

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENA DUSZOVÁ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENA DUSZOVÁ

**PRIMERJALNO VREDNOTENJE IZPLENOV DNA IZ VZORCEV PERIFERNE  
KRVI BOLNIKOV Z RAKOM PROSTATE IN LEVKOCITNIH  
KONCENTRATOV KRVODAJALCEV**

**COMPARATIVE EVALUATION OF DNA YIELDS EXTRACTED FROM  
PERIPHERAL BLOOD SAMPLES OF PATIENTS WITH PROSTATE CANCER  
AND BLOOD DONORS' BUFFY COATS**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju,izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm., za možnost opravljanja diplomske naloge pod njegovim mentorstvom, za vsestransko pomoč, dostopnost in prijaznost.

Zahvaljujem se tudi Petri Ferkov, mag. lab. biomed., za pomoč pri delu v laboratoriju, njeno razpoložljivost, potrpežljivost, in praktične nasvete.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno, pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Alena Duszová

Predsednik komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE:

POVZETEK .....	IV
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
1 UVOD .....	1
1.1 Kri.....	1
1.2 Struktura DNA .....	4
1.3 Metode izolacije DNA .....	5
1.4 Shranjevanje DNA .....	8
1.4.1 Mehanizmi degradacije DNA .....	8
1.4.2 Pogoji shranjevanja DNA .....	9
2 NAMEN DELA .....	11
3 MATERIALI IN METODE .....	12
3.1 Materiali .....	12
3.2 Metode .....	13
3.2.1 Postopek izolacije DNA iz vzorcev periferne krvi bolnikov .....	14
3.2.2 Postopek izolacije DNA iz vzorcev BC .....	16
3.2.3 Določanje koncentracije in stopnje čistote izolirane DNA .....	18
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	20
4.1 Vrednotenje izplenov DNA iz vzorcev periferne krvi bolnikov .....	20
4.1.1 Primerjava koncentracij DNA, izoliranih iz po dveh vzorcev periferne krvi, sočasno odvzetih posameznim bolnikom .....	21
4.1.2 Odnos med številom levkocitov bolnikov in koncentracijami izolirane DNA iz vzorcev njihove periferne krvi .....	23
4.1.3 Vrednotenje stopnje čistote DNA, izolirane iz vzorcev periferne krvi bolnikov .....	25

4.2 Vrednotenje izplenov DNA iz vzorcev BC .....	26
4.2.1 Odnos med koncentracijami izolirane DNA in volumni vzorcev BC .....	27
4.2.2 Vrednoteje čistote DNA, izolirane iz vzorcev BC .....	31
4.3 Primerjava povprečnih koncentracij DNA, izoliranih iz vzorcev periferne krvi bolnikov in BC krvodajalcev .....	31
5 SKLEP .....	32
6 LITERATURA .....	34
7 PRILOGE .....	36

## **KAZALO SLIK:**

<b>Slika 1:</b> Shematski prikaz priprave buffy coat-a (BC) iz vzorca periferne krvi .....	3
<b>Slika 2:</b> Primerjava koncentracij DNA, izoliranih iz parnih vzorcev periferne krvi posameznih bolnikov .....	21
<b>Slika 3:</b> Mediani, vrednosti 25. in 75. percentila ter razponi koncentracij DNA, izoliranih iz parov sočasno odvzetih vzorcev periferne krvi posameznega bolnika.....	22
<b>Slika 4:</b> Linearna in Demingova regresija med povprečnimi vrednostmi koncentracij DNA, izoliranih iz parnih vzorcev periferne krvi posameznih bolnikov, in številom levkocitov v času odvzema vzorcev .....	24
<b>Slika 5:</b> Koncentracije DNA, izolirane iz posameznih vzorcev BC, razdeljenih v skupine, glede na njihove volumne.....	27
<b>Slika 6:</b> Grafični prikaz median, vrednosti 25. in 75. percentilov ter razponov koncentracij DNA, izoliranih iz vzorcev BC z različnimi volumni. ....	29
<b>Slika 7:</b> Linearna in Demingova regresija med povprečnimi vrednostmi koncentracij DNA posameznih volumskih skupin vzorcev BC .....	30

## **KAZALO PREGLEDNIC:**

<b>Preglednica I:</b> Število vzorcev BC glede na njihove volumne .....	12
---	----

<b>Preglednica II:</b> Volumni uporabljenih reagentov ter časi centrifugiranja za vzorce BC z volumni 600-2.000 $\mu\text{L}$ .....	17
<b>Preglednica III:</b> Volumni uporabljenih reagentov in časi centrifugiranja za vzorce BC z volumni 200-500 $\mu\text{L}$ .....	18
<b>Preglednica IV:</b> Oznake in različne lastnosti vzorcev periferne krvi bolnikov z rakom prostate .....	36
<b>Preglednica V:</b> Oznake in različne lastnosti vzorcev BC krvodajalcev.....	41

## POVZETEK

Človeško deoksiribonukleinsko kislino (DNA) izoliramo za molekularno-biološke preiskave, različne raziskovalne namene in za potrebe forenzike, pri čemer je najpogostejši vir DNA kri oziroma mononuklearne celice (levkociti), ki jih ta vsebuje. Poznamo kar nekaj metod, namenjenih izolaciji DNA iz periferne krvi ali levkocitnega koncentrata (ang. buffy coat - BC), ki so jih postopoma razvijali, da bi kar najbolj izboljšali učinkovitost tega postopka. V okviru diplomske naloge smo izolirali DNA s pomočjo komercialnega reagenčnega kompleta FlexiGene DNA Kit (Qiagen), in sicer iz 120 vzorcev periferne krvi enakih volumnov, odvzetih 15 bolnikom z rakom prostate v različnih časovnih obdobjih ter iz 118 vzorcev BC zdravih oseb (krvodajalci), različnih volumnov. Na voljo smo imeli po dva vzorca periferne krvi vsakega posameznega bolnika ter po en vzorec BC vsakega krvodajalca. Izolacijo DNA smo v obeh primerih izvedli skladno z modificiranim postopkom, ki je dobro preverjen in ga uporabljajo v molekularno-biološkem laboratoriju Katedre za klinično biokemijo (Fakulteta za farmacijo). Kljub temu smo naleteli na težave zaradi slabega raztapljanja vzorcev DNA, izoliranih iz periferne krvi, in slabega pritrjevanja usedline, ki je vsebovala DNA, iz vzorcev BC na stene centrifugirk. Zaradi slednje težave smo iz enega vzorca pri odstranitvi supernatanta sočasno odlili tudi DNA. S statistično analizo rezultatov smo ugotovili, da ni bilo statistično značilnih razlik v količinah izolirane DNA iz dveh vzorcev periferne krvi istega bolnika, kar smo tudi pričakovali, saj sta bila oba odvzeta ob istem času. Pri iskanju povezave med številom levkocitov in koncentracijo izolirane DNA smo ugotovili, da v našem primeru ne moremo trditi, da lahko iz vzorcev, ki vsebujejo večje število levkocitov, vedno izoliramo večjo količino DNA. Za vzorce BC nismo mogli preveriti tovrstne povezave, ker nismo imeli podatkov za število levkocitov v njih. Zato smo se osredotočili na odnos med volumenom BC in količino izolirane DNA. Rezultati za našo skupino vzorcev BC niso pokazali močne povezave med koncentracijami izolirane DNA in volumni BC. Potrdili pa smo, da smo v povprečju iz BC izolirali do približno 10-krat večjo količino DNA kot iz periferne krvi, saj je BC dejansko koncentrat levkocitov. Na podlagi vrednosti razmerij meritev, določenih pri absorbancah  $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$  in  $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ , ki jih uporabljamo za vrednotenje čistote DNA, smo ocenili, da smo iz vzorcev BC izolirali bolj čisto DNA kot iz periferne krvi. Vsi izolirani vzorci DNA so namenjeni za nadaljnje molekularno-biološke raziskave, zato jih moramo shraniti pod takšnimi pogoji, da ohranimo njihove lastnosti.

**Ključne besede:** izolacija DNA, koncentracija DNA, periferna kri, levkocitni koncentrat  
(ang. buffy coat)



## ABSTRACT

Deoxyribonucleic acid (DNA) extraction is performed for molecular biology testing, research and forensic science. The most commonly available source of DNA is blood, more specifically leukocytes. Many methods are being used for DNA extraction from peripheral blood and concentrated leukocyte suspensions or buffy coats (BCs), which have gradually evolved with a goal to achieve better yields of this procedure. We extracted DNA from 120 samples of peripheral blood (each containing 3 mL) obtained at different time frames from 15 patients with prostate cancer, as well as from 118 BC samples of blood donors, containing different volumes, by using the commercially available FlexiGene DNA Kit (Qiagen). At each defined time point, two identical peripheral blood samples per patient were drawn, while only one BC sample was obtained from each blood donor. In both cases, we used a modified DNA extraction method, which is being routinely used in the molecular biology laboratory at the Chair of Clinical Biochemistry (Faculty of Pharmacy). Despite this, we were confronted with various problems, such as poor dissolution of DNA isolated from peripheral blood samples in a selected hydration buffer, and weak pellet attachment to centrifuge tube walls following the centrifugation step of lysed BC samples. In one case this led to complete loss of DNA, when supernatant together with the pellet was discarded. The statistical analysis showed that there were no significant differences in the amounts of extracted DNA between paired samples of peripheral blood, taken at particular time from the same patient. This result was expected, because both samples were taken from a given patient on the same day. As we were assessing the relationship between the amount of leucocytes in samples and the concentration of extracted DNA, we found that we were not always able to extract more DNA from peripheral blood containing higher numbers of mononuclear cells. We could not explore this relationship in case of BC samples, because no data regarding the amounts of leucocytes in them were available. Therefore, we focused on the assessment of relationship between various BC volumes and the corresponding amounts of extracted DNA. We found that this correlation was also weak. However, we were able to show, that we could extract on average approximately 10 times more DNA from same volumes of BCs, as compared to same volumes of peripheral blood, which reflects the fact that leucocytes are concentrated several times within the BC. Values of 260 nm/280 nm and 260 nm/230 nm absorbance ratios, which are used for defining DNA purity, showed that

DNA isolated from BC samples was of higher purity than that extracted from peripheral blood. All extracted DNA samples are intended to be used for further molecular-biological research, and were therefore stored under conditions assuring their integrity.

**Key words:** DNA extraction, DNA concentration, peripheral blood, buffy coat

## SEZNAM OKRAJŠAV

DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. Deoxyribonucleic acid)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (ang. Ethylenediaminetetraacetic acid)
BC	levkocitni koncentrat (ang. Buffy Coat)
NS	statistično neznačilno (ang. Not Significant)

## 1 UVOD

Človeško DNA izoliramo za potrebe molekularno-bioloških testov, raziskovalne namene in za potrebe forenzike. Danes lahko izoliramo DNA iz kateregakoli biološkega materiala, tudi iz arheološkega. Človeško DNA lahko izoliramo iz periferne krvi, različnih celičnih suspenzij (npr. semenske tekočine), bukalne sluznice ter različnih tkiv in organov (npr. lasnih foliklov, zob, kosti). Vsekakor pa v ta namen najpogosteje uporabljamo periferno kri ali njene pripravke (1).

### 1.1 KRI

Kri je specializirano tekoče tkivo, v katerem so krvne celice suspendirane v krvni plazmi. Prenaša kisik iz pljuč do tkiv in ogljikov dioksid iz tkiv do pljuč, vsebuje hranilne snovi, hormone, vitamine, odpadne snovi celičnega metabolizma ter uravnava telesno temperaturo in kislinsko-bazično ravnovesje.

Krvna plazma je raztopina s pH vrednostjo v intervalu 7,35-7,45, ki vsebuje 92 % vode (m/m), v kateri so raztopljeni proteini in druge snovi. Med poglavitne plazemske proteine sodijo (2):

- *albumin* – uravnava predvsem osmotski tlak krvi;
- *α-globulini* in *β-globulini* - mednje spadajo transportni dejavniki (npr. transferin), koagulacijski dejavniki (npr. protrombin, fibronektin) in lipoproteini; krvno plazmo brez koagulacijskih dejavnikov imenujemo serum, ki je blede rumene barve;
- *γ-globulini* – njihovi predstavniki so imunoglobulini (protitelesa);
- *fibrinogen* – sodeluje v procesu strjevanja krvi, in sicer polimerizira v fibrinska vlakna, ki se prepletejo in predstavljajo ogrodje krvnega strdka;
- *komplement* – proteini, ki so del obrambnega oz. imunskega sistema organizma.

V plazmi so razen proteinov raztopljeni še elektroliti (npr. kalijevi, natrijevi, kalcijevi, kloridni ioni), hormoni (npr. insulin, adrenalin, testosteron), plini (kisik, ogljikov dioksid), hranilne snovi (npr. glukoza, vitamini, aminokisliline, holesterol), odpadni proizvodi celičnega metabolizma (npr. mlečna kislina, sečnina, amonijak).

Krvne celice, suspendirane v krvni plazmi, so eritrociti (rdeče krvne celice), levkociti (bele krvne celice) in trombociti (krvne ploščice).

*Eritrociti* so najštevilnejše krvne celice. V 1 litru krvi jih je približno  $4,2-6,3 \times 10^{12}$ . Njihova bikonkavna oblika zagotavlja veliko razmerje med njihovo površino in volumnom, kar omogoča hitro izmenjevanje plinov. So zelo fleksibilni, zato lahko preidejo tudi skozi majhne kapilare. V procesu dozorevanja izgubijo jedro in organele, vendar so presnovno aktivni, energijo iz glukoze pa pridobivajo z anaerobno glikolizo (3). Njihovo citoplazmo zapolnjuje protein hemoglobin, ki je ključen za prenos kisika. Življenska doba eritrocitov je približno 120 dni.

*Levkociti* so skupina raznolikih celic imunskega sistema, ki sodelujejo v obrambnih mehanizmih organizma. V 1 litru krvi jih je približno  $4-10 \times 10^9$ . Za razliko od eritrocitov imajo jedra, zato so dostopen in bogat vir nukleinskih kislin. Lahko tudi zapustijo krvni obtok in migrirajo v tkiva.

Delimo jih na dve skupini: granulocite in agranulocite. Predstavniki granulocitov, ki imajo v svoji citoplazmi specifična zrnca, so *nevtrofilci*, *eozinofilci* in *bazofilci*. Zanje je značilno, da imajo jedra segmentirana na režnje, vsebujejo citotoksična in druga zrnca, ter da energijo pridobivajo z glikolizo. Poglavitna funkcija nevtrofilcev je fagocitoza, eozinofilci ubijajo velike patogene, zlasti črve, bazofilci pa sodelujejo pri alergijskih reakcijah. Nevtrofilci imajo najkrajšo življensko dobo (od nekaj ur do 4 dni), sledijo jim eozinofilci (1-2 tedna), bazofilci pa živijo najdlje (nekaj mesecev).

Agranulociti nimajo specifičnih zrn, njihova jedra pa so okroglih ali ovalnih oblik. Mednje sodijo *monociti*, ki se s prehodom v tkiva preobrazijo v *makrofage* (zrela oblika monocitov) in limfociti, ki jih, glede na označevalce pripadnosti, izražene na površini celic, delimo na *limfocite T*, *limfocite B* in *naravne celice ubijalke* (celice naravne imunosti) (4). Makrofagi so najbolj znani fagociti, limfociti pa ključne efektorske celice pridobljene imunosti. Agranulociti lahko živijo od nekaj ur pa do nekaj let.

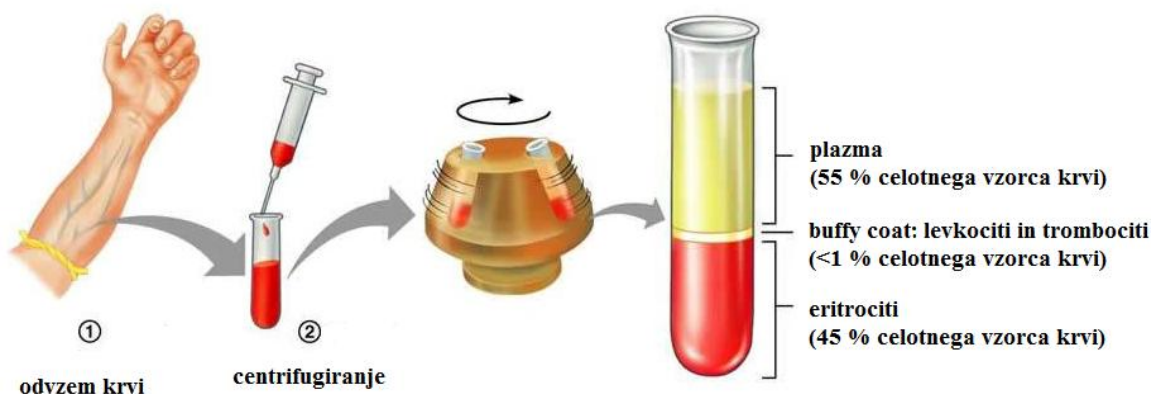
*Trombociti* niso prave celice, pač pa zelo majhni, različno veliki odluščki celic, ki jih imenujemo megakariociti. Megakariociti, ki se nahajajo predvsem v kostnem mozgu, tvorijo dolge podaljške do krvnih kapilar, od koder se trombociti odluščijo v obliki mešičkov njihove citoplazme. Liter krvi vsebuje  $140-340 \times 10^9$  trombocitov. Tako kot zreli

eritrociti, tudi oni nimajo jedra. Trombociti sodelujejo pri zaustavljanju krvavitev. Ko se aktivirajo, se spremenijo njihove površinske lastnosti in pride do nastanka čepa, ki je posledica njihove agregacije. V kaskadi nadaljnjih reakcij pa pride do celjenja poškodovanega mesta (2). Življenska doba trombocitov je približno 10 dni.

### **Priprava levkocitnega koncentrata (BC - buffy coat-a) iz polne krvi**

Levkocitni koncentrat ali buffy coat (BC) je tudi pogosto uporabljen, zelo bogat vir nukleinskih kislin. Gre za koncentrirano suspenzijo levkocitov, v kateri so prisotni tudi eritrociti in trombociti.

Za pripravo BC moramo preprečiti strjevanje krvi, kar dosežemo z njenim zbiranjem v vrečke ali epruvete, ki vsebujejo antikoagulate, npr. natrijev citrat, EDTA, heparin, ipd. Nato zbrano kri dobro premešamo in centrifugiramo, 10 min pri 200 x g (5). Pri tem se kri razdeli na 3 sloje. V spodnjem delu so sedimentirani eritrociti, v zgornjem prosojna, rahlo viskozna plazma, med njima pa je tanek rahlo belkast sloj, ki ga imenujemo buffy coat (Slika 1).



**Slika 1:** Shematski prikaz priprave buffy coat-a (BC) iz vzorca periferne krvi; prirejeno po (6).

## 1.2 STRUKTURA DNA

Pri izolaciji DNA iz polne krvi ali iz BC, se moramo zavedati, da so njen vir levkociti, saj so to edine krvne celice z jedrom.

DNA je nosilec genetskih informacij, v njej so shranjeni zapisi za sintezo vseh celičnih sestavin. Sestavljena je iz sladkorja, *deoksiriboze* in različnih dušikovih baz. Te se delijo na purine: *adenin*, *gvanin*; in pirimidine: *citozin*, *timin* in se s sladkornimi komponentami povezujejo preko N-glikozidnih vezi. Deoksiribozo, povezano z dušikovo bazo, imenujemo nukleozid. Nukleozide med seboj povezuje *fosfatna skupina*, ki se veže na 3' ogljik ene deoksiriboze in na 5' ogljik druge deoksiriboze. Z vezavo fosfatnih skupin na nukleozide nastanejo nukleotidi, ki tvorijo primarno strukturo DNA.

Sekundarno strukturo DNA gradita dve polinukleotidni verigi, ki sta oviti okoli skupne osi (7). Dušikove baze v dvojno vijačnico povezanih verigah tvorijo komplementarne pare, in sicer adenin s timinom ter gvanin s citozinom. V posameznem paru sta torej vedno purinski in pirimidinski nukleotid, kar zagotavlja konstanten premer molekule DNA. Sladkorno-fosfatno ogrodje je usmerjeno navzen, dušikove baze pa navznoter. V vodnem okolju fosfatne skupine ionizirajo, zato je molekula DNA negativno nabita.

### 1.3 METODE IZOLACIJE DNA

Danes je na voljo kar nekaj postopkov izolacije DNA iz krvi, ki se med sabo razlikujejo predvsem glede tehničnih zahtev, trajanja, stroškov ter količine in čistote izolirane DNA. Zelo zaželeno je, da je uporabljena metoda hitra in enostavna ter da ne predstavlja tveganja za osebo, ki izvaja izolacijo. Zavedati pa se moramo, da na rezultat ne vpliva le sam postopek izolacije, ampak tudi zbiranje in shranjevanje krvi ter starost preiskovancev (8).

Prvi je leta 1869 izoliral DNA Friedrich Miescher, in sicer iz limfocitov v gnojnem abscesu (1). Med postopkom čiščenja proteinov je odkril snov, ki se je razlikovala od takrat znanih beljakovin. Ime DNA pa je molekuli dal Miescherjev študent Richard Altman. Miescher je zatem napisal dva postopka z osnovnimi koraki za izolacijo DNA. Prvi pravi laboratorijski postopek za njeno izolacijo pa sta leta 1958 razvila Meselson in Stahl (1). Od takrat dalje so razvili več različnih metod, pri čemer so stremeli k optimizaciji učinkovitosti izolacije in s tem k pridobivanju čistejše DNA.

Vse metode izolacije sledijo istim principom, in sicer: razbitju celičnih membran, inaktivaciji nukleaz in razgradnji proteinov, očiščenju DNA od bioloških in kemijskih kontaminantov ter oboritev DNA in njeno raztapljanje v končnem mediju. Razbitje celičnih membran dosežemo z detergenti, ki jih lahko uporabljamo tudi v kombinaciji z encimi. Inaktivacijo nukleaz zagotovimo s proteazami, obarjanje DNA pa povzročijo visoke koncentracije soli in nekatera topila. Čiščenje izolirane DNA poteka v ustreznih topilih, kot medij za shranjevanje DNA pa najpogosteje uporabljamo pufre. Idealne metode za izolacijo DNA iz krvi ni, saj ima vsaka od obstoječih določene prednosti in slabosti. Odločitev za izbiro najustreznejše metode pa je odvisna od vsakega laboratorija posebej.

Izolaciji DNA običajno sledi vrednotenje izplena, kar je pomembno za nadaljnje delo z izoliranim materialom. Koncentracijo DNA [ng/ $\mu$ L] določamo spektrofotometrično, in sicer merimo absorbanco ultravijoličnih žarkov pri valovni dolžini 260 nm ( $A_{260}$  nm) (9). Čistost DNA pa vrednotimo iz razmerij absorbanco pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm ( $A_{260}$  nm/ $A_{280}$  nm) ter 260 nm in 230 nm ( $A_{260}$  nm/ $A_{230}$  nm). Za DNA brez nečistot naj bi bilo razmerje  $A_{260}$  nm/ $A_{280}$  nm od 1,8 do 2,0, razmerje  $A_{260}$  nm/ $A_{230}$  nm pa med 1,8 in 2,2.



## **Pregled metod za izolacijo DNA iz periferne krvi in BC**

Danes so na voljo različne metode za izolacijo DNA iz krvi in BC. Nekatere uporabljamo že desetletja, druge pa so patentirali le nekaj let nazaj. Zagotovo lahko tudi v prihodnosti pričakujemo nove, še izboljšane postopke za izolacijo DNA.

Danes so najbolj uporabljane metode za izolacijo DNA iz periferne krvi in BC naslednje (10):

- *izolacija z uporabo organskih topil* (ang. organic solvent/chaotropes method)
- *metoda izsoljevanja* (ang. salting out method)
- *metoda, ki temelji na uporabi silikagela* (ang. glass milk/silica resin method)
- *metoda, ki temelji na izmenjavi anionov* (ang. anion exchange method)
- *izolacija z magnetnimi kroglicami* (ang. magnetic beads method).

Zadnje 3 metode štejemo med *metode izolacije na trdni fazi* (ang. solid-phase DNA extraction methods).

*Izolacija s pomočjo organskih topil* uporablja za razbitje celičnih membran natrijev lavril sulfat ali N-lavril sarkozin. Denaturacijo proteinov in inaktivacijo encimov dosežemo z dodatkom mešanice fenol-kloroform-izoamilni alkohol, ki sicer hitro denaturira proteine, vendar pa vsebuje fenol, ki je toksičen, koroziven in vnetljiv. Po centrifugiranju se vsebina v centrifugirki razdeli na dva sloja. Zgornji vsebuje vodno fazo, v kateri je raztopljena DNA, spodnji pa je hidrofobno organsko topilo, ki vsebuje proteine in druge hidrofobne komponente. Po dodatku visoko koncentrirane raztopine soli (npr. natrijevega acetata), oborimo DNA z etanolom ali izopropanolom, nato pa jo očistimo s pomočjo 70 % (v/v) raztopine etanola, osušimo in raztopimo v ustreznem pufu. Slabost metode je v uporabi toksičnih organskih topil, ki predstavljajo tveganje za osebe, ki izvaja izolacijo.

*Metoda izsoljevanja* ne uporablja organskih topil, zato je bolj varna. Tudi v tem primeru razbitje celičnih membran dosežemo z natrijevim lavril sulfatom, encime inaktiviramo s proteinazo K, proteine pa oborimo z dodatkom visoke koncentracije soli (običajno 6 M raztopina natrijevega klorida) in jih po centrifugiranju oddelimo od DNA, raztopljene v supernatantu. Tega nato prenesemo v drugo centrifugirko in DNA oborimo z etanolom ali izopropanolom.

Veliko komercialno dostopnih reagenčnih kompletov temelji na *metodah izolacije DNA na trdni fazi* (11). Glavni princip tovrstnih izolacij je adsorpcija DNA na trdno fazo, in sicer pri določenih vrednostih pH in določeni koncentraciji soli. Trdno fazo lahko predstavlja kar sama centrifugirka, ki vsebuje smolo s pozitivno nabitimi skupinami. Pri tem je naboj vsakega kationa nevtraliziran z ustreznim anionom. V procesu izolacije se DNA veže s svojimi negativno nabitimi fosfatnimi skupinami na pozitivne funkcionalne skupine smole, pri čemer nadomesti nanje predhodno vezane anione (*metoda, ki temelji na izmenjavi anionov*). Po vezavi DNA pa vse ostale komponente odstranimo s spiranjem s pufrom.

Kot trdno fazo lahko uporabimo tudi podlago iz silikagela (*metoda, ki temeljijo na uporabi silikagela*), ki je pozitivno nabita in zato omogoča vezavo DNA. Princip ločevanja je enak kot pri metodi, ki temelji na izmenjavi anionov.

Tretja možnost je uporaba magnetnih kroglic (*metoda z magnetnimi kroglicami*). Te so nanometrskih velikosti, narejene iz  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ali  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  in prevlečene z materiali, katerih funkcionalne skupine vežejo DNA. Kroglice z vezano DNA imobiliziramo z magnetom in odlijemo supernatant. Temu sledi čiščenje in suspendiranje magnetne usedline.

## 1.4 SHRANJEVANJE DNA

Po končanem postopku izolacije moramo DNA shraniti tako, da ohranimo njene kemijske in fizikalne lastnosti. Zato je pomembno določiti, pod kakšnimi pogoji in za koliko časa jo bomo shranili, pri čemer upoštevamo njeno čistost in stroške, povezane s shranjevanjem. Z razvojem znanosti se povečuje tudi število vzorcev DNA in drugih bioloških vzorcev, ki jih je potrebno shraniti. V ta namen se ustanovljajo posebne biobanke, ki skrbijo za njihovo dolgotrajno shranjevanje v optimalnih pogojih (12). Poznavanje mehanizmov razgradnje DNA pa je nedvomno osnova za načrtovanje najprimernejših pogojev njenega shranjevanja.

### 1.4.1 Mehanizmi razgradnje DNA

Kemijsko stabilnost DNA ogroža predvsem prisotnost encimov nukleaz, ki cepijo fosfodiestrne vezi med nukleotidi. Med postopkom izolacije se jih v procesu čiščenja trudimo znebiti, vendar pa njihova morebitna prisotnost predstavlja grožnjo za ohranitev celovitosti molekule tudi v času shranjevanja.

Zaradi kemijske strukture DNA je njena razgradnja lahko rezultat hidrolize, ki poteka na fosfodiestrskih vezeh. Ta proces se potem lahko nadaljuje tudi na citozinskih, adeninskih in gvaninskih ostankih. V tem primeru govorimo o deaminaciji (13). Na hidrolizo je enako občutljiva tudi N-glikozidna vez, ki se cepi tako pri purinih kot pirimidinih, vendar se ta reakcija pogosteje pojavlja pri prvih, zato je dobila naziv depurinizacija (13). V literaturi zasledimo tudi naziv depirimidacija, ki pa označuje isti tip reakcije. Na osnovi navedenega lahko ugotovimo, da voda ni primeren medij za dolgoročno shranjevanje DNA.

Oksidativne poškodbe molekule DNA nastajajo v prisotnosti kovinskih ionov, zlasti  $\text{Fe}^{3+}$  in  $\text{Cu}^{2+}$ . V tako imenovani Fentonovi reakciji nastajajo hidroksilni radikali ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), ki imajo en nesparjen elektron, posledica česar je njihova velika reaktivnost, zato lahko reagirajo z DNA in jo poškodujejo (14, 15). Vzorce DNA največkrat shranjujemo pri nizkih temperaturah, pri katerih je gibanje molekul zelo omejeno. Negativen vpliv na njeno stabilnost ima tudi ponavljanje odtajajevanja in zamrzovanja istega vzorca (ang. freeze / thaw cycles). Zaenkrat obstaja razmeroma malo raziskav na to temo, vendar pa novejša kažejo, da se s povečevanjem števila omenjenih ciklov povečuje njena degradacija. Ta pa

je sicer premosorazmerna z velikostjo molekule (16). Vzrok za tovrstne poškodbe DNA je v tem, da kristali vode, ki nastajajo med zamrzovanjem vzorca ter njihova preureditev med odtajevanjem povzročajo napetosti, ki lahko molekulo DNA razcepijo na manjše fragmente.

#### **1.4.2 Pogoji shranjevanja DNA**

Vzorci DNA, raztopljene v različnih medijih, lahko shranjujemo pri različno nizkih temperaturah, lahko pa DNA tudi posušimo in jo shranimo v suhem stanju. DNA lahko shranjujemo pri naslednjih temperaturah:

- 4 °C
- -20 °C
- -80 °C
- -196 °C (v tekočem dušiku)
- na sobni temperaturi, v suhem stanju.

Omenili smo že, da nizke temperature omejujejo gibanje molekul, kar preprečuje možnost razgradnje DNA zaradi prisotnosti nukleaz. Zato temperatura 4 °C ni primerna za njeno dolgotrajno shranjevanje. Vzorce zato največkrat shranjujemo pri temperaturah -20 °C ali -80 °C, ki zagotavljata zadovoljive pogoje. Pomembna dejavnika, ki vplivata na izplene DNA po odmrzovanju, pa sta njeni začetna čistost oz. kvaliteta in koncentracija (17). Namreč, v kolikor pride do degradacije v vzorcih z zelo nizkimi začetnimi koncentracijami DNA, se lahko njena vsebnost zniža do te stopnje, da ne dobimo več produktov v verižni reakciji s polimerazo (PCR – ang. Polymerase Chain Reaction). V tekočem dušiku, pri temperaturi -196 °C se DNA nahaja v stanju, pri katerem je gibanje molekul minimalno, zato se njena kemijska reaktivnost močno zmanjša, to pa prepreči degradacijo (14). Zato lahko v teh pogojih DNA shranjujemo nekaj desetletij.

Alternativa zamrzovanju je shranjevanje DNA v suhem stanju na sobni temperaturi. Prednost te metode je predvsem v bistveno nižjih stroških, povezanih z dolgoročnim shranjevanjem, pa tudi vzorci so lažje in hitreje dostopni (18). DNA običajno pretvorimo v

suho obliko s postopkom liofilizacije, s katerim zmanjšamo vsebnost vode na minimum. Žal pa to ne pomeni, da je DNA v takšni obliki popolnoma stabilna, saj je še vedno občutljiva na kisik in relativno vlažnost, zato ji dodajajo trehalozo, ki jo stabilizira. Trehaloza je disaharid naravnega izvora, sestavljen iz dveh glukoznih enot, medsebojno povezanih z  $\alpha$ - $\alpha$  glikozidno vezjo. Točnega mehanizma omenjene stabilizacije ne poznamo, predvidevajo pa, da poteka preko vezave trehaloze na fosfatne skupine (onemogočen dostop vode) ali tvorbe vodikovih vezi z molekulo DNA (zmanjšana možnost sprememb v njeni strukturi) (19). Če nam uspe preprečiti dostop kisika in vode do suhe DNA, jo lahko shranjujemo na sobni temperaturi najverjetneje desetletja.

Kot medij za raztapljanje izolirane DNA običajno uporabljamo pufer Tris (tris hidroksimetil aminometan), in sicer v kombinaciji z EDTA, ki kelira kovinske ione, potrebne tako za aktivnost nukleaz kot za oksidacijske reakcije. Vrednost pH omenjenega pufra mora biti med 7,0 in 8,5, da se izognemo hidrolizi DNA. Druga možnost pa je uporaba etanola, v katerem je DNA oborjena. Take vzorce shranimo pri temperaturi  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Pomemben vpliv na stabilnost DNA imajo tudi mikrocentrifugirke, v katerih jo shranjujemo. Morajo se enostavno odpirati in zapirati, pokrovi morajo dobro tesniti, poleg tega pa morajo biti izdelane kakovostno, da ne vsebujejo ostankov kemikalij, uporabljenih za njihovo proizvodnjo. Prav tako si ne želimo, da bi se DNA adsorbirala na stene mikrocentrifugirk, zato danes najpogosteje uporabljamo take, ki so izdelane iz polipropilena (20).

## **2 NAMEN DELA**

V okviru diplomske naloge bomo iz 120 vzorcev periferne krvi 15 bolnikov z rakom prostate, vključenih v klinično študijo (dovoljenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko, številka 91/03/10, z dne 6. 4. 2010), ki bodo odvzeti v različnih časovnih intervalih, ter vzorcev BC 118 zdravih oseb (krvodajalci), s pomočjo komercialnega reagenčnega kompleta FlexiGene DNA Kit (Qiagen) izolirali DNA. V vsakem izoliranem vzorcu bomo nato izmerili njeno koncentracijo in določili stopnjo njene čistote. Ob upoštevanju števila levkocitov bolnikov, določenega na dan odvzema krvnih vzorcev, ocenjenih medianah in povprečnih vrednosti in razponov količin teh celic v 31 kontrolnih BC (podatki Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino) ter seveda izhodnih volumnov vsakega od uporabljenih 118 vzorcev BC bomo primerjalno ovrednotili izplene in čistost izolirane DNA.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

##### Vzorci

DNA smo izolirali iz 120 vzorcev periferne krvi 15 bolnikov z rakom prostate, odvzetih v različnih časovnih obdobjih tekom klinične študije, in 117 vzorcev BC zdravih oseb (krvodajalcev). Vzorce periferne krvi so odvzeli v epruvete Vacutube s K3EDTA (vijolični zamaški) na Kliničnem oddelku za urologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Vsi so imeli volumen 3 mL. Vzorci BC, ki so jih pripravili na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, pa so imeli različne volumne (Preglednica I). Po prevzemu smo vse vzorce do začetka izolacije DNA shranili na temperaturi -20 °C.

**Preglednica I:** Število vzorcev BC glede na njihove volumne.

Število vzorcev BC	Volumen BC [mL]
4	2
3	1,8
2	1,5
32	1
6	0,9
36	0,8
9	0,7
1	0,65
8	0,6
15	0,5
1	0,4
1	0,2

## **Aparature in pribor**

- Centrifuga (Centrifuge 5804 R, Eppendorf)
- Centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf)
- Vodni kopeli (Water bath-thermostat WB-4MS, Biosan)
- Termoblok (Heating/Cooling Dry Block CH-100, Biosan)
- Vibracijski stresalnik (Bio Vortex V1, Biosan)
- Avtomatske pipete: 0,5-10  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  (Research Plus, Eppendorf)
- Avtomatska pipeta 500-5000  $\mu\text{L}$  (Biohit m5000, Sartorius)
- Nastavki za pipete (Sartorius, Sarstedt, Tip One)
- Centrifugirke: 15 mL (Corning, TPP)
- Centrifugirke: 50 mL (TPP)
- Mikrocentrifugirke: 1,5 mL (Eppendorf, Plastibrand)
- Mikrocentrifugirke: 2 mL (Eppendorf)
- Sterilne vatirane palčke (Eurotubo)
- Spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., ZDA)

## **Reagenti**

- FlexiGene DNA Kit, kataloška številka 51206 (Qiagen)
- 100 % izopropanol (2-propanol for analysis, Merck KGaA)
- 100 % etanol (ethanol absolute for analysis, Merck KGaA)
- Destilirana voda (Fakulteta za farmacijo)

## **Statistična analiza rezultatov**

Računalniški program GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., ZDA): osnovna statistika, parni t-test, enosmerna analiza variance (test ANOVA) s post hoc analizo (Holm-Šidákov test) ter linearna in Demingova regresija.



### *FlexiGene DNA Kit*

Komercialni reagenčni komplet uporabljamo za izolacijo DNA iz človeške periferne krvi, BC in celic, gojenih *in vitro*. Vsebuje pufre FG1 (3 x 220 mL), FG2 (5 x 30 mL) in FG3 (5 x 50 mL), liofilizirano QIAGEN proteazo ter priročnik z navodili.

Pufer FG1 vsebuje spojine za celično lizo, pufer FG2 gvanidinijev klorid, pufer FG3 pa je raztopina 10 mM Tris-Cl s pH = 8,5. Liofilizirano proteazo QIAGEN, ki vsebuje subtilizin, smo, skladno z navodili, raztopili v 1,4 mL pufru FG3 in jo shranili v hladilniku na temperaturi 4 °C.

## **3.2 Metode**

Reagenčni komplet FlexiGene DNA Kit omogoča izolacijo DNA v eni epruveti, s čimer zmanjšamo možnost zamenjave vzorcev in je namenjen za uporabo v molekularni biologiji.

Korake, ki smo jih naredili pred izolacijo DNA smo izvajali po postopku, ki je naveden v priročniku. Postopka izolacije DNA iz vzorcev periferne krvi in BC pa smo modificirali. Na koncu smo s pomočjo spektrofotometra NanoDrop v vsakem izoliranem vzorcu izmerili koncentracijo DNA, določili njeno čistoto in rezultate statistično analizirali.

### **3.2.1 Postopek izolacije DNA iz vzorcev periferne krvi bolnikov**

Za izolacijo DNA iz vzorcev periferne krvi smo delno modificirali postopek, ki je naveden v priročniku reagenčnega kompleta (21).

*Postopki, ki smo jih izvedli tik pred izolacijo DNA:*

- Izračunali smo in pripravili mešanico pufru FG2 in raztopine proteaze QIAGEN, in sicer tako, da smo za 1 mL krvi pomešali 0,5 mL prvega in 5 µL raztopine proteaze; za 3 mL krvi smo torej potrebovali 3-kratno količino te mešanice.

- Zmrznjene vzorce krvi smo odtalili v vodni kopeli na 37 °C in jih do izolacije hranili na ledu.
- Nato smo vodno kopel ogreli na 65 °C.
- Centrifugo (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) smo ohladili na 4 °C.
- Pripravili smo 70 % etanol (v/v), tako, da smo absolutni EtOH ustrezno redčili z destilirano vodo.

*Postopek izolacije DNA:*

1. Odpipetiramo 7,5 mL pufra FG1 v 15 mL, ustrezno označeno centrifugirko in dodamo 3 mL periferne krvi, jo dobro zapremo in vsebino 10 x močno premešamo z obračanjem.
2. Centrifugiramo 9 min na 2.500 x g.
3. Pazljivo odlijemo supernatant in obrnjeno centrifugirko 2 min pustimo na čisti papirnati brisači, da odstranimo še zadnje ostanke supernatanta, pri čemer pazimo, da vsa usedlina ostane v centrifugirki.
4. Dodamo 1,5 mL mešanice pufra FG2 in raztopine proteaze QIAGEN ter vsebino takoj premešamo na vibracijskem stresalniku pri visoki hitrosti, da se usedlina popolnoma homogenizira (običajno 3-4 x po 5 s).  
V primeru, da se usedlina ne homogenizira popolnoma, dodamo še 300 µL pufra FG2 in vsebino zopet dobro pretresemo na stresalniku.
5. Zaprto centrifugirko inkubiramo v vodni kopeli, in sicer 10 min na 65 °C.
6. Dodamo 1,5 mL 100 % izopropanola in dobro zaprto centrifugirko obračamo (približno 20 x), dokler se DNA ne obori.
7. Centrifugiramo 6 min na 2.500 x g.
8. Supernatant odlijemo in obrnjeno centrifugirko pustimo 5 min na čisti papirnati brisači ter pazimo, da vsa usedlina ostane v njej.
9. Dodamo 1,5 mL 70 % (v/v) etanola in temeljito premešamo na vibracijskem stresalniku pri najnižji hitrosti.
10. Centrifugiramo 6 min na 2.500 x g.
11. Odlijemo supernatant in obrnjeno centrifugirko pustimo 10 min na čistem papirju, da izhlapi ves etanol, pri tem pa pazimo, da usedlina ostane v centrifugirki.

12. S sterilno vatirano palčko obrišemo notranjo stran centrifugirke, da odstranimo morebitne ostanke etanola, pri čemer pazimo, da se ne dotaknemo usedline.
13. Dodamo 600  $\mu\text{L}$  pufru FG3, centrifugirko dobro zapremo in vsebino premešamo na vibracijskem stresalniku pri najnižji hitrosti ter izolirano DNA inkubiramo čez noč v vodni kopeli na 65 °C, da se popolnoma raztopi.

Po inkubaciji preko noči v vodni kopeli centrifugirke pobremo, jih obrišemo s papirnato brisačo in 1 min centrifugiramo na 400 x g, da se kaplice na stenah združijo z vsebino v centrifugirki. Nato raztopino DNA odpipetiramo v ustrezne označene 1,5-mL mikrocentrifugirke in jih shranimo v hladilniku na 4 °C.

### **3.2.2 Postopek izolacije DNA iz vzorcev BC**

DNA iz vzorcev BC smo izolirali po istem principu kot iz periferne krvi. Postopek se je razlikoval le v tem, da smo ga prilagodili različnim začetnim volumnom vzorcev, kar je vplivalo na aparature in pribor, ki smo jih pri tem uporabljali.

Izolacijo DNA iz vzorcev BC z volumni 600-2.000  $\mu\text{L}$  smo izvedli z enakimi aparaturami in priborom kot v primeru njene izolacije iz 3 mL periferne krvi.

Izolacijo DNA iz vzorcev BC z volumni 200-500  $\mu\text{L}$  pa smo naredili v 2-mL mikrocentrifugirkah, ki smo jih centrifugirali v drugi centrifugi (Centrifuge 5415 R). Za njihovo inkubacijo smo namesto vodne kopeli uporabljali termoblok.

*Postopki, ki smo jih izvedli tik pred izolacijo DNA:*

- Izračunali in pripravili smo mešanico pufru FG2 in raztopine proteaze QIAGEN, in sicer tako, da smo za 100  $\mu\text{L}$  BC pomešali 100  $\mu\text{L}$  prvega in 1  $\mu\text{L}$  raztopine encima.
- Zmrznjene vzorce BC smo odtalili v vodni kopeli na 37 °C in jih do izolacije shranili na ledu.
- Vodno kopol smo ogreli na 65 °C (za volumne BC od 600 do 2.000  $\mu\text{L}$ ).

- Ogrelimo termoblok na 65 °C (za volumne BC od 200 do 500 µL).

*Postopek izolacije DNA:*

Pri izolaciji DNA iz vzorcev BC smo sledili korakom v povsem enakem zaporedju kot v primeru izvajanja tega postopka iz vzorcev periferne krvi, pri čemer pa smo spreminjali volumne reagentov ter čas in število obratov pri centrifugiranju, in sicer glede na volumen posameznega vzorca BC. Volumen pufru FG3 smo prav tako določili sami, glede na izhodni volumen BC, razen če ni bil že naveden v priročniku. Pri uporabi centrifuge Centrifuge 5415 R je bil čas prvega centrifugiranja 30 s, namesto 20 s, ker je to najkrajši čas, ki ga lahko uporabimo pri tej aparaturi. Tekom dela smo se zaradi izboljšanja učinkovitosti postopka odločili podaljšati čas in povečati število obratov prvega centrifugiranja s centrifugo Centrifuge 5804 R.

Zadnjo spremembo v postopku smo naredili pri uporabi sterilnih vatiranih palčk, ki smo jih uporabljali le v primeru izvedbe izolacije v centrifugirkah (večji volumni vzorcev BC).

Zaradi boljše preglednosti smo vse uporabljene volumne reagentov ter čase in hitrosti centrifugiranja predstavili v Preglednicah II in III.

**Preglednica II:** Volumni uporabljenih reagentov ter časi centrifugiranja za vzorce BC z volumni 600-2.000 µL.

	<b>Vzorci BC [mL]</b>								
	<b>2</b>	<b>1,8</b>	<b>1,5</b>	<b>1</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>0,65</b>	<b>0,6</b>
<b>Pufer FG1 [mL]</b>	5	4,5	3,75	2,5	2,25	2	1,75	1,75	1,5
<b>Mešanica pufru FG2 in proteaze QIAGEN [mL]</b>	2	1,8	1,5	1	0,9	0,8	0,7	0,7	0,6
<b>100 % izopropanol [mL]</b>	2	1,8	1,5	1	0,9	0,8	0,7	0,7	0,6

<b>70 % etanol [mL]</b>	2	1,8	1,5	1	0,9	0,8	0,7	0,7	0,6
<b>Pufer FG3 [<math>\mu</math>L]</b>	400	400	350	300	300	300	300	300	300
<b>Prvo centrifugiranje</b>	9 min na 2.500 x g								
<b>Ostala centrifugiranja</b>	3 min na 2.000 x g								

**Preglednica III:** Volumni uporabljenih reagentov in časi centrifugiranja za vzorce BC z volumni 200-500  $\mu$ L.

	<b>Vzorci BC [<math>\mu</math>L]</b>		
	500	400	200
<b>Pufer FG1 [<math>\mu</math>L]</b>	1250	1000	500
<b>Mešanica pufra FG2 in proteaze QIAGEN [<math>\mu</math>L]</b>	500	400	200
<b>100 % izopropanol [<math>\mu</math>L]</b>	500	400	200
<b>70 % etanol [<math>\mu</math>L]</b>	500	400	200
<b>Pufer FG3 [<math>\mu</math>L]</b>	200	200	200
<b>Prvo centrifugiranje</b>	30 s na 10.000 x g		
<b>Ostala centrifugiranja</b>	3 min na 10.000 x g		

Po inkubaciji v vodni kopeli smo iz nje vzeli centrifugirke, jih obrisali s papirnato brisačo in centrifugirali 1 min na 400 x g, da smo kapljice, ki so se zadrževale na notranji steni omenjenih vsebnikov, združili z ostalo vsebino. Nato smo raztopine DNA prepipetirali v ustrezno označene 1,5-mL mikrocentrifugirke in jih shranili v hladilniku na 4 °C.

Vsebine 2-mL mikrocentrifugirk, v katerih smo izvedli izolacijo DNA iz vzorcev BC z volumni  $\leq 500 \mu\text{L}$ , smo po inkubaciji v termobloku neposredno odpipetirali v označene 1,5-mL mikrocentrifugirke in jih prav tako shranili v hladilniku na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.2.3 Določanje koncentracije in stopnje čistote izolirane DNA**

Koncentracije DNA v izoliranih vzorcih smo določili s spektrofotometrom NanoDrop. Računalniški program, ki ga aparat vsebuje, je nato na podlagi izmerjenih absorbanč pri 260 nm in 280 nm izračunal koncentracije DNA ter vrednosti razmerij absorbanč  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  in  $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$ , s katerimi smo ovrednotili njeno čistost.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Vrednotenje izplenov DNA iz vzorcev periferne krvi bolnikov

Na voljo smo imeli 120 vzorcev periferne krvi 15 bolnikov z rakom prostate, ki so bili uvrščeni v klinično študijo. Pri izolaciji DNA iz njih ter njenem ovrednotenju smo bili stoodstotno uspešni, zato smo lahko vse rezultate statistično analizirali.

Koncentracijo DNA smo izmerili šele takrat, ko se je ta popolnoma raztopila v pufri. Za učinkovitejše raztapljanje DNA smo centrifugirke po končanem postopku izolacije čez noč inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 65 °C. Kljub temu so bili v nekaterih, sicer redkih primerih še vedno prisotni deli neraztopljene DNA. Slabo raztapljanje je lahko posledica nezadostne količine dodanega pufra, prekratke inkubacije po končani izolaciji ali pa kontaminacije. Prvemu vzroku smo se želeli izogniti tako, da smo povečali volumen pufra FG3 s 300 na 600 µL. Podaljšali smo tudi trajanje inkubacije, in sicer iz 1 ure na inkubacijo preko noči. Kontaminaciji vzorca se lahko izognemo le z natančnim izvajanjem predpisanih korakov znotraj postopka izolacije in doslednim upoštevanjem pravil pri delu z biološkimi vzorci, med katere sodijo: redno razkuževanje površin in pribora, uporaba sterilnih nastavkov za pipetiranje ter centrifugirk in mikrocentrifugirk, pazljivo pipetiranje in uporaba zaščitnih rokavic. Najpogosteje povzročajo kontaminacijo ostanki topil, uporabljenih med postopkom izolacije, in prisotnost zaostalih proteinov. Prisotnost nečistot ugotavljamo z določanjem razmerja absorbanca A 260 nm /280 nm in A 260 nm/230 nm.

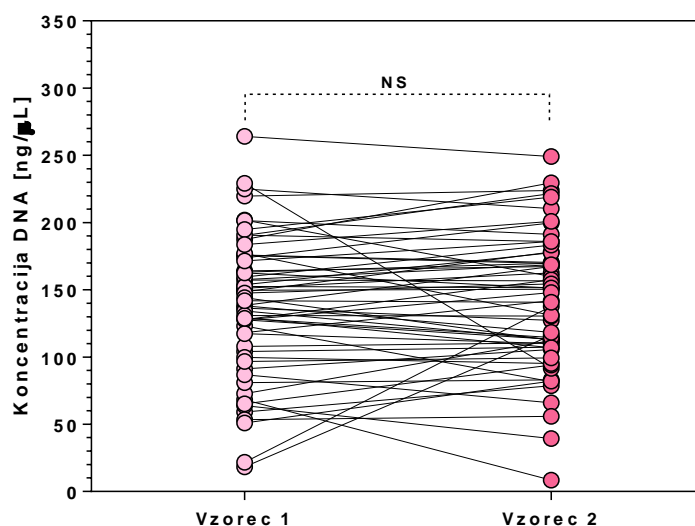
Tiste vzorce, v katerih smo opazili neraztopljeno DNA, smo pustili stati na sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo, tako dolgo, dokler se ni popolnoma raztopila. Šele nato smo jih odpipetirali v označene 1,5-mL mikrocentrifugirke, izmerili koncentracije in preverili čistoto DNA.

V statistično obdelavo smo vključili rezultate izolacije DNA iz vseh parnih vzorcev (Vzorec 1, Vzorec 2), ki jih je bilo skupaj 118 (59 parov). V primeru treh posameznih vzorcev v parih, ki smo jih v Preglednici IV (Priloga) označili z modro barvo, so bili rezultati razmerij absorbanca, s katerimi ocenjujemo čistoto DNA neustrezni, ob tem pa je bila tudi koncentracija DNA v njih zelo nizka. Kljub temu smo se jih odločili uvrstiti med ostale podatke za statično obdelavo, saj smo želeli prikazati realno stanje dobljenih

rezultatov. V nadaljnjo analizo pa nismo uvrstili dveh vzorcev, ki sta v Preglednici IV (Priloga) označena z rumeno barvo, saj nista imela para.

#### 4.1.1 Primerjava koncentracij DNA, izoliranih iz po dveh vzorcev periferne krvi, sočasno odvzetih posameznim bolnikom

Vsakemu bolniku so v različnih časovnih obdobjih sočasno odvzeli po dva 3-mL vzorca periferne krvi, iz katerih smo izolirali DNA. Najprej nas je zanimalo, ali se koncentracije DNA, določene v parnih vzorcih posameznega bolnika med seboj statistično značilno razlikujejo ali ne (Sliki 2 in 3). Statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo izvedli s parnim t-testom, pri čemer smo kot statistično značilne rezultate šteli tiste, z vrednostjo  $p \leq 0,05$ .



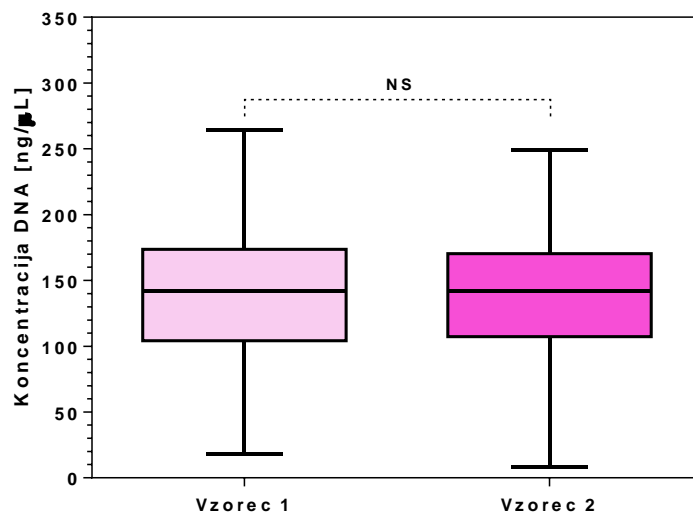
**Slika 2:** Primerjava koncentracij DNA, izoliranih iz parnih vzorcev periferne krvi posameznih bolnikov. Črte povezujejo izmerjene koncentracije DNA med omenjenimi pari vzorcev (Vzorec 1, Vzorec 2) istega bolnika. Legenda: NS – statistično neznačilno ( $p = 0,57$ ).

Slika 2 prikazuje razlike v koncentracijah DNA, izoliranih iz parov sočasno odvzetih vzorcev (Vzorec 1, Vzorec 2) periferne krvi bolnikov. Vidimo, da je razpon koncentracij DNA dokaj velik, od 8,4 ng/μL do 264,1 ng/μL (Preglednica IV, Priloga). Če primerjamo razlike koncentracij v parnih vzorcih pri istem bolniku, vidimo, da se ne razlikujejo



bistveno, z izjemo nekaj primerov. Parni t-test je pokazal, da sta povprečni vredosti koncentracij DNA v parnih vzorcih primerljivi ( $p = 0,57$ ), zato lahko zaključimo, da razlike med njimi niso statistično značilne (NS).

Rezultate lahko grafično predstavimo tudi na drug način (Slika 3).



**Slika 3:** Mediani, vrednosti 25. in 75. percentila ter razponi koncentracij DNA, izoliranih iz parov sočasno odvzetih vzorcev periferne krvi posameznega bolnika. Legenda: NS – statistično neznačilno ( $p = 0,57$ ).

Slika 3 nam poleg razponov koncentracij DNA (od najnižjih do najvišjih), prikazuje tudi mediani ter vrednosti 25. in 75. percentila v vsaki skupini parnih vzorcev (Vzorec 1 in Vzorec 2). Mediani sta povsem enaki ( $142 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). Vidimo tudi, da je pravokotnik skupine Vzorec 1 širši kot tisti pri skupini Vzorec 2, kar pomeni, da je v prvi skupini več rezultatov znotraj intervala 25 – 75 %. Primerjava izmerjenih koncentracij DNA v parnih vzorcih posameznih bolnikov je torej pokazala, da ni statistično značilnih razlik med njimi. Tak rezultat smo pričakovali, saj so bili vzorci posameznemu bolniku odvzeti ob istem času in v enakem volumnu ( $3 \text{ mL}$ ). Omenimo še, da smo imeli za vsakega bolnika na dan odvzema posameznega para vzorcev periferne krvi, na razpolago tudi podatek o številu levkocitov. V primerih, kjer smo v paru vzorcev izmerili zelo različne vrednosti DNA, lahko to pripišemo:

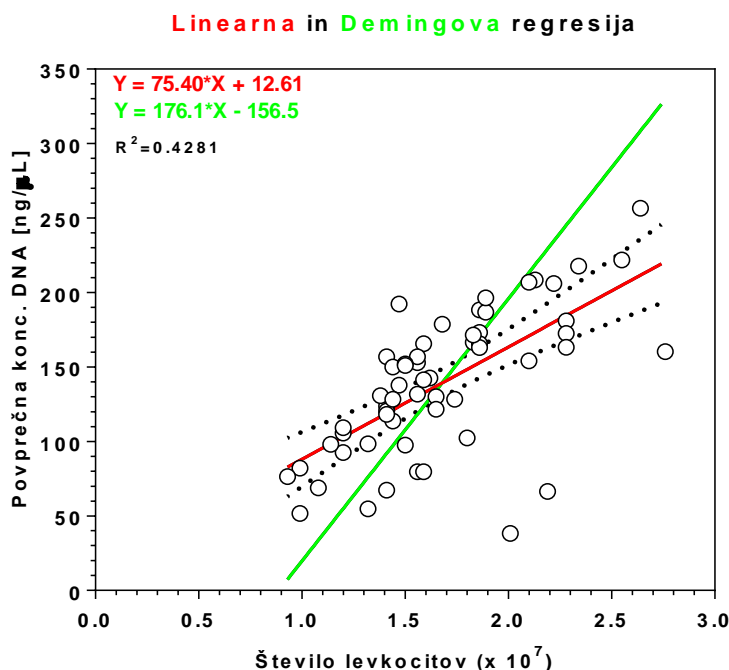
- napakam pri izvedbi postopka izolacije:
  - na začetku morda nismo dovolj močno premešali odmrznjene kri s pufrom FG1, tako da nismo lizirali vseh celic;
  - usedline po prvem centrifugiranju, v kateri je bila tudi DNA, morda nismo dovolj homogenizirali, zato nam v naslednjih korakih ni uspelo ločiti celokupne DNA od ostalih sestavin;
- nepopolnemu raztapljanju DNA: če v času določanja količine DNA, le-ta v posameznih vzorcih ni bila popolnoma raztopljena, smo v njih seveda izmerili manjše koncentracije, kot bi jih sicer.

#### **4.1.2 Odnos med številom levkocitov bolnikov in koncentracijami izolirane DNA iz vzorcev njihove periferne krvi**

Naslednje vprašanje, ki smo si ga zastavili, je, kakšna je povezava med številom levkocitov v odvzetih vzorcih periferne krvi in koncentracijami iz njih izolirane DNA. Glede na to, da izolirana DNA izvira iz krvnih celic z jedri, torej iz levkocitov, smo pričakovali, da bomo iz njihovega večjega števila lahko pridobili ustrezno večjo količino DNA. Najprej smo izračunali povprečne vrednosti koncentracij DNA, izoliranih iz parnih vzorcev periferne krvi, ki so bili v določenih časovnih obdobjih odvzeti posameznemu bolniku ter iz hematoloških izvidov, ki so nam jih posredovali s Kliničnega oddelka za urologijo, Kirurške klinike Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, zbrali podatke o številu levkocitov, določenem ob vsakokratnem vzorčenju. Ker so se podatki o številu levkocitov nanašali na liter krvi, smo jih preračunali na volumne naših vzorcev, torej vedno na 3 mL.

Odvisnost med povprečnimi koncentracijami DNA, izolirane iz parnih vzorcev periferne krvi, in številom levkocitov, ki jih je imel posamezen bolnik ob času njihovega odvzema, smo vrednotili s pomočjo linearne in Demingove regresije (Slika 4). Prva temelji na vsotah najmanjših kvadratov razlik med povprečnimi in posameznimi izmerjenimi vrednostmi spremenljivk  $x$  in  $y$ , pri čemer predpostavlja, da neodvisno spremenljivko  $x$  določamo brez napak, medtem ko je merjenje neodvisne spremenljivke  $y$  podvrženo naključnim napakam (22). Demingova ali ortogonalna regresija pa vsote omenjenih kvadratov minimalizira enakovredno, tako v smeri spremenljivke  $x$  kot  $y$ , zato je primernejša za uporabo (23). S pomočjo linearne regresije določimo tudi determinacijski koeficient  $R^2$ , to je kvadrat

korelacijskega koeficienta  $R$ , ki predstavlja razmerje varianc odvisne spremenljivke in stopnjo povezave med  $x$  in  $y$ . Njegova vrednost, npr. 0,5, pomeni, da lahko s pomočjo pripadajoče regresijske enačbe [ $Y = \text{nagib premice} \cdot X + \text{konstanta (presečišče z osjo } y)$ ] pojasnimo 50 % variance v odvisni spremenljivki.



**Slika 4:** Linearna in Demingova regresija med povprečnimi vrednostmi koncentracij DNA, izoliranih iz parnih vzorcev periferne krvi posameznih bolnikov, in številom levkocitov v času odvzema vzorcev. Prikazani so tudi: 95 % intervala zaupanja za potek premice, določene z linearno regresijo; enačbi premic, izračunani z linearno (rdeča barva) in Demingovo (zelena barva) regresijo ter vrednost parametra  $R^2$  (linearna regresija).

Zaradi navedenih razlik med linearno in Demingovo regresije sta poteka premic (nagiba in presečišči z osjo  $y$ ) različna, opazimo pa tudi kar nekaj točk (povprečnih vrednosti koncentracij DNA), ki ležijo precej stran od njiju, zlasti pri nižjih vrednostih. Vidimo tudi, da je bila vrednost determinacijskega koeficienta  $R^2$  precej nizka (0,43), zato lahko trdimo, da v našem primeru večje število levkocitov v posameznih vzorcih ni vedno pomenilo, da bomo iz njih izolirali ustrezno večje količine DNA.

Vzrokov za to je lahko več, npr. morebitne napake, narejene med postopkom izolacije DNA, ki smo jih že omenili v podpoglavju „Primerjava koncentracij DNA, izoliranih iz po dveh vzorcev periferne krvi, sočasno odvzetih posameznim bolnikom“. Zato bi bilo morda potrebno dodatno modificirati posamezne korake uporabljene metode in jih ustrezno ovrednotiti. Priporočljivo bi bilo narediti tudi vrsto dodatnih eksperimentov, v katerih bi DNA, z uporabo različnih metod, izolirali iz še večjega števila vzorcev periferne krvi in nato rezultate primerjali s številom levkocitov v njih.

#### **4.1.3 Vrednotenje stopnje čistote DNA, izolirane iz vzorcev periferne krvi bolnikov**

Čistoto izolirane DNA smo ocenili na podlagi vrednosti razmerij absorbanca  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  in  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ . Te le v primeru treh vzorcev niso bile ustrezne (Preglednica IV, Priloga), saj so preveč odstopali od ciljnih oz. zelenih vrednosti.

## 4.2 Vrednotenje izplenov DNA iz vzorcev BC

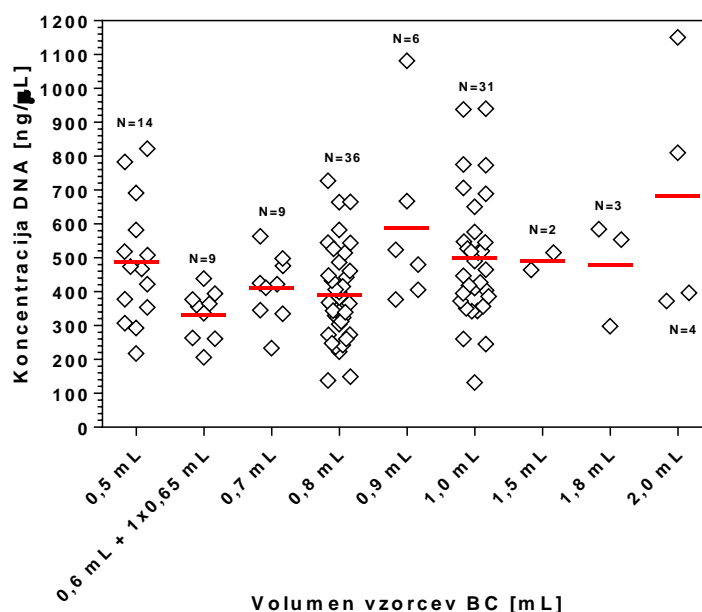
Na voljo smo imeli 118 vzorcev BC krvodajalcev, pri čemer nam je uspelo DNA izolirati iz 117. Med izvajanjem postopka izolacije smo večkrat naleteli na težavo, ki je bila neodvisna od izhodne količine vzorca, in sicer se je pogosto dogajalo, da se po dodatku pufra FG1 in prvem centrifugiranju usedlina ni dovolj močno prijela na steno centrifugirke/mikrocentrifugirke. Zato se nam je na začetku dela, pri enem vzorcu BC, zaradi neizkušenosti, med odlivanjem supernatanta po prvem centrifugiranju zgodilo, da smo skupaj z njim nehote odstranili tudi usedlino, ki je vsebovala DNA. Kasneje smo bili med vsako naslednjo izolacijo v tem koraku še posebej pazljivi in smo zato pri odstranjevanju supernatanta centrifugirko obrnili tako, da smo ga odlivali na strani, ki je bila nasproti tisti, kjer se je nahajala usedlina. Kadar smo opazili, da se je ta premaknila v smeri toka supernatanta, smo vzorec ponovno centrifugirali, da bi jo trdneje pritrdili na notranjo popvršino centrifugirke. Če se stanje ni izboljšalo niti po tretjem dodatnem centrifugiranju, smo supernatant previdno odstranili s pipeto, pri čemer smo se trudili, da smo ga odstranilo čim več in se pri tem z nastavkom nismo dotaknili usedline. Enake težave smo imeli tudi med odstranjevanjem supernatanta od oborjene DNA, zato smo tudi v tem primeru uporabili pipeto. Pazljivo odlivanje supernatantov ali njihovo odstranjevanje s pipeto, ki so ju spremljala dodatna centrifugiranja so precej podaljšali čas celotnega postopka izolacije, kar je bilo še posebej obremenjujoče takrat, ko so se tovrstne težave pojavile pri več vzorcih hkrati.

Težave smo poskušali odpraviti tudi tako, da smo povečali število obratov in podaljšali čas centrifugiranja, vendar pa pri tem nismo bili uspešni. Ker niti z dodatnimi centrifugiranjmi nismo izboljšali stanja, smo pomislili tudi na morebiten vpliv materiala, iz katerega so izdelane centrifugirke. Izolacijo DNA iz druge polovice vzorcev BC smo povsem nenamerno, zato ker nam je zmanjkalo centrifugirk prvotnega proizvajalca, izvedli v drugih, novega proizvajalca in opazili, da opisanih težav ni bilo več. Seveda pa ne moremo zagotovo trditi, da je bilo to dramatično izboljšanje posledica uporabe drugačnega materiala, saj bi za potrditev te predpostavke morali izvesti dodatne, bolj obsežne primerjalne eksperimente. Pomembna razlika med vzorci DNA, izoliranimi iz periferne krvi in BC, je bila tudi ta, da pri raztapljanju slednjih nismo imeli težav, tako kot pri prvih. Vzrok za to bi lahko bila manjša količina nečistot, saj je BC levkocitni koncentrat, zato je zelo verjetno, da iz tovrstnih vzorcev lahko izoliramo čistejšo DNA kot iz periferne krvi.

V statistično obdelave rezultatov smo vključili vzorce BC z volumni od 0,5 mL do 2 mL, katerih število je bilo tako, da smo lahko izračunali povprečne vrednosti iz njih izoliranih koncentracij DNA. Največje število vzorcev BC sta imela volumna 0,8 mL (N = 36) in 1 mL (N = 31).

#### 4.2.1 Odnos med koncentracijami izolirane DNA in volumni vzorcev BC

Statistična analiza rezultatov izolacije DNA iz vzorcev BC se pomebno razlikuje od tiste, ki smo jo izvedli pri vzorcih periferne krvi, saj smo imeli na voljo le po en vzorec BC posameznega krvodajalca, poleg tega pa so bili ti vzorčeni v različnih volumnih. Prav tako nismo imeli na voljo podatkov o številu levkocitov v naših vzorcih. Z Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) so nam posredovali le podatke, vezane na validacijo postopka priprave BC iz posameznih krvodajalskih odvzemov krvi, ki so jo izvedli v letošnjem letu. V ta namen so testirali 31 BC in ugotovili naslednje: mediana vrednost števila levkocitov:  $33,2 \times 10^9/L$  razpon: od  $12,0 \times 10^9/L$  do  $97,2 \times 10^9/L$  in povprečna vrednost:  $33,45 \times 10^9/L$ . Glede na to seveda ni bilo smiselno statistično vrednotiti odvisnosti med količino izolirane DNA in številom levkocitov v posameznem vzorcu BC. Zato smo namesto tega za primerjavo uporabili različne volumne vzorcev BC (Slike 5, 6 in 7).



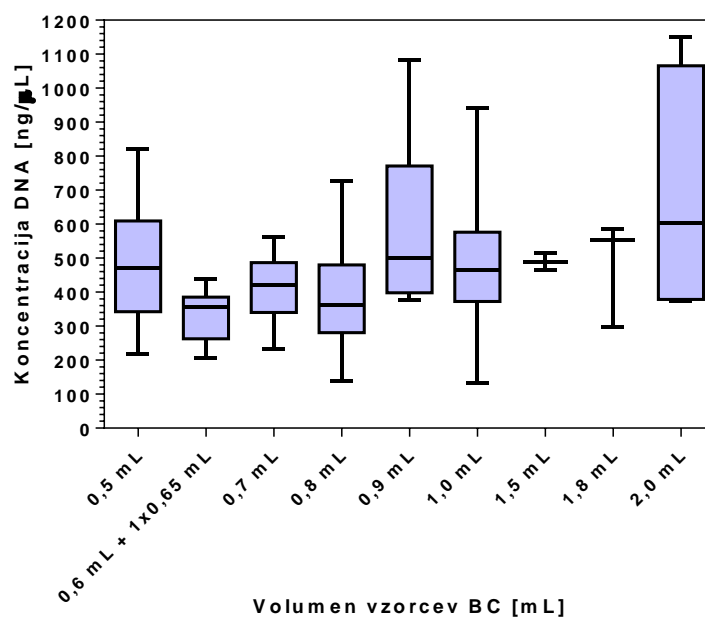
**Slika 5:** Koncentracije DNA, izolirane iz posameznih vzorcev BC, razdeljenih v skupine, glede na njihove volumne. Povprečne vrednosti koncentracij v posamezni skupini so označene z rdečo črto. Na grafu nista predstavljena vzorca z 0,2 mL (21,1 ng DNA/ $\mu$ L) in 0,4 mL (264,9 ng DNA/ $\mu$ L).

Zanimalo nas je, kakšni so razponi in povprečne vrednosti koncentracij DNA, izoliranih v posameznih skupinah BC, ki jih predstavljajo njihovi različni volumni, pri čemer smo iz analize izključili vzorca z volumnoma 0,2 mL in 0,4 mL. Na Sliki 5 sta za vsako volumsko skupino prikazana število pripadajočih vzorcev ter povprečna vrednost koncentracij DNA. Za primerjavo povprečnih vrednosti koncentracij DNA med različnimi volumskimi skupinami smo izvedli enosmerno analizo variance oz. enosmerni test ANOVA in ugotovili, da se, gledano v celoti, med seboj statistično pomembno razlikujejo ( $p = 0,001$ ). Pri nadaljnem, podrobnejšem vrednotenju razlik med pari posameznih volumskih skupin, pa smo z uporabo Holm-Šidákovega post hoc testa, dobili naslednje rezultate:

- povprečna vrednost koncentracije DNA v skupini 0,5 mL se, statistično gledano, ne razlikuje od tistih v ostalih skupinah (NS);
- povprečna vrednost koncentracije DNA v skupini 0,6 mL + 1 x 0,65 mL se statistično značilno razlikuje le od tiste v skupini 2 mL ( $p = 0,003$ );
- povprečna vrednost koncentracije DNA v skupini 0,7 mL se, statistično gledano, ne razlikuje od tistih v ostalih skupinah (NS);
- povprečna vrednost koncentracije DNA v skupini 0,8 mL se statistično značilno razlikuje le od tiste v skupini 2 mL ( $p = 0,002$ );
- povprečna vrednost koncentracije DNA v skupini 0,9 mL se, statistično gledano, ne razlikuje od tistih v ostalih skupinah (NS);
- povprečna vrednost koncentracije DNA v skupini 1 mL se, statistično gledano, ne razlikuje od tistih v ostalih skupinah (NS);
- povprečna vrednost koncentracije DNA v skupini 1,5 mL se, statistično gledano, ne razlikuje od tistih v ostalih skupinah (NS);

- povprečna vrednost koncentracije DNA v skupini 2 mL se statistično značilno razlikuje od tistih v skupinah 0,8 mL ( $p = 0,002$ ) in 0,6 mL + 1 x 0,65 mL ( $p = 0,003$ );

Vidimo torej, da ni nujno, da se z večanjem volumna vzorcev BC povečuje tudi povprečna količina izolirane DNA. Ta rezultat nas ni presenetil, kajti če si natančneje ogledamo validacijske podatke, ki so nam jih poslali z ZTM, opazimo veliko variabilnost števila levkocitov v posameznih vzorcih BC. Ta vrednost se seveda razlikuje med posamezniki, pri čemer so dejavniki, ki pomembno vplivajo nanjo, predvsem spol, starost in zdravstveno stanje v času odvzema krvi.



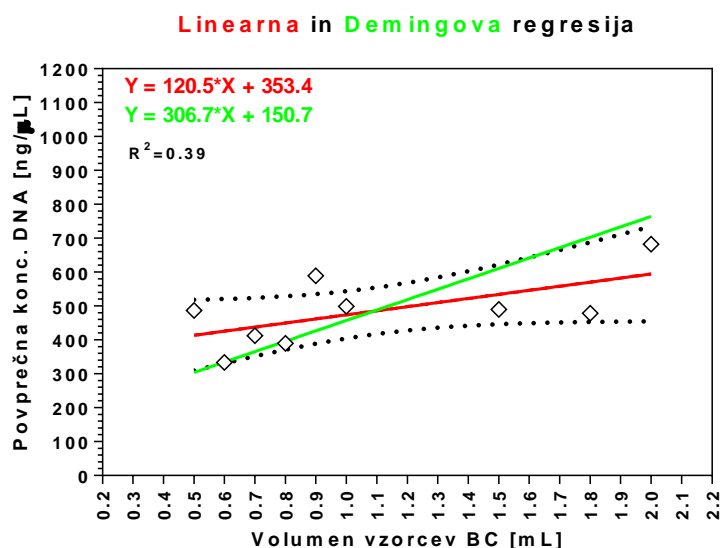
**Slika 6:** Grafični prikaz median, vrednosti 25. in 75. percentilov ter razponov koncentracij DNA, izoliranih iz vzorcev BC z različnimi volumni. Število vzorcev z volumnom 1,5 mL je bilo 2, z volumnom 1,8 mL pa 3.

Na Sliki 6 so za vsako volumsko skupino vzorcev BC prikazane mediane, razponi med najnižjimi in najvišjimi izmerjenimi koncentracijami, v obliki pravokotnikov pa vrednosti, ki sodijo v interval 25 in 75 % rezultatov. Tudi v tem primeru vidimo, da ni velikih razlik v medianah koncentracij DNA posameznih volumskih skupin. Pomembno je, da smo glede zaključkov naših analiz previdni, saj v primerjanih skupinah nismo imeli enakega števila



vzorcev, zato je lahko pomen povprečnih in medianih vrednosti v primeru njihovega majhnega števila precej vprašljiv.

Na koncu smo ovrednotili še stopnjo povezanosti med povprečnimi vrednostmi koncentracij DNA in volumskimi skupinami vzorcev BC, in sicer s pomočjo linearne in Demingove regresije (Slika 7).



**Slika 7:** Linearna in Demingova regresija med povprečnimi vrednostmi koncentracij DNA posameznih volumskih skupin vzorcev BC. Prikazani so tudi: 95 % intervala zaupanja za potek premice, določene z linearno regresijo; enačbi premic, izračunani z linearno (rdeča barva) in Demingovo (zelena barva) regresijo ter vrednost parametra  $R^2$  (linearna regresija).

Poteka premic, izračunana z linearno in Demingovo regresijo, sta po pričakovanju različna, poleg tega pa kar nekaj povprečnih vrednosti koncentracij DNA leži precej stran od njiju. Tudi vrednost determinacijskega koeficienta  $R^2$  je nizka (0,39), zato lahko trdimo, da v našem primeru večji volumen vzorca BC še ne pomeni, da bomo iz njega izolirali temu ustrezno večjo količino DNA. Najverjetnejše razloge za to pa smo že navedli v prejšnjih odstavkih.

#### **4.2.2 Vrednoteje čistote DNA, izolirane iz vzorcev BC**

Iz podatkov razmerij absorbanc, s pomočjo katerih ocenjujemo čistoto DNA, vidimo, da kriterijem ni ustrezal samo en vzorec BC, ki smo ga v Preglednici V (Priloga) označili z modro barvo. Zdi se, da smo iz vzorcev BC izolirali DNA z večjo čistoto kot iz vzorcev periferne krvi. Slednja je namreč kompleksna mešanica različnih celičnih in drugih sestavin, BC pa pretežno celični koncentrat (levkociti, trombociti), zato je možnost za kontaminacijo izolirane DNA iz periferne krvi večja.

#### **4.3 Primerjava povprečnih koncentracij DNA, izoliranih iz vzorcev periferne krvi bolnikov in BC krvodajalcev**

Zanimalo nas je še, ali naši rezultati potrjujejo dejstvo, da je BC nekajkratni koncentrat levkocitov, v primerjavi s periferno krvjo. Zato smo najprej preračunali povprečni koncentraciji DNA, pridobljeni iz obeh virov, in sicer na 1 mL, nato pa izračunali njuno razmerje, kot sledi:

A - povprečna koncentracija DNA, izolirana iz 1 mL BC (N=31): 481,5 ng/ $\mu$ L

B - povprečna koncentracija DNA, izolirana iz 1 mL krvi (N=59): 139,16 ng/ $\mu$ L /3 = 46,4 ng/ $\mu$ L

Razmerje:  $A/B = 481,5/46,4 = 10,4$

Rezultat potrjuje dejstvo, da lahko BC v enakem volumnu vsebuje od 6- do 10-krat več levkocitov kot periferna kri. Razlike v vsebnostih DNA v vzorcih BC in periferne krvi pa smo zlahka vizualno zaznali tekom postopka njene izolacije, saj se je v primeru BC izoborila v bistveno večji količini kot v primeru periferne krvi.

## 5 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo s pomočjo komercialnega reagenčnega kompleta FlexiGene DNA Kit izolirali DNA iz 120 vzorcev periferne krvi, odvzetih 15 bolnikom z rakom prostate, v različnih časovnih obdobjih med potekom klinične študije, ter DNA iz 117 vzorcev BC krvodajalcev. V vseh vzorcih smo izmerili koncentracije DNA in ovrednotili njeno čistoto, nato pa rezultate statistično analizirali.

Pri izolaciji DNA smo upoštevali modificirani postopek proizvajalca omenjenega reagenčnega kompleta in kljub temu smo naleteli na določene probleme. Tako smo imeli težave pri končnem raztapljanju vzorcev DNA, izoliranih iz periferne krvi, v primeru vzorcev BC pa smo morali reševati zaplete, povezane s pritrditvijo usedline na stene centrifugirke po prvem centrifugiranju, ki je sledilo celični lizi, kar je seveda zelo pomembno za uspešno izolacijo DNA.

Statistično analizo rezultatov smo izvedli posebej za vzorce periferne krvi bolnikov in posebej za vzorce BC krvodajalcev. Za vsakega bolnika smo imeli na voljo pare enakovrednih, ekvivolumskih (3 mL) vzorcev periferne krvi, odvzetih na isti dan, pri čemer pa so bila vzorčenja izvedena večkrat, v različnih časovnih obdobjih. Ugotovili smo, da se vrednosti koncentracij DNA, izolirane iz parnih vzorcev istega bolnika, med seboj statistično ne razlikujejo, ter, da ne moremo trditi, da lahko iz vzorcev periferne krvi z večjim številom levkocitov izoliramo ustrezno večje količine DNA.

Pri vzorcih BC, ki so bili za razliko od vzorcev periferne krvi vzorčeni v različnih volumnih, pa smo vrednotili povezavo med količinami izhodnih BC in koncentracijami iz njih izolirane DNA. S statistično analizo smo ugotovili, da ni nujno, da iz večjih volumnov BC pridobimo višje koncentracije DNA.

Z izračunom razmerja povprečnih koncentracij DNA, izoliranih iz 1 mL BC in 1 mL periferne krvi smo pokazali, da smo iz BC uspeli pridobiti približno 10-krat več DNA kot iz periferne krvi. Na podlagi vrednosti razmerij absorbanc, in sicer  $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$  in  $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$  pa smo ocenili, da so vzorci DNA, izolirani iz BC izkazovali večjo čistoto kot tisti, pridobljeni iz periferne krvi.

Glede na naše rezultate in spoznanja, priporočamo nadaljne modifikacije uporabljenega postopka izolacije DNA iz obeh vrst bioloških vzorcev. Za razjasnitev vprašanj v zvezi s

povezavo med količino izolirane DNA in številom levkocitov v vzorcih periferne krvi ali volumni izhodnih BC, pa bodo potrebne dodatne, obsežnejše raziskave.

## 6 LITERATURA

1. Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, Mignini F, Napolioni V: Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2011; 5(1): 1-7.
2. Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, 2013: 236, 248.
3. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U: *Williams Hematology*, McGraw-Hill, New York, 2001: 319.
4. Flaherty DK: *Immunology for Pharmacy*, Elsevier Mosby, St. Louis, 2012: 5.
5. <http://www.humanimmunologyportal.com/protocols/preparing-a-buffy-coat-from-whole-blood/> Dostop: 17. 7. 2016
6. <http://www.medical-labs.net/blood-plasma-and-buffy-coat-318/> Dostop: 17. 7. 2016
7. Boyer R: *Temelji biokemije*, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 252.
8. Richardson AJ, Narendran N, Guymer RH, Vu H, Baird PN: Blood storage at 4 °C-factors involved in DNA yield and quality. *J Lab Clin Med* 2006; 147(6): 290-4.
9. NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.3 User's Manual. NanoDrop Technologies, Inc 2006: 5-2.
10. Chacon-Cortes D, Griffiths LR: Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 2014; 2: 1-9.
11. <https://www.qiagen.com:443/si/shop/sample-technologies/dna/magattract-magnetic-rack/> Dostop: 23. 7. 2016
12. Hubel A, Spindler R, Skubitz APN: Storage of Human Biospecimens: Selection of the Optimal Storage Temperature. *Biopreservation and Biobanking* 2014; 12(3): 165-75.
13. Gates KS: An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals. *Chem Res Toxicol*. 2009; 22(11): 1747-60.

14. [http://www.ogt.co.uk/resources/literature/403\\_dna\\_storage\\_and\\_quality](http://www.ogt.co.uk/resources/literature/403_dna_storage_and_quality) Dostop: 16. 7. 2016
15. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H: Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 32(11): 1102-15.
16. Shao W, Khin S, Kopp WC: Charakterization of Effect of Repeated Freeze and Thaw Cycles on Stability of Genomic DNA Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Biopreservation and Biobanking* 2012; 10(1): 4-11.
17. Lee SB, Crouse CA, Kline MC: Optimizing Storage and Handling of DNA Extracts. *Forensic Science Review* 2010; 22(2): 131-44.
18. Anchordoquy TJ, Molina MC: Preservation of DNA. *Cell Preservation Tehnology* 2007; 5(4): 180-8.
19. Bonnet J, Colotte M, Coudy D, Couallier V, Portier J, Morin B, Tuffet S: Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage. *Nucleic Acids Research* 2010; 38(5): 1531-46.
20. Gaillard C, Strauss F: Eliminating DNA loss and denaturation during storage in plastic microtubes. *International biotechnology laboratory* 2000; 18(13): 6.
21. FlexiGene<sup>®</sup> DNA Handbook. Qiagen 2010: 18-20.
22. Dunn J, Wild D. Calibration curve fitting. V: *The immunoassay handbook*. Elsevier, Oxford, 2013: 323-336.
23. Davies C. Immunoassay performance measures. V: *The immunoassay handbook*. Elsevier, Oxford, 2013: 11-26.

## 7 PRILOGE

Preglednica IV: Oznake in različne lastnosti vzorcev periferne krvi bolnikov z rakom prostate.

Zap. št.	Vzorec	Datum odvzema	Datum izolacije DNA	Konc. levkocitov ( $\times 10^7$ )	A 260 nm	A 280 nm	A 260 nm/280 nm	A 260 nm/230 nm	Konc. DNA [ng/ $\mu$ L]
1.	P9 DTH	29. 7. 2015	3. 5. 2016	1,32	1,823	0,956	1,91	1,30	91,2
2.	P9 DTH	29. 7. 2015	3. 5. 2016	1,32	2,112	1,101	1,92	1,47	105,6
3.	P10 DTH	25. 11. 2015	1. 3. 2016	1,56	2,768	1,433	1,93	1,50	138,4
4.	P10 DTH	25. 11. 2015	2. 3. 2016	1,56	3,348	1,727	1,94	1,65	167,4
5.	P10 V2a	4. 8. 2015	13. 5. 2016	1,59	3,281	1,798	1,82	1,91	164,0
6.	P10 V2a	4. 8. 2015	13. 5. 2016	1,59	2,927	1,601	1,83	1,74	146,3
7.	P11 DTH	4. 11. 2015	24. 2. 2016	1,41	3,145	1,624	1,94	1,53	157,2
8.	P11 DTH	4. 11. 2015	24. 2. 2016	1,41	3,132	1,622	1,93	1,60	156,6
9.	P11 DTH	3. 12. 2015	10. 3. 2016	1,80	2,460	1,258	1,96	1,66	123,0
10.	P11 DTH	3. 12. 2015	15. 3. 2016	1,80	1,637	0,826	1,98	1,40	81,8
11.	P11 V2a	11. 8. 2015	13. 5. 2016	1,56	3,024	1,656	1,83	2,00	151,2
12.	P11 V2a	11. 8. 2015	13. 5. 2016	1,56	3,253	1,845	1,76	1,41	162,6
13.	P12 DTH	9. 12. 2015	24. 2. 2016	2,13	3,748	1,986	1,89	1,62	187,4
14.	P12 DTH	9. 12. 2015	1. 3. 2016	2,13	4,590	2,459	1,87	1,52	229,5
15.	P12 DTH	11. 11. 2015	10. 3. 2016	2,55	4,394	2,342	1,88	1,88	219,7
16.	P12 DTH	11. 11. 2015	10. 3. 2016	2,55	4,478	2,379	1,88	1,87	223,9
17.	P12 V1a	29. 7. 2015	3. 5. 2016	1,86	3,812	1,976	1,93	1,38	190,6
18.	P12 V1a	29. 7. 2015	3. 5. 2016	1,86	3,719	1,940	1,92	1,70	186,0
19.	P12 V2a	18. 8. 2015	23. 2. 2016	3,00	5,082	2,624	1,94	1,83	254,1
20.	P13 DTH	25. 11. 2015	10. 3. 2016	1,56	2,726	1,399	1,95	1,79	136,3
21.	P13 DTH	25. 11. 2015	15. 3. 2016	1,56	2,546	1,349	1,89	1,58	127,3
22.	P13 DTH	22. 12. 2015	10. 3. 2016	2,01	3,365	1,757	1,91	1,83	168,2

23.	P13 DTH	22. 12. 2015	15. 3. 2016	2,01	0,168	0,069	2,43	0,34	8,4
24.	P13 V1a	11. 8. 2015	3. 5. 2016	1,41	0,368	0,157	2,35	0,63	18,4
25.	P13 V1a	11. 8. 2015	3. 5. 2016	1,41	2,321	1,197	1,94	1,58	116,1
26.	P14 DTH	2. 12. 2015	24. 2. 2016	2,64	5,281	2,759	1,91	1,81	264,1
27.	P14 DTH	2. 12. 2015	1. 3. 2016	2,64	4,984	2,648	1,88	1,68	249,2
28.	P14 DTH	4. 11. 2015	10. 3. 2016	2,22	3,810	2,046	1,86	1,49	190,5
29.	P14 DTH	4. 11. 2015	10. 3. 2016	2,22	4,433	2,362	1,88	1,78	221,6
30.	P14 DTH	29. 12. 2015	16. 3. 2016	2,34	4,502	2,411	1,87	1,70	225,1
31.	P14 DTH	29. 12. 2015	16. 3. 2016	2,34	4,208	2,167	1,94	1,69	210,4
32.	P14 V1a	18. 8. 2015	23. 2. 2016	2,19	4,870	2,556	1,91	1,69	243,5
33.	P15 DTH	22. 12. 2015	16. 3. 2016	1,20	1,453	0,76	1,91	1,30	72,7
34.	P15 DTH	22. 12. 2015	16. 3. 2016	1,20	2,247	1,162	1,93	1,35	112,3
35.	P15 DTH	19. 4. 2016	3. 5. 2016	1,56	0,436	0,175	2,50	0,82	21,8
36.	P15 DTH	19. 4. 2016	13. 5. 2016	1,56	2,754	1,485	1,85	2,07	137,7
37.	P15 V1a	4. 2. 2016	21. 3. 2016	0,99	1,620	0,849	1,91	1,25	81,0
38.	P15 V1a	4. 2. 2016	21. 3. 2016	0,99	1,662	0,834	1,99	1,18	83,1
39.	P15 V2a	25. 2. 2016	16. 3. 2016	1,08	1,183	0,618	1,91	1,15	59,2
40.	P15 V2a	25. 2. 2016	16. 3. 2016	1,08	1,573	0,837	1,88	1,00	78,6
41.	P15 V3	17. 11. 2015	2. 3. 2016	0,93	1,739	0,915	1,90	1,17	86,9
42.	P15 V3	17. 11. 2015	10. 3. 2016	0,93	1,317	0,694	1,90	1,25	65,9
43.	P15 V3a	17. 3. 2016	4. 4. 2016	0,99	1,275	0,661	1,93	0,96	63,8
44.	P15 V3a	17. 3. 2016	4. 4. 2016	0,99	0,789	0,358	2,20	0,81	39,4
45.	P15 V4a	7. 4. 2016	3. 5. 2016	1,32	1,070	0,548	1,95	0,90	53,5
46.	P15 V4a	7. 4. 2016	3. 5. 2016	1,32	1,119	0,551	2,03	0,96	55,9
47.	P15 V4	8. 12. 2015	15. 3. 2016	1,20	2,081	1,085	1,92	1,59	104,1
48.	P15 V4	8. 12. 2015	15. 3. 2016	1,20	2,147	1,116	1,92	1,53	107,3
49.	P15 levkaferenza	2. 9. 2015	23. 2. 2016	1,41	2,684	1,383	1,94	1,30	134,2
50.	P15 levkaferenza	2. 9. 2015	23. 2. 2016	1,41	2,262	1,155	1,96	1,35	113,1
51.	P16 DTH	4. 1. 2016	10. 3. 2016	2,28	4,037	2,157	1,87	1,85	201,8



52.	P16 DTH	4. 1. 2016	10. 3. 2016	2,28	3,197	1,686	1,90	1,84	159,9
53.	P16 V2	3. 11. 2015	10. 3. 2016	1,62	2,556	1,355	1,89	1,66	127,8
54.	P16 V2	3. 11. 2015	10. 3. 2016	1,62	3,148	1,659	1,90	1,52	157,4
55.	P16 V3	24. 11. 2015	24. 2. 2016	1,86	3,518	1,848	1,90	1,64	175,9
56.	P16 V3	24. 11. 2015	1. 3. 2016	1,86	3,409	1,793	1,90	1,50	170,4
57.	P16 V4	15. 12. 2015	15. 3. 2016	1,83	3,262	1,770	1,84	1,62	163,1
58.	P16 V4	15. 12. 2015	15. 3. 2016	1,83	3,397	1,753	1,94	1,46	169,8
59.	P17 DTH	6. 1. 2016	21. 3. 2016	2,28	3,510	1,854	1,89	1,68	175,5
60.	P17 DTH	6. 1. 2016	21. 3. 2016	2,28	3,393	1,760	1,93	1,66	169,6
61.	P17 V1a	12. 2. 2016	21. 3. 2016	1,89	3,474	1,836	1,89	1,57	173,7
62.	P17 V1a	12. 2. 2016	22. 3. 2016	1,89	3,997	2,090	1,91	1,60	199,8
63.	P17 V2	10. 11. 2015	2. 3. 2016	1,89	4,031	2,086	1,93	1,83	201,5
64.	P17 V2	10. 11. 2015	2. 3. 2016	1,89	3,825	1,979	1,93	1,69	191,2
65.	P17 V2a	8. 3. 2016	21. 3. 2016	2,28	2,969	1,566	1,90	1,53	148,5
66.	P17 V2a	8. 3. 2016	22. 3. 2016	2,28	3,563	1,838	1,94	1,55	178,1
67.	P17 V3	2. 12. 2015	15. 3. 2016	1,86	3,077	1,610	1,91	1,69	153,8
68.	P17 V3	2. 12. 2015	15. 3. 2016	1,86	3,552	1,848	1,92	1,74	177,6
69.	P17 V3a	30. 3. 2016	4. 4. 2016	1,86	3,151	1,671	1,89	1,65	157,6
70.	P17 V3a	30. 3. 2016	4. 4. 2016	1,86	3,371	1,717	1,96	1,65	168,6
71.	P17 V4a	19. 4. 2016	3. 5. 2016	2,19	1,020	0,551	1,85	1,52	51,0
72.	P17 V4a	19. 4. 2016	13. 5. 2016	2,19	1,641	0,798	2,05	1,42	82,0
73.	P17 V4	23. 12. 2015	24. 2. 2016	1,83	3,191	1,653	1,93	1,69	159,6
74.	P17 V4	23. 12. 2015	1. 3. 2016	1,83	3,666	1,904	1,93	1,74	183,3
75.	P18 DTH	20. 1. 2016	22. 3. 2016	1,20	2,157	1,085	1,99	1,27	107,9
76.	P18 DTH	20. 1. 2016	22. 3. 2016	1,20	2,210	1,137	1,94	1,16	110,5
77.	P18 V1	3. 11. 2015	2. 3. 2016	1,44	2,992	1,536	1,95	1,47	149,6
78.	P18 V1	3. 11. 2015	2. 3. 2016	1,44	3,010	1,593	1,89	1,54	150,5
79.	P18 V1a	10. 3. 2016	16. 3. 2016	1,38	2,615	1,376	1,90	1,64	130,8
80.	P18 V1a	10. 3. 2016	16. 3. 2016	1,38	2,610	1,323	1,97	1,50	130,5

81.	P18 V2	24. 11. 2015	15. 3. 2016	1,41	2,554	1,348	1,90	1,44	127,7
82.	P18 V2	24. 11. 2015	15. 3. 2016	1,41	2,264	1,174	1,93	1,30	113,2
83.	P18 V2a	1. 4. 2016	4. 4. 2016	1,44	2,347	1,248	1,88	1,36	117,4
84.	P18 V2a	1. 4. 2016	4. 4. 2016	1,44	2,198	1,132	1,94	1,25	109,9
85.	P18 V3	15. 12. 2015	1. 3. 2016	1,50	3,050	1,601	1,90	1,38	152,5
86.	P18 V3	15. 12. 2015	15. 3. 2016	1,50	3,031	1,578	1,92	1,51	151,5
87.	P18 V4	6. 1. 2016	21. 3. 2016	1,50	2,950	1,564	1,89	1,54	147,5
88.	P18 V4	6. 1. 2016	21. 3. 2016	1,50	3,091	1,582	1,95	1,51	154,5
89.	P19 DTH	12. 4. 2016	13. 5. 2016	1,74	2,882	1,580	1,82	2,03	144,1
90.	P19 DTH	12. 4. 2016	13. 5. 2016	1,74	2,247	1,223	1,84	1,89	112,4
91.	P19 V1	22. 1. 2016	21. 3. 2016	2,10	3,539	1,887	1,88	1,68	177,0
92.	P19 V1	22. 1. 2016	21. 3. 2016	2,10	2,622	1,356	1,93	1,41	131,1
93.	P19 V2	12. 2. 2016	22. 3. 2016	1,65	2,364	1,282	1,84	1,16	118,2
94.	P19 V2	12. 2. 2016	22. 3. 2016	1,65	2,838	1,469	1,93	1,40	141,9
95.	P19 V3	1. 3. 2016	21. 3. 2016	1,56	3,251	1,720	1,89	1,49	162,6
96.	P19 V3	1. 3. 2016	21. 3. 2016	1,56	3,027	1,575	1,92	1,70	151,3
97.	P19 V4	22. 3. 2016	4. 4. 2016	1,47	2,554	1,333	1,92	1,40	127,7
98.	P19 V4	22. 3. 2016	4. 4. 2016	1,47	2,958	1,521	1,94	1,42	147,9
99.	P20 V1	16. 2. 2016	22. 3. 2016	1,68	3,429	1,791	1,91	1,52	171,4
100.	P20 V1	16. 2. 2016	22. 3. 2016	1,68	3,721	1,943	1,91	1,53	186,0
101.	P20 V2	10. 3. 2016	16. 3. 2016	2,10	3,898	2,070	1,88	1,73	194,9
102.	P20 V2	10. 3. 2016	16. 3. 2016	2,10	4,380	2,355	1,86	1,39	219,0
103.	P20 V3	1. 4. 2016	4. 4. 2016	1,65	2,574	1,385	1,86	1,64	128,7
104.	P20 V3	1. 4. 2016	4. 4. 2016	1,65	2,293	1,200	1,91	1,35	114,6
105.	P20 afereza	13. 1. 2016	22. 3. 2016	2,76	4,582	2,447	1,87	1,81	229,1
106.	P20 afereza	13. 1. 2016	22. 3. 2016	2,76	1,830	0,912	2,01	0,99	91,5
107.	P21 V1	23. 2. 2016	16. 3. 2016	1,59	1,305	0,764	1,71	1,12	65,2
108.	P21 V1	23. 2. 2016	16. 3. 2016	1,59	1,881	1,005	1,87	0,96	94,0
109.	P21 V2	15. 3. 2016	4. 4. 2016	1,59	2,837	1,504	1,89	1,31	141,9

110.	P21 V2	15. 3. 2016	4. 4. 2016	1,59	2,817	1,498	1,88	1,28	140,8
111.	P21 V3	5. 4. 2016	3. 5. 2016	1,50	1,997	1,098	1,82	1,82	99,8
112.	P21 V3	5. 4. 2016	13. 5. 2016	1,50	1,905	0,959	1,99	1,26	95,2
113.	P21 afereza	20. 1. 2016	22. 3. 2016	1,47	3,671	1,980	1,85	1,65	183,6
114.	P21 afereza	20. 1. 2016	22. 3. 2016	1,47	4,019	2,095	1,92	1,35	200,9
115.	P22 V1	4. 3. 2016	22. 3. 2016	1,41	2,586	1,344	1,92	1,32	129,3
116.	P22 V1	4. 3. 2016	22. 3. 2016	1,41	2,137	1,104	1,94	1,23	106,9
117.	P22 V2	24. 3. 2016	4. 4. 2016	1,14	1,934	1,017	1,90	1,15	96,7
118.	P22 V2	24. 3. 2016	4. 4. 2016	1,14	1,988	0,995	2,00	1,18	99,4
119.	P22 V3	15. 4. 2016	3. 5. 2016	1,44	2,762	1,518	1,82	1,85	138,1
120.	P22 V3	15. 4. 2016	13. 5. 2016	1,44	2,369	1,171	2,02	1,54	118,4

Legenda:

- Vzorca označena z rumeno barvo: nismo ju upoštevali pri statistični analizi, ker nimata para.

- Vzorci označeni z modro barvo: rezultati razmerij absorbanca A 260 nm/280 nm in A 260 nm/230 nm so neustrezni, vendar smo jih kljub temu vključili v statistično analizo.

**Preglednica V: Oznake in različne lastnosti vzorcev BC krvodajalcev.**

Zap. št.	Vzorec	Datum izdaje	Datum izolacije DNA	Volumen BC [mL]	Koncentracija levkocitov ( $\times 10^7$ )	A 260 nm	A 280 nm	A 260 nm/280 nm	A 260 nm/230 nm	Koncentracija DNA [ng/ $\mu$ L]
1.	P1 BCV1a	13. 1. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	6,596	3,637	1,81	1,88	329,8
2.	P1 BCV2a	3. 2. 2015	16. 5. 2016	0,5	1,66	11,643	6,632	1,76	1,86	582,1
3.	P1 BCV3a	24. 2. 2015	9. 5. 2016	0,6	1,99	8,767	4,753	1,84	1,99	438,4
4.	P1 BCV4a	17. 3. 2015	9. 5. 2016	0,6	1,99	5,265	2,822	1,87	1,74	263,3
5.	P2 BCV1a	20. 1. 2015	21. 4. 2016	0,8	2,66	6,475	3,491	1,85	1,93	323,8
6.	P2 BCV2a	10. 2. 2015	16. 5. 2016	0,5	1,66	13,820	7,465	1,85	2,00	691,0
7.	P2 BCV3a	3. 3. 2015	12. 5. 2016	0,7	2,32	11,270	6,207	1,82	2,14	563,5
8.	P2 BCV4a	24. 3. 2015	9. 5. 2016	0,6	1,99	7,120	3,821	1,86	1,94	356,0
9.	P6 BCV1	24. 10. 2014	16. 5. 2016	0,2	6,64	0,421	0,234	1,80	2,08	21,1
10.	P6 BCV2	18. 11. 2014	14. 4. 2016	1	3,32	8,934	4,946	1,81	1,87	446,7
11.	P6 BCV3	9. 12. 2014	14. 4. 2016	1	3,32	8,076	4,437	1,82	1,74	403,8
12.	P6 BCV4	30. 12. 2014	21. 4. 2016	0,8	2,66	6,086	3,271	1,86	1,89	304,3
13.	P6 BCV1a	24. 2. 2015	12. 4. 2016	0,5	1,66	7,559	4,201	1,80	2,31	377,9
14.	P6 BCV2a	17. 3. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	7,984	4,312	1,85	1,94	399,2
15.	P6 BCV2a, $\approx 10^8$ celic	17. 3. 2015	16. 5. 2016	1,8	5,98	11,075	6,072	1,82	2,27	553,8
16.	P6 BCV3a	8. 4. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	8,851	4,731	1,87	2,13	442,6
17.	P6 BCV4a	24. 4. 2015	10. 5. 2016	0,9	2,99	8,107	4,394	1,85	2,11	405,4
18.	P7 BCV1	6. 11. 2014	12. 4. 2016	0,5	1,66	4,347	2,372	1,83	2,30	217,3
19.	P7 BCV2	27. 11. 2014	9. 5. 2016	2	6,64	7,458	3,974	1,88	2,12	372,9
20.	P7 BCV3	18. 12. 2014	9. 5. 2016	0,6	1,99	7,280	3,906	1,86	1,96	364,0
21.	P7 BCV4	8. 1. 2015	21. 4. 2016	0,8	2,66	8,314	4,546	1,83	1,92	415,7
22.	P7 BCV1a	3. 3. 2015	14. 4. 2016	1	3,32	15,461	8,347	1,85	1,82	773,1
23.	P7 BCV2a	24. 3. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	6,476	3,409	1,90	2,07	323,8

24.	P7 BCV3a	14. 4. 2015	14. 4. 2016	1	3,32	8,221	4,484	1,83	1,82	411,0
25.	P7 BCV4a	5. 5. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	7,236	3,949	1,83	1,88	361,8
26.	P8 BCV1	11. 11. 2014	20. 4. 2016	0,8	2,66	10,902	6,035	1,81	2,07	545,1
27.	P8 BCV2	2. 12. 2014	14. 4. 2016	1	3,32	9,810	5,471	1,79	1,88	490,5
28.	P8 BCV3	23. 12. 2014	21. 4. 2016	0,8	2,66	13,282	7,089	1,87	2,12	664,1
29.	P8 BCV4	14. 1. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	9,734	5,380	1,81	1,98	486,7
30.	P8 BCV2a	31. 3. 2015	21. 4. 2016	0,8	2,66	4,466	2,401	1,86	1,78	223,3
31.	P8 BCV3a	21. 4. 2015	18. 4. 2016	1	3,32	10,961	5,922	1,85	2,13	548,0
32.	P8 BCV4a	12. 5. 2015	18. 4. 2016	1	3,32	6,871	3,669	1,87	1,95	343,6
33.	P9 BCV1	19. 11. 2014	14. 4. 2016	1	3,32	8,555	4,717	1,81	1,86	427,8
34.	P9 BCV2	10. 12. 2014	21. 4. 2016	0,8	2,66	4,740	2,557	1,85	1,75	237,0
35.	P9 BCV3	30. 12. 2014	21. 4. 2016	0,8	2,66	5,460	2,951	1,85	1,87	273,0
36.	P9 BCV4	21. 1. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	7,364	3,897	1,89	2,10	368,2
37.	P9 BCV1a	19. 3. 2015	14. 4. 2016	1	3,32	15,514	8,348	1,86	1,82	775,7
38.	P9 BCV2a	10. 4. 2015	16. 5. 2016	0,5	1,66	15,655	8,409	1,86	2,07	782,8
39.	P9 BCV3a	29. 4. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	6,252	3,226	1,94	2,08	312,6
40.	P9 BCV4a	21. 5. 2015	25. 4. 2016	0,8	2,66	8,131	4,446	1,83	1,84	406,6
41.	P10 BCV1	19. 3. 2015	12. 5. 2016	0,7	2,32	8,510	4,617	1,84	2,11	425,5
42.	P10 BCV2	10. 4. 2015	16. 5. 2016	0,5	1,66	7,081	3,873	1,83	2,11	354,0
43.	P10 BCV3	29. 4. 2015	18. 4. 2016	1	3,32	4,905	2,578	1,90	1,89	245,3
44.	P10 BCV4	21. 5. 2015	21. 4. 2016	0,8	2,66	7,228	3,956	1,83	1,94	361,4
45.	P10 BCV1a	10. 7. 2015	25. 4. 2016	0,8	1,66	7,307	3,990	1,83	1,87	365,4
46.	P10 BCV2a	4. 8. 2015	9. 5. 2016	2	6,64	7,935	4,254	1,87	2,18	396,7
47.	P10 BCV3a	25. 8. 2015	12. 5. 2016	0,7	2,32	9,527	5,210	1,83	2,11	476,4
48.	P10 BCV4a	15. 9. 2015	12. 5. 2016	0,7	2,32	6,913	3,757	1,84	2,03	345,6
49.	P11 BCV1	27. 3. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	8,655	4,661	1,86	2,11	432,7
50.	P11 BCV2	17. 4. 2015	21. 4. 2016	0,8	2,66	5,446	2,982	1,83	1,87	272,3
51.	P11 BCV3	8. 5. 2015	18. 4. 2016	1	1,99	6,853	3,783	1,81	1,72	342,6
52.	P11 BCV1a	21. 7. 2015	9. 5. 2016	0,6	2,66	5,231	2,783	1,88	1,76	261,6

53.	P11 BCV2a	11. 8. 2015	16. 5. 2016	0,5	1,66	16,439	8,759	1,88	2,21	821,9
54.	P11 BCV3a	2. 9. 2015	18. 4. 2016	1	3,32	10,302	5,600	1,84	2,11	515,1
55.	P11 BCV	22. 9. 2015	18. 4. 2016	1	3,32	9,301	5,000	1,86	2,11	465,1
56.	P12 BCV1	3. 4. 2015	21. 4. 2016	0,8	2,66	6,882	3,757	1,83	1,90	344,1
57.	P12 BCV2	21. 4. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	4,855	2,545	1,91	1,97	242,8
58.	P12 BCV3	12. 5. 2015	12. 5. 2016	0,7	2,32	8,438	4,625	1,82	2,08	421,9
59.	P12 BCV4	2. 6. 2015	16. 5. 2016	1,8	3,32	11,692	6,420	1,82	2,28	584,6
60.	P12 BCV2a	18. 8. 2015	18. 4. 2016	1	2,32	7,128	3,781	1,89	1,99	356,4
61.	P12 BCV3a	8. 9. 2015	25. 4. 2016	0,8	2,66	8,956	4,924	1,82	1,85	447,8
62.	P12 BCV4a	29. 9. 2015	25. 4. 2016	0,8	2,66	4,951	2,639	1,88	1,69	247,5
63.	P13 BCV1	14. 4. 2015	14. 4. 2016	1	3,32	2,631	1,398	1,88	1,22	131,6
64.	P13 BCV2	5. 5. 2015	20. 4. 2016	0,8	2,66	10,290	5,730	1,80	1,98	514,5
65.	P13 BCV3	26. 5. 2016	18. 4. 2016	1	3,32	10,402	5,595	1,86	1,90	520,1
66.	P13 BCV4	16. 6. 2015	21. 4. 2016	0,8	1,66	13,300	7,117	1,87	2,13	665,0
67.	P13 BCV1a	11. 8. 2013	16. 5. 2016	0,5	2,66	9,344	5,145	1,82	2,27	467,2
68.	P13 BCV2a	4. 9. 2015	12. 5. 2016	0,7	2,32	8,226	4,467	1,84	2,14	411,3
69.	P13 BCV3a	22. 9. 2015	18. 4. 2016	1	3,32	7,012	3,702	1,89	1,92	350,6
70.	P13 BCV4a	13. 10. 2015	18. 4. 2016	1	3,32	7,451	3,959	1,88	1,99	372,5
71.	P14 BCV1	24. 4. 2015	10. 5. 2016	0,9	2,99	10,478	5,662	1,85	2,17	523,9
72.	P14 BCV2	15. 5. 2015	10. 5. 2016	0,9	2,99	9,597	5,159	1,86	2,20	479,9
73.	P14 BCV3	9. 6. 2015	21. 4. 2016	0,8	2,66	14,553	7,713	1,89	2,09	727,7
74.	P14 BCV4	23. 6. 2015	12. 4. 2016	0,5	3,32	10,158	5,703	1,78	2,26	507,9
75.	P14 BCV1a	18. 8. 2015	18. 4. 2016	1	2,99	8,372	4,495	1,86	1,97	418,6
76.	P14 BCV2a	9. 9. 2015	25. 4. 2016	0,8	2,66	2,763	1,495	1,85	1,14	138,2
77.	P14 BCV3a	30. 9. 2015	9. 5. 2016	0,6	1,99	7,891	4,250	1,86	1,92	394,5
78.	P14 BCV4a	21. 10. 2015	25. 4. 2016	0,8	2,66	10,878	6,000	1,81	1,98	543,9
79.	P15 BCV1	6. 10. 2015	25. 4. 2016	0,8	2,66	2,977	1,622	1,84	1,11	148,9
80.	P15 BCV2	21. 10. 2015	12. 5. 2016	0,65	2,16	6,729	3,690	1,82	2,31	336,4
81.	P15 BCV3	17. 11. 2015	14. 4. 2016	1	3,32	7,907	4,319	1,83	1,74	395,4

82.	P15 BCV4	8. 12. 2015	28. 4. 2016	1	3,32	18,755	10,131	1,85	2,07	937,7
83.	P15 BCV1a	4. 2. 2016	10. 5. 2016	0,9	2,99	7,543	4,029	1,87	2,12	377,1
84.	P15 BCV2a	25. 2. 2016	12. 4. 2016	0,5	2,16	6,136	3,272	1,87	2,01	306,8
85.	P15 BCV3a	17. 3. 2016	9. 5. 2016	0,6	1,99	7,533	4,039	1,87	1,94	376,7
86.	P15 BCV4a	7. 4. 2016	28. 4. 2016	1	3,32	18,808	10,131	1,86	2,05	940,4
87.	P16 BCV1	13. 10. 2015	25. 4. 2016	0,8	2,66	6,786	3,665	1,85	1,83	339,3
88.	P16 BCV2	3. 11. 2015	14. 4. 2016	1	-	-	-	-	-	-
89.	P16 BCV3	24. 11. 2015	14. 4. 2016	1	3,32	11,531	6,486	1,78	1,73	576,6
90.	P16 BCV4	15. 12. 2015	9. 5. 2016	2	6,64	23,015	12,320	1,87	2,10	1150,8
91.	P17 BCV1	22. 10. 2015	9. 5. 2016	0,6	1,99	4,134	2,186	1,89	1,74	206,7
92.	P17 BCV2	10. 11. 2015	14. 4. 2016	1	3,32	13,777	8,767	1,57	0,86	688,8
93.	P17 BCV3	2. 12. 2015	10. 5. 2016	0,9	2,99	21,636	11,562	1,87	2,22	1081,8
94.	P17 BCV4	23. 12. 2015	28. 4. 2016	1	2,66	14,121	7,620	1,85	1,97	706,1
95.	P17 BCV1a	12. 2. 2016	25. 4. 2016	0,8	3,32	9,222	5,071	1,82	1,87	461,1
96.	P17 BCV2a	8. 3. 2016	18. 4. 2016	1	3,32	5,206	2,697	1,93	1,86	260,3
97.	P17 BCV3a	30. 3. 2016	16. 5. 2016	0,5	1,66	9,487	5,167	1,84	2,34	474,4
98.	P17 BCV4a	19. 4. 2016	16. 5. 2016	1,5	4,98	10,315	5,740	1,80	2,23	515,7
99.	P18 BCV1	3. 11. 2015	12. 5. 2016	0,7	2,32	4,676	2,482	1,88	1,92	233,8
100.	P18 BCV2	24. 11. 2015	25. 4. 2016	0,8	2,66	5,203	2,815	1,85	1,71	260,2
101.	P18 BCV3	15. 12. 2015	9. 5. 2016	2	6,64	16,201	8,671	1,87	2,18	810,0
102.	P18 BCV4	6. 1. 2016	16. 5. 2016	1,5	3,32	9,280	5,038	1,84	2,17	464,0
103.	P18 BCV1a	10. 3. 2016	28. 4. 2016	1	2,66	10,913	6,097	1,79	2,01	545,7
104.	P18 BCV2a	1. 4. 2016	10. 5. 2016	0,9	2,99	13,345	7,160	1,86	2,13	667,3
105.	P19 BCV1	22. 1. 2016	12. 4. 2016	0,5	1,66	5,851	3,222	1,82	2,24	292,6
106.	P19 BCV2	12. 2. 2016	28. 4. 2016	1	3,32	10,546	5,840	1,81	2,00	527,3
107.	P19 BCV3	1. 3. 2016	12. 4. 2016	0,5	1,66	10,367	5,869	1,77	2,21	518,4
108.	P19 BCV4	23. 3. 2016	16. 5. 2016	0,5	1,66	8,444	4,612	1,83	2,21	422,2
109.	P20 BCV1 razr.	16. 2. 2016	16. 5. 2016	1,8	5,98	5,956	3,164	1,88	2,15	297,8

110.	P20 BCV2	10. 3. 2016	28. 4. 2016	1	3,32	13,018	7,073	1,84	1,91	650,9
111.	P20 BCV3	1. 4. 2016	25. 4. 2016	0,8	2,66	10,532	5,820	1,81	1,92	526,6
112.	P21 BCV1	23. 2. 2016	25. 4. 2016	0,8	2,66	11,641	6,518	1,79	1,92	582,0
113.	P21 BCV2	15. 3. 2016	12. 5. 2016	0,7	2,32	9,958	5,390	1,85	2,13	497,9
114.	P21 BCV3	5. 4. 2016	28. 4. 2016	1	3,32	10,373	5,735	1,81	1,98	518,7
115.	P22 BCV1	4. 3. 2016	16. 5. 2016	0,4	1,33	5,297	2,837	1,87	2,42	264,9
116.	P22 BCV2	24. 3. 2015	12. 5. 2016	0,7	2,32	6,701	3,622	1,85	2,00	335,1
117.	P22 BCV3	15. 4. 2016	28. 4. 2016	1	3,32	7,720	4,237	1,82	1,86	386,0

Legenda:

- Vzorec označen z modro barvo - nezadovoljive vrednosti razmerij absorbcanc A 260 nm/280 nm in A 260 nm/230 nm.