

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Michal Pokorný**

Stabilizace a uchování biologického materiálu a DNA před následnou genetickou analýzou  
Stabilization and storage of biological material and DNA for the subsequent genetic analysis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Vaněk, PhD.

Praha, 2025

## Prohlášení

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

V Praze dne 16. 4. 2025

Podpis: Michal Pokorný

## Poděkování

Chtěl bych poděkovat mému školiteli, RNDr. Danielu Vaňkovi, PhD., za vedení a odbornou pomoc při psaní bakalářské práce, jeho cenné rady, vstřícný a aktivní přístup.

## Abstrakt

Konzervační média určená k ochraně NK před degradací nám umožňují stabilizovat DNA po dobu několika let při pokojové teplotě bez množstevních ztrát nebo narušení její integrity. V některých institucích ale stále přetrvává přesvědčení, že zmražení je nejefektivnějším způsobem skladování DNA. Stejně nebo dokonce i signifikantně vyšší kvality a množství můžeme dosáhnout za určitých podmínek i s použitím jiných metod. Tato bakalářská práce diskutuje jedny z prvních stabilizačních procesů používaných při mumifikacích ve starověkém Egyptě společně se zkoumáním starobylé (ancient) DNA a oborů bioarcheologie zabývajících se analýzou koproilitů a jantaru. Diskutovány jsou i podmínky, které přispívají k degradaci molekuly DNA (teplota, světelné záření, vlhkost, pH, mikrobiální degradace) s konkrétními příklady vlivů způsobujících poškození genetické informace. Hlavní náplní práce je porovnání jednotlivých přístupů při stabilizaci DNA s důrazem na: rozdíl při uchovávání molekuly DNA v ne/přítomnosti stabilizačních činidel, skladování vzorku při pokojové teplotě nebo ve zmražené podobě, a vhodnost metody pro krátkodobou či dlouhodobou konzervaci. V práci jsou dále zmíněny přístupy vedoucí k optimalizaci výtěžku a kvality DNA s důrazem na jednotlivé druhy skladovaného biologického materiálu a detailněji jsou rozebrány tři stabilizační přípravky (trehalóza, DNAsheils a DNA/RNA Shield).

**Klíčová slova:** koproilit, mumifikace, jantar, ancient DNA, degradace DNA, stabilizační médium, vysoušení vzorku, pokojová teplota, zmražení, stabilizace biologických materiálů

## Abstract

Preservation media designed to protect DNA from degradation allow us to stabilize DNA for several years at room temperature without quantitative loss or compromising its integrity. In some institutions, however, the belief still persists that freezing is the most efficient way to store DNA. The same or even significantly higher quality and quantity can be archived under certain conditions using other methods. This bachelor thesis discusses some of the earliest stabilization processes used in mummification in ancient Egypt, along with the study of ancient DNA and the fields of bioarcheology concerned with the analysis of coprolites and amber. Conditions that contribute to the degradation of the DNA molecule (temperature, light, humidity, pH, microbial degradation) are also discussed, with specific examples of the effects that cause damage to genetic information. The main focus of the work is a comparison of different approaches to DNA stabilization, with emphasis on: the difference in the preservation of the DNA molecule in the absence of stabilizing agents, storage of the sample at room temperature or in frozen form, and the suitability of the method for short-term or long-term preservation. The approaches leading to optimization of DNA yield and quality with focus on different types of stored biological material are also evaluated and three stabilizing agents (trehalose, DNAsHells and DNA/RNA Shield) are analyzed in detail.

**Key words:** coprolite, mummification, amber, ancient DNA, DNA degradation, stabilization medium, sample desiccation, room temperature, freezing, stabilization of biological material

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Ancient DNA.....	2
3	Mumifikace .....	3
4	Bioarcheologie – analýza koprolitů .....	5
5	Bioarcheologie – analýza jantaru .....	6
6	Podmínky degradace DNA a obrana proti nim.....	6
6.1	Degradace mikroorganismy .....	7
6.2	Vliv vlhkosti .....	7
6.3	Vliv světelného záření.....	8
6.4	Vliv teploty.....	9
6.5	Vliv pH .....	10
7	Stabilizace NK.....	11
7.1	Želvušky, anhydrobióza.....	11
7.2	Zmrazení vs. vysoušení DNA a biologického materiálu .....	11
7.3	Desikace vzorku.....	13
7.3.1	Trehalóza .....	13
7.3.2	Lyofilizace a sacharidy .....	13
7.4	Akcelerované stárnutí.....	14
7.5	Stabilizační média určená ke skladování DNA při pokojové teplotě (RT) .....	15
7.5.1	DNASHells .....	16
7.5.2	DNA/RNA Shield.....	16
7.6	Metoda skladování podle typu vzorku .....	17
7.6.1	Měkká tkáň .....	17
7.6.2	Feces.....	17
7.6.3	Krev .....	18
7.6.4	Kosti.....	19
7.6.5	Srst, peří .....	20

7.6.6	Sliny.....	20
8	Závěr.....	22
9	Seznam použité literatury.....	23

# 1 Úvod

Nejstarší molekula DNA byla nalezena v zubu mamuta uchovaného v permafrostu, který žil v době asi 1,65 milionů let př. n. l. <sup>1</sup>. Lidská DNA je datována do období 430 000 př. n. l. u předků pozdějších Neandertálců <sup>2</sup>, ale některé studie mluví o stáří vyšším o 100 000 let <sup>3</sup>. To jsou jedny z prvních případů, kdy došlo k uchování DNA přirozenou cestou. Později v období starověkého Egypta byl proces už chtěný, promyšlený a s náboženskou podstatou, kdy při tzv. mumifikacích používali specializované látky jako např. natron.

V těchto dobách samozřejmě nedocházelo k cílenému uchování molekuly DNA. Ta byla totiž objevena až v roce 1869 švýcarským vědcem Friedrichem Miescherem ve směsi s RNA a byla nazvána nuklein. Ten ji považoval za molekulu jednoznačně odlišnou od proteinů, jelikož neobsahovala síru a zároveň nesla velké množství fosforu <sup>4</sup>. Později složení DNA objasnil hlavně Albrecht Kossel, který jako první objevil tři ze čtyř nejběžnějších dusíkatých bází, a to konkrétně adenin <sup>5</sup>, thymin <sup>6</sup> a cytosin <sup>7</sup>. Ještě dříve J. B. Unger objevil poslední dusíkatou bázi, která byla až později nazvána jako guanin <sup>8</sup>. Tato zjištění vedla následně k definování tří základních komponent NK, kterými jsou pětiuhlíkaté cukry, dusíkaté báze a fosfátové skupiny <sup>9</sup>. Dověšením objevů bylo objasněno párování jednotlivých složek (cukr, báze a fosfát) v rámci molekuly DNA. Tato strukturní jednotka byla nazvána nukleotid <sup>10</sup>. Komplementaritu jednotlivých bází určil Erwin Chargaff, který zjistil, že poměr purinových (A, G) a pyrimidinových (C, T) bází je v DNA 1 : 1 a liší se mezi organismy <sup>11</sup>. Celkovou strukturu DNA poprvé popsali Watson, Crick, kteří DNA zobrazili jako dvoušroubovici <sup>12</sup>.

Práce s nosičem genetické informace zažívá rapidní vývoj a setkáme se s ní v aplikovaném výzkumu, medicíně, kriminalistice, forenzních vědách, genealogii, v muzeích a archivech, ale například i při určování paternity. S tím roste i důraz na kvalitu jejího skladování s využitím dostupných metod, které ale nemusí být vždy tak účinné. Bohužel asi nikdy nenalezneme ideální způsob k uchování všeho a napořád, protože každý biologický materiál se chová odlišně a pro obsaženou DNA stanovíme ideální podmínky až při jejím odběru či zpracování se zahrnutím faktorů způsobujících její poškození. Zohledňujeme, jak dlouho chceme molekulu uchovat před opětovným použitím. Od této informace se bude odvíjet další postup, jako je volba teploty, jak se zbavit vlhkosti ve vzorku, rozhodnutí o použití chemických činidel pro ochranu vzorku před možnou mikrobiální degradací (a jejich koncentrace), volba mezi komerčně prodávaným kitem nebo vlastní přípravou stabilizačního média, jakými látkami stabilizujeme pH nebo množství vzorku, které budeme chtít uchovat.

Jak tedy molekulu DNA uchovávat co nejefektivněji? Jednou z možností je ji zmrazit. Proces je ale energeticky, finančně a kapacitou úložných prostor velmi limitující, nemluvě o jeho problémech spojených s výpadky proudu. DNA v digitální formě tyto problémy nemá, ale jeho nevýhodou je

potřeba vysokokapacitního úložiště a nemožnost použití vzorku k další analýze, protože není fyzicky přítomen. Populární se proto stává skladování DNA při pokojové teplotě ve stabilizačních médiích nebo specializovaných kitech, které volíme podle podmínek a délky uchování.

Můj názor na danou problematiku je takový, že mnoho institucí se drží starších postupů, které jsou svou funkčností již dávno překonány. Stejně jako ve všech oblastech vědy je i zde potřeba vytěžit maximum ze současně dostupných metod a dosáhnout tak lepších výsledků. Hlavním cílem bakalářské práce je provést rešerši postupů pro dlouhodobou stabilizaci nukleových kyselin (převážně DNA) a biologických materiálů pro případnou budoucí genetickou analýzu. Kromě popisu hlavních faktorů, které se podílejí na degradaci (jako jsou vlhkost, teplota, světelné záření, pH, přítomnost mikroorganismů), byla provedena kritická analýza v současnosti používaných metod a navrženy alternativní postupy.

## 2 Ancient DNA

S využitím moderních technik jsme schopni studovat starobylou DNA z fosilních záznamů, mumifikovaných těl nebo ze zachovalé měkké tkáně. Mitochondriální DNA (mtDNA), charakteristická svou minimalizací způsobenou nízkým obsahem nekódujících sekvencí, je preferována oproti jaderné DNA<sup>13</sup>. Nespornou výhodou je i vyšší počet kopií, který je pro běžnou savčí buňku kolem tisíce, přičemž u 7000 let staré lidské mozkové tkáně stačilo pouhých 50 kopií k úspěšnému provedení amplifikace<sup>14</sup>. Průlomovým okamžikem pro využití mtDNA bylo definování její celkové sekvence v lidském mitochondriálním genomu<sup>13</sup>. I přesto nejsme schopni přesně určit stáří genetické informace nalezené po milionech let, protože DNA je v těchto případech ze značné části kontaminována bakteriální DNA z dnešní doby. Proces kontaminace může ovlivnit jak mitochondriální, tak chloroplastovou DNA, na jejichž základě nesprávně určíme stáří vzorku<sup>15</sup>.

Hlavní procesy zodpovědné za poškození ancient DNA (aDNA) je možné rozdělit do tří kategorií: zkracování délky jednotlivých fragmentů, poškození zodpovědná za blokaci polymerační aktivity DNA polymerázy a chyby vznikající při replikaci DNA, jako je zařazení nesprávné báze, inserce nebo delece<sup>16</sup>. Fragmentace a ztráta celistvosti DNA není závislá na čase, ale hlavně na rychlosti vysoušení organismu po jeho smrti. Po několika pokusech se získáním úseků DNA o délce 471 bp, 121 bp a 84 bp bylo zjištěno, že amplifikační produkt lze získat z fragmentu o maximální délce 140 bp<sup>17</sup>. Hlavní důvod fragmentace u ancient DNA je depurinace, tedy proces oddělení purinových bází (A, G) od cukr-fosfátové kostry DNA. Po vzniku tzv. apurinního místa trvá štěpení ds DNA za laboratorních podmínek (pH 7,4, 37 °C a dostatečného přísunu  $Mg^{2+}$  iontů) přibližně 190 h, ale při 25 °C a vyšším pH jen několik hodin<sup>18</sup>. Problémem jsou i intramolekulární crosslinky tvořící se ve vysoké míře i za nízkých teplot, častěji než depurinace, a způsobují markantnější poškození aDNA než ss zlomy<sup>19</sup>. Po štěpení molekuly DNA procesem  $\beta$ -eliminace zůstává na 5' konci fosfát a na 3' konci OH skupina. Obecně jsou

na 5' konci zastoupeny cukry s purinovými bázemi, a to hlavně guanin, protože má nižší energetický práh pro narušení N-glykosidické vazby díky své rezonanční struktuře<sup>20</sup>. Dřívější studie ale tvrdí, že častější je depurinace adeninu kvůli možné protonizaci na dusíku N<sub>7</sub> a N<sub>3</sub> vedoucí k větší nestabilitě<sup>21</sup>. Kromě procesu depurinace se můžeme setkat i s depyrimidinací, která je však mnohem pomalejší<sup>22, 23</sup>.

Problém s narušením struktury DNA je převážně způsoben oxidací bází závislé na teplotě, u níž platí, že teplotní rozdíl 20 °C, může vést k 10 až 25násobnému snížení oxidační aktivity v chladnějším prostředí<sup>24</sup>. Běžné oxidace však neovlivní možnost amplifikace DNA, problém je s výskytem hydantoinu, který blokuje elongační aktivitu DNA polymerázy, a právě v neamplifikovatelných vzorcích se vyskytuje ve značně zvýšeném množství<sup>24</sup>.

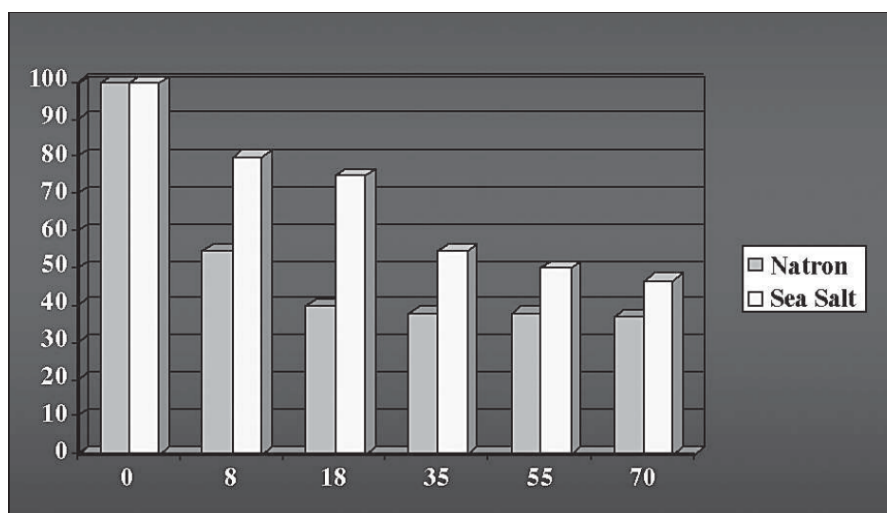
Důležitým faktorem degradace aDNA je také deaminace postihující cytosin. Deaminací C vznikne U, který místo s G tvoří pár s A, což vede k substituci guaninu adeninem<sup>16</sup>. Záměna může vést až k nesprávnému nahrazení deaminovaného C (uracilu) thyminem, který vytvoří pár s A, čímž dojde k celkové záměně původního vazebného páru G–C za pár A–T, přičemž častější je změna C na T než G na A<sup>25</sup>. Dominantní je vždy pouze jeden typ substituce, což může souviset s poškozením aDNA vlivem přírodních podmínek nebo s problémem při PCR, který je způsoben preferenčním zařazením dATP před ostatními nukleotidy, což je typické pro Taq polymerázu<sup>26</sup>. Nesprávnému vložení adenosinu místo guanosinu zabráníme uracil-N-glykosylázou, ta ale odstraněním U vytváří apyrimidinová místa náchylná ke štěpení<sup>25</sup>. Všechny zmíněné procesy lze výrazně zpomalit uchováním DNA v ideálních podmínkách (teplota, pH, vlhkost, ...), kterým se budeme věnovat později.

### 3 Mumifikace

I přes velkou variabilitu přírodních i lidmi zprostředkovaných mumifikací se zaměříme na proces praktikovaný ve starověkém Egyptě. Ten zahrnoval odstranění všech vnitřních orgánů včetně mozku, zachováno bylo pouze srdce, popř. ledviny. Orgány byly odebírány v chirurgicky logickém pořadí řezem na levém boku. Mozek byl téměř jistě odstraňován přes nosní dutinu pomocí měděného drátu s ostrým koncem sloužícím k proražení čichové kosti. Tupým drátem narušili tvrdou plenu, převrátili jedince na břicho a zbylý nevyteklý obsah odstranili tkaninou připevněnou na daném drátu. Zbylé orgány byly umístěny do separátních dóz (viscerálních schránek) a uchovány v natronu<sup>27</sup>.

Natron je látka složená z uhličitanu a hydrogenuhličitanu sodného (typy sody) s příměsí chloridu (kuchyňská sůl) a síranu sodného<sup>28</sup>. Zastoupení chloridu (2–27 %) a síranu sodného (až 39 %) bylo velmi variabilní a mohlo dosahovat i více jak 50 %<sup>29</sup>. Směsí se ošetřovalo tělo mumie, její útroby, orgány a byl nalezen i v použitém (zakopaném) balzamovacím materiálu<sup>30</sup>. Byl využíván ve zředěné formě, aby svým zásaditým charakterem nezpůsobil příliš velké poškození tkáni kyselého charakteru. Pomáhal při

dehydrataci tkání trvající až 70 dní a s vysrážením MK, které byly v reakci s ním neutralizovány. Proces probíhal v kádi s tekutým natronem a po jeho ukončení byly přebytečné krystalky natronu z těla omyty vodou, tkáň dosušena a zbytky natronu odsála gáza po ukončení mumifikace<sup>28</sup>. Při procesu mumifikace byl natron preferován před běžnou mořskou solí vzhledem k jeho efektivnější dehydrataci tkáně. Experimenty s prasečím srdcem prokázaly pokles hmotnosti přibližně o 50 % po desetidenní inkubaci v natronu, zatímco v mořské soli činil úbytek pouze 20 % (Obr. 1)<sup>31</sup>.



**Obr. 1:** Úbytek hmotnosti u prasečího srdce sušeného pomocí natronu v porovnání s mořskou solí po dobu 69 dní při teplotě 37 °C<sup>31</sup>.

Důležitý byl i samotný „balzám“ složený z pryskyřic myrhovníku, jehličnanů nebo řečíku, společně s včelím voskem, rostlinnými oleji a bitumenem<sup>32</sup>. Bitumen byl ve starověkém Egyptě vysoce ceněnou, voděodolnou látkou<sup>33</sup> dováženou z Mrtvého moře ve formě asfaltu, za účelem balzamování mrtvých<sup>34</sup>. Jeho přítomnost byla zjištěna zvýšeným obsahem vanadu a niklu, které najdeme v pryskyřicích pouze ve stopovém množství. V dřevěném dehtu používaném k ředění směsi pryskyřice : bitumen není zastoupen<sup>33</sup>. Použití pryskyřic se lišilo dle dynastie, kupříkladu pryskyřice cedru odpuzovala hmyz a z jeho dřeva se vyráběly i rakve. Látky jako skořice odstraňovaly zápach, protože obsahovaly mnoho aldehydových skupin náchylných k oxidaci<sup>35</sup>. Hena sloužila k barvení, lišejníky měly antibakteriální i antimikrobiální efekt a bránily vývoji larev v útrokách těla, cibule chránila mumii před UV zářením a také měla antimikrobiální účinek<sup>36</sup>. Balzamovací proces probíhal několikrát, vždy po přiložení nové vrstvy gázy<sup>28</sup> namočené do rozehrátého vosku, aby na mumii držela<sup>37</sup>. Proces mohl být dále kombinován s natronem nebo pilinami, ale tato směs mohla být také pouhým odpadním produktem<sup>30</sup>. Vysušené, zabalené a balzamované torzo bylo v případě faraonů umístěno do hrobky po další tisíce let.

## 4 Bioarcheologie – analýza koprolitů

Koprolit byl z paleontologického hlediska fosilizovaný výkal, který mohl být za ideálních podmínek uchován i několik milionů let<sup>38</sup>. Později se ale ukázalo, že prochází spíše částečnou mineralizací nebo může být uchováván vysoušením<sup>39</sup>. Analýzou koprolitů zjistíme stáří aDNA, jako ve skalním komplexu v Oregonu, kde se potvrdilo osídlení lidmi již před 12 300 lety př. n. l. i bez kosterních nálezů<sup>40</sup>. Zkoumat koprolity můžeme na úrovni makroskopické (tvar, konzistence a barva), mikroskopické (přítomnost kosterních úlomků, zbytky nestrávené potravy) i molekulární (zastoupení jednotlivých látek v potravě). Variabilita ve výkalech nám umožňuje rozlišit, zda byl jedinec omnivor, herbivor, karnivor, nebo dokonce jestli výkal patří člověku, psu nebo praseti<sup>41</sup>. V současné době je to nejpřesnější metoda schopná objasnit stravování našich předků. V koprolitech nacházíme zbytky semen, pylových zrn nebo fytolity, mikroskopická tělíčka vzniklá depozicí SiO<sub>2</sub> v různých částech rostlin<sup>42</sup>.

Stěžejní pro formování koprolitu je fosforečnan vápenatý, který se uvolňuje z kostí či zubů a pomáhá se zachováním jednotlivých složek feces, například u krokodýlů<sup>43</sup>. Díky tomu jsou karnivorní koprolity obsahující mineralizující kostěné inkluze mnohem odolnější než herbivorní<sup>44</sup>. Analýzou koprolitů objevíme i stopy po symbiotických mikroorganismech z mikroflóry jedince, které můžeme porovnat s dnešní populací, což nám jinak umožní pouze analýza zubního plaku<sup>45</sup>. Z koprolitů můžeme získat i informace o parazitech, jimiž byl daný jedinec napaden, jako jsou roupy nebo tenkohlavec<sup>46</sup>.

Podmínky okolního prostředí mohou významně zpomalovat nebo urychlovat proces dekompozice. Koprolity není třeba před analýzou ošetřit kyselinou chlorovodíkovou nebo fluorovodíkovou, pokud se nenacházely v lokalitách se zvýšeným obsahem oxidů křemíku nebo uhličitanu vápenatého. Při jejich zpracování je ale doporučeno provést podélný řez, jednu z polovin uchovat pro budoucí analýzu a druhou rehydratovat v 0,5% vodném roztoku fosforečnanu sodného<sup>47</sup>.

Analýzou půdy obsahující koprolity je možné potvrdit osídlení lokality lidmi v minulosti díky zvýšenému množství organických látek, jako jsou lipidy<sup>48</sup>. Záleží i na poměru biomarkerů, kupříkladu lidé mají oproti hospodářským zvířatům hodně sterolů s dominancí epikoprostanolu a koprostanolu jako degradačních produktů cholesterolu. Stejně lze postupovat i u žlučových kyselin s přihlédnutím k času a míře degradace<sup>49</sup>. Záleží i na příjmu fytosterolů, které negativně ovlivňují přeměnu cholesterolu na jeho degradační produkty (koprostanol, koprostanon atd.), a proto je vylučován ve zvýšené míře<sup>50</sup>. Hormony lipidové povahy lze využít i k detekci pohlaví. Výsledný poměr testosteronu vůči estrogeneru ve stolici u čtyř testovaných žen byl nejvyšší (0,2 až 7), pokud byly ve folikulární fázi menstruačního cyklu a u čtyř mužů činil 3 až 118. V porovnání s výsledky paleokoprolitů z pravěké jeskyně (vždy >24) bylo potvrzeno, že vzorky nemohly patřit ženám<sup>51</sup>.

## 5 Bioarcheologie – analýza jantaru

Jantar je fosilizovaná pryskyřice z jehličnatých stromů schopná uchovat vzorky hmyzu (např. komárů) nebo rostlin. Jeho stavební prvky jsou uhlík, kyslík, dusík a výrazně proměnlivý může být obsah síry, pokud je zrovna přítomna<sup>52,53</sup>. I přes značnou variabilitu byl na základě molekulární analýzy rozdělen do čtyř základních skupin<sup>54</sup>. Typická je jeho zvýšená citlivost k oxidativnímu poškození. Po 35 dnech simulovaného stárnutí jantaru při 70 °C v temnu se množství karbonylových skupin, jakožto prekurzorů karboxylových kyselin, signifikantně zvýšilo v kyslíkatém prostředí oproti anoxickému nebo uchování v roztoku, což značí vyšší míru degradace<sup>55</sup>. Anoxické prostředí chrání jantar před poškozením, protože většina jeho ložisek vznikla splavením pryskyřic do řek, kde se usadila, a za těchto podmínek začala jejich fosilizace<sup>56</sup>. Diferenciální termogravimetrická (DTG) analýza potvrdila „zrání“ pryskyřice při zvýšené teplotě, kde byl rozdíl zhruba 21 °C každých 100 milionů let, přičemž čím vyšší byl DTG pík, tím starší byl i vzorek<sup>53</sup>. Vliv UV záření na degradaci jantaru byl dříve přisuzován oblastem mimo UV-Vis (380–750 nm)<sup>57</sup>. Oxidace pomocí UV-Vis byla později potvrzena s dodatkem, že bez proměnlivé vlhkosti prostředí nevede k vzniku prasklin a naopak<sup>58</sup>. Kolísavá a zvýšená vlhkost mohou za nadměrnou hydrolyzu esterových vazeb vedoucí k přeměně na karbonylové skupiny nezávisle na pH. I přesto je doporučeno skladovat jantar za neutrálního pH<sup>59</sup>. Vyšší rozsah absorpce jantaru vede k širšímu barevnému spektru, které klesá stářím a fluktuuje pouze v nízkých vlnových délkách. Vyšší absorpce v modrém spektru vede ke žloutnutí, ale pryskyřice postupem času tmavne až zčerná<sup>58</sup>. Dříve byl jantar uchováván v damarové pryskyřici, která ho chránila před oxidativním poškozením. Bohužel není odolná vůči světelnému záření a časem začíná praskat, žloutnout a ztrácet průhlednost<sup>60</sup>. Dnes se jantar zalévá do běžného čirého epoxidu, nejčastěji Epo-Tek 301–2 (Epoxy technology Inc., USA) a jeho ekvivalentů, které vykazují nejlepší konzervační vlastnosti<sup>61</sup>. Optimálních výsledků docílíme při skladování jantaru v uzavřeném systému bez přístupu kyslíku a světelných paprsků, při optimální teplotě mezi 17–21 °C, neutrálním pH a v prostředí s relativní vlhkostí okolo 45 %<sup>62</sup>.

## 6 Podmínky degradace DNA a obrana proti nim

Biologický materiál při svém krátkodobém/dlouhodobém uchování čelí biotickým a abiotickým faktorům vedoucím k jeho rychlejší a intenzivnější degradaci. Činitelé jsou často propojeni, a tím svůj efekt umocňují nebo naopak inhibují. Degradace nemusí nastat vlivem prostředí, nýbrž v důsledku běžného lidského znečištění. Účelnou kontaminaci očištěných kosterních nálezů dotykem bylo možné odstranit, znečištění slinami a roztokem s cizorodou DNA ale nikoliv<sup>63</sup>. Doba od vzniku znehodnocení hraje také důležitou roli. Důkazem je poškození zubů, které bylo u dříve kontaminovaných vzorků pětikrát vyšší<sup>64</sup>. Největší problém je kontaminace negativní kontroly, díky níž nemusíme odhalit

znečištění vzorků a dále interpretované výsledky poté ztrácí svou hodnotu <sup>65</sup>. My se ale zaměříme na vybrané biologické materiály a procesy poškozující jejich DNA.

## 6.1 Degradace mikroorganismy

Mikrobiální degradace probíhá buď kvůli podmínkám podporujícím růst mikroorganismů, nebo kvůli špatnému skladování vzorku. Bakteriální zastoupení u mrtvol je odlišné v rámci různých částí těla a v pozdějších fázích má tendenci přecházet od aerobních k anaerobním druhům <sup>66</sup>. Analýzou mikrobiální flóry střev, úst, břišní dutiny a výkalů dvou částečně dekomponovaných mužských těl bylo zjištěno velmi abundantní zastoupení bakterií z kmenů Firmicutes a Proteobacteria <sup>67</sup>. Bakterie degradují organické materiály v procesech fermentace nebo respirace, a získávají tím energii. Respirace probíhá na povrchu těl a využívá kyslík k degradaci organických látek na anorganické. Fermentace probíhá uvnitř těl bez kyslíku a přeměňuje např. lipidy pouze na polyhydroxy mastné kyseliny <sup>68</sup>, které mohou být enzymatickou dráhou společně s MK a mýdlem konvertovány na adipocery za pomoci oxo- a hydroxyforem kyseliny stearové a palmitové <sup>69</sup>. Objasnit celkové složení adipoceru se dlouho nedařilo a přítomnost izomeru 9-hydroxystearové kyseliny oproti doložené formě 10-hydroxystearové nebyla potvrzena, a dle mého názoru se jednalo pouze o spekulaci <sup>70</sup>.

Mikrobiální degradace není svým působením omezena pouze na tkáň, ale ovlivňuje i sperma před odběrem ze znásilněné oběti. Semeno je díky svému alkalickému charakteru (pH 7,3 až 7,8 <sup>71</sup>, možné i pH nad 8 <sup>72</sup>) schopné neutralizovat kyselý vaginální povrch (pH 3,5 až 4,5) a nastolit ideální podmínky pro vývoj mikroorganismů <sup>73</sup>. Seminální tekutina obsahuje také N-acetylglukosamin a různé aminokyseliny poskytující mikrobům dusík, a v kombinaci s vlastnostmi spermatu jsou důležité pro filamentaci mikroorganismů <sup>74</sup>. Neplatí však pravidlo, že přítomnost mikroorganismů znamená vždy kontaminaci. Využívají se např. při forenzní mikrobiální analýze, která se kromě bioterorismu a biokriminality zabývá i neúmyslným uvolněním mikroorganismů, se snahou zjistit, odkud pochází <sup>75</sup>.

## 6.2 Vliv vlhkosti

Zvýšená vlhkost často iniciuje a urychluje degradaci DNA <sup>76</sup> procesem hydrolýzy, při kterém dojde k oddělení cukerné složky od báze díky přerušení N-glykosidické vazby, jako v případě deoxyuridinu a thymidinu ve vodném prostředí <sup>77</sup>. Hydrolytické štěpení neprobíhá pouze v hydratovaném stavu, nýbrž i suchém, kde je ale značně pomalejší. Purinové a pyrimidinové hydratované polybazické řetězce polyC a polyA mají hydrolýzu o řád pomalejší než dCMP a dAMP, polyT a dTMP mají opačný vztah a řádově se neliší <sup>78</sup>.

Co ale při odběru environmentální DNA (eDNA) z vodného prostředí? Vzorek skladovaný v chladu (lednici) bez přístupu světla neprojevil ztrátu eDNA po dvou dnech od uložení <sup>79</sup>, ale eDNA produkovaná mlokem (*D. atermimus*) za chladových podmínek bez světla byla detekovatelná i po 18 dnech a vzorky

vystavené světlu a okolní teplotě po prvních třech dnech degradovaly jen minimálně<sup>80</sup>. Poškození DNA závisí i na množství kontaminací přítomných ve vodě a délce fragmentu, přičemž se zvyšující se délkou je úsek DNA ve vlhkém prostředí náchylnější ke štěpení<sup>81</sup>. Dlouhodobé uchování DNA ve vodě je ale nevhodné, protože sliny, krev, kosti a další biologický materiál dosáhly po dvou až čtyřech letech průměrného poklesu koncentrace DNA mezi vzorky 20–85 % z počátečních setin mikrogramů<sup>82</sup>.

Mimo vodní prostor nás zajímá tzv. relativní vlhkost (RH), uvádějící poměr současného obsahu vodní páry ve vzduchu oproti maximálnímu množství. Má kupříkladu vliv na vodivost, kdy NK s větším množstvím G–C párů při relativní vlhkosti 20–50 % mohou změnit svou vodivost až 200krát, zatímco se zvýšeným obsahem A–T párů pouze 50krát<sup>83</sup>. Může ovlivnit i metylaci genů a mít jak hypometylační účinek (např. ICAM-1), tak i hypermetylační účinek (např. Alu). Stejnou schopnost má i teplota, ale vliv teploty a relativní vlhkosti se předpokládá nezávislý, případně sekvenční<sup>84</sup>. Vlhkost a teplota mohou způsobit poškození a modifikace DNA, jako u husího peří, které mělo nejnižší amplifikační výtěžek při vysoké teplotě a vlhkosti, která podporuje také růst mikroorganismů, jež mohly degradaci umocnit<sup>85</sup>.

### 6.3 Vliv světelného záření

UV záření rozdělujeme do tří základních typů: UV-A (320–400 nm), UV-B (280–320 nm) a UV-C (<280 nm). Detekce celého spektra vlnových délek (200–400 nm) potvrdila dopad UV-C záření na zemský povrch v mizivém procentu<sup>86</sup>, a tvrzení o plném pohlcení UV-C ozonem nebo kyslíkem v atmosféře je tedy nepřesné<sup>87</sup>. Působením UV vznikají v DNA pyrimidinové dimery, které se v lidské kůži tvoří nejvíce při vlnové délce 296–302 nm<sup>88</sup>. Nejběžnější jsou cyklobutan-pyrimidinové dimery (CPD), vznikající nejprve saturací dvojnás vazby mezi uhlíky C<sub>5</sub> a C<sub>6</sub> a vzniklý prstenec se následně kovalentně spojí<sup>89</sup>. Na rozdíl od 6-4 fotoproduktů a Dewarových izomerů jsou rezistentnější k buněčné apoptóze a opravám DNA. Zcela nejstabilnějším izomerem je TT-CPD, vznikající pouze působením UV-A záření, jež se podařilo odstranit po 48 h pouze z 55 %<sup>90</sup>. Dimerní struktury vytvořené pyrimidiny nebo méně ochotně i puriny mohou vést ke vzniku přerušení u NK v závislosti na acidolabilitě, zastoupení pyrimidinů v okolí, flexibilitě molekuly a v případě thyminu i na struktuře DNA<sup>91</sup>. CPD dimery mohou v živých buňkách kromě iniciace ss zlomů vést k rozpadu replikační vidličky, inhibici signálních drah a ovlivnění exprese genů zodpovědných za opravy DNA zlomů<sup>92</sup>. UV-A a UV-B vliv na tvorbu pyrimidinových dimerů, oxidativní poškození, modifikaci bází a vznik zlomů je závislý na expozici DNA. Hydratovanou DNA poškodila obě záření, dehydratovanou pouze UV-B a v krvi obsaženou žádné<sup>93</sup>. Pokus s UV-C zářením vedl k zjištění, že k tvorbě dvouřetězcových (ds) zlomů dochází nahromaděním sousedících jednořetězcových (ss) zlomů na kompatibilních vláknech<sup>89</sup>. U volné DNA se tedy prvně vytváří pyrimidinové dimery, poté dochází k oxidativnímu poškození, a nakonec se tvoří ss a ds zlomy dominantně zastoupené u dehydratovaných vzorků<sup>93</sup>.

UV záření je často využíváno při sterilizaci nástrojů nebo prostředí, kde nám dnešní přístroje umožňují zbavit se z velké části i MDR (Multi drug resistance) bakterií, bohužel výsledky může ovlivnit dostupnost povrchů, vzdálenost od zdroje UV-C nebo izolovanost prostoru<sup>94</sup>. Sterilizace pomocí UV navíc není 100% účinná, a v závislosti na technologii sníží koncentraci bakterií o několik řádů<sup>95</sup>. Lepších výsledků docílíme např. použitím vakuum-UV místo běžného UV v bezvodém prostředí<sup>96</sup>. Grampozitivní bakterie *S. epidermidis* prokázala vyšší míru rezistence vůči UV oproti čtyřem testovaným gramnegativním druhům<sup>97</sup>. Zvýšená odolnost je dána robustnější membránou a silnější vrstvou peptidoglykanu, které bakterii obklopují<sup>95</sup>. Spory bakterií jako *B. subtilis* jsou ještě odolnější a k jejich nejefektivnějšímu zneškodnění bylo zapotřebí 21,6 mJ.cm<sup>-2</sup> UV záření o vlnové délce 222 nm. Nezáleží pouze na absorpci DNA v určité vlnové délce, ale i na látkách přenášejících světelnou energii jako kyselina dipikolinová v tomto případě<sup>96</sup>. Bez přítomnosti dalších substancí má absorpční koeficient DNA maximum v 260 nm.

#### 6.4 Vliv teploty

Vliv teploty se z části překrývá s již zmíněnými reakcemi a vede k podobným projevům. Charakteristické je však pro ni formování reactive oxygen species (ROS), kterému brání přítomnost D<sub>2</sub>O prodlužující poločas rozpadu O<sub>2</sub>. ROS jsou přeměněny pomocí superoxid dismutázy na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který je zodpovědný za tvorbu tzv. oxoforem bází jako 8-oxoguanin<sup>98</sup>. U guaninu při vyšší teplotě (37 °C) dochází i k transverzi, tedy změně běžného WC párování<sup>99</sup>, nebo poskytnutím energie 28 kcal/mol z okolního tepla dojde k uvolnění guaninu z DNA, a to 1,4krát rychleji než u adeninu<sup>98</sup>.

Citlivost biologických materiálů k teplotním podmínkám se u jednotlivých vzorků liší. Signifikantní pokles DNA při různé vlhkosti nastal u krve a slin během prvních dnů při 55 °C a mezi 15. až 19. dnem při 37 °C, zatímco odolnější vzorky spermatu nevykazovaly úbytek koncentrace DNA<sup>76</sup>. Při extrémních teplotách (>1000 °C) jsou odolnější tkáně s menším obsahem vody jako zuby, které si oproti kostem dokázaly zachovat 25 % DNA 30 min v 1250 °C<sup>100</sup>. Kostní DNA odolalo nezávisle na míře ředění pouhých 15 min při teplotě 200 °C<sup>101</sup>. Vliv teplotního rozdílu (-70 až 65 °C) na krevní DNA nevedl ani po 26 týdnech k významnému rozdílu degradace mezi -70 až 37 °C, ale vzorek skladovaný v 65 °C zdegradoval za 21 h a po osmi dnech ho nebylo možné analyzovat<sup>102</sup>. Spojení vlivu teploty a relativní vlhkosti působící na uskladněnou DNA ovocných mušek vedlo k vyšší degradaci s rostoucí teplotou a vlhkostí v závislosti na délce expozice, zatímco menší teplotní proměnlivost a stabilní vlhkost signifikantní nebyly<sup>103</sup>.

Teplota je intenzivně studována z hlediska úspěšnosti konzervace vzorků související s přechodem ke skladování při teplotách okolo 25 °C, protože ne vždy platí, že nižší teplota zajistí nižší míru degradace. Sperma skladované v tekutém dusíku (-196 °C) dosáhlo fragmentace dokonce i 10 % u jaderné i mitochondriální DNA<sup>104</sup> s podobnými výsledky u neplodných mužů<sup>105</sup>. Navíc molekula DNA

překonávající větší teplotní rozdíl po 18 cyklech rozmrazení z  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla více fragmentovaná v závislosti na původní délce úseku a koncentraci DNA <sup>106</sup>. Názory o vlivu zmražení na integritu DNA se velmi liší, a například Isachenko uvádí, že rychlost zamražení vzorku procesem vitrifikace nebo postupným zamražením nemá vliv na degradaci DNA <sup>107</sup>.

## 6.5 Vliv pH

Hodnoty pH mimo neutrální oblast zrychlují proces hydrolýzy. Při kyselém pH jsou báze DNA v reaktivnější (protonované) formě a při alkalickém pH přechází do méně reaktivní (aniontové) formy, kde vyšší pH účinkuje pouze na deoxyguanosin a deoxythymidin <sup>108</sup>. Hydrolytická aktivita deoxyadenosinu je 2,2krát vyšší při  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  než u deoxyguanosinu, který je oproti guanosinu při  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  520krát méně stabilní. To znamená, že nezáleží pouze na hodnotě pKa, ale i na teplotě a iontové síle <sup>109</sup>. Hodnota pKa je totiž vyšší u adeninu, což by značilo jeho vyšší reaktivitu <sup>110</sup>, ale s objevem tří pKa vrcholů u adeninu i guaninu by mohl být i tento vztah nepřesný <sup>111</sup>. Vychýlené pH je problémem i při opravě špatně zařazených bází pomocí mismatch repair, kdy adenin a cytosin jsou stabilizovány v protonované formě nejlépe při pH 5,5, ale vzniklé chybné páry A–A a T–C při nízkém pH stabilizovány nejsou <sup>112</sup>. Po odštěpení báze v DNA působí na řetězec za alkalických podmínek  $\beta$ -eliminace a u RNA navíc vznikají cyklofosfáty.  $\beta$ -eliminace u DNA probíhá 154krát rychleji než u RNA, které je i po zahrnutí cyklofosfátů 16,8krát stabilnější než DNA, pravděpodobně díky přítomnosti OH skupiny na uhlíku C<sub>2</sub> <sup>113</sup>.

DNA si během denaturace zachovává molekulovou hmotnost, ale vznikem intermolekulárních vazeb oproti intramolekulárním v ds formě se zkompaktní jak při kyselém, tak zásaditém pH <sup>114</sup>. Vzniklá ss DNA vlásenka v přítomnosti LiOH a NaOH s pH 12,5 a 13 začala degradovat po 5, resp. 30 min, a po 30, resp. 60 min již nebyla detekována. Fragmentace nastala ale pouze po přidání uracil-DNA-glykosylázy, která vytvořila alkalicky labilní místa <sup>115</sup>. Stabilita DNA při pH 3,3 a teplotě  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla nižší díky pozici 3'-5' fosfodiesterové vazby v porovnání s TNA s 2'-3' fosfodiesterovou vazbou, která je odolnější vůči  $\beta$ -eliminaci, protože destabilizuje oxokarbeniový ion <sup>116</sup>. Kyselé pH vlivem přechodu z 0,1 na 200 MPa pokleslo z 4,6 na 4,3 a lépe stabilizovalo i-motiv. Nižší pH by ale způsobilo dvojitou protonaci C, případně pH značně vyšší než neutrální jeho deprotonaci, což by i-motiv destabilizovalo <sup>117</sup>. Deprotonace při vysokém pH mění poměr A–T : G–C, snižuje  $T_m$  u spiralizované formy DNA, ale zvyšuje  $T_m$  u šroubovicové formy. Při hodnotě pH 8 a vyšší začne  $T_m$  G–C páru ( $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) klesat a kolem pH 10,3 dosáhne plató, u páru A–T ( $69,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) začne  $T_m$  klesat později, ale po překročení 10,3 klesá stále <sup>118</sup>.

## 7 Stabilizace NK

Pro maximalizaci ochrany našich vzorků je nutné uvažovat o délce skladování a zdali uchováme DNA izolovanou nebo jako součást biologického materiálu. Tělním tekutinám, stěrům nebo částem tkání budou totiž vyhovovat jiné přístupy zajišťující různou míru ochrany jejich DNA.

### 7.1 Želvušky, anhydrobióza

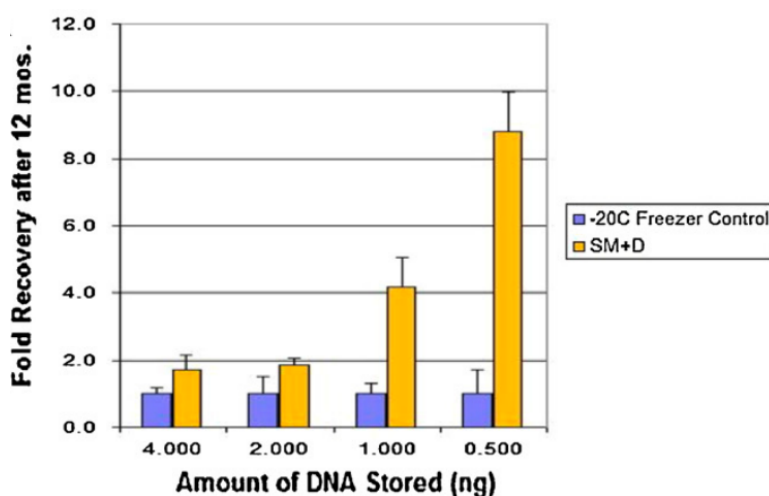
V přírodě se přirozeně vyskytuje proces desikace, který pomáhá zachovat integritu DNA, a jeho typickým příkladem je anhydrobióza probíhající u želvušek. Želvušky nepoškozuje samotný proces vysychání, ale spíše doba, po kterou se v tomto metabolicky omezeném stavu vyskytují. Délka anhydrobiózy dva dny, šest týdnů a deset měsíců vedla ke stoupající míře fragmentace DNA od 2 % přes 13 % až k 23 %, což značí postupnou akumulaci poškození v čase <sup>119</sup>. To dokazuje, že i takto odolné organismy nepřežívají staletí v tomto stavu, jak se dříve myslelo, ale fakticky můžeme uvažovat spíše o desetiletích <sup>120</sup>. Dle dostupných informací nejstarší vzorek želvušky, přivedený zpět z anhydrobiózy do plně metabolicky funkční podoby, byl 20letý exemplář *Echiniscus testudo* <sup>121</sup>.

Mechanismus anhydrobiózy je založen na akumulaci disacharidu trehalózy. Jeho běžná úroveň u aktivních jedinců je 0,1 %, zatímco po sedmi hodinách vysoušení se dostane na 2,3 %, a tato hodnota je již neměnná. Počátkem hydratace začne i postupná degradace trehalózy na původní úroveň <sup>122</sup>. Dřívější názor, že trehalóza poskytuje vodíkové vazby důležité pro stabilitu proteinu v bezvodém prostředí přímou interakcí s proteinovou molekulou <sup>123</sup>, již neplatí. Anhydrobióza myoglobinu potvrdila, že nedochází k přímému napojení molekul trehalózy na daný protein, nýbrž je pod ním jedna či dvě vrstvy molekul vody <sup>124</sup>. Hlavní stabilizační funkcí trehalózy je, že dokáže přerušit interakci vodíkových vazeb v molekule vody, což vede ke snížení hladiny teploty nezbytné pro formování krystalů vody, které by způsobily poškození biologických struktur. Její funkce roste při koncentraci vyšší než 30 %, a v porovnání s ostatními disacharidy se jeví jako nejúčinnější kryoprotektant <sup>125</sup>. Podobných výsledků bylo dosaženo i u myoglobinu, kdy při použití různého množství trehalózy voda nezačala krystalizovat, dokud její obsah ve vzorku nebyl vyšší než 33 % <sup>124</sup>.

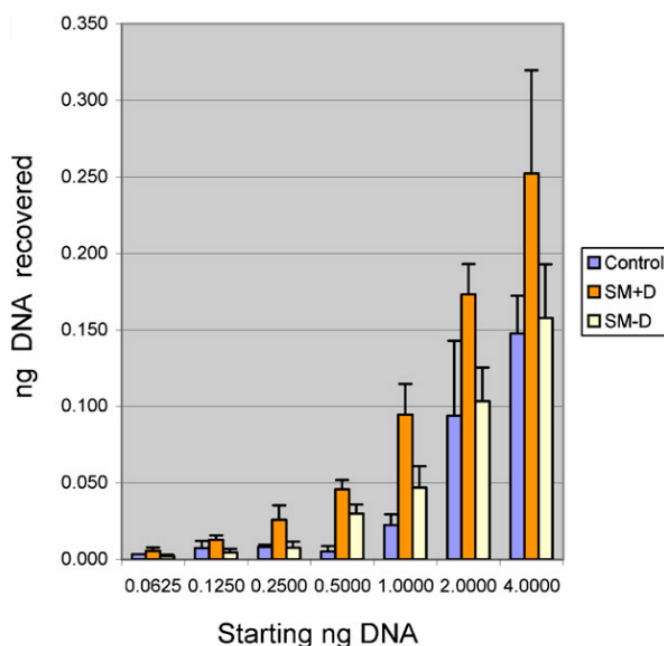
### 7.2 Zmrazení vs. vysoušení DNA a biologického materiálu

Vzorky skladované při pokojové teplotě (RT) podléhají před analýzou procesu hydratace, zatímco při nízkých teplotách dochází k jejich rozmrazení. Otázkou zůstává, který z těchto přístupů (opakovaná hydratace či rozmrazení) má negativnější dopad na integritu DNA. Výsledkem studie pracující s teplotami  $-10\text{ °C}$  až  $-192\text{ °C}$  bylo, že rozmrazování nemá vliv na ds strukturu DNA <sup>126</sup>. Později se ale potvrdil vliv mrazících cyklů související s délkou fragmentu, koncentrací vzorku a zastoupením bází, kdy T oligomery jsou nejodolnější a G oligomery nejcitlivější bez započtení ionizační energie. Pomalé zmrazení je dle výsledků pětikrát destruktivnější než zmrazení v tekutém dusíku <sup>127</sup>. Naopak při uchování

DNA v médiu SampleMatrix (SM, Biomatrix, USA) byl jeho výtěžek oproti kontrole zmražené v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dvakrát až desetkrát vyšší (Obr. 2), v závislosti na přítomnosti vysoušedla (Obr. 3), s důrazem na zvýšenou ochranu vzorků s nízkým obsahem DNA <sup>128</sup>.



**Obr. 2:** Množství DNA po jednom roce skladování v médiu SampleMatrix (SM) při RT společně s vysoušedlem (D) v porovnání s kontrolním vzorkem zmraženým na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  <sup>128</sup>.



**Obr. 3:** Průměrný výtěžek DNA (ng) pro jednotlivé počáteční hmotnosti vzorků (ng) po jednom roce skladování při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (control) a při RT v SampleMatrix (SM) médiu s vysoušedlem (SM+D) nebo bez vysoušedla (SM-D) <sup>128</sup>.

Jiná média GenTegra (Genvalut, USA) a QIASafe (Qiagen, USA) obstála za podobných teplot v porovnání s kontrolní DNA, zamraženou na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , protože po třech hydratačních cyklech nebyl mezi skladovacími metodami rozdíl v obsahu DNA. Ani po jedné hydrataci malého množství DNA (0,15 ng/μl) po

šestiměsíčním skladování za stálých podmínek se rozdíl neprojevil, ale účinnost byla vyšší u GenTegra (111 %) oproti QIAsafe (78 %) <sup>129</sup>. QIAsafe neobstál ani při uchování mixované DNA tří lidí o množství 150 pg po dobu dvou let při RT, protože docílil signifikantní ztráty DNA 28 %, tedy pro dlouhodobé uchování malých množství DNA není vhodnou variantou <sup>130</sup>. I když se GenTegra zdá být ideální možností, její pokles STR signálů za výše zmíněných podmínek byl 40 % a u QIAsafe 48 % oproti zmražené DNA <sup>129</sup>. Naopak DNA skladovaná při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  poskytla identifikační profily pachatelů k přezkoumání a porovnání i po devíti až 18 letech <sup>131</sup>. Volba stabilizačních podmínek závisí na předem definovaném způsobu následného zpracování vzorku.

### 7.3 Desikace vzorku

Vysoušení představuje jednu z fází předcházejících procesu skladování DNA při pokojové teplotě. Porovnáním vysoušení eDNA pomocí silikagelových kuliček a filtrů namočených v ethanolu zjistíme, že efektivita uchování je při nižších teplotách po 15 měsících prakticky totožná, zato při teplotě  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  si vedou lépe silikagelové kuličky <sup>132</sup>. I po týdenním skladování byl největší obsah DNA ve filtru sušeném v silikagelu a potvrdila se i vyšší výnosnost DNA z celulóзовých filtrů oproti polyethersulfonovým filtrům <sup>133</sup>. Vysušování silikagelem by mohlo být výhodné i pro mikrobiální DNA na rostlinných vzorcích, ovšem s důrazem na krátkodobost uchování <sup>134</sup>. To jsou možnosti využívané v terénu, v laboratoři se vody ve vzorku zbavíme pomocí přístrojů s laminárním prouděním vzduchu, které jsou relativně levné, dostupné, ale ne vždy vhodné. DNA ve spermatu lamy, po 30 min sušení a 60 dnech uchování při teplotě  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mělo již po sedmi dnech významně vyšší míru fragmentace než kontrolní, nevysušený vzorek <sup>135</sup>.

#### 7.3.1 Trehalóza

Na základě poznatků o ochranné funkci trehalózy u želvušek, kde napomáhá stabilizaci biomolekul v extrémních podmínkách, se začala využívat jako stabilizační činidlo i pro molekulu DNA. Ceněná je hlavně díky své vysoké  $T_g$  teplotě ( $107\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), např. oproti sacharóze ( $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Teplota je ale v řádu jednotek variabilní v závislosti na dokonalosti vysoušení vzorku, a pokud by došlo ke zvýšení vlhkosti o 0,5 %, hodnota  $T_g$  by mohla poklesnout až o  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  <sup>136</sup>. Za přítomnosti albuminu byl naopak potvrzen nárůst  $T_g$  teploty, stanovené na  $108\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trehalózy, v níž byly skladovány savčí buňky. Bohužel žádné další vlastnosti ovlivňující stabilitu DNA nebyly u albuminu pozorovány <sup>137</sup>. Nevýhodou u trehalózy může být její závislost na pH. Acidita tělní dutiny želvušek ovlivňovala rychlost odbourávání trehalózy, jež se běžně vrátí na původní úroveň přibližně po šesti hodinách, ale v prostředí se 20 %  $\text{CO}_2$  její koncentrace zůstala po šesti hodinách na stejné úrovni <sup>122</sup>.

#### 7.3.2 Lyofilizace a sacharidy

Lyofilizace (sušení mrazem) je vhodná pro vzorky uchované při RT nebo zamražené, přesto má několik limitací. U plazmidové DNA došlo po lyofilizaci k 75% snížení její bioaktivity, strukturním změnám

v důsledku denaturace a změně v teplotě tání. Projevům zamezily sacharidy, které vzorek ochránily beze ztrát při koncentraci 4000 : 1, zatímco u koncentrace pod 4 : 1 nebyl pozorován žádný znatelný vliv<sup>138</sup>. Jejich důležitost byla prokázána i u DNA-lipidových komplexů, které se v přítomnosti glukózy po dvou letech v suchém stavu shlukly, ale při inkubaci s neredukujícími sacharidy (trehalóza, sacharóza) nikoliv. Přesto u všech tří typů stabilizačních médií došlo k nárůstu ROS, a to 212krát u glukózy, 39krát u sacharózy a pouze osmkrát u trehalózy, nicméně proti formování ROS nejsou schopni DNA plně ochránit<sup>139</sup>. Rapidní nárůst konformačních změn u DNA a až 100krát snížená exprese genů byla pozorována u polyplexů bez použití sacharidů. S použitím těchto stabilizátorů je lyofilizace vhodná k uchování DNA, ale nedokáže zabránit vlivu vysokých teplot při transfekčních manipulacích s DNA<sup>140</sup>.

Koncentraci těchto stabilizačních látek nelze považovat za univerzální, neboť záleží na typu použitého sacharidu, poměru koncentrace DNA k sacharidu, a zda je DNA v komplexu s jinou molekulou. Pro uchování DNA s koncentrací 8 µg/ml a 40 µg/ml v komplexu s L- $\alpha$ -dioleoylphosphatidyl-ethanolaminem a 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propanem bylo zapotřebí 1250krát větší množství sacharózy než DNA<sup>141</sup>. Důkazem velkého rozptylu koncentrací je třítydenní uchování DNA v komplexu s transferin-polyethyleniminem, kdy bylo zapotřebí na každých 10 µg DNA 100 mg sacharózy<sup>142</sup>. I po použití požadovaného množství stabilizátoru je nutné nezapomenout na faktor spojený se sušením mrazem, tedy tzv. nezamrzající vodu. Ta dokáže přetrvat u lipidů při teplotě -20 °C v poměru 7 : 1 molekul vody vůči lipidu<sup>143</sup>, ale nežádoucí vliv by mohla mít i na DNA.

#### 7.4 Akcelerované stárnutí

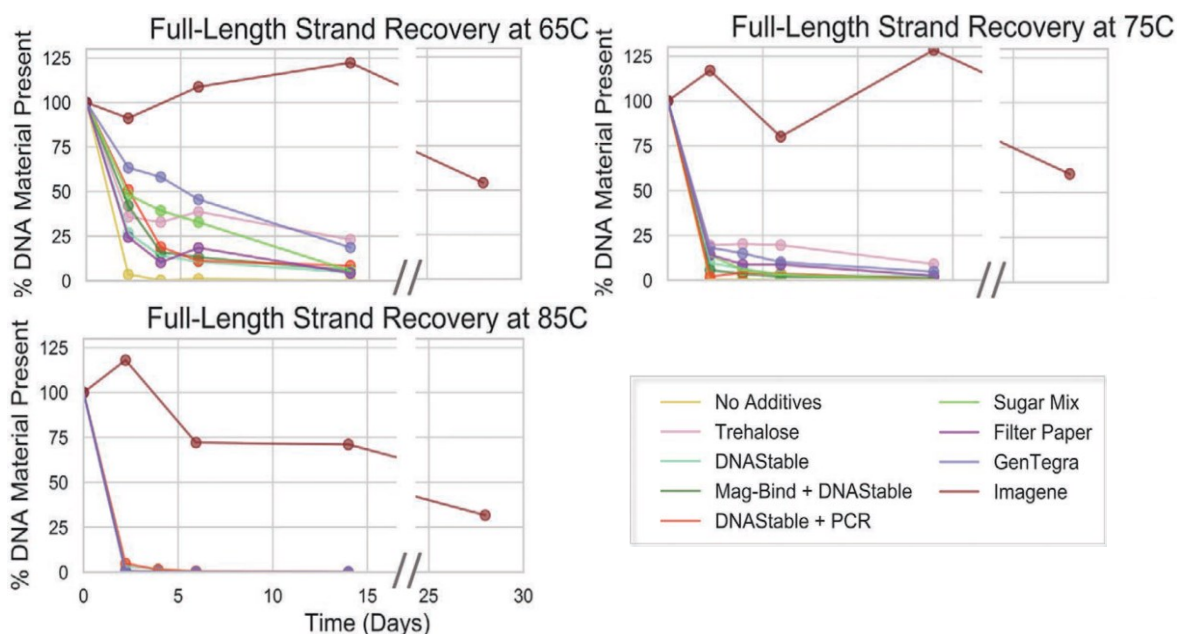
Akcelerované stárnutí je metoda simulující prodlouženou dobu skladování tím, že zvýšíme teplotu nad rámec hodnoty, které bude vzorek vystaven, a tím urychlíme jeho stárnutí. Design experimentu závisející na požadované délce uchování a materiálu se řídí tzv. desetistupňovým pravidlem, které nám říká, že zvýšením teploty o 10 °C dosáhneme dvakrát rychlejší degradace<sup>144</sup>. Jaký je ale vlastně rozdíl v akcelerovaném stárnutí oproti běžnému?

U vzorků krve uchovaných na FTA kartách a v mikrozkrumavkách byl prokázán vliv zvýšené teploty na akceleraci stárnutí. Obě metody disponovaly zvýšenou ochranou pro různě dlouhé fragmenty DNA, kdy korelace dějů byla nejvíce patrná u fragmentů v rozmezí 1000 až 5000 bp<sup>145</sup>. Zrychlené stárnutí je logicky spojeno i s vysycháním a jejich kombinace způsobuje hlavně dysbalanci redoxního potenciálu a oxidativní poškození. Hladina 5-metylcytosinu v rostlinné DNA byla po 72 h při 45 °C poloviční (5,56 %) oproti původní (11,9 %) s konstantním poklesem, zatímco 8-oxoguanin měl opačný trend s výslednou koncentrací 4,6krát vyšší<sup>146</sup>. Vzorky vysušené DNA z krve, semene, slin a vaginálních stěrů uchované 548 dní při RT, 194 dní při 37 °C a 76 dní při 50 °C se od sebe nelišily natolik, aby bylo konstatováno, že se metody běžného a akcelerovaného stárnutí odchyľují. Největší odolnost vůči

degradaci prokázaly vaginální stěry a semeno, a nejcitlivější byly vzorky slin <sup>147</sup>. Sušenou krevní DNA dlouhou 273 bp a 1600 bp bylo možné amplifikovat při 100% vlhkosti a 45 °C po dobu osmi měsíců v obou případech, ale při 55 °C a 65 °C pouze tři měsíce u kratšího a jeden měsíc u delšího fragmentu <sup>148</sup>.

## 7.5 Stabilizační média určená ke skladování DNA při pokojové teplotě (RT)

Skladování DNA při RT je nejen šetrnější k životnímu prostředí, ale také efektivnější z hlediska spotřeby energie, finančních nákladů a prostorových požadavků. Jeho popularita vzrostla hlavně s vyvinutím dostupných stabilizačních médií, jako byl SampleMatrix (SM) od společnosti Biomatrix, USA. SM byl schopný konzervovat DNA čtyři roky při 56 °C nebo RT s lepšími výsledky než trehalóza, polyvinyl alkohol nebo zmrazení (-20 °C), oproti němuž ale dosahoval menšího počtu delších úseků DNA <sup>149</sup>. Médii a přístupů k uchování DNA je nespočet a záměrem práce není tvorba jejich seznamu dle efektivity. Jejich účinek často ani nelze porovnat kvůli rozdílům v době stabilizace, počáteční koncentraci DNA, míře poškození, kterému byla NK vystavena, nebo náročnosti extrakce vzorku z daného média. Příkladem může být srovnání devíti stabilizačních médií za podmínek akcelerovaného stárnutí v teplotách 65 °C, 75 °C a 85 °C po dobu 14 dní (Obr. 4). Za daných podmínek bylo DNA uchováno nejdéle v kapslích DNAsheils (Imagene SA, Francie). Metoda GenTegra a trehalóza se prakticky nelišily, a nejhoršího výsledku dosáhla samotná, dnes již nevyráběná látka, DNASTable (Biomatrix, USA) <sup>150</sup>, což by bylo v rozporu se zmíněnou studií <sup>149</sup> bez přihlídnutí k průběhu experimentu.



**Obr. 4:** Míra degradace DNA pro devět jednotlivých přístupů, vyjádřená v procentech fragmentů, které si zachovaly svou plnou délku během 14denního akcelerovaného stárnutí při 65 °C, 75 °C a 85 °C. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí qPCR <sup>150</sup>. Uspořádání grafů bylo vlastnoručně upraveno pro potřeby práce.

### 7.5.1 DNAs shells

Skladování DNA v hermeticky uzavřených nerezových kapslích tzv. DNAs shells (Imagene SA, France) je v současné době asi nejúčinnější metodou pro uchování vysušené DNA. Akcelerovaným štěpením DNA při teplotách 100 až 140 °C bylo vypočteno, že ke vzniku zlomu u DNA uchované v kapsli dojde jednou za 100 let na 100 000 bází, to znamená, že 150 bp fragment by byl při RT zcela rozštěpen za přibližně 38 000 let, což je o tři řády lepší výsledek než u jakékoliv jiné metody<sup>151</sup>. Kapsle neprokázaly pokles koncentrace DNA ani při uskladnění po dobu 18 měsíců při RT v porovnání se zmrazenou DNA a zkumavkami GenTegra. Výsledky akcelerovaného stárnutí, odpovídající skladování 100 let při 25 °C, byly pro DNAs shells a GenTegra stejné u vysušených vzorků, nicméně při RH 50 % byly DNAs shells významně účinnější. Po jednom měsíci v teplotních extrémech klesla koncentrace DNA v kapslích na 30–90 % oproti kontrole, a k dosažení vyššího výtěžku bylo zapotřebí trehalózy<sup>152</sup>. DNAs shells ochránily i vzorky DNA z plic a střev jedinců postižených mutacemi, vystavené 76 °C po dobu 15 h, bez rozdílu od mrazem uchovaných vzorků, stejně jako počty SNP v DNA *L. monocytogenes*<sup>153</sup>. Kapsle je možné kombinovat s magnetickými nanočásticemi prokládanými vrstvami SiO<sub>2</sub> kvůli stabilizaci, kdy výsledné množství DNA může tvořit až 3,4 % hmotnosti kapsle. Nejvíce DNA pojmuly nanočástice po nanesení čtyř dvojvrstev DNA–křemík, a v podmínkách zrychleného stárnutí při 70 °C a 50 % RH zachovaly minimálně 89,5 % DNA o délce 186 bp intaktní<sup>154</sup>. DNAs shells také neovlivňují absorpci DNA v oblasti 260/230 nm<sup>152</sup>, nicméně jeho příprava je časově náročná, proto je v terénu zapotřebí využít jiných možností (DNA/RNA Shield).

### 7.5.2 DNA/RNA Shield

Stabilizační přípravek DNA/RNA Shield (Zymo Research Corp., USA), uchovávající mikroorganismy žijící v ledu a sněhu, poskytuje stabilizaci srovnatelnou se zmražením v tekutém dusíku a také více než dvojnásobný výtěžek (132 ng/μl oproti 56 ng/μl), který není tolik závislý na množství přefiltrovaného vzorku<sup>155</sup>. Kvalitu konzervace potvrdil i při stabilizaci půdní mikrobiální kultury oproti vzorku bez média či pufru za skladovacích teplot –180 °C, –20 °C, 4 °C a 23 °C po dobu jednoho měsíce. Nejvyšší účinnost měl při 23 °C, zatímco v teplotách –20 °C a 4 °C dosahoval lepších stabilizačních vlastností solný pufr DESS<sup>156</sup>. Ale i vlastnoručně vyrobený stabilizační pufr pro NK (NAP)<sup>157</sup> dokázal ochránit DNA dokonce lépe než komerční DNA/RNA Shield. Skupina po desetidenní stabilizaci fekálních stěrů uvedla, že nejlepší je stěry zamrazit samotné, pokud byl ale zapotřebí pufr, NAP dosahoval lepších výsledků při zmražení než DNA/RNA Shield. Tento přípravek je ale preferován jako vhodná varianta pro skladování při RT<sup>158</sup>. Výhodou přípravku DNA/RNA Shield je vyšší míra stabilizace NK s částečným narušením. Svalová tkáň z čerstvé a částečně dekomponované mrtvolky byla uložena do DNA/RNA Shield po dobu tří měsíců při teplotě 25 °C a 35 °C. Přípravek si po celou dobu experimentu zajistil stabilní výtěžek a bylo z něj možné analyzovat kompletní STR profily obětí i po třech měsících, kromě tkáně

dekomponované při 25 °C (96 %), a svým výsledkem předčil i specializovaný pufr<sup>159</sup>. Dle názvu je médium schopné uchovat i RNA, a proto bylo hojně využíváno během SARS-CoV-2 pandemie. Při uchování výtěrů z nosohltanu v médiu DNA/RNA Shield, NAT (nucleic acid transport), VMT (virus transport medium), Ezmedlab (Ningbo EZ Medical Instruments Co., LTD., Čína) a fosfátovém pufru vykazoval DNA/RNA Shield jak nízké C<sub>q</sub> hodnoty (15,15 a 25,15), tak vysokou kvalitu a kvantitu skladované DNA (>7000 RFU). K uchování koronaviru lze využít všechna média, ale u fosfátového pufru je zapotřebí tepelná inaktivace viru<sup>160</sup>.

## 7.6 Metoda skladování podle typu vzorku

Zmražení je často preferovanou volbou stabilizace DNA vzorků, ale nemusí být v každé situaci nezbytné. Zaměříme se na data ilustrující skladovací podmínky pro krev, měkkou tkáň, kosti, sliny, feces a další.

### 7.6.1 Měkká tkáň

Kvalita DNA střevní tkáně skladované při -80 °C ve třech typech médií (DNA/RNA Shield ad.), inkubovaných 24 h, 72 h a jeden měsíc při 4 °C před uskladněním v -20 °C, byla srovnatelná. Média jsou tedy vhodnou variantou pro krátkodobé skladování v chladu nebo transport<sup>161</sup>. Integritu DNA je možné zachovat i déle, kdy buňky ústní dutiny uložené v pufrch TENT (Tris-EDTA-NaCl-Tween20), DESS (dimethyl sulphoxid disodium-EDTA-saturated NaCl) a PBS (phosphate-buffered saline) zajistily výtěžky nad 10 µg/ml 30 dní při 4 °C, což bylo více než při RT. DESS si zachoval nejvyšší čistotu DNA za obou teplotních podmínek a dle výsledků je schopný stabilizovat vzorek po dobu 90 dní při 4 °C a 30 dní při RT<sup>162</sup>. I po přidání lyzačního pufru zůstala DNA neporušená, na rozdíl od vzorků skladovaných při RT a 4 °C před jeho aplikací. Na kvantitu DNA však signifikantní vliv neměl<sup>163</sup>.

Stabilizace při pokojové teplotě není z hlediska dosažených výsledků horší než jiné přístupy. Kvalita DNA extrahované z lyofilizovaných buněk rakoviny prsu, skladovaných jeden rok při RT, se vzhledem k zmražené kontrole nelišila, ale k dosažení kompletního profilu jak DNA, tak i RNA je zapotřebí vzorek skladovat v temném prostředí a s vysoušedlem<sup>164</sup>. Ochranné vlastnosti médií jsou patrné i při vyšších teplotách. Lidská tkáň, skladovaná 28 dní při 35 °C v osmi typech činidel, zaznamenala pokles v koncentraci DNA po prvních čtyřech dnech, a poté se ustálila. Za nejlepší stabilizační médium bylo označeno DMSO a DNA-Gen (DNA Genotek Inc., Kanada), protože téměř vždy poskytly kompletní sadu alel a extrakce DNA byla možná jak z tkáně, tak přímo z nich<sup>165</sup>. Bez přístupu k médiu je možné využít alternativní metodu skladování tkáně v chloridu sodném. Takto skladovaná měkká tkáň mrtvolů při RT jeden rok nevykazovala známky poškození a výtěžek DNA měla vyšší než tkáň skladovaná při -20 °C<sup>166</sup>.

### 7.6.2 Feces

Odebraná čerstvá lidská stolice obsahuje okolo tří až čtyř milionů buněk<sup>167</sup> poskytujících dostatek DNA pro budoucí analýzu, pokud vzorek příliš nezředíme<sup>168</sup>. Důležité je si uvědomit, že součástí fekální DNA

je DNA jedince, ale také mikrobiální DNA, a ty je zapotřebí od sebe odlišit. FTA karty, 95% ethanol nebo OMNIgene Gut kit (DNA Genotek Inc., Kanada) jsou vhodné pro osmitýdenní uchování lidského a psiho feces, pokud dochází k fluktuaci teplot nebo je výkal uskladněn při RT, s důrazem na vyšší rozdíl mikrobioty mezi druhy oproti skladovacím technikám <sup>169</sup>. Studie dále důrazně varovala před použitím 70% ethanolu, jehož konzervační schopnosti jsou nedostatečné. Víceprocentní ethanol byl preferován i při uchování fekálních vzorků medvěda hnědého po dobu šesti měsíců, naopak sušení silikagelem nebylo doporučeno u vysoce vlhkých vzorků, protože dehydratace nebyla dostatečně rychlá <sup>170</sup>. I přes tuto limitaci nelze silikagel označit za nevhodný k uskladnění vzorků, protože při práci s lyofilizovaným fekálním práškem nebo mrazem sušenými výkaly byla tato metoda při RT nejlepší mezi testovanými <sup>171</sup>. Výzkum DNA z vajíček měchovce obsažených ve feces označil jako nejlepší variantu pro jejich 60denní uchování zmrazení v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebyl pozorován rozdíl mezi ne/použitím médií a při  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  si nejlépe vedly FTA karty, dále dvoukrokové sušení v silikagelu, 5% dichroman draselný a možnou alternativou je konzervace v 95% ethanolu. DNA v nechráněném vzorku byla detekovatelná při  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  deset dní <sup>172</sup>.

### 7.6.3 Krev

Krev je současně asi nejčastěji skladovaným biologickým typem vzorku, proto jsou její změny během skladování v různých teplotách a s použitím médií intenzivně studovány. DNA může poškodit i srážení krve, kterému zabráníme přidáním antikoagulantu. Zkumavky s EDTA po 130 dnech skladování krve při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  měly míru fragmentace DNA (19,3 %) menší než heparinové, a bez použití dalších médií bylo doporučeno izolovat DNA do deseti dnů a při RT do tří dnů <sup>173</sup>. Zmražené EDTA zkumavky s krví však mohou mít negativní vliv na výtěžek DNA při extrakci <sup>174</sup>. Krevní DNA skladovaná 14 dní při  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla stabilizována před poškozením pouze v BCT médiu (Streck Inc., USA) v porovnání s nechráněným vzorkem. Mezitím množství DNA ve formaldehydu značně pokleslo a glutaraldehyd byl označen za inhibitor PCR <sup>175</sup>. BCT médium prokázalo lepší konzervační vlastnosti i v porovnání se specializovaným přípravkem PAXgene (BD Biosciences, Jihoafrická republika). Násobek počtu kopií genomové DNA byl po sedmi dnech skladování při RT 1,17 u BCT a 37,4 u PAXgene zkumavek, takže u BCT prakticky nedošlo k lýzi buněk a uvolnění DNA do krevní plazmy a lze ho označit za vhodnou alternativu pro krátkodobé uchování krevní DNA <sup>176</sup>.

Skladování krve v mrazničce může být účinným způsobem jejího uchování za předpokladu, že hladina teploty je konstantní. Lidská krev skladovaná při  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve zkumavkách po dobu dvou až 19 let měla průměrný výtěžek DNA 108,95  $\mu\text{g}$  a z toho bylo přibližně 79 % v ds formě. Absorbance vzorků mezi 260/280 nm indikovala prakticky čistou DNA, ale poměr A260/230 nm naznačil přítomnost organických látek <sup>177</sup>. Využití média umožňuje skladování při pokojové teplotě s nižšími energetickými náklady a srovnatelnou kvalitou. Množství DNA v krvi skladované při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bylo v průběhu jednoho roku stabilní (>70 %), ale už po dvou týdnech skladování při RT významně pokleslo. Po přidání média

DNAgard (Biomatrix, USA) se výtěžek při RT stabilizoval a po roce činil 60–80 %. Při –80 °C vzrostl výtěžek po přidání DNAgard před zmražením o více než 85 % a před rozmražením o více než 90 %<sup>174</sup>. Vyšší výtěžek krevní DNA získáme také dehydratací vzorku. Suchý krevní extrakt ovce a člověka skladovaný zhruba šest týdnů při 18 °C v DNASTable a DNAgard měl stejný výtěžek DNA jako krev skladovaná při –20 °C a –80 °C u obou organismů. Průměrný výtěžek DNA u člověka byl vyšší a významně čistší u zmražených vzorků<sup>178</sup>. Levnější variantou uchování krevních skvrn mohou být papírové utěrky. Nedosáhly tak velkého výtěžku DNA jako DNA/RNA Shield (1,63 mg/μl), ale významná míra degradace se u nich během 130denního experimentu též neprojevila. Nevýhodou papírových utěrek a dalších testovaných metod je různý výtěžek DNA závislý na použité extrakční metodě (TE nebo NaOH)<sup>179</sup>. Stabilizační médium DNA/RNA Shield se osvědčilo i při konzervaci kinetoplastidové DNA *Leishmania* v lidské krvi. Před jeho uskladněním při RT nebyla zapotřebí lýze erytrocytů, a za těchto podmínek dosáhl lepších hodnot než RNAprotect (Qiagen, USA). Pokud bychom chtěli zachovat i RNA, bylo by výhodnější vzorek skladovat při 4 °C v RNAprotect, který nám zároveň zajistí i vyšší kvalitu DNA za těchto podmínek<sup>180</sup>.

#### 7.6.4 Kostí

Porovnáním kostí uskladněných při –20 °C, při RT, dehydratací/vysušením mrazem, v lyzačním pufru anebo 96% ethanolu bez přidání dalších aditiv bylo zjištěno, že pro dlouhodobé uchování (jeden rok) je nejlepší kosti zamrazit, ale při krátkodobějším skladování (šest týdnů) je výhodnější umístit vzorky do ethanolu<sup>181</sup>. Je ale potřeba nezapomínat na to, že několikanásobné rozmrazování kostí vede ke změně jejich fyzikálně chemických vlastností<sup>182</sup>. Důležitá je i forma, v jaké budeme kosti skladovat, protože po deseti letech konzervace kostí z 2. sv. války při –20 °C bylo zjištěno, že pokud skladujeme kosti ve formě prášku, dostáváme signifikantně vyšší výtěžek DNA (0,062 ng/mg) než u celistvého kusu (0,03 ng/mg)<sup>183</sup>. Stejná výzkumná skupina zjišťovala pokles výtěžku kostní DNA po deseti letech a potvrdila, že skladování při –20 °C neochrání DNA tak dobře, jak se myslelo, s přibližně pětinným výtěžkem (12,2 pg/μl) v porovnání s množstvím DNA v kostech (57,7 pg/μl) z roku 2009<sup>184, 185</sup>. Při tříletém skladování kostního prachu při –20 °C, RT a RH navíc nebyl potvrzen signifikantní rozdíl v kvantitě DNA (6–74 ng/g), až na jeden případ (0,31 ng/g). Kvalita vzorků též nebyla odlišná, ale prach skladovaný při RT poskytl 17 celistvých STR profilů z 21, zatímco zmražený pouze 13<sup>186</sup>. Skladování ve stabilizačním médiu je možnou alternativou zastupující metodu zmražení, pokud má vliv na integritu NK. Nejnižší výtěžek DNA z prasečích kostí uchovaných 10 až 30 dní ve 20 °C a 35 °C mělo médium TENT (27 ng/μl), u EtOH byl téměř dvakrát větší (60,5 ng/μl) a nejvyšší mělo NaCl (72,5 ng/μl) při zachování 86 % až 110 % DNA. Výsledky NaCl, potvrzené na lidských kostech, naznačují, že v neideálních podmínkách je možné skladovat kosti v soli při RT 30 dní bez vlivu na kvalitu DNA<sup>187</sup>.

### 7.6.5 Srst, peří

Srst, konkrétně vlasy, jsou charakteristické zastoupením jednotlivých typů DNA. Jak u vlasů čerstvých (88,4–99,5 %), tak starých (>99 %) tvoří převážnou většinu jaderná DNA, která ale podléhá vyšší míře fragmentace, proto bývají nalezené úseky mtDNA delší. Velikost fragmentů obou typů DNA je občas tak malá, že způsobuje problémy při následné PCR<sup>188</sup>. Zvýšená fragmentace ale nezabránila amplifikaci DNA ani po 50 až 150letém skladování koňských žíní za variabilní teploty a vlhkosti. Výtěžek DNA významně poklesl po omytí srsti, kdy byla odstraněna mikrobiální DNA a kvůli teplotní variabilitě během skladování, která neměla vliv na sníženou čistotu vzorků<sup>189</sup>.

Vědecké studie porovnávající vliv konzervačních médií a teploty na DNA ve vzorcích srsti a peří jsou relativně omezené. Podle některých výzkumů stačilo pro krátkodobé uchování DNA obsažené v peří její skladování v suchu v papírové obálce<sup>190</sup>. Vysušení nebo zmrazení vzorku ovšem nemusí garantovat 100% stabilitu DNA během dlouhodobého skladování. Medvědí srst konzervovaná jeden rok při –20 °C a RT v přítomnosti silikagelu, měla v obou případech sníženou amplifikaci delšího fragmentu (1000 bp) po dvou týdnech a mikrolokusů po šesti měsících, přesto bylo doporučeno delší úseky DNA zamrazit<sup>191</sup>. Po stabilizaci vlasových folikulů na dobu 24 h při 4 °C a týdne při 4 °C a 19 °C v médiu RNAlater byl přípravek označen jako vhodný pro převoz vlasových vzorků před dlouhodobým uskladněním, protože zajistil vysokou kvalitu DNA bez kvantitativních ztrát<sup>192</sup>.

### 7.6.6 Sliny

Množství a kvalita výtěžku DNA extrahované ze slin závisí na složce, jež je předmětem analýzy. Kompletní stěry slin, jejich supernatant a pelet utvořený při centrifugaci obsahující mikrobiální DNA, bylo možné uchovat při –80 °C po dobu šesti měsíců bez významných ztrát. Kompletní stěry a pelet ale poskytly DNA o lepší kvalitě a také s 29krát vyšším výtěžkem než supernatant<sup>193</sup>. Specializované přípravky a kity nám umožňují skladovat DNA ve slinách ve zmraženém stavu i při RT. Průměrný výtěžek (35 µg) byl pozorován u slin po šesti měsících skladování při RT i –80 °C. Zmražený vzorek dosáhl, byť nevýznamně, vyšší čistoty, pokud byl před zmražením 14 dní inkubován při 30 °C<sup>194</sup>. V experimentu se stejným kitem byly sliny stabilizovány při 37 °C 18 měsíců bez významné fragmentace nebo poklesu čistoty. Výtěžek DNA, který byl u slin (116,8 ng/µl) dvakrát větší než u krve (67,4 ng/µl), způsobilo hlavně vysoké zastoupení mikrobiální DNA ve slinách v porovnání s krví<sup>195</sup>. Některé soupravy poskytují kvalitní ochranu i po delší dobu, například pěti let při 24 °C nebo 187 dní během akcelerovaného stárnutí při 50 °C<sup>196</sup>. Místo kitu lze použít i stabilizační roztok RNAprotect. I když je primárně určen pro skladování RNA, udržel DNA ve vzorku slin stabilní po dobu deseti týdnů beze změny Ct hodnot oproti kontrole, kde se zvýšila přibližně o deset<sup>197</sup>. I laboratorně připravený SPB (saliva preservation buffer), složený z Tris, EDTA, močoviny, SDS a azidu, umožnil extrahovat DNA o vysoké čistotě i po 160 dnech od

počátku inkubace při RT. SPB byl doporučen k dlouhodobému skladování slin, i když výtěžek a čistota DNA byly závislé na extrakci pomocí magnetických partikulí<sup>198</sup>.

Typů organických materiálů, které lze skladovat, je nespočet, zde byly zmíněny jen základní z nich. Pro jejich uchování je dobré se držet Tab. 1 nebo Tab. 2<sup>199, 200</sup> v závislosti na potřebné délce uchování a celkových možnostech experimentátora. Pro příklad již zmíněný DNA/RNA Shield je dle výrobce schopen zachovat integritu DNA v uvedených biologických vzorcích po dobu minimálně dvou let při teplotě 4 °C až 30 °C<sup>201</sup>.

**Tab. 1:** Srovnání účinnosti metod při krátkodobém skladování biologických materiálů. Upraveno dle<sup>199, 200</sup>.

Typ vzorku	Mraznička	Lednice	Kontrolovaná teplota	Pokojeová teplota
Tekutá krev	PŘIJATELNÉ	NEJLEPŠÍ	< 12 h	< 12 h
Suchý biologický materiál			NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ
Vlhký biologický materiál (bez možnosti vysušení)	NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ	< 12 h	< 12 h
Kosti	PŘIJATELNÉ	PŘIJATELNÉ	PŘIJATELNÉ	PŘIJATELNÉ
Vlasy, srst, peří			NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ
Feces	NEJLEPŠÍ			
Sliny			NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ
Biologické vzorky stabilizované v DNA/RNA Shield			NEJLEPŠÍ	NEJLEPŠÍ

**Tab. 2:** Srovnání účinnosti metod při dlouhodobém skladování biologických materiálů. Upraveno dle<sup>199, 200</sup>.

Typ vzorku	Mraznička	Lednice	Kontrolovaná teplota	Pokojeová teplota
Tekutá krev	NEJLEPŠÍ			
Suchý biologický materiál			NEJLEPŠÍ	
Kosti			NEJLEPŠÍ	
Vlasy, srst, peří			NEJLEPŠÍ	
Feces	NEJLEPŠÍ			
Sliny			NEJLEPŠÍ	
Biologické vzorky stabilizované v DNA/RNA Shield			NEJLEPŠÍ	NEJLEPŠÍ
Extrahovaná DNA	NEJLEPŠÍ (tekuté)	PŘIJATELNÉ (tekuté)	NEJLEPŠÍ (suché)	

## 8 Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřila na jednotlivé přístupy praktikované při skladování DNA a biologického materiálu před následnou genetickou analýzou, a kriticky zhodnotila výhody a nevýhody jednotlivých metod s doporučením alternativních postupů. Dále byly uvedeny techniky používané při mumifikacích, společně s náhledem do specializovaných odvětví, jako ancient DNA a bioarcheologie koprolitů nebo jantaru, s demonstrací informací, které jsme schopni získat jejich analýzou.

Z prvních záznamů víme, že těla zemřelých ve starověkém Egyptě byla uchovávána ve směsích sody a solí, jejichž hlavním účelem bylo tkáň dostatečně vysušit. Společně s použitím dalších přírodních látek, jako vosk nebo lišejníky, se lidé pokoušeli předcházet hlavním degradačním vlivům působícím na jednotlivé tkáně, a tím nevědomě konzervovali i nukleové kyseliny v nich obsažené. Za hlavní faktory poškozující DNA můžeme označit teplotu, UV, vlhkost, pH a mikrobiální degradaci, které významně narušují stabilitu a strukturu DNA pomocí depurinací, depyrimidinací, hydrolytického štěpení, formování ROS a dimerních struktur, transformace bází a mnoha dalších.

Mezi přístupy, jak stabilizovat DNA před těmito vlivy, se ukázaly být značné nuance. Z této práce jasně vyplývá, že metoda zmrazení není za všech podmínek nejideálnější variantou pro skladování vzorků, ačkoliv si to dodnes někteří myslí. Finanční a energetická náročnost, nedostatek prostoru a obtíže při transportu jsou problémy technického rázu. Narušení integrity DNA po mnoha cyklech rozmrazení, nižší výtěžek nebo fragmentace ale ovlivňují výzkum samotný. Za definovaných podmínek jsme schopni krátkodobě i dlouhodobě dosáhnout stejně kvalitních, nebo i nadstandardních výsledků při použití stabilizačních médií umožňujících skladování vzorků při pokojové teplotě. Pro optimalizaci výsledků je zapotřebí vzorek zbavit kontaminací a uchovávat jej ve vysušeném stavu, ideálně v přítomnosti vysoušedla. Struktura DNA je současně nejlépe zachována v nerezových kapslích DNAsells, které umožňují uskladnění velkého množství vzorku v dlouhodobém horizontu. Nevýhodou je jejich cena a náročnost extrakce, pro kterou je zapotřebí laboratorní vybavení. Přípravek DNA/RNA Shield naopak zajistí snadnou extrakci volného či v tkáni vázaného genetického materiálu, který před uskladněním může být i částečně narušen. DNA je možné v médiu skladovat minimálně dva roky bez významných ztrát, ale ne v takovém množství jako v DNAsells.

Bez ohledu na kvalitu a dostupnost médií je nezbytné provádět individuální hodnocení parametrů každého vzorku, jako je rozsah degradace a dostupné množství genetického materiálu. Tab. 1 a Tab. 2 v bakalářské práci by měly sloužit jako základní návod, jak přistupovat k stabilizaci biologického materiálu podle principů zajišťujících nejvyšší možnou stabilitu vzorku, společně s co nejmenším vlivem na strukturu a vlastnosti při jejich použití.

## 9 Seznam použité literatury

sekundární citace označeny \* (citace 199 = knižní zdroj, citace 201 = internetový zdroj)

1. Callaway, E. Million-year-old mammoth genomes shatter record for oldest ancient DNA. *Nature* **590**, 537–538 (2021).
2. Arsuaga, J. L. *et al.* Neandertal roots: Cranial and chronological evidence from Sima de los Huesos. *Science (1979)* **344**, 1358–1363 (2014).
3. Bischoff, J. L. *et al.* High-resolution U-series dates from the Sima de los Huesos hominids yields  $600^{+∞}_{-66}$ kyrs: implications for the evolution of the early Neanderthal lineage. *J Archaeol Sci* **34**, 763–770 (2007).
4. Miescher, J. F. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Medicinischem-Chemische Untersuchungen* **4**, 441–460 (1871).
5. Kossel, A. Ueber eine neue Base aus dem Thierkörper. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **18**, 79–81 (1885).
6. Kossel, A. & Neumann, A. Ueber das Thymin, ein Spaltungsproduct der Nucleinsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **26**, 2753–2756 (1893).
7. Kossel, A. & Neumann, A. Darstellung und spaltungsprodukte der nucleinsäure (adenylsäure). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **27**, 2215–2222 (1894).
8. Unger, B. Das Guanin und seine verbindungen. *Journal für Praktische Chemie* **39**, 34–41 (1846).
9. Levene, P. A. Hydrolysis of spleen-nucleic acid by dilute mineral acid. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **12**, 213–219 (1904).
10. Levene, P. & Mandel, J. Über die Konstitution der Thymo-nucleinsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **41**, 1905–1909 (1908).
11. Chargaff, E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* **6**, 201–209 (1950).
12. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
13. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).

14. Pääbo, S., Gifford, J. A. & Wilson, A. C. Mitochondrial DNA sequences from a 7000—year old brain. *Nucleic Acids Res* **16**, 9775–9787 (1988).
15. \* Pääbo, S. & Wilson, A. C. Miocene DNA sequences — a dream come true? *Current Biology* **1**, 45–46 (1991).
16. Dabney, J., Meyer, M. & Pääbo, S. Ancient DNA Damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, (2013).
17. Paabo, S. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 1939–1943 (1989).
18. Lindahl, T. & Andersson, A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**, 3618–3623 (1972).
19. Hansen, A. J. *et al.* Crosslinks rather than strand breaks determine access to ancient DNA sequences from frozen sediments. *Genetics* **173**, 1175–1179 (2006).
20. Overballe-Petersen, S., Orlando, L. & Willerslev, E. Next-generation sequencing offers new insights into DNA degradation. *Trends Biotechnol* **30**, 364–368 (2012).
21. \* Loeb, L. A. & Preston, B. D. Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet* **20**, 201–230 (1986).
22. Lindahl, T. & Karlström, O. Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* **12**, 5151–5154 (1973).
23. Lindahl, T. & Nyberg, B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**, 3610–3618 (1972).
24. Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M. & Pääbo, S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* **24**, 1304–1307 (1996).
25. Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Von Haeseler, A. & Pääbo, S. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* **29**, 4793–4799 (2001).
26. Wuenschell, G. E. *et al.* Mutagenic Potential of DNA Glycation: Miscoding by (R)- and (S)-N<sup>2</sup>-(1-Carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine. *Biochemistry* **49**, 1814–1821 (2010).
27. Brier, B. & Ronald, S. W. Surgical procedures during ancient Egyptian mummification. *Z Aegypt Sprach Altertumskd* **126**, 89–97 (1999).

28. Lucas, A. The use of natron by the ancient Egyptians in mummification. *J Egypt Archaeol* **1**, 119–123 (1914).
29. Lucas, A. Natural soda deposits in Egypt. *Government Press* **22**, 15–16 (1912).
30. Lucas, A. The use of natron in mummification. *J Egypt Archaeol* **18**, 125–140 (1932).
31. Nerlich, A. G., Falter, J. & Zink, A. Why did the Egyptians use natron for artificial embalming? An experimental study on organ mummification. *Journal of Biological Research — Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale* **80**, (2005).
32. Buckley, S. A. & Evershed, R. P. Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies. *Nature* **413**, 837–841 (2001).
33. Spielmann, P. E. To what extent did the ancient Egyptians employ bitumen for embalming. *J Egypt Archaeol* **18**, 177–180 (1932).
34. Nissenbaum, A. Dead Sea asphalts—historical aspects. *Am Assoc Pet Geol Bull* **62**, 837–844 (1978).
35. Baumann, B. B. The botanical aspects of ancient Egyptian embalming and burial. *Econ Bot* **14**, 84–104 (1960).
36. \* Abdel-Maksoud, G. & El-Amin, A.-R. A review on the materials used during the mummification processes in ancient Egypt. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry* **11**, 129–150 (2011).
37. Serpico, M. & White, R. Oil, fat and wax. *Ancient Egyptian materials and technology* **402**, (2000).
38. Buckland, W. Additional remarks on coprolites and fossil sepia. *Proceedings of the Geological Society of London* **11**, 142–143 (1829).
39. Reinhard, K. J. & Bryant, V. M. Coprolite analysis: a biological perspective on archaeology. *Archaeological method and theory* **4**, 245–288 (1992).
40. Jenkins, D. L. *et al.* Clovis age Western Stemmed projectile points and human coprolites at the Paisley Caves. *Science (1979)* **337**, 223–228 (2012).
41. Brönnimann, D., Pümpin, C., Ismail-Meyer, K., Rentzel, P. & Égüez, N. Excrements of omnivores and carnivores. *Archaeological Soil and Sediment Micromorphology* 67–81 (2017).
42. Portillo, M., García-Suárez, A. & Matthews, W. Livestock faecal indicators for animal management, penning, foddering and dung use in early agricultural built environments in the Konya Plain, Central Anatolia. *Archaeol Anthropol Sci* **12**, 1–15 (2020).

43. Fisher, D. C. Crocodilian scatology, microvertebrate concentrations, and enamel-less teeth. *Paleobiology* **7**, 262–275 (1981).
44. Chin, K. Analyses of coprolites produced by carnivorous vertebrates. *The Paleontological Society Papers* **8**, 43–50 (2002).
45. Warinner, C., Speller, C., Collins, M. J. & Lewis, C. M. Ancient human microbiomes. *J Hum Evol* **79**, 125–136 (2015).
46. Iñiguez, A. M., Araújo, A., Ferreira, L. F. & Vicente, A. C. P. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**, 63–65 (2003).
47. Reinhard, K. *et al.* Imaging coprolite taphonomy and preservation. *Archaeol Anthropol Sci* **11**, 6017–6035 (2019).
48. Birk, J., Lensi, R., Fromin, N., Karl, J. & Hitziger, M. Pre-Columbian raised fields in French Guiana couple the actions of human and natural ecosystem engineers: evidence from soil geochemical and physical. *Sixth World Archeological Congress* (2008).
49. Prost, K., Birk, J. J., Lehndorff, E., Gerlach, R. & Amelung, W. Steroid biomarkers revisited – improved source identification of faecal remains in archaeological soil material. *PLoS One* **12**, (2017).
50. Cuevas-Tena, M., Alegría, A. & Lagarda, M. J. Determination of fecal sterols following a diet with and without plant sterols. *Lipids* **52**, 871–884 (2017).
51. Sobolik, K. D., Gremillion, K. J., Whitten, P. L. & Watson, P. J. Technical Note: Sex Determination of Prehistoric Human Paleofeces. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists* **101**, 283–290 (1996).
52. Truică, G. I. *et al.* A multi-analytical approach to amber characterisation. *Chemical Papers* **68**, 15–21 (2014).
53. Ragazzi, E., Roghi, G., Giaretta, A. & Gianolla, P. Classification of amber based on thermal analysis. *Thermochim Acta* **404**, 43–54 (2003).
54. Anderson, K. B., Winans, R. E. & Botto, R. E. The nature and fate of natural resins in the geosphere—II. Identification, classification and nomenclature of resinites. *Org Geochem* **18**, 829–841 (1992).

55. Pastorelli, G. A comparative study by infrared spectroscopy and optical oxygen sensing to identify and quantify oxidation of Baltic amber in different ageing conditions. *J Cult Herit* **12**, 164–168 (2011).
56. Gomez, B., Martínez-Delclòs, X., Bamford, M. & Philippe, M. Taphonomy and palaeoecology of plant remains from the oldest African Early Cretaceous amber locality. *Lethaia* **35**, 300–308 (2002).
57. Thickett, D., Cruickshank, P. & Ward, C. The conservation of amber. *Studies in Conservation* **40**, 217–226 (1995).
58. Bisulca, C., Nascimbene, P. C., Elkin, L. & Grimaldi, D. A. Variation in the deterioration of fossil resins and implications for the conservation of fossils in amber. *Am Mus Novit* **2012**, 1–19 (2012).
59. Pastorelli, G., Shashoua, Y. & Richter, J. Hydrolysis of Baltic amber during thermal ageing – An infrared spectroscopic approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **106**, 124–128 (2013).
60. Zatorska, A. *et al.* Optical characterization of amber specimens from the unique collection of the Museum of the Earth of the Polish Academy of Sciences in Warsaw. *Optics for Arts, Architecture, and Archaeology IV* **8790**, 250–262 (2013).
61. Corral, J. C., López del Valle, R. & Alonso, J. El ámbar cretácico de Álava (Cuenca Vasco-Cantábrica, norte de España). Su colecta y preparación. *Estudios del Museo de Ciencias Naturales de Álava* **14**, 7–21 (1999).
62. \* Mecklenburg, M. F., Tumosa, Ch. S. & Pride, A. Preserving legacy buildings. *HVAC Retrofit: A supplement to ASHRAE Journal* (2004).
63. von Wurmb-Schwark, N., Heinrich, A., Freudenberg, M., Gebühr, M. & Schwark, T. The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and anthropological research. *Leg Med* **10**, 125–130 (2008).
64. Sampietro, M. L. *et al.* Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol Biol Evol* **23**, 1801–1807 (2006).
65. Malmström, H., Storå, J., Dalén, L., Holmlund, G. & Götherström, A. Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth. *Mol Biol Evol* **22**, 2040–2047 (2005).

66. Carter, D. O., Yellowlees, D. & Tibbett, M. Temperature affects microbial decomposition of cadavers (*Rattus rattus*) in contrasting soils. *Applied soil ecology* **40**, 129–137 (2008).
67. Hyde, E. R., Haarmann, D. P., Lynne, A. M., Bucheli, S. R. & Petrosino, J. F. The living dead: Bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PLoS One* **8**, (2013).
68. Schoenen, D. & Schoenen, H. Adipocere formation—the result of insufficient microbial degradation. *Forensic Sci Int* **226**, (2013).
69. Takatori, T. The mechanism of human adipocere formation. *Leg Med* **3**, 193–204 (2001).
70. Ruttan, R. F. & Marshall, M. J. The composition of adipocere. *Journal of Biological Chemistry* **29**, 319–327 (1917).
71. Cooper, T. G., Jockenhövel, F. & Nieschlag, E. Variations in semen parameters from fathers. *Human Reproduction* **6**, 859–866 (1991).
72. Haugen, T. B. & Grotmol, T. pH of human semen. *Int J Androl* **21**, 105–108 (1998).
73. Vasundhara, D., Raju, V. N., Hemalatha, R., Nagpal, R. & Kumar, M. Vaginal & gut microbiota diversity in pregnant women with bacterial vaginosis & effect of oral probiotics: an exploratory study. *Indian Journal of Medical Research* **153**, 492–502 (2021).
74. Alvarez, F. J., Ryman, K., Hooijmaijers, C., Bulone, V. & Ljungdahl, P. O. Diverse nitrogen sources in seminal fluid act in synergy to induce filamentous growth of *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* **81**, 2770–2780 (2015).
75. Budowle, B. *et al.* Building microbial forensics as a response to bioterrorism. *Science (1979)* **301**, 1852–1853 (2003).
76. Al-Kandari, C., Chandrakant, V., Singh, J., Sangar, V. C. & Jerbai, B. Time-dependent effects of temperature and humidity on quality of DNA in samples of human saliva, blood and semen in Kuwait. *Int J Pharm Sci Res* **7**, 2852–2873 (2016).
77. Shapiro, R. & Kang, S. Uncatalyzed hydrolysis of deoxyuridine, thymidine, and 5-bromodeoxyuridine. *Biochemistry* **8**, 1806–1810 (1969).
78. Marrone, A. & Ballantyne, J. Hydrolysis of DNA and its molecular components in the dry state. *Forensic Sci Int Genet* **4**, 168–177 (2010).

79. Curtis, A. N., Larson, E. R. & Davis, M. A. Field storage of water samples affects measured environmental DNA concentration and detection. *Limnology (Tokyo)* **22**, 1–4 (2021).
80. Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Mol Ecol Resour* **14**, 109–116 (2014).
81. Lund, S. & Dissing, J. Surprising stability of DNA in stains at extreme humidity and temperature. *Int Congr Ser* **1261**, 616–618 (2004).
82. Zupanič Pajnič, I. *et al.* On the long term storage of forensic DNA in water. *Forensic Sci Int* **305**, (2019).
83. Ha, D. H. *et al.* Humidity effects on the conductance of the assembly of DNA molecules. *Chem Phys Lett* **355**, 405–409 (2002).
84. Bind, M. A. *et al.* Effects of temperature and relative humidity on DNA methylation. *Epidemiology* **25**, 561–569 (2014).
85. Vili, N. *et al.* Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling. *J Ornithol* **154**, 587–595 (2013).
86. Herndon, J. M., Hoisington, R. D. & Whiteside, M. Deadly ultraviolet UV-C and UV-B penetration to Earth's surface: Human and environmental health implications. *J Geog Environ Earth Sci Intn* **14**, 1–11 (2018).
87. Frederick, J. E., Snell, H. E. & Haywood, E. K. Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochem Photobiol* **50**, 443–450 (1989).
88. Freeman, S. E. *et al.* Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 5605–5609 (1989).
89. Hall, A. & Ballantyne, J. Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications. *Anal Bioanal Chem* **380**, 72–83 (2004).
90. Courdavault, S. *et al.* Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)* **4**, 836–844 (2005).
91. Becker, M. M. & Wang, Z. Origin of ultraviolet damage in DNA. *J Mol Biol* **210**, 429–438 (1989).

92. Garinis, G. A. *et al.* Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *EMBO J* **24**, 3952–3962 (2005).
93. Hall, A., Sims, L. M. & Ballantyne, J. Assessment of DNA damage induced by terrestrial UV irradiation of dried bloodstains: forensic implications. *Forensic Sci Int Genet* **8**, 24–32 (2014).
94. Yang, J. H., Wu, U. I., Tai, H. M. & Sheng, W. H. Effectiveness of an ultraviolet-C disinfection system for reduction of healthcare-associated pathogens. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **52**, 487–493 (2019).
95. Nunayon, S. S., Zhang, H. & Lai, A. C. K. Comparison of disinfection performance of UVC-LED and conventional upper-room UVGI systems. *Indoor Air* **30**, 180–191 (2020).
96. Wang, D., Oppenländer, T., El-Din, M. G. & Bolton, J. R. Comparison of the disinfection effects of vacuum-UV (VUV) and UV light on *Bacillus subtilis* spores in aqueous suspensions at 172, 222 and 254 nm. *Photochem Photobiol* **86**, 176–181 (2010).
97. Yang, Y., Zhang, H., Nunayon, S. S., Chan, V. & Lai, A. C. K. Disinfection efficacy of ultraviolet germicidal irradiation on airborne bacteria in ventilation ducts. *Indoor Air* **28**, 806–817 (2018).
98. Bruskov, V. I., Malakhova, L. V., Masalimov, Z. K. & Chernikov, A. V. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* **30**, 1354–1363 (2002).
99. Krickler, M. C. & Drake, J. W. Heat mutagenesis in bacteriophage T4: another walk down the transversion pathway. *J Bacteriol* **172**, 3037–3039 (1990).
100. Yudianto, A., Novita, M., Wibowo, A. & Setiawan, F. Nuclei DNA damage due to extreme high-temperature exposure during forensic identification examination. *Majalah Kedokteran Bandung* **52**, 185–192 (2020).
101. Imaizumi, K., Taniguchi, K. & Ogawa, Y. DNA survival and physical and histological properties of heat-induced alterations in burnt bones. *Int J Legal Med* **128**, 439–446 (2014).
102. Madisen, L., Hoar, D. I., Holroyd, C. D., Crisp, M. & Hodes, M. E. The effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med Genet* **27**, 379–390 (1987).
103. Fowler, E. V., Starkie, M. L., Blacket, M. J., Mayer, D. G. & Schutze, M. K. Effect of temperature and humidity on insect DNA integrity evaluated by real-time PCR. *J Econ Entomol* **117**, 1995–2002 (2024).

104. Amor, H. *et al.* Relationship between nuclear DNA fragmentation, mitochondrial DNA damage and standard sperm parameters in spermatozoa of fertile and sub-fertile men before and after freeze-thawing procedure. *Andrologia* **50**, (2018).
105. Le, M. T. *et al.* Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? *Clin Exp Reprod Med* **46**, 67–75 (2019).
106. Shao, W., Khin, S. & Kopp, W. C. Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreserv Biobank* **10**, 4–11 (2012).
107. Isachenko, E. *et al.* DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction* **19**, 932–939 (2004).
108. \* Shapiro, R. Damage to DNA caused by hydrolysis. *Chromosome Damage and Repair* 3–18 (1981).
109. Zoltewicz, J. A., Clark, D. F., Sharpless, T. W. & Grahe, G. Kinetics and mechanism of the acid-catalyzed hydrolysis of some purine nucleosides. *J Am Chem Soc* **92**, 1741–1750 (1970).
110. Verdolino, V., Cammi, R., Munk, B. H. & Schlegel, H. B. Calculation of pKa values of nucleobases and the guanine oxidation products guanidinohydantoin and spiroiminodihydantoin using density functional theory and a polarizable continuum model. *Journal of Physical Chemistry B* **112**, 16860–16873 (2008).
111. Martínez Guerra, J., Rojas Hernández, A., Garrido, L. D. G. & Ramírez Silva, M. T. New insights about Equilibrium Constants, pKa, of Purine Nitrogenous Bases: The Case of Adenine and Guanine. A UV-Vis Spectrophotometric Study at I = 0.4 M. *J Mex Chem Soc* **69**, 70–77 (2025).
112. Brown, T., Leonard, G. A., Booth, E. D. & Kneale, G. Influence of pH on the conformation and stability of mismatch base-pairs in DNA. *J Mol Biol* **212**, 437–440 (1990).
113. Küpfer, P. A. & Leumann, C. J. The chemical stability of abasic RNA compared to abasic DNA. *Nucleic Acids Res* **35**, 58–68 (2007).
114. Paul Ehrlich, B. *et al.* The alkaline denaturation of deoxyribose nucleic acid. *J Am Chem Soc* **80**, 4251–4255 (1958).
115. Bivehed, E., Hellman, B., Fan, Y., Haglöf, J. & Buratovic, S. DNA integrity under alkaline conditions: An investigation of factors affecting the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **891**, (2023).

116. Lee, E. M., Setterholm, N. A., Hajjar, M., Barpuzary, B. & Chaput, J. C. Stability and mechanism of threose nucleic acid toward acid-mediated degradation. *Nucleic Acids Res* **51**, 9542–9551 (2023).
117. Lepper, C. P. *et al.* Effects of Pressure and pH on the Physical Stability of an I-Motif DNA Structure. *ChemPhysChem* **20**, 1567–1571 (2019).
118. Lando, D. Y. *et al.* Theoretical and experimental study of DNA helix-coil transition in acidic and alkaline medium. *J Biomol Struct Dyn* **12**, 355–366 (1994).
119. Neumann, S., Reuner, A., Brümmer, F. & Schill, R. O. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **153**, 425–429 (2009).
120. Ingemar Jönsson, K. & Bertolani, R. Facts and fiction about long-term survival in tardigrades. *J Zool* **255**, 121–123 (2001).
121. Jørgensen, A., Møbjerg, N. & Kristensen, R. M. A molecular study of the tardigrade *Echiniscus testudo* (Echiniscidae) reveals low DNA sequence diversity over a large geographical area. *J Limnol* **66**, 77–83 (2007).
122. Westh, P. & Ramløv, H. Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *Journal of Experimental Zoology* **258**, 303–311 (1991).
123. Carpenter, J. F. & Crowe, J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **28**, 3916–3922 (1989).
124. Olsson, C., Jansson, H. & Swenson, J. The role of trehalose for the stabilization of proteins. *Journal of Physical Chemistry B* **120**, 4723–4731 (2016).
125. Lerbret, A. *et al.* Influence of homologous disaccharides on the hydrogen-bond network of water: complementary Raman scattering experiments and molecular dynamics simulations. *Carbohydr Res* **340**, 881–887 (2005).
126. Shikama, K. Effect of freezing and thawing on the stability of double helix of DNA. *Nature* **207**, 529–530 (1965).
127. Davis, D. L., O'Brien, E. P. & Bentzley, C. M. Analysis of the degradation of oligonucleotide strands during the freezing/thawing processes using MALDI-MS. *Anal Chem* **72**, 5092–5096 (2000).
128. Lee, S. B. *et al.* Assessing a novel room temperature DNA storage medium for forensic biological samples. *Forensic Sci Int Genet* **6**, 31–40 (2012).

129. Frippiat, C. *et al.* Evaluation of novel forensic DNA storage methodologies. *Forensic Sci Int Genet* **5**, 386–392 (2011).
130. Frippiat, C. & Noel, F. Efficiency of a novel forensic room-temperature DNA storage medium. *Forensic Sci Int Genet* **9**, 81–84 (2014).
131. Sguazzi, G., Lovisolo, F. & Gino, S. Is Genomic DNA extracted and stored at –20 °C for long time useful in forensic field? *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* **7**, 629–631 (2019).
132. Allison, M. J. *et al.* The effect of silica desiccation under different storage conditions on filter-immobilized environmental DNA. *BMC Res Notes* **14**, 1–6 (2021).
133. Majaneva, M. *et al.* Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Sci Rep* **8**, (2018).
134. Smenderovac, E. *et al.* Desiccation as a suitable alternative to cold-storage of phyllosphere samples for DNA-based microbial community analyses. *Sci Rep* **15**, (2025).
135. Carretero, M. I. *et al.* Air-drying llama sperm affects DNA integrity. *Front Vet Sci* **7**, (2020).
136. Roe, K. D. & Labuza, T. P. Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures. *Int J Food Prop* **8**, 559–574 (2005).
137. Zhang, M. *et al.* Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: preservation of DNA integrity. *Sci Rep* **7**, (2017).
138. Poxon, S. W. & Hughes, J. A. The effect of lyophilization on plasmid DNA activity. *Pharm Dev Technol* **5**, 115–122 (2000).
139. Molina, M. D. C. *et al.* The stability of lyophilized lipid/DNA complexes during prolonged storage. *J Pharm Sci* **93**, 2259–2273 (2004).
140. Kasper, J., Schaffert, D., Ogris, M., E Wagner & W Friess. Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability—A step closer from promising technology to application. *Journal of controlled release* **151**, 246–255 (2011).
141. Molina, M. D. C., Dean Allison, S. & Anchordoquy, T. J. Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: Insight from other structural indicators. *J Pharm Sci* **90**, 1445–1455 (2001).
142. Talsma, H. *et al.* Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying. *Int J Pharm* **157**, 233–238 (1997).

143. Wolfe, J., Bryant, G. & Koster, K. L. What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there? *CryoLetters* **23**, 157–166 (2002).
144. \* Hemmerich, K. J. General aging theory and simplified protocol for accelerated aging of medical devices. *Medical Plastic and Biomaterials* **5**, 16–23 (1998).
145. Cossette, M. L., Stotesbury, T. & Shafer, A. B. A. Quantifying visible absorbance changes and DNA degradation in aging bloodstains under extreme temperatures. *Forensic Sci Int* **318**, (2021).
146. Plitta-Michalak, B. P., Litkowiec, M. & Michalak, M. Epigenetic marks, DNA damage markers, or both? The impact of desiccation and accelerated aging on nucleobase modifications in plant genomic DNA. *Cells* **11**, (2022).
147. Bathrick, A. S. & Davoren, J. M. Accelerated aging of forensically relevant biological materials on swabs. *Biotechniques* **70**, 233–238 (2021).
148. Dissing, J., Søndervang, A. & Lund, S. Exploring the limits for the survival of DNA in blood stains. *J Forensic Leg Med* **17**, 392–396 (2010).
149. Ivanova, N. V. & Kuzmina, M. L. Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature. *Mol Ecol Resour* **13**, 890–898 (2013).
150. Organick, L. *et al.* An empirical comparison of preservation methods for synthetic DNA data storage. *Small Methods* **5**, (2021).
151. Coudy, D., Colotte, M., Luis, A., Tuffet, S. & Bonnet, J. Long term conservation of DNA at ambient temperature. Implications for DNA data storage. *PLoS One* **16**, (2021).
152. Clermont, D. *et al.* Assessment of DNA encapsulation, a new room-temperature DNA storage method. *Biopreserv Biobank* **12**, 176–183 (2014).
153. Washetine, K. *et al.* DNAsheIl protects DNA stored at room temperature for downstream next-generation sequencing studies. *Biopreserv Biobank* **17**, 352–354 (2019).
154. Chen, W. D. *et al.* Combining data longevity with high storage capacity—layer-by-layer DNA encapsulated in magnetic nanoparticles. *Adv Funct Mater* **29**, (2019).
155. Trivedi, C. B. *et al.* DNA/RNA preservation in glacial snow and ice samples. *Front Microbiol* **13**, (2022).
156. Pavlovskaja, M., Prekrasna, I., Parnikoza, I. & Dykyi, E. Soil sample preservation strategy affects the microbial community structure. *Microbes Environ* **36**, (2021).

157. Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I. & Leonard, J. A. Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Mol Ecol Resour* **13**, 663–673 (2013).
158. Menke, S., Gillingham, M. A. F., Wilhelm, K. & Sommer, S. Home-made cost effective preservation buffer is a better alternative to commercial preservation methods for microbiome research. *Front Microbiol* **8**, (2017).
159. Worrakitrunsi, W., Sathirapatya, T., Sukawutthiya, P., Vongpaisarnsin, K. & Varrathyarom, P. Assessing the feasibility of free DNA for disaster victim identification and forensic applications. *Sci Rep* **14**, (2024).
160. Barrera-Avalos, C. *et al.* Analysis by real-time PCR of five transport and conservation mediums of nasopharyngeal swab samples to COVID-19 diagnosis in Santiago of Chile. *J Med Virol* **94**, 1167–1174 (2022).
161. Wyatt, N. J. *et al.* Evaluation of intestinal biopsy tissue preservation methods to facilitate large-scale mucosal microbiota research. *EBioMedicine* **112**, (2025).
162. Nunes, J. S. *et al.* Comparison of different DNA preservation solutions for oral cytological samples. *Arch Oral Biol* **158**, (2024).
163. Nedel, F., De Almeida André, Dá., De Oliveira, I. O., Tarquinio, S. B. C. & Demarco, F. Á. F. Buccal cells submitted to three different storage conditions before DNA extraction. *Journal of Applied Oral Science* **17**, 113–115 (2009).
164. Leboeuf, C. *et al.* Long-term preservation at room temperature of freeze-dried human tumor samples dedicated to nucleic acids analyses. *Cell Preserv Technol* **6**, 191–198 (2008).
165. Allen-Hall, A. & McNevin, D. Human tissue preservation for disaster victim identification (DVI) in tropical climates. *Forensic Sci Int Genet* **6**, 653–657 (2012).
166. Caputo, M., Bosio, L. A. & Corach, D. Long-term room temperature preservation of corpse soft tissue: An approach for tissue sample storage. *Investig Genet* **2**, 1–6 (2011).
167. Albaugh, G. P. *et al.* Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *Int J Cancer* **52**, 347–350 (1992).
168. Gerloff, U. *et al.* Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Mol Ecol* **4**, 515–518 (1995).
169. Song, S. J. *et al.* Preservation methods differ in fecal microbiome stability, affecting suitability for field studies. *MSystems* **1**, 21–37 (2016).

170. Murphy, M. A. *et al.* An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conservation Genetics* **3**, 435–440 (2002).
171. Wasser, S. K., Houston, C. S., Koehler, G. M., Cadd, G. G. & Fain, S. R. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol Ecol* **6**, 1091–1097 (1997).
172. Papaïakovou, M. *et al.* A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen. *PLoS Negl Trop Dis* **12**, (2018).
173. Permenter, J. *et al.* Quantitative analysis of genomic DNA degradation in whole blood under various storage conditions for molecular diagnostic testing. *Mol Cell Probes* **29**, 449–453 (2015).
174. Bulla, A., De Witt, B., Ammerlaan, W., Betsou, F. & Lescuyer, P. Blood DNA yield but not integrity or methylation is impacted after long-term storage. *Biopreserv Biobank* **14**, 29–38 (2016).
175. Das, K., Fernando, M. R., Basiaga, S., Wigginton, S. M. & Williams, T. Effects of a novel cell stabilizing reagent on DNA amplification by PCR as compared to traditional stabilizing reagents. *Acta Histochem* **116**, 55–60 (2014).
176. Toro, P. V. *et al.* Comparison of cell stabilizing blood collection tubes for circulating plasma tumor DNA. *Clin Biochem* **48**, 993–998 (2015).
177. Chen, W. C. *et al.* The integrity and yield of genomic DNA isolated from whole blood following long-term storage at –30°C. *Biopreserv Biobank* **16**, 106–113 (2018).
178. Udtha, M. *et al.* The protection and stabilization of whole blood at room temperature. *Biopreserv Biobank* **12**, 332–336 (2014).
179. Özdemir, D. A practical, low-cost, short-term storage method for genomic DNA. *Biotechniques* **70**, 194–201 (2021).
180. Eberhardt, E. *et al.* Comparative evaluation of nucleic acid stabilizing reagents for RNA- and DNA-based *Leishmania* detection in blood as proxy for visceral burdens. *J Microbiol Methods* **173**, (2020).
181. Iyavoo, S., Hadi, S. & Goodwin, W. Evaluation of five preservation methods for recovery of DNA from bone. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* **7**, 200–202 (2019).
182. McElderry, J.-D. P., Kole, M. R. & Morris, M. D. Repeated freeze-thawing of bone tissue affects Raman bone quality measurements. *J Biomed Opt* **16**, (2011).

183. Grdina, S., Friš, E. L., Podovšovnik, E., Zupanc, T. & Zupanič Pajnič, I. Storage of Second World War bone samples: Bone fragments versus bone powder. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* **7**, 175–176 (2019).
184. Friš, E. L., Grdina, S., Podovšovnik, E., Zupanc, T. & Zupanič Pajnič, I. Comparison of DNA yield after long-term storage of Second World War bone samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* **7**, 117–119 (2019).
185. Zupanič Pajnič, I., Gornjak Pogorelc, B. & Balažic, J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second World War Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med* **124**, 307–317 (2010).
186. Zupanič Pajnič, I. & Leskovar, T. How to store the bone powder left after extraction for future analysis. *Forensic Sci Int* **369**, (2025).
187. de Arellano Sánchez, J. A. R. *et al.* Comparing preservation substrates under field conditions for efficient DNA recovery in bone. *Int J Legal Med* **137**, 297–301 (2023).
188. Brandhagen, M. D., Loreille, O. & Irwin, J. A. Fragmented nuclear DNA is the predominant genetic material in human hair shafts. *Genes (Basel)* **9**, (2018).
189. Kirkinen, T. *et al.* Determination of different predictors affecting DNA concentration isolated from historical hairs of the Finnhorse. *J Archaeol Sci Rep* **41**, (2022).
190. Ramón-Laca, A., White, D. J., Weir, J. T. & Robertson, H. A. Extraction of DNA from captive-sourced feces and molted feathers provides a novel method for conservation management of New Zealand kiwi (*Apteryx spp.*). *Ecol Evol* **8**, 3119–3130 (2018).
191. Roon, D. A., Waits, L. P. & Kendall, K. C. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Mol Ecol Notes* **3**, 163–166 (2003).
192. Harkin, E. E., Browne, J. A. & Murphy, B. A. Evaluation of short-term hair follicle storage conditions for maintenance of RNA integrity. *PLoS One* **19**, (2024).
193. Karched, M., Bhardwaj, R. G., Pauline, E. M., George, S. & Asikainen, S. Effect of preparation method and storage period on the stability of saliva DNA. *Arch Oral Biol* **81**, 21–25 (2017).
194. Ng, D. P. K., Koh, D., Choo, S. & Chia, K. S. Saliva as a viable alternative source of human genomic DNA in genetic epidemiology. *Clinica chimica acta* **367**, 81–85 (2006).
195. Anthonappa, R. P., King, N. M. & Rabie, A. B. M. Evaluation of the long-term storage stability of saliva as a source of human DNA. *Clin Oral Investig* **17**, 1719–1725 (2013).

196. Iwasiow, R., Desbois, A. & Birnboim, H. Long-term stability of DNA from saliva samples stored in the Oragene self-collection kit. *DNA Genotek* **3**, (2011).
197. Jiang, J., Park, N. J., Hu, S. & Wong, D. T. A universal pre-analytic solution for concurrent stabilization of salivary proteins, RNA and DNA at ambient temperature. *Arch Oral Biol* **54**, 268–273 (2009).
198. Bhati, A. *et al.* An effective method for saliva stabilization and magnetic nanoparticles based DNA extraction for genomic applications. *Anal Biochem* **624**, (2021).
199. \* Ballou, S. *et al.* *The Biological Evidence Preservation Handbook: Best Practices for Evidence Handlers. The biological evidence preservation handbook: Best Practises for Evidence Handlers* (National Institute of Standards and Technology, 2013).
200. \* Vaňková, L., Říhová, P., Formanová, D. & Vaněk, D. Zajišťování a skladování vzorků živočišného materiálu pro následnou analýzu DNA - technický manuál. *Chemagazín* **6**, 48–49 (2020).
201. \* Zymo Research. DNA/RNA Shield Stabilization Solution - Free Sample | ZYMO RESEARCH – Zymo Research International. <https://zymoresearch.eu/products/dna-rna-shield> (2025).