

CHEMAGAZÍN 5

ROČNÍK XXIII (2013)

TÉMA ČÍSLA

BIOTECHNOLOGIE, BIOCHEMIE A FARMACIE**Biotechnologie v ČR**

METTINUM – **Systém pro dlouhodobou archivaci vzorků DNA**

Nečistoty ve farmaceutických produktech

způsobují problémy

Bioplasty:

alternativa s budoucností?

Klasifikace čistých prostor podle ISO

s použitím čítačů částic unášených vzduchem

Ekonomika a řízení

podniků v chemickém průmyslu

**Direct Detect™**

Zvolte přímou cestu ke kvantifikaci biomakromolekul

Kolorimetrickým a UV metodám zvoní hrana! Kvantifikujte proteiny, peptidy, detergenty nebo lipidy i ve složitých reálných vzorcích rychle, levně a spolehlivě. To vše intuitivně, bez nutnosti vytváření pracovních kalibračních křivek a jen ve 2 µl vzorku. Nechte se okouzlit možnostmi špičkové FT-IR technologie, která ve spojení s unikátním přístupem k nanášení vzorků na hydrofilní membránky tvoří systém Direct Detect™, který změní Váš pohled na kvantifikaci biomakromolekul **jednou pro vždy!**



Dovolujeme si Vás pozvat do našeho stánku A2 a na odbornou přednášku v rámci doprovodného programu veletrhu „Sbohem, paní Bradfordová... aneb IČ spektroskopie ve službách kvantifikace proteinů a peptidů.“

Merck Millipore je divize společnosti

www.merckmillipore.cz, www.merckmillipore.sk

METTINUM – SYSTÉM PRO DLOUHODOBOU ARCHIVACI VZORKŮ DNA A DALŠÍCH BIOMETRICKÝCH ZNAKŮ

KUKLA P.¹, VANĚK D.^{2,3}, DUBSKÁ J.³

1 Mettinum s.r.o., email@kukla.cz

2 Ústav soudního lékařství, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze

3 Forenzní DNA servis, s.r.o.

Cílem článku je popsat technické řešení archivace vzorků deoxyribonukleové kyseliny (dále jen DNA) a popřípadě i dalších biometrických znaků, jež mohou být použity pro budoucí identifikaci či analýzu. Technické řešení se týká způsobu archivace DNA vzorků a zařízení k jeho provádění, které zajišťuje archivaci DNA vzorků různého původu, jako jsou DNA vzorky humánní, veterinární, rostlinné či mikroorganismů společně s datovými nosiči obsahujícími informace o uloženém vzorku.

Úvod

Vzorky nukleové kyseliny, jež jsou zpracovávány v molekulárně-biologických výzkumných, servisních či znaleckých laboratořích, musí být z důvodu následných experimentů či na základě požadavků ze stran nejrůznějších institucí, jako jsou zdravotnická zařízení, armáda, policie, soudní znalci a znalecké ústavy z oboru Zdravotnictví a Kriminalistika apod. dočasně či dlouhodobě uchovávány. V současnosti se k dlouhodobé archivaci DNA nejčastěji používají tři základní způsoby:

- zamrazení vzorku [1],
- archivace na FTA kartu [2],
- anhydrobiotická stabilizace vzorku pro uložení v normální teplotě [3].

Zamrazení vzorku:

Klasická metoda dlouhodobé archivace DNA na dobu mnoha měsíců či let, je založena na technologii zamrazení vzorku pomocí mrazicích boxů při teplotách $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo kapalného dusíku při teplotách $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při dlouhodobém uložení vzorků DNA při vyšších teplotách (většinou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) může docházet i k hydrolyze, čímž dochází k nevratné degradaci archivovaného materiálu. Nedostatky tohoto řešení spočívají v tom, že se jedná o metodu finančně i technologicky náročnou a zcela závislou na spolehlivosti technického vybavení, neboť dojde-li k výpadku elektrické energie či poruše chladicího zařízení, dochází k nevratnému zničení takto uložených vzorků. Informace o uloženém vzorku se vzhledem k extrémním teplotám omezují pouze na jednoduché kódové označení nosiče vzorku.

Archivace na FTA kartu:

FTA karty, jež byly patentovány společností Fitzco, Inc., USA v roce 1993, se používají k transportu vzorku tekutého biologického materiálu z místa odběru do laboratoře a dále jako archivační médium pro dlouhodobé uskladnění vzorků tělních tekutin při pokojové teplotě. Nevýhodou této metody je, že ne vždy bezpečně garantuje dostatečné množství použitelné DNA (zejména při zajišťování vzorků slin) a vzorky takto dlouhodobě uložené jsou náchylné na destrukci vlivem vnějšího prostředí, jako je vlhkost, kontaminace cizorodou DNA apod. Další nevýhodou je rozsah informací o uloženém vzorku, který se většinou omezuje na popis vzorku na jednoduchém papírovém formuláři. Asi největším omezením je to, že k archivaci vzorků biologického materiálu je nutné použít primární vzorek tělní tekutiny (krev, sliny), protože v případě aplikace izolované DNA na FTA kartu je nutné aplikovat vzorek s vysokou koncentrací DNA.

Archivace anhydrobioticky stabilizované DNA v plastových mikrozkuvkách:

S ohledem na nevýhody uložení vzorků zamrazením nebo na FTA kartu bylo v posledních letech vyvinuto a testováno několik postupů a produktů pro dlouhodobou archivaci vzorků nukleových kyselin

při laboratorní teplotě [4]. Kromě komerčně dostupných produktů (firmy GenVault, Biomatrica, Qiagen) je možné k archivaci vzorků DNA použít i trehalózu nebo polyvinyl alkohol (PVA) [5]. Stabilizované vzorky je možné skladovat při laboratorní teplotě po neomezeně dlouhou dobu. Identifikace vzorků je nejčastěji prováděna ve formě 1D nebo 2D čárového kódu, ten je ale omezen velikostí zkušavky a proto je limitováno množství informace, jež lze ke vzorku přiřadit.

Popis nového technického řešení

Nové technické řešení METTINUM (obr. 1) pro dlouhodobou archivaci vzorků DNA využívá anhydrobioticky stabilizovanou DNA, jež umožňuje časově neomezenou archivaci DNA vzorků při běžné pokojové teplotě. Ke zpracování a archivaci DNA jsou použity standardní biochemické postupy a běžně dostupné materiály a chemikálie a je garantováno dostatečné množství a kvalita archivované DNA pro následné analýzy, a to při splnění podmínky dlouhodobé ochrany před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí. Nové technické řešení spočívá v tom, že vzorek může být identifikován DNA profilem (či jiným výsledkem analýzy), získaným v rámci přípravy vzorku k archivaci a je umožněno snadné a rychlé následné zpracování vzorku bez nutnosti použití zvláštních chemikálií ve formě uložení READY-2B-TESTED. Pro dosažení maximální univerzálnosti a zároveň bezproblémové obnovy datových nosičů je systém pro dlouhodobou archivaci vzorků DNA koncipován modulárně (obr. 2–4).

Obr. 1 – DNA modul. Stabilizovaná DNA je vložena mezi 2 vypouklá skla, jež jsou následně vložena do hermeticky uzavřeného ochranného plastového pouzdra



Mezi další pozitivní vlastnosti patří malé rozměry archivačního média, jež umožňují tvorbu rozsáhlých archivů. Mechanická konstrukce archivačního média pak umožňuje automatizovanou obsluhu robotickými mechanismy (obr. 5), přičemž v nouzovém stavu je možno archivovanou DNA zpracovávat manuálně a data uložená na nosičích získat bez použití nákladných zařízení. Systém METTINUM je dále propojitelný s elektronickou datovou sítí a umožňuje v rámci technického vývoje obměnu datových nosičů bez porušení nosiče DNA vzorku.

V rámci zátěžových testů byla v simulovaných laboratorních podmínkách ověřena inertnost archivované DNA vůči chloroformu, jež je používán pro lepení pouzdra. Dále byla testována odolnost

ochranného pouzdra a uložení DNA při extrémních změnách teplot. Ochranné pouzdro bylo po vložení nosiče se standardní DNA spojeno chloroformem a vystavováno střídajícím se teplotám (2h laboratorní teplota, 72 h -26°C , 48 h $+65^{\circ}\text{C}$, 48 h -26°C , 72 h $+65^{\circ}\text{C}$). Po této proceduře zůstalo ochranné pouzdro neporušeno a po jeho opětovném otevření bylo zjištěno, že kvalita a kvantita stabilizované DNA nebyla nijak negativně ovlivněna.

Obr. 2 – Datový modul. Obsahuje RFID čip a optický modul s mikrofilmem. Na mikrofilmu je možné uložit další biometrické informace, jako je DNA profil vzorku, fotografie obličeje a duhovek, otisky prstů nebo rentgen čelistí. Datové nosiče jsou opět hermeticky uzavřeny v plastovém pouzdře.



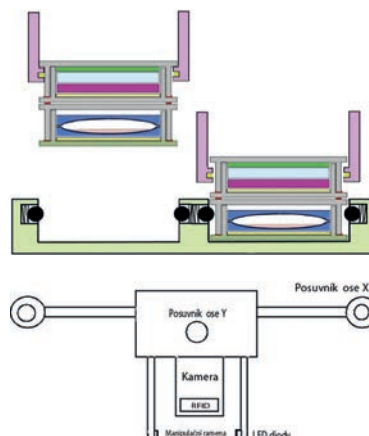
Obr. 3 – Nativní modul. Součástí archivačního média může být i modul obsahující semena či části vysušených rostlin.



Obr. 4 – Modulární koncepce. Kombinace jednotlivých modulů pro různé oblasti využití.



Obr. 5 – Návrh robotického systému pro automatizovanou obsluhu. Lokalizace vzorku je umožněna dle souřadnic, které jsou zaznamenány v elektronické paměti řídicího počítače.



Součástí robotického mechanismu je čtečka RFID čipů, skenovací mikrokamera a světelný zdroj světla tvořený například LED diodami. Čtečka RFID čipů umožňuje načtení základních informací o vzorku, jako je identifikace a DNA profil vzorku. Skenovací mikrokamera umožňuje grafické naskenování informací uložených na mikrofilmu. Světelný zdroj podsvěcuje po obvodu archivační médium tak, aby bylo umožněno naskenování uloženého mikrofilmu. Dvojice úchopných ramen zajišťuje vložení a výběr archivačního média ze zásobníku DNA vzorků a jeho předání k dalšímu zpracování v laboratoři.

Závěr

Nová technologie archivace DNA a dalších biometrických znaků umožňuje časově neomezenou stabilizaci vzorku při pokojové teplotě, bezproblémové zpětné zpracování v jakékoli DNA laboratoři, nezávislost archivace na energetických zdrojích a technickém vybavení, bezdotykovou identifikaci vzorku a možnost tvorby velkých archivů s možností sdílení v elektronické podobě. Modulární koncepce archivačního systému (DNA modul, datový modul), jednak garantuje variabilitu použití systému a zároveň umožňuje obměnu datových nosičů bez porušení základního DNA modulu s nosičem DNA (DNA, DNA-DATA).

Upozornění: Popsané technické řešení je registrováno na Úřadu průmyslového vlastnictví.

Literatura

- [1] Madisen L, Hoar DI, Holroyd CD, Crisp M, Hodes ME. (1987) DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med Genet.* Jun;27 (2):379-90.
- [2] Vanek D., Hradil R., Budowle B. (2001) Czech Population Data on Ten Short Tandem Repeat Loci of SGM Plus STR System Kit Using DNA Purification by FTA™ Cards. *Forensic. Sci. Int.* 119(1):107-8
- [3] Fripiat, et al., (2010) Evaluation of novel forensic DNA storage methodologies, *Forensic Sci. Int. Genet.* Nov;5(5):386-92
- [4] Wan E., Akana M., Pons J., Chen J., Musone St. Et al.(2010) Green Technologies for Room Temperature Nucleic Acid Storage. *Curr. Issues Mol. Biol.* 12: 135-142
- [5] Ivanova NV, Kuzmina ML. (2013) Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature. *Mol Ecol Resour.* Sep;13(5):890-8

Abstract

METTINUM – SOLUTION FOR LONG-TERM STORAGE OF DNA SAMPLES AND OTHER BIOMETRIC DATA

Summary: The aim of this article is to describe a novel technical solution of long-term storage of DNA samples in room temperature.

Key words: DNA, banking, stabilization, biometrics, anhydrobiosis