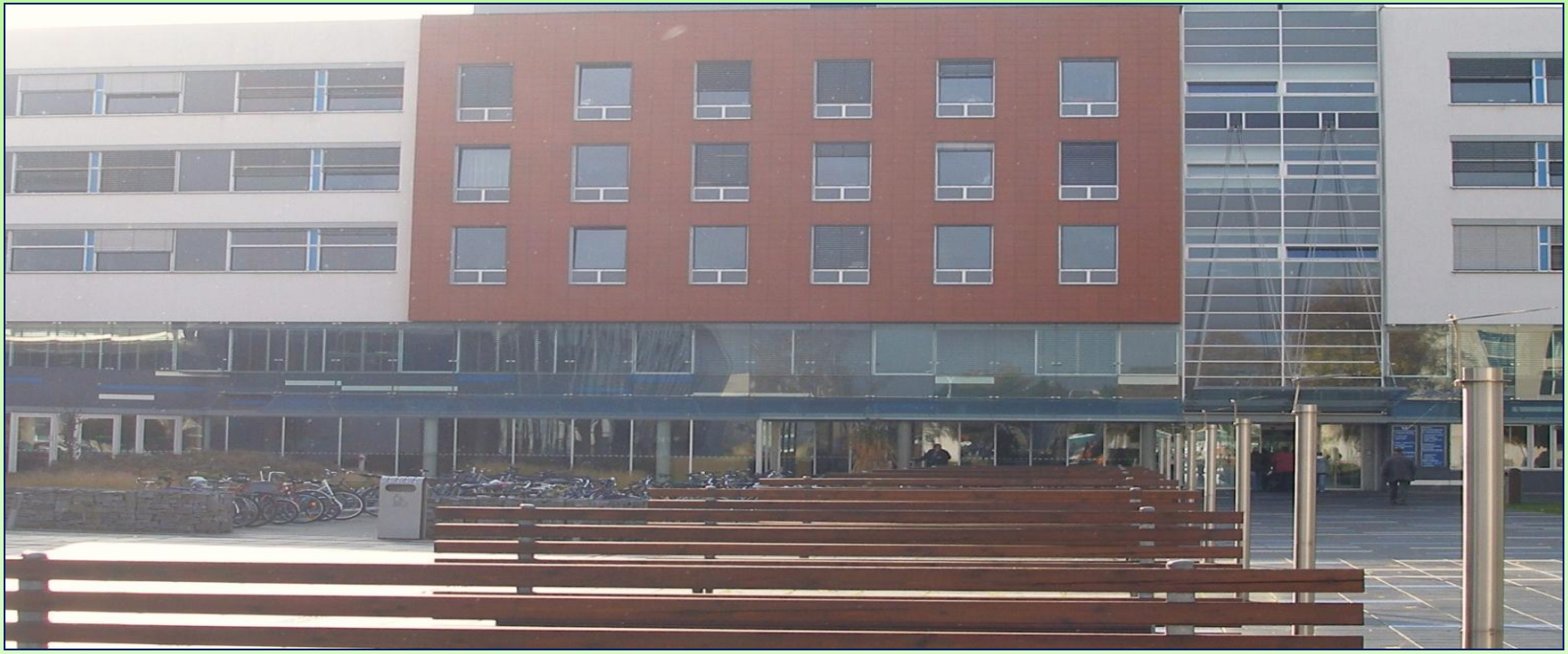
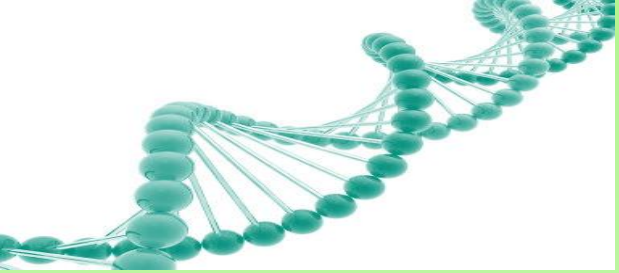
Posouzení vhodnosti izolačních postupů u alternativních biologických materiálů a srovnání výtěžnosti DNA v závislosti na podílu fragmentované a nefragmentované DNA



Hegerová J., Marková R. , Drastíková M., Beránek M.
ÚKBD FN a LF Hradec Králové



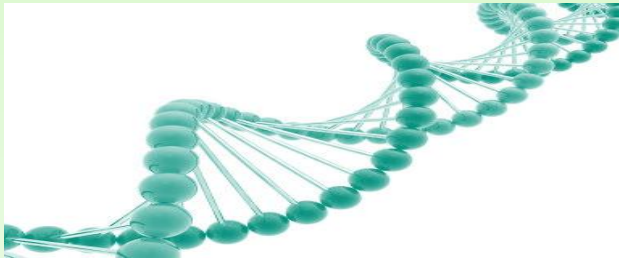
Běžnými biologickými materiály užívanými k vyšetření v molekulárně biologické laboratoři jsou:

- plná nesrážlivá krev
- kostní dřeň
- plodová voda
- kultivované amniocyty
- nativní tkáň
- parafínové bločky

K izolaci DNA se využívají tři základní izolační metody

- Izolace DNA pomocí kitu firmy Qiagen
- Fenol-chloroformová extrakce
- Magnetické partikule (přístroj MagnaPure, Roche)

Izolační metoda je vybírána podle typu vyšetření, které bude v biologickém materiálu prováděno



Cíl studie:

* ověření možnosti využití *alternativního biologického materiálu* (ABM) pro běžná rutinní vyšetření lidského genomu molekulárně biologickými metodami

* optimalizace vstupního množství DNA z ABM pro jednotlivé aplikace molekulárně biologických metod

* odhad rozsahu fragmentace DNA v závislosti na použitém biologickém materiálu a způsobu izolace

Biologický materiál užitý ve studii: bukální stěr
vlasový kořínek
nehty z dolních končetin
vzorek moče
krevní skvrny

Biologický materiál 8 anonymních dárců byl izolován dvěma různými pracovními postupy:

* modifikované mikrokolonkové extrakční postupy (Qiagen)

* fenol-chloroformová extrakce

Vyhodnocení kvantity a čistoty DNA bylo provedeno:

* spektrofotometricky v UV oblasti (260 a 280 nm, NanoDrop 1000, Thermo Scientific)

* fluorimetricky - Qubit (Invitrogen)

V rámci této studie byla odzkoušena i izolace DNA z krevních skvrn

Krev od anonymních dárců byla nakapána na dva druhy materiálů:

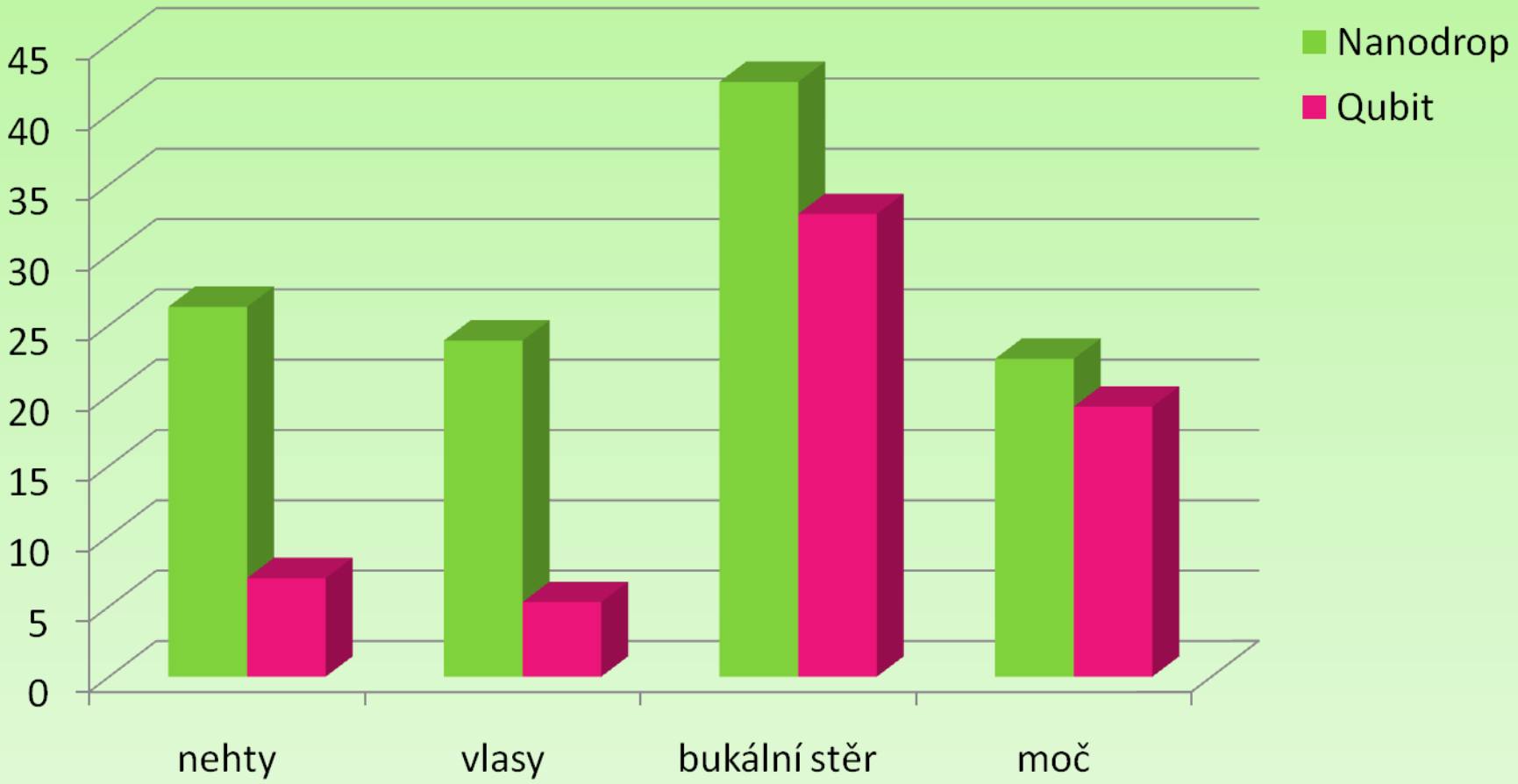
* filtrační papír
* látková plena

K izolaci krve (zaschlé po dobu 48 hodin) byla použita:

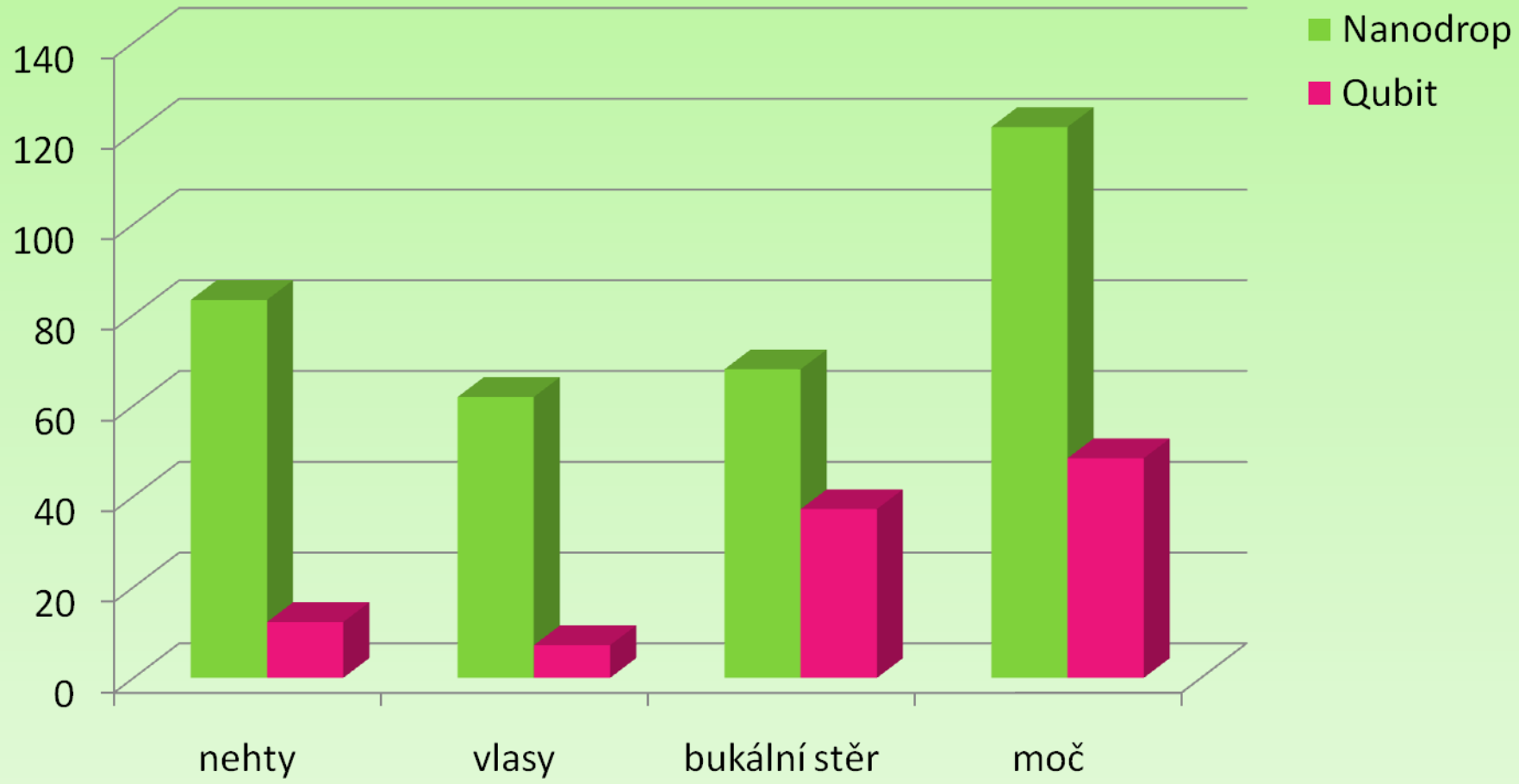
* izolace podle návodu pro krevní skvrny s ATL pufrem (Qiagen)

* modifikovaná izolace s PBS pufrem

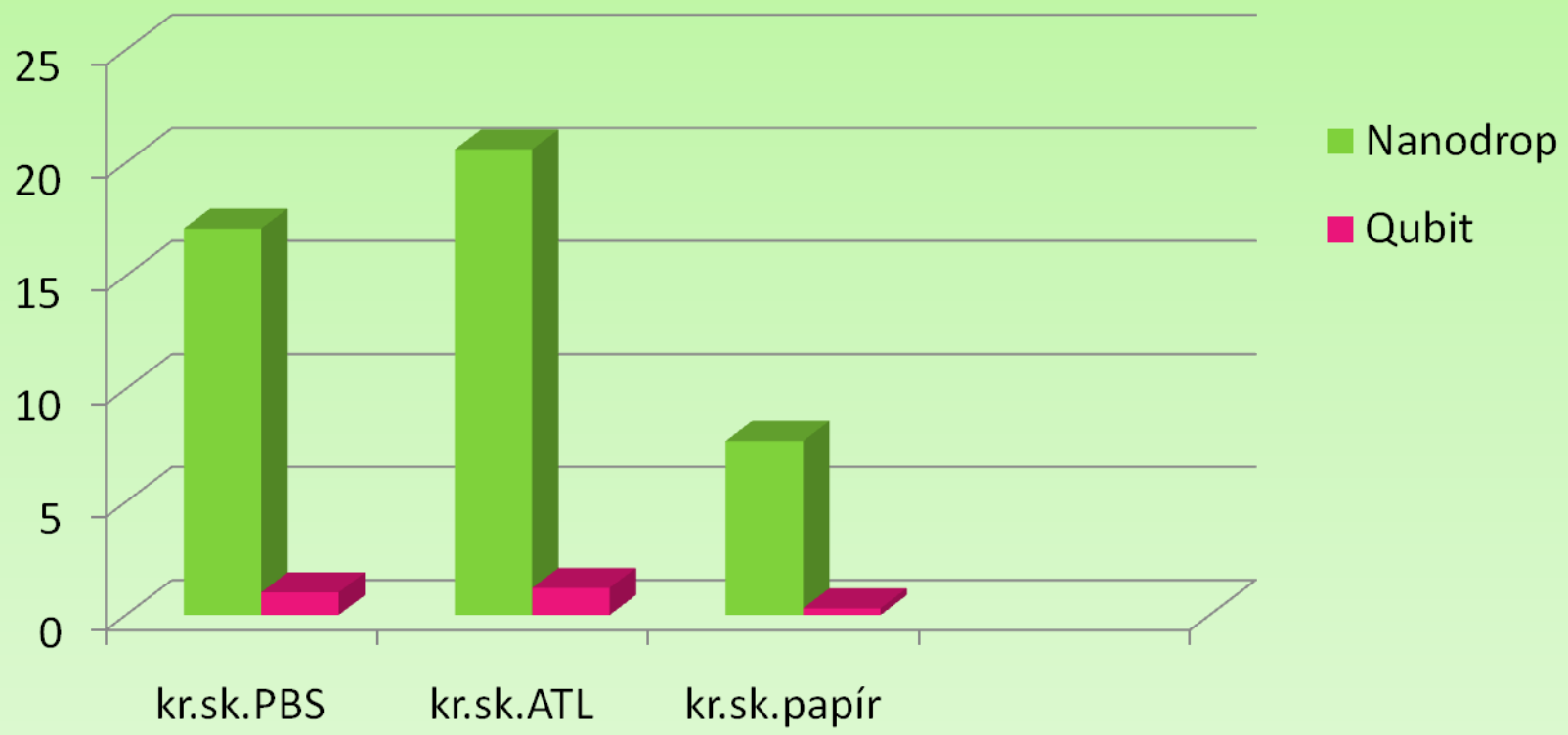
Výtěžek DNA v µg/ml Izolace mikrokolonková extrakce (Qiagen)



Výtěžek DNA v µg/ml Fenol-chloroformová extrakce

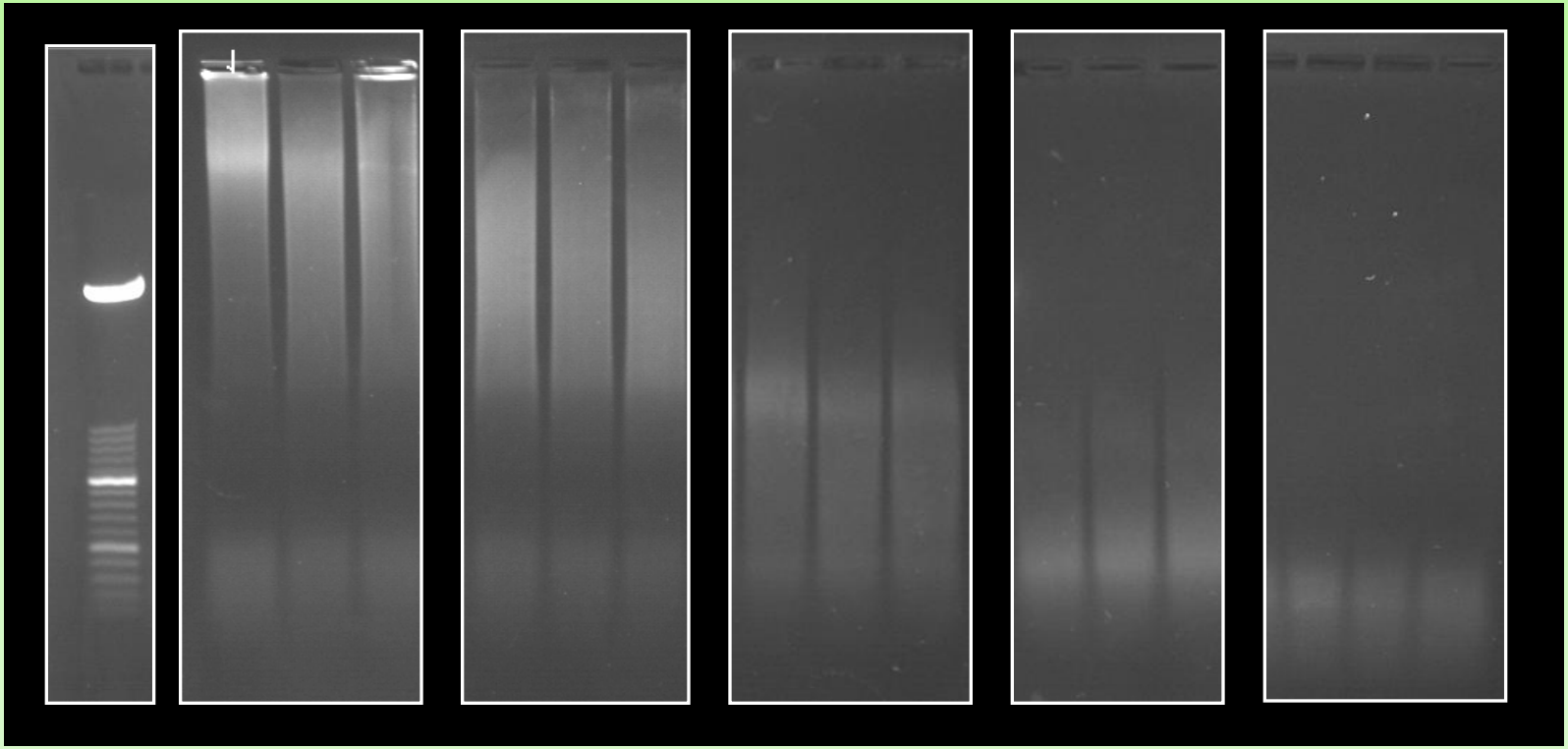


Výtěžek DNA v µg/ml - izolace krevní skvrny



DNA fragmentace způsobená účinkem DNázy I in vitro

Vzorek č. MXIII 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

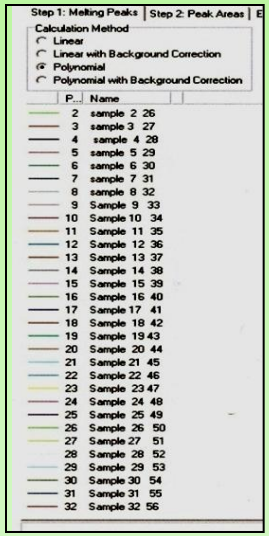


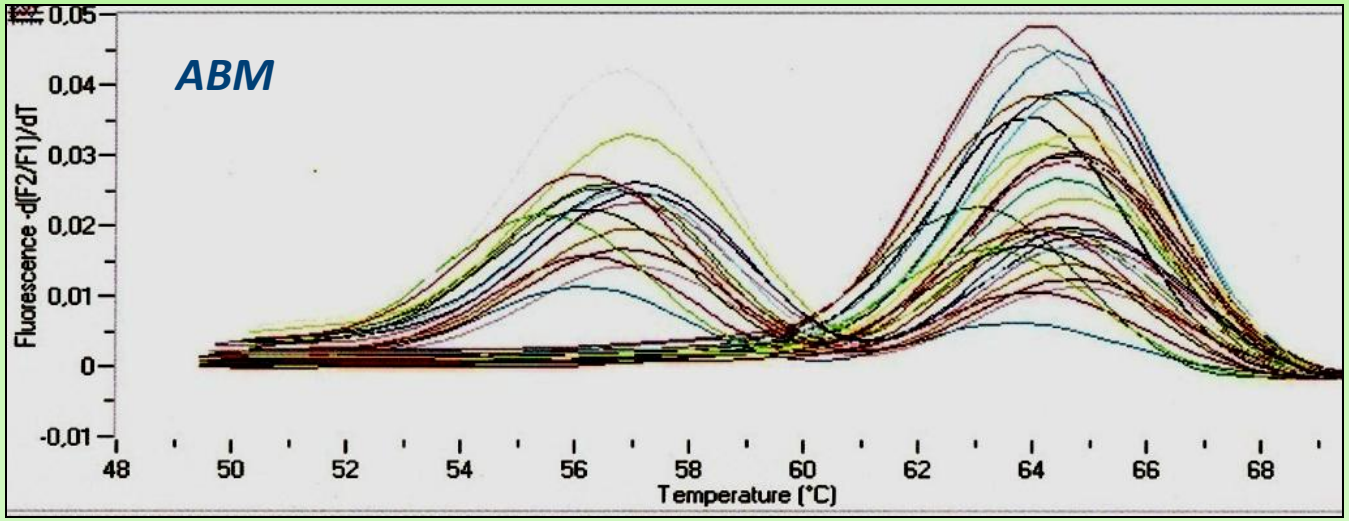
DNáza I (U / rci)	0,01			0,01			0,1			0,1			1		
Inkubace 37 °C (min)	0	2	4	12	14	16	2	4	6	12	14	16	8	10	12
Nanodrop (ng/ul)	226	205	211	205	211	218	232	226	233	234	232	237	236	240	241
Qubit (ng/ul) *50	2,2	1,8	1,7	1,8	1,7	1,7	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	0,3	0,2	0,2
% fragmentace	51	56	59	56	60	61	74	76	76	76	76	79	94	96	96

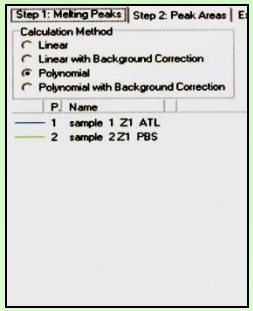
Vhodnost (integrita) DNA z ABM pro klinické aplikace molekulárně biologických metod byla ověřena

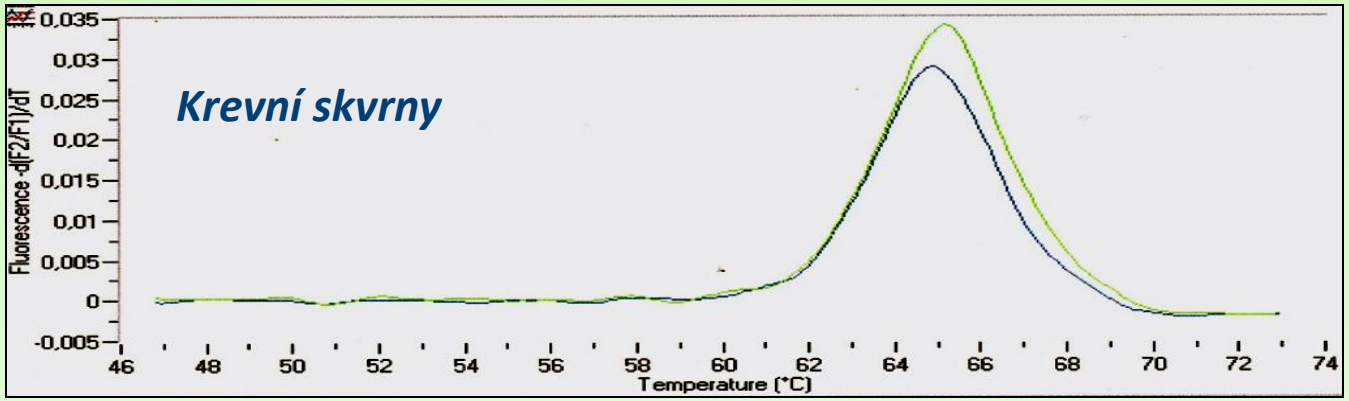
- amplifikací části genu pro faktor V krevního srážení (Factor V Leiden Kit, Roche)
- hodnocením produktů na 3,5 % Metaphor agarosovém gelu (gen pro amelogenin)
- pomocí fragmentační analýzy (genetický analyzátor ABI 3130, Applied Biosystems)

Factor V Leiden Kit Roche



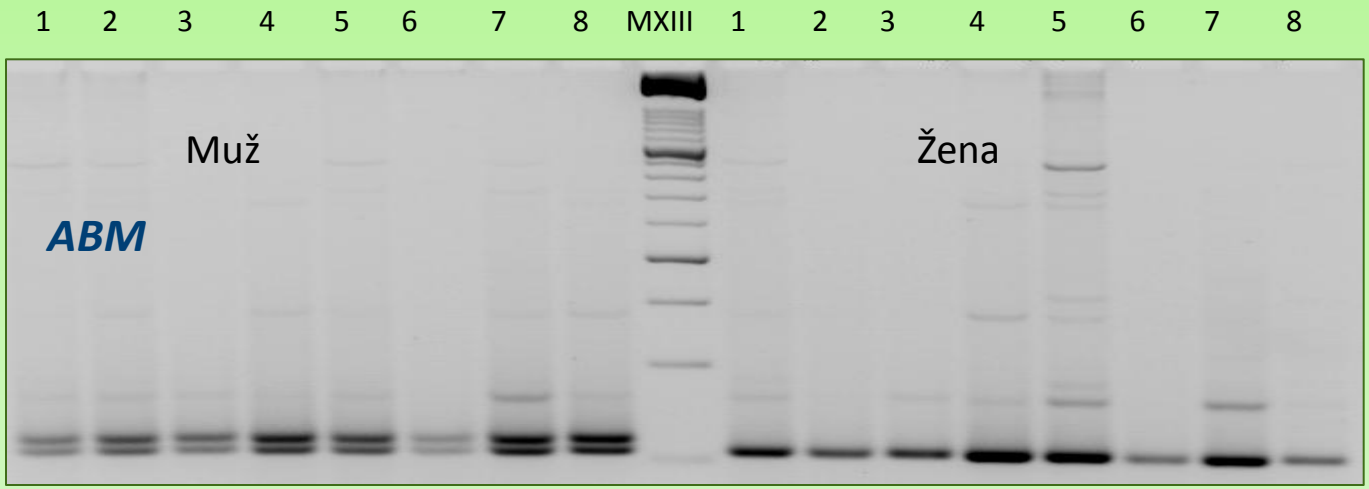




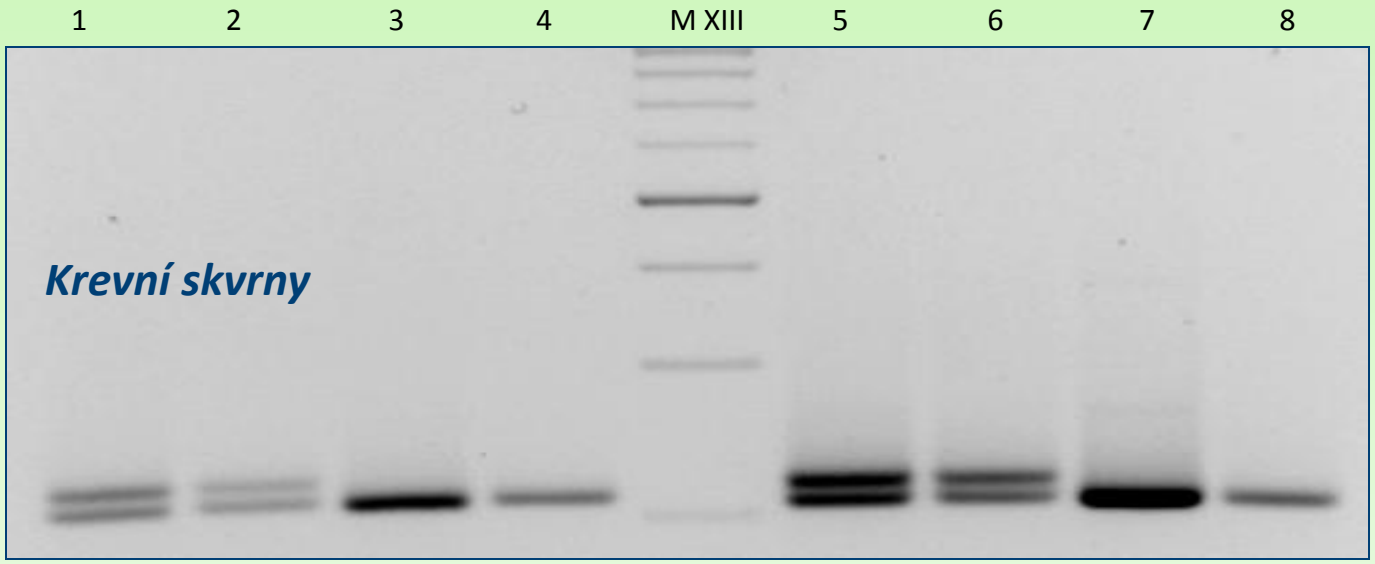


Gen pro amelogenin

(106 bp chromosom X, 112 bp chromosom Y)



1 Moč Q
2 Moč F
3 Nehty Q
4 Nehty F
5 Vlasy Q
6 Vlasy F
7 BS Q
8 BS F



1-4 izolace Q

5-8 izolace s PBS

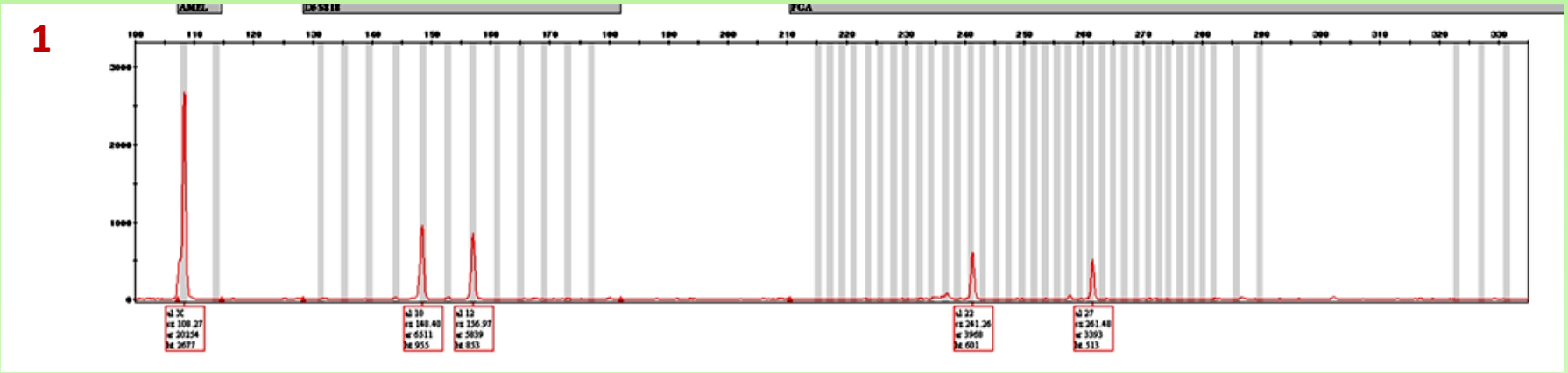
Pro PCR bylo použito vždy 2 ul DNA extraktu

Fragmentační analýza

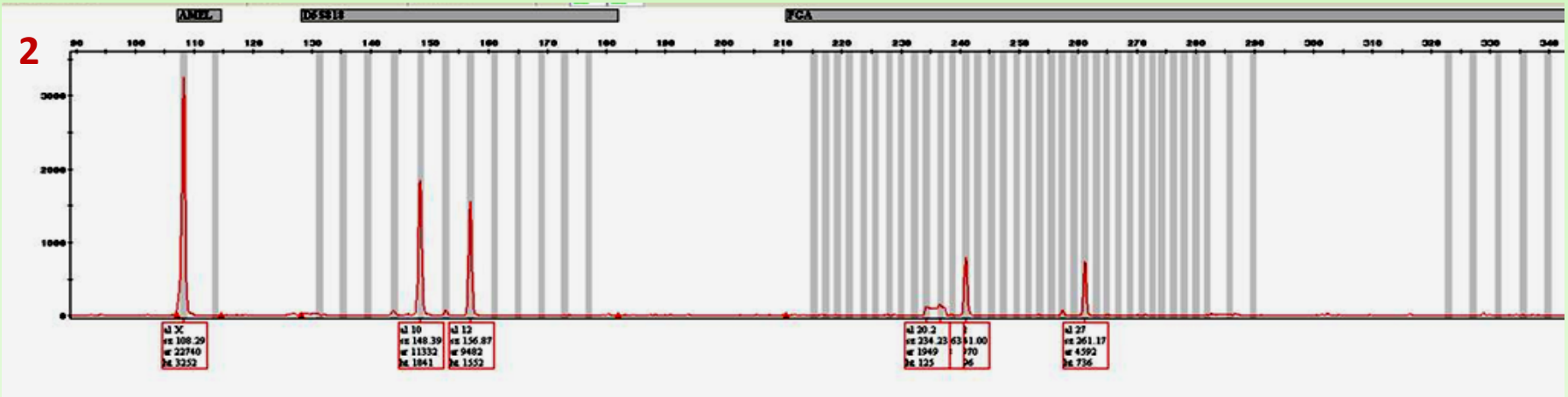
/analýza téhož jedince/

1 moč
2 nehty

1



2



Fragmentační analýza
/ krevní skvrna/

Závěry

Naše studie prokázala možnost využiti DNA z alternativního biologického materiálu pro rutinní klinická vyšetření lidského genomu

Optimalizací izolačních postupů lze z ABM získat DNA vhodných analytických parametrů

Pro efektivitu PCR je důležité nejen množství přidávaného DNA templátu, ale i stupeň jeho fragmentace

Ze srovnání obou izolačních metod vyplývá, že fenol- chloroformová extrakce poskytuje vyšší výtěžek DNA, ale DNA je zřejmě více fragmentovaná než při mikrokolonkové izolaci (Qiagen)

Děkuji Vám za pozornost