

VREDNOTENJE RAZLIČNIH METOD EKSTRAKCIJE NUKLEINSKIH KISLIN IZ HUMANE CELIČNE 3D KULTURE RAKA

Stefanija Ivanova ¹, Alexandra Bogožalec Košir ², Metka Novak ³, Barbara Breznik ³, Mojca Milavec ²

¹ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

³ Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: mojca.milavec@nib.si

Izvilleček

Ustrezna izolacija DNA je bistvena za molekularne raziskave in diagnostiko, saj količina in kakovost DNA vplivata na postopke analize, kot sta sekvenciranje in PCR, ter na zanesljivost rezultatov. Ocenili smo učinkovitost štirih komercialnih metod ekstrakcije DNA iz 3D celičnih kultur glioblastoma. Količino izolirane DNA smo merili spektrofotometrično, fluorimetrično in z metodo avtomatske elektroforeze. Rezultati kažejo, da so med metodami ekstrakcije lahko večkratne razlike v učinkovitosti in da je pomembna tudi izbira metode za merjenje količine DNA. Delo je potekalo v okviru mednarodnega projekta GenomeMET, katerega namen je razviti meroslovno podporo za genomsko profiliranje in tako podpreti zgodnje odkrivanje raka ter precizno medicino.

Uvod

Glioblastom je najpogostejši primarni maligni tumor možganov pri odraslih in predstavlja približno 49 % vseh malignih možganskih tumorjev. Kljub napredku v zdravljenju je mediana preživetja bolnikov z glioblastomom še vedno nizka, kar poudarja potrebo po poglobljenem razumevanju patofiziologije in iskanju novih terapevtskih tarč.^{1,2} V raziskavah raka se kot modeli za preučevanje molekularnih mehanizmov pogosto uporabljajo celične kulture. Dvodimenzionalne (2D) celične kulture so že dolgo uveljavljene kot modeli *in vitro*, vendar ne posnemajo tridimenzionalnega (3D) okolja tumorjev. 3D celične kulture, kot so sferoidi in organoidi, ponujajo bolj realistično predstavitev celičnih interakcij in mikrookolja, kar je ključno za razumevanje celičnega vedenja in odziva na zdravljenje.^{3,4}

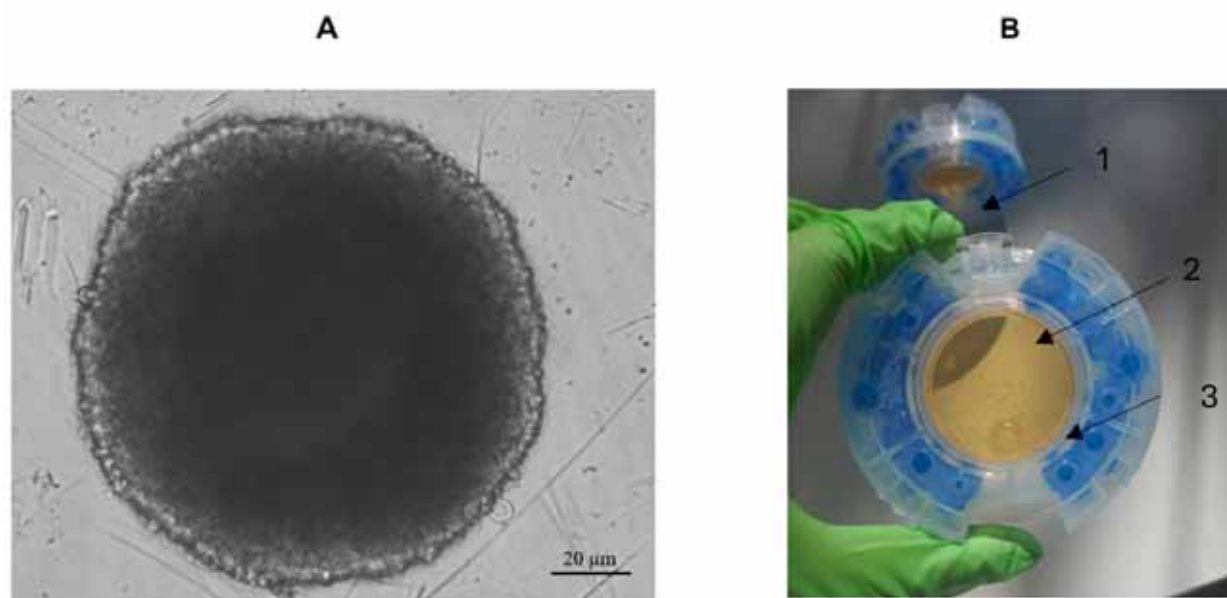
Tako za proučevanje molekularnih mehanizmov kot za molekularno diagnostiko je izolacija DNA iz vzorcev eden ključnih korakov v analizi, saj količina in kakovost DNA neposredno vplivata na nadaljnje korake kot sta sekvenciranje ali PCR in na zanesljivost končnih rezultatov. Zadostna količina DNA ustrezne kakovosti je še posebej pomembna v diagnostiki raka, kjer je potrebno zaznati izjemno majhne količine tumorske DNA, ki kroži v krvi (cirkulirajoča tumorska DNA ali ctDNA). Če je izolacija neustrezna, lahko te redke označevalce spregledamo, kar vodi do napačne diagnoze ali nepravilne ocene učinkovitosti zdravljenja. Kljub temu se pomembnost kakovostne ekstrakcije DNA še vedno premalo upošteva tako diagnostiki kot v raziskavah.

V okviru mednarodnega projekta *Metrology for genomic profiling to support early cancer detection and precision medicine*, na kratko GenomeMET⁵, razvijamo meroslovno podporo za genomsko profiliranje. Med drugim razvijamo potencialni referenčni merilni postopek za določanje količine in kvalitete DNA izolirane iz tkiva tumorja ali tekočinske biopsije. V postopku vrednotenja je metoda na osnovi digitalnega PCR (dPCR), s katero lahko sočasno določamo število kopij petih humanih referenčnih genov v vzorcu in s tem zelo natančno določimo količino oziroma koncentracijo DNA. S to metodo bomo lahko bolje ocenili zanesljivost drugih metod, ki se uporabljajo za merjenje celokupne DNA kot so fluorimetrične in spektrofotometrične metode in metode avtomatizirane elektroforeze. Za ta namen smo pripravili večje količine celičnih 3D kultur, iz katerih smo DNA izolirali s štirimi različnimi ekstrakcijami in količino izolirane DNA izmerili s tremi različnimi pristopi.

Metode

Priprava 3D sferoidov glioblastomske celične linije

3D sferoide smo pripravili s pomočjo sistema Celvivo. Za pripravo enega sferoida smo potrebovali 3×10^4 celic (primarna celična linija NIB140, pridobljena iz biopsije bolnika) v 100 μ L. Pripravili smo 480 sferoidov v 5 mikrotiterskih ploščah s 96 vdolbinicami v obliki črke U. Po 3 dneh inkubacije na ploščah smo sferoide (Slika 1A) prenesli v ClinoReactor (Slika 1B). Po sedmih dneh smo po 10 sferoidov prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko, ki ne veže DNA, jim odstranili medij in jih na hitro zmrznili. Tako pripravljene sferoide smo shranili na -80°C .



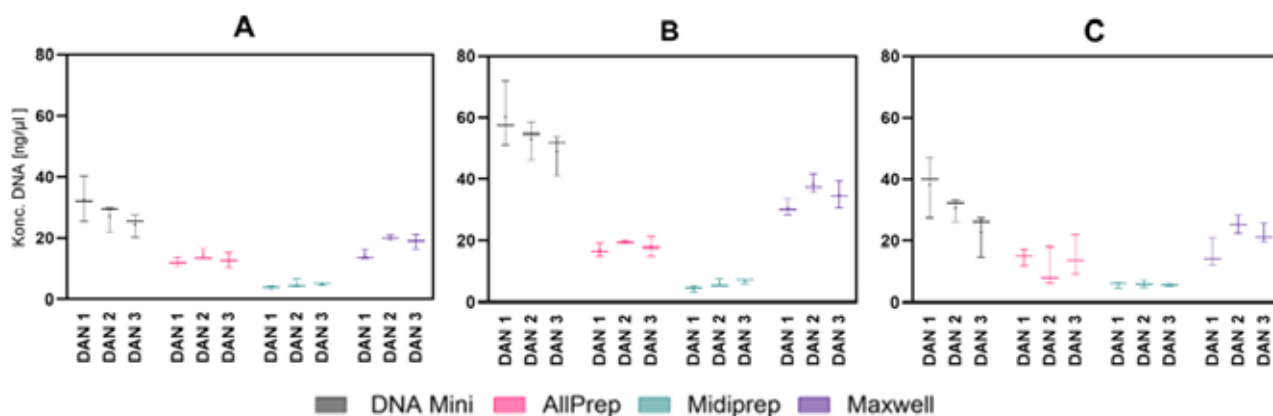
Slika 1: Priprava celičnih 3D kultur glioblastoma. A - Sferoid celične linije NIB140 pasaže 58 po 3 dneh inkubacije. Slika je bila posneta pri 100 $\times$ povečavi. Merilo slike: 20 μ m. B - ClinoReactor. (1 - čep komore za celične kulture, 2 - komora za celične kulture (10 ml), 3- podporna komora z vlažilnimi kroglicami).

Primerjava metod izolacije DNA iz celičnih 3D kultur

Iz celičnih 3D kultur glioblastoma smo DNA izolirali s štirimi komercialno dostopnimi kompleti za ekstrakcijo DNA. Uporabili smo komplete QIAamp DNA Mini (QIAGEN), (v nadaljevanju: DNA mini); AllPrep DNA/RNA Mini (QIAGEN) (v nadaljevanju: AllPrep); Quick –DNA MidiPrep Plus (ZYMO Research) (v nadaljevanju: Midiprep) in Maxwell[®] RSC Whole Blood DNA (Promega) (v nadaljevanju: Maxwell). Vsako od štirih ekstrakcijskih metod smo izvedli v treh različnih dnevih, vsak dan v treh tehničnih ponovitvah (skupno 9 ponovitev). Za določanje količine izolirane DNA smo uporabili tri komplementarne metode: fluorometrično metodo (Qubit, Thermo Fisher Scientific), spektrofotometrično metodo (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) ter avtomatizirano elektroforezo (TapeStation, Agilent).

Rezultati

Rezultati kažejo, da so med metodami ekstrakcije lahko večkratne razlike v učinkovitosti. Z metodo DNA mini smo iz celičnih 3D kultur izolirali vsaj petkrat več DNA kot z metodo Midiprep. Poleg tega na Sliki 2 vidimo, da so pri posamezni ekstrakciji lahko skoraj dvakratne razlike tako med tehničnimi ponovitvami kot med različnimi dnevi. Pri metodi Maxwell je bila pri meritvah z avtomatsko elektroforezo (Slika 2C) na dan 1 najnižja izmerjena koncentracija 12 ng/ μ L, najvišja pa 21 ng/ μ L, povprečna koncentracija DNA na dan 1 je bila 15,7 ng/ μ L, najvišja pa 25,3 ng/ μ L na dan 2.



Slika 2: Primerjava metod izolacije DNA iz celičnih 3D kultur NIB140 pri različnih dnevih. *A*- Metoda kvantifikacije: fluorimetrične meritve (Qubit), *B*- spektrofotometrične meritve (NanoDrop), *C*- meritve z avtomatsko elektroforezo (TapeStation). Posamezne metode izolacije so barvno označene: sivo (DNA Mini), roza (AllPrep), cian (Midiprep) in vijolično (Maxwell). Ekstrakcijske metode smo izvedli v 3 različnih dnevih in v 3 tehničnih ponovitvah (skupno 9 ponovitev). Grafičen prikaz je bil narejen v programu GraphPad Prism 10.4.1.

Rezultati kažejo tudi, da je pomembna tudi izbira metode za merjenje količino DNA. V naši raziskavi smo s spektrofotometričnimi meritvami pri vseh metodah izolacije z izjemo Midiprep izmerili do dvakrat višje količine DNA kot s fluorimetričnimi meritvami in z meritvami s sistemom za avtomatsko elektroforezo (Tabela 1).

Tabela 1: Povprečna koncentracija DNA in koeficient variabilnosti (CV) različnih metod ekstrakcije DNA iz 3D celičnih linij izmerjenih s fluorimetričnimi meritvami (Qubit), spektrofotometričnimi meritvami (NanoDrop) in meritvami s sistemom za avtomatsko elektroforezo (TapeStation). Povprečna vrednost je izračunana za 9 izolacij (3 tehnične ponovitve v treh dneh).

Metoda izolacije	QUBIT		NANODROP		TAPESTATION	
	DNA (ng/μl)	CV (%)	DNA (ng/μl)	CV (%)	DNA (ng/μl)	CV (%)
DNA Mini	28,1	21,2	54,0	16,1	30,5	30,0
AllPrep	13,1	15,8	18,1	12,4	13,5	38,3
Midiprep	4,7	22,2	5,8	25,7	5,9	15,0
Maxwell	17,8	16,4	34,6	13,0	20,6	26,4

Nenazadnje je pomembna tudi kombinacija metode za izolacijo in metode za merjenje koncentracije DNA. Pri meritvah koncentracije DNA izolirane z metodo AllPrep smo največjo variabilnost opazili pri metodi za avtomatsko elektroforezo (CV = 38,3 %), najmanjšo pa pri spektrofotometričnih meritvah (CV = 12,4 %).

Na podlagi rezultatov naše raziskave, lahko trdimo, da se je komplet DNA Mini izkazal kot najučinkovitejša metoda za izolacijo DNA iz 3D celičnih kultur. Potrdili smo tudi, da so med uporabljenimi metodami za določanje koncentracije lahko velike razlike.^{6,7} Naša raziskava je pokazala, da je preverjanje učinkovitosti ekstrakcijskih metod ključnega pomena za zagotavljanje zanesljivih rezultatov analiz DNA. Izolirano DNA bomo analizirali še z metodo dPCR za sočasno določanje

števila kopij petih humanih referenčnih genov, kjer pričakujemo bolj natančne podatke o učinkovitosti in ponovljivosti metod za izolacijo DNA in dodatne podatke o zanesljivosti metod za merjenje celokupne DNA.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru projekta GenomeMET, ki je prejel finančna sredstva iz Evropskega partnerstva za meroslovje, ki ga sofinancirajo program Evropske unije za raziskave in inovacije Obzorje Evropa ter sodelujoče države.

Literatura

1. Upadhyay A. Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. *Genes Dis.* 2020,8(5), 655-661.
2. Gilard V, et al. Diagnosis and Management of Glioblastoma: A Comprehensive Perspective. *Journal of Personalized Medicine.* 2021, 11(4), 258.
3. Kim JB: Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2005, 15(5), 365-377.
4. Mehta G, et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release.* 2012, 164(2), 192-204.
5. <https://www.genomemet.org/>
6. Willis A, et al. Quantity, integrity & purity: A comparative study of different genomic DNA assessment methods. *Human Immunology.* 2018, 79:133-134.
7. Masago K, et al. Comparison between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests. *Medicina (Kaunas).* 2021, 57(12):1375.

