

Abstrakt

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Radka Vaňková

Školitel: doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv přídavku nosiče na izolaci volně cirkulujících nukleových kyselin z krevní plazmy

Cíl práce: Cílem této práce bylo porovnat výtěžky volné cirkulující fragmentované DNA (cfDNA) extrahované ze vzorků krevní plazmy s přídavkem komerčně dostupných nosičů. Na základě výsledků real-time polymerasové řetězové reakce (qPCR) byl vybrán neoptimálnější nosič pro rutinní izolaci cfDNA ze vzorků krevní plazmy.

Metody: Kolonkovou extrakční metodou NucleoSpin Plasma XS Kit (Macherey-Nagel) byla z alikvotů směsné plazmy izolována cfDNA. Celkem bylo použito 7 typů nosičů, a to nosičová RNA (Qiagen), glykogen (Invitrogen), polyadenylová kyselina (Roche), lineární polyakrylamid (Invitrogen), kvasinková transferová RNA (Ambion), DNA ze spermatu lososa (Invitrogen), DNA ze spermatu sledě (Promega). Následně byla plazmatická DNA kvantifikována spektrofotometricky, fluorimetricky a pomocí qPCR.

Výsledky: Nejlepších výsledků bylo dosaženo s přídavkem polyadenylové kyseliny o finální koncentraci 1,55 µg/ml. Výtěžnost cfDNA se přídavkem nosičové RNA a polyadenylové kyseliny o finálních koncentracích 1,55 µg/ml a 0,1 µg/ml signifikantně nezměnila. Významně negativní účinek na množství eluované cfDNA měli glykogen, lineární polyakrylamid, kvasinková tRNA, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě.

Závěr: Vzhledem k pozitivnímu účinku přídavku polyadenylové kyseliny o koncentraci 1,55 µg/ml na množství eluované cfDNA byl tento nosič vyhodnocen jako nejvhodnější pro rutinní izolaci cfDNA ze vzorků krevní plazmy soupravou NucleoSpin Plasma XS Kit. U ostatních nosičů ke zlepšení výtěžnosti nedošlo a pro izolaci cfDNA kolonkovou extrakční metodou jsou nevhodné.