

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Radan Matura

**Vliv fixačních činidel na kvalitu a kvantitu nukleových kyselin v
archivovaných vzorcích tkání**

The effect of fixatives on DNA quality and quantity in archival tissue
specimens

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

Praha 2015

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 22. 7. 2015

.....

podpis

Poděkování

Děkuji mému školiteli, RNDr. Danielu Vaňkovi, Ph.D., za to, že mi u něj v laboratoři umožnil vypracovat diplomovou práci. Děkuji MUDr. Tomáši Vojáčkovi za odběr vzorků. Dále děkuji Jiřině Josefiové za všestrannou duševní a fyzickou pomoc a Jitce Votrubové a Báře Emmerové za vytvoření myšlenkově stimulujícího prostředí. V neposlední řadě děkuji svým blízkým za jejich materiálně-mentální podporu.

Abstrakt

Formaldehyd je široce používané fixační činidlo. Jeho výhodou je nízká cena, jednoduché použití a výborné fixační vlastnosti, především rychlé pronikání do tkání, dobré zachování morfologických struktur tkáně a kompatibilita s následnými histologickými analýzami. Jeho nevýhodou jsou však negativní účinky na nukleové kyseliny. Vlivem jeho působení dochází k modifikaci primární struktury deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z angl. deoxyribonucleic acid), její fragmentaci a vzniku vazeb na proteiny, které znesnadňují izolaci takovéto DNA. Míra negativních účinků formaldehydu je závislá na mnoha faktorech. V této práci byl zkoumán vliv chemického složení roztoku formaldehydu (ředění roztoku, přítomnost pufru či kyseliny mravenčí) a vliv délky fixace. Posuzováno bylo množství DNA a míra fragmentace DNA získané z fixovaných tkání, a to metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce, fluorescenčním stanovením koncentrace DNA a pomocí čipové elektroforézy na přístroji bioanalyzátor Agilent 2100. Kvalita a kvantita získané DNA byla následně otestována také při stanovení DNA profilu pro identifikační účely analýzou STR (tandemová opakování krátkých motivů; z angl. short tandem repeats). Z výsledků vyplývá, že nejvhodnějším z testovaných roztoků formaldehydu je pufrovaný 4% formaldehyd, který poskytoval dostatečné množství DNA o potřebné kvalitě. Ostatní varianty roztoku formaldehydu (nepufrovaný 4% roztok, nepufrovaný 36% roztok, roztok s přídavkem kyseliny mravenčí či hydroxidu sodného) zhoršovaly kvalitu a kvantitu získané DNA více než 4% pufrovaný formaldehyd. Dále se ukázalo, že čím déle je tkáň fixována, tím nižší výtěžky a méně kvalitní DNA lze získat.

Klíčová slova: FFPE, formaldehyd, kvalita, DNA, fixace

Abstract

Formaldehyde is widely used fixative. Its advantages are low cost, simplicity of use and good fixation traits, which are fast tissue penetration, good preservation of morphological structures and compatibility with downstream histological applications. Formaldehyde disadvantages are negative effects on nucleic acids. Formaldehyde solutions modify primary structure of deoxyribonucleic acid (DNA), fragment DNA and create protein-DNA covalent bonds that hinder DNA isolation procedures. Level of negative effects of formaldehyde is dependent on many factors. Effect of formaldehyde chemical composition (formaldehyde dilution, presence of buffer or formic acid) and effect of fixation length were studied in this work. On DNA extracted from fixed tissues, DNA quantity and level of DNA fragmentation were studied by quantitative polymerase chain reaction, fluorescence assay for DNA quantification and by on-chip electrophoresis on bioanalyzer Agilent 2100. Quality and quantity of acquired DNA were tested by DNA profile determination for identification purposes using STR (short tandem repeats) analysis. Results show that of all tested fixatives, buffered 4% formaldehyde is the most suited solution in regards of sufficient amount of DNA and sufficient DNA quality. Other formaldehyde variants (non-buffered 4% formaldehyde, non-buffered 36% formaldehyde and formaldehyde solutions with addition of formic acid or sodium hydroxide) worsened quality and quantity of acquired DNA more than buffered 4% formaldehyde. It was also shown that the longer the tissue is fixed the less DNA in worse quality is obtained.

Keywords: FFPE, formaldehyde, quality, DNA, fixation

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1 Úvod a cíle práce	10
2 Literární přehled	11
2.1 Fixace tkání	11
2.1.1 Princip fixace tkání	11
2.1.1.1 Prefixační faktory	11
2.1.1.2 Faktory spojené s fixací	11
2.1.1.3 Postfixační faktory	12
2.1.2 Formaldehyd	12
2.1.2.1 Příprava FFPE bločků	14
2.1.2.2 Formaldehyd a jeho působení na DNA	14
2.1.2.3 Faktory ovlivňující formaldehydovou fixaci ve vztahu k DNA	15
2.2 Izolace DNA z FFPE bločků	16
2.2.1.1 Pre-extrakční ošetření FFPE tkáně	16
2.2.1.2 Extrakce DNA z FFPE bločků	17
2.2.1.3 Post-extrakční úprava DNA izolované z FFPE bločků	18
2.2.1.4 Výhody a nevýhody jednotlivých postupů izolace DNA z FFPE bločků	18
2.3 Stanovení kvality DNA vyizolované z FFPE bločků	20
2.3.1 Spektrofotometrické metody	20
2.3.2 Fluorometrické metody	21
2.3.3 Elektroforetické metody	21
2.3.4 Metody založené na PCR	22
2.3.4.1 Princip kvantitativní PCR	22
2.3.4.2 Stanovení kvality DNA pomocí qPCR	24
3 Materiál a metody	26
3.1 Materiál	26
3.1.1 Přístroje	26
3.1.2 Použité chemikálie	26
3.1.3 Tkáně	27
3.1.4 Roztoky	27
3.1.5 Primery	28
3.2 Metody	29
3.2.1 Fixace I	29
3.2.2 Fixace II a Fixace III	29
3.2.3 Odvodnění a zavodnění fixované tkáně (u Fixace II a Fixace III)	30
3.2.4 Štěpení fixované tkáně	30
3.2.5 Izolace DNA	30
3.2.6 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR)	31
3.2.7 Stanovení koncentrace DNA fluorescenčním měřením	32
3.2.8 Stanovení koncentrace a míry fragmentace pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100	32
3.2.9 Genetická identifikace analýzou krátkými tandemově se opakujícími repeticemi (STR)	33
4 Výsledky	35
4.1 Chemické složení fixačního roztoku formaldehydu ovlivňuje množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA	36
4.1.1 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA metodou qPCR	37

4.1.2	Stanovení koncentrace DNA fluorescenčním měřením	38
4.1.3	Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100.....	39
4.2	Délka fixace má vliv na množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA.....	42
4.2.1	Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA metodou qPCR.....	42
4.2.2	Stanovení koncentrace DNA fluorescenčním měřením	44
4.2.3	Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100.....	44
4.3	Pre-fixační ošetření tkáně roztokem DNAgard Tissue nemá vliv na množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA	49
4.4	Porovnání fixačního experimentu Fixace II s Fixací I a Fixací III	51
4.5	V závislosti na chemickém složení fixačního roztoku formaldehydu a délce fixace se mění možnosti provedení STR analýzy.....	54
5	Diskuze	59
6	Souhrn.....	63
7	Použitá literatura.....	64
8	Přílohy	69
	

Seznam použitých zkratek

DNA	deoxyribonukleová kyselina; z angl. deoxyribonucleic acid
FFPE	(tkáň) fixovaná formalínem, zalitá do parafinu; z angl. formalin-fixed, paraffin-embedded (tissue)
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie; z angl. fluorescence resonance energy transfer
PCR	polymerázová řetězová reakce; z angl. polymerase chain reaction
PNA	peptidová nukleová kyselina (z angl. peptide nucleic acid)
PMI	posmrtný interval, post mortem interval
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce; z angl. quantitative polymerase chain reaction
RNA	ribonukleová kyselina; z angl. ribonucleic acid
SDS	dodecylsírán sodný; z angl. sodium dodecyl sulfát
SNP	jednonukleotidový polymorfismus; z angl. single nucleotide polymorphism
STR	tandemová opakování krátkých motivů; z angl. short tandem repeats
36NF	36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd
4NF	4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd
4NF+K	4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí
4NF+NaOH	4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným
4PF	4% (v/v) pufrovaný formaldehyd
4PF+K	4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí

1 Úvod a cíle práce

Fixace tkání je základním procesem používaným pro dlouhodobé uchování tkání. Účelem fixace je zabránit samovolným autolytickým procesům, a umožnit tak následnou analýzu dané tkáně v co nejméně změněném stavu. S rozvojem molekulárně biologických metod začaly fixované vzorky představovat nejen materiál pro zejména mikroskopickou analýzu, ale také zdroj materiálu pro analýzu nukleových kyselin: ribonukleové kyseliny (RNA, z angl. ribonucleic acid) a deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z angl. deoxyribonucleic acid).

V současné době je nejčastěji používaným fixačním činidlem formaldehyd. Jeho použití má na kvalitu (fragmentace či vyizolované množství) nukleových kyselin řadu negativních účinků. Tyto negativní účinky však mohou být alespoň do jisté míry potlačeny. Jednou z možností, jak získat nukleové kyseliny o vyšší kvalitě, je optimalizace fixačního procesu. Ta může být zaměřena například na chemické složení formaldehydu, dobu jeho působení na tkáň či teplotu, během níž fixace probíhá. Druhou variantu optimalizace představuje proces izolace nukleových kyselin z fixované tkáně. V tomto případě je důležitá volba samotné izolační metody a případné nastavení podmínek, za kterých probíhá.

Cíle diplomové práce byly následující:

- 1) V rešeršní části zmapovat možnosti optimalizace procesu fixace tkání formaldehydem a optimalizace procesu izolace DNA z tkání fixovaných formaldehydem vzhledem ke kvalitě získané DNA a shrnout metodické přístupy měření kvality DNA
- 2) V experimentální části určit vliv chemického složení roztoku formaldehydu a vliv délky fixace na kvalitu a kvantitu následně izolované DNA

2 Literární přehled

2.1 Fixace tkání

2.1.1 Princip fixace tkání

Fixace tkání je proces rychlé denaturace bílkovin pomocí fixačních faktorů a činidel. Jeho cílem je zabránit samovolným autolytickým procesům v buňkách a tkáních, a uchovat tak buněčné struktury a tělní tkáně v co nejpřirozenějším stavu (Vacek, 1996).

Fixované tkáně mohou být využity k histologickému barvení, imuno-histochemickému barvení, *in situ* hybridizaci, hmotnostní spektrometrii či izolaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z angl. deoxyribonucleic acid) a ribonukleové kyseliny (RNA, z angl. ribonucleic acid) (Grizzle, 2009).

Kvalita zafixované tkáně, která zásadně ovlivňuje možnost izolace DNA z fixovaného vzorku, závisí na mnoha faktorech. Ty lze rozdělit na faktory prefixační, faktory spojené s fixací a faktory postfixační (Srinivasan *et al.*, 2002).

2.1.1.1 Prefixační faktory

Prefixačními faktory se myslí jevy působící na tkáň od chvíle jejího vyjmutí z organismu po moment započetí fixace. V závislosti na typu tkáně stačí i deset minut nedostatečného okysličení a v buňce začne docházet k významným biochemickým změnám, které v důsledku vedou k buněčné smrti (Kingsbury *et al.*, 1995). Ať už se jedná o nekrózu či apoptózu, oba tyto procesy ovlivňují (být rozdílně) kvalitu izolovatelné DNA (Didenko *et al.*, 2003; Nagata, 2000; Zhang *et Xu*, 2000). Je třeba si také uvědomit rozdíl vyjmutí tkáně z živého organismu a z organismu již mrtvého (tkáň v mrtvém těle se zpravidla nachází v anoxickém stavu již před vyjmutím).

2.1.1.2 Faktory spojené s fixací

Mezi faktory spojené s fixací patří fixační faktory a činidla použitá pro fixaci vzorku a podmínky, za kterých fixace probíhá. Jedná se zejména o délku fixace, teplotu, pH a objem fixačního činidla (Helander, 1994; Hewitt *et al.*, 2008).

Fixační činidla musí splňovat následující vlastnosti. Předně by měla dobře zachovávat strukturu buněk a tkání a zároveň co nejméně ovlivňovat anatomii a chemii

fixovaného vzorku (k určitým změnám vlivem fixačního činidla však dochází vždy a zabránit tomuto ději nelze). Dále by měla rychle pronikat do tkáně, aby zabránila autolýze v celém objemu a také by měla zachovat barvitelnost tkáně pro mikroskopickou analýzu. Fixační činidla a faktory dělíme na fyzikální (vysoké či nízké teploty) a chemické (Vacek, 1996).

Chemická fixační dále členíme na čtyři hlavní druhy: aldehydy, které způsobují cross-linkování buněčných makromolekul (formaldehyd, glutaraldehyd); oxidační činidla také způsobující cross-linkování (oxid osmičelý); činidla založená na alkoholech, která denaturují proteiny odvodněním (ethanol, methanol) a fixační činidla obsahující kovový prvek, tvořící nerozpustné sraženiny s buněčným materiálem (chlorid rtuťnatý) (Thavarajah *et al.*, 2012).

V dnešní době je nejrozšířenějším fixačním činidlem 10% neutrální pufrovaný formol (Srinivasan *et al.*, 2002). Vzhledem k zaměření práce bude tomuto fixačnímu činidlu v textu věnován další prostor.

2.1.1.3 Postfixační faktory

Mezi nejvýznamnější postfixační faktory patří doba a podmínky skladování zafixované tkáně. Bylo ukázáno, že v čase dochází ke snížení detekovatelného množství DNA. V případě teploty skladování není známo, zda by uchovávání fixované tkáně za určitých teplot mohlo zabránit degradaci DNA. Optimálních podmínek při uchovávání fixovaného vzorku by však teoreticky mohlo být dosaženo použitím vakua, které by bránilo oxidaci vzorku (Srinivasan *et al.*, 2002).

2.1.2 Formaldehyd

Prvenství objevu formaldehydu (CH_2O , systematický název methanal) jakožto fixačního činidla se připisuje k roku 1893 Ferdinandu Blumovi, byť formaldehyd byl znám od roku 1859 díky Alexandru Butlerovovi (Fox *et al.*, 1985; Puchtler *et al.*, 1985).

Důvody, proč je formaldehyd stále široce používán, jsou jeho cena, relativně dobrá dostupnost a především splňuje požadavky na dobré fixační činidlo: velmi dobře zachovává anatomii velké většiny tkání, velmi rychle proniká do celého objemu vzorku (nicméně samotné zafixování trvá podstatně déle) a významně neinterferuje s barvicími metodami, a tedy ani s následnou mikroskopickou analýzou. Zároveň není uživatelsky náročný, například nemůže snadno dojít k „přefixování“ apod.

Při použití formaldehydu v histologii musíme brát na zřetel specifickou nomenklaturu. Za prvé, nasycený roztok formaldehydu nazýváme formolem či formalínem (100% formol či 100% formalín), přičemž se jedná o dva různé názvy pro stejný roztok. Za druhé, nasycený roztok formaldehydu ve vodě je nasycený jako 40%, vyjadřujeme-li procentuální podíl jako hmotnost/objem, a jako 37%, vyjadřujeme-li procentuální podíl jako hmotnost/hmotnost. Množství formaldehydu je v obou případech stejné, pokaždé se tedy jedná o stejný nasycený roztok, pouze se liší vyjádření procentuálního podílu formaldehydu v roztoku. Hovoříme-li tedy o 10% formolu, máme na mysli 4% roztok formaldehydu (jelikož 100% formol je 40% formaldehyd, kde 40% formaldehyd je nasyceným roztokem (vyjadřujeme-li procentuální podíl jako hmotnost/objem)). Právě 4% roztok formaldehydu se používá k fixaci tkání.

Při vyšších koncentracích formaldehyd samovolně polymerizuje, čemuž se zabráňuje přidáváním alkoholu (nejčastěji 10% methanolu), který slouží jako inhibitor této reakce.

Další vlastností formaldehydu je jeho přeměna ve vodném prostředí na methylglykol ($\text{CH}_2(\text{OH})_2$). Chemická rovnováha tohoto procesu je nakloněna silně ve prospěch methylglykolu, a ten se tudíž nachází ve vodných roztocích formaldehydu v relativně vysokých koncentracích. Zpět na formaldehyd se methylglykol přeměňuje odebráním formaldehydu z roztoku prostřednictvím jeho vyvazování do fixované tkáně. Toto postupné „doplňování“ formaldehydu je důvodem jeho relativně nízké fixační rychlosti (Fox *et al.*, 1985).

Poslední výraznou vlastností formaldehydu je jeho přeměna na kyselinu mravenčí (CH_2O_2), jejíž přítomnost při fixaci zhoršuje kvalitu histologických preparátů. K přeměně na kyselinu mravenčí dochází samovolně oxidací a neutralizuje se přidáním uhličitanu vápenatého (CaCO_3), uhličitanu hořečnatého (MgCO_3), fosfátovými solemi či přečištěním na iontoměniči. Kyselina mravenčí se vyskytuje již ve formaldehydu zakoupeném z výroby, kontaminaci tudíž musíme předpokládat vždy, pokud ji sami aktivně neodstraníme či nepředcházíme. Další možností je příprava čerstvého formaldehydu přímo z paraformaldehydu, tedy polymerizovaného formaldehydu (v takovém případě je koncentrace kyseliny mravenčí o řád nižší než u standardního 4% pufovaného formaldehydu) (Fox *et al.*, 1985).

Samotný mechanismus fixace formaldehydem spočívá ve vytváření intramolekulárního a intermolekulárního cross-linkování. Nejčastějším jevem je vznik methylenového můstku mezi postranními řetězci aminokyseliny lysinu. K dalšímu cross-

linkování může docházet také mezi dalšími aminokyselinami a biomolekulami. Fixace formaldehydem neovlivňuje sekundární a terciární strukturu proteinů a vzniklé cross-linkování a funkce proteinů jsou vratné účinkem zvýšené teploty (Howat *et Wilson*, 2014).

2.1.2.1 Příprava FFPE bločků

Vzorky fixované formalínem a zalité do parafínu (tzv. FFPE bločky, z angl. formalin-fixed, paraffin-embedded) jsou tkáně, které prošly fixací ve formaldehydu, následně byly odvodněny (parafín není mísitelný s vodou) a napuštěny roztokem mísitelným s parafínem (obvykle xylen). Ten následně pomáhá parafínu prostupovat do tkáně. Takovýto bloček může být uchováván desítky let v pokojové teplotě bez výrazné degradace archivované tkáně. Samotné zalití vzorku do parafínu by nemělo mít výrazný vliv na kvalitu biomolekul. Nicméně doporučuje se použití parafínu tajícího při nižších teplotách, protože vysoká teplota by negativní vliv na kvalitu biomolekul mít mohla (Hewitt *et al.* 2008).

Protokolů, podle kterých tento proces probíhá je velmi mnoho a prakticky každé patologické či lékařsko-soudní pracoviště má svůj vlastní. Součástí této práce bylo také zjišťování protokolů na přípravu FFPE. Shrnutí informací získaných z protokolů je uvedeno v Tabulce P1 (Příloha, str. 69) a reprezentativní výběr těchto protokolů se nachází v Tabulce P2 (Příloha, str. 70).

2.1.2.2 Formaldehyd a jeho působení na DNA

Pokud chceme tkáň fixovanou formaldehydem využít jako zdroj DNA, musíme vzít v úvahu, že formaldehyd s DNA chemicky reaguje, a tím ji negativně ovlivňuje. Konkrétně dochází ke změně primární sekvence, fragmentaci, cross-linkování s biomolekulami a obecně ke zhoršení izolačních možností DNA. Z tohoto důvodu existují snahy nahradit formaldehyd moderními fixačními činidly, která by poskytly stejné histologické výsledky jako formaldehyd, ale zároveň by byly šetrnější k nukleovým kyselinám (Belloni *et al.*, 2013; Howat *et Wilson*, 2014; Staff *et al.*, 2013).

Existují čtyři typy chemických interakcí mezi formaldehydem a DNA. Vlivem prvních dvou dochází ke cross-linkování jednotlivých molekul či fragmentů DNA s DNA a proteiny. Molekula formaldehydu se nejdříve váže (mechanismem chemické adice) na dusík báze nukleové kyseliny, a vytváří tak hydroxymethylovou skupinu. Tato N-hydroxymethylová skupina následně elektrofilně atakuje další bázi nukleové kyseliny, a

vytváří tak methylenový můstek mezi dvěma aminoskupinami dvou bází. Obdobně vzniká methylenový můstek také mezi DNA a proteiny. Formaldehyd dále způsobuje hydrolýzu N-glykosidické vazby, což vede k uvolňování purinů a pyrimidinů z molekul DNA. V neposlední řadě pak formaldehyd způsobuje hydrolýzu fosfodiesterové vazby, a tím molekulu DNA štěpí na fragmenty (Douglas *et al.*, 1998; Srinivasan *et al.*, 2002).

Nicméně je potřeba mít na paměti, že přestože výše popsanou degradaci DNA způsobuje formaldehyd sám o sobě, nemusí být nutně jejím jediným zdrojem. Jak je uvedeno v kapitole 3.1.2, formaldehyd se přeměňuje na kyselinu mravenčí. Kyselina mravenčí snižuje pH roztoku formaldehydu a toto nízké pH způsobuje hydrolytické degradační procesy, tedy uvolňování purinů a pyrimidinů z molekul DNA a štěpení fosfodiesterové vazby (Koshiha *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1999).

2.1.2.3 Faktory ovlivňující formaldehydovou fixaci ve vztahu k DNA

Negativní účinky formaldehydu na DNA mohou být do jisté míry ovlivněny nastavením podmínek, za kterých fixace probíhá. Jako hlavní faktory jsou nejčastěji uváděny délka fixace, teplota, během níž fixace probíhá, či chemické složení a pH použitého formaldehydu a v neposlední řadě je důležitý i typ tkáně, kterou fixujeme.

Jedním z faktorů, které hrají roli, je tkáň samotná. Tkáň s vyšší buněčnou proliferací jsou více postihovány negativními účinky fixace formaldehydem, jelikož replikující se DNA je obecně více náchylná ke škodlivému chemickému a fyzikálnímu působení (Dutta *et al.*, 2012; Khoja *et al.*, 2012).

Dalším faktorem je délka fixace formaldehydem. Výsledky studií ukazují, že čím déle působí formaldehyd na DNA, tím více dochází k jejímu cross-linkování (Khoja *et al.*, 2012), což může způsobovat nižší kvalitu vyizolované DNA (Ferrer *et al.*, 2007). Delší působení formaldehydu na DNA však nevede pouze k vyšší míře fragmentace DNA a nižším výtěžkům, snáze také může docházet k změně primární struktury DNA (Karlsen *et al.*, 1994). V závislosti na typu následné analýzy a dalších podmínek, jako je například velikost vzorku či způsob extrakce DNA z fixovaného vzorku, se tyto negativní účinky formaldehydu mohou projevit již po 6 hodinách fixace (Ben-Ezra *et al.*, 1991).

Teplota fixace je dalším faktorem. Standardně se fixace provádí za pokojové teploty (25 °C), nicméně bylo ukázáno, že fixace za nízké teploty (4 °C) poskytuje podstatně méně degradovanou DNA (Bussolati *et al.*, 2011; Tokuda *et al.*, 1990).

Posledním důležitým faktorem jsou chemické parametry formaldehydu. Tkáň fixované chemicky ošetřeným (pufrovaným) formaldehydem jsou lepším zdrojem

nukleových kyselin než vzorky fixované formaldehydem, který pufrovaný není. Tato skutečnost se projevuje zejména u vzorků, které jsou ve formaldehydu fixovány po dlouhou dobu – až měsíce či roky. Pravděpodobně protože při použití nepufrovaného formaldehydu dochází k dlouhodobému přibývání kyseliny mravenčí v roztoku, a tudíž snižování pH roztoku, což významně přispívá k degradaci DNA. Pufrovaný formaldehyd je alespoň do určité míry schopný potlačovat změny v pH roztoku (Ferrer *et al.*, 2007; Greer *et al.*, 1991; Hewitt *et al.*, 2008; Thavarajah *et al.*, 2012).

2.2 Izolace DNA z FFPE bločků

Ačkoli vlivem fixace dochází k modifikaci a degradaci DNA, poskytují FFPE bločky materiál, z něhož lze provést extrakci nukleových kyselin. Poprvé se DNA z FFPE bločků podařilo vyizolovat za použití proteinázy K a dodecylsírany sodného (SDS, z angl. sodium dodecyl sulfát), jakožto hlavních činidel, v roce 1985. Bylo prokázáno, že takto získanou DNA je možné štěpit restrikcčními endonukleázami a následně hybridizovat s DNA sondami (Dubeau *et al.*, 1986; Goelz *et al.*, 1985).

Základní kroky extrakce DNA z FFPE bločků vycházející z původního protokolu dle Goelz *et al.* (1985) a Dubeau *et al.* (1986) se pro izolaci DNA používají dodnes. Existuje však zároveň mnoho variant a komerčních kitů, které umožňují získat co nejkvalitnější vzorek DNA v závislosti na jeho dalším využití (tabulka kitů vhodných pro izolaci DNA z FFPE bločků je uvedena v Příloze jako Tabulka P1).

2.2.1.1 Pre-extrakční ošetření FFPE tkáně

Podle původního protokolu je pro extrakci DNA nejprve nutné odstranit parafín, ve kterém byla tkáň zalita. Parafín může být odstraňován z celistvého bločku, vhodnější se však zdá být odstraňování parafínu z bločku, který se předem nařeže na tenké řezy (Dubeau *et al.*, 1986). Nejčastěji se k odstranění parafínu používá xylen, jenž parafín rozpouští a uvolňuje od tkáně. Pro dokonalé odstranění parafínu je nutné tento krok několikrát opakovat. Po odstranění parafínu xylenem je tkáň rehydratována pomocí série promývacích kroků v ethanolu (postupně je použit 100%, 70% a 50% ethanol) a krátce vysušena (Goelz *et al.*, 1985; Pikor *et al.*, 2011). K odstranění parafínu však mohou být využity i jiné přístupy než použití xylenu, např. použití minerálních olejů či mikrovlkn (Banerjee *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2009).

Existují také studie, které nepovažují odstranění parafínu za důležité, nebo jej nahrazují jinými postupy. Jedná se například o zahřátí tkáně uložené v FFPE bločcích,

bez předchozího xylen/ethanolového kroku, na teplotu 98 °C v pufru obsahujícím Tris či zahřátí na 120 °C v alkalickém roztoku. (Shi *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Extrakce DNA z FFPE bločků

Byla publikována celá řada metodických přístupů zabývajících se extrakcí a purifikací nukleových kyselin z FFPE bločků. Původní protokol izolace DNA dle Dubeau *et al.* (1986) byl založen na použití proteinázy K a SDS. Proteináza K se používá k štěpení enzymů a proteinů, jako jsou například nukleázy, které by mohly způsobit degradaci DNA. SDS slouží jako denaturační činidlo usnadňující štěpení tkáně, z níž se DNA uvolňuje. Následná purifikace DNA z tkáňového lyzátu byla provedena pomocí chloroform-izoamyl alkoholové extrakce, při které dochází k oddělení DNA a RNA do horní vodné fáze od lipidů, proteinů a polysacharidů, které zůstávají ve spodní organické fázi. V dalším kroku byl vzorek inkubován s RNázou A a pronázou, aby se odstranila RNA a zbylé proteiny. K odstranění použitých enzymů a finální izolaci čisté DNA ze vzorku byla na závěr použita fenolová extrakce (Dubeau *et al.*, 1986; Pikor *et al.*, 2011).

Mezi základní modifikace původního protokolu izolace DNA z FFPE bločků patří zvýšení koncentrace proteinázy K, prodloužení času štěpení tkáně proteinázou K či zvýšení teploty před, během nebo po tomto kroku (Dedhia *et al.*, 2007; Duval *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009). Některé studie však enzymatické štěpení tkáně zcela vynechávají a pro izolaci DNA z FFPE bločků doporučují pouze zahřátí vzorku na vysokou teplotu v alkalickém prostředí (Shi *et al.*, 2002). Podle autorů těchto studií by alkalický roztok a vysoké teploty měly vést k rozpadu buněčné a jaderné membrány a k odstranění cross-linkování mezi DNA a proteiny. Na druhou stranu je třeba zmínit, že účinkem samotné vyšší teploty dochází k degradaci DNA, a proto je tento krok potřeba optimálně nastavit (Lindhahl, 1993).

Mezi další modifikace původního protokolu patří úprava složení lyzačního pufru. Pro zvýšení výtěžků extrakce DNA lze přidat látky, které pomáhají odstranit formaldehyd, jenž se uvolňuje během extrakce nukleových kyselin. Jedná se například o detergenty, jako je glycin (Shedlock *et al.*, 1997).

K odstranění použitých enzymů či jiných kontaminujících proteinů nemusí být použito pouze fenolové extrakce, ale proteiny mohou být ze vzorku odstraněny také vysolením, například saturovaným roztokem chloridu sodného (Howe *et al.*, 1997).

Další alternativu izolace DNA z FFPE bločků představuje metoda založená namísto na organické purifikaci na využití silikátových partikulí či kolonek nebo na polymerním

materiálu, který odděluje DNA od degradačních enzymů a jiných kontaminujících látek (Boom *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 1991; Wickham *et al.*, 2000).

2.2.1.3 Post-extrakční úprava DNA izolované z FFPE bločků

Zcela jiný přístup optimalizace izolace DNA z FFPE bločků byl publikován v roce 2003. Jeho autoři před samotnou polymerázovou řetězovou reakcí (PCR; z angl. polymerase chain reaction) DNA vyizolované z FFPE tkáně nejprve zařadili pre-PCR krok opravy DNA. Ten byl proveden pomocí Taq DNA polymerázy, která opravila jednořetězové zlomy DNA, a tím došlo k získání delších DNA fragmentů pro samotnou PCR amplifikaci (Bonin *et al.*, 2003).

2.2.1.4 Výhody a nevýhody jednotlivých postupů izolace DNA z FFPE bločků

Existuje mnoho studií zabývajících se srovnáním účinků jednotlivých variant protokolu izolace DNA z FFPE bločků. Tyto studie však často přinášejí rozdílné závěry. Na výsledek izolace DNA z FFPE vzorku má totiž značný vliv nejen zvolená izolační metoda, ale také mnohé parametry spojené s původní fixací vzorku, jako druh tkáně, kvalita provedení fixace či délka a podmínky skladování daného vzorku (viz kapitola 3.1.1). Dalším významným faktorem v hodnocení účinnosti izolace DNA z FFPE bločků je parametr, který pro hodnocení použijeme. Některé metody například přinášejí lepší výtěžky DNA, jiné výrazně zlepšují čistotu DNA, další postupy mohou být šetrnější, a tím zajistit izolaci delších fragmentů DNA. Je tedy potřeba brát ohled na to, k čemu vyizolovanou DNA budeme dále požívat a které z kritérií je pro nás klíčové.

Některé srovnávací studie považují za kritický krok izolace DNA z FFPE bločku odstranění parafínu (Sengüven *et al.*, 2014), jiné naopak tento krok nepovažují za nezbytný, neboť nepřináší žádný benefit (Gilbert *et al.*, 2007).

Jako jednoznačně výhodné se jeví zařazení delšího inkubačního času při štěpení vzorku proteinázou K, a to až na 48–72 hodin. V důsledku prodloužení lyzačního kroku dochází k lepší amplifikovatelnosti DNA v PCR reakci, zároveň ale nedochází k zvýšení množství vyizolované DNA. Zdá se tedy, že prodloužení času štěpení vzorku činí DNA více vhodnou pro následnou PCR reakci, pravděpodobně odstraněním cross-linkování DNA (Gilbert *et al.*, 2007). Nicméně jiné studie zkoumající vliv delšího inkubačního času během štěpení tkáně z FFPE bločků zaznamenaly i vyšší výtěžky DNA, pravděpodobně se tak v rámci pozitivního vlivu na izolaci DNA uplatňují oba mechanismy

(Paireder *et al.*, 2013; Sengüven *et al.*, 2014). Podobně výhodné se zdá být i použití vyšší teploty během lyzování vzorku, maximálně však 65 °C, neboť vyšší teploty již pravděpodobně vedou k degradaci DNA, a tím k získání nižších výtěžků DNA ze vzorku (Gilbert *et al.*, 2007; Paireder *et al.*, 2013). Lepší výtěžky a amplifikovatelnost DNA byly zaznamenány také při zahřátí vzorku na vysokou teplotu (95 °C), ale až po jeho lyzování (Dedhia *et al.*, 2007).

Naopak ne zcela jednoznačně pozitivní vliv mělo zařazení pre-extrakčního zahřátí FFPE bločku na vysokou teplotu (okolo 98 °C) či použití protokolu založeném na izolaci DNA za vysoké teploty (100–120 °C) v alkalickém prostředí. Ačkoli obě modifikace vedly k zisku dobře amplifikovatelné DNA v následné PCR reakci, u obou metod došlo k negativnímu ovlivnění jiných parametrů. V případě zařazení pre-extrakčního zahřátí došlo k snížení účinnosti multiplexové PCR a v případě izolace DNA účinkem vysoké teploty v alkalickém prostředí došlo k snížení množství vyizolované DNA (Gilbert *et al.*, 2007).

Ve srovnávacích studiích přineslo jednoznačně negativní účinek na amplifikovatelnost DNA v PCR reakci přidání glycinu do lyzačního pufru použitého na izolaci DNA (Gilbert *et al.*, 2007).

Dobrých výsledků bylo dosaženo použitím komerčních kitů na izolaci DNA z FFPE tkáně založených na silikátových kolonkách, konkrétně QIAamp DNA izolačních kitů od výrobce Qiagen. Jejich použitím byla získána dobře amplifikovatelná DNA a lepších výsledků bylo dosaženo také v multiplexové PCR reakci (Gilbert *et al.*, 2007; Sengüven *et al.*, 2014). Použití komerčního kitu bylo také nejvhodnější variantou v případě izolace DNA z dlouhodobě (více než 50 let) skladovaných vzorků (Paireder *et al.*, 2013). Ze závěrů jiné studie se optimální metodou pro izolaci a purifikaci DNA zdá být kombinace komerčního QIAamp DNA kitu spolu s fenol-chloroformovou extrakcí. Fenol-chloroformový krok pravděpodobně zajišťuje odstranění kontaminací, které by mohly negativně ovlivnit schopnost DNA vázat se na silikátovou matrix, a zároveň obě metody pravděpodobně zajišťují odstranění případných inhibitorů následné PCR reakce ze vzorku (Farrugia *et al.*, 2010).

Post-extrační oprava DNA pomocí Taq DNA polymerázy přinesla výrazné zlepšení amplifikovatelnosti DNA v PCR reakci, ačkoli zároveň nebyly detekovány významné změny ve velikosti fragmentů DNA. Zdá se tedy, že pre-PCR opravný krok umožní opravy pouze drobných poškození DNA nikoli výrazných defektů DNA, jako představuje fragmentace DNA. Zároveň je třeba uvést, že studie se nezabývají potenciální možností

vzniku chyb v sekvenci DNA, která by při opravě DNA v tomto kroku mohla vzniknout (Gilbert *et al.*, 2007).

2.3 Stanovení kvality DNA vyizolované z FFPE bločků

Kvalita DNA vyizolované z FFPE bločků může být posuzována na základě různých kritérií, jako je množství, čistota, integrita či amplifikovatelnost DNA v průběhu PCR reakce. Pro ohodnocení uvedených parametrů jsou vhodné různé metody, ideálně potom jejich kombinace, neboť jednotlivé metody často nepodávají dostatečně komplexní informaci o kvalitě získané DNA. Porovnání jednotlivých metod používaných pro stanovení vlastností DNA je uvedeno v Tabulce 1, zařazené na konec této kapitoly (str. 25).

Určení kvality DNA nám umožňuje vybrat vhodný metodický přístup v dalším analyzování DNA vzorku. Například stanovení míry fragmentace DNA je důležité pro následný výběr vhodné metody určení profilu DNA pro identifikační účely. K tomuto účelu se standardně používá detekce tandemových opakování na DNA, tzv. STR (z angl. short tandem repeats). Avšak bylo ukázáno, že pro vysoce fragmentovanou DNA (fragменты kratší než 200 bp) je vhodnější detekce mini-STR nebo jednonukleotidových polymorfismů, tzv. SNP (z angl. single nucleotide polymorphism), u detekce SNP je ale potřeba vzít v úvahu, že u tkání s delším posmrtným intervalem (PMI, post mortem interval) může docházet k záměně bazí, což má zásadní vliv na výsledek analýzy (Alaedini *et al.*, 2010; Hughes-Stamm *et al.*, 2010).

2.3.1 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrického měření lze využít k určení koncentrace a čistoty vyizolované DNA. Koncentraci lze spektrofotometricky určit řádově v $\mu\text{g/ml}$ a stanovení je založeno na měření absorbance při 260 nm (absorbční maximum pro DNA). Pro převod hodnot absorbance na koncentraci DNA je využito Lambert-Beerova zákona. Absorbance o hodnotě 1 při měření v 1cm kyvetě odpovídá přibližně koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ dvouřetězcové DNA. K absorbanci při 260 nm přispívá jednořetězcová i dvouřetězcová DNA, ale také RNA, která se vyskytuje ve vzorku, proto není takto stanovená koncentrace DNA zcela přesná. Absorbance při 320 nm by měla sloužit jako kontrolní měření, neboť DNA neabsorbuje UV světlo této vlnové délky (Santella, 2006).

Spektrofotometrického měření lze využít také k určení čistoty vyizolované DNA. K stanovení kontaminace proteiny nebo RNA se používá poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm (A260/A280) pro určení kontaminace chaotropními solemi poměr absorbancí při 260 nm a 230 nm (A260/A230). Čistá DNA má hodnotu A260/A280 rovnou 1,8, jako akceptovatelné hodnoty se udává A260/A280 v rozmezí 1,8–2. Vyšší hodnoty ukazují na kontaminaci RNA, nižší hodnoty potom na kontaminaci proteiny (Gallagher, 2001).

Vzorek DNA izolované z fixované tkáně bývá často alespoň částečně cross-linkován s proteiny a vlivem izolačních procedur nezřídka obsahuje další látky a enzymy, a proto je obecně stanovení koncentrace a čistoty pomocí spektrofotometrie obtížné (Ahn *et al.*, 1995).

2.3.2 Fluorometrické metody

Fluorometrického stanovení koncentrace DNA se využívá v případě, že vzorek obsahuje velmi malá množství DNA. Citlivost metody umožňuje detekovat koncentrace DNA pohybující se řádově v ng/ml – pg/ml. Metoda je založena na měření fluorescence generované v případě inkorporace fluorescenční barvy do dvouřetězcové DNA. Z toho také plyne, že tento přístup umožňuje detekovat pouze dvouřetězcové molekuly DNA. Koncentrace DNA ve vzorku se stanovuje vzhledem ke kalibrační křivce tvořené z definovaných koncentrací DNA. Na rozdíl od spektrofotometrie však fluorometrické metody nepřinášejí informaci o čistotě získané DNA (Santella, 2006).

Mezi původně používané barvy patřil Hoechst 33258 a ethidium bromid. Nevýhodou použití Hoechstu 33258 je skutečnost, že se preferenčně váže do A-T bohatých oblastí DNA. V případě ethidium bromidu nevýhodu představuje fakt, že se může vázat i na jednořetězcovou DNA a RNA (Gallagher, 2001).

V dnešní době patří mezi nejvyužívanější látky fluorescenční barva SYBR Green či PicoGreen. Jejich výhodou je, že po vazbě na DNA dochází k výrazné změně jejich fluorescenčních vlastností, pozadí měření (dané nenavázanou barvou přítomnou ve vzorku) je tudíž velmi nízké, dále jsou stabilní vůči vysvěcování, selektivně se váží na dvouřetězcovou DNA a kontaminace vzorku (jako jednořetězcová DNA, RNA či fenol) nemají na jejich vazbu vliv (Ahn *et al.*, 1995).

2.3.3 Elektroforetické metody

Jednoznačnou výhodou použití elektroforetických metod při hodnocení kvality DNA získané z FFPE bločků je informace o integritě této DNA. K elektroforetickému

stanovení integrity DNA se využívá migrace vzorku DNA v agarózovém gelu umístěném v elektrickém poli. Vzhledem k tomu, že DNA obsahuje negativně nabitě fosfátové skupiny, dochází po umístění DNA do elektrického pole k její migraci směrem ke kladnému pólu. Během migrace je celkový DNA vzorek v gelu rozdělen na jednotlivé fragmenty v závislosti na jejich velikosti. Vizualizace jednotlivých fragmentů barvou, která se váže na DNA (například ethidium bromid či jiná fluorescenční barva), poté poskytne informaci o míře fragmentace DNA.

Tradiční agarózové gely jsou vhodné pro analýzu fragmentů DNA v rozmezí 0,5–25 kb pro analýzu menších fragmentů je vhodnější polyakrylamidová elektroforéza. V závislosti na velikosti fragmentů se používá nejčastěji 0,5–1,5% agaróza (Lee *et al.*, 2012; Voytas, 2001).

Analýza DNA v agarózovém gelu také umožňuje stanovení množství DNA. To může být určeno na základě porovnání intenzity vizualizovaného analyzovaného vzorku DNA s intenzitou vizualizovaného standardu DNA, který však musí mít stejnou délku jako analyzovaná DNA. Přesnější výsledky poskytuje denzitometrické měření intenzity vizualizovaného analyzovaného vzorku DNA a následné porovnání s kalibrační křivkou tvořenou DNA o známých koncentracích. Tímto přístupem lze určit nejlépe množství DNA pohybující se mezi 20 ng až 100 ng (Dorfman *et al.*, 2013; de Jong *et al.*, 2011).

V dnešní době však existují i alternativní přístupy založené na elektroforetickém měření, které poskytují informaci nejen o stupni degradace vyizolované DNA, ale zároveň také jednoduše a přesně stanovují její koncentraci. Jedná se DNA elektroforézu založenou na čípech, které jsou tvořeny skupinou mikrokanálek, do nichž je umístěn vzorek analyzované DNA. Podobně jako u klasické agarózové elektroforézy je DNA elektroforeticky rozdělena na jednotlivé fragmenty na základě jejich velikosti. Největší výhodou čipové elektroforézy je, že k měření stačí velmi malé množství vzorku (až 1 μ l o koncentraci DNA řádově ng/ml) a poskytuje značně komplexní informaci o kvalitě DNA (Dorfman *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2000; Woolley *et al.*, 1994).

2.3.4 Metody založené na PCR

2.3.4.1 Princip kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR, z angl. quantitative polymerase chain reaction; označovaná také jako real-time PCR) se od klasického PCR liší především v odečítání informací.

Zatímco klasická PCR podává informace pouze o konečném stavu reakce, qPCR umožňuje sledovat její průběh. qPCR totiž kombinuje klasické amplifikování DNA spolu s měřením odpovídajícího nárůstu fluorescence pomocí fluorescenčních sond či barev. Cyklus, ve kterém dojde k překročení stanovené míry fluorescence, nese označení Ct (cycle-threshold). Porovnáním Ct jednotlivých vzorků DNA s hodnotou Ct známého množství referenční DNA lze stanovit množství DNA v původním vzorku. Takto však lze stanovit pouze DNA, kterou je možné v PCR amplifikovat. Nižší hodnoty Ct naznačují vyšší množství amplifikovatelného templátu DNA (Gilbert *et al.*, 2007).

Příkladem často používaných fluorescenčních sond jsou TaqMan sonda a fluorescenční barva SYBR Green I. V případě TaqMan sondy neboli hydrolytické sondy nazýváme sondou oligonukleotid (nikoliv nutně viz Braasch *et al.*, 2001), který má k sobě kovalentně připevněn fluorofor a jeho zhášec. Fluorofor je připevněn k 5' konci a zhášec je připevněn k 3' konci oligonukleotidu. Takovéto umístění zaručuje jejich vzájemnou blízkost a umožňuje zhášeci neustále snižovat fluorescenční intenzitu fluoroforu. Tento proces se nazývá fluorescenční rezonanční přenos energie (z angl. fluorescence resonance energy transfer, FRET) (Stryer, 1978). Sonda má takovou primární nukleotidovou strukturu, aby nasedala na námi zvolenou sekvenci cílové molekuly DNA, kterou kvantifikujeme. Tuto cílovou sekvenci ohraničíme primery. Metoda využívá 5'→3' exonukleázovou aktivitu některých polymeráz (především Taq polymerázy). Ne všechny polymerázy s 5'→3' exonukleázovou aktivitou jsou však pro tuto metodu vhodné (Kreuzer *et al.*, 2000). Poté, co primery a sonda nasednou na cílovou sekvenci, nasedá přes primery polymeráza a syntetizuje nové vlákno DNA. Vzhledem k tomu, že mezi primery se nachází nasednutá sonda, je tato polymerázou odstraněna (oligonukleotid je hydrolyzován na samostatné nukleotidy) a na ni připevněný fluorofor se zhášecem se od sebe vzdálí a je-li fluorofor excitován, je schopen vyzařovat signál do okolí (tento není pohlcován zhášecem). Zaznamenání tohoto signálu značí přítomnost cílové molekuly, síla signálu pak vyjadřuje množství takové molekuly. Jako fluorofor se používá například FAM (6-carboxyfluorescein), JOE (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein) či TET (tetrachloro-6-carboxyfluorescein). TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamin) se používá jako zhášec (Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 1991).

TaqMan sondy mohou být navíc modifikovány. Modifikace sond slouží především k změnám teploty tání a teploty nasedání primerů. Změníme-li totiž afinitu oligonukleotidové kostry primeru k cílové sekvenci (bez změny samotné sekvence),

můžeme volněji upravovat délku primeru, a tím jeho teplotu tání a teplotu nasedání. Tyto modifikace například zahrnují spojení oligonukleotidu s chemickou skupinou silně vázající malý žlábek DNA dvoušroubovice (Kutyavin *et al.*, 2000) či chemicky syntetizovanou peptidovou nukleovou kyselinou (PNA, z angl. peptide nucleic acid), která nahrazuje samotnou fosfodiesterovou kostru DNA a která má k DNA větší afinitu než DNA samotná (Kubista *et al.*, 2006).

SYBR Green I (N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-yliden)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropan-1,3-diamin) je látka, která má výrazné fluorescenční vlastnosti pouze při interakci s dvouřetězcovou molekulou DNA, a její detekovatelná fluorescence se tedy zvyšuje s celkovým množstvím dvouřetězcové DNA. Jedná se o nespecifický fluorofor, tato metodika tudíž nevyžaduje žádnou konkrétní sekvenci (nicméně nespecifičnost není absolutní (Zipper *et al.*, 2004)) s výhodou, že jeho samotné použití je velmi triviální (Simpson *et al.*, 2000). Nevýhodou je však právě zmíněná nespecifičnost, kdy se fluorescence vzorku zvyšuje nespecifickými PCR produkty i pouhými primerovými dimery. Nicméně tyto problémy jsou kontrolovatelné (Ririe *et al.*, 1997).

2.3.4.2 Stanovení kvality DNA pomocí qPCR

Ke kvantifikaci DNA pomocí qPCR je na molekule DNA nutno vybrat správné cílové sekvence pro kvantifikační primery a (případnou) oligonukleotidovou sondu. Cílové sekvence musí být specifické pro lidskou DNA, aby nedocházelo k interferencím v případě smíšených vzorků. Zároveň by cílová sekvence měla být co nejméně variabilní kvůli univerzálnosti užití. Sekvence by též měla být rozumně krátká, s přihlédnutím k možnostem systému (použitá polymeráza, případná kontaminace apod.). V neposlední řadě jsou výhodné takové sekvence DNA, jejichž lokusy se v lidském genomu nacházejí ve vyšším počtu. Příkladem takovýchto sekvencí jsou: *Alu* sekvence, STR sekvence či lidský gen *RBI* (human retinoblastoma susceptibility gene). Citlivost této metody je v některých případech až 1 pg či 1 až 100 molekul DNA. Kvantifikace se dá provádět v několika nastaveních. Může probíhat v součinnosti s určováním míry degradace molekul DNA, může speciálně určovat množství přítomné mužské DNA (sekvence na Y chromozomu) nebo můžeme určovat množství mitochondriální DNA (používá se v případě nedostatečné genomické DNA) (Andréasson *et al.*, 2002; Hudlow *et al.*, 2008; Nicklas *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2003).

Úpravou nastavení PCR lze zjistit stupeň fragmentace molekul DNA a délku amplifikovatelných fragmentů. V tomto případě se využívá tzv. multiplex PCR. Tato metoda je založená na použití dvou a více dvojic primerů pro amplifikaci ampliconů o různých délkách, ty se mohou lišit o desítky (Hudlow *et al.*, 2008) až stovky párů bazí (Deagle *et al.*, 2006). Stupeň fragmentace DNA se následně určuje z poměru zastoupení amplifikovaných sekvencí, vyšší poměr ve prospěch kratších sekvencí přitom ukazuje na vyšší míru degradace DNA (Swango *et al.*, 2006).

Průběh reakce pak nepřímo vypovídá o čistotě vzorku, poněvadž některé látky použité pro fixaci nebo následnou izolaci DNA působí jako inhibitory PCR (Gilbert *et al.*, 2007).

V případě, že stanovujeme kvalitu DNA z FFPE bločků, je potřeba mít na paměti, že tyto vzorky často nejsou zcela vhodné. Vliv na PCR analýzu DNA vyizolované z FFPE bločku mají především následující skutečnosti popsané výše v textu. Za prvé, nukleové kyseliny jsou v důsledku fixování tkáně formaldehydem výrazně modifikovány (především se jedná o cross-linkování DNA s proteiny). Za druhé, v analyzovaném vzorku mohou být přítomny látky, které inhibují amplifikaci DNA (například formalín). Za třetí, je zde možnost kontaminace vzorku během izolace DNA.

Tabulka 1: Porovnání metod určování kvality DNA. Tabulka shrnuje metodické přístupy na měření kvality DNA a jejich limitace.

		Metody				
		Spektrofotometrické	Fluorometrické	Elektroforetické	Elektroforetické (čip)	PCR
Stanovovaná vlastnost	Množství	> 5 µg/ml	25 pg/ml – 1 µg/ml	20 – 100 ng	5 – 500 pg/µl a 0,1 – 50 ng/µl	< 25 pg
	Čistota	Lze	Nelze	Nelze	Nelze	Lze (inhibice PRC)
	Stupeň fragmentace	Nelze	Nelze	Lze	Lze	Lze (amplicon)
	Amplifikovatelnost	Nelze	Nelze	Nelze	Nelze	Lze

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Přístroje

Bioanalyzátor Agilent 2100, Agilent Technologies, USA

Centrifuga 5415 R, Eppendorf, Německo

Centrifuga MiniSpin, Eppendorf, Německo

DNA analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA

Koncentrátor 5301, Eppendorf, Německo

Laboratorní lednice kombinovaná s mrazákem Mediline, Liebherr, Německo

Laboratorní mrazák Mediline, Liebherr, Německo

Laboratorní váhy KERN 572-31, KERN & SOHN, Německo

PCR cyklér Mastercycler nexus gradient, Eppendorf, Německo

Pracovní stanice Ultraviolet sterilizing PCR workstation, UVP, USA

Real Time PCR cyklér Mastercycler system ep realplex, Eppendorf, Německo

Spektrometr BioSpectrometer, Eppendorf, Německo

Štítkovač BMP 51, Brady, USA

Třepačka Thermomixer Comfort, Eppendorf, Německo

Vortex PV-1, Grand Instruments, Velká Británie

Vortex V-1, Biosan, Litva

3.1.2 Použité chemikálie

DNA standard pro qPCR SRM 2372 Human DNA Quantitation Standard, NIST, USA

DNAGard Tissue, Biomatrix, USA

Ethanol (EtOH) absolutní p.a., PENTA, ČR

Formaldehyd 36% (v/v) nepufrovaný (39% w/v) AnalaR Normapur, BDH Prolabo, USA

Formaldehyd 4% (v/v) pufrovaný (formol) Qpath, Labonord SAS, Francie

Formamid Hi-Di (highly deionized), Life Technologies, USA

Hydroxid sodný (NaOH), Lach-Ner, ČR

Chlorid hořečnatý (MgCl₂) ve formě 50 mM roztoku, Bio-Rad, USA

Kit na fluorescenční stanovení koncentrace DNA – Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen, USA

Kit na stanovení koncentrace DNA na Bioanalyzáru Agilent 2100 – Agilent High Sensitivity DNA kit, Agilent Technologies, USA

Kit na izolaci DNA – ZR Genomic DNA Tissue MicroPrep, Zymo Research, USA

Kit na PCR amplifikaci STR – AmpFLSTR NGM SElect, Applied Biosystems, USA

Kyselina mravenčí (HCOOH) 98%, Lach-Ner, ČR

SYBR Green – iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad, USA

Vnitřní standard pro SRT analýzu – GeneScan 600 LIZ Size Standard v 2.0, Life Technologies, USA

Voda (H₂O) PCR grade, Promega, USA

Voda destilovaná (dH₂O), vlastní výroba

3.1.3 Tkáně

Vzorky lidské tkáně byly získány od MUDr. Tomáše Vojáčka z pracoviště Nemocnice Na Bulovce, Oddělení soudního lékařství. Byly provedeny celkem 3 fixační procedury (4.2.1) s těmito tkáněmi:

Fixace I: (žena, 50 let, posmrtný interval (PMI) 15 hod.) plíce, srdce, slezina, ledvina, sval

Fixace II: (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) srdce, ledvina, sval, játra, srdce ošetřené v roztoku DNAGard Tissue (Biomatrix, USA) (4.1.2) po dobu 24 hod. před fixací

Fixace III: (muž, 82 let, PMI 3 dny) srdce, ledvina, sval, játra.

3.1.4 Roztoky

Fixační roztok 4NF (4% nepufrovaný formaldehyd)

Formaldehyd 36% nepufrovaný	11,10 % (v/v)
dH ₂ O	doplnit do 100 % (v/v)

Fixační roztok 4PF (4% pufrovaný formaldehyd)

Formaldehyd 4% pufrovaný	100 % (v/v)
--------------------------	-------------

Fixační roztok 36NF (36% nepufrovaný formaldehyd)

Formaldehyd 36% nepufrovaný	100 % (v/v)
-----------------------------	-------------

Fixační roztok 4NF+K (4% nepufrovaný formaldehyd s 4% kyselinou mravenčí)

Formaldehyd 36% nepufrovaný	11,10 % (v/v)
Kyselina mravenčí 98%	4,08 % (v/v)
dH ₂ O	doplnit do 100 % (v/v)

Fixační roztok 4PF+K (4% pufrovaný formaldehyd s 4% kyselinou mravenčí)

Kyselina mravenčí 98%	4,08 % (v/v)
Formaldehyd 4% pufrovaný	doplnit do 100 % (v/v)

Fixační roztok 4NF+NaOH (4% nepufrovaný formaldehyd s 4% hydroxidem sodným)

Formaldehyd 36% nepufrovaný	11,1 % (v/v)
Hydroxid sodný	4 % (w/v)
dH ₂ O	doplnit do 100 % (v/v)

qPCR reakční směs

2X SYBR Green (Bio-Rad, USA)	7,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,15 µl
Primer forward (10µM)	0,075 µl
Primer reverse (10µM)	0,075 µl
Cílová DNA	1 µl
H ₂ O (PCR grade)	6,2 µl

3.1.5 Primery

Primery byly nasyntetizovány firmou VBC-Biotech Service (Rakousko). Sekvence primerů byly následující:

Alu1 (jako forward primer): 5'-TGGTGGCTCACGCCTGTAA

Alu2 (jako reverse primer): 5'-CGATCTCGGCTCACTGCAA

Alu3 (jako reverse primer): 5'-CCACCACGCCCGGCTAAT

Alu4 (jako reverse primer) 5'-CTCGTGATCCGCCCGCCTC

Alu5 (jako forward primer): 5'-GGGCGCGGTGGCTCAC

Primery Alu1 + Alu2 tvoří produkt o velikosti 229 bp.

Primery Alu1 + Alu3 tvoří produkt o velikosti 141 bp.

Primery Alu4 + Alu5 tvoří produkt o velikosti 63 bp.

3.2 Metody

3.2.1 Fixace I

Z orgánů pocházejících z mrtvého lidského těla (3.1.3) byla oddělena malá část tkáně (odebíraná část tedy nepocházela z homogenizovaného vzorku daného orgánu) a ta byla následně umístěna na 48 hod. do chladicího boxu (4 °C). Poté byla tkáň naložena do fixačních roztoků 4NF, 4PF, 36NF, 4NF+K, 4PF+K (3.1.4), kde byla ponechána po dobu 1 hod. a 46 hod. Po vyjmutí tkáně z fixačního roztoku následoval proces odmytí fixačního roztoku (probíhající při pokojové teplotě) složený z následujících kroků: jednorázové promytí v destilované vodě, 30 min. inkubace v destilované vodě za občasného promíchání a dvakrát promytí v destilované vodě. Po odmytí fixačního roztoku ihned následovalo štěpení tkáně (3.2.4). Zpracování fixované tkáně bylo prováděno vždy v duplikátu. Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C.

3.2.2 Fixace II a Fixace III

Z orgánů pocházejících z mrtvého lidského těla (3.1.3) byla oddělena malá část tkáně (odebíraná část tedy nepocházela z homogenizovaného vzorku daného orgánu) a ta byla následně umístěna na 48 hod. do chladicího boxu (4 °C). Poté byla tkáň naložena do fixačních roztoků 4NF, 4PF, 36NF, 4PF+K, 4NF+NaOH v případě Fixace II a do fixačních roztoků 4NF, 4PF, 36NF, 4PF+K roztoků (3.1.4) v případě Fixace III. Ve fixačních roztocích byla tkáň ponechána po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. Po vyjmutí tkáně z fixačního roztoku následoval proces odmytí fixačního roztoku (probíhající při pokojové teplotě) složený z následujících kroků: 1 min. promývání pod tekoucí vodovodní vodou, 10 min. inkubace ve vodovodní vodě, 5 min. promývání pod tekoucí vodovodní vodou, 10 min. inkubace ve vodovodní vodě a 1 min. promývání pod tekoucí vodovodní vodou. Po odmytí fixačního roztoku ihned následovalo odvodnění a zavodnění fixované tkáně (3.2.3)

Ve vybraných případech (3.1.3) byla tkáň před samotnou fixací inkubována 24 hod. v roztoku DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) při pokojové teplotě. Zpracování fixované tkáně bylo prováděno vždy v duplikátu. Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C.

3.2.3 Odvodnění a zavodnění fixované tkáně (u Fixace II a Fixace III)

Po fixaci a promytí byla tkáň okamžitě odvodněna a následně ihned zavodněna. Odvodnění a zavodnění probíhalo zvyšující se a snižující se alkoholovou řadou. Veškeré přidávané objemy alkoholu byly cca 1 ml, výměny roztoků probíhaly prostým odlitím. Celý proces probíhal při pokojové teplotě a sestával z následujících kroků: dvakrát 5 min. inkubace za lehkého třepání v 75% ethanolu, dvakrát 5 min. inkubace za lehkého třepání v 95% ethanolu, 30 min. inkubace za lehkého třepání v 100% ethanolu, dvakrát 5 min. inkubace za lehkého třepání v 95% ethanolu, dvakrát 5 min. inkubace za lehkého třepání v 75% ethanolu. Na závěr byl ethanol důkladně odstraněn a tkáň byla 5 min. inkubována za lehkého třepání v PCR grade vodě. Ta byla poté důkladně odstraněna a ihned následovalo štěpení tkáně (3.2.4).

3.2.4 Štěpení fixované tkáně

Štěpení fixované tkáně bylo prováděno pomocí kitu ZR Genomic DNA Tissue MicroPrep (Zymo Research, USA), který obsahoval 2X Digestion Buffer a proteinázu K (přibližně 20 mg/ml). K fixované, promyté a odvodněné/zavodněné tkáni bylo přidáno 15 µl proteinázy K, 142,5 µl 2X Digestion Buffer a 142,5 µl PCR grade vody. Roztok s tkání byl zvortexován a intenzivně třepán (750 rpm) při 55 °C přes noc (cca 16–18hod.). Po štěpení tkáně ihned následovala izolace DNA (3.2.5)

3.2.5 Izolace DNA

Na izolaci DNA ze štěpené tkáně byl použit kit ZR Genomic DNA Tissue MicroPrep (Zymo Research, USA), který obsahoval: Genomic Lysis Buffer, kolonku Zymo-Spin IC Column, Pre-Wash Buffer, g-DNA Wash Buffer a DNA Elution Buffer. Ke štěpenému vzorku (rozštěpená tkáň, 15 µl proteinázy K, 142,5 µl PCR grade vody, 142,5 µl 2X Digestion Buffer) bylo přidáno 1 050 µl roztoku Genomic Lysis Buffer. Směs byla řádně promíchána a centrifugována (10 000 x g, 1 min.). Supernatant byl následně přenesen na kolonku Zymo-Spin IC Column a centrifugován (10 000 x g, 1 min.). Poté bylo k vzorku na kolonce přidáno 200 µl roztoku DNA Pre-Wash Buffer a kolonka byla centrifugována (10 000 x g, 1 min.). Následně bylo k vzorku na kolonce přidáno 400 µl roztoku g-DNA Wash Buffer a kolonka byla opět centrifugována (10 000 x g, 1 min.). Nakonec byl DNA vzorek eluován: na kolonku bylo nanášeno 100 µl DNA Elution

Buffer, kolonka byla ponechána 5 minut při pokojové teplotě a následně centrifugována 1 min. na maximální rychlost (16 100 x g).

3.2.6 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA

kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR)

Metoda qPCR byla použita pro stanovení koncentrace a fragmentace vyizolované DNA. K tomuto účelu bylo využito pěti primerů (3.1.5) kombinovaných do tří párů amplifikujících lidské repetitivní Alu sekvence. Nastavení použitých qPCR programů je uvedeno v Tabulce 2. Na konci každé qPCR analýzy bylo provedeno měření efektivity reakce, tzv. melting curve analysis. Jeho nastavení je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 2: Použité qPCR programy.

qPCR program krok	Alu1 + Alu2 a Alu1 + Alu3		Alu4 + Alu5	
	teplota	čas	teplota	čas
1. krok	94 °C	4 min.	94 °C	4 min.
2. krok	94 °C *	30 s	94 °C	30 s
3. krok	55 °C *	45 s	65 °C	30 s
4. krok	72 °C *	30 s	72 °C	20 s
5. krok	72 °C	7 min.	72 °C	7 min.
opakování 2., 3. a 4. kroku	40 x		40 x	

* U qPCR programu pro primery Alu1 + Alu2 a Alu1 + Alu3 byla mezi 2. a 3. krokem rychlost změny teploty (ramp speed) 13 % a mezi 3. a 4. krokem rychlost změny teploty (ramp speed) 21 %.

Tabulka 3: Program použitý pro měření efektivity qPCR reakce (melting curve analysis).

Nastavení měření krok		
	teplota	Čas
1. krok	95 °C	15 s
2. krok	60 °C *	15 s
3. krok	95 °C *	15 s
4. krok	4 °C	neomezen

* Doba změny teploty (ramp time) mezi 2. a 3. krokem byla 20 min.

Reakce probíhala v celkovém objemu 15 µl. Přesné složení qPCR směsi je uvedeno v kapitole 3.1.4. Jako standard byla použita DNA (SRM 2372 Human DNA Quantitation Standard) od firmy NIST (USA) v koncentracích 1,850 ng/µl; 0,210 ng/µl a 0,023 ng/µl. Jako negativní kontrola byla připravena reakční směs, která neobsahovala templátovou DNA ze vzorku. Koncentrace vyizolované DNA byla určena na základě srovnání

amplifikační dynamiky stanovované DNA s amplifikační dynamikou DNA standardů o známé koncentraci. Fragmentace vyizolované DNA byla stanovena poměrem koncentrací rozdílně dlouhých produktů qPCR reakce získaných použitím uvedených párů primerů. Každý biologický duplikát byl pro qPCR analýzu připraven a změřen jako duplikát technický. Měření bylo provedeno na přístroji Real Time PCR Mastercycler system ep realplex (Eppendofr, Německo).

3.2.7 Stanovení koncentrace DNA fluorescenčním měřením

Koncentrace DNA stanovená na základě měření fluorescence byla provedena pomocí kitu Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA), který obsahoval: Qubit dsDNA HS reagent a Qubit dsDNA HS buffer. Nejprve byl připraven roztok Qubit working solution, a to smícháním 1 dílu roztoku Qubit dsDNA HS reagent a 199 dílů roztoku Qubit dsDNA HS buffer. Do 190 μ l roztoku Qubit working solution bylo následně přidáno 10 μ l analyzovaného vzorku o neznámé koncentraci. Výsledný roztok byl krátce zvortexován a inkubován po 2 min. v pokojové teplotě. Měření probíhalo na spektrometru BioSpectrometer (Eppendofr, Německo) v jednorázových plastových kyvetách při pokojové teplotě. Vlnová délka excitačního světla byla 470 nm. Vlnová délka emisního světla byla 520 nm. Standardy o koncentraci 0; 3,91; 15,63; 62,5; 125; 250 a 500 pg/ μ l byly připraveny a změřeny stejným způsobem.

3.2.8 Stanovení koncentrace a míry fragmentace pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100

Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA na přístroji bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) bylo provedeno pomocí kitu Agilent High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, USA) (kit obsahoval: High Sensitivity DNA chip, High Sensitivity DNA dye concentrate, High Sensitivity DNA gel matrix, High Sensitivity DNA marker a High Sensitivity DNA ladder). Prvním krokem byla příprava čipu High Sensitivity DNA chip. Roztoky High Sensitivity DNA dye concentrate a High Sensitivity DNA gel matrix byly 30 min. bez přístupu světla temperovány na pokojovou teplotu, roztok High Sensitivity DNA dye byl následně zvortexován, stočen a v objemu 15 μ l přidán do zkumavky s alikvotem roztoku High Sensitivity DNA gel matrix. Výsledný roztok byl zvortexován, nanesen na zkumavkový filtr a centrifugován (2240 x g, 10 min.). Následně bylo 9 μ l tohoto roztoku napipetováno do příslušné jamky na čip umístěný v

přípravné stanici, tato přípravná stanice byla uzavřena a pomocí tlakovacího zařízení (nastaveného na objem 1 ml) byl 1 min. vyvíjen na gel tlak, který způsobil jeho rovnoměrné rozprostření v čipu. Po otevření přípravné stanice bylo do dalších tří příslušných jamek napipetováno 9 μ l roztoku High Sensitivity DNA dye + High Sensitivity DNA gel matrix. Následně bylo do zbývajících 12 jamek napipetováno po 5 μ l roztoku High Sensitivity DNA marker (vnitřní standard). Do jedné z těchto jamek byl napipetován 1 μ l roztoku High Sensitivity DNA ladder a do zbylých 11 jamek bylo napipetováno po 1 μ l měřených vzorků. Na základě optimalizačních měření byly vybrány vzorky před nanesením na čip zakoncentrovány na přístroji Koncentrátor 5301 (Eppendorf, Německo). Čip se vzorky byl vortexován (2400 rpm, 1 min.). Měření bylo provedeno na přístroji bioanalyzátor Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) a následná analýza proběhla v programu Expert 2100 (Agilent Technologies, USA).

3.2.9 Genetická identifikace analýzou krátkými tandemově se opakujícími repeticemi (STR)

Procesy izolace DNA a její kvantifikace, které jsou součástí genetické identifikace analýzou STR, jsou popsány v kapitolách 3.2.5 a 3.2.6. Následujícím krokem analýzy STR je nabohacení a označení cílových sekvencí DNA (k označení se používají 4 fluorescenční barvy, které jsou vyhodnocovány ve 4 fluorescenčních detekčních systémech) metodou multiplexové PCR. Poté následuje příprava ampliconů (denaturace dvouřetězcové DNA na jednořetězcovou DNA) na kapilární elektroforézu a elektroforéza samotná. Výsledkem měření je elektroforetogram, kde pozice píku na ose x určuje délku ampliconu (a tím počet repetice v příslušné STR alele) a výška píku, daná intenzitou fluorescenčního signálu, odráží relativní množství amplifikované DNA ve vzorku.

Na PCR amplifikaci byl použit kit STR AmpFLSTR NGM Select (Applied Biosystems, USA) (obsahující NGM SElect Master Mix, NGM SElect Primer Set, AmpFLSTR NGM SElect Allelic Ladder), který je založen na použití 17 párů primerů, které amplifikují 17 lokusů lidské DNA (16 autozomálních STR + 1 gonozomální marker Amelogenin). Reakční směs pro multiplexovou PCR byla připravena dle pokynů výrobce a její složení bylo následující:

NGM SElect Master Mix	10 μ l
NGM SElect Primer Set	5 μ l
cílová DNA	1 ng
H ₂ O (PCR grade)	doplnit do objemu 25 μ l

V případě potřeby byly vzorky DNA zakoncentrovány na přístroji Koncentrátor 5301 (Eppendorf, Německo). Multiplexová PCR proběhla na přístroji Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Německo), nastavení PCR programu je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: PCR program použitý pro STR analýzu.

Nastavení měření		
krok	teplota	Čas
1. krok	95 °C	11 min.
2. krok	94 °C	20 s
3. krok	59 °C	3 min.
4. krok	60 °C	10 min.
5. krok	4 °C	neomezen
opakování 2. a 3. kroku	30 x	

Následně proběhla příprava amplifikované DNA na elektroforézu. K PCR produktu (na základě optimalizačních měření byly vybrané vzorky předem naředěny) o objemu v rozmezí 0,8–3 μ l (objem závisel na konkrétním vzorku) bylo přidáno 0,5 μ l vnitřního standardu GeneScan 600 LIZ Size Standard v 2.0 (Life Technologies, USA) a 12 μ l Hi-Di Formamidu (Life Technologies, USA). Výsledný roztok byl zahříván 3 min. na 95 °C a následně byl ihned přenesen do namraženého bločku, kde byl ponechán 3 min. Stejně byl připraven i roztok alelického žebříčku AmpFLSTR NGM SElect Allelic Ladder. Elektroforetická analýza probíhala na přístroji ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), všechny vzorky byly do DNA analyzátoru injikovány 5 s, s výjimkou vzorků fixovaných 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4PF+K a 46 hod. v roztoku 4NF+NaOH, tyto byly injikovány 10 s. Vyhodnocení bylo uděláno v programu Gene Mapper ID (Applied Biosystems, USA).

4 Výsledky

Celkem byly provedeny 3 fixační experimenty: Fixace I (3.2.1), Fixace II a Fixace III (3.2.2). Pro Fixaci I byly použity následující roztoky: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF), 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) a 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí 4NF+K (3.1.4). Pro Fixaci II a Fixaci III byly použity roztoky 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K a 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným (4NF+NaOH) (3.1.4). Roztok 4NF+K ve Fixaci II a Fixaci III již nebyl použit vzhledem podobnosti výsledků s roztokem 4PF+K. Ze stejného důvodu nebyl použit roztok 4NF+NaOH ve Fixaci III.

Abychom se vyhnuli případné chybě zanesené nesprávným výběrem fixované tkáně, bylo testováno více typů lidských tkání (3.1.3). V případě Fixace I byly zvoleny tyto tkáně: plíce, srdce, slezina, ledvina a sval. V průběhu experimentu však bylo zjištěno, že plíce a slezina nejsou dobrými experimentálními modely kvůli jejich náročnosti na korektní zpracování. Plicní tkáň ve fixačním roztoku plove, a tudíž nemusí docházet k homogenní fixaci. Slezinná tkáň je velmi křehká, a proto se s ní velmi špatně manipuluje. Pro Fixace II a Fixace III byly tedy následně zvoleny tyto tkáně: srdce, ledvina, sval a játra. V případě Fixace II byla část srdeční tkáně ještě před fixací naložena na 24 hodin do konzervačního přípravku DNAGard Tissue (Biomatrix, USA) (3.1.3). Použití jednotlivých tkání, fixačních roztoků a fixačních časů v jednotlivých experimentech je shrnuto v Tabulce 5.

Tabulka 5: Přehled fixačních experimentů. V tabulce jsou shrnuty použité tkáně, roztoky a fixační časy.

Fixace Tkáň	Fixace I (1 hod., 46 hod.)	Fixace II (1 hod., 22 hod., 46 hod.)	Fixace III (1 hod., 22 hod., 46 hod.)
Plíce	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+K	-	-
Slezina	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+K	-	-
Srdce	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+K	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+NaOH	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K
Ledvina	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+K	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+NaOH	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K
Sval	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+K	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+NaOH	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K
Játra	-	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+NaOH	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K
Srdce+ DNAGard	-	4PF, 4NF, 36N, 4PF+K, 4NF+NaOH	-

4PF = 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd, 4NF = 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd, 36NF = 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd, 4PF+K = 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí, 4NF+K = 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí, 4NF+NaOH = 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným.

Po fixaci tkáně (a následném zavodnění a odvodnění tkáně u Fixace II a III (3.2.3)) byla tkáň štěpena proteinázou K (3.2.4) a následně byla ze vzorků vyizolována DNA (3.2.5) a její koncentrace a kvalita byly ohodnoceny různými metodickými přístupy. Vzhledem k tomu, že většina dat byla pořízena z Fixace II, budou i ukázané výsledky pocházet z Fixace II. Srovnání s výsledky získanými z Fixace I a III bude shrnuto v kapitole 4.4.

4.1 Chemické složení fixačního roztoku formaldehydu ovlivňuje množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA

Z naší laboratorní praxe a publikované odborné literatury (Hewitt *et al.*, 2008) bylo zjištěno, že DNA izolovaná pro molekulárně biologické účely z FFPE bločků nemusí být vždy v dostatečně vysoké kvalitě a kvantitě, což komplikuje následnou aplikaci molekulárně biologických metod. Rozhodli jsme se tedy ověřit, jak různé chemické složení roztoku formaldehydu, který se používá jako fixační roztok v přípravě FFPE bločků, ovlivňuje množství a stupeň fragmentace DNA izolované z FFPE bločků.

Pro fixační experimenty bylo proto připraveno několik variant roztoku formaldehydu (3.1.4). Prvním roztokem byl 4% pufrovaný formaldehyd (4PF), který je hojně používaným fixačním činidlem, a vzhledem k stabilnímu pH byl očekáván relativně nízký negativní vliv na DNA. Druhým roztokem byl 4% nepufrovaný formaldehyd (4NF), také používaný jako fixační činidlo, u kterého lze vzhledem k nepřítomnosti pufru očekávat výraznější vliv na DNA oproti pufrovanému formaldehydu. Třetím roztokem byl 36% nepufrovaný formaldehyd (36NF), který byl použit vzhledem k tomu, že si některé laboratoře formaldehyd ředí samy, a mohlo by tedy docházet k jeho nedostatečnému naředění. Dalším roztokem byl 4% pufrovaný či nepufrovaný formaldehyd s přidavkem kyseliny mravenčí (4PF+K, 4NF+K) v konečné koncentraci 4 % (v/v). Tyto roztoky byly zvoleny jako simulace výrazně znehodnoceného formaldehydu, v takovém totiž dochází k tvorbě a akumulaci kyseliny mravenčí, která je známá svým negativním působením na DNA (Fox *et al.*, 1985; Koshiba *et al.*, 1993). Posledním roztokem byl 4% nepufrovaný formaldehyd s přidavkem hydroxidu sodného (4NF+NaOH) s konečnou koncentrací 4 % (v/v).

Fixace tkání všemi roztoky probíhala po dobu 22 hod., neboť 12–24 hodin je běžně používaný fixační čas na patologických a soudně lékařských pracovištích (viz Tabulka P1, Příloha, str. 69).

4.1.1 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA metodou qPCR

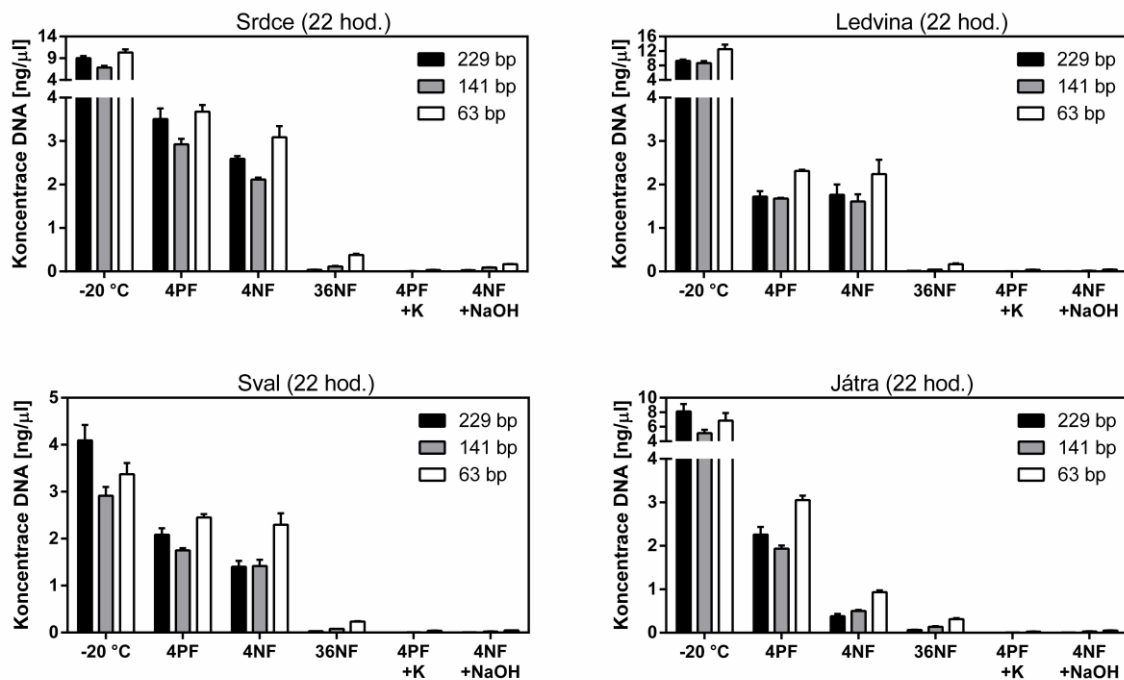
Při měření stupně degradace a koncentrace DNA pomocí metody qPCR (3.2.6) byly použity 3 páry primerů pro lidské Alu sekvence (3.1.5). Ty tvořily produkty o délce 229 bp, 141 bp a 63 bp. Trojice primerů poskytující různě dlouhé produkty byla zvolena záměrně, aby bylo možné pomocí metody qPCR stanovit nejen celkovou koncentraci DNA, ale také stupeň její fragmentace. Ten lze určit z poměru zastoupení kratších produktů vůči delším produktům qPCR reakce. Je-li totiž poměr posunut ve prospěch kratších produktů, je DNA více degradovaná na kratší fragmenty, a delší produkty se tak již nemohou tolik tvořit.

Vliv chemického složení jednotlivých variant roztoku formaldehydu byl posuzován vzhledem k roztoku 4PF, u kterého byl očekáván relativně nízký negativní efekt na DNA. Hodnoty koncentrace DNA v grafech (obrázek 1) jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze dvou technických duplikátů, které byly připraveny z duplikátů biologických, a jejich směrodatné odchylky.

Jak je vidět na obrázku 1, roztoky 36NF, 4PF+K a 4NF+NaOH ve srovnání s roztokem 4PF výrazně negativně ovlivňují koncentraci vyizolované DNA, což bylo stanoveno pomocí všech tří párů primerů u všech fixovaných tkání. Oproti tomu tkáně fixované roztokem 4NF poskytovaly ve srovnání s tkáněmi fixovanými roztokem 4PF pouze mírně snížené výtěžky DNA u vzorku srdce a svalů (obrázek 1) a výrazně snížené výtěžky u vzorku jater (obrázek 1). U vzorku ledvin byly výtěžky DNA srovnatelné. Na obrázku 1 jsou ukázány také výtěžky DNA z kontrolního vzorku. Jako kontrolní vzorek sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C.

Vzhledem k zastoupení nejkratších (63 bp) produktů qPCR reakce vůči produktům delším (141 bp a zejména 229 bp) lze říci, že v případě porovnání vzorků fixovaných v roztoku 4NF vůči vzorkům fixovaným v roztoku 4PF, byla míra fragmentace shodná (ledvinná tkáň) nebo mírně vyšší u vzorků fixovaných roztokem 4NF (tkáň srdce, svalů a jater). U vzorků fixovaných roztoky 36NF, 4PF+K a 4NF+NaOH byla koncentrace

vyizolované DNA velmi nízká, takže metodou qPCR nešlo fragmentaci DNA přesně stanovit (obrázek 1).

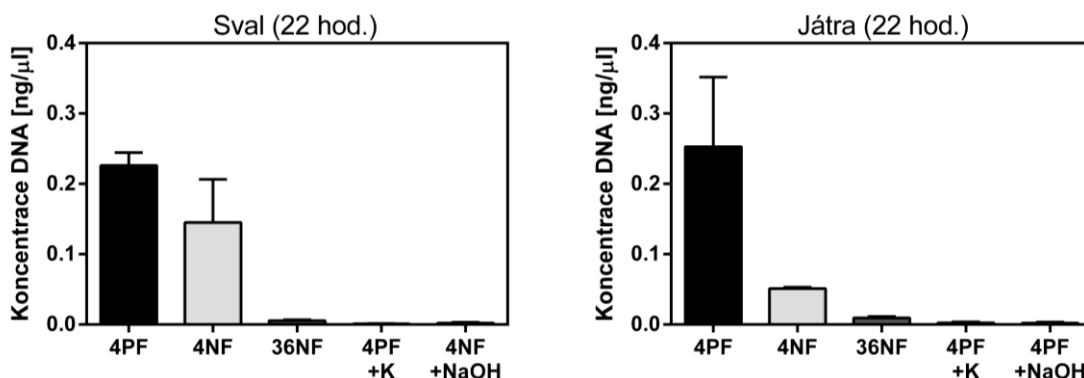


Obrázek 1: Koncentrace a míra degradace vyizolované DNA stanovená metodou qPCR v závislosti na použitých fixačních roztocích. Vzorky z tkání srdce, ledviny, svalu a jater (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 22 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF), 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) a 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným (4NF+NaOH). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena metodou qPCR pomocí tří párů primerů pro lidské Alu sekvenční, které tvořily produkty o délkách 229 bp, 141 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou uvedeny jako průměry čtyř hodnot ze dvou technických duplikátů, které byly připraveny z duplikátů biologických, a jejich směrodatné odchylky.

4.1.2 Stanovení koncentrace DNA fluorescenčním měřením

Stanovení koncentrace DNA pomocí měření fluorescence (3.2.7), jež je založeno na detekci fluorescence závislé na množství DNA ve vzorku, bylo prováděno pomocí kitu Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) na spektrometru BioSpectrometer (Eppendorf, Německo). Touto metodou byla koncentrace DNA stanovena pouze u vzorků z jater a svalu. Hodnoty koncentrace DNA v grafech (obrázek 2) jsou znázorněny jako průměry dvou hodnot z jednotlivých měření biologických duplikátů a jejich směrodatné odchylky.

Z obrázku 2 je patrné, že použití roztoků 36NF, 4PF+K a 4NF+NaOH velmi výrazně snižuje výtěžky DNA ve srovnání s roztokem 4PF. Také u roztoku 4NF došlo k výraznému snížení výtěžků DNA oproti roztoku 4PF u vzorku jater a částečnému snížení výtěžků DNA v případě vzorku svalu.



Obrázek 2: Koncentrace vyizolované DNA stanovená fluorescenčním měřením v závislosti na použitých fixačních roztocích. Vzorky z tkání svalu a jater (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 22 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF), 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) a 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným (4NF+NaOH). Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena fluorescenčním měřením. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou uvedeny jako průměry dvou hodnot z jednotlivých měření biologických duplikátů a jejich směrodatné odchylky.

4.1.3 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100

Stanovení koncentrace DNA, jež proběhlo na čipové elektroforéze (3.2.8), je založeno na detekci fluorescence závislé na množství DNA ve vzorku. Zároveň také dochází k elektroforetickému rozdělení fragmentů DNA podle velikosti. Koncentrace DNA se tedy stanovuje pro jednotlivé fragmenty, nikoli pro celkovou DNA ve vzorku. Koncentrace jednotlivých fragmentů a jejich délka nám podávají informaci o míře fragmentace DNA ve vzorku.

Měření bylo provedeno pomocí kitu Agilent High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, USA) na přístroji bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA), a to pouze u vzorků svalu. Změřeny byly vzorky svalové tkáně fixované 22 hod. v roztocích 4PF, 4NF, 36NF (měřen jako 3,3x zakoncentrovaný) a 4PF+K (měřen jako 3,3x zakoncentrovaný) spolu s kontrolním vzorkem, jímž byla tkáň zmražená na -20 °C

(měřena jako 5x ředěná), jedná se tedy o čas 0 hod. bez jakéhokoli ošetření fixačním činidlem.

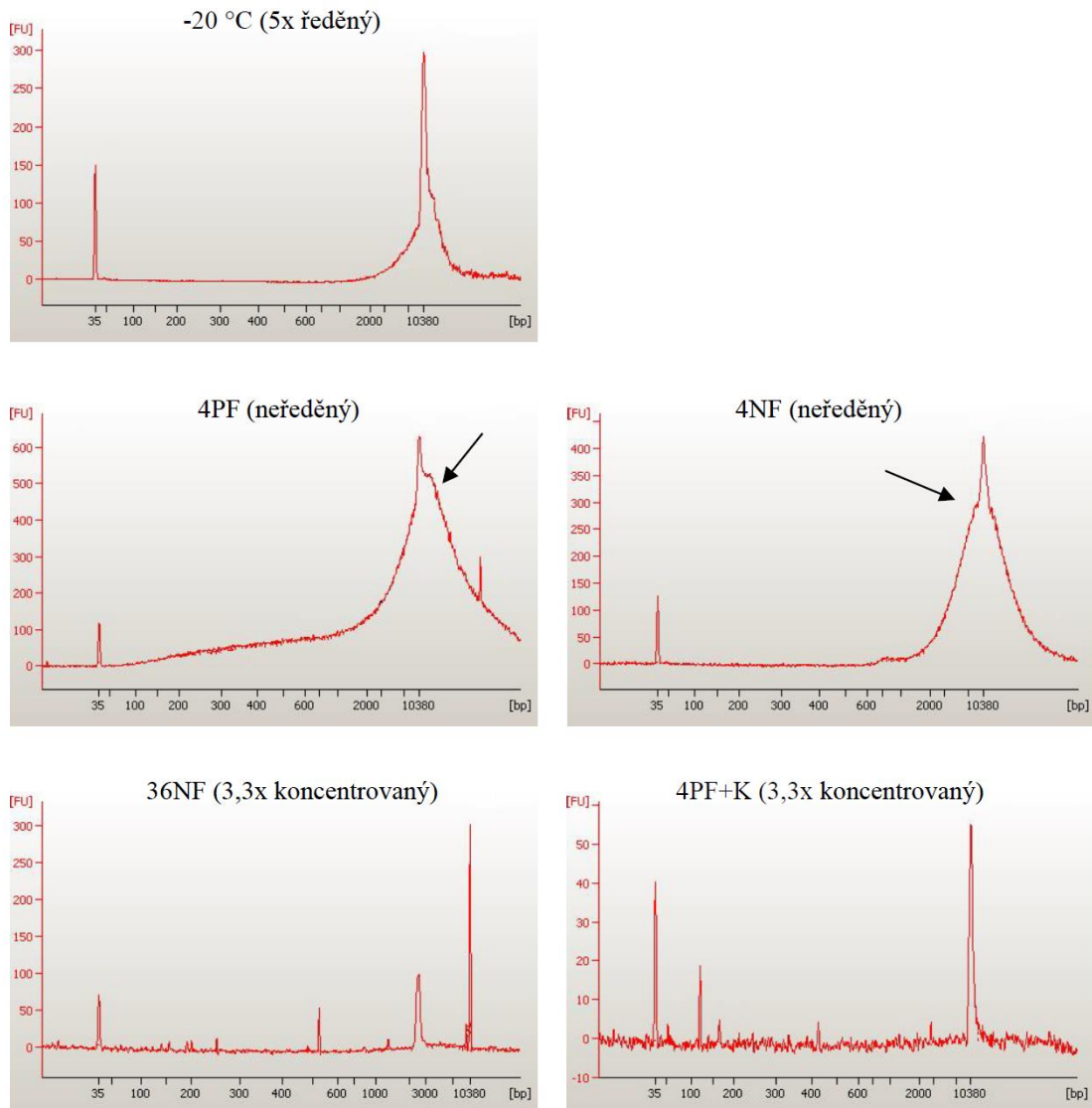
Kontrolní vzorek -20 °C byl měřen jako 5x ředěný. Ačkoli je zřetelná přítomnost delších fragmentů (cca 2 500–10 380 bp), elektroforetogram zobrazuje i relativně významné koncentrace delších fragmentů DNA (avšak ty jsou mimo rozsah použitého kitu, protože 10 380 bp je maximum standardu), přítomnost kratších fragmentů nebyla detekována. To může být způsobeno tím, že DNA fragmentována vůbec není, a nebo tím, že byl vzorek příliš zředěný a kratší fragmenty, nacházející se ve vzorku v nižších koncentracích, tudíž nejsou vidět (obrázek 3).

Elektroforetogram pro vzorek fixovaný v roztoku 4PF ukazuje na relativně významné koncentrace DNA v oblasti fragmentů o délce cca 2 500–10 380 bp a více (avšak ty jsou mimo rozsah použitého kitu). Zároveň je patrná přítomnost kratších fragmentů DNA o délce cca 35–2 500 bp. Tyto fragmenty se ve vzorku oproti delším fragmentům nacházejí v relativně nižších koncentracích (obrázek 3).

Na elektroforetogramu pro vzorek fixovaný v roztoku 4NF je, při porovnání s elektroforetogramem vzorku fixovaného v roztoku 4PF, v oblasti delších fragmentů (cca 2 500–10 380 bp) vidět mírný posun těchto fragmentů směrem k relativně kratším délkám. Zároveň se tyto fragmenty nacházejí ve vzorku v nižších koncentracích. Fragmenty o délce 35–2 500 bp jsou přítomny ve výrazně nižším množství, než u vzorku fixovaného roztokem 4PF. Tyto fragmenty se ve vzorku pravděpodobně nachází, ale vzhledem k celkově nižší koncentraci DNA patrně nejsou dobře detekovatelné. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že při fixaci v roztoku 4NF dochází oproti fixaci v roztoku 4PF k nižším výtěžkům DNA při izolaci a tato DNA je více fragmentována.

Na elektroforetogramu pro vzorek fixovaný roztokem 36NF (měřen jako 3,3x zakonzentrován) je, při porovnání s elektroforetogramem vzorku fixovaného v roztoku 4PF, pozorovatelný extrémní úbytek fragmentů DNA v rámci celého měřeného rozsahu. Původně vysoká koncentrace fragmentů DNA v rozsahu 2 500–10 380 bp je výrazně snížena a délka fragmentů je značně posunuta směrem k relativně kratším délkám (v elektroforetogramu pro vzorky fixované v roztoku 4PF je velká část fragmentů mimo rozsah standardu (maximum je 10 380 bp), v elektroforetogramu pro vzorky fixované v roztoku 36NF se tyto fragmenty přesunuly k délkám kolem 2 500 bp). Ačkoliv je v rozsahu 35–2 500 bp patrný výskyt signálů, nebyly tyto signály vyhodnoceny jako píky DNA fragmentů. Toto je patrně způsobeno velmi nízkými koncentracemi DNA ve vzorku (obrázek 3).

Na elektroforetogramu vzorku fixovaného roztokem 4PF+K (měřen jako 3,3x zakoncentrovaný) není detekován prakticky žádný signál, který by byl vyhodnocen jako fragmenty DNA (obrázek 3).



Obrázek 3: Koncentrace a míra fragmentace vyizolované DNA stanovená pomocí čipové elektroforézy v závislosti na použitých fixačních roztocích. Vzorky z tkáně svalů (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) byla analyzována míra fragmentace a koncentrace fragmentů DNA. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Černé šipky v elektroforetogramech značí posun fragmentů, z větších délek u roztoku 4PF ke kratším délkám u roztoku 4NF. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [FU]. FU = fluorescenční jednotka.

4.2 Délka fixace má vliv na množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA

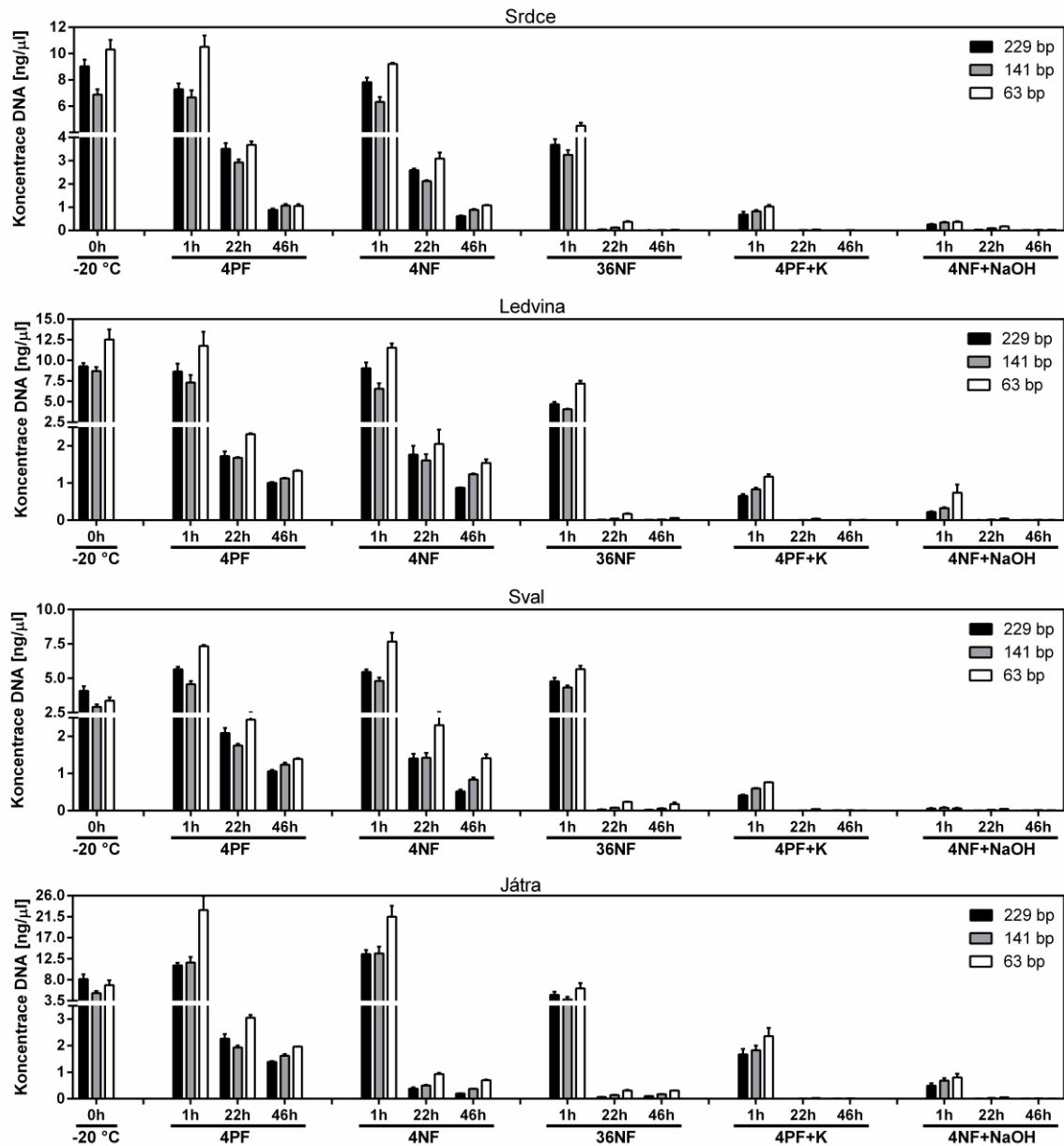
Dalším důležitým faktorem, který má vliv na množství a kvalitu vyizolované DNA, je doba, po kterou fixace probíhá (Ferrer *et al.*, 2007; Khoja *et al.*, 2012). Na pracovištích patologie či soudního lékařství je běžně používaná doba fixace vzorku formaldehydem před jeho zalitím do parafínu a následným histologickým zhodnocením 12–24 hod. (viz Tabulka P1, Příloha, str. 69). Nicméně fixační procedura může dosahovat časových hodnot od 1 hod. až k 48 hod. Na základě těchto skutečností byly zvoleny tři časové úseky, po které probíhala fixace tkání: 1 hod., 22 hod. a 46 hod.

4.2.1 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA metodou qPCR

Jak je uvedeno výše, pro měření kvality a kvantity DNA pomocí metody qPCR (3.2.6) byly použity 3 páry primerů pro lidské Alu sekvence (3.1.5). Ty tvořily produkty o délce 229 bp, 141 bp a 63 bp. Měření koncentrace DNA byla provedena u vzorků srdce, ledviny, svalu a jater fixovaných v roztocích 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K a 4NF+NaOH. Hodnoty koncentrace DNA v grafech (obrázek 4) jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze dvou technických duplikátů, které byly připraveny z duplikátů biologických, a jejich směrodatné odchylky. Jako kontrolní vzorek sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod.

Z výsledků je patrné, že hodnoty koncentrace DNA naměřené pro tkáně fixované po dobu 1 hod. v roztocích 4PF a 4NF se zpravidla příliš neliší od hodnot naměřených pro kontrolu -20 °C. V případě vzorků svalu a jater fixovaných po dobu 1 hod. v roztocích 4PF a 4NF je však patrná mírně vyšší fragmentace DNA. Dále z výsledků pro roztoky 4PF a 4NF vyplývá, že u většiny vzorků dochází k významnému poklesu koncentrace DNA vyizolované z tkání fixovaných po dobu 22 hod. ve srovnání s koncentrací DNA vyizolované z tkání fixovaných po dobu 1 hod. K dalšímu poklesu koncentrace DNA u vzorků fixovaných v roztocích 4PF a 4NF dochází při prodloužení fixace tkání z 22 hod. na 46 hod. Je také vidět, že u vzorků fixovaných 46 hod. roztokem 4NF dochází k větší fragmentaci DNA než u vzorků fixovaných 46 hod. roztokem 4PF. V případě vzorků fixovaných v roztocích 36NF, 4PF+K a 4NF+NaOH je snížení koncentrace mezi tkání fixovanou 1hod. a 22 hod. značné, nicméně mezi vzorky fixovanými 22 hod. a 46 hod.,

vzhledem k celkově nízké koncentraci DNA, už snížení koncentrace není tak patrné (obrázek 4).

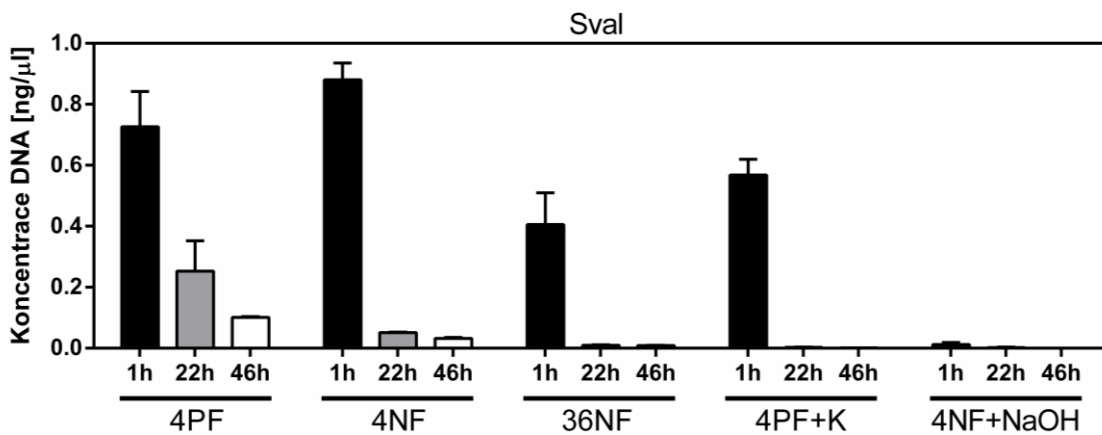


Obrázek 4: Koncentrace a míra degradace vizolované DNA stanovená metodou qPCR v závislosti na délce fixace. Vzorky z tkání srdce, ledviny, svalu a jater (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF), 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) a 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným (4NF+NaOH). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí tří párů primerů pro lidské Alu sekvence, které tvořily produkty o délkách 229 bp, 141 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou uvedeny jako průměry čtyř hodnot ze dvou technických duplikátů, které byly připraveny z duplikátů biologických, a jejich směrodatné odchylky.

4.2.2 Stanovení koncentrace DNA fluorescenčním měřením

Měření koncentrace DNA bylo provedeno na vzorcích jater fixovaných v jednotlivých roztocích po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. Výsledky v grafu (obrázek 5) jsou znázorněny jako průměry dvou hodnot z jednotlivých měření biologických duplikátů a jejich směrodatné odchylky.

Obrázek 5 ukazuje, že pokles koncentrace DNA vyizolované z tkáně fixované 22 hod. oproti tkáni fixované 1 hod. je výrazný u vzorků, které byly připraveny roztokem 4PF a velmi výrazný u všech ostatních vzorků, tedy tkáních fixovaných roztoky 4NF, 36NF, 4PF+K a 4PF+NaOH. Následný pokles koncentrace DNA mezi tkáněmi fixovanými 22 hod. a 46 hod. již tak výrazný není.



Obrázek 5: Koncentrace vyizolované DNA stanovená fluorescenčním měřením v závislosti na délce fixace. Vzorky z jaterní tkáně (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF), 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) a 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným (4NF+NaOH). Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena fluorescenčním měřením. Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměry dvou hodnot z jednotlivých měření biologických duplikátů a jejich směrodatné odchylky.

4.2.3 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100

Pomocí bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) byly změřeny vzorky svalové tkáně fixované po 1 hod. roztoky 4PF (měřen jako 5x ředěný), 4NF (měřen jako 5x ředěný), 36NF (měřen jako 5x ředěný), 4PF+K (měřen jako 5x ředěný), po 22 hod. roztoky 4PF, 4NF, 36NF (měřen jako 3,3x zakoncentrovaný), 4PF+K (měřen jako 3,3x

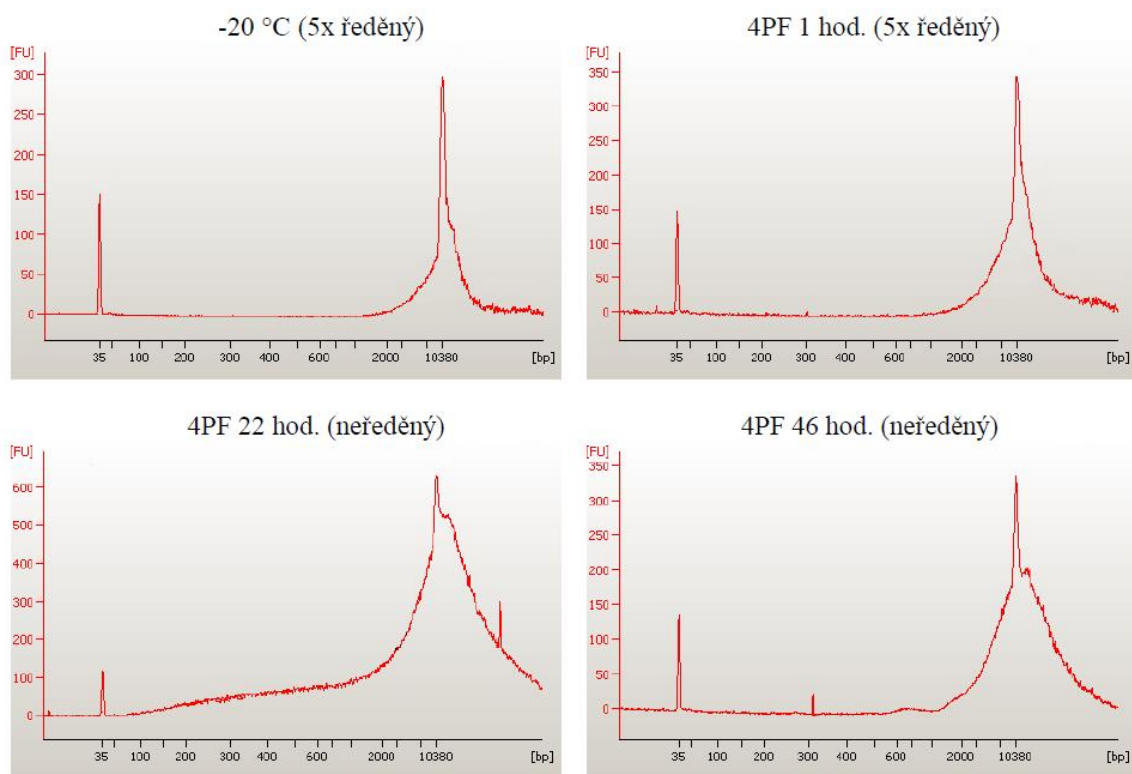
zakoncentrovaný) a po 46 hod. roztoky 4PF, 4NF, 36NF (měřen jako 3,3x zakoncentrovaný) a 4PF+K (měřen jako 3,3x zakoncentrovaný) a spolu s kontrolním vzorkem, jímž byla tkáň zmražená na -20 °C – jedná se tedy o čas 0 hod. bez jakéhokoli ošetření fixačním činidlem (měřena jako 5x ředěná).

Kontrolní vzorek -20 °C byl měřen jako 5x ředěný. Ačkoli je zřetelná přítomnost delších fragmentů (cca 2 500–10 380 bp), elektroforetogram zobrazuje i relativně významné koncentrace delších fragmentů DNA (avšak ty jsou mimo rozsah použitého kitu, protože 10 380 bp je maximum standardu), přítomnost kratších fragmentů nebyla detekována (obrázek 6). To může být způsobeno tím, že DNA fragmentována vůbec není, a nebo tím, že byl vzorek příliš zředěný a kratší fragmenty, nacházející se ve vzorku v nižších koncentracích, tudíž nejsou vidět.

Stejně tak vzorek fixovaný 1 hod. fixačním roztokem 4PF byl měřen jako 5x ředěný. I v tomto případě je zřetelná přítomnost fragmentů o délce cca 2 500–10 380 bp a více (avšak ty jsou již mimo rozsah použitého kitu) a přítomnost kratších fragmentů nebyla detekována. Nicméně navzdory ředění může být pozorován rozdíl mezi kontrolou -20 °C a vzorkem fixovaným v roztoku 4PF po dobu 1 hod. V případě vzorku fixovaného 1 hod. v roztoku 4PF je u delších fragmentů viditelná lehká degradace (posun fragmentů k relativně kratším délkám). Na vzorku fixovaném 1 hod. v roztoku 4PF je navíc vodorovná část křivky v rozmezí 35–2 500 bp zubatá, kdežto stejná část křivky u kontroly -20 °C téměř hladká (obrázek 6). To může být způsobeno přítomností fragmentů DNA, které nejsou dostatečně vidět vzhledem k ředění vzorku (zde nepublikované výsledky tomu nasvědčují).

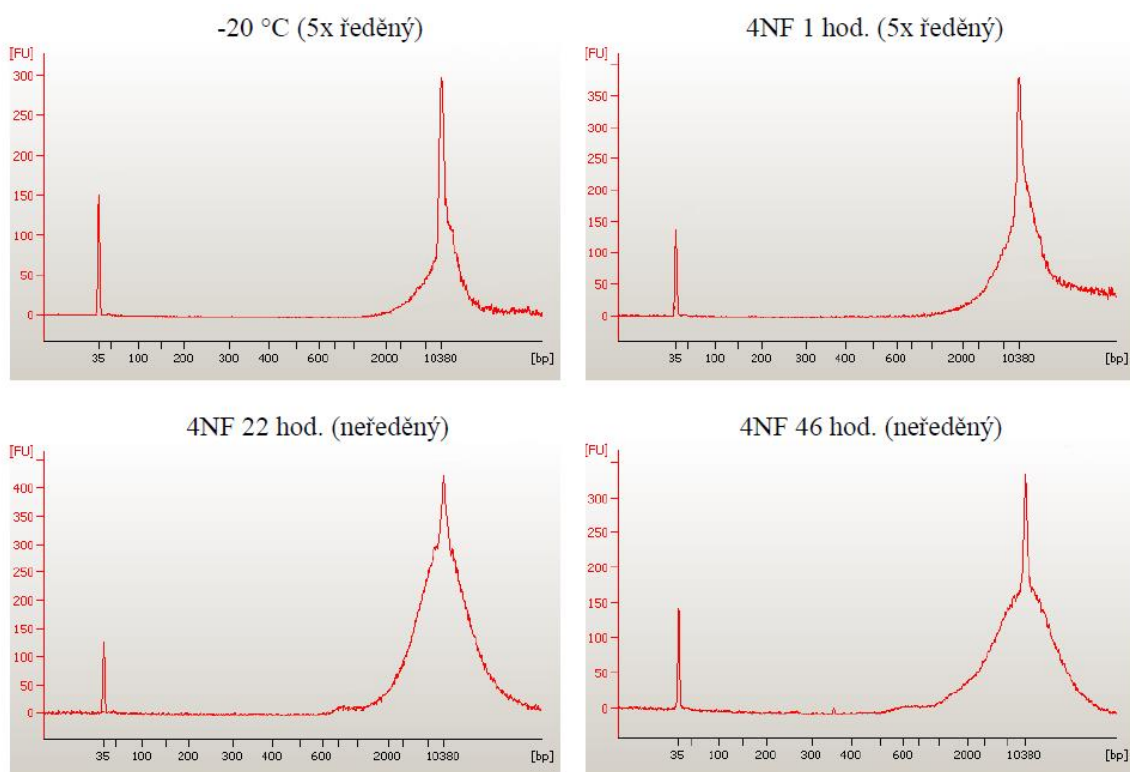
Výsledky ze vzorku fixovaného 22 hod. v roztoku 4PF ukazují na pokles koncentrace DNA v oblasti fragmentů o délce cca 2 500–10 380 bp oproti vzorku fixovanému 1 hod. (obrázek 6). Elektroforetogram zároveň ukazuje na přítomnost kratších fragmentů DNA o délce cca 35–2 500 bp. Tyto fragmenty se ve vzorku oproti delším fragmentům nacházejí v relativně nižších koncentracích.

U vzorku fixovaného 46 hod. je oproti vzorku fixovanému 22 hod. na elektroforetogramu patrné další snížení fluorescenční intenzity velkých DNA fragmentů DNA (cca 1 800–10 380 bp) a celkové vymizení malých fragmentů DNA. Přestože lze vidět pík okolo 300 bp, nebylo toto vyhodnoceno jako fragmenty DNA. Tyto skutečnosti naznačují, že koncentrace DNA ve vzorku s fixačním časem 46 hod. je celkově nižší než ve vzorku s fixačním časem 22 hod. (obrázek 6).



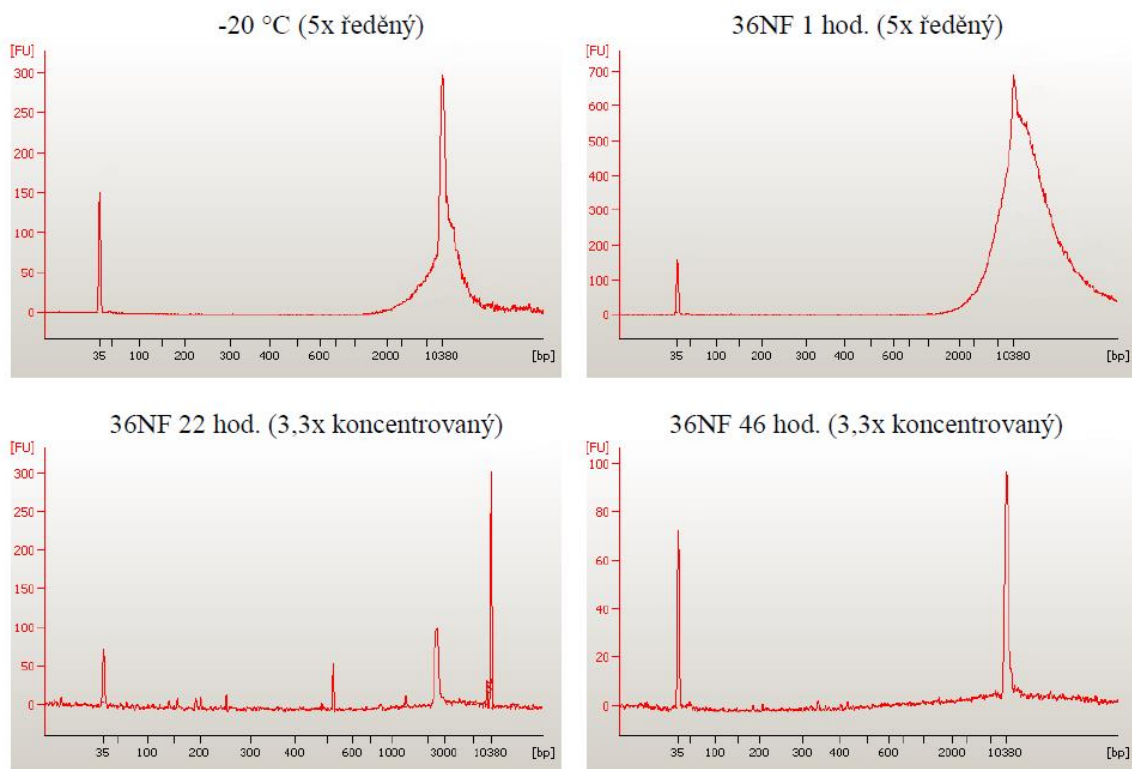
Obrázek 6: Koncentrace a míra fragmentace vyizolované DNA stanovená pomocí čipové elektroforézy v závislosti na délce fixace (roztok 4PF). Vzorky z tkáně svalů (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) pufovaného formaldehydu (4PF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) byla analyzována její koncentrace a míra fragmentace. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [FU]. FU = fluorescence unit (fluorescenční jednotka).

Výsledky vzorků fixovaných roztokem 4NF mají velmi podobný časový průběh jako výsledky vzorků fixovaných roztokem 4PF. Mezi vzorkem fixovaným 1 hod. (5x ředěný) a vzorkem fixovaným 22 hod. je vidět pokles koncentrace DNA v oblasti fragmentů o délce cca 2 500–10 380 bp a jejich lehký posun směrem k relativně kratším délkám. Dynamika koncentrace DNA v oblasti fragmentů o délce 35–2 500 bp není příliš dobře pozorovatelná, zčásti kvůli velkému ředění (1 hod.) a z části pravděpodobně kvůli příliš nízké koncentraci DNA ve vzorku (22 hod.). Detekovatelná je pouze část fragmentů v rozmezí 600–2 500 bp. U vzorku ze 46 hod. dochází k dalšímu celkovému poklesu koncentrace DNA. Při porovnání vzorku fixovaného 46 hod. v roztoku 4NF a vzorku fixovaného 46 hod. v roztoku 4PF je vidět významný rozdíl ve fragmentaci delších fragmentů (>2 000 bp) (obrázek 7).



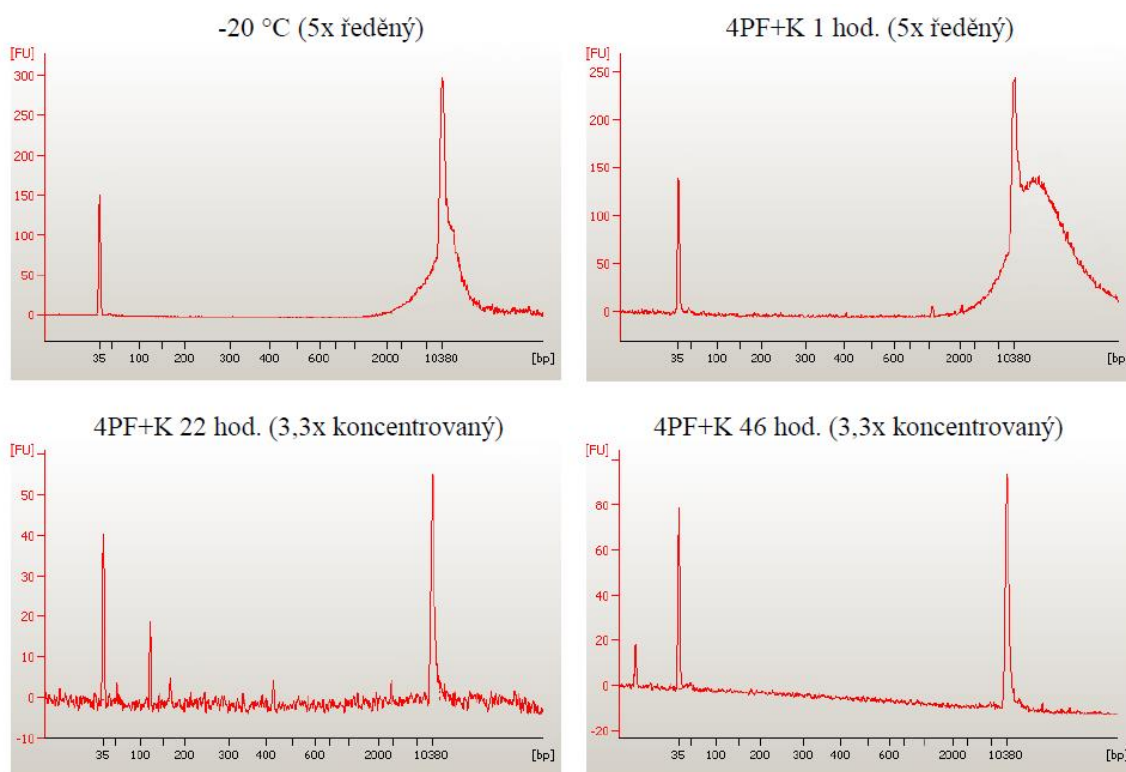
Obrázek 7: Koncentrace a míra fragmentace vyizolované DNA stanovená pomocí čipové elektroforézy v závislosti na délce fixace (roztok 4NF). Vzorky z tkáně svalu (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) nepufrovaného formaldehydu (4NF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) byla analyzována její koncentrace a míra fragmentace. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [FU]. FU = fluorescence unit (fluorescenční jednotka).

Vzorek fixovaný 1 hod. v roztoku 36NF (5x ředěný) řádově odpovídá vzorku fixovanému 1 hod. v roztoku 4PF. Nicméně, na vzorku fixovaném 22 hod. v roztoku 36NF (3,3x zakoncentrovaný) je již pozorovatelný extrémní úbytek koncentrace DNA spojený s významnou degradací DNA (v elektroforetogramu pro vzorky fixované 1 hod. v roztoku 36NF je velká část fragmentů mimo rozsah standardu (10 380 bp), v elektroforetogramu pro vzorky fixované 22 hod. v roztoku 36NF se tyto fragmenty přesunuly k délkám kolem 2 500 bp). Ve vzorku fixovaném 46 hod. v roztoku 36NF (3,3x zakoncentrovaný) již není detekovatelná žádná DNA (obrázek 8).



Obrázek 8: Koncentrace a míra fragmentace vyizolované DNA stanovená pomocí čipové elektroforézy v závislosti na délce fixace (roztok 36PF). Vzorky z tkáně svalů (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztoku 36% (v/v) nepufrovaného formaldehydu (36NF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) byla analyzována její koncentrace a míra fragmentace. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [FU]. FU = fluorescence unit (fluorescenční jednotka).

V případě vzorku fixovaného 1 hod. v roztoku 4PF+K (5x ředěný) je pozorovatelný extrémní úbytek koncentrace DNA. Po fixaci 22 hod. v roztoku 4PF+K (3,3x koncentrovaný) jsou detekovatelná pouze velmi malá množství DNA, a to pouze v rozmezí velikostí fragmentů cca 35–2 500 bp. Ve vzorku fixovaném 46 hod. v roztoku 4PF+K (3,3x koncentrovaný) již není detekovatelná žádná DNA (vyjma 3 bp velkého píku, který je mimo rozsah vnitřního standardu) (obrázek 9).



Obrázek 9: Koncentrace a míra fragmentace vyizolované DNA stanovená pomocí čipové elektroforézy v závislosti na délce fixace (roztok 4PF+K). Vzorky z tkáně svalu (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) pufovaného formaldehydu s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzátoru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) byla analyzována její koncentrace a míra fragmentace. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [FU]. FU = fluorescence unit (fluorescenční jednotka).

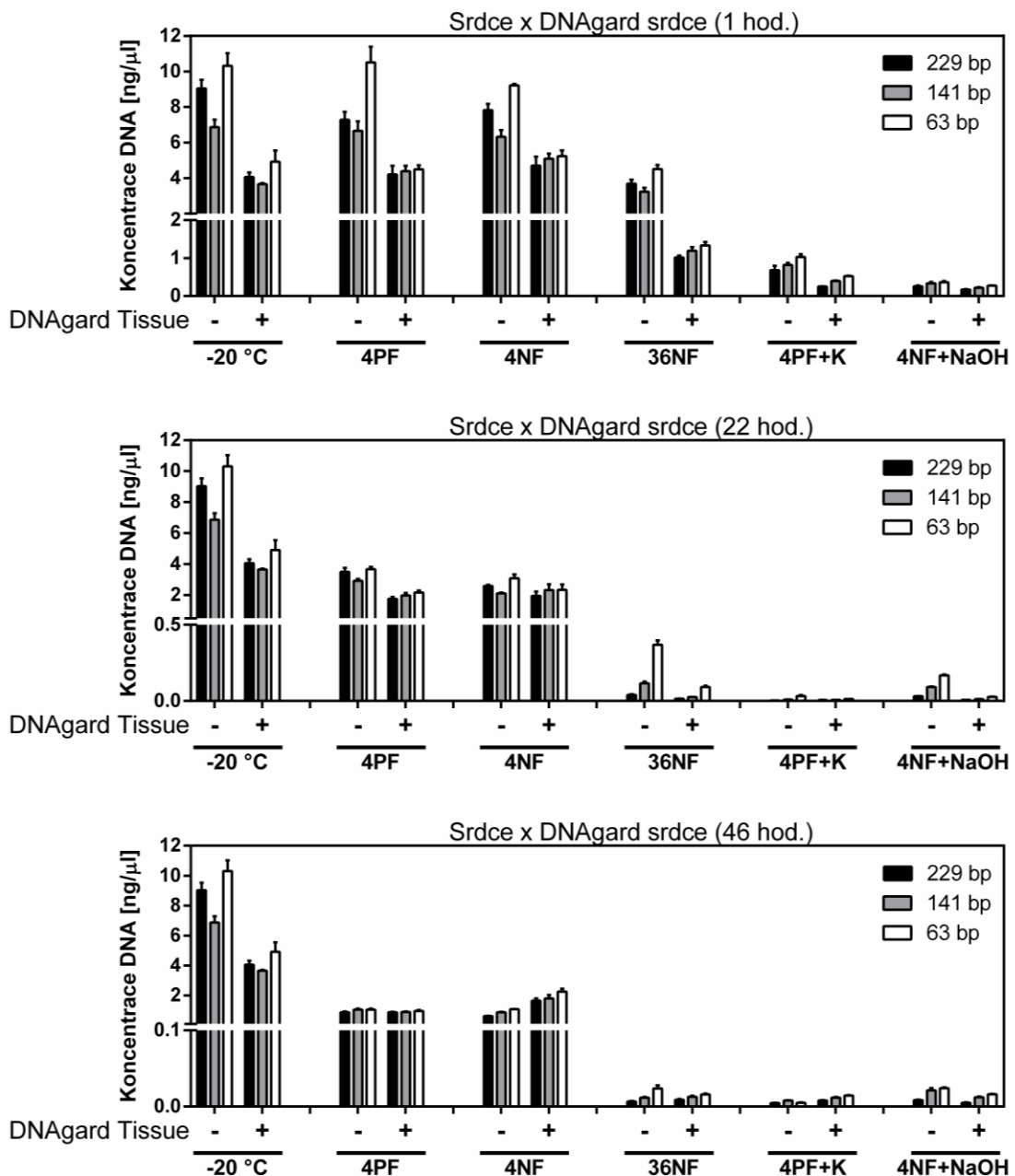
4.3 Pre-fixační ošetření tkáně roztokem DNAgard Tissue nemá vliv na množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA

DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) je roztok určený na stabilizaci nevyizolované DNA v tkáňových vzorcích. Bylo ověřeno, zda ošetření vzorku tkáně roztokem DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) po 24 hod. před fixací fixačními roztoky 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K a 4NF+NaOH má vliv na kvalitu a kvantitu následně izolované DNA. Testované vzorky pocházely ze srdeční tkáně a byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod., a 46 hod.

Hodnoty koncentrace DNA v grafech (obrázek 10) jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze dvou technických duplikátů, které byly připraveny z duplikátů

biologických, a jejich směrodatné odchylky. Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod.

Obrázek 10 ukazuje, že ošetření tkání roztokem DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) před fixací vede k zisku srovnatelných nebo dokonce nižších výtěžků DNA u všech fixačních roztoků a ve všech sledovaných časech jako u vzorků neošetřených roztokem DNAgard Tissue (Biomatrix, USA). Z měření metodou qPCR tedy vyplynulo, že umístění vzorku tkáně do DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) na 24 hod. před fixací nemá výrazně pozitivní vliv na kvalitu a kvantitu vyizolované DNA.



Obrázek 10: Pre-fixační ošetření tkáně roztokem DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) nemá vliv na množství a míru fragmentace vyizolované DNA. Vzorky ze srdeční tkáně (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF), 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) a 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným (4NF+NaOH). Část vzorků byla před fixací 24 hod. inkubována v roztoku DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) při pokojové teplotě (v grafech znázorněno znaménkem „+“; neošetřená tkáň je znázorněna znaménkem „-“). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí tří párů primerů pro lidské Alu sekvence, které tvořily produkty o délkách 229 bp, 141 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou uvedeny jako průměry čtyř hodnot ze dvou technických duplikátů, které byly připraveny z duplikátů biologických, a jejich směrodatné odchylky.

4.4 Porovnání fixačního experimentu Fixace II s Fixací I a Fixací III

Doposud uvedené výsledky jsou všechny získány z Fixace II (3.2.2). Aby byla eliminována náhodná či experimentální chyba, byly udělány celkem tři fixační experimenty: Fixace I, Fixace II, Fixace III (3.2.1. a 3.2.2), které byly následně porovnány mezi sebou.

Analýza vzorků připravených v rámci Fixace I neposkytla mnoho relevantních dat. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že experiment Fixace I byl připraven tak, že po fixaci tkání bylo fixační činidlo od tkáně odstraněno promytím vzorků v destilované vodě. Toto promytí ale pravděpodobně nevedlo k dostatečnému odstranění fixačního roztoku a následná qPCR analýza vzorků byla ve velkém množství případů inhibována. Z tohoto důvodu byl u Fixace II a Fixace III po zafixování tkáně zařazen krok odvodnění a zavodnění (3.2.3) a Fixace I nebyla dále zpracována (zde neukázané výsledky nicméně ukazují na stejné trendy jako v případě Fixace II a Fixace III).

Na obrázku 11 jsou znázorněny souhrnné výsledky získané z dat naměřených metodou qPCR (3.2.6) ze vzorků Fixace II a Fixace III, na něž byla aplikována statistická analýza. Použity byly 3 páry primerů pro lidské Alu sekvence (3.1.5). Ty tvořily produkty o délce 229 bp, 141 bp a 63 bp.

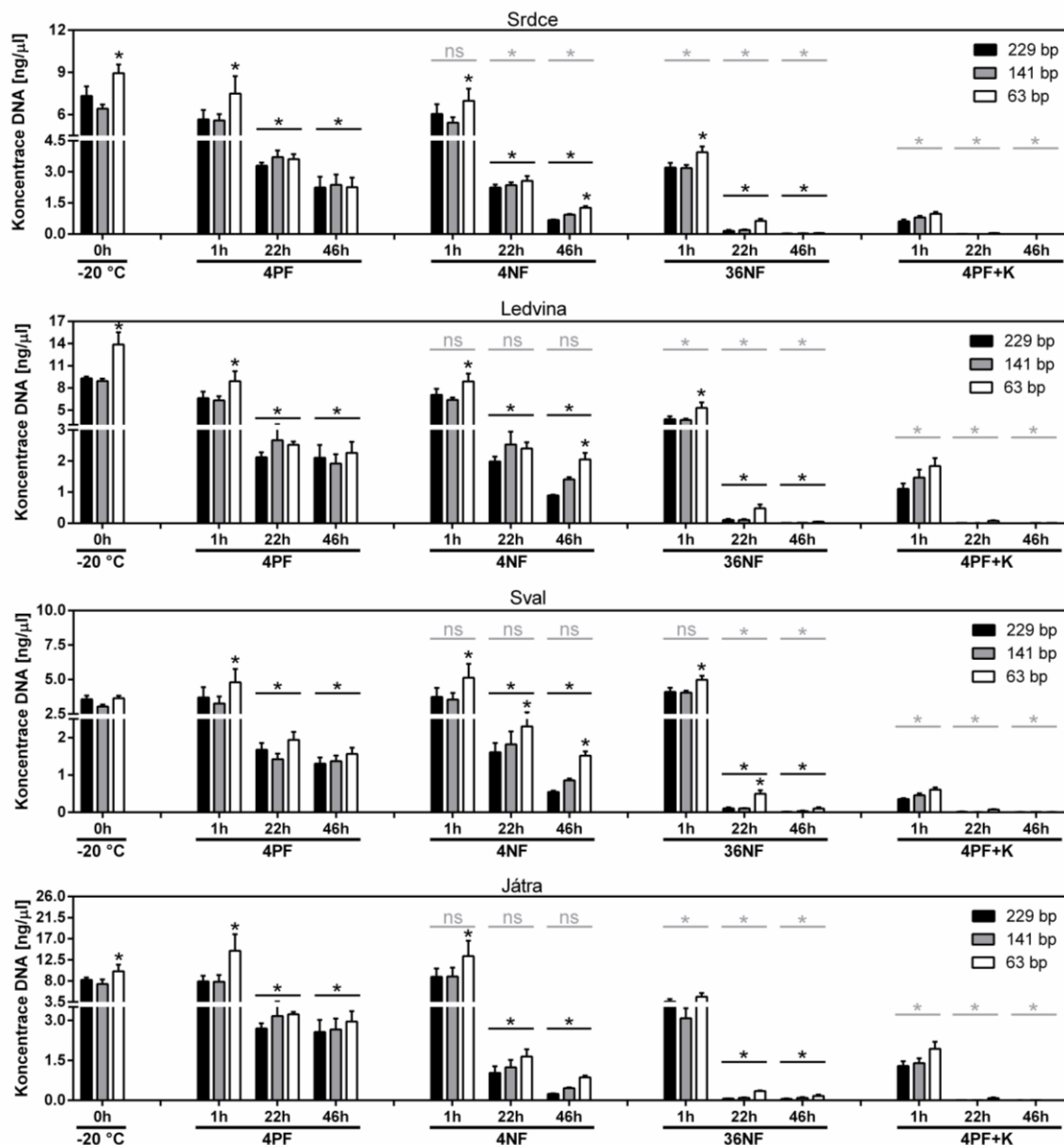
Měření koncentrace DNA byla provedena u vzorků srdce, ledviny, svalu a jater fixovaných v roztocích 4PF, 4NF, 36NF a 4PF+K. Hodnoty koncentrace DNA v grafech (obrázek 11) jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze dvou technických duplikátů, které byly připraveny z duplikátů biologických, od dvou dárců, a jejich směrodatné

odchylky. Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jedná se tedy o čas 0 hod.

Tyto výsledky potvrzují, že hodnoty koncentrace DNA naměřené pro tkáň fixované po dobu 1 hod. v roztocích 4PF a 4NF se zpravidla příliš neliší od hodnot naměřených pro kontrolu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na rozdíl od kontroly došlo u svalové tkáň fixované po dobu 1 hod. v roztocích 4PF a 4NF k statisticky signifikantně vyšší fragmentaci DNA. U ostatních tkání bylo zastoupení nejkratšího (63 bp) produktu qPCR v porovnání s nejdelším produktem (229 bp) u kontroly a vzorků fixovaných 1 hod. roztokem 4PF a 4NF srovnatelné. Pokles v koncentraci DNA získané ze vzorků fixovaných roztokem 4NF v porovnání s fixací v roztoku 4PF, byl statisticky signifikantní pouze u vzorku srdce fixovaného po dobu 22 a 46 hod. (obrázek 11).

Dále se u vzorků fixovaných roztokem 4PF a 4NF potvrdilo, že u všech tkání dochází k významnému a statisticky signifikantnímu poklesu koncentrace DNA vyizolované z tkání fixovaných po dobu 22 hod. a 46 hod. ve srovnání s koncentrací DNA vyizolované z tkání fixovaných po dobu 1 hod. U všech tkání, s výjimkou jaterní tkáně, fixovaných 46 hod. roztokem 4NF navíc dochází k větší fragmentaci DNA než u vzorků fixovaných 46 hod. roztokem 4PF, neboť rozdíl v zastoupení nejkratších produktů qPCR reakce vůči nejdelším produktům byl statisticky signifikantní pouze u vzorků fixovaných v roztoku 4NF a nikoliv u vzorků fixovaných v roztoku 4PF (obrázek 11).

V případě vzorků fixovaných v roztocích 36NF a 4PF+K se potvrdilo, že dochází k významnému a statisticky signifikantnímu poklesu množství vyizolované DNA oproti vzorkům fixovaným v roztoku 4PF, a to v případě všech fixačních časů. U vzorků fixovaných v roztoku 36NF je navíc snížení koncentrace mezi tkání fixovanou 1hod. a 22 hod. a 46 hod. statisticky signifikantní, nicméně u vzorků fixovaných v roztoku 4PF+K pokles koncentrace DNA, vzhledem k celkově nízké koncentraci DNA, statisticky signifikantní není (obrázek 11).



Obrázek 11: Souhrnné výsledky kvality a kvantity DNA z Fixace II a Fixace III stanovené metodou qPCR. Vzorky z tkání srdce, ledviny, svalu a jater dvou dárců (dárce 1: muž, 50-60 let, PMI 4 dny; dárce 2: muž, 82 let, PMI 3 dny) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmrazená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí tří párů primerů pro lidské Alu sekvence, které tvořily produkty o délkách 229 bp, 141 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou uvedeny jako průměry čtyř hodnot ze dvou technických duplikátů, které byly připraveny z duplikátů biologických, od dvou dárců a jejich směrodatné odchylky. V případě, že byl rozdíl v zastoupení nejkratších (63 bp) produktů vůči nejdelším (229 bp) statisticky signifikantní ($p \leq 0,5$; Mann-Whitney test), je vyznačen symbolem * nad sloupečky pro produkty 63 bp. Statisticky signifikantní ($p \leq 0,5$; Mann-Whitney test) rozdíly koncentrace DNA (stanovené pomocí všech párů primerů) u delších fixačních časů (22 a 46 hod.) v

porovnání s fixačním časem 1 hod. při použití jednoho fixačního roztoku jsou v grafech vyznačeny černými linkami a černými symboly *. Statisticky signifikantní ($p \leq 0,5$; Mann-Whitney test) rozdíly koncentrace DNA (stanovené pomocí všech párů primerů) mezi jednotlivými fixačními roztoky v porovnání s hodnotami koncentrace DNA pro roztok 4PF (srovnány jsou vždy odpovídající si fixační časy) jsou v grafech vyznačeny šedými linkami a šedými symboly *. ns = nebyl statisticky signifikantní rozdíl.

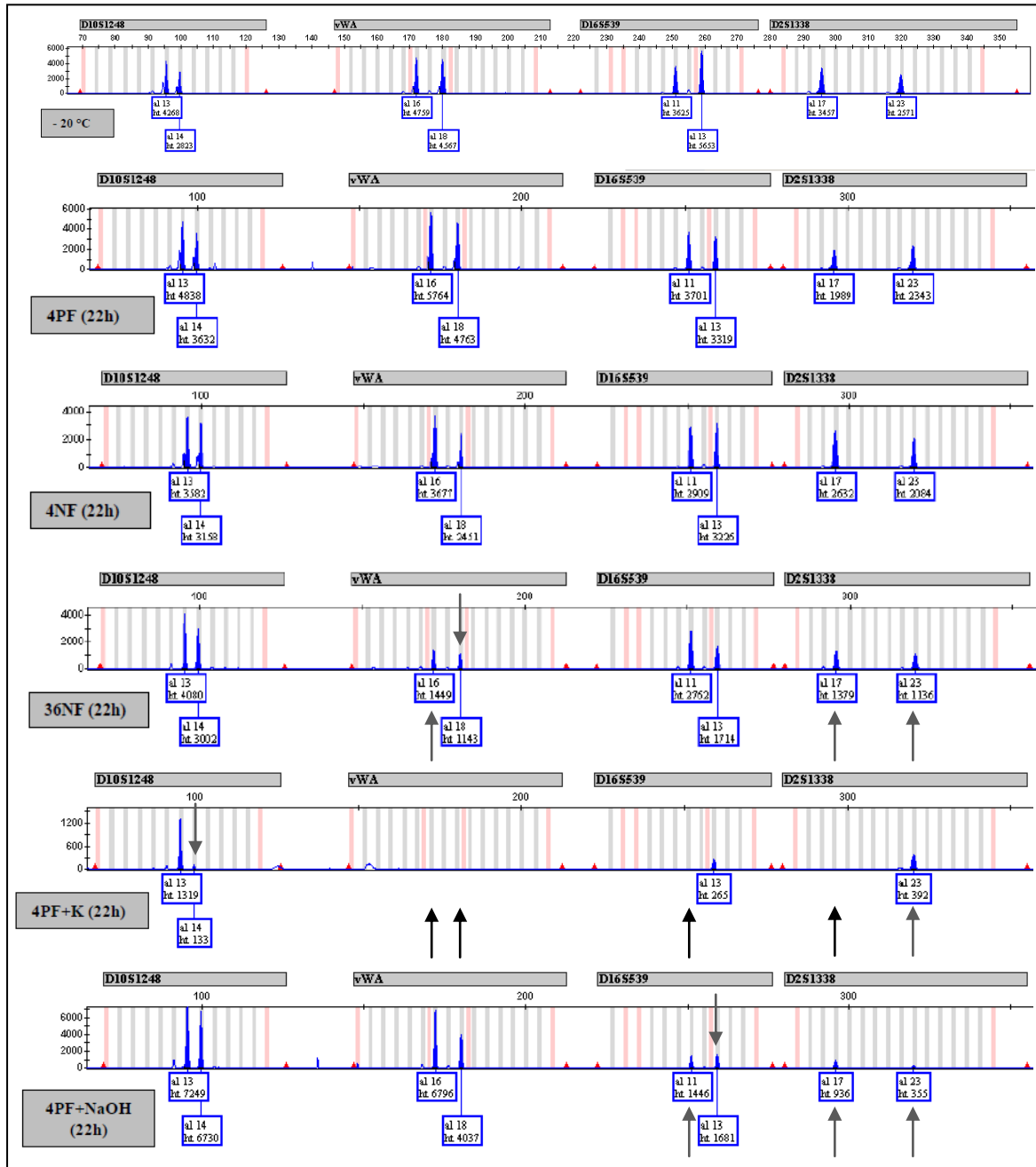
4.5 V závislosti na chemickém složení fixačního roztoku formaldehydu a délce fixace se mění možnosti provedení STR analýzy

STR analýza sestává z multiplexové PCR reakce s následným elektroforetickým dělením a fluorescenční detekcí produktů PCR reakce (3.2.9). Výsledkem STR analýzy je stanovení DNA profilu pro identifikační účely. V této práci představovala STR analýza důležitý výstup, protože je rutinně používanou praktickou aplikací na forezních pracovištích, kde vzorky z tkání fixovaných formaldehydem představují nestandardní materiál.

Měření bylo provedeno pomocí kitu AmpFLSTR NGM SElect (Applied Biosystems, USA) na přístroji DNA analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), a to pouze u vzorku svalu fixovaného po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztocích 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K a 4NF+NaOH. Ředění a objemy jednotlivých vzorků (po amplifikaci a naznačení metodou multiplexové PCR) přidávaných k roztoku na elektroforetickou analýzu (3.2.9) jsou uvedeny v Tabulce 6 (str. 58). STR analýza zahrnovala 17 ampliconů (16 autozomálních + 1 gonozomální) rozdělených do 4 fluorescenčních systémů. Jako kontrolní vzorek sloužila tkáň zmražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jedná se tedy o čas 0 hod. bez jakéhokoli ošetření fixačním činidlem. Pro přehlednost jsou zařazeny výsledky pouze z jednoho fluorescenčního detekčního systému, zbylé jsou uvedeny v Příloze (kapitola 8, str. 72–81).

Vzorek fixovaný roztokem 4PF poskytuje píky o vysoké intenzitě fluorescenčního signálu. Vzorek fixovaný roztokem 4NF poskytuje pouze lehce sníženou intenzitu fluorescenčního signálu oproti vzorku fixovanému roztokem 4PF, výška píků je však stále nad analytickým limitem (obrázek 12; P1 a P2, Příloha, str. 72, 74). Při fixaci v roztoku 36NF již u vzorku dochází k viditelnému snížení výšky píků, u některých systémů dokonce dochází ke drop-out efektu (vymizení píků) (obrázek 12; P3, Příloha, str. 76). Vzorek fixovaný v roztoku 4PF+K vykazuje extrémní snížení výšky píků až k hranici

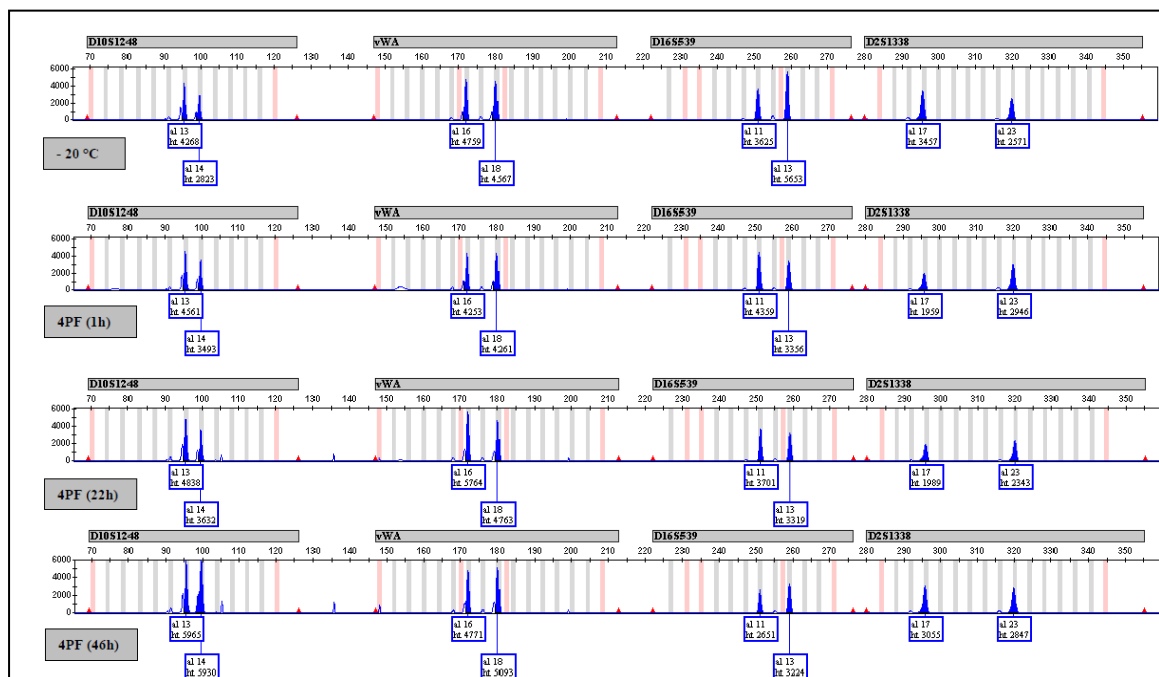
analytického limitu a nezřídka dochází i k drop-out efektu. V případě vzorku fixovaného v roztoku 4NF+NaOH dochází ke snižování výšky piků především u delších amplikonů (obrázek 12).



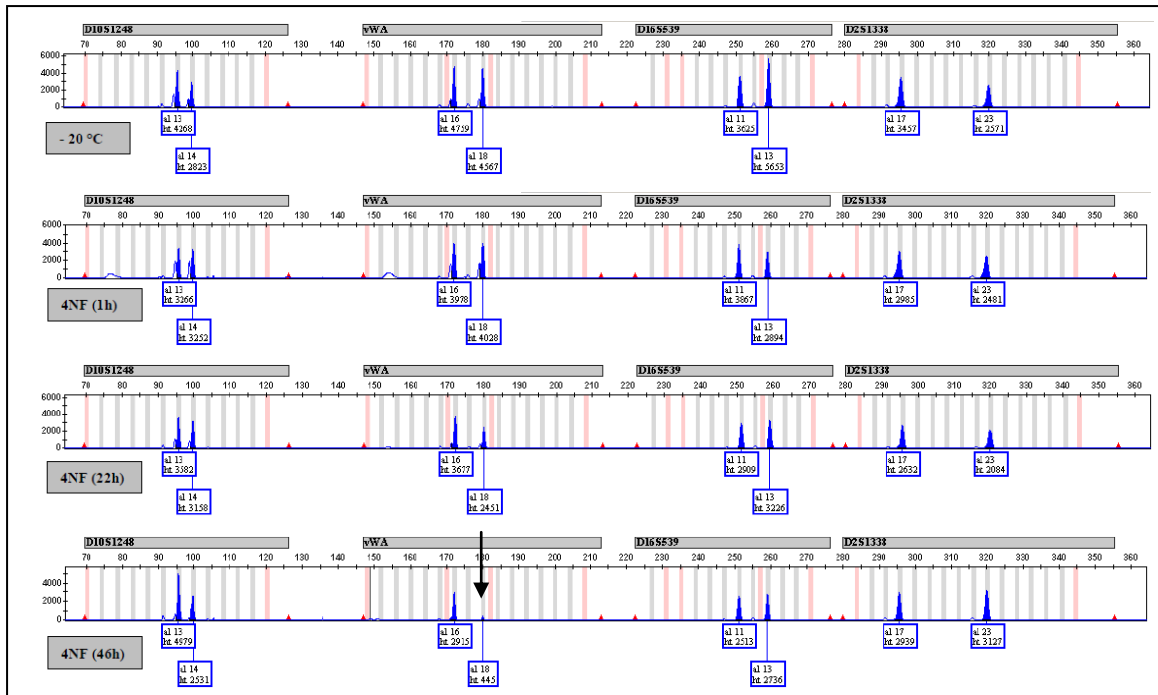
Obrázek 12: V závislosti na chemickém složení fixačního roztoku se mění možnosti provedení STR analýzy. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po 22 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF), 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) a 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd s 4% (w/v) hydroxidem sodným (4NF+NaOH). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyizolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Černé šipky znázorňují příklady

míst s drop-out efektem, šedé šipky ukazují příklady míst se značně sníženou intenzitou signálu. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).

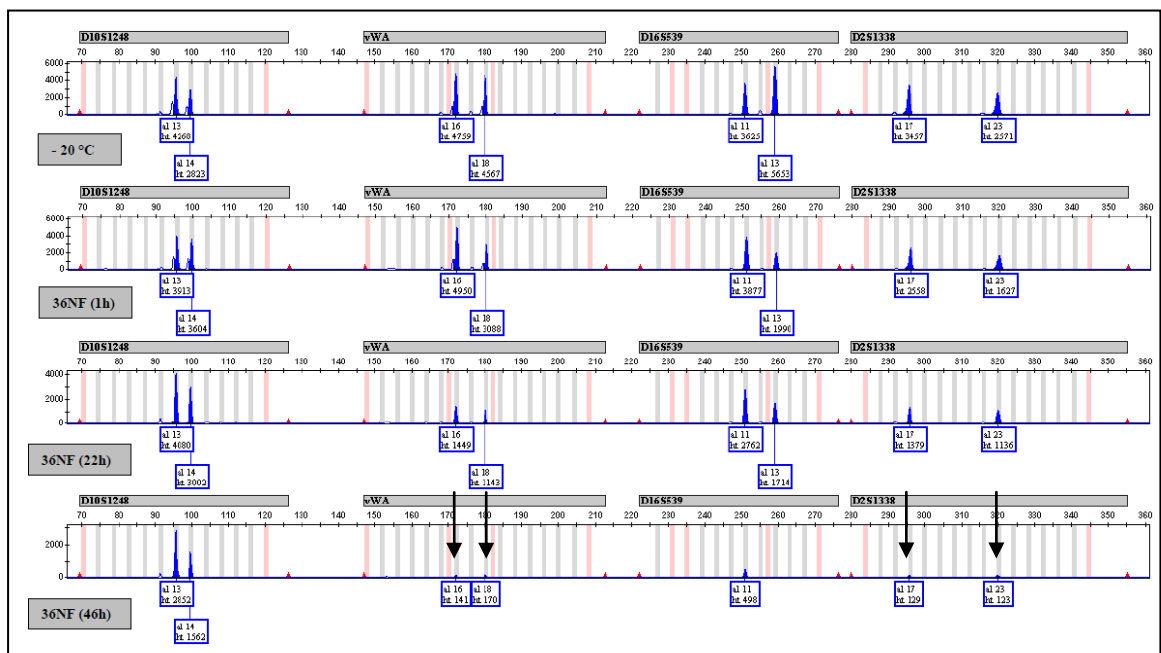
U vzorku fixovaného v roztoku 4PF dochází s prodlužujícím se fixačním časem k minimálním změnám ve výškách píků (obrázek 13). V případě vzorku fixovaného v roztoku 4NF dochází s prodlužujícím se fixačním časem k významnějšímu snížení výšky píků a k drop-out efektu (obrázek 14). U vzorku fixovaného v roztoku 36NF se s prodlužujícím se fixačním časem výrazně snižuje výška píků a při 46 hod. dlouhé fixaci dochází k výraznému drop-out efektu (obrázek 15). Obdobné výsledky byly získány u vzorků fixovaných v roztocích 4PF+K a 4NF+NaOH. Pro přehlednost jsou elektroforetogramy pro vzorky fixované v roztocích 4PF+K a 4NF+NaOH zařazeny do Přílohy (kapitola 8, str.78–80) jako obrázky P4 a P5.



Obrázek 13: V závislosti na délce fixace se mění možnosti provést STR analýzu. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) pufovaného formaldehydu (4PF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmrazená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyizolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).



Obrázek 14: V závislosti na délce fixace se mění možnosti provést STR analýzu. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) nepufrovaného formaldehyd (4NF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyizolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Černé šipky znázorňují příklady míst s drop-out efektem. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).



Obrázek 15: V závislosti na délce fixace se mění možnosti provést STR analýzu. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztoku 36% (v/v) nepufrovaného formaldehydu (36NF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyizolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou

výsledné elektroforetogramy. Černé šipky znázorňují příklady míst s drop-out efektem. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).

Tabulka 6: Přehled použitých objemů (a výsledné ředění) DNA přidávaných do roztoku na elektroforetickou analýzu STR.

Fixační roztok	Čas fixace	Objem (ředění)
4PF	1 hod.	0,8 µl (10x)
4NF	1 hod.	0,8 µl (10x)
36NF	1 hod.	0,8 µl (10x)
4PF+K	1 hod.	0,8 µl (10x)
4NF+NaOH	1 hod.	0,8 µl (10x)
4PF	22. hod.	0,8 µl (10x)
4NF	22. hod.	0,8 µl (10x)
36NF	22. hod.	0,8 µl (5x)
4PF+K	22. hod.	3 µl (1x)
4NF+NaOH	22. hod.	0,5 µl (1x)
4PF	46 hod.	0,8 µl (5x)
4NF	46 hod.	0,8 µl (5x)
36NF	46 hod.	0,8 µl (5x)
4PF+K	46 hod.	3 µl (1x)
4NF+NaOH	46 hod.	3 µl (1x)
Kontrola -20 °C	0 hod.	0,8 µl (10x)

5 Diskuze

Fixace tkání formaldehydem a následné zalití do parafínového bločku je rozšířenou metodou používanou v patologické a lékařsko soudní praxi. Ačkoliv je formaldehyd pro své vlastnosti výtečným fixačním činidlem pro histologickou analýzu, v případě aplikace molekulárně biologických metod přináší jeho použití problémy. Z formaldehydem zafixované tkáně se DNA jednak hůře izoluje (zhoršené štěpení tkáně, inhibice izolačních technik, kovalentní vazba DNA na proteiny) a jednak je tato DNA chemicky a fyzicky modifikována (kovalentní vazba DNA na proteiny, fragmentace, modifikace primární sekvence). Tyto problémy nezpůsobuje pouze formaldehyd, ale i produkty vznikající jeho rozkladem (kyselina mravenčí) (Fox *et al.*, 1985; Koshiha *et al.*, 1993). Dopady těchto komplikací se dají snížit dvěma způsoby: optimalizací fixačního postupu nebo optimalizací izolačního postupu.

V rámci této práce byl nejprve proveden dotazníkový výzkum pracovišť soudního lékařství a patologie v České republice. Na základě tohoto dotazníku bylo rozhodnuto o provedení experimentů v časových bodech 1 hod., 22 hod. a 46 hod. Dále bylo rozhodnuto o použití několika fixačních roztoků založených na formaldehydu tak, aby byly simulovány různé chemické stavy formaldehydu používaného k fixacím. Byly provedeny celkem tři na sobě nezávislé fixace: Fixace I, Fixace II a Fixace III. Diskutované výsledky jsou primárně získané z Fixace II. Aby byly tyto výsledky validované, je Fixace II porovnávána k Fixaci I a Fixaci III.

Ze srovnání dat získaných ze vzorků fixovaných 1 hod. ve fixačním roztoku 4PF s daty získanými z kontroly, připravené zamražením tkáně na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, metodou qPCR je patrné, že takto krátké působení přesně naředěného a pufrovaného formaldehydu má minimální negativní vliv na koncentraci a fragmentaci DNA. Toto zjištění se potvrdilo i při měření na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) v případě delších fragmentů DNA (řádově 10^3 bp). Vzhledem k příliš vysokému ředění obou vzorků ale nebyl touto metodou zjištěn vliv fixace po dobu 1 hod. v roztoku 4PF na fragmentaci DNA u kratších fragmentů (řádově 10^2 bp). U vzorků fixovaných v roztoku 4PF po dobu 22 hod. byl metodou qPCR pozorován úbytek v množství vyizolované DNA. Tento trend byl potvrzen fluorescenčním stanovením koncentrace DNA (absolutní hodnoty koncentrací naměřené touto metodou jsou cca o řád nižší, než bylo stanoveno metodou qPCR, tato skutečnost by mohla být způsobena tím, že je ve vzorku přítomna ve vysoké

koncentraci jednořetězcová DNA, která není při použití této metody detekovatelná nebo mohla degradace DNA ovlivnit přesnost měření (Sedlackova *et al.*, 2013)). Z měření na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA), vzhledem k příliš vysokému ředění vzorku 4PF z fixace po dobu 1 hod., nelze přesně stanovit dynamiku malých fragmentů (řádově 10^2 bp) v čase mezi 1 hod. až 22 hod., ale u velkých fragmentů (řádově 10^3 bp) lze vyzorovat snížení koncentrace. Delší fixace (46 hod.) tyto trendy dále prohlubuje. Lze tedy říci, že i správně ředěný a pufrovaný formaldehyd má negativní vliv na získání DNA z fixovaných tkání, je-li fixace prováděna po delší dobu (standardní fixační doba na klinických pracovištích je 12–24 hod. (viz Tabulka P1, Příloha, str. 69). V případě fixace po dobu 1 hod. pravděpodobně nedochází k dostatečnému profixování tkáně, jelikož formaldehyd, ač rychle proniká do tkání, fixuje pomalu (Fox *et al.*, 1985). Nutno podotknout, že přestože fixace v roztoku 4PF snižuje kvantitu a kvalitu vyzolovatelné DNA, STR analýza na takto fixovaných tkáních probíhá bezproblémově i po 46 hod. fixaci.

Roztok 4NF byl vybrán, aby simuloval formaldehyd v případě špatné laboratorní praxe. Takovýto formaldehyd by měl mít nižší pH a obsahovat vyšší procento kyseliny mravenčí, což působí negativně na DNA (Koshihara *et al.*, 1993). Z výsledků vyplývá, že roztok 4NF se chová velmi podobně jako roztok 4PF při fixaci po dobu 1 hod., kdy jsou stupeň fragmentace a koncentrace DNA v podstatě shodné. Avšak u tkání fixovaných 22 hod. je již patrný mírný pokles ve výtěžcích DNA. U tkání fixovaných 46 hod. dochází ke zřetelně vyšší fragmentaci DNA, než u vzorků fixovaných roztokem 4PF, jak bylo ukázáno pomocí qPCR a bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA). U fixaci 22 hod. a 46 hod. u vzorku jater bylo, na rozdíl od ostatních tkání, detekováno velké snížení výtěžků DNA. Tato data získaná z qPCR byla potvrzena také fluorescenčním měřením. Toto je pravděpodobně způsobeno rozdílnou vnímavostí různých tkání k fixačním činidlům (Karlsen *et al.*, 1994). Z výsledků STR analýzy tkání fixovaných v roztoku 4NF vyplývá, že negativní vliv roztoku 4NF na kvalitu a kvantitu DNA má vliv i na kvalitu analýzy STR. Při fixaci 22 hod. je pozorovatelný úbytek intenzity signálu a při 46 hod. fixaci dochází až k alelickému drop-out efektu. Z tohoto plyne, že nedostatečně ošetřený formaldehyd může způsobit komplikace při STR analýze.

Roztok 36NF je v porovnání s roztokem 4PF horším fixačním činidlem, minimálně s ohledem na molekulárně biologické techniky. Již při fixaci po dobu 1 hod. je zpravidla vidět pokles ve výtěžcích DNA. Při fixacích po dobu 22 hod. a 46 hod. je výtěžek DNA minimální. Toto bylo potvrzeno jak metodou qPCR, tak metodou

fluorescenčního měření koncentrace DNA a měřením na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA). Vzorek fixovaný roztokem 36NF na STR analýze vykazuje postupnou ztrátu intenzity signálu úměrně s délkou fixačního času a to tak, že při fixaci 22 hod. je již výrazně snížena výška píků a při fixaci 46 hod. dochází k vícenásobnému alelickému drop-out efektu.

Zásadní snížení ve výtěžcích DNA způsobila fixace tkání v roztoku 4PF+K a 4NF+NaOH. Tyto roztoky představují extrémně znehodnocený formaldehyd. Již po 1 hod. fixace dochází k velmi výraznému úbytku v koncentraci DNA. Vzorky fixované 22 hod. a 46 hod. obsahují minimum detekovatelné DNA, jak bylo stanoveno metodou qPCR. Totožné výsledky poskytuje i fluorescenční měření koncentrace DNA a v případě 4PF+K také měření na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA). Na STR analýze dochází k výraznému snížení intenzity signálu a k alelickému drop-out efektu. Vzorky fixované roztoky 4PF+K a 4NF+NaOH jsou tedy nevhodné k analýze STR.

V této práci byl také sledován vliv roztoku DNAGard Tissue (Biomatrix, USA) na srdeční tkáň fixovanou roztoky 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K a 4NF+NaOH po 1 hod., 22 hod. a 46 hod. Tkáň byla do roztoku DNAGard Tissue (Biomatrix, USA) umístěna na 24 hod. před samotnou fixací. Výrobce udává, že tento roztok ochrání DNA před degradací až po dobu 6 měsíců, je-li v něm tkáň naložena. Bylo tedy testováno, zda-li by krátkodobé umístění tkáně do roztoku DNAGard Tissue (Biomatrix, USA) před fixací nepomohlo zachovat kvalitu a kvantitu DNA při následné fixaci. Měření ukázalo, že se tomu tak neděje a výtěžky DNA jsou sníženy stejně, jako když k ošetření roztokem DNAGard Tissue (Biomatrix, USA) nedochází. Důvodem nejspíše bylo, že roztok DNAGard Tissue (Biomatrix, USA) DNA chemicky trvale nemodifikuje, a tedy ji před změnami chrání pouze, pokud se s ní nachází v trvalém kontaktu.

Srovnání Fixace II s Fixací III potvrzuje trendy popsané na základě měření vzorků z Fixace II. Pro silnější statistické zhodnocení by bylo dobré provést další opakování.

Primery použité v této práci tvoří produkty o relativně blízké velikosti (63 bp, 141 bp, 229 bp). Přestože jsou tyto amplikony vhodné vzhledem k následné STR analýze (která pracuje v tomto velikostním rozsahu), postihují relativně malý rozsah možností fragmentace DNA, a tudíž nejsou zcela vhodné pro hlubší zkoumání fragmentace DNA. Toto zvláště vyniká při porovnání s měřeními na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA). Jelikož v rámci Alu sekvencí nelze vytvořit amplikony řádově o tisících až desetitisících bázích, přináší měření na přístroji bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) podstatné rozšíření informací o stupni fragmentace DNA.

U jednotlivých tkání byla při měření metodou qPCR patrná rozdílnost v absolutních hodnotách koncentrací vyizolované DNA. Toto je pravděpodobně způsobeno rozdílnou vnímavostí tkání k účinkům fixačních činidel a rozdílnou izolovatelností DNA po fixaci. Odlišná izolovatelnost DNA může být daná jinou konzistencí tkání po fixaci, což vede tomu, že štěpení tkání při extrakci DNA probíhá s rozdílnou účinností (Karlsen *et al.*, 1994). Další možností je také odlišná hustota jader v různých tkáních.

Z této práce vyplývá, že v případech, kdy je možné pracovat se vzorky, které byly fixovány kvalitním 4% pufovaným formaldehydem, není problém aplikovat molekulárně biologické metody včetně STR analýzy. Nicméně v případech, kdy byla tkáň fixována 4% formaldehydem nižší (4NF) či velmi nízké kvality (36 NF, 4PF+K, 4NF+NaOH), tato práce naznačuje, že daný vzorek nebude poskytovat dobré výsledky při aplikaci molekulárně biologických metod. Možností, jak takový stav zvrátit, je použití vhodnějšího extrakčního postupu (viz rešeršní část této práce, kapitola 3.2.1.4).

Další možností je se takového stavu vyvarovat, což umožňuje použití tzv. molekulárních fixačních činidel, jako je například PAXgene (Qiagen, Německo). Molekulární fixační činidla by mohla nahrazovat formaldehyd jako fixační činidlo. Mají totiž stejně dobře zachovávat morfologický a antigenní profil tkáně, navíc však mají být šetrnější k nukleovým kyselinám. Literatura uvádí, že ačkoliv molekulární fixační roztoky mohou přinášet benefit v případě RNA, v případě DNA poskytují srovnatelnou kvalitu s formaldehydem. Při jejich použití však odpadá nutnost kontroly kvality formaldehydu (Belloni *et al.*, 2013; Staff *et al.*, 2013).

Je nutné mít na paměti, že ačkoliv jsou zde prezentovány výsledky získané z tkání fixovaných formaldehydem, nebyly tyto zalité do parafínu, což je jinak běžnou součástí histologické praxe. Nutnost manipulace s parafínem by vnesla další proměnné, především procesem odstranění parafínu. Nicméně parafín sám o sobě by neměl DNA nikterak chemicky modifikovat (Hewitt *et al.*, 2008), a tudíž byl záměrně opomenut.

V dalších experimentech by bylo vhodné racionalizovat použití fixačních roztoků. Například u roztoku 4PF+K by koncentrace kyseliny mravenčí mohla být odvozena od skutečně používaných roztoků v konkrétních klinických laboratořích. Stejně tak by se mohla upravovat koncentrace formaldehydu blíže okolo hodnoty 4 %. Popřípadě by mohlo být použito přímo roztoků zapůjčených z klinických pracovišť. Dále by bylo zajímavé zahrnout pH či teplotu roztoku do proměnných, které ovlivňují kvalitu vyizolované DNA.

6 Souhrn

Cílem předkládané diplomové práce bylo posoudit vliv fixace tkání ve fixačních roztocích založených na formaldehydu na kvalitu a kvantitu izolované DNA. Za tímto účelem byly různými metodickými přístupy zkoumány dva faktory, které ovlivňují míru fragmentace a množství vyizolované DNA.

Prvním faktorem je chemické složení fixačního roztoku formaldehydu. Bylo ukázáno, že pro molekulárně biologické metody je z testovaných fixačních činidel založených na formaldehydu nejvhodnější 4% pufrovaný formaldehyd. Mírně zhoršenou kvalitu a kvantitu DNA poskytovaly vzorky fixované 4% nepufrovaným formaldehydem. Další chemické modifikace již ovlivňují stupeň fragmentace a množství vyizolované DNA zásadně, jak bylo ukázáno na výsledcích pro 36% nepufrovaný formaldehyd, 4% pufrovaný formaldehyd s 4% kyselinou mravenčí a 4% nepufrovaný formaldehyd s 4% hydroxidem sodným. Oproti 4% pufrovanému formaldehydu tyto roztoky zhoršovaly měřené parametry vyizolované DNA a zároveň neposkytovaly tolik kvalitní materiál pro stanovení DNA profilu v STR analýze.

Druhým zkoumaným faktorem byla délka fixace. Zde bylo ukázáno, že čím déle fixace probíhala, tím nižší výtěžky a méně kvalitní DNA byla získána, což platí pro všechny použité fixační roztoky.

Obecné doporučení pro přípravu fixovaných preparátů vzhledem k jejich následné analýze s využitím molekulárně biologických metod je tedy používat opravdu správně ředěný a pufrovaný 4% formaldehyd, jelikož i mírnější chemická modifikace může při déle trvající fixaci způsobovat komplikace. V případě, že si nejsme jisti kvalitou formaldehydu, je třeba dbát na to, aby fixace trvala pouze nezbytně dlouhou dobu. Nicméně, to je skutečnost, kterou je lepší dodržovat i při použití kvalitního formaldehydu.

Dále byla zpracována literární rešerše zabývající se optimalizací fixace tkání formaldehydem a optimalizací následné izolace DNA z formaldehydem fixovaných vzorků.

7 Použitá literatura

- Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1996 Jul 1;24(13):2623-5.
- Andréasson H1, Gyllensten U, Allen M. Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Biotechniques.* 2002 Aug;33(2):402-4, 407-11.
- Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA-A review. *Forensic Sci Int Genet.* 2010 Apr;4(3):148-57.
- Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *Biotechniques.* 1995 May;18(5):768-70, 772-3.
- Belloni B, Lambertini C, Nuciforo P, Phillips J, Bruening E, Wong S, Dummer R. Will PAXgene substitute formalin? A morphological and molecular comparative study using a new fixative system. *J Clin Pathol.* 2013 Feb;66(2):124-35.
- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem.* 1991 Mar;39(3):351-4.
- Bonin S, Petrera F, Niccolini B, Stanta G. PCR analysis in archival postmortem tissues. *Mol Pathol.* 2003 Jun;56(3):184-6.
- Boom R, Sol C, Wertheim-van Dillen P. Rapid purification of ribosomal RNAs from neutral agarose gels. *Nucleic Acids Res.* 1990 Apr 25;18(8):2195.
- Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol.* 2001 Jan;8(1):1-7.
- Bussolati G, Annaratone L, Medico E, D'Armento G, Sapino A. Formalin fixation at low temperature better preserves nucleic acid integrity. *PLoS One.* 2011;6(6):e21043.
- Didenko VV, Ngo H, Baskin DS. Early necrotic DNA degradation: presence of blunt-ended DNA breaks, 3' and 5' overhangs in apoptosis, but only 5' overhangs in early necrosis. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1571-8.
- De Jong D, Verbeke SLj, Meijer D, Hogendoorn PC, Bovee JV, Szuhai K. Opening the archives for state of the art tumour genetic research: sample processing for array-CGH using decalcified, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue-derived DNA samples. *BMC Res Notes.* 2011 Jan 4;4:1.
- Deagle BE1, Eveson JP, Jarman SN. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples--a case study on DNA in faeces. *Front Zool.* 2006 Aug 16;3:11.
- Dedhia P, Tarale S, Dhongde G, Khadapkar R, Das B. Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007 Jan-Mar;8(1):55-9.
- Dorfman KD, King SB, Olson DW, Thomas JD, Tree DR. Chem Rev. Beyond gel electrophoresis: microfluidic separations, fluorescence burst analysis, and DNA stretching. *Chem Rev.* 2013 Apr 10;113(4):2584-667.
- Douglas MP, Rogers SO. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res.* 1998 Jun 5;401(1-2):77-88.
- Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res.* 1986 Jun;46(6):2964-9.
- Dutta D, Park I, Mills NC. Fixation temperature affects DNA integrity in the testis as measured by the TUNEL assay. *Toxicol Pathol.* 2012 Jun;40(4):667-74.

- Duval K, Aubin RA, Elliott J, Gorn-Hondermann I, Birnboim HC, Jonker D, Fourney RM, Frégeau CJ. Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcohol-based fixative. *Forensic Sci Int Genet.* 2010 Feb;4(2):80-8.
- Farrugia A, Keyser C, Ludes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int.* 2010 Jan 30;194(1-3):e25-8.
- Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, Parchi P, Arzberger T, Bell J, Budka H, Ströbel T, Giaccone G, Rossi G, Bogdanovic N, Fakai P, Schmitt A, Riederers P, Al-Sarraj S, Ravid R, Kretschmar H. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol.* 2007 Jul;17(3):297-303.
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* 1985 Aug;33(8):845-53.
- Gallagher SR. Quantification of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001 May;Appendix 3:Appendix 3D.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. 1996 Oct;6(10):995-1001. *Genome Res.*
- Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Van Marck E, Worobey M. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One.* 2007 Jun 20;2(6):e537.
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Jul 16;130(1):118-26.
- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol.* 1991 Feb;95(2):117-24.
- Grizzle WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem.* 2009 Oct;84(5):185-93.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94.
- Helander KG. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem.* 1994 May;69(3):177-9.
- Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, Goralski TJ, Langmore JP, Raja RG, Williams PM, Palma JF, Warrington JA. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2008 Dec;132(12):1929-35.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
- Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods.* 2014 Nov;70(1):12-9.
- Howe JR, Klimstra DS, Cordon-Cardo C. DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure: a reliable method for PCR amplification of archival material. *Histol Histopathol.* 1997 Jul;12(3):595-601.
- Hudlow WR, Chong MD, Swango KL, Timken MD, Buoncristiani MR. A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: a diagnostic tool for STR typing. *Forensic Sci Int Genet.* 2008 Mar;2(2):108-25.

- Hughes-Stamm SR, Ashton KJ, van Daal A. Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. *Int J Legal Med.* 2011 May;125(3):341-8.
- Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest.* 1994 Oct;71(4):604-11.
- Khoja H, Smejkal G, Krowczynska A, Herlihy JD. Optimizing sample fixation and chromatin shearing for improved sensitivity and reproducibility of chromatin immunoprecipitation. Application note. Edition November 2012. <http://covarisinc.com/wp-content/uploads/truChip-Fixation-App-Note.pdf> (k datu 20.7. 2015).
- Kingsbury AE, Foster OJ, Nisbet AP, Cairns N, Bray L, Eve DJ, Lees AJ, Marsden CD. Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995 Feb;28(2):311-8.
- Koshiha M, Ogawa K, Hamazaki S, Sugiyama T, Ogawa O, Kitajima T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol Res Pract.* 1993 Feb;189(1):66-72.
- Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR, Schmidt CA. Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan probe format in the LightCycler instrument. *Mol Cell Probes.* 2000 Apr;14(2):57-60.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125. Epub 2006 Feb 3.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lohov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 15;28(2):655-61.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012 Apr 20;(62). pii: 3923.
- Legrand B, Mazancourt Pd, Durigon M, Khalifat V, Crainic K. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. *Forensic Sci Int.* 2002 Feb 18;125(2-3):205-11.
- Lin J, Kennedy SH, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz JW, Xu A, Zondervan KT. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal Biochem.* 2009 Dec 15;395(2):265-7.
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993 Apr 22;362(6422):709-15.
- Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis.* 2000 Jan;21(1):128-34.
- Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):12-8.
- Nicklas JA1, Buel E. Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *J Forensic Sci.* 2003 Sep;48(5):936-44.
- Paireder S, Werner B, Bailer J, Werther W, Schmid E, Patzak B, Cichna-Markl M. Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Anal Biochem.* 2013 Aug 15;439(2):152-60.
- Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp.* 2011 Mar 26;(49). pii: 2763.

- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997 Feb 15;245(2):154-60.
- Puchtler H, Meloan SN. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry.* 1985;82(3):201-4.
- Santella RM. Approaches to DNA/RNA Extraction and whole genome amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Sep;15(9):1585-7.
- Santos S, Sá D, Bastos E, Guedes-Pinto H, Gut I, Gärtner F, Chaves R. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Res Vet Sci.* 2009 Jun;86(3):421-6.
- Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol Proced Online.* 2013 Feb 13;15(1):5.
- Sengüven B, Baris E, Oygur T, Berktaş M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Int J Med Sci.* 2014 Mar 27;11(5):494-9.
- Shedlock AM, Haygood MG, Pietsch TW, Bentzen P. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *Biotechniques.* 1997 Mar;22(3):394-6, 398, 400.
- Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, Liu D, Lim H, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem.* 2002 Aug;50(8):1005-11.
- Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis.* 2000 Oct 5;6:178-83.
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002 Dec;161(6):1961-71.
- Staff S, Kujala P, Karhu R, Rökman A, Ilvesaro J, Kares S, Isola J. Preservation of nucleic acids and tissue morphology in paraffin-embedded clinical samples: comparison of five molecular fixatives. *J Clin Pathol.* 2013 Sep;66(9):807-10.
- Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem.* 1978;47:819-4
- Swango KL, Timken MD, Chong MD, Buoncristiani MR. A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Sci Int.* 2006 Apr 20;158(1):14-26.
- Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012 Sep;16(3):400-5.
- Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, Maeda S, Doi K, Baba S, Sugiyama T. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J Clin Pathol.* 1990 Sep;43(9):748-51.
- Vacek Z. *Histologie a histologická technika I. část – Histologie.* Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1996. ISBN: 80-7013-201-9.
- Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001 May;Chapter 2:Unit2.5A.
- Walker JA, Kilroy GE, Xing J, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA. Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 2003 Apr 1;315(1):122-8.

- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991 Apr;10(4):506-13.
- Wickham CL, Boyce M, Joyner MV, Sarsfield P, Wilkins BS, Jones DB, Ellard S. Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies. *Mol Pathol*. 2000 Feb;53(1):19-23.
- Williams C, Pontén F, Moberg C, Söderkvist P, Uhlén M, Pontén J, Sitbon G, Lundeberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol*. 1999 Nov;155(5):1467-71.
- Woolley AT, Mathies RA. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Nov 22; 91(24):11348-52.
- Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002 Sep;10(3):269-74.
- Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res*. 2000 Sep;10(3):205-11.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 12;32(12):e103.

8 Přílohy

Tabulka P1: Shrnutí dotazníkového průzkumu ohledně fixačních protokolů používaných na pracovištích patologie a soudního lékařství. Formou elektronického dotazníku bylo obesláno přibližně sto pracovišť soudního lékařství a patologie v České republice. V tabulce jsou uvedeny informace získané od 27 respondentů ohledně typu používaného formaldehydu (pufrovaný nebo nepufrovaný), jeho přípravy a ohledně délky fixace. Vyneseno je také zastoupení jednotlivých odpovědí v procentech.

4% formaldehyd	Počet odpovědí	V procentech
Nespecifikovalo, že používá pufrovaný	21	78%
Specifikovalo, že používá pufrovaný	5	19%
Používá oba typy, dle následné analýzy	1	4%
Příprava 4% formaldehydu		
Uvedlo, že odebírají již ředěný	9	33%
Uvedlo, že ředí sami	12	44%
Používá oba způsoby, dle potřeby	4	15%
Nespecifikovalo	2	7%
Délka fixace		
Používá 12–24 hod.	20	74%
Uvedlo i kratší dobu (1–2 hod.), dle velikosti tkáně	3	11%
Uvedlo i delší dobu (až 48 hod.), dle velikosti tkáně a doby dodání vzorku	4	15%

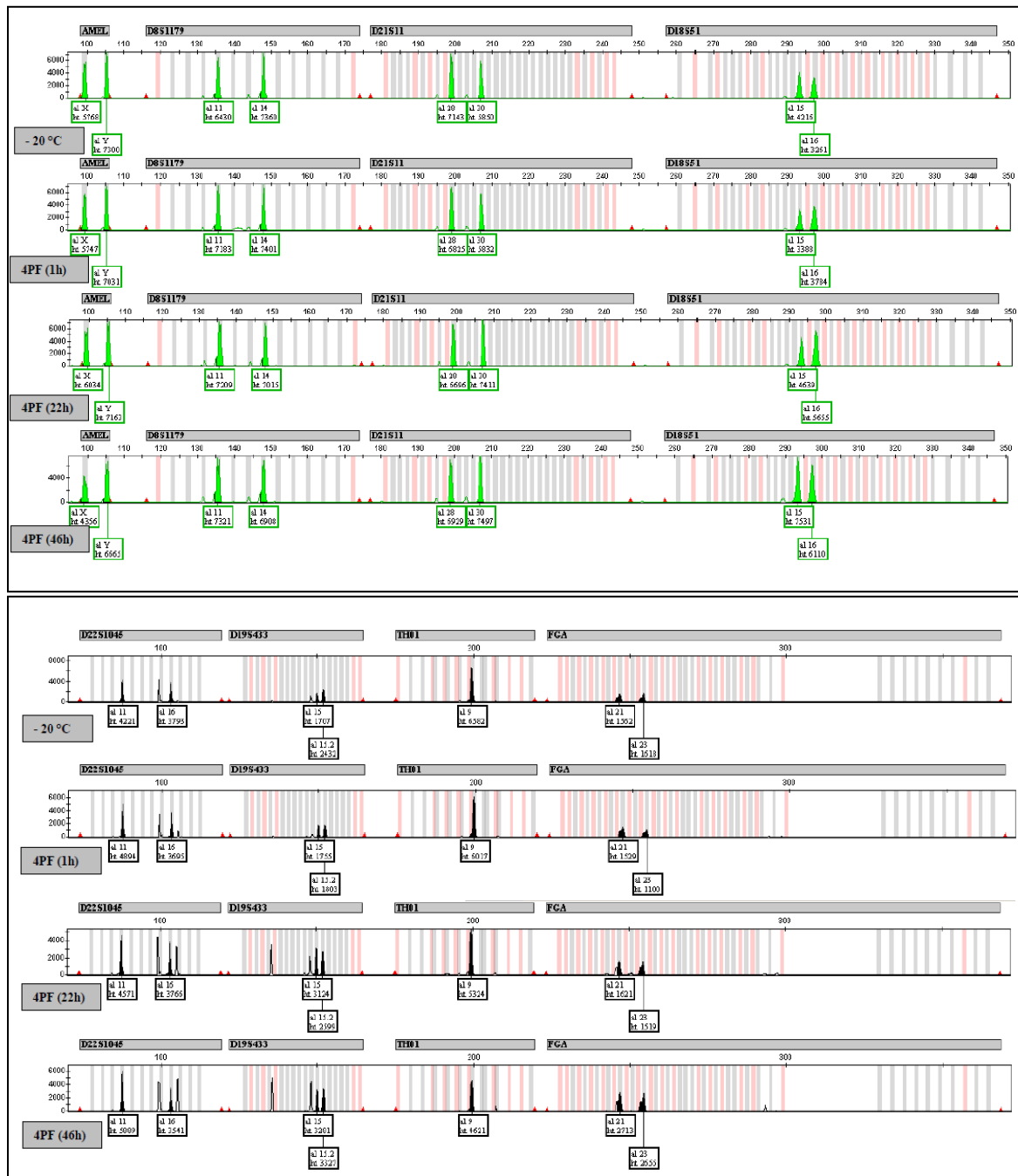
Tabulka P2: Shrnutí dotazníkového průzkumu ohledně protokolů na přípravu tkání fixovaných ve formaldehydu a do zalitých do parafinu (FFPE) používaných na pracovištích patologie a soudního lékařství. Formou elektronického dotazníku bylo obesláno přibližně sto pracovišť soudního lékařství a patologie v České republice. V tabulce jsou uvedeny informace získané od 5 respondentů ohledně přípravy FFPE bločku vybraných tak, aby ukazovaly na variabilitu v protokolech.

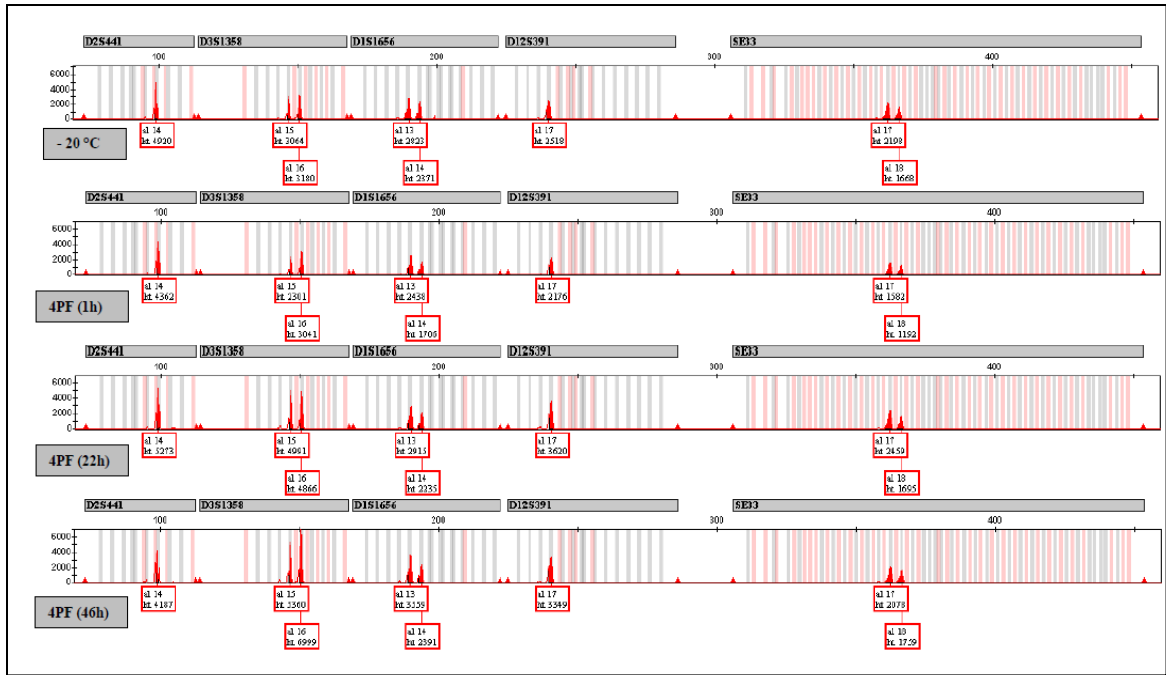
Fixace formaldehydem 1 hod. – 48 hod.						
Promytí vodou cca 30 min., pokud je součástí protokolu						
Odvodnění	70% EtOH 90 min	96% EtOH 60 min	80% EtOH 60 min	60% EtOH 90 min	70% EtOH 60 min	80% EtOH 60 min
	80% EtOH 90 min	96% EtOH 60 min	80% EtOH 60 min	70% EtOH 90 min	96% EtOH 60 min	96% EtOH 120 min
	96% EtOH 90 min	96% EtOH 60 min	96% EtOH 60 min	80% EtOH 90 min	96% EtOH 60 min	96% EtOH 180 min
	96% EtOH 90 min	96% EtOH 60 min	96% EtOH 60 min	96% EtOH 120 min	96% EtOH 60 min	96% EtOH 180 min
	Bezvodý EtOH 90 min	96% EtOH 90 min	96% EtOH 60 min		96% EtOH 60 min	96% EtOH 240 min
	Bezvodý EtOH 90 min	Isopropanol 90 min	96% EtOH 60min			96% EtOH 240 min
Impregnace látkou umožňující pronikání parafinu	Xylen 90 min	Xylen 60 min	Aceton 60 min	Aceton 90 min	Aceton 60 min	Aceton 30 min
	Xylen 90 min	Xylen 90 min	Xylen 60 min	Aceton-Xylen 90 min	Aceton 60 min	Xylen 60 min
	Xylen 90 min	Xylen 90 min	Xylen 60 min	Xylen 90 min	Toluen 60 min	Xylen 60 min
					Toluen 60 min	Xylen 60 min
					Toluen 60 min	
Uložení do parafinu	Parafín 90 min	Parafín 120 min	Parafín 60 min	Parafín 2 hod	Parafín 60 min	Parafín 15 min
	Parafín cca 3 hod	Parafín 120 min	Parafín 60 min	Parafín 3 hod	Parafín 60 min	Parafín cca 3 hod
			Parafín cca 4-5 hodin		Parafín 60 min	
					Parafín 60 min	

Tabulka P3: Seznam kitů na izolaci DNA z FFPE bločků. Tabulka shrnuje komerční kity na izolaci DNA z FFPE bločků dostupných k 5. 5. 2014. Uveden je vždy výrobce, název, katalogové číslo a odkaz na www. stránku.

Výrobce	Název	Kat. číslo	Web
Illumina	Infinium FFPE DNA Restoration Solution	WG-321-1001	http://www.illumina.com/products/infinium_ffpe_dna_restoration_solution.ilmn
Illumina	QuickExtract™ FFPE DNA Extraction Kit	QEF81805	http://www.epibio.com/applications/nucleic-acid-purification-extraction-kits/dna-extraction/quickextract-ffpe-dna-extraction-kit
Life Technologies	PicoPure® DNA Extraction Kit	KIT0103	http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/KIT0103
Life Technologies	PureLink® Pro 96 Genomic DNA Purification Kit	K1821-04A	http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K182104A
Macherey-nagel	NucleoSpin® FFPE DNA	740980.10	http://www.mn-net.com/Products/DNAandRNAPurification/DNAfromtissueandcells/NucleoSpinFFPEDNA/tabid/11451/language/en-US/Default.aspx
Mobio	BiOstic® FFPE Tissue DNA Isolation Kit	12250-50	http://www.mobio.com/tissue-cells-dna-isolation/biostic-ffpe-tissue-dna-isolation-kit.html
Promega	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System	A2351	http://worldwide.promega.com/products/dna-and-rna-purification/genomic-dna-purification-kits/reliaprep-ffpe-gdna-miniprep-system/?activeTab=0
Qiagen	DNeasy Blood & Tissue Kit (50)	69504	http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit#orderinginformation
Qiagen	GeneRead DNA FFPE Kit	180134	http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/generead-dna-ffpe-kit
Qiagen	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	56404	http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-ffpe-tissue-kit
Qiagen	QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	60404	http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dsp-dna-ffpe-tissue-kit#orderinginformation
Qiagen	QIASymphony DSP DNA Kits	937255	http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiasymphony-dsp-dna-kits
Qiagen	REPLI-g FFPE Kit	150243	http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/repli-g-ffpe-kit
Roche	High Pure FFPE DNA Isolation Kit	6868487001	http://lifescience.roche.com/shop/products/high-pure-ffpe-dna-isolation-kit#tab-0
Sigma	GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits	G1N10-1KT	http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g1n10?lang=en&region=CZ
Sigma	GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit	WGA2-10RXN	http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/wga2?lang=en&region=CZ
Zymo research	ZR FFPE DNA MiniPrep™	D3065	http://www.zymoresearch.com/dna/genomic-dna/solid-ffpe-tissue-dna/zr-ffpe-dna-mini-prep

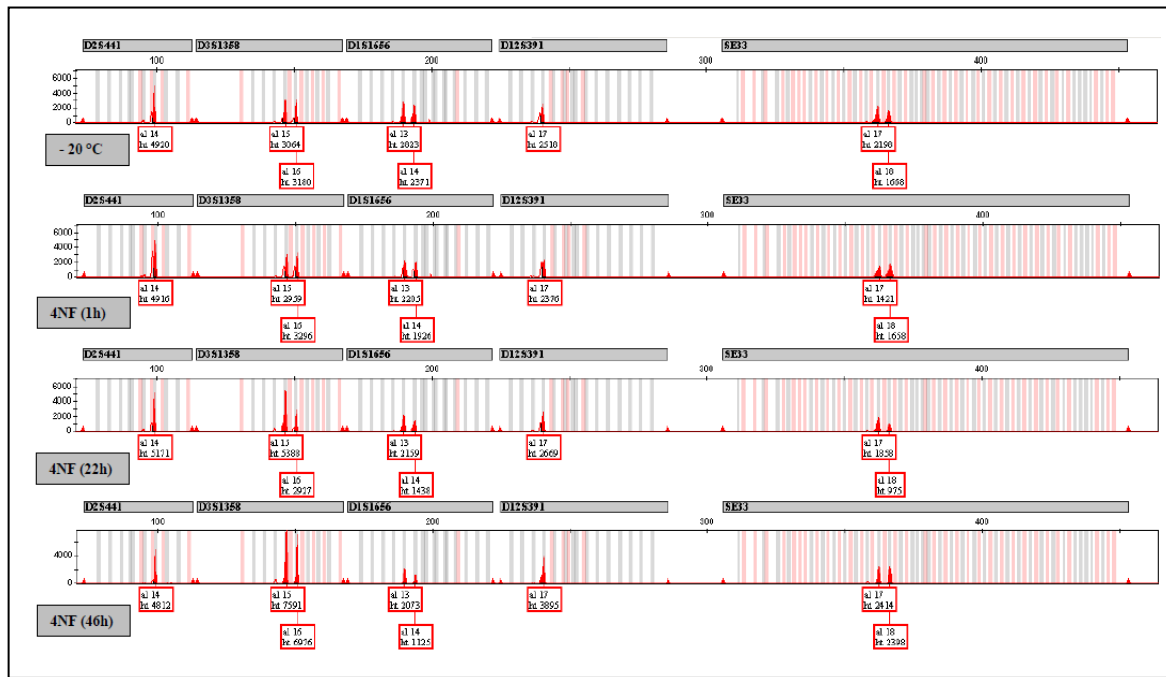
Obrázek P1: Výsledky STR analýzy DNA izolované z tkáně fixované 4% pufovaným formaldehydem v různých fluorescenčních systémech. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) pufovaného formaldehydu (4PF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyzolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).



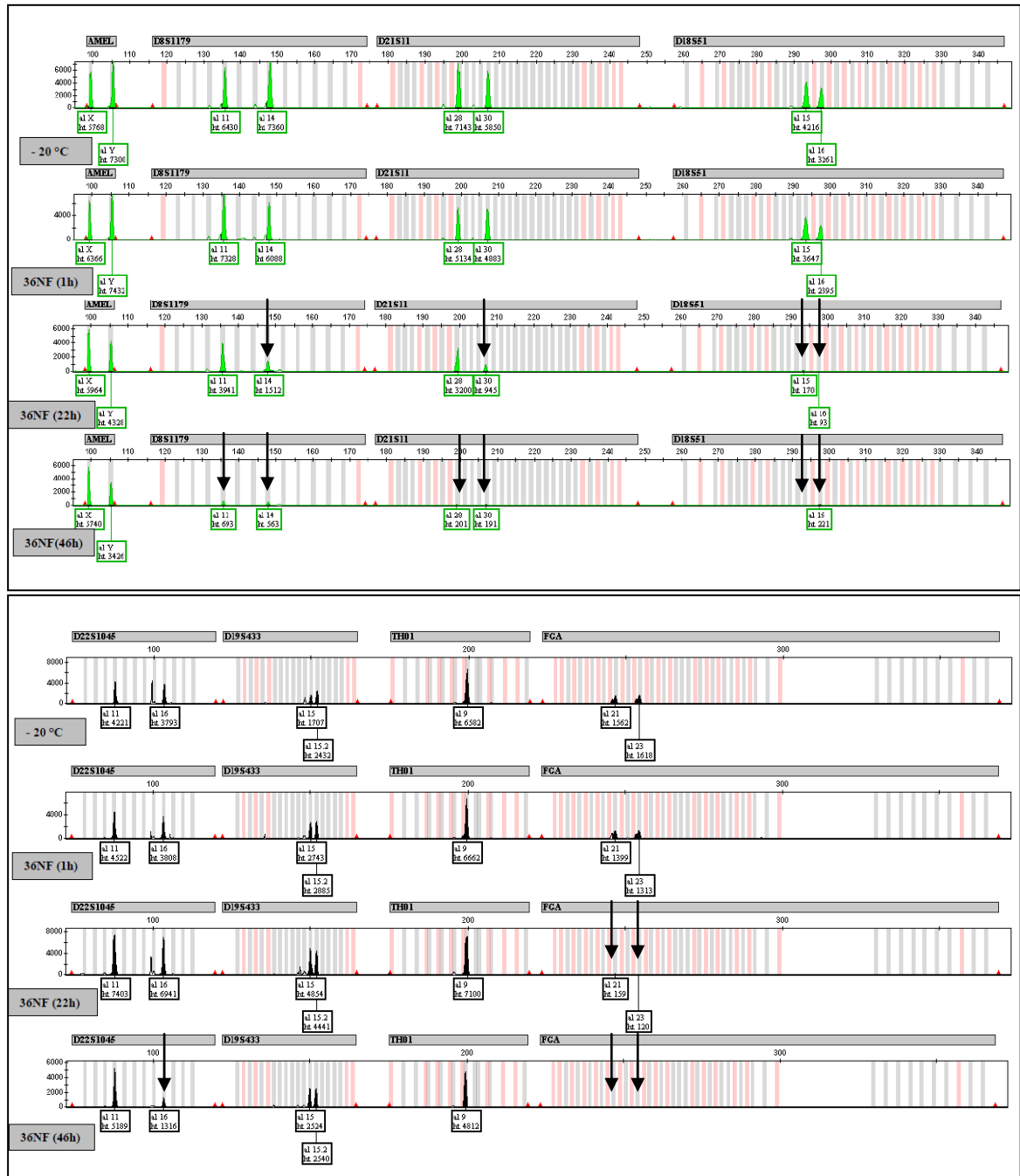


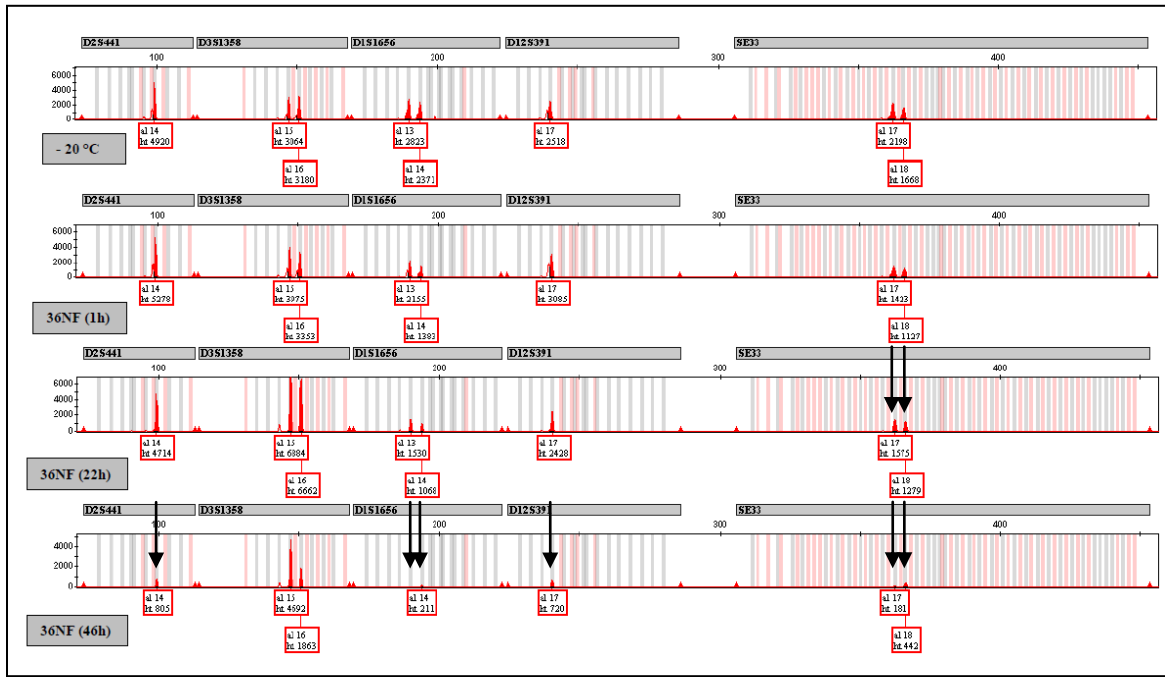
Obrázek P2: Výsledky STR analýzy DNA izolované z tkáně fixované 4% nepufrovaným formaldehydem v různých fluorescenčních systémech. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) nepufrovaného formaldehydu (4NF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyzizolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Černé šipky znázorňují příklady míst s drop-out efektem či výrazně sníženou intenzitou signálu. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).



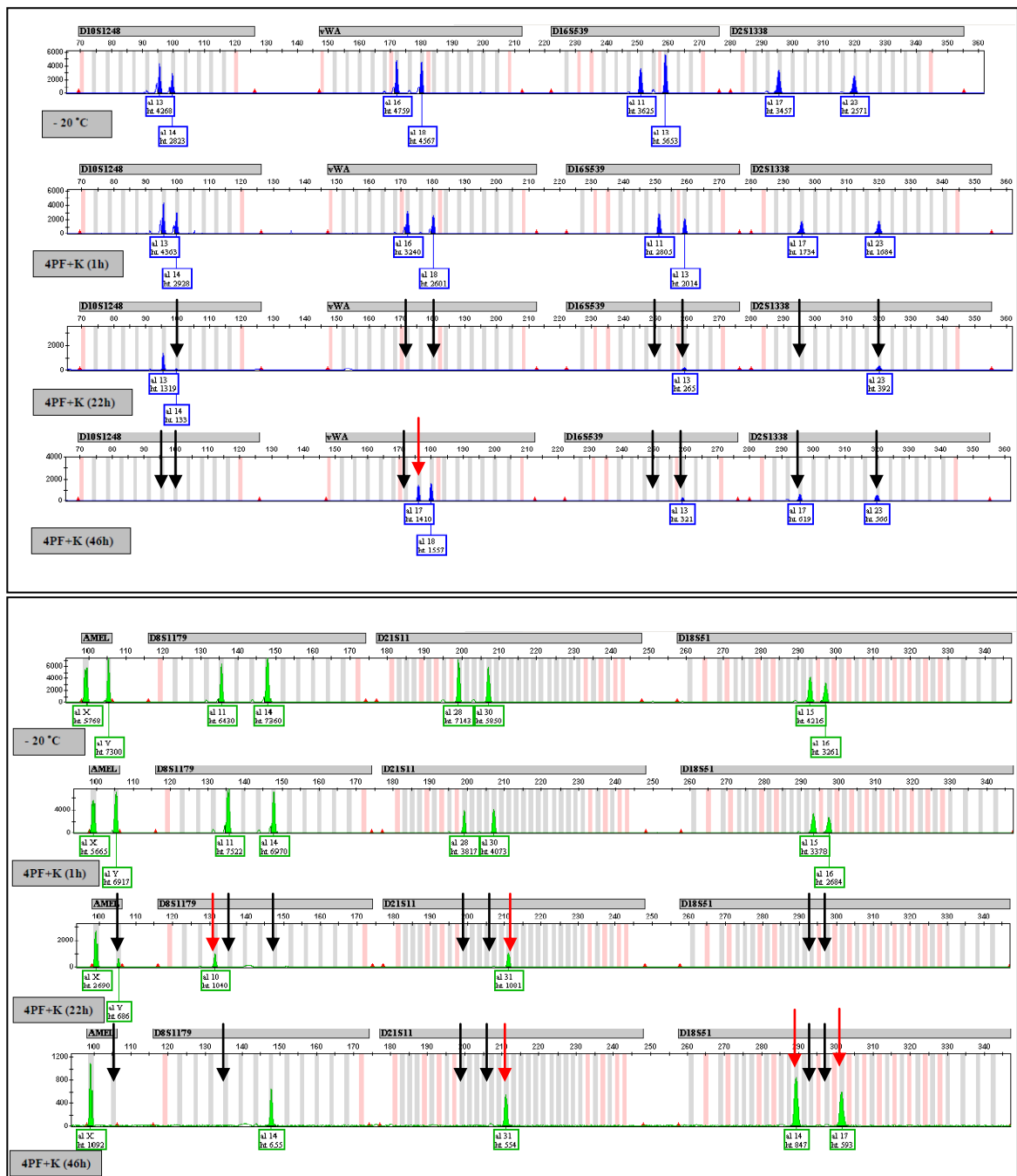


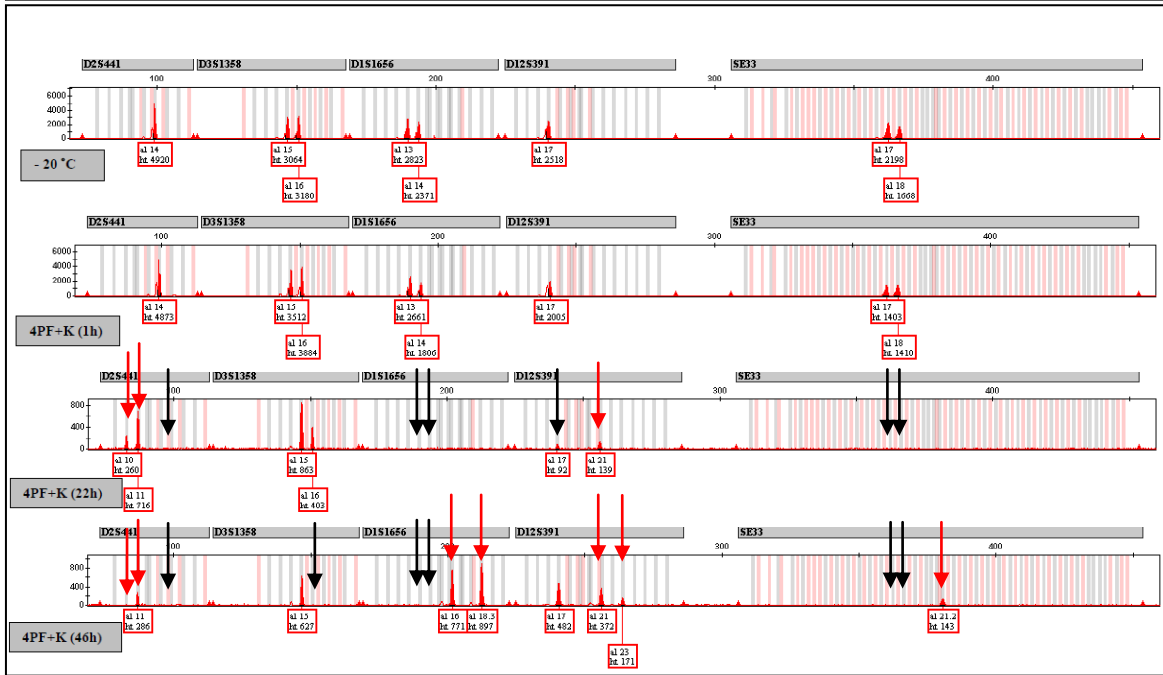
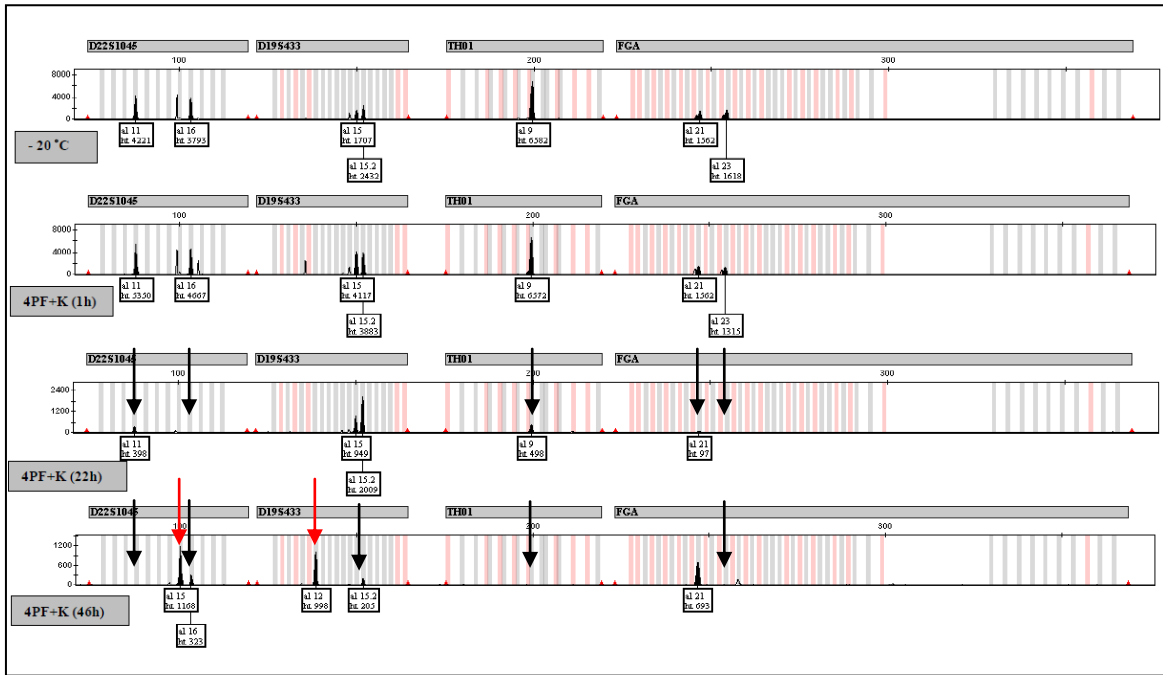
Obrázek P3: Výsledky STR analýzy DNA izolované z tkáně fixované 36% nepufrovaným formaldehydem v různých fluorescenčních systémech. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztoku 36% (v/v) nepufrovaného formaldehydu (36NF). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyzizolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Černé šipky znázorňují příklady míst s drop-out efektem či výrazně sníženou intenzitou signálu. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).





Obrázek P4: Výsledky STR analýzy DNA izolované z tkáně fixované 4% pufrovaným formaldehydem s 4% kyselinou mravenčí v různých fluorescenčních systémech. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) pufrovaného formaldehydu s 4% (v/v) kyselinou mravenčí. Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyzolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Černé šipky znázorňují příklady míst s drop-out efektem či výrazně sníženou intenzitou signálu, červené šipky označují příklady míst s detekovanou kontaminací. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).





Obrázek P5: Výsledky STR analýzy DNA izolované z tkáně fixované 4% pufovaným formaldehydem s 4% kyselinou mravenčí v různých fluorescenčních systémech. Vzorky z tkáně srdce (muž, 50-60 let, PMI 4 dny) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4% (v/v) pufovaného formaldehydu s 4% (v/v) kyselinou mravenčí. Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. DNA vyzolovaná ze vzorků byla následně podrobena STR analýze. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Černé šipky znázorňují příklady míst s drop-out efektem či výrazně sníženou intenzitou signálu, červené šipky označují příklady míst s detekovanou kontaminací. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena koncentrace DNA [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).

