

„Alternativní“ biologický materiál pro rutinní analýzu nukleových kyselin – validace preanalytické fáze vyšetření DNA

Beránek M., Hegerová J., Drastíková M.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Hradec Králové

SOUHRN

Cíl studie: Výsledek každé analýzy DNA je do značné míry závislý na typu biologického materiálu použitého pro extrakci nukleových kyselin. Cílem naší studie je porovnat vlastnosti DNA extraktů získaných dvěma různými izolačními postupy z buněk bukalní sliznice, močového sedimentu, nehtů, vlasových kořínků a periferních krevních buněk.

Materiál a metody: Biologické vzorky byly získány od 24 dobrovolníků s mediánem věku 31 let (25–54 let). Izolace DNA byla provedena fenol-chloroformovou extrakcí a pomocí separačních mikrokolonek (Qiagen). Eluční objem byl v obou případech 50 µl. Extrakty byly charakterizovány spektrofotometricky, fluorimetricky, elektroforeticky a z hlediska účinnosti následné PCR amplifikace.

Výsledky: Nejvyšší koncentrace DNA obsahovaly extrakty z buněk periferní krve a bukalní sliznice; nejnižší koncentrace DNA byly izolovány z vlasových kořínků. Všechny typy extraktů měly uspokojivou čistotu (mediány v rozmezí 1,7–1,9). Podíl nefragmentované DNA ve vzorcích získaných mikrokolonkovou metodou byl téměř dvojnásobný v porovnání s fenolovou extrakcí. Procentuální zastoupení nefragmentovaných molekul klesal podle biologického zdroje v následující řadě: krev (73,3 %) > bukalní sliznice (63,5 %) > močový sediment (31,3 %) > nehty (25,3 %) > vlasy (20,4 %). Amplifikační účinnost u extraktů z periferní krve, bukalního stěru a močového sedimentu byla vyšší než u extraktů z nehtů a vlasů.

Závěr: Všechny analyzované extrakty pocházející z krevních buněk, bukalní sliznice, močového sedimentu, nehtů a vlasů poskytly dostatek DNA molekul k provedení molekulárně biologických vyšetření. Nejvhodnějšími materiály byly krevní buňky a buňky bukalní sliznice. Z nich připravené extrakty měly nejvyšší koncentraci a čistotu DNA bez ohledu na použitou izolační metodu, nejnižší podíl degradované DNA a nejvyšší účinnost amplifikace krátkých i dlouhých ampliconů.

Klíčová slova: DNA, extrakce, biologický materiál, validace, preanalytická fáze

SUMMARY

Beránek M., Hegerová J., Drastíková M.: „Alternative“ biological material for routine analysis of nucleic acids – validation of the pre-analytical phase of DNA testing

Objective: Results of DNA testing depend in many cases on the type of biological material used for extraction of nucleic acids. The aim of the study is to compare properties of DNA extracts prepared using two different isolation procedures from buccal cells, urine sediment, nails, hair roots, and peripheral blood cells.

Material and Methods: Biological material was collected from 24 volunteers at median age of 31 years (range 25–54 years). Phenol–chloroform extraction and spin microcolumn extraction method (Qiagen) were used for DNA isolation. In both the procedures, the elution volume was 50 µl. The extracts were characterized optically (UV spectrophotometric and fluorimetric analyses), electrophoretically, and by PCR amplification efficiency.

Results: The highest DNA concentrations were found in extracts from peripheral blood and buccal cells; the lowest DNA concentrations were in hair extracts. All types of the extracts had acceptable purity (medians 1.7–1.9). The content of non-fragmented DNA molecules in the microcolumns extracts was almost twofold higher in comparison to the phenol ones. The percentages of non-fragmented DNA decreased as follows: blood (73.3 %) > buccal cells (63.5 %) > urine sediment (31.3 %) > nails (25.3 %) > hair roots (20.4 %). The amplification efficiency in the peripheral blood, buccal swab, and urine extracts was significantly higher than in the nail and hair extracts.

Conclusion: All analyzed DNA extracts received from blood, buccal cells, urine sediment, nails, and hair roots provided a sufficient number of integral DNA molecules for following DNA testing. The best quality of DNA was found in extracts from blood and buccal cells (high concentrations and purity, low degree of fragmentation, and high efficiency of amplification for either short or long PCR amplicons).

Key words: DNA, extraction, biological material, validation, pre-analytical phase

Úvod

Molekulárně biologické analýzy nukleových kyselin (NK) patří již dvacet let k laboratorním metodám, které umožňují u řady lidských chorob jejich rychlou diagnostiku, pomáhají při predikci vhodné terapie a kontrolují účinnost léčebného procesu. Výpovědní hodnota výsledku DNA analýzy je však do značné míry závislá na typu použitého biologického materiálu a vlastnostech extraktu NK.

K „tradičním“ biologickým materiálům pro vyšetření lidské DNA patří vzorky nesrážlivé žilní krve ve standardních odběrových zkumavkách nebo ve formě krevních skvrn vsáknutých do vrstvy vhodného nosiče (tzv. Guthriho kartičky) [1]. Běžně se používají také sternální punktáty, zejména pro DNA diagnostiku v onkohematologii, bioptické vzorky příslušné tkáně (nejčastěji jaterní, plicní nebo střevní), chirurgické resekaty pro vyšetření DNA v onkologii, plodová voda pro prenatální diagnostiku a fixovaná tkáň v parafínovém bločku pro

molekulárně patologickou analýzu [2–6].

K molekulárně biologickému vyšetření lze však DNA získat i z jiných, „alternativních“, biologických materiálů (ABM). Mezi tyto materiály patří biologické tekutiny – moč [7–8], sliny [9], bronchoalveolární laváž, pleurální výpotky, ejakulát, cervikální hlen [10], krevní plasma a krevní sérum [8, 11–15]. Zdrojem DNA mohou být také vzorky stolice [16], stěry z bukální sliznice [17–18], vlasy [19] nebo nehty [20]. Výběr materiálu závisí na jeho dostupnosti a na účelu prováděné DNA analýzy.

Vzhledem k omezenému množství odebíraných vzorků (počtem i objemem) je u ABM obtížné optimalizovat a validovat preanalytickou fázi molekulárně biologických vyšetření, především použité extrakční procedury. Cílem naší práce je porovnat vlastnosti DNA extraktů získaných dvěma různými izolačními postupy z buněk bukální sliznice, močového sedimentu, nehtů, vlasových kořínek a periferních krevních buněk.

Materiál a metody

Biologické vzorky poskytli 24 dobrovolníci (12 žen a 12 mužů, medián věku 31 let, věkové rozpětí souboru 25–54 let) na základě informovaného souhlasu s DNA analýzou. K extrakci bylo použito 15 ml moči (první ranní odběr), nehty dolních končetin o hmotnosti nejméně 0,1 g, stěr z bukální sliznice, dvanáct vlasů s vlasovými koříny a 3 ml nesrážlivé EDTA krve. Veškerý biologický materiál byl odebrán tak, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku buňkami jiného jedince (sterilní odběrový plast na jedno použití, manipulace se vzorky v jednorázových latexových laboratorních rukavicích, sterilní nůžky, skalpely, pipetovací špičky a laboratorní mikroskopovky na jedno použití). Po odběru byl materiál uložen do chladnice a izolace DNA byla provedena vzhledem k její stabilitě nejpozději do 24 hodin po odběru [21].

Izolace DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce

K izolaci DNA byla použita standardní extrakční procedura [22] a definované množství příslušného biologického materiálu: močový sediment získaný ze 7,5 ml moče; 0,05 g nehtů nastříhaných na délku 2–3 mm; jeden odběrový tampón (FLOG Swabs, Copan Diagnostics, Murrieta, USA) s buňkami bukální sliznice; šest vlasů zkrácených na délku 1 cm s vlasovými koříny a 200 µl žilní krve. Biologický materiál byl smíchán s 300 µl lyzačního pufru (0,1 mol/l NaCl, 10 mmol/l TRIS, 1 mmol/l EDTA; pH 9,0), 40 µl proteinázy K (koncentrace 10 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim, SRN) a 40 µl 10% roztoku laurylsíranu sodného. Následovala inkubace této směsi v termobloku při 56 °C po dobu 16 hodin. Poté bylo ke směsi přidáno 500 µl fenolu pufovaného na pH 6,7 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Po homogenizaci směsi vortexováním byla provedena centrifugace při 10 000g po dobu 10 minut při 4 °C. Vodná fáze byla přidána k 500 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1, Sigma-Aldrich) a následovala centrifugace za výše uvedených podmínek. Vodná fáze byla poté přenesena do zkumavky s obsahem 250 µl 3 mol/l roztoku octanu sodného (pH 5,2) a 700 µl 96 %

ethanolu. Z této směsi byla DNA precipitována po dobu 30 minut při teplotě -20 °C. Po následné dvacetiminutové centrifugaci byla získaná peleta DNA opláchnuta 700 µl 70 % ethanolu a vysušena při pokojové teplotě. V posledním kroku byla DNA rozpuštěna v 50 µl demineralizované vody.

Izolace DNA pomocí separačních mikrokolonek

K izolaci byla použita souprava DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, SRN) podle doporučení výrobce pro extrakci DNA z příslušných tkání. Biologický materiál byl použit ve stejném množství jako u předešlého typu izolace. Po lýze buněk příslušnými lyzačními pufrů v přítomnosti proteinázy K (Qiagen) byla směs přenesena na separační mikrokolonku. Následovalo promývání komerčními pufrů AW1 a AW2, a poté eluce DNA pomocí AE pufru (50 µl).

Optická charakteristika DNA extraktů

K určení koncentrace a čistoty získané DNA byly použity 2 µl každého extraktu. Spektrofotometrická analýza v UV oblasti byla provedena na přístroji Nanodrop ND-1000 (Thermo-Scientific, USA). Dalších 10 µl každého extraktu bylo smícháno s roztokem Quant-iT dsDNA BR Reagent podle pokynů výrobce (souprava Quant-iT dsDNA BR Assay Kit, Invitrogen, Eugene, USA) a analyzováno fluorimetricky na přístroji Qubit (Invitrogen). Fluorescenčně tak byla zjištěna koncentrace celistvých, nefragmentovaných DNA molekul.

Elektroforéza DNA extraktů

Integrita DNA v extraktech byla hodnocena elektroforeticky na 1% agarosovém gelu s ethidiumbromidem. Do každé jamky byl pipetován objem extraktu odpovídající množství 2 µg DNA. Elektroforéza probíhala při 80 V po dobu 90 minut.

Hodnocení účinnosti amplifikace DNA při real-time PCR a standardní PCR

Pro real-time PCR byla použita souprava Factor V Leiden Kit (Roche Diagnostics) podle instrukcí výrobce. Amplifikace probíhala v přístroji LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics). Množství DNA přidávané do reakční směsi bylo 10 ng. PCR produkt měl délku 222 bp. Při hodnocení účinnosti real-time PCR byl pro každý extrakt určen cyklus PCR, ve kterém narůstající fluorescence produktů ve skleněné kapiláře prořala mez detekce použité vyšetřovací metody (crossing point, CP). Čím nižší byla hodnota CP, tím vyšší účinnosti amplifikace bylo dosaženo.

Pro hodnocení účinnosti PCR při tvorbě dlouhých amplikonů byla použita standardní PCR amplifikace v genu pro apolipoprotein B (apoB gen). Sekvence primerů 5' ATG GAA ACG GAG AAA TTA TG 3' a 5' CCT TCT CAC TTG GCA AAT AC 3' byly navrženy tak, aby pokrývaly oblast variabilního počtu tandemových repetitivních (VNTR) v blízkosti 3' konce genu. Dosud provedené studie odhalily v lidské populaci dvanáct délkově různých alel, které při PCR tvoří produkty o délce mezi 570 a 900 bp [23]. Reakční směs o objemu 25 µl obsahovala 1x koncentrovaný PCR pufr; 1,5 U Taq Takara po-

lymerázy; 0,2 mmol/l každého z deoxynukleotidů (vše Takara, Otsu, Japonsko); 0,8 μmol/l obou primerů (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika) a 50 ng DNA. Amplifikace byla provedena v termocykléru ABI 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA) za těchto teplotních podmínek: úvodní denaturace 10 minut při 95 °C, po které následovalo 30 cyklů PCR (denaturace při 95 °C 1 minuta, hybridizace primerů a polymerace při teplotě 58 °C 6 minut). PCR produkty byly následně hodnoceny elektroforeticky na 2% agarosovém gelu s ethidiumbromidem, separace v horizontálním uspořádání probíhala při 100 V po dobu 2,5 hodiny.

Statistická analýza

Výsledky v tabulce 1 jsou vyjádřeny jako mediány a rozpětí dat v každé z hodnocených skupin. Statistické hodnocení dat bylo provedeno pomocí Wilcoxon-Whiteova pořadového testu. Jako referenční skupina byly vybrány extrakty z periferní krve získané mikrokolonkovou metodou. Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměry a směrodatné odchylky. Statistická významnost je hodnocena pomocí Studentova t testu. Za statisticky významné byly považovány změny na hladině spolehlivosti $P < 0,05$.

Výsledky

Optická charakteristika DNA extraktů v UV oblasti ukázala, že fenolová extrakce poskytuje vyšší koncentrace DNA molekul než použitá mikrokolonková metoda. Z tabulky 1 (sloupec 3) je patrné, že v případě bukálních stěrů, nehtů a vlasů byly rozdíly v koncentracích více než dvojnásobné. Nejvyšší množství DNA obsahova-

ly extrakty z buněk periferní krve (medián koncentrace u fenolové extrakce 104,0 ng/μl; u mikrokolonek 78,8 ng/μl) a bukální sliznice (89,2 ng/μl; 31,7 ng/μl). Nejnižší množství DNA bylo izolováno z vlasových kořínků (15,7 ng/μl; 6,4 ng/μl). Porovnáním koncentrací DNA v extraktech získaných z ABM a z periferní krve byly zjištěné rozdíly hodnoceny jako statisticky významné.

Všechny typy extraktů měly uspokojivou čistotu (mediány kolísaly v rozmezí 1,7–1,9), a to nezávisle na použité izolaci (Tabulka 1, sloupec 4). Ve skupinách extraktů pocházejících z močového sedimentu, nehtů a vlasů bylo zaznamenáno širší rozpětí dosažených hodnot než u extraktů z krve a z bukální sliznice.

Integrita DNA v extraktech byla závislá na druhu použitého biologického materiálu a zvolené extrakční proceduře (Tabulka 1, sloupce 5 a 6). Podíl nefragmentované DNA ve vzorcích získaných mikrokolonkovou metodou byl téměř dvojnásobný v porovnání s fenolovou extrakcí. Nejvyšší podíl nefragmentované DNA při použití mikrokolonek měly extrakty z periferní krve (medián 73,3 %) a bukální sliznice (63,5 %). Procentuální zastoupení nefragmentovaných molekul klesalo podle biologického zdroje v následující řadě: krev > bukální sliznice > močový sediment > nehty > vlasy. Rozdíly ve fragmentaci DNA v extraktech z nehtů a vlasů nebyly statisticky významné. Přítomnost značného podílu fragmentovaných molekul v extraktech z močového sedimentu, nehtů a vlasů demonstruje provedená elektroforéza DNA (obr. 1).

Integrita DNA byla následně hodnocena z hlediska účinnosti provedené PCR amplifikace. Při real-time PCR s amplicony o délce 222 bp nebyly shledány statisticky významné rozdíly v hodnotách CP u extraktů z periferní krve (medián 27,9 pro fenolovou extrakci a 28,3 pro

Table 1. Optical characteristics of DNA in extracts. The values are expressed as medians and ranges. DNA extracted from peripheral blood cells by spin microcolumns was used as a reference group. Abbreviations used in the table: CP: crossing point; a: $P < 0,001$; b: $P < 0,01$; c: $P < 0,05$; ref.: reference group.

Biological material	Extraction procedure	DNA concentration (ng/μl)	DNA purity A_{260} / A_{280}	Non-fragmented DNA (ng/μl)	Non-fragmented DNA (%)	CP value
Buccal cells	Phenol-chloroform	89.2 (19.6 - 167.3)	1.9 (1.8 - 2.0)	28.0 (5.4 - 93.6) ^a	31.3 (2.2 - 94.8) ^a	28.6 (27.1 - 31.2)
Buccal cells	Microcolumns	31.7 (9.8 - 72.5) ^a	1.9 (1.6 - 2.1)	19.3 (3.4 - 56.5) ^a	63.5 (27.0 - 83.3) ^a	28.3 (27.7 - 30.4)
Urine sediment	Phenol-chloroform	27.0 (2.3 - 430.6) ^a	1.7 (1.0 - 1.9) ^a	6.3 (0.1 - 143.6) ^a	18.8 (0.6 - 41.1) ^a	29.0 (24.8 - 40.2)
Urine sediment	Microcolumns	14.7 (3.7 - 183.3) ^a	1.7 (1.0 - 1.9) ^a	6.8 (0.1 - 89.6) ^a	31.3 (2.2 - 94.8) ^a	28.5 (27.5 - 34.7)
Nails	Phenol-chloroform	83.2 (5.4 - 455.9)	1.9 (1.6 - 2.0)	7.7 (1.1 - 35.0) ^a	10.0 (5.3 - 34.9) ^a	31.6 (30.4 - 39.6) ^a
Nails	Microcolumns	20.2 (2.9 - 79.1) ^a	1.5 (1.0 - 2.0) ^a	4.6 (1.0 - 41.2) ^a	25.3 (7.1 - 65.2) ^a	31.3 (29.3 - 32.8) ^a
Hair	Phenol-chloroform	15.7 (1.8 - 444.7) ^a	1.7 (0.8 - 2.0) ^a	1.0 (0.1 - 67.9) ^a	10.6 (1.8 - 28.4) ^a	31.0 (28.8 - 40.8) ^a
Hair	Microcolumns	6.4 (3.0 - 74.2) ^a	1.8 (1.4 - 2.2) ^b	1.0 (0.1 - 30.6) ^a	20.4 (2.3 - 41.2) ^a	29.9 (28.2 - 40.6) ^a
Blood	Phenol-chloroform	104.0 (58.1 - 302.3) ^b	1.8 (1.7 - 1.9) ^c	45.9 (29.4 - 120.8) ^c	41.2 (17.3 - 62.5) ^a	27.9 (26.7 - 29.7)
Blood (ref.)	Microcolumns	78.8 (47.0 - 146.3)	1.9 (1.8 - 2.0)	56.8 (32.4 - 120.8)	73.3 (62.5 - 89.4)	28.3 (27.3 - 29.8)

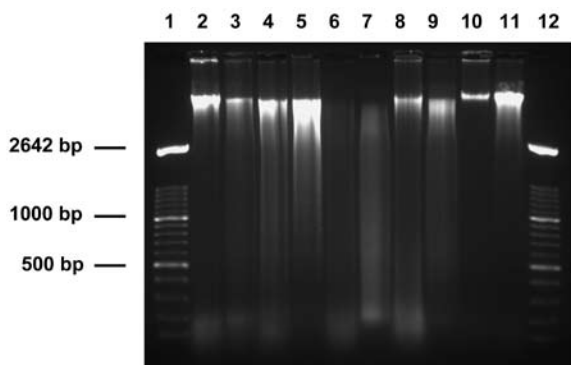


Fig. 1. Horizontal electrophoresis of DNA samples on 1% agarose gel with ethidium bromide. DNA Molecular Weight Marker XIII Roche (line 1); DNA from buccal swabs extracted by phenol extraction procedure (PP, line 2) and spin microcolumns (SM, line 3); urine sediment DNA extracted by PP (line 4) and SM (line 5); DNA from nails extracted by PP (line 6) and SM (line 7); DNA from hair extracted by PP (line 8) and SM (line 9); blood cells DNA extracted by SM (line 10) and PP (line 11).

mikrokolonky), bukálního stěru (28,6; 28,3) a močového sedimentu (29,0; 28,5). V extraktech z nehtů a vlasů byly hodnoty CP signifikantně vyšší než u výše zmíněných materiálů (31,6; 31,3 pro nehty a 31,0; 29,9 pro vlasy; $P < 0.001$). Při totožném množství DNA templátu použitým v reakčních směsích (10 ng) tento fakt svědčí o nižší účinnosti amplifikace u těchto typů extraktů (Tabulka 1, sloupec 7 a obr. 2).

Pro tvorbu dlouhých amplikonů byla použita VNTR oblast apoB genu. Jak ukazuje přiložený elektroforeogram PCR produktů jednoho z probandů (obr. 3), nízká míra amplifikace v extraktech z nehtů a vlasů se projevila slabou fluorescencí amplikonů na gelu (dráhy 8 a 9).

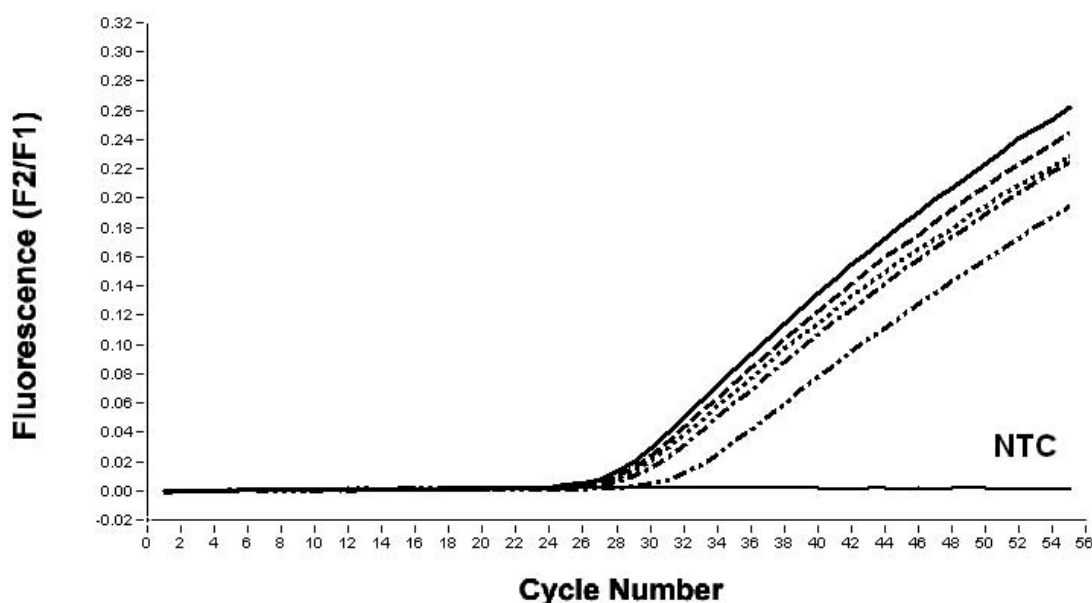


Fig. 2. Real-time PCR (Factor V Leiden Kit Roche) amplifiability of DNA extracted by spin microcolumns from blood cells (solid line), buccal swabs (broken line), urine sediment (dotted line), nails (double-dot-and-dashed line), and hair (dot-and-dashed line). No template control (NTC) was included in each run.

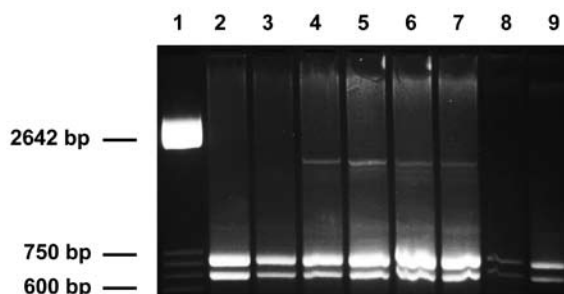


Fig. 3. Horizontal electrophoresis of PCR products of the apoB gene on 2% agarose gel with ethidium bromide. DNA Molecular Weight Marker XIII Roche (line 1); DNA from buccal swabs extracted by phenol extraction procedure (PP, line 2) and spin microcolumns (SM, line 3); DNA from urine sediment extracted by PP (line 4) and SM (line 5); DNA from blood cells extracted by PP (line 6) and SM (line 7); DNA from nails (line 8) and hair (line 9) extracted by PP.

Diskuse

Stabilita struktury DNA molekul je závislá na působení fyzikálních (teplota, záření, stáří vzorků, počet provedených zamražení a rozmražení), chemických (pH a iontová síla) a biologických (přítomnost degradačních enzymů, deoxyribonukleáz) faktorů při zpracování biologického materiálu, extrakci a manipulaci s DNA, a rovněž při následném skladování.

V naší studii byl každý extrakt charakterizován z hlediska koncentrace DNA, dosažené čistoty (spektrofotometricky v UV oblasti), stupně fragmentace DNA (fluorescencně a elektroforeticky) a účinnosti amplifikace při standardní a real-time PCR.

Při fenolové extrakci z jakéhokoliv biologického zdroje DNA standardně rozpouštíme v 50 μ l demineralizované vody. U použitého mikrokolonkového ex-

trakčního systému výrobce doporučuje upravit objem elučního pufru podle typu a množství biologického materiálu a podle předpokládaného množství eluované DNA. Pro účely studie jsme proto nejprve ověřovali, zda nižší objem elučního AE pufru ovlivňuje koncentrace DNA v extraktech z ABM. Na obr. 4 a 5 jsou znázorněny závislosti koncentrace DNA v jednotlivých typech extraktů na objemu použitého elučního pufru v rozsahu 50–150 μ l. Přestože výtěžek DNA spíše klesal se zvyšujícím se objemem pufru, změny v koncentracích DNA nebyly v případě bukálního stěru ani vlasů statisticky významné. V případě močového sedimentu a nehtů bylo při elučním objemu 50 μ l dosaženo významně vyšších koncentrací DNA než při objemu 150 μ l.

Jak vyplývá z našich výsledků, extrakce fenolem poskytuje vyšší koncentrace DNA než mikrokolonková extrakční metoda. Na druhou stranu, délky centrifugace, použití organických rozpouštědel, eluce DNA do demineralizované vody a celkový čas procedury mohou u fenolové extrakce ovlivnit integritu extrahovaných DNA molekul, a to nezávisle na použitém biologickém materiálu. Podíl fragmentované DNA u fenolové extrakce byl v naší studii dvojnásobný oproti testované mikrokolonkové metodě. Nejmarkantněji je tento vliv patrný u extraktů z vlasů a nehtů, kde jsou výtěžky DNA nesrovnatelně nižší než u jiných biologických materiálů. Jiné extrakční postupy, například vysolování [24] nebo extrakce DNA pomocí

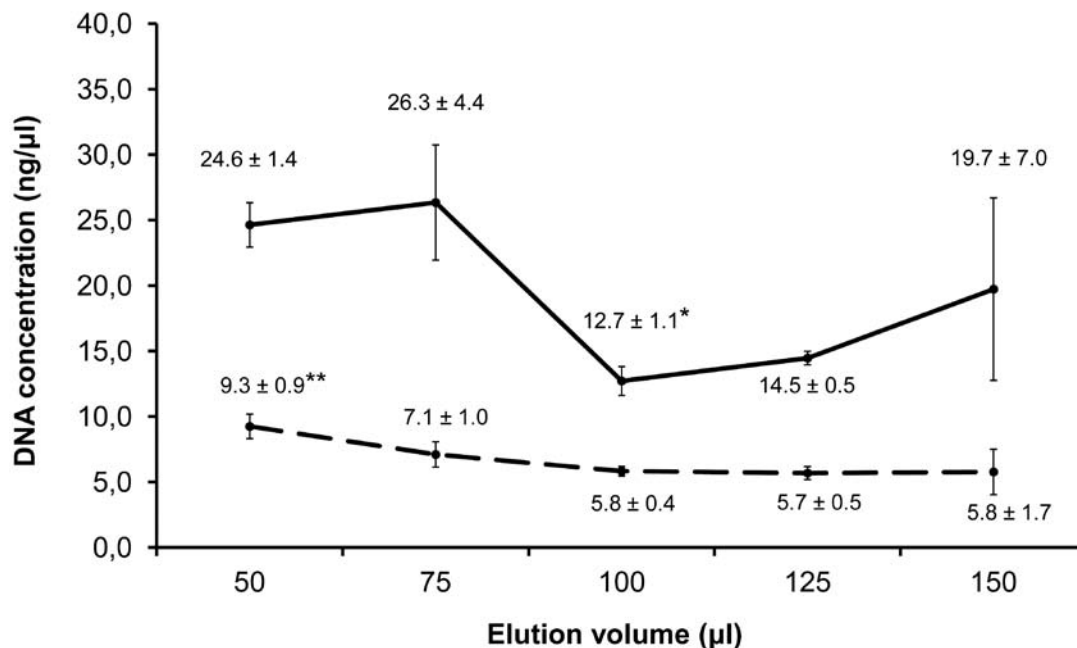


Fig. 4. Concentrations of DNA in extracts according to the volume of the elution buffer (AE Buffer, Qiagen). Solid line: DNA from buccal swabs; broken line: urine sediment DNA. The values are expressed as means and standard deviations. * $P < 0.01$; ** $P < 0.05$.

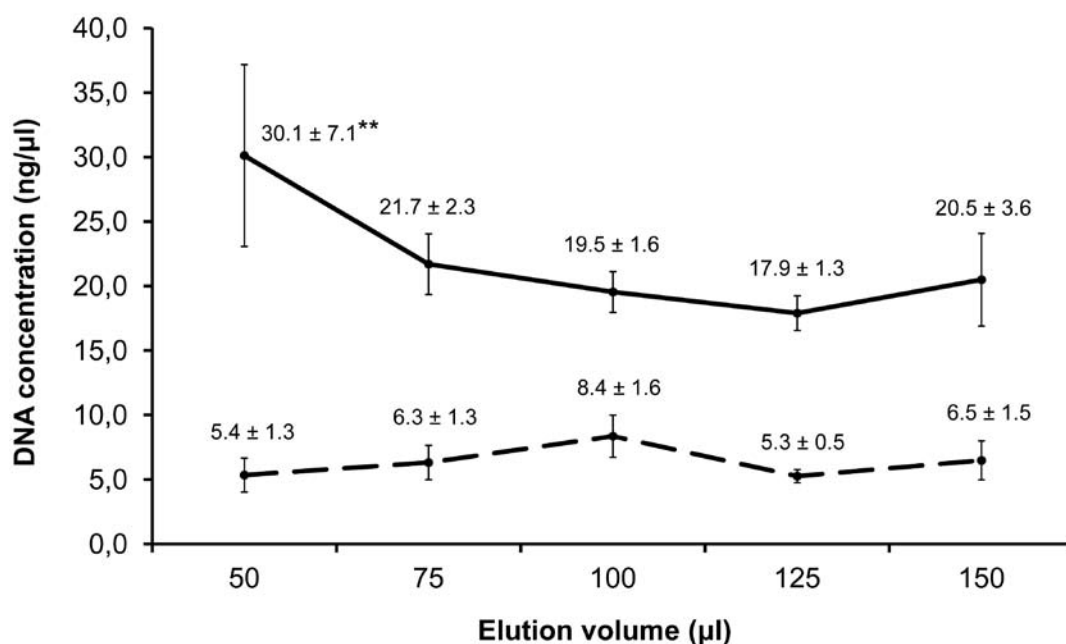


Fig. 5. Concentrations of DNA in extracts according to the volume of the elution buffer (AE Buffer, Qiagen). Solid line: DNA from nails; broken line: hair DNA. The values are expressed as means and standard deviations. ** $P < 0.05$.

magnetických částic, mohou být vůči DNA šetrnější než fenolová extrakce.

V další části experimentu jsme hodnotili čistotu DNA extraktů. Přestože mediány čistoty byly pro všechny ABM přijatelné, u močového sedimentu, nehtů a vlasů byly pozorovány individuální případy, kdy nízká čistota extraktů v rozmezí 1,0–1,5 ovlivnila nejen rozpětí hodnot kolem vypočítaných mediánů, ale i amplifikační účinnost PCR reakcí. Nižší čistotu extraktů způsobuje zvýšený obsah proteinů a dalších látek přítomných v nehtech (keratin, mikroorganismy a jejich produkty), ve vlasech (keratin, melanin, látky obsažené v umělých vlasových barvivech) a v močovém sedimentu (proteinurie, produkty endogenního či exogenního metabolismu, apod.).

Extrakty DNA získané z různého biologického materiálu se vzájemně lišily obsahem nefragmentovaných molekul DNA. Integrita DNA získaná z bukální sliznice byla srovnatelná s DNA pocházející z periferní krve, a to nezávisle na použité extrakční metodě. Podíl nefragmentované DNA v extraktech z močového sedimentu byl oproti krvi a bukální sliznici asi poloviční. Méně vhodnými ABM pro molekulárně biologickou analýzu jsou vlasové kořínky a nehty, a to nejen kvůli nízkým výtěžkům DNA, ale také pro vysoký stupeň její fragmentace. Proces fragmentace podmiňuje expozice vlasů a nehtů vnějším vlivům, včetně působení nukleáz, dále vyšší zastoupení mrtvých buněk v obou typech materiálu a vysoký obsah melaninu ve vlasech, jak bylo popsáno dříve [18–19]. Předpokládáme, že tyto faktory budou mnohem významněji ovlivňovat stabilitu RNA molekul, a že použití vlasů, nehtů, ale i moči bude pro analýzu genové exprese v těchto ABM velmi problematické.

Fragmentace DNA se odrazila v účinnosti provedených PCR amplifikací. Vysokou účinnost PCR měly extrakty pocházející z krve a z bukální sliznice. Podobné údaje byly publikovány i jinými autory [17–18]. Poměrně dobrou amplifikační účinnost měly také extrakty z močového sedimentu.

Moč je jako biologický materiál používána pro vyšetřování jak buněčných, tak volně cirkulujících DNA molekul [25]. Navzdory poměrně dobrým výtěžkům a amplifikační účinnosti PCR nejsou močový sediment ani moč příliš vhodné materiály pro extrakci DNA. Důvodů je pro to několik. Prvním z nich je možnost kontaminace DNA vzorkem jiného jedince: pohlavním stykem [8], sdílením hygienických pomůcek a zařízení, nesterilitou odběrových nádobek, manipulací s močí při přípravě močového sedimentu, apod. Dalším důvodem je možná přítomnost bakterií v moči, zejména u osob s infekcemi ledvin a močových cest. Bakterie mohou nejen interferovat svou NK při zjišťování optických charakteristik lidské DNA, ale obsahují též poměrně bohatou enzymovou výbavu pro degradaci jakékoliv nukleové kyseliny na kratší fragmenty [25]. Třetím důvodem proti rutinnímu používání DNA z moči je možná inhibice účinnosti PCR přítomnými kataboly endogenního a exogenního původu. Velmi podobné interference lze očekávat například i při extrakci DNA ze vzorku stolice, tedy materiálu testovaného v rámci molekulárně biologické diagnostiky kolorektálního karcinomu [16].

Vzhledem k nízkému výtěžku, čistotě DNA i její fragmentaci jsou nejméně vhodnými ABM nehty a vlasové kořínky. Jak ukázala PCR amplifikace krátkých i dlouhých produktů, při vhodné optimalizaci manuálních extrakčních metod je však v některých případech možno použít i tyto biologické materiály k diagnostickým účelům.

V naší studii byly hodnoceny biologické materiály, pro které zatím nebyly vyvinuty univerzálně použitelné pracovní protokoly výrobců automatických extrakčních systémů (to platí zejména pro nehty a vlasy). Technicky obtížnou částí automatizace je v případě ABM rozdílná příprava biologického materiálu, podmínky a časy nezbytné pro kompletní lýzu buněk, rozdílný obsah proteinů a dalších balastních látek, a také výsledné množství eluované DNA.

Závěr

Všechny analyzované extrakty pocházející z krevních buněk, bukální sliznice, močového sedimentu, nehtů a vlasů poskytly dostatek DNA molekul k provedení molekulárně biologických vyšetření. Nejvhodnějšími biologickými materiály, které byly testovány, jsou krevní buňky a buňky bukální sliznice. Z nich připravené extrakty měly nejvyšší koncentraci a čistotu DNA bez ohledu na použitou izolační metodu, nejnižší podíl degradované DNA a nejvyšší účinnost amplifikace krátkých i dlouhých ampliconů.

Literatura

1. **McEwen, J. E., Reilly, P. R.** Stored Guthrie cards as DNA banks. *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, 55, s. 196–200.
2. **Verdonck, L. F., van Blokland, W. T. M., Bosboom-Kalsbeek, E. K., van Heugten, H. G., Tilanus, M. G. J., de Weger, R. A.** Complete donor T cell chimerism is accomplished in patients transplanted with bone marrow grafts containing a fixed low number of T cells. *Bone Marrow Transplant.*, 1996, 18, s. 389–395.
3. **Crisan, D., Cadoff, E. M., Mattson, J. C., Hartle, K. A.** Polymerase chain reaction: Amplification of DNA from fixed tissue. *Clin. Biochem.*, 1990, 23, s. 489–495.
4. **Beránek, M., Bureš, J., Palička, V., Jandík, P., Langr, F., Nejedlá, E.** A relationship between K-ras gene mutations and some clinical and histologic variables in patients with primary colorectal carcinoma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1999, 37, s. 723–727.
5. **Beránek, M., Bureš, J., Rejchrt, S., Dědič, K., Palička V.** Mutations in the Ki-ras gene detected in colorectal biopsy specimens. *Klin. Biochem. Metab.*, 2004, 12, s. 97–100.
6. **Rebello, M. T., Hackett, G., Smith, J., et al.** Extraction of DNA from amniotic fluid cells for the early prenatal diagnosis of genetic disease. *Prenat. Diagn.*, 1991, 11, s. 41–46.
7. **Botezatu, I., Serdyuk, O., Potapova, G., et al.** Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin. Chem.*, 2000, 46, s. 1078–1084.
8. **Chan, A. K. C., Chiu, R. W. K., Lo, Y. M. D.** Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in

- molecular diagnosis. *Ann. Clin. Biochem.*, 2003, 40, s. 122–130.
9. **Keijzer, H., Endenburg, S. C., Smits, M. G., Koopmann M.** Automated genomic DNA extraction from saliva using the QIAextractor. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2010, 48, 641–643.
 10. **Kocík, M., Vymětalová, Y., Málek, I.** Volná (neboundená) lidská DNA v tělních tekutinách – možnosti klinického využití. *Čas. Lék. Čes.*, 2007, 146, s. 96–101.
 11. **Lui, Y. Y. N., Chik, K. W., Chiu, R. W. K., Ho, C. Y., Lam, C. W. K., Lo, Y. M. D.** Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin. Chem.*, 2002, 48, s. 421–427.
 12. **Johnson, P. J., Lo, Y. M. D.** Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin. Chem.*, 2002, 48, s. 1186–1193.
 13. **Farina, A., LeShane, E. S., Lambert-Messerlian, G. M., et al.** Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clin. Chem.*, 2003, 49, s. 239–242.
 14. **Chiu, R. W. K., Poon, L. L. M., Lau, T. K., Leung T. N., Wong, E. M. C., Lo, Y. M. D.** Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin. Chem.*, 2001, 47, s. 1607–1613.
 15. **Beránek, M., Vlčková, J., Hypiusevová, V., Živný, P., Palička, V.** Comparison of various methods used for extraction of genomic DNA from human plasma. *Klin. Biochem. Metab.*, 2006, 14, s. 21–24.
 16. **Nollau, P., Moser, C., Weinland, G., Wagener, C.** Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. *Int. J. Cancer*, 1996, 66, s. 332–6.
 17. **King, I. B., Satia-Abouta, J., Thornquist, M. D., et al.** Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002, 11, s. 1130–1133.
 18. **Cao, W., Hashibe, M., Rao, J. Y., Morgenstern, H., Zhang, Z. F.** Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect. Prev.*, 2003, 27, s. 397–404.
 19. **Leanza, S. M., Burk, R. D., Rohan, T. E.** Whole genome amplification of DNA extracted from hair samples: potential for use in molecular epidemiologic studies. *Cancer Detect. Prev.*, 2007, 31, s. 480–488.
 20. **Dowlman, E. A., Martin, N. C., Foy, M. J., Lochner, T., Neocleous, T.** The prevalence of mixed DNA profiles on fingernail swabs. *Sci. Justice*, 2010, 50, s. 64–71
 21. **Visvikis, S., Schlenck, A., Maurice, M.** DNA extraction and stability for epidemiological studies. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1998, 36, s. 551–555.
 22. **Blin, N., Stafford, D. W.** A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, 1976, 3, s. 2303–2308.
 23. **Boerwinkle, E., Xiong, W., Fourest, E., Chan, L.** Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, s. 212–216.
 24. **Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16, s. 1215.
 25. **Shekhtman, E. M., Anne, K., Melkonyan, H. S., Robbins, D. J., Warsof, S. L., Umansky, S. R.** Optimization of transrenal DNA analysis: detection of fetal DNA in maternal urine. *Clin. Chem.*, 2009, 55, s. 723–729.

Poděkování

Autoři děkují Prof. MUDr. Radimu Brdičkovi, DrSc. za pečlivé pročtení textu a kritické připomínky. Studie vznikla v rámci grantového projektu IGA MZ ČR NT11334–4/2010.

Do redakce došlo 2. 12. 2011

Adresa pro korespondenci:
Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky
LF a FN Hradec Králové
Sokolská 581
50005 Hradec Králové
e-mail: beranek@lfhk.cuni.cz