

Biologija

Vpliv časa in temperature shranjevanja na koncentracijo DNA



Mentorica:
Sonja Artač, prof. biol.

Avtorica:
Manca Črnič, 4.f

Zunanji mentorici:
doc. dr. Tina Eleršek – NIB
mag. Maša Zupančič – NIB

V Ljubljani, marec 2021

Vsebina

Teoretično ozadje.....	8
Metode dela	11
Vzorčenje in shranjevanje vzorcev	11
NanoDrop	12
Qubit.....	13
Izolacija DNA.....	14
Rezultati.....	15
Razprava	20
Zaključek.....	22
Viri in literatura	23
Viri slik	24

Kazalo grafov

Graf 1: Graf absorbance za vzorec M2	16
Graf 2: Graf absorbance za vzorec M3	16
Graf 3: Graf absorbance za vzorec M5	17
Graf 4: Graf absorbance za vzorec M6	17
Graf 5: Graf absorbance za vzorec M7	18
Graf 6: Graf absorbance za vzorec M8	18

Kazalo tabel

Tabela 1: Vzorci	11
Tabela 2: Rezultati koncentracije izbranih vzorcev z napravo NanoDrop	15
Tabela 3: Rezultati čistosti izbranih vzorcev z napravo NanoDrop	15
Tabela 4: Rezultati meritve izbranih vzorcev z napravo Qubit	19

Kazalo slik

Slika 1: Dvojna vijačnica DNA z baznimi pari adenina in timina ter citozina in gvanina	8
Slika 2: Zgradba nukleotida	9
Slika 3: Delovna površina za merjenje z napravo NanoDrop	12
Slika 4: Naprava NanoDrop	12
Slika 5: Priprava vzorcev za meritev z napravo Qubit	13
Slika 6: Merjenje z napravo Qubit	14

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici Sonji Artač, prof., za vodenje in pomoč pri pripravi in pisanju raziskovalne naloge. Zahvaljujem se zunanji mentorici doc. dr. Tini Eleršek in mag. Maši Zupančič za strokovno pomoč, spodbudo in vse nasvete pri raziskovalnem delu. Zahvaljujem se Maji Gerden, prof., za pomoč pri pripravi na ustno predstavitev naloge.

Posebej pa se zahvaljujem moji družini za podporo in spodbudo pri mojem raziskovalnem delu.

Povzetek

V zadnjih letih so bile razvite številne nove metode analiz in novi načini uporabe znanja o DNA (deoksiribonukleinski kislini), zato se potrebe po ustreznem shranjevanju vzorcev DNA nenehno večajo. Analiziranje vzorcev DNA, predvsem pa poznavanje pogojev njihovega shranjevanja, sta pomembna za raziskave na najrazličnejših področjih, npr. raziskave izumrlih vrst, ugotavljanje sorodnosti ali pri forenziki. DNA lahko sicer po potrebi namnožimo s PCR (verižno reakcijo s polimerazo), kljub temu pa sta nespremenjena koncentracija in čistost DNA po shranjevanju bistveni za nadaljnje analize.

Cilj naloge je bil ugotoviti, kako čas in temperatura shranjevanja vzorca vplivata na koncentracijo in čistost DNA. Preučevali smo vzorce biofilma iz rek Kamniške Bistrice, Save in Poljsanske Sore, ki so bili s krtačko postrgani s površin kamnov in shranjeni v etanolu do izolacije DNA. Analizirani vzorci so bili odvzeti v obdobju dveh tednov, nato pa za različno časovno obdobje (en mesec ali dodatni trije meseci) shranjeni pri različnih temperaturah. Vzorci so bili pred izolacijo shranjeni en mesec pri temperaturi 4 °C, nato smo iz polovice materiala izolirali DNA, drugo polovico pa še za tri mesece shranili pri temperaturi -20 °C. Za merjenje koncentracije in čistosti DNA v vzorcu smo uporabili napravi spektrometer NanoDrop in fluorometer Qubit.

Meritve z napravo NanoDrop so pokazale, da se je koncentracija DNA po nadaljnjih treh mesecih hranjenja v zamrzovalniku (pri -20 °C) zmanjšala za 12% do 23%. Meritve z napravo Qubit pa, da je koncentracija ostala enaka ali pa se povečala za do 32%. V tem času se je čistost spremenila za do 9%.

Shranjevanje vzorcev DNA v nespremenjeni koncentraciji in čistosti je izrednega pomena za raziskovanje na različnih področjih. Običajno so vzorci v laboratoriju shranjeni do 5 let pri temperaturi -20 °C. Način shranjevanja vzorcev, ki zagotavlja dolgoročno ohranitev nespremenjene dedne informacije, je pomemben za preučevanje ogroženih in izumrlih vrst, iskanje genetske povezanosti vrst in posameznikov znotraj iste vrste, določanja nagnjenosti k določeni dedni bolezni in v analizah DNA v forenziki. Za te potrebe je potrebno vzorce shranjevati pri nižjih temperaturah (-25 °C do -80 °C). Glede na trenutno dinamiko potreb po analiziranju vzorcev DNA lahko v prihodnjih letih pričakujemo še številna nova področja, na katerih bo delo z ustreznimi shranjenimi vzorci DNA ena od metod, ki bo omogočala celovit in zanesljiv vpogled v dedni zapis ter njegove analize za potrebe posameznih raziskav.

KLJUČNE BESEDE: koncentracija DNA, čistost DNA, shranjevanje vzorcev DNA, temperatura, čas

Uvod

Izolacija DNA (dezoksiribonukleinske kisline) je postopek, pri katerem iz celic izločimo DNA, ki jo uporabljamo za nadaljnje analize. Od odvzema vzorca do izolacije DNA moramo vzorce DNA pogosto različno dolgo shranjevati, pri čemer je pomembno, da se njihova kakovost ne slabša, torej DNA ne razpada. Nespremenjena koncentracija in čistost vzorca DNA sta bistveni za zanesljive in natančne rezultate analize shranjenih vzorcev DNA.

Za molekulo DNA vemo, da je zelo stabilna, če jo hranimo v primernih pogojih (temnem, hladnem okolju pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH med 5 in 9). DNA je zaradi svoje zgradbe ena najstabilnejših kompleksnih organskih molekul. V naravi je DNA v obliki β vijačnice najpogostejša. Stabilnost DNA daje njena terciarna struktura, prostorska ureditev v obliki dvojne vijačnice, ki omogoča močne vodikove vezi med posameznimi baznimi pari. Medtem ko proteini in encimi lahko hitro izgubijo terciarno strukturo, če se spremeni temperatura (pri nekaterih encimih do nedelovanja pride že pri spremembi temperature za $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ od optimalne), DNA vse to prenese in ohrani svojo strukturo. Razlogi so dvojna vijačnica in številne vodikove vezi, katerih veliko število v posamezni molekuli DNA pomembno pripomore k njeni stabilnosti; številne vodikove vezi med komplementarnimi organskimi bazami vzdolž verige DNA. Še danes je mogoče iz več tisoč let starih zamrznjenih ostankov izolirati dele DNA (bakterijska DNA iz stalno zamrznjenih tal v Sibiriji, stara do 400 000 let). DNA tudi pri 45 minutnem segrevanju do $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ne izgubi trajno svoje terciarne strukture. Še najbolj občutljiva je DNA na veliko spremembo pH in na ultravijolično sevanje. Če DNA hranimo v optimalnih razmerah, pa je praktično neuničljiva, na primer v temnem okolju in pri $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ jo je mogoče shraniti za 2000 let, pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ se ta čas podaljša na milijon let. (Huš, 2018) (Hansen & Mitchell, 2006) (Marguet & Forterre, 1994)

Kljub temu, da molekula DNA sama od sebe ne bo kar razpadla, se sčasoma lahko dogajajo posamične menjave baznih parov (točkovne mutacije). V živih sistemih te mutacije popravljalni mehanizmi nenehno iščejo in popravljajo. Ko vzorec odzamemo in mu dodamo različne snovi za shranjevanje, organizem ne živi več; takrat prenehajo delovati popravljalni mehanizmi, tudi do mutacij ne prihaja več. (Huš, 2018)

Po smrti organizma se ravnovesje v celici poruši, saj se procesi v njej ustavijo. Pride do poškodb DNA in do njene fragmentacije. Na ohranjenost DNA ne vpliva zgolj čas, ki je pretekel od smrti organizma, temveč predvsem okolje, v katerem se je organizem po smrti nahajal. Geološke in kemijske lastnosti zemlje, vode ali zraka ter prisotnost soli, izpostavitve sevanju, pH, dostop kisika in vlage, prisotnost mikroorganizmov ter temperatura so glavni dejavniki okolja, ki vplivajo na ohranjenost DNA. Najprimernejši pogoji za dobro ohranjenost DNA so nizka izpostavljenost ultravijoličnemu (UV) sevanju, hitra izsušitev ostankov DNA, nizka vlažnost, visoka koncentracija soli, rahlo bazičen ali nevtralen pH, nizka vsebnost huminskih kislin, odsotnost mikroorganizmov in predvsem nizka temperatura, ki je ključnega pomena. Z nizko temperaturo lahko bistveno upočasnimo razpadanje DNA, zlasti preden jo izoliramo iz celice. Tako upočasnimo delovanje prisotnih encimov, ki na razpadanje vplivajo. Vzorci podobne starosti, shranjeni pri nizkih temperaturah, so boljše ohranjeni kot tisti, ki so bili izpostavljeni višjim temperaturam. Po izolaciji DNA iz celice je njena stabilnost odvisna od metode izolacije

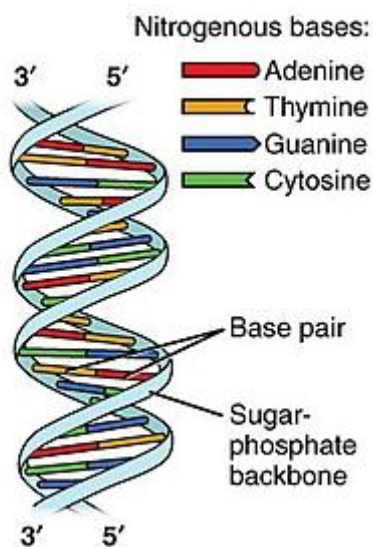
(kemijske lastnosti pufra) in pogojev shranjevanja (temperatura, izpostavljenost UV žarkom, dostop kisika). (Zupančič Pajnič, 2020)

Raziskovalno vprašanje: Kako pogoji shranjevanja vzorca (temperatura in čas) vplivajo na koncentracijo in čistost shranjenega vzorca DNA?

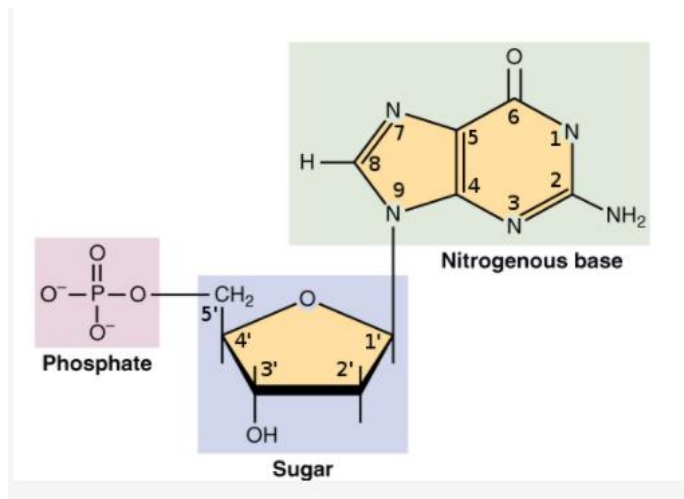
Hipoteza: Temperatura in čas shranjevanja vzorca (1 mesec v hladilniku v primerjavi z 1 mesec v hladilniku in 3 mesece v zamrzovalniku) ne vplivata več kot 10% na koncentracijo in čistost izolirane shranjene DNA.

Teoretično ozadje

DNA je molekula, ki je nosilka genske informacije v vseh živih organizmih. Vsak organizem, ki je nastal s spolnim razmnoževanjem, ima drugačen DNA zapis. Na podlagi DNA lahko identificiramo vrsto organizma in z določenimi metodami tudi posamezen osebek. DNA je nerazvejan polimer, katerega osnovna gradbena enota je nukleotid (slika 1). Vsak nukleotid je sestavljen iz pentoznega sladkorja, fosfatne skupine in dušikove baze (slika 2). Terciarna struktura molekule DNA je dvojna vijačnica. Dušikove baze znotraj vijačnice se medsebojno vežejo v pari, citozin z gvaninom in timin z adeninom (slika 1). Pri evkariontih se večina DNA nahaja v jedru, pri prokariontih pa prosto v citoplazmi. Zaporedje nukleotidov v DNA nosi informacijo o zgradbi beljakovin. Del DNA se prepíše v mRNA (ribonukleinska kislina), ki je zaporedju na DNA komplementarna. Na podlagi tega zapisa se nato s pomočjo tRNA iz posameznih aminokislin gradi beljakovina. Osnovna funkcionalna enota DNA je kodon, zaporedje treh nukleotidov, ki vsebuje zapis za eno aminokislino. Najmanjša enota dedovanja DNA je gen, ki vsebuje zapis za eno beljakovino. Posamezen gen je sestavljen iz več kodonov. (Stušek & Vilhar, 2010)



Slika 1: Dvojna vijačnica DNA z baznimi pari adenina in timina ter citozina in gvanina



Slika 2: Zgradba nukleotida

DNA začne propadati takoj, ko celica odmre. S tem se količina DNA v celici zmanjša. Na čas razpada vplivajo različni dejavniki, in sicer lastnosti DNA (oblika, dolžina in povezava s celičnimi membranami oziroma membranami organelov), okolje (temperatura, svetloba, kisik, pH, slanost, UV in količina vode) ter nekateri drugi dejavniki (predvsem prisotnost encimov). Koncentracija DNA s časom pada, vendar lahko njen razpad bistveno upočasnimo s shranjevanjem pri nižjih temperaturah in zaščiteno pred svetlobo. (Barnes & Turner, 2016) (Zupančič Pajnič, 2020)

Raziskave (Baust, 2008) so pokazale, da je kvaliteta vzorcev DNA, shranjenih pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ostala skoraj nespremenjena in se ni bistveno poslabšala tudi po štiriindvajsetih mesecih shranjevanja. Vzorci shranjeni pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ so bili stabilni dvanajst mesecev. DNA v vzorcih, shranjenih pri sobnih pogojih ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$), pa je bila po šestih mesecih že popolnoma razpadla in neuporabna. (Wu J, 2009)

Shranjevanje DNA v nespremenjeni koncentraciji in čistosti je izrednega pomena za raziskovanje na številnih področjih. Način hrambe vzorcev, ki zagotavlja dolgoročno ohranitev nespremenjene dedne informacije, je pomemben za preučevanje ogroženih in izumrlih vrst, iskanje genetske povezanosti, določanja dednih bolezni in v forenziki. Gre predvsem za problem, ko istočasen odvzem vseh vzorcev za primerjavo ni mogoč ter v primerih, ko želimo shraniti referenčne vzorce. (Fuentes-Pardo & Ruzzante, 2017)

DNA lahko namnožimo z uporabo PCR. S tem se njena koncentracija v vzorcu poveča, tako so nadaljnje raziskave spet možne. Količina DNA, ki je potrebna za pomnoževanje, je odvisna od kompleksnosti vzorca in števila kopij tarčnih genov v vzorcu. Pri genomski DNA se priporoča uporaba $1\text{ ng} - 1\text{ }\mu\text{g}$ (Takaraka, 2021). Pri uporabi PCR je pomembno, da je razmerje med absorbanca A_{260}/A_{280} čistost vzorca okrog 1,8. Pri tej čistosti okoljskih vzorcev so ti primerni za nadaljnjo obdelavo. (Termo Fischer scientific, 2012)

Ker se večina DNA nahaja v jedru celice, moramo najti način, kako jedro odpreti, če želimo DNA izolirati. Celična membrana in jedrna membrana sta zgrajeni iz dvojnega fosfolipidnega sloja. Ta je navzven polaren, zato ga lahko poškodujemo s polarnim detergentom. Dokončno celice odpremo z mehanskimi postopki, na primer jih pretlačimo ali pa zamrzemo, da celične

stene in membrane počijo. DNA nato oborimo s pomočjo nepolarnega topila, običajno je to alkohol. Iz oborine jo nato izoliramo. DNA, ki ji nato dodamo pufer, lahko nato v zamrzovalniku hranimo do nadaljnje obdelave. (Hribernik, 2013)

Za izolacijo se običajno uporablja industrijsko pripravljene sete kemikalij s priloženimi postopki. V nalogi smo uporabili NucleoSpin Soil Kit, ki se uporablja za izolacijo DNA iz biofilma, ki se iz podlage postrga s krtačko ali drugim pripomočkom in shrani do izolacije.

Večina mikroorganizmov v vodnih okoljih ima dva načina pojavljanja, prosto v vodnem stolpcu v planktonski obliki in pritrjena v obliki biofilma. Organizmi, katerih DNA sem opazovala, so rasli v obliki biofilma na kamnih na mestih odvzema (tabela 1). Za biofilm je značilna pritrjenost mikroorganizmov na površino ter matrika - polimer, ki ga celice izločajo in jih medsebojno povezuje, ščiti, lahko pa jim tudi omogoča medsebojno komunikacijo. (Donlan, 2002)

Po izolaciji lahko kakovost DNA določamo na različne načine. Za ugotavljanje čistosti vzorca so najprimernejše metode, ki temeljijo na spektrometriji. DNA in nečistoče absorbirajo različne dele svetlobnega spektra (podrobneje opisano v nadaljevanju). Na podlagi absorbance lahko ugotovimo koncentracijo DNA ter razmerje med koncentracijama DNA in nečistoč. Vedno je potrebno testirati tudi kontrolo izolacije, da potrdimo, da med delom ni prišlo do kontaminacije. (Hribernik, 2013)

Metode dela

Vzorčenje in shranjevanje vzorcev

Tabela 1: Vzorci

Oznaka vzorca	Vir vzorca	Datum odvzema vzorca	Datum izolacije	Način shranjevanja vzorca pred izolacijo
M1	Bistrica	17. 6. 2019	22.07.2019	1 mesec v hladilniku
M2	Sava	19. 6. 2019	22.07.2019	1 mesec v hladilniku
M3	Poljanska Sora	1. 7. 2019	22.07.2019	1 mesec v hladilniku
M4	slepa kontrola izolacije	/	22.07.2019	/
M5	Bistrica	17. 6. 2019	21.10.2019	1 mesec v hladilniku, nato 3 mesece v zamrzovalniku
M6	Sava	19. 6. 2019	21.10.2019	1 mesec v hladilniku, nato 3 mesece v zamrzovalniku
M7	Poljanska Sora	1. 7. 2019	21.10.2019	1 mesec v hladilniku, nato 3 mesece v zamrzovalniku
M8	slepa kontrola izolacije	/	21.10.2019	/

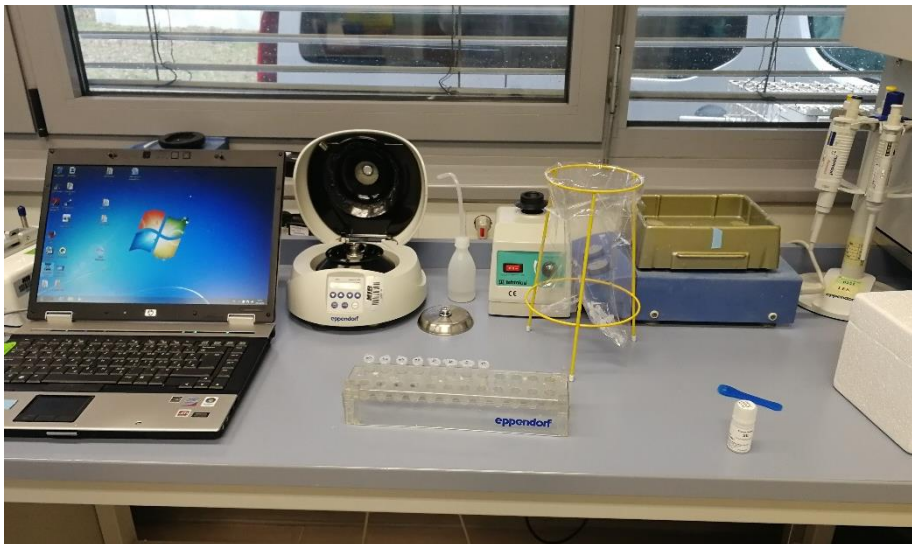
Vzorci so bili odvzeti iz treh različnih slovenskih rek. Biofilm je bil (s krtačko) postrgan s kamnov in nato fiksiran v absolutnem etanolu. Nato so bili vsi vzorci za en mesec shranjeni v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Po tem času je bila izolirana DNA iz dela posameznega vzorca (M1, M2, M3, vzorec M4 pa je slepa kontrola za to izolacijo). Preostanek vzorcev, iz katerih DNA še ni bila izolirana, je bil nato za tri mesece shranjen v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Nato je bila iz vsakega od vzorcev ponovno izolirana DNA (M5, M6, M7, vzorec M8 pa je slepa kontrola za to izolacijo).

Postopki dela:

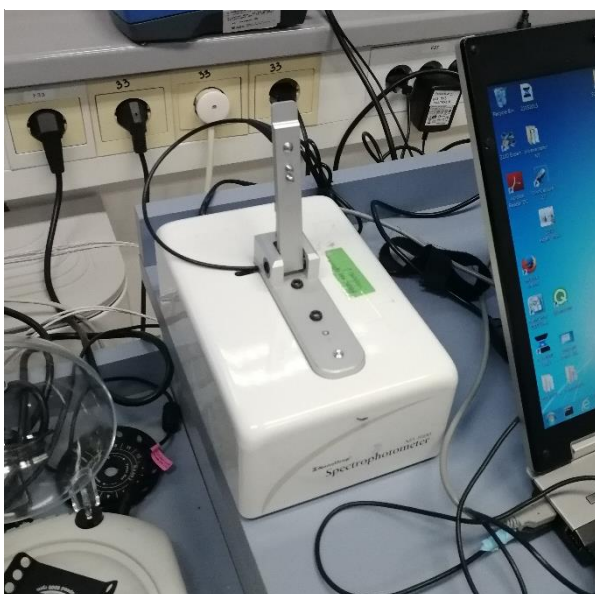
- Izolacija DNA (NucleoSpin Soil kit)
- NanoDrop meritve
- Qubit meritve

NanoDrop

Napravo NanoDrop smo najprej umerili tako, da smo na merilni prostor nanesli 2 μ L vode, ki ne vsebuje DNA (ang. DNA free water), in izvedli meritev. Nato smo nanašali po 2 μ L vzorca. Med posameznimi meritvami smo nanešene vzorce obrisali s papirnato brisačko, namenjeno posebej za NanoDrop, ki ne pušča vlaken.



Slika 3: Delovna površina za merjenje z napravo NanoDrop



Slika 4: Naprava NanoDrop

NanoDrop je laboratorijska naprava, ki z uporabo spektrometrije izmeri koncentracijo proteinov DNA ali metabolitov v vzorcu. Spektrometrija deluje tako, da skozi vzorec pošlje določen spekter svetlobe in meri absorbanco vzorca. Merjenje spektrometrije z NanoDropom sem uporabila za določanje koncentracije beljakovin in DNA v vzorcu ter razmerja med tema dvema koncentracijama. DNA najbolje absorbira ultravijolično svetlobo valovne dolžine 260 nm, medtem ko beljakovine najbolje absorbirajo ultravijolično svetlobo valovne dolžine 280 nm. Na podlagi tega razmerja lahko nato ugotovimo, kako čist je vzorec. (Thermo Fisher Scientific, 2010)

Pri meritvah z NanoDropom lahko pride do napake predvsem, če instrument ni bil dobro umerjen, če pred merjenjem novega vzorca merilnega mesta nismo dobro obrisali ali pa če je v kapljici, ki jo naneseemo na merilno mesto, mehurček zraka. V teh primerih pogosto dobimo negativno vrednost in je potrebno meritev ponoviti. (Thermo Fisher Scientific, 2010)

Qubit

Najprej smo zmešali Qubit pufer in reagent. Nato smo pripravili po eno mikrocentrifugirko za vsak vzorec in še dve za standard. V mikrocentrifugirki za standard smo dodali v vsako po 190 μL mešanice, ki smo jo pripravili prej, in po 10 μL standarda, ki ga izberemo glede na to, katere molekule nas zanimajo (npr. DNA, [RNKRNA](#), ...). V preostale mikrocentrifugirke smo odmerili po 198 μL mešanice pufera z reagentom in po 2 μL vzorca. Vsako mikrocentrifugirko smo nato 2-3 sekunde stresali, nato pa počakali 2 minuti, preden smo začeli z meritvijo. V Qubit smo najprej vstavili in izvedli meritev za oba standarda, nato pa še vzorce.



Slika 5: Priprava vzorcev za meritev z napravo Qubit



Slika 6: Merjenje z napravo Qubit

Qubit fluorometer je laboratorijski instrument, ki s pomočjo fluorescentnih barvil pomaga pri določevanju koncentracije DNA, [RNK/RNA](#) ali beljakovin v vzorcu. Različna barvila se vežejo na različne molekule in takrat fluorescirajo. Barvilo, ki smo ga dodali vzorcu, se veže na dvoverižne molekule DNA in tako izmeri le koncentracijo teh molekul. Tako omogoča natančnejše določanje koncentracije, saj so izmerjeni podatki vezani točno na določeno molekulo. To je glavna razlika med meritvijo s fluorometrom (Qubit) in spektrometrom (NanoDrop), saj spektrometer poleg dvoverižnih molekul DNA izmeri tudi koncentracijo enoverižnih molekul DNA (ki je že razpadla) in [RNK/RNA](#). Poleg tega je pri metodi spektrometrije težava v tem, da pri valovni dolžini 260 nm absorbirajo tudi nekatere druge molekule. (Angostorm Enginiring, 2017)

Izolacija DNA

Izolacijo smo izvedli po protokolu ter s pripomočki NucleoSpin Soil kit (Postopek opisan v viru (Vautier, Vasselon, & Chardon, 2020)).

Rezultati

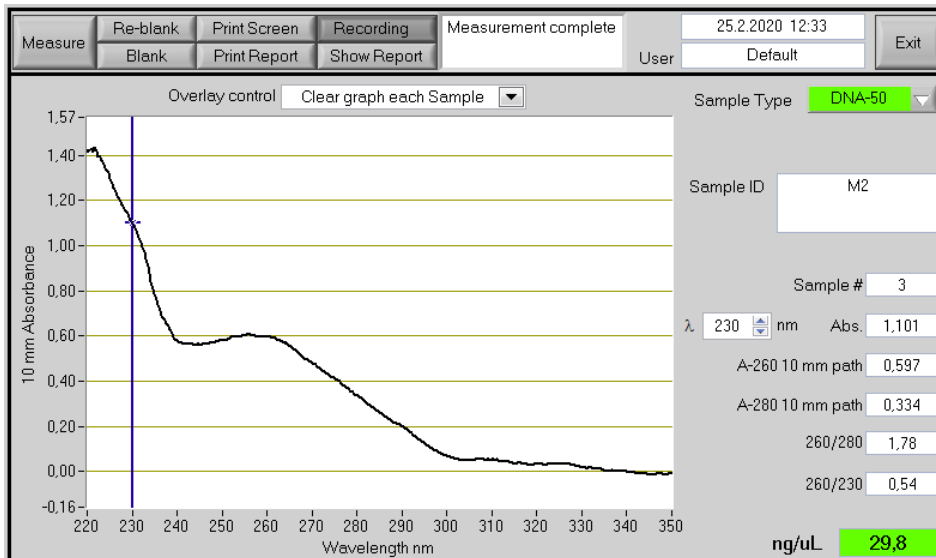
Rezultati so prikazani najprej za meritve z napravo NanoDrop (koncentracija v tabeli 2 in čistost v tabeli 3), sledijo grafi absorbance za vsak vzorec (graf 1-6), nato pa še meritve koncentracij z napravo Qubit (tabela 4)

Tabela 2: Rezultati koncentracije izbranih vzorcev z napravo NanoDrop

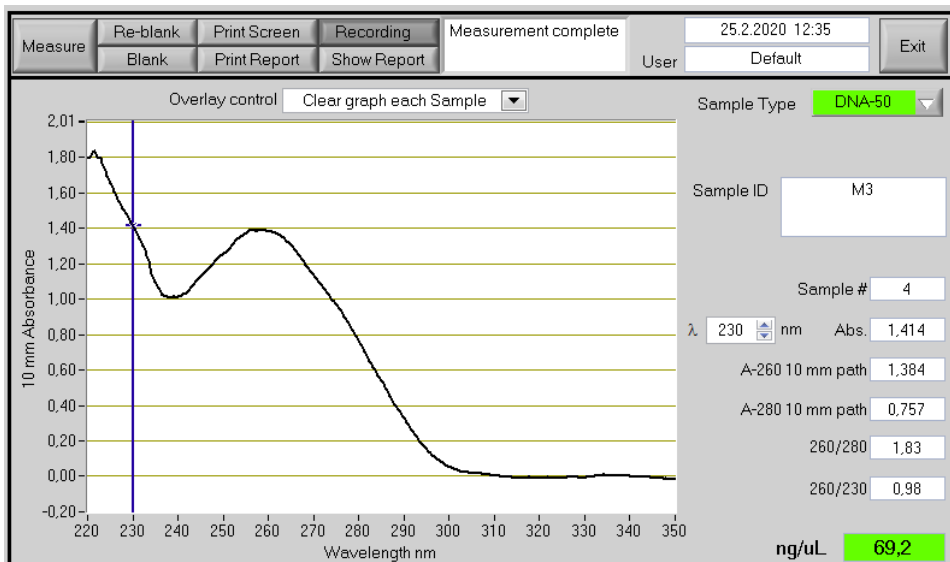
Oznaki vzorcev	Vir vzorcev	Koncentracija ng/ μ l po 1 mesecu hranjenja v hladilniku	Koncentracija ng/ μ l po 1 mesecu hranjenja v hladilniku + 3 mesecih v zamrzovalniku	Sprememba koncentracije po 3 mesecih
M1, M5	Bistrica	2,48	2,02	-22,8%
M2, M6	Sava	29,83	26,57	-12,3%
M3, M7	Poljanska Sora	69,83	61,79	-13,0%
M4, M8	Slepa kontrola izolacije	4,59	-0,08	/

Tabela 3: Rezultati čistosti izbranih vzorcev z napravo NanoDrop

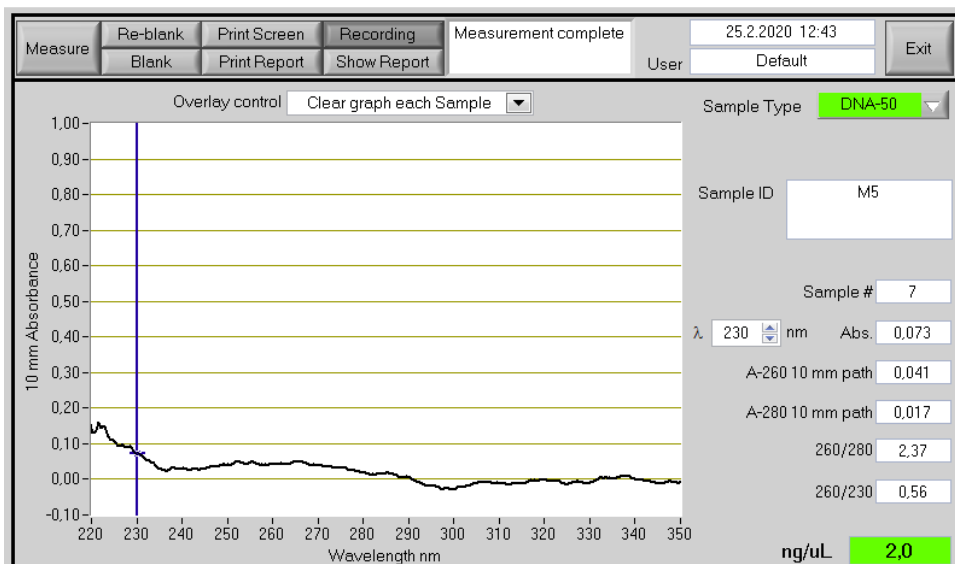
Oznaki vzorcev	Vir vzorcev	Razmerje A_{260}/A_{280} po 1 mesecu hranjenja v hladilniku	Razmerje A_{260}/A_{280} po 1 mesecu hranjenja v hladilniku + 3 mesecih v zamrzovalniku	Odstopanje druge meritve
M1, M5	Bistrica	2,46	2,37	-3,7%
M2, M6	Sava	1,78	1,96	+9,2%
M3, M7	Poljanska Sora	1,83	1,90	+3,4%
M4, M8	Slepa kontrola izolacije	2,71	-0,14	/



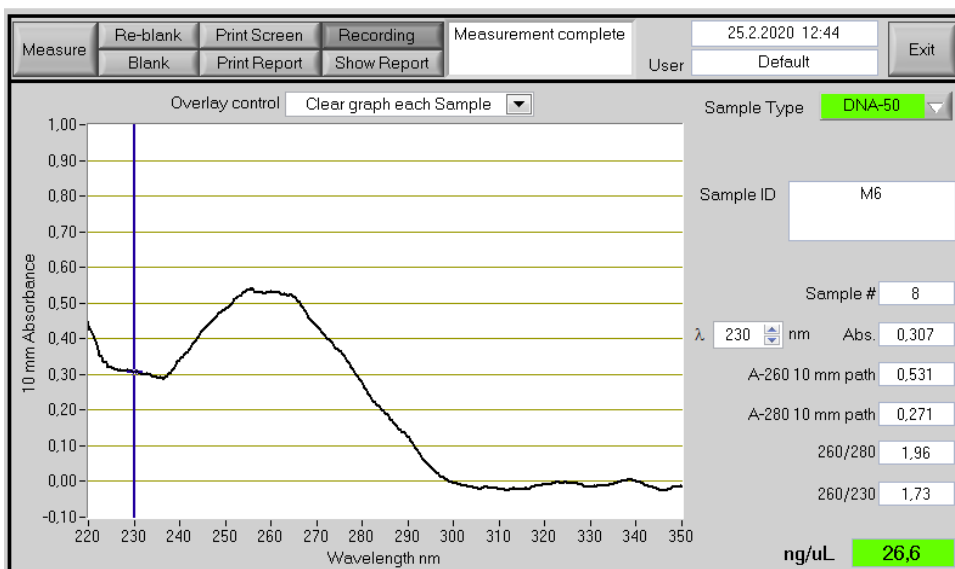
Graf 1: Graf absorbance za vzorec M2



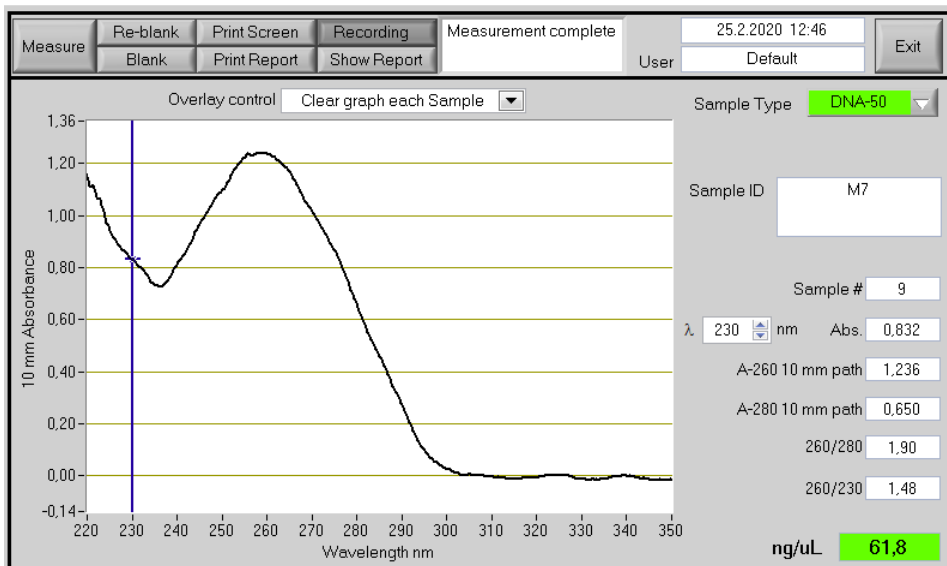
Graf 2: Graf absorbance za vzorec M3



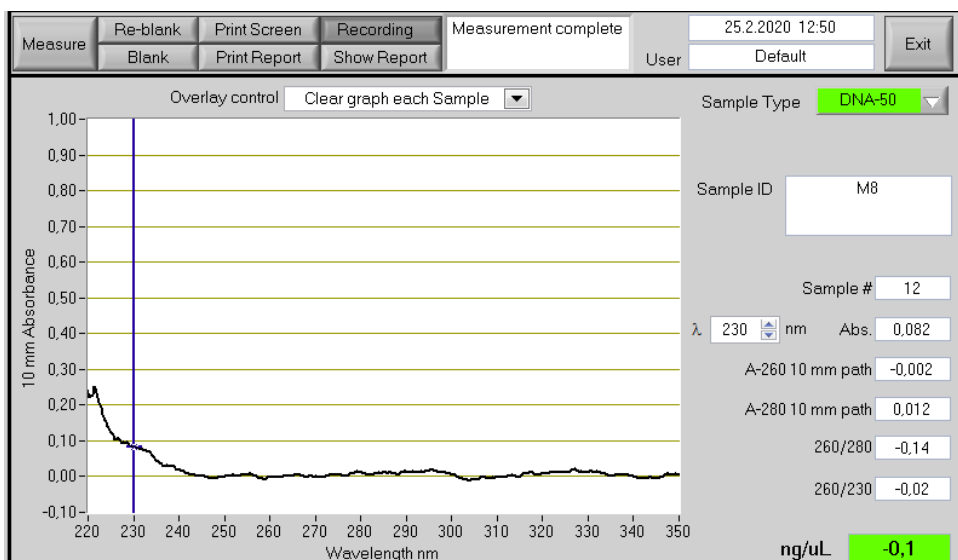
Graf 3: Graf absorbance za vzorec M5



Graf 4: Graf absorbance za vzorec M6



Graf 5: Graf absorbance za vzorec M7



Graf 6: Graf absorbance za vzorec M8

Tabela 4: Rezultati meritve izbranih vzorcev z napravo Qubit

Oznaki vzorcev	Vir vzorcev	Koncentracija ng/ μ l po 1 mesecu hranjenja v hladilniku	Koncentracija ng/ μ l po 1 mesecu hranjenja v hladilniku + 3 mesecih v zamrzovalniku	Sprememba koncentracije po 3 mesecih
M1, M5	Bistrica	1,95	2,85	+31,5%
M2, M6	Sava	17,8	22,2	+19,8%
M3, M7	Poljanska Sora	55,5	55,5	ni spremembe
M4, M8	Slepa kontrola izolacije	pod mejo zaznave	pod mejo zaznave	/

Razprava

Rezultati meritev deloma potrjujejo moje hipoteze, saj so koncentracije DNA, izolirane iz istega vzorca po treh mesecih hranjenja v zamrzovalniku (pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), od -23% do $+32\%$ (absolutna razlika od 12% do 32%) drugačne od izolacije po enem mesecu hranjenja v hladilniku (pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). V tem času se je čistost spremenila za do 9% . Iz literature je razvidno, da se razpad DNA pri nižjih temperaturah bistveno upočasni, vendar so tam navedene temperature bistveno nižje od tistih, v katerih sem shranjevala vzorce. DNA se, če so celice vzorca shranjene v etanolu, pri pod lediščem ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ohranja. To dokazuje, da je DNA zelo stabilna molekula. Odpornost na nižje temperature, zlasti nekaj stopinj pod lediščem, je pomembna, saj se s takimi razmerami v naravi pogosto srečujemo. DNA se pri nižjih temperaturah počasneje razgrajuje, saj encimi za razgradnjo niso aktivni.

Pri meritvah z napravo NanoDropo je nekajkrat prišlo do napak. Meritve teh vzorcev sem ponovila. Vzrok za napake je lahko bil mehurček v kapljici vzorca, slabo očiščena merilna površina med merjenji ali pa slabo umerjen instrument. Pri tej napravi velikokrat pride do odstopanj v zaporednih merjenjih istega vzorca, zato bi bilo potrebno izdelati natančen protokol za njeno uporabo.

Rezultati merjenja vzorcev iz Save (M2, M6) in Poljanske Sore (M3, M7) se ujemajo s pričakovanji. Kot je razvidno iz grafov 1, 2, 4 in 5 je vrh, torej najvišja absorbanca, pri svetlobi valovne dolžine 260 nm . To potrjuje visoko koncentracijo DNA v vzorcu. Koncentracija meritev vzorcev M4 in M8 je nizka, kar potrjuje, da med izolacijo DNA ni prišlo do kontaminacije. Izmerjena koncentracija v obeh vzorcih Bistrice (M1 in M5) je zelo nizka. Oblika grafa se ne sklada s pričakovanji. Tudi po več zaporednih meritvah je vrednost ostala enaka. To izključuje napako v meritvi. Meritev s Qubitom (tabela 4) potrjuje, da je koncentracija v teh dveh vzorcih res nizka, saj je koncentracija pod mejo zaznave tega instrumenta.

NanoDrop meritve so tudi potrdile, da je vzorec DNA čist, saj je razmerje med absorbanco pri svetlobi valovne dolžine 260 nm , ki jo absorbira DNA, in 280 nm , ki jo absorbirajo beljakovine in druge nečistoče, večje od $1,78$. S tem smo potrdili, da je vsebnost nečistoč in drugih beljakovin v vzorcu majhna. Med hranjenjem se čistost ni bistveno spremenila, kar pomeni da je vzorec primeren za pomnoževanje s PCR.

Meritve s Qubitom, ki so natančnejše od NanoDropa, se skladajo s prvimi meritvami. S tem potrjujemo, da pri teh meritvah do večjih odstopanj ni prišlo. Potrjujejo, da se koncentracija DNA po daljšem shranjevanju ne zmanjšuje. Meritve z NanoDropom nakazujejo, da se je koncentracija DNA po nadaljnjih treh mesecih hranjenja v zamrzovalniku (pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zmanjšala za 12% do 23% . Iz rezultatov je razvidno, da so koncentracije DNA najvišje pri vzorcih, odvzetih iz Poljanske Sore, manjše so pri vzorcih, odvzetih iz Save. Manjše razlike so bile v vzorcih, kjer je bila koncentracija DNA višja.

Meritve s Qubitom nakazujejo, da je koncentracija ostala enaka ali pa se povečala za do 32% . Pri vzorcih iz Bistrice so koncentracije DNA zelo majhne. Koncentracija DNA izolirane iz vzorca Bistrice (M1 in M5) in Save (M2 in M6) je višja pri vzorcih, ki so bili predhodno shranjeni v zamrzovalniku. Koncentracija DNA iz vzorcev Poljanske Sore (M3 in M7) je povsem enaka. S Qubitom sem izmerila tudi koncentracijo DNA v kontrolnih vzorcih (M4 in M8), vendar je bila

prenizka, da bi jo instrument zaznal. Poskusila sem tudi z esejem za nižje koncentracije, vendar je bila koncentracija še zmeraj prenizka za zaznavo. Ta rezultat je ugoden, saj ponovno dokazuje, da pri izolaciji ni prišlo do kontaminacije.

Nastala razlika v koncentracijah med vzorci, odvzetimi iz iste reke, ni nujno posledica kakršnihkoli razlik v kakovosti izolacije ali razpadu DNA, temveč je lahko le posledica nenatančno umerjenega instrumenta, če pred nanosom novega vzorca merilnega mesta nismo dobro obrisali ali pa če je v kapljici, ki jo nanesimo na merilno mesto, mehurček zraka (zlasti NanoDrop pogosto vrednosti za isti vzorec izmeri različno, kot posledica nenatančnega čiščenja).

Po izvedbi meritev je bila hipoteza ovržena, saj se je količina izolirane DNA po dodatnih treh mesecih shranjevanja v zamrzovalniku spremenila za več kot 10%. Meritve z NanoDropom nakazujejo, da se je koncentracij v tem času zmanjšala za 12% do 23%, meritve s Qubitom pa nakazujejo, da se je koncentracija po tem času povečala za do 32%. Zaradi neskladja med rezultati dveh različnih metod na podlagi teh meritev ne moremo določiti, ali se je koncentracija DNA spremenila. Ti dve metodi nista natančni, zlasti pri nižjih koncentracijah (vzorec 1 in 5), pri katerih je odstopanje največje. Meritve kažejo tudi, da se v tem času shranjevanja čistost izolirane DNA ni poslabšala, saj razmerje med DNA in proteini pri izolaciji iz vzorcev istih rek ne odstopa za več kot 10%. To dejstvo je uporabno posebej za obdelavo okoljskih vzorcev in drugih vzorcev, ki niso vsi odvzeti ob istem času.

Zaključek

Z dvema metodama (NanoDrop in Qubit) sem izmerila koncentracijo DNA in njeno čistost. Imela sem vzorce iz treh rek, in sicer Kamniške Bistrice, Save in Poljanske Sore. Del DNA je bil iz vsakega vzorca izoliran po mesecu hranjenja v hladilniku, del pa po nadaljnjih treh mesecih hranjenja v zamrzovalniku.

Meritve z NanoDropom nakazujejo, da se je koncentracija DNA po treh mesecih hranjenja v zamrzovalniku (pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zmanjšala za 12% do 23%. Meritve s Qubitom pa nakazujejo, da se je koncentracija po istem času hranjenja pri enakih pogojih povečala za do 32%. Razlike v meritvah so najverjetneje posledica nenatančno umerjenega instrumenta, če pred nanosom novega vzorca merilnega mesta nismo dobro obrisali ali pa če je v kapljici, ki jo naneseemo na merilno mesto, mehurček zraka. Veliko odstopanje med meritvami obeh naprav je najverjetneje posledica nenatančnosti instrumentov in nenatančnost merjenja pri nižjih koncentracijah, kjer je odstopanje najvišje (Vzorec 1 in 5). Naše ugotovitve so uporabne posebej za obdelavo okoljskih vzorcev in drugih vzorcev, ki niso vsi odvzeti ob istem času. S tem pa ni potrjeno, da so ti vzorci primerni za vse nadaljnje analize. Za ta namen bi bilo potrebno izvesti analize, ki bi prikazale razgrajenost izolirane DNA (elektroforeza), lahko pa bi primerjali tudi učinkovitost pomnoževanja z metodo qPCR med različnimi vzorci. Prav tako bi lahko preučevali vzorce, izpostavljene svetlobi in shranjevanje v različnih pufrih.

Shranjevanje DNA v nespremenjeni količini je izrednega pomena za raziskovanje na številnih področjih, ki se pospešeno razvijajo v zadnjih letih. Način hrambe vzorcev, ki zagotavlja dolgoročno ohranitev nespremenjene dedne informacije, je pomemben za preučevanje ogroženih in izumrlih vrst, iskanje genetske povezanosti, določanja dednih bolezni in v forenziki. Gre predvsem za problem, ko istočasen odvzem vseh vzorcev za primerjavo ni mogoč ter v primerih, ko želimo shraniti referenčne vzorce. Glede na trenutni razvoj tega področja lahko v prihodnjih letih pričakujemo še številna nova področja uporabnosti. Vzorci so v laboratorijih običajno shranjeni pri temperaturi -20°C , zato je pomembno vedeti, v kakšni meri se pri teh pogojih koncentracija in čistost vzorca izolirane DNA ohranjata. Glede na velika odstopanja pri meritvah bi lahko nalogo nadaljevala tako, da bi vsak vzorec z isto napravo izmerila večkrat in tako dobila zanesljivejše rezultate. Prav tako bi lahko iz istega vzorca naredili več vzporednih izolacij in tako preverili odstopanje v koncentraciji in čistosti med vzorci DNA, izoliranimi ob enakih pogojih shranjevanja.

Viri in literatura

- Angostorm Engineering. (2017). *Angostorm Engineering*. Pridobljeno iz Quantum series: https://angstromengineering.com/quantum-series-for-josephson-junctions/?utm_campaign=Main_Angstrom_Search&utm_medium=cpc&utm_source=pvdJJ_group&gclid=CjwKCAjwkPX0BRBKEiwA7THxiBdHQYBPSH6BnC5L9a_IDIJ9C52D-q3SdlG2vd1q5hGojapp9uzm_xoCTE8QAvD_BwE
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). *Springer Link*. Pridobljeno iz Conservation genetics: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Baust, J. G. (2008). *Strategies for the Storage of DNA Biopreservation and Biobanking*. Pridobljeno iz docksci.com/: https://docksci.com/strategies-for-the-storage-of-dna_5adc2aebd64ab25b09b7e325.html
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, 881-890.
- Fuentes-Pardo, A. P., & Ruzzante, D. E. (5. september 2017). *PubMed.gov*. Pridobljeno iz Whole-genome sequencing approaches for conservation biology: Advantages, limitations and practical recommendations: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28746784/>
- Hansen, A. J., & Mitchell, D. L. (1. junij 2006). *Crosslinks Rather Than Strand Breaks Determine Access to Ancient DNA Sequences From Frozen Sediments*. Pridobljeno iz <https://academic.oup.com/>: <https://doi.org/10.1534/genetics.106.057349>
- Hribernik, M. (marec 2013). *knjižnica celje*. Pridobljeno iz Izolacija DNA iz sadja in zeljenjave: <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4201303643.pdf>
- Huš, M. (april 2018). *DNA namesto diskov*. Pridobljeno iz Monitor: <https://www.monitor.si/clanek/DNA-namesto-diskov/184785/>
- Marguet, E., & Forterre, P. (11. maj 1994). *DNA stability at temperatures typical for hyperthermophiles*. Pridobljeno iz Oxford Academic: <https://academic.oup.com/nar/article/22/9/1681/1057230?login=true>
- Stušek, P., & Vilhar, B. (2010). *Biologija celice in genetika*. Ljubljana: DZS.
- Thermo Fischer scientific. (januar 2012). *Thermo Fischer scientific tools*. Pridobljeno iz Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios : <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *Nucleid acid-Thermo Fisher Scientific*.
- Vautier, M., Vasselon, V., & Chardon, C. (7. april 2020). *DNA extraction from environmental biofilm using the NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL)*. Pridobljeno iz protocols.io: <https://www.protocols.io/view/dna-extraction-from-environmental-biofilm-using-th-bd52i88e>

Wu J, C. J. (2009). *Colorado edu*. Pridobljeno iz Stability of Genomic DNA at Various Storage Conditions: https://www.colorado.edu/ecenter/sites/default/files/attached-files/seracare_stability_of_genomic_dna_at_various_storage_conditions_isber2009.pdf

Zupančič Pajnič, I. (april 2020). Molekularnogenetski vidiki preiskav starodavne DNA. *Zdravniški vestnik*.

Viri slik

Slika 1, 2: Anatomy and Physiology, J. Gordon Betts, Kelly A. Young,, Apr 25, 2013, Houston, Texas, <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/3-3-the-nucleus-and-dna-replication>