



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 bukálních
stěrů pro účely sekvenování**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Kristýna Roštíková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Optimalizace amplifikace DNA izolované z bukálních stěrů pro účely sekvenování jsem vypracovala 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 2.5. 2023

.....

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

Tématem mé bakalářské práce byla problematika odběru primárních vzorků DNA z bukální sliznice, určení ideální délky a optimálních podmínek skladování a následná analýza 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.

Cílem mé bakalářské práce mělo být zjištění optimální délky a podmínek skladování vzorků z bukální sliznice pro další zpracování. Také jsem hodnotila, jak tyto parametry ovlivňují kvalitu, čistotu, množství izolované DNA a také průběh PCR.

Dle získaných výsledků se jeví jako optimální uchovávání vzorků v laboratorní teplotě a jejich zpracování v nejkratší možné době, nebo uchovávání vzorků v chladničkové teplotě a zpracování v rámci týdnů až tří měsíců.

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

The topic of my bachelor thesis was the issue of taking primary DNA samples from the buccal mucosa, determination of 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 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 aim of my bachelor thesis was to determine the optimal length and storage conditions of samples from the buccal mucosa for further processing. Then I evaluated how these parameters affect the quality, purity and quantity of isolated DNA as well as the course of the polymerase chain reaction.

According to the obtained results, the best option is to store the samples in a refrigerator temperature and perform their analysis in the shortest possible time, or to store samples in a refrigerator temperature and process them within weeks to three months.

Key words

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

Obsah

Úvod	8
1. Preamalytická fáze	9
1.1 Žádanky	9
1.2 Biologický materiál	10
2. Izolace DNA	12
2.1 Izolace DNA metodou vysolování	13
2.2 Izolace DNA organickou extrakcí a enzymatickým štěpením	13
2.3 Izolace DNA pomocí iontoměničové chromatografie	14
2.4 Izolace DNA pomocí silikátových kolonek	14
2.5 Izolace DNA pomocí magnetických kuliček	14
3. Metody amplifikace DNA	15
3.1 Polymerázová řetězová reakce	15
3.1.1 Princip metody	15
3.1.2 Kvantitativní real-time PCR	16
3.1.3 Hot-start PCR	17
3.1.4 Multiplexní real-time PCR	17
3.1.5 Nested PCR	17
3.2 Ligázová řetězová reakce	18
3.3 Izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou	18
4. Elektroforéza nukleových kyselin	19
4.1 Gelová elektroforéza	19
4.2 Pulzní gelová elektroforéza	20
4.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza	20
4.4 Kapilární elektroforéza	21
5. Sekvenování DNA	22
5.1 Maxam-Gilbertova metoda	22
5.2 Sangerova metoda	22
5.3 Automatické sekvenování DNA	23
5.4 Sekvenování nové generace	23
6. Cíl práce	25
7. Metodika	26
7.1 Odběr vzorků	26
7.2 Izolace DNA	26
7.2.1 Lýza vzorku	27

7.2.2	Přidání ethanolu a navázání DNA	27
7.2.3	Promývací krok.....	28
7.2.4	Eluční krok.....	28
7.3	Koncentrace DNA získané z bukálních stěrů.....	29
7.4	Měření čistoty DNA	30
7.5	Elektroforéza izolované DNA z bukálních stěrů	30
7.5.1	Pracovní postup přípravy vzorků pro elektroforézu DNA.....	31
7.6	Polymerázová řetězová reakce	32
7.6.1	Pracovní postup přípravy vzorků pro PCR reakci	33
7.7	Enzymatické přečištění PCR produktů	34
7.8	Příprava na sekvenaci.....	35
8.	Výsledky	36
8.1	Izolace DNA, změřená koncentrace a absorbance	36
8.2	Výsledky koncentrace DNA	37
8.3	Výsledky absorbance DNA.....	43
8.3.1	Čistota vzorků skladovaných v laboratorní teplotě.....	49
8.3.2	Čistota vzorků skladovaných chladničkové teplotě.....	50
8.4	Výsledky elektroforézy v gelu po izolaci DNA.....	50
8.5	Výsledky elektroforézy v gelu po proběhlé PCR reakci.....	52
8.6	Výsledky sekvenování izolované DNA	53
9.	Diskuze.....	56
10.	Závěr.....	60
11.	Seznam použitých zdrojů.....	61
12.	Seznam obrázků a tabulek.....	66
13.	Seznam zkratk.....	68

Úvod

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. 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, 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).

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

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).

1.1 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, eventuálně rodné číslo, pohlaví a datum narození, pokud to není zřejmé z čísla pojištěnce, číslo pojišťovny, kód pacientovy diagnózy a účel vyšetření. (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) a popřípadě, kdy byl materiál odebrán. Pokud náleží k jedné žadance více vzorků, které jsou v identických nádobkách, je potřeba také označení, o jaký materiál se jedná. (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).

1.2 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 se řadí vzorky nesrážlivé žilní krve ve standardních odběrových zkumavkách nebo ve formě krevních skvrn vsáknutých do vrstvy vhodného nosiče. Běžně se používají také sternální punktáty, zejména pro DNA

diagnostiku v onkohematologii, bioptické vzorky příslušné tkáně (nejčastěji jaterní, plicní nebo střevní), chirurgické resekáty pro vyšetření DNA v onkologii anebo 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).

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 thyminem a třemi vodíkovými vazbami mezi bázemi cytosinem a guaninem (Kočárek, 2008).

Izolace DNA je proces extrakce DNA, který se používá k jejímu čištění pomocí chemických nebo fyzikálních metod z biologického vzorku. Je jedním z nejdůležitějších nástrojů v molekulární biologii. Tyto procesy oddělují DNA od proteinu, buněčných membrán a dalších buněčných složek (Žurovec et al., 1999).

Metod izolace DNA je velké množství. Liší se 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).

Metody extrakce musí být upraveny tak, aby mohly účinně purifikovat DNA z různých zdrojů. Jsou tedy závislé na zdroji a stáří vzorku. Dalším 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).

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).

Izolovaná DNA může být použita pro širokou škálu následných metod, jako je polymerázová řetězová reakce, kvantitativní PCR, Southern blotting, náhodná amplifikace polymorfni DNA, sekvenování DNA, přípravu pro genomové knihovny a mnoho dalších. V oblasti medicíny mohou tyto metody sloužit jako základ pro diagnostiku genetických onemocnění, prediktivní genetické testování pro hodnocení rizik

rozvinutí nemoci později v životě, použití cíleného screeningu a strategií časně prevence, genovou terapii, farmakogenomiku pro predikci účinnosti léků nebo nežádoucích reakcí na léky (Shetty a Dairawan, 2020).

2.1 Izolace DNA metodou vysolování

Metoda vysolování je netoxická metoda extrakce DNA. Tradiční postup zahrnuje počáteční rozrušení buněk a štěpení pomocí SDS-proteinázy K. Směs se inkubuje přes noc při 55–65 °C. Následně se přidá vysoká koncentrace solí, obvykle nasyceného chloridu sodného. Směs se poté odstředí, vysoká koncentrace soli snižuje rozpustnost proteinu, což vede k jeho vysrážení, a se supernatantem obsahujícím DNA se přenese do nové lahvičky. DNA je poté možné vysrážet za použití ethanolu nebo isopropanolu (Shetty a Dairawan, 2020).

2.2 Izolace DNA organickou extrakcí a enzymatickým 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. Pokud se opatrně smíchá buněčný extrakt s rozpouštědlem a vrstvy se následně oddělí centrifugací, sražené proteinové molekuly se ve formě bílé koagulované sraženiny objeví na rozhraní mezi vodou a organickou vrstvou. Vodný roztok nukleových kyselin se potom může 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 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).

2.3 Izolace DNA pomocí iontoměničové chromatografie

Jde o metodu využívající rozdílů v elektrickém náboji. 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 je možné různé typy molekul z pryskyřice uvolnit jednu po druhé (Brown, 2007).

2.4 Izolace DNA pomocí silikátových kolonek

Při této technice extrakce je DNA navázána na kolonku se silikagelovou membránou v přítomnosti vysokých koncentrací chaotropních iontů. Pro zajištění specifických podmínek pro navázání DNA na membránu je do lyzátu přidáván ethanol. Postupným promýváním různými pufrů jsou odstraněny nečistoty. Následně je čistá DNA získávána ze silikagelové membrány pomocí elučního pufru. Tato metoda purifikace je rychlá, netoxická a je díky ní možné získat vysoké výtěžky čisté DNA. Hlavní výhodou této techniky je, že dokáže izolovat DNA z jakéhokoli biologického vzorku a tkáně (Chacon-Cortes a Griffiths, 2014).

2.5 Izolace DNA pomocí magnetických kuliček

Magnetizovatelné mikročástice a nanočástice nacházejí uplatnění v široké škále biomedicínských a biotechnologických oborů. Díky svým paramagnetickým nebo superparamagnetickým vlastnostem reagují částice na vnější magnetické pole, čehož se využívá pro separaci specifických látek z roztoku. V závislosti na změně vnějšího magnetického pole lze částice a na ně navázané molekuly snadno nahromadit nebo rozptýlit v roztoku (Vlčnovská et al., 2012).

Pro izolaci DNA se využívají částice s funkčním povrchem na základě silanolových skupin, samotná magnetická separace je založena na elektrostatické interakci DNA s povrchem částic. Tato separace je jednoduchá a velmi účinná. Celá magnetická separace se skládá celkem ze čtyř kroků: promývání, imobilizace, promývání a eluce (Vlčnovská et al., 2012).

3. Metody amplifikace DNA

3.1 Polymerázová řetězová reakce

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. 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. V PCR reakci je přítomno dostatečné množství deoxyribonukleotidtrifosfátů, aby bylo dostatek substrátu pro syntézu nových vláken. 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 denaturaci (Bartůňková et al., 2011).

Po dokončení syntézy obou vláken je zkumavka s PCR reakcí opět zahřáta na 95 °C, aby došlo k denaturaci nově vytvořených DNA duplexů a celý cyklus začíná znovu. Opakování těchto cyklů denaturace 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 kb (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.

3.1.2 Kvantitativní real-time PCR

Jedním z nedostatků základního 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 relevantní 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 denuraci 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 zařazuje 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 je uvolněno do roztoku, schopnost fluorescence se obnoví. V průběhu

PCR 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). Uvnitř těchto termocyklerů je vzorek ozářen excitačním 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 (Kočárek, 2007).

3.1.3 Hot-start PCR

U hot-start PCR je zvyšována specifita reakce tím, že se využívá speciálně upravená polymeráza, která pro svou aktivitu vyžaduje aktivační teplotu. Jedná se o teplotu okolo 95 °C. Enzym se aktivuje až při denaturační teplotě. Odpadá tedy riziko vzniku PCR produktu z nespecificky nasednutých primerů při nízkých teplotách v průběhu přípravy reakce (LabGuide, 2023).

3.1.4 Multiplexní real-time PCR

Během multiplexní real-time PCR je amplifikováno několik odlišných úseků DNA současně. Používá se několik párů primerů s odlišnou specifitou. Smyslem je současná detekce několika úseků nukleových kyselin, například současná detekce více druhů mikroorganismů, společná detekce cílového genu apod. Tato forma PCR šetří čas a náklady na analýzu. Detekce je možná využitím oligonukleotidových sond příslušných konkrétní amplifikované oblasti, přičemž každá příslušná sonda je označena jiným fluoroforem a fluorofory se vzájemně liší emisními spektry (Nezbeda, 2018).

3.1.5 Nested PCR

Nested PCR je modifikace PCR, která byla navržena tak, aby zlepšila citlivost a specifitu. Umožňuje amplifikaci velmi malého množství DNA. Je založena na použití dvou sad primerů a dvou po sobě jdoucích polymerázových reakcí. Během první reakce dochází k amplifikaci vybraného úseku vyšetřované DNA. Poté následuje další PCR „nested reaction“, kde je templátem pro syntézu DNA produkt předcházející reakce. Pro první reakci se používají dva oligonukleotidy, které vymezí první amplifikovaný úsek. Ve druhé reakci se využívají nové dva oligonukleotidy, které hybridizují s úseky vzniklými při první PCR reakci (Carr et al., 2010).

3.2 Ligázová řetězová reakce

LCR neboli Ligase chain reaction se hlavně používá v diagnostice infekčních onemocnění. V klinické genetice je vhodná pro detekci fixních mutací. Je to amplifikační metoda určená především pro automatizaci. Může se kombinovat s PCR či jinými metodami (Křemen et al., 1998).

Během LCR se na rozdíl od PCR používají dva páry syntetických oligonukleotidových primerů. Každý pár vymezuje na jednom z komplementárních řetězců analyzované DNA příslušnou cílovou oblast. Vzdálenost mezi primery bývá pouze několik nukleotidů dlouhá, což urychluje amplifikaci. Reakční systém obsahuje termostabilní DNA-polymerázu a termostabilní DNA-ligázu. Jeden cyklus LCR se skládá ze čtyř dílčích reakcí, které se jako u PCR mnohonásobně opakují. Amplifikovaný úsek DNA lze detekovat například na základě elektroforetické pohyblivosti nebo pomocí značené sondy (Křemen et al., 1998).

3.3 Izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou

LAMP neboli Loop-mediated isothermal amplification je metoda, která amplifikuje DNA s vysokou specifitou, účinností a rychlostí za izotermických podmínek. V principu metody LAMP jde o amplifikaci kontinuální, a to při stálé teplotě kolem 60-65 °C. Využívá DNA-polymerázu a sadu čtyř speciálně navržených primerů, které rozpoznávají celkem šest odlišných sekvencí na cílové DNA. Správný návrh primeru je pro provedení amplifikace rozhodující (Notomi et al., 2000).

V průběhu vlastní reakce LAMP jsou specifické sekvence nukleových kyselin amplifikovány při fixní teplotě, a to při opakování dvou typů elongačních reakcí, během kterých dochází k prodloužení templátového vlákna v oblastech takzvané kmenové "smyčky". K reakci jsou využívány dvojice vnitřních a vnějších primerů, přičemž každý z vnitřních primerů obsahuje genovou sekvenci, která je komplementární k jednomu řetězci amplifikační oblasti na 3'-konci. Tato sekvence je identická s vnitřní oblastí stejného řetězce na 5'-konci templátového vlákna (Šviráková et al., 2017).

Především na základě charakteristik vnitřního primeru dochází k amplifikaci s daleko vyšší specifitou, než jaká je typická pro jiné metody. Proces amplifikace je obvykle dokončen do jedné hodiny. Návrh specifických loop-primerů může dobu amplifikace zkrátit (Šviráková et al., 2017).

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 rychleji 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).

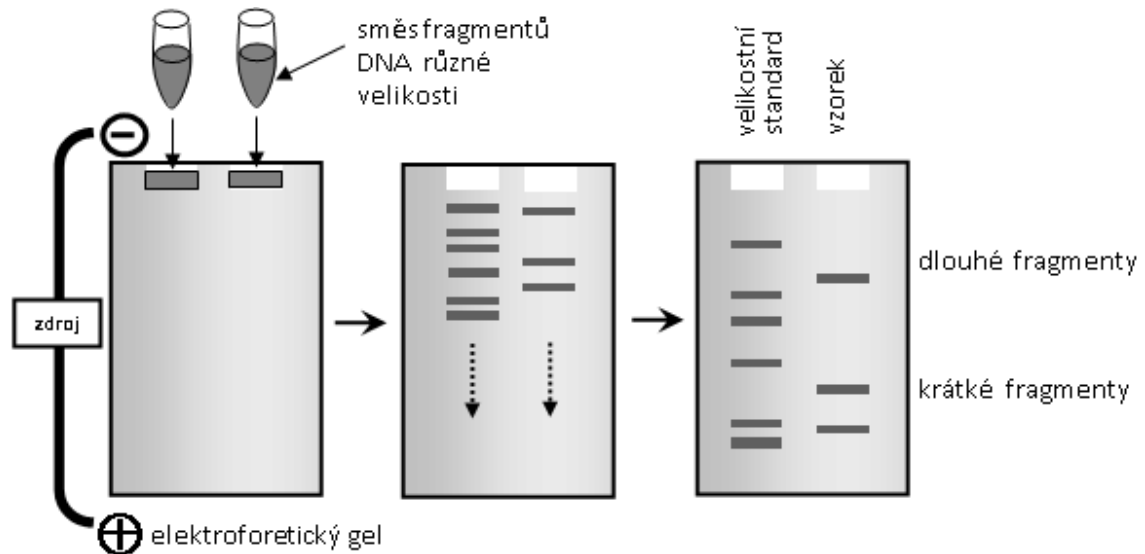
Elektroforéza má v molekulární biologii mnohostranné využití. Má význam při ověření kvality vzorku DNA, v přímé a nepřímé diagnostice různých mutací, kdy je potřeba identifikovat různě dlouhé fragmenty DNA. Využívá se také při izolaci úseků DNA vzniklých polymerázovou řetězovou reakcí a při sekvenování 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, 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 viditelná 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 nedenaturovaném 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 vnitřních průměrů kapilár je to, že generuje minimální množství tepla, které vzniká průchodem elektrického proudu elektrolytem. Díky tomu lze použít kapalné elektrolyty spolu s vysokými hodnotami elektrického pole při analýze. Z důvodu vysokých hodnot elektrického pole dochází ke zkracování 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. (Brown, 2007).

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).

Z důvodu toxicity chemikálií používaných u metody chemické degradace, které představují pro pracovníky zdravotní riziko, se od této metody již upustilo. Metoda terminace řetězců neboli Sangerovo sekvenování se dosud běžně používá. V současné době je stále více využívána metoda sekvenování druhé generace (Brown, 2007).

5.1 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 jednořetězcové 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).

5.2 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).

Během Sangerovy metody je opakovaně syntetizován nový řetězec DNA podle stejného templátu, ale při každém opakování dochází k přerušení syntézy nového řetězce tím, že

se do něj náhodně přiřadí modifikovaná nukleotidová báze (dideoxynukleotid), která nedovolí DNA polymeráze pokračovat v syntéze nově vznikajícího vlákna (Kolísko, 2017).

Při Sangerově sekvenování na sobě každá modifikovaná báze nese specifickou fluorescenční barvu, pomocí které lze poznat, o jakou bázi jde. Náhodným přerušováním syntézy nově vznikajícího komplementárního řetězce DNA vznikají různě dlouhé molekuly. Na konci molekuly se nachází fluorescenčně označený dideoxynukleotid. Pomocí jejich odlišného fluorescenčního značení se přečte výsledná sekvence, tedy pořadí bází (Kolísko, 2017).

5.3 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, z nichž každá je určená pro detekci produktů zakončených specifickou bází (Bártová, 2011).

K následnému stanovení sekvence DNA se využívá genetický analyzátor nazývaný 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).

5.4 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. 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 (stovky 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).

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. 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

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:

- Mikropipeta
- 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 Proteinázy K. Zároveň nastavit blokový termostat na 70 °C a vložit Elution Buffer BL4 do termostatu, aby byl připraven k použití, tedy předeřhřátý 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 fosfátového pufru (PBS), 200 µl Buffer BL1 a 25µl Proteinázy 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*

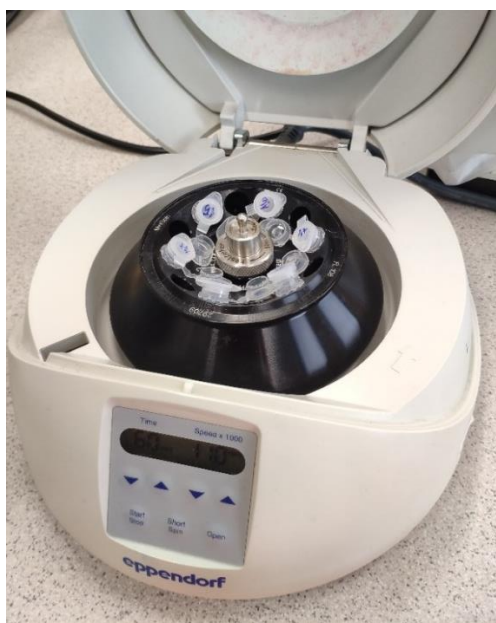
Do vzorku jsem přidala 210 µl 96–100 % ethanolu. Znovu jsem řádně promíchala na vortexu a krátce stočila (maximálně 3000 otáček za minutu, 5 s).

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. Pokud bych zaznamenala, že by procházel přes kolonku špatně, centrifugaci bych 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 μ l Buffer BL2 a vzorek jsem centrifugovala 1 minutu při 11 000 otáčkách za minutu (obrázek 2). 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 μ l Buffer BL3. Roztok jsem poté centrifugovala 2 minuty při 11 000 otáčkách za minutu. Sběrnou zkumavku s filtrátem jsem odstranila a kolonku vložila do nové označené 1,5 ml zkumavky.



Obrázek 2: Centrifuga, ve které jsem centrifugovala vzorky

(Zdroj: vlastní)

7.2.4 *Eluční krok*

Po promývání jsem přímo na střed kolonky napipetovala 100 μ l předeřátého 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 kolonku a čistá genomová DNA byla připravena pro další použití.

7.3 Koncentrace DNA získané z bukálních stěrů

Pro následnou práci s vyizolovanou 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 bází v ultrafialové oblasti spektra. Absorpční maximum mají při vlnové délce 260 nm (Křemen et al., 1998).

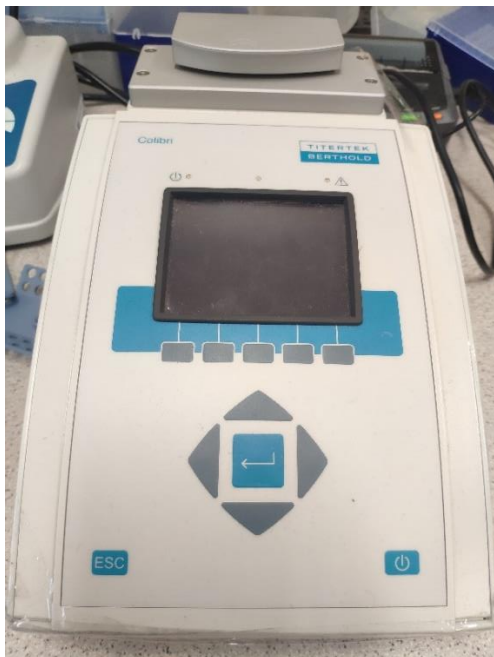
U všech vzorků, které jsem odebrala a izolovala, jsem následně změřila na spektrofotometru Colibri Microvolume Spectrophotometer hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm, a také jejich koncentrace a poměry mezi absorbancemi 260/280 nm a 260/230 nm.

Pomůcky:

- Buffer BL4
- Špičky
- Mikropipeta

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 (Navrátil et al., 2004):

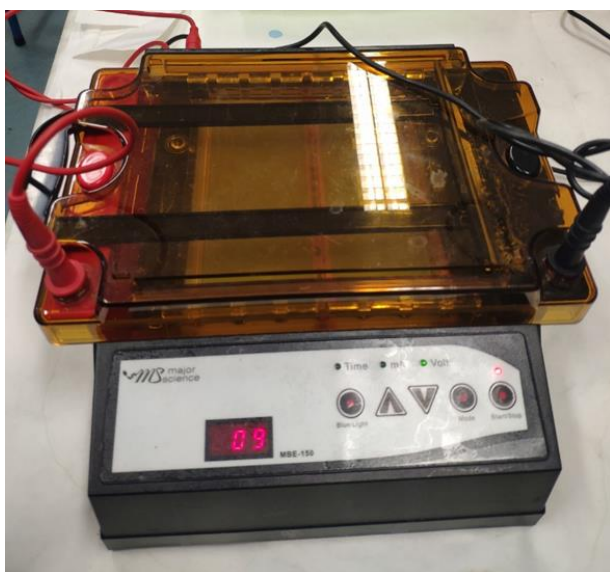
$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) \{1,7; 1,8\} = \text{čistá DNA}$

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

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

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:

- Mikropipeta
- 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 pufr. Elektrodotový 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 napětí 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 (tabulka 1). Byly syntetizovány na zakázku firmou GENERI BIOTECH. Pro analýzu byl vybrán exon 11 genu ALAS2 (obrázek 5), který obsahoval 289 páru bází. Celkový produkt obsahoval 448 bází.

Gen ALAS2

```
atttggagatctagctcaaccatttttccctccccctcccctaccaccttcaggaagctgctgctggctggactgcgctggggctgcccctcaggatgtgtctgtgctgcaatttctgcctt
cctgtacactttgagctcatgagtgagtggaacgttctacttcgggaacatggggcccgatgtcaccacctatgcctgagaagccagctgctaggattcacacccacctgcctcacttgggtcc
aggcctactcctgtcttctgcttgggtgctccttagctgaattgagcctaaaataaagcacaacccacagcattggaagcctttattggacaggggaacagacaagtgcttctgactccctagacaa
gtggcagatctatgaggttaaccataggtcactgttggctaccatt
```

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

(Zdroj: vlastní)

Tabulka 1: Sekvence navržených primerů

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 mikrozkuhavky

Reagencie:

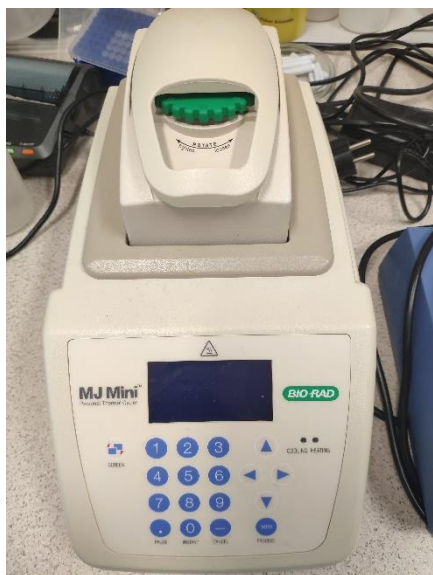
- DNA
- Forward primer, Reverse primer
- Master Mix
- PCR voda

7.6.1 Pracovní postup přípravy vzorků pro PCR reakci

Potřebné reagentie jsem si vyndala z mrazničky a nechala rozmraznout v pokojové teplotě. Po rozmrazení reagentií jsem je krátce zvortexovala a zcentrifugovala. Dále jsem se vzorky pracovala v laminárním boxu, aby nedošlo k jejich kontaminaci a znečištění. Do každé mikrozkušavky jsem napipetovala příslušné množství DNA a k té jsem přidala 7,5 μ l Master Mixu. Poté jsem přidala primery: 1,5 μ l forward primeru a 1,5 μ l reverse primeru, oba o koncentraci 10 pmol/ μ l. Následně jsem přidáním příslušného množství vody doplnila množství roztoku v každé mikrozkušavce na 15 μ l.

Poté jsem mikrozkušavky krátce zvortexovala a stočila. Následně jsem je vložila do termocykleru (obrázek 6) 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	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 přečištění PCR produktů

Produkty PCR je potřeba přecistit a zbavit je tak veškerých příměsí, aby nedošlo k poklesu až ztrátě signálu během sekvenování. Mezi příměsi, které je důležité odstranit patří inhibitory obsažené v původních biologických materiálech, které nebyly při izolaci DNA odstraněny a také inhibitory, které se k DNA dostanou během izolace nebo pročišťování, tedy zbytky vazebných nebo promývacích pufrů (různé soli, detergenty, alkoholy) (SEQme s.r.o., 2012-2023).

Pomůcky:

- Mikropipeta
- 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 mikrozkuvek o objemu 0,2 ml napipetovala 5 µl PCR produktu, 0,5 µl enzymu EXO I a 1 µl enzymu rSAP. Následně jsem celý obsah znovu promíchala a krátce stočila na centrifuze. Takto připravené vzorky jsem vložila do termocykleru, na kterém jsem zvolila příslušný program pro inkubaci vzorků a inaktivaci enzymů (tabulka 4).

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:

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

Reagencie:

- PCR voda
- Přečištěný PCR produkt
- Forward primer
- Reverse primer

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 vlepila do vlastního sešitu s poznámkami. Do takto připravených mikrozkušavek jsem napipetovala 5 µl primeru. Do jedné zkumavky forward primer a do druhé reverse primer. Poté jsem přidala 1,5 µl přečištěného PCR produktu a následně jsem do mikrozkušavek doplnila PCR vodu, která vyplnila celkový objem na 10 µl.

Takto připravené mikrozkušavky jsem odeslala firmě GenSeq s.r.o. Tato firma má instalované sběrné boxy, které jsou určeny pro zasílání vzorků na sekvenování. Jeden z těchto boxů se nachází na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity, kam jsem vzorky vložila a nechala vzorky osekvenovat.

8. Výsledky

Celkem jsem analyzovala 42 vzorků odebraných z bukální sliznice. Odebírala jsem sedmkrát šest vzorků. Šest vzorků odebraných ve stejný čas bylo skladováno po stejné časové období. Tři z těchto vzorků byly skladovány v laboratorní teplotě (20-25 °C) a zbylé tři v chladničkové teplotě (4-8 °C) 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. Následovala polymerázová řetězová reakce, po které jsem provedla elektroforézu PCR produktů. 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 vypočítala průměr.

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

poměr absorbancí 260/230 odpovídá čistotě DNA, pokud je výsledek 2,0 až 2,2 (Navrátil et al., 2004).

8.2 Výsledky koncentrace DNA

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
1	113,25	111,42
	109,59	
2	95,79	96,54
	97,28	
3	51,90	48,54
	45,18	
Celkový průměr		85,50

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
4	17,62	21,77
	25,91	
5	33,34	33,58
	33,81	
6	48,21	49,03
	49,85	
Celkový průměr		34,79

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
7	4,34	4,16
	3,98	
8	17,97	17,90
	17,83	
9	9,86	9,58
	9,30	
Celkový průměr		10,55

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
10	31,02	30,77
	30,52	
11	22,23	25,48
	28,72	
12	30,67	30,76
	30,85	
Celkový průměr		87,01

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
13	5,64	5,66
	5,68	
14	6,86	6,49
	6,11	
15	4,45	4,59
	4,73	
Celkový průměr		5,58

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
16	81,71	81,67
	81,62	
17	91,04	91,67
	92,29	
18	35,02	41,67
	48,32	
Celkový průměr		71,67

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
19	14,24	13,07
	11,89	
20	7,39	7,65
	7,91	
21	7,39	7,55
	7,71	
Celkový průměr		9,42

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
22	138,72	138,07
	137,42	
23	164,13	166,02
	167,91	
24	144,20	133,61
	123,02	
Celkový průměr		145,90

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
25	5,53	6,75
	7,96	
26	6,94	6,94
	6,94	
27	6,88	7,07
	7,26	
Celkový průměr		6,92

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
28	162,87	162,45
	162,03	
29	180,86	180,64
	180,41	
30	112,66	112,42
	112,17	
Celkový průměr		151,83

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
31	100,94	100,42
	99,89	
32	13,09	13,19
	13,28	
33	9,68	9,84
	10,00	
Celkový průměr		41,15

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
34	32,01	32,19
	32,36	
35	27,80	27,86
	27,92	
36	14,64	14,32
	14,00	
Celkový průměr		24,79

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
37	30,17	30,40
	30,62	
38	24,52	24,17
	23,82	
39	31,00	31,41
	31,81	
Celkový průměr		28,66

Zdroj: vlastní

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

Č. vzorku	Koncentrace (ng/μl)	Průměr 1. a 2. měření (ng/μl)
40	152,74	153,15
	153,56	
41	186,42	186,49
	186,55	
42	84,82	84,95
	85,08	
Celkový průměr		141,53

Zdroj: vlastní

Ve výše uvedených tabulkách jsou zaznamenány naměřené hodnoty koncentrace DNA. Jelikož jsem měření jednoho vzorku provedla dvakrát, nachází se zde i průměry prvního a druhého měření. Vzorky jsou do tabulek rozřazeny podle podmínek a délky skladování (tabulka 6 až 19).

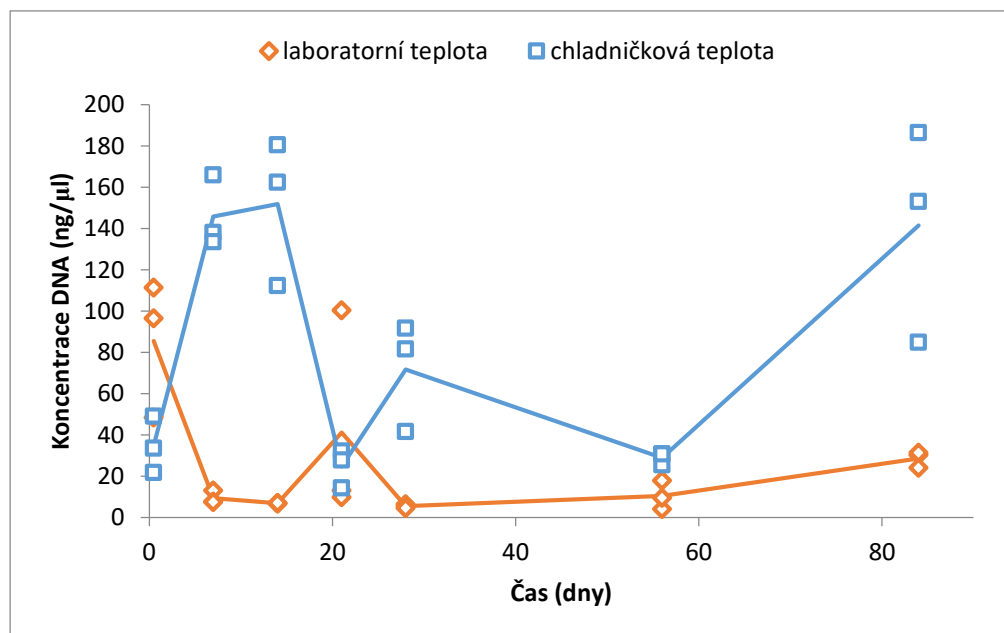
Z naměřených hodnot jsem zjistila, že celkový průměr všech změřených koncentrací DNA je 56,23 ng/μl. Medián, který udává střední hodnotu, je 30,77 ng/μl. Směrodatná odchylka je 56,75 ng/μl.

Na grafu níže jsou znázorněny všechny naměřené koncentrace DNA. V grafu jsou modře zaznamenány vzorky skladované v chladničkové teplotě a oranžově ty které byly skladovány v laboratorní teplotě.

Jedná se vždy o šest vzorků skladovaných po stejnou časovou dobu. Z těchto šesti vzorků byly tři skladovány v laboratorní teplotě (oranžově) a tři v chladničkové teplotě (modře). Minimální naměřená hodnota je 4,16 ng/μl u vzorku číslo 7, který byl skladován dva

měsíce v laboratorní teplotě. Maximální naměřená hodnota je 186,49 ng/μl a byla naměřena u vzorku číslo 41, který byl skladován tři měsíce v chladničkové teplotě (obrázek 7).

Z tohoto grafu vyplívá, že větší část vzorků skladovaných v chladničkové teplotě má vyšší koncentraci DNA než vzorky skladované v laboratorní teplotě. Také je zde možné pozorovat, že DNA se mění nezávisle na délce skladování. Například vzorek číslo 5 (skladován v chladničkové teplotě několik hodin) má nižší koncentraci DNA než vzorek číslo 41 (skladován v chladničkové teplotě, tři měsíce). Z toho je možné usuzovat, že koncentrace DNA, která je skladována v chladu, je ve své koncentraci stabilnější, než DNA skladovaná v laboratorní teplotě. Koncentrace DNA tedy závisí na podmínkách skladování (obrázek 7).



Obrázek 7: Znáznornění rozdílné koncentrace DNA v závislosti na podmínkách jejího skladování (Zdroj: vlastní)

8.3 Výsledky absorpance DNA

Tabulka 20: Absorbance vzorků skladovaných několik hodin v laboratorní teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
1	2,27	1,19	1,90	1,90	2,04	2,06
	2,19	1,15	1,90		2,07	
2	1,92	0,97	1,97	1,95	2,22	2,22
	1,95	1,01	1,93		2,22	
3	1,04	0,65	1,61	1,90	1,92	4,17
	0,90	0,42	2,18		6,41	

Zdroj: vlastní

Tabulka 21: Absorbance vzorků skladovaných několik hodin v chladničkové teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
4	0,35	0,13	2,74	2,30	8,02	4,96
	0,52	0,28	1,86		1,89	
5	0,67	0,35	1,89	1,87	1,86	1,89
	0,68	0,37	1,84		1,92	
6	0,96	0,52	1,87	1,86	2,21	2,20
	1,00	0,54	1,84		2,18	

Zdroj: vlastní

Tabulka 22: Absorbance vzorků skladovaných 2 měsíce v laboratorní teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
7	0,09	0,06	1,45	1,41	0,47	0,47
	0,08	0,06	1,37		0,46	
8	0,36	0,23	1,56	1,56	0,49	0,49
	0,36	0,23	1,55		0,49	
9	0,20	0,15	1,34	1,33	0,30	0,30
	0,19	0,14	1,31		0,30	

Zdroj: vlastní

Tabulka 23: Absorbance vzorků skladovaných 2 měsíce v chladničkové teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
10	0,62	0,46	1,36	1,59	1,23	1,28
	0,61	0,34	1,82		1,33	
11	0,44	0,32	1,38	1,63	1,84	1,72
	0,57	0,31	1,87		1,59	
12	0,61	0,33	1,83	1,85	1,45	1,45
	0,62	0,33	1,86		1,44	

Zdroj: vlastní

Tabulka 24: Absorbance vzorků skladovaných 1 měsíc v laboratorní teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
13	0,11	0,09	1,33	1,40	0,50	0,50
	0,11	0,08	1,46		0,50	
14	0,14	0,10	1,44	1,41	0,57	0,57
	0,12	0,09	1,37		0,56	
15	0,09	0,07	1,27	1,31	0,49	0,48
	0,09	0,07	1,35		0,46	

Zdroj: vlastní

Tabulka 25: Absorbance vzorků skladovaných 1 měsíc v chladničkové teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
16	1,63	0,88	1,89	1,87	1,91	1,90
	1,63	0,89	1,84		1,89	
17	1,82	0,99	1,84	1,84	2,02	2,02
	1,85	1,00	1,84		2,02	
18	0,70	0,46	1,52	1,65	1,93	1,84
	0,97	0,54	1,78		1,75	

Zdroj: vlastní

Tabulka 26: Absorbance vzorků skladovaných 1 týden v laboratorní teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
19	0,28	0,17	1,68	1,34	0,82	1,35
	0,24	0,24	0,99		1,88	
20	0,15	0,10	1,41	1,10	0,48	0,74
	0,16	0,20	0,79		1,00	
21	0,15	0,09	1,65	1,64	0,76	0,75
	0,15	0,10	1,62		0,74	

Zdroj: vlastní

Tabulka 27: Absorbance vzorků skladovaných 1 týden v chladničkové teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
22	2,77	1,50	1,85	1,86	2,15	2,15
	2,75	1,48	1,86		2,15	
23	3,28	1,76	1,89	1,88	2,22	2,22
	3,36	1,80	1,87		2,21	
24	2,88	1,57	1,84	1,80	2,13	2,32
	2,46	1,41	1,75		2,50	

Zdroj: vlastní

Tabulka 28: Absorbance vzorků skladovaných 2 týdny v laboratorní teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
25	0,11	1,04	0,11	1,04	0,09	0,26
	0,16	0,08	1,97		0,42	
26	0,14	0,09	1,63	1,60	0,33	0,34
	0,14	0,09	1,57		0,35	
27	0,14	0,07	1,92	1,91	0,45	0,46
	0,15	0,08	1,90		0,46	

Zdroj: vlastní

Tabulka 29: Absorbance vzorků skladovaných 2 týdny v chladničkové teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
28	3,26	1,73	1,89	1,89	2,28	2,30
	3,24	1,73	1,88		2,31	
29	3,62	1,92	1,89	1,89	2,16	2,17
	3,61	1,92	1,88		2,17	
30	2,25	1,19	1,89	1,89	2,34	2,35
	2,24	1,18	1,89		2,35	

Zdroj: vlastní

Tabulka 30: Absorbance vzorků skladovaných 3 týdny v laboratorní teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
31	2,02	1,09	1,86	1,85	1,47	1,49
	2,00	1,08	1,84		1,50	
32	0,26	0,16	1,61	1,57	0,55	0,55
	0,27	0,18	1,52		0,55	
33	0,19	0,11	1,83	1,81	0,73	0,74
	0,20	0,11	1,78		0,75	

Zdroj: vlastní

Tabulka 31: Absorbance vzorků skladovaných 3 týdny v chladničkové teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
34	0,64	0,33	1,92	1,93	1,77	1,74
	0,65	0,33	1,94		1,71	
35	0,56	0,28	1,96	1,94	1,90	1,92
	0,56	0,29	1,91		1,93	
36	0,29	0,15	1,97	1,71	1,68	1,46
	0,28	0,19	1,44		1,24	

Zdroj: vlastní

Tabulka 32: Absorbance vzorků skladovaných 3 měsíce v laboratorní teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
37	0,60	0,35	1,75	1,75	1,03	1,02
	0,61	0,35	1,75		1,01	
38	0,49	0,32	1,53	1,55	0,71	0,71
	0,48	0,31	1,56		0,71	
39	0,62	0,39	1,59	1,60	0,73	0,74
	0,64	0,40	1,60		0,75	

Zdroj: vlastní

Tabulka 33: Absorbance vzorků skladovaných 3 měsíce v chladničkové teplotě

Č. vzorku	A 260	A 280	Poměr 260/280	Průměr poměru 260/280	Poměr 260/230	Průměr poměru 260/230
40	3,05	1,64	1,87	1,87	2,08	2,07
	3,07	1,65	1,87		2,06	
41	3,73	1,99	1,87	1,87	1,98	1,98
	3,73	2,00	1,86		1,97	
42	1,70	0,94	1,80	1,80	1,57	1,58
	1,70	0,95	1,80		1,59	

Zdroj: vlastní

Hodnoty absorbancí vzorků jsou zaznamenány v tabulkách výše (tabulka 20 až 33). Modře, oranžově a žlutě je vyznačena znečištěná DNA (podrobněji vysvětleno v tabulkách 34 a 35).

Tabulka 34: Hodnocení poměru absorbancí 260/280

Poměr 260/280	1,7 až 1,9	Čistá DNA
Poměr 260/280	<1,7	DNA je znečištěná proteiny
Poměr 260/280	>1,9	DNA je znečištěná RNA

Zdroj: vlastní

Tabulka 35: Hodnocení poměru absorbancí 260/230

Poměr 260/230	$\geq 2,0$	Čistá DNA
Poměr 260/230	<2,0	Kontaminace DNA látkami, které jsou součástí izolačních souprav

Zdroj: vlastní

Z výsledků poměru absorbancí jsem následně vypracovala tabulky, ze kterých je možné pozorovat procentuální zastoupení čisté a znečištěné DNA. Znečištěná DNA je rozdělena na DNA znečištěnou proteiny, RNA nebo látkami, které jsou součástí izolačních souprav.

Podle poměru A 260/280 bylo izolováno 48 % čisté DNA, 40 % bylo znečištěno proteiny a 12 % bylo znečištěno RNA. Poměr A 260/230 ukázal, že z 31 % se jednalo o čistou DNA a 69 % bylo znečištěno látkami, které jsou součástí izolačních souprav (tabulka 36 a 37).

Celkově bylo izolováno 26 % čisté DNA a 74 % znečištěné DNA minimálně jednou z výše uvedených možností.

Tabulka 36: Množství čisté a znečištěné DNA podle poměru absorbancí 260/280

Čistota DNA	Poměr 260/280	Četnost	Procenta
Čistá DNA	1,7 až 1,9	20	48 %
DNA znečištěná proteiny	<1,7	17	40 %
DNA znečištěná RNA	>1,9	5	12 %
Celkem		42	100 %

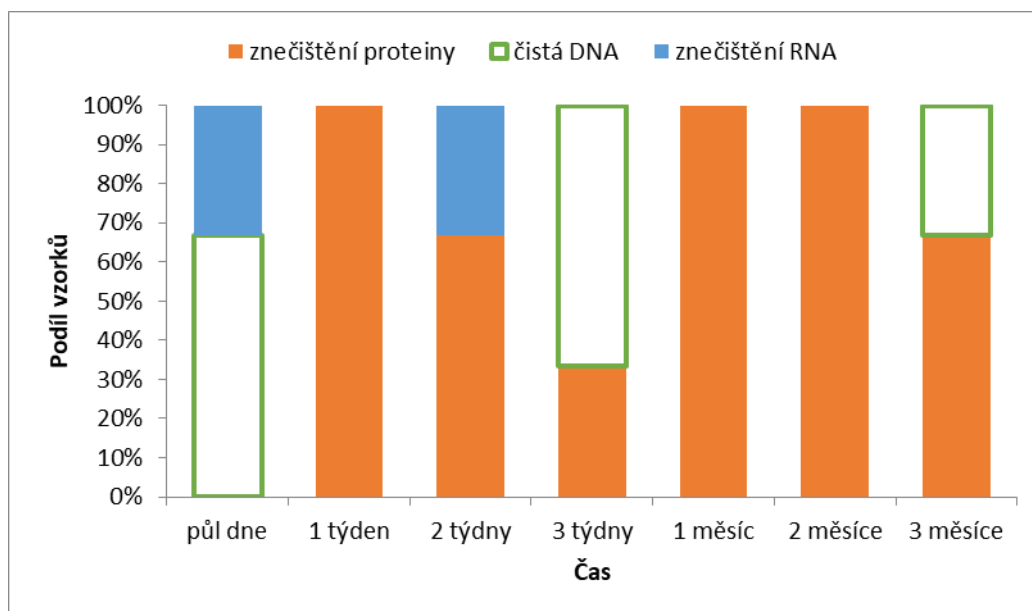
Zdroj: vlastní

Tabulka 37: Množství čisté a znečištěné DNA podle poměru absorbancí 260/230

Čistota DNA	Poměr 260/230	Četnost	Procenta
Čistá DNA	$\geq 2,0$	13	31 %
Kontaminace DNA látkami, které jsou součástí izolačních souprav	< 2,0	29	69 %
Celkem		42	100 %

Zdroj: vlastní

8.3.1 Čistota vzorků skladovaných v laboratorní teplotě



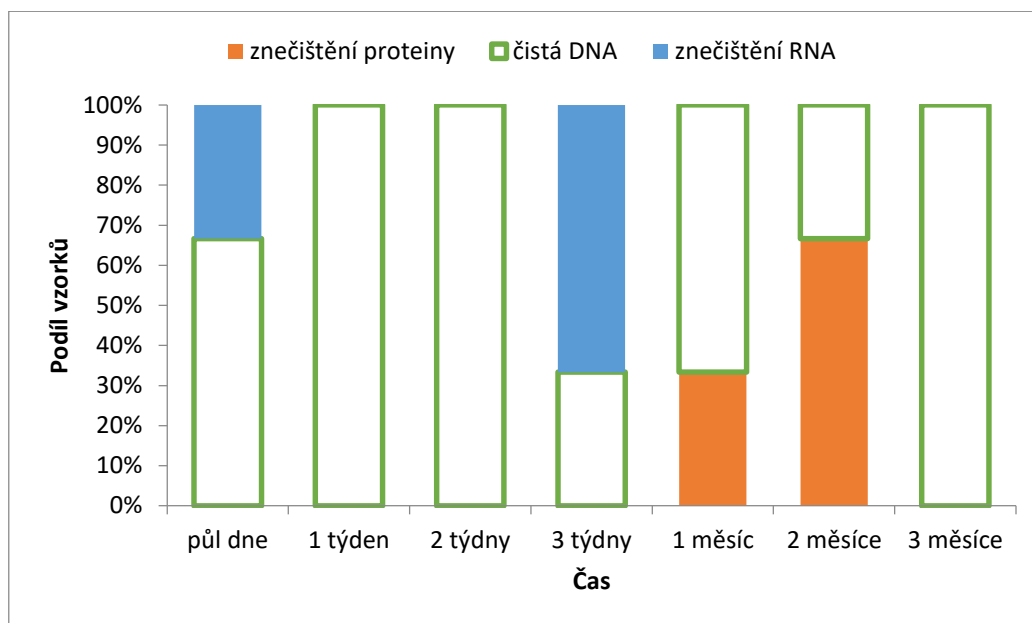
Obrázek 8: Znázornění čistoty DNA skladované v laboratorní teplotě (hodnocení poměru absorbancí 260/280)

(Zdroj: vlastní)

Na výše uvedeném grafu je znázorněno procentuální zastoupení čisté a znečištěné DNA. Je možné pozorovat, že většina izolované DNA skladované v laboratorní teplotě je znečištěna (obrázek 8). Dále můžeme vidět, že DNA skladovaná v laboratorní teplotě je především znečištěna proteiny, a to také můžeme pozorovat u vzorků, které mají nízkou koncentraci DNA.

Nejméně znečištěná je DNA skladovaná několik hodin. Také DNA skladovaná tři týdny má nejmenší znečištění, ale její koncentrace ve vzorku je velmi nízká. Z toho lze vyvodit, že pokud je nutné DNA skladovat v laboratorní teplotě, je nutné ji analyzovat co nejdříve.

8.3.2 Čistota vzorků skladovaných chladničkové teplotě



Obrázek 9: Znárodnění čistoty DNA skladované v chladničkové teplotě (hodnocení poměru absorbančí 260/280)

(Zdroj: vlastní)

Ve vzorcích skladovaných v chladničkové teplotě převládá čistá DNA (obrázek 9). Zcela čistá DNA se nachází u vzorků skladovaných jeden týden, dva týdny a tři měsíce. U vzorků skladovaných jeden týden a tři týdny je část DNA kontaminována RNA. U vzorků skladovaných jeden a dva měsíce je část DNA znečištěna proteiny.

Z těchto výsledků je možné usuzovat, že DNA skladovaná v chladničkové teplotě je méně náchylná ke kontaminaci.

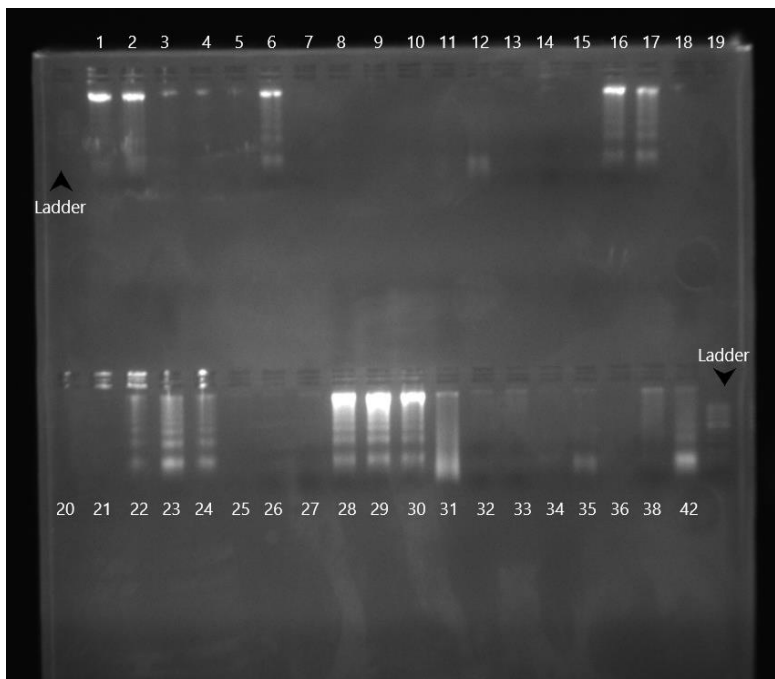
8.4 Výsledky elektroforézy v gelu po izolaci DNA

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, vyřadila jsem z analýzy čtyři vzorky. Jednalo se o vzorky číslo 37, 39, 40 a 41. Hodnotím-li toto rozhodnutí zpětně, nyní bych postupovala jinak, a elektroforézu bych provedla dvakrát.

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 do elektroforetické cely, která byla naplněná TBE pufrem, 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 10).



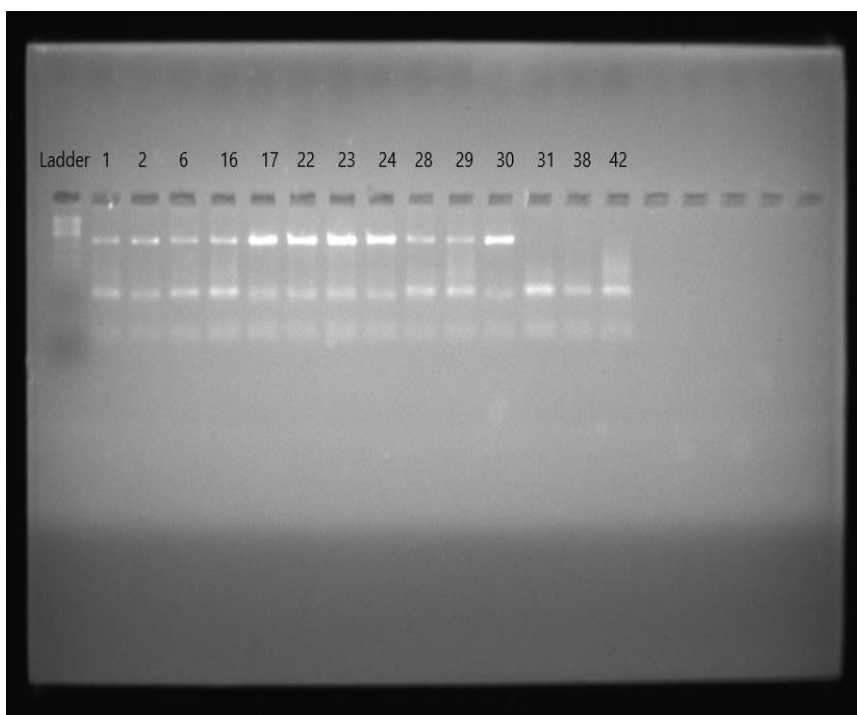
*Obrázek 10: Elektroforéza vzorků na gelu pro potvrzení přítomnosti DNA
(Zdroj: vlastní)*

Na výsledné fotografii elektroforézy můžeme vidět, že některé vzorky obsahovaly jen velmi malé množství DNA, a tedy jsou viditelné částečně nebo vůbec. Na vině může být i lidský faktor, jelikož jsem elektroforézu nikdy dříve neprováděla, a tudíž některé vzorky nemusely být nanесeny do gelu zcela správně. U takových vzorků by také nebyla vidět žádná separace.

Naopak u některých vzorků (např.: číslo 1, 2, 16, 17, 23, 28, 29, ...) byla elektroforéza úspěšná. Jednalo se o vzorky, které měly koncentraci DNA okolo 90 ng/μl a více (obrázek 10).

8.5 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 a 42. Tato čísla vzorků odpovídají těm, která jsou již uvedena v tabulkách 6 až 19. Poté, abych zkontrolovala, zda reakce řádně proběhla, jsem vzorky znovu podrobila elektroforéze na agarózovém gelu.



Obrázek 11: Elektroforéza PCR produktů na agarózovém gelu

(Zdroj: vlastní)

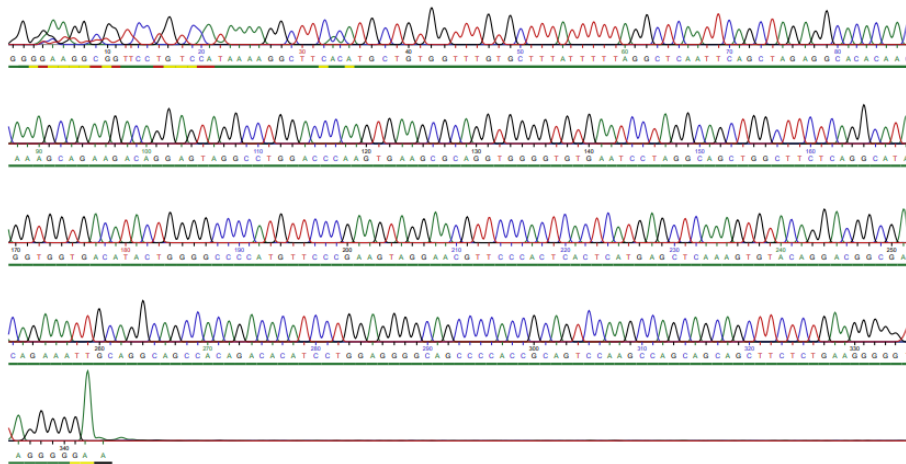
Na výše uvedené fotografii můžeme pozorovat, že u většiny vzorků proběhla amplifikace DNA v pořádku. První místo je jako obvykle vyhrazeno pro DNA ladder (100 bp DNA ladder) neboli „žebřík“, který má definovanou velikost jednotlivých fragmentů a do zbylých pozic byly napipetovány produkty PCR (obrázek 11).

8.6 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 označila čárovým kódem a zaslala je firmě GenSeq s.r.o. 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 jsem hodnotila ve formátu PDF a ve formátu ABI v programu BioEdit.

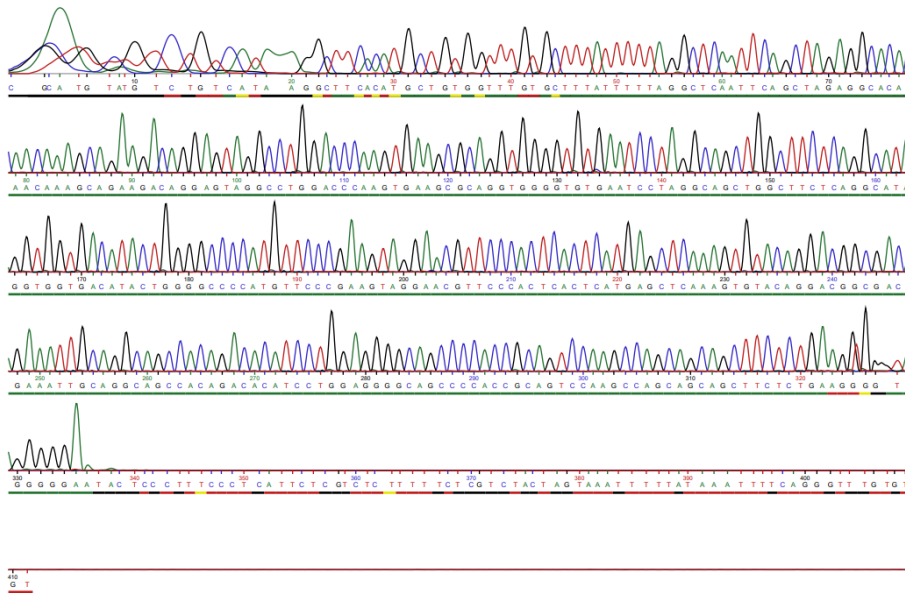
Pro ukázkou sekvencí jsem zvolila čtyři vzorky (vzorky číslo 6, 23, 38 a 42), které měly sekvence rozdílné. Dvě z těchto sekvencí byly pěkné a čitelné, další dvě jsem vybrala špatné a nečitelné, jelikož jsem chtěla ukázat viditelný kontrast mezi nimi.



Obrázek 12: Sekvence vzorku 6

(Zdroj: vlastní)

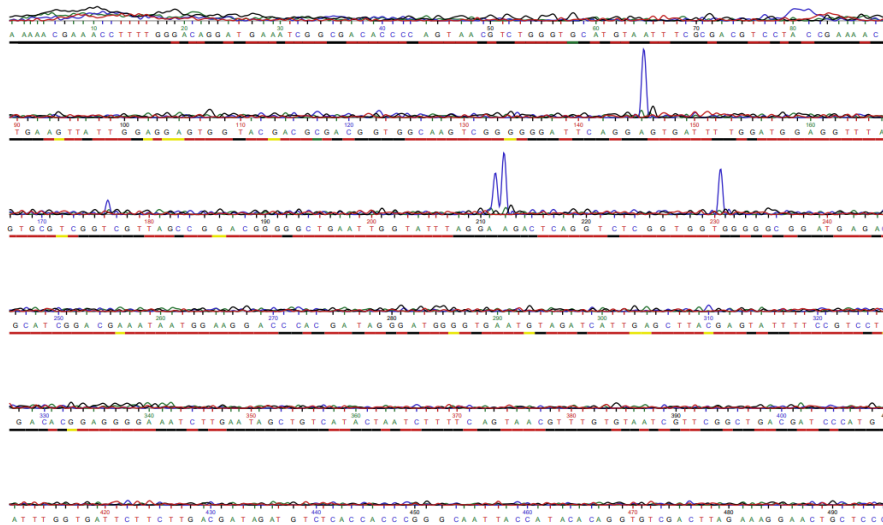
Vzorek číslo 6, jehož sekvenci můžeme vidět na obrázku výše, byl skladován několik hodin v chladničkové teplotě a jeho koncentrace je 49,03 ng/μl. Můžeme si povšimnout, že výsledné sekvence nejsou nijak vysoké, ale jsou stále dobře čitelné (obrázek 12).



Obrázek 13: Sekvence vzorku 23

(Zdroj: vlastní)

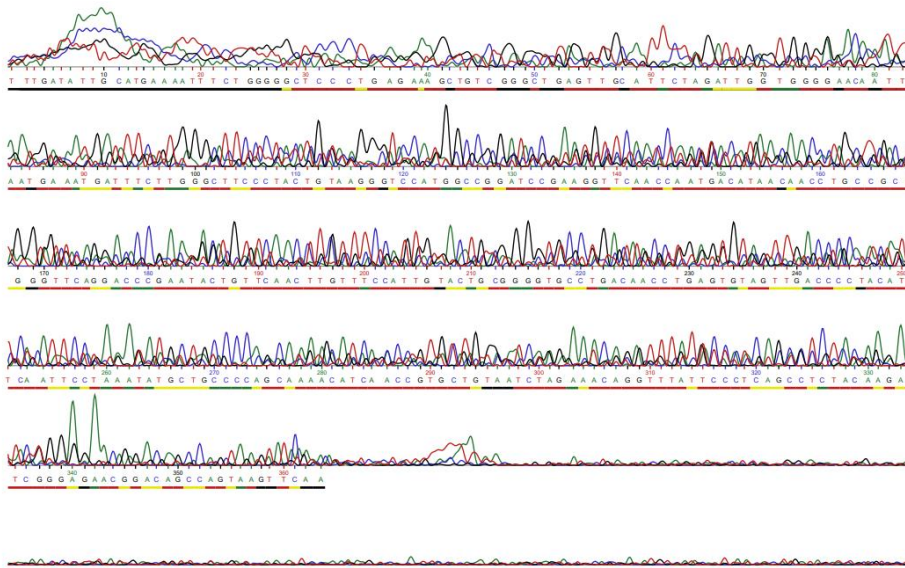
U vzorku číslo 23 je sekvence vysoká a čitelná, jedná se o ukázkovou sekvenaci. U tohoto vzorku jsem naměřila relativně vysokou koncentraci DNA, tedy 166,02 ng/μl. Byla skladována jeden týden v chladničkové teplotě a poměry absorbancí ukazují, že se jedná o ničem nekontaminovanou DNA. Elektroforéza PCR produktu u tohoto vzorku ukazuje, že reakce proběhla v pořádku (obrázek 13).



Obrázek 14: Sekvence vzorku 38

(Zdroj: vlastní)

Naopak u vzorku číslo 38, jehož sekvence je nízká a nečitelná, byla izolována nižší koncentrace DNA, tedy 24,17 ng/μl. Poměry absorbancí u tohoto vzorku ukazují, že se nejedná o čistou DNA (obrázek 14).



Obrázek 15: Sekvence vzorku 42

(Zdroj: vlastní)

U sekvence vzorku číslo 42 můžeme na první pohled vidět, že se jedná o špatnou a nečitelnou sekvenci. Vzorek 42 byl skladován tři měsíce v chladničkové teplotě. Koncentrace DNA je 84,95 ng/μl (obrázek 15).

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 poukázali 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 je podpořen výsledkem autorů článku. Tedy, že sběr DNA z bukálních stěrů poskytuje vysoce kvalitní 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. V případě, že například selže test nebo se nepovede odběr krve (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. Proto je také patrné, že byl každý odběr proveden v různé kvalitě.

Výsledky vzorků, které jsem analyzovala, jsou poměrně rozdílné. Je pravděpodobné, že rozdílnost v množství izolované DNA, je zapříčiněno právě nehomogenitou prostředí, ze kterého se vzorky odebírala.

Možným důvodem může také být to, že jsem odbírala vzorky pro analýzu sama. Snažila jsem si odběr nastudovat, jak nejlépe jsem mohla, ale neměla jsem takové zkušenosti jako zkušený pracovníci, kteří se tímto zabývají. Myslím si tedy, že jde i 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 získané 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.

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 osmi vzorků jsem dosáhla tohoto rozmezí a u devíti vzorků jsem izolovala více než 100 ng/μl DNA.

Vzorek číslo 40, který měl koncentraci 153,74 ng/μl, tedy více než je rozmezí udávané výrobcem kitu, byl skladován tři měsíce v chladničkové teplotě. Poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230 ukazují, že se jedná o čistý vzorek. Z tohoto příkladu, je možné pozorovat, že pokud je vzorek DNA skladován v chladničkové teplotě, je možné i po třech měsících získat kvalitní DNA.

Naopak u vzorků číslo 19, 20 a 21 byla izolována velmi malá koncentrace DNA, která byla znečištěná proteiny a RNA. Tyto vzorky byly skladovány v laboratorní teplotě pouze jeden týden. Tento výsledek potvrzuje, že na podmínkách skladování DNA záleží.

Jelikož jsem nenašla mnoho článků, které bych mohla využít k diskuzi ohledně výsledků množství izolované DNA, dovoluji 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 srovnávají výsledky koncentrace DNA izolované z bukalních stěrů a krve. Z mého pohledu se dostatečně věnují i izolaci DNA z bukalní sliznice.

Pro izolaci DNA využili kit s názvem QIAamp DNA Blood Mini Kit, jehož pracovní postup dodržovali s výjimkou drobných modifikací.

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 29 a 41), které se vyskytují u vzorků, skladovaných dva týdny a tři měsíce v chladničce, jsou výsledkům z odborného článku poměrně podobné. Autoři izolovali nejvíce 257,96 ng/μl DNA z bukálních vzorků, ale jednalo se 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 sami 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 používala 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).

Ve většině laboratorních příruček je psáno, že adekvátní skladování je pár hodin až dva týdny v chladničkové teplotě. 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 v chladu. Dále to doplňují i výsledky elektroforézy PCR produktů a sekvenování.

Možnou alternativou by mohlo být použití samoschnoucích bukálních 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 sníží riziko kontaminace a degradace DNA. Bohužel já jsem tyto speciální samoschnoucí bukální výtěrové tampóny neměla k dispozici, ale myslím si, že je to také jeden ze

způsobů, jak ovlivnit preanalytickou fázi. Rovněž také kvalitu a množství izolované DNA (Bauer et al., 2017).

Z výsledků vzorků, které jsem analyzovala, jsem dospěla k závěru, že pokud chceme DNA izolovat v den odběru, postačí tento vzorek skladovat při laboratorní teplotě. Pokud ovšem chceme, izolovat DNA za delší dobu (týdny až měsíce), je lepší skladovat tento vzorek v chladničkové teplotě. Takto skladované vzorky, odebrané z bukální sliznice, jsou kvalitním biologickým materiálem, ze kterého lze izolovat kvalitní DNA, která je optimální pro amplifikaci 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.

Praktická část mé práce byla založená na zkoumání, jaká je ideální doba a místo skladování. Z toho důvodu, 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. Poté následovala elektroforéza PCR produktů, abych zjistila, zda u vzorků proběhla polymerázová řetězová reakce. Nakonec jsem odeslala 14 vzorků 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 absorpance, abych dospěla k přesvědčivému závěru. Tedy, že pokud je proveden správný odběr vzorku z bukální sliznice, a tento vzorek je skladován v chladničkové teplotě, je možné izolovat DNA za delší dobu (týdny až měsíce), a stále získat kvalitní DNA pro další zpracování. U vzorků skladovaných v laboratorní teplotě, je vhodnější provést izolaci v den odběru.

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 pro polymerázovou řetězovou reakci. 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. CARR J., WILLIAMS D.G., HAYDEN R.T., 2009. *Molecular Diagnostics*. Academic Press. 744 s. ISBN 978-0-12-369428-7.
11. DAIRAWAN M., SHETTY J. P., 2020. The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 8(1), 39-45. doi: 10.34297/AJBSR.2020.08.001234.
12. 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>
13. GAŠ, B., 2001. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír*. 80 (7), 370-2. ISSN 0042-4544.
14. 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.
15. CHACON-CORTES D., GRIFFITHS L., 2014. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. 3(2), 1-9. doi: 10.2147/BSAM.S46573.
16. Khan Academy, © 2021. Gel electrophoresis [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gen-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
17. 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.
18. KOČÁREK, E., 2008. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vydání. Praha: Scientia. 211 s. ISBN 978-80-86960-36-4.
19. KOLÍSKO, M., 2017. Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*. 3/2017, 73-6. ISSN 0044-4812.

20. KREJČÍ, A., MÜLLER, P., VOJTĚŠEK, B., 2015. Bioinformatika a sekvenování nové generace. *Klinická onkologie*. 28(Supplementum 2), 91-6. doi: 10.14735/amko20152s91.
21. KŘEMEN, J., POHLREICH, P., STRÍBRNÁ, J., 1998. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Praha: Karolinum. 117 s. ISBN 80-7184-504-3.
22. LABGuide Průvodce laboratoří, © 2022. Modifikace PCR [online]. [cit. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/modifikace-pcr/>
23. 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.
24. 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>
25. 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.
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. NEZBEDA P., 2018. DNA a RNA diagnostika lidských chorob [online]. [cit. 2022-11-15]. Dostupné z: https://postudium.cz/pluginfile.php/10033/mod_resource/content/3/DNA%20diagnostika%20lidsk%C3%BDch%20chorob_CEVA_unor_2014_final.pdf

28. NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28(12), e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
29. NOVOTNÁ, M., 2018. Princip NGS metody [online]. GENERI BIOTECH [cit. 2021-05-25]. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/princip-ngs-metody/>
30. ROSYPAL, S., 2006. Úvod do molekulární biologie. 4. (inovované) vydání. Brno: Stanislav Rosypal. 289 s. ISBN 80-902562-5-2.
31. 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.
32. SEQme s.r.o., © 2012-2023, Přečištění PCR produktů – srovnání kolonkových souprav různých výrobců a naše tipy [online]. [cit. 2023-01-20]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/cs/magazine/precistení-pcr-produktu>.
33. SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., 2009. Genetika. Brno: Masarykova univerzita. 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
34. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. Metody molekulární biologie. Brno: Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
35. ŠVIRÁKOVÁ E., KYZNAR J., LOUPANCOVÁ K., 2017. Využití metody LAMP pro rychlou detekci patogenních mikroorganismů v potravinářské a klinické praxi. *Mlékařské listy*. 28(5), 31-38
36. 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>

37. VLČNOVSKÁ M., ŠMERKOVÁ K., DOSTÁLOVÁ S., SOCHOR J., KIZEK R., 2012. Izolace DNA pomocí magnetizovatelných částic a jejich využití v diagnostice nádorových onemocnění [online]. Brno: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. [cit. 2022-11-25]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/izolace-dna-pomoci-magnetizovatelnych-castic-a-jejich-vyuziti-v-diagnostice-nado/>
38. ŽUROVEC, M., A KOL., 1999. Soubor materiálů k předmětu metody molekulární biologie. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, Entomologický ústav. 161 s.

12. Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Schéma gelové elektroforézy	20
Obrázek 2: Centrifuga, ve které jsem centrifugovala vzorky	28
Obrázek 3: Colibri Microvolume Spectrophotometer	29
Obrázek 4: Souprava pro elektroforézu	30
Obrázek 5: Sekvence exonu 11 – šedě je znázorněna sekvence exonu 11, červeně primery a černě intronové oblasti	32
Obrázek 6: Temocykler MJ Mini od firmy BIO-RAD	33
Obrázek 7: Znázornění rozdílné koncentrace DNA v závislosti na podmínkách jejího skladování	42
Obrázek 8: Znázornění čistoty DNA skladované v laboratorní teplotě (hodnocení poměru absorbancí 260/280)	49
Obrázek 9: Znázornění čistoty DNA skladované v chladničkové teplotě (hodnocení poměru absorbancí 260/280)	50
Obrázek 10: Elektroforéza vzorků na gelu pro potvrzení přítomnosti DNA.....	51
Obrázek 11: Elektroforéza PCR produktů na agarózovém gelu.....	52
Obrázek 12: Sekvence vzorku 6	53
Obrázek 13: Sekvence vzorku 23	54
Obrázek 14: Sekvence vzorku 38	54
Obrázek 15: Sekvence vzorku 42	55
Tabulka 1: Sekvence navržených primerů.....	32
Tabulka 2: Ředění primerů pro PCR reakci.....	32
Tabulka 3: Teplotní profil PCR reakce.....	34
Tabulka 4: Teplotní profil PCR – EXO	35
Tabulka 5: Datum odběru, datum analýzy a doba skladování vzorků.....	36
Tabulka 6: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných několik hodin v laboratorní teplotě.....	37
Tabulka 7: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných několik hodin v chladničkové teplotě.....	37
Tabulka 8: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 měsíce v laboratorní teplotě..	37
Tabulka 9: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 měsíce v chladničkové teplotě	38

Tabulka 10: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 měsíc v laboratorní teplotě	38
Tabulka 11: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 měsíc v chladničkové teplotě	38
Tabulka 12: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 týden v laboratorní teplotě..	39
Tabulka 13: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 1 týden v chladničkové teplotě	39
Tabulka 14: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 týdny v laboratorní teplotě..	39
Tabulka 15: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 2 týdny v chladničkové teplotě	40
Tabulka 16: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 týdny v laboratorní teplotě..	40
Tabulka 17: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 týdny v chladničkové teplotě	40
Tabulka 18: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 měsíce v laboratorní teplotě	41
Tabulka 19: Koncentrace DNA u vzorků skladovaných 3 měsíce v chladničkové teplotě	41
Tabulka 20: Absorbance vzorků skladovaných několik hodin v laboratorní teplotě	43
Tabulka 21: Absorbance vzorků skladovaných několik hodin v chladničkové teplotě..	43
Tabulka 22: Absorbance vzorků skladovaných 2 měsíce v laboratorní teplotě	43
Tabulka 23: Absorbance vzorků skladovaných 2 měsíce v chladničkové teplotě.....	44
Tabulka 24: Absorbance vzorků skladovaných 1 měsíc v laboratorní teplotě	44
Tabulka 25: Absorbance vzorků skladovaných 1 měsíc v chladničkové teplotě	44
Tabulka 26: Absorbance vzorků skladovaných 1 týden v laboratorní teplotě.....	45
Tabulka 27: Absorbance vzorků skladovaných 1 týden v chladničkové teplotě.....	45
Tabulka 28: Absorbance vzorků skladovaných 2 týdny v laboratorní teplotě	45
Tabulka 29: Absorbance vzorků skladovaných 2 týdny v chladničkové teplotě.....	46
Tabulka 30: Absorbance vzorků skladovaných 3 týdny v laboratorní teplotě	46
Tabulka 31: Absorbance vzorků skladovaných 3 týdny v chladničkové teplotě.....	46
Tabulka 32: Absorbance vzorků skladovaných 3 měsíce v laboratorní teplotě	47
Tabulka 33: Absorbance vzorků skladovaných 3 měsíce v chladničkové teplotě.....	47
Tabulka 34: Hodnocení poměru absorbancí 260/280	47
Tabulka 35: Hodnocení poměru absorbancí 260/230	47
Tabulka 36: Množství čisté a znečištěné DNA podle poměru absorbancí 260/280	48
Tabulka 37: Množství čisté a znečištěné DNA podle poměru absorbancí 260/230	48

13. Seznam zkratek

A	Absorbance
ABI	Applied Biosystems
BL Buffer	Bass/Lead buffer
bp	Pár bází (base pair)
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouvláknová DNA
EXO I	Exonukleáza I
IČP	Identifikační číslo provozovny
kb	Klobáze (kilobase)
LAMP	Izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou
LCR	Ligázová řetězová reakce
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
NGS	Sekvenování nové generace (next generation sequencing)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDF	Portable document format
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza
RNA	Ribonukleová kyselina
rSAP	Shrimp alkaline phosphatase
SDS	Dodecylsulfát sodný
ssDNA	Jednovláknová DNA
TBE pufr	Tris-Borát-EDTA pufr
UV	Ultrafialové záření (ultraviolet)