toho, jak těsně jsou vázány k elektricky nabitým částicím přítomným v chromatografické matrix neboli pryskyřici (Brown, 2007).

DNA a RNA jsou negativně nabitě, stejně jako některé proteiny, a proto se váží k pozitivně nabitě pryskyřici. Elektrostatická vazba může být rozrušena solí, přičemž k uvolnění těsnější vazby mezi molekulami je zapotřebí vyšších koncentrací solí. Postupným zvyšováním koncentrace soli, tak můžeme různé typy molekul z pryskyřice uvolnit jednu po druhé (Brown, 2007).

3. Metody amplifikace DNA

3.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda sloužící k mnohonásobnému zmnožení neboli amplifikaci specifického úseku DNA *in vitro*. PCR zavedl v roce 1983 Kary Mullis. Kopie úseku DNA jsou syntetizovány pomocí enzymu DNA-polymerázy podle templátu ve formě jednořetězcové DNA na principu komplementarity bází (Bártová, 2014).

3.1.1 Princip metody

Reakce je založena na schopnosti dvouvláknové DNA denaturovat při vysoké teplotě a opětovně renaturovat po jejím snížení za zachování pravidla komplementarity bází. Jestliže jsou známy nukleotidové sekvence na koncích určitého regionu DNA, je možno úsek amplifikovat pomocí této polymerázové řetězové reakce. Podmínkou provedení PCR je příprava oligonukleotidových sond, které specificky hybridizují na obou koncích cílového úseku DNA a slouží jako základ pro tvorbu nových vláken. Dnes již syntéza primerů o požadované sekvenci probíhá na automatizovaných přístrojích a není finančně nákladná. PCR začíná tepelnou denaturací vzorku DNA na dva jednoduché řetězce při teplotě 95 °C (Bartůňková et al., 2011).

V další fázi po ochlazení vzorku na 50–60 °C dojde k nasednutí primerů na komplementární 3' konce cílové DNA. Primery jsou v PCR reakci přítomny ve velké koncentraci na rozdíl od dlouhých řetězců analyzované DNA, které v této fázi zůstávají odděleny. Hybridizované primery slouží jako základ pro syntézu nových vláken. Aby bylo dostatek substrátu pro syntézu nových vláken, je v PCR reakci přítomno dostatečné množství deoxyribonukleotidtrifosfátů. Syntéza nových vláken je katalyzovaná termostabilní DNA polymerázou. Často používanou je DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech. Je označována Taq polymeráza. Tento enzym prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od 5' konce ke 3' konci při teplotě 72 °C, a zůstává aktivní i po zahřátí na 95 °C, nutných k denuraci (Bartůňková et al., 2011).

Po dokončení syntézy obou vláken je zkumavka s PCR reakcí opět zahřáta na 95 °C, aby došlo k denuraci nově vytvořených DNA duplexů a celý cyklus začíná znovu. Opakování těchto cyklů denurace a syntézy vede k rychlému namnožení cílové sekvence DNA. Po každém cyklu dojde k zdvojnásobení počtu kopií úseku mezi

nasedlými primery. Při optimálních podmínkách je možno pomocí PCR amplifikovat DNA úseky dlouhé až 10 kbp (Bartůňková et al., 2011).

Polymerázová řetězcová reakce musí obsahovat několik součástí nezbytných pro průběh reakce (Bartůňková et al., 2011):

- Vzorek DNA (který obsahuje zkoumaný úsek).
- Syntetické oligonukleotidy (primery), které slouží jako základ pro syntézu nových vláken.
- Směs všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátů.
- Mg^{2+} ionty.
- Taq polymerázu.
- PCR pufr.

3.2 Kvalitativní PCR v reálném čase

Jedním z nedostatků základního protokolu PCR jsou omezené možnosti kvantitativního stanovení amplikonu. Přitom počet amplifikovaných molekul DNA závisí na množství vyšetřovaného (templátového) úseku DNA, podle jehož sekvence se tyto amplikony vytvořily (Kočárek, 2007).

Teoreticky lze množství produktu odhadnout již podle mohutnosti, tloušťky či fluorescenční intenzity pruhu, který se po rozdělení amplikonů objeví na elektroforetickém gelu. Takové stanovení je ovšem zatíženo velkou chybou a zpravidla neposkytuje relativní údaje (Kočárek, 2007).

Přesná kvantifikace amplikonů je možná pomocí sondy označené fluorescenčním barvivem. Tato sonda musí být sestavena tak, aby hybridizovala s vyšetřovanou DNA za stejných podmínek jako primery. Po denaturaci se sonda k templátové DNA připojí v místě, které leží mezi sekvencemi, k nimž nasedají oba protisměrně orientované primery. Termostabilní DNA – polymeráza, která připojuje ke každému primeru další nukleotidy, narazí při syntéze komplementárního vlákna na navázanou sondu. V této fázi enzym projeví exonukleázovou aktivitu. To znamená, že pokračuje v syntéze nového komplementárního vlákna, přičemž sondu postupně odbourává a na její místo zařezuje nukleotidy z reakční směsi. Při odbourávání se jednotlivé nukleotidy tvořící původní řetězec sondy uvolňují do roztoku. Některé z těchto nukleotidů jsou označeny specifickým fluorescenčním barvivem, které však nefluoreskuje, pokud je navázáno na

sondu. Jakmile se ovšem uvolní do roztoku, schopnost fluorescence se obnoví. V průběhu PCR tak pokračuje uvolňování fluorescenčně značených nukleotidů, takže intenzita fluorescence reakční směsi vzrůstá. Tento nárůst je přímo úměrný množství amplikonů, které při reakci vznikají (Kočárek, 2007).

Při kvantitativním PCR v reálném čase se používají speciální termocyklery (světelné termocyklery), v jejichž nitru je vzorek ozařován excitačním UV zářením, které indukuje fluorescenci příslušného barviva. Po každém cyklu změří intenzitu fluorescence speciální detektor, jenž převádí výsledky do počítače. Specializovaný program pak zaznamenává průběžně neboli v reálném čase koncentraci fluorescenčního barviva, které odpovídá množství vzniklého amplikonu. Často lze relativní výsledky odečíst dříve, než proběhnou všechny naprogramované cykly (Kočárek, 2007).

4. Elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza patří k metodám, které se standartně používají k separaci nukleových kyselin a proteinů. Při elektroforéze se molekuly stejného tvaru pohybují v elektrickém poli rychlostí, která je závislá na poměru jejich náboje k molekulové hmotnosti. Molekuly nukleových kyselin, které mají v roztoku za neutrálního pH záporný náboj v důsledku ionizace fosfátových skupin, se pohybují k anodě. Pohyblivost různě dlouhých řetězců je však téměř stejná, pokud se elektroforéza provádí v roztoku nebo na papíře, protože poměr náboje k molekulové hmotnosti je pro jednotlivé nukleové kyseliny prakticky shodný (Křemen et al., 1998).

K optimálnímu rozdělení nukleových kyselin nebo proteinů dochází při elektroforéze v agarózovém gelu, kde je pohyblivost odlišně velkých molekul různou měrou omezena. Kratší molekuly se v gelu pohybují pomaleji než molekuly, které jsou tvořeny delšími řetězci. V gelu, který má vhodnou porozitu, je možné dosáhnout vysoce účinného dělení podle délky řetězců (Křemen et al., 1998).

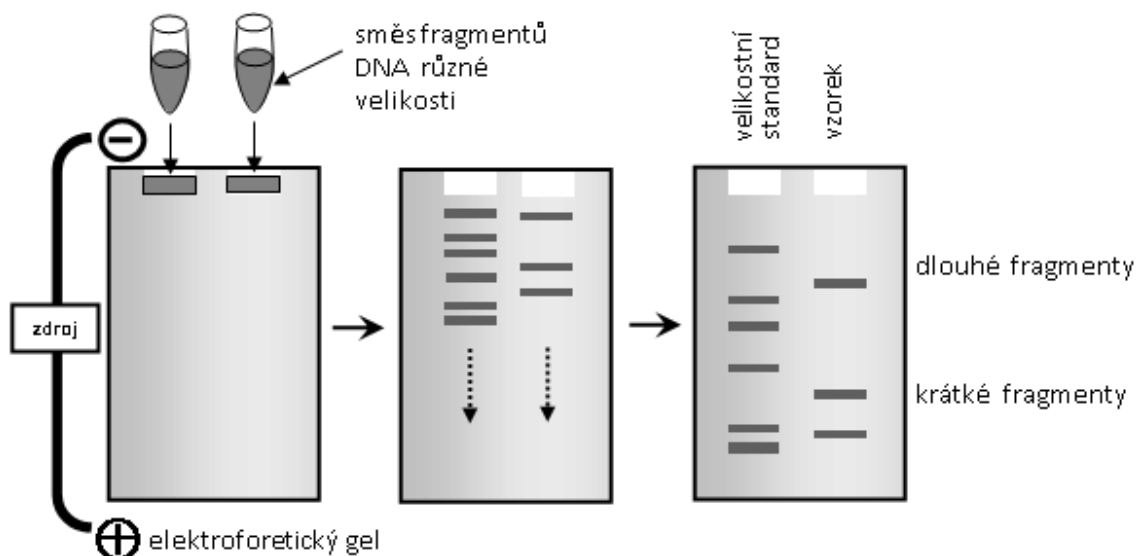
Elektroforéza má v molekulární biologii mnohostranné využití. Má význam při ověření kvality vzorku DNA, v přímé a nepřímé diagnostice různých mutací, kdy je potřeba identifikovat různě dlouhé fragmenty DNA. Využívá se také při izolaci úseků DNA vzniklých polymerázovou řetězovou reakcí a při sekvenování DNA (Kočárek, 2007).

4.1 Gelová elektroforéza

Elektroforéza na agarózovém gelu je jedním z nejpoužívanějších způsobů separace fragmentů DNA rozdílných velikostí od 100 bp do 50 kb. Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou. Ty vytvářejí složitou síťovitou strukturu polymerních molekul s póry. Během tuhnutí gelu se agarózové polymery nekovalentně asociují a tvoří síť svazků. Molekulární vlastnosti tohoto molekulárního síta určují velikost pórů, kterou je možné ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru (Šmarda et al., 2005).

Vzorky DNA se nanášejí do jamek v gelu, které byly vytvořeny pomocí tzv. hřebínku. Dále jsou smíchány s nanášecím pufrem, který obsahuje barvivo, aby se vzorky nevyplavovaly z vytvořených jamek, a také pro kontrolu vložení vzorku do příslušné jamky a pro sledování migrace v gelu (obrázek 1) (BIOGEN Molekulární biologie a genetika, 2021).

Po skončení elektroforézy, a tedy i separaci fragmentů DNA, je nutné je zviditelnit. Proto se do gelu přidávají barviva, která se vážou na nukleové kyseliny a jsou viditelné při osvětlení UV zářením v UV transluminátoru (Khan Academy, 2021).



Obrázek 1: Schéma gelové elektroforézy (Zdroj: Bártová, 2014)

4.2 Pulzní gelová elektroforéza

Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) se využívá pro separaci větších molekul DNA. Při PFGE je gel vystaven elektrickému poli, jehož směr se pod určitým úhlem v časových intervalech mění. Molekuly DNA musí změnit svou orientaci, aby se mohly pohybovat ve směru změněného elektrického pole. Tento proces se nazývá reorientace. Větší molekuly DNA potřebují na reorientaci více času, než menší a jejich výsledný pohyb je proto pomalejší (Šmarda et al., 2005).

Technika pulzní elektroforézy se používá k separaci intaktních molekul DNA (např.: chromozomů bakterií a kvasinek) nebo restrikčních fragmentů DNA o velikosti desítek kilobází až několika megabází (Šmarda et al., 2005)

4.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Rozdíly v sekvenci (např.: bodové mutace) v krátkých molekulách DNA o stejné délce mohou být detekovány pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE), která využívá rozdílné elektroforetické mobility u částečně denaturované DNA a DNA v nedenaurovaném stavu (Šmarda et al., 2005).

Jedná se o jednu z technik, která se používá k průkazu mutací nebo také neutrálních polymorfismů postihujících určitý lokus jednoho z homologních chromozomů (Křemen et al., 1998).

4.4 Kapilární elektroforéza

Vývoj elektroforézy je nyní zaměřen převážně na kapilární elektroforézu. Tímto termínem se označuje separační metoda využívající pohyb nabitých částic v elektrickém poli přímo ve volném roztoku elektrolytu, nebo v nosném médiu, například gelu. Nabité částice mohou být malé ionty či makromolekuly DNA. Podle způsobu separace se dělí na kapilární zónovou elektroforézu, kapilární izotachoforézu a další (Gaš, 2001).

Výhoda kapilární elektroforézy je minimální spotřeba množství vzorku a elektrolytu. Další výhodou malých vnitřní průměrů kapilár je to, že generuje minimální množství tepla, které vzniká průchodem elektrického proudu elektrolytem. Díky tomu lze použít kapalných elektrolytů spolu s vysokými hodnotami elektrického pole při analýze. Z důvodu vysokých hodnot elektrického pole dochází ke zkrácení doby analýzy a zvýšení kvality separace (Gaš, 2001).

5. Sekvenování DNA

Sekvenování DNA představuje v oblasti molekulární biologie pravděpodobně nejvýznamnější techniku, pomocí níž na úseku DNA zjišťujeme přesné pořadí nukleotidů. Rychlé a účinné sekvenování je možné teprve od konce 70. let 20. století. Sekvence DNA představuje první a velice zásadní informaci, jakou lze o klonovaném genu získat (Brown, 2007).

Sekvenování DNA je termín používaný pro metody, umožňující popsat pořadí čtyř chemických stavebních bloků neboli bází, které tvoří molekulu DNA. Sekvenační data je možné použít k určení, které úseky DNA obsahují geny a které úseky nesou regulační pokyny. Tyto data mohou také upozornit na změny v genu, které mohou způsobit onemocnění (National Human Genome Research Institute, 2020).

Téměř současně byly vyvinuty dvě odlišné techniky sekvenování DNA. Metoda terminace řetězců a metoda specifické chemické degradace. Jde o dvě naprosto odlišné techniky, které umožňují ve velmi krátkém čase určit DNA sekvence dlouhé několik kilobází (Brown, 2007).

Metoda terminace řetězců neboli Sangerovo sekvenování se stále běžně používá, ale v současné době se stále více využívá metod sekvenování druhé generace. Z důvodu toxicity chemikálií používaných u metody chemické degradace, které představují pro pracovníky zdravotní riziko, se od této metody upustilo (Kolísko, 2017).

Po získání sekvencí se provádí jejich identifikace a popis předpokládaných genů. Používají se počítačové algoritmy, které prohledávají sekvence v genových databázích. Hledají se v nich otevřené čtecí rámce, iniciační kodon, počátky a konce intronů s v určité vzdálenosti jeden ze stop kodonů (UAG, UAA, UGA). Je možné vyhledávat i regulační oblasti, které mají také specifické sekvence (Kuciel a Urban, 2016).

5.1 Sangerova metoda

Sangerova metoda sekvenování, známá také pod názvy enzymatická metoda nebo metoda terminace řetězců, byla objevena v roce 1977 Frederikem Sangerem a jeho kolegy. Tato metoda umožnila čtení velmi dlouhých řetězců, a to až 1 000 bází na jednu sekvenační reakci (Kolísko, 2017).

Byla částečně založena na tzv. metodě „plus a minus“, která jako první použila k sekvenování procesu prodlužování primeru DNA-polymerázou. Při sekvenování Sangerovou metodou je DNA, jejíž sekvence je stanovována, použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky prostřednictvím DNA-polymerázy. Syntéza řetězce je zahájena od místa, ke kterému je připojen specifický primer pro sekvenování (Šmarda et al., 2005).

5.1.1 Automatické sekvenování DNA

Automatické sekvenování DNA je variantou enzymatického sekvenování DNA. Syntéza DNA probíhá metodou asymetrické polymerázové řetězové reakce v termocykleru s využitím Taq DNA-polymerázy. K detekci se používají čtyři různé fluorescenční značky, každá určená pro detekci produktů zakončených specifickou bází. (Šmarda et al., 2005).

K následnému stanovení sekvence DNA se využívá genetický analyzátor – sekvenátor. Detekce PCR produktů probíhá během kapilární elektroforézy pomocí laserového detektoru napojeného na počítač. Laser zachycuje fluorescenční signály na jednotlivých PCR produktech a následně dochází ke stanovení pořadí nukleotidů (Bártová, 2011).

5.2 Maxam-Gilbertova metoda

Maxam-Gilbertova metoda sekvenování byla poprvé popsána v roce 1977. Je známá také jako chemická metoda sekvenování, jelikož je založena na specifickém štěpení molekuly DNA s využitím chemických činidel (Maxam a Gilbert, 1977).

Podstatou této metody je specifické rozštěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech, kde je lokalizována báze určitého typu. Výchozím materiálem pro tuto metodu je soubor identických fragmentů jednořetězové DNA, označených na jednom konci radioaktivní značkou. Fragmenty jsou detekovány autoradiograficky a jsou detekovány pouze ty, které nesou označený konec. Poté se stanoví sekvence DNA z autoradiogramu (Šmarda et al., 2005).

5.3 Sekvenování nové generace

Next Generation Sequencing (NGS), tedy sekvenování nové generace je v posledních letech jednou z nejrychleji se rozvíjejících metod v oblasti diagnostiky různých onemocnění. S vývojem techniky se posouvají i hranice požadavků na kvalitu zpracování

vzorku, požadavků na vstupní materiál a zejména kvalitu analyzovaných dat. NGS se v současné době využívá zejména ve výzkumu, ale postupně se stává metodou, která opouští prostředí experimentálních laboratoří a přesouvá se do klinické praxe (Novotná, 2018).

Základní myšlenkou metod NGS je princip masivní paralelizace procesu sekvenování. Během jednoho experimentu je v jednom okamžiku zároveň sekvenováno velké množství samostatných molekul. Vstupní DNA je fragmentována na úseky, které mají délku několika desítek až stovek párů bází a v případě potřeby je amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce. Tyto fragmenty jsou poté čteny a zpracovávány paralelně. Společným znakem těchto metod je čtení velkého množství fragmentů, které jsou relativně krátké (v řádu stovek bází). Takto vysoká míra paralelizace je hlavní rozdíl mezi NGS a klasickým Sangerovým sekvenováním, při kterém je čteno mnohem méně molekul DNA (Krejčí et al., 2015).

Výhodou NGS je relativně nenáročná a rychlá zpracování vzorků. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou data utřídit a analyzovat. Z tohoto důvodu je nezbytný uživatelsky jednoduchý software generující spolehlivý výsledek (Novotná, 2018).

NGS se používá zejména pro celogenomové sekvenování, sekvenování jednotlivých chromozomů, plazmidů či mitochondrií, studium genetické variability, mutační analýzu, kvantifikaci jednotlivých alel a další (LabGuide, 2014-2019).

6. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

1. Seznámení se s prací v molekulárně biologické laboratoři.
2. Izolace DNA z bukálních stěrů a srovnávání množství a kvality DNA v závislosti na odběru, délce a podmínkách skladování.

7. Metodika

Praktickou část své bakalářské práce jsem vykonala v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích. Sekvenaci vybraných vzorků jsem nechala provést u firmy GenSeq s.r.o. Odebrala jsem 42 vzorků a podle odlišných podmínek skladování a následné analýzy těchto vzorků jsem se snažila určit adekvátní délku a podmínky pro skladování stěrů z bukální sliznice určených pro izolaci DNA, která by byla vhodná pro další analýzu.

7.1 Odběr vzorků

Odběr jsem prováděla vždy kolem desáté hodiny dopoledne. Zajistila jsem, aby byl dotyčný, před odběrem poučen a aby nejméně hodinu před odběrem nejedl a nepil nic mimo neslazené neperlivé vody a také aby nežvýkal nebo neprováděl krátce před odběrem ústní hygienu.

Před samotným odběrem jsem si řádně umyla ruce a následně jsem provedla odběr, tak abych nekontaminovala výtěrovou tyčinku (FLOQ Swabs). Výtěry jsem prováděla z bukálních sliznic, tak že jsem tyčinkou přejížděla mezi horní a dolní čelistí po vnitřní straně tváře asi po dobu 1 minuty. Během odběru jsem výtěrovou tyčinkou otáčela, čímž bylo zajištěno, že se využil celý její povrch. Tím jsem se snažila odebrat dostatečné množství kvalitní DNA.

Následně jsem vzorky odebrané pomocí FLOQ Swabs vložila do ochranného plastového sáčku a umístila do požadovaných podmínek pro skladování. Některé jsem tedy umístila do chladničky a některé jsem nechala skladovat při laboratorní teplotě.

7.2 Izolace DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) představuje základní genetický materiál většiny živých organismů. Základem každé molekuly DNA je polynukleotidový cukr fosfátový řetězec, ve kterém jsou částice deoxyribózy propojeny fosfátovými skupinami a na každou částici deoxyribózy je připojena jedna z dusíkatých bází. Nejběžnější struktura molekuly DNA je pravotočivá dvoušroubovice. Je tvořena dvěma antiparalelními polynukleotidovými řetězci, tyto řetězce jsou navzájem propojeny vodíkovými můstky mezi dusíkatými bázemi. Oba řetězce jsou vzájemně vázány dvěma vodíkovými vazbami mezi bázemi adeninem (A) a thyminem (T) a třemi vodíkovými vazbami mezi bázemi cytosinem (C) a guaninem (G) (Kočárek, 2008).

Genomová DNA byla izolována podle speciálního izolačního protokolu izolace DNA ze stěru bukální sliznice. Využila jsem kit s názvem Kit for isolation of DNA from body fluids (GENERI BIOTECH). Vhodným typem materiálu pro izolaci je v tomto případě stěr z bukální sliznice.

Pomůcky:

- Pipeta
- Špičky
- Kolonka
- 1,5 ml zkumavky
- Sběrné zkumavky
- Rukavice

Reagencie:

- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Wash Buffer BL2
- Wash Buffer BL3
- Buffer BL1
- Elution Buffer BL4
- Proteináza K
- 96 % Ethanol

Před začátkem izolace DNA bylo nutné připravit dle návodu pracovní roztoky Wash Buffer BL3 a Proteinasy K. Zároveň nastavit blokový termostat na 70 °C a vložit Elution Buffer BL4 do termostatu, aby byl připraven k použití, tedy předehřátý na 70 °C.

7.2.1 Lýza vzorku

Stěrový materiál se vzorkem stěru bukální sliznice jsem umístila do předem popsané 2 ml zkumavky. Přidala jsem 200 µl deionizované vody (PBS), 200 µl Buffer BL1 a 25µl Proteinasy K. Tento roztok jsem řádně promíchala na vortexu asi 20 vteřin a vložila do blokového termostatu, kde se roztok inkuboval 15 minut při 70 °C.

Po inkubaci jsem před otevřením vzorek promíchala na vortexu a krátce stočila (maximálně 3000 otáček za minutu, 5 s). Poté jsem vzorek přenesla do nové popsané 1,5 ml zkumavky a stěrový materiál jsem odstranila.

7.2.2 Přidání ethanolu a navázání DNA

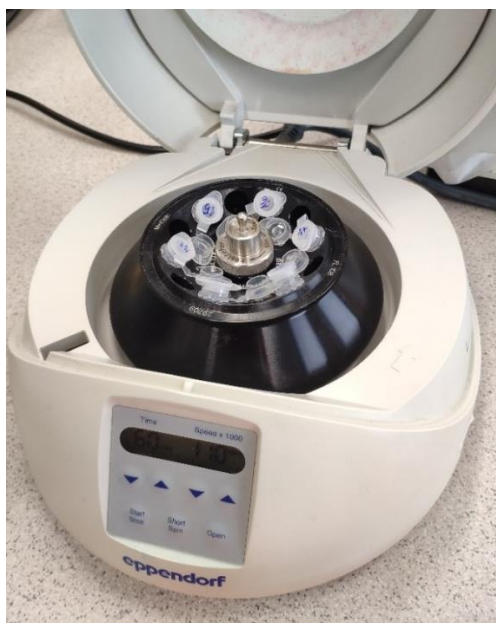
Do vzorku jsem přidala 210 μl 96–100 % ethanolu. Znovu jsem řádně promíchala na vortexu a krátce stočila (maximálně 3000 otáček za minutu, 5 s).

Pro každý vzorek jsem si z izolačního kitu připravila jednu kolonku a dvě sběrné zkumavky pro promývací kroky. Na kolonku umístěnou ve 2 ml sběrné zkumavce jsem přepipetovala 600 μl vzorku. Následně jsem roztok centrifugovala 1 minutu při 11 000 otáčkách. Vzorek procházel přes kolonku bez problému, ale pokud bych zaznamenala, že by prošel přes kolonu špatně, tak v takovém případě bych centrifugaci opakovala při vyšších otáčkách (maximálně však 15 000 otáček za minutu).

7.2.3 Promývací krok

Při prvním promývacím kroku jsem na kolonku napipetovala 500 μl Buffer BL2 a vzorek jsem centrifugovala 1 minutu při 11 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci jsem tekutinu ze sběrné zkumavky vylila a kolonku jsem vložila zpět do sběrné zkumavky.

Následně při druhém promývacím kroku jsem na kolonku napipetovala 600 μl Buffer BL3. Roztok jsem poté centrifugovala 2 minuty při 11 000 otáčkách za minutu. Sběrnou zkumavku s filtrátem jsem odstranila a kolonu vložila do nové označené 1,5 ml zkumavky.



Obrázek 2: Centrifuga, ve které jsem centrifugovala vzorky po přidání promývacích roztoků (Zdroj: vlastní)

7.2.4 Eluční krok

Po promývání jsem přímo na střed kolonky napipetovala 100 μ l přehřátého Buffer BL4 vytemperovaného na 70 °C. Následně jsem vzorek nechala inkubovat přesně 5 min při laboratorní teplotě. Vzorek jsem centrifugovala 1 minutu při 11 000 otáčkách za minutu.

Poté jsem odstranila kolonu a čistá genomová DNA byla připravena pro další použití.

7.3 Koncentrace DNA získané z bukálních stěrů

Veškeré chemické reakce, včetně laboratorní práce s DNA, probíhají v určitých objemech a za určitých koncentrací. Pro následnou práci s vyzolovanou DNA je důležité znát její koncentraci v příslušném vzorku. Stanovení koncentrace DNA se provádí nejčastěji spektrofotometricky a fluorometricky (Navrátil et al., 2004).

Při spektrofotometrických stanoveních se měří veličina, která se nazývá absorbance (A). Nukleové kyseliny absorbují v důsledku přítomnosti dusíkatých bazí v ultrafialové oblasti spektra. Absorpční maximum mají při vlnové délce 260 nm (Křemen et al., 1998).

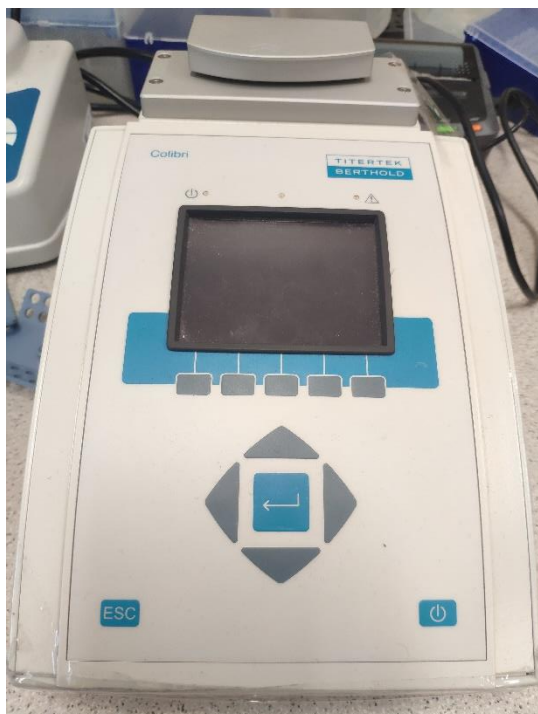
U všech vzorků, které jsem odebrala a izolovala, jsem následně změřila na spektrofotometru Colibri Microvolume Spectrophotometer hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm, a také jejich koncentrace a poměry mezi absorbancemi 260/280 nm a 260/230 nm.

Pomůcky:

- Buffer BL4
- Špičky
- Pipeta

Přístroje:

- Spektrofotometr: Colibri Microvolume Spectrophotometer (obrázek 3)



Obrázek 3: Colibri Microvolume Spectrophotometer (Zdroj: vlastní)

7.4 Měření čistoty DNA

Při aplikaci jakékoliv metody izolace DNA se nikdy nepodaří vyizolovat z buněk stoprocentně čistou DNA. Vždy je znečištěná dalšími komponentami, jako jsou zejména proteiny a polysacharidy. Dalším nutným krokem v laboratorní práci s DNA je její purifikace (vyčištění). Protože většina technik molekulární biologie je často úspěšná pouze při použití čisté DNA, je tedy nezbytné stanovit čistotu vyizolované DNA. Nejrychlejší cestou je změření absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Z těchto hodnot je potom možné zjistit nejen čistotu DNA, ale i její koncentraci v roztoku, a také koncentraci znečišťujících proteinů (Navrátil et al., 2004).

Pro měření čistoty DNA platí:

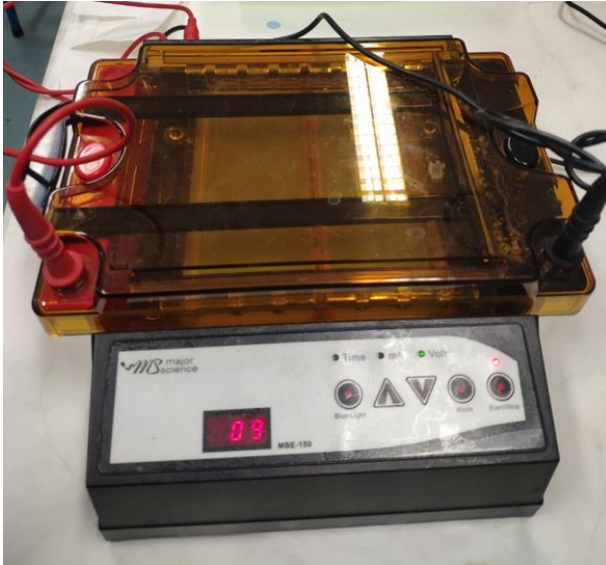
$$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) \{1,7; 1,8\} = \text{čistá DNA}$$

$$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) < 1,7 = \text{znečištěná DNA (proteiny nebo organické látky)}$$

$$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) > 1,9 = \text{DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami}$$

7.5 Elektroforéza izolované DNA z bukálních stěrů

Metoda gelové elektroforézy zahrnuje několik důležitých kroků, od přípravy gelu a vzorků, přes nanesení vzorků do jamek a spuštění celé separace, až po konečnou vizualizaci fragmentů DNA (Snustad a Simmons, 2009).



Obrázek 4: Souprava pro elektroforézu (Zdroj: vlastní)

Pomůcky:

- Pipeta
- Špičky
- Rukavice

Reagencie:

- Agaróza SERVA
- 1xTBE-puffer
- Ethidium bromid SERVA
- 100bp DNA-ladder (NEB, ROTH)
- Destilovaná voda

7.5.1 Pracovní postup přípravy vzorků pro elektroforézu DNA

Agarózový gel je na přípravu celkem nenáročný. Nejprve jsem si musela připravit 1xTBE pufr. Do skleněného válce o objemu 1 l jsem odměřila 100 ml 10x TBE pufru a válec doplnila po rysku 900 ml destilované vody. Nespotřebovaný 1x pufr jsem uschovala pro další přípravu gelů.

2% gel vznikne smícháním 5 g práškové agarózy s 250 ml 1xTBE pufru. Připravila jsem si 2% gel, jelikož je vhodný pro dlouhé fragmenty, naopak hustý gel by byl vhodnější pro krátké fragmenty. Celou směs jsem tedy uvedla do varu a po mírném vychladnutí jsem přidala Ethidium bromid a směs jsem promíchala. S látkou Ethidium bromid se musí pracovat opatrně a v rukavicích, jelikož se jedná o vážný karcinogen. Následně jsem připravený gel nalila do předem sestavené a vyvážené formy. Do této formy jsem poté zasunula hřeben, který vytvořil v gelu jamky pro nanesení vzorku. Gel jsem nechala ztuhnout při laboratorní teplotě.

Po ztuhnutí gelu jsem vyndala hřebínek a gel jsem vložila do elektroforetické vany. Vanu s gelem jsem zalila 1xTBE pufrem. Elektrodový pufr musí překrývat gel umístěný ve vaně. Následně jsem do první jamky napipetovala 7 µl 100bp DNA ladderu, a pak do dalších jamek 7 µl jednotlivých vzorků PCR. Elektroforetickou vanu jsem přikryla víkem a připojila elektrody. Elektroforéza probíhala po dobu 35 minut při 110 V.

Po ukončení elektroforézy jsem odpojila elektrody a sundala víko z vany. Gel jsem opatrně vzala a umístila jej na UV transiluminátor, kde jsem ho prosvítla UV zářením. Gel jsem vyfotografovala a obrázek přesunula na připravený flash disk.

7.6 Polymerázová řetězová reakce

Primery pro amplifikaci částí genů byly navrženy v laboratoři pomocí programu Primer-BLAST, který je veřejně dostupný na stránkách NCBI. Byly syntetizovány na zakázku firmou GENERI BIOTECH. Pro analýzu byl vybrán exon 11 genu ALAS2, který obsahoval 289 páru bází. Celkový produkt obsahoval 448 bází, samotný exon 11 má 369 bází.

Gen ALAS2

```
atttggagatctagtctaaccatttttccctccctccccctaccaccttcaggagagctgctgctggctgactgctggggctgccccctcaggatgtgtctgtggctgcaatttctgcctgt  
cctgtacactttgagctcatgagtgagtgaggagcttctacttcgggaacatggggccccagtagtgcaccacctatgctgagaagccagctgctaggattcacccccacctgcgcttcacttgggtcc  
aggcctactcctgtcttctgttggctgcttagctgaattgagcctaaaaataaagcacaaaccacagcattgtgaagcctttattggacagggaaacagacaagtgcattctgactccctcagacaa  
gtggcagatctatgaggtaaccataggtcacttgttggtcaccatt
```

Obrázek 5: Sekvence exonu 11 – šedě je znázorněna sekvence exonu 11, červeně primery a černě intronové oblasti (Zdroj: vlastní)

Tabulka 1: Sekvence navrženého primeru

Gen	Sekvence forward primeru (5'→3')	Sekvence reverse primeru (3'→5')
ALAS2	TCCCCCTACCACCTTCAGAG	GCCACTTGTCTGAGGGAGTC

Zdroj: vlastní

Tabulka 2: Ředění primerů pro PCR reakci

Forward primer (μl)	Reverse primer (μl)	H ₂ O (μl)	Celkový objem (μl)
10	10	90	100

Zdroj: vlastní

Pomůcky:

- Špičky
- Rukavice
- 0,2 ml mikrozkušavky

Reagencie:

- DNA
- primer forward
- primer reverse
- MasterMix
- PCR voda

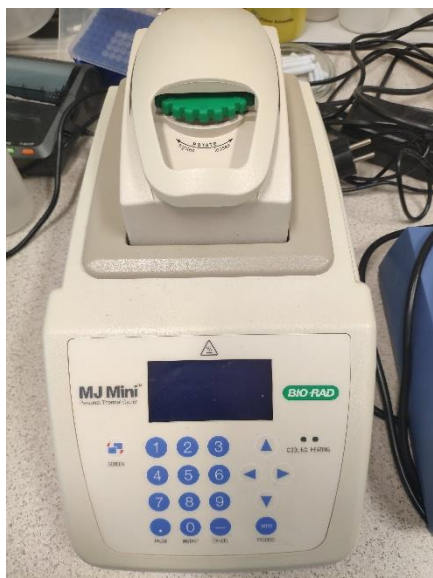
7.6.1 Pracovní postup přípravy vzorků pro PCR reakci

Potřebné reagencie jsem si vyndala z mrazničky a nechala rozmraznout v pokojové teplotě. Během čekání na rozmrznutí roztoků jsem si připravila 0,2 ml mikrozkušavky, které jsem si označila podle čísel vzorků.

Po rozmrznutí reagentů jsem je krátce zvortexovala a zcentrifugovala. Dále jsem se vzorky pracovala v laminárním boxu, aby nedošlo k jejich kontaminaci a znečištění. Do každé mikrozkušavky napipetovala příslušné množství DNA a k té jsem přidala 7,5 μl Mastermix. Poté jsem přidala primery 1,5 μl primeru forward a 1,5 μl primeru reverse oba o koncentraci 10pmol/μl. Následně jsem přidáním příslušného množství vody doplnila množství roztoku v každé mikrozkušavce na 15 μl.

Poté jsem mikrozkušavky krátce zvortexovala a stočila. Následně jsem je vložila do termocyklu (obrázek 5) a spustila jsem předem nastavený příslušný program podle teplotního profilu (tabulka 3). Teplotní profil PCR nebylo potřeba optimalizovat, jelikož byl v laboratoři již dříve použit a optimalizován.

Po proběhnutí polymerázové řetězové reakce jsem pomocí elektroforézy zjišťovala, zda proběhla správně amplifikace genů.



Obrázek 6: Termocykler MJ Mini od firmy BIO-RAD (Zdroj: vlastní)

Tabulka 3: Teplotní profil PCR reakce

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
1. Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1
2. Denaturace	95 °C	30 s	35
3. Annealing	60 °C	30 s	35
4. Extenze	72 °C	1 min	35
5. Konečná extenze	72 °C	10 min	1
6. Chlazení	12 °C	12 hod	1

Zdroj: vlastní

7.7 Enzymatické pročištění PCR produktů

Pomůcky:

- Pipeta
- Špičky
- 1,5 ml zkumavky
- Rukavice

Reagencie:

- EXO I (NEB)
- rSAP (NEB)
- PCR produkt

Nejprve jsem před zahájením enzymatického pročištění PCR produkty krátce zvortexovala a stočila. Poté jsem do mikrozkmavek o objemu 0,2 ml napipetovala 5 μ l PCR produktu, 0,5 μ l enzymu EXO I a 1 μ l enzymu rSAP. Následně jsem celý obsah znovu promíchala a krátce stočila na centrifuze. Takto připravené vzorky jsem vložila do termocykleru (obrázek 5), na kterém jsem zvolila příslušný program pro inkubaci vzorků a inaktivaci enzymů.

Tabulka 4: Teplotní profil PCR – EXO

Postup	Teplota	Čas
Inkubace	37 °C	15 min
Inaktivace enzymů	80 °C	15 min
Chlazení	4 °C	24 h

Zdroj: vlastní

7.8 Příprava na sekvenaci

Pomůcky:

- Pipeta
- Špičky
- 1,5 ml zkumavky
- Rukavice

Reagencie:

- PCR voda
- Přečištěný PCR produkt
- Primer forward
- Primer reverse

Připravila jsem si zkumavky o objemu 1,5 ml, které jsem následně označila čárovým kódem od firmy GenSeq s.r.o. Druhou část kódu jsem si vlepila do vlastního sešitu s poznámkami. Do takto připravených mikrozkušavek jsem napipetovala 5 μ l primeru. Do jedné zkumavky primer forward a do druhé primer revers. Poté jsem přidala 1,5 μ l přečištěného PCR produktu a následně jsem do mikrozkušavek doplnila PCR vodu, která vyplnila celkový objem na 10 μ l.

Takto připravené mikrozkušavky jsem odeslala firmě GenSeq s.r.o., která se nachází na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a nechala vzorky osekvenovat.

8. Výsledky

Celkem jsem analyzovala 42 vzorků odebraných z bukální sliznice. Odebrala jsem vždy šest vzorků, které se skladovaly po stejné časové období. Tři z těchto vzorků byly skladovány v laboratorní teplotě a zbylé tři v chladničkové teplotě po přesně danou dobu, jak je uvedeno v tabulce níže (tabulka 5).

Analýza vzorků zahrnovala izolaci DNA, zjištění její koncentrace a čistoty. Dále také elektroforézu pro potvrzení, že vzorky opravdu DNA obsahují a PCR, po které následovala elektroforéza PCR produktů, abych zjistila, zda polymerázová řetězová reakce proběhla. Podle výsledků elektroforézy PCR produktů jsem se dále rozhodla, které vzorky odeslat na sekvenování.

Tabulka 5: Datum odběru, datum analýzy a doba skladování vzorků

Doba skladování	Datum odběru	Datum analýzy
3 měsíce	1.1. 2021	1.3. 2021
2 měsíce	16.12. 2020	16.2. 2021
1 měsíc	25.1. 2021	25.2. 2021
3 týdny	9.2. 2021	1.3. 2021
2 týdny	15.2. 2021	1.3. 2021
1 týden	18.2. 2021	25.2. 2021
1 den	16.2. 2021	16.2. 2021

Zdroj: vlastní

8.1 Izolace DNA, změřená koncentrace a absorbance

Při izolaci DNA jsem postupovala podle manuálu, který byl součástí kitu s názvem Kit for isolation of DNA from body fluids. Po izolaci jsem změřila koncentraci a poměry mezi absorbancemi, které jsem využila ke zjištění čistoty DNA. Měřila jsem každý vzorek dvakrát, a pokud nebyly výsledky stejné nebo podobné, měření jsem opakovala. Z těchto naměřených hodnot jsem udělala průměr.

Zda je izolovaná DNA čistá či nikoli jsem zjistila díky poměru absorbancí 260/280. Je stanoveno, že pokud se poměr 260/280 rovná 1,7 až 1,9 jedná se o čistou DNA. Také poměr absorbancí 260/230 odpovídá čistotě DNA a to, pokud je výsledek 2,0 až 2,2.

Tabulka 6: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných několik hodin v laboratorní teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
1	1	113,25	111,42	2,27	1,19	1,90	2,04
	2	109,59		2,19	1,15	1,90	2,07
2	1	95,79	96,54	1,92	0,97	1,97	2,22
	2	97,28		1,95	1,01	1,93	2,22
3	1	51,90	48,54	1,04	0,65	1,61	1,92
	2	45,18		0,90	0,42	2,18	6,41

Zdroj: vlastní

Tabulka 7: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných několik hodin v chladničkové teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
4	1	17,62	21,77	0,35	0,13	2,74	8,02
	2	25,91		0,52	0,28	1,86	1,89
5	1	33,34	33,58	0,67	0,35	1,89	1,86
	2	33,81		0,68	0,37	1,84	1,92
6	1	48,21	49,03	0,96	0,52	1,87	2,21
	2	49,85		1,00	0,54	1,84	2,18

Zdroj: vlastní

Tabulka 8: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 měsíce v laboratorní teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
7	1	4,34	4,16	0,09	0,06	1,45	0,47
	2	3,98		0,08	0,06	1,37	0,46
8	1	17,97	17,90	0,36	0,23	1,56	0,49
	2	17,83		0,36	0,23	1,55	0,49
9	1	9,86	9,58	0,20	0,15	1,34	0,30
	2	9,30		0,19	0,14	1,31	0,30

Zdroj: vlastní

Tabulka 9: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 měsíce v chladničkové teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
10	1	31,02	30,77	0,62	0,46	1,36	1,23
	2	30,52		0,61	0,34	1,82	1,33
11	1	22,23	25,48	0,44	0,32	1,38	1,84
	2	28,72		0,57	0,31	1,87	1,59
12	1	30,67	30,76	0,61	0,33	1,83	1,45
	2	30,85		0,62	0,33	1,86	1,44

Zdroj: vlastní

Tabulka 10: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 měsíc v laboratorní teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
13	1	5,64	5,66	0,11	0,09	1,33	0,50
	2	5,68		0,11	0,08	1,46	0,50
14	1	6,86	6,49	0,14	0,10	1,44	0,57
	2	6,11		0,12	0,09	1,37	0,56
15	1	4,45	4,59	0,09	0,07	1,27	0,49
	2	4,73		0,09	0,07	1,35	0,46

Zdroj: vlastní

Tabulka 11: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 měsíc v chladničkové teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
16	1	81,71	81,67	1,63	0,88	1,89	1,91
	2	81,62		1,63	0,89	1,84	1,89
17	1	91,04	91,67	1,82	0,99	1,84	2,02
	2	92,29		1,85	1,00	1,84	2,02
18	1	35,02	41,67	0,70	0,46	1,52	1,93
	2	48,32		0,97	0,54	1,78	1,75

Zdroj: vlastní

Tabulka 12: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 týden v laboratorní teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
19	1	14,24	13,07	0,28	0,17	1,68	0,82
	2	11,89		0,24	0,24	0,99	1,88
20	1	7,39	7,65	0,15	0,10	1,41	0,48
	2	7,91		0,16	0,20	0,79	1,00
21	1	7,39	7,55	0,15	0,09	1,65	0,76
	2	7,71		0,15	0,10	1,62	0,74

Zdroj: vlastní

Tabulka 13: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 týden v chladničkové teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
22	1	138,72	138,07	2,77	1,50	1,85	2,15
	2	137,42		2,75	1,48	1,86	2,15
23	1	164,13	166,02	3,28	1,76	1,89	2,22
	2	167,91		3,36	1,80	1,87	2,21
24	1	144,20	133,61	2,88	1,57	1,84	2,13
	2	123,02		2,46	1,41	1,75	2,50

Zdroj: vlastní

Tabulka 14: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 týdny v laboratorní teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
25	1	5,53	6,75	0,11	1,04	0,11	0,09
	2	7,96		0,16	0,08	1,97	0,42
26	1	6,94	6,94	0,14	0,09	1,63	0,33
	2	6,94		0,14	0,09	1,57	0,35
27	1	6,88	7,07	0,14	0,07	1,92	0,45
	2	7,26		0,15	0,08	1,90	0,46

Zdroj: vlastní

Tabulka 15: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 týdny v chladničkové teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
28	1	162,87	162,45	3,26	1,73	1,89	2,28
	2	162,03		3,24	1,73	1,88	2,31
29	1	180,86	180,64	3,62	1,92	1,89	2,16
	2	180,41		3,61	1,92	1,88	2,17
30	1	112,66	112,42	2,25	1,19	1,89	2,34
	2	112,17		2,24	1,18	1,89	2,35

Zdroj: vlastní

Tabulka 16: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 týdny v laboratorní teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
31	1	100,94	100,42	2,02	1,09	1,86	1,47
	2	99,89		2,00	1,08	1,84	1,50
32	1	13,09	13,19	0,26	0,16	1,61	0,55
	2	13,28		0,27	0,18	1,52	0,55
33	1	9,68	9,84	0,19	0,11	1,83	0,73
	2	10,00		0,20	0,11	1,78	0,75

Zdroj: vlastní

Tabulka 17: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 týdny v chladničkové teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
34	1	32,01	32,19	0,64	0,33	1,92	1,77
	2	32,36		0,65	0,33	1,94	1,71
35	1	27,80	27,86	0,56	0,28	1,96	1,90
	2	27,92		0,56	0,29	1,91	1,93
36	1	14,64	14,32	0,29	0,15	1,97	1,68
	2	14,00		0,28	0,19	1,44	1,24

Zdroj: vlastní

Tabulka 18: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 měsíce v laboratorní teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
37	1	30,17	30,40	0,60	0,35	1,75	1,03
	2	30,62		0,61	0,35	1,75	1,01
38	1	24,52	24,17	0,49	0,32	1,53	0,71
	2	23,82		0,48	0,31	1,56	0,71
39	1	31,00	31,41	0,62	0,39	1,59	0,73
	2	31,81		0,64	0,40	1,60	0,75

Zdroj: vlastní

Tabulka 19: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 měsíce v chladničkové teplotě

Č. vzorku	Č. měření	Koncentrace (ng/μl)	Průměr \bar{c} (ng/μl)	A 260	A 280	Poměr 260/280	Poměr 260/230
40	1	152,74	153,15	3,05	1,64	1,87	2,08
	2	153,56		3,07	1,65	1,87	2,06
41	1	186,42	186,49	3,73	1,99	1,87	1,98
	2	186,55		3,73	2,00	1,86	1,97
42	1	84,82	84,95	1,70	0,94	1,80	1,57
	2	85,08		1,70	0,95	1,80	1,59

Zdroj: vlastní

Pokud se jedná o tabulku 18 a 19 jsou zde zařazeny vzorky, které byly skladovány nejdéle. V laboratorní praxi není běžné vzorky pro analýzu DNA odebrané z bukální sliznice skladovat tři měsíce. Do této práce jsem je zařadila pro zajímavost, jak se budou podobat či lišit od ostatních naměřených hodnot.

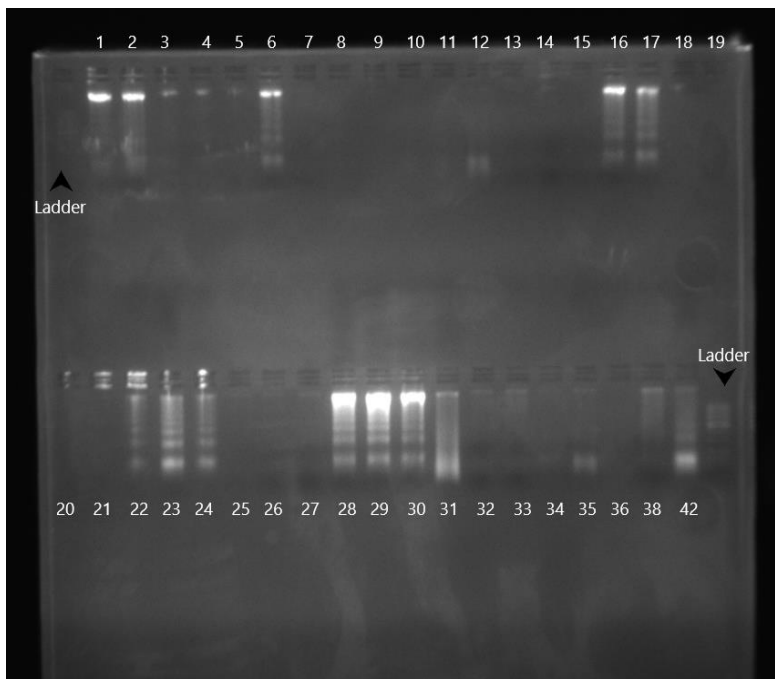
8.2 Výsledky elektroforézy v gelu po izolaci DNA

Po změření koncentrace a zjištění čistoty DNA jsem vzorky připravila k elektroforéze. V tomto případě jsem elektroforézu v agarózovém gelu provedla, abych potvrdila či vyloučila přítomnost DNA ve vzorku. Dále také abych odhadla kvalitu DNA, fragmentaci a čistotu.

Jelikož jsem měla v elektroforéze místo jen na 38 vzorků, ale odebraných vzorků bylo 42, musela jsem z analýzy čtyři vzorky vyškrtnout, a jak jsem již výše zmiňovala, není zcela běžné skladovat vzorky DNA odebrané z bukálních sliznic po dobu tří měsíců, rozhodla jsem se tedy z těchto vzorků pro další analýzu použít jen dva. Vzorek číslo 38 skladovaný v pokojové teplotě a vzorek číslo 42 skladovaný v chladničce.

Nejprve jsem přidala k DNA vzorkům vkladací pufr. Pro zviditelnění DNA jsem použila látku ethidium bromid, kterou jsem přidala k chladnoucemu gelu během jeho přípravy. Poté jsem do ztuhlého gelu vloženého ve vaně, která byla naplněná TBE puftrem, aplikovala na první pozici 100 bp DNA ladder a do ostatních pozic jsem napipetovala vzorky.

DNA ladder neboli „žebřík“ má definovanou velikost jednotlivých fragmentů a měl by sloužit pro odhad velikosti separovaných fragmentů nukleových kyselin. V mém případě první DNA ladder není viditelný a druhý je jen částečně viditelný.



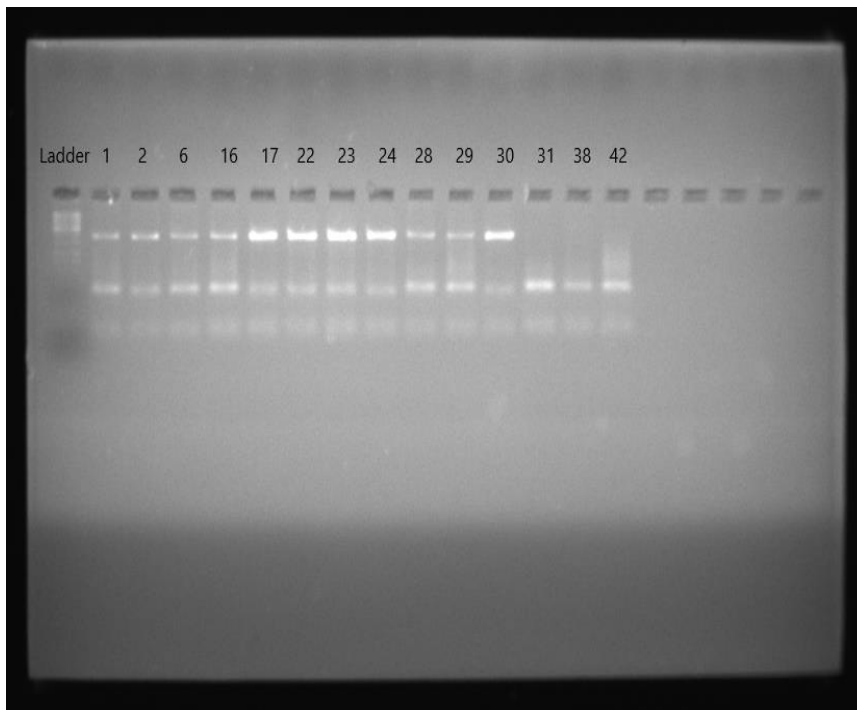
Obrázek 7: Elektroforéza vzorků na gelu pro potvrzení přítomnosti DNA (Zdroj: vlastní)

Na obrázku 7 můžeme vidět, že některé vzorky neobsahovaly DNA a některé nemuseli klesnout, tak výrazně ke dnu jamky. Na vině je pravděpodobně lidský faktor, jelikož jsem elektroforézu nikdy dříve neprováděla. U takových vzorků tedy není vidět žádná nebo

téměř žádná separace. Naopak u některých vzorků například vzorků číslo 16 a 17 proběhla elektroforéza v pořádku.

8.3 Výsledky elektroforézy v gelu po proběhlé PCR reakci

Předtím než mohla proběhnout polymerázová řetězová reakce, bylo potřeba navrhnout primer, který byl syntetizován na zakázku. Byl vybrán exon 11 genu ALAS2. Pokračovala jsem s analýzou vzorků, tak že jsem připravila vzorky k PCR reakci. Tyto vzorky byly vybrány podle výsledků předešlé elektroforézy, tak abych zvýšila pravděpodobnost správné amplifikace genů při PCR reakci. Konkrétně se jednalo o vzorky číslo 1, 2, 6, 16, 17, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 31, 38, 42. Tyto čísla vzorků odpovídají těm, které jsou již uvedena v tabulkách 6 až 19. Poté abych zkontrolovala, zda řádně proběhla polymerázová řetězová reakce jsem vzorky znovu podrobila elektroforéze na agarózovém gelu.



Obrázek 8: Elektroforéza PCR produktů na agarózovém gelu (Zdroj: vlastní)

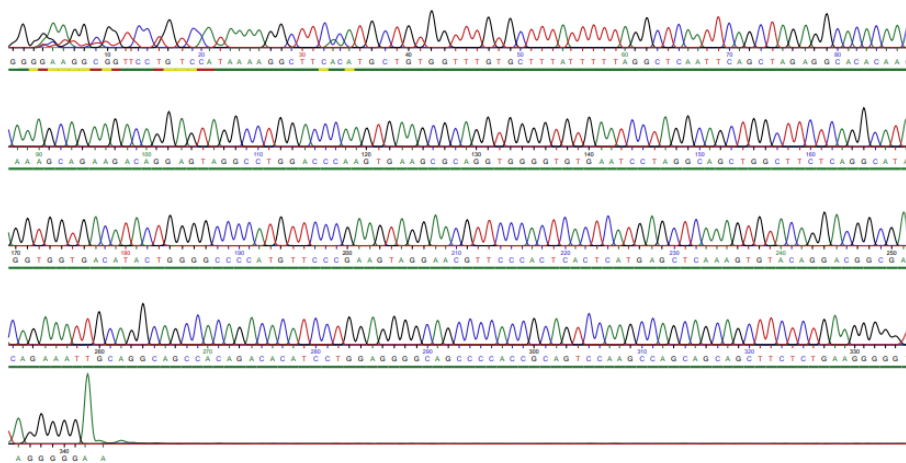
Na obrázku 8 můžeme pozorovat, že u většiny vzorků proběhla amplifikace DNA v pořádku. U posledních tří vzorků je pravděpodobné, že amplifikace proběhla jen částečně nebo vůbec. První místo je jako obvykle vyhrazeno pro DNA ladder (100 bp DNA ladder) neboli „žebřík“, který má definovanou velikost jednotlivých fragmentů a do zbylých pozic byly napipetovány produkty PCR.

8.4 Výsledky sekvenování izolované DNA

Po elektroforéze produktů PCR jsem vzorky enzymaticky pročistila a poté jsem je takto připravené vložila do termocyklieru, na kterém jsem nastavila příslušný program. Pročištěné vzorky jsem připravila, tím že jsem na ně nalepila čárový kód a zaslala je firmě na sekvenaci.

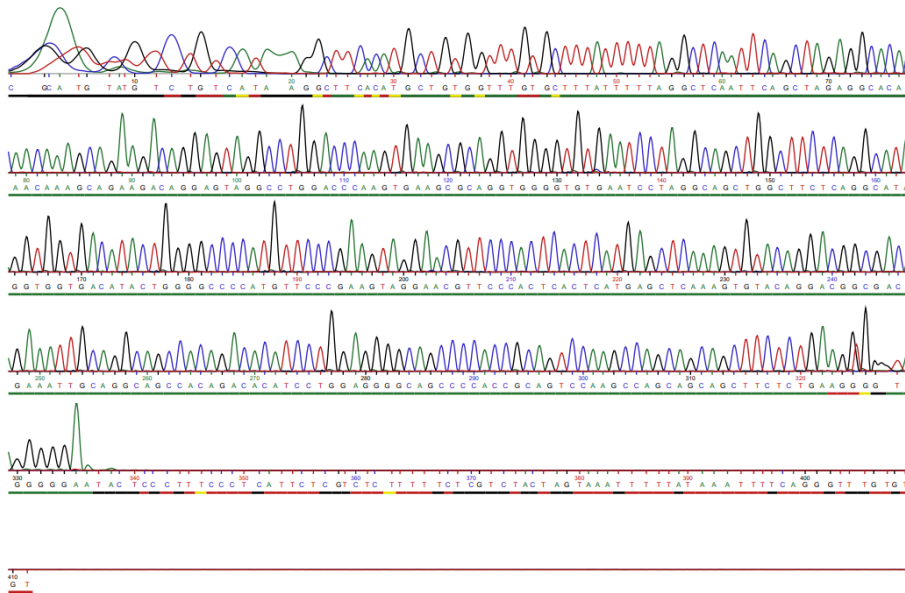
Pro sekvenování jsem vybrala všechny vzorky, které jsem podrobila PCR, dohromady tedy 14 vzorků. Osekvenované vzorky byly za pár dní dostupné na stránkách firmy GenSeq s.r.o., kde jsem je vyhledala pomocí čárových kódů. Sekvence u většiny vzorků, které jsem poslala na sekvenování proběhla v pořádku. Tyto sekvence jsem hodnotila ve formátu PDF nebo ve formátu ABI v programu BioEdit.

Pro ukázkou sekvencí jsem zvolila čtyři vzorky (vzorky číslo 6, 23, 38, 42), které měly sekvence rozdílné. Dvě z těchto sekvencí byly pěkné a čitelné, další dvě jsem vybrala špatné a nečitelné, jelikož jsem chtěla ukázat viditelný kontrast mezi nimi.



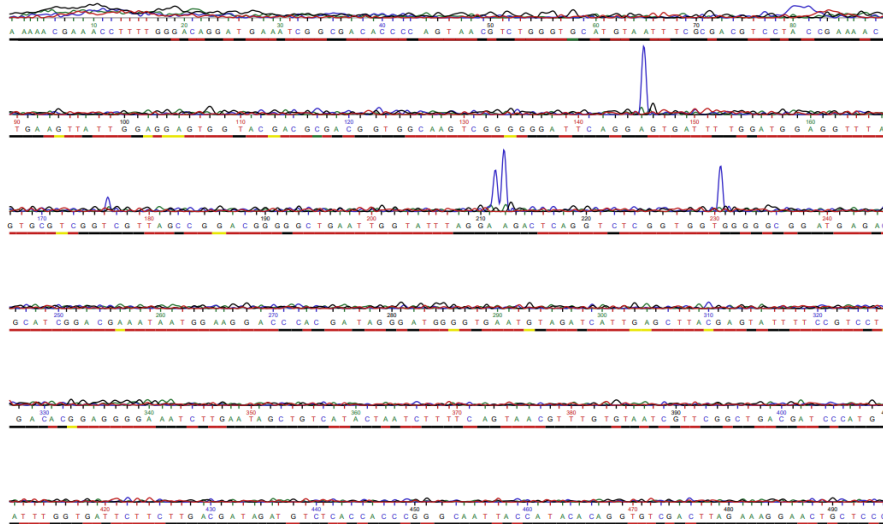
Obrázek 9: Sekvence vzorku 6 (Zdroj: vlastní)

Vzorek číslo 6, jehož sekvenci můžeme vidět na obrázku 9, měl sekvenci podobnou většině ostatních osekvenovaných vzorků. Na tomto obrázku si můžeme povšimnout, že výsledné sekvence nejsou nijak vysoké, ale jsou stále dobře čitelné.



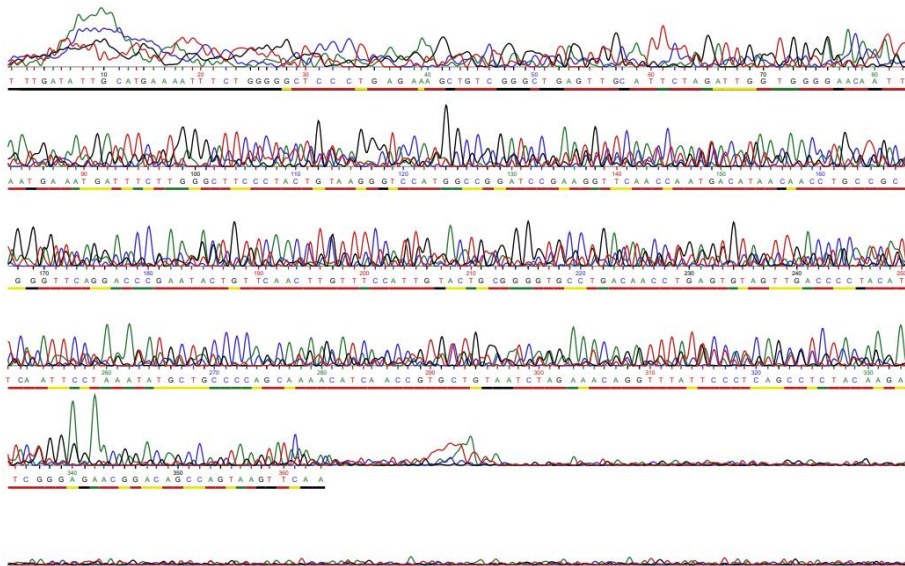
Obrázek 10: Sekvence vzorku 23 (Zdroj: vlastní)

Na obrázku 10 můžeme vidět vzorek číslo 23. Sekvence je vysoká a čitelná, jedná se o ukázkovou sekvenaci. U tohoto vzorku jsem také naměřila relativně vysokou koncentraci DNA a poměry mezi absorbancemi ukazují, že se jedná o ničím nekontaminovanou DNA.



Obrázek 11: Sekvence vzorku 38 (Zdroj: vlastní)

Naopak na obrázku 11 je vidět vzorek číslo 38, jehož sekvence je nízká a nečitelná. Naměřená koncentrace byla také nízká a poměry absorbancí dávají najevo, že se nejedná o čistou DNA.



Obrázek 12: Sekvence vzorku 42 (Zdroj: vlastní)

Sekvenci vzorku číslo 42 můžeme vidět na obrázku 12, ze kterého je na první pohled vidět, že se jedná o špatnou a nečitelnou sekvenci. Vzorek 42 má průměrnou koncentraci DNA a byl skladován tři měsíce v chladničkové teplotě. Podle těchto informací a také výsledku jeho sekvenace, můžeme říci, že se jedná o znečištěný vzorek.

9. Diskuze

Má bakalářská práce byla zaměřena na proces výběru nejlepší varianty podmínek skladování a ideální délku skladování vzorků DNA odebraných z bukální sliznice. Pro tuto práci jsem odebrala 42 vzorků, které jsem analyzovala a výsledky jsem použila ke zjištění koncentrace, čistoty, fragmentace, amplifikace a sekvenace DNA izolované z bukálních stěrů.

Dle mého názoru a také názoru mnoha odborníků, pokud se jedná o odběry z bukální sliznice, jde o jednoduchou neinvazivní metodu odběru, při které by neměl být pacient fyzicky ani psychicky zatížen. Myslím si, že jde o velkou výhodu vzorků pocházejících z bukální sliznice. To také potvrzuje článek *Genomics in premature infants: A non-invasive strategy to obtain high-quality DNA*, ve kterém se autoři zabývají získáním kvalitní DNA z bukálních epitelálních buněk od předčasně narozených dětí pro genomickou analýzu (Said et al., 2014).

Autoři poukázaly na výhodu bukálních stěrů u předčasně narozených dětí. Výsledky dat, která získali, jsou důkazem, že již osvědčená metoda bukálního stěru je spolehlivá, levná a neinvazivní. DNA z bukálních stěrů splňuje kvantitativní a kvalitativní požadavky na screening a sekvenční technologie nové generace (Said et al., 2014).

Můj názor podporuje výsledek autorů článku, tedy že sběr DNA z bukálních stěrů poskytuje vysoce kvalitní a kvantitativní DNA pro genetickou analýzu a nejmodernější genomickou technologii, jako je sekvenování celého genomu. Jednou z nejdůležitějších výhod v tomto případě je, že se jedná o snadno opakovatelné odběry vzorků u předčasně narozených novorozenců, například pokud selže test nebo se nepovede odběr (Said et al., 2014).

Naopak značnou nevýhodou vzorků z bukální sliznice je, že jsou odebírány z vysoce nehomogenního prostředí. Z toho důvodu nebylo možné u všech vzorků zajistit stejné složení. Podobně je to i s množstvím odebraného materiálu, i s tím se pojí řada proměnných. Proto mohl být každý odběr proveden v různé kvalitě.

Některé výsledky vzorků, které jsem analyzovala, jsou poměrně rozdílné i přesto, že se jedná o vzorky, které byly odebrány stejný den, pravděpodobně je to z důvodu, že jsem odbírala vzorky pro analýzu sama, a i přes to že jsem si odběr nastudovala, jak nejlépe jsem mohla, neměla jsem takové zkušenosti, jako zkušenosti pracovníci, kteří se tímto

zabývají. Myslím si tedy, že jde o zkušenosti, které mají lidé pracující v tomto oboru několik let, a které jsem se snažila získat, v průběhu zpracovávání mé bakalářské práce.

Další proměnou, která mohla ovlivnit mé výsledky je velké množství vzorků, které jsem odebírala jen od jedné osoby, z tohoto důvodu mohlo dojít u některého vzorku k nedostatečnému odběru, jelikož jsem odebírala nejčastěji šest vzorků v určitou denní dobu. Je tedy pochopitelné, že nejkvalitněji odebraný vzorek bude ten, který byl odebraný jako první než vzorek odebraný jako poslední. Myslím si, že důvodem může být například snížené množství slin a tím způsobené lehké odření vnitřní strany tváře.

Z tohoto důvodu jsem našla maličkost, se kterou nesouhlasím v tvrzení (Livy et al., 2012), aby se od jednotlivce odebíralo více bukálních stěrů najednou, poněvadž je nutné zvýšit celkové množství bukální DNA na mnohem větší množství. Mohlo by to pomoci v množství DNA, které je potřeba pro genotypování založené na mikročipu, o kterém ve svém článku hovoří, ale nemyslím si, že by to pomohlo se zlepšením čistoty DNA, se kterým se ve výsledcích také potýkají.

K izolaci DNA jsem používala kit od GENERI BIOTECH (Kit for isolation of DNA from body fluids), který umožňuje získat velice čistou genomovou DNA. Výrobce deklaruje tyto parametry: poměr A260/A280 1,60 až 1,90 o koncentraci v rozmezí 40-100 ng/μl (Generi biotech, 2015).

Pokud srovnám vytěženou DNA s tím, kolik umožňuje získat kit, který jsem používala, dosáhla jsem příznivých výsledků. U osmy vzorků jsem dosáhla tohoto rozmezí a u devíti vzorků jsem izolovala více než 100 ng/μl DNA. Dva z těchto vzorků (vzorky číslo 40, 41), u kterých jsem vyizolovala více než je rozmezí, byly skladovány tři měsíce v chladničkové teplotě. Také je zajímavé, že oba tyto vzorky mají poměr absorbancí A260/A280, které ukazují, že se jedná o čisté vzorky. Vzhledem k délce skladování je to netypické. Dalším zajímavým vzorkem je vzorek číslo 31, který byl tři týdny skladován při laboratorní teplotě, tedy okolo 20 až 25 °C a jeho koncentrace je vysoká a poměr absorbancí ukazuje, že se také jedná o čistý vzorek.

Jelikož jsem nenašla mnoho článků, které bych mohla využít k diskuzi ohledně výsledků množství izolované DNA, dovolím si použít pro srovnání článek s názvem Evaluation of quality of DNA extracted from buccal swabs for microarray based genotyping (Livy et

al., 2012), ve kterém autoři srovnávali výsledky koncentrace DNA izolované z bukálních stěrů a krve. Z mého pohledu se dostatečně věnují i izolaci DNA z bukální sliznice.

Pro izolaci DNA využili kit s názvem QIAamp DNA Blood Mini Kit, jehož pracovní postup dodržovali s výjimkou drobných modifikací. Přesto byl postup velice podobný, samozřejmě se v některých ohledech lišil, například eluovanou DNA skladovali před tím, než byla použita v rozdílných podmínkách tedy ve 4 °C, naproti tomu já jsem eluovanou DNA skladovala v mrazáku (Livy et al., 2012).

Kvalitu DNA také podrobili elektroforéze DNA. Použili 1% agarový gel. Na jejich elektroforéze je patrná degradace DNA, která byla prokázána fragmentací vzorků DNA. Degradaci pozorovali u 3 až 4 bukálních vzorků. V mém případě jsem degradaci u některých vzorků také pozorovala (Livy et al., 2012).

Když porovnám výsledky koncentrace izolované DNA z třinácti vzorků, které izolovali autoři tohoto článku se svými, mohu konstatovat, že mají větší výtěžnost DNA. Pokud ale srovnám své nejvyšší koncentrace DNA (například vzorky číslo 23, 29), které se vyskytují u vzorků, skladovaných týden nebo dva týdny v chladničce, jsou výsledkům z odborného článku poměrně podobné. Autoři izolovali nejvíce 257,96 ng/μl DNA z bukálních vzorků, ale jednalo o nejvíce znečištěnou DNA (Livy et al., 2012).

Srovnám-li čistotu izolovaných vzorků z článku s čistotou izolované DNA vzorků z mé práce, které nebyly skladovány déle než jeden měsíc, můžu říci, že jsem vyizolovala čistější DNA. Autoři článku samy zmiňují, že čistota jimi izolované DNA byla menší než 1,7. To naznačuje, že jejich DNA byla kontaminována proteiny. Podle mého názoru to mohlo být způsobeno tím, že použili kit určený pro izolaci DNA z krve i pro izolaci vzorků z bukální sliznice. Naopak já jsem požívala kit přímo určený pro izolaci DNA z bukálních sliznice (Livy et al., 2012).

V diskuzi autoři článku došli k závěru, se kterým souhlasím, a tím je, že pokud jde o vzorky z bukální sliznice, je velice důležité dbát na správný odběr, skladování vzorku a poučení jedince, kterému je vzorek odebírán (Livy et al., 2012).

Nakonec mě autoři zavedli na zajímavou myšlenku, a to že kvalita DNA v ústech se liší od člověka k člověku. V některých případech je DNA náchylnější k časně degradaci. Bohužel jsem to ve své práci nemohla prozkoumat, jelikož jsem odebírala vzorky pouze jedné osobě (Livy et al., 2012).

Při aplikování vzorků do gelu na elektroforézu mi chyběla zručnost, myslím si, že pokud bych tuto práci opakovala znovu, mohly by mé výsledky být kvalitnější, neboť jsem se během praktické části mé bakalářské práce naučila pracovat precizněji. Vzhledem k většímu počtu vzorků a nevelkému množství izolované DNA ze vzorků, nebylo možné elektroforézu všech vzorků opakovat, tak aby zbylo dostatečné množství na všechny jednotlivé kroky. Mé tvrzení podporuje výsledek elektroforézy produktů PCR, kde je možné vidět téměř všechny do gelu aplikované vzorky. Je tedy možné, že jsem se v aplikování vzorků do slotů zlepšila.

Ve většině laboratorních příruček je psáno, že adekvátní skladování je pár hodin až dva týdny, ale samozřejmě v chladničkové teplotě a pokud se má vzorek uchovávat déle je nutné ho zmrazit (Lonský, 2021). Podle mých výsledků mohu souhlasit s těmito tvrzeními, jelikož byly od samého začátku mé práce potvrzovány. Přesvědčily mě o tom například výsledky izolace DNA, kde největší koncentraci DNA mají právě vzorky skladované dva týdny. Dále to doplňují i výsledky elektroforézy PCR produktů a sekvenování. Samozřejmě pár zajímavých vzorků, které měly vysokou koncentraci DNA, i přes dlouhou dobu skladování, jsem mezi svými vzorky měla.

Možnou alternativou by mohlo být použití samoschnoucích bukalních výtěrů. Tyto tampony jsou vybaveny ventilační membránou na dně tuby, která umožňuje samosušení tamponu ve zkumavce. Vzorky mohou být vloženy do zkumavky ihned po odběru a není nutné žádné sušení tamponu na volném prostranství, mimo zkumavku. Vzhledem k rychlému samoschnoucímu procesu by bylo možné očekávat, že se jejich použitím snížilo riziko kontaminace a degradace DNA. Bohužel já jsem tyto speciální samoschnoucí bukalní výtěrové tampóny neměla k dispozici, ale myslím si, že je to také jeden ze způsobů, jak ovlivnit preanalytickou fázi a tím i výsledky (Bauer et al., 2017).

Na závěr této diskuze bych chtěla konstatovat, že jsem dospěla k závěru vyplývajícího z výsledků mé práce. Podle výsledků množství koncentrace DNA a její čistoty vychází jako nejlepší možnost uchovávat vzorky v chladničkové teplotě do doby, kdy je možné začít s jejich zpracováním. Můžeme si všimnout, že většina vzorků, která byla uchovávána v chladničkové teplotě, mají větší koncentraci DNA než ty, které byly uchovávány v laboratorní teplotě. Kdybych měla určit nejlepší dobu skladování, tak podle vzorků, které jsme analyzovala, jde o jeden až dva týdny, kde většina vzorků měla vysoké množství koncentrace DNA, a poměry absorbancí DNA ukazovaly, že jde o čistou DNA.

10. Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem vypracovala odbornou rešerši, při které jsem se seznámila s preanalytickým procesem mimolaboratorním i laboratorním, a dále také s vyšetřovacími metodami práce v molekulárně biologické laboratoři.

Teoretickou část své práce jsem zpracovala od preanalytické fáze laboratorního vyšetření po jednotlivé metody, které byly součástí mého tématu pro ucelení informací, které jsou důležité pro pochopení důležitosti preciznosti odběru vzorku a zacházení s tímto vzorkem.

Praktická část mé práce byla založená na zkoumání, jaká je ideální doba a místo skladování, aby bylo vyizolováno největší množství DNA, ale zároveň, aby se také jednalo o čistou DNA, která by byla vhodná k amplifikaci. K této práci jsem analyzovala 42 vzorků, odebraných z bukální sliznice.

Celá praktická část byla podrobně popsána a skládala se z odběru, izolace a zjištění čistoty a koncentrace DNA ve vzorku. Dále z elektroforézy těchto vzorků pro potvrzení přítomnosti DNA a provedení PCR, po které jsem opět provedla elektroforézu tentokrát PCR produktů, abych zjistila, zda u vzorků proběhla polymerázová řetězová reakce. Nakonec jsem zvolila pro sekvenování všech 14 vzorků a odeslala je na sekvenování firmě GenSeq s.r.o.

Poslední částí mé práce bylo sepsání výsledků a porovnání naměřených dat. Zkoumala jsem, které vzorky mají největší koncentraci DNA, a jaké jsou jejich poměry absorbancí, abych došla k přesvědčivému závěru. Tedy k závěru, jaké podmínky nejvíce vyhovující ke skladování vzorků z bukální sliznice.

Cílem této práce bylo převážně osvojení si některých metod, které se nejčastěji využívají v molekulárně biologické laboratoři, zjištění optimální délky skladování primárních vzorků a porovnání naměřených dat.

Hlavním přínosem mé bakalářské práce byl pokus o optimalizování laboratorních podmínek a délky skladování vzorků odebraných z bukální sliznice, tak aby byly vhodné k analýze DNA. Dalším přínosem této práce bylo seznámení se s metodami molekulární biologie, osvojení si samostatné práce v laboratoři a zvládnutí orientace v laboratorním prostředí.

11. Seznam použitých zdrojů

1. BÁRTOVÁ, E., © 2011. Sekvenování DNA [online]. Brno: VFU Brno. [cit. 2021-08-20]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-sekvenovani&lang=cz
2. BÁRTOVÁ, E., © 2014. Metody molekulární biologie [online]. Brno: VFU Brno. [cit. 2021-06-20]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz
3. BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2011. Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada. 164 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
4. BAUER, N., ROHRMANSTORFER, R., ZELCH, S., WALLERSTORFER, D., HUNT, S., HYUN, CH., KAZLOVA, V., 2017. DNA by Mail: Ensure DNA Integrity by use of Self-Drying Buccal Swabs. Letters in Health and Biological Sciences. 2(2), 71–7. doi: 10.15436/2475-6245.17.02017.020.
5. BENÁKOVÁ, H., 2022. Preanalytická příručka klinických laboratoří ÚLBLD [online]. Praha: VFN v Praze, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky [cit. 2022-02-13]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/4986/preanalyticka-prirucka.pdf>
6. BERÁNEK, M., 2016. Molekulární genetika pro bioanalytiku. Praha: Karolinum. 196 s. ISBN 978-80-246-3224-7.
7. BERÁNEK, M., HEGEROVÁ, J., DRASTÍKOVÁ, M., 2012. „Alternativní“ biologický materiál pro rutinní analýzu nukleových kyselin – validace preanalytické fáze vyšetření DNA. Klinická biochemie a metabolismus. 20(1), 31–7, ISSN 1210-7921.
8. BIOGEN Molekulární biologie a genetika, © 2021. Elektroforéza nukleových kyselin [online]. BIOGEN PRAHA s.r.o. [cit. 2021-06-11]. Dostupné z: <https://biogen.cz/elektroforeza-nukleovych-kyselin>
9. BROWN, T., A., 2007. Klonování genů a analýza DNA: úvod. Olomouc: Univerzita Palackého. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.

10. Encyclopedia.com, 2018. DNA Isolation Methods [online]. World of Forensic Science [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biology-and-genetics/genetics-and-genetic-engineering/dna-isolation-methods#3448300189>
11. GAŠ, B., 2001. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír*. 80 (7), 370-2. ISSN 0042-4544.
12. GENERI BIOTECH s.r.o., 2015. Návod k použití: Kit for isolation of DNA from body fluids. Verze 1.4. Katalogové číslo: 3100-050, 3100-100.
13. Khan Academy, © 2021. Gel electrophoresis [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
14. KOČÁREK, E., 2007. Molekulární biologie v medicíně. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
15. KOČÁREK, E., 2008. Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika. 2. vydání. Praha: Scientia. 211 s. ISBN 978-80-86960-36-4.
16. KOLÍSKO, M., 2017. Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*. 3/2017, 73-6. ISSN 0044-4812.
17. KREJČÍ, A., MÜLLER, P., VOJTĚŠEK, B., 2015. Bioinformatika a sekvenování nové generace. *Klinická onkologie*. 28(Supplementum 2), 91-6. doi: 10.14735/amko20152s91.
18. KŘEMEN, J., POHLREICH, P., STRÍBRNÁ, J., 1998. Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně. Praha: Karolinum. 117 s. ISBN 80-7184-504-3.
19. KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. Principy genetiky. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 200 s. ISBN 978-80-7509-385-1.

20. LABGuide Průvodce laboratoří, © 2014-2019. Klasické metody sekvenování [online]. [cit. 2021-02-14]. Dostupné z: <https://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>
21. LABGuide Průvodce laboratoří, © 2014-2019. Sekvenování nové generace [online]. [cit. 2021-02-27]. Dostupné z: <https://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/>
22. LIVY A., LYE S., JAGDISH C.K., HANIS N., SHARMILA V., LER L.W., PRAMOD B., 2012. Evaluation of quality of DNA extracted from buccal swabs for microarray based genotyping. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 27(1), 28-33. doi: 10.1007/s12291-011-0154-y.
23. LONSKÝ, P., 2021. Dokumentace integrovaného systému managementu, Laboratorní příručka genetické laboratoře [online]. PORTNATAL [cit. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://pronatal.cz/upload/redactor/1628677565-d0e2ea83199ac88bf1a4322b4614d850.pdf>
24. MAXAM M.A., GILBERT W., 1977. A new method for sequencing DNA. *National Academy of Sciences*. 74(2), 560-4. doi: 10.1073/pnas.74.2.560.
25. National Human Genome Research Institute, 2020. DNA Sequencing Fact Sheet [online]. [cit. 2021-02-28]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Fact-Sheet>
26. NAVRÁTIL, M., UVÍROVÁ, L., NÁDVORNÍK, P., KUBALÁKOVÁ, M., KLUKÁČKOVÁ, J., 2004. Základní praktická cvičení z molekulární biologie [online]. Olomouc: Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta [cit. 2021-04-18]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/MBCSB_Zakladni_prakticka_cviceni_z_molekularni_biologie.pdf
27. NOVOTNÁ, M., 2018. Princip NGS metody [online]. GENERI BIOTECH [cit. 2021-05-25]. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/princip-ngs-metody/>

28. ROSYPAL, S., 2006. Úvod do molekulární biologie. 4. (inovované) vydání. Brno: Stanislav Rosypal. 289 s. ISBN 80-902562-5-2.
29. SAID, M., CAPPIELLO, C., DEVANEY, J.M., PODINI, D., BERES, A.L., VUKMANOVIC, S., RAIS-BAHRAMI, K., LUBAN, N.C., SANDLER, A.D., TATARI-CALDERONE, Z., 2014. Genomics In Premature Infants: A Non-Invasive Strategy To Obtain High-Quality DNA. Scientific Reports. 4 (4286). doi: 10.1038/srep04286.
30. SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., 2009. Genetika. Brno: Masarykova univerzita. 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
31. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. Metody molekulární biologie. Brno: Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
32. TICHÝ, L., 2022. Laboratorní příručka, podklady ke spolupráci mezi komplementem a klinickými pracovišti [online]. Fakultní nemocnice Brno: Center of Molecular Biology and Genetics [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/laboratorni-prirucka-cmbgt/f2487>
33. Vaše laboratoře, © 2019. Zaměření laboratoře a vybavení [online]. [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/informace-o-laboratori/zamereni-laboratore-a-vybaveni>
34. ŽIŽKOVÁ, H., 2021. Oddělení molekulární genetiky, Laboratorní příručka [online]. Praha: Ústav hematologie a krevní transfuze [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: https://www.uhkt.cz/laboratore/laboratorni-prirucky/oddeleni-molekularni-genetiky/13100_lp_15_01/download
35. ŽUROVEC, M., A KOL., 1999. Soubor materiálů k předmětu metody molekulární biologie. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, Entomologický ústav. 161 s.

12. Seznam tabulek a obrázků

Obrázek 1: Schéma gelové elektroforézy (Zdroj: Bártová, 2014).....	18
Obrázek 2: Centrifuga, ve které jsem centrifugovala vzorky po přidání promývacích roztoků (Zdroj: vlastní).....	26
Obrázek 3: Colibri Microvolume Spectrophotometer (Zdroj: vlastní).....	28
Obrázek 4: Souprava pro elektroforézu (Zdroj: vlastní).....	29
Obrázek 5: Sekvence exonu 11 – šedě je znázorněna sekvence exonu 11, červeně primey a černě intronové oblasti (Zdroj: vlastní)	30
Obrázek 6: Temocykler MJ Mini od firmy BIO-RAD (Zdroj: vlastní).....	32
Obrázek 7: Elektroforéza vzorků na gelu pro potvrzení přítomnosti DNA (Zdroj: vlastní)	41
Obrázek 8: Elektroforéza PCR produktů na agarózovém gelu (Zdroj: vlastní).....	42
Obrázek 9: Sekvence vzorku 6 (Zdroj: vlastní)	43
Obrázek 10: Sekvence vzorku 23 (Zdroj: vlastní)	44
Obrázek 11: Sekvence vzorku 38 (Zdroj: vlastní)	44
Obrázek 12: Sekvence vzorku 42 (Zdroj: vlastní)	45
Tabulka 1: Sekvence navrženého primeru.....	31
Tabulka 2: Ředění primerů pro PCR reakci.....	31
Tabulka 3: Teplotní profil PCR reakce.....	32
Tabulka 4: Teplotní profil PCR – EXO	33
Tabulka 5: Datum odběru, datum analýzy a doba skladování vzorků.....	35
Tabulka 6: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných několik hodin v laboratorní teplotě	36
Tabulka 7: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných několik hodin v chladničkové teplotě	36
Tabulka 8: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 měsíce v laboratorní teplotě.....	36
Tabulka 9: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 měsíce v chladničkové teplotě	37
Tabulka 10: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 měsíc v laboratorní teplotě.....	37

Tabulka 11: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 měsíc v chladničkové teplotě	37
Tabulka 12: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 týden v laboratorní teplotě.....	38
Tabulka 13: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 týden v chladničkové teplotě	38
Tabulka 14: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 týdny v laboratorní teplotě.....	38
Tabulka 15: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 týdny v chladničkové teplotě	39
Tabulka 16: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 týdny v laboratorní teplotě.....	39
Tabulka 17: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 týdny v chladničkové teplotě	39
Tabulka 18: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 měsíce v laboratorní teplotě.....	40
Tabulka 19: Výsledky koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 měsíce v chladničkové teplotě	40

13. Seznam zkratek

A	Adenin
BL Buffer	Bass/Lead buffer
bp	Pár bází (base pair)
C	Cytosin
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvoušroubovice DNA
ssDNA	Jednořetězcová DNA
G	Guanin
kb	Klobáze
NGS	Sekvenování nové generace (next generation sequencing)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza
RNA	Ribonukleová kyselina
T	Thymin
UV	Ultrafialové záření (ultraviolet)