

DEGRADATION OF NUCLEIC ACIDS IN VARIOUS LABORATORIAL CONDITIONS

Sedláčková T., Knoll A., Svobodová K.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: sedlact@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to gather knowledge about the degradation of nucleic acids due to laboratory conditions. The work was focused on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid. The study factors were temperature (20, 5, -20 and -70°C), time (0-4 weeks) and the input concentration of nucleic acid. For the DNA analysis the PCR product included selected sequence of *EEF1a2* gene was used. The sample of RNA was isolated from pig muscle. For the analysis PCR resp. Real-time PCR were used and optimized. The results were evaluated by Ct values obtained from real-time PCR reaction. To monitor the degradation (quantity and quality) of RNA resp. rRNA the agarose gel electrophoresis was used. The DNA samples stored in 20 °C was completely degraded after the first week but in other temperatures only slightly. The rRNA samples stored in the room temperature were also completely degraded after one week. Based of our results, the nucleic acids are best preserved at temperatures 5, -20 and -70 °C. Inappropriate storage of nucleic acids could result in degradation and subsequently in wrong results therefore.

Key words: degradace, nukleové kyseliny, real-time PCR

ÚVOD

V současnosti se nám naskytují spousty možností jak zvýšit užitek u hospodářských zvířat. Jednou z nich je využití molekulárně-genetických metod. Základem těchto metod je důkladná znalost projevů o chování nukleových kyselin v prostředí ve kterém se právě nacházejí. Od těchto znalostí se odvíjí následná manipulace a uschování. Práce s nukleovými kyselinami musí být šetrná, kvalita záleží na posouzení konečného výsledku. Musejí zůstat kompaktní a izolace provedena co nejšetrnějším způsobem, aby nedošlo k nežádoucímu poškození. Důležitým faktorem je uschování nukleových kyselin za příhodných podmínek. Pokud není vhodně nukleová kyselina uschována, nastává proces degradace, který zapříčiní nevratné změny na struktuře nukleové kyseliny a následně znehodnocení případného vzorku. Dojde-li k degradaci či znehodnocení, mohou nastat případy, ve kterých dojde k ovlivnění konečných výsledků a ty pak mohou být zavádějící. Typické vlastnosti a chování této molekuly v různých podmínkách prostředí se dají z větší části odvodit ze struktury a složení. Nejčastějším případem degradace nukleových kyselin je teplota a čas.

V těchto podmínkách (teplota, čas) byly zjišťovány změny struktury kyseliny deoxyribonukleové pomocí vysoce přesné laboratorní metody real-time PCR (real-time polymerázová řetězová reakce). Pro zjištění změn struktury u ribonukleové kyseliny byla vybrána metoda gelové elektroforézy.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky: Jako vstupní materiál pro tuto studii sloužil vzorek izolovaný ze svaloviny (m. biceps femoris) prasete. Pro DNA byl vybrán gen *EEF1A2B* a pro RNA - rRNA. Testováno bylo plemeno České bílé ušlechtilé, Llandrasse, Pietrain a křížencek plemen Pietrain a Meishan.

PCR: Vlastní PCR byla prováděna ve zkumavkách Eppendorf v termálním cyklu na přístroji GeneAmp® PCR 2400 firmy Perkin Elmer (Applied Biosystems, Foster City California, USA). Použit pro amplifikaci PCR produktu.

Použité chemizmy pro PCR: Celkový objem jednoho vzorku 20 μ l ; 11,3 μ l PCR vody, 2 μ l Blue master mix Top-Bio (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR) , 0,5 μ l dNTPs (10 mM) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, SRN), 0,5 μ l EEF1A (10 μ M), 0,5 μ l EEF2B(10 μ M), 0,2 (μ l) Polymeráza Unis (5U/ μ l) (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR), 5 μ l lyzátu DNA

Průběh vlastní PCR: Po úvodní denaturaci (95 °C /2 min.) následovalo sekvenování, detekce polymorfismů ve 30 cyklech (95 °C/20 s), dále annealing primerů (64 °C/30 s) a syntéza DNA (72 °C/ 60 s). Závěrečná elongace probíhala při 72 °C/7 min.

Real-time PCR: Reakce byly prováděny na bázi SYBR Green chemismu, konkrétně s kity SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) na přístroji 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) a na cyklu PTC-200 s použitím detektoru Opticon 4 Detector (MJ Research, součást firmy Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA).

Použité chemizmy pro real-time PCR: Celkový objem jednoho vzorku 20 μ l; 7,6 μ l PCR Ultra H2O, Top-Bio (Top-Bio s.r.o., Praha, Česká republika), 10 μ l SYBR® Green PCR Master Mix, 0,1 μ l EEF1A (10 μ M), 0,1 μ l EEF2B (10 μ M), 0,2 μ l UNG, 2 μ l vzorku DNA.

Průběh vlastní real-time PCR: 2 min při 50 °C, 10 min. při 95 °C, 50 cyklů při opakování kroků denaturace po dobu 15s při 95 °C a annealing a elongace, které probíhaly v jednom kroku po dobu 1 min, při 60 °C. Podmínky následné disociace: 95 °C /15 s, 60°C/1 min, 95 °C/15 s. Každý vzorek byl analyzován v jednom opakování. Další část výzkumu zahrnovala optimalizační proces real-time PCR a vlastní relativní kvantifikaci. Real-time PCR byla prováděna na přístroji 7500 Real-Time PCR System a byl použit originální software SDS verze 1.2 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Primery: byly navrženy ze sekvence příslušného genu z dostupných elektronických databází nově zjištěných sekvencí EEF1A2 (draft, Sequencing, Porcine sequence TC348097 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>)). Ověřování primerů bylo prováděno v programu Primer Express software verze 2 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Zohledňována byla především teplota 60 °C, která byla dána použitým systémem, dále délka PCR produktu, která nepřesáhla 250 bp, zastoupení G+C bazí a stabilita na 3'-konci, kde byl důraz kladen zejména na eliminaci sekundárních vnitřních struktur a vzájemnou komplementaritu primerů. Pro každém měření byly také analyzovány slepé vzorky, neboli NTC (no template control). Koncentrace primerů byla 50 nM. Vzorky byly před započítím vlastní real-time PCR ošetřeny enzymem AmpErase® Uracil N-glycosylase (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Izolace RNA: Homogenizace vzorků probíhala v homogenizátoru FastPrep FP 120 (ThermoSavant, Holbrook, New York, USA). Celková RNA byla izolována izolačním kitem FastRNA Pro Green Kit (Q-BIOgene, Solon, Ohio, USA). Vzorky izolované RNA resp. rRNA byly vizuálně kontrolovány a hodnoceny pomocí gelové elektroforézy dle Rapley et Manning (1998). Byl použit 3% agarózový gel Agarose Serva for DNA Electrophoresis (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) při napětí 100 V po dobu 10 min. Jako velikostní marker byl použit RNA Ladder, High Range – 2 μ l (Fermentas, Ontario, Kanada).

Gelová elektroforéza: Byla provedena na 3% agarózovém gelu obsahujícím ethidiumbromid. Obsah každého vzorku - 5 μ l. Byl použit tentýž gel jako u izolace RNA (viz výše). Izolovaná neporušená celková RNA dává při kontrole elektroforetickou separací v agarózovém gelu dva silně viditelné pruhy: 28S rRNA a 18S rRNA. Výsledek byl po ukončení elektroforézy zjišťován na transiluminátoru a poté vyfotografován.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Degradace DNA

Tato studie byla zaměřena na několik faktorů účastnících se degradace DNA. Vzorky byly inkubované za různých podmínek. Teplota 20 °C zastupovala běžnou teplotu laboratoře, 5 °C je teplota vzorků uchovaných v chladničce a -20 °C pro mrazničku. Teplota -70 °C byla vybrána z důvodu

dostupnosti mrazáku (nebývá standardním vybavením laboratoří) a především jako teplota pro referenční, neboli kontrolní vzorky. Tato teplota je všeobecně považována za nejvhodnější pro uchování vzorků (Stratagene, 2007). Teplota - 70 °C je také všeobecně považována za konečnou pro DNázy a RNázy. Prostřednictvím real-time PCR a programu SDS v 1.2 byla na základě posunu Ct hodnot hodnocena degradace nebo stabilita vzorků. Tato studie probíhala vždy v několika řádech ředění. U DNA byly změřeny Ct hodnoty uvedené v tabulce č.1 a průběh znázorněn v grafu 1 (100x ředění). U získaných hodnot musíme zohlednit možnou pipetovací chybu. Je patrné, že Ct hodnoty u teploty 20 °C jsou výrazně vyšší, než-li u ostatních zbývajících (5 °C a -20 °C a -70 °C). Tato indikace prokazatelně naznačuje na rychlou degradaci DNA v laboratorní teplotě. Závěry se shodují i s výsledky Almeida *et al.*, (2004). V práci Almeida *et al.*, (2004) byla dokonce studována pomocí real-time PCR i teplota 37 °C. V této studii tato teplota nebyla zkoumána z důvodu, že není relevantní pro laboratorní podmínky.

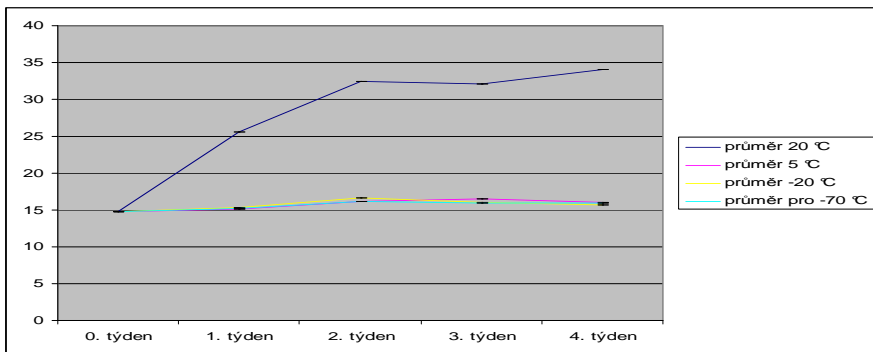
Tedy skladování při laboratorní teplotě je absolutně nevyhovující. Důvodů může být hned několik: příliš vysoká teplota, v této teplotě není zastavena činnost DNáz a RNáz, samotný vliv teploty na strukturu nukleových kyselin. Naopak vzorky uchované v nižších teplotách mají degradaci jen minimální, tj. jejich Ct hodnoty se vůbec, nebo jen málo mění v závislosti na času. Dle těchto hodnot lze utvořit závěr, že nejvhodnější uschování se pohybuje od 5 °C a -20 °C a -70 °C. Při teplotě 5 °C jde o uschování krátkodobé. V mrazničce -20 a při -70 jsou podmínky nejvhodnější pro dlouhodobé uchování. Tímto zjištěním lze zajistit kvalitu vzorků, které jsou rozhodujícím faktorem pro určení správnosti výsledků. Pokud vzorek špatně uschováme, musíme vynaložit další náklady pro získání nových a to je z ekonomického hlediska nežádoucí. Nicméně je třeba zdůraznit, že skladování vzorků je různorodá otázka, záleží jak na managementu tzn. zajištění správného popisu a postupu, tak i na existenci záložních zdrojů pro případný výpadek proudu. Pokud dojde k selhání přístroje či výpadku proudu a není zajištěn krizový management, jsou veškeré snahy marné.

Ani při nejlepší skladovací teplotě nebo médiu nelze odhadnout kvalitu vzorku, pokud není použito správné čistoty vody (Mabic *et al.*, 2003).

Tab. 1 Průměrné Ct hodnoty s \pm SD, 0-4 týden, 4 teploty (20 °C, 5 °C, -20 °C a -70 °)

	Ø Ct	SD	Ø Ct	SD	Ø Ct	SD	Ø Ct	SD
	20 °C	20 °C	5 °C	5 °C	- 20 °C	-20 °C	-70 °C	-70 °C
0. týden	14,77	4.398	14,77	4.398	14,77	4.398	14,77	4.398
1. týden	25,56	4.483	15,165	6.382	15,325	7.581	15,215	7.457
2. týden	32,49	4.462	16,19	5.002	16,68	7.053	16,185	6.970
3. týden	32,075	2.852	16,49	6.964	16,005	6.521	15,945	6.299
4. týden	34,06	3.054	16,025	6.905	15,74	6.245	15,9	6.555

Graf 1 \bar{C}_t hodnoty $\pm SD$, 0.-4. týden, 4 teploty (20 °C, 5 °C, -20 °C a -70 °), ředění 0.01

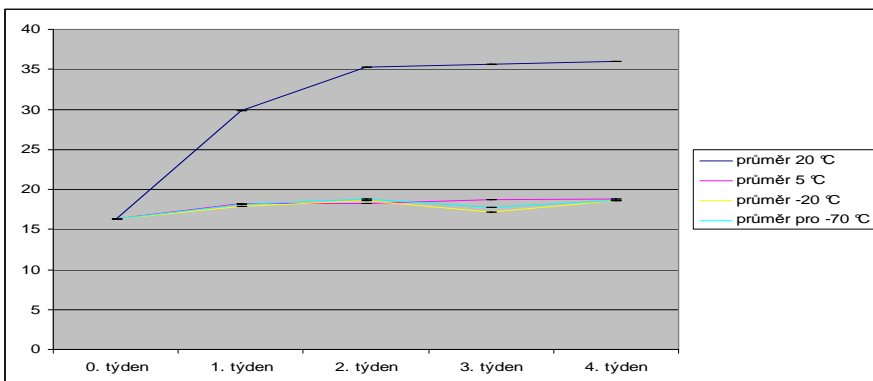


V tabulce 2 jsou naměřeny hodnoty při 1000x ředění. Tyto hodnoty lze interpretovat stejně jako u ředění 100x. Tj. nejvíce degradoval vzorek, který byl uchován při teplotě 20 °C, a zbylé vzorky ostatních teplot (5 °C a -20 °C a -70 °C) zůstaly jen s nepatrnou degradací. (i zde musíme zohlednit možnou pipetovací chybu např. ve třetím týdnu).

Tab. 2 průměrné C_t hodnoty $\pm SD$, 0-4 týden, 4 teploty (20 °C, 5 °C, -20 °C a -70 °)

	\bar{C}_t 20 °C	SD 20°C	\bar{C}_t 5 °C	SD 5°C	\bar{C}_t -20 °C	SD -20°C	\bar{C}_t -70 °C	SD -70°C
0. týden	16,31	4,398	16,31	4,398	16,31	4,398	16,31	4,398
1. týden	29,8	4,483	18,255	6,382	17,905	7,581	18,145	7,457
2. týden	35,26	4,462	18,245	5,002	18,595	7,053	18,85	6,970
3. týden	35,585	2,852	18,715	6,964	17,13	6,521	17,695	6,299
4. týden	35,96	3,054	18,865	6,905	18,545	6,245	18,615	6,555

Graf 2 \bar{C}_t hodnoty $\pm SD$, 0-4 týden, 4 teploty (20 °C, 5 °C a -20 °C a -70 °C), ředění 0.001

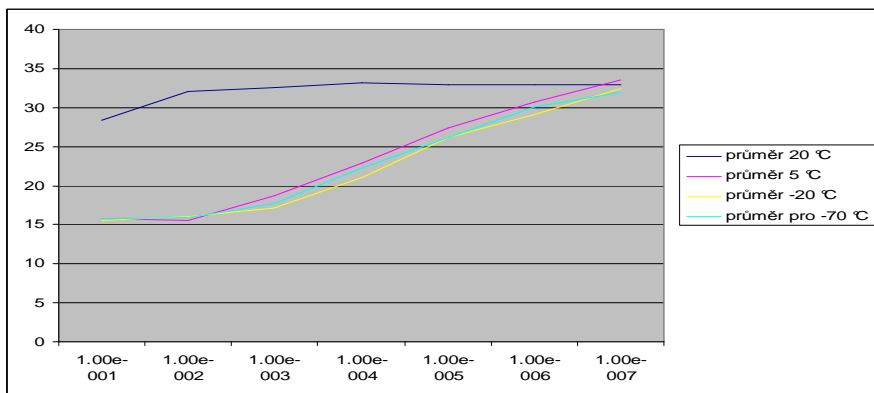


Při studiu bylo také sledováno, zda je vztah mezi koncentrací vzorku a degradací. Tato hypotéza se nám však nepodařila potvrdit. Bylo provedeno ředění do sedmého řádu. Tyto hodnoty nám vykazují, že s vyšším řádem ředění se vytváří stále méně produktu, tudíž vysoké stupně ředění při této studii se nedoporučují. Je zde patrné, při kterém ředění jsou podmínky nevhodnější.

Tab. 3 Druhý týden, průměr Ct hodnoty, ředění do sedmého řádu.

	Ø Ct 20 °C	Ø Ct 5 °C	Ø Ct -20 °C	Ø Ct -70 °C
1.00e-001	28,325	15,84	15,53	15,8
1.00e-002	32,075	15,49	16,005	15,945
1.00e-003	32,585	18,715	17,13	17,695
1.00e-004	33,155	22,88	21,035	22,25
1.00e-005	32,86	27,42	26,165	26,125
1.00e-006	32,88	30,725	29,06	30,055
1.00e-007	32,96	33,525	32,38	31,91

Graf 3 Druhý týden, Ø Ct hodnoty, ředění do sedmého řádu.



Degradace RNA

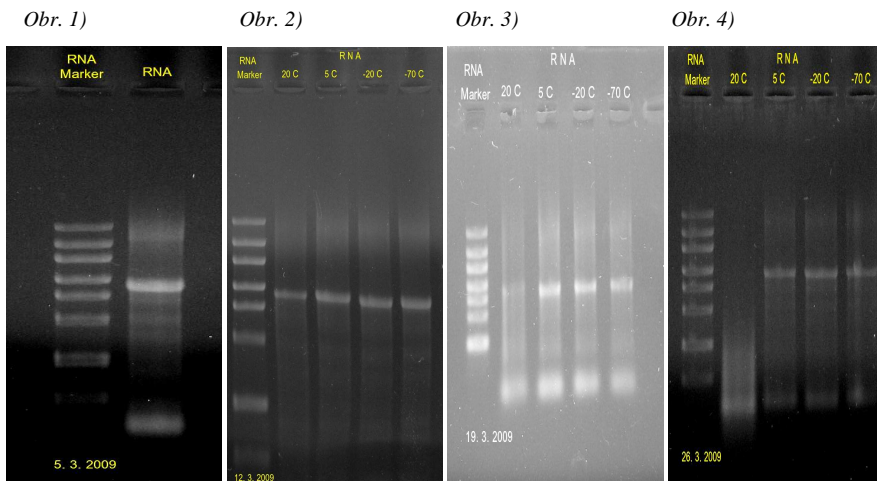
Vyzolovaná RNA resp. rRNA ze svalu (*m. biceps femoris*) prasete byla nanesena na gelovou elektroforézu. Základní profil složení savčí buňky RNA obsahuje především rRNA 28S, 18S, 5,8S a 5S (Creighton, 1999). Tyto hodnoty jednotlivých molekul RNA jsou obarvené pozorovatelné na gelové elektroforéze (Rapley, 1998). Pro sledování jsou dnes k dispozici i modernější, nutno však podotknout, že i nákladnější, metody, jako např. RIN metoda (Bustin *et al.*, 2004). Výsledek byl po ukončení elektroforézy zjišťován na transluminátoru a poté vyfotografován. Vzorky byly uchovány při inkubačních teplotách 20 °C, 5 °C a -20 °C a -70 °C po dobu 1, 2, 3 týdnů. Při porovnání výsledků z každého časového intervalu zjistíme, do jaké míry byl vzorek degradován. Za předpokladu, že RNA resp. rRNA není degradována, profil zůstává zachován. V opačném případě se ostře

definované pruhy rRNA mění v tzv. smír, což je směs různě dlouhých molekul nukleových kyselin, resp. RNA.

To je patrné na fotografii gelu č. 2., 3 a 4. Vzorek skladovaný při teplotě 20 °C je přeměněn na tzv. smír, ostatní vzorky si uchovaly viditelné profily.

Patrné jsou dva pruhy – tenčí, vrchní pro 28S rRNA - a 2x silnější, spodní pro 18S rRNA. Vzorek uchovávaný při teplotě 20 °C degradoval do jednoho týdne nejvíce. V dalších týdnech je již patrné, že byl degradován zcela. Vzorek uchovávaný při teplotě 5 °C měl degradaci pozvolnější. První týden nepatrnou, v dalších týdnech již výraznější. Teploty -20 °C a -70 °C v posledním týdnu degradovaly jen nepatrně. Tyto výsledky se shodují se studiemi, které byly provedeny v poslední dekádě Bustin *et al.*, (2004) nebo Breit (2004). Stejně tak jako Bílek (2008) dospěl k podobným výsledkům a to, že není zásadní rozdíl při skladování RNA v lednici, anebo mrazáku.

Obrázek 1) 5. 3. 2009, zobrazení markeru (RNA Ladder, High Range), vyzolovaná RNA.; Obrázek 2) 12. 3. 2009, č. 3) 19.3. 2009 a č.4) 26. 3. 2009, zobrazení markeru (RNA Ladder, High Range), RNA ve čtyřech vzorcích po čtyřech teplotách (20 °C, 5 °C a -20 °C a -70 °C), proužky; menší pro 28S rRNA a větší pro 18S rRNA.



ZÁVĚR

V této studii byly vybrány vlivy ovlivňující degradaci nukleových kyselin v podobě teploty a času. Teploty se pohybovaly v hodnotách 20 °C, 5 °C, -20 °C a -70 °C. Časovou jednotkou byl zvolen jeden týden. K posouzení, zda k degradaci DNA došlo a do jaké míry, jsme určili velice přesnou metodu real-time PCR a k posouzení degradace RNA byla využita metoda gelové elektroforézy. Úsek genu *EEF1A2* byl definován jako vhodný u zkoumání degradace DNA a byl před vlastní analýzou amplifikován pomocí PCR reakce. Tento PCR produkt byl rozdělen a zkoumán v čase a v definovaných

teplotách. Po optimalizaci podmínek pro PCR a optimalizaci podmínek real-time PCR jsme získali výsledky v podobě Ct hodnot se směrodatnými odchylkami. Ty jsou reprodukovány v podobě tabulek a grafů.

K analýze ribonukleové kyseliny byl vybrán izolát RNA určovaná byla rRNA ze svaloviny prasete (*m. biceps femoris*). Ze zjištěných poznatků je patrné, že nejvíce degradované vzorky jak DNA, tak RNA byly ty, které byly uschovány při laboratorní teplotě. A to již po prvním týdnu velice markantně. V dalším týdnu byly zcela degradovány. Nejvhodnější teplota se nachází při -20 °C až -70 °C. Tyto hodnoty vykazovaly jen nepatnou degradaci. U RNA se výsledky pohybovaly velice podobně. RNA v laboratorní teplotě degradovala po týdnu zcela, za ostatních teplot pozvolněji.

Tato práce dospěla k cenným zjištěním, které je možné aplikovat na mnoha pracovištích. V analýzách bylo potvrzeno, že vodné skladování nukleových kyselin je skutečně podmínkou pro správné analýzy a ty jsou základem pro zdokonalování zjištěných metod a dalšího vývoje nových technologií.

LITERATURA

Almeida A., Thiery P., Magdelnat H., Radvanyi F.: Gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of tissue handling. *Animlal Biochem.*, 2004, p. 101-108.

Bílek K., Zrůstová J., Knoll A.: Determination of RNA stability using reverse transcription real-time PCR. *Acta Universitatis agriculturae et silviculturae Mendeliana Brunensis* č. 4. 2008.

Breit S., Ness M., Schaefer U., Pfoersich M., Hagemeyer CH., Muckenthaler M., Kulozik E.: Impact of pre-analytical handling on bone marrow mRNA gene Expression. *The Jounfal of Histoehemigtrg and Cytochemistry*. 2004, p. 231-243.

Bustin S.A., Nolan T.: Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomol Tech.* 2004, p. 155-166.

Creighton T.E.: The encyclopedia of molecular biology (4-Volume Set). John Wiley & Sons, Inc. 1999, p.3500.

Rapley R., Manning D. L. :RNA Isolation and Characterization Protocols. Humana Press. 1998. p. 280.

Mabic S., Kano: Impact of Purified Water Quality on Molecular Biology Experiments. *Clinical chemistry and laboratory medicíně*.2003, p. 1434-6621.

Stratagene [online]. Methods and Applications Guide – Introduction to Quantitative PCR. 2007. <https://www.surveymonkey.com/s.asp?u=664272792012>. 10 MB.