

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

Využití materiálů na bázi TiO_2
pro izolaci a purifikaci molekul RNA

Bc. Denisa Smělá

Diplomová práce
2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa Smělá**
Osobní číslo: **C16461**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Využití materiálů na bázi TiO₂ pro izolaci a purifikaci molekul RNA**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část

- 1) Struktura a význam nukleových kyselin
- 2) RNA v eukaryotní buňce - typy, struktura, funkce
- 3) Úloha RNA v tělních tekutinách se zaměřením na exozomy
- 4) miRNA jako diagnostický marker
- 5) Metody izolace RNA molekul se zaměřením na metody specifické pro izolaci miRNA - současný stav výzkumu a vývoje, komerční testy pro rutinní izolace
- 6) Využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu miRNA - současný stav a nové trendy
- 7) Použití relevantní internetové zdroje, průběžně sledovat novinky v oboru

Experimentální část

- 1) Optimalizace elektroforetických podmínek pro analýzu RNA metodou TBE-PAAG s 8 M močovinou - koncentrace akrylamidu, techniky barvení
- 2) Zavedení techniky izolace miRNA komerčními testy
- 3) Zavedení techniky a optimalizace podmínek izolace miRNA z biol. materiálu pomocí vybraných materiálů (TiO₂ mikročástice, TiO₂NTs@Fe₃O₄NPs)
- 4) Zavedení a optimalizace podmínek analýzy RNA molekul metodou spektrometrie

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Eliška Kročová**


Katedra biologických a biochemických věd

Ostatní konzultanti: **Mgr. Pavla Murasová**

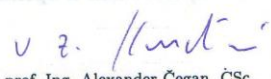
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**


prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2018

Denisa Smělá

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za cenné rady při zpracování diplomové práce, motivaci ke studiu, odborné vedení a za čas věnovaný konzultacím. Děkuji také Mgr. Elišce Kročové za pomoc při práci na experimentech v laboratoři, rady při zpracovávání a vyhodnocování výsledků a za čas a trpělivost věnované konzultacím. Dále Mgr. Rudolfu Kupčikovi za vstřícnost, ochotu a pomoc při měření a zpracování dat. V neposlední řadě děkuji mojí rodině za podporu v průběhu studia.

ANOTACE:

Diplomová práce je zaměřena na zavedení metody izolace a purifikace krátkých molekul RNA pomocí materiálů na bázi TiO_2 s následnou detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Podmínky izolace oligo RNA byly testovány a optimalizovány na TiO_2 mikročásticích (Titansphere) a na magnetických nanotrubičkách ($\text{TiO}_2\text{NTs@Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$). Výchozím biologickým materiálem byly T- a B-lymfatické nádorové buněčné linie JURKAT a RAJI. Bylo zjištěno, že pomocí TiO_2 mikročástic lze ve vhodně zvolených podmínkách izolovat nukleové kyseliny a současně oddělit krátké molekuly RNA od dlouhých.

Součástí práce bylo také zavedení komerčně dostupných technik izolace RNA a jejich porovnání s nově vyvíjeným postupem. Byla provedena optimalizace metody průkazu a identifikace krátkých RNA metodou elektroforetické separace na polyakrylamidovém gelu s močovinou. Byly zjištěny podmínky separace: 20% polyakrylamidový gel s 8M močovinou a barvení SYBRTM Green II. V neposlední řadě jsme se v této práci zaměřili na možnost průkazu a analýzy krátkých RNA pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro optimalizaci preanalytické fáze byl sestaven panel matic, ze kterých byly vybrány matrice s vhodnými vlastnostmi pro následnou ionizaci sledovaných biomolekul.

KLÍČOVÁ SLOVA: miRNA, oligo RNA, TiO_2 , extrakce na pevné fázi, diskontinuální elektroforéza, hmotnostní spektrometrie

TITLE: Application of TiO₂-based materials for isolation and purification of RNA molecules

ANNOTATION:

This thesis deals with the application of TiO₂-based materials for isolation and purification of short RNA molecules with mass spectrometry used for its detection afterwards. Process of oligo RNA isolation has been tested for TiO₂ microparticles (Titansphere) and magnetic nanotubes (TiO₂NTs@Fe₃O₄NPs). Immortalized lines of human T- and B-lymphocyte cells were used as the source material. Nucleic acids can be isolated and short RNA molecules can be separated from longer ones by TiO₂ microparticles in suitable conditions.

Important part of this work was also implementation of commercially available kits and comparison of their relative quantification with the newly developed method. To ensure quality detection of isolated RNA, the optimization of electrophoretic separation using polyacrylamide gel with urea for the short RNAs analysis was done. The best conditions are: 20% polyacrylamide gel with 8M urea, died with SYBRTM Green II. Last, but not least, we focused on short RNA detection using mass spectrometry. We choose several matrix suitable for RNA analysis from the list of chemicals prepared for preanalytical phase optimization.

KEYWORDS: miRNA, oligo RNA, TiO₂, solid-phase extraction, discontinuous electrophoresis, mass spectrometry

Obsah

ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Nukleové kyseliny.....	15
1.1.1 Struktura DNA a RNA	16
1.1.2 Typy a funkce RNA v eukaryotických organismech	18
1.1.3 RNA v tělních tekutinách	22
1.2 Mikro-RNA.....	25
1.2.1 Biogeneze miRNA	25
1.2.2 MiRNA jako klinicky významný biomarker	27
1.3 Izolace a purifikace RNA	30
1.3.1 Fenol-chloroformová extrakce.....	30
1.3.2 Extrakce na pevné fázi	31
1.4 Možnosti průkazu RNA.....	36
1.4.1 Northern blot.....	36
1.4.2 Polymerázová řetězová reakce.....	37
1.4.3 Sekvenování nové generace.....	39
1.4.4 Hmotnostní spektrometrie.	40
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	43
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
3.1 Laboratorní přístroje a vybavení.....	44
3.2 Chemikálie, reagensie a speciální biologický materiál.....	45
3.3 Elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu s močovinou.....	48
3.4 Izolace RNA komerčními testy:.....	50
3.4.1 TRIzol™ Reagent.....	50
3.4.2 <i>mirVana</i> ™ miRNA Isolation Kit	51
3.4.3 MagMAX™ <i>mirVana</i> ™ Total RNA Isolation Kit	52

3.5	Určení koncentrace a čistoty RNA pomocí UV/VIS spektrofotometru	53
3.6	Izolace oligo RNA pomocí TiO ₂ materiálů	54
3.7	Odsolení vzorku	55
3.8	Výběr vhodných matic pro analýzu RNA pomocí hmotnostní spektrometrie	55
3.9	Určení stability RNA v prostředí o pH 1 – 10	57
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	58
4.1	Optimalizace barvení oligo RNA po elektroforetické separaci	58
4.1.1	Barvení gelu pomocí SYBR TM Safe DNA Gel Stain	59
4.1.2	Barvení gelu pomocí SYBR TM Green II RNA Gel Stain	60
4.1.3	Barvení gelu pomocí Toluidine Blue O	61
4.2	Izolace miRNA komerčně dostupnými soupravami	63
4.3	Zavedení a optimalizace metody izolace oligo RNA pomocí TiO ₂ materiálů	66
4.3.1	Testování afinity dvou nosičů na bázi TiO ₂ k RNA	67
4.3.2	Optimalizace izolace oligo RNA pomocí Titansphere	70
4.4	Výběr matic pro detekci oligo RNA hmotnostní spektrometrií	79
5	ZÁVĚR	84
6	POUŽITÁ LITERATURA	86
7	PŘÍLOHY	98
	Příloha 1:	98

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Centrální dogma molekulární biologie.	16
Obrázek 2: Obecná struktura nukleotidu.	16
Obrázek 3: Pyrimidinové a purinové báze.	17
Obrázek 4: Schéma struktury jednovláknových nukleových kyselin.	18
Obrázek 5: Průběh transkripce a translace u eukaryotických organismů.	19
Obrázek 6: Schématické znázornění ribozómu.	19
Obrázek 7: Struktura tRNA.	20
Obrázek 8: Schéma ovlivnění genové exprese nekódujícími RNA.	21
Obrázek 9: Biogeneze exozomů.	23
Obrázek 10: Schéma biogeneze miRNA.	25
Obrázek 11: Struktura lidského proteinu Ago2 s navázanou miR-20a.	27
Obrázek 12: Schéma fenol-chloroformové extrakce pro izolaci nukleových kyselin.	31
Obrázek 13: Schéma izolace RNA pomocí mirVana TM miRNA IsolationKit.	33
Obrázek 14: Schéma izolace nukleových kyseliny pomocí magnetických částic.	34
Obrázek 15: Snímky TiO ₂ nanotrubic pokrytých Fe ₃ O ₄	35
Obrázek 16: Northern blot.	36
Obrázek 17: Schéma reverzní transkripce, probíhající v rámci RT-PCR.	38
Obrázek 18: Princip metody TaqMan TM využívající „stem-loop“ primery.	39
Obrázek 19: Obecný princip maticí zprostředkované laserové desorpce.	40
Obrázek 20: Princip průletového analyzátoru.	41
Obrázek 21: PAAG obarvený SYBR Safe TM	59
Obrázek 22: PAAG obarvený SYBR TM Green II.	60
Obrázek 23: PAAG barvené 0,1% roztokem Toluidine Blue O po dobu 10 a 30 min.	61
Obrázek 24: PAAG barvený nejprve SYBR TM Green II a následně Toluidine Blue O.	62
Obrázek 25: RNA izolovaná z buněk RAJI – TRIzol, mirVana a MagMAX na PAAG.	64
Obrázek 26: RNA izolovaná z buněk JURKAT – TRIzol, mirVana a MagMAX na PAAG.	64
Obrázek 27: Porovnání stability RNA při různých hodnotách pH v čase.	66
Obrázek 28: PAAG – izolace oligo RNA pomocí Titansphere a TNTs	67
Obrázek 29: PAAG – izolace oligo RNA pomocí Titansphere a TNTs (50mM glycinový pufr s 0,1M NaCl o pH 2,5).	68
Obrázek 30: PAAG – izolace oligo RNA pomocí Titansphere a TNTs (100mM MES pufr s 0,1M NaCl o pH 4).	69
Obrázek 31: PAAG – porovnání 50 a 200mM Na ₂ HPO ₄ pufru.	70

Obrázek 32: PAAG – ověření vlivu přídavku soli do MES pufru na sorpci RNA.	73
Obrázek 33: PAAG – izolace s vazebnými pufrů obsahující 1M kyselinu mléčnou nebo 1M kyselinu citronovou.	74
Obrázek 34: PAAG – izolace s MES pufrém obsahujícím přídavky kyseliny citronové.	75
Obrázek 35: PAAG – izolace s MES a glycinovým pufrém obsahujícím přídavky kyseliny glutamové.	77
Obrázek 36: PAAG s výsledky izolací s MES pufrém obsahujícím kyselinu citronovou.	78
Obrázek 37: MALDI/TOF/TOF – ionizace v matrici DAN.	79
Obrázek 38: MALDI/TOF/TOF – ionizace v matrici SA s 20mM DAHC.	80
Obrázek 39: MALDI/TOF/TOF – ionizace v matrici 2,4,6-THAP se 70mM DAHC.	81
Obrázek 40: MALDI/TOF/TOF – ionizace v matrici DHB s 40mM DAHC.	82
Obrázek 41: MALDI/TOF/TOF – ionizace v matrici ATT s 20mM DAHC.	83

SEZNAM GRAFŮ A TABULEK:

Graf 1: Porovnání relativní výtěžnosti izolace oligo RNA metodami TRIzol, mirVana a MagMAX.	65
Tabulka 1: Hodnoty relativních výtěžností oligo RNA po izolaci na Titansphere pro testované eluční pufrů.	71
Tabulka 2: Hodnoty relativních výtěžností oligo RNA po izolaci na Titansphere pro testované vazebné pufrů.	73
Tabulka 3: Hodnoty relativních výtěžností standardu oligo RNA po izolaci s využitím vazebných pufrů s přídavky dalších látek.	76
Tabulka 4: Hodnoty relativních výtěžností oligo RNA po izolaci, ke které byl použit MES pufr s různými koncentracemi přidané kyseliny citronové.	78

SEZNAM ZKRATEK

3-HPA – 3-hydroxypikolinová kyselina

A – adenin (báze)

ACN – acetonitril

ATT – 6-aza-2-thiothymin

C – cytosin (báze)

cDNA – komplementární DNA

CLL – chronická lymfocytární leukémie

DAHC – hydrogencitronan amonný

DAN – 1,5-diaminonaftalen

DEPC – diethylpyrokarbonát

DGCR8 – tzv. „DiGeorge syndrome critical region gene 8“

DHB – kyselina dihydroxybenzoová

DIG – digoxigenin

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina

EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

G – guanin (báze)

GTP – guanosintrifosfát

HDL – lipoprotein s vysokou hustotou

lincRNA – dlouhá mezigenová nekódující ribonukleová kyselina

LNA – tzv. „locked nucleic acids“

lncRNA – dlouhé nekódující ribonukleové kyseliny

MALDI – matricí zprostředkovaná laserová desorpce

MES – 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina

miRNA – mikro-ribonukleová kyselina

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

MS – hmotnostní spektrometrie

ncRNA – nekódující ribonukleová kyselina

NGS – sekvenování nové generace

piRNA – ribonukleová kyselina interagující s PIWI

pri-miRNA – primární mikro-ribonukleová kyselina

RISC – tzv. „RNA-induced silencing complex“

RNA – ribonukleová kyselina
RNAi – interference ribonukleových kyselin
rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina
RT-qPCR – kvantitativní polymerázová reakce
S – Svedberg (jednotka sedimentačního koeficientu, představuje čas 10^{-13} s)
SA – kyselina sinapová
siRNA – malá interferující ribonukleová kyselina
snoRNA – malá jadéřková ribonukleová kyselina
snRNA – malá jaderná ribonukleová kyselina
ssDNA – jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
ssRNA – jednovláknová ribonukleová kyselina
T – thymin (báze)
TAE – pufr složený z Tris, kyseliny octové a EDTA
TBE – pufr složený z Tris, kyseliny borité a EDTA
TBE-PAAG – elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu s močovinou
TE – pufr složený z Tris a EDTA
TEMED – N,N,N,N-tetramethylenethyldiamin
TERRA – nekódující ribonukleová kyselina asociovaná s telomerami
TFA – kyselina trifluoroctová
THAP – 2,4,6-trihydroxyacetofenon
TNTs – $\text{TiO}_2\text{NTs}@Fe_3O_4\text{NPs}$
TOF – průletový analyzátor
Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA – transferová ribonukleová kyselina
U – uracil (báze)

ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v České republice. Úspěch terapie záleží na včasné diagnostice a určení typu nádoru. Z tohoto důvodu stále vzrůstá potřeba kvalitních diagnostických markerů.

V současné době jsou stále objevovány nové nekódující molekuly, mezi které patří mimo jiné mikro-RNA (miRNA). Řadí se mezi krátké nekódující RNA a podílí se na regulaci řady biologických procesů. Molekulám miRNA je věnována velká pozornost, a to hlavně z důvodu jejich spojování s různými onemocněními. Je zřejmé, že míra exprese miRNA za fyziologického a patologického stavu se liší. Změny hladin miRNA jsou pozorovány například právě u karcinogeneze, kde jsou tyto molekuly díky svým vlastnostem považovány za potenciální diagnostický marker. Má se za to, že kromě určení druhu tumoru by mohly sloužit také ke stanovení prognózy pacienta, nebo k predikci jeho reakce na zvolenou léčbu.

Analýza těchto molekul vyžaduje speciální přístup. Je obtížná kvůli jejich malé velikosti a nízkým hladinám v organismu. Další překážkou je fakt, že existuje řada různých druhů miRNA, které mají často velmi podobnou sekvenci. K detekci jsou v dnešní době používány Northern blot, kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) nebo metody sekvenování nové generace (NGS).

V této práci jsme se zaměřili na možnost izolování miRNA pomocí materiálů založených na TiO_2 . V rámci práce s RNA jsme měli za cíl zavést do laboratoře komerčně dostupné techniky izolace RNA a následně vytvořit podmínky, při kterých by docházelo k purifikaci krátkých molekul RNA s využitím TiO_2 materiálů. K detekci různých druhů miRNA by mohla být vhodná hmotnostní spektrometrie. Dalším cílem tedy bylo vybrat vhodnou matici pro analýzu pomocí MALDI/TOF, která je pro analýzu nukleových kyselin používána. Je to velmi citlivá technika a díky možnosti fragmentace analyzovaných molekul by mohla být využívána pro sekvenování krátkých RNA.

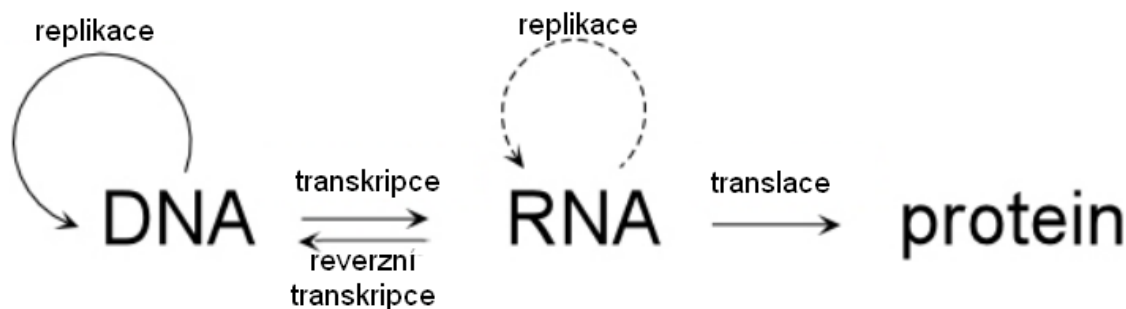
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Nukleové kyseliny

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je zkoumána již od roku 1869, kdy Friedrich Miescher při svých experimentech objevil slabou kyselinu přítomnou v jádrech bílých krvinek. Brzy poté byly poprvé pozorovány chromozomy a také to, že v buňkách stejného druhu je jejich počet stejný, kdežto mezi druhy se může lišit. Nedlouho poté se začaly objevovat nepřímé důkazy o vztahu mezi chromozomy a DNA [1].

Kolem roku 1920 se mělo za to, že genetickým materiálem jsou proteiny a DNA slouží pouze k zachování struktury chromozomů [2]. Důležitým milníkem byl rok 1928, kdy Frederick Griffith prokázal možnost přenesení zkoumané vlastnosti z jedné buňky na druhou. Griffith studoval bakterie *Streptococcus pneumoniae*, které tvoří dva typy kolonií – R typ (s drsným povrchem), který nezpůsobuje zápal plic a S typ (s lesklým, hladkým povrchem), který má schopnost vyvolat onemocnění. Pokusem na myších zjistil, že myš, očkovaná usmrceným kmenem tvořícím S kolonie nebo kmenem tvořícím R kolonie, zůstane zdravá. Oproti tomu myš, které je aplikován usmrcený kmen tvořící S kolonie a zároveň kmen tvořící R kolonie, onemocní zápal plic. To prokázalo, že buňky nevirulentního kmene získaly schopnost vyvolat onemocnění procesem nazývaným transformace [3]. Fakt, že DNA je příčinou tohoto jevu, byl objasněn až v roce 1944 experimentem, na kterém se podíleli Oswald Avery, Colin MacLeod a Maclyn McCarty. Tento experiment dokázal, že látka zodpovědná za transformaci je právě DNA, a proto je nositelkou genetické informace [4].

Prostorové uspořádání DNA v podobě dvoušroubovice, stejně jako možný mechanismus přepisu DNA navrhli James Watson a Francis Crick v roce 1953 [5]. K objasnění struktury DNA velkou mírou přispěly rentgenové difrakční snímky pořízené Rosalind Franklinovou a Maurice Wilkinsem [6, 7]. Ve stejném roce bylo také formulováno centrální dogma molekulární biologie. Centrální dogma vysvětluje přenos informace mezi nukleovými kyselinami a proteiny (genovou expresi). Jak je patrné z Obrázku 1, genetická informace je přepisována (transkripce) z DNA do ribonukleové kyseliny (RNA) a následně překládána (translace) do proteinů. Přenos informace probíhá vždy ve směru od DNA k proteinu. Výjimkou je reverzní transkripce, kdy dochází k přepisu RNA do DNA [8].

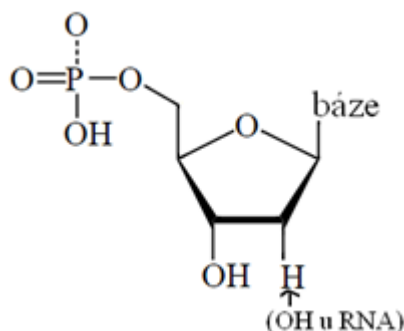


Obrázek 1: Centrální dogma molekulární biologie zobrazuje přenos genetické informace v organismu. DNA je přepisována do RNA a následně překládána na protein.

1.1.1 Struktura DNA a RNA

Nukleové kyseliny jsou polymerní látky, složené z monomerních jednotek, které se nazývají nukleotidy. Nukleotidy jsou složeny ze tří částí, které se liší chemicky i strukturně, a to z fosfátové skupiny, cukerného zbytku a dusíkaté báze (viz Obrázek 2) [8].

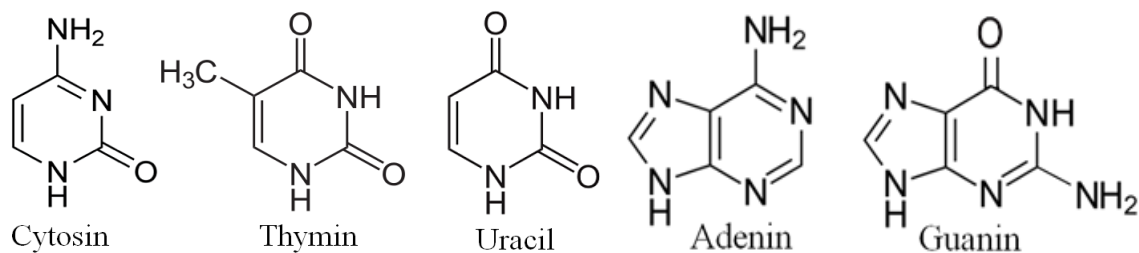
Cukerný zbytek je pěti-uhlíková 2-deoxy- β -D-ribóza u DNA a β -D-ribóza u RNA.



Obrázek 2: Obecná struktura nukleotidu, který je tvořen bází, cukerným zbytkem a fosfátovou skupinou.

Dusíkaté báze se dělí na purinové a pyrimidinové. Pyrimidiny mají ve své struktuře jeden šestičlenný kruh a řadí se mezi ně cytosin – C, thymin – T a uracil – U (viz Obrázek 3). Puriny jsou tvořeny kondenzovaným pyrimidinovým a imidazolovým kruhem. Purinové báze jsou adenin – A a guanin – G (viz Obrázek 3) [8].

Důležitou vlastností bází je jejich komplementarita v rámci struktury nukleové kyseliny. Tuto vlastnost, a fakt, že počet purinů v molekule DNA odpovídá počtu pyrimidinů, blíže popsal Erwin Chargaff. Zjistil, že báze se vážou vždy v párech A-T, G-C pro DNA a A-U, G-C pro RNA. Báze jsou v dvouvláknových molekulách propojeny vodíkovými můstky. Páry G-C mají vodíkové můstky tři, A-U a A-T páry mají dva [9].



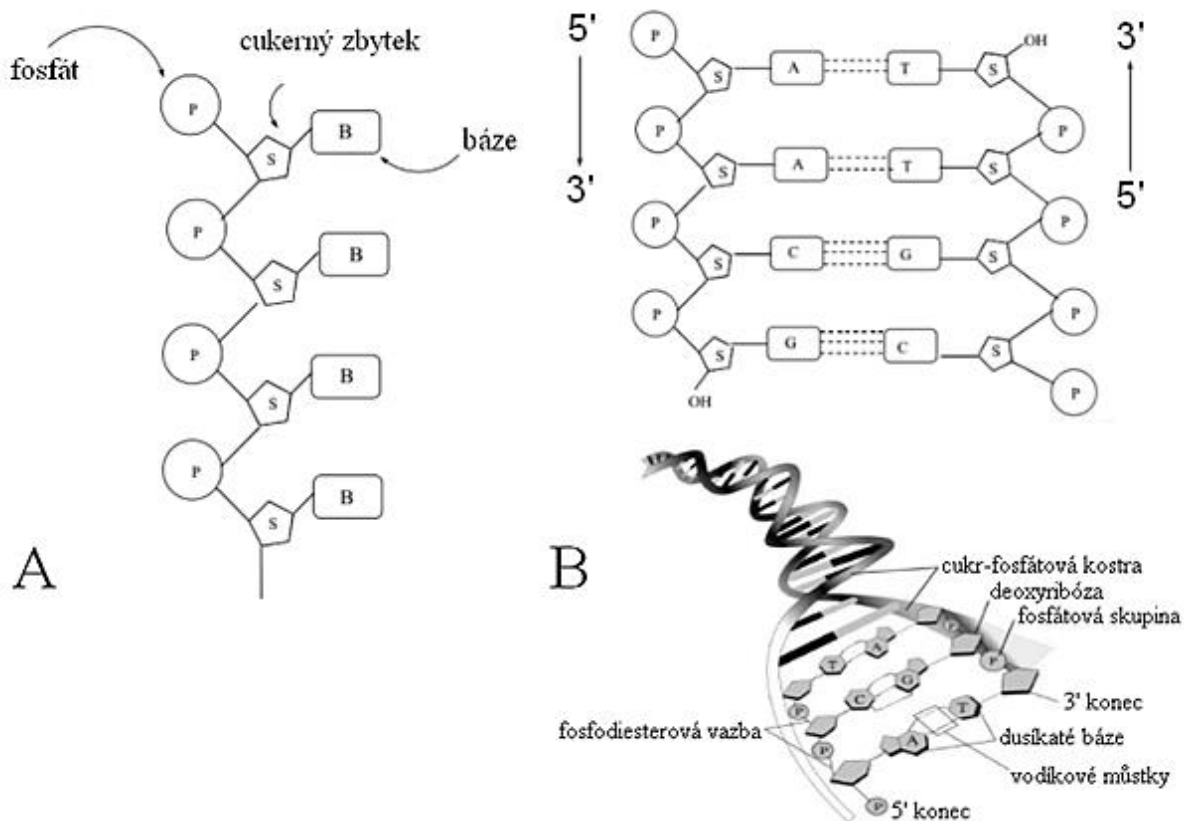
Obrázek 3: Pyrimidinové báze – cytosin, thymin a uracil a purinové báze – adenin a guanin.

Nukleotidy jsou spojeny do polynukleotidového řetězce tak, že fosfát, připojený na pátém uhlíku jednoho cukru, se spojuje s hydroxylovou skupinou na třetím uhlíku cukru dalšího. Jedná se o fosfodiesterovou vazbu, která vzniká působením specifických enzymů – polymeráz. Podle této orientace jsou potom značeny konce řetězce jako 5' konec (s fosfátovou skupinou) a 3' konec (s hydroxylovou skupinou). Pokud se jedná o dvouvláknovou DNA (dsDNA), pak jsou k sobě orientovány dva řetězce v opačném směru, tedy 5' konec jednoho vlákna je připojen k 3' konci vlákna druhého.

Pořadí bází v řetězci je označováno jako primární struktura. Zjednodušené schéma primární struktury nukleových kyselin je vyobrazeno na Obrázku 4 – A.

Sekundární strukturou se rozumí spojení a prostorové uspořádání dvou vláken DNA (ssDNA) pomocí vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi (viz Obrázek 4 – B). Tyto dvě vlákna pak vytváří pravotočivou, případně levotočivou dvoušroubovici (nejčastější je konformace B, která je pravotočivá, vyskytuje se ale také v konformacích A a Z) v závislosti na podmínkách, ve kterých se nachází. Vně dvoušroubovice je cukr-fosfátová kostra, báze se nacházejí uvnitř. Báze neprocházejí přesně středem podélné osy dvoušroubovice, proto dvoušroubovice není symetrická, ale tvoří malý a velký žlábek.

DNA může být uspořádána do kruhu, lineárně nebo se stáčet do tzv. nadšroubovice, což se označuje jako struktura terciální. Kvartérní struktury mohou vznikat například ve smyslu komplexů nukleových kyselin s proteiny.



Obrázek 4: A – Schéma primární struktury jednovláknových nukleových kyselin. Báze jsou spojeny do řetězce fosfodiesterovými vazbami. B – Schéma párování bází v dsDNA (nahore) a model dvoušroubovice (sekundární struktura, dole). Převzato a upraveno z: [10]

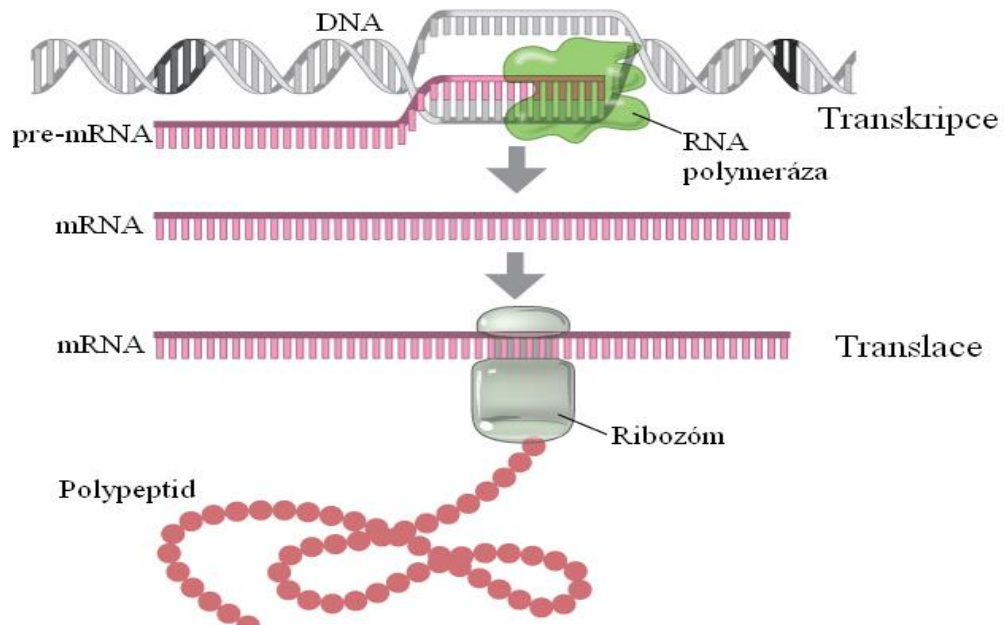
1.1.2 Typy a funkce RNA v eukaryotických organismech

RNA vykazuje ve velké míře strukturní mnohotvárnost, díky které molekuly RNA získávají svoji specifickou funkci. Nejčastěji se vyskytuje jako jednovláknová RNA (ssRNA), která se může díky komplementaritě bází skládat do rozmanitých útvarů [8].

RNA molekuly jsou syntetizovány enzymem RNA polymeráza, který využívá vlákno DNA jako templát. Syntéza RNA probíhá vždy směrem od 5' konce k 3' konci. Tento proces se nazývá transkripce a vzniklý produkt u eukaryotických organismů podléhá modifikacím.

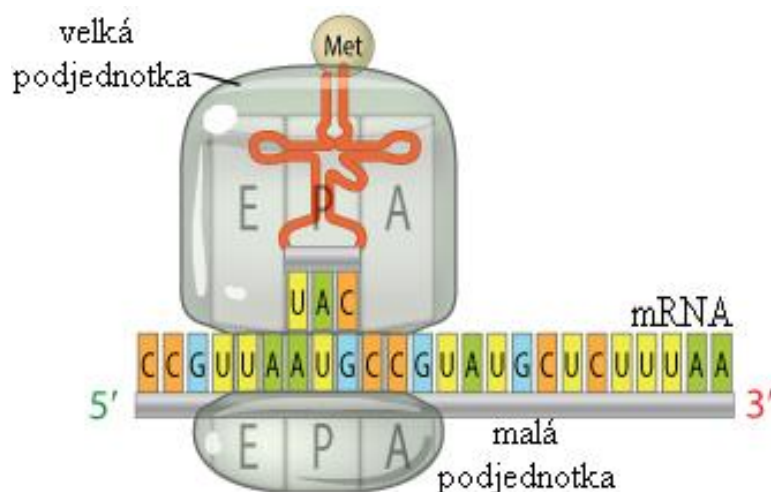
Modifikovaný transkript, vzniklý přímým přepisem ze sekvence DNA, se nazývá mediátorová RNA (mRNA). Na 5' konec je přidána tzv. čepička (7-methyl guanosin), která je nutná pro vazbu s ribozomem. Modifikován je i 3' konec, na který je připojována polyadenosinová sekvence (poly-A konec), zajišťující stabilitu mRNA. Další důležitou úpravou je RNA „splicing“ (sestřih), při kterém dochází k odstranění úseků nekódující sekvence (intronů) a spojení kódujících částí (exonů). Tento proces probíhá za pomoci částic zvaných spliceozomy, které jsou tvořeny proteiny a několika typy specializovaných malých RNA [8, 11]. Takto upravenou RNA lze využít k syntéze proteinů procesem zvaným

translace. Produktem translace je polypeptidový řetězec, tvořený aminokyselinami v přesném pořadí, které předurčuje sekvence bází v mRNA. Schéma průběhu exprese genu a další fáze realizace genetické informace ukazuje Obrázek 5 [8, 11].



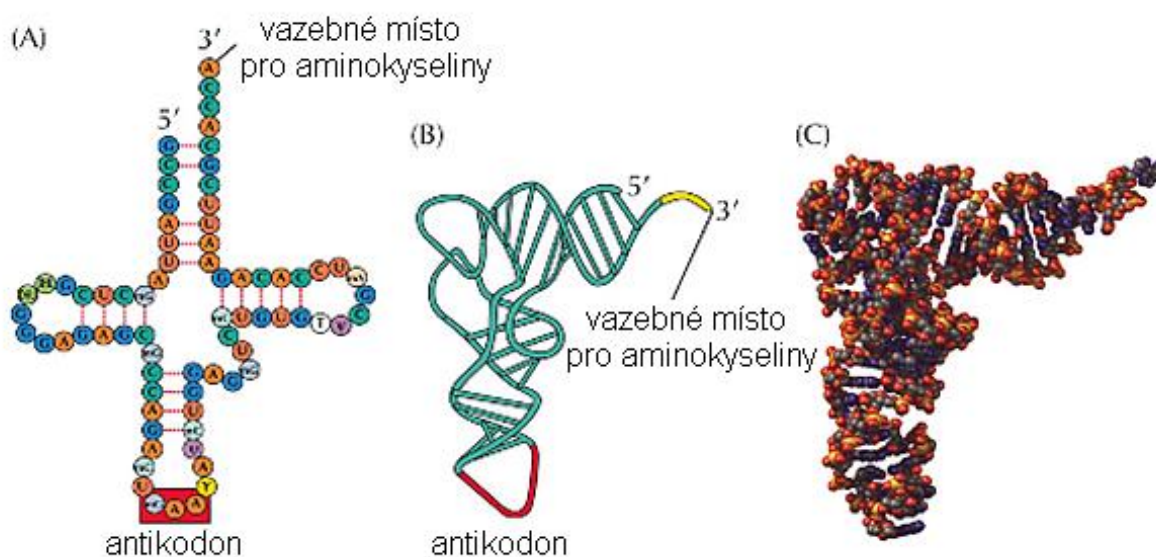
Obrázek 5: Průběh transkripce a translace u eukaryotických organismů. Za katalýzy RNA polymerázy je z DNA syntetizována mRNA, která je dále překládána za účasti tRNA a rRNA do řetězce příslušných aminokyselin. Převzato a upraveno z: [11]

Ribozomální RNA (rRNA) spolu s řadou proteinů vytváří ribozómy, na kterých probíhá translace. Jak lze vidět na Obrázku 6, ribozómy jsou tvořeny dvěma podjednotkami – malou (40S) a velkou (60S). S je značkou pro jednotku Svedberg, která podává informaci o rychlosti sedimentace částic a tím zároveň o jejich velikosti [12].



Obrázek 6: Schématické znázornění ribozómu, složeného z velké a malé podjednotky, na počátku translace (zde již přítomna tRNA s navázaným methioninem, který je vždy na začátku peptidového řetězce). Převzato a upraveno z: [11]

Transferové RNA (tRNA) jsou molekuly dlouhé přibližně 75 – 80 nukleotidů, které přináší příslušné aminokyseliny na ribozóm [13]. Mají tvar trojlístku a v jejich sekvenci obsahují antikodon (viz Obrázek 7), neboli tři báze, které jsou komplementární ke kodonu (skupina 3 bází, které odpovídají příslušné aminokyselině) na mRNA. Pro každou aminokyselinu existuje příslušná tRNA. Dojde tak k přeložení sekvence bází mRNA do sekvence aminokyselin daného proteinu. K navázání dochází za katalýzy aminoacyl tRNA syntetázy [8, 11].



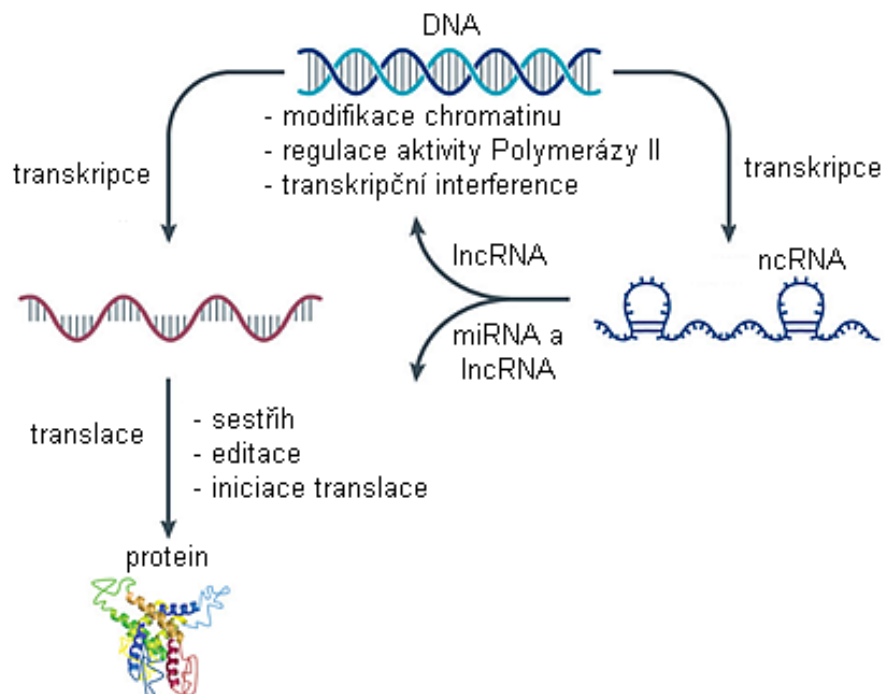
Obrázek 7: Struktura tRNA. A – 2D struktura připomínající trojlístek, B – zjednodušená 3D struktura, C – 3D struktura. Na schématu lze vidět antikodon a vazebné místo pro aminokyseliny. Převzato a upraveno z: [14]

Ačkoliv se dlouhou dobu věřilo, že převážná část genomu obsahuje kódující sekvence (sekvence, ze kterých transkripcí a translací vznikají proteiny), u eukaryotických organismů tomu tak není. Převážná část genomu je složena z nekódujících sekvencí, které mohou být přepisovány do RNA (za katalýzy RNA polymerázy II nebo III). Taková RNA se označuje jako nekódující (ncRNA) a má převážně regulační funkci. Nekódující RNA se dělí na dlouhé nekódující RNA (lncRNA), složené z více než 200 nukleotidů a krátké nekódující RNA o velikosti do 200 nukleotidů. Mezi ncRNA patří také tRNA a rRNA.

lncRNA jsou velmi komplexní a rozmanité. Podílejí se na regulaci transkripce a post-transkripčních úpravách. Mohou být prekurzory pro krátké nekódující RNA nebo součástí mechanismů pro jejich umlčení. Hlavní úlohou je pravděpodobně regulace genové exprese, kterou ovlivňují jak negativně (např. inhibicí RNA polymerázy II), tak i pozitivně (např. remodelací chromatinu). Ovlivnění genové exprese ilustruje zjednodušené schéma

na Obrázku 8. Mají také schopnost blokovat sestřihová místa pre-mRNA, mohou se vázat na mikro-RNA (miRNA) a funkčně ji umlčet nebo vytvářet komplexy s proteiny a modulovat jejich vlastnosti [15, 16]. Podrobnější informace o miRNA podává kapitola [1.2](#).

Mezi lncRNA řadíme dlouhé mezigenové nekódující RNA (lincRNA), které se v genomu nacházejí vždy mezi dvěma geny. Zapojují se například do tzv. „imprintingu“ (genetický jev, u kterého míra exprese genu závisí na tom, od kterého rodiče byl přenesen) nebo do procesu maligní transformace [17, 18]. Další skupinou jsou dlouhé intronové nekódující RNA, u kterých se předpokládá, že mnoho z nich je zpracováno do krátkých nekódujících RNA [19]. Nekódující RNA asociované s telomerami (TERRA) vznikají přepisem DNA v telomerických oblastech a jsou pravděpodobně důležitým regulátorem aktivity telomeráz [20, 21]. Zvláštní skupinou jsou dlouhé nekódující RNA s dvojitou funkcí, mezi které se řadí RNA transkripty, které mají jak regulační, tak kódující schopnosti [22]. Geny, které ztratí schopnost kódovat protein, se nazývají pseudogeny. Jsou to poškozené nebo nekompletní geny, kterým se někdy říká „junk“ DNA. Bylo zjištěno, že některé pseudogeny jsou schopné regulovat genovou expresi a mohou být zpracovány do malých nekódujících RNA [23].



Obrázek 8: Zjednodušené schéma ovlivnění genové exprese nekódujícími RNA. Nekódující transkripty se podílí na regulaci translace řadou procesů. Převzato a upraveno z: [24]

Do skupiny malých nekódujících RNA je řazena malá jaderná RNA (snRNA), důležitá pro regulaci sestřihu pre-mRNA. Podílí se také na regulaci transkripce ovlivněním RNA polymerázy II.

Pro modifikace rRNA je spolu s příslušnými proteiny velmi důležitá malá jadéřková RNA (snoRNA) o velikostech od 60 do 300 nukleotidů. Většina snoRNA pochází z intronů. Mimo jiné je důležitá pro sestřih genu pro serotoninový receptor 5-HT(2C)R. Bylo prokázáno, že tato specifická snoRNA není exprimována u Prader-Williho syndromu. Předpokládá se, že by takový defekt mohl přispívat ke vzniku tohoto syndromu [15].

Buněčnou homeostázu pomáhá udržovat mimo jiné i RNA interagující s PIWI (piRNA). Jsou to 24 – 30 nukleotidů dlouhé molekuly, které se váží na proteiny PIWI, pocházející z rodiny proteinů zvané Argonaute. Zodpovídají za stabilitu genomu v zárodečných buňkách [25].

Malé nekódující RNA o délce 20 – 30 nukleotidů jsou mikro-RNA (miRNA) a malé interferující RNA (siRNA). Tyto RNA se komplementárně spojují s cílovou mRNA a tím znemožňují, aby došlo k translaci. Fenomén známý jako RNA interference (RNAi) a podrobnější charakterizace miRNA bude rozebrána v kapitole 1.2. Rozdílem mezi těmito molekulami je, že miRNA reguluje endogenní geny, siRNA potom slouží k ochraně genomové integrity proti exogenním nukleovým kyselinám (např.: viry, transpozóny, transgeny apod.) [15, 26].

1.1.3 RNA v tělních tekutinách

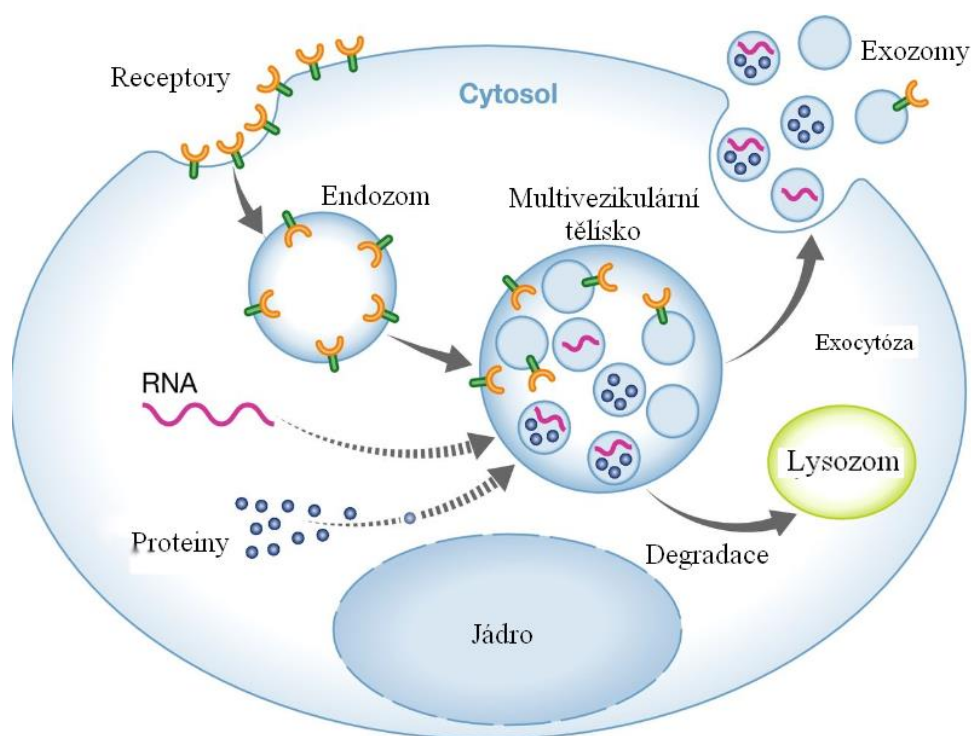
Charakterizování RNA v tělních tekutinách je v dnešní době prováděno převážně za pomoci kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR) nebo metod sekvenace nové generace (NGS). Izolace RNA z tělních tekutin lze využít například ve forenzní genetice k určení typu tělní tekutiny [27, 28] nebo stáří vzorku [29]. Existuje také snaha prozkoumat rozmanité typy RNA z tělních tekutin a využít je jako biomarkerů pro různá onemocnění, ať už pro screening, diagnostiku nebo pro sledování průběhu nemoci, léčby a pro určení prognózy pacienta. Takzvaná tekutá biopsie se jeví jako slibná cesta k diagnostice řady patologických stavů. Z periferní krve je možné izolovat volnou cirkulující RNA (RNA mohou být asociovány také s HDL částicemi) nebo RNA obsaženou v exozomech či jiných váčcích [30].

Exozomy jsou malé částice tvořené cytoplazmou a lipidovou dvouvrstvou, velké 30 – 150 nm, které obsahují proteiny a RNA molekuly. Jsou sekretovány různými druhy

buněk jak v kulturách *in vitro*, tak *in vivo* v organismu. Můžeme je najít v krvi, moči, mozkomíšním moku, ve slinách i v řadě dalších tělních tekutin. Exozomy mají různé funkce, podle toho, z jaké tkáně pocházejí. Mimo jiné umožňují mezibuněčnou komunikaci přenosem makromolekulárních molekul [31].

Problémem izolace miRNA z tělních tekutin je všudypřítomný výskyt RNáz, které molekuly RNA včetně miRNA degradují. Exozomy tvoří jakousi bariéru proti RNázám a zároveň zajišťují molekulám miRNA jejich přirozené vnitřní mikroprostředí, což představuje velkou výhodu pro analýzu těchto molekul.

Obrázek 9 znázorňuje, jak probíhá vznik exozomů. Zráním endozomu v buňce vzniká multivezikulární tělísko, které obsahuje intraluminální váčky. Multivezikulární tělísko fúzí splyne s buněčnou membránou a exocytózou dojde k uvolnění intraluminálních váčků, které nesou intracelulární molekuly do extracelulárního prostoru [32].



Obrázek 9: Biogeneze exozomů. Endozom dozrává v multivezikulární tělísko, které následně splyne s membránou buňky a exocytózou se uvolní intraluminální váčky, mezi které se řadí i exozomy. Převzato a upraveno z: [32]

Jelikož jsou již známy protokoly pro izolaci exozomů z krve, je snaha analyzovat jejich obsah. MiRNA, obsažené v exozomech, se ukazují jako slibné biomarkery řady onemocnění od neurodegenerativních nemocí, jako je Alzheimerova choroba [33], až po nádorová onemocnění. Exozomy je možné izolovat z prakticky všech tělních tekutin poměrně jednoduchým postupem, a to precipitací, centrifugací a následnou resuspendací ve vhodném

roztoku. Bylo zjištěno, že v séru je vyšší obsah exozomů než v moči [31]. Exozomy z různých tělních tekutin obsahují různé složení RNA a proteinů. Exozomy ze séra obsahují více miRNA, zatímco exozomy z moče obsahují rRNA [31].

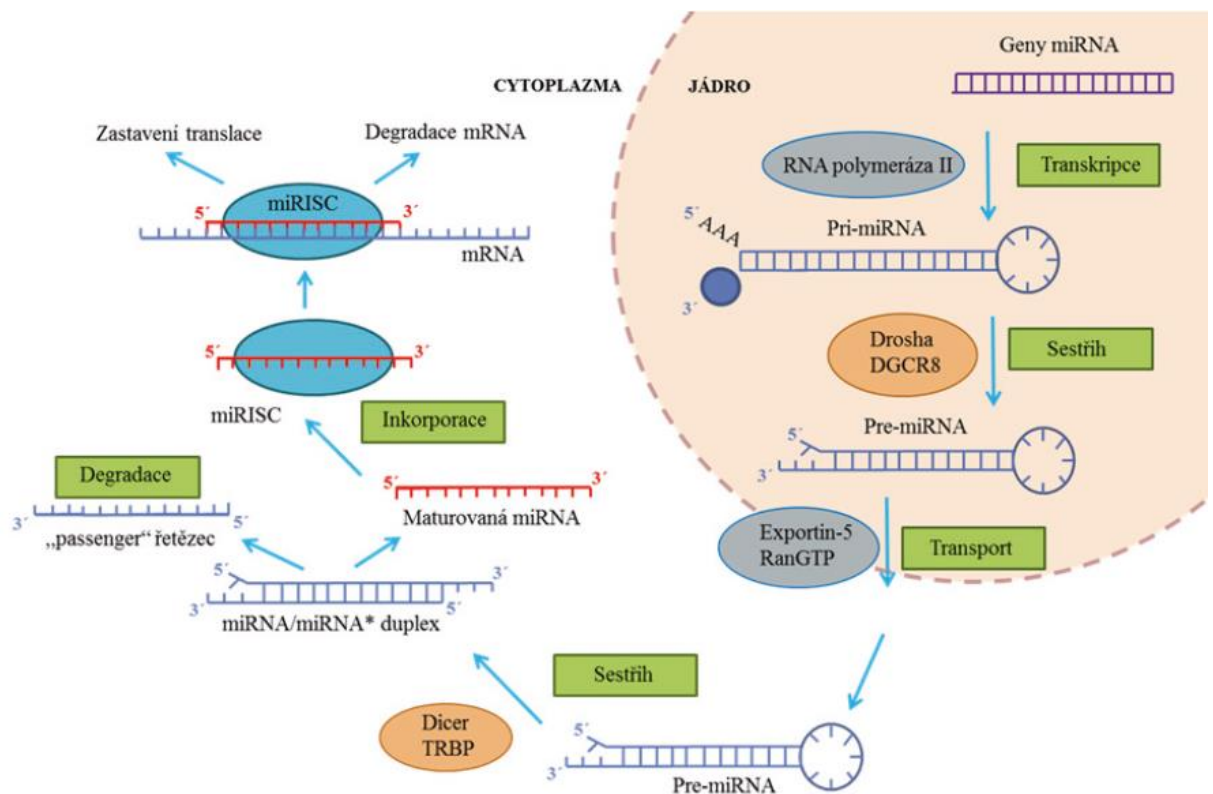
Bylo prokázáno, že exozomální miRNA má řadu funkcí, ať už fyziologických nebo patologických. Protože některé miRNA mají tumor-supresorové účinky, je snaha využít exozomů jako nosičů terapeutických miRNA do nádorové tkáně. Taková terapie by měla využívat buňky produkující exozomy s konkrétní miRNA, které by byly izolovány, purifikovány a aplikovány pacientovi [34].

1.2 Mikro-RNA

Malé nekódující molekuly RNA hrají významnou roli v genové regulaci. Efekty malých RNA na genovou expresi bývají většinou inhibiční, proto jsou často zahrnovány pod termín RNA „silencing“ (umlčování). MiRNA jsou specifické molekuly, které se váží na cílové nukleové kyseliny skrz komplementární vazby mezi bázemi [35]. Tyto molekuly jsou kódovány širokou škálou genů v rostlinách i u zvířat [36, 37].

1.2.1 Biogeneze miRNA

Biogeneze miRNA je několika krokový postup, který se odehrává v jádře a následně v cytoplazmě buňky. Schéma tohoto procesu je zobrazeno na Obrázku 10.



Obrázek 10: Schéma biogeneze miRNA. Primární transkript je sestřihán enzymem Drosha a exportován z jádra. Takto vzniklá pre-miRNA je dále zkrácena enzymem Dicer. Duplex miRNA je zakomponován do komplexu RISC, na kterém dojde k oddělení vedlejšího vlákna. Hlavní jádro obsažené v RISC komplexu se pak může podílet na regulaci genové exprese. Převzato z: [38]

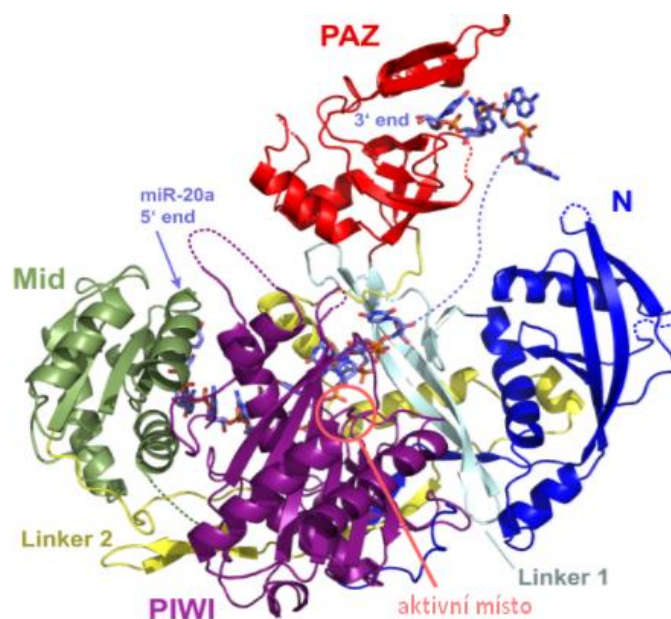
Na začátku je v buněčném jádře transkribována sekvence pro miRNA z DNA do RNA za pomoci RNA polymerázy II. Tak vznikne primární miRNA (pri-miRNA), která je opatřena na 5' konci guanidinovou čepičkou a na 3' konci polyadenylovým zbytkem [39]. Pri-miRNA tvoří vlásenkové struktury, které jsou rozpoznávány komplexem „Microprocessor“.

Ten se skládá ze dvou proteinů – enzymu RNAsa III, nazývaného Drosha, a kofaktoru DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8). Drosha rozeznává pri-miRNA od ostatních prekurzorů RNA, DGCR8 pak rozeznává dsRNA a dokáže vyhledat místo k sestřihu. Sestřih pri-miRNA je zajištěn opět enzymem Drosha. Vzniká tak vlákno dlouhé 70 – 100 nukleotidů, které se označuje jako pre-miRNA. Existuje také alternativní cesta sestřihu pri-miRNA na pre-miRNA. Není příliš častá, ale objevuje se u zvířat. Využívá sestřihu pri-miRNA transkriptů na introny, které přesně imitují strukturální vlastnosti pre-miRNA. Takovéto introny jsou dále zpracovány jako sestřihy vzniklé klasickou cestou [26, 38, 40].

Pre-miRNA mají strukturu úplné vlásenky s dvou-nukleotidovým přesahem na 3' konci. Jsou transportovány z jádra do cytoplazmy Exportinem-5 za spotřeby GTP. Mimo jádro jsou dále zpracovány enzymem zvaným Dicer (ATP-dependentní multidoménový enzym) na 18 – 24 nukleotidů dlouhá dvouvlákna. Takové dvouvlákno je označeno miRNA:miRNA* (nověji pak miR-číslo označení-5p/3p). U rostlin odštížení smyčky probíhá v jádře. Duplex miRNA existuje krátkou dobu, pouze do chvíle, kdy je asociován s proteinem z argonautové rodiny (Ago) [26, 38].

Aby vznikla funkční miRNA, je třeba dvouvlákno rozpojit. K tomu dochází po zakomponování miRNA duplexu do RISC komplexu (RNA-induced silencing complex). Vlákno, které je odděleno, se nazývá vedlejší miRNA a je buď degradováno, nebo může mít další regulační funkce. Výběr hlavního vlákna, tedy miRNA, která zůstává spojeno s komplexem RISC, závisí mimo jiné na relativní termodynamické stabilitě 5' konců miRNA, tzv. pravidlu asymetričnosti. V RISC komplexu je uchováváno vlákno miRNA s nestabilnějším 5' koncem [26, 38].

RISC komplex má centrum tvořené proteiny z argonautové rodiny, konkrétně Ago2, jehož strukturu zobrazuje Obrázek 11. Ago2 je řídicím centrem štěpící aktivity RISC komplexu a je vázán na domény PIWI a PAZ, které jsou důležité pro RNAi. Na PIWI doménu se navazuje 5' konec miRNA a na doménu PAZ potom dvou-nukleotidový přesah 3' konce miRNA. PIWI doména funguje také jako endoribonukleáza. RISC komplex obsahující miRNA rozpoznává většinou 3'UTR konec cílové mRNA. S molekulou mRNA se může spojovat buď kompletně, při čemž dochází k degradaci mRNA, nebo jenom částečně, kdy nedojde k degradaci, ale pouze k dočasné blokaci translace. Tím je pak inhibován vznik proteinu, který mRNA kódovala. Jeden druh miRNA může ovlivnit více cílových molekul mRNA díky možnosti navázání se s neúplnou komplementaritou. Zároveň jedna molekula mRNA může být regulována více různými miRNA [38, 41].



Obrázek 11: Struktura lidského proteinu Ago2 s navázanou miR-20a. Převzato z: [42]

1.2.2 MiRNA jako klinicky významný biomarker

Výzkumu miRNA je věnována velká pozornost, a to hlavně z důvodu jejich asociace s rozmanitými druhy onemocnění. Geny pro miRNA se nachází mimo Y chromozomu na všech chromozomech a bývají často pozměněny při patologických stavech (např.: delece nebo amplifikace nukleotidu), například v průběhu karcinogeneze. Tím je poté ovlivněna míra exprese dané miRNA [43]. MiRNA se mohou vyskytovat jako onkogeny (pokud je jejich exprese při tumorigenezi zvýšená), ale také jako tumor-supresorové geny (v případě, kdy dochází k útlumu exprese dané miRNA při tumorigenezi). Díky těmto vlastnostem by mohly být ideálním diagnostickým markerem. Oproti mRNA, která je používána jako diagnostický marker má miRNA výhodu díky vyšší stabilitě.

MiRNA by mohly být využity k určení druhu tumoru nebo ke stanovení prognózy onemocnění pacienta. Lze je využít i jako biomarker k predikci reakce pacienta na určitou terapii. Byl by tak možný výběr pacientů, pro které je vhodnější určitá specifická léčba. Související problematikou je také využití miRNA pro překonání rezistence vůči chemoterapeutikům.

První důkaz propojení miRNA a rakoviny se objevil při studiu tumor-supresorového genu v malém úseku na chromozomu 13q14. Tento ~30 kb dlouhý úsek byl deletován ve více než polovině případů výskytu chronické lymfocytární leukémie (CLL), což je jedna z nejčastějších forem leukémie. Analýza prokázala lokaci dvou miRNA genů (miR-15a a miR-16-1) v tomto kritickém úseku, které jsou negativně regulovány či deletovány v 68 %

CLL. Vzhledem k tomu, že delece genů miR-15a a miR-16-1 koreluje s rozvojem neinvazivní formy CLL, byly tyto miRNA označeny za možné tumor-supresory CLL.

Delece na úseku chromozomu 13q14 byla zjištěna také u rakoviny prostaty [44] nebo mnohočetného myelomu [45]. Pacienti s touto delecí mají příznivější prognózu, než pacienti s abnormálními karyotypy či delecí na jiném chromozomu jako je 11q23 či 17q13, díky tomu, že homology genů miR-15a a miR-16-1, miR-15b a miR16-2, nacházející se na chromozomu 3 se při CLL alespoň v malé míře exprimují [46].

Bylo zjištěno, že u pacientů s hepatocelulárním karcinomem snížená hladina miR-26 značí horší prognózu, ale na druhou stranu tito pacienti lépe reagují na léčbu interferonem- α [47]. U pacientů s rakovinou slinivky, kteří měli zvýšené hladiny miR-21 byla naopak zjištěna snížená odpověď na terapii gemcitabinem. Jedna z prvních studií na toto téma proběhla v roce 2006, kdy v buněčné kultuře buněk cholangiokarcinomu byly inhibovány miR-21 a miR-200b, což vedlo ke zvýšení citlivosti na léčivo gemcitabin [38, 48].

Molekuly miRNA jsou různě exprimovány ve zdravé tkáni a v rakovinné tkáni, což umožňuje rozeznat i málo diferenciované nádory. Expresce miRNA se může lišit i v různých subtypech rakovinných buněk. Například miR-126, miR-143 a miR-145 jsou exprimovány ve výrazně nižších hladinách u více než 80 % nádorových onemocnění. Naopak miR-21 je u více než 80 % vzorků rakovinných tkání přítomna ve zvýšené míře [41].

První rozsáhlé profilování biologických vzorků odebraných pacientům (př.: akutní lymfoblastická leukémie, adenokarcinom plic, myeloidní leukémie a další) pro zjištění hladin různých miRNA provedli Lu a kolektiv v roce 2005, kdy z 334 vzorků izolovali 217 miRNA. Při porovnání se zdravou tkání zjistili, že 129 z těchto 217 miRNA bylo v rakovinné tkáni redukováno [49].

Mezi prvními identifikovanými onkogenními miRNA byl gen pro klastr miRNA-17-92, také známý jako oncomiRNA-1. Ten kóduje šest miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1), které jsou zvýšeně exprimovány u řady rakovinných onemocnění. Tento klastr se nachází na chromozomu 13q31.3 [50, 51].

Důkazem, že k indukci tumorigeneze stačí změna exprese pouze jedné miRNA je výsledek experimentu s miR-155. Zvýšená tvorba této molekuly vede až k leukemii B-buněk a lymfomu. Její exprese je zvýšená u řady malignit B-buněk, jako je Hodgkinův lymfom, agresivní forma CLL nebo Burkittův lymfom. Takový nález je u pacientů spojen se špatnou prognózou [52]. Je to jedna z nejprozkoumanějších miRNA působících jako onkogen solidních nádorů a zároveň je miR-155 příkladem multifunkční miRNA, která ovlivňuje řadu

procesů, zahrnujících hematopoézu, zánětlivé reakce a imunitní odpověď. Bylo prokázáno, že indukuje proliferaci buněk a při zvýšení tvorby také tvorbu lymfomů [53].

Jako onkogenní miRNA je označována také miR-10b. Tato miRNA, která pozitivně reguluje migraci buněk a jejich invazi, se vyskytuje ve zvýšené míře u pacientů s metastazovanou rakovinou prsu. Zvýšená exprese miR-10b v ještě nemetastazovaném tumoru prsu vede k iniciaci metastáze [54]. Existují také miRNA, které mohou působit buď jako supresory tumoru či jako onkogeny v závislosti na tkáni, v jaké jsou exprimovány. Příkladem lze uvést vysoce homologní miRNA miR-221 a miR-222. Jejich význam v procesu tumorigeneze a roli v reakci na léčbu přehledně shrnuli Garofalo a kol. v jejich práci z roku 2012 [55].

Opakem miRNA vyskytujících se ve zvýšené míře, a tedy označovaných jako onkogenních, jsou miRNA, jejichž exprese je při nádorovém onemocnění snížena. Předpokládá se, že mají tumor-supresorové funkce. Jako příklad lze uvést let-7, miR-15a a miR-16-1 [56]. Let-7 je jednou z nejvíce abundantních miRNA. Její exprese je snížena například u nádorů plic. Snížená exprese je také spojena s krátkým přežíváním pacientů po chirurgickém odstranění různých typů nádorů [57].

Mezi další tumor-supresorové miRNA patří například miR-353. Tato miRNA reguluje sadu genů s možným metastazujícím potenciálem a tvoří tak bariéru pro vznik metastází. Negativní regulace miR-353 se objevuje v metastázích karcinomu plic, rakoviny prsu či sekundárních metastázích v kostech [58].

Další využití miRNA se nabízí v terapii nádorových onemocnění. Jednou z možností je vnesení supresorové miRNA, jejíž gen byl mutací při vzniku rakoviny deletován, do organismu. Jiným přístupem je potom zavedení oligonukleotidů, které by blokovaly onkogenní formy miRNA v buňkách pomocí procesu RNA interference.

Budoucí výzkum miRNA nás může posunout k přesnějším diagnostickým metodám, vytipování rizikových skupin lidí pro specifické druhy rakoviny a k novým možnostem terapie s větší úspěšností a menšími vedlejšími účinky. Různé miRNA jsou velmi specificky charakterizované. Jsou to malé molekuly, existuje celá řada druhů, často s podobnou sekvencí a v organismu se vyskytují v extrémně nízkých hladinách. Proto jejich izolace a analýza vyžaduje nové metodické postupy.

1.3 Izolace a purifikace RNA

Metody izolace krátkých RNA jsou podobné jako pro celkovou RNA. Velmi často jsou miRNA získávány v rámci izolace celkové RNA, existují ale i soupravy, které umožňují oddělení dlouhých RNA a tím obohacení pouze frakce krátkých RNA (> 200 nukleotidů). Obecně je pro úspěšnou izolaci a purifikaci nukleových kyselin třeba efektivně lyzovat buňky, popřípadě rozrušit zpracovávanou tkáň, denaturovat komplexy nukleových kyselin s proteiny a inaktivovat nukleázy (RNázy pro izolaci RNA). Je také nutné zabránit kontaminaci cílové látky. Pokud izolujeme RNA, je žádoucí, aby neobsahovala DNA, proteiny, lipidy a další látky, které se v buněčném lyzátu vyskytují [59].

Protože je RNA náchylná na degradaci RNázami, úspěšnost její extrakce závisí na správné laboratorní technice. RNázy jsou tepelně stabilní a náročné na inaktivaci, jelikož pro svou funkci nepotřebují kofaktory. Pro inhibici endogenních RNáz je nutné použít silná denaturační činidla. Ochrana proti exogenním RNázám je zajištěna použitím speciálního vybavení, které je sterilní a zbavené nukleáz a je označováno jako RNase-free. Pro přípravu roztoků se používá voda ošetřená diethylpyrokarbonátem (DEPC), který RNázy inaktivuje [60].

Důležité je také skladování vzorku. Pokud chceme správně kvantifikovat miRNA z plazmy, je třeba vzorek zpracovat do 48 hodin, pokud je uchováván při -20°C nebo -70°C . V případě, že je vzorek uchováván při -4°C , dochází k výrazné degradaci miRNA již po 24 hodinách [61].

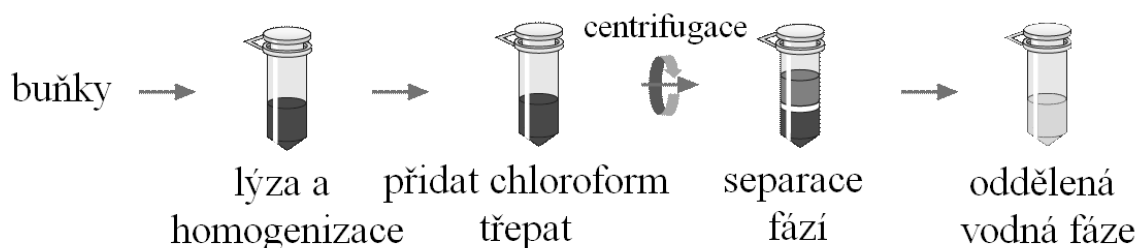
Metody izolace nukleových kyselin lze obecně rozdělit do dvou skupin, a to na chemickou extrakci a extrakci na pevné fázi.

1.3.1 Fenol-chloroformová extrakce

Jednou z nejrozšířenějších metod je fenol-chloroformová extrakce, jejíž obecný postup zobrazuje Obrázek 12. Využívá se směsi fenol-chloroform-izoamyl alkohol v poměru 25:24:1. Se vzorkem je tato směs mísená v poměru 1:1 [62].

Molekuly ze vzorku přechází do jedné ze dvou fází podle své rozpustnosti, a to do vodné nebo organické fáze. K rozdělení fází dochází díky přidání směsi fenolu a chloroformu k vzorku ve vodném prostředí. Organická vrstva se po centrifugaci nachází ve spodní části, kdežto vodná fáze je nahoře. Nukleové kyseliny při izolaci zůstávají ve vodné fázi, jelikož jsou díky své negativně nabitě fosfátové kostře polární. Zda získáme DNA nebo RNA je určeno na základě pH použitého fenolu. Při pH 7 – 8 se do vodné fáze dostávají jak DNA,

tak i RNA. Pokud ale pH snížíme na 4,8 (použitím kyselého fenolu), zůstane ve vodné fázi pouze RNA. Jelikož je velmi často jednovláknová, její dusíkaté báze jsou obnaženy a mohou vytvářet vodíkové vazby s molekulami vody. Náboj RNA je proto neutralizován obtížněji než u DNA. Proteiny a krátké fragmenty DNA pak přechází do organické fáze a dlouhá DNA do mezifáze. Nižší pH je výhodné také kvůli tomu, že inhibuje aktivitu RNáz [63, 64]. Nukleové kyseliny mohou být následně precipitovány přidáním etanolu nebo izopropanolu. Pro větší efektivitu precipitace se přidávají soli jako je acetát sodný nebo amonný. Precipitát je následně promyt 70% etanolem a resuspendován v pufru nebo ve sterilní vodě [65].



Obrázek 12: Obecné schéma fenol-chloroformové extrakce pro izolaci nukleových kyselin. Převzato a upraveno z: [64]

Pro extrakci RNA je k fenol-chloroformové extrakci často přidáván guanidium thiokyanát a guanidium hydrochlorid, chaotropní činidla se schopností lyzovat buňky a inaktivovat nukleázy. Guanidium thiokyanát má větší inhibiční účinek na RNázy [66]. Těchto vlastností využili například Boom a kol., kteří sestavili protokol pro vazbu nukleových kyselin ze séra a moči na částice z oxidu křemičitého. K této vazbě dochází po lýzi krevních buněk, způsobené vysokou koncentrací právě guanidium thiokyanátu.

Na tomto principu funguje řada komerčně dodávaných souprav. Jedním z příkladů je TRIzol™ Reagent od firmy Thermo Fiesher Scientific, kterým lze izolovat RNA, DNA i proteiny z jednoho vzorku. Pro extrakci stačí k této směsi přidat chloroform, čímž dojde k oddělení fází. Ve vodné fázi se potom nachází RNA a v mezifázi a organické fázi jsou DNA a proteiny. RNA je precipitována izopropanolem, DNA etanolem [67].

1.3.2 Extrakce na pevné fázi

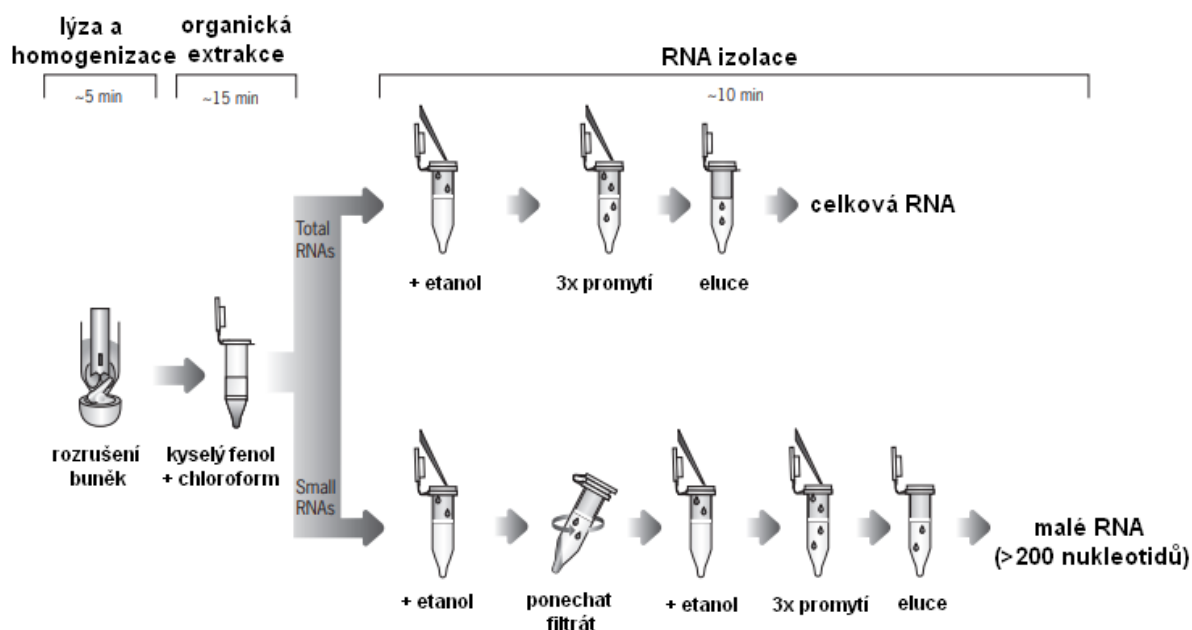
Extrakce na pevné fázi je principem většiny komerčně dodávaných souprav pro izolaci nukleových kyselin. Tyto metody řeší problém s možností neúplné separace fází u chemické extrakce. Princip je analogický, ale fenol je nahrazen nerozpustnými částicemi, které mají afinitu k nukleovým kyselinám. Adsorpce nukleových kyselin na pevnou fázi je ovlivněna

použitým pH nebo koncentrací solí. Pevné fáze mohou být buď v kolonovém uspořádání, nebo jako volné částice (speciálním typem jsou magnetické nosiče). V obou případech se pro oddělení supernatantu využívá centrifugace [68].

Prvním krokem extrakce na pevné fázi je smočení kolony (případně volného nosiče), na kterou je poté nanesen vzorek s lyzovanými buňkami. Molekuly nukleových kyselin se sorbují na pevnou fázi a jsou následně promyty, aby došlo k odstranění nežádoucích komponent, jako jsou například proteiny. Promývací roztok může obsahovat látku, která soutěží o vazebná místa se složkami, které mají slabší afinitu k povrchu pevné fáze, než mají nukleové kyseliny. Elučním krokem dojde k uvolnění purifikovaných nukleových kyselin buď puřem, nebo destilovanou vodou.

Pevné fáze mohou být tvořeny řadou materiálů a je možnost využít směsi dvou a více materiálů pro zlepšení interakce s nukleovými kyselinami [69]. Jednou z látek, kterou lze uplatnit v DNA je oxid křemičitý. Používají se skleněné částice, skleněná vlákna nebo přímo částice oxidu křemičitého [66, 70]. Principem sorpce DNA na oxid křemičitý je afinita negativně nabitě molekuly DNA k pozitivně nabitě částici. Důležitou roli mají sodné ionty, které ve vysoké koncentraci podporují vznik interakcí mezi fosfátovou kořtrou DNA a částicemi oxidu křemičitého. Promytím je DNA purifikována od nečistot a následně eluována Tris/EDTA (TE) puřem nebo destilovanou vodou. Další, avšak méně specifickou možností pro izolaci nukleových kyselin, jsou nitrocelulózové nebo polyamidové membrány [71].

Pro specifickou izolaci krátkých RNA molekul existuje, mimo jiné, například komerčně dostupná souprava od Thermo Fisher Scientific – *mirVana*TM miRNA Isolation Kit, která kombinuje fenol-chloroformovou extrakci s extrakcí na pevné fázi. Využívá tak výhody obou metod a slibuje získat velmi čisté RNA za zhruba 30 minut, jak je zobrazeno na Obrázku 13. Tato metoda je založena na adsorpci nukleových kyselin na filtr tvořený skleněnými vlákny. Prvním krokem je lýza buněk, následovaná fenol-chloroformovou extrakcí. V tomto kroku je od RNA oddělena většina nečistot, včetně DNA. V následujícím postupu se mírně liší izolace krátkých RNA od izolace celkové RNA. V obou případech je ovšem přidán etanol a směs je přefiltrována přes kolonu se skleněnými vlákny, na kterých je RNA zachycena, promyta a následně eluována. Delší RNA se zachycuje na skleněná vlákna již při nižších koncentracích etanolu, než RNA krátká. Toho je využito při oddělení frakce krátkých RNA [72].



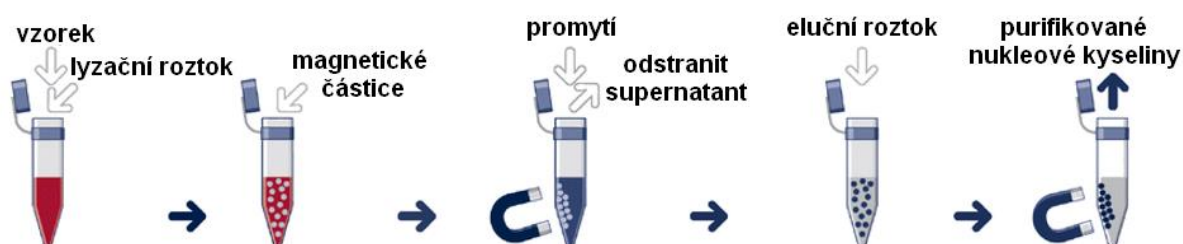
Obrázek 13: Schéma izolace RNA pomocí *mirVana*TM miRNA IsolationKit. Převzato a upraveno z: [72]

Z dalších souprav, které kombinují různé principy izolace se zaměřením specificky na miRNA, lze zmínit například NucleoSpinTM miRNA Plasma od MachereyNagel [73] nebo miRNease Serum/Plasma Kit od Qiagen [74].

Nosič testovaný pro separaci krátkých RNA extrakcí na pevné fázi v této práci je Titansphere TiO firmy GL Sciences. Jsou to 10 µm velké sférické porézní částice vytvořené z oxidu titaničitého, které jsou převážně používány k izolaci fosforylovaných proteinů [75].

Magnetické částice:

Tyto částice jsou superparamagnetické, což znamená, že vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Pokud je magnetické pole odstraněno, částice magnetické vlastnosti opět ztrácí. Izolace nukleových kyselin využívající magnetické částice jsou tedy založeny na principu extrakce na pevné fázi. Jejich velkou výhodou oproti klasickým pevným fázím je snadná manipulace a tedy rychlost extrakce. Díky tomu, že jsou tyto částice magnetické, je velmi jednoduché oddělit je od supernatantu jak při promývání, tak při eluci nukleových kyselin vložení směsi do magnetického pole, jak je zobrazeno na Obrázku 14.



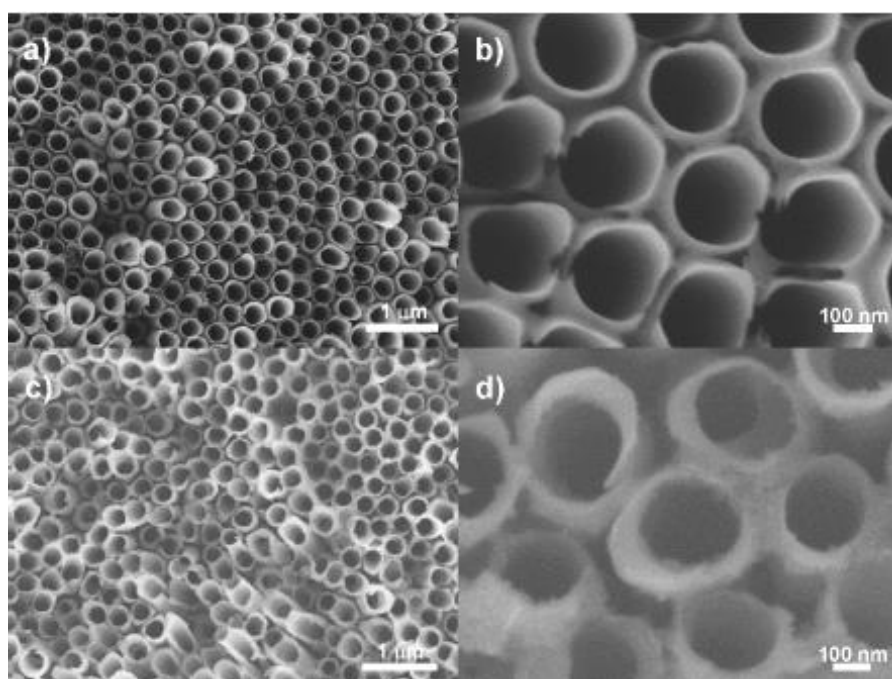
Obrázek 14: Obecné schéma izolace nukleových kyseliny pomocí magnetických částic. Převzato a upraveno z: [76]

Na trhu je dostupná řada magnetických nosičů. Často jsou to magnetické částice, na kterých jsou imobilizované ligandy, nebo částice připravené z biopolymerů vykazujících afinitu k analyzované molekule [77]. Variantou je také uzavřít magnetický materiál do vrstvy polymeru, jako například celulózy. Dalšími možnostmi pokrytí magnetického jádra částice jsou například kyselina alginová [78], polyvinylalkohol [79], zlato [80] nebo sloučeniny křemíku [81].

Superparamagnetické jádro částice je nejčastěji tvořeno oxidy železa, které jsou relativně bezpečné a netoxické, dále mohou být využívány i Ni a Co. Na těchto částicích lze izolovat nukleové kyseliny i bez pokrytí dalšími látkami [82]. Zajímavá je také izolace na magnetické částice izolované z magnetických bakterií (např.: *Magnetospirillum magneticum*) [83, 84].

Komerčně dodávanou metodou využívající magnetické částice je například MagMAXTM mirVanaTM Total RNA Isolation Kit od firmy Thermo Fisher Scientific. Tato souprava je navržena k izolaci celkové RNA včetně krátkých RNA ze séra, plazmy, celkové krve, buněčné kultury, moči i tkání [85]. Jako další možnost je možné uvést například DynabeadsTM Streptavidin dodávané firmou Thermo Fisher Scientific, využitelné mimo jiné pro izolaci mRNA [86].

Magnetický nosič vybraný pro testování v této práci ($\text{TiO}_2\text{NTs@Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, zobrazený na Obrázku 15) byl vyvinut na pracovišti Centrum materiálů a nanotechnologií Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice a ošetřen patentem Univerzity Pardubice (CZ305599 z 18. 11. 2015 a WO/2016/015690 z 04. 02. 2016; [87]). Jedná se o TiO_2 nanotrubicice s vnitřním průměrem ~ 230 nm, pokryté vrstvou Fe_3O_4 . Díky Fe_3O_4 má tento materiál magnetické vlastnosti. Fe_3O_4 společně s TiO_2 potom zajišťují afinitu k vybraným biomolekulám. Na tomto nosiči je možné například purifikovat a obohacovat proteiny označené polyhistidinovou kotvou [88].



Obrázek 15: Snímky TiO_2 nanotrubic (a, b) následně pokrytých Fe_3O_4 (c, d) pořízené elektronovým mikroskopem. Převzato z: [89]

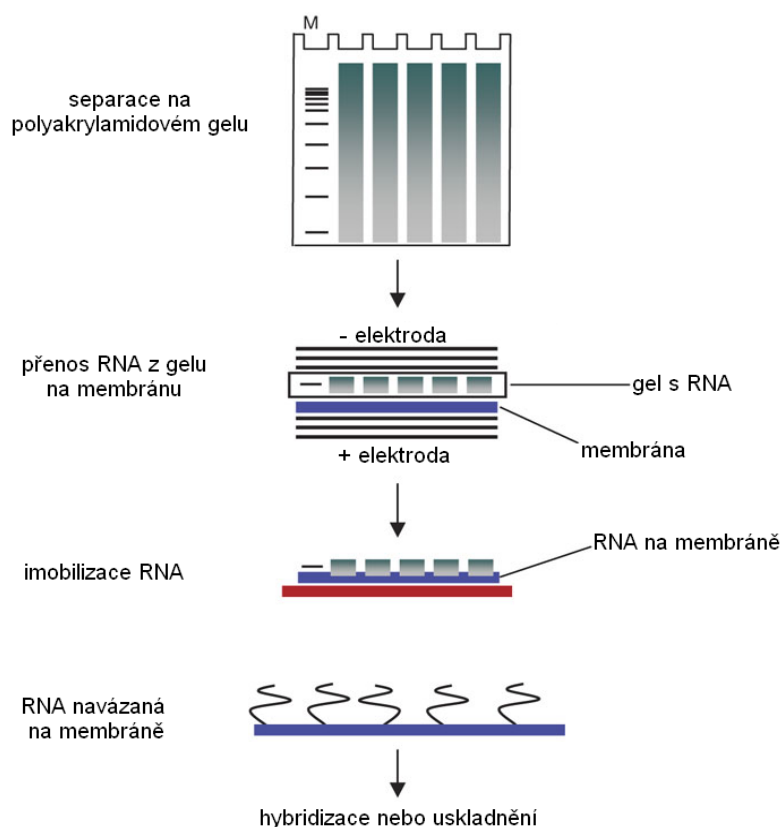
1.4 Možnosti průkazu RNA

Celková koncentrace a čistota izolované RNA jsou stanovovány absorpční spektrofotometrií. Měří se absorbance při 230, 260 (absorpční maximum nukleových kyselin) a 280 nm. Poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230 by pro RNA měly být zhruba 2 nebo vyšší. Pokud jsou hodnoty nižší, značí to kontaminaci vzorku. Při 280 nm absorbují proteiny, při 230 nm pak nečistoty, které ve vzorku zůstaly po předchozím zpracování jako například fenol, guanidinium thiokyanát a další.

Pro multiplexní analýzu miRNA jsou dnes nejčastěji využívány metody Northern blot, qRT-PCR nebo NGS.

1.4.1 Northern blot

K rozdělení RNA podle velikosti molekuly lze využít polyakrylamidových či agarózových gelů a k následné kvantifikaci techniky Northern blot. Pro krátké nukleové kyseliny jsou používány polyakrylamidové gely obsahující 8M močovinu [90]. Z gelu jsou molekuly přenášeny na membránu (často nylonovou) a hybridizovány se speciálními sondami. Zjednodušený postup ukazuje Obrázek 16.



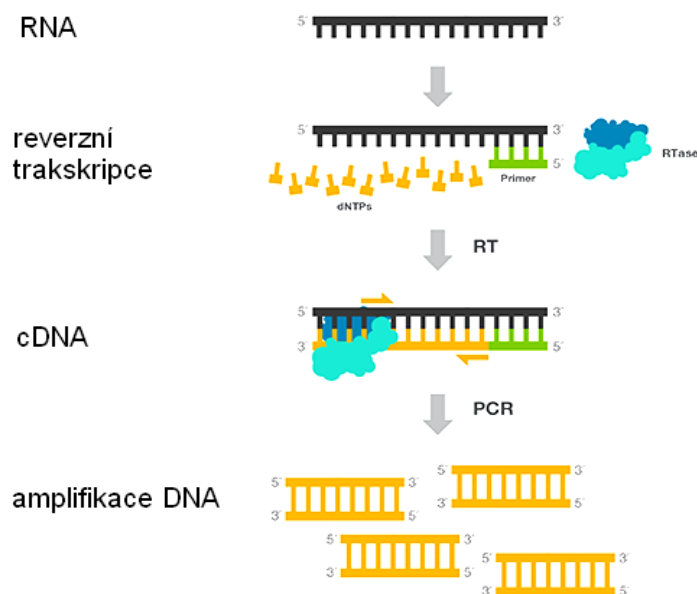
Obrázek 16: Northern blot. Molekuly RNA jsou přeneseny z polyakrylamidového gelu na membránu, kde jsou imobilizovány a následně hybridizovány se specifickými sondami. Převzato a upraveno z: [91]

Aby nedocházelo ke ztrátě molekul při hybridizaci a promývání, jsou RNA na membráně imobilizovány buď pomocí UV záření, nebo nověji pomocí 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC). Pro krátké molekuly se EDC jeví jako vhodnější, protože jeho působením dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi fosfátem na 5' konci RNA a amino skupinou na nylonové membráně a celá molekula RNA je tak dostupná pro hybridizaci. Oproti tomu UV zářením pravděpodobně vznikají vazby mezi převážně U a amino skupinami membrány. Kovalentně navázané báze potom nejsou dostupné pro hybridizaci, což u krátkých RNA může snižovat účinnost vazby detekční sondy [91].

Pro detekci miRNA má klasický Northern blot nízkou citlivost a je potřeba poměrně velké množství vzorku. Protokoly upravené pro analýzu miRNA se liší převážně způsobem značení a navržení sond, které se používají pro průkaz miRNA. Jednou z možností je inkorporace radio-izotopu (^{32}P). Bezpečnější alternativou jsou pak DIG (digoxigenin)-značené sondy [92]. Klasické DNA oligonukleotidové sondy jsou čím dál častěji nahrazovány LNA („locked nucleic acid“) modifikovanými oligonukleotidovými sondami. LNA jsou analogy RNA, které mají furanový kruh v cukr-fosfátové kostře „zamčen“ methylenovým můstkem, který spojuje 2'-O a 4'-C [90].

1.4.2 Polymerázová řetězová reakce

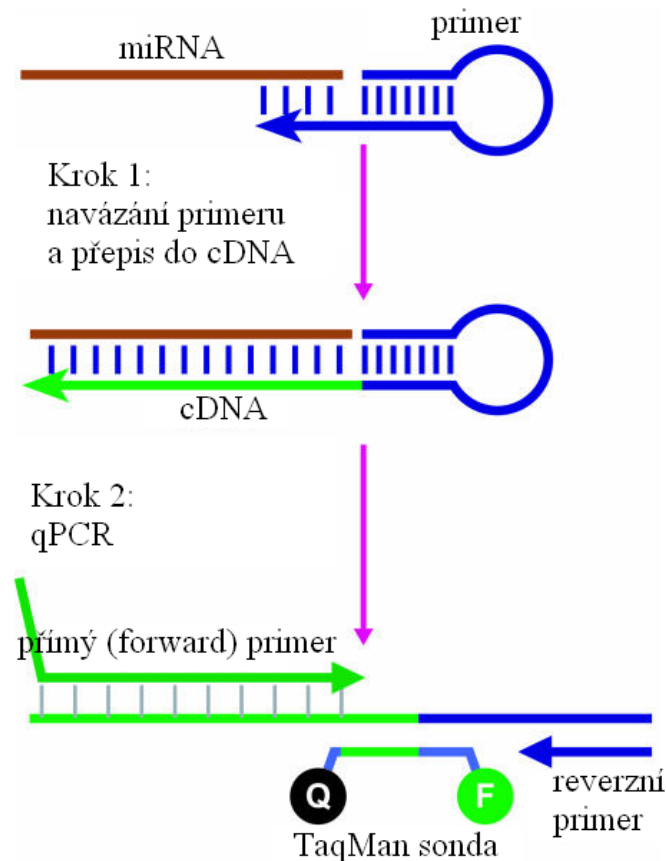
Pro detekci RNA se obecně používá polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR). Jak ukazuje Obrázek 18, prvním krokem je převedení RNA na komplementární DNA (cDNA) enzymem reverzní transkriptáza. Dále se postupuje stejně jako u přímé PCR, a to denaturací cDNA zvýšením teploty, nasednutím primerů (annealing) na jednotlivá vládna DNA a elongací, kdy je primer prodlužován komplementárně podle templátového vlákna. Pro určení množství RNA ve vzorku je vhodná kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR), u které je vznikající cDNA fluorescenčně značena během exponenciální fáze amplifikace v reálném čase [93].



Obrázek 17: Schéma reverzní transkripce, probíhající v rámci RT-PCR. Převzato a upraveno z: [93]

Problémem u detekce miRNA pomocí metody PCR je, že konvenčně používané primery jsou stejně dlouhé jako miRNA, tudíž je nutné zajistit kratší primery. Krátké primery mají sníženou teplotu tání, a proto musí být snížena i teplota pro nasedání primerů, což vede ke zhoršení účinnosti metody [94]. Jelikož jsou miRNA přítomny ve velmi nízkých koncentracích (celkové cirkulující miRNA jsou v řádech femtomolů) a tvoří pouze malou část celkové RNA, je zde i velká náročnost na citlivost zvolené metody [95]. Vysoká podobnost jejich sekvencí pak stěžuje specifickou detekci konkrétní miRNA [41].

Jednou z nejvíce používaných komerčních metod je TaqMan™ Assays. Pro amplifikaci konkrétních miRNA jsou využívány speciální primery ve tvaru vlásenky („stem-loop primers“), které nasednou na 3' konec miRNA. Reverzní transkripcí je miRNA přepsána do cDNA, která je kvantifikována za pomoci specifických primerů a značené TaqMan sondy [96]. Schéma principu ukazuje Obrázek 18.



Obrázek 18: Princip metody TaqMan™ využívající „stem-loop“ primery. Převzato a upraveno z: [96]

Pro analýzu více druhů miRNA je možné použít Advanced TaqMan™ Assay, která používá nespecifické primery [97]. Nespecifické primery využívá také MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix firmy Sigma-Aldrich [98]. Další variantou pro analýzu miRNA pomocí PCR je miRCURY™ LNA™ miRNA PCR System od firmy QIAGEN [99].

1.4.3 Sekvenování nové generace

Průlom v oblasti sekvenování nastal v roce 1977, kdy byla publikována práce Fredericka Sanger a kolektivu. Jímí popsaná metoda využívá procesu replikace DNA. Do reakční směsi, která obsahuje primer, vhodnou DNA polymerázu, zásobu deoxyribonukleotidů a templátovou DNA, je přidán jeden ze čtyř dideoxyribonukleotidů. Ty se poté začleňují do řetězce a svým zakomponováním ukončí elongaci vznikajícího řetězce. Sekvence je určována z délky elektroforetické separace reakčních směsí [100].

Metody NGS jsou dnes více používány hlavně proto, že je možné celý proces automatizovat a sekvenovat velká množství vzorků za krátkou dobu. Mezi sekvenátory, které jsou dostupné a hojně využívané patří například Applied Biosystems 3730xl sekvenátor, který vychází právě z principu Sangerova sekvenování. Dále sem patří 454/Roche FLX system

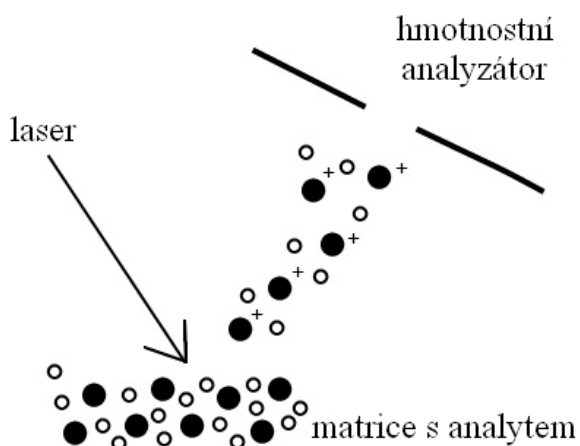
od Roche Applied Science, Illumina/Solexa sekvenátor od Illumina, Inc. nebo Applied Biosystems SOLiD [101].

1.4.4 Hmotnostní spektrometrie.

Hmotnostní spektrometrie (MS) je založená na interakci nabitých částic analytu s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Základní uspořádání hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, analyzátor a detektor.

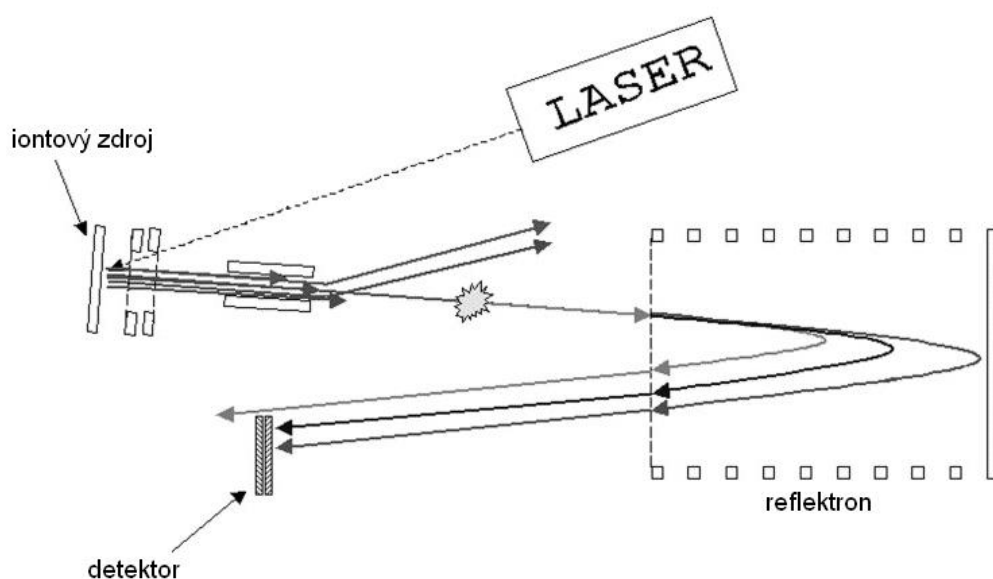
Úkolem iontového zdroje je převést analyzované molekuly na ionty. Nejčastěji používanými iontovými zdroji pro analýzu biomolekul jsou elektrosprej a MALDI (Matrix assisted laser desorption ionization). Vzniklé ionty následně vstupují do hmotnostního analyzátoru, kde v elektromagnetickém poli dochází k jejich rozdělení na základě poměru jejich molekulové hmotnosti a náboje (m/z) [102].

Při MALDI přijímá matrice energii laseru. Absorbováním energie dojde k zahřátí matrice a následně k desorpci molekul matrice i vzorku z destičky a k převedení analytu z pevné fáze do fáze plynné. Vhodná matrice, kterou bývá nejčastěji aromatická organická kyselina, je před analýzou smíšena s analyzovaným vzorkem, směs je nanášena na destičku a vysušena. Dalšími možnostmi je smíšení vzorku s matricí přímo na destičce, případně nanášení vzorku, který je po vysušení převrstven matricí. Princip techniky izolace MALDI zobrazuje Obrázek 19 [103].



Obrázek 19: Obecný princip matricí zprostředkované laserové desorpce. Absorbací energie laserového paprsku dojde k ionizaci matrice a analytu. Převzato a upraveno z: [104]

Metoda ionizace MALDI je často spojována s průletovým analyzátozem (TOF), a to hlavně proto, že TOF je pulzní analyzátor. Ionty se k detektoru pohybují vakuovanou trubicí a k separaci dochází na základě jejich rozdílné rychlosti. Doba letu iontů závisí na poměru m/z – čím je menší, tím kratší dobu iont letí. Pro zlepšení rozlišení lze využít uspořádání s iontovým zrcadlem, tzv. reflektorem, díky kterému je prodloužena dráha a doba letu iontů, a díky kterému je eliminována počáteční kinetická energie iontů. Toto uspořádání je zobrazeno na Obrázku 21. Pro zlepšení rozlišení je také používána opožděná extrakce iontů („delayed extraction“), která využívá pulsu urychlujícího napětí, který je aplikován s časovou prodlevou po ionizaci [103].



Obrázek 20: Princip průletového analyzátoru. Převzato a upraveno z: [105]

MALDI v kombinaci s průletovým analyzátozem (TOF) je velmi efektivní technika pro analýzu biopolymerů, jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny. Pro úspěšnou analýzu je důležité vybrat vhodnou matici. Matrice je látka absorbující v oblasti vlnové délky, kterou emituje laser. Musí být stabilní ve vakuu a měla by po nanesení na destičku tvořit jemné, homogenní krystaly.

Žádoucím výsledkem ionizace je jeden pík molekulového iontu analytu. Matrice by neměla způsobovat fragmentaci analyzované molekuly, ačkoliv v některých aplikacích (jako například určování sekvence) toto může být výhodou. Pokud jsou ve vzorku obsaženy ionty solí (např.: sodné, draselné nebo hořečnaté), nukleové kyseliny mají tendenci tvořit s nimi adukty. Tyto adukty potom snižují citlivost, zhoršují rozlišení a komplikují interpretaci výsledků, jelikož místo jednoho píku molekulového iontu se v hmotnostním spektru objevuje

shluk píkù, které se mírně liší v hodnotě m/z. Tento problém je řešen odsolováním vzorkù před analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie, dále mícháním několika matic nebo přidáváním amonných solí.

Výběr vhodné matrice je prováděn podle typu analyzované molekuly. Matrice, která je vhodná pro ionizaci proteinù nemusí poskytovat kvalitní spektra při analýze nukleových kyselin. Nejčastěji používané jsou matrice pro analýzu proteinù a peptidù, mimo jiné například α -kyano-4-hydroxybenzoová kyselina nebo dihydroxybenzoová kyselina.

Pro analýzu nukleotidù existuje řada matic. Jednou z nejpoužívanějších matic při analýze nukleových kyselin je 3-hydroxypikolinová kyselina [106]. Ionizace nukleových kyselin byla prokázána i při použití látek jako sinapová a dihydroxybenzoová kyselina [107], 6-aza-2-thiothymín [108] nebo 1,5-diaminonaftalen (DAN). Na rozdíl od klasicky využívaných matic byla při použití DAN pozorována vysoká fragmentace nukleových kyselin, což by potenciálně mohlo být využito pro jejich sekvenaci [109]. Další maticí využívanou pro ionizaci nukleových kyselin je 2,4,6-trihydroxyacetofenon (2,4,6-THAP) samostatně nebo v kombinaci s 2,3,4-THAP a citrátem amonným v poměru 2:1:1. Přídavek citrátu amonného k maticím výrazně ovlivňuje ionizaci nukleových kyselin. Molekuly v přítomnosti citrátu amonného snadněji ionizují a navíc díky němu dochází k potlačení vzniku aduktù se solnými a draselnými ionty [110]. Pro ionizaci nukleových kyselin byla popsána i řada dalších látek, používaných samostatně, ve směsích, či s dalšími přísadami. Pro dosažení co nejkvalitnějších výsledkù je nutné vždy optimalizovat koncentrace matrice i aditiva pro konkrétní analyzované molekuly.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo optimalizovat a zavést do laboratoře novou metodu izolace oligo RNA z komplexní směsi pomocí TiO₂ materiálů.

Součástí práce byly dílčí úkoly:

- 1) Optimalizace elektroforetických podmínek pro analýzu RNA s využitím polyakrylamidového gelu s 8M močovinou – koncentrace gelu, výběr vhodného vzorkového pufru a techniky barvení krátkých molekul RNA.
- 2) Zavedení technik izolace miRNA komerčními testy – porovnání účinnosti izolace krátkých molekul RNA metodami se třemi různými principy separace nukleových kyselin z biologického materiálu.
- 3) Zavedení a optimalizace techniky izolace miRNA pomocí materiálů na bázi TiO₂ – výběr vhodného nosiče, optimalizace teploty izolace a vazebného a elučního pufru.
- 4) Zavedení a optimalizace podmínek analýzy RNA hmotnostním spektrometrem – porovnání vlastností různých matric.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní přístroje a vybavení

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- aparatura pro elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA USA)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS+ System s Image Lab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- hmotnostní spektrometr 4800 MALDI/TOF/TOF Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, Framingham, MA, USA)
- inkubátor Memmert INE 400 (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- koncentrátor Concentrator Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- mikrozkuhavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- orbitální třepačka Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- rotátor RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- spektrofotometr Nano-MD UV-Vis Bio Spectrophotometer s nástavcem NanoStick-D (SCINCO Co. Ltd., Seoul, Korea)
- stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- špičky GeLoader 20µl (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- topné hnízdo Block heater Grant Bio BTB (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- třepačka Vortex mixer Wx (Velp Scientifica, Usmate, Itálie)
- ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)
- zdroj napětí Powerpac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

3.2 Chemikálie, reagensie a speciální biologický materiál

Chemikálie a reagensie:

- 1,5-diaminonafalen (DAN; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina (MES; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2,4,6-trihydroxyacetofenon (THAP; Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 6-aza-2-thiothymín (ATT, Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- Acetonitril (ACN; Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amoniak (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Barvivo Toluidine Blue O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Barvivo Xylene Cyanole FF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, ČR)
- Citran sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- DEPC-Treated Water (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, part no. 45-2224, lot no. 1574421)
- DEPC-Treated Water (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, part no. AM9915G, lot no. 1606045)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4 ; Penta, Chrudim, ČR)
- Etanol (Lachema, Neratovice, ČR)
- Ficoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Formamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fosforečnan sodný (Na_3PO_4 ; Penta, Chrudim, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydrogencitronan amonný (DAHC; Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- Hydrogenfosforečnan amonný ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; Penta, Chrudim, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4 ; Penta, Chrudim, ČR)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (NaCl; Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Izopropanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina 3-hydroxypikolinová (3-HPA; Honeywell Fluka, New Jersey, USA)

- Kyselina boritá (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina citronová (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina dihydroxybenzoová (DHB; LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, Francie)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA; Lachema, Neratovice, ČR)
- Kyselina glutamová (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina glykolová (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina mléčná (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina salicylová (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina sinapová (SA; Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- Kyselina trifluoroctová (TFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina vinná (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- MagMAXTM *mirVana*TM Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Močovina (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin (TEMED; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-metylenbisakrylamid 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Nucleic Acid Sample Loading Buffer (5x) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Octan sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- RNaseZapTM RNase Decontamination Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standard 10 bp DNA Ladder (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, lot no. 1823711, ref: 10821-015)
- SYBRTM Green II RNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- SYBRTM Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Šťavelan sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TRIzolTM Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Speciální biologický materiál:

- Buněčná linie JURKAT (lidské T-lymfatické buňky Akutní lymfoblastické leukémie, ACC 282)
- Buněčná linie RAJI (lidské B-lymfatické buňky Burkittova lymfomu, ACC 319)
- Oligo RNA 10-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR, lot no. 1256F3)
- Oligo RNA 20-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR, lot no. 1256F4 a lot no. 1490I2)
- Oligo RNA 23-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR, lot no. 1490I3 a lot no. 1462J0)
- Oligo RNA 30-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR, lot no. 1256F5)
- Oligo RNA 40-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR, lot no. 1256F6)

Nosiče:

- TiO₂NTs@Fe₃O₄NPs (poskytnuto v rámci spolupráce s CEMNAT, Fakulta chemicko-technologické Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR)
- Titansphere TiO (GL Sciences Inc, Tokyo, Japan, lot no. ZQ1-2868-15)

3.3 Elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu s močovinou

Použité roztoky:

- 45% směs akrylamidu s N,N'-metylenbisakrylamidem (v poměru 28:1)
- 10x koncentrovaný TBE pufr (0,89M Tris, 0,89M kyselina boritá, 20mM EDTA, pH = 8,3)
- Elektrodový pufr: 1x TBE
- 10% roztok persíranu amonného
- TEMED
- Vzorkový pufr „Nucleic Acid Sample Loading Buffer (5x)“ firmy Bio-Rad
- Vzorkový pufr: 89mM Tris, 89mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, 7M močovina, 12% Ficoll, 0,01% směs bromfenolové modři a xylene cyanole FF
- Marker (10 bp DNA Ladder Bio-Rad)
- Barvicí roztok 0,1% roztok Toluidine Blue O
- SYBRTM Safe DNA Gel Stain v TBE (1:10000)
- SYBRTM Green II RNA Gel Stain v TBE (1:10000)
- Odbarvovací roztok: 1% kyselina octová

Postup:

1) Příprava 20% gelu s 8M močovinou:

Do zkumavky s 5,76 g močoviny bylo napipetováno 1,5 ml redestilované vody, 1,5 ml 10x TBE a 5,32 ml 45% roztoku akrylamidu. Tato směs byla rozpuštěna a odvzdušněna pomocí ultrazvukové lázně. Následně bylo přidáno 6 μ l TEMED a 63,36 μ l 10% roztoku persíranu amonného. Směs byla dvakrát promíchána obrácením zkumavky a následně napipetována mezi připravená skla. Ihned byla také vložena očištěná šablona pro 15 jamek. Gel byl zpolymerován během 10 minut.

Skla s gely byla přenesena do elektroforetické vany, kam byl následně nalit elektrodový pufr tak, aby jeho hladina dosahovala vyznačené rysky. Nádoba s gely a elektrodovým pufrem byla temperována v inkubátoru při 42°C po dobu 40 min.

2) Příprava a aplikace vzorků:

Pro přípravu vzorku s využitím komerčně dodávaného vzorkového pufru byl vzorek o objemu 5 μ l (v případě koncentrovanějšího vzorku byl ředěn DEPC-vodou na objem 5 μ l) smíchán s 2,5 μ l vzorkového pufru firmy Bio-Rad a 5 μ l formamidu. Tato směs byla zahřáta na 70°C po dobu 5 min.

Vzorkový pufr připravený v laboratoři byl smísen se vzorkem v poměru 1:1. Tato směs byla po dobu 4 minut zahřívána na 70°C.

Připravené vzorky byly ihned po zahřátí naneseny do jamek v gelu. Jamky byly před dávkováním vzorků důkladně propláchnuty elektrodoým pufrem pro odstranění zbytků močoviny. Na každý gel byl nanesen naředěný standard (1 μ l standardu s 4 μ l DEPC-vody), připravený stejně jako vzorky.

3) Podmínky separace:

Elektroforetická separace byla provedena při konstantním napětí 180 V. Vkládaný proud byl 150 mA. Dělení probíhalo 125 min.

Barvení gelů:

1) Barvení pomocí SYBRTM Safe DNA Gel Stain:

Barvicí roztok byl připraven smícháním 18 ml redestilované vody, 2 ml 10x TBE a 2 μ l SYBRTM Safe (1:10000 v TBE). Gel v barvicí nádobě byl převrstven 20 ml barvicího roztoku a inkubován 30 min při laboratorní teplotě. Poté byl barvicí roztok vylit a gel byl promyt TBE pufrem.

2) Barvení pomocí SYBRTM Green II RNA Gel Stain:

Barvicí roztok byl připraven smícháním 18 ml redestilované vody, 2 ml 10x TBE a 2 μ l SYBRTM Green II (1:10000 v TBE). Gel v barvicí nádobě byl převrstven 20 ml barvicího roztoku a inkubován 40 min ve tmě při laboratorní teplotě. Gel nebylo třeba promývat.

3) Barvení Toluidine Blue O

Gel v barvicí nádobě byl převrstven 20 ml 0,1% roztoku Toluidine blue O a inkubován 15 minut při laboratorní teplotě. Po vylití barvicího roztoku byl ke gelu přidán 1% roztok kyseliny octové k odbarvení. Odbarvovací roztok byl podle potřeby vyměňován, dokud nedošlo k odbarvení pozadí gelu (cca hodina a půl).

4) Hodnocení gelů:

Detekce po všech typech barvení byla provedena přístrojem ChemiDoc XRS+. Snímek gelu byl následně vyhodnocen programem ImageLab.

V experimentální části této práce byly u elektroforetické separace na polyakrylamidovém gelu s močovinou (TBE-PAAG) optimalizovány pro analýzu krátkých molekul RNA tyto podmínky:

- koncentrace akrylamidu,
- technika barvení,
- složení vzorkového pufu.

3.4 Izolace RNA komerčními testy:

3.4.1 TRIZol™ Reagent

Použité roztoky:

- TRIZol™ Reagent
- Izopropanol
- 75% etanol
- DEPC-voda

Postup:

Pro izolaci celkové RNA byly dodržovány pokyny výrobce. Každý vzorek, ze kterého byla izolována celková RNA, obsahoval $5 \cdot 10^6$ buněk z buněčné linie JURKAT nebo RAJI.

Buňky byly resuspendovány v 750 μ l TRIZol™ Reagentu a inkubovány 5 min při laboratorní teplotě, aby došlo k jejich lýze. Poté bylo přidáno 150 μ l chloroformu a směs byla míchána třepáním 2 – 3 min při laboratorní teplotě. Pro oddělení fází byla směs centrifugována 15 min při 12000 g. Horní, vodná fáze obsahovala RNA, mezifáze a fenolová fáze pak proteiny a DNA.

K získání RNA byla odebrána horní vrstva, ke které bylo přidáno 375 μ l izopropanolu, kterým byla RNA precipitována 10 min při laboratorní teplotě. Následně byla směs centrifugována 10 min při 12000 g a supernatant byl odpipetován do odpadu. Peleta vysrážené RNA byla promyta 750 μ l 75% etanolu. Po centrifugaci 5 min při 7500 g byl supernatant opět odebrán, vyhozen a peleta byla opatrně vysušena na koncentrátoru v módu V-AL při 30°C. Získaná RNA byla resuspendována v 20 μ l DEPC-vody a inkubována 10 – 15 min v topném hnízdě při 55 – 60°C.

Koncentrace a čistota takto získané RNA byla stanovena na UV/VIS spektrofotometru.

3.4.2 *mirVana*TM miRNA Isolation Kit

Roztoky z použité soupravy:

- miRNA Wash Solution 1 (před prvním použitím přidáno 21 ml etanolu)
- Wash Solution 2/3 (před prvním použitím přidáno 40 ml etanolu)
- Lysis/Binding Buffer
- miRNA Homogenate Additive
- Acid-Phenol:Chloroform

Postup:

Pro izolaci krátkých RNA byly dodržovány pokyny výrobce. Každý vzorek, ze kterého byla izolována celková RNA, obsahoval $5 \cdot 10^6$ buněk z buněčné linie JURKAT nebo RAJI.

Buňky byly homogenizovány v 600 μ l Lysis/Binding Buffer důkladným promícháním. Ke vzorku bylo následně přidáno 60 μ l miRNA Homogenate Additive. Následně byl vzorek inkubován 10 min na ledu. Po inkubaci bylo přidáno 600 μ l směsi Acid-Phenol:Chloroform a promícháváno 1 min na třepačce. Pro oddělení fází byl vzorek centrifugován 5 min při 10000 g a poté byla horní, vodná fáze opatrně odebrána a přenesena do nové zkumavky.

Pro izolaci krátkých RNA byl přidán 100% etanol o objemu 1/3 odebrané vodné fáze. Po důkladném promíchání byla směs přenesena na fritu umístěnou do sběrné zkumavky, která je poskytována v soupravě. Po centrifugaci (cca 15 s při 10000 g) na fritě zůstaly zachyceny dlouhé molekuly RNA, které bylo možné získat aplikováním protokolu pro izolaci celkové RNA, kdežto filtrát obsahoval krátké molekuly RNA. Do zkumavky s přefiltrovaným roztokem byl přidán 100% etanol v množství, které odpovídalo 2/3 objemu filtrátu a po promíchání byla směs přenesena na novou fritu a centrifugována cca 15 s při 10000 g.

Filtrát byl odstraněn a fritu se zachycenými krátkými molekulami RNA byla promyta nejprve 700 μ l miRNA Wash Solution 1 (centrifugace 5 – 10 s) a poté dvakrát 500 μ l Wash Solution 2/3. Po odstranění veškerého filtrátu byla fritu ve sběrné zkumavce centrifugována 1 min pro odstranění zbytkové tekutiny. Fritu byla přenesena do čisté sběrné zkumavky a byla provedena eluce RNA 50 μ l DEPC-vody, předehřáté na 95°C, a to centrifugací 20 – 30 s při maximální rychlosti.

Koncentrace a čistota takto získané frakce krátkých RNA byla stanovena na absorpčním spektrofotometru.

3.4.3 MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit

Použité roztoky:

- Wash Solution 1 Concentrate (před prvním použitím přidáno 10 ml izopropanolu)
- Wash Solution 2 Concentrate (před prvním použitím přidáno 48 ml etanolu)
- Turbo DNase Solution (50 µl na zkumavku: 48 µl MagMAX™ TURBO DNase™ Buffer + 2 µl TURBO DNase™, skladováno na ledu)
- Binding Beads (20 µl na zkumavku: 10 µl RNA Binding Beads + 10 µl Lysis/Binding Enhancer, skladováno na ledu)
- Lysis Binding Mix (200 µl na zkumavku: 99 µl Lysis Buffer + 100 µl izopropanol + 1 µl 2-merkaptoetanol)
- Rebinding Buffer
- Elution Buffer

Postup:

Každý vzorek, ze kterého byla izolována celková RNA, obsahoval $5 \cdot 10^6$ buněk z buněčné linie JURKAT nebo RAJI. Roztoky v soupravě byly podle instrukcí dodavatele smíchány a připraveny pro další použití.

Buňky byly resuspendovány v 200 µl směsi Lysis Binding Mix a inkubovány 5 min bez míchání a poté další 3 minuty za míchání na rotátoru. Vzorek byl následně přenesen do zkumavky s připravenými Binding Beads a inkubován 5 min na rotátoru. Zkumavka byla vložena do magnetického stojánu a ponechána 5 minut, nebo dokud roztok nebyl čirý, aby bylo možné odebrat supernatant. Magnetické částice byly promyty 150 µl Wash Solution 1 po dobu 1 min na rotátoru. Po vložení zkumavky do magnetického stojánu byl supernatant odstraněn a promývání bylo zopakováno se 150 µl Wash Solution 2. Magnetické částice byly po odebrání veškerého supernatantu ponechány k vysušení v otevřené zkumavce mimo magnetický stojánek.

DNA byla odstraněna přidáním 50 µl TURBO DNase Solution, se kterým byly částice inkubovány 15 min na rotátoru. Do směsi bylo poté přidáno 50 µl Rebinding Buffer a 100 µl izopropanolu a za míchání inkubováno další 3 min. Zkumavka byla umístěna na magnetický stojánek na 3 minuty a poté byl odebrán supernatant. Částice byly dvakrát promyty 150 µl Wash Solution 2 na rotátoru po dobu 1 min. Promývací roztok byl odstraněn po vložení zkumavky do magnetického stojánu a zkumavka byla ponechána 2 min otevřená mimo magnetický stojánek k vysušení.

Pro eluci RNA bylo přidáno 50 μ l Elution Buffer, který byl dopředu přehřátý na 37°C. Po inkubaci 3 min na rotátoru byla zkumavka vložena do magnetického stojánku na 3 min a poté byl eluát přenesen do čisté zkumavky.

Koncentrace a čistota takto získané celkové RNA byla stanovena na absorpčním spektrofotometru.

3.5 Určení koncentrace a čistoty RNA pomocí UV/VIS spektrofotometru

Vzorky izolované RNA byly proměřeny na přístroji Nano-MD UV-Vis Bio Spectrophotometer pomocí nástavce NanoStick-D, na který byly nanесeny 2 μ l slepého vzorku a následně 2 μ l příslušných izolátů. Jako slepý vzorek byl použit vždy roztok, ve kterém byla RNA po izolaci resuspendována.

Měření absorbance probíhalo při 230, 260 a 280 nm. Absorpční maximum nukleových kyselin je při 260 nm. Softwarem LabPro Plus byly zároveň s koncentrací RNA vyhodnoceny také poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230.

3.6 Izolace oligo RNA pomocí TiO₂ materiálů

Použité roztoky a materiál:

- Nosiče na bázi TiO₂: TiO₂NTs@Fe₃O₄NPs (TNTs), Titansphere, oba v množství 1 mg
- Vazebný a promývací pufr: 100mM MES pufr s přidavkem 5mM nebo 100mM kyseliny citronové (pH 4)
- Promývací pufr: 100mM MES pufr (pH 4)
- Eluční roztok: 200mM Na₂HPO₄ (pH ~ 9,2)
- 80% ACN s 0,1% TFA
- 5% TFA

Postup:

Pro odebrání supernatantu bylo vždy nutné zkumavky s TNTs vložit do magnetického stojánku a zkumavky s Titansphere centrifugovat 1 min při 595 g. Nosiče byly naváženy a smočeny v 500 μ l 80% ACN s 0,1% TFA 2 – 3 min při 37°C. Následně byly dvakrát promyty 500 μ l vazebného a promývacího pufru (MES s přidavkem kyseliny citronové). Supernatant byl odebrán do odpadu a k nosiči bylo přidáno 200 μ l směsi vzorku a vazebného a promývacího pufru (oligo RNA byly přidávány v množství 150 pmol na zkumavku). Směs byla inkubována 60 min při 37°C v topném hníždě při 1200 rpm.

Vazebná frakce byla odebrána a uschována pro detekci. Nosiče byly dvakrát promyty 500 μ l vazebného a promývacího pufru a následně třikrát 500 μ l promývacího pufru (MES pufr bez přidavku kyseliny citronové). Všechny promývací kroky probíhaly 2 – 3 min při 37°C v topném hníždě při 1200 rpm. Po posledním promytí byl supernatant odebrán a k nosiči bylo přidáno 100 μ l elučního roztoku. Eluce probíhala 10 min při 37°C v topném hníždě při 1200 rpm. Eluční frakce byla odebrána a okyselena 30 μ l 5% roztoku TFA. V případě provedení druhé eluce bylo k nosiči přidáno opět 100 μ l elučního roztoku. Druhá eluce trvala 20 min při 37°C v topném hníždě při 1200 rpm. Odebraná eluční frakce byla okyselena 30 μ l 5% roztoku TFA. Detekce izolovaných oligo RNA byla provedena metodou TBE-PAAG.

V rámci experimentální části této práce byly optimalizovány tyto podmínky:

- typ nosiče,
- opakovaná analýza na nosiči (+ regenerace částic),
- teplota sorpce RNA,
- druh a pH vazebného a promývacího roztoku,
- přidavky dalších látek k vazebnému pufru,
- druh elučního roztoku.

3.7 Odsolení vzorku

Použité roztoky:

- 80% ACN s 0,1% TFA
- 0,1% TFA
- 60% ACN s 0,1% TFA

Postup:

Konec špičky GeLoader byl stlačen, aby nedocházelo k uvolnění fáze. Do takto upravené špičky bylo pipetováno 10 – 15 μ l fáze R3, která byla resuspendována v 80% ACN s 0,1% TFA. Vzniklá kolona byla promyta nejprve 10 μ l 80% ACN s 0,1% TFA a poté 15 μ l 0,1% TFA. Na promytou kolonu byl dávkován vzorek. Fáze s navázaným vzorkem byla dvakrát promyta 15 μ l 0,1% TFA. Při posledním promytí byla fáze vysušena protlačením zbytkového vzduchu, aby nebyl naředěn eluční roztok. Eluce byla provedena 60% ACN s 0,1% TFA.

3.8 Výběr vhodných matric pro analýzu RNA pomocí hmotnostní spektrometrie

Matrice:

- 50 mg 3-HPA v 1 ml 50% ACN s 40mM DAHC
- 10 mg 3-HPA v 1 ml 50% ACN s 20mM DAHC
- 10 mg 2,4,6-THAP v 1 ml 50% ACN s 20mM DAHC
- 28,64 mg 2,4,6-THAP v 1 ml 50% ACN s 70mM DAHC
- 10 mg ATT v 1 ml 50% ACN s 20mM DAHC
- 10 mg DHB v 1 ml 50% ACN/0,1% TFA s 10mM DAHC
- 10 mg DHB v 1 ml 50% ACN/0,1% TFA s 20mM DAHC
- 10 mg DHB v 1 ml 50% ACN/0,1% TFA s 40mM DAHC
- 10 mg SA v 1 ml 50% ACN
- 10 mg SA v 1 ml 50% ACN s 20mM DAHC
- 10 mg DAN v 1 ml 50% ACN s 10mM DAHC

Postup:

Pro výběr vhodné matrice pro analýzu krátkých RNA pomocí MS byly připraveny roztoky standardů oligo RNA dlouhých 10, 20 a 30 nukleotidů. Každý roztok obsahoval standard oligo RNA v množství 150 pmol a byl odsolen postupem [3.7](#). Výsledná koncentrace každého odsoleného roztoku standardu oligo RNA byla 20 pmol/μl. Z každého roztoku standardu byl odebrán vzorek (0,5 μl), který byl následně míchán na MALDI destičce s připravenými maticemi v poměru 1:1. Všechny tři standardy byly dávkovány na vyleštěnou MALDI destičku v duplikátu pro každou matici.

Analýza RNA probíhala v pozitivním i negativním lineárním módu na MALDI/TOF/TOF analyzátoru. Získaná spektra byla vyhodnocena v programu Applied Biosystems – Data Explorer. Měření probíhala na pracovišti Ústavu Molekulární patologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Hradci Králové.

3.9 Určení stability RNA v prostředí o pH 1 – 10

Použité roztoky:

- Glycinový pufr (50mM, pH 1 a pH 2)
- Fosfátové pufr (100mM)
 - pH 10: $\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$
 - pH 9: Na_2HPO_4
 - pH 8: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$
- NaOH (1M)
- HCl (0,5M)

Postup:

Stabilita RNA byla testována přidáním standardu oligo RNA o délce 30 nukleotidů k pufru o požadovaném rozsahu pH. Z glycinového pufru o pH 1 a 2 byla připravena vždy směs o celkovém objemu 20 μl , která obsahovala 600 pmol oligo RNA. Ze směsi bylo odebráno 5 μl po jedné, dvou a třech hodinách. Ihned po odebrání byly vzorky neutralizovány 1M NaOH.

Analogicky bylo postupováno i v případě pH 8, 9 a 10. Z každého fosfátového pufru bylo připraveno 15 μl směsi, která obsahovala 450 pmol oligo RNA. Po jedné a dvou hodinách bylo odebráno 5 μl směsi, která byla neutralizována 0,5M HCl.

Zneutralizované vzorky byly analyzovány metodou TBE-PAAG. Výchozí koncentrace obou směsí byla zvolena tak, aby všechny vzorky nanášené na gel obsahovaly stejné množství oligo RNA, konkrétně 150 pmol na jamku.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Počátečním úkolem v laboratoři bylo seznámit se s pravidly pro práci s RNA. Při prováděných experimentech je nutné zabránit kontaminaci materiálu RNázami, které by cílové molekuly mohly degradovat. Veškerý použitý plastový materiál byl od výrobce označen jako RNase-free a pokud to bylo možné, byl autoklávován. Práce se vzorky probíhala vždy v rukavicích, aby nedošlo ke kontaminaci biologického vzorku. Veškeré pomůcky, které nebyly autoklávovány, a pracovní plochy byly před a po použití očištěny sprejem RNaseZap™ RNase Decontamination Solution. Pro ředění vzorků nebo pro přípravu roztoků byla použita buď redestilovaná voda, která byla autoklávována, nebo voda ošetřená DEPC.

4.1 Optimalizace barvení oligo RNA po elektroforetické separaci

První experimenty měly za cíl nalézt vhodnou techniku barvení krátkých RNA, aby bylo možné dostatečně citlivě prokazovat tyto molekuly po izolaci ze vzorků na polyakrylamidovém gelu. Pro optimalizaci byly použity standardy oligo RNA o délkách 10, 20 a 30 bází v různých koncentracích. Porovnávány byly tři druhy barviv, a to – SYBR™ Safe DNA Gel Stain, SYBR™ Green II RNA Gel Stain a Toluidine Blue O.

Barvicí roztok SYBR™ Safe DNA Gel Stain je navržen jako bezpečnější a k životnímu prostředí šetrnější varianta ke klasickému barvení ethidium bromidem. Jedná se o interkalační barvivo, kterým lze detekovat jak DNA, tak RNA [111].

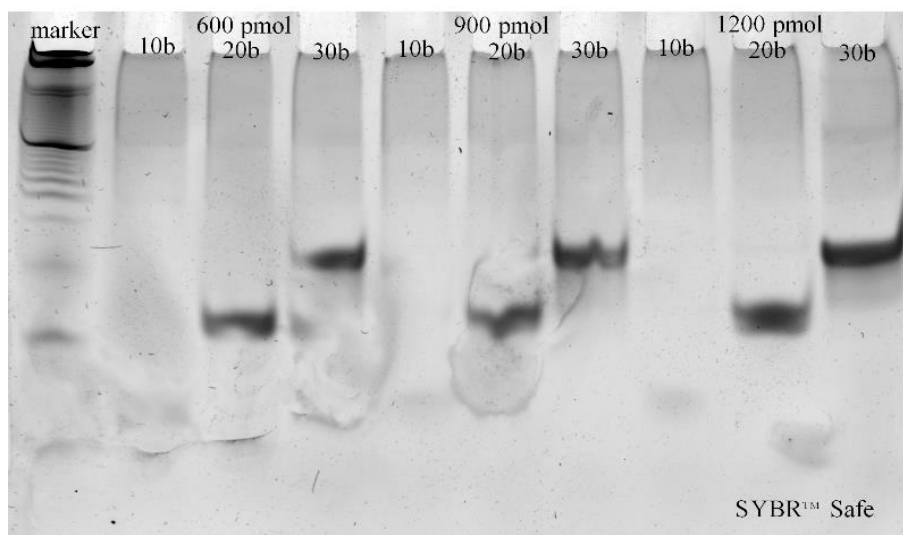
Barvicí roztok SYBR™ Green II RNA Gel Stain není specifický pro značení RNA, ale vykazuje k ní vyšší afinitu, než k DNA. Není ovlivňován přítomností močoviny v gelu a není nutné ho vymývat před další analýzou [112].

Toluidine Blue O je bazické barvivo s afinitou k nukleovým kyselinám. Má široké uplatnění, běžně se využívá například i pro barvení tkání [113].

4.1.1 Barvení gelu pomocí SYBRTM Safe DNA Gel Stain

Pro barvení SYBRTM Safe byl připraven gel pomocí metody TBE-PAAG, na který byly dávkovány standardy oligo RNA, zředěné DEPC-vodou na požadované množství 600, 900 a 1200 pmol na jamku. Jako standard (tzv. „marker“) byly použity 2 μ l 10 bp DNA Ladder. Barvicí roztok byl připraven podle instrukcí výrobce. SYBRTM Safe byl ředěn 1:10000 v pufru, který obsahoval Tris, kyselinu boritou a EDTA (TBE).

Gel byl převrstven 20 ml barvicího roztoku a barven 30 minut, poté byl snímán pomocí stanice ChemiDoc XRS+. Jak je patrné z Obrázku 21, standard oligo RNA o délce 10 nukleotidů je prakticky nedetekovatelný i při vysokém dávkovaném množství (1200 pmol).



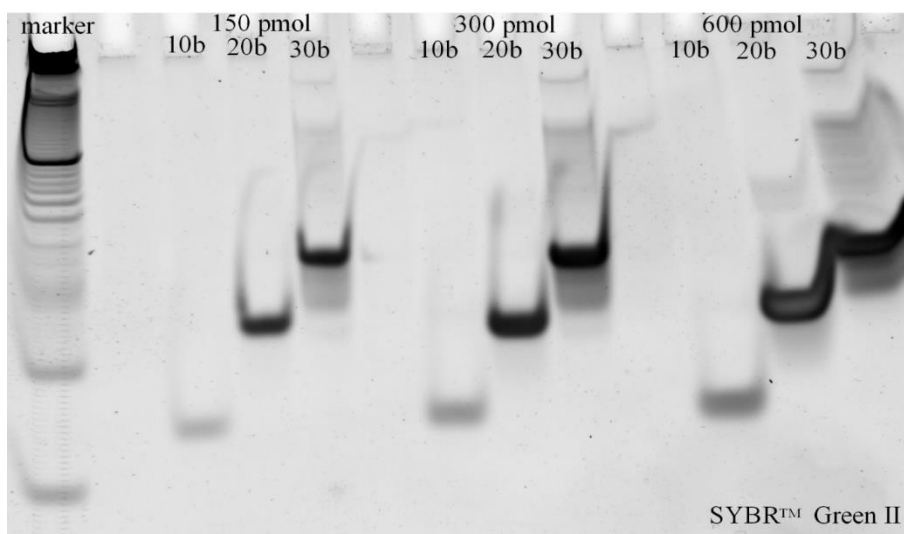
Obrázek 21: PAAG obarvený SYBR SafeTM. Hodnota pmol udává přesné množství standardu oligo RNA dávkované na jamku. Označení 10/20/30 b vyjadřuje délku neboli počet bází daného standardu.

4.1.2 Barvení gelu pomocí SYBRTM Green II RNA Gel Stain

Pro barvení SYBRTM Green II byl připraven gel pomocí metody TBE-PAAG, na který byly dávkovány standardy oligo RNA, zředěné DEPC-vodou na požadované množství 150, 300 a 600 pmol na jamku. Jako standard (tzv. „marker“) byly použity 2 μ l 10 bp DNA Ladder. Barvicí roztok byl připraven podle instrukcí výrobce. SYBRTM Green II byl ředěn 1:10000 v TBE pufru. Připravený roztok bylo možné použít opakovaně, což ovšem snižovalo kvalitu detekce.

Gel byl barven 20 ml barvicího roztoku 40 minut ve tmě. Po obarvení byl snímán pomocí stanice ChemiDoc XRS+. Standard oligo RNA o velikosti 10 nukleotidů byl detekovatelný do množství 150 pmol na jamku (viz Obrázek 22). Dalším experimentem bylo zjištěno, že standard oligo RNA o velikosti 20 nukleotidů, který nejlépe simuluje délku miRNA, bylo při tomto barvení možné prokázat i v množství 18,75 pmol na jamku.

Barvení SYBRTM Green II bylo vybráno pro detekci krátkých RNA získaných experimenty v rámci této diplomové práce.

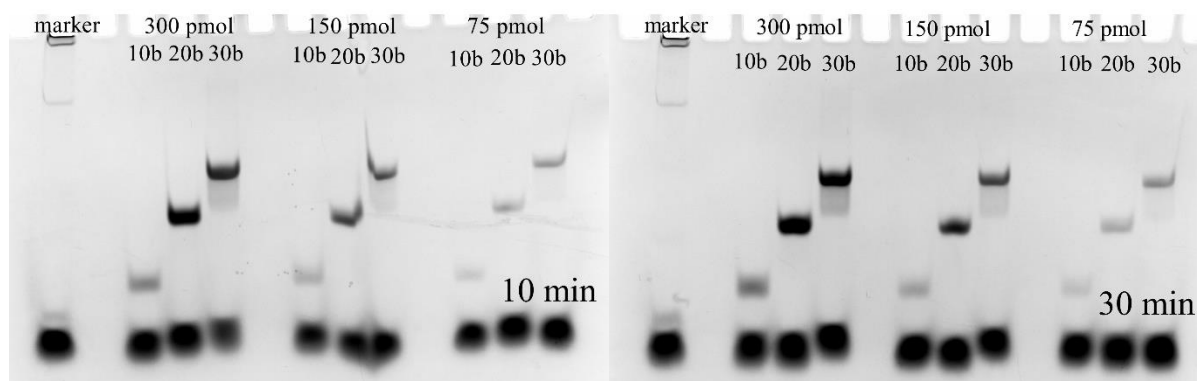


Obrázek 22: PAAG obarvený SYBRTM Green II. Hodnota pmol udává přesné množství standardu oligo RNA dávkované na jamku. Označení 10/20/30 b vyjadřuje délku neboli počet bází daného standardu.

4.1.3 Barvení gelu pomocí Toluidine Blue O

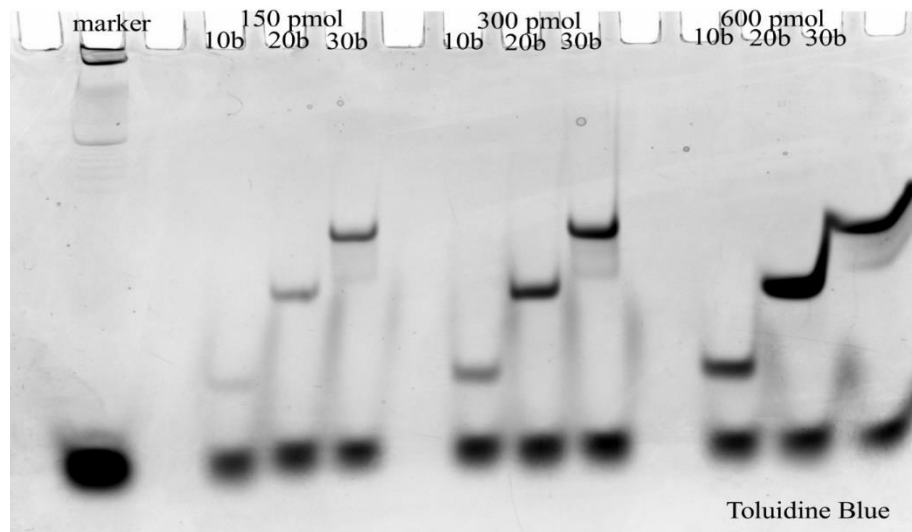
Pro barvení Toluidine Blue O byl připraven gel pomocí metody TBE-PAAG, na který byly dávkovány standardy oligo RNA, zředěné DEPC-vodou na požadované množství 75, 150, 300 a 600 pmol na jamku. Jako standard (tzv. „marker“) byly použity 2 μ l 10 bp DNA Ladder. Pro barvení byl připraven roztok Toluidine Blue O v redestilované vodě. Barvicí roztok bylo možné používat opakovaně. Gel byl barven 20 ml barvicího roztoku 15 minut. Následně byl odbarven destilovanou vodou nebo 1% roztokem kyseliny octové zhruba 90 minut (lze ponechat odbarvit přes noc) a snímán pomocí stanice ChemiDoc XRS+. Standard oligo RNA o velikosti 10 nukleotidů byl prokazatelný i v množství 75 pmol na jamku (viz Obrázek 23).

Doba barvení a koncentrace barvicího roztoku byly optimalizovány. Testovány byly 0,05% a 0,1% roztoky Toluidine Blue O, kterými byly gely barveny po dobu 10, 15, 30 a 40 minut. Koncentrace 0,1 % Toluidine Blue O poskytla intenzivnější barvení. Jak je patrné z Obrázku 24, barvením po 10 a 30 min jsme získali prakticky stejný výsledek. Rozdílem byla ovšem doba odbarvování gelu, která se prodlužovala zároveň s dobou barvení (při barvení 40 min tento krok trval až přes 2 hodiny). Nejlepší výsledky barvení byly dosahovány při barvení 0,1% roztokem Toluidine Blue O po dobu 15 minut.



Obrázek 23: Porovnání PAAG barvených 0,1% roztokem Toluidine Blue O po dobu 10 min (vlevo) a 30 min (vpravo). Hodnota pmol udává přesné množství standardu oligo RNA dávkované na jamku. Označení 10/20/30 b vyjadřuje délku neboli počet bází daného standardu.

Výhodou této techniky je možnost barvení gelu již obarveného SYBRTM Green II (viz Obrázek 24), ačkoliv tím docházelo ke snížení citlivosti.



Obrázek 24: PAAG barvený nejprve SYBRTM Green II a následně Toluidine Blue O. Hodnota pmol udává přesné množství standardu oligo RNA dávkované na jamku. Označení 10/20/30 b vyjadřuje délku neboli počet bází daného standardu.

4.2 Izolace miRNA komerčně dostupnými soupravami

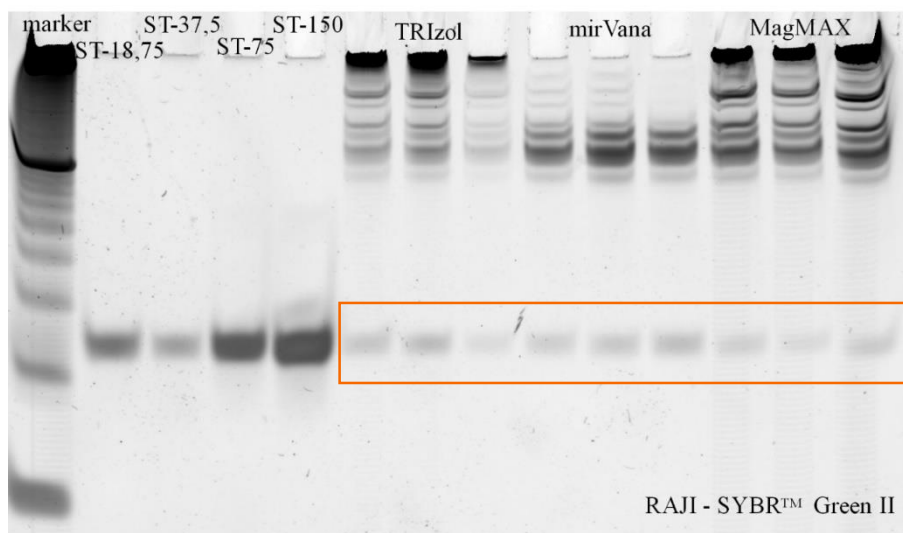
Tři komerčně dostupné metody byly zavedeny a porovnány z hlediska účinnosti izolace krátkých molekul RNA. Provedli jsme izolace RNA z T- a B-lymfatických nádorových buněčných linií JURKAT a RAJI v triplikátu pro každou metodu.

Izolace s využitím TRIzolTM Reagent (TRIzol) byly provedeny postupem [3.4.1](#), u kterého byl upraven objem DEPC-vody, ve které byla RNA resuspendována, na 50 μ l, aby odpovídal výsledným objemům ostatních metod. Celkové koncentrace izolovaných RNA molekul byly měřeny na UV/VIS spektrofotometru. Průměrná koncentrace vyizolované RNA byla stanovena na 834 μ g/ml pro buňky RAJI a na 1393 μ g/ml pro buňky JURKAT. Pro soupravu *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (mirVana) bylo postupováno podle protokolu [3.4.2](#). Průměrné koncentrace izolovaných krátkých RNA byly 42 μ g/ml pro buňky RAJI a 20 μ g/ml pro buňky JURKAT. Metodou MagMAXTM *mirVana*TM Total RNA Isolation Kit (MagMAX) bylo podle postupu [3.4.3](#) izolováno průměrně 146 μ g/ml RNA z buněk RAJI a 303 μ g/ml z buněk JURKAT.

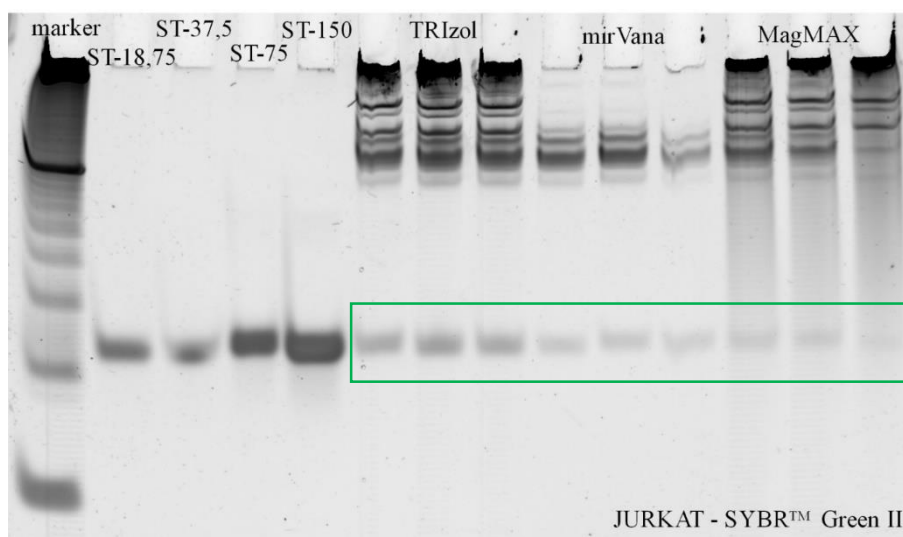
Pro vzájemné porovnání účinnosti metod byla provedena analýza izolovaných frakcí metodou TBE-PAAG. Koncentrace izolovaných miRNA ve vzorcích byly velmi nízké, proto nebylo možné je prokázat na gelu v oblasti krátkých RNA. Z toho důvodu byly izolace zopakovány, avšak výchozí buněčný lyzát byl obohacen o 150 pmol standardu oligo RNA, dlouhého 20 nukleotidů, v prvním kroku všech postupů. Tak bylo možné sledovat účinnost izolace krátkých RNA každé metody.

Výsledky získané pro buňky RAJI ukazuje Obrázek 25, pro buňky JURKAT pak Obrázek 26. Třetí izolát TRIzol u buněk RAJI a třetí izolát mirVana u buněk JURKAT byly vyřazeny z vyhodnocování z důvodu výrazně nižší celkové účinnosti izolace RNA oproti dalším dvěma měřením. Průměrné intenzity proužků odpovídající přidanému standardu oligo RNA izolovaného jednotlivými metodami jsou zobrazeny v Grafu 1 společně s příslušnými směrodatnými odchylkami.

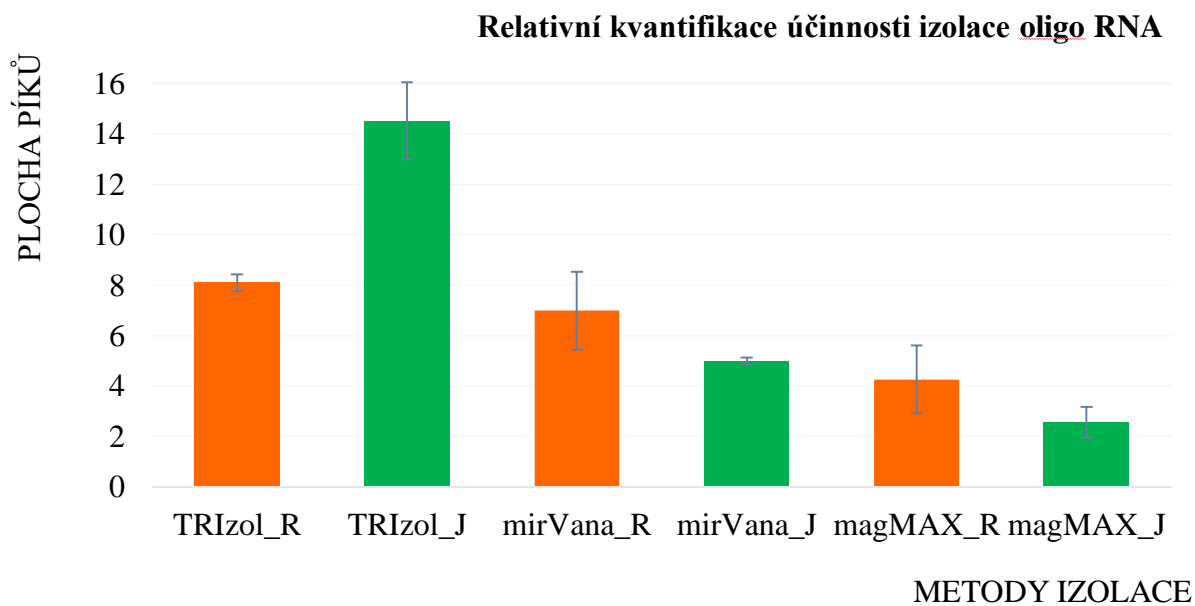
Ze zobrazených výsledků vycházela nejlépe TRIzol metoda, díky které bylo izolováno největší množství standardu oligo RNA, a zároveň byly získány nejvyšší celkové koncentrace RNA. Dobré výsledky z pohledu izolace standardu oligo RNA poskytla i metoda mirVana. Koncentrace celkové získané RNA byla z testovaných souprav nejnižší, což bylo vzhledem k jejímu zaměření na obohacení krátkých RNA očekáváno. Největší ztráty vykazovala izolace metodou MagMAX. Proužky standardu oligo RNA, který byl získaný ze vzorků pomocí MagMAX, měly ze tří testovaných souprav nejmenší intenzitu.



Obrázek 25: Vzorčky RNA získané izolací z buněk **RAJI** pomocí TRIzol, mirVana a MagMAX na PAAG. Číselná hodnota u kalibrační řady, označené jako ST, vyjadřuje množství oligo RNA dlouhé 20 nukleotidů dávkované na jamku. V prvním kroku izolace byl přidán standard oligo RNA o velikosti 20 bází. Oblast krátkých RNA na gelu je barevně označena.



Obrázek 26: Vzorčky RNA získané izolací z buněk **JURKAT** pomocí TRIzol, mirVana a MagMAX na PAAG. Číselná hodnota u kalibrační řady, označené jako ST, vyjadřuje množství oligo RNA dlouhé 20 nukleotidů dávkované na jamku. V prvním kroku izolace byl přidán standard oligo RNA o velikosti 20 bází. Oblast krátkých RNA na gelu je barevně označena.



Graf 1: Porovnání relativní výtěžnosti izolace oligo RNA metodami TRIzol, mirVana a MagMAX. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty relativních výtěžností pro buňky **RAJI** a **JURKAT** s příslušnými směrodatnými odchylkami.

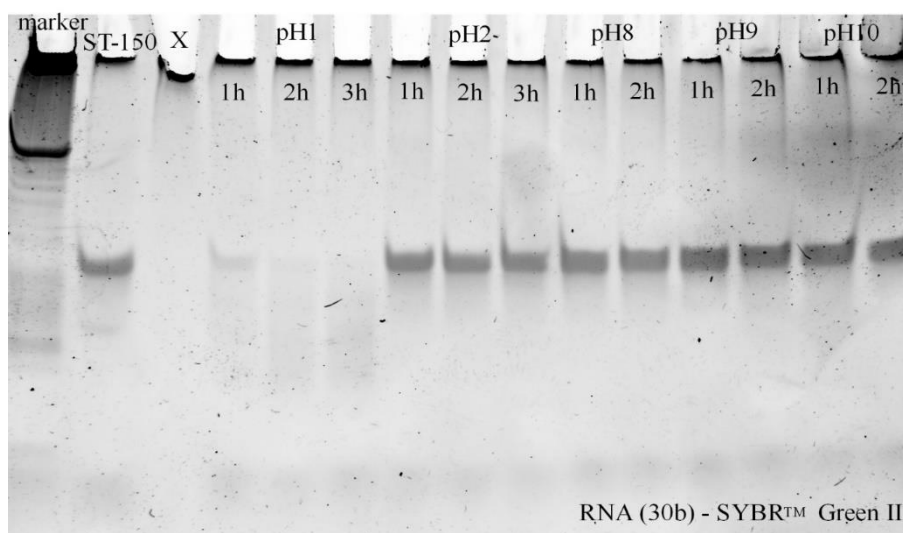
4.3 Zavedení a optimalizace metody izolace oligo RNA pomocí TiO₂ materiálů

Schopnost izolovat oligo RNA byla testována u dvou nosičů, a to u TiO₂ mikročástic (Titansphere) a u TiO₂ nanotrubic pokrytých vrstvou Fe₃O₄ (TNTs), používaných v rámci patentu Univerzity Pardubice (CZ305599 z 18. 11. 2015 a WO/2016/015690 z 04. 02. 2016). Před provedením experimentů na nosičích bylo nutné ověřit parametry a podmínky provedení izolace. Testovali jsme: stabilitu RNA v prostředí o různém pH, koncentraci PAAG (10, 15 a 20%) pro separaci krátkých RNA a možnost odsolení vzorku v průběhu izolace (výsledky neuvedeny).

Ověření stability RNA v rozmezí pH 1 – 10:

Sorpce a eluce u vybraných nosičů probíhá v roztocích o různém pH. Aby nedocházelo k degradaci stanovovaných molekul vlivem zvolených podmínek, bylo nutné ověřit stabilitu RNA v rozdílných hodnotách pH. To bylo provedeno postupem [3.9](#).

Ze získaného snímku (viz Obrázek 27) je možné usoudit, že RNA je stabilní v rozmezí pH 2 – 10. Při delším vystavení velmi nízkému pH 1 dochází k degradaci standardu oligo RNA o délce 30 nukleotidů. Stabilita byla posuzována porovnáním intenzity proužků oligo RNA, získaných z testovaných vzorků a proužku standardu, dávkovaného na gel v množství 150 pmol. RNA je v daném pH stabilní, pokud výsledný proužek vzorku odpovídá standardu.



Obrázek 27: Porovnání stability RNA při různých hodnotách pH v čase. Popisek ST-150 označuje standard oligo RNA o délce 30 nukleotidů, který byl dávkován na gel v množství 150 pmol pro určení stupně degradace RNA v testovaných roztocích. Zkratky 1/2/3h označují frakce odebírané z roztoku o daném pH po 1, 2 a 3 hodinách.

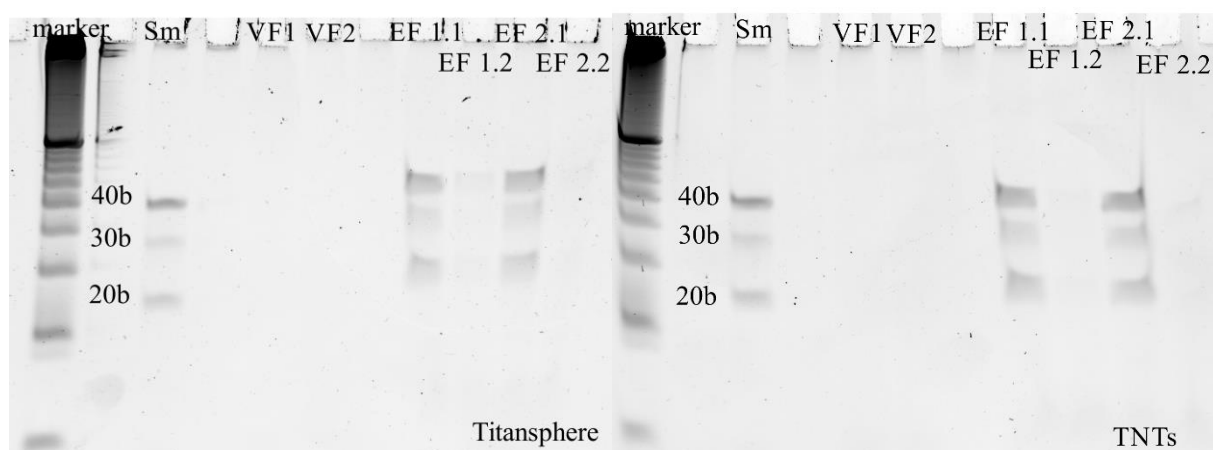
4.3.1 Testování afinity dvou nosičů na bázi TiO₂ k RNA

Prvním krokem bylo vytvoření protokolu pro práci se zvolenými nosiči. Ten byl sestaven po nastudování současné literatury zabývající se afinitou TiO₂ k nukleovým kyselinám.

Navržený protokol používal na rozdíl od postupu v kapitole 3.6 jako vazebný a promývací pufr 50mM glycinový pufr s 0,1M NaCl o pH 2,5. Tento roztok sloužil zároveň jako promývací pufr pro všech pět kroků promytí. Pro testování byla připravena směs oligo RNA o velikostech 20, 30 a 40 nukleotidů v množství odpovídající 150 pmol na zkumavku s 1 mg nosiče. Vzorky připravené pro každý nosič v duplikátu byly po izolaci vyhodnoceny pomocí metody TBE-PAAG. Nosiče byly poté zregenerovány (postup 3.6) a byla otestována možnost jejich opakovaného použití.

Bylo prokázáno, že oba nosiče jsou schopny zachytit krátké molekuly RNA a že izolované RNA lze z nosiče účinně eluovat (viz Obrázek 28). Oba nosiče je také možné použít opakovaně, ačkoliv u Titansphere částic v takovém případě dochází ke snížení účinnosti. Relativní výtěžnost izolace standardů RNA pomocí Titansphere se pohybovala kolem 85 % a s druhým použitím klesla na 70 %.

Při opakovaném použití TNTs je naopak možné pozorovat zvýšení účinnosti izolace oligo RNA. Relativní výtěžnost izolace všech standardů RNA pro TNTs se pohybovala kolem 90 % a s druhým použitím se blížila 100 %.

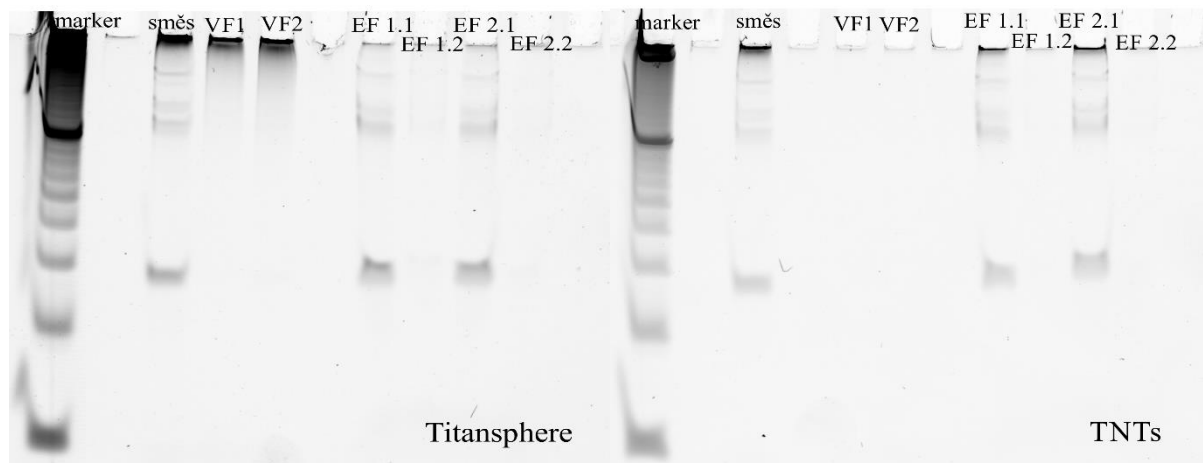


Obrázek 28: PAAG s výsledky izolace oligo RNA pomocí Titansphere (vlevo) a TNTs (vpravo). Značky 40/30/20 b označují počet bází standardu oligo RNA. Do třetí jamky byl dávkován původní směsný vzorek, označený Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce z obou duplikátů, označené VF1 a VF2. První číslo u popisu eluční frakce (EF) je označením vzorku, druhé číslo za tečkou upřesňuje, o jakou eluční frakci se jedná. První eluční frakce jsou tedy označeny jako EF1.1 a EF 2.1, druhé eluční frakce pak EF1.2 a EF 2.2.

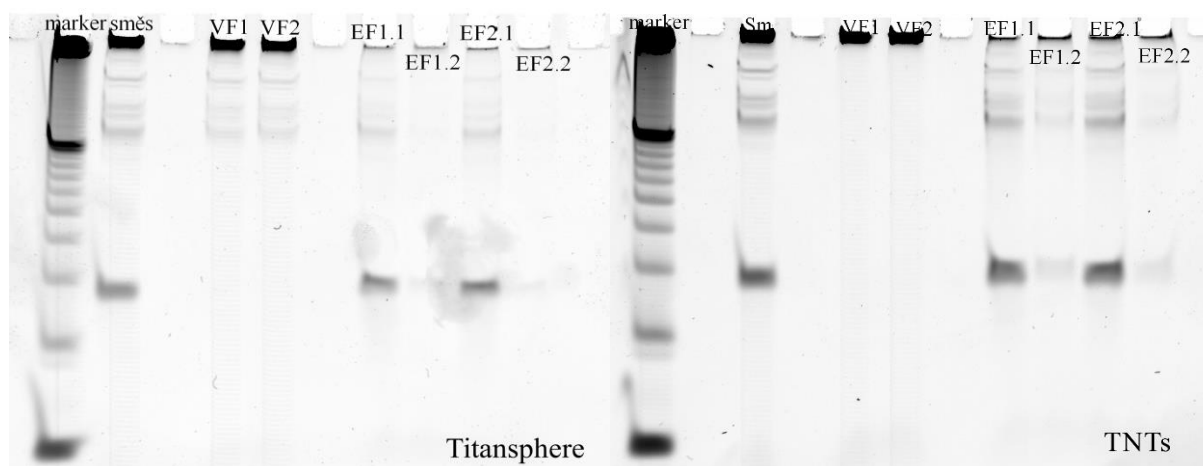
Dalším krokem bylo přidání delších RNA do směsného vzorku. Směsný vzorek byl prvně připraven smísením vazebného a promývacího pufru se standardem oligo RNA a izolátem RNA získaným metodou TRIzol.

Standard oligo RNA, který byl používán během dalších experimentů byl dlouhý 23 nukleotidů a jeho sekvence byla navržena podle hsa-miR-18a-3p. Množství oligo RNA přidávané do směsných vzorků bylo vždy 150 pmol na zkumavku s 1 mg nosiče. Genomová RNA izolovaná TRIzolem byla přidávána v objemu 5 μ l na zkumavku (množství odpovídající zhruba 3 – 4 μ g RNA). Izolace byla provedena v 50mM glycinovém pufru s 0,1M NaCl (viz Obrázek 29) a následně v 100mM MES pufru s 0,1M NaCl (viz Obrázek 30), aby bylo zjištěno, zda byla sorpce oligo RNA na nosič ovlivněna hodnotou pH, při kterém reakce probíhala.

Při porovnání výsledných PAAG (Obrázek 29 a 30), bylo zjištěno, že při použití Titansphere dochází k částečnému oddělení krátkých molekul RNA od delších RNA, a že tento efekt je podpořen zvýšením pH pufru, ve kterém izolace probíhala. Podobný trend vyšší afinity krátkých RNA molekul k pevné fázi byl pozorován i u TNTs od hodnoty pH reakčního prostředí pH 4.



Obrázek 29: PAAG s výsledky izolace oligo RNA pomocí Titansphere (vlevo) a TNTs (vpravo), kdy byl použit 50mM glycinový pufr s 0,1M NaCl o pH 2,5. Původní směsný vzorek je označený Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce z obou duplikátů, označené VF1 a VF2. První číslo u popisu eluční frakce (EF) je označením vzorku, druhé číslo za tečkou upřesňuje, o jakou eluční frakci se jedná. První eluční frakce jsou tedy označeny jako EF1.1 a EF 2.1, druhé eluční frakce pak EF1.2 a EF 2.2.



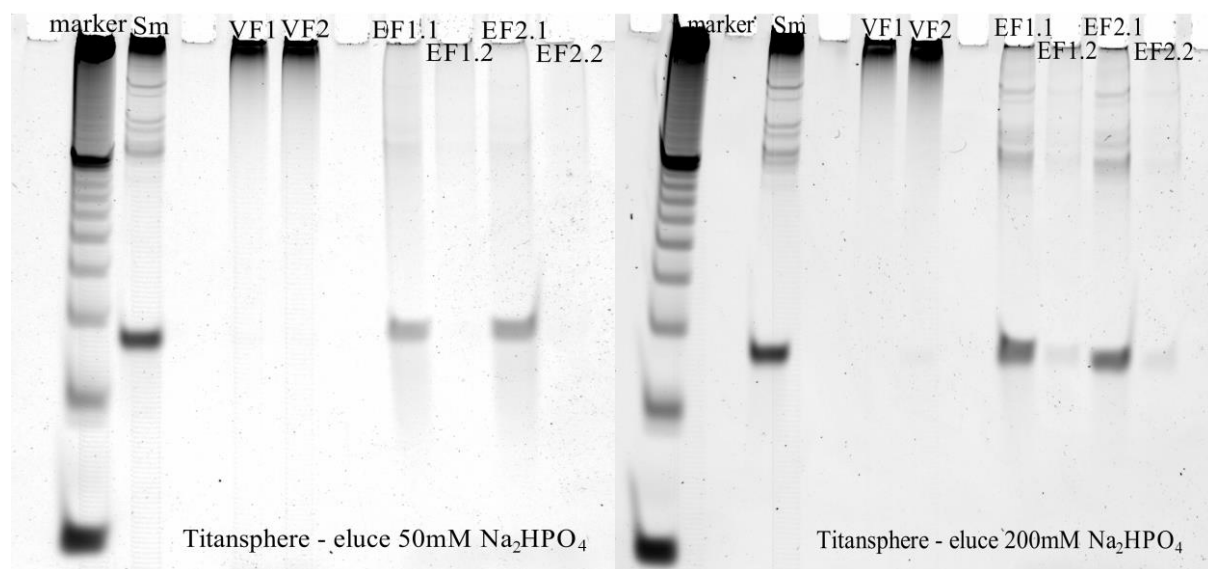
Obrázek 30: PAAG s výsledky izolace oligo RNA pomocí Titansphere (vlevo) a TNTs (vpravo), kdy byl použit 100mM MES pufr s 0,1M NaCl o pH 4. Původní směsný vzorek je označený Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce z obou duplikátů, označené VF1 a VF2. První číslo u popisu eluční frakce (EF) je označením vzorku, druhé číslo za tečkou upřesňuje, o jakou eluční frakci se jedná. První eluční frakce jsou tedy označeny jako EF1.1 a EF 2.1, druhé eluční frakce pak EF1.2 a EF 2.2.

Bylo prokázáno, že oba nosiče je možné použít pro izolaci molekul RNA. Jelikož jsme se v rámci této práce zaměřili na izolaci a purifikaci miRNA, byl pro další testování vybrán nosič Titansphere TiO od firmy GL Sciences Inc, i přes to, že TNTs vykazovali vyšší relativní výtěžnosti. Titansphere TiO byl vybrán hlavně z důvodu větší selektivity při izolaci oligo RNA.

4.3.2 Optimalizace izolace oligo RNA pomocí Titansphere

Podmínky sorpce a eluce byly ověřovány nezávisle na sobě. Optimalizace podmínek izolace RNA pomocí Titansphere byly zahájeny výběrem elučního pufru, aby bylo zajištěno, že je fáze eluce kvantitativní. Experimenty probíhaly podle protokolu 3.6. Směsné vzorky byly připraveny z vazebného pufru, izolátu TRIzol a standardu oligo RNA.

Pro otestování každého elučního roztoku bylo nejprve provedeno zachycení RNA na nosič vždy v glycinovém i v MES pufru. Eluce byla prováděna 200mM Na₂HPO₄, 200 mM Na₃PO₄ a 200mM (NH₄)₂HPO₄. Nejlepší výsledky poskytly 200mM Na₂HPO₄ a 200mM (NH₄)₂HPO₄, avšak při použití (NH₄)₂HPO₄ docházelo k výraznému rozmývání proužků na gelu. Z těchto možností byl tedy vybrán pro další experimenty eluční roztok 200mM Na₂HPO₄. U elučního roztoku Na₂HPO₄ jsme ověřovali, zda změna koncentrace (50 a 100mM Na₂HPO₄) ovlivňuje výsledek eluce. Na obrázku 31 je zobrazen rozdíl při použití 50mM a 200mM roztoku Na₂HPO₄.



Obrázek 31: PAAG s výsledky porovnání 50mM Na₂HPO₄ pufru (vlevo) a 200mM Na₂HPO₄ pufru (vpravo). Původní směsný vzorek je označený Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce z obou duplikátů, označené VF1 a VF2. První číslo u popisu eluční frakce (EF) je označením vzorku (1. vzorek – sorpce v MES pufru, 2. vzorek – sorpce v glycinovém pufru), druhé číslo za tečkou upřesňuje, o jakou eluční frakci se jedná. První eluční frakce jsou tedy označeny jako EF1.1 a EF 2.1, druhé eluční frakce pak EF1.2 a EF 2.2.

Ze získaných snímků byla vyhodnocena relativní výtěžnost izolace standardu oligo RNA pro každý eluční roztok. Tyto hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1: Hodnoty relativních výtěžností oligo RNA (23 bází) po izolaci na Titansphere pro testované eluční pufrы. Výchozí vzorek odpovídá 100 %.

ELUČNÍ PUFRY	Vazebný pufr (pH)	Relativní výtěžnost vzorku [%]
50mM Na₂HPO₄	glycinový (2,5)	16,25
50mM Na₂HPO₄	MES (4)	25,35
100mM Na₂HPO₄	glycinový (2,5)	50,7
100mM Na₂HPO₄	MES (4)	44,2
200mM Na₂HPO₄	glycinový (2,5)	52,65
200mM Na₂HPO₄	MES (4)	55,9
200mM (NH₄)₂HPO₄	glycinový (2,5)	50,7
200mM (NH₄)₂HPO₄	MES (4)	72,15
200mM Na₃PO₄	glycinový (2,5)	36,75
200mM Na₃PO₄	MES (4)	29,75

Zvyšující se koncentrace pufru zvyšuje účinnost eluce. Z toho důvodu byl proveden experiment, kdy byla navázaná RNA uvolňována z nosiče elučním gradientem. Roztoky použité pro tento gradient byly 20, 50, 75, 100, 150 a 200mM Na₂HPO₄. Eluční krok trval vždy 10 min, po kterých byl supernatant odebrán a k nosiči byl přidán další eluční roztok o vyšší koncentraci, než předcházející. Detekce relativní výtěžnosti izolace proběhla metodou TBE-PAAG s denzitometrickým vyhodnocením.

Bylo zjištěno, že 20mM Na₂HPO₄ není dostatečně silný pro kvantitativní uvolnění RNA z Titansphere a gradientová eluce vedla k významnému naředění izolovaných molekul tak, že RNA nebyla na gelu detekovatelná.

Optimalizace vazebných podmínek:

V této fázi diplomové práce jsme se zaměřili na optimalizaci vazebných podmínek. Optimalizace jsme zahájili ověřením vlivu teploty na účinnost izolace oligo RNA. Následně jsme ověřovali optimální složení vazebného pufru a vliv hodnoty pH a přítomnosti soli ve vazebném pufru na účinnost izolace. V poslední fázi byl ověřen vliv přídavku kyseliny mléčné, kyseliny citronové, kyseliny dihydroxybenzoové, kyseliny glutamové, kyseliny glykolové, kyseliny vinné, kyseliny salicylové, kyselina 3-hydroxypikolinové a šťavelanu sodného na izolaci RNA pomocí Titansphere.

Sorpce probíhala podle původně navržených podmínek v 50mM glycinovém pufru s 0,1M NaCl (pH 2,5) nebo v 100mM MES s 0,1M NaCl (pH 4) při 37°C. Směsné vzorky byly připraveny z testovaných vazebných pufrů, standardu oligo RNA o délce 23 nukleotidů a izolátu TRIzol. Eluční frakce byly analyzovány metodou TBE-PAAG.

Vliv zvýšené teploty byl otestován pro oba vazebné pufrы. Po provedení izolace postupem [3.6](#), kdy všechny kroky probíhali při pokojové teplotě (25°C), byly výsledky porovnány s hodnotami získanými izolací RNA při 37°C. Relativní výtěžnost oligo RNA se při laboratorní teplotě pohybovala pouze okolo 30 % pro oba vazebné pufrы, zatímco při 37°C byla relativní výtěžnost oligo RNA okolo 60 % pro MES pufr a okolo 75 % pro pufr glycinový. Bylo zjištěno, že snížení teploty snižuje účinnost izolace RNA.

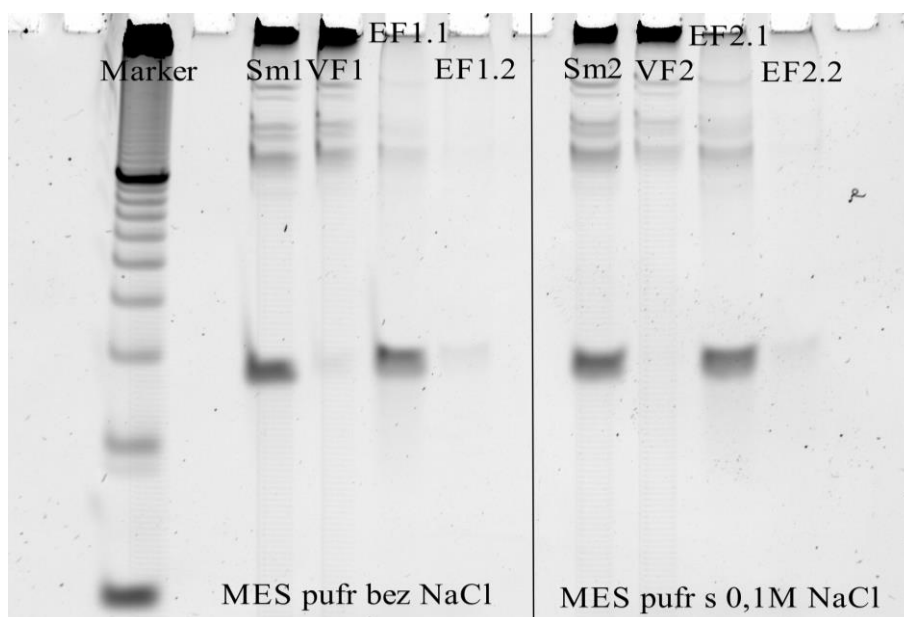
Dále bylo zkoumáno, jak sorpci RNA ovlivňuje pH a druh vazebného pufru. Porovnávány byly čtyři mobilní fáze lišící se hodnotou pH, konkrétně: 50mM glycinový pufr (pH 2,5) a 100mM MES (pH 4), oba s i bez přídavku 0,1M NaCl, 0,1M acetátový pufr (pH 3 a 3,5) a 50mM citrátový pufr (pH 3 a 3,5). Následně bylo možné zhodnotit, zda má přídavek soli vliv na účinnost izolace. Hodnoty relativní výtěžnosti získané vyhodnocením získaných snímků zobrazuje Tabulka 2.

Na základě výsledků byly pro další optimalizaci vazebných podmínek vybrány glycinový a MES pufr. Jejich hodnoty relativní výtěžnosti RNA byly výrazně vyšší, než bylo dosaženo u acetátového a citrátového pufru. Z hlediska selektivity krátkých molekul se jevil jako nejvhodnější MES pufr (dílčí výsledky neuvedeny).

Tabulka 2: Hodnoty relativních výtěžností oligo RNA (23 bází) po izolaci na Titansphere pro testované vazebné pufrы. Východní vzorek odpovídá 100 %.

VAZEBNÉ PUFRY (pH)	Relativní výtěžnost vzorku [%]
Glycinový bez NaCl (2,5)	81,20
Glycinový s NaCl (2,5)	74,75
Acetátový (3)	25,35
Acetátový (3,5)	25,35
Citrátový (3)	40,3
Citrátový (3,5)	29,9
MES bez NaCl (4)	57,85
MES s NaCl (4)	64,35

Výsledné hodnoty relativní výtěžnosti MES a glycinového pufru s a bez NaCl byly mírně rozdílné. Pro glycinový pufr vypadaly obě eluční frakce na gelu stejně. Pro MES pufr můžeme na Obrázku 32 pozorovat zvýšené množství dlouhých RNA v přítomnosti 0,1M NaCl. Výsledky naznačují, že přidavek soli pravděpodobně zlepšil podmínky pro izolaci molekul RNA na nosič.

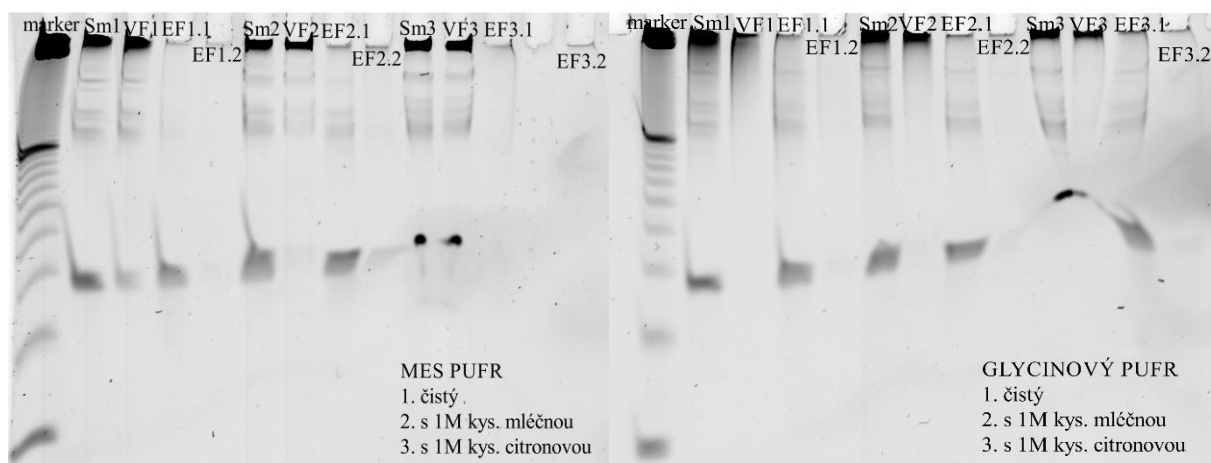


Obrázek 32: PAAG s výsledky porovnání vlivu přidavku soli do MES pufru na sorpci RNA. Původní směsné vzorky jsou označeny Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce pro oba vzorky, označené VF1 a VF2. První číslo u popisu eluční frakce (EF) je označením vzorku (1. vzorek – izolace v MES pufru bez NaCl, 2. vzorek – izolace v MES pufru s 0,1M NaCl), druhé číslo za tečkou upřesňuje, o jakou eluční frakci se jedná. První eluční frakce jsou tedy označeny jako EF1.1 a EF 2.1, druhé eluční frakce pak EF1.2 a EF 2.2.

Aby byl blíže určen možný vliv přísadků, byl sestaven panel devíti látek, které by mohli mít schopnost interagovat s povrchem TiO₂ a ovlivňovat tak izolaci RNA. Byly vybrány kyselina mléčná, kyselina citronová, kyselina dihydroxybenzoová, kyselina glutamová, kyselina glykolová, kyselina vinná, kyselina salicylová, kyselina 3-hydroxypikolinová a šťavelan sodný.

Přísadky všech látek byly testovány v glycinovém i v MES pufru. Nejprve byl testován přísadek kyseliny mléčné nebo kyseliny citronové (1M) a účinnost izolace byla porovnána s výsledky izolace s vazebným pufrům bez přísadků (Obrázek 33).

Pozitivní vliv přísadku kyseliny mléčné nebyl pozorován ani v jednom ze dvou vazebných pufrů. U přísadku kyseliny citronové v MES pufru nedošlo k navázání RNA – v eluční frakci nebylo možné detekovat RNA, jak je vidět na Obrázku 33. Bylo také patrné, že 1M kyselina citronová ovlivňuje elektroforetickou pohyblivost izolovaných molekul, která byla následně potvrzena vizualizací barvením SYBRTM Green II. Proto byly připraveny další pufrы s nižší koncentrací kyseliny citronové (10, 50, 200 a 500mM).

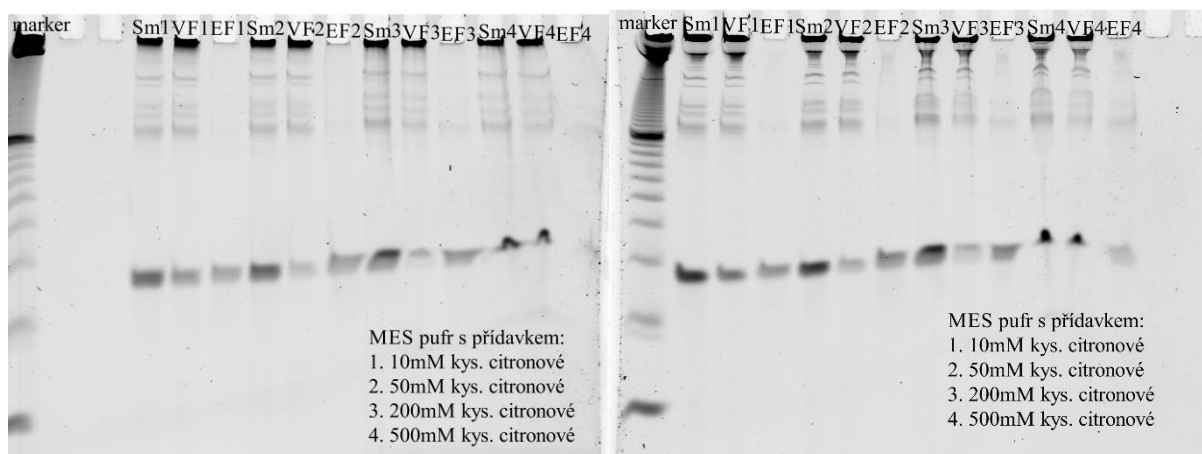


Obrázek 33: PAAG s výsledky izolací s vazebnými pufrы obsahujícími 1M kyselinu mléčnou nebo 1M kyselinu citronovou. Původní směsný vzorek je označený Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce vzorků, označené VF1, VF2 a VF3. První číslo u popisu eluční frakce (EF) je označením vzorku (1. vzorek – sorpce v čistém vazebném pufru, 2. vzorek – sorpce ve vazebném pufru s 1M kys. mléčnou, 3. vzorek – sorpce ve vazebném pufru s 1M kys. citronovou), druhé číslo za tečkou upřesňuje, o jakou eluční frakci se jedná. První eluční frakce jsou tedy označeny jako EF1.1, EF 2.1 a EF 3.1, druhé eluční frakce pak EF1.2, EF 2.2 a EF 3.2.

Po izolaci RNA, při které byl použit glycinový pufr s přísadky, nebyl pozorován žádný vliv změny koncentrace kyseliny citronové. V MES pufru bylo možné vidět, že vyšší koncentrace kyseliny citronové zlepšila účinnost sorpce RNA na Titansphere. Z pohledu selektivity separace krátkých RNA lze říci, že čím méně kyseliny citronové bylo obsaženo

ve vazebném pufru, tím méně dlouhých molekul se na Titansphere zachytilo, jak ukazuje Obrázek 34.

Látky přidávané do vazebného pufru ovlivňovali elektroforetickou separaci a docházelo k rozmývání proužků izolovaného standardu RNA (Obrázek 34 – vlevo). Z tohoto důvodu byl vyzkoušen nový vzorkový pufr pro dávkování na gel, který byl připraven podle TBE-Urea Sample Buffer od firmy Bio-Rad. Skládal se z 89mM Tris, 89mM kyseliny borité, 2mM EDTA, 7M močoviny, 12% Ficollu a 0,01% směsi bromfenolové modři a xylene cyanole FF (Obrázek 34 – vpravo). Díky novému vzorkovému pufru byly proužky zaostřenější a efekt přidavku byl lépe viditelný. Při dalších detekcích byl proto používán pro dávkování na gel tento vzorkový pufr.



Obrázek 34: PAAG s výsledky izolací s MES pufrům obsahujícími přísady kyseliny citronové (vlevo). PAAG, na který byly vzorky dávkovány s novým vzorkovým pufrům (vpravo). Původní směsný vzorek je označený Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce vzorků, označené VF. Číslo u popisu eluční frakce (EF) je označením vzorku: 1. vzorek – MES s 10mM kys. citronovou, 2. vzorek – MES s 50mM kys. citronovou, 3. vzorek – MES s 200mM kys. citronovou, 3. vzorek – MES s 500mM kys. citronovou.

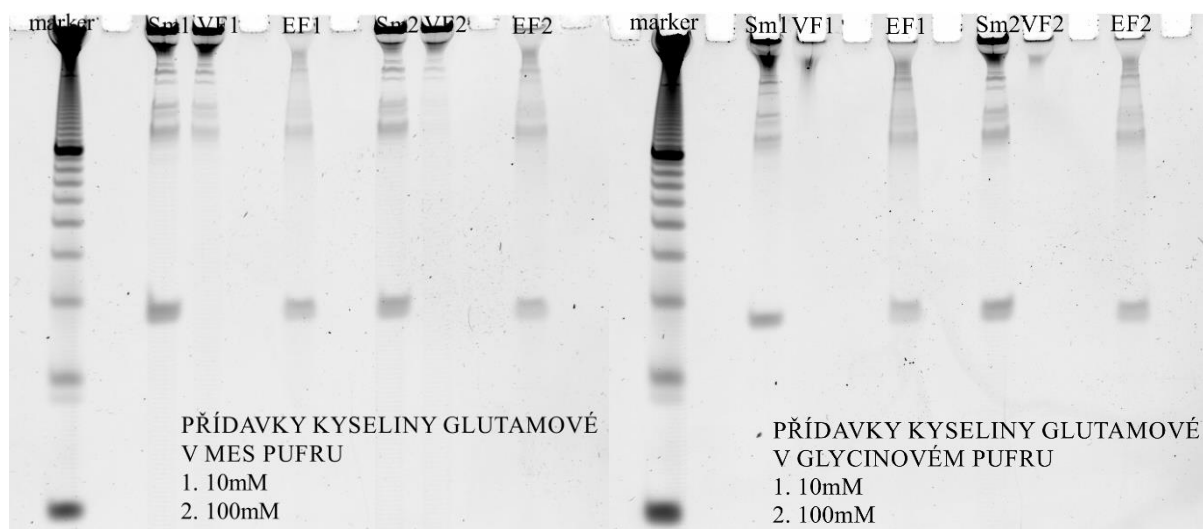
S ohledem na získaná data byly pro další testování do MES a glycinového pufru přidávány látky o koncentraci 10 mM a 100 mM, případně 50 mM pokud to vyžadovala situace (např.: špatná rozpustnost použité látky). Tabulka 3 shrnuje relativní výtěžnosti standardu oligo RNA o délce 23 nukleotidů, získané izolacemi provedenými pro optimalizaci přísadků ve vazebném pufru (bez kyseliny mléčné a citronové).

Tabulka 3: Hodnoty relativních výtěžností standardu oligo RNA (23 bází) po izolaci s využitím vazebných pufrů s přidavky dalších látek. Výchozí vzorek odpovídá 100 %.

PŘIDÁVANÁ LÁTKA – KONCENTRACE	Vazebný pufr (pH)	Relativní výtěžnost vzorku [%]
Přídavek DHB		
10 mM	glycinový (2,5)	58,5
100 mM	glycinový (2,5)	76,05
10 mM	MES (4)	30,55
100 mM	MES (4)	35,75
Přídavek kys. glutamové		
10 mM	glycinový (2,5)	40,3
100 mM	glycinový (2,5)	39,65
10 mM	MES (4)	29,9
100 mM	MES (4)	35,75
Přídavek kys. glykolové		
10 mM	glycinový (2,5)	42,9
100 mM	glycinový (2,5)	42,25
10 mM	MES (4)	35,75
100 mM	MES (4)	45,5
Přídavek kys. vinné		
10 mM	glycinový (2,5)	33,8
100 mM	glycinový (2,5)	41,6
10 mM	MES (4)	37,7
100 Mm	MES (4)	32,5
Přídavek kys. salicylové		
10 mM	glycinový (2,5)	34,45
10 mM	MES (4)	45,5
Přídavek šťavelanu sodného		
10 mM	glycinový (2,5)	24,05
50 mM	glycinový (2,5)	28,6
10 mM	MES (4)	16,9
50 mM	MES (4)	24,05
Přídavek 3-HPA		
10 mM	glycinový (2,5)	31,2
10 mM	MES (4)	37,7

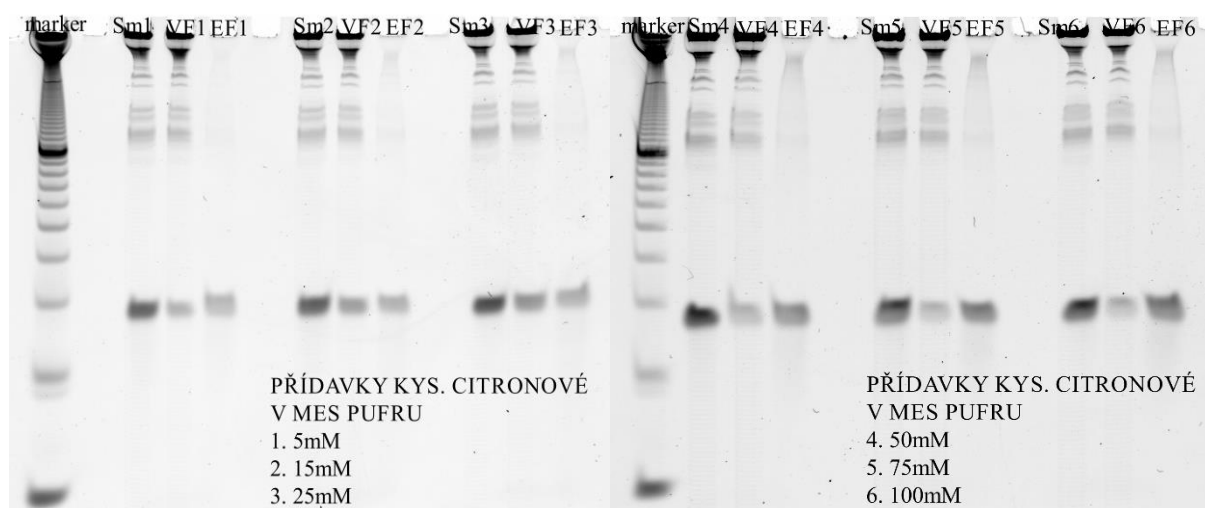
Na Obrázku 35 jsou zobrazeny výsledky izolace po sorpci RNA v MES a glycinovém pufru s přidavky kyseliny glutamové. Lze pozorovat, že s rostoucí koncentrací přídavku se na nosič sorbovalo více RNA. Tento jev ovšem není výrazný a oddělování krátkých molekul

od dlouhých, tzv. selektivita, zde nebylo pozorováno. Snímky z gelů získané po detekcích z ostatních izolací vypadaly pro většinu dalších testovaných látek velmi podobně.



Obrázek 35: PAAG s výsledky izolací s MES (vlevo) a glycinovým (vpravo) pufrem obsahujícím kyselinu glutamovou. Původní směsný vzorek je označený Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce vzorků, označené VF1 a VF2. Číslo u popisu eluční frakce (EF) je označením vzorku: 1. vzorek – sorpce ve vazebném pufru s 10mM kys. glutamovou, 2. vzorek – sorpce ve vazebném pufru s 100mM kys. glutamovou.

V glycinovém pufru nebyl pozorován žádný efekt způsobený přítomností kyseliny citronové, proto byla podrobnější koncentrační řada (5, 15, 25, 50, 75 a 100mM kyselina citronová) připravena pouze pro MES pufr. Po zachycení RNA byl nosič dvakrát promyt MES puftrem s přídatkem a následně třikrát puftrem bez kyseliny citronové. Na Obrázku 36 lze pozorovat, že s rostoucí koncentrací kyseliny citronové přibývaly dlouhé molekuly RNA v elučních frakcích. Zároveň se s koncentrací přídatku zvyšovaly relativní výtěžnosti standardu oligo RNA, které jsou shrnuty v Tabulce 4. MES pufr s 5mM kyselinou umožňoval efektivnější separaci krátkých molekul RNA od dlouhých. Pro dosažení vyšší výtěžnosti byl vhodnější MES pufr se 100mM kyselinou citronovou. Za těchto podmínek se v eluční frakci objevovaly i dlouhé řetězce RNA.



Obrázek 36: PAAG s výsledky izolací s MES pufrem obsahujícím kyselinu citronovou. Původní směsný vzorek je označený Sm. Dále byly dávkovány vazebné frakce vzorků, označené VF1 – 6. Číslo u popisu eluční frakce (EF) j označením vzorků 1 – 6, které byly označeny podle rostoucí koncentrace kys. citronové – 5, 15, 25, 50, 75 a 100mM v MES puftru.

Tabulka 4: Hodnoty relativních výtěžností oligo RNA (23 bází) po izolaci, ke které byl použit MES pufr s různými koncentracemi přidané kyseliny citronové. Výchozí vzorek odpovídá 100 %.

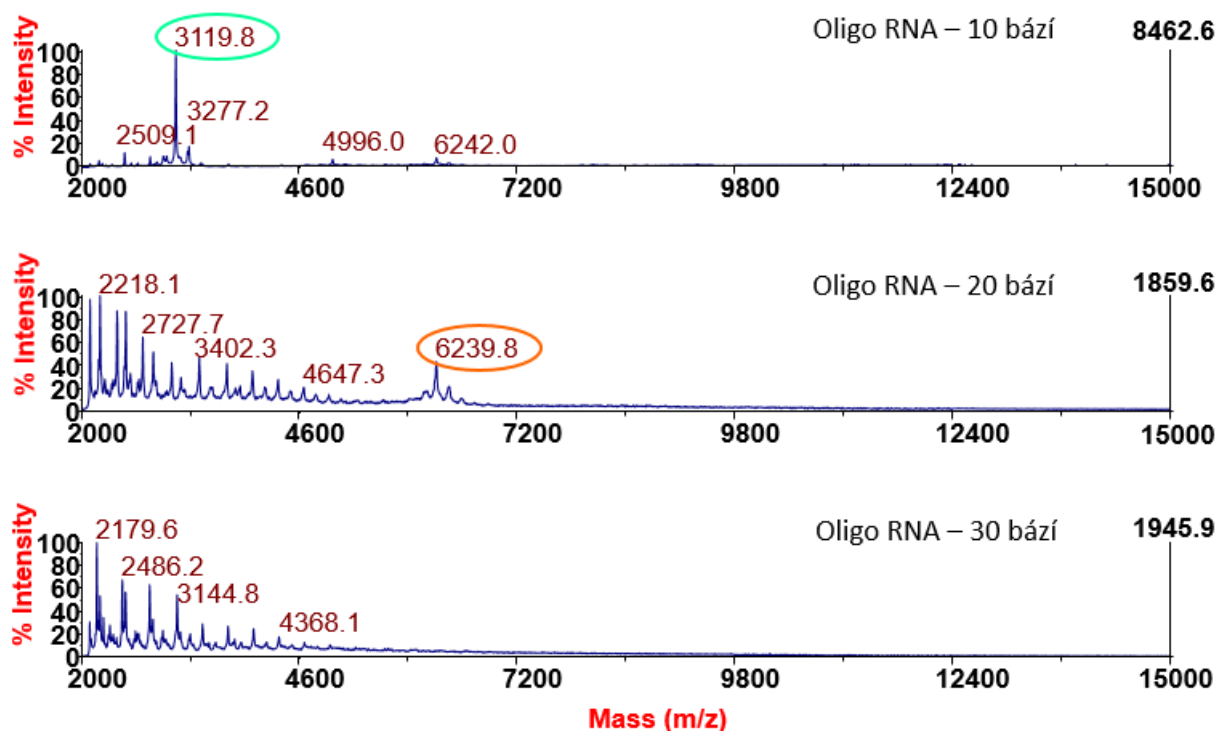
PŘÍDAVKY KYSELINY CITRONOVÉ V MES PUFRU	Oligo RNA ve vazebné frakci [%]	Relativní výtěžnost vzorku [%]
5mM	14,95	23,4
10mM	28,6	24,05
15mM	24,7	19,5
25mM	30,6	23,4
50mM	11,05	39,0
50mM (další izolace)	13,7	31,2
75mM	11,05	37,7
100mM	12,35	52,65
200mM	10,4	33,8
500mM	-	-

Na závěr byl otestován vliv dalšího promývacího kroku pufrem s přidavkem kyseliny citronové. Sorpce RNA probíhala v čistém MES puftru bez přidavku. První a druhý promývací krok byly provedeny s 5mM nebo 100mM přidavkem kyseliny citronové a následně byl nosič třikrát promyt opět čistým MES pufrem. Při promytí pufrem s 5mM kyselinou citronovou byla relativní výtěžnost 31 %, s 100mM 20 %. Výsledky těchto experimentů se ve výsledném optimalizovaném protokolu neuplatnily. Všechny kroky optimalizací v kapitole [4.3](#) byly zohledněny při finalizaci protokolu pro izolaci a purifikaci krátkých oligo RNA z komplexní směsi. Přesný popis postupu je uveden v kapitole [3.6](#).

4.4 Výběr matic pro detekci oligo RNA hmotnostní spektrometrií

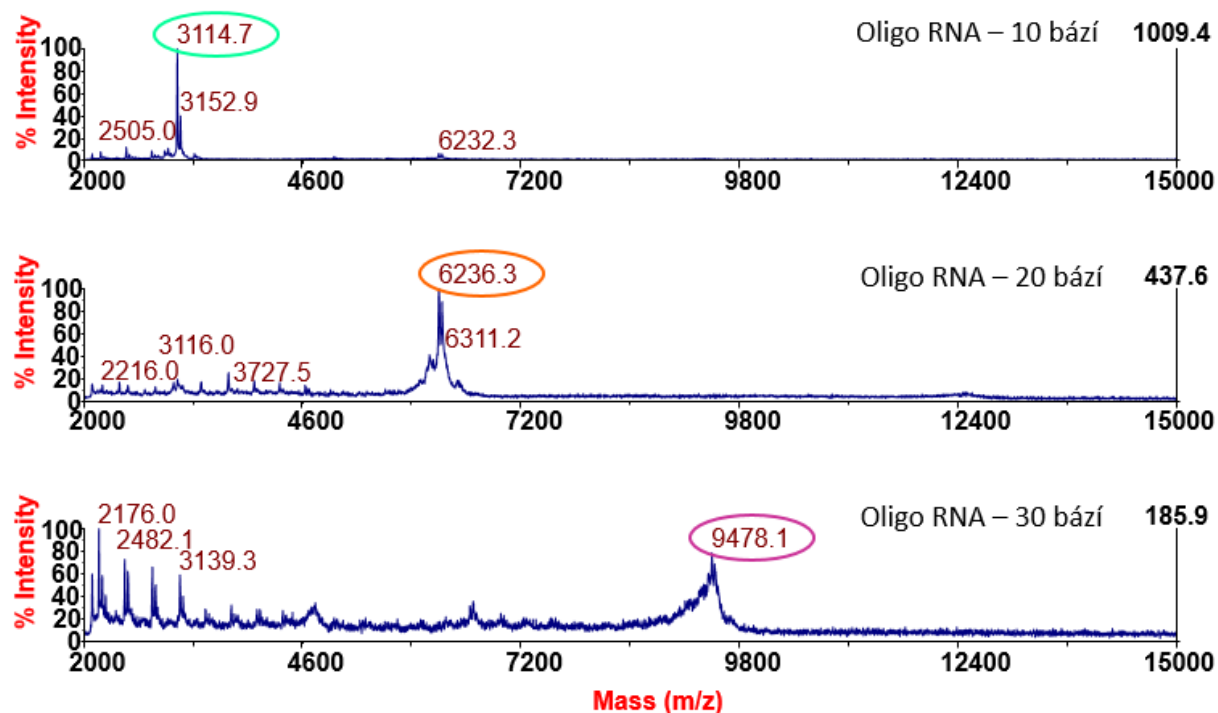
Příprava vzorků proběhla podle postupu 3.11. Dihydroxybenzoová (DHB) a sinapová kyselina (SA) jsou převážně používány při měření v pozitivním iontovém módu. Matrice 3-hydroxypikolinová (3-HPA) kyselina, 6-aza-2-thiothymine (ATT), 2,4,6-trihydroxyacetofenon (THAP) a 1,5-diaminonaftalen (DAN) jsou používány v negativním iontovém módu. V rámci tohoto experimentu byly vzorky v duplikátech se všemi maticemi proměřeny v lineárním pozitivním i negativním módu. Použité standardy oligo RNA měly molární hmotnost 3120,9 g/mol (10 nukleotidů), 6239,8 g/mol (20 nukleotidů) a 9446,7 g/mol (30 nukleotidů).

Hmotnostní spektra oligo RNA (20 a 30 nukleotidů) získaná ionizací s maticemi 3-HPA (50 mg/ml s 40mM DAHC i 10 mg/ml s 20mM DAHC), 2,4,6-THAP (10 mg/ml s 20mM DAHC), SA (10 mg/ml) a DAN (10 mg/ml s 10mM DAHC) nebyla hodnotitelná, a to z důvodu vysoké hladiny šumu. Hmotnostní spektra oligo RNA s maticí DAN vykazovala výraznou fragmentaci, avšak chyběl v nich pík molekulového iontu standardu oligo RNA, jak je vidět na Obrázku 37 a byl tedy obtížně detekovatelný.



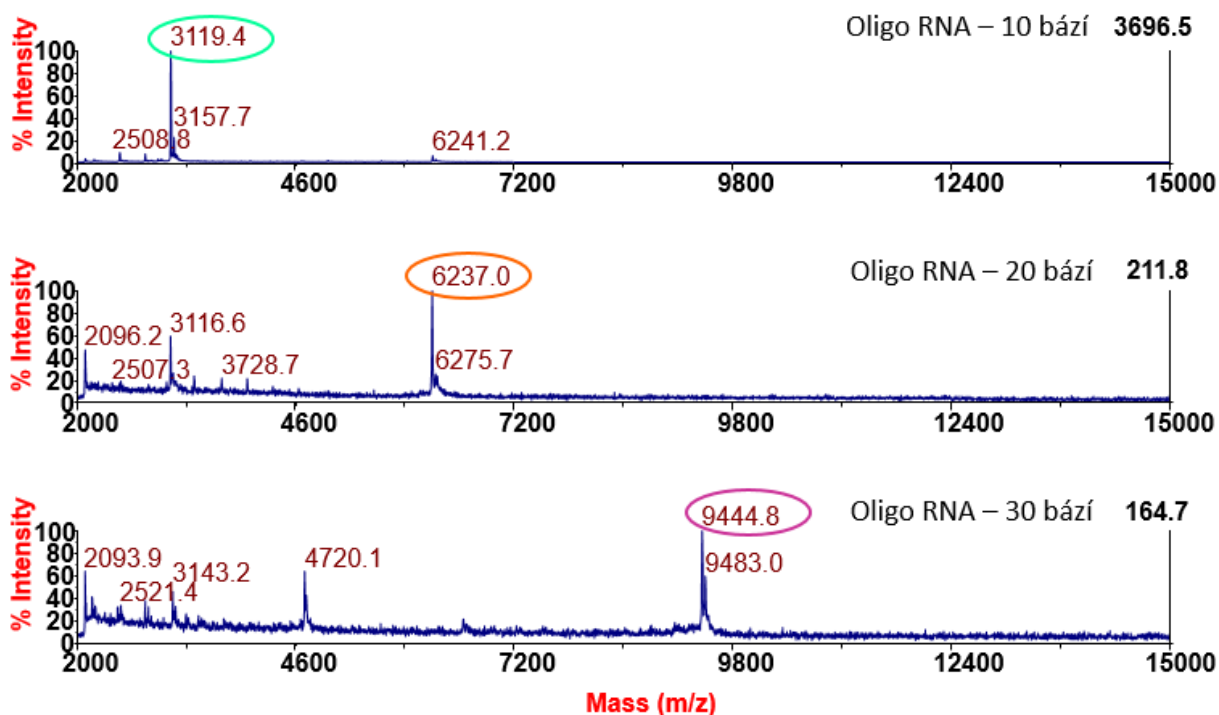
Obrázek 37: MALDI/TOF/TOF – hmotnostní spektra analýzy oligo RNA o délce 10, 20 a 30 nukleotidů ionizované v matici DAN, měřená v pozitivním lineárním módu.

Získaná spektra pro matrice SA a 2,4,6-THAP se výrazně zlepšila přidáním většího množství DAHC a u 2,4,6-THAP celkovým zvýšením koncentrace na 28,6 mg/ml. Spektra pro SA matrici s 20mM DAHC můžeme vidět na Obrázku 38. Je patrné, že v této matrici vytvářela RNA velké množství aduktů s draslíkem (+38), což by mohlo být vyřešeno zvýšením koncentrace DAHC.



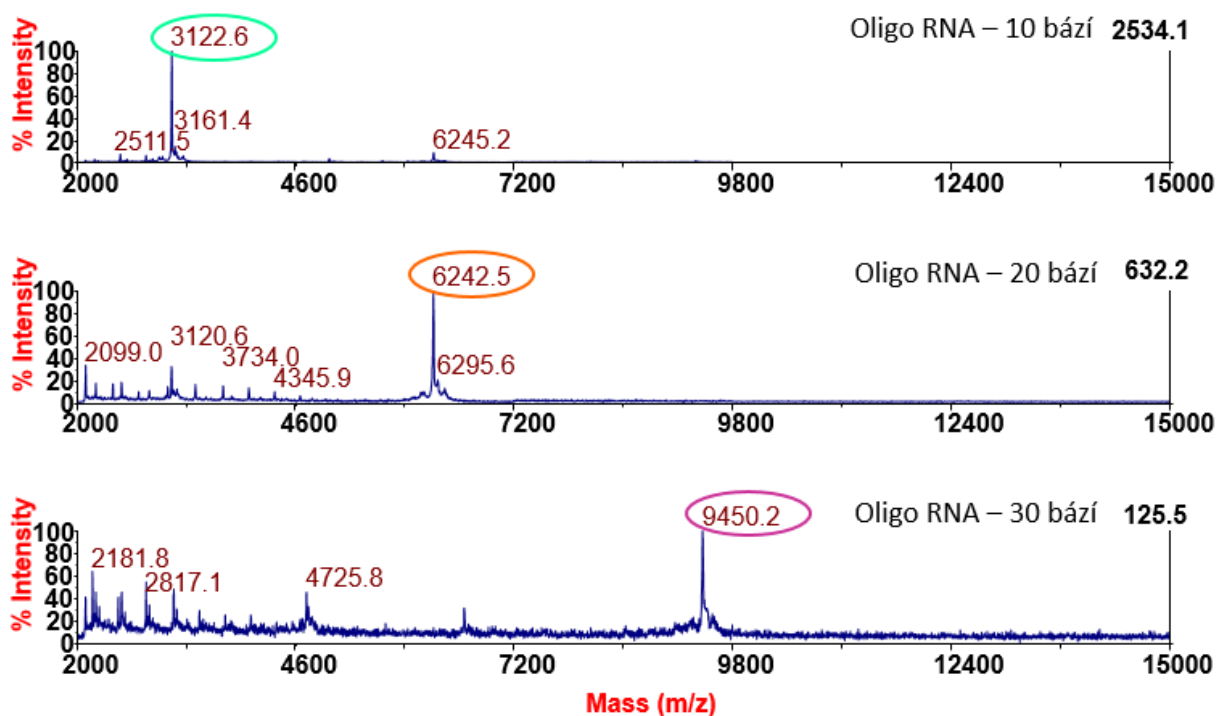
Obrázek 38: MALDI/TOF/TOF – hmotnostní spektra analýzy oligo, RNA o délce 10, 20 a 30 nukleotidů ionizované v matrici SA s 20mM DAHC, měřená v pozitivním lineárním módu.

Matrice 2,4,6-THAP o koncentraci 28,6 mg/ml s 70mM DAHC poskytla spektra s nejmenším množstvím píků fragmentových iontů, které byly poměrně vysoké a dobře hodnotitelné. Spektra z pozitivního a negativního módu byla srovnatelná. Na Obrázku 39 jsou zobrazena spektra pro standardy oligo RNA, které v této matrici tvoří adukty se sodíkem (+22), draslíkem (+38) a železem (+55), měřená v pozitivním lineárním módu.



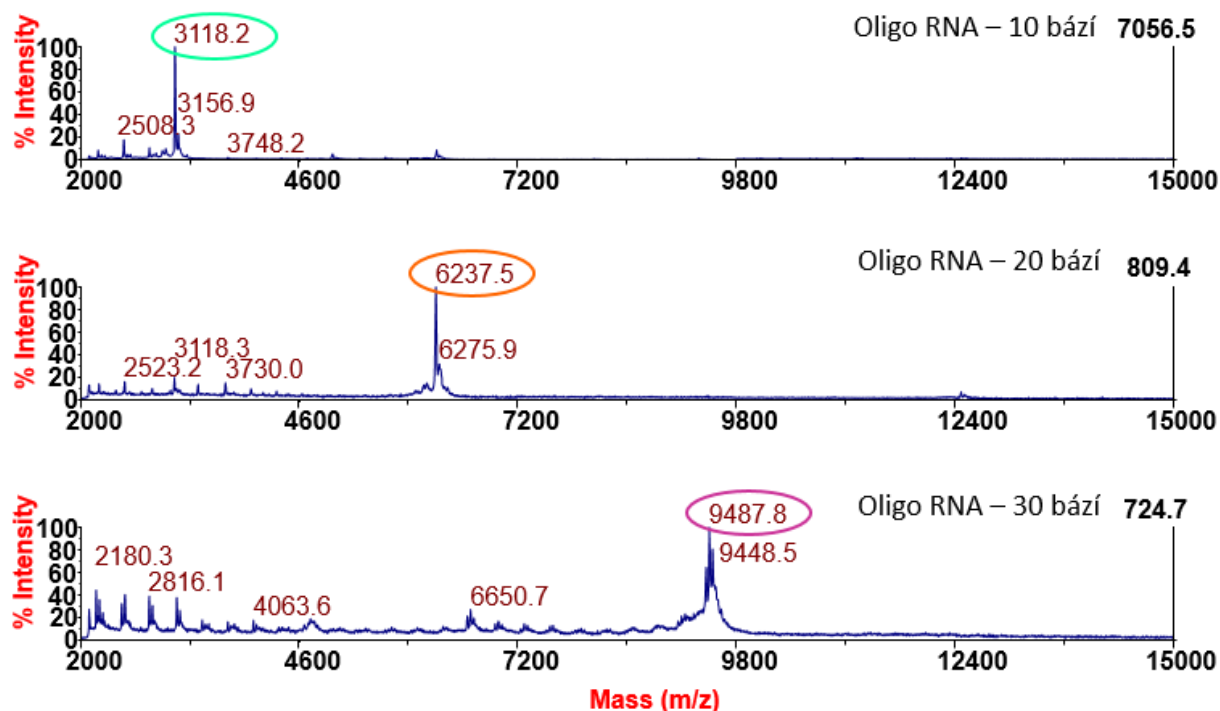
Obrázek 39: MALDI/TOF/TOF – hmotnostní spektra analýzy oligo RNA o délce 10, 20 a 30 nukleotidů ionizované v matrici 2,4,6-THAP 28,6 mg/ml se 70mM DAHC, měřená v pozitivním lineárním módu.

Dobré výsledky měla také DHB o koncentraci 10 mg/ml, která byla testována s 10, 20 a 40mM DAHC. Bylo potvrzeno, že koncentrace DAHC má významný vliv na kvalitu spekter. Porovnání spekter pro všechny koncentrace DAHC přidané k DHB je vyobrazeno v [Příloze 1](#). Obrázek 40 ukazuje spektra získaná pro matrici s 40mM DAHC, která byla měřena v pozitivním lineárním módu. I zde jsou přítomny píky aduktů se sodíkem (+22), draslíkem (+38) a železem (+55).



Obrázek 40: MALDI/TOF/TOF – hmotnostní spektra analýzy oligo RNA o délce 10, 20 a 30 nukleotidů ionizované v matrici DHB s 40mM DAHC, měřená v pozitivním lineárním módu.

Některé matrice (např. ATT) dokáží fragmentovat ionty analytu. Nejlepší píky fragmentových iontů poskytovala ATT. Píky jsou dobře viditelné v celém rozsahu spektra m/z a u žádného ze standardů oligo RNA nechybí pík molekulového iontu. Spektra naměřená v pozitivním lineárním módu (viz Obrázek 41) byla kvalitnější, než spektra z módu negativního (výsledky neuvedeny). Ve všech spektrech jsou přítomny píky aduktů se sodíkem (+22), draslíkem (+38) a železem (+55).



Obrázek 41: MALDI/TOF/TOF – hmotnostní spektra analýzy oligo RNA o délce 10, 20 a 30 nukleotidů ionizované v matrici ATT s 20mM DAHC, měřená v pozitivním lineárním módu.

Závěrem byly vybrány čtyři matrice vhodné pro analýzu krátkých řetězců RNA pomocí hmotnostní spektrometrie. Testovány byly matrice připravené z kyseliny 3-hydroxypikolinové, kyseliny sinapové, kyseliny dihydroxybenzoové, 6-aza-2-thiothyminu, 2,4,6-trihydroxyacetofenonu a 1,5-diaminonaftalenu v různých koncentracích a s různými přísadkami hydrogencitronanu amonného (DAHC). Bylo prokázáno, že vyšší koncentrace DAHC přispívají k lepší kvalitě výsledných spekter. Matrice, které poskytly nejlepší spektra pro standardy oligo RNA o délce 10, 20 a 30 nukleotidů byly 2,4,6-trihydroxyacetofenon o koncentraci 28,6 mg/ml se 70mM DAHC, dihydroxybenzoová kyselina o koncentraci 10 mg/ml s 40mM DAHC, 6-aza-2-thiothymin o koncentraci 10 mg/ml s 20mM DAHC a kyselina sinapová o koncentraci 10 mg/ml s 20mM DAHC. Aby byla maximalizována šance identifikovat krátké molekuly RNA, budou v budoucnu testovány kombinace některých matic a optimální koncentrace přísadku DAHC.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo optimalizovat a zavést techniku izolace miRNA pomocí materiálů na bázi TiO₂. Ze dvou testovaných materiálů byly vybrány komerčně dodávané mikročástice Titansphere. Na rozdíl od nanotrubiček TNTs, které dokázaly navázat veškerou RNA přítomnou ve vzorku, Titansphere ve vhodných podmínkách separoval oligo RNA ze směsi s genomovou RNA. Podmínky izolace byly optimalizovány. Jako nejlepší vazebný pufr se jevil 100mM MES pufr s přídavkem kyseliny citronové. Přídavek může být 5mM pro selektivnější izolaci krátkých RNA, nebo 100mM pro účinnější vazbu celkové RNA. Sorpce RNA na nosič byla také podpořena zvýšením teploty na 37°C. Analyt byl z nosiče uvolňován 200mM Na₂HPO₄ elučním pufrem.

Zároveň s touto novou technikou byly do laboratoře zavedeny techniky izolace RNA z biologického materiálu komerčními testy. Tři komerční soupravy využívající jiné principy izolace RNA (TRIZol™ Reagent, *mirVana*™ miRNA Isolation Kit a MagMAX™ *mirVana*™ Total RNA Isolation Kit) byly porovnány z hlediska jejich výtěžnosti. Jako nejúčinnější byl stanoven TRIZol™ Reagent od firmy Thermo Fisher Scientific. Izoláty, připravené touto metodou, byly používány pro přípravu složitějších vzorků, na kterých byly optimalizovány podmínky izolace s Titansphere.

Detekce probíhala metodou TBE-PAAG. Pro kvalitní detekci byly optimalizovány elektroforetické podmínky pro separaci krátkých molekul. Na začátku byl vybrán vhodný způsob barvení. Na standardech oligo RNA o různých velikostech a koncentracích byly testovány tři barvicí roztoky (SYBR™ Safe DNA Gel Stain, SYBR™ Green II RNA Gel Stain a Toluidine Blue O). Krátké molekuly lze barvit SYBR™ Green II RNA Gel Stain, který dokázal vizualizovat oligo RNA o délce 20 nukleotidů až do množství 18,75 pmol. Dostatečně citlivé bylo i barvení Toluidine Blue O, kterým byl standard oligo RNA o 20 bázích stanoven až do množství 75 pmol. V průběhu experimentů byly optimalizovány koncentrace polyakrylamidového gelu a nanášecí vzorkový pufr, aby byla zajištěna kvalitní detekce. Finální postup využíval 20% polyakrylamidového gelu s 8M močovinou, na který byly vzorky dávkovány vzorkovým pufrem připraveným v laboratoři.

Analýza oligo RNA pomocí hmotnostní spektrometrie byla možná s použitím matic: 2,4,6-THAP (28,6 mg/ml se 70mM DAHC), DHB (10 mg/ml s 40mM DAHC), ATT (10 mg/ml s 20mM DAHC) a SA (10 mg/ml s 20mM DAHC). Zajímavou možností byla právě ATT, jejíž velkou výhodou byla výsledná hmotnostní spektra, která obsahovala píky fragmentových iontů a zároveň také dobře detekovatelný pík molekulového iontu.

Cíle diplomové práce byly splněny, podařilo se vybrat nosič a nastavit podmínky pro účinnou izolaci oligo RNA a ověřit, že krátké molekuly RNA jsou analyzovatelné pomocí hmotnostní spektrometrie s matricemi 2,4,6-THAP s 70mM DAHC, DHB s 40mM DAHC, ATT s 20mM DAHC a SA s 20mM DAHC.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MORANGE, M. *A History of Molecular Biology*. Cambridge: Harvard University Press, 2000. ISBN 978-0-674-00169-5.
- [2] DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*. 2005, **278**(2), 274–288. ISSN 0012-1606.
- [3] GRIFFITH, F. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*. 1925, **27**(2), 113-159. ISSN 1438-4639.
- [4] AVERY, O. T., MACLEOD, C. M. a MCCARTY, M.. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *The Journal of Experimental Medicine*. 1944, **79**(2), 137–158. ISSN 0022-1007.
- [5] WATSON, J. D., CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. 1953, **4356**(171), 737-738. ISSN 1061-4036.
- [6] WILKINS, M. H. F. Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acids. *Nature*. 1953. **4356**(171) s. 738-739. ISSN 1061-4036.
- [7] FRANKLIN, R. E., GOSLING, R. G. Molecular configuration in Sodium Thymonucleates. *Nature*. 1953, **4356**(171) s. 740-741. ISSN 1061-4036.
- [8] HARTL, D. L., JONES, E. W. *Genetics principles and analysis*. 4. vyd. Sudbury: Jones & Bartlett Pub Hardcover, 1998. ISBN 9780763704896.
- [9] CHARGAFF, E. Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation. *Experientia*. 1950, **VI**(6), 201–240. ISSN 0014-4754.
- [10] EDUCATION OF SCIENCE. Gene It's Nature, Expression and Regulation - Structure of DNA. *Hemant More* [online]. 2017 [cit. 2017-08-30]. Dostupné z: <https://hemantmore.org/biology-1/biology-gene-nature-expression-regulation-structure-of-dna/2071/>
- [11] LEARN SCIENCE AT SCITABLE. Nucleic Acid Structure and Function. *Nature Education* [online]. ©2014 [cit. 2017-08-31]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topic/nucleic-acid-structure-and-function-9>
- [12] NOBELPRIZE.ORG. DNA-RNA-Protein [online]. © Nobel Media AB 2018 [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: https://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/svedberg_unit.html
- [13] LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, L. S., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. a DARNELL, J. *Molecular Cell Biology*. 4. vyd. W. H. Freeman, 2000. ISBN 978-0-7167-3136-8.

- [14] SAMFORD UNIVERSITY. Structure of tRNA [online]. ©2011 [vid. 2017-08-31]. Dostupné z: <http://faculty.samford.edu/~djohnso2/44962w/405/08/f8-01-0.jpg>
- [15] MATTICK, J. S. a MAKUNIN, I. V.. Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*. 2006, **15**(1), 17–29. ISSN 0964-6906.
- [16] ŠÁNA, J., FALTEJSKOVÁ, P., SVOBODA, M. a SLABÝ, O. Dlouhé nekódující RNA a jejich význam u nádorových onemocnění. *Klinická onkologie*. 2012, **25**(4), 246–254. ISSN 1802-5307.
- [17] RINN, J. L., KERTESZ, M., WANG, J. K., SQUAZZO, S. L., XU, X., BRUGMANN, S. A., GOODNOUGH, H., HELMS, J. A, FARNHAM, P. J., SEGAL, E. a CHANG, H. Y. Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Non-Coding RNAs. *Cell*. 2007, **129**(7), 1311–1323. ISSN 0092-8674.
- [18] KHALIL, A. M., GUTTMAN, M., HUARTE, M., GARBER, M., RAJ, A., RIVEA, D. MORALES, D., THOMAS, K., PRESSER, A., BERNSTEIN, B. E., VAN OUDENAARDEN, A., REGEV, A., LANDER, E. S. a RINN, J. L. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, **106**(28), 11667–11672. ISSN 0027-8424.
- [19] HIROSE, T., IDEUE, T., NAGAI, M., HAGIWARA, M., SHU, M. a STEITZ, J. A. A Spliceosomal Intron Binding Protein, IBP160, Links Position-Dependent Assembly of Intron-Encoded Box C/D snoRNP to Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*. 2006, **23**(5), 673–684. ISSN 1097-2765.
- [20] LUKE, B., PANZA, A., REDON, S., IGLESIAS, N., LI, Z. a LINGNER, J. The Rat1p 5' to 3' Exonuclease Degrades Telomeric Repeat-Containing RNA and Promotes Telomere Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*. 2008, **32**(4), 465–477. ISSN 1097-2765.
- [21] ISKEN, O. a MAQUAT, L. E. Telomeric RNAs as a novel player in telomeric integrity. *F1000 Biology Reports*. 2009, **1**. ISSN 1757-594X.
- [22] KAWASHIMA, H., TAKANO, H., SUGITA, S., TAKAHARA, Y., SUGIMURA, K. a NAKATANI, T. A novel steroid receptor co-activator protein (SRAP) as an alternative form of steroid receptor RNA-activator gene: expression in prostate cancer cells and enhancement of androgen receptor activity. *Biochemical Journal*. 2003, **369**(Pt 1), 163–171. ISSN 0264-6021.

- [23] HARRISON, P. M., ZHENG, D., ZHANG, Z., CARRIERO, N. a GERSTEIN, M. Transcribed processed pseudogenes in the human genome: an intermediate form of expressed retrosequence lacking protein-coding ability. *Nucleic Acids Research*. 2005, **33**(8), 2374–2383. ISSN 0305-1048.
- [24] WAHLESTEDT, C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013, **12**(6), 433–446. ISSN 1474-1776.
- [25] ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2011, **12**(12), 861. ISSN 1471-0064.
- [26] CARTHEW, R. W. a SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009, **136**(4), 642–655. ISSN 0092-8674.
- [27] JUUSOLA, J. a BALLANTYNE, J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Science International*. 2003, **135**(2), 85–96. ISSN 0379-0738.
- [28] JUUSOLA, J. a BALLANTYNE, J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Science International*. 2005, **152**(1), 1–12. ISSN 0379-0738.
- [29] BAUER, M., POLZIN, S. a PATZELT, D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Science International*. 2003, **138**(1), 94–103. ISSN 0379-0738.
- [30] YU, X., WU, Y., LIU, X., HUANG, X., HOU, X., WANG, J., CHENG, X., MAO, W., LING, Z. Cell-Free RNA Content in Peripheral Blood as Potential Biomarkers for Detecting Circulating Tumor Cells in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *International Journal of Molecular Science*. 2016, **17**(1845), 1–15. ISSN 1422-0067.
- [31] LI, M., ZERINGER, E., BARTA, T., SCHAGEMAN, J., CHENG, A. a VLASSOV, A. V.. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science*. 2014, **369**(1652). ISSN 0962-8436.
- [32] SCHOREY, J. S., CHENG, Y., SINGH, P. P. a SMITH, V. L. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports*. 2015, **16**(1), 24–43. ISSN 1469-221X, 1469-3178.
- [33] WANG, W., RAJEEV, B. W., STROMBERG, A. J., REN, N., TANG, G., HUANG, Q., RIGOUTSOS, I. a NELSON, P. T.. The Expression of MicroRNA miR-107 Decreases Early in Alzheimer’s Disease and May Accelerate Disease Progression

- through Regulation of β -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008, **28**(5), 1213–1223. ISSN 0270-6474.
- [34] KOSAKA, N., TAKESHITA, F., YOSHIOKA, Y., HAGIWARA, K., KATSUDA, T., ONO, M., OCHIYA, T. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Review*. 2013, **65**(3), 376-382. ISSN 1872-8294.
- [35] MEISTER, G., LANDTHALER, M., DORSETT, Y. a TUSCHL, T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*. 2004, **10**(3), 544–550. ISSN 1355-8382, 1469-9001.
- [36] YANG, T., XUE, L. a AN, L. Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science*. 2007, **172**(3), 423–432. ISSN 0168-9452.
- [37] RAJEWSKY, N. microRNA target predictions in animals. *Nature Genetics*. 2006, **38**(6s), 8–13. ISSN 1546-1718.
- [38] VLAHOVÁ, V., ŠMERKOVÁ, K., VACULOVIČOVÁ, M. a KIZEK, R.. MiRNA Od biogeneze po využití v lékařství. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014, **1**, 18—22. ISSN 2336-3940.
- [39] ZIMMERMAN, A. L. a WU, S. MicroRNAs, Cancer and Cancer Stem Cells. *Cancer letters*. 2011, **300**(1), 10–19. ISSN 0304-3835.
- [40] YING, S. *Current Perspectives in microRNAs (miRNA)*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. ISBN 978-1-4020-8532-1.
- [41] DONG, H., LEI, J., DING, L., WEN, Y., JU, H. a ZHANG, X. MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chemical Reviews*. 2013, **113**(8), 6207–6233. ISSN 0009-2665.
- [42] JOSHUA-TOR LAB. Mechanism of RNAi and non-coding RNAs. *Cold spring Harbor Laboratory* [online]. [cit. 2018-01-11]. Dostupné z: <http://joshua-torlab.labsites.cshl.edu/projects/rnai/>
- [43] CALIN, G. A., SEVIGNANI, C., DUMITRU, C. D., HYSLOP, T., NOCH, E., YENDAMURI, S., SHIMIZU, M., RATTAN, S., BULLRICH, F., NEGRINI, M. a CROCE, C. M.. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, **101**(9), 2999–3004. ISSN 0027-8424.

- [44] DONG, J. T., BOYD, J. C. a FRIERSON, Jr. H. F. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *The Prostate*. 2001, **49**(3), 166–171. ISSN 0270-4137.
- [45] SUN, CH., SHE, X., QIN, Y., CHU, Z., CHEN, L., AI, L., ZHANG, L. a HU, Y. miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis*. 2013, **34**(2), 426–435. ISSN 1460-2180.
- [46] CALIN, G. A., DUMITRU, C. D., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., NOCH, E., ALDLER, H., RATTAN, S., KEATING, M., RAI, K., RASSENTI, L., KIPPS, T., NEGRINI, M., BULLRICH, F. a CROCE, C. M. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, **99**(24), 15524–15529. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- [47] JI, J., YU, L., YU, Z., FORGUES, M., UENISHI, T., KUBO, S., WAKASA, K., ZHOU, J., FAN, J., TANG, Z., FU, S., ZHU, H., JIN, J. G., SUN, H. a WANG, X. W. Development of a miR-26 Companion Diagnostic Test for Adjuvant Interferon-alpha Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Biological Sciences*. 2013, **9**(3), 303–312. ISSN 1449-2288.
- [48] MENG, F., HENSON, R., LANG, M., WEHBE, H., MAHESHWARI, S., MENDELL, J. T., JIANG, J., SCHMITTGEN, T. D. a PATEL, T.. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006, **130**(7), 2113–2129. ISSN 0016-5085.
- [49] LU, J., GETZ, G., MISKA, E. A., ALVAREZ-SAAVEDRA, E., LAMB, J., PECK, D., SWEET-CORDERO, A., EBERT, B. L., MAK, R. H., FERRANDO, A. A., DOWNING, J. R., JACKS, T., HORVITZ R. H. a GOLUB, T. R. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005, **435**(7043), 834–838. ISSN 0028-0836.
- [50] DI, L., CROCE, G. C., CROCE, M. C. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends in Molecular Medicine*. 2010, **16**(6), 257–267. ISSN 1471-499X.
- [51] TANZER, A. a STADLER, P. F. Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *Journal of Molecular Biology*. 2004, **339**(2), 327-335. ISSN 00222836.
- [52] COSTINEAN, S., ZANESI, N., PEKARSKY, Y., TILI, E., VOLINIA, S., HEEREMA, N. a CROCE, C. M. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, **103**(18), 7024–7029. ISSN 0027-8424.
- [53] FARAONI, I., ANTONETTI, F. R., CARDONE, J. a BONMASSAR, E. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2009, **1792**(6), 497–505. ISSN 0925-4439.
- [54] MA, L., TERUYA-FELDSTEIN, J. a WEINBERG, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007, **449**(7163), 682. ISSN 1476-4687.
- [55] GAROFALO, M., QUINTAVALLE, C., ROMANO, G., CROCE, C. M. a CONDORELLI, G. miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy. *Current molecular medicine*. 2012, **12**(1), 27–33. ISSN 1566-5240.
- [56] CALIN, G. A., CIMMINO, A., FABBRI, M., FERRACIN, M., WOJCIK, S. E., SHIMIZU, M., TACCIOLI, C., ZANESI, N., GARZON, R., AQEILAN, R. I., ALDER, H., VOLINIA, S., RASSENTI, L., LIU, X., LIU, CH., KIPPS, T. J., NEGRINI, M. a CROCE, C. M. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, **105**(13), 5166–5171. ISSN 0027-8424.
- [57] TAKAMIZAWA, J., KONISHI, H., YANAGISAWA, K., TOMIDA, S., OSADA, H., ENDOH, H., HARANO, T., YATABE, Y., NAGINO, M., NIMUEA, Y., MITSUDOMI, T. a TAKAHASHI, T. Reduced Expression of the let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Research*. 2004, **64**(11), 3753-3756. ISSN 1538-7445.
- [58] TAVAZOIE, S. F., ALARCÓN, C., OSKARSSON, T., PADUA, D., WANG, Q., BOS, P. D., GERALD, W. L. a MASSAGUÉ, J.. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008, **451**(7175), 147–152. ISSN 1476-4687.
- [59] PROMEGA. Protocols and Applications Guide. *Promega* [online]. © 2009 [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: https://www.promega.com//media/files/resources/paguide/letter/paguide_us.pdf?la=en
- [60] BUCKINGHAM, L. a FLAWS, M. L. *Molecular diagnostics: fundamentals, methods, & clinical applications*. Philadelphia: F.A. Davis, 2007. ISBN 978-0-8036-1659-2.
- [61] SOURVINOU, I. S., MARKOU, A. a LIANIDOU, E. S. Quantification of Circulating miRNAs in Plasma: Effect of Preanalytical and Analytical Parameters on Their

- Isolation and Stability. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013, **15**(6), 827–834. ISSN 1525-1578.
- [62] PACIFIC BIOSCIENCES. *Shared Protocol: Extracting DNA usinig Phenol-Chloroform* [online]. © 2012 [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/SharedProtocol-Extracting-DNA-usinig-Phenol-Chloroform.pdf>
- [63] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *How to Use Phenol/Chloroform for DNA Purification* [online]. [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/phenol-chloroform-extraction.html>
- [64] ZUMBO, P. a MASON, C. E.. Methods for RNA Isolation, Characterization and Sequencing (RNA-Seq). *Genome Analysis: Current Procedures and Applications*. 2014, 21. ISBN: 978-1-908230-29-4.
- [65] GREEN, M. R. a SAMBROOK, J. Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016, **2016**(12). ISSN 1940-3402, 1559-6095.
- [66] BOOM, R., SOL, C. J., SALIMANS, M. M., JANSEN, C. L, DILLEN P. M. a van der NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990, **28**(3), 495–503. ISSN 0095-1137, 1098-660X.
- [67] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *TRIzol Reagent* [online]. [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026>
- [68] TAN, S. C. a YIAP, B. C. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, **2009**. ISSN 1110-7243.
- [69] ACADEMIA.EDU. DNA Extractions - the Past, Present and Future Approaches. *Nur Munirah* [online]. [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: http://www.academia.edu/15159140/DNA_Extractions_-the_Past_Present_and_Future_Approaches
- [70] ZAPOROZHCHENKO, I. A., MOROZKIN, E. S., SKVORTSOVA, T. E., BRYZGUNOVA, O. E., BONDAR, A. A., LOSEVA, E. M., VLASSOV, V. V. a LAKTIONOV, P. P. A phenol-free method for isolation of microRNA from biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 2015, **479**, 43–47. ISSN 0003-2697.
- [71] ARNOLD, T. E., MEYERING, M. E. a CHESTERSON, R. S. Nucleic acid binding matrix. US6869532B2. 22. březen 2005. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US6869532/en>

- [72] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *mirVana miRNA Isolation Kit, with phenol* [online]. [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1560>
- [73] MACHEREY-NAGEL. *NucleoSpin miRNA Plasma* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.mn-net.com/Products/DNAandRNAPurification/RNA/NucleoSpinmiRNAPlasma/tabid/11663/language/en-US/Default.aspx>
- [74] QIAGEN. *miRNeasy Serum/Plasma Kit - Online Shop* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/rna/mirna/mirneasy-serumplasma-kit/#orderinginformation>
- [75] GL SCIENCES. *Titansphere™ TiO Bulk Material* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.glsciences.com/c-product/sample/phosphopeptides/titansphere-tio-bulk-material/>
- [76] CREATIVE DIAGNOSTICS. *Nucleic Acid Separation* [online]. [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: https://www.cd-bioparticles.com/t/Nucleic-Acid-Separation_49.html
- [77] SAFARIKOVA, M a SAFARIK, I. The Application of Magnetic Techniques in Biosciences. *Physical Separation in Science and Engineering*. 2000, **10**(4), 223-252. ISSN 14786478, 14786486.
- [78] PRODĚLALOVÁ, J., RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A., PETROVÁ, K. a BENEŠ, M. J. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1056**(1), 43–48. ISSN 0021-9673.
- [79] OSTER, J., PARKER, J. a BRASSARD, L. A. Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2001, **225**(1), 145–150. ISSN 0304-8853.
- [80] LOAIZA, O. A., JUBETE, E., OCHOTECO, E., CABAÑERO, G., GRANDE, H. a RODRÍGUEZ, J. Gold coated ferric oxide nanoparticles based disposable magnetic genosensors for the detection of DNA hybridization processes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, **26**(5), 2194–2200. ISSN 0956-5663.
- [81] TOYOBO CO LTD. Method for isolating nucleic acids using silica-coated magnetic particles [online]. UEMATSU, H., DAIMON, K., YOSHIGA, S. Patent: US5945525A. 8. červenec 1996. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US5945525A/en>

- [82] SAIYED, Z. M., BOCHI WAL, C., GORASIA, H., TELANG, S. D. a RAMCHAND, C. N. Application of magnetic particles (Fe₃O₄) for isolation of genomic DNA from mammalian cells. *Analytical Biochemistry*. 2006, **356**(2), 306–308. ISSN 0003-2697.
- [83] MATSUNAGA, T. a KAMIYA, S. Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1987, **26**(4), 328–332. ISSN 0175-7598, 1432-0614.
- [84] YOZA, B., ARAKAKI, A., MARUYAMA, K., TAKEYAMA, H. a MATSUNAGA, T. Fully automated DNA extraction from blood using magnetic particles modified with a hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003, **95**(1), 21–26. ISSN 1389-1723.
- [85] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit* [online]. [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A27828>
- [86] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *mRNA Isolation with Dynabeads in 15 minutes* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/napamisc/mrna-isolation-dynabeads.html>
- [87] UNIVERZITA PARDUBICE. Method for Separation of Biopolymer Molecules and a Carrier for Application of This Method [online]. KUPCIK, R., BILKOVA, Z., REHULKA, P. a MACAK, J. Patent: CZ305599. 18. 11. 2015 a WO/2016/015690. 4. 2. 2016. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf;jsessionid=0997C2B053125069130EADB381E2AC91.wapp1nC?docId=WO2016015690&recNum=1&tab=PCTDocuments&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString>
- [88] KUPCIK, R., REHULKA, P., BILKOVA, Z., SOPHA, H. a MACAK, J. M. New Interface for Purification of Proteins: One-Dimensional TiO₂ Nanotubes Decorated by Fe₃O₄ Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017, **9**(34), 28233–28242. ISSN 1944-8244, 1944-8252.
- [89] MACÁK, J. M., KUPČÍK, R. a BÍLKOVÁ, Z. *Funkční vzorek - Nový materiál pro izolace a purifikace vybraných biomolekul na bázi TiO₂ nanotrubic povrchově modifikovaných Fe₃O₄ nanočásticemi*. Univerzita Pardubice. 2017
- [90] VÁLÓCZI, A., HORNYIK, C., VARGA, N., BURG YÁN, J., KAUPPINEN, S. a HAVELDA, Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research*. 2004, **32**(22), 175–175. ISSN 0305-1048, 1362-4962.

- [91] PALL, G. a HAMILTON, A. J. Improved Northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nature protocols*. 2008, **3**, 1077–84. ISSN 1754-2189.
- [92] KIM, S. W., LI, Z., MOORE, P. S., MONAGHAN, A. P., CHANG, Y., NICHOLS, M. a JOHN, B. A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Research*. 2010, **38**(7), 98–98. ISSN 0305-1048, 1362-4962.
- [93] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Reverse Transcription Applications* [online]. [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html>
- [94] LI, X., NI, M., ZHANG, CH., MA, W. a ZHANG, Y.. A convenient system for highly specific and sensitive detection of miRNA expression. *RNA*. 2014, **20**(2), 252–259. ISSN 1355-8382.
- [95] BRUNET-VEGA, A., PERICAY, C., QUÍLEZ, M. E., RAMÍREZ-LÁZARO, M. J., CALVET, X. a LARIO, S. Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits. *Analytical Biochemistry*. 2015, **488**, 28–35. ISSN 0003-2697.
- [96] CHEN, C., RIDZON, D. A., BROOMER, A. J., ZHOU, Z., LEE, D. H, NGUYEN, J. T., BARBISIN, M., XU, N. L., MAHUVAKAR, V. R., ANDERSEN, M. R., LAO, K. Q., LIVAK, K. J. a GUEGLER, K. J. Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. *Nucleic Acids Research*. 2005, **33**(20), 179. ISSN 0305-1048.
- [97] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *TaqMan Advanced miRNA Assays* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/mirna-ncrna-taqman-assays/taqman-advanced-mirna-assays.html>
- [98] SIGMA-ALDRICH. *microRNA Quantitative PCR - Quantitative PCR*. [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/molecular-biology-products.html?TablePage=111027730>
- [99] QIAGEN. *LNA Technology – LNA qPCR* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/dk/resources/technologies/lna/lna-qpcr/>
- [100] SANGER, F., NICKLEN, S. a COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977, **74**(12), 5463–5467. ISSN 0027-8424.

- [101] BUERMANS, H., ARIYUREK, Y., van OMMEN, G., den DUNNEN, J. T. a AC 't HOEN, P. New methods for next generation sequencing based microRNA expression profiling. *BMC Genomics*. 2010, **11**(1), 716. ISSN 1471-2164.
- [102] EKMAN, R. *Mass spectrometry instrumentation, interpretation*. Hoboken: John Wiley and Sons. 2009. ISBN 978-0-471-71395-1.
- [103] COLE, R. B. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. 2. vyd. Hoboken: John Wiley and Sons. 2010. ISBN 978-0-471-74107-7.
- [104] BARRON, A. *Physical Methods in Chemistry and Nano Science*. Connexions: Rice University. 2012. ISBN 9781300065449.
- [105] KENNY, D. J., BROWN, J. M., PALMER, M. E., SNEL, M. F. a BATEMAN, R. H. A Parallel Approach to Post Source Decay MALDI-TOF Analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006, **17**(1), 60–66. ISSN 1044-0305.
- [106] WU, K. J., STEDING, A a BECKER, C. H. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid communications in mass spectrometry*. 1993, **7**(2), 142–146. ISSN 0951-4198.
- [107] PIELES, U., ZURCHER, W., SCHARL, M. A MOSER, H. E., Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 1993, **21**(14), 3191-3196. ISSN 0305-1048, 1362-4962.
- [108] LECCHI, P., LE, H. M. T. A PANNELL, L. K. 6-Aza-2-thiothymine: a matrix for MALDI spectra of oliunucleotides. *Nucleic Acids Research*. 1995, **23**(7), 1276 - 1277. ISSN 0305-1048, 1362-4962.
- [109] HAGAN, N. A., SMITH, C. A, ANTOINE, M. D., LIN, J. S., FELDMAN, A. B., DEMIREV, P. A. Enhanced In-Source Fragmentation in MALDI-TOF-MS of Oligonucleotides Using 1,5-Diaminonaphthalene. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. 2012, **23**(4), 773 - 777. ISSN 1044-0305, 1879-1123.
- [110] ZHU, Y. F., CHUNG, C. N., TARANENKO, N. I., ALLMAN, S. L., MARTIN, S. A., HAFF, L. A CHEN, C. H. The Study of 2,3,4-Trihydroxyacetophenone and 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as Matrices for DNA Detection in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1996, **10**(3), 383 - 388. ISSN 0951-4198, 1097-0231.

- [111] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *SYBR Safe DNA Gel Stain* [online]. [cit. 2018-04-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S33102>
- [112] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *SYBR Green II RNA Gel Stain, 10,000X concentrate in DMSO*. [cit. 2017-11-28]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S7564?SID=srch-srp-S7564>
- [113] SRIDHARAN, G. a SHANKAR, A. A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2012, **16**(2), 251–255. ISSN 0973-029X.

7 PŘÍLOHY

Příloha 1: Porovnání spekter pro 10 mg/ml DHB s 10, 20 a 40mM DAHC. S rostoucí koncentrací DAHC se zlepšuje kvalita spekter.

