



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A  
KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ  
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO  
INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

# IZOLACE mRNA POMOCÍ PARAMAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC Z ROSTLIN

mRNA ISOLATION USING PARAMAGNETIC MICROPARTICLES FROM THE PLANT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

ZDENĚK JANÍČEK

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. MARTIN VALLA

KONZULTANT  
CONSULTANT

doc. Ing. RENÉ KIZEK, Ph.D.

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

**Student:** Zdeněk Janíček

**Ročník:** 3

**ID:** 109604

**Akademický rok:** 2009/10

## NÁZEV TÉMATU:

**Izolace mRNA pomocí paramagnetických mikročástic z rostlin**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s postupem analýzy DNA od přípravy vzorku, přes purifikaci, polymerázovou řetězovou reakci (PCR), gelovou elektroforézu až po sekvenaci. Seznamte se s možnostmi přístrojů, které jsou dostupné na Ústavu biomedicínského inženýrství, a uveďte seznam potřebných reagensů. Pro analýzu DNA připravte explantátové kultury židovské třešně. Izolujte mRNA využitím magnetizovatelných mikročástic s kovalentně vázaným oligo dT řetězcem. Navrhněte optimalizovaný postup pro izolaci mRNA a její detekci. Všechny optimalizační a vyhodnocovací kroky matematicky zpracujte a výsledek zhodnoťte. Prostudujte a zpracujte dostupné informace genomu.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Mcpherson, M., Moller, G.: PCR : Second Edition. 2nd compl. edition. [s.l.] : Taylor & Francis Group, 2006. 292 s. The Basics. ISBN 0-4153-5547-8

[2] Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Lynn B. Jorde. USA : Wiley, 2005. 3897. ISBN 0470849746.

**Termín zadání:** 8.2.2010

**Termín odevzdání:** 31.5.2010

**Vedoucí práce:** Ing. Martin Valla

**Konzultanti bakalářské práce:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*předseda oborové rady*

## UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

## **Abstrakt**

Bakalářská práce obsahuje informace o různých metodách izolace nukleových kyselin a zaměřuje se především na metodu, která umožňuje izolovat nukleové kyseliny pomocí paramagnetických částic. Zahrnuje informace o nejlepších podmínkách pro získání dostatečného množství nukleové kyseliny. Důraz je kladen také na seznámení se s přístrojem, který slouží pro automatické pipetování. Cílem je vytvořit program pro automatické izolování nukleových kyselin pomocí paramagnetických částic.

***Klíčová slova:*** izolace, nukleová kyselina, paramagnetické částice, automatická pipetovací stanice

## **Abstrakt**

The bachelor thesis includes the information about different methods of the isolation of nucleic acids and focuses on the method which allows isolating of nucleic acids from Chinese lantern plant using paramagnetic particles. It includes the information about the best conditions for gaining sufficient amount of nucleic acid. The emphasis is put on the apparatus which is used for automated pipetting. The aim is to create a program for automated isolation of nucleic acids using paramagnetic particles.

***Keywords:*** isolation, nucleic acid, paramagnetic particles, automated pipetting station

## **Bibliografická citace**

JANÍČEK, Z. *Izolace mRNA pomocí paramagnetických mikročástic z rostlin: bakalářská práce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2010. 47 s., 1.příl.. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Valla.

## Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma Izolace mRNA pomocí paramagnetických mikročástic z rostlin, jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 31. května 2010

.....  
podpis autora

## Poděkování

Rád bych poděkoval všem lidem, kteří se fyzicky či psychicky podíleli na mé cestě studiem.

Rád bych poděkoval vedoucímu bakalářské práce Ing. Martinu Vallovi za jeho trpělivost, pedagogickou a odbornou pomoc.

Velké poděkování patří především Ing. Daliborovi Húskovi, jedinečnému člověku a výbornému odborníkovi za jeho nesmírnou ochotu, trpělivost a pomoc. Pomohl mi svými znalostmi, cennými radami a připomínkami. Je tím největším rádcem a pomocníkem.

Rád bych poděkoval doc. Ing. Renému Kízkovi, Ph.D. za jeho rady, připomínky a velkou trpělivost. Byl a je tím největším rádcem a pomocníkem. Především mi poskytl potřebné zázemí pro vznik celé práce.

Poděkování patří i kolegům z laboratoře za vytváření skvělých podmínek pro práci a prostředí.

V Brně dne 31. května 2010

.....  
podpis autora

# OBSAH

<b>1. SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>7</b>
<b>2. SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>7</b>
<b>3. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>4. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>5. TEORETICKÝ ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
5.1. NUKLEOVÉ KYSELINY .....	10
5.2. DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA .....	10
5.3. RIBONUKLEOVÁ KYSELINA .....	11
5.4. ÚSTŘEDNÍ DOGMA MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE .....	13
5.5. METODY PRO CHARAKTERIZACI NUKLEOVÝCH KYSELIN .....	14
5.6. IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN .....	15
5.6.1. <i>Izolace DNA</i> .....	15
5.6.2. <i>Izolace RNA</i> .....	17
<b>6. PARAMAGNETICKÉ ČÁSTICE</b> .....	<b>19</b>
6.1. IZOLACE NK ZALOŽENÁ NA MAGNETIZOVATELNÝCH ČÁSTICÍCH.....	20
6.2. SYNTÉZA A MODIFIKACE POVRCHU MAGNETICKÝCH ČÁSTIC.....	21
6.3. SEPARACE POMOCÍ MPS ČÁSTIC .....	21
<b>7. MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>23</b>
7.1. CHEMIKÁLIE.....	23
7.2. PŘÍSTROJE .....	23
7.2.1. <i>Elektrochemická detekce na rtuťové elektrodě</i> .....	23
7.2.2. <i>Přístrojové vybavení pro izolaci NK pomocí MPs</i> .....	24
7.3. BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	24
7.4. AUTOMATICKÁ PIPETOVACÍ STANICE EPOTION .....	25
<b>8. VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>27</b>
8.1. MANUÁLNÍ PŘÍPRAVA IZOLACE NK – NÁVRH POSTUPU .....	27
8.2. OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO IZOLACI NUKLEOVÝCH KYSELIN POMOCÍ PARAMAGNETICKÝCH ČÁSTIC A MATEMATICKÁ ANALÝZA DAT .....	27
8.2.1. <i>Vliv pH vazebného pufru na izolaci nukleových kyselin</i> .....	29
8.2.2. <i>Vliv iontové síly v používaném vazebném pufru na izolaci nukleových kyselin</i> .....	30
8.2.3. <i>Vliv doby interakce NK s magnetickými částicemi</i> .....	31
8.2.4. <i>Vliv různých druhů paramagnetických částic na vazbu NK</i> .....	32
8.2.5. <i>Závislost odezvy signálu na koncentraci NK izolované pomocí paramagnetických částic</i> . .....	33
8.3. IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN Z REÁLNÝCH VZORKŮ .....	34
8.4. VÝSLEDNÝ POSTUP IZOLACE NK POMOCÍ PARAMAGNETICKÝCH ČÁSTIC .....	35
8.4.1. <i>Optimalizovaný postup manuální izolace pomocí paramagnetických částic</i> .....	35
8.5. IZOLACE POMOCÍ AUTOMATICKÉ PIPETOVACÍ STANICE.....	36
8.5.1. <i>Programovací příkazy</i> .....	38
8.6. NÁVRH PROTOKOLU PRO AUTOMATICKOU IZOLACI NUKLEOVÝCH KYSELIN ZA VYUŽITÍ PARAMAGNETICKÝCH ČÁSTIC NA ZÁKLADĚ VYPRACOVANÉ A OPTIMALIZOVANÉ METODIKY .....	40
8.6.1. <i>Postup izolace nukleových kyselin pomocí automatické pipetovací stanice</i> .....	40
8.6.2. <i>Závislost odezvy signálu na koncentraci NK pomocí paramagnetických částic na                 epMotion</i> .....	42
<b>9. ZÁVĚR A SHRNU TÍ</b> .....	<b>43</b>
<b>10. SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>47</b>

# 1. Seznam obrázků

**Obrázek 1:** *Dvojšroubovice DNA*

**Obrázek 2:** *Jednořetězová RNA*

**Obrázek 3:** *Ústřední dogma molekulární biologie*

**Obrázek 4:** *Vsolování a vysolování*

**Obrázek 5:** *Struktura MPs částic*

**Obrázek 6:** *Částice železa a jejich zachycení v okolí magnetu*

**Obrázek 7:** *Izolace RNA pomocí paramagnetických částic*

**Obrázek 8:** *Automatická pipetovací stanice – epMotion*

**Obrázek 9:** *Závislost účinnosti izolace NK na pH hybridizačního roztoku*

**Obrázek 10:** *Závislost účinnosti izolace NK na koncentraci NaCl ve vazebném roztoku*

**Obrázek 11:** *Závislost účinnosti odchycené NK na čase*

**Obrázek 12:** *Závislost účinnosti izolace NK na síle třepání pomocí přístroje MSC – 3000*

**Obrázek 13:** *Závislost účinnosti izolace NK na různých druzích paramagnetických částic*

**Obrázek 14:** *Kalibrační křivka*

**Obrázek 15:** *Izolace NK z různého množství explantátové kultury Mochyně židovské (Physalis ankekegii, Solanaceae).*

**Obrázek 16:** *Pracovní prostředí pro provedení manuální izolace NK pomocí MPs*

**Obrázek 17:** *Simulace programu*

**Obrázek 18:** *Pracovní plocha*

**Obrázek 19:** *Prostředí pro nastavování parametrů*

**Obrázek 20:** *Kalibrační křivka*

# 2. Seznam tabulek

**Tabulka 1:** *Složení MS*

**Tabulka 2:** *Názvy pracovních nástrojů, které jsou zobrazeny v pracovní ploše*

### 3. Úvod

V dnešní době se biologie stává stále více interdisciplinární vědou. Velký rozvoj zaznamenává zejména její spojení s informatikou. Toto spojení přináší řadu nových poznatků, které umožňují výzkum struktury organismů, především jejich genomů. Bioinformatika jako taková je protkaná složitými procesy, které vyžadují větší úsilí pro jejich pochopení. Důležitým předpokladem k porozumění bioinformatiky jako celku je pochopení základních principů. Vzhledem k finanční náročnosti tohoto oboru je nejdůležitějším kritériem pro společnosti působící v této oblasti dostatek financí. Jejich možným zdrojem jsou internetové stránky společností, působících v této oblasti, odborné články a knihy věnující se biologickému výzkumu. Převážná část těchto zdrojů je cizojazyčná. K praktickému výzkumu jsou nutné laboratoře vybavené kvalitními přístroji, které umožňují detailní zpracování zkoumaného materiálu a vyhodnocení odpovídajících výsledků. Tato práce byla zpracována ve spolupráci s Ústavem chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně, kde byla provedena optimalizace podmínek nukleové kyseliny, její izolace pomocí paramagnetických částic a následné promytí a odpipetování ostatních látek. Samotná izolace spočívá v navázání molekul nukleové kyseliny na tři odlišné povrchy. V prvním kroku dochází k interakci mezi vzorkem (nukleovou kyselinou) a paramagnetickou částicí. Ve druhém kroku je povrch separován díky interakci magnetu a paramagnetických částic, přičemž jsou nenavázané molekuly vymyty. V posledním kroku dochází k detekci povrchu pomocí elektrochemie. Tyto procesy vedou k získání souboru data, který charakterizuje strukturu nukleové kyseliny.

## 4. Cíle práce

Bakalářská práce je zaměřena na vývoj zcela nových a originálních postupů pro jednoduchou a rychlou izolaci nukleových kyselin (mRNA) s následnou elektrochemickou detekcí a bioinformatickým optimalizačním postupem. Pro řešení byly vytýčeny následující dílčí cíle:

- Popsat stav současné řešené problematiky
- Seznámit se s manuální přípravou izolace nukleových kyselin pomocí paramagnetických částic
- Seznámit se s automatickou pipetovací stanicí epMotion
- Vytvořit program pro izolaci nukleových kyselin pomocí automatické pipetovací stanice epMotion
- Optimalizovat podmínky navázání nukleových kyselin na paramagnetické částice a jejich uvolnění

# 5. Teoretický úvod

## 5.1. Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny (NK) jsou biopolymery, které nesou genetickou informaci. Základními jednotkami jsou nukleosidy a nukleotidy. Nukleosidy obsahují dusíkatou bázi a pentosu spojenou N – glykosidovou vazbou. Nukleotidy jsou deriváty nukleotidů, u kterých se váže esterovou vazbou kyselina fosforečná. Nukleotidy a nukleosidy mohou v buňkách plnit různé funkce. Zúčastňují se přenosu vodíku (NAD - nikotinamidadenin nukleotid, FAD – flavinadenin nukleotid) a přenosu charakteristických skupin (-NH<sub>2</sub>). Podílejí se také na biosyntéze bílkovin, sacharidů a lipidů. Jsou také součástí přenosu volné chemické energie v buňce. Je již obecně známo, že nukleotidy mohou obsahovat i více fosfátových skupin, z nichž je velmi významná ATP (adenosin trifosfát). U něhož, díky hydrolýze se z ATP uvolňuje energie a vzniká ADP (adenosin difosfát) a fosfát [1]. NK jsou polynukleotidy složené z několika desítek až milionů nukleotidů. Jednotlivé nukleotidy se v nich spojují fosfodiesterovými vazbami. Řetězce všech nukleových kyselin jsou složeny z pravidelně se opakující sekvence fosfát – pentosa. Úkolem nukleových kyselin je uchovávání a předávání genetické informace. Každý řetězec má svůj 5' – konec a 3' – konec. Na 5' – konci má nukleotid volnou fosfátovou skupinu a na opačném konci řetězce je nukleotid s hydroxylovou skupinou. Mezi základní rozlišovací prvky patří rozdělení do dvou tříd. První třídu tvoří deoxyribonukleové kyseliny a druhou třídu tvoří ribonukleové kyseliny [2].

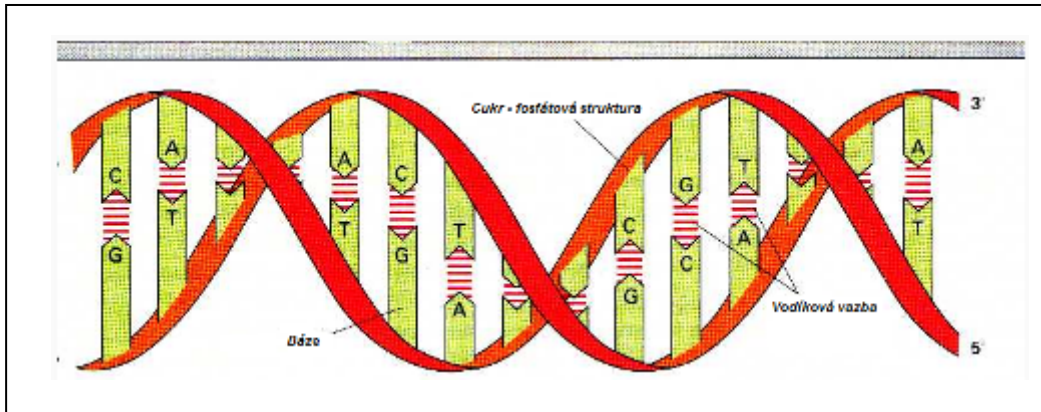
## 5.2. Deoxyribonukleová kyselina

Deoxyribonukleová kyselina (DNA), viz

Obrázek 1, je nositelkou genetické informace všech živých organismů kromě virů, u nichž může hrát tuto úlohu ribonukleová kyselina (RNA). DNA ve své struktuře kóduje buňkám jejich funkci. Vlastnosti celého organismu jsou předurčovány změnou genové exprese. U organismů jako jsou rostliny a živočichové je genomová DNA uložena uvnitř buněčného jádra. U bakterií se DNA nachází volně v cytoplazmě. DNA má strukturu dvojšroubovice tvořené dvěma řetězci *nukleotidů*. Jednotlivé nukleotidy se skládají ze tří složek:

- *nukleové báze* (dusíkaté sloučeniny),
- *fosfátu* (vazebný zbytek kyseliny fosforečné),
- *deoxyribózy* (pětiuhlíkatý cukr).

V DNA se vyskytují v různých kombinacích čtyři nukleové báze rozdělené do dvou skupin. U prvních dvou je základem *purin*. V čistém stavu je to krystalická zásaditá látka a její deriváty jsou součástí nukleových kyselin. Druhé dvě jsou deriváty *pyrimidinu* [3].

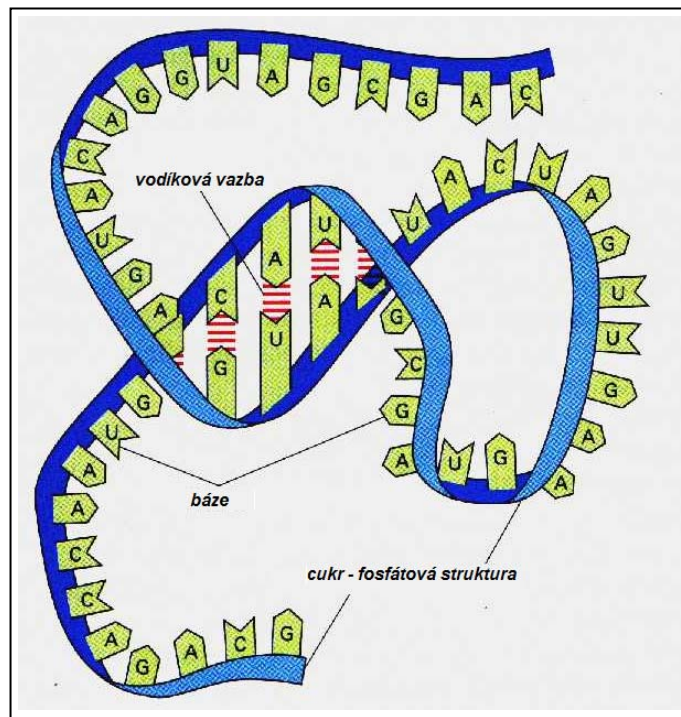


Obrázek 1: Dvojšroubovice DNA [4]

### 5.3. Ribonukleová kyselina

Ribonukleová kyselina (mRNA), viz

Obrázek 2, se uplatňuje při syntéze bílkovin. Molekuly RNA jsou tvořeny ribonukleotidy spojenými fosfodiesterovou vazbou a jejich sekvence je dána přepisem sekvencí DNA. RNA obsahuje místo thyminu bázi uracil, který je stejně jako thymin komplementární k adeninu a vytváří stejné vodíkové vazby. Molekuly RNA jsou jednořetězcové, pouze některé molekuly virů obsahují dvě antiparalelní vlákna RNA vytvářející dvojšroubovici. I když je RNA jednořetězcová, mohou se v ní vyskytovat intramolekulární komplementární úseky a tedy i dvojšroubovicové úseky, které dávají vzniknout vlásečkám. Ve dvojšroubovicových RNA se mohou vyskytovat i neobvyklé párování bází guanin – cytosin a komplementarita mezi protilehlými částmi tvořícími dvojšroubovici může být neúplná. RNA plní v buňce řadu funkcí podmíněné různou formou RNA [5].



Obrázek 2: Jednořetězová RNA [4]

### *Mediátorová RNA (informační, messenger, mRNA)*

Hlavní význam mRNA spočívá v tom, že *přenáší genetickou informaci*, která je obsažena v genech. Přenos probíhá z jádra do cytoplasmy, kde se pak na ribozomech podle mRNA syntetizuje protein. mRNA obsahuje pouze jeden řetězec, který vzniká transkripcí podle DNA (zachování principu párování bází). Je přesnou kopií strukturního genu, který poskytuje informaci o syntéze proteinu. Pro každý protein proto existuje specifická mRNA. Každá z 21 standardních aminokyselin je ve struktuře mRNA vyjádřena tripletem tj. trojicí po sobě jdoucích bází, který je označován jako *kodon*. Tripletty se tvoří kombinací čtyř bází, z nichž je možno získat 64 kódujících tripletů. Tři slouží, jako signál k ukončení syntézy a zbývajících 61 kóduje aminokyseliny [6][7].

### *Transferová RNA*

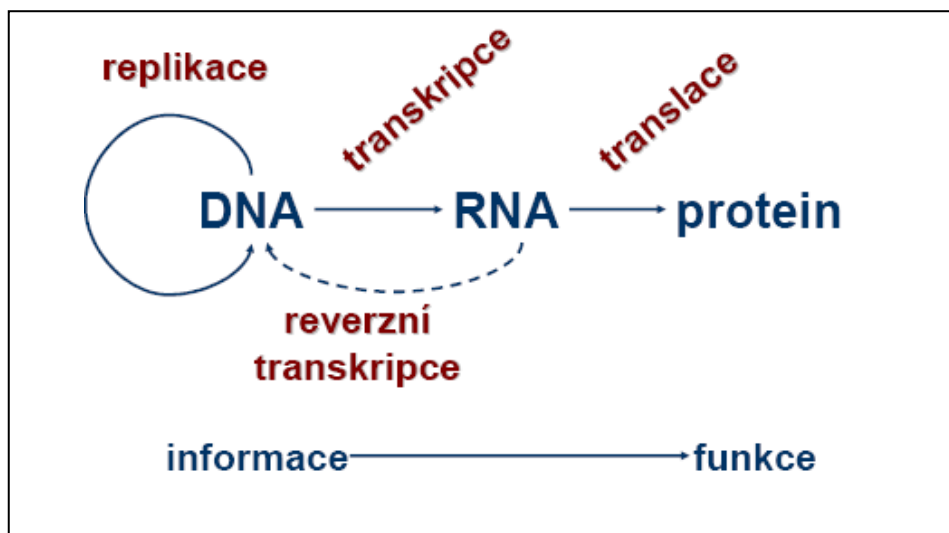
Mezi další typ RNA se řadí *tRNA*, která je nejmenší a skládá se z několika desítek nukleotidů. Hlavní význam tRNA spočívá v tom, že specificky *váží aminokyseliny*, *přenáší* je na ribosom a *zařazuje* je do polypeptidového řetězce. Účastní se procesu translace. V každé buňce se nachází nejméně 21 tRNA, tj. nejméně jedna tRNA pro každou aminokyselinu. Je však známo více než 60 různých typů tRNA (odpovídá to počtu kodonů). Struktura tRNA připomíná jetelový trojlístek [2][8].

### *Ribosomová RNA*

Posledním typem RNA je *rRNA*, která patří k nejrozšířenějším ribonukleonovým kyselinám v buňce. Představuje až 80% všech RNA. Vyskytují se v několika typech, které se odlišují velikostí i složením bází a charakterizují se pomocí specifické konstanty *S* (sedimentační konstanty). Jsou strukturální součástí podjednotek ribosomů, na jejichž povrchu probíhá translace. rRNA je jednovláknová, ale určité části molekul mají strukturu dvojité šroubovice. Vzniká v jádru. Sekvence rRNA umožňuje vědcům nahlédnout do příbuzenských vztahů mezi biologickými druhy, protože geny, které ji kódují, mají nízkou variabilitu. Geny pro rRNA jsou kódovány na tzv. rDNA [2][8].

## 5.4. Ústřední dogma molekulární biologie

Je základní idea molekulární biologie, viz Obrázek 3, kde dochází k přenosu genetické informace buď z nukleové kyseliny do nukleové kyseliny nebo z nukleové kyseliny do proteinu, *ale zpětný přenos z proteinu do nukleové kyseliny nelze provést*. Genetická informace bývá zakódována v dvojšroubovicové molekule DNA. Řetězce DNA jsou spojeny komplementárním párováním. Pokud dochází k buněčnému dělení, *DNA se replikuje* a genetická informace je předávána dceřiným buňkám. U retrovirů existuje reverzní transkripce, kde je informace přepisována z RNA do DNA. V procesu *transkripce* je informace komplementárně přepsána do heterogenní jaderné RNA, která se stává po vystřížení intronů, funkční mediátorovou – mRNA a přechází do cytoplasmy, kde se spojí s ribosomy a proběhne *translace*, nebo-li proteosyntéza. Transkripce a translace jsou tedy procesy, kterými buňka realizuje své genetické instrukce zapsané v DNA. Informace mRNA se překládá z jazyku bází do jazyka aminokyselin. Komplementárně přepsaný triplet bází do mRNA se nazývá kodón. Každý kodón, kromě STOP kodónů, v sekvenci mRNA kóduje specifickou aminokyselinu a genetický kód se nepřekrývá. K ukončení translace dojde pomocí terminačního kodónu. Polypeptidový řetězec podléhá *posttranslačním úpravám*, což vede k rozštěpení řetězce, ke zkrácení nebo glykosylaci. Vedou k produkci proteinů z jednoho genu [9][10].



**Obrázek 3:** Ústřední dogma molekulární biologie [9]

Vztah nukleových kyselin a proteinů je mezi sebou takový, že zajišťují základní funkce živých soustav, a to přeměnu látek, metabolismus a reprodukci. Genetická informace se potomstvem dědí jen prostřednictvím nukleových kyselin. Biosyntéza nukleových kyselin a proteinů v živé soustavě je závislá na enzymech a na nukleových kyselinách jako nositelích genetické informace [10].

## 5.5. Metody pro charakterizaci nukleových kyselin

Studium NK by nebylo umožněno bez kvantitativní a kvalitativní izolace. Pro další charakterizaci NK se používají především následující techniky. Spektrofotometrie, PCR, elektroforéza a sekvenování.

*Spektrofotometrie:* Jedná se o stanovení vlastností vzorku, např. koncentrace určité látky, na základě pohlcování světla o určité vlnové délce. Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami. Běžně jsou způsobeny absorpcí ultrafialového (190 až 400 nm) a viditelného záření (400 až 800 nm). U měření DNA se pohybuje vlnová délka okolo 260 - 280 nm. V klinické biochemii je z optických metod nejužívanější absorpční spektrofotometrie. Jde o optickou metodu stanovení látky absorbující elektromagnetické záření. Množství absorbovaného záření o určité vlnové délce závisí na charakteru a množství absorbující látky. Měření se provádí při konstantní vlnové délce, která odpovídá maximu absorpce stanovované látky.

*Polymerázová řetězová reakce (PCR):* Principem této metody je enzymatická amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. DNA amplifikace spočívá v cyklickém opakování 3 kroků: denaturace, hybridizace a syntézy chybějícího komplementárního úseku DNA. Každá typická PCR začíná tepelnou denaturací vzorků DNA na dva jednoduché řetězce při teplotě 95 °C. Reakce je založena na schopnosti dvojvláknové DNA denaturovat při vysoké teplotě a opětovně renaturovat po snížení teploty při zachování pravidla komplementarity bází. Jestliže jsou známy nukleotidové sekvence na koncích určitého úseku DNA, je možné úsek amplifikovat pomocí této polymerázové řetězové reakce. Další fáze spočívá v ochlazení vzorku na 30 až 65 °C. Při této teplotě dochází k nasednutí primerů na komplementární 3' konce cílové DNA. Dalším krokem je syntéza nových vláken, která katalyzuje termostabilní DNA polymerázu. Je využívána ve všech odvětvích vědy. Od základního výzkumu týkajícího se izolace genů, přes aplikovaný genetický výzkum, klinické disciplíny, až k archeologii a k dalšímu využití [14][15]. Hlavní výhodou PCR, ze které těží také lékařská diagnostika, je její vysoká citlivost. Protože dokáže z pouhých 2 vláken vytvořit po 30 cyklech 230 molekul. Naopak její nevýhodou je, že nedokáže efektivně syntetizovat produkty delší než cca 3-15 tisíc párů bází [15]. Po PCR obvykle provádíme kontrolu výsledku elektroforézou na agarózovém, případně polyakrylamidovém gelu.

*Elektroforéza:* Využívá schopnosti nabitých částic migrovat v elektrickém poli. Vzhledem k tomu, že rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly, různě velké a různě nabitě molekuly se budou pohybovat odlišnou rychlostí. Můžeme proto elektroforézu využívat k separaci látek a to především pro analytické účely [14]. Elektroforéza DNA rozděluje vlákna DNA podle délky. Molekuly DNA mají záporný náboj a tak když se různě dlouhé kousky vláken DNA dají do gelového prostředí, tak v něm po zapnutí stejnosměrného elektrického proudu začnou pomalu migrovat. Čím jsou úseky DNA kratší, tím se v tomto gelu, který zde funguje jako molekulární síť, pohybují rychleji. Krátké molekuly DNA sítím snadno projdou a doputují v gelu od startu nejdále. Stejně dlouhé úseky se pohybují stejnou rychlostí a tak pokud jich je ve sledovaném vzorku více, vytvoří po určité době v gelu proužek. Tak se dá například určovat, zda se ve vzorku vyskytují určité varianty známých genů, zda vzorek patří vyšetřovanému jedinci a nebo třeba i to, zda nejsou některé geny poškozeny a prověřovaného nečeká některá z geneticky šířených nemocí. Mezi výhody patří minimální spotřeba vzorku, rychlost, snadná vizualizace. Naopak mezi nevýhody patří omezená reprezentativnost vzorku a senzitivita [14][16].

*Sekvenování:* Metody sekvenování slouží k přesnému určení nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA nebo RNA. Je nejpřesnějším, avšak pracovně nejnáročnějším, nejsložitějším a nejdražším způsobem studia DNA, při kterém se určuje přesné pořadí bází v určitém úseku DNA. Dva základní principy sekvenačních metod (za oba byla udělena Nobelova cena). Tzv. „dideoxy“ metoda (Sangerova) je enzymová metoda, jejíž využití v současné době zcela zastínilo druhou, chemickou metodu (Maxam-Gilbertova metoda). V dnešní době existuje více sekvenačních metod, např. pyrosekvenování (založena na sekvenaci syntézou komplementární DNA. Jde o jednu z prvních metod, která se začala rozvíjet jako alternativa ke klasické Sangerově metodě), sekvenační čipy (mikročipy mohou být efektivně využity pro detekci mutací a polymorfismů, také pro sekvenační analýzy. Princip techniky DNA čipů spočívá v hybridizační reakci mezi vzorkem DNA a sekvenčně specifickými DNA sondami, které jsou navázány na povrchu čipu exprese). Výhoda sekvenování tkví v tom, že za prvé přináší informaci o nejzákladnější struktuře genetického materiálu, za druhé množství zkoumaných znaků (nukleotidů) je velmi vysoké, za třetí je relativně jednoduché získat informace o evolučních procesech. Nevýhoda spočívá v časové náročnosti a vysoké ceně [16].

## 5.6. Izolace nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin je nezbytným a velmi důležitým krokem k jejímu dalšímu zkoumání pomocí PCR, elektroforézy a sekvenování. Pro izolaci nukleových kyselin bylo vypracováno mnoho metod. Mezi nejpoužívanější patří vsolování a vysolování, srážení organickými rozpouštědly, fenol – chloroformová metoda a adsorpce na silikát a dnes stále více používanou metodu založenou na paramagnetických částicích [17]. [17]

### 5.6.1. Izolace DNA

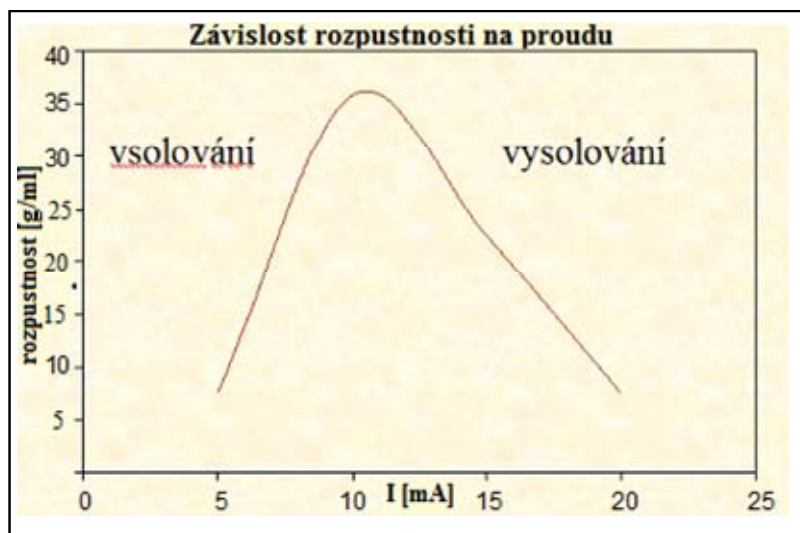
K porozumění genetické informaci je potřeba začít nejprve izolací DNA. Při izolaci DNA se bere podobnost DNA s ostatními biopolymery. Vybírají se tedy metody s vysokou selektivitou a citlivostí. Při izolaci nukleové kyseliny je třeba volit metodu v závislosti na požadované čistotě a množství finální nukleové kyseliny a na typu buněk, z nichž má být nukleová kyselina izolována. Ve velké míře by se měla zohledňovat také časová náročnost izolačního procesu a celková ekonomická stránka.

Většinou se izoluje DNA, která je přítomna v nitrobuněčném obsahu. Prvním krokem by měla být *lýza buněk*, ze kterých je možno získat DNA. U živočišných buněk stačí obvykle rozpuštění biomembrán pomocí detergentu. Detergenty se vyskytují ve formě SDS (dodecylsulfátu sodného) nebo mohou být iontové povahy, ale bývají také jako nenabitě detergenty. Pro lýzu pevných částic musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. protřepáváním na vortexu se skleněnými kuličkami, drcením tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce. Také se k roztoku přidává enzym proteináza K, který štěpí bílkoviny. Buněčný obsah včetně nukleových kyselin se z lyzovaných buněk uvolní do pufrovaného roztoku, který kromě detergentu obsahuje EDTA. Ta komplexně váže ionty vápníku, které jsou potřebné jako kofaktor nukleáz [18]. Dalším krokem je *precipitace DNA* etanolem a její následné *promytí*. Nakonec se DNA *rozpusť* ve vhodném pufru. *Čistota a koncentrace DNA* se zjistí *spektrofotometricky*. K oddělení izolované látky z roztoku lze docílit dočasnou denaturací. Použít můžeme teplotní denaturaci, techniku vsolování a vysolování nebo srážení organickými rozpouštědly. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při 260 a 280 nm [18].

*Odstranění RNA:* RNA a DNA jsou velmi podobné makromolekuly. Proto lze směs těchto dvou látek získat jednoduše. Pokud chceme získat pouze DNA, přidáme pro odstranění RNA enzym ribonukleáza (RNáza), který štěpí RNA na směs oligonukleotidů, aniž by změnil vlastnosti molekuly DNA [18].

*Fenol - chloroformová extrakce:* U fenol – chloroformové extrakce je postup následující. Vzorky prochází homogenizací a lyzací. K výslednému lyzátu se přidává fenol, chloroform a izoamylalkohol. Chloroform se nemísí s vodným roztokem buněčného lyzátu a směs se rozdělí na dvě fáze. První fáze se nazývá horní vodná a druhá fáze dolní chloroformová. Poté se provede protřepání, při němž dojde k mísení fází a fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Chloroformová fáze nastane po přidání izoamylalkoholu, který zvýší rozpustnost fenolu v chloroformu. Po protřepání je roztok odstředěn pro oddělení fází a na rozhraní se objeví bílý prstenec sražených proteinů. V horní vodné fázi se nacházejí nukleové kyseliny, které jsou přeneseny do čisté zkumavky. Pro dokonalé odstranění proteinů se metoda musí opakovat neustálým přidáváním směsi fenolu-chloroformu-izoamylalkoholu a protřepáváním tak dlouho, dokud se na rozhraní nepřestane objevovat bílá bílkovinná sraženina. U izolace z hub, rostlin a některých bakterií je nutné odstranit i polysacharidy. Mělo by také ke konci dojít k použití směsi chloroformu s izoamylalkoholem, jako na začátku v poměru 24:1, aby došlo k odstranění fenolu, který by mohl interagovat např. s použitým enzymem. Z přečištěného vodného roztoku je možné nukleové kyseliny vysrážet přidáním koncentrovaného etanolu. Po centrifugaci se na dně zkumavky objeví mléčně zkalený sediment. S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které zvyšují účinnost srážení nukleových kyselin, což má za následek bílé zbarvení. Poté se musí soli vymýt 70% etanolem. Čisté nukleové kyseliny je možné po odsátí supernatantu rozpustit ve vodě nebo ve vhodném pufru. Protože více než 95% objemu nukleových kyselin v buňce tvoří RNA, převažuje RNA i v tomto roztoku. Pokud chceme pracovat s čistou DNA, tak RNA odstraníme působením RNázy a pokud chceme pracovat pouze s čistou RNA použijeme pro odstranění DNA právě DNázu [19]. Tato metoda je obtížnější a používá se spíše pro práci s větším množstvím nukleových kyselin.

*Vsolování a vysolování:* Při vsolování dochází k vzestupu rozpustnosti bílkoviny při zvyšování koncentrace soli v oblasti nízkých koncentrací. Různé bílkoviny se navzájem liší odezvou na přídavek soli. Vysolování se často používá pro frakcionaci globulinů, které se nacházejí ve vodě a mohou být rozpuštěny zvyšováním iontové síly roztoku. Uvedená metoda však má svá omezení. Přítomnost některých iontů totiž rozpustnost proteinů naopak zvyšuje. Některé ionty vyvolávají denaturaci (a poškození) bílkovin a tím znemožňují jejich další využití. V takových případech je nutno zvolit buď jinou sůl, nebo jinou separační metodu. Musí být zachován součin rozpustnosti. Nejčastěji se používá síran amonný kvůli jeho malým denaturačním účinkům. K izolaci nukleových kyselin je vhodná koncentrace asi 30% množství potřebného ke vzniku nasyceného roztoku, vyšší obsah vede k nechtěnému srážení proteinů [21].



**Obrázek 4:** *Vsolování a vysolování* [22]

*Srážení organickými rozpouštědly:* Tato metoda je založena na jejich schopnosti snížit dielektrickou konstantu prostředí. Tím se zvyšují intramolekulární elektrostatické interakce nabitých skupin a tedy dochází ke snižování rozpustnosti. Nejznámější je použití ethanolu, tzv. etanolové srážení. V současné době je ale ethanol nahrazován šetrnějšími organickými rozpouštědly [20].

*Adsorpce na křemičitan:* Mezi další metody izolace DNA patří adsorpce na křemičitan. Je založena na přítomnosti chaotropních solí (zvýšená koncentrace může navodit denaturaci proteinů), které jsou přilnuty na křemičitanový povrch. K roztoku se zlyzovaným buněčným obsahem se přidává chaotropní sůl a suspenze křemičitanových částic. Při protřepání dochází ke změně DNA na částice. Ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku a můžeme je odstranit. Částice necháme usadit nebo použijeme centrifugy pro urychlení. Poté odsajeme roztok nad částicemi a propláchneme novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Po opětovné centrifugaci a odsátí roztoku zůstává na částicích čistá DNA. DNA z povrchu částic uvolníme přidáním vhodného pufru, který nebude obsahovat chaotropní soli. Po odstředění zůstanou na dně jen samotné částice a nad nimi bude čistý roztok DNA [19]. Při adsorpci na křemičitan je výhodou jejich rychlost a pohodlnost. Na této metodě jsou založeny kity (komerční soupravy) pro extrakce DNA. Kity jsou používané na konkrétní typ a množství vzorku a získávají se standardizované výsledky. Výhoda souvisí také s tím, že pro kity se používají nástavce do mikrozkuhavek, obsahující jemný filtr, který zadrží křemičitanové částice.

### 5.6.2. Izolace RNA

Nejdůležitějším krokem při plnění mnoha základních pokusů molekulární biologie jako je RT-PCR, RNA mapování, in vitro překlad a konstrukce cDNA knihovny je získání vysoce kvalitní, neporušené RNA. Úspěšná izolace RNA by měla zahrnovat několik důležitých kroků, jak před, tak po skutečném čištění RNA. Izolace jako taková se u RNA provádí obtížněji než u DNA [23].

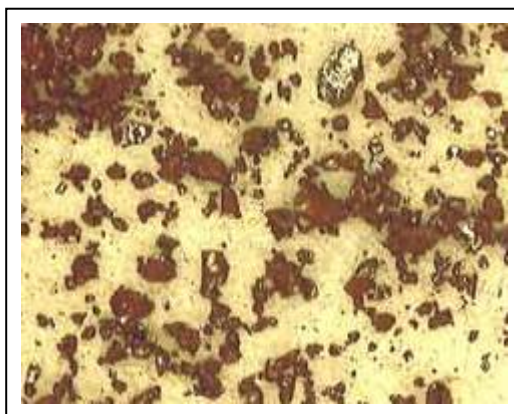
Buňky jsou lyzovány nebo homogenizovány v přítomnosti roztoku *fenolu a guanidium isothiokyanátu*. Přidání chloroformu a následná krátká centrifugace vedou k separaci vzorku do tří fází: 1. vodní fáze, obsahující RNA, 2. interfáze, obsahující DNA a 3. organická fáze, obsahující proteiny. RNA je izolována z vodní fáze precipitací pomocí izopropanolu. Hlavním problémem při izolaci RNA jsou RNázy – všude přítomné a velmi odolné enzymy, štěpící

RNA. RNázy jsou velmi stabilní. Zachovávají si velkou část své aktivity i po povaření, mohou být stabilní i v širokém rozmezí pH a renaturují snadno po chemické denaturaci. RNázy se vyskytují v nádobkách a v roztocích, které přicházejí do styku se vzorkem a RNázy samotného vzorku. Všechny vodné roztoky a materiál, které přijdou do styku se zpracovávaným vzorkem, proto musí být zbaveny RNáz. Pro izolaci lze opět použít fenol-chloroformovou extrakci. Fenol musí mít vyšší teplotu a musí být kyselý. Takže se získá roztok všech typů RNA, tj. tzv. celková RNA, kterou lze zbavit kontaminující DNA působením DNázy. Tento enzym štěpí jednovláknové a dvouvláknové řetězce DNA za vzniku mono- a oligonukleotidů. DNáza I v přítomnosti  $Mg^{2+}$  hydrolyzuje každý z řetězců dvouvláknové DNA nezávisle a náhodně. Jako příklad použití lze uvést odstranění stopových množství DNA z preparátů RNA. Nejčastějším cílem izolace je obvykle získání samostatné mRNA, která se používá např. pro sledování exprese konkrétních genů nebo pro přípravu cDNA apod. Izolace samostatné mRNA je založena na přítomnosti tzv. polyA sekvence na 3'-konci všech molekul mRNA. Proto lze mRNA z roztoku "vychytat" vazbou na krátké komplementární polyT-řetězce [18][19]. Ostatní látky lze potom odstranit opakovaným promýváním, tak jako při adsorpci DNA na silikátové částice. Izolace lze provádět pomocí komerčních kitů. Vzorky RNA je potřeba i po izolaci chránit proti působení RNáz skladováním při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mohou se také chránit pomocí specifického inhibitoru RNáz. Metody pro izolaci RNA se používají podobně jako u izolace DNA, které jsou popsány u izolace DNA. U RNA dochází k delší izolaci oproti DNA. Výskyt většího množství promývacích kroků a obtížněji se inhibuje. Dokonce v případech, kdy jsou známy výsledky analýzy proteinů, RNA poskytuje užitečné informace o akumulaci transkriptu a jeho stabilitě. Pomáhá i při objasňování nepředpokládaných fenotypových projevů. Extrakce mRNA z oblasti životního prostředí představuje velkou výzvu pro analýzu bakteriálních genů z živých buněk [24]. Můžeme však říci, že použití paramagnetických částic k izolaci nám z určitého hlediska urychlí celý proces. Izolace pomocí paramagnetických částic je vysvětlena v následující kapitole.

## 6. Paramagnetické částice

Magnetizovatelné částice (MPs – magnetic particles), viz Obrázek 5, pronikají do všech vědeckých odvětví. Velké uplatnění se nachází hlavně v izolaci, separaci a transportu od nukleových kyselin, proteinů až po celé buňky. Široké uplatnění nalézají v biomedicínských a biotechnologických oborech, zabývající se syntézou a různým působením na MPs. Tímto MPs propojují jednotlivé vědecké disciplíny. Mezi první práce popisující aplikaci magnetických částic pocházejí z počátku 20. století, kdy H.A. Lowenstam použil biochemicky precipitovaný magnetit, sloužící jako radula u zubů chitonů. V roce 1975 R. Blakemore objevil bakterii *Magnetospirillum gryphiswaldense*, která je schopna vytvářet sférické krystaly magnetitu o velikosti 50 nm [27]. Bakterie vytváří řetízky magnetických částic, které jí slouží k tomu, aby byla vyrovnaná souběžně se zemským magnetickým polem. Bylo zjištěno, že tyto bakterie plavou na severní polokouli vždy k severu zatímco na jižní polokouli je tomu naopak. V současnosti jsou tyto bakterie velkým středem zájmu. V 70. letech se MPs naplno začaly rozšiřovat v biologických a medicínských oborech [25]. MPs pro biologickou separaci se skládají z jednoho nebo více magnetických jader s povrchovou úpravou matice polymerů, křemíku nebo hydroxylapatitu s terminálem funkcionalizovaných skupin. Magnetické jádro se tedy obecně skládá buď z magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), nebo maghemite (gamma  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) se superparamagnetickými nebo feromagnetickými vlastnostmi. Superparamagnetismus je definován jako dvojpólový moment částice,

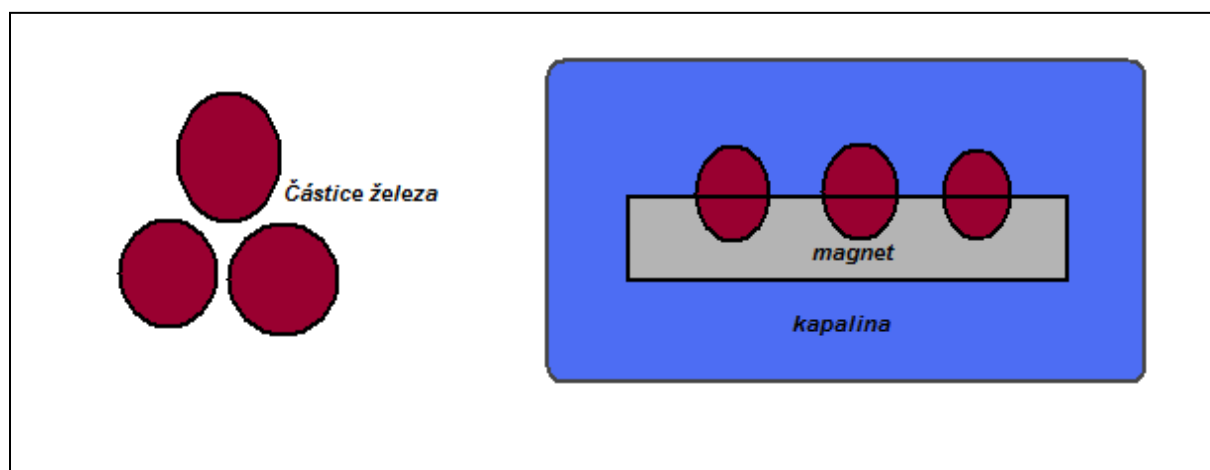
která se pohybuje rychleji v jádře v důsledku tepelné excitace. Neexistuje žádný magnetický moment pro makroskopické časy. Tyto částice jsou non-magnetické, když magnetické pole je aplikováno ve vnějším prostředí. Magnetické oddělení MPs částicemi je ideální pro automatizované stanovení nebo analytické systémy, které budou hrát velmi důležitou roli v blízké budoucnosti. Výhody u superparamagnetických částic jsou ve snadné resuspenzi, ve velké ploše, pomalé sedimentaci a v rovnoměrném rozložení částic v suspenzních médiích. Jakmile se magnetizované částice chovají jako malé magnety, tak tvoří agregáty nebo mříž [26].



**Obrázek 5:** *Struktura MPs částic* [26]

## 6.1. Izolace NK založená na magnetizovatelných částicích

Pro izolaci nukleových kyselin byly vypracovány různé postupy vycházející z odstranění interferujících proteinů a následného vysrážení alkoholem nebo ionty těžkých kovů. Klasická izolace nukleových kyselin vykazuje stále nejvyšší výtěžky nukleové kyseliny, ale je časově náročná a vnáší do postupu řadu systematických chyb způsobených lidským faktorem. Tento závažný problém je řešen několika různými způsoby, především za využití pevných sorbentů a nejnověji pomocí MPs [28]. Izolace biomolekul pomocí MPs je založena na interakci mezi částicemi izolovanou biomolekulou a na vnějším magnetickém poli. Umožňují navázání různých bioreaktivních molekul díky jejich afinitě k modifikovanému povrchu přímo z biologického materiálu. MPs značně zkracují dobu izolace oproti konvenčním metodám, které jsou popsány výše. Rozměry MPs se mohou pohybovat v (nm) až ( $\mu\text{m}$ ). Atomy (draslíku, sodíku, hliníku), které mírně zesilují magnetické pole, mají své vlastní magnetické pole. Vnější magnetickým polem by tedy bylo možné je uspořádat tak, aby došlo k souhlasné orientaci magnetických polí jednotlivých atomů, a tím i ke značnému zesílení magnetického pole v látce. Ve skutečnosti tento stav nenastává - brání mu tepelný pohyb. Magnetické pole v paramagnetické látce není možné zesílit ani vnějším polem o velké magnetické indukci. Magnetické částice (oxidy železa) v magnetickém poli se přitáhnou k magnetu a po nějakém čase se od magnetu pustí a dispergují. Ztrácí magnetické vlastnosti (neshlukují se).



**Obrázek 6:** Částice železa a jejich zachycení v okolí magnetu

Pro dokonalé využití MPs k zachycení různých biomolekul je jejich povrch modifikován. Objevuje se zde i vrstva polymeru, která je chráněna proti vnějšímu prostředí například proti oxidaci. Modifikace povrchu je závislá na izolované látce. Nejčastější modifikací povrchu MPs jsou proteiny, protilátky a oligonukleotidy. Výhody magnetických separačních technik spočívají v tom, že jsou rychlé a jednoduché v manipulaci se vzorkovacími lahvíčkami a je možnost pracovat i s velkými i malými objemy vzorků bez nutnosti časově náročného odstředování. Vynecháním těchto kroků se podstatně zkracuje čas získání cílených biomolekul a navíc se předejde jejich případnému fyzikálnímu nebo biologickému poškození.

## 6.2. Syntéza a modifikace povrchu magnetických částic

MPs z oxidu kovu jsou v popředí zájmu, vzhledem k jejich netoxicitě na rozdíl od jiných kovů (kobalt či nikl), které však mají lepší magnetické vlastnosti. Základní metody syntézy zahrnují postupy, které jsou založené na:

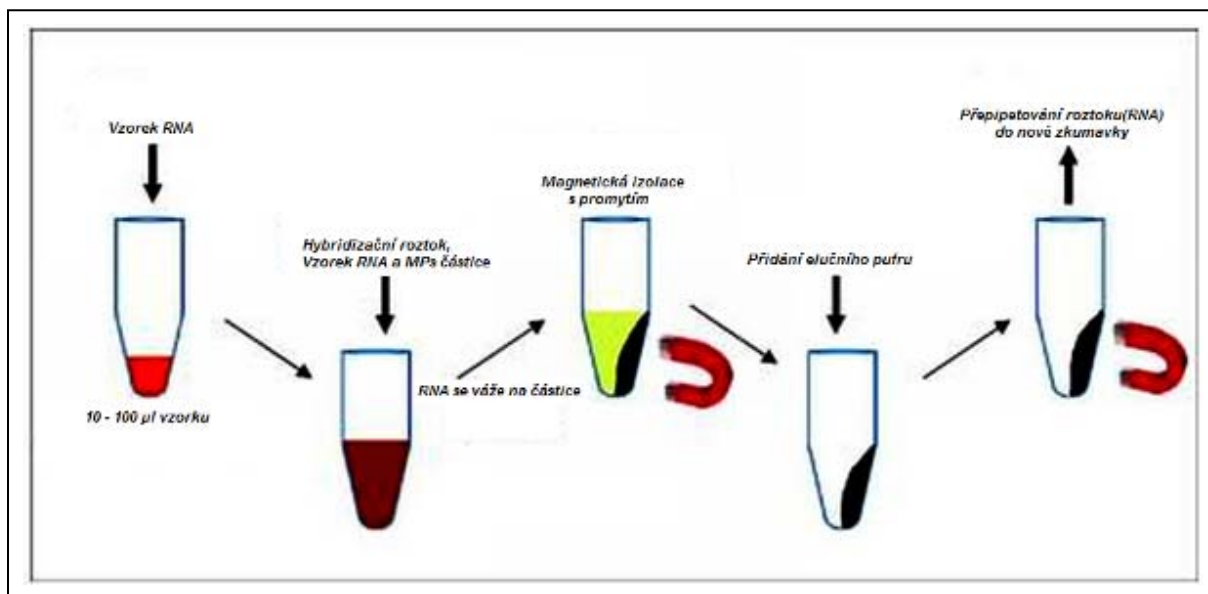
- a) usazování částic v plynné fázi,
- b) litografii,
- c) mikroemulsi,
- d) sonochemické syntéze
- e) hydrolytické reakci [29] [30] [31]

Základní postup chemické syntézy MPs z magnetitu je založen na hydrolytické reakci. Příprava těchto částic se skládá z následujících kroků – nejdříve proběhne koprecipitace magnetitu při 80°C ve vodném roztoku  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů v prostředí 25% hydroxidu amonného. Vzniknou tak malé částice magnetitu. Ty se dále prostorově stabilizují pomocí kyseliny laourové, kyseliny myristové nebo pomocí kyseliny olejové. Dále se musí jednotlivé částice oddělit od zbylého roztoku, to se provádí dekantací tj. volným usazováním. Roztok nad částicemi se pak odsaje, přidá se promývací roztok a postup se opakuje. Tento postup je často využíván v mnoha laboratořích a umožňuje připravit magnetické částice pro aplikace v biologii. Dalším krokem je modifikace jejich povrchu, která následuje po jejich stabilizaci. Výrazně se tím zasahuje do jejich biokompatibility. Teprve tento krok dělá z částic pravý nástroj pro jejich využití. Pokrytím tenkou vrstvou zlata na komerční částice se zlepšuje přichycení protilátek na povrch částic a účinně se tak redukuje nespecifická adsorpce [32]. Pro další modifikace povrchu se využívají hlavně polymery, organické látky a nejrůznější pokovování [33].

## 6.3. Separace pomocí MPs částic

V separačních metodách se nejčastěji využívají dva způsoby modifikace MPs částic. První z nich vyžaduje použití nabitého kovového povrchu pro elektrostatickou adsorpci biomolekul. Modifikaci MPs v roztoku toulenu vyvolávající hustý amino povlak na povrchu částic. Takto vzniklé  $\text{NH}_2$ -MPs jsou přidány k extraktu DNA a na základě elektrostatické interakce mezi negativně nabitou DNA a pozitivně nabitou skupinou  $\text{NH}_2$  navázanou MPs. Tato metoda na rozdíl od jiných konvenčních extrakčních metod, nepoužívá k promývání a uvolnění DNA organických roztoků. Tím eliminuje vliv organických roztoků na následnou detekci signálu. Podobné metody elektrostatické adsorpce založené na DNA extrakci používají polyamidamin dendrimerní modifikované MPs [34][40]. Další metody modifikace povrchu MPs zahrnují navázání specifické skupiny umožňující vázat konkrétní biomolekuly. Mezi, které patří aktivní chemické skupiny (karboxyl a aminoskupiny), které se mohou kovalentně vázat na biomolekuly v přítomnosti specifických cross-linking činidel. Streptavidin / Avidin ligandy, které se mohou specificky vázat na biotinylizované biomolekuly. Tyto metody jsou obvykle používány k imobilizaci specifických receptorů pro zachycení cílových molekul jako třeba DNA sonda k cílové DNA a protilátka k antigenu. Komerční MPs použité v magnetické separaci jsou typické paramagnetické částice s velikostí v mikrometrech (1-10  $\mu\text{m}$ ) a jsou vybaveny polymerním obalem na vnější straně magnetického nanočásticového jádra. Tyto na zakázku dělané magnetické částice jsou modifikovány pomocí různých vazebných skupin pro specifické chemické vazby. Porovnání fyzikálních a chemických znaků některých komerčně dostupných MPs bylo zhodnoceno [35]. Chemicky syntetizovaný oxid železa pro MPs může být vytvářen pomocí magnetických

bakterií - bakteriální magnetické nanočástice (BMPs) [36]. BMPs jsou feromagnetické částice, které mají uniformní tvar a velikost od 50 – 100 nm. Zjevně přirozená lipidová dvojrstva membrány fosfatidylethanolamin na vnější straně částice jí poskytuje velmi dobrou disperzi ve vodním roztoku a umožňuje, tak BMPs sloužit jako substrát pro kovalentní vazbu s biomolekulami [37]. Jiné MPs jako třeba  $MFe_2O_4$  ( $M = Co$  nebo  $Mn$ )  $Co Fe_2O_4$  superparamagnetické nanočástice byly syntetizovány a zkoumány pro biosenzorové aplikace. Nicméně procedury syntéz těchto částic jsou poměrně složité a drahé ve srovnání s nanočásticemi z oxidů železa [38][39].



**Obrázek 7:** *Izolace RNA pomocí paramagnetických částic*

# 7. Materiály a metody

## 7.1. Chemikálie

Všechny používané chemikálie byly ACS čistoty a společně s parafilmem byly zakoupeny od firmy (Sigma-Aldrich, USA). Jednotlivé koncentrace poly(A) byly připravovány ze zásobního roztoku o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  z lyofilizované poly(A) (0,5 mg/ml)  $M_r = 400\ 000$  (Sigma-Aldrich, Česká republika) a rozpuštěny ve vodě ACS čistoty. Vše bylo skladováno ve tmě při  $-20^\circ\text{C}$ . Koncentrace zásobních roztoků nukleových kyselin byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm na přístroji SPECORD 210/205 (Anglie). Deionizovaná voda byla demineralizovaná pomocí reversní osmózy za použití přístroje Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a následně purifikována za použití Millipore RG (Millipore Corp., USA, 18  $M\Omega$ ) – MiliQ voda. pH bylo měřeno na přístroji WTW inoLab (Weilheim, Germany).

*Pufry použité pro experimenty:* a) fosfátový pufr: 0,1 M NaCl + 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,2 M NaCl + 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; b) acetátový pufr: 0,2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0,2 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ .

*Použité pufry pro izolaci NK pomocí MPs:* a) pufr č.1 – promývací fosfátový pufr - 0,05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  b) pufr č.2 – hybridizace a eluce – 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  c) pufr č.3 – hybridizační roztok – 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,5 M NaCl + 0,6M guanidium thiocyanate + 0,15 M Trizma base upravená pomocí HCl na pH = 7,5 d) pufr č. 4 – eluční roztok – 10 mM Tris HCl pH = 8. Ostatní použité chemikálie byly získány v čistotě ACS od společnosti Sigma- Aldrich.

Izolace nukleových kyselin probíhala na magnetických částicích viral DNA/RNA, food, DNA plant, DNA blood a DNA tissue všechny zakoupené od firmy Chemagen (USA).

## 7.2. Přístroje

### 7.2.1. Elektrochemická detekce na rtuťové elektrodě

Elektrochemické stanovení s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE; s plochou kapky 0,4  $\text{mm}^2$ ) jako pracovní elektrodou bylo provedeno pomocí přístroje AUTOLAB analyzátoru (EcoChemie, Holandsko), ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byla používána pracovní cela s tříelektrodovým zapojením. Referenční elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda byla uhlíková tyčinka. Základní elektrolyt acetátový pufr (pH = 5,0). K analýze nukleových kyselin bylo využito adsorptivní přenosové techniky, kde probíhá akumulace vzorku na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). Pro vlastní měření se odebralo 5  $\mu\text{l}$  připraveného vzorku nukleové kyseliny, toto množství se dalo na parafilm, poté se vzorek adsorboval na kapku. Následně byla rtuťová kapka omyta v ACS vodě a ponořena do elektrolytu, kde byla před měřením deoxygenována pomocí probublávání argonem (99.999%) nasyceného vodou po dobu 120 s. Pak následovala vlastní detekce. Všechny experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Tato metoda je selektivní a umožňuje použití velmi malého množství vzorku v řádech několika mikrolitů.

### 7.2.2. Přístrojové vybavení pro izolaci NK pomocí MPs

Izolace probíhala v RNA/DNA UV cleaner box UVT od firmy BioSan (Litva). Pro centrifugaci a třepání vzorků byla využita centrifuga multi-spin MSC-3000 Biosan (Litva), která byla umístěna v RNA/DNA UV cleaner box UVT-S-AR. Paramagnetické částice byly přitahovány pomocí magnetického stojanu MPC – S (Magnetic Particle Concentrator) byl vyroben firmou Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway. Eluce probíhala za konstantní teploty 55°C, za využití Thermomixer 5355 Comfort/ Compact (Eppendorf Německo). Nastavení tohoto přístroje: doba eluce 10 minut, po 90 s byly vzorky 10 sekund třepány při otáčkách 850 rpm/min.

pH roztoků se měřilo na pH-metru WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), který byl ve spojení s osobním počítačem. Pro měření byla použita elektroda (pH – Electrode SenTix H, pH 0..14/0..100°C/3 mol/l KCl).

### 7.3. Biologický materiál

Pro izolaci NK z reálného vzorku byla využita explantátová kultura z mochyň židovské (*Physalis ankekegii*, *Solanaceae*) zakoupené od firmy Semo, a. s. (Smržice, Česká republika). Odvození kalusu probíhalo následovně: Semena byla opláchnuta destilovanou vodou, poté umístěna na míchačce (IKA, RTC Basic, Německo) v destilované vodě s několika kapkami surfaktantu Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 30 minut. Poté byla semena za sterilních podmínek (laminární box s HEPA filtrem, Chirana, Česká republika) opláchnuta sterilní destilovanou vodou a inkubována po dobu 20 min. ve sterilním roztoku SAVA (15%, v/v) na třepačce (136 ot.min<sup>-1</sup>, Unimax 1010, Heidolph Instruments, Německo). Poté byla třikrát opláchnuta sterilní destilovanou vodou a napasážována na standardní pevné Murashige and Skoog (MS) kultivační médium následujícího složení:

**Tabulka 1: Složení MS**

Vzorky	Množství	Místo výroby
Médium MS (včetně makroelementů, mikroelementů a vitamínů)	4,405 g/l	Duchefa, Holandsko
Sacharóza	30 g/l	Tamda, Česká republika
Gelrit	2,7 g/l	Duchefa, Holandsko

pH kultivačního média bylo upraveno na 5,6 (HCl/KOH, Sigma-Aldrich, USA, 3510 pH Meter, Jenway, Velká Británie). Médium bylo sterilizováno v autoklávu AUT 26/2 (Chirana, Česká republika) po dobu 20 minut (teplota 120 °C). Kultivace probíhala v Erlenmayerových baňkách (250 ml) s 50 ml kultivačního média v kultivačním boxu (Luminex, Česká republika), s osvětlením 5,000 luxů (zářivky Lumilux, Osram, Česká republika) s délkou fotoperiody 14 hod., teplotou 24±0,5 °C. Po vyklíčení semen a následném růstu (3 týdny) byly rostliny opět za sterilních podmínek rozděleny na jednotlivé rostlinné orgány, ty byly rozděleny na cca 5 m segmenty, Tyto segmenty byly na pasážovány na pevné kultivační médium stejné jako v předchozím případě, tzn. MS suplementované sacharózou a gelritem, ale navíc obohacené thiaminem (0,9 mg.l<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, USA), kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou (Duchefa, Holandsko) a KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, USA) s cílem navodit kalogenezi, tzn. tvorbu kalusu. Kalusy byly odvozeny z listových čepelí, délka

subkultivace byla z růstových charakteristik stanovena na 25 dní na suplementovaném MS médiu.

#### **7.4. Automatická pipetovací stanice epMotion**

Pro automatickou izolaci byl využit přístroj epMotion 5075 od firmy Eppendorf z Německa. Tento přístroj obsahuje různé druhy příslušenství, které je kompatibilní s automatickou pipetovací stanicí. Pro naše účely byly použity PCR destičky (Eppendorf – Německo). Promega magnet (Eppendorf – Německo). Thermo stojánek o velikosti 1,5 ml (Eppendorf – Německo). Module Reservoir (Eppendorf – Německo). Špičky o velikosti 50  $\mu$ l, 300  $\mu$ l a 1000  $\mu$ l (Eppendorf – Německo). Pipetovací hlava o velikosti 50  $\mu$ l s rozsahem 2 - 50  $\mu$ l (Eppendorf – Německo), pipetovací hlava o velikosti 300  $\mu$ l s rozsahem 20 - 300  $\mu$ l (Eppendorf – Německo) a pipetovací hlava 1000  $\mu$ l s rozsahem 70 - 1000  $\mu$ l (Eppendorf - Německo).

epMotion umožňuje rychlé, přesné a reprodukovatelné pipetování a dávkování kapalin. Používá se pro purifikační procesy a přípravu vzorků, bez chyb způsobených lidským faktorem. Pipetování je možné do různých formátů zkumavek a destiček např. 96 jamek, 384 jamek a další. Záleží pouze na vlastním nastavení uživatele. Přenos může probíhat ze zkumavek do destiček 1  $\times$  96, mikrozkušavek a obráceně. Lze provádět přenos i ze zkumavek 1  $\times$  384 do destiček o stejné velikosti. Ředění nebo promíchání se může nastavit v softwaru. Objemy lze nastavit od (1) 2  $\mu$ l do 1000  $\mu$ l (pipetováním a dávkováním). Pipetování a dávkování probíhá bez kontaktu s povrchem. Výška hladiny se snímá opticky. Umožňuje bezkontaktní rozeznávání hladiny kapalin v různých jamkách. Jedná se o čistší proces oproti manuálnímu použití a šetří drahé vodivé špičky. Rozeznává nejen výměnné hlavice, ale i jednotlivé formáty zkumavek, držáky reagentů a držáky vzorků. Programy je možno uložit a přenášet pomocí Multi-Media Card (MMC). Automatická pipetovací stanice je ukázána na Obrázek 8.



**Obrázek 8:** *Automatická pipetovací stanice – epMotion*

Pro obsluhu epMotionu je k dispozici uživatelské rozhraní, které nám umožňuje nastavení přístroje dle našich parametrů. O jednotlivých možnostech bude pojednáno v následujícím textu.

## 8. Výsledky a diskuse

### 8.1. Manuální příprava izolace NK – návrh postupu

Připravíme si paramagnetické částice v závislosti na počtu vzorků (jeden vzorek = 20  $\mu$ l). K částicím přidáme stejné množství fosfátového pufru č.1. MPs s pufrem promícháme pomocí pipety 15 krát a umístíme na magnetický stojánek (MPC - S). Po přitáhnutí MPs ke stěně zkumavky odsajeme veškerý roztok. Ve zkumavce nám poté zůstanou jen MPs. Přidáme opět fosfátový pufr č.1 promícháme pomocí pipety 15 krát a po umístění na magnetický stojánek odsajeme roztok. Promývání pomocí fosfátového pufru č.1 provedeme ještě jednou. Po posledním promytí a odsátí roztoku do odpadu přidáme podle počtu vzorků vazebný pufr (na každý vzorek 20  $\mu$ l). Zkumavku opatrně protřepeme v ruce až do rozptýlení MPs v pufru. Nyní rozpipetujeme takto připravené MPs (podle počtu vzorků, na každý vzorek vždy 20  $\mu$ l MPs) do předem připravených zkumavek se vzorky. Vzorek je složen z vazebného roztoku a z vlastního vzorku NK v poměru 20:1. Jednotlivé vzorky promícháme pipetou 15 krát a necháme stát při pokojové teplotě 5 min. Po skončení vazebné interakce přemístíme vzorky na magnetický stojánek a vazebný roztok odsajeme. NK jsou nyní navázány na MPs. Nyní provedeme promývání MPs i s navázaným vzorkem stejně, jak jsme učinili na začátku. Opět se promývací kroky provedou dvakrát. Po druhém promytí přidáme ke každému vzorku fosfátový pufr č.2. (eluční roztok) o objemu 100  $\mu$ l. Zkumavky se vzorky umístíme na 55 °C podobu 10 min. na termoblok. Po skončení eluce dáme zkumavky na magnetický stojánek a odsajeme výsledný roztok obsahující náš vzorek NK do nových a čistých zkumavek. Těmito kroky jsme získali čistou NK, se kterou se může následně pracovat. V našem případě elektrochemicky detekovat. Tento postup sloužil jako základní schéma pro pracování s MPs.

### 8.2. Optimalizace podmínek pro izolaci nukleových kyselin pomocí paramagnetických částic a matematická analýza dat

Po navrhnutí základního postupu izolace jsme nyní mohli přistoupit k optimalizaci jednotlivých parametrů. U většiny výsledků jsme porovnávali účinnost odchycené NK vzhledem k provedenému experimentu. Výsledky jsou vyhodnoceny pomocí chybových úseček, podle rovnice regrese, hodnoty spolehlivosti. Je zde proveden také výpočet směrodatné odchylky a výpočet mediánu pro každou odezvu signálu.

*Chybové úsečky* slouží k zakreslení lišících se údajů od požadovaného průběhu. Lze je zakreslit do grafu ke každému datovému bodu řady. U závislosti účinnosti na pH hybridizačního roztoku, koncentraci NaCl ve vazebném roztoku, na čase, na síle třepání MSC - 3000 a na různých druzích paramagnetických částic jsou zobrazeny pětiprocentní kladné i záporné chyby.

Provedli jsme také výpočet *lineární regrese* (kalibrační křivky), která představuje aproximaci daných hodnot polynomem prvního řádu (přímku) metodou nejmenších čtverců. Jinak řečeno, jedná se o proložení několika bodů v grafu takovou přímkou, aby součet druhých mocnin odchylek jednotlivých bodů od přímky byl minimální. Pro účely lineární regrese se počítají dva typy součtu čtverců. Součet čtverců pro regresní odhady se počítá jako suma druhých mocnin odchylek původních hodnot závislé proměnné od jejího průměru:

$$SSy(x_i) = \sum_{i=1}^N (y_i - m(y))^2 \quad (6.1)$$

Součet čtverců reziduí (nebo také chyb) regresního odhadu se oproti předchozímu součtu počítá jako suma druhých mocnin rozdílů regresních odhadů od původních hodnot dat:

$$SSy(x_i) = \sum_{i=1}^N (y_i - y(x_i))^2 \quad (6.2)$$

Regrese u *Obrázek 14* je  $y = 3,5643x + 9,3151$ . Hodnota spolehlivosti je indikátor od 0 do 1 udávající, jak přesně odpovídají získané výsledky. Hodnota spolehlivosti u *Obrázek 14* se rovná  $R^2 = 0,9678$ . Tyto hodnoty jsou zobrazeny i u *Obrázek 20*.

Také se provedl výpočet *směrodatné odchylky* a mediánu pro každý experiment. Směrodatná odchylka je definována jako druhá odmocnina rozdílnosti. To znamená, že to je kořenový střední čtverec (RMS) odchylka od aritmetického průměru. Směrodatná odchylka je vždy kladné číslo (nebo nula) a je vždy změřena ve stejných jednotkách jako originální data. Například, jestliže data jsou měření délek v metrech, směrodatná odchylka bude také měřena v metrech. Směrodatná odchylka se vypočítá pomocí:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (6.3)$$

Směrodatná odchylka se pro *Obrázek 9* rovnala  $\sigma = 108,27$  nA.

Také se u každého experimentu vypočítal *medián*. Prostřední hodnota uspořádané řady hodnot. Pro nalezení mediánu daného souboru stačí hodnoty seřadit podle velikosti a vzít hodnotu, která se nalézá uprostřed seznamu. Pokud má soubor sudý počet prvků, obvykle se za medián označuje aritmetický průměr hodnot na místech  $n/2$  a  $n/2+1$ . V případě rozdělení pravděpodobnosti je mediánem číslo  $m$ , které splňuje rovnost  $P(X \leq m) \geq 0,5$  a  $P(X \geq m) \geq 0,5$ . V případě spojitého rozdělení zadaného hustotou pravděpodobnosti  $f$  pro medián platí:

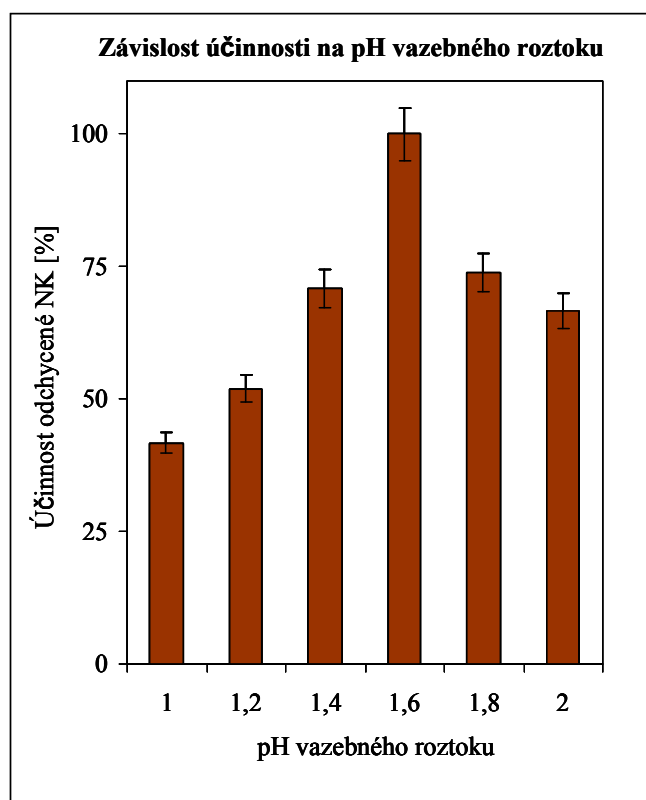
$$\int_{-\infty}^m f(x) dx = 0,5 \quad (6.4)$$

Medián se pro *Obrázek 9* rovnal 406,17.

U kalibračních křivek máme zobrazeny směrnice přímky. Je to tangens úhlu, který svírá daná přímka (nerovnoběžná s osou  $y$ ) s kladným směrem osy  $x$  pravouhlých souřadnic. Směrnice tvar přímky je  $y = kx + q$ , číslo  $k$  představuje směrnici přímky. Je-li  $k > 0$ , jedná se o rostoucí funkci, a naopak, je-li  $k < 0$ , jde o funkci klesající. Je-li  $k = 0$ , je přímka rovnoběžná s osou  $x$ . Přímku rovnoběžnou s osou  $y$  nelze pomocí směrnice vyjádřit. V našem případě je u obou kalibračních křivek  $k > 0$ , jedná se tedy o rostoucí funkci.

### 8.2.1. Vliv pH vazebného pufru na izolaci nukleových kyselin

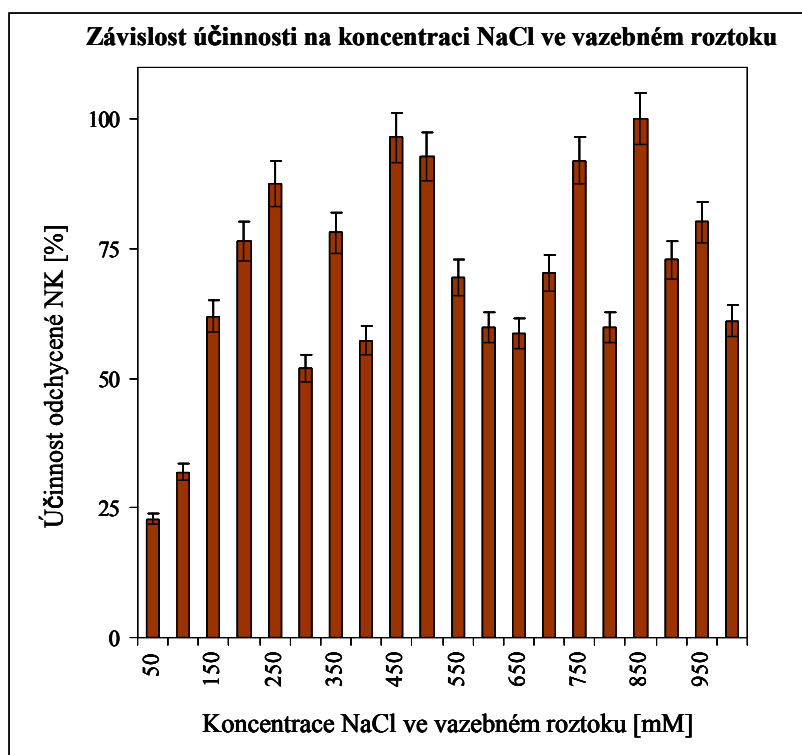
V tomto experimentu bylo testováno pH vazebného roztoku na konečný výtěžek NK. Navrhli jsme tyto hodnoty pH: (pH = 6; pH = 5; pH = 4; pH = 3 a pH = 2). Aplikovaná koncentrace NK byla 5  $\mu\text{g/ml}$ . Podle vyhodnocených výsledků se zjistilo, že při pH = 2 se NK nejlépe váží na MPs. Podle tohoto výsledku jsme zvolili nové rozmezí pH, které se pohybovalo od pH = 2 a bylo zvyšováno po krocích 0,2 až k pH = 3. Při detekci u pH 2,2 – 3 byla zjištěna velmi malá účinnost zachycené NK (do 10%). Při pH = 2 vazebného pufru účinnost zachycení NK na paramagnetické částice vzrostla na 50%. V následném experimentu byl sledován efekt nízkého pH vazebného pufru na účinnost izolace. Hodnota pH se měnila opět po krocích 0,2 od pH = 1 až k pH = 2. Jak lze rozpoznat z vykresleného grafu největší vliv pH na izolaci NK se pohyboval kolem hodnoty pH = 1,6. Při této hodnotě pH došlo k optimálnímu množství odchycené nukleové kyseliny a proto byl vazebný pufr o pH=1,6 dále používán.



**Obrázek 9:** Závislost účinnosti izolace NK na pH hybridizačního roztoku (Vzorky vazebného roztoku měly pH = 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2. Hodnota směrodatné odchylky byla 108,27 nA a medián se rovnal 406,17)

## 8.2.2. Vliv iontové síly v používaném vazebném pufru na izolaci nukleových kyselin

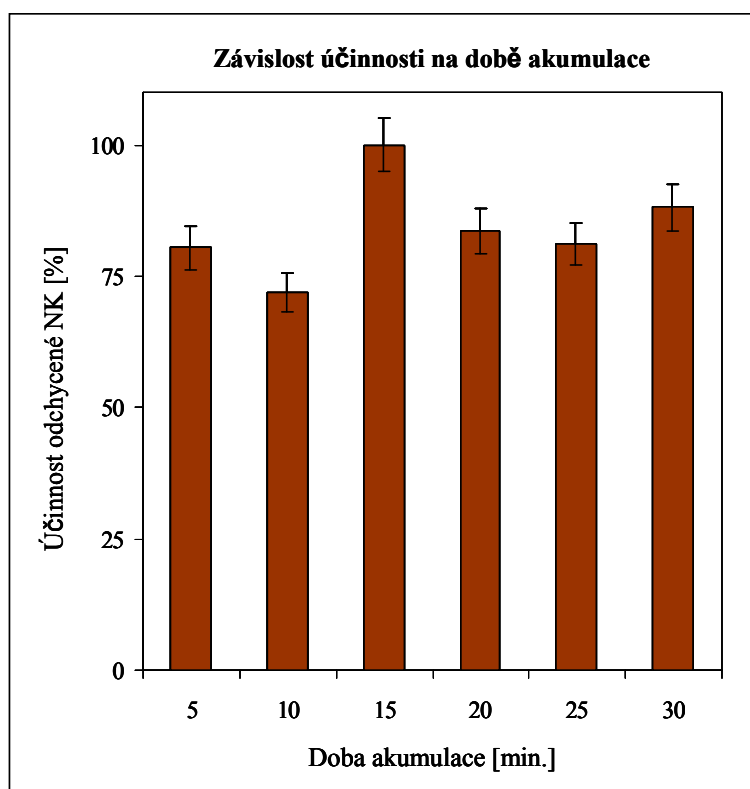
Další parametr, který ovlivňuje účinnost izolace NK je iontová síla. Provedli jsme experiment, který byl založený na vytvoření dvaceti odlišných koncentrací NaCl. Koncentrace NaCl se pohybovaly v rozmezí 50 - 1000 mM a měnily se po 50 mM. Pufr měl hodnotu pH = 1,6 s těmito změnami se mohla provést izolace podle kapitoly 8.1. Potom se provedla elektrochemická detekce u získaných vzorků, kde byla použita koncentrace NaCl 50 – 450 mM, kde se jeví nejlépe použít NaCl o koncentraci 450 mM. Dále se zvyšovala koncentrace NaCl až ke koncentraci 1000 mM. Ze získaných výsledků se nakonec mezi sebou porovnávaly hodnoty o koncentracích 450 mM a 850 mM. Bylo vytvořeno 6 vzorků, které obsahovaly koncentraci NaCl 450 mM a každý z nich byl změřen. Potom bylo vytvořeno 6 vzorků o koncentraci 850 mM a opět každý z nich byl změřen. Zjistilo se, že vazbu NK na MPs ovlivňuje více iontová síla o koncentraci 850 mM NaCl oproti koncentraci 450 mM NaCl. V dalších experimentech jsme používali pH vazebného roztoku 1,6 a koncentraci NaCl 850 mM.



**Obrázek 10:** Závislost účinnosti izolace NK na koncentraci NaCl ve vazebném roztoku (Vzorky obsahovaly NaCl o koncentraci 50 – 1000 mM. V tomto měření byla nejvyšší účinnost odchycení u koncentrace 850mM. Hodnota směrodatné odchylky byla  $\sigma = 74,34$  nA a medián se rovnal 263,17)

### 8.2.3. Vliv doby interakce NK s magnetickými částicemi

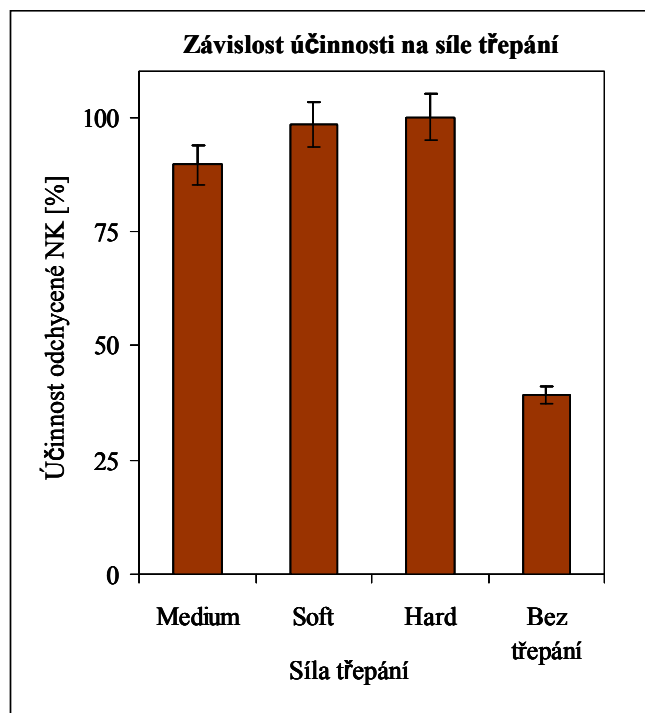
Dalším a velmi důležitým parametrem, který jsme sledovali, byla doba, po kterou probíhalo navazování NK na MPs. Časové úseky byly zvoleny od 5 min. do 30 min. Vazba probíhala ve vazebném pufru pH = 1,6 a koncentraci NaCl 850 mM. Opět se provedla izolace podle kapitoly 8.1. Na základě matematického vyhodnocení výsledků z elektrochemického měření se ukázala být nejvhodnější doba akumulace NK na MPs 15 min. Graf znázorňující závislost doby interakce na účinnosti izolace je ukázán na Obrázek 11.



**Obrázek 11:** Závislost účinnosti odchycené NK na čase (Vzorky byly akumulovány v různých časových podmínkách. Časy byly od 5 do 30 min, po 5 minutových krocích. Při izolaci byla nejvyšší účinnost odchycení NK v čase 15 minut. Hodnota směrodatné odchylky byla 33,80 nA a medián se rovnal 325,26)

Součástí postupu bylo také sledování izolačních podmínek na přístroji MSC - 3000. Tímto pokusem jsme chtěli ověřit vliv třepání vzorku na izolaci NK. Zvolili jsme podmínky třepání definované na přístroji MSC – 3000 pod značkou Medium, Soft a Hard. Tyto vzorky byly následně porovnány proti kontrole tj. příprava vzorku bez třepání. Doba interakce NK s MPs byla zvolena podle předchozích experimentů na 15 min. Podle analýzy lze říci, že třepání vzorku během interakce NK s MPs má významný vliv na celkovém množství získané NK, přičemž největší množství získané NK bylo u nastavení funkce Hard (

Obrázek 12). Jak lze vidět na závislosti účinnosti odchycené NK, tak pomocí funkce Hard se odchytilo o 60% více NK než při podmínkách bez třepání MPs.

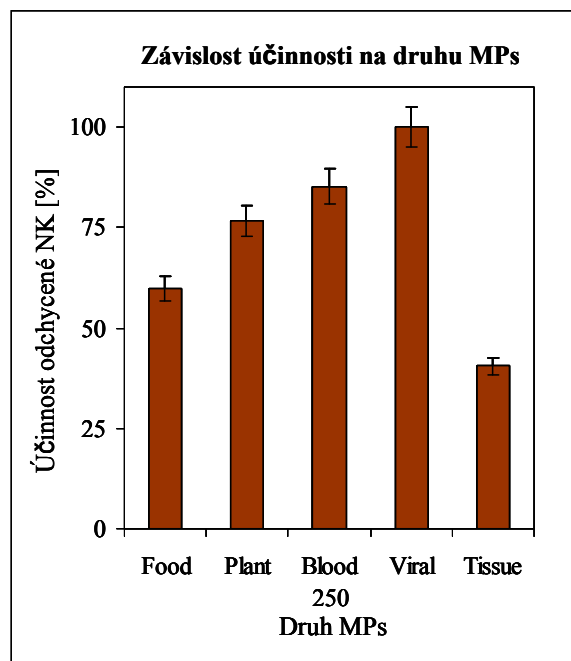


**Obrázek 12:** Závislost účinnosti izolace NK na síle třepání pomocí přístroje MSC – 3000.

Síla třepání byla u přístroje MSC - 3000 nastavena na následující funkce Medium, Soft a Hard. Porovnávali se s hodnotou bez třepání. Hodnota směrodatné odchylky byla 93,11 nA a medián se rovnal 351,67)

#### 8.2.4. Vliv různých druhů paramagnetických částic na vazbu NK

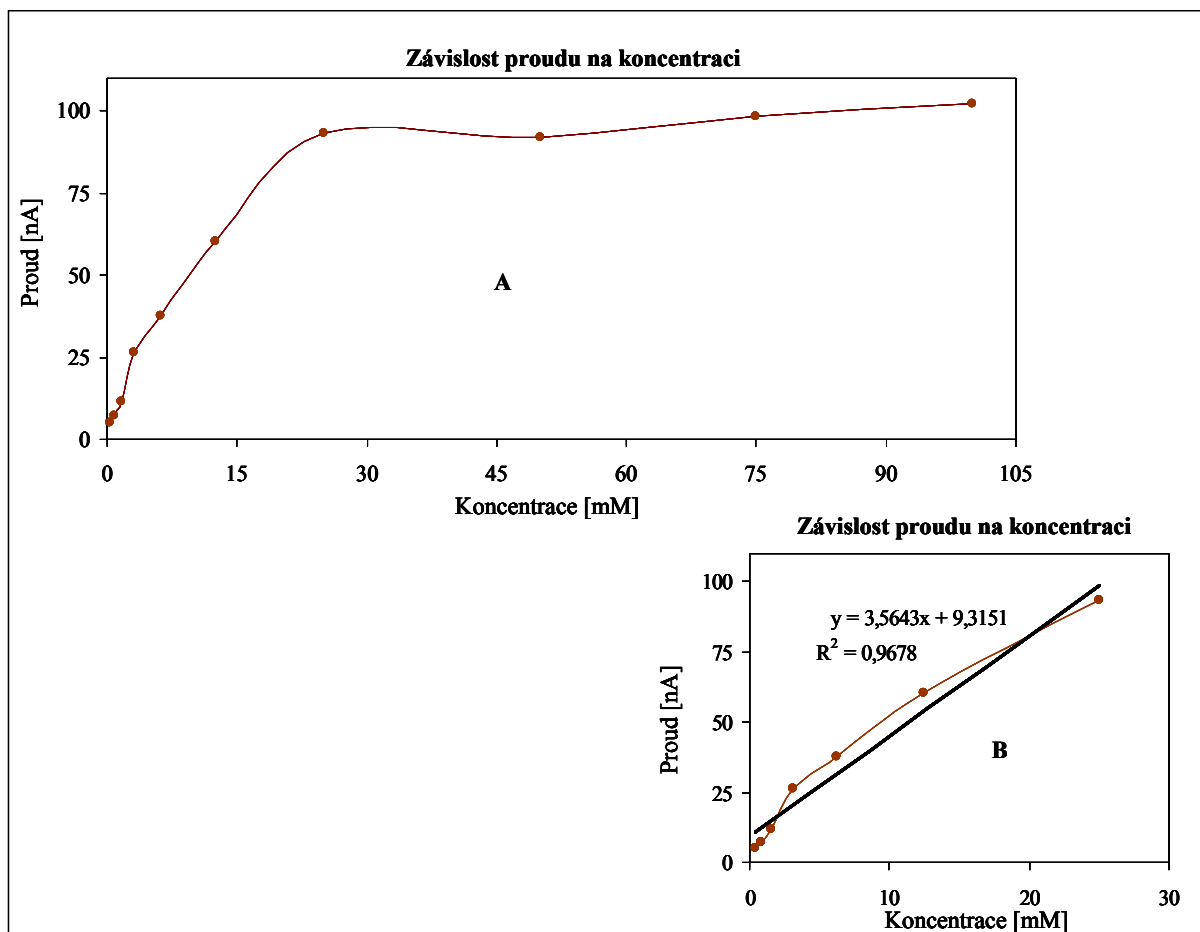
Byly provedeny experimenty s různě modifikovanými MPs pro zachycení NK. Bylo použito 5 různých druhů paramagnetických částic. První částice se nazývaly Food, druhý druh částic se nazýval Plant, třetí Blood 250, čtvrtý Viral a pátý Tissue. Při analýze jsme porovnávali mezi sebou účinnosti odchycené NK vzhledem k použitým druhům MPs. Z výsledků vyplývá, že dostatečné množství NK jsme získali po použití Viral částic, účinnost získané NK se pohybovala kolem 70%. Naopak nežádoucí výtěžek poskytovaly částice Tissue. Tímto experimentem jsme mohli přejít k závěrečnému pokusu, zdali jsme schopni izolovat různé množství NK.



**Obrázek 13:** Závislost účinnosti izolace NK na různých druzích paramagnetických částic (Použití různých druhů MPs. Množství odchycené NK lineárně stoupal až k částicím Viral, kde došlo k neoptimálnějšímu zachycení NK. Naopak vliv částic Tissue měl nejmenší vliv na navázání NK. Hodnota směrodatné odchytky byla 110,27 nA a medián se rovnal 410,67)

#### 8.2.5. Závislost odezvy signálu na koncentraci NK izolované pomocí paramagnetických částic

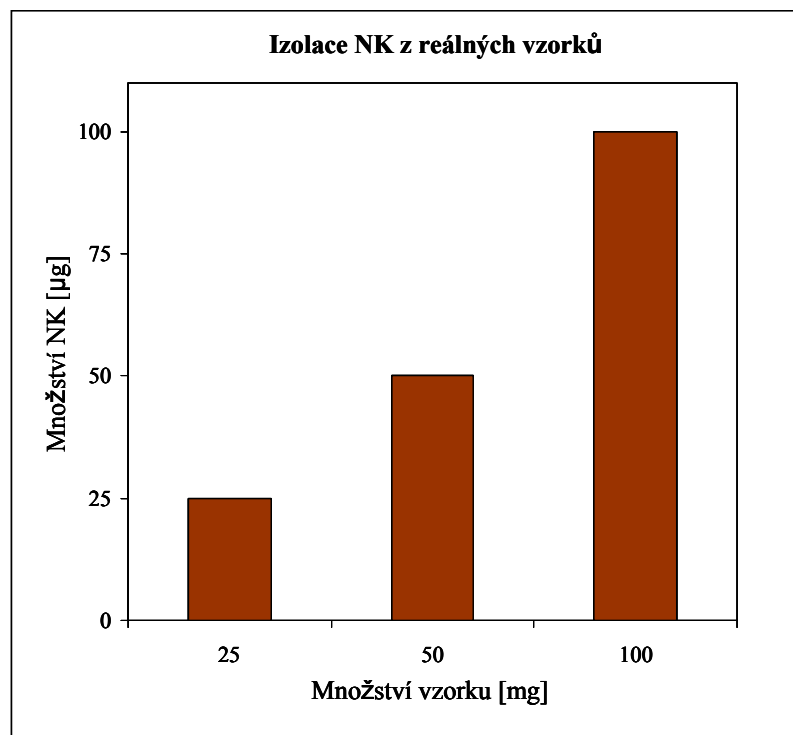
Po provedení optimalizačních kroků jsme získali postup a složení roztoků, pomocí kterých jsme schopni izolovat největší možné množství NK. Abychom ověřili správnost postupu, provedli jsme experiment, kde jsme sledovali schopnost izolovat různé koncentrace NK pomocí MPs. Ředěním bylo připraveno 10 různých koncentrací NK 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 a 0,39  $\mu\text{g/ml}$ . Po elektrochemické detekci získaných vzorků byly data vyhodnocena a sestrojena kalibrační křivka (Obrázek 14). Odezva signálu lineárně roste do koncentrace 25  $\mu\text{g/ml}$  podle rovnice  $y = 3,5643x + 9,3151$  s faktorem spolehlivosti  $R^2 = 0,9678$ . Od koncentrace 25  $\mu\text{g/ml}$  do 100  $\mu\text{g/ml}$  je nárůst signálu velmi pozvolný. Tímto experimentem jsme potvrdili účinnost postupu izolace NK na syntetických molekulách. Proto jsme mohli přistoupit k izolaci NK z reálného vzorku.



**Obrázek 14:** Kalibrační křivka A) Závislost proudu (nA) na koncentraci 0 -100 µg/ml a B) závislost proudu (nA) na koncentraci 0 – 25 µg/ml. U obrázku B je zobrazena hodnota regrese a hodnota spolehlivosti. Hodnota směrodatné odchylky byla 38,37 nA a medián se rovnal 49,05)

### 8.3. Izolace nukleových kyselin z reálných vzorků

Po kompletní optimalizaci postupu izolace NK jsme tento postup mohli aplikovat na reálné vzorky. Jako reálný vzorek nám posloužila explantátová kultura Mochyně židovské (*Physalis anlikekengii*, *Solanaceae*). Funkčnost celého postupu jsme ověřili jednoduchým experimentem, kdy bylo měřeno celkové množství NK v různých množstvích vzorku. Podle kalibrační křivky  $y = 3,5643x + 9,3151$  byl vypočítán celkový obsah NK ve vzorku. Na Obrázek 15 pozorujeme, že se vzrůstajícím množstvím vzorku roste i množství NK.



**Obrázek 15:** *Izolace NK z různého množství explantátové kultury Mochyně židovské (Physalis ankekeengii, Solanaceae)*

#### 8.4. Výsledný postup izolace NK pomocí paramagnetických částic

Z předchozích výsledků je zřejmé, že pro izolaci nukleových kyselin byly vypracovány různé postupy. Klasická izolace vykazuje stále nejvyšší výtěžky nukleové kyseliny, ale je časově náročná a vnáší do postupu řadu systematických chyb způsobených lidským faktorem. Tento závažný problém je řešen několika různými způsoby, především za využití pevných adsorbentů a nejnověji pomocí paramagnetických částic. Na základě všech získaných výsledků v předložených experimentech v předchozím textu, jsme mohli sestavit závěrečný a pevně stanovený postup [28]. Konečná verze postupu pro izolaci je popsána v následujícím textu.

##### 8.4.1. Optimalizovaný postup manuální izolace pomocí paramagnetických částic

Nejprve se připraví samotný vzorek, který se skládá z 95 µl vazebného pufru (pH = 2, NaCl = 850 mM), k pufru se přidá 5 µl NK. (může se použít jakékoliv množství vzorku, ale vždy zachovat poměr pufr : vzorek, 20:1). K tomuto roztoku se přidá 20 µl paramagnetických částic (Viral). Směs MPs, vazebného pufru a vzorku se 10 – 15 krát promixuje pomocí pipety a vloží se na 15 minut na MSC-3000 (nastavení: 1000 otáček, 4 sekundy otáčení, Vortex Hard 20 sekund a 45 cyklů). Po skončení 15 minut se mikrozkuhavka přenesse na magnetický stojánek a odpipetuje se celkový obsah roztoku do odpadu. V mikrozkuhavce zůstanou pouze částice s navázaným vzorkem. K těmto MPs se přidá 100 µl promývacího roztoku pufr č.1. a po odebrání mikrozkuhavky z magnetického stojánku se pomocí pipety 10 – 15 krát obsah promixuje. Mikrozkuhavka se opět vloží na magnetický stojánek a odsaje se veškerý obsah roztoku do odpadu, kromě MPs. Tento promývací krok se zopakuje ještě jednou. Přidá se stejné množství elučního roztoku, jako bylo

vzorku a vazebného pufru dohromady a vzorek se umístí po dobu 10 min. a 55 °C na Thermoblok. Po skončení eluce se mikrozkumavka vrátí na magnetický stojánek a odpipetuje se veškerý roztok (náš vzorek s NK) do nové mikrozkumavky. Nakonec se provede detekce pomocí elektrochemie a vyhodnocení získaných dat.



**Obrázek 16:** Pracovní prostředí pro provedení manuální izolace NK pomocí MPs (Provedení veškeré manuální přípravy izolace NK proběhl zde)

### 8.5. Izolace pomocí automatické pipetovací stanice

Druhý úkol byl založen na seznámení se s automatickým prostředím pipetovací stanice a vytvořením odpovídajícího programu (viz přílohy) pro úspěšnou izolaci nukleových kyselin. V dnešní době si metody žádají plně automatizované postupy, které řeší čas a experimentální chybu. Automatický postup izolace NK paramagnetickými částicemi se provedl pomocí komerčně dostupné automatické pipetovací stanice. Pro využití programovacích příkazů, simulačního prostředí a nastavování parametrů si musíme sestavit protokol s postupem izolace NK.

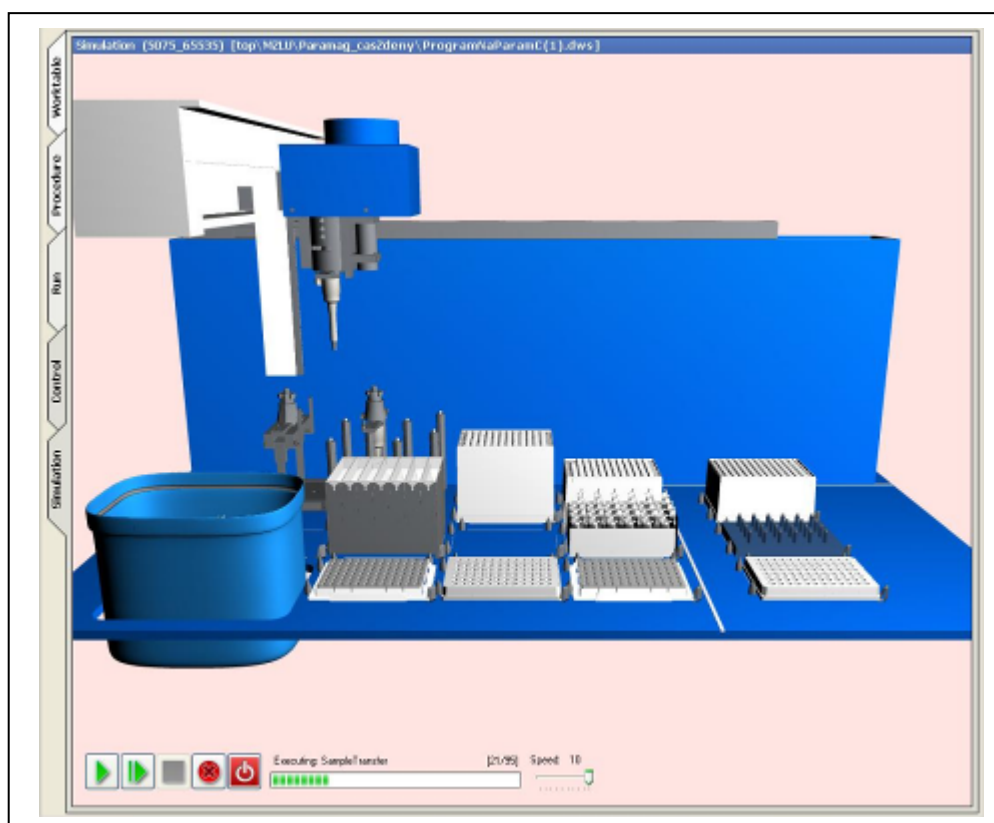
#### Programování

Programování lze provádět skupinou speciálních příkazů v prostředí Windows na PC. Ještě předtím než se začne programovat, je nezbytné definovat Labware, který je důležitou součástí programového balíku. Obsahuje definování polohy pipetovacích hlav, nosiče špiček, mikrotitrační destičky, vaničky, držáky vaniček, zkumavky, racky, termobloky pro zkumavky nebo mikrotitrační držáky adaptéru. V programu jsou uložena geometrická data, aby bylo možné správně dávkovat kapaliny. Tyto informace se ukládají do uzlu epMotion a mohou se kdykoliv otevřít. Pro programování metod lze vybrat části, které jsou k dispozici z uzlu během instalace. Potom se během programování objeví pouze tyto části. Výběr se zjednoduší a lze jej i měnit. K částem z výroby lze přidávat i další jednotky editované uživatelem. Ty si musí uživatel nastavit dopředu, než pustí software epBlue. Editace je možná pomocí běžných příkazů. Mezi ně patří pipetování, vícenásobné dávkování. Technické základy pro tyto příkazy (např. rychlost dávkování, výška špičky pro nasátí nebo dávkování kapaliny, vypuštění zbytkové kapaliny), které musí být specificky naprogramovány a specifikovány, jako parametry dávkování pro danou třídu kapalin. Specifické dávkovací vzorce, jako

vícenásobné přenosy z jedné jamky nebo zkumavky pro přenos vzorků, vkládání mikrotitrační destičky nebo racků horizontálně nebo vertikálně lze definovat graficky. *Program metody* se skládá z komponent „pracovní plocha“ a „procedura“. Pracovní plocha se na začátku plní špičkami, racky a mikrotitračními destičkami. Procedura se skládá ze sekvence příkazů, které se nazývají „SampleTransfer“ a „ReagentTransfer“. Příkazy jsou charakteristické dávkovacím objemem nebo typem kapaliny.

### Simulační prostředí

Simulační prostředí, viz Obrázek 17, slouží ke kontrole programu. Uživatel si ho může spustit v tom případě, když si není jistý ve svém postupu programování nebo se mu nezdá, co přístroj dělá při reálném užívání. Také si lze ověřit, jestli jsou správně nastaveny velikosti objemu u jednotlivých kroků a jestli funguje pipetování a program správně. Umožňuje neplýtvat se vzorky nebo s drahým materiálem. Simulační prostředí je vytvořené ve formě 3D, ale je stále ve fázi vývoje.



Obrázek 17: Simulace programu

### 8.5.1. Programovací příkazy

Pracovní postup je definován po sobě jdoucími příkazy. K dispozici jsou následující příkazy.



**Počet vzorků** – definování počtu vzorků a počtu dávkovacích kroků pro následující příkazy v proceduře.



**Transfer vzorků** – transfer několika pozic ze zdroje do několika pozic cíle. Nejprve jsou kapaliny nasáty z destičky A a jsou vypuštěny do destičky B.



**Ředění** - modifikace příkazu „Sample Transfer“ pro zjednodušení programování ředících řad.



**Pool** - přenos kapaliny z několika zdrojových pozic do cílové pozice.



**Pool do jediného cíle** – transfer kapaliny z několika zdrojových pozic do jediné cílové pozice.



**Mix** – příkaz k mixování, který je nezávislý.



**Transport** – změna umístění labwaru. Obvykle se jedná o transport mezi pracovní plochou s labwarem a prázdnou parkovací pozicí.



**Teplota** – nastavení teploty na bloku pro řízené temperování.



**Čekání** - čekací doba mezi příkazy, po uplynutí nastaveného času následuje další krok.

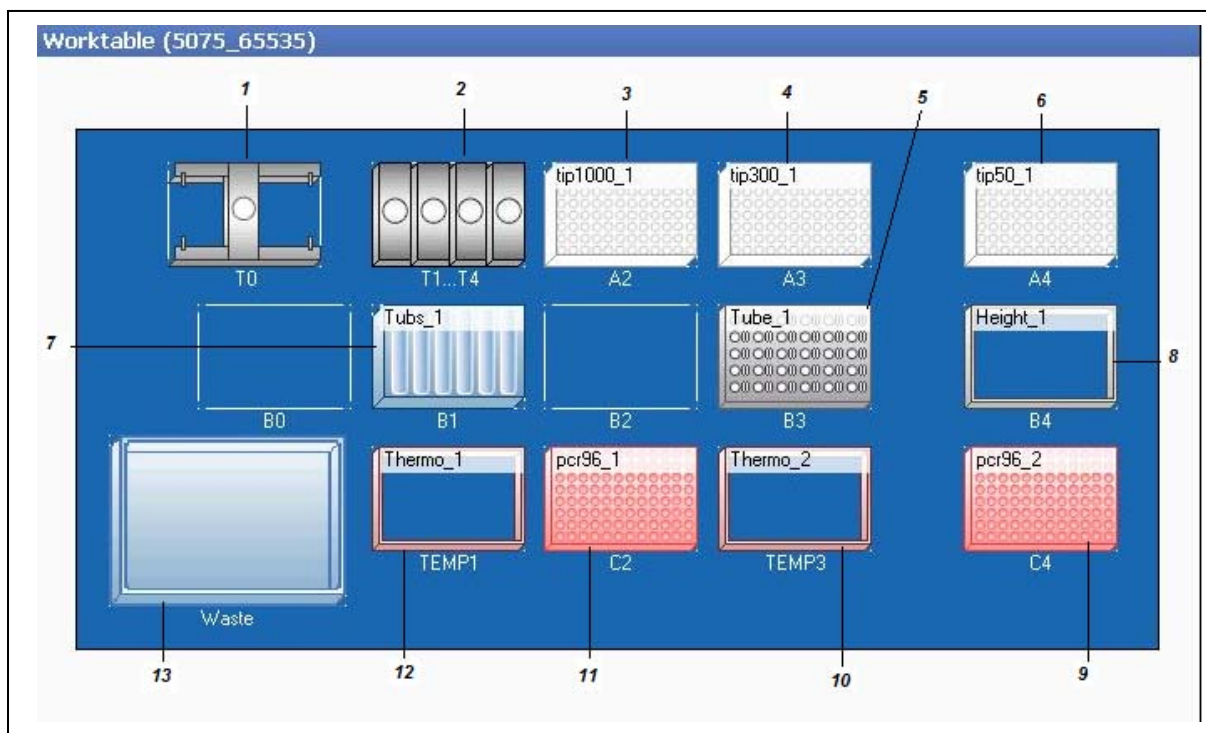


**Komentář** – není příkazem pro přístroj. Je to řádek s libovolnou informací pro uživatele zařazenou v proceduře. Např. pro zadání informace specifické pro metodu.



**Intervence uživatele** – Přerušení dávkovací sekvence. Požadavek na otevření čelního krytu při potřebě provedení externích kroků.

Součástí programovacích příkazů je také nutnost ovládat a znát, co se vyskytuje na pracovní ploše, viz Obrázek 18, a také co si lze nastavit u programovacích příkazů. Je to popsáno v následujícím textu.

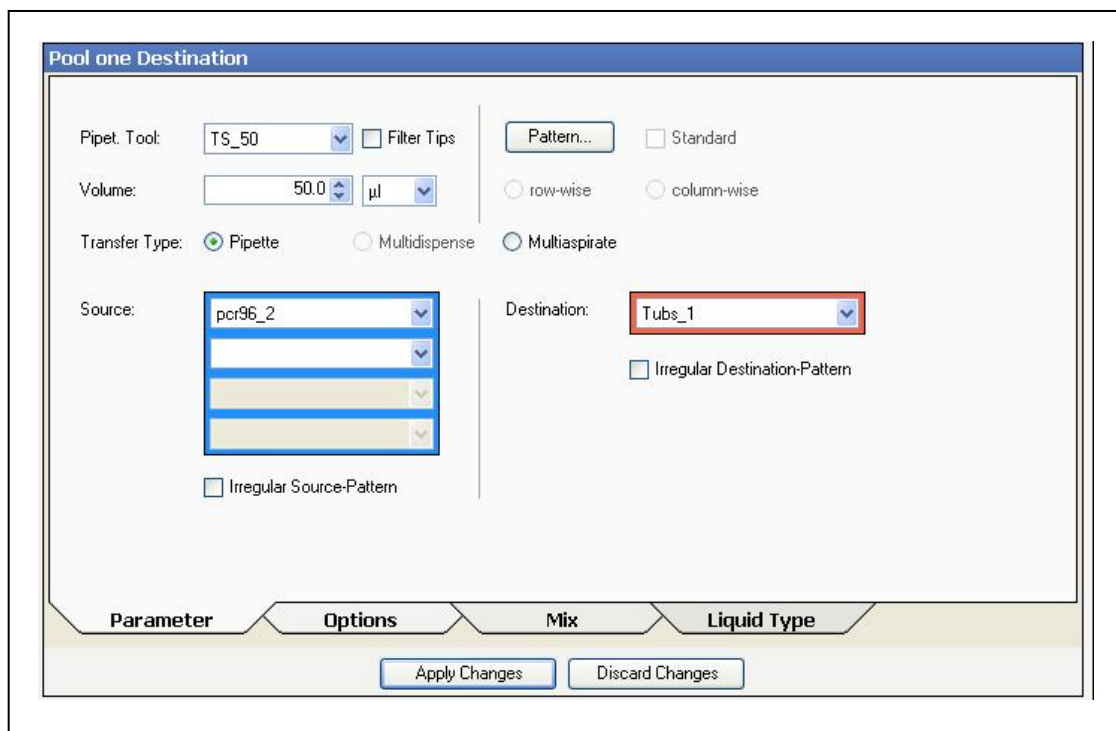


**Obrázek 18:** Pracovní plocha

**Tabulka 2:** Názvy pracovních nástrojů, které jsou zobrazeny v pracovní ploše

Nástroje	Nástroje
1 - Gripper (Přenašeč)	8 – Magnet
2 - Pipetovací hlavy	9 - PCR destička 2
3 - Špičky o objemu 1000 $\mu$ l	10 - Thermoadapter 2
4 - Špičky o objemu 300 $\mu$ l	11 - PCR destička 1
5 - Eppendorf stojánek 1,5 $\mu$ l	12 - Thermoadapter 1
6 - Špičky o objemu 50 $\mu$ l	13 – Odpadní nádoba
7 - Lázně o objemu 7x30 ml	

Každý příkaz má vlastní sestavu parametrů, které se nastavují. Obrázek 19 ukazuje prostředí, kde se nastavují tyto parametry.



**Obrázek 19:** *Prostředí pro nastavování parametrů*

Ve složce Parametr, viz Obrázek 19, si lze nastavit velikost použitých špiček. Dále se zde nastavuje velikost objemu, který má být přenášen a typ přenosu (jaké bude dávkování a pipetování). Stanoveno je také, ze které pracovní pozice (tedy z jaké destičky), do které pracovní pozice. Souvisí s předem zadaným vybavením pracovní plochy (labware).

## **8.6. Návrh protokolu pro automatickou izolaci nukleových kyselin za využití paramagnetických částic na základě vypracované a optimalizované metodiky**

Vytvořili jsme univerzální program pomocí softwaru dodávaného k automatické pipetovací stanici. Dále bylo nutné celý program vyzkoušet a optimalizovat jednotlivé technické parametry nastavení. Postup vychází z optimalizace, která byla provedena při manuální izolaci. Popis výsledného postupu je v následujícím textu.

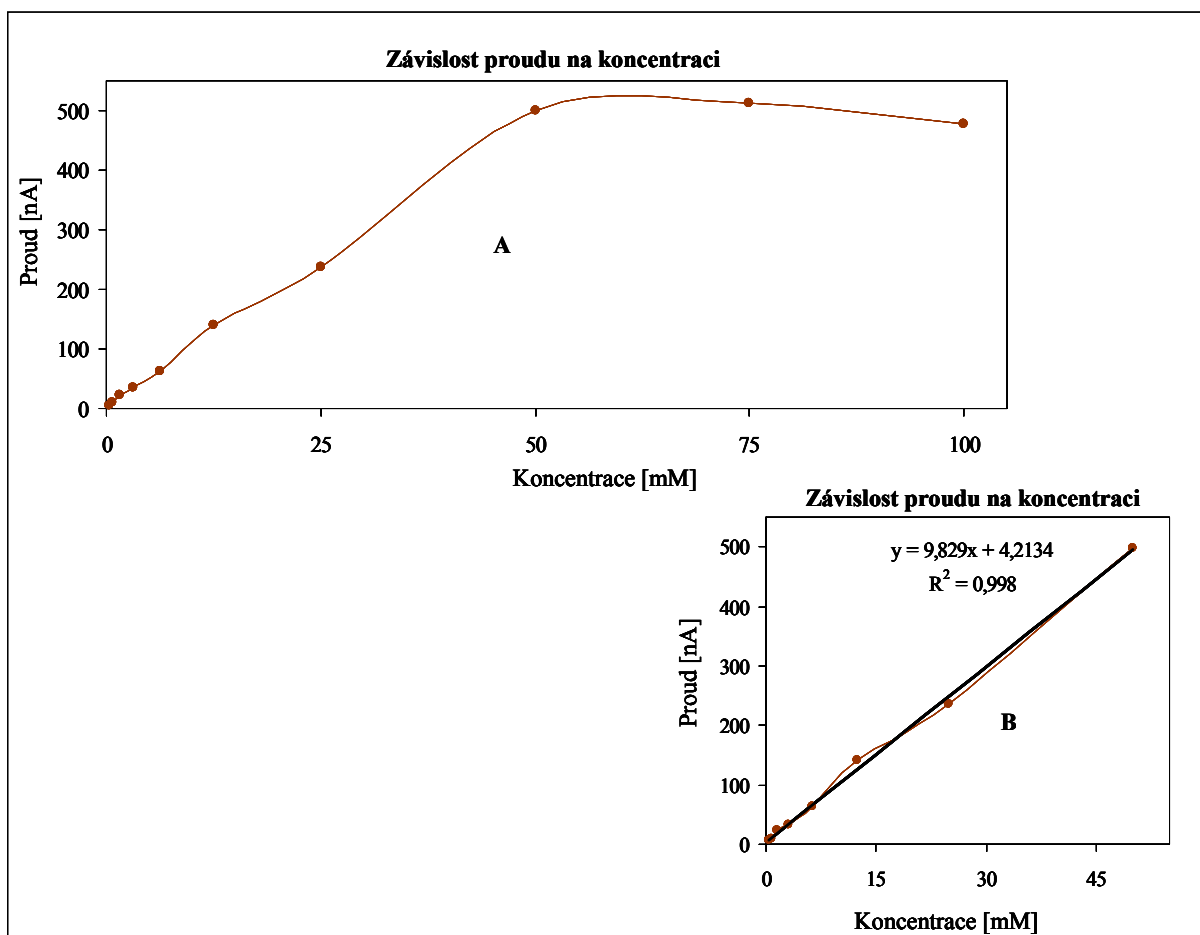
### **8.6.1. Postup izolace nukleových kyselin pomocí automatické pipetovací stanice**

Připraví se pufrы a vzorky, které budou potřeba pro izolaci NK. Manuálně se napipetuje 500 µl paramagnetických částic do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a následně se umístí na pozici 1 ve stojánku. Zde je také umístěn vazebný a eluční roztok. Do vaničky 1 o objemu 30 ml se napipetuje promývací pufr č.1. Pozice 2 ve vaničce slouží jako odpad. Na začátku se nastaví teplota na pozicích TEMP 1 na 5 °C a na pozici TEMP 3 na 25 °C. Pipetou o velikosti 300 µl se napipetuje 60 µl magnetických částic do PCR destičky na pozici

C4 do pozice 1. Pipeta o velikosti 300  $\mu$ l napipetuje 60  $\mu$ l promývacího pufru do PCR destičky do pozice 1 a MPs promixuje spolu s pufrům. Gripper (zařzení pro přenos destiček na různé pozice) přeneser destičku na magnetický adaptér. Dojde k přitáhnutí částic k magnetu. Pomocí pipety o velikosti 300  $\mu$ l se odpipetuje 120  $\mu$ l roztoku bez MPs do odpadu, který je součástí vaničky v pozici 2. Promývací krok se dvakrát opakuje pomocí promývacího pufru. Pipetou o velikosti 300  $\mu$ l se napipetuje 60  $\mu$ l pufru do pozice 1 a následně se pufr s MPs promixuje. Poté je PCR destička přenesena z pozice C4 na magnetický adaptér, kde se zachytí pouze MPs a roztok je odpipetován do odpadu. Následně je PCR destička gripperem přenesena zpět na pozici C4. Následuje napipetování promývacího pufru do PCR destičky v pozici 1 a roztok se 12 krát promixuje. Poté se pipetou o velikosti 50  $\mu$ l rozpipetuje promývací pufr společně s MPs do dalších pozic v PCR destičce po 20  $\mu$ l. Po rozpipetování je PCR destička přenesena na magnetický adaptér. Po přitáhnutí MPs ke stěně destičky se roztok odpipetuje do odpadu. PCR destička je dále přenesena zpět na pozici C4 a do jednotlivých pozic je nepipetováno 95  $\mu$ l vazebného pufru a 5  $\mu$ l vzorku a provede se promixování (nejméně 10 krát) v každé pozici. PCR destička se přeneser pomocí gripperu na magnetický adaptér a roztok se odsaje do odpadu. V této chvíli gripper přeneser PCR destičku na pozici TEMP 1, kde zůstane po dobu 15 min. Po 15 minutách gripper přeneser PCR destičku zpátky na magnetický adaptér, kde dojde k zachycení MPs k magnetu. Poté se zbytek směsi odsaje do odpadu. Na pozici TEMP 1 se změni teplota na 55 °C. PCR destička se z adaptéru přeneser gripperem zpět na pozici C4. Následuje promývání pomocí pipety o objemu 300  $\mu$ l, která nepipetuje 60  $\mu$ l promývacího pufru do každé pozice PCR destičky. Po provedení pipetování a promixování v každé pozici se PCR destička přeneser na magnetický adaptér. Potom se odpipetuje zbývající roztok do odpadu. Opět se destička vrátí zpět na pozici C4. Pipetou o objemu 300  $\mu$ l se do každé pozice PCR destičky napipetuje eluční roztok ze stojánku eppendorf. V každé pozici proběhne mixování. Před přenesením se PCR destička uzavře. Poté se přeneser na zahřátou pozici TEMP 1, kde je teplota 55 °C a proběhne eluce. Doba je 10 min. Z PCR destičky se odstraní uzávěr a přeneser se na magnetický adaptér, po zachycení MPs se odpipetuje roztok do nové PCR destičky, která je umístěna na TEMP 2 a je neustále chlazena na 5 °C. Tímto krokem je postup ukončen a získaný vzorek může být dále zpracováván v našem případě elektrochemicky změřen.

### 8.6.2. Závislost odezvy signálu na koncentraci NK pomocí paramagnetických částic na epMotion

Po provedení manuální izolace NK pomocí MPs se provedla izolace NK pomocí paramagnetických částic, automaticky. K tomu nám posloužila automatická pipetovací stanice epMotion. Díky tomuto přístroji bychom měli získat větší množství NK. Abychom ověřili správnost postupu pro automatickou izolaci, provedli jsme experiment, kde jsme sledovali schopnost izolovat různé koncentrace NK pomocí MPs. Ředěním bylo připraveno 10 různých koncentrací NK 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 a 0,39  $\mu\text{g/ml}$ . Po elektrochemické detekci získaných vzorků byla data vyhodnocena a sestrojena kalibrační křivka viz Obrázek 20. Odezva signálu lineárně roste do koncentrace 50  $\mu\text{g/ml}$  podle rovnice  $y = 9,829x + 4,2134$  s faktorem spolehlivosti  $R^2 = 0,998$ . Od koncentrace 50  $\mu\text{g/ml}$  do 100  $\mu\text{g/ml}$  je nárůst signálu velmi pozvolný. Lze tedy říci, že naše snažení bylo úspěšné a program pro automatickou izolaci NK kyselin funguje. Rozdíl ve faktoru spolehlivosti se liší o 0,0302.



**Obrázek 20:** Kalibrační křivka A) Závislost proudu (nA) na koncentraci 0 -100  $\mu\text{g/ml}$  a B) závislost proudu (nA) na koncentraci 0 – 50  $\mu\text{g/ml}$ . U obrázku B je zobrazena hodnota regrese a hodnota spolehlivosti. Hodnota směrodatné odchylky byla 205,02 nA a medián se rovnal 101,95.

## 9. Závěr a shrnutí

Izolace NK hraje důležitou roli v jejich studiu. Práce je zaměřena především na rychlou izolaci a detekci pomocí paramagnetických částic (MPs) částic. Pomocí paramagnetických částic lze provést izolaci plně automaticky. Tato práce byla zaměřena na vytvoření zcela unikátního postupu prostřednictvím komerčně dostupných MPs částic. Vzhledem k faktu, že podmínky pro tento postup byly přesně definovány, což komerční kity neumožňují, protože není známo jejich složení, bylo nutné se zaměřit na optimalizaci podmínek. Tato práce popisuje vytvoření a optimalizaci zcela nového postupu. Nejdůležitějšími parametry, které hrají roli při izolaci NK pomocí MPs jsou i) pH vazebného roztoku, dle našich výsledků je nejvhodnější pH 1,6; ii) iontová síla, v provedených experimentech simulovala NaCl a výsledná optimální koncentrace byla 850 mM a iii) doba akumulace, pro naše experimenty je optimálních 15 min. Bylo studováno působení třepání na izolaci NK pomocí MPs za využití přístroje, který umí třepat a centrifugovat. Umožňuje nastavit třepání do třech poloh a) Hard, b) Medium a c) Soft. Po analýze získaných dat jsem zjistil, že se zvyšující se silou třepání, roste i účinnost izolace NK oproti netřepaným vzorkům. V této práci proběhlo také porovnání různých druhů MPs. Největší úspěšnost uchycení NK měli MPs částice typu *Viral* a na základě těchto výsledků byl vytvořený postup pro izolaci NK pomocí MPs. Potom jsem vytvořil postup pro automatickou izolaci pomocí MPs. Nakonec byly vytvořeny kalibrační křivky, které se vyhodnotili. Podle dostupných výsledků se potvrdila domněnka, že účinnost zachycení NK bude větší u provedení automatické izolace. Účinnost zachycení NK pomocí epMotionu byla stanovena na 80%. Paramagnetické částice ve spojení s automatickou pipetovací stanicí jsou tedy vhodné pro izolaci NK, jak naznačují výsledky, jež jsem popsal ve své bakalářské práci výše.

## Seznam použité literatury

- [1] WILHELM, Z., et al. *Stručný přehled fyziologie člověka pro bakalářské studijní programy*. 2nd ed. Masarykova univerzita, 2005.
- [2] DOSTÁL, Jiří, et al. *Biochemie pro bakaláře*. 1. dotisk 1. vydání. Brně : Masarykova univerzita, 2005. 173 s.
- [3] *Genome.gov* [online]. 15. září. 2009 [cit. 2010-04-23]. Deoxyribonucleic Acid. Dostupné z WWW: <<http://www.genome.gov/25520880>>.
- [4] *DNA structure in detail* [online]. 10.11.2009 [cit. 2010-04-23]. DNA structure. Dostupné z WWW: <<http://www.uic.edu/classes/phys/phys461/phys450/ANJUM04/>>.
- [5] BENDA, Vladimír ; BABŮREK, Ivan; KOTRBA, Pavel. *Základy Biologie*. první. Praha : VŠCHT, 2005. 167 s.
- [6] *Nukleové kyseliny* [online]. 2005 [cit. 2010-04-23]. Nukleové kyseliny. Dostupné z WWW: <[http://www.gymkh.cz/student/Biologie/Bu%C5%88ka/nukleov%C3%A9%20kys/NUKLEOV%C3%89%20Kyseliny\\_kone%C4%8Dn%C3%BD.doc](http://www.gymkh.cz/student/Biologie/Bu%C5%88ka/nukleov%C3%A9%20kys/NUKLEOV%C3%89%20Kyseliny_kone%C4%8Dn%C3%BD.doc)>.
- [7] *Nukleové kyseliny*. In Chemie, Nukleové kyseliny, Vana. Praha : -, 2006 [cit. 2010-04-23]. Dostupné z WWW: <<http://vilem.borec.cz/upload/data/Chemie,%20Nukleove%20kyseliny,%20Vana.doc>>
- [8] MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY DĚDIČNOSTI . In VLAHOVA, -. *33biol*. Brno 1998 : Gymnázium J.G. Menděla, 29.1.2001 [cit. 2010-04-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.imaturita.cz/pdf/33biol.pdf>>.
- [9] *Genetika.ppt* [online]. 13.9.2007 [cit. 2009-09-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.gjs.cz/vedy-o-zemi/Ruda/Sbi/1-SB4-zaklady-molekularni-dedicnosti.pdf>>.
- [10] JAKUB. *Centralni\_dogma\_molekularni\_biologie.pdf* [online]. 7.1.2008 [cit. 2009-10-28]. Dostupný z WWW: <[http://fotoskladka.110mb.com/school/statnice/Centralni\\_dogma\\_molekularni\\_biologie.pdf](http://fotoskladka.110mb.com/school/statnice/Centralni_dogma_molekularni_biologie.pdf)>.
- [11] *Evolution of the Inflated Calyx Syndrome in Solanaceae.pdf*. MBE [online]. 30.10.2007, -, [cit. 2010-04-29]. Dostupný z WWW: <<http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/full/24/11/2443>>.
- [12] From the Genome to the Proteome.pdf. - : -, 2007. 2 s. Dostupné z WWW: <[http://www.454.com/downloads/news-events/from-the-genome-to-the-proteome\\_FINAL.pdf](http://www.454.com/downloads/news-events/from-the-genome-to-the-proteome_FINAL.pdf)>.
- [13] - [online]. 20.10.2005 [cit. 2010-04-29]. *GENOM*. Dostupné z WWW: <<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/prezentace/genom.ppt>>.
- [14] *Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce* [online]. [2008] [cit. 2009-10-04]. Dostupný z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm>>.
- [15] MACKOVÁ, Pavla. Projekt. [s.l.], 2009. 17 s. FEKT VUT Brno. *Semestrální práce*.

- [16] VINARSKÝ, Vladimír. *Porovnání nových metod sekvenace bakteriálních genomů s metodou klasickou*. [s.l.], 2006. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Doc. MUDr. David Šmajš, PhD.
- [17] *Zaklady-genetiky-a-poradenstvi.pdf* [online]. 2004 [cit. 2010-04-29]. *Možnosti aplikace metod MG*. Dostupné z WWW: <[http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni\\_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/04.pdf/](http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/04.pdf/)>.
- [18] *Genetické metody*. [s.l.] : [s.n.], 2008. 50 s.
- [19] *Izolace nukleových kyselin* [online]. 2009 [cit. 2009-10-28]. Dostupný z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>>.
- [20] *2 prednaska* [online]. 16.3.2009 [cit. 2010-04-29]. Srážení, extrakce a centrifugace. Dostupné z WWW: <<http://biomikro.vscht.cz/isolacebmm/prednaska2.pdf>>.
- [21] CÍDLOVÁ, Hana. - [online]. - [cit. 2010-04-29]. *Vysolování*. Dostupné z WWW: <[http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni\\_metody/vysolovani.pdf](http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni_metody/vysolovani.pdf)>.
- [22] SAFARIKOVA, -. - [online]. 18.11.2004, 1.12.2006 [cit. 2010-04-29]. *Slide 1*. Dostupné z WWW: <<http://www.usbe.cas.cz/people/safarik/Prednasky-na-JcU/Enzymologie/isolace-enzymu-PP95.ppt>>.
- [23] AMBION [online]. 2010 [cit. 2010-04-29]. *The Basics: RNA Isolation*. Dostupné z WWW: <<http://www.ambion.com/techlib/basics/rmaisol/index.html>>.
- [24] *Quantification of mRNA in Salmonella sp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR*. -. 2007, 2, s. 1-7.
- [25] OBATA, K, et al. Recent developments in laboratory automation using magnetic particles for genome analysis : *Pharmacogenomics*. Si. 2005, 3, 5, s. 697-708.
- [26] Chemicell [online]. - [cit. 2010-04-29]. *Biomagnetic Separation*. Dostupné z WWW: <<http://www.citace.com/generator.php?druh=8&ukol=1>>.
- [27] Science [online]. 1978 [cit. 2010-04-29]. *Magnetotactic bacteria*. Dostupné z WWW: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/203/4387/1355>>.
- [28] HÚSKA, Dalibor, et al. Elektrochemická detekce mRNA izolované z rostlinných pletiv za využití paramagnetických mikročástic. In KÍZEK, René . *Elektrochemická detekce.pdf*. Brno : -, 22.2.2010 [cit. 2010-04-29]. Dostupné z WWW: <[www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_03\\_177-185.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_03_177-185.pdf)>.
- [29] STOLNIK, S, et al. Long circulating microparticulate drug carriers : *Advanced Drug Delivery Reviews*. Si. 1995, 16, 2-3, s. 195-214.
- [30] RISHTON, S.A., et al. *Magnetic tunnel junctions fabricated at tenth-micron dimensions by electron beam lithography*. Science. 1996, -, s. 249-252.
- [31] KANG, Y.S., et al. *Synthesis and characterization of nanometer-size Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles* : Chemistry of Materials. Science. 1996, 8, 9, s. 2209-&.

- [32] ZHANG, H.R.; MEYERHOFF, M.E. *Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: Enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance* : Analytical Chemistry. Si. 2006, 78, 2, s. 609-616.
- [33] GUPTA, A.K.; GUPTA, M. *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials. Si. 2005, 26, 18, s. 3995-4021.
- [34] YOZA, B., et al. Fully automated DNA extraction from blood using magnetic particles modified with a hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Si. 2003, 101, 3, s. 219-228.
- [35] SOLE, S.; MERKOCI, A.; ALEGRET, S. *New materials for electrochemical sensing - III. Beads*. Trac-Trends Anal. Chem. Si. 2001, 20, 2, s. 102-110.
- [36] MATSUNAGA, T.; TAKEYAMA, H. *Biomagnetic nanoparticle formation and application*. Supramolecular Science. Si. 1998, 5, 3-4, s. 391-394.
- [37] MATSUNAGA, T., et al. *Chemiluminescence enzyme immunoassay using bacterial magnetic particles*. Analytical Chemistry. Si. 1996, 68, 20, s. 3551-3554.
- [38] GRANCHAROV, S., et al. *Bio-functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles and their use as biomolecular labels in a magnetic tunnel junction based sensor*. Journal of Physical Chemistry B. -. 2005, 109, 26, s. 13030-13035.
- [39] GU, H.W., et al. *Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection*. Chemical Communications. -. 2006, 9, s. 941-949.
- [40] YOZA, B.; MATSUMOTO, M.; MATSUNAGA, T. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *Journal of Biotechnology*. Si. 2002, 94, 3, s. 217-224.

## 10. Seznam zkratek

MPs	paramagnetické částice
NK	nukleová kyselina
DNA	kyselina deoxyribonukleová
RNA	kyselina ribonukleová
BMP	feromagnetické částice
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
tRNA	transférová ribonukleová kyselina
rRNA	ribozómová ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát