

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KOS

**VPLIV TRIPSINIZACIJE IN ALTERNATIVNIH METOD PRIPRAVE  
CELIC NA INTEGRITETO RIBONUKLEINSKIH KISLIN,  
IZOLIRANIH IZ RAZLIČNIH ADHERENTNIH CELIČNIH LINIJ**

MAGISTRSKO DELO

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA  
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA KOS

**VPLIV TRIPSINIZACIJE IN ALTERNATIVNIH METOD PRIPRAVE  
CELIC NA INTEGRITETO RIBONUKLEINSKIH KISLIN,  
IZOLIRANIH IZ RAZLIČNIH ADHERENTNIH CELIČNIH LINIJ**

**THE INFLUENCE OF TRYPSINIZATION AND ALTERNATIVE  
PROCEDURES FOR CELL PREPARATION ON THE INTEGRITY OF  
RIBONUCLEIC ACIDS, ISOLATED FROM DIFFERENT ADHERENT  
CELL LINES**

MAGISTRSKO DELO

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA  
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za Farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek, ki mi je omogočila opravljanje magistrske naloge. Hvala za zaupanje v moje delo in za priložnost, da sem lahko sodelovala pri tem projektu. Hvala tudi za vse nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge ter vodenje pri pisanju znanstvenega članka. Prav tako hvala Petru Vrtačniku, mag. farm., za uvajanje v laboratorijsko delo, vse nasvete in pomoč pri načrtovanju in izvedbi eksperimentalnega dela naloge ter pri pisanju znanstvenega članka. Zahvaljujem se tudi vsem drugim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za prijazno pomoč pri delu v laboratoriju in prof. dr. Janji Marc za zaupanje in podporo med študijem.

Posebna zahvala gre moji družini in fantu, ki so me v vseh teh letih razumevajoče podpirali in me spodbujali, ter tudi prijateljem, ki so mi stali ob strani.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek.

Špela Kos

## VSEBINA

POVZETEK .....	i
ABSTRACT .....	iii
SEZNAM OKRAJŠAV .....	v
1 UVOD.....	1
1.1 Ribonukleinske kisline.....	1
1.1.1 Ribonukleaze .....	2
1.2 Metode priprave celic za izolacijo RNA.....	3
1.2.1 Tripsinizacija .....	4
1.2.2 Disociacija celic z drugimi proteazami in neencimskimi pripravki .....	4
1.2.3 Mehanska disociacija celic .....	4
1.2.4 Spontana disociacija celic s temperaturno odzivne površine .....	5
1.3 Izolacija RNA .....	5
1.3.1 Preverjanje kakovosti izolirane RNA .....	6
1.4 Analiza izražanja genov .....	8
1.4.1 qPCR.....	9
1.4.2 Pomen integritete RNA za zanesljivost rezultatov analize izražanja genov .	12
2 NAMEN DELA .....	13
3 MATERIALI IN METODE .....	14
3.1 Materiali.....	14
3.1.1 Laboratorijska oprema.....	14
3.1.2 Kemikalije in reagenčni kompleti .....	15
3.2 Delo s celičnimi kulturami.....	16
3.2.1 Celične linije.....	16
3.2.2 Priprava gojišč in drugih raztopin .....	17
3.2.3 Gojenje in presajanje celic.....	19
3.2.4 Diferenciacija celic HOS .....	20

3.2.5	Priprava celic pred izolacijo RNA.....	20
3.2.6	Tretiranje celic z inaktiviranim tripsinskim reagentom.....	22
3.3	Delo z RNA .....	22
3.3.1	Priprava raztopin in agaroznega gela.....	22
3.3.2	Izolacija RNA .....	23
3.3.3	Preverjanje koncentracije in kakovosti RNA .....	24
3.3.4	Inkubacija predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom .....	25
3.4	Analiza izražanja genov .....	25
3.4.1	Reverzna transkripcija .....	25
3.4.2	qPCR.....	27
3.4.3	Analiza rezultatov qPCR .....	29
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	30
4.1	Vpliv rutinske tripsinizacije na integriteto izolirane RNA .....	30
4.1.1	Vpliv pasaže in stopnje diferenciacije celic na integriteto izolirane RNA....	31
4.1.2	Vpliv celične linije na integriteto izolirane RNA .....	32
4.2	Vpliv alternativnih metod priprave celic na integriteto izolirane RNA.....	33
4.3	Mehanizem razgradnje RNA med tripsinizacijo .....	34
4.3.1	Vpliv proteazne aktivnosti tripsina na integriteto izolirane RNA .....	35
4.3.2	Prisotnost RNaz v tripsinskem reagentu.....	38
4.4	Vpliv integritete RNA na analizo izražanja genov s qPCR .....	42
5	SKLEP .....	48
6	LITERATURA .....	50

Priloga 1. Pregled tripsinskih reagentov

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1.</b> Kemijska zgradba RNA. ....	1
<b>Slika 2.</b> Elektroforeza RNA na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom. ....	6
<b>Slika 3.</b> Rezultat analize integritete RNA z mikrofluidnim analizatorjem. ....	7
<b>Slika 4.</b> Kvantifikacija nukleinskih kislin s qPCR. ....	10
<b>Slika 5.</b> Različni oligonukleotidni začetniki za reverzno transkripcijo. ....	11
<b>Slika 6.</b> $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoda za relativno kvantifikacijo. ....	11
<b>Slika 7.</b> Vpliv rutinske tripsinizacije na integriteto izolirane RNA. ....	30
<b>Slika 8.</b> Vpliv pasaže in stopnje diferenciacije celic na integriteto izolirane RNA po tripsinizaciji in direktni lizi. ....	32
<b>Slika 9.</b> Integriteta RNA, izolirane iz različnih celičnih linij po tripsinizaciji in direktni lizi. ....	33
<b>Slika 10.</b> Vpliv alternativnih metod priprave celic na integriteto izolirane RNA. ....	34
<b>Slika 11.</b> Vpliv koncentracije tripsina na integriteto izolirane RNA. ....	36
<b>Slika 12.</b> Vpliv proteazne aktivnosti tripsina na integriteto izolirane RNA. ....	38
<b>Slika 13.</b> Integriteta RNA po tretiranju predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom. ....	39
<b>Slika 14.</b> Integriteta RNA po tretiranju predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom v prisotnosti RNaznega inhibitorja. ....	39
<b>Slika 15.</b> Integriteta RNA po tretiranju predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom v prisotnosti natrijevega hipoklorita. ....	40
<b>Slika 16.</b> Vpliv tripsinskega reagenta brez encimske aktivnosti na integriteto izolirane RNA. ....	41
<b>Slika 17.</b> Integriteta RNA vzorcev, uporabljenih za analizo s qPCR. ....	45

## KAZALO GRAFOV

<b>Graf 1.</b> Vpliv integritete RNA na koncentracijo mRNA, odčitano z umeritvene krivulje, in na njeno standardno deviacijo. ....	44
<b>Graf 2.</b> Vpliv integritete RNA na koncentracijo mRNA, odčitano z umeritvene krivulje, po izločitvi izstopajočega vzorca. ....	46

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1.</b> Priprava mešanice RNA in oligonuklotidnih začetnikov za reverzno transkripcijo.....	26
<b>Preglednica 2.</b> Priprava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo.....	26
<b>Preglednica 3.</b> Priprava reakcijskih mešanic s SYBR Select izhodiščno zmesjo. ....	27
<b>Preglednica 4.</b> Zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov.....	28
<b>Preglednica 5.</b> Temperaturni program za analizo izražanja gena <i>RPL13A</i> .....	28
<b>Preglednica 6.</b> Temperaturni program za analizo izražanja genov <i>NAPDH</i> , <i>RPLP0</i> , <i>GUSB</i> , <i>ACTB</i> , <i>TBP</i> in <i>B2M</i> . ....	29
<b>Preglednica 7.</b> Čas disociacije celic s površine gojilne posode v odvisnosti od koncentracije tripsina. ....	36
<b>Preglednica 8.</b> Morfološki pregled celic, tretiranih z mešanico tripsinskega reagenta in FBS. ....	37
<b>Preglednica 9.</b> Koncentracije specifičnih mRNA, odčitane z umeritvene krivulje pri analizi s qPCR. ....	45
<b>Preglednica 10.</b> Primerjava vzorcev z visoko integriteto RNA in vzorcev z nizko integriteto RNA glede na normalizirano koncentracijo za 7 izbranih genov.....	47

## POVZETEK

**Izhodišča in namen:** Zanesljivost analize izražanja genov je močno odvisna od integritete ribonukleinskih kislin (RNA). Pri delu s celicami HOS smo opazili, da je RNA, izolirana iz adherentnih celic, razgrajena, kadar celice pred izolacijo RNA tripsiniziramo. Izkušnje več raziskovalcev kažejo, da tripsinizacija lahko povzroči razgradnjo RNA, vendar v literaturi o tem nismo našli podatkov. Primarni cilj magistrske naloge je bil najti ustrezno metodo za pripravo celic, ki bo omogočila izolacijo intaktne RNA. Nadalje smo želeli odkriti mehanizem, odgovoren za razgradnjo RNA med tripsinizacijo, ter ovrednotiti vpliv integritete RNA na zanesljivost analize izražanja genov. **Metode:** Uporabili smo celične linije Caco2, PC3, HepG2, SW 1353, MCF7 in HOS. RNA smo izolirali iz celic, pripravljenih s tripsinizacijo, direktno lizo, strganjem, disociacijo z nadomestkom tripsina in spontano disociacijo s temperaturno odzivne površine, ter njeno integriteto analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom. Uporabili smo tudi tripsinski reagent, inaktiviran s fetalnim govejim serumom in natrijevim hipokloritom, s tripsinskim reagentom pa smo tretirali tudi predhodno izolirano intaktno RNA. Intaktno in razgrajeno RNA smo uporabili za analizo izražanja genov *GAPDH*, *RPLP0*, *GUSB*, *ACTB*, *TBP*, *B2M* in *RPL13A* s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR). **Rezultati:** Vse štiri preizkušene alternativne metode priprave celic so omogočile izolacijo intaktne RNA, tripsinizacija pa je povzročila razgradnjo RNA neodvisno od celične linije, celične pasaže in stopnje diferenciacije. Za razgradnjo RNA so najverjetneje odgovorne ribonukleaze v tripsinskem reagentu, saj je inaktivacija tripsinskega reagenta z natrijevim hipokloritom razgradnjo preprečila, inaktivacija s fetalnim govejim serumom pa ne. Nizka integriteta RNA ima velik vpliv na izmerjene koncentracije informacijskih RNA vseh analiziranih genov, poleg tega normalizacija rezultatov ne izniči negativnega vpliva nizke integritete RNA na končne rezultate. **Zaključki:** Razgrajena RNA, izolirana iz tripsiniziranih celic, je neprimerna za analizo izražanja genov s qPCR. Ker so za razgradnjo RNA najverjetneje odgovorne ribonukleaze, prisotne v tripsinskem reagentu, je pri vseh postopkih, povezanih z analizo RNA, potrebna previdnost pri uporabi reagentov, ki vsebujejo komponente, izolirane iz živalskega pankreasa. Kot alternativo metodo priprave celic priporočamo direktno lizo, kadar se tripsinizaciji ni mogoče izogniti, pa uporabo reagentov, ki vsebujejo rekombinantne proteaze. Pred začetkom eksperimentov svetujemo testiranje postopka izolacije RNA. Integriteto RNA lahko enostavno in cenovno učinkovito preverjamo z uporabo elektroforeze RNA na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

**KLJUČNE BESEDE:**

celična kultura, integriteta RNA, tripsin, disociacija celic, qPCR.

## ABSTRACT

**Background and objectives.** Reliability of gene expression quantification is critically dependant on the integrity of ribonucleic acids (RNA). During our work with HOS cells, we have repeatedly observed RNA degradation following cell trypsinization prior to RNA isolation. There is an informal consensus, that trypsinization may cause RNA degradation, however, we haven't found any information regarding this phenomenon in the literature. Our primary aim was to find appropriate method for cell preparation that would enable isolation of intact RNA. In addition we wanted to elucidate the mechanism responsible for observed RNA degradation and evaluate the influence of RNA integrity on the reliability of gene expression quantification. **Methods:** Cell lines Caco2, PC3, HepG2, SW 1353, MCF7 and HOS were used. RNA isolated from cells prepared by trypsinization, direct cell lysis, cell scraping, dissociation using recombinant trypsin replacement and spontaneous dissociation from temperature responsive cell culture surface was analysed by bleach gel electrophoresis. Trypsin reagent inactivated with fetal bovine serum or sodium hypochlorite was also used. Trypsin reagent was used on cells and isolated intact RNA. Quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) was used to analyse gene expression of *GAPDH*, *RPLP0*, *GUSB*, *ACTB*, *TBP*, *B2M* and *RPL13A* in samples containing intact or degraded RNA. **Results:** In contrast to other methods used for cell preparation, trypsinization led to RNA degradation regardless of cell line, passage number and differentiation stage. Inactivation of trypsin reagent with sodium hypochlorite but not fetal bovine serum prevented RNA degradation. Therefore, exogenous ribonucleases present in trypsin reagent are most likely responsible for RNA degradation during trypsinization. Trypsinization associated degradation of RNA has a negative impact on quantification of RNA transcript levels, furthermore data normalization cannot eliminate the influence of impaired RNA integrity on qPCR results. **Conclusions:** Degraded RNA, isolated from cells after trypsinization, cannot be used for reliable gene expression quantification. Exogenous ribonucleases present in trypsin reagent are most likely responsible for RNA degradation during trypsinization, therefore it is important, to pay attention whenever using reagents containing components derived from animal pancreas in any procedures associated with RNA. We suggest the use of alternative procedures for cell preparation before RNA isolation such as direct cell lysis or use of animal origin free recombinant proteases. We also recommend careful testing of the RNA isolation procedure before starting with the experiment. RNA integrity can be easily and cost-effectively monitored using bleach gel electrophoresis.

**KEYWORDS:**

cell culture, RNA integrity, trypsin, cell dissociation, qPCR.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC – American type culture collection

bp – bazni par

cDNA – komplementarna DNA

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA – deoksiribonukleinska kislina

ECACC – European collection of cell cultures

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

FBS – fetalni goveji serum

MEM – minimal essential medium

MIQE – minimalne informacije, ki bi jih morali zagotoviti ob objavi qPCR rezultatov

mRNA – informacijska RNA

PBS – fosfatni pufer

PCR – verižna reakcija s polimerazo

qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

RIN – vrednost, ki opisuje integriteto RNA (ang. RNA integrity number)

RNA – ribonukleinska kislina

RNaza – ribonukleaza

RPM – obratov na minuto

RQI – označevalec integritete RNA ( ang. RNA quality indicator)

rRNA – ribosomska RNA

ST – sobna temperatura

TAE – tris acetatni pufer

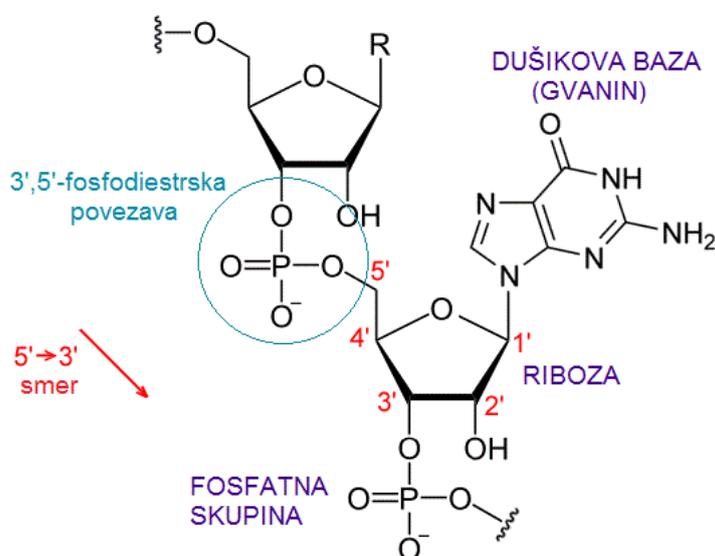
UV – ultravijoličen

# 1 UVOD

Številne raziskave v medicini in farmaciji, ki so usmerjene v odkrivanje patogeneze različnih bolezni ter prepoznavanje novih diagnostičnih in terapevtskih tarč, vključujejo kvantitativno analizo izražanja genov v prizadetih tkivih ali ustreznih celičnih linijah, podvrženih različnim *in vitro* eksperimentom. Kakovost izoliranih ribonukleinskih kislin (RNA) je izrednega pomena za zanesljivo analizo izražanja genov.

## 1.1 Ribonukleinske kisline

RNA je linearna polimerna molekula, sestavljena iz nukleotidov. Vsak nukleotid je sestavljen iz treh enot: dušikove baze, riboze in ene, dveh ali treh fosfatnih skupin. Nukleotidi so med seboj povezani s fosfatnimi skupinami preko 3',5'-fosfodiestrške povezave (slika 1). 5'-fosfatna skupina enega nukleotida se poveže s 3'-OH skupino naslednjega nukleotida (za oštevilčenje atomov pentoznega obroča uporabljamo številke z opuščanjem). Nukleotidi, ki sestavljajo RNA, vsebujejo štiri različne dušikove baze: adenin, gvanin, citozin in uracil (1).



Slika 1. Kemijska zgradba RNA (2).

Poznamo več vrst RNA molekul, ki v celici opravljajo različne funkcije. Informacijska RNA (mRNA) je pomemben vezni člen med dednim zapisom, ki se v celici nahaja v obliki deoksiribonukleinskih kislin (DNA), in proteini, ki v celici opravljajo najrazličnejše funkcije. V jedru se določen segment DNA, ki obsega enega ali več genov, prepíše v mRNA.

Proces imenujemo prepisovanje ali transkripcija. Novo sintetizirana RNA se nato s posttranskripcijskimi modifikacijami spremeni v zrelo, biološko funkcionalno molekulo, ter potuje v citoplazmo, kjer na ribosomih poteka sinteza proteinov. Prenos informacije z zaporedja nukleotidov v zaporedje aminokislin imenujemo prevajanje ali translacija. Trije zaporedni nukleotidi v molekuli mRNA sestavljajo kodon, ki določa eno aminokislino. Pri sintezi proteinov sodeluje tudi transportna RNA (tRNA), ki z enim koncem, imenovanim antikodon, prepozna kodon na mRNA, na drugem koncu pa nosi pripeto ustrezno aminokislino, ki se vgradi v protein. Proces poteka na ribosomih, strukturah, sestavljenih iz ribosomske RNA (rRNA) in proteinov (1). Proteini, ki se sintetizirajo v celici, so odgovorni za večino encimskih reakcij, ki potekajo v celici, opravijo večino transporta znotraj in med celicami, predstavljajo številne strukturne komponente in delujejo tudi kot regulatorne molekule. Merjenje izražanja genov, ki nosijo zapis za različne proteine, nam zato veliko pove o tem, kaj se v celici dogaja. Izražanje genov merimo z določanjem števila kopij ali koncentracije mRNA za določen gen.

Poleg mRNA, rRNA in tRNA, ki sodelujejo pri sintezi proteinov, poznamo tudi druge vrste RNA molekul. Majhne jedrne RNA (snRNA) na primer sodelujejo pri procesiranju mRNA molekul v jedru, protismiselne RNA (asRNA) sodelujejo pri regulaciji izražanja genov z vezavo na mRNA, regulatorne RNA se vežejo na proteine, DNA ali druge RNA molekule, ribocimi pa so RNA molekule z encimsko funkcijo (3).

### **1.1.1 Ribonukleaze**

RNA se lahko razgradi pod vplivom ultravijolične (UV) svetlobe ali visoke temperature. Največjo grožnjo pa ribonukleinskim kislinam predstavljajo povsod navzoče ribonukleaze (RNaze), encimi, ki katalizirajo razgradnjo RNA. Delimo jih na eksoribonukleaze in endoribonukleaze. Prve postopno razgrajujejo RNA s 3' konca v smeri proti 5' koncu ali obratno, medtem ko druge cepijo RNA znotraj molekule (4, 5). Tri največje in najbolj raziskane družine ribonukleaz so družine RNaze A, T1 in T2. RNaze iz družine RNaze A najdemo pri vretenčarjih. Goveja pankreatična RNaza A, po kateri se družina imenuje, je bila prva odkrita RNaza in je eden izmed najbolj raziskanih sesalčjih encimov. T1 RNaze najdemo le pri bakterijah in glivah, medtem ko so T2 RNaze prisotne pri praživalih, rastlinah, bakterijah, virusih in živalih, vključno s človekom (6). RNaze sodelujejo v najrazličnejših procesih, ki vključujejo razgradnjo zaužite RNA, obrambo pred bakterijami in virusi, zorenje in razgradnjo različnih RNA molekul v celicah in posledično regulacijo

izražanja genov, lahko pa delujejo tudi nevrotoksično, imunosupresivno ali antitumorsko. Poleg tega imajo virusne RNaze nekaterih virusov pomembno vlogo pri infekciji gostiteljskih celic (7).

RNaze so majhni, kompaktni proteini, odporni na ekstremne pH vrednosti in temperature. Vsebujejo cisteinske aminokislinske ostanke, ki tvorijo intramolekulske disulfidne vezi, zato se lahko denaturirane RNaze pri ohlajanju na sobno temperaturo in v odsotnosti denaturantov povrnejo v nativno strukturo. Zaradi omenjenih lastnosti RNaze ohranijo svojo aktivnost kljub večkratnemu zamrzovanju in odmrzovanju in celo avtoklaviranju (7, 8).

Ker se RNaze nahajajo v mikroorganizmih, izločajo pa jih tudi keratinociti in so zato prisotne na površini naše kože, pri laboratorijskem delu zlahka pride do kontaminacije reagentov ali vzorcev z RNazami in posledično do razgradnje RNA (9). RNaze lahko vstopajo v celice s pomočjo endocitoze (10), zato lahko pride do razgradnje RNA zaradi kontaminacije z RNazami že pri postopkih pred izolacijo RNA. Poleg eksogenih RNaz lahko RNA v celicah razgradijo tudi endogene inducibilne RNaze. Te se v celicah običajno nahajajo v latentni obliki in so prisotne v velikih količinah. Signali iz okolja, ki povzročajo akutni celični stres, sprožijo sproščanje sekvestriranih RNaz. Podobno se zgodi tudi pri resekciji tkiva in izolaciji RNA. V nekaterih primerih lahko stres aktivira transkripcijo RNaznih genov in tako povzroči povečano izražanje RNaz (7, 11).

## **1.2 Metode priprave celic za izolacijo RNA**

V raziskavah se pogosto uporabljajo različne celične linije, ki jih v laboratoriju izpostavimo kontrolnim in testnim pogojem ter na različne načine merimo njihove odzive. Če želimo v okviru takšnih *in vitro* raziskav meriti izražanje genov, moramo adherentne celice pred izolacijo RNA požeti oziroma sprostiti s površine na kateri rastejo. V nasprotju s suspenzijskimi celicami se adherentne celice v celičnih kulturah razraščajo pritrjene na dno gojilne posode. Na voljo so različne metode, ki omogočajo disociacijo celic s površine gojilnih posod.

### **1.2.1 Tripsinizacija**

Ena najpogosteje uporabljenih metod disociacije adherentnih celic s površine gojilnih posod je tripsinizacija, pri kateri izkoriščamo proteazno aktivnost tripsina (12, 13). Tripsin je serinska proteaza, ki se izloča iz trebušne slinavke in sodeluje pri prebavi proteinov iz hrane in drugih bioloških procesih. Je srednje velik globularen protein, ki se sintetizira kot neaktiven proencim tripsinogen. Aktiven tripsin cepi peptide na C-terminalnem koncu ob lizinu in argininu. Na voljo so reagenti, ki vsebujejo tripsin, izoliran iz prašičjega ali govejega pankreasa, ali pa rekombinantno pridobljen tripsin.

Tripsinizacija se rutinsko uporablja za presajanje adherentnih celic v celičnih kulturah in žetje celic z namenom nadaljnje analize. Pred tripsinizacijo je treba odstraniti gojišče in celice sprati z raztopino, ki ne vsebuje  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  in tripsinskih inhibitorjev. Celice nato inkubiramo z raztopino tripsina. Po inkubaciji tripsin inaktiviramo z dodajanjem serumskega gojišča (sesalčki serum vsebuje tripsinski inhibitor) ali tripsinskega inhibitorja drugega izvora (12). Celice nato centrifugiramo in resuspendiramo v svežem gojišču.

Aktivnost tripsina pri delu v laboratoriju izkoriščamo tudi za disociacijo tkiv, *in vitro* študije proteinov, cepitev fuzijskih proteinov, izolacijo mitohondrijev in drugo (14).

### **1.2.2 Disociacija celic z drugimi proteazami in neencimskimi pripravki**

Poleg tripsina se za disociacijo celic uporabljajo tudi druge proteaze živalskega ali rekombinantnega izvora, kot sta kolagenaza in dispaza. Na voljo so tudi pufri za disociacijo celic, ki ne vsebujejo encimov. Ti so zlasti uporabni za disociacijo rahlo pritrjenih celic ter v študijah, kjer je pomembna ohranitev proteinov, ki se nahajajo na površini celičnih membran, niso pa priporočljivi za presajanje močno pritrjenih celic (15).

### **1.2.3 Mehanska disociacija celic**

Za disociacijo nekaterih rahlo pritrjenih celic zadostuje že tresenje gojilne posode, močnejše pritrjene celice, ki so občutljive na proteaze, pa lahko postrgamo s površine s celičnimi strgali. Pri tem celicam v gojilni posodi odstranimo izrabljeno gojišče in ga nadomestimo s svežim, nato pa celice postrgamo s površine gojilne posode in jih tako sprostimo v gojišče. S suspenzijo celic ravnamo enako kot pri tripsinizaciji. Pri uporabi te metode moramo biti previdni, saj strganje celic lahko pri nekaterih celičnih linijah povzroči poškodbe celičnih membran, kar lahko vpliva na nadaljnje analize (16, 17).

#### **1.2.4 Spontana disociacija celic s temperaturno odzivne površine**

V zadnjem času so na voljo tudi gojilne posode s temperaturno odzivno površino, ki omogoča pritrditev celic pri temperaturi 37 °C, pri znižanju temperature na 20 °C pa se celice spontano odlepijo od podlage. Celice v takšne gojilne posode nasadimo po običajnem postopku ter jih gojimo pri temperaturi 37 °C. Ko želimo celice požeti, jih 10–40 minut inkubiramo pri 20–25 °C. Pri menjavi gojišča in drugih tretiranjih moramo biti pozorni na čas, ko so celice izpostavljene sobni temperaturi, in na temperaturo uporabljenega svežega gojišča, pufrov in drugih raztopin, ki jih uporabljamo pri tretiranju celic, saj se le te lahko odlepijo od podlage. Glavna prednost te metode je možnost pridobitve celotnega monosloja z intaktnim zunajceličnim matriksom, saj se ta pri odlepljanju celic od podlage ne razgradi (18, 19).

Vse omenjene metode lahko uporabimo tudi za pripravo celic pred izolacijo RNA. Po disociaciji celic s površine dobljeno celično suspenzijo centrifugiramo in zavržemo supernatant. Celice, ki ostanejo v usedlini na dnu centrifugirke, liziramo z dodatkom liznega pufra. Lizni pufer lahko dodamo tudi neposredno na monosloj celic v gojilni posodi ter tako združimo žetje in lizo celic. Postopek imenujemo direktna liza.

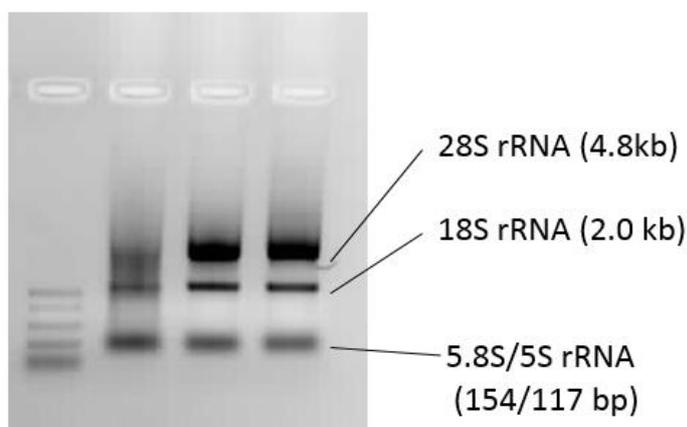
### **1.3 Izolacija RNA**

Pri izolaciji citoplazemske RNA uporabljamo za lizo celic neionske, hipotonične pufre. Pomanjkljivost tovrstnih liznih pufrov je nezadostna inhibicija RNaz, zato morajo biti vzorci ves čas na ledu ali pa je potrebna uporaba eksogenih RNaznih inhibitorjev. Za izolacijo celokupne RNA in DNA običajno uporabljamo gvanidinijeve lizne pufre. Ti pufri porušijo terciarno strukturo RNaz, kar inhibira njihovo delovanje in prepreči razgradnjo RNA (5). DNA in proteine lahko iz vzorca odstranimo z ultracentrifugiranjem, danes pa se namesto ultracentrifugiranja uporablja predvsem ekstrakcija s fenolom in kloroformom. Nato RNA oborimo z izopropilnim alkoholom in speremo z etanolom. Za čiščenje RNA lahko uporabimo tudi kolone, epruvete ali magnetne delce, preplastene s snovjo, ki v prisotnosti kaotropnih snovi omogoča adsorpcijo RNA (20).

### 1.3.1 Preverjanje kakovosti izolirane RNA

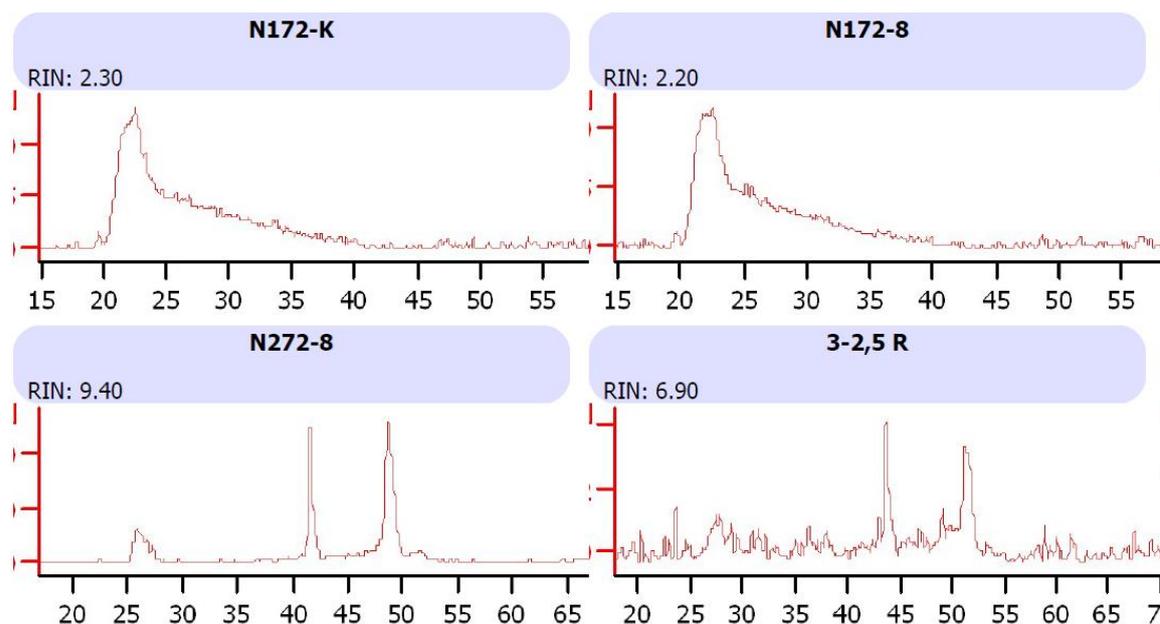
Po izolaciji RNA moramo preveriti, ali je le-ta ustrezne kakovosti za nadaljnjo analizo. Kakovost RNA zajema njeno koncentracijo, čistost in integriteto. Koncentracijo in čistost določamo spektrofotometrično. V ta namen se najpogosteje uporablja NanoDrop UV-VIS spektrofotometer, ki omogoča natančne meritve z ekstremno majhno porabo vzorca (1  $\mu$ L). Koncentracijo RNA določamo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 260 nm. Podatek o čistosti izolirane RNA nam povesta razmerji absorbanc  $A_{260}/A_{280}$  in  $A_{260}/A_{230}$ . Razmerje  $A_{260}/A_{280}$ , izmerjeno v raztopini čiste RNA, je  $2,0 \pm 0,1$ , razmerje  $A_{260}/A_{230}$  pa 2,0–2,4.

Integriteto RNA določamo z elektroforezno ločbo in vizualizacijo RNA molekul s fluorescentnimi barvili. Pred razvojem metod za analizo RNA, ki temeljijo na mikrofluidni tehnologiji, se je za določanje integritete RNA uporabljala elektroforeza na agaroznem gelu z denaturanti, kot so formaldehid, formamid ali urea, ki porušijo sekundarne strukture RNA in omogočijo potovanje enoverižnih molekul. Na ta način zagotovimo, da je hitrost potovanja RNA molekul v elektroforeznem gelu odvisna zgolj od njihove dolžine (21). Pri elektroforezni ločbi intaktne denaturirane RNA dobimo tri značilne lise, ki predstavljajo 28S, 18S in 5,8S oziroma 5S rRNA in so dokaz, da je izolirana RNA nerazgrajena (slika 2). Razpotegnjena lisa, ki se nahaja pod nivojem 18S rRNA lise, kaže na nizko integriteto RNA (11). Glavna slabost te metode je dolgotrajnost in uporaba toksičnih reagentov. Kot alternativo formaldehidnemu gelu zato v nekaterih laboratorijih uporabljajo agarozni gel z natrijevim hipokloritom. Natrijev hipoklorit pri tem deluje kot denaturant in RNazni inhibitor ter tako omogoči potovanje enoverižnih molekul, hkrati pa prepreči razgradnjo RNA z RNazami med samo elektroforezo (21).



**Slika 2.** Elektroforeza RNA na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

V zadnjih letih so za analizo integritete in koncentracije RNA na voljo tudi sistemi, ki temeljijo na mikrofluidni tehnologiji (2100 Bioanalyzer Agilent Technologies, Experion Bio-Rad Laboratories). Pri uporabi takšnih sistemov vzorcem pred analizo dodamo fluorescentno barvilo in jih naneseemo v vdolbinice na čipu. Fragmenti RNA nato potujejo po gelu v mikrokanalih čipa in se ločijo s pomočjo elektroforeze. Zaznava ločenih fragmentov RNA poteka na podlagi merjenja fluorescence, rezultat analize pa sta elektroferogram (slika 3) in slika, ki posnema lise na agaroznem gelu. Glavna prednost omenjenih sistemov je njihova velika zanesljivost in objektivna interpretacija rezultatov, ki posledično omogoča boljšo primerljivost rezultatov analize različnih vzorcev ob različnih časih in tudi v različnih laboratorijih. Eden izmed rezultatov analize je namreč številčna vrednost, ki opredeljuje integriteto RNA (*RNA integrity number (RIN)*, *RNA quality indicator (RQI)*). RIN in RQI sta vrednosti, ki ju dobimo pri analizi RNA z dvema različnima analizatorjema dveh različnih proizvajalcev, njun pomen pa je enak. Njuna maksimalna vrednost je 10 in označuje intaktno nerazgrajeno RNA. Nižja kot je izmerjena vrednost, slabša je integriteta analizirane RNA. Velika prednost mikrofluidnih metod je tudi majhna poraba vzorca za analizo, saj zadostuje že 1  $\mu\text{L}$  vzorca s koncentracijo RNA 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (22). Pomanjkljivost omenjenih tehnologij je njihova cena in posledično omejena dostopnost za številne laboratorije.



Slika 3. Rezultat analize integritete RNA z mikrofluidnim analizatorjem.

## 1.4 Analiza izražanja genov

RNA je izhodišče za velik nabor metod, ki omogočajo kvantitativno analizo izražanja genov. Nekatero so namenjene analizi posameznih genov, druge, zmogljivejše, pa omogočajo presejanje velikega števila vzorcev in hkratno analizo izražanja več genov.

Ena izmed najbolj enostavnih metod je **metoda točkovnega prenosa**, ki omogoča hitro določitev relativne količine tarčne RNA v vzorcu. Primerna je za kvantifikacijo mRNA v fazi vrednotenja testnega modela in eksperimentalnih pogojev. Denaturirane vzorce RNA pri tej metodi prenesemo neposredno na membrano, kjer jih hibridiziramo s sondami. Za analizo lahko uporabimo izolirano RNA ali celični lizat brez predhodne elektroforezne ločbe ali verižne reakcije s polimerazo (PCR) (5). **Prenos po Northernu** kljub razvoju novih metod ostaja standardna metoda za zaznavo in kvantifikacijo nivoja mRNA molekul (23). Temelji na elektroforezni ločbi RNA molekul pri denaturirajočih pogojih in prenosu vzorca na membrano, kjer RNA hibridiziramo z ustrezno označenimi sondami in zaznamo z avtoradiografijo ali kemiluminiscenco. Metoda ne omogoča absolutne določitve količine RNA, temveč je namenjena primerjavi količine specifične RNA med vsemi analiziranimi vzorci. **Analiza z zaščito pred nukleazami** je novejša metoda, kjer hibridizacija z razliko od prenosa po Northernu poteka v raztopini. Temelji na vezavi ustrezno označenih DNA ali RNA sond na tarčne molekule RNA, ki jih na ta način zaščitimo pred nukleazami. V raztopino nato dodamo nukleaze, ki specifično razgrajujejo enoverižne nukleinske kisline. Zaščitene dvoverižne fragmente nato ločimo z gelsko elektroforezo in vizualiziramo z avtoradiografijo. Metoda je zaradi hibridizacije v raztopini in razgradnje nehibridiziranih nukleinskih kislin 10-krat bolj občutljiva kot prenos po Northernu. Najpogosteje uporabljena metoda za kvantitativno analizo izražanja genov je **kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)**, ki temelji na klasični reakciji PCR. Pred dvajsetimi leti pa so se začele pospešeno razvijati **visoko zmogljive metode za analizo izražanja genov**, ki so namenjene presejanju velikega števila vzorcev in hkratni analizi izražanja več genov. Med visokozmogljivimi metodami je najbolj razširjena uporaba **mikromrež**. Sestavljene so iz steklenega, silikonskega ali plastičnega nosilca, na katerega so nanešena kratka zaporedja posameznih genov. Mikromrežo inkubiramo z mešanico označenih komplementarnih DNA (cDNA) molekul iz enega ali več proučevanih vzorcev. cDNA molekule so običajno fluorescentno označene, kar omogoča fluorescentno zaznavo. Visokozmogljive metode običajno uporabimo za identifikacijo kandidatnih genov, ki jih

nato analiziramo s qPCR (5). Ena izmed najnovejših metod na tem področju je **globoko sekvenciranje celotnega transkriptoma** (RNA-Seq). Pri tej metodi RNA prepisemo v knjižnico cDNA fragmentov, na katere vežemo adaptorje. Vsaki molekuli nato določimo zaporedje z eno izmed visokozmogljivih tehnologij za sekvenciranje. Pomembna prednost RNA-Seq pred metodami, ki temeljijo na hibridizaciji, je ta, da lahko z njo analiziramo izražanje genov, katerih zaporedja ne poznamo (24).

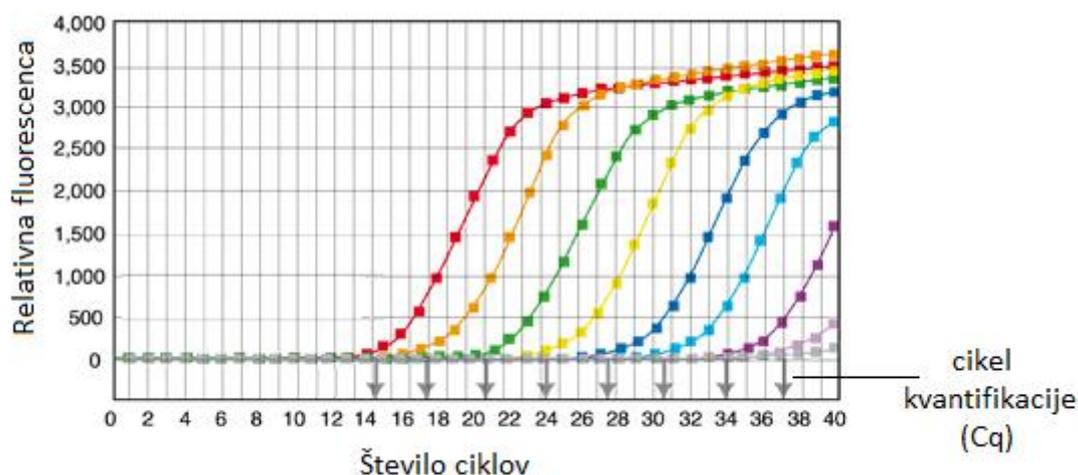
#### 1.4.1 qPCR

**qPCR** je najpogosteje uporabljena metoda za kvantitativno analizo izražanja genov. Je preprosta, občutljiva, specifična in hitra metoda, zato se danes rutinsko uporablja za merjenje izražanja tarčnih genov in validacijo rezultatov, pridobljenih z visoko zmogljivimi metodami (25-27). Temelji na klasični reakciji PCR, ki omogoča selektivno pomnoževanje tarčnih zaporedij DNA.

Reakcijo PCR sestavljajo trije koraki, ki potekajo pri različnih temperaturah. V prvem koraku poteče denaturacija matrične DNA (~90 °C), sledi prileganje oligonukleotidnih začetnikov (50–60 °C) in nazadnje sinteza komplementarne verige s termostabilno DNA polimerazo (~70 °C). Celotni cikel se ponovi 20–40-krat (3, 28). Pri klasični reakciji PCR produkte zaznavamo po končani reakciji s pomočjo elektroforeze na agaroznem gelu (28). Teoretično se število kopij tarčnega zaporedja v vsakem ciklu reakcije PCR podvoji, vendar pa to velja le za eksponentno fazo pomnoževanja. Zaznava produktov reakcije PCR v fazi platoja zato za kvantifikacijo ni primerna. Kvantifikacija nukleinskih kislin s klasično reakcijo PCR je močno omejena, saj je pri njej zaznava ločena od pomnoževanja, zato težko določimo eksponentno fazo. Poleg tega je občutljivost metod, ki se uporabljajo za zaznavo produktov, prenizka, da bi lahko reakcijo ustavili pri nižjem številu ciklov in s tem zagotovili zaznavo v eksponentni fazi.

qPCR temelji na hkratnem pomnoževanju tarčnega zaporedja in zaznavi PCR produktov. To omogoča enostavno določitev eksponentne faze, kjer je količina produkta PCR sorazmerna z začetnim številom kopij v vzorcu in tako omogoča kvantifikacijo DNA in RNA. Zaznava produktov pri kvantitativni izvedbi je lahko nespecifična, kar dosežemo z uporabo interkalirajočih fluorescentnih barvil, ali pa specifična, ki jo dosežemo z uporabo različnih fluorescentno označenih sond. Pri vseh omenjenih metodah merjenje fluorescence poteka

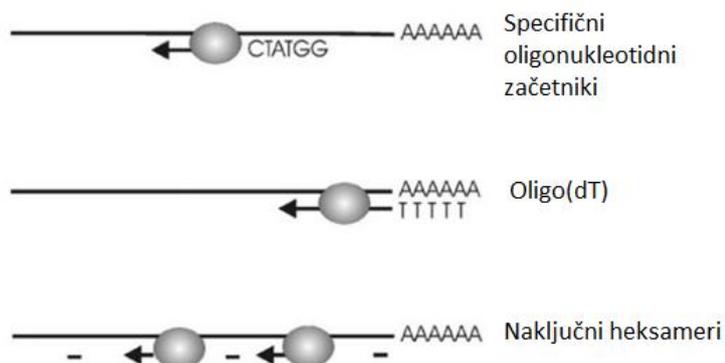
sočasno z reakcijo PCR, izmerjena fluorescenca pa je sorazmerna s številom nastalih PCR produktov. Cikel, pri katerem izmerjena fluorescenca preseže vnaprej določen prag, imenujemo cikel kvantifikacije – C<sub>q</sub> (slika 4) (29, 30).



**Slika 4.** Kvantifikacija nukleinskih kislin s qPCR (31).

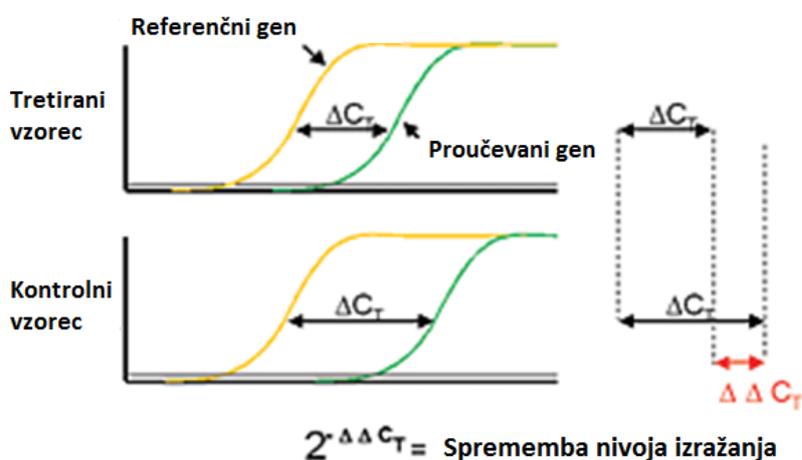
Krivulje na grafu, ki so rezultat analize z metodo qPCR, prikazujejo naraščanje fluorescence v odvisnosti od števila ciklov. Iz grafa lahko razberemo C<sub>q</sub> vrednosti.

Pred izvedbo qPCR z namenom analize izražanja genov moramo mRNA prepisati v cDNA. RNA molekule prepisemo v DNA s pomočjo encima reverzna transkriptaza, ki sintetizira DNA na podlagi RNA matrice, pri tem pa lahko uporabimo tri vrste oligonukleotidnih začetnikov (slika 5). Oligo(dT) oligonukleotidni začetniki se prilegajo poli(A) repu, prisotnem pri večini evkariontskih mRNA, in tako omogočajo reverzno transkripcijo čisto od začetka 3' konca mRNA molekule. Naključni heksameri so kratki oligonukleotidni začetniki z naključnimi zaporedji, ki omogočajo prepisovanje najrazličnejših zaporedij. Vežejo se lahko na več mestih znotraj ene RNA molekule ter tako dosežejo transkripcijo celokupne RNA. Tretja možnost je uporaba specifičnih oligonukleotidnih začetnikov, ki so primerni za analizo majhnega števila različnih mRNA (32).



**Slika 5.** Različni oligonukleotidni začetniki za reverzno transkripcijo (Prirejeno po: Kubista et al. (32)).

qPCR omogoča absolutno in relativno kvantifikacijo. Za absolutno kvantifikacijo potrebujemo umeritveno krivuljo, ki jo dobimo z analizo serijsko redčene standardne raztopine cDNA ali DNA z znano koncentracijo oziroma z znanim številom kopij tarčnega zaporedja. Koncentracijo oziroma število kopij tarčnega zaporedja v proučevanih vzorcih nato odčitamo z umeritvene krivulje. Bolj pogosta je relativna kvantifikacija, kjer proučevane vzorce primerjamo med seboj. Najpogosteje uporabljena metoda za relativno kvantifikacijo je  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  metoda (slika 6) (33). Pri obeh načinih kvantifikacije rezultate normaliziramo na izražanje referenčnih genov. To so geni, ki se konstitutivno izražajo v vseh proučevanih vzorcih, neodvisno od eksperimentalnih pogojev ali bolezenskega stanja. Z normalizacijo rezultatov zmanjšamo navidezne razlike v izražanju genov med vzorci, ki so posledica razlik v količini in kakovosti izhodnega materiala (29).



**Slika 6.**  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  metoda za relativno kvantifikacijo (34).

#### **1.4.2 Pomen integritete RNA za zanesljivost rezultatov analize izražanja genov**

Za pridobitev zanesljivih rezultatov analize izražanja genov mora biti izpolnjenih več pogojev. Izolacija RNA z visoko integriteto je pri tem ključnega pomena. Prenos po Northernu in priprava cDNA knjižnice za analizo z mikromrežami zahtevata izredno visoko integriteto RNA. qPCR in analiza z zaščito pred nukleazami sicer temeljita na analizi krajših odsekov in sta zato manj občutljivi na slabšo integriteto RNA (35), kljub temu pa so številne raziskave pokazale, da integriteta RNA pomembno vpliva na rezultate qPCR in tudi normalizacija podatkov z uporabo referenčnih genov ne more izničiti omenjenega vpliva (36-41). Raziskovalci naj bi zato v skladu s smernicami, ki opisujejo minimalne informacije, ki bi jih morali zagotoviti ob objavi qPCR rezultatov (MIQE, ang. *Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*), med drugim podali tudi dokaz, da je bila za analizo uporabljena RNA ustrezne integritete.

## 2 NAMEN DELA

Pri delu s celicami HOS smo se soočili s problemom razgrajene RNA, izolirane iz tripsiniziranih celic. Izkušnje več raziskovalcev kažejo, da tripsinizacija lahko povzroči razgradnjo RNA, vendar v literaturi o tem nismo našli podatkov. Poleg tega avtorji kljub priporočilom MIQE v svojih člankih metod, uporabljenih za pripravo celic in izolacijo RNA, ne opisujejo dovolj natančno, da bi jih bilo mogoče ponoviti. Pomanjkanje informacij nas je vzpodbudilo, da sistematično pristopimo k problemu. Primarni cilj magistrske naloge bo poiskati ustrezno metodo za pripravo celic, ki bo omogočila izolacijo intaktne RNA. Nadalje želimo odkriti mehanizem, odgovoren za razgradnjo RNA med tripsinizacijo, ter ovrednotiti vpliv nizke integritete RNA, ki je posledica tripsinizacije celic, na zanesljivost analize izražanja genov z metodo qPCR.

Hipoteze, ki jih bomo preverjali so:

1. Tripsinizacija celic povzroči razgradnjo RNA.
2. Tripsin poškoduje celične membrane, te poškodbe pa inducirajo endogene inducibilne RNaze, ki razgradijo RNA.
3. V tripsinskem reagentu so prisotne RNaze, ki med tripsinizacijo vstopajo v celice in povzročijo razgradnjo RNA.
4. Nizka integriteta RNA, ki je posledica tripsinizacije celic, vpliva na analizo izražanja genov z metodo qPCR.

Da bi hipoteze potrdili in našli ustrezno metodo za pripravo celic pred izolacijo RNA, bomo na celičnih kulturah osteoblastov (HOS) preizkusili več različnih načinov disociacije celic in njihov vpliv na integriteto izolirane RNA ovrednotili z elektroforezo na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom. Analizirali bomo tudi integriteto RNA, izolirane iz različnih celičnih linij ter celic z različno pasažo in stopnjo diferenciacije. Da bi odkrili mehanizem, odgovoren za razgradnjo RNA med tripsinizacijo, bomo poskušali v ločenih eksperimentih selektivno inhibirati proteazno aktivnost tripsina in aktivnost RNaz ter proučiti vpliv modificiranih reagentov na integriteto izolirane RNA. Z modificiranimi tripsinskimi reagenti bomo tretirali tako celice HOS kot tudi intaktno predhodno izolirano RNA. Da bi ovrednotili vpliv nizke integritete RNA na analizo izražanja genov s qPCR, bomo s qPCR analizirali izražanje 7 genov, ki se v našem laboratoriju pogosto uporabljajo kot referenčni geni. Uporabili bomo vzorce z intaktno RNA in vzorce z razgrajeno RNA ter rezultate med seboj statistično primerjali.

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 Materiali**

#### **3.1.1 Laboratorijska oprema**

Aparature:

- analizator Light Cycler 480 (Roche),
- aparat za ultra čisto vodo (Elga),
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica),
- centrifuga Centrifuge 5415R (Eppendorf),
- centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Fischer Scientific),
- ciklični termoblok 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems),
- DNA/RNA komora (Biosan),
- inkubator brez CO<sub>2</sub> (Sanyo),
- inkubator s 5 % CO<sub>2</sub> (Heraeus),
- invertni mikroskop Olympus CK 40 (Olympus),
- komora z laminarnim pretokom zraka (Iskra PIO),
- mehanske pipete (Eppendorf),
- mikrofluidni analizator 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies),
- pipetor Midi Plus (Biohit),
- sistem za elektroforezo (Bio Rad),
- spektrofotometer Nanodrop ND 1000 (Thermo Fischer Scientific),
- tehtnica EW 620-3NM (Kern),
- termoblok (Biosan),
- UV transiluminacijski sistem G-BOX (Syngene).

Material:

- celično strgalo (TPP),
- centrifugirke 15 mL, 50 mL (TPP),
- gojilne ploščice (TPP),
- gojilne posode – ploske gojilne steklenice T25 (USA Scientific, TPP),
- mikrocentrifugirke različnih volumnov (Brand, Eppendorf),
- nastavki za pipete (Starlab),
- Neubauerjeva komora za štetje celic (Brand),

- petrijevke Nunc UpCell (Thermo Fischer Scientific),
- ploščice za analizator Light Cycler 480 s 384 luknjicami in folija za pokrivanje ploščic (Roche),
- sistem za filtriranje raztopin s podtlakom (TPP),
- sterilne steklene serološke pipete (TPP).

### 3.1.2 Kemikalije in reagenčni kompleti

- Agarozna za uporabo v molekularni biologiji (Sigma-Aldrich),
- antibiotik/antimikotik – 100-kratna raztopina (Sigma-Aldrich),
- askorbinska kislina (Sigma-Aldrich),
- barvilo Midori Green Advanced (Nippon Genetics Europe GmbH),
- bromfenolmodro (Merck),
- čistilo za odstranjevanje RNaz – RnaseZap (Ambion),
- *D*-glukoza (Merck),
- DNA lestvica – PCR Markers (Promega),
- etanol (Merck Millipore),
- fetalni goveji serum (FBS) (Gibco),
- glicerol (Merck),
- HCl (Sigma-Aldrich),
- hidrokortizon – prah (Sigma-Aldrich),
- humani epidermalni rastni dejavnik – rekombinanten, iz *E. Coli*, liofiliziran (Sigma-Aldrich),
- inzulin – iz govejega pankreasa, prah (Sigma-Aldrich),
- izhodiščna zmes - Syber Select, 2-kratna koncentracija (Applied Biosystems),
- izopropilni alkohol (Merck Millipore),
- KCl (Sigma-Aldrich),
- $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  (Fluka),
- kloroform (EMSURE Merck Millipore),
- *L*-glutamin – raztopina, 200 mmol/L (Sigma-Aldrich),
- medij za celice DMEM/F-12 (Gibco),
- medij za celice Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich),
- medij za celice Leibovitz's L-15 (Sigma-Aldrich),
- medij za celice Minimal essential medium (MEM) (Sigma-Aldrich),

- Na<sub>2</sub>-EDTA×12 H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich),
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka),
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich),
- NaCl (Sigma-Aldrich),
- NaClO(Pancreac),
- NaHCO<sub>3</sub> (Alkaloid Skopje),
- NaOH (Sigma-Aldrich),
- oligonukleotidni začetniki (Sigma-Aldrich),
- reagenčni komplet za analizo na analizatorju 2100 Bioanalyzer - Agilent 6000 Nano Kit (Agilent Technologies),
- reagenčni komplet za reverzno transkripcijo – Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche),
- reagent za lizo celic – QIAzol Lysis Reagent (Qiagen),
- nadomestek tripsina – TrypLE Express, rekombinantna proteaza, 1-kratna raztopina (Gibco),
- tripsansko modrilo (Sigma-Aldrich),
- tripsinski reagent - 0,25-odstotni tripsin z etilendiamintertraoetno kislino (EDTA) in fenol rdečim, iz prašičjega pankreasa, 1-kratna raztopina (Gibco),
- voda brez RNaz (Thermo Fisher Scientific),
- β-glicerofosfat (Sigma-Aldrich).

## **3.2 Delo s celičnimi kulturami**

### **3.2.1 Celične linije**

Uporabili smo več celičnih linij, kupljenih pri American Type Culture Collection (ATCC):

- HOS (ATCC® CRL-1543™): humane celice kostnega izvora, izolirane iz kosti 13-letne deklice, obbolele za osteosarkomom,
- SW 1353 (ATCC® HTB-94™): humane celice kostnega izvora, izolirane iz nadlahtnice 72-letne pacientke s hondrosarkomom,
- HepG2 (ATCC® HB-8065™): humane jetrne celice, izolirane iz jeter 15-letnega dečka s hepatoceličnim karcinomom,
- PC3 (ATCC® CRL-1435™): humane celice adenokarcinoma prostate, izolirane iz metastatskega mesta v kosti 62-letnega pacienta,

- Caco2 (ATCC® HTB-37™): humane črevesne celice, izolirane iz črevesja 72-letnega pacienta s kolorektalnim adenokarcinomom,
- MCF7 (ATCC® HTB-22™): humane celice mlečnih žlez, izolirane iz pleuralnega izliva (metastatsko mesto) 69-letne pacientke z adenokarcinomom dojke.

Vse uporabljene celične linije so človeškega izvora in so adherentne.

## 3.2.2 Priprava gojišč in drugih raztopin

### 3.2.2.1 Gojišča

Za gojenje celic smo uporabili naslednja gojišča:

- Za celice HOS in HepG2: gojitveni medij DMEM z 10-odstotnim FBS, 1-odstotnim *L*-glutaminom in 1-odstotnim antibiotikom in antimikotikom.
- Za celice Caco2: gojitveni medij MEM z 20-odstotnim FBS, 1-odstotnim *L*-glutaminom in 1-odstotnim antibiotikom in antimikotikom.
- Za celice PC3: gojitveni medij DMEM/F-12 z 10-odstotnim FBS, 1-odstotnim *L*-glutaminom in 1-odstotnim antibiotikom in antimikotikom.
- Za celice SW 1353: gojitveni medij Leibovitz's L-15 z 10-odstotnim FBS, 1-odstotnim *L*-glutaminom in 1-odstotnim antibiotikom in antimikotikom.
- Za celice MCF7: gojitveni medij DMEM/F-12 z 10 µg/ml inzulina, 0,5 µg/ml hidrikortizona in 20 ng/ml epidermalnega rastnega dejavnika, z 10-odstotnim FBS, 1-odstotnim *L*-glutaminom in 1-odstotnim antibiotikom in antimikotikom.

Pripravljena gojišča smo do uporabe hranili v hladilniku.

Gojišče za 1. stopnjo diferenciacije celic HOS smo pripravili tako, da smo gojišču za celice HOS dodali askorbinsko kislino do končne koncentracije 50 µg/mL, gojišču za 2. stopnjo diferenciacije celic HOS pa smo poleg askorbinske kisline dodali še β-glicerofosfat do končne koncentracije 5 mmol/L. Obe gojišči za diferenciacijo celic HOS smo pripravili neposredno pred menjavo gojišča.

### 3.2.2.2 10-kratni fosfatni pufer (PBS) za spiranje celic

Zatehtali smo:

- 80 g NaCl,
- 2 g KCl,
- 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
- 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Vse sestavine smo raztopili v 800 mL ultra čiste vode in uravnali pH na 7,4 s HCl oziroma NaOH ter nato dopolnili z ultra čisto vodo do 1000 ml.

### 3.2.2.3 1-kratni PBS

Za pripravo 1-kratnega PBS smo 10-kratni PBS 10-krat razredčili, filtrirali s sistemom za filtriranje s podtlakom in v komori z laminarnim pretokom zraka filtriran PBS alikvotirali v 50-mililitrske centrifugirke, ki smo jih do uporabe shranili pri sobni temperaturi (ST).

### 3.2.2.4 Raztopina za redčenje tripsinskega reagenta

Za redčenje tripsinskega reagenta smo pripravili raztopino z enako sestavo kot uporabljen tripsinski reagent, razen fenol rdečega in tripsina. V 1000 mL ultra čiste vode smo raztopili:

- 400 mg KCl,
- 60 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,
- 350 mg NaHCO<sub>3</sub>,
- 8 g NaCl,
- 120 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12H<sub>2</sub>O,
- 1 g *D*-glukoze,
- 413 g Na<sub>2</sub>-EDTA×2H<sub>2</sub>O.

Uravnali smo pH na 7,4 in raztopino filtrirali.

### 3.2.2.5 Inaktiviran tripsinski reagent

Za inaktivacijo tripsinskega reagenta smo uporabili FBS in 10-odstotni natrijev hipoklorit. Pripravili smo 0,125-odstotni tripsin z 0, 12, 25 in 50 odstotki FBS. Za uravnavanje volumnov smo uporabili prej pripravljeno raztopino za redčenje tripsina. Ločeno smo pripravili 0,25-odstotni tripsin z 0,12 odstotki natrijevega hipoklorita.

### 3.2.3 Gojenje in presajanje celic

Celice smo gojili v CytoOne T25 ploskih gojilnih steklenicah za adherentne celične kulture v inkubatorju pri 37 °C in atmosferi, nasičeni z vlago in s 5 % CO<sub>2</sub>. Ko so celice prerasle 80 do 100 % površine gojilne posode, smo jih tripsinizirali in presadili v komori z laminarnim pretokom zraka:

1. S pipeto smo odstranili izrabljeno gojišče in celice sprali z 2,5 mL PBS.
2. Dodali smo 1,5 mL tripsinskega reagenta in celice inkubirali 3 min v inkubatorju pri 37 °C.
3. Po treh min smo pod invertnim mikroskopom preverili, ali so se celice odlepile od podlage.
4. Dodali smo 3,5 mL gojišča ter dno gojilne posode večkrat sprali s suspenzijo celic.
5. Suspenzijo celic smo prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 1200 obratih na minuto (RPM).
6. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 1 mL svežega gojišča ter suspenzijo predstavili v 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko.
7. Iz mikrocentrifugirke smo odvzeli vzorec za štetje celic.
8. Po štetju celic smo ustrezno število celic nasadili v novo gojilno posodo s 5 mL ogretega svežega gojišča.

Štetje celic:

1. Pripravili smo celično suspenzijo s tripanskim modrilom v razmerju 1:1 in jo nanesli na Neubauerjevo komoro za štetje celic.
2. Pod mikroskopom smo pri 100-kratni povečavi prešteli celice v 4 kvadrantih.
3. Izračunali smo število celic na mL po enačbi:

$$\frac{\text{Število celic}}{\text{mL}} = \frac{\text{število celic}}{\text{število kvadrantov}} \times \text{faktor redčenja} \times 10^4$$

4. Izračunali smo tudi celično viabilnost po enačbi:

$$\text{Celična viabilnost} = \frac{\text{število živih celic}}{\text{število vseh celic}}$$

### **3.2.4 Diferenciacija celic HOS**

Diferenciacija celic HOS v zrele osteoblaste je potekala 3 tedne. Gojišče smo menjali na 3 do 4 dni. Nasadili smo  $5,2 \times 10^3$  celic/cm<sup>2</sup>. Četrti dan smo gojišče za celice HOS zamenjali z gojiščem za 1. stopnjo diferenciacije, 11. dan pa z gojiščem za 2. stopnjo diferenciacije. Celice smo poželi 21. dan.

### **3.2.5 Priprava celic pred izolacijo RNA**

#### **3.2.5.1 Disociacija celic s tripsinom**

Pri pripravi celic s pomočjo tripsinizacije smo ravnali enako kot pri presajanju celic (3.2.3) do stopnje centrifugiranja (točka 5). Nato smo nadaljevali po naslednjem postopku:

1. Po centrifugiranju smo odlili in odpipetirali supernatant.
2. Dodali smo 1000  $\mu$ L reagenta za lizo celic in takoj homogenizirali s pipetiranjem (10 do 15-krat).
3. Celični lizat smo prenesli v 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko in inkubirali 5 min pri ST, nato pa mikrocentrifugirko postavili na led.
4. Homogeniziran celični lizat smo shranili pri  $-70$  °C.
5. Z izolacijo smo nadaljevali v roku 1 do 14 dni.

V ločenem poskusu smo celice tripsinizirali z različno razredčenimi raztopinami tripsinskega reagenta (0,05-, 0,01-, 0,002-odstotni tripsinski reagent). Za pripravo serijskih redčitev tripsinskega reagenta smo uporabili 0,25-odstotni tripsinski reagent, ki smo ga uporabljali za rutinsko tripsinizacijo pri presajanju, in pripravljeno raztopino za redčenje tripsinskega reagenta (3.2.2.4). Pri tripsinizaciji celic z različnimi redčitvami tripsinskega reagenta smo ravnali po prej opisanem protokolu za tripsinizacijo, pri tem pa smo morali nekoliko podaljšati čas inkubacije s tripsinom, ki v nobenem primeru ni presegel priporočenega časa inkubacije (42).

#### **3.2.5.2 Priprava celic z direktno lizo**

Pri pripravi celic pred izolacijo RNA z direktno lizo smo ravnali po naslednjem postopku:

1. S pipeto smo odstranili izrabljeno gojišče in celice sprali z 2,5 mL PBS.

2. Direktno na celice v gojilni posodi smo s pipeto dodali 1000  $\mu$ L reagenta za lizo celic in z nagibanjem gojilne posode poskrbeli, da je reagent v čim krajšem času pokrtil celotno površino.
3. Celični lizat v gojilni posodi smo inkubirali 5 min pri ST.
4. S pipeto smo nato večkrat sprali dno gojilne posode s celičnim lizatom in lizat prestavili v 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko.
5. Homogeniziran celični lizat smo shranili pri  $-70$  °C.
6. Z izolacijo smo nadaljevali v roku 1 do 14 dni.

### **3.2.5.3 Priprava celic s strganjem**

Pri pripravi celic pred izolacijo RNA s strganjem smo ravnali po naslednjem postopku:

1. S pipeto smo odstranili izrabljeno gojišče in celice sprali z 2,5 mL PBS.
2. Dodali smo 5 mL svežega gojišča in celice s celičnim strgalom postrgali z dna gojilne posode.
3. Celice smo resuspendirali s pipeto in s suspenzijo večkrat sprali dno gojilne posode.
4. Celično suspenzijo smo prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko in nadaljevali po enakem postopu kot pri tripsinizaciji (3.2.5.1).

### **3.2.5.4 Disociacija celic z nadomestkom tripsina**

Za disociacijo celic z nadomestkom tripsina smo uporabili reagent TrypLE Express. Ravnali smo po prej opisanem protokolu za tripsinizacijo (3.2.5.1). Po priporočilih proizvajalca smo tripsinski reagent neposredno nadomestili z reagentom TrypLE Express, ki vsebuje rekombinantno proteazo.

### **3.2.5.5 Spontana disociacija celic s temperaturno odzivne površine**

Pri pripravi celic pred izolacijo RNA s spontano disociacijo smo celice nasadili v petrijevko z Nunc UpCell površino in jih poželi po navodilih proizvajalca:

1. Petrijevko smo 40 min inkubirali pri sobni temperaturi.
2. Po 40 min smo z rahlim tresenjem in spiranjem površine z gojiščem z dna odstranili še celice, ki so po 40 min ostale pritrjene na površino.
3. Celično suspenzijo smo prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko in nadaljevali po enakem postopku kot pri tripsinizaciji (3.2.5.1).

## **3.2.6 Tretiranje celic z inaktiviranim tripsinskim reagentom**

### **3.2.6.1 Inaktivacija tripsinskega reagenta s FBS**

Preden smo celice tretirali z inaktiviranim tripsinskim reagentom s FBS, smo izvedli test inaktivacije tripsina. Na celicah, ki smo jih gojili na gojilni ploščici s 6 vdolbinicami, smo preizkusili tripsinski reagent z 0, 12, 25 in 50 odstotki FBS ter opazovali disociacijo celic pod mikroskopom. Na podlagi rezultatov smo se odločili, da uporabimo tripsinski reagent s 50 odstotki FBS. Celice iz treh T25 gojilnih posod smo poželi s strganjem in jih resuspendirali v 1,5 mL inaktiviranega tripsinskega reagenta s 50 odstotki FBS. Po treh min smo dodali 3,5 mL gojišča in suspenzijo ponovno centrifugirali 5 min pri 1200 RPM ter nadaljevali po enakem postopku kot pri pripravi celic pred izolacijo RNA s pomočjo tripsinizacije (3.2.5.1).

### **3.2.6.2 Inaktivacija tripsinskega reagenta z natrijevim hipokloritom**

V drugem poskusu smo za inaktivacijo tripsina in drugih proteinov, prisotnih v tripsinskem reagentu, uporabili natrijev hipoklorit. Celice iz treh T25 gojilnih posod smo poželi s strganjem in jih resuspendirali v 1,5 mL inaktiviranega tripsinskega reagenta z 0,12 odstotki natrijevega hipoklorita. Po petih min smo dodali 3,5 mL gojišča in suspenzijo ponovno centrifugirali 5 min pri 1200 RPM ter nadaljevali po enakem postopku kot pri pripravi celic pred izolacijo RNA s pomočjo tripsinizacije (3.2.5.1).

## **3.3 Delo z RNA**

### **3.3.1 Priprava raztopin in agaroznega gela**

#### **3.3.1.1 1-kratni tris acetatni pufer**

Za pripravo 1 L 1-kratnega tris acetatnega (TAE) pufra, ki smo ga uporabili za pripravo agaroznega gela in izvedbo elektroforeze, smo uporabili 20 mL 50-kratnega TAE pufra (sestava: 121 g tris baze, 28,6 g CH<sub>3</sub>COOH, 50 mL 0,5 M EDTA, ultra čista voda do 500 mL) in ultra čisto vodo.

### **3.3.1.2 Nanašalno barvilo**

Za pripravo nanašalnega barvila, ki smo ga uporabili za elektroforezo RNA na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom, smo uporabili:

- 0,025 g bromfenolmodrega,
- 7 mL ultra čiste vode,
- 3 mL glicerola.

### **3.3.1.3 Agarozni gel z natrijevim hipokloritom**

Za elektroforezo RNA smo uporabili agarozni gel z natrijevim hipokloritom (21), ki inhibira delovanje RNaz in tako omogoča elektroforezo intaktne RNA.

1. Zatehtali smo 0,75 g agaroze ter dodali 75 mL 1-kratnega TAE pufru in 450  $\mu$ L 10-odstotnega natrijevega hipoklorita. Mešanico smo 5 min inkubirali pri ST in jo vmes večkrat premešali z vrtinčenjem.
2. Mešanico smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se agaroz ni popolnoma raztopila.
3. Dodali smo 3  $\mu$ L barvila Midori Green Advanced, gel vlili v model in pustili pri ST vsaj 30 min, da se je strdil.

### **3.3.2 Izolacija RNA**

Najprej smo izvedli ekstrakcijo z gvanidinijevim tiocianatom, fenolom in kloroformom:

1. Celični lizat smo odmrznili in ga 5 min inkubirali pri ST.
2. Lizatu smo v digestoriju dodali 200  $\mu$ L kloroforma in mikrocentrifugirko dobro zaprli.
3. Vsebino smo dobro premešali, tako da smo mikrocentrifugirko 15 sekund stresali z roko.
4. Mešanico smo inkubirali 3 min pri ST, ponovili stresanje in ponovno inkubirali 3 min pri ST.
5. Mešanico smo centrifugirali 15 min pri 4 °C in 12.000 g ter izolacijo RNA nadaljevali v DNA/RNA komori.

Nato smo RNA izolirali z obarjanjem z izopropanolom:

1. Po centrifugiranju je prišlo do ločitve faz na zgornjo vodno fazo, interfazo in spodnjo organsko fazo. 500  $\mu$ L vodne faze smo dodali 500  $\mu$ L izopropanola, premešali z obračanjem in inkubirali 30 min pri -20 °C.
2. Centrifugirali smo 10 min pri 4 °C in 12.000 g ter odstranili supernatant.

3. Dodali smo 1 mL 75-odstotnega etanola, vsebino premešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali 5 min pri 4 °C in 7.500 g.
4. Odpipetirali smo etanol in pustili odprto mikrocentrifugirko stati v pokončnem položaju 10–20 min, da se je RNA posušila in je usedlina na dnu mikrocentrifugirke postala prosojna.
5. RNA smo raztopili v 100 µL vode brez RNaz, premešali s pipeto in pustili v hladilniku čez noč.
6. Naslednji dan smo vzorce inkubirali 10 min pri 60 °C v termobloku, nato pa vsebino premešali s pipeto. Vzorce smo shranili pri –70 °C.

### **3.3.3 Preverjanje koncentracije in kakovosti RNA**

#### **3.3.3.1 Merjenje koncentracije in analiza čistosti RNA**

Za merjenje koncentracije in analizo čistosti RNA smo uporabili spektrofotometer Nanodrop 1000 in pripadajoči računalniški program ND 1000 V3.8.1. Nanodrop smo pred uporabo očistili z ultra čisto vodo in vpojnim papirjem. Kot slepi vzorec smo uporabili vodo brez RNaz. Za analizo RNA smo uporabili 1,5 µL posameznega vzorca. Nanodrop smo po merjenju posameznega vzorca očistili z vpojnim papirjem. Po vsaki meritvi smo preverili koncentracijo RNA, razmerje  $A_{260}/A_{280}$  in razmerje  $A_{260}/A_{230}$  ter absorpcijski spekter.

#### **3.3.3.2 Analiza integritete RNA**

Integriteto RNA smo preverjali z elektroforezo na 1-odstotnem agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom:

1. Pripravili smo 10-mikrolitrške alikvotne vzorcev RNA s koncentracijo 100 ng/µL. Za redčenje RNA smo uporabili vodo brez RNaz. Preostanek RNA smo shranili pri –70 °C.
2. Za oceno velikosti odsekov RNA smo uporabili 3 µL DNA lestvice.
3. Vzorcem smo dodali po 2 µL prej pripravljenega nanašalnega barvila, DNA lestvici pa 1 µL.
4. Na gel smo nanegli vzorce in DNA lestvico z nanašalnim barvilom.
5. Zagnali smo elektroforezo, ki je potekala 30 min pri stalni napetosti 100 V.
6. Gel smo po končani elektroforezi slikali z UV transiluminacijskim sistemom G-Box.

Za primerjavo smo nekatere vzorce, ki smo jih analizirali z elektroforezo, analizirali tudi z mikrofluidnim analizatorjem 2100 Bioanalyser in reagenčnim kompletom Agilent 6000 Nano Kit. Analizo smo izvedli po navodilih proizvajalca.

### **3.3.4 Inkubacija predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom**

Za inkubacijo RNA s tripsinskim reagentom smo uporabili intaktno RNA (kar smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom), izolirano iz celic HOS, pripravljenih z direktno lizo. 1  $\mu\text{g}$  RNA smo neposredno dodali 0,25-odstotni tripsinski reagent. Preizkusili smo različne volumne tripsinskega reagenta (5, 10, 17  $\mu\text{L}$ ) in različne čase inkubacije (0, 5, 15 min). Kot kontrolo smo uporabili vodo brez RNaz. Vzorce smo po inkubaciji analizirali z elektroforezo na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

Da bi preprečili delovanje RNaz, smo nekaterim vzorcem pred dodatkom tripsinskega reagenta dodali po 0,5  $\mu\text{L}$  RNaznega inhibitorja skupaj s 4  $\mu\text{L}$  ustreznega reakcijskega pufra iz reagenčnega kompleta za sintezo cDNA (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit). Vzorce smo po inkubaciji analizirali z elektroforezo na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

Podobno kot pri tretiranju celic z inaktiviranim tripsinom smo tudi RNA inkubirali z 0,25-odstotnim tripsinskim reagentom z 0,12 odstotki natrijevega hipoklorita. Natrijev hipoklorit smo tripsinskemu reagentu dodali 30 min pred inkubacijo z RNA. Vzorce smo po inkubaciji analizirali z elektroforezo na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom. Enak poskus smo izvedli s 15  $\mu\text{g}$  RNA, le da smo po inkubaciji RNA z inaktiviranim tripsinskim reagentom RNA ponovno oborili z izopropanolom po enakem postopku kot pri izolaciji RNA iz celic (3.3.2). RNA smo nato analizirali z elektroforezo na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

## **3.4 Analiza izražanja genov**

### **3.4.1 Reverzna transkripcija**

Za reverzno transkripcijo smo uporabili reagenčni komplet Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. Reverzno transkripcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca:

1. Vse reagente smo pred uporabo odmrznili in centrifugirali, med postopkom pa smo jih hranili na ledu.
2. Pripravili smo 10-mikrolitrske alikvote RNA s koncentracijo 150 ng/ $\mu$ L za 3 vzorce, pri katerih smo kot postopek priprave celic pred izolacijo RNA uporabili tripsinizacijo (HOS T1, HOS T2 in HOS T3) in 3 vzorce, kjer smo uporabili direktno lizo (HOS O1, HOS O2 in HOS O3). Za redčenje RNA smo uporabili vodo brez RNaz.
3. V sterilni mikrocentrifugirki za PCR smo pripravili mešanico RNA in oligonukleotidnih začetnikov za vsak vzorec posebej:

**Preglednica 1.** Priprava mešanice RNA in oligonukleotidnih začetnikov za reverzno transkripcijo.

Sestavina	Volumen	končna koncentracija
Celokupna RNA s koncentracijo 150 ng/ $\mu$ L	10 $\mu$ L	1,5 $\mu$ g celokupne RNA*
Oligo(dT) <sub>18</sub> oligonukleotidni začetniki	1 $\mu$ L	2,5 $\mu$ mol/L
Naključni heksamerni oligonukleotidni začetniki	2 $\mu$ L	60 $\mu$ mol/L
Skupni volumen	13 $\mu$ L	

\*reagenčni komplet omogoča prepis 10 ng–5  $\mu$ g RNA

4. Mešanico RNA in oligonukleotidnih začetnikov smo denaturirali s segrevanjem pri 65 °C 10 min v termobloku z ogrevanim pokrovom in nato mikrocentrifugirke ohladili na ledu.
5. Pripravili smo reakcijsko mešanico po spodnji shemi in dodali 7  $\mu$ L reakcijske mešanice v vsak vzorec.

**Preglednica 2.** Priprava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo.

Sestavina	Volumen	končna koncentracija
Reakcijski puffer - 5-kratna koncentracija	4 $\mu$ L	1-kratna (8 mmol/L MgCl <sub>2</sub> )
RNazni inhibitor	0,5 $\mu$ L	20 U
Mešanica deoksinukleotidov	2 $\mu$ L	1 mmol/L vsak
Reverzna transkriptaza	0,5 $\mu$ L	10 U
<b>Skupni volumen</b>	<b>7 <math>\mu</math>L</b>	

6. vzorce smo previdno premešali s pipetiranjem, centrifugirali in vstavili mikrocentrifugirke v ciklični termoblok z ogrevanim pokrovom.

7. Inkubirali smo jih 10 min pri 25 °C in 60 min pri 50 °C.
8. Reverzno transkriptazo smo inaktivirali s segrevanjem na 85 °C 5 min, nato smo mikrocentrifugirke položili na led ter vzorce shranili pri –20 °C do naslednjega dne.

### 3.4.2 qPCR

1. Za pripravo standardov smo uporabili manjši delež treh vzorcev cDNA s koncentracijo 150 ng/μL v enakih razmerjih. Standarde smo serijsko redčili do koncentracij 5 ng/μL, 2,5 ng/μL, 1,25 ng/μL, 0,625 ng/μL in 0,313 ng/μL in jih uporabili za umeritveno krivuljo.
2. Vzorce cDNA smo redčili na koncentracijo 2,50 ng/μL.
3. Pripravili smo reakcijsko mešanico za PCR po naslednji shemi:

**Preglednica 3.** Priprava reakcijskih mešanic s SYBR Select izhodiščno zmesjo.

Sestavina	<i>GAPDH, GUSB, RPLP0</i>	<i>ACTB, B2M, RPL13A, TBP</i>
Voda (stopnje čistosti za PCR)	1,6 μL	2,35 μL
Smerni oligonukleotidni začetniki	0,45 μL	0,075 μL
Protismerni oligonukleotidni začetniki	0,45 μL	0,075 μL
SYBR Select 2-kratna koncentracija	7,5 μL	7,5 μL
<b>Skupni volumen</b>	<b>10 μL</b>	<b>10 μL</b>

4. Za pripravo reakcijske mešanice smo uporabili oligonukleotidne začetnike s koncentracijo 600 nmol/L za gene *RPLP0*, *GAPDH* in *GUSB* ter oligonukleotidne začetnike s koncentracijo 100 nmol/L za gene *ACTB*, *B2M*, *TBP*, in *RPL13A*, ter SYBR Select izhodiščno zmes.
5. Uporabljene oligonukleotidne začetnike smo načrtovali s pomočjo programa Primer-BLAST ali pa zaporedje pridobili v literaturi. Zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov so prikazana v preglednici 4.

**Preglednica 4.** Zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov.

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje 5'-3'	Vir
<i>ACTB</i> smerni	CTTCGCGGGCGACGAT	Načrtovan
<i>ACTB</i> protismerni	AATCCTTCTGACCCATGCCC	
<i>B2M</i> smerni	AGATGAGTATGCCTGCCGTG	Načrtovan
<i>B2M</i> protismerni	GCGGCATCTTCAAACCTCCA	
<i>GAPDH</i> smerni	TGCACCACCAACTGCTTAGC	(43)
<i>GAPDH</i> protismerni	TGGCATGGACTGTGGTCATG	
<i>GUSB</i> smerni	GGCTCCGAATCACTATCGCC	Načrtovan
<i>GUSB</i> protismerni	CCTTGGGATACTTGGAGGTGT	
<i>RPL13A</i> smerni	AAAAAGCGGATGGTGGTTC	(44)
<i>RPL13A</i> protismerni	CTTCCGGTAGTGGATCTTGG	
<i>RPLP0</i> smerni	TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT	Načrtovan
<i>RPLP0</i> protismerni	CAATCTGCAGACAGACACTGG	
<i>TBP</i> smerni	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	Načrtovan
<i>TBP</i> protismerni	CACATCACAGCTCCCCACCA	

6. Na ploščico za analizo z analizatorjem Light Cycler 480 s 384 luknjicami smo napipetirali reakcijsko mešanico (10 µL/vdolbinico).
7. V reakcijsko mešanico na ploščici smo dodali vzorce in standarde (5 µL/vdolbinico) v triplikatih.
8. Ploščico smo pokrili z Light Cycler 480 folijo in jo centrifugirali 5 min pri 2300 RPM.
9. Ploščico smo vstavili v analizator Light Cycler 480 in nastavili programe:

**Preglednica 5.** Temperaturni program za analizo izražanja gena *RPL13A*.

Korak	Temperatura	Čas	Cikli
Pre-inkubacija	50 °C	2 min	/
	95 °C	2 min	
Amplifikacija	95 °C	15 s	45 ciklov
	56 °C	15 s	
	72 °C	1 min	
Talilna krivulja	95 °C	5 s	/
	65 °C	1 min	
	97 °C	kontinuirano	
Ohlajanje	40 °C	30 s	/

**Preglednica 6.** Temperaturni program za analizo izražanja genov *NAPDH*, *RPLP0*, *GUSB*, *ACTB*, *TBP* in *B2M*.

Korak	Temperatura	Čas	Cikli
Pre-inkubacija	50 °C	2 min	/
	95 °C	2 min	
Amplifikacija	95 °C	15 s	45 ciklov
	60 °C	1 min	
Talilna krivulja	95 °C	5 s	/
	65 °C	1 min	
	97 °C	kontinuirano	
Ohlajanje	40 °C	30 s	/

### 3.4.3 Analiza rezultatov qPCR

Po končani reakciji qPCR smo preverili specifičnost produktov s pomočjo talilnih krivulj. Pregledali smo odstopanja med triplicati za vsak vzorec. V kolikor je ena izmed meritev močno odstopala od ostalih dveh, smo jo izločili in za nadaljnjo analizo uporabili le meritvi v duplikatu. Za analizo smo uporabili koncentracije, ki smo jih pridobili na podlagi umeritvene krivulje.

#### 3.4.3.1 Normalizacija

S pomočjo programa NormFinder smo izmed sedmih analiziranih genov izbrali gen, ki se najbolj stabilno izraža. To je bil *GAPDH*, zato smo ga uporabili kot referenčni gen. Normalizirane koncentracije smo izračunali tako, da smo koncentracijo določenega gena za posamezen vzorec delili s koncentracijo *GAPDH* za isti vzorec.

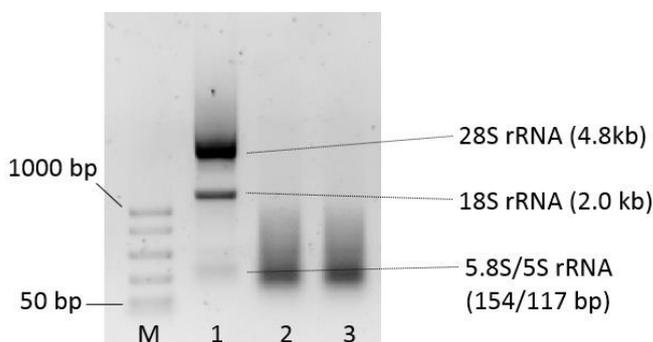
#### 3.4.3.2 Statistična analiza

Statistično analizo smo izvedli s programom IBM SPSS Statistics 22. S F-testom smo preverili enakost varianc. S T-testom z dvostranskim 5-odstotnim tveganjem ( $\alpha = 0,05$ ) smo nato preverili, ali se vzorci z visoko integriteto RNA in vzorci z nizko integriteto RNA med seboj statistično značilno razlikujejo glede na normalizirano koncentracijo za določen gen.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Vpliv rutinske tripsinizacije na integriteto izolirane RNA

Na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo smo pri delu s celicami HOS ugotovili, da je iz celic izolirana RNA močno razgrajena, kadar pred izolacijo RNA celice tripsiniziramo. To je razvidno z agaroznega gela z natrijevim hipokloritom, kjer pri dveh vzorcih, kjer smo celice pred izolacijo RNA tripsinizirali, vidimo eno samo razpotegnjeno liso, ki je znak razgrajene RNA. Nasprotno pa pri prvem vzorcu vidimo tri značilne lise, ki predstavljajo 28S, 18S in 5,8S/5S rRNA in kažejo na visoko integriteto RNA (slika 7).



**Slika 7.** Vpliv rutinske tripsinizacije na integriteto izolirane RNA.

Rutinska tripsinizacija (2, 3) je povzročila razgradnjo RNA, zato na agaroznem gelu ne vidimo treh značilnih lis, ki kažejo na visoko integriteto RNA. Za kontrolo smo uporabili RNA z visoko integriteto (1). Tukaj so vidne tri značilne lise. Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

Izkušnje več raziskovalcev sicer kažejo, da tripsinizacija lahko povzroči razgradnjo RNA, vendar v literaturi nismo zasledili podatkov o vplivu tripsinizacije na integriteto RNA niti o možnih mehanizmih razgradnje RNA med tripsinizacijo. Tripsinizacija je sicer ustaljen postopek, primeren za disociacijo večine adherentnih celičnih linij s površine gojilnih posod (12, 13). Viabilnost celic po tripsinizaciji je običajno visoka, zato ATCC, European Collection of Cell Cultures (ECACC) (45) in številni proizvajalci reagentov, ki se uporabljajo za delo s celičnimi kulturami, za presajanje adherentnih celic priporočajo uporabo tripsina (16, 45-47). Nekateri proizvajalci reagenčnih kompletov za izolacijo RNA priporočajo tripsinizacijo tudi za pripravo adherentnih celic pred izolacijo RNA v primerih, ko jih gojimo v ploskih gojilnih steklenicah (ang. flask) (48). Znano je, da lahko tripsin zaradi svoje proteolitične aktivnosti poškoduje proteine na površini celice in tudi celično membrano, če je njegova koncentracija previsoka ali pa so mu celice predolgo izpostavljene (49). Vendar pa je malo verjetno, da bi tripsin s svojo proteolitično aktivnostjo poškodoval

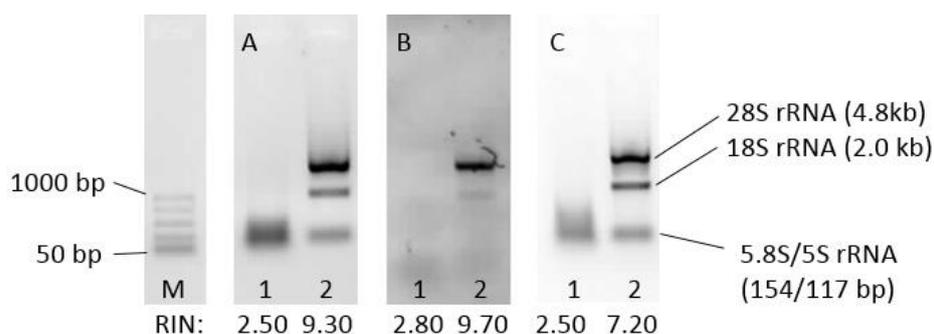
nukleinske kisline, zlasti zato, ker se pri presajanju celic ni izkazalo, da bi tripsin deloval citotoksično. Viabilnost celic pri presajanju je pri delu s celicami HOS vedno presegala 90 odstotkov, kar smo vrednotili z barvanjem celic s tripanom (rezultati niso prikazani). Poleg tega izolacija RNA iz celičnih linij ne velja za problematično, zlasti v primerjavi z izolacijo RNA iz svežih tkiv in tkiv, vklopljenih v parafin.

V več študijah so pokazali, da integriteta RNA pomembno vpliva na zanesljivost rezultatov qPCR (36-41). Opažanja pri delu s celicami HOS na Fakulteti za farmacijo kot tudi opažanja drugih raziskovalcev, da tripsinizacija lahko povzroči razgradnjo RNA, predvsem pa odsotnost informacij o tem v literaturi, so nas vzpodbudili, da sistematično pristopimo k problemu. Naš primarni cilj je bil najti ustrezno metodo za pripravo celic pred izolacijo RNA, ki bo omogočila izolacijo intaktne visoko kakovostne RNA. Zanimal nas je tudi mehanizem, odgovoren za opaženo razgradnjo RNA med tripsinizacijo in vpliv nizke integritete RNA, ki je posledica tripsinizacije, na zanesljivost analize izražanja genov, ki se v našem laboratoriju pogosto uporabljajo kot referenčni geni.

#### **4.1.1 Vpliv pasaže in stopnje diferenciacije celic na integriteto izolirane RNA**

Najprej smo želeli ugotoviti, ali je stabilnost RNA odvisna od celične pasaže in stopnje diferenciacije celic. Znano je namreč, da se celice iste vrste z različno pasažo lahko razlikujejo med seboj po morfologiji, hitrosti proliferacije, metabolni aktivnosti, izražanju genov in drugih lastnostih (50). Poleg tega lahko na fenotip celice močno vpliva njihova stopnja diferenciacije. Celično linijo HOS lahko vzpodbudimo k diferenciaciji v dva različna tipa celic, diferencirane osteoblaste, ki izločajo organski matriks, in adipocite, ki vsebujejo maščobne kapljice (51).

Da bi proučili možno povezavo med razgradnjo RNA in pasažo celic ter stopnjo diferenciacije celic, smo testirali celice z nizko (8.) in visoko (23.) pasažo ter diferencirane celice HOS v 9. pasaži. V vseh treh primerih je tripsinizacija, ki jo sicer rutinsko uporabljamo za presajanje celic (3.2.3), povzročila popolno razgradnjo RNA, kar na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom vidimo kot eno samo razpotegnjeno liso (slika 8). S poskusi smo torej pokazali, da pasaža in stopnja diferenciacije ne vplivata na občutljivost celic na razgradnjo RNA med tripsinizacijo.



**Slika 8.** Vpliv pasaže in stopnje diferenciacije celic na integriteto izolirane RNA po tripsinizaciji in direktni lizi.

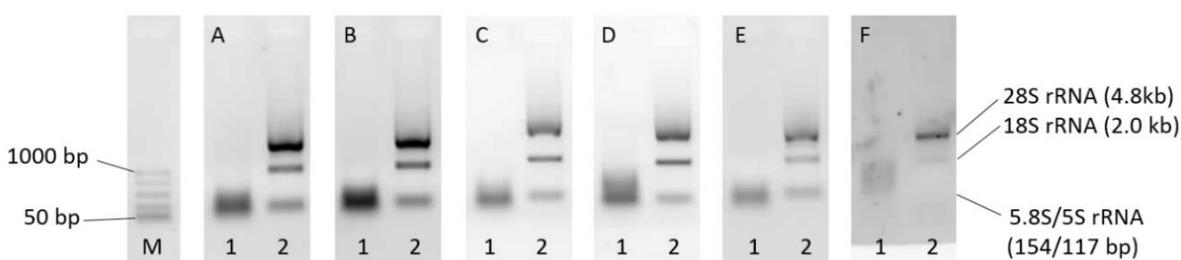
Tripsinizacija (1) pred izolacijo RNA je povzročila razgradnjo RNA, medtem ko se je pri direktni lizi (2) integriteta RNA ohranila pri celicah HOS z nizko (A) in visoko pasažo (B) ter tudi pri diferenciranih celicah HOS (C). Pri vseh vzorcih na sliki je bila določena tudi vrednost RIN, ki kaže, da rezultati, pridobljeni z analizatorjem in agarozno elektroforezo, dobro korelirajo. V vseh treh primerih ima razgrajena RNA nizko vrednost RIN (2,50, 2,80 in 2,50), intaktna RNA pa visoko vrednost RIN (9,30, 9,70 in 7,20). Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom in z analizatorjem 2100 Bioanalyzer.

Integriteto RNA, izolirane iz celic HOS z nizko in visoko pasažo ter iz diferenciranih celic HOS, smo analizirali tako z elektroforezo na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom kot z analizatorjem 2100 Bioanalyzer, s pomočjo katerega dobimo informacije o koncentraciji, velikosti in integriteti analizirane RNA, vključno z RIN vrednostjo. Pri izračunu RIN vrednosti, ki številčno opredeljuje integriteto RNA, se upoštevajo podatki celotnega elektroferograma, ne le razmerje med intenziteto elektroforeznih lis 18S in 28S rRNA. Maksimalni RIN je 10 in označuje intaktno RNA. Nižji kot je izmerjen RIN, slabša je integriteta analizirane RNA (52). Vzorci RNA z RIN vrednostjo, večjo od 8, veljajo za kakovostne vzorce z visoko integriteto, medtem ko so vzorci z RIN vrednostjo, manjšo od 5, neprimerni za analizo izražanja genov. RIN vrednosti med 5 in 8 predstavljajo delno razgrajeno RNA (53). Na podlagi primerjave rezultatov obeh analiz (Slika 8) smo ugotovili, da lahko integriteto RNA enostavno in cenovno učinkovito preverjamo z uporabo elektroforeze RNA na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom in zato ne potrebujemo dragih analizatorjev, ki temeljijo na mikrofluidni tehnologiji in so mnogim laboratorijem zaradi cene nedostopni.

#### 4.1.2 Vpliv celične linije na integriteto izolirane RNA

V nadaljevanju smo želeli preveriti, ali pride do razgradnje RNA med tripsinizacijo le pri celični liniji HOS ali je pojav bolj splošen in značilen za več različnih celičnih linij. V ta

namen smo testirali še 5 drugih celičnih linij (Caco2, PC3, HepG2, SW 1353 in MCF7), ki izvirajo iz različnih človeških tkiv in se v našem laboratoriju uporabljajo za raziskave. Rezultati so pokazali, da se testirane linije med seboj ne razlikujejo v občutljivosti na razgradnjo RNA med tripsinizacijo, saj je v vseh primerih prišlo do razgradnje RNA (slika 9). S tem smo pokazali, da problem, s katerim smo se soočili pri delu na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo, ni omejen zgolj na raziskave, ki se pri nas ali drugje izvajajo na celicah HOS. Rezultati naše raziskave so zato pomembni za širšo množico raziskovalcev, katerih raziskave temeljijo na uporabi adherentnih celičnih linij in analizi RNA.



**Slika 9.** Integriteta RNA, izolirane iz različnih celičnih linij po tripsinizaciji in direktni lizi.

Tripsinizacija (1) pred izolacijo RNA je povzročila popolno razgradnjo RNA, medtem ko se je pri direktni lizi celic (2) integriteta RNA ohranila pri vseh testiranih celičnih linijah – HOS (A), Caco2 (B), PC3 (C), HepG2 (D), SW 1353 (E) in MCF7 (F). Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

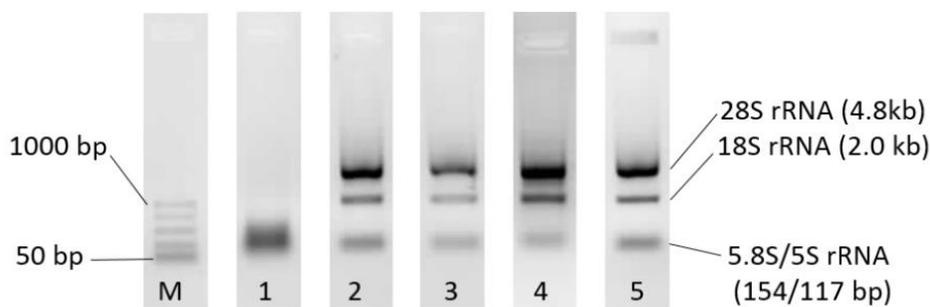
## 4.2 Vpliv alternativnih metod priprave celic na integriteto izolirane RNA

Da bi našli ustrezno metodo za pripravo celic, ki nam bo omogočila izolacijo intaktne, visoko kakovostne RNA, smo za pripravo celic pred izolacijo RNA uporabili 5 različnih metod:

- tripsinizacijo,
- direktno lizo celic,
- strganje celic,
- spontano disociacijo celic s temperaturno odzivne površine in
- disociacijo celic z nadomestkom tripsina.

Na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom smo zaznali eno razpotegnjeno liso, ki je znak razgrajene RNA, pri tripsinizaciji, tri značilne lise (28S, 18S in 5,8/5S), ki kažejo na visoko integriteto RNA, pa pri uporabi vseh ostalih metod (slika 10). Pri našem delu se je direktna

liza celic izkazala za časovno najmanj potratno ter cenovno najbolj učinkovito metodo, zato smo se odločili, da bomo v nadaljnjih poskusih v našem laboratoriju za pripravo celic pred izolacijo RNA uporabljali direktno lizo. Negativen vpliv tripsinizacije v primerjavi z direktno lizo celic smo opazili tudi pri vseh ostalih testiranih celičnih linijah (slika 9).



**Slika 10.** Vpliv alternativnih metod priprave celic na integriteto izolirane RNA.

Tripsinizacija (1) pred izolacijo RNA je povzročila popolno razgradnjo RNA, medtem ko se je integriteta RNA ohranila pri vseh ostalih metodah priprave celic – direktna liza celic (2), strganje celic (3), spontana disociacija s temperaturno odzivne površine (4) in disociacija z nadomestkom tripsina (5). Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

### 4.3 Mehanizem razgradnje RNA med tripsinizacijo

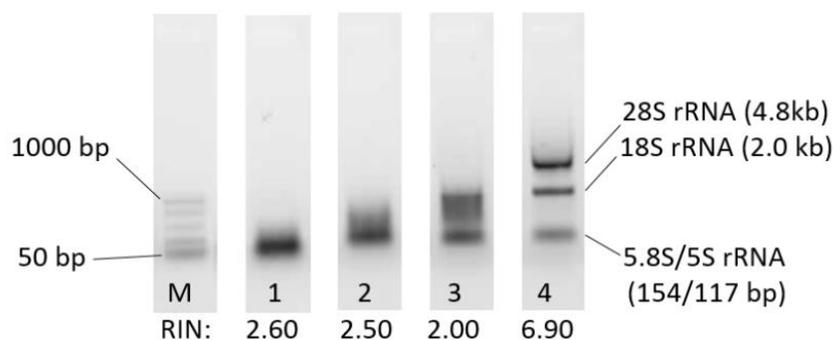
V nadaljevanju smo želeli odkriti mehanizem, odgovoren za opaženo razgradnjo RNA med postopkom tripsinizacije. Predvideli smo več možnih mehanizmov. Znano je, da encimi s proteazno aktivnostjo lahko poškodujejo membranske proteine in celično membrano (49). Te poškodbe bi med tripsinizacijo lahko povzročile aktivacijo znotrajceličnih inducibilnih RNaz ter posledično razgradnjo RNA v prizadetih celicah (7). Pri primerjavi tripsinskih reagentov različnih proizvajalcev (priloga 1) smo ugotovili, da se le-ti med seboj razlikujejo le po obliki (raztopina ali prah) ter v primeru raztopin po koncentraciji in natančni sestavi pufru (prisotnost EDTA, različne soli, fenol rdeče), skoraj vsi pa so pridobljeni iz govejega ali prašičjega pankreasa. Ker je tkivo pankreasa izjemno bogato z RNazami, potencialno vsi reagenti s tripsinom, izoliranim iz govejega ali prašičjega pankreasa, vsebujejo RNaze (6). Ker RNaze lahko vstopijo v celice s pomočjo endocitoze, lahko pride med tripsinizacijo do razgradnje RNA tudi z eksogenimi RNazami (10).

### **4.3.1 Vpliv proteazne aktivnosti tripsina na integriteto izolirane RNA**

Že uporaba TrypLE reagenta, ki služi kot nadomestek tripsina, je pokazala, da sama proteazna aktivnost najverjetneje ni odgovorna za razgradnjo RNA. TrypLE reagent vsebuje encim rekombinantnega izvora s proteazno aktivnostjo, ki cepi peptidne vezi na C-terminalnem koncu lizina in arginina in se uporablja kot direkten nadomestek tripsina. Izdeluje ga isti proizvajalec kot tripsinski reagent, ki ga v našem laboratoriju uporabljamo za rutinsko presajanje celic. Za disociacijo celic z obema reagentoma smo uporabili popolnoma enak protokol, kot to priporoča proizvajalec. Oba reagenta sta bila enako učinkovita, kar se tiče disociacije celic s površine gojilnih posod, njun vpliv na integriteto RNA pa je bil popolnoma različen. Medtem ko je tripsin povzročil razgradnjo RNA, TrypLE reagent ni imel opaznega vpliva na integriteto izolirane RNA (slika 10). Ker TrypLE reagent ni živalskega izvora, manj verjetneje vsebuje RNaze. Na podlagi zgornjih rezultatov lahko zato sklepamo, da so za razgradnjo RNA med tripsinizacijo najverjetneje odgovorne RNaze, prisotne v tripsinskem reagentu, ne pa proteazna aktivnost tripsina. Ugotovitev smo v nadaljevanju želeli potrditi z dodatnimi eksperimenti.

#### **4.3.1.1 Vpliv redčenja tripsinskega reagenta na integriteto izolirane RNA**

V laboratoriju na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo se za rutinsko presajanje celic po priporočilih ATCC uporablja 0,25-odstotni tripsin (42). Tudi proizvajalci določenih reagenčnih kompletov za izolacijo RNA priporočajo za pripravo celic pred izolacijo RNA uporabo tripsina v koncentracijah med 0,1 in 0,25 % (48). Predolga izpostavitve in previsoka koncentracija tripsina lahko namreč povzročita poškodbo celičnih membran in posledično smrt celic, kar lahko močno zmanjša viabilnost celic pri presajanju (54). Da bi ugotovili, ali koncentracija tripsina vpliva na integriteto izolirane RNA, smo za tripsinizacijo celic HOS uporabili različne redčitve reagenta, ki ga sicer rutinsko uporabljamo za presajanje celic, ter po tripsinizaciji izolirali RNA. S padajočo koncentracijo tripsina je integriteta RNA naraščala do te mere, da razgrajenosti na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom ni bilo več mogoče zaznati (slika 11).



**Slika 11.** Vpliv koncentracije tripsina na integriteto izolirane RNA.

RNA, izolirana po pripravi celic z uporabo 0,25-odstotnega tripsina (1), 0,05-odstotnega tripsina (2), 0,01-odstotnega tripsina (3) in 0,002-odstotnega tripsina (4). Pri vseh vzorcih smo določili tudi RIN vrednosti. S padajočo koncentracijo tripsina integriteta RNA narašča. Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom in z analizatorjem 2100 Bioanalyzer.

Čeprav je s padajočo koncentracijo tripsina čas disociacije celic naraščal, je reagent pri vseh redčitvah ohranil zadostno proteazno aktivnost in čas disociacije tudi pri najbolj razredčenem reagentu ni presegel priporočenega (42) (preglednica 7).

**Preglednica 7.** Čas disociacije celic s površine gojilne posode v odvisnosti od koncentracije tripsina.

Koncentracija tripsina	Čas disociacije celic
0,25 %	3 min
0,05 %	6 min
0,01 %	6 min
0,002 %	11 min

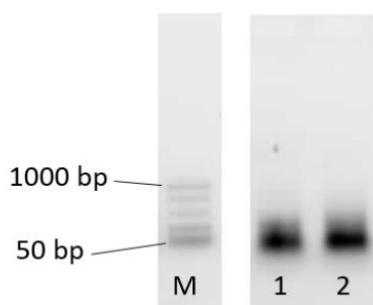
Rezultati kažejo na to, da se s padajočo koncentracijo tripsina kljub ohranjeni proteazni aktivnosti zmanjšujejo poškodbe celic, ki bi aktivirale endogene RNaze in povzročile razgradnjo RNA. Vendar pa se moramo pri interpretaciji rezultatov zavedati omejitve tega eksperimenta. Z redčenjem tripsinskega reagenta nismo redčili le tripsina, temveč tudi vse ostale sestavine reagenta. Ob upoštevanju dejstva, da je tripsinski reagent pri vseh redčitvah ohranil zadostno proteazno aktivnost za disociacijo celic, je zato povsem mogoče, da je za razgradnjo RNA odgovorna neka druga sestavina tripsinskega reagenta, katere koncentracija se pri 125-kratnem redčenju dovolj zmanjša, da povzroči bistveno manjšo razgradnjo RNA.

#### 4.3.1.2 Vpliv inaktivacije tripsinskega reagenta s FBS na integriteto izolirane RNA

Da bi lahko boljše pojasnili rezultate prejšnjega eksperimenta, smo želeli selektivno inhibirati tripsin. Za inaktivacijo tripsina smo uporabili FBS, ki vsebuje antitripsin in se tudi pri rutinskem presajanju celic uporablja za inaktivacijo tripsina po zaključeni inkubaciji (12). Inaktivacijo tripsina smo preverili z ločenim poskusom. Celice na gojilni ploščici smo inkubirali s tripsinskim reagentom, ki je vseboval različne deleže FBS. Tripsin s 50 odstotki FBS v 20 minutah ni povzročil vidnih morfoloških sprememb celic niti odlepljanja celic s površine gojilne posode (preglednica 8), zato smo se odločili, da v nadaljevanju celice HOS, ki so bile predhodno postrgane in centrifugirane, inkubiramo s tripsinskim reagentom s 50 odstotki FBS. Kot kontrolo smo uporabili celice HOS, inkubirane z ustrežno razredčenim tripsinskim reagentom. Ne glede na proteazno aktivnost tripsina smo v obeh primerih opazili popolno razgradnjo RNA (slika 12).

**Preglednica 8.** Morfološki pregled celic, tretiranih z mešanico tripsinskega reagenta in FBS.

	delež FBS v mešanici	3 min	6 min	10 min	20 min
1	0 %	Večina celic se je že odlepila od podlage.	Vse celice so se že odlepile od podlage.	Vse celice so se že odlepile od podlage.	Vse celice so se že odlepile od podlage.
2	12 %	Vse celice so bile še pritrjene, vidne pa so bile morfološke spremembe, povezane z disociacijo celic.	Nekaj celic se je že odlepilo od podlage.	Večina celic se je že odlepila od podlage.	Vse celice so se že odlepile od podlage.
3	25 %	Vse celice so bile še pritrjene, videti ni bilo nobenih morfoloških sprememb.	Vse celice so bile še pritrjene, videti ni bilo nobenih morfoloških sprememb.	Vse celice so bile še pritrjene, videti ni bilo nobenih morfoloških sprememb.	Vse celice so bile še pritrjene, videti ni bilo nobenih morfoloških sprememb.
4	50 %	Vse celice so bile še pritrjene, videti ni bilo nobenih morfoloških sprememb.	Vse celice so bile še pritrjene, videti ni bilo nobenih morfoloških sprememb.	Vse celice so bile še pritrjene, videti ni bilo nobenih morfoloških sprememb.	Vse celice so bile še pritrjene, videti ni bilo nobenih morfoloških sprememb.



**Slika 12.** Vpliv proteazne aktivnosti tripsina na integriteto izolirane RNA.

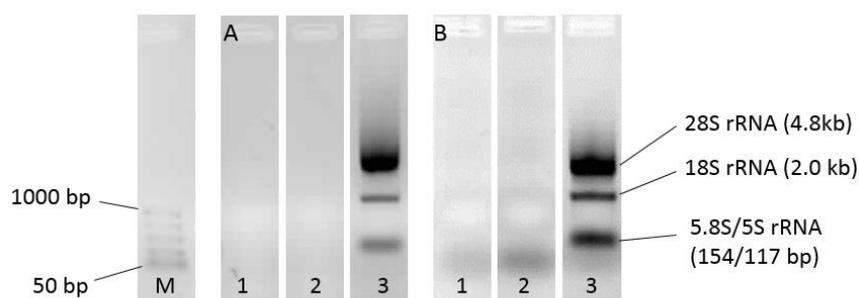
RNA, izolirana po inkubaciji celic z 0,125-odstotnim tripsinom (1), in s FBS inaktiviranim tripsinom (2). Reagent je povzročil popolno razgradnjo RNA, ne glede na proteazno aktivnost. Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

Na podlagi rezultatov smo zaključili, da proteazna aktivnost tripsina ni odgovorna za razgradnjo RNA med tripsinizacijo, zato smo pozornost preusmerili na eksogene RNaze.

### **4.3.2 Prisotnost RNaz v tripsinskem reagentu**

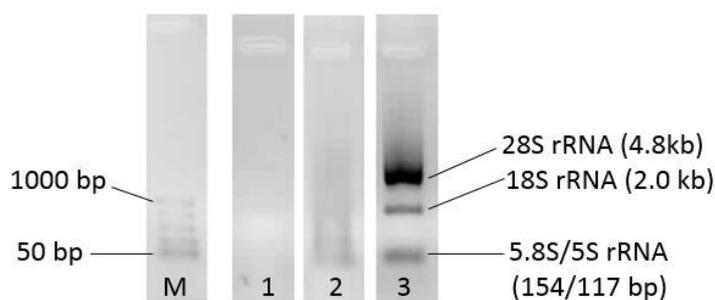
#### **4.3.2.1 Integriteta RNA po tretiranju predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom**

Da bi ugotovili, ali so v tripsinskem reagentu RNaze prisotne v takšni koncentraciji, ki omogoča razgradnjo RNA, smo intaktno RNA, izolirano iz celic HOS, ki so bile pripravljene z direktno lizo, inkubirali z 0,25-odstotnim tripsinskim reagentom. Analiza integritete RNA z elektroforezo je pokazala razgradnjo RNA, ne glede na čas inkubacije in volumen tripsinskega reagenta (slika 13).



**Slika 13.** Integriteta RNA po tretiranju predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom. V prvem eksperimentu (A) smo uporabili 1  $\mu\text{g}$  RNA in dodali 17  $\mu\text{L}$  0,25-odstotnega tripsinskega reagenta. Mešanico smo nanegli na gel takoj (A1) oziroma po 15-minutni inkubaciji (A2). V drugem eksperimentu (B) smo uporabili 1  $\mu\text{g}$  RNA in dodali 5  $\mu\text{L}$  (B1) oziroma 10  $\mu\text{L}$  (B2) 0,25-odstotnega tripsinskega reagenta. Mešanici smo inkubirali 5 min pri sobni temperaturi in ju nanegli na gel. Inkubacija RNA s tripsinskim reagentom je povzročila razgradnjo RNA ne glede na čas inkubacije in volumen tripsinskega reagenta. Pri vzorcih A3 in B3 smo namesto tripsinskega reagenta uporabili vodo brez RNaz. Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

Rezultati kažejo na to, da tripsinski reagent vsebuje RNaze, ki povzročijo razgradnjo RNA. Da bi to potrdili, smo tripsinskemu reagentu pred inkubacijo z RNA dodali RNazni inhibitor. Uporabili smo inhibitor iz reagenčnega kompleta za reverzno transkripcijo. Inhibitor ni popolnoma preprečil razgradnje RNA, je pa bila razgradnja v prisotnosti inhibitorja nekoliko manjša kot v njegovi odsotnosti (slika 14).

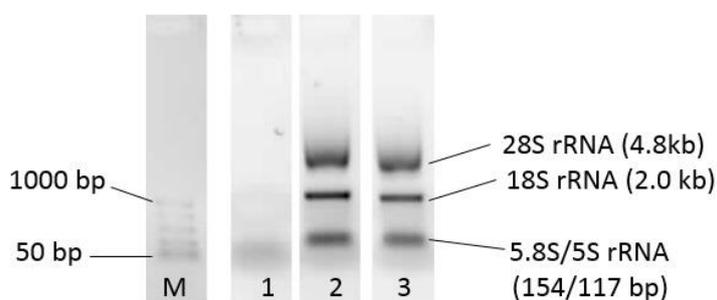


**Slika 14.** Integriteta RNA po tretiranju predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom v prisotnosti RNaznega inhibitorja.

Uporabili smo 1  $\mu\text{g}$  RNA in dodali 10  $\mu\text{L}$  0,25-odstotnega tripsinskega reagenta brez (1) oziroma z (2) RNaznim inhibitorjem. Pri vzorcu 3 smo namesto tripsinskega reagenta uporabili vodo brez RNaz. Zmesi smo inkubirali 5 min pri ST in jih nanegli na gel. Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

Vzrok za nepopolno inhibicijo RNaz, ki so domnevno prisotne v tripsinskem reagentu, je lahko v sami strukturi uporabljenega inhibitorja. Uporabili smo proteinski inhibitor, ki je med inkubacijo s tripsinom zaradi njegove proteazne aktivnosti podvržen razgradnji. V nadaljevanju smo zato tripsinskemu reagentu pred inkubacijo z RNA dodali natrijev hipoklorit, ki sicer tudi pri gelski elektroforezi z natrijevim hipokloritom preprečuje razgradnjo RNA.

Prisotnost 0,12 odstotkov natrijevega hipoklorita v tripsinskem reagentu je popolnoma ohranila integriteto RNA (slika 15). Vzrok je najverjetneje porušenje strukture RNaz in posledično njihova inhibicija.



**Slika 15.** Integriteta RNA po tretiranju predhodno izolirane intaktne RNA s tripsinskim reagentom v prisotnosti natrijevega hipoklorita.

15  $\mu$ g RNA smo 5 minut inkubirali z 0,25-odstotnim tripsinskim reagentom z 0,12 odstotki natrijevega hipoklorita (2). Nespremenjen 0,25-odstotni tripsinski reagent (1) in vodo brez RNaz (3) smo uporabili za kontrolo (3). Po inkubaciji s tripsinskim reagentom smo zmesem dodali Qiazol in ponovno izolirali RNA ter njeno integriteto analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

Vsi rezultati v tem sklopu poskusov jasno nakazujejo na to, da tripsinski reagent, ki vsebuje tripsin, izoliran iz živalskega pankreasa, vsebuje RNaze. Predvidevamo, da te RNaze vstopajo v celice s pomočjo endocitoze med postopkom tripsinizacije, nato pa povzročijo razgradnjo RNA znotraj celic (10).

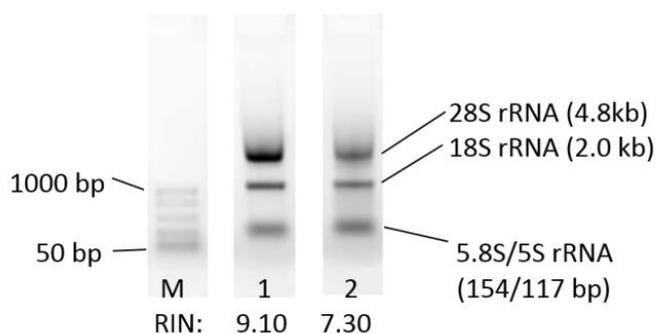
#### 4.3.2.2 Vpliv tripsinskega reagenta brez encimske aktivnosti na integriteto izolirane RNA

Čeprav smo uspeli pokazati, da so vzrok za razgradnjo RNA med tripsinizacijo najverjetneje eksogene RNaze, prisotne v tripsinskem reagentu, pa na tej stopnji ne moremo izključiti možnosti, da inaktiviran tripsin ali druge komponente tripsinskega reagenta aktivirajo

znotrajcelične RNaze in tako dodatno pripomorejo k razgradnji RNA. Da bi ugotovili, kateri mehanizem prevladuje, smo vso encimsko aktivnost tripsinskega reagenta inhibirali z dodatkom natrijevega hipoklorita, celice postrgali, centrifugirali in resuspendirali v tripsinskem reagentu brez encimske aktivnosti. Iz tretiranih celic smo izolirali RNA in preverili njeno integriteto z elektroforezo.

V prejšnjem poskusu smo s tripsinskim reagentom, obdelanim z natrijevim hipokloritom, inkubirali izolirano in očiščeno intaktno RNA. Po pričakovanjih do razgradnje RNA ni prišlo, saj smo endogene RNaze odstranili že med izolacijo in čiščenjem RNA, eksogene RNaze pa smo inaktivirali z natrijevim hipokloritom (Slika 15).

Pri poskusu, kjer smo s tripsinskim reagentom brez encimske aktivnosti inkubirali celice, smo preverjali vpliv endogenih RNaz na razgradnjo RNA med tripsinizacijo, saj smo eksogene RNaze inhibirali z natrijevim hipokloritom, endogene RNaze, ki se nahajajo znotraj celic, pa so pri tem ostale intaktne. Pri tem poskusu smo sicer zaznali vpliv tripsinskega reagenta na integriteto izolirane RNA, vendar pa je bil ta kljub prisotnosti intaktnih endogenih RNaz zelo majhen (slika 16).



**Slika 16.** Vpliv tripsinskega reagenta brez encimske aktivnosti na integriteto izolirane RNA.

RNA, izolirana po inkubaciji z gojiščem z 0,12 odstotki natrijevega hipoklorita (1) in z 0,25-odstotnim tripsinskim reagentom z 0,12 odstotki natrijevega hipoklorita (2). Natrijev hipoklorit sam po sebi ni vplival na integriteto RNA (RIN vrednost 9,1) (1), medtem ko je tripsinski reagent z 0,12 odstotki natrijevega hipoklorita povzročil le rahlo razgradnjo RNA (RIN vrednost 7,3) (2). To je razvidno tudi z agaroznega gela z natrijevim hipokloritom, saj 28S lisa v stolpcu 2 ni 2-krat bolj izrazita kot lisa 18S, poleg tega sta obe lisi v stolpcu 2 manj ostri kot v stolpcu 1. Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom in z analizatorjem 2100 Bioanalyzer.

Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da je indukcija endogenih RNaz med tripsinizacijo manj verjeten mehanizem razgradnje RNA in so tako glavni vzrok za razgradnjo RNA med tripsinizacijo RNaze, prisotne v tripsinskem reagentu, ki izvira iz živalskega pankreasa.

Pri oblikovanju sklepov, ki temeljijo na pridobljenih rezultatih, se moramo zavedati nekaterih pomembnih omejitev naše študije. Večino eksperimentov smo izvedli na eni sami celični liniji, presejalno pa smo testirali šest različnih celičnih linij, zato ne moremo izključiti možnosti, da so nekatere druge celične linije manj podvržene opaženim učinkom tripsinizacije ali pa so nanje celo odporne. Poleg tega smo v študiji uporabili le en tripsinski reagent živalskega izvora in en reagent, ki vsebuje ustrezno nadomestno rekombinantno proteazo. Čeprav večina tripsinskih reagentov vsebuje tripsin enakega izvora (prašičji pankreas), pa se proizvodni postopki različnih proizvajalcev najverjetneje razlikujejo in zato produkti različnih proizvajalcev lahko povzročijo učinke, ki se razlikujejo od učinkov, opaženih v naši raziskavi. Pomembna omejitev naše študije je tudi to, da nismo uspeli specifično dovolj učinkovito inhibirati učinka RNaz. Popolno inhibicijo RNaz smo dosegli le ob hkratni inhibiciji proteazne aktivnosti, kar pomeni, da določeni rezultati le posredno dokazujejo naše domneve. Kljub vsem omejitvam lahko zaključimo, da so, vsaj v našem primeru, za razgradnjo RNA, ki je za nadaljnje analize neuporabna, odgovorne RNaze, prisotne v tripsinskem reagentu, ki med tripsinizacijo vstopajo v celice z endocitozo in razgradijo RNA.

#### **4.4 Vpliv integritete RNA na analizo izražanja genov s qPCR**

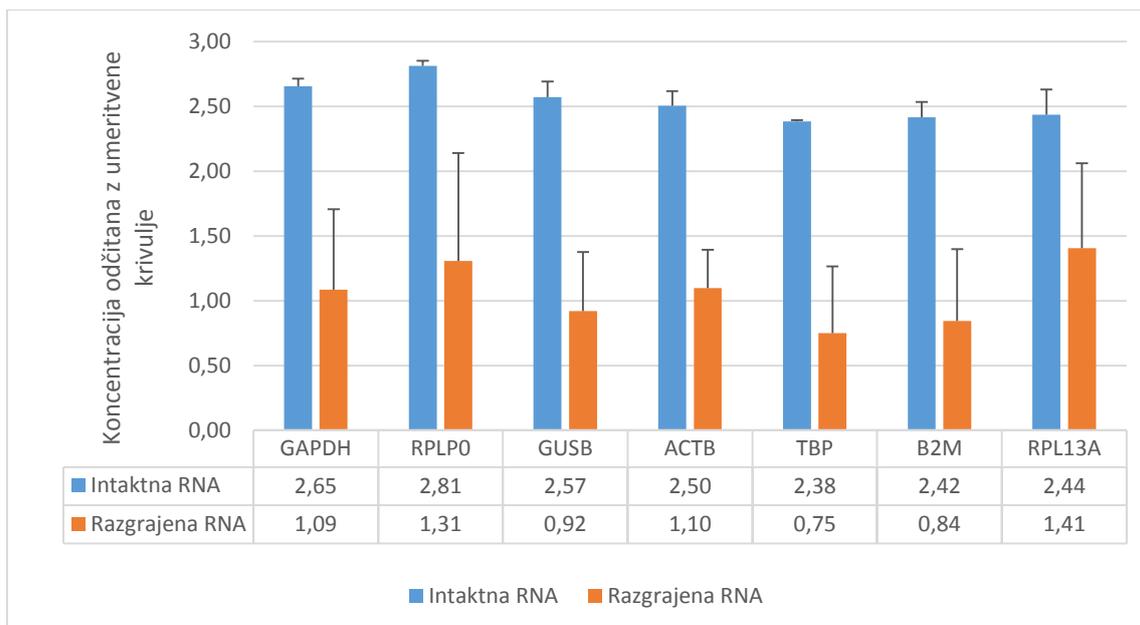
Številne raziskave v medicini in farmaciji danes temeljijo na kvantitativni analizi izražanja genov v ustreznih celičnih linijah, podvrženih različnim *in vitro* eksperimentom. Že več študij je pokazalo, da je zanesljivost takšnih analiz močno odvisna od integritete analizirane RNA. Gingrich in sodelavci so s preprostim poskusom pokazali, da integriteta RNA močno vpliva na kvantifikacijo specifičnih mRNA molekul. RNA, izolirano iz celične linije jetrnega karcinoma (HepG2), so različno dolgo inkubirali pri temperaturi 90 °C ter tako dosegli različne stopnje razgradnje RNA. Pri analizi izražanja genov *GAPDH*, *HPRT*, *β-tobulina* in *β-aktina* so ugotovili, da se pri znižanju vrednosti RQI z 9,9 na 1,5 Cq poveča za 6,8 do 9,9 cikla. RQI označuje integriteto RNA, vrednost 10 pomeni, da je RNA intaktna, vrednost 1 pa označuje močno razgrajeno RNA. Rezultati nakazujejo na to, da pri analizi močno

razgrajene RNA dobimo enake rezultate, kot če bi imeli približno 100- do 1000-krat manj mRNA molekul v izhodiščnem vzorcu. (40).

Teoretično naj bi bili normalizirani podatki, pridobljeni na vzorcih z nizko integriteto RNA, primerljivi z rezultati, pridobljenimi na vzorcih z intaktno RNA, vendar se je že v več študijah izkazalo, da normalizacija rezultatov ne reši popolnoma problema, ki izhaja iz nizke kakovosti analizirane RNA. Vermeulen in sodelavci so za analizo s qPCR uporabili 740 kliničnih vzorcev zamrznjenega tkiva pridobljenega z biopsijo tumorjev pri pacientih z nevroblastomom. Vzorce so razdelili v podskupine z visoko oziroma nizko integriteto RNA. Opazovali so vpliv integritete RNA na stabilnost izražanja referenčnih genov, na sposobnost določanja razlik v izražanju posameznih genov med dvema skupinama (z visokim in nizkim tveganjem) ter na zanesljivost klasifikacije tveganja, ki temelji na profilu izražanja več genov. Ugotovili so, da integriteta RNA vpliva na vse tri opazovane parametre, poleg tega pa rezultati študije kažejo tudi na to, da normalizacija podatkov ne more popolnoma izničiti vpliva nizke kakovosti RNA na končne rezultate, pridobljene z metodo qPCR (36).

Da integriteta RNA pomembno vpliva na stabilnost izražanja referenčnih genov, so pokazali tudi Perez-Novo in sodelavci. Ugotovili so, da so za normalizacijo rezultatov pri analizi vzorcev z intaktno RNA primerni drugi referenčni geni kot pri analizi vzorcev z razgrajeno RNA in da so torej različni referenčni geni različno občutljivi na razgradnjo. Ker moramo za normalizacijo rezultatov vedno uporabiti iste referenčne gene za vse analizirane vzorce, ne moremo zanesljivo primerjati vzorcev z visoko in nizko integriteto RNA (37).

Da bi ovrednotili vpliv nizke integritete RNA, ki je posledica tripsinizacije celic, na zanesljivost analize izražanja genov, smo pri izbranih vzorcih z metodo qPCR izmerili izražanje genov *GAPDH*, *RPLP0*, *GUSB*, *ACTB*, *TBP*, *B2M* in *RPL13A*, ki se v našem laboratoriju pogosto uporabljajo kot referenčni geni. Za analizo smo izbrali tri vzorce z visoko integriteto RNA, izolirano iz celic, ki so bile pripravljene z direktno lizo, ter tri vzorce z nizko integriteto RNA, izolirano iz celic, ki so bile podvržene tripsinizaciji. Pri vzorcih z nizko integriteto RNA smo izmerili 42–69 % nižje koncentracije mRNA za izbranih 7 genov, poleg tega je bila standardna deviacija pri vzorcih z razgrajeno RNA bistveno večja kot pri vzorcih z intaktno RNA (graf 1).

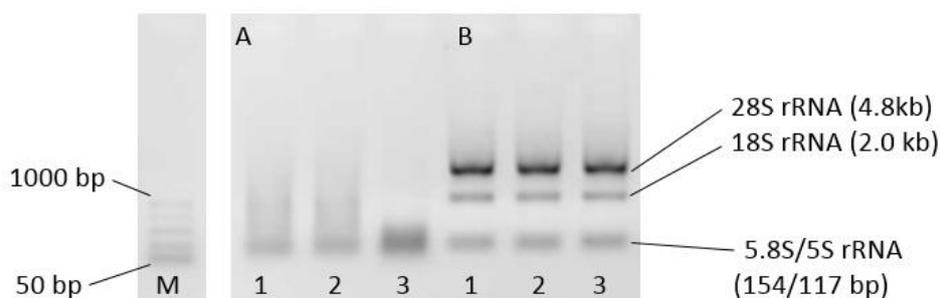


**Graf 1.** Vpliv integritete RNA na koncentracijo mRNA, odčitano z umeritvene krivulje, in na njeno standardno deviacijo.

Kljub temu, da smo pri reverzni transkripciji uporabili kombinacijo oligo(dT) nukleotidnih začetnikov in naključnih heksamerov ter s tem kar se da povečali verjetnost prepisa tarčnega zaporedja, smo pri vzorcih z razgrajeno RNA izmerili bistveno nižje koncentracije mRNA kot pri vzorcih z intaktno RNA. V primerih, ko je mRNA razgrajena, se lahko zgodi, da reverzna transkripcija z oligo(dT) oligonukleotidnimi začetniki ne doseže tarčnega zaporedja reakcije PCR, saj se prepis z oligo(dT) oligonukleotidnimi začetniki vedno prične pri poli(A) repu mRNA, kar je tudi glavna pomanjkljivost te metode. Zlasti je to problem, kadar analiziramo vzorce, ki se med seboj razlikujejo v integriteti RNA. Za transkripcijo RNA slabše integritete je zato priporočljiva uporaba naključnih heksamerov, ki se lahko vežejo na več mestih znotraj ene RNA molekule in tako v primerjavi z uporabo oligo(dT) začetnikov povečajo verjetnost prepisa tarčnega zaporedja reakcije PCR (32). Kadar želimo prepisati čim večji spekter mRNA, lahko uporabimo kombinacijo oligo(dT) in naključnih heksamernih začetnikov, kar smo naredili v našem primeru.

Skladno s podatki v literaturi tudi naši rezultati kažejo, da ima integriteta RNA velik vpliv na izmerjeno koncentracijo specifičnih mRNA z metodo qPCR. Upoštevajoč rezultate, ki smo jih pridobili z analizo 7 genov, ki se dobro izražajo, pa predvidevamo, da bi lahko pri analizi genov, ki se slabo izražajo, koncentracija mRNA zaradi razgradnje padla tudi pod mejo zaznave.

Na podlagi elektroforeze na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom smo ugotovili, da sta si 2 vzorca, ki sta bila podvržena tripsinizaciji (HOS T1 in HOS T2), zelo podobna po integriteti RNA, pri tretjem vzorcu (HOS T3) pa je integriteta slabša (slika 17). To se odraža tudi na izmerjeni koncentraciji mRNA (preglednica 9).



**Slika 17.** Integriteta RNA vzorcev, uporabljenih za analizo s qPCR.

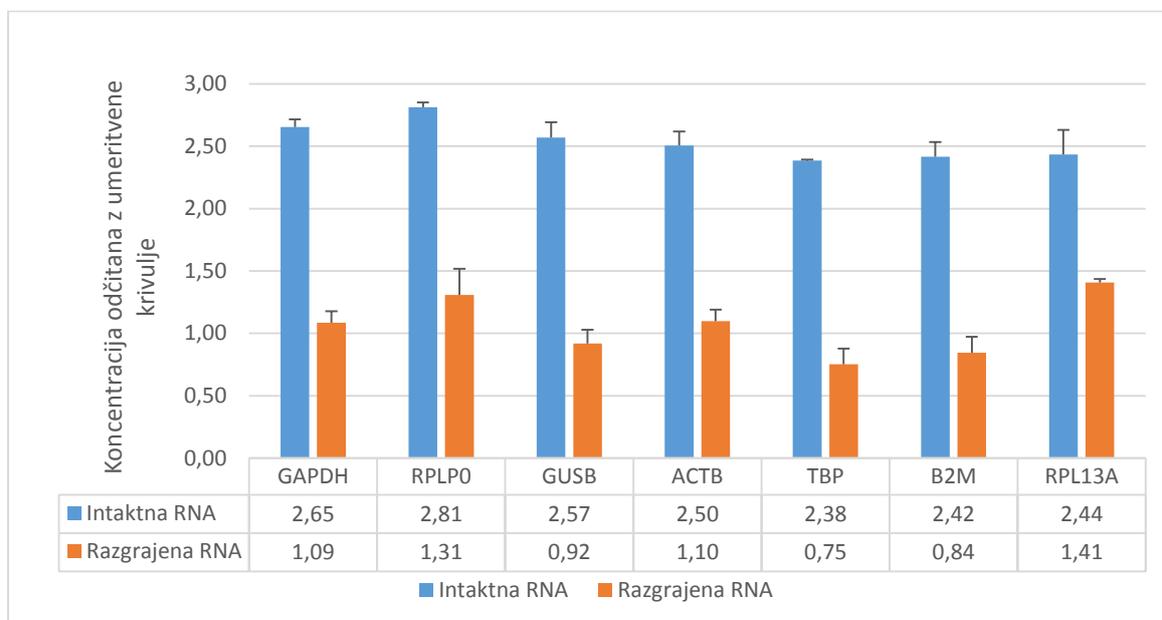
Za analizo s qPCR smo izbrali 3 vzorce z nizko integriteto (A) in 3 vzorce z visoko integriteto (B). Vzorec HOS T3 (A3) ima slabšo integriteto RNA kot vzorca HOS T1 (A1) in HOS T2 (A2), medtem ko je skupina vzorcev z visoko integriteto RNA (B1-3) bolj homogena. Integriteto RNA smo analizirali na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

**Preglednica 9.** Koncentracije specifičnih mRNA, odčitane z umeritvene krivulje pri analizi s qPCR.

<b>gen</b> <b>vzorec</b>	<i>GAPDH</i>	<i>RPLP0</i>	<i>GUSB</i>	<i>ACTB</i>	<i>TBP</i>	<i>B2M</i>	<i>RPLP13A</i>
HOS T1	1,428	1,674	1,126	1,209	0,981	1,098	1,840
HOS T2	1,614	2,095	1,347	1,393	1,233	1,359	1,899
HOS T3	0,213	0,155	0,285	0,694	0,038	0,073	0,480
povprečje HOS T	1,085	1,308	0,919	1,098	0,751	0,843	1,406
HOS O1	2,669	2,862	2,572	2,465	2,387	2,386	2,672
HOS O2	2,575	2,767	2,421	2,389	2,372	2,288	2,194
HOS O3	2,720	2,811	2,719	2,660	2,394	2,572	2,439
povprečje HOS O	2,655	2,813	2,570	2,505	2,384	2,415	2,435

Vzorec HOS T3 se po integriteti RNA razlikuje od vzorcev HOS T1 in HOS T2, čeprav so bili vsi trije podvrženi enakim postopkom od tripsinizacije celic do analize s qPCR, medtem ko so si vzorci, pripravljene z direktno lizo (HOS O1, HOS O2 in HOS O3), po integriteti RNA bolj podobni. To pomeni, da obseg razgradnje RNA, ki jo povzroči tripsinizacija, ni vedno enak, kar povečuje standardno deviacijo (razvidno tudi iz grafa 1) in zmanjšuje zanesljivost analize.

Ker smo želeli v nadaljevanju med seboj primerjati skupino vzorcev z visoko integriteto RNA in skupino vzorcev z nizko integriteto RNA, pri tem pa smo želeli, da sta skupini čim bolj homogeni, smo podatke za vzorec HOS T3 izključili iz analize. Pri tem smo opazili, da se standardna deviacija bistveno zmanjša, še vedno pa je standardna deviacija pri vzorcih z razgrajeno RNA večja kot pri vzorcih z intaktno RNA.



**Graf 2.** Vpliv integritete RNA na koncentracijo mRNA, odčitano z umeritvene krivulje, po izločitvi izstopajočega vzorca.

Da bi preverili, ali se vzorci z visoko integriteto RNA in vzorci z nizko integriteto RNA med seboj statistično značilno razlikujejo po normalizaciji izmerjenih koncentracij, smo s programom NormFinder izbrali gen, ki se najbolj stabilno izraža, in nanj normalizirali vse ostale gene, nato pa podatke statistično ovrednotili. Pri tem smo sprva v analizo vključili vseh 6 vzorcev ter ugotovili, da se vzorci z visoko in nizko integriteto RNA med seboj statistično ne razlikujejo glede na normalizirano koncentracijo za nobenega izmed analiziranih genov. Rezultate pripisujemo visoki standardni deviaciji v skupini vzorcev z nizko integriteto RNA, ki je posledica razlik v integriteti RNA znotraj skupine. Visoka standardna deviacija tako preprečuje, da bi zaznali razliko med skupinama.

Kot že omenjeno smo zato v nadaljevanju iz analize izključili vzorec HOS T3 ter ugotovili, da se vzorci z visoko integriteto RNA in vzorci z nizko integriteto RNA med seboj statistično

značilno razlikujejo glede na normalizirano koncentracijo za tri izmed šestih analiziranih genov (*GUSB*, *ACTB* in *RPL13A*).

**Preglednica 10.** Primerjava vzorcev z visoko integriteto RNA in vzorcev z nizko integriteto RNA glede na normalizirano koncentracijo za 7 izbranih genov.

Gen	p vrednost (ob upoštevanju vseh vzorcev)	p vrednost (ob izključitvi vzorca HOS T3)
<i>RPLP0</i>	0,975	0,208
<i>GUSB</i>	0,922	0,012
<i>ACTB</i>	0,468	0,032
<i>TBP</i>	0,192	0,114
<i>B2M</i>	0,238	0,063
<i>RPL13A</i>	0,194	0,021

Za statistično analizo smo uporabili T-test za neodvisne vzorce s stopnjo tveganja  $\alpha = 0,05$ .

Kljub omejitvam naše študije, ki zajemajo predvsem majhno število vzorcev, vključenih v analizo, in izredno preprost način obdelave podatkov v primerjavi z ostalimi študijami na tem področju, menimo, da rezultati zadovoljivo ponazarjajo vpliv razgradnje RNA, ki je posledica tripsinizacije celic pred izolacijo RNA, na zanesljivost analize izražanja genov z metodo qPCR. Ugotovili smo, da so geni, ki se v našem laboratoriju uporabljajo kot referenčni geni, različno občutljivi na razgradnjo, poleg tega normalizacija rezultatov ne izniči popolnoma negativnega vpliva nizke integritete RNA na končne rezultate, pridobljene s qPCR.

Na podlagi podatkov v literaturi in naših rezultatov sklepamo, da lahko analiza vzorcev z različno integriteto RNA pri raziskovalnem delu kljub normalizaciji privede do identifikacije lažnih razlik v izražanju genov med kontrolno in testno skupino, ki v resnici niso posledica spremenjenih procesov v celicah, pač pa razlik v integriteti RNA. Po drugi strani pa lahko razlike v integriteti RNA znotraj posamezne skupine povečajo variabilnost rezultatov do te mere, da ne moramo identificirati razlik med testno in kontrolno skupino, ki v resnici obstajajo. Ugotavljamo, da normalizacija ne izniči popolnoma vpliva integritete RNA na rezultate, pridobljene s qPCR.

## 5 SKLEP

Pri raziskovalnem delu smo se srečali s problemom razgrajene RNA, izolirane iz tripsiniziranih celic, zato smo sistematično pristopili k problemu in poiskali ustrezno metodo za pripravo celic, ki omogoča izolacijo intaktne, visoko kakovostne RNA.

Ugotovili smo, da tripsinizacija celic povzroči razgradnjo RNA, ki ni odvisna od pasaže in stopnje diferenciacije celic.

Testirane celične linije HOS, Caco2, PC3, HepG2, SW 1353 in MCF7 se med seboj ne razlikujejo v občutljivosti na razgradnjo RNA med tripsinizacijo. Pojav je torej značilen za več različnih celičnih linij in ni omejen na celično linijo HOS.

Preizkušene alternativne metode priprave celic: direktna liza, strganje, spontana disociacija s temperaturno odzivne površine in disociacija z nadomestkom tripsina omogočajo izolacijo intaktne, visoko kakovostne RNA.

Možna sta vsaj dva mehanizma razgradnje RNA med tripsinizacijo. Najverjetneje so v večji meri za razgradnjo RNA odgovorne eksogene RNaze, prisotne v tripsinskem reagentu, ki med tripsinizacijo vstopajo v celice z endocitozo. Pri vseh postopkih, povezanih z analizo RNA, zato svetujemo previdnost pri uporabi reagentov, ki vsebujejo kakršno koli komponento, izolirano iz živalskega pankreasa. Ne izključujemo pa možnosti, da v manjši meri razgradnjo RNA povzročajo tudi inducibilne endogene RNaze, ki jih aktivirajo komponente tripsinskega reagenta.

Nizka integriteta RNA, ki je posledica tripsinizacije celic pred izolacijo RNA, ima velik vpliv na izmerjene koncentracije mRNA vseh sedmih genov (*GAPDH*, *RPLP0*, *GUSB*, *ACTB*, *TBP*, *B2M* in *RPL13A*), ki se pri nas pogosto uporabljajo kot referenčni geni za normalizacijo rezultatov pri analizi izražanja genov s qPCR.

Normalizacija rezultatov ne izniči negativnega vpliva nizke integritete RNA na končne rezultate, pridobljene s qPCR. Razgrajena RNA, izolirana iz tripsiniziranih celic, je zato neprimerna za analizo izražanja genov z metodo qPCR.

Kot alternativno metodo priprave celic pred izolacijo RNA priporočamo direktno lizo, ki se je v našem primeru izkazala za časovno najmanj potratno ter cenovno najbolj učinkovito

metodo. Kadar se tripsinizaciji ni možno izogniti, priporočamo uporabo reagentov, ki vsebujejo rekombinanten tripsin ali druge rekombinantne proteaze. Pred začetkom eksperimentov svetujemo testiranje postopka izolacije RNA. Kot je pokazala naša študija, lahko integriteto RNA enostavno in cenovno učinkovito preverjamo z uporabo elektroforeze RNA na agaroznem gelu z natrijevim hipokloritom.

Rezultate smo objavili v reviji *Analytical Biochemistry* v članku z naslovom: *Influence of trypsinization and alternative procedures for cell preparation before RNA extraction on RNA integrity* (55).

## 6 LITERATURA

1. Boyer RF: Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 244- 333.
2. RNA. <http://en.wikipedia.org/wiki/RNA>. Dostop: 11.10.2014
3. Clark DP: Molecular Biology. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2005: 69-70.
4. Craig NL: Molecular Biology: Principles of Genome Function. Oxford University Press, Oxford, 2010: 392-394
5. Farrell RE: RNA methodologies. In: Meyers RA. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Epigenetic Regulation and Epigenomics. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2011: 12-28.
6. Sorrentino S: The eight human "canonical" ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. FEBS Lett 2010; 584 (11): 2194-200.
7. Nicholson AW: Ribonucleases. Springer Berlin Heidelberg, 2011: 115-134.
8. Life Technologies: Working with RNA: the basics. Avoiding, detecting, and inhibiting RNase. 2014. <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/files/dna-rna-purification-analysis/pdfs.par.91610.file.dat/co24813%20-%20rna%20basics1-final-high.pdf>. Dostop: 27.01.2014
9. Harder J, Schroder JM: RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. J Biol Chem 2002; 277 (48): 46779-84.
10. Chao TY, Raines RT: Mechanism of ribonuclease A endocytosis: analogies to cell-penetrating peptides. Biochemistry 2011; 50 (39): 8374-82.
11. Ferrell RE: RNA methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Academic Press, Burlington, 2005: 164-176.
12. Davis J: Animal Cell Culture : Essential Methods. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, 2011: 113-121.
13. Phelan MC: Basic techniques in mammalian cell tissue culture. Current Protocols of Cell Biology 2007; 36:1.1:1.1.1–1.1.18.
14. Worthington biochemical corporation. Trypsin. <http://www.worthington-biochem.com/TRY/>. Dostop: 15.03.2014
15. Life Technologies. Cell dissociation buffer, enzyme free, Hank's balanced salt solution. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/13150016>. Dostop: 05.04.2014
16. ATCC: ATCC Animal cell culture guide - tips and techniques for continuous cell lines. 2014. [https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture\\_Guide.pdf](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.pdf). Dostop: 16.02.104

17. Bundscherer A, Malsy M, Lange R, et al.: Cell harvesting method influences results of apoptosis analysis by annexin V staining. *Anticancer Res* 2013; 33 (8): 3201-4.
18. Kumashiro Y, Yamato M, Okano T: Cell attachment-detachment control on temperature-responsive thin surfaces for novel tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2010; 38 (6): 1977-88.
19. Nagase K, Kobayashi J, Okano T: Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering. *J R Soc Interface* 2009; 6: 293-309.
20. Vomelova I, Vanickova Z, Sedo A: Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia biologica* 2009; 55 (6): 243-51.
21. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL: Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *Electrophoresis* 2012; 33 (2): 366-9.
22. Wiczorek D, Delauriere L, Schagat T: Methods of RNA quality assessment. 2012. <http://www.promega.co.uk/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/>. Dostop: 10.05.2014
23. Life Technologies. The basics: Northern analysis. <http://www.lifetechnologies.com/rs/en/home/references/ambion-tech-support/northern-analysis/general-articles/the-basics-northern-analysis.html>. Dostop: 07.06.2014
24. Wang Z, Gerstein M, Snyder M: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009; 10 (1): 57-63.
25. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al.: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22 (1): 130-1, 4-8.
26. Bustin S: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25 (2): 169-93.
27. Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, et al.: MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 2010; 11: 74.
28. McPherson MJ, Møller SG: PCR. BIOS, Oxford, 2000: 10-19.
29. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008; 44 (5): 619-26.
30. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al.: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55 (4): 611-22.
31. Thermo Scientific. ABgene QPCR Overview. <http://www.thermoscientific.de/com/cda/article/general/1,,20636,00.html>. Dostop: 30.06.2014
32. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al.: The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27 (2-3): 95-125.
33. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402-8.

34. Eppendorf: Absolute and relative quantification methods.  
<http://www.eppendorf.com/int/index.php?l=131&sitemap=2.5.1.5&pb=54f2acc04e6b0bd6&action=products&contentid=101&catalognode=9466&mode=print>. Dostop: 15.03.2014
35. Life Technologies. Is your RNA intact? Methods to check RNA integrity.  
<http://www.lifetechnologies.com/rs/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/is-your-rna-intact.html>. Dostop: 07.06.2014
36. Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, et al.: Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2011; 39 (9): e63.
37. Perez-Novo CA, Claeys C, Speleman F, et al.: Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques* 2005; 39 (1): 52-6.
38. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, et al.: Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 2005; 33 (6): e56.
39. Fleige S, Munich TU, Germany, et al.: Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* 2013; 28 (19): 1601-13.
40. Bio-Rad Laboratories. Effect of RNA degradation on data quality in quantitative PCR and microarray experiments. 2008. [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5452B.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5452B.pdf). Dostop: 15.11.2013
41. Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, et al.: RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med* 2011; 125 (4): 573-80.
42. ATCC: HOS (ATCC® CRL-1543™). <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1543.aspx#culturemethod>. Dostop: 27.1.2014
43. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al.: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3 (7): Research0034.
44. Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, et al.: Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 17.
45. ECACC: Fundamental Techniques in cell culture - Laboratory handbook. 2010.  
<http://www.phe-culturecollections.org.uk/promotions/labhandbook.aspx>. Dostop: 16.02.2014
46. Life Technologies. Cell culture basics handbook. 2014.  
<http://www.lifetechnologies.com/si/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>.  
Dostop: 10.02.2014
47. Sigma Life Science. Cell culture manual 2011-2014. <http://www.sigmaaldrich.com/ifb/life-science/ccm/cell-culture-manual.html>. Dostop: 16.02.2014

48. Qiagen: RNeasy Mini Handbook. RNeasy Mini Kit For purification of total RNA from animal cells, animal tissues, bacteria, and yeast, and for RNA cleanup. 2010.  
<http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>. Dostop: 25.07.2013
49. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, et al.: Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci* 2010; 17: 36.
50. ATCC: Passage number effects in cell lines. 2011. <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb07.ashx>. Dostop: 28.11.2013
51. Mohseny AB, Machado I, Cai Y, et al.: Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest* 2011; 91 (8): 1195-205.
52. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al.: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 3.
53. Fleige S, Walf V, Huch S, et al.: Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* 2006; 28 (19): 1601-13.
54. Sigma Aldrich. Trypsin-EDTA solution product information.  
[http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/t4049pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t4049pis.pdf). Dostop: 8.3.2014
55. Vrtacnik P, Kos S, Bustin SA, et al.: Influence of trypsinization and alternative procedures for cell preparation before RNA extraction on RNA integrity. *Anal Biochem* 2014; 463c: 38-44.

## Priloga 1. Pregled tripsinskih reagentov

Proizvajalec	Produkt	Izvor	Oblika	Konc.	Vsebuje	Uporaba	Testiranja	Opozorila
SIGMA	T4799	prašičji pankreas	liofiliziran prah		1,000-2,000 BAEE enot/mg trdne snovi, vsebuje laktozo, vsebuje kimotripsinsko in elastazno aktivnost	disociacija celic v celičnih kulturah, raziskave v proteomiki - razgradnja različnih proteinov	izgled, topnost, aktivnost (BAEE enote), disociacija celic, prisotnost mikoplazme in parvovirusov	Samo za laboratorijsko uporabo. Predolga inkubacija ali previsoka koncentracija tripsina lahko poškoduje celične membrane in povzroči celično smrt.
SIGMA	T1426	goveji pankreas	liofiliziran prah, tretiran s TPCK		≥10,000 BAEE enot/mg proteinov, kimotripsin, brez soli	disociacija celic v celičnih kulturah, raziskave v proteomiki - razgradnja različnih proteinov	izgled, topnost, aktivnost (BAEE enote), delež proteinov, nečistoče (kimotripsin)	Samo za laboratorijsko uporabo.
SIGMA	T4049	prašičji pankreas	filtrirana raztopina	0,25 %	HBSS, EDTA, fenol rdeče	disociacija celic v celičnih kulturah	izgled, pH, sterilnost, osmolalnost, aktivnost (BAEE enote), prisotnost mikoplazme in parvovirusov, celična disociacija	Samo za laboratorijsko uporabo. Predolga inkubacija ali previsoka koncentracija tripsina lahko poškoduje celične membrane in povzroči celično smrt.
SIGMA	59418C	prašičji pankreas	10-kratna filtrirana raztopina, obsevana z gama žarki	0,50 %	fiziološka raztopina, EDTA	disociacija celic v celičnih kulturah - za presajanje	prašičji parvovirus, izgled, endotoksin, mikoplazma, osmolalnost, pH, sterilnost, celična disociacija	za uporabo v raziskavah ali v proizvodnji. Ni za terapevtsko uporabo. Med tripsinizacijo je potrebno večkrat preveriti disociacijo celic, saj predolga inkubacija lahko poškoduje celice.

Proizvajalec	Produkt	Izvor	Oblika	Konc.	Vsebuje	Uporaba	Testiranja	Opozorila
SIGMA	T3449	rekombinanten goveji tripsin iz koruze	filtrirana vodna raztopina	1×	DPBS brez Ca in Mg, EDTA	disociacija celic v celičnih kulturah s serumskim ali brezserumskim gojiščem	izgled, pH, osmolalnost, sterilnost, disociacija celic	Samo za uporabo v raziskavah in razvoju.
GIBCO	27250-018	prašičji pankreas	prah, obsevana mešanica proteaz iz prašičjega pankreasa			disociacija celic v celičnih kulturah - presajanje, disociacija primarnega tkiva	izgled, aktivnost (BAEE enote), celična disociacija, certifikat obsevanja, kimotripsin, pankreatin, sledovi težkih kovin, endotoksin, mikoplazma, virusi, salmonela	Ni za diagnostične in terapevtske namene.
GIBCO	25200-056	prašičji pankreas	1-kratna raztopina	0,25 %	KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, D-glukoza, fenol rdeč, Na <sub>2</sub> EDTA	disociacija celic - presajanje celic, disociacija primarnega tkiva	disociacija celic, prisotnost mikoplazme in parvovirusov, osmolalnost, pH, sterilnost	Ni za diagnostične in terapevtske namene.
GIBCO	15400-054	prašičji pankreas	10-kratna raztopina	0,50 %	NaCl, Na <sub>2</sub> EDTA	disociacija celic - presajanje celic, disociacija primarnega tkiva	osmolalnost, pH, prašičji parvovirus, mikoplazma, sterilnost, celična disociacija	Ni za diagnostične in terapevtske namene.
GIBCO	12604-013	rekombinantna proteaza	1-kratna raztopina	1×	KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, EDTA	disociacija celic, tudi za matične celice	osmolalnost, sterilnost, pH, celična disociacija	Samo za uporabo v raziskovalne namene, ni za uporabo v diagnostične namene.
RICHCORE	Rc Trypsin (powder)	rekombinanten protein iz <i>Pichia pastoris</i>	liofiliziran prah			disociacija celic v celičnih kulturah, pretvorba proinzulina v inzulin	izgled, pH, proteini, specifična aktivnost, čistost, sterilnost, patogeni ( <i>E.coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> )	

Proizvajalec	Produkt	Izvor	Oblika	Konc.	Vsebuje	Uporaba	Testiranja	Opozorila
RICHCORE	Rc Trypsin (powder)	rekombinanten protein iz <i>Pichia pastoris</i>	raztopina		NP	disociacija celic v celičnih kulturah, pretvorba proinzulina v inzulin	izgled, pH, proteini, specifična aktivnost, čistost, sterilnost, patogeni ( <i>E.coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> )	
STEMCELL TECHNOLOGIES	7901	prašičji pankreas	raztopina	0,25 %	EDTA, HBSS brez Ca in Mg	disociacija adherentnih celic, disociacija tkiv in embrioidnih telesc		Samo za uporabo v raziskovalne namene, ni za uporabo v diagnostične in terapevtske namene.
MERCK MILLIPORE	SM-2003-C		raztopina	0,25 %	EDTA, HBSS brez Ca in Mg			Samo za uporabo v raziskovalne namene.
MERCK MILLIPORE	SCM090		raztopina	0,05 %	EDTA, ne vsebuje komponent živalskega izvora, reagenčni komplet vsebuje tudi raztopino za nevtralizacijo tripsina	disociacija adherentnih celic	sterilnost, osmolalnost, pH	Samo za uporabo v raziskovalne namene, ni za uporabo v diagnostične in terapevtske namene.
JR SCIENTIFIC INC.	82702-100	prašičji pankreas	filtrirana raztopina	0,25 %	EDTA, HBSS, fenol rdeče	disociacija adherentnih celic	sterilnost	Predolga inkubacija ali previsoka koncentracija tripsina lahko poškoduje celične membrane in povzroči celično smrt.
PAA	L11-004	prašičji pankreas	raztopina	0,05 %	EDTA, DPBS	disociacija adherentnih celic	pH, osmolalnost, endotoksin, sterilnost, prisotnost mikoplazme in prašičjega parvovirusa, disociacija celic	