

# Izolace nukleových kyselin z plazmy pro účely kvantitativní analýzy

**Studentka:** Pavla Šoffrová, ZL 3

Školitelé: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Ústav biologie, LF v Plzni UK

**Východisko:** Kardiovaskulární onemocnění jsou celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtí. Pro léčbu pacientů s tímto onemocněním používá lékař nejen výsledky oboru zobrazovacích metod, ale také laboratorní stanovení biomarkerů. Přestože mají tyto klasické markery (např. troponin) své nezastupitelné místo v diagnostice, existuje snaha najít nové biomarkery, které doplní informace v moment, kdy klasické markery nedostačují. Jako potenciální nové biomarkery kardiovaskulárních onemocnění se ukazují mikroRNA. Existují konkrétní mikroRNA, která jsou exprimována v plazmě pacientů s kardiovaskulárním onemocněním ve změněném množství ve srovnání se zdravými jedinci. Díky tomu se jako vhodný materiál pro izolaci mikroRNA jeví plazma.

**Cíl:** Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda je možné použít plazmu pro izolaci nukleových kyselin (RNA) v dostatečném množství tak aby bylo možno provést stanovení biomarkerů ze skupiny mikroRNA u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. Dalšími cíli bylo izolovat celkovou RNA obohacenou frakcí mikroRNA z plazmy pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, změřeni koncentrace celkové RNA a vyhodnocení výtěžku a čistoty izolované RNA.

**Metodika:** Bylo použito 503 vzorků plazmy, ze které bylo provedeno 508 izolací nukleových kyselin (RNA). Pro izolaci byly použity soupravy pro izolaci od firmy Qiagen. Plazmu jsme rozmrazili, vortexovali a dali centrifugovat. Poté jsme odebrali 200  $\mu\text{L}$  plazmy, ke které jsme přidali QIAzol Lysis Reagent a vortexovali. Přidali jsme miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control a chloroform. Provedli jsme centrifugaci, po které se směs ve zkumavkách rozdělila na 3 vrstvy. Horní vrstvu jsme odpipetovali a přidali k ní 100% alkohol. Vzorky jsme napipetovali na kolonky a nechali profiltrovat. Následně jsme přes kolonky profiltrovali RTW, RPE a 80% alkohol. Kolonky jsme přemístili na čisté eppe. Na kolonky jsme napipetovali RNase-free vodu a nechali profiltrovat. Koncentraci RNA a čistotu jsme měřili na spektrofotometru Nanodrop 1000.

**Výsledky:** Byly sledovány hodnoty čistoty a koncentrace RNA izolované z plazmy. Některé výsledky bylo potřeba izolovat opakovaně a u některých vzorků bylo provedeno opakované spektrofotometrické stanovení. V ideálním případě by měla být čistota 1,8 – 2 a výtěžek RNA by měl být vyšší než 15  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

Výtěžek:

Medián	16,985 $\text{ng}/\mu\text{L}$
< 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$	184 vzorků
> 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$	324 vzorků

Čistota:

Medián	1,47
95% percentil	1,3
< 1,8	493 vzorků
1,8 – 2	12 vzorků
> 2	3 vzorky

**Závěr:** RNA bylo po izolaci použito pro RT real-time PCR, pro kterou stačí koncentrace RNA 5 ng/μL a je možné použít i vzorky o čistotě 1,3. Z tohoto důvodu můžeme říci, že izolace RNA pomocí kitu od firmy Qiagen je velmi výhodným způsobem pro provedení izolace.