

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza RNA a DNA pomocí hmotnostní spektrometrie

Autor: Miroslav Kubát

Vedoucí práce: Mgr. Rudolf Kupčík

Konzultant: Mgr. Denisa Smělá

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Miroslav Kubát**
Osobní číslo: **C16253**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Analýza RNA a DNA pomocí hmotnostní spektrometrie**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Struktura a význam nukleových kyselin; DNA a RNA v eukaryotní a prokaryotní buňce - typy, struktura, funkce.
2. Nekódující molekuly RNA - funkce a možnosti analýzy; oligoDNA - využití a jejich analýza; štěpení delších úseků nukleových kyselin za účelem jejich analýzy.
3. Separční techniky využívané pro analýzu nukleových kyselin pomocí hmotnostní spektrometrie.
4. Hmotnostní spektrometrie - zaměřit se na techniky využitelné pro analýzu nukleových kyselin a popsat metody analýzy nukleových kyselin pomocí hmotnostní spektrometrie.
5. Použít relevantní zdroje (především vědecké články), průběžně sledovat novinky v oboru.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Rudolf Kupčík**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Denisa Smělá**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

PROHLAŠUJI:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 7. 2019

.....

Miroslav Kubát

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu práce Mgr. Rudolfu Kupčíkovi za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady, ochotu, trpělivost, a především za všechno věnovaný čas týkající se tvorby této práce. Poděkování patří také konzultantce práce Mgr. Denise Smělé.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je věnována analýze nukleových kyselin pomocí hmotnostní spektrometrie. V první části je popsána struktura a význam DNA a RNA, také je poukázáno na jejich strukturní a funkční rozdíly. Další část popisuje běžně používané metody izolace nukleových kyselin. Také jsou představeny separační metody nukleových kyselin a možnosti spojení s hmotnostní spektrometrií. Hlavní část je zaměřena na teoretický úvod k hmotnostní spektrometrii, ionizační techniky používané při analýze nukleových kyselin, hmotnostní analyzátoři a jejich možná uspořádání a možnosti detekce. Popsány jsou také konkrétní metody analýz DNA a RNA pomocí hmotnostní spektrometrie.

KLÍČOVÁ SLOVA

nukleové kyseliny, nukleotid, DNA, RNA, separace, ionizace, analýza, hmotnostní spektrometrie

TITLE

RNA and DNA analysis by mass spectrometry

ANNOTATION

This bachelor thesis is dedicated to the analysis of nucleic acids using mass spectrometry. In the first part is described structure and significance of DNA and RNA, there are also pointed out their structural and functional distinctions. Next part describes commonly used methods of nucleic acids isolation. Either there are introduced separation methods of nucleic acids and possible connections with mass spectrometry. Main part is focussed on theoretic introduction to mass spectrometry, ionization techniques used to analysis of nucleic acids, mass analysers and their possible setups and detection options. Particular methods of DNA and RNA analysis using mass spectrometry are also described.

KEY WORDS

nucleic acids, nucleotide, DNA, RNA, separation, ionization, analysis, mass spectrometry

OBSAH

ÚVOD.....	12
1. NUKLEOVÉ KYSELINY	13
1.1. Struktura nukleových kyselin.....	13
1.2. Význam DNA.....	16
1.3. Struktura a funkce RNA.....	17
1.4. Typy RNA.....	18
1.5. Štěpení nukleových kyselin za účelem analýzy	19
1.5.1. Příklady využívaných nukleáz	19
2. IZOLACE A SEPARACE NUKLEOVÝCH KYSELIN ZA ÚČELEM JEJICH ANALÝZY	20
2.1. Metody izolace nukleových kyselin.....	20
2.2. Fenol-chloroformová extrakce	20
2.3. Extrakce nukleových kyselin na pevné fázi	21
2.3.1. Silikátové matrice	22
2.3.2. Magnetické částice.....	23
2.4. Separace nukleových kyselin pomocí elektroforézy	23
2.4.1. Kapilární elektroforéza	24
2.4.2. Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií.....	25
2.5. Separace nukleových kyselin pomocí kapalinové chromatografie	25
2.5.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	25
2.5.2. Metody kapalinové chromatografie	26
2.5.3. Separační metody využívané ve spojení s hmotnostní spektrometrií	26
2.5.4. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií	27
2.5.5. Separační metody nukleových kyselin pomocí kapalinové chromatografie	28
3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	30
3.1. Úvod k hmotnostní spektrometrii.....	30
3.2. Iontové zdroje.....	31
3.2.1. Ionizace elektrosprejem	31
3.2.2. Desorpční ionizace laserem za asistence matrice	33
3.2.3. Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	35
3.3. Hmotnostní analyzátory	35
3.3.1. Kvadrupólový hmotnostní analyzátor.....	36
3.3.2. Průletový analyzátor	37

3.3.3.	Iontové pasti.....	38
3.3.4.	Orbitrap.....	38
3.3.5.	Tandemové uspořádání	38
3.4.	Detektory.....	39
3.5.	Metody analýzy nukleových kyselin pomocí hmotnostní spektrometrie.....	40
3.5.1.	Hmotnostní spektrometrie oligonukleotidů s ionizací elektrosprejem	40
3.5.2.	Hmotnostní spektrometrie oligonukleotidů s desorpční laserovou ionizací za účasti matrice	42
3.5.3.	Analýza DNA a RNA pomocí MALDI-TOF-MS	43
3.5.4.	Sekvenování oligoRNA pomocí kyselého hydrolyzy a MALDI-TOF-MS.....	44
4.	ZÁVĚR.....	45
5.	ZDROJE	46

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1 Základní stavební složky nukleotidu	13
Obr. 2 Dusíkaté báze.....	14
Obr. 3 Komplementarita bází.....	14
Obr. 4 Primární struktura DNA a RNA	15
Obr. 5 Sekundární struktura DNA	15
Obr. 6 Sekundární struktura tRNA	17
Obr. 7 Ionizace elektrosprejem	32
Obr. 8 Desorpční ionizace laserem za účasti matrice	34
Obr. 9 Kvadrupólový analyzátor	36
Obr. 10 Průletový analyzátor	37
Obr. 11 Detektory	40

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

ssDNA – DNA tvořena jedním řetězcem (single strand)

dsDNA – DNA tvořená dvěma řetězci (double strand)

oligoDNA – oligodeoxyribonukleová kyselina

oligoRNA – oligoribonukleová kyselina

ncRNA – nekódující RNA

lncRNA – dlouhá nekódující RNA

mRNA – messenger/mediátorová RNA

tRNA – transferová RNA

snRNA – malá jaderná RNA

siRNA – malá interferující RNA

miRNA – mikro RNA

pH – záporný logaritmus aktivity vodíkových iontů

SDS – dodecylsírán sodný

EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina

TE – Tris/EDTA (pufr)

CE – kapilární elektroforéza

CZE – kapilární zónová elektroforéza

LC – kapalinová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UHPLC – ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie

RPLC – kapalinová chromatografie na reverzní fázi

HILIC – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

IP-RPLC – iontově-párová RPLC

HFIP – hexafluoro-2-propanol

MS – hmotnostní spektrometrie

m/z – poměr molekulové hmotnosti k jednotkovému náboji

MS/MS; MSⁿ – tandemová hmotnostní spektrometrie

ESI – ionizace elektrosprejem

MALDI – desorpční ionizace laserem za účasti matrice

3-HPA – 3-hydroxypikolinová kyselina

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

TOF – průletový hmotnostní analyzátor

QqQ – trojitý kvadrupól

FT-ICR – iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

FTO – s obezitou asociovaný protein

SNPs – jedno-nukleotidové polymorfismy

RHD – gen kódující RhD antigen

SRY – gen určující pohlaví na chromozomu Y

PCR – polymerázová řetězová reakce

ÚVOD

Existence nukleových kyselin byla objevena již v devatenáctém století a s postupným rozvojem molekulární biologie ve dvacátém století bylo také poukázáno na jejich hluboký biologický význam, který vyústil v rozvoj analyzačních metod. V dnešní době jsou již nukleové kyseliny rutinně analyzovány ve všech molekulárně biologických laboratořích. Nukleové kyseliny je možné stanovit mnoha metodami, z nichž nejznámější je dnes zřejmě polymerázová řetězová reakce (PCR). Nicméně požadavky na přesnost, selektivitu, specifitu, rychlost a celkovou účinnost analýz nukleových kyselin jsou stále zvyšovány, proto se do popředí dostávají alternativní metody využívající hmotnostní spektrometrie, které těmto požadavkům vyhovují.

Hmotnostní spektrometrie poskytuje velmi přesný a selektivní způsob detekce specifických molekul založený na separaci iontů analytu podle poměru molekulové hmotnosti a náboje. Využívá se v analýze jak anorganických, tak organických látek či biomolekul. Nicméně kvalitní analýzu nukleových kyselin umožnil až vývoj šetrných ionizačních technik.

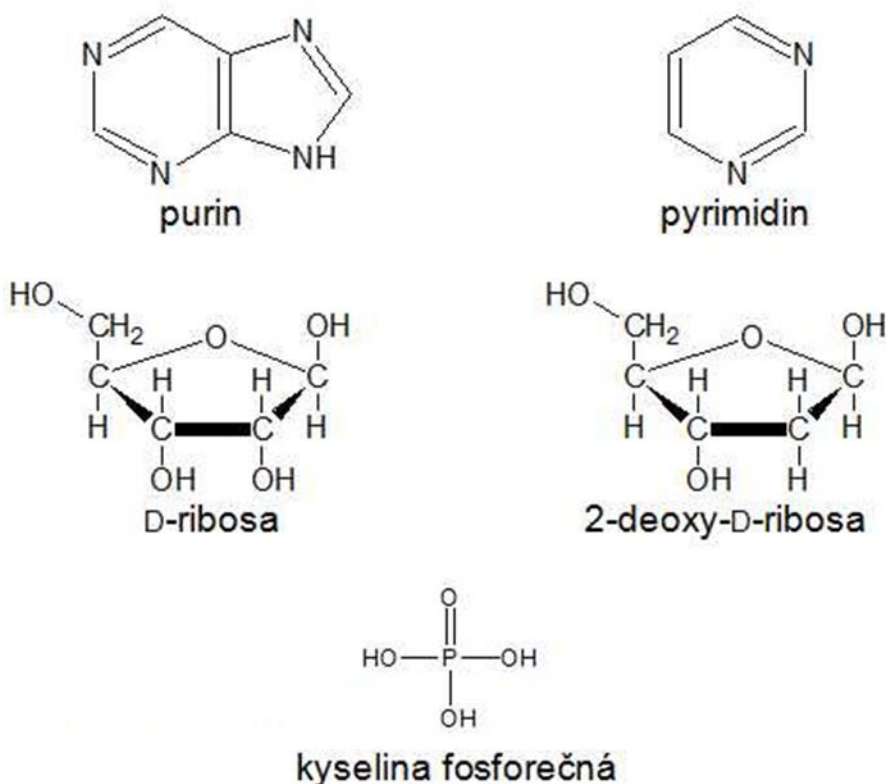
Před jakoukoliv analýzou či procesem je však vhodné nukleové kyseliny nejprve izolovat a purifikovat. Následně mohou být podle potřeby hydrolyzovány na kratší úseky či separovány. Spojením hmotnostní spektrometrie se specifickými separačními metodami elektroforézy či kapalinové chromatografie se dá dosáhnout velmi vysoké účinnosti analýz, umožňujících ještě hlubší náhled do struktury nukleových kyselin.

1. NUKLEOVÉ KYSELINY

Jsou makromolekulární látky tvořené polynukleotidovými řetězci, patří mezi biopolymery a spolu s proteiny představují základní složky všech živých soustav, tedy všech buněk i virů. Jsou lokalizovány v jádrech ale i mimo jádro, jedná se o DNA a RNA, které slouží k uchování, přenosu a expresi genetické informace (Rosypal 2006).

1.1. Struktura nukleových kyselin

Základní stavební jednotkou je nukleotid, který je vždy tvořen dusíkatou heterocyklickou bází, pětiuhlíkatou cukernou složkou (pentosou) a zbytkem kyseliny fosforečné. Dusíkatými bázemi jsou puriny (adenin, guanin) a pyrimidiny (cytosin, thymin, uracyl). Cukernou složkou je buď 2-deoxy- β -D-ribosa v případě kyseliny deoxyribonukleové (DNA) a β -D-ribosa v případě ribonukleové kyseliny (RNA) (Štípek 1997, Rosypal 2006).



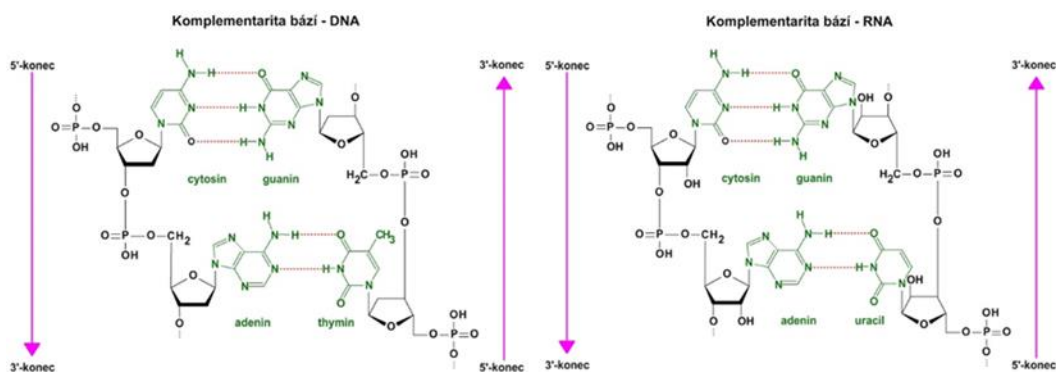
Obr. 1 Základní stavební složky nukleotidu
Přejato a upraveno z: (Studium biochemie 2013)



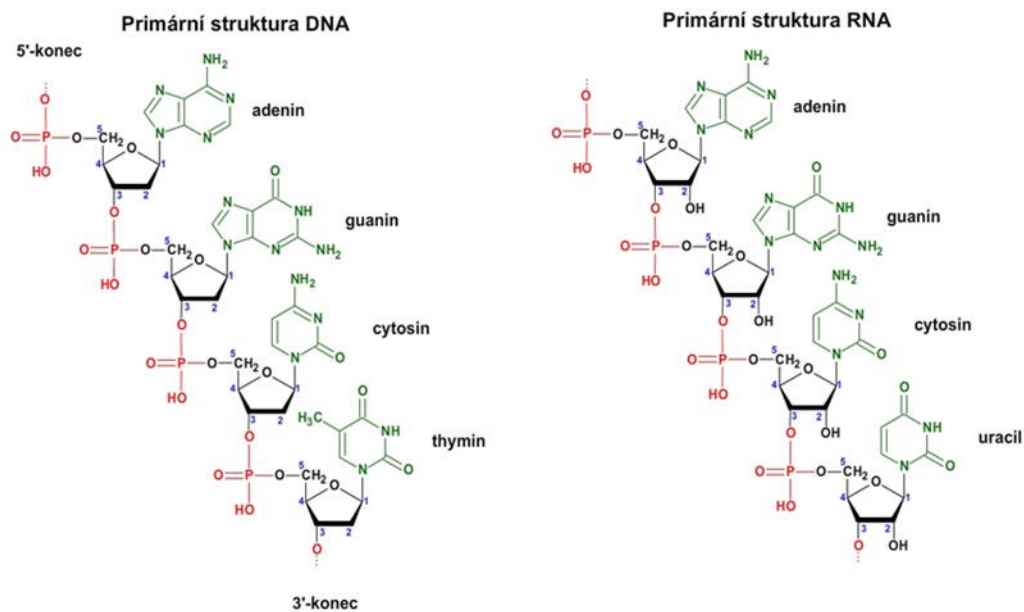
Obr. 2 Dusíkaté báze
Přejato a upraveno z: (Studium biochemie 2013)

Spojením nukleové báze a sacharidu pomocí N-glykosidové vazby vzniká nukleosid. Nukleosidy mohou na základě rotace kolem N-glykosidové vazby existovat ve dvou konformacích – syn a anti (v přírodě převažují). Dále spojením nukleosidu a kyseliny fosforečné vzniká kompletní nukleotid. Označíme-li pentosový uhlík s N-glykosidickou vazbou číslem 1, pak na uhlíku číslo 5 je napojen zbytek kyseliny fosforečné fosfoesterovou vazbou a na uhlíku číslo 3 se tento nukleotid spojuje s dalším nukleotidem fosfodiesterovou vazbou (Bansal 2003).

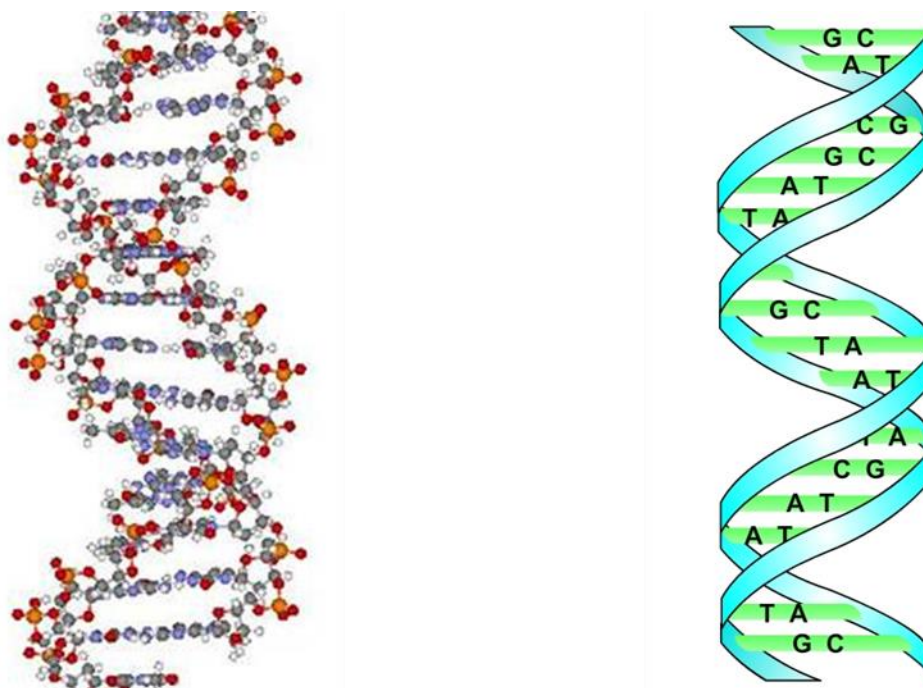
Spojené nukleotidy vytváří polynukleotidové vlákno, přičemž pořadí nukleotidů určuje primární strukturu a zároveň genetickou informaci. Dvě polynukleotidová vlákna vytváří nejčastěji pravotočivou dvoušroubovici (sekundární struktura), přičemž jsou vlákna uspořádána antiparalelně, což znamená, že polarita jednoho řetězce je opačná k polaritě druhého řetězce. Tímto jsou dané odlišně polarizované konce molekuly DNA – 3' konec (OH skupina pentosy) a 5' konec (zbytek kyseliny fosforečné). Mezi vlákny dvoušroubovice dochází ke slabým vazebným interakcím, jimiž jsou vodíkové můstky, které jsou asi 20 - 30x slabší než kovalentní vazba. Vždy je spojena purinová a pyrimidinová báze. Adenin je komplementární ke thyminu a jsou spojeny dvěma vodíkovými můstky. Cytosin je komplementární ke guaninu a jsou spojeny třemi vodíkovými můstky. V RNA je však oproti DNA thymin nahrazen uracilem (Bansal 2003; Rosypal 2006).



Obr. 3 Komplementarita bází
Přejato a upraveno z: (Studium biochemie 2013)



Obr. 4 Primární struktura DNA a RNA
Přejato a upraveno z: (Studium biochemie 2013)



Obr. 5 Sekundární struktura DNA
Přejato a upraveno z: (Studium biochemie 2013)

Nejčastějším typem DNA je tzv. B-forma, která je pravotočivá, má zhruba 10 bází na závit, báze tvoří pár vždy v jedné rovině a na povrchu dvoušroubovice se nachází dva typy žlábků (malý a velký). Dalším typem je A-forma, která je také pravotočivá a má 11 párů bází na závit. Posledním biologicky významným typem je Z-forma, která je však levotočivá, vytváří se, pokud se ve šroubovici objeví pravidelné opakování bází adeninu a thyminu. Přechody mezi jednotlivými formami jsou závislé na iontové síle prostředí a také vlhkosti (Bansal 2003, Rosypal 2006).

Za zmínku stojí i vyšší úrovně struktur, kdy se dvoušroubovice dále vine a vytváří tzv. nadšroubovicové vinutí (supercoiling), tedy dodatečné šroubovicové vinutí již existující dvoušroubovice, což například usnadňuje kondenzaci DNA (Bansal 2003).

1.2. Význam DNA

DNA je nositelkou genetické informace všech živých organismů a mnoha virů. Některé viry jsou však schopné uchovávat svůj genetický materiál v podobě RNA, avšak RNA nepodléhá opravným mechanismům, a proto rychle mutují. Schopnost ukládat a přenášet genetickou informaci je jednou ze základních vlastností života. Bez DNA vydrží buňky jen omezenou dobu, například erythrocyty se při svém zrání zbavují jadra. Poté již nejsou schopny proteosyntézy, proto se erythrocyty po čase opotřebí a jsou z krevního oběhu odstraněny (Alberts 2004; Rosypal 2006; Points et al. 2012).

Většina DNA se nachází uvnitř eukaryotického jádra, kde spolu s histony a dalšími proteiny tvoří chromozomy. Chromozomy jsou již pozorovatelné např. světelným mikroskopem, nejlépe při buněčném dělení, kdy se chromozomy rovnoměrně rozmisťují do dceřiných buněk. DNA existuje však i mimo jádro, jde o mitochondriální či plastidovou DNA. V mitochondriích má DNA cirkulární uspořádání a kóduje geny, které se podílí např. na proteosyntetickém aparátu a enzymatickém vybavení mitochondrií. Tato genetická informace je značně komprimována a neobsahuje introny. U prokaryotických organismů je DNA součástí cirkulárních bakteriálních chromozomů v nukleoidu nebo se nachází volně v cytoplasmě ve formě plazmidu (Vondrejs 2003, Alberts 2004).

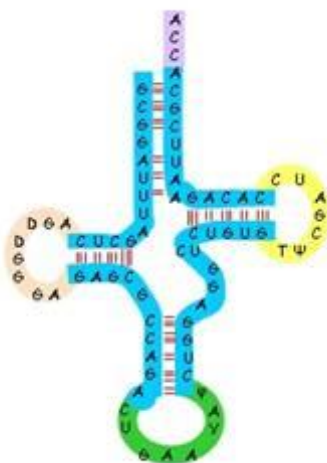
Sada chromozomů tvoří genom. Lidský genom má přibližně 3,2 miliardy párů bází, které jsou uspořádané do 46 chromozomů. Nejvyšší informační hodnotu genomu mají konkrétní úseky DNA – geny, které zaznamenávají informaci pro tvorbu RNA. Proces, kdy se přepisuje informace z DNA do komplementární sekvence RNA se nazývá transkripce. Na transkripci navazuje translace, kdy je sekvence nukleotidů překládána do sekvence

aminokyselin, které tvoří proteiny. Každé trojici bází (kodonu) odpovídá jedna aminokyselina. Avšak jednu aminokyselinu může kódovat více kodonů. Proto se říká, že je genetický kód redundantní neboli degenerovaný (Vondrejs 2003, Alberts 2004, Points et al. 2012).

Neméně důležitou funkcí DNA je replikace. Každý z obou řetězců může být předlohou pro syntézu komplementárního vlákna. Oba řetězce tedy nesou stejnou informaci. Velká část genomu mnoha organismů se však do RNA nepřepisuje, jedná se o tzv. nekódující úseky DNA, jejichž funkce je v mnoha případech neznámá, avšak někdy pomáhá regulovat expresi okolních genů (Alberts 2004).

1.3. Struktura a funkce RNA

Stejně jako DNA, i RNA je nukleová kyselina, která nese genetickou informaci, evolučně pravděpodobně předcházela DNA. Avšak RNA se od DNA liší kromě mnohem kratší délky přítomností hydroxylové skupiny na každé molekule pentosy. RNA je tvořena čtyřmi nukleovými bázemi: adeninem, cytosinem, guaninem a uracilem, který zde nahrazuje thymin přítomný v DNA. V RNA mohou být zastoupeny i vzácnější alkylované báze nebo např. 7-methylguanosa, který tvoří čepičkovou strukturu na 5' konci většiny mRNA, dihydrouridin, inosin a další. RNA je nejčastěji tvořena jedním vláknem, avšak i na tomto jednoduchém vlákně může docházet při setkání komplementárních úseků ke spojování vláken a tím ke tvorbě sekundární struktury. U většiny biologicky aktivních RNA převažuje sekundární struktura (Saenger 1984, Alberts 2004).



Obr. 6 Sekundární struktura tRNA
Přejato a upraveno z: (Studium biochemie 2013)

Oproti DNA, jež může tvořit mnoho forem dvoušroubovice, RNA dokáže formovat pouze dvě příbuzné pravotočivé A-formy (A a A') dvoušroubovice kvůli sterickým restrikcím hydroxylové skupiny na 2' uhlíku na ribóze. A-forma obsahuje 11 párů bází na jeden závit a A'-forma obsahuje 12 párů bází na závit. Obě tyto formy se vyznačují velkým hlubokým a malým plytkým žlábkem (Saenger, 1984).

RNA je molekula s mnoha funkcemi. Kromě přenosu genetické informace z DNA do proteinů může RNA katalyzovat specifické biochemické reakce podobně jako proteinové enzymy. Tyto RNA enzymy (ribozomy) se účastní mnoha zásadních biologických procesů jako je RNA sestřih, translace nebo také biosyntéza tRNA. Některé RNA známé jako „riboswitches“ mohou také regulovat genovou expresi měněním své vlastní struktury v odpovědi na změny v buněčném prostředí nebo na vazbu ligandů (Kruger et al. 1982, Mandal a Breaker 2004).

Významným objevem za poslední dvě desetiletí bylo odhalení velkého množství nekódujících RNA (ncRNA) v lidských buňkách. RNA, jež nemají žádný nebo malý kódující potenciál a jsou delší než 200 nukleotidů, jsou definovány jako dlouhé nekódující RNA (lncRNA). Naopak krátké nekódující RNA jsou kratší než 200 nukleotidů. U mnoha lncRNA byly nalezeny různé typy funkcí zahrnující regulaci chromatinu a tím i genovou expresi nebo zprostředkování komunikace mezi RNA a proteiny. Nicméně pro široké množství variací v sekvenci a expresi lncRNA je velmi náročné porozumět jejich funkcím či tomu, jak jsou regulovány (Birney 2007, Quinn a Chang 2016).

Obecně je známo pravidlo, že sekvence určuje strukturu a struktura určuje funkci, zejména pro proteiny. Avšak RNA je schopna také skládat složité tvary díky lokálnímu a dálkovému párování nukleotidů. Známymi příklady jsou již zmíněné ribozomy, riboswitche či některé lncRNA. RNA struktury jsou pro jejich funkci zásadní a jejich aberace pravděpodobně vedou k onemocněním (Wapinski a Chang 2011, Halvorsen et al. 2010).

1.4. Typy RNA

mRNA (messenger RNA) – informační či mediátorová RNA, jejíž zásadní funkcí je řídit vznik proteinu, její kodóny signalizují, kde má začít a kde skončit syntéza proteinu. Iniciačním kodonem je AUG a stop kodony jsou UAA, UAG či UGA.

rRNA (ribosomální) – tvoří jádro ribosomů, na nichž je mRNA překládána do proteinu, u eukaryot je syntetizována v jadérku, zastupuje až 90 % všech RNA.

tRNA (transferová) – je adaptorem, který vybírá správné aminokyseliny a umísťuje je do správného místa na ribosomu, aby mohly být začleněny do rostoucího aminokyselinového řetězce.

snRNA (small nuclear) – nekódující RNA, podílí se na splicingu (sestřihu), tedy vystřížení nekódujících sekvencí z genů.

ribozym – RNA se specifickým tvarem a povrchem fungující jako katalyzátor a obdobně i jako enzym (Alberts 2004).

riboswitch – RNA regulující genovou expresi změnami ve své vlastní struktuře v odpovědi na změny v buněčném prostředí nebo na vazbu ligandů (Mandal a Breaker 2004).

1.5. Štěpení nukleových kyselin za účelem analýzy

Rozštěpení nukleových kyselin se dá obecně provést alkalickou nebo kyselou hydrolyzou, avšak mnohem větší využití poskytují enzymy schopné hydrolyticky štěpit DNA či RNA – nukleázy. Nukleázy štěpí fosfodiesterové vazby fosfátové kostry nukleových kyselin, podle místa štěpení je rozdělujeme na exonukleázy (štěpí od volného 5' či 3' konce) a endonukleázy (štěpí vnitřně). Deoxyribonukleázy štěpí DNA (DNázy) a ribonukleázy štěpí RNA (RNázy). Na jednu stranu jsou jako kontaminanty při analýzách nukleových kyselin nežádoucí, ale na druhou jsou velmi užitečné při manipulaci s DNA či RNA např. za účelem klonování nebo umožnění či usnadnění pokročilých analýz. Dnes je již známo velmi mnoho nukleáz, z nichž většina pochází z bakterií či plísní (Rittié a Perbal 2008).

1.5.1. Příklady využívaných nukleáz

DNáza I – endonukleáza ssDNA či dsDNA izolovanou či v chromatinu

Exonukleáza III – 3' exonukleáza dsDNA, ale také RNáza H, fosfatáza nebo endonukleáza

Bal31 – zkracuje dsDNA na obou koncích, endonukleáza ssDNA

Exonukleáza VII – endonukleáza ssDNA na obou koncích, nepůsobí na RNA

RNáza A – endonukleáza ssRNA na 3' koncích, štěpí RNA v DNA/RNA hybridech

RNáza H – degraduje RNA v RNA/DNA hybridech

Další RNázy – každá má specifické požadavky na štěpení, využívají se v RNA sekvenování

DNA/RNA nukleázy – štěpí ssDNA i RNA, využívají se při hybridizaci k odstraňování vyčnívající ssDNA (Rittié a Perbal 2008).

2. IZOLACE A SEPARACE NUKLEOVÝCH KYSELIN ZA ÚČELEM JEJICH ANALÝZY

Izolace nukleových kyselin je zásadním krokem pro jejich další analýzu. Aby následná analýza podávala správné a nezkreslené informace, musí být splněny jisté požadavky již při prvních krocích izolace. Následující kapitola je věnována obecným postupům a konkrétním metodám, které slouží k izolaci nukleových kyselin. Další kapitoly jsou věnovány již separacím nukleových kyselin, a to zejména elektroforéze a kapalinové chromatografii, jejich principům a metodám. Vyzdviženy budou metody používané ve spojení s hmotnostní spektrometrií a také bude poukázáno na možná technická uspořádání. Spojení těchto technik totiž poskytuje řadu výhod jako je vysoká selektivita, citlivost a přesnost v kvalitativní či kvantitativní analýze mimo jiné i nukleových kyselin.

2.1. Metody izolace nukleových kyselin

Nejzákladnějším krokem, který může být zařazen před jakýmkoliv dalším procesem či analýzou nukleových kyselin je odsolení vzorku, jelikož je soli běžně kontaminují. Dalším základním krokem metod izolace nukleových kyselin z buněk je jejich narušení (buněčná lyze), přičemž toto narušení musí být dostatečně šetrné, aby nepoškodilo i nukleové kyseliny. Nejčastěji se používají detergenty např. dodecylsírán sodný (SDS) (Miller et al. 1999), které narušují cytoplasmatickou membránu, mohou však být použity i fyzikálně-chemické postupy jako je ultrazvuk. Musí být zajištěna optimální teplota a pH, aby nedošlo k denaturaci. Dále musí být zabráněno degradaci nukleových kyselin nukleázami. Pro inaktivaci deoxyribonukleáz se používá etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), která vyvazuje Ca^{2+} ionty sloužící mimo jiné jako kofaktory deoxyribonukleáz. Izolace RNA je poněkud složitější, protože ribonukleázy se nachází hojně v krvi, tkáních, bakteriích, plísních a také na kůži (proto se při práci s RNA používají rukavice), jsou teplotně stabilní a nevyžadují kofaktory, k jejich inaktivaci se využívá guanidin thiokyanát nebo fenol a SDS. Poté je nutno purifikovat nukleovou kyselinu od kontaminujících složek buněčného lyzátu či jiných složek vzorku, a právě tímto krokem se z velké části zabývají níže uvedené metody (Ding et al. 2008, Tan a Yiap 2009).

2.2. Fenol-chloroformová extrakce

Fenol-chloroformová extrakce je jednou z nejběžnějších metod izolace nukleových kyselin. Ačkoliv fenol je toxický a rychle denaturuje proteiny, neinhibuje zcela aktivitu ribonukleáz

(Sambrook a Russel 2001). Tento problém se dá vyřešit použitím směsi fenol:chloroform:isoamyl alkohol v poměru (25:24:1). Proteiny, lipidy, sacharidy i buněčný lyzát jsou odstraněny extrakcí vodného roztoku s organickou směsí fenolu a chloroformu (Sambrook a Russel 2001, Chomczynski a Sacchi 2006). Smícháním roztoku buněčného lyzátu s fenolem a chloroformem se vytvoří dvoufázová emulze. Centrifugací dochází k rozdělení těchto fází na hydrofobní (spodní) a hydrofilní (horní), přičemž spodní fáze obsahuje organické látky s fenolem a chloroformem a horní vodný roztok s nukleovými kyselinami (Buckingham a Flaws 2007). Horní fáze může být odebrána a DNA precipitována přidáním ethanolu nebo isopropanolu v poměrech 2:1 nebo 1:1 a koncentrované soli. Po odstředění vznikne na dně zkumavky precipitát s přebytkem soli, která je odstraněna promytím 70% etanolem. Následně se odsaje supernatant a DNA může být rozpuštěna v Tris/EDTA (TE) pufru nebo sterilní destilované vodě (Buckingham a Flaws 2007).

V případě RNA extrakce probíhá s fenolem a chloroformem za sníženého pH v přítomnosti guanidin isothiokyanátu, který je zároveň chaotropním činidlem degradujícím proteiny. Roztok guanidin isothiokyanátu a fenolu používaný pro RNA extrakci je znám také jako TRIzol nebo Tri-Reagent. Principem této metody je extrakce s kyselým roztokem obsahujícím guanidin isothiokyanát, octan sodný, fenol a chloroform (Chomczynski a Sacchi 2006). Za těchto kyselých podmínek všechna RNA zůstane v horní vodné fázi směsi, zatímco DNA a proteiny zůstanou na pomezí nebo ve spodní organické fázi. RNA je pak získána odebráním horní fáze a precipitací s isopropanolem podobně, jak již bylo výše popsáno u DNA (Sambrook a Russel 2001).

2.3. Extrakce nukleových kyselin na pevné fázi

Tato metoda umožňuje rychlou a efektivní izolaci nukleových kyselin v porovnání extrakcí v kapalně fázi a dalšími konvenčními metodami. Tuto metodu navíc využívá většina komerčních extrakčních souprav dostupných na trhu (Esser et al. 2005). Pevná fáze bude adsorbovat nukleové kyseliny v extrakčním procesu založeném na pH a obsahu soli pufru. Tato metoda zahrnuje čtyři zásadní kroky: buněčnou lyzi, adsorpci nukleových kyselin, promytí a eluci (Kojima a Ozawa 2002). Prvním krokem je sestavení kolony pro adsorpci vzorku. Kolona může být zavedena do cyklu použitím pufru o určitém pH, který převede povrch nebo funkční skupiny na pevné fázi na určité chemické formy. Následně je vzorek lyzován použitím pufru a aplikován na kolonu. Požadované nukleové kyseliny budou adsorbovat na kolonu za pomoci zvýšeného pH a koncentrace solí (vazebný roztok). Další komponenty vzorku, jako

jsou proteiny, se mohou také silně nespecificky vázat na stacionární fázi kolony. Takto navázané kontaminanty ale mohou být snadno odstraněny pufrům obsahujícím kompetitivní činidlo. Pro eluční krok je vhodný TE pufr nebo voda, která může být použita pro uvolnění požadované nukleové kyseliny z kolony v relativně čisté formě bez kontaminací solemi. Během promývacích a elučních kroků se běžně používá rychlá centrifugace či vakuová filtrace (Gjerde et al. 2009).

Byly představeny také „mixed-bed“ pevné fáze kombinující alespoň dvě pevné fáze, z nichž každá může cíleně vázat nukleovou kyselinu. První pevná fáze váže nukleovou kyselinu v přítomnosti prvního roztoku a v přítomnosti druhého roztoku ji uvolňuje. Druhá pevná fáze váže nukleovou kyselinu naopak v přítomnosti druhého roztoku a v přítomnosti prvního ji uvolňuje. První i druhá pevná fáze uvolňuje nukleovou kyselinu v přítomnosti elučního pufru (Smith et al. 2002).

2.3.1. Silikátové matrice

Pro své unikátní vlastnosti selektivního vázání DNA jsou silikátové matrice základem většiny produktů spojených s izolací nukleových kyselin. Dostupné jsou různé typy silikátových matric zahrnující skleněné částice jako je skleněný prášek či skleněná mikrovlákna nebo křemelina (Padhye et al. 1997). Principem je vysoká afinita negativně nabitě DNA kostry k pozitivně nabitým silikátovým částicím (Esser et al. 2006). Sodík slouží jako kationtový most přitahující negativně nabitý kyslík fosfátové kostry nukleové kyseliny. Sodíkové kationty ruší vodíkové vazby mezi vodíky vody a negativně nabitými kyslíkovými ionty v silikátu v prostředí s vysokou koncentrací soli. DNA je silně navázána a promýváním se odstraní veškeré kontaminace. Purifikované molekuly DNA mohou být poté uvolněny za nízké iontové síly použitím TE pufru nebo destilované vody (Esser et al. 2006, Department of Biology, Davidson College).

Kromě silikátových matric jsou známy také nitrocelulózoové a polyamidové membrány jako je nylon. Tyto matrice také váží nukleové kyseliny, avšak s nižší specifitou. Polyamidové jsou více odolné než nitrocelulózoové a váží nukleové kyseliny nevratně i za nízké iontové síly (Arnold et al. 2005).

Co se týče komerčního využití, tak lze zmínit např. MirVana soupravu, která je speciálně připravená pro izolaci krátkých molekul RNA jako jsou siRNA a miRNA, dokáže však izolovat i celkovou RNA. Tento kit využívá kombinaci organické extrakce s následnou izolací RNA na filtrech ze skleněných vláken. Využívá výhod obou metod a zároveň postrádá

jejich nevýhody. RNA požadované čistoty může být získána do 30 min (Life technologies 2011).

2.3.2. Magnetické částice

Separace pomocí magnetických částic je jednoduchá a efektivní metoda a v dnešní době již často používaná k izolaci nukleových kyselin. Částice mající magnetický náboj mohou být separovány použitím permanentního magnetu. Těmito částicemi jsou nejčastěji magnetické kuličky (tvořené FeO) pokryté materiálem s vysokou afinitou k nukleovým kyselinám. Těmito materiály mohou být syntetické polymery, biopolymery, porézního sklo nebo již zmíněný SiO₂. Výsledné magnetické částice jsou známé jako „core-shell“ částice (Berensmeier 2006).

Příkladem může být také částice magnetizovatelné celulózy. Tyto částice obsahují v celulóze zabalený FeO zaujímající 90 % celkové hmotnosti částice, což jim dodává skvělé magnetické vlastnosti. V přítomnosti určité koncentrace soli (nejčastěji octan sodný) a polyalkylen glykolu mohou tyto částice vázat nukleové kyseliny, přičemž krátké nukleové kyseliny vyžadují pro pevnou vazbu vyšší koncentrace soli. Použití magnetu na spodu nebo na straně zkumavky umožňuje čisticí či promývací kroky bez ztráty nukleových kyselin. Poté se použije vhodný eluční pufr, který uvolní navázané nukleové kyseliny (Nargessi 2005).

Na bázi magnetické separace jsou také dostupné komerčně vyráběné soupravy. Tyto soupravy využívají všechny výhody magnetické separace zmíněné výše a jsou s nimi dodávány i potřebná činidla a reagenty, což dělá izolaci ještě snazší.

2.4. Separace nukleových kyselin pomocí elektroforézy

Pro izolované molekuly DNA nebo RNA existuje celá řada technik, které slouží k jejich následné separaci a analýze. Jednou z nich je elektroforéza, jejímž principem je separace na základě rozdílného pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Rozdíly v pohyblivosti molekul jsou dány kromě rozdílných nábojů také rozdílnými velikostmi a tvary molekul. Ve volném roztoku se DNA pohybují téměř identicky nehledě na jejich velikosti, nicméně nedenaturované RNA mohou mít rozdílnou pohyblivost. K dosažení elektroforetické separace i podle velikosti molekul je možno využít separačních matic (Perkins et al. 1995). Nejčastěji jsou gely, jejichž porézní struktura tvoří něco jako „molekulární síta“. Nukleové kyseliny jsou potom v elektrickém poli nuceny skrz tyto „póry“ migrovat (Smisek 1995).

Existuje mnoho polymerů umožňující účinnou separaci nukleových kyselin, například deriváty celulózy mají velmi účinnou separaci krátkých úseků DNA. Polyakrylamid je vhodný pro separaci DNA či RNA s následným sekvenováním, kde je nutné rozlišení jednotlivých bází malých fragmentů, používá se k separaci ssDNA. Velmi známá je také elektroforéza na agarózovém gelu, používá se k separaci dsDNA. Obecně platí, že s rostoucí koncentrací roztoku polyakrylamidu se lépe separují kratší úseky DNA (menší než 600 bp) a naopak s rostoucí koncentrací agarózy se lépe separují delší úseky DNA. Použitím směsi vysokomolekulárních a nízkomolekulárních polymerů o nižší koncentraci lze dosáhnout separace DNA v rozsáhlém rozmezí velikostí (Sunada et al. 1997, Slater et al. 2003).

Po ukončení elektroforézy je nutné zobrazení separovaných složek. Proto do agarózy či pufru bývá přidáváno fluorescenční barvivo ethidium bromid, který se váže zejména na DNA ale i nedenaturované RNA. Po ozáření UV lampou emituje záření o vlnové délce 605 nm, které zobrazí jednotlivé frakce oranžově (Sigmon a Larcom 1996). Další možností zobrazení jsou komerčně dostupná barviva, např. fluorescenční barvivo SYBR Green I, toto barvivo tvoří s DNA komplex absorbující modré záření o vlnové délce 497 nm a emituje zelené záření o vlnové délce 520 nm (Zipper 2004). Na podobném principu fungují také další fluorescenční barviva jako jsou např. GelGreen a GelRed. Za zmínku stojí také dnes již poměrně zastaralá zobrazovací metoda stříbření používaná především u polyakrylamidu (Blum et al. 1987).

2.4.1. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) nebo také kapilární zónová elektroforéza (CZE) využívá úzké kapiláry, ve které jsou separovány nabitě vysokomolekulární (proteiny či nukleové kyseliny) či nízkomolekulární látky (organické i anorganické) s možností on-line detekce. Tyto kapiláry tvořené taveným borosilikátovým sklem mohou a nemusí být pokryty např. polyakrylamidem, který snižuje elektroosmotický průtok (Hjerten 1985). Separace jsou umožněny použitím vysokého napětí, které generuje elektroosmotický a elektroforetický proud roztoku pufru a iontů (Adamson et al. 1990). Detekce probíhá spektrofotometricky v UV oblasti nebo pomocí hmotnostní spektrometrie. Hlavními výhodami CE jsou zejména rychlost, vysoké rozlišení a možnost použití malých objemů vzorků (Sunada et al. 1997, Hoffmann a Stroobant 2007). Tato metoda se používá zejména k analýze a sekvenování DNA nebo určování velikosti DNA fragmentů či k separaci ssDNA a dsDNA (Heller 2001).

2.4.2. Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

Spojení CE s hmotnostní spektrometrií závisí zejména na výběru iontového zdroje. Nejvhodnější je spojení CE s ionizací elektrosprejem a hmotnostní spektrometrií (CE-ESI-MS), přičemž verze nanospreje dosahuje nejlepších výsledků. Přívod CE kapiláry ponořen v nádobě s pufrém, do které je separační anodou přiváděno vysoké napětí. Druhý konec CE kapiláry vstupuje do ESI jehly, která je připojena ke zdroji vysokého napětí ESI. Pro spojení CE kapiláry a ESI jehly existuje několik možností rozhraní, mezi které patří rozhraní bez přídavné kapaliny, s přídavnou kapalinou a kapalinový spoj (Dass 2007). U tohoto spojení se však mohou vyskytovat komplikace v důsledku nekompatibility CE pufrů (mohou potlačovat ionizaci) a jejich nízkých průtoků. Nicméně i přesto je toto spojení široce používané jak pro kvalitativní, tak i pro kvantitativní analýzu chemicky různorodých molekul. Tato metoda slouží k citlivé separaci, identifikaci a kvantifikaci zejména biologických vzorků (Hoffmann a Stroobant 2007, Norková a Jaklová 2013).

2.5. Separace nukleových kyselin pomocí kapalinové chromatografie

Principem chromatografie je dynamická separace jednotlivých složek analytu pomocí dvou vzájemně nemísitelných fází – mobilní a stacionární, přičemž rozdělení probíhá na základě rozdílných afinit jednotlivých složek analytu ke stacionární fázi. Složky s vysokou afinitou ke stacionární fázi se pohybují pomaleji, oddělí se tak od rychlejších složek s nižší afinitou. Podle skupenství mobilní fáze jsou chromatografie děleny na plynové a kapalinové (Dass 2007). Následující odstavce budou věnovány chromatografii kapalinové (LC).

2.5.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pokud je kapalinová chromatografie prováděna v koloně za vysokých tlaků pomocí výkonného čerpadla, jedná se o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Kolona má při standardních průtocích většinou průměr 2,1 až 4,6 mm a zároveň délku 30 až 250 mm. Stacionární fázi většinou tvoří mikročástice o velikosti 3 až 10 μm . Jedná se zejména o adsorpční či rozdělovací chromatografie. Ve srovnání s nízkotlakovou kolonovou chromatografií HPLC umožňuje účinnější separace za kratší čas. HPLC může být použita jak pro kvalitativní, tak kvantitativní analýzy komplexních biologických, anorganických i organických složek (Dass 2007, Siddhant et al. 2018)

Možným uspořádáním kapalinové chromatografie je také ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) Tato metoda je aplikována na kolonách s velmi malými částicemi (menší než 2 μm v průměru). Tyto částice vytváří ještě vyšší tlaky, na jejichž dosažení je potřeba ještě výkonnějšího čerpadla, což se ve výsledku projeví ještě vyšším rozlišením, rychlostí a citlivostí (Swartz 2005, Wu et al. 2006, Siddhant et al. 2018)

2.5.2. Metody kapalinové chromatografie

Adsorpční chromatografie – stacionární fází je pevná látka, na kterou specificky adsorbují molekuly analytu, zatímco mobilní fáze tento proces potlačuje.

Rozdělovací chromatografie – stacionární fází je kapalina nanesená na nosiči. Principem je rozdělení molekul analytu mezi dvě kapalně fáze. Tuto metodu je možno provádět na „normální“ fázi (stacionární je polární a mobilní je nepolární) nebo na „reverzní“ fázi, jejíž mechanismus bude popsán níže.

Iontově výměnná chromatografie – využívá se pro roztoky iontů. Tato metoda je založena na interakci iontů roztoku s nabitými skupinami stacionární fáze. Ionty roztoku s opačným nábojem jsou na koloně zachyceny, zatímco ionty se stejným nábojem se nezachytí. Zachycené ionty mohou být poté uvolněny např. změnou teploty, pH nebo koncentrace soli.

Gelová permeační chromatografie – separuje molekuly na základě jejich velikosti. Stacionární fází je polymerní matrice (gel) obsahující póry. Malé molekuly do těchto pórů pronikají, tím jsou zpomaleny a separovány od větších molekul, které do pórů neproniknou.

Afinitní chromatografie – je založena na specifické interakci mezi jedním typem molekuly analytu s komplementárním typem molekuly navázané na pevném nosiči. Tyto interakce zahrnují elektrostatické nebo hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly či vodíkové můstky (Meyer 1999, Dass 2007, Tan a Yiap 2009).

2.5.3. Separační metody využívané ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Obecně je nejpoužívanější rozdělovací vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC), kdy stacionární fáze je nepolární (alkylové skupiny např. uhlíkový řetězec C18, C8 či C4 navázaný na silikagelu) a mobilní fáze je částečně polární (např. voda s metanolem, isopropanolem či acetonitrilem). Tato metoda je založena na hydrofobní interakci mezi analytem a nepolární matricí stacionární fáze. Jednotlivé komponenty směsi jsou poté selektivně rozděleny mezi dvě fáze a separovány elucí, ke které dochází zvýšením podílu mobilní fáze (Dass 2007).

Další významnou metodou je iontově-párová chromatografie na reverzní fázi (IP-RPLC), která je založena na tvorbě iontových párů mezi separovanou látkou a opačně nabitým iontem navázaným na koloně. Tato metoda je velmi selektivní – na koloně jsou zachyceny analyty opačně nabitě, naopak retence stejně nabitých analytů je snížena a retence neutrálních ovlivněna není. Uplatnění nachází především v separaci látek iontové povahy, jimiž jsou mimo jiné i nukleové kyseliny (Knox a Hartwick 1981). Za určitého pH iontový charakter nukleotidových organofosfátů umožňuje interakci s kationtovými činidly za tvorby iontových párů. Vyžadovány jsou iontově párová činidla jako jsou např. triethylamin, dibutylamine či diisopropylethylamin (Gong et al. 2014, Studzinska et al. 2017).

Oproti IP-RPLC je také častěji využívána hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC). Tato metoda je velmi podobná rozdělovací LC na normální fázi (stacionární fáze je polární), avšak liší se složením mobilní fáze (nejčastěji směs vody a organického rozpouštědla např. acetonitrilu), které je naopak podobné rozdělovací LC na reverzní fázi. Avšak oproti RPLC k eluci dochází snížením podílu organického rozpouštědla v mobilní fázi. Tato metoda je určena zvláště k separaci polárních hydrofilních sloučenin (Hemstroöm a Irgum 2006, Appelblad et al. 2008).

HILIC obvykle využívá stacionární fáze na bázi siliky, nebo mohou obsahovat navázané více komplexní fáze obsahující ionizovatelné či neutrální funkční skupiny. Příkladem neutrálních fází mohou být dioly, kyano skupiny či amidy. Ionizovatelné fáze mohou být poly(2-sulfoethyl), sulfobetain. Na rozdíl od RPLC, pro HILIC neexistuje stacionární fáze, která by mohla být universálně aplikována pro separace polárních látek (Lobue et al. 2019).

2.5.4. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Nejvhodnějším spojením se jeví spojení kapalinové chromatografie s elektrosprejem (LC-ESI-MS), protože dokáže citlivě analyzovat netěkavé a tepelně nestabilní molekuly od nízkomolekulárních po vysokomolekulární, také protože ionizace probíhá za atmosférického tlaku. Další výhodou je kompatibilita RP-HPLC polárních rozpouštědel a také přijatelné rozmezí průtoků. Průtok se dá do jisté míry korigovat změnou průměru kolony HPLC. Například zúžení z 4,6 mm v průměru na 320 μm v průměru sníží průtok z 1 ml/min na 4,9 $\mu\text{l}/\text{min}$. Kolony s menšími průměry navíc disponují lepší citlivostí, např. zúžením průměru kolony na polovinu se zvýší citlivost čtyřikrát, a nižší spotřebou vzorku či potřebných rozpouštědel (Dass 2007).

Další možností je spojení kapalinové chromatografie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Toto spojení je kompatibilní se středně polárními až nepolárními sloučeninami jako jsou např. nukleové kyseliny (Covey et al. 1986). Stejně jako ESI se dá přizpůsobit vyšším průtokům HPLC (Gelpí 1995).

2.5.5. Separační metody nukleových kyselin pomocí kapalinové chromatografie

V analýze fosforylovaných složek (nukleotid mono-/di-/tri-fosfáty) metodou LC-MS analyty mohou interagovat se specifickými částmi instrumentální konfigurace (Tuytten et al. 2006). V kyselém médiu dochází k adsorpci analytů na silanové skupiny stacionární fáze nebo se tvoří kovové komplexy fosforylovaných zbytků s kovovými ionty vznikajícími v různých částech chromatografického systému. Tyto procesy vedou ke snížení a zkreslení chromatografických signálů (Wakamatsu et al. 2005). Bylo navrženo mnoho řešení jako je derivatizace volných silanových skupin nebo jejich deaktivace trimethylchlorosilanem (Gritti et al. 2007, Domínguez-Álvarez et al. 2017)

LC lze využít k simultánní separaci nukleotidů a nukleosidů. Tyto molekuly jsou však vysoce polární a ionizovatelné, což omezuje retenci na běžných C18 kolonách používaných RPLC. Nicméně za určitého pH mobilní fáze mohou být polární nukleotidy zadrženy na koloně a následně uvolněny gradientovou elucí, přičemž nukleosidy jsou uvolněny později (Ren 2011, Studzinska a Buszevsky 2013).

Mnohem větší využití pro separaci nukleotidů má však iontově-párová chromatografie IP-RPLC. Dosud byla spojována kromě UV detekce také s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Ačkoliv použití iontově-párových činidel dosahuje velké separační účinnosti chromatografie, dochází díky nim ke snížení nabitých stavů iontů při ESI-MS. Proto je vyžadováno použití modifikátoru elektrospreje jako je hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Basiri 2017) ideálně v koncentraci 20 mM. Nicméně příliš vysoké koncentrace HFIP (nad 100 mM) mohou vést k potlačení tvorby iontů (Chen a Bartlett 2013). Optimální iontově-párové činidlo a modifikátorový systém může záviset také na typu a obsahu oligonukleotidu (Lobue et al. 2019).

Alternativou k IP-RPLC, která je vhodná pro separaci nukleových kyselin je hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) (Alpert 1990). Tato metoda se v posledních letech dostává do popředí, protože dokáže velmi účinně separovat polární látky, jimiž jsou mimo jiné také

nukleotidy či oligonukleotidy (Lobue et al. 2019). Mechanismus této metody byl již popsán výše.

Využitelnost HILIC byla také nedávno demonstrována při simultánním stanovení 5 nukleosidů a 15 nukleotid mono-, di- a tri-fosfátů (Mateos-Vivas et al. 2015). Tato metoda zabráňuje nežádoucí adsorpci nukleotidů na LC-MS strukturu a podporuje jejich retenci na HILIC stacionární fázi. Mobilní fáze obsahuje HFIP a diethylamin jako hydrofilní kationické činidlo tvořící iontové páry. Výsledkem je sdružování iontů mezi fosfátovými skupinami nukleotidů a kationickým činidlem, což významně zlepšuje výsledný signál díky HFIP (Zhang et al. 2014, Mateos-Vivas et al. 2015).

Nově je komerčně dostupná HILIC stacionární fáze obsahující modifikované diolové skupiny na polymerních částicích pro separaci a analýzu různých oligonukleotidů. Separace DNA oligomerů pomocí této stacionární fáze dosahuje vysoké separační účinnosti i bez použití iontově párových činidel (Addepalli a Limbach 2011). Hodnocení separační účinnosti této stacionární fáze bylo demonstrováno na oligoDNA, oligoRNA a fosforothionátech. Díky specifickému složení mobilní fáze se dá dosáhnout opakované silné retence a rozlišení jednotlivých komponent vzorku s následnou MS detekcí. V porovnání s IP-RPLC-MS dosahuje HILIC-MS srovnatelné separační účinnosti bez použití iontově párových činidel (Lobue et al. 2019).

3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

3.1. Úvod k hmotnostní spektrometrii

Metoda hmotnostní spektrometrie (MS) spočívá v separaci iontů analytu podle jejich poměru molekulové hmotnosti a náboje (m/z). Metoda poskytuje velmi přesný a selektivní způsob detekce specifických molekul. Základní režim hmotnostní spektrometrie může být dále rozšířen o tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS), která poskytuje dodatečnou informaci o vzniklých fragmentech prekursoru, důležitou pro spolehlivou identifikaci analytu. Pokud se ovšem jedná o komplexní vzorky, je vhodné před analýzou hmotnostní spektrometrií zařadit vhodný separační krok. Tímto lze dosáhnout požadované detekční úrovně ($1:10^9$) (Tretyakova et al. 2013). Separačním krokem bývá nejčastěji kapalinová chromatografie nebo kapilární elektroforéza. Separační zařízení navazuje na hmotnostní spektrometr, který se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru (Friedecký 2012, Tretyakova et al. 2013).

Samotná analýza probíhá v několika krocích. Prvním krokem je ionizace a převedení molekul či atomů analytu na nabitě částice a do plynné fáze, což vyžaduje odebrání či přidání elektronů či protonů. Dalším krokem je separace a hmotnostní analýza molekulárních iontů a jejich fragmentů na základě jejich m/z poměru. Tyto kroky probíhají za vysokého vakua. Následně probíhá detekce a měření nadbytku separovaných iontů detektorem, který převádí ionty na elektrický signál. Tento signál je zesílen a převeden do počítače ve formě hmotnostního spektra (Dass 2007, Gross 2011).

Vlastní hmotnostní analýza a transport iontů do analyzátoru probíhá za vysokého vakua, které umožňuje volný pohyb iontů bez kolizí či interakcí s dalšími ionty. Kolize totiž mohou vést k fragmentaci molekulových iontů a možné produkci jiných iontů prostřednictvím iontově-molekulárních reakcí. Zmíněné nežádoucí procesy snižují senzitivitu, rozlišení a zvyšují nejednoznačnost měření. Kromě toho pozadí atmosférického tlaku způsobuje interferenci (Dass 2007).

Hmotnostní spektrum představuje dvoudimenzionální znázornění intenzity signálu proti m/z . Pozici píku odráží m/z hodnota iontu vytvořeného z analytu v iontovém zdroji. Intenzita píku znázorňuje zastoupení daného iontu. Pík s největší intenzitou bývá označován jako základní pík a normalizován jako 100 % relativní intenzity. Zastoupení všech ostatních iontů je pak udáváno v procentech relativních k základního píku (Gross 2011).

3.2. Iontové zdroje

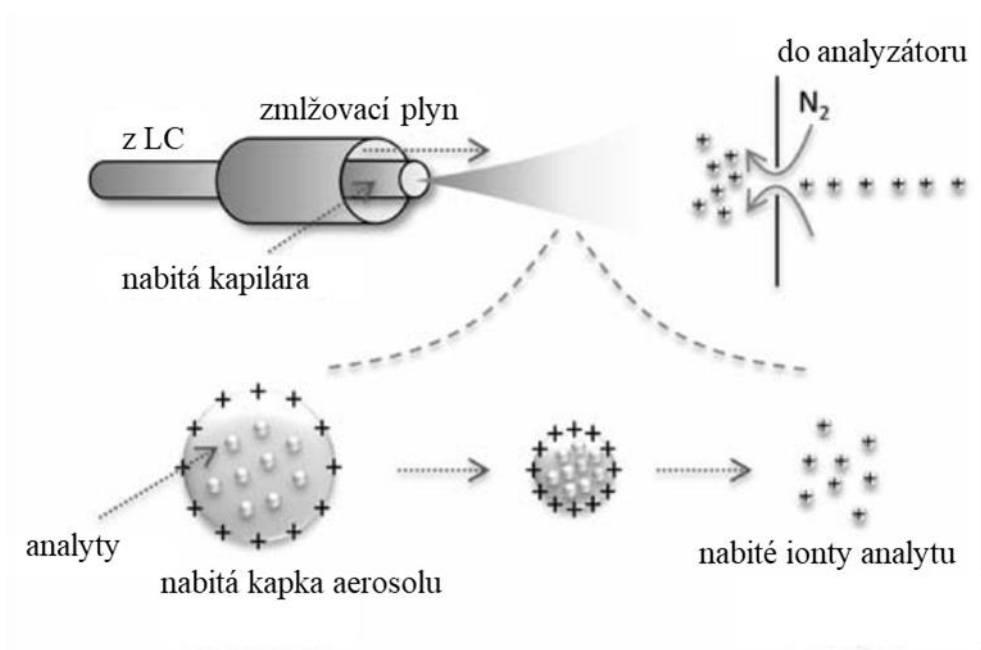
Ionizace analytu je zásadním krokem pro analýzu hmotnostní spektrometrií. V iontovém zdroji se převádí neutrální složky na ionty v plynné fázi. Ionizace je dosažena odejmutím nebo přijmutím elektronu analytem za vzniku radikálu kationtu $[M^{+\bullet}]$, nebo aniontu $[M^{\bullet-}]$. Další možností je přidání nebo odebrání protonu za tvorby aduktových kationtů $[M+H]^+$ či aniontů $[M-H]^-$. Pro měření hmotnostní spektrometrií je ionizace je vyžadována, protože pohyb iontů může být usměrňován aplikováním elektrických či magnetických sil. Energie a rychlost iontů mohou být kontrolovány, což usnadňuje jejich separaci a detekci (Dass 2007). Iontové zdroje můžeme podle množství dodávané energie rozdělit na „tvrdé“ a „měkké“. Nadměra převedené energie může způsobit fragmentaci molekuly a tvorbu radikálů, což je případ „tvrdých“ iontových zdrojů. Pro analýzu nukleových kyselin mají však význam pouze „měkké“ zdroje, které zachovávají původní strukturu molekuly tvorbou aduktů, a proto jim budou věnovány následující odstavce (Friedecký 2012).

3.2.1. Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI) je technika, která převádí látky rozpuštěné v roztoku na ionty v plynné fázi a ty jsou následně detekovány hmotnostní spektrometrií (ESI-MS). ESI je poměrně univerzální technika ionizace, zvládá ionizaci polárních molekul jako jsou nukleosidy, nukleotidy či oligonukleotidy (Fenn 1989). Umožňuje ionizaci i velkých biomolekul jako jsou proteiny či nukleové kyseliny. ESI-MS je ideální metodou pro detekci analytů z vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo kapilární elektroforézy (CE). ESI-MS nachází využití v biochemickém, biomedicinském a farmakologickém výzkumu. Na význam ESI-MS poukázala Nobelova cena, kterou získal v roce 2002 John Fenn, jenž byl hlavním vývojářem této metody (Gross 2011, Dass 2007, Tretyakova et al. 2013).

Ionizace probíhá aplikací silného elektrického pole (napětí 1-5 kV) do vodivého hrotu či nerezové kapiláry nebo přímo do kapaliny skrz spojení kapalina-kapalina (Bruins 2010). Proces produkce iontů v plynné fázi zahrnuje několik kroků, mezi než patří produkce nabitých kapiček aerosolu na hrotu elektrosprejové kapiláry, do které vstupuje roztok (např. mobilní fáze s analyty). Tvorba aerosolu je podporována koaxiálně proudícím zmlžujícím plynem (suchý N_2). Dalším krokem je zmenšení nabitých kapiček odpařováním rozpouštědla proudem plynu o zvýšené teplotě, čímž se zmenšuje jejich povrchový náboj, který je nakonec překonán Coulombickým odpuzováním, čímž dochází k explozi kapičky. Opakovaný rozpad kapiček vede nakonec k velmi malým vysoce nabitým kapičkám, z jejichž povrchu jsou ionty

uvolňovány do plynné fáze. Tyto kroky probíhají v regionu atmosférického tlaku aparatury (Cole 2010, Banerjee a Mazumdar 2012, Tretyakova et al. 2013).



Obr. 7 Ionizace elektrosprejem
Přejato a upraveno z: (Friedecký 2012)

Některé z iontů vytvořených v předešlých krocích vchází do vakuovaného regionu aparatury vedoucího k hmotnostnímu spektrometru malým otvorem nebo vzorkovací kapilárou. Tyto ionty jsou nashromážděny společně s molekulami rozpouštědla a dalších aditiv a jsou podrobeny tepelnému očištění v zahřáté kapiláře vedoucí do částečného vakua v první komoře a kolizní aktivaci díky rozdílu potenciálů vynucenému mezi koncem vzorkovací kapiláry a sběračem vedoucím do druhé vysokovakuové komory, ve které se nachází i hmotnostní spektrometr (Cole 2010).

Použití sušícího plynu a zahřáté kapiláry může ovlivnit robustnost systému a snížit stupeň hromadění iontů. Přenos iontů analytu z rozpouštědla do plynné fáze není energetický proces, avšak desolvatační proces poměrně efektivně chladí již zmíněné ionty v plynné fázi. Tudiž ionty analytu s nízkými vnitřními energiemi jsou vpuštěny do hmotnostního spektrometru ze sondy ESI, přičemž struktura analytu za vhodných podmínek zůstává nedotčena, analyt tedy není fragmentován (Banerjee a Mazumdar 2012).

Konverze iontů v kapalně fázi na plynnou je kompetitivní proces v důsledku omezeného prostoru a náboje možného na nabitých kapičkách. Takto mohou ostatní komponenty vzorku přítomné v řádově vyšších koncentracích vytvářet konkurenční ionty (interferovat) nebo dokonce utlumit ionizaci analytu. Tento fenomén je znám jako utlumení tvorby iontů (ion

suppression) a běžně je pozorován při stopové ESI analýze. Purifikace vzorku a jeho separace od složek snižujících iontový výtěžek např. pomocí HPLC zajistí optimální ionizaci analytu elektrosprejem a tím i citlivost MS detekce (Friedecký 2012, Tretyakova et al. 2013).

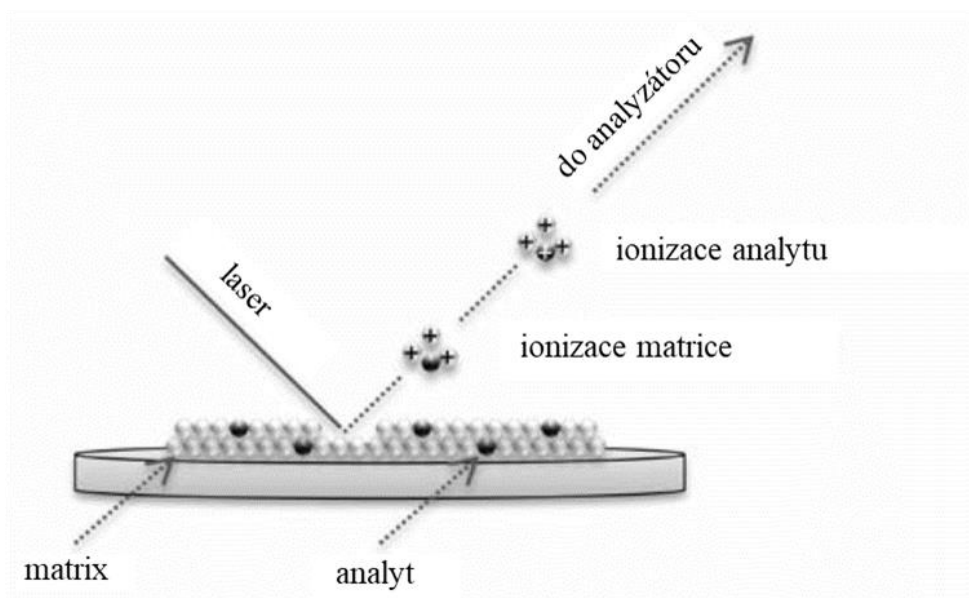
ESI může být podle polarity napětí na něj ukládané zdrojem protonovaných i deprotonovaných iontů. Nukleové kyseliny jsou polyanionty díky své záporně nabitě fosfátové kostře, jsou tedy analyzovány v režimu záporných iontů, podobně tomu je tak i u nukleosid monofosfátů (Kim et al. 2005). Naopak nukleové báze a nukleosidy jsou typicky analyzovány v režimu pozitivních iontů. V ojedinělých případech může adukt nukleové báze obsahovat silný elektron odebírající substituent jako je např. dusík, v tomto případě je preferován záporný iontový režim (Tretyakova et al. 2013).

Jednou z variant je ionizace nanosprejem, což je verze ESI s velmi malým průtokem (20-50 nl/min) (Wilm and Mann 1996). Toto snížení průtoku bylo docíleno výměnou jehly spreje za kapilárku z borosilikátového skla o průměru několika mikrometrů. Aplikuje se napětí 0,7-1,1 kV. Zatímco obvyklý ESI produkuje počáteční nabitě kapky o průměru 1-2 μm , nanosprej produkuje nabitě kapky o průměru menším než 200 nm, to znamená, že objem produkovaných kapiček je 100x až 1000x menší než u běžných elektrosprejů. Pro tuto techniku je vhodné použití velmi malých koncentrací a objemů vzorku, což je zároveň i její výhodou, nevýhodou je naopak nízká robustnost. Nano-ESI zvýšil toleranci k vodným roztokům a jejich kontaminací solemi (Banerjee a Mazumdar 2012).

3.2.2. Desorpční ionizace laserem za asistence matrice

Desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice (MALDI) je široce používanou technikou ionizace, která je vhodná pro celou řadu biomolekul mezi něž patří např. proteiny a mimo jiné i oligonukleotidy a nukleové kyseliny. Za vývoj této techniky získal v roce 2002 K. Tanaka Nobelovu cenu. Umožňuje „měkkou“ ionizaci produkující primárně pozitivně nebo záporně nabitě ionty. Vzorky jsou připravovány smícháním s nadbytkem organické matrice, vysušením a jejich společnou krystalizací. Molekuly analytu jsou pak zasazeny v matici a jsou od sebe dokonale izolovány. Matrice absorbuje UV nebo IR záření a laser s příslušnou vlnovou délkou pak zasáhne vysušenou vykrytalizovanou směs analytu s maticí. Absorbovaná energie se mění na teplo, čímž dojde k odpaření matrice a zároveň k desorpci a ionizaci vzorku. Současně dochází k ionizaci matrice, která předává náboj analytu. Celý proces probíhá obvykle ve vakuu (Hoffmann a Stroobant 2007, Dass 2007).

„Desorpce“ nebo „ablace“ může být charakterizována jako fázová změna v závislosti na hustotě energie uložené laserem. Desorpce je charakterizována hladkým přechodem z pevné látky na plyn na povrchu vzorku. Při ablaci je vzorek přehřátý a dochází k nukleaci pod povrchem, což způsobuje „fázovou explozi.“ To uvolní kondenzovaný materiál, který může být zachycen a přímo zobrazen (Cole 2010).



Obr. 8 Desorpční ionizace laserem za účasti matrice
Přejato a upraveno z: (Friedecký 2012)

Nejdůležitějším faktorem úspěšné ionizace pomocí MALDI je matrice. Matricí MALDI jsou typicky organické kyseliny obsahující chromofor, který absorbuje záření o vlnové délce použitého laseru. Matrice absorbuje energii z laserového pulsu, usnadňuje ionizaci analytu a zároveň jej chrání před poškozením radiací (van den Boom et al. 2007). Preferovaná matrice pro analýzu DNA je 3-hydroxypikolinová kyselina (3-HPA) (Nordhoff et al. 1994), zatímco pro RNA to je směs 2,3,4- a 2,4,6-trihydroxy-acetofenonu nebo 3-HPA (Zhu et al. 2002). Dalšími matricemi mohou být 2,5 dihydroxybenzoová kyselina, kyselina nikotinová nebo glycerol (Bourcier 2002, Tretyakova et al. 2013).

Oproti ostatním iontovým zdrojům fungujícím kontinuálně, MALDI je pulzní ionizační technika produkující ionty ve svazcích nesouvislým procesem. Je proto vhodné spojení MALDI a TOF-MS, protože poté probíhá jak ionizace, tak analýza pulzně. Avšak MALDI může být spojena i s ostatními hmotnostními analyzátoři jako jsou iontové pasti nebo hmotnostní spektrometry s Fourierovou transformací (např. Orbitrap) (Hoffmann a Stroobant 2007).

3.2.3. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je další možností „měkké“ ionizační techniky. Používá se instrumentální spojení s kapilární elektroforézou nebo vysokotlakou kapalinovou chromatografií. Roztok analytu z HPLC nebo CE je převeden do plynné fáze v zahřátém zmlžovači s pomocí sušícího plynu (typicky dusík). Molekuly rozpouštědla jsou ionizovány, když procházejí koronárním výbojem generovaným vysokým napětím aplikovaným na kovovou jehlu (Thomson 2007). Následně dochází k ionizaci molekul analytu přenosem náboje z molekul rozpouštědla na molekuly analytu. APCI umožňuje ionizaci i méně polárních látek. Také umožňuje použití stejných pufrů jako pro CE separace (Mol 2005). APCI je navíc tolerantní k přítomnosti povrchově aktivních látek, které mohou např. u ESI interferovat. Ionizace v plynné fázi navíc umožňuje vyšší průtok HPLC. Avšak protože k analýze DNA si vystačíme s ionizací elektrosprejem, je APCI používána jenom ojediněle ve výjimečných případech, kdy je potřeba vyšší průtok HPLC (Tretyakova et al. 2013, Norková a Jaklová 2013).

3.3. Hmotnostní analyzátory

Ionty v plynné fázi produkované iontovým zdrojem jsou převedeny do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle m/z poměru. Je však třeba zmínit, že vícenásobně nabitě ionty představují pouze část jejich skutečné hmotnosti, protože ta je vztažena k jednotkovému náboji. Separace iontů podle jejich m/z poměru mohou být založeny na různých principech. Všechny analyzátory však využívají statického nebo dynamického elektrického a magnetického pole samostatně či v kombinaci. Neméně důležitou funkcí hmotnostního analyzátoru je fokusace separovaných iontů na jedno místo směřující k detektoru (Dass 2007, Hoffmann a Stroobant 2007).

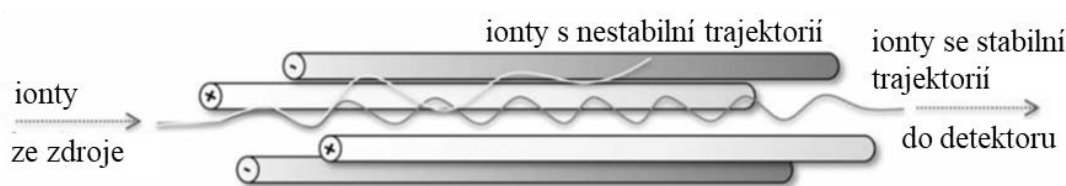
Hmotnostní analyzátory můžeme dělit na skenovací, které vysílají ionty různých hmotností postupně, ale umožní analýzu pouze v určitém rozmezí m/z . Mezi ně patří magnetické sektorové analyzátory nebo quadrupóly. Ostatní analyzátory umožňují analýzu všech iontů současně, například disperzní magnetický analyzátor, TOF, iontové pasti, cyklotronová rezonance nebo orbitrap (Hoffmann a Stroobant 2007).

V současnosti je komerčně dostupných již mnoho typů analyzátorů či dokonce jejich kombinací někdy označovaných také jako „hybridní“ analyzátory. Každý analyzátor má své výhody i nevýhody a hodí se více pro kvalitativní nebo pro kvantitativní analýzu. Výše zmíněné

„hybridní“ analyzátory potom těží z kombinace výhod, což zvyšuje efektivitu analýz (Hoffmann a Stroobant 2007, Tretyakova et al. 2013).

3.3.1. Kvadrupólový hmotnostní analyzátor

V současnosti je kvadrupól pravděpodobně nejvíce rozšířeným hmotnostním analyzátozem, a to i díky jeho relativně nižší pořizovací ceně. Jedná se o kombinaci čtyř paralelních kovových tyčí, na které je přivedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí (protistojné elektrody mají vždy stejnou polaritu) formující tak elektromagnetické pole umožňující průchod či filtraci specifických iontů skrz středový prostor aparatury. Napětí aplikované na páry tyčí může být nastaveno, aby aktivovalo jen ionty spadající do úzkého rozpětí poměru molekulové hmotnosti k náboji (m/z) zajišťující tak stabilní dráhu (Boyd et al. 2008). Tyto ionty jsou schopny projít kvadrupólovým hmotnostním filtrem. Ostatní ionty s nestabilní trajektorií se k detektoru nedostanou. Tento režim se využívá pro citlivou kvantifikaci předem zvolených látek. Nicméně, kontinuální změny elektrického pole umožňují proměřit všechny ionty vzniklé v iontovém zdroji, avšak za cenu nižší citlivosti (Dass 2007, Friedecký 2012, Tretyakova et al. 2013).

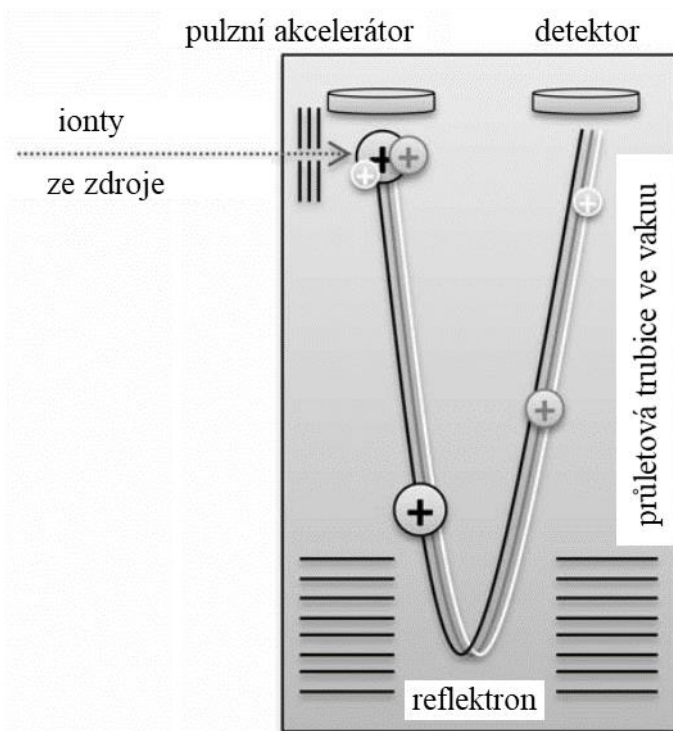


Obr. 9 Kvadrupólový analyzátor
Přejato a upraveno z: (Friedecký 2012)

Jednou z možností uspořádání jsou trojitě kvadrupóly ($Q_1q_2Q_3$) obsahující dva filtrující kvadrupóly (Q_1 a Q_3), které pracují jako hmotnostní analyzátory. Mezi nimi je třetí kvadrupól (q_2) sloužící jako kolizní cela. Tyto analyzátory se hodí pro tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS). Kolizní cela je naplněna inertním plynem (Ar nebo N_2) a funguje pouze v režimu radiové frekvence umožňující přenos všech iontů. Ionty ve specifikovaném rozmezí (m/z) opouští první kvadrupól a jsou urychleny elektrickým polem. Po vniknutí do kolizní cely se sráží s inertním plynem, což má za následek zvýšení vnitřní energie iontů a štěpení slabších vazeb. Výsledné fragmenty iontů opouští kolizní celu a jsou analyzovány ve třetím kvadrupólu (Q_3). Trojitý kvadrupól je široce používaným analyzátozem pro kvantitativní analýzu. Je velmi populární díky jeho selektivitě, senzitivitě, velkému dynamickému rozpětí při analýze biologických matic, relativně levné ceně a snadné obsluze (Friedecký 2012, Tretyakova et al. 2013).

3.3.2. Průletový analyzátor

V průletovém analyzátoru (TOF) jsou ionty v pulzech akcelerovány elektrickým polem do dlouhé vakuované trubice, kde se pohybují směrem k detektoru. Jelikož ionty s vyšší m/z putují pomaleji než ionty s nižší hmotností, rozdělí se v prostoru podle jejich rychlostí. Hodnota m/z je vypočtena ze zjištěných časů letu mezi zdrojem a detektorem. Průletové analyzátoři mohou nabídnout lepší rozlišovací schopnost iontů než analyzátoři kvadrupólové. Často se využívá uspořádání za použití tzv. reflektoru (iontového zrcadla), které otáčí směr letu o téměř 180° , čímž se prodlouží dráha i doba letu. Zároveň se tím kompenzují rozdíly v hodnotách kinetické energie iontů dané látky, což významně zlepšuje rozlišení iontů. TOF analyzátoři mohou být spojeny s MALDI nebo ESI iontovými zdroji (Boyd et al. 2008). TOF analyzátoři prošly v posledních letech významným vývojem. Pro svou citlivost a přesnost se používá na kvalitativní analýzy, avšak hybridní přístroj složený z kvadrupólového hmotnostního filtru, kolizní cely a TOF hmotnostního analyzátoru (QqTOF) se dá použít i pro kvantitativní analýzu, citlivostí se však nevyrovná trojitému kvadrupólu (Lacorte et al. 2006, Friedecký 2012, Tretyakova et al. 2013).



Obr. 10 Průletový analyzátor
Přejato a upraveno z: (Friedecký 2012)

3.3.3. Iontové pasti

Iontové pasti (lineární nebo sférické) vychytávají a shromažďují ionty v ohraničeném prostoru. Shromážděné ionty mohou být z iontové pasti selektivně vyřazeny a detekovány podle jejich m/z hodnoty. Fragmentační spektra iontů mohou být získána vyřazením všech ostatních iontů mimo sledované rozmezí m/z (Dass 2001). Následuje fragmentace vybraných iontů kolizí s okolním plynem (He) a poté hmotnostní analýza výsledných iontových fragmentů. Tento proces shromažďování a fragmentace iontů může být opakován několikrát umožňující tak získání fragmentačního hmotnostního spektra (MS^2). Iontové pasti jsou výkonným nástrojem kvalitativní analýzy, v kvantitativní analýze tradičně používány nejsou, nabízí však lepší možnost identifikace při opakované fragmentaci prekursorů vedoucí k získání např. MS^3 spektra. Využití nachází ve zjišťování např. struktur DNA aduktů či DNA sekvenování (Goodenough et al. 2007, Tretyakova et al. 2013).

3.3.4. Orbitrap

Tento analyzátor nabízí vysoké rozlišení i vysokou přesnost určení hmoty. Orbitrap je dostupný nejčastěji v kombinaci s kvadrupólem nebo lineární iontovou pastí. Orbitrap je analyzátor odchyťující elektrony, skládá se z centrální a vnější elektrody. Diskrétní balíčky elektronů o specifické energii jsou vneseny mezi tyto elektrody a jsou mezi nimi zachyceny použitím elektrostatického pole. Ionty všech m/z hodnot cirkulují v kruhové orbitě okolo osy z , přičemž frekvence jejich oscilace (ω) je závislá na jejich m/z hodnotách: $\omega = [(z/m) \times k]^{1/2}$, kde k je konstanta závislá na síle pole. Iontové oscilace jsou detekovány jako obraz proudu a do hmotnostního spektra jsou převedeny Fourierovou transformací (Makarov 2000). Orbitrap je výkonný hmotnostní analyzátor vynikající rozlišením, přesností a dynamickým rozpětím. Tento přístroj se díky své vysoké citlivosti skvělému poměru signál/šum hodí např. pro komplexní vzorky obsahující stopové množství DNA aduktů v nadbytku normálních nukleotidů (Sangaraju et al. 2012, Hu et al. 2005, Tretyakova et al. 2013).

3.3.5. Tandemové uspořádání

Tandemové uspořádání (MS/MS) obecně zahrnuje alespoň dvě fáze hmotnostní analýzy buď ve spojení s disociačním procesem nebo chemickou reakcí, která mění hmotnost nebo náboj iontu. Běžně bývá první analyzátor používán k izolaci prekursorů iontu, které jsou potom fragmentovány za vzniku produktových iontů a neutrálních fragmentů. Druhý analyzátor pak tyto produktové ionty analyzuje. Je však možné rozšířit analýzu o další krok selekce iontů ze získaných fragmentů a až poté analyzovat fragmenty posledních selektovaných iontů.

Taková analýza se pak označuje jako MS/MS/MS nebo MS³, přičemž počet kroků může být navýšen na MSⁿ (Hoffmann a Stroobant 2007).

Rozlišujeme tandemovou MS v prostoru a v čase. Tandemová MS v prostoru představuje spojení alespoň dvou hmotnostních analyzátorů. Nejčastěji se používá spojení tří kvadrupólů (QqQ) nebo také kombinace quadrupólu a TOF (QqTOF) nebo dvou TOF (TOF/TOF). Tandemová MS v čase představuje pouze jeden analyzátor provádějící kroky selekce, aktivace i analýzy postupně na jednom místě, například iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) (Gross 2011).

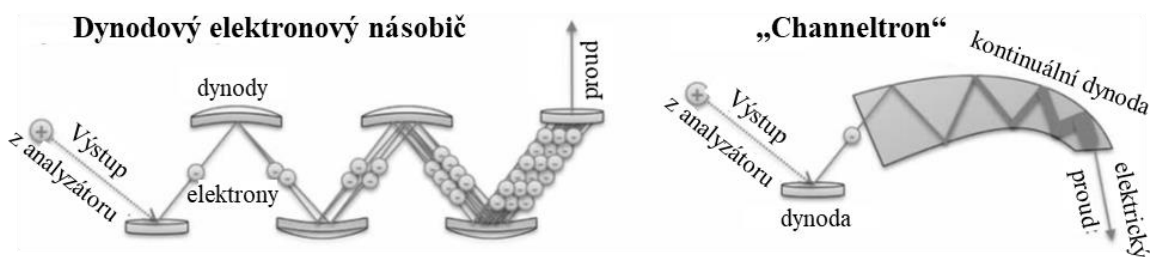
Vývoj vysokoúčinné tandemové hmotnostní spektrometrie společně s ESI či MALDI dal vzniknout jednomu z nejvýkonnějších analytických nástrojů v medicíně, farmacii a dalších vědách. Tandemová hmotnostní spektrometrie je známá jako senzitivní, přesný a univerzální analytický nástroj (Schürch 2016).

3.4. Detektory

Ionty, které prošly hmotnostním analyzátozem jsou následně detekovány a převedeny na signál, který může být zobrazen na monitoru v digitální formě. Detekce iontů je vždy založena na jejich náboji, hmotnosti nebo rychlosti. Iontové detektory mohou být rozděleny do dvou tříd (Hoffmann a Stroobant 2007).

Do první třídy jsou řazeny detektory, které zaznamenávají všechny ionty bez ohledu na m/z. Některé jsou založeny na přímém měření proudu vznikajícího, když iont narazí na povrch a je neutralizován. Příkladem může být Faradayův pohár. Ostatní detektory jsou založeny na přenosu kinetické energie iontů kolizí s povrchem, který generuje sekundární elektrony. Protože množství iontů vycházející z hmotnostního analyzátoru je obecně dost malé, k získání použitelného signálu je nutné podstatné zesílení. Toho může být docíleno pomocí elektronových násobičů, které zesilují elektrony pomocí sady dynod. Další možností je kontinuální dynodový násobič tzv. „channeltron“ (Hoffmann a Stroobant 2007, Friedecký 2012).

Do druhé třídy jsou řazeny detektory schopné zaznamenávat ionty přímo uvnitř analyzátoru pomocí páru kovových destiček umístěných blízko iontových trajektorií. Do této skupiny patří hmotnostní analyzátozem jako je FT-ICR nebo orbitrap. Ionty jsou detekovány jako „proudový obraz“ všech přítomných iontů na připojené destičky. Signál je poté zpracován Fourierovou transformací (Hoffmann a Stroobant 2007, Friedecký 2012).



Obr. 11 Detektory
Přejato a upraveno z: (Friedecký 2012)

3.5. Metody analýzy nukleových kyselin pomocí hmotnostní spektrometrie

První zmínky analýzy monomerů nukleových kyselin sahají až do 60. let 20. století, kdy Biemann a kolegové provedli analýzu nukleosidů a nukleotidů pomocí MS s elektronovou ionizací. Tato technika se ukázala být velmi přesná a citlivá u analýz organických méně polárních látek s nižší molekulovou hmotností, avšak nebyly k dispozici dostatečně šetrné ionizační techniky, které by zvládly analýzu větších, netěkavých a tepelně senzitivních oligomerů. Pokrok byl zaznamenán použitím desorpční ionizace či ionizace rychle rychlými atomy, tyto techniky pomohly určovat sekvence oligonukleotidů až po 10-mery. V 80. letech 20. století byl objeven velký potenciál MS/MS pro určování sekvence oligonukleotidů. Poté již byly představeny MALDI a ESI a započal vývoj moderních výkonných analyzátorů, které značně urychlily pokrok nejen v určování molekulové hmotnosti, ale i detailních struktur. Základní přehled použití ESI a MALDI v analýze nukleových kyselin poskytl Nordhoff (Schürch 2016).

3.5.1. Hmotnostní spektrometrie oligonukleotidů s ionizací elektrosprejem

ESI-MS/MS s využitím trojitého kvadrupólu či FT-ICR jako hmotnostních analyzátorů se využívají mimo jiné k sekvenování oligoDNA či RNA molekul. Díky přesnému určení hmoty je možná i analýza modifikovaných nukleových bází či oligoDNA s methylfosfátovou kostrou. Například s využitím FT-ICR hmotnostního analyzátoru bylo možné určit strukturu DNA 50-meru a přesnou pozici mutace jediné nukleové báze (Little et al. 1995). Tento výsledek byl získán použitím MS/MS či MS³ s použitím infračervené multifotonové disociace (Nordhoff et al. 1996).

Skenovací operační mód ESI-MS s kvadrupólovým analyzátozem se hodí pro přímé spojení s chromatografickou separací či CZE. Nukleázami naštěpené brzlíkové DNA byly pomocí CZE separovány a následně byla provedena detekce všech možných dinukleotidů, což umožnilo odvození vzorců modifikovaných oligomerů až po 5-mery. Dalším příkladem je také analýza rentgenovým zářením poškozených DNA 4-merů. Ty byly analyzovány pomocí HPLC separace s následnou kapilární isotachoforézou a ESI-MS či ESI-MS/MS (Zhao et al. 1995). Vyvolané změny bází tak bylo možno identifikovat i v minoritním zastoupení (Nordhoff et al. 1996).

ESI-MS je také velice vhodná pro studium nekovalentních komplexů zahrnujících nukleové kyseliny, protože poskytuje šetrnou ionizaci přímo z vodné fáze. V tomto případě byly úspěšně analyzovány komplexy dsDNA s antibiotikem distamycinem a několika přechodnými kovy. Dále byly vyšetřeny sekvenční požadavky pro vazbu antibiotika aktinomycinu D na ssDNA pomocí ESI-MS. Zvláštním případem je také analýza komplexů DNA s proteiny (Cheng et al. 1996), např. komplexy mezi ds-oligoDNA nesoucí specifický vazebný motiv pro PU.1 transkripční faktor a proteinem byly úspěšně detekovány i v dvacetinásobném přebytku nespecifických oligoDNA (Nordhoff et al. 1996).

McCloskey a kolegové zavedli metodu analýzy posttranskripčních modifikací v RNA (Kowalak et al. 1993), která je založená na enzymatickém štěpení RNA molekuly, následné HPLC separaci a ESI-MS analýze. Kombinace informací z jednotlivých kroků umožňuje určit lokalizaci dané modifikace. Tato metoda je použitelná pro všechny kovalentní strukturální modifikace zahrnující změnu v molekulové hmotnosti. K určení druhu modifikace je daná frakce z HPLC podrobena enzymatické hydrolýze za tvorby nukleosidů, které jsou poté analyzovány pomocí kapalinové chromatografie spojené s ionizací termosprejem a hmotnostní spektrometrií. Toto uspořádání bylo aplikováno pro určení post-transkripčních modifikací v tRNA a rRNA z různých organismů. Tato metoda byla dále vyvinuta aplikací částečné degradace exonukleáz na frakci oligoRNA z HPLC následované ESI-MS (Nordhoff et al. 1996).

Ze současných metod využívajících enzymatické štěpení je možné zmínit např. charakterizaci krátkých RNA pomocí LC-ESI-MS/MS. Oproti běžným metodám jako jsou DNA čipy, biosenzory, kvantitativní PCR v reálném čase či northern blot, LC-ESI-MS/MS dokáže navíc analyzovat modifikace v krátkých RNA. Touto metodou byly vyšetřovány modifikace v krátkých RNA skládajících se z 16-28 nukleotidů. Po efektivní izolaci a neutrálním štěpení RNA probíhá vlastní LC-ESI-MS/MS analýza. Tato metoda umožnila

detekovat 57 různých typů nukleosidových modifikací a bylo objeveno 24 modifikací v krátkých RNA (16-28 nukleotidů) v lidských buňkách, což nabízí nový rozsah studia funkcí ncRNA u savců. Navíc byl objeven demetylační účinek proteinu FTO (s obezitou asociovaný protein) na methylované modifikace adenosinu v krátkých RNA (Lan et al. 2018).

Dále může být MS využita ke kvalitativní i kvantitativní analýze DNA modifikací jako jsou např. epigenetické methylace či jiné modifikace cytosinu nebo modifikací způsobených karcinogeny či chemickým poškozením DNA zahrnující alkylaci, oxidaci, deaminaci či cross-linking. Konkrétním příkladem pro kvantitativní analýzu může být např. HPLC-ESI-MS/MS, místo ESI může být použita také APCI. Tyto DNA adukty či modifikace mohou způsobovat mutace a hromadění mutací v genech kontrolujících buněčný růst pravděpodobně způsobuje rakovinu. Tvorby DNA aduktů může být tedy využito např. ke kvantifikaci reparačních systémů či k posouzení potenciálu genetického poškození (Tretyakova et al. 2013).

3.5.2. Hmotnostní spektrometrie oligonukleotidů s desorpční laserovou ionizací za účasti matrice

Velký potenciál MALDI-MS pro sekvenování nukleových kyselin byl znám již v devadesátých letech 20. stoléní. Pomocí MALDI-FT-ICR-MS byla určena sekvence šesti nukleotidů v oligodeoxyribonukleotidu. DNA sekvenování bylo prováděno na základě enzymaticky di-deoxyribonukleotidové terminace, kde jsou výsledné produkty separovány elektroforeticky na polyakrylamidovém gelu. Tento proces je velmi časově náročný a zdrojem chyb díky nedostatečné separaci. MALDI-MS byla navržena jako vhodná alternativa (Nordhoff et al. 1996).

Pomocí MALDI-TOF byly sekvence obsahující thymidin nejlépe analyzovány v negativním iontovém módu, navíc bylo možné analyzovat oligonukleotidy do velikosti 20 bází. Poté byla představena 3 - hydroxypikolinová kyselina (3-HPA) jako vhodná matrice pro analýzu DNA v pozitivním iontovém módu, čímž započal rozmach této metody (Wu et al. 1993). Dále se musely řešit problémy jako depurinace delších DNA fragmentů a tvorba aduktů DNA se sodíkem a draslíkem, což vedlo ke zkresleným výsledkům při analýze nad 50 bází. Tento problém se dal řešit několika způsoby, avšak klíčovým řešením bylo přidání amonných iontů při přípravě matrice (Pieleš et al. 1993). Dalším důležitým krokem v rozvoji sekvenování oligonukleotidů bylo jejich částečné naštěpení exonukleázami od 5'- a 3'- konce s detekcí pomocí MS (Nordhoff et al. 1996).

V roce 1995 zaznamenala technika MALDI-TOF značný pokrok integrací zpožděné extrakce, což dramaticky zvýšilo rozlišení hmotnostního spektra (Vestal et al. 1995). Dalším problémem byla analýza mutací – jedno-nukleotidových polymorfismů (SNPs) (Haff a Smirnov 1997). Při hmotnosti molekuly kolem 6000 Da bylo nemožné rozlišit jednu změnu (např. z T na A je změna 9 Da). Toto bylo řešeno použitím několikanásobného prodloužení bází se specifickým zakončením. Tím byly mutační alely odděleny (Little et al. 1997). Po uvedení této techniky byla zahájena kampaň na analýzu mutací pomocí MALDI-TOF-MS. Bylo zjištěno, že SNPs se běžně vyskytují v lidských a dalších genomech. Za poslední desetiletí se MALDI-TOF začal používat i při molekulární haplotypizaci, analýze metylací, expresnímu profilování či detekci mutací (Gut 2004).

3.5.3. Analýza DNA a RNA pomocí MALDI-TOF-MS

Nebuněčná fetální DNA a RNA vyskytující se v plazmě či séru těhotných žen nabízí nové možnosti studia chorob či abnormalit spojených s těhotenstvím. Stejně tak nádorové buňky mohou uvolňovat DNA a RNA, které mohou být použity k diagnózám, prognózám či monitorování. Nicméně tyto DNA a RNA jsou zastoupeny většinou ve velmi nízkých koncentracích, navíc jsou analýzy komplikovány DNA a RNA vypuštěnými z buněk. MALDI-TOF-MS je schopná kvantitativní, specifické a senzitivní analýzy těchto nukleových kyselin (Ding a Lo 2006).

Klinicky významná je detekce fetální specifické DNA a RNA pomocí MALDI-TOF. Například určení fetálního RhD faktoru je užitečné při zacházení s RhD senzibilizovanou těhotnou ženou (Lo et al. 1998). Velké přesnosti bylo dosaženo v klinických podmínkách pro RHD (gen kódující RhD antigen) genotypování (Gautier et al. 2005). Je relativně lehčí detekovat fetální specifické DNA sekvence jako je SRY (gen určující pohlaví na chromozomu Y) a RHD geny, pokud těhotná žena nemá homologní sekvence. V mnoha situacích jako je β -thalasémie nebo cystická fibróza jsou fetální sekvence v přebytku virtuálně identických mateřských sekvencí, kterých může být více než 99 % z celé nebuněčné DNA v plazmě, což ztěžuje detekci fetální DNA. U těchto detekcí je potřeba vyšší specifity, čímž se však snižuje citlivost (Ding a Lo 2006).

MALDI-TOF se začala také široce používat pro genotypizaci mutací – SNPs (Tang et al. 1999). DNA sekvence jsou nejprve amplifikovány pomocí PCR, poté jsou přebytné nukleotidy odstraněny alkalickou fosfatázou. Následuje reakce prodloužení primerů, která umožňuje rozlišit mezi mutovanými a normálními alelami. Primer se váže na DNA hned vedle

místa mutace. Poté je přidána směs di-deoxynukleotidů a deoxynukleotidů, které vytváří s mutovanými alelami produkty s jinou molekulovou hmotností. MALDI-TOF umožňuje velmi přesné určení molekulových hmotností DNA o rozlišení několika Daltonů (Ding a Lo 2006).

Další klinické využití nachází MALDI-TOF např. v určení koncentrace nebuněčné DNA v mateřské plasmě. Například fetální DNA je několikanásobně zvýšena při preeklampsii, která postihuje 6-8 % těhotných žen. Zvýšená nebuněčná DNA byla také zpozorována u jistých aneuploidíí a jiných komplikací spojených s těhotenstvím (Ding a Lo 2006).

3.5.4. Sekvenování oligoRNA pomocí kyselé hydrolýzy a MALDI-TOF-MS

RNA ss i ds oligonukleotidy za přítomnosti silných kyselin (pH 1-2) podléhají hydrolýze fosfodiesterových vazeb na 5' konci ribózy. Tyto degradační produkty mohou být analyzovány pomocí MALDI spojené s Orbitrapem disponujícím vysokým rozlišením. Z rozdílů molekulových hmotností mezi píky může být určena sekvence. Nízká účinnost štěpení na koncích řetězců vede ke vzniku dimerů a trimerů, které mohou být identifikovány pomocí MS/MS. Touto cestou mohou být určovány sekvence ds i ss částí siRNA 21-meru. Tato metoda může být použita i k identifikaci RNA modifikací jako je např. 2'-methoxyribóza na fosfátové kostře (Bahr et al. 2009).

4. ZÁVĚR

Hmotnostní spektrometrie je velmi všestranným analytickým nástrojem používaným v mnoha analytických odvětvích. Vývoj šetrných ionizačních technik jako je ESI a MALDI společně s vývojem moderních hmotnostních analyzátorů umožnil hlubokou analýzu nukleových kyselin. Jednotlivé analyzátory mají své výhody i nevýhody, proto jejich volba závisí také na cílech analýzy. Metody analýz DNA a RNA pomocí MS vynikají oproti jiným metodám vysokou přesností, citlivostí, specifitou, selektivitou, robustností a zejména vysokou rychlostí. Nicméně součástí těchto metod jsou také běžné izolační a purifikační kroky. Podle potřeby je zahrnuto také enzymatické štěpení. MS může být navíc spojena s kapilární elektroforézou či vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, což dodává ještě větší selektivitu a přesnost analýz. Velmi často je používána tandemová MS, která je vhodná pro přesné určení identity a sekvence RNA a DNA molekul. Velké využití nachází v analýze modifikací nukleových kyselin např. v uspořádání HPLC-ESI-MS/MS. Další velmi rozšířená uspořádání s širokým uplatněním jsou např. MALDI-TOF-MS nebo také ESI-TOF-MS. MS nachází celou řadu klinicky významných uplatnění v kvalitativní i kvantitativní analýze DNA i RNA. Typickým příkladem může být průkaz genu či analýza mutací, které často vedou ke vzniku onemocnění.

5. ZDROJE

ADAMSON, Arthur W. and GAST, Alice P. *Physical Chemistry of Surfaces*. 1. vyd. New York: John Wiley & Sons, 1997, 808 s. ISBN: 978-0-471-14873-9.

ADDEPALLI, B.; LIMBACH, P.A.; Mass spectrometry-based quantification of pseudouridine in RNA, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 1363–1372.

ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2004, 740 s. ISBN 80-902906-0-4.

ALPERT, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177–196.

APPELBLAD, Patrik; JONSSON, Tobia; PONTÉN, Einar and Wen JIANG. *A practical guide to HILIC*. Merck SeQuant AB (2008) 29 s. ISBN 978-91-631-8370-6.

ARNOLD, Todd Edward; MEYERING, Mark T. and CHESTERSON, R. S. *Nucleic acid binding matrix*. United States. US 6869532 B2. 3M Incorporated Properties Co, March 2005.

BAHR, Ute, Hüseyin AYGÜN a Michael KARAS. Sequencing of Single and Double Stranded RNA Oligonucleotides by Acid Hydrolysis and MALDI Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 81(8), 3173–3179 (2009) ISSN 0003-2700.

BANERJEE, Shibdas a MAZUMDAR, Shyamalava. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* (2012), 1–40. ISSN 1687-8760, 1687-8779.

BANSAL, Manju. DNA structure: Revisiting the Watson-Crick double helix. *Current science*. 2003, 35 (11), 1556-1563. ISSN 0011-3891.

BASIRI, B.; VAN HATTUM, H.; VAN DONGEN, W.D.; MURPH, M.M.; BARTLETT, M.G. The role of fluorinated alcohols as mobile phase modifiers for LC-MS analysis of oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 190–199.

BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 73(3), 495–504. ISSN: 0175-7598.

BIRNEY, Ewan. Evolutionary genomics: come fly with us. *Nature*. 2007, 450(7167), 184–5. ISSN: 0028-0836.

BLUM, Helmut; BEIER, Hildburg and GROSS, Hans J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987, 8(2), 93–99. ISSN 0173-0835, 1522-2683

BOURCIER, S.; HOPPILLIARD, Y. BELYP DFT molecular orbital approach, an efficient method to evaluate the thermochemical properties of MALDI Matrices. *Int. J. Mass Spectrom.* (2002), 217, 231–244

BOYD, R. K.; BASIC, C.; BETHEM, R. A. Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry. Tools of the Trade V. Mass Analyzers for Quantitation: Separation of Ions by m/z Values; *John Wiley & Sons: West Sussex, England*, 2008; pp 266–301.

BRUINS, A. P. Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications; ESI Source Design; 2. Vyd. Wiley: (2010); pp 123–147.

BUCKINGHAM, L. and FLAWS, M. L. Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications. *F.A. Davis, Philadelphia, Pa, USA*, 2007.

COLE, R. B. (Ed.) Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, Second Edition, *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA* (2010), ISBN: 978-0-471-74107-7

COVEY, Thomas R.; LEE, Edgar D.; BRUINS, Andries P. and HENION, Jack D. Liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. (1986) 58(14), 1451–1461. ISSN: 1061-9348.

DASS, C. Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry. Mass Analysis and Ion Detection; *Wiley-Interscience: New York*, 2001; pp 59–93.

DASS, Ch. Fundamentals of contemporary mass spectrometry, *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA* (2007) ISBN: 978-0-471-68229-5

DAVIDSON COLLEGE. Department of biology – GeneClean *BIO 101*. [online] 1999. [cit. 2019-06-19].

Dostupné z:

<http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/lauren/geneclean.html>.

DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry, Principles and Applications, Third Edition, *John Wiley & Sons Ltd, England*, 2007, ISBN: 978-0-470-03310-4

DING, C. a Y. M. D. LO, MALDI-TOF Mass Spectrometry for Quantitative, Specific, and Sensitive Analysis of DNA and RNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075 (1), (2006) 282–287. ISSN 0077-8923.

DING, Ling-Wen; SUN, Qiao-Yang; WANG, Zhao-Yu; SUN, Yong-Bin and XU, Zeng-Fu. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. *Analytical Biochemistry* [online]. 2008, 374 (2), 426-428 [cit. 2019-03-25]. ISSN 0003-2697. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269707007798?via%3Dihub>

ESSER, K. H.; MARX, W. H. and LISOWSKY, T. Nucleic acidfree matrix: regeneration of DNA binding columns, *BioTechniques*, 39 (2), p. 270–271, 2005.

ESSER, Karl-Heinz; MARX, Wolfram H. and LISOWSKY, T. MaxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods*. 2006, 3(1). ISSN: 1548-7091

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Whitehouse, C. M. Science* 1989, 246, 64.

FRIEDECKÝ, D.; LEMR, K., Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klinická biochemie a metabolismus*. [online] 20 (41). 152-157 (2012). [cit. 2019-06-20] Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>

GAUTIER, E. *et al.*. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192: 666–669 (2005.)

GELPÍ, Emilio. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. (1995) 703 (1-2), 59–80. ISSN: 0021-9673.

GJERDE, Douglas T.; HOANG, Lee and HORNBY, David. *RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography*. 1. vyd. Berlin: Wiley-VCH, Weinheim, 2009, 206 s. ISBN: 978-3-527-62719-6.

GONG, L.; MCCULLAGH, J.S. Comparing ion-pairing reagents and sampledissolution solvents for ion-pairing reversed-phase liquidchromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis ofoligonucleotides, *Rapid Commun. Mass Spectr.* 28 (2014) 339–350.

GOODENOUGH, Angela K., Herman A. J. SCHUT a Robert J. TURESKY. Novel LC-ESI/MS/MS ⁿ Method for the Characterization and Quantification of 2'-Deoxyguanosine Adducts of the Dietary Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridine by 2-

D Linear Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. (2007) 20(2), 263–276. ISSN 0893-228X, 1520-5010.

GRITTI, F.; KAZAKEVICH, Y.V.; GUIOCHON, G. Effect of the surface coverage of endcapped C18-silica on the excess adsorption isotherms of commonly used organic solvents from water in reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 111-124.

GROSS, J. H. Mass Spectrometry, A Textbook, Second Edition, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany*, (2011), ISBN: 978-3-642-10709-2

GUT, Ivo Glynnne,. DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Human Mutation* 23(5), 437–441., 1098-1004 (2004) ISSN 1059-7794

HAFF LA, SMIRNOV IP. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res* 7:378–388 (1997).

HALVORSEN, Matthew; JOSHUA, M. S.; BRODWAY, et all. Diseaseassociated mutations that alter the RNA structural ensemble. *PLoS Genetics* [online]. 2010, 6(8) [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1001074>.

HELLER, Christoph, Principles of DNA separation with capillary electrophoresis. *Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin-Dahlem, Germany*. 22 (4), 629-643 (2001).

HEMSTRÖM, P. and IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* (2006) 29 (12), 1784-1821. ISSN: 1615-9306.

HJERTÉN, Stellan. High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption, *Journal of Chromatography*, vol 347, 1985, 191-198. ISSN: 0021-9673

HU, Qizhi; NOLL, Robert J.; LI, Hongyan; MAKAROV, Alexander. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*. 40 (4), 430–443 (2005). ISSN 1076-5174, 1096-9888.

CHEN, B.; BARTLETT, M.G. Evaluation of mobile phase composition for enhancing sensitivity of targeted quantification of oligonucleotides using ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry: application to phosphorothioate deoxyribonucleic acid, *J. Chromatogr. A* 1288 (2013) 73–81.

CHENG, X.; MORIN, P. E.; HARMS, A. C.; BRUCE, J. E.; BEN-DAVID, Y.; SMITH, R. D. Mass spectrometric characterization of sequence-specific complexes of DNA and transcription factor PU.1 DNA binding domain, *Anal. Biochem.* (1996), 239, 35.

CHOMCZYNSKI, Piotr and SACCHI, Nicoletta. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols.* 2006, 1(2), 581–585. ISSN: 1754-2189.

KIM, J.; PARK, S.; TRETYAKOVA, N. Y.; WAGNER, MOL, C. R. A Method for Quantitating the Intracellular Metabolism of AZT Amino Acid Phosphoramidate Pronucleotides by Capillary High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecular Pharmaceutics* 2 (3). 233-241 (2005).

KNOX, John H. a Richard A. HARTWICK. Mechanism of ion-pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anionic hetaerons. *Journal of Chromatography A* 204, p3–21. (1981) ISSN 00219673.

KOJIMA, Kyoko and OZAWA, Satoshi. *Method for isolating and purifying nucleic acids.* United States. US 2002/0192667 A1. Hitachi Ltd, December 2002.

KOWALAK, J. A.; POMERANTZ, S. C.; CRAIN, P. F.; MCCLOSKEY, J. A. “A novel method for the determination of post-transcriptional modification in RNA by mass spectrometry, *Nucleic Acids Res.* (1993), 21, 4577.

KRUGER, Kelly; GRABOWSKI Paula J.; ZAZG, Arthur J.; SANDS, Julie; GOTTSCHLING; Daniel E. and CECH, Thomas R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell.* 1982, 31(1), 147–157. ISSN: 0092-8674.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food; *Mass Spectrom. Rev.* 2006, 25, 866.

LAN, Meng-Dan, Jun XIONG, Xue-Jiao YOU, Xiao-Cheng WENG, Xiang ZHOU, Bi-Feng YUAN a Yu-Qi FENG,. Existence of Diverse Modifications in Small-RNA Species Composed of 16-28 Nucleotides. *Chemistry - A European Journal.* 24(39), 9949–9956 (2018) ISSN 09476539.

LIFE TECHNOLOGIES, *mirVana™ miRNA Isolation Kit.* [online] 1999. [cit. 2019-06-19]. Dostupné z: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/fm_1560.pdf

- LITTLE D.P.; BRAUN A.; DARNHOFER-DEMAR B, KOSTER H.. Identification of apolipoprotein E polymorphisms using temperature cycled primer oligo base extension and mass spectrometry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35:545–548 (1997).
- LITTLE, D. P.; THANNHAUSER, T. W.; MCLAFFERTY, F. W. Verification of 50- to 100-mer DNA and RNA sequences with high-resolution mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), 92, 2318.
- LO, Y.M. *et al.*. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N. Engl. J. Med.* 339: 1734–1738 (1998).
- MAKAROV, Alexander. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*, 2000 72(6), 1156–1162. ISSN 0003-2700, 1520-6882.
- MANDAL, Maumita and BREAKER, Ronald R. Gene regulation by riboswitches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004, 5(6), 451–63. ISSN: 1471-0072.
- MATEOS-VIVAS, M.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; D. GARCÍA-GOMEZ, CARABIAS-MARTÍNEZ R. Hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the presence of hydrophilic ion-pairing reagents for the separation of nucleosides and nucleotide mono-, di- and triphosphates, *J. Chromatogr. A* 1414 (2015) 129-137.
- MEYER, Veronika R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 3. vyd. Chichester: *J. Wiley & Sons*, 1999. 338 s. ISBN 0-471-98372-1
- MILLER, D. N.; BRYANT, J. E.; MADSEN, E. L. and GHIORSE W. C. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65 (11), 4715-24. ISSN: 0099-2240.
- MOL R.; De JONG G. J.; SOMSEN G. W. On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance. *Electrophoresis*. 26 (1), 146-154 (2005)
- NARGESSI, R. *Magnetic isolation and purification of nucleic acids*. United States. US 6855499 B1. Cortex Biochem, Inc., February 2005.
- NORDHOFF, E. Mass spectrometry of nucleic acids. *Mass Spectrometry Reviews*. 15 (2) 67-138 (1996).

NORDHOFF, E.; KIRPEKAR, F.; KARAS, M.; CRAMER, R.; HAHNER, S.; HILLENKAMP, F.; KRISTIANSEN, K.; ROEPSTROFF, P.; LEZIUS, A. Comparison of IR- and UV-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research* 22 (13), 2460-2465 (1994).

NORKOVÁ, Renáta; JAKLOVÁ Jana; DYTRTOVÁ a KAŠIČKA, Václav. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemické listy* [online]. 2013, 107, 945–955 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013_12_949-955.pdf

PADHYE, Vikas. V.; YORK, Chuck and BURKIEWICZ, Adam. *Nucleic acid purification on silica gel and glass mixture*. United States. US 5658548. Promega Corporation, August 1997.

PERKINS, Thomas T.; SMITH, Douglas E.; LARSON, Ronald G. and CHU, Steven. Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow. *Science*. 1995, 268(5207), 83-87. ISSN: 1095-9203.

PIELES U, ZURCHER W, SCHAR M, MOSER HE. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 21 (14), 3191-3196 (1993).

QUINN, Jeffrey J. and CHANG, Howard Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics*. 2016, 17(1), 47–62. ISSN: 1471-0056.

REN, Y.; ZHANG, J.; SONG, X.; CHEN, X.; LI, D. Simultaneous determination of 50-monophosphate nucleotides in infant formulas by HPLC-MS, *Journal Chromatography Scencii*. 49 (2011) 332-337.

RITTIÉ, Laure a Bernard PERBAL,. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2(1–2), p 25–45 (2008) ISSN 1873-9601.

ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie. Díl 1*. 1. vyd. Brno: Stanislav Rozsypal, 2006, 289 s. ISBN 80-902562-5-2.

SAENGER, Wolfram. *Principles of Nucleic Acid Structure* [online]. New York: Springer-Verlag, c1984, 556 s. [cit. 2019-03-25]. Springer Advanced Texts in Chemistry. ISBN: 978-1-4612-5190-3

SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA, 1 (3), 2001.

SANGARAJU, Dewakar, Melissa GOGGIN, Vernon WALKER, James SWENBERG a Natalia TRETYAKOVA. NanoHPLC-nanoESI⁺-MS/MS Quantitation of *Bis*-N7-Guanine DNA–DNA Cross-Links in Tissues of B6C3F1 Mice Exposed to subppm Levels of 1,3-Butadiene. *Analytical Chemistry*. 2012. 84(3), 1732–1739. ISSN 0003-2700, 1520-6882.

SCHÜRCH, Stefan. Characterization of nucleic acids by tandem mass spectrometry - The second decade (2004-2013): From DNA to RNA and modified sequences: TANDEM MS OF NUCLEIC ACIDS. *Mass Spectrometry Reviews*. 35(4), 483–523 (2016). ISSN 02777037.

SIDDHANT More, Ghodekar SMITA. Hplc – High Performance Liquid Chromatography & Uplc – Ultra Performance Liquid Chromatographic System – A Review On Modern Liquid Chromatography 2018. 13

SIGMON, Janie a. LARCOM. Lyndon L. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1996, 17(10), 1524–1527. ISSN: 0173-0835.

SLATER, Gary W.; KENWARD, Martin; MCCORMICK, Laurette C. a GAUTHIER, Michel G.. The theory of DNA separation by capillary electrophoresis. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (1), 58–64 (2003). ISSN 09581669.

SMISEK, David. L. Capillary electrophoresis with polymeric separation media: Considerations for theory. *Electrophoresis*, 16(1), 1995, 2094-2099. ISSN: 0173-0835

SMITH, Craig E.; HOLMES, Diana L.; SIMPSON, D. J.; KATZHENDLER, Jehoshua; BITNER, R. M. and GROSH, J. C. *Mixed-bed solid phase and its use in the isolation of nucleic acids*. United States. US 2002/0001812 A1. Promega Corporation, January 2002.

STUDIUM BIOCHEMIE. Nukleové kyseliny - Struktura DNA a RNA [online]. 2013 [cit. 2019-07-02]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>

STUDZINSKA, S.; BUSZEWSKI, B. Effect of mobile phase pH on the retention of nucleotides on different stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1663-1672.

STUDZINSKA, S.; ROLA, R.; BUSZEWSKI B. The impact of ion-pairing reagents on theselectivity and sensitivity in the analysis of modified oligonucleotides inserum samples by liquid chromatography coupled with tandem massspectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 138 (2017) 146–152.

- STULTS, John T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Genentech, Inc., South San Francisco, USA*. 5 (5), 691-698 (1995)
- SUNADA, Wade M. a BLANCH, Harvey W. Polymeric separation media for capillary electrophoresis of nucleic acids. *Electrophoresis*. 1997, 18(12–13), 2243–2254. ISSN: 0173-0835.
- SWARTZ, Michael E. UPLC: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. (2005), 28, 1253–1263. ISSN: 1082-6076.
- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie: uchování a exprese genetické informace: učební texty*. 1. vyd. Praha: Medprint, 1997, 92 s. ISBN 8090203620.
- TAN, Siun Chee and YIAP, Beow Chin. DNA, RNA and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2009/574398/>.
- TANG, K. *et al.*. Chip-based genotyping by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10016–10020 (1999).
- THOMSON, B. A. Encyclopedia of Mass Spectrometry. The heated nebulizer LC-MS interface; Oxford, 2007; pp 366–370.
- TRETYAKOVA, Natalia; VILLALTA, Peter W. a KOTAPATI, Srikanth. Mass Spectrometry of Structurally Modified DNA. *Chemical Reviews* (2013), 113 (4), 2395–2436.
- TUYTTEN, R.; LEMIERE, F.; WITTERS, E.; VAN-DONGEN, W.; SLEGGERS, H.; NEWTON, R.P.; VAN-ONCKELEN, H. Stainless steel electrospray probe, A dead end for phosphorylated organic compounds, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 209-221.
- VAN DEN BOOM, D.; BERKENKAMP, S. MALDI. MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. MALDI-MS of Nucleic Acids and Practical Implementations in Genomics and Genetics; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, (2007); pp 131–179.
- VESTAL ML, JUHASZ P, MATRIN SA.. Delayed extraction matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 9. 1044–1050 (1995).
- VONDREJS, Vladimír. *Genové inženýrství III*. 1 vyd. Praha: Karolinum, 2003, 76 s. ISBN 8024605864.

- WAKAMATSU, A.; MORIMOTO, K.; SHIMIZU, M.; KUDOH, S. A severe peak tailing of phosphate compounds caused by interaction with stainless steel used for liquid chromatography and electrospray mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1823-1830.
- WAPINSKI, Orly and CHANG, Howard Y. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends in Cell Biology.* 2011, 21(6), 354–61. ISSN: 0962-8924.
- WILM, M. and MANN, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source, *Analytical Chemistry*, vol. 68, no. 1, (1996). pp. 1–8,
- WU KJ, STEDING A, BECKER CH. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom* 7 (2), 142–146 (1993).
- WU, Yan; ENGEN, John R. and HOBBS, William B. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) further improves hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry.* (2006) 17(2), 163–167. ISSN: 1044-0305.
- ZHANG, G.; WALKER, A.D.; LIN, Z.; HAN, X.; BLATNIK, M.; STEENWYK, R.C.; GROEBER, E.A. Strategies for quantitation of endogenous adenine nucleotides in human plasma using novel ion-pair hydrophilic interaction chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1325 (2014) 129-136.
- ZHAO, Z.; HARMS, A. C.; UDSETH, H. R.; FUCIARELLI, A. F.; SMITH, R. D. “Capillary isotachopheresis-mass spectrometric determination of DNA damage,” *Proc. 43rd ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics*, Atlanta, Georgia (1995) p. 592.
- ZHU, Y. F.; CHUNG, C. N.; TARANENKO, N. I.; ALLMAN, S. L.; MARTIN, S. A.; HAFF, L.; CHEN, C. H. The Study of 2,3,4-Trihydroxyacetophenone and 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as Matrices for DNA Detection in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1996), 10, 383.
- ZIPPER, H. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research.* 32(12). p 103 (2004) ISSN 1362-4962.