

Utjecaj broja leukocita na koncentraciju i čistoću izolirane DNA

Đuraković, Melani

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:210987>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Melani Đuraković

**Utjecaj broja leukocita na koncentraciju i čistoću
izolirane DNA**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Opća klinička biokemija Sveučilišta u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i
hematologiju pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Marije Grdić Rajković.



Ovaj diplomski rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-1247.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc.Mariji Grdić Rajković na uloženom trudu i pomoći
prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Nukleinske kiseline.....	1
1.1.1.	Građa deoksiribonukleinske kiseline (DNA)	1
1.1.2.	Funkcija DNA	3
1.2.	Izolacija DNA.....	4
1.2.1.	Uzorci koji se koriste za izolaciju DNA.....	4
1.2.2.	Kemikalije koje se upotrebljavaju prilikom izolacije nukleinskih kiselina	5
1.2.3.	Metoda izoliranja po Milleru	6
1.2.4.	Izolacija DNA upotrebom Qiagen komercijalnih test paketa	7
1.3.	Određivanje koncentracije i čistoće DNA	8
1.3.1.	DeNovix DS-11 spektrofotometar	8
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	9
3.	MATERIJALI I METODE	10
3.1.	Uzorci i ispitanici.....	10
3.2.	Određivanje broja leukocita.....	11
3.2.1.	Načelo metode.....	11
3.3.	Izolacija metodom po Milleru	12
3.3.1.	Reagensi	12
3.3.2.	Postupak	12
3.4.	Izolacija upotrebom Qiagen FlexiGene DNA kita	13
3.4.1.	Reagensi	13
3.4.2.	Postupak	13
3.5.	Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA	14
3.6.	Statističke metode.....	15
4.	REZULTATI.....	16
4.1.	Deskriptivna statistika rezultata mjerenja.....	16
4.2.	Usporedba rezultata	17
4.2.1.	Usporedba broja leukocita.....	17
4.2.2.	Usporedba koncentracija DNA	18
4.2.3.	Usporedba čistoća DNA.....	19

4.3.	Ispitivanje povezanosti koncentracije i čistoće DNA o broju leukocita.....	20
4.3.1.	Povezanost koncentracije DNA i broja leukocita	20
4.3.2.	Povezanost čistoće DNA i broja leukocita	22
5.	RASPRAVA.....	24
6.	ZAKLJUČCI	26
7.	LITERATURA.....	27
8.	SAŽETAK/ SUMMARY	30
8.1.	Sažetak.....	30
8.2.	Summary.....	31
9.	PRILOZI.....	32
9.1.	Popis kratica	32

1. UVOD

1.1. Nukleinske kiseline

Nukleinske kiseline su makromolekule koje sudjeluju u pohrani, prijenosu i ekspresiji genetske informacije. Dva osnovna tipa nukleinskih kiselina su DNA (deoksiribonukleinska kiselina) i RNA (ribonukleinska kiselina). Molekula DNA je spremište genetske informacije i nalazi se u jezgri. Molekula RNA se stvara u jezgri i 90% je prisutna u citoplazmi. Sudjeluje u ekspresiji informacija tijekom sinteze proteina (Gajera i sur., 2008).

1.1.1. Građa deoksiribonukleinske kiseline (DNA)

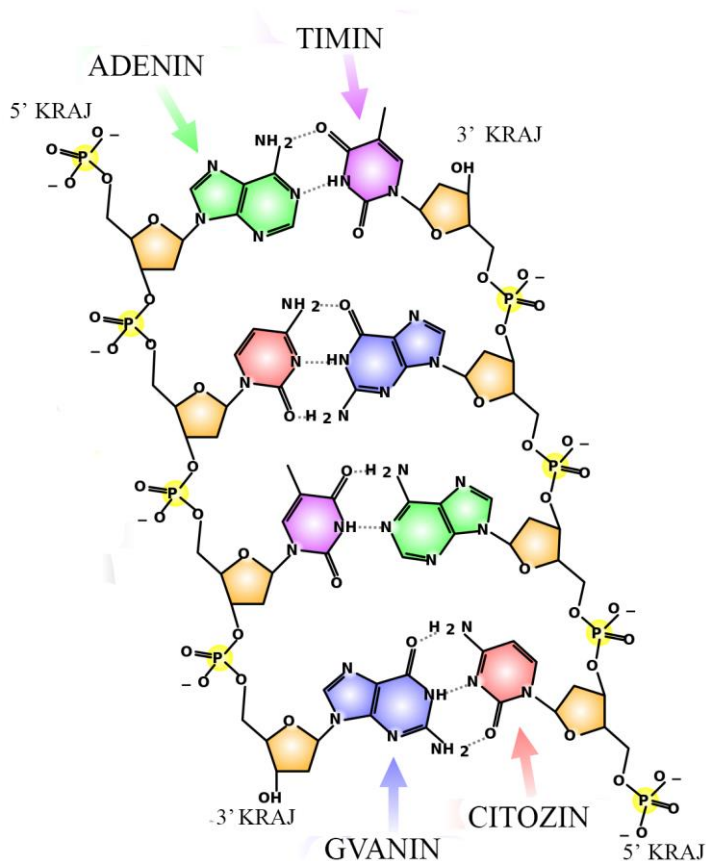
Osnovna građevna jedinica DNA je nukleotid koji se sastoji od dušikovih baza, šećera deoksiriboze i fosfata. Molekula DNA sadrži konstantni i varijabilni dio. Okosnica DNA je konstantni dio molekule i sastoji se od fosfatnih estera šećera deoksiriboza međusobno povezanih fosfodieterskim vezama. Varijabilni dio molekule jeste njezin slijed baza. DNA se sastoji od četiri dušikove baze: adenin i gvanin predstavljaju purinske baze, a timin i citozin pirimidinske baze (Stryer, 2013).

Watson i Crick su 1953.godine otkrili strukturu uzvojnice DNA na osnovi rezultata ogiba rentgenskih zraka, zbog čega su dobili Nobelovu nagradu (Pećina-Šlaus, 2009). Molekula DNA građena je od dva antiparalelna polinukleotidna lanca spiralno uvijena oko zajedničke osi. Jedan lanac ima na prvom nukleotidu terminalnu fosfatnu skupinu na položaju 5' deoksiriboze, a na zadnjem nukleotidu u lancu slobodnu hidroksilnu skupinu na položaju 3' deoksiriboze. Drugi lanac je suprotnog usmjerenja, što znači da ima slobodnu hidroksilnu skupinu na položaju 3' deoksiriboze prvog nukleotida i terminalnu fosfatnu skupinu na položaju 5' deoksiriboze zadnjeg nukleotida u lancu. Nukleotidi su međusobno povezani fosfodieterskom vezom između 5' fosfatne skupine jednog i 3' hidroksilne skupine drugog nukleotida. Dva antiparalelna lanca su povezana vodikovim vezama između komplementarnih parova dušikovih baza. Baze su smještene u unutrašnjosti uzvojnice, a fosfati i šećeri u vanjskom dijelu molekule i čine okosnicu DNA (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Molekulu DNA karakterizira specifičnost pri sparivanju baza. 1950.godine Erwin Chargaff je primijetio da su omjeri između adenina i timina te gvanina i citozina u molekulama DNA kod svih proučenih vrsta blizu 1. Tu pravilnost nazivamo Chargaffovim pravilom. Nakon što su Watson i Crick predložili svoj model moglo se vidjeti da se taj omjer odnosi na specifičnost sparivanja baza. Glikozidne veze koje povezuju baze su uvijek udaljene 1,085

nm, što je dovoljno veliko za par baza purin-pirimidin, a premalo za sparivanje dvije purinske baze, dok bi dvije pirimidinske baze bile predaleko da bi mogle stvoriti vodikove veze. Adenin se ne može spariti s citozinom jer bi se na mjestu namijenjenom jednoj vodikovoj vezi našla dva vodikova atoma, a na mjestu namijenjenom drugoj vodikovoj vezi nijedan vodikov atom. Zato adenin stvara dvije vodikove veze s timinom, a gvanin tri vodikove veze s citozinom (Stryer, 2013).

Hidrofobne interakcije između susjednih parova baza daju dodatnu potporu molekuli. Molekula je višestruko negativno nabijena jer svaki nukleotid nosi jedan negativan naboj na fosfatnoj skupini (Pećina-Šlaus, 2009). Ravnine baza su približno okomite na os uzvojnice, a ravnine u kojima leži deoksiriboza gotovo su okomite na ravnine baza. Razmak između susjednih baza je 0,34 nm duž osi uzvojnice, a međusobno su zaokrenute oko osi za 36 stupnjeva. Spiralna struktura se ponavlja nakon deset nukleotida u svakom lancu, tj. u intervalima od 3,4 nm. Promjer uzvojnice je 2 nm (Čvorišćec i Čepelak, 2009).



Slika 1. Kemijska struktura DNA.

Preuzeto sa simple.wikipedia.org/wiki/DNA#/media/File:DNA_chemical_structure.svg, pristupljeno 11.4.2018.

1.1.2. Funkcija DNA

DNA je molekula naslijeđa. Slijed baza duž polinukleotidnog lanca čini genetičku informaciju koja se prenosi iz jedne generacije u drugu. Genetička informacija sadržana u molekuli DNA služi za sintezu proteina (Pećina-Šlaus, 2009). Informacija je sadržana unutar svake stanice i podijeljena u 46 dugačkih struktura zvanih kromosomi. Kromosomi su građeni od nekoliko tisuća kratkih segmenata DNA koji se nazivaju geni. Svaki gen sadrži upute za sintezu proteina. Genom je kompletan set informacija u organizmu koji nosi informaciju za sve proteine koje će organizam ikada sintetizirati (Alberts i sur., 2002).

Dva najvažnija svojstva molekule DNA su replikacija i transkripcija. Za replikaciju DNA najprije se razdvajaju lanci polinukleotida. Lanci zatim služe kao kalupi za biosintezu novih komplementarnih lanaca. Nastala DNA je semikonzervativna što znači da je jedan lanac novosintetiziran, a drugi potječe od roditeljske molekule DNA. Centralna dogma molekularne biologije objašnjava tijek informacija od gena do proteina. Informacije sadržane u genima se transkripcijom prenose u RNA, a translacijom u proteine. U procesu transkripcije nastaje molekula RNA koja je antiparalelna u odnosu na DNA kalup (Pećina-Šlaus, 2009). Genetički kod opisuje povezanost između slijeda DNA i aminokiselina u proteinima (Alberts i sur., 2002).

1.2. Izolacija DNA

Izolacija DNA je proces pročišćavanja DNA iz bioloških uzoraka. Prisutnost proteina, lipida, polisaharida i ostalih organskih ili anorganskih komponenti ometa analizu DNA i može smanjiti kvalitetu i stabilnost molekule (Elkins, 2013). Prvu izolaciju napravio je 1869. godine Friedrich Miescher (Dahm, 2005). Izolacija DNA je trenutno rutinski postupak koji prethodi svim molekularnim testovima koji se široko primjenjuju u znanosti, forenzici i medicini.

Postupak izolacije provodi se sa sterilnim reagensima u sterilnom posuđu. Potrebno je pažljivo rukovati s biološkim materijalom kako bi se spriječila kontaminacija. Izbor metode izolacije ovisi o uzorku, potrebnom volumenu, čistoći, količini nukleinskih kiselina, vremenu potrebnom za izolaciju, toksičnim reagensima i cijeni. Izolirana DNA se nakon izolacije određuje mjerenjem apsorbancije ili denzitometrijski nakon gel elektroforeze (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

1.2.1. Uzorci koji se koriste za izolaciju DNA

Sva živa bića sadrže DNA. Nukleinske kiseline se izoliraju iz različitih bioloških uzoraka kao što su puna krv, urin, likvor, sjemenja tekućina, slina, kultura stanica, biopsiji i parafinski tkivni preparati (Čvorišćec i Čepelak, 2009). U forenzici se DNA analizom želi identificirati nepoznata osoba, pa se uzorci mogu prikupiti s predmeta kao što su četkica za zube koja sadrži slinu, odjeća na kojoj su prisutne epitelne stanice, žvakaća guma, opušci cigarete, četka za kosu i slično (www.nij.gov).

Izolacija se najčešće radi iz jezgara leukocita pune krvi izvađene na antikoagulans. Puna krv može se dobiti iz arterije, vene ili kapilare. Najčešće se sakuplja venska krv, a postupak uzimanja venske krvi naziva se venepunkcija. Postupak dobivanja krvi naziva se flebotomija i radi ga dobro obučeno osoblje. Najčešći antikoagulans je EDTA. EDTA kelira divovalentne katione, uključujući i kalcij koji je važan za proces zgrušavanja. Koristi se kao dinatrijeva, dikalijeva ili trikalijeva sol. Učinkovit je u koncentracijama od 1 do 2 grama po litri krvi, jer veće koncentracije dovode do hipertoničnog smanjivanja eritrocita. Osobito se koristi u molekularnoj dijagnostici zato što čuva stanične komponente krvi. U novijim epruvetama koje sadrže EDTA kao antikoagulans može se naći gel separator koji odvaja plazmu od stanica ili može biti ugrađen gradijent gustoće kojim se postiže veća koncentracija DNA (Burtis i sur., 2012).

Krv sadrži krvne stanice: leukocite, eritrocite i trombocite. Leukociti su stanice koje sudjeluju u imunosnom odgovoru i jedine su krvne stanice koje sadrže jezgru, stoga se iz jezgara leukocita izolira DNA (Dean, 2005). Izolacije se rade iz različitih volumena krvi, pa se ovisno o dostupnom volumenu biraju metode različite osjetljivosti.

1.2.2. Kemikalije koje se upotrebljavaju prilikom izolacije nukleinskih kiselina

Deterdženti se koriste kako bi narušili integritet stanične membrane disocijacijom membranskih proteina i otapanjem lipidnih membrana. Najčešće se koriste SDS (natrij duodecilsulfat) i TWEEN (polioksietilensorbitan monolaurat) (Pećina-Šlaus, 2009). SDS ima hidrofilnu anionsku sulfatnu glavu na jednom kraju i hidrofobni rep na drugom kraju. Jaki je ionski deterdžent koji potpuno uništava nativnu membransku strukturu i uništava biološku aktivnost membranskih proteina (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Velika prednost SDS-a je što ne denaturira DNA, a denaturira DNAze. Ne utječe na aktivnost proteinaze K, enzima koji se koristi tijekom izolacije. TWEEN su neionski deterdženti koji ne denaturiraju DNA a po sastavu su polioksietilen sorbitan esteri masnih kiselina. TWEEN i SDS se smatraju iritansima.

Potrebno je ukloniti lipide, ugljikohidrate i proteine. Proteini vezani za DNA predstavljaju problem u analizi DNA zato što otežavaju dostupnost molekule različitim analitičkim procesima. Ugljikohidrati su nepoželjni zato što povećavaju viskoznost otopine DNA i tako ju čine nepodobnom za umnožavanje PCR-om. Fenol je organsko otapalo koje ekstrahira proteine koji su pomoću deterdženata disocirani s nukleinskih kiselina. Dodatkom fenola proteini zaostaju u međusloju između gornje vodene i donje fenolne faze. Fenol otapa i dio lipida i polisaharida (Pećina-Šlaus, 2009). Iritans je ako se udiše, vrlo je otrovan i može uzrokovati teške opekline. U dodiru s kožom izaziva upalu i nekrozu kože. Duljim izlaganjem fenolu dolazi do kroničnog oštećenja bubrega i jetara, a dokazana je i povećana učestalost kromosomskih aberacija nakon peroralne primjene fenola. Ne smatra se karcinogenom. (www.epa.gov). Kloroform uklanja proteine slično kao i fenol, ali se upotrebljava i za uklanjanje fenola iz uzoraka. (Pećina-Šlaus, 2009). Iritans je s opasnim parama. Kronično udisanje kloroforma ima učinak na jetru i središnji živčani sustav. Potencijalni je karcinogen za ljude, a dokazani karcinogen na životinjama (www.epa.gov). Upravo zbog toksičnosti fenola i kloroforma oni su zamijenjeni s manje toksičnim kemikalijama, pa se u metodi izoliranja proteini talože povećanom koncentracijom netoksičnog natrijeva klorida (Pećina-Šlaus, 2009).

Proteinaza K je suptilizinska serin proteaza koja reže peptidne veze na karboksilnom kraju aromatskih i nenabijenih aminokiselina. Ima vezna mjesta za kalcijeve ione koji stabiliziraju strukturu enzima, no kalcij nije nužan za katalizu jer je proteinaza K aktivna i u puferima koji sadrže kelirajuće agense kao što je EDTA. U količinama potrebnim za izolaciju ne smatra se opasnom za čovjeka (www.worthington-biochem.com).

EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) inaktivira nukleaze vezanjem dvovalentnih iona i na taj način održava integritet DNA. Tris je slaba organska baza koja u otopini s vlastitom soli daje pufer. Najčešće se koristi Tris/TrisHCl pufer. Važan je za održavanje konstantnog pH.

Za taloženje DNA koriste se alkoholi, najčešće hladni apsolutni etanol ili hladni 2-propanol. Alkoholi odstranjuju hidratacijski omotač oko nukleinskih kiselina. Hidratacijski omotač zaklanja negativno nabijene fosfate koje molekulu DNA čine polianionom. Da bi došlo do taloženja DNA potrebno je stvoriti ionske parove između kationa i polianiona DNA. Prema Coulombovom zakonu sila između iona obrnuto je proporcionalna dielektričnoj konstanti medija. Polarna otapala kao što je voda imaju veliku dielektričnu konstantu. Dodatkom organskog otapala smanjuje se dielektrična konstanta otopine, a povećava elektrostatska sila, što dovodi do stvaranja ionskih parova aniona i kationa. Rabi se ledeni alkohol jer je pri nižim temperaturama manja topljivost (Pećina-Šlaus, 2009).

1.2.3. Metoda izoliranja po Milleru

1988. Miller i suradnici su objavili protokol izolacije DNA koji se temelji na precipitaciji proteina pri velikoj koncentraciji soli. Konformacija makromolekula je kontrolirana hidrofilnim i hidrofobnim interakcijama sa staničnim okruženjem. Molekula se smata tako da su svi hidrofobni dijelovi molekule agregirani, a hidrofilni dijelovi su slobodni za interakciju s vodom. Hidrofilni dijelovi proteina su nabijene i polarne aminokiseline kao što su glutamat, lizin i tirozin. Molekule vode okružuju te aminokiseline. Kada se u otopinu dodaje velika koncentracija soli ioni soli privlače molekule vode. Na taj način se smanjuje broj molekula vode dostupnih za interakciju s nabijenim dijelom proteina, što dovodi do povećanih protein-protein interakcija i agregacije proteina (www.encyclopedia.com).

Standardni protokol podrazumijeva lizu stanica sa SDS lizirajućim agensom i proteinazom K. SDS otapa lipidne membrane i dovodi do lize stanica, a proteinaza K razgrađuje nukleaze te tako omogućuje da DNA neoštećena izađe iz stanice. Proteinaza K je aktivna u prisutnosti denaturirajućih agenasa, uključujući i SDS. Nakon lize stanica dodatkom visoke koncentracije soli, obično 6M natrijevog klorida, DNA se odvaja od proteina. Smjesa se zatim centrifugira kako bi se proteini mogli istaložiti na dnu. Nakon centrifugiranja DNA se nalazi u

supernatantu koji se prenosi u novu epruvetu, te se taloži koristeći apsolutni etanol. Dodatkom etanola i centrifugiranjem nastaje bijeli precipitat „meduzaste DNA“. DNA se ispire u etanolu, resuspendira u TE puferu i pohranjuje na +4 stupnjeva (Chacon-Cortes i Griffith, 2014).

1.2.4. Izolacija DNA upotrebom Qiagen komercijalnih test paketa

FlexiGene DNA kit tvrtke Qiagen omogućuje brzo i jednostavno pročišćavanje DNA. Izolacija se radi u jednoj epruveti što smanjuje otpad i smanjuje rizik od zamjene uzoraka. Potpuno je izbjegnuto korištenje toksičnih organskih reagensa. Izolirana DNA je visoke koncentracije i čistoće s minimalno kontaminanata i inhibitora. Može se sigurno pohraniti na 2-8° C ili -20° C.

Kit sadrži pufer za lizu, denaturacijski pufer, hidracijski pufer i QIAGEN proteazu. Uzorku se dodaje pufer za lizu. Centrifugiranjem se talože stanične jezgre i mitohondriji. Talog se resuspendira i inkubira u denaturacijskom puferu i QIAGEN proteazi. Denaturacijski pufer sadrži kaotropne soli koje mogu pokidati vodikove veze među molekulama vode, čime oslabljuju hidrofobni efekt i smanjuju stabilnost native konformacije proteina. Ovaj korak učinkovito uklanja kontaminante kao što su proteini. DNA se taloži dodatkom izopropanola i centrifugiranjem. Izolirana DNA se ispire u 70% etanolu, suši i resuspendira u hidracijskom puferu (10 mM tris.Cl, pH 8,5)

Kvaliteta i koncentracija izolirane DNA ovisi o uvjetima skladištenja bioloških uzoraka. Svježiji uzorci daju kvalitetniju DNA. Veličina pročišćene DNA je oko 150 kb. Ta duljina je prikladna za daljnje analize i može biti efikasno umnožena (Qiagen, 2010).

1.3. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Nukleinske kiseline zbog svoje strukture apsorbiraju svjetlost određene valne duljine. DNA maksimalno apsorbira svjetlost pri valnoj duljini 260 nm. Postoji linearan odnos između količine apsorbirane svjetlosti i koncentracije DNA (Pećina-Šlaus, 2009). Apsorbancija je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja i zračenja propuštenog kroz uzorak, a prema Beer-Lambertovom zakonu je jednaka umnošku koncentracije, molarnog ekstinkcijskog koeficijenta i debljine kivete. Molarni ekstinkcijski koeficijent je mjera jakosti apsorpcije svjetlosti neke tvari i konstantna je za zadanu tvar (Harris, 2010). Prosječni ekstinkcijski koeficijent dvolančane DNA iznosi 50 ($\mu\text{g/ml}$)/cm, što znači da se za apsorbanciju jednaku 1 pri 260 nm dobiva približna koncentracija DNA od 50 $\mu\text{g/mL}$. Zato se koncentracija DNA računa prema sljedećoj jednadžbi: $A_{260} \times 50 \times \text{razrjeđenje} = \text{koncentracija DNA } (\mu\text{g} / \text{mL})$.

Čistoćom DNA želimo opisati u kolikoj su mjeri u izoliranoj otopini DNA prisutne druge molekule. Za određivanje čistoće DNA određuje se omjer apsorbancija na dvije valne duljine: 260 i 280 nm. Na valnoj duljini 280 nm apsorbiraju aromatske aminokiseline i peptidi, te spojevi s aromatskim prstenom, primjerice fenol koji se ponekad koristi tijekom izolacije. Za otopinu s omjerom A_{260}/A_{280} od 1,8 do 2,0 smatra se da sadrži čistu DNA. Manje vrijednosti upućuju na kontaminaciju proteinima, a više na kontaminaciju s RNA (Pećina-Šlaus, 2009).

1.3.1. DeNovix DS-11 spektrofotometar

DeNovix DS-11 spektrofotometar je visokoosjetljivi uređaj za mjerenje apsorbancije. Moguće je izmjeriti puni spektar UV-VIS analiza određivanjem apsorbancije pri valnim duljinama od 190 do 840 nm. Izvor svjetlosti je pulsirajuća ksenon lampa. Dovoljno je 0,5 μL otopine za analizu, a aparat može odrediti koncentraciju od čak 0,75 ng/ μl dvolančane DNA molekule. Sadrži integrirani procesor, visoko rezolucijski zaslon osjetljiv na dodir i Android operacijski sistem što omogućava lako korištenje bez potrebe za instalacijom softvera na osobno računalo. Softver sadrži aplikaciju koja automatski kvantificira nukleinske kiseline i određuje čistoću mjerenjem apsorbancija na 260, 280 i 230 nm. Mogu se mjeriti apsorbancije u rasponu od 0,015 do 750. Rezultati se lako prebacuju na računalo upotrebom prijenosnog hardvera, Ethernet ili Wi-Fi mreže. Aparat nije potrebno kalibrirati (www.denovix.com).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Izolacija DNA je ključni korak analize DNA koji prethodi svim pretragama u molekularnoj dijagnostici, a podrazumijeva pročišćavanje molekule DNA iz uzorka. Testovi molekularne dijagnostike mogu analizirati slijed baza u molekuli DNA i na taj način dijagnosticirati brojne nasljedne bolesti kao što je cistična fibroza, odrediti genetički materijal bakterije ili virusa i na taj način dijagnosticirati zarazne i upalne bolesti kao što je hepatitis ili odrediti aktivnost gena koji su važni za razvitak tumora. Osim u molekularnoj dijagnostici izolacija se koristi i u forenzici, gdje je analiza DNA potrebna kako bi se identificirala osoba, te u genetičkom inženjerstvu gdje se točno određeni dijelovi gena jednog organizma ugrađuju u drugi organizam kako bi se poboljšala svojstva genetički modificiranog organizma.

Jedan od često korištenih uzoraka je puna krv uzeta na antikoagulans EDTA iz koje se DNA izolira iz jezgara leukocita. Hipoteza ovog istraživanja je da početni broj leukocita u uzorku pune krvi uzete na EDTA kao antikoagulans utječe na koncentraciju i čistoću izolirane DNA.

Ciljevi diplomskog rada:

- 1) Odrediti broj leukocita u uzorcima pune krvi prije izolacije DNA.
- 2) Izolirati DNA iz uzoraka pune krvi korištenjem dvije metode izoliranja: metodom po Milleru i primjenom Qiagen komercijalnog paketa.
- 3) Odrediti postoji li povezanost između broja leukocita i koncentracije ili čistoće DNA za navedene metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci i ispitanici

U ovom istraživanju korišteni su uzorci pune krvi izvađene na antikoagulans EDTA. Za metodu po Milleru korišteno je 227 uzoraka od kojih su 92 zdrava ispitanika a 135 ispitanika ima kroničnu opstruktivnu plućnu bolest. Za izolaciju DNA Qiagen test paketom korištena su 173 uzorka od kojih je 98 zdravih ispitanika i 75 ispitanika na hemodijalizi.

Venepunkcija je rađena iz kubitalne vene u epruvetu koja je sadržavala EDTA kao antikoagulans. Nominalna koncentracija EDTA je 1,8 mg po mililitru krvi. Nakon venepunkcije epruvete su lagano promiješane 8 puta kako bi se krv pomiješala s antikoagulansom (Nikolac i sur., 2014).

Nakon određivanja broja leukocita uzorci su pohranjeni na -20°C do izolacije DNA.

3.2. Određivanje broja leukocita

Broj leukocita određen je u svakom uzorku neposredno nakon uzorkovanja automatiziranom metodom na hematološkom brojaču.

3.2.1. Načelo metode

Hematološki brojač optičkim mjerenjem određuje broj stanica u uzorku. Hidrodinamički fokusirana struja uzorka se pušta kroz kanalić u čije središte pada zraka izvora svjetlosti. Stanice struje kroz kanalić gdje ih jednu po jednu osvjetljava laserska zraka. Svaka stanica u uzorku raspršuje zrake svjetlosti koje se optičkim sustavom leća prenose u fotomultiplikator i fotodetektor, gdje se svjetlosni signal prenosi u električni. Svaka promjena u rasapu svjetlosti ukazuje na prolazak stanice kroz kanalić. Osim broja stanica mjerenjem rasapa svjetlosti može se odrediti volumen i granuliranost stanice. Reflektirani snop zraka prenosi se u sustav leća i s pomoću zrcala hvata pod dva različita kuta. Rasap svjetlosti pod malim kutem od 0° korelira s volumenom stanice, a pod velikim kutom od 90° s granuliranosti stanice.

3.3. Izolacija metodom po Milleru

3.3.1. Reagensi

Za pripremu 500 ml CLB otopine za lizu stanica potrebno je 54,8g saharoze i 5 g Triton X-100 otopiti u 2,5 ml 2M Tris pufera pH 8,2 i 1,25 ml 2M $MgCl_2$ te sterilno filtrirati.

Za pripremu 500 ml SLR otopine potrebno je pomiješati 3,5 ml 2M Tris pufera pH 8,2, 1,75 ml 2M $MgCl_2$ i 990 μ l 5M NaCl te autoklavirati.

Za pripremu 100 ml NLB otopine potrebno je pomiješati 500 μ l Tris pufera pH 8,2, 8,04 ml 5M NaCl i 400 μ l 0,5 M EDTA i autoklavirati.

Koristi se zasićena otopina NaCl. Za pripremu 100 ml zasićene otopine otopi se 20g NaCl na 50 ml destilirane vode i autoklavira.

Za pripremu 100 mL TE pufera otopi se 0,12 g 10 mM Tris pufera pH 8,0 i 0,4 g 1 mM EDTA i autoklavira.

Koristi se 10% otopina SDS, 1 mg/ml Proteinaze K i apsolutni etanol.

3.3.2. Postupak

Uzorci se odmrzavaju 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se pipetira 2,5 mL krvi u sterilnu plastičnu epruvetu volumena 15 mL. Dodaje se 9,5 mL CLB otopine, dobro promiješa i stavlja epruvete na led koje se zatim 20 minuta tresu na tresilici. Nakon toga slijedi centrifugiranje 20 minuta na 6000 rpm. Nakon centrifugiranja se odlijeva supernatant, a talog se resuspendira u CLB otopini dodanoj do 9 ml. Epruvete se postavljaju na led i tresilicu tijekom 20 minuta, te se ponovno 20 minuta centrifugiraju. Supernatant se odlije i talogu se dodaje do 10 ml SLR otopine te se miješa dok se talog ne odvoji od dna epruvete. Epruvete se stavljaju na led i tresu na tresilici 20 minuta nakon čega se epruvete 20 minuta centrifugiraju na 6000 rpm. Nakon odlijevanja supernatanta talogu se dodaje 1,5 mL ledeno hladnog NLB, 100 μ L SDS i 250 μ L proteinaze K i ostavlja se uz laganu vrtnju preko noći na 65°C. Sljedeći dan se u epruvete s uzorkom dodaje 500 μ L zasićene otopine NaCl, te se centrifugira 30 minuta pri 6000 rpm. Supernatant se odlijeva u nove plastične epruvete te se nadopuni s ledenim apsolutnim etanolom do 8 mL i pažljivo miješa sve dok se ne pojavi mežuzasta DNA. Pipetom se pažljivo izdvoji DNA, prenese u sterilnu Eppendorf epruveticu volumena 1,5 mL, centrifugira 5 min na 4000 rpm te se odlije etanol. Otvorena Eppendorfica se ostavlja otvorena preko noći kako bi etanol mogao ispariti. Sljedeći dan DNA se otopi u 100 μ L TE pufera.

3.4. Izolacija upotrebom Qiagen FlexiGene DNA kita

3.4.1. Reagensi

QIAGEN test paket sadrži tri pufera (pufer za lizu, denaturacijski pufer i hidracijski pufer) i QIAGEN proteazu. Denaturacijski pufer sadrži gvanidin hidroklorid. Hidracijski pufer je 10 mM otopina TrisCl pufera pH 8.5. Qiagen proteaza sadrži subtilizin.

Koristi se 100% otopina izopropanola i 70% otopina etanola.

3.4.2. Postupak

Prije početka izolacije liofilizat QIAGEN Proteaze resuspendira se u 0,3 mL hidracijskog pufera. Maksimalno jedan sat prije početka izolacije priprema se smjesa QIAGEN proteaze i denaturacijskog pufera u omjeru 1:100. Na 1250 μ L pufera za lizu dodaje se 500 μ L pune krvi i miješa okretanjem epruvete 5 puta. Smjesa se centrifugira 20 sekundi na 10 000 g. Odlije se supernatant, a epruveta ostavi okrenuta na čistu staničevinu 2 minute kako bi se talog osušio. Talog se resuspendira u 250 μ L smjese denaturacijskog pufera i QIAGEN proteaze i odmah se miješa na miješalici dok se talog u potpunosti ne otopi. Lagano se centrifugira 3-5 sekundi te inkubira 5 minuta u vodenoj kupelji na 65°C. Tada uzorak mijenja boju iz crvene u maslinasto zelenu što upućuje na razgradnju proteina. Dodaje se 250 μ L 100% izopropanola i intenzivno miješa okretanjem epruvete sve dok DNA precipitat ne bude vidljiv. Centrifugira se 3 minute na 10 000 g, odlije supernatant i pažljivo ostavi okrenuta epruveta na čistu staničevinu kako bi se talog osušio, pazeći pritom da talog ostane u epruveti. Dodaje se 250 μ L 70% etanola i miješa na miješalici 5 sekundi. Centrifugira se 3 minute na 10 000 g a nakon toga se odlije supernatant i ponovno ostavi okrenuta epruveta na čistu staničevinu. DNA talog se suši na zraku dok etanol ne ispari, resuspendira se u 200 μ L hidracijskog pufera, miješa na miješalici 5 sekundi pri maloj brzini i otapa inkubiranjem u vodenoj kupelji na 65°C 1 sat.

3.5. Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Koncentracija i čistoća DNA se provjeravaju mjerenjem apsorbancije otopine DNA na dvije valne duljine: 260 i 280 nm. Mjerenje se provodi na De Novix DS-11 spektrofotometru visoke osjetljivosti. Izvor svjetlosti obasjava uzorak i mjeri se udio svjetlosti koji je prošao kroz otopinu i došao do detektora. Svjetlosni signal se pretvara u električni te se brojučano prikazuje na zaslonu spektrofotometra.

DNA zadovoljavajuće čistoće imat će A_{260}/A_{280} 1,8 – 2,0. Koncentracija DNA se izračuna po jednadžbi: $A_{260} \times 50 \times \text{razrjeđenje} = \text{koncentracija DNA } (\mu\text{g} / \text{mL})$. Spektrofotometar automatski računa koncentracije i čistoće.

Kao slijepa proba korišten je TE pufer.

3.6. Statističke metode

Za statističku analizu podataka korišten je računalni program MedCalc v.14.8.1. (© 1993.-2014. MedCalc Software). Deskriptivnom statistikom dobivene su informacije o medijanu i 95% intervalu pouzdanosti. Medijan je mjera centralne tendencije i predstavlja vrijednost središnjeg elementa za neparni broj uzoraka ili aritmetičku sredinu dvaju središnjih elemenata za parni broj uzoraka. Interval pouzdanosti predstavlja raspon mogućih vrijednosti unutar kojega se s izvjesnom vjerojatnosti nalazi ta statistička mjera populacije. Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je D'Agostino-Pearsonov test. Normalna distribucija slijedi Gaussovu krivulju.

Mann Whitneyev test se koristio kako bi se ispitalo postojanje statistički značajne razlike između broja leukocita u uzorcima koji su se izolirali s dvije metode, te između dobivenih koncentracija i čistoća. Rezultati su se prikazali pomoću box and whisker dijagrama u kojem zeleni kvadrat predstavlja vrijednost između 1. i 3. kvartila a zelena linija u kvadratu predstavlja medijan. Vertikalna zelena linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti.

Za ispitivanje korelacije broja leukocita i čistoće, odnosno koncentracije DNA rađen je Spearmanov koeficijent korelacije uz razinu statističke značajnosti P. Spearmanov koeficijent korelacije može imati vrijednost od -1 do 1. Vrijednost 0 označava nepostojanje korelacije. $P < 0,05$ smatra se statistički značajnim. Podaci se prikazuju grafički.

4. REZULTATI

4.1. Deskriptivna statistika rezultata mjerenja

U tablici 1 prikazana je deskriptivna statistika za broj leukocita u uzorcima pune krvi koja je izolirana pomoću Millerove metode i Qiagen FlexiGene DNA kita, te za čistoću i koncentraciju DNA dobivene navedenim metodama.

Metodom po Milleru dobivene su puno veće koncentracije i čistoće DNA nego izolacijom pomoću Qiagen test paketa.

Tablica 1. Deskriptivna statistika

Metoda po Milleru	Medijan	95% CI za medijan
Leukociti (x10 ⁹ /L)	6,6	6,3 – 7,1
Koncentracija DNA (ng/μL)	138,7	123,1-157,7
Čistoća DNA	1,7	1,7-1,7
FlexiGene DNA kit	Medijan	95% CI za medijan
Leukociti (x10 ⁹ /L)	5,9	5,6-6,2
Koncentracija DNA (ng/μL)	57,0	48,0-76,5
Čistoća DNA	1,3	1,3-1,5

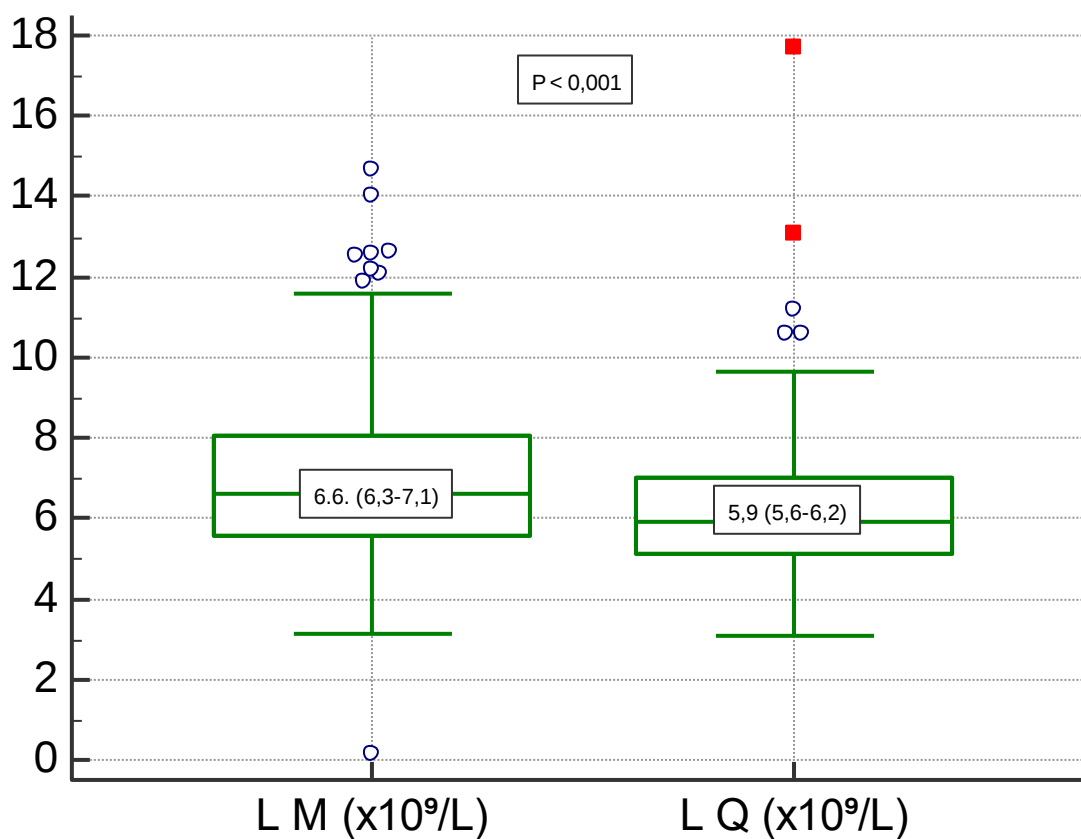
95% CI – 95% interval pouzdanosti

4.2. Usporedba rezultata

4.2.1. Usporedba broja leukocita

Mann Whitneyevim testom pokazano je da postoji statistički značajna razlika između broja leukocita u uzorcima korištenim za izolaciju metodom po Milleru u odnosu na uzorke korištene za izolaciju Qiagen test paketom.

U uzorcima korištenim za izolaciju metodom po Milleru prisutno je više leukocita nego u uzorcima korištenim za izolaciju Qiagen test paketom (slika 2).

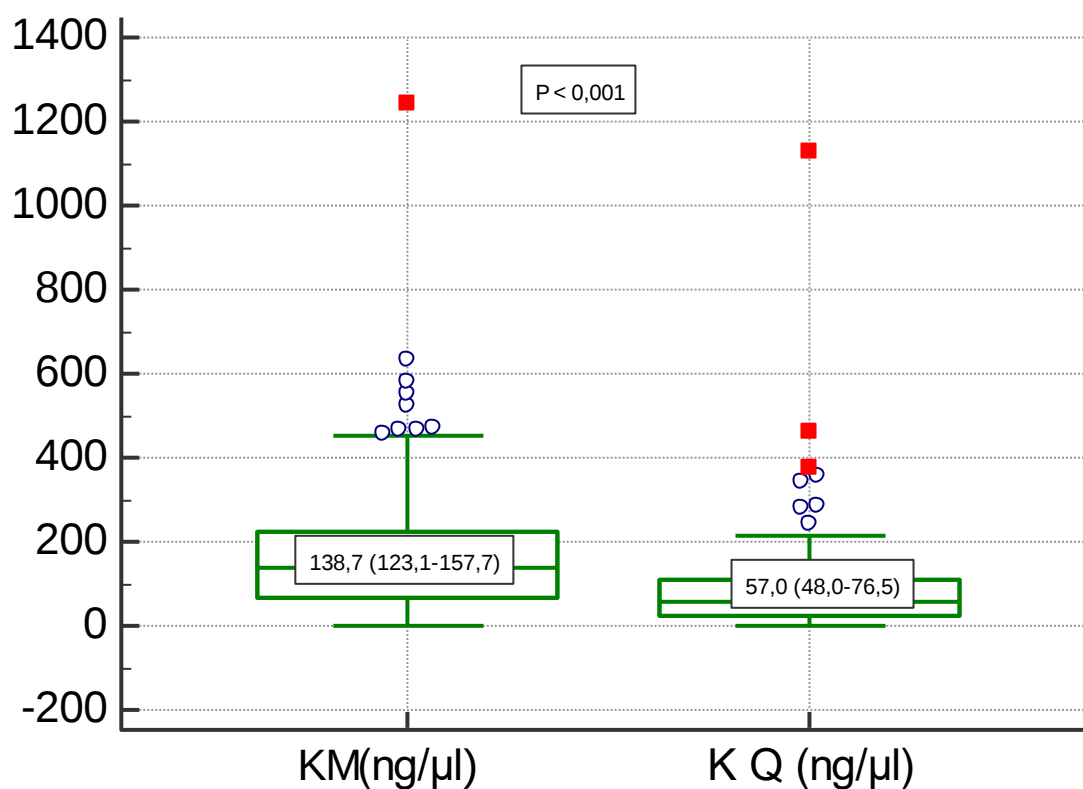


Slika 2. Usporedba broja leukocita u uzorcima korištenim za metodu po Milleru (L M) u odnosu na broj leukocita u uzorcima korištenim za izolaciju Qiagen test paketom (L Q)

4.2.2. Usporedba koncentracija DNA

Mann Whitneyevim testom pokazano je da postoji statistički značajna razlika između koncentracija DNA dobivenih metodom po Milleru u odnosu na metodu izolacije Qiagen test paketom.

Metodom po Milleru dobivene su veće koncentracije DNA nego metodom izolacije Qiagen test paketom (slika 3).

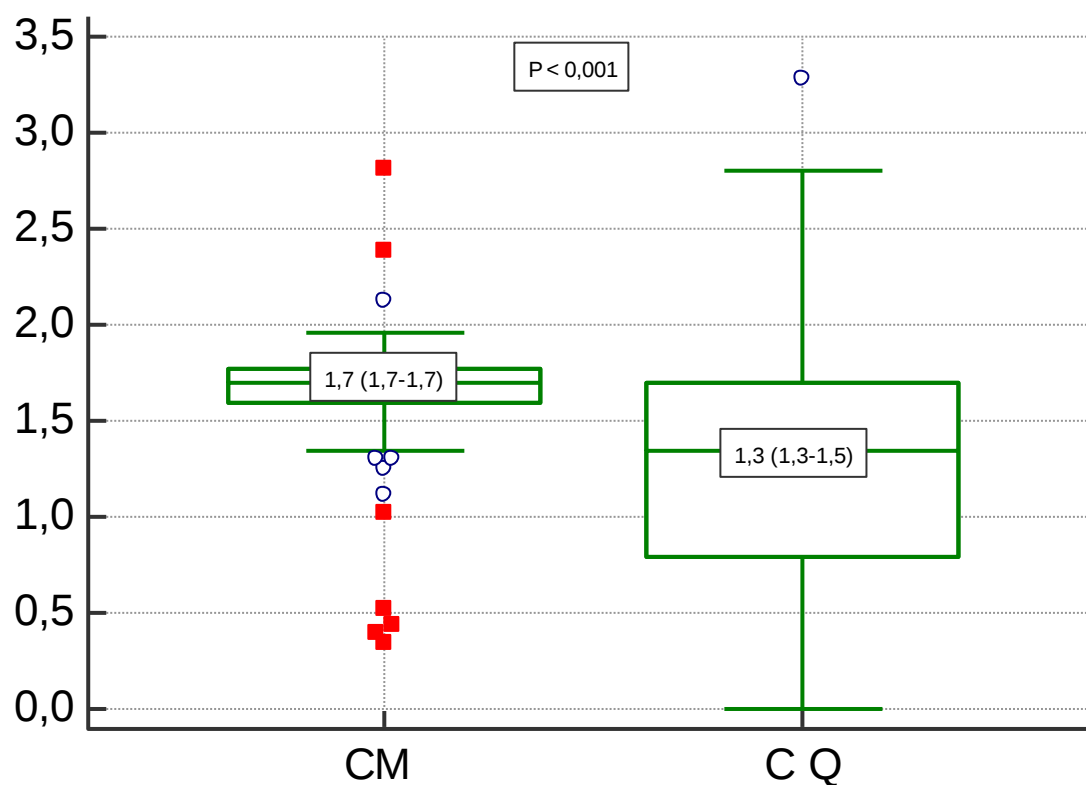


Slika 3. Usporedba vrijednosti koncentracija DNA dobivenih metodom po Milleru (K M) u odnosu na koncentracije DNA dobivene izolacijom Qiagen test paketom (K Q).

4.2.3. Usporedba čistoća DNA

Mann Whitneyevim testom pokazano je da postoji statistički značajna razlika između čistoća DNA dobivenih metodom po Milleru u odnosu na metodu izolacije Qiagen test paketom.

Metodom po Milleru dobivene su veće čistoće nego metodom izolacije Qiagen test paketom (slika 4).



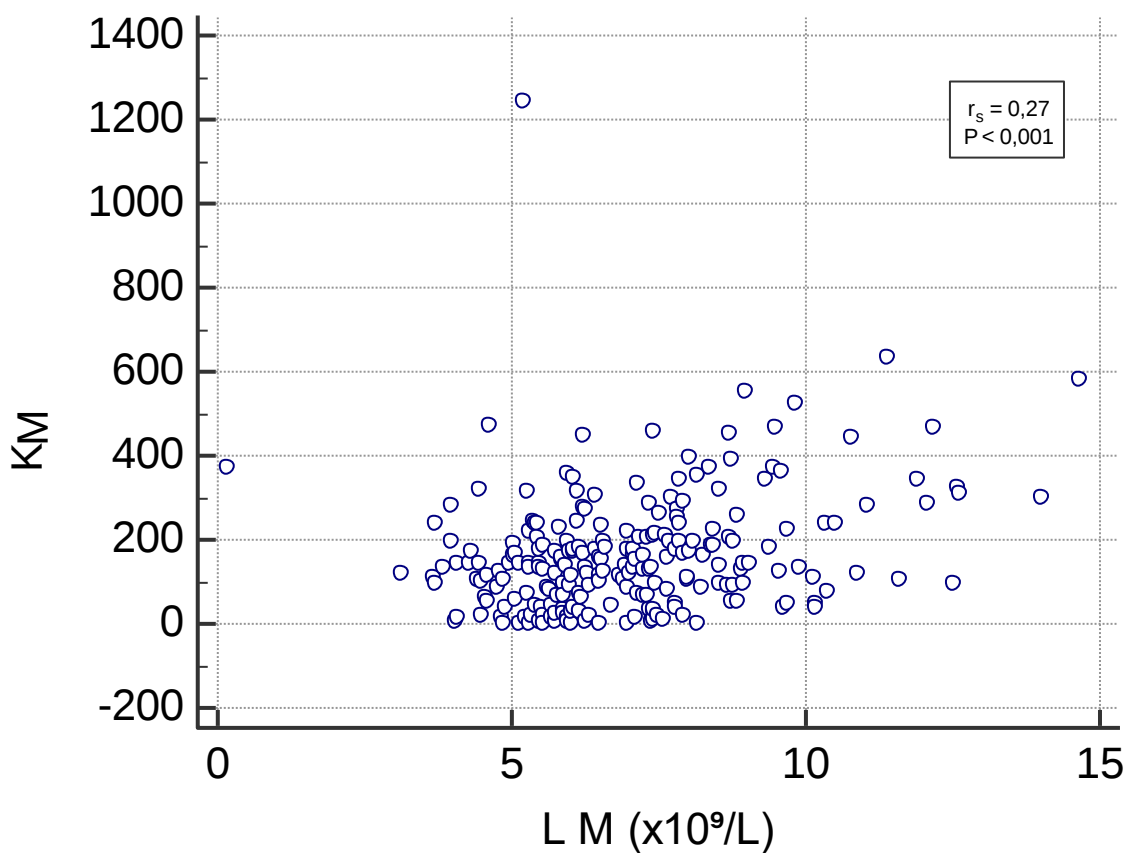
Slika 4. Usporedba čistoća DNA dobivenih metodom po Milleru (C M) u odnosu na metodu izolacije Qiagen test paketom (C Q)

4.3. Ispitivanje povezanosti koncentracije i čistoće DNA o broju leukocita

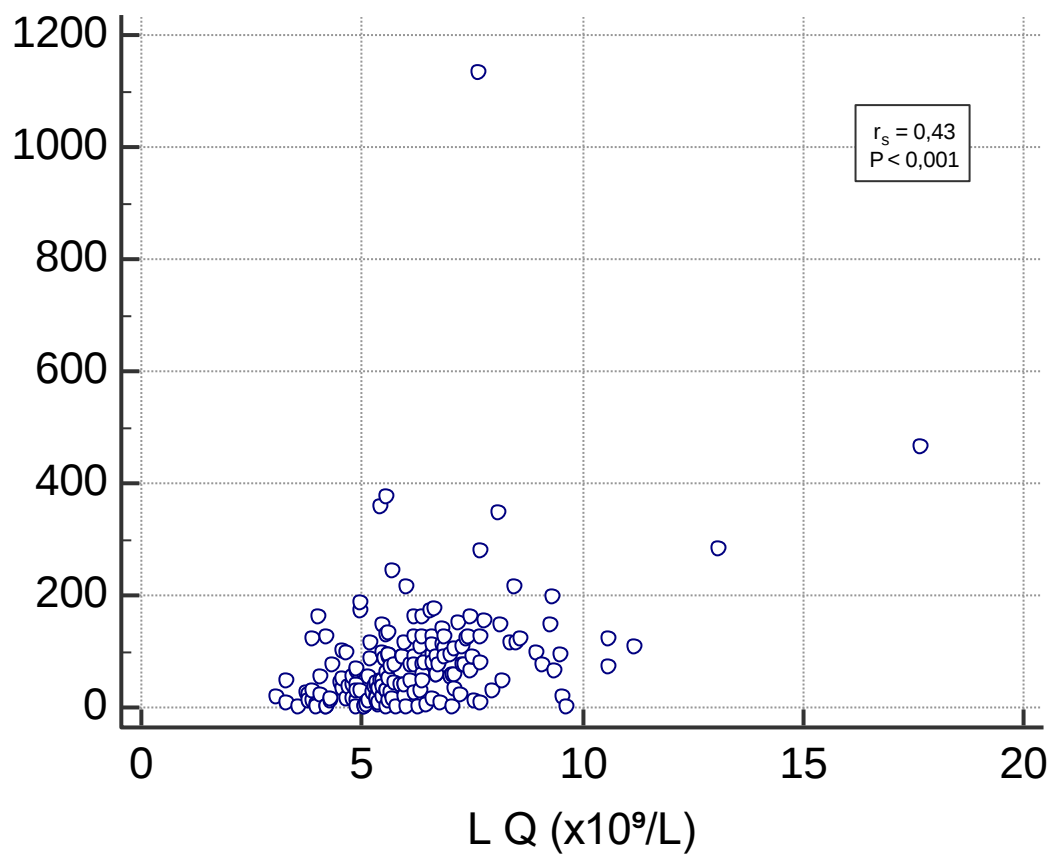
4.3.1. Povezanost koncentracije DNA i broja leukocita

Spearmanovim testom korelacije utvrđeno je da postoji slaba korelacija između broja leukocita i koncentracije DNA dobivene metodom po Milleru (slika 5).

Pokazana je slaba korelacija između broja leukocita i koncentracije DNA dobivene izolacijom pomoću Qiagen test paketa (slika 6).



Slika 5. Povezanost koncentracija DNA dobivenih metodom po Milleru (K M) i broja leukocita u uzorku (L M).



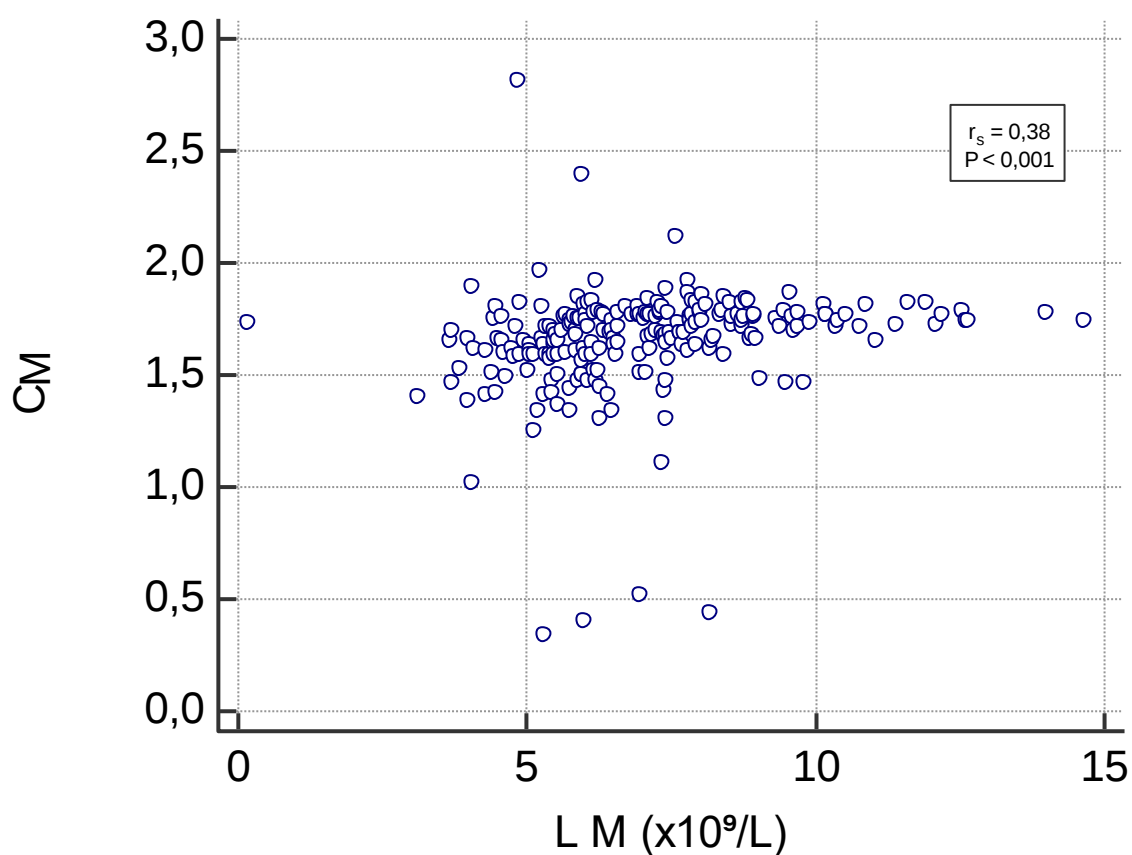
Slika 6. Povezanost koncentracija DNA dobivenih izolacijom Qiagen test paketom (K Q) i broja leukocita u uzorku (L Q).

4.3.2. Povezanost čistoće DNA i broja leukocita

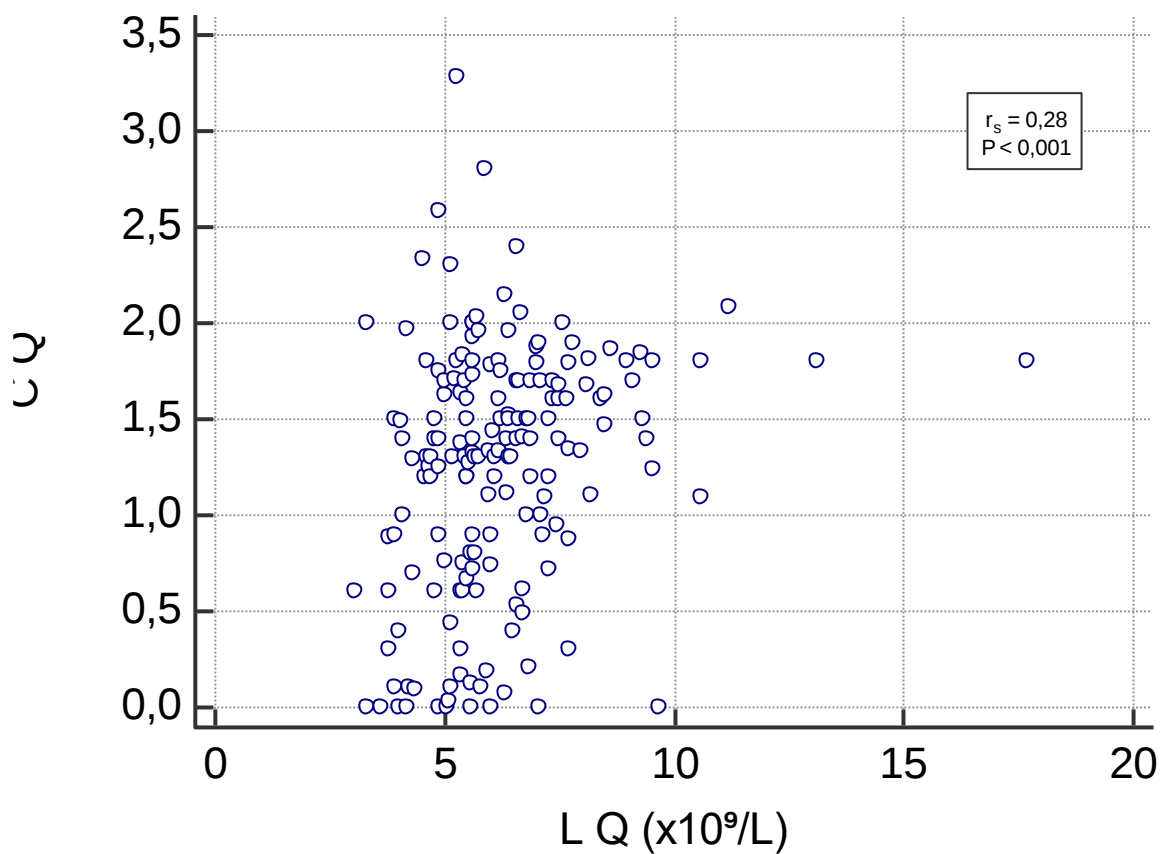
Spearmanovim testom korelacije utvrđeno je da postoji slaba korelacija između broja leukocita i čistoće DNA dobivene metodom po Milleru (slika 7).

Pokazana je slaba korelacija između broja leukocita i čistoće DNA dobivene izolacijom pomoću Qiagen test parketa (slika 8).

Metodom po Milleru je dobivena značajnija korelacija čistoće DNA s brojem leukocita nego metodom izolacije Qiagen test paketom.



Slika 7. Povezanost čistoće DNA dobivene metodom po Milleru (C M) i broja leukocita u uzorku (L M).



Slika 8. Povezanost čistoće DNA dobivene izolacijom Qiagen test paketom (C Q) i broja leukocita u uzorku (L Q).

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju istraženo je kako broj leukocita u ishodišnom uzorku utječe na koncentracije i čistoće DNA dobivenih pomoću dvije metode izoliranja: metodom po Milleru i korištenjem Qiagen FlexiGene DNA kita. S obzirom da se DNA izolira iz jezgara leukocita, očekuje se da s porastom broja leukocita u uzorku izolacijom DNA dobivamo veće koncentracije. Prilikom interpretacije rezultata treba uzeti u obzir da izolacije s dvije različite metode nisu rađene s istim uzorcima, stoga u ovom istraživanju nije moguće usporediti iskoristivost ovih metoda.

Uzorci u kojima je rađena izolacija DNA metodom po Milleru imaju veći broj leukocita ($6,6 (6,3-7,1) \times 10^9/L$) stoga i veću koncentraciju DNA ($138,7 (123,1-157,7) \text{ ng}/\mu\text{L}$) u odnosu na broj leukocita ($5,9 (5,6-6,2) \times 10^9/L$) i koncentraciju DNA ($57,0 (48,0-76,5) \text{ ng}/\mu\text{L}$) dobivenu Qiagen test paketom. Na veću koncentraciju osim broja leukocita utjecali su i volumeni krvi s kojima su izolacije rađene. Izolacija metodom po Milleru je rađena s volumenom krvi od 2,5 mL, a za izolaciju s Qiagen FlexiGene DNA kitom korišteno je 0,5 ml pune krvi. Veći volumen pune krvi podrazumijeva veći broj leukocita te veću koncentraciju DNA. Koncentracija DNA dobivena metodom po Milleru je otprilike 3 puta veća, a razlika u početnom volumenu pune krvi metodom po Milleru je 5 puta veća nego Qiagen test paketom. Izolaciju se mora raditi pažljivo, te oprezno slijediti upute i svaki korak u protokolu jer postoje brojni uzroci koji dovode do smanjene koncentracije DNA:

1. Nepotpuna liza stanica uzrokovana nedovoljno temeljitim miješanjem uzorka s lizirajućim puferom.
2. Ukoliko uzorak za analizu sadrži krvni ugrušak potrebno je odvojiti nekoaguliranu frakciju kao materijal za analizu.
3. Pogrešne brzine centrifugiranja dovode do neadekvatne stabilnosti taloga.
4. Moguće je da dodatkom etanola ili izopropanola nije vidljiv precipitat DNA. Osim malog broja leukocita, do toga dovodi neoprezno i nepotpuno miješanje s alkoholom.
5. Previše osušenu DNA je teško otopiti čime se smanjuje iskoristivost (www.qiagen.com).

Čistoće dobivene metodom po Milleru ($1,7 (1,7-1,7)$) su veće nego upotrebom Qiagen kitova ($1,3 (1,3-1,5)$). Omjer apsorbancija na 260 i 280 nm kod čiste DNA treba biti između 1,8 i 2,0. U obje metode medijan čistoća je niži od 1,8 što ukazuje na kontaminaciju

proteinima. Uzrok kontaminacije proteinima u metodi izoliranja su nedovoljno istaloženi proteini dodatkom natrijevog klorida. Izolacijom Qiagen FlexiGene DNA kitom treba osobito pripaziti da je QIAGEN proteaza pripremljena i skladištena točno prema uputama, te da je smjesa denaturacijskog pufera i QIAGEN proteaze pripremljena maksimalno 1 sat prije upotrebe. Na taj način se osigurava maksimalna digestija proteazom te osigurava dovoljna čistoća izolirane DNA. Iako je medijan čistoće izolacijom Qiagen kitom manji, raspon čistoća je širi što ukazuje da su čistoće osobito osjetljive na postupak izolacije te da je potrebno izrazito pažljivo rukovati s materijalima i paziti da ne dođe do kontaminacije.

Korelacija broja leukocita s koncentracijama DNA ($r_s=0,27$, $P<0,001$ za metodu po Milleru i $r_s=0,43$, $P<0,001$ za izolaciju FlexiGene DNA kitom) i čistoćama ($r_s=0,38$, $P<0,001$ za metodu po Milleru i $r_s=0,28$, $P<0,001$ za izolaciju FlexiGene DNA kitom) DNA je pronađena u obje metode, ali je vrlo slaba. Qiagen test paketom dobivena je značajnija korelacija između koncentracija DNA i broja leukocita nego metodom po Milleru. Ovisno o uzorku različita je manipulacija, što je moglo dovesti do različite iskoristivosti te slabljenja korelacije. Izolacija DNA je postupak koji nije automatiziran te je stoga i podložniji pogrešci. U obzir treba uzeti i pohranu uzoraka pune krvi. Zamrzavanje pune krvi na -20°C može dovesti do degradacije DNA što dovodi do smanjene koncentracije i duljine DNA.

Prednost metode po Milleru u odnosu na Qiagen FlexiGene DNA kit je niska cijena i veća koncentracija izolirane DNA. Niti u jednoj metodi se ne koriste pretjerano toksične i za okoliš i organizam opasne kemikalije, ali su reagensi korišteni u metodi po Milleru dostupniji i cijenom prihvatljiviji. Metoda po Milleru ipak ima dug i iscrpljujuć protokol koji traje nekoliko dana. Za potrebe brze izolacije prikladno je koristiti Qiagen kit jer je izolacija brza te se radi u samo jednoj epruveti.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Metodom po Milleru dobivene su veće koncentracije i čistoće u odnosu na metodu s Qiagen FlexiGene DNA kitom, ali su korišteni uzorci sa većim brojem leukocita i izolacija je rađena s većim volumenom pune krvi
- 2) Pronađena je slaba povezanost između broja leukocita i čistoća te koncentracija izolirane DNA za obje korištene metode
- 3) Povezanost broja leukocita s koncentracijom DNA je veća u slučaju izolacije DNA Qiagen komercijalnim kitom
- 4) Povezanost broja leukocita s čistoćama DNA je veća u slučaju izolacije DNA metodom po Milleru

7. LITERATURA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular Biology of the Cell, 4th edition, Garland Science, New York, 2002., preuzeto s www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/, pristupljeno 2.5.2018.

Burtis C.A, Ashwood E.R, Bruns D.E: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 5th Edition, Elsevier Inc, Missouri, 2012., str. 145-152.

Chacon-Cortes D, Griffiths LR: Methods from extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives, Journal of Biorepository Science for Applied Medicine, 2014., str. 1-4.

Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B: Medicinsko-biokemijske smjernice, Medicinska naklada, Zagreb, 2004., str. 253.

Čvorišćec D, Čepelak I: Štrausova medicinska biokemija, Zagreb, Medicinska naklada, 2009., str. 622-623.

Dahm R: Developmental Biology, Elsevier Inc, 2005., str. 277.

Dean L: Blood Groups and Red Cell Antigens, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, 2005.

DeNovix ds-11 User Guide, 2018, dohvaćeno iz www.denovix.com, pristupljeno 13.4.2018.

Elkins M K: DNA Extraction, Forensic DNA Biology, 2013., str. 1.

Encyclopedia: DNA isolation method, 2016., dohvaćeno iz www.encyclopedia.com/science-and-technology/biology-and-genetics/genetics-and-genetic-engineering/dna-isolation-methods, pristupljeno 10.4.2018.

Gajera H P, Patel S V, Golakiya B A: Fundamentals of Biochemistry: A textbook, International Book Distributing CO., Lucknow, 2008., str. 115.

Harris Q C: Quantitative Chemical Analysis, 8th Edition, W.H.Freeman and Company, 2010, str. 396.

Nikolac N, Šupak Smolčić V, Šimundić A-M, Čelap I: Hrvatsko Društvo Medicinske Biokemije i Laboratorijske Medicine: Nacionalne preporuke za uzorkovanje venske krvi, HDMBLM, Zagreb, 2014., str. 17.

National Institute of Justice, DNA Evidence Basics: Types of Samples Suitable for DNA Testing, dohvaćeno iz www.nij.gov/topics/forensics/evidence/dna/basics/pages/types-of-samples.aspx, pristupljeno 29.5.2018.

Pećina-Šlaus N: Odabrane metode molekularne biologije, Medicinska naklada, Zagreb, 2009, str. 1-19.

PubChem: Sodium Lauryl Sulfate, dohvaćeno iz pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium_dodecyl_sulfate#section=Information-Sources, pristupljeno 23.4.2018.

Qiagen, FlexiGene DNA Handbook, 2010.

Stryer L: Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 497-499.

United States Environmental Protection Agency: Chlorophorm 67-66-3, dohvaćeno iz www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/chloroform.pdf, pristupljeno 29.5.2018.

United States Environmental Protection Agency: Phenol 108-95-2, dohvaćeno iz www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/phenol.pdf, pristupljeno 29.5.2018.

Worthington Biochemical Corporation: Proteinase K, dohvaćeno iz www.worthington-biochem.com/PROK/, pristupljeno 29.5.2018.

8. SAŽETAK/ SUMMARY

8.1. Sažetak

Izolacija DNA je ključni korak koji prethodi brojnim analizama u molekularnoj dijagnostici. Izolacija DNA iz leukocita izoliranjem (po Milleru ili Qiagen test paketom) temelji se na odvajanju staničnih proteina povećanjem koncentracije soli i centrifugiranjem, nakon čega se DNA taloži apsolutnim etanolom. Cilj istraživanja je ispitati utjecaj broja leukocita na koncentraciju i čistoću izolirane DNA.

Broj leukocita određen je neposredno nakon uzorkovanja na hematološkom brojaču. Uzorci pune krvi pomiješani s antikoagulansom EDTA su pohranjeni na -20°C do izolacije DNA. DNA je izolirana metodom po Milleru (N=227; 92 zdrava ispitanika i 135 ispitanika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti) i primjenom komercijalnog kita tvrtke Qiagen (N=173; 98 zdravih ispitanika i 75 ispitanika na hemodijalizi). Apsorbancije na 280 i 260 nm izmjerene su na DeNovix DS-11 spektrofotometru visoke osjetljivosti. Statistička analiza provedena je korištenjem MedCalc statističkog programa.

Millerovom metodom izolacije u odnosu na Qiagen test paket dobivene su veće koncentracije DNA [138,6 (123,1-151,7) vs 57,0 (48,0-76,5) ng/ μL ; $P<0,001$] i čistoće [1,7 (1,7-1,7) vs 1,3 (1,3-1,5); $P<0,001$]. Broj leukocita se značajno razlikovao u uzorcima korištenim za dvije različite metode izolacije. Pronađena je slaba korelacija između broja leukocita i koncentracije DNA ($r_s=0,27$; $P<0,001$ i $r_s=0,43$; $P<0,001$) i između broja leukocita i čistoće DNA ($r_s=0,38$; $P<0,001$ i $r_s=0,28$; $P<0,001$).

Ovisno o korištenoj metodi broj leukocita je utjecao na koncentraciju i čistoću izolirane DNA, međutim uočena korelacija iako značajna je vrlo slaba. Svakako treba uzeti u obzir da su uzorci prije izolacije zamrznuti, što je moglo utjecati na dobivene rezultate.

8.2. Summary

Isolation of DNA is a key step that precede various analysis in molecular diagnostics. Extracting DNA from leukocytes by salting out method (by Miller or with Qiagen purification kit) is based on increasing salt concentration which separates proteins and cellular debris from the DNA fraction. After centrifugation of the mixture, DNA molecules are precipitated by absolute ethanol. Purpose of this research is to examine the impact of number of leukocytes on concentration and purity of isolated DNA.

Number of leukocytes was determined on automated hematology analyser immediately after sampling of blood. Whole blood samples taken on anticoagulant EDTA were stored on -20 °C until DNA extraction. DNA was isolated by Miller method (N=227; 92 healthy subjects and 135 subjects with chronic obstructive pulmonary disease) and Qiagen commercial kit (N=173; 98 healthy subjects and 75 patients undertaking hemodialysis). Absorbances at 260 and 280 were measured on DeNovix DS-11 highly sensitive spectrophotometer. Statistic analysis was done by MedCalc statistic program.

Higher DNA concentrations were isolated by Miller method compared to the Qiagen commercial kit method [138.6 (123.1-151.7) vs 57.0 (48.0-76.5) ng/μL; $P < 0.001$ and purity [1.7 (1.7-1.7) vs 1.3 (1.3-1.5); $P < 0.001$]. Number of leukocytes in samples used for two methods of isolation was significantly different. We observe weak correlation between number of leukocytes and DNA concentration ($r_s = 0.27$; $P < 0.001$ and $r_s = 0.43$; $P < 0.001$) and between number of leukocytes and DNA purity ($r_s = 0.38$; $P < 0.001$ and $r_s = 0.27$; $P < 0.001$).

Depending on method, number of leukocytes showed significant but weak impact on extracted DNA concentration and purity. However, it is very important to know that before isolation all samples were frozen, which could have an effect on the obtained results.

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)

SDS – natrij duodecil sulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)

TWEEN - polioksietilensorbitan monolaurat (engl. polyoxyethylene sorbitan monolaurate)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. polymerase chain reaction)

UV-VIS – ultra ljubičasti – vidljivi spektar

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj broja leukocita na koncentraciju i čistoću izolirane DNA

Melani Đuraković

SAŽETAK

Izolacija DNA je ključni korak koji prethodi brojnim analizama u molekularnoj dijagnostici. Izolacija DNA iz leukocita izoliranjem (po Milleru ili Qiagen test paketom) temelji se na odvajanju staničnih proteina povećanjem koncentracije soli i centrifugiranjem, nakon čega se DNA taloži apsolutnim etanolom. Cilj istraživanja je ispitati utjecaj broja leukocita na koncentraciju i čistoću izolirane DNA.

Broj leukocita određen je neposredno nakon uzorkovanja na hematološkom brojaču. Uzorci pune krvi pomiješani s antikoagulansom EDTA su pohranjeni na -20°C do izolacije DNA. DNA je izolirana metodom po Milleru ($N=227$; 92 zdrava ispitanika i 135 ispitanika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti) i primjenom komercijalnog kita tvrtke Qiagen ($N=173$; 98 zdravih ispitanika i 75 ispitanika na hemodijalizi). Apsorbancije na 280 i 260 nm izmjerene su na DeNovix DS-11 spektrofotometru visoke osjetljivosti. Statistička analiza provedena je korištenjem MedCalc statističkog programa.

Millerovom metodom izolacije u odnosu na Qiagen test paket dobivene su veće koncentracije DNA [$138,6$ ($123,1-151,7$) vs $57,0$ ($48,0-76,5$) $\text{ng}/\mu\text{L}$; $P<0,001$] i čistoće [$1,7$ ($1,7-1,7$) vs $1,3$ ($1,3-1,5$); $P<0,001$]. Broj leukocita se značajno razlikovao u uzorcima korištenim za dvije različite metode izolacije. Pronađena je slaba korelacija između broja leukocita i koncentracije DNA ($r_s=0,27$; $P<0,001$ i $r_s=0,43$; $P<0,001$) i između broja leukocita i čistoće DNA ($r_s=0,38$; $P<0,001$ i $r_s=0,27$; $P<0,001$).

Ovisno o korištenoj metodi broj leukocita je utjecao na koncentraciju i čistoću izolirane DNA, međutim uočena korelacija iako značajna je vrlo slaba. Svakako treba uzeti u obzir da su uzorci prije izolacije zamrznuti, što je moglo utjecati na dobivene rezultate.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 31 stranicu, 7 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Izolacija DNA, metoda po Milleru, DNA, broj leukocita, Qiagen FlexiGene DNA kit, čistoća DNA, koncentracija DNA

Mentor: **Doc. dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Doc.dr.sc. Marija Grdić Rajković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Doc. dr. sc. Petra Turčić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Dr. Sc. Andrea Hulina, *viši asistent, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: lipanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The impact of number of leukocytes on concentration and purity of isolated DNA

Melani Đuraković

SUMMARY

Isolation of DNA is a key step that precede various analysis in molecular diagnostics. Extracting DNA from leukocytes by salting out method (by Miller or with Qiagen purification kit) is based on increasing salt concentration which separates proteins and cellular debris from the DNA fraction. After centrifugation of the mixture, DNA molecules are precipitated by absolute ethanol. Purpose of this research is to examine the impact of number of leukocytes on concentration and purity of isolated DNA.

Number of leukocytes was determined on automated hematology analyser immediately after sampling of blood. Whole blood samples taken on anticoagulant EDTA were stored on -20 °C until DNA extraction. DNA was isolated by Miller method (N=227; 92 healthy subjects and 135 subjects with chronic obstructive pulmonary disease) and Qiagen commercial kit (N=173; 98 healthy subjects and 75 patients undertaking hemodialysis). Absorbances at 260 and 280 were measured on DeNovix DS-11 highly sensitive spectrophotometer. Statistic analysis was done by MedCalc statistic program.

Higher DNA concentrations were isolated by Miller method compared to the Qiagen commercial kit method [138.6 (123.1-151.7) vs 57.0 (48.0-76.5) ng/μL; $P < 0.001$ and purity [1.7 (1.7-1.7) vs 1.3 (1.3-1.5); $P < 0.001$]. Number of leukocytes in samples used for two methods of isolation was significantly different. We observe weak correlation between number of leukocytes and DNA concentration ($r_s = 0.27$; $P < 0.001$ and $r_s = 0.43$; $P < 0.001$) and between number of leukocytes and DNA purity ($r_s = 0.38$; $P < 0.001$ and $r_s = 0.27$; $P < 0.001$).

Depending on method, number of leukocytes showed significant but weak impact on extracted DNA concentration and purity. However, it is very important to know that before isolation all samples were frozen, which could have an effect on the obtained results.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 31 pages, 7 figures, 1 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: DNA isolation, Miller method, DNA yield, DNA purity, DNA, number of leukocytes, Qiagen FlexiGene DNA kit

Mentor: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Petra Turčić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Andrea Hulina, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2018.