



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Porovnání metod izolace DNA**

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: **Zdravotní laborant**

**Autor:** Kristýna Šestáková

**Vedoucí práce:** Ing. Tomáš Nix, PhD.

České Budějovice 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Porovnání metod izolace DNA* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019 .....

## **Poděkování**

Mé poděkování patří Ing. Tomášovi Nixovi Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Mé poděkování patří též firmě KRD v zastoupení Michala Sklenáře za spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce.

## Porovnání metod izolace DNA

### Abstrakt

Izolace DNA je v genetických laboratořích stěžejní. Bývá první metodou k dalším postupům, které vedou k získání informací o DNA. Nároky na izolační metody jsou vysoké. Díky podobnosti DNA s jinými biopolymery musí metoda vykazovat vysokou selektivitu a díky velkému obsahu DNA v biologickém materiálu i senzitivitu. Vstupním vzorkem z klinické praxe bývá nejčastěji lidská krev a v ní obsažené jaderné buňky. V této práci je popsáno, proč je právě krev nejčastěji používána. Ze získané krve dobrovolníků byla DNA izolována čtyřmi metodami: vysolovací, založenou na změně rozpustnosti DNA v závislosti na změně koncentrace iontů v roztoku; fenol-chloroformovou extrakcí, která patří k nejlevnějším a nejstarším metodám; dále pomocí komerčně vyráběného kitu, rychlá a jednoduchá metoda využívající navázání DNA na silikátový povrch; a izolaci pomocí automatického přístroje, separujícího pomocí magnetických částic (Anzenbacher a Kovář, 1986). Každá z metod má své výhody i nevýhody a její výběr je závislý na dalším nakládání s DNA. K nejčastějším kritériím při zvolení izolační metody jsou časová náročnost metody, cena metody, výtěžek a čistota DNA. V této práci jsou tyto požadavky porovnávány mezi zmíněnými metodami.

### Klíčová slova

Deoxyribonukleová kyselina; Ribonukleová kyselina; izolační metody

## **Comparison of DNA isolation methods**

### **Abstract**

Isolating DNA is crucial in genetic laboratories. It is the first method of further steps to obtain DNA information. The isolation method requirements are high, Due to the similarity of DNA to other biopolymers, the method must exhibit high selectivity and also sensitivity due to the low DNA content of the biological material. The input sample from clinical practice is usually human blood and nuclear cells contained in it. This thesis describes why blood is most commonly used. From the volunteer blood obtained, DNA was isolated by four methods: salting out, based on a change in DNA solubility depending on the change in ion concentration in the solution; phenol-chloroform extraction, which is one of the cheapest and oldest methods; in addition, using a commercially available kit, a fast and simple method using DNA binding to a silicate surface; and isolating with an automated magnetic particle separator (Anzenbacher and Kovář, 1986). Each method has its advantages and disadvantages and its choice depends on the further handling of DNA. The most common criteria for choosing an isolation method is its time-consuming , the cost of the method, the yield and the purity of the DNA. In this thesis these requirements are compared amongst methods.

### **Key words**

Deoxyribonucleic acid; Ribonucleic acid; isolation methods

## TEORETICKÁ ČÁST

<b>1. Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Historie.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Eukaryotická buňka.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Buněčný cyklus.....</b>	<b>9</b>
<b>5. Mitóza.....</b>	<b>9</b>
5.1 Profáze.....	10
5.2 Metafáze.....	10
5.3 Anafáze.....	10
5.4 Telofáze.....	10
5.5 Cytokineze.....	11
5.6 Replikace.....	11
<b>6. Jádro.....</b>	<b>11</b>
<b>7. Chromozom.....</b>	<b>11</b>
<b>8. Nukleová kyselina.....</b>	<b>12</b>
8.1 Definice a struktura.....	12
8.2 Funkce.....	12
8.3 Genová exprese.....	12
8.4 Transkripce.....	13
8.5 Translace.....	13
8.6 Izolace.....	13
8.7 Uchování.....	13
8.8 Využití.....	14
<b>9. Biologický materiál.....</b>	<b>14</b>
9.1 Krev.....	14

## PRAKTICKÁ ČÁST

<b>1. Bezpečnost práce v genetických laboratořích.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Izolace DNA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Informovaný souhlas pacienta.....	15

2.2 Odběr krve.....	16
2.2.1 EDTA.....	16
2.3 Transport.....	16
2.4 Příjem materiálu.....	16
2.5 Izolační techniky.....	17
2.5.1 Izolace DNA vysolením.....	17
2.5.2 Pracovní postup izolace DNA vysolením.....	17
2.5.3 Izolace DNA pomocí QIAamp Blood Mini Kit.....	19
2.5.4 Pracovní postup izolace DNA pomocí QIAamp Blood Mini Kit.....	19
2.5.5 Izolace DNA na přístroji MagCore® HF16 Plus.....	21
2.5.6 Pracovní postup izolace DNA pomocí přístroje MagCore® HF16 Plus.....	21
2.5.7 Izolace DNA fenol- chloroformovou metodou.....	22
2.5.8 Pracovní postup izolace DNA fenol- chloroformovou metodou...	22
2.5.9 Možné komplikace.....	24

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Cíle práce.....	24
2. Popis souboru.....	24
3. Příprava metod.....	25
4. Izolační metody a výsledky.....	25
5. Hodnocení.....	28
6. Diskuze.....	31
7. Závěr.....	33
8. Zdroje.....	34

<b>9. Seznam příloh a obrázků.....</b>	<b>36</b>
<b>10. Přílohy.....</b>	<b>37</b>
<b>11. Seznam zkratk.....</b>	<b>45</b>

## TEORETICKÁ ČÁST

### 1. Úvod

Práce je rozdělena na celkem tři části. V první, teoretické části je po jednotlivých kapitolách rozebrán původ, definice i struktura deoxyribonukleové kyseliny. Ve druhé části jsem se zabývala praktickou činností v genetické laboratoři, která obsahuje např. bezpečnost práce, správný postup při odběru krve, a především upozorňuje na možné komplikace během izolace DNA. Ve Třetím úseku práce jsou shrnuty výsledky, hodnocení i závěr izolací DNA pomocí čtyř různých izolačních metod.

### 2. Historie

Vznik eukaryotické buňky představuje jeden ze základních evolučních kroků v dějinách života na Zemi. Odhaduje se, že k této události došlo před více než jednou miliardou let. Jako jeden z prvních popsal buněčnou stavbu v roce 1665 anglický vědec Robert Hooke, který na základě zkoumání primitivním mikroskopem vytvořil nákresy a zveřejnil je v knize *Micrographia*. K vytvoření buněčné teorie přispěl i český badatel Jan Evangelista Purkyně, který roku 1825 uveřejnil první popis jádra eukaryotické buňky. První izolace DNA proběhla v roce 1869 lékařem a přírodovědcem Friedrichem Miescherem, nukleonovou kyselinu izoloval z bílých krvinek. V této době se vědci stále domnívali, že genetickou informaci nesou proteiny. Až v roce 1902 Theodor Boveri a Wallter Sutton uvažovali o teorii, že by chromozom souvisel s přenosem genetické informace. Jejich domněnka byla potvrzena v roce 1910 T. H. Morganem, který dokázal, že chromozom je podstatou dědičnosti a poprvé vyřknul domněnku o chromozomálním základu evoluce. 1953 Francis Crick a James Watson objevili stavbu DNA pomocí Chargaffova poměru bází DNA a rentgenové krystalografie kolegů Maurice Wilkinse a Rosalind Franklinové. Sestavili model molekuly DNA, ukázali její tvar dvojité šroubovice. Watson, Crick a Wilkins v roce 1962 získali Nobelovu cenu, Rosalinda Franklinová ještě před udělováním



cen zemřela (Hughes, 2004; Winston et al., 2005).

### **3. Eukaryotická buňka**

Již počátkem devatenáctého století biologové prokázali, že všechny živé organizmy se skládají z buněk, můžeme tedy říct, že buňka je základní jednotkou života. Některé z těchto organismů jsou tvořeny pouze jednou jedinou buňkou, jiné obsahují buněk biliony. Každý z těchto drobných útvarů, viditelných samostatně pouze pod mikroskopem, je plný funkčních součástí. Každá buňka je tedy složitým uskupením molekul, které může přijímat z okolního prostředí různé látky, získávat a ukládat energii nebo provádět další aktivity včetně rozmnožování (Jelínek et al., 2003; Snustad, et al., 2016).

### **4. Buněčný cyklus**

Buněčným cyklem označujeme dobu, po kterou buňka plní svou funkci včetně dělení. Celý cyklus dělíme na dvě části, a to interfázi a samotnou mitózu. Interfáze je doba, během které dochází k růstu buňky zdvojením buněčné hmoty, přípravě potřebných enzymů a nukleotidů pro replikaci DNA (G1). Poté dochází k samotné syntéze DNA a duplikaci chromozomů (S). Během interfáze je také potřeba zdvojit počet organel a vytvořit struktury potřebné pro dělení buňky, např. dělicí vřeténko. Jedná se o přípravu na buněčné dělení (G2). Pokud je překonána bariéra všech kontrolních uzlů vstupuje buňka do reálného dělení mateřské buňky, které nazýváme mitóza. Během období interfáze nejsou jednotlivé chromozomy rozeznatelné. Délka buněčného cyklu se u různých typů eukaryotických buněk liší (Snustad, et al., 2016).

### **5. Mitóza**

Mitóza je jednou z fází buněčného cyklu. Je způsob dělení jaderné buňky, při kterém dochází k duplikaci a předávání genetické informace. Z mateřských buněk, které se začínají dělit, vznikají produkty, které nazýváme dceřiné buňky. Dceřiné buňky obdrží rovnoměrně rozdělený obsah mateřské buňky. Obsahem myslíme organely a větší počet zdvojených chromozomů, které nesou genetickou informaci. Organely, jako jsou mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát apd. nejsou distribuovány do dceřiných buněk s porovnáním s chromozomy tak rovnoměrně a přesně. Některé z nich se dokonce během buněčného dělení rozpadají na fragmenty, které jsou v nově vzniklých buňkách obnoveny. Výsledkem mitózy jsou tedy dvě geneticky rovnocenná jádra

s naprosto identickou sestavou jednochromatidových chromozomů (Kočárek, 2004; Snustad, et al., 2016).

### **5.1 Profáze**

V první fázi mitózy dochází ke zdvojení DNA v chromozomech tak, aby vznikla dvě totožná vlákna, která jsou spojená centromerou. Chromozomy se zkracují a zesilují, pro nás se stávají pod mikroskopem viditelnými. Jaderná pórovitá membrána se zcela rozpouští a z mikrotubulů (komponenty cytoskeletu) se vytváří složité prostorové uskupení, které nazýváme mitotická dělicí vřeténka (Winston et al., 2005; Závodská 2006).

### **5.2 Metafáze**

Některé z mikrotubulů se napojují na kinetochory, což jsou proteinové struktury spojené s centromerami duplikovaných chromozomů. Připojení mikrotubulů vřeténka ke kinetochorům znamená zahájení metafáze. V tomto stadiu je každá z chromatid připojená k opačnému pólu pomocí mikrotubulů, které jsou navázány na její kinetochor. Každá chromatida je tedy seřazena svou centromerou do centrální roviny buňky. Tato rovina se nazývá metafázní destička. Orientace chromatid hraje zásadní roli v procesu rovnoměrného a přesného rozdělení genetického materiálu do dceřiných buněk (Winston et al., 2005; Závodská 2006).

### **5.3 Anafáze**

Rozdělení sesterských chromatid je podmíněno zkracováním mikrotubulů dělicího vřeténka a současně degradací proteinů, které drží sesterské chromatidy pohromadě v místě centromery. Oddělené sesterské chromatidy se označují jako chromozomy, jakmile jsou odděleny, jsou přitaženy k opačným pólům buňky. Póly se od sebe také vzdalují, tímto dvojitým pohybem je zajištěno dokonalé rozdělení dvou sad chromozomů do opačných částí dělicí se buňky (Winston et al., 2005; Závodská 2006).

### **5.4 Telofáze**

Telofáze se vyznačuje zánikem dělicího vřeténka. Chromozomy se protahují a přestávají být pro nás viditelné. Obnovuje se původní podoba chromatinu. Okolo každé sady chromozomů se zase vytváří jaderná membrána. Objevují se jádérka. Znovu se formují organely, které před samotným dělením buňky byly fragmentovány (Golgiho aparát,

endoplazmatické retikulum) (Winston et al., 2005; Závodská 2006).

### **5.5 Cytokineze**

Jakmile je mitotické dělení dokončeno, dceřiné buňky se od sebe začínají fyzicky oddělovat. Vytváří se cytoplazmatická přepážka, která posléze rozdělí mateřskou buňku na dvě dceřiné. Obě dceřiné buňky jsou geneticky identické, každá z nich obsahuje kompletní sadu chromozomů. Čas od času může docházet při dělení k chybám (Winston et al., 2005; Závodská 2006).

### **5.6 Replikace**

Původní dvojitá šroubovice DNA se v několika bodech podélně rozděljuje. Při tomto procesu vznikají části, kde jsou dvě samostatná jednoduchá vlákna. Volné báze se spojují s oběma jednoduchými vlákny DNA. Pořadí, ve kterém se volné báze k jednoduchému vláknu připojují je určeno bázemi DNA, které už na jednoduchém vláknu jsou. Zatímco se k vláknu připojují báze, začínají se obě nově vzniklá dvojitá vlákna stáčet. Tento proces pokračuje po celé délce DNA až se nakonec vytvoří dva naprosto stejné dvojitě řetězce DNA (Winston et al., 2005).

## **6. Jádro**

Charakteristickou strukturou všech eukaryotních buněk je jádro. Jádro je ohraničeno dvouvrstevným obalem od okolní cytoplazmy. Obsahuje genetický materiál, který zajišťuje buněčné dělení a diferenciaci buněk. A právě diferenciované buňky tvoří orgány a tkáně mnohobuněčných organismů. Hlavními jadernými strukturami jsou jadérko (ve kterém dochází k syntéze ribozomální RNA) a chromatinová vlákna (Manych et al., 1990).

## **7. Chromozom**

Každý chromozom se skládá z chromatinu, ten je tvořen deoxynukleovou kyselinou a určitým množstvím proteinů histonů. Většinu času mají chromozomy podobu chromatinových vláken, tyčinkový tvar pozorujeme pouze při buněčném dělení ve fázi, kterou označujeme jako mitóza (Snustad, et al., 2016).

## **8. Nukleová kyselina**

Nukleové kyseliny jsou tvořeny základními stavebními jednotkami zvanými nukleotidy. Každý stavební kámen, nukleotid, má tři základní složky. Těmi jsou molekula cukru,

molekula fosfátu a dusíkatá báze. V ribonukleové kyselině (RNA) je cukernou složkou ribóza. U Deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je cukernou složkou deoxyribóza. DNA a RNA se od sebe neliší pouze cukerným základem, ale také stavbou nukleotidu. V RNA a DNA jsou čtyři typy nukleotidů z toho tři jsou společné pro oba typy nukleových kyselin. Jedná se o Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) čtvrtou dusíkatou bází pro RNA je Uracil (U) a pro DNA Thymin (T). Pro eukaryotické buňky platí, že největší podíl buněčné DNA je v jádře, pouze malá část v mitochondriích a u rostlin v chloroplastech. DNA nese všechny informace k tvorbě bílkovin v buňkách, je to životně důležitá látka, která je předmětem neustálého zkoumání (Foretová, 2002; Henderson 2014).

### **8.1 Definice a struktura**

Kyselina deoxyribonukleová je duplexní molekula tvořena dvěma vlákny, která jsou držena pohromadě vodíkovými můstky mezi specifickými páry bází. Existují dva druhy specifických párů bází. Purinovými nukleovými bázemi jsou adenin a guanin a pyrimidinovými nukleovými bázemi jsou cytosin, thymin a uracil. Právě daná kombinace nukleových bází je zásadní pro vlastnosti DNA. Neutrální molekula cukru nazývaná deoxyribóza váže přes OH skupinu molekulu fosfátu, která způsobuje, že má DNA slabě kyselé vlastnosti. Dusíkatá molekula zase zajišťuje mírně bazické chemické vlastnosti (Kočárek, 2007); Oswald, 2007).

### **8.2 Funkce**

Z hlediska funkce je DNA látka k přenosu a úschově genetické informace. Lidský genom (veškerá DNA) obsahuje přibližně  $3 \times 10^9$  párů bází a můžeme ho rozlišit na exony, tedy úsek genomu, který přímo kóduje pořadí aminokyselin v proteinu. Informace, které nejsou překládány do proteinů a tvoří největší část genomu, jsou neproteinové sekvence – introny. Jejich význam není zcela objasněn a teorie jim dávají nejčastěji regulační funkce (Kohoutová, 2013).

### **8.3 Genová exprese**

Genová exprese je složitě regulovaný děj, kterým je sekvence DNA převedena do proteinu (García-Sancho, 2012).

### **8.4 Transkripce**

První fází exprese genetické informace je transkripce. Tento proces probíhá v jádře a

genetický kód DNA je během něj převeden na RNA. Klíčovou roli zde hrají RNA polymerázy, které po rozpletení DNA připojují komplementární nukleotidy RNA. Takto se přepíše jedno vlákno DNA do mRNA, poté se odpojí a doputuje do ribozomu (Vrba, 1994).

### **8.5 Translace**

Translace je děj probíhající na ribozomech na jehož konci je syntetizovaná bílkovina (Vachtenheim, 1992). Ribozomy jsou buněčné organely, které se skládají z rRNA a bílkovin. Zde informace z DNA transkripcí přepsána do mRNA je předlohou pro sestavení řetězce aminokyselin. Jde o energeticky velice náročný proces skládající se z iniciace, elongace a terminace (Teplá, 2013).

### **8.6 Izolace**

Izolace nukleových kyselin je základem pro většinu metod molekulární genetiky. Výchozí biologický materiál je různorodý, více popsán ve 4. kapitole. Nejběžnějším materiálem klinické praxe je krev a její jaderné buňky. Jádra není nutné předem izolovat a podstatou izolačních metod je desintegrace komplexu DNA a jaderných proteinů použitím detergentu (nejčastěji dodecylsíránem sodným). Následuje odstranění kontaminujících látek. Výsledkem je čistá, nerozštěpená DNA bez příměsí RNA a bílkovin (Vachtenheim, 1992).

### **8.7 Uchovávání**

Nakládání s DNA je legislativně ošetřeno a pokud přijde na řadu archivace, existuje mnoho způsobů zachování DNA. Mezi obory (genetické laboratoře, forenzní genetiky, farmacie, evoluční biologové) se nároky na udržení stabilního vzorku liší. Krátkodobě (několik dnů, popř. týdnů) lze vzorky skladovat při teplotě 4°C, což je nejběžnější právě v laboratořích. K technikám dlouhodobého uchovávání patří skladování při -20°C, popř. při -80°C (DNA je vysrážena v ethanolu), v tekutém dusíku a dalšími patentovanými technologiemi (Anchordoquy, Molina, 2007).

### **8.8 Využití**

Spektrum využití izolované DNA je velice široké napříč nejrůznějšími obory. V molekulárně genetických laboratořích izolace předchází stanovení přítomnosti nebo

absence genu u nemocného nebo nosiče. Metody odkrývají odchylky ve struktuře DNA u genetických chorob a nádorových onemocnění, případně detekují přítomnost DNA jiného organismu – infekčních agens. Navazujícími metodami jsou PCR, sekvenování DNA a další (Vrba, 1994).

## **9. Biologický materiál**

V rámci diagnostiky DNA lze použít širokou škálu vzorků. Vzorky můžeme získat neinvazivně (buňky bukalní sliznice, či buňky z močového sedimentu) i invazivně (buňky z plodové vody, buňky choriových klků, buňky kostní dřeně, anebo periferní krevní buňky). Buňky bukalní sliznice by se mohly zdát nejvhodnějším biologickým materiálem. Ústní sliznice obsahuje velké množství živých buněk, které lze snadno a neinvazivně odebrat sterilním tampónem. Musíme si ale uvědomit riziko, které spočívá v rozmanitosti ústní mikroflory. Buňky močového sedimentu mohou být dvojího původu, což opět může vést k nepřesnosti diagnostiky. V moči se mohou objevit prakticky všechny krevní elementy, ale také buňky původem z ledviny či vývodných močových cest. Nepřesnost diagnostiky DNA z moče může vycházet z faktu, že pacient může trpět bakteriální infekcí a my stejně jako u buněk z bukalní sliznice můžeme vyizolovat bakteriální DNA.

Plodová voda obsahuje nejen buňky plodu, které se musí v laboratoři nejprve nakultivovat neboli namnožit v tkáňové kultuře. Po náročné kultivaci se z amniocytů vyšetřuje karyotyp plodu. Metoda je především časově náročná a neprovádí se vždy. (Caldá, 2010)

Dalším biologickým materiálem, se kterým se můžeme v genetické laboratoři setkat jsou choriové klky. Provedení je identické jako u buněk z plodové vody s rozdílem, že z choria se postupem času vytvoří placenta. Buňky choria poskytují informaci obdobnou amniovým buňkám z plodové vody. Vyšetření buněk kostní dřeně se provádí po odběru z hrudní kosti. Tento odběr biologického materiálu se řadí mezi jeden nejbolestivější, proto se rozhodně nedoporučuje pro rutinní vyšetření v genetické laboratoři. Vhodnější je vycházet z plné krve (Březinová et al., 2012).

### **9.1 Krev**

Krev je tvořena nejrůznějšími typy buněk, které proudí v krevní plazmě. Za svou barvu vděčí milionům červených krvinek, které mají jedinečné vlastnosti. Přijímají v plicích sklípce kyslík a uvolňují ho do tělesných tkání. Krevní plazma, ve které buňky plují zajišťuje dopravu výživných látek. V krvi jsou také miliardy specializovaných buněk,

kteře jsou součástí obranných mechanismů těla. Bílé krvinky mají za úkol najít a zničit cizorodé organismy. Bílé krvinky jsou jednou tak větší než červené krvinky a mají jádro. Jádro obsahuje většinu DNA lidského těla, a to ve formě chromozomů. Dělit jaderné buňky můžeme podle vzhledu, ale i podle úkolů. Mezi hlavní typy jaderných buněk patří neutrofil, eozinofil, lymfocyt, bazofil a monocyt (Penka et al., 2011).

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

### **1. Bezpečnost práce v genetických laboratořích**

Problematiku bezpečnosti při práci v laboratořích legislativně upravuje norma ČSN 01 8003 a na pracovišti je zahrnuta v provozním řádě. Rizika napříč různými laboratořemi se mohou lišit. Jelikož genetické laboratoře pracují s biologickým materiálem, musí dodržovat zásady ve Vyhlášce Ministerstva zdravotnictví č. 195/2005 Sb., upravující hygienické požadavky a podmínky předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění. Nejpravděpodobnějšími nehodami zde je pořezání, píchnutí jehlou, poleptání, popálení a profesionální infekce. Povinností laborantů je proto striktní dodržení pracovních postupů a bezpečnostních opatření (Skřehot, 2018).

### **2. Izolace DNA**

Nezbytným prvním a základním krokem pro většinu vyšetřovacích metod molekulární genetiky je izolace DNA (popř. RNA). Bohužel není ojedinělým jevem, že se získaná DNA nedá pro další vyšetření použít kvůli své špatné kvalitě. A to z mnoha různých důvodů. Nejčastěji jde o špatný odběr, malé množství odebraného materiálu, odběr do špatné zkumavky, nevhodné uchování odebraného vzorku, degradace biologického materiálu při transportu nebo přítomnost různých kontaminantů, které mohou inhibovat PCR apod. (Gubenšeková et al., 2008).

#### ***2.1 Informovaný souhlas pacienta***

Indikující lékař zasílá do genetických laboratořích s žádankou o vyšetření i pacientem podepsaný souhlas s diagnostickým postupem (analýzou DNA) a informací o dalším nakládání s jeho DNA.

#### ***2.2 Odběr krve***

Odběr se provádí v pohodlné poloze, v sedě, s nataženou paží, u které je vyloučeno poranění, hematom, zjizvení apd. Po usazení pacienta je připraven potřebný počet

zkumavek, jehla s vhodnou světlostí, turniket, desinfekce, buničina, náplast a rukavice. Místo odběru musí být vydesinfikováno a řádně oschnuto, aby nedošlo ke kontaminaci, nebo hemolýze vzorku. Při odběru může být použit turniket, který je uvolněn, jakmile krev začne vtékat do zkumavky. Vakuum ve zkumavce zajistí přiměřené naplnění zkumavky, a tak vhodný poměr krve a protisrážlivého činidla (k analýze DNA je činidlem EDTA). Bezprostředně po odběru je krev ve zkumavkách promíchána opakovaným převrácením zkumavky. Místo vpichu i s jehlou je zakryto buničinou, stlačeno prsty a pomalým tahem se vytáhne jehla ze žíly. Místo vpichu se přelepí náplastí a pacientovi je doporučeno si tisknout místo alespoň dvě minuty. Po odběru jsou jehly bezpečně zlikvidovány. A vzorek krve s žádankou a informovaným souhlasem předán k transportu (Kolektiv pracovníků Klinických laboratoří OKB a OHKT, 2019).

### **2.2.1 EDTA**

EDTA je často využívané antikoagulační činidlo, jelikož vyváže vápenaté ionty a tím blokuje koagulační kaskádu a zároveň inhibuje DNázy a neovlivňuje tak kvalitu extrahované DNA. Avšak ovlivňuje koncentrace hořečnatých iontů u „downstream“ aplikací. Heparin není příliš vhodný antikoagulační činidlo, jelikož se váže na DNA během purifikace a dokonce inhibuje Taq polymerázu během PCR reakce (Zagon et al., 2012).

### **2.3 Transport**

Různé typy biologických materiálů mají různé nároky na transport a uchovávání v jeho průběhu. Venózní krev ve zkumavkách s EDTA je dopravována při teplotě 2- 8°C nejlépe týž den nebo následující (Beránek et al., 2012).

### **2.4 Příjem materiálu**

Příjem vzorků je část preanalytické fáze, která probíhá v laboratoři. Bývá často opomíjena, přestože se právě během této činnosti často chybuje. Úkony se mohou stát rutinní záležitostí a laborant může snadno udělat chybu. Laborant by se před samotnou analýzou měl ujistit, zda byly pacientem dodrženy všechny doporučené zásady před odběrem krve. Dále musí být jako prevence záměny překontrolovaná žádanka, zda je řádně vyplněná a zda je shodně označená s odběrovou zkumavkou (Beránek et al., 2012).



## **2.5 Izolační techniky**

### **2.5.1 Izolace DNA vysolením**

Princip vysolovací metody je velice jednoduchý. Z periferní krve je po lýzi erytrocytů získána leukocytární frakce. Následuje lýze leukocytů. DNA je uvolněna z jader buněk. Vysrážena 96% ethanolem, promyta a přenesena do uchovávací mikrozkušavky. Metoda izolace DNA vysolením je poměrně časově náročná, ale spolehlivá. V ideálním případě by se izolace prováděla během dvou dnů. Podle níže uvedeného postupu lze izolovat z množství krve od 0,5 ml do 2ml. Standardně se výtěžnost DNA získané ze 2 ml krve pohybuje kolem 50- 100 mikrogramů dsDNA (dvoušrobicová). Při rutinní izolaci z většího objemu krve by bylo nutné poměrově přizpůsobit objemy lyzačních roztoků (Kühn et al., 2016; Turtinen et al., 1998).

### **2.5.2 Pracovní postup Izolace DNA vysolením**

#### Potřebný materiál:

Periferní krev

Jednorázové ochranné gumové rukavice

Stojánek na zkumavky

Zkumavky

Automatická pipeta

Špičky k automatické pipetě

Pasteurovy pipety

Širší kelímek

Vysterilizovaný skleněný háček

Mikrozkušavka typu Eppendorf

#### Chemikálie:

Lyzační roztok na erytrocyty ( $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaHCO}_3 + \text{EDTA} + \text{H}_2\text{O}$ )

Lyzační roztok na leukocyty ( $6\text{M NaCl} + 0,5\text{M EDTA} + 1\text{M TRIS} + \text{H}_2\text{O}$ )

TE pufr ( $1\text{M TRIS} + \text{HCl pH } 8 + \text{EDTA} + \text{H}_2\text{O}$ )

SDS (dodecylsulfát sodný)

Enzym proteináza K (komerčně vyráběna, Cobas)

60% a 96% ethanol

6M NaCl

### Přístroje:

Laminární box

Lednice

Centrifuga

Ohřívací suchý blok

Třepačka Vortex

### Pracovní postup:

1. Veškerá manipulace se vzorkem probíhá v laminárním boxu (Biohazardu). Do sterilní, prázdné, řádně označené 10ml zkumavky pomocí pipety přeneseme 2 ml promíchané periferní krve a dolijeme 8ml lyzačního roztoku na erythrocyty. Pořádně protřepeme na třepačce a uložíme na 2 hodiny do lednice.
2. Po 2 hodinách vzorek znova protřepeme a centrifugujeme při 3,5 tisíce otáček 10 minut (obrázek č. 1 ). Pomocí automatické pipety odsajeme obsah zkumavky, tak aby na dně zůstal světlý pelet leukocytů (obrázek č.2).
3. Opět přidáme 8 ml lyzačního roztoku na erythrocyty, třepáním rozbijeme pelet a dáme do lednice. Po půl hodině stočíme v centrifuze při stejných otáčkách i čase. Tento postup opakujeme, dokud se erythrocytů úplně nezbavíme. To poznáme pohledem – ve zkumavce není červená barva, pouze bílý pelet leukocytů.
4. K peletu přidáme 2 ml lyzačního roztoku na leukocyty, 100 µl SDS (detergent, který rozpouští biomembrány) a 5µl proteinázy K (která štěpí bílkoviny) a uložíme vzorek do suchého bloku vyhřátého na 56°C na tři hodiny.
5. Po třech hodinách vzorek vytemperujeme na pokojovou teplotu a přidáme 2ml 6M NaCl, točíme v centrifuze při 6tis. otáčkách 10 minut.
6. Do čisté prázdné zkumavky přeneseme pomocí pipety supernatant a sedimentovanou sůl zlikvidujeme.
7. Vzorek znova centrifugujeme a supernatant přenášíme do nové zkumavky, dokud se nepřestane tvořit sediment.
8. Připravíme si mikrozukmavku se 100µl TE pufru, další s 500µl 60% ethanolem, širší kelímek s 5ml 96% ethanolu a vysterilizovaný skleněný háček.
9. Do Pasteurovy pipety natáhneme menší polovinu vzorku (nyní velmi záleží na šikovnosti laboranta, zbylou část vzorku je vhodné uschovat do skončení izolace, v případě špatného vysrážení lze následující body opakovat se zbylým supernatantem).

10. Do širšího kelímku s 96% ethanolem, který je uchováván v mrazáku při teplotě do -18°C, pomalu kapeme supernatant, přičemž je okamžitě vidět „obláček“ vysrážené DNA. Pomocí skleněného háčku obláček namotáváním rychle vytáhneme (obrázek č.3), na 5 sekund ponoříme do 60% ethanolu (oplach) a z háčku uvolníme v mikroskopické zkumavce s TE pufrem (obrázek č.4)

11. DNA se v TE pufru rozpouští několik hodin. Tento čas lze zkrátit vložením vzorku do ohřívacího suchého bloku teploty 36°C na hodinu za občasného třepání.

### ***2.5.3 Izolace DNA pomocí QIAamp Blood Mini Kit***

Izolace DNA z krve pomocí QIAamp Blood Mini Kitu probíhá na kolonkách pomocí roztoků a centrifugace. Principem je lyze buněk, vazba DNA na silikátový povrch v kolonkách, promytí kolonky a eluce DNA z kolonky. Izolace DNA pomocí kitu je rychlá a spolehlivá. Podle níže uvedeného postupu lze vyizolovat z 200 mikrolitru periferní krve cca 3-4 mikrogramů DNA (Beránek, 2016; Qiagen, 2012).

### ***2.5.4 Pracovní postup izolace DNA pomocí QIAamp Blood Mini Kit***

#### Potřebná materiál:

Gumové ochranné rukavice

Stojánek na zkumavky

Třepačka Vortex

Centrifuga

Ohřívací suchý blok

Izolační sada QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit

#### Chemikálie:

200 ul plné krve

96% ethanol

#### Postup:

1. Do lyzační zkumavky s označením LT přeneseme automatickou pipetou s vhodnou špičkou 20 µl proteázy QIAGEN, 200 µl krevního vzorku a 200 µl lyzačního pufru (AL), uzavřeme víčko a na třepačce 15 sekund promícháme.

2. Zkumavku lehce necháme stočit v centrifuze na maximální počet otáček, tak aby vysoce viskózní lyzační pufr ztekl ze stran zkumavky a zaručil nám účinnou lýzy proteinů.
3. Zkumavku přeneseme do termostatu, kde necháme vzorek inkubovat 10 minut při teplotě 56°C (obrázek č. 5).
4. Po inkubaci přeneseme zkumavku se vzorkem do centrifugy, kde necháme lyzační zkumavku točit po dobu minimálně 5 sekund při plné rychlosti.
5. Do lyzační zkumavky (LT) přidáme 200 µl 96% ethanolu, zavřeme pečlivě víčko a přibližně 15 sekund vzorek promícháváme na třepačce.
6. Zkumavku lehce necháme stočit v centrifuze na maximální počet otáček.
7. Pomocí automatické pipety s čistou a vhodnou špičkou přepipetujeme celý lyzát na kolonku, aniž by došlo k navlhčení jejího okraje. Nedotýkáme se membrány kolonky pipetovací špičkou.
8. Pečlivě zavřeme víčko a necháme vzorek točit v centrifuze jednu minutu při 8000 rpm (obrázek č. 6).
9. Vyjmeme zkumavku z centrifugy, kolonku přendáme do nové čisté promývací zkumavky (WT), zkumavku obsahující lyzát vyhodíme do biologického odpadu.
10. Opatrně otevřeme kolonku a přidáme 500 µl promývacího pufru 1 (AW1), aniž by došlo k navlhčení okraje kolony. Nesmíme se dotknout membrány kolony QIAamp Mini Spin pipetovací špičkou, aby nedošlo k porušení.
11. Zavřete víčko kolony QIAamp Mini Spin a centrifugujeme při 6000 rpm přibližně 1 minutu.
12. Vložíme kolonku QIAamp Mini Spin do čisté promývací zkumavky (WT) a vyhodíme zkumavku obsahující filtrát do koše na biologický odpad.
13. Opatrně otevřeme kolonku QIAamp Mini Spin a přidáme 500 µl promývacího pufru 2 (AW2), aniž by došlo k navlhčení okraje kolonky.
14. Zavřeme víčko kolonky QIAamp Mini Spin a centrifugujeme při plné rychlosti přibližně 1 minutu.
15. Vložíme kolonku QIAamp Mini Spin do čisté promývací zkumavky (WT) a vyhodíme zkumavku obsahující filtrát do koše na biologický odpad.
16. Centrifugujeme při plné rychlosti po dobu 3 minuty, aby došlo k úplnému vysušení membrány. Vynechání této centrifugace, při níž dochází k vysušení kolony, může vést k inhibici následné analýzy.

17. Vložíme kolonku QIAamp Mini Spin do čisté eluční zkumavky (ET) a promývací zkumavku (WT) obsahující filtrát vyhodíme opět do biologického odpadu (obrázek č.7).

18. Opatrně otevřeme víčko kolonky QIAamp Mini Spin a nanese 50 až 200 µl elučního pufru (AE) na střed membrány. Uzavřeme víčko a inkubujeme při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty.

19. Centrifugujeme vzorek při 6000 rpm přibližně po dobu 1 minuty, aby došlo k eluci DNA. (Příručka QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, 2012)

### ***2.5.5 Izolace DNA na přístroji MagCore® HF16 Plus***

Izolace nukleové kyseliny pomocí kitu MagCore® Genomic DNA Large Volume Whole Blood Kit (1.2 ml) na přístroji pro automatickou izolaci nukleových kyselin MagCore® HF16 Plus probíhá na principu lýze buněk, uvolnění nukleových kyselin do roztoku, jejich vazbu na magnetické skleněné částice, odstranění nenavázaných látek několika promytími a následnou elucí purifikované nukleové kyseliny.

Automatická izolace DNA pomocí kitu MagCore® Genomic DNA Large Volume Whole Blood Kit (1.2 ml) na přístroji MagCore® HF16 Plus je velice rychlá, bezpečná a spolehlivá. Pomocí výše uvedeného kitu lze vyizolovat z 500 – 1000 mikrolitru periferní krve cca 14-47 mikrogramů DNA.

### ***2.5.6 Pracovní postup izolace DNA pomocí přístroje MagCore® HF16 Plus***

#### Potřebný materiál:

Periferní krev

Jednorázové gumové rukavice

Sada MagCore® Genomic Large Volume Whole Blood Kit (1.2 ml)

Automatická pipeta

Špičky k automatické pipetě

#### Přístroje:

Lednice

Automatický izolátor MagCore® HF16 Plus

#### Postup:

1. Přidáme 1,1 ml pufru do zkumavky s označením Proteinase K a promícháme šetrným vířením v ruce

2. 80µl připravené proteinázy K napipetujeme do zkumavek vzorku MagCore.
3. Do připravené vzorkovací kapiláry přidáme 1200 µl plné krve.
4. Kalibrační kapiláru připravíme do jamky 1 T-stojánku dle návodu k izolátoru.
5. Vložíme námi připravené eluční kapiláry do polohy 5 T-stojánku, špičku a pipety do stojánku 3T.
6. Spustíme program Code.104 na MagCore®, který trvá 43 minut bez optické detekce.

Poznámka: V hodně viskózních vzorcích se mohou vyskytovat perličky nebo sraženiny v eluentu. Tato situace by ovšem neměla nijak ovlivnit výtěžnost a čistotu DNA ani následné zpracování genetického materiálu.

### ***2.5.7 Izolace DNA fenol- chloroformovou metodou***

V této metodě použijeme k oddělení proteinů směs organických rozpouštědel fenolu a chloroformu v poměru 1:1. Výsledkem nám bude oddělení směsi na dvě frakce, kdy ve vodném roztoku zůstanou nukleové kyseliny. Organická rozpouštědla, v našem případě fenol chloroform, vysráží proteiny (Kühn et al., 2016).

### ***2.5.8 Pracovní postup izolace DNA fenol- chloroformovou metodou***

#### Potřebný materiál:

Gumové ochranné rukavice

Zkumavky

Stojánek na zkumavky

Špičky k automatické pipetě

Automatická pipeta

Skleněný háček

#### Chemikálie:

200 ul vzorku plné krve

300 ul lyzačního pufru Queen's (pH 7,5)

100 ul proteinázy K

100 ul 10% roztoku laurylsíranu sodného (SDS)

700 ul směsi fenol-chloroform (1:1)

1200 ul chloroformu

70% ethanol na omytí  
150 ul 3M octanu sodného  
700 ul izopropanolu  
500 ul TE pufru (pH8)

Přístroje:

Termostat  
Centrifuga  
Mrazák

Postupy:

1. Do stojánku si připravíme 6 zavřených a již předepsaných 1,5 ml zkumavek (obrázek č. 8).
2. Do první zkumavky si automatickou pipetou s vhodnou špičkou přeneseme 500 ul vzorku krve, přidáme 100 ul proteinázy K a 100 ul 10% roztoku laurylsíranu sodného. Se vzorečky nikdy netřepeme, promíchání provádíme jemným překlápěním v ruce (obrázek č. 9).
3. Zkumavky přeneseme do termostatu, kde je necháme inkubovat při cca 38°C tři hodiny.
4. Zkumavky vyjmeme z termostatu a do každé přidáme 700 ul směsi fenol-chloroform (1:1), Vzorky opět lehce promícháme a necháme centrifugovat 15 minut při 13 000 g. Tím dosáhneme oddělení proteinů od vodné fáze (obr. č. 10).
5. Zkumavky si přeneseme z centrifugy zpět do stojánku, kde pomocí automatické pipety s vhodnou špičkou odebereme pouze vodnou fázi, ve které se nám nachází pouze nukleové kyseliny a přendáme do nové 1,5 ml zkumavky. Dáváme si pozor, aby nedošlo k nasátí mezifáze s proteiny. K vodné fázi přidáme 500 ul chloroformu, opět lehce promícháme a necháme centrifugovat 15 min. při 13 000 g. Celý postup bodu 5 zopakujeme.
6. Opět pomocí automatické pipety s vhodnou špičkou přeneseme do nové 1,5ml zkumavky vodnou fázi, ke které přidáme 150 ul 3M octanu sodného a 700 ul izopropanolu vychlazeného na -20°C. Začneme vzorek okamžitě lehce překlápět a překlápíme tak dlouho, dokud se neobjeví malý mráček, sraženina DNA.
7. Tento bod potřebuje alespoň malou zdatnost, přesnost a rychlost, DNA namotáme pomocí skleněné tyčinky a omyjeme 70% ethanolem.

8. Do nové 1,5ml zkumavky s 500 ul TE pufru ponoříme skleněnou tyčinku tak, aby se nám DNA uvolnila.
9. DNA necháme důkladně rozpustit v termostatu při cca 38°C. Po dokonalém rozpuštění můžeme vzorek zmrazit.

### **2.5.9 Možné komplikace**

Žádná diagnostická laboratoř nepřišla zatím na způsob, jak by nahradila lidskou sílu. A právě možnost lidské chyby může nevratně ovlivnit výtěžnost DNA, čistotu DNA a také ovlivňuje rychlost provedení pracovního postupu izolace. Největším rizikem, kde se může stát chyba je pipetování. Laborant může snadno zaměnit nesprávně označené zkumavky, nedodržet předepsaný pracovní postup či jednou špičkou sáhnout do dvou vzorků a jeden z nich kontaminovat.

Dalším rizikem může být špatné uchování, naředění či odměření chemikálií. Ukázkovým příkladem je nejčastěji používaná proteáza K. Správně připravený určitý typ proteinázy K (10 mg / ml) se pro úspěšnou izolaci musí skladovat při -20 ° C. Ne vždy jsou tyto skladovací podmínky dodrženy, tím se snižuje účinnost proteinázy K. Což bývá velikou nevýhodou, protože působení enzymů potřebuje dlouhou dobu inkubace vzorků a tím se vylučuje vhodnost pro rutinní diagnostické použití (Skřehot, 2018).

## **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **1. Cíle práce**

Cílem práce je se seznámit se správnou technikou izolačních metod DNA. Porovnání se bude týkat čtyř různých metod. Hodnoceny budou tyto ukazatele: čistota a koncentrace DNA z periférních krevních buněk, finanční a časová náročnost metod, i chybnost lidského faktoru.

### **2. Popis souboru**

Výchozím biologickým materiálem je venózní krev, která byla poskytnuta třinácti dobrovolníky na transfúzním oddělení. Dárci byli seznámeni se záměrem této práce a na základě dostatečné informovanosti jim byl předložen k podpisu „Informovaný souhlas“ ve dvojím vyhotovení.

### **3. Příprava metod**

V první řadě proběhl pro nás zjednodušený příjem vzorku. Do Laboratorního protokolu



se zapsalo pořadí izolovaných vzorků. Pro následný ucelený slet úkonů v laboratoři byl jednu hodinu před začátkem izolací zapnut suchý blok Mini Dry Bath Incubator MINIB 100RT a nastavena v něm teplota na 56°C. Dosažená teplota byla zkontrolována kalibrovaným teploměrem a zaznamenána do Laboratorního protokolu.

V laminárním boxu jsme si připravili stojánky pro 15ml zkumavky, které se řádně označily nesmazatelným fixem a to na boční stěně zkumavky a zároveň na víčku zkumavky. Během dvou izolačních postupů bylo potřeba přenést vysráženou DNA pomocí skleněných háčků, které jsme si nejdříve vyrobili. Skleněnou Pasteurovu pipetu jsme nahřáli nad zapáleným plynovým kahanem a pomalým otáčením jsme vytvarovali na konci Pasteurovy pipety kuličku, která posloužila jako háček. Po vychladnutí byly vyrobené skleněné háčky ponořeny do 96% ethanolu a prozatím ponechány v laminárním boxu. Pro sterilní prostředí byla v laminárním boxu zapnuta UV lampa a to na 5-10 minut. Během celých postupů se udržovalo stále stejné pořadí vzorků jako je zaznamenalo do Laboratorního protokolu. Správnost přenosu vzorků a souhlasného označení zkumavek bylo kontrolováno před, během i po přenosu vzorku. Při práci byly vždy použity jednorázové latexové rukavice, protože veškerý biologický materiál je nutno považovat jako potenciálně infekční. Zároveň zabráníme kontaktu reagensů s kůží. Reagencie označené jako hořlavé byly uchovávány v dostatečné vzdálenosti od otevřeného plamene (Holasová, et al., 2006).

#### **4. Izolační metody a výsledky**

Genomová DNA byla izolována ze vzorků periférní krve námi upravenou vysolovací metodou, fenol- chloroformovou metodou, kitem QIAamp Blood mini Kit, na přístroji pro automatickou izolaci nukleových kyselin MagCore® HF16 Plus pomocí komerčně dodávaného kitu MagCore® Genomic DNA Large Volume Whole Blood Kit (1.2 ml).

Při běžném provozu by byly příchozí vzorky pacientů skladovány při +2°C až +8°C v označené chladničce a izolace by byla zahájena nejpozději do 72 hodin od odběru vzorku. Z důvodu časové náročnosti izolací, nemohla být DNA izolace zahájena do doporučené doby zpracování, proto byly vzorky krve pacientů zamrazeny v označené mrazničce a izolovány v nejbližším možném termínu.

##### **Izolace DNA vysolením**

Vysolovací metoda se řídila pracovním postupem popsáním v kapitole 2.2.2. Aby bylo možné metody srovnávat, vstupní množství biologického materiálu bylo upraveno na

500ul. Izolace z rozmražené krve probíhala obtížně. Vymývání složky erytrocytů muselo být několikrát zopakováno. Po přidání detergentu a proteinázy K a následné tříhodinové inkubaci při 56°C byla většina vzorků stále zakalena. Eluční objem byl 500ul. Celý postup trval 595 minut a cena jednoho vzorku byla 63Kč.

Tabulka č.1 Naměřené koncentrace získané DNA vysolením (ng/ul).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
17,2	15,5	7,3	6,2	22,7	21,6	6,8	12,1	12,2	10,9	10,6	12,3	11,0

Tabulka č. 2 Naměřená čistota získané DNA vysolením poměrem absorbancí 260/280.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2,1	2,2	4,9	13,9	1,8	2,2	4,9	3,5	1,9	1,7	4,9	2,9	2,6

#### Izolace DNA pomocí QIAamp Blood Mini Kit

Izolace pomocí QIAamp Blood Mini Kitu byla prováděna podle pracovního postupu z kapitoly 2.2.4. Výstupní objem eluátu byl upraven na 500ul, aby se metody mohly porovnat. Izolace byla nenáročná, protože nebylo použito tolik chemikálií, které by do postupu mohly přinést chybnost lidského faktoru. Postup byl založen na lýzy buněk, vazbě DNA na silikátový povrch v kolonkách, promytí kolonek a eluci DNA. Zpracování trvalo celkem 80 minut. Cena jednoho vyizolovaného vzorku byla 78Kč.

Tabulka č.3 Naměřené koncentrace získané DNA pomocí kitu (ng/ul).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
78,2	24,2	59,2	21,0	57,6	67,3	51,2	40,4	30,4	41,4	39,2	20,4	45,7

Tabulka č. 4 Naměřená čistota získané DNA kitem poměrem absorbancí 260/280.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2,1	2,7	2,1	2,0	2,2	2,1	1,8	1,9	2,3	1,8	2,3	2,2	1,4

#### Izolace DNA na přístroji MagCore® HF16 Plus

Izolace pomocí automatického izolátoru nukleových kyselin byla prováděna podle pracovního postupu z kapitoly 2.2.6. Výstupní objem eluátu byl po samotné izolaci

upraven na 500ul. Tato metoda byla rychlá, jednoduchá a efektivní, protože souprava obsahovala všechny potřebné reagentie i laboratorní vybavení pro automatizaci čištění pomocí technologie magnetických částic. Jedinou nevýhodou je pořizovací cena izolátoru, která činí 390 000 Kč bez DPH. Čas potřebný k izolaci představoval pouhých 60 minut a cena jednoho vyizolovaného vzorku byla 196 Kč.

Tabulka č.5 Naměřené koncentrace získané DNA pomocí automatického přístroje (ng/ul)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
68,2	41,8	59,8	46,2	80,3	55,1	59,8	68,3	33,5	21,8	41,8	16,2	59,2

Tabulka č. 6 Naměřená čistota získané DNA poměrem absorbancí 260/280.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1,9	2,0	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	2,1	1,9	1,9	1,9

Izolace DNA fenol- chloroformovou metodou

Izolace nukleové kyseliny pomocí fenol-chloroformem byla provedena podle postupu v odstavci 2.2.8. I přes to, že se jedná o jednu z nejstarších metod, o „zlatý standart“, nevyhovuje metoda svou časovou náročností a riskantností, protože se pracovalo s toxickými látkami. Na izolaci bylo potřeba 285 minut a cena jednoho vzorku činila 102Kč.

Tabulka č.7 Naměřené koncentrace získané DNA fenol-chloroformem (ng/ul).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
23,4	3,3	4,7	6,1	25,0	39,5	65,5	18,9	13,7	14,7	39,5	8,5	20,1

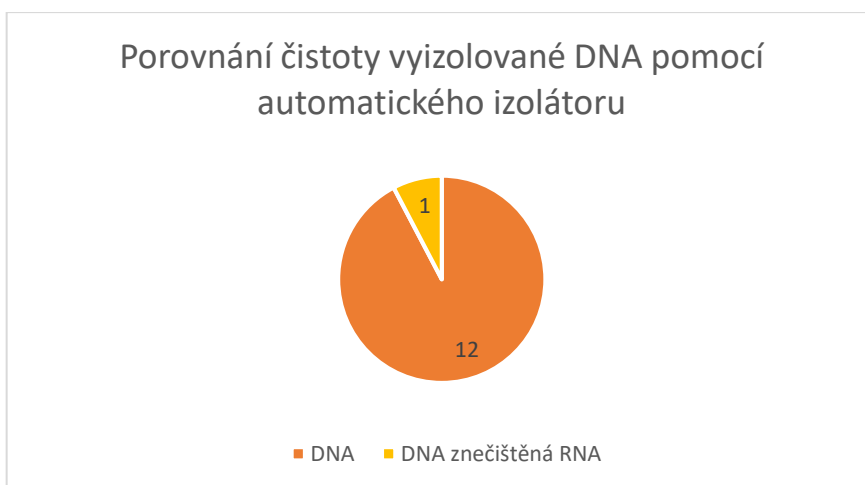
Tabulka č. 8 Naměřená čistota získané DNA poměrem absorbancí 260/280.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1,4	2,3	1,3	2,9	1,8	1,7	1,3	1,8	2,3	1,9	1,9	2,2	2,3

## 5. Hodnocení

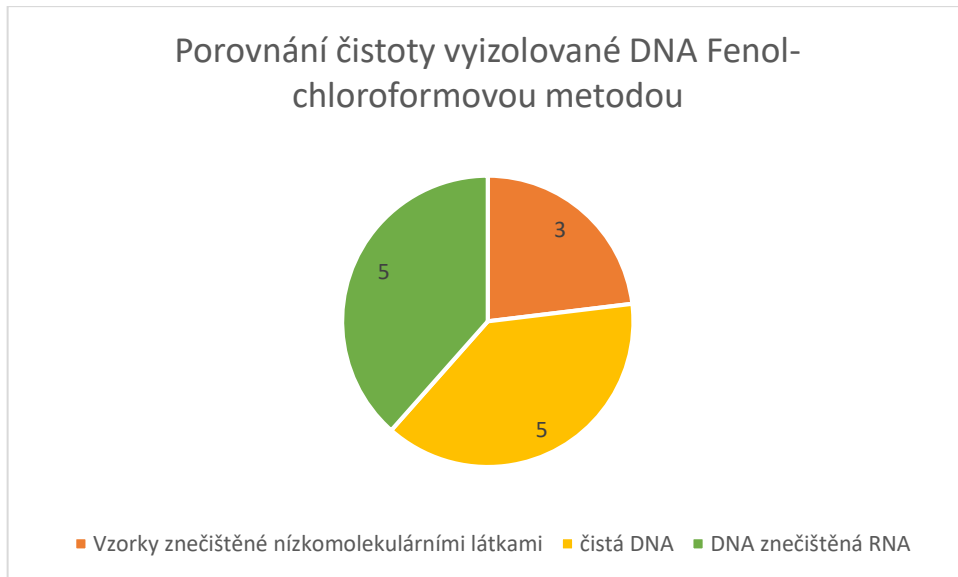
Optimální hodnoty čistoty vyizolované DNA je dána poměrem absorbance A 260/280, který by měl mít hodnotu 1,8. Hodnoty pod 1,6 ukazují na znečištění nízkomolekulárními látkami, DNA proteiny nebo zvýšený obsah dalších látek v extraktu (fenol, EDTA). Hodnoty nad 2,0 ukazují na vysokou příměs čisté RNA ve vzorku. Výrazně odlišné hodnoty poměru absorbancí pak svědčí o značném znečištění vzorku a takovéto vzorky mohou být obtížně amplifikovatelné. Koncentrace a čistota vzorků byla spektrofotometricky přeměřena za použití spektrofotometru NANODROP ND-2000/2000c. K proměření bylo zapotřebí 0,5 $\mu$ l elučního roztoku s DNA (M.G.P., 2019). Největší počet vzorků s čistou DNA vykázal automatický izolátor. Zde byla úspěšně vyizolovaná čistá DNA v 92,30% ze soubor (Graf č.1). V pomyslném žebříčku následuje izolace fenol-chloroformovou metodou, kde čistá DNA byla úspěšně vyizolovaná u 38,46% vzorků. Stejně procento znamenalo vyizolovanou RNA a 23,08% bylo znečištěno pravděpodobně fenolem či chloroformem (Graf č.2). Čistá DNA byla v 30,1% vyizolovaná pomocí kitu, mnohem větší zastoupení, a to 61,54%, měla DNA znečištěna příměsí RNA. Pouhých 7,69% bylo znečištěných nízkomolekulárními látkami (Graf č.3). V našem případě byla vysolovací metoda nejméně účinná. Čisté DNA bylo vyizolováno pouhých 23,07% ze souboru vzorků. V 76,92% byla vyizolovaná směs DNA s RNA (Graf č.4).

Koncentrace vzorku ng/ul byla vypočtená na bázi absorbance při 260nm a zvolené analytické konstantě. Výsledky koncentrací jsou k porovnání zaznamenány v grafu č. 5 jako mediány s informací o rozpětí skutečných hodnot.

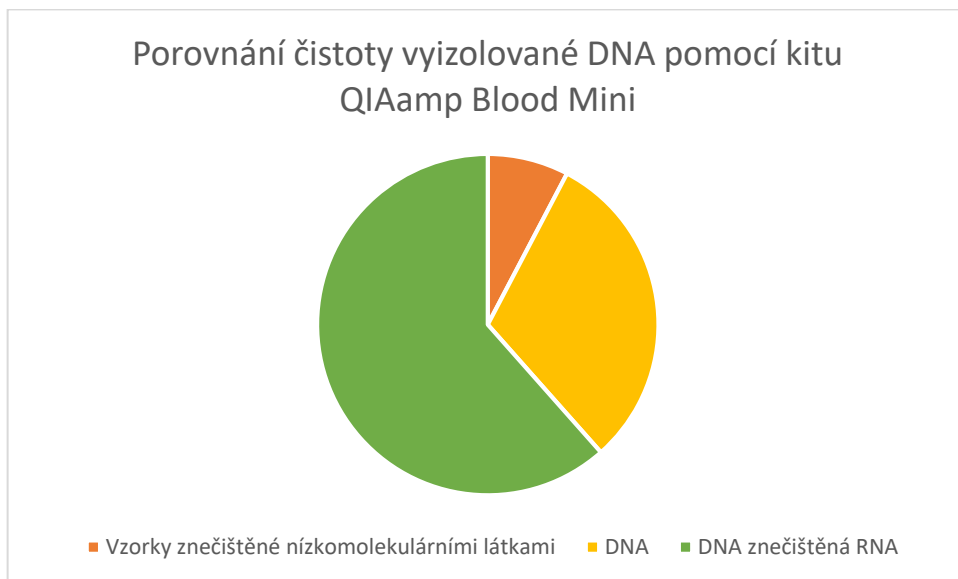


Graf č. 1 Porovnání čistoty vyizolované DNA pomocí automatického izolátoru.

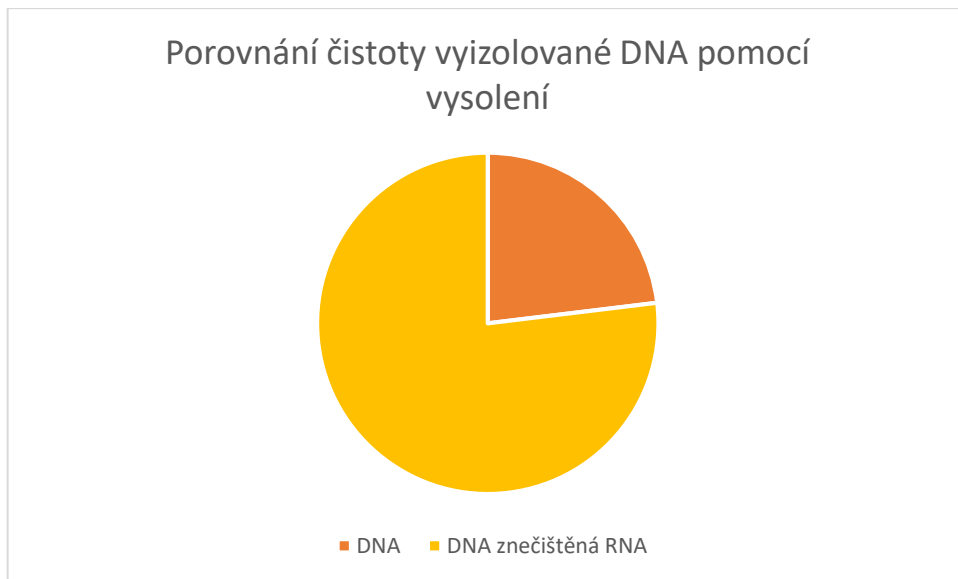
(Zdroj vlastní)



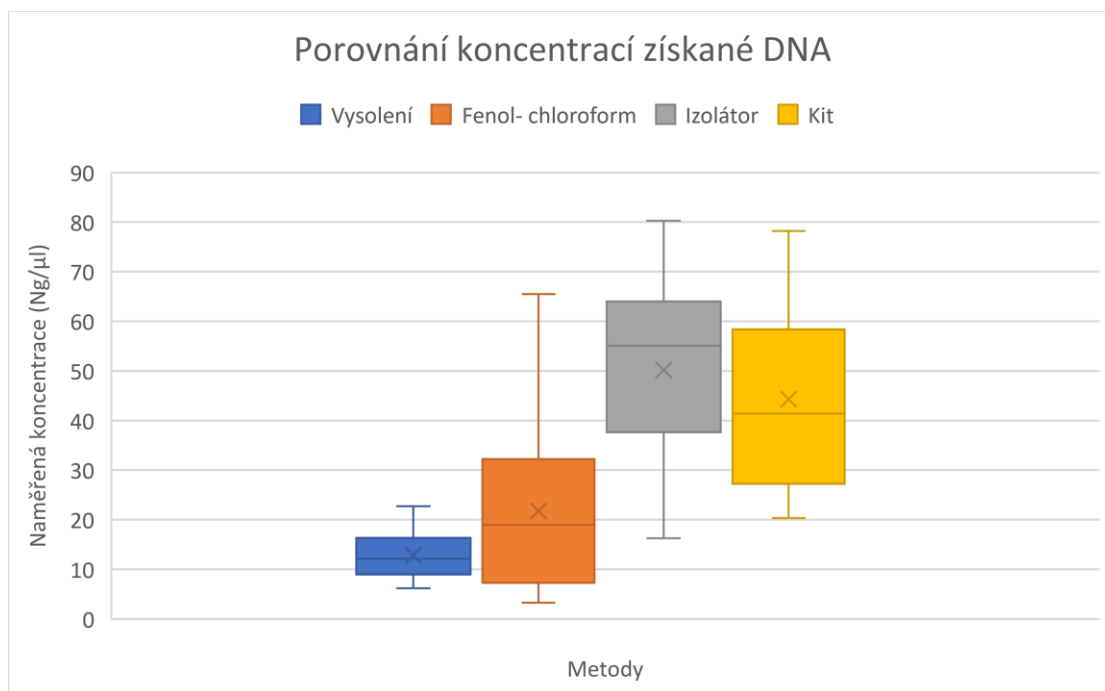
Graf č. 2 Porovnání čistoty vyizolované DNA Fenol-chloroformovou metodou.  
(Zdroj vlastní)



Graf č. 3 Porovnání čistoty vyizolované DNA pomocí kitu QIAamp Blood Mini.  
(Zdroj vlastní)



Graf č.4 Porovnání čistoty vyizolované DNA pomocí vysolení.  
(Zdroj vlastní)



Graf č. 5 Porovnání koncentrací získané DNA  
(Zdroj vlastní)

## 6. Diskuze

Pokud do hodnocení zahrneme zároveň i výsledky proměřené čistoty a čas potřebný k izolaci, je na první pohled jednoznačné, že nejkvalitněji izoloval automatický izolátor. Tato metoda je ovšem z námi zvolených metod nejdražší, a to jak cenou pořizovací, tak cenou jednorázových kazet, které jsou k izolaci potřeba. Ovšem průměrná koncentrace DNA v souboru vzorků byla 50,15ng/ul v rozpětí 20,4-78,2ng/ul, průměrná čistota 1,92 v rozpětí 1,4-2,7. Velkým konkurentem se stává izolace pomocí QIAamp Blood Mini kitu, která je více než o polovinu levnější a je pouze o 20 minut delší. Námi provedená izolace nebyla zdaleka tak kvalitní, jako pomocí izolátoru, DNA byla v osmi případech znečištěná vyizolovanou RNA, průměrná koncentrace ze souboru vzorků byla 44,04ng/ul v rozpětí 20,4- 78,2ng/ul, průměrná čistota byla 1,93 v rozpětí 1,4-2,7. V podobné studii v Hradci Králové vykázali výsledky o průměrné koncentraci 78,8ng/ul v rozpětí 47,0-146,3ng/ul (Beránek, 2012). Fenol-chloroformová metoda byla provedená i přes to, že její toxicita vylučuje rutinní provozování. Průměrná koncentrace vyizolované DNA činila 21,76ng/ul v rozpětí 3,3-65,5ng/ul. Průměrná čistota vyizolované DNA pomocí fenol-chloroformové metody byla 2,06 v rozpětí 1,3- 2,9. V hradecké studii vyizolovali DNA o průměrné koncentraci 104,0ng/ul v rozpětí 58,1- 302,3ng/ul a průměrné čistotě 1,8 v rozpětí 1,7-1,9 (Beránek, 2012). Rozdílné výsledky můžeme přisoudit rozdílným vstupním objemům krve k izolaci, či k rozdílnému rozředění eluentu. Námi vytvořená modifikace vysolovací metody se neosvědčila, protože průměrná hodnota koncentrace vyizolované DNA byla pouhých 12,8ng/ul v rozpětí 6,2-22,7ng/ul a průměrné čistotě 3,8 v rozpětí 1,7-13,9. Chybným krokem bylo použití zamražených krevních vzorků, které ovšem byly pro všechny metody stejné. Po konzultaci s laborantkou z laboratoře CGB v Ostravě jsem dospěla k závěru, že by se vysolovací metoda mnohem lépe osvědčila s krví získanou ihned po odběru a inkubací vzorků popsanou v pracovním postupu v odstavci 2.2.2 v bodě 4 alespoň 12 hodin. Dále je podstatné zmínit, že vysolovací metoda a izolace pomocí fenol- chloroformu nabízí možnost úpravy čistoty DNA, a to zopakováním kroků izolace (Vysolovací metoda od bodu 4 v pracovním postupu uvedeném v odstavci 2.2.2 a u fenol- chloroformové metody od bodu 2 v pracovním postupu uvedeném v odstavci 2.2.8), nebo dodatečnou ethanolovou precipitací DNA. Množství RNA, které nám znečistilo vyizolovanou DNA by se dalo omezit enzymatickým odstraněním pomocí RNázy. Opakování kroků nebylo provedeno z důvodu navýšení nákladů, a především času potřebnému k samotné izolaci. Ze stejného

důvodu nebyla provedená dodatečná precipitace ani pročištění RNázou. Podstatné je také sdělit, že pro laboranta je vysoká koncentrace DNA ve vzorku důležitá. I přes to, že většina laboratorní techniky umí pracovat již s koncentracemi kolem 15ng/ul, lze vzorky s vysokou koncentrací DNA dále ředit a tím eliminovat množství kontaminantů inhibující např. PCR.



## 7. ZÁVĚR

Cílem práce bylo v teoretické části definovat DNA, možnosti a postupy jejího získávání, uchovávání a nakládání s ní. Dále byly v práci popsány metody izolace DNA z periferní krve. Dalším cílem práce bylo stanovení koncentrace, čistoty a vhodnosti vyizolované DNA pro základní DNA analýzy a zároveň zhodnotit časovou a cenovou náročnost metodik. Izolace pomocí automatického izolátoru MagCore® HF16 Plus trvala celkem 60 minut, cena jednoho vyizolovaného vzorku činila 196Kč, průměrná koncentrace byla 50,15ng/ul a průměrná čistota při absorbanci A 260/280 1,92. Izolace pomocí QIAamp Blood Mini kitu trvala 80 minut, cena jednoho vyizolovaného vzorku činila 78Kč, průměrná koncentrace byla 44,04ng/ul a průměrná čistota při absorbanci A 260/280 1,93. Izolace pomocí námi modifikované vysolovací metodou trvala 595 minut, cena jednoho vyizolovaného vzorku činila 63 Kč, průměrná koncentrace byla 12,8ng/ul a průměrná čistota při absorbanci A 260/280 3,8. Izolace fenol- chloroformovou metodou trvala 285 minut, izolace jednoho vzorku stála 102 Kč, průměrná koncentrace byla 21,76ng/ul a průměrná čistota při absorbanci A 260/280 2,06. Nejvhodnější metodou je tedy izolace automatickým izolátorem, která bohužel není dostupná pro každou laboratoř z důvodu pořizovací ceny izolátoru.

## 8. ZDROJE

1. ANCHORDOQUY, T.J., MOLINA, M.C., 2007: Preservation of DNA [online]. Cell Preservation Technology [cit.8.4.2019]. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cpt.2007.0511>
2. BERÁNEK, M., HEGEROVÁ, J., DRASTÍKOVÁ, M., 2012. "Alternativní" biologický materiál pro rutinní analýzu nukleových kyselin –Validace preanalytické fáze vyšetření DNA. *Klinická biochemie a metabolismus*. 20(3). 31-37. ISSN 1210-7921.
3. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7.
4. BŘEZINOVÁ, D.et al., 2012. *Specifické metody izolace DNA pro potřeby molekulární diagnostiky a paternitních expertýz* [online]. Ústav Hematologie a krevní transfuze, Praha [cit.8.4.2019]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/izolace-dna-pomoci-magnetizovatelnych-castic-a-jejich-vyuziti-v-diagnostice-nado/>
5. CALDA, P., 2010. *Ultrazvuková diagnostika v porodnictví a gynekologii*. Praha: Aprofema. ISBN 978-80-903706-2-3. S. 496.
6. FORETOVÁ, L., 2002. *Co jsou geny a jak fungují* [online]. Brno: Masarykův onkologický ústav [cit.8.4.2019]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/co-jsou-geny-a-jakfunguji/t2354#responsible-form>
7. GARCÍA-SANCHO, M., 2012. *Biology, computing, and the history of molecular sequencing: from proteins to DNA, 1945-2000*. New York: Palgrave Macmillan. ISBN 978-0-230-25032-1.
8. GUBENŠEKOVÁ M. et al., 2008. *Izolace DNA pro molekulární analýzu* [online]. Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK LF MU a FN Brno [cit.8.4.2019]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-patologie/2008-1/izolace-dna-pro-molekularni-analyzu -30217>
9. HENDERSON, M., 2014. *Genetika: 50 myšlenek, které musíte znát*. Praha: Slovart. ISBN 978-80-7391-824-8.
10. HOLASOVÁ, Š., RADILOVÁ, H., BUNČEK, M., 2006. *Praktická cvičení z molekulární genetiky*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1072-8
11. HUGHES, J., 2004. *Velká obrazová všeobecná encyklopedie*. Praha: Svojtka & Co. ISBN 80-7237-256-4

12. JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V., 2003. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 6. rozšířené vydání. Olomouc: Nakladatelství Olomouc. ISBN 80-7182- 159-4.
13. KOČÁREK, E., 2004. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika: molekulární biologie: biotechnologie: genomika*. Praha: Scientia. ISBN 80-7183-326-6.
14. KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-80-7013- 450-4.
15. KOHOUTOVÁ, M., 2013. *Lékařská biologie a genetika (II. Díl)*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1873-9
16. KOLEKTIV PRACOVNÍKŮ KLINICKÝCH LABORATOŘÍ OKB A OHKT, 2019. *Manuál pro odběry primárních vzorků* [online]. Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha [cit.8.4.2019]. Dostupné z: <http://lavys.uvn.cz/index.php/laboratorni-priruccka/c-manual-pro-odbery-primarnichvzorku/c-8-odber-vzorku/c-8-1-odber-zilni-krve>
17. KÜHN, R., WURST, W., WEFERS, B., 2016. *Talens: methods and protocols*. New York: Humana Press. ISBN 978-1-4939-2931-3.
18. M.G.P. spol. s.r.o. (Ltd), 2019. *Návod na obsluhu Spektrofotometru NANODROP ND-2000/2000c* [online] Zlín [cit.12.4.2019] Dostupné z <http://www.mgp.cz/files/nd8000-manual.pdf>
19. OSWALD, N., 2007. *The Basics: How Ethanol Precipitation of DNA and RNA Works* [online]. Bitesize Bio [cit.10.4.2019]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/253/the-basics-how-ethanol-precipitation-of-dna-and-rna-works/>
20. PENKA, M., SLAVÍČKOVÁ, E., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.
21. QIAGEN. 6/2012 *Příručka QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit*, [verze 2], Dostupné z <https://www.qiagen.com/cz/>
22. SKŘEHOT, A., SKŘEHOTOVÁ, M., 2018. *Nové standardy pro zajištění bezpečnosti a ochrany zdraví při práci v laboratořích* [online]. Portál BOZP [cit.10.4.2019]. Dostupné z: <http://www.portalbozp.cz/nove-standardy-zajisteni-bezpecnosti-ochrany-zdravi-pripraci-laboratorich/>
23. SNUSTAD, D., SIMMONS, P.M.J., 2016. *Principles of genetics*. 7. vydání. Hoboken: John Wiley & Sons. ISBN 9781119142287.
24. TEPLÁ, M., 2013. *Nukleové kyseliny-Translace* [online].Praha: PřF UK [cit.8.4.2019]. Dostupné z:<http://www.studiumbiochemie.cz/translace.html#4>
25. TURTINEN, L.W., JURAN, B.D., 1998. *Protein Salting-Out Method Applied to Genomic DNA Isolation from Fish Whole Blood* [online]. BioTechniques [cit.8.4.2019].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9494722>

26. VACHTENHEIM, J., DUCHOŇ, J., 1992. *Molekulární biologie pro mediky a lékaře*. Praha: Karolinum. ISBN 80-7066-581-5.

27. VRBA, M., 1994. *Genetika pro zdravotní laboranty*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-184-5.

28. WINSTON, R., 2005. *Člověk: obrazová encyklopedie lidstva*. Praha: Knižní klub. ISBN 80-242-1455-5.

29. ZAGON, J. et al., 2012. *Preservation of primer and probes on "ready-to-use" 96-well microtiter plates: A step forward towards enhancing throughput and harmonization of real-time PCR applications in food and feed control* [online]. *Food Control* [cit.8.4.2019]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511005470>

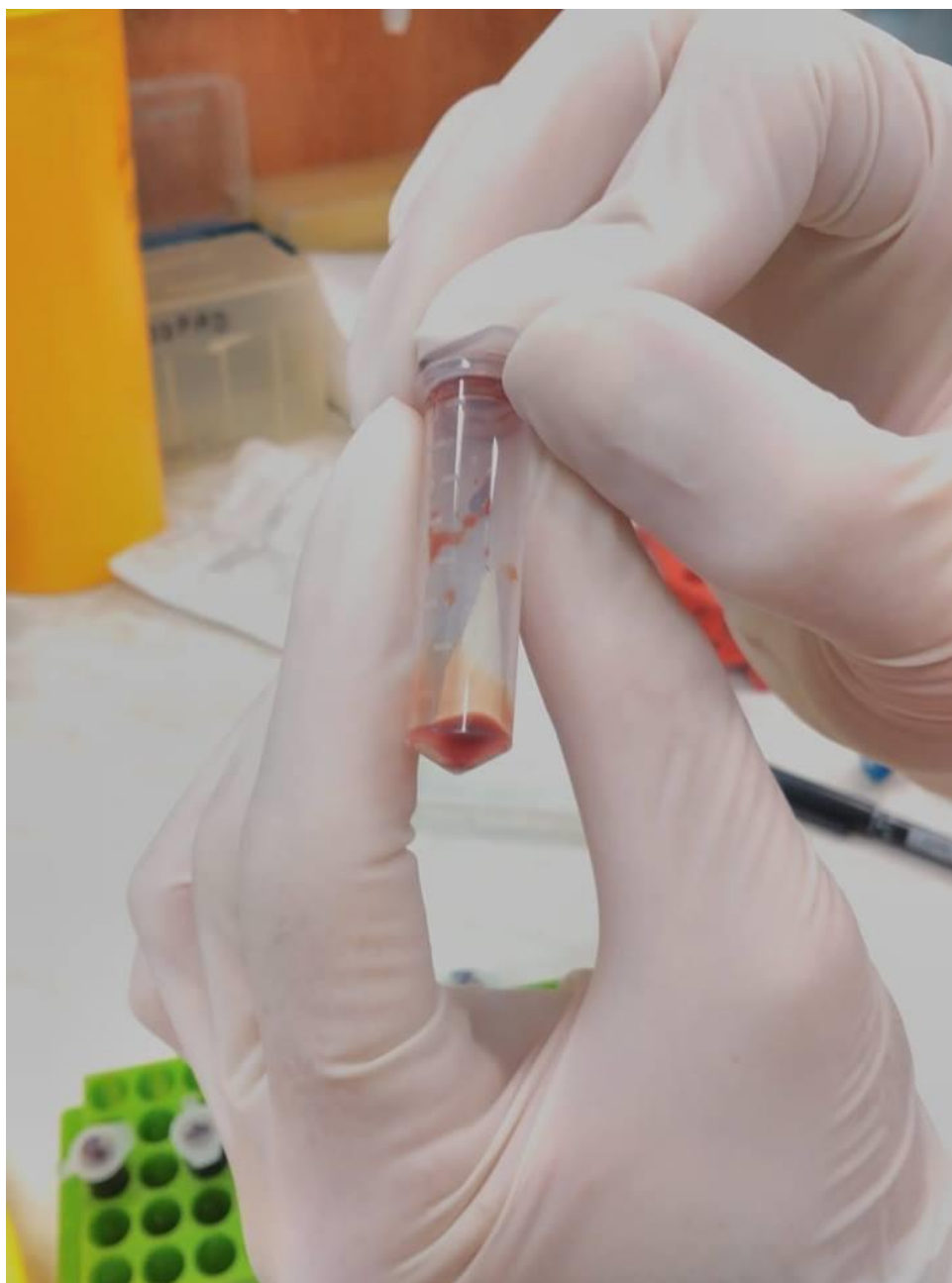
30. ZÁVODSKÁ, R., 2006. *Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie*. Praha: Scientia. ISBN 80-86960-15-3.

## 9. Seznam příloh a obrázků

Graf č. 1 Porovnání čistoty vyizolované DNA pomocí automatického izolátoru.....	28
Graf č. 2 Porovnání čistoty vyizolované DNA Fenol-chloroformovou metodou.....	29
Graf č. 3 Porovnání čistoty vyizolované DNA pomocí kitu QIAamp Blood Mini.....	29
Graf č.4 Porovnání čistoty vyizolované DNA pomocí vysolení.....	30
Graf č. 5 Porovnání koncentrací získané DNA.....	30
Obrázek č.1 Promíchaná periferní krev s lyzačním roztokem na erythrocyty.....	18
Obrázek č. 2 Odsávání obsahu zkumavky, aby zůstal světlý pelet leukocytů.....	18
Obrázek č. 3 Namotávání vysrážené DNA pomocí skleněného háčku.....	19
Obrázek č. 4 Mikrozkušavka s TE pufrem, do které je uvolňována DNA z háčku.....	19
Obrázek č. 5 Zkušavky inkubované v suchém bloku vyhřátém na teplotu 56°C.....	20
Obrázek č 6 Pečlivě vyvážená centrifuga.....	20
Obrázek č. 7 Kolonka QIAamp Mini Spin v čisté eluční zkumavce.....	21
Obrázek č. 8 Stojánek s připravenými zavřenými a již předepsanými zkumavkami....	23
Obrázek č. 9 Překlápění vzorku krve v ruce s přidaným množstvím proteinázy a laurylsíranu sodného.....	23
Obrázek č. 10 Oddělené proteiny od vodné fáze během fenol-chloroformové izolace..	23
Tabulka č.1 Naměřené koncentrace získané DNA vysolením (ng/ul).....	26

Tabulka č. 2 Naměřená čistota získané DNA vysolením poměrem absorbančí 260/280.	26
Tabulka č.3 Naměřené koncentrace získané DNA pomocí kitu (ng/ul).....	26
Tabulka č. 4 Naměřená čistota získané DNA kitem poměrem absorbančí 260/280.....	26
Tabulka č.5 Naměřené koncentrace získané DNA pomocí automat. přístroje (ng/ul)....	27
Tabulka č. 6 Naměřená čistota získané DNA poměrem absorbančí 260/280.....	27
Tabulka č.7 Naměřené koncentrace získané DNA fenol-chloroformem (ng/ul).....	27
Tabulka č. 8 Naměřená čistota získané DNA poměrem absorbančí 260/280.....	27

## 10. PŘÍLOHY



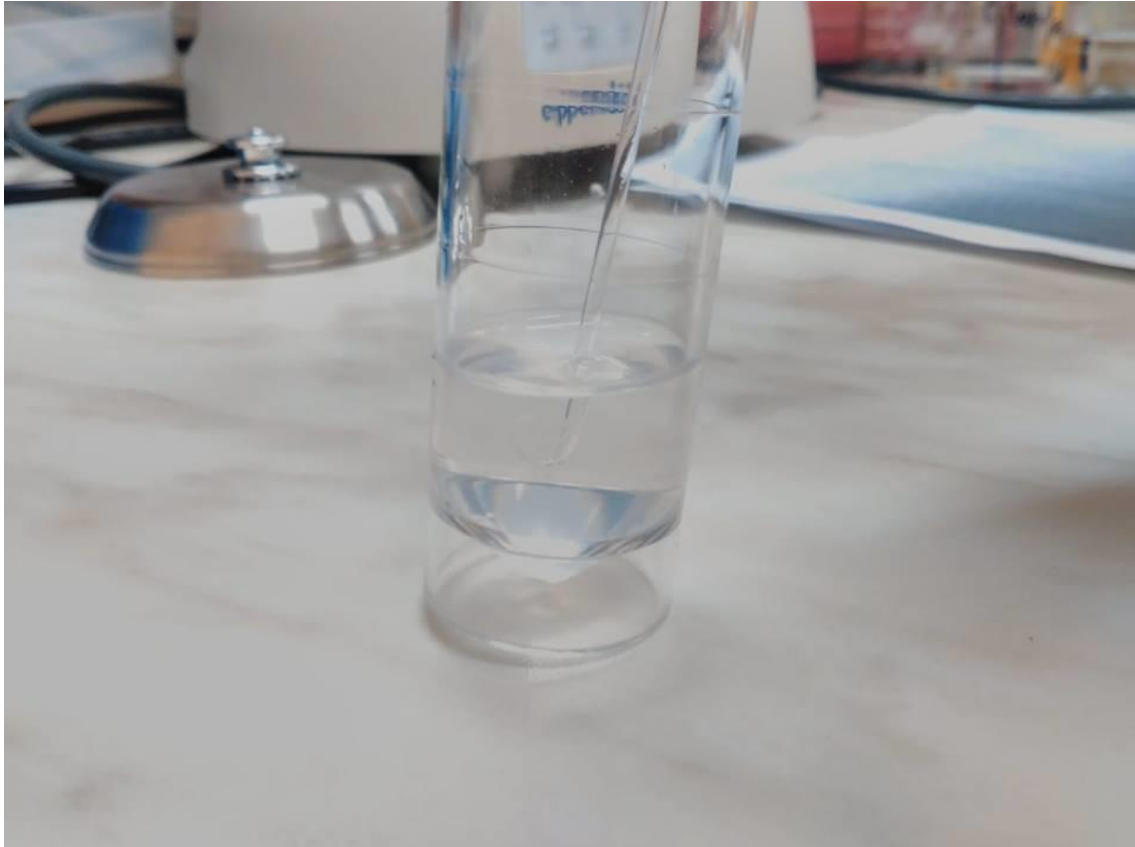
Obrázek č.1 Promíchaná periferní krev s lyzačním roztokem na erytrocyty.

(Zdroj vlastní)



Obrázek č. 2 Odsávání obsahu zkumavky, aby zůstal světlý pelet leukocytů.

(Zdroj vlastní)



Obrázek č. 3 Namotávání vysrážené DNA pomocí skleněného háčku.  
(Zdroj vlastní)



Obrázek č. 4 Mikrozukmavka s TE pufrem, do které je uvolňována DNA z háčku.  
(Zdroj vlastní)





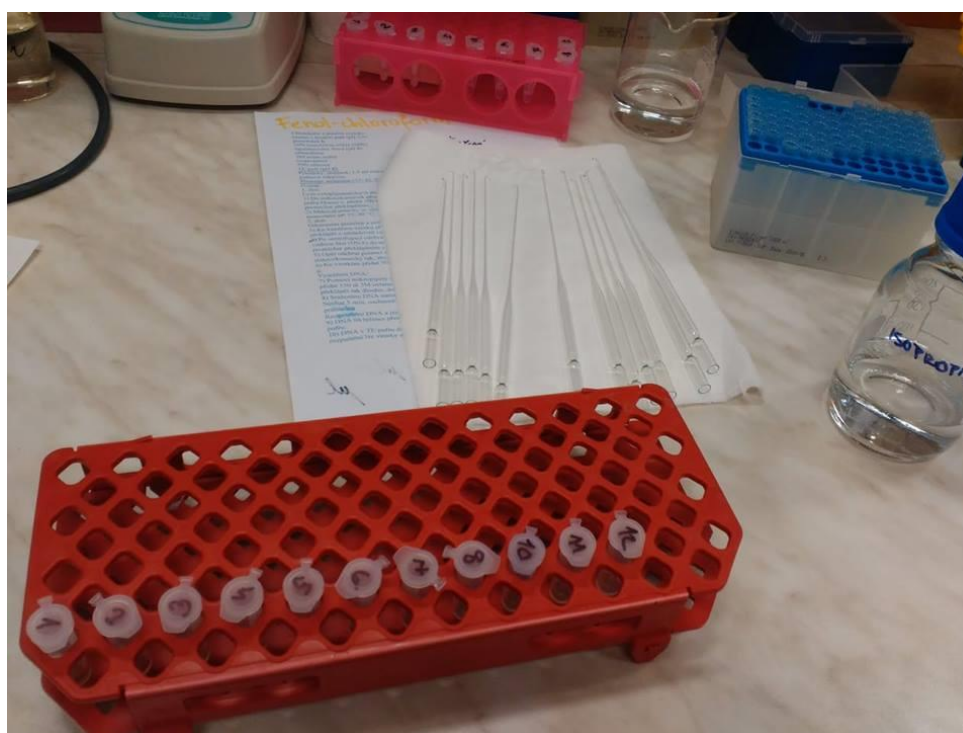
Obrázek č. 5 Zkumavky inkubované v suchém bloku vyhřátém na teplotu 56°C.  
(Zdroj vlastní)



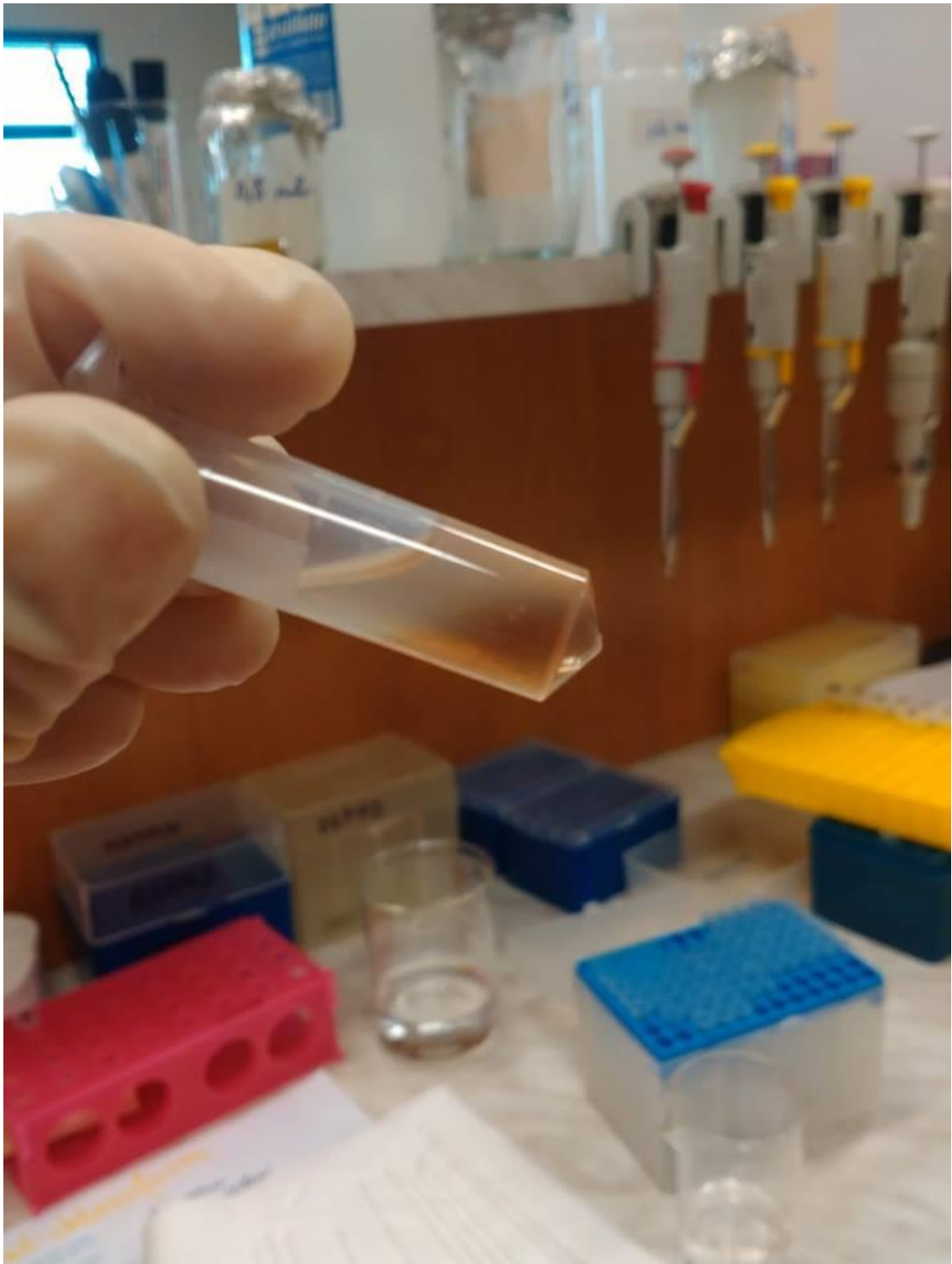
Obrázek č 6. Pečlivě vyvážená centrifuga. (Zdroj vlastní)



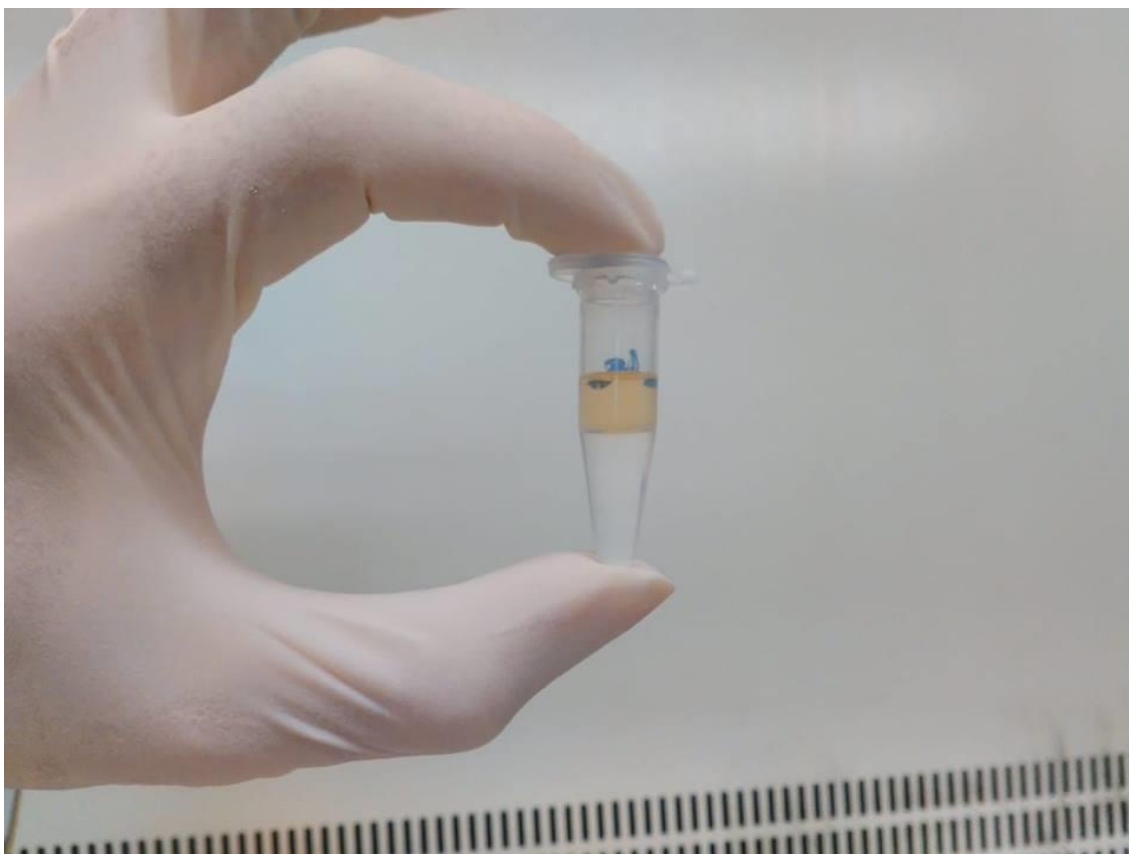
Obrázek č. 7 Kolonka QIAamp Mini Spin v čisté eluční zkumavce. (Zdroj vlastní)



Obrázek č. 8 Stojánek s připravenými zavřenými a již předepsanými zkumavkami.  
(Zdroj vlastní)



Obrázek č. 9 Překlápění vzorku krve v ruce s přidaným množstvím proteinázy a laurylsíranu sodného. (Zdroj vlastní)



Obrázek č. 10 Oddělené proteiny od vodné fáze během fenol-chloroformové izolace.  
(Zdroj vlastní)

## 11. Seznam zkratek

DNA- Deoxyribonukleová kyselina

mRNA- Messenger též mediátorová nebo informační ribonukleová kyselina

PCR- Polymerázová řetězová reakce

RNA- Ribonukleová kyselina

rRNA- Ribozomální ribonukleová kyselina