

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Daria Yudzina

Jak získat kvalitní RNA pro studium relativní genové exprese?

How to get a high-quality RNA for Relative Gene Expression?

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. **Michaela Moserová, Ph.D.**

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Abstrakt

Ribonukleové kyseliny (RNA) jsou molekuly s různými funkcemi, které hrají životně důležitou roli v činnosti a fyziologii buněk, jako je přenos genetické informace z DNA do proteinu, regulace genové exprese, anebo katalýza různých důležitých biochemických reakcí. Izolace RNA je primárním krokem řady preparativních a analytických metod, které jsou důležité v diagnostice mnoha dědičných poruch a nádorů, virových a bakteriálních chorob. RNA lze izolovat z jakéhokoli biologického materiálu, jako jsou živé nebo konzervované tkáně, buňky nebo virové částice. V současné době existuje mnoho specializovaných metod, které lze použít k extrakci čistých molekul RNA.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo nalezení optimálních metodických postupů, které by poskytly vhodné množství kvalitní RNA pro následující analýzu relativní genové exprese. Byly porovnány metody izolace celkové RNA za použití konzervativního postupu fenol-chloroformové extrakce, tak i různých komerčních sad. Dále byla porovnána čistota a koncentrace izolované RNA. A nakonec byly porovnány různé podmínky studia integrity pomocí horizontální agarosové elektroforézy za použití komerčních barviv. Taktéž studie zahrnovala srovnání kvality izolované RNA v závislosti na způsobu homogenizace tkáně. Homogenizace za použití mikrotloučku vykazovala nejvyšší hodnoty koncentrace izolované RNA. Bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžky vykazuje sada Direct-Zol RNA Miniprep plus (Zymo Research). Metoda přečištění RNA pomocí silikátových kolonek za použití NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel) nebyla účinná a způsobila další znečištění RNA nízkomolekulárními látkami. Pro přípravu agarosového gelu s následujícím barvením vzorků poskytl kontrastnější obrázek a nejlepší ostrost proužků 28S a 18S rRNA komerční dostupné tablety MIDORI, které obsahují barvivo MIDORI Green.

Klíčová slova: RNA, izolace RNA, horizontální agarosová elektroforéza

Abstract

Ribonucleic acids (RNA) are the molecules with various functions that plays a vital role in the activity and physiology of cells, such as the transfer of genetic information from DNA to proteins, regulation of gene expression and the catalysis of various important biochemical reactions. Purification of RNA is the primary step of a number of preparative and analytical methods, important in diagnostics of many inherited disorders and tumours, viral and bacterial diseases. RNA can be isolated from any biological material such as living or conserved tissues, cells or virus particles. Currently, there are many specialized methods that can be used to extract pure RNA molecules.

The main goal of this bachelor thesis was to find optimal methodological procedures that would provide a suitable amount of high quality RNA for the subsequent analysis of relative gene expression. In the present work we studied methods for isolation of total RNA using conservative phenol-chloroform extraction procedure as well as various commercial kits. Furthermore, purity and concentration of isolated RNA were control spectrophotometrically. Finally, different conditions for studying the integrity of isolated RNA by horizontal agarose electrophoresis using commercially gel dyes were compared. The thesis also included a comparison of the quality of the isolated RNA depending on the method of tissue homogenization. Homogenization using a microbead showed the highest values of isolated RNA concentration. The highest quality results were observed using the commercial kit Direct-Zol RNA Miniprep plus Kit (Zymo Research). The method of RNA purification with silica columns using NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel) was not effective and caused contamination of RNA with low molecular weight substances. The commercially available MIDORI tablets, which contain MIDORI Green dye, provided a more contrasting image and the best sharpness of the 28S and 18S rRNA bands.

[IN CZECH]

Keywords: RNA, isolation of RNA, horizontal agarose electrophoresis

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	7
1. Úvod.....	9
1.1 Nukleové kyseliny.....	9
1.2 Nukleosidy a nukleotidy.....	9
1.2.1 Vlastnosti nukleotidu a nukleosidu.....	10
1.3 Ribonukleová kyselina.....	12
1.3.1 Struktura a vlastnosti RNA.....	13
1.3.2 Stabilita RNA.....	18
1.3.3 Podmínky izolování RNA.....	19
1.4 Genová exprese.....	20
1.5 Způsoby měření genové exprese.....	20
1.5.1 „Northern blotting“.....	21
1.5.2 Polymerázová řetězová reakce.....	21
1.5.3 RNA mikročip.....	22
1.5.4 Sekvenování RNA.....	23
1.6 Studium a analýza genové exprese.....	23
1.7 Relativní genová exprese.....	23
2. Cíl práce.....	24
3. Materiál a metody.....	24
3.1 Použité chemikálie.....	24
3.2 Použité přístroje.....	25
3.3 Metody.....	25
3.3.1 Izolace RNA z živočišného materiálu.....	25
3.3.1.1 Homogenizace v třecí misce za chlazení tekutým dusíkem.....	26
3.3.1.2 Homogenizace za použití mikrotloučku.....	26
3.3.1.3 Homogenizace za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema.....	27
3.3.1.4 Izolace RNA za použití fenol-chloroformové metody.....	27
3.3.1.5 Izolace RNA za použití Total RNA Mini Kit.....	28
3.3.1.6 Izolace RNA za použití Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit.....	29
3.3.2 Stanovení čistoty a koncentrace RNA.....	30
3.3.3 Stanovení integrity RNA.....	32
3.3.3.1 Horizontální agarosová elektroforéza za použití barviva SYBR Green II.....	33
3.3.3.2 Horizontální agarosová elektroforéza za použití barviva GoodView.....	34
3.3.3.3 Horizontální agarosová elektroforéza za použití tablety MIDORI.....	35
3.3.4 Přechlazení izolované RNA.....	36

4. Výsledky.....	37
4.1 Izolace RNA.....	37
4.2 Přečištění RNA.....	39
4.3 Horizontální agarosová elektroforéza.....	40
5. Diskuze.....	45
6. Závěr.....	52
Seznam použité literatury.....	53

Seznam použitých zkratek

araC	arabinocytidin
ATP, ADP	adenosintrifosfát, adenosindifosfát
A _x	absorbance při vlnové délce x nm
bp	bázové páry (z ang. base pair)
c	molární koncentrace
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina, z angl. complementary deoxyribonucleic acid
dA	deoxyadenosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	dioxynukleotidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
kbp	tisíc párů bází
Mbp	milión párů bází
miRNA	microRNA
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
ncRNA	nekódující RNA (z angl. non-coding RNA)
PCR	polymerásová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce, z angl. quantitative polymerase chain reaction
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
RT-qPCR	kvantitativní polymerásová řetězová reakce s reverzní transkripcí (z angl. quantitative reverse transcription PCR)
siRNA	malé interferující RNA (z angl. small interfering RNA)
snoRNA	malé jadéřkové RNA (z angl. small nucleolar RNA)
snRNA	malé jaderné RNA (z angl. small nuclear RNA)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

tRNA	transferová RNA
UV	ultrafialové záření
v/v	objem/objem
WC párování bázi	Watson-Crickovo párování bázi
w/v	hmotnost/objem

1. Úvod

Až donedávna byla ribonukleová kyselina (RNA) ve srovnání s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) přehlížena. Nyní je známo, že RNA hraje mnohem více funkčních rolí a je zodpovědná za mnoho základních biologických procesů. V posledních 30 letech byla RNA předmětem aktivního výzkumu – v roce 1989 získali profesor Thomas R. Cech a Sidney Altman Nobelovu cenu za objev katalytické funkce RNA [1], v roce 1993 získali Richard J. Roberts a Phillip A. Sharp Nobelovu cenu za objev sestřihu [2], v roce 2006 získali Andrew Z. Fire a Craig C. Mello Nobelovu cenu za objev interference RNA [3] a v roce 2009 získali Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz and Ada E. Yonath Nobelovu cenu za studium struktury a funkce ribosomů [4]. Všechny tyto objevy zatím odhalily, že RNA je skutečně pozoruhodná molekula, jejíž výzkum vedl k mnoha důležitým biologickým objevům při studiu genové exprese. Ale každý aplikovaný výzkum vyžaduje čisté a nedegradované molekuly RNA, jejich izolace a čištění jsou však kritickými kroky kvůli snadné degradovatelnosti RNA. Současné techniky izolace a čištění molekul RNA mají stále několik omezení a požadavků, které byly prozkoumány v této bakalářské práci.

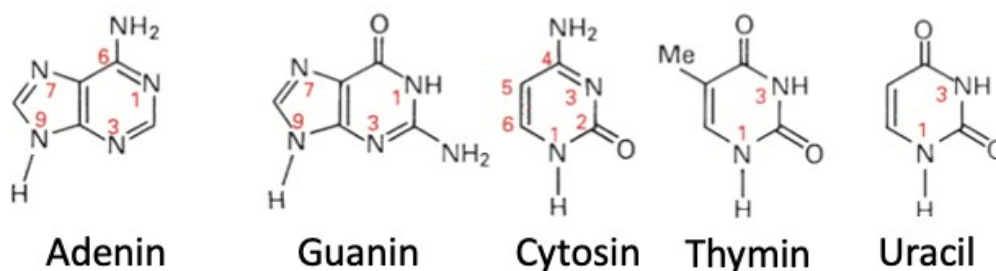
1.1 Nukleové kyseliny

Život organismu je zcela pod kontrolou genetické informace, která ovládá průběh všech životních procesů. Genetická informace je v podstatě souborem dat, který definuje veškeré vlastnosti organismu. Je uchována a přenášena makromolekulami nukleových kyselin. Nukleové kyseliny jsou dlouhé polymery, které se skládají z monomerů zvané nukleotidy. Různé nukleové kyseliny mohou mít přibližně od 80 nukleotidů, jako v tRNA, až po více než 108 párů nukleotidů v jednom eukaryotickém chromozomu [5]. Jednotkou velikosti nukleové kyseliny je pár bází (pro dvouvláknové druhy) nebo báze (pro jednovláknové druhy). Obecně se používá zkratka bp (angl. base pair), stejně jako větší jednotky Mbp (milion párů bází) a kbp (tisíc párů bází).

Podle složení nukleové kyseliny se dělí na DNA (angl. deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina) a RNA (angl. ribonucleic acid – ribonukleová kyselina).

1.2 Nukleosidy a nukleotidy

Nukleotidy se skládají z cukerné složky, dusíkaté heterocyklické báze a fosfátového zbytku. Dusíkaté báze se dělí na purinové (adenin, Ade; guanin, Gua) a pyrimidinové (cytosin, Cyt; thymin, Thy; a uracil, Ura) (viz Obr.1). Pyrimidinové báze mohou se vyskytovat ve dvou tautomerních formách (laktimová a laktamová forma). Cukerná složka, 2-deoxy-D-ribose nebo D-ribose, v cyklické formě je spojena pomocí N-glykosidové vazby na prvním uhlíku pentózy s jednou z bází za vzniku pěti základních nukleosidů: adenosinu (Ado), guanosinu (Guo), cytidinu (Cyd), thymidinu (dThd) a uridinu (Urd). Pokud 5'-hydroxylová skupina cukerné složky je fosforylovaná, z nukleosidu se stane nukleotid. Nukleotid je nejen stavebním kamenem DNA a RNA, ale také hraje důležitou roli v energetických a informačních intracelulárních procesech. Například, deriváty adenosinu, adenosintrifosfát (ATP) a adenosindifosfát (ADP), při rozkladu uvolňují velké množství energie, která se využívá téměř ve všech typech buněčných pochodů, jako vnitrobuněčný transport, tvorba proteinu či syntéza RNA. Kromě základních nukleosidů existuje řada přirozeně se vyskytujících a chemicky syntetizovaných nukleosidů, které mají významnou protinádorovou aktivitu, např. arabinocytidin (araC) a deoxyadenosin (dA), které se používají pro systémovou léčbu akutní lymfoblastické leukemie [6][7].



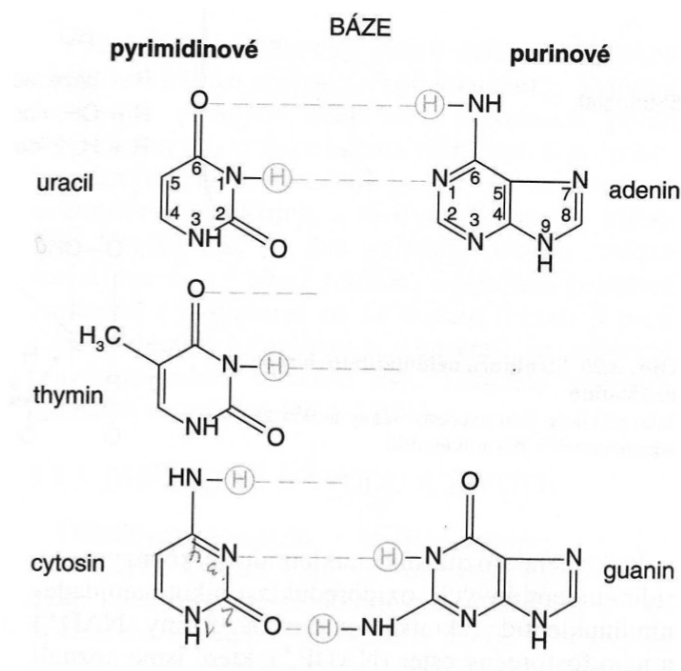
Obr.1 Struktury pěti hlavních purinových (adenin, guanin) a pyrimidinových bází (cytosin, thymin, uracil) nukleových kyselin v jejich dominantních tautomerních formách. Vytvořeno v ChemSketch.

1.2.1 Vlastnosti nukleotidu a nukleosidu

Chemická struktura bází umožňuje stabilizaci dvou vláken pomocí vodíkových můstků mezi komplementárními páry bází: adenin se váže s thyminem (v DNA) nebo

uracilem (v RNA) dvěma vodíkovými vazbami, mezi guaninem a cytosinem se vytvářejí tři vazby. První vazba se vytváří mezi NH_2 skupinou adeninu, který je navázán na šestý uhlík a ketoskupinou thyminu (uracilu), který je navázán na šestý uhlík. Druhá vazba je mezi NH^1 skupinou thyminu (uracilu) a N^1 adeninu. Mezi guaninem a cytosinem se vazby vytvářejí stejným způsobem (viz Obr.2). Tohle párování bází poprvé popsali Watson a Crick a nazývá se také kanonické.

Elektronegativní atomy O a N s volnými páry, které se nacházejí v dusíkatých bázích, jsou potenciálními akceptory vodíkové vazby. Atomy vodíku připojené k velmi elektronegativním atomům jako O a N mají silný částečný kladný náboj a jsou potenciálními donory vodíkových vazeb [8].



Obr.2 Schematické znázornění párování komplementárních párů bází. Z levé strany jsou pyrimidinové báze (uracil, thymin, cytosin), z pravé strany jsou purinové báze (adenin, guanin). Čárkovanými šedými čarami jsou označeny vodíkové vazby mezi jednotlivými dvojicemi bází DNA (RNA). Převzato z [9].

Ve srovnání s kovalentními vazbami s dobře definovanou délkou, silou a orientací jsou vodíkové vazby 20 až 30-krát slabší Error: Reference source not found, a proto jsou náchylnější k ohýbání a protahování, což vede k její strukturní variabilitě.

1.3 Ribonukleová kyselina

Ribonukleová kyselina (RNA) je molekula s různými funkcemi, která hraje životně důležitou roli v činnosti a fyziologii buněk. Kromě přenosu genetické informace z DNA do proteinu, může RNA katalyzovat různé důležité biochemické reakce, jako translace RNA nebo syntéza tRNA. Některé RNA, známe jako „riboswitches“, mohou regulovat exprese genů prostřednictvím změn jejich konformaci v reakci na změnu v buněčném prostředí Error: Reference source not found.

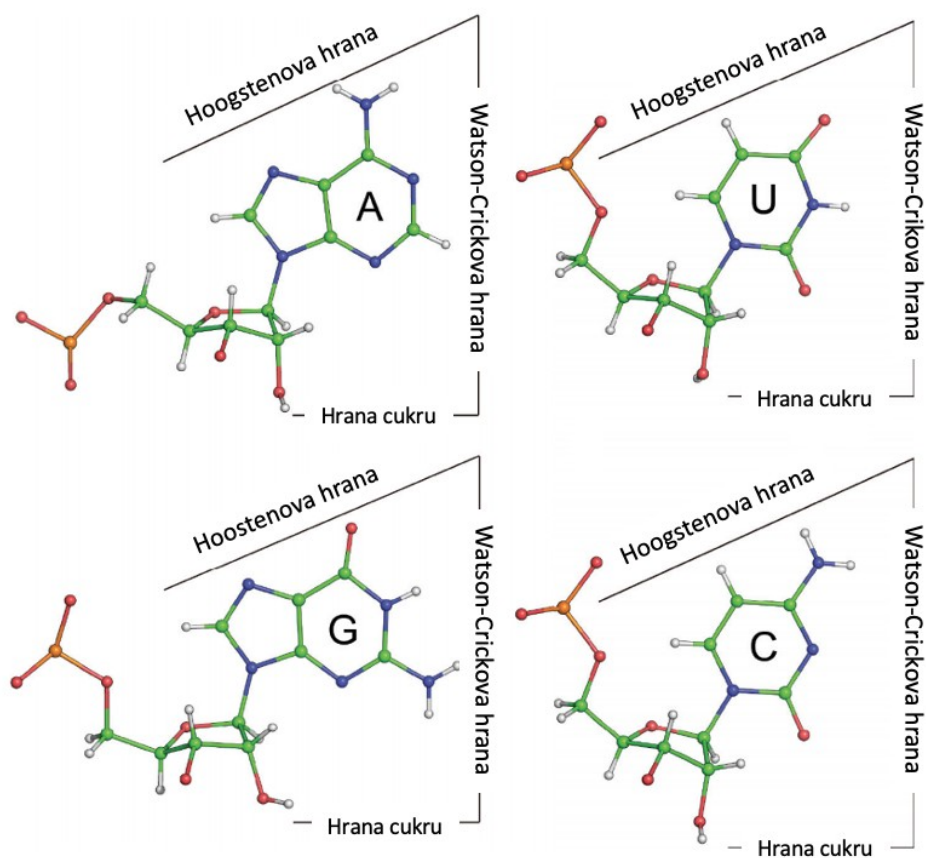
V buňkách organismu existují různé typy RNA, které se liší svou strukturou a funkcí. Dříve se RNA dělily na ribosomální RNA (rRNA), transferovou RNA (tRNA) a mediátorovou RNA (mRNA, z angl. messenger – posel). Aktuálnější rozdělení RNA je na kódující (mRNA), která zajišťuje přenos genetické informace z DNA na bílkoviny, a nekódující RNA (ncRNA z angl. non-coding). Nekódující RNA zahrnuje rRNA a tRNA, ale i řadu menších ncRNA, jako miRNA (z angl. microRNA), snRNA (malé jaderné RNA, z angl. small nuclear RNA), snoRNA (malé jadéřkové RNA, z angl. small nucleolar RNA) a siRNA (malé interferující RNA, z angl. small interfering RNA). Nicméně analýza genové exprese je založena výhradně na mRNA [10].

1.3.1 Struktura a vlastnosti RNA

Molekula RNA se skládá z polynukleotidového vlákna, které má 4 typů nukleotidů. Kostru nukleotidů tvoří sacharid ribosa střídající se s fosfátovou skupinou. Na tuto kostru jsou navázány dusíkaté báze (adenin, cytosin, guanin a uracil). Tyto báze jsou planární a se komplementárně párují skoro vždy stejným způsobem podle Watsona a Cricka (kanonické párování bází).

Existují však i nekanonické možnosti párování bází, které jsou nedílnou částí struktury RNA a umožňují sbalení RNA do sekundární struktury [12]. Nazývají se podle svého objevitele Hoogsteenovým párováním a vzniká buď mezi nekomplementárními bázemi nebo komplementárními, ale v jiných polohách. Například, nejběžnější párování je G-U (angl. G-U wobble pair), které má skoro stejnou termodynamickou stabilitu jako standardní A-U párování Error: Reference source not found [11], ale jsou rozpoznatelné pro proteiny a jiné RNA.

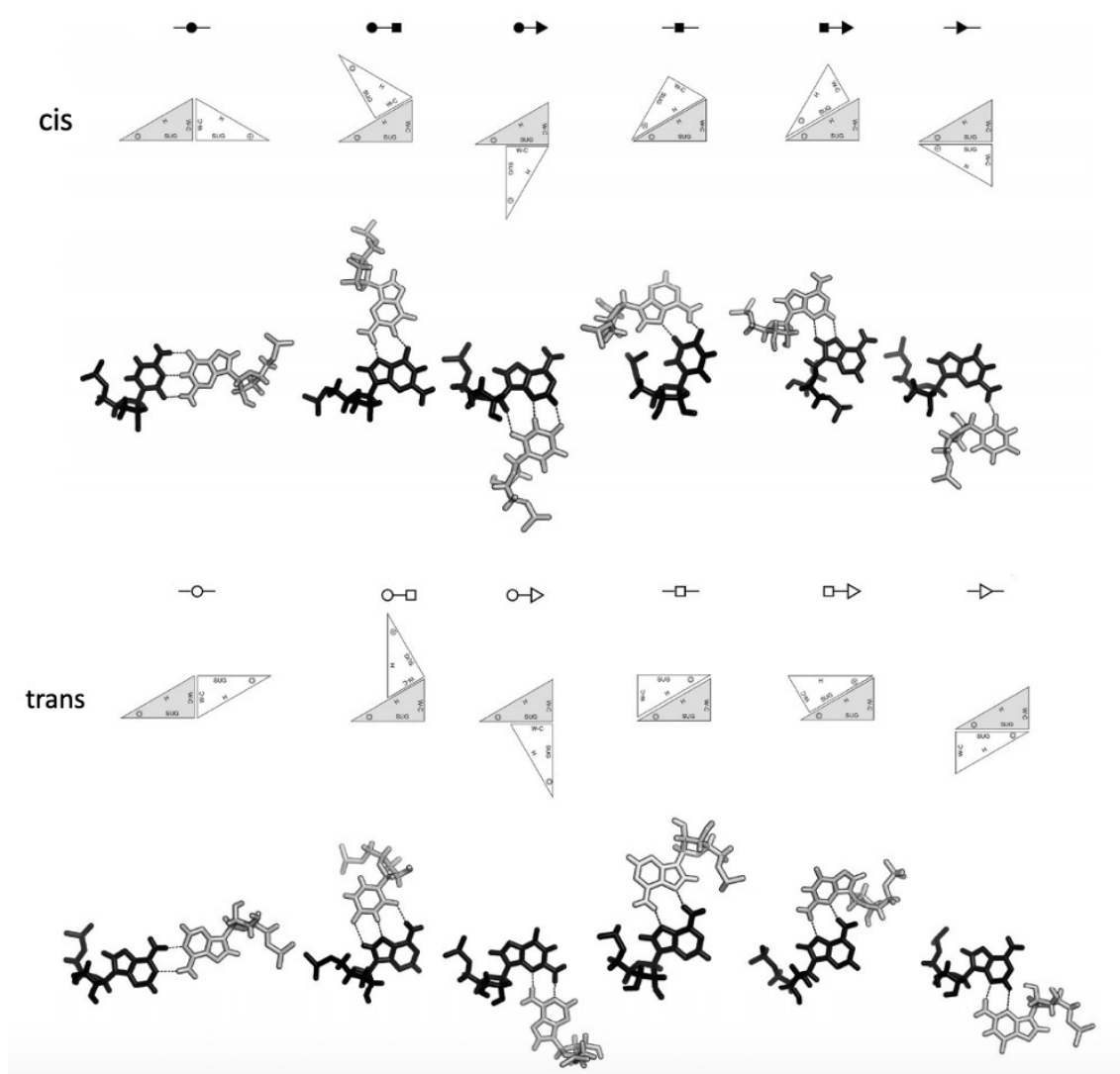
Pro popis vazeb mezi jinými hrany purinových a pyrimidinových bází byla zavedena určitá aproximace. Každou bází lze představit jako pravoúhlý trojúhelník, jehož přepona reprezentuje tzv. Hoogsteenovu hranu (angl. Hoogsten edge), a odvěšny tvoří Watson-Crickovu hranu (angl. Watson-Crick edge) a hranu cukru (angl. sugar edge) (viz Obr.3) [12].



Obr.3 Chemická struktura čtyř bází nukleových kyselin (A – adenin, U – uracil, G – guanin, C – cytosin) znázorňující Hoogsteenovu hranu (angl. Hoogsten edge), Watson-Crickovu hranu (angl. Watson-Crick edge) a hranu cukru (angl. sugar edge). Převzato z [12].

Všechny tři okraje mohou fungovat jako interagující okraje a každý z nich může potenciálně tvořit vodíkovou vazbu s kterýmkoli z těchto tří okrajů jiné báze. S ohledem na orientaci glykosidové vazby může být vazba cis nebo trans. Kombinace interakcí

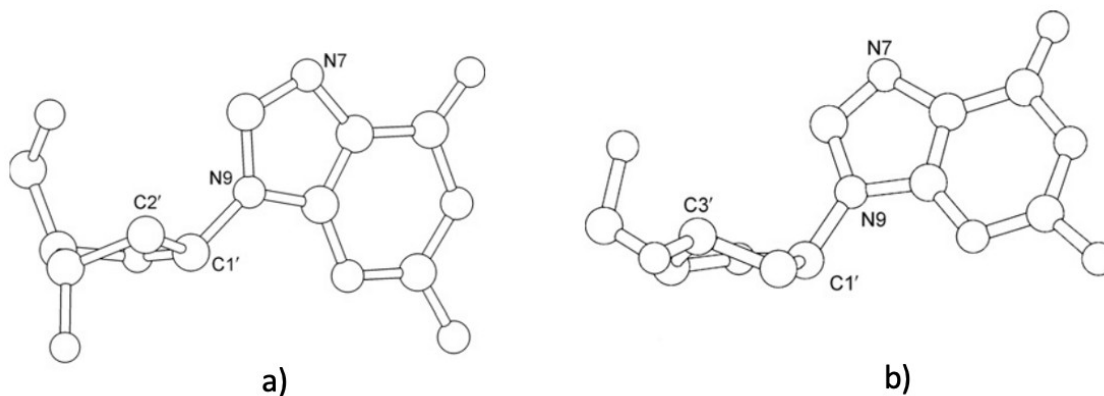
různých okrajů a orientace mezi různými dvěma bázemi tvoří 12 typů párování bází (viz Obr.4).



Obr.4 12 typů možných párování bází v molekule RNA. Nahoře jsou znázorněny cis (černě plněné značky) konformace, dolu jsou znázorněny trans (šedé, neplněné značky) konformace. Kruh znázorňuje Watson-Crickovu hranu, čtverec znázorňuje Hoogsteenovu hranu a trojúhelník znázorňuje hranu cukru. Převzato z [12].

Další věc, která určuje tvar RNA a odlišuje ji od DNA je struktura sacharidu. Molekula ribosy není planární a může zaujmout několik konformací. Nejběžnější pozorované struktury jsou tzv. „3-endo“, která je nejčastěji zastoupena u RNA a „2-endo“, která je nejčastěji zastoupena u DNA. U „3-endo“ konformace C³ atom míří dovnitř k rovině báze (viz Obr.5b, str. 15). Důsledkem toho je menší vzdálenost mezi

fosfáty, než u „2-endo“ konformace – jen 5,9 Angströmů. U „2-endo“ konformace je atom C² posunutý blíže k bázi, což způsobuje větší vzdálenost mezi fosfáty – 7 Angströmů (viz Obr.5a) [13]. Kvůli tomu dvoušroubovice DNA je protáhlejší než dvoušroubovice RNA.



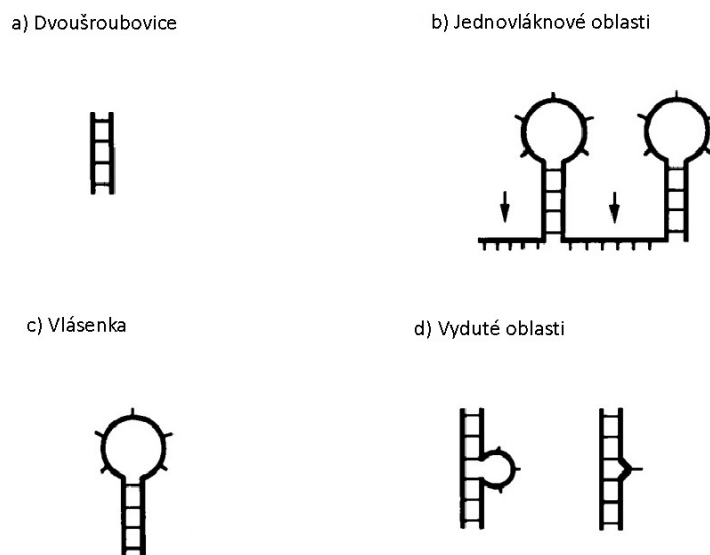
Obr.5 a) “2-endo” konformace ribosy v struktuře guanosinu, b) “3-endo” konformace ribosy v struktuře guanosinu. Převzato z [13].

Přestože RNA a DNA mají skoro stejné chemické složení, hodně se liší celkovou strukturou, což má vliv na jejich funkci. Primární funkcí DNA je uchování genetické informace, což splňuje její dvoušroubovicová struktura. Zatímco RNA je molekula, která je schopna sbalit se do dvojrozměrné nebo trojrozměrné struktury stejným způsobem jako z primární sekvence aminokyselin vzniká protein. Tato schopnost umožňuje RNA i jiné funkce než přepis genetické informace z DNA do proteinu, může mít také strukturní a katalytickou funkci.

Struktura RNA je popsána pomocí pojmů, které se používají při popsání struktury bílkovin: primární, sekundární a terciární struktura.

Primární struktura se skládá z lineární sekvence nukleotidů RNA. Na rozdíl od proteinů, které ve většině případů fungují jen při správném sbalení, lineární sekvence RNA má několik důležitých funkcí. Například, mRNA musí být rozbalena pro přepis genetické informace při translaci [14].

Sekundární struktura RNA je tvořena krátkou pravotočivou dvoušroubovici s antiparalelními vlákny, která je stabilizována patrovými interakcemi a vodíkovými vazbami, a nespárovanými regiony jako jednovláknové oblasti (angl. single stranded region), vlásenka (angl. hairpins), vyduté oblasti (angl. bulges) atd. [15] (viz Obr.6, str. 16).



Obr.6 Zjednodušené zobrazení elementů sekundární struktury molekuly RNA: a) dvoušroubovice, b) jednovláknové oblasti, c) vlášenska, d) vyduté oblasti. Převzato z [11].

Narozdíl od DNA, jejíž dvouřetězcová struktura může nabývat mnoha forem, je dvouřetězcová struktura RNA díky přítomnosti ribosy místo deoxyribosy omezena jen na dvě pravotočivé formy A a A'. A-forma obsahuje 11 bp na jednu otáčku a A'-forma obsahuje 12 bp [16]. Obě A-formy se vyznačují hlubokým velkým žlábkem (angl. major groove) a plochým malým žlábkem (angl. minor groove), proto RNA dvoušroubovice přijímá formu, která má širší a více plochý tvar, na rozdíl od DNA, která nejčastěji zaujímá B-formu. Tento rozdíl je zajištěn přítomností hydroxylové skupiny a pomáhá proteinům a ligandům rozpoznat, jestli to je DNA nebo RNA.

Nejnámějším příkladem sekundární struktury je tRNA, která má charakteristický tvar jetelového listu, jehož tři listy tvoří tři vlášenkové struktury.

Interakce mezi dvěma nebo více prvky sekundární struktury vede k vzniku terciární struktury. To může být interakce mezi nespárovanými regiony a smyčkami, spojování několika dvoušroubovic atd.

1.3.2 Stabilita RNA

Díky tomu, že G-C pár je vázán třemi vodíkovými můstky, zatímco A-T pár dvěma, RNA s vyšším obsahem G-C párů je stabilnější, než RNA s vyšším obsahem A-T. Vodíkové vazby významně nestabilizují RNA, stabilitu RNA především zajišťují

patrové interakce neboli „stohování bází“ (angl. base stacking). Patrové interakce jsou typem nekovalentní vazby, kde báze jsou uspořádány vodorovně nad sebou, což vede k interakci jejich π elektronu.

Kovové ionty jsou nezbytné pro účinné skládání RNA, stabilitu a různé biologické funkce. Konkrétně může být kladný náboj kovových kationtů použit ke kompenzaci záporného náboje RNA fosfátové kostry. Navázání Mg^{2+} na dusíkaté báze či na cukrfosfátovou kostru redukuje odpuzování fosfátových skupin sekundárních elementů, které se spolu dostávají do interakce v terciární struktuře.

Funkce kovových iontů však nejsou omezeny jen na neutralizaci nábojů, stabilita sekundární a terciární struktury RNA je citlivá na koncentrace a typ přítomných iontů.

Pozitivně nabité ionty jako Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} a další [17] mají velký efekt na sekundární strukturu, nicméně pozitivní bivalentní ionty mnohem více ovlivňují strukturu terciární. Například, přítomnost horečnatých iontů a polyaminů stabilizuje terciární strukturu molekuly [18].

Iont Mg^{2+} se také váže na G-U pár ve velkém žlábků helixu. Bez kovového iontu by terciární struktura jako pseudoknot nemohla vzniknout [17].

1.3.3 Podmínky izolování RNA

Pro studium relativní genové exprese existuje řada metod, ale téměř pro každou potřebujeme čistou izolovanou RNA.

Jedním z hlavních problémů ovlivňujících integritu RNA je všudypřítomná přítomnost ribonukleas (RNasy). Tyto enzymy jsou přítomny u prokaryot [19], eukaryot [20][21] a dokonce se objevují u některých virů [22]. Protože se tyto enzymy nacházejí v mikroorganismech, z nichž mnohé jsou rozptýleny ve vzduchu a mohou snadno kontaminovat laboratorní vzorky. Kromě toho se RNasy vylučují z kůže [23] a nacházejí se v různých tekutinách produkovaných lidským tělem, např. slzy, sliny a pot.

Pokud výzkumný vzorek obsahující RNA bude kontaminován RNasami, následná analýza využívající tento vzorek může vést ke špatným výsledkům. Proto musí být při přípravě vzorků vždy dodržována zvláštní laboratorní opatření.

Při práci s RNA je vhodné používat rukavice bez pudru a vyhýbat se kontaktu se zařízením, povrchy a člověkem, aby se nekontaminovali čisté rukavice. Pracovní plochu je nutné očistit a musí být označena a omezena výhradně pro práce s RNA. Skleněné pomůcky je potřeba před použitím ošetřit v sušárně vysokou teplotou, veškeré

pomůcky spolu se zařízením musí být ostříkány 10% peroxidem vodíku. Při práci s RNA vzorky vždy mějte na ledu, pipetovat třeba rychle a pomocí jednorázových špiček.

1.4 Genová exprese

Tradiční pohled na pojem genové exprese sestává z dvoufázového procesu přeměnění informace z DNA na bílkoviny. První fáze, která se děje v buněčném jádru, se nazývá transkripce. Pomocí polymerasy vzniká mRNA, která je komplementární kopii matrice DNA. Tato mRNA je transportovaná do cytoplasmy, kde probíhá druhá fáze, molekuly mRNA jsou přeloženy na molekuly bílkovin, které zajišťují všechny důležité procesy v organismu. Však se ukázalo, že epigenetické procesy jako acetylace histonů a methylace DNA mají schopnost měnit fenotyp organismu, aniž by se změnila samotná genetická informace. To znamená, že se mění míra použití genetické informace nebo mění se genová exprese.

1.5 Způsoby měření genové exprese

Genová exprese může být měřena v různých fázích, jako transkripce, posttranskripční modifikace (přeměna primárního transkriptu na mRNA), translace, posttranslační modifikace, tedy genová exprese může být měřena jak na úrovni RNA, tak na úrovni bílkovin [24].

Nejdůležitější je úroveň transkripce, protože ta rozhoduje o tom, jestli vůbec bude daný gen přepsán do mRNA a tudíž může postoupit do dalších úrovní.

Analýza genové exprese na úrovni transkripce zahrnuje měření množství nebo počtu kopií transkriptu specifických sekvencí RNA. Korelace mezi hladinami mRNA a přítomností příslušných proteinů v buňce není přímá. Přímá kvantifikace proteinů je v současné době technicky obtížná, hlavně kvůli chemické složitosti proteinů ve vztahu k RNA. Experimentální podmínky pro měření množství mRNA jsou téměř stejné pro všechny geny ve srovnání s velkým rozsahem podmínek, které jsou specifické pro každou molekulu proteinu.

Základními složkami pro detekci a kvantifikaci množství specifické mRNA v biologickém vzorku jsou dostatečné množství celkové nebo mediátorové RNA,

sekvenčně specifické sondy, citlivá detekční metoda a vhodné kontroly a/nebo standardy pro interpretaci výsledků.

Existuje široké spektrum metod pro měření genové exprese na úrovni mRNA: Northern blotting, RNA čipy, kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase, RNA sekvenování.

1.5.1 „Northern blotting“

Mezi první techniky měření míry genové exprese patří metoda „Northern blotting“, která slouží k nalezení, měření délky a množství mRNA. Zkoumaná RNA je extrahována z tkáně a rozdělena podle velikosti pomocí gelové elektroforézy. Vzorek je poté přenesen na nylonovou membránu a na ni zafixován. Dále se provádí hybridizace: jestliže byl gen exprimován a transkript je přítomný, sonda bude hybridizována a přilne k membráně. Výhodou metody „Northern blotting“ je, že lze určit délku mRNA a různé sestříhové varianty genu. Nevýhodou je velké počáteční množství RNA. Metoda je časově náročná a má nižší senzitivitu [26].

1.5.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction) je jedna z nejpoužívanějších metod, která umožňuje mnohonásobnou amplifikaci určitého úseku nukleové sekvence pomocí enzymu, a tudíž jeho detekci. Princip této reakce založen na opakované replikaci určitého úseku DNA pomocí specifické DNA-polymerasy. Před zahájením reakce reakční směs obsahuje DNA-polymerasu, templát, primery a nukleotidy (jednotky bázi DNA, také známe jako dioxynukleotidtrifosfáty – dNTPs). PCR postupuje třemi cyklicky opakovanými reakcemi: denaturace (rozvolnění dvoušroubovice DNA), navázání primeru (angl. annealing) a syntéza DNA. Aby DNA-polymerasa mohla začít fungovat, musí dvoušroubovice DNA být rozvolněná na jednotlivé řetězce, k čemuž je zahřívána na vysokou teplotu (94-98 °C). Když máme dva rozdělené řetězce, může být zahájena replikace. Pro replikaci nepotřebujeme znát celou sekvenci, ale jenom koncové úseky, kam nasedají primery. tj. komplementární molekula DNA přibližné délky 15-20 párů bázi. Teplota, při které nasedají primery, musí být nižší o 3-5 stupňů než spočítaná teplota, při které primery se oddělí od templátu. Jestli teplota bude vyšší, primery nasedají špatně a výtěžek amplifikované DNA bude nízký.

V opačném případě bude vyšší pravděpodobnost amplifikace nežádoucích úseků DNA. Prodloužení oligonukleotidových primerů přidáním komplementárních nukleotidů probíhá při 70-72 °C – to je teplota, při které aktivita termostabilní DNA-polymerasy je optimální [27]. Syntéza se opakuje obvykle 30 až 40-krát. Až od třetího cyklu vznikne přesně omezený žádoucí produkt, po kterém výtěžek exponenciálně roste.

Kvantitativní PCR s reverzní transkripcí v reálném čase (real-time RT-qPCR, z angl. real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) je běžně používána metoda, pokud výchozím materiálem je RNA. Při používání real-time RT-qPCR je potřeba izolovat totální RNA, mRNA převést na komplementární DNA (cDNA, z angl. complementary DNA) pomocí reverzní transkripce. Získaná cDNA může být použita jako templát pro qPCR [28]. Sledování procesu amplifikace se děje v reálném čase (angl. real time), tj. přímo během reakce [29]. Zatímco u PCR se analyzuje až výsledný produkt, u qPCR se zaznamenává přírůstek intenzity fluorescence v každém cyklu reakce. To je umožněno přidáním fluorescenčních reportérů, které se specificky či nespecificky vážou na DNA a na základě vazby vyzařují světelný signál. Ten je pak zachycen detektorem, zpracován počítačem a převeden do grafu.

RT-qPCR je běžně používána metoda analýzy genové exprese díky výborné citlivosti a specifitě. Často je použita pro kontrolu dat, které byly získány pomocí jiných metod s vyšší propustností, jako sekvencování RNA a mikročipy Error: Reference source not found. Výhodou této metody je rychlost, možnost zpracování malého množství nebo částečně degradované RNA, velkého množství vzorku najednou.

1.5.3 RNA mikročip

RNA mikročip (angl. RNA microarray) je destička, která obsahuje řadu krátkých specifických sekvencí RNA (tzv. sondy), které jsou imobilizovány na její povrchu [30]. Metoda je založena na hybridizaci značených nukleových kyselin se specifickými sondami, při které dochází k fluorescenci. Na konci hybridizace je mikročip opláchnut, aby došlo k odstranění nehybridizovaných řetězců. Detekce fluorescenčního světla ukazuje, jestli došlo ke hybridizaci ve specifickém bodě ke konkrétní sekvenci. Intenzita detekovaného světla je přímo úměrná množství navázané RNA.

RNA mikročip technologie ve srovnání s „Northern blotting“ umožnila analyzovat tisíce transkriptů najednou. Nevýhodou je možnost studovat jenom známé sekvence genomu, nové transkripty vytvořené alternativním sestřihem nelze detekovat.

1.5.4 Sekvenování RNA

Sekvenování RNA, nebo RNA-Seq (z angl. sequencing) je metodou, která analyzuje exprese genu mnohem přesnější než jiné metody a umožňuje prozkoumat celý transkriptom [31]. Prvním krokem je připravení sekvenační knihovny. V případě práci z mRNA je potřeba je fragmentovat do menších úseků pomocí teploty nebo endonukleas, aby byl sekvenátor schopen analyzovat zkoumanou sekvenci. Dalším krokem je přepsání RNA na cDNA pomocí reverzní transkripce a následně syntézy komplementárního vlákna. Po fragmentaci je nutné zarovnat konce získaných sekvencí. Pak následuje navázání určitých sekvencí nukleotidů (tzv. adaptory), které se podílejí na navázání vlákna ke komplementární sekvenci v průběhu následujícího kroku zvané amplifikace. Jakmile amplifikace je dokončena, začíná samotná sekvenace.

Ve srovnání s metodou RNA mikročipy má sekvenování vyšší specifitu a senzitivitu. Na rozdíl od mikročipu nevyžaduje specifické sondy pro daný druh nebo transkript, proto může detekovat nové transkripty, sestřihové varianty a varianty jednotlivých nukleotidů. Nevýhodou této metody je její finanční náročnost.

1.6 Studium a analýza genové exprese

Analýza genové exprese měřené na úrovni RNA se používají ke studiu otázek, jako které geny (nebo jejich části) jsou přepsané, kdy a v jakých tkáních probíhá exprese. Z toho lze určit rozdíl míry exprese různých genů, což je důležité pro vysvětlení mechanismu mezi aktivací a deaktivací genů během fyziologických (např. buněčný cyklus, diferenciace, vývoj, podněty a reakce) i patologických procesů (např. příčina onemocnění, nástup, následky a progres). V kontextu řízení lidského zdraví může analýza genové exprese pomoci při objevování, které geny mohou být potenciálními cíli pro zásah v terapeutickém prostředí, pro vývoj léčiv a následujícímu léčení chorob [24].

1.7 Relativní genová exprese

Při studiu genové exprese polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) v reálném čase vědci obvykle zkoumají změny – zvýšení nebo snížení v expresi konkrétního genu nebo

sady genů měřením nadbytku genově specifického transkriptu. Za definovaného souboru podmínek se monitoruje reakci genů na léčbu sloučeninou nebo léčivem, o které je zájem.

Tato metoda měření genové exprese vyžaduje relativní množství mRNA, tj. porovnává se relativní změna genové exprese oproti kontrolnímu vzorku, kterým může být např. mRNA zdravých neovlivněných buněk. Tento referenční gen může být společně amplifikován ve stejné zkumavce nebo v samostatné zkumavce. Relativní kvantifikace proto nevyžaduje standardy se známými koncentracemi a referenčním genem může být jakýkoli transkript, pokud je známa jeho sekvence. Pro výpočet exprese cílového genu ve vztahu k adekvátnímu referenčnímu genu jsou stanoveny různé matematické modely [25].

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu izolace RNA, která může být použita pro studium relativní genové exprese. K dosažení cíle je třeba splnit tyto body:

- 1) provedení izolace RNA různými postupy
- 2) provedení charakterizace integrity RNA agarosovou elektroforézou za použití různých barviv
- 3) porovnání použitých metod mezi sebou a vybrání nejvhodnější metody pro izolaci RNA
- 4) vytvoření optimalizovaného protokolu pro izolaci RNA

3. Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

<i>Ambion, USA</i>	Nuclease free H ₂ O
<i>Geneaid, Tchaj-wan</i>	GENEZol Reagent, Total RNA Mini Kit
<i>Zymo Research, USA</i>	Direct-zol RNA Mini Kit
<i>Macherey-Nagel, Německo</i>	NucleoSpin RNA Clean-up
<i>Amplia, SR</i>	GoodView
<i>Nippon Genetics, Německo</i>	MIDORI Green Advance Agarose Tablets
<i>Invitrogen, USA</i>	Agarosa, SYBR Green II

<i>Linde, ČR</i>	Suchý led, tekutý dusík
<i>Penta, ČR</i>	Chloroform
<i>Lach-Ner, ČR</i>	Isopropanol, ethanol
<i>New England BioLabs, USA</i>	ssRNA ladder, 6x loading dye
<i>Thermo Sciencific, USA</i>	Lambda DNA/EcoRI + HindIII
Bio Basic Inc.	TRIS, kyselina boritá, EDTA

3.2 Použité přístroje

<i>Labox</i>	Flow-box
<i>Eppendorf</i>	Centrifuga (Centrifuge 5415R)
<i>Labnet</i>	Mikrocentrifuga
<i>VELP</i>	Vortex (Scientifica Rx3)
<i>Denovix</i>	Spektrofotometr
<i>Dark Reader</i>	Transluminátor
<i>Canon</i>	Fotoaparát (PowerShot G16)
<i>Bio-Rad</i>	Zdroj napětí (Electrophoresis Power Supply-EPS 301)
<i>H+P Labortechnik GmbH</i>	Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z
<i>Gilson</i>	Automatické pipety Pipetman
<i>Sanyo Sterilizer MOV-212S</i>	Sušárna

3.3 Metody

3.3.1 Izolace RNA z živočišného materiálu

Na rozdíl od DNA, při jejíž izolaci je možné jednoduše inaktivovat DNasy (enzymy štěpicí DNA), RNA je labilní a velice náchylná na působení ribonukleas (RNas), tj. může dojít k úplné degradaci veškeré buněčné mRNA. Nejčastěji RNasy jsou drženy neaktivní pomocí chlazení nebo použití silných denaturačních činidel jako guanidium isothiokyanát. Z toho důvodu nejpoužívanější metodou extrakce RNA je tzv. fenol-chloroformová metoda právě za přítomnosti guanidium isothiokyanátu [32].

Skleněné pomůcky byly před použitím sterilizovány v sušárně vysokou teplotou (180 °C) nejméně 6 hodin. Pracovní plocha, veškeré pomůcky a zařízení byli očištěny od RNAs pomocí 10% roztoku peroxidu vodíku. Po celou dobu izolace bylo pracováno ve Flow-boxu, který filtruje vzduch pomocí filtrů a dává možnost pracovat ve sterilním prostředí bez mikroorganismů. Pipety byly vyhrazeny pouze pro práci s RNA. Po ukončení izolace vzorky byly uchovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

Byla provedena izolace RNA z tkáni ledvin laboratorních potkanů. Jedná se o potkany kontrolní, kterým byl perorálně aplikován pouze slunečnicový olej, jednalo se o již zmrazené tkáně z předchozích studií prováděných na katedře biochemie.

Bylo provedeno několik druhů mechanické homogenizace – rozetření v třetí misce pomocí tekutého dusíku, manuální homogenizace zmrazené tkáně pomocí mikrotloučku a homogenizace pomocí homogenizátoru dle Pottera a Elvhjema.

Bylo provedeno několik přístupů k izolaci RNA – standardní fenol-chloroformová metoda pomocí činidla GENEzol (Geneaid) [33], izolace za použití komerčních sad Total RNA Mini Kit (Geneaid) [34] a Direct-zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research) [35].

3.3.1.1 Homogenizace v třetí misce za chlazení tekutým dusíkem

Před vlastní homogenizací byla třetí miska s tlučkem vychlazená tekutým dusíkem. K dusíku v misce bylo přidáno požadované množství tkáně a pomocí tlučku byla tkáň rozmělněna na jemný prášek.

Rozmělněná tkáň byla okamžitě převedena do mikrozkuřavky s extrakčním činidlem. Rovněž při práci s tekutým dusíkem používáme ochranné pomůcky, a to zejména rukavice, ochranné brýle a laboratorní plášť. Je třeba brát zřetel na to, že se třetí misky a tluček působením tekutého dusíku stanou velmi podchlazenými, a proto při manipulaci s nimi využíváme ochranné pomůcky (např. látkové chňapky, utěrky). Homogenát byl dále použit na izolaci RNA dle kap. 3.3.1.4, 3.3.1.6.

3.3.1.2 Homogenizace za použití mikrotloučku

Homogenizace za použití mikrotloučku vyžadovala více manuální síly a času. Předem zvážená tkáň byla vložena do mikrozkuřavek, ve kterých bylo požadované množství pufru (400 μ l RB pufru a 4 μ l β -merkaptoethanolu). Za pomoci

polyethylenového mikrotloučku byla tkáň rozetřena na jemnou hmotu. Homogenát byl dále použit na izolaci RNA dle kap. 3.3.1.4, 3.3.1.5, 3.3.1.6.

3.3.1.3 Homogenizace za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema

Homogenizátor se skládá ze silnostěnné skleněné zkumavky a pístu (skleněný nebo plastový), který se spojí s elektromotorkem. Do homogenizátoru bylo do pufru (GENEzol Reagent nebo TRIzol Reagent) vloženo požadované množství tkáně. Pak byl do zkumavky vložen píst a za pomoci motorku je tkáň homogenizována. Zkumavkou bylo zvolna pohybováno nahoru a dolů, při tomto pohybu rotující píst drtí tkáň, která prochází mezi stěnou zkumavky a pístem. Pohyb pístu nahoru a dolů byl několikrát opakováno úplně homogenizace materiálu. Homogenizace nemá trvat déle než 30 až 60 sekund, aby se biologický materiál zbytečně nezahříval. Celá homogenizace probíhala v chlazené místnosti při teplotě 4 °C.

3.3.1.4 Izolace RNA za použití fenol-chloroformové metody

Fenol-chloroformová metoda byla provedena pomocí činidla GENEzol Reagent (Geneaid) [32], které obsahuje fenol, chloroform a guanidin isothiokyanát. Toto činidlo je určené pro extrakci RNA, DNA a proteinů z různých vzorků, např. krve, plasmy, séra, kultivovaných buněk a tkáně. Extrahovaná RNA může být použita při přípravě sekvenčních knihoven, pro výzkum pomocí RT-PCR a „Northern blotting“.

Připravené vzorky se liší podle způsobu homogenizace. První třetina vzorků byla rozetřena v třetí misce pomocí tekutého dusíku (viz kap. 3.3.1.1). Druhá třetina byla připravena pomocí homogenizátoru (viz kap. 3.3.1.3). Poslední třetina byla homogenizována manuálně pomocí tloučku (viz kap. 3.3.1.2). Do každé mikrozukavky bylo přidáno přibližně stejné množství rozmělněné tkáně či homogenátu (~50 mg) pomocí špachtle.

Ke každému vzorku bylo přidáno 1 ml činidla GENEzol, mikrozukavky byly promíchány na vortexu (VELP), postaveny dnem vzhůru a ponechány inkubovat po dobu 5 minut při pokojové teplotě.

Dále bylo ke vzorkům přidáno 200 µl chloroformu, každá mikrozukavka byla promíchána na vortexu a opět ponechána inkubovat po dobu 3 minut. Následně byla

provedena centrifugace při 4 °C po dobu 15 minut při 12000× g (centrifuga Eppendorf 5415R).

Po centrifugaci vznikly 3 fáze – organická fáze (spodní), která obsahuje DNA a proteiny, mezifáze (uprostřed) a vodná fáze obsahující RNA (vrchní). Pomocí automatické pipety byla do čistých mikrozkušavek odebrána vodná fáze (přibližně 400-540 µl).

RNA je vysrážena tak, že do každé mikrozkušavky byl přidán stejný objem podchlazeného isopropanolu tak, aby se objem přidaného isopropanolu rovnal objemu vodné fáze. Vzorky byly následně zamíchány opatrným překlápěním a inkubovány po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Následně byla provedena centrifugace 12000× g při 4 °C po dobu 15 minut (centrifuga Eppendorf 5415R). Vzniklý supernatant byl opatrně odstraněn a ke každé peletě bylo přidáno 1 ml 75% podchlazeného ethanolu (v/v v „RNase-free“ vodě). Vzorky byly zamíchány na vortexu (VELP) a následně centrifugovány při 12000× g při 4 °C po dobu 5 minut (centrifuga Eppendorf 5415R). Po centrifugaci byl vzniklý supernatant odstraněn a zbylý ethanol odpařen otevřením zkumavky a postavením dnem vzhůru na papírovou utěrku ve flow-boxu. Ke vzorkům bylo přidáno 40 µl „RNase-free“ vody, mikrozkušavky byly promíchány na vortexu (VELP) a inkubovány po dobu 15 minut při teplotě 60 °C. Získané vzorky byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

3.3.1.5 Izolace RNA za použití Total RNA Mini Kit

Total RNA Mini Kit (Geneaid) [33] je určen pro izolaci RNA z různých živočišných tkání. Izolace měla čtyři zásadní kroky – homogenizace tkáně, navázání RNA na kolonky s filtrem pomocí chaotropní soli, odstranění všech nežádoucích látek a vyčištění celkové RNA. Purifikovaná RNA je připravena k dalšímu použití např. pro RT-PCR, „Northern Blotting“ a další.

Předem zvážená zmrazená tkáň ledvin potkanů byla rozdělena do mikrozkušavek po ne více než 25 mg. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 400 µl RB pufru a 4 µl β-merkapt ethanolu a každý vzorek byl rozdrcen pomocí mikrotloučku (viz kap. 3.3.1.2). Vzniklá směs byla dále rozmělněna pomocí 20-G stříkačky a následně byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Vzniklý lyzát byl přelit na RB kolonku s filtrem, která byla umístěna do sběrné zkumavky. Následovala centrifugace při 1000× g při pokojové teplotě po dobu 30 sekund (centrifuga Eppendorf 5415R). Supernatant byl opatrně přelit do nové 1,5ml mikrozkušavky.

Fáze navázání RNA na kolonku byla zahájena přidáním 400 µl 70% ethanolu připraveném v ddH₂O (RNase a DNase free water – sterilní voda bez obsahu nukleas) k supernatantu. Vzniklý roztok byl vortexován a přelit do nové RB kolonky s filtrem, která byla umístěna do 2ml sběrné zkumavky. Vzorky byly následně centrifugovány po dobu 60 sekund při 14000× g (centrifuga Eppendorf 5415R). Vzniklý supernatant byl opatrně odstraněn, ale kolonka s navázanou RNA zachována.

V další fázi, promývací, bylo ke vzniklé peletě přidáno 400 µl W1 pufru a vzorky byly centrifugovány při 14000× g po dobu 30 sekund (centrifuga Eppendorf 5415R). Po odstranění supernatantu byla kolonka vrácena do sběrné zkumavky. Následně bylo k vzorkům přidáno 600 µl promývacího pufru a byla provedena centrifugace při 14000× g 30 sekund (centrifuga Eppendorf 5415R). Tento krok se opakoval třikrát, přičemž poslední centrifugace trvala 3 minuty do úplného vyschnutí RB kolonky.

Suchá RB kolonka byla umístěna do čisté 1,5ml mikrozukavky, bylo přidáno 50 µl „RNase-free“ vody přesně do středu matrice. Vzorky byly ponechány stát 2 minuty při pokojové teplotě, aby se voda absorbovala do matrice.

Posledním krokem byla centrifugace po dobu 1 minutu při 14000× g (centrifuga Eppendorf 5415R). Izolovaná RNA byla uchována v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

3.3.1.6 Izolace RNA za použití Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit

Izolace RNA za použití Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research) [34] se dělí na tři části: příprava pufrů, homogenizace tkáně a purifikace RNA. Všechny kroky byly provedeny při pokojové teplotě.

Příprava pufrů:

- „RNA PreWash“ pufr: ke 40 ml koncentrátu bylo přidáno 10 ml 95% ethanolu,
- „RNA Wash Buffer“ pufr: k 12 ml bylo přidáno 52 ml 95% ethanolu.

Předem zvážená zmražená tkáň (max. 50 mg) byla rozmístěna do mikrozukavek, do kterých bylo přidáno 600 µl „TRI Reagent“ a první část vzorků byla homogenizována pomocí mikrotloučku (viz kap.3.3.1.2). Druhá část byla rozetřena v třetí misce za použití tekutého dusíku (viz kap.3.3.1.1), třetí část byla připravena za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema (viz kap.3.3.1.3).

Následně bylo ke vzorkům přidáno 600 µl 98% ethanolu a mikrozkušavky byly vortexovány (vortex VELP).

Vzniklá směs byla přenesena na kolonky („Zymo-Spin IICG“), které byly umístěny do sběrných zkumavek, a následně centrifugovány po dobu 30 sekund při 16000× g (centrifuga Eppendorf 5415R). Vzniklý supernatant byl odstraněn a kolonka byla přemístěna do nové sběrné zkumavky.

Pro odstranění genomové DNA ze vzorků RNA se doporučuje ošetření DNasou I. Enzym DNasa I je klasifikován jako endonukleasa, která je schopná štěpit jednovláknovou a dvouvláknovou DNA na jednotlivé báze nebo oligonukleotidy. Enzym je specifický pro DNA bez negativního vlivu na integritu zbývající RNA. Proto k bylo polovině vzorků přidáno 400 µl RNA promývacího pufru („RNA Wash Buffer“) a byla provedena centrifugace po dobu 30 sekund při 16000× g (centrifuga Eppendorf 5415R). V každé zkumavce „RNase-free tube“ bylo smícháno 5 µl DNasy I (6 U/µl) a 75 µl pufru „DNA Digestion Buffer“ a tato směs byla zamíchaná mírným otáčením. Připravená směs byla přidána ke vzorkům a vzorky byly inkubovány po dobu 15 minut při pokojové teplotě.

Ke každému vzorku bylo přidáno 400 µl pufru „Direct-Zol RNA Pre-Wash“, po následné centrifugaci po dobu 30 sekund při 16000× g (centrifuga Eppendorf 5415R) byl odstraněn vzniklý supernatant, tento krok byl třikrát zopakován. Dále bylo přidáno 700 µl RNA promývacího pufru („RNA Wash Buffer“) a vzorky byly centrifugovány po dobu 2 minut při 16000× g (centrifuga Eppendorf 5415R), pro úplné odstranění promývacího pufru. Dále byla kolonka opatrně přemístěna do zkumavky „RNase-free tube“. Pro eluci RNA bylo přidáno 100 µl „RNase-free“ vody a vzorky byly centrifugovány po dobu 30 sekund při 16000× g (centrifuga Eppendorf 5415R). Získaná RNA byla uchována v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

3.3.2 Stanovení čistoty a koncentrace RNA

Čistota a koncentrace RNA byly určeny pomocí měření absorbance spektrofotometrem Denovix, který vyžaduje pouze malé množství vzorku, 0,5-1 µl [36].

Nukleové kyseliny a aromatické aminokyseliny mají absorpční maxima při 260 a 280 nm. Historicky byl poměr absorbance těchto vlnových délek používán jako míra čistoty při izolaci nukleových kyselin, který může nám ukázat, jestli je vzorek kontaminován. Čistota RNA je určena mírou přítomnosti proteinů, tj. poměrem absorbancí při 260 a 280 nm.

Očekávaný poměr pro čistou RNA je v rozmezí 1,8 až 2. Jestliže je koncentrace RNA velmi nízká nebo je vzorek kontaminován proteiny, poměr absorbcí 260/280 bude nižší než 1,75.

Poměr A_{260}/A_{230} vyjadřuje kontaminaci látkami, které jsou součástí izolačních souprav. Například fenol, který absorbuje světlo při 230 nm [36], je organické rozpouštědlo používané k oddělení proteinů od nukleových kyselin. V pufrech se často používá chaotropní soli, jako guanidin isothiokyanát a guanidin hydrochlorid, které jsou denaturačními činidly pro inaktivaci RNAs a zároveň chaotropními činidly degradujícími proteiny. Ethanol, který má absorbance při 230-240 nm, je používán v promývacích pufrech a také může ovlivnit absorpční spektra [37]. Očekávané hodnoty A_{260}/A_{230} jsou obvykle v rozmezí 2,0-2,2 [36]. Nízké hodnoty A_{260}/A_{230} ukazují na problém s izolačním postupem, v průběhu kterého mohl být vzorek kontaminován.

Ale pokud je ve vzorku přítomna DNA, které také absorbuje světlo kolem 260 nm, může přispívat k hodnotě absorbance, což má za následek nadhodnocení koncentrace RNA.

Pokud je RNA degradována, změny v integritě RNA se v měření neodrážejí, protože jednotlivé nukleotidy také mají absorbance při 260 nm.

Vzorec pro stanovení čistoty je s ohledem na korekci šumu na pozadí, které absorbuje světlo při 320 nm:

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}} \quad (1)$$

Koncentrace RNA se stanoví na základě pohlcování světla v různých vlnových spektrech. Naměřené hodnoty absorbance se přepočítávají na koncentraci pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

Absorbance roztoku RNA (A) je určena součinem koncentrace (c), délky optické dráhy (l) a molárního absorpčního koeficientu RNA (ε), který se rovná 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Vzorec pro stanovení koncentrace:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \cdot l \cdot 40, \mu g / \mu l \quad (3)$$

V našem případě koncentrace byla spočítána podle vzorce:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \cdot 40, \mu g / \mu l \quad (4)$$

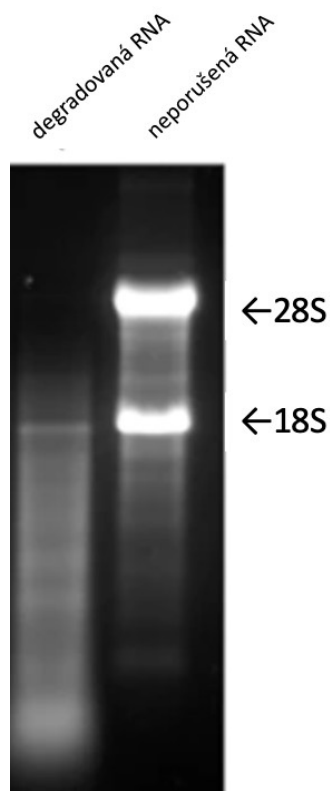
3.3.3 Stanovení integrity RNA

Jedním z hlavních problémů ovlivňujících integritu RNA je všudypřítomná přítomnost ribonukleas. Pokud vzorek obsahující RNA bude kontaminován RNasami, následná analýza využívající tento vzorek může vést ke špatným výsledkům.

Pro vizuální vyhodnocení integrity RNA je často využívána horizontální gelová elektroforéza. Elektroforéza na agarosových nebo polyakrylamidových gelech je standardní metodou používanou k analýze nukleových kyselin [39]. Molekuly nukleových kyselin jsou podle velikosti rozděleny pomocí elektrického pole, kde negativně nabitě molekuly RNA migrují směrem ke kladně nabitě elektrodě – anodě. Migrační tok je určen pouze molekulovou hmotností, kde molekuly malé hmotnosti migrují rychleji než větší molekuly. Po ukončení elektroforézy se k vizualizaci molekul nukleových kyselin běžně používají fluorescenční barviva jako je ethidium bromid nebo SYBR Green. Barvivo vytváří s nukleovou kyselinou komplex, který po osvětlení UV zářením fluoreskuje.

Jedním ze způsobů zobrazení jsou komerčně dostupná barviva, např. fluorescenční barvivo SYBR Green II, které emituje záření o vlnové délce 525 nm [43] a fluoreskuje zelenou barvou. Barviva SYBR Green jsou cyaninová barviva, které mají určité výhody oproti fenantridinovým barvivům, jako je ethidium bromid. Na rozdíl od EtBr SYBR Green II potřebuje pro kvantifikace nižší koncentrace, a to od 2 ng/ml [41]. Výhodou oproti EtBr je, že barvivo není toxické [44], i když je rovněž dražší. Barvivo vykazuje vysokou afinitu k nukleovým kyselinám a je citlivější až 100-krát než EtBr [43].

V elektroforeogramu RNA jsou pozorovatelné dva pruhy – vrchní pro 28S rRNA, který je dvakrát silnější a spodní pro 18S rRNA. Neporušená RNA bude mít ostré, jasné 28S a 18S rRNA pruhy (Obr.8). Vykázaný poměr ostrosti 2:1 pro 28S:18S naznačuje, že RNA je zcela neporušená. Částečně degradovaná RNA bude mít rozmazaný vzhled, postrádá jasné pruhy nebo nebude vykazovat poměr 2:1.



Obr.7 Záznam agarosového gelu, na kterém jsou označeny 28S a 18S pruhy rRNA. Z levé strany se nachází degradovaná RNA (z levé strany), z pravé strany se nachází neporušená RNA. Převzato z [46]

3.3.3.1 Horizontální agarosová elektroforéza za použití barviva SYBR Green II

SYBR Green II (Invitrogen) [47] je jedno z nejcitlivějších barviv známých pro detekci RNA v elektroforetických gelech. Ačkoli barvivo není selektivní jen pro RNA, vykazuje vyšší kvantový výtěžek fluorescence, když se váže na RNA než na dvouvláknovou DNA. Kromě toho, fluorescence komplexu RNA-SYBR Green II je více než sedmkrát vyšší než fluorescence komplexu RNA-ethidium bromid. Zároveň je afinita SYBR Green II k RNA také vyšší než afinita ethidium bromidu. Protože gelové

barvivo SYBR Green II má nízkou vnitřní fluorescenci, není potřeba odbarvovat gely před vizualizací výsledků izolaci RNA. Jeho afinita k RNA, citlivost a bezpečnost dělá barvivo SYBR Green II vhodnější k použití.

Skleněné pomůcky byly před použitím sterilizovány v sušárně vysokou teplotou (180 °C) nejméně 6 hodin. Pro přípravu agarosového gelu byl použit 5× TBE pufr (445 mM TRIS, 445 mM kyseliny borité a 10 mM EDTA).

Pro přípravu 50 ml 1% agarosy (w/v) bylo naváženo 0,50 g agarosy, která byla kvantitativně přenesena do předem kalibrované Erlenmayerovy baňky. Směs byla doplněna 0,5× TBE pufrem do 50 ml a byla zahřata v mikrovlnné troubě přibližně po dobu 2 minut do úplného rozpuštění agarosy. Následně byl roztok zchlazen proudem studené vody a vlit do aparatury, kam byl umístěn hřeben. Gel byl ponechán 30 minut ztuhnout.

Každý vzorek pro elektroforézu obsahoval 2 µl RNA a 1 µl vzorkového pufru „6× Loading dye“ a 3 µl RNase free dH₂O . Poté byl připraven marker, který byl připraven smísením 1 µl ssRNA Ladder, 4 µl H₂O a 1 µl „6× Loading dye“. Směs byla zahřátá na 90 °C a poté chlazená 3 minuty na ledu.

Po ztuhnutí gelu byly vyjmuty hřebeny, gel byl umístěn do aparatury na elektroforézu a převrstven elektrodovým pufrem 0,5× TBE. Po nanesení 6 µl markeru a 7 µl vzorku do jamek byla aparatura zakryta víkem a připojena ke zdroji napětí (Electrophoresis Power Supply-EPS 301). Elektroforéza probíhala přibližně po dobu 60 minut při 110 V.

Pro vizualizaci gelu byla připravena barva SYBR Green II (Invitrogen) 10000x ředěním v 50 ml 1× TBE pufru. Gel byl vložen do plastové krabičky s připraveným roztokem barviva a celá krabička byla zabalena do alobalu, kam byla přidána připravená směs a byl zakrytý alobalem. Gel byl s připraveným barvivem inkubován po dobu 30 minut za třepání při laboratorní teplotě.

Proužky byly vizualizovány v temné místnosti pomocí transiluminátoru (Dark Reader) a gel byl vyfocen.

3.3.3.2 Horizontální agarosová elektroforéza za použití barviva GoodView

GoodView (Amplia) [48] je nová netoxická reagentie pro detekci nukleových kyselin v agarosovém gelu, alternativa k tradičnímu ethidium bromidu. Při vazbě na

DNA nebo RNA emituje záření o vlnové délce 530 nm, tj. produkuje zelené fluorescenční záření. Umožňuje vizualizaci RNA a DNA při koncentraci vyšší než 100 ng/ml, což je vyšší koncentrace, než umožňuje barvivo SYBR Green II (Invitrogen), ale dvakrát nižší, než umožňuje ethidium bromid. Barvivo není toxické.

Pro přípravu 50 ml 1% agarosy (w/v) bylo naváženo 0,50 g agarosy, která byla kvantitativně přenesena do předem kalibrované Erlenmayerovy baňky. Směs byla doplněna 0,5× TBE pufrem do 50 ml a byla zahřata v mikrovlnné troubě přibližně po dobu 2 minut do úplného rozpuštění agarosy. Následně byl roztok zchlazen proudem studené vody a byly přidány 4 µl barviva GoodView (Amplia). Směs byla vlita do aparatury, kam byl umístěn hřeben. Gel byl ponechán 30 minut ztuhnout.

Každý vzorek pro elektroforézu obsahoval 4 µl RNA, 1 µl „RNase free“ vody a 1 µl vzorkového pufru „6× Loading dye“. Pote byl připraven marker, který byl připraven smíšením 1 µl λ EcoRI + HinDIII, 4 µl H₂O a 1 µl „6× Loading dye“. Směs byla zahřívána na 90° C a poté chlazená 3 minuty na ledu.

Po ztuhnutí gelu byly vyjmuty hřebeny a gel byl umístěn do aparatury na elektroforézu a převrstven elektrodovým pufrem 0,5× TBE. Po nanesení 5 µl markeru a 5 µl vzorku do jamek aparatura byla zakryta víkem a připojena ke zdroji napětí (Electrophoresis Power Supply-EPS 301). Elektroforéza byla zahájena a probíhala přibližně po dobu 60 minut při 110 V.

Po ukončení elektroforézy byly proužky vizualizovány v temné místnosti pomocí transiluminátoru (Dark Reader) a gel byl vyfocen.

3.3.3.3 Horizontální agarosová elektroforéza za použití tablety MIDORI

Tableta MIDORI (Nippon Genetics) [49] je tableta pro rychlou přípravu agarosového gelu, která obsahuje barvivo MIDORI Green. Barvivo při vazbě na DNA nebo RNA emituje záření o vlnové délce 530 nm, tj. produkuje zelené fluorescenční záření. Barvivo není toxické a má stejnou citlivost jako ethidium bromid. Příprava gelu je méně časově náročné, je potřeba rozpustit agarosovou tabletu v TBE pufru, zahřát a nalít gel.

Pro přípravu 1% agarosového gelu (w/v) byla použita jedna tableta MIDORI, která byla rozpuštěna v 50 ml 0,5× TBE pufru. Směs byla ponechána stát přibližně 3 minuty, dokud tableta se úplně nerozpustila. Po rozpuštění tablety byla směs zahřata v

mikrovlnné troubě po dobu 2 minut, pokud se nevytvořil čirý roztok. Následně byl roztok zchlazen proudem studené vody a vlit do aparatury, kam byl umístěn hřeben. Gel byl ponechán 30 minut ztuhnout.

Každý vzorek pro elektroforézu obsahoval 3,5 μ l RNA a 3,5 μ l vzorkového pufru „2 \times Loading dye“. Poté byl připraven marker, který byl připraven smíšením 1 μ l λ EcoRI + HinDIII, 4 μ l H₂O a 1 μ l „6 \times Loading dye“.

Po ztuhnutí gelu byly vyjmuty hřebeny a gel byl umístěn do aparatury na elektroforézu a převrstven elektrodovým puftrem 0,5 \times TBE. Po nanesení 6 μ l markéru a 7 μ l vzorku do jamek aparatura byla zakryta víkem a připojena ke zdroji napětí (Electrophoresis Power Supply-EPS 301). Elektroforéza byla zahájena a probíhala přibližně po dobu 60 minut při 110 V.

Po ukončení elektroforézy byly proužky vizualizovány v temné místnosti pomocí transiluminátoru (Dark Reader) a gel byl vyfocen.

3.3.4 Přečištění izolované RNA

Při použití jakékoliv metody izolace RNA se někdy nepodaří vyizolovat z buněk čistou RNA, ale vždy znečištěnou dalšími komponentami, které jsou součástí izolačních postupů. Nutným krokem je její purifikace (vyčištění), pomocí které se odstraňují soli, metabolity, organické látky jako fenol a makromolekulární buněčné složky.

Přečištění bylo provedeno pomocí komerčního kitu NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel) [49]. Tato komerční sada využívá technologie purifikace pomocí silikátové matrice, jejíž principem je vysoká afinita negativně nabitých fosfátových kostry RNA k pozitivně nabitým silikátovým částicím. Metoda obsahuje 3 zásadní kroky – vázání RNA na silikátovou matici, promývání matrice a uvolnění čisté RNA. K navázání RNA dochází po přidávku vysoké koncentrace chaotropních solí, které rozbíjí vodíkové můstky mezi molekulami vody a povrchem silikátu. Na takto dehydratovaný silikát se svými fosfátovými skupinami váže RNA. Kontaminanty je pak možné odmyt. RNA se ze silikátové matrice uvolní puftrem s nízkým obsahem solí nebo vodou bez obsahu RNAs.

Purifikace RNA je většinou časově i finančně náročné, a proto je nezbytné nejdříve stanovit její čistotu. V této práci byli pro přečištění zvoleny vzorky s nízkým poměrem absorbancí 260/230, což ukazuje na kontaminace látkami, které jsou součástí izolačních souprav.

Nejprve je potřeba připravit vzorky a pufr. Vzorky byly připraveny smíšením 20 μl vzorku RNA a 80 μl „RNase-free“ vody. Dále byl připraven pufr „Buffer RA1-ethanol premix“ smíšením 300 μl „Buffer RA“ a 300 μl 96% ethanolu.

Ke každému vzorku bylo přidáno 600 μl připraveného pufru „Buffer RA1-ethanol premix“ a vzorky byly následně zamíchány na vortexu (VELP).

Vzniklá směs byla přenesena na kolonky („NucleoSpin RNA Clean-up Column“), které byly umístěny do sběrných zkumavek, a následně centrifugována po dobu 30 sekund při 8000 \times g (centrifuga Eppendorf 5415R). Vzniklý supernatant byl odstraněn a kolonka byla přemístěna do nové sběrné zkumavky.

Na kolonku bylo přidáno 700 μl pufru „Buffer RA3“ a vzorky byly centrifugovány po dobu 30 sekund při 8000 \times g (centrifuga Eppendorf 5415R). Supernatant byl odstraněn a kolonka byla promyta podruhé přidáním 350 μl pufru „Buffer RA3“. Vzorky byly centrifugovány po dobu 2 minuty při 8000 \times g (centrifuga Eppendorf 5415R). Kolonky byly přeneseny do čistých sběrných mikrozkuvek a vzorky byly ponechány inkubovat s otevřeným víkem při pokojové teplotě po dobu 3 minuty, aby vyschla membrána kolonky.

Ke vzorkům bylo přidáno 40 μl „RNase-free“ vody a vzorky byly centrifugovány po dobu 60 sekund při 8000 \times g (centrifuga Eppendorf 5415R). Purifikovaná RNA byla přenesena do čistých mikrozkuvek a uchována v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

4. Výsledky

4.1 Izolace RNA

Z tkání ledvin laboratorních potkanů kontrolních byla izolována celková RNA za použití fenol-chloroformové metody pomocí komerčního činidla GENEzol Reagent (Geneaid) (viz kap. 3.3.1.4), sady Total RNA Mini Kit (Geneaid) (viz kap. 3.3.1.5) a Direct-Zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research) (viz kap. 3.3.1.6). Homogenizace byla provedena třemi způsoby, a to v třecí misce za chlazení tekutým dusíkem (viz kap. 3.3.1.1), za použití mikrotloučku (viz kap. 3.3.1.2) a homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema (viz kap. 3.3.1.3).

Tab.1 ukazuje výslednou čistotu a koncentraci RNA, která byla zjištěna spektrofotometrickým stanovením za použití spektrofotometru Denovix a pomocí vzorce (4) (viz kap. 3.3.2).

Tab.1 : Čistota a koncentrace RNA izolované z tkání ledvin laboratorních potkanů kontrolních za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid), souprav Total RNA Mini Kit (Geneaid) a Direct-Zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research).

Přístup k izolaci RNA	Zkratka vzorku	m tkáně, [mg]	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	objem H_2O [μl]	RNA na 1 mg tkáně [μg]
fenol-chloroformová metoda za použití GENEzol Reagent (Geneaid)	CT1	50	1,87	1,19	1,697	40	1,36
	CT2		1,89	0,99	1,915		1,53
	CT3		1,97	0,97	3,389		2,71
	CH1		2,00	1,43	5,668		4,53
	CH2		2,02	1,39	3,445		2,76
	CH3		2,03	1,69	3,201		2,56
	CP1		1,99	1,50	3,405		2,72
	CP2		1,95	1,22	2,851		2,28
	CP3		1,92	2,96	0,184		0,15
Total RNA Mini Kit (Geneaid)	T1	25	2,18	0,15	0,129	50	0,26
	T2		2,08	1,55	0,094		0,19
	T3		2,09	1,84	0,221		0,44
	T4		2,03	1,43	0,071		0,14
Direct-Zol RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research)	Z1	50	1,93	1,61	0,497	100	0,99
	Z2		1,91	2,98	0,262		0,52
	Z3		1,93	2,69	0,291		0,58
	Z4		1,96	2,56	0,291		0,58
	Z5		1,99	2,94	0,177		0,35
	Z6		1,99	2,49	0,291		0,58
	KT1		1,96	2,49	0,270		0,54
	KT2		1,85	1,85	0,318		0,64
	KT3		1,94	2,24	0,548		1,10
	KH1		2,02	2,29	0,765		1,53
	KH2		1,90	2,31	0,546		1,09
	KH3		1,92	2,52	0,434		0,87
	KP1		1,89	3,56	0,109		0,22
	KP2		1,90	2,30	0,542		1,08
	KP3		2,17	1,84	7,442		14,88

Vzorky CT1, CT2, CT3, CH1, CH2, CH3, CP1, CP2, CP3 byly izolovány za použití fenol-chloroformové metody pomocí komerčního činidla GENEzol Reagent (Geneaid). Vzorky T1, T2, T3, T4 byly izolovány za použití sady Total RNA Mini Kit (Geneaid). Vzorky Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 a KT1, KT2, KT3, KH1, KH2, KH3, KP1, KP2, KP3

byly izolovány za použití sady Direct-Zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research). Hodnoty absorbančí a koncentrace vzorku KP3 jsou vyloučeny jako odlehlé výsledky.

U zkratk druhé písmeno značí způsob homogenizace. T značí homogenizace v třecí misce za chlazení tekutým dusíkem, H značí homogenizace za použití mikrotloučku a P značí homogenizace za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema.

Hodnota čistoty se pohybuje v rozmezí 1,8-2, však poměr absorbančí 260/230 je u vzorků T1, T4, Z1, CT3, CH1 příliš nízký, což znamená kontaminace látkami, které jsou součástí izolačních souprav. Tyto vzorky byly dále přečišťovány.

4.2 Přečištění RNA

Přečištění bylo provedeno za použití komerčního kitu NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel) (viz kap. 3.3.4), pomocí kterého se odstraňují soli, metabolity, organické látky jako fenol a makromolekulární buněčné složky. Byly přečištěny vzorky T1, T4, které byly izolovány za použití Total RNA Mini kitu (Geneaid), vzorek Z1, který byl izolován za použití Direct-Zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research) a vzorky CT3, CH1, které byly izolovány pomocí fenol-chloroformové metody za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid). Vzorky byli zvoleny kvůli jejich nízkému poměru absorbančí 260/230.

V Tab.2 jsou porovnány koncentrace a čistota RNA hned po izolaci a po přečištění.

Název komerčního kitu	Zkratka vzorků	Počáteční koncentrace vzorků, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Výsledná koncentrace vzorků, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Počáteční poměr A_{260}/A_{280}	Výsledný poměr A_{260}/A_{280}	Počáteční poměr A_{260}/A_{230}	Výsledný poměr A_{260}/A_{230}
NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel)	T1	0,129	0,026	2,18	1,91	0,15	0,16
	T4	0,071	0,018	2,09	1,92	1,84	0,92
	Z1	0,497	0,093	1,93	2,04	1,61	0,55
	CT3	3,389	0,198	1,89	2,10	0,99	1,09
	CH1	5,668	0,438	1,97	2,13	0,97	1,00

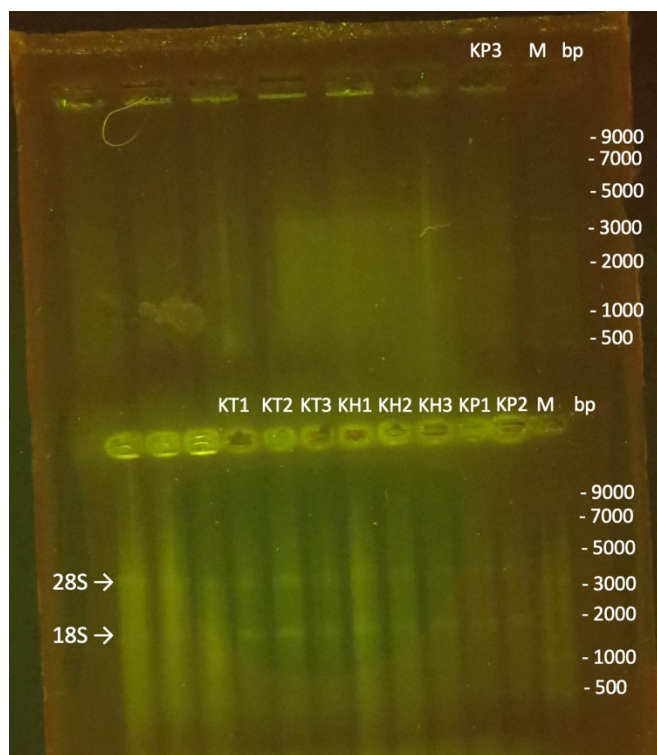
Tab.2 Počáteční a výsledná čistota a koncentrace izolované RNA po přečištění soupravou NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel).

Podle výsledků k významnému přečištění nedošlo.

4.3 Horizontální agarosová elektroforéza

Pro vizuální vyhodnocení integrity RNA byla provedena horizontální agarosová elektroforéza. Elektroforéza byla provedena za použití barviv SYBR Green II (Invitrogen), GoodView (Amplia) a tablety MIDORI (Nippon Genetics) pro rychlou přípravu agarosového gelu, která obsahuje barvivo MIDORI Green. Na Obr.8, Obr.10, Obr.11, Obr.12, Obr.12 jsou uvedeny výsledky elektroforézy, kde jsou dva charakteristické proužky 28S a 18S, pomocí kterých lze posoudit, zda došlo k porušení integrity RNA.

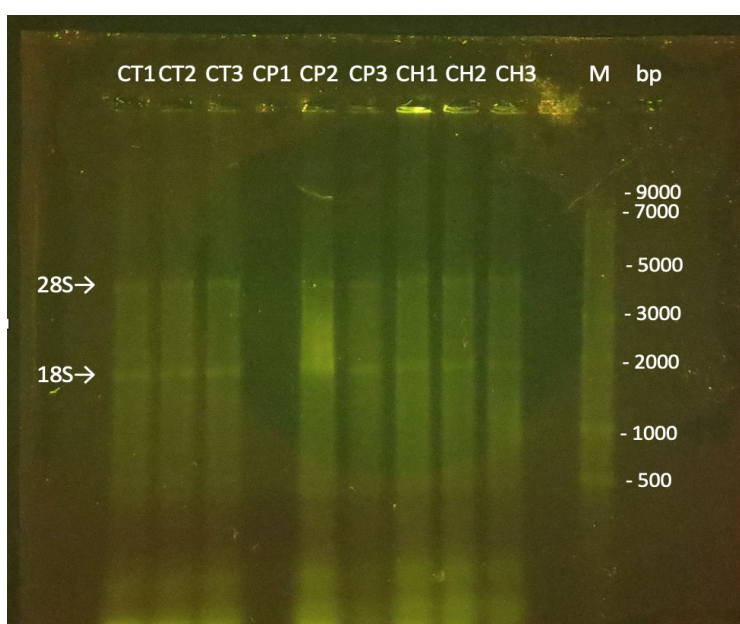
Na Obr.8 je uveden výsledek elektroforézy vzorků izolovaných za použití Direct-Zol RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research) (vzorky KT1, KT2, KT3, KH1, KH2, KH3, KP1, KP2, KP3). Elektroforéza byla provedena za použití barviva SYBR Green II (Invitrogen), byl použit marker ssRNA Ladder (New England BioLabs).



Obr.8 Horizontální agarosová elektroforéza izolované RNA za použití barviva SYBR Green II (Invitrogen), marker ssRNA Ladder (New England BioLabs). Označené vzorky KT1, KT2, KT3, KH1, KH2, KH3, KP1, KP2, KP3 byly izolovány za použití Direct-Zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research).

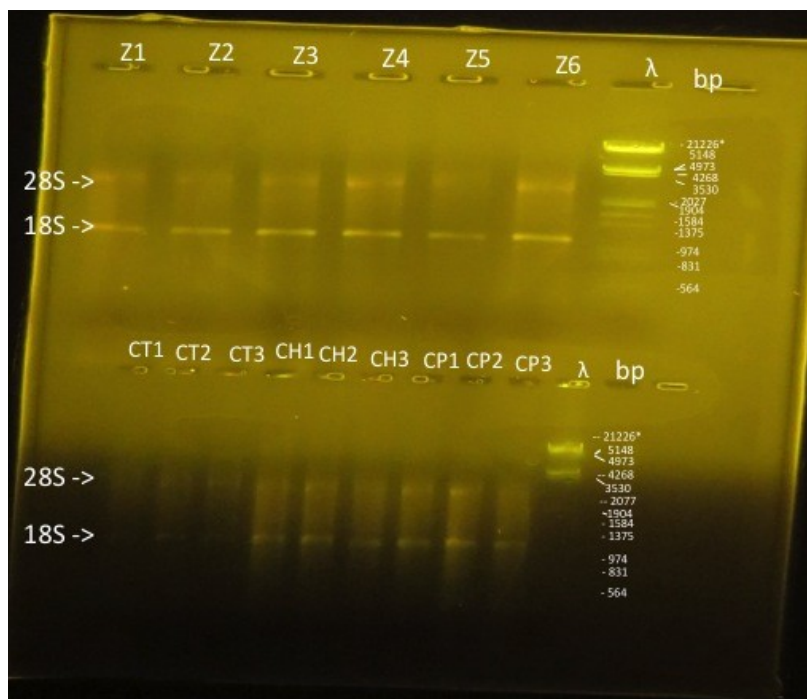
U vzorků KP1, KP2, KP3 nejsou proužky 28S a 18S dostatečně ostré, téměř chybí. Vzorky ve spodní části gelu KT1, KT2, KT3, KH1, KH2, KH3 jsou lepe viditelné, ale proužky nejsou dostatečně ostré.

Vzorky CT1, CT2, CT3, CH1, CH2, CH3, CP1, CP2, CP3, které byly izolovány pomocí fenol-chloroformové metody za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid), byly naředěny 10x a byla provedena horizontální agarosová elektroforéza za použití barviva SYBR Green II (Invitrogen) (viz Obr.9). Jak je vidět, všechny vzorky mají viditelné proužky 28S a 18S, a to kromě vzorku CP1, u kterého pravděpodobně došlo k chybnému pipetování.



Obr.9 Horizontální agarosová elektroforéza izolované RNA za použití barviva SYBR Green II (Invitrogen), marker ssRNA Ladder (New England BioLabs). Označené vzorky CT1, CT2, CT3, CP1, CP2, CP3, CH1, CH2, CH3 byly izolovány za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid).

Na Obr.10 je uveden výsledek elektroforézy vzorků izolovaných pomocí fenol-chloroformové metody za použití činidla GENEzol (Geneaid) (vzorky CT1, CT2, CT3, CH1, CH2, CH3, CP1, CP2, CP3) a za použití Direct-Zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research) (vzorky Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6). Elektroforéza byla provedena za použití barviva GoodView (Amplia), byl použit marker Lambda DNA/EcoRI + HinDIII (Thermo Scientific).



Obr.10 Horizontální agarosová elektroforéza izolované RNA za použití barviva GoodView (Amplia), marker Lambda DNA/EcoRI + HinDIII (Thermo Scientific). Označené vzorky CT1, CT2, CT3, CP1, CP2, CP3, CH1, CH2, CH3 byly izolovány za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid), vzorky Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 za použití Direct-Zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research).

Proužky jsou viditelné a dostatečně ostré u všech vzorků, kromě CT1, CT2, CT3. Jak je z elektroforeogramu patrné, barvivo GoodView (Amplia) se nedostalo do spodní části gelu.

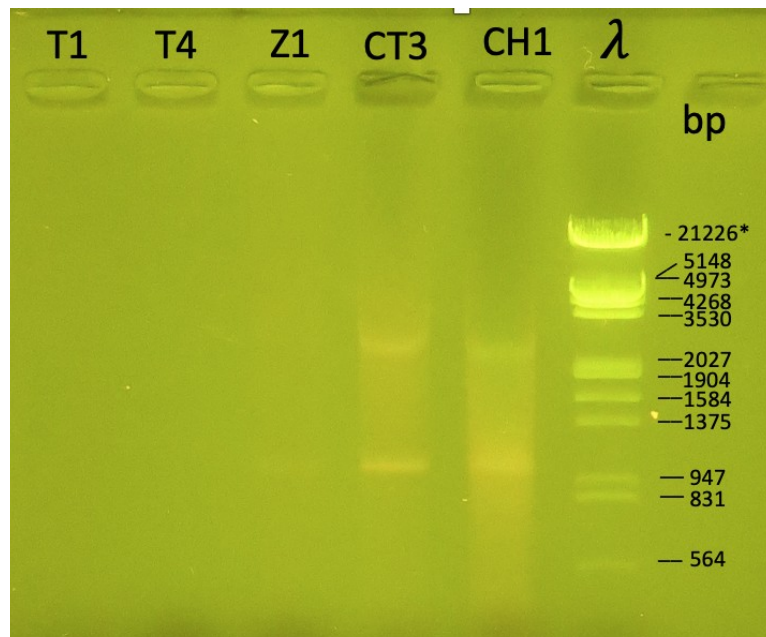
Na Obr.11 je uveden výsledek elektroforézy vzorků izolovaných za použití Total RNA Mini Kit (Geneaid) (vzorky T1, T2, T3, T4). Elektroforéza byla provedena za použití tablety MIDORI (Nippon Genetics), která obsahuje barvivo MIDORI Green, byl použit marker Lambda DNA/EcoRI + HinDIII (Thermo Scientific).



Obr.11 Horizontální agarosová elektroforéza izolované RNA za použití tablety MIDORI (Nippon Genetics), která obsahuje barvivo MIDORI Green, marker Lambda DNA/EcoRI + HinDIII (Thermo Scientific). Označené vzorky T1, T2, T3, T4 byly izolovány za použití Total RNA Mini Kit (Geneaid).

Nejlépe je vidět vzorek T2, který má dva poměrně ostré proužky 28S a 18S. Vzorky T1, T3 a T4 nejsou téměř viditelné.

Na Obr.12 je uveden výsledek elektroforézy vzorků po přechistění za použití komerčního kitu NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel). Elektroforéza byla provedena za použití barviva GoodView (Invitrogen), byl použit marker Lambda DNA/EcoRI + HinDIII (Thermo Scientific). Vzorky T1, T4 byly izolovány za použití Total RNA Mini Kit (Geneaid), vzorek Z1 byl izolován za použití Direct-Zol RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research) a vzorky CT3, CH1 byly izolovány pomocí fenol-chloroformové metody za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid).



Obr.12 Horizontální agarosová elektroforéza izolované RNA za použití barviva GoodView (Invitrogen), marker Lambda DNA/EcoRI + HinDIII (Thermo Scientific). Označené vzorky T1, T4, byly izolovány za použití Total RNA Mini Kit (Geneaid), vzorek Z1 byl izolován za použití Direct-Zol RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research), vzorky CT3, CH1 byly izolovány pomocí fenol-chloroformové metody za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid).

Vzorky T1 a T4, které byly vizualizovány před přečistěním pomocí horizontální agarosové elektroforézy za použití tablety MIDORI (Nippon Genetics) (viz Obr.11) byly degradovány, což je také vidět i po přečistění na Obr.12. Vzorek Z1 také je degradován, k čemuž došlo v průběhu přečistění vzorku, protože při vizualizaci před přečistěním (Obr.10) vzorek má dva charakteristické proužky.

5. Diskuze

V této bakalářské práci byla provedena izolace RNA z tkání ledvin laboratorních potkanů kontrolních pomocí různých přístupů provedení, jak homogenizace, tak i samotné izolace RNA s následnou kontrolou čistoty a integrity izolované RNA pomocí spektrofotometrického stanovení a horizontální agarosové elektroforézy. Homogenizace byla provedena třemi způsoby, a to v třetí misce za chlazení tekutým dusíkem (viz kap. 3.3.1.1), za použití mikrotloučku (viz kap. 3.3.1.2) a homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema (viz kap. 3.3.1.3). Pro izolace RNA byly vybrány fenol-chloroformová metoda za použití komerční dostupného činidla GENEzol Reagent (Geneaid) (viz kap. 3.3.1.4), komerční souprava Total RNA Mini Kit (Geneaid) (viz kap. 3.3.1.5) a Direct-

Zol RNA Miniprep plus Kit (Zymo Research) (viz kap. 3.3.1.6). Purifikace vybraných vzorků byla provedena za použití komerční sady NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel) (viz kap. 3.3.4). Horizontální agarosová elektroforéza byla provedena za použití barviva SYBR Green II (Invitrogen) (viz kap. 3.3.3.1), GoodView (Amplia) (viz kap. 3.3.3.2) a za použití tablety MIDORI (Nippon Genetics) (viz kap. 3.3.3.3) pro přípravu agarosového gelu, která obsahuje barvivo MIDORI Green.

Tři komerčně dostupné metody byly porovnány z hlediska účinnosti izolace molekul RNA.

Izolace RNA pomocí fenol-chloroformové metody za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid) (viz kap. 3.3.1.4) ukázala čistotu všech vzorků v požadovaném rozmezí 1,8-2 (viz Tab.1, str. 36), což znamená, že vzorky nejsou kontaminovány proteiny. Pravděpodobně vzorky jsou kontaminovány fenolem a guanidin isothiokyanátem, které jsou součástí činidla GENEzol Reagent (Geneaid), jelikož poměr absorbancí 260/230 není v požadovaném rozmezí 2-2,2.

Hodnoty koncentrace RNA za použití komerčního činidla GENEzol Reagent (Geneaid) (viz Tab.1, str. 36) vyšly výrazně vyšší, než za použití ostatních komerčních kitů. Podle vzorce (4) (viz kap. 3.3.2) vysoká hodnota koncentrace může být způsobena přítomností DNA, které absorbuje světlo kolem 260 nm.

Integrita izolované RNA byla zkontrolována pomocí horizontální agarosové elektroforézy za použití komerčního barviva SYBR Green II (Invitrogen) (viz kap. 3.3.3.1, Obr.9) a barviva GoodView (Amplia) (viz kap. 3.3.3.2, Obr.10).

U vzorků CT1, CT2, CT3, CH1, CH2, CH3, CP2, CP3 které byly vizualizovány za použití barviva SYBR Green II (Invitrogen) proužky 28S a 18S nejsou dostatečně ostré. Vzorek CP1 chybí, k čemuž pravděpodobně došlo kvůli chybnému pipetování.

Vzorky byly znovu vizualizovány za použití dalšího barviva GoodView (Amplia) a obrázek vyšel lépe viditelný. Proužky jsou dostatečně ostré u všech vzorků, kromě CT1, CT2, CT3, jelikož barvivo GoodView (Amplia) se nedostalo do spodní části gelu. Vzorek CP3 postrádá proužek 28S, což znamená, že vzorek je degradován. Proužky vzorků CP1, CP2, CH1, CH2, CH3 jsou ostřejší, než proužky stejných vzorků vizualizovaných za použití barviva SYBR Green II (Invitrogen) (viz Obr.9). Horší viditelnost proužků 28S a 18S ukazuje na možnou nevhodnost barviva SYBR Green II (Invitrogen) v daném případě vizualizace RNA po rozdělení vzorků horizontální agarosovou elektroforézou.

Jestli porovnávat barviva podle ceny, 1 ml barviva SYBR Green II (Invitrogen) stojí 20450 Kč bez DPH [52], což je 102,3 Kč bez DPH na jednu vizualizaci (5 μ l na jednu vizualizaci). Cena barviva GoodView (Amplia) činí 48 EUR [53], což je 1219,2 Kč bez DPH podle kurzu České národní banky ke dni 13.08.2021 [54]. Na jednu vizualizaci cena barviva GoodView (Amplia) činí 4,9 Kč bez DPH (4 μ l na jednu vizualizaci) (viz Tab.3).

Přístup k vizualizaci RNA	Cena jedné vizualizace/jedné elektroforézy
barvivo SYBR Green II (Invitrogen)	102,3 Kč bez DPH
barvivo GoodView (Amplia)	4,9 Kč bez DPH
klasická agarosová elektroforéza za použití barviva GoodView (Amplia)	21,5 Kč bez DPH
tablety MIDORI Green Advance (Nippon Genetics)	2,8 Kč bez DPH

Tab.3 Celkové ceny jednotlivých vizualizací za použití barviv SYBR Green II (Invitrogen) a GoodView (Amplia), klasické elektroforézy za použití barviva GoodView (Amplia) a tablety MIDORI (Nippon Genetics).

Barvivo GoodView (Amplia) je levnější alternativa k barvivu SYBR Green II (Invitrogen) a vykazuje lepší vizualizaci integrity RNA v daném případě.

Pro zjištění, který ze způsobů homogenizace je nejúčinnější a nejjednodušší v rámci čistoty provedení, byla homogenizace provedena třemi způsoby, a to v třetí misce za chlazení tekutým dusíkem (vzorky CT1, CT2, CT3) (viz kap. 3.3.1.1), za použití mikrotloučku (vzorky CH1, CH2, CH3) (viz kap. 3.3.1.2) a homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema (vzorky CP1, CP2, CP3) (viz kap. 3.3.1.3).

Homogenizace za použití mikrotloučku vykazala nejvyšší výslednou koncentraci RNA (viz Tab.1, str. 36), která ale vyžaduje aktivní manuální práci. Koncentrace izolované RNA za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema a v třetí misce za chlazení tekutým dusíkem vyšla nižší, než homogenizace za použití mikrotloučku. Homogenizace za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema je nejjednodušší v rámci provedení a ovládnání přístroje, ale prochází v chlazené místnosti při teplotě 4

°C. Taktéž nevyžaduje žádné další chemikálie, na rozdíl od homogenizace v třecí misce za chlazení tekutým dusíkem.

Cena činidla GENEzol Reagent (Geneaid) na 100 stanovení je 4417 Kč bez DPH [55], což je 44,17 Kč bez DPH na jedno stanovení. Metoda vyžadovala přidání chloroformu (Penta), jehož cena je 160 Kč bez DPH na 1000 ml [56], což je 0,032 Kč bez DPH na jedno stanovení (200 µl na jedno stanovení). Cena použitého isopropanolu (Lach-Ner) je 145 Kč bez DPH na 1000 ml [57], což je 0,0116 Kč bez DPH na jedno stanovení (80 µl na jedno stanovení). Byl použit ethanol (Nach-Ler), jehož cena je 555 Kč bez DPH na 1000 ml [58], což je 0,42 Kč bez DPH na jedno stanovení (750 µl na jedno stanovení). Cena ‚RNase-free‘ vody (Invitrogen) je 3460 Kč bez DPH na 1000 ml [59], což je 1 Kč bez DPH na jedno stanovení (290 µl na jedno stanovení). Celková cena na jedno stanovení činí 45,6 Kč bez DPH (viz Tab.4) (z důvodů zanedbatelné ceny nejsou do celkové ceny započítány mikrozskumavky, které jsou ale součástí balení u zbývajících komerčních kitů).

Přístup k izolaci RNA	Cena jednotlivého měření
fenol-chloroformová metoda za použití GENEzol Reagent (Geneaid)	45,6 Kč bez DPH
Total RNA Mini Kit (Geneaid)	105,3 Kč bez DPH
Direct-Zol RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research)	150,5 Kč bez DPH

Tab.4 Celkové ceny jednotlivých měření izolací RNA za použití GENEzol Reagent (Geneaid), Total RNA Mini Kit (Geneaid), Direct-Zol RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research).

Izolace RNA fenol-chloroformovou metodou za použití činidla GENEzol (Geneaid) byla poměrně časově náročná – trvala cca 1,5 hodiny. Byla pracná a vyžadovala práci s organickými rozpouštědly a fenolem, který má leptavé účinky na všechny tkáně v tele. Postup vyžadoval separaci fází, během které může dojít ke kontaminaci RNA vedlejší fází. Výhodou této metody je její poměrně nízká cena.

Izolace RNA za použití komerční sady Total RNA Mini kit (Geneaid) (viz kap. 3.3.1.5) ukázala čistotu o něco větší, než je požadované rozmezí 1,8-2 (viz Tab.1, str.

36). To znamená, že vzorky jsou nepatrně kontaminovány proteiny. Však poměr absorbancí 260/230 každého vzorku je nižší než požadované rozmezí 2-2,2, což ukazuje na kontaminace látkami, které jsou součástí izolační soupravy. V případě izolační soupravy Total RNA Mini kit (Geneaid) kontaminace může být způsobena chaotropní soli, která je součástí pufru „RB Buffer“ a ethanolem, jehož obsahuje promývací pufr „Wash Buffer“. Vzorky T1, T4 ukázali nejnižší poměr absorbancí 260/230 a byly dále přečišťovány.

Koncentrace izolované RNA, která byla homogenizována pouze za použití mikrotloučku (3.3.1.2), vyšla nejnižší ze všech přístupů izolací (Tab.1, str. 36).

Integrita RNA byla ověřena za použití tablety MIDORI (Nippon Genetics) (3.3.3.3, Obr.11), která obsahuje barvivo MIDORI Green. Nejlépe je vidět vzorek T2, který má dva poměrně ostré proužky 28S a 18S, což znamená, že RNA není porušená. Vzorky T1, T3 a T4 jsou pravděpodobně degradované, protože na gelu jsou viditelné pouze 18S proužky.

Barvivo MIDORI Green vykazuje vhodnou viditelnost pro danou metodu. 100 tablet MIDORI (Nippon Genetics) stojí 2760,- Kč bez DPH [60], což činí 2,8 Kč bez DPH na jednu elektroforézu. Metoda za použití tablety MIDORI (Nippon Genetics) je levnější v porovnání s klasickou horizontální agarosovou elektroforézou, protože tableta MIDORI (Nippon Genetics) již obsahuje přesné množství agarosy a barviva MIDORI Green. Celková cena klasické agarosové elektroforézy za použití vhodnějšího v daném případě barviva GoodView (Amplia) zahrnuje cenu barviva GoodView (Amplia) a příslušného množství agarosy. Cena 100 g agarosy je 3320 Kč bez DPH [61], což je 3,32 Kč bez DPH na jednu elektroforézu. Celková cena činí 21,5 Kč bez DPH na jednu elektroforézu (viz Tab.3, str. 44). Taktéž práce s tabletou MIDORI (Nippon Genetics) je méně časově náročná a automatizována, protože nevyžaduje manipulaci s potenciálně toxickým barvivem a s přípravou agarosy.

Cena sady Total RNA Mini kit (Geneaid) na 50 stanovení je 5 210 Kč bez DPH [62], což je 104,2 Kč bez DPH na jedno stanovení. Pro přípravu promývacího pufru „Wash Buffer“ byl použit ethanol (Nach-Ler), jehož cena je 555 Kč bez DPH na 1000 ml [58], což je 1,11 Kč bez DPH na jedno stanovení (2 ml na jedno stanovení). Celková cena na jedno stanovení činí 105,3 Kč bez DPH (viz Tab.4, str. 45).

Výhodou izolace za použití Total RNA Mini kit (Geneaid) je její časová nenáročnost, která je založena na třech krocích – navázání RNA na kolonky s filtrem pomocí chaotropní soli, odstranění všech nežádoucích látek a vyčištění celkové RNA.

Trvala izolace cca 1 hodinu. Nicméně zvýšení rychlosti často snižuje výtěžnost metody. Je to patrné z hodnot čistoty a poměrů absorbancí 260/230, které nejsou v požadovaném rozmezí – pro čistotu 1,8-2 a pro poměr absorbancí 260/230 2-2,2 (viz Tab.1, str. 36). Izolace je ekonomicky relativně výhodná.

Při použití kitu Direct-Zol RNA Miniprep plus (Zymo Research) (viz kap. 3.3.1.6) izolovaná RNA vykazovala požadovanou čistotu v rozmezí 1,8-2 (viz Tab.1, str. 36) kromě vzorku KP3, který je nepatrně kontaminován proteiny. Hodnoty poměrů A_{260}/A_{230} jsou maximálně přiblíženy k požadovanému rozmezí 2,0-2,2. Znečištění může být způsobeno ethanolem, který je součástí pufru „RNA Wash Buffer“ a „Direct-zol RNA PreWash“, fenolem a guanidin isothiokyanátem, které jsou součástí činidla „TRIzol Reagent“.

Ověření integrity RNA bylo provedeno pomocí horizontální agarosové elektroforézy za použití barviva SYBR Green II (Invitrogen) (viz kap. 3.3.3.1, Obr.8) pro vzorky KT1, KT2, KT3, KH1, KH2, KH3, KP1, KP2, KP3 a barviva GoodView (Amplia) (viz kap. 3.3.3.2, Obr.10) pro vzorky Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6. Proužky 28S a 18S vzorků KP1, KP2, KP3 chybí, což znamená, že RNA je zcela degradována. Vzorky KT1, KT2, KT3, KH1, KH2, KH3 jsou lepe viditelné, ale proužky nejsou dostatečně ostré. To může být způsobeno buď nevhodností barviva SYBR Green II (Invitrogen) v daném případě vizualizace RNA, nebo částečnou degradací izolované RNA. Vzorky Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 vizualizované za použití barviva GoodView (Amplia) jsou dostatečně ostré a oba proužky jsou viditelné, což znamená, že integrita nebyla porušena.

Koncentrace vzorků má hodnoty rozptýlené a zaleží na způsobu homogenizace. Pro zjištění, který ze způsobů homogenizace je nejúčinnější a nejjednodušší v rámci čistoty provedení, byla homogenizace provedena třemi způsoby, a to v třetí misce za chlazení tekutým dusíkem (vzorky KT1, KT2, KT3) (viz kap. 3.3.1.1), za použití mikrotloučku (vzorky KH1, KH2, KH3 a Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6) (viz kap. 3.3.1.2) a homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema (vzorky KP1, KP2, KP3) (viz kap. 3.3.1.3).

Nejvyšší výtěžky vykázali vzorky, které byly homogenizovány za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema. Koncentrace vzorků KH1, KH2, KH3 homogenizovaných za použití mikrotloučku jsou nižší, než za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema. Horší výsledky mají vzorky, které byly homogenizovány v třetí misce za chlazení tekutým dusíkem. Nejnižší hodnoty koncentrace mají vzorky Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 homogenizované za použití mikrotloučku. Hodnoty koncentrace těchto

vzorků jsou srovnatelné se vzorky homogenizovanými v třecí misce za chlazení tekutým dusíkem a jsou nižší, než hodnoty koncentrace vzorků KH1, KH2, KH3, které byli taktéž homogenizovány za použití mikrotloučku a vzorků, které byli homogenizovány za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema (viz Tab.1, str. 36).

Cena kitu Direct-Zol RNA Miniprep plus (Zymo Research) na 50 stanovení je 7472,64 Kč bez DPH [50], což je 149,45 Kč bez DPH na jedno stanovení. Byl použit ethanol (Lach-Ner), jehož cena je 555 Kč bez DPH na 1000 ml [58], což je 1,02 Kč bez DPH na jedno stanovení (1,84 ml na jedno stanovení). Celková cena na jedno stanovení činí 150,5 Kč bez DPH (viz Tab.4, str. 45).

Izolace za použití kitu Direct-Zol RNA Miniprep plus (Zymo Research) byla pohodlná a nejméně časově náročná (cca 45 minut), jelikož nevyžadovala žádné zdlouhavé kroky. Avšak se zvýšením rychlosti izolace RNA pravděpodobně došlo ke kontaminaci vzorků ethanolem, fenolem a/nebo guanidin isothiokyanátem. Čistota RNA je poměrně vysoká u každého vzorku, na rozdíl od ostatních použitých metod. Další nevýhodou je její finanční náročnost.

Přečistění vzorků T1, T4, Z1, CT3, CH1 bylo provedeno za použití komerčního kitu NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel) (viz kap. 3.3.4). Vzorky T1, T4 byly izolovány za použití Total RNA Mini kitu (Geneaid) (viz kap. 3.3.1.5), vzorek Z1 byl izolován za použití Direct-Zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research) (viz kap. 3.3.1.6) a vzorky CT3, CH1 byly izolovány pomocí fenol-chloroformové metody za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid) (viz kap. 3.3.1.4). Podle výsledků (viz Tab.2, str. 37) došlo k celkovému snížení koncentrace RNA, hodnota čistoty RNA nepatrně stoupla pouze u vzorků T1, T4. Došlo k významnému snížení poměrů absorbancí 260/230, což ukazuje na další znečistění vzorků během přečistění RNA.

Homogenizace za použití mikrotloučku vykázala nejvyšší hodnoty koncentrace izolované RNA, než ostatní způsoby. Taktéž metoda nevyžaduje doplňkové podmínky, jako je chlazená místnost v případě homogenizaci dle Pottera a Elvehjema a přidávání dalších chemikálií v případě homogenizace v třecí misce za chlazení tekutým dusíkem.

Z porovnávaných postupů izolace RNA vykazuje vesměs nejlepší výsledky souprava Direct-Zol RNA Miniprep plus (Zymo Research), která jediná splnila podmínku čistoty pro poměr absorbancí 260/230. Izolace byla časově nenáročná, automatizovaná, izolovaná RNA splňuje podmínky čistoty jak pro poměr A_{260}/A_{230} tak i A_{260}/A_{280} a její koncentrace je též uspokojující. Pokud ovšem vynecháme kritérium

čistoty v hodnotách absorbancí 260/230, tak pak vychází nejlépe metoda za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid), jelikož izolovaná RNA vykazuje nejvyšší výtěžky koncentrace. Přesto, že izolace RNA za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid) je nejlevnější a izolovaná RNA vykazuje nejvyšší hodnoty koncentrace, než za použití Direct-Zol RNA Miniprep plus (Zymo Research), izolace za použití činidla GENEzol Reagent (Geneaid) byla časově nejnáročnější, vyžadovala zdlouhavé kroky a práci s organickými rozpouštědly a fenolem. Pokud bychom ovšem volili cestu v rámci nejlepšího poměru času a výkonu, tak jednoznačně vychází jako nejlepší kombinace homogenizace v malém homogenizátoru v kombinaci s izolací přes kolonky Direct-zol Miniprep Plus (Zymo Research). V pořadí třetí se umístila souprava Total RNA Mini kit (Geneaid), jelikož izolovaná RNA měla nejnižší koncentrace a nesplňovala podmínky pro poměry absorbancí 260/280 a 260/230.

V daném případě metoda přečištění RNA nebyla účinná a způsobila další znečištění RNA nízkomolekulárními látkami.

Pro přípravu agarosového gelu je nejméně náročná metoda za použití tablety MIDORI (Nippon Genetics), která obsahuje barvivo MIDORI Green, než komerční barvivo SYBR Green II (Invitrogen) a GoodView (Amplia). Je levnější, než klasická horizontální agarosová elektroforéza a nevyžaduje manipulaci s potenciálně toxickým barvivem a s přípravou agarosy. Taktéž barvivo MIDORI Green, které obsahuje tableta MIDORI, poskytuje kontrastnější obrázek a nejlepší ostrost proužků 28S a 18S rRNA.

6. Závěr

V rámci této bakalářské práce bylo dosaženo níže uvedených výsledků:

- Byla úspěšně izolována celková RNA z tkáně ledvin laboratorních potkanů kontrolních, a to za použití konzervativního postupu fenol-chloroformové extrakce, tak i dvou komerčních sad, jako jsou Total RNA Mini Kit (Geneaid) a Direct-zol Miniprep Plus Kit (Zymo Research). Tkáň byla homogenizována třemi způsoby, a to v třetí misce za chlazení tekutým dusíkem, za použití mikrotloučku a za použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema.
- Byla úspěšně provedena charakterizace integrity RNA agarosovou elektroforézou za použití komerčního barviva SYBR Green II (Invitrogen), GoodView (Amplia) a za použití tablety MIDORI (Nippon Genetics) pro rychlou přípravu agarosového gelu, která obsahuje barvivo MIDORI Green.

- Na základě porovnání výsledků bylo vytvořeno doporučení pro homogenizaci a izolaci RNA, a to kombinace homogenizace za použití mikrotloučku. V případě potřeby rychlého izolačního postupu využít komerční soupravu Direct-Zol RNA Miniprep plus (Zymo Research). A v případě časové nenáročnosti využít konzervativní metodu.
- Pro přípravu agarosového gelu s následujícím barvením vzorků poskytl kontrastnější obrázek a nejlepší ostrost proužků 28S a 18S rRNA komerční dostupné tablety MIDORI, které obsahují barvivo MIDORI Green.

Seznam použité literatury

- [1] The Nobel Prize in Chemistry 1989. Dostupné z URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1989/summary/> [cit. 15.08.2021]
- [2] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1993. Dostupné z URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1993/summary/> [cit. 15.08.2021]
- [3] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. Dostupné z URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/> [cit. 15.08.2021]
- [4] The Nobel Prize in Chemistry 2009. Dostupné z URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2009/summary/> [cit. 15.08.2021]
- [5] Crick, F.: *Central Dogma of Molecular Biology*. Nature, 1970, s. 561–563.
- [6] Baker, W. J.; Royer, G. L.; Weiss, R. B. Cytarabine and Neurologic Toxicity. *J Clin Oncol* **1991**, 9 (4), 679–693.
- [7] Hentosh, P.; Peffley, D. M. The Cladribine Conundrum: Deciphering the Drug's Mechanism of Action. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2010**, 6 (1), 75–81.
- [8] Vladilo, G.; Hassanali, A. Hydrogen Bonds and Life in the Universe. *Life (Basel)* **2018**, 8 (1).
- [9] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2., opr. vyd., Praha, Academia, 1996
- [10] Nygaard, V.; Hovig, E. Methods for Quantitation of Gene Expression. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2009**, 14, 552–569.
- [11] Chastain, M.; Tinoco, I. Structural Elements in RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **1991**, 41, 131–177.
- [12] Miao, Z.; Westhof, E. RNA Structure: Advances and Assessment of 3D Structure Prediction. *Annu Rev Biophys* **2017**, 46, 483–503.
- [13] Neidle, S.: *Principles of Nucleic Acid Structure*. Academic Press, 2008.
- [14] Chen, Y.; Varani G. RNA Structure. Encyclopedia of Life Sciences. *John Wiley & Sons* **2010**
- [15] Tinoco, I. J.; Bustamante, C. How RNA Folds. *J Mol Biol* **1999**, 293 (2), 271–281.
- [16] Egly, M.; Flavell, A.; Pyle, A. M.; Wilson, W. D.; Haq, S. I.; Luisi, B.; Fisher, J.; Laughton, C.; Allen, S.; Engels, J. Nucleic Acids in Chemistry and Biology. *The Royal Society of Chemistry* **2006**.

- [17] Auffinger, P.; Grover, N.; Westhof, E. Metal Ion Binding to RNA. *Met Ions Life Sci* **2011**, *9*, 1–35.
- [18] Knapp, G. Enzymatic Approaches to Probing of RNA Secondary and Tertiary Structure. *Methods Enzymol* **1989**, *180*, 192–212.
- [19] Kazantsev, A. V.; Pace, N. R. Bacterial RNase P: A New View of an Ancient Enzyme. *Nat Rev Microbiol* **2006**, *4* (10), 729–740.
- [20] Chawla, H. S. Introduction to Plant Biotechnology. *Science Publishers* **2002**.
- [21] Jin, L.; Kryukov, K.; Suzuki, Y.; Imanishi, T.; Ikeo, K.; Gojobori, T. The Evolutionary Study of Small RNA-Directed Gene Silencing Pathways by Investigating RNase III Enzymes. *Gene* **2009**, *435* (1–2), 1–8.
- [22] Taddeo, B.; Sciortino, M. T.; Zhang, W.; Roizman, B. Interaction of Herpes Simplex Virus RNase with VP16 and VP22 Is Required for the Accumulation of the Protein but Not for Accumulation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (29), 12163–12168.
- [23] Barber, G. N. The NFAR's (Nuclear Factors Associated with DsRNA): Evolutionarily Conserved Members of the DsRNA Binding Protein Family. *RNA Biol* **2009**, *6* (1), 35–39.
- [24] Nygaard, V.; Hovig, E. Methods for Quantitation of Gene Expression. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2009**, *14*, 552–569.
- [25] Fleige, S.; Walf, V.; Huch, S.; Prgomet, C.; Sehm, J.; Pfaffl, M. W. Comparison of Relative mRNA Quantification Models and the Impact of RNA Integrity in Quantitative Real-Time RT-PCR. *Biotechnol Lett* **2006**, *28* (19), 1601–1613.
- [26] Damm, K.; Bach, S.; Muller, K. M. H.; Klug, G.; Burenina, O. Y.; Kubareva, E. A.; Grunweller, A.; Hartmann, R. K. Impact of RNA Isolation Protocols on RNA Detection by Northern Blotting. *Methods Mol Biol* **2015**, *1296*, 29–38.
- [27] Green, M. R.; Sambrook, J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols* **2019**.
- [28] Kuang, J.; Yan, X.; Genders, A. J.; Granata, C.; Bishop, D. J. An Overview of Technical Considerations When Using Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Expression in Human Exercise Research. *PLoS One* **2018**, *13* (5).
- [29] Bustin, S. A.; Benes, V.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W. Quantitative Real-Time RT-PCR—a Perspective. *J Mol Endocrinol* **2005**, *34* (3), 597–601.
- [30] Heller, M. J. DNA Microarray Technology: Devices, Systems, and Applications.

Annu Rev Biomed Eng **2002**, 4, 129–153.

- [31] Nagalakshmi, U.; Wang, Z.; Waern, K.; Shou, C.; Raha, D.; Gerstein, M.; Snyder, M. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science* **2008**, 320 (5881), 1344–1349.
- [32] Bird, I. M. Extraction of RNA from Cells and Tissue. *Methods Mol Med* **2005**, 108, 139–148
- [33] Protokol GENEzol Reagent (Geneaid). Dostupné z URL: <<https://geneaid.com/data/files/1606201218655841537.pdf>> [cit. 10.09.2020]
- [34] Protokol Total RNA Mini Kit (Tissue) (Geneaid). Dostupné z URL: <<https://www.geneaid.com/data/files/1606187380732953444.pdf>> [cit. 10.09.2020]
- [35] Protokol Direct-zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research). Dostupné z URL: <https://files.zymoresearch.com/protocols/_r2070t_r2070_r2071_r2072_r2073_direct-zol_rna_miniprep_plus_kit.pdf> [cit. 24.08.2021]
- [36] Návod na použití spektrofotometru Denovix. Dostupné z URL: <https://www.biolabtech.com.ua/media/shop/files/DS_Family_Broshure_-2018-EN_O0ddlJy.pdf> [cit. 25.08.2021]
- [37] Methods of RNA Quality Assessment. Dostupné z URL: <<https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/>> [cit. 20.02.2020]
- [38] A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. Dostupné z URL: <<http://www.science.smith.edu/cmbs/wp-content/uploads/sites/36/2020/01/A-Practical-Guide-to-Analyzing-Nucleic-Acid-Concentration-and-Purity-with-Microvolume-Spectrophotometers.pdf>> [cit. 20.02.2020]
- [39] Vomelová, I.; Vanicková, Z.; Sedo, A. Methods of RNA Purification. All Ways (Should) Lead to Rome. *Folia Biol (Praha)* **2009**, 55 (6), 243–251.
- [40] Stellwagen, N.C. DNA Gel Electrophoresis. *Springer Lab Manual* **1998**
- [41] Green, M. R.; Sambrook, J. Quantifying and Storing RNA. *Cold Spring Harb Protoc* **2020**, 2020 (3), 101709.
- [42] Schmidt, D. M.; Ernst, J. D. A Fluorometric Assay for the Quantification of RNA in Solution with Nanogram Sensitivity. *Anal Biochem* **1995**, 232 (1), 144–146.
- [43] Singer, V. L.; Lawlor, T. E.; Yue, S. Comparison of SYBR Green I Nucleic

- Acid Gel Stain Mutagenicity and Ethidium Bromide Mutagenicity in the Salmonella/Mammalian Microsome Reverse Mutation Assay (Ames Test). *Mutat Res* **1999**, 439 (1), 37–47.
- [44] Hooper-McGrevy, K. E.; MacDonald, B.; Whitcombe, L. Quick, Simple, and Sensitive RNA Quantitation. *Anal Biochem* **2003**, 318 (2), 318–320.
- [45] Kirsanov, K. I.; Lesovaya, E. A.; Yakubovskaya, M. G.; Belitsky, G. A. SYBR Gold and SYBR Green II Are Not Mutagenic in the Ames Test. *Mutat Res* **2010**, 699 (1–2), 1–4.
- [46] Agarose Gel Electrophoresis. Dostupné z URL: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/rna-protocol/agarose-gel-electrophoresis-of-rna.html> [cit. 10.07.2020]
- [47] Protokol SYBR Green II (Invitrogen). Dostupné z URL: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fmp07568.pdf&title=U1lCUiBHcmVlbiBJSSBSTkEgR2VsIFN0YWlu> [cit. 27.07.2021]
- [48] Protokol GoodView (Amplia). Dostupné z URL: <https://www.amplia.sk/files/documents/protokol-goodview.pdf> [cit. 29.07.2021]
- [49] Protokol MIDORI Green Advance Agarose Tablets (Nippon Genetics). Dostupné z URL: https://www.nippongenetics.eu/app/uploads/2018/10/AG11_Midori-Green-Advance-Agarose-Tablets_manual.pdf [cit. 29.07.2021]
- [50] Protokol NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel). Dostupné z URL: <https://www.mn-net.com/media/pdf/d5/44/b6/Instruction-NucleoSpin-RNA-Clean-up.pdf> [cit. 27.07.2021]
- [51] Cena Direct-zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research). Dostupné z URL: [https://amplicon.webnode.cz/_files/200000141-aeb61aeb64/ZYMO%20cen%20C3%ADk%20platn%C3%BD%20k%201.4.2021\(1\).pdf](https://amplicon.webnode.cz/_files/200000141-aeb61aeb64/ZYMO%20cen%20C3%ADk%20platn%C3%BD%20k%201.4.2021(1).pdf) [cit. 02.08.2021]
- [52] Cena SYBR Green II (Invitrogen). Dostupné z URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S7564#/S7564> [cit. 13.08.2021]

- [53] Cena GoodView (Amplia). Dostupné z URL: https://www.amplia.sk/files/documents/cennik_bezpecna_nahrada_etbr.pdf [cit. 13.08.2021]
- [54] Kurz České národní banky ke 13.08.2021. Dostupné z URL: <https://www.cnb.cz/cs/financni-trhy/devizovy-trh/kurzy-devizoveho-trhu/kurzy-devizoveho-trhu/> [cit. 13.08.2021]
- [55] Cena GENEzol Reagent (Geneaid). Dostupné z URL: <https://shop.krd.cz/products/genezol-reagent-100-ml/> [cit. 02.08.2021]
- [56] Cena chloroformu (Penta). Dostupné z URL: <https://www.pentachemicals.eu/chemikalie/chloroform-403> [cit. 02.08.2021]
- [57] Cena isopropanolu (Lach-Ner). Dostupné z URL: <https://www.lach-ner.cz/produkt/isopropylalkohol/> [cit. 02.08.2021]
- [58] Cena ethanolu (Nach-Ler). Dostupné z URL: <https://www.lach-ner.cz/produkt/ethanol/> [cit. 01.08.2021]
- [59] Cena ‚RNase-free‘ vody (Invitrogen). Dostupné z URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM9932#/AM9932> [cit. 02.08.2021]
- [60] Cena MIDORI Green Advance Agarose Tablets (Nippon Genetics). Dostupné z URL: <https://www.nippongenetics.eu/en/products/electrophoresis-dna-rna/agarose-tablets/agarose-tablets-stain/midori-green-advance-agarose-tablets-100/> [cit. 13.08.2021]
- [61] Cena agarosy (Invitrogen). Dostupné z URL: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/mm/2120op?context=product> [cit. 13.08.2021]
- [62] Cena Total RNA Mini Kit (Geneaid). Dostupné z URL: <https://shop.krd.cz/products/total-rna-mini-kit-tissue-50-izolaci/> [cit. 01.08.2021]