

Název: **Specifická izolace microRNA pomocí magnetizovatelných mikročástic**

Školitel: Veronika Vlahová

Datum: 21. 3. 2014

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

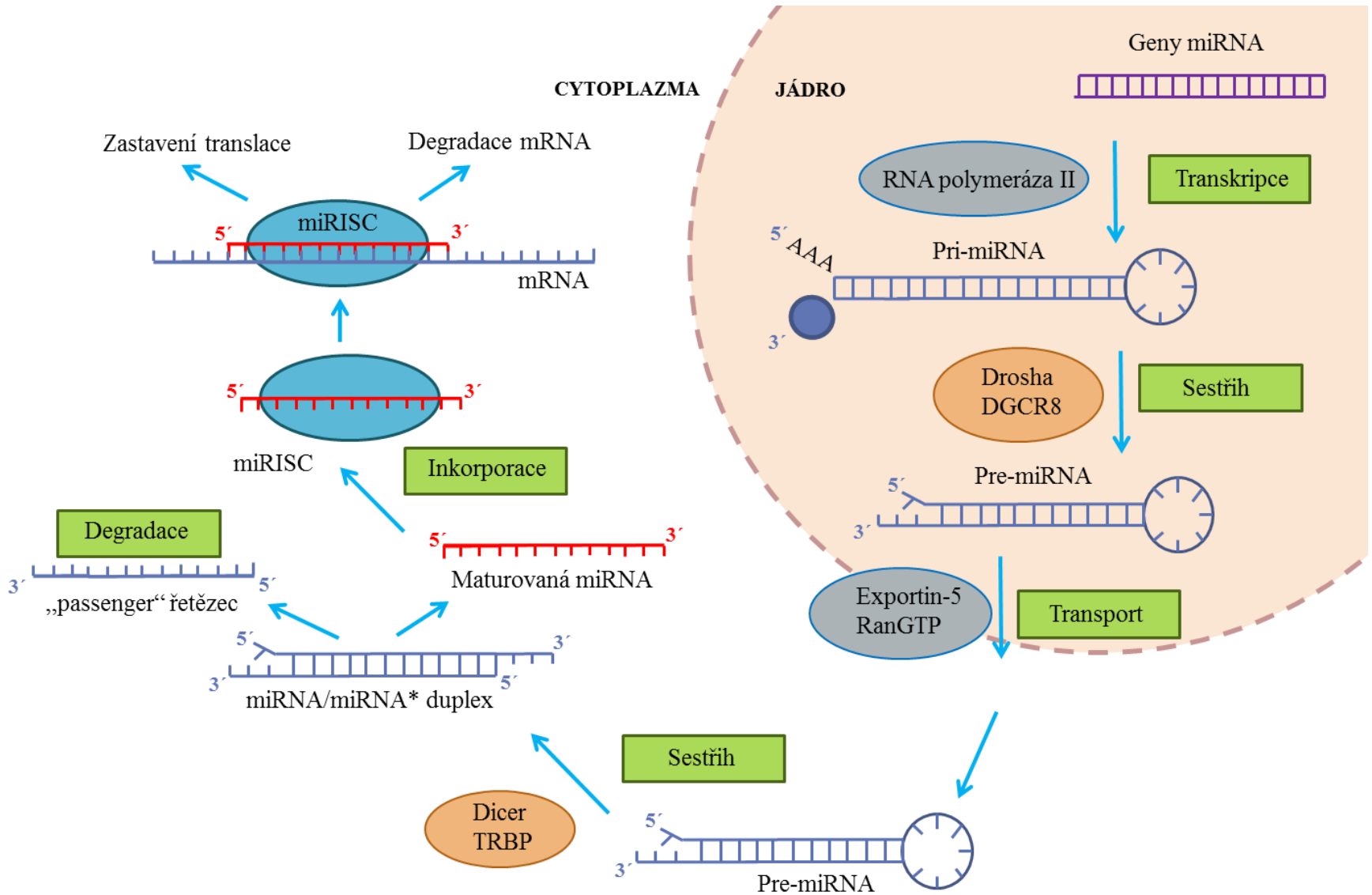
Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



MicroRNA

- Délka přibližně 22 nt
- Vznikají přepisem DNA v jádře
- Regulátory genové exprese na post-transkripční úrovni
- Uplatňují se v mnoha biologických procesech
- Mají význam v procesech nádorové transformace
 - Deregulace v mnoha typech karcinomů
 - Potenciální biomarker

Vznik a funkce miRNA



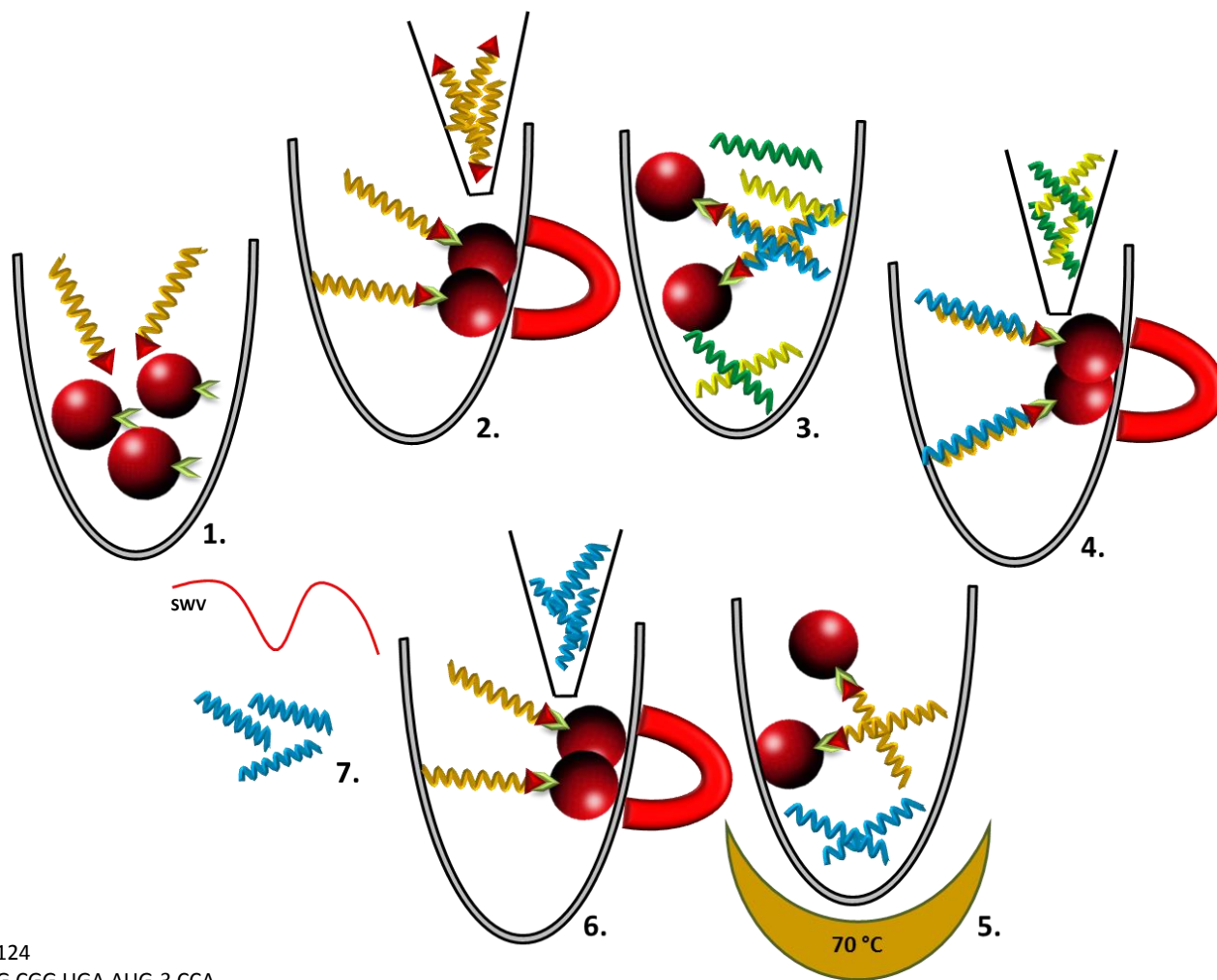
miR-124

- Vyskytují se tři typy genů pro miR-124
- Délka 21 nt
- Vysoká konzervovanost v rámci druhů
- Nejvyšší exprese v mozkové tkáni
- Ovlivňuje diferenciaci nervových buněk
- Deregulace exprese v karcinomech prostaty, kolorektálním karcinomu, glioblastomu a meduloblastomu

Cíle práce

- Cílem této práce bylo vyvinout specifickou metodu pro izolaci miRNA bez použití značení
- Optimalizace izolace pomocí magnetizovatelných částic
- Detekce miR-124 pomocí elektrochemie
- Aplikace optimalizované metody na reálné vzorky

Princip metody



Sekvence miR-124

5-UAA GGC ACG CGG UGA AUG-3 CCA

Sekvence anti-miR-124

5-Biotin-TGG CAT TCA CCG CGT GCC TTA-3



MPs modifikovaná streptavidinem



Biotinylovaná anti-miR-124



miR-124



Externí magnetické pole

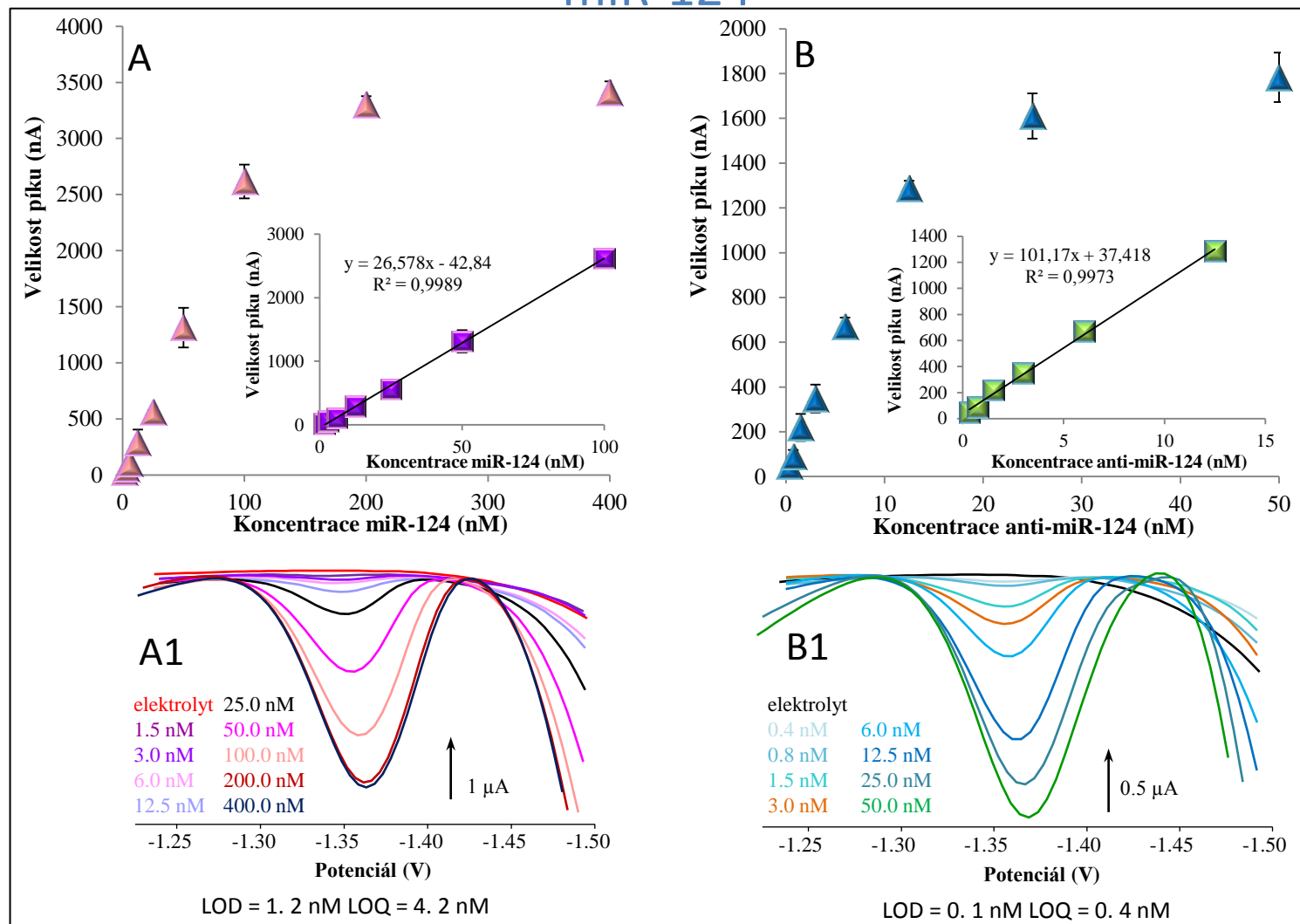


RNA



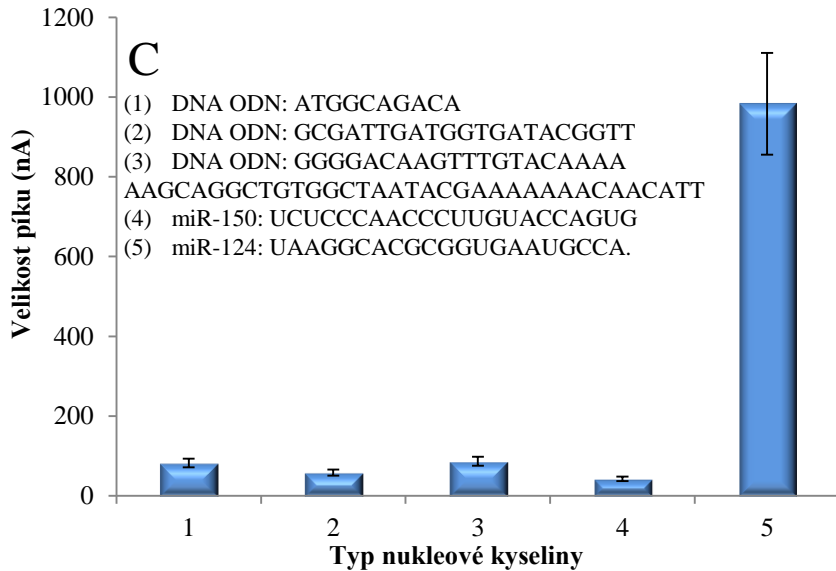
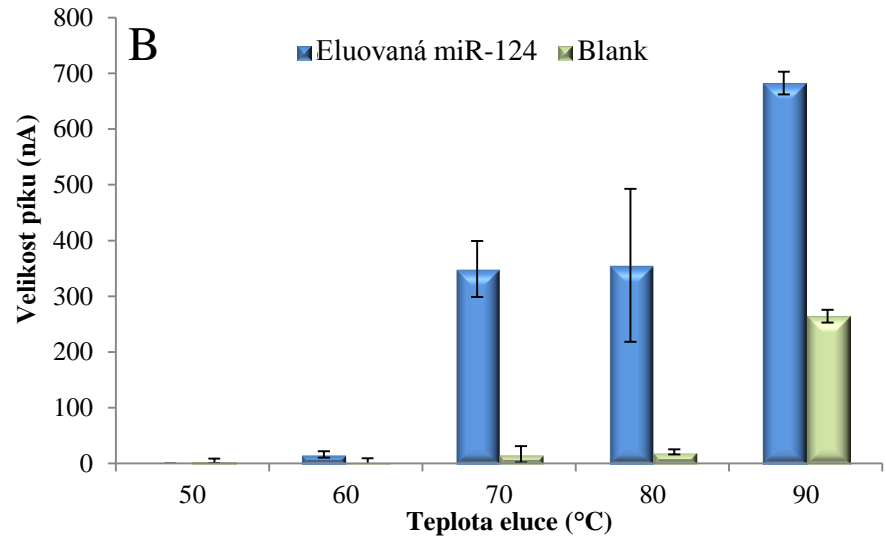
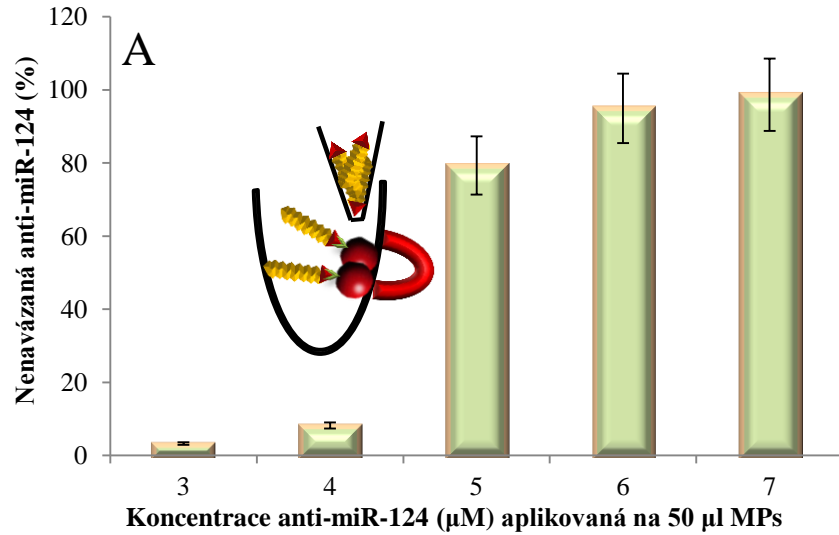
Voltamogram

Kalibrace elektrochemického stanovení miR-124 a anti-miR-124



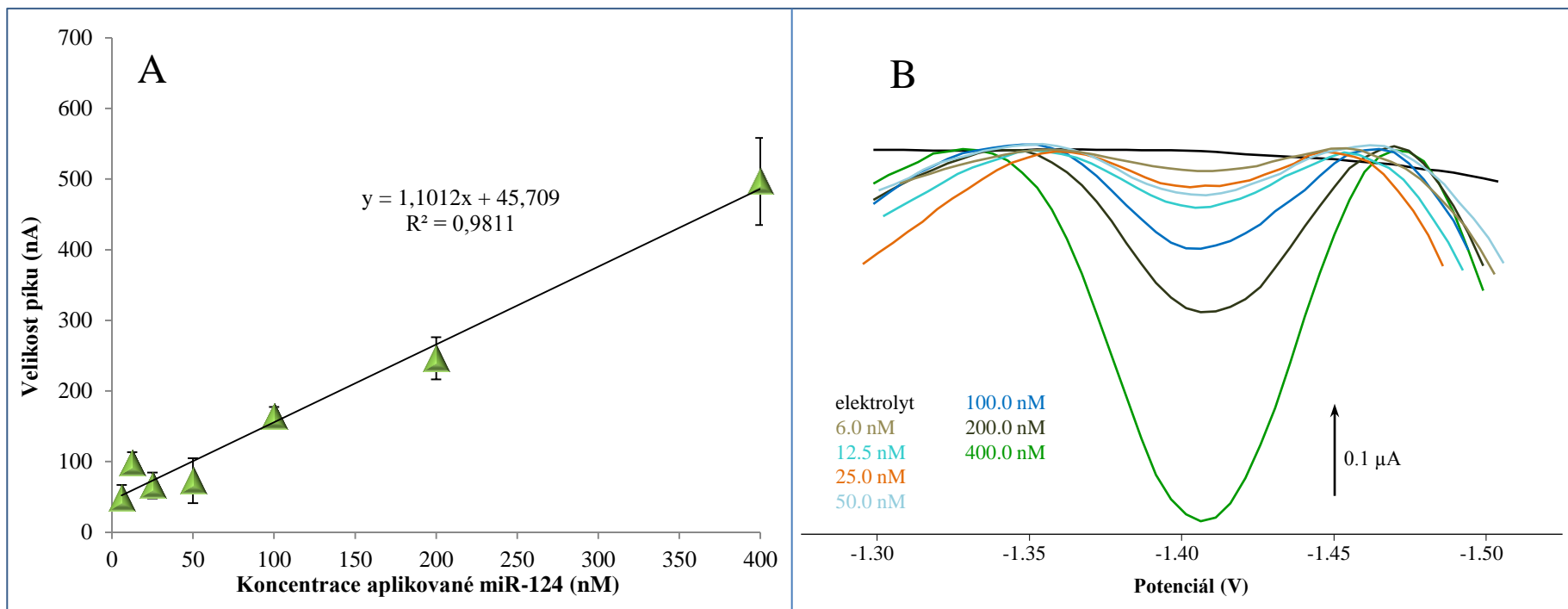
- (A) Kalibrační křivka miR-124 s voltamogramem (A1): velikost píku je závislá na koncentraci miR-124
- (B) Kalibrační křivka anti-miR-124 s voltamogramem (B1): velikost píku je závislá na koncentraci anti-miR-124

Optimalizace metody



- (A) Optimalizace navázání anti-miR-124 na MPs: byla měřena zbytkové množství nenavázané anti-miR-124 v roztoku, který byl odebrán od separovaných MPs
- (B) Optimalizace eluční teploty: byl posuzován rozdíl mezi signálem izolované miR-124 a signálem roztoku bez miR-124
- (C) Ověření specifiity vazby: byly vyzkoušeny různé typy sekvencí pro potvrzení specifické vazby miR-124 na anti-miR-124

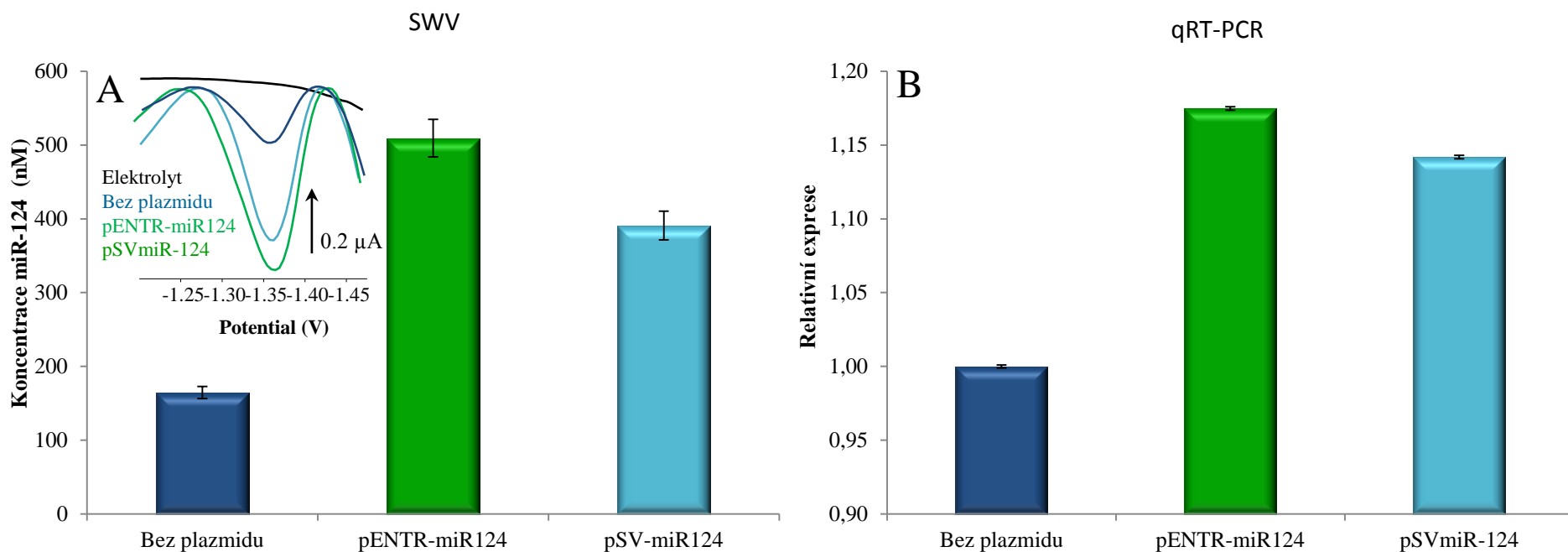
Kalibrace optimalizovaného izolačního postupu



(A) Kalibrace optimalizovaného izolačního postupu s voltamogramem (B): velikost píku je závislá na koncentraci aplikované miR-124

Průměrná výtěžnost izolačního postupu je 27,3 %
LOD = 4,06 nM LOQ = 13,54 nM

Aplikace metody na reálné vzorky



(A) Koncentrace izolované miR-124 z reálných vzorků: množství miR-124 izolovaná optimalizovanou metodou z třech typů HEK buněk: neobsahující plazmid, s plazmidem pENTR-miR-124, s plazmidem pSVmiR-124. Vnořený graf zobrazuje voltamogram izolovaných miR-124

(B) Relativní exprese miR-124 v HEK buňkách: pomocí qRT-PCR byla provedena detekce relativní exprese miR-124 ve třech typech HEK buněk: neobsahující plazmid, s plazmidem pENTR-miR-124, s plazmidem pSVmiR-124

Závěr

- Byla vyvinuta nová metoda izolace miRNA pomocí magnetizovatelných částic, která je např. v porovnání qRT-PCR méně časově náročná, vyžaduje menší množství vzorku a je metodicky jednodušší
- Byla provedena její optimalizace
- Izolovaná miR-124 byla detekována pomocí elektrochemie
- Pomocí této metody byla izolována miR-124 z reálného vzorku modifikovaných HEK buněk

Poděkování

- Ing. Kristýně Šmerkové
- Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D.
- Dr. Vladimíru Pekaříkovi, Ph.D.
- RNDr. Michalovi Masaříkovi, Ph.D.
- Prof. Ing. Renému Kizekovi, Ph.D.
- A celému kolektivu Laboratoře Metalomiky a Nanotechnologií

Děkuji za pozornost

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik

