



Bakalářská práce

Optimalizace izolace plazmidové DNA z autochtonních bakteriálních kultur získaných z reálných vzorků kontaminované podzemní vody

Studijní program: B0114A300075 Přírodopis se zaměřením na vzdělávání

Studijní obory: Přírodopis se zaměřením na vzdělávání
Tělesná výchova se zaměřením na vzdělávání

Autor práce: **Filip Mařas**

Vedoucí práce: Mgr. Iva Dolinová, Ph.D.
Krajská nemocnice Liberec, a.s.

Liberec 2024



Zadání bakalářské práce

Optimalizace izolace plazmidové DNA z autochtonních bakteriálních kultur získaných z reálných vzorků kontaminované podzemní vody

<i>Jméno a příjmení:</i>	Filip Mařas
<i>Osobní číslo:</i>	P20000395
<i>Studijní program:</i>	B0114A300075 Přírodopis se zaměřením na vzdělávání
<i>Specializace:</i>	Přírodopis se zaměřením na vzdělávání Tělesná výchova se zaměřením na vzdělávání
<i>Zadávací katedra:</i>	Katedra chemie
<i>Akademický rok:</i>	2022/2023

Zásady pro vypracování:

V rámci bakalářské práce bude student seznámen s technikou izolace bakteriální DNA. Po teoretickém zvládnutí metody bude cílem bakalářské práce optimalizovat dostupné postupy tak, aby bylo možné izolovat plazmidovou DNA z autochtonních bakteriálních kultur. Doposud používané postupy jsou validované pouze pro plazmidovou DNA z bakteriálních kultur, nikoliv pro vzorky z reálných lokalit. Po získání plazmidové NK bude změřena koncentrace NK a provedena kontrolní amplifikace pomocí PCR reakce.

Používané metody: Izolace NK, měření koncentrace NK, elektroforéza NK, PCR

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace
Rozsah pracovní zprávy: 40 až 50 normostran
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická
Jazyk práce: čeština

Seznam odborné literatury:

1. OTOVÁ, B., et al., 2014. *Lékařská biologie a genetika (I.díl)*. 2. nezm. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2835-6
2. KOHOUTOVÁ, M., et al., 2019. *Lékařská biologie a genetika (II.díl)*. 2. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3790-7
3. PANCZAK, A., et al., 2013. *Lékařská biologie a genetika (III. díl)*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2415-0
4. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7
5. SNUSTAD, D. P. a SIMMONS, M. J., 2017. *Genetika*. 2. aktual. vyd. Brno: Nakladatelství MuniPress. ISBN 978-80-210-8613-5.
6. PRITCHARD, D. J. a KORF B. R., 2013. *Základy lékařské genetiky*. Praha: Nakladatelství Galén. ISBN 978-80-7492-513-9
7. HURYCH, J. a ŠTÍCHA, R., 2020. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák – TRITON. ISBN 978-80-7553-844-4

Vedoucí práce: Mgr. Iva Dolinová, Ph.D.
Krajská nemocnice Liberec, a.s.

Datum zadání práce: 10. října 2022
Předpokládaný termín odevzdání: 22. května 2023

prof. RNDr. Jan Pícek, CSc.
děkan

L.S.

RNDr. Alena Ševců, Ph.D.
garant studijního programu

V Liberci dne 20. října 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci 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.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

Poděkování

V prvé řadě bych rád poděkoval všem kolegům, kteří mi pomohli s realizací této bakalářské práce.

Děkuji vedoucí bakalářské práce Mgr. Ivě Dolinové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při zpracování bakalářské práce a cennou životní příležitost podílet se na významném vědeckém projektu a rozvíjet se v oboru, jemuž bych se rád dále věnoval.

Děkuji odborné školitelce RNDr. Aleně Ševců, Ph.D. za umožnění spolupráce a za podporu při řešení výzkumného projektu.

Dále všem odborným laboratorním pracovníkům, za Technickou univerzitu v Liberci, Mgr. Kristýně Markové, Bc. Denise Sokolové a Mgr. Aday Amirbekovi.

Za Krajskou nemocnici v Liberci zejména Mgr. Elišce Tvrzníkové, dále Ing. Veronice Prouskové, Bc. Márii Pilařové, Ph.D., Ing. Monice Kordíkové, Ing. Janě Rotkové, Ph.D., Ing. Dagmar Polákové, Mgr. Martinu Kracíkovi a Ladislavě Caldové a všem ostatním, s nimiž bylo radostí spolupracovat.

Poděkování náleží i Mgr. Martině Štrojsové, Ph.D., jež mi vřele doporučila kontaktovat paní doktorku Dolinovou, a bez jejíž rady, by moje profesní cesta pravděpodobně směřovala úplně jiným směrem.

Děkuji také všem pedagogům Technické univerzity v Liberci, kteří mě provázeli mým studiem, vážili si mojí píle a snahy a nikdy to se mnou nevzdali.

Na závěr bych chtěl moc poděkovat mým rodičům a spolužákům z univerzity, za obrovskou podporu během celého mého studia, bez níž bych se tak daleko nikdy nedostal.

Práce byla podpořena projektem: Kdo je ten zodpovědný? Propojení přeměny organochlorových sloučenin s konkrétními bakteriálními populacemi (projekt 21-15989S, GAČR) a výzkumnou infrastrukturou NanoEnviCz (LM2023066, MŠMT).

Anotace

Bakalářská práce se zaměřuje na optimalizování metod izolace plazmidové DNA u bakterií degradujících chlorované uhlovodíky. Cílem práce je vyzkoušení standardizovaných a vlastních postupů izolace. Bakteriální vzorky jsou získány filtrací podzemní vody z vrtů kontaminovaných lokalit. Plazmidová DNA je izolována komerčními extrakčními kity. Měření probíhá amplifikační metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Výsledky experimentální části práce ukazují, že použití standardních postupů komerčně dostupných extrakčních kitů je nedostatečné, jelikož extrahují veškerý genetický materiál. Řešení nabízí aplikace enzymu exonukleázy, jenž odstraní lineární chromozomální DNA, zatímco nefragmentovanou kružnicovou plazmidovou DNA zachová.

Klíčová slova

bakterie, DNA, plazmidy, chlorované uhlovodíky, extrakční kity, polymerázová řetězová reakce, amplifikace, spektrofotometrie, elektroforéza, marker, exonukleáza

Annotation

The bachelor thesis focuses on optimizing methods for isolating plasmid DNA in bacteria degrading chlorinated hydrocarbons. The aim of the thesis is to evaluate standardized and custom isolation procedures. Bacterial samples are obtained from filtration of groundwater from wells at contaminated sites. Plasmid DNA is isolated using commercial extraction kits. Measurement is conducted using the real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification method. The results of the experimental part of the thesis indicate that the use of standard procedures with commercially available extraction kits is inadequate because they extract all genetic material. The solution involves the application of the exonuclease enzyme, which removes linear chromosomal DNA while unfragmented preserving circular plasmid DNA.

Keywords

bacteria, DNA, plasmids, chlorinated hydrocarbons, extraction kits, polymerase chain reaction, amplification, spectrophotometry, electrophoresis, marker, exonuclease

Obsah

Seznam obrázků.....	11
Seznam použitých zkratk a symbolů.....	13
ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1. Vznik prokaryotních organismů	16
1.2. Bakterie.....	17
1.2.1. Bakteriální buněčná stěna	18
1.2.2. Metabolismus bakterií.....	18
1.3. Replikace DNA u bakterií.....	19
1.3.1. Transkripce	22
1.3.2. Translace	23
1.4. Horizontální přenos genetické informace u bakterií.....	24
1.4.1. Transformace	24
1.4.2. Konjugace	24
1.4.3. Transdukce.....	24
1.5. Testovací bakteriální druh	25
1.5.1. <i>Chlamydia trachomatis</i>	25
1.6. Sledované bakteriální druhy	26
1.6.1. Dehalococcoides	26
1.6.2. Dehalogenimonas.....	26
1.7. Plazmidy	26
1.8. Replikace plazmidové DNA	28
1.9. Izolace plazmidové DNA.....	28
1.9.1. Metoda rychlého varu	28
1.9.2. Metoda fenol-chloroformové extrakce	29

1.9.3.	Metoda alkalické lýze	29
1.9.4.	Metoda komerčních kitů	30
1.10.	Chlorované uhlovodíky.....	30
1.11.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	33
1.12.	Real-time PCR (qPCR).....	36
1.12.1.	Analýza pomocí hydrolyzačních sond.....	36
1.12.2.	Analýza pomocí hybridizačních FRET sond	37
1.12.3.	Kvantitativní analýza skrze Real-time PCR	37
1.13.	Digitální PCR.....	38
1.14.	Sekvenování DNA	38
1.15.	Gelová elektroforéza.....	40
1.16.	Měření izolované DNA.....	41
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
2.	Metodika	42
3.	Přípravná část.....	43
3.1.	Školení	43
3.2.	Pipetování	45
3.3.	Filtrace vzorků z kontaminované podzemní vody	47
3.4.	Vážení nanovlákných nosičů biomasy	47
3.5.	Polymerázová řetězová reakce (PCR) a kontrola získaných extraktů	48
3.6.	Izolace DNA z granulocytů	49
3.7.	Izolace plazmidové DNA z <i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
3.8.	Izolace DNA z parafinových bločků	51
3.9.	Kolonková izolace DNA.....	52
3.10.	Izolace plazmidové DNA komerčním extrakčním kitem	52
4.	Výsledky a diskuze	54
4.1.	Filtrace a příprava vzorků z kontaminované podzemní vody	54

4.2.	Izolace plazmidové DNA ze vzorku HV-59 filtrA a MV-5-filtrA	54
4.3.	Izolace plazmidové DNA z <i>Chlamydia trachomatis</i>	55
4.4.	Koncentrace a kvalita izolované plazmidové DNA.....	55
4.5.	Izolace plazmidové DNA ze vzorku MV-1D	56
4.6.	Aplikace exonukleázy na vzorky testovacího organismu.....	57
4.7.	Aplikace exonukleázy na vzorky z kontaminovaných lokalit	59
	ZÁVĚR	62
	Seznam použitých zdrojů	63

Seznam obrázků

Obr. 1: Asymetrie v syntéze vedoucích a zaostávajících vláken. Převzato a upraveno (Morgan O. D., 2007)	21
Obr. 2: Transkripce: iniciace. Převzato a upraveno (Forluvoft, 2007).....	22
Obr. 3: Transkripce: elongace. Převzato a upraveno (Forluvoft, 2007).....	23
Obr. 4: Transkripce: terminace. Převzato a upraveno (Forluvoft, 2007)	23
Obr. 5: Proces biodegradace chlorovaných uhlovodíků v půdě. Převzato a upraveno (Dolinová I. et al., 2017)	32
Obr. 6: Princip polymerázové řetězové reakce. Obrázek převzat z (Dolinová I. et al., 2016), původní zdroj (Vierstraete E., 1999).....	35
Obr. 7: Příklad získaných dat metodou qPCR. Převzato a upraveno (Marková K., 2023)	38
Obr. 8: C1000 Thermal Cycler, CFX96 Real-time PCR system (Mařas F., 2022).....	43
Obr. 9: C1000 Thermal Cycler, CFX96 Real-time PCR systém (Mařas F., 2022).....	44
Obr. 10: Standardní vybavení molekulární a genetické laboratoře v laminárním boxu (Mařas F., 2022)	46
Obr. 11: Standardní vybavení molekulární a genetické laboratoře v laminárním boxu (Mařas F., 2022)	46
Obr. 12: Izolace DNA z granulocytů (Mařas F., 2022).....	50
Obr. 13: SD Biosensor – Standard M10 (Mařas F., 2022).....	50
Obr. 14: Výsledky měření koncentrace DNA vzorků z kontaminovaných lokalit (MV-1D-A a MV-1D-B)	57
Obr. 15: Vzorky z nemocnice testovacího organismu po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S	58
Obr. 16: Vzorky z nemocnice testovacího organismu po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S a plazmidový marker Chlamydií	58
Obr. 17: Vzorky z kontaminovaných lokalit po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S a vcrA	59
Obr. 18: Elektroforéza DNA 5366	60
Obr. 19: Elektroforéza DNA 5184	60
Obr. 20: Elektroforéza DNA E328.....	60
Obr. 21: Elektroforéza DNA 5184	60

Obr. 22: Vzorky z kontaminovaných lokalit po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S, vcrA, oriT a trfA..... 61

Seznam použitých zkratek a symbolů

DNA	Deoxyribonucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
RNA	Ribonucleic Acid (ribonukleová kyselina)
GAČR	Grantová agentura České republiky
PCE	tetrachlorethylen
NK	Nucleic Acid (nukleová kyselina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
OH	hydroxyl
SSB	Single-Stranded Binding (vazebný protein jednořetězcové DNA)
pH	Potential of Hydrogen (potenciál vodíku)
Cq/Ct	Quantification Cycle/Threshold Cycle (kvantifikační cyklus/práh detekce)
LED	Light Emitting Diode (světelná dioda)
FRET	Förster Resonance Energy Transfer (energetický přenos rezonance Förstera)

ÚVOD

Izolace plazmidové DNA z komplexních environmentálních bakteriálních vzorků, není dosud standardizovanou a běžně využívanou metodou. Existují komerční firmy, které se zabývají výrobou izolačních kitů, umožňujících izolaci nejrozšířenějších, nejvíce prostudovaných či průmyslově využívaných mikroorganismů.

Absence existence postupů pro izolaci environmentálních vzorků může být pro úspěšné řešení určitých výzkumných projektů limitující.

Jedním z nich je i projekt RNDr. Aleny Ševců, Ph.D. z Technické univerzity v Liberci pod názvem “Kdo je ten zodpovědný? Propojení přeměny organochlorových sloučenin s konkrétními bakteriálními populacemi”, pod zkratkou GAČR 22-00150S.

Existuje více druhů bakterií, jež obsahují enzymy, tzv. reduktivní dehalogenázy, které v anaerobních podmínkách odštěpují atom chloru v jednotlivých biodegradačních krocích u organických chlorovaných sloučenin. Příkladem je pravděpodobný karcinogen tetrachlorethylen (PCE), jež je stále častým kontaminantem půd. Nicméně výsledkem jejich činnosti je mnohdy přeměna těchto sloučenin na ještě více nebezpečné látky, mezi něž patří i hepatotoxický vinylchlorid s prokázanými karcinogenními vlastnostmi. V přírodě byly nalezeny pouhé dva bakteriální druhy, jež zvládají právě poslední biodegradační krok, jímž je rozklad vinylchloridu na ethen, který je na rozdíl od předešlých látek pro živé organismy neškodný.

Vzhledem k tomu, že se v rámci projektu zkoumá přítomnost reduktivních dehalogenáz na plazmidech a možnost přenosu plazmidů mezi bakteriemi pro poslední biodegradační krok, je použití optimálních postupů izolace naprosto klíčové.

Nalezení možností optimalizace dosud používaných postupů, aby bylo možné izolovat plazmidovou DNA z environmentálních vzorků, je proto cílem mé bakalářské práce. Na Oddělení genetiky a molekulární diagnostiky v Krajské nemocnici Liberec budu teoreticky i prakticky proškolen v manipulaci s laboratorní technikou, přípravě vzorků, technikou izolace bakteriální DNA, metodách jejího měření a vyhodnocení. Poté navážu spolupráci s genetickou laboratoří na Oddělení aplikované biologie Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace Technické univerzity v Liberci a ve spolupráci s oběma pracovišti se budu zabývat řešením problematiky.

V teoretické části nejprve představím obecně prokaryotické jednobuněčné organismy a cílené bakteriální druhy. Následně popíšu základní strukturu, metabolismus a způsoby přenosu

genetické informace. Dále charakterizují sledované chemické kontaminanty a na závěr uvedu přehled jednotlivých metod genetické analýzy. V experimentální části provedu filtraci vzorků přes filtrační aparaturu, extrakci plazmidové DNA ze vzorků a měření její koncentrace, kvality a délky plazmidových markerů.

TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Vznik prokaryotních organismů

Život na zemi vznikl před 3,5 až 3,9 miliardami let. Experiment z roku 1953 prokázal, že je možné vytvořit aminokyseliny a sacharidy v prostředí elektrických výbojů ze směsi vodíku, amoniaku, methanu a vody. Mezi výzkumníky je nejrozšířenější názor že prvotní molekulou byla ribonukleová kyselina (RNA), jelikož slouží jako informační molekula a zároveň může disponovat enzymatickou aktivitou. Později byla vytlačena stabilnější molekulou DNA ve funkci informační a bílkovinami ve funkci katalytické.

Zdali byla první primitivní forma metabolismu zajišťovaná bílkovinami anebo informace o sekvenci proteinů pro uchování a replikování zůstává záhadou. Hypotéza, že primitivní formy života byly jednoduché metabolické řetězce uzavřené v membránách je dnes považována za překonanou.

Mezi další pravděpodobnější hypotézy patří vznik života v okolí podmořských průduchů, působení minerálních katalyzátorů (jíly) či přenos života na planetu z jiného místa ve vesmíru v rámci teorie panspermie.

Nejprimitivnější organismy byly pravděpodobně malé jednořetězcové RNA molekuly (viroidy) nebo jiné jednoduché viry složené z proteinového obalu a informační molekuly uvnitř pláště. Schopnost samoreplikace mohla být později ztracena při přechodu k parazitickému způsobu života. První autotrofní organismy se objevily v období zhruba před 3,1 miliardami let a eukaryotické buňky o jednu miliardu let později. Podle endosymbiotické hypotézy došlo ke vzniku částečně semiautonomních organel (mitochondrie, plastidy) vstupem prokaryotní buňky do primitivní eukaryotní buňky. O úplné soběstačnosti nelze mluvit, jelikož se většina jejich genetického materiálu (regulační geny) přesunula do jádra buňky. Zachovali si především geny pro vlastní replikaci nezávislou na chromozomální DNA hostitelské buňky.

Univerzální genetický kód společný všem organismům obsahuje 64 kodonů pro kódování 20 esenciálních aminokyselin. Mezi základní vlastnosti takového genetického kódu spadá degenerace genetického kódu (většina aminokyselin kódována více kodony) a skutečnost, že skupiny kodonů kódujících jednu aminokyselinu se většinou odlišují ve třetí pozici kodonu (Panczak et al., 2013).

Živé soustavy se dnes rozlišují na buněčné a nebuněčné typy. Mezi nebuněčné formy života se dnes řadí virusoidy, viroidy a viry. Soustavy buněčné se dále rozlišují na

mnohobuněčné či jednobuněčné. Podle velikosti a struktury jádra ještě rozlišujeme prokaryotické a eukaryotické buňky. Doména představuje nejvyšší taxon v hierarchické klasifikaci živých soustav. Tato moderní klasifikace byla určena s pomocí analýzy genů rRNA ribozomálních podjednotek eukaryot a prokaryot. V současnosti dělíme organismy do tří domén, Archea, Bakterie a Eukaryota, viry jsou mimo tuto klasifikaci jakožto nitrobuněční parazité. Švédský biolog Carl von Linné založil dodnes používanou binominální nomenklaturu, kdy se odborný název každého organismu skládá z rodového a druhového jména. Na základě společných znaků jsou druhy dále řazeny do dalších kategorií, ve vzestupném pořadí do čeledí, řádů, tříd, oddělení, kmenů, říší a na nejvyšší příčce právě domén (Otová et al., 2014).

1.2. Bakterie

Bakterie je typickým zástupcem prokaryot, dle starší systematiky organismů skládajících se pouze z jedné buňky. Oproti eukaryotům nemá bakterie jadérko ani jaderný obal, pouze chromozom (nukleoid), což dokládá již řecký původ jména znamenající “primitivní jádro”. Nedělí se mitózou, má odlišnou strukturu chromozomů a spřažený transkripční i translační proces. Velikost genomu bakterií se uvádí mezi 0,5 až 10 mega bázemi (Mb)- Význam bakterií ve vnějším prostředí a jejich vliv na lidské zdraví je enormní. První bakterií, jejíž genom byl kompletně prostudován, byla v roce 1995 *Haemophilus influenzae*. Mezi velmi významný modelový organismus genetického výzkumu patří především bakterie *Escherichia coli*, díky které byli popsány mechanismy replikace DNA, transkripce či translace neboli syntézy proteinů

Bakterie jakožto prokaryotní buňky dosahují velikosti kolem jednoho až 10 mikrometrů a jejich struktura je celkově primitivnější oproti eukaryotním buňkám. Rozdíl je dále například ve struktuře biomembrán. Kromě cytoplazmatické membrány chrání cytoplazmu bakterií navíc vnější buněčná stěna z peptidoglykanového polymeru (mureinu), umožňující pobyt v hypotonickém prostředí. Díky rozdílům ve struktuře bakteriální stěny je možné jejich rozlišení pomocí Gramova diferenciálního barvení. Bakterie s liposacharidovým pouzdrém jsou gramnegativní, zatímco s peptidoglykanovou stěnou grampozitivní. Dále mohou bakterie obsahovat dodatečnou polysacharidovou ochrannou kapsulu, na povrchu stěny fimbrie umožňující adhezi na buňku hostitele nebo bičíky zajišťující aktivní pohyb. Rozdílný tvar bakterií (kulovité, tyčinkovité) a jejich počet v kolonii (koky, diplokoky atd.) je důležitým taxonomickým měřítkem. Jelikož bakterie nemají klasický cytoskelet, je jejich chromozom

uchycen pouze v jednom místě cytoplazmatické membrány, které je místem počátku replikace (OriC). Nejvýznamnějšími a takřka jedinými pomyslnými organelami bakterií jsou ribozomy umožňující syntézu proteinů. Skládají se z velké a malé podjednotky, označené pomocí Svedbergovy konstanty na základě sedimentačního koeficientu jako 50S a 30S. Malá podjednotka se dále skládá z jedné molekuly RNA a 21 proteinů. Gen pro tuto molekulu RNA se nazývá 16S rRNA, je přítomen u všech bakterií a využívá se v molekulární diagnostice jako taxonomický marker. Využívá se specifického složení genu obsahujícího konzervované a variabilní úseky. Pomocí sekvence variabilních úseků, ve kterých se mohou hromadit mutace bez vlivu na funkci ribozomu, lze zařadit bakterie do jednotlivých taxonů. Tato metoda má ale i své limity a v některých případech nelze bakterie spolehlivě oddělit.

V neposlední řadě mohou být bakterie vybavené různými chemoreceptory, díky nimž mohou reagovat na vnější i vnitřní podněty. Dodnes bylo popsáno více než 6000 druhů bakterií s nejrůznější úlohou v ekosystémech od degradace a recyklace látek po způsobování nejrůznějších onemocnění. Jejich vznik se datuje před zhruba 3 miliardami let (Kohoutová et al., 2019).

1.2.1. Bakteriální buněčná stěna

Základní stavební látkou buněčné stěny bakterií je peptidoglykan (murein), mřížka peptidicky spojených polysacharidových řetězců. Grampozitivní bakterie mají výrazně větší vrstvu peptidoglykanu ve své stěně, navíc s kolmými řetězci lipoteichoové a teichoové kyseliny. V případě Gramova barvení dochází k jejich zvýraznění do modré fialové barvy, jelikož krystalová violet s jodem neprochází při odbarvení buněčnou stěnou.

Gramnegativní bakterie obsahují zevní fosfolipidovou membránu a slabší vrstvu peptidoglykanu v rámci periplazmatického prostoru mezi vnější a vnitřní membránou. Růžové zbarvení při gramově barvení nastává v důsledku vymytí krystalové violeti s jodem, a následného přidání karbolfuchsinu (Hurych a Štícha, 2020).

1.2.2. Metabolismus bakterií

Mikroorganismy se dělí do několika skupin na základě využívání různých zdrojů energie, molekul pro přenos elektronů v rámci redoxních reakcí (redukční ekvivalenty) a zdrojů uhlíku. Fototrofní mikroorganismy využívají světelnou energii, kdežto chemotrofní energii

chemických vazeb. Litotrofové získávají redukční ekvivalenty z anorganických sloučenin a organotrofní naopak z organických. Recyklaci látek v přírodě zajišťují tři skupiny bakterií.

Heterotrofní bakterie, získávající uhlík z organických sloučenin. Ty mohou být také původci infekčních onemocnění u jiných organismů. Uhlík z oxidu uhličitého během procesu fotosyntézy dokážou vázat autotrofní bakterie. A poslední skupina mixotrofních bakterií dokáže získávat uhlík heterotrofně i autotrofně.

Další důležité dělení bakterií je na základě potřeby kyslíku v procesu metabolismu (aerobní) a nevyžadujících kyslík (anaerobní).

Prototrofní bakterie jsou schopné vytvářet všechny životně nezbytné látky na minimálním množství půdy. Na závěr bakterie, které mohou růst výlučně v prostředí obsahující látku, kterou nedokážou sami syntetizovat, nazýváme auxotrofní.

Nepříznivé podmínky přežívají bakterie v endosporách, jež tvoří prespora s kopií chromozomu a funkčních struktur uvnitř pevného pouzdra (Kohoutová et al., 2019).

1.3. Replikace DNA u bakterií

Jak již bylo řečeno dnešní poznatky o replikaci DNA máme díky studiu bakterie *Escherichia coli*. Komplex proteinů účastnících se replikace nazýváme replisom. Nejprve se při zahájení replikace oddělí jednotlivá vlákna dvoušroubovice DNA v místě zvaném replikační vidlice a semikonzervativní replikací dojde k vytvoření dvou dceřiných kruhových chromozomů v obou směrech od iniciačního místa OriC (origin). Tento replikační počátek obsahuje dvě sekvence. Jednu sekvenci tvořenou trojrepetičním tandemem 13 bp. Složenou především z dusíkatých bází adeninu a thyminu, které se párují dvěma vodíkovými můstky. A druhou sekvencí o čtyřech 9 bp úsecích pro navázání proteinů vázajících DNA s DNA-polymerázou. Replikující se úsek DNA z jednoho místa nazýváme replikonem a místo tvořené dvěma dceřinými dvouřetězci replikační bublinou.

Rozvinutí dvoušroubovice DNA zajišťují DNA helikázy za spotřeby ATP. Topoizomeráza 1 katalyzuje přerušování a opětovné napojení jednoho řetězce, zatímco Topoizomeráza 2 obou řetězců DNA a zároveň jejich otočení. SSB proteiny (Single Strand Binding Proteins) se vážou na jednořetězcovou DNA a brání vytvoření vazby mezi nukleotidy jednovláknové DNA, jež by překáželi její replikaci. DNA-primáza poté zahájí syntézu komplementárního krátkého úseku RNA k DNA původního řetězce neboli primeru.

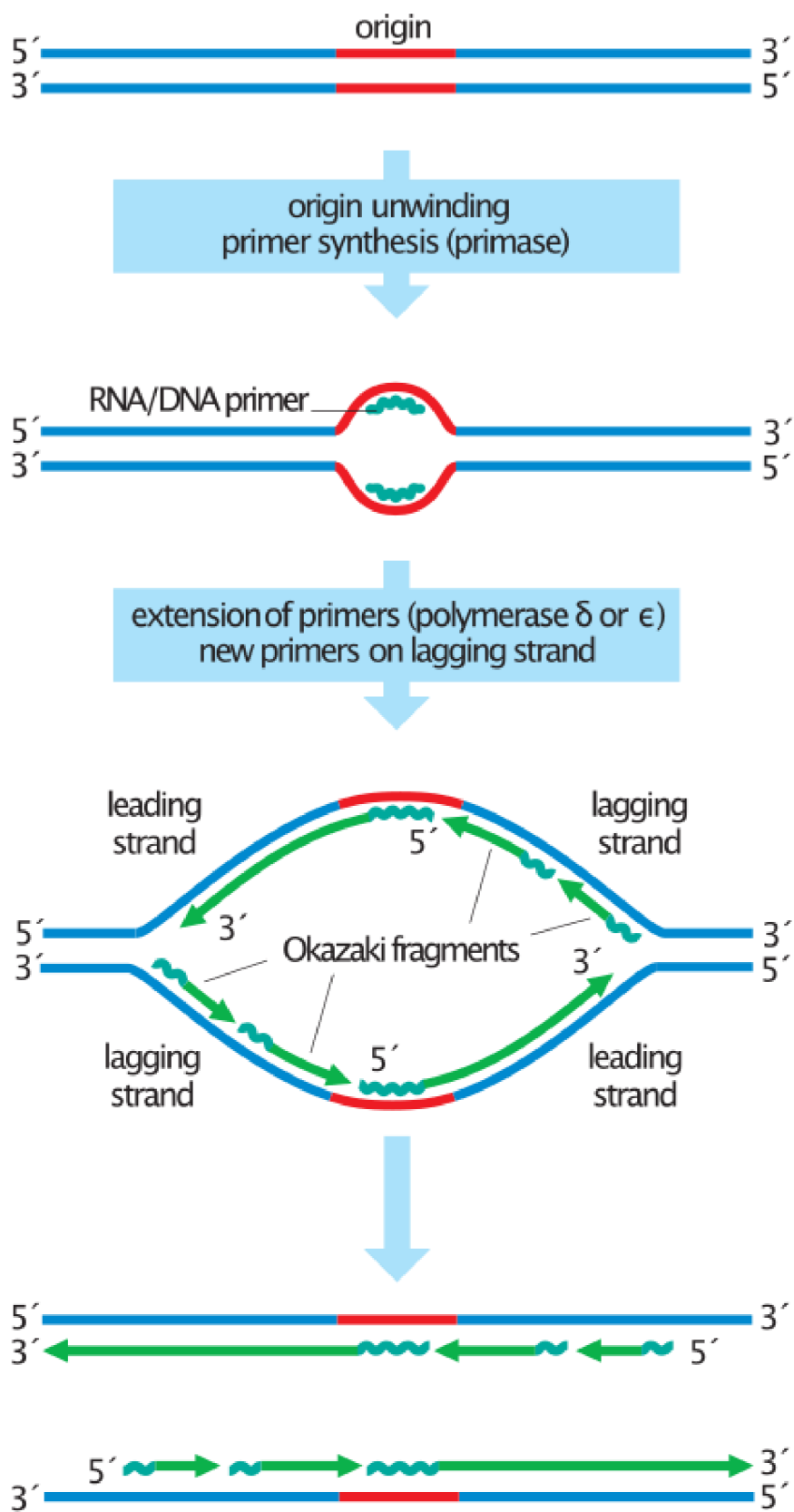
DNA polymeráza 1 (Kornbergův enzym) katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby 3'OH konce primeru a 5' fosfátu deoxyribonukleotidu a jakožto zároveň nukleáza umožňuje opravu poškozené DNA. Uplatnění DNA polymerázy 2 je při replikaci poškozené DNA. Další DNA-polymeráza 3 zodpovídá za semikonzervativní replikaci zabráněním odpoutání DNA polymerázy od templátu, katalýzou napojení trifosfonukleotidů na 3'OH konec a kontrolou správného zařazení nukleotidů v novém řetězci.

Primozomy mají úlohu při tvorbě Okazakiho fragmentů, úseků nově replikované DNA na zpoždujícím se vlákne, které jsou později pospojovány v kontinuální řetězec (Obr. 1).

DNA-polymeráza s exonukleázovou aktivitou vyštípuje primery mezi úseky DNA a dosyntetizovává komplementární řetězec na uvolněné místo s pomocí volného 3'OH konce od předchozího úseku DNA. DNA-ligáza nakonec spojí úseky nového řetězce katalýzou kovalentní fosfodiesterové vazby.

Při konjugaci bakterií se uplatňuje replikace mechanismem otáčející se kružnice, kdy jeden řetězec kruhové DNA (intaktní) slouží jako matrice pro syntézu komplementárního řetězce a druhý řetězec přeruší endonukleáza v místě signální sekvence. Helikáza přeruší vodíkové můstky z vazby s intaktním řetězcem, oddělí 5' konec přerušeného řetězce a 3' OH konec je primerem pro syntézu komplementárního řetězce k matrici s DNA polymerázou 3. Odvíjející se řetězec jednovláknové DNA je v buňce příjemce diskontinuálně doplněn komplementárním řetězcem.

Reprodukční cyklus trvá u každého bakteriálního rodu odlišnou dobu v závislosti na fyziologických aspektech (generační době), optimální růstové teplotě, dostupnosti živin, vnějších podmínek (pH) a přítomnosti inhibitorů (antibiotika, produkty vlastního metabolismu atd.). Za příznivých podmínek trvá reprodukční cyklus u *Escherichia coli* 20 minut, zatímco například *Mycobacterium tuberculosis* 15 až 20 hodin. Ačkoliv se bakterie dělí nepohlavně je u nich možná rekombinace genetického materiálu parasexuálními mechanismy, jako je konjugace, transdukce a transformace (Kohoutová et al., 2019).



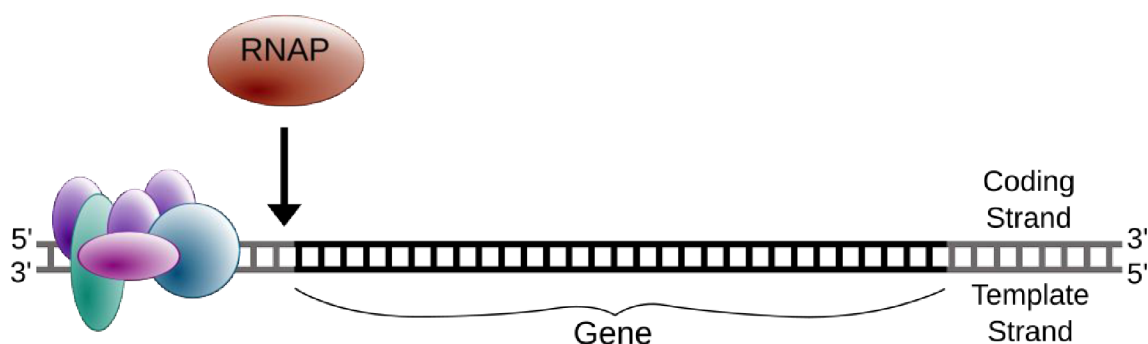
Obr. 1: Asymetrie v syntéze vedoucích a zaostávajících vláken. Převzato a upraveno (Morgan O. D., 2007)

1.3.1. Transkripce

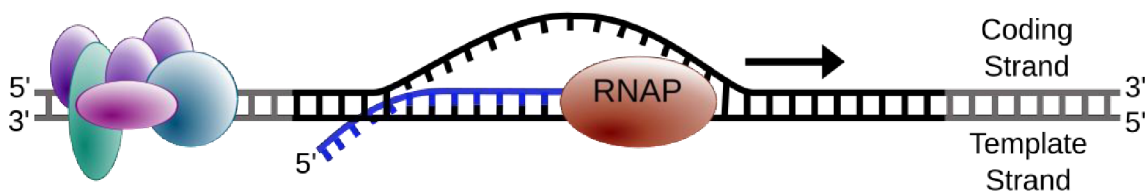
Transkripční jednotkou je segment DNA transkribující se ve formě jedné molekuly RNA, přičemž může obsahovat jeden nebo sérii sousedících genů. Tento proces obsahuje stádium iniciační (Obr. 2), elongační (Obr. 3) a terminační (Obr. 4) podobně jako u eukaryot. U prokaryot je charakteristická syntéza RNAc, jež je katalyzovaná transkriptázou ve směru od 5 do 3 konce.

Prvním krokem transkripce je navázání Sigma faktoru na promotor a kompletace RNA-polymerázy navazujícími polypeptidy. Jejím působením dochází k despiralizování krátkého úseku DNA dvoušroubovice, přerušení vodíkových můstků v tomto místě a vytvoření vazby mezi nukleotidy původní DNA a vznikající RNA. Konsenzuální sekvence jsou dvě konzervované sekvence promotorů prokaryot, které se od těch eukaryotních odlišují uniformní strukturou. Na pozici -10 paměťového řetězce se jedná o takzvaný TATA box (TATAAT), na který se váže Sigma faktor a na pozici -35 Pribnow box (TTGACA), napomáhající rozvinutí a oddělování řetězců DNA.

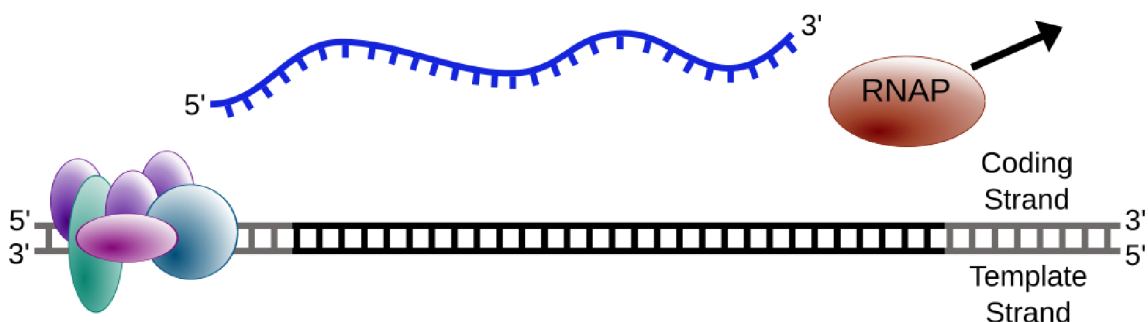
Během elongace dochází k syntéze RNA ve směru od 5' do 3' konce RNA-polymerázou v místě transkripční bubliny. Polymeráza nejprve despiralizuje DNA, dochází ke komplementárnímu nasedání volných nukleotidů, následně ji opět respiralizuje a jejím posunem po vláknu DNA dochází k prodlužování vznikající RNA. Ukončení transkripce dochází působením terminačního signálu (stop kodonu) na mRNA. DNA prokaryot neobsahuje introny a nově vzniklá RNA neprochází dodatečnými posttranskripčními úpravami před translací (Kohoutová et al., 2019).



Obr. 2: Transkripce: iniciace. Převzato a upraveno (Forluvoft, 2007)



Obr. 3: Transkripce: elongace. Převzato a upraveno (Forluvoft, 2007)



Obr. 4: Transkripce: terminace. Převzato a upraveno (Forluvoft, 2007)

1.3.2. Translace

Transkripce i translace probíhá téměř ve stejném čase na stejném místě. Translaci zajišťují ribozomy složené z malých a velkých podjednotek, které se při translaci spojují a po dokončení translace opětovně rozpadají. Pro úspěšnou translaci je nezbytný dostatek energie a všech potřebných aminokyselin. Prvním krokem translace je vznik komplexu ribozom-mRNA po vytvoření peptidové vazby mezi prvními dvěma aminokyselinami nově vznikajícího polypeptidu. Jako první je u prokaryot zařazován formylmethionin (fMet), který bývá později z výsledného polypeptidu odštěpen. Při elongaci dochází nejprve k napojení aminoacyl-tRNA na uvolněné vazebné místo ribozomu, vytvoření peptidické vazby mezi tímto posledním enzymem a aminokyselinou téhož enzymu na vazebném místě ribozomu a jeho posunutí o jeden kodon po mRNA. Zároveň se odpoutá volná tRNA, syntetizovaný polypeptid se z ní uvolní v posledním místě na jiné místo. Poslední aminokyselina polypeptidu, jenž je navázaná z tRNA se přesune z počátečního místa do posledního místa, čímž se prvotní místo uvolní pro vazbu další aminoacyl-tRNA a celý proces se během elongace cyklicky opakuje.

Enzymy potřebné pro získání energie štěpením energeticky bohatých sloučenin katabolickou reakcí u bakteriální buňky jsou tvořeny pouze v případě výskytu využitelného substrátu. Enzymy přenášející a štěpící substrát přes buněčnou membránu se nazývají induktivní a celý regulační proces je indukci. V případě nadbytku látek dochází k potlačení

transkripce genů pro enzymy v mechanismu regulace anabolických reakcí (represe). Regulace genové exprese umožňuje působení pozitivní a negativní kontroly, kdy určitý podnět expresi dalších genů podněcuje či zastavuje. Tuto regulaci v určité metabolické dráze kontrolují dva geny, regulátor kódující protein represor a operátor na nějž se váže. Pokud k tomuto stavu dojde, zabrání navázání RNA polymerázy na promotor strukturních genů a tím zahájení jejich transkripce (Kohoutová et al., 2019).

1.4. Horizontální přenos genetické informace u bakterií

1.4.1. Transformace

Jedná se o aktivní enzymaticky řízený proces s velkou energetickou náročností, u bakterií geneticky vybavených pro tento způsob přenosu. Konkrétně je nezbytná přítomnost kompetenčních proteinů (Com), které příslušný řetězec DNA chrání před degradací a začleňují do chromozomu recipientní buňky. Volná exogenní genetická informace je pohlcena a vmezeřena do vlastního bakteriálního genomu (Snustad a Simmons, 2017).

1.4.2. Konjugace

Genetickou informaci mohou předat pouze bakterie obsahující F faktor, který je předpokladem tvorby fimbrií umožňujících kontakt mezi bakteriemi, díky kterému se vytvoří cytoplazmatický můstek (pilus), přes který dojde k přenosu jednovláknové kopie DNA, jejíž komplementární řetězec se dosyntetizuje v buňce příjemce. Během tohoto procesu dochází často k rekombinaci obou chromozomů (Hfr bakterie = high frequency of recombination). Bakterie se mohou odlišovat v pořadí předávaných genů, jelikož může být faktor inkorporován na odlišná místa chromozomu, přičemž počet předaných a rekombinovaných genů závisí na době konjugace (Kohoutová et al., 2019).

1.4.3. Transdukce

Genetická informace může být také přenesena pomocí bakteriofágů ve formě transdukce. Dělíme ji na generalizovanou, při které je přenášena libovolná část DNA hostitelské

buňky virionem a dále na specializovanou, při níž jsou přenášeny pouze určité části DNA. Tento způsob přenosu je možný pouze v průběhu lyzogenního cyklu reprodukce viru. Působením bakteriofága na bakterii dochází k fragmentaci její DNA, jejíž část se může během komplementace virové DNA či RNA vmezeřit do proteinových obalů nově vzniklého viru a být přenesená do další hostitelské buňky. Jelikož neobsahuje iniciační místo ani počátek pro navázání DNA-polymerázy, nemůže se v přenesené buňce replikovat. K dědičné změně dojde v případě, že se donorová DNA vměstná rekombinací do chromozomu hostitelské buňky (Kohoutová et al., 2019).

1.5. Testovací bakteriální druh

1.5.1. *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis náleží mezi obligátně intracelulární parazity, jelikož sama nedokáže syntetizovat ATP. Onemocnění, která může způsobovat záleží na konkrétním sérotypu, nejčastěji se jedná o oční záněty (trachomy) či uretritidy, které mohou vést až k neplodnosti. Buněčná membrána se podobá částečně membráně gramnegativních bakterií, nicméně neobsahuje peptidoglykan. Kultivace na umělých půdách není možná, používají se proto tkáňové kultury. K diagnostice přítomnosti genů této bakterie slouží metoda PCR z neinvazivního biologického vzorku (Hurych a Štícha, 2020). V dřívějších studiích byla velikost běžného plazmidu udávána na 7,4 kbp a ve formě 10 kopií na jeden 660 bp chromozom (Palmer a Falkow, 1986). Novější studie metodou alkalické lýze a qPCR zjistili velikost tohoto kryptického plazmidu na 7,5 kbp a počet kopií téměř shodný s hodnotou velikosti, tedy až 7,6 kopií na chromozom (Pickett et al., 2005). Ve Švédsku byl zaznamenán výskyt nové varianty sérotypu E této bakterie, s delecí 377 bp plazmidové DNA pro kontrolu průběhu amplifikace (NAATs), u které nebyla možná detekce plazmidu běžnými komerčně molekulárně diagnostickými testy. Následná studie našla vysoce konzervovanou oblast plazmidu CDS2, která je vhodná pro vývoj budoucích diagnostických nástrojů (Seth-Smith et al., 2009).

1.6. Sledované bakteriální druhy

1.6.1. Dehalococcoides

Dehalorespirační bakterie *Dehalococcoides* získávají energii oxidací atomů vodíku spolu s redukční dehalogenací halogenovaných uhlovodíků (dříve halokarbonátů). Jako jediné známé bakterie dokážou redukovat chlorované dioxiny. Největší pozornosti se jim dostává díky jejich schopnosti bioremediace tetrachlorethenu (PCE) a trichlorethenu (TCE) přes dichlorethen (DCE) a vinylchlorid až na neškodný ethen (Cheng a He 2009).

1.6.2. Dehalogenimonas

Jedná se o další druh bakterie schopné bioremediace polychlorovaných alkanů jako je 1,2,3-trichlorpropan (Chen et al., 2022). Prvním izolovanou kulturou a typickým zástupcem je *Dehalogenimonas lykanthroporepellens*, jenž svému pojmenování vděčí za svůj česnekový zápach, který v umělecké beletrii odpuzuje vlkodlaky. Toto aroma vytvářejí sloučeniny (diallylsulfidu, allylmethylsulfidu atd.), při dehalogenaci 1,2,3-trichlorpropanu na allylchlorid (Moe et al., 2009)

1.7. Plazmidy

Bakterie obsahují jeden cirkulární chromozom s mnohonásobně spiralizovanou dvoušroubovicí DNA, uložený v nukleoidu. U některých bakterií, archeí a méně často u některých eukaryot (kvasinky, řasy, prvoci) se v cytoplazmě vyskytuje ještě další typ DNA, který se replikuje nezávisle na chromozomu. Tato DNA je malá, kruhová a nazývá se plazmid. U vybraných druhů bakterií jsou známy i plazmidy lineárního typu, jejichž existence bývá v nejrůznějších zdrojích často opomíjena. Dříve byly označovány jako útvary, jež nejsou pro život bakterie nezbytné, ale dnes je již toto tvrzení značně diskutabilní (Dib et al. (2015).

Plazmidy mohou poskytovat bakteriím řadu pozitivních funkcí zajišťujících selektivní výhodu, dalo by se říct až superschopností, mezi něž spadá rezistence na antibiotika a těžké kovy, produkce toxinů a bakteriocinů, tvorba oxidačních a degradačních látek, adherentních nebo kolonizačních struktur, fixování atmosférického dusíku, vytváření produkci různých pigmentů a tím výčet možností zdaleka nekončí. Tyto vlastnosti se mohou snadno šířit mezi

jednotlivými bakteriemi – uplatňují se totiž při horizontální výměně genetické informace, to znamená, že jsou různými mechanismy předávány mezi bakteriálními buňkami.

Pokud plazmidy obsahují společně s hlavním chromozomem inzertní sekvence (IS), mohou inkorporovat plazmidy do jiných plazmidů nebo do hlavního chromozomu skrze homologní rekombinaci (transpozony). IS elementy mohou obsahovat pouze gen enzymu transponázy a repetitivní koncové sekvence umožňující inzerci transpozonu do řetězce DNA. Inzertní sekvence jsou rozpoznány transponázou a přeruší u nich obě vlákna kruhové molekuly DNA plazmidu včetně hlavního chromozomu, což umožňuje spojení tohoto elementu s hlavním chromozomem nebo plazmidem v rozštěpeném místě. Do chromozomů může být začleněn celý plazmid, pokud transpozony obsahují i strukturní geny, ty se pak nazývají epizomy. Transpozony mohou být zařazeny na různá místa hlavního chromozomu, jelikož obecně obsahují větší počet inzertních sekvencí.

Můžeme rozlišit dva hlavní druhy plazmidů. Fertilní plazmidy (F) kódují proteiny umožňující konjugaci bakterií a tím předání DNA z buňky donorové (dárce, F+) do recipientní (příjemce, F-). Donorové bakterie (F faktor) jsou charakteristické povrchovými fimbriemi (sex pili) umožňujícími konjugaci. Rezistentní plazmidy (R) obsahují geny pro rezistenci vůči různým látkám, nejčastěji antibiotikům. Jelikož tyto plazmidy mívají také F faktor, mohou se předávat konjugací také mezi různými bakteriálními kmeny (Rosypal, 1997).

Plazmidy řadíme mezi replikony, jelikož obsahují jeden replikační počátek (ori). Skládají se většinou z kruhové dvouvláknové spiralizované molekuly dvoušroubovicové DNA, o velikosti od 1,5 do několika set kilo bází (kbp), dosahují tak menších rozměrů než prokaryotický chromozom – v porovnání např. s chromozomem bakterie *Escherichia coli*, s velikostí kolem 4,6 milionů párů bází (OPENAI, ChatGPT-3.5). Velké plazmidy bývají v jedné kopii, zatímco malé ve více kopiích. Počet kopií plazmidu na jeden chromozom bakterie je pro daného hostitele charakteristický a slouží k rozlišení na základě plazmidového čísla (Kaprálek, 1999).

Buňka poskytující jiné buňce část genomu prostřednictvím plazmidu se označuje jako donorová, zatímco buňka přijímající plazmid je recipientní. Nejběžnějším typem přenosu je konjugace u větších plazmidů, která je uskutečňována interakcí specializovaných vláken (pilusů) buňky donorové s proteinovými receptory recipientní buňky (Rosypal, 1997).

1.8. Replikace plazmidové DNA

Replikace plazmidů může být nezávislá na chromozomu bakterií. Zajímavostí je, že příbuzné plazmidy jsou nekompatibilní a jejich udržení v témže hostiteli je tak nestabilní. Velikost plazmidů do značné míry determinuje jejich schopnost konjugace. Plazmidy větší než 40 kbp bývají konjugativní s autonomním kódováním veškerých nezbytných funkcí pro svoji replikaci a dělí se shodně jako chromozom bakterií. Plazmidy menší než 7 kbp tuto schopnost obvykle nemají, dělí se nahodile a jsou závislé na aparátch hostitelské buňky (Julák, 2006).

Replikace plazmidové DNA probíhá nejčastěji posunem replikační vidlice po kružnicové matici, nazývá se tak replikací otáčivou kružnicí. Začíná na replikačním počátku (ori), kde specifický Rep-protein zahájí hydrolýzu jedné fosfodiesterové vazby pozitivního DNA-řetězce, což vede k uvolnění jeho 5' konce a následného vytlačení 3' koncem nově syntetizovaného řetězce prodlužovaného polymerací. Rep protein následně hydrolyzuje další fosfodiesterovou vazbu v terminačním úseku ori, kde je spojen vytlačený pozitivní matricový řetězec s nasyntetizovaným pozitivním řetězcem podle negativního matricového řetězce. Volné konce pozitivních řetězců se nakonec spojí na základě komplementarity katalytickým účinkem DNA-ligázy. Výsledkem je pozitivní kružnicový DNA řetězec a nová molekula plazmidu, jenž může vstoupit do nového replikačního cyklu. Negativní řetězec vytlačeného pozitivního řetězce se dosyntetizuje Okazakiho fragmenty skrze buněčné proteiny a tato komplexní molekula plazmidu se rovněž může dále replikovat. (Rosypal, 1997).

1.9. Izolace plazmidové DNA

Dnes je známo mnoho metod izolace plazmidové DNA, ale všechny mají základní kostru stejnou. Samotnému procesu předchází extrakce bakteriální kultury či kultivace konkrétního druhu, lýze izolovaných bakterií a následná purifikace plazmidové DNA.

1.9.1. Metoda rychlého varu

Již dlouho známou možností izolace plazmidové DNA z bakterie *Escherichia coli* je tzv. metoda rychlého varu. Kultivované bakteriální buňky jsou přeneseny do mikrocentrifugační zkumavky a vařeny po dobu 5 minut při 100 °C. Po ochlazení se odstraní nerozpustná sraženina. Bakteriální RNA je oddělena centrifugací při vysokých otáčkách

(12000g) a následným dvoukrokovým čištěním ethanolem a centrifugací je izolace téměř dokončena. Na závěr je plazmidová DNA získána srážením isopropanem a následným resuspendováním v pufru. Metoda rychlého varu odděluje plazmidovou DNA od chromozomální díky rozdílu ve velikosti a struktuře molekul. Plazmidová DNA je menší a kruhová, což jí umožňuje zůstat v supernatantu po centrifugaci, zatímco větší a lineární chromozomální DNA má tendenci sedimentovat s buněčnými zbytky. (Holmes. a Quigley, 1981). Omezením této metody je přítomnost endonukleázy A u některých bakteriálních kmenů, jenž může i po vystavení varu vydržet aktivní a v součinnosti s ionty hořčíku izolovanou plazmidovou DNA degradovat (ChatGPT-3.5).

1.9.2. Metoda fenol-chloroformové extrakce

Tomu lze zabránit druhou metodou, jenž spočívá ve vystavení buněčného materiálu odsolovacímu činidlu (např. fenol či chloroform). Fenol slouží k denaturaci proteinů a chloroform k odstranění hydrofobních molekul. Centrifugací se oddělí organická a vodná fáze, ve které je izolovaná plazmidová DNA obsažena. Nevýhodou této metody je zejména práce s toxickými látkami, ale také delší doba celého procesu (Beránek, 2016).

1.9.3. Metoda alkalické lýze

Tato metoda je založena na faktu, že většina chromozomální DNA, bakteriálních proteinů a SDS precipituje při neutralizaci silně alkalického roztoku pomocí octanu draselného, kdežto plazmidová DNA zůstává v roztoku.

Bakterie obsahující plazmid jsou kultivovány v tekutém médiu obsahujícím vhodné antibiotikum pro zjištění přežití výlučně buněk obsahujících plazmidy. Vzorek je dále centrifugován, aby se pelety bakteriálních buněk oddělily od kultivačního média. Bakteriální pelety jsou resuspendovány v pufru obsahujícím Tris-HCl, EDTA a RNÁzu. Tris-HCl udržuje stabilní pH, EDTA chelatuje (vytvoření stabilní kruhové struktury) dvojmocné kationty, které jsou esenciální pro stabilitu buněčné stěny a RNÁza degraduje RNA. Resuspendované buňky jsou smíchány s alkalickým pufrem obsahujícím NaOH a SDS (sodium dodecyl sulfát). NaOH narušuje buněčné stěny a denaturuje DNA a proteiny, zatímco SDS solubilizuje (převod do rozpustné formy) buněčné membrány a denaturuje proteiny. Alkalická směs je neutralizována přidáním kyselého pufru, který obsahuje octan draselný. Octan draselný snižuje pH, což vede

k precipitaci denaturovaných chromozomálních DNA a proteinů. Plazmidová DNA zůstává rozpuštěná vzhledem k menším rozměrům a může rychle reasociovat. Směs je centrifugována, aby se oddělily vysrážené materiály (chromozomální DNA, proteiny a buněčné zbytky) od supernatantu obsahujícího plazmidovou DNA. Supernatant obsahující plazmidovou DNA je pečlivě odsát, aby se minimalizovala kontaminace vysráženým materiálem. Plazmidová DNA v supernatantu je precipitována (vytvoření sraženiny) přidáním isopropanolu nebo ethanolu. DNA je pak získána centrifugací. DNA pelet je opláchnut ethanol, aby se odstranily zbytky solí a dalších nečistot. Po odstranění ethanolu je DNA pelet vysušen a následně rozpuštěn ve vhodném pufru, kterým je například TE pufr nebo voda (Birnboim a Doly, 1979).

Obecně lze říci, že je tato metoda rychlá a účinná (Green a Sambrook, 2012).

1.9.4. Metoda komerčních kitů

Dnes již existuje velké množství výrobců komerčních izolačních kitů pro plazmidovou DNA, které obsahují veškeré potřebné reagenty (lyzační, promývací i eluční pufr). Nukleové kyseliny jsou v jednotlivých krocích adsorbovány na svrchní vrstvě modifikovaného silikagelu, díky čemuž lze odstranit nepotřebný sediment až do posledního kroku. Celý extrakční proces je díky plné automatizaci časově nejefektivnějším v porovnání s ostatními metodami, ale za cenu vyšších finančních nákladů (Beránek, 2016).

1.10. Chlorované uhlovodíky

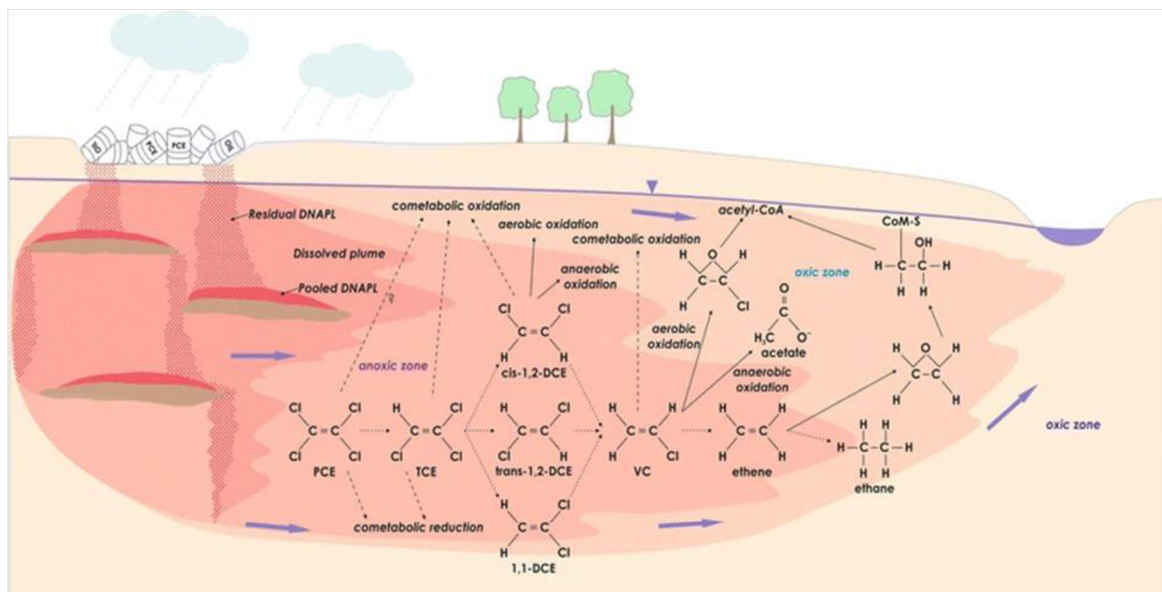
V životním prostředí dnes chlorované uhlovodíky, zkráceně CIU, zaujímají přední místo na stupnici nejrozšířenějších kontaminantů, v důsledku jejich nezodpovědného využívání. Dominantní postavení má zejména tetrachlorethylen (PCE), často nazýván též jako perchlorethylen, a trichlorethylen (TCE), sloužící jako rozpouštědla, odmašťovadla a čisticí prostředky. Obě látky jsou kvůli svým hydrofobním vlastnostem nerozpustné ve vodě a pronikají do značných podzemních hloubek (Dolinová, 2018). Aktuálně nejefektivnější metodu jejich odstraňování z kontaminovaných lokalit, je kombinace chemických i biologických prostředků. S pomocí nástrojů molekulární genetiky pak lze průběh celé biodegradční reakce monitorovat, predikovat budoucí vývoj a upravit jej na základě výsledků pro zefektivnění sanačního procesu.

Často se lze v podzemní vodě kontaminovaných lokalit setkat i se sekundární kontaminací, způsobenou při rozkladu perchlorethylenu na dichlorethylen a trichlorethylen na vinylchlorid, jenž dosahují oproti těm původním podstatně vyšší toxicity (Obr. 5).

Proces biodegradace probíhá nejčastěji anaerobní cestou, ale ani aerobní podmínky nejsou vyloučené. Za anaerobních podmínek se PCE a TCE přeměňuje dichlorethylen, dále na vinylchlorid až nakonec do podoby etylenu, metabolickými procesy různých bakteriálních společenstev, na základě vlastností konkrétního prostředí. Chlorované uhlovodíky přijímají za anaerobních podmínek elektrony, zatímco v aerobní režimu je odevzdávají. Využití autochtonních bakteriálních kultur, je nejen levnější, oproti aplikaci chemického sanačního prostředku, ale také environmentálně šetrné, což lze molekulárně-genetickými metodami vizualizovat. Aby mohla reduktivní dehalogenace proběhnout, je nezbytný zdroj elektronů (vodíku) z fermentace organických látek. Atomy vodíku jsou odevzdávány chlorovaným uhlovodíkům a uvolněná reakční energie slouží bakteriím k růstu. Biogeochemické procesy a množství lokálního vodíku rychlost procesu ovlivňují. (Dolinová et al., 2016) Snížením rychlosti nebo jen částečnou dechlorací či jejich oboustrannou kombinací dochází k hromadění toxických meziproductů, které dokážou degradovat na méně škodlivý ethen zatím jediné dva rody kmene Chloroflexi, a to *Dehalococcoides* a *Dehalogenimonas* (Czinnerova et al., 2022). Jiné druhy, jako *Dehalobacter spp.*, *Desulfitobacterium spp.* apod. degradují pouze specifický chlorovaný uhlovodík. Aerobní degradaci vinylchloridu, působením enzymů mono- a dioxygenázy, zvládne větší množství bakteriálních druhů, mezi ty významné uvedme *Mycobacterium sp.* a *Pseudomonas aeruginosa*, nicméně při ní existuje riziko těkání halogenových uhlovodíků do vnějšího prostředí.

Výhodná pro okolí, ale méně pro bakterie samotné, je kometabolická biodegradace chlorovaných uhlovodíků, které vstupují do zcela odlišných bakteriálních metabolických drah, a jsou tak degradovány zároveň např. se sírou, železem atd. Z této degradace CIU nezískávají bakterie žádnou energii a jakmile se výrazně sníží koncentrace primárního substrátu (toluen, methan apod.), celý kometabolický proces se zastaví. (Dolinová et al., 2016). Výsledky posledních studií uvádějí, že aplikace substrátů s organickými zdroji uhlíku (glycerolu, syrovátky, emulze rostlinných olejů atd.) významně zvyšuje proces redukční dechlorace. Je to dáno jeho vysokou spotřebou kyslíku (CHSK, 950 g/l), obsahem prospěšného organického uhlíku, emisemi iontů vodíku a nízkou pořizovací cenou. (Czinnerová et al., 2022). Pro odběr a izolaci bakteriálních DNA vzorků z podzemní vody byly vyvinuty speciální nanovláknové nosiče biomasy, které jsou umístěny v podzemních vrtech kontaminovaných lokalit (Dolinová, 2018). Ve svém experimentu se pokusím izolovat plazmidovou DNA s pomocí druhé varianty,

kteřou je filtrace dovezené vody ve vysokokapacitních ampulích přes filtrační papír s pomocí filtrační aparatury.



Obr. 5: Proces biodegradace chlorovaných uhlovodíků v půdě. Převzato a upraveno (Dolinová I. et al., 2017)

1.11. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je dnes nejužívanější metodou genetické analýzy skrze amplifikaci specifických úseků DNA, jelikož je levnější oproti ostatním metodám a umožňuje analýzu z velmi malého množství vzorku.

Pro provedení standardní reakce je zapotřebí několika základních složek. V první řadě templátová DNA, ve které je obsažena cílová sekvence. Její množství by se mělo pohybovat mezi 25 až 100 ng na 100 μ l směsi, ale lze teoreticky použít jeden jediný pikogram.

Další komponentou jsou oligonukleotidové primery, jednovláknové molekuly DNA (ssDNA) o délce přibližně 20 nukleotidů, jež vymezují úsek pro amplifikaci. Jsou zapotřebí dva, po rozvolnění DNA kódující (forward/upstream) primer, vázající se na počáteční úsek 5' konec cílového úseku DNA a antikodující (reverse/downstream) primer, který se váže na opačný 3' konec. Je nezbytná jejich komplementarita k úsekům protilehlých vláken DNA, ale zároveň je nekomplementarita 3' konců obou primerů, jinak by došlo ke tvorbě jejich dimerových molekul. Důležitá je rovněž teplota nasedání na templátovou DNA, jež by se mezi nimi neměla lišit o více než 2 $^{\circ}$ C.

Enzym, bez kterého by tato metoda nemohla fungovat a jenž prošel dlouhou historií vývoje je DNA-polymeráza, která syntetizuje nový komplementární řetězec k původnímu. Na začátku vývoje se používali termolabilní polymerázy, které jak již název napovídá, při teplotách převyšujících 37 $^{\circ}$ C nevratně denaturovali. Řešením se nakonec stali termostabilní polymerázy. Nejrozšířenější termostabilní *Taq* DNA polymeráza I byla vyvinuta z bakterie *Thermus aquaticus* z gejzírních pramenů národního parku Yellowstone. Mezi její významné katalytické inhibitory náleží alkoholy, heparin, fenol, melanin či dokonce chlorofyl a jiné huminové látky. Důvodem, proč je její použití v rámci PCR výhodné, je absence 3' – 5' nukleázové aktivity, zvyšující polymerační rychlost a využitelnost modifikovaných nukleotidů. Její optimální pracovní teplota se udává 72 $^{\circ}$ C a při teplotě 95 $^{\circ}$ C, sloužící k rozvolnění templátu DNA, klesá její biologický potenciál až po 40 minutách. Při denaturačních krocích do 60 sekund, v závislosti na době ohřevu reakčního plastového podkladu a délky budoucího produktu, je tak její aktivita po 40 opakujících se reakcích stále zachována. Není tak nutné dodatečně přidávat enzym, čímž se riziko nechtěných kontaminací významně snížilo. Charakteristický profil tří teplot u PCR vznikl navíc potřebou hybridizace primerů při teplotě mezi 50 až 65 $^{\circ}$ C. Mezi další používané termostabilní polymerázy s vysokou přesností patří její modifikovaná verze fragment Stoffelové, Tth polymeráza z bakterie *Thermus thermophilus* a Pfu polymeráza z

Pyrococcus furiosus. Složité úseky DNA řeší Bst polymeráza z bakterie *Bacillus stearothermophilus* a funkci reverzní transkripce umožňuje *Tth* polymeráza z *Thermus thermophilus*.

Reakční pufrы mají významnou roli pro udržení optimálního pH, stabilizaci teploty, udržení iontových sil a ochraně DNA polymerázy před degradací. Podobné účinky mají i soli s monovalentními kationty.

Deoxynukleotidtrifosfáty (dNTPs) jsou substrátem pro DNA-polymerázu. Právě z nich vznikají nová amplifikovaná vlákna DNA. Pokud jich je v reakční směsi nadměrné množství, paradoxně snižují přesnost DNA polymerázy, čemuž se lze vyvarovat vyšší koncentrací hořečnatých kationtů. Bývají jimi chlorid nebo síran hořečnatý a kromě toho, že aktivují činnost polymerázy, pomáhají také stabilizovat vazebnou interakci primerů s cílovou DNA.

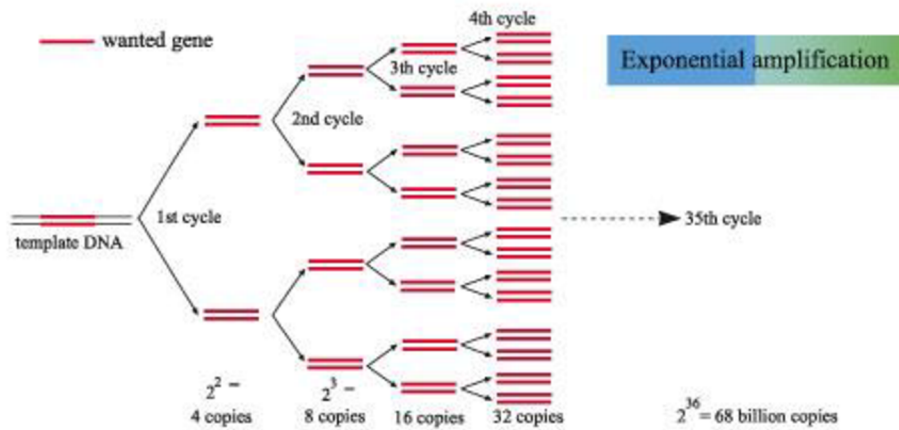
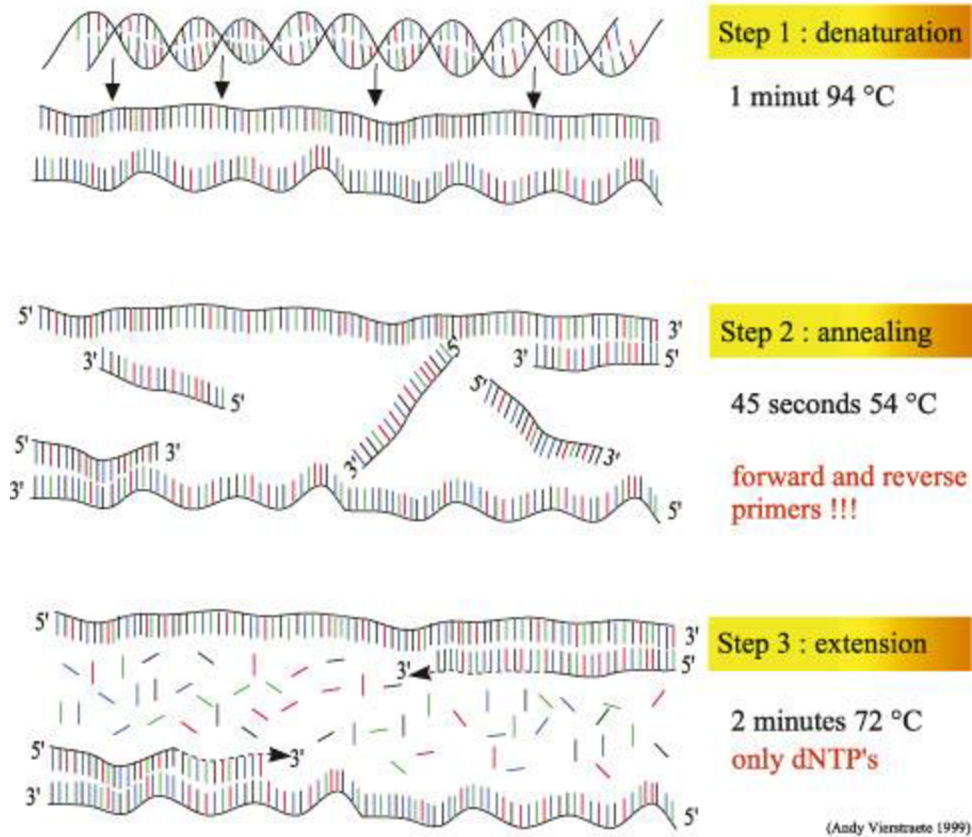
Nakonec bývají součástí reakce aditiva snižující hromadění nukleových kyselin na povrchu zkumavek, látky dekontaminační a snižující teplotu tání dvouřetězcové DNA.

Amplifikace probíhá opakujícími se cykly v přístroji termální cycler, skládajících se z denaturace DNA, připojení primerů a elongace. První přístroje fungovaly na principu enzymatické aktivity termolabilních polymeráz a dvou vodních lázní (denaturační a polymerační). Pokročilejší systémy umožnili používání topné spirály, ale bylo nutné na víčkách zkumavek aplikovat minerální oleje, které bránili výparu směsi a kondenzaci par na víčkách při vysokých teplotách. S nástupem termostabilních polymeráz došlo vlivem konstrukčních změn k výraznému usnadnění práce a zkrácení doby celé reakce (Beránek, 2016).

Celý proces PCR popisuje přiložený obrázek (Obr. 6). Nejprve je vzorek DNA zahřát na teplotu 94°C k přerušení vodíkových vazeb v řetězci a rozvolnění dvoušroubovice. V dalším kroku dojde ke snížení teploty na zhruba 60°C pro připojení komplementárních primerů k 3' konců obou vláken templátové DNA. V závěrečném procesu elongace DNA-polymeráza syntetizuje nový řetězec za ideální teploty pro danou polymerázu (72 °C pro *Taq*). Po tomto cyklu, který časově trvá do jedné minuty, dochází ke zdvojnásobení množství dané DNA a celý proces se opakuje do vyčerpání zdrojových složek (Kohoutová et al., 2019). Takto lze amplifikovat i sekvence RNA jsou-li převedeny s pomocí reverzní transkriptázy do cDNA replikátů. Nevýhodou této metody je omezená velikost templátu, nutnost znalosti ohraničujících úseků amplifikace, absolutní čistota vzorku a absence jakékoliv opravy chyb (Pritchard a Korf, 2013).

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Obr. 6: Princip polymerázové řetězové reakce. Obrázek převzat z (Dolinová I. et al., 2016), původní zdroj (Vierstraete E., 1999)

1.12. Real-time PCR (qPCR)

Real-time PCR umožňuje využití interkalačních barviv, hydrolyzačních nebo hybridizačních sond pro pozorování procesu a výsledku v reálném čase. Je dokonce možné fluorescenční značení primerů, a využít tak možnosti “dva v jednom”. Nejběžněji využívaná interkalační barviva jsou SYBR Green, Ethidiumbromid, Amplifluor a v poslední době zejména EvaGreen. Jejich předností je nižší cena a univerzální použití za cenu nižší specifčnosti, v případě kontaminace nespecifickými produkty, jelikož se vážou na veškerou dsDNA.

Sondy rozlišujeme hydrolyzační a hybridizační. Hydrolyzní sondy (TaqMan) využívají specifickou sekvenci nukleotidů, která hybridizuje s cílovou DNA nebo RNA během PCR. Hybridizační sondy FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) fungují jako molekulární majáky na principu změny struktury při hybridizaci s cílovou sekvencí.

Mezi přístrojové vybavení patří termocykler, zdroj záření a detektor zaznamenávající fluorescenčně excitující se fotony. Pro přesnou regulaci teploty z topné spirály, halogenové lampy nebo dnes používaného termobloku a LED lampy, postačuje chlazení nasávaným vnějším vzduchem. (Beránek, 2016).

1.12.1. Analýza pomocí hydrolyzačních sond

Při této metodě je využita jednořetězcová komplementární sonda, která má na 5' konci kovalentně umístěný fluorescenční zářič a na 3' konci zhášec. Zhášec zachycuje excitované elektrony světelného zdroje (nejčastěji LED dioda), aby zabránil detekci signálu detektorem v případě celistvé sondy. Mezi zhášecem a zářičem dochází k velmi krátkému nezářivému přenosu energie, což je označováno jako FRET (fluorescence resonance energy transfer). DNA polymeráza během elongace odštěpí 5' konec sondy, čímž uvolní zářič do roztoku. Uvolněný zářič při excitaci elektrony vyzařuje fotony specifické vlnové délky, které jsou zachyceny detektorem. Sondy jsou složeny z 20–30 nukleotidů, s nadpolovičním obsahem guaninu a cytosinu. Jejich teplota tání by měla být vyšší zhruba o 5 °C oproti oběma primerům, aby byla účinnost hydrolyzy maximální. Dnes se pro jejich lepší vlastnosti často aplikují syntetické deriváty z peptidových nukleových kyselin (PNA) nebo locked nucleic acids (LNA), které zvyšují teplotu tání sond o 6–8 °C, což umožňuje používat kratší sondy. Annealing i polymerace probíhá při stejné teplotě a délka výsledných ampliconů se pohybuje mezi 100 a 300 bázemi (bp).

System Universal ProbeLibrary nabízí trochu odlišný princip, obsahující 165 hydrolyzačních sond dlouhých 8–9 nukleotidů. Tento počet nukleotidů je dostatečný, aby se sondy hybridizovaly na jedinečných pozicích v genomu vůči primerům. (Beránek, 2016).

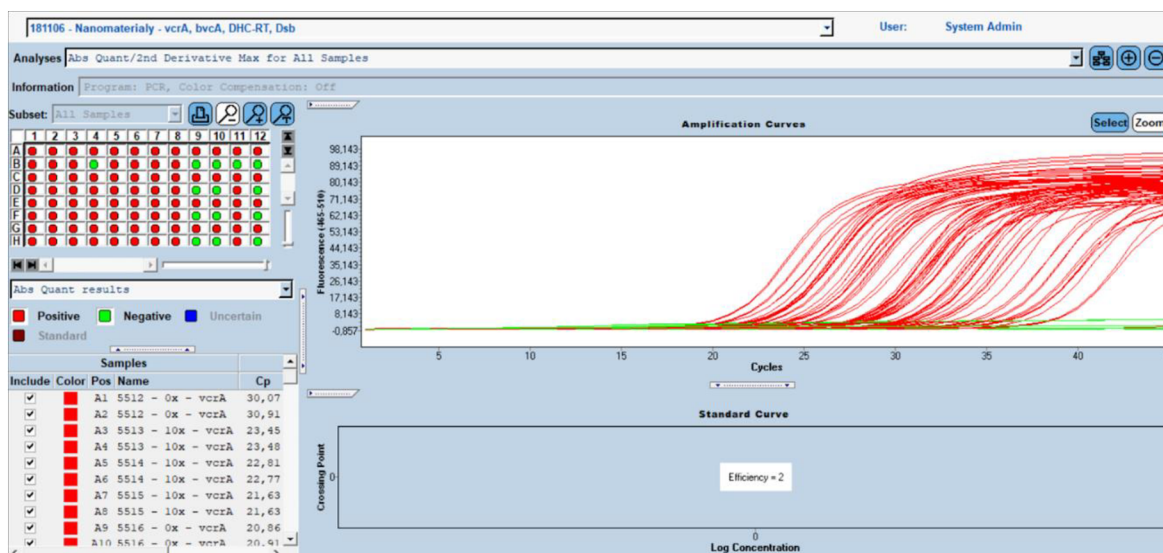
1.12.2. Analýza pomocí hybridizačních FRET sond

Zde je principem přítomnost dvou sousedících sond (max. 3 nukleotidy vzdálených) na téže DNA templátu, jež si předávají energii a uvolňují tak slabé fluorescenční záření. Na obou sondách musí být umístěna příslušná značka. Detekční sonda má na 3' konci fluorescein. Kotvící sonda je na stejném místě fosforylována pro zabránění annealingu a na svém 5' konci disponuje specifickým fluoroforem. Ten je příjemcem excitovaného záření, pokud dojde k hybridizaci sond u DNA, jemuž předchází excitace donorových elektronů působením LED diodového záření. Tím dojde k uvolnění elektronů patřičné vlnové délky, jež jsou detekovány (Beránek, 2016).

1.12.3. Kvantitativní analýza skrze Real-time PCR

Vstupní množství templátové DNA je vyhodnoceno na základě překonané mezní hodnoty detekce (threshold) v exponenciální fázi PCR, kdy osa X udává počet reakčních cyklů, osa Y detekovaný fluorescenční signál (Obr. 7). Rychlejšímu překonání tohoto milníku napomáhá vyšší počáteční množství molekul DNA reakční směsi. Čím menší počet těchto cyklů Ct (cycle threshold) bude, tím pravděpodobněji obsahovala reakční směs cílený templát a nikoliv náhodné amplifikované kontaminanty (Beránek, 2016).

Pomocí Real-time PCR tak lze sledovat změnu nárůstu či poklesu počtu kopií genů ve směsném vzorku DNA pro biodegradaci chlorovaných uhlovodíků.



Obr. 7: Příklad získaných dat metodou qPCR. Převzato a upraveno (Marková K., 2023)

1.13. Digitální PCR

Při této metodě dochází k paralelní amplifikaci DNA v odděleném prostoru (mikroreaktor) kapky olejové emulze, jamky mikrotitrační destičky nebo sektoru čipového kanálku. V případě metody Real-time PCR se pro kvantifikaci vyhodnocuje množství původní DNA, které se přepočítává na počet kopií extrahované DNA, zatímco v případě digitální PCR je principem distribuce templátu do mnoha kompartmentů a absolutní kvantifikace na základě počtu pozitivních a negativních kompartmentů na konci PCR. V případě správné optimalizace amplifikační reakce nabízí tato metoda minimální riziko náhodné chyby a analýzu z velmi malého množství vzorku, se kterým by si ostatní metody hůře poradili (Beránek, 2016).

1.14. Sekvenování DNA

Pořadí nukleotidů sledovaných úseků DNA je možné stanovit jejich sekvenováním, které prošlo za dobu své existence dlouhým vývojem. Prvními metodami byla separace molekul NK ultracentrifugací v sacharóze nebo chloridu cesia, chromatografickými a elektroforetickými principy. Takto bylo možné analyzovat pouze krátké nukleotidové úseky.

V roce 1977 Frederick Sanger vytvořil metodu sekvenování, za níž dostal v roce 1980 Nobelovu cenu. Základem je modifikovaná replikace DNA – v replikační směsi jsou smíchány standardní deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs) se speciálními dideoxyribonukleotidfosfáty (ddNTPs). Ty si jsou navzájem chemicky podobné, avšak chybějící OH skupina ddNTP

neumožňuje další pokračování replikace. Náhodně se začleňující fluorescenčně značené ddNTPs ukončují reakci za vzniku různě dlouhých fragmentů. Analýzou pomocí kapilární elektroforézy jsou poté seřazeny jednotlivé fragmenty podle délky, takže koncové nukleotidy postupně se prodlužujících fragmentů vytvoří celistvou řadu. Fluorescenční píky značící jednotlivé báze koncových ddNTPs umožní odečíst výslednou sekvenci.

Gilbertovo degradační sekvenování využívalo označení konců DNA molekul radioaktivním fosforem polynukleotidovou kinázou a terminální transferázou. Po denuraci a elektroforéze se na fotografický papír provedl záznam radioaktivního záření a porovnávala se mobilita fragmentů NK na základě specifických degradačních drah pro puriny a pyrimidiny ve čtyřech zkumavkách. Z důvodu toxických reagentů a vysoké degradační teplotě NK nebylo možné tuto metodu automatizovat.

Na krátké fragmenty DNA (80–200 nukleotidů) je možné použít metodu pyrosekvenování, kdy dochází k detekci krátkého světelného záblesku po přeměně látky luciferinu na oxyluciferin enzymem luciferáza za přítomnosti ATP.

Sekvenační metody nové generace (Next Generation Sequencing) umožňuje detailní analýzu komplexních bakteriálních vzorků (metagenom) nebo konkrétních kmenů bakterií, aniž by bylo nutné klonovat sledované úseky DNA do vektorů s následnou buněčnou kultivací. Omezením této metody je minimální vstupní koncentrace $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ izolované DNA, jinak hrozí zkreslení reálných výsledků.

Ve sledovaném projektu byly cílem enzymy s degradačním účinkem na chlorované uhlovodíky. K tomuto účelu, bylo použito i sekvenování nové generace založené na měření změny pH vzorku zařízením Ion Torrent, způsobené uvolněním vodíkových protonů při amplifikaci po každém napojení báze (Beránek, 2016).

1.15. Gelová elektroforéza

Nukleové kyseliny se při vystavení stejnosměrného elektrického pole v separačním médiu pohybují k anodě rozdílnou rychlostí, jelikož nemají jednotné prostorové uspořádání (konformaci) a velikost, což umožňuje jejich identifikaci určením délky sekvence. Standardním separačním médiem je agarózový gel, který se připravuje z práškové agarózy (polymer z mořských řas) a jednoho z pufrů (TBE, TAE, TPE), které se skládají z tris(hydroxymethyl)aminomethanu (TRIS) a kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), a liší se pouze v ve třetí složce, kterou je kyselina boritá, octová nebo fosforečná. Pufř je směs kyselých nebo zásaditých solí udržujících stabilní pH (Oxford Reference).

Dalším běžně používaným médiem je polyakrylamidový gel, který nabízí rozlišení nukleových kyselin (max. 500 nukleotidových řetězců), které mají mezi sebou rozdíl pouhého jednoho nukleotidu, ale jejich příprava je složitější a průběh separace pomalejší oproti gelům agarózovým.

Elektroforéza probíhá v prostoru plastové separační kazety (vany) v horizontálním, případně vertikálním uspořádání při napětí 5–20 voltů na jeden centimetr gelu a teplotě do 30 °C. Vyhodnocení probíhá z digitálního záznamu po působení monochromatického záření UV transiluminátoru (254–366 nm) na nukleotidové fragmenty, které jsou předem označeny interkalačními barvivy. Běžně používaný ethidiumbromid a akridinová oranž byly nahrazeny bezpečnějšími alternativami, z nichž nejpoužívanější barvou je SYBR Green. Pipetováním se vloží vzorky o objemu 10–20 µl do připravených gelových žlábků spolu s vkladacím pufrem (*loading buffer*) z viskózní látky urychlující sedimentaci vzorku a barvy zvýrazňující separační proces (Orange G, bromfenolová modř apod.). Délka fragmentů NK je určena porovnáním s velikostním markeru, který musí být v jedné z jamek gelu přítomen.

Modernější kapilární elektroforéza pracuje při napětí 5–15 kV a teplotě do 60 °C. Nukleové kyseliny jsou označeny fluorofory (fluorescein, rhodamin apod.) a vizualizovány po jejich ozáření spektrálně kompatibilním laserem (argonový, helium-neonový či polovodičový) fotonovou emisní aktivitou fluoroforů (Beránek, 2016).

1.16. Měření izolované DNA

Spektrofotometrie je jednou z nejvíce využívaných rychlých a neinvazivních metod měření izolované DNA, která využívá absorpční vlastnosti nukleových kyselin v ultrafialové oblasti spektra. DNA absorbuje UV světlo při vlnové délce 260 nm a spektrofotometr měří absorbanci (A_{260}), která je přímo úměrná koncentraci DNA v roztoku. Poměr absorbance při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) se používá k hodnocení čistoty DNA, přičemž čistá DNA má poměr přibližně 1,8.

Fluorometrie je citlivější metoda schopná detekovat velmi nízké koncentrace DNA. Využívá fluorescenční barviva (SYBR Green apod.), která se specificky vážou na dsDNA a při excitaci emitují světlo. Intenzita fluorescenčního signálu je přímo úměrná koncentraci DNA

Při agarózové gelové elektroforéze jsou DNA fragmenty separovány na základě velikosti při průchodu agarózovým gelem v elektrickém poli pro vyhodnocení kvality daného vzorku. Před samotným procesem elektroforézy je gel obarven specifickým barvivem, které se váže na DNA a vizualizován pod UV světlem.

Pokročilejší metodou je kapilární elektroforéza, kdy jsou DNA fragmenty separovány v úzké kapiláře naplněné polymerním gelem v elektrickém poli a detekovány na základě jejich fluorescenčního značení.

Na závěr kvantitativní PCR (qPCR) je metodou, která nejenže kvantifikuje DNA, ale také umožňuje specifickou detekci cílové sekvence. Specifická amplifikace cílové sekvence pomocí PCR v reálném čase sleduje nárůst fluorescenčního signálu při každém replikačním cyklu (Beránek, 2016).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2. Metodika

Mezi používané výzkumné metody náleží filtrace vzorků z kontaminované podzemní vody přes filtrační aparaturu, izolace plazmidové nukleové kyseliny (NK), měření koncentrace a kvality izolované plazmidové NK pomocí spektrofotometrie, měření délky plazmidové NK elektroforézou a kontrolní amplifikace izolátu polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Další metoda, kterou bylo nutné použít, patří aplikace exonukleázy pro odstranění chromozomální DNA.

Výstupními daty je koncentrace NK v ng/μl, dále hodnota poměru 260/230 udávající čistotu nukleové kyseliny (kvalitní vzorky dosahují numerické hodnoty indexu lomu 2,0), poměr 260/280, jež udává případnou kontaminaci solemi (ideální index lomu 1,8), Ct/Cq hodnota z real-time PCR a snímky z elektroforézy.

Dominantní metodou organizace sběru dat je zúčastněné pozorování a zpracovanými daty jsou nominální proměnné. Rešerše odborných článků byla provedena pomocí prestižní internetové databáze Web of Science a odborná literatura byla vybrána pomocí online vyhledávacího katalogu Krajské vědecké knihovny v Liberci a Univerzitní knihovny Technické univerzity v Liberci.

3. Přípravná část

3.1. Školení

Než bylo možné přejít k jakýmkoliv praktickým činnostem, bylo nutné absolvovat komplexní bezpečnostní školení práce nejen v laboratoři, ale celkově ve zdravotnickém zařízení. Především s pokyny při vstupu do objektu v režimu ochranného pásma. Po vstupu do objektu jsem obdržel vlastní pracovní oděv, přidělenou šatní skříňku a obstaral si pracovní obuv. Poté jsem byl v doprovodu paní primářky na prohlídce celého oddělení a seznámen s veškerým personálem. Po zaškolení v bezpečnosti práce a požární ochraně jsem byl na závěr krátce seznámen s metodou kapilární elektroforézy na přístroji MultiNa. Princip spočívá v rozdělení fragmentů DNA, které putují agarovým gelem na základě elektrického pole. Dále mi byl představen přístroj C1000 Thermal Cycler a CFX96 Real-time PCR system, jehož funkcí je rozmnožení (amplifikaci) vzorku DNA metodou polymerázové řetězové reakce (Obr. 8 a Obr. 9)



Obr. 8: C1000 Thermal Cycler, CFX96 Real-time PCR system (Mařas F., 2022)



Obr. 9: C1000 Thermal Cycler, CFX96 Real-time PCR systém (Mařas F., 2022)

3.2. Pipetování

Nezbytnou pomůckou nejen v genetické laboratoři jsou automatické pipety (Obr. 10, Obr. 11). Na pracovišti OGMD KNL byla používána pipeta od firmy Eppendorf Nichipet EX II. Každá pipeta a k ní příslušející špička je schopná nabrat určité množství vzorku. Nejmenší možné množství je od 0,1 μ l do 10 μ l. Střední hodnotou je 20 μ l až 200 μ l. Nejvyšší možná hodnota je od 100 μ l do 1000 μ l. Kolečkem se nastavuje požadovaný objem, jehož hodnota je zobrazená v číselníku. Špičky se nasazují na pipetu před pipetováním, v žádném případě se nepipetuje bez špičky, došlo by ke kontaminaci vnitřních částí přístroje. Špičky obsahují filtr, který zabraňuje vniknutí vzorku do vnitřní části přístroje a vytečení látky při orientaci špičky směrem dolů. Existují různé druhy pipet například osmikanálová, pro pipetování osmi vzorků najednou.

Nejprve jsou před každou prací nasazeny ochranné rukavice, nejčastěji z latexu. Veškerá práce probíhá v laminárním (biohazard) boxu se zapnutým odvětráváním, pro zabránění kontaminace místnosti a zdraví pracovníka. U dražších a kvalitnějších špiček je možné jejich nasazení zatlačením pipety do špičky přímo v krabici, u levnějších modelů je nutné nasazení manuálně druhou rukou. Zmáčknutím pístu do první polohy a jeho podržením se pipeta připraví na nasátí vzorku. V této chvíli se špička s pipetou vloží do zkumavky se vzorkem a povolením pístu dojde k nasátí vzorku. Při přenášení pipety je nutné dbát na to, aby se zbytečně neobracela a držela špičkou dolů, aby nedošlo k možnému úniku vzorku. Poté se pipeta se špičkou vpraví do předpřipravené zkumavky a domáčknutím pístem do druhé polohy dojde k vypuštění veškerého obsahu. Vypouštění látky probíhá po stěně zkumavky tak, aby se zabránilo tvoření bublin, kvůli kterým by byla hůře pozorovatelná konzistence roztoku. Druhým pístem tzv. vyhazovačem dojde k vyjmutí použité špičky, kterou je nutné po použití vyhodit do koše na nebezpečný odpad.

Než jsem mohl přejít k reálným vzorkům, musel jsem se naučit základy pipetování. K tomuto účelu posloužil trénink pipetování barviv. S pomocí pipety jsem nabral požadované množství barviva a přidal do zkumavky s vodou. Roztok jsem dále zvortexoval (protřepal) a zcentrifugoval. Takto připravený roztok jsem pipetou s osmi násadami v požadovaném množství rovnoměrně přesunul do připravené mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Osvojil jsem si tedy základní dovednosti manipulace s laboratorní technikou a přípravy vzorků.



Obr. 10: Standardní vybavení molekulární a genetické laboratoře v laminárním boxu (Mařas F., 2022)



Obr. 11: Standardní vybavení molekulární a genetické laboratoře v laminárním boxu (Mařas F., 2022)

3.3. Filtrace vzorků z kontaminované podzemní vody

Bakteriální vzorky jsou získávány filtrací podzemní vody z hlubinných vrtů. První krokem je zkontrolování filtrační aparatury. Pro filtraci je využit membránový filtr s velikostí pórů 0,22 μm (DURAPORE PVDF Membrane). Na každý vzorek se používá vlastní odměrný válec, ostatní pomůcky jsou před použitím na další vzorek dezinfikovány ethanolem.

Membránový filtr se položí na aparaturu vycentrovaný na střed a veškeré součásti nádoby se vrátí na své místo. Hlavním spínačem se zapne vývěva a až poté, co podtlak ve filtrační aparatuře dosáhne uspokojivé hladiny, se vlije vzorek do filtrační nádoby po 100 ml. Následně se otevře kohoutek uzávěru, čímž je filtrace zahájena.

3.4. Vážení nanovláknenných nosičů biomasy

Při své práci budu výhradně pracovat s filtračními papíry, ze kterých se budu pokoušet extrahovat plazmidovou DNA. Abych komplexně chápal proces a cíle výzkumného projektu, vyzkoušel jsem si vážení nanovláknenných nosičů biomasy, které představují druhou možnost získání vzorků. Tyto nosiče slouží jako umělý biofilm pro růst bakterií. Sledované bakterie se totiž v půdě vyskytují nejčastěji ve formě biofilmu a je tedy žádoucí, aby byl srovnán rozdíl koncentrace bakterií mezi nosičem a vodným roztokem.

Nosič je smotek nanovláken umístěný ve válcovité patroně se závažím. Patrona je umístěna do podzemního vrtu na kontaminované lokalitě tak, aby byla pod hladinou podzemní vody. Na nanovlákněch, které mají velký povrch, narostou během inkubace autochtonní bakterie přirozeně se vyskytující v půdním zvodnělém prostředí. Odběrná místa jsou v určitých hloubkách na přesných neměnných souřadnicích.

Výhodou nosičů biomasy je skutečnost, že se nemusí čerpadlem získávat podzemní voda v dlouhodobém časovém měřítku. V běžném případě se totiž odebírá veškerá stojatá voda, ale pro potřeby výzkumu se sbírá až ta voda, jenž nateče na uvolněné místo.

Měřicí přístroj je nejprve na začátku zapnut a kalibrován pomocí příslušného tlačítka. Připravená prázdná zkumavka se umístí na váhu a vytáruje. Poté je nosič opatrně vyjmut z plastového sáčku a přenesen do dané zkumavky, ta je následně umístěna na podložku měřícího přístroje. Po uzavření bezpečnostních dvířek je po zmáčknutí požadovaného tlačítka změřena hmotnost daného nosiče.

Nosič z kontaminovaného zdroje se později přenesse na nekontaminovaný a bude se sledovat potenciální horizontální přenos sledovaných genů.

3.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a kontrola získaných extraktů

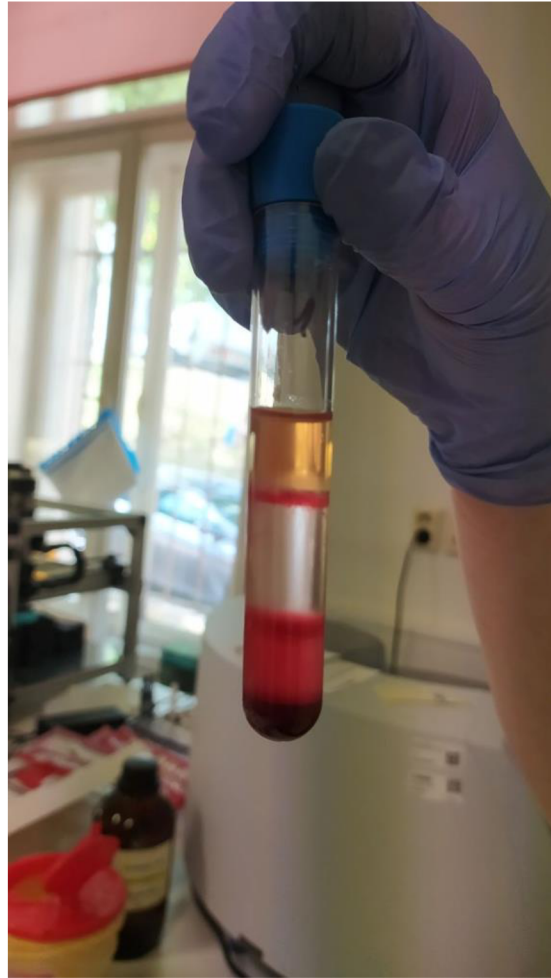
V rámci tréninku metody qPCR jsem byl zaškolen v analýze faktoru II a V (funkční proteiny pro srážení krve) anonymizovaných kontrolních vzorků.

Dále jsem byl seznámen s postupem měření čistoty a koncentrace izolované DNA spektrofotometrickou metodou. Nejprve jsem zvortexoval MasterMix, směs potřebných reagensů (především Taq DNA polymeráza a optimalizovaný reakční pufr) a spolu s interní kontrolou v požadovaném množství přenesl pipetou do PCR stripů (zkumavek s víčkem). Následně jsem vzorky a interní kontrolu napipetoval do jamek s MasterMixem. Takto připravené vzorky jsem umístil do přístroje CFX96 a spustil PCR. Výsledek představují zelené a červené křivky, kdy samostatná zelená křivka znamená wild-type výsledek, zelená a červená křivka značí heterozygota a samostatná červená křivka homozygota pro dané onemocnění či mutaci. Vyzkoušel jsem si dále práci se spektrofotometrem Nanodrop 2000 (Thermo scientific), který slouží k měření čistoty a koncentrace izolované DNA průchodem světla přes vzorek. Na kovovou tečku uprostřed kolečka se pipetují 2 μ l vzorku. Výsledná křivka by měla být ideálně ve tvaru sinusoidy. Poměr 260/280 co nejbližší hodnotě 1,8 značí, že je vzorek bez znečištění proteiny. Poměr 260/230 s hodnotami přibližně 2,0 absence kontaminace látkami s absorpční 230 nm. Před použitím a po použití se kovová tečka čistí destilovanou vodou. Na závěr jsem byl seznámen s postupem vyšetření přítomnosti viru SARS-CoV-2 z anonymizovaného vzorku rovněž metodou PCR.

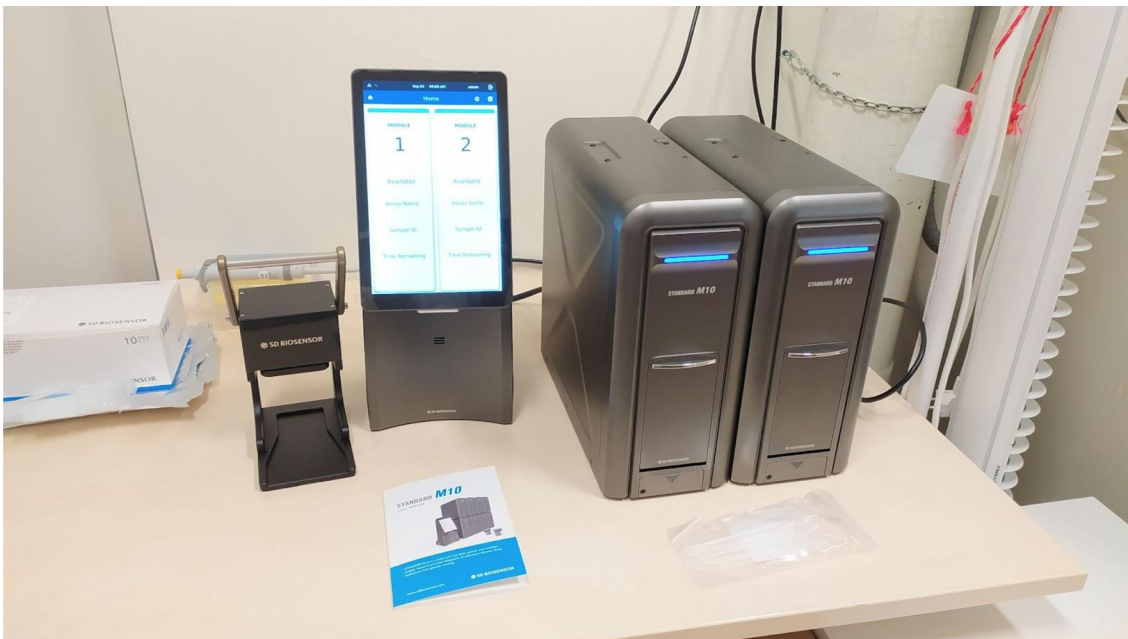
3.6. Izolace DNA z granulocytů

Další náplní mého školení byla izolace DNA z granulocytů kitem na izolaci DNA z tělních tekutin (Kit for isolation of DNA from body fluids) od firmy Generi Biotech. Nejprve jsem si připravil veškeré vybavení a chemikálie temperoval na požadovanou teplotu. Opatrně jsem napipetoval dvě separační látky a nakonec anonymizovanou plnou krev. Centrifugací jsem získal oddělené frakce plné krve a hustotního média, z nichž jsem se pokusil napipetovat pouze proužek granulocytů v supernatantu (Obr. 12). Na konci první fáze proběhlo tříkolové promývání fyziologickým roztokem a centrifugace. V druhé fázi jsem s pomocí proteinázy K a pufru BL1 provedl lýzu vzorku. Vzorek jsem dále promyl za pomoci 96% ethanolu. Roztok byl centrifugován na 1 min při 11000×g (v každém kroku stejný počet otáček) pro navázání DNA, jež byla následně promývána pufrem BL2 (centrifugace 1 minutu) a BL3 (centrifugace 2 minuty). V elučním kroku byl přidán vytemperovaný pufr BL4 na 70°C, inkubace 1 minutu na pokojovou teplotu a provedena závěrečná centrifugace.

Následovalo měření vzorků v přístroji Nanodrop 2000. Vzhledem k tomu, že pro potřeby nácviku byly použity starší vzorky krve, hodnoty koncentrace a čistota nukleových kyselin byly velmi nízké. Při druhém pokusu již byly výsledky koncentrací i kvality izolované DNA mnohem vyšší. Dále jsem se seznámil s novým přístrojem SD Biosensor – Standard M10, jenž z lidského vzorku izoluje nukleovou kyselinu, následně amplifikuje a fluorescenčně vyhodnotí v reálném čase (Obr. 13). Dále jsem se seznámil s přípravou agarózových gelů, sloužících k pročištění DNA, jelikož ta jako jediná projde cestičkami uvnitř gelu, zatímco nečistoty gel nepropustí.



Obr. 12: Izolace DNA z granulocytů (Mařas F., 2022)



Obr. 13: SD Biosensor – Standard M10 (Mařas F., 2022)

3.7. Izolace plazmidové DNA z *Klebsiella pneumoniae*

Jelikož jsem byl v předešlých praktických cvičeních zručný, poprvé jsem vyzkoušel izolaci plazmidů z ESBL (ANTB rezistentní bakterie *Klebsiella pneumoniae*) z anonymizovaného kontrolního vzorku. Izolace proběhla s pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid, a vybrán postup pro high-copy plazmid DNA z *Escherichia coli*, jelikož jsou obě bakterie gramnegativní plus s výjimkou absence bičků poměrně podobné. Postup byl shodný s izolací DNA z granulocytů, tedy centrifugace vzorku s promývacími pufrů vybraného extrakčního kitu.

Další den proběhlo měření úspěšnosti předešlé izolace plazmidů a seznámení s postupem centrálního příjmu materiálu, jednotlivými typy vzorků a způsoby jejich zpracování a uchování. Měření proběhlo na přístroji MultiNa metodou elektroforézy, kdy záporně nabitá DNA pod napětím prochází agarózovým gelem ke kladné anodě.

Bohužel se nepodařilo naměřit žádné hodnoty, a tak následující den proběhla odborná porada (brainstorming).

Po odborné debatě, vzhledem k minulému nezdaru, bylo rozhodnuto, že jako modelový testovací organismus poslouží bakterie *Chlamydia trachomatis*, jelikož s jistotou plazmidy obsahuje, ale bude zapotřebí vytvoření metodiky ověření přítomnosti plazmidů bez chromozomální DNA.

3.8. Izolace DNA z parafinových bločků

Abych se seznámil s různými metodami izolace nukleových kyselin, byl jsem zaškolen i v metodě izolování DNA z parafinových bločků.

Jak je již zvykem, nejprve bylo potřeba si připravit veškeré vybavení a jednotlivé chemikálie temperovat na požadovanou teplotu. Parafinové bločky již byly připravené na oddělení patologie. Mým úkolem bylo přidání deparafinizačního roztoku a následná centrifugace se vzorkem. Následovala inkubace 3 minuty při 56 °C a ochlazení na pokojovou teplotu. Po přidání pufru ATL bylo provedeno vortexování a centrifugace.

Do spodní čisté fáze se přidala proteináza K a s roztokem promíchala pipetováním. Po tomto kroku byla inkubace roztoku 1 hodinu při 56 °C a poté 1 hodinu při 90 °C. Poté byla spodní čistá fáze přenesena do nové mikrozkuřavky a důkladně zvortexována s AL pufrů a 96% ethanolem. Celý objem lyzátu byl opatrně přenesen do speciální kolonky a proběhla

centrifugace. Kolonka se opatrně otevřela, přidal se pufr AW1 a následovala centrifugace. Stejný krok se opakoval s pufrem AW2. Po další centrifugaci a přidání pufru ATE byl na závěr roztok temperován po dobu 1 minuty při pokojové teplotě a zcentrifugován.

3.9. Kolonková izolace DNA

Další tréninkovou metodou před izolací bakteriální plazmidové DNA byla zvolena kolonková izolace DNA. Ta se běžně používá v případě poruchy automatického izolátoru nebo pokud se při izolaci na automatickém izolátoru nezíská dostatečné množství DNA pro provedení PCR reakce. Byl použit High Pure PCR Template Kit, jenž nevyžaduje separaci leukocytů a využívá vzorek plné nesrážlivé krve. Nejprve jsou lyzovány erytrocyty, genomová DNA je absorbována na membránu kolonky, několikrát promyta a poté eluována z membrány kolonky do roztoku.

3.10. Izolace plazmidové DNA komerčním extrakčním kitem

Na samotnou izolaci plazmidů extrakční kit od firmy Elisabeth Pharmacon (Eligene). Při izolaci plazmidové DNA s pomocí extrakčního kitu firmy Elisabeth Pharmacon (Eligene) je prvním krokem centrifugace 1 minutu při 12000×g a odsátí sedimentu. Následuje vortexování vzorků a napipetování 250 µl Resuspension Buffer NP1. Tekutina je pipetou přenesena do nové Eppendorfovy zkumavky (epinky) a přidáno 250 µl Lysis Buffer EP2. Zkumavka se v ruce osmkrát převrátí (invertuje) pro promíchání reagentů a ponechává se 4 minuty při pokojové teplotě. Poté se napipetuje 350 µl neutralization Buffer EP3, znovu se zkumavka invertuje a centrifuguje 10 minut při 12000×g. Následuje přenesení a promývací krok na kolonku se sběrnou zkumavkou. Nejprve proběhne centrifugace 1 minutu při 12000×g. Sediment je odstraněn a kolonka umístěna zpět do stejné sběrné zkumavky. Do kolonky se napipetuje 500 µl Wash Buffer EP4 a vše se centrifuguje 1 minutu při 12000×g. Opětovně proběhne odstranění sedimentu a navrácení kolonky. Až po další centrifugaci 2 minutu při 12000×g se kolonka přenesou do nové sběrné zkumavky. V závěrečném kroku se do kolonky napipetuje 50 µl Elution Buffer EP6, směs se inkubuje 1 minutu při pokojové teplotě a pro větší výtěžek následně 5 minut v termostatu při 60 °C. Na závěr proběhne poslední centrifugace 1

minutu při 10000×g. Izolovaná plazmidová DNA se naváže do sběrné zkumavky a kolonka se odstraní.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Filtrace a příprava vzorků z kontaminované podzemní vody

Při běžném postupu se filtruje objem o velikosti 0,5 l, nicméně jsme s odbornou školitelkou vyzkoušeli přefiltrovat rovnou celý objem, jenž činí něco málo přes jeden litr. Museli jsme být při práci velmi důkladní, jelikož v několika minulých případech se přefiltrovat celý vzorek nepodařilo, kvůli zanesení filtru.

Vzorek HV-59 měl celkový objem 1120 ml. Vzorek MV-5 měl celkový objem o trochu vyšší, to jest 1150 ml. Na závěr se odměrné válce umyly saponátem a následně destilovanou vodou

Byl jsem proškolen, že vzorky budou uskladněny v -80°C a je nutné je po rozmrazení zpracovat, případně druhý den jsou-li uchovány ve ledničce. Vzorky byly získány z podzemních vrtů v půdě, do které byly aplikovány živné roztoky a oba bakteriální rody schopné biodegradace chlorovaných uhlovodíků, jejichž plazmidové geny byly sledovány (*Dehalococcoides* a *Dehalogenimonas*).

Další den mělo podle původního plánu dojít k izolaci DNA z donesených vzorků HV-59 filtrA (Jablonec) a MV-5-filtrA (Toužim), nicméně nebyl znám ideální postup extrakce bakteriálních vzorků z filtračního papíru.

Následovala proto odborná porada a nakonec byl rozhodnut následující postup.

Filtrační papír se vzorky byl rozstříhán na menší kusy a ty byly umístěny do zkumavky s 1,5 ml PCR vody. Poté došlo k centrifugaci a vortexování, aby došlo k uvolnění bakterií do roztoku. Takto předpřipravené vzorky byly poté umístěny do hlubokomrazícího boxu při teplotě -80°C .

4.2. Izolace plazmidové DNA ze vzorku HV-59 filtrA a MV-5-filtrA

Další týden proběhla izolace plazmidové DNA z minulých reálných bakteriálních vzorků: HV-59 filtrA (Jablonec) a MV-5-filtrA (Toužim) extrakčním kitem od firmy Elisabeth Pharmacon (Eligene). Byla využita nová centrifuga Eppendorf MiniSpin. Zmražené vzorky v roztoku PCR vody a kousků filtračního papíru jsem se pokusil uvolnit manuálně pomocí

štětíčky.

Součástí extrakčních kitů bývají mnohdy extrakční kuličky. V příštím pokusu by se tak mohla vyzkoušet extrakce s jejich pomocí. Rozdíly ve vlastnostech kuliček různých komerčních kitů vyjma velikosti by měly být zanedbatelné.

4.3. Izolace plazmidové DNA z *Chlamydia trachomatis*

Samostatně za odborného dohledu jsem provedl izolaci plazmidové DNA z modelového testovacího organismu, kterým byla bakterie *Chlamydia trachomatis* z anonymizovaného kontrolního vzorku, pro porovnání výsledků s předešlými vzorky. Rozhodli jsme se pro Chlamydie z toho důvodu, že obecně obsahují velké množství plazmidů. Na izolaci byl použit kit NucleoSpin® Plasmid. K vyhodnocení vzorků z kontaminovaných lokalit a vzorku testovacího organismu dojde najednou.

4.4. Koncentrace a kvalita izolované plazmidové DNA

Podle předchozího plánu proběhlo měření izolovaných vzorků (HV-59 filtrA, MV-5-filtrA a *Chlamydia trachomatis*) spektrofotometrickou metodou na přístroji Nanodrop 2000.

Výsledky vzorku testovací bakterie *Chlamydia trachomatis* dopadly velmi dobře, podařilo se naměřit koncentraci plazmidové DNA o hodnotě 874,3 ng/μl. Poměr 260/280, udávající čistotu NK (kontaminaci proteiny), dosahoval hodnoty 1,83 a poměr 260/230, udávající kontaminaci solemi, na 2,28. Vzhledem k tomu, že by měl poměr 260/280 být co nejbližší hodnotě 1,8 a poměr 260/230 hodnotě 2,0 lze konstatovat, že izolovaný vzorek plazmidové DNA dosahuje vysoké kvality. Výsledky reálných vzorků HV-59 filtrA (Jablonec) a MV-5-filtrA (Toužim) dopadly hůře, což mohlo mít za následek několik faktorů. Jednak je měření na přístroji Nanodrop obecně méně spolehlivé než z přístroje MultiNa. Dále nebyly vzorky ihned zpracovány po rozmražení a zvolený postup oddělení vzorku od filtru rovněž nebyl ideální. Vzorek z Jablonce měl hodnoty koncentrace 8,3 ng/μl, poměr 260/280 na 0,96 a poměr 260/230 na 0,38. Vzorek z Toužimi měl všechny hodnoty lepší, přičemž koncentrace činila 22,9 ng/μl, poměry 260/280 na 1,45 a poměr 260/230 na 0,77.

4.5. Izolace plazmidové DNA ze vzorku MV-1D

Nejprve proběhla filtrace dovezené podzemní vody pro získání bakteriálních vzorků s pomocí filtrační aparatury přes 0,22 mm membránový filtr (Merck Millipore).

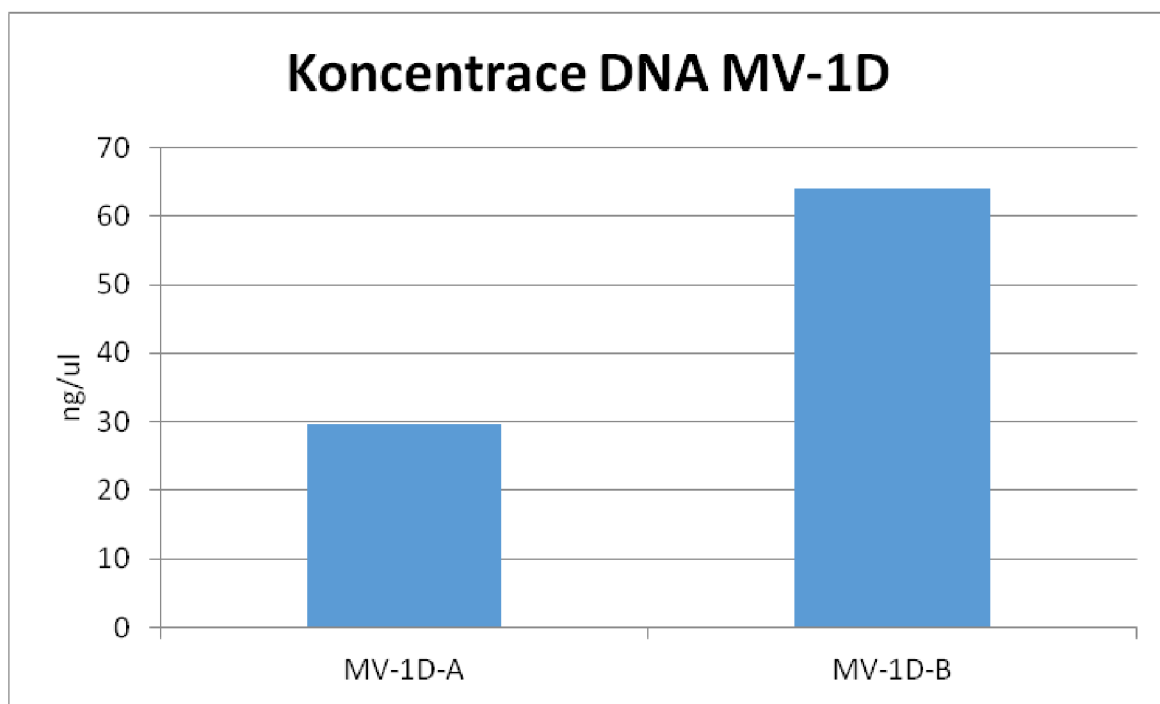
Následně proběhla extrakce vzorků z membránových filtrů vlastní metodou, která představovala mechanické třepání se skleněnými kuličkami a izolaci plazmidové DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid. Extrakce vzorků z filtru proběhla ve dvou pokusech. Filtr MV-1D A byl rozstříhán a vložen do 5 ml zkumavky s 10 skleněnými kuličkami a filtr MV-1D B do 50 ml zkumavky rovněž s deseti kuličkami. Třepání proběhlo v několika opakováních s různou hodnotou rpm (počet otáček motoru) v lyzačním pufru. Obě zkumavky byly třepány při 500 rpm po dobu pěti minut, poté po dobu 5 minut při 100 rpm a nakonec 2000 rpm. Následovala izolace plazmidové DNA vybraným extrakčním kitem. Množství potřebných reagensů bylo spočítáno na 500 mg vzorku, 978 μ l Sodium phosphate Buffer a 122 μ l MT Buffer to Lysing Matrix E Tube.

Z výsledků tabulky je patrné (Obr. 14), že lepšího výtěžku (koncentrace DNA) bylo dosaženo z filtru MV-1D B (64 ng/ μ l) oproti filtru MV-1D A (29,7 ng/ μ l), jelikož bylo možné použít menší zkumavku, jejíž rozměry umožnily dodatečnou homogenizaci při rychlosti 3040 rpm po dobu 30 s.

Na základě analýzy produktu metodou PCR a pozitivního výsledku na přítomnost 16S ribozomální DNA bylo zjištěno, že námi vyzkoušený extrakční kit na extrachromozomální DNA izoloval veškerý genetický materiál, nikoliv pouze plazmidy. Problém by mohl být také s ostatními extrakčními kity, pravděpodobně tak bude nutné vymyslet jiný postup.

Následující týden během rešerše a studia odborné literatury bylo zjištěno, že plazmidové kity jsou na extrakci výhradně z bakterie *Escherichia coli*, tedy gramnegativních bakterií. Nebudou tedy schopné extrahovat DNA z grampozitivních bakterií.

Jako možné řešení bylo navržena kombinace běžného extrakčního kitu, odstranění genomové DNA a následná amplifikace plazmidů.



Obr. 14: Výsledky měření koncentrace DNA vzorků z kontaminovaných lokalit (MV-1D-A a MV-1D-B)

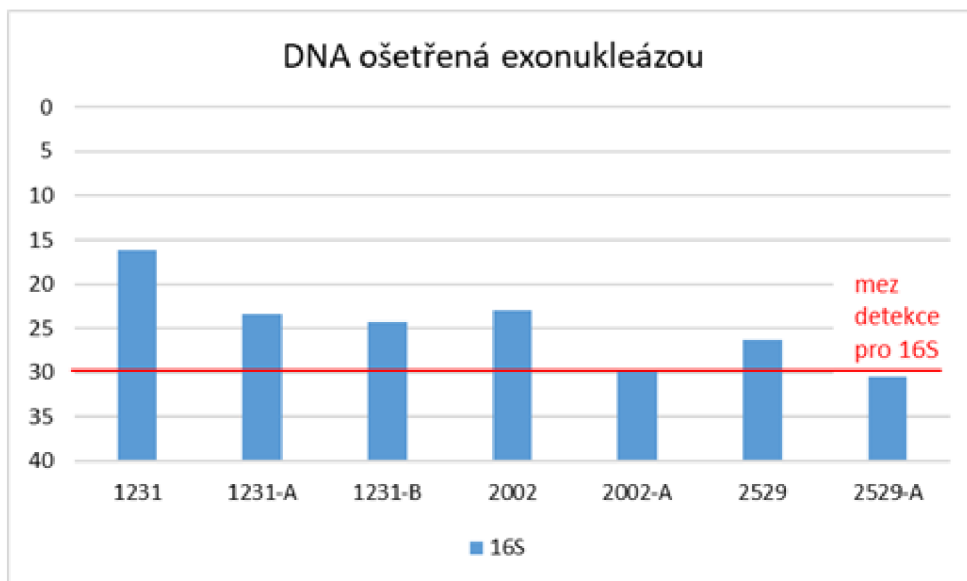
4.6. Aplikace exonukleázy na vzorky testovacího organismu

Po zvážení všech možných řešení bylo rozhodnuto, že chromozomální DNA bude odstraněna z produktu dodatečně enzymem exonukleázou.

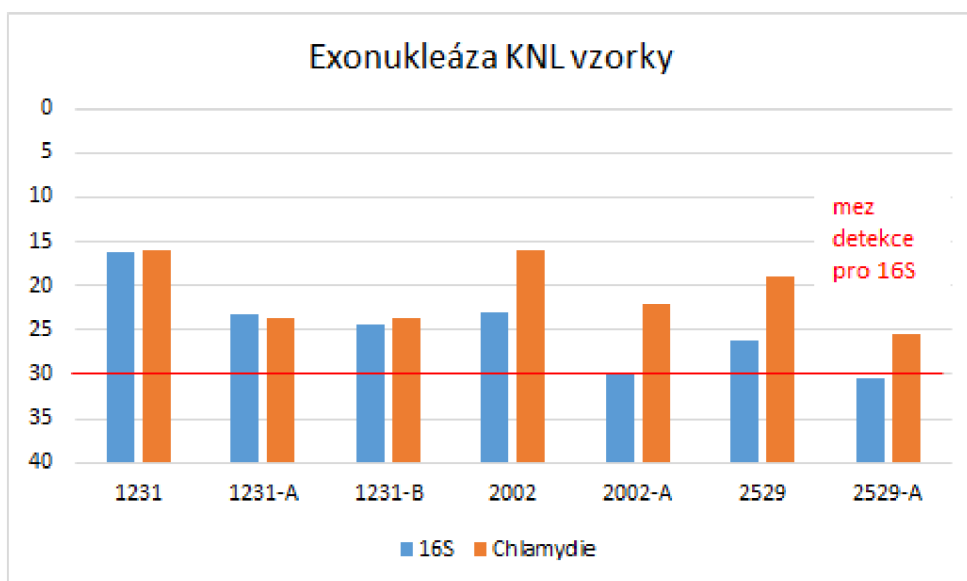
Vzhledem k tomu, že plasmidy našich bakterií jsou kruhového tvaru a nikoliv lineárního, exonukleáza by je neměla degradovat, jelikož nemají volné konce, na něž by mohla nasednout.

Byl zvolen enzym Exonuclease V (RecBCD) od firmy BioTech a.s. Před započítím budoucích experimentů byla na elektroforetickém přístroji TapeStation ověřena specifita použitých plazmidových primerů oriT a trfA.

Následně byla změřena koncentrace DNA fluorometrem Qubit 2.0 u vzorků 03-1231, 03-2002 a .03-2529. U vzorku 03-1231 byla koncentrace nejvyšší 107 ng/μl, jelikož byl při izolaci přidán dodatečný krok s puforem PR. Vzorek 03-2002 byl v nejnižší koncentraci 3,67 ng/μl a vzorek 03-2529 měl koncentraci vyšší v hodnotě 19,3 ng/μl. V závislosti na změřené koncentraci bylo spočítáno potřebné množství reagentů při následné aplikaci exonukleázy. Jelikož bylo vzorku 03-1231 více, byl rozdělen do dvou verzí. V první verzi A byla reakce ponechána po dobu 30 minut, tak jako u zbylých dvou vzorků, a ve verzi B po dobu 60 minut.



Obr. 15: Vzorky z nemocnice testovacího organismu po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S

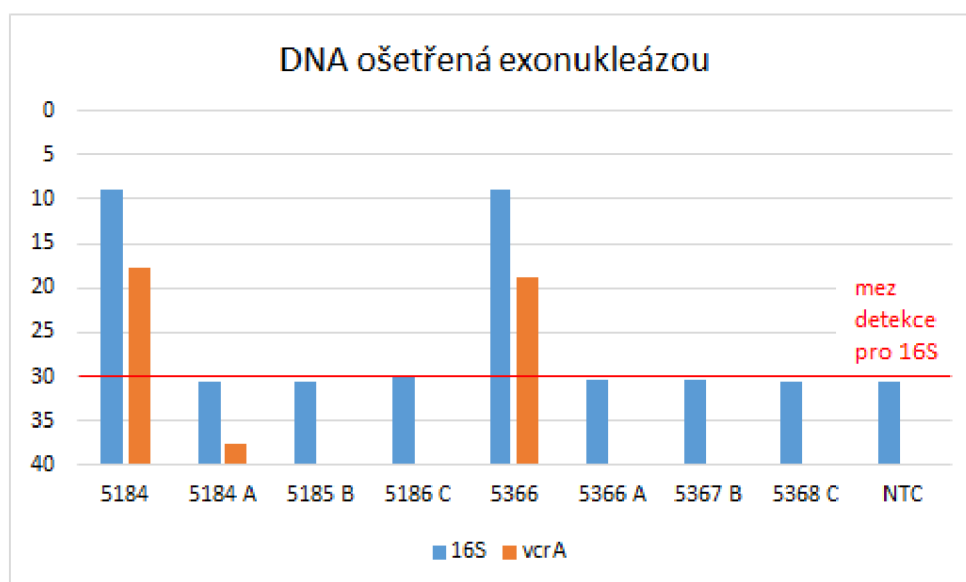


Obr. 16: Vzorky z nemocnice testovacího organismu po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S a plazmidový marker Chlamydie

Z výsledků qPCR je patrné (Obr. 15 a Obr. 16), že DNA genu 16S, která se nachází v bakteriálním chromozomu, byla u vzorků 2002-A a 2529-A kompletně odstraněna. Marker na Chlamydie, který se nachází i na plazmidech, poklesl, ale stále dosahuje mezní hodnoty pro detekci, z čehož lze usuzovat, že se plazmidy podařilo izolovat.

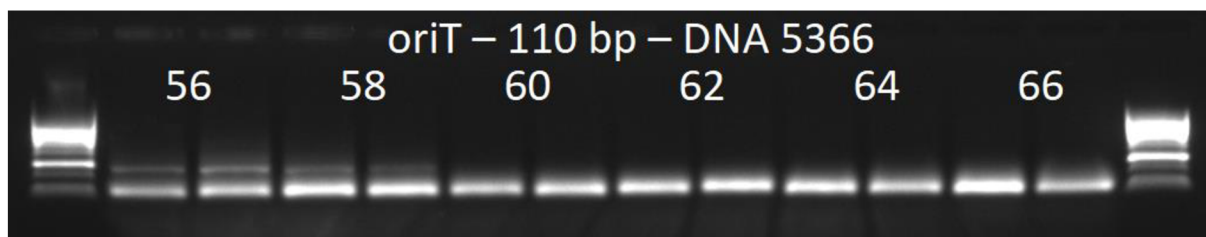
4.7. Aplikace exonukleázy na vzorky z kontaminovaných lokalit

Standardním postupem byla extrahována DNA ze vzorků 5184 a 5366 komerčním kitem Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals). Vzorek 5184 byl rozdělen na tři vzorky 5184 A, 5185 B a 5186 C. Vzorek 5366 byl rozdělen na tři vzorky 5366 A, 5367 B a 5368 C. NTC (no template control) představuje negativní kontrolu pro přítomnost kontaminace (žádná přidaná DNA). Na tyto vzorky byla následně aplikována exonukleáza. Výsledky zobrazuje obrázek níže (Obr. 17: Vzorky z kontaminovaných lokalit po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S a vcrA).

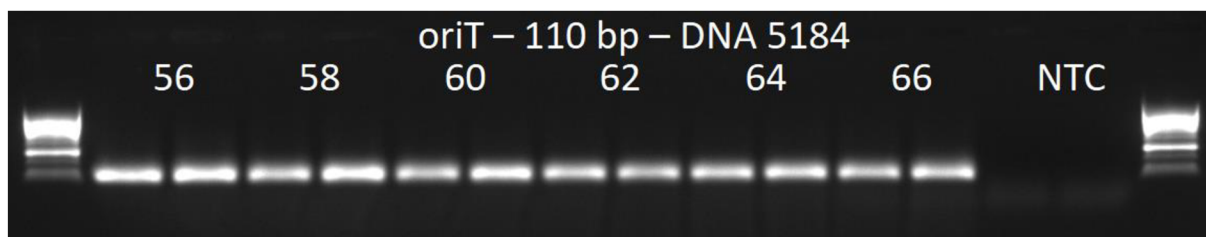


Obr. 17: Vzorky z kontaminovaných lokalit po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S a vcrA

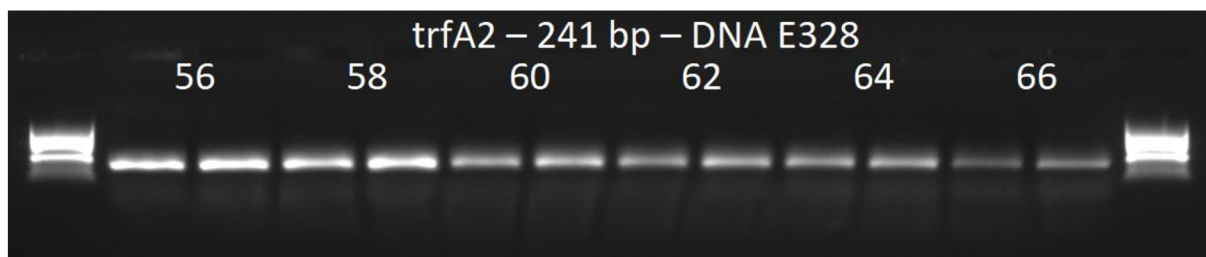
Stejně vzorky byly podrobeny analýze skrze qPCR na přítomnost markerů, které jsou zaručeně součástí plazmidové DNA. Jedná se o replikační počátek oriT a transkripční faktor trfA. Nejprve byla elektroforézou ověřena specifita dovezených plazmidových primerů oriT a trfA při různé annealingové teplotě (Obr. 18: Elektroforéza DNA 5366 Obr. 19: Elektroforéza DNA 5184, Obr. 20: Elektroforéza DNA E328 a Obr. 21: Elektroforéza DNA 5184).



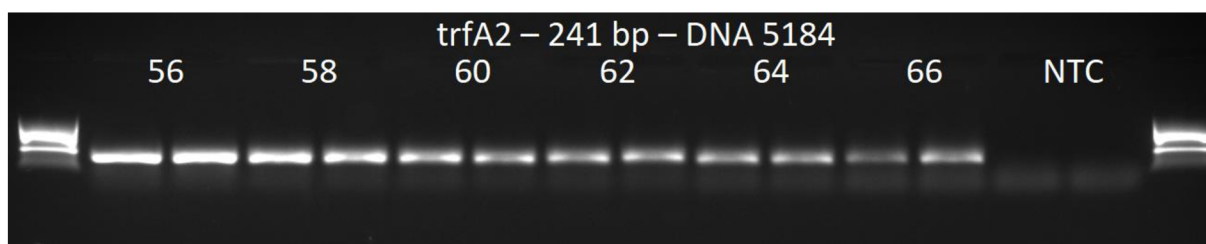
Obr. 18: Elektroforéza DNA 5366



Obr. 19: Elektroforéza DNA 5184



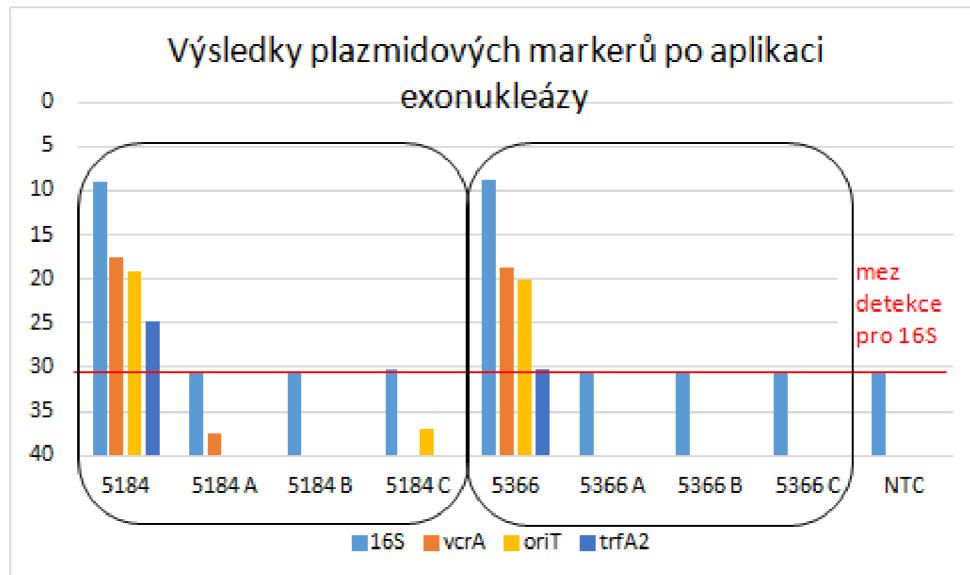
Obr. 20: Elektroforéza DNA E328



Obr. 21: Elektroforéza DNA 5184

Z výsledků qPCR na níže uvedeném grafu je patrné (Obr. 22: Vzorky z kontaminovaných lokalit po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S, vcrA, oriT a trfA), že se chromozomální DNA podařilo odstranit (16S). Enzymatická aktivita exonukleázy rovněž odstranila marker pro vinylchlorid reduktázu (vcrA), ale i oba markery pro plazmidovou DNA, replikační počátek (oriT) a transkripční faktor (trfA2).

Exonukleáza odstraňuje veškerou DNA, která má volný konec, proto odstranila i plasmidy, které jsou zřejmě fragmentovány během izolačního procesu, pravděpodobně mechanicky při třepání s kuličkami.



Obr. 22: Vzorky z kontaminovaných lokalit po ošetření exonukleázou a vyhodnocení qPCR pro 16S, vcrA, oriT a trfA

ZÁVĚR

V experimentální části práce bylo ověřeno, že komerční extrakční kity pro izolaci plazmidové DNA fungují pouze na gramnegativní bakteriální kultury. Grampozitivní bakterie, které byly součástí autochtonních bakteriálních kultur z kontaminované podzemní vody, mají obecně silnější buněčnou stěnu, a proto nelze použít na izolaci bakteriální plazmidové DNA z environmentálních směsných vzorků standardní postupy.

U vzorků z kontaminovaných lokalit došlo aplikací exonukleázy k úspěšnému odstranění chromozomální DNA. Plazmidová DNA byla fragmentována vlivem mechanického třepání pro uvolnění vzorku z filtrů, kvůli čemuž neměla kruhovou strukturu a exonukleáza ji svoji enzymatickou aktivitou taktéž odstranila.

Úkolem navazujícího výzkumu bude nalézt šetrnější metodu, která by uvolnila plazmidovou DNA bez její fragmentace. Nejnovější výsledky naznačují jako východisko využití chemické cesty, například enzymatickou lýzu bakteriálních buněk, jež by narušila buněčné stěny, ale zároveň ušetřila kruhovou plazmidovou DNA. Tyto závěry nepochybně pomohou při hledání konečného řešení v budoucím výzkumu.

Seznam použitých zdrojů

BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7.

BIRNBOIM, H.C. a DOLY, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), s. 1513-1523.

CHEN, G., MURDOCH, K.F., XIE, Y., MURDOCH, R.W., CUI, Y., YANG, Y., YAN, J., KEY, A.T. a Löffler, F.E., 2022. Dehalogenation of Chlorinated Ethenes to Ethene by a Novel Isolate, "*Candidatus Dehalogenimonas etheniformans*". *Applied and Environmental Microbiology* [online]. Volume 88, Part 12. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aem.00443-22>.

CZINNEROVA, M., STEJSKAL, V., MARKOVA, K., NOSEK, J. a SEVCU, A., 2022. Field application of glycerol to enhance reductive dechlorination of chlorinated ethenes and its impact on microbial community. *Chemosphere*, Volume 309, Part 1. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.136640. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653522031332>.

DIB, J.R., WAGENKNECHT, M., FARIAS, M.E. a MEINHARDT, F., 2015. Strategies and approaches in plasmidome studies—uncovering plasmid diversity disregarding of linear elements? *Frontiers in Microbiology* [online]. 6:463. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00463. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.00463/full>.

DOLINOVÁ, I., ŠPÁNEK, R., ŠEVCŮ, A. a DVOŘÁK, L., 2016. Aplikace molekulárně-genetických metod pro studium procesů biodegradace chlorovaných uhlovodíků v podzemních vodách. *Vodní hospodářství* [online]. ISSN 1211-0760. Dostupné z: <https://vodnihospodarstvi.cz/aplikace-molekularne-geneticky-metod/>.

DOLINOVÁ, I., 2018. *Molecular biology tools for diagnostics of ongoing remediation* [online]. Liberec: Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a

mezioborových studií. Dostupné z: <https://dspace.tul.cz/server/api/core/bitstreams/1be7a1e3-5c9e-4333-bdf3-12b707b96dee/content>.

GREEN, M.R. a SAMBROOK, J., 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-1936113422.

HOLMES, D.S. a QUIGLEY, M., 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* [online]. USA: Department of Biological Sciences and Center for Biological Macromolecules, 27. 10. 1980 (29. 11. 2004), 114, s. 193-197 [cit. 2022-12-14]. DOI: 10.1007/978-1-4939-9877-7_1. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269781904735?via%3Dihub>

HURYCH, J. a ŠTÍCHA, R., 2020. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák - TRITON. ISBN 978-80-7553-844-4.

CHENG, D. a HE, J., 2009. Isolation and characterization of "Dehalococcoides" sp. strain MB, which dechlorinates tetrachloroethene to trans-1,2-dichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009 Sep;75(18), s. 5910-5918. DOI:10.1128/AEM.00767-09. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2747852/>.

JULÁK, J., 2016. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum. ISBN 9788024632100.

KAPRÁLEK, F., 1999. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-811-5.

KOHOUTOVÁ, M., et al., 2019. *Lékařská biologie a genetika (II. díl)*. 2. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3790-7.

MOE, W.M., YAN, J., NOBRE, M.F., DA COSTA, M.S. a RAINEY, F.A., 2009. Dehalogenimonas lykanthroporepellens gen. nov., sp. nov., a reductively dehalogenating bacterium isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 59 (11), s. 2692-2697. DOI: 10.1099/ijs.0.011502-0. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.011502-0>.

NIJENHUIS, I. a ZINDER, S.H., 2005. Characterization of hydrogenase and reductive dehalogenase activities of Dehalococcoides ethenogenes strain 195. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005 Mar;71(3), s. 1664-1667. DOI: 10.1128/AEM.71.3.1664-1667.2005. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1065153/>.

OPENAI. *OPEN* [online]. Verze GPT-3.5 [cit. 2024-07-10]. Dostupné z: <https://chat.openai.com/>.

OTOVÁ, B., et al., 2014. *Lékařská biologie a genetika (I. díl)*. 2. nezm. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2835-6.

Oxford Reference [online]. Oxford University Press. Dostupné z: <https://www.oxfordreference.com/>.

PALMER, L. a FALKOW, S., 1986. A common plasmid of Chlamydia trachomatis. *Plasmid* [online]. Volume 16, Issue 1, s. 52-62. ISSN 0147-619X. DOI: 10.1016/0147-619X(86)90079-X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0147619X8690079X?via%3Dihub>.

PANCZAK, A., et al., 2013. *Lékařská biologie a genetika (III. díl)*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2415-0.

PICKETT, M., et al., 2005. The plasmids of Chlamydia trachomatis and Chlamydophila pneumoniae (N16): Accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. *Microbiology* [online]. Spojené království: Microbiology Society, březen 2005, 151(3), s. 893-903. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mik.0.27625-0. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27625-0>.

PRITCHARD, D.J. a KORF, B.R., 2013. *Základy lékařské genetiky*. Praha: Nakladatelství Galén. ISBN 978-80-7492-513-9.

ROSYPAL, S., 1997. *Úvod do molekulární biologie: První díl. 2. rozš. vyd.* Brno: PřF MUNI. ISBN 80-238-8186-8 (v knize neuvedeno).

SETH-SMITH, H., et al., 2009. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. *BMC Genomics* [online]. Spojené království: Springer Nature, 21. 5. 2009, 10(239) [cit. 2022-12-14]. ISSN 1471-2164. DOI: 10.1186/1471-2164-10-239. Dostupné z: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-239>.

SNUSTAD, D.P. a SIMMONS, M.J., 2017. *Genetika. 2. aktual. vyd.* Brno: Nakladatelství Munipress. ISBN 978-80-210-8613-5.