UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA SITAR

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ

LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA SITAR

PRIMERJAVA USPEŠNOSTI IZOLACIJE DNA IZ RAZLIČNIH BIOLOŠKIH VZORCEV Z RAZTOPINO NATRIJEVEGA HIDROKSIDA

COMPARISON OF DNA ISOLATION EFFICIENCY FROM DIFFERENT BIOLOGICAL SAMPLES WITH SODIUM HYDROXIDE SOLUTION

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek, mag. farm. za mentorstvo, strokovno pomoč, nasvete in pregled diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo, še zlasti Manji Cedilnik, dipl. ing. lab. biomed. in Petri Ferkov, dipl. ing. lab. biomed. za tehnično pomoč in nasvete.

Zahvala gre tudi vsem mojim domačim, ki so me ves čas študija podpirali in me spodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.

Nataša Sitar

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Ljubljana, maj 2012

KAZALO VSEBINE

POVZETEK ..... **I**

ABSTRACT ..... **II**

SEZNAM OKRAJŠAV ..... **III**

KAZALO SLIK ..... **IV**

KAZALO PREGLEDNIC ..... **V**

1. UVOD **0**

1.1 MOLEKULE DNA 0

1.1.1 STRUKTURA IN ZNAČILNOSTI DNA *1*

1.1.2 SPREMEMBE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA *2*

1.1.2.1 GENSKA PREISKAVA IN DIAGNOSTIKA GENETSKIH BOLEZNI 3

1.2 IZOLACIJA DNA IZ BIOLOŠKIH VZORCEV 4

1.2.1 KLASIČNE METODE ZA IZOLACIJO DNA *5*

1.2.2 SODOBNE METODE ZA IZOLACIJO DNA *7*

1.3 BIOLOŠKI VZORCI ZA IZOLACIJO DNA 9

1.3.1 SHRANJEVANJE VZORCEV PRED IZOLACIJO IN SHRANJEVANJE IZOLIRANE DNA *11*

2 NAMEN DELA **12**

3 MATERIALI IN METODE **13**

3.1 SPLOŠNA NAVODILA 13

3.2 BIOLOŠKI VZORCI 14

3.3 IZOLACIJA DNA IZ POLNE KRVI IN KRVNIH MADEŽEV Z UPORABO 14

3.4 IZOLACIJA DNA IZ BRISOV BUKALNE SLUZNICE Z UPORABO NATRIJEVEGA HIDROKSIDA 16

3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI DNA 18

3.6 VELIKOST IZOLIRANE DNA 19

3.7 GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI 23

4. REZULTATI IN RAZPRAVA **26**

4.1 REZULTATI IZOLACIJE IZ VZORCEV POLNE KRVI 26

4.2 REZULTATI PREISKOVANIH VZORCEV IZ KRVNIH MADEŽEV 37

4.3 REZULTATI PREISKOVANIH VZORCEV IZ BRISOV BUKALNE SLUZNICE 40

5. SKLEP **48**

6. LITERATURA **49**

POVZETEK

Osnovni pogoj za uspešnost genskih analiz je ustrezna kakovost in količina izolirane DNA. Ta pa je odvisna od vrste in količine biološkega vzorca ter vrste uporabljene metode izolacije. Zaradi potreb po analizi čim večjega števila vzorcev je cilj čim enostavneje pridobiti zadostno količino dovolj kakovostne DNA.

Namen našega dela je bil zato preizkusiti izolacijo DNA iz različnih bioloških vzorcev z enostavnimi in hitrimi metodami z uporabo natrijevega hidroksida.

DNA smo izolirali iz vzorcev polne krvi, krvnih madežev in brisov bukalne sluznice. Izolacijo smo izvajali pri različnih temperaturah, pri vzorcih polne krvi in brisov bukalne sluznice pa smo ocenjevali tudi vplive temperature in časa shranjevanja vzorcev pred izolacijo. Uspešnost izolacije smo ovrednotili s spektrofotometričnim merjenjem koncentracije in čistosti DNA, agarozno elektroforezo in genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami.

Naši rezultati so pokazali, da je izolacija z raztopino NaOH primerna za vse tri vrste vzorcev, pri čemer so se brisi bukalne sluznice izkazali kot najprimernejši. Za izolacijo DNA iz polne krvi in krvnih madežev se je kot najuspešnejši izkazal postopek s spiranjem in inkubacijo pri 95 °C. Uspešnost genotipizacije pri polni krvi je bila 95 % in 80 % pri krvnih madežih. Pri brisih bukalne sluznice pa je bila uspešnost genotipizacije 100 %, če smo izolacijo izvedli takoj po odvzemu ali smo vzorce posušili in jih shranili do 24 ur pri 4 ºC. Prednost brisov bukalne sluznice pred drugima vzorcema je tudi neinvaziven odvzem, ki ga lahko izvede preiskovanec sam. Zaradi tega predstavljajo brisi zelo primeren vzorec za epidemiološke študije. Pomemben pa je pravilen način njihovega odvzema, zato smo oblikovali standardizirani postopek odvzema.

Za natančnejšo oceno uspešnosti izolacije bi bilo v prihodnje smiselno izvesti študijo na večjem številu vzorcev.

ABSTRACT

Precondition for the success of genetic analysis is the appropriate quality and quantity of isolated DNA. This depends on the type and quantity of biological samples and methods used for isolation. Due to the increasing need for analysis of many samples the goal is to obtain a sufficient amount of DNA of sufficient qualityby using simple and rapid methods.

The purpose of our work was therefore to examine the isolation of DNA from different biological samples with a simple and rapid method using sodium hydroxide.

DNA was isolated from samples of whole blood, blood stains and buccal swabs. Isolation was performed at different temperatures. For samples of whole blood and buccal swabs the effects of temperature and time of sample storage prior to isolation were also evaluated. Isolation performance was evaluated by spectrophotometric measurement of DNA concentration and purity, agarose electrophoresis and genotyping by hydrolysing probes.

Our results showed that the isolation of the NaOH is suitable for all three samples, though buccal swabs proved to be the best. For isolation of DNA from whole blood and blod stains the most effective protocol includes washing and incubation at 95 °C. The success of genotyping was 95 % in whole blood and 80 % in blood stains. For buccal swabs the success of genotyping was 100 % for samples isolated immediately or those which were dried and kept at 4 ºC up to 24 hours prior to isolation. Main advantage of the buccal swabs is non-invasive collecting, which can be carried out by the patient himself. As such they represent a suitable sample swabs for epidemiological studies. However, the correct way of collection is very important therefore standardized sampling procedure was developed.

For a more detailed assessment of the isolation effectiveness, it would be a study on a larger number of samples should be contucted in the future.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	adenin
bp	bazni par
C	citozin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNA-za	deoksiribonukleaza
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
G	gvanin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RNA	ribonukleinska kislina
RNA-za	ribonukleaza
TRIS	tris (hidroksimetil) aminometan
TRIS-HCl	tris hidroklorid
SDS	natrijev dodecilsulfat
T	timin
UV	ultravijolična svetloba

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba evkariotske celice 1
Slika 2: Shematski prikaz dvoverižne DNA 2
Slika 3: Shematski prikaz postopka izolacije z reagenčnim kompletom FlexiGene DNA... 7
Slika 4: Shematski prikaz postopka izolacije z reagenčnim kompletom QIAamp® DNA .. 9
Slika 5: Kapljični spektrofotometer. 19
Slika 6: Kemijska formula agaroze 20
Slika 7: Kadička za agarozno elektroforezo. 23
Slika 8: Shematski prikaz principa genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami 24
Slika 9: Primeri rezultatov genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami pri vzorcih polne krvi 36
Slika 10: Primeri rezultatov genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami pri krvnih madežih. 39
Slika 11: Rezultati elektroforeze na 2 % agaroznem gelu za drugo serijo 45
Slika 12: Primeri rezultatov genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami pri brisih bukalne sluznice 46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz tipičnega izkoristka izolirane DNA pri reagenčnem kompletu FlexiGene DNA kit 5
Preglednica II: Sestava reakcijske zmes, za genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami .. 25
Preglednica III: Shematski prikaz programa za izvedbo genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami 26
Preglednica IV: Izmerjene koncentracije vzorcev sveže polne krvi 27
Preglednica V: Izmerjene koncentracije vzorcev tri dni stare polne krvi 29
Preglednica VI: Izmerjene koncentracije vzorcev sedem dni stare polne krvi 31
Preglednica VII: Izmerjene koncentracije vzorcev zamrznjene polne krvi 33
Preglednica IX: Izmerjene koncentracije vzorcev krvnih madežev 37
Preglednica X: Prikaz uspešnosti genotipizacije krvnih madežev. 40
Preglednica XI: Izmerjene koncentracije posušenih in neposušenih vzorcev brisov bukalne sluznice 41
Preglednica XII: Izmerjene koncentracije vzorcev brisov bukalne sluznice od posameznikovih odvzemov 41
Preglednica XIII: Izmerjene koncentracije vzorcev brisov bukalne sluznice izoliranih po shranjevanju 42
Preglednica XIV: Prikaz uspešnosti genotipizacije pri brisih bukalne sluznice. 46

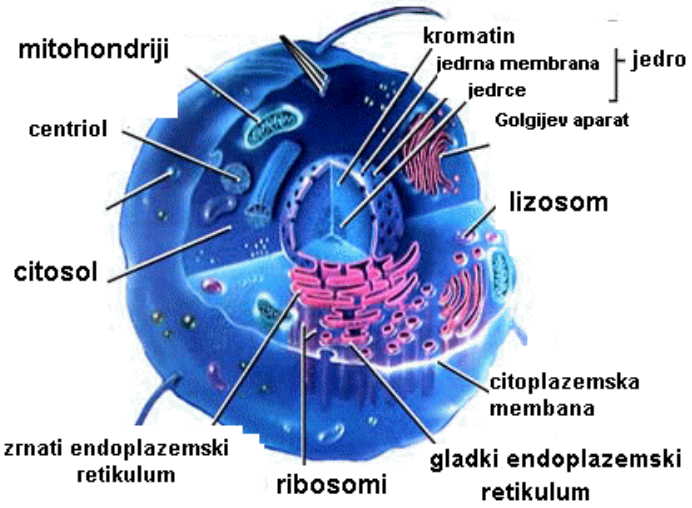
1. UVOD

Bolezni, ki so posledica sprememb v strukturi ali izražanju genov, so velik zdravstveni problem. Pri sumu na bolezni z genetsko osnovo lahko njihove vzroke odkrivamo in potrjujemo z molekularno genetskimi preiskavami.

Pred tem moramo iz različnih bioloških vzorcev izločiti dedno snov deoksiribonukleinsko kislino (DNA). Zaradi povečanega števila preiskav se pojavljajo potrebe po novih metodah izolacije DNA, ki bi temeljile na čim bolj enostavnem in čim hitrejšem postopku, hkrati pa bi dale zadostno količino dovolj kvalitetne DNA za genetske preiskave.

1.1 MOLEKULE DNA

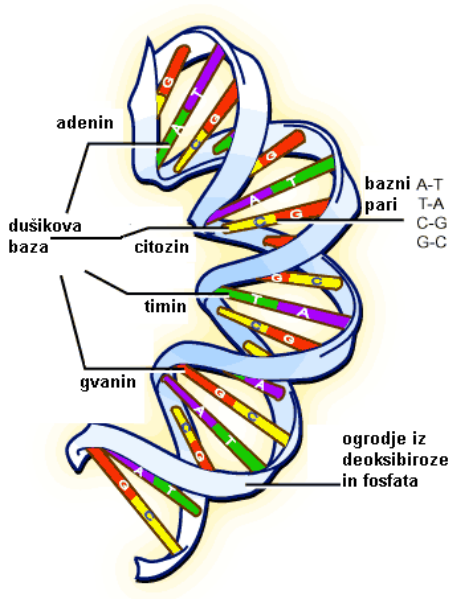
DNA je nosilka genetske informacije. Nahaja se v celičnem jedru večine celic, ki je prisotno v večini celic, ki sestavljajo človeško telo (jedrna DNA). Poleg tega so krajše krožne molekule DNA tudi v celičnem organelu mitohondriju (mitohondrijska DNA). Jedrna molekula DNA se v celici nahaja v kompleksu z bazičnimi proteini, ki jih imenujemo histoni. Kompleks histonov in DNA imenujemo kromatin (slika 1).



Slika 1: *Zgradba evkariotske celice* ***(1).***

1.1.1 STRUKTURA IN ZNAČILNOSTI DNA

DNA je nerazvejan polimer, ki ga sestavljajo štiri vrste monomernih nukleotidnih enot. Vsaka monomerna enota je sestavljena iz treh delov: dušikove organske baze, ogljikovega hidrata (sladkorja deoksiriboze) in fosfata. Strukturno ogrodje vsake verige, ki predstavlja zunanji del molekule, je sestavljeno iz ogljikovih hidratov in fosfatnih skupin, ki so povezane s kovalentnimi fosfodiesterskimi povezavami. Pri takšni ureditvi so organske baze obrnjene v notranjost dvojne vijačnice. Organske baze v posamezni verigi so naložene ena vrh druge, kar jim omogoča, da se povežejo z nekovalentnimi interakcijami. Baze obeh nasprotnih verig so dovolj blizu, da lahko nastanejo komplementarni bazni pari, v katerih se baze povežejo s specifičnimi vodikovimi vezmi. Optimalna ureditev je tista, pri kateri se adenin (A) poveže s timinom (T), gvanin (G) pa s citozinom (C). Informacije v molekuli DNA so shranjene v obliki zaporedja nukleotidov A, T, G in C (slika 2).



Slika 2: *Shematski prikaz dvoverižne DNA (**2**).*

DNA molekula se znova in znova podvaja (replikacija). Pri razpiranju dvojne vijačnice nastaneta dve enojni polinukleotidni verigi, ki delujeta kot matrici za podvojevanje. Pri podvojevanju DNA mora biti nova kopija DNA popolnoma enaka starševski DNA. Zato mora biti proces replikacij natančen in strogo nadzorovan.

Druga pomembna vloga DNA molekule je sinteza RNA prepisovanje (transkripcija), kjer se iz verige DNA prepiše zaporedje v RNA. RNA se prepiše le iz določenih področij DNA, ki vsebujejo ustrezno informacijo. Nastala RNA se mora najprej biokemijsko spremeniti, da postane biološko aktivna. Posttranskripcijske modifikacije ali zorenje RNA omogočajo encimi in riboencimi.

Za končno stopnjo, kjer poteka prenos informacije iz zaporedja v obliki RNA v zaporedje aminokislin v proteinih, pa je potreben proces prevajanja (translacije) (2,3). Genska informacija vsebuje zapis za sintezo proteinov, ki so bistvenega pomena za naše življenje. Informacije v dednem materialu se berejo v skupku treh nukleotidov, ki ga imenujemo kodon in nosi zapis za eno aminokislino (4).

1.1.2 SPREMEMBE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

Genetske spremembe so spremembe v strukturi DNA. Njihove posledice se kažejo v nepravilnosti v zgradbi in delovanju celice oziroma organizma. Spremembe v genih so

lahko posledica zunanjih dejavnikov, ki so lahko fizikalni (npr. toplota, ultravijolična ali ionizirajoča sevanja, ki na nekaterih mestih povzročajo lomljenje kromosomov, razpad spojin na radikale, ki reagirajo z DNA, ali pa ustvarjajo nenavadne povezave med bazami nukleotidov DNA), kemijski (razne škodljive kemikalije, ki posredno ali neposredno reagirajo z DNA) ali biološki (npr. virusi, ki vrinejo svojo nukleinsko kislino v gen in s tem spremenijo njegovo zaporedje nukleotidov). Lahko pa nastanejo tudi zaradi notranjih vzrokov (npr. zaradi motenj v delovanju encimov, ki popravljajo napake pri podvajanju DNA, ali pa zaradi napak pri izmenjavi segmentov DNA homolognih kromosomov med mejozo) (5).

Glede na velikost delimo mutacije na:

- **genske mutacije**, ki nastanejo zaradi sprememb v zgradbi gena. Nukleotidi, ki ga sestavljajo, se lahko zamenjajo, lahko izpadejo oz. se vrinejo v verigo nukleotidov. Najpogostejši v tej skupini so **SNP** (ang. *Single-Nucleotide Polymorphism*), kjer gre za zamenjavo, izpad ali vstavitev enega nukleotida.
- **kromosomske mutacije**, ki povzročijo hude posledice v nadaljnjem razvoju organizma, do njih pa največkrat pride med delitvijo celice. Kromosom se lahko pri ločevanju hčerinskih celic pretrga na dveh koncih in izpade srednji del, zato znova zlepljena dela tvorita krajši kromosom. Pogosteje pa se del kromosoma prilepi na drug kromosom ali pa se pretrgani kromosomi spojijo v napačnem zaporedju.
- **genomske mutacije**, kjer pride do spremembe celotnega genoma, lahko se pomnoži število vseh kromosomov ali pa le nekaterih. Do teh mutacij lahko pride med mejozo, če se kromosomi ne ločijo in ostane celica diploidna ter se tako ob združitvi s haploidno tvori celica s tremi kompleti kromosomov – triploidna celica. Na enak način nastanejo tudi celice s še več kompleti kromosomov. Ker se število kromosomov množi z mnogokratnikom osnovnega števila kromosomov, imenujemo ta pojav poliploidija. Za te celice je značilno, da so večje od normalnih (5).

1.1.2.1 GENSKA PREISKAVA IN DIAGNOSTIKA GENETSKIH BOLEZNI

Genske preiskave so močno izboljšale možnosti prepoznavanja genetskih bolezni (klinična diagnostika), v številnih primerih tudi več let pred pojavom bolezenskih znakov

(predsimptomatična diagnostika) ali celo pred rojstvom (predrojstvena oz. prenatalna diagnostika). Pri preiskavi DNA nismo omejeni samo na prepoznavanje genetskih bolezni, na osnovi testiranja okvarjene beljakovine, ampak lahko določamo vse bolezni, za katere poznamo gen oz. mutacije, ki bolezen povzročajo. Govorimo o neposredni diagnostiki s preiskavo DNA, ki je hitra, natančna in zanesljiva. V številnih primerih, ko ne poznamo niti okvarjene beljakovine niti gena, pa lahko izvajamo tako imenovano posredno diagnostiko, pri kateri preiskujemo DNA v bližini predpostavljenega položaja »bolezenskega« gena. Iz načina dedovanja lahko na osnovi s takšno preiskavo najdene posebnosti v preiskanem delu DNA, ki naj bi se zaradi bližine prenesla skupaj z bolezenskim genom na potomce, sklepamo tudi o tem, ali je potomec bolezen podedoval ali ne. Prednost obeh postopkov je tudi ta, da lahko odkrivamo tudi prenašalce mutiranih genov, ki sicer ne kažejo znakov bolezni.

Za DNA diagnostiko velja, da je hitra in zanesljiva. Zgodnja in natančna klinična diagnostika omogoča pravilno izbiro zdravljenja ali lajšanja bolezni že v samem začetku. Znanstvene raziskave so usmerjene v iskanju genov in mutacij ter povezovanje teh izsledkov z vrstami bolezni in oblikami posameznih bolezni.

Nova spoznanja o genetskih bolezni pa niso dragocena samo za izboljšanje diagnostike in lajšanja neozdravljivih ali težko ozdravljivih bolezni in motenj, ampak pomenijo tudi izhodišče za gensko zdravljenje (gensko terapijo), s katerimi bo morda mogoče popravljati napake v genih oziroma okvarjene gene nadomeščati z nepoškodovanimi (2,5).

1.2 IZOLACIJA DNA IZ BIOLOŠKIH VZORCEV

Izolacija genomske DNA je osnovni pogoj za analizo. Začetni korak izvedbe je pravilen odvzem in shranjevanje vzorca. Če ta korak ni pravilno izveden, so lahko rezultati takšne analize netočni. Sledi izolacija DNA z izbranim postopkom. V izoliranem DNA izmerimo koncentracijo, čistost in integriteto, da dobimo podatek, koliko in kako kvalitetno DNA smo izolirali. DNA vzorec shranimo v hladilniku ali zamrzovalniku do izbrane analize.

Pri večini metod za analizo DNA moramo preiskovani odsek predhodno pomnožiti, kar naredimo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Produkt PCR nato vstopa v nadaljnje

postopke genotipizacije. Izjema so nekatere novejše metode, kjer pomnoževanje in genotipizacija potekata hkrati (6). Primer takšne metode je genotipizacija s hidrolizirajočimi sondami. Njen princip je opisan v poglavju 1.6.

1.2.1 KLASIČNE METODE ZA IZOLACIJO DNA

Med osnovne metode izolacije spada izolacija z mešanico fenola in kloroforma, pozneje pa se je razvila metoda z izsoljevanjem. Pri obeh si moramo sami pripraviti reagente, kar je zamudno in lahko predstavlja vir napak. Zaradi tega so bili razviti različni reagenčni kompleti, ki so bolj primerni za diagnostične potrebe.

Za samo izolacijo DNA uporabljamo različne komplete reagentov. Razlika je v tem, da se nekateri uporabljajo za manjše, drugi pa za večje volumne vzorcev. Med komplete za večje volumne spadajo kompleti: FlexiGene DNA kit (Qiagen), DNA isolation kit for Mammaian Blood (Roche), Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen), DNAzol® Genomic DNA isolation reagent (Invitrogen), The GeneCatcher ™ g DNA Blood Kits (Invitrogen).

- FlexiGene DNA kit (Qiagen):

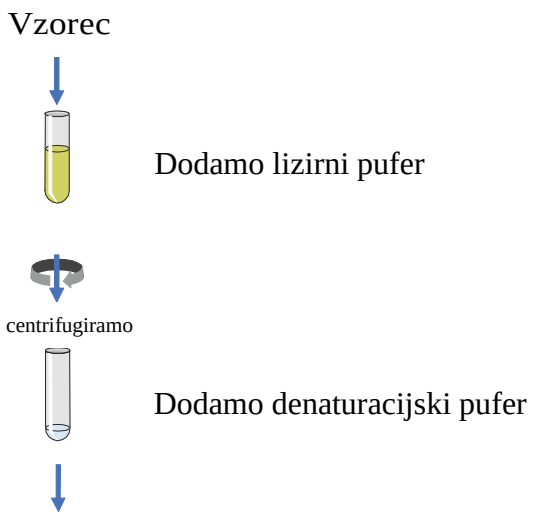
Komplet je namenjen za hitro in enostavno izlocaijo DNA iz 0,1–10 ml polne krvi, plasti levkocitov (buffy coat) in kultiviranih celic. Izolacijo opravljamo v eni epruveti in s tem zmanjšamo možnost zamenjave reagentov. Ves postopek lahko opravimo v manj kot uri, a pri tem ni upoštevana 1 ura raztapljanja DNA po končanem postopku. Ta komplet omogoča dober izkoristek izolirane DNA, kar vidimo v preglednici I. Dobimo visoko molekularno DNA, ki jo lahko uporabljamo za različne molekularne analize, vključno s PCR (7).

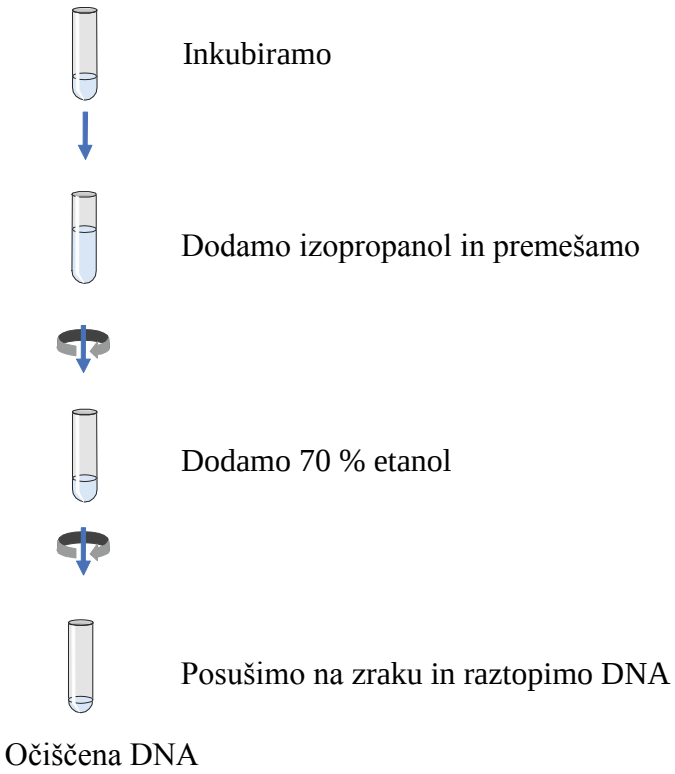
Preglednica I: *Prikaz tipičnega izkoristka izolirane DNA pri reagenčnem kompletu FlexiGene DNA kit (7).*

Vzorec	Volumen (ml)	DNA izkoristek (µg)
Kri	0,3	11–14
Kri	2	75–90
Kri	10	380–460

plasti levkocitov	0,5	110–130

K vzorcu dodamo lizirni pufer, da razbijemo jedra celičnih membran ter nato centrifugiramo. Peletke, ki vsebujejo celično jedro in mitohondrije raztopimo in inkubiramo v denaturacijskem pufru, ki vsebuje kaotropne soli in Qiagen proteazo. Ta korak učinkovito odstrani proteine. DNA oborimo z dodatkom izopropanola, jo speremo s 70 % etanolom, posušimo in raztopimo v hidracijskem pufru (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) (slika 3).





Slika 3: *Shematski prikaz postopka izolacije z reagenčnim kompletom FlexiGene DNA* ***(7).***

1.2.2 SODOBNE METODE ZA IZOLACIJO DNA

Sodobne metode za izolacijo DNA so hitre, dostopni so komercialni kompleti (Ready Amp Kit, DNAzol …) ali kolone (QIA-Amp®, Roti®-extract T, DEAE Sephacel, DEAE Sephadex …). Sestavljene so iz anionskega matriksa, ki veže negativno nabito DNA, nečistoče pa se sperejo s kolone (8). DNA se izolira z uporabo pufra z visoko ionsko močjo. Prednosti teh hitrih metod so, da za izolacijo zadostujejo že mikro količine bioloških vzorcev.

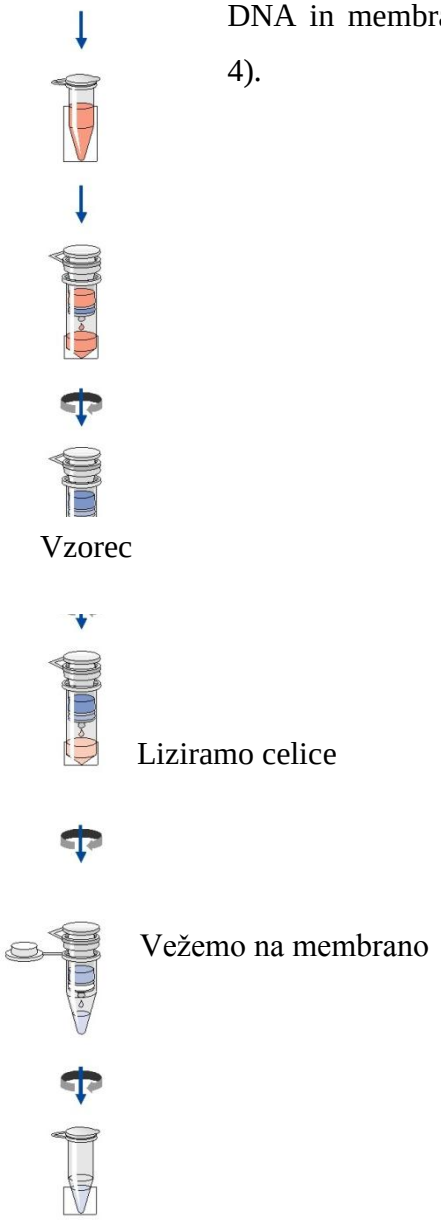
Na tržišču najdemo mnogo komercialnih kompletov, ki omogočajo hitro, enostavno, predvsem pa varno in kvalitetno pripravo vzorcev za analize DNA (PCR …).

Komercialni kompleti po podatkih proizvajalcev ne vsebujejo toksičnih organskih topil, ampak sol gvanidinijevega tiocianata v kombinaciji z membrano iz silikagela ali steklenih vlaken, kamor se vežejo kontaminanti ali molekule DNA. Uporaba različnih pufrov zagotavlja primerne pH pogoje za uspešno izolacijo. Proces izolacije sestavlja več faz:

- liza vzorca z lizirnim pufrom in proteoliza s proteinazo K,
- adsorpcija DNA na membrano med centrifugiranjem,
- odstranitev drugih kontaminantov z večkratnim spiranjem,
- elucija čiste DNA z destilirano vodo ali elucijskim pufrom.

QIAamp® DNA Mini

Komplet je namenjen za hitro čiščenje, povprečno 6 µg celotne DNA iz polne krvi, plasti levkocitov in kultiviranih celic. Vzorci so lahko sveži ali zamrznjeni. Pri metodi QIAamp najprej liziramo celice in celotno mešanico prenesemo na QIAamp kolono, kjer se DNA veže na silika-gel membrano v koloni. Sledi spiranje frakcij iz kolone. S spiranjem odstranimo vse komponente iz kolone, razen DNA, ki je vezana na membrano v koloni (9). Sledi desorbcija, kjer se vezi med DNA in membrano pretrgajo in iz kolone se spere čista DNA (slika 4).



Spiramo (Pufer AW1)

Spiramo (Pufer AW2)

Eluiramo

Čista DNA

Slika 4: *Shematski prikaz postopka izolacije z reagenčnim kompletom QIAamp® DNA* ***(9).***

1.3 BIOLOŠKI VZORCI ZA IZOLACIJO DNA

DNA kot analit lahko izoliramo iz različnih bioloških vzorcev, kot so periferna kri, serum, plazma, kostni mozeg, tkiva, celične kulture, amnijska tekočina, sekreti, eskreti, celice bukalne sluznice. Za potrebe sodobne medicine lahko DNA izoliramo tudi iz drugih bioloških materialov, kot so: krvni madeži, slina, vaginalne celice, mešani madeži iz različnih vrst mehkih tkiv, iz kosti, zob, las in urina (10).

Polna kri je najpogostejši vir DNA za genetske preiskave. Iz vzorca polne krvi lahko izoliramo genomsko DNA z uporabo različnih postopkov. Klasičen način je z

uporabo organskih topil, lahko pa tudi z uporabo komercialno pripravljenih kolon ali pa z metodo obarjanja z alkoholom po predhodni lizi celic. Kri je tkivo iz tekoče medceličnine (plazme) s prosto gibljivimi celicami (eritrociti, levkociti, trombociti), ki zavzemajo 45 % volumna krvi. Največ DNA izoliramo iz levkocitov, ker vsebujejo jedro in celične organele. Kri je lahko sveža ali zamrznjena.

Možno je izolirati tudi DNA iz strjene krvi s predhodno homogenizacijo krvnega strdka, vendar je pri tem količina DNA manjša. Zaradi tega je priporočljivo odvzeti vzorce krvi z antikoagulantnim sredstvom. Čeprav je EDTA kot antikoagulant učinkovita in običajno uporabljena v te namene, so ugotovili, da uporaba citratne dekstroze daje pri vzorcih krvi shranjenih pri sobni temperaturi večje količine izolirane DNA (11).

V zadnjih časih se izolira DNA tudi iz brisov bukalne sluznice. Odvzem vzorca je enostaven in neinvaziven. Za odvzem so pripravljeni kompleti, ki vsebujejo navodila in material za odvzem. Prednost teh kompletov pa je, da lahko vzorec pošljemo na analizo kar po pošti. Takšen vzorec predstavlja minimalen potrebni volumen za molekularno genetsko preiskavo.

DNA izolirana iz raznih drugih tkiv se lahko uporablja za analizo raznih mutacij (npr. p53 mutacij), za detekcijo človeškega papiloma virusa in detekcijo ras mutacij. Pred začetkom izolacije DNA moramo vzorce tkiva homogenizirati, izpostavimo jih mehanskim silam, ki povzročijo ločitev posameznih celic, vendar minimalno lizo. Mehansko razgradnjo običajno dosežemo s homogenizatorjem.

V kliničnih laboratorijih in prenatalni diagnostiki se uporablja DNA, izolirana iz horionskih resic, ki jih dobimo s postopkom, imenovanim vzorčenje horionskih resic. Pri tem postopku se vzame majhen delček horionske resice iz posteljice za kromosomske analize v prvem tromesečju nosečnosti. Horionske resice se uporabljajo za kariotipizacijo, kromosomsko analizo, biokemične teste za odkritje mnogih podedovanih metabolnih motenj in kot vir DNA za gensko analizo. Poleg horionskih resic se v prenatalni diagnostiki uporablja tudi DNA izolirana iz amnijske tekočine ali celic amnijske tekočine (22).

Poseben primer so sodno-medicinske preiskave, pri katerih je treba izolirati DNA iz zelo majhnih količin vzorcev, kot so: madež posušene krvi, plazma ali serum, lasje, kosti,

zobje, semenska tekočina, urin, ustni bris, vaginalni bris, epitelijske celice na obleki. V nekaterih primerih je nujna predhodna separacija željenih celic od kontaminiranega materiala. Izolacija DNA je lahko uspešna, četudi so na voljo količinsko zelo omejeni vzorci. Najbolj uveljavljeni metodi za prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav s preiskavo DNA, ki se uporabljata v zadnjem desetletju v sodni medicini in kriminalistiki sta določanje "prstnih odtisov DNA" (angl. DNA-fingerprinting) in analize polimorfizmov DNA oziroma določanje alelnih vzorcev ali profilov DNA (DNA profiliranje) (23).

1.3.1 SHRANJEVANJE VZORCEV PRED IZOLACIJO IN SHRANJEVANJE IZOLIRANE DNA

Shranjevanje vzorcev pred analizo je zelo pomembno. Treba jih je shraniti v stabilno in primerno okolje, s tem preprečimo kontaminacijo in degradacijo vzorcev. Številni dejavniki shranjevanja vzorcev lahko vplivajo na kakovost izolacije DNA. Kontaminacijo z mikroorganizmi je mogoče preprečiti z zmrzovanjem vzorcev. Avtolizo in razgradnjo DNA z endogenimi in eksogenimi encimi lahko zmanjšamo z nižanjem temperature. Vzorci, ki zahtevajo dolgotrajno skladiščenje, hranimo pri - 80 ºC (priporočljiva je čim hitrejša zamrznitev s tekočim dušikom). Liofilizirani vzorci so lahko shranjeni pri sobni temperaturi v suhem prostoru prav tako za dlje časa. Kakršnekoli postopke priprave vzorcev (sušenje ali zamrznitev) je treba izvesti čim prej po pridobitvi vzorca (12).

Dolgoročno shranjevanje izolirane DNA je potrebno za številne genetske študije. DNA se lahko izolira iz vzorcev krvi shranjene pri - 70 ºC za najmanj 2 meseca ali pri 23 ºC za teden ali več, vendar pa s hranjenjem krvi pri teh temperaturah lahko dobimo DNA z manj visoko molekulsko maso. Izolirano DNA, ki je shranjena v suhi obliki do 30 let, je težko raztopiti, vendar pa bo vzorec, ki je shranjen v suhi obliki do 13 let, nato pa hranjen v raztopin pri - 20 ºC za 7 let, ostal nespremenjen.

Običajno se DNA shranjuje v raztopinah. Lahko se shrani v destilirani vodi, vendar se mora uporabiti v roku nekaj dni. Primerna je za PCR ali za endonukleazno razgradnjo. Kljub temu je za shranjevanje DNA najbolj priporočen Tris- Na_2EDTA. V raztopini Tris-Na_2EDTA je povišana koncentracija EDTA. Tris pufer ne preprečuje prevelikih sprememb

pH, zaradi katerih se lahko spontano razgradi DNA. Natrijeve soli stabilizirajo dvojno vijačno strukturo. EDTA preprečuje delovanje nukleaz in kelira dvovalentne kovinske ione. Poznamo dva načina shranjevana DNA, in sicer kratkoročno (do enega leta) in dolgoročno shranjevanje (več let). Do danes je dostopnih malo podatkov o pogojih za kratkotrajno in dolgotrajno shranjevanje in vpliva na kakovost ter količino DNA. DNA naj bi zadržala karakteristike pri dolgotrajnem shranjevanju, če bi bila zamrznjena. Liofilizacija bi lahko bila dobra metoda za shranjevanje DNA, če bi razvili boljše metode hidracije DNA (33).

2 NAMEN DELA

Osnovni pogoj za uspešnost genskih analiz je ustrezna kakovost in količina izolirane DNA. Ta je odvisna od postopkov izolacije in vzorcev, iz katerih pridobimo DNA. Zaradi potreb po analizi čim večjega števila vzorcev je cilj čim enostavneje pridobiti zadostno količino dovolj kakovostne DNA.

Namen našega dela bo preizkusiti izolacijo DNA iz bioloških vzorcev z enostavnimi in hitrimi metodami z uporabo natrijevega hidroksida.

V ta namen bomo:

- preizkusili in po potrebi prilagodili postopke izolacije DNA iz treh različnih vrst bioloških vzorcev (polna kri, krvni madež in bris bukalne sluznice),
- pri vzorcih polne krvi in brisov bukalne sluznic preverili vplive temperatur in časa shranjevanja vzorcev pred izolacijo,
- uspešnost izolacije ovrednotili s spektrofotometričnim merjenjem koncentracije in čistosti DNA, agarozno elektroforezo in genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SPLOŠNA NAVODILA

Delo v laboratoriju zahteva upoštevanje varnostnih navodil zato moramo biti z njimi seznanjeni.

Ves material, ki ga uporabljamo, očistimo s 3 % hipokloritom in avtoklaviramo. Avtoklaviramo tudi ultra čisto vodo, ki jo uporabljamo za pripravo vzorcev, raztopin in pufrov. Skozi ves postopek dela pazimo na čistočo, da ne kontaminiramo vzorcev, pribora in reagentov. Zato pred vsako izolacijo razkužimo delovne površine in delovni pribor. Z obvezno uporabno zaščitne halje in zaščitnih rokavic preprečimo kontaminacijo z lastnimi DNA-zami, ki bi lahko razgradile DNA v vzorcu.

3.2 BIOLOŠKI VZORCI

Kot biološke vzorce za izolacijo DNA smo uporabili:

- 3,5 mL polne venske krvi (prve osebe), ki smo jo razdelili na:
  - 60 alikvotov za takojšno izolacijo,
  - 60 alikvotov za izolacijo po treh dneh (shranjeni v hladilniku pri 4 ºC),
  - 60 alikvotov za izolacijo po sedmih dneh (shranjeni v hladilniku pri 4 ºC),
  - 60 alikvotov za izolacijo po zamrznitvi;
- 3,5 mL polne venske krvi (druge osebe), ki smo jo razdelili na:
  - 40 alikvotov za krvne madeže;
- 40 vzorcev brisov bukalne sluznice (po dva vzorca na 20 oseb)
- 20 vzorcev brisov bukalne sluznice pridobljenih s standardnim odvzemom (po dva vzorca na 10 oseb, vsi vzorci brisov bukalne sluznice so bili anonimni)

3.3 IZOLACIJA DNA IZ POLNE KRVI IN KRVNIH MADEŽEV Z UPORABO NATRIJEVEGA HIDROKSIDA

PRINCIP IZOLACIJE DNA Z UPORABO NATRIJEVEGA HIDROKSIDA

Izolacija z NaOH je ena izmed najpreprostejših metod izolacije. Z njo raztopimo membranske proteine in ioniziramo aminokisline. DNA je dobro stabilna v alkalni raztopini. Reakcijo nevtraliziramo z dodatkom Tris-HCL in s tem zmanjšamo pH reakcije iz 13,0 na 8,5 (16).

DELOVNI PRIBOR ZA IZOLACIJO DNA:

- rokavice za enkratno uporabo, papirnate brisače in 3 % hipoklorit,
- polavtomatske pipete (2–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL, 1–5 ml) in nastavki za pipete,
- epruvetke Eppendorf (1,5 mL),
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf Centrifuge 5415R),
- tehtnica (Železniki mikro 242),
- vodna kopel (VORTEMP 56 EVC),
- vrtinčasto mešalo (BIOSAN BioVortex V1),
- aparat za ultra čisto vodo (Purelab Classic ELGA).

KEMIKALIJE IN REAGENTI ZA IZOLACIJO DNA:

- 0,2 M NaOH (pripravimo iz 1 M NaOH),
- c1 * V1 = c2 * V2; V1 = (c2 * V2) / c1; V1 = (0,2 M NaOH * 10 mL) / 1 M NaOH = 2 mL,
- 2 mL 1 M NaOH dodamo 8 mL ultra čiste vode; dobimo 10 mL 0,2 M NaOH,
- 0,04 M Tris-HCl (pH 7,5),
- ultra čista avtoklavirana voda.

POSTOPEK IZOLACIJE POLNE KRVI BREZ SPIRANJA

V 1,5 mL epruvetke smo pipetirali 10 µL polne krvi in dodali 40 µL 0,2 M NaOH ter dobro premešali na vrtinčastem mešalu. Nato smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi pri 75 ºC ali 95 ºC. Ekstrakcijo smo končali z dodajanjem 360 µL 0,04 M Tris-HCl.

POSTOPEK IZOLACIJE POLNE KRVI S SPIRANJEM

S postopkom izolacije s spiranjem smo odstranili hemoglobin in plazemske proteine iz polne krvi.

V 1,5 mL epruvetke smo odpipetirali 10 µL polne krvi in dodali 1 mL ultra čiste avtoklavirane vode. Nato smo takoj 1 minuto centrifugirali na 12000 xg. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant. V še mokro epruvetko smo dodali 40 µL 0,2 M NaOH in inkubirali 5 minut. Pogoje inkubacije smo izvajali pri sobni temperaturi, pri 75 ºC in 95 ºC. Ekstrakcijo smo končali z dodajanjem 360 µL 0,04 M Tris-HCl.

POSTOPEK IZOLACIJE IZ KRVNIH MADEŽEV BREZ SPIRANJA

Na filter papir smo nakapljali po 10 µL polne krvi. Krvne madeže smo nato posušili na zraku in jih izrezali v obliki kroga v velikosti premera epruvetke. Krvnemu madežu v epruvetki smo dodali s 40 µL 0,2 M NaOH, pri tem smo pazili, da smo ga čim bolj napipetirali na krvni madež. To smo 5 minut inkubirali pri temperaturi 75 ºC ali 95 ºC. Ekstrakcijo smo končali z dodatkom 360 µL 0,04 M Tris-HCl.

POSTOPEK IZOLACIJE KRVNIH MADEŽEV S SPIRANJEM

Na filter papir smo kanili po 10 µL polne krvi. Krvne madeže smo nato posušili na zraku in jih izrezali v obliki kroga v velikosti premera epruvetke. Krvni madež smo prenesli v epruvetko, dodali 1 ml ultra čiste avtoklavirane vode in 1 minuto mešali na vrtinčastem mešalu. Nato smo takoj 1 minuto centrifugirali na 12000 xg. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant in filter papir. V še mokro epruvetko smo dodali 40 µL 0,2 M NaOH in inkubirali 5 minut. Pogoje inkubacije smo izvajali pri sobni temperaturi, pri 75 ºC ali pri 95 ºC. Ekstrakcijo končamo z dodatkom 360 µL 0,04 M Tris-HCl.

3.4 IZOLACIJA DNA IZ BRISOV BUKALNE SLUZNICE Z UPORABO NATRIJEVEGA HIDROKSIDA

DELOVNI PRIBOR ZA IZOLACIJO DNA:

- rokavice za enkratno uporabo, papirnate brisače in 3 % hipoklorit,
- polavtomatske pipete (2–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL, 1–5 ml) in nastavke za pipete,

- epruvetke Eppendorf (1,5 mL),
- vatirane palčke,
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5804R, Eppendorf Centrifuge 5415R),
- tehtnica (Železniki mikro 242),
- vodna kopel (VORTEMP 56 EVC),
- vrtinčasto mešalo (BIOSAN BioVortex V1),
- aparat za ultra čisto vodo (Purelab Classic ELGA).

KEMIKALIJE IN REAGENTI ZA IZOLACIJO DNA:

- 0,05 M NaOH,
- 1 M Tris-HCl (pH 8,0),
- ultra čista avtoklavirana voda.

STANDARDNI POSTOPEK ODVZEMA BUKALNE SLUZNICE

Pred odvzemom brisa bukalne sluznice je priporočljivo, da vsaj eno uro pred odvzemom ne zaužijemo hrane, pijemo kave in si pred tem ne umivamo zob (vsaj ne z zobno pasto).

1. Ustno votlino vsaj dvakrat speremo z vodo.
2. Vzamemo vatirano palčko in drgnemo (vrtimo palčko) po celotni notranji površini strani lica vsaj 1 minuto. Treba je relativno močno pritisniti s palčko. Pri tem pazimo,da se s palčko ne dotikamo jezika in zob.

3. Po odvzemu vatirano palčko shranimo nazaj v prvotni ovoj. Pazimo, da jo takoj po odvzemu pospravimo, brez da bi se dotikali vatiranega dela palčke.
4. Nato vzamemo drugo vatirano palčko in po istem postopku ponovimo bris na drugi notranji strani lica in jo po istem postopku shranimo nazaj v ovoj.

POSTOPEK IZOLACIJE

Vatirano palčko z vzorcem prenesemo v 1,5 mL epruvetko in dodamo 600 µL 50 mM NaOH. Epruvetko zapremo in jo premešamo na vrtinčastem mešalu 3 minute. Nato vzorce inkubiramo pri 95 ºC 10 minut. Na koncu dodamo še 120 µL 1 M Tris (pH 8,0), še enkrat premešamo na vrtinčastem mešalu 1 minuto in iz epruvetke previdno odstranimo vatirano palčko.

3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI DNA

Koncentracijo DNA določamo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 260 nm. Pri tej valovni dolžini absorbirajo ultravijolično svetlobo predvsem heterociklične baze DNA, interferirajo pa RNA molekule, aminokisline in proteini. Izmerjena A_{260} = 1 pomeni, da je v vzorcu koncentracije dvoverižne DNA 50 µg/mL. Če analiziramo enoverižno DNA, A_{260} = 1 pomeni, da je koncentracija v vzorcu 40 µg/ml. Absorpcija svetlobe je linearno odvisna od koncentracije nukleinskih kislin v vzorcu, dokler so vrednosti absorbance pod 1. Razmerje med A_{260} in A_{280} nam pove, kako čist je vzorec. Razmerje A_{260}/ A_{280} je pri čistem vzorcu DNA v območju 1,8. Nečistoče v vzorcu bistveno zmanjšajo razmerje med obema absorbancama (13).

Meritve smo izvajali na spektrofotometru NanoDrop 1000, ki je spektrofotometer brez kivete.

Za meritve potrebujemo samo 1–2 µL vzorca. Uporablja se tehnologija z optičnimi vlakni. Vzorec pipetiramo na spodnje optično vlakno in zapremo kapljični spektrofotometer. Vzorec se nahaja med dvema optičnima površinama tako, da je pot svetlobe, ki prehaja skozi vzorec 1 mm oziroma 0,2 mm.

Vzorce smo merili proti slepi (vsebuje reagente, namesto vzorca pa ultra čisto vodo).

OPREMA:

• pipeta,
• kapljični spektrofotometer (Spectrophotometer ND-1000),
• računalnik (program Nanodrop 100).

MATERIALI:

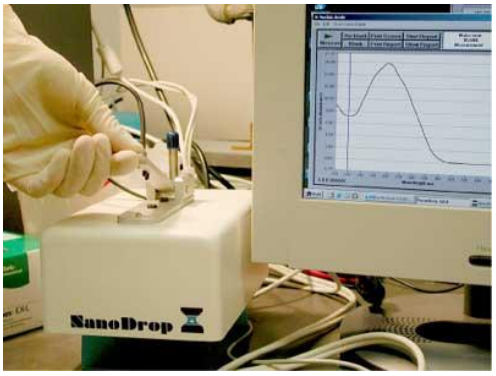
• deionizirana voda,

• nastavki za pipete,

• papirnata brisačka.

POSTOPEK

Vse vzorce premešamo na vrtinčastem mešalu, da jih homogeniziramo. Nato jih kratko centrifugiramo, da se tekočina zbere na dnu epruvetke. Zaženemo program *"Nanodrop 100" in izberemo "Nucleic Acid"*. Kapljični spektrofotometer očistimo tako, da pipetiramo 1,5 µL deionizirane vode in pritisnemo "*OK"*. Obrišemo s kosom papirja. Ko je kapljični spektrofotometer očiščen, še enkrat napipetiramo deionizirano vodo, zapremo kapljični spektrofotometer in pritisnemo *"BLANK"*, da uravnamo spektrofotometer na vrednost 0. Po končanem merjenju obrišemo s papirjem. Pipetiramo 1,5 µL vzorca, zapremo kapljični spektrofotometer, označimo ID vzorca in pritisnemo *"MEASURE"*. Pobrišemo in spet pipetiramo, drugi vzorec. Ko končamo z merjenjem, očistimo kapljični spektrofotometer z deionizirano vodo. Slika 5 prikazuje kapljični spektrofotometer.



Slika 5: *Kapljični spektrofotometer.*

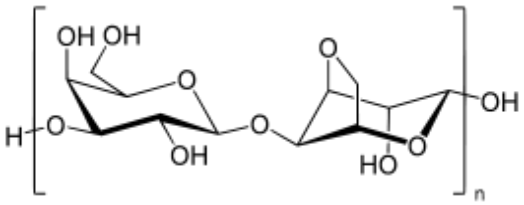
3.6 VELIKOST IZOLIRANE DNA

Standardna metoda za ločevanje,prepoznavanje in čiščenje odsekov DNA je elektroforeza. Uporabljata se dva tipa gelov: agarozni in poliakrilamidni. Za določen tip se odločimo glede na velikost odeskov, ki jih ločujemo.

Agarozna gelska elektroforeza

Agaroza je linearni polimer s ponavljajočim dimerom D-galaktoze in 3,6 anhidro-L-galaktoze (slika 6). Gele pripravimo tako, da trdno agarozo s segrevanjem raztopimo v elektroforeznem pufru. Z ohlajevanjem raztopine tvori agaroza gel, katerega gostota je

odvisna od koncentracije agaroze. Z agaroznimi geli lahko v električnem polju ločujemo molekule, velike od 100 bp do približno 50 kb. Hitrost potovanja DNA je odvisna od: velikosti DNA, oblike DNA, koncentracije agaroze, jakosti električnega polja, sestave elektroforeznega pufra in interkalirajočih barvil. Nukletidno zaporedje odsekov DNA ne vpliva na hitrost potovanja v gelu. Pri izvedbi moramo paziti, da ne presežemo temperature tališča gela (13).



Slika 6: *Kemijska formula agaroze.*

PRIPRAVA 2 % AGAROZNEGA GELA ZA ELEKTROFOREZO

MATERIALI:

- rokavice,
- nosilec za gel, kadička, glavnički,
- erlenmajerica,
- merilni valj (75 mL),
- pipeta, nastavki za pipete,
- plastične vrečke za shranjevanje agaroznega gela,
- agaroza (Sigma, Agarose For Routine Use),
- pufer 1 x TAE (Pufer Tris/acetat/EDTA),
- sestava 50 x TAE: 242,0 g Tris baza; 57,1 g CH3COOH; 100 µL 0,5M EDTA in ad 1000 µL biH2O; za 1 x TAE zmešamo 200 µL 50 x TAE in dopolnimo z ultra čisto vodo do 1000 µL,
- Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogen™Molecular Probes™), OPOZORILO: Sybr® Safe je potencialno toksičen, zato je nujna uporaba neprepustnih vijoličnih rokavic in delo v digestoriju. Sybr® Safe razpada na svetlobi, zato ga shranjujemo v temnem in hladnem prostoru.

OPREMA:

- digestorij (Waldner, Electronics FAZ1),
- tehtnica (EXACTA 300 EB),
- mikrovalovna pečica (OPTIQUICK compact).

POSTOPEK:

Pripravimo si vse, kar potrebujemo, za izdelavo gela. Pogledamo, če je dovolj 1 x TAE pufra. Če ga ni, ga pripravimo tako, da v litrski merilni valj nalijemo 200 mL 50 x pufra TAE. Dopolnimo do oznake 1000 mL z deionizirano vodo iz aparata ELGA, PURELAB Classic. Premešamo z obračanjem merilnega valja. Valje speremo z deionizirano vodo. V digestoriju pripravimo nosilec za gel tako, da damo kadičko v nastavek in privijemo, da se ne premika. V kadičko damo merilec, da lahko kadičko popolnoma poravnamo. Pripravimo glavničke in Sybr® Safe v digestorij. V erlenmajerico natehtamo 1,5 g agaroze. V merilni valj nalijemo 75 mL pufer 1 x TAE in ga dolijemo v erlenmajerico k agarozi. Premešamo s kroženjem, postavimo na tehtnico in stariramo. Pokrijemo z urnim steklom in v mikrovalovni pečici segrevamo toliko časa, da dobimo prozorno raztopino. Raztopina ne sme imeti mehurčkov, biti mora homogena. Erlenmajerico postavimo nazaj na tehtnico in dodamo toliko ultračiste vode, kolikor gramov smo izgubili s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Erlenmajerico prenesemo v digestorij, dodamo 7,5 µL barvila Sybr® Safe in premešamo z vrtenjem. Raztopino prelijemo previdno in počasi v kadičko. Mehurčke, ki so morebiti nastali ob prelivanju, odstranimo z nastavkom za pipete. Vstavimo še glavničke, pokrijemo in gel pustimo v zaprtem digestoriju, da se strdi. Po 30 minutah, ko je gel strjen, odstranimo glavničke, ga previdno vzamemo ven, prenesemo v plastično vrečko, označimo (ime, lastnost gela, datum priprave) in shranimo v hladilniku.

OPOZORILO: Sybr® Safe je potencialno toksičen, zato je nujna uporaba neprepustnih vijoličnih rokavic in delo v digestoriju. Sybr® Safe razpada na svetlobi, zato ga shranjujemo v temnem in hladnem prostoru.

ELEKTROFOREZA NA 2 % AGAROZNEM GELU

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Metoda se izvaja horizontalno, tako da je agarozni gel popolnoma potopljen v pufer (v našem primeru pufer 1 x TAE).

MATERIALI:

- nitrilne rokavice,
- elektroforezna kadička,
- pipete,
- nastavki za pipete,
- parafilm,
- skalpel,
- podstavek,
- 2 % agarozni gel,
- pufer 1 x TAE,
- barvilo bromfenol modro,
- označevalec dolžin (Marker II; Roche Diagnostic GmbH, Germany; DNA Molecular Weight; 0,12–23,1 kbp),
- označevalec dolžin (PCR Markers; Promega; 1,000 bp).

OPREMA:

- aparat (BIO RAD, POWER PAC 300),
- vrtinčasto mešalo (BIOSAN, BioVorteks V1),
- centrifuga (TEHTNICA, Železniki MIKRO 242).

POSTOPEK:

Vzorce na kratko premešamo na vrtinčastem mešalu. Za nekaj sekund jih zavrtimo na centrifugi, da se vzorec zbere na dnu epruvetke. Medtem gel vzamemo iz hladilnika in ga na podstavku s skalpelom odrežemo, kolikor ga potrebujemo. Gel položimo v kadičko tako, da je popolnoma prekrit s pufrom 1 x TAE. Če gel ni pokrit, dolijemo pufer 1 x TAE. Vzamemo parafilm in nanj naredimo kapljice barvila, ki služi kot indikator položaja nukleinskih kislin določene velikosti v gelu. V eno kapljico barvila dodamo označevalec

dolžin (Marker I), premešamo in vse skupaj s pipeto prenesemo v žepek na gelu. V drugo kapljico barvila dodamo označevalec dolžin (Marker II), premešamo in vse skupaj s pipeto prenesemo v žepek na gelu. Označevalec dolžin vsebuje standarde znane dolžine nukleinskih kislin zato je potreben, kadar želimo določiti velikost nukleinskih kislin. V ostale kapljice dodamo na enak način posamezne vzorce (za vzorce polne krvi in krvnih madežev smo za primerjavo dodali po 2 µL in 10 µL vzorca, pri brisih bukalne sluznice pa po 2 µL vzorca). Ko prenesemo vse vzorčke v žepke, pokrijemo kadičko, jo priklopimo na vir napetosti, nastavimo program (napetost = 90 V; čas = 25 min) (slika 7).

Po končani elektroforezi prenesemo gel v komoro (G: BOX, SYNGENE). S programom *Gene Snap from Syn Gene* fotografiramo gel pod UV svetlobo. Na temnem gelu so vidne bele lise. Syber Safe se vgradi v DNA in fluorescira ob ekscitaciji z UV svetlobo, zato se na mestu, kjer je DNA, vidijo lise.

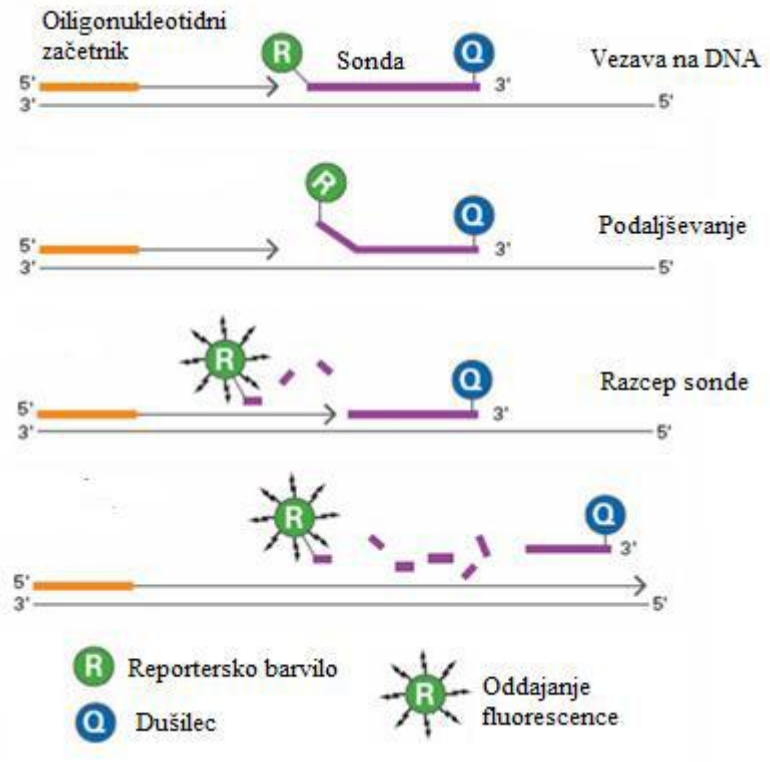
Slika 7: *Kadička za agarozno elektroforezo.*

3.7 GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI

Metoda genotipizacije temelji na uporabi PCR v realnem času, ki omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Pomnoževanje in detekcija produktov PCR torej potekata istočasno.

V začetku se na tarčno DNA vežejo oligonukleotidni začetniki in sonda, označena z reporterskim barvilom (R) na 5’-koncu in dušilcem (Q) na 3’-koncu. V naslednji stopnji Taq DNA polimeraza sintetizira komplementarno verigo tarčne DNA in ko doseže na tarčno zaporedje vezano sondo, povzroči zaradi 5’-nukleazne aktivnosti njeno hidrolizo. Posledično se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem poveča ter fluorescenca reporterskega barvila naraste. Prikaz principa genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami je prikazan na sliki 8.

V reakcijsko zmes vključimo dve fluorescentno označeni sondi. Ena sonda je označena z reporterskim barvilom VIC, druga pa z barvilom FAM. Sonda označena z enim barvilom se prilega na normalno zaporedje tarčne DNA, sonda označena z drugim barvilom pa se prilega na mutirano zaporedje tarčne DNA (14).



Slika 8: *Shematski prikaz principa genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami.*

MATERIALI:

- rokavice, halja,
- papirnate brisačke, 10 % etanol, 3 % hipoklorit,
- nastavki za pipete (beli in rumeni),
- 0,5 mL epruvete,
- niz epruvetk (MicroAmpTM optical 8-tube strip; 0,2 mL; Applied Biosystems),
- optični pokrovčki (8 Caps/Strip; Applied Biosystems),
- podstavek (MicroAmp® Splash Free Suport Base; Applied Biosystems),
- ultračista voda,
- Taq-polimeraza, pufer, Mg^{2+}, dNTP (5 x HOT FIRE Pol® Probe gPCR Mix Plus (ROX), Solis BioDyne),

- mešanica oligonukleotidnih sond (40 x TaqMan® SNP Genotyping Assay za rs2071375, Applied Biosystems).

OPREMA:

- pipete (Eppendorf Research 0,5–10 µL; 2–20 µL; 20–200 µL),
- komora za PCR (BIOSAN DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR),
- hladilnik (Gorenje),
- vrtinčasto mešalo/centrifuga (BIOSAN Combi-Spin FUL 2400N),
- centrifuga (Mikro-242),
- tehtnica (Ţelezniki),
- centrifuga (Centric 322A, Tehtnica),
- abi prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems).

POSTOPEK:

Reakcijo izvajamo v posebni komori, da preprečimo kontaminacijo. Očistimo komoro, pipete in škatlice z nastavki in epruvetkami s 3 % hipokloritom. Vrtinčasto mešalo/centrifugo očistimo z 10 % etanolom. Ves material, ki ga bomo potrebovali za delo, zložimo v komoro in za 30 min prižgemo UV luč. Reagente odtalimo v hladilniku. Sonde morajo biti ves čas na hladnem in temnem, saj fluorescenčno barvilo razpada na svetlobi, zato jih še dodatno ovijemo v aluminijasto folijo. Pripravimo si epruvetko, v kateri bomo pripravili reakcijsko zmes, za vso serijo vzorcev. Reagente premešamo na vrtinčastem mešalu in jih kratko centrifugiramo. V 0,5 mL epruveti pripravimo reakcijsko zmes. Preglednica II prikazuje sestavo reakcijske zmesi.

Preglednica II: *Sestava reakcijske zmes, za genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami.*

SESTAVINA	**VOLUMEN za 1 vzorec (µL)**
Ultračista voda	5,75
Taq-polimeraza, pufer, Mg^{2+}, dNTP (5 x)	2
Začetniki in sonde za ILArs2071375 (40 x)	0,25

Vzorec DNA	2
Skupni volumen	10

Opomba: Vzorec DNA se nanaša na 2µL izolata

Pripravljeno reakcijsko zmes razdelimo v optične epruvetke, ki so povezane med seboj (osem v kompletu). V vsako epruvetko odpipetiramo določen volumen vzorca DNA ter previdno in natančno pokrijemo z optičnimi pokrovčki. Pri pokrivanju pazimo, da se čim manj dotikamo zgornje strani pokrovčkov, in s tem preprečimo napačen rezultat. Pomagamo si s plastičnim zapiralcem. Optične epruvetke centrifugiramo pri 1900 obratih 2 min. Po centrifugiranju nize epruvetk previdno prenesemo v aparat. V vsaki seriji pripravimo tudi slepi vzorec, da kontroliramo, ali je med delom prišlo do kontaminacije z DNA. V slepo namesto vzorca dodamo dH2O. Nato izvedemo pomnoževanje po naslednjem programu, ki je prikazan v preglednici III.

Preglednica III: *Shematski prikaz programa za izvedbo genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami.*

Absolutna kvantifikacija			Alelna diskriminacija
Korak 1 *Začetna denaturacija*	Korak 2 →50 ciklov *Denaturacija*	*Prileganje*	
95 °C, 15 min	95 °C, 20 sek	60 °C, 1 min	60 °C, 1 min
V = 10 µL			

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen našega dela je bil, da iz različnih bioloških vzorcev izoliramo zadostno količino dovolj kakovostne DNA, ki bi bila uporabna za nadaljnje genetske analize. Pri tem smo uporabili in po potrebi prilagodili postopke, ki so hitri, enostavni in cenovno ugodni.

4.1 REZULTATI IZOLACIJE IZ VZORCEV POLNE KRVI

Izolacije iz polne krvi smo naredili iz istega vzorca, pri čemer smo za vse pogoje uporabili 10 paralelk. Vzorce smo izolirali z metodo spiranja in brez spiranja pri različnih temperaturah. Vsem izoliranim vzorcem (svežim vzorcem, tri dni starim vzorcem, sedem dni starim vzorcem in zamrznjenim vzorcem) smo izmerili koncentracijo DNA in njeno čistost na kapljičnem spektrofotometru. Meritve so prikazane v preglednicah IV, V, VI in VII.

Preglednica IV: *Izmerjene koncentracije vzorcev sveže polne krvi.*

Z rumeno so označeni vzorci izolirani pri sobni temperaturi, z zeleno vzorci izolirani pri temperaturi 75 °C in z vijolično vzorci izolirani pri 95 °C.

Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280	Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280
1	210,0	4,2	2,884	1,46	**1a**	2,85	0,057	0,064	0,89
2	218,85	4,377	2,956	1,48	**2a**	4,65	0,093	0,101	0,92
3	176,2	3,524	2,426	1,45	**3a**	4,65	0,093	0,108	0,86
4	219,35	4,387	2,916	1,50	**4a**	5,4	0,108	0,138	0,78
5	203,15	4,063	2,850	1,43	**5a**	4,3	0,086	0,104	0,83
6	252,85	5,057	3,481	1,45	**6a**	4,1	0,082	0,094	0,87
7	224,2	4,484	3,077	1,46	**7a**	3,6	0,072	0,104	0,69
8	188,6	3,772	2,656	1,4	**8a**	4,05	0,081	0,103	0,79
9	210,25	4,205	2,933	1,43	**9a**	3,2	0,064	0,083	0,77
10	184,55	3,691	2,594	1,42	**10a**	6,2	0,124	0,141	0,88
Povp. vrednost	208,8	4,176	2,8773	1,448		4,3	0,086	0,104	0,83
SD	22,32	0,446	0,288	0,03		1,00	0,02	0,023	0,07
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
11	121,6	2,432	1,705	1,43	**11a**	5,05	0,101	0,132	0,77
12	106,8	2,136	1,478	1,44	**12a**	5,35	0,107	0,115	0,93
13	146,6	2,932	2,015	1,46	**13a**	4,4	0,088	0,103	0,85
14	132,75	2,655	1,867	1,42	**14a**	4,85	0,097	0,137	0,71
15	120,9	2,418	1,733	1,37	**15a**	4,2	0,084	0,107	0,79
16	132,85	2,657	1,911	1,4	**16a**	4,4	0,088	0,108	0,81
17	131,35	2,627	1,862	1,41	**17a**	3,65	0,073	0,094	0,78
18	139,1	2,782	1,966	1,42	**18a**	5,1	0,102	0,089	1,15
19	120,05	2,401	1,738	1,38	**19a**	5,35	0,107	0,107	1,0
20	97,8	1,956	1,533	1,28	**20a**	5,65	0,113	0,144	0,79
Povp. vrednost	124,98	2,50	1,781	1,40		4,80	0,096	0,114	0,86
SD	14,72	0,294	0,177	0,05		0,62	0,012	0,018	0,13
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
21	70,55	1,411	1,128	1,25	**21a**	3,8	0,076	0,068	1,12
22	79,15	1,583	1,293	1,22	**22a**	4,65	0,093	0,088	1,06
23	85,6	1,712	1,388	1,23	**23a**	4,75	0,095	0,091	1,04
24	78,3	1,566	1,327	1,18	**24a**	4,65	0,093	0,119	0,78
25	70,95	1,419	1,255	1,13	**25a**	4,5	0,090	0,097	0,93

26	61,6	1,232	1,140	1,08	**26a**	6,5	0,130	0,143	0,91
27	60,2	1,204	1,085	1,11	**27a**	4,7	0,094	0,118	0,8
28	6,1	1,222	1,128	1,08	**28a**	4,4	0,088	0,094	0,94
29	63,05	1,261	1,123	1,12	**29a**	4,5	0,090	0,081	1,11
30	58,3	1,166	1,066	1,09	**30a**	4,75	0,095	0,090	1,06
Povp. vrednost	63,38	1,378	1,193	1,15		4,72	0,094	0,099	0,98
SD	22,10	0,19	0,112	0,07		0,69	0,014	0,022	0,12

Vzorce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri sobni temperaturi. Vzorce 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a, 9a, 10a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri sobni temperaturi. Vzorce 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri 75 ºC. Vzorce 11a, 12a, 13a, 14a, 15a, 16a, 17a, 18a, 19a, 20a smo izolirali po postopku izolacije s spiranje pri 75 ºC. Vzorce 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri 95 ºC. Vzorce 21a, 22a, 23a, 24a, 25a, 26a, 27a, 28a, 29a, 30a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri 95 ºC.

Preglednica V: *Izmerjene koncentracije vzorcev* ***tri dni stare*** *polne krvi.*

Z rumeno so označeni vzorci izolirani pri sobni temperaturi, z zeleno vzorci izolirani pri temperaturi 75 ºC in z vijolično vzorci izolirani pri 95 ºC.

Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280	Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280
31	342,75	6,855	4,7	1,46	**31a**	4,5	0,09	0,115	0,78
32	343,0	6,86	4,686	1,47	**32a**	7,05	0,141	0,149	0,95
33	269,65	5,393	3,768	1,44	**33a**	7,15	0,143	0,151	0,95
34	423,65	8,473	6,351	1,34	**34a**	7,1	0,142	0,142	1,0
35	405,5	8,11	5,68	1,43	**35a**	8,0	0,160	0,173	0,92
36	413,0	8,26	5,771	1,43	**36a**	6,8	0,136	0,156	0,87
37	373,2	7,464	5,247	1,43	**37a**	10,1	0,202	0,224	0,9
38	429,05	8,581	6,358	1,35	**38a**	8,25	0,165	0,169	0,98
39	434,6	8,692	6,29	1,38	**39a**	7,9	0,158	0,179	0,88
40	427,15	8,543	6,19	1,38	**40a**	8,8	0,176	0,205	0,86
Povp. vrednost	386,16	7,723	5,50	1,41		7,6	0,151	0,166	0,91
SD	53,6	1,072	0,883	0,05		1,5	0,029	0,031	0,07
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
41	146,9	2,938	2,004	1,47	**41a**	8,45	0,169	0,165	1,02
42	178,5	3,570	2,422	1,47	**42a**	5,85	0,117	0,124	0,94
43	160,1	3,202	2,162	1,48	**43a**	8,7	0,174	0,171	1,02
44	203,1	4,062	2,713	1,5	**44a**	10,75	0,215	0,239	0,9
45	170,3	3,406	2,362	1,44	**45a**	10,2	0,204	0,219	0,93
46	193,1	3,862	2,681	1,44	**46a**	10,8	0,216	0,220	0,98
47	213,05	4,261	2,867	1,49	**47a**	10,35	0,207	0,213	0,97
48	174,35	3,487	2,403	1,45	**48a**	10,6	0,212	0,219	0,97
49	164,15	3,283	2,265	1,45	**49a**	9,15	0,183	0,207	0,88
50	168,95	3,379	2,354	1,44	**50a**	10,45	0,209	0,204	1,02
Povp. vrednost	177,25	3,545	2,423	1,46		9,53	0,191	0,198	0,96
SD	20,32	0,406	0,263	0,02		1,55	0,031	0,034	0,05
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
51	71,7	1,434	1,255	1,16	**51a**	16,5	0,33	0,264	1,25
52	70,9	1,418	1,255	1,15	**52a**	9,95	0,199	0,172	1,16

53	73,55	1,471	1,308	1,14	**53a**	10,75	0,215	0,22	0,98
54	69,65	1,493	1,233	1,15	**54a**	10,5	0,210	0,211	1,0
55	69,6	1,392	1,203	1,17	**55a**	10,7	0,214	0,2	1,07
56	70,05	1,401	1,234	1,15	**56a**	10,15	0,203	0,204	1,0
57	71,0	1,42	1,236	1,16	**57a**	9,3	0,186	0,161	1,15
58	69,75	1,495	1,214	1,16	**58a**	9,45	0,189	0,187	1,01
59	72,1	1,442	1,241	1,18	**59a**	9,35	0,187	0,178	1,05
60	72,35	1,447	1,253	1,17	**60a**	9,9	0,198	0,194	1,02
Povp. vrednost	71,07	1,441	1,243	1,16		10,66	0,213	0,199	1,07
SD	1,34	0,036	0,028	0,01		2,12	0,042	0,029	0,09

Vzorce 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri sobni temperaturi. Vzorce 31a, 32a, 33a, 34a, 35a, 36a, 37a, 38a, 39a, 40a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri sobni temperaturi. Vzorce 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri 75 ºC. Vzorce 41a, 42a, 43a, 44a, 45a, 46a, 47a, 48a, 49a, 50a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri 75 ºC. Vzorce 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri 95 ºC. Vzorce 51a, 52a, 53a, 54a, 55a, 56a, 57a, 58a, 59a, 60a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri 95 ºC.

Preglednica VI: *Izmerjene koncentracije vzorcev* ***sedem dni stare*** *polne krvi.*

Z rumeno so označeni vzorci izolirani pri sobni temperaturi, z zeleno vzorci izolirani pri temperaturi 75 ºC in z vijolično vzorci izolirani pri 95 ºC.

Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280	Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280
61	281,15	5,623	3,882	1,45	**61a**	3,65	0,073	0,072	1,01
62	270,5	5,41	3,727	1,45	**62a**	6,35	0,127	0,145	0,88
63	230,9	4,618	3,102	1,49	**63a**	5,55	0,111	0,117	0,95
64	147,45	2,949	2,083	1,42	**64a**	6,9	0,138	0,146	0,95
65	193,75	3,875	2,679	1,45	**65a**	3,95	0,079	0,101	0,78
66	182,55	3,651	2,514	1,45	**66a**	4,1	0,082	0,102	0,8
67	161,25	3,225	2,238	1,44	**67a**	5,9	0,118	0,15	0,79
68	225,8	4,516	3,04	1,49	**68a**	3,2	0,064	0,09	0,71
69	142,6	2,852	1,998	1,43	**69a**	4,95	0,099	0,098	1,01
70	137,35	2,747	1,927	1,43	**70a**	5,2	0,104	0,141	0,74
Povp. vrednost	197,33	3,947	2,719	1,45		4,975	0,1	0,116	0,86
SD	52,63	1,052	0,703	0,02		1,23	0,025	0,028	0,11
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
71	63,9	1,278	1,093	1,17	**71a**	7,1	0,142	0,162	0,88
72	85,95	1,719	1,356	1,27	**72a**	4,55	0,091	0,108	0,84
73	105,85	2,117	1,597	1,33	**73a**	4,9	0,098	0,11	0,89
74	87,35	1,747	1,392	1,26	**74a**	5,75	0,115	0,151	0,76
75	102,8	2,056	1,588	1,29	**75a**	3,55	0,071	0,087	0,82
76	106,25	2,125	1,625	1,31	**76a**	4,4	0,088	0,088	1
77	70,45	1,409	1,173	1,2	**77a**	4,25	0,085	0,106	0,8
78	82,25	1,645	1,356	1,21	**78a**	5,05	0,101	0,096	1,05
79	107,3	2,146	1,653	1,3	**79a**	4,95	0,099	0,113	0,88
80	93,75	1,875	1,493	1,26	**80a**	4,9	0,098	0,108	0,91
Povp. vrednost	90,59	1,812	1,433	1,26		4,94	0,099	0,113	0,88
SD	15,41	0,308	0,193	0,05		0,95	0,019	0,025	0,09
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
81	64,4	1,288	1,088	1,18	**81a**	3,75	0,075	0,084	0,89
82	71,55	1,431	1,201	1,19	**82a**	5,1	0,102	0,134	0,76

83	67,2	1,344	1,153	1,17	**83a**	7,95	0,159	0,183	0,87
84	74,25	1,485	1,256	1,18	**84a**	5,1	0,102	0,101	1
85	70,15	1,403	1,187	1,18	**85a**	8,1	0,162	0,186	0,87
86	73,35	1,467	1,253	1,17	**86a**	5,2	0,104	0,103	1
87	74,5	1,49	1,274	1,17	**87a**	6	0,12	0,12	1
88	75,5	1,51	1,242	1,22	**88a**	5,25	0,105	0,119	0,88
89	82,45	1,649	1,359	1,21	**89a**	5,4	0,108	0,124	0,87
90	71,9	1,438	1,235	1,16	**90a**	5,7	0,114	0,124	0,92
Povp. vrednost	72,53	1,451	1,225	1,18		5,76	0,115	0,128	0,90
SD	4,9	0,098	0,0734	0,02		1,33	0,027	0,033	0,08

Vzorce 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri sobni temperaturi. Vzorce 61a, 62a, 63a, 64a, 65a, 66a, 67a, 68a, 69a, 70a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri sobni temperaturi. Vzorce 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri 75 ºC. Vzorce 71a, 72a, 73a, 74a, 75a, 76a, 77a, 78a, 79a, 80a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri 75 ºC. Vzorce 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri 95 ºC. Vzorce 81a, 82a, 83a, 84a, 85a, 86a, 87a, 88a, 89a, 90a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri 95 ºC.

Preglednica VII: *Izmerjene koncentracije vzorcev* ***zamrznjene*** *polne krvi.*

Z rumeno so označeni vzorci izolirani pri sobni temperaturi, z zeleno vzorci izolirani pri temperaturi 75 ºC in z vijolično vzorci izolirani pri 95 ºC.

Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280	Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280
91	280,75	5,615	3,841	1,46	**91a**	14,2	0,284	0,248	1,15
92	387,3	7,746	5,348	1,45	**92a**	18,2	0,364	0,271	1,34
93	453,2	9,064	6,57	1,38	**93a**	16,7	0,334	0,279	1,2
94	428,3	8,566	6,045	1,42	**94a**	12,7	0,254	0,24	1,1
95	417,5	8,35	6,071	1,38	**95a**	15,35	0,307	0,273	1,12
96	370,4	7,408	5,296	1,4	**96a**	13,25	0,265	0,26	1,02
97	410,15	8,203	5,757	1,42	**97a**	14,15	0,283	0,234	1,21
98	416	8,32	6,018	1,38	**98a**	13,75	0,275	0,278	0,99
99	388,85	7,777	5,492	1,42	**99a**	13,45	0,269	0,236	1,14
100	461,85	9,237	6,806	1,36	**100a**	16,65	0,333	0,291	1,14
Povp. vrednost	401,43	8,029	5,724	1,41		14,84	0,297	0,261	1,14
SD	51,08	1,022	0,825	0,03		1,81	0,036	0,02	0,1
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
101	199,35	3,987	2,748	1,45	**101a**	15,15	0,303	0,232	1,31
102	292,3	5,846	4,054	1,44	**102a**	12,75	0,255	0,267	0,96
103	295,7	5,914	4,109	1,44	**103a**	12,4	0,248	0,248	1
104	263,5	5,27	3,547	1,49	**104a**	14	0,28	0,249	1,12
105	197,8	3,956	2,718	1,5	**105a**	12,2	0,244	0,26	0,94
106	197,25	3,945	2,788	1,41	**106a**	12,65	0,253	0,25	1,01
107	228,45	4,569	3,17	1,44	**107a**	10,55	0,211	0,208	1,01
108	236,85	4,737	3,288	1,44	**108a**	11,6	0,232	0,247	0,94
109	240,25	4,805	3,296	1,46	**109a**	11,65	0,233	0,233	1
110	266,2	5,324	3,722	1,43	**110a**	11,25	0,225	0,215	1,05
Povp. vrednost	241,77	4,835	3,344	1,45		12,42	0,248	0,241	1,03
SD	37,19	0,744	0,513	0,02		1,35	0,027	0,019	0,11
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
111	78,25	1,565	1,358	1,15	**111a**	10,9	0,218	0,189	1,15
112	111,75	2,235	1,798	1,24	**112a**	12,3	0,246	0,249	0,99

113	122,4	2,448	1,928	1,27	**113a**	20,25	0,405	0,411	0,99
114	102	2,04	1,672	1,22	**114a**	11,95	0,239	0,239	1
115	85,35	1,707	1,474	1,158	**115a**	12,65	0,253	0,253	1
116	73,8	1,476	1,295	1,14	**116a**	12,45	0,249	0,244	1,02
117	76,65	1,533	1,359	1,13	**117a**	13	0,26	0,269	0,97
118	78,5	1,57	1,364	1,15	**118a**	13,05	0,261	0,264	0,99
119	88,5	1,77	1,502	1,18	**119a**	12,35	0,247	0,234	1,06
120	70	1,4	1,215	1,15	**120a**	11,8	0,236	0,227	1,04
Povp. vrednost	88,72	1,774	1,497	1,18		13,07	0,261	0,258	1,02
SD	17,59	0,352	0,232	0,05		2,6	0,052	0,058	0,05

Vzorce 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri sobni temperaturi. Vzorce 91a, 92a, 93a, 94a, 95a, 96a, 97a, 98a, 99a, 100a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri sobni temperaturi. Vzorce 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri 75 ºC. Vzorce 101a, 102a, 103a, 104a, 105a, 106a, 107a, 108a, 109a, 110a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri 75 ºC. Vzorce 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri 95 ºC. Vzorce 111a, 112a, 113a, 114a, 115a, 116a, 117a, 118a, 119a, 120a smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri 95 ºC.

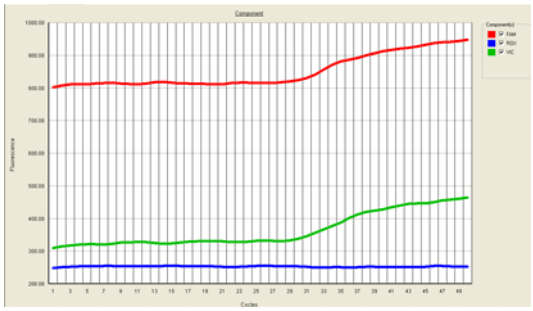
Polno kri smo preizkusili zato, ker je to najpogostejši vzorec za izolacijo DNA. Izhajali smo iz postopka po Rudbecku, kjer priporočajo za izolacijo pogoje, ki so jih določili na podlagi eksperimentov (inkubacija z 0,2 M NaOH od 1–60 min v območju temperatur od sobne temperature do 90 ºC). Mi smo se odločili, da poleg predlaganega postopka pri sobni temperaturi preizkusimo še temperaturi 75 ºC in 95 ºC. Preizkusili smo tudi različno starost in shranjevanje vzorcev, ker včasih vzorcev ne moremo takoj analizirati. Na podlagi merjenja absorbanc pri 260 nm in 280 nm smo ocenili koncentracijo in čistost. To je standardni postopek, ki pa je bolj primeren za preverjanje po drugih, bolj zapletenih in večstopenjskih postopkih, kjer dobimo bolj čisto DNA. V primeru izolacije z NaOH bi bila bolj primerna metoda ACES ^{TM} 2.0^{+} Human DNA Quantitation System, ki so jo Rudbeck in sodelavci uporabljali za določanje količine izolirane DNA. Dobili so 65 % izkoristek,vendar čistosti ne navajajo (16). Zaradi prispevka absorbanc drugih prisotnih snovi, tako pri 260 kot tudi 280 nm, dobljene koncentracije in čistosti niso realne, omogočajo pa nam primerjavo izolatov DNA iz istega biološkega vzorca ob uporabi

različnih temperatur ter prisotnosti ali odsotnosti spiranja. Pri vseh temperaturah so absorbance bistveno nižje ob uporabi postopka spiranja, ker po podatkih tega članka s tem odstranimo 85 % proteinov. Speremo tudi del DNA, kar je slaba stran tega postopka. Rudbeck in sodelavci postopka s spiranjem ne izpostavljajo, zato z njimi ne moremo primerjati rezultatov. Glede starosti oz. zamrzovanja vzorcev pa ni opaziti velikih vplivov na rezultate. V literaturi nismo našli podatka o shranjevanju vzorcev.

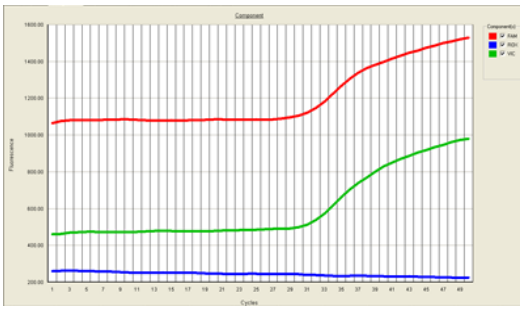
Z namenom ugotavljanja integritete DNA smo izvedli elektroforezo na 2 % agaroznem gelu z 2 µL in 10 µL ekstrakta, vendar na gelu ni bilo vidnih lis, da bi lahko določili dolžine fragmentov. Glede na rezultate Rudbecka in sodelavcev, ki so elektroforezo izvedli po predhodnem koncentriranju ekstrakta, pa lahko sklepamo, da je izolirana DNA visoko molekularna (16).

PREVERJANJE USPEŠNOSTI GENOTIPIZACIJE S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI

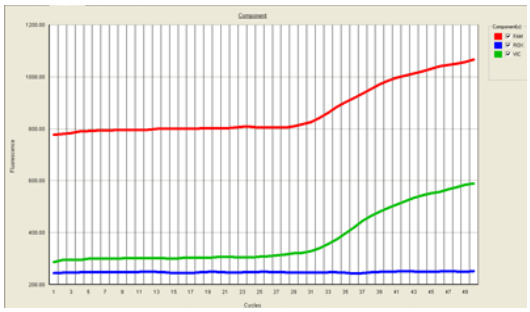
Z metodo genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami smo hoteli ugotoviti, če so izolirane DNA ustrezne za uspešno genotipizacijo. To metodo smo izbrali, ker se danes pogosto uporablja v diagnostičnih laboratorijih. Izvedli smo genotipizacijo polimorfizma IL1Ars2071375. Od vsakega postopka izolacije smo izbrali najmanj po pet vzorcev in naredili genotipizacijo. V vsaki seriji genotipizacije smo naredili še slepi vzorec, pri katerem ne sme priti do porasta fluorescence. Fluorescenca barvila VIC poraste ob prisotnosti nukleotida A, barvila FAM pa ob prisotnosti nukleotida G. Primeri genotipizacije so na sliki 9.



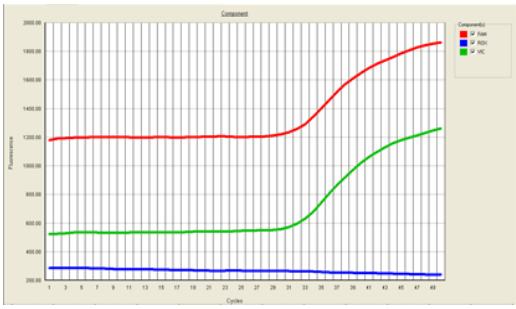
A



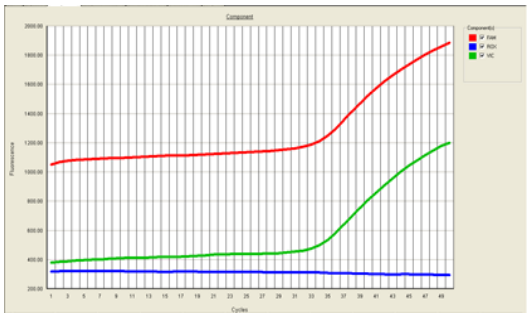
A1



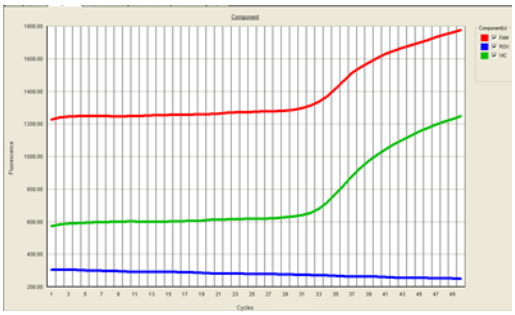
B



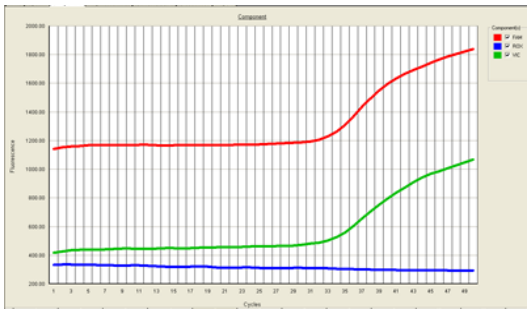
B1



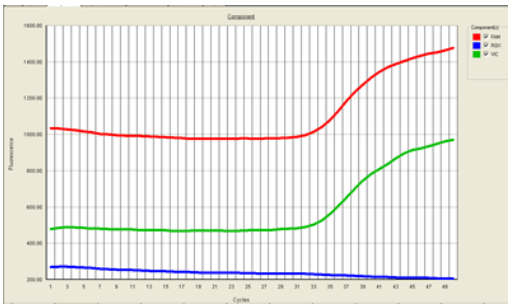
C



C1



D



D1

Slika 9: *Primeri rezultatov genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami pri vzorcih polne krvi.*

Slika A prikazuje rezultat svežega vzorca brez spiranja pri sobni temperaturi, slika A1 prikazuje rezultat svežega vzorca s spiranjem pri sobni temperaturi. Slika B prikazuje primer rezultata tri dni stare krvi brez spiranja pri 75 °C, slika B1 pa primer rezultata tri dni stare krvi s spiranjem pri 75 °C; slika C primer genotipizacije sedem dni stare krvi brez spiranja pri 95 °C, slika C1 primer sedem dni stare krvi s spiranjem pri 95 °C; slika D primer rezultata genotipizacije zamrznjene krvi brez spiranja pri sobni temperaturi in D1 primer rezultata zamrznjene krvi s spiranjem pri sobni temperaturi.

Preglednica VIII: *Prikaz uspešnosti genotipizacije pri vzorcih polne krvi.*

	Brez spiranja		**S spiranjem**	
Pogoji inkubacije	**Št. uspelih/ št. vseh**	**Uspešnost (%)**		**Uspešnost (%)**
Sobna T	12/20	60 %	11/20	55 %
75 ºC	16/20	80 %	18/20	90 %
95 ºC	17/20	85 %	19/20	95 %

Razlika med absorbancami brez in s spiranjem je vplivala na večjo uspešnost PCR. Rezultati s spiranjem so boljši, ker z njim odstranimo do 85 % proteinov, ki so potencialni inhibitorji PCR. Uspešnost PCR narašča tudi z naraščanjem temperature od sobne temperature prek 75 ºC do 95 ºC (preglednica VIII). Kot vidimo iz slike, smo dobili porast fluorescence okoli 31. do 35. cikla. Teoretično bi iz enega vzorca lahko opravili 205 genotipizacij. Rudbeck in sodelavci niso uporabljali hidrolizirajočih sond. Pri metodi PCR so pomnoževali daljše odseke od nas. Kot osnovni način so pomnoževali odsek dolžine 1600 bp. Potem pa so uspešnost preizkusili še na krajših odsekih od 183 do 900 bp. V 50 µL zmes PCR so dali 5 µL vzorca (16).

Pomemben podatek je tudi stabilnost izolirane DNA, česar sami nismo preverjali. Po podatkih Rudbecka in sodelavcev je DNA izolirana brez postopka spiranja stabilna vsaj mesec dni pri 4 ºC (16).

4.2 REZULTATI PREISKOVANIH VZORCEV IZ KRVNIH MADEŽEV

Analize krvnih madežev smo izvedli iz drugega vzorca polne krvi, pri čemer smo za vsake pogoje uporabili 10 paralelk. Vzorce smo primerjali z metodo spiranja in brez spiranja pri različnih temperaturah. Vsem izoliranim vzorcem smo izmerili koncentracijo DNA in njeno čistost na kapljičnem spektrofotometru. Meritve so prikazane v preglednici IX.

Preglednica IX: *Izmerjene koncentracije vzorcev krvnih madežev.*

Z oranžno so označeni vzorci izolirani pri temperaturi 75 ºC in z modro vzorci izolirani pri temperaturi 95 ºC.

Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**

121a	59	1,18	1,059	1,11	**122a**	34,4	0,688	0,551	1,25
121b	63,6	1,272	1,129	1,13	**122b**	17,3	0,346	0,319	1,08
121c	62,05	1,241	1,088	1,14	**122c**	17,9	0,358	0,317	1,13
121d	66,55	1,331	1,2	1,11	**122d**	17,55	0,351	0,297	1,18
121e	66,3	1,326	1,204	1,1	**122e**	21,95	0,439	0,414	1,06
121f	72,75	1,455	1,321	1,1	**122f**	18,1	0,362	0,33	1,1
121g	61,15	1,223	1,049	1,17	**122g**	24,65	0,493	0,405	1,22
121h	60,55	1,211	1,077	1,12	**122h**	16,25	0,325	0,332	0,98
121i	61,4	1,228	1,07	1,15	**122i**	33,45	0,669	0,557	1,2
121j	67,65	1,353	1,22	1,11	**122j**	16,45	0,329	0,303	1,09
Povp. vrednost	64,1	1,282	1,142	1,12		21,8	0,436	0,383	1,13
SD	4,18	0,084	0,09	0,02		6,91	0,138	0,099	0,08
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
123a	71,2	1,424	1,196	1,19	**124a**	20,7	0,414	0,378	1,1
123b	81	1,62	1,322	1,23	**124b**	22,65	0,453	0,433	1,05
123c	66,45	1,329	1,124	1,18	**124c**	25,95	0,519	0,469	1,11
123d	81,7	1,634	1,432	1,14	**124d**	22,75	0,455	0,44	1,03
123e	84,95	1,699	1,463	1,16	**124e**	3,5	0,07	0,044	1,59
123f	63,6	1,272	1,101	1,16	**124f**	25,05	0,501	0,47	1,07
123g	62,3	1,246	1,043	1,19	**124g**	24,7	0,494	0,453	1,09
123h	75,25	1,505	1,293	1,16	**124h**	29,55	0,591	0,566	1,04
123i	72,35	1,447	1,27	1,14	**124i**	25,55	0,511	0,492	1,04
123j	68,2	1,364	1,144	1,19	**124j**	24,2	0,484	0,43	1,13
Povp. vrednost	72,7	1,454	1,239	1,17		22,46	0,4492	0,4175	1,12
SD	7,88	0,158	0,141	0,03		7,07	0,141	0,14	0,17

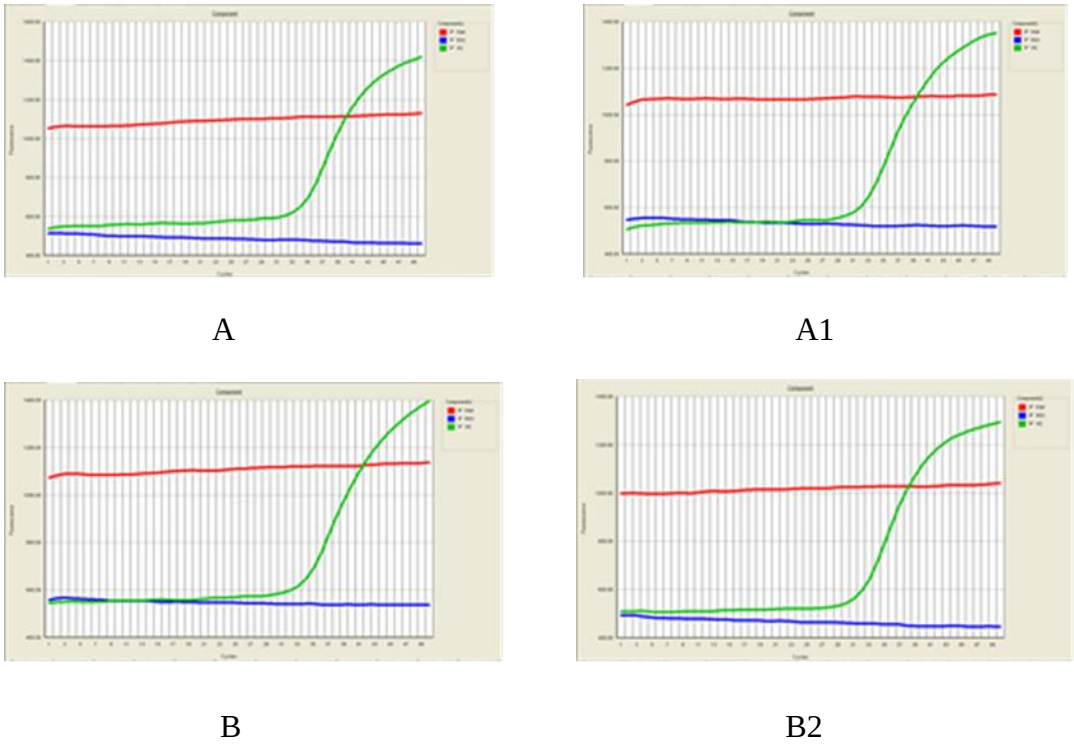
Vzorce 121a, 121b, 121c, 121d, 121e, 121f, 121g, 121h, 121i, 121j smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri temperaturi 75 ºC. Vzorce 122a, 122b, 122c, 122d, 122e, 122f, 122g, 122h, 122i, 122j smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri temperaturi 75 ºC. Vzorce 123a, 123b, 123c, 123d, 123e, 123f, 123g, 123h, 123i, 123j smo izolirali po postopku izolacije brez spiranja pri temperaturi 95 ºC. Vzorce 124a, 124b, 124c, 124d, 124e, 124f, 124g, 124h, 124i, 124j smo izolirali po postopku izolacije s spiranjem pri temperaturi 95 ºC.

Krvne madeže smo izolirali podobno kot polno kri. Izhajali smo iz postopka po Rudbecku, kjer priporočajo za izolacijo pogoje, ki so jih določili na podlagi eksperimentov, inkubacija z 0,2 M NaOH od 5–6 min pri 75 ºC (16). Mi smo se odločili, da poleg predlaganega postopka pri 75 ºC preizkusimo še 95 ºC. Na podlagi merjenja absorbanc pri 260 nm in 280 nm smo ocenili koncentracijo in čistost. Podobno kot pri

polni krvi dobljene koncentracije in čistosti zaradi prispevka absorbanc drugih prisotnih snovi tako pri 260 kot tudi 280 nm niso realne. Omogočajo pa nam primerjavo izolatov DNA iz istega biološkega vzorca ob uporabi različnih temperatur ter prisotnosti ali odsotnosti spiranja. Pri vseh temperaturah so ob uporabi postopka spiranja absorbance bistveno nižje, ker po podatkih tega članka odstranimo 85 % proteinov. Slaba stran postopka s spiranjem pa je, da s tem lahko speremo tudi DNA. Rezultati so bili podobni pri obeh temperaturah inkubacije.

Z namenom ugotavljanja integritete DNA smo izvedli elektroforezo na 2 % agaroznem gelu z 2 µL in 10 µL ekstrakta, vendar na gelu ni bilo vidnih lis, da bi lahko določili dolžine fragmentov. Rudbeck in sodelavci elektroforeze niso opravili, ampak so samo preverili uspešnost PCR. Lahko pa sklepamo, da je DNA visoko molekularna podobno kot pri polni krvi (16).

PREVERJANJE USPEŠNOSTI GENOTIPIZACIJE S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI



Slika 10: *Primeri rezultatov genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami pri krvnih madežih.*

Slika A prikazuje rezultat krvnega madeža brez spiranja pri inkubaciji 75 ºC, slika A1 primer rezultata krvnega madeža s spiranjem pri inkubaciji 75 ºC, slika B primer genotipizacije krvnega madeža brez spiranja pri inkubaciji 95 ºC in slika B1 primer rezultata genotipizacije krvnega madeža s spiranjem pri 95 ºC.

Preglednica X: *Prikaz uspešnosti genotipizacije krvnih madežev.*

	Brez spiranja		**S spiranjem**	
Pogoji inkubacije	**Št. uspelih/št. vseh**	**Uspešnost (%)**	**Št. uspelih/št. vseh**	**Uspešnost (%)**
75 ºC	3/5	60 %	4/5	80 %
95 ºC	3/5	60 %	4/5	80 %

Kot pri polni krvi se je tudi tukaj pokazalo, da je uspešnost PCR večja pri postopku s spiranjem (preglednica X). Kot vidimo iz slike 10, smo dobili porast fluorescence okoli 31. do 33. cikla. Teoretično bi iz enega vzorca lahko opravili 205 genotipizacij. Rudbeck in sodelavci so uporabljali klasičen PCR. Pri metodi PCR so pomnoževali odseke velikosti od 186–1600 bp. V 50 µL zmes PCR so dali 5 µL vzorca (16).

4.3 REZULTATI PREISKOVANIH VZORCEV IZ BRISOV BUKALNE SLUZNICE

Najprej smo od desetih prostovoljcev odvzeli vzorce brisov bukalne sluznice. Od vsakega posameznika smo vzeli po dva vzorca (iz vsake notranje strani lica). Vzorce smo odvzeli po postopku standardiziranega postopka, da bi dobili čim bolj primerljive rezultate in da bi preprečili razne vplive, ki bi lahko vplivali na izolirano DNA, kot so premalo nanosa celic na palčko, spiranje ust zaradi možne kontaminacije z mikroorganizmi in inhibitorji PCR v hrani. Pred postopkom izolacije smo po en vzorec od vsakega posušili na zraku, drugega pa smo izolirali neposušenega.

Vse te vzorce smo izolirali poskusno z namenom, da bi ugotovili uspešnost izolacije in vpliv posušenih oz. neposušenih vzorcev pred izolacijo. Izoliranim vzorcem

smo izmerili koncentracijo DNA in njihovo čistost na kapljičnem spektrofotometru. Meritve so prikazane v preglednici XI.

Preglednica XI: *Izmerjene koncentracije posušenih in neposušenih vzorcev brisov bukalne sluznice.*
Z rumeno so označeni vzorci, ki so posušeni na zraku in nato izolirani, z zeleno so označeni neposušeni vzorci in takoj izolirani.

Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280	Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280
I	74,85	1,497	0,925	1,62	**Ia**	82,6	1,652	0,91	1,82
II	61,9	1,238	0,76	1,63	**IIa**	66,65	1,333	0,824	1,62
III	95,2	1,904	1,218	1,56	**IIIa**	127,2	2,544	1,54	1,65
IV	99,65	1,993	1,238	1,61	**IVa**	124,1	2,482	1,449	1,71
V	101,75	2,035	1,304	1,56	**Va**	67,6	1,352	0,884	1,53
Povp. vrednost	86,67	1,733	1,089	1,7		93,63	1,873	1,121	1,67
SD	17,48	0,35	0,235	0,03		29,93	0,599	0,344	0,11

Vzorci I, II, III, IV in V so posušeni na zraku in nato izolirani po postopku izolacije DNA iz brisov bukalne sluznice z uporabo natrijevega hidroksida. Vzorci Ia, IIa, IIIa, IVa in Va so neposušeni in takoj izolirani po postopku izolacije DNA iz brisov bukalne sluznice z uporabo natrijevega hidroksida.

Naslednji vzorci so vzorci petih posameznikov, ki so si jih ob priloženih navodilih za standardni postopek odvzema brisa bukalne sluznice posamezniki odvzeli sami. Vse te vzorce smo po odvzemu takoj izolirali. Izoliranim vzorcem smo izmerili koncentracijo DNA in njihovo čistost na kapljičnem spektrofotometru. Meritve so prikazane v preglednici XII.

Preglednica XII: *Izmerjene koncentracije vzorcev brisov bukalne sluznice od posameznikovih odvzemov.*

Vzorec	ng/ul	A260	A280	260/280
XXVI	165,65	3,313	2,029	1,63
XXVIa	128,75	2,575	1,559	1,65
XXVII	104,35	2,087	1,288	1,62

XXVIIa	121,95	2,439	1,538	1,59
XXVIII	150,15	3,003	1,871	1,61
XXVIIIa	122,6	2,452	1,473	1,66
XXIX	143,1	2,862	1,949	1,47
XXIXa	131,35	2,627	1,634	1,61
XXX	144,8	2,896	1,805	1,6
XXXa	171,6	3,432	2,122	1,62
Povp. vrednost	138,43	2,769	1,727	1,61
SD	20,73	0,415	0,269	0,05

Naslednje vzorce brisov bukalne sluznice smo odvzeli dvajsetim prostovoljcem. Od vsakega posameznika smo vzeli po dva vzorca (iz vsake notranje strani lica). Vzorce smo odvzeli po postopku standardnega odvzema.

Vse te vzorce smo izolirali z namenom, da bi ugotovili uspešnost izolacije in vpliv posušenih oz. neposušenih in vpliv shranjevanje vzorcev 24 ur pri dveh različnih pogojih. Izoliranim vzorcem smo izmerili koncentracijo DNA in njihovo čistost na kapljičnem spektrofotometru. Meritve so prikazane v preglednici XIII.

Preglednica XIII: *Izmerjene koncentracije vzorcev brisov bukalne sluznice izoliranih po shranjevanju.*

Z rdečo so označeni vzorci, ki so po odvzemu shranjeni pri sobni temperaturi, in z zeleno so označeni posušeni vzorci, ki so po odvzemu shranjeni pri 4 ºC.

Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
VI	74,5	1,49	0,89	1,67	**VIa**	115,3	2,306	1,45	1,59
VII	113,9	2,278	1,34	1,7	**VIIa**	185,15	3,703	2,333	1,59
VIII	156,6	3,132	1,881	1,67	**VIIIa**	186,95	3,739	2,442	1,53
IX	129,15	2,583	1,594	1,62	**IXa**	141,2	2,824	1,697	1,66
X	163,8	3,276	1,94	1,69	**Xa**	135,15	2,703	1,581	1,71
XI	142,85	2,857	1,762	1,62	**XIa**	140,3	2,806	1,666	1,68
XII	180,8	3,616	2,203	1,64	**XIIa**	198,05	3,961	2,409	1,64
XIII	215,95	4,319	2,968	1,46	**XIIIa**	119,65	2,393	1,377	1,74
XIV	104,2	2,084	1,231	1,69	**XIVa**	121,65	2,433	1,483	1,64
XV	117,65	2,353	1,436	1,64	**XVa**	109,9	2,198	1,284	1,71
Povp. vrednost	139,94	2,799	1,725	1,64		145,33	2,906	1,772	1,65
SD	41,03	0,821	0,58	0,07		32,69	0,654	0,448	0,07
Vzorec	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**	**Vzorec**	**ng/ul**	**A260**	**A280**	**260/280**
XVI	174,05	3,481	2,307	1,51	**XVIa**	125,4	2,508	1,482	1,69
XVII	179,2	3,584	2,46	1,46	**XVIIa**	169,55	3,391	2,074	1,64

XVIII	142,95	2,859	1,836	1,56	**XVIIIa**	182,6	3,652	2,33	1,57
XIX	196,05	3,921	2,463	1,59	**XIXa**	192,4	3,848	2,452	1,57
XX	163,2	3,264	2,021	1,62	**XXa**	157,8	3,156	1,975	1,6
XXI	163,85	3,277	2,073	1,58	**XXIa**	175,4	3,508	2,322	1,51
XXII	242,3	4,846	3,142	1,54	**XXIIa**	174,1	3,482	2,262	1,54
XXIII	158,2	3,164	1,976	1,6	**XXIIIa**	184,65	3,693	2,294	1,61
XXIV	279,6	5,592	3,445	1,62	**XXIVa**	274,9	5,498	3,33	1,65
XXV	154,45	3,089	1,977	1,56	**XXVa**	181,2	3,624	2,29	1,58
Povp. vrednost	185,39	3,708	2,37	1,56		181,8	3,636	2,281	1,6
SD	43,27	0,865	0,535	0,05		37,71	0,754	0,461	0,05

Vzorci VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII,XIV, XV so neposušeni, izolirani po postopku izolacije DNA iz brisov bukalne sluznice z uporabo natrijevega hidroksida in shranjeni 24 ur na sobni temperaturi. Vzorci VIa, VIIa, VIIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, XIIIa,XIVa, XVa so posušeni, izolirani po postopku izolacije DNA iz brisov bukalne sluznice z uporabo natrijevega hidroksida in shranjeni 24 ur na sobni temperaturi. Vzorci XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV so neposušeni, izolirani po postopku izolacije DNA iz brisov bukalne sluznice z uporabo natrijevega hidroksida in shranjeni 24 ur pri 4 ºC. Vzorci XVIa, XVIIa, XVIIIa, XIXa, XXa, XXIa, XXIIa, XXIIIa, XXIVa, XXVa so posušeni, izolirani po postopku izolacije DNA iz brisov bukalne sluznice z uporabo natrijevega hidroksida in shranjeni 24 ur pri 4 ºC.

Brise bukalne sluznice smo preizkusili zato, ker je to najlažje dostopen vzorec za izolacijo DNA. Izhajali smo iz postopka po Amy H. Walker, kjer za izolacijo priporočajo pogoje, ki so jih določili na podlagi eksperimentov, inkubacija z 0,05 M NaOH pri 95 ºC (17). Mi smo se odločili, da poleg predlaganega postopka preizkusimo tudi različno shranjevanje vzorcev, ker včasih vzorcev ne moremo takoj analizirati. Na podlagi merjenja absorbanc pri 260 nm in 280 nm smo ocenili koncentracijo in čistost. Koncentracije izmerjenih posušenih in neposušenih vzorcev se med sabo rahlo razlikujejo. Pri večini neposušenih vzorcev je izmerjena koncentracija nekoliko višja kot pri posušenih vzorcih. Večja koncentracija pri neposušenih vzorcih lahko pomeni prisotnosti DNA različnih mikroorganizmov, ki pa se pri posušenih vzorcih niso mogli razrasti. Čistost pa je v primerjavi z vzorci polne krvi in krvnih madežev veliko boljša.

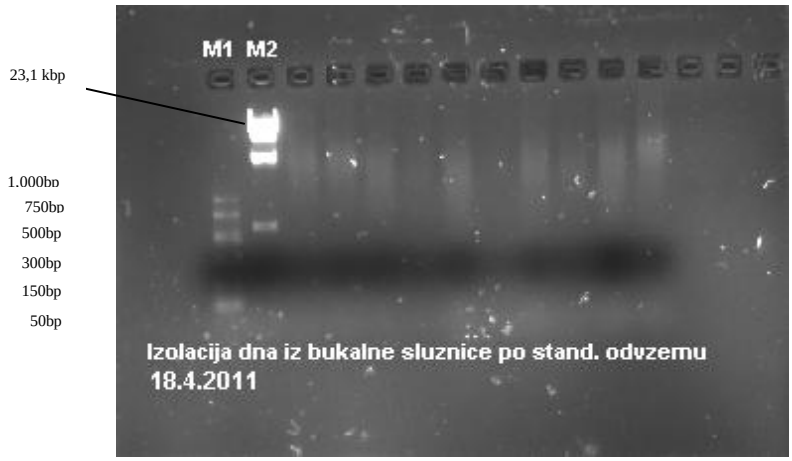
Pri vzorcih, kjer so si posamezniki ob priloženih navodilih za standardni postopek odvzema brisa bukalne sluznice sami odvzeli vzorce, so koncentracije in čistost vzorcev

med sabo zelo podobne, ker smo jih izolirali takoj po odvzemu. Večji vpliv bi bil pri vzorcih, ki jih ne moremo takoj izolirati (brisi, ki prispejo po pošti), zato smo preizkusili še vpliv shranjevanja. Glede na vpliv shranjevanja sklepamo, da je zaradi preprečitve encimske razgradnje DNA in razmnoževanja mikroorganizmov bolje shranjevati pri 4 ºC. Za izolacijo 10 vzorcev smo porabili približno 15 min časa.

Naše rezultate dela smo primerjali z rezultati drugih raziskav. Walker in sodelavci so primerjali vzorce bukalne sluznice, ki so jih posamezniki poslali po pošti in sveže vzorce. Izolirali so jih po enakem postopku kot mi. Koncentracije in čistosti niso navajali, ker je spektrofotometrično niso merili, prav tako niso delali elektroforeze. Navajajo pa, da temperatura shranjevanja vzorcev ni imela vpliva na nadaljnje preiskave. Testirali so, da so vzorci izolirane DNA uporabni do 41 mesecev, če jih hranimo pri 4 ºC (17).

Yolande B. Saab in sodelavci so izolirali 150 vzorcev brisov bukalne sluznice po z uporabo NaOH in 150 vzorcev po metodi Nucleospin Tissue® Kit. Med sabo so ti dve metodi primerjali. Koncentracijo in čistost so določali spektrofotometrično. Pri vzorcih, ki so jih izolirali po metodi NaOH, so dobili povprečno koncentracijo DNA 14,18 µg/mL, pri vzorcih, ki pa so jih izolirali z metodo Kit, pa 16,67 µg/mL. Čistost je bila pri vzorcih izoliranih z Nucleospin Tissue® Kit v povprečju boljša, in sicer 1,24. Pri vzorcih izoliranih z metodo NaOH pa je bila čistost 1,08. Pri teh dveh metodah izolacije so primerjali tudi čas izolacije. Za 12 vzorcev so pri metodi NaOH porabili 16 minut, pri izolaciji Nucleospin Tissue® Kit pa za isto število vzorcev 43 minut (26).

PREVERJANJE USPEŠNOSTI Z ELEKTROFOREZO NA 2 % AGAROZNEM GELU

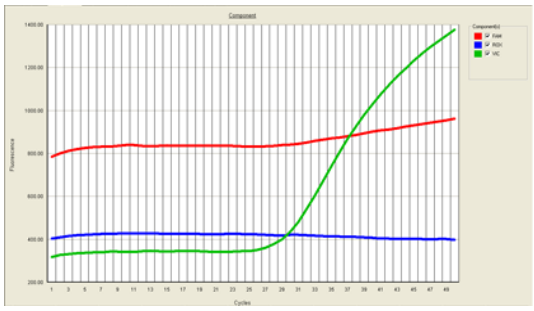


Slika 11: *Rezultati elektroforeze na 2 % agaroznem gelu za drugo serijo.*

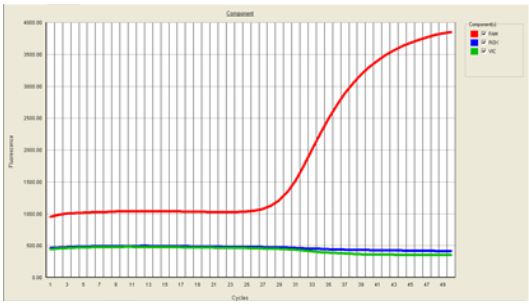
Vzorci sledijo z leve proti desni: M1,M2, XXVI, XXVIa, XXVII, XXVIIa, XXVIII, XXVIIIa, XXIX, XXIXa, XXX, XXXa.

Izolirani vzorci brisa bukalne sluznice so bili dovolj koncentrirani, da so bile na elektroforezi vidne lise DNA razen za vzorca XXVIIa in XXVIIIa. Čeprav se lise pri teh dveh vzorcih niso videle, je bila genotipizacija uspešna. Pri drugih vzorcih je izolirana DNA visokomolekularna (slika 11).

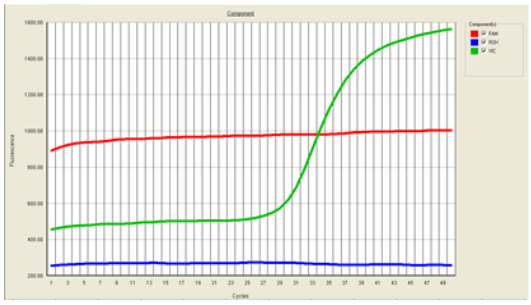
PREVERJANJE USPEŠNOSTI GENOTIPIZACIJE S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI



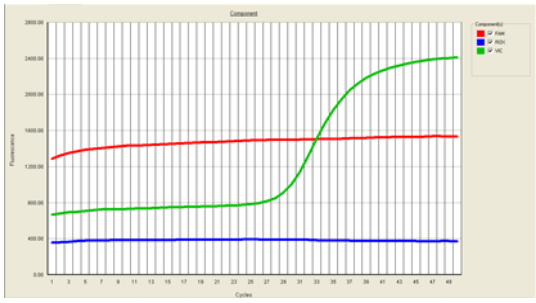
A



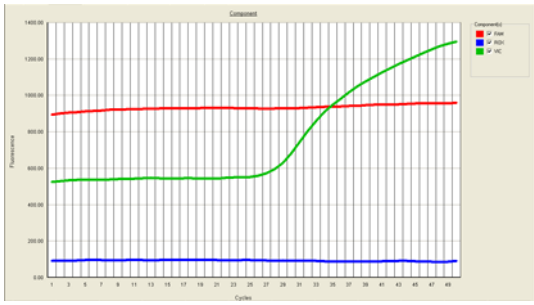
B



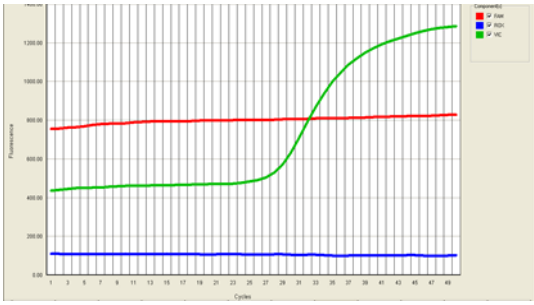
C



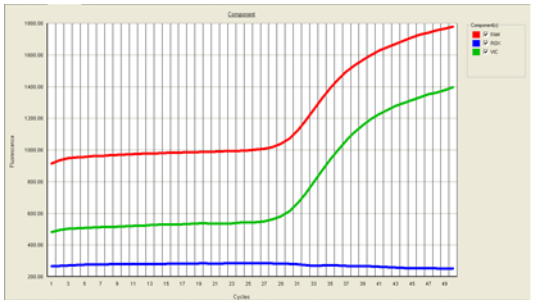
D



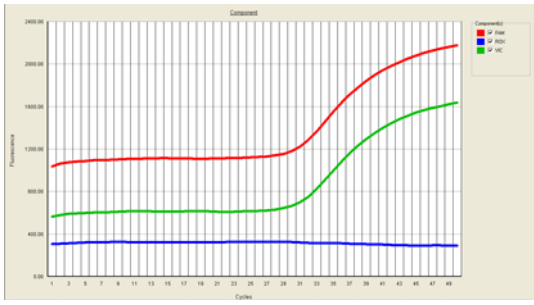
E



F



G



H

Slika 12: *Primeri rezultatov genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami pri brisih bukalne sluznice.*

Slika A prikazuje rezultat vzorca I, slika B prikazuje rezultat vzorca IIa, slika C prikazuje vzorec VII, slika D prikazuje vzorec VIIa, slika E prikazuje rezultat vzorca XVII, slika F prikazuje vzorec XXIIIa, slika G prikazuje rezultat vzorca XXVI in slika H prikazuje rezultat vzorca XXVIa.

Preglednica XIV: *Prikaz uspešnosti genotipizacije pri brisih bukalne sluznice.*

	Št. uspelih/št. vseh	**Uspešnost (%)**
Neposušeni in shranjeni	4/5	80 %

pri sobni T		
Posušeni in shranjeni pri sobni T	4/5	80 %
Neposušeni in shranjeni 24 ur pri 4 ºC	4/5	80 %
Posušeni in shranjeni 24 ur pri 4 ºC	5/5	100 %
Takoj izolirani po odvzemu	10/10	100 %

Genotipizacija je bila uspešna vsaj v 80 %. Največjo, kar 100 % uspešnost, smo dosegli pri takojšnji izolaciji vzorca oziroma pri posušenih vzorcih, ki smo jih do izolacije 24 ur hranili pri 4 ºC (preglednica XIV). Kot vidimo iz slike 12, smo dobili porast fluorescence med 28. in 31. ciklom.

Amy H. Walker in sodelavci so opravili PCR analizo. Pomnoževali so odseke treh genov CYP3A4 (592 bp), GSTM1 in GSTT1 (za GSTM1 in GSTT1 dolžine fragmentov ne navajajo). Analizirali so 995 vzorcev. Od tega niso uspešno pomnožili 12 vzorcev, kar pomeni da so imeli 98,8 % uspešnost (17).

Yolande B. Saab in sodelavci so s PCR pomnoževali odseke genov. Uspešno so pomnožili 91,3 % vzorcev, ki so bili izolirani z NaOH, in 96 % vzorcev, ki so bili izolirani z reagenčnim kompletom Nucleospin Tissue® Kit. Uspešnost pomnoževanja so določali na podlagi agarozne gelske elektroforeze (26).

5. SKLEP

Z uporabo NaOH smo s hitrimi in enostavnimi postopki iz vzorcev polne krvi, krvnih madežev in brisov bukalne sluznice izolirali DNA in preverili njeno primernost za genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami.

- Za izolacijo DNA iz polne krvi je najprimernejši postopek s spiranjem in inkubacijo pri 95 °C. Hranjenje vzorca v hladilniku do 7 dni ali zamrzovanje ne vpliva bistveno na uspešnost izolacije.
- Za izolacijo DNA iz krvnih madežev je najprimernejši postopek s spiranjem in inkubacijo pri 95 °C.

- Za izolacijo DNA iz brisov bukalne sluznice je najprimernejši postopek brez sušenja in takojšnja izolacija vzorca z inkubacijo pri 95 ºC. Če izolacije ne moremo izvesti takoj, vzorce posušimo in shranimo pri 4 ºC.
- Pri vzorcih bukalne sluznice je zelo pomemben način odvzema, zato smo oblikovali standardizirani postopek odvzema.

Z delom smo potrdili, da je izolacija z NaOH najbolj primerna za brise bukalne sluznice. Ker je odvzem neinvaziven in si vzorec lahko odvzame preiskovanec sam, predstavljajo brisi zelo primeren vzorec za epidemiološke študije. Za natančnejšo oceno uspešnosti izolacije bi bilo v prihodnje smiselno izvesti študijo na večjem številu vzorcev.

6. LITERATURA

1.http://www.zdravstvena.info/vsznj/wp-content/uploads/2007/10/evkariontska-celica.gif. 10.1.2012

2. Boyer R.: Temelji biokemij. Ljubljana: Študentska založba, 2005; 30–33, 250–252, 272–274, 283–287.

3.http://sl.wikipedia.org/wiki/Gensko_prevajanje, 13.1.2012

4.Turnpenny P. D., Ellard S.: Emery's elements of medical genetics, trinajsta izdaja,

Churchil Livingstone Elsevier, New York, 2007; 13, 18, 20.

5.Komel R.: Genske bolezni in genska preiskava; Proteus 1998, 8/6: 344–356.

6. Burtis C.A., Ashwood E,R., Bruns D.E.: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, četrta izdaja, Elsevier Saunders, St. Louis, 2006; 1422–1427.

7. www.qiagen.com/hb/flexigenednakit_en: stran 7, 8, 11.

8. Valjavec F. Izolacija DNA iz krvnega strdka: Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, 2004.

9. www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=200373: stran 12, 13, 14.

10. Klančnik I. Izolacija DNA iz mikro količin plazme: Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, 2000.

11. Lodish H., Berk A., Kaiser AC., Kreiger M., Scott PM., bRETSCER A., Ploegh H., Matsudaira P.: Molecular cell Biology, Sixth edition, New York, 2008: 111–153.

12. 6. Keer J. T., Birch L.: Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach, Royal Society of Chemistry, Cambrige, 2008; 59–60, 66, 132–135.

13. Herzog-Velikonja B., Gruden K.: Praktikum iz molekularne biologije, Teoretični del, Ljubljana 2000; 25–28

15. Ostanek B.: Vaje iz Biomedicinske analitike2. st., Gradivo za interno uporabo.

16. Rudbeck L. Benchmarks, BioTechniques 25, October 1998; 588–592.

17. Walker A.H., Najarian D., White D.L., Jaffe J.M., Kanetesky P.A., Rebbeck T.R.: Collection of Genomic DNA by Buccal Swabs for Polymerase Chain Rection-Based Biomarker Assays, Environmental Health Perspectives, Volume 107, Number 7, July 1999; 517–520.

18. Arve U., Per Magne U.: Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping in Unprocessed Whole Blood and Serum by Real-Time PCR, Clinical Chemistry. 2001;47: 2050–2053.

19. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R.: Chelex as a medium for simple exctraction of DNA for PCR-bassed typing from forensic material. Biotechniques 1991; 10 (4): 506–513.

20. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.

21. Osredkar M.: Primerjava avtomatizirane metode z metodo izsoljevanja za izolacijo DNA iz polne krvi, diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo. Ljubljana 2004.

22. Osredkar J.: Downov sindrom – laboratorijska diagnostika. Medicinski razgledi 1995; 34: 343–366.

23. Zupančič I.: Genski detektivi – prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav s preiskavo DNA; Proteus, Ljubljana, 1998, 9–10/60: 400–405

24. Old JM. Fetal DNA analysis: A practical approach (Practical approach series), Paperback 2nd ed. 1993; 1–19.

25. Juarez- Cedillo T., Sanchez-Garcia S., Mould-Quevedo J.F., Garcia-Pena C., Gallo J.J., Wagner F.A., Vargas-Alarcon G.: Cost-effective analysis of genotyping using oral cells in the geriatric population. Genetics and molecular Research 9 (3) 2010; 1886–1895.

26. Saab Y.B., Kabbara W., Chbib C., Gard P.R.: Buccal Cell DNA Extraction: Yield, Purity, and Cost: A Comparison of two Methods. GENETIC TESTING, Volume 11, Number 4, 2007; 413–416.

27. Nancy L Craig, Orna Cohen-Fix, Rachel Green, Carol W Greider, Gisela Storz, Cynthia Wolberge.: Molecular Biology, Principles of Genome Function. Oxford University Press. New York, 2010:193–194, 288–29, 406–408.

28. Lasken R.S.: Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method, Biochemical society Transaction, 2009; 37: 450.

29. Ying L., Hyun-Jin K., Chunyang Z., Wing H. A., Jeonghwa L., Brendan K., Xiaojing P., Bertrand L., Huimin K.: Primase-based whole genome amplification, BioHelix Corporation,2008; 36: 1–4.

30. Arko B.: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji, Farmacevtski vestnik, 2004; 55: 1,: 3–5.

31. Šerman D., Stavljenić – Rakovina A., Sertić J. Metode molekularne biologije u medicini, Medicinski fakultet Sveučilišta, Zagreb,1998.

32. Addonizio M.: Whole genome amplification technologies , Genetic Eingineering & Biotechnology News, 2005; 25: 18.

33. Špiranec M. Primerjava dveh metod postopkov izolacije DNA iz večjih volumnov polne krvi: Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, 2011.