

## Optimalizace postupu izolace celkové RNA z tukové tkáně

Lacinová Z., Dolinková M., Haluzíková D., Krajičková J., Haluzík M.

III. interní klinika, 1. LF UK a VFN, Praha

### SOUHRN

**Cíl práce:** Optimalizovat izolaci RNA z tukové tkáně a ověřit její parametry.

**Materiál a metody:** Tuková tkáň (cca 100 mg) byla odebrána pacientům při chirurgických výkonech. Vzorek tkáně byl uchován ve stabilizačním činidle RNAlater. Celková RNA byla izolována následujícími kity: Rneasy Protect Mini, Rneasy Lipid Tissue (QIAGEN GmbH, Německo) a MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) pro přístroj MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Německo).

**Výsledky:** Výtěžky RNA byly při použití Rneasy Protect Mini Kit  $37,5 \pm 20,7 \mu\text{g/ml}$  ( $n = 63$ ), Rneasy Lipid Tissue Kit  $85,9 \pm 36,3 \mu\text{g/ml}$  ( $n = 29$ ), respektive MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue)  $50,6 \pm 13,6 \mu\text{g/ml}$  ( $n = 28$ ). Poměry  $R_{260 \text{ nm}/280 \text{ nm}}$  byly 1,6–2,0. Validace postupů hodnocená prostřednictvím RT-PCR potvrdila podobnou míru schopnosti amplifikace vzorků RNA. Přesnost postupu byla do 7 %. Celková RNA nebyla kontaminována DNA až na vzorky z RNeasy Protect Mini Kit.

**Závěr:** Rneasy Lipid Tissue Kit a MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) splňují požadavky kladené na izolaci RNA z tukové tkáně. Vzorky RNA jsou vhodné pro další zpracování metodami molekulární biologie.

**Klíčová slova:** RNA izolace, beta-2-mikroglobulin, RT-PCR.

### SUMMARY

**Lacinová Z., Dolinková M., Haluzíková D., Krajičková J., Haluzík M.: Optimization of procedure for isolation of total RNA from adipose tissue**

**Objective:** Optimise RNA isolation from fat tissue and verify its parameters.

**Material and Methods:** Adipose tissue (about 100 mg) was collected from patients during surgical operations. Tissue sample was stabilized in RNAlater agent (QIAGEN GmbH, Germany). Total RNA was extracted by following kits: Rneasy Protect Mini, Rneasy Lipid Tissue (QIAGEN GmbH, Germany) and MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) for MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

**Results:** RNA concentrations obtained were as follows: Rneasy Protect Mini Kit  $37.5 \pm 20.7 \mu\text{g/ml}$  ( $N = 63$ ), Rneasy Lipid Tissue Kit  $85.9 \pm 36.3 \mu\text{g/ml}$  ( $N = 29$ ), MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue)  $50.6 \pm 13.6 \mu\text{g/ml}$  ( $N = 28$ ).  $R_{260 \text{ nm}/280 \text{ nm}}$  ratios were 1.6–2.0. Comparison of MagNA Pure and QIAGEN RNA isolation by RT-PCR for beta-2-microglobulin showed similar amplification profiles. Inter- and intra-assay were less than 7%. No DNA contamination of total RNA samples was detected with the exception of samples isolated by Rneasy Protect Mini Kit.

**Conclusion:** Rneasy Lipid Tissue Kit and MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) provide RNA samples of high quantity, purity and PCR amplifiability. RNA samples are reliable for further processing using methods of molecular biology.

**Key words:** RNA isolation, beta-2-microglobulin, RT-PCR.

## Úvod

Experimentální a klinická data získaná v posledních letech pozměnila náhled na tukovou tkáň, která byla donedávna považovaná jen za pasivní zásobárnu energie [1]. Nyní je všeobecně uznáváno, že tato tkáň je metabolickým a endokrinním orgánem, který kromě adipocytů obsahuje tkáňovou matrix, nervová vlákna, stromavaskulární a imunitní buňky [2]. Tuková tkáň vylučuje řadu bioaktivních látek, které se mohou podílet na rozvoji některých chronických onemocnění [3, 4].

Endokrinní funkce tukové tkáně závisí na jejím množství, morfologii (velikost a počet adipocytů), topografii (viscerální a subkutánní tuk) a na genetické informaci uložené v DNA – vliv genových mutací a polymorfismů [2].

Fyziologické a patologické působení některých faktorů v metabolismu tukové tkáně bylo již detailně popsáno, přesto prohlubování dosavadních znalostí může vést ke zlepšení tradičního způsobu terapie některých nemocí. Jednou z metod, kterou lze použít ke stu-

diu bioaktivních molekul, respektive ke studiu míry jejich genové exprese, je polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR). Správné provedení molekulárně biologických analýz je podmíněno, mj. použitím dostatečného množství vysoce kvalitní RNA.

Izolaci RNA z tkání lze provádět ultracentrifugací v prostředí s CsCl po destrukci buněčných membrán guanidinthiokyanátem [5]. Další metodou je extrakce RNA v kyselém prostředí s guanidinthiokyanátem a fenolem [6]. Tento princip využívá i řada kitů, např. TRIzol® (Life Technologies, Německo) nebo Insta-Pure™ (Eurogentec, Německo). Kity firmy QIAGEN kombinují klasickou lysaci buněk v roztoku guanidinthiokyanátu s následnou purifikací přes silikagelovou membránu. K dispozici jsou kromě poloautomatů zcela automatické systémy např. od firmy Roche Diagnostics GmbH (Německo), kde je aplikována vynikající technologie využívající k purifikaci RNA magnetické skleněné mikročástice.

Získat RNA z tukové tkáně, respektive z adipocytů, v dostatečném množství a kvalitě je však spojeno

s různými technickými problémy, které narůstají spolu s rostoucím obsahem triglyceridů v buňkách, což je typický rys u pacientů s morbidní obezitou.

V této práci jsou uvedeny naše dosavadní poznatky o izolaci celkové RNA z tukové tkáně včetně optimalizací protokolů kítů firmy QIAGEN (GmbH, Německo) i kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) pro přístroj MagNA Pure Compact Instrument, Roche Diagnostics (GmbH, Německo).

K validaci postupu izolace RNA z tukové tkáně byla použita RT-PCR pro gen beta-2-mikroglobulinu (B2M).

## Materiál a metody

Pacientům (n = 65) při chirurgických výkonech (operace kardiokirurgická, bandáž žaludku a cholecystektomie) bylo odebráno cca 100 mg tukové tkáně, která byla stabilizovaná v 1 ml RNAlateru (QIAGEN, GmbH, Německo). Vzorek byl skladován při -70 °C. Pacienti byli před výkonem informováni o cílech studie a podepsali informovaný souhlas.

### Homogenizace a izolace RNA

Vzorek tukové tkáně byl před vlastní izolací homogenizován. K homogenizaci byl používán ruční systém (ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> 18 basic, IKA<sup>®</sup> Werke GmbH, Německo) nebo automatický (MagNA Lyser, Roche Diagnostics GmbH, Německo). Po homogenizaci byla RNA extrahována Rneasy Protect Mini Kitem, respektive Rneasy Lipid Tissue Kitem (QIAGEN GmbH, Německo) nebo MagNA Pure Compact RNA Isolation Kitem (Tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Postupy shrnuje tabulka 1. Do doby další analýzy byly vzorky skladovány při -70 °C.

**Table 1.** RNA Procedure isolation from adipose tissue

Kit	Rneasy Protect Mini	Rneasy Lipid Tissue	MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue)
Producer	QIAGEN GmbH	QIAGEN GmbH	Roche Diagnostics
Fatty Tissue (mg)	50–60	70–80	70–80
Lysis Reagent (ml)	RLT* + βME 0.60 + 0.06	QIAzol** 1.20	Tissue Buffer*** 0.60
Homogenization	ULTRA-TURRAX <sup>®</sup> T 18 30 s, on ice	ULTRA-TURRAX <sup>®</sup> T 18 30 s, on ice	MagNA Lyser 5500 rpm, 10s
Extraction	—	chloroform	—
Purification	Rneasy Spin Column	Rneasy Spin Column	Magnetic Glass Particles
Elution (μl)	Rnase-free water 40	Rnase-free water 40	Elution Buffer*** 50

\* guanidine thiocyanate + β mercaptoethanol

\*\* guanidine thiocyanate + phenol

\*\*\* It is not specified by producer.

### Elektroforéza a spektrofotometrie

Celistvost RNA a její kontaminace DNA byly kontrolovány elektroforeticky na 1% agarozovém gelu s ethidium bromidem (1%).

Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometrickým měřením absorbance při 260 nm (BioPhotometr Eppendorf AG, Německo). Optická hustota  $A_{260}=1$  odpovídá 40 μg RNA/ml. Poměr  $R_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$  byl použit k posouzení čistoty vzorků.

### Reverzní transkripce (RT)

Pro přípravu cDNA bylo použito 0,1–1 μg RNA. Syn téza byla provedena soupravou RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Sciences, Lithuania) s oligo(dT)18 primery podle protokolu doporučeného výrobcem. Vzorky cDNA byly naředěny vodou na koncentraci 300 μg/ml a skladovány při -20 °C.

### RT-PCR

Validace postupu izolace celkové RNA z tukové tkáně byla provedena stanovením míry genové exprese B2M metodou RT-PCR v systému se specifickou hydrolyzační sondou, respektive s nespecifickým fluorescenčním barvivem SYBR<sup>®</sup> Green.

RT-PCR s hydrolyzační sondou TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay pro B2M (kat. č. Hs99999907\_m1) a TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG (Applied Biosystems, USA) byla provedena na přístroji ABI 7500 (Applied Biosystems, USA). V reakční směsi byla cDNA (1 μg), TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG (12,5 μl) a hydrolyzační sonda TaqMan<sup>®</sup> (1,25 μl). Celkový objem reakční směsi byl 25 ul. Podmínky reakce byly následující: po iniciační denaturaci při 95 °C, 10 minut následovalo 40 cyklů, kde anealing probíhal při 60 °C 1 minutu a hydrolyza při 95 °C 15 sekund.

V systému s SYBR Green se do reakční směsi přidává cDNA (0,3 μg), Lightcycler FastStart DNA Master SYBR<sup>®</sup> I (Roche Diagnostics GmbH, Německo) a specifické primery pro B2M [7]. Po iniciační denaturaci při 95 °C 10 minut následovala amplifikace cDNA (40 cyklů: denaturace 15 sekund při 95 °C, anealing 5 sekund při 65 °C, extenze 30 sekund při 72 °C). Délka PCR produktu byla 161 bp.

Data byla vyjádřena jako prahové hodnoty ( $C_t$ ), tzn. jako změna fluorescence v reálném čase.

## Výsledky

Výtěžky celkové RNA, poměr absorbance  $R_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$  včetně časové a finanční náročnosti stanovení jsou shrnuty v tabulce 2.

Výtěžky celkové RNA při použití kitu Rneasy Lipid Tissue byly nejvyšší v porovnání s ostatními testovanými kity, respektive byly dvojnásobné v porovnání s kitem Rneasy Protect Mini. Při práci s MagNA Pure Compact RNA Isolation Kitem (Tissue) byl výtěžek RNA ze stejného množství tukové tkáně standardizován (vyjádřeno variačním koeficientem (v. k. 26,5 %) na rozdíl od kítů firmy QIAGEN (v. k. 42,5 %).

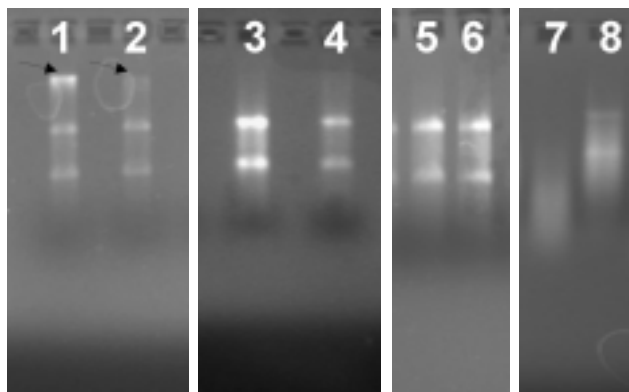
**Table 2.** Evaluation of kits MagNa Pure and QIAGEN RNA isolation

Kit	Rneasy Protect Mini	Rneasy Lipid Tissue	MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue)
Total amount of RNA (ug/ml) <sup>1</sup>	37.5 ± 20.7	85.9 ± 36.3	50.6 ± 13.6
Ratio <sub>260nm/280 nm</sub> <sup>1</sup>	1.94 ± 0.16	1.70 ± 0.10	1.74 ± 0.04
DNA contamination	+	-	-
Total time consumption (min) <sup>2</sup>	120	150	50
Price 1 sample (Kč)	134,-	177,-	250,-
Sample Numbers	63	29	28

<sup>1</sup>Data are mean ± SEM.

<sup>2</sup>Data on time consumption for parallel processing of eight samples.

Ověřování celistvosti molekuly RNA bylo provedeno horizontální elektroforézou (obr. 1). Byl získán typický vzorek izolované celkové RNA, 18S a 28S ribozomální RNA. Vzorky izolované Rneasy Protect Mini Kit měly na gelu viditelnou zónu DNA. Při izolaci MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) byla vidět na gelu stopa degradované molekuly RNA. Při homogenizaci s keramickými kuličkami déle než 5 sekund molekuly RNA degradovaly. Fragmenty RNA jako 5S rRNA nebo tRNA nebyly na gelu určeny.



**Fig. 1.** Horizontal electrophoretic analysis of total RNA samples 5 ug of total RNA were loaded in each lane and electrophoresed on 1% native agarose gels with ethidium bromid, total RNA were extracted with

- a) Rneasy Protect Mini Kit (lanes 1–2);
- b) Rneasy Lipid Tissue Kit (lanes 3–4);
- c) MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) (lanes 5–6);
- d) degraded RNA (lanes 7–8).

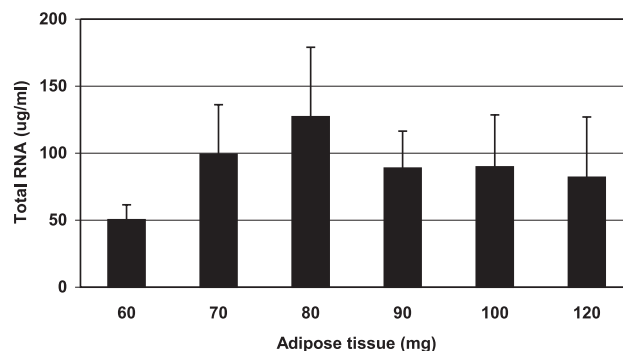
Arrows indicate DNA contamination of RNA samples.

Izolační přístroj po nastavení protokolu, umístění reakční soupravy a plastu pracoval plně automaticky, 8 vzorků izoloval cca 40 minut. Při použití separačních kolonek QIAGEN se pracovalo ručně. Čas analýzy 8 vzorků byl 3krát delší než s přístrojem MagNA Pure Compact Instrument.

Finanční náklady na zpracování jednoho vzorku při použití automatického systému byly o 38 % vyšší než při práci s kitem Rneasy Lipid Tissue. V ceně kitů QIAGEN nebyla zahrnuta položka plastů (špičky, zkumav-

ky), rovněž nebyl zohledněn čas pracovníka, který prováděl analýzu. Cena izolačního přístroje nebyla vyčíslena, protože se jedná o dlouhodobou investici a toto zařízení může sloužit i k jiným účelům včetně izolace DNA z krve [8].

Pro izolaci RNA bylo rozhodující množství použité tkáně, způsob a doba homogenizace, složení, objem lyzačního činidla a také zpracování homogenizátu na koloně QIAGEN nebo přístrojem MagNA Pure Compact Instrument. Podle výrobce je vazebná kapacita kolony pro celkovou RNA 100 µg. V naší práci proto bylo testováno, jaké maximální množství homogenizátu tukové tkáně lze aplikovat na kolonu, aniž by došlo ke snížení výtěžku celkové RNA ze vzorku. Z obrázku 2 je patrné, že 70–80 mg tkáně bylo maximální množství, které lze po homogenizaci nanést na kolonu bez ztráty výtěžku. Pokud se pracovalo s více než 80 µg tkáně, výtěžky RNA se neměnily, nebo byly dokonce nižší. Na izolátoru bylo pracováno se stejným množstvím tkáně, jako při práci se separační kolonou.



**Fig. 2.** Relation between amount adipose tissue used to extraction and total RNA yield obtained by Rneasy Lipid Tissue Kit

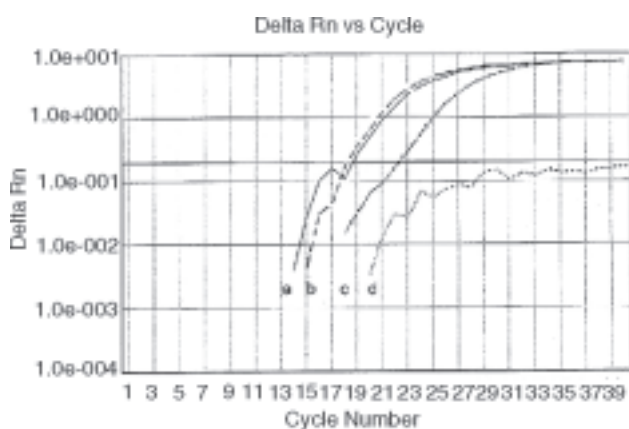
Další faktor, který ovlivňoval kvalitu, respektive kvantitu RNA, bylo složení lyzačních roztoků. Tukové buňky se nejlépe lyzovaly v roztoku QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN GmbH, Německo). Guanidinthio- kyanát, který byl součástí tohoto činidla, lyzoval buňky a inhiboval RNázy, fenol rozpouštěl triglyceridy. Fenol a chloroform, použité v systému, snížily poměr  $R_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$  (viz tab. 2).

Roztok RLT, který je součástí Rneasy Protect Mini Kit, nebyl vhodný k lyzaci tukové tkáně, protože získaná RNA byla kontaminovaná DNA (viz obr. 1). Pro MagNA Pure Compact Instrument byla homogenizace provedena v lyzačním roztoku, který byl součástí soupravy výrobce Roche, respektive v QIAzol Lysis Reagentu; výtěžky RNA ze stejného vzorku byly srovnatelné (v. k. do 15 %).

RNA izolovaná separačními kolonami a automatickým analyzátozem vykazovala stejnou schopnost syntézy cDNA s oligo(dT)18 primery, respektive účinnost reverzní transkriptázy M-MuLV byla stejná při použití 0,1–1,0 µg RNA v reakci; výtěžek cDNA byl 1,6 mg/ml (v. k. 2,6 %).

K validaci izolačních kitů, respektive kvality RNA byla použita metoda RT-PCR pro gen B2M. Míra schopnosti amplifikace RNA, respektive cDNA, a zjištění kontaminací DNA nebo inhibitory bylo provedeno analýzou různých klinických vzorků tukové tkáně.

Srovnání MagNA Pure a QIAGEN izolací prostřednictvím Ct hodnot B2M je uvedeno v tabulce 3. Přesnost ve stanovení byla určena opakovanou analýzou jednoho vzorku tukové káň. Variační koeficienty byly menší než 4 %. Přesnost mezi sériemi byla stanovena analýzou různých RNA, v. k. do 6,6 %. Hodnoty Ct pro kity QIAGEN se lišily o 0,5–1 cyklus. Rozdíl Ct hodnot mezi izolací na separačních kolonách a izolací na magnetických nosičích byl cca 2,5 cyklu. Tento rozdíl byl způsoben částečnou degradací molekuly RNA. Degradované molekuly mají vyšší hodnoty Ct [9]. Profil amplifikace B2M s TaqMan sondou byl stejný pro vzorky RNA získané testovanými soupravami (obr. 3), což potvrdilo jejich podobnou míru schopnosti PCR amplifikace.



**Fig. 3.** Amplification curves of gen beta-2-microglobulin (instrument: ABI PRISM 75000, Applied Biosystems, USA)

- a) Rneasy Protect Mini Kit (solid line curve).
- b) Rneasy Lipid Tissue Kit (dashed line curve).
- c) MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) (dot-and-dashed line curve).
- d) Negativ control – no RNA template in the reaction tube (dot line curve).

**Table 3.** Comparison of MagNa Pure and QIAGEN RNA isolation via RT-PCR for beta-2-microglobulin (instrument: ABI PRISM 75000, Applied Biosystems, USA)

Kit	Rneasy Protect Mini	Rneasy Lipid Tissue (Tissue)	MagNA Pure Compact RNA Isolation
Intra-assay: Ct	19.19 ± 0.75	20.19 ± 0.14	23.41 ± 0.16
Number	5	7	7
Inter-assay: Ct	19.94 ± 0.58	20.68 ± 0.87	23.02 ± 1.52
Number	10	23	42

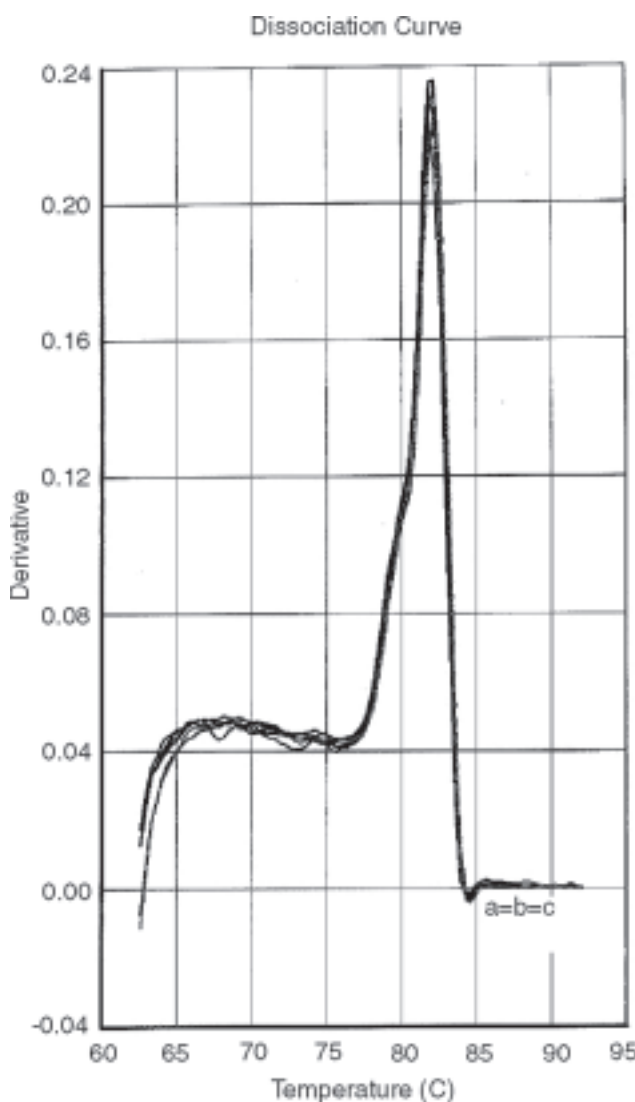
Data are expressed as mean ± SEM.

Na obrázku 4 jsou produkty PCR B2M po amplifikaci s fluorescenčním barvivem SYBR Green. Vzorky RNA z různých izolačních postupů se chovaly i v tomto systému zcela identicky a odpovídaly amplikonu B2M. Výsledek byl potvrzen i křivkou tání (obr. 5).



**Fig. 4.** PCR products beta-2-microglobulin after amplification with SYBR Green I

15 ug of cDNA were loaded in each lane and electrophoresed on 2% native agarose gels with ethidium bromid, total RNA were extracted with a) Rneasy Protect Mini kit (lanes 1–2). b) Rneasy Lipid Tissue Kit (lanes 3–4). c) MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) (lanes 5–6). \*100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA).



**Fig. 5.** Melting curve analysis of gen beta-2-microglobulin (instrument: ABI PRISM 75000, Applied Biosystems, USA)

- a) Rneasy Protect Mini Kit.
- b) Rneasy Lipid Tissue Kit.
- c) MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue).



## Diskuse

Přes obrovský zájem, který se týká studia míry genové exprese bioaktivních látek v tukové tkáni, respektive v adipocytech, jsme se setkali v literatuře pouze s omezeným množstvím publikací zabývajících se problematikou izolace RNA z tukové tkáně [10]. Starší práce vycházejí z publikace Chomczynski P. et al. [6], kde postupy jsou časově velmi náročné, zahrnují řadu precipitačních a centrifugačních kroků, pracuje se s toxickými či karcinogenními chemikáliemi. K získání několika µg celkové RNA je třeba stovky miligramů tukové tkáně [11], která často není k dispozici.

Množství a čistota RNA izolované z tkáně podle našich zkušeností závisí nejen na způsobu homogenizace vzorku a na použité izolační soupravě, ale souvisí také s charakterem těchto vzorků, respektive s obsahem triglyceridů v buňkách tukové tkáně [12]. Při použití Rneasy Protect Mini Kitu, respektive při práci s lyzačním činidlem RLT, byly triglyceridy nedostatečně odstraněny, tuky tuhly při ochlazení společně s adipocyty na povrchu zkumavek, ucpávaly póry separačních membrán, což vedlo nejen k nízkým výtěžkům RNA z tkáně, ale vzorky byly kontaminovány DNA. Takto kontaminované vzorky musí být před jejich využitím metodami molekulární biologie ošetřeny DNAsou I a přečištěny, což vede k dalším ztrátám RNA, zvyšuje cenu a prodlužuje čas stanovení. Naopak vzorky RNA získané soupravami Rneasy Lipid Tissue a MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) měly parametry odpovídající požadavkům RT-PCR. Zjištěné rozdíly v Ct hodnotách B2M při použití uvedených souprav, mohly být způsobeny odlišným principem izolace RNA a způsobem homogenizace. Studium genové exprese metodou RT-PCR je relativně kvantitativní stanovení, tzn. v systému se využívá skutečnosti, že ve vzorku RNA se vyšetřovaný gen i B2M chovají stejně, a proto rozdíl v Ct pro různé izolační postupy nemá vliv na výsledek kvantitativního stanovení.

## Závěr

Rneasy Lipid Tissue Kit a MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) jsou vhodné pro izolaci celkové RNA z tukové tkáně. Vzorky RNA odpovídají potřebám metod molekulární biologie.

RNA získaná systémem MagNA Pure Instrument měla standardní parametry na rozdíl od manuálního zpracování. Při zpracování většího množství vzorků za den je automatický izolační systém prostředkem, který výrazně urychluje zpracování vzorků bez negativního ovlivnění kvality jejich zpracování.

## Literatura

1. **Hauer, H.** The new concept of adipose tissue function. *Physiology & Behavior*, 2004, 83, p. 653–658.
2. **Avram, A. S., Avram, M. M., James, W. D.** Subcutaneous fat in normal and diseased states. 1. Introduction. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2005, 53, p. 663–670.
3. **Avram, A. S., Avram, M. M., James, W. D.** Subcutaneous fat in normal and diseased states. 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2005, 53, p. 663–670.
4. **Kahn, B. B., Flier, J. S.** Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 2000, 106, p. 473–481.
5. **Glisin, V., Crkvenjakov, R., Byus, C.** Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*, 1974, 13, p. 2633–2637.
6. **Chomczynski, P., Sacchi, N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, 162, p. 156–159.
7. **Murphy, R. M., Watt, K. K., Cameron-Smith, D., Gibbons, C. J., Snow, R. J.** Effect of creatine supplementation on housekeeping genes in human skeletal muscle using real-time PCR. *Physiol. Genomics.*, 2003, 15, p. 163–174.
8. **Beránek, M., Voborníková, J., Hypišová, V., Palička, V.** MagNA Pure System for DNA Extraction from Whole Blood. Clinical Verification of Pre-analytical Phase of DNA Testing. *Klin. Biochem. Metab.*, 2005, 13, p. 10–13.
9. **Antonov, J., Goldstein, D. R., Oberli, A. et al.** Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab. Invest.*, 2005, 85, p. 1040–1050.
10. **Tavangar, K., Hoffman, A. R., Kraemer, F. B.** A micromethod for the isolation of total RNA from adipose tissue. *Anal. Biochem.*, 1990, 186, p. 60–63.
11. **Louveau, I., Chaudhuri, S., Etherton, T. D.** An improved method for isolating RNA from porcine adipose tissue. *Anal. Biochem.*, 1991, 196, p. 309–310.
12. **Janke, J., Engeli, S., Gorzelnik, K., Sharma A. M.** Extraction of Total RNA from Adipocytes. *Horm. Metab. Res.*, 2001, 33, p. 213–215.

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZČR č. 8302-5 a výzkumným záměrem MŠM 0021620814.

Do redakce došlo 6. 2. 2006.

Adresa pro korespondenci:  
RNDr. Zdena Lacinová  
III. interní klinika VFN  
U Nemocnice 1  
128 21 Praha 2  
e-mail: lacinova.zdenka@vfn.cz