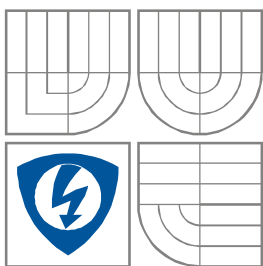


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

IZOLACE A PURIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN POMOCÍ MAGNETIZOVATELNÝCH MIKRO- A NANOČÁSTIC

ISOLATION AND PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS USING MAGNETISED MICRO- AND
NANOPARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

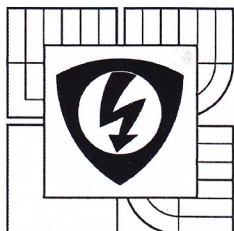
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

SIMONA DOSTÁLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. RENÉ KIZEK, Ph.D.

BRNO, 2012



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Simona Dostálová

Ročník: 3

ID: 125018

Akademický rok: 2011/12

NÁZEV TÉMATU:

Izolace a purifikace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných mikro- a nanočástic

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Provedte literární rešerši o magnetizovatelných mikro- a nanočásticích, vybraných metodách elektrochemické detekce a možnostech izolace nukleových kyselin. Zaměřte se na srovnání možností izolace nukleových kyselin běžnými metodami a magnetizovatelnými mikro- a nanočásticemi. 2) Popište požadované obecné podmínky izolace a purifikace DNA (včetně specifických PCR produktů). 3) Navrhněte vhodnou metodu izolace a purifikace DNA pomocí magnetizovatelných mikro- a nanočástic s následnou detekcí vybranými elektrochemickými metodami. 4) Provedte optimalizaci podmínek izolace a purifikace DNA pro navrženou izolační a detekční metodu. 5) Provedte experimenty a získejte relevantní výsledky k posouzení funkčnosti a kvality metody. 6) Provedte diskuzi, zhodnocení výsledků a využitelnosti řešení v praxi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] HUSKA D., HUBALEK J., ADAM V., VAJTR D., HORNÁ A., TRNKOVÁ L., HAVEL L., KIZEK R. Automated nucleic acids isolation using paramagnetic microparticles coupled with electrochemical detection. *Talanta* 79 (2): 402-411, 2009

[2] HSING I.M., XU Y., ZHAO W.T. Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis* 19 (7-8): 755-768, 2007

Termín zadání: 6.2.2012

Termín odevzdání: 25.5.2012

Vedoucí práce: doc. Ing. René Kizek, Ph.D.

Konzultanti bakalářské práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.; Ing. Kristýna Šmerková


prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Abstrakt

Nukleové kyseliny jsou zcela jedinečnou složkou každého organismu. Určují jeho vzhled, chování nebo například dispozice k různým chorobám. I přes jejich důležitost je stále mnoho informací, které o nukleových kyselinách nejsou známy. Pro zkoumání nukleových kyselin je nutné je očistit od všech ostatních složek organismu. Běžné metody izolace a purifikace nukleových kyselin jsou ale často pracné a časově náročné, proto se nově vyvíjejí postupy využívající magnetickou separaci. Bakalářská práce se zabývá magnetizovatelnými mikro- a nanočásticemi a jejich využitím právě v oblasti izolace a purifikace nukleových kyselin. V práci jsou shrnuty obecné podmínky této izolace a jsou zde uvedeny metody detekce nukleových kyselin se zaměřením na elektrochemické metody. Je prezentován vhodný postup pro izolaci a purifikaci nukleových kyselin využívající magnetizovatelné částice a detekci pomocí square-wave voltametrie.

V praktické části bakalářské práce byl tento postup optimalizován pro dosažení maximální výtěžnosti. Optimalizovány byly kroky promývání, imobilizace a eluce. Bylo zjištěno, že pro promytí částic před imobilizací nukleových kyselin na jejich povrch byl vhodným roztokem fosfátový pufr. Imobilizace probíhala po dobu 5 minut při teplotě 20 °C a mikrozkuhavka během ní byla intenzivně třepána. Imobilizační roztok byl složen z 0,1M Na_2HPO_4 + 0,1M NaH_2PO_4 , 0,6M guanidium thiokyanátu, 0,15M Tris-HCl o pH 7,5 a 2,5M CsCl. Pro promytí komplexu částice-nukleová kyselina po imobilizaci bylo vhodné použití 5M NaCl. Eluce probíhala po dobu 15 minut při teplotě 99 °C a optimálním elučním roztokem byl Tris-EDTA o pH 9,1.

Klíčová slova

Izolace nukleových kyselin, magnetizovatelné částice, adsorpce na silikát, square-wave volumetrie, adsorptivní přenosová technika

Abstract

Nucleic acids are a completely unique component of every organism. They determine the appearance, behaviour or disposition to a certain disease. Despite their importance, there is still a lot of information unknown. In order to study the nucleic acids, they need to be purified from other components of the organism. The routine methods of isolation and purification are often laborious and time consuming; therefore experiments with magnetic separation are carried out. This thesis deals with magnetic micro- and nanoparticles and their application in this field. General conditions of this isolation are summarized in the thesis. Detection methods of nucleic acids are listed, focusing on electrochemical methods. A procedure for isolation and purification of nucleic acids using magnetic particles and square-wave voltammetry is described.

This procedure was modified in experimental part of the thesis to achieve the maximum yield. Partial steps including washing, immobilization and elution were optimized. Results showed that the phosphate buffer was optimal for washing of beads before immobilization of nucleic acids on their surface. The optimal immobilization was carried out for 5 minutes at 20 °C and microtube needed to be firmly shaken during the process. Immobilization solution composed of 0.1M Na₂HPO₄ + 0.1M NaH₂PO₄, 0.6M guanidinium thiocyanate, 0.15M Trizma base adjusted by HCl on pH 7.5 and 2.5M CsCl. 5M NaCl was optimal for washing of the complex “beads-nucleic acid” after the immobilization. Elution was carried out for 15 minutes at 99 °C and the highest yield was obtained using elution solution composed of Tris-EDTA pH at 9.1.

Key words

Nucleic acids isolation, magnetised particles, adsorption to silica, square-wave voltammetry, adsorptive transfer technique

Bibliografická citace

DOSTÁLOVÁ, S. *Izolace a purifikace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných mikro- a nanočástic*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 68 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. René Kizek, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma Izolace a purifikace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných mikro- a nanočástic jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 24. května 2012

.....

podpis autorky



Tato práce vznikla v rámci CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Renému Kizekovi, Ph.D. za to, že mi umožnil zpracovat bakalářskou práci pod jeho cenným vedením. Dále bych chtěla poděkovat celé pracovní skupině pod jeho vedením, především Ing. Kristýně Šmerkové a Mgr. Markétě Ryvolové, Ph.D. za nedocenitelnou pomoc při vypracování méj bakalářské práce a velkou trpělivost při zodpovídání mnoha mých dotazů. Mgr. Jindřichu Kynickému, Ph.D. děkuji za vyhotovení fotografií použitých částic pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. V neposlední řadě děkuji mým rodičům za podporu během celého studia. Mému snoubenci děkuji za to, že je.

V Brně dne 24. května 2012

podpis autorky

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK.....	13
1 ÚVOD	14
2 NUKLEOVÉ KYSELINY	15
2.1 RNA.....	15
2.1.1 Mediátorová RNA	15
2.1.2 Ostatní typy RNA.....	16
2.2 DNA.....	16
3 METODY IZOLACE A PURIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN	19
3.1 Obecné podmínky izolace nukleových kyselin	19
3.2 Fenol-chloroformová extrakce	20
3.3 Adsorpce na silikát	21
3.4 Magnetická separace.....	22
3.4.1 Magnetické látky	22
3.4.2 Syntéza magnetizovatelných částic	23
3.4.3 Modifikace povrchu magnetizovatelných částic	25
4 METODY DETEKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN.....	27
4.1 Polymerázová řetězová reakce	27
4.2 Elektroforéza	28
4.2.1 Gelová elektroforéza	29
4.2.2 Vizualizace gelu	29
4.3 Spektrofotometrie	30

4.4	Elektrochemické metody	31
4.4.1	Square-wave voltametrie/polarografie	33
5	MATERIÁL A METODY	36
5.1	Chemikálie.....	36
5.2	Magnetizovatelné částice.....	37
5.3	Přístrojové vybavení	38
5.4	Příprava vzorku pro izolaci nukleových kyselin	38
5.5	Izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic	39
5.6	Elektrochemická detekce	42
5.7	Spektrofotometrické stanovení absorpance PCR produktu v závislosti na jeho teplotě	43
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
6.1	Výchozí podmínky izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic	44
6.2	Optimalizace promývání částic	45
6.2.1	Vliv promývacího roztoku	45
6.2.2	Vliv počtu promývacích kroků.....	47
6.3	Optimalizace imobilizace nukleové kyseliny na částice	48
6.3.1	Vliv třepání během imobilizace	48
6.3.2	Vliv teploty při imobilizaci	49
6.3.3	Vliv složení imobilizačního roztoku	51
6.3.4	Vliv doby imobilizace	52
6.3.5	Vliv koncentrace soli v imobilizačním roztoku	53
6.3.6	Vliv použitého chloridu alkalického kovu	54
6.4	Optimalizace eluce nukleové kyseliny z částic	56

6.4.1	Vliv složení elučního roztoku	56
6.4.2	Vliv pH elučního roztoku Tris-EDTA	57
6.4.3	Vliv doby eluce	58
6.4.4	Vliv třepání při eluci	59
6.4.5	Vliv teploty eluce	60
6.5	Optimalizované podmínky izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic	61
7	ZÁVĚR.....	64
	SEZNAM LITERATURY	65
	SEZNAM ZKRATEK.....	68
	SEZNAM SYMBOLŮ	68

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 2.1 Vodíkové vazby mezi páry bází.....	17
Obrázek 4.1 Potenciálový program při square-wave voltametii/polarografii.....	34
Obrázek 4.2 Typický voltamogram DNA naměřený pomocí square-wave voltametrie.....	35
Obrázek 5.1 Snímek částic Dynabeads [®] MyOne Silane pořízený skenovacím elektronovým mikroskopem.....	37
Obrázek 5.2 Schéma postupu izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic.....	41
Obrázek 5.3 Schéma adsorptivní přenosové techniky..	43
Obrázek 6.1 Vliv promývacích roztoků před imobilizací a po ní na výtěžek izolace.....	46
Obrázek 6.2 Vliv počtu promývacích kroků	47
Obrázek 6.3 Vliv třepání během imobilizace.....	48
Obrázek 6.4 Vliv teploty imobilizace.....	49
Obrázek 6.5 Závislost absorbance PCR produktu na jeho teplotě	50
Obrázek 6.6 Vliv složení imobilizačního roztoku.....	51
Obrázek 6.7 Vliv doby imobilizace.....	52
Obrázek 6.8 Vliv koncentrace NaCl v imobilizačním roztoku	53
Obrázek 6.9 Vliv použitého chloridu alkalického kovu.....	54
Obrázek 6.10 Vliv složení elučního roztoku	56
Obrázek 6.11 Vliv pH elučního roztoku	57
Obrázek 6.12 Vliv doby eluce.....	58
Obrázek 6.13 Vliv třepání při eluci.....	59
Obrázek 6.14 Vliv teploty eluce.....	60
Obrázek 6.15 Srovnání návratnosti výchozí a optimalizované metody	62

SEZNAM TABULEK

Tabulka 6.1 Srovnání výchozí a optimalizované metody	63
--	----

1 ÚVOD

Již od svého objevení před více než 140 lety jsou nukleové kyseliny předmětem neustálého zkoumání. Díky rozvoji genomiky došlo k sekvenování genomu člověka i dalších organismů. Různým moderním biochemickým a molekulárně biologickým metodám musí často předcházet izolace nukleové kyseliny. Velmi často je nutné získat nukleové kyseliny pouze z několika málo buněk, je proto nezbytné tyto molekuly amplifikovat, k čemuž se využívá polymerázové řetězové reakce (PCR). Složky směsi potřebné pro amplifikaci ale mohou ovlivnit následnou analýzu, proto je potřeba nukleové kyseliny z roztoku izolovat.

Správně provedená izolace nukleových kyselin tak stojí na počátku mnoha metod molekulární biologie, ať se jedná o testování nově vyvíjených protinádorových léčiv nebo identifikaci pachatelů trestných činů. Přitom ale provést izolaci bez kontaminace nebo rovnou znehodnocení vzorku není snadné. Každý si jistě dokáže představit důsledky kontaminace tkáně odebrané na místě činu v případě odhalování pachatele vraždy nebo znásilnění. Těžší je ale pro člověka, který není „z oboru“ vidět důležitost čistoty vzorku v experimentálním výzkumu.

Pro izolaci nukleových kyselin je možné použít mnoho metod, běžné metody, jako je fenol-chloroformová extrakce, adsorpce na silikát za použití chaotropních solí nebo iontová chromatografie, jsou ale často časově náročné a velmi pracné a navíc při nich může dojít ke kontaminaci vzorku nebo není možné je miniaturizovat a vytvořit tak lab-on-chip. Nově se tedy vyvíjejí postupy využívající magnetickou separaci. Tyto postupy jsou velmi rychlé a snadné, je také možné je miniaturizovat a integrovat na čip.

V práci je navržen vhodný postup pro izolaci PCR amplikonů o délce 500 bp pomocí magnetizovatelných mikročástic, jejichž povrch je modifikován pomocí silanolových skupin. Postup tak využívá výhod magnetické separace a skutečnosti, že DNA se v přítomnosti roztoků s velkou iontovou silou a za určitého pH adsorbuje na silikát.

2 NUKLEOVÉ KYSELINY

Nukleové kyseliny jsou biomolekuly s vysokou variabilitou sekundární struktury. Jejich význam spočívá v kódování genetické informace, proto patří mezi zcela nepostradatelné biopolymery živých soustav [1]. Monomery nukleových kyselin se označují jako nukleotidy a jsou složeny ze tří hlavních částí: fosfátové skupiny, pentózy a dusíkaté báze. Dusíkaté báze se rozdělují na bicyklické puriny a monocyklické pyrimidiny. Mezi puriny patří adenin a guanin, mezi pyrimidiny cytozin, tymin a uracil.

V přírodě se vyskytují nukleové kyseliny dvou typů: deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA), přičemž se od sebe liší cukernou složkou. RNA obsahuje ribózu, kdežto DNA deoxyribózu. Také se liší dusíkatými bázemi, v DNA se nachází adenin, guanin, tymin a cytosin, zatímco v RNA se místo tyminu nachází uracil.

2.1 RNA

RNA existuje obvykle jako jednovláknový polymer. U některých organismů může RNA sloužit jako nositelka genetické informace, častěji je nezbytná pro genovou expresi. Existuje 5 typů molekul RNA, které se účastní genové exprese. Ta se skládá z transkripce a translace, přičemž transkripce je přenos genetické informace z DNA do RNA a translace přenos informace z RNA do proteinu. K translaci dochází na organelách zvaných ribozomy [2].

2.1.1 Mediátorová RNA

Mediátorová RNA (mRNA) slouží k přenosu genetické informace do místa syntézy proteinů v cytoplazmě, tedy do ribozomů. Produktem transkripce je primární transkript, který bývá u eukaryot následně zpracován odštěpováním určitých sekvencí a modifikací obou konců. Primární transkript se označuje jako pre-mRNA nebo hnRNA. Nekódující sekvence v pre-mRNA se označují jako introny, kódující jako exony. Sestřihové reakce probíhají v makromolekulárních strukturách zvaných spliceozomy.

Úkolem mRNA je určování pořadí aminokyselin v proteinu, který je produktem genové exprese. Sekvence mRNA se dá rozdělit na úseky o délce tří nukleotidů zvané kodony, přičemž každý kodon kóduje při translaci jednu konkrétní aminokyselinu. Na 3' konci každé mRNA se nachází úsek adenylové kyseliny v délce 20-200 nukleotidů, který se nazývá poly(A) zakončení [2].

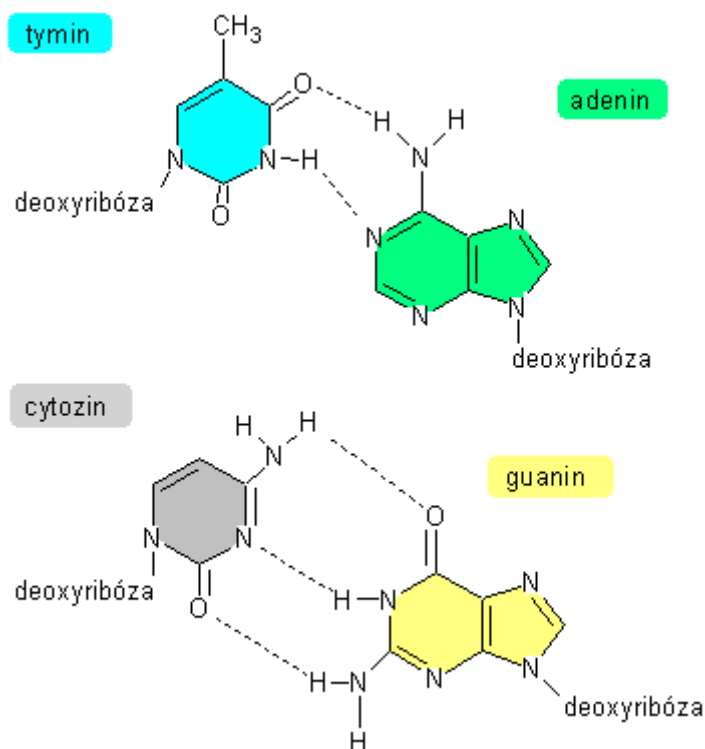
2.1.2 Ostatní typy RNA

Ribozomová RNA (rRNA) je strukturní a katalytickou složkou ribozomů. Transferová RNA (tRNA) je malá molekula, která slouží k přenosu aminokyselin při translaci. Karboxylové skupiny aminokyselin jsou navázány na 3'-hydroxylové konce tRNA, která je schopna rozeznat kodon mRNA a prezentuje aminokyselinu v konfiguraci usnadňující tvorbu peptidové vazby. Malá jaderná RNA (snRNA) je strukturní složkou spliceozomů. Mikro RNA (miRNA) jsou krátké jednovláknové sekvence, které blokují expresi komplementárních mRNA [2].

2.2 DNA

DNA má oproti RNA vyšší úroveň uspořádání, obvykle jde o dvouvláknový polymer (šroubovice) [2], ve kterém se kolem sebe navzájem obtáčejí dva polynukleotidové řetězce ve spirále. Strukturní podjednotky jsou od sebe rozmístěny v pravidelných vzdálenostech 0,34 nm podél osy molekuly. Tato konformace se nazývá B-DNA a DNA ji zaujímá za fyziologických podmínek, tedy ve vodných roztocích o nízké koncentraci solí. Jednotlivé polynukleotidové řetězce jsou tvořeny typickou sekvencí nukleotidů, spojených fosfodiesterovými vazbami, které propojují sousední deoxyribózy. Fosfodiesterové vazby jsou typem kovalentní vazby, což je silná chemická vazba tvořená sdílením elektronů mezi atomy. Dvě nukleotidová vlákna jsou spojena vodíkovými vazbami mezi páry bází, což jsou slabé vazebné interakce mezi elektronegativním atomem a atomem vodíku, který je kovalentně navázaný k dalšímu elektronegativnímu atomu. Vodíkové vazby se vytvářejí mezi

komplementárními bázemi. Adenin s thyminem jsou tak ve svých běžných strukturních stavech spojeny dvěma vodíkovými vazbami, cytosin s guaninem třemi (Obrázek 2.1 [2]).



Obrázek 2.1 Vodíkové vazby mezi páry bází

Páry bází se nad sebou nacházejí zhruba ve vzdálenosti 0,34 nm, přičemž na jedné otáčce šroubovice se nachází přibližně 10,4 párů bází (bp). Vlákna DNA jsou antiparalelní. Na DNA se nachází malý a velký žlábek, které jsou důležité při interakcích DNA s proteiny regulujícími genovou expresi [2].

Dvojitá šroubovice DNA je stabilní nejen díky vodíkovým vazbám, ale i hydrofobním interakcím, které se tvoří mezi sousedními páry bází a jejich vznik zapříčiňuje jev zvaný stacking neboli stohování. Tyto vazby se tvoří vlivem delokalizovaného systému π -elektronů na cyklech bází [3]. Roviny párů bází jsou relativně nepolární, proto mají tendenci v polárním pufovaném prostředí tvořit hydrofobní vazby, čímž zvýší stabilitu molekuly DNA.

Konformace molekul DNA je velmi flexibilní, mění se totiž v závislosti na okolním prostředí vlivem tvorby hydrofobních vazeb. Při vysokých koncentracích solí nebo v částečně dehydratovaném stavu je možné nalézt A-DNA, která je pravotočivou dvoušroubovicí, kde na

jednu otáčku připadne 11 bp. Je kratší a silnější než B-DNA a má průměr 2,3 nm. Forma Z-DNA je pak levotočivá dvoušroubovice, která se vyskytuje ve šroubovicích bohatých na C:G a G:C páry bází a obsahujících střídající se puriny a pyrimidiny. Nachází se zde 12 bp na jednu otáčku, průměr je 1,8 nm a má jediný hluboký žlábek [1,2].

3 METODY IZOLACE A PURIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Další část této práce je věnována srovnání možností izolace a purifikace nukleových kyselin běžnými metodami a nově vyvíjenými postupy, které využívají magnetizovatelné mikro- a nanočástice. Metod pro izolaci nukleových kyselin existuje mnoho, například fenol-chloroformová extrakce [4], vysolování [5], adsorpce na silikát za použití chaotropních solí [6], iontová chromatografie [7], a nově se také se experimentuje s použitím magnetizovatelných částic [8]. Nejdříve jsou ale uvedeny obecné podmínky izolace nukleových kyselin.

3.1 Obecné podmínky izolace nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin je jednou z nejdůležitějších metod molekulární biologie. Pro úspěšnou izolaci je vždy nejdříve nutné narušit buňky nebo celé tkáně, ve kterých se nukleové kyseliny nachází. Toto narušení musí být zároveň šetrné, aby nedošlo k poškození nukleových kyselin. Pro rozklad buněk a uvolnění jejich obsahu je možné použít detergenty, které rozruší membrány, nebo různé fyzikálně-chemické postupy (například použití ultrazvuku). Detergenty mohou být iontové povahy, například dodecylsírán sodný (SDS) nebo soli žlučových kyselin [9].

Degradaci nukleových kyselin je nutné zabránit během celého procesu jejich izolace, musí se tedy zajistit takové podmínky, aby k ní nedošlo. Tyto podmínky by měly co nejvíce odpovídat fyziologickým hodnotám a jednou z nich je inaktivace nukleáz, jako je ribonukleáza při izolaci RNA a deoxyribonukleáza při izolaci DNA. Pro tuto inaktivaci se používá kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), která působí jako chelatační činidlo, váže se na dvojmocné kovové ionty v roztoku (například Ca^{2+}), čímž dojde ke snížení jejich reaktivity. Tyto ionty působí jako kofaktory výše uvedených nukleáz [10].

Dále musí být zajištěna optimální teplota a pH roztoků, ve kterých je DNA uchovávána, aby nedošlo k její denaturaci. Při zahřívání roztoku, ve kterém se nachází dvoušroubovice DNA, na určitou teplotu dojde ke kolapsu nativní dvouřetězcové struktury DNA, oddělení komplementárních řetězců DNA a jejich sbalení do náhodného uspořádání. Denaturací dojde ke změně fyzikálně-chemických vlastností roztoků DNA, například viskozity a absorpčního spektra. Teplota tání duplexu je závislá na celé řadě faktorů, jako je povaha solventu, koncentrace a typ přítomných iontů, pH, nebo obsah GC a AT párů [11]. Nesmí také dojít k mechanickému poškození nukleových kyselin. Dalším krokem izolace a purifikace nukleových kyselin je denaturace nukleoproteinových komplexů.

Nutné je také očištění od kontaminantů, jako jsou složky lyzátu při izolaci nukleových kyselin z buněk nebo tkání, PCR směs při izolaci PCR produktu, uhlovodíky nebo ostatní typy nukleových kyselin. Při rozkladu buněk se v roztoku spolu s nukleovými kyselinami nachází i celá řada dalších chemických látek, které byly uvolněny z buňky a ty je potřeba odstranit. Kontaminantem mohou být i jiné nukleové kyseliny. Při izolaci DNA je tak potřeba odstranit RNA, která v buňkách převažuje. Pro její odstranění se používá enzym ribonukleáza. Obdobně při izolaci RNA je potřeba odstranit DNA pomocí deoxyribonukleázy. Také je nutné odlišit jednotlivé typy RNA. Nejčastěji se izoluje mRNA, u které se využívá jejího poly(A) zakončení. mRNA je tak možné izolovat pomocí vazby na komplementární poly(T) řetězce [10].

Zvláštní pozornost je třeba věnovat izolaci RNA, protože jde o velmi nestabilní molekulu s velmi krátkým poločasem rozpadu po extrakci z buněk nebo tkání. Ribonukleázy jsou enzymy nacházející se v krvi, všech tkáních a většině bakterií a plísní v běžném prostředí. Jde o teplotně stabilní enzymy, které nevyžadují kofaktory. Inaktivace je možné docílit použitím guanidin thiokyanátu nebo fenolu a SDS [12].

3.2 Fenol-chloroformová extrakce

Stále ještě velmi používanou metodou je fenol-chloroformová extrakce. Slouží k odstranění všech nežádoucích složek roztoku, ve kterém se nukleová kyselina nachází. K roztoku se

přidává směs fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu. Fenol slouží ke srážení proteinů a chloroform k extrakci lipidů. Isoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu. Roztok fenolu musí být čistý, nesmějí se v něm nacházet žádné odpadové produkty vzniklé oxidací a upravuje se u něj pH podle typu izolované nukleové kyseliny.

Nukleová kyselina je uchovávána ve vodném roztoku. Chloroform, což je organické rozpouštědlo, se s ním nemísí a směs se tak rozdělí na dvě fáze, kdy nahoře je fáze vodná a dole chloroformová. Protřepáním se tyto fáze promísí a dojde k vysrážení proteinů fenolem. Po odstředění se fáze oddělí, přičemž na jejich rozhraní se vytvoří prstenec proteinů. Horní vodná fáze obsahující nukleové kyseliny je přenesena do čisté mikrozkušavky.

Ve vodné fázi se mohou nacházet stopové zbytky fenolu, je tedy nutné ji extrahovat směsí chloroformu a isoamylalkoholu pro jeho odstranění. Fenol totiž může narušit funkčnost enzymů v následných biochemických reakcích.

Nukleové kyseliny jsou následně precipitovány pomocí koncentrovaného etanolu. Po odstředění se na dně mikrozkušavky objeví mléčně zkalený sediment. Bílé zbarvení má vlivem koprecipitujících se solí. Po odstranění supernatantu je přidán vhodný pufr, ve kterém jsou nukleové kyseliny rozpuštěny [10].

Tradiční fenol-chloroformová extrakce je pracná a časově náročná. Vyžaduje také velké množství spotřebního materiálu a je u ní častější kontaminace mezi jednotlivými vzorky než u jiných metod [13]. Není vhodná pro malé množství roztoku nukleových kyselin (například 10 μ l).

3.3 Adsorpce na silikát

Dnes je tato metoda již nejčastějším způsobem izolace nukleových kyselin. Vychází z premisy, že se DNA v přítomnosti roztoků s velkou iontovou silou (jako jsou chaotropní soli) a za určitého pH adsorbuje na silikátový povrch a v přítomnosti roztoků s malou iontovou silou (například voda) je z něj eluována [14]. Chaotropní soli (například guanidin thiokyanát) jsou iontové sloučeniny snižující strukturovanost vody. K roztoku nukleových kyselin, které je třeba purifikovat, jsou přidány chaotropní soli, suspenze silikátových částic

nebo skleněných vláken a pufr pro udržení konstantní hodnoty pH. Směs je protřepána pro usnadnění imobilizace DNA na částice. Odstředěním částice sedimentují a zbytek roztoku je odsát. Částice se promyjí pufrům s obsahem chaotropních solí. Po odsátí pufru zůstane na povrchu částic DNA, kterou je možné uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru neobsahujícího chaotropní soli a dalším odstředěním. Při adsorpci DNA na silikát se uplatňují elektrostatické interakce, dehydratace DNA a povrchu silikátu a vodíkové vazby mezi povrchem DNA a silikátu [15].

Tato metoda je rychlá, jednoduchá a pohodlná, jsou na ní často založeny komerční soupravy pro izolaci DNA. Metoda má dobrou reprodukovatelnost a nevyžaduje speciální vybavení laboratoře. Kontaminace mezi jednotlivými vzorky není příliš častá [16].

3.4 Magnetická separace

K magnetické separaci nukleových kyselin se používají magnetizovatelné částice (MPs), což jsou struktury o rozměrech řádově nanometrů až mikrometrů, které mají paramagnetické nebo superparamagnetické vlastnosti. Pokud se MPs nacházejí v roztoku, mohou se jednoduše rozptýlovat nebo shlukovat v závislosti na působení vnějšího magnetického pole. Povrch MPs je možné modifikovat různými látkami, čímž je zajištěna specifická izolace daných biomolekul, virů nebo buněk [17]. MPs mají i řadu jiných využití, jako je cílený transport genů [18] nebo léčiv, oprava tkání, detoxikace biologických tekutin [19] a zobrazování pomocí nukleární magnetické rezonance [20].

3.4.1 Magnetické látky

Každý elektron v atomu má orbitální dipólový magnetický moment a spinový magnetický dipólový moment, což jsou vektory, jejichž výslednice se vektorově skládá s výslednicemi ostatních elektronů v atomu a obdobně pro všechny atomy ve vzorku látky. Pokud součet všech těchto magnetických dipólových momentů vytváří makroskopické magnetické pole, látka je označována jako magnetická. Existují 3 hlavní typy magnetismu: diamagnetismus,

paramagnetismus a feromagnetismus. Diamagnetismus vykazují všechny látky, ale je velmi slabý, proto je snadno překryt jiným typem magnetismu.

Atomy látek vykazujících paramagnetismus mají magnetický dipólový moment i bez působení vnějšího magnetického pole, ale tyto momenty jsou orientovány náhodně, takže výsledné magnetické pole látky je nulové. Působením vnějšího magnetického pole se dipólové momenty uspořádají ve směru vnějšího pole. Po odstranění působení vnějšího magnetického pole toto dipólové uspořádání zaniká, a látka tak již magnetické pole netvoří.

Pro feromagnetické látky je typické, že některé jejich elektrony seřadí souhlasně své výsledné magnetické dipólové momenty a vytvoří tzv. domény. Působením vnějšího magnetického pole jsou magnetické momenty těchto domén seřazeny a je tak vytvořeno silné magnetické pole. Po odstranění působení vnějšího magnetického pole je toto uspořádání magnetických dipólových momentů převážně zachováno [21].

Superparamagnetismus vykazují shluky feromagnetických nebo ferimagnetických nanočástic. U dostatečně malých nanočástic se může směr magnetických dipólových momentů měnit vlivem fluktuací teploty. Bez přítomnosti vnějšího magnetického pole je jejich magnetické pole nulové. V přítomnosti vnějšího magnetického pole jsou pak magnetické dipólové momenty seřazeny v jeho směru, přičemž výsledné magnetické pole je mnohem vyšší než u paramagnetických látek [22].

3.4.2 Syntéza magnetizovatelných částic

Využití MPs je závislé na jejich fyzikálně chemických vlastnostech, jako je velikost částic i magnetizace nebo morfologie povrchu. Nejčastějším materiálem pro výrobu superparamagnetických částic jsou oxidy kovů, jako je maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nebo magnetit (Fe_3O_4). Železné částice o rozměrech do 10 nm vykazují superparamagnetismus, zatímco v řádech μm vykazují feromagnetismus. Nanočástice z oxidů železa je možné snadno syntetizovat a upravovat jejich velikost podle velikosti biomolekul, se kterými mají interagovat (protein 5-50 nm, virus 20-450 nm a buňky 10-100 μm [17]). Metody syntézy zahrnují například litografii elektronovým paprskem [23], mikroemulzi, sonochemickou syntézu a hydrolytické reakce [19].

Mikroemulze je termodynamicky stabilní izotropní disperze dvou nemísitelných kapalin. V mikroemulzi typu voda v oleji je vodná fáze rozptýlená v podobě kapek o velikosti 1-50 nm, které jsou obklopeny vrstvou surfaktantových molekul. Po začlenění rozpustné soli kovu do vodné fáze mikroemulze, se ta usadí ve vodních mikrokápkách obklopených olejem. Mikrokapky se neustále rozpadají, splývají a opět se rozpadají. Pokud jsou 2 reaktanty rozpuštěny ve stejných mikroemulzích typu voda v oleji, po promíchání vytvoří precipitát. Růst částic v mikroemulzi závisí na agregaci jader a výměny mezi jednotlivými kapkami. Mikroemulzí je možné syntetizovat superparamagnetické nanočástice z oxidů železa, které mají uniformní chemické a fyzikální vlastnosti. Velikost nanočástic závisí na velikosti vodního jádra micel, takže může být velmi uniformní i méně než 15 nm [19].

Hydrolytická reakce je založena na koprecipitaci Fe^{2+} a Fe^{3+} ve vodných solných roztocích přidáním zásady. Velikost, tvar a kompozici nanočástic je možné ovlivnit typem použité soli (chlorid, sulfát, nitrid, perchlorát), dále poměrem Fe^{2+} a Fe^{3+} , hodnotou pH a iontovou silou roztoku, ve kterém reakce probíhá. Běžně je přidána zásada do roztoku chloridů Fe^{2+} a Fe^{3+} v molárním poměru 1:2. Je precipitován magnetit, který má černou barvu. Kompletní precipitace nastává kolem pH 9 až 14 a v neoxidujícím prostředí zbaveném kyslíku je udržen molární poměr 1:2. Oxidace radikálně mění fyzikální a chemické vlastnosti částic, proto a také pro zabránění jejich aglomerace, je jejich povrch pokryt organickými a anorganickými molekulami již během precipitace. Z prostředí je odstraněn kyslík pomocí probublávání dusíkem. V důsledku odstranění kyslíku je také redukována velikost vzniklých částic v porovnání s ostatními metodami syntézy. Za optimálních podmínek syntézy se v saturovaném médiu zformuje krystalické jádro, které dále roste. Tento růst je uskutečněn přidáváním a odstraňováním jednotlivých monomerů, jako jsou atomy, ionty nebo molekuly. Síla, která způsobuje disoluci monomerů, se zvyšuje se snižující se velikostí částic. Pokud se tedy v roztoku nacházejí částice různých velikostí, větší částice budou růst na úkor menších [19].

3.4.3 Modifikace povrchu magnetizovatelných částic

Po syntéze nanočástic je vyžadována modifikace jejich povrchu pro stabilizaci *in vivo* a *in vitro* i pro zvýšení jejich biokompatibility. Samotné částice mají hydrofobní povrch s velkým poměrem povrchu částice vůči jejímu objemu. Mezi jednotlivými MPs dochází k hydrofobním interakcím, a vytvářejí tak shluky, čímž se zvětšuje jejich objem. Jednotlivé shluky vykazují silné feromagnetické vlastnosti (mezi nimi je dipól-dipólová přitažlivost). Pokud se k sobě přiblíží dva větší shluky, každá jejich částice je dále magnetizována vlivem magnetického pole sousedního shluku, čímž jsou zesíleny agregační vlastnosti. Mezi částicemi tak vznikají nejen Van der Waalsovy interakce, ale i magnetická přitažlivost, modifikace jejich povrchu je tedy nepostradatelná pro eliminaci těchto vlastností. Pro stabilizaci MPs je často potřeba velká hustota pokrytí povrchu. Již při syntéze částic tedy bývá přidán stabilizátor, například polymer nebo surfaktant pro zabránění agregace vytvořených částic [19].

Například při modifikaci pomocí proteinu laktoferinu jsou částice stabilní při pokojové teplotě a je redukována nespecifická endocytóza *in vivo*. Pokrytí komerčních tosylovaných polystyrenových MPs vrstvou zlata zlepšuje orientaci připojení protilátek k povrchu částic a redukuje nespecifickou adsorpci [17] a pokrytí polyetylen glykolem zlepšuje biokompatibilitu částic [19].

Pro magnetickou separaci existují dva možné způsoby modifikace pro připojení biomolekul. Jedna z nich zahrnuje pokrytí nabitou vrstvou pro elektrostatickou adsorpci molekul. Touto vrstvou může být například aminosilan pro použití v roztoku toluenu. Takto modifikované částice mohou být použity pro izolaci DNA na základě elektrostatických interakcí mezi záporně nabitou DNA a kladně nabitými částicemi s navázanou skupinou NH_2 . Tato metoda nevyžaduje použití organického rozpouštědla pro oddělení DNA sekvencí, takže je eliminován jeho vliv při pozdější detekci. Pro izolaci na základě elektrostatických interakcí je možné použít také polyamidoamin dendrimer pro modifikaci povrchu MPs [17]. Pro izolaci DNA je možné modifikovat povrch silanolovými skupinami.

Druhým způsobem je modifikace částic specifickými skupinami biomolekul. Mohou být použity aktivní chemické skupiny (jako je karboxylová nebo amino skupina), které tvoří

kovalentní vazby s biomolekulami za přítomnosti specifických reagentů. Dále se povrch MPs může modifikovat streptavidinem nebo avidinem, který specificky váže biotinylované biomolekuly. Pro izolaci mRNA se využívá modifikace povrchu poly(T) řetězci. Existuje i mnoho jiných příkladů tohoto způsobu modifikace. Tato metoda je často používána pro imobilizování specifických receptorů pro izolaci cílových molekul [17].

Existuje několik firem zabývajících se přípravou komerčních MPs používaných pro magnetickou separaci. Často jde o paramagnetické částice o rozměrech několika mikrometrů s pokrytím povrchu polymery a jádrem tvořeným magnetickou nanočásticí. Modifikovány mohou být mnoha různými molekulami pro specifickou izolaci daného produktu [17].

4 METODY DETEKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN

4.1 Polymerázová řetězová reakce

Pro detekci nukleových kyselin je často nutná jejich amplifikace. Tu je možné *in vitro* provádět například pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Během několika hodin je možné sekvence (ať již jde o geny nebo negenové sekvence) amplifikovat i milionkrát nebo vícekrát. Je nutné znát krátké nukleotidové sekvence ohraničující úsek, který má být amplifikován. Je totiž potřeba vyrobit syntetické oligonukleotidy zvané primery, které budou komplementární k těmto známým hraničním sekvencím. Metoda PCR je velmi významná například v prenatální diagnostice při diagnostice dědičných onemocnění, kdy se vychází z velmi malého množství DNA. Dalším významným využitím PCR jsou forenzní případy.

Metoda zahrnuje tři kroky, které probíhají v opakujících se cyklech. Prvním krokem je denaturace, při které jsou rozděleny řetězce DNA rozpadem vodíkových můstků mezi vlákny při teplotě 92-95 °C. Doba denaturace se liší v závislosti na délce amplifikovaného řetězce v rozmezí 15-60 sekund. První denaturace probíhá delší dobu, pro zajištění úplného oddělení řetězců.

Druhým krokem je hybridizace, při které se na denaturovaná vlákna DNA navážou oligonukleotidové primery. Hybridizace probíhá při 50-60 °C s nadbytkem primerů. Teplota se liší v závislosti na počtu a typu bází primerů, příliš nízká teplota snižuje specifitu (primery totiž nasednou i na sekvence, které jsou komplementární jen zčásti), kdežto příliš vysoká zamezí amplifikaci. Doba hybridizace se obvykle pohybuje v rozmezí 30-60 sekund.

Třetím krokem je polymerace, která probíhá obvykle při 70-72 °C po dobu 1-1,5 minuty, kdy DNA-polymeráza replikuje úsek DNA mezi komplementárními místy k primerům. Primer obsahuje volnou 3'-OH skupinu potřebnou pro kovalentní navázání

dalšího nukleotidu a následné prodlužování řetězce a denaturovaná DNA zde funguje jako templát.

Po proběhnutí těchto tří kroků následuje další cyklus. Amplifikace je exponenciální, jelikož z jedné dvoušroubovice vzniknou po jednom cyklu dvě a z každé v dalším cyklu opět dvě. Po 30 amplifikacích tak vznikne více než miliarda kopií sekvence DNA. Poslední polymerace probíhá delší dobu pro dokončení všech syntéz.

Jako replikáza se používá termostabilní DNA-polymeráza z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která je také nazývána *Taq*-polymeráza. Ta zůstává aktivní i během denaturačního kroku na rozdíl například od DNA-polymerázy I z bakterie *Escherichia coli*.

Přístroje pro PCR pojmu velké množství vzorků a jsou řízeny jen postupným střídáním teploty. Amplifikace specifických sekvencí je tak jednoduchá a rychlá. Nevýhodou je, že *Taq*-polymeráza nemá korekční aktivitu, a tak produkuje při replikaci chyby s vyšší četností než je obvyklé *in vivo* nebo u jiných polymeráz. Druhou nevýhodou je, že *Taq*-polymeráza neúčinně amplifikuje úseky delší než několik tisíc nukleotidových sekvencí [2].

PCR je možné použít i k detekci vytvořených ampliconů za použití real-time PCR, kdy se sleduje navýšení fluorescence barviv nebo sondy po jednotlivých proběhnutých cyklech. Intenzita záření je úměrná množství produktu [24].

4.2 Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, při které je využíváno schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly. Elektroforéza se používá pro separaci látek, které je možné následně kvantifikovat. Podle prostředí, ve kterém separace probíhá, se elektroforetické metody dělí na papírovou elektroforézu, gelovou elektroforézu a kapilární elektroforézu. Pomocí elektroforézy je možné jednoduše ověřit úspěšnost PCR.

4.2.1 Gelová elektroforéza

Gel pro gelovou elektroforézu bývá nejčastěji vyroben z agarosy nebo polyakrylamidu. Ředěné agarosové gely jsou jednoduché na přípravu a dostatečně rigidní v nízkých koncentracích. Používají se k separaci velkých makromolekul, jako jsou právě nukleové kyseliny až do velikosti 20 kb. DNA je záporně nabitá, v elektrickém poli se tedy bude pohybovat směrem ke kladnému pólu, přičemž krátké úseky se pohybují rychleji než úseky dlouhé.

Elektroforéza musí probíhat ve vodném roztoku o stálém pH, pro naplnění elektroforetické vany a přípravu gelu se tedy používají pufrы, které neutralizují ionty H^+ a OH^- , které vznikají hydrolyzou vody na elektrodách. Hustotu gelu je potřeba přizpůsobit velikosti molekul, které se separují, velké molekuly tedy vyžadují řidší gel a malé hustší. Elektroforéza také musí probíhat po dostatečnou dobu pro zvýraznění rozdílů v rychlosti putování různě velkých molekul gelem. Poloha separovaných molekul závisí tedy nejen na jejich velikosti, ale i síle použitého elektrického pole a době elektroforézy. Při předem neznámé velikosti molekul je tedy třeba srovnání s velikostí známých molekul, k čemuž jsou využívány markery molekulové hmotnosti [10].

4.2.2 Vizualizace gelu

Po separaci gelovou elektroforézou je analyt pouhým okem neviditelný, pro jeho kvantifikaci se tedy používá barvení gelu, popřípadě radioaktivní značení analytu. Je možné použít ethidium bromid, což je fluorescenční barvivo, které se specificky váže na nukleové kyseliny. Je totiž schopno interkalovat mezi ploché páry bází v molekule DNA popřípadě dvouvláknové úseky molekuly RNA. Tato jeho schopnost je významná právě pro vizualizaci nukleových kyselin.

Ethidium bromid se do gelu přidává již při jeho přípravě, nukleové kyseliny se tak obarví ihned po spuštění elektroforézy. Elektroforézu je tedy možné kdykoliv přerušit a stav separace zkontrolovat na UV-transluminátoru, což je plochý zdroj UV záření. Zároveň ale přítomnost ethidium bromidu ve struktuře nukleových kyselin ovlivňuje jejich pohyblivost v gelu, především u nelineárních molekul. Druhá nevýhoda použití ethidium bromidu je ta, že

slabě fluoreskují i jeho volné molekuly přítomné v gelu. Navíc jsou tyto volné molekuly kladně nabitě, takže postupují ve směru opačném ke směru pohybu nukleových kyselin, čímž vzniká ostré rozhraní mezi částí gelu bez ethidium bromidu, které má černé pozadí, a částí obsahující volné molekuly ethidium bromidu, která má oranžové pozadí. Pro zvýšení kvality následné fotografie je tak lepší obarvit nukleové kyseliny v lázni s ethidium bromidem až po skončení elektroforézy s následným odstraněním přebytečných molekul promytím v destilované vodě [10].

4.3 Spektrofotometrie

Nejjednodušší a nejvíce používaný způsob detekce nukleových kyselin je pomocí spektrofotometrie. Tato metoda je založena na premise, že aromatické struktury bází specificky absorbují UV-záření určitých vlnových délek, přičemž intenzitu absorpce je možné měřit spektrofotometrem.

Nukleové kyseliny specificky absorbují UV-záření prostřednictvím konjugovaných elektronů, které se nacházejí nad a pod rovinou bází v jejich struktuře. Tyto elektrony jsou charakteristicky uspořádány, což vede k tomu, že nukleové kyseliny různě intenzivně absorbují energii fotonů různých vlnových délek. Po vynesení absorbance čistého vodného roztoku nukleových kyselin při různých vlnových délkách do grafu je získána charakteristická křivka s vrcholem při vlnové délce 260 nm. Hodnota absorbance je přímo závislá na koncentraci nukleových kyselin ve vzorku.

Jsou-li v roztoku pouze nukleové kyseliny, míra absorpce odpovídá jejich koncentraci. Často je ale roztok kontaminován bílkovinami, jejichž aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrosin také specificky absorbují UV-záření. Intenzita absorpce nukleových kyselin a bílkovin se liší při různých vlnových délkách, čistotu vzorku je tedy možné posoudit z poměru absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Poměr absorbancí při těchto vlnových délkách je charakteristický pro vzorek nukleových kyselin vzhledem k charakteristickému tvaru absorpční křivky. Tento tvar je stejný bez ohledu na koncentraci, je tedy stejný i uvedený poměr absorbancí. Hodnota absorbance při vlnové délce 260 nm u čistého roztoku je

dvojnásobná oproti absorpanci při vlnové délce 280 nm. Po znečištění bílkovinami obsahujícími aromatické aminokyseliny, absorbuje roztok více při vlnové délce 280 nm.

RNA i DNA absorbují UV-zářeni víceméně shodně, pro stanovení koncentrace pouze jedné složky je tedy zapotřebí druhou z roztoku odstranit. Způsob výpočtu koncentrace závisí na tom, zda je nukleovou kyselinou DNA nebo RNA, zda je molekula jednovláknová nebo dvouvláknová a zda je známa sekvence, případně molekulová hmotnost molekuly [25].

4.4 Elektrochemické metody

Elektrochemické metody spočívají v měření elektrických veličin, jako je proud, potenciál nebo náboj, a jejich vztahu s chemickými veličinami. Elektrochemické metody jsou v současnosti velmi populární, například pro konstrukci chemosenzorů a biosenzorů.

Elektrochemické procesy se odehrávají na rozhraní elektrod a roztoku. Vždy je vytvořena elektrochemická cela složená ze dvou až čtyř elektrod a elektrolytu, který obsahuje vzorek. Povrch elektrody uskutečňuje převod mezi vodivostí iontovou (v elektrolytu) a vodivostí elektronovou. Jedna elektroda má vždy konstantní potenciál, tedy potenciál nezávislý na vlastnostech vzorku, a označuje se tedy jako referentní. Potenciál druhé elektrody se mění v závislosti na vlastnostech vzorku, označuje se tedy jako pracovní [26].

Voltametrie a polarografie jsou metody, při nichž se sleduje závislost proudu procházejícího pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku na potenciálu, který se na tuto elektrodu vkládá z vnějšího zdroje. Elektrochemický článek musí obsahovat pracovní elektrodu ponořenou do analytu a referentní elektrodu, která je spojena s roztokem pomocí solného můstku. Tomuto uspořádání se říká dvouelektrodové. Pokud se přidá také pomocná elektroda, označuje se takovéto uspořádání jako tříelektrodové. Potenciál nepolarizovatelné referentní elektrody je konstantní, se změnou vloženého napětí se tak mění pouze potenciál pracovní elektrody. Ten ale není možné přesně měřit, protože při dvouelektrodovém zapojení se při průchodu část vloženého napětí ztratí na odporu analytu. U tříelektrodového zapojení prochází proud pouze mezi pomocnou a pracovní elektrodou a skutečný potenciál pracovní elektrody je tak možné vůči potenciálu referentní elektrody

změřit. Pracovní elektrody mohou být rtuťové nebo z tuhých materiálů. Při použití kapající rtuťové kapkové elektrody (DME) se jedná o polarografii, kdežto při použití visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) nebo tuhých elektrod se jedná o voltametrii. Rtuťové elektrody jsou vhodné pro stanovení látek katodickou redukcí při negativních potenciálech, vodík se zde totiž redukuje s velkým přepětím, platinové a uhlíkové jsou pak vhodné pro stanovení látek anodickou oxidací. Povrch rtuti je homogenní, hladký a je možné jej snadno obnovit. Referenční elektrody bývají elektrody II. druhu, například argentchloridová nebo kalomelová. Pomocné elektrody bývají z inertního materiálu, například z platiny nebo uhlíku ve tvaru plíšku nebo drátku [27].

Proudová odezva při polarizaci elektrody je složena se složek kapacitního a faradayického proudu. Kapacitní proud je nutný pro nabití elektrody na daný potenciál, čímž se na jejím povrchu vytvoří elektrická dvojvrstva. Faradayický proud je výsledkem redukčního nebo oxidačního děje na elektrodě a jeho velikost je dána velikostí náboje, který je vyměňován mezi elektrodou a roztokem, za jednotku času [26].

Pokud v analytu není látka, která by se oxidovala nebo redukovala, neprobíhá elektrodová reakce a elektrodou prochází pouze kapacitní proud. Pokud se v okolí elektrody nachází látka, která se při určitém potenciálu oxiduje nebo redukuje (výměna elektronu mezi elektrodou a ionty), dojde k depolarizaci elektrody a začne jí procházet faradayický proud. Velikost tohoto proudu je mírou koncentrace dané látky. Křivka, zobrazující závislost proudu na vloženém potenciálu se nazývá voltamogram a přítomnost analytu se na ní projeví voltametrickou vlnou [27].

Existují dva hlavní typy elektrochemických metod: potenciometrické a techniky s řízeným potenciálem. Potenciometrické metody jsou techniky s nulovým proudem, ve kterých je informace o vzorku získána pomocí měření potenciálu, který se vytvoří na membráně elektrody. Existuje mnoho různých materiálů pro výrobu membrán, a každý z nich je vhodný pro rozpoznávání jiného iontu.

Principem metod s řízeným potenciálem je sledování transportu iontů na rozhraní elektrody a vzorku za dynamických podmínek (při nenulovém proudu). Potenciál elektrod je zde použit pro vyvolání transportu elektronu a měří se výsledný proud, vyvolává tak

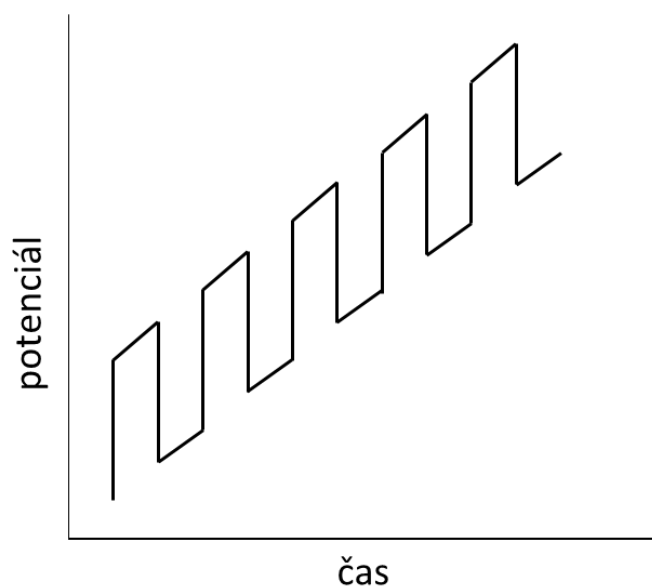
oxidačně-redukční děj. Výsledný proud odráží míru, kterou se elektrony pohybují skrz rozhraní elektrody a vzorku.

Mezi metody s řízeným potenciálem patří chronoamperometrie, cyklická, pulzní, AC, rozpouštěcí voltametrie/polarografie nebo průtoková analýza. Mezi techniky pulzní voltametrie/polarografie pak patří normální pulzní, diferenční pulzní, square-wave nebo staircase voltametrie/polarografie. Mezi techniky rozpouštěcí voltametrie/polarografie patří anodická, katodická, potenciometrická, adsorpční a abrazivní rozpouštěcí voltametrie [26].

Pro elektroanalýzu DNA je možné použít různé metody voltametrie/polarografie, jako je cyklická, linear sweep, eliminační, diferenční pulzní, AC, adsorpční rozpouštěcí, square-wave voltametrie/polarografie a chronopotenciometrie [28]. Tato práce je zaměřena na square-wave voltametrii/polarografii, která bude využita pro řešení praktické části závěrečné práce.

4.4.1 Square-wave voltametrie/polarografie

Při square-wave voltametrii je na elektrodu vložen potenciál lineárně se měnící s časem a ten se moduluje střídavým napětím pravoúhlého tvaru o malé amplitudě (asi 10 mV, Obrázek 4.1) a frekvenci zhruba 100 Hz [27]. Během jednoho cyklu je proud měřen dvakrát, poprvé na konci dopředného pulzu a podruhé na konci zpětného pulzu. Zpětný pulz způsobuje opačnou reakci produktu než proud dopředný. Do voltamogramu jsou vynášeny rozdíly obou měření v závislosti na napětí. Hodnota proudu píku na voltamogramu je úměrná koncentraci analytu.

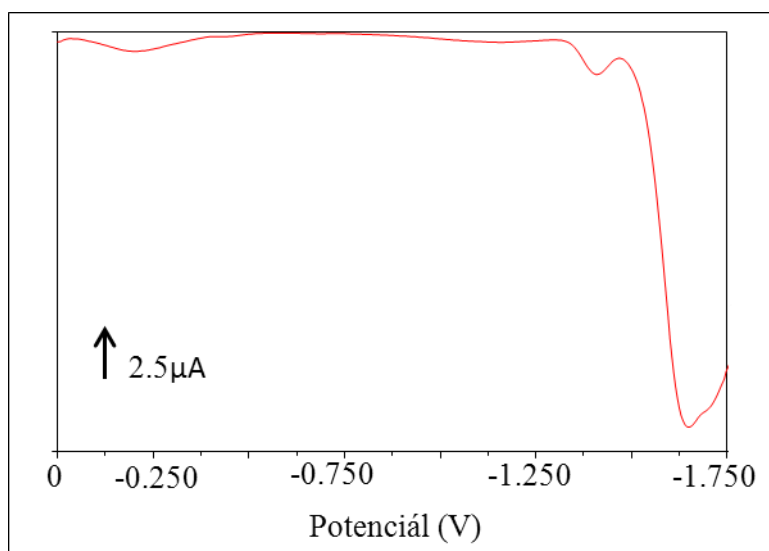


Obrázek 4.1 Potenciálový program při square-wave voltametrii/polarografii

Metoda je velmi senzitivní, jelikož výsledný proud je vyšší než obě složky proudu zvlášť (dopředná i zpětná). Také efektivně eliminuje kapacitní složku proudu, je tedy možné dosáhnout velmi nízké detekční limity. Proudů naměřené pomocí square-wave voltametrie jsou přibližně 4x vyšší než ty naměřené pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV).

Velkou výhodou této metody je její rychlost. Efektivní rychlost polarizace je dána součinem frekvence square-wave (v jednotkách Hz) a výšky vlny. Doba analýzy je tak velmi redukována, je možné vykreslit celý voltamogram během několika vteřin (u DPV jde o 2 až 3 minuty). Celý voltamogram tak může být získán pomocí jediné kapky rtuti [26].

Square-wave voltametrie je nejlepší pulzní metodou, jelikož efektivitu eliminace kapacitního proudu má shodnou s DPV, ale má lehce vyšší senzitivitu, je rychlejší a je možné ji použít s různými druhy materiálů elektrod, přičemž největší reprodukovatelnost a nejnižší limity detekce má měření pomocí rtuťové elektrody. Pro analýzu DNA jde o jednu z metod s největší senzitivitou a nejnižšími detekčními limity [28]. Typický záznam (voltamogram) detekce DNA pomocí square-wave voltametrie Obrázek 4.2.



Obrázek 4.2 Typický voltamogram DNA naměřený pomocí square-wave voltametrie

5 MATERIÁL A METODY

Tato část práce je věnována materiálu a přístrojovému vybavení použitému pro vypracování experimentální části bakalářské práce. Jsou zde uvedeny metody pro přípravu vzorku, izolaci nukleových kyselin z něj a detekci těchto nukleových kyselin.

5.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly v ACS čistotě pořízeny od firmy Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA), pokud není uvedeno jinak. Parafilm pro elektrochemické měření byl také od firmy Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA).

DNA bakteriofágu λ o délce 48 502 bp byla pořízena od firmy New England BioLabs Inc. (MA, USA). Směs pro PCR byla připravena pomocí *Taq* PCR Kit firmy New England Biolabs Inc. (MA, USA). Primery pro PCR bakteriofágu λ byly syntetizovány firmou Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA). Sekvence „forward primeru“ byla následující: 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3'. Sekvence „reverse primeru“ byla následující: 5'-TCCGGATAAAAACGTCGATGACATTTGC-3'.

Pro promývání částic byly použity následující roztoky: *a*) fosfátový pufr I: 0,1M NaCl + 0,05M Na₂HPO₄ + 0,05M NaH₂PO₄; *b*) 1x *Taq* pufr: 0,01M Tris-HCl, 0,05M KCl, 0,015M MgCl₂, pH 8,3 (BioLabs,USA); *c*) H₂O; *d*) 5M NaCl.

Pro optimalizaci imobilizačního roztoku byly použity: *a*) 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; *b*) 0,6M guanidin thiokyanát; *c*) 0,15M Tris-HCl (pH 7,5); *d*) 0,5M NaCl; *e*) 1,25M NaCl; *f*) 2,5M NaCl; *g*) 3M NaCl; *h*) 4M NaCl; *i*) 5M NaCl; *j*) 2,5M LiCl; *k*) 2,5M CsCl; *l*) 2,5M KCl; *m*) 2,5M SrCl₂; *n*) 2,5M CaCl₂; *o*) 70 % etanol.

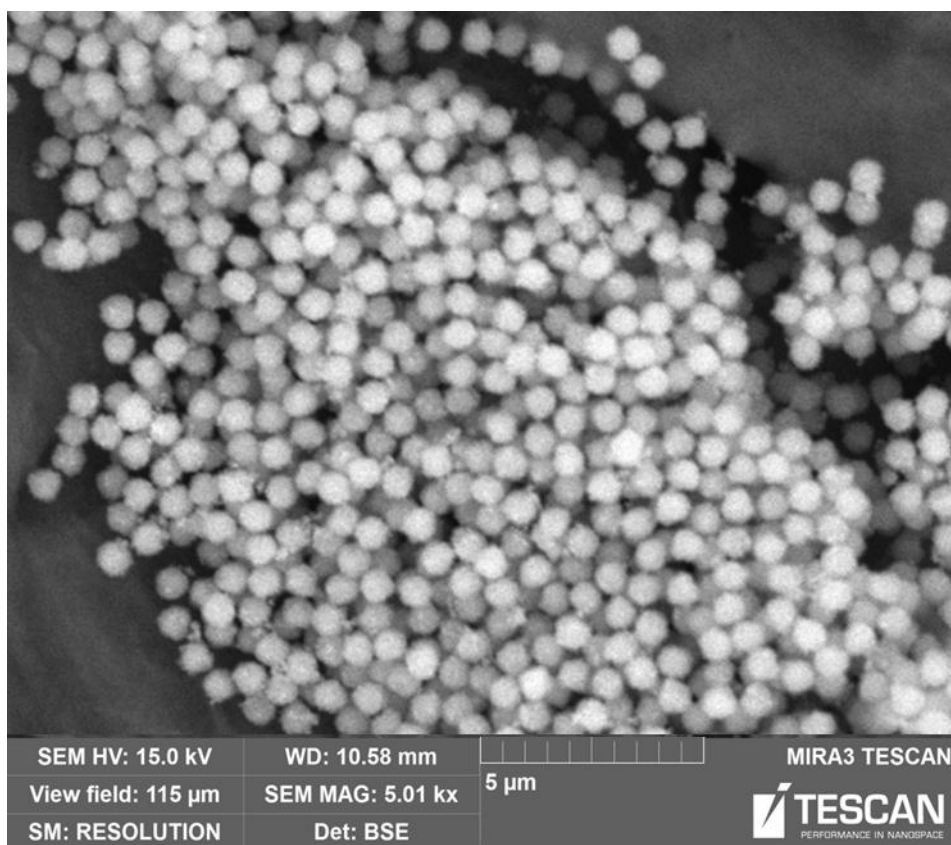
Jako eluční roztoky byly použity: *a*) fosfátový pufr II: 0,2M NaCl + 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; *b*) Tris-EDTA: 0,01M Tris + 1·10⁻⁴M EDTA (pH 6,62; 7,45; 8,02; 8,99; 9,14; 9,58; 10,19; 10,74; 10,9; 11,21); *c*) 0,01M Tris-HCl (pH 8,96).

Pro elektrochemické měření byl použit acetátový pufr s následujícím složením: 0,2M CH₃COOH + 0,2M CH₃COONa, pH 5.

5.2 Magnetizovatelné částice

Pro izolaci vzorku (specifický PCR produkt o délce 500 bp) byly použity částice Dynabeads[®] MyOne Silane (Invitrogen, Norsko) a magnetický stojan Magnetic Particle Concentrator-S (Invitrogen, Oslo). Všechny experimenty byly provedeny v RNA/DNA UV cleaner box UVT-S-AR (Biosan, Lotyšsko).

Dynabeads[®] MyOne Silane jsou uniformní částice o průměru 1,15 μm vyrobené z polystyrenu se síťovanou strukturou s rovnoměrně rozptýleným magnetickým materiálem, kterým byl oxid železa. Povrch je u těchto částic modifikován pomocí silanolových skupin, takže částice se projevují podobnými vlastnostmi jako silikát. Částice byly dodány o koncentraci 40 mg/ml ve vodě obsahující jako konzervant 0,02 % NaN_3 a byly skladovány při teplotě 2-8 $^{\circ}\text{C}$. Obrázek 5.1 ukazuje snímek těchto částic pořízený skenovacím elektronovým mikroskopem.



Obrázek 5.1 Snímek částic Dynabeads[®] MyOne Silane pořízený skenovacím elektronovým mikroskopem

5.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy R 160 P (Sartorius research, Germany)
- Autokláv Tuttnauer 2540 el (Schoeller Instruments, s.r.o., ČR)
- Mastercycler[®] ep *realplex*⁴ S (Eppendorf, Německo)
- RNA/DNA UV cleaner box UVT-S-AR (Biosan, Lotyšsko)
- Multi spin MSC-6000 (Biosan, Lotyšsko)
- Thermomixer 5355 Comfort/Compact (Eppendorf, Německo)
- AUTOLAB PGS30 Analyzer (Eco Chemie, Nizozemsko)
- VA Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko)
- Specord 210 (Analytic Jena AG, Německo)

5.4 Příprava vzorku pro izolaci nukleových kyselin

V práci došlo k optimalizaci izolace specifického PCR produktu pomocí magnetizovatelných částic. Specifický PCR produkt o délce 500 bp byl získán pomocí přístroje Mastercycler[®] ep *realplex*⁴ S (Eppendorf, Německo). Směs pro PCR byla připravena následovně: *a)* 40, 75 $\mu\text{H}_2\text{O}$; *b)* 5 μl 10x *Taq* pufru; *c)* 1 μl 0,010M dNTP; *d)* 1 μl $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ forward primeru; *e)* 1 μl $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ reverse primeru; *f)* 0,25 μl *Taq* polymerázy; *g)* 1 μl vzorku (DNA bakteriofága λ). Všechny chemikálie byly před přidáním do reakční směsi protřepány a odstředěny, s výjimkou *Taq* polymerázy, která byla pouze odstředěna.

Vytvořená reakční směs byla promíchána a vložena do přístroje, na kterém byl nastaven následující teplotní profil: počáteční denaturace probíhala po dobu 2 minut při 95 °C, poté proběhlo 60 cyklů s denaturací po dobu 15 s při 95 °C, hybridizací po dobu 15 s při 64 °C a polymerací po dobu 45 s při 72 °C. Závěrečná polymerace probíhala po dobu 5 minut při 72 °C. PCR produkt byl následně krátkodobě skladován při teplotě 4 °C až do dalšího použití. Pro dlouhodobé skladování byla použita teplota -20 °C.

5.5 Izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic

Existuje mnoho různých postupů pro izolaci a purifikaci nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic. Každý výrobce pro svůj produkt uvádí mírně odlišný postup. Všechny metody ale mají společný princip. Částice jsou vždy nejdříve promytím odděleny od roztoku, ve kterém byly uchovány. Následuje imobilizace, kdy se částice přidají k roztoku nukleových kyselin, které je potřeba purifikovat. Částice s již navázanými nukleovými kyselinami se opět promyjí pro odstranění kontaminantů a posledním krokem je eluce, kdy se nukleové kyseliny uvolňují do čistého roztoku. Výchozí postup, který byl použit pro experimentální část této práce, je podle [29]. Uvedený postup viz Obrázek 5.2.

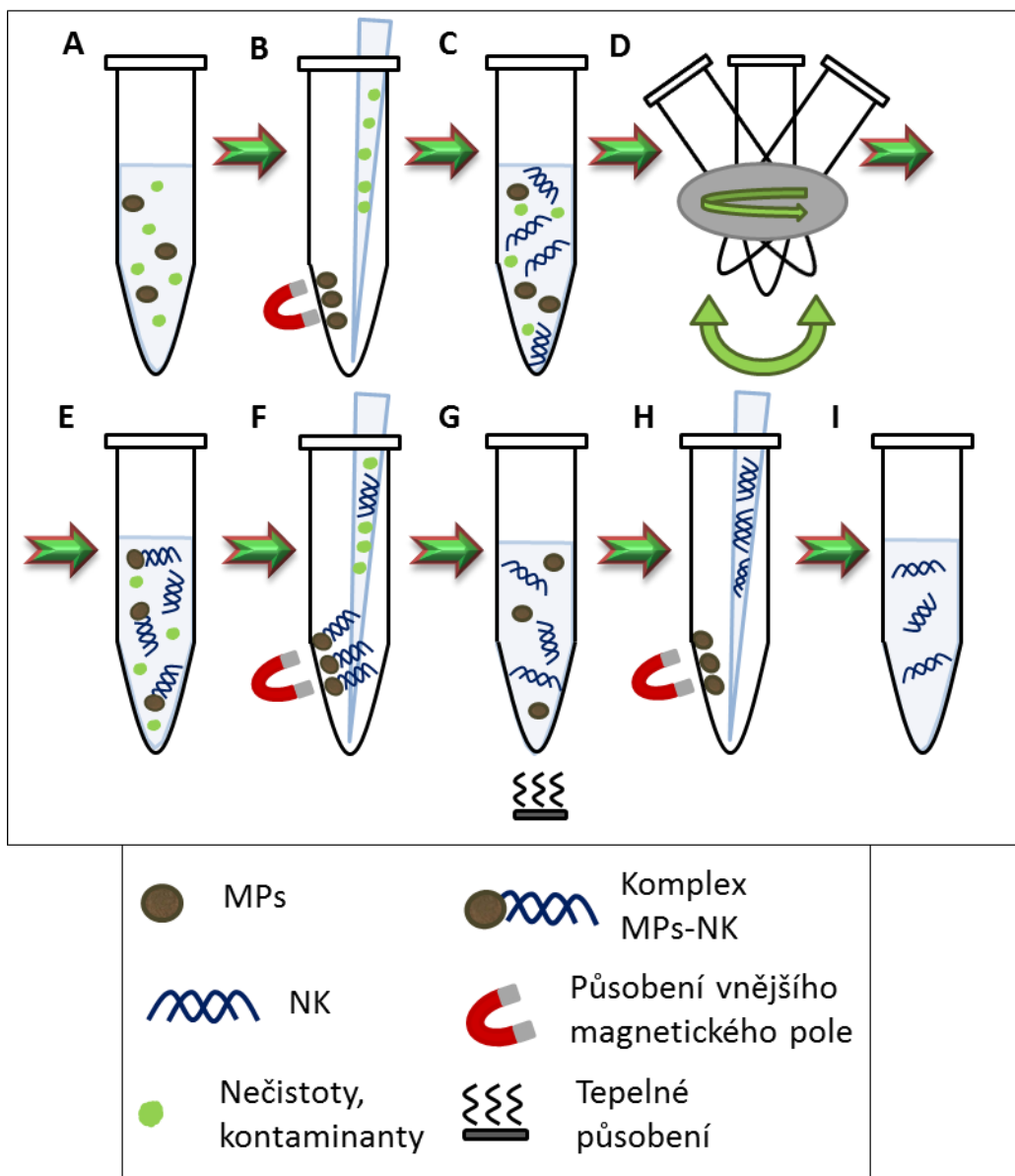
Po zajištění rovnoměrné disperze MPs v uchovávacím roztoku bylo do mikrozkušavky umístěno 10 μ l MPs. Mikrozkušavka se poté umístila na magnetický stojan, kde vlivem působení vnějšího magnetického pole došlo ke zmagnetizování MPs. Ty přilnuly ke stěně zkumavky přilehlé k magnetickému stojanu, a bylo tak možné z mikrozkušavky odstranit přebytečný uchovávací roztok.

Následně byla zkumavka odstraněna z vnějšího magnetického pole, k MPs bylo přidáno 20 μ l promývacího roztoku, a manuálně byla zajištěna rovnoměrná disperze MPs v promývacím roztoku. Poté byla zkumavka opět umístěna na magnetický stojan a promývací roztok byl odstraněn. Následně se přidal čistý promývací roztok, ale disperze MPs byla tentokrát provedena automaticky, třepáním a následným odstředěním na přístroji Multi spin MSC-6000 (Biosan, Lotyšsko). Třepání bylo nastaveno na nejsilnější stupeň a probíhalo po dobu 20 s, odstředění probíhalo při centrifugační síle 285 g po dobu 1 sekundy. Celé promývání (s manuální i automatickou disperzí částic) bylo následně dvakrát zopakováno. Celkově tedy byly částice promyty 6x.

Imobilizace je krokem, při kterém dochází k samotné izolaci a purifikaci nukleových kyselin. Na základě afinity nukleových kyselin k látce, kterou byl modifikován povrch MPs, dojde k jejich pevnému navázání na částice, pokud se nacházejí ve vhodném prostředí. Pro jeho zajištění bylo po odstranění zbytků promývacího roztoku přidáno 10 μ l roztoku

imobilizačního a 10 µl samotného vzorku. Imobilizace probíhala v několika cyklech po určitou dobu. Každý cyklus sestával z třepání na nejslabším stupni po dobu 20 s, s následným odstředěním při centrifugační síle 285 g po dobu 1 s.

Po imobilizaci následovalo promytí částic s navázanými nukleovými kyselinami. Výše uvedený postup promytí byl opět proveden třikrát, částice tedy byly 6x promyty. K promyтым částicím s navázanými nukleovými kyselinami bylo poté přidáno 30 µl elučního roztoku a eluce probíhala při zahřátí po určitou dobu na přístroji Thermomixer 5355 (Eppendorf, Německo). Vlivem teploty a pH elučního roztoku byly nukleové kyseliny uvolněny z částic do elučního roztoku. Magnetizovatelné částice byly uchyceny ke stěnám zkumavky působením vnějšího magnetického pole a roztok obsahující pouze nukleové kyseliny byl přenesen do čisté zkumavky a dále elektrochemicky analyzován.



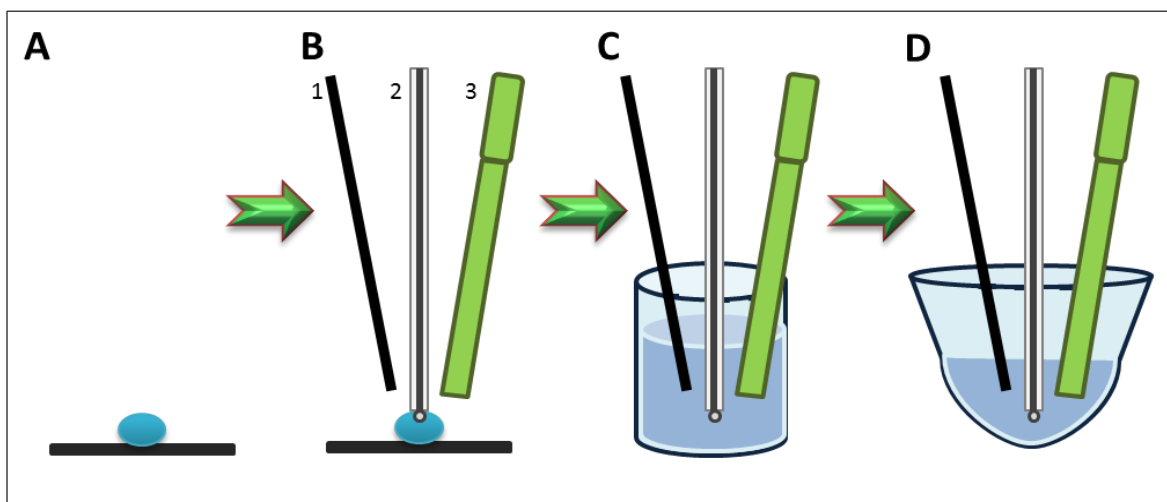
Obrázek 5.2 Schéma postupu izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic. *A* MPs nacházející se v uchovávacím roztoku; *B* Promytí částic pro odstranění zbytků uchovávacího roztoku; *C* Přidání vzorku, který je nutné izolovat; *D* Třepání a odstředění po určitou dobu; *E* Imobilizace nukleové kyseliny na MPs; *F* Promytí částic s navázanou nukleovou kyselinou pro odstranění kontaminantů a nenavázaných molekul; *G* Zahřátí mikrozkumavky pro eluci nukleové kyseliny z částic; *H* Odsátí nukleové kyseliny; *I* Předání nukleové kyseliny do čisté mikrozkumavky.

5.6 Elektrochemická detekce

Pro detekci výtěžku izolace DNA byla použita elektrochemická analýza provedená pomocí adsorptivní přenosové techniky na analyzátoru AUTOLAB PGS30 Analyzer (Eco Chemie, Nizozemsko) propojeném s VA Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Pro měření bylo použito standardní tříelektrodové zapojení, kde jako pracovní elektroda sloužila visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), pomocná elektroda byla platinová a jako referentní byla použita argentchloridová elektroda.

Při adsorptivní přenosové technice se nukleové kyseliny adsorbují na povrch pracovní elektrody. K adsorpci docházelo na parafilmu, na který byla nanесena 5 μ l kapka vzorku, ke které byla přiložena pracovní elektroda. Adsorpce probíhala po dobu 2 minut. Po adsorpci byla elektroda oddělena od vzorku a omyta v destilované vodě pro odstranění zbytku analytu, který se neadsorboval na povrchu rtuťové kapky. Po omytí byla elektroda přenesena do roztoku elektrolytu. Jako elektrolyt sloužil acetátový pufr pH 5, který je vhodný pro analýzu nukleových kyselin. Schéma adsorptivní přenosové techniky viz Obrázek 5.3.

V elektrolytu došlo k detekci DNA pomocí square-wave voltametrie. Analýza proběhla za následujících parametrů: počáteční potenciál byl 0 V, koncový potenciál byl -1,8 V, potenciálový krok byl 0,00459 V. Použitá amplituda byla 0,02505 V a frekvence 280 Hz. Ze vzniklého záznamu byla odečtena výška píku v oblasti přibližně -1,4 V, jejíž hodnoty byly vyneseny do příslušného grafu.



Obrázek 5.3 Schéma adsorptivní přenosové techniky. 1 Pomocná elektroda; 2 Pracovní elektroda; 3 Referenční elektroda; A Nanesení vzorku na parafilm; B Adsorpce nukleové kyseliny na povrch pracovní elektrody; C Omytí pracovní elektrody; D Ponoření pracovní elektrody do elektrolytu a měření.

5.7 Spektrofotometrické stanovení absorbance PCR produktu v závislosti na jeho teplotě

Pro stanovení závislosti absorbance PCR produktu na jeho teplotě byl použit přístroj Specord 210 (Analytic Jena AG, Německo). PCR produkt se nacházel v roztoku Tris-EDTA o pH 9,1, který byl během optimalizace určen jako vhodný eluční roztok. Referenčním vzorkem byl roztok Tris-EDTA. Měření absorbance probíhalo při vlnové délce 260 nm, při které dochází k největší absorbanci molekulami DNA. 200 μ l PCR produktu bylo vždy zahřáto na určitou teplotu pomocí přístroje Thermomixer 5355 Comfort/Compact (Eppendorf, Německo) a poté byla změřena jeho absorbance.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části bakalářské práce budou uvedeny výsledky experimentů vedoucích k optimalizaci navržené metody izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic. Pro dosažení maximálního výtěžku izolace DNA byly optimalizovány kroky promývání, imobilizace a eluce. Detekce výtěžku izolace byla u všech experimentů provedena pomocí square-wave voltametrie. Z každého experimentu byl vždy pík o nejvyšší hodnotě určen jako 100 % a ostatní hodnoty s ním byly porovnávány.

6.1 Výchozí podmínky izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic

Jako promývací roztok před imobilizací amplikonů byl použit fosfátový pufr I, k 10 μl částic bylo přidáno 20 μl tohoto roztoku a částice byly 3x promyty výše uvedeným postupem s jejich manuální i automatickou rovnoměrnou disperzí v roztoku.

Po odstranění zbytků promývacího roztoku bylo přidáno 10 μl vzorku, a 10 μl imobilizačního roztoku, který byl složen z 0,1M Na_2HPO_4 + 0,1M NaH_2PO_4 ; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris HCl pH 7,5 a solí v imobilizačním roztoku byla 0,5M NaCl. Imobilizace probíhala při teplotě 20 °C po dobu 40 minut a mikrozkuhavka byla třepána pouze jemně.

Po imobilizaci následovalo opakované promytí částic s navázanými nukleovými kyselinami 20 μl fosfátového pufru I. Po promytí bylo k částicím přidáno 30 μl fosfátového pufru II, jehož pH bylo 6,5 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

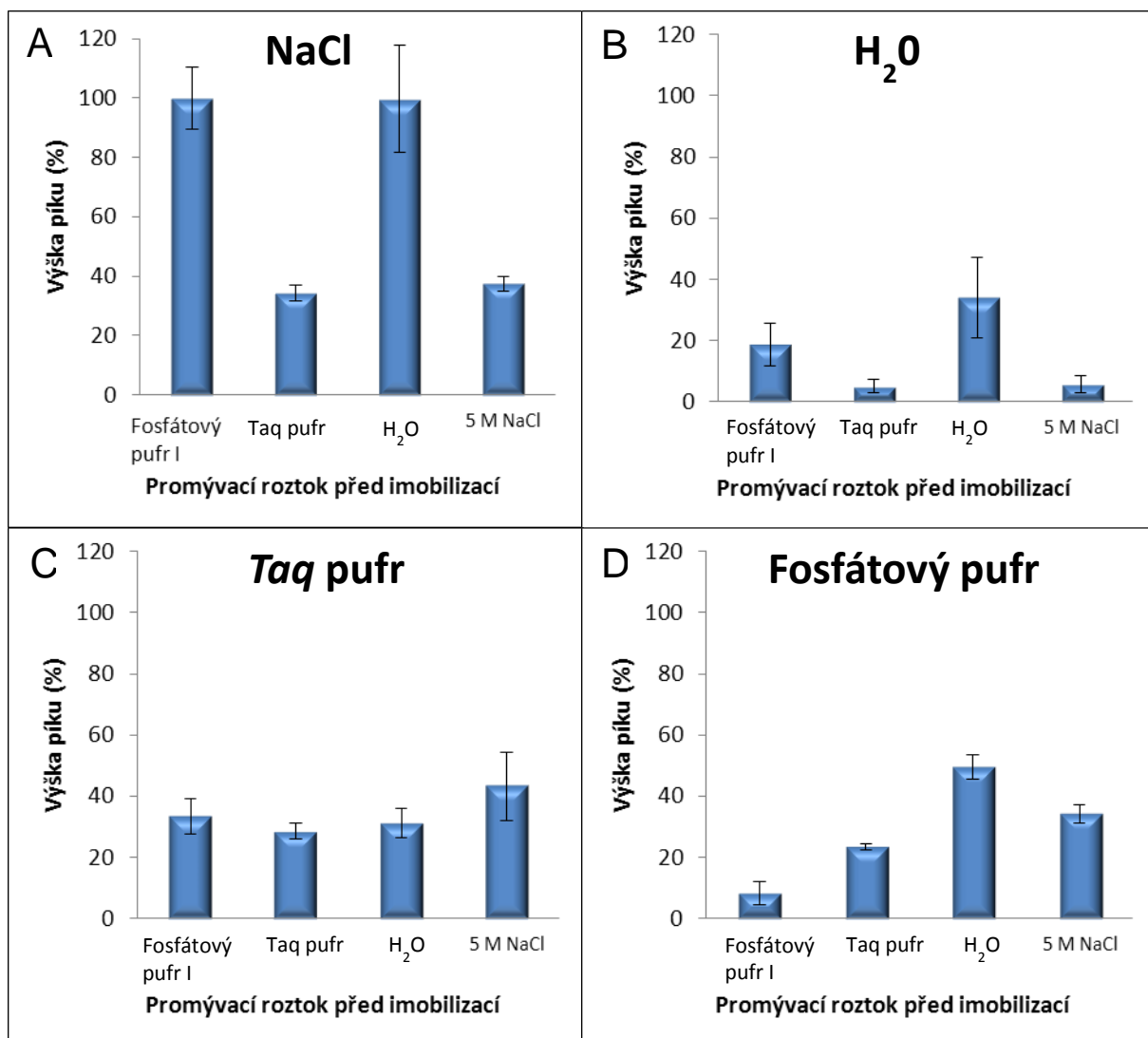
6.2 Optimalizace promývání částic

6.2.1 Vliv promývacího roztoku

Nejdříve bylo optimalizováno použití promývacích roztoků před imobilizací amplikonů a po ní. Pro experimenty byly jako promývací roztoky použity fosfátový pufr I, *Taq* pufr, H₂O a 5M NaCl. V grafech je zobrazena závislost všech promývacích roztoků před imobilizací vždy na jednom promývacím roztoku po imobilizaci (Obrázek 6.1) Použití 5M NaCl jako promývacího roztoku po imobilizaci vedlo k větší výtěžnosti ve srovnání s ostatními roztoky v průměru o 42 %. Nejvyšší účinnosti izolace bylo dosaženo, pokud byly částice před imobilizací amplikonů promyty pomocí fosfátového pufru I a po ní pomocí 5M NaCl. Pro relativní srovnání promývacích roztoků byla tato maximální hodnota výtěžnosti uvažována jako 100 %. Při použití H₂O jako promývacího roztoku před imobilizací a 5M NaCl po ní byla účinnost izolace DNA také vysoká, ale lepší opakovatelnosti měření bylo dosaženo při použití fosfátového pufru I, kdy byla směrodatná odchylka stanovení (RSD) pro 5 měření 10,4 %. Při použití H₂O byla RSD 18,1 %. Opakovatelnost byla dále zlepšena při promytí částic před imobilizací *Taq* puftrem (RSD 2,7 %) nebo 5M NaCl (RSD 2,6 %) a po ní 5M NaCl, ale výtěžek izolace byl za těchto podmínek nižší než v předchozím případě (34-37 %). Nejlepší opakovatelnosti měření bylo dosaženo při promytí částic před imobilizací *Taq* puftrem a po ní fosfátovým puftrem I (RSD 1,2 %), ale výtěžek izolace byl za těchto podmínek nízký (23,5 %). Naopak nejhorší opakovatelnosti měření (RSD 18,1 %) bylo dosaženo promytím částic před imobilizací pomocí H₂O a po imobilizaci pomocí 5M roztoku NaCl.

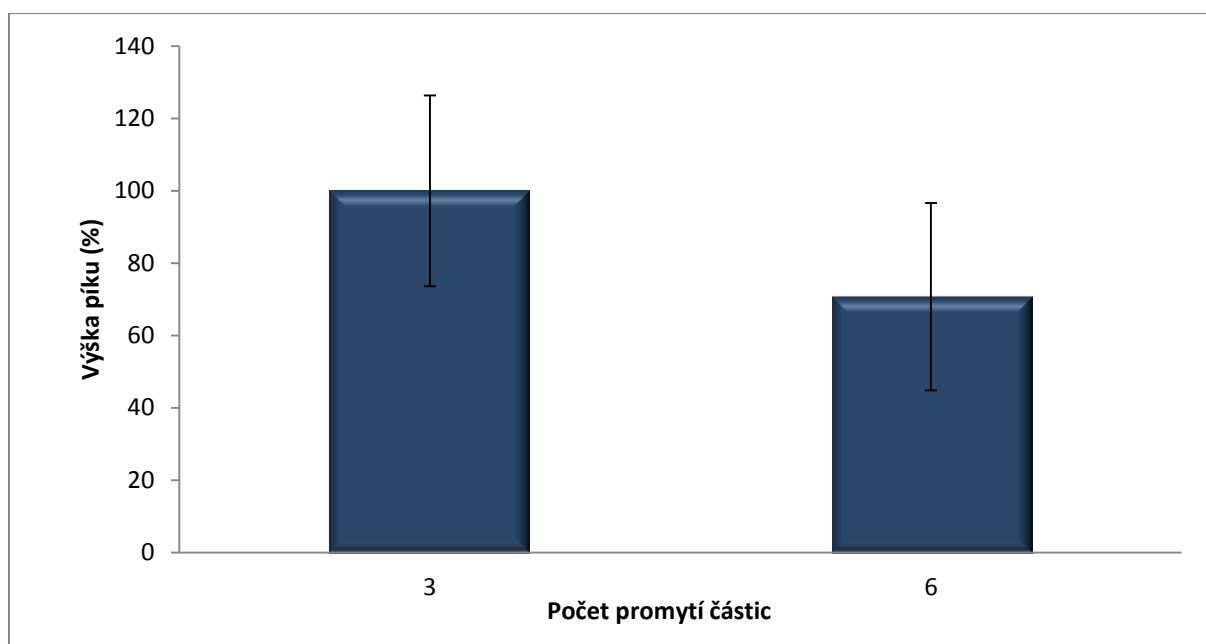
Optimální je použití fosfátového pufru I jako promývacího roztoku před imobilizací amplikonů a 5M NaCl jako promývacího roztoku po imobilizaci. Před imobilizací amplikonů je potřeba zajistit, aby byl roztok použitý pro promytí částic schopen odstranit všechny zbytky uchovávacího roztoku, obsahujícího azid sodný. K tomu je vhodná voda nebo právě fosfátový pufr. Po imobilizaci amplikonů je nutné zajistit velkou iontovou sílu promývacího roztoku, aby nebyla nukleová kyselina uvolňována z částic do roztoku a tak odplavena spolu s kontaminanty a nenavázanými molekulami [30]. NaCl měl z promývacích roztoků nejvyšší iontovou sílu, proto je vhodný pro toto promytí.

Ostatní podmínky izolace byly následující: imobilizace probíhala po dobu 15 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 1,25M NaCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 10,9 a eluce probíhala po dobu 5 minut.



Obrázek 6.1 Vliv promývacích roztoků před imobilizací a po ní na výtěžek izolace. A: Po imobilizaci byl použit 5M NaCl; B: Po imobilizaci byla použita H₂O; C: Po imobilizaci byl použit Taq pufr; D: Po imobilizaci byl použit fosfátový pufr I

6.2.2 Vliv počtu promývacích kroků



Obrázek 6.2 Vliv počtu promývacích kroků

V tomto experimentu byl sledován vliv počtu promytí částic na výtěžek izolace. Obrázek 6.2 ukazuje závislost výšky píku elektrochemické detekce na počtu promytí částic. Vyšší výtěžnosti bylo dosaženo, pokud byly částice promyty 3× a jejich rovnoměrná disperze v roztoku byla zajištěna manuálně. RSD byla při manuální disperzi a promytí 3×26,4 %, při promytí 6× 25,9 %, ale výtěžnost byla při tomto promytí jen 70,7 %.

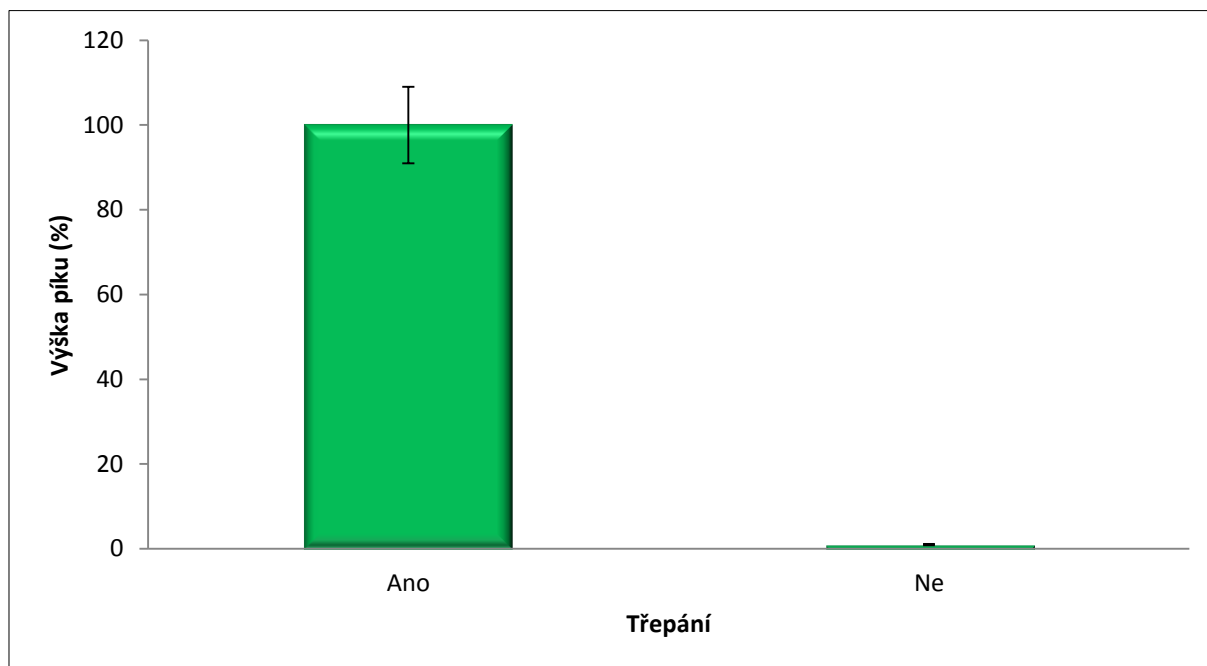
Optimální je, aby byly částice promyty 3× a jejich disperze v promývacím roztoku byla zajištěna manuálně. Při dalších promytích po imobilizaci může dojít k uvolnění navázaných nukleových kyselin z částic do promývacího roztoku, zejména pokud je disperze zajištěna na přístroji Multi spin MSC-6000 (Biosan, Lotyšsko), kde je mikrozkmavka intenzivně třepána.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala 15 minut při 20 °C. Imobilizační roztok byl 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5 CsCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,1 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

6.3 Optimalizace imobilizace nukleové kyseliny na částice

Pro optimalizaci imobilizace nukleové kyseliny na částice byly sledovány vliv třepání během imobilizace, vliv teploty při ní, vliv doby imobilizace, vliv složení imobilizačního roztoku, vliv koncentrace NaCl v imobilizačním roztoku a vliv použitého chloridu alkalického kovu.

6.3.1 Vliv třepání během imobilizace



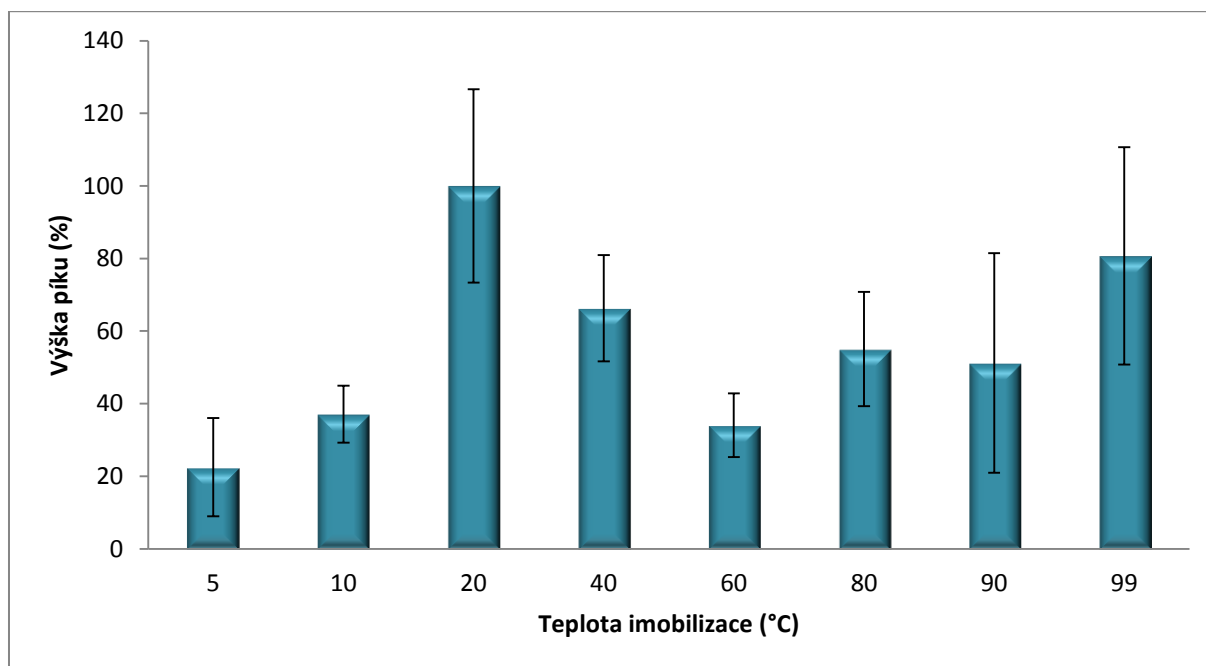
Obrázek 6.3 Vliv třepání během imobilizace

V tomto experimentu byl sledován vliv třepání na přístroji Multi spin MSC-6000 (Biosan, Lotyšsko) během imobilizace amplikonů na výtěžek izolace. Obrázek 6.3 zobrazuje závislost výšky píku elektrochemické detekce na třepání během imobilizace. Vyšší výtěžnosti bylo dosaženo, pokud byla mikrozkuhavka intenzivně třepána. Tato hodnota výtěžnosti tak byla vzata jako 100 %. RSD byla při třepání mikrozkuhavky 9 %, při jejím netřepání 0,1 %, ale výtěžek izolace byl při netřepání signifikantně menší (1 %).

Optimální je, aby byla během imobilizace mikrozkuhavka intenzivně třepána. Při třepání dojde k promíchání nukleové kyseliny a částic ve vzorku, čímž je lépe zpřístupněn povrch částic, a částice s nukleovou kyselinou jsou vhodně prostorově orientovány.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Imobilizační roztok byl 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 1,25M NaCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 10 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

6.3.2 Vliv teploty při imobilizaci

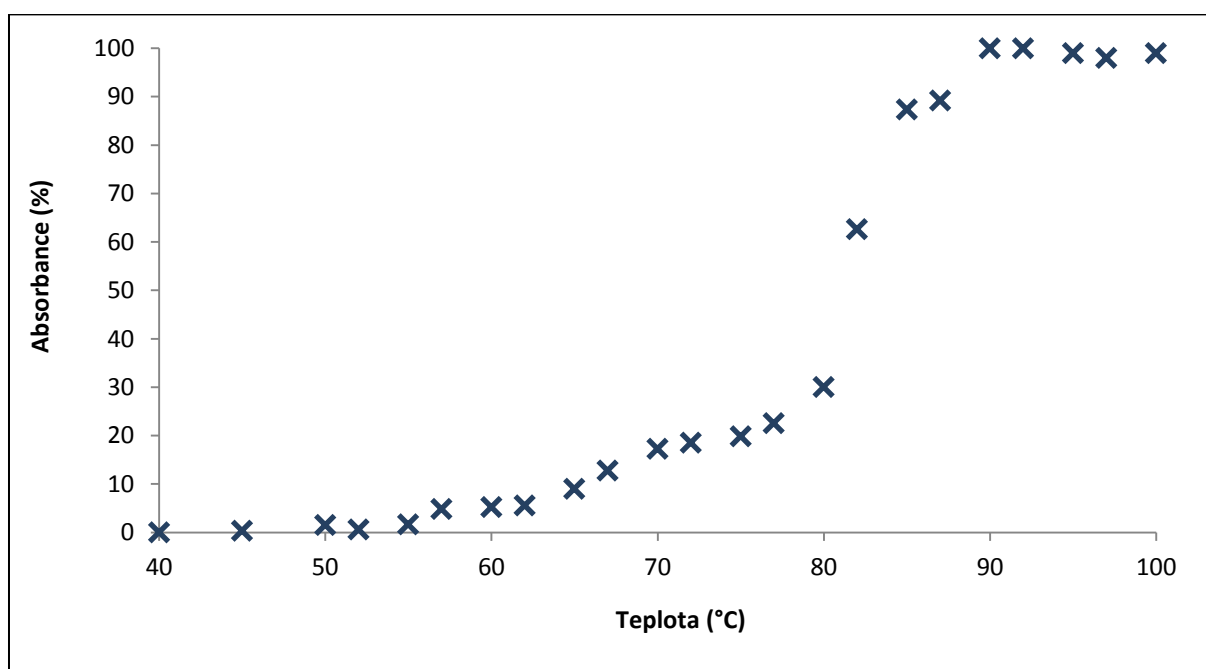


Obrázek 6.4 Vliv teploty imobilizace

V experimentu byl sledován vliv teploty při imobilizaci amplikonů na výtěžek izolace. Pro experiment byly zvoleny teploty v rozsahu 5 – 99 °C. Obrázek 6.4 zobrazuje závislost výšky píku na teplotě při imobilizaci. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo, pokud byla teplota při imobilizaci 20 °C. Tato hodnota byla uvažována jako 100 % a RSD při ní byla 26,7 %. Nejlepší opakovatelnost (RSD 7,8 %) byla při teplotě 10 °C, ale výtěžnost byla malá (37,1 %). Nejnižší výtěžnost byla při teplotě 60 °C s RSD 8,8 %. Nejhorší opakovatelnost byla při teplotě 90 °C (RSD 30,3 %). Výtěžnost byla při této teplotě 51,2 %.

Optimální je imobilizace amplikonů při 20 °C. Při chlazení vzorku může být zpomalena kinetika reakce PCR produktu se silanolovými skupinami a tím snížení výtěžnosti.

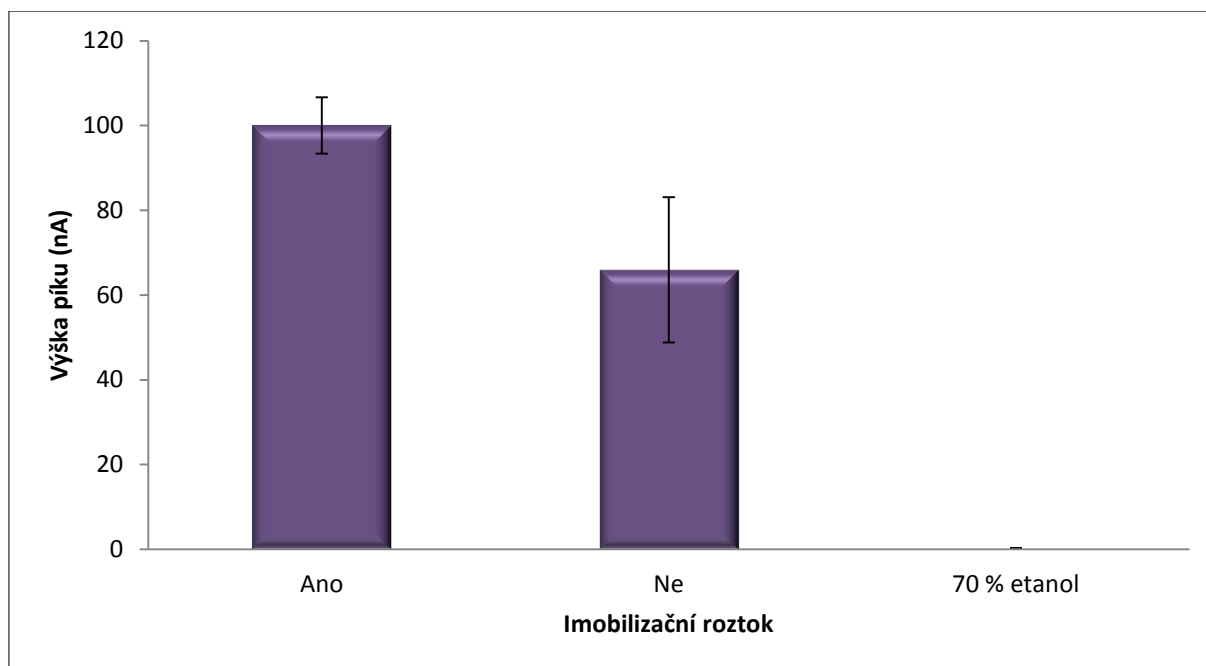
V grafu závislosti absorbance PCR produktu na jeho teplotě (Obrázek 6.5) je vidět zlom přibližně při teplotě 62 °C. Pravděpodobně při této teplotě dochází ke kolapsu terciární struktury PCR produktu a nejsou tak vhodné podmínky pro její imobilizaci na částice. Teplota tání použitého PCR produktu je 81 °C, při této teplotě se 50 % produktu nachází v jednořetězcové a 50 % v dvouřetězcové formě. Při dalším zvyšování teploty roste podíl jednořetězcové formy PCR produktu, a tedy narůstá koncentrace molekul DNA. Proto při dalším zvyšování teploty výtěžnost rostla.



Obrázek 6.5 Závislost absorbance PCR produktu na jeho teplotě

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 5 minut za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M CsCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,1 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 99 °C.

6.3.3 Vliv složení imobilizačního roztoku



Obrázek 6.6 Vliv složení imobilizačního roztoku

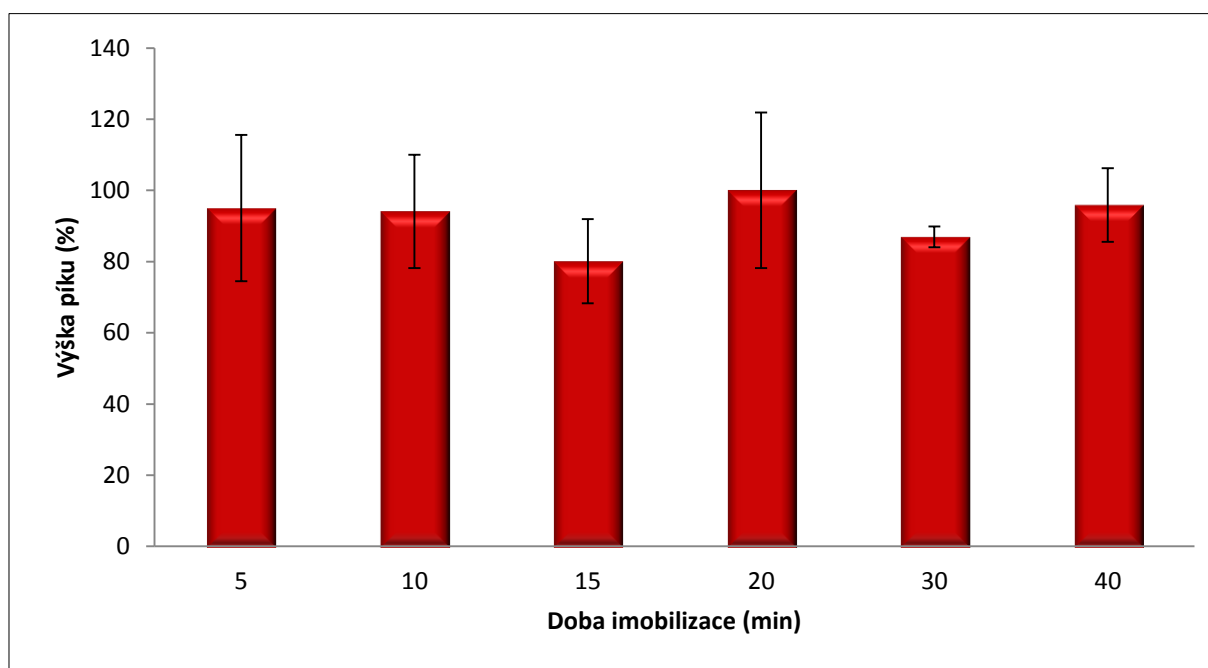
V experimentu byl sledován vliv složení imobilizačního roztoku na množství izolovaného amplikonu (Obrázek 6.6). Jeden imobilizační roztok byl 70 % etanol, druhý byl složen ze 4 složek (0,1M Na_2HPO_4 + 0,1M NaH_2PO_4 ; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M NaCl), ve třetím případě nebyl použit žádný imobilizační roztok. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo, pokud byl použit čtyř složkový imobilizační roztok. Tato hodnota byla vzata jako 100 % a RSD zde byla 6,6 %. Výtěžnost byla nižší, pokud nebyl použit žádný imobilizační roztok (66 %), kdy byla RSD 17,2 %. Oproti tomu při použití etanolu byla výtěžnost 0,3 % a RSD 0,03 %. Použití etanolu jako imobilizačního roztoku tedy není vhodné.

Optimální je použití uvedeného čtyř složkového imobilizačního roztoku. Jednou ze složek tohoto roztoku je chaotropní sůl guanidin thiokyanát, která mění hydratační obal DNA a silanolových skupin na povrchu částic a tím umožňuje imobilizaci [15]. Další složky roztoku jsou vhodné pro udržení konstantního pH a potřebné iontové síly. Pokud imobilizační roztok chybí, výtěžnost izolace je tím snížena. Firma Beckman Coulter pro izolaci DNA

pomocí svých částic doporučuje používat jako imobilizační roztok 70 % etanol. Ten pro použití s částicemi Dynabeads[®] MyOne Silane není vhodný, vlivem etanolu dojde k uvolnění případně navázaných nukleových kyselin zpět do roztoku.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok byl fosfátový pufr I. Imobilizace probíhala po dobu 15 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,5 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

6.3.4 Vliv doby imobilizace



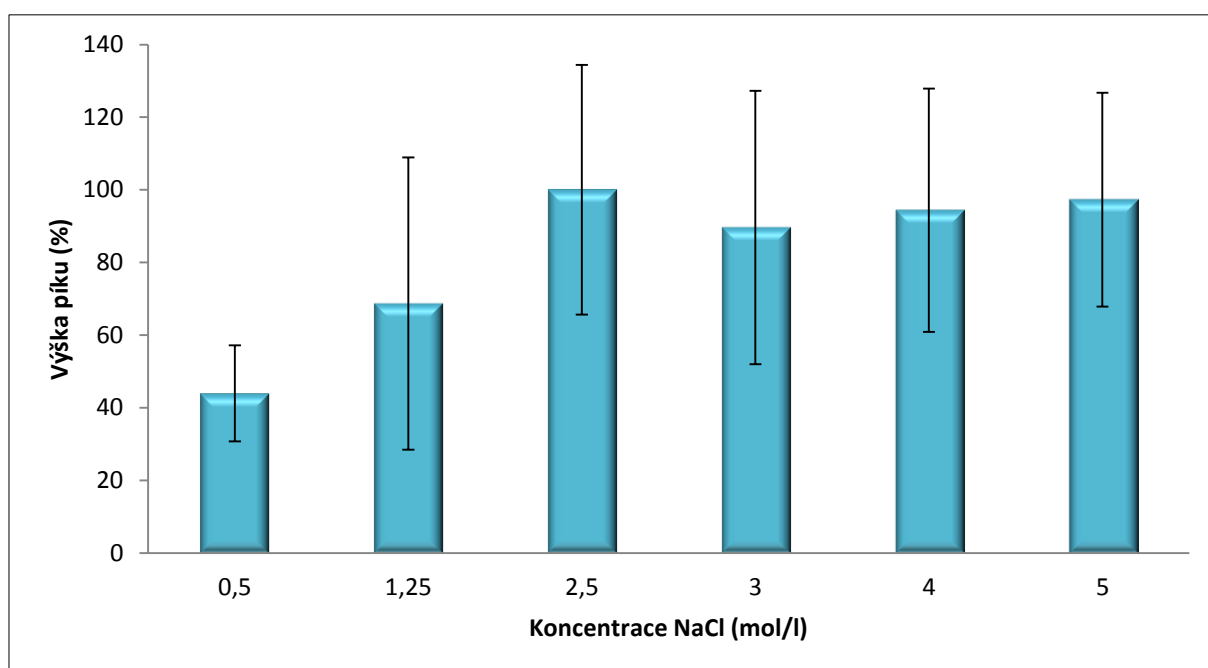
Obrázek 6.7 Vliv doby imobilizace

Následně byl sledován vliv doby imobilizace na výtěžek izolace (Obrázek 6.7). Sledované doby byly 5, 10, 15, 20, 30 a 40 minut. Z grafu vyplývá, že doba imobilizace nemá na výtěžek izolace vliv, alespoň v rozmezí námi zkoumaných intervalů. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při imobilizaci po dobu 20 minut, tato hodnota byla uvažována jako 100 % a RSD byla 21,8 %. Ostatní výtěžnosti se pohybovaly v rozmezí 80-96 % a RSD v rozmezí 3-21 %.

Pro zkrácení celého postupu je optimální imobilizace po dobu 5 minut. Kinetika imobilizace nukleové kyseliny na povrch částic je rychlá, stačí tedy krátká doba imobilizace (i 30 s [30]), a poté se již další molekuly nukleové kyseliny na částice nenavážou.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M CsCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,1 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

6.3.5 Vliv koncentrace soli v imobilizačním roztoku



Obrázek 6.8 Vliv koncentrace NaCl v imobilizačním roztoku

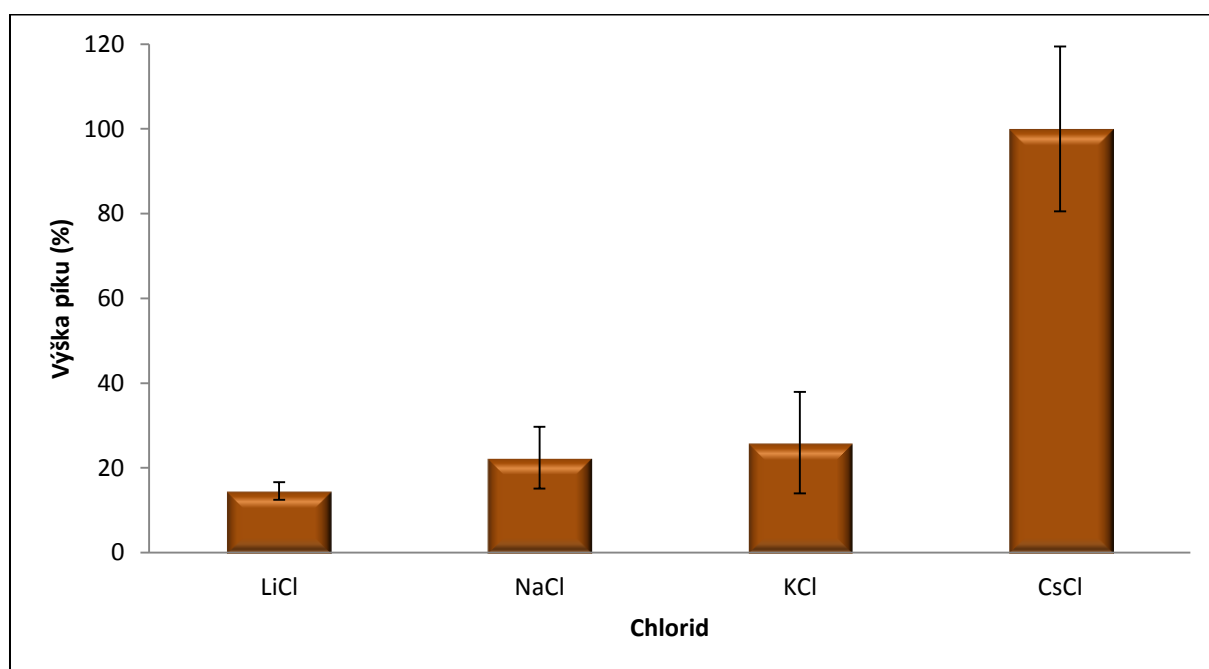
V experimentu byl sledován vliv koncentrace NaCl v imobilizačním roztoku (Obrázek 6.8). Koncentrace byly 0,5, 1,25, 2,5, 3, 4 a 5M. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při použití 2,5M NaCl v imobilizačním roztoku. Tato hodnota byla brána jako 100 %, RSD byla 34,4 %. Vysoké výtěžnosti bylo dosaženo také při použití 3, 4 nebo 5M NaCl (výtěžnost 90-97 %, RSD 29-38 %). Nejlepší opakovatelnosti bylo dosaženo při použití 0,5M NaCl (RSD 13,2 %),

ale výtěžnost byla jen 44 %. Naopak nejhorší opakovatelnosti bylo dosaženo při použití 1,25M NaCl (RSD 40,2 %) a také výtěžek izolace byl nižší (68,7 %).

Optimální je použití 2,5M NaCl jako jedné ze čtyř složek imobilizačního roztoku. Se vzrůstající koncentrací NaCl v roztoku roste také iontová síla a ta má vliv na imobilizaci nukleové kyseliny na částice. Při dalším zvyšování koncentrace ale již iontová síla neroste.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 15 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na_2HPO_4 + 0,1M NaH_2PO_4 ; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a různé koncentrace NaCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,1 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

6.3.6 Vliv použitého chloridu alkalického kovu



Obrázek 6.9 Vliv použitého chloridu alkalického kovu

V tomto experimentu byl dále sledován vliv iontové síly imobilizačního roztoku na výtěžek izolace. Byly připraveny roztoky různých chloridů alkalických kovů (LiCl, NaCl, KCl a CsCl), o koncentraci 2,5M, která byla v předchozím experimentu vyhodnocena jako

optimální. Výtěžnost rostla se vzrůstající relativní atomovou hmotností (Obrázek 6.9). Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při použití CsCl, tato hodnota byla uvažována jako 100 % a RSD byla 19,5 %. Nejlepší opakovatelnosti (RSD 2,1 %) bylo dosaženo při použití LiCl v porovnání s CsCl, ale výtěžek izolace byl nejmenší (14,6 %).

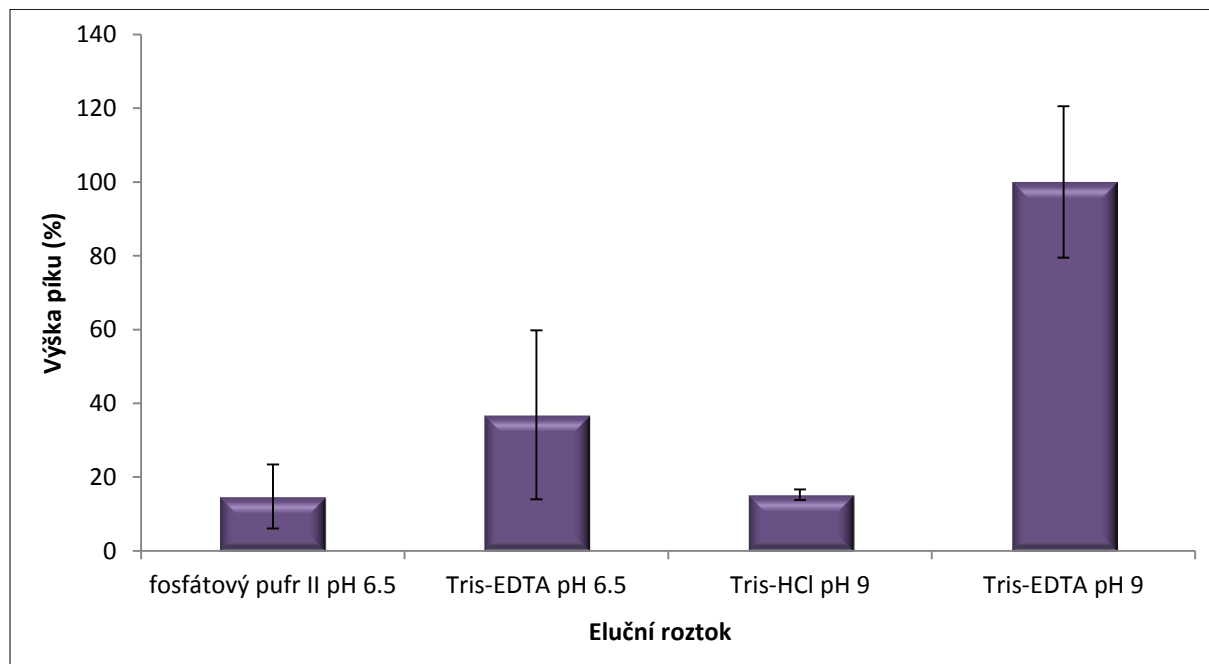
Optimální je použití 2,5M CsCl jako jedné ze čtyř složek imobilizačního roztoku. Se vzrůstající relativní atomovou hmotností chloridu roste také iontová síla jeho roztoku a tím výtěžnost izolace.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 15 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na_2HPO_4 + 0,1M NaH_2PO_4 ; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M chloridy různých alkalických kovů (Li, Na, K a Cs). Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,1 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

6.4 Optimalizace eluce nukleové kyseliny z částic

Pro optimalizaci eluce nukleové kyseliny z částic byly sledovány vliv složení elučního roztoku, vliv pH elučního roztoku Tris-EDTA, vliv doby eluce a vliv teploty eluce.

6.4.1 Vliv složení elučního roztoku



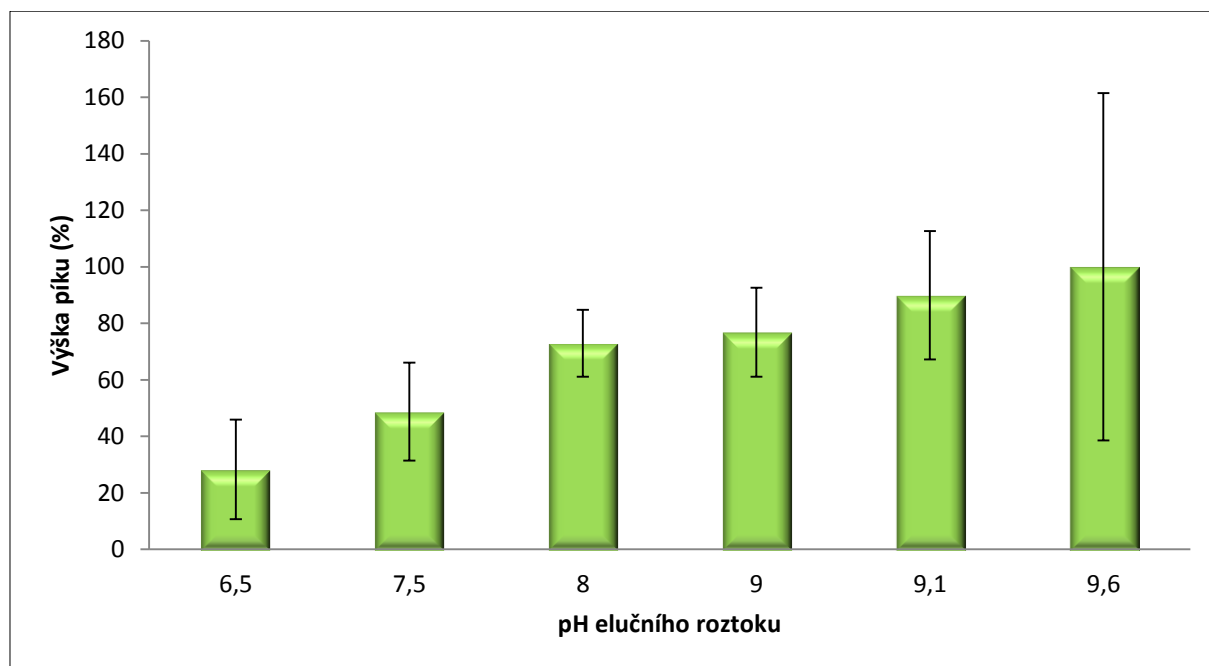
Obrázek 6.10 Vliv složení elučního roztoku

Při optimalizaci eluce byly nejprve porovnávány roztoky fosfátového pufru II a Tris-EDTA o pH 6,5 a Tris-HCl a Tris-EDTA o pH 9. Z výsledků je zřejmé, že vyšší účinnosti izolace bylo dosahováno při použití roztoku Tris-EDTA ve srovnání s ostatními roztoky (Obrázek 6.10). Relativní maximální hodnota výtěžnosti (100 %) byla stanovena u roztoku Tris-EDTA o pH 9. U stejného roztoku o pH 6,5 byla výtěžnost 36,9 %. Nejlepší opakovatelnost byla dosažena při použití roztoku Tris-HCl (RSD 1,4 %) v porovnání s Tris-EDTA o pH 9 (RSD 20,5 %), ale výtěžnost je nízká (15,2 %).

Optimální je použití roztoku Tris-EDTA jako elučního roztoku. EDTA funguje jako chelatační činidlo, takže inaktivuje nukleázy, které mohou DNA degradovat. Přítomnost EDTA v roztoku může také ovlivnit elektrochemickou detekci.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 15 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na_2HPO_4 + 0,1M NaH_2PO_4 ; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M NaCl. Eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

6.4.2 Vliv pH elučního roztoku Tris-EDTA



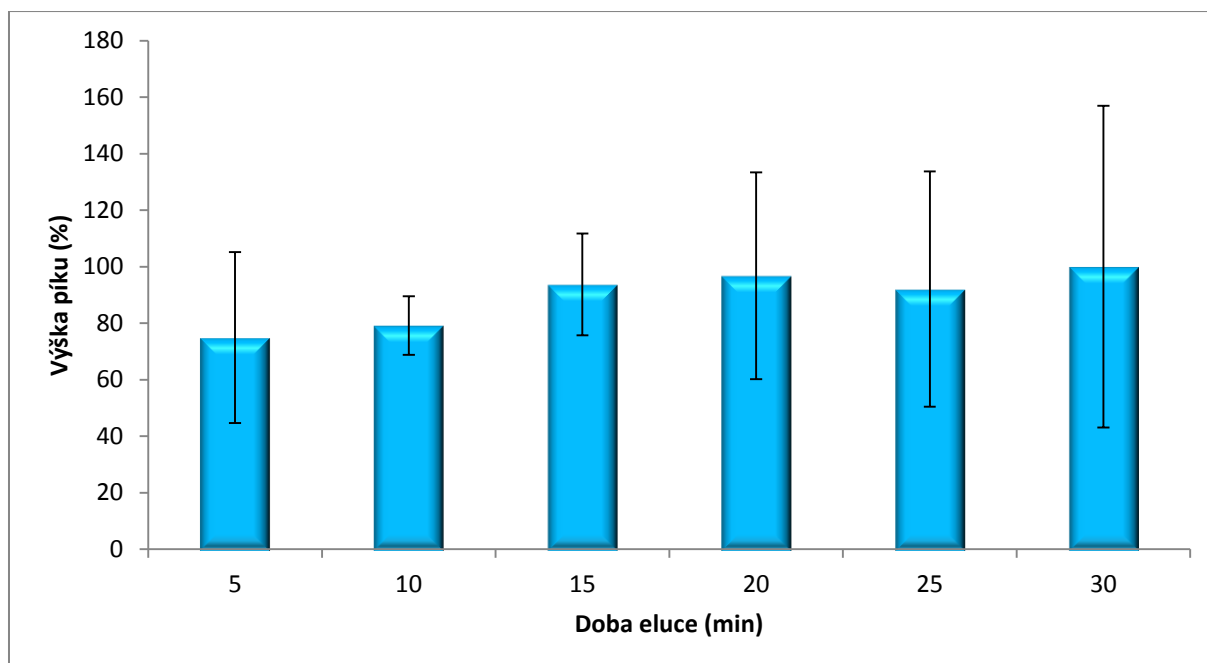
Obrázek 6.11 Vliv pH elučního roztoku

Dále bylo optimalizováno pH elučního roztoku Tris-EDTA, jelikož v předchozím experimentu byl zřejmý jeho vliv na výtěžek izolace. Z výsledků vyplývá, že se zvyšujícím se pH bylo dosaženo vyšší výtěžnosti izolace (Obrázek 6.11). Nejvyšší relativní účinnost izolace (100 %) byla zjištěna u hodnoty pH 9,6, ale došlo k výraznému zhoršení opakovatelnosti měření (RSD 61,4 %). Obdobně při použití roztoku o příliš nízkém pH byla také opakovatelnost zhoršena a také výtěžek izolace byl nejnižší (28 %). Při použití roztoku o pH 9,1 bylo dosaženo dobré výtěžnosti izolace (89,9 %) i opakovatelnosti měření (RSD 22,7 %), ačkoliv nejlepší opakovatelnosti měření (RSD 11,8 %) bylo dosaženo při použití elučního roztoku o pH 8, ale výtěžek izolace byl nižší (76,9 %).

Optimální je použití roztoku Tris-EDTA o pH 9,1 jako elučního roztoku. V zásaditém prostředí mají silanolové skupiny na povrchu částic záporný náboj a vlivem elektrostatických sil dojde k odpuzování částic a taktéž záporně nabitě nukleové kyseliny. Proto je pro eluční roztok vhodné zásadité pH.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 15 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na_2HPO_4 + 0,1M NaH_2PO_4 ; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M NaCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 85 °C.

6.4.3 Vliv doby eluce



Obrázek 6.12 Vliv doby eluce

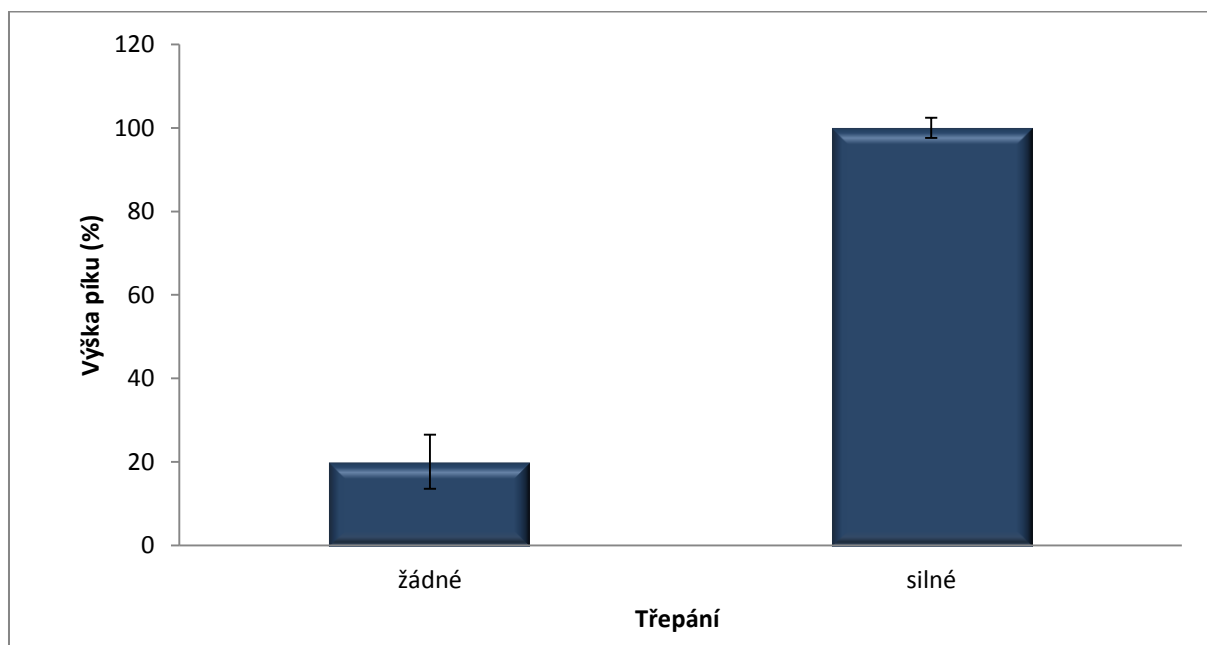
V experimentu byl sledován vliv doby eluce na výtěžek izolace. Byly zvoleny doby 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minut. Se vzrůstající dobou eluce rostla výtěžnost izolace (Obrázek 6.12). Nejvyšší relativní účinnost izolace (100 %) byla zjištěna, pokud eluce probíhala po dobu 30 minut. Za těchto podmínek ale byla zároveň nejhorší opakovatelnost (RSD 57 %). Obdobně byla horší opakovatelnost při 25minutové eluci (41,6 %). Nejmenší výtěžek byl při 5minutové

eluci (74,9 %). Nejlepší opakovatelnosti bylo dosaženo při 10minutové eluci (RSD 10,4 %), výtěžnost byla 79,2 %. Dobré výtěžnosti bylo dosaženo při 15minutové eluci (93,7 %) a RSD byla 18 %.

Optimální je eluce probíhající po dobu 15 minut. Pro uvolnění nukleové kyseliny z částic je zapotřebí delší čas než pro její imobilizaci, jelikož kinetika této reakce je pomalejší. Se vzrůstající dobou eluce se zvyšuje i výtěžek, ale zároveň se zhoršuje opakovatelnost.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 5 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M CsCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,1 a eluce probíhala při teplotě 85 °C.

6.4.4 Vliv třepání při eluci



Obrázek 6.13 Vliv třepání při eluci

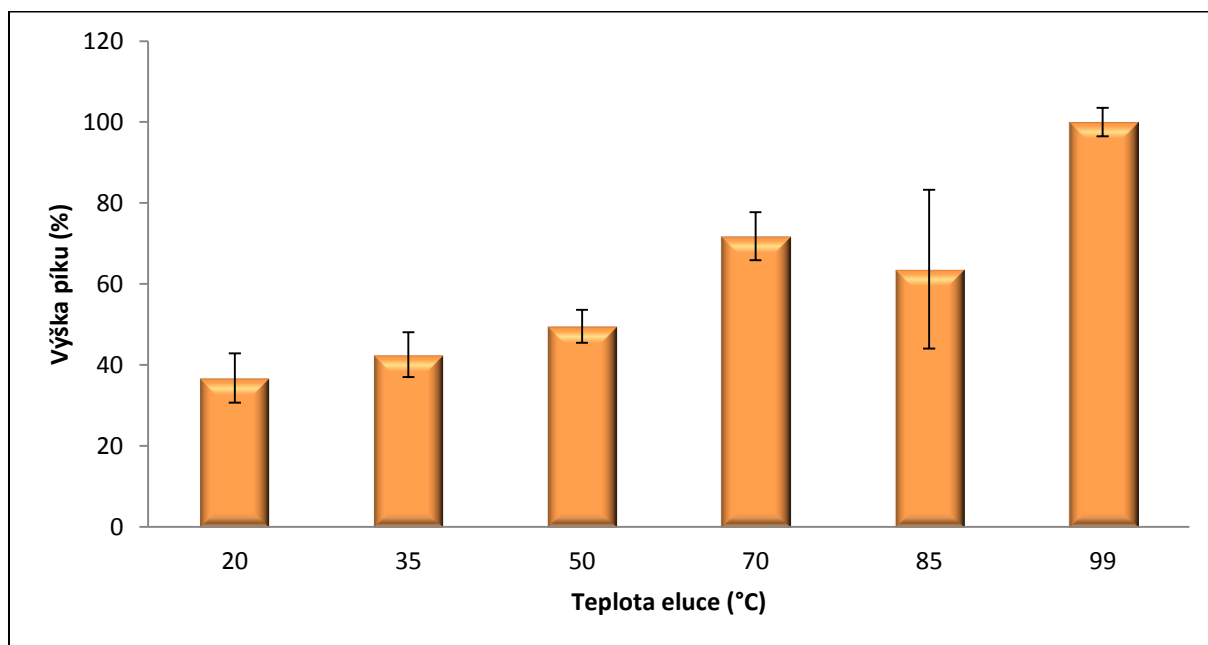
Dále byl sledován vliv třepání na přístroji Thermomixer 5355 Comfort/Compact (Eppendorf, Německo) během eluce nukleové kyseliny z částic do roztoku na výtěžek izolace. Obrázek 6.13 dokládá závislost výtěžnosti nukleové kyseliny na třepání během eluce. Vyšší výtěžnosti

bylo dosaženo, pokud byla mikrozkumavka intenzivně třepána. Tato hodnota výtěžnosti tak byla vzata jako 100 %. RSD byla při třepání mikrozkumavky 2,4 %, při jejím netřepání 6,5 %, ale výtěžek izolace byl při netřepání jen 20,1 %.

Optimální je, aby byla během eluce mikrozkumavka intenzivně třepána. Třepání napomáhá uvolnění nukleové kyseliny z částic do elučního roztoku, takže méně nukleové kyseliny zůstane po eluci přichyceno k částicím.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 5 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na_2HPO_4 + 0,1M NaH_2PO_4 ; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M CsCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,1 a eluce probíhala po dobu 5 minut při teplotě 99 °C.

6.4.5 Vliv teploty eluce



Obrázek 6.14 Vliv teploty eluce

Nakonec byl sledován vliv teploty eluce na výtěžek izolace. Byly zvoleny teploty 20, 35, 50, 70, 85 a 99 °C. Se vzrůstající teplotou eluce rostla výtěžnost izolace, jak dokládá Obrázek 6.14. Nejvyšší výtěžek byl, pokud eluce probíhala při teplotě 99 °C, proto byla tato hodnota

určena pro další srovnání jako 100 % a i opakovatelnost byla za těchto podmínek nejlepší (RSD 3,5 %). Naopak nejhorší opakovatelnost byla při teplotě 85 °C (RSD 19,6 %). Nejnižší výtěžek byl při teplotě eluce 20 °C (36,8 %) s RSD 6,1 %.

Optimální je eluce při teplotě 99 °C. Se zvyšující se teplotou dochází k rozvolnění dvoušroubovice nukleové kyseliny a tím k uvolnění jednovláknových řetězců do elučního roztoku.

Ostatní podmínky izolace byly následující: promývací roztok před imobilizací byl fosfátový pufr I, po ní 5M NaCl. Imobilizace probíhala po dobu 5 minut při pokojové teplotě za současného intenzivního třepání. Imobilizační roztok byl 0,1M Na₂HPO₄ + 0,1M NaH₂PO₄; 0,6M guanidin thiokyanát; 0,15M Tris-HCl pH 7,5 a 2,5M CsCl. Elučním roztokem byl Tris-EDTA pH 9,1 a eluce probíhala po dobu 5 minut.

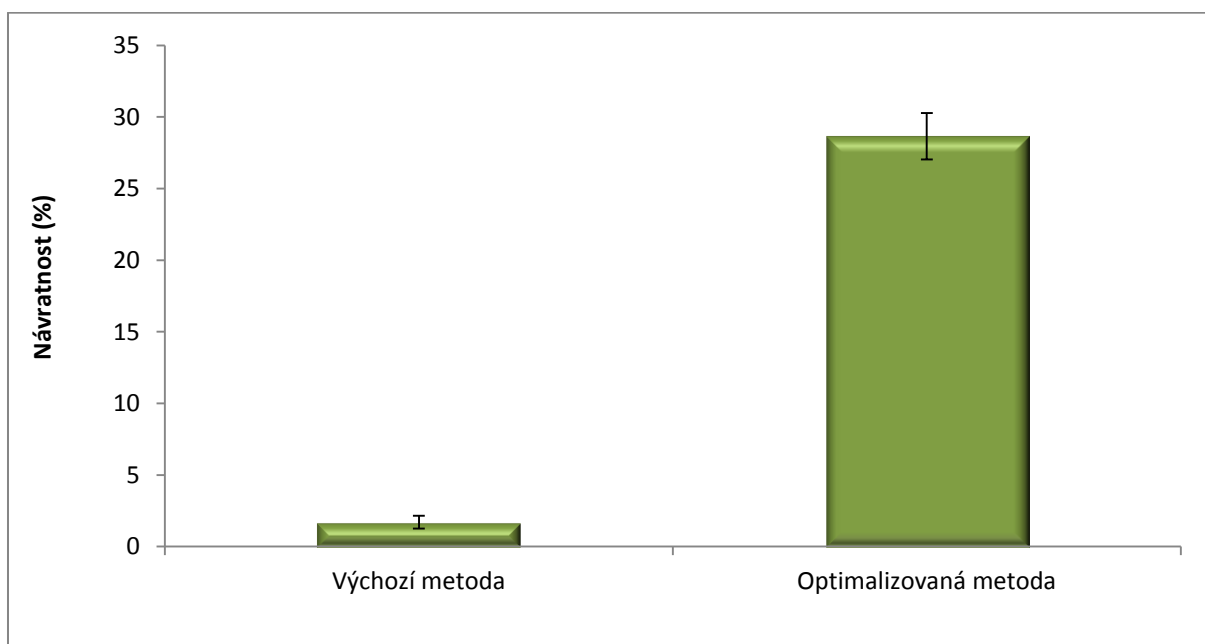
6.5 Optimalizované podmínky izolace nukleových kyselin pomocí magnetizovatelných částic

Jako promývací roztok před imobilizací amplikonů byl použit fosfátový pufr I, k 10 µl částic bylo tedy přidáno 20 µl tohoto roztoku a manuálně byla zajištěna rovnoměrná disperze MPs v něm. Následně se mikrozkuhavka umístila na magnetický stojan a promývací roztok byl odstraněn. Toto promývání bylo 2× zopakováno.

Po odstranění zbytků promývacího roztoku bylo přidáno 10 µl vzorku, který bylo třeba purifikovat, a 10 µl imobilizačního roztoku, jehož složení bylo stejné jako u výchozí metody, jen jako sůl v něm byl použit 2,5M CsCl. Optimální byla 5minutová imobilizace při teplotě 20 °C a mikrozkuhavka během ní byla intenzivně třepána.

Po imobilizaci následovalo promytí částic s navázanými nukleovými kyselinami 20 µl 5M NaCl. Promytí bylo opět 2× zopakováno.

Po promytí bylo k částicím přidáno 30 µl elučního roztoku Tris-EDTA o pH 9,1 a eluce probíhala po dobu 15 minut při teplotě 99 °C. Během eluce byla mikrozkuhavka intenzivně třepána.



Obrázek 6.15 Srovnání návratnosti výchozí a optimalizované metody

Byla stanovena návratnost optimalizované metody, která byla srovnána s návratností původní metody, jak dokládá Obrázek 6.15. Návratnost původní metody byla 1,7 % s RSD 0,5 %. Po optimalizaci se návratnost zvýšila na 28,7 % s RSD 1,6 %. Při použití optimalizované metody tedy došlo k výraznému zvýšení návratnosti za cenu lehkého zhoršení opakovatelnosti.

Pro výpočet limitu detekce optimalizované metody byl použit vzorec 1 [31], kde σ je směrodatná odchylka šumu a m je směrnice kalibrační závislosti. Limit detekce pro optimalizovanou metodu je 1 $\mu\text{g/ml}$.

$$LOD = 3 \cdot \frac{\sigma}{m} \quad (1)$$

Pro výpočet limitu stanovitelnosti optimalizované metody byl použit vzorec 2 [31], kde σ je směrodatná odchylka šumu a m je směrnice kalibrační závislosti. Limit stanovitelnosti pro optimalizovanou metodu je 3 $\mu\text{g/ml}$.

$$LOQ = 10 \cdot \frac{\sigma}{m} \quad (2)$$

Při optimalizování postupu došlo také k jeho výraznému zkrácení. Promytí částic před i po imobilizaci bylo provedeno jen 3 \times oproti původnímu počtu 6 promytí a rovnoměrná

disperze částic v promývacím roztoku byla zajištěna pouze manuálně, čímž se celé promytí časově zkrátilo. Imobilizace v optimalizovaném postupu je 5minutová oproti výchozí 40minutové. I přesto, že eluce probíhá delší dobu než ve výchozí metodě (15 minut oproti 5 minutám), časová náročnost celého postupu je nižší (30 minut oproti původním 75 minutám). Přehledné srovnání výchozí a optimalizované metody viz Tabulka 6.1.

Tabulka 6.1 Srovnání výchozí a optimalizované metody

Metoda		Výchozí	Optimalizovaná
Promytí před imobilizací	Promývací roztok	Fosfátový pufr I	Fosfátový pufr I
	Počet promytí částic	6	3
Imobilizace	Sůl	0,5M NaCl	2,5M CsCl
	Doba [min]	40	5
	Teplota [°C]	20	20
	Třepání	slabé	silné
Promytí po imobilizaci	Promývací roztok	Fosfátový pufr I	5M NaCl
	Počet promytí částic	6	3
Eluce	Eluční roztok	Fosfátový pufr II	Tris-EDTA
	pH elučního roztoku	6,5	9,1
	Doba [min]	5	15
	Teplota [°C]	85	99
	Třepání	žádné	silné
Návratnost metody[%]		1,7	28,7
Doba trvání metody[min]		75	30

7 ZÁVĚR

Mnoho vědeckých pracovišť se dnes zabývá studiem nukleových kyselin, zejména DNA. Často je ale vzorku jen malé množství, musí proto dojít k jeho amplifikaci. Po provedení PCR jsou nukleové kyseliny znečištěné zbytky PCR směsi, pro jejichž odstranění mohou být využity magnetizovatelné částice.

Práce se zabývá nukleovými kyselinami a možnostmi jejich izolace a detekce. V literární rešerši jsou porovnány běžné metody izolace nukleových kyselin s nově vyvíjenou magnetickou separací. Jsou zde také popsány obecné podmínky izolace a purifikace nukleových kyselin. Z literární rešerše vyplývá, že magnetizovatelné částice jsou vhodné pro izolaci a purifikaci nukleových kyselin, protože při jejich použití je minimalizována možnost kontaminace vzorků, postup je technicky i časově nenáročný a je možné jej miniaturizovat a automatizovat.

Následně je v práci navržena metoda izolace nukleových kyselin, která využívá magnetizovatelné částice. Pro detekci nukleových kyselin byla zvolena square-wave voltametrie. Metoda izolace nukleových kyselin je v experimentální části optimalizovaná pro dosažení co největší výtěžnosti. Optimalizovány jsou kroky promývání, imobilizace a eluce. Byla tak vyvinuta velmi rychlá a senzitivní metoda, jejíž návratnost je významně vyšší než návratnost výchozí metody. Časová náročnost metody je nižší než u výchozí metody.

Optimalizovaný postup může být využit při dalším studiu nukleových kyselin, například studiu interakce DNA s platinovými cytostatiky pomocí fluorescence kvantových teček nebo při sekvenování genomů různých organismů. Postup může být také využit pro izolaci DNA z reálných vzorků.

SEZNAM LITERATURY

- [1] NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, H&H, Praha, 2000. 555 s. ISBN 80-86022-46-3.
- [2] SNUSTAD, D.P. a SIMMONS, M.J. *Genetika*, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno, 2009. 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [3] WINTJENS, R., LIEVIN, J., ROOMAN, M. a BUISINE, E. Contribution of cation- π interactions to the stability of protein-DNA complexes. *Journal of Molecular Biology*, 2000, roč. 302, č. 2, s. 393-408. ISSN 0022-2836.
- [4] COOMBS, N.J., GOUGH, A.C. a PRIMROSE, J.N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*, 1999, roč. 27, č. 16, s. 3. ISSN 1362-4962.
- [5] RIVERO, E.R.C., NEVES, A.C., SILVA-VALENZUELA, M.G., SOUSA, S.O.M. a NUNES, F.D. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology Research and Practice*, 2006, roč. 202, č. 7, s. 523-529. ISSN 0344-0338.
- [6] YANG, D.Y., ENG, B., WAYE, J.S., DUDAR, J.C. a SAUNDERS, S.R. Technical note: Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, 1998, roč. 105, č. 4, s. 539-543. ISSN 0002-9483.
- [7] LEVISON, P.R., BADGER, S.E., HATHI, P., DAVIES, M.J., BRUCE, I.J. a GRIMM, V. New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, roč. 827, č. 2, s. 337-344. ISSN 0021-9673.
- [8] BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, roč. 73, č. 3, s. 495-504. ISSN 0175-7598.
- [9] GUYOT, C. a STIEGER, B. Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: Evidence for bile salt resistant microdomains. *Journal of Hepatology*, 2011, roč. 55, č. 6, s. 1368-1376. ISSN 0168-8278.
- [10] BURDYCHOVÁ, R. a SLÁDKOVÁ, P. *Mikrobiologická analýza potravin*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 2007. s. 208. ISBN 978-80-7375-116-6
- [11] MALÝ, J. *Molekulární a buněčná biologie*, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Ústí nad Labem 2006. 65 s.
- [12] TAN, S.C. a YIAP, B.C. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, roč. 2009, č. 2009, s. 10. ISSN 1110-7243.
- [13] KRAMVIS, A., BUKOFZER, S. a KEW, M.C. Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp blood kit, GeneReleaser, and the phenol-chloroform method. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, roč. 34, č. 11, s. 2731-2733. ISSN 0095-1137.

- [14] SHAW, K.J., THAIN, L., DOCKER, P.T., DYER, C.E., GREENMAN, J., GREENWAY, G.M. a HASWELL, S.J. The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths. *Analytica Chimica Acta*, 2009, roč. 652, č. 1-2, s. 231-233. ISSN 0003-2670.
- [15] MELZAK, K.A., SHERWOOD, C.S., TURNER, R.F.B. a HAYNES, C.A. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, roč. 181, č. 2, s. 635-644. ISSN 0021-9797.
- [16] BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIMVANDILLEN, P.M.E. a VANDERNOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic-acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, roč. 28, č. 3, s. 495-503. ISSN 0095-1137.
- [17] HSING, I.M., XU, Y. a ZHAO, W.T. Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis*, 2007, roč. 19, č. 7-8, s. 755-768. ISSN 1040-0397.
- [18] SCHERER, F., ANTON, M., SCHILLINGER, U., HENKEL, J., BERGEMANN, C., KRUGER, A., GANSBACHER, B. a PLANK, C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 2002, roč. 9, č. 2, s. 102-109. ISSN 0969-7128.
- [19] GUPTA, A.K. a GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005, roč. 26, č. 18, s. 3995-4021. ISSN 0142-9612.
- [20] YEZHELYEV, M.V., GAO, X., XING, Y., AL-HAJJ, A., NIE, S.M. a O'REGAN, R.M. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 2006, roč. 7, č. 8, s. 657-667. ISSN 1470-2045.
- [21] HALLIDAY, D., RESNICK, R. a WALKER, J. *Fyzika: Vysokoškolská učebnice obecné fyziky*, Vutium, Brno, 2000. 1254 s. ISBN 80-214-1869-9.
- [22] BOWLES, J., JACKSON, M., CHEN, A. a SOLHEID, P. Interpretation of Low-Temperature Data Part 1: Superparamagnetism and Paramagnetism. *The IRM Quarterly*, 2009, roč. 19, č. 3, s. 5. ISSN 2152-1972.
- [23] CHOU, S.Y., KRAUSS, P.R. a KONG, L.S. Nanolithographically defined magnetic structures and quantum magnetic disk. *Journal of Applied Physics*, 1996, roč. 79, č. 8, s. 6101-6106. ISSN 0021-8979.
- [24] HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J. a WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 1996, roč. 6, č. 10, s. 986-994. ISSN 1054-9803.
- [25] NI, Y.N., LIN, D.Q. a KOKOT, S. Synchronous fluorescence and UV-vis spectrometric study of the competitive interaction of chlorpromazine hydrochloride and Neutral Red with DNA using chemometrics approaches. *Talanta*, 2005, roč. 65, č. 5, s. 1295-1302. ISSN 0039-9140.
- [26] WANG, J. *Analytical electrochemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006. 272 s. ISBN 978-0471678793.
- [27] BAREK, J., OPEKAR, F. a ŠTULÍK, K. *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha, 2005. 188 s. ISBN 80-246-1146-5.
- [28] HYNEK, D., PRASEK, J., KOUDELKA, P., CHOMOUCKA, J., TRNKOVA, L., ADAM, V., HUBALEK, J. a KIZEK, R. Advantages and progress in the analysis of

- DNA by using mercury and amalgam electrodes. *Current Physical Chemistry*, 2011, roč. 1, č. 4, s. 299-324. ISSN 1877-9476.
- [29] HUSKA, D., HUBALEK, J., ADAM, V., VAJTR, D., HORNA, A., TRNKOVA, L., HAVEL, L. a KIZEK, R. Automated nucleic acids isolation using paramagnetic microparticles coupled with electrochemical detection. *Talanta*, 2009, roč. 79, č. 2, s. 402-411. ISSN 0039-9140.
- [30] HAWKINS, T. DNA purification and isolation using magnetic particles, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass., USA, 1998, pp. 16.
- [31] POHANKA, M. Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy*, 2010, roč. LXXIX, č. 2, s. 60-63. ISSN 0372-7025.

SEZNAM ZKRATEK

AC střídavý proud

bp párů bází

DME kapající rtuťová kapková elektroda

DNA deoxyribonukleová kyselina

DPV diferenčně pulzní voltametrie

EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová

HMDE visící rtuťová kapková elektroda

kb kilobází

miRNA mikro RNA

MPs magnetic particles, magnetizovatelné částice

mRNA mediátorová ribonukleová kyselina

PCR polymerázová řetězová reakce

pre-mRNA, hnRNA primární transkript RNA

RNA ribonukleová kyselina

rRNA ribozomová RNA

RSD směrodatná odchylka stanovení

SDS dodecylsírán sodný

snRNA malá jaderná RNA

tRNA transferová RNA

SEZNAM SYMBOLŮ

γ gama

λ lambda

μ mikro

π pí