

Procjena djelotvornosti triju protokola za izolaciju RNA iz malog broja stanica periferne krvi primjenom Qubit fluorometra i IMPLEN spektrofotometra

Zidar, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:491042>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Zidar

PROCJENA DJELOTVORNOSTI TRIJU
PROTOKOLA ZA IZOLACIJU RNA IZ
MALOG BROJA STANICA PERIFERNE
KRVI PRIMJENOM QUBIT
FLUOROMETRA I IMPLEN
SPEKTROFOTOMETRA

Završni rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Zidar

PROCJENA DJELOTVORNOSTI TRIJU
PROTOKOLA ZA IZOLACIJU RNA IZ
MALOG BROJA STANICA PERIFERNE
KRVI PRIMJENOM QUBIT
FLUOROMETRA I IMPLEN
SPEKTROFOTOMETRA

Završni rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren u: Laboratorij za analizu DNA, Medicinski fakultet u Osijeku

Mentor rada: **doc. dr. sc. Stana Tokić**

Rad ima 40 listova, 9 tablica i 10 slika

ZAHVALE

Veliku zahvalnost izražavam mentorici doc. dr. sc. Stani Tokić na iskazanom povjerenju, vodstvu i pomoći tijekom izrade ovog završnog rada. Hvala na korisnim savjetima i strpljenju pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem Maji Jirouš na pomoći pri radu u laboratoriju.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na potpori tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Građa i uloga RNA.....	1
1.2. Vrste RNA.....	2
1.2.1. Glasnička RNA.....	2
1.2.2. Transportna RNA.....	3
1.2.3. Ribosomska RNA.....	4
1.3. Izolacija nukleinskih kiselina.....	4
1.3.1. Metode izolacije RNA.....	5
1.4. Mononuklearne stanice periferne krvi.....	6
1.4.1. Izolacija RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi.....	6
1.5. Mjerenje koncentracije izolirane RNA.....	7
1.5.1. Fluorescencijsko mjerenje.....	7
1.5.2. Spektrofotometrijsko mjerenje.....	8
1.6. Primjena izolirane RNA.....	8
2. CILJEVI	9
3. MATERIJAL I METODE	10
3.1. Ustroj studije.....	10
3.2. Materijal.....	10
3.2.1. Upotrijebljene kemikalije i oprema.....	10
3.3. Metode.....	11
3.3.1. Izolacija PBMC iz periferne krvi.....	12
3.3.2. Izolacija RNA - Direct-zol™ RNA Microprep komplet.....	13
3.3.3. Izolacija RNA - Invitrogen PureLink™ RNA Micro komplet.....	14
3.3.4. Izolacija RNA - Dynabeads® mRNA Direct™ komplet.....	15
3.3.5. Izolacija RNA - TRIzol™ reagens.....	15
3.3.6. Mjerenje koncentracije RNA s pomoću komercijalnog kompleta „Qubit HighSensitivity RNA“.....	16
3.4. Statističke metode.....	17
4. REZULTATI	18
4.1. Analiza prinosa RNA ovisno o izboru metode za izolaciju i kvantifikaciju.....	18
4.1.1. Mjerenja na Qubit fluorometru.....	18
4.1.2. Mjerenja na Implen spektrofotometru.....	19
4.1.3. Mjerenja na DeNovix fluorometru i spektrofotometru.....	20

4.2. Usporedba prinosa RNA ostvarenog u podskupinama uzoraka (10 000, 50 000, 100 000 stanica) ovisno o izboru metode za izolaciju	22
4.2.1. Prinos RNA iz 10 000 PBMC stanica	22
4.2.2. Prinos RNA iz 50 000 PBMC stanica	23
4.2.3. Prinos RNA iz 100 000 PBMC stanica	24
4.3. Usporedba čistoće (A260/A280 omjera) svih RNA uzoraka ovisno o izboru metode za izolaciju	25
4.4. Usporedba čistoće (A260/A280 omjera) RNA uzoraka po skupinama (10 000, 50 000, 100 000 stanica) ovisno o izboru metode za izolaciju	25
4.4.1. Vrijednosti A260/A280 omjera u RNA uzorcima izoliranim iz 10 000 stanica	25
4.4.2. Vrijednosti A260/A280 omjera u RNA uzorcima izoliranim iz 50 000 stanica	26
4.4.3. Vrijednosti A260/A280 omjera u RNA uzorcima izoliranim iz 100 000 stanica ..	26
4.5. Analiza podudarnosti mjerenja koncentracije RNA na Qubit fluorometru i Implen spektrofotometru	27
5. RASPRAVA	31
6. ZAKLJUČAK	34
7. SAŽETAK	35
8. SUMMARY	36
9. LITERATURA	37
10. ŽIVOTOPIS	40

Popis kratica

DEPC - dietil pirokarbonat (engl. *diethyl pyrocarbonate*)

miRNA - mikro RNA (engl. *microRNA*)

mRNA - glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

PBMC - mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS - fiziološka otopina puferirana s fosfatom (engl. *Phosphate-buffered saline*)

RNA - ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

rRNA - ribosomska RNA (engl. *ribosomal RNA*)

RPM - broj okretaja u minuti (engl. *Revolutions Per Minute*)

snRNA - mala jezgrina RNA (engl. *small nuclear RNA*)

tRNA - transportna RNA (engl. *transfer RNA*)

1. UVOD

Nukleinske kiseline otkrio je Friedrich Miescher 1868. godine. One predstavljaju složene organske makromolekule koje sudjeluju u prijenosu, pohrani i ekspresiji genetičke informacije. Prema strukturi nukleotida dijele se na dvije osnovne vrste; deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) koja sadrži šećer deoksiribozu i nositelj je genetičke informacije u jezgri te ribonukleinsku kiselinu (RNA) koja u svojoj građi ima šećer ribozu i sudjeluje u transkripciji i prijevodu genetičkih informacija tijekom sinteze proteina.

1.1. Građa i uloga RNA

Poznavanje građe ribonukleinske kiseline važno je da bi se objasnile njezine funkcije i mehanizmi djelovanja. Ribonukleinske kiseline jednolančane su molekule koje nastaju međusobnim povezivanjem nukleotida 3'-5' fosfodieterskom vezom. Građevna im je jedinica ribonukleotid, koji sadrži molekulu šećera riboze, fosfat i jednu od baza; adenin, citozin, gvanin, uracil. Baze se vežu na šećer ribozu i tako nastaju nukleozidi. Nukleotidi dodatno sadrže jednu ili više fosfatnih skupina vezanih na 5' ugljik nukleozidnog šećera (1). Polimerizacija nukleotida, kojom se formiraju nukleinske kiseline, uključuje stvaranje fosfodieterskih veza između 5'-fosfata jednoga nukleotida i 3'-hidroksilne skupine drugog nukleotida (1). Polinukleotidi koji oblikuju stanične RNA mogu sadržavati tisuće i milijune nukleotida (1). Budući da su jednolančane, RNA molekule mogu stvarati složene trodimenzionalne strukture; ukosnice i petlje. To postižu na način da se dijelovi jednolančane RNA molekule okreću jedan prema drugom i međusobno povezuju vodikovim vezama između komplementarnih baza. Komplementarne parove baza čine adenin i uracil odnosno citozin i gvanin. Takva komplementarnost baza osnova je prijenosa i ekspresije genetičke informacije. Sposobnost presavijanja u složene trodimenzionalne oblike omogućuje da neke molekule RNA imaju strukturne i katalitičke funkcije (2). RNA molekule sintetiziraju se u procesu transkripcije, koji predstavlja prepisivanje genetičke informacije sadržane u molekuli DNA. Transkripcija započinje vezanjem enzima RNA polimeraze na sekvencu promotora u DNA. Dvostruka zavojnica DNA odmotava se djelovanjem enzima helikaze. Enzim RNA polimeraza prepisuje informaciju nekodirajućeg lanca, sintetizirajući komplementarnu, kodirajuću RNA molekulu u smjeru 5'-3' (2). RNA polimeraze kataliziraju stvaranje fosfodieterskih veza i povezuju nukleotide u jedan linearni lanac. Na taj se način rastući RNA lanac istodobno produžuje za jedan nukleotid u smjeru 5'-3'. Supstrati su nukleozidni trifosfati (ATP, CTP,

UTP i GTP). U sat vremena iz jednog gena može se sintetizirati preko tisuću transkripata (2). RNA molekule također sudjeluju i u translaciji, procesu prevođenja genetičke informacije u slijed aminokiselina u proteinu. Translacija je proces u kojemu se aminokiseline, na temelju informacije zapisane u mRNA, povezuju u polipeptidni lanac. Proces se naziva prevođenje jer se jezik nukleotida prevodi u jezik aminokiselina (3). Translacija se događa na ribosomima u citoplazmi. Translacija i posttranslacijske modifikacije ključni su koraci u regulaciji genske ekspresije i proizvodnji funkcionalnih proteina (3).

1.2. Vrste RNA

Glavne vrste RNA molekula su glasnička RNA (mRNA, prema engl. *messenger RNA*), ribosomska RNA (rRNA, prema engl. *ribosomal RNA*), transportna RNA (tRNA, prema engl. *transfer RNA*), male jezgrine RNA (snRNA, prema engl. *small nuclear RNA*) i mikro RNA (miRNA, prema engl. *microRNA*). Ovi različiti tipovi ribonukleinskih kiselina sudjeluju u nekoliko staničnih aktivnosti. Glasnička RNA nosi informaciju od DNA do ribosoma, gdje služi kao kalup za sintezu proteina. Druga dva tipa RNA (ribosomska RNA i transportna RNA) sudjeluju u sintezi proteina. Dok su ostali tipovi RNA uključeni u doradu, prijenos i regulaciju ekspresije ribonukleinskih kiselina i proteina. U snRNA ubrajamo niz malih RNA molekula koje se nalaze u jezgri.

1.2.1. Glasnička RNA

Glasnička RNA prenositelj je genetičke informacije zapisane u DNA molekuli. Ona čini samo 5 % ukupne RNA u stanici, ali po sastavu i veličini predstavlja izrazito heterogeni skup RNA molekula. Informacija za slijed aminokiselina u proteinu zapisana na DNA molekuli prepisuje se (transkribira) u mRNA molekulu, koja zatim služi kao kalup za sintezu proteina na ribosomima. Način prevođenja slijeda nukleotida u protein definiran je troslovnim genskim kodom ili tripletom. Triplet nukleotidnih baza u mRNA molekuli predstavlja šifru za jednu aminokiselinu, dok niz tripleta ili niz kodona određuje slijed više aminokiselina ili polipeptidni lanac. Genetički kod je degeneriran, što znači da jednu aminokiselinu može kodirati mnogo različitih kodona. Postoje i 3 stop kodona (UAA, UAG, UGA), koji označavaju završetak translacije. U slučaju prokariota, u citoplazmi sintetizirane mRNA molekule odmah služe kao kalup za sintezu proteina, dok se kod eukariota u jezgri sintetizirane mRNA molekule modificiraju i tek nakon modifikacije prelaze u citoplazmu, gdje služe kao kalup za sintezu

proteina. Tako sintetizirana mRNA u eukariota često se naziva primarnim transkriptom ili heterogenom nuklearnom RNA (hnRNA, prema engl. *heterogeneous nuclear RNA*). Stoga, prije nego što je transkript gena spreman za transport iz jezgre, mora proći tri glavne post-transkripcijske modifikacije da bi nastala zrela mRNA molekula (4). Prvi korak modifikacije mRNA događa se nakon sinteze prvih 20-30 nukleotida (4). Modifikacije uključuju dodavanje tzv. zaštitne kape na 5' kraj primarnog transkripta, zatim izrezivanje introna (nekodirajućih sekvenci), te dodatak tzv. poliA repa na 3' kraju mRNA. Dodatak gvanozin trifosfata na 5' kraj mRNA, dio je post-transkripcijskih modifikacija, koje potpomažu prepoznavanje između mRNA i male podjedinice ribosoma tijekom translacije. Struktura zaštitne kape igra dakle glavnu ulogu u stabilizaciji mRNA, jer sprječava djelovanje 5'-3' egzonukleaze (4). Zaštitnu ulogu ima također i 3' kraj mRNA, preciznije dodani poli-A rep, koji sprječava enzimatsku razgradnju mRNA s 3' kraja (4).

1.2.2. Transportna RNA

Transportna RNA najmanja je od 3 osnovne vrste RNA. Ona posjeduje oko 75-95 nukleotida. tRNA molekule važne su komponente translacije. Služe za transport aminokiselina do ribosoma na kojima će se provesti biosinteza proteina povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom. Svaka od 20 aminokiselina ima specifičnu tRNA koja se s njom veže i prenosi na rastući polipeptidni lanac. tRNA imaju karakterističnu sekundarnu strukturu djeteline koja je stabilizirana jakim vodikovim vezama između nukleotida (5). Struktura joj je podijeljena na specifične regije karakterističnih motiva sekundarne strukture: dihidouridinska peteljka, D petlja, antikodonska petlja i timin-pseudouridin-citozin petlja (TΨC) (5). Završava specifičnim slijedom nukleotida na svom 3' kraju – CCA. Najvažnija uloga tRNA transport je odgovarajuće aminokiseline na ribosom tijekom translacije. Za uspješno provođenje translacije njezin 3' kraj mora se aminoacilirati pomoću enzima aminoacil-tRNA-sintetaze. Također, pravilno sparivanje kodona i antikodona aminoacilirane tRNA ključno je za točnost translacije, odnosno za prijenos ispravne aminokiseline na rastući polipeptidni lanac na ribosomu (5). Kako bi tRNA mogla uspješno provesti svoje funkcije potrebne su određene kemijske i strukturne promjene koje joj to omogućuju. Te promjene nazivaju se post-transkripcijske modifikacije (6).

1.2.3. Ribosomska RNA

rRNA molekule čine 80 % ukupne RNA u stanici. rRNA molekule izgrađuju ribosome. Ribosomi su organele u citoplazmi stanice koje služe za biosintezu proteina, a izgrađeni su od 80-tak različitih proteina i nekoliko tipova rRNA molekula. Ribosomi se sastoje od velike podjedinice (50S) i male podjedinice (30S), od kojih se svaka sastoji od vlastitih specifičnih molekula rRNA. Različite rRNA prisutne u ribosomima uključuju male i velike rRNA, koje pripadaju malim, odnosno velikim podjedinicama ribosoma. rRNA molekule komuniciraju s tRNA i drugim molekulama koje su ključne za sintezu proteina. rRNA u kombinaciji sa proteinima i enzimima putuju duž molekule mRNA tijekom translacije i olakšavaju biosintezu polipeptidnog lanca. Proces prevođenja katalizira ribosom, veliki višekomponentni kompleks RNA i proteina koji kontrolira specifično uparivanje svake mRNA s odgovarajućim slijedom aminoaciliranih tRNA i stvara peptidne veze ciljnog proteina (7). rRNA modificiraju se tijekom transkripcije i naknadnog sazrijevanja u jezgri i citoplazmi (8). Iako su mehanizmi koji reguliraju djelomičnu modifikaciju i funkcije specijaliziranih ribosoma uglavnom nepoznati, javljaju se promjene u obrascu modifikacije rRNA kao odgovor na promjene u okolišu, tijekom razvoja bolesti. Stoga modifikacije rRNA mogu pridonijeti translacijskoj kontroli ekspresije gena (8).

1.3. Izolacija nukleinskih kiselina

Izolacija RNA visoke čistoće i integriteta temeljni je uvjet za analizu genske ekspresije. Kvaliteta i količina izolirane RNA važni su čimbenici koji uvjetuju uspješnost analize, poput analize slijeda i broja mRNA kopija (qRT-PCR). RNA je međutim, osjetljiva makromolekula sklona razgradnji, posebice u prisutnosti enzima ribonukleaza (RNase). Ovi se enzimi često pronalaze na laboratorijskom priboru i reagensima široke primjene; stoga je njihova inaktivacija ključan preduvjet za uspješnu izolaciju RNA. Izolacija RNA započinje homogenizacijom tkiva ili lizom stanica. Homogenizacija može biti mehanička (taronik, homogenizator) i kemijska (detergenti, enzimi). Provodi se na ledu ili uz inhibitore da bi se spriječila aktivnost staničnih enzima. Nakon toga se uklanjaju proteini (proteinazom K, isoljavanjem) te se izdvaja nukleinska kiselina iz uzorka. Vrlo je važno odvojiti RNA od ostatka staničnog materijala: proteina, lipida i ugljikohidrata, budući da stanični proteini, uključujući enzime nukleaze, te histonski proteini koji sudjeluju u pakiranju i zaštiti DNA, mogu ometati analizu. Visoka kvaliteta izolirane RNA preduvjet je za uspjeh u eksperimentima

kao što su lančana reakcija polimeraze, Northern blotting, izrada cDNA knjižnice, sekvenciranje ili RNAseq i microarray analize (9).

1.3.1. Metode izolacije RNA

Metode za izolaciju RNA oslanjaju se na specifična svojstva nukleinskih kiselina, proteina, lipida i RNaza, kako bi osigurale optimalnu kvalitetu izolata uz minimalni gubitak dragocjenog RNA materijala. Stoga razlike u metodama izolacije RNA mogu značajno utjecati na konačni prinos (10). Prvi korak u izolaciji RNA podrazumijeva lizu stanica primjenom reagensa koji istovremeno inhibira RNaze, kao što je to gvanidin tiocijanat, ključni sastojak TRIzol reagensa. RNA se zatim izdvaja od ostalih staničnih makromolekula (DNA, proteina i lipida) na temelju razlike u afinitetu za vezanje na čvrstu fazu, poput silika kolonice, ili topljivosti u organskim otapalima, poput fenola i kloroforma. Pojedini setovi komercijalnih reagensa, poput RiboPure kompleta za pročišćavanje RNA iz krvi, kombiniraju TRIzol i druga organska otapala sa silika kolonicama, kako bi na temelju razlike u topljivosti i afiniteta osigurali specifično izdvajanje RNA iz smjese staničnih lipida i proteina (11). Prinos RNA materijala značajno varira ovisno o primijenjenoj metodi (12).

Tako razlikujemo metode:

1. Temeljene na razlikama u topivosti
 - a. Namatanjem na štapić
 - b. Pročišćavanjem fenol-kloroform-izoamilnim alkoholom
2. Temeljene na adsorpciji na silika kolone
3. Izdvajanje RNA kromatografijom
4. Metode centrifugiranja u gradijentu gustoće CsCl

Od navedenih metoda za ekstrakciju nukleinskih kiselina, za izolaciju RNA najčešće se primjenjuju metode bazirane na silika kolonama, uz prethodnu inkubaciju tkiva ili stanica s reagensima za razgradnju stanične membrane, poput TRIzol-a, β -merkaptoetanol ili ditionitrola (DTT). TRIzol je reagens koji omogućava izolaciju ukupne RNA iz uzoraka. TRIzol (ili TRI reagens) je monofazna otopina fenola i gvanidinij izotiocijanata koja istovremeno otapa biološki materijal i denaturira bjelančevine (13). Nakon otapanja, dodavanje kloroforma uzrokuje razdvajanje faza (slično ekstrakciji s fenolom: kloroformom: izoamilnim alkoholom), gdje se protein ekstrahira u organsku fazu, DNA se otapa na površini, a RNA ostaje u vodenoj fazi. Stoga se RNA, DNA i proteini mogu pročistiti iz jednog uzorka (otuda

naziv TRIzol) (13). Nukleinske kiseline se izdvajaju iz uzorka na temelju različite topljivosti u organskim i polarnim otapalima. Tijekom izolacije nastaju 3 sloja: donji fenol-kloroform sloj, međufazni sloj i gornji vodeni sloj u kojem se nalazi RNA. Osnova TRIzol reagensa je fenol. Stoga rad s TRIzolom zahtijeva digestor zbog isparavanja fenola. Kompleti za izolaciju RNA rade na principu adsorpcije na silika kolone. Vrlo su popularni zbog jednostavnosti korištenja, visoke kvalitete i čistoće dobivenog uzorka. Korištenjem različitih pufera tijekom postupka mijenja se ionska jakost. U uvjetima visoke ionske jakosti RNA se veže za kolonu i nečistoće se mogu isprati. U posljednjem koraku, koristi se pufer niske ionske jakosti koji potiče otpuštanje DNA s kolone. Pojedine metode izolacije RNA temelje se na primjeni magnetskih čestica silicijevog dioksida koje vežu RNA molekule za kratke oligo dT nastavke na svojoj površini. Na taj način omogućuju jednostavnu i brzu izolaciju čiste, netaknute poliadenilirane (polyA) mRNA iz ukupne RNA (14). Magnetske kuglice s poli-dT oligonukleotidima vežu mRNA, ali ne i ukupnu RNA, koja se zajedno s drugim makromolekulama i nečistoćama ispiru i odbacuju.

1.4. Mononuklearne stanice periferne krvi

Mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC, prema engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) ključni su pokretači imunološkog odgovora i imaju jednu okruglu jezgru (15). Pripadaju u skupinu leukocita, koji se dijele na mononuklearne i polimorfonuklearne stanice. Leukociti ili bijele krvne stanice nositelji su imunosti organizma. Nastaju od zajedničke pluripotentne krvotvorne matične stanice (engl. hematopoietic stem-cells) u koštanoj srži. Mononuklearne stanice periferne krvi prolaze aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju u različite podskupine (15). Sastoje se od nekoliko klasa imunih stanica; limfocita (T-stanica, B-stanica i NK-stanica), monocita i dendritičkih stanica. Prisutnost ovih grupa stanica unutar populacije mononuklearnih stanica varira od osobe do osobe, ali najčešće su limfociti u rasponu od 70 do 90 %, monociti od 10 do 20 %, a dendritične stanice čine 1-2 % ukupne PBMC populacije (16).

1.4.1. Izolacija RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi

Najčešći izvori RNA različiti su biološki uzorci, poput tkiva, staničnih kultura, pune krvi te poli- ili mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC). Puna krv najprikladniji je izvor RNA. Važne informacije o imunološkom sustavu i promjenama vezanim uz autoimuna oboljenja, nalaze se u bijelim krvnim stanicama ili leukocitima, koji čine mali dio stanične frakcije krvi

(17). Brojnost pojedinih leukocitnih subpopulacija i njihovih podvrsta u krvi vrlo je mala i čini izazov u imunološkim istraživanjima (17). Ekstrakcija RNA iz rijetkih leukocitnih vrsta jedan je od izazovnih laboratorijskih postupaka koji uvelike ovise o izboru i optimizaciji metodološkog pristupa.

1.5. Mjerenje koncentracije izolirane RNA

Isolacija RNA iz vrlo rijetkih krvnih populacija predstavlja velik izazov jer su prinosi vrlo mali i često neadekvatni za pouzdanu kvantifikaciju. Stoga je čistoća i koncentracija uzorka dobivenog izolacijom ključna za uspješnu kvantifikaciju i nastavne analize RNA.

1.5.1. Fluorescencijsko mjerenje

Fluorescencijsko mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina temelji se na vezanju specifičnih fluorescentnih boja za ciljane makromolekule. Fluorescencijsko zračenje nastaje nakon apsorpcije zračenja određene valne duljine, pri čemu molekula fluorofora prelazi iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje. Pobuđena molekula fluorofora u gornjim vibracijskim razinama predaje energiju susjednim molekulama te postepeno prelazi u najnižu vibracijsku razinu. Pri tome, dolazi do otpuštanja dijela energije u obliku fotona koje je moguće izmjeriti pomoću odgovarajućeg detektora (18). Primjena fluorescencijskog mjerenja vrlo je važna zbog povećanja osjetljivosti i specifičnosti mjerenja različitih makromolekula. Otapala i onečišćenja puno manje interferiraju kod ovog tipa mjerenja. Za mjerenje je ujedno potrebna puno manja početna količina uzorka nego za klasičnu spektroskopiju. U primjeni su mnogobrojne fluorescentne boje koje se specifično vežu za različite molekule, stoga je moguće razlučiti DNA od RNA, što kod spektroskopije nije slučaj jer obje makromolekule apsorbiraju UV zračenje na identičan način. Fluorescentni signal lakše je identificirati, budući da fluorescentne boje pojačavaju osjetljivost. Također postoji mogućnost pojačavanja signala. Stoga se mogu detektirati manje količine uzorka i male razlike u koncentraciji. Qubit i DeNovix fluorometri su instrumenti koji se koriste za precizno fluorescencijsko mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina.

1.5.2. Spektrofotometrijsko mjerenje

Spektrofotometrija je kvantitativna mjerna tehnika koja omogućuje istraživanje optičkih svojstava materijala u širokom rasponu valnih duljina, od ultraljubičastog do vidljivog i infracrvenog spektralnog područja (19). Ona omogućuje kvantifikaciju biomolekula. Mjeri se fotoelektrično zračenje koje neka supstanca apsorbira na određenoj valnoj duljini. Najvažniji dijelovi instrumenta koji se primjenjuju u apsorpcijskoj spektrofotometriji jesu: izvor svjetlosti, monokromator, kivete i držači za kivete, te uređaj za mjerenje intenziteta propuštene svjetlosti. Prema područjima valnih duljina izvora svjetla, razlikuju se ultraljubičasta (200-400 nm), vidljiva (400-760 nm) i infracrvena (iznad 760 nm) spektrofotometrija. Za kvantifikaciju DNA ili RNA na spektrofotometru mjeri se apsorbancija pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm. Očitavanje apsorbancije pri 260 nm omogućava računanje koncentracije nukleinskih kiselina u uzorku. Mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 280 nm mjeri se količina proteina u uzorku. Spektrofotometar tvrtke Implen, omogućuje mjerenje svih vrsta nukleinskih kiselina, uključujući dsDNA, ssDNA, RNA, miRNA te oligonukleotida.

1.6. Primjena izolirane RNA

Dobivanje visokokvalitetne RNA prvi je i često najvažniji korak u izvođenju mnogih temeljnih eksperimenata molekularne biologije. Kvaliteta i količina RNA važni su čimbenici za osiguravanje točnosti analize genske ekspresije i ostalih nizvodnih analiza temeljenih na RNA. Izolacija RNA do danas je našla primjenu u različitim poljima, od medicinske dijagnostike, genetičkog inženjerstva životinja i biljaka, do kriminalističke forenzike. Izoliranje visokokvalitetnih molekula RNA vrlo je važno za provedbu mnogih eksperimentalnih metoda, poput kloniranja, reverzne transkripcije za sintezu cDNA, RT-PCR, RT-qPCR i RNA-seq. Analiza RNA primjenjuje se u svrhu istraživanja transkriptoma, sekvence, strukture i funkcije RNA. Analiza cjelovitih transkriptoma ima sve veću važnost u razumijevanju genetskih varijanti koje pridonose razvoju složenih bolesti kao što su rak, dijabetes i kardiovaskularne bolesti. Analiza diferencijalne ekspresije RNA na cijelom genomu pruža bolji uvid u biološke puteve i molekularne mehanizme koji reguliraju razvoj i napredovanje bolesti.

2. CILJEVI

Glavni ciljevi ovoga istraživanja jesu:

- 1) Ispitati i usporediti prinos RNA iz 10 000, 50 000 i 100 000 perifernih mononuklearnih stanica primjenom TRIzol reagensa i komercijalnih kompleta na bazi silika kolonice i magnetskih čestica;
- 2) Ustanoviti djelotvornost ispitivanih metoda za izolaciju RNA mjerenjem podudarnosti koncentracije RNA na Qubit fluorometru i Implen spektrofotometru.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Ovo istraživanje je metodološka studija provedena na 10 zdravih, dobrovoljnih ispitanika. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku (KLASA: 602-04/21-08/07, URBROJ: 2158-61-07-21-36).

3.2. Materijal

U svrhu analize učinkovitosti različitih metoda za izolaciju RNA iz malog broja stanica periferne krvi, korišteni su alikvoti PBMC stanica izolirani iz krvi 10 zdravih, dobrovoljnih ispitanika s prethodno prikupljenim informiranim pristankom za dobrovoljno izuzimanje krvi. Od svakog ispitanika uzet je jedan uzorak krvi.

3.2.1. Upotrijebljene kemikalije i oprema

Direct-zol™ RNA Microprep komplet (Zymo Research, CA, SAD)

- RNA Wash pufer
- Direct-zol™ RNA Pre Wash
- DNase/RNase-Free voda
- TRI Reagent
- Etanol (96 %)
- Zymo-Spin IC kolone s kolektorskim tubicama

Invitrogen PureLink™ RNA Micro Kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, SAD)

- Pufer za lizu
- DNase, 2x DNase puffer
- RNase free voda
- 70 % etanol
- Wash puffer I, Wash puffer II
- RNase free tubice
- Kolone s kolektor tubicama
- Recovery tubice

Dynabeads® mRNA Direct™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania, Baltics UAB)

- Lysis/Binding pufer

- Washing puferi A i B
- Dynabeads® Oligo (dT) 25
- Tris-HCl pH 7,5
- PBS
- RNase free tubice 1,5 ml
- Magnet
- Rotating/roller mikser

TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, SAD)

- Kloroform
- Trizol
- 2-Propanol
- 75 % Etanol
- Dietil pirokarbonat (DEPC, prema engl. *diethyl pyrocarbonate*) H₂O
- RNase free tubice (1,5 ml)

Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, SAD)

- Qubit® RNA HS Reagent (Component A)
- Qubit® RNA HS Buffer (Component B)
- Qubit® RNA HS Standard #1 (Component C)
- Qubit® RNA HS Standard #2 (Component D)

3.3. Metode

Prikupljanje, izolacija i analiza RNA iz uzoraka periferne krvi, provodila se u Laboratoriju za analizu DNA, Medicinskog fakulteta u Osijeku. Iz uzoraka pune krvi izolirani su ukupni periferni leukociti centrifugiranjem u gradijentu gustoće Lymphoprep medija. Izolacija RNA iz PBMC alikvota provedena je primjenom TRIzol reagensa i komercijalnih kompleta na bazi silika kolona (PureLink™ RNA micro scale i Direct-zol™ RNA Microprep komplet) i magnetskih čestica (Dynabeads® mRNA Direct™ Purification komplet). Mjerenje koncentracije izolirane RNA iz svakog uzorka provedeno je pomoću Qubit fluorometra i Implen spektrofotometra.

3.3.1. Izolacija PBMC iz periferne krvi

Periferne mononuklearne stanice izolirane su iz uzoraka krvi prikupljenih u spremnike sa heparinom (vacutainer sa zelenim čepom). Uzorci heparinizirane krvi (2 x 4 ml) razrijeđeni su jednakim volumenom fiziološke otopine (8 ml) i zatim polako, pomoću Pasteur pipete nadslojeni na 16 ml. Lymphoprep medija, pazeći da se slojevi ne bi izmiješali. Pripremljeni uzorci su centrifugirani na sobnoj temperaturi, brzinom od 800 g tijekom 25 minuta, uz ubrzanje 6 i brzinu kočenja 0. Nakon centrifugiranja, u nove 15 ml tubice prebačen je bjeličasti sloj PBMC stanica (**Slika 1.**). Tubice od 15 ml s izdvojenim PBMC stanicama nadopunjene su fiziološkom otopinom puferiranom s fosfatom (PBS, prema enlg. *Phosphate-buffered saline*) do vrha. Stanice su zatim spuštene centrifugiranjem na sobnoj temperaturi pri brzini od 800 g, tijekom 15 minuta, uz ubrzanje 9 i brzinu kočenja 9. Supernatant je odbačen, a pelet resuspendiran u 5 ml PBS pufera. Broj stanica utvrđen je pomoću Burker-Turk komorice i svjetlosnog mikroskopa, a preciznost brojanja provjerena je na automatskom brojaču stanica Countess II (Thermo Fisher Scientific, SAD). Stanice su zatim peletirane na sobnoj temperaturi, brzinom od 550 g tijekom 10 minuta. Sukladno utvrđenom broju stanica pripremljeni su alikvoti od 10 000, 50 000 i 100 000 stanica za susljednu izolaciju RNA.

Priprema alikvota:

ALIKVOTI 1×10^6

- npr. 13×10^6 stanica resuspendirano je u 1,3 ml kako bi ostvarili koncentraciju veličine 1×10^6 st/100 μ l

ALIKVOTI 1×10^5

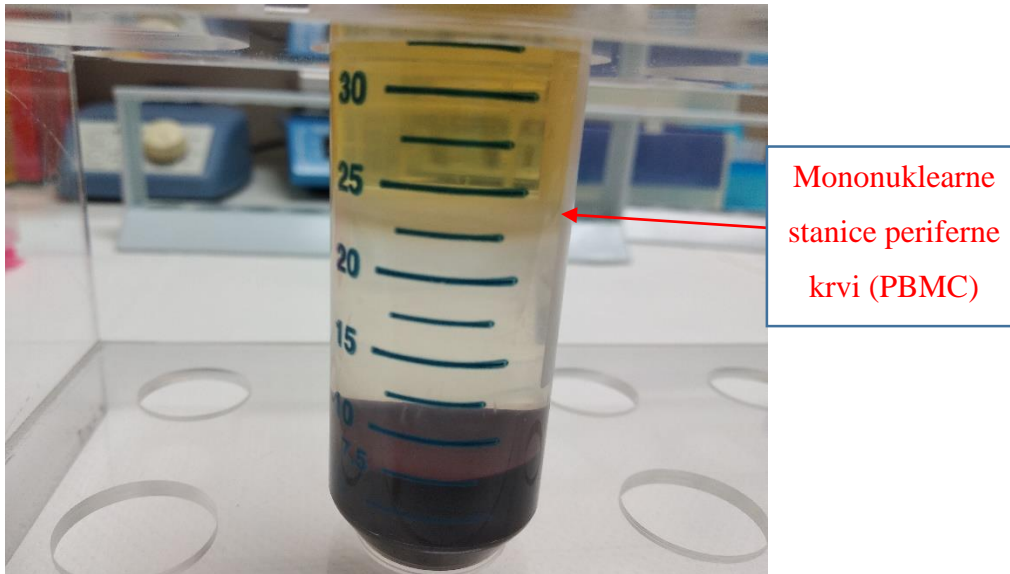
- 100 μ l razrjeđenja (1×10^6 st/100 μ l) otopljeno je u 900 μ l PBS pufera, i 100 μ l uzeto je za 1×10^5 alikvote

ALIKVOTI 5×10^4

- 100 μ l razrjeđenja (1×10^5 st/100 μ l) otopljeno je u 900 μ l PBS pufera, i uzeto je po 500 μ l za 5×10^4 alikvote

ALIKVOTI 1×10^4

- 100 μ l razrjeđenja (1×10^5 st/100 μ l) otopljeno je u 900 μ l PBS pufera, i uzeto je 100 μ l za 1×10^4 alikvote



Slika 1. Mononuklearne stanice periferne krvi (Izvor: fotografirala autorica rada)

3.3.2. Izolacija RNA - Direct-zol™ RNA Microprep komplet

Izolacija RNA primjenom Direct-zol™ RNA Microprep kompleta temelji se na primjeni silika kolonica i TRIzol reagensa.

U pripremljene alikvote volumena 100 μ l dodano je 300 μ l TRIzola, a zatim i jednak volumen 95-100 % etanola. Smjesa je dobro promiješana na vorteks miješalici i u cijelosti prebačena na silika kolonu. Pripremljeni uzorci centrifugirani su brzinom od 15 000 g tijekom 30 sekundi. Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u novu tubicu, a protok je odbačen. U sljedećem koraku, kolona je isprana s 400 μ l Direct-zol RNA PreWash otopine. Prije upotrebe pripremljeni su Direct-zol RNA PreWash i RNA Wash puferi (**Tablica 1.**). Uzorci su centrifugirani brzinom od 15 000 g, tijekom 30 sekundi, i postupak ispiranja ponovljen je još jednom. Na kolonu, zatim je dodano 700 μ l RNA Wash pufera koji je uklonjen centrifugiranjem na 15 000 g tijekom 1 minute. Kolona je prebačena u novu tubicu, a vezana RNA eluirana je u 7 μ l DNase/RNase-Free vode centrifugiranjem pri brzini od 15 000 g, tijekom 30 sekundi.

Tablica 1. Priprema pufera - Direct-zol™ RNA Microprep komplet

Priprema Direct-zol RNA PreWash	dodano je 10 ml 95-100 % etanola u 40 ml RNA
Priprema RNA Wash Pufera	dodano je 48 ml 100 % etanola (52 ml 95 % etanola) u 12 ml RNA Wash pufera

3.3.3. Izolacija RNA - Invitrogen PureLink™ RNA Micro komplet

PureLink RNA Micro komplet omogućuje jednostavnu, brzu i pouzdanu izolaciju ukupne RNA iz različitih tipova uzoraka s malim količinama polaznog materijala (20). Temelji se na primjeni silika kolonica. Pri izolaciji RNA ovim kitom važno je naglasiti da pufer za lizu i pufer za ispiranje kolonica (Wash pufer I) sadrže gvanidin izotiocijanat.

Pri izolaciji RNA pomoću ovog kompleta stanice su najprije peletirane centrifugiranjem na 4 °C pri brzini od 2000 g tijekom 5 minuta. Supernatant je odbačen i dodano je 350 µl pufera za lizu. Homogenizacija stanica učinjena je najprije snažnim miješanjem na vorteks miješalici, a zatim dodatno, višestrukim propuštanjem stanične suspenzije kroz iglu veličine 21 gauge. Nakon toga, u smjesu je dodano 350 µl 70 % etanola. Uzorci su miješani na vorteks miješalici sve dok se precipitat više nije mogao vidjeti. Pripremljeni uzorci (700 µl) nanešeni su na kolonu i centrifugirani pri brzini 15 000 g, tijekom 1 minute na sobnoj temperaturi. Protok je odbačen, a kolona je zatim isprana s 600 µl Wash pufera I, koji je pripremljen prije upotrebe (**Tablica 2.**). Nakon toga slijedilo je centrifugiranje pri brzini 15 000 g, tijekom 15 sekundi, protok je odbačen, a kolona prebačena u novu kolekcijsku tubicu. Postupak ispiranja nastavljen je dodatkom 500 µl Wash pufera II, koji je odbačen nakon centrifugiranja (15 000 x g 15 sekundi). Koraci ispiranja Wash puferom II su ponovljeni još jednom. Ostatak pufera uklonjen je s kolone dodatnim centrifugiranjem pri brzini 15 000 g, tijekom 1 minute, protok je odbačen, a kolona prebačena u novu kolekcijsku tubicu. U konačnici na kolonu je dodano 12 µl RNase free vode, uzorci su inkubirani 1 minutu na sobnoj temperaturi, a RNA je eluirana centrifugiranjem pri brzini od 12 000 g, tijekom 2 minute.

Tablica 2. Priprema pufera - Invitrogen PureLink™ RNA Micro komplet

Priprema pufera za lizu	-10 µl 2-merkaptetanola dodano je u 1 ml pufera za lizu (dobiven je pufer za lizu s 1 % 2-merkaptetanolom) -alternativa za 2-merkaptetanol - DTT (20 µl 2M DTT na svakih 1 ml pufera za lizu)
Priprema Wash pufera II	-dodano je 60 ml 96 % etanola
Priprema PureLink DNase stock	-resuspendirana je liofilizirana DNaza u 550 µl RNase free vode i pohranjena na +4 °C na kratki period -aliquoti su pohranjeni na -20 °C

3.3.4. Izolacija RNA - Dynabeads® mRNA Direct™ komplet

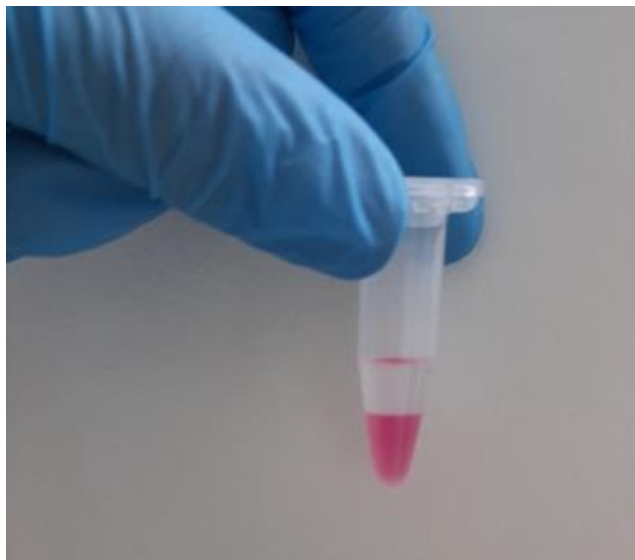
Izolacija RNA primjenom Dynabeads® mRNA Direct™ Purification kompleta temelji se na primjeni magnetskih čestica silicijevog dioksida koje vežu RNA molekule za kratke oligo dT nastavke na svojoj površini. Magnetske kuglice s poli-dT oligonukleotidima vežu mRNA, stoga ova metoda služi isključivo za izolaciju mRNA, a ne ukupne RNA koja se ispire i odbacuje.

U pripremljene alikvote volumena 100 µl dodano je 300 µl Lysis/Binding pufera i snažno miješano pipetom dok smjesa nije postala viskozna. Pripremljeni lizati ostavljeni su sa strane, Dynabeads Oligo(dT) magnetske kuglice pripremljene su snažnim miješanjem, nakon čega je 10 µl izdvojeno u 1,5 ml RNase free tubicu. Izdvojeni alikvoti Dynabeads kuglica postavljeni su na magnet, a bistri supernatant koji se pojavio nakon 30 sekundi je odbačen. Tubice su zatim uklonjene s magneta, a Dynabeads čestice resuspendirne dodatkom 50 µL Lysis/Binding pufera. Tubica je ponovno vraćena na magnet, a bistri supernatant uklonjen je nakon 30 sekundi. Ovako pripremljene Dynabeads čestice zatim su resuspendirane dodatkom 400 µl ranije pripremljenog staničnog lizata. Dobivena smjesa dobro je promiješana i potom inkubirana 3-5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, tubice su postavljene na magnet, a bistri supernatant uklonjen je nakon 2 minute. Vezane čestice isprane su dva puta, najprije s 600 µl Washing pufera A, a potom još dva puta s 300 µl Washing pufera B. Izolirane mRNA molekule eluirane su s Dynabeads čestica tijekom inkubacije (65 °C 2 minute) u 10 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Slobodne Dynabeads čestice uklonjene su iz mRNA izolata postavljanjem tubice na magnet, nakon čega je bistri supernatant s mRNA molekulama izdvojen u novu RNase-free tubicu.

3.3.5. Izolacija RNA - TRIzol™ reagens

TRIzol je monofazna otopina fenola i gvanidinijeva izotiocijanata, koji istovremeno solubiliziraju biološki materijal i denaturiraju proteine. Nakon solubilizacije dodatak kloroforma dovodi do povećanja gustoće organske faze koja se od vodene faze odvaja za vrijeme centrifugiranja. Pri tome, proteini zaostaju u organskoj fazi, DNA u međufazi, a RNA u vodenoj fazi. Dodatkom etanola u vodenu fazu dolazi do precipitacije RNA (21). Netom prije izolacije RNA pomoću TRIzol reagensa, svježe stanice peletirane su centrifugiranjem 10 minuta na 500 g i odbačen je supernatant. Na pelet stanica dodano je 300 µl TRIzol kemikalije. Uzorci su snažno promiješani na vorteks miješalici 30 sekundi i zatim inkubirani 20-30 minuta

na ledu. Nakon inkubacije u staničnu suspenziju dodano je 60 μl kloroforma i sve zajedno još jednom promiješano na vorteks miješalici. Organska i vodena faza razdvojene su prilikom 15 minuta centrifugiranja, pri brzini od 13 000 okretaja u minuti (rpm, prema engl. *Revolutions Per Minute*) i temperaturi od 4 °C. Vodena faza (**Slika 2.**) zatim je izdvojena u nove tubice i udružena s 250 μl hladnog izopropanola. Dobivena smjesa nježno je promiješana izvrtanjem tubice i centrifugirana pri temperaturi 4 °C i brzini od 13 000 rpm tijekom 5 minuta. Supernatant je odbačen, a sitni talog ukupne RNA resuspendiran je dodatkom 500 μl hladnog apsolutnog etanola. Precipitat RNA peletiran je 10 minutnim centrifugiranjem na 10 000 rpm i 4 °C. Supernatant je odbačen, i tubice su ostavljene otvorene kako bi etanol ishlapio. Polusuhi RNA talog na dnu tubice u konačnici je otopljen u 10 μl dietil pirokarbonat (DEPC, prema engl. *diethyl pyrocarbonate*) H_2O .



Slika 2. Odvajanje vodenog sloja u kojem se nalazi RNA (Izvor: fotografirala autorica rada)

3.3.6. Mjerenje koncentracije RNA s pomoću komercijalnog kompleta „Qubit HighSensitivity RNA“

Za mjerenje koncentracije RNA 120 uzoraka i 2 standarda pomoću Qubit fluorometra pripremljena je radna otopina razrjeđenja 1:200. Radna otopina sastojala se od dviju komponenata: 24 278 μl Qubit RNA HS pufera i 122 μl Qubit RNA HS reagensa. Za pripremu standarda 1 (0 ng/ μl), odnosno standarda 2 (10 ng/ μl) pomiješano je 190 μl Qubit radne otopine i 10 μl stock otopine Qubit RNA HS Standarda 1, odnosno 10 μl stock otopine Qubit RNA HS Standarda 2. Alikvoti za mjerenje RNA u uzorcima nepoznate koncentracije pripremljeni su miješanjem 199 μl Qubit radne otopine i 1 μl RNA izolata, nakon čega su kratko vorteksirani

te inkubirani na sobnoj temperaturi. Prvo su izmjerene vrijednosti fluorescencije standarda 1 i standarda 2, a nakon toga na temelju dobivene standardne krivulje određene su vrijednosti koncentracije RNA u ispitivanim uzorcima (**Slika 3.**).



Slika 3. Qubit fluorometar (Izvor: fotografirala autorica rada)

3.4. Statističke metode

Po završetku eksperimentalnog dijela rada, provedena je obrada rezultata i analiza podudarnosti mjerenja dobivenih mjerenjem na Qubit i Implen uređaju, poredba prinosa po skupinama, testiranje normalnosti distribucije, neparametrijska testiranja razlika među skupinama za kontinuirane podatke, te grafička analiza uz mjeru Linovog koeficijenta konkordancije (22). Numerički podatci opisani su medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama ispitana je neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom, s post hoc Bonferroni-Dunnovom poredbom. Podudarnost mjerenja ocijenjena je Linovim koeficijentom konkordancije korelacija s pripadnim 95 %-tnim intervalom pouzdanosti. Statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$. Za statističku analizu upotrebljen je MedCalc program v.20 (MedCalc Software, Ltd, Ostend, Belgija). Za grafički prikaz dobivenih rezultata korišten je R program v4.1.0 (<https://www.r-project.org/>)

4. REZULTATI

Nakon eksperimentalnog dijela rada izmjerene su koncentracije RNA na Qubit i DeNovix fluorometru i Implen spektrofotometru (**Slika 4.**), ovisno o izboru metode za ekstrakciju RNA. Također je provedena analiza podudarnosti izmjerenih vrijednosti RNA koncentracija.

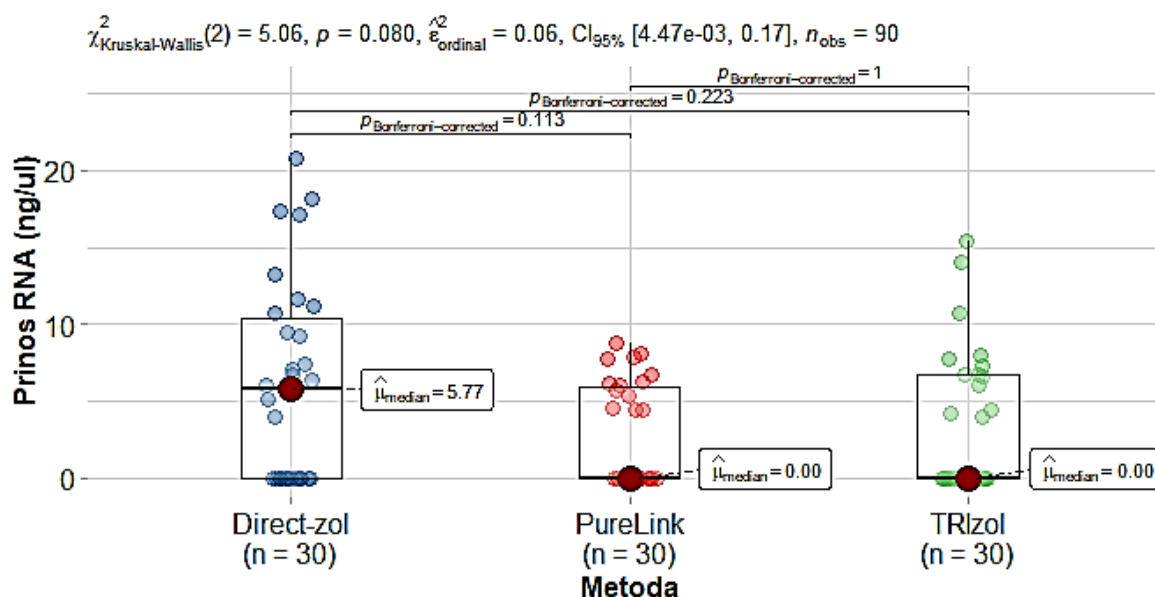


Slika 4. Implen spektrofotometar P330 (Izvor: fotografirala autorica rada)

4.1. Analiza prinosa RNA ovisno o izboru metode za izolaciju i kvantifikaciju

4.1.1. Mjerenja na Qubit fluorometru

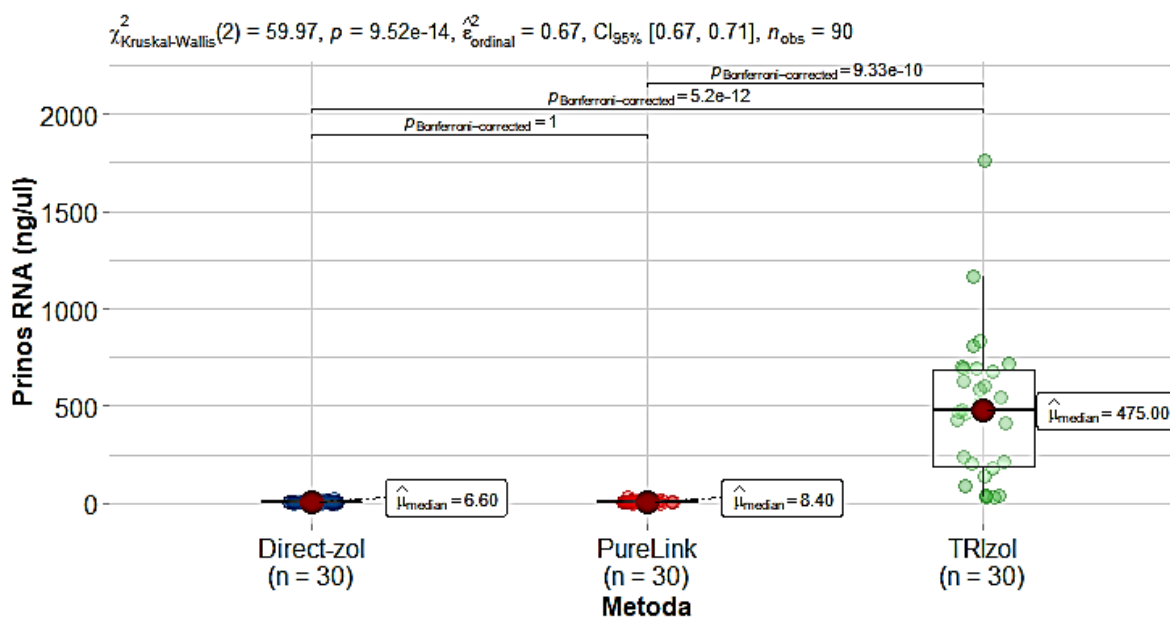
Mjerenjem koncentracije ukupne kolekcije uzoraka RNA na Qubit fluorometru nije utvrđena statistički značajna razlika između prinosa RNA ostvarenog različitim metodama (Kruskall-Wallis test, $P = 0,08$). Važno je međutim, naglasiti da je radi ograničenja Qubit fluorometra vezanih uz donju granicu osjetljivosti, a koja iznosi $0,025 \text{ ng}/\mu\text{l}$ u $200 \mu\text{l}$ radne otopine, u većini naših uzoraka oskudnog RNA prinosa i volumena, bilo nemoguće Qubit uređajem kvantificirati koncentraciju RNA. Većina je uzoraka, naime, eluirana u volumenu do $10 \mu\text{l}$, a mjerenja su, sukladno preporukama proizvođača, izvršena u smjesi od $1 \mu\text{l}$ RNA uzorka i $199 \mu\text{l}$ radnog reagensa, pri čemu se donji prag osjetljivosti metode može dostići jedino u uzorcima koncentracije $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$, što je bio nedostižan rezultat za većinu uzoraka s početnim materijalom od $10\ 000$ PBMC stanica. U tom kontekstu, prinosi mRNA ostvareni primjenom Dynabeads magnetskih čestica također su bili nemjerljivi na Qubit fluorometru. Veći prinosi, bilježe se pak, u uzorcima s većim početnim materijalom ($50\ 000$ i $100\ 000$ PBMC stanica), pri čemu su najveće vrijednosti koncentracije RNA zabilježene u uzorcima koji su izolirani primjenom Direct-zol kompleta [**Slika 5**; medijan (IQR); $M_e = 5,77$ ($0 - 10,39$) $\text{ng}/\mu\text{l}$].



Slika 5. Usporedba prinosa RNA ukupne kolekcije uzoraka izoliranih primjenom različitih metoda i izmjerenih Qubit fluorometrom. Koncentracija je izmjerena na uređaju Qubit, a vrijednosti su prikazane box-plot dijagramima. Rezultati su opisani kao medijan i interkvartilni raspon. Gornje i donje vertikalne crte predstavljaju granice interkvartilnog raspona. $P = 0,08$ (Kruskal-Wallisov test s post hoc Bonferroni-Dunnovom poredbom).

4.1.2. Mjerenja na Implen spektrofotometru

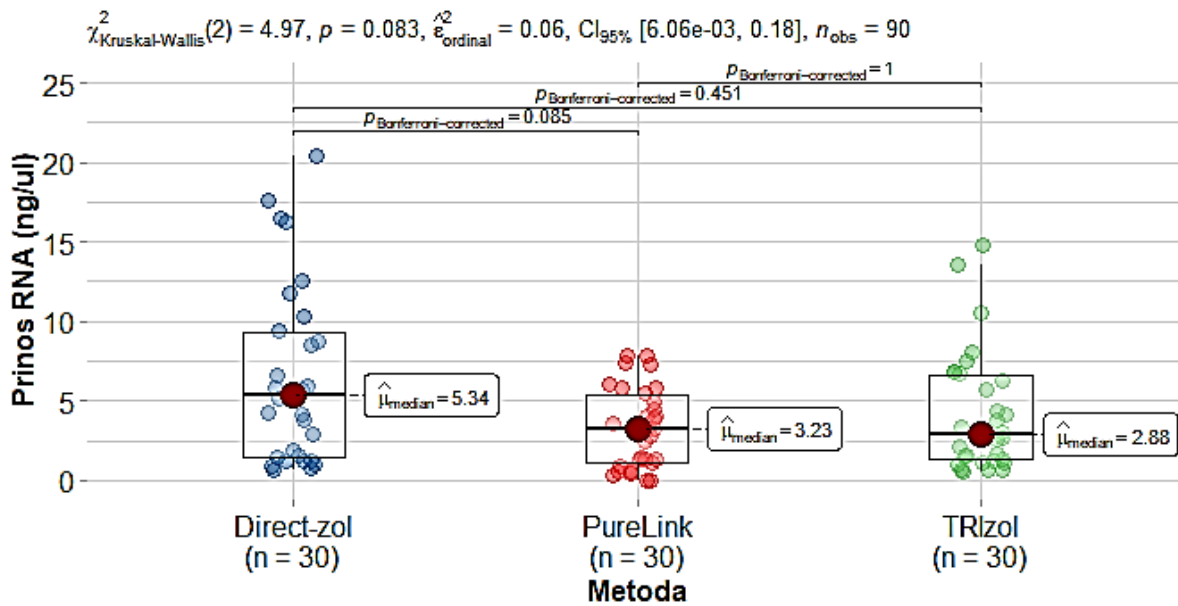
Usporedbom vrijednosti koncentracije RNA dobivenih mjerenjem pomoću Implen spektrofotometra uočena je statistički značajna razlika između uzoraka izoliranih primjenom TRIZol reagensa i komercijalnih kompleta Direct-zol i PureLink (Kruskal-Wallis test, $P < 0,001$). Najveći prinos RNA zabilježen je u uzorcima koji su izolirani pomoću TRIZol kompleta [medijan (IQR); $M_e = 475$ (187 - 688)], a značajno manje vrijednosti uočene su u preostalim uzorcima izoliranim Direct-zol [medijan (IQR); $M_e = 6,60$ (4,5 - 8,7) ng/μl] i PureLink [medijan (IQR); $M_e = 8,40$ (4,8 - 11,6) ng/μl] kompletom (**Slika 6.**). Koncentracija RNA u Dynabeads uzorcima bila je većinom nemjerljiva ($M_e = 0$; IQR = 0; min = 0; max = 9.6 ng/μl).



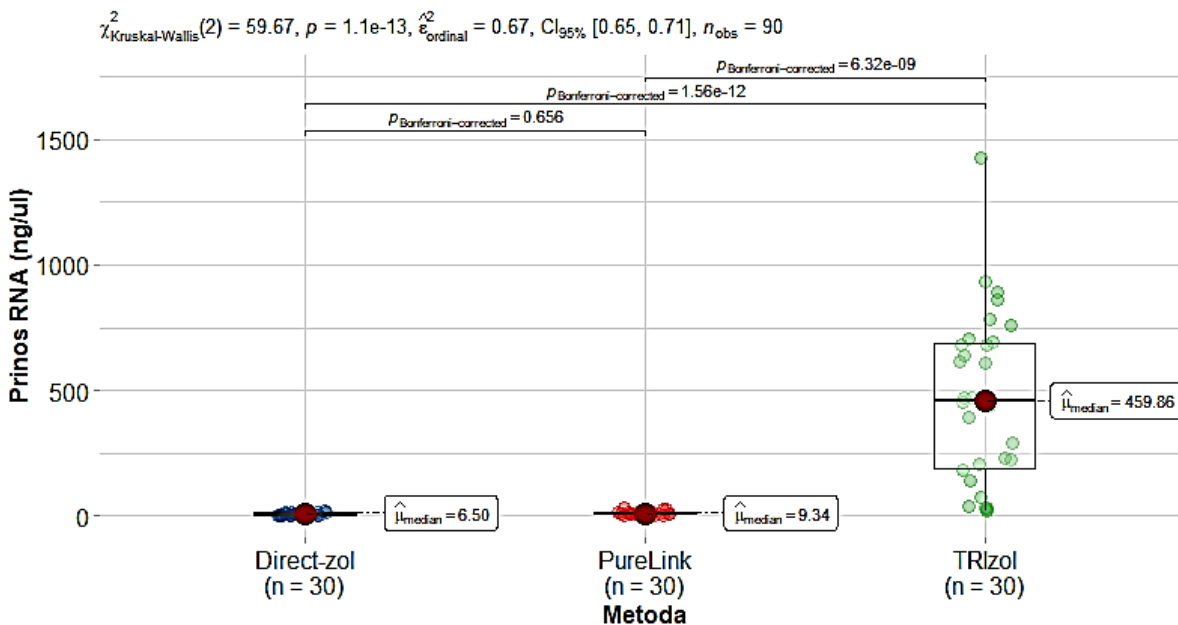
Slika 6. Usporedba prinosa RNA svih uzoraka izoliranih primjenom različitih metoda i izmjerenih Implen spektrofotometrom. Koncentracija je izmjerena na uređaju Implen, a vrijednosti su prikazane box-plot dijagramima. Rezultati su opisani kao medijan i interkvartilni raspon. Gornje i donje vertikalne crte predstavljaju granice interkvartilnog raspona. $P < 0,001$ (Kruskal-Wallisov test s post hoc Bonferroni-Dunnovom poredbom).

4.1.3. Mjerenja na DeNovix fluorometru i spektrofotometru

Usporedbom vrijednosti koncentracije RNA dobivenih primjenom DeNovix fluorometra nije utvrđena statistički značajna razlika između uzoraka izoliranih različitim metodama (**Slika 7**; $P = 0,08$; Kruskal-Wallis test). Najveći prinos RNA ostvaren je pak, primjenom Direct-zol kompleta [medijan (IQR); $M_e = 5,34$ (1,49 - 9,26) ng/μl]. Međutim, nakon spektrofotometrijskog mjerenja istih uzoraka na DeNovix uređaju, zapažena je statistički značajna razlika (Kruskal-Wallis test, $P < 0,001$) između prinosa ostvarenog primjenom TRIzol reagensa [medijan (IQR); $M_e = 459,86$ (187,66 - 689,60) ng/μl] u odnosu na prinos dobiven komercijalnim kompletima (**Slika 8.**). Koncentracija mRNA ostvarena primjenom Dynabeads magnetskih kuglica bila je mjerljiva na DeNovix uređaju, pri čemu su zabilježena slijedeća fluorimetrijska [medijan (IQR); $M_e = 0,56$ (0,25 - 1,145); min = 0; max = 1.3 ng/μl] i nešto veća spektrofotometrijska [medijan (IQR); $M_e = 0,705$ (0,47 - 1,01); min = 1.0.; max = 13.32 ng/μl] mjerenja.



Slika 7. Usporedba prinosa RNA u ovisnosti o izboru metode za izolaciju RNA nakon fluorometrijskog mjerenja na DeNovix uređaju. Vrijednosti koncentracije prikazane su box-plot dijagramima. Rezultati su opisani kao medijan i interkvartilni raspon. Gornje i donje vertikalne crte predstavljaju granice interkvartilnog raspona. $P = 0,08$ (Kruskal-Wallisov test s post hoc Bonferroni-Dunnovom poredbom).



Slika 8. Usporedba prinosa RNA u ovisnosti o izboru metode za izolaciju RNA nakon spektrofotometrijskog mjerenja na DeNovix uređaju. Vrijednosti koncentracije prikazane su box-plot dijagramima. Rezultati su opisani kao medijan i interkvartilni raspon. Gornje i donje

vertikalne crte predstavljaju granice interkvartilnog raspona. $P < 0,001$ (Kruskal-Wallisov test s post hoc Bonferroni-Dunnovom poredbom).

4.2. Usporedba prinosa RNA ostvarenog u podskupinama uzoraka (10 000, 50 000, 100 000 stanica) ovisno o izboru metode za izolaciju

4.2.1. Prinos RNA iz 10 000 PBMC stanica

Vrijednosti koncentracije RNA dobivene primjenom različitih izolacijskih pristupa i mjerene fluorometrijskom metodom na DeNovix uređaju nisu se značajno razlikovale (Kruskal-Wallis test, $P = 0,09$). Sukladno ranije navedenom ograničenju Qubit reagensa, vrijednosti RNA na Qubit uređaju nisu bile mjerljive, i stoga nisu uspoređene s mjerenjima dobivenim na DeNovix fluorometru. Značajna razlika pojavljuje se međutim, prilikom usporedbe RNA prinosa izmjerenih spektrofotometrijskim mjerenjem, kako na uređaju Implen (Kruskal-Wallis test, $P < 0,001$) tako i na DeNovix (Kruskal-Wallis test, $P < 0,001$) uređaju, pri čemu je najveći prinos RNA zabilježen u uzorcima koji su izolirani pomoću TRIzol kompleta. (**Tablica 3.**)

Tablica 3. Usporedba prinosa RNA iz 10 000 stanica ovisno o izboru metode za izolaciju

Implen spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Median	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	4,2	4,4	0,8	13,2	< 0,001
PureLink	10	4,6	6,7	0	29,6	
TRIzol	10	443	332,5	42	1762	
DeNovix fluorometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Median	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	1,19	0,55	0,71	1,91	0,09
PureLink	10	0,50	0,97	0	1,42	
TRIzol	10	1,09	0,65	0,57	2,07	
DeNovix spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Median	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	3,69	1,62	2,14	12,23	< 0,001
PureLink	10	5,61	9,96	0,68	35,66	
TRIzol	10	313,47	289,77	32,28	1426,38	

4.2.2. Prinos RNA iz 50 000 PBMC stanica

Prinos RNA u skupini uzoraka od 50 000 stanica bio je mjerljiv na Qubit uređaju, te je uočena nominalno značajna razlika (Kruskal-Wallis test, $P = 0,053$) među uzorcima RNA izoliranim različitim metodama, pri čemu su najveće vrijednosti zabilježene u uzorcima izoliranim Direct-zol kompletom. Sličan rezultat uočen je usporedbom DeNovix fluorometrijskih mjerenja RNA koncentracije (Kruskal-Wallis test, $P = 0,022$). Spektrofotometrijska mjerenja RNA koncentracije u uzorcima izoliranim TRIzol reagensom bila su međutim, značajno veća od RNA prinosa ostvarenih primjenom Direct-zol i PureLink komercijalnih kompleta (Tablica 4.).

Tablica 4. Usporedba prinosa RNA iz 50 000 stanica ovisno o izboru metode za izolaciju

Qubit fluorometrijsko mjerenje RNA koncentracije (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	6,25	2,66	0	9,28	0,053
PureLink	10	0	4,4	0	5,4	
TRIZol	10	2	4,35	0	10,7	
Implen spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	5,4	3,1	1,6	13,2	< 0,001
PureLink	10	5,2	5,9	3,6	12,8	
TRIZol	10	442	512	36	1168	
DeNovix fluorometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	5,64	1,74	2,86	8,51	0,022
PureLink	10	3,4	1,42	0,90	4,49	
TRIZol	10	3,59	2,27	1,24	10,5	
DeNovix spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	5,52	3,50	3,99	13,94	0,002
PureLink	10	7,08	6,10	5,46	16,48	
TRIZol	10	453,80	511,25	24,34	861,47	

4.2.3. Prinos RNA iz 100 000 PBMC stanica

Usporedbom fluorometrijskih mjerenja RNA prinosa u skupini uzoraka od 100 000 stanica, statistički značajna razlika zabilježena je između mjerenja ostvarenih Qubit (Kruskal-Wallis test, $P = 0,005$) i DeNovix (Kruskal-Wallis test, $P = 0,004$) fluorometrom, pri čemu su najveće koncentracije RNA, na oba fluorometra, izmjerene u uzorcima koji su izolirani primjenom Direct-zol kompleta (**Tablica 5.**). Analizom spektrofotometrijskih mjerenja, također je zabilježena značajna razlika na Implen (Kruskal-Wallis test, $P = 0,002$) i DeNovix (Kruskal-Wallis test, $P < 0,001$) spektrofotometru, ali je suprotno od fluorometrijskih mjerenja, najveći RNA prinos uočen u uzorcima izoliranim TRizol reagensom, uz značajna odstupanja u odnosu na puno niže RNA koncentracije ostvarene primjenom komercijalnih kompleta (**Tablica 5.**).

Tablica 5. Usporedba prinosa RNA 100 000 stanica ovisno o izboru metode za izolaciju

Qubit fluorometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	12,5	6,5	5,08	20,8	0,005
PureLink	10	6,52	1,77	0	8,84	
TRizol	10	7,03	1,74	0	15,4	
Implen spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	9,2	4,5	4,8	22,4	0,002
PureLink	10	11,6	4,3	7,2	18	
TRizol	10	641	434,5	32	838	
DeNovix fluorometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	12,15	6,81	5,16	20,4	0,004
PureLink	10	5,97	1,76	3,21	7,86	
TRizol	10	6,84	2,06	2,56	14,8	
DeNovix spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije RNA (ng/μl)						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	13,10	3,91	7,14	23,26	< 0,001
PureLink	10	14,43	6,76	8,87	26,51	
TRizol	10	660,69	472,06	22,76	934,21	

4.3. Usporedba čistoće (A260/A280 omjera) svih RNA uzoraka ovisno o izboru metode za izolaciju

Analiza čistoće ukupne kolekcije RNA uzoraka provedena je primjenom DeNovix i Implen spektrofotometra. Statistički značajne razlike zabilježene su između mjerenja ostvarenih DeNovix (Kruskal-Wallis test, $P = 0,003$) i Implen spektrofotometrom (Kruskal-Wallis test, $P < 0,001$), pri čemu su najveći A260/A280 omjeri uočeni u uzorcima izoliranim pomoću PureLink komercijalnog kompleta, a najslabiji rezultat ostvaren je primjenom TRIzol reagensa (Tablica 6.).

Tablica 6. Usporedba čistoće svih RNA uzoraka ovisno o izboru metode za izolaciju

DeNovix A 260/280						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	30	1,48	0,52	0,94	2,04	0,003
PureLink	30	1,67	0,33	0,67	2,03	
TRIzol	30	1,41	0,27	1,24	1,75	
Implen A 260/280						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	30	1,46	0,23	0,94	1,75	< 0,001
PureLink	30	1,83	0,49	1,3	2,4	
TRIzol	30	1,23	0,15	1,10	1,78	

4.4. Usporedba čistoće (A260/A280 omjera) RNA uzoraka po skupinama (10 000, 50 000, 100 000 stanica) ovisno o izboru metode za izolaciju

4.4.1. Vrijednosti A260/A280 omjera u RNA uzorcima izoliranim iz 10 000 stanica

Usporedbom vrijednosti A260/A280 omjera u skupini uzoraka izoliranih iz 10 000 stanica utvrđena je statistički značajna razlika između mjerenja ostvarenih Implen (Kruskal-Wallis test, $P = 0,002$), ali ne i DeNovix spektrofotometrom ($P = 0,412$), pri čemu je najbolji rezultat zabilježen u uzorcima RNA izoliranim PureLink komercijalnim kompletom (Tablica 7.).

Tablica 7. Usporedba čistoće 10 000 stanica ovisno o izboru metode za izolaciju

Denovix A 260/280						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	1,31	0,37	0,94	2,04	0,412
PureLink	10	1,43	0,23	0,67	1,85	
TRIZol	10	1,36	0,20	1,24	1,61	
Implen A 260/280						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	1,32	0,23	1	1,62	0,002
PureLink	10	1,82	0,47	1,3	2,4	
TRIZol	10	1,22	0,25	1,14	1,57	

4.4.2. Vrijednosti A260/A280 omjera u RNA uzorcima izoliranim iz 50 000 stanica

U skupini uzoraka od 50 000 stanica utvrđena je statistički značajna razlika pri mjerenju Implen (Kruskall-Wallis test, $P = 0,002$), ali ne i DeNovix spektrofotometrom ($P = 0,089$). Najveće vrijednosti A260/A280 omjera zabilježene su u PureLink uzorcima, na oba spektrofotometra (Tablica 8.).

Tablica 8. Usporedba čistoće 50 000 stanica ovisno o izboru metode za izolaciju

DeNovix A 260/280						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	1,52	0,49	0,97	1,83	0,089
PureLink	10	1,69	0,24	1,41	2,04	
TRIZol	10	1,48	0,35	1,26	1,74	
Implen A 260/280						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	1,46	0,15	0,94	1,5	0,002
PureLink	10	2,10	0,72	1,32	2,4	
TRIZol	10	1,24	0,12	1,10	1,64	

4.4.3. Vrijednosti A260/A280 omjera u RNA uzorcima izoliranim iz 100 000 stanica

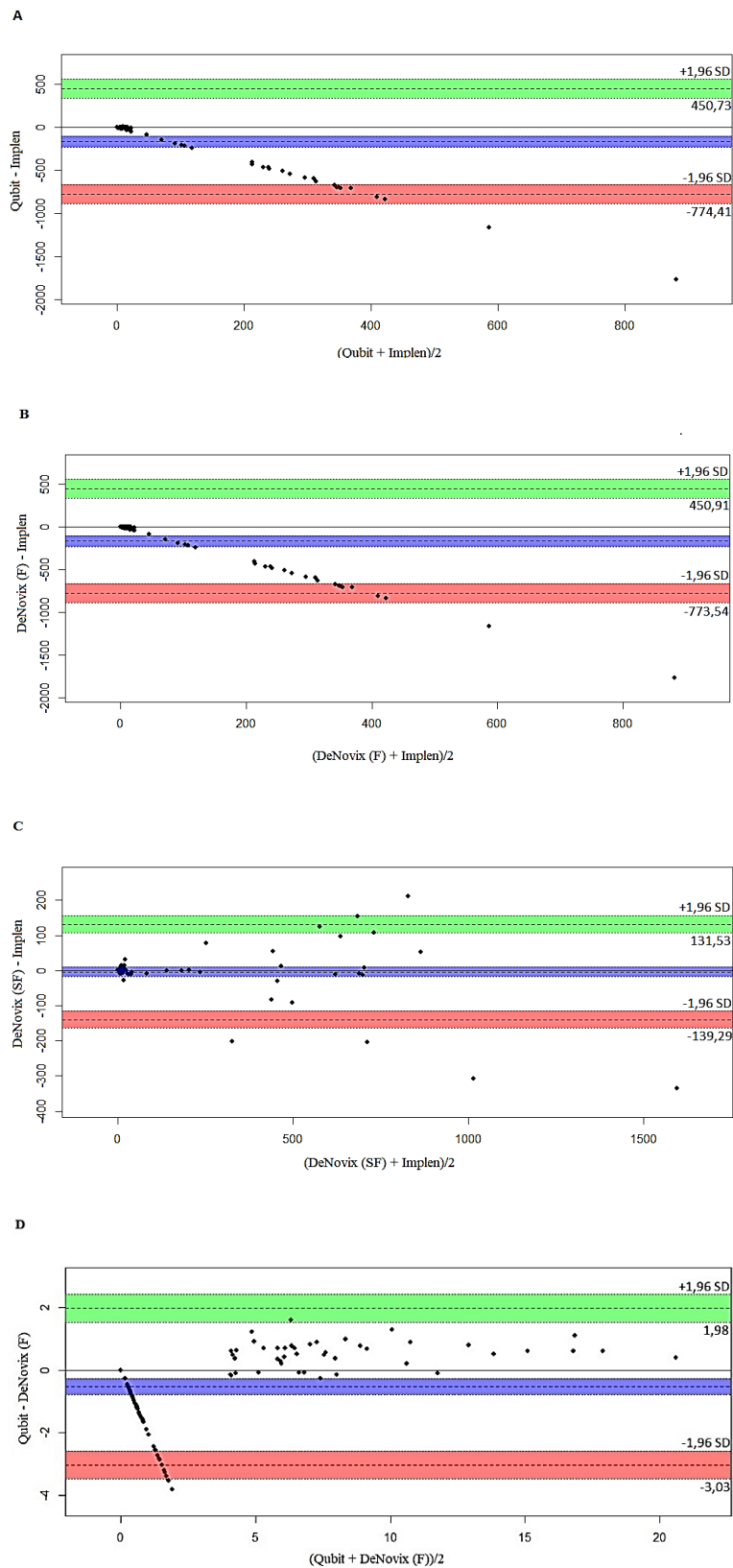
U skupini od 100 000 stanica utvrđena je statistički značajna razlika između mjerenja ostvarenih na Implen (Kruskall-Wallis test, $P = 0,001$) i DeNovix (Kruskall-Wallis test, $P = 0,001$) uređaju, pri čemu je najveća čistoća RNA uzoraka zabilježena u skupini PureLink RNA uzoraka (Tablica 9.).

Tablica 9. Usporedba čistoće 100 000 stanica ovisno o izboru metode za izolaciju

Denovix A 260/280						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	1,67	0,29	0,98	1,88	0,001
PureLink	10	1,82	0,17	1,49	2,01	
TRIzol	10	1,45	0,22	1,33	1,75	
Implen A 260/280						
Metoda	Broj mjerenja	Medijan	Interkvartilni raspon (IQR)	Minimum	Maksimum	P
Direct-zol	10	1,59	0,08	1	1,75	0,001
PureLink	10	1,82	0,31	1,41	2,06	
TRIzol	10	1,22	0,14	1,12	1,78	

4.5. Analiza podudarnosti mjerenja koncentracije RNA na Qubit fluorometru i Implen spektrofotometru

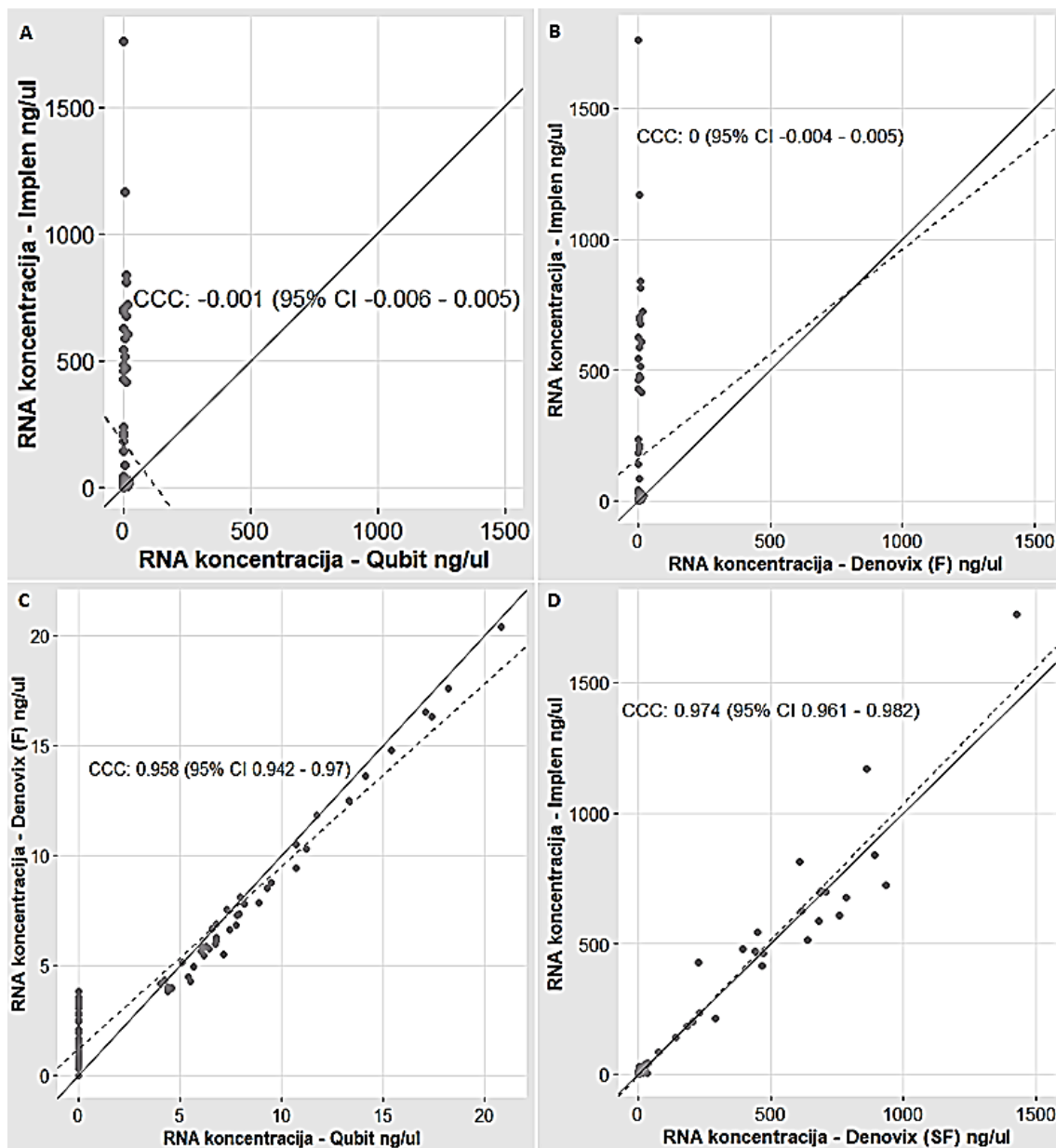
Bland-Altman test služi za analizu podudarnosti mjerenja dobivenih primjenom različitih kvantifikacijskih metoda. U svrhu kvantifikacije podudarnosti određuje se interval pouzdanosti koji se izračunava pomoću srednje vrijednosti i standardne devijacije razlike između dvaju mjerenja. Izračunata srednja vrijednost razlike mjerenja predstavlja procjenu podudarnosti dviju metoda. Standardna devijacija razlike mjerenja omogućuje definiranje intervala pouzdanosti unutar kojeg je moguće vidjeti slučajne fluktuacije zabilježenih razlika. Ako se srednja vrijednost razlike značajno razlikuje od nule, to ukazuje na prisutnost konstantne pristranosti mjerenja dobivenih jednom metodom u odnosu na drugu metodu. Analizom zabilježenih vrijednosti koncentracije RNA izmjerenih na Qubit fluorometru i Implen spektrofotometru utvrđena je srednja vrijednost razlike mjerenja koja iznosi 161,84 jedinica. Što znači da Implen pri procjeni koncentracije RNA u ispitivanim uzorcima, u prosjeku mjeri 161,84 jedinica više u odnosu na Qubit. Rezultati na grafu pokazuju izrazito heterogena odstupanja duž intervala podudarnosti (**Slika 9A**). To je uvelike posljedica nepouzdanosti spektrofotometrijskih mjerenja Implenom za tako mali broj stanica, koji uzrokuju pojavu velike razlike između mjerenja ostvarenih na uređajima Qubit i Implen. Analizom vrijednosti koncentracija RNA na DeNovix fluorometru i Implen spektrofotometru uočena je srednja vrijednost razlike mjerenja koja je iznosila 161,31 jedinice (**Slika 9B**). Što je u skladu s ranije navedenim mjerenjima. Usporedbom spektrofotometrijskih mjerenja na uređajima Implen i DeNovix srednja vrijednost razlike mjerenja iznosila je 3,88 (**Slika 9C**). Dok je srednja vrijednost razlike mjerenja između Qubit i DeNovix fluorometra iznosila 0,53 jedinica (**Slika 9D**). Što predstavlja najmanju razliku među uspoređivanim uređajima.



Slika 9. Bland-Altman dijagram raspršenja; usporedba spektrofotometrijskih (SF) i fluorometrijskih (F) mjerenja koncentracije RNA. Y-os predstavlja razliku izmjerenih vrijednosti, a X-os predstavlja aritmetičku sredinu uparenih mjerenja A) (Qubit + Implen)/2,

B) (DeNovix (F) + Implen)/2, C) (DeNovix (SF) + Implen)/2 i D) (Qubit + DeNovix (F))/2. Srednja vrijednost razlike mjerenja označena je plavom horizontalnom osi. Svaka točka predstavlja odnos srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) razlika između dvaju mjerenja. Granice intervala pouzdanosti definirane su rasponom od +/- 1,96 x SD razlike mjerenja.

Linov koeficijent konkordancije je test kojim se mjeri podudarnost mjerenja zabilježenih primjenom nove i referentne metode. Stupanj korelacije između dvaju mjerenja opisuje vrijednost Linova koeficijenta koji se kreće od -1 do 1. Očekivana vrijednost Linova koeficijenta konkordancije savršeno podudarnih mjerenja približava se 1. Linov koeficijent konkordancije korišten je za prikaz podudarnosti mjerenja RNA koncentracije izmjerenih pomoću Qubit fluorometra, Implen spektrofotometra i DeNovix fluorometra i spektrofotometra. Graf Linova koeficijenta konkordancije pokazuje izrazito mali stupanj korelacije i podudarnosti [**Slika 10A**; CCC = -0,001 (-0,006 – 0,005)] između mjerenja dobivenih pomoću Qubit fluorometra i Implen spektrofotometra. Dobiveni stupanj podudarnost između mjerenja dobivenih pomoću DeNovix fluorometra i Implen spektrofotometra također je mali [**Slika 10B**; CCC = 0 (-0,004 – 0,005)]. Veći stupanj podudarnosti uočen je usporedbom mjerenja Qubit i DeNovix fluorometra [**Slika 10C**; CCC = 0,958 (0,942 – 0,97)]. Dok je najveći stupanj korelacije utvrđen između spektrofotometara Implen i DeNovix [**Slika 10D**; CCC = 0,974 (0,961 – 0,982)].



Slika 10. Analiza podudarnosti izmjerenih vrijednosti koncentracije RNA izolirane primjenom PureLink, Direct-zol i TRIzol kompleta, utvrđene spektrofotometrijskim (SF) i fluorometrijskim (F) mjerenjima na uređajima Qubit, Implen i DeNovix. Linov koeficijent konkordancije – CCC (Concordance correlation coefficient).

5. RASPRAVA

Izolacija RNA koja prethodi brojnim postupcima laboratorijske analize genetičkog materijala izazovan je postupak koji zahtijeva primjenu visoko učinkovitih ekstrakcijskih metoda čija je svrha osigurati izolaciju RNA materijala s malim udjelom nečistoća koje mogu ometati nizvodne analitičke procese. RNA je osjetljiva makromolekula sklona razgradnji, posebice u prisutnosti enzima ribonukleaza, koji se često pronalaze na laboratorijskom priboru i reagensima; stoga je njihova inaktivacija ključan preduvjet za uspješnu izolaciju RNA. Najčešći izvor RNA puna je krv, te poli- ili mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC, od engl. peripheral blood mononuclear cell). Bijele krvne stanice ili leukociti čine mali dio stanične frakcije krvi. U njima se nalaze važne informacije o imunološkom sustavu i promjenama vezanim uz autoimuna oboljenja. Međutim, brojnost pojedinih leukocitnih subpopulacija i njihovih podvrsta u krvi vrlo je mala, i čini dodatni izazov u imunološkim istraživanjima. Ekstrakcija RNA iz rijetkih leukocitnih vrsta jedan je od izazovnih laboratorijskih postupaka koji uvelike ovise o izboru i optimizaciji metodološkog pristupa. Danas postoje brojne metode za izolaciju RNA koje se temelje na različitim kemijskim svojstvima molekule RNA i drugih makromolekula koje nalazimo u stanicama. Među češće korištene metode za izolaciju RNA ubraja se izolacija RNA pomoću TRIzol reagensa. Ostali setovi komercijalnih reagensa kombiniraju TRIzol i druga organska otapala sa silika kolonicama, kako bi na temelju razlike u topljivosti i afiniteta osigurali specifično izdvajanje RNA iz smjese staničnih lipida i proteina. Komercijalni kitovi za izolaciju RNA sve su učestaliji u laboratorijima, radi jednostavnosti korištenja, velike brzine, visoke čistoće i kvalitete dobivenog izolata. Unatoč tome, izolacija RNA iz vrlo rijetkih krvnih populacija i dalje predstavlja izazov. Prinosi su vrlo mali i često neadekvatni za pouzdanu kvantifikaciju. Primjenom različitih metoda za izolaciju i kvantifikaciju RNA iz malog broja stanica nastojimo pridonijeti boljem razumijevanju prednosti i ograničenja predloženih metoda za izolaciju RNA iz malog broja stanica periferne krvi. Svrha je ovog istraživanja stoga bila procijeniti djelotvornost izolacije ukupne RNA iz malog broja stanica periferne krvi primjenom TRIzol™ reagensa, PureLink™ RNA Micro kompleta i Direct-zol™ RNA Microprep kompleta. U tu svrhu provedeno je mjerenje koncentracije dobivenih RNA izolata pomoću Qubit fluorometra i Implen spektrofotometra. Magnetska tehnologija izolacije pomoću Dynabeads® mRNA Direct™ kompleta strogo je ograničena na izolaciju mRNA. Koncentracije mRNA koje smo dobili izolacijom pomoću magnetskih čestica, stoga nije bilo moguće uspoređivati s prinosom ukupne RNA dobivene pomoću ostalih metoda.

Najveći prinos RNA materijala, izmjeren Qubit i DeNovix fluorometrijskim mjerenjem, zabilježen je u uzorcima koji su izolirani primjenom Direct-zol komercijalnog kompleta. Spektrofotometrijskim mjerenjem na Implen i Denovix uređaju, najveći prinos zabilježen je pak primjenom TRIzol reagensa, uz značajna odstupanja u odnosu na vrijednosti RNA koncentracije ostvarene komercijalnim kompletima na bazi silika kolonica. Ekstrakcija TRIzol reagensom opći je postupak kojim se postiže deproteinizacija i izolacija RNA, često praćena ostatkom manjeg udjela DNA i organskih otapala, koje uz RNA, mogu apsorbirati spektrofotometrijsko zračenje i na taj način preuveličati konačni rezultat mjerenja RNA koncentracije (23). Štoviše, ako je suditi po našim rezultatima, čini se da ostatak neželjenih primjesa, posebice u uzorcima s oskudnom količinom početnog biološkog materijala, značajno „napuhuje“ mjerenja RNA koncentracije. Na ovakav zaključak, upućuje poznata činjenica da prosječna, humana stanica limfocita T sadrži 1-2 pg/stanici ukupne RNA, sugerirajući prosječan prinos od 10-20 ng iz 10 000 stanica, što uvelike nalikuje izmjerenim koncentracijama RNA od 1-2 ng/ μ l, koje su zabilježene primjenom fluorometrijskih, ali ne i spektrofotometrijskih metoda (23).

U svrhu identifikacije stupnja potencijalnog onečišćenja RNA izolata, uz mjeru apsorbancije na valnoj duljini od 260 nm, često se stoga određuje omjer apsorbancije izmjeren pri valnim duljinama od 260 i 280 nm. Maksimalna apsorpcija nukleinskih kiselina i proteina je pri 260 i 280 nm. Omjer A260/A280 koristi se kao mjera čistoće. Čista RNA ima omjer oko 2,0. Također se, kao pokazatelj onečišćenja, koristi i apsorpcija pri valnoj duljini od 230 nm, pri tome se rabi omjer A260/A230, pri čemu se vrijednosti omjera za čistu RNA kreću u rasponu od 2,0 do 2,2 (24). U ovom istraživanju za procjenu čistoće izolirane RNA korišten je omjer A260/A280. Najveće vrijednosti omjera zabilježene su u uzorcima izoliranim pomoću PureLink komercijalnog kompleta s kolonicama, a najslabiji rezultat uočen je pak u TRIzol uzorcima, što podupire raniju pretpostavku o potencijalnom utjecaju zaostalih onečišćenja na izmjerene vrijednosti apsorbancije u našim uzorcima. Sudeći po centralnoj vrijednosti A260/A280 omjera koja je zabilježena u uzorcima izoliranim PureLink kompletom ($M_e = 1,83$), ova je metoda, u odnosu na Direct-zol™ i TRIzol® alternativu, optimalan izbor za izolaciju RNA visoke čistoće. S druge strane, nije na odmet napomenuti prednosti TRIzol reagensa, koji je pak posebno koristan kada stanice ili tkiva imaju veliku količinu endogenih RNaza ili kada nije moguće odvojiti citoplazmatsku RNA od nuklearne RNA (25). Međutim, za razliku od TRIzol reagensa, Direct-zol™ RNA Miniprep i PureLink™ RNA Micro kompleti koriste kolone za pročišćavanje i uklanjanje onečišćenja, a u okviru protokola nude i

moćnost tretiranja RNA izolata Dnazom, kako bi se spriječilo onečišćenje s DNA i osigurala još veća čistoća konačnog RNA prinosa (26). Reagens TRIzol koji se upotrebljava u TRIzol® i Direct-zol™ protokolu, sastoji se od fenola, toksične kemikalije koja može izazvati teške opekline kože, nadražiti dišne puteve, uzrokovati genska oštećenja, a nakon duljeg izlaganja i oštećenja organa. Stoga s njime treba oprezno raditi, a obvezno je korištenje zaštitne opreme i pravilno odlaganje.

Usporedbom mjerenja koncentracije RNA na Qubit fluorometru i Implen spektrofotometru uočeno je da uređaj Implen u prosjeku bilježi 161,8 jedinica više nego Qubit fluorometar. Slično je utvrđeno i analizom vrijednosti koncentracija RNA na DeNovix fluorometru i Implen spektrofotometru gdje je srednja vrijednost razlike mjerenja iznosila 161,3 jedinice. Međutim, visoka podudarnost zabilježena je između spektrofotometrijskih mjerenja na uređajima Implen i DeNovix, gdje je srednja vrijednost razlike mjerenja iznosila je 3,88. Također i kod fluorometrijskih mjerenja ostvarenih na Qubit i DeNovix uređaju uočena je visoka podudarnost, pri čemu je srednja vrijednost razlike mjerenja iznosila 0,53 jedinica. Ovakvi rezultati ukazuju na nemogućnost direktne usporedbe fluorometrijskih i spektrofotometrijskih vrijednosti koncentracije RNA, barem u uzorcima s malom početnom količinom biološkog materijala i niskim RNA prinosom. Podudarnost RNA mjerenja dakle uvelike ovisi o izboru metode za kvantifikaciju, ali jednako tako i o izboru metode za izolaciju RNA, budući da spektrofotometrijske vrijednosti RNA izmjerene u uzorcima izoliranim TRIzol reagensom, uvelike odstupaju od vrijednosti izmjerenih u uzorcima izoliranim pomoću komercijalnih kompleta na bazi silika kolonica. U tom kontekstu, za preciznu kvantifikaciju niskih RNA prinosa ostvarenih primjenom TRIzol reagensa iz uzoraka s oskudnom količinom PBMC stanica (< 100 000), uputno je osloniti se na fluorometrijske, a ne spektrofotometrijske metode kvantifikacije. S druge strane, najbolji rezultat u smislu RNA prinosa iz malog broja PBMC stanica, ostvaren je Direct-zol™ metodom, a u PureLink™ uzorcima zabilježena je najveća čistoća. Međutim, uzimajući u obzir sve čimbenike; koncentraciju, čistoću i trajanje postupka, metoda Direct-zol™ pokazala se kao najoptimalnija alternativa između testiranih metoda. Osim toga, ona se jednostavno i brzo primjenjuje pa je prikladna za korištenje u kombinaciji s dugotrajnim postupcima izolacije i sortiranja specifičnih krvnih populacija. Za procjenu iskoristivosti izolirane RNA, potrebne su međutim, nizvodne validacijske analize slijeda, brojnosti i funkcije RNA molekula, primjenom qRT-PCR i RNAseq metoda.

6. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati doveli su do sljedećih zaključaka:

- 1) U odnosu na klasičnu metodu TRIzol®, najveći prinos RNA materijala iz malog broja stanica periferne krvi postiže se primjenom Direct-zol™ kompleta.
- 2) RNA najveće kvalitete dobivena je primjenom PureLink™ kompleta.
- 3) Spektrofotometrijska mjerenja nisu pouzdana za uzorke s malim prinosom RNA.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati i usporediti prinos RNA iz 10 000, 50 000 i 100 000 perifernih mononuklearnih stanica (PBMC) primjenom TRIzol reagensa i komercijalnih kompleta na bazi silika kolonica i magnetskih čestica. Ustanoviti djelotvornost ispitivanih metoda za izolaciju RNA mjerenjem podudarnosti koncentracije RNA na Qubit fluorometru i Implen spektrofotometru.

Nacrt studije: Metodološka studija

Materijali i metode: Iz uzoraka pune krvi 10 zdravih dobrovoljnih ispitanika, PBMC stanice izdvojene su centrifugiranjem u gradijentu gustoće Lymphoprep medija. Izolacija RNA iz PBMC alikvota provedena je primjenom TRIzol reagensa i komercijalnih kompleta na bazi silika kolona (PureLink™ RNA micro scale i Direct-zol™ RNA Microprep Kit) i magnetskih čestica (Dynabeads mRNA Direct Purification kit). Mjerenje koncentracije izolirane RNA iz svakog uzorka provedeno je pomoću Qubit fluorometra, Implen spektrofotometra i DeNovix fluorometra/spektrofotometra.

Rezultati: Primjenom Direct-zol™ komercijalnog kompleta zabilježena je najviša prosječna koncentracija. Korištenjem PureLink™ komercijalnog kompleta izmjerena je najveća čistoća. Najveća podudarnost mjerenja utvrđena je između fluorometrijskih mjerenja zabilježenih na Qubit i DeNovix uređajima.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja prikazuju prednosti i nedostatke metoda izolacije RNA za mali broj stanica. Na taj način olakšavaju odluku o najučinkovitijem protokolu pri određenom eksperimentalnom postupku. Uzimajući u obzir čistoću, koncentraciju i trajanje postupka, primjenom Direct-zol™ komercijalnog kompleta dobiveni su najbolji rezultati.

Ključne riječi: magnetske čestice; periferne mononuklearne stanice; RNA; silika kolonice

8. SUMMARY

Efficiency assesement of three protocols for RNA extraction from small number of peripheral blood cells using Qubit fluorometer and Implen spectrophotometer

Objectives: Examination and comparison of RNA yields from 10 000, 50 000 and 100 000 peripheral mononuclear cells (PBMC) using TRIzol reagents and commercial kits based on silica column and magnetic particles. To determine the effectiveness of the tested methods for RNA isolation by measuring the concordance of RNA concentration on a Qubit fluorometer and an Implen spectrophotometer.

Study design: Methodology study

Materials and method: From whole blood samples from 10 healthy volunteers, PBMC cells were isolated by centrifugation in a density gradient of Lymphoprep medium. Isolation of RNA from PBMC aliquots was performed using TRIzol reagents and commercial kits based on silica columns (PureLink™ RNA micro scale and Direct-zol™ RNA Microprep Kit) and magnetic particles (Dynabeads mRNA Direct Purification kit). Measurement of the concentration of isolated RNA from each sample was performed using a Qubit fluorometer, an Implen spectrophotometer, and a DeNovix fluorometer/spectrophotometer.

Results: The highest average concentration was recorded using the Direct-zol commercial kit. The highest purity was measured using a PureLink™ commercial kit. The highest measurement concordance was determined between the fluorometric measurements recorded on Qubit and DeNovix devices.

Conclusion: The results of this study show the advantages and disadvantages of RNA isolation methods for a small number of cells. In this way, they facilitate the decision on the most efficient protocol in a particular experimental procedure. Taking into account the purity, concentration and duration of the procedure, the best results were obtained using the Direct-zol™ commercial kit.

Keywords: magnetic particles; peripheral mononuclear cells; RNA; silica columns

9. LITERATURA

1. Geoffrey M Cooper and Robert E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*. 5. izd. Boston University; 2009:252-262.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *From DNA to RNA*, New York: Garland Science; 2002.
3. Nicole Dalla Venezia, Anne Vincent, Virginie Marcel, Frédéric Catez, Jean-Jacques Diaz. Emerging Role of Eukaryote Ribosomes in Translational Control. 2019 Mar 11;20(5):1226.
4. Nick J. Proudfoot, Andre Furger, Michael J. Dye, Integrating mRNA processing with transcription. 2002 Feb 22;108(4):501-12.
5. Babić L. *Posttranskripcijske modifikacije tRNA (završni rad)*. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2019.
6. Eric M Phizicky, Anita K Hopper. tRNA biology charges to the front. 2010 Sep 1; 24(17):1832-1860.
7. Šponer J, Bussi G, Krepl M, Banáš P, Bottaro S, Cunha RA, i sur. RNA Structural Dynamics As Captured by Molecular Simulations: A Comprehensive Overview. *Chem. Rev.* 2018;118:8:4177-4338.
8. Katherine E. Sloan, Ahmed S. Warda, Sunny Sharma, Karl-Dieter Entian, Denis L J Lafontaine, Markus T. Bohnsacka. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biology*. 2016;14:9:1138-1152.
9. Davis LG, Kuehl WM, Battey, JF. *Osnovne metode u molekularnoj biologiji*. 2. izd. Appleton & Lange, Norwalk, CT. 1994;11:1-5.
10. Amanda N, Jeffrey A Lewis. Comparison of RNA isolation methods on RNA-Seq: implications for differential expression and meta-analyses. 2020;21:249.
11. Rodríguez A, Duyvejonck H, Van Belleghem JD, Gryp T, Van Simaey L, Vermeulen S, Van Mechelen E, Vanechoutte M. Comparison of procedures for RNA-extraction from peripheral blood mononuclear cells, 2020;15:2.
12. Mack E, Neubauer A, Brendel C. Comparison of RNA yield from small cell populations sorted by flow cytometry applying different isolation procedures. 2007;71A:404-409.

13. Donald C. Rio, Manuel Ares Jr, Gregory J, Hannon and Timothy W Nilsen. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2010.
14. Alhouayek M, Stafberg L, Karlsson J, Halin Bergström S, Fowler CJ. Effects of orthotopic implantation of rat prostate tumour cells upon components of the N-acylethanolamine and monoacylglycerol signalling systems: an mRNA study, 2020; 10:6314.
15. Sen P, Kemppainen E and Orešič M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front. Mol. Biosci.* 2018;4:96.
16. Verhoeckx K, Cotter P, Kleiveland C. Peripheral Blood Mononuclear Cells in The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models, Kleiveland CR. Cham: Springer. 2015;161-169.
17. Pourahmad J, Salimi A. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res.* 2015;14(4):679-980.
18. Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Osnove analitičke kemije*. Zagreb: Školska knjiga; 1999. str. 585-593.
19. Allen D, Cooksey C, Tsai B. Spectrophotometry. 2010, October 5. Dostupno na <http://www.nist.gov/pml/div685/grp03/spectrophotometry.cfm>. Datum pristupa: 1.5.2021.
20. Rump L, Asamoah B, Gonzalez-Escalona N. Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from Salmonella cells; 2010; 3:211.
21. Rio DC, Ares Jr M, Hannon GJ, Nilsen W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;6:1-4.
22. Lin L i sur. *J Biopharm Stat.* 2007;17(4):629-52.
23. JingyaWang, SadiyeAmcaoglu Rieder, JinchengWu, Susana Hayes, RebeccaA. Halpin, Melissa de los Reyes, Yashaswi Shrestha, Roland Kolbeck, Rajiv Raja. Evaluation of ultra-low input RNA sequencing for the study of human T cell transcriptome. 2019;9:8445.
24. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques.* 1997 Mar;22(3):474-6,478-81.

25. Rio DC, Ares Jr M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using Trizol® (TRI reagent). Cold Spring Harb Protoc. 2010 Jun;2010(6).
26. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, i sur. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Ana Zidar

Datum i mjesto rođenja: 08.06.1999., Osijek

Adresa: B.J. Jelačića 27, 33515, Orahovica

Adresa e-pošte: azidar@mefos.hr

Obrazovanje:

2015. - 2018.: Opća gimnazija Stjepan Ivšić Orahovica

2018. - 2021.: Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike,
Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku