

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VLIV PŘÍDAVKU NOSIČE NA IZOLACI VOLNĚ
CIRKULUJÍCÍCH NUKLEOVÝCH KYSELIN
Z KREVNÍ PLAZMY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Bc. Radka Vaňková

„Prohlašuji, že předkládaná diplomová práce je mým původním autorským dílem. Použité zdroje a odbornou literaturu, z které jsem čerpala, řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury. Práce nebyla využita pro získání jiného nebo stejného titulu.“

datum

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, cenné rady a trpělivost při zpracování diplomové práce. Zároveň děkuji pracovnímu kolektivu úseku molekulární biologie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové za poskytnutí podmínek pro vypracování této práce. Děkuji mé rodině a blízkým, kteří pro mne byli nenahraditelnou oporou po celou dobu studia.

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.

Abstract

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Radka Vaňková

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

Title of diploma thesis: Influence of Carrier Molecule Addition on Plasma Free Circulating Nucleic Acid Extraction

Outline: The aim of this thesis was to compare the yields of cell-free DNA (cfDNA) extracted from blood plasma specimens with the addition of commercially available carrier molecules. According to the real-time polymerase chain reaction (qPCR) results, we chose the most optimal carrier molecules for routine isolation of cfDNA from blood plasma samples.

Methods: cfDNA was isolated from aliquots of a pooled blood plasma by spin column extraction method NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel). We used 7 different types of carrier molecules as RNA carrier (Qiagen), Glycogen (Invitrogen), Poly (A) Polyadenylic acid (Roche), Linear Acrylamide (Invitrogen), Yeast transfer RNA (Ambion), Salmon sperm DNA (Invitrogen), Herring sperm DNA (Promega). After the extraction, plasmatic DNA with the addition of carrier molecules was quantified by spectrophotometry, fluorimetry and qPCR.

Results: The best results were achieved with the addition of polyadenylic acid with final concentration of 1.55 µg/ml. The addition of carrier RNA and polyadenylic acid with final concentration of 1.55 µg/ml and 0.1 µg/ml did not show any significant effect on the yield of cfDNA. Glycogen, linear acrylamide, yeast tRNA, salmon sperm DNA and herring sperm DNA had a significant negative effect on the yield of cfDNA.

Conclusion: Due to a positive effect of the addition of polyadenylic acid (with final concentration of 1.55 $\mu\text{g/ml}$) to the amount of eluted cfDNA, this carrier was evaluated as the most suitable carrier for routine isolation of cfDNA from blood plasma samples by NucleoSpin Plasma XS Kit. The other carrier molecules did not improve the yield of cfDNA, and therefore they are not appropriate for isolation of cfDNA by spin column extraction methods.

Klíčová slova: volná cirkulující fragmentovaná DNA, krevní plazma, nosičové molekuly, preanalytické faktory, real-time PCR

Keywords: cell-free DNA, blood plasma, carrier molecules, pre-analytical factors, real-time PCR

Obsah

Teoretická část	11
1 Úvod	11
2 Struktura nukleových kyselin	12
2.1 Hlavní rozdíly ve struktuře a funkci DNA a RNA	12
2.2 Význam molekulárně genetického vyšetření nukleových kyselin	17
3 Volně cirkulující nukleové kyseliny	18
3.1 Definice	18
3.2 Původ a eliminace cfDNA	18
3.3 Charakteristika a forma cfDNA	19
3.4 Biologický materiál ke zpracování	21
3.5 Preanalytické faktory	22
3.6 Plazma vs. sérum	24
3.7 Klinický význam vyšetření cfDNA	25
3.7.1 Nádorová onemocnění	26
3.7.2 Neinvazivní prenatalní diagnostika	27
3.7.3 Jiné patologické stavy	29
3.8 Výtěžky volně cirkulující fragmentované DNA získané různými izolačními postupy ..	30
4 Nosiče nukleových kyselin používané při extrakci cfDNA	32
4.1 Nosičová RNA	32
4.2 Glykogen	33
4.3 Polyadenylová kyselina	34
4.4 Lineární polyakrylamid	35
4.5 Kvasinková transferová RNA	36
4.6 DNA ze spermatu lososa	36
4.7 DNA ze spermatu sledě	37
5 Cíle diplomové práce	38
Experimentální část	39
6 Použité materiály a přístroje	39
6.1 Chemikálie	39

6.1.1	Chemikálie použité pro izolaci DNA.....	40
6.1.2	Fluorimetrické měření - použité chemikálie	41
6.1.3	Kvantifikace real-time PCR - použité chemikálie.....	42
6.2	Další používané technické vybavení	42
6.3	Přístroje	42
6.4	Vzorky DNA	43
7	Metodiky.....	44
7.1	Izolace DNA	44
7.1.1	NucleoSpin Plasma XS.....	44
7.1.2	Testované skupiny vzorků	46
7.2	Kvantifikace cfDNA izolované z krevní plazmy	46
7.2.1	Spektrofotometrie	46
7.2.2	Fluorimetrie	47
7.2.3	Real-time PCR.....	47
7.3	Vliv délky inkubační doby na koncentraci a amplifikovatelnost eluátu cfDNA	49
7.4	Statistické vyhodnocení dat.....	49
8	Výsledky.....	50
8.1	Kvantifikace cfDNA	50
8.1.1	Spektrofotometrie	50
8.1.2	Fluorimetrie.....	53
8.1.3	Kvantitativní PCR	56
8.2	Vliv délky inkubační doby na koncentraci a amplifikovatelnost eluátu cfDNA	59
9	Diskuze	61
10	Závěr.....	69
11	Seznam tabulek.....	70
12	Seznam obrázků.....	71
13	Seznam grafů	72
14	Seznam použitých zkratk	73
15	Použitá literatura.....	75

Teoretická část

1 Úvod

Jedním z nejmladších vědních oborů je molekulární genetiky, která za posledních 30 let zaznamenala velký rozmach, a to především díky technickým a metodickým pokrokům molekulárně-genetických metod. Mezi průlomové momenty patří vývoj polymerasové řetězové reakce (PCR) a sekvenování, jejichž uplatnění je dnes v mnoha biologických oborech nezastupitelné. Molekulární analýzy umožňují včasnou diagnostiku řady onemocnění, napomáhají při volbě patřičné terapie a monitorují účinnost a průběh léčby.

Důležitou součástí molekulární genetiky je deoxyribonukleová kyselina (DNA), která byla objevena koncem 19. století. Volná cirkulující fragmentovaná DNA (cfDNA) byla popsána téměř o století později. V krevním řečišti zdravé populace se cfDNA fyziologicky vyskytuje ve velice nízkých koncentracích. Experimentální studie potvrzují asociaci zvýšené hladiny cfDNA s řadou fyziologických a patologických stavů včetně těhotenství, traumata a zánětlivých poruch. Výrazně zvýšené hladiny cfDNA jsou popisovány u pacientů s maligním onemocněním.

Volná fragmentovaná cirkulující DNA je v současné době v popředí zájmu mnoha klinických oborů. Kvantitativní metody na principu real-time polymerasové řetězové reakce (qPCR) jsou schopné detekovat a kvantifikovat extrémně nízké koncentrace nukleových kyselin. Variabilita preanalytické fáze analýzy cfDNA a krátký biologický poločas rozpadu cfDNA výrazně ovlivňují výsledné stanovené hodnoty. Nynější snahou vědců je důkladnější poznání charakteristiky a funkce cfDNA v krevním oběhu zdravých jedinců. Fyziologicky nízké hladiny cfDNA ztěžují standardizaci preanalytické fáze a následné převedení stanovení cfDNA do rutinní klinické praxe. Vyšetření cfDNA je prozatím využíváno k detekci tumorové DNA a v prenatální diagnostice.

Tato práce je zaměřena na optimalizaci extrakční procedury modifikací protokolu NucleoSpin Plasma XS přidavkem nosičových molekul s následným porovnáním výtěžků cfDNA kvantifikovaných pomocí qPCR.

2 Struktura nukleových kyselin

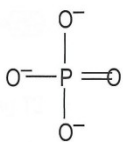
První poznatky o izolaci DNA ve směsi s ribonukleovou kyselinou (RNA) sahají do roku 1869. Zasloužil se o ně švýcarský student medicíny V. F. Meisher, kterému se podařilo získat z buněk obsažených v hnisu kyselou substanci, kterou souhrnně označil nuklein. Určil, že v dané látce je hojně zastoupený dusík a fosfor [1]. Poměrně dlouhou dobu se vědcům nedařilo vyizolovat čistou molekulu DNA. Americký biochemik P. A. T. Levene objasnil chemickou strukturu nukleových kyselin objevením cukr-fosfátové kostry. V roce 1909 určil, že RNA obsahuje ribosu, a o dvacet let později, že DNA obsahuje deoxyribosu [2]. Úctyhodný objev se povedl v roce 1944 O. T. Averymu. Prokázal, že molekula DNA je nositelkou genetické informace [3]. Jeden z největších milníků genetiky je datován rokem 1953, kdy se vědcům J. D. Watsonovi, F. H. C. Crickovi, M. H. F. Wilkinsovi a R. Franklinové podařilo popsat sekundární dvoušroubovicovou strukturu DNA [4]. Za tento objev obdrželi Watson, Crick a Wilkins v roce 1962 Nobelovu cenu za medicínu a fyziologii [5]. Francis Crick v roce 1958 prezentoval cestu přenosu informace mezi biopolymery tzv. centrální dogma molekulární biologie, které vyjadřuje vztahy mezi DNA, RNA a proteiny [6].

2.1 Hlavní rozdíly ve struktuře a funkci DNA a RNA

Nukleové kyseliny (NK) tvoří základ existence živého organismu, zodpovídají za reprodukci a biologickou evoluci žijících organismů. Řadí se mezi makromolekulární sloučeniny složené z nukleotidů, které tvoří základ polynukleotidového řetězce. Jsou známy dva typy NK, a to DNA a RNA, které se značně liší ve struktuře a biologické funkci. Přehled hlavních rozdílů je popsán níže [7].

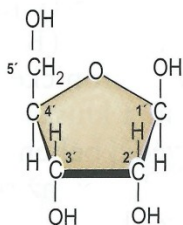
Primární struktura NK je daná počtem a pořadím neboli sekvencí nukleotidů, která je pro konkrétní řetězec charakteristická. Díky ní lze odlišit jeden gen od druhého. Jednotlivé nukleotidy jsou tvořeny pětiuhlíkatým monosacharidem (pentosa), dusíkatou bází a zbytkem kyseliny trihydrogenfosforečné. Z hlediska primární struktury lze DNA od RNA odlišit dle typu pentosy a dusíkatých bází [7][8].

(1)
fosfátová
skupina:

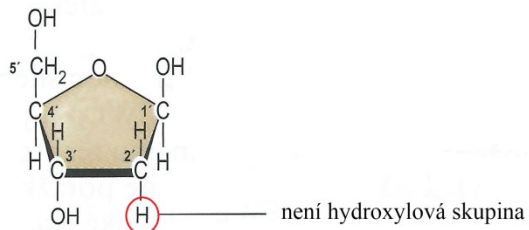


(2)
pětiuhlíkatý
cukr
neboli pentosa:

(a) v RNA:
ribosa

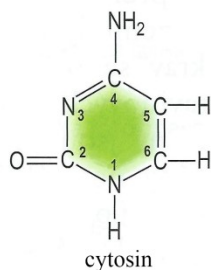
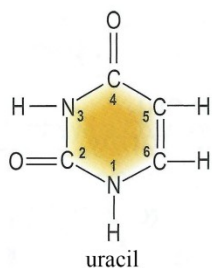


(b) v DNA:
2-deoxyribosa

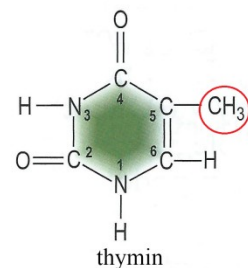


(3)
cyklická
dusíkatá báze:

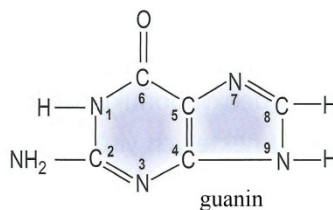
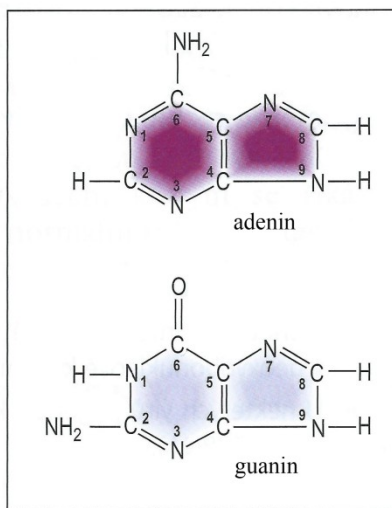
(a) pouze v RNA:
(se vzácnými výjimkami):



(c) pouze v DNA
(se vzácnými výjimkami):



pyrimidiny



puriny

Obrázek 1 Strukturální složky nukleových kyselin

Zdroj: Modifikováno dle [7].

Molekula DNA obsahuje 2-deoxyribosu (na druhém uhlíku pětiuhlíkatého cyklu chybí hydroxylová skupina), zatímco molekula RNA obsahuje ribosu (viz Obrázek 1). Dusíkaté báze jsou organické aromatické heterocyklické sloučeniny buď purinového (adenin, guanin), nebo pyrimidinového charakteru (cytosin, thymin, uracil). Polynukleotidové vlákno DNA obsahuje adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G). Namísto thyminu, který je v páté pozici pyrimidinového cyklu methylován, je v molekule RNA přítomen uracil (U). Dále se v molekule RNA mohou vyskytovat minoritní dusíkaté báze typické pro strukturu ribosomální RNA a transferové RNA (pseudouridin, inosin, dihydrouridin, 7-methylguanin) [7][9][10][11].

Sekundární struktura nukleových kyselin je určena prostorovým uspořádáním polynukleotidového řetězce. Molekula DNA je obvykle tvořena dvěma polynukleotidovými vlákny (dsDNA), která jsou spolu spojena vodíkovými vazbami a stočena do dvoušroubovice. Výjimkou jsou některé viry např. čeleď Parvoviridae, ve které je přítomna jednovláknová DNA (ssDNA) [12]. Ve dvoušroubovici DNA platí Chargaffovo pravidlo, kdy počet purinových a pyrimidinových bází se rovná jedné. V molekule tRNA tomu tak není, kdy přítomností chemicky modifikovaných nukleotidů (např. inosin) dochází ke kolísavému párování bází tzv. wobbling kodonu s antikodonem. Tímto se inosin může párovat s adeninem, cytosinem a uracilem [7].

Díky specifickému Watson-Crickovu pravidlu o párování bází vznikají dvě vodíkové vazby mezi adeninem a thyminem (uracilem) a tři vodíkové vazby mezi guaninem a cytosinem. Aby se mohly vytvořit vodíkové můstky mezi nukleotidy, je zapotřebí dodržet tautomerii bází. Stabilní formy jsou cytosin a adenin v aminorformě a thymin, uracil a guanin v ketoformě [13]. Vzniklá polynukleotidová vlákna jsou vzájemně komplementární a jsou orientována antiparalelně, jeden řetězec ve směru $5' \rightarrow 3'$ zatímco protěžší řetězec ve směru $3' \rightarrow 5'$. Dvouřetězce DNA z chemického hlediska zaujímají určitou konformaci. Nejstabilnější ve vodném prostředí je pro DNA konformace typu B, jež má pravotočivý charakter (dále existuje ještě typ A a typ Z) [7][9].

Lineární molekula DNA se v jádře eukaryontní buňky nenachází volně, ale postupně se nabaluje na bazické proteiny zvané histony, čímž vznikají nukleosomy (základní jednotky chromosomů). Mimo jádro se DNA dále vyskytuje i v některých buněčných organelách cytoplazmy (mitochondrie, rostlinné chloroplasty). Hlavní funkcí

DNA je uchování a přenos genetické informace na potomky. Ve struktuře DNA je zapsána sekvence polynukleotidového vlákna, jehož přepisem a následně překladem do podoby proteinu je podmíněna existence všech biomolekul a buněčných struktur [7][11].

Všechny molekuly RNA vznikají podle centrálního dogmatu molekulární biologie transkripce (přepisem) genetické informace, která je uložena v molekule DNA. Vzniklé primární transkripty podléhají chemickým modifikacím tzv. posttranskripčním úpravám a získávají tak svoji biologickou funkci. Molekula RNA je obvykle tvořena jedním polynukleotidovým řetězcem. Výjimkou jsou některé viry, které obsahují dvouvláknovou lineární RNA, např. reoviry. Virová RNA plní funkci genoforu (nosiče genetické informace). V buňce se nachází z velké části v cytoplazmě a v menší míře v jádře buňky. Vzhledem k větší reaktivitě ribosy (přítomnosti hydroxylové skupiny) je molekula RNA méně stabilní, získává různá prostorová uspořádání a podílí se na rozmanitých biologických funkcích. V zásaditém prostředí dochází k hydrolýze hydroxylové skupiny a rozštěpení vlákna RNA. Sekundární a terciární struktura není pro jednotlivé molekuly RNA stejná [7][9][14][15].

Typy RNA lze rozdělit podle toho, zdali se podílejí na proteosyntéze nebo regulují genovou expresi:

- kódující molekuly RNA: mediátorová RNA (mRNA), transferová RNA (tRNA), ribosomální RNA (rRNA)
- malé nekódující molekuly RNA: mikroRNA (miRNA), krátké interferující RNA (siRNA), malé jaderné RNA (snRNA), malé jadérové RNA (snoRNA)
- velké nekódující molekuly RNA: dlouhé nekódující molekuly RNA (lncRNA) [9].

Přepisem strukturálních genů u eukaryontních buněk vznikají primární transkripty mRNA, které podléhají posttranskripčním modifikacím. Finální transkript dále podléhá translaci a určuje počet a pořadí aminokyselin v peptidovém řetězci. Výsledkem exprese genů pro funkční RNA jsou všechny ostatní typy RNA kromě mediátorové [7][8].

Molekula rRNA má katalytické funkce (ribozomy) a spolu s ribosomálními proteiny tvoří buněčné organely ribosomy [14]. Molekuly tRNA jsou malé struktury přibližně o délce 75 - 90 nukleotidů. Vyskytují se volně v cytoplazmě a hrají klíčovou úlohu během translace [16]. Slouží jako přenašeče, přes které je na akceptorové rameno

kovalentně navázána aminokyselina a na antikodonové rameno nekovalentně připojena nukleová kyselina (kodon - mRNA). Díky intramolekulárním interakcím jsou ve stočených částech molekuly patrné typické vlásenkové struktury [8]. Sekundární struktura tRNA připomíná jetelový list.

Molekuly miRNA jsou dlouhé přibližně 19 - 25 nukleotidů a umožňují posttranskripční regulaci genové exprese [17]. Taktéž molekuly siRNA mají regulační funkci a podílejí se na aktivaci nebo inaktivaci molekul RNA. V neposlední řadě výše zmíněné snRNA a snoRNA mají vliv na sestřih (splicing) eukaryotických mRNA molekul [8][9][11]. Souhrnný přehled hlavních rozdílů mezi DNA a RNA zobrazuje Tabulka 1.

Tabulka 1 Souhrnný přehled hlavních rozdílů mezi DNA a RNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA)	Ribonukleová kyselina (RNA)
Nachází se uvnitř jádra buňky a buněčných organel (mitochondrie, chloroplasty u rostlin)	Malé množství RNA se nachází uvnitř jádra, většina je přítomna v cytoplazmě
Dvoušroubovicová molekula, ve vodném prostředí je nejstabilnější konformace B	Jednořetězcová molekula, struktura se liší dle typu RNA
2-deoxyribosa, fosfátová kostra, dusíkaté báze (adenin, guanin, cytosin, thymin)	Ribosa, fosfátová kostra, dusíkaté báze (adenin, guanin, cytosin, uracil)
Polynukleotidové řetězce jsou vzájemně propojeny vodíkovými můstky mezi dusíkatými bázemi a párují se vždy A-T, G-C	Párování bází vodíkovými můstky je přítomné u stočených částí molekuly (např. tRNA) a páruje se vždy A-U, G-C
Vyskytuje se ve formě chromatinu (chromosomů)	Vyskytuje se v ribosomech, ve formě spojené s ribosomy nebo v cytoplazmě
Funkcí je přenos genetické informace z jedné generace na druhou	Funkcí je proteosyntéza a katalýza biochemických reakcí
Typy DNA: intracelulární a extracelulární	Typy RNA: mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, siRNA, snRNA, snoRNA, lncRNA

Zdroj: Modifikováno dle [7][8].

2.2 Význam molekulárně genetického vyšetření nukleových kyselin

Význam molekulárně genetického vyšetření je v dnešní době velký, a to především díky rozvoji analytických metod na konci 80. let minulého století. Jedním ze stěžejních úkolů molekulární genetiky je určit doposud neznámé specifické sekvence DNA, které snadno podléhají strukturním změnám a mohou tím podmínit patologickou aktivitu genu a rozvoj onemocnění [9].

Molekulární metody lze aplikovat v prenatalní a postnatalní diagnostice a také v populačním screeningu dědičných chorob. Dále lze analýzu nukleových kyselin uplatnit v diagnostice onkologických onemocnění, soudním lékařství (genotypizace osob), transplantologii a při určení onemocnění způsobených infekčními agens (viry, bakterie, houby a paraziti) [10].

Nejčastěji používanými technikami při DNA analýzách jsou PCR, Southern blotting a sekvenování. Metody DNA analýzy můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na metody přímé a nepřímé. Přímé metody odhalují monogenně (Mendelovsky) dědičné onemocnění, které souvisí s konkrétní změnou (např. mutací) v genetické informaci v konkrétním genu nebo u neznámých mutací v celém genomu (screening). K provedení nepřímé metody musíme znát rodokmen vyšetřovaného probanda. Nevyšetřujeme přímo poškozený gen, ale marker (repetitivní sekvence, restrikční místo), který je v jeho těsné blízkosti [8][9][10].

3 Volně cirkulující nukleové kyseliny

Volně cirkulující nukleové kyseliny můžeme v krevním řečišti najít ve formě nukleosomů, DNA, RNA, mitochondriální DNA (mtDNA) a mikroRNA (miRNA) [18]. Během posledních 15 let vzrostl zájem o aplikaci volné fragmentované cirkulující DNA (z angl. cell-free DNA, cfDNA) do klinické praxe. Důkazem toho je narůstající počet publikovaných prací v oblastech virologie, onkologie a prenatální diagnostiky.

3.1 Definice

Volná fragmentovaná cirkulující DNA je definována jako extracelulární DNA uvolněná z krevních buněk, která je v malém množství běžnou součástí krevního řečiště zdravé populace [19][20]. Zvýšené hodnoty jsou spojovány s celou řadou onemocnění, která jsou blíže popsána v kapitole 3.7.

3.2 Původ a eliminace cfDNA

Původ volně cirkulujících nukleových kyselin a přesný mechanismus jejich uvolnění z buněk do extracelulárního prostředí není dodnes zcela objasněn. Jsou popsány celkem tři způsoby uvolnění cfDNA do krevního řečiště, a to cestou apoptózy, nekrózy a aktivního uvolňování buňkami [21]. Těmito procesy vznikají nestejně dlouhé fragmenty DNA, přičemž jejich původ lze rozlišit na základě jejich elektroforetických vlastností. Podrobně jsou tyto tři procesy popsány v předchozí práci kolegyně Totzauerové [22]. Pro snadnější orientaci v textu je níže nastíněn základní rozdíl mezi apoptózou a nekrózou.

Apoptózou nazýváme fyziologický děj, který je přísně regulovaný a probíhá u člověka již v období embryogeneze. Programovaná smrt buňky je indukována cíleně a zahrnuje sled biochemických reakcí katalyzovaných enzymy, které postupně vedou k degradaci cytoskeletu, smrštění buňky a následně k fragmentaci jádra na stejně dlouhé dvouvláknové fragmenty uniformní velikosti 185 - 200 bp. Buňka se postupně rozpadá na apoptická tělíska, která jsou z extracelulárního prostředí nejčastěji odstraňována makrofágy. Apoptózou tak dochází k odstranění již nepotřebných buněk bez poškození okolní tkáně [23][24][25].

Nekróza je patologický stav, kdy důsledkem vnějších vlivů nastává porušení homeostázy a následná smrt buňky. Narušením integrity cytoplazmatické membrány dochází k edému buňky, vylití jejího vnitřního obsahu do extracelulárního prostředí, rozpadu buňky a následně až k poškození okolních buněk (tkání) vyvoláním zánětlivé reakce. Působením degradačních enzymů je jaderná DNA štěpena na nestejně dlouhé fragmenty délky 185 - 926 bp [23] mnohdy až 10 000 bp [25].

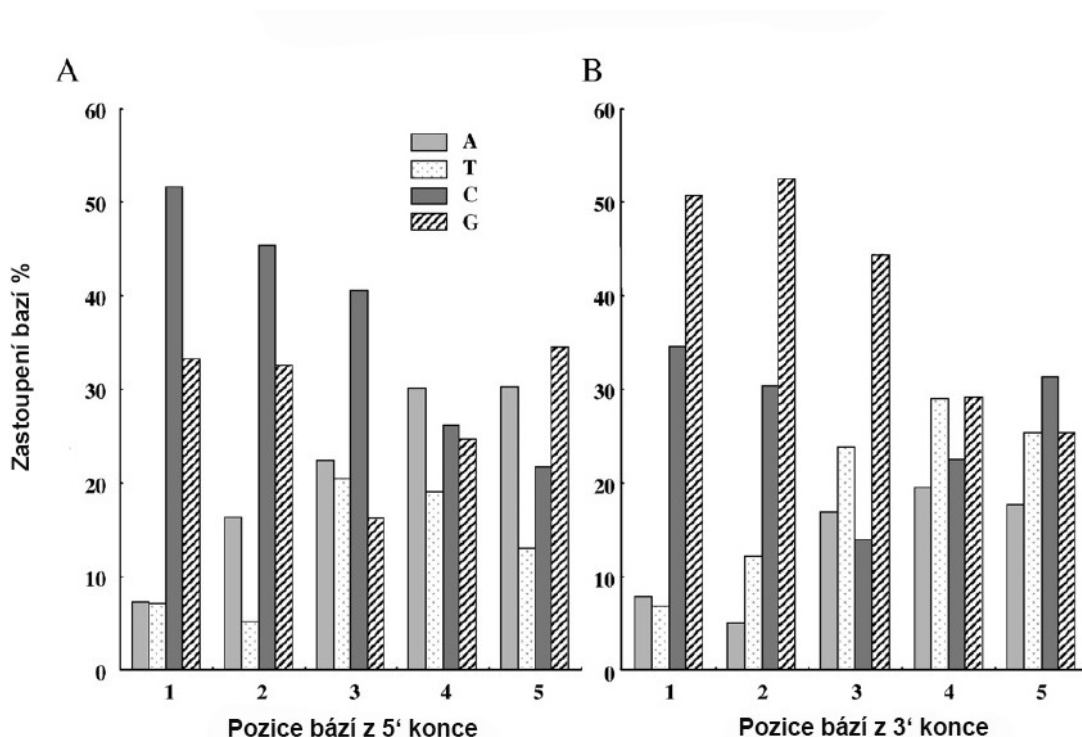
Nejen původ, ale i způsob eliminace volných nukleových kyselin z krevního řečiště není přesně znám. Biologický poločas rozpadu cfDNA je odhadován zhruba na několik desítek minut. Fragmenty cfDNA jsou z krevního řečiště odstraňovány zejména činností jater a ledvin. Značný podíl na clearance cfDNA mají i plazmatické nukleasy. Množství cfDNA exkretované močí je odhadováno na 0,5 až 2 % celkové plazmatické cfDNA [26][27]. Volná cirkulující fragmentovaná fetální DNA (z angl. cell-free fetal DNA, cffDNA) je z krve matky po porodu odstraněna rychle, a to do 16 minut (4 - 30 minut) [28]. Podrobnější informace o DNA plodu jsou uvedeny v kapitole 3.7.2.

3.3 Charakteristika a forma cfDNA

Jedny z prvních poznatků o struktuře a funkci cfDNA izolované z plazmy onkologických pacientů jsou popsány ve studii Stroun et al. (1987). Izolovaný materiál měl charakter dsDNA, byl odolný vůči působení RNas a proteas, nicméně působením DNasy I byl degradován na kratší fragmenty [29]. Fragmenty extracelulární DNA se ve většině případů v krevním řečišti nenacházejí volně, ale jsou ve formě komplexů asociovány s proteiny a lipidy [26] nebo uvnitř apoptických tělísek [30].

Strukturální charakteristiky molekuly cfDNA mohou souviset s její stabilitou v plazmě. Suzuki et al. zkoumali charakter cfDNA ve skupině deseti zdravých dobrovolníků. Vzorky byly extrahovány využitím QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen). Sekvenční analýzou zjišťovali četnost zastoupení GC v molekule cfDNA a zároveň na koncích fragmentů cfDNA. K určení struktury koncových částí fragmentů cfDNA využili Klenowův fragment a terminální deoxynukleotidyl transferasu (TdT). Zjistili, že zastoupení CG ve fragmentech DNA je v průměru 53,7 %. Dále popsali, že 5' konec fragmentů je bohatý na cytosin, 3' konec fragmentů na guanin a na 5' konci řetězce mají fragmenty kohezní („lepivé“) konce (viz Obrázek 2). Předpokládá se, že tyto strukturální charakteristiky jsou následkem působení enzymů během apoptózy. Ačkoli

fyziologická funkce cfDNA v krevní plazmě zůstává nadále nejasná, je zajímavé, že CpG motiv fragmentů DNA se podílí na regulaci různých imunitních odpovědí [31].



Obrázek 2 Rozložení bází na koncích cfDNA fragmentů sekvenční analýzou

Složení bází bylo analyzováno vždy pro 5 bází od 5' konce (A) a od 3' konce (B) řetězce

Zdroj: Modifikováno dle [31].

Fyziologické množství cfDNA v krvi zdravé populace je obvykle nízké, avšak poměrně variabilní v rozmezí od 0 do 100 ng/ml (průměrná koncentrace je 30 ng/ml) [32]. Některé vědecké práce předkládají výrazně větší rozptyl hodnot cfDNA v krvi [21][33]. U pacientů s nádorovým onemocněním hladina cfDNA v plazmě nebo séru kolísá mezi 0 až 1000 ng/ml (průměrná koncentrace je 180 ng/ml) [32].

Vzhledem k těmto poměrně širokým rozmezím hodnot je obtížné vyvozovat jednoznačné závěry o zdravotním stavu jedince. Navíc koncentrace cfDNA onkologických pacientů mnohdy přesahují fyziologická rozmezí zdravých jedinců a naopak [26][34]. Pro názornou ukázkou je uvedena přehledná Tabulka 2, která zobrazuje variabilitu koncentrací fyziologických hladin cfDNA v plazmě/séru s ohledem na kvantifikační metodu [26].

Vaart a Pretorius se ve své studii pokusili určit referenční rozmezí pro jednotlivé typy tumorů a vytvořit cut-off hodnoty pro diagnostiku onemocnění. Jelikož hladina cfDNA v krvi není konstantní, ale kolísá u zdravých i nemocných jedinců, určit tak přesná referenční rozmezí bylo téměř nemožné [35].

Tabulka 2 Hodnoty koncentrací cfDNA v plazmě a séru zdravých jedinců

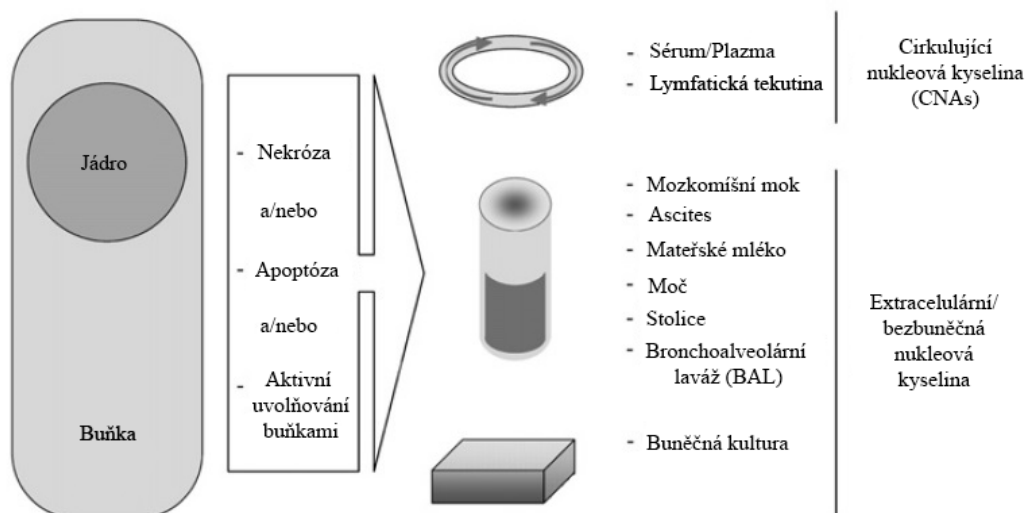
Testovaná skupina	cfDNA v plazmě [ng/ml]	cfDNA v séru [ng/ml]	Kvantifikační metoda
44 ZD	7		PicoGreen dsDNA kit [36]
100 ZD		57	PicoGreen dsDNA kit [37]
44 ZD	11,6		PicoGreen dsDNA kit [38]
66 ZD		318	RIA na pevné fázi [39]
66 C	35	318	RIA [40]
14 ZD	8,3		Real-time PCR [41]
46 ZD	1,8	12,6	Real-time PCR [42]

ZD - zdraví dobrovolníci, C - kontrolní vzorky, PicoGreen (fluorimetrie), RIA (radioimunoanalýza), Real-time PCR (kvantitativní PCR)

Zdroj: Modifikováno dle [26].

3.4 Biologický materiál ke zpracování

Volné nukleové kyseliny se nacházejí ve fragmentované podobě, a to jak rozptýlené v tělních tekutinách, tak cirkulující v cévním řečišti. Na základě toho je můžeme pomyslně rozdělit do dvou skupin. Ty, které cirkulují v plazmě, séru nebo míze, lze nazývat cirkulující nukleové kyseliny (z angl. circulating nucleic acids, CNAs) a ty, které jsou izolovány z tělních tekutin nebo buněčných kultur, lze nazývat extracelulární nukleové kyseliny (z angl. extracellular/cell free nucleic acids) [26]. Názorně zobrazuje Obrázek 3.



Obrázek 3 Mechanismus uvolňování extracelulárních nukleových kyselin

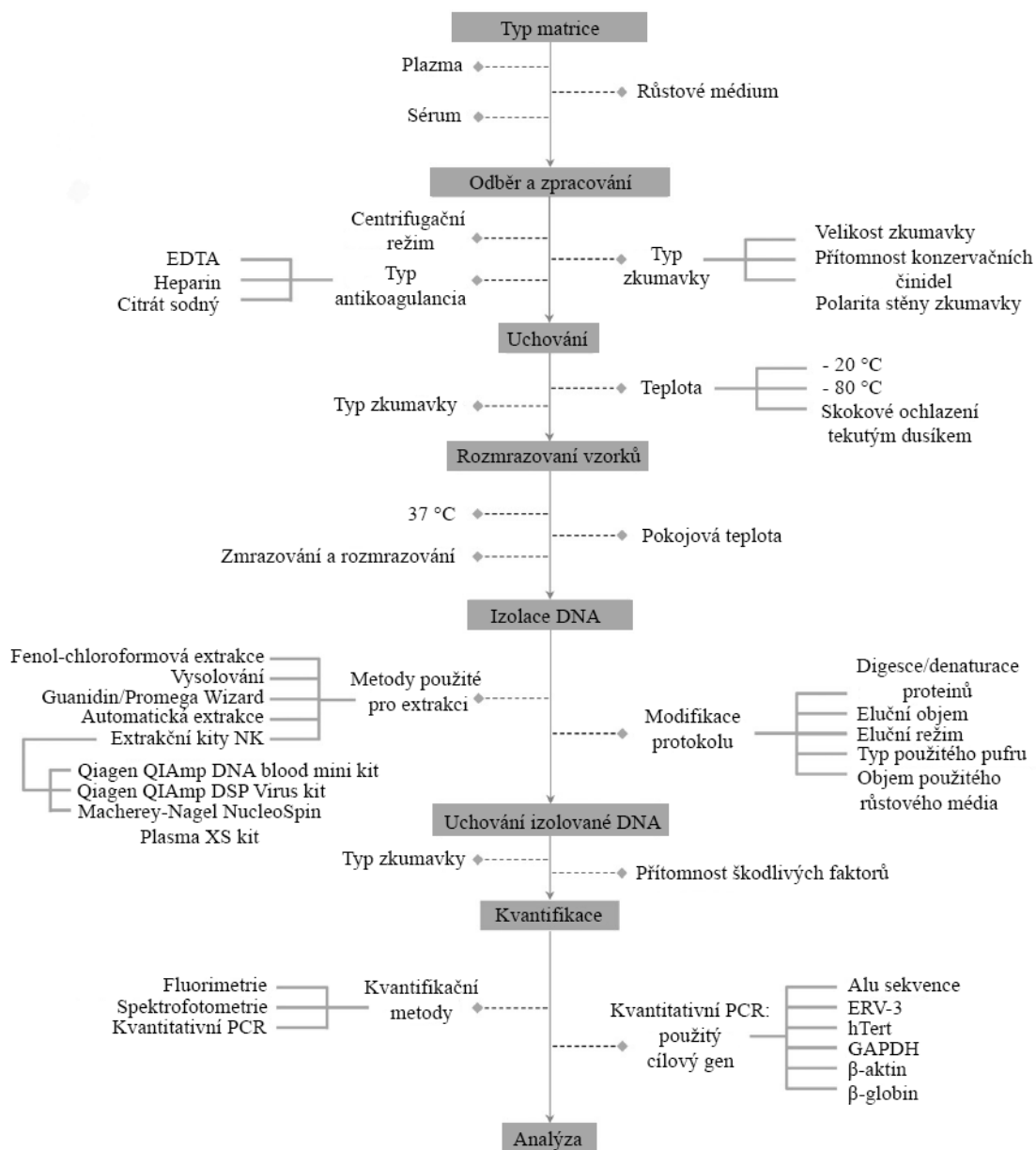
Zdroj: Modifikováno dle [26].

Vzhledem k tomu, že odběr krve patří mezi nejčastěji prováděný standardizovaný postup vyšetření pacienta, nespočet publikovaných prací využívá jako biologický materiál právě plazmu nebo sérum. Volné fragmentované nukleové kyseliny můžeme také izolovat z mozkomíšního moku, ascites, mateřského mléka, mízy, peritoneální tekutiny, moči, stolice, aspirátu kostní dřene, cerebrospinální tekutiny, sputa, bronchoalveolární laváže a žaludečních šťáv [26].

3.5 Preanalytické faktory

Stanovená hladina cfDNA v krvi závisí nejen na pohlaví, věku a fyzickém stavu jedince, ale především na technických postupech zvolených při extrakci a kvantifikaci cfDNA. Standardizace metodického postupu analýzy vzorku je klíčovým faktorem pro dosažení konzistentních dat srovnatelných mezi jednotlivými laboratořemi. V převážné většině vědeckých prací se metodické postupy liší v izolaci, kvantifikaci, vlastní analýze cfDNA, a tím i v interpretaci laboratorních výsledků [43][44]. Z tohoto důvodu prozatím není definován standardní operační postup zpracování cfDNA. Nedostatečná shoda mezi laboratorními protokoly je jednou ze stěžejních překážek v zavedení analýzy cfDNA do rutinní klinické praxe [43].

Celá řada kroků preanalytické fáze (viz Obrázek 4), od odebrání krevního vzorku až po uchování extraktů DNA, může mít vliv na koncentraci a fragmentaci cfDNA. Mezi nejvíce ovlivnitelné preanalytické faktory patří v první řadě typ použitého biologického materiálu, a to plazma nebo sérum (rozdíly jsou popsány níže v textu). Dále je to zpracování vzorků, typ antikoagulancia, podmínky uchování vzorků, typ extrakční metody a zvolená kvantifikační metoda [34].



Obrázek 4 Preanalytické faktory, které ovlivňují stanovení cfDNA

Zdroj: Modifikováno dle [34].

3.6 Plazma vs. sérum

Při zpracování vzorků cfDNA původem z plazmy nebo ze séra zjišťujeme, že jsou zde nezanedbatelné rozdíly ve stanovených laboratorních hodnotách cfDNA, na které je potřeba při interpretaci výsledků brát zřetel [43]. Zdali je však vhodnější použít pro vyšetření cfDNA plazmu nebo sérum, není přesně určeno.

Výzkumné práce v různých klinických oborech prokazují, že fragmenty cfDNA jsou hojněji zastoupeny ve vzorcích séra, než ve vzorcích plazmy. Množství DNA v séru může být 2krát až 24krát vyšší než v plazmě, a to v důsledku procesu krevního srážení, kdy dochází k ruptuře leukocytů a hematopoetických buněk a následně k uvolnění genomové DNA (gDNA) do krevního řečiště [34][45]. Kromě toho bylo zjištěno, že u vzorků ze séra jsou detekovány větší rozdíly v koncentracích cfDNA mezi jednotlivými pacienty než u vzorků z plazmy [34].

Taback et al. porovnávali výtěžky cfDNA z plazmy a séra zdravých jedinců a pacientů s pokročilým metastazujícím melanomem. Vzorky séra a plazmy byly zpracovány ihned po odebrání, kdy jeden vzorek plné krve byl inkubován přes noc při teplotě 37 °C. Studie prokázala signifikantně vyšší koncentrace cfDNA v séru (4krát) než v plazmě od stejného pacienta. Stejně tak výtěžky ze séra inkubovaného přes noc byly 4krát vyšší než ze séra zpracovaného ihned po odebrání krve. Ovšem pozoruhodné bylo, že u zdravých jedinců byla identifikována cfDNA pouze ze vzorků séra (z plazmy nikoliv) [46]. Výsledek studie naznačuje, že výhodnějším biologickým materiálem je sérum. Avšak poslední studie prokazují opak [34][47].

Thijssen et al. srovnávali, zda plazma nebo sérum při stanovení cfDNA lépe odráží klinický stav pacienta. Porovnávali výsledky analýzy vzorků séra a plazmy odebraných od 26 pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu. DNA byla kvantifikována dvěma metodami real-time PCR a fluorimetricky (PicoGreen). Z hlediska klinického stavu pacienta byla DNA ze vzorků séra spojována s metastázami v játrech, zatímco hladina DNA z plazmy předpovídala recidivu onemocnění. Koncentrace cfDNA byla u 24 pacientů signifikantně vyšší v séru než v plazmě, což mohlo být způsobeno již zmíněnou kontaminací gDNA uvolněnou při krevním srážení. Lze tedy předpokládat, že pro představu o *in vivo* koncentraci cfDNA v krevním řečišti je vhodnější analýza vzorků z krevní plazmy [48].

Vzhledem k tomu, že jsou hodnoty plazmatické DNA méně variabilní a nedochází ke kontaminaci gDNA, jsou doporučovány právě vzorky krevní plazmy pro většinu genetických vyšetření, a to především pro analýzu mutací díky nízkým hladinám wild-type¹ DNA, která by mohla ztížit detekci mutované sekvence DNA. Nicméně některé studie, týkající se klinického významu, nadále pracují se vzorky séra (např. z důvodu retrospektivních studií a zaběhlého odběru vzorků) [34].

3.7 Klinický význam vyšetření cfDNA

Informace o struktuře a funkci cfDNA jsou zmíněny již v kapitole 3.3. Volně cirkulující fragmentované nukleové kyseliny DNA a RNA byly v krevním oběhu zdravých i nemocných jedinců popsány francouzskými vědci Mandel a Metais v roce 1948 [49]. Zpočátku se vědci soustředili spíše na spojitost s autoimunitními onemocněními, kde u revmatoidní artritidy a systémového lupus erythematoses detekovali v séru zvýšené hladiny cirkulující DNA [50].

Avšak k tehdejším nedostatečným informacím o biologické funkci, původu a patofyziologických vlastnostech extracelulární DNA se první potenciální přínos pro diagnostiku a prognózu nádorového onemocnění objevil až v roce 1977. Tehdy Leon et al. popsali zvýšené hladiny cirkulující DNA v séru u pacientů s rakovinou pankreatu a metastázami v porovnání s pacienty se solidními nádory [19]. Po provedení chemoterapeutické léčby došlo k výraznému poklesu hladiny DNA v séru, avšak u pacientů, kteří nedostatečně reagovali na léčbu, vysoké hodnoty cirkulující DNA přetrvávaly [20].

Výrazný pokrok byl zaznamenán v roce 1989, kdy Stroun et al. detekovali v plazmě onkologických pacientů DNA s neoplastickými vlastnostmi. O pár let později byly popsány genetické alterace v extrahované cirkulující DNA u pacientů s myelodysplastickým syndromem, akutní myeloidní leukémií (N-ras mutace), u pacientů s kolorektálním karcinomem a rakovinou slinivky břišní (K-ras mutace) [20][50].

¹ Alela častěji se vyskytující v populaci.

Kromě detekce a monitorování nádorového onemocnění lze cirkulující nukleové kyseliny uplatnit v oblasti neinvazivní prenatální diagnostiky. Roku 1997 Lo et al. úspěšně detekovali fetální Y-chromosomální sekvenci v krvi matky [50].

Za posledních 30 let bylo díky citlivějším analytickým metodám (především PCR) provedeno značné množství experimentů, které potvrdily, že cirkulující DNA nádorového původu vykazuje podobné charakteristiky jako bioptický vzorek nádorové tkáně. Analýza cirkulující nádorové DNA je označována termínem „tekutá biopsie“ [43].

Zvýšené hladiny cfDNA v krvi jsou asociovány s řadou dalších patologických stavů, mezi něž patří solidní nádory a hematologická onemocnění, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, těžká poranění, akutní a chronické zánětlivé stavy, autoimunitní poruchy, nadměrná fyzická zátěž, komplikace v průběhu těhotenství, stárnutí a se stářím spojená degenerativní onemocnění [20][50].

3.7.1 Nádorová onemocnění

Genetické změny v molekule DNA vedou k rozvoji nádorového bujení. Účinnost léčby nádorového onemocnění je spjata s včasnou diagnostikou daného onemocnění. Navzdory tomu, že je bioptický odběr patologické tkáně považován za invazivní a poměrně náročný zákrok pro pacienta, je nadále zlatým standardem při diagnostice nádorového onemocnění. Vzhledem k tomu, že není vždy snadné a možné biopsii tkáně provést (např. u rakoviny plic), není divu, že se vědci hojně zajímají právě o aplikaci cfDNA do klinické praxe [44].

Detekce nádorově specifické cfDNA, v literatuře označované jako ctDNA (z angl. circulating tumor DNA) nebo „tekutá biopsie“ (z angl. liquid biopsy), zmíněná výše, by mohla mít do budoucna poměrně slibné vyhlídky, jakožto neinvazivní, rychlá, bezbolestná metoda a zároveň krevní marker při diagnostice a monitorování zdravotního stavu pacientů s maligním onemocněním [43][44]. Vyšetření by mohlo usnadnit sledování úspěšnosti léčby, a to především zhoubných novotvarů s vysokou incidencí, kterými jsou kolorektální karcinom, karcinom prsu a nemalobuněčný karcinom plic [51].

Fragmenty ctDNA vykazují stejné genetické a epigenetické změny, které jsou přítomny v buňkách primárního nádoru. Mezi genetické změny patří například bodové

mutace, ztráta heterozygoty (z angl. loss of heterozygosity, LOH), mikrosatelitní alterace, jednonukleotidové polymorfismy, přeskupené genomické sekvence a hypermethylované promotorové oblasti několika genů [21][26]. Detekcí těchto změn lze odlišit ctDNA od cfDNA, která se v krvi vyskytuje spolu se specifickou nádorovou DNA, a tím zvýšit diagnostickou specifičnost vyšetření v porovnání s pouhým stanovením celkové koncentrace cfDNA v krvi. Zejména v pokročilých stádiích nemoci se v periferní krvi onkologických pacientů hojně vyskytují fragmenty DNA vyplavované z nádorových buněk [34][44].

Je prokázáno, že při zlepšení stavu pacienta dochází ke snížení koncentrace cfDNA v krevní plazmě, naopak přetrvávající vysoké hladiny cfDNA v krvi jsou spojovány s nepříznivou prognózou a rezistencí pacienta na léčbu. Lze říci, že hladiny specifické cfDNA korelují s progresí onemocnění, a proto je možné kontinuálně sledovat minimální reziduální chorobu, určit relaps onemocnění a zahájit včasnou léčbu pacienta [44].

Kromě solidních nádorů jsou zvýšené hladiny cfDNA spojovány s hematologickými malignitami, a to zejména z B buněčné řady. U pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií a non-Hodgkinovým lymfomem byla detekována v cfDNA přestavba těžkého imunoglobulinového řetězce [20]. V periferní krvi pacientů s mnohočetným myelomem byly v cfDNA detekovány specifické sekvence IgH klonu odvozeného od plazmatických buněk kostní dřeně. Vzhledem k tomu, že u těchto pacientů dochází téměř z 50 % k relapsu onemocnění, je intenzivně hledán vhodný neinvazivní marker pro odhalení recidivy a zahájení včasné léčby [44].

3.7.2 Neinvazivní prenatální diagnostika

Za posledních 20 let, během kterých byla poprvé detekována fetální Y-chromosomální sekvence v krvi matky, výrazně vzrostl zájem o využití vyšetření cfDNA v prenatální diagnostice. Hlavním důvodem byl snadný odběr periferní krve matky a vysoká citlivost a spolehlivost těchto neinvazivních prenatálních testů (z angl. non invasive prenatal testing, NIPT) [52].

V případě pozitivního výsledku screeningového vyšetření vrozených vývojových vad plodu, které se rutinně provádí v prvním a druhém trimestru těhotenství (vyšetření biochemických a ultrazvukových markerů), je nutné provést spolehlivý diagnostický test. V současné době se standardně stanovuje karyotyp plodu z biologického materiálu odebraného invazivními metodami, a to biopsií choriových klků nebo amniocentézou. Avšak tyto metody jsou oproti stanovení volné mimobuněčné fetální DNA invazivní a mohou tak způsobit vážné komplikace až abortus plodu [52].

V krevním oběhu matky lze identifikovat jak fetální DNA, tak maternální DNA. Hlavním zdrojem DNA plodu se zdá být placenta, dále hematopoetické buňky a plodová voda. Procentuální zastoupení fetální DNA v plazmě těhotných žen je proměnlivé v rozmezí od 4 do 25 % (průměrně 10 %) vzhledem k stádiu těhotenství (znatelný nárůst ve třetím trimestru), velikosti placenty, patologickému těhotenství apod. [52][53][54].

Délka fragmentů fetální a maternální cfDNA byla zjištěna pomocí gelové elektroforézy. Sekvence kratší než 300 bp jsou fetálního původu, zatímco úseky cfDNA delší než 500 bp pocházejí z leukocytárních buněk matky [55]. Nejpoužívanější metodou pro detekci a stanovení cfDNA z krevní plazmy gravidní ženy je real-time PCR s vysokou citlivostí a specifitou (~ 99 %) [56].

Zvýšené hladiny cfDNA jsou spojovány s autosomálně dědičnými chorobami, mezi které patří cystická fibróza, achondroplasia a β -talasemie [55]. Dále byly stanoveny vysoké koncentrace DNA plodu v krvi těhotné ženy, jež měla příznaky placenta accreta², gravidarum³ nebo preeklampsie⁴ [34].

Tento způsob testování chromosomálních vad plodu byl zaveden do klinické praxe v roce 2011. Prozatím jím však nelze zcela nahradit standardní diagnostické testy. Test se používá jako dodatečné genetické vyšetření k potvrzení pozitivních screeningových vyšetření rizikových gravidit (věk, abnormální screening, anamnéza). V České republice jsou neinvazivní prenatalní testy dostupné v centrech lékařské genetiky. Prozatím jsou však poměrně finančně náročné [52][57]. Již od 10. týdne těhotenství lze pomocí NIPT testů určit pohlaví a RhD genotyp plodu a zároveň dle typu testu širokou škálu genetických vad plodu. Běžně se určují genomové mutace jako je Downův

² Placenta je nadměrně vrostlá do děložní stěny (komplikace během těhotenství a při porodu).

³ Nadměrné zvracení těhotných žen.

⁴ Těhotenské onemocnění s otoky (přítomnost bílkoviny v moči a vysoký krevní tlak).

syndrom (trisomie chromosomu 21), Edwardsův syndrom (trisomie chromosomu 18) a Patauův syndrom (trisomie chromosomu 13) [55][58].

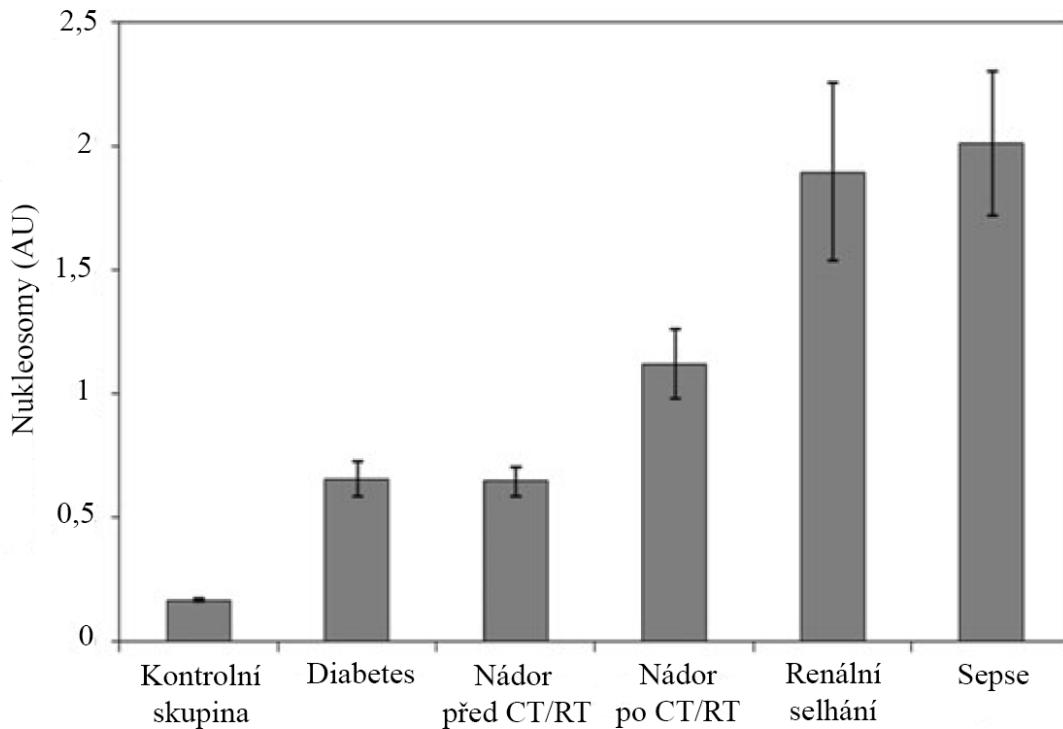
3.7.3 Jiné patologické stavy

Monitorování hladin cfDNA může mít v řadě patologických stavů značný prognostický význam. Sepsa bývá hlavní příčinou morbidity a mortality u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Je spojována s nekrózou a apoptózou buněk. Rhodes et al. [59] vyšetřovali u pacientů se sepsí a septickým šokem prognostickou hladinu cfDNA. Došli k závěru, že predikční faktor mortality je dosažen při hodnotách plazmatické koncentrace DNA vyšších než 127 ng/ml, s citlivostí 92 % a specifitou 80 %. Prognostická hodnota hladiny cfDNA byla prokázána také u pacientů s infarktem myokardu [60] a mozkovou mrtvicí [61]. Koncentrace plazmatické DNA koreluje také se závažností poškození organismu [59]. V případě, že byly vzorky odebrány ihned po traumatickém poranění (do 60 minut), bylo možné určit prediktor mortality s citlivostí 78 % a specifitou 82 % [62].

Zvýšené hladiny plazmatické DNA byly dále zjištěny u traumatických poranění a popálenin, diabetických pacientů a pacientů s renálním selháním. Obrázek 5 přehledně znázorňuje hladiny nukleosomů stanovených v séru zdravých dobrovolníků, pacientů s cukrovkou, renálním selháním, sepsí a rakovinou (před a po chemoterapii/radioterapii) [21].

Vědci s využitím kvantitativní PCR detekovali zvýšené množství DNA v plazmě u pacientů s orgánovým selháním, s těžkými poraněními, se syndromem multiorgánové dysfunkce, plicní embolií a Whippleovou chorobou [21].

Signifikantně vyšší hladiny nukleových kyselin jsou patrné i u autoimunitních onemocnění, jako jsou revmatoidní artritida, autoimunitní hepatitida, onemocnění pojivové tkáně, systémové vaskulitidy (spojené s anti-neutrofilními cytoplazmatickými protilátkami) [21].



Obrázek 5 Hladina sérových nukleosomů zdravých jedinců a pacientů dle choroby
 Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny v arbitrárních jednotkách (AU), CT - chemoterapie, RT - radioterapie

Zdroj: Modifikováno dle [21].

3.8 Výtěžky volně cirkulující fragmentované DNA získané různými izolačními postupy

Kuang et al. vzájemně porovnávali tři extrakční kity: QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen), NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel) a Promega Wizard (Promega). Vzorky plné krve byly odebrány do zkumavek s heparinátem sodným: BD Vacutainer CPT Cell Preparation Tube (BD Biosciences). Plazma byla izolovaná dle pokynů výrobce a pocházela od pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) [23]. Podle dřívější studie Umetami et al. [63] je většina nádorové DNA nekrotického původu v plazmě v podobě nestejně dlouhých fragmentů délky od 185 bp do 926 bp (průměrně 544 bp), zatímco cfDNA pocházející z apoptických tělísek je obvykle jednotné délky 185 - 200 bp [64]. Vzhledem k těmto skutečnostem se amplifikací Alu sekvencí pomocí kvantitativní PCR snažili odlišit fragmenty pocházející z apoptických a nekrotických buněk. Alu sekvence (typ retrotransposonů často se vyskytujících v genomu) délky

115 bp (Alu115) zahrnovala úseky fragmentů z apoptických a zároveň nekrotických buněk (celková cfDNA). Oproti tomu Alu sekvence délky 247 bp (Alu247) zahrnovala pouze sekvence DNA pocházející z nekrotických (nádorových) buněk. Vypočítáním poměru Alu247/Alu115 určili procentuální zastoupení nádorové DNA z celkové cfDNA. Nejvhodnější kit pro určení celkové cfDNA zvolili NucleoSpin Plasma XS, zatímco pro izolaci fragmentů z nádorových buněk je vhodnější použít Qiamp DNA Micro Kit [23][65]. Souhrnné výsledky studie zobrazuje Tabulka 3.

Tabulka 3 Výsledky porovnání extrakčních souprav pro detekci cfDNA

DNA extrakční protokol	Koncentrace celkové DNA (ng/ml)	Frakce tumorové cfDNA (% poměr Alu 247/115)
QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)	64	50,9
NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel)	86	10,9
Wizard (Promega)	21	59,4

Zdroj: Modifikováno dle [65].

Hao et al. prověřovali integritu cfDNA pomocí výše zmíněných Alu sekvencí u skupiny zdravých jedinců, pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) a pacientů s intestinálními polypy. Jedním z cílů studie bylo zjistit, zdali existuje signifikantní korelace mezi hladinou celkové cfDNA, integritou DNA a klinickými parametry. Vzorky séra byly zpracovány extrakční metodou na principu magnetických částic Magnetic Bead DNA Extraction Kit (Tianlong). Koncentrace cfDNA byla kvantifikována prostřednictvím kvantitativní PCR amplifikací Alu115 a Alu247. Koncentrace Alu115 (cfDNA) u zdravých jedinců byla 385,4 ng/ml, u pacientů s intestinálními polypy 423,3 ng/ml a u pacientů s CRC 1046 ng/ml [66].

4 Nosiče nukleových kyselin používané při extrakci cfDNA

Nosič (z angl. carrier) neboli koprecipitant je látka, která zlepšuje výtěžnost nukleových kyselin (NK) při extrakci. Nosiče jsou sloučeniny nerozpustné v roztocích etanolu a isopropanolu. Zředěných roztoků napomáhají vysrážet NK. Během centrifugace vzorku nosič spolu s NK tvoří viditelnou peletu, čímž je usnadněno následné odstranění supernatantu bez narušení pelety NK [67].

4.1 Nosičová RNA

Vlastnosti a aplikace

Struktura nosičové RNA (z angl. RNA carrier) je tvořena jednořetězcovým vláknem ribonukleové kyseliny. Nosičová RNA bývá součástí komerčně dodávaných souprav používaných k purifikaci virových nukleových kyselin ze séra nebo z krevní plazmy [68].

Nosičovou RNA lze použít pro usnadnění vazby virové RNA a DNA na silikátovou membránu kolonky především v případě, kdy je v analyzovaném vzorku málo cílových molekul. Zároveň lze přidávkem velkého množství nosičové RNA ochránit virovou RNA před možnou degradací (nedostatečná denaturace RNAs chaotropními solemi). Vzhledem k tomu, že množství nosičové RNA přítomné v získaném eluátu značně převyšuje množství virových NK, je zapotřebí pro následující amplifikační reakce vypočítat množství eluátu v souladu s přidávaným množstvím nosičové RNA pro dosažení nejvyšších hladin senzitivity amplifikační reakce [68].

Doporučená koncentrace

Doporučené množství nosičové RNA použité při extrakci NK je vypočítáno dle pokynů výrobce vzhledem k počtu vzorků pro danou analýzu. Množství nosičové RNA pro jeden vzorek bylo optimalizováno na 5,6 μg (hodnota koncentrace pracovního roztoku nosičové RNA je udávána 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v 200 μl AL pufu) [68].

4.2 Glykogen

Vlastnosti a aplikace

Glykogen (z angl. glycogen) je polysacharid, který má rozvětvenou strukturu složenou z řádově tisíců monomerů D-glukosy. Molární hmotnost glykogenu obsahujícího okolo 50 tisíc glukosových molekul je přibližně 8 milionů g/mol. Komerčně dodávaný glykogen bývá izolovaný z biologických zdrojů, například z ústřice a slávky jedlé. Vyizolovaný glykogen je ošetřen proteinasou K a dodecylsíránem sodným, z důvodu odstranění případných kontaminujících enzymů (nukleasy). Poté je extrahován fenol-chloroformovou extrakcí, precipitován etanolem a resuspendován ve vodě bez nukleas [69]. Získaný glykogen je dodáván ve vodném roztoku, a to ve vysoce čisté formě s garancí nepřítomnosti degradačních enzymů RNas a DNas. Je považován za inertní nosič, který signifikantně zvyšuje výtěžky nukleových kyselin při alkoholové precipitaci [70].

Ideální použití tohoto nosiče je při extrakci oligonukleotidů delších než 8 bází, při množství DNA > 20 pg ve zředěných vzorcích. Výtěžky fragmentů kratších než 20 bp jsou v přítomnosti nosiče glykogenu vyšší než s nosičem lineárního polyakrylamidu (blíže popsány níže v textu) [71]. Vzhledem k tomu, že je glykogen inertní, neovlivňuje většinu reakcí. Neinterferuje s PCR, DNA sekvenováním, hybridizačními reakcemi, DNA digescí prostřednictvím endonukleas. Dále neovlivňuje cDNA (komplementární DNA) syntézu, DNA značení, *in vitro* transkripci, bakteriální transformaci, gelovou elektroforézu NK, spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA/RNA ($A_{260-280}$ měření čistoty) a enzymatické reakce při finální koncentraci do 8000 $\mu\text{g/ml}$ [69][71].

UltraPureTM glykogen:

Při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ neinhibuje aktivitu TdT (terminální deoxynukleotidyl transferasa, používá se při značení DNA). Při koncentraci \leq než 2000 $\mu\text{g/ml}$ nemá vliv na reverzní transkriptasu. T4 RNA ligasa není inhibována v roztocích, ve kterých je glykogen přítomen v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$. Může ovlivňovat DNA-proteinové interakce. Při stanovení RNA může snižovat kvalitu molekuly RNA a inhibovat reverzní transkripci-PCR u vzorků, které jsou izolovány z tkání bohatých na polysacharidy a proteoglykany [72].

Doporučená koncentrace

Doporučená finální koncentrace glykogenu pro extrakci je 50 - 150 µg/ml [67].

4.3 Polyadenylová kyselina

Vlastnosti a aplikace

Polyadenylová kyselina (z angl. Poly (A) carrier, Poly (A)) je jednovláknový úsek nukleové kyseliny složený pouze z adeninových nukleotidů. Délka RNA vlákna bývá v rozmezí 2100 až 10 000 nukleotidů. Jedné mononukleotidové jednotce je rovna koncentrace Poly (A) 2,3 µmol/mg (hodnota zjištěná dle absorbance) [73].

Poly (A) se nejčastěji používá jako nosič pro zvýšení výtěžků kvantitativní precipitace DNA a RNA. Poly (A) nosič byl použit při digitální PCR ve studii Miyaoka et al. [74], která se zabývala dvěma základními mechanismy oprav dvouřetězcových zlomů DNA, kterými jsou: nehomologní spojování konců DNA (z angl. non-homologous end-joining, NHEJ) a homologní rekombinace (z angl. homology-directed repair, HDR). Komerčně připravené dvouvláknové pozitivní DNA kontrolní vzorky byly resuspendovány v 250 µl TE pufru a 100 µg/ml Poly (A) nosiče (Roche) a stanoveny pomocí digitální PCR [74].

Doporučená koncentrace

Shaw et al. [75] určili, že optimální poměr přídavku nosiče RNA k DNA pro maximální výtěžek NK ze vzorku je v rozmezí 50:1 a 10:1. Doporučená koncentrace pracovního roztoku Poly (A) je 500 µg/ml [73].

4.4 Lineární polyakrylamid

Vlastnosti a aplikace

Lineární polyakrylamid (z angl. linear polyacrylamide, LPA) je velice účinný inertní neutrální nosič vhodný pro etanolovou precipitaci pikogramových množství nukleových kyselin. Lze jím precipitovat fragmenty molekuly DNA délky > 20 bp. Kratší fragmenty DNA a volné nukleotidy LPA vysrážet nedokáže, čehož lze využít při oddělení reakčních produktů (úseky delší než 20 bp) od nevčleněných nukleotidů a oligonukleotidových primerů. Lineární polyakrylamid a glykogen jsou v porovnání s nosičem kvasinkové tRNA (blíže popsán níže) preferovány v případech, kde přidaná nukleová kyselina může interferovat nebo kompetitivně ovlivnit enzymatické reakce. Výhodou LPA proti ostatním nosičům (např. glykogen, kvasinková tRNA a DNA ze spermatu lososa) je, že nepochází z biologického materiálu a není ošetřen reagensy z biologických zdrojů (např. proteasa). Díky syntetickému původu lze LPA považovat za ideální nosič při stanovení výtěžků DNA polymerasovou řetězovou reakcí a pomocí kvantitativní real-time PCR [67][71][76][77].

V laboratořích pro běžnou manipulaci s DNA je LPA využíván především jako koprecipitant zvyšující výtěžek nukleových kyselin. Vzhledem ke své inertnosti je dále používán při enzymatických reakcích, gelové elektroforéze, klonování a DNA-proteinových interakcích. Například na rozdíl od molekuly tRNA není fosforylován polynukleotidovou kinasou a na rozdíl od glykogenu neovlivňuje DNA-proteinové interakce [67][76].

Doporučená koncentrace

Finální koncentrace LPA pro extrakci je doporučována v rozmezí 10 - 20 $\mu\text{g/ml}$ [77].

4.5 Kvasinková transferová RNA

Vlastnosti a aplikace

Kvasinková transferová RNA (z angl. yeast transfer RNA, tRNA) je jednovláknová molekula RNA izolovaná z pivovarských kvasnic. Použití nosičové tRNA není doporučováno, pokud po precipitaci následují enzymatické reakce s polynukleotidovou kinasou nebo terminální transferasou, protože molekula tRNA by mohla kompetovat o vazbu na přidaný substrát. Při manipulaci s tímto nosičem je potřeba dbát zvýšené pozornosti, protože velice snadno podléhá působení degradačních enzymů ribonukleas. Pro etanolovou precipitaci oligonukleotidového vlákna délky například 35 bází (z angl. 35-mer) je efektivnější použít jako koprecipitant glykogen nebo lineární polyakrylamid [78].

Kvasinkovou tRNA lze využít jako efektivní koprecipitant malých množství nukleových kyselin při alkoholové precipitaci. Nosič lze dále použít jako blokační činidlo u hybridizačních reakcí, kde se používají RNA sondy (např. In situ hybridizace, Northern blotting a Dot blot analýza) [78].

Doporučená koncentrace

Finální používaná koncentrace nosičové tRNA je doporučována v rozmezí 10 - 20 µg/ml [78].

4.6 DNA ze spermatu lososa

Vlastnosti a aplikace

DNA ze spermatu lososa (z angl. salmon sperm DNA) je v podobě dvouřetězcové molekuly DNA, která je izolována ze spermatu ryb rodu *Salmo* (např. Losos obecný). K vysoce čisté DNA získané ze spermií lososa pomocí fenol-chloroformové extrakce je přidána destilovaná, neionizovaná voda bez nukleas, čímž vzniká vodný roztok DNA, který se obvykle využívá k přípravě prehybridizačních a hybridizačních roztoků.

Extrahované fragmenty DNA jsou v roztoku v denaturované podobě o průměrné velikosti ≤ 2000 bp [79][80].

Vodný roztok nosičové DNA ze spermatu lososa se používá v hybridizačním protokolu jako blokační činidlo, které redukuje nespecifické navázání hybridizační sondy k povrchu membrány - blokace nespecifické hybridizace [79].

Doporučené koncentrace

DNA ze spermatu lososa je při hybridizacích doporučováno používat o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ [79].

4.7 DNA ze spermatu sledě

Vlastnosti a aplikace

DNA ze spermatu sledě (z angl. herring sperm DNA) je dvouvláknová molekula DNA získávaná ze spermatu mořských ryb rodu *Clupea* (např. Sled' obecný). Purifikovaná DNA je sonikací upravena na fragmenty délky v rozsahu 587 - 831 bp (nejúčinnější pro hybridizaci). Získané fragmenty jsou denaturovány varem na jednovláknové úseky [81][82][83].

Obdobně jako nosičová DNA ze spermatu lososa je i nosičová DNA ze spermatu sledě hojně využívána k přípravě prehybridizačních a hybridizačních roztoků nebo jako nosič při izolaci DNA. DNA ze spermatu sledě se používá také jako účinné blokační činidlo při hybridizačních a blotovacích technikách [82][84].

Doporučovaná koncentrace

DNA ze spermatu sledě je při hybridizacích doporučováno používat o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ [84].

5 Cíle diplomové práce

- A. Provést izolaci cfDNA ze vzorků směsné krevní plazmy pomocí extrakčních kolonek NucleoSpin Plasma XS od firmy Macherey-Nagel s přidavkem nosiče (vždy u série deseti alikvotů, postupně přidat 7 typů testovaných nosičů).
- B. Dle optických charakteristik a výsledků real-time PCR analýzy vybrat nejvhodnější typ nosiče pro rutinní izolaci cfDNA ze vzorků krevní plazmy.
- C. Zjistit vliv délky inkubační doby na koncentraci cfDNA izolované pomocí kolonek NucleoSpin Plasma XS, a to bez přidavku nosiče, s přidavkem nosičové RNA a s přidavkem polyadenylové kyseliny.

Experimentální část

6 Použité materiály a přístroje

6.1 Chemikálie

Komerčně dodané materiály použité pro tuto práci uvádí Tabulka 4. Jejich bližší charakteristika je popsána v následujících podkapitolách.

Tabulka 4 Komerčně dodané chemikálie

Účel použití	Použité chemikálie	Výrobce	Země původu
Izolace DNA	NucleoSpin Plasma XS	Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG	Düren, Germany
Nosič	RNA Carrier QIAamp DSP Virus Spin Kit	Qiagen	Hilden, Germany
Nosič	Poly (A) Polyadenylic acid	Roche Diagnostic	Mannheim, Germany
Nosič	UltraPure Glycogen	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Nosič	Yeast tRNA	Ambion	Sydney, NSW
Nosič	Linear Acrylamide	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Nosič	UltraPure Salmon Sperm DNA	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Nosič	Herring Sperm DNA	Promega, Corp	Madison, WI, USA
qPCR	gb Genetic Human DNA	Generi Biotech, s.r.o.	Hradec Králové, ČR
Fluorimetrie	Qubit dsDNA HS Assay	Life Technologies, Corp	Carlsbad, CA, USA

6.1.1 Chemikálie použité pro izolaci DNA

A. Nucleospin® Plasma XS - obsah soupravy

- Proteinasa K (lyofilizovaná)
- Binding Buffer BB (vázející pufr)
 - guanidinium thiokyanát⁵ 30 - 60 % + etanol 35 - 55 %
- Wash Buffer WB (promývací pufr)
 - etanol 55 - 75 %
- Elution Buffer (eluční pufr)
 - slabě alkalický pufr s nízkou iontovou silou (5 mM Tris-HCl; pH 8,5)
- NucleoSpin® Plasma XS kolonky
- Sběrné zkumavky [85].

B. Použité nosiče

- RNA Carrier
 - množství komerčního lyofilizátu 310 µg
 - koncentrace pracovního roztoku 28 µg/ml
- Poly (A) Polyadenylic acid
 - množství komerčního lyofilizátu 100 mg
 - koncentrace pracovního roztoku 10 µg/ml (pokus 3A)
 - koncentrace pracovního roztoku 1 µg/ml (pokus 3B)
- UltraPure Glycogen
 - koncentrace komerčního koncentrátu 20 000 µg/ml
 - koncentrace pracovního roztoku 2 000 µg/ml
- Linear Acrylamide
 - koncentrace komerčního koncentrátu 5 000 µg/ml
 - koncentrace pracovního roztoku 500 µg/ml

⁵ Chaotropní sůl, která naváže DNA na silikátový povrch.

- Yeast tRNA
 - koncentrace komerčního koncentrátu 10 000 µg/ml
 - koncentrace pracovního roztoku 1 000 µg/ml
- Salmon sperm DNA
 - koncentrace komerčního koncentrátu 10 000 µg/ml
 - koncentrace pracovního roztoku 500 µg/ml
- Herring Sperm DNA
 - koncentrace komerčního koncentrátu 10 000 µg/ml
 - koncentrace pracovního roztoku 500 µg/ml

C. Reagencie použité pro přípravu pracovních roztoků

- Demineralizovaná voda
- AE pufr (Qiagen) - QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
- AVE pufr (Qiagen) - QIAamp DSP Virus Spin Kit (Qiagen)

6.1.2 Fluorimetrické měření - použité chemikálie

A. Qubit dsDNA HS Assay Kit - obsah soupravy

- dsDNA HS Reagent
 - 200x koncentrát v DMSO
- dsDNA HS Buffer
- dsDNA HS Standard #1
 - 0 µg/ml v TE pufru
- dsDNA HS Standard #2
 - 10 µg/ml v TE pufru [86].

6.1.3 Kvantifikace real-time PCR - použité chemikálie

A. gb Genetic Human DNA - obsah soupravy

- Assay qPCR POLR2A
- Deionizovaná voda (negativní kontrola)
- Standard Human PC (pozitivní kontrola)
 - 20 000 ng/ml

6.2 Další používané technické vybavení

- pipety a pipetovací špičky
- 0,2 ml PCR zkumavky
- 1,5 ml zkumavky
- 50 ml sběrné zkumavky
- termobloky
- mrazicí box
- vortex (třepačka)
- chladičí kovový blok - real-time PCR

6.3 Přístroje

Použité přístroje jsou uvedeny dle účelu jejich použití (viz Tabulka 5).

Tabulka 5 Použité přístroje

Přístroj	Výrobce	Země původu	Účel použití
Microfuge 18 centrifuge	Beckman Coulter, Inc	Brea, CA, USA	centrifugace
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (sér. Č. 1483)	Thermo Fisher Scientific, Inc	Wilmington, DE, USA	spektrofotometrie
Qubit	Life Technologies, Corp	Carlsbad, CA, USA	fluorimetrie
Rotor-Gene 6000	Corbett Research	Sydney, Austrálie	real-time PCR

6.4 Vzorky DNA

Pro hodnocení extrakčních metod byla použita směsná plazma získaná smícháním předem anonymizovaných vzorků nesrážlivé krve z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Stáří vzorků uchovávaných v chladnici při 8 °C bylo dva dny, aby byl zajištěn dostatečný obsah DNA v krevní plazmě. Při skladování se DNA postupně uvolňovala ze sedimentu krevních buněk. Odebrané zkumavky standardně obsahovaly 3 - 3,5 ml EDTA nesrážlivé krve. Po 10 minutové centrifugaci při pokojové teplotě byl z každé zkumavky oddělen supernatant (čirá plazma) do 200 ml baňky, jejíž obsah byl mícháním homogenizován. Potřebné množství směsné plazmy bylo 85 ml. Po promíchání byla směsná plazma alikvotována (rozdělena) po 800 µl do devadesáti 1,5 ml zkumavek. Všechny zkumavky byly stočeny v chlazené centrifuze při teplotě 4 °C, 12 000g a po dobu 10 minut. Supernatant o objemu 750 µl byl opatrně oddělen do nových 1,5 ml zkumavek. Každý alikvot byl popsán příslušným číslem. Vzhledem k časovému horizontu prováděných pokusů byly alikvoty plazmy uloženy do mrazicího boxu a uchovány při teplotě -20 °C. Před každým pokusem byly alikvoty vždy vytemperovány na pokojovou teplotu.

7 Metodiky

7.1 Izolace DNA

Na základě předchozího výzkumu kolegyně Totzauerové, která porovnávala 4 vybrané extrakční postupy izolace cfDNA z krevní plazmy, byla doporučena pro rutinní izolaci cfDNA souprava NucleoSpin Plasma XS od firmy Macherey-Nagel [22]. Tato souprava je výrobcem doporučována k izolaci fragmentované cirkulující DNA z lidské EDTA plazmy, séra nebo bronchoalveolární laváže.

7.1.1 NucleoSpin Plasma XS

Níže popsaným postupem bylo zpracováno všech 90 zkumavek, rozdělených do 9 skupin po 10 zkumavkách (pro 9 nezávislých extrakčních pokusů, viz kapitola 7.1.2). Před daným pokusem bylo nutné každý vzorek řádně vytemperovat na laboratorní teplotu a předehřát dva termobloky: jeden na teplotu 37 °C a druhý na teplotu 90 °C.

Vzhledem k doporučenému izolačnímu objemu extrakční kolonky (240 µl) bylo zapotřebí přepočítat používaný objem BB pufru pro dosažení optimálního navázání DNA na silikátový povrch kolonky.

1. Objem každé zkumavky (750 µl plazmy) byl vždy řádně homogenizován a rozpipetován do tří 1,5 ml předem popsaných zkumavek (každá trojice měla vždy stejné číslo) po objemu 250 µl (celkem tedy 30 zkumavek pro každý pokus).
2. Do každé zkumavky bylo přidáno 20 µl proteinasy K a následovala inkubace v termobloku při teplotě 37 °C po dobu 10 minut.
3. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 375 µl BB pufru (vzhledem k použitému objemu plazmy 250 µl). Po přidání pufru bylo nutné zkumavku 3krát otočit, zvortexovat a krátce přetočit v centrifuze.
4. Obsah zkumavky z předchozího kroku (první z trojice zkumavek) byl opatrně přepipetován do kolonky NucleoSpin Plasma XS Column nasazené na Collection Tube (sběrná tuba). Následovala centrifugace 1 minutu při 2000g.

5. Po stočení byla použita sběrná tuba s „filtrátem“ odstraněna a kolonka byla přemístěna do nové čisté sběrné tuby.
6. Tento postup byl zopakován ještě 2krát, a to pro druhou a třetí zkumavku ze série, vždy přes jednu a tu samou kolonku a za stejných centrifugačních podmínek.
7. Po přenesení objemu z třetí zkumavky v sérii proběhla krátká centrifugace při 11 000g po dobu 5 vteřin.
8. V dalším kroku byly kolonky promyty promývacím roztokem WB pufru.
9. Nejdříve bylo přidáno 500 μ l pufru WB. Následovala centrifugace 1 minutu při 11 000g. Kolonka byla opět přesunuta do nové čisté sběrné tuby a tuba s „filtrátem“ byla odstraněna.
10. Poté bylo přidáno 250 μ l pufru WB. Následovala centrifugace 3 minuty při 11 000g.
11. Kolonka byla přesunuta do nové čisté 1,5 ml zkumavky. Sběrná tuba s „filtrátem“ byla opět odstraněna.
12. V konečné fázi bylo do kolonky opatrně napipetováno 35 μ l elučního pufru a po jednodominutové inkubaci při laboratorní teplotě následovala poslední centrifugace při 11 000g po dobu 1 minuty.
13. Po centrifugaci byla kolonka odstraněna a otevřená zkumavka s eluátem byla vložena na 8 minut do předem předehřátého termobloku na 90 °C.
14. Nakonec byla zkumavka s eluátem ochlazená na laboratorní teplotu.

Pracovní roztoky jednotlivých nosičů byly připraveny dle pokynů výrobce. Do extrakčního protokolu byly nosiče zařazeny v pipetovacím kroku buď před (glykogen, lineární polyakrylamid, kvasinková tRNA, DNA ze spermatu lososa, DNA ze spermatu sledě), nebo zároveň (nosičová RNA, Poly (A)) s přidáním BB pufru (viz Tabulka 6).

Tabulka 6 Přídavky a finální koncentrace použitých nosičů

	koncentrace pracovního roztoku nosiče (µg/ml)	přídavek nosiče (µl)	finální koncentrace nosiče (µg/ml)
nosičová RNA	28	375	16,25
Poly (A) I (pokus 3A)	10	100	1,55
Poly (A) II (pokus 3B)	1	65	0,10
glykogen	2000	16	49,60
lineární polyakrylamid	500	25,8	20,00
kvasinková tRNA	1000	12,9	20,00
DNA ze spermatu lososa	500	25,8	20,00
DNA ze spermatu sledě	500	25,8	20,00

Celkový objem lyzační směsi byl vždy 645 µl

7.1.2 Testované skupiny vzorků

1. DNA ze vzorků 1-10 byla izolována bez přídavku nosiče
2. DNA ze vzorků 11-20 byla izolována s přídavkem nosičové RNA
3. DNA ze vzorků 21-30 byla izolována s přídavkem Poly (A) I (pokus 3A)
4. DNA ze vzorků 31-40 byla izolována s přídavkem Poly (A) II (pokus 3B)
5. DNA ze vzorků 41-50 byla izolována s přídavkem glykogenu
6. DNA ze vzorků 51-60 byla izolována s přídavkem lineárního polyakrylamidu
7. DNA ze vzorků 61-70 byla izolována s přídavkem kvasinkové tRNA
8. DNA ze vzorků 71-80 byla izolována s přídavkem DNA ze spermatu lososa
9. DNA ze vzorků 81-90 byla izolována s přídavkem DNA ze spermatu sledě

7.2 Kvantifikace cfDNA izolované z krevní plazmy

Pro vyhodnocení výtěžků získaných izolací DNA z plazmy byly použity celkem tři kvantifikační způsoby.

7.2.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie byla použita pouze jako orientační metoda stanovení koncentrace DNA vzhledem k předpokládané optické interferenci některých nosičů.

Proto jen u vybraných vzorků (vzorky 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81) byla koncentrace cfDNA izolované z krevní plazmy změřena v sérii 5krát spektrofotometrem NanoDrop ND 1000. Potřebný objem vzorku pro analýzu činil 5krát 2 μ l. Po nastavení přístroje do režimu měření koncentrace DNA byl předem homogenizovaný vzorek napipetován na patřičné místo mezi rameny. Přístroj proměřil absorpční spektrum a z hodnoty absorbance při vlnové délce 260 nm byla vypočítána koncentrace daného vzorku v jednotkách ng/ μ l [87].

7.2.2 Fluorimetrie

Vzhledem k objemové náročnosti tohoto měření byly pro každý extrakční postup vytvořeny směsné extrakty vzorků se stejnorodým zastoupením všech extraktů DNA daného typu. Koncentrace DNA v každém směsném extraktu byla zpracována 3krát pomocí soupravy Qubit dsDNA HS Assay Kit.

Nejprve bylo nutné připravit pracovní roztok fluorescenční barvičky smícháním reagensů dsDNA HS Reagent a dsDNA HS Buffer v ředícím poměru 1:200. Do 0,5 ml zkumavek bylo napipetováno 10 μ l vzorku a přidáno 190 μ l pracovního roztoku. Stejným způsobem byly připraveny kalibrační standardy (10 μ l příslušného standardu + 190 μ l pracovního roztoku). Obsah každé zkumavky byl opatrně zvortexován a 2 minuty inkubován při laboratorní teplotě. Následovalo změření koncentrace jednotlivých vzorků fluorimetrem Qubit, na kterém bylo nutné nastavit vhodný měřicí program dle příslušné soupravy (Quant-iT dsDNA, HS) [86].

7.2.3 Real-time PCR

V každém eluátu z jednotlivých extrakčních postupů byla koncentrace DNA kvantifikována kitem gb Genetic Human DNA. Tato souprava slouží k detekci specifického úseku genu *POLR2A* v lidské genomové DNA. Komponenta Assay qPCR POLR2A obsahuje specifické primery, interní pozitivní kontrolu (IPC) a fluorescenčně značené DNA sondy (hydrolyzační), čímž lze amplifikovat specifický úsek DNA genu *POLR2A*, který se řadí svojí funkcí mezi tzv. *house-keeping genes* a je lokalizován na krátkém raménku chromosomu 17 v pozici 13.1. Gen *POLR2A* kóduje velkou

podjednotku RNA polymerázy II - enzym zodpovědný za syntézu mRNA u eukaryot [88][89].

Reagencie z této soupravy jsou připraveny v koncentracích umožňujících jejich přímé použití (ve formě „ready to use“). Součástí kitu je Standard human PC - pozitivní kontrola v koncentraci odpovídající 20 000 ng/ml lidské genomové DNA [90].

Nejprve bylo do 0,2 ml PCR zkumavek (kompatibilních s termocyklérem Rotor Gene 6000) umístěných v chladícím kovovém bloku napipetováno 15 µl Assay qPCR POLR2A. Do každé zkumavky bylo přidáno 10 µl eluátu DNA (resp. 10 µl deionizované vody - negativní kontrola, 10 µl příslušného roztoku z kalibrační řady). Roztoky kalibrační řady byly připraveny ze Standard Human PC o koncentracích: 20 000 ng/ml; 10 000 ng/ml; 5 000 ng/ml; 2 500 ng/ml a 1 250 ng/ml.

Zkumavky byly vloženy do rotoru termocykléru Rotor-Gene 6000 a v softwaru byly nastaveny reakční podmínky uváděné v návodu soupravy [90]:

- počáteční denaturace: 95 °C 3 minuty
- 50 cyklů:
- denaturace: 95 °C 10 vteřin
- annealing + elongace: 60 °C 30 vteřin

Fluorescence byla snímána během elongační fáze:

Detekce signálu primárního qPCR systému probíhala v kanálu FAM/Sybr:

- primární systém: specifické primery a fluorescenčně značené sondy
 - excitační vlnová délka 495 nm
 - emisní vlnová délka 520 nm

Detekce signálu sekundárního qPCR systému probíhala v kanálu JOE/HEX:

- sekundární systém: interní pozitivní kontrola (IPC)
 - excitační vlnová délka 535 nm
 - emisní vlnová délka 556 nm

Signály v jednotlivých fluorescenčních kanálech byly odečteny z amplifikační křivky, a to proložením thresholdu (určený práh fluorescence stejný pro každý cyklus) a následným odečtením hodnoty Ct (*threshold cycle*), kdy amplifikační křivka prochází nastaveným tresholdem [10][90]. Detekční hladina thresholdu byla nastavena na 0,1476.

V případě, že vzorek obsahoval specifický úsek genu *POLR2A*, byl signál detekován v kanálu FAM/Sybr. U negativní kontroly musel být signál nulový.

Díky detekci IPC v kanálu JOE/HEX lze odhalit přítomnost potenciálního inhibitoru PCR reakce, a to v případě nulového signálu jak v primárním, tak sekundárním systému [90].

7.3 Vliv délky inkubační doby na koncentraci a amplifikovatelnost eluátu cfDNA

Pro tento pokus byly náhodně vybrány zkumavky s eluáty cfDNA číslo 1 (bez nosiče), 12 (s přidavkem nosičové RNA), 25 (s přidavkem nosiče Poly (A) I) a 40 (s přidavkem nosiče Poly (A) II). Termoblok byl předem vytemperován na teplotu 90 °C.

1. Byl zjištěn přesný objem jednotlivých eluátů ve zkumavkách číslo 1, 12, 25 a 40. Každá zkumavka byla doplněna pufrem AE (Qiagen) na objem 70 μ l a rozdělena po 35 μ l do dvou 1,5 ml zkumavek (1/1, 1/2, 12/1, 12/2, 25/1, 25/2, 40/1 a 40/2).
2. Otevřené zkumavky 1/1, 12/1, 25/1 a 40/1 byly na 12 minut vloženy do termobloku vyhřátého na teplotu 90 °C.
3. Otevřené zkumavky 1/2, 12/2, 25/2, 40/2 byly vloženy na 6 minut do termobloku vyhřátého na teplotu 90 °C.
4. Po inkubaci byla určena koncentrace DNA v extraktech po odpaření postupem popsaným v kapitole 7.2.3.

7.4 Statistické vyhodnocení dat

Laboratorní data byla zpracována v softwaru STATISTICA (StatSoft) a vyhodnocena pomocí oboustranného nepárového t-testu. Jako hladina významnosti α byla zvolena hodnota 0,05. Za referenční skupinu dat byly použity hodnoty koncentrace cfDNA pocházející ze skupiny bez přidavku nosiče.

8 Výsledky

8.1 Kvantifikace cfDNA

Výtěžky cfDNA izolované ze vzorků krevní plazmy byly změřeny výše popsanými kvantifikačními metodami (viz kapitola 7.2).

8.1.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometricky byly změřeny koncentrace cfDNA vybraných vzorků (vždy jeden) pro každý extrakční postup v sérii 5krát (viz Tabulka 7). Vliv přidavku jednotlivých nosičů na výtěžek cfDNA hodnocených oboustranným nepárovým t-testem zobrazuje Tabulka 8 a znázorňuje Graf 1.

Tabulka 7 Koncentrace plazmatické cfDNA změřená spektrofotometricky

Vybrané vzorky	Typ Nosiče	c _{DNA} [ng/ml]					průměr c _{DNA} [ng/ml]	CV [%]
		1	2	3	4	5		
1	bez přidavku nosiče	14500	15800	13000	15300	15000	14720 ± 1070	7,27
11	nosičová RNA	232100	231000	230600	231600	234500	231960 ± 1530	0,66
21	Poly (A) I	58600	58900	59200	62000	59400	59620 ± 1360	2,28
31	Poly (A) II	9700	10300	10700	11800	11400	10780 ± 840	7,79
41	glykogen	8800	7200	9400	9200	9000	8720 ± 880	10,09
51	lineární polyakrylamid	8700	10500	8500	10400	11000	9820 ± 1140	11,61
61	kvasinková tRNA	5900	6400	8300	6900	9300	7580 ± 1190	15,70
71	DNA ze spermatu lososa	91200	88900	94100	90300	90300	90960 ± 1940	2,13
81	DNA ze spermatu sledě	113100	113900	116900	114300	116900	115020 ± 1770	1,54

c_{DNA} - koncentrace cfDNA, CV - variační koeficient

průměrná koncentrace c_{DNA} ± směrodatná odchylka z pěti měření

Poly (A) I - přidavek polyadenylové kyseliny (pokus 3A)

Poly (A) II - přidavek polyadenylové kyseliny (pokus 3B)

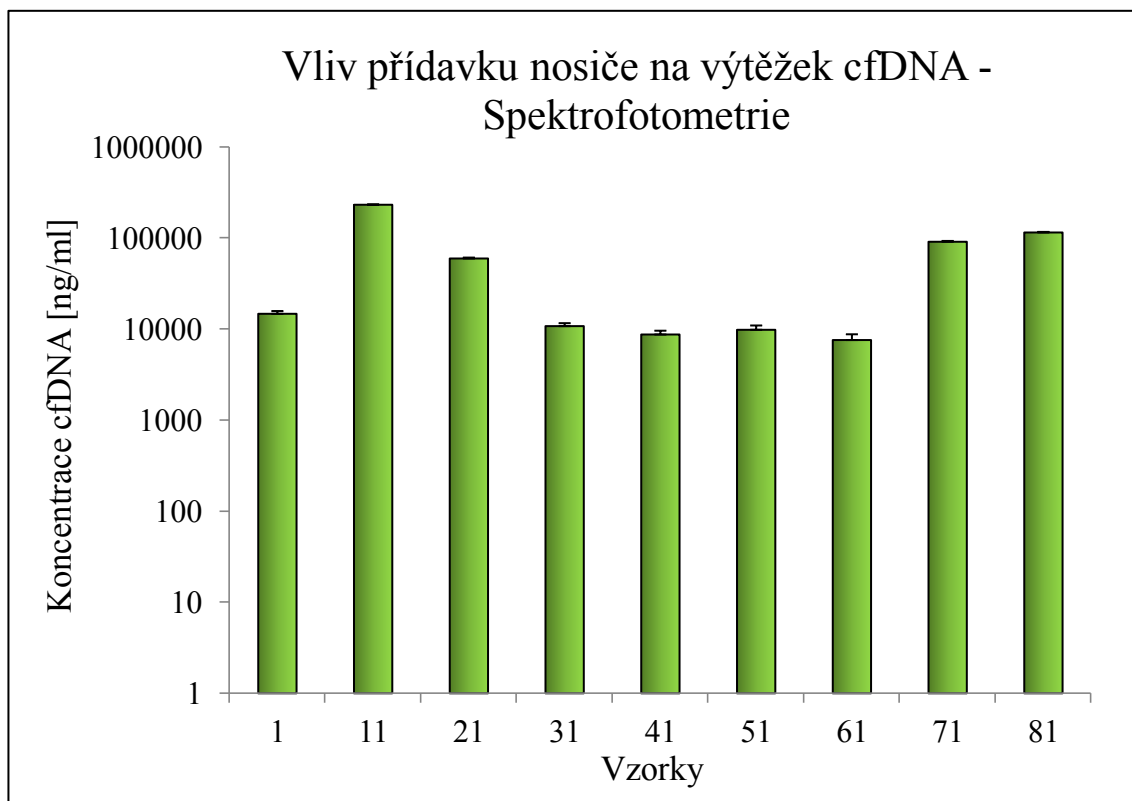
Tabulka 8 Vliv přidavku nosiče na výtěžek cfDNA - spektrofotometrie

Typ Nosiče	průměr c_{DNA} [ng/ml]	rozdíl průměrů [ng/ml]	
nosičová RNA	231960	217240	$P < 0,001$
Poly (A) I	59620	44900	$P < 0,001$
Poly (A) II	10780	-3940	$P < 0,001$
glykogen	8720	-6000	$P < 0,001$
lineární polyakrylamid	9820	-4900	$P < 0,001$
kvasinková tRNA	7580	-7140	$P < 0,001$
DNA ze spermatu lososa	90960	76240	$P < 0,001$
DNA ze spermatu sledě	115020	100300	$P < 0,001$

Průměrná koncentrace DNA bez přidavku nosiče byla 14720 ng/ml

Vyhodnocení

Výpočtem oboustranného nepárového t-testu byla prokázána statisticky významně vyšší průměrná hodnota cfDNA u vzorků s přidavkem nosiče: nosičová RNA, Poly (A) I, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě oproti průměrné hodnotě cfDNA bez přidavku nosiče (referenční). Ve vzorcích s přidavkem nosiče: Poly (A) II, glykogen, lineární polyakrylamid a kvasinková tRNA byla průměrná hodnota cfDNA statisticky významně nižší než průměrná hodnota referenční skupiny.



Graf 1 Vliv přidavku nosiče na výtěžek cfDNA z krevní plazmy - spektrofotometrie

Koncentrace cfDNA jsou vyjádřeny průměrnou hodnotou. Chybové úsečky znázorňují hodnotu směrodatné odchylky. Osa y je uvedena v logaritmickém měřítku. Vzorek *1* bez přidavku nosiče. Vzorek *11* s přidavkem nosičové RNA. Vzorek *21* s přidavkem Poly (A) I (pokus 3A). Vzorek *31* s přidavkem Poly (A) II (pokus 3B). Vzorek *41* s přidavkem glykogenu. Vzorek *51* s přidavkem lineárního polyakrylamidu. Vzorek *61* s přidavkem kvasinkové tRNA. Vzorek *71* s přidavkem DNA ze spermatu lososa. Vzorek *81* s přidavkem DNA ze spermatu sledě.

8.1.2 Fluorimetrie

Fluorimetricky byly změřeny směsné extrakty vzorků pro každý extrakční postup v sérii 3krát (viz Tabulka 9). Vliv přidavku jednotlivých nosičů na výtěžek cfDNA hodnocených oboustranným nepárovým t-testem zobrazuje Tabulka 10 a znázorňuje Graf 2.

Tabulka 9 Koncentrace plazmatické cfDNA změřená fluorimetricky

Směsné extrakty	Typ Nosiče	c _{DNA} [ng/ml]			průměr c _{DNA} [ng/ml]	CV [%]
		1	2	3		
1-10	bez přidavku nosiče	89	90	92	90 ± 1	1,38
11-20	nosičová RNA	611	576	607	598 ± 19	3,20
21-30	Poly (A) I	791	766	816	791 ± 25	3,16
31-40	Poly (A) II	77	76	76	76 ± 0,5	0,59
41-50	glykogen	48	52	55	52 ± 3	6,60
51-60	lineární polyakrylamid	84	82	81	82 ± 2	1,95
61-70	kvasinková tRNA	51	50	44	48 ± 3	6,79
71-80	DNA ze spermatu lososa	7490	7590	7620	7567 ± 68	0,90
81-90	DNA ze spermatu sledě	7080	6950	7030	7020 ± 66	0,93

c_{DNA} - koncentrace cfDNA, CV - variační koeficient

průměrná koncentrace c_{DNA} ± směrodatná odchylka ze tří měření

Poly (A) I - přidavek polyadenylové kyseliny (pokus 3A)

Poly (A) II - přidavek polyadenylové kyseliny (pokus 3B)

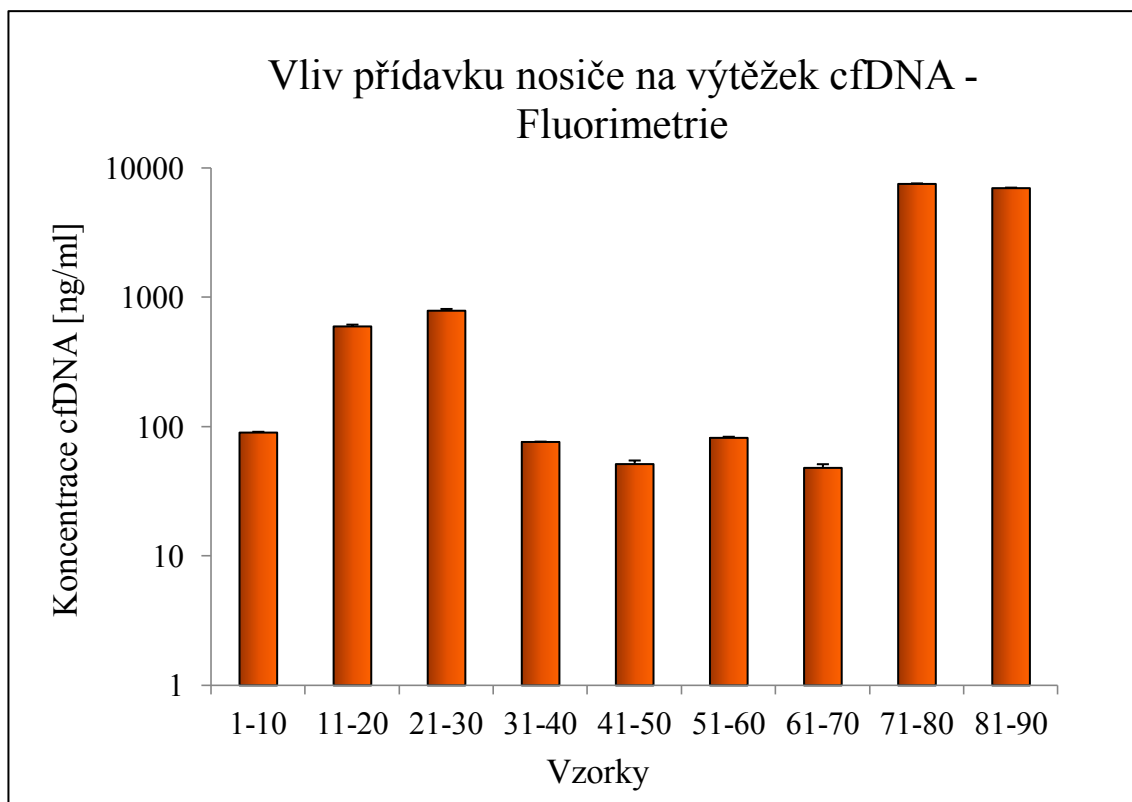
Tabulka 10 Vliv přídavku nosiče na výtěžek cfDNA - fluorimetrie

Typ Nosiče	průměr c_{DNA} [ng/ml]	rozdíl průměrů [ng/ml]	
nosičová RNA	598	508	$P < 0,001$
Poly (A) I	791	701	$P < 0,001$
Poly (A) II	76	-14	$P < 0,001$
glykogen	52	-39	$P < 0,001$
lineární polyakrylamid	82	-8	$P < 0,005$
kvasinková tRNA	48	-42	$P < 0,001$
DNA ze spermatu lososa	7567	7476	$P < 0,001$
DNA ze spermatu sledě	7020	6930	$P < 0,001$

Průměrná koncentrace DNA bez přídavku nosiče byla 90 ng/ml

Vyhodnocení

Výpočtem oboustranného nepárového t-testu byla prokázána statisticky významně vyšší průměrná hodnota cfDNA u vzorků s přídavkem nosiče: nosičová RNA, Poly (A) I, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě vůči průměrné hodnotě cfDNA bez přídavku nosiče (referenční). Ve vzorcích s přídavkem nosiče: Poly (A) II, glykogen, lineární polyakrylamid a kvasinková tRNA byla průměrná hodnota cfDNA statisticky významně nižší než průměrná hodnota referenční skupiny.



Graf 2 Vliv přidavku nosiče na výtěžek cfDNA z krevní plazmy - fluorimetrie

Koncentrace cfDNA jsou vyjádřeny průměrnou hodnotou. Chybové úsečky znázorňují hodnotu směrodatné odchylky. Osa y je uvedena v logaritmickém měřítku. Vzorky 1-10 bez přidavku nosiče. Vzorky 11-20 s přidavkem nosičové RNA. Vzorky 21-30 s přidavkem Poly (A) I (pokus 3A). Vzorky 31-40 s přidavkem Poly (A) II (pokus 3B). Vzorky 41-50 s přidavkem glykogenu. Vzorky 51-60 s přidavkem lineárního polyakrylamidu. Vzorky 61-70 s přidavkem kvasinkové tRNA. Vzorky 71-80 s přidavkem DNA ze spermatu lososa. Vzorky 81-90 s přidavkem DNA ze spermatu sledě.

8.1.3 Kvantitativní PCR

Pomocí qPCR byly proměřeny všechny analyzované vzorky (viz Tabulka 11). Vliv přidavku jednotlivých nosičů na výtěžek cfDNA hodnocených oboustranným nepárovým t-testem zobrazuje Tabulka 12 a znázorňuje Graf 3.

Tabulka 11 Koncentrace plazmatické cfDNA změřená kvantitativní PCR

	Bez přidavku nosiče		nosičová RNA		Poly (A) I		Poly (A) II		glykogen	
	c _{DNA} [ng/ml]		c _{DNA} [ng/ml]		c _{DNA} [ng/ml]		c _{DNA} [ng/ml]		c _{DNA} [ng/ml]	
	1	900	11	1000	21	1100	31	1000	41	600
	2	1000	12	1100	22	1000	32	1000	42	600
	3	1100	13	900	23	1100	33	900	43	600
	4	1100	14	1000	24	1200	34	1100	44	600
	5	900	15	1000	25	1100	35	1100	45	600
	6	900	16	1000	26	1200	36	1100	46	600
	7	1100	17	1000	27	1200	37	1100	47	700
	8	700	18	600	28	800	38	700	48	500
průměr	9	900	19	500	29	900	39	700	49	500
cDNA	10	700	20	600	30	800	40	700	50	400
[ng/ml]	930 ± 149		870 ± 216		1040 ± 158		940 ± 178		570 ± 82	
CV [%]	16,07		24,86		15,17		18,90		14,44	

	lineární polyakrylamid		kvasinková tRNA		DNA ze spermatu lososa		DNA ze spermatu sledě	
	c _{DNA} [ng/ml]		c _{DNA} [ng/ml]		c _{DNA} [ng/ml]		c _{DNA} [ng/ml]	
	51	700	61	700	71	500	81	600
	52	600	62	700	72	500	82	700
	53	700	63	600	73	400	83	600
	54	700	64	700	74	400	84	600
	55	700	65	700	75	500	85	700
	56	700	66	700	76	600	86	700
	57	700	67	800	77	500	87	700
	58	500	68	500	78	400	88	400
průměr	59	500	69	500	79	300	89	400
cDNA	60	500	70	400	80	300	90	500
[ng/ml]	630 ± 95		630 ± 125		440 ± 97		590 ± 120	
CV [%]	15,06		19,87		21,96		20,29	

c_{DNA} - koncentrace cfDNA, CV - variační koeficient

průměrná koncentrace c_{DNA} ± směrodatná odchylka z deseti měření

Poly (A) I - přidavek polyadenylové kyseliny (pokus 3A)

Poly (A) II - přidavek polyadenylové kyseliny (pokus 3B)

Tabulka 12 Vliv přídavku nosiče na výtěžek cfDNA - qPCR

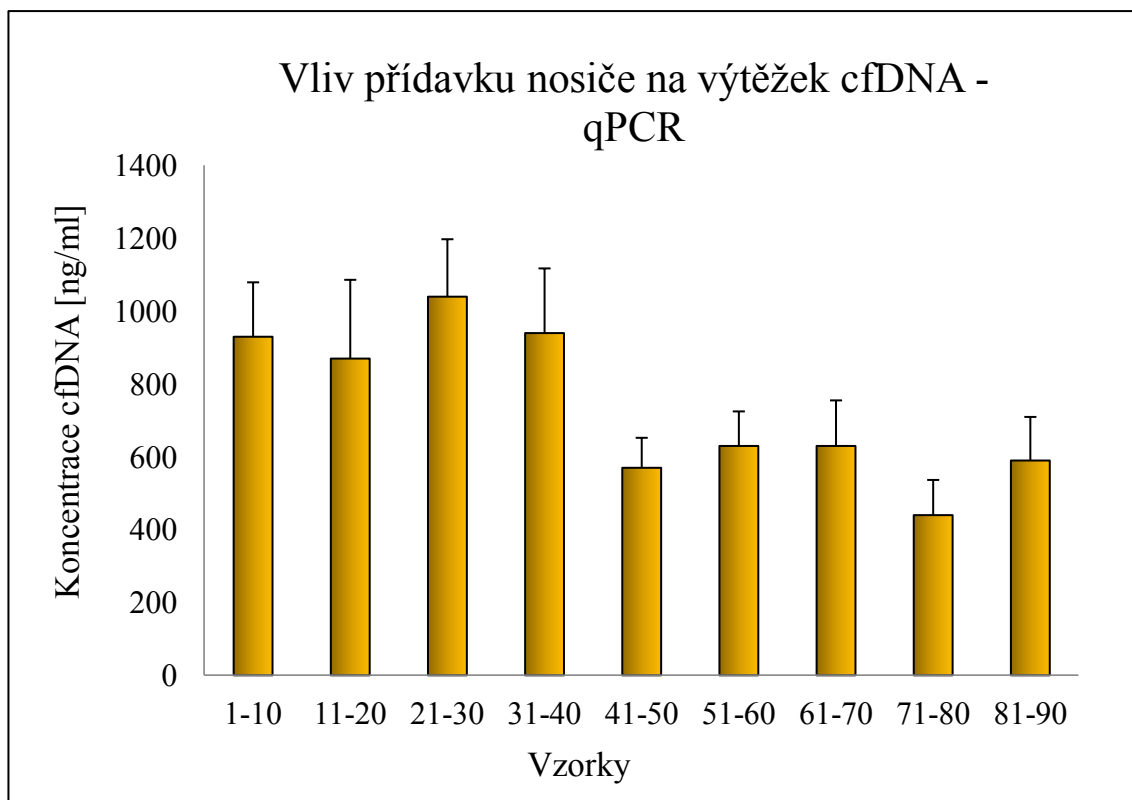
Typ Nosiče	průměr c _{DNA} [ng/ml]	rozdíl průměrů [ng/ml]	
nosičová RNA	870	-60	NS
Poly (A) I	1040	110	NS
Poly (A) II	940	10	NS
glykogen	570	-360	P < 0,001
lineární polyakrylamid	630	-300	P < 0,001
kvasinková tRNA	630	-300	P < 0,001
DNA ze spermatu lososa	440	-490	P < 0,001
DNA ze spermatu sledě	590	-340	P < 0,001

Průměrná koncentrace DNA bez přídavku nosiče byla 930 ng/ml

NS - statisticky nevýznamné

Vyhodnocení

Výpočtem oboustranného nepárového t-testu byla prokázána statisticky významně nižší průměrná hodnota cfDNA u vzorků s přídavkem nosiče: glykogen, lineární polyakrylamid, kvasinková tRNA, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě vzhledem k průměrné hodnotě cfDNA bez přídavku nosiče. V případě vzorků s přídavkem nosičové RNA, Poly (A) I a Poly (A) II byly rozdíly mezi průměrnými hodnotami cfDNA oproti referenční skupině statisticky nevýznamné. Pozitivní účinek nosiče na výtěžnost cfDNA byl zaznamenán pouze v případě přídavku Poly (A) I (výtěžek cfDNA se zvýšil o 110 ng/ml vůči referenční skupině).



Graf 3 Vliv přidavku nosiče na výtěžek cfDNA z krevní plazmy - qPCR

Koncentrace cfDNA jsou vyjádřeny průměrnou hodnotou. Chybové úsečky znázorňují hodnotu směrodatné odchylky. Osa y je uvedena v logaritmickém měřítku. Vzorky *1-10* bez přidavku nosiče. Vzorky *11-20* s přidavkem nosičové RNA. Vzorky *21-30* s přidavkem Poly (A) I (pokus 3A). Vzorky *31-40* s přidavkem Poly (A) II (pokus 3B). Vzorky *41-50* s přidavkem glykogenu. Vzorky *51-60* s přidavkem lineárního polyakrylamidu. Vzorky *61-70* s přidavkem kvasinkové tRNA. Vzorky *71-80* s přidavkem DNA ze spermatu lososa. Vzorky *81-90* s přidavkem DNA ze spermatu sledě.

Shrnutí

Průměrné hodnoty koncentrace plazmatické cfDNA změřené spektrofotometricky, fluorimetricky a qPCR shrnuje Tabulka 13.

Tabulka 13 Průměrné hodnoty koncentrace cfDNA dle kvantifikační metody

Vzorky	Typ Nosiče	Spektrofotometrie		Fluorimetrie		qPCR	
		c _{DNA} [ng/ml]	CV [%]	c _{DNA} [ng/ml]	CV [%]	c _{DNA} [ng/ml]	CV [%]
1-10	bez přídavku nosiče	14720 ± 1070	7,27	90 ± 1	1,38	930 ± 149	16,07
11-20	nosičová RNA	231960 ± 1530	0,66	598 ± 19	3,20	870 ± 216	24,86
21-30	Poly (A) I	59620 ± 1360	2,28	791 ± 25	3,16	1040 ± 158	15,17
31-40	Poly (A) II	10780 ± 840	7,79	76 ± 0,5	0,59	940 ± 178	18,90
41-50	glykogen	8720 ± 880	10,09	52 ± 3	6,60	570 ± 82	14,44
51-60	lineární polyakrylamid	9820 ± 1140	11,61	82 ± 2	1,95	630 ± 95	15,06
61-70	kvasinková tRNA	7580 ± 1190	15,70	48 ± 3	6,79	630 ± 125	19,87
71-80	DNA ze spermatu lososa	90960 ± 1940	2,13	7567 ± 68	0,90	440 ± 97	21,96
81-90	DNA ze spermatu sledě	115020 ± 1770	1,54	7020 ± 66	0,93	590 ± 120	20,29

c_{DNA} - průměrná koncentrace cfDNA ± směrodatná odchylka, CV - variační koeficient

Poly (A) I - přídavek polyadenylové kyseliny (pokus 3A)

Poly (A) II - přídavek polyadenylové kyseliny (pokus 3B)

8.2 Vliv délky inkubační doby na koncentraci a amplifikovatelnost eluátu cfDNA

Vzhledem k negativnímu účinku nosičů z testovaných skupin 41 - 90 (viz kapitola 8.1.3) byly pro tento pokus náhodně vybrány celkem 4 vzorky z testovaných skupin 1-10, 11-20, 21-30 a 31-40. Cílem pokusu bylo zjistit vliv rozdílné délky inkubační doby (6 a 12 minut) na koncentraci a amplifikovatelnost eluátu cfDNA inkubovaného v termobloku při 90 °C (závěrečný krok extrakčního postupu).

V jednotlivých zkumavkách 1, 12, 25 a 40 byl zjištěn přesný objem eluátu. Následně byl doplněn pufrem AE (Qiagen) na výsledný objem 70 µl a rozdělen do dvou 1,5 ml zkumavek. Vzorky byly kvantifikovány pomocí qPCR postupem popsáním v kapitole 7.2.3. Naměřené hodnoty koncentrace eluátu cfDNA po inkubaci zkumavek v termobloku při 90 °C zobrazuje Tabulka 14 a Graf 4.

Tabulka 14 Hodnoty koncentrace cfDNA v závislosti na délce inkubační doby

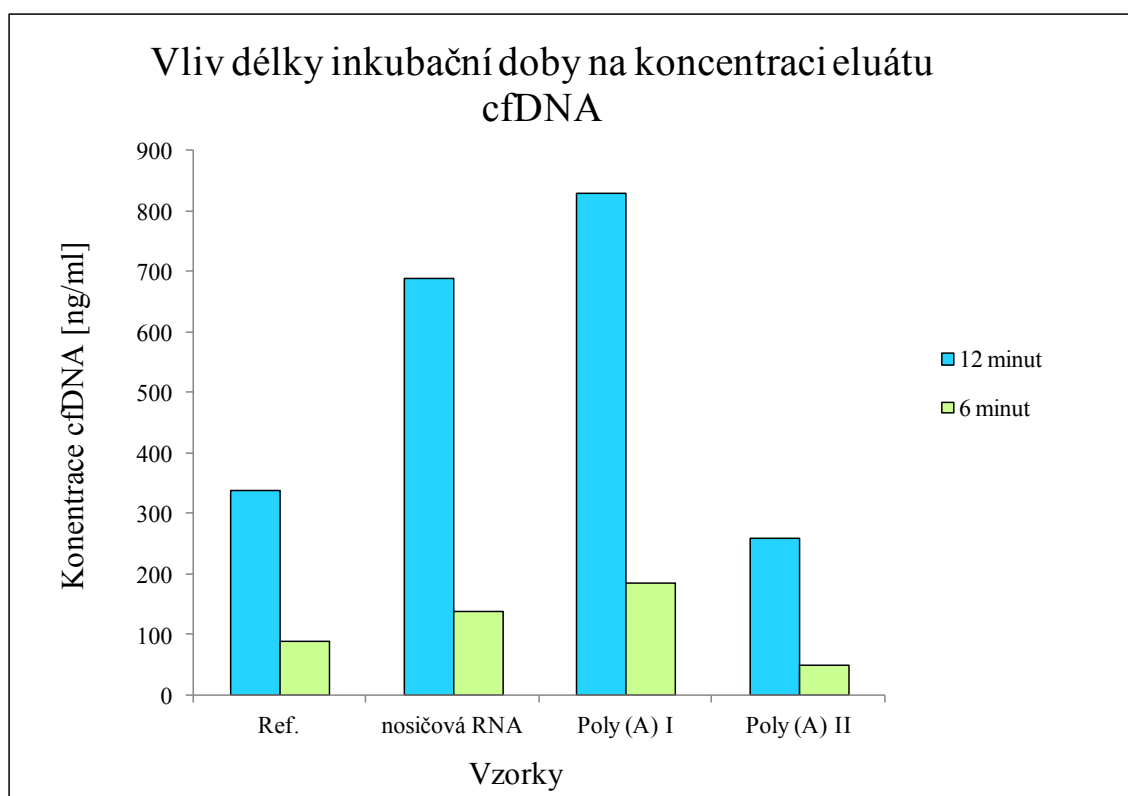
	A	B	
	c _{DNA} [ng/ml]	c _{DNA} [ng/ml]	c _{DNA} [ng/ml]
Ref.	340	90	90
nosičová RNA	690	140	140
Poly (A) I	830	180	190
Poly (A) II	260	50	50
doba inkubace	12 minut	6 minut	

c_{DNA} - koncentrace cfDNA

Eluáty cfDNA skupiny A i B byly inkubovány v termobloku při teplotě 90 °C

Ref. - bez přídavku nosiče, Poly (A) I - přídavek polyadenylové kyseliny (pokus 3A)

Poly (A) II - přídavek polyadenylové kyseliny (pokus 3B)



Graf 4 Vliv délky inkubační doby na koncentraci cfDNA v termobloku při 90 °C

Vyhodnocení:

Z výsledků vyplývá, že při delší inkubační době (12 min) dochází až k pětinasobnému nárůstu hodnoty koncentrace cfDNA.

9 Diskuze

Účelem této práce bylo posoudit vliv přídavku nosičových molekul na výtěžek cfDNA ze vzorků směsné krevní plazmy. Izolace DNA byla provedena mikrokolonkovou extrakční metodou NucleoSpin Plasma XS od firmy Macherey-Nagel, která je vhodná pro extrakci fragmentů DNA délky 50 - 1000 bp [22][85]. Vzorek směsné plazmy byl rozdělen do 9 skupin po 10 alikvotech (pro 9 nezávislých extrakčních pokusů). Celkem bylo použito 7 typů nosičů (nosičová RNA, polyadenylová kyselina, glykogen, lineární polyakrylamid, kvasinková tRNA, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě).

Nejprve byly vybrané vzorky, vždy jeden z každé skupiny, změřeny přístrojem NanoDrop pro obecné posouzení vlivu optických charakteristik (interference) jednotlivých nosičů na spektrofotometrickou analýzu v UV oblasti světla. Použitý analyzátor dokáže stanovit koncentraci DNA v rozmezí 2 000 - 3 700 000 ng/ml. Při měření hodnot o koncentraci nižší než 5 000 ng/ml, dochází ke snížení citlivosti a přesnosti (dle předchozí práce kolegyně Totzauerové) [22]. Dále i molekula RNA absorbuje záření při stejné vlnové délce jako molekula DNA. Z těchto důvodů nemá spektrofotometrické stanovení cfDNA velký význam a získané hodnoty lze považovat pouze za orientační. Použitím této metody byly naměřeny statisticky významně vyšší hladiny koncentrace cfDNA u vzorků s přídavkem nosiče, který je tvořený nukleovou kyselinou - vzorky č. 11, 21, 71 a 81 (nosičová RNA, Poly (A) I, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě). U eluátu s přídavkem nosičové RNA (231960 ± 1530 ng/ml) byla naměřena 15krát vyšší koncentrace proti referenčnímu vzorku (14720 ± 1070 ng/ml).

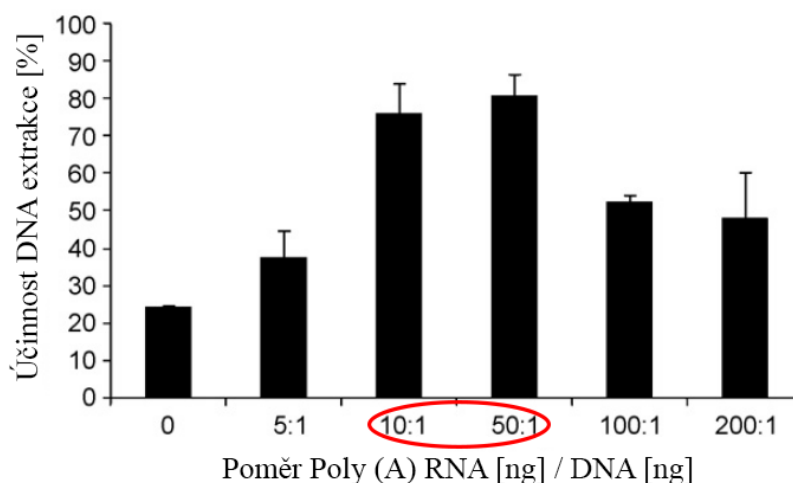
Poté byla koncentrace plazmatické DNA ve směsných extraktech stanovena fluorimetricky soupravou Qubit dsDNA HS Assay Kit, která je vysoce specifická pro dvouvláknovou DNA. Stejně jako u spektrofotometrického stanovení, byly i zde naměřeny statisticky významně vyšší hladiny DNA u vzorků s přídavkem nosiče, jehož základem je interferující nukleová kyselina, a to především molekula DNA. Například ve směsných extraktech 71-80 s přídavkem DNA ze spermatu lososa (7567 ± 68 ng/ml) a 81-90 s přídavkem DNA ze spermatu sledě (7020 ± 66 ng/ml) byla naměřena 80krát vyšší koncentrace DNA oproti referenčnímu vzorku (90 ± 1 ng/ml).

Ve většině studií, zmíněných v teoretické části, byla pro kvantifikaci DNA použita metoda real-time PCR a to především proto, že kvantifikace probíhá na základě amplifikace specifického úseku DNA (vysoce citlivá a specifická metoda). V této práci byly všechny vyizolované extrakty stanoveny kitem gb Genetic Human DNA, který slouží k detekci a kvantifikaci specifického úseku genu *POLR2A* v lidské genomové DNA. U vzorků ze skupiny 21-30, ke kterým byla během extrakční procedury přidána polyadenylová kyselina o finální koncentraci 1,55 µg/ml (Poly (A) I), byl zaznamenán pozitivní účinek nosiče na množství eluované cfDNA (výtěžek se zvýšil o 110 ng/ml) oproti referenční skupině. Statisticky významné rozdíly průměrných hodnot cfDNA prokázány nebyly. Vzhledem k malému počtu pozorování by bylo vhodné extrakční proceduru s přidavkem Poly (A) I zopakovat na větším souboru. Přídavek nosičové RNA a Poly (A) II se na množství získané plazmatické DNA statisticky významně neprojevil. Ve zbylých případech měl přídavek nosiče na výtěžek cfDNA statisticky významně negativní účinek (glykogen, lineární polyakrylamid, kvasinková tRNA, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě).

Výsledky byly porovnány s dalšími studii, které se zabývaly obdobnou tematikou. Nicméně v některých z těchto studií byl přídavek nosiče zmíněn pouze v extrakčním protokolu, ale vliv nosiče na výtěžek cfDNA okomentován nebyl [97][98].

Podobných výsledků jako v naší práci bylo dosaženo ve studii Kishore et al. [91], kteří testovali vliv přídavku glykogenu (Sigma Chemical) a Poly (A) RNA nosiče (Qiagen) na automatických systémech BioRobot EZ1 a BioRobot M48, které jsou založeny na kolonkových metodách. K ředěným vzorkům krve a spermatu byl přidán 1 µg nosiče Poly (A) RNA a 100 µg glykogenu. Výtěžky DNA byly kvantifikovány pomocí real-time PCR. V extraktech s přidavkem glykogenu byly získány nižší výtěžky plazmatické DNA v porovnání se vzorky bez nosiče. Přídavek tohoto nosiče měl na výtěžek DNA spíše nepříznivý efekt. V případě přídavku Poly (A) RNA byl zaznamenán signifikantně vyšší výtěžek plazmatické DNA, a to jak ve zředěných vzorcích krve (4krát), tak u zředěných vzorků spermatu (40krát) v porovnání se vzorky bez přídavku Poly (A) RNA. Dále bylo zjištěno, že přídavek nosiče RNA nijak neovlivňuje následnou analýzu extraktů DNA (kvantifikace DNA pomocí kvantitativní PCR nebo STR analýzy) [91].

Vliv nosiče Poly (A) RNA na výtěžek DNA byl zmíněn také ve studii Shaw et al. [92], kteří se zabývali jeho působením na účinnost DNA extrakce na tuhé fázi pomocí monolitových kolonek mikrofluidního zařízení. Poly (A) RNA nosič (Qiagen) byl přidán do roztoku chaotropních solí (guanidin hydrochlorid). K určení koncentrace DNA byla použita souprava Quanti-iT™ PicoGreen (Invitrogen). Vzorky lidských buňkových buněk byly nejdříve extrahovány použitím QIAamp DNA Micro Kits (Qiagen). Následně byl alikvot DNA zároveň s Poly (A) RNA nosičem (1 000 µg/ml) přidán v daném poměru RNA/DNA k roztoku 5 M guanidin hydrochloridu a zpracován na monolitové kolonce mikrofluidního zařízení. Účinnost DNA extrakce (viz Obrázek 6) byla vypočítána v procentech, a to poměrem množství DNA výtěžku získaného během elučního kroku k množství DNA přidané do reakce [92].



Obrázek 6 Poměrné zastoupení RNA/DNA

Zdroj: Modifikováno dle [92].

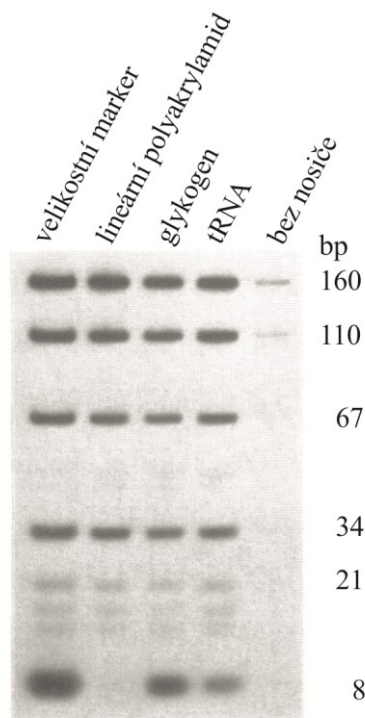
Pro dosažení maximální účinnosti DNA extrakce (100 %) autoři doporučují použít množství Poly (A) RNA nosiče/DNA v rozmezí 10:1 a 50:1 (poměry zvolené mimo tuto rozmezí nezaručí maximální výtěžek DNA). Původní množství DNA bylo stanovováno v rozmezí 1 ng až 100 ng. U všech vzorků, ke kterým bylo přidáno ≤ 25 ng DNA, bylo dosaženo 100 % účinnosti. Výtěžky plazmatické DNA s přidavkem nosiče Poly (A) RNA byly 5krát vyšší oproti analyzovaným vzorkům bez nosiče [75][92]. Kladný účinek nosiče Poly (A) RNA na výtěžek DNA byl potvrzen i v naší práci.

Pozitivní efekt přidavku glykogenu na výtěžek DNA byl prokázán ve studii Heath et al. [93], kteří použili jako zdroj biologického materiálu sběr bukalních buněk. Tento materiál lze použít ve forenzní diagnostice jako alternativní zdroj DNA pro klinické testování. Vliv přidavku proteinasy K a glykogenu ověřili na soupravě PUREGENE DNA Tissue Kit (Gentra Systems Inc). Purifikační protokol byl modifikován ve dvou případech:

- a) při lýze buněk bylo ke vzorku přidáno 15 μ l proteinasy K o koncentraci 20 000 μ g/ml.
- b) při precipitaci DNA isopropanolem bylo ke vzorku přidáno 5 μ l roztoku glykogenu o koncentraci 20 000 μ g/ml.

Výtěžky DNA byly změřeny kvantitativní PCR. Přidání proteinasy K a glykogenu vedlo k signifikantnímu nárůstu výtěžku DNA v porovnání se vzorky bez proteinasy K a glykogenu. Výtěžky DNA byly získány v rozmezí 12 μ g až 60 μ g [93]. V našem případě jsme kvůli použití odlišné extrakční metody stejné výsledky nepotvrdili. Ke vzorkům krevní plazmy bylo přidáno 16 μ l glykogenu o finální koncentraci 20 μ g/ml. Přídavek glykogenu měl spíše negativní vliv na výtěžek cfDNA (570 ± 82 ng/ml) vůči referenčnímu vzorku (930 ± 149 ng/ml), kdy se koncentrace snížila téměř o jednu třetinu.

Gaillard a Strauss [76] použili lineární polyakrylamid (LPA) při etanolové precipitaci pikogramového množství DNA. Přídavkem nosiče LPA byly vysráženy kompletně všechny fragmenty DNA delší než 20 bp (viz Obrázek 7). V případě vzorku bez přidavku nosiče byla téměř všechna DNA ztracena. Vzhledem k tomu, že fragmenty DNA kratší než 20 bp s LPA nekoprecipitují, lze LPA využít při separaci značené DNA od nenavázaných nukleotidů během precipitace. Pro detekci fragmentů kratších než 20 bp je vhodnější při etanolové precipitaci použít glykogen nebo tRNA [76]. V naší práci při použití mikrokolonkové extrakční metody byly výsledky odlišné. Po přidání 25,8 μ l LPA o finální koncentraci 20 μ g/ml ke vzorkům směsné plazmy se výtěžnost snížila téměř o jednu třetinu (630 ± 95 ng/ml) oproti referenčnímu vzorku (930 ± 149 ng/ml).



Obrázek 7 Precipitace DNA fragmentů v přítomnosti LPA, glykogenu a tRNA

Zdroj: Modifikováno dle [76].

Cheung et al. [94] popsali rychlou a citlivou metodu pro detekci molekuly RNA viru hepatitidy C (HCV). Pro izolaci nukleové kyseliny použili silikagelové částice a pro detekci modifikovanou reverzně transkriptasovou-PCR. Před vlastní purifikací molekuly RNA byly k ředěným vzorkům pozitivních na HCV virus přidány nosiče tRNA (Bethesda Research Laboratories) a DNA ze spermatu lososa (Sigma), oba dva o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Změnou objemu přidaného nosiče jak tRNA, tak DNA ze spermatu lososa došlo ke změně výtěžku HCV RNA. V přítomnosti 100 μl a 10 μl nosiče DNA ze spermatu lososa byly výtěžky HCV RNA 1000krát nižší, zatímco po přidání 1 μl nosiče byly výtěžky HCV RNA sníženy 100krát a po přidavku 0,1 μl DNA ze spermatu lososa již k poklesu nedošlo. Obdobně pak v případě přidání 100 μl nosiče tRNA se výtěžky HCV RNA snížili 100krát. Z uvedených výsledků lze usuzovat, že přidání cizorodé nukleové kyseliny v podobě DNA ze spermatu lososa nebo tRNA, snižuje vaznost cílené RNA na silikagelové částice a tím i výtěžek HCV RNA [94]. Také v našem případě přídavek těchto nosičů negativně ovlivnil výtěžek cfDNA. Po přidání 12,5 μl kvasinkové tRNA o finální koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrace cfDNA klesla o jednu třetinu ($630 \pm 125 \text{ ng/ml}$) oproti referenčnímu vzorku ($930 \pm 149 \text{ ng/ml}$).

V případě přidavku 25,8 μ l DNA ze spermatu lososa o finální koncentraci 20 μ g/ml se koncentrace cfDNA snížila téměř o polovinu (440 ± 97 ng/ml) vůči referenčnímu vzorku.

Vliv přidavku nosiče Poly (A) RNA a DNA ze spermatu lososa (ssDNA) na výtěžek DNA byl sledován i ve studii Schiffner et al. [95]. Vzorky z bukálních stěrů sliznic byly purifikovány za použití centrifugačních filtrů (Microcon, Millipore). Výsledky popisují signifikantně vyšší výtěžek DNA v případě přidavku obou nosičů 1 ng Poly (A) RNA a 1 ng DNA ze spermatu lososa. Nicméně v přítomnosti DNA ze spermatu lososa mohou vznikat nežádoucí amplikony, a proto autoři upřednostňují používat nosič Poly (A) RNA [95].

Sanders et al. [96] porovnávali kvantitativní metody qPCR a digitální PCR (dPCR) při měření malého množství (< 200 kopií) DNA. Pro zhodnocení přesnosti, citlivosti a reprodukovatelnosti metody dPCR použili různé templátové DNA a matrice. Během příprav templátových DNA byl k analyzovaným vzorkům přidán nosič DNA ze spermatu lososa o koncentraci 50 μ g/ml (Agilent). Přidaný nosič neměl výrazný vliv na stanovené množství DNA, ale v jeho přítomnosti byla zvýšena přesnost měření dPCR [96].

Leary et al. [97] se zabývali studiem citlivé kolorimetrické metody založené na vizualizaci biotinem značených DNA sond hybridizovaných na DNA nebo RNA, které jsou imobilizované na nitrocelulózové membráně, tzv. bio-blotování. Aby zabránili nespecifickému navázání hybridizačních sond, tak v kroku přípravy prehybridizačních a hybridizačních pufrů použili přísadu sonikované DNA ze spermatu sledě (Sigma) o koncentraci 250 - 500 μ g/ml. Při porovnávání citlivosti detekčních metod bylo k jednotlivým vzorkům vždy přidáno 7,5 μ g nosičové DNA ze spermatu sledě [97].

Gersberg et al. [98] testovali kvalitu mořské vody vybraných rekreačních středisek ve Spojených státech a Mexiku. Zjišťovali korelaci mezi hladinou konvenčních fekálních indikátorů, jako jsou *Escherichia coli* a enterokoky, s hladinou viru hepatitidy A (HAV) a enterovirů. K analyzovaným vzorkům vody byla přidána nosičová DNA ze spermatu sledě o koncentraci 0,005 μ g/ml. Množství HAV a enterovirů ve vzorcích bylo stanoveno pomocí kvantitativní reverzní transkriptasové-PCR (qRT-PCR) [98].

Obdobně jako v naší práci se Beránek et al. [89] zabývali vlivem přidavku různých nosičových molekul na výtěžnost ctDNA. Vzorky krevní plazmy (EDTA) pocházely

od pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem. Jednotlivé nosiče byly přidány ke vzorkům krevní plazmy před extrakcí mikrokolonkovou metodou (NucleoSpin Plasma XS, Macherey-Nagel). Extrakty byly vyhodnoceny kvantitativní real-time PCR. Výsledky této studie korelují s výsledky naší práce. Signifikantně pozitivní účinek na množství eluované ctDNA ($p < 0,05$) byl prokázán pouze po přidavku 4 μg polyadenylové kyseliny. Ostatní nosiče neměly žádný (nosičová RNA) nebo negativní účinek (glykogen, lineární polyakrylamid, kvasinková tRNA, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě) na výtěžek ctDNA [89]. Dle již zmíněné studie Shaw et al. [92] pro zachování maximální účinnosti DNA extrakce byl nosič Poly (A) RNA přidán v poměru 12:1 (RNA/DNA). Nosičová RNA byla přidána v poměru 50:1, avšak bez efektu na výtěžnost ctDNA [89]. Mechanismus, kterým nosič RNA zvyšuje výtěžek DNA při mikrokolonkové extrakci není prozatím znám [91]. Při jeho použití je tedy potřeba brát zřetel na správný poměr RNA/DNA, nicméně i délka Poly (A) vláken a jejich uspořádání v prostoru by pravděpodobně mohly ovlivnit extrakční proces [89].

Dle doporučení výrobce byly při naší experimentální práci v posledním kroku extrakční procedury vloženy otevřené zkumavky s eluátem cfDNA na 8 minut do předem vyhřátého termobloku na 90 °C. Tento krok je důležitý pro odstranění zbytkových stop etanolu a pro zajištění vyšší citlivosti PCR reakce [85]. Tímto způsobem bylo zpracováno všech 90 alikvotů, jejichž eluční objem byl 35 μl . Je uváděno, že při elučním objemu 20 μl dojde k odpaření vzorku na objem 12 - 14 μl [85].

Závěrečným cílem této práce bylo porovnat vliv délky inkubační doby na koncentraci a amplifikovatelnost cfDNA. Vybrané zkumavky s eluáty cfDNA byly rozděleny do 2 skupin, každý z eluátů měl objem 35 μl . Následně byly otevřené zkumavky vloženy do termobloku (90 °C), první skupina A na 12 minut a druhá skupina B na 6 minut. Ve skupině A došlo k odpaření 22 - 24 μl a ve skupině B se odpařilo 11 - 13 μl . Při prodloužení inkubační doby na 12 minut se koncentrace cfDNA zvýšila až pětinasobně. Zakoncentrováním eluátu se účinnost amplifikace templátu DNA významně nezměnila. Při real-time PCR nebyly v testovaných skupinách zjištěny statisticky významné rozdíly v hodnotách Ct (viz Tabulka 15). Přítomnost inhibitorů PCR reakce a enzymů nukleas (DNAs) prokázána nebyla.

Tabulka 15 Účinnost amplifikace real-time PCR

	Ct hodnota	
	12 minut	6 minut
Ref.	28,15	29,26
nosičová RNA	27,56	28,93
Poly (A) I	27,42	28,68
Poly (A) II	28,40	29,71

Ct hodnota - *threshold cycle*

Eluáty cfDNA byly inkubovány v termobloku při teplotě 90 °C

Ref. - bez přídavku nosiče, Poly (A) I - přídavek polyadenylové kyseliny (pokus 3A)

Poly (A) II - přídavek polyadenylové kyseliny (pokus 3B)

Podobných výsledků bylo dosaženo ve studii Bronkhorst et al. [34], kteří rozdělili růstové médium do tří 6 ml zkumavek, které byly evaparovány v zařízení SpeedVac na celkový objem 2,5 ml. Koncentrace cfDNA se v každém z testovaných vzorků zvýšila v průměru 2,33krát \pm 0,2 [34]. Z výsledků vyplývá, že finální krok extrakce je velice důležitý a neměl by být opomíjen.

10 Závěr

Hlavním cílem diplomové práce bylo zjistit vliv přidavku různých nosičových molekul na výtěžnost cfDNA ze vzorků krevní plazmy. Modifikace extrakčního protokolu by mohla napomoci optimalizaci standardizace analýzy cfDNA.

Ze vzorku směsné plazmy bylo získáno celkem 90 alikvotů, které byly rozděleny do 9 skupin (extrakčních pokusů) dle typu nosiče a zpracovány soupravou NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel). Testovanými nosiči byly: RNA carrier (Qiagen), Glycogen (Invitrogen), Poly (A) Polyadenylic acid (Roche), Linear Acrylamide (Invitrogen), Yeast transfer RNA (Ambion), Salmon sperm DNA (Invitrogen), Herring sperm DNA (Promega).

Předpokládaná optická interference některých nosičů (nosičová RNA, polyadenylová kyselina, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě) byla potvrzena spektrofotometrickou analýzou eluátů cfDNA v UV oblasti světla. V případě přidání těchto nosičů byly spektrofotometricky změřeny statisticky významně vyšší koncentrace cfDNA (15krát) oproti referenční skupině. Vzhledem ke specifitě fluorimetrického stanovení, byly vlivem přidavku interferující molekuly DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě změřeny statisticky významně vyšší hladiny cfDNA (80krát) v porovnání s referenčním vzorkem.

Zhodnocením výsledků, kvantitativní real-time PCR, byl zaznamenán pozitivní účinek na množství eluované cfDNA pouze v případě polyadenylové kyseliny o finální koncentraci 1,55 $\mu\text{g/ml}$, avšak výtěžnost cfDNA se signifikantně nezměnila. Přídavek nosičové RNA a polyadenylové kyseliny o koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$ se na množství získané plazmatické DNA statisticky významně neprojevil. Ve zbylých případech měl přídavek nosiče na výtěžek cfDNA negativní účinek (glykogen, lineární polyakrylamid, kvasinková tRNA, DNA ze spermatu lososa a DNA ze spermatu sledě). Na základě těchto poznatků byl jako nevhodnější nosič pro rutinní izolaci cfDNA soupravou NucleoSpin Plasma XS, ze vzorků krevní plazmy, vyhodnocen přídavek polyadenylové kyseliny o finální koncentraci 1,55 $\mu\text{g/ml}$.

Při testování vlivu délky inkubační doby na koncentraci a amplifikovatelnost eluátu cfDNA ve zkumavkách vložených do termobloku o teplotě 90 °C bylo zjištěno, že prodloužením inkubační doby z 6 na 12 minut se koncentrace cfDNA zvýšila pětinašobně, ale ke změně účinnosti amplifikace templátu DNA nedošlo.

11 Seznam tabulek

Tabulka 1 Souhrnný přehled hlavních rozdílů mezi DNA a RNA	16
Tabulka 2 Hodnoty koncentrací cfDNA v plazmě a séru zdravých jedinců.....	21
Tabulka 3 Výsledky porovnání extrakčních souprav pro detekci cfDNA.....	31
Tabulka 4 Komerčně dodané chemikálie.....	39
Tabulka 5 Použité přístroje	43
Tabulka 6 Přídatky a finální koncentrace použitých nosičů	46
Tabulka 7 Koncentrace plazmatické cfDNA změřená spektrofotometricky	50
Tabulka 8 Vliv přídatku nosiče na výtěžek cfDNA - spektrofotometrie	51
Tabulka 9 Koncentrace plazmatické cfDNA změřená fluorimetricky	53
Tabulka 10 Vliv přídatku nosiče na výtěžek cfDNA - fluorimetrie	54
Tabulka 11 Koncentrace plazmatické cfDNA změřená kvantitativní PCR.....	56
Tabulka 12 Vliv přídatku nosiče na výtěžek cfDNA - qPCR.....	57
Tabulka 13 Průměrné hodnoty koncentrace cfDNA dle kvantifikační metody.....	59
Tabulka 14 Hodnoty koncentrace cfDNA v závislosti na délce inkubační doby	60
Tabulka 15 Účinnost amplifikace real-time PCR	68

12 Seznam obrázků

Obrázek 1	Strukturní složky nukleových kyselin	13
Obrázek 2	Rozložení bází na koncích cfDNA fragmentů sekvenční analýzou	20
Obrázek 3	Mechanismus uvolňování extracelulárních nukleových kyselin.....	22
Obrázek 4	Preanalytické faktory, které ovlivňují stanovení cfDNA	23
Obrázek 5	Hladina sérových nukleosomů zdravých jedinců a pacientů dle choroby.....	30
Obrázek 6	Poměrné zastoupení RNA/DNA	63
Obrázek 7	Precipitace DNA fragmentů v přítomnosti LPA, glykogenu a tRNA.....	65

13 Seznam grafů

Graf 1 Vliv přídavku nosiče na výtěžek cfDNA z krevní plazmy - spektrofotometrie ..	52
Graf 2 Vliv přídavku nosiče na výtěžek cfDNA z krevní plazmy - fluorimetrie	55
Graf 3 Vliv přídavku nosiče na výtěžek cfDNA z krevní plazmy - qPCR.....	58
Graf 4 Vliv délky inkubační doby na koncentraci cfDNA v termobloku při 90 °C.....	60

14 Seznam použitých zkratek

A	adenin
AE	pufr obsahující TRIS a EDTA
AL	pufr obsahující guanidin hydrochlorid
AVE	pufr obsahující 0,04% azid sodný
BB	pufr obsahující guanidium thiokyanát a etanol
bp	páry bází
C	cytosin
cDNA	komplementární DNA
cfDNA	volná cirkulující fragmentovaná DNA
cffDNA	volná cirkulující fetální fragmentovaná DNA
CRC	kolorektální karcinom
Ct	threshold cycle
ctDNA	volná cirkulující nádorová fragmentovaná DNA
CV	variační koeficient
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNasa	deoxyribonukleasa
dsDNA	dvouvláknová DNA
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
G	guanin
gDNA	genomová DNA
HCV	virus hepatitidy C
HDR	homologní rekombinace, oprava dvouřetězcových DNA zlomů
IPC	interní pozitivní kontrola
lncRNA	dlouhé nekódující molekuly RNA
LOH	ztráta heterozygosity
LPA	lineární polyakrylamid
miRNA	mikroRNA, malá nekódující molekula RNA
mRNA	mediátorová (informační) RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
NHEJ	nehomologní spojování konců, oprava dvouřetězcových DNA zlomů

NIPT	neinvazivní prenatální testování
NK	nukleová kyselina
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
PCR	polymerasová řetězová reakce
Poly (A) I	polyadenylová kyselina o finální koncentraci 1,55 µg/ml
Poly (A) II	polyadenylová kyselina o finální koncentraci 0,1 µg/ml
Poly (A)	polyadenylová kyselina
qPCR	kvantitativní real-time PCR
qRT-PCR	kvantitativní reverzní transkriptasová polymerasová řetězová reakce
RIA	radioimunoanalýza
RNA	ribonukleová kyselina
RNasa	ribonukleasa
rRNA	ribosomální RNA
siRNA	krátká interferující RNA
snoRNA	malá jadéřková RNA
snRNA	malá jaderná RNA
ssDNA	jednovláknová DNA
STR	mikrosatelity
T	thymin
TdT	terminální deoxynukleotidyl transferasa
TE	pufr obsahující TRIS a EDTA
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová RNA
U	uracil
WB	promývací pufr obsahující etanol

15 Použitá literatura

- [1] *DNA from the Beginning: DNA and proteins are key molecules of the cell nucleus* [online]. [cit. 4. 8. 2016].
Dostupné z: <http://www.dnaftb.org/15/bio>
- [2] *Phoebus Levene: American chemist* [online]. [cit. 4. 8. 2016]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/biography/Phoebus-Aaron-Theodor-Levene>
- [3] AVERY O., MACLEOD C., MCCARTY M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of Experimental Medicine*. **1944**, roč. 79, č. 2, s. 137-158.
- [4] WATSON J. D. a CRICK F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. **1953**, roč. 171, č. 4356, s. 737-738.
- [5] *MLA style: "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962"*. *Nobelprize.org* [online]. [cit. 4. 8. 2016].
Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962
- [6] CRICK F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*. **1970**, roč. 227, s. 561-563.
- [7] SNUSTAD D., SIMMONS P. a SIMMONS M. J. et al. *Genetika*. Přeložil MATALOVÁ A. Brno: Masarykova univerzita, **2009**. 894 s.
ISBN 978-80-210-4852-2.
- [8] Přednášky z Molekulární biologie pro obor Zdravotnická bioanalytika. *Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze*. roč. **2013/2014**.
- [9] BERÁNEK M. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, **2016**. 194 s. ISBN 978-80-246-3224-7.
- [10] Přednášky z Molekulární genetiky pro obor Zdravotnická bioanalytika. *Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze*. roč. **2014/2015**.
- [11] ROSYPAL S., ROSYPALOVÁ A., VONDREJS V. *Molekulární genetika*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, **1989**. 351 s. ISBN 80-04-23117-9.

- [12] KRUPOVIC M. a FORTERRE P. Single-stranded DNA viruses employ a variety of mechanisms for integration into host genomes. *Annals of The New York Academy of Sciences*. **2015**, roč. 1341, s. 41-53.
- [13] SEMBER A. *Centrální dogma molekulární biologie*. [oline]. [cit. 8. 8. 2016].
Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3710505>
- [14] OTOVÁ B. a MIHALOVÁ R. *Základy biologie a genetiky člověka*. V Praze: Karolinum, **2012**. 227 s. ISBN 978-80-246-2109-8.
- [15] VONKA V. *Kapitoly z molekulové biologie*. Jinočany: H & H, **1992**. 246 s. ISBN 80-85467-93-3.
- [16] RICH A. a KIM S. H. The free-dimensional structure of transfer RNA. *Scientific American*. **1978**, roč. 1, s. 52-62.
- [17] ROLLE K., PIWECKA M., BELTER A. et al. The sequence and structure determine the function of mature human miRNAs. *PLoS ONE* [online]. **2016**, roč. 11, č. 3 [cit. 9. 8. 2016]. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article>
- [18] PETERS D. L. a PRETORIUS P. J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA-a new paradigm in genetic behaviour. *Clinica Chimica Acta*. **2011**, roč. 412, s. 806-811.
- [19] SWARUP V. a RAJESWARI M. R. Circulating (cell-free) nucleic acids - A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters*. **2007**, roč. 581, s. 795-799.
- [20] ANKER P., LYAUTEY J., LEDERREY C. et al. Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clinica Chimica Acta*. **2001**, roč. 313, s. 143-146.
- [21] MITTRA I., NAIR N. K., MISHRA P. K. Nucleic acids in circulation: Are they harmful to the host? *Journal of Biosciences*. **2012**, roč. 37, s. 301-312.
- [22] TOTZAUEROVÁ, K. *Volné cirkulující nukleové kyseliny v krevní plazmě*. Hradec Králové, **2015**. 68 s. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře biochemických věd. Vedoucí diplomové práce Martin Beránek.
- [23] KUANG Y., ROGERS A., YEAP B. Y. et al. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* **2009**, roč. 15, s. 2630-2636.
- [24] *Buněčná smrt*. [online]. [cit. 8. 8. 2016]
Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/bunecna-smrt>

- [25] JAHR S., HENTZE H., ENGLISCH S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research*. **2001**, roč. 61, č. 4, s. 1659-1665.
- [26] FLEISCHHACKER M. a SCHMIDT B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer - A survey. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2007**, roč. 1775, s. 181-232.
- [27] KORABEČNÁ M., OPATRŇA M., WIRTH J. Diagnostický potenciál plazmatické volně cirkulující DNA (cell-free DNA) ve vztahu k nefrologii. *Aktuality v nefrologii*. **2007**, roč. 13, č. 4, s. 139-142.
- [28] LO Y. M., LEUNG T. N., LAU T. K. et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *The American Journal of Human Genetics*. **1999**, roč. 64, s. 218-224.
- [29] STROUN M., ANKER P., LYAUTEY J. et al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. **1987**, roč. 23, s. 707-712.
- [30] HASSELMANN D. O., RAPPL G., TILGEN W. et al. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clinical Chemistry*. **2001**, roč. 47, s. 1488-1489.
- [31] SUZUKI N., KAMATAKI A., YAMAKI J. et al. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clinica Chimica Acta*. **2008**, roč. 387, s. 55-58.
- [32] GORMALLY E., CABOUX E., VINEIS P. et al. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutation Research*. **2007**, roč. 635, s. 105-117.
- [33] BOARD R. E., WILLIAMS V. S., KNIGHT L. et al. Isolation and extraction of circulating tumor DNA from patients with small cell lung cancer. *Annals of New York Academy of Sciences*. **2008**, roč. 1137, s. 98-107.
- [34] BRONKHORST A. J., AUCAMP J., PRETORIUS P. J. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clinica Chimica Acta*. **2015**, roč. 450, s. 243-253.
- [35] VAART M., PRETORIUS P. J. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? *Clinical Biochemistry*. **2010**, roč. 43, s. 26-36.
- [36] CHANG H. W., LEE S. M., GOODMAN S. N. et al. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance and CA 125 as diagnostic tests for cancer, *Journal of the National Cancer Institute*. **2002**, roč. 94, s. 1697-1703.

- [37] WU T. T., ZHANG. D., CHIA J. H. et al. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range, *Clinica Chimica Acta*. **2002**, roč. 321, s. 77-87.
- [38] XIE G. S., HOU A. R., LI L. Y. et al. Quantification of plasma DNA as a screening tool for lung cancer, *Chinese Medical Journal*. **2004**, roč. 117, s. 1485-1488.
- [39] COX R. A. a GOKCEN M. Circulating DNA levels in man, *Biochemical Medicine*. **1976**, roč. 15, s. 126-137.
- [40] COX R. A. a GOKCEN M. DNA concentrations in serum and plasma, *Clinical Chemistry*. **1977**, roč. 23, s. 297.
- [41] LUI Y. Y., CHIK K. W., CHIU R. W. et al. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation, *Clinical Chemistry*. **2002**, roč. 48, s. 421-427.
- [42] GAUTSCHI O., BIGOSCH C., HUEGLI B. et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. **2004**, roč. 22, s. 4157-4164.
- [43] EL MESSAOUDI S., ROLET F., MOULIERE F. et al. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*. **2013**, roč. 424, s. 222-230.
- [44] KUBACZKOVÁ V., SEDLAŘÍKOVÁ L., BEŠŠE L. et al. Potenciál volné cirkulující DNA v diagnostice nádorových onemocnění. *Klinická onkologie*. **2015**, roč. 28, s. 251-259.
- [45] JUNG M., KLOTZEK S., LEWANDOWSKI M. et al. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clinical Chemistry*. **2003**, roč. 49, č. 6, s. 1028-129.
- [46] TABACK B., O'DAY S. J., HOON D. S. B. Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients. *Annals of The New York Academy of Sciences*. **2004**, roč. 1022, s. 17-24.
- [47] THIERRY A. R., MOULIERE F., GONGORA C. et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Research*, **2010**, roč. 38, s. 6159-6175.

- [48] THIJSSSEN M. A., SWINKELS. D. W., RUERS T. J. et al. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer Research*, **2002**, roč. 22, s. 421-425.
- [49] MANDEL P. a METAIS P. Les acidos du plasma sanguin chez l' Homme. **1948**, s. 241-243.
- [50] TONG U. K. a LO D. Y. M. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clinica Chimica Acta*. **2006**, roč. 363, s. 187-196.
- [51] *Epidemiologie zhoubných nádorů v české republice: Stručný přehled dat NOR ČR z roku 2013* [online]. [cit. 15. 10. 2016].
Dostupné z: <http://svod.cz/publikace/60>
- [52] *Postgraduální medicína: Screening Downova syndromu a jeho další perspektivy* [online]. [cit. 17. 10. 2016].
Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/postgradualni-medicina/screening>
- [53] LO Y. M., TEIN M. S. C., LAU T. K. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*. **1998**, roč. 62, s. 768-77.
- [54] EHRICH M., DECIU C., ZWIEFELHOFER T. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **2011**, roč. 204, s. 205.e1-11.
- [55] MEANEY C., NORBURY G. Non-invasive prenatal diagnosis. *Methods in Molecular Biology*. **2011**, roč. 688, s. 155-172.
- [56] *Doporučení o laboratorním screeningu vrozených vývojových vad v prvním a druhém trimestru těhotenství* [online]. [cit. 20. 10. 2016]
Dostupné z: http://www.cskb.cz/doporučení/2014/vvv_20141110
- [57] *Asociace center lékařské genetiky ČR - členové asociace* [online]. [cit. 20. 10. 2016]. Dostupné z: <http://www.aclg.cz/clenove-asociace>
- [58] *Neinvazivní prenatalní testování* [online]. [cit. 21. 10. 2016].
Dostupné z: <http://www.neinvazivnitestovani.cz>
- [59] RHODES A., WORT J. S., THOMAS H. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Critical Care*. **2006**, roč. 10, č. 2, R60.

- [60] CHANG C. P., CHIA R. H., WU T. L. et al. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta*. **2003**, roč. 327, s. 95-101.
- [61] RAINER T. H., WONG L. K., LAM W. et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clinical Chemistry*. **2003**, roč. 49, s. 562-569.
- [62] LO Y. M., RAINER T. H., CHAN L. Y. et al. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clinical Chemistry*. **2000**, roč. 46, s. 319-323.
- [63] UMETANI N., KIM J., HIRAMATSU S. et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical Chemistry*. **2006**, roč. 52, č. 6, s. 1062-1069.
- [64] GIACONA M. B., RUBEN G. C., ICZKOWSKI K. A. et al. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. **1998**, roč. 17, s. 89-97.
- [65] BENESOVA L., BELSANOVA B., SUCHANEK S. et al. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Analytical Biochemistry*. **2013**, roč. 433, s. 227-234.
- [66] HAO T. B., SHI W., SHEN X. J. et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. **2014**, roč. 111, s. 1482-1489.
- [67] ZUMBO P., **2012**. Ethanol precipitation. In: *Physiology.med.cornell.edu* [online]. [cit. 17. 9. 2016]. Dostupné z: http://physiology.med.cornell.edu/zumbo/ETHANOL_PRECIPITATION.
- [68] QIAQEN. *QIAamp DSP Virus Spin Kit Handbook*. [online]. [cit. 30. 8. 2016]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail>
- [69] THERMOFISHER SCIENTIFIC. *Glycogen, molecular biology grade*. [online]. [cit. 30. 8. 2016]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/catalog/product/R0561>
- [70] THERMOFISHER SCIENTIFIC. *Glycogen*. [online]. [cit. 13. 11. 2016]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/catalog/product/AM9510>
- [71] HENGGEN P. N. Carriers for precipitating nucleic acids. *TIBS*. **1996**, roč. 21, s. 224 -225.

- [72] THERMOFISHER SCIENTIFIC. *Ultrapure Glycogen*. [online].
[cit. 30. 8. 2016].
Dostupné z: https://tools.thermofisher.com/manuals/ultra_pure_glycogen
- [73] SIGMA-ALDRICH. *Roche - Poly (A) Polyadenylic acid*. [online].
[cit. 30. 8. 2016]
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/10108626001>
- [74] MIYAOKA Y., BERMAN J. R., COOPER S. B. et al. Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Scientific Reports*. **2016**, roč. 6, č. 23549, s. 1-12.
- [75] SHAW K. J., OAKLEY J., DOCKER. P. T. et al. DNA extraction, using carrier RNA, integrated with agarose gel-based polymerase chain reaction in a microfluidic device. *University of Hull*. **2008**, s. 1069-1071.
- [76] GAILLARD C. a STRAUSS F. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Research*. **1989**, roč. 18, č. 2, s. 378.
- [77] THERMOFISHER SCIENTIFIC. *Linear Acrylamide - Ambion*. [online].
[cit. 21. 8. 2016].
Dostupné z: https://tools.thermofisher.com/content/manuals/sp_9520
- [78] THERMOFISHER SCIENTIFIC. *Yeast tRNA - Ambion*. [online].
[cit. 29. 8. 2016].
Dostupné z: https://tools.thermofisher.com/content/manuals/sp_7119
- [79] THERMOFISHER SCIENTIFIC. *Salmon Sperm DNA Solution - Ambion*. [online]. [cit. 31. 8. 2016].
Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/manuals/15632011>
- [80] CHARGAFF E., LIPSHITZ R., GREEN C. et al. The composition of the deoxyribonucleic acid of salmon sperm. *The Journal of Biological Chemistry*. **1951**, roč. 192, s. 223-230.
- [81] PROMEGA. *Herring sperm DNA*. [online]. [cit. 31. 8. 2016].
Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/products/herring-sperm-dna>
- [82] ABCAM. *Herring sperm ssDNA*. [online]. [cit. 31. 8. 2016].
Dostupné z: <http://www.abcam.com/herring-sperm-ssdna>
- [83] SIGMA-ALDRICH. *Deoxyribonucleic acid from Herring sperm*. [online].
[cit. 31. 8. 2016].
Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/Herring_sperm

- [84] INVITROGEN. *Herring sperm DNA solutio*. [online]. [cit. 31. 8. 2016].
Dostupné z: https://tools.thermofisher.com/Herring_Sperm_DNA_Solution
- [85] MACHEREY-NAGEL. *Circulating DNA from Plasma: NucleoSpin® Plasma XS* [online]. [cit. 21. 8. 2016].
Dostupné z: http://www.mn-net.com/Protocols/DNAPlasma_NSXS
- [86] *Qubit™ dsDNA HS Assay Kits - Invitrogen* [online]. [cit. 21. 8. 2016].
Dostupné z: http://www.ecologiemicrobiennelyon.fr/Qubit_dsDNA_HS_Assay
- [87] *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* [online]. [cit. 21. 8. 2016].
Dostupné z: <http://nanodrop.com/nd-1000-v3.7-users-manual>
- [88] *POLR2A polymerase RNA II subunit A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI* [online]. [cit. 30. 11. 2016]
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5430>
- [89] BERÁNEK M., SIRÁK I., VOŠMIK M. et al. Carrier molecules and extraction of circulating tumor DNA for next generation sequencing in colorectal cancer. *Acta Medica*. **2016**, roč. 59, č. 2, s. 54-58.
- [90] *gb GENETIC Human DNA kit - Generi biotech* [online]. [cit. 30. 11. 2016]
Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/gb-genetic-human-dna/>
- [91] KISHORE R., REEF H. W., ANDERSON V. J. et al. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48. *Journal of Forensic Sciences*, **2006**. roč. 51, č. 5., s. 1055-1061.
- [92] SHAW K. J., THAIN L., DOCKER P. T. et al. The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths. *Analytica Chimica Acta*. **2009**, roč. 652, s. 231-233.
- [93] HEATH E. M., MORKEN N. W., CAMPBELL K. A. et al. Use of buccal cells collected in mouthwash as a source of DNA for clinical testing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. **2001**, roč. 125, s. 127-133.
- [94] CHEUNG R. C., MATSUI S. M. a GREENBERG H. B. Rapid and Sensitive Method for Detection of Hepatitis C Virus RNA by Using Silica Particles. *Journal of Clinical Microbiology*. **1994**, roč. 32, č. 10., s. 2593-2597.
- [95] SCHIFFNER L. A., BAJDA E. J., PRINZ M. et al. Optimization of a simple, automatable extraction method to recover sufficient DNA from low copy number DNA samples for generation of short tandem repeat profiles. *Croatian Medical Journal*. **2005**. roč. 46, č. 4., s. 578-786.

- [96] SANDERS R., HUGGETT J. F., BUSHELL C. A. et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Analytical Chemistry*. **2011**, roč. 83, č. 17, s. 6474-6484.
- [97] LEARY J. J., BRIGATI D. J. a WARD D. C. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *PNAS*. **1983**, roč. 80, s. 4045-4049.
- [98] GERSBERG R. M., ROSE M. A., ROBLES-SIKISAKA R. et al. Quantitative detection of hepatitis A virus and enteroviruses near the United States-Mexico border and correlation with levels of fecal indicator bacteria. *Applied and environmental mikrobiology*. **2006**, roč. 72, č. 12, s. 7438-7444.