

# DETEKCE LEIDENSKÉ MUTACE

*Toto praktikum využívá prvky přístupu PBL (problem based learning).*

*problém: "Leidenská mutace" - ze všech úhlů pohledu*

*(molekulární podstata, fyziologie hemostázy, patofyziologie, klinický význam a diagnostika)*

Leidenská mutace je autozomálně intermediárně (neúplná dominance) dědičná jednobodová mutace v genu pro hemokoagulační faktor V. Jde o nejběžnější genetickou příčinu trombofilie (zvýšené krevní srážlivosti) v evropské populaci. Tato mutace byla objevena v roce 1993 (publikováno r. 1994) a pojmenována podle místa objevu – město Leiden v Nizozemsku.

## Molekulární podstata

Na molekulární úrovni se jedná o jednonukleotidový polymorfismus, SNP (z anglického *Single Nucleotide Polymorphism*) označovaný v databázích rs6025. Písmeno představuje laboratoř nebo výzkumný tým, který daný SNP objevil, číslo pak pořadí objevu v rámci příslušného týmu. Jde o substituci G1691A, tedy záměnu G (guanin) za A (adenin) na pozici 1691 v kódující oblasti genu pro faktor V. Gen pro faktor V je lokalizován na dlouhém raménku prvního chromozomu (locus q23), celková délka tohoto genu je 80 kb. Gen obsahuje celkem 25 exonů, přičemž Leidenská mutace (také označovaná jako faktor V Leiden) se nachází na exonu číslo 10.

```
ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAGGCAGGAACAACACCATGATCAGAGCAG
TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCAG
GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT
```

*Obr. 1 Část nukleotidové sekvence genu pro faktor V. Barevně označen exon 10.*

Následkem této mutace/substituce/polymorfismu/záměny v genu je změna primární struktury produkovaného proteinu hemokoagulačního faktoru V (jde o kofaktor, bez proteolytické funkce). Na pozici 506 dochází k záměně aminokyseliny argininu za glutamin. Podle změny genetické informace se jedná o nesynonymní SNP typu missense. To znamená, že kodon se zaměnou bází kóduje jinou aminokyselinu a může tak být změněná funkce proteinu.

**FV wild type** CTG GAC AGG C**GA** GGA ATA CAG AGG GCA  
 Leu-Asp-Arg-**Arg**-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

**FV Leiden** CTG GAC AGG C**AA** GGA ATA CAG AGG GCA  
 Leu-Asp-Arg-**Gln**-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

**Arg 506 Gln      G 1691 A**

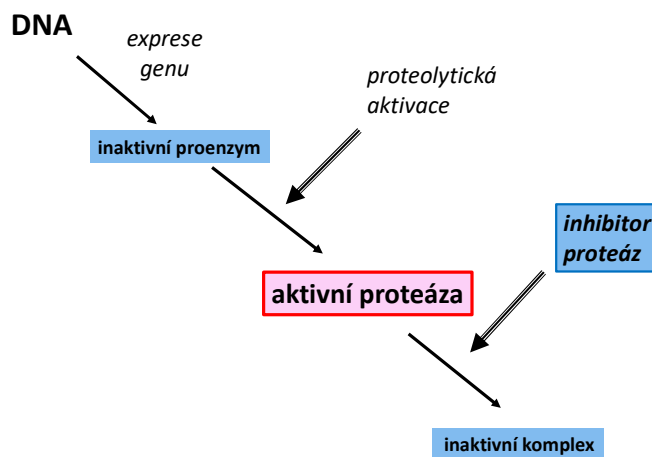
Obr. 2 Část nukleotidové a aminokyselinové sekvence zdravého (wild type) a mutovaného genu. Zdůrazněna záměna nukleotidu a aminokyseliny.

## Hemostáza

Hemostáza (zástava krvácení) je životně důležitý děj chránící organismus před nadměrnou ztrátou krve při porušení vaskulární integrity (porušení kontinuity krevního řečiště). Na zástavě krvácení se podílejí tyto mechanismy: reakce cév (vazokonstrikce), činnost krevních destiček (aktivace a jejich nahromadění v místě poranění) a srážení krve tzv. hemokoagulace. Tyto procesy vedou ke vzniku krevní sraženiny (trombu).

*Rozlišujte trombus a koagulum: trombus je intravitálně a intravazálně vzniklá krevní sraženina, zatímco koagulum je krevní sraženina vzniklá extravazálně nebo posmrtně.*

Samotná **hemokoagulace** je kaskáda enzymových reakcí vedoucí k přeměně fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Tento proces vyžaduje souhru mnoha koagulačních faktorů, fosfolipidů a vápenatých iontů. Koagulační faktory jsou označovány názvem a římskou číslicí, která má pouze historický charakter, to znamená, že neudává posloupnost reakcí. Koagulační faktory mají většinou charakter proteolytických enzymů (F II, VII, IX, X, XI, XII, prekalikrein), podle mechanismu účinku jde o tzv. serinové proteázy. Jsou syntetizovány v játrech ve formě inaktivních proenzymů (zymogenů), které se postupně (kaskádovitě) vzájemně aktivují. Aktivace jednotlivých proenzymů na aktivní enzymy spočívá v jejich proteolytickém štěpení enzymem aktivovaným v předchozí reakci.



Obr. 3 Zjednodušené schéma exprese, aktivace a inhibice proteolytického enzymu

Dále existují přídatné faktory urychlující aktivaci zymogenů (FIII, V, VIII...). Pro úspěšné zapojení koagulačních faktorů II, VII, IX, X a antikoagulačních faktorů - proteinu C a S nestačí pouze proteolýza. Podstupují nejprve posttranslační úpravu (jde o karboxylaci 10 – 12 zbytků kyseliny glutamové na  $\gamma$  uhlíku), která bezpodmínečně vyžaduje vitamín K. Smyslem této posttranslační úpravy je zvýšení schopnosti reagovat s ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a připoutat koagulační faktor k fosfolipidové membráně. Nedojde-li ke karboxylaci, je afinita faktoru k membráně nízká, což se projeví poruchou srážlivosti.

Koagulační děje se rozdělují do dvou systémů: vnitřního a zevního/vnějšího, které však na sobě nejsou nezávislé a společně směřují k aktivaci faktoru X. Ve vnitřním systému (všechny prokoagulační faktory jsou v krvi) je aktivován faktor XII (tzv. Hagemanův faktor) kontaktem s negativně nabitým povrchem (kolagen, fosfolipidy destiček) poškozené cévy. Za spolupůsobení vápenatých iontů se postupně aktivují faktory IX (tzv. Christmasův faktor), VIII (tzv. antihemofilní faktor) a X (tzv. Stuart-Prowerův faktor). Zevní systém začíná uvolněním faktoru III – tkáňového tromboplastinu. Faktor III spolu s uvolněnými membránovými fosfolipidy z buněk, faktorem VII (tzv. prokonvertin) a vápenatými ionty vede k aktivaci faktoru X. Pro oba systémy pak pokračuje společná cesta. Aktivovaný faktor Xa, vápenaté ionty, destičkové fosfolipidy, aktivovaný faktor Va (tzv. proakcelerin) a neaktivní protrombin (faktor II) vytvoří protrombinázový komplex. Pak může dojít k aktivaci protrombinu na trombin. Trombin je serinová proteáza, která odštěpuje z fibrinogenu dva fibrinopeptidy. Tím je umožněna spontánní polymerace fibrin-monomerů nekovalentními vazbami. Pak zasáhne fibrin stabilizující faktor (faktor XIIIa), který stabilizuje za přítomnosti vápenatých iontů nově vzniklý fibrin-polymer. Nerozpustný fibrin vytvoří společně s destičkami sraženinu, zátku uzavírající ránu.

Hemokoagulace je mnohastupňově regulovaný proces, protože spontánní srážení krve v cirkulaci může mít fatální následky. Proto v krvi koluje společně s koagulačními faktory i několik inhibitorů koagulačních faktorů. Tyto inhibitory se řadí mezi serpiny (serin proteázové inhibitory). Patří sem hlavně antitrombin, protein C (PC), protein S a na endotel vázaný trombomodulin.

Přesto k hemokoagulaci dochází i v nenarušeném žilním systému, pokud zde dojde ke stáze krve. V tomto případě jde o patologický proces vedoucí k tromboembolismu (bližší vysvětleno v kapitole Klinický význam). Přispívá k tomu i nefunkčnost nebo nedostatek přirozených inhibitorů koagulace často jako následek genetické poruchy (např. FV Leiden).

Dalším, časově vzdálenějším mechanismem navazujícím na zástavu krvácení je **fibrinolýza** (odstranění trombu) a aktivace fibroblastů a hladkých svalových buněk. Výsledkem je zahojení poraněné tkáně.

Primární fibrinolýza je přirozený fyziologický proces, jehož cílem je odstranit ze zhojené cévy již nepotřebný trombus. Fibrin (v menší míře také fibrinogen), je štěpen plasminem na rozpustné fibrinové štěpy. Plasmin (dříve nazývaný fibrinolyzin) je aktivní forma bílkoviny plasminogenu. Jde o serinovou proteázu. Aktivaci plasminogenu na plasmin způsobuje účinný enzym, tkáňový aktivátor plasminogenu (tissue plasminogen activator, t-pA). Naopak rychlou degradaci plasminu způsobuje  $\alpha_2$ -antiplasmin, plazmatický protein, který s ním vytváří nevratný inaktivní komplex.

Při štěpení fibrinu se do krve uvolňují produkty této degradace. Jde o dva propojené D fragmenty proteinu fibrinu, které se nazývají **D-dimery**. Jejich stanovení našlo uplatnění v klinické praxi při diagnostice trombózy a embolií. Vzhledem k faktu, že vznik sraženiny i její odbourávání jsou fyziologické děje, nemůžeme jednoduše spojit zvýšenou hladinu D-dimerů s nějakým onemocněním. Avšak jsou-li D-dimery negativní, můžeme vyloučit přítomnost jakékoliv sraženiny v krevním řečišti (tím pádem lze vyloučit i diagnózu trombózy nebo

embolie). Jedná se o relativně levný, rychlý a především pacienta nezatěžující test a proto je využíván v klinické praxi k prvnímu rozřídění pacientů s podezřením např. na plicní embolii. Pomocí testu může lékař rozdělit pacienty na zdravé, které již není třeba dále vyšetřovat a na ty, u nichž je třeba chorobu dále prokázat či vyloučit pomocí dalších metod.

Sekundární fibrinolýza (častěji označovaná jako trombolýza) je poměrně nebezpečný avšak nezřídka život zachraňující lékařský výkon, využívaný dnes především u masivní plicní embolie. Do krevního oběhu pacienta jsou podávány preparáty s fibrinolytickou aktivitou (altepláza, streptokináza atd.) za účelem rozpustit sraženinu uzavírající tepnu a obnovit tak krevní oběh za ní. Hlavním rizikem může být závažné krvácení, znemožňující navíc případné chirurgické řešení situace, která si podání trombolýzy vyžádala.

Bezchybný vznik koagula omezeného v konkrétním místě a čase je podmíněn správnou interakcí mnoha specifických látek. Některé působí ve smyslu posílení a zrychlení srážení krve, jiné mají za úkol mechanismus srážení krve brzdit. Úkolem tohoto složitého systému je zajistit dynamickou rovnováhu, která nejen že zastaví krvácení v případě poranění, ale na druhé straně i zabrání nekontrolovatelnému srážení krve, které by v konečném důsledku uzavřelo cévní řečiště.

### **Patofyziologie Leidenské mutace**

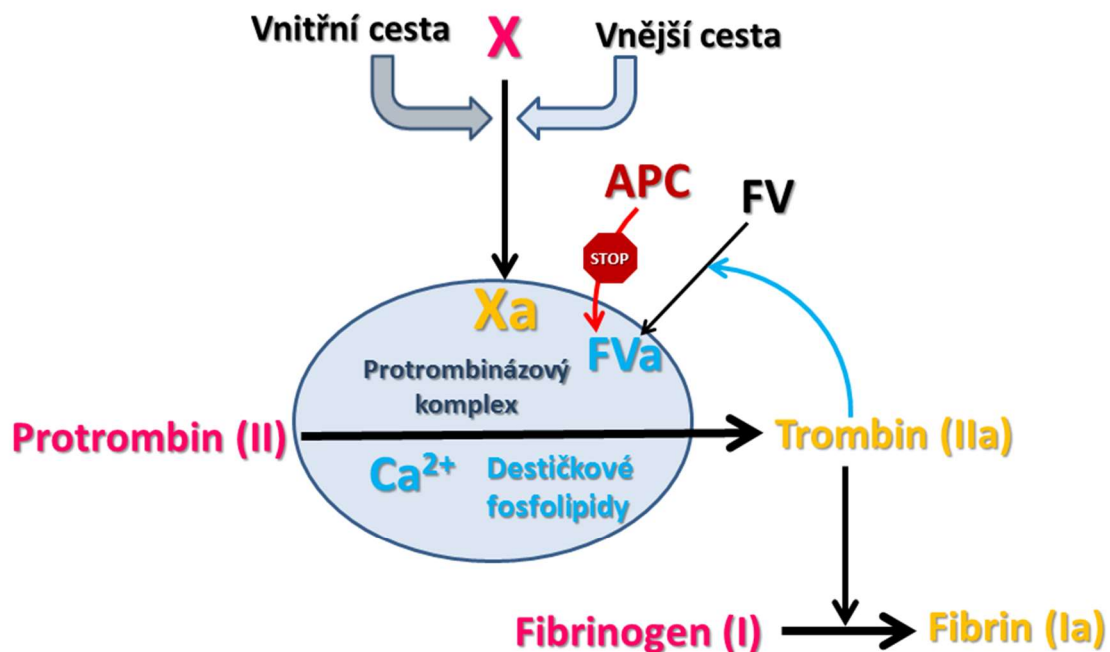
**Faktor V (FV)** je glykoprotein, koagulační faktor, nazývaný také proakcelerin nebo labilní faktor. Na rozdíl od většiny koagulačních faktorů nemá enzymatickou aktivitu, funguje jako kofaktor. FV je aktivován trombinem na FVa. Při aktivaci se rozštěpí na dva řetězce, které jsou spojeny prostřednictvím vápenatých iontů viz obr.5. FVa se váže na specifické receptory na membráně destiček a společně s faktorem Xa a protrombinem tvoří protrombinázový komplex. Protrombin je následně štěpen aktivovaným faktorem Xa na trombin. Role FVa je tedy na straně prokoagulačních faktorů. Mohlo by se zdát, že důsledkem mutace faktoru V, který má prokoagulační účinky, by mělo být snížení účinnosti koagulačního systému. Záměna 1 aminokyseliny ve struktuře proteinu FV Leiden oproti FV wild type nemá kupodivu žádný vliv na jeho prokoagulační aktivitu. Trombofilie spojovaná s Leidenskou mutací je podmíněná změnou v jeho odbourávání.

Aktivovaný faktor Va je inaktivován aktivovaným proteinem C (APC), což omezuje jeho působení v koagulaci. APC se váže na FVa v místě tří různých argininových zbytků a proteolytickým štěpením způsobí jeho inaktivaci.

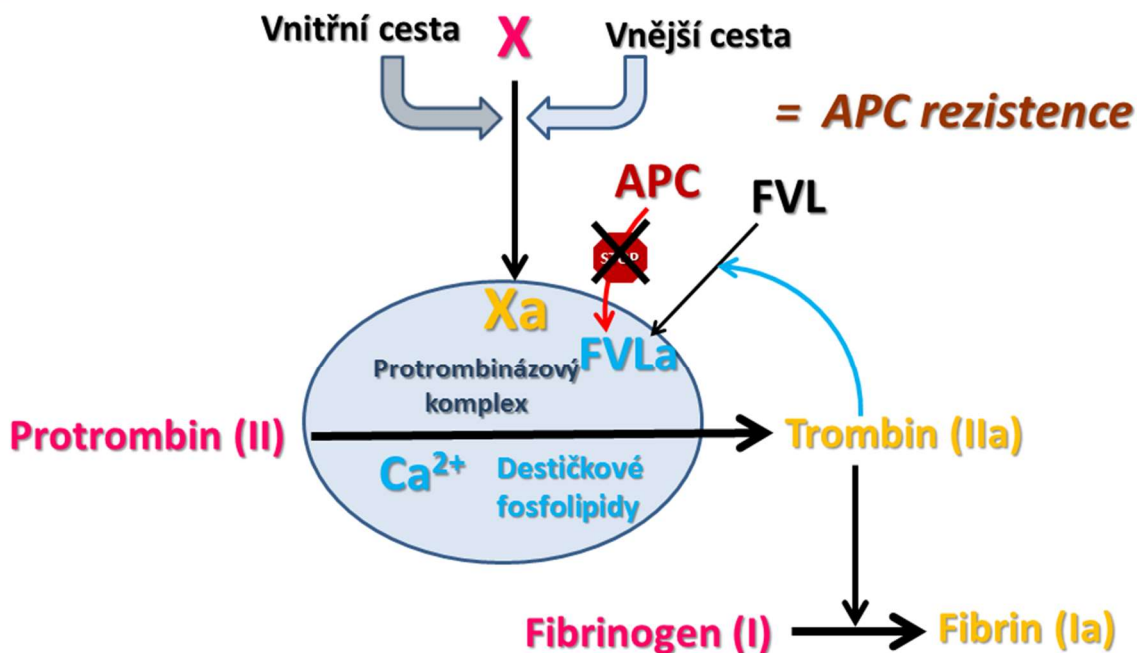
Leidenská mutace faktoru V způsobuje záměnu aminokyseliny argininu za glutamin na 506 pozici FV, kde se nachází jedno vazebné místo pro APC. Ten se na FV obtížněji váže. Výsledkem je perzistence (prodloužení doby trvání) aktivity FVa. Tento trombofilní stav je výsledkem prodloužení doby působení FVa.

Leidenská mutace je také někdy popisována jako APC rezistence - rezistence aktivovaného faktoru Va k antikoagulační aktivitě aktivovaného proteinu C (APC). APC je potřebný pro inaktivaci faktoru Va a VIIIa, a je jedním ze základních fyziologických inhibitorů koagulace. Tyto inhibitory se řadí mezi serpiny (serin proteázové inhibitory). Patří sem hlavně antitrombin, protein C (PC), protein S a na endotel vázaný trombomodulin.

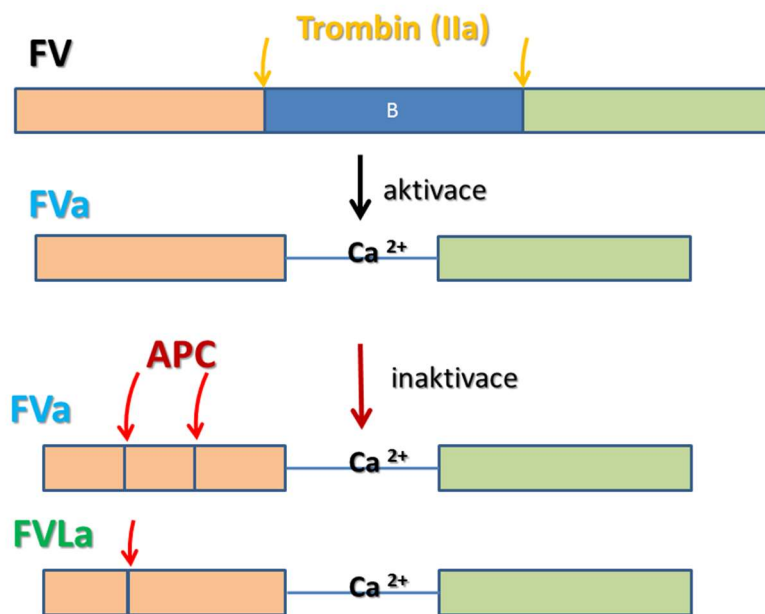
## Koagulační kaskáda



## Koagulační kaskáda - Faktor V Leiden



Obr. 4 Zjednodušené schéma hemokoagulační kaskády s důrazem na vztah k APC

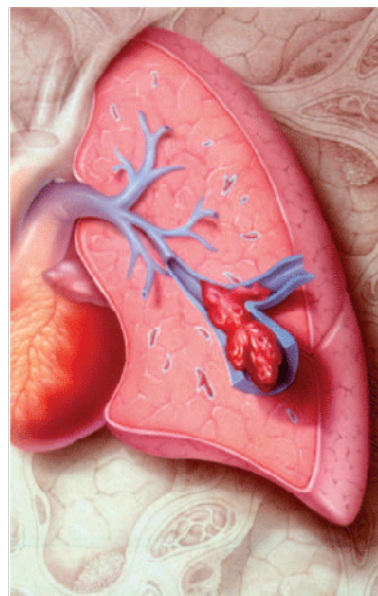


Obr. 5 Faktor V (FV)

### Klinický význam

Leidenská mutace vykazuje zajímavou závislost na rase a zeměpisné lokalizaci. V České republice se homozygoti pro faktor V Leiden vyskytují 1 na 5000 obyvatel, heterozygoti tvoří cca 5% populace. Nejvyšší výskyt mutace FV Leiden byl detekován ve Švédsku, naopak v asijských či afrických populacích se jedná o velmi vzácnou mutaci. Vysvětluje se to tím, že mutace vznikla v Kavkazské populaci asi před 20 až 34 tisíci lety. Mutace faktor V Leiden (a další trombofilní mutace) se udržely v populaci dlouhou dobu, musely být tedy z hlediska evoluce výhodné. Trombofilní mutace vedou k rychlejší zástavě krvácení, např. při boji, lovu nebo po porodu, což zvyšuje pravděpodobnost přežití jejich nositele. To, co však bylo výhodné kdysi, se dnes stává přítěží. Homozygoti pro faktor V Leiden mají asi 80× vyšší riziko vzniku hluboké žilní trombózy. U heterozygotů je riziko asi 8× vyšší bez jiného rizikového faktoru a 30× vyšší při kombinaci s kombinovanou hormonální antikoncepcí nebo hormonální substitucí.

**Hluboká žilní trombóza** je vznik krevní sraženiny (trombu) v hlubokém žilním systému. Sraženina vede k obstrukci, tj. omezení toku krve žilou. Hluboká žilní trombóza postihuje převážně hluboké distální žíly bérce, výjimkou nejsou ani popliteální žíly či femorální žíly až k vena iliaca. Utržením trombu a jeho průchodem přes pravou síň a komoru do plicnice vzniká nejzávažnější komplikace - **plicní embolie**. Jde o život ohrožující stav vzniklý obstrukcí a. pulmonalis nebo jejích větví. Trombóza povrchových žil, která je většinou doprovázena zánětem (tromboflebitida) ke vzniku plicní embolie nevede.



Obr. 6 Plicní embolie

Za normálních okolností je v organismu rovnováha mezi vznikem a rozpuštěním trombu. V patogenezi trombózy se uplatňují rizikové faktory označované jako **Virchowova trias**. Jsou to: **1. změny hemodynamiky** – zpomalený tok krve tzv. venostáza. Příčinou může být dlouhodobé upoutání pacienta na lůžko, imobilizace končetiny, dlouhé cestování s omezeným pohybem. **2. poškození stěny cévy** např. během chirurgické operace, dále úrazem, zánětem, arteriosklerózou. **3. trombofilní stavy** např. mutace genů koagulačních faktorů (Leidenská mutace faktoru V) nebo stavy získané během života například nádorovým bujením. I u pacientů se zvýšeným rizikem vzniku trombu je k jeho tvorbě nutný nějaký spouštěč např. infekce, úraz, dehydratace, kouření, hormonální změny, nádorová onemocnění.

### Prevence a monitorace léčby

U trombofilních stavů existuje reálné riziko opakování hluboké žilní trombózy, u žen jsou vyšší rizika porodnických komplikací vedoucí k potratům či předčasným porodům. Ženy s trombofilií by také neměly užívat hormonální antikoncepci, protože estrogeny zvyšují sklon ke srážení krve i u zdravých žen. U trombofilních stavů by měla být zajištěna prevence specialistou hematologem zvláště před plánovanými operačními výkony, dlouhodobými lety, v těhotenství, období kolem porodu a šestinedělí. V některých případech je nutná prevence v průběhu celého života.

Prevence spočívá v podávání antikoagulancií, tedy léčiv snižujících srážlivost krve. Léčba těmito preparáty má svá rizika: předávkování může vést k závažnému krvácení, zatímco při poddávkování je léčba neúčinná. Proto je během léčby obvykle nutné stav koagulačního systému monitorovat pomocí speciálních testů.

Pro krátkodobou prevenci má nejvhodnější vlastnosti heparin nebo modernější nízkomolekulární heparin (Fraxiparin, Clexan). Oba mají rychlý nástup účinku a jejich predikovatelné (mající předpověditelný průběh) vlastnosti umožňují fixní dávkování. Nevýhodou je nutnost podávání parenterální cestou (parenterální = mimostřevní) např.: Fraxiparin s.c. - podkožně. Účinnost terapie heparinem lze kvantifikovat pomocí času **aPTT (activated partial thromboplastin time)**. Toto vyšetření odráží stav vnitřní a společné cesty koagulačního systému. Terapii nízkomolekulárním heparinem obvykle není nutné kontrolovat, lze ji však v případě potřeby posoudit vyšetřením **aktivity anti Xa**.

Skupinu perorálních antikoagulancií reprezentují moderní xabany nebo gatrany a především, stále ještě nejpoužívanější, **warfarin**. Warfarin je kumarinový derivát, původně používaný jako jed na krysy, který má schopnost inhibovat enzym *vitamin K reductázu*. Tento enzym obnovuje redukovanou formu vitamínu K, která je nezbytná pro karboxylaci několika koagulačních faktorů. Za nedostatečné nabídky redukovatého vitamínu K nejsou jaterní buňky schopné syntetizovat vitamin K-dependentní

koagulační faktory (II, VII, IX a X). Výsledkem je menší množství na vitaminu K závislých faktorů kolující v krvi, a tím i menší pohotovost ke koagulaci.

Účinky warfarinu se začnou projevovat až za několik dní po zahájení terapie a jsou velice variabilní jak interindividuálně, tak v rámci času (například v závislosti na obsahu vitaminu K v potravě). Proto je léčbu warfarinem nutné průběžně monitorovat stanovením **protrombinového času (PT)**. K plazmě antikoagulované citrátem se přidá tkáňový faktor (F III) spolu s dostatkem iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a změří se čas do vzniku koagula. Zjištěný čas v sekundách dobře odráží funkčnost zevní cesty koagulačního systému. Aby ale bylo možné porovnávat hodnoty z různých laboratoří, ukázalo se jako praktičtější vyjádřit výsledky jako hodnotu **INR (International Normalized Ratio)**. Zjednodušeně jde o poměr protrombinového času pacienta ke kontrolnímu (zdravému) protrombinovému času.

*Hodnota INR u zdravého pacienta se pohybuje mezi 0,8 - 1,2. Pacient je účinně koagulovaný při hodnotách mezi 2,0 - 3,5.*

$$\text{INR} = \text{PT}_{\text{pacient}} / \text{PT}_{\text{norma}}$$



## METODICKÁ ČÁST

### Izolace nukleových kyselin

Nukleové kyseliny lze izolovat z jakéhokoli biologického materiálu, který obsahuje buňky se zachovanými jádry. Běžným zdrojem DNA jsou leukocyty nesrážlivé krve. Obvykle se odebírá 0,5 – 10 ml žilní krve nejlépe uzavřeným odběrovým systémem do sterilních zkumavek s K<sub>2</sub>-EDTA. V prenatalní diagnostice jsou obvyklým zdrojem amniové buňky a choriové klky. Pokud je třeba získat materiál pro izolaci DNA neinvazivním způsobem, provádí se odběr DNA z buňky sliznice. DNA lze získat dokonce i ze skvrn zaschlé krve. Zdrojem RNA bývá nejčastěji tkáň získaná biopsií nebo nesrážlivá žilní krev.

Kvalita výchozího materiálu významně ovlivňuje výtěžek, kvalitu a neporušenost/celistvost izolované nukleové kyseliny. Nejlepších výsledků se dosahuje s čerstvým materiálem. Vzorek by měl být okamžitě zpracován nebo neprodleně zamrazen (v případě DNA do tří hodin po odběru) a dále skladován při -80°C, aby nedošlo ke štěpení DNA na kratší fragmenty nebo k degradaci RNA (především mRNA). Materiál musí být přechováván ve vhodném obalu zbaveném příslušných nukleas. Toto je důležité hlavně v případě RNA, která je daleko méně odolná, navíc ribonukleázy jsou všudypřítomné a velmi odolné enzymy.

V poslední době lze pro izolaci obou nukleových kyselin využít vzorky tkáně fixované formaldehydem a zalité v parafínu (FFPE = formalin-fixed paraffin embedded), které byly původně odebrány pro histologická vyšetření. Přestože takto zpracované vzorky neposkytují ideální výsledky (dochází k fragmentaci nukleových kyselin) jsou velmi cenné, protože jsou mnohdy jediným zdrojem biologického materiálu, zvláště v případě retrospektivních studií u zemřelých pacientů.

Se vzorky pro stanovení genové exprese je nutné zacházet obzvláště pečlivě, aby naměřené hodnoty odpovídaly skutečným hladinám přítomným *in vivo* a ne aby odrážely změny, které nastaly během zpracování vzorku. Vzorky proto musí být neprodleně po odběru zamrazeny v tekutém dusíku a dále skladovány při -80°C. Pro případy, kdy toto není možné, jsou komerčně dostupné stabilizátory.

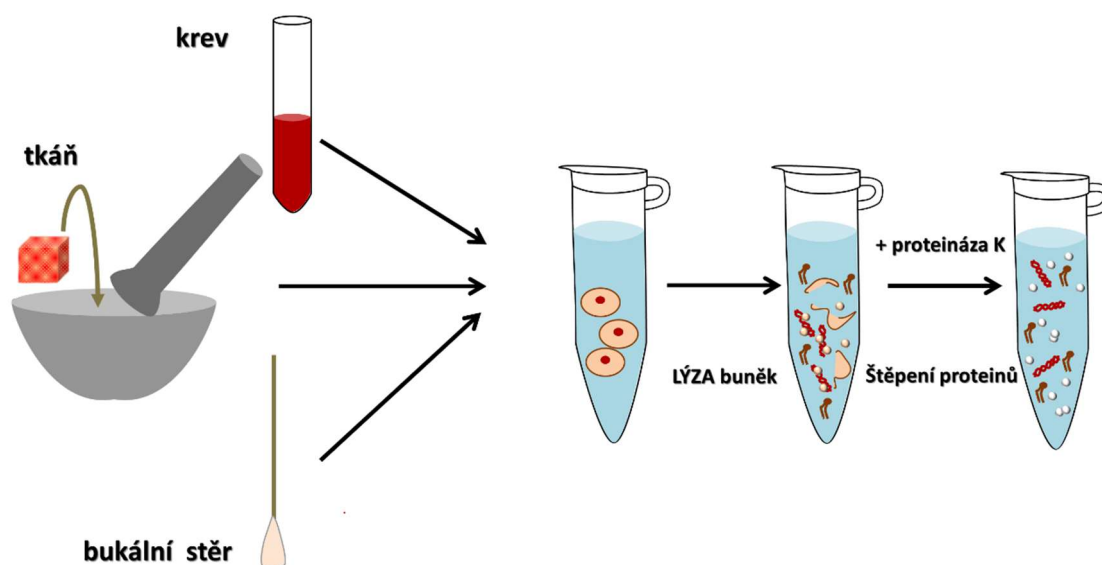
*DNA byla poprvé izolována roku 1869 Friedrichem Miescherem, v současné době se jedná o rutinní techniku molekulární biologie.*



#### **Friedrich Miescher (1844-1895)**

*byl švýcarský lékař, který v roce 1869 izoloval z buněčného jádra leukocytů neznámou látku, kterou nazval „**nuclein**“. Že se jedná o novou látku, usoudil z toho, že svými vlastnostmi neodpovídala, v té době známým proteinům ani lipidům. Nuclein byl rezistentní k proteázám, neobsahoval síru, ale obsahoval velké množství fosforu. Miescherovo pojmenování zůstalo zachováno v dnešním názvu DNA - deoxyribon**ukleová** kyselina.*

Izolační metoda závisí jednak na povaze biologického materiálu, ze kterého má být nukleová kyselina získána, jednak na metodě následné analýzy získané molekuly. Ve všech případech je prvním krokem lýza buněk, ze kterých chceme nukleové kyseliny získat. U krevních buněk obvykle stačí k rozrušení biomembrán detergent. Pro rozrušení pevných tkání musí být použita mechanická síla, např. drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce, protřepávání s kuličkami z různých materiálů, speciální homogenizátory. Do lyzačního roztoku se přidává také chelatační činidlo - etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), která s ionty vápníku vytvoří nedisociovatelné komplexy. Tím zabrání štěpení čerstvě uvolněné DNA nukleázami (DNázy), které se při lýze buněk také uvolňují. Ionty vápníku totiž slouží jako kofaktory nezbytné pro jejich funkci. Aby bylo zajištěno rozštěpení proteinů, včetně histonů vázaných na DNA, přidává se enzym proteináza K (jedná se o bakteriální enzym s teplotním optimem kolem 60 °C, který nevyžaduje vápenaté ani hořečnaté ionty a který neinhibují ani koncentrované tenzidy. Navíc velmi účinně štěpí DNázy). Při izolaci RNA se do lyzačního roztoku přidává guanidin thiokyanát a  $\beta$ -merkaptoethanol jako inhibitory ribonukleas lokalizovaných na membránách organel.



Obr. 7 Příprava buněčného lyzátu pro izolaci DNA

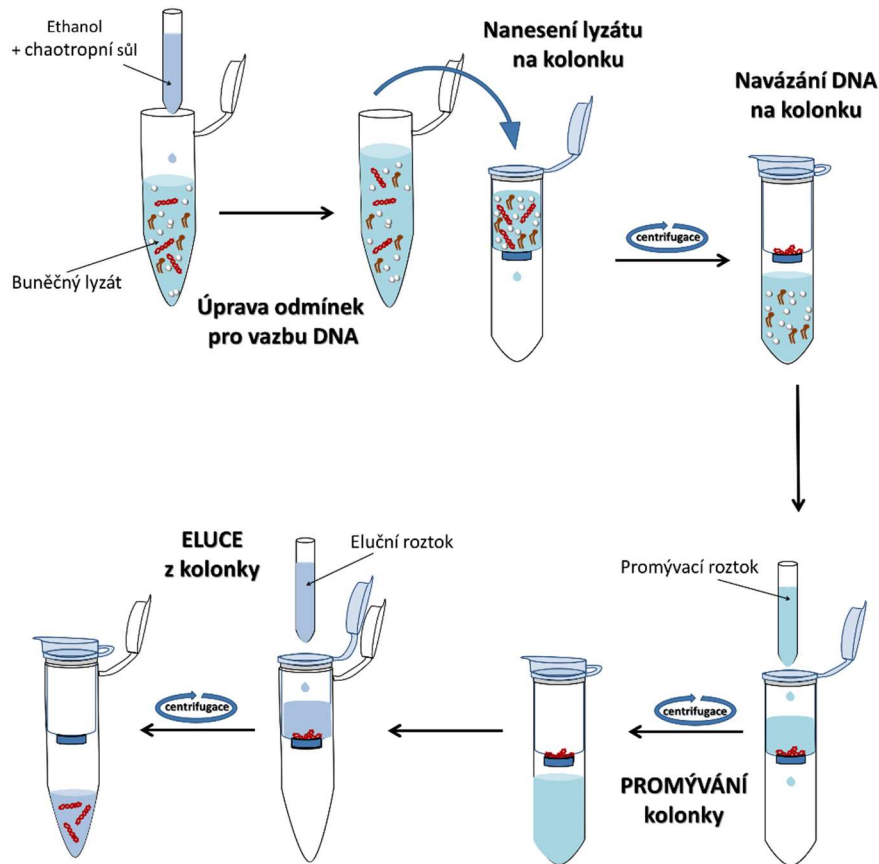
Ze získaného lyzátu je nutno odstranit balastní látky. Získaná čistá nukleová kyselina se ředí na optimální koncentraci pro další použití ve vhodném rozpouštědle, nejčastěji ve vodě nebo pufru.

V současnosti se k odstranění balastních látek nejčastěji používají dvě metody:

- **Kolonková metoda**

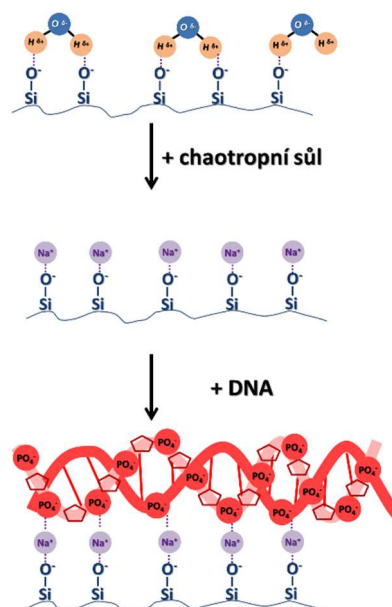
Kolonková metoda obecně pracuje na principu iontové výměnné chromatografie. Molekuly DNA i RNA nesou záporný náboj. V přítomnosti vysoké koncentrace tzv. chaotropních solí se nukleové kyseliny navážou na silikát, zatímco většina kontaminujících látek kolonkou proteče. Obvykle se pro zlepšení vazby nukleové kyseliny na silikátovou kolonku přidává k lyzátu ethanol nebo izopropanol. Poté se postupně kolonka promývá různými pufrů, aby se

navázané kontaminanty odstranily. Na závěr se čistá nukleová kyselina vymyje zředěným pufrům nebo destilovanou vodou.



Obr. 8 Extrakce DNA z buněčného lyzátu kolonkovou metodou

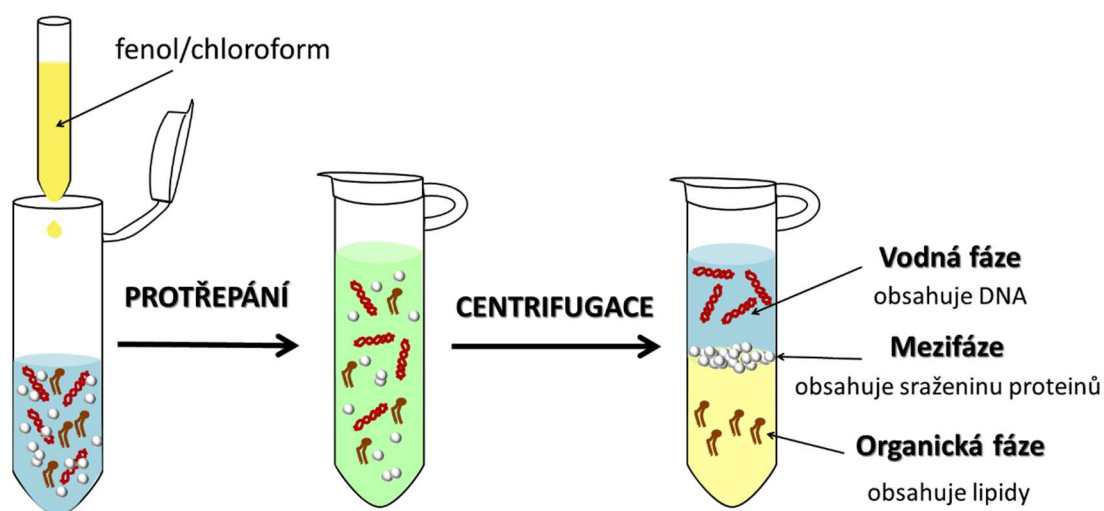
**Chaotropní soli** = iontové sloučeniny, které narušují svou přítomností pravidelnou strukturu vodíkových můstků ve vodě v tekutém skupenství. Při izolacích nukleových kyselin se nejčastěji používá jodid sodný, guanidin hydrochlorid nebo guanidin thiokyanát.



Obr. 9 Princip vazby DNA na silikátovou membránu v přítomnosti chaotropních solí

### • Fenol-chloroformová metoda

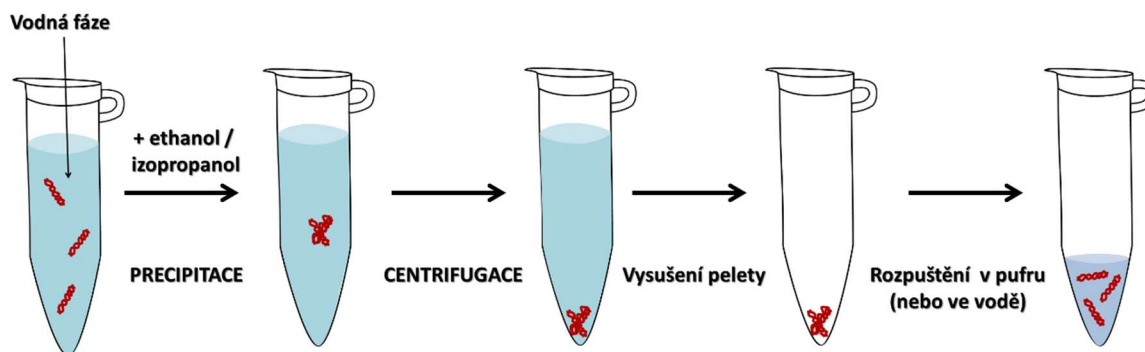
Tradiční spolehlivá, levná metoda, která poskytuje velmi čisté nukleové kyseliny. Jejimi nevýhodami jsou pracnost a zdolouhavost postupu (celý postup izolace zabere cca. 3 dny), práce s toxickými, žíravými, hořlavými a zápachajícími látkami. K lyzátu se přidává s vodou nemísitelná směs fenolu a chloroformu, která denaturuje přítomné proteiny. Denurací se proteiny stávají hůře rozpustné ve vodě a přecházejí do organické fáze nebo zůstávají na rozhraní fází, zatímco nukleové kyseliny zůstávají ve vodné fázi. Lipidy se rozpouštějí v chloroformu. Někdy se přidává izoamylalkohol, který brání tvorbě pěny zvláště u vzorků bohatých na proteiny. Vzniklá směs se důkladně protřepe a poté se odstředí, aby došlo k oddělení fází - horní vodné a dolní fenol-chloroformové. Na rozhraní těchto fází obvykle vzniká mezifáze tvořená bílým prstencem sražených proteinů. Vodná fáze obsahující nukleové kyseliny se opatrně přenese do nové čisté zkumavky. Pro dokonalé odstranění proteinů je většinou nutné extrakci několikrát opakovat (na rozhraní se už neobjeví bílá sraženina proteinů). I pouhé stopy fenolu mohou ovlivnit následnou analýzu izolované nukleové kyseliny, např. fenol inhibuje PCR. Proto se pro poslední extrakci používá samotný chloroform nebo směs chloroformu s izoamylalkoholem, který usnadňuje odstranění fenolu z vodné fáze tím, že zvyšuje jeho rozpustnost v chloroformu.



Obr. 10 Extrakce DNA z buněčného lyzátu fenol-chloroformovou metodou

Z čisté vodné fáze je nutno nukleovou kyselinu precipitovat, nejčastěji absolutním ethanolem nebo isopropanolem. Zvýšení účinnosti srážení lze docílit snížením teploty a přidávkem solí (např. acetát sodný, chlorid sodný, chlorid litný nebo acetát amonný). Soli precipitaci usnadňují tím, že nukleové kyselině odebírají hydratační obal, neutralizují náboj na cukr-fosfátové kostře a tím snižují její rozpustnost ve vodě. Ethanol je méně polární rozpouštědlo než voda. Nukleová kyselina je tedy v ethanolu ještě méně rozpustná a vypadáva z roztoku. Přítomnost solí zabarvuje peletu do běla.

Po odstranění supernatantu a promytí 70% ethanolem (rozpuští přítomné soli) je získaná čistá nukleová kyselina rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle, nejčastěji ve vodě nebo pufru.



Obr. 11 Precipitace DNA z vodné fáze získané fenol-chloroformovou metodou

Podle toho, kterou nukleovou kyselinu potřebujeme získat, volíme extrakční pufr. pH použitého extrakčního pufru značně ovlivňuje, zda ve vodné fázi bude převažovat DNA nebo RNA. V neutrálním nebo mírně alkalickém prostředí ( $\text{pH} \approx 7-8$ ) převažuje DNA. Kyselé prostředí je naproti tomu vhodnější pro izolaci RNA. Důvodem je rozdílný náboj, který nesou tyto molekuly v kyselém prostředí. Cukr-fosfátová kostra nukleových kyselin nese na svém povrchu v neutrálním prostředí záporný náboj. Pokud ale molekula DNA je v prostředí s nízkým pH, a tedy vysokou koncentrací iontů  $\text{H}^+$ , fosfátové skupiny jsou neutralizovány. To vede ke ztrátě polárního charakteru DNA a jejímu přechodu do nepolární organické fáze. Oproti tomu jednovláknová RNA má obnažené dusíkaté báze, které zachovávají její polární charakter a udržují ji tak ve vodné fázi.

V každém případě, ale získáme požadovanou nukleovou kyselinu kontaminovanou tou druhou. Pokud je nutné pracovat s čistou DNA, kontaminující RNA se odstraní působením RNázy a DNA se znovu přečistí fenol-chloroformovou extrakcí a následnou precipitací etanolem. Pokud potřebujeme získat pro další práci čistou RNA, odstraníme přítomnou DNA působením DNázy. RNA reprecipitujeme isopropanolem a promyjeme etanolem.

Popsaným postupem získáme celkovou RNA. Někdy je výhodné izolovat pouze mRNA, protože celková RNA obsahuje vysoký podíl tRNA a rRNA. Po lýze a homogenizaci vzorku a denaturaci celkové RNA se provede selektivní zachycení poly(A)RNA = mRNA na imobilizovaném afinantu oligo(dT)<sub>20</sub>, nežádoucí složky se odstraní, navázaná mRNA se promyje a následně uvolní z afinantu do roztoku.

V současnosti existuje celá řada komerčně dostupných kitů pro izolaci genomické DNA, plasmidové DNA, celkové RNA i jednotlivých typů RNA (mRNA, rRNA, miRNA, snRNA atd.) z různých biologických materiálů. Pro rutinní klinické laboratoře jsou dokonce dostupné automatické izolátory nukleových kyselin. Protože pro automatické linky je obtížné zařadit centrifugace, využívají se k oddělování jednotlivých složek např. magnetické kuličky. Tyto kuličky mají silikátový povrch, na který se nukleová kyselina specificky naváže. Při promývání jsou kuličky přidrženy magnetem. Nakonec se čistá nukleová kyselina eluuje z povrchu oddělených kuliček.

## Uchovávání izolované nukleové kyseliny

DNA je relativně stabilní molekula, přesto je nutné ji chránit před degradací nukleázami. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi dlouhou molekulu, je náchylná k tvorbě zlomů. Proto je nutné se při izolaci a další manipulaci se vzorkem DNA vyvarovat hrubého pipetování (příliš prudkého nasávání a vypouštění pipetované kapaliny) a nadměrného prudkého vortexování. DNA se uchovává rozpuštěná v pufru např. v TE (*Tris/EDTA*) pufru (roztok 10mM Tris-HCl (tris-hydroxymethylaminomethan hydrochlorid) a 1 mM EDTA (chelaton 3), pH 8,5), protože ve vodě hydrolyzuje. Složka Tris udržuje stabilní pH, EDTA chelatuje vápenaté a hořečnaté ionty, čímž blokuje nežádoucí činnost DNáz a do jisté míry i RNáz ve vzorku. Vyizolovaná DNA je skladována krátkodobě (dny) při 4°C a dlouhodobě (týdny – měsíce) při -20°C, nebo při -80°C. Je nutné vyvarovat se opakovanému zamrazování a rozmrazování, které také poškozuje DNA. RNA se obvykle uchovává ve vodě bez nukleas (RNase-free water) při -20°C nebo při -80°C.

## Kvantifikace a kontrola čistoty nukleových kyselin

Pro stanovení koncentrace nukleových kyselin a kontrolu jejich čistoty lze využít několik metod - spektrofotometrii, elektroforetické vyhodnocení nebo stanovení pomocí fluorescenčních DNA-vazných barviv.

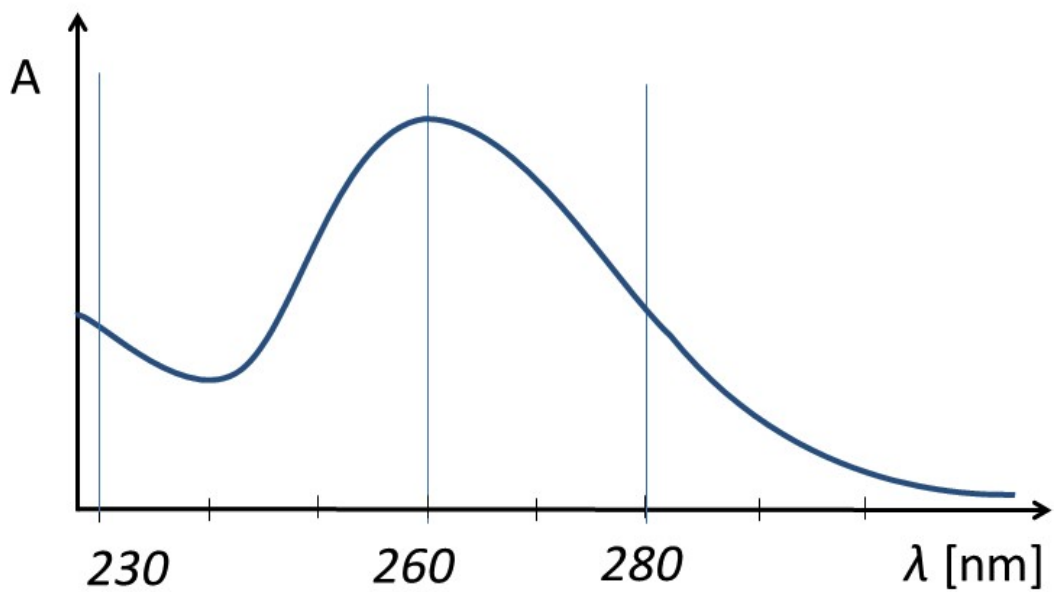
V praxi využijeme spektrofotometrické stanovení. Čistý roztok nukleové kyseliny (DNA i RNA) má absorpční maximum při 260 nm, proteiny maximálně absorbují při 280 nm, při 230 nm mají absorpční maximum nízkomolekulární látky (např. fenol, chloroform, EDTA, polysacharidy...). Absorbance při 320 nm znamená přítomnost nerozpuštěných pevných částic nebo znečištěnou květu.

Koncentrace nukleové kyseliny se počítá ze změřené absorbance při 260 nm. Vychází se z následujících vztahů:

$A_{260} = 1$ , pokud je v měřeném roztoku:

- dvouřetězcová DNA (dsDNA) o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$
- jednořetězcové DNA o koncentraci 37  $\mu\text{g/ml}$
- RNA o koncentraci 40  $\mu\text{g/ml}$

Čistota vzorku se hodnotí podle poměrů absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{230}$ . Poměr  $A_{260}/A_{280}$  by měl být pro čistou DNA okolo 1,8, u RNA okolo 2. Poměr  $A_{260}/A_{230}$  by měl být pro čistou DNA vyšší než 2,0. Pokud hodnota poměrů je výrazně nižší, je roztok kontaminován proteiny nebo fenolem. Není-li u vzorků splněna požadovaná čistota, je nutné provést reprecipitaci vzorku, což vede k výraznému snížení obsahu nečistot.



Obr. 12 Absorpční spektrum DNA



Obr. 13 Ukázka záznamu z přístroje DeNovix DS-11

## PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z *anglického Polymerase Chain Reaction*) je enzymatická metoda umožňující *in vitro* zmnožení (amplifikaci) vybraného úseku DNA, ohraničeného krátkými oligonukleotidy, tzv. primery. Metoda pracuje na principu replikace nukleových kyselin. Umožňuje velmi rychle získat milióny přesných kopií z velmi malého množství vstupního materiálu, dokonce i z DNA z jediné buňky, tj. pouze z jediné molekuly DNA. Vlastní reakce je založena na cyklickém střídání teplot. Protože se jedná o řetězení těchto cyklů, nazýváme tuto metodiku řetězová reakce.

### Složení reakční směsi

Do polymerázové řetězové reakce je nutné vložit:

1. **templát DNA** – dsDNA jako předlohu (templát) pro syntézu
2. **dNTP** = dATP, dGTP, dCTP, dTTP – směs deoxynukleotidtrifosfátů představující stavební kameny, z nichž se syntetizuje nový řetězec DNA.
3. **primery** - dva syntetické oligonukleotidy, které vymezují amplifikovaný úsek
4. **DNA polymerázu** - enzym, který provede syntézu DNA
5. pufr = prostředí vhodné pro aktivitu polymerasy, složením lze ovlivnit výtěžek i specifitu reakce.

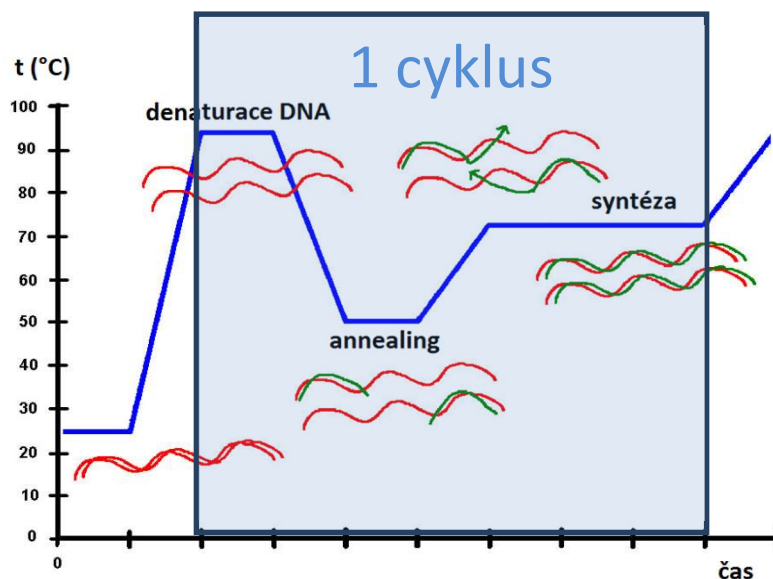
Celkový reakční objem se volí podle potřeby, nejběžněji 15 – 100  $\mu$ l.

### Princip a průběh reakce

Reakce, založená na cyklickém střídání teplot, se skládá ze tří periodicky se opakujících kroků:

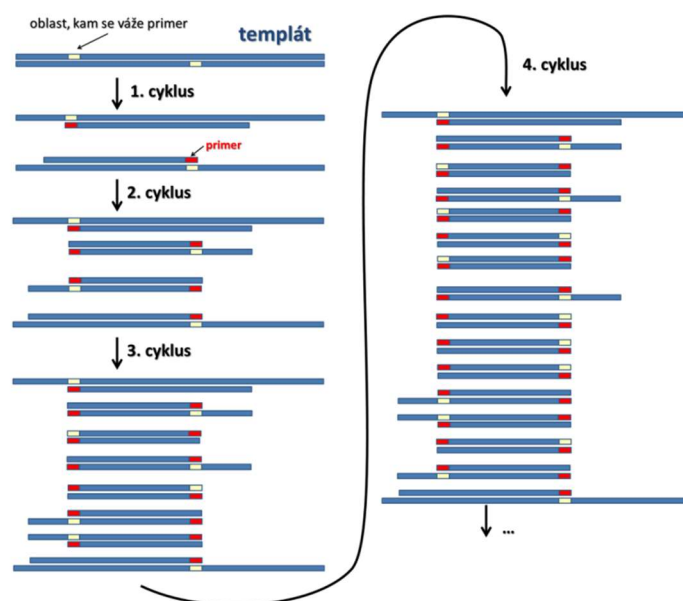
1. **Denaturace** - zvýšením teploty reakční směsi na cca. 95°C dochází k porušení vodíkových můstků mezi bázemi v dvouvláknové DNA. Vzniknou tedy dvě jednovláknové molekuly DNA.
2. **Hybridizace** (nasednutí) primerů - tzv. „*annealing*“ – ochlazení reakční směsi na teplotu, při níž se mohou primery specificky navázat na komplementární sekvenci templátového vlákna DNA. Teplota závisí na délce a nukleotidovém složení primerů. Nejčastěji se tato teplota pohybuje mezi 50 a 60°C.
3. **Syntéza** nových řetězců – v tomto kroku dochází k nasednutí DNA polymerázy prodloužení primerů (*elongace*) – zahřátí směsi na teplotní optimum DNA polymerasy (obvykle 72°C) umožní efektivní syntézu fragmentu požadované délky v daném čase. Doba trvání jednotlivých cyklů závisí na délce replikovaného fragmentu a na typu polymerasy.





Obr. 14 Střídání teplot v průběhu PCR

Cyklus se periodicky opakuje 15 – 40 krát, což vede k exponenciálnímu zmnožení zvoleného fragmentu. Jak je zajištěno, že vznikne právě zvolený fragment? Nové vlákno DNA syntetizuje DNA polymeráza, která nasedne v místě primeru a prodlužuje jej. V prvním cyklu by teoreticky mohla syntetizovat až do konce řetězce předlohy. Prakticky toto nenastává, protože dříve dojde k denaturaci v dalším tj. 2. cyklu. Ve 2. cyklu dojde k rozvolnění dvouvláknové DNA na jednotlivá vlákna. Na takto vzniklé 4 řetězce nasednou znovu primery a vše se opakuje a tím rozdílem, že je-li předlohou vlákno vzniklé v 1. cyklu, toto vlákno končí v místě prvního primeru, tudíž nový řetězec už má příslušnou délku. Tyto krátké specifické produkty přibývají exponenciálně, zatímco delší produkty (podle původního dlouhého templátu) se množí lineárně.



Obr. 15 Průběh PCR

Aby nebylo nutno po každé denaturaci přidávat nový enzym, používá se termostabilní DNA polymerasa, která neztratí svoji aktivitu ani po zahřátí na 95°C. Nejčastěji se používá DNA polymerasa získaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, zvaná Taq polymerasa. Aby se zabránilo práci polymerázy při nízké teplotě, která může vést k nespecifické amplifikaci, používá se tzv. hot-start polymerázy. Tyto enzymy obvykle využívají monoklonální protilátky, které se vážou do katalytického místa enzymu, čímž reverzibilně blokují jeho aktivitu. Při prvním denaturačním cyklu dojde k ireverzibilní teplotní denaturaci protilátky a tím k odblokování enzymatické aktivity.

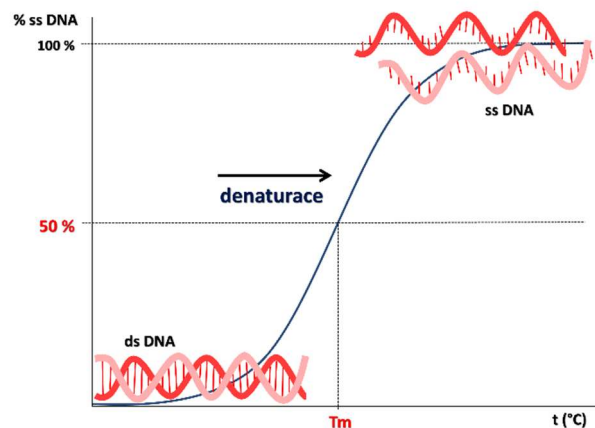
Klíčovou podmínkou úspěchu je výběr správných primerů. Tyto oligonukleotidy obvykle o délce 17-25 nukleotidů, hybridizují s komplementární sekvencí opačných vláken templátové DNA a ohraničují tak amplifikovanou sekvenci. Musí být tedy komplementární k cílové DNA, ale nesmí být komplementární vůči sobě navzájem či uvnitř jednoho z primerů. Tyto oligonukleotidy jsou po hybridizaci na 3'-konci prodlužovány DNA polymerasou, která neumí začít syntézu komplementárního řetězce DNA de novo. Jejich sekvence se udává ve směru 5'-3' kopírovaného vlákna, první označujeme forward (upstream) a druhý reverse (downstream). Vybrané sekvence by měly být jedinečné, specifické pro amplifikovanou sekvenci, aby se nemnožil jiný úsek než požadovaný. Také by měly mít stejnou nebo alespoň podobnou teplotu annealingu. Teplotu annealingu lze různými metodami přibližně vypočítat, vždy však musí být empiricky optimalizována, aby amplifikace byla specifická při dostatečném výtěžku. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, se kterými nejsou zcela komplementární. Vytvoří se tak nespecifický produkt. Při příliš vysoké teplotě primery hybridizují nedostatečně a produkt se tvoří ve velmi malém množství.

V neposlední řadě je účinnost amplifikace ovlivněna kvalitou a čistotou templátové DNA. Nečistoty obsažené ve vzorku mohou působit jako inhibitory polymerázy, nebo polymerasovou reakci výrazně zpomalovat tím, že se váží na templátovou DNA a znepřístupňují ji pro vazbu polymerázy.

Protože pro úspěšný průběh PCR je bezpodmínečně nutná dobře denaturovaná DNA, předřazuje se před blok cyklů úvodní denaturace (obvykle 95°C 2 – 3 min), která zabezpečí rozdělení dsDNA na dvě ssDNA. Po proběhnutí zvoleného počtu cyklů se standardně vkládá krok pro dosyntetizování fragmentů - 72°C, 5 - 7 min, pak se reakční směs zchladí na 4°C.

## Denaturace a renaturace DNA

Stoupající teplota prostředí (stejně tak silně alkalické pH) vede k porušení vodíkových můstků mezi vlákna dvoušroubovice. Hovoříme o denaturaci DNA. Tato změna je reverzibilní. Navrácení do původního dvouvláknového stavu, tzv. renaturace (= hybridizace) lze dosáhnout pomalým ochlazováním. Při prudkém ochlazení nenastává. Za vhodných podmínek mohou takto vytvořit dvoušroubovici i vlákna různého původu pouze na základě komplementarity bází.



Obr. 16 Denaturace DNA

Charakteristikou stability fragmentu dsDNA je jeho teplota tání  $T_m$  (melting temperature). Je to teplota, při které je dvouřetězcová DNA z poloviny denaturována. Tato teplota závisí na délce fragmentu, na jeho nukleotidovém složení (vyšší podíl GC párů zvyšuje teplotu tání) a na dalších faktorech jako pH nebo iontová síla roztoku.

U oligonukleotidů kratších než 50 bp lze orientačně vypočítat podle vzorce:

$$T_m = 2 \times (\text{počet AT párů}) + 4 \times (\text{počet GC párů})$$

Hybridizační teplota je o 5 °C nižší než je  $T_m$ .

### Amplifikace RNA

V případě amplifikace RNA se provádí reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí (RT – PCR). Při reverzní transkripci se reakční směs skládá z následujících složek:

- templátová RNA
- reverzní transkriptasa, což je enzym, který provede zpětný přepis RNA na jednovláknovou DNA
- syntetický oligonukleotid
  - při reverzní transkripci mRNA se používá oligonukleotid oligo(dT)<sub>12–24</sub>, který se přichytí na polyadenylový řetězec, nebo směs oligonukleotidů (obvykle hexamerů) s různými sekvencemi, které se přichycují na náhodné komplementární sekvence RNA
  - při reverzní transkripci určité vybrané RNA se známou částí nukleotidové sekvence se používá genově specifický primer
- inhibitor ribonukleas

Běžná reverzní transkripce má tento průběh:

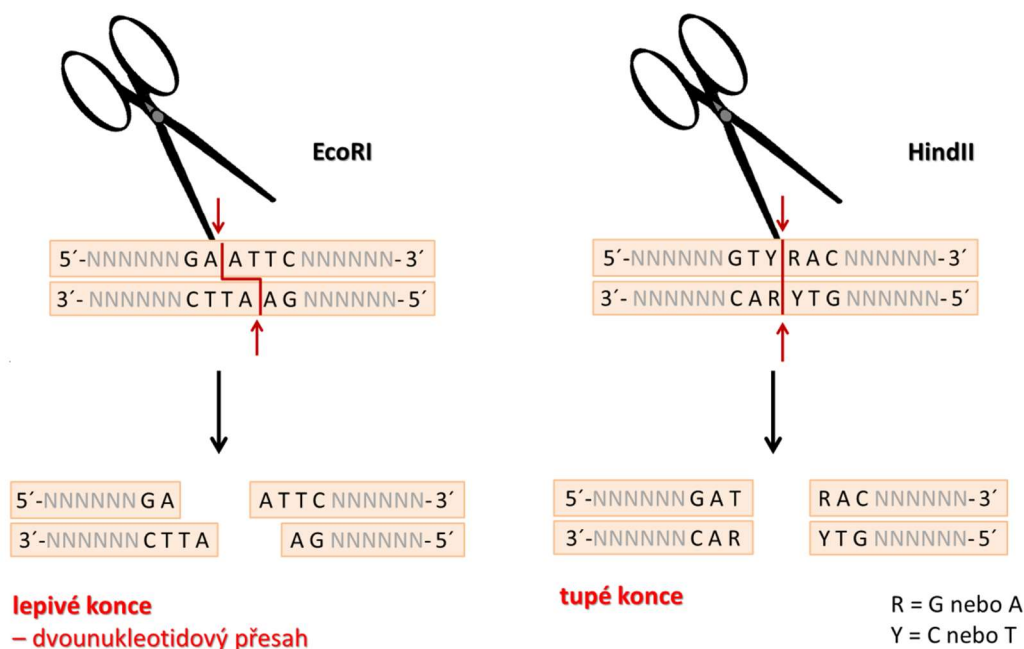
1. denaturace RNA před přípravou reakční směsi
2. příprava reakční směsi
3. přichycení primeru při vhodné teplotě (pro oligo(dT)<sub>15</sub> 25°C 10 min)
4. vlastní syntetická reakce (cca 42°C 60 min)
5. teplotní inaktivace enzymu (při 99°C 5 min)
6. zchlazení směsi na 4°C

Následná PCR, při níž je reverzní transkriptázou syntetizované 1. vlákno cDNA amplifikováno na běžnou dvouvláknovou DNA, se již podstatně neliší od PCR výše uvedené.

## Restrikční endonukleazy (restriktasy)

Restrikční endonukleázy jsou bakteriální enzymy štěpící cizorodou dsDNA na kratší úseky, tzv. restrikční fragmenty. Bakteriím tyto enzymy slouží jako jakýsi „imunitní systém“, který je chrání před cizorodou DNA. Vlastní DNA bakterie je chráněna proti degradaci methylací v místech rozpoznávaných sekvencí. Tyto bakteriální enzymy lze izolovat a využít v molekulárně biologické laboratoři k fragmentaci DNA.

Restrikční endonukleázy jsou podle svých vlastností rozdělovány do 4 typů. Praktické využití při analýzách DNA mají endonukleázy typu II. Tyto restriktázy neštěpí DNA náhodně, ale rozpoznávají specifické sekvence (restrikční místa) a DNA přímo v nich, nebo v jejich těsné blízkosti štěpí. Tato místa bývají obvykle dlouhá asi 4-8 nukleotidů, často mají charakter palindromů (obrácených repetic). Štěpení fosfodiesterové vazby probíhá současně na obou řetězcích. Pokud dochází ke štěpení přesně uprostřed restrikčního místa, vznikají tzv. tupé konce. Pokud dochází ke štěpení v jiném místě, vznikají konce s různě dlouhým přesahem, tzv. lepivé konce.



Obr. 17 Způsob štěpení

V současnosti je známo více jak 4 000 restriktáz, které rozpoznávají více jak 300 různých sekvencí. Existují databáze, např. REBASE® ([rebase.neb.com](http://rebase.neb.com)), ve kterých je možné vyhledávat restriktázy např. podle rozpoznávané sekvence.

Názvosloví restrikčních endonukleáz je poměrně specifické. První tři písmena názvu jsou odvozena z rodového (první písmeno), respektive druhového jména (druhé a třetí písmeno) organismu, ze kterého restriktasa pochází, např. *Eco* pro *Escherichia coli* nebo *Hin* pro *Haemophilus influenzae*. Následuje symbol pro označení kmene, *Hind* pro *H. influenzae* kmen d. Poslední součástí názvu je římská číslice označující jednotlivé restriktázy produkované stejným kmenem, *HindII* a *HindIII*. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz má široké využití např. restrikční analýza DNA, molekulární klonování, tvorba cDNA knihoven...

## Stanovení SNP

Ke stanovení jednonukleotidových polymorfismů lze využít metodu nazvanou „polymorfismus délek restrikčních fragmentů“ (RFLP, restriction fragment length polymorphism) nebo její modifikaci PCR-RFLP = AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). V praxi využijeme modifikovanou metodu.

V prvním kroku se izoluje DNA, která má být analyzována. Oblast s předpokládaným výskytem polymorfismu je amplifikována pomocí PCR. Získaný PCR produkt je podroben restrikčnímu štěpení. Původní metoda používá k restrikčnímu štěpení přímo izolovanou genomovou DNA. Liší-li se dvě alely nukleotidovou sekvencí, která je na jedné z nich součástí místa rozeznávaného restrikční endonukleasou, je toto restrikční místo na druhé z nich porušeno, tj. DNA není v tomto místě danou restriktaázou štěpena. Po rozštěpení daným restrikčním enzymem se původně stejně dlouhé fragmenty liší svojí délkou. Získané fragmenty se analyzují pomocí gelové elektroforézy.

Protože genomová DNA je kromě cílové sekvence štěpena danou restriktaázou ještě v obrovském počtu dalších restrikčních míst, výsledkem štěpení je obrovské množství fragmentů, které tvoří na elektroforéze souvislou „šmouhu“. Pro zjištění polohy fragmentů sledované sekvence je proto nutné použít tzv. Southern blot. V případě metody PCR-RFLP je výsledkem štěpení jen několik málo fragmentů a proto na elektroforéze přímo vidíme výsledek.

### **Southernův přenos (Southern blot/blotting)**

Southernův přenos je hybridizační technika, pojmenovaná podle E. Southerna, který daný postup zavedl. DNA se elektroforézou na agarosovém gelu rozdělí podle velikosti fragmentů a denurací v roztoku NaOH se převede na jednovláknovou strukturu. Jednovláknová DNA (ssDNA) se přenesou na nylonovou nebo nitrocelulosovou membránu. Přenos DNA z gelu na membránu (blotting) se uskutečňuje buď pomocí kapilárních jevů nebo pomocí elektrických sil (elektroblotting). DNA se na membráně zakotví (nejčastěji UV zářením). Poté se membrána nechá inkubovat v roztoku, který obsahuje značené definované fragmenty DNA - sondy (próby). Tyto sondy hybridizují (vytvářejí dvouvláknové úseky) s komplementárními řetězci zakotvené DNA. Po hybridizaci se nenačtené sondy odmyjí a deteguje se poloha navázaných sond. Jsou-li sondy značeny radioaktivně, provede se autoradiografie – membrána se položí na rentgenový film a nechá exponovat. Po vyvolání filmu bude na místě hybridizované radioaktivní sondy signál. Existují však i komerčně dostupné sety pro neradioaktivní značení, např. fluorescenční nebo chemiluminiscenční.

Existuje obdobná hybridizační technika pro analýzu RNA nazvaná Northern blot.

## Elektroforéza

Základní technikou dělení, identifikace a purifikace nukleových kyselin je elektroforéza na gelu. Nukleové kyseliny se v mírně zásaditém prostředí (pH  $\approx$ 8,5) chovají jako polyanionty. Se zvyšujícím se počtem nukleotidů v molekule úměrně roste její náboj. Proto se v elektrickém poli pohybují směrem k anodě. Abychom docílili jejich rozdělení podle velikosti, používáme vhodný nosič, nejčastěji agarosový nebo polyakrylamidový gel, které slouží jako molekulové síto. Větší molekuly se jimi pohybují mnohem hůře než molekuly menší.

Pro delší fragmenty (500 bp – 25 kbp) se používají agarosové gely, pro kratší fragmenty gely polyakrylamidové. Dělicí schopnost agarosového gelu lze ovlivnit koncentrací agarosy, standardně používané koncentrace uvádí tabulka.

koncentrace agarosy v gelu (%)	délky efektivně dělených fragmentů DNA (kbp)
0,5	30 – 1
0,7	12 – 0,8
1,0	10 – 0,5
1,2	7 – 0,4
1,5	3 – 0,2

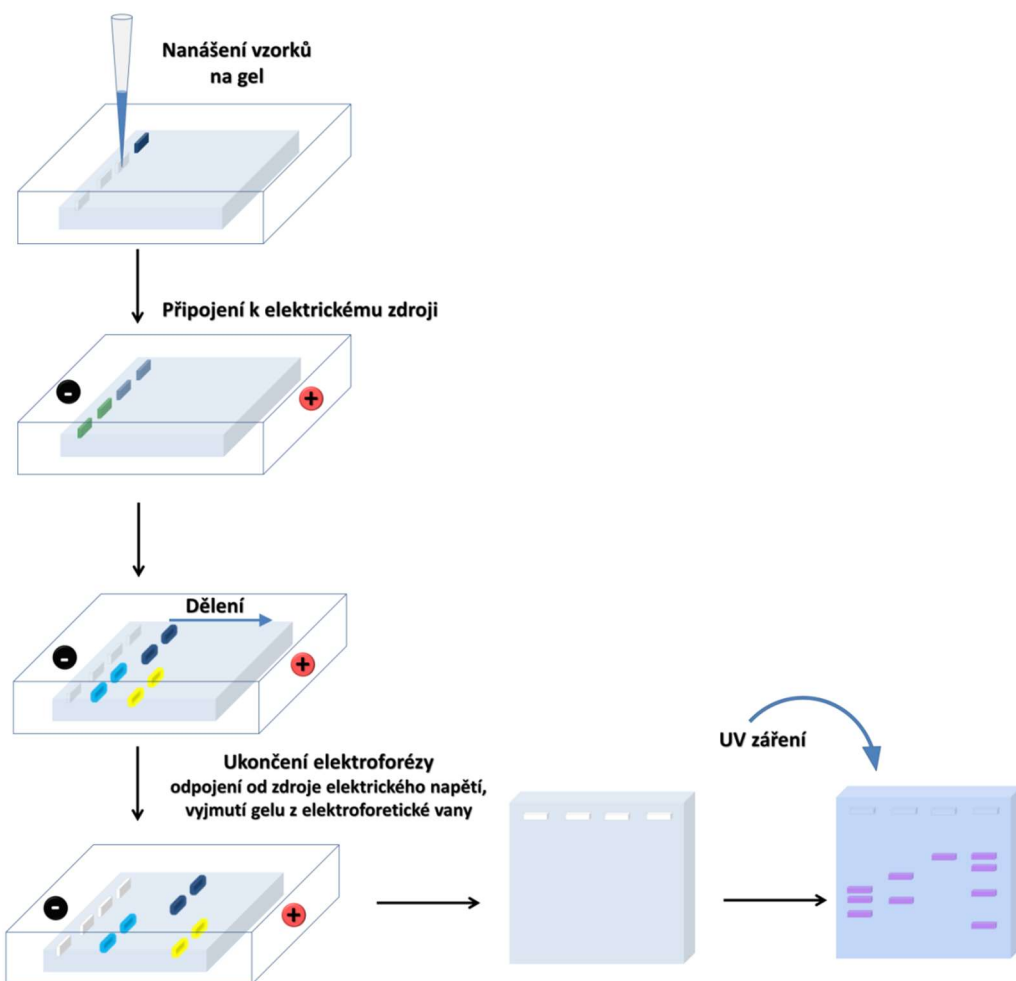
Elektroforéza na agarosovém gelu se provádí v horizontálním provedení. Připraví se gel s danou koncentrací agarosy v elektroforetickém pufru (TAE nebo TBE), který má tloušťku 0,5 – 1 cm a na startu jamky pro nanesení vzorků. Gel se vloží do elektroforetické nádoby a zalije se elektroforetickým pufrem tak, aby nad gelem byla vrstva pufru 1 mm.

Před nanesením na gel se vzorek smísí s nanášecím pufrem (loading buffer), což zvýší hustotu směsi a tím usnadní aplikaci do jamky. Nanášecí pufr obsahuje navíc i barvivo, které vlivem elektrického pole migruje stejným směrem jako nukleové kyseliny a poskytuje tak možnost odhadnout pozici dělených fragmentů. Nejčastěji se používá bromfenolová modř, která postupuje rychlostí stejnou jako fragment DNA o délce 500bp.

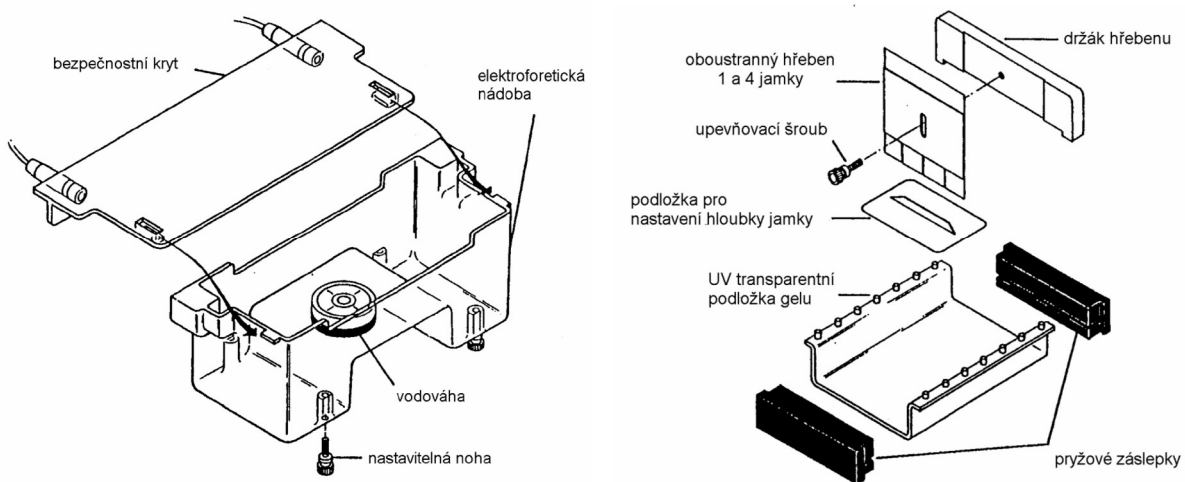
Pro určení délek analyzovaných fragmentů je vhodné se vzorky nanést na gel i marker, tj. směs DNA fragmentů vhodných délek, jejichž velikost je známa.

Po nanesení vzorků se elektroforéza připojí k elektrickému zdroji, nastaví se napětí 1 - 10 V / cm délky gelu a podle délky dělených fragmentů se zvolí doba průběhu.

Rozdělené fragmenty mohou být vizualizovány vybarvením gelu ethidiumbromidem, což je barvivo, které se interkaluje do DNA a pod ultrafialovým zářením oranžově fluorescenčně září. Barvení gelu může být provedeno po ukončení elektroforézy koupáním v roztoku ethidiumbromidu (0,5  $\mu$ g/ml) nebo lze ethidiumbromid do gelu přidat již při jeho přípravě (konečná koncentrace ethidiumbromidu v gelu - 0,5  $\mu$ g/ml). Ethidiumbromid je potenciální karcinogen.



*Obr. 18 Elektroforéza – princip*



*Obr. 19 Elektroforetická vanička*





## Pomůcky a slangové termíny

### Eppendorfka (mikrozkumavka typu Eppendorf)



Malá plastová zkumavka (nejčastěji o objemu 1,5 ml) s víčkem a s kónickým dnem. Je to snad nejuniverzálnější a nejvíce používaná "nádobka" v laboratořích biochemie a molekulární biologie. Uplatnění má všude tam, kde se pracuje s malými objemy (v řádu desítek až stovek mikrolitrů). Slouží nejen k provádění reakcí, ale i pro přípravu a skladování roztoků. Je vhodná i pro skladování hluboce zamražených vzorků (-80 °C). Při provádění reakcí odolá i teplotám 100 °C. Zkumavka je autoklávovatelná.

*Autoklávování je v laboratořích běžný a velice účinný způsob sterilizace vlhkým vzduchem za vysokého tlaku a teploty (parní sterilizace), typicky 120 °C po dobu 15 minut.*

Připojené víčko snadno umožňuje těsné uzavření, které brání kontaminaci během práce a dělá z eppendorfky nádobku vhodnou i na dlouhodobé skladování.

Kónické dno umožňuje centrifugaci, navíc tento tvar zkumavky s úzkým prostorem dna usnadňuje práci s malými objemy, tj. i pokud je ve zkumavce jen minimální objem, pořád je odtud relativně pohodlně pipetovatelný.

Slangový název eppendorfka pochází od názvu firmy, která tento typ zkumavky poprvé v roce 1963 uvedla na trh (německá firma Eppendorf založená roku 1945 v Hamburku ve čtvrti Eppendorf, podle které si dala firma jméno). Zkumavky jsou vyráběny z polypropyleny, což je materiál chemicky velmi odolný, snese i extrémní teploty (-90 °C až +121 °C). Za více než 50 let existence se v designu zkumavek projevila mnohá drobná vylepšení, která mohou zpříjemnit práci a některá směřují zkumavky k jednomu určitému typu použití. Dostupné jsou eppendorfky se "safe-lock" pojistkou víčka, která brání snadnému otevření, zkumavky s naprosto čirou stěnou, která umožní jejich přímé použití jako kyvet pro optické metody. Stěna zkumavek může mít hrubé měřítko objemu nebo plošku pro "nesmazatelné" označení.

### Vortex (vortex mixer)

Přístroj určený k důkladnému promíchání obsahu malých zkumavek a nádobek. Když je zkumavka vtlačena do gumové části nahoře na přístroji, spustí se motor a gumová část rychle osciluje kruhovitým pohybem, pohyb se přenáší na tekutinu uvnitř nádoby a ta se vířivým způsobem (vortex = vír) velice efektivně míchá. Většina přístrojů má nastavitelnou rychlost pohybu a možnost volby, zda je motor spuštěn nepřetržitě nebo se zapne jen na dobu, kdy na gumovou část tlačíme zkumavkou.



Je možných více způsobů, jak zkumavku na vortex přikládat (vtlačit do středu gumové části nebo jen opřít o hranu). Pro běžné promíchání roztoku stačí většinou jen krátké přiložení (5-10 sekund), ale v některých procedurách je ale vyžadováno intenzivní míchání po delší dobu.

Při míchání obsahu eppendorfky je nutné, aby jeden prst ruky, ve které eppendorfku držíme, jistil víčko proti možnému otevření! Jinak hrozí vystříknutí obsahu. Z tohoto důvodu se nedoporučuje vortexovat žíraviny.

*zvortexovat = promíchat na vortexu*

### Mikrocentrifuga

Mikrocentrifuga je centrifuga určená k odstředování malých zkumavek (eppendorfek).

