

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

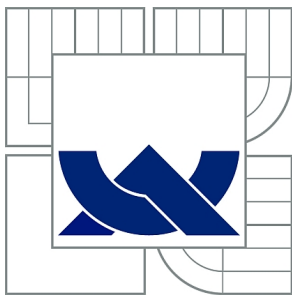
VYUŽITÍ TECHNIKY DGGE K ANALÝZE A IDENTIFIKACI VYBRANÝCH
DRUHŮ MIKROORGANISMŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

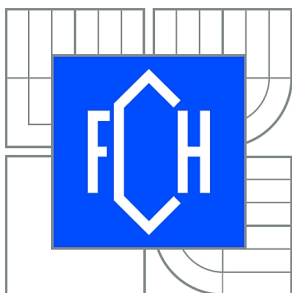
Bc. KRISTÍNA JANKEJE

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ TECHNIKY DGGE K ANALÝZE A IDENTIFIKACI VYBRANÝCH DRUHŮ MIKROORGANISMŮ

USE OF DGGE TO ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF SELECTED MICROORGANISMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KRISTÍNA JANKEJE

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0481/2010** Akademický rok: **2010/2011**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Kristína Jankeje**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce **doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

Využití techniky DGGE k analýze a identifikaci vybraných druhů mikroorganismů

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše - metoda PCR-DGGE (denaturační gradientová elektroforéza), princip a aplikace
2. Zavedení a optimalizace metod DGGE pro kvasinky, případně bakterie
3. Aplikace metod DGGE na identifikaci různých druhů karotenogenních kvasinek v modelových vzorcích
4. Využití metod DGGE k analýze kvasinek v reálných přírodních vzorcích

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Kristína Jankeje
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Predložená diplomová práca je zameraná na využitie techniky DGGE v analýze a identifikácii vybraných druhov mikroorganizmov. PCR-DGGE je metódou, ktorá umožňuje priamu charakterizáciu mikrobiálneho spoločenstva v prirodzenom prostredí, tzn. bez potreby kultivácie. Literárny prehľad sa venuje princípu metódy, súčasným aplikáciám i limitačným faktorom.

V experimentálnej časti práce bola izolovaná mikrobiálna DNA, ktorá bola použitá ako templát pre reakciu PCR. S použitím univerzálnych eukaryotických primerov bola amplifikovaná D1/D2 oblasť 26S rDNA. Zvolená bola modifikácia PCR využívajúca vonkajší a vnútorný pár primerov – nested PCR vyznačujúca sa vyššou citlivosťou a špecifitou. Získané amplikóny (asi 250 bp) boli ďalej separované technikou DGGE.

Vlastná analýza vybraných mikrobiálnych druhov metódou DGGE bola uskutočnená po optimalizácii základných parametrov (predovšetkým rozsah denaturačného gradientu a celkový čas separácie). Vzájomné rozlíšenie medzi jednotlivými druhmi kvasiniek napriek optimalizácii nebolo možné, keďže každý referenčný druh bol reprezentovaný niekoľkými fragmentmi DNA v tých istých pozíciách.

V závere práce je diskutovaný DGGE profil získaný z reálnych vzoriek muštu vínnej révy. Prítomné zóny naznačujú prítomnosť predovšetkým apikulárnych kvasiniek, v malej miere kvasinkového mikroorganizmu *A. pullulans* a pravdepodobne sacharomycétnych kvasiniek. Technika ostáva otvorená ďalšej optimalizácii, najmä čo sa týka podmienok polymerázovej reťazovej reakcie.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

mikrobiálna diverzita, PCR, DGGE, rDNA, kvasinky, mušt

ABSTRACT

Presented diploma thesis is focused on use of DGGE to analysis and identification of selected microorganisms. PCR-DGGE is a method that allows direct characterization of the microbial community in the natural environment without necessity of cultivation. A literature review is devoted to the principle of the method, current applications and its limitations too.

In experimental part microbial DNA was isolated and used as a template for PCR reaction. Microbial DNA was then amplified using the universal eukaryotic primers that target the D1/D2 domain of the 26S subunit of ribosomal DNA. To improve specificity and sensitivity of detection nested PCR was chosen using outer and inner primer pairs. Generated amplicons (250 bp) were consequently separated by DGGE.

The analysis of selected microorganisms by DGGE technique was performed after optimization of electrophoresis conditions (in particular the denaturing gradient extent and separation time). Despite the optimization, mutual differentiation among individual yeast strains was not possible since each reference strain was represented by several bands in the same positions.

In conclusion DGGE profile obtained from wine musts is discussed. Present bands suggest the major presence of non-*Saccharomyces* yeasts, yeast-like strain *A. pullulans* is present in the minority and *Saccharomyces* yeasts are probably present too. The technique remains open for further optimization, particularly as regards the conditions of polymerase chain reaction.

KEY WORDS

microbial diversity, polymerase chain reaction, DGGE, rDNA, yeasts, wine must

JANKEJE, K. *Využití techniky DGGE k analýze a identifikaci vybraných druhů mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 69 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje boli správne a úplne citované. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá pre komerčné účely iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Pod'akovanie:

Na tomto mieste chcem vyjadriť svoju vďaku doc. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za výber originálnej témy, odborné vedenie a ústretovosť nielen v študijných záležitostiach. Ďalej ďakujem Ing. Andrei Háronikovej za pomoc pri riešení experimentálnej časti práce. Predložená práca bola finančne podporená z prostriedkov projektu CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy	10
2.1.1	Morfológia kvasiniek	10
2.1.2	Rozmnožovanie kvasiniek	10
2.1.2.1	<i>Nepohlavné (vegetatívne) rozmnožovanie</i>	10
2.1.2.2	<i>Pohlavné (sexuálne) rozmnožovanie</i>	10
2.1.3	Rody tvoriace askospóry, trieda Ascomycetes	11
2.1.4	Bazídiomycétne kvasinky	11
2.1.5	Rody, u ktorých nie je známa tvorba pohlavných spór	11
2.2	Vybrané kvasinkové rody	11
2.2.1	Rod <i>Rhodotorula</i>	11
2.2.2	Rod <i>Cystofilobasidium</i>	12
2.2.3	Rod <i>Sporobolomyces</i>	12
2.2.4	Rod <i>Phaffia (Xanthophyllomonas)</i>	12
2.2.5	Rod <i>Aureobasidium</i>	13
2.2.6	Rod <i>Saccharomyces</i>	13
2.2.6.1	<i>Mikrobiológia vínnej révy a ovocného muštu</i>	14
2.3	Mikroskopické huby (plesne)	14
2.3.1	Rod <i>Fusarium</i>	14
2.4	Rast a kultivácia mikroorganizmov	15
2.4.1	Živné médiá	15
2.4.2	Kultivácia mikroorganizmov	15
2.4.2.1	<i>Spôsoby kultivácie</i>	15
2.5	Nukleové kyseliny	16
2.5.1	Stabilita a denaturácia DNA	18
2.5.2	Replikácia DNA	18
2.5.3	Izolácia a analýza DNA	19
2.5.3.1	<i>Izolácia a purifikácia DNA</i>	19
2.5.3.2	<i>Kvantifikácia DNA</i>	20
2.5.3.3	<i>Analýza DNA elektroforetickými metódami</i>	20
2.6	Amplifikácia nukleových kyselín v reakcii PCR	22
2.6.1	Primery	23
2.6.2	<i>Taq</i> DNA-polymeráza	24
2.6.3	PCR v praxi	24
2.6.3.1	<i>Horečnaté ióny Mg²⁺</i>	25
2.6.3.2	<i>Teplota pripojenia primeru</i>	25
2.6.3.3	<i>Počet cyklov a ich trvanie</i>	26
2.6.3.4	<i>Riziko kontaminácie</i>	27
2.6.4	Hniezdová (nested) PCR	27
2.6.5	Analýza PCR produktov	29
2.7	Denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE)	29
2.7.1	Mikrobiálna diverzita	29

2.7.1.1	Metódy závislé na kultivácii	29
2.7.1.2	Metódy nezávislé na kultivácii	29
2.7.2	Princíp DGGE	30
2.7.3	DGGE v praxi	31
2.7.3.1	Vlastná separácia v denaturačnom géli	33
2.7.3.2	Farbenie DGGE gélov	34
2.7.3.3	PCR s ohľadom na DGGE	34
2.7.3.4	Štandardy v DGGE	35
2.7.4	Limitácie DGGE	35
2.7.5	Aplikácie	37
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	38
3.1	Použité chemikálie, prístroje a pomôcky	38
3.1.1	Chemikálie	38
3.1.1.1	Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov	38
3.1.1.2	Chemikálie pre izoláciu DNA	38
3.1.1.3	Komponenty pre PCR	38
3.1.1.4	Chemikálie pre elektroforézu	38
3.1.2	Prístroje a pomôcky	39
3.1.2.1	Kultivácia mikroorganizmov	39
3.1.2.2	Izolácia DNA	39
3.1.2.3	PCR	39
3.1.2.4	Analýza izolovanej DNA a PCR produktov	39
3.1.3	Používané kultúry mikroorganizmov	40
3.1.4	Materiál	40
3.2	Produkcia mikrobiálnej biomasy	41
3.2.1	Kultivácia vybraných kmeňov kvasiniek	41
3.2.1.1	Inokulum č. 1	41
3.2.1.2	Inokulum č. 2	42
3.2.1.3	Produkčné médium	42
3.2.2	Kultivácia kvasinkového organizmu <i>A. pullulans</i>	42
3.2.3	Kultivácia vláknitej huby <i>Fusarium solani</i>	42
3.2.4	Spracovanie mikrobiálnej biomasy	42
3.3	Izolácia a analýza mikrobiálnej DNA	43
3.3.1	Izolácia kvasinkovej DNA fenol-chloroformovou extrakciou	43
3.3.1.1	Purifikácia izolovanej DNA	43
3.3.1.2	Stanovenie čistoty a koncentrácie izolovanej DNA	43
3.3.2	Izolácia DNA izolačnou súpravou UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit	44
3.3.3	Analýza DNA elektromigračnými metódami	44
3.3.3.1	Príprava vzoriek	44
3.3.3.2	Príprava agarózového gélu	45
3.3.3.3	Postup pri horizontálnej elektroforéze	45
3.4	PCR	45
3.4.1	Použité primery	45
3.4.2	Príprava reakčnej zmesi pre PCR	46
3.4.3	Prvý amplifikačný krok	46

3.4.4	Druhý amplifikačný krok	47
3.4.5	Elektroforetická detekcia fragmentov PCR produktov	47
3.5	Denaturačná gradientová gélová elektroforéza	47
3.5.1	Príprava polyakrylamidového gélu s lineárnym gradientom denaturantov	47
3.5.2	Príprava vzoriek pre separáciu DGGE	48
3.5.3	Postup pri elektroforéze	49
3.5.4	Farbenie DGGE gélov	49
3.5.4.1	<i>Farbenie striebrom</i>	49
3.5.4.2	<i>Farbenie EtBr</i>	49
3.6	Manipulácia s reálnymi vzorkami muštu vínnej révy	50
3.6.1	Kultivačné prístupy	50
3.6.1.1	<i>Kultivácia na tuhom médiu</i>	50
3.6.1.2	<i>Kultivácia v tekutom médiu</i>	50
3.6.2	Priama izolácia komplexnej DNA z reálnych vzoriek muštu	50
3.6.3	Amplifikácia a analýza fragmentov DNA	50
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	51
4.1	Príprava čistých (referenčných) kultúr mikroorganizmov	51
4.1.1	Izolácia mikrobiálnej DNA	51
4.1.1.1	<i>Izolácia DNA fenol-chloroformovou extrakciou</i>	51
4.1.1.2	<i>Izolácia DNA izolačnou súpravou UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit</i>	51
4.1.2	Amplifikácia izolovanej DNA	52
4.1.2.1	<i>Prvý amplifikačný krok</i>	53
4.1.2.2	<i>Druhý amplifikačný krok</i>	54
4.2	Analýza PCR produktov referenčných kultúr metódou DGGE	55
4.2.1	Optimalizácia denaturačného gradientu	55
4.2.2	Optimalizácia farbenia DGGE gélov	55
4.2.3	Optimalizácia trvania separácie	56
4.2.4	Vlastná analýza referenčných kmeňov	57
4.3	Spracovanie reálnych vzoriek muštov vínnej révy	59
4.4	Analýza reálnych vzoriek metódou DGGE	61
5	ZÁVER	63
6	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	65
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	68
8	ZOZNAM PRÍLOH	69

1 ÚVOD

Kvasinky a mikroorganizmy všeobecne sú často klasifikované na základe morfológických, fyziologických a biochemických vlastností. Tradičná metodológia zahŕňa cca 60 až 90 rôznych testov, proces identifikácie je zložitý a časovo náročný. V niektorých prípadoch môžu byť získané výsledky neisté a niesť prípadné chyby. Najväčším obmedzením tradičných kultivačných prístupov je nedostatok vedomostí ohľadom reálnych podmienok, pri ktorých väčšina mikroorganizmov rastie v ich prirodzenom prostredí. Odhaduje sa, že až 99 % všetkých mikroorganizmov v prírode nie je možné izolovať ako čisté kultúry. Súčasným trendom je preto zlepšenie a zjednodušenie metód identifikácie.

Zásadnú zmenu v štúdiu mikroorganizmov umožnilo zavedenie molekulárno-biologických metód, ktoré sa uplatňujú v identifikácii a analýze i nekultivovateľných druhov. Pozornosť je v tomto smere zameraná najmä na ribozomálnu DNA, keďže ide o vysoko konzervatívny úsek genómu, ktorý obsahuje aj variabilné sekvencie. Pre štúdium eukaryotických spoločenstiev sa s výhodou využíva amplifikácia veľkej podjednotky (26S) rRNA, konkrétne génov kódujúcich D1/D2 domény tejto podjednotky.

Dôležitým pojmom pri analýze mikroorganizmov v reálnych vzorkách potravín je mikrobiálna diverzita. Techniky genetického fingerprintu poskytujú profil (odtlačok) genetickej diverzity mikrobiálneho spoločenstva na základe fyzickej separácie nukleových kyselín jednotlivých druhov. Všeobecný postup zahŕňa izoláciu nukleovej kyseliny, amplifikáciu génov kódujúcich veľkú ribozomálnu podjednotku 26S rRNA, a napokon analýzu PCR produktov konkrétnou metódou. Spomedzi týchto techník je najviac používanou denaturačná gradientová gélová elektroforéza.

Denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE) je metóda, ktorá slúži na detekciu už jednonukleotidových zámien v molekule DNA. Princípom je separácia amplifikovaných fragmentov rDNA s rovnakou či podobnou veľkosťou (najviac 500 bp), majúcich však rôznu sekvenciu. Separácia je založená na klesajúcej pohyblivosti fragmentov v polyakrylamidovom géli s rastúcim lineárnym gradientom denaturantov (zmes močoviny a formamidu). Jednou z predností metódy je rýchla analýza zloženia, ako aj sledovanie vývoja mikrobiálneho spoločenstva v čase či priestore. Pre získanie plnohodnotného profilu mikrobiálnej komunity je výhodné metódy molekulárnej biológie zároveň doplniť tradičnými technikami kultivácie.

Cieľom diplomovej práce je zavedenie techniky DGGE do laboratória ÚCHPBT. Práca vychádza z literárnej rešerše zameranej na princíp a aplikácie metódy, ako aj na vybrané mikroorganizmy. Hlavnou náplňou experimentálnej štúdie je optimalizácia metódy pre kvasinky, prípadne pre mikroskopické huby. Rovnako je diskutovaný i DGGE profil získaný z vhodných reálnych vzoriek – muštu vínnej révy.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotické mikroorganizmy, ktoré netvoria jednotnú taxonomickú skupinu. Systematicky sa zaraďujú medzi nižšie huby (*Fungi*). Podľa spôsobu pohlavného rozmnožovania patria niektoré z nich medzi askomycéty, iné medzi bazidiomycéty (súhrnne sú označované ako teleomorfné kvasinky). U niektorých však pohlavné rozmnožovanie nie je známe, tie sa zaraďujú medzi deuteromycéty. Taxonómia ďalej rozlišuje tzv. kvasinkovité mikroorganizmy – organizmy so zložitejším životným cyklom, v ktorom má však výrazné zastúpenie fáza kvasinková, kedy sa mikroorganizmus rozmnožuje v jednobunkovej forme pučaním [1][2].

Kvasinky možno charakterizovať ako zväčša jednobunkové organizmy, rozmnožujúce sa prevažne pučaním a spracovávajúce zdroje uhlíka zvyčajne kvasením. Niektoré kvasinky však pri určitých podmienkach môžu vytvárať mycélia priehradkovým delením a môžu tak existovať i vo viacbunkovej forme. Existujú tiež kvasinky, ktoré nie sú schopné fermentácie a zdroje uhlíka a energie tak spracovávajú výlučne oxidatívnou cestou [2].

2.1.1 Morfológia kvasiniek

Kvasinky sú mikroskopické organizmy. Sú však väčšie ako bunky bakteriálne, v dlhšom rozmere zvyčajne dosahujú dĺžku 3 – 15 μm [2].

Najbežnejším tvarom kvasinkovej bunky je rotačný elipsoid, bežný je tiež guľatý tvar. Existujú však aj kvasinky, ktorých bunky majú dlhý pretiahnutý, citrónovitý, valcovitý či trojuholníkovitý tvar. Dnes je známe, že ich tvar nie je stály a v čistej kultúre sa mení v závislosti na štádiu vývoja a podmienkach kultivácie [1][2].

2.1.2 Rozmnožovanie kvasiniek

2.1.2.1 Nepohlavné (vegetatívne) rozmnožovanie

Vo veľkej miere súvisí tvar bunky so spôsobom vegetatívneho rozmnožovania. Prevažná väčšina kvasiniek sa rozmnožuje pučaním buniek, sú však aj kvasinky, ktoré sa podobne ako baktérie rozmnožujú jednoduchým zaškrtením, delením [1][2].

Niektoré rody či kmene kvasiniek vytvárajú pretiahnuté bunky, ktoré pučia iba na pólach a ostávajú spojené v dlhé zaškrtené vlákna – tzv. pseudomycélium označované tiež ako nepravé hýfy. Iné rody kvasiniek tvoria pravé mycélium – vlákno vznikajúce pričným delením pretiahnutých buniek [1].

2.1.2.2 Pohlavné (sexuálne) rozmnožovanie

Okrem vegetatívneho rozmnožovania je u mnohých kvasiniek známy i pohlavný spôsob, výsledkom ktorého sú pohlavné spóry:

- endospóry (askospóry) sú umiestnené vo vrečku (asku), môžu mať rôzny tvar (guľovitý až elipsoidný, vretenovitý, saturnovitý, kosáčikovitý, obličkovitý a pod.),
- exospóry (bazidiospóry) sú umiestnené na vonkajšej strane spórotvorných buniek [1].

Pre základné rozlíšenie askomycét a bazidiosporogénnych kvasiniek sa používa test schopnosti produkovať ureázu či farbenie nárastu biomasy diazóniovou modrou [2].

2.1.3 Rody tvoriace askospóry, trieda Ascomycetes

Ide o nepigmentované kvasinky tvoriace endospóry, ktorých bunková stena obsahuje najmä glukán a manán. Neprodukujú ureázu, sacharidy môžu, ale i nemusia skvasovať, ich bunky nie je možné ofarbiť diazóniovou modrou [3].

Do triedy Ascomycetes patria predovšetkým kvasinkové druhy používané ako priemyselné kvasinky. Technologicky najdôležitejším je rod *Saccharomyces*. Zástupcovia tohto rodu sú schopní skvasovať niekoľko cukrov, nikdy však nevyužívajú laktózu ako zdroj uhlíka. Tvoria zväčša krátke elipsoidné, vajcovité či pretiahnuté bunky [4].

Najvýznamnejším druhom je *Saccharomyces cerevisiae*, ktorá sa uplatňuje ako pekárska, pivárska, liehovarská a vinárska kvasinka. Zároveň slúži ako modelový mikroorganizmus pre biochemické či genetické štúdie a je tak najviac preštudovanou kvasinkou [4].

Medzi ostatné rody tvoriace askospóry sa zaraďujú: *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* či *Pichia* [4].

2.1.4 Bazídiomycétne kvasinky

Do triedy Basidiomycetes sa zaraďujú pigmentované kvasinkovité mikroorganizmy vyznačujúce sa tvorbou exospór, produkciou ureázy, vyfarbovaním biomasy diazóniovou modrou do červena a vysokým obsahom G+C v DNA. Bunková stena týchto kvasiniek je tvorená najmä chitínom a manánom, sacharidy spravidla neskvasujú, iba vo výnimočných prípadoch môže prebiehať slabé kvasenie [3].

Medzi bazídiomycéty patria napríklad rody *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporidiobolus* a ďalšie. Pomerne širokou a významnou skupinou sú červené kvasinkovité organizmy vyznačujúce sa produkciou látok karotenoidnej povahy. Bunky i celé kolónie tak získavajú žltý, oranžový až sýto-ružový farebný nádych [4].

2.1.5 Rody, u ktorých nie je známa tvorba pohlavných spór

Tieto rody sa zvykli označovať ako nepravé kvasinky, v súčasnosti nesú pomenovanie *Fungi imperfecti* [1].

Najpočetnejší je rod *Candida*, ktorý tvoria ako druhy nekvasiace, tak aj druhy so silnými kvasnými schopnosťami. Niektoré z nich slúžia pre prípravu kýmneho droždia vyrábaného z melasy a iných odpadových materiálov (najviac využívaný pre tento účel je druh *Candida utilis*). Existujú však aj druhy, ktoré su patogénne a teda pre človeka nebezpečné. Spôsobujú ochorenia známe ako kandidózy, a to najmä kože a nechtov, ojedinele i vnútorných orgánov a slizníc [4].

2.2 Vybrané kvasinkové rody

2.2.1 Rod *Rhodotorula*

Ide o ubikvitné, celosvetovo rozšírené kvasinky. Možno ich izolovať zo vzduchu, pôdy, sladkej i slanej vody, z povrchu rastlín, ale i rôznych orgánov živočíšnych organizmov. Ľahko sa kultivujú, sú nenáročné na životné podmienky, často sa rozmnožujú i v pôdach bez zdroja dusíka a ich identita sa dobre dokazuje už pre ich červenú pigmentáciu spôsobenú prítomnými karotenoidmi. Obdobne sú charakterizované i kvasinky rodu *Cystofilobasidium*, ktoré sa, rovnako ako druhy rodu *Rhodotorula*, systematicky zaraďujú do čeľade *Rhodotorulaceae* [3].

Rod *Rhodotorula* neskvasuje žiadne cukry, má silne vyvinutý pentózový cyklus využívania glukózy. Tvorí guľovité až elipsoidné bunky s obsahom karotenoidných pigmentov

podmieňujúcich tak oranžové až ružové sfarbenie kolónií. Tieto farbivá chránia bunky pred pôsobením ultrafialového žiarenia. V kvapalnom prostredí tvoria tieto kvasinky sediment a prstenec spravidla svetlej, krémovej až svetloružovej farby [3][4].

Všetky druhy rodu *Rhodotorula* sú lipidotvorné (lipogénne) a v bunkách tak dochádza k akumulácii lipidov, pri určitých podmienkach dokonca v nadmernom množstve. S tým súvisí i schopnosť produkovať lipolytické enzýmy [3].

Hlavnými zložkami pigmentov u kvasiniek sú β -karotén, γ -karotén, torulén a torularodín. Vzájomné pomery karotenoidov sa výrazne menia v závislosti na prostredí a podmienkach kultivácie. Pre produkciu karotenoidov vyžadujú kvasinky prítomnosť svetla a kyslíka. Karotenoidné farbivá sú nerozpustné vo vode, avšak rozpustné v tukoch a preto nikdy nedifundujú do živného prostredia. Sú lokalizované na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány [2][3].

2.2.2 Rod *Cystofilobasidium*

Rod *Cystofilobasidium* patrí medzi menej popísané kvasinkové rody so štyrmi známymi druhmi – tri ružovo sfarbené (*Cystofilobasidium bisporidii*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*) a jeden krémovo sfarbený [5].

Kvasinky vytvárajú kolónie s hladkým lesklým povrchom, bunky sú guľovitého až pretiahnutého tvaru. V kvapalných médiách tvoria tenkú kožku. Od rodu *Rhodotorula* sa odlišujú typom bazídií, ktoré je jednobunkové, neseptované, ide o tzv. holobazídium [2][3].

2.2.3 Rod *Sporobolomyces*

Druhy rodu *Sporobolomyces* sú časté kontaminanty rôznych potravín, rastlinného materiálu, vinárskych zariadení. Vyskytujú sa na stenách a dlážkach kvasiarní. Systematicky sa sem zaraďujú: *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces shibatanus* [3].

Kvasinky rodu *Sporobolomyces* majú striktné aeróbnym metabolizmus, nemajú teda kvasné schopnosti. Kolónie v dôsledku produkcie karotenoidov získavajú žlté až sýto-ružové sfarbenie, zväčša sú silne zvrásnené a akoby poprásené či pomúčené. Tento „poprašok“ je spôsobený balistospórmi, ktoré po vystrelení často padajú späť na kolóniu. Vedľa pučiacich buniek tvoria tiež bohaté mycélium. Pomerne častý je ich výskyt na listoch stromov a iných rastlinách, odkiaľ sa dostávajú do tečúcich i stojatých vôd [3][4].

Sporobolomyces roseus je súčasťou fylosféry a atmosféry, kde je častým zdrojom výživy dusíkom nitrát. Vyznačuje sa silnou karotenogenezou, jeho nátery sú tmavočervené a hladké. Bunky sú guľovité, elipsoidné až pretiahnuté. V kvapalných prostrediach vytvára sediment a veľmi hrubý prstenec. Má rovnaký obsah G+C v DNA ako *S. salmonicolor* [3].

2.2.4 Rod *Phaffia* (*Xanthophyllomonas*)

Jediným predstaviteľom rodu je druh *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomonas dendrorhous*), ktorý bol izolovaný z exsudátov stromov v Japonsku a Severnej Amerike. *P. rhodozyma* tvorí elipsoidné bunky, a to buď jednotlivé, v pároch alebo krátkych retiazkach. V kvapalnom médiu tvorí sediment, prstenec i kožku. Náter na agare je pomarančovo-červený, hladký [3].

Od všetkých ostatných červených kvasiniek sa odlišuje svojou schopnosťou skvasovať cukry, aj keď iba veľmi slabo, po dlhšom čase a pri nízkej teplote. Prioritne produkovaným pigmentom je astaxantín, ktorý predstavuje až 85 % z celkového podielu karotenoidov, ďalej

nasledovaný β -karoténom. So zvyšujúcim sa množstvom prijímaného kyslíka v kvapalných médiách vzrastá i produkcia astaxantínu. *Phaffia rhodozyma* sa tiež vyznačuje vysokým podielom cukru a celkových tukov v porovnaní s mnohými ďalšími kvasinkami [3][6].

2.2.5 Rod *Aureobasidium*

Rod *Aureobasidium* je v súčasnosti predmetom zvýšeného záujmu, a to pre jeho schopnosť enzymaticky degradovať celulózu, hemicelulózu, xylány a lignín. Táto vlastnosť je významná pri použití drevných odpadov s cieľom syntézy jednobunkových bielkovín. Po morfolologickej stránke predstavuje tento rod prechod medzi kvasinkami a plesňami, keďže niektoré kmene produkujú veľké množstvo kvasinkovitých buniek a vzdušné mycélium je takmer neprítomné [4][7].

Najvýznamnejším zástupcom je *Aureobasidium pullulans*; ide o tzv. čierny kvasinkovitý organizmus priemyselne používaný pre produkciu polysacharidu pululanu, ktorý je biotechnologicky dôležitou zlúčeninou pre výrobu biopolymérov. Slizovitý pululan určuje vlhký, slizovitý charakter kolónií, ktoré tak svojím vzhľadom pripomínajú kolónie kvasiniek či baktérií. V kvapalnom médiu sa vyskytujú hrubé kožky, niekedy i vysoký sliznatý sediment. Kolónie niektorých kmeňov sú bezfarebné, iné ružové až oranžové, prípadne modrozelené až čierne, a to v dôsledku produkcie melanoidných farbív. Pri získavaní biomasy je častou prekážkou práve čierny pigment melanín, inokedy je nežiaduca nadprodukcia pululánového slizu či množstvo hýf. Jednotlivé kmene sa navzájom líšia, záleží tiež na podmienkach kultivácie [2][4][7].

Aureobasidium pullulans je častou kontamináciou ovzdušia, vyskytuje sa však aj ako parazit na rastlinách a môže tiež spôsobiť choroby zvierat. V mušte pred kvasením môže tvoriť nevzhľadnú sýto-čiernu masu zloženú z čiernych dvojbunkových chlamydospór, ktoré sú však tolerantné k najviac 2 % ethanolu a vo víne tak už nie sú prítomné. *A. pullulans* je tiež súčasťou slizu na stenách vinárskych prevádzok [4][7].

2.2.6 Rod *Saccharomyces*

Technologicky najdôležitejším zástupcom je druh *Saccharomyces cerevisiae*. Bunky majú zväčša krátko elipsoidný, vajcovitý alebo pretiahnutý tvar. Askospóry sú guľovité až elipsoidné s hladkou stenou, v počte jeden až štyri v asku. Vegetatívne sa rozmnožujú multilaterálnym pučaním, môžu vytvárať pseudomycélium, nie však pravé mycélium [1][2][4].

Sacharomycétne kvasinky nikdy nevyužívajú laktózu ako zdroj uhlíka, ani NO_3^- ako zdroj dusíka. *S. cerevisiae* patrí k fakultatívne anaeróbnym mikroorganizmom s prevahou fermentatívneho metabolizmu. Skvasuje glukózu, sacharózu, maltózu, galaktózu a čiastočne alebo úplne trisacharid rafinózu. Hlavným produktom kvasenia (primárneho metabolizmu) je ethanol, na ktorého vzniku sa podieľajú tri typy alkoholdehydrogenázy [2][4].

S. cerevisiae je najviac preštudovanou kvasinkou a má tak prioritné postavenie ako modelový organizmus v biochemických, genetických a ďalších výskumoch. Nemenej významné je jej využitie v potravinárskom priemysle. V tejto súvislosti možno rozlíšiť štyri základné priemyselné kmene, ktoré sa aplikujú v jednotlivých technológiách pri výrobe piva, vína, liehu a pekárskeho droždia. Navzájom sa odlišujú svojimi fyziologickými vlastnosťami [4].

Pri alkoholovom kvasení ovocného muštu majú prvoradý význam vinárske (vínne) kvasinky, ktoré sa do muštov dostávajú z najrôznejších druhov ovocia; najväčší priemyselný

význam majú bobule vínnej révy. Každý mušt obsahuje veľmi pestrú paletu rôznych rodov a druhov kvasiniek. Najväčšmi sa uplatňujú tzv. pravé vinárske kvasinky (*Saccharomyces vini*, synonymá *S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus*). Selekciou je možné získať rôzne kmene s vlastnosťami, ktoré sú najvhodnejšie pre vlastný technologický výrobný proces, ako aj pre konečnú kvalitu vína. Vinárske kvasinky sa vyznačujú vyššou toleranciou voči ethanolu. Kvasenie prebieha pri 25 °C po dobu jedného až dvoch týždňov (obsah ethanolu rastie iba pomaly). U týchto kmeňov je žiaduca autolýza kvasiniek, čo prispieva k vytváraniu buketu vína [1].

2.2.6.1 Mikrobiológia vínnej révy a ovocného muštu

Na zdravých bobuliach vínnej révy sú dominantnými druhmi apikulátne kvasinky *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*); rod *Kloeckera* predstavuje 50 až 75 % celkovej populácie kvasiniek na povrchu hrozna. V menšom pomere sú prítomné aeróbne rody ako *Candida* (*Metchnikowia*), *Pichia*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces* a *Rhodotorula*, ďalej kvasinkovitý mikroorganizmus *Aureobasidium pullulans*. Naopak, kvasné druhy rodu *Saccharomyces* sú na zdravých nepoškodených bobuliach zastúpené iba minimálne (menej ako 50 CFU/ml); vyžadujú vyššiu koncentráciu sacharidu v prostredí muštu. Lepšia dostupnosť živín v trhlkách poškodených bobúľ je podnetom pre väčšiu a rozmanitejšiu kvasinkovú populáciu [8][9][10].

Za alkoholovú fermentáciu ovocného muštu sú primárne zodpovedné kvasinky, pričom ich diverzita prispieva k sensorickej kvalite vína. V prvých fázach fermentačného procesu môže byť prítomných až 15 rodov nesacharomycétnych kvasiniek, ako sú napr. *Brettanomyces* (*Dekkera*), *Pichia*, *Kloeckera* a *Candida*. *Kloeckera* a *Candida* sú hlavnými zástupcami nesacharomycétnych kvasiniek v spontánných i riadených fermentáciach ovocného muštu. Silne kvasiace sacharomycéty skvasujú sacharidy na alkohol, čím mikroorganizmy strácajú zdroj uhlíka a energie. I pre vyššiu koncentráciu ethanolu v kvasiacom mušte nastáva pokles zastúpenia mikroorganizmov. Fermentačnému procesu tak dominuje jeden či viacero kmeňov *S. cerevisiae*, a to vďaka vysokej tolerancii voči produkovanému ethanolu v porovnaní s ostatnými kvasinkami prítomnými v prostredí muštu [9][11].

2.3 Mikroskopické huby (plesne)

Ako plesne sa označujú mikroskopické vláknité eukaryotické mikroorganizmy taxonomicky patriace medzi *Fungi*. Rozmnožujú sa spórami (pohlavne i nepohlavne) a tiež rozrastaním hýf. Hýfy sa vetvia približne v pravom uhle a ich spleť sa nazýva mycélium [4].

2.3.1 Rod *Fusarium*

Ide o veľmi rozsiahly a v prírode rozšírený rod, ktorý spôsobuje hniloby niektorých plodín (napr. jablák, paradajok, kukurice, obilnín). Niektoré druhy sú pôvodcami ochorení rastlín, iné môžu produkovať toxíny a spôsobiť tak vážne ochorenia človeka. Fusária žijú v pôde – v rhizosfére, teda v najbližšej zóne okolo koreňov rastlín, možno ich však nájsť aj na iných rastlinných častiach. Pokiaľ nedochádza k parazitickej činnosti, vytvorí sa určitá voľnejšia symbióza medzi nimi a koreňovými bunkami [1][4].

Fusarium sa rozmnožuje pomocou viacbunkových banánovitých konídií, tvorí tiež jednobunkové konídie (tzv. mikrokonídie); niektoré druhy môžu tvoriť i chlamydo-spóry [4].

2.4 Rast a kultivácia mikroorganizmov

2.4.1 Živné médiá

V laboratóriu sa mikroorganizmy kultivujú na sterilných živných médiách. Zloženie média musí vyhovovať všetkým požiadavkám daného mikroorganizmu na výživu, pH, osmotické pomery a ďalšie fyzikálno-chemické podmienky [1].

Podľa pôvodu a zloženia možno živné médiá rozdeliť do troch skupín:

- a) prirodzené – prirodzené substráty mikroorganizmov, sú vhodné na krátkodobú kultiváciu alebo na izoláciu z prírodných zdrojov,
- b) polosyntetické (komplexné) – nie sú chemicky presne definované, ako zdroj uhlíka a dusíka obsahujú proteíny a peptidy, ktoré sa pridávajú vo forme extraktov, hydrolyzátov a peptónov,
- c) syntetické – ich chemické zloženie je presne definované, pridávajú sa niektoré aminokyseliny, vitamíny či rastové faktory [1].

Z hľadiska rastu mikroorganizmov sa živné médiá rozlišujú nasledovne:

- a) univerzálne – svojím zložením vyhovujú požiadavkám na výživu širokého spektra mikroorganizmov,
- b) selektívne – ich zloženie zvyhodňuje rast jednej skupiny či druhu mikroorganizmov; obsahujú jednu či viac inhibičných látok, ktoré potláčajú rast zvyšnej mikroflóry,
- c) selektívne-diagnostické – rastie na nich iba malá skupina mikroorganizmov, ktorých rast sa prejaví charakteristickou biochemickou reakciou [1].

2.4.2 Kultivácia mikroorganizmov

Pod pojmom kultivácia sa rozumie pestovanie mikroorganizmov pri laboratórnych podmienkach – tj. proces, ktorý zahŕňa naočkovanie inokula do živného média a jeho inkubáciu pri optimálnej teplote a dobe [1][12].

2.4.2.1 Spôsoby kultivácie

Statická kultivácia prebieha v pokojovom režime. Mikroorganizmy sú naočkované do určitého objemu tekutého živného média alebo na povrch tuhého média, pričom sú v priebehu rastu postupne vyčerpané živiny a hromadia sa splodiny metabolizmu, ktoré často majú inhibičný vplyv na rast [1].

Submerzná kultivácia prebieha v tekutom živnom médiu, ktoré je neustále premiešavané (na trepačke) a prevzdušňované. Rast pri submerzných podmienkach prebieha rýchlejšie, dodnes sa v priemysle využíva vo fermentoroch. Nevýhodou ako statickej, tak i submerznej kultivácie je nemožnosť presnej špecifikácie aktuálnych rastových podmienok a zaistenia ich konštantnosti [1].

Podstata kontinuálnej kultivácie spočíva v tom, že k rastúcej kultúre mikroorganizmov pritekajú živiny a odteká rovnaký objem média s vyrastenými mikroorganizmami. Zvolením vhodnej rýchlosti prítoku je možné dosiahnuť rovnovážny stav, kedy sa situácia v inkubačnej nádobe nemení a v celom objeme živného média je udržiavaný konštantný počet buniek (je tak laboratórnym modelom, ktorý sa najviac približuje prirodzeným podmienkam mikroorganizmov v ich prirodzenom prostredí) [1].

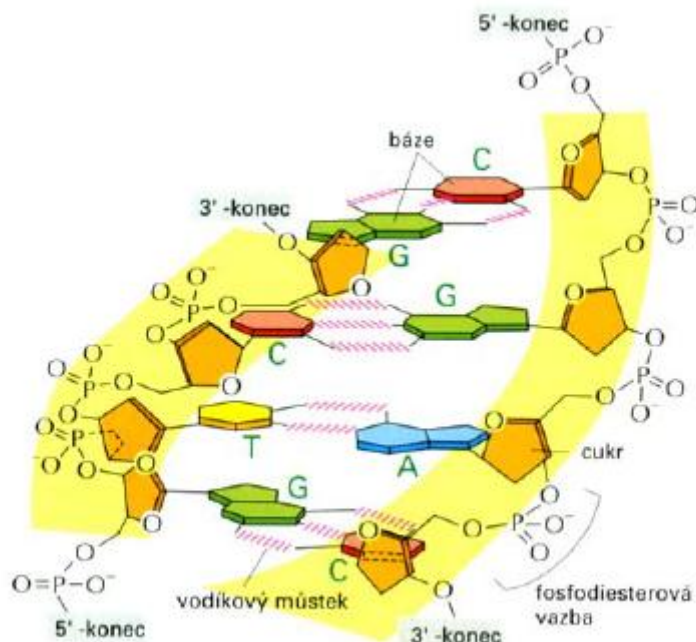
Podľa nárokov mikroorganizmov na prítomnosť či neprítomnosť vzdušného kyslíka možno rozlíšiť kultiváciu aeróbnu a anaeróbnu:

- aeróbná kultivácia – mikroorganizmy využívajú vzdušný kyslík, ktorý sa prirodzene dostáva do kultivačnej nádoby,
- anaeróbná kultivácia – pri tomto spôsobe kultivácie je potrebné odstrániť vzdušný kyslík zo živného média a zamedziť jeho ďalšiemu prístupu ku kultúre, napr. pridaním redukujúcich látok do média, odčerpaním vzduchu alebo vzduchotesným uzavrením apod. [1].

2.5 Nukleové kyseliny

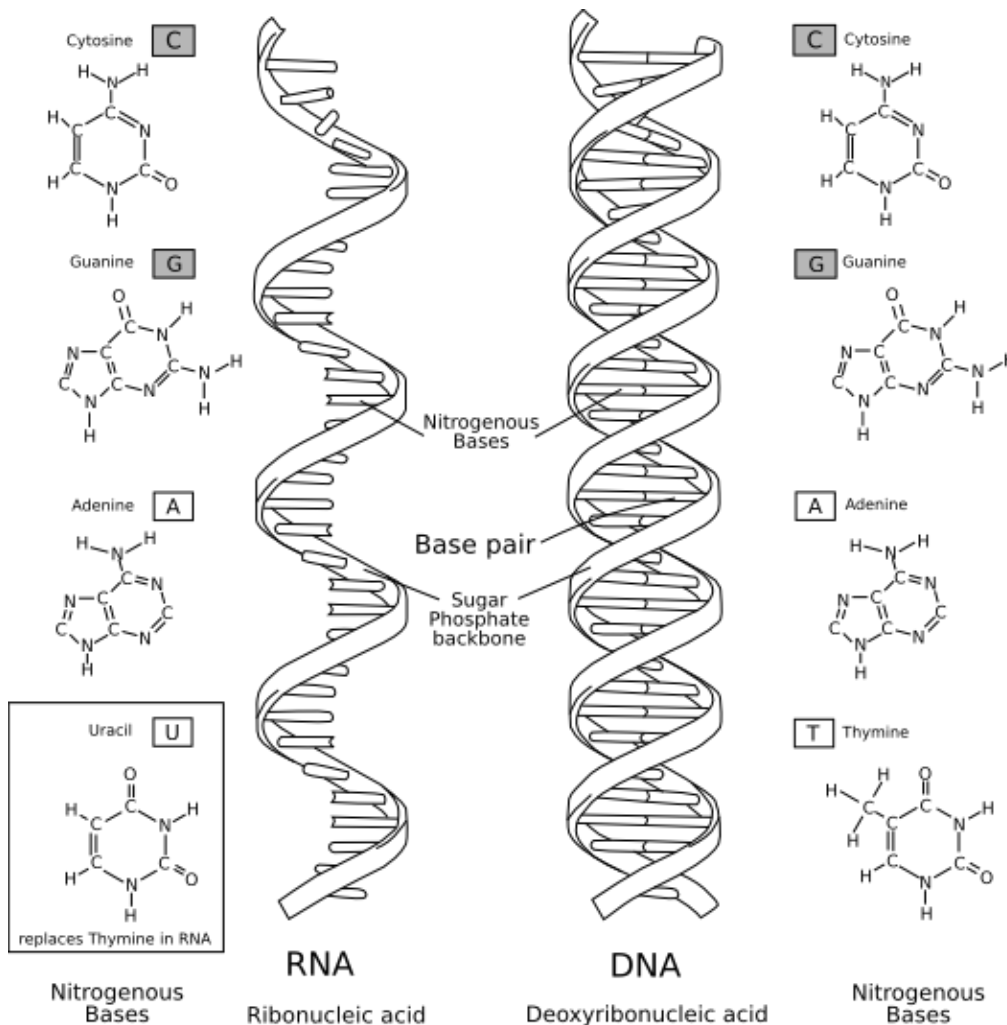
Nukleové kyseliny sú biochemické makromolekulárne látky tvorené polynukleotidovým reťazcom, ktorý vo svojej štruktúre uchováva genetickú informáciu. Podľa chemického zloženia sa rozlišujú dva typy nukleových kyselín: deoxyribonukleová (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA). DNA slúži ako depozitár genetickej informácie, RNA následne ako prenášač tejto informácie do poradia aminokyselín v syntetizovanom proteíne [13][14].

Nukleové kyseliny majú nerozvetvený reťazec vzniknutý kondenzáciou nukleotidov. V reťazci sa striedajú zvyšky pentóz a kyseliny fosforečnej. Postrannými skupinami sú dusíkaté bázy glykozidicky viazané na pentózové zvyšky. Pentózou môže byť: β -D-ribóza v RNA a 2-deoxy- β -D-ribóza v DNA. Dusíkaté bázy sú vždy štyri, a to dve purínové (adenín – A a guanín – G) a dve pyrimidínové (cytozín – C, ktorý je prítomný vo všetkých nukleových kyselinách, tymín – T, ktorý sa vyskytuje len v DNA a uracil – U, ktorý nahrádza tymín v RNA). Rôznym poradím nukleotidov v reťazci je možné dosiahnuť enormné množstvo kombinácií. Práve sekvenciou (poradím) dusíkatých báz v nukleových kyselinách je kódovaná genetická informácia bunky [13][14][15].



Obr. 1 Krátky úsek dvojzávitnice DNA: nukleotidy sú navzájom spojené fosfodiesterovými väzbami medzi 3'-hydroxylovou skupinou (-OH) jedného sacharidu a 5'-fosfátovou skupinou druhého sacharidu [16]

S výnimkou niektorých vírusov je molekula RNA jednovláknová – tvorená jediným polyribonukleotidovým reťazcom. Molekula DNA je spravidla pravotočivá dvojzávitnica (dihelix) zložená z dvoch polynukleotidových reťazcov opačnej orientácie; tie sú zatočené v špirálach okolo spoločnej centrálnej osy. Oba reťazce sú navzájom viazané na princípe komplementarity: dvoma vodíkovými väzbami medzi bázami adenínom (A) a tymínom (T) a tromi vodíkovými väzbami medzi cytozínom (C) a guanínom (G). Dusíkaté bázy sú orientované dovnútra a fosfosacharidové reťazce tak tvoria kostru dihelixu DNA [14][17].



Obr. 2 Rozdiel v štruktúre RNA a DNA [13]

Okrem štruktúry sa molekuly DNA a RNA líšia aj svojou funkciou. Deoxyribonukleová kyselina predstavuje základný genetický materiál väčšiny živých organizmov. Ribonukleová kyselina sa podľa funkcie, ktorú v bunkách plní, rozlišuje na tri typy: ribozomálna RNA (rRNA), ktorá tvorí hlavný stavebný materiál bunkových organel – ribozómov; mediátorová RNA (mRNA), ktorá prenáša informáciu z jadra bunky do cytoplazmy a transférová RNA (tRNA), ktorá funguje ako prenášač aktivovaných aminokyselín z cytoplazmy na ribozómy. Všetky tieto RNA sú syntetizované podľa predlohy DNA v procese transkripcie [14][15].

2.5.1 Stabilita a denaturácia DNA

Pôsobením zvýšenej teploty dochádza k prerušeniu väzieb stabilizujúcich dihelikálnu formu DNA. Nastáva tak rozpad natívnej štruktúry molekuly, oba komplementárne reťazce sa oddelia a zaujímajú konformáciu náhodného kľbka. Postupným znižovaním teploty sú obe oddelené vlákna schopné späť reasociovať a tak plne regenerovať dvojzávitnicovú molekulu DNA. Tento proces sa označuje ako renaturácia [14][17].

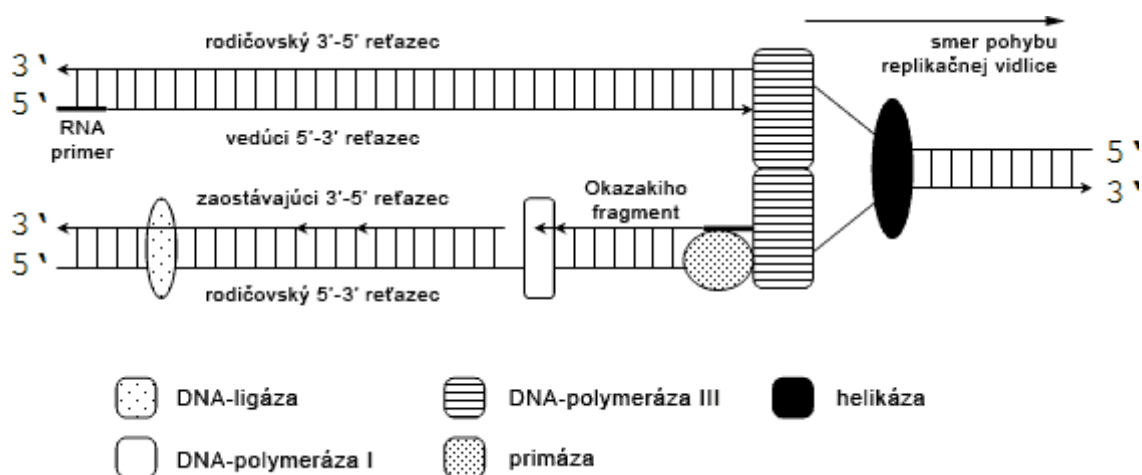
Denaturácia je kooperatívnym procesom, kedy zrušenie jednej časti molekuly postačuje pre destabilizáciu jej zvyšku; je preto vyjadrený esovitou krivkou – tzv. krivkou topenia DNA. Denaturáciu DNA sprevádza tzv. hyperchrómny efekt, kedy dochádza ku zvýšeniu absorbancie UV svetla (jednoreťazcové molekuly DNA absorbujú UV žiarenie silnejšie než dsDNA). Sledovať prechod medzi natívnym a denaturovaným stavom je možné meraním UV-absorpčného spektra pri 260 nm [14][17][18].

Stabilita dvojzávitnice DNA, a tým aj teplota, pri ktorej nastáva jej denaturácia, závisí od niekoľkých faktorov. Na tepelnej stabilite sa najväčšmi podieľa obsah guanínu a cytozínu. S ich molárnym pomerom vzrastá teplota nutná pre denaturáciu, čo súvisí s fixáciou týchto párov pomocou troch vodíkových mostíkov, na rozdiel od dvoch vodíkových väzieb v prípade párov adenínu a tymínu. Teplota, pri ktorej zdenaturuje 50 % dvojzávitnicovej molekuly DNA sa označuje ako teplota topenia – T_m (angl. „melting temperature“). Táto teplota zodpovedá inflexnému bodu denaturačnej krivky a je lineárne závislá na percentuálnom obsahu guanínu a cytozínu. Teplotu T_m DNA ovplyvňujú i ďalšie faktory: pH, iónová sila roztoku a povaha rozpúšťadla [17][18].

2.5.2 Replikácia DNA

Podmienkou prenosu informácie uloženej v DNA (do dcérskych buniek, ako aj ďalších generácií organizmu) je schopnosť zdvojenia samej seba. Toto zdvojenie sa označuje ako semikonzervatívna replikácia; to znamená, že vznikajú dve dcérske, vzájomne identické kópie, pričom jedno vlákno pochádza z materskej DNA a druhé je syntetizované. Replikácia je enzymaticky riadeným procesom presného kopírovania sekvencie DNA na základe komplementarity nukleových báz (A-T a G-C) [13][14].

Pri vlastnej syntéze DNA sa obe vlákna pôvodnej (materskej) molekuly začnú od seba vzdŕalovať a rozpletať pôsobením enzýmu helikázy. Do rozpletenej DNA sa na obe vlákna pripojí enzým RNA-polymeráza (primáza) a na každom vlákne vytvorí krátky úsek RNA (tzv. primer). Naň sa následne napojuje novo vytvorená DNA. Voľné nukleotidy sa podľa princípu komplementarity (pôsobením enzýmu DNA-polymerázy) začnú prikladať k pôvodnému (matricovému) vláknu DNA ($3' \rightarrow 5'$), oproti druhému vláknu ($5' \rightarrow 3'$) syntetizuje DNA-polymeráza iba krátke úseky (tzv. Okazakiho fragmenty). Jedno z novo tvorených vlákien sa teda netvorí kontinuálne, ale kus za kusom. Jednotlivé časti rastúceho reťazca spája ďalší enzým – DNA-ligáza. Pri replikácii môže dôjsť k množstvu chýb vo výslednom genetickom materiáli. Preto bunky disponujú niekoľkými opravnými (reparačnými) mechanizmami, ktoré sú schopné likvidovať nežiadané zásahy do štruktúry DNA a to najmä činnosťou enzýmov [13][14].



Obr. 3 Schéma replikácie DNA u baktérií [19]

2.5.3 Izolácia a analýza DNA

2.5.3.1 Izolácia a purifikácia DNA

Cieľom izolácie nukleovej kyseliny je rozrušenie komplexu DNA-proteín a extrakcia čistej, nerozštiepenej DNA bez prímiesí (RNA, bielkoviny). Voľba konkrétnej metódy je kompromisom medzi:

- typom použitého biologického materiálu určeného k izolácii DNA,
- rýchlosťou a účinnosťou, selektivitou a citlivosťou metódy,
- účelom použitia izolovanej DNA (jej následnou analýzou),
- požadovanou čistotou, integritou a množstvom nukleovej kyseliny [13][20][21].

DNA možno izolovať buď ako komplexnú genómovú DNA, alebo podľa potreby konkrétny typ DNA (chromozomálnu, mitochondriálnu, a i.). Existuje mnoho rôznych metód extrakcie nukleových kyselín, avšak ich základné rysy sú spoločné [15][20].

Prvým predpokladom je dostupnosť vstupného materiálu, ktorým môžu byť napr. kultúry bakteriálnych alebo eukaryotických buniek. Tie je potrebné oddeliť od živného média, zvyčajne centrifugáciou. Pre uvoľnenie vnútorného obsahu buniek je potrebné vyvolať lýzu bunkovej steny pomocou lytického pufru. Jeho nevyhnutnou súčasťou okrem detergentov (dodecylsírán sodný) je kyselina ethyléndiamíntetraoctová (EDTA), ktorá pôsobí ako chelatačná látka tvoriaca komplexy s kationmi (napr. Ca^{2+}). Tieto ióny slúžia ako kofaktory enzýmov štiepiacich nukleové kyseliny. Pokiaľ by tieto ióny neboli vyviazané do komplexov, nukleázy by zostali aktívne a izolovanú DNA by tak rozštiepili. Po rozrušení bunkovej steny a plazmatickej membrány sa v roztoku objavia ich degradačné produkty spoločne s intracelulárnymi zložkami a vzniká tak komplexná zmes DNA, RNA, proteínov, lipidov, sacharidov [15][20].

Pre odstránenie proteínov z lyzátoov buniek sa používajú proteázy, napr. proteináza K. Odstránenie proteínov je pri purifikácii nukleových kyselín veľmi dôležité, pretože bunky obsahujú jednak množstvo enzýmov, ktoré degradujú nukleové kyseliny, a tiež proteíny, ktoré sa na DNA viažu a môžu tak znižovať účinnosť nasledujúcich experimentov [20].

Klasickým a stále pomerne často využívaným postupom pre odstránenie proteínov z lyzátoov buniek je extrakcia zmesou fenolu a chloroformu. Tieto organické zlúčeniny sa

nemiesia s vodou, a preto po pridaní do vodného prostredia bunkového lyzátu, pretrepaní a následnej centrifugácii dochádza ku vzniku dvoch oddelených fáz. Na rozhraní medzi fázami sa vytvorí biely prstenec vyzrážaných proteínov (tzv. interfáza), ktorý tak oddeľuje ťažšiu organickú a ľahšiu vodnú fázu. Pokiaľ sa používa fenol ekvilibrovaný neutrálnym alebo alkalickým pufrum, nukleové kyseliny (DNA i RNA) zostávajú vo vodnej fáze. V prípade, že sa pre extrakciu použije kyslý fenol, prechádza DNA do organickej fázy a vo vodnej fáze ostáva len RNA. Pre dokonalé odstránenie proteínov z roztoku je možné s vodnou fázou opakovať postup extrakcie tak dlho, kým sa biely prstenec proteínov prestane vytvárať [13][20][21].

Výsledkom extrakcie je vodný roztok nukleovej kyseliny bez proteínov, ktorý je však pravdepodobne príliš nariadený a navyše obsahuje stopy fenolu a chloroformu. Prevedenie DNA do malého objemu a jej purifikáciu možno zaistiť zrážaním – precipitáciou alkoholom, zvyčajne ethanolom alebo izopropanolom. V prítomnosti jednomocných iónov (Na^+ , K^+ alebo NH_4^+) je možné nukleové kyseliny zrážať do podoby agregátu, ktorý pri centrifugácii sedimentuje. Účinnému zrážaniu DNA v nízkych koncentráciách napomáha zníženie teploty a prídavok soli, napr. 3 mol/l octanu sodného. Pokiaľ je potrebné zvýšiť selektivitu zrážania pre DNA, teda minimalizovať súčasnú precipitáciu RNA, zrážanie je vhodné uskutočňovať pri laboratórnej teplote. Spoločne s nukleovými kyselinami môžu byť čiastočne zrážané i soli. Peletu, ktorý sa získa centrifugáciou, tak dávajú biele sfarbenie. Tieto soli je potrebné odstrániť, a to premytím 70% ethanolom [13][20].

Keďže viac ako 95 % objemu nukleových kyselín v bunke tvorí RNA a tiež pre podobnosť vlastností, prevláda RNA i v tomto roztoku. Odstránenie RNA z purifikovanej DNA možno dosiahnuť pôsobením ribonukleázy, ktorá špecificky štiepi RNA na zmes oligonukleotidov bez toho, aby degradovala molekulu DNA. Tento enzým je stabilný i pri vysokej teplote a pre svoju činnosť nevyžaduje prítomnosť dvojmocných iónov [13][20][21].

Získaná DNA je napokon rozsuspenderovaná v zvolenom objeme vody alebo vhodného pufru a uchovaná pri teplote $-20\text{ }^\circ\text{C}$ [15].

2.5.3.2 Kvantifikácia DNA

Pokiaľ je purifikovaná DNA dostatočne čistá, tj. zbavená všetkých látok, ktoré absorbujú ultrafialové žiarenie (napr. RNA, voľné nukleotidy, proteíny) možno jej koncentráciu určiť spektrofotometrickým meraním absorpcie roztoku pri vlnovej dĺžke 260 nm. Tento spôsob stanovenia koncentrácie je jednoduchý, avšak nie príliš selektívny. Roztok dvojreťazcovej DNA s koncentráciou 50 $\mu\text{g/ml}$ má absorpciu rovnú 1. Túto hodnotu však mení prítomnosť proteínov či fenolu [20].

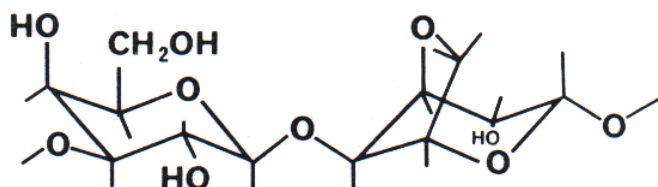
2.5.3.3 Analýza DNA elektroforetickými metódami

Izolácia nukleovej kyseliny z pôvodnej vzorky nemusí byť vždy úspešná; preto je pred ďalšou analýzou vhodné uskutočniť kontrolu zvoleného izolačného postupu. Ako overenie úspešnosti izolácie DNA (prítomnosť či neprítomnosť určitého fragmentu) sa bežne používa elektroforetická separácia DNA v agarózovom géli [13].

Princípom elektroforetickej separácie je pohyb ionizovaných častíc v elektrickom poli. Hlavným nositeľom náboja nukleových kyselín sú záporne nabité fosfátové skupiny, a preto nukleové kyseliny v elektrickom poli putujú smerom k anóde [20].

Elektroforéza sa uskutočňuje vo vhodnom nosiči; tým je bežne gél. Elektroforetické gély používané pre separáciu nukleových kyselín sú najčastejšie tvorené polyakrylamidom (PA) alebo agarózou (obr. 4). Vytvárajú zložitú sieťovanú štruktúru polymérnych molekúl s pórmí, ktorých veľkosť možno ovplyvniť zložením roztoku a koncentráciou polyméru. Agarózové gély sú vhodné pre delenie fragmentov DNA s veľkosťou 100 bp až 40 kb, PA gély pre separáciu menších molekúl (10 až 1 000 bp). Na základe polohy gélu v elektroforetickej aparátúre sa rozlišuje horizontálna a vertikálna elektroforéza; obe majú tzv. plošné usporiadanie (na doskách s tenkou vrstvou gélu) [18][20].

Rýchlosť pohybu separovaných častíc sa označuje ako elektroforetická mobilita a je nepriamo úmerná logaritmu ich veľkosti. Pri posudzovaní elektroforetickej pohyblivosti určitej molekuly DNA tak nie je potrebné brať do úvahy veľkosť náboja, keďže nukleové kyseliny majú náboj rovnomerne rozložený a jeho veľkosť je na jednotku dĺžky molekuly rovnaká. Neznáme veľkosti fragmentov je možné určiť porovnaním s presne veľkostne definovanými DNA fragmentmi, ktoré sa označujú ako hmotnostné štandardy (*angl.* DNA ladder) a na gél sa nanášajú spoločne so študovanými vzorkami DNA [20].



Obr. 4 Štruktúra agarózy: lineárny polysacharid tvorený β -D-galaktopyranózou a 3,6-anhydro- β -L-galaktopyranózou, ktoré sú spojené glykozidickými väzbami [20]

Po separácii možno rozdelenú DNA detekovať selektívnym farbením tzv. interkalačnými činidlami. Ide o zlúčeniny s aromatickými kationmi, ako je napr. ethidium bromid. Tieto farbivá sa viažu interkaláciou (tzn. vmedzerením sa medzi susedné páry báz) na závitnicu DNA. V prítomnosti UV žiarenia tak intenzívne fluoreskujú, prípadne výrazne zvyšujú už existujúcu fluorescenciu. Najčastejšie sa používa práve vizualizácia EtBr, kedy sa zóny DNA po ožiarení UV svetlom s vlnovou dĺžkou 260 až 360 nm javia ako ružové pásy na svetloružovom pozadí [18][22].

Namiesto ethidium bromidu môže byť pre farbenie nukleových kyselín použitá tiež skupina fluorescenčných kyaninových farbív s komerčným označením SYBR[®]. Tie sa vyznačujú vyššou citlivosťou a zároveň nevytvárajú tak silné pozadie ako ethidium bromid. Pre detekciu molekúl DNA separovaných v polyakrylamidových géloch sa rovnako používa farbenie striebrom, pričom citlivosť tejto metódy je asi sto až tisíckrát vyššia ako pri farbení EtBr [20].

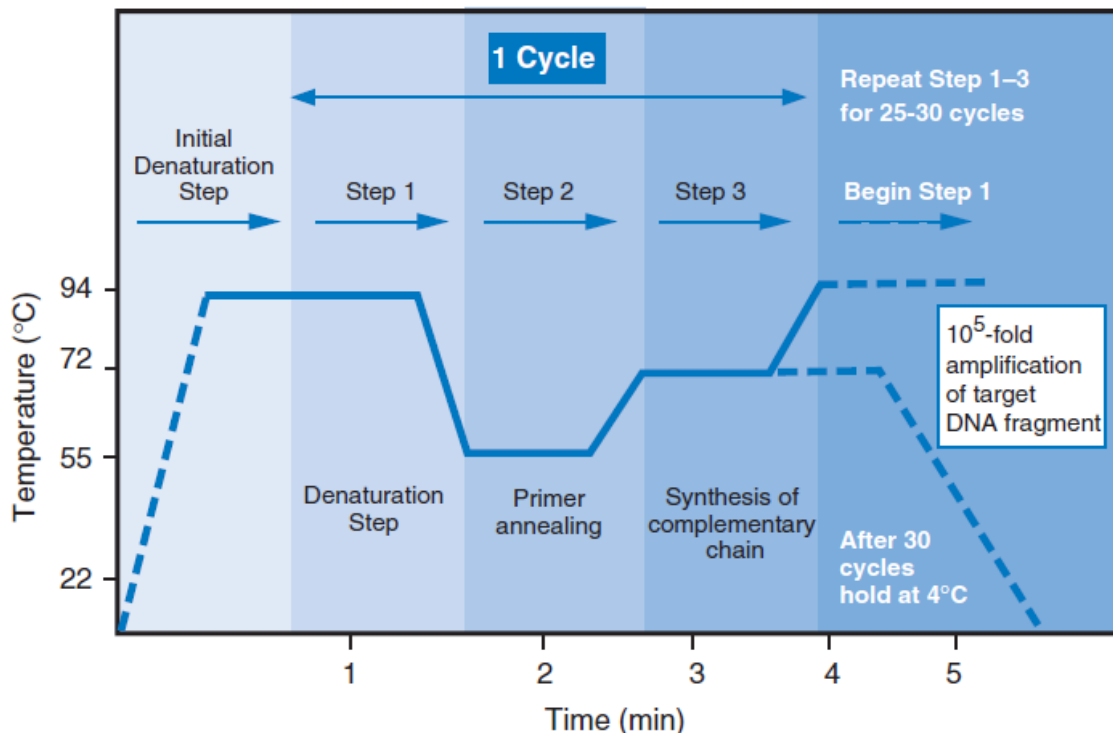
Špeciálnou elektroforetickou technikou separácie fragmentov DNA rovnakej veľkosti, avšak rôznej sekvencie je denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE), ktorej sa venuje samostatná kapitola (kap. 2.7).

2.6 Amplifikácia nukleových kyselín v reakcii PCR

Princíp PCR (Polymerase Chain Reaction) vychádza z replikácie nukleových kyselín, ktorá je základným molekulárnym procesom u všetkých živých organizmov. PCR umožňuje mnohonásobnú amplifikáciu špecifického úseku DNA *in vitro*. Podstatou je cyklicky sa opakujúca enzýmová syntéza nových reťazcov vybraných úsekov dvojreťazcovej DNA v smere 5' → 3' pôsobením DNA-polymerázy. Študovaný úsek nukleotidovej sekvencie je vymedzený pripojením dvoch primerov, ktoré sa viažu na protiľahlé reťazce DNA tak, že ich 3'-konce smerujú proti sebe a sú komplementárne ku koncovým sekvenciám oblasti, ktorá má byť amplifikovaná. Po pridaní DNA polymerázy a nukleotidov potom prebieha syntéza nových vlákien na oboch matricových reťazcoch protismerne. Pre syntézu DNA sa používajú termostabilné polymerázy izolované z termofilných mikroorganizmov odolávajúce teplotám, pri ktorých DNA denaturuje. PCR je proces, pri ktorom sa v závislosti na teplote reakčnej zmesi pravidelne striedajú tri kroky:

- denaturácia templátu (dsDNA) pri 94 °C – separácia dsDNA na jednotlivé reťazce,
- pripojenie alebo hybridizácia primerov (*angl.* annealing) k oddeleným reťazcom (30 – 65 °C) – najdôležitejší krok celého procesu, keďže na správnom naviazaní primerov závisí úspech celej PCR,
- extenzia – vlastná syntéza nových reťazcov DNA z dostupných dNTP pôsobením DNA-polymerázy (65 – 75 °C).

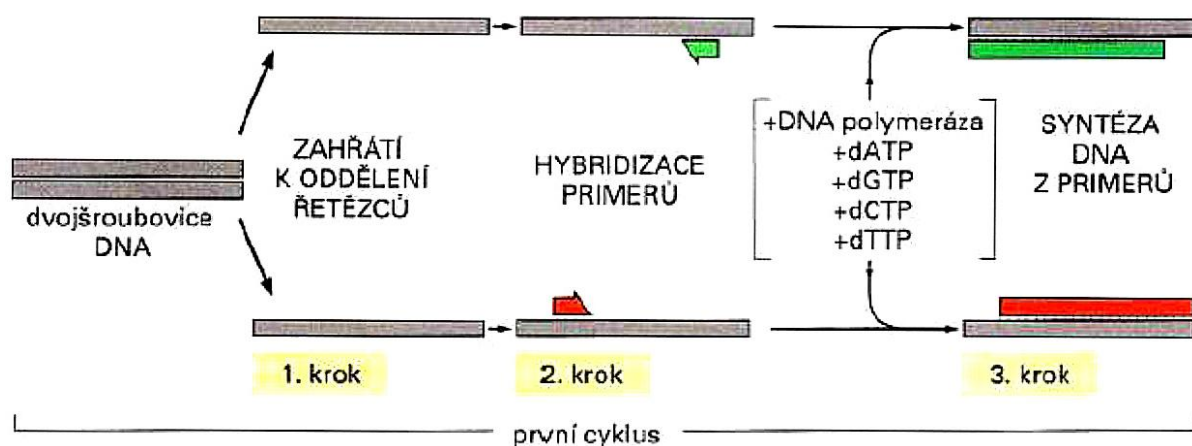
Tieto tri kroky sa cyklicky opakujú 20 až 40-krát a výsledkom sú amplikóny – úseky DNA definovanej dĺžky s veľkosťou zvyčajne 2 až 4 kb. Zariadenie umožňujúce presný priebeh reakcie PCR je označované ako termocykler. Ide o programovateľný termostat, v ktorom sa teplota mení automaticky v naprogramovaných časových intervaloch. Postupným opakovaním tohto procesu sa exponenciálne (2^n , kde n je počet cyklov) amplifikuje obrovské množstvo kópií vybraného úseku cieľovej molekuly DNA [18][20].



Obr. 5 Teplotný profil štandardnej PCR [23]

Reakčná zmes pre PCR obsahuje nasledovné komponenty:

- ✓ dva syntetické oligonukleotidové primery (každý cca 20 nukleotidov),
- ✓ cieľovú DNA, ktorá slúži ako templát pre reakciu; ide o úsek izolovanej dsDNA, ktorý zahŕňa sekvenciu vymedzenú oboma primermi,
- ✓ termostabilnú DNA-polymerázu,
- ✓ zmes štyroch nukleotidov (dATP, dCTP, dTTP, dGTP),
- ✓ komerčne dodávaný pufoer s obsahom iónov horčička Mg^{2+} ,
- ✓ vodu v kvalite pre PCR [18].



Obr. 6 Schéma reakcie PCR [16]

2.6.1 Primery

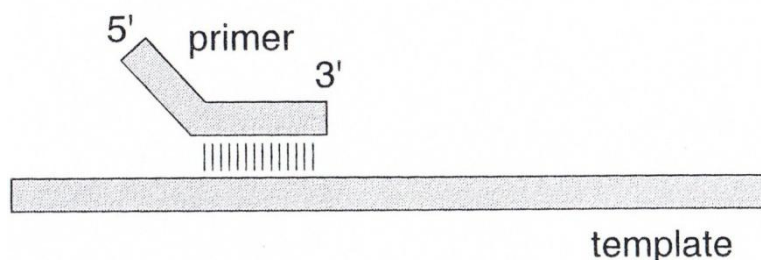
Presnosť a úspešnosť PCR pri amplifikácii určitého génu alebo časti sekvencie genómovej DNA je podmienená vhodnou sekvenciou a koncentráciou navrhnutých primerov. Pre návrh vhodných primerov je potrebné zvážiť nasledovné (orientačné) zásady:

- dĺžka spravidla 18 až 25 nukleotidov,
- obsah G+C 40 % až 60 %,
- rovnomerná distribúcia (vyvážený pomer) oblastí bohatých na G-C a A-T páry,
- teplota T_m primeru aspoň 50 °C,
- podobná teplota T_m oboch primerov,
- špecifita primerov (na matricovej DNA nesmú byť nešpecifické väzbové miesta),
- absencia komplementárnych sekvencií v primeroch, ktoré by mohli viesť k tvorbe duplexov,
- absencia vnútorných sekundárnych štruktúr (inverzne opakovaných sekvencií) [18][20].

Viacere aplikácie nevyžadujú sekvenciu primerov plne komplementárnu k cieľovej sekvencii templátovej DNA. Úsek primeru, ktorý by však mal byť dokonale komplementárny k sekvencii templátu, je jeho 3'-koniec. Ten disponuje voľnou hydroxylovou skupinou, ku ktorej DNA-polymeráza v ďalšom kroku prikladá dNTP a predlžuje práve 3'-koniec nasadeného primeru. Tým je zaistená špecifita nasadenia primeru k správnej cieľovej sekvencii. Minimálne tri prvé nukleotidy na 3'-konci by mali úplne sedieť k templátu [24].

Primery pre PCR teda môžu byť navrhnuté tak, že okrem sekvencie požadovanej pre hybridizáciu s cieľovou DNA obsahujú ďalšiu sekvenciu adaptoru na 5'-konci (tzv. lepiť koniec). Táto sekvencia sa nezúčastňuje prvého hybridizačného kroku, kedy hybridizuje iba

3'-koniec primeru, ale následne sa stáva súčasťou amplifikovaného fragmentu DNA. Dodatočná sekvencia na 5'-konci primeru môže byť zvolená ľubovoľne a poskytuje širokú prispôsobivosť pre modifikáciu koncov DNA [20].



Obr. 7 3'-koniec primeru je zásadný pre úspešnú hybridizáciu s cieľovou DNA, kým 5'-koniec môže byť modifikovaný a niesť dodatočné sekvencie [24]

2.6.2 *Taq* DNA-polymeráza

Na začiatku každého cyklu je nutné templátovú DNA denaturovať, a to pôsobením vysokej teploty, ktorá však bežné DNA-polymerázy inaktivuje. PCR preto pracuje s termostabilnými polymerázami, čo sú enzýmy pochádzajúce z baktérií adaptovaných na extrémne podmienky (napr. hlboké moria blízko ústia podmorských sopiek). Ich proteínová štruktúra je evolúciou uspôsobená tak, že po určitú dobu odoláva i teplotám okolo 95 °C. Najčastejšie sa používa *Taq*-polymeráza (izolovaná z termofilnej baktérie *Thermus aquaticus*), ktorá disponuje dostatočnou aktivitou enzýmu po celú dobu amplifikácie [13][18][20].

Podobne ako iné biochemické procesy, ani replikácia neprebíha bezchybne a *Taq* DNA-polymeráza do novo syntetizovaných reťazcov príležitostne zaraďuje chybné, teda nekomplementárne nukleotidy. Z analýzy sekvencií klonovaných PCR produktov vyplýva, že frekvencia chýb pre *Taq* DNA-polymerázu je 1 na 4 000 až 5 000 bp. Frekvencia týchto chýb *in vitro* výrazne závisí na vyvážení jednotlivých zložiek reakcie, najmä na koncentrácii iónov Mg^{2+} , zmenách pH reakčného pufru a vyvážení koncentrácie štyroch dNTP. Bunka (živý organizmus) má schopnosť chybné začlenené bázy odstraňovať opravnými mechanizmami. *Taq* DNA-polymeráza má však iba 5' → 3' polymerázovú aktivitu a 3' → 5' exonukleázová aktivita jej chýba. Inkorporácia nesprávneho reťazca tak vedie k terminácii reťazca a súčasne i syntézy DNA. Pre mnoho aplikácií však táto presnosť postačuje a výhodou tohto enzýmu je jeho pomerne vysoká procesivita – schopnosť syntetizovať dlhé (10 kb) úseky DNA [18][20].

2.6.3 PCR v praxi

Komplikáciou PCR sú odlišné vlastnosti študovaných fragmentov (templátov) i použitých primerov. Vo väčšine prípadov je potrebné niektoré parametre reakcie optimalizovať. Vysoká špecifita PCR môže byť dosiahnutá:

- optimálnou koncentráciou iónov Mg^{2+} , primerov, dNTP a DNA-polymerázy,
- účinnou denaturáciou, vysokými anelačnými teplotami,
- obmedzením počtu cyklov a ich dĺžky,
- ďalšími (komerčnými) aditívami,
- kvalitou templátu,
- modifikáciami PCR (nested PCR, hot-start PCR, touchdown PCR) [24].

2.6.3.1 Horečnaté ióny Mg^{2+}

Okrem *Taq* DNA-polymerázy a primerov obsahuje reakčná zmes ako kofaktor ióny horčíka Mg^{2+} , ktorých koncentrácia je pre PCR kritickou. Horčík vytvára s jednotlivými 2-deoxyribonukleozid-5-trifosfátmi (dNTP) rozpustný komplex dNTP- Mg^{2+} , ktorý interaguje s pentózo-fosfátovou kostrou nukleových kyselín a ovplyvňuje aktivitu DNA-polymerázy. Keďže ióny Mg^{2+} interagujú nielen s dNTP, ale i s primermi a templátovou DNA, je vo väčšine prípadov potrebné stanoviť pre každú aplikáciu optimálnu koncentráciu horečnatých iónov empiricky. Bežným prístupom pre stanovenie optimálnej koncentrácie Mg^{2+} je prispôbiť pufor tak, že koncentrácia $MgCl_2$ sa pohybuje v rozmedzí 0,5 až 5 mM, s krokom zvyčajne 0,5 alebo 1 mM. Koncentrácia horčíka v reakčnej zmesi sa však mení i zmenou koncentrácie dNTP. Nízka koncentrácia Mg^{2+} poskytuje nízke výťažky, kým naopak príliš vysoká koncentrácia môže znížiť fidelitu (definovaná ako vernosť originálu) *Taq* DNA-polymerázy a viesť tak k amplifikácii nešpecifických produktov [20][24].

2.6.3.2 Teplota pripojenia primeru

Pre PCR je dôležitá úplná počiatková denaturácia templátu; pre tento účel zvyčajne postačuje zahriatie reakčnej zmesi na 94 °C po dobu dvoch až piatich minút. V prípade neúplnej – čiastočnej denaturácie, molekuly DNA rýchlo renaturujú, čo vedie k nešpecifickej väzbe primerov (*angl.* self-priming) a falošným výsledkom [20].

Úspešnosť PCR je vo veľkej miere závislá práve na špecifite, s akou primer nasadá výlučne na cieľovú sekvenciu. O tom, či sa primer pripojí iba k cieľovej sekvencii templátu, alebo aj k nekomplementárnym sekvenciám, rozhoduje práve teplota pripojenia primeru, tzv. anelačná teplota. Vo všeobecnosti platí, že čím vyššia je anelačná teplota, tým je pripojenie primeru k cieľovej sekvencii väzbového miesta templátu viac špecifické. Naopak, nižšia anelačná teplota znamená vyššiu toleranciu k nekomplementárnemu párovaniu a vedie tak k zvýšenej amplifikácii necieľových sekvencií (nešpecifických produktov). V praxi sa odporúča začať s teplotou cca 55 °C. V prípade nízkeho výťažku a výrazného pozadia nešpecifických produktov je žiaduca optimalizácia anelačnej teploty spoločne s optimalizáciou koncentrácie $MgCl_2$ (kap. 2.6.3.1). V súčasnosti dostupné termocyklyery disponujú tzv. gradientovým blokom, ktorý vytvorením skúšobného teplotného gradientu umožňuje stanovenie optimálnej anelačnej teploty súbežne v jednej reakcii. Reakčná zmes je rozdelená do alikvotných objemov v niekoľkých sériách, jedinou premennou je anelačná teplota nastavená pomocou gradientového bloku [24].

Anelačná teplota sa zvyčajne pohybuje v rozmedzí 55 °C až 68 °C, pričom závisí na dĺžke oligonukleotidu a na zastúpení A-T a G-C párov (tri vodíkové mostíky fixujúce G-C zvyšujú stabilitu a tým i denaturačnú teplotu). Spravidla je možné túto teplotu získať z údajov priamo od výrobcu primerov [18][20].

Pre stanovenie anelačnej teploty sa ako indikátor často uvádza teplota T_m , pri ktorej je polovica primerov pripojená k cieľovej sekvencii templátovej DNA. Existuje niekoľko prístupov pre stanovenie T_m ; najjednoduchší z nich pre primery s dĺžkou do 20 nukleotidov je založený na sčítaní počtu každého nukleotidu v primeri nasledovným vzťahom:

$$T_m = [(G + C)4 \text{ °C} + (A + T)2 \text{ °C}] \quad (1)$$

Všeobecne prijatým pravidlom pre stanovenie anelačnej teploty primeru je zníženie teploty T_m o 5 °C. Pri stanovení T_m je vhodné zvažovať iba ten úsek primeru, ktorý hybridizuje

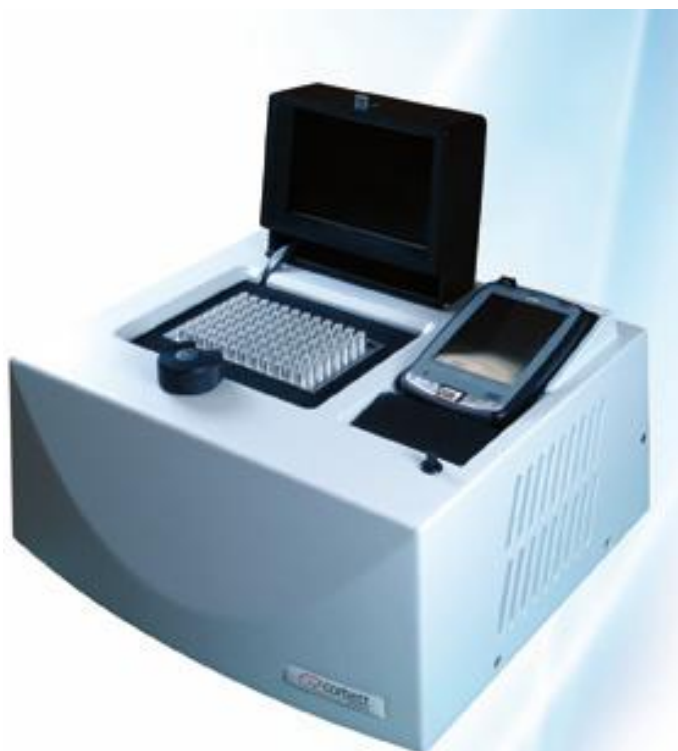
s templátovou DNA; v prípade, že na 5'-lepivý koniec bola pridaná dodatočná sekvencia, ktorá sa hybridizácie nezúčastňuje, je možné ju z týchto úvah vynechať [18][20][24].

Modifikáciou PCR využívajúcou zvýšenú teplotu nasadenia primeru na začiatku amplifikácie a jej postupného znižovania (o 1 °C každé dva cykly) je touchdown PCR. V prvých cykloch vzniká určité malé množstvo výhradne špecifických produktov, kým v ďalších cykloch je znížením teploty dosiahnutá akumulácia týchto produktov. Tento prístup redukuje nešpecifickú hybridizáciu primeru na minimum a tým obmedzuje tvorbu nešpecifických produktov [13][24].

2.6.3.3 Počet cyklov a ich trvanie

Optimálny počet cyklov závisí na východzej koncentrácii templátovej DNA, spravidla sa pohybuje v rozmedzí 25 až 30 cyklov. Všeobecne platí, že počet cyklov by mal byť udržiavaný na minime postačujúcom pre získanie dostatočného množstva produktu pre ďalšiu analýzu. Príliš vysoký počet cyklov významne zvyšuje množstvo vznikajúcich nešpecifických produktov PCR [20][24].

Ďalším faktorom, ktorý môže ovplyvniť špecifitu PCR je čas, za ktorý je dosiahnutá zmena teploty medzi jednotlivými krokmi reakcie. Čím rýchlejšie a efektívnejšie dokáže termocykler prepínať medzi jednotlivými teplotami, tým je špecifita reakcie vyššia. Niektoré dostupné termocykly dosahujú rýchlosť zahrievania (chladenia) už 2 – 3 °C za sekundu [24].



Obr. 8 Termocykler od firmy Corbett Research [25]

2.6.3.4 Riziko kontaminácie

Citlivosť a špecifita PCR spôsobuje, že kontaminácia i jedinou molekulou exogénnej alebo neznámej DNA môže poskytnúť falošný výsledok. Pre minimalizáciu falošných pozitívnych výsledkov sú odporúčané určité štandardné postupy: používanie autoklávovaných roztokov; fyzikálna separácia používaných PCR reagentov od templátovej DNA a produktov PCR; príprava reagentov i vzoriek do alikvotných častí; používanie UV svetla pre odstránenie exogénnych nukleových kyselín na pracovnej ploche; používanie jednorázových rukavíc; pridávanie DNA do reakcie ako poslednej zložky; starostlivá voľba pozitívnych, negatívnych a vnútorných kontrol. Vylúčenie kontaminácie je dôležité najmä u nízkokópiových templátov DNA alebo degradovaných vzoriek, kde je potrebný vysoký počet amplifikačných cyklov pre dosiahnutie požadovaného množstva produktu. V týchto prípadoch môže zvyškové množstvo exogénnej DNA konkurovať templátovej DNA, potlačiť amplifikačný proces a spôsobiť tak falošný výsledok. V prípade pochybností je najlepším prístupom opakovanie experimentu so starostlivým dodržiavaním čiastkových postupov a kontrol. Ako zdroj kontaminácie DNA je najčastejšie uvádzaný:

- prenos kontaminujúcej DNA z predtým amplifikovaných produktov PCR, tzv. carry-over,
- vzájomná kontaminácia zdrojového materiálu [20][24].

Veľká pozornosť by mala byť venovaná možným nečistotám v templátovej DNA, ktoré môžu inhibovať *Taq* DNA-polymerázu. Medzi ne patria ako látky vlastné biologickému materiálu, tak i zlúčeniny použité pre izoláciu DNA. Ide o niektoré detergenty (SDS), EDTA, vysoké koncentrácie solí a negatívne tiež pôsobí vysoká koncentrácia DNA. Pre PCR je potrebné iba malé množstvo templátovej DNA, preto môžu byť tieto nečistoty vo väčšine prípadov odstránené dostatočným nariadením vzorky [20][24].

2.6.4 Hniezdová (nested) PCR

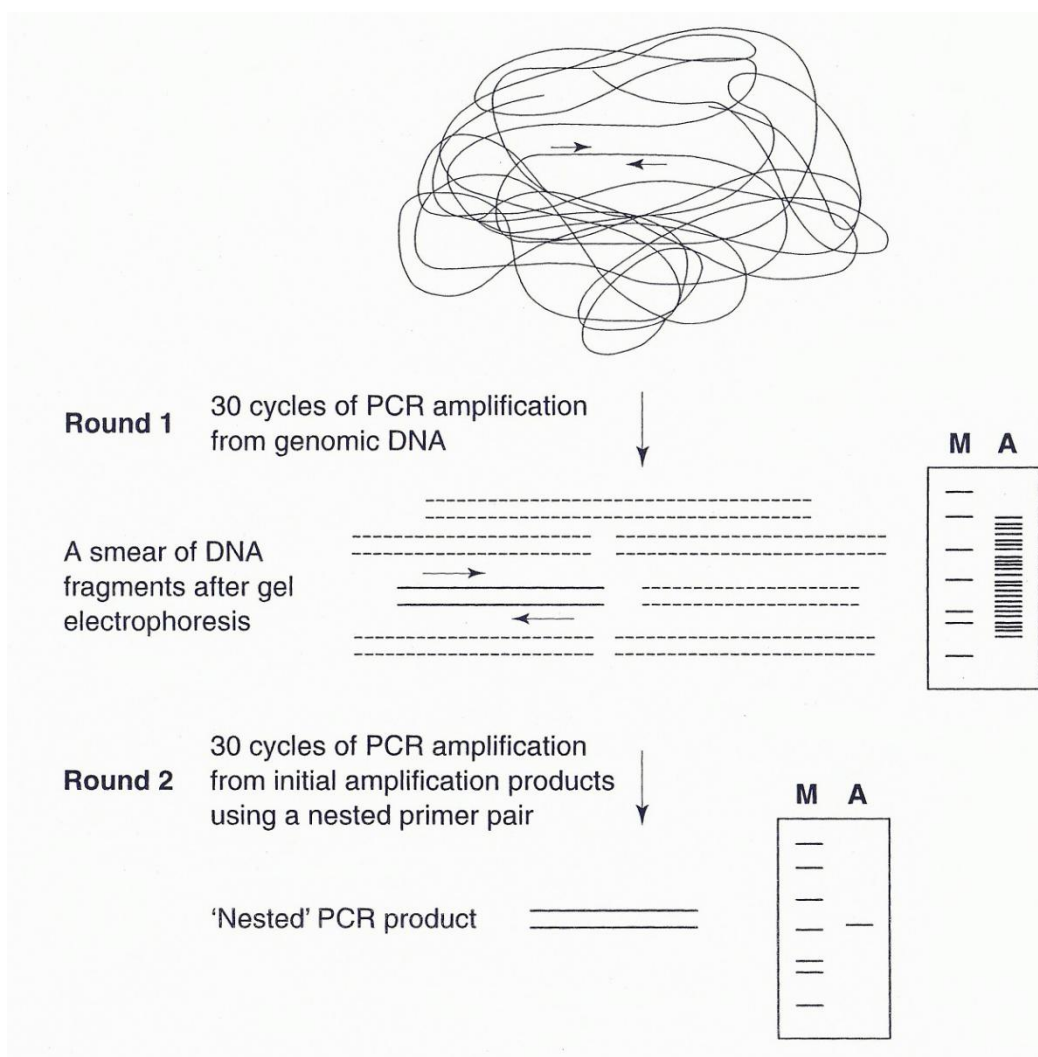
Modifikácia PCR využívajúca vonkajšie a vnútorné primery je v porovnaní so štandardnou PCR vysoko citlivá metóda, ktorá umožňuje detekovať i jedinou molekulu templátovej DNA. Pri typickom protokole sa amplifikácia uskutočňuje v dvoch krokoch:

- *prvý amplifikačný krok* zahŕňa 15 až 30 cyklov s jedným párom tzv. vonkajších primerov. V tomto kroku vzniká produkt, ktorý je prevedený do novej skúmavky pre druhý amplifikačný krok pomocou páru tzv. vnútorných primerov; tie sú špecifické pre vnútornú časť sekvencie amplifikovanej s párom vonkajších primerov.
- *druhý amplifikačný krok* zahŕňa ďalších 15 až 30 cyklov, po jeho dokončení je produkt detekovaný elektroforézou. Prenos amplifikačných produktov z prvej reakcie do druhej umožňuje nariadenie inhibítorov, ktoré mohli byť prítomné v pôvodnej vzorke, ale prináša so sebou i riziko kontaminácie [20].

V prvom amplifikačnom kroku môže dôjsť k amplifikácii necieľových sekvencií, a znemožniť tak identifikáciu požadovaných amplikónov. Je však vysoko nepravdepodobné, že tieto nešpecifické produkty budú mať väzbové miesta aj pre ďalší pár (vnútorných) primerov. Naopak, požadovaný amplikón disponuje cieľovou sekvenciou pre tento pár primerov. Druhý krok reakcie s použitím vnútorných primerov navrhnutých tak, aby amplifikovali vnútornú oblasť pôvodného amplifikovaného produktu, vedie k 10^4 znásobeniu skutočného produktu oproti nešpecifickým. Aby sa zamedzilo akýmkoľvek amplifikáciám pôvodného templátu, produkt prvej reakcie môže byť vhodne nariadený tak, že absolútne množstvo pôvodného templátu je zanedbateľné (zvyčajne 1 μ l v 10 alebo v 100 μ l PCR

vody). Výsledkom druhého amplifikačného kroku by mal byť PCR produkt menšej veľkosti v porovnaní s pôvodným (prvá PCR) [24].

Pre obmedzenie manipulácie a zníženie rizika kontaminácie môžu byť oba amplifikačné kroky uskutočnené v jednej skúmavke. Obsah prvého amplifikačného kroku môže byť oddelený od druhého silnou prepážkou z minerálneho oleja; po prvej amplifikácii sú reakčné komponenty zmiešané mikrocentrifugáciou a obsah je amplifikovaný znovu. Častejšie sa však navrhujú páry vonkajších a vnútorných primerov, ktoré sa podstatne líšia teplotou T_m . Prvá amplifikácia s párom vonkajších primerov sa uskutočňuje pri málo presných podmienkach (nízka teplota pre pripojenie primeru) s 10 až 15 cyklami. Jej výsledkom je zmes produktov ako vnútorných a vonkajších primerov, tak ich kombinácie. Nasleduje druhotná amplifikácia s 15 až 30 cyklami pri presných podmienkach (optimálna teplota pre pripojenie primeru) s vnútornými primermi, ktorých konce sú často bohaté na G+C bázy a tak uprednostňujú amplifikáciu vnútorného produktu. Výsledné PCR produkty môžu byť analyzované elektroforézou v agarózovom géli, pričom by mali byť detekované oba – produkty primárnej amplifikácie spoločne s menšími produktmi druhého amplifikačného kroku [20][24].



Obr. 9 Schéma nested PCR genómovej DNA; M – marker molekulových hmotností, A – amplifikovaný fragment DNA [24]

2.6.5 Analýza PCR produktov

Významnú úlohu v optimalizácii podmienok PCR zohráva analýza amplifikovaných fragmentov. Bežným a rýchlym spôsobom detekcie amplikónov je štandardná elektroforéza v agarózovom géli (kap. 2.5.3.3). Pokiaľ sú podmienky PCR optimálne, je možné pozorovať výrazný pás vysokej intenzity zodpovedajúci PCR produktu. Niekedy sú však špecifické PCR produkty neprítomné a na konci dráh v géli sú viditeľné primery či duplexy primer-dimer. Neoptimálne podmienky PCR sa prejavia prítomnosťou ďalších fragmentov v géli, ktoré sú zvyčajne výsledkom nešpecifickej hybridizácie primerov. Príčinou vzniku nešpecifických produktov sú často nízke anelačné teploty, vysoká koncentrácia iónov Mg^{2+} a prítomnosť podobných *priming* sekvencií v komplexnom templáte. Vo väčšine prípadov je celkom jednoduché určiť, ktorý fragment reprezentuje požadovaný amplikón – v závislosti na očakávanej veľkosti (pokiaľ je známa), a tiež na výraznejšom vzhľade detekovanej zóny DNA s ostrejšími hranami v porovnaní s nešpecifickými produktmi [24].

2.7 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE)

2.7.1 Mikrobiálna diverzita

Súčasná úroveň poznania mikrobiálnej diverzity a jej úlohy v prírode je iba nízka. Dôvodom sú predovšetkým tradičné mikrobiologické techniky založené na kultivácii mikroorganizmov, ktoré majú len obmedzené použitie pre ich klasifikáciu a identifikáciu. Odhaduje sa, že až 99 % všetkých mikroorganizmov v prírode nie je možné izolovať ako čisté kultúry a charakterizovať ich. Kultivačné prístupy môžu viesť k chybám a skresleným výsledkom, keďže nereprezentujú skutočné podmienky, ktoré mikroorganizmus pre svoj rast vyžaduje. Navyše sú tieto metódy často prácne a časovo náročné. Výrazné rozpory boli zistené medzi počtom buniek kultivovateľných pri laboratórnych podmienkach a celkovým počtom buniek toho istého prostredia. Jedným z dôvodov týchto nezrovnalostí môže byť vzájomná závislosť rôznych organizmov obývajúcich spoločné prostredie; ďalším dôvodom je nedostatok vedomostí ohľadom reálnych podmienok, pri ktorých väčšina mikroorganizmov rastie v ich prirodzenom prostredí [26][27][28].

2.7.1.1 Metódy závislé na kultivácii

Tradičné metódy detekcie a identifikácie mikroorganizmov v reálnych vzorkách (potravin) sú založené na kultivácii, vyčíslení a izolácii kolónií pre ďalšie identifikačné postupy. Pôvodná vzorka môže byť homogenizovaná a skoncentrovaná pred vlastnou kultiváciou na selektívnom médiu, ktoré je svojím zložením podobné životným podmienkam prostredia, z ktorého sú príslušné mikroorganizmy izolované. Identifikačné postupy zahŕňajú morfológické charakteristiky (mikroskopické pozorovanie buniek a vzhľad kolónií), rôzne biochemické analýzy určujúce fyziologické vlastnosti (zloženie membrány či bunkovej steny), prípadne vplyv vonkajších podmienok prostredia na rast mikroorganizmov (pH, teplota, rezistencia k antibiotikám) [9][28].

2.7.1.2 Metódy nezávislé na kultivácii

V mnohých prirodzených prostrediach, a teda i v reálnych vzorkách potravín a nápojov, sa vyskytujú životaschopné, avšak nekultivovateľné druhy mikroorganizmov. Detekcia takýchto organizmov vyžaduje priamu extrakciu a analýzu komplexnej DNA prostredia. Mikrobiálne

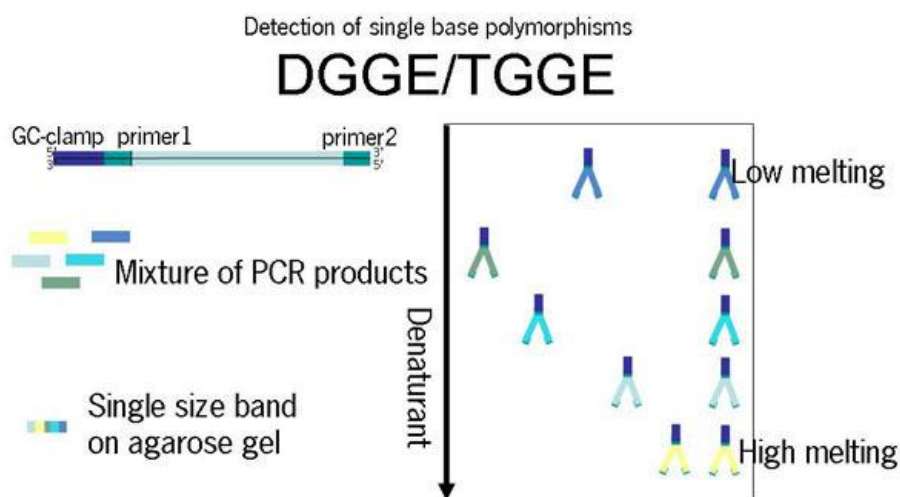
populácie podliehajú sezónnym zmenám a reagujú aj na zmeny prostredia, možno tak hovoriť o komplexnej dynamike týchto populácií. Určenie diverzity mikroorganizmov v ich prirodzených prostrediach a monitorovanie vývoja mikrobiálnych komunit v čase či priestore umožňujú práve metódy na kultivácii nezávislé. Na rozdiel od bežných kultivačných postupov nevyžadujú izoláciu a kultiváciu jednotlivých zástupcov mikrobiálnej komunity [26][29][30].

Techniky genetického fingerprintu poskytujú profil (odtlačok) genetickej diverzity mikrobiálneho spoločenstva na základe fyzickej separácie nukleových kyselín jednotlivých druhov. Tieto metódy sú rýchle a jednoduché, navyše umožňujú analýzu niekoľkých vzoriek súčasne. Všeobecný postup zahŕňa izoláciu nukleovej kyseliny, amplifikáciu génov kódujúcich ribozomálne podjednotky 16S rRNA (u baktérií) alebo 26S rRNA (u eukaryotov), a napokon analýzu PCR produktov konkrétnou metódou (DGGE, TGGE) [27][31].

2.7.2 Princíp DGGE

Denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE) je metóda, ktorá slúži na detekciu už jednonukleotidových zámien v molekule DNA. Princípom je separácia amplifikovaných fragmentov rDNA s rovnakou či podobnou veľkosťou (najviac 500 bp), majúcich však rôznu sekvenciu (teplotu topenia T_m). Separácia je založená na klesajúcej pohyblivosti fragmentov v polyakrylamidovom géli s rastúcim lineárnym gradientom denaturantov (zmes močoviny a formamidu). Variantou DGGE je teplotná denaturačná gradientová elektroforéza (TGGE), kde denaturujúcim faktorom je presne definovaný a kontrolovaný gradient teploty [26].

Metóda DGGE bola prvýkrát použitá pre detekciu jednobodových substitučných mutácií. Bolo zistené, že molekuly DNA divokého typu a molekuly DNA s jednou substituovanou bázou môžu migrovať v gradiente vzrastajúcej koncentrácie denaturačných činidiel v oddelených zónach [32].



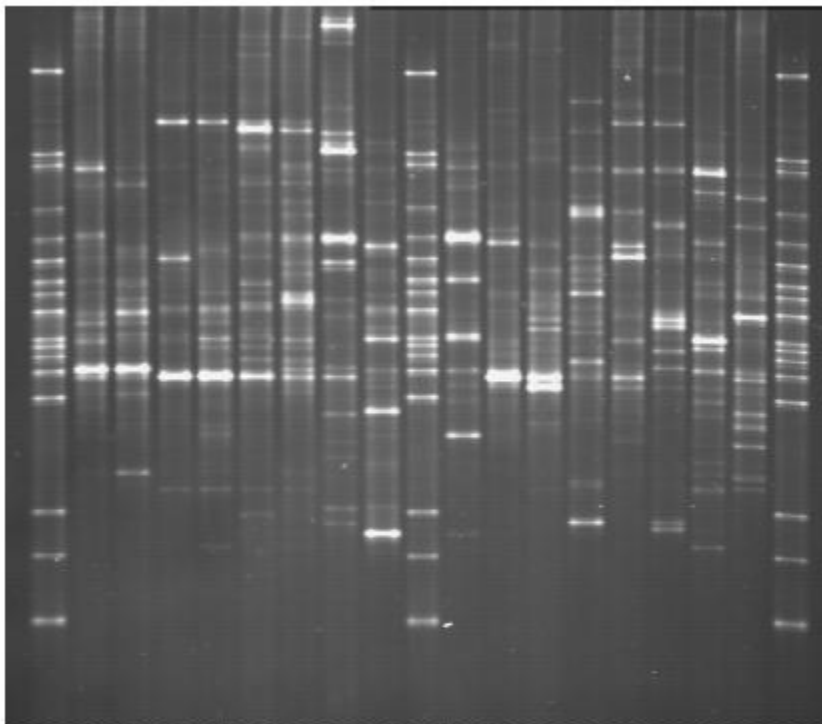
Obr. 10 Schéma DGGE s naznačenou GC-svorkou na 5'-konci primeru [13]

Rýchlosť denaturácie, a tým aj elektroforetická pohyblivosť fragmentov, závisí na počte vodíkových väzieb medzi nukleotidmi, tzn. na type, distribúcii a množstve dusíkatých báz dsDNA. Reťazce DNA sa budú od seba ľahšie oddeľovať v miestach bohatých na A-T páry (fixované dvoma vodíkovými mostíkmi), kým úseky bohaté na G-C páry budú stabilnejšie (vďaka trom vodíkovým väzbám). Molekula DNA putuje gélom až do chvíle, kedy dosiahne

určitú koncentráciu denaturačných činidiel, následkom čoho sa čiastočne rozpletá a vytvára tak vetvené štruktúry s lokálnymi jednoreťazcovými oblasťami. Konformačná zmena terciárnej štruktúry DNA spomalí migráciu fragmentu, až sa úplne zastaví. Technika DGGE je zdokonalená pridaním tzv. GC-svorčky, čo je sekvencia bohatá na páry guanínu a cytozínu, prisyntetizovaná na 5'-koniec jedného z použitých primerov v reakcii PCR. Táto sekvencia, zvyčajne tvorená 30 až 50 nukleotidmi, je koamplifikovaná s cieľovou sekvenciou a je tak začlenená do výsledného amplikónu. Použitím GC-svorčky sa zamedzí úplnej disociácii dsDNA na jednoreťazcové formy, zvýši sa rozlišovacia schopnosť a umožní sa detekcia takmer všetkých zmien v sekvencii DNA [20][26].

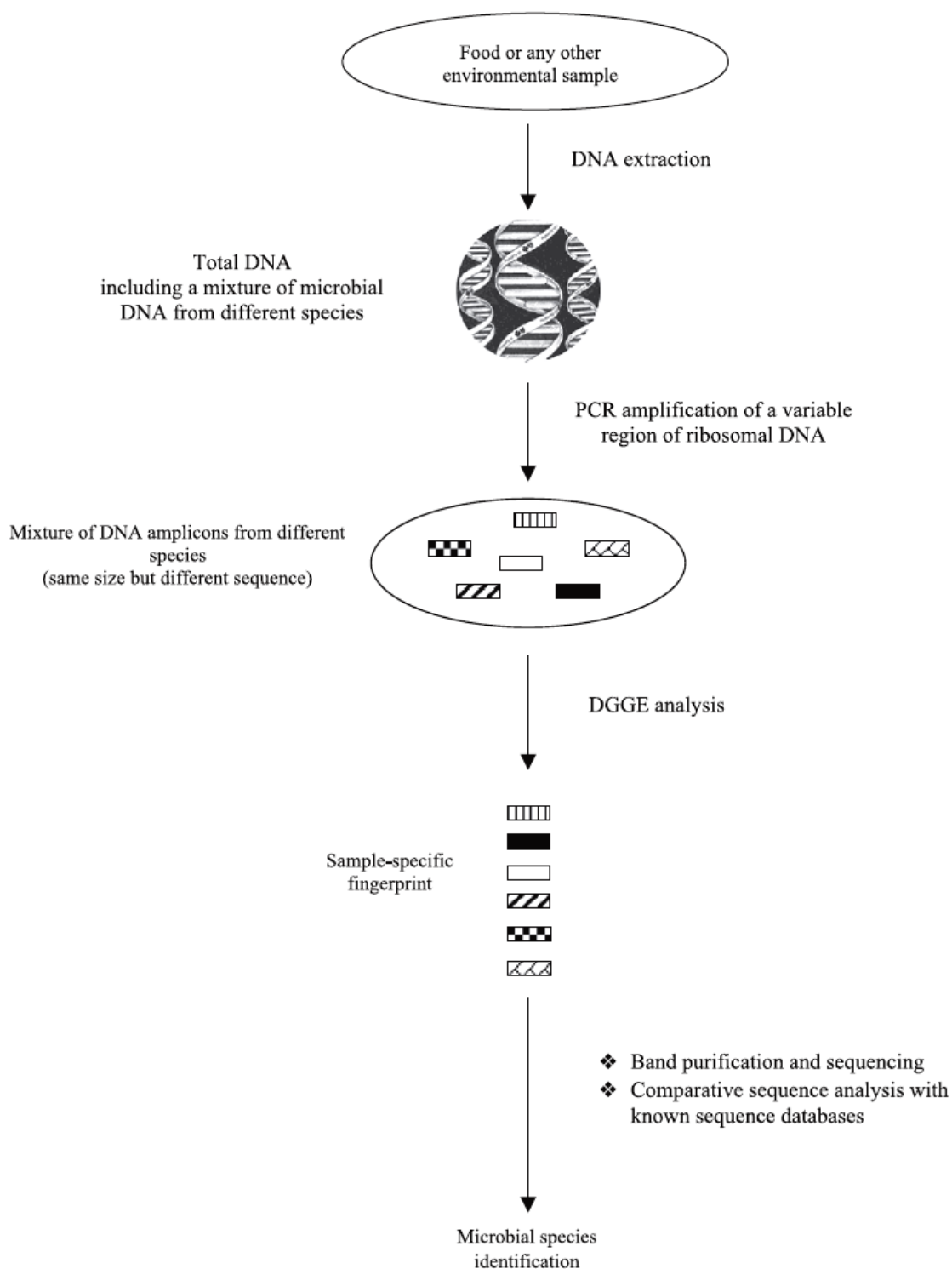
2.7.3 DGGE v praxi

PCR-DGGE je technika, ktorá sa uplatňuje vo viacerých odvetviach mikrobiológie. Jej hlavnou devízou je možnosť priamej extrakcie DNA z reálnych vzoriek, napr. potravín. Výsledkom je DNA odtlačok mikrobiálnej komunity tohto prostredia [33].



Obr. 11 Príklad DGGE profilu eukaryotického spoločenstva [34]

Prvým krokom je izolácia komplexnej DNA z reálnej vzorky, čím je získaná zmes DNA rôznych mikrobiálnych druhov prítomných vo vzorke. Zmes DNA je ďalej použitá ako templát v PCR amplifikácii určitých variabilných úsekov DNA (tie umožňujú rozlíšenie medzi jednotlivými druhmi). Výsledným PCR produktom je zmes amplikónov niekoľkých rôznych druhov prítomných v pôvodnej analyzovanej vzorke. Všetky amplikóny sú rovnakej veľkosti majú odlišné sekvencie, a môžu tak byť separované metódou DGGE. Konečným výsledkom je fingerprint (odtlačok) špecifický pre analyzovanú vzorku – tvorený niekoľkými fragmentmi reprezentujúcimi zloženie mikrobiálneho spoločenstva v študovanej vzorke [33].



Obr. 12 Schéma aplikácie PCR-DGGE na reálnu vzorku [33]

Po separácii je možné v DGGE géli pozorovať fragmenty DNA neurčitého pôvodu. Tie môžu byť z gélu izolované, reamplifikované s použitím podobných podmienok a PCR primerov (bez GC-svorky), ďalej sekvenované a porovnané so sekvenciami dostupnými v databázach. Týmto postupom možno určiť identitu pôvodne neznámeho fragmentu [28].

2.7.3.1 Vlastná separácia v denaturačnom géli

Elektroforetickým médiom v technike DGGE je polyakrylamidový gél. Polyakrylamid je tvorený základným monomérom akrylamidom (AA) a zosieťovacím činidlom N,N-methylén-bis-akrylamidom (BIS), ktorý sa náhodne zabudováva do lineárneho reťazca polyméru. Polymerácia akrylamidu prebieha ako radikálová reakcia pri laboratórnej teplote v prostredí pufru (TAE). Iniciačným činidlom reakcie je persíran amónny (APS), ktorý homolyticky štiepi väzby O–O. Pre urýchlenie polymerizácie sa používa voľná zásada N,N'-tetramethyléndiamín (TEMED), ktorý katalyzuje tvorbu voľných radikálov persíranu amónneho. Polymerizácia sa neuskutoční pri nízkom pH či za prístupu kyslíka [13].

Koncentrácia polyakrylamidového gélu sa líši podľa veľkosti separovaných fragmentov DNA (tab. 1) a určuje jeho mechanické vlastnosti. Optimálne rozlíšenie fragmentov v géli možno dosiahnuť úpravou vzájomného pomeru AA/BIS [10][13].

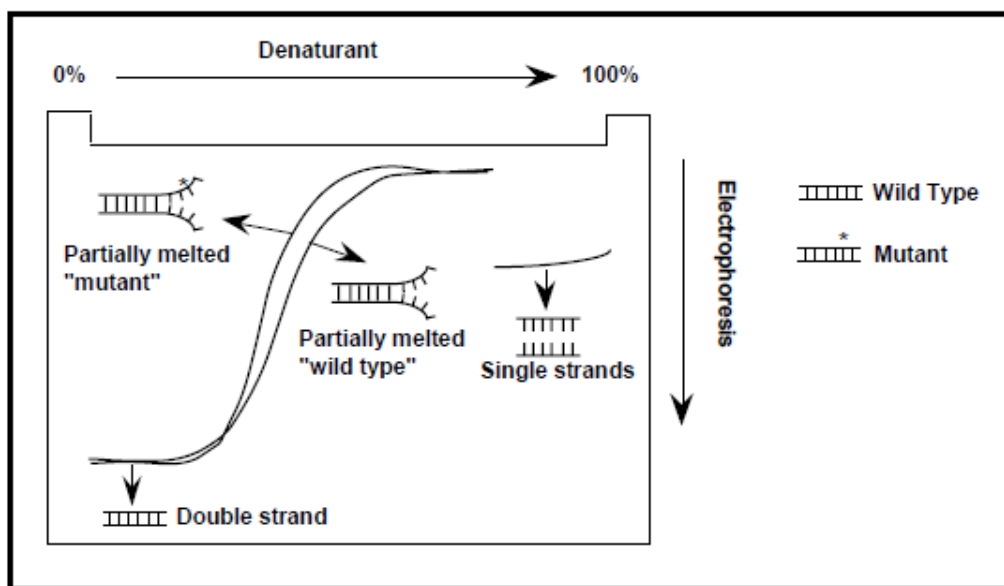
Tabuľka 1 Rozsah veľkostí separovaných fragmentov v závislosti na koncentrácii PA gélu [35]

koncentrácia polyakrylamidu (%)	veľkosť separovaných fragmentov (bp)
6	300 – 1 000
8	200 – 400
10	100 – 300

Denaturačné podmienky v priebehu elektroforézy sú zaistené kombináciou stálej teploty, zvyčajne 50 – 60 °C, a lineárneho gradientu tvoreného močovinou a formamidom. Roztok 100% chemického denaturantu zodpovedá 7 M močovine a 40% formamidu. Denaturačný gradient môže byť vytvorený buď kolmo alebo paralelne k smeru elektroforézy [33][35].

Perpendikulárny gradientový gél, kde gradient denaturačných činidiel vzrastá zľava doprava naprieč gélom, čiže kolmo k elektrickému poľu, zvyčajne využíva široký rozsah gradientu v rozmedzí 0 až 100 %, prípadne 20 – 100 %. Tento typ gélu umožňuje experimentálne určiť optimálny rozsah gradientu pre paralelnú separáciu niekoľkých fragmentov v paralelných géloch. Na gél je v tomto prípade nanosená jediná vzorka, napr. ako zmes amplikónov. Výsledkom je krivka sigmoidného tvaru (obr. 13). Pri nízkych koncentráciách denaturantov (ľavá strana gélu) zachováva fragment DNA dvojreťazcovú štruktúru, so vzrastajúcou koncentráciou sa však začína rozpletať. Napokon, pri veľmi vysokých koncentráciách denaturantov podlieha molekula DNA kompletnej denaturácii až na jednoreťazcové formy a migrácia fragmentu sa zastaví [26][33][35].

Paralelené gradientové gély majú vzrastajúcu koncentráciu denaturantov zhora nadol, teda v smere elektroforézy. Používajú sa pre analýzu niekoľkých rôznych vzoriek na jednom géli. Rozsah gradientu je zúžený, čím je dosiahnutá lepšia separácia analyzovaných fragmentov. Optimálny čas elektroforézy môže byť určený experimentálne pomocou tzv. time travel experimentu, kedy sú rôzne vzorky nanosené na gél v určitých konštantných časových intervaloch [26][33].



Obr. 13 Príklad perpendikulárneho gradientového gélu [35]

Príliš dlhé trvanie elektroforézy môže viesť k nestabilite denaturačného gradientu; príčinou je inkubácia gélu pri zvýšenej teplote po dlhú dobu separácie. Výsledkom je tak skreslená separácia fragmentov a nesprávna interpretácia získaného DGGE profilu. Preto by celkový čas elektroforézy mal byť minimalizovaný s ohľadom na optimálne rozlíšenie separovaných fragmentov DNA [36].

2.7.3.2 Farbenie DGGE gélov

Všeobecné prístupy pre farbenie nukleových kyselín po elektroforetickej separácii sú uvedené v kap. 2.5.3.3. Najčastejšie sa zóny zodpovedajúce jednotlivým fragmentom DNA v DGGE géli vizualizujú farbením ethidium bromidom. Ďalšou možnosťou je farbenie komerčnými produktmi z radu SYBR[®], ktoré nevytvárajú pozadie a umožňujú detekciu DNA fragmentov už pri nízkych koncentráciách. Najcitlivejšou metódou vizualizácie je farbenie striebrom, ktoré znižuje objem PCR produktu aplikovaného na gél už na 10 µl. Gél je skladovateľný niekoľko dní až týždňov bez straty signálu. Naopak, nevýhodou je, že takto ofarbené gély nemôžu byť ďalej použité pre hybridizačné experimenty, rovnako problematická je izolácia frakcií z gélu a ich následná reamplifikácia. Farbenie striebrom je natoľko senzitivne, že sú ľahko identifikované i fragmenty ssDNA [33][37].

2.7.3.3 PCR s ohľadom na DGGE

Vlastnej separácii DNA fragmentov v DGGE géli predchádza ich amplifikácia, v ktorej kľúčovú úlohu zohráva výber vhodných primerov. Predmetom amplifikácie a následnej separácie v PCR-DGGE je zvyčajne ribozomálna DNA, keďže ide o vysoko konzervatívny úsek genómu, ktorý obsahuje aj variabilné sekvencie. Primery pre PCR sú navrhnuté tak, aby hybridizovali s konzervatívnymi úsekmi, a zároveň zahŕňali i variabilné oblasti. Výsledkom sú amplicóny s druhovo-špecifickými rozdielmi v zložení nukleotidov; spĺňajú tak podmienku separácie metódou DGGE. Pre analýzu komplexných mikrobiálnych spoločenstiev musia cieľové sekvencie génov určujúcich jednotlivé druhy existovať v jedinej kópii. Pre štúdium

baktérií fingerprintovými technikami je bežná amplifikácia variabilných úsekov 16S (malej podjednotky) rRNA. V identifikácii kvasiniek sa uplatňuje amplifikácia veľkej podjednotky (26S) rRNA, konkrétne génov kódujúcich D1/D2 domény tejto podjednotky (tie sú známe pre všetky druhy kvasiniek). Amplifikovaný bol i gén kódujúci malú ribozomálnu podjednotku eukaryotov (18S rRNA), v DGGE géli však boli pozorované zóny korešpondujúce s nemikrobiálnou DNA [28][29][33][38].

Naopak, pri použití niektorých primerov určených k amplifikácii bakteriálnej 16S rDNA je zároveň koamplifikovaná i kvasinková, fungálna, či rastlinná DNA, ktoré sú rovnako prítomné v reálnej vzorke. Amplifikácia nebakteriálnej DNA tak maskuje skutočnú bakteriálnu populáciu [39].

2.7.3.4 Štandardy v DGGE

Alternatívou k sekvenovaniu jednotlivých frakcií za účelom identifikácie mikrobiálnych druhov v získanom DGGE profile je konštrukcia molekulárnych rebríčkov (referenčných markerov). Identifikačný marker je zostrojený ako zmes amplikónov rDNA reprezentatívnych druhov analyzovanej reálnej vzorky, napr. potraviny. PCR produkt DNA izolovanej priamo z matrice je na gél nanosený spoločne so zmesou amplikónov referenčných druhov ako rebríček alebo štandard. Porovnaním migračných vzdialeností amplikónov s referenčnými druhmi v identifikačnom rebríčku je možná identifikácia mikroorganizmov prítomných v analyzovanej vzorke [33].

Tento prístup je podstatne jednoduchší než sekvenovanie fragmentov, na druhej strane však nezaručuje jednoznačnú a spoľahlivú identifikáciu pre isté implicitné nedostatky. Známe sú najmä prípady spoločnej migrácie amplikónov rôznych druhov, čo sa prejaví rovnakými pozíciami zón v DGGE profile. Dôvodom je vzájomná blízka príbuznosť niektorých druhov baktérií. Prípád komigrácie bol zaznamenaný napr. u laktobacilov; použitím iného páru primerov či úpravou gradientových podmienok v DGGE však bolo možné dosiahnuť uspokojivú separáciu. Spoločná migrácia zón bola zistená i u kvasiniek spojených s procesom výroby vína. Použitím páru univerzálnych primerov NL1/LS2 bolo možné rozlíšiť jednotlivé rody týchto kvasiniek, avšak amplifikácia týmito primermi neumožnila rozlíšenie medzi jednotlivými druhmi toho istého rodu (*Candida*, *Saccharomyces*) [11][33].

Ďalšou nevýhodou použitia tohto typu štandardov je možnosť existencie niekoľkých kópií génu pre 16S rRNA. Jediný mikrobiálny druh je tak zobrazený ako séria niekoľkých fragmentov, čo činí identifikáciu ešte náročnejšou a nadhodnocuje skutočnú diverzitu mikrobiálneho spoločenstva v reálnej vzorke. V niektorých prípadoch sú rozdiely v migračných vzdialenostiach zón DNA pomerne malé, takže neumožňujú vzájomné porovnanie referenčného markeru a neznámych druhov. Vtedy je najlepším riešením sekvenovanie [33].

2.7.4 Limitácie DGGE

Všetky druhy metód majú svoje špecifické limitácie, ktoré vyžadujú starostlivé zváženie s ohľadom na analýzu a interpretáciu výsledkov. Molekulárne techniky rovnako podliehajú chybám; k tým môže dôjsť už odberom vzorky a manipuláciou s ňou. Takéto skreslenia sú časté ako v tradičných, tak i molekulárnych prístupoch. Aeróbne či anaeróbne skladovanie, premývanie, transport, uchovávanie pri nízkych teplotách – to všetko môže ovplyvniť vývoj mikrobiálnych druhov prítomných v reálnej vzorke čo do množstva, tak i do rozmanitosti [33][38].

Ďalším krokom v molekulárnej charakterizácii mikrobiálnych komunit je extrakcia nukleových kyselín z buniek prítomných vo vzorke. Rozdielne usporiadanie bunkovej steny je dôvodom, prečo rôzne druhy majú rôznu senzitivitu k lytickým činidlám. Purifikácia nukleových kyselín z komplexnej matrice potraviny je pomerne náročná; preto musia byť metódy extrakcie DNA z reálnych vzoriek optimalizované s cieľom získať produkt dostatočnej čistoty s vysokým výťažkom použiteľný ako templát pre PCR. Čím komplexnejšia je matrica, tým ťažšie je dosiahnuť uspokojivý stupeň extrakcie a zbaviť sa všetkých nečistôt, ktoré inak môžu negatívne ovplyvniť amplifikačný krok. Prípady potravinových matric je zvlášť obtiažny; dôvodom je prítomnosť prírodných látok ako sú lipidy, proteíny, polysacharidy a soli. Niektoré z nich môžu pretrvať až do záveru extrakcie. Pri použití konečného extraktu ako templátu pre PCR sa zvyšky matrice môžu správať ako inhibítory reakcie. Konkrétnym príkladom sú polyfenoly a polysacharidy bobúľ vínnej révy. Tieto látky sú často prítomné ako nečistoty izolovanej DNA a inhibujú tak PCR [26][33][38][40].

Významným zdrojom chýb a skreslení v molekulárnych štúdiách reálnych vzoriek je samotná reakcia PCR. Ako bolo uvedené vyššie, zásadným problémom v analýze vzoriek potravín je prítomnosť látok v izolovanej zmesi DNA, spôsobená nedostatočnou purifikáciou cieľovej DNA. Komplikáciou môže byť i tzv. preferenčná amplifikácia, ktorá uprednostňuje iba určité konkrétne templáty niektorých druhov. Mikrobiálna DNA z komplexnej komunity je amplifikovaná len čiastočne a výsledkom je tak PCR produkt, kde niektorí z pôvodných členov komunity chýbajú. Voľba vhodného páru primerov a fragmentov určených k amplifikácii je teda základným predpokladom pre úspešnú separáciu [26][33][38].

Metóda DGGE umožňuje separáciu fragmentov do veľkosti najviac 500 bp, čo je limitálny faktor pre sekvenčné analýzy. Ďalším problémom súvisiacim s PCR amplifikáciou je tvorba heteroduplexov, ktoré znižujú spoľahlivosť analýzy a sťažujú interpretáciu získaného DGGE profilu. Heteroduplexy pochádzajúce z rekombinácie jednoreťazcových molekúl z dvoch rôznych PCR produktov bežne vznikajú v posledných cykloch PCR. Pre nezhody v párovaní medzi dvoma vláknami v molekulách heteroduplexov je ich teplota topenia T_m nižšia než pre homoduplexy, a ich migrácia v géli sa tak zastaví skôr. Táto skutočnosť môže byť problémom v analýze mikrobiálnych populácií, keďže nadhodnocuje skutočnú rozmanitosť spoločenstva. DGGE analýza dvoch PCR produktov v tomto prípade poskytne štyri zóny – dve pre homoduplexné a dve pre heteroduplexné molekuly [26][33].

Prítomnosť zdvojených fragmentov v DGGE profile môže byť spôsobená nielen tvorbou heteroduplexov, ale i degeneráciou primerov. Pomerne častý je aj výskyt zdvojených fragmentov bez jasného pôvodu, ktorých intenzitu možno významne znížiť predĺžením záverečnej extenzie v reakcii PCR [31][41].

O ďalších limitáciách, ako sú spoločná migrácia zón a existencia niekoľkých kópií 16S rDNA, pojednáva kap. 2.7.3.4.

Výsledný DGGE fingerprint poskytuje obraz iba o dominantných druhoch prítomných v mikrobiálnom spoločenstve. Prítomnosť a neprítomnosť zón v DGGE profiloch naznačuje nárast či pokles výskytu určitých druhov v rámci populácie, čo je výhodné najmä pri sledovaní priestorových a časových zmien v reálnej vzorke. Všeobecný detekčný limit metódy bol stanovený na 1 % v celkovej populácii. Detekčný limit pre konkrétne aplikácie je však rôzny a závisí najmä od mikrobiálneho druhu a charakteru potravinovej matrice [26][33][38].

2.7.5 Aplikácie

Denaturačná gradientová gélová elektroforéza bola pôvodne vyvinutá ako metóda pre detekciu bodových mutácií v klinickej diagnostike. PCR-DGGE ribozomálnej DNA bola do odvetvia mikrobiálnej ekológie zavedená v r. 1993, kedy bola prvýkrát použitá pre analýzu bakteriálnej diverzity. Za pomerne krátky čas sa stala obľúbenou fingerprintovou technikou a v súčasnosti je bežným molekulárnym prístupom pre sledovanie mikrobiálnych populácií [32][33][42].

PCR-DGGE je veľmi prispôsobivou a univerzálnou metódou, ktorá našla uplatnenie v mnohých oblastiach mikrobiálnej ekológie. Zvyčajne sa využíva pre určenie štruktúry mikrobiálnych komunit v prírodných vzorkách bez potreby kultivácie a pre sledovanie dynamiky spoločenstva v reakcii na zmeny prostredia. Konkrétne aplikácie tejto techniky sú zamerané na štúdium štruktúry a vývoja mikrobiálnych komunit z pôdy, z vody morí, riek a jazier; gastrointestinálneho traktu, bioreaktorov odpadových vôd, hmyzu a klinických vzoriek. Napriek ohromnému praktickému zázemiu bola metóda DGGE do mikrobiológie potravín zavedená len nedávno. Obrovský potenciál metódy, ktorý sa ukázal v analýze prírodných vzoriek, bol podnetom pre aplikáciu DGGE v štúdiu mikrobiálnych fermentácií v potravinách a ekosystémoch blízkych potravinám [33].

Spomedzi potravinárskych výrobkov sú najviac študované mliečne produkty, najčastejším cieľom analýzy sú baktérie mliečneho kvasenia a vôbec proces mliečnej fermentácie. Konkrétnymi aplikáciami sú: štúdium bakteriálnej diverzity (16S rRNA) v mlieku, rôznych druhov syra či jogurtov; analýza acetobaktérií v balzamikovom octe; sledovanie bakteriálnych populácií na povrchu šalátu, v červených vínach, či v ovocných džúsoch [33].

S výhodou bola metóda PCR-DGGE aplikovaná na štúdium eukaryotických spoločenstiev, ktoré často zohrávajú dôležitú úlohu vo fermentačných procesoch potravín. Ako bolo uvedené v kap. 2.7.3.3, amplifikácia 18S rDNA pre štúdium kvasiniek sa ukázala ako nevhodná. Pre sledovanie kvasinkovej populácie tak bol vyvinutý prístup, ktorý separuje amplifikované produkty variabilných úsekov 26S rDNA z kvasinkovej DNA. Ten bol overený pre modelové fermentačné procesy v laboratórnom meradle, umožňujúc detekciu už 10^3 buniek/ml a identifikáciu aspoň štyroch rôznych druhov kvasiniek. Následne bol aplikovaný pre sledovanie kvasinkovej populácie v priebehu komerčných (priemyselných) fermentačných procesov výroby vína. V každom stupni kvasného procesu bolo možné profilovať mikrobiálnu komunitu a identifikovať druhy kvasiniek patriace k rodom *Metschnikowia*, *Candida* a *Pichia* na začiatku fermentácie, a *Saccharomyces cerevisiae* ako dominantný druh v posledných štádiách procesu. Rovnako bola potvrdená účinnosť *S. cerevisiae* ako mikroorganizmu vedúceho kvasný proces: fragment zodpovedajúci tomuto druhu sa vyskytoval ako dominantný v DGGE profíloch všetkých vzoriek analyzovaných počas fermentácie. Podobne bola PCR-DGGE aplikovaná i pre určenie diverzity kvasiniek fermentačného procesu v botrytizovaných vínach. Analýza touto metódou potvrdila, že teplota kvasného procesu má významný vplyv na rast nesacharomycétnych kvasiniek, ktorý výrazne poklesol pri vyšších teplotách. Ďalším zaujímavým záverom je skutočnosť, že i keď *Metschnikowia pulcherrima* bola izolovaná v koncentráciách 10^5 CFU/ml, amplikón zodpovedajúci tomuto druhu nebol v DGGE profíle pozorovaný; pravdepodobnou príčinou bola neúčinná amplifikácia použitím univerzálneho páru primerov NL1/LS2 [11][33][43].

PCR-DGGE bola ďalej použitá pre analýzu kvasinkových populácií v prostrediach ako sú: bobule vínnej révy, rôzne druhy cesta, kakaové bôby, fermentované klobásy a surové neupravené mlieko [29][33][44].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie, prístroje a pomôcky

3.1.1 Chemikálie

3.1.1.1 Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov

- Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
- D-glukóza bezvodá p.a., Lachema (ČR)
- Síran amónny p.a., Lach-Ner (ČR)
- Dihydrogénfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner (ČR)
- Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lachema (ČR)
- Bakteriologický peptón, Himedia (India)
- Chlorid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
- Agar, Himedia (India)
- LB (Luria Bertani) živné médium, Sigma (USA)

3.1.1.2 Chemikálie pre izoláciu DNA

- Chelatón III dihydrát (EDTA) p.a., Lach-Ner (ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethán (Tris), Serva (SRN)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a., Lach-Ner (ČR)
- Dodecylsíran sodný (SDS), Serva (SRN)
- β -merkaptoethanol, Serva (SRN)
- Fenol p.a., Lachema (ČR)
- Chloroform, Lachema (ČR)
- Octan sodný bezvodý p.a., Lachema (ČR)
- Ethanol p.a., Lachema (ČR)
- Ribonukleáza A (RNAáza), Serva (SRN)
- Izopropylalkohol p.a., Lach-Ner (ČR)

3.1.1.3 Komponenty pre PCR

- PCR voda – voda pre injekcie ČSL 4, Biotika (SR)
- Syntetické primery (NL1, NL4, LS2), Elisabeth Pharmacon (ČR)
- KAPA2G™ Robust PCR Kit, Kapa Biosystems (USA)

3.1.1.4 Chemikálie pre elektroforézy

- Agaróza Premium, Serva (SRN)
- Ethidium bromid, Serva (SRN)
- Brómfenolová modrá – sodná soľ, Serva (SRN)
- Sacharóza p.a., Lach-Ner (ČR)
- Kyselina octová 99,8% p.a., Lach-Ner (ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethán (Tris), Serva (SRN)
- Chelatón III dihydrát (EDTA) p.a., Lach-Ner (ČR)
- λ -EcoT14 I/Bgl II Digest Standard Marker, Takara Bio (Japonsko)
- DNA ladder RTU (Ready-to-Use) 100 bp, Nippon Genetics (SRN)
- Akrylamid 99%, Sigma (SRN)

- N,N'-methylénbisakrylamid, Serva (SRN)
- Močovina p.a., Penta (ČR)
- Formamid p.a., Penta (ČR)
- Persíran amónny (APS), Serva (SRN)
- N,N'-tetramethyléndiamín (TEMED), Serva (SRN)
- Glycerol p.a., Lachema (ČR)
- Dusičnan strieborný 99,8%, Sigma-Aldrich (SRN)
- Ethanol p.a., Lachema (ČR)
- Formaldehyd (36-38%) p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)

3.1.2 Prístroje a pomôcky

3.1.2.1 Kultivácia mikroorganizmov

- Analytické váhy, Boeco (SRN)
- Kompaktné váhy, model Scout™ Pro, Ohaus (USA)
- Ultrazvuk, model PS 02000, Notus Powersonic (SR)
- Očkovací box Aura Mini, Bioair Instruments (ITA)
- Trepačka Yellow Line, model RS 10 Basic, Labicom (SRN)
- Centrifúga, model 3-15, Sigma Laborzentrifugen (SRN)
- Termostat, model IP100-U, Lte Scientific (GB)

3.1.2.2 Izolácia DNA

- UltraClean® Microbial DNA Kit, Mo Bio Lab. (USA)
- Vortex, typ Heidolph, Vitrum (ČR)
- Vortex Genie 2, Mo Bio Lab. (USA)
- Centrifúga, model U-32R, Boeco, (SRN)
- Centrifúga, model Mikro 200, Hettich Zentrifugen (SRN)
- Vodná lázeň, model TW2, Julabo Labortechnik (SRN)

3.1.2.3 PCR

- Vortex Experion™ Vortex Station, Bio-Rad (USA)
- Kompaktná mikrocentrifúga HERMLE Z-100M, Labortechnik (SRN)
- PCR box Aura Mini, Bioair Instruments (ITA)
- Termocykler Palm Cycler™, Corbett Research (Austrália)

3.1.2.4 Analýza izolovanej DNA a PCR produktov

- Mikrovlnná trúba, model M1610N, Samsung (ČR)
- Horizontálna elektroforetická vaňa Owl, model B2, Owl Separation Systems (USA)
- Zdroj napätia pre elektroforézu MP-300N, Major Science (USA)
- Zdroj napätia pre elektroforézu SH-300, Shelton Scientific (USA)
- DGGE aparátúra DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad (USA)
- Trepačka Yellow Line, model RS 10 Basic, Labicom (SRN)
- Transluminátor Ultra Viewer, Ultra Lum (USA)
- Software Scion Image, Biotech (ČR)

- NanoPhotometer™ UV/VIS, Implen (SRN)

3.1.3 Používané kultúry mikroorganizmov

- *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-88
- *Xanthophylomonas dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) CCY 77-1-1
- *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4
- *Sporobolomyces salmonicolor* CCY 19-4-6
- *Sporobolomyces shibatanus* CCY 19-20-3
- *Rhodotorula aurantiaca* CCY 20-9-7
- *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-33
- *Rhodotorula rubra* CCY 20-7-28
- *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1
- *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-2
- *Aureobasidium pullulans* CCM F-148
- *Fusarium solani* CCM F-552

3.1.4 Materiál

Ako reálne vzorky boli použité mušty vínnej révy niekoľkých odrôd získané z Výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho Bratislava, SR: Chardonnay, Rizling vlašský, Dunaj, Svätovavrinecké, Rulandské modré, Modrý Portugal. Odrody boli pestované v oblasti južného Slovenska, vzorky muštov boli odobrané vo fáze búrlivej fermentácie.

3.2 Produkcia mikrobiálnej biomasy

3.2.1 Kultivácia vybraných kmeňov kvasiniek

Vybrané červené kvasinky patria medzi mezofilné, aeróbne mikroorganizmy s podobnými nárokmi na podmienky rastu. Pre optimálnu kultiváciu kvasiniek použitých kmeňov bolo použité tekuté inokulačné a produkčné médium, ktorých zloženie je uvedené v tabuľkách 2 a 3. Kvasinky boli kultivované submerzne v Erlenmeyerových bankách pri podmienkach stáleho trepania a teplote 25 °C. Vzhľadom k tomu, že cieľom kultivácie nebola produkcia karotenoidných pigmentov, stále osvetlenie kultivovaných kultúr nebolo potrebné. Z rovnakého dôvodu bola kultivácia v produkčnom médiu ukončená už po 24 hodinách (rovnako ako v inokulačných médiách). Spoločne s červenými kvasinkami bola pri rovnakých podmienkach kultivovaná i *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabuľka 2 Médium č. 1

Zložky média	Množstvo
glukóza	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,696 g
kvasničný autolyzát	7 g
voda	1 000 ml

Médium č. 1 (zloženie uvedené v tab. 2) bolo používané ako inokulačné. Pasterácia prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút.

Tabuľka 3 Médium č. 2

Zložky média	Množstvo
glukóza	30 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,696 g
voda	1 000 ml

Médium č. 2 (zloženie uvedené v tab. 3) bolo používané ako produkčné. Pasterácia prebiehala rovnako v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút.

3.2.1.1 Inokulum č. 1

Objem 50 ml sterilného média č. 1 (kap. 3.2.1, tab. 2) v Erlenmeyerovej banke s objemom 250 ml bol zaočkovaný štyrmi očkovacími kličkami zásobnej kultúry príslušného kmeňa kvasinky z Petriho misky. Kultivácia prvého inokula prebiehala pri podmienkach stáleho trepania (90 rpm) a teplote 25 °C po dobu 24 hodín. Inokulum č. 1 bolo použité pre zaočkovanie druhého inokulačného média.

3.2.1.2 Inokulum č. 2

Do 100 ml sterilného média č. 2 (kap. 3.2.1, tab. 2) v Erlenmeyerovej banke s objemom 500 ml bolo asepticky prevedených 25 ml inokula č. 1 (kap. 3.2.1.1). Kultivácia prebiehala pri podmienkach stáleho trepania (90 rpm) a teplote 25 °C po dobu 24 hodín. Inokulum č. 2 bolo použité pre zaočkovanie produkčného média.

3.2.1.3 Produkčné médium

Kultivácia kvasiniek ďalej prebiehala v Erlenmeyerových bankách (1 000 ml), z ktorých každá obsahovala 250 ml produkčného média. Každé zo sterilných médií č. 2 (kap. 3.2.1, tab. 3) bolo asepticky zaočkované 50 ml inokula č. 2 (kap. 3.2.1.2). Kultivácia prebiehala pri podmienkach stáleho trepania (90 rpm) a teplote 25 °C po dobu 24 hodín.

3.2.2 Kultivácia kvasinkového organizmu *A. pullulans*

Pre kultiváciu kvasinkového organizmu *A. pullulans* bolo použité tekuté médium, ktorého zloženie je uvedené v kap. 3.2.1, tab. 2. Pasterácia prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút. Objem 50 ml sterilného média v Erlenmeyerovej banke s objemom 100 ml bol zaočkovaný dvoma až tromi očkovacími kličkami zásobnej kultúry mikroorganizmu z Petriho misky. Kultivácia prebiehala submerzne pri podmienkach stáleho trepania (120 rpm) a teplote 28 °C po dobu siedmich dní.

3.2.3 Kultivácia vláknitej huby *Fusarium solani*

Pre kultiváciu plesne *F. solani* bolo použité tekuté médium, ktorého zloženie je uvedené v tab. 4. Pasterácia prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút. Objem 50 ml sterilného média v Erlenmeyerovej banke s objemom 100 ml bol zaočkovaný dvoma až tromi očkovacími kličkami zásobnej kultúry mikroorganizmu z Petriho misky. Kultivácia prebiehala submerzne pri podmienkach stáleho trepania (120 rpm) a teplote 30 °C po dobu siedmich dní.

Tabuľka 4 Tekuté médium pre kultiváciu *F. solani*

Zložky média	Množstvo
glukóza	15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,5 g
NaCl	5 g
voda	1 000 ml

3.2.4 Spracovanie mikrobiálnej biomasy

Celý objem produkčného média bol odstredovaný na centrifúge pri otáčkach 5 000 rpm po dobu 10 minút. Získaný supernatant bol zliaty a sediment premytý destilovanou vodou. Suspenzia bola znova odstredovaná 10 minút pri 5 000 rpm. Sediment bol pretrepaný v cca 30 ml fyziologického roztoku (0,09% NaCl) a uskladnený v riadne označenej nádobke pri -18 °C pre ďalšie použitie.

3.3 Izolácia a analýza mikrobiálnej DNA

Izolácia mikrobiálnej DNA bola uskutočnená jednak ako klasická extrakcia DNA pomocou organických rozpúšťadiel, a tiež ako rýchla izolácia pomocou špeciálneho izolačného kitu.

3.3.1 Izolácia kvasinkovej DNA fenol-chloroformovou extrakciou

Získaná kultúra buniek vo fyziologickom roztoku bola rozmrazená v studenej vode a scentrifugovaná (10 min, 5 000 rpm). Kvasničná biomasa bola ďalej rozsuspendovaná v 4 ml lytického pufru (50 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l EDTA, 3% SDS). Ku vzorke bolo pridaných 100 μ l 90% β -merkptoethanolu a vzniknutá suspenzia bola inkubovaná pri 65 °C po dobu 25 minút. Následne boli ku vzorke pridané 4 ml zmesi fenol : chloroform v pomere 1 : 1. Vzorka bola dôkladne premiešaná na vortexe asi jednu minútu. Bunky boli odstredené na centrifúge pri otáčkach 15 000 rpm pri 4 °C po dobu 20 minút.

Horná vodná fáza obsahujúca DNA bola odpipetovaná do skúmavky a bola k nej pridaná 1/10 objemu 3 mol/l octanu sodného. Vzorka bola doplnená 96% ethanolom na výslednú koncentráciu ethanolu 70 %. V tomto kroku došlo ku vzniku viditeľnej zrazeniny DNA na rozhraní ethanolu a vodnej fázy.

Takto získaná DNA bola odstredená pri otáčkach 9 000 rpm a pri 4 °C po dobu 15 minút, premytá 70% ethanolom a opäť odstredená pri otáčkach 9 000 rpm a 4 °C po dobu 5 minút. Sediment bol vysušený miernym prúdom vzduchu, rozpustený v 200 μ l TE pufru (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8) a prevedený do mikrocentrifugačnej skúmavky.

3.3.1.1 Purifikácia izolovanej DNA

Za účelom odstránenia kontaminujúcej RNA bola použitá ribonukleáza A (1 mg/ml), ktorá bola inkubovaná vo vodnej lázni pri 95 °C po dobu asi 5 minút. Takto pripravená RNAáza bola pridaná ku vzorkám izolovanej DNA (10 μ l enzýmu na 100 μ l izolovanej DNA). Vzorky s RNAázou boli inkubované 30 minút pri 37 °C. V ďalšom kroku bol k roztoku DNA s enzýmom pridaný izopropylalkohol v objeme 1 000 μ l, ktorý podobne ako ethanol zráža DNA (je však selektívnejší, keďže RNA sa ním nezráža). V tejto fáze došlo ku vzniku viditeľnej zrazeniny – vlákien DNA. Vzorky boli ďalej centrifugované pri otáčkach 11 500 rpm po dobu 10 minút. Supernatant bol zliaty, získaný sediment bol vysušený miernym prúdom vzduchu a napokon rozsuspendovaný v 200 μ l TE pufru. Takto prečistené vzorky izolovanej DNA boli delené v agarózovom géli pri rovnakých podmienkach ako vzorky kvasinkovej DNA bez aplikácie RNAázy. Čistota izolovaného preparátu bola overená spektrofotometricky, ako referenčná vzorka bol používaný TE pufor (kap. 3.3.1.2).

3.3.1.2 Stanovenie čistoty a koncentrácie izolovanej DNA

Najrýchlejším a najjednoduchším spôsobom, ako určiť čistotu izolovanej DNA, je spektrofotometrické stanovenie – premeranie absorpcií pri vlnových dĺžkach 260 nm a 280 nm. Nukleové kyseliny majú absorpčné maximum pri 260 nm, kým ich najčastejšie kontaminanty, proteíny, najviac absorbujú pri 280 nm. Na základe pomeru hodnôt A_{260}/A_{280} tak možno určiť typ kontaminácie, a to nasledovne: pomer absorpcií čistej DNA sa pohybuje v rozmedzí 1,8 – 2,0, ak je vzorka znečistená proteínmi pomer je $< 1,8$, v prítomnosti kontaminujúcej RNA je získaný pomer $\geq 2,0$.

Pre stanovenie koncentrácie DNA platí: ak $A_{260} = 1$, potom c (dsDNA) = 50 μ g/ml.

3.3.2 Izolácia DNA izolačnou súpravou UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit

Objem 1,8 ml mikrobiálnej kultúry rozsuspendovanej vo fyziologickom roztoku bol napipetovaný do mikroskúmavky a scentrifugovaný pri otáčkach 11 300 rpm po dobu 30 sekúnd pri laboratórnej teplote. Supernatant bol zliaty a k usadeným bunkám bolo pridaných 300 μ l „MicroBead“ roztoku obsahujúceho soli a pufor. Bunky boli rozsuspendované na vortexe a takto získaný roztok bol presunutý do ďalšej mikroskúmavky obsahujúcej drobný piesok. K roztoku bolo pridaných 50 μ l MD1, ktorý obsahuje SDS a iné činidlá umožňujúce lýzu bunky. Mikroskúmavky boli zahrievané vo vodnej lázni pri 65 °C po dobu 10 minút.

Následne boli mikroskúmavky vortexované v horizontálnej polohe (použitý bol adaptér k vortexu MO Bio Vortex Adapter[®]) pri maximálnej rýchlosti po dobu 10 minút a napokon scentrifugované pri otáčkach 11 300 rpm po dobu 30 sekúnd. Supernatant obsahujúci DNA bol presunutý do novej mikroskúmavky a bolo k nemu pridaných 100 μ l MD2, ktorý zráža ako organické, tak i anorganické nečistoty. Roztok bol krátko (asi 5 sekúnd) vortexovaný a ďalej inkubovaný 5 minút pri 4 °C. Potom bol opäť centrifugovaný pri rovnakých podmienkach ako pri predošlej centrifugácii.

Supernatant bol opätovne presunutý do novej mikroskúmavky a bolo k nemu pridaných 900 μ l MD3 obsahujúceho vysoko koncentrovaný roztok soli potrebný pre naviazanie DNA na filter. Roztok bol presunutý do špeciálnej filtračnej mikroskúmavky a opäť centrifugovaný. Tento postup bol opakovaný dva až tri-krát, kým nebol prefiltrovaný celý objem pôvodného roztoku. Kvapalina, ktorá prešla filtrom, neobsahuje DNA a teda môže byť odstránená.

Filter bol ďalej prečistený 300 μ l roztoku MD4 obsahujúcim ethanol, ktorý je schopný rozpustiť prípadné kontaminanty DNA. Roztok bol opäť centrifugovaný a filter presunutý do novej mikroskúmavky. Ku zrazenine DNA na filtri bolo pridaných 50 μ l MD5, ktorý obsahuje elučný pufor uvoľňujúci zrazeninu z filtra. Po konečnej centrifugácii bol prázdny filter odstránený a roztok obsahujúci DNA uskladnený pri -20 °C. Čistota i koncentrácia takto izolovanej DNA bola stanovená rovnako ako v prípade fenol-chloroformovej extrakcie (kap. 3.3.1.2).

Pozn.: Všetky použité roztoky, mikroskúmavky a ostatné pomôcky sú súčasťou komerčne dodávanej izolačnej súpravy.

3.3.3 Analýza DNA elektromigračnými metódami

Pre overenie prítomnosti a čistoty izolovanej DNA z buniek kvasiniek bola použitá separácia bežnou horizontálnou elektroforézou v agarózovom géli.

3.3.3.1 Príprava vzoriek

Pre určenie pozície najkratších fragmentov DNA v géli v priebehu delenia bol pripravený roztok brómfenolovej modrej (0,025 g brómfenolovej modrej a 4 g sacharózy na 10 ml redetilovanej vody). Kvapalné vzorky kvasinkovej DNA v TE pufrí boli ofarbené farbivom vždy v objeme 2 μ l na 10 μ l vzorky. Ako štandard bol použitý λ -EcoT14 I/Bgl II Digest Standard Marker (Takara) podľa priloženého manuálu.

3.3.3.2 Príprava agarózového gélu

Pre separáciu kvasinkovej DNA bol používaný 1% agarózový gél. Príslušné množstvo agarózy (1 g) bolo rozpustené v 100 ml 1× Tris-acetátového (TAE) pufru (50-krát koncentrovaný 2 mol/l TAE pufr: 242 g Tris; 57,1 ml ľadovej kyseliny octovej; 100 ml 0,5 mol/l EDTA, pH 8 na 1 l redistilovanej vody). Agaróza bola rozpustená zahriatím v mikrovlnnej trúbe. Po ochladení bolo k roztoku pridaných 15 µl ethidium bromidu (zásobný roztok 10 mg/ml), takže jeho konečná koncentrácia v géli bola 1,5 µg/ml. Jemne zamiešaný gél bol naliaty do elektroforetickej formy, ďalej bol vložený hrebeň pre vytvorenie jamiek pre vzorky. Gél stuhol asi za 30 minút pri laboratórnej teplote. Po stuhnutí boli do vzniknutých jamiek nanesené vzorky.

3.3.3.3 Postup pri horizontálnej elektroforéze

Elektroforetická forma s gélom a vzorkami bola zaliata TAE pufrom po rysku vyznačenú na okraji elektroforetickej vane. Aparatúra bola prikrytá a k elektródam bol pripojený zdroj jednosmerného prúdu. Podmienky elektroforézy boli nasledovné: 80 V, 90 mA, pričom separácia prebiehala po dobu 3 hodín. Po skončení elektroforézy bol gél prenesený do komory vizualizačného systému Ultralum, kde sa pri osvetlení UV svetlom javili pásy DNA ako sýto ružové fluoreskujúce pružky na slabo ružovom pozadí. Obrázok bol spracovaný programom Scion Image a uložený v počítači.

3.4 PCR

Mikrobiálna DNA izolovaná pomocou komerčného kitu (kap. 3.3.2) bola použitá ako templát pre reakciu PCR. Pre vyššiu citlivosť a vyšší výťažok bola zvolená modifikácia polymerázovej reťazovej reakcie – nested PCR, ktorá prebiehala v dvoch amplifikačných krokoch [10].

3.4.1 Použité primery

Pre amplifikáciu D1/D2 oblasti 26S rDNA boli použité univerzálne eukaryotické primery. Syntetické oligonukleotidové primery dodané v lyofilizovanom stave (Elisabeth Pharmacon, s.r.o.) boli rozpustené v príslušnom objeme sterilnej PCR vody podľa priloženého manuálu.

Sekvencie použitých primerov sú uvedené v tab. 5.

Tabuľka 5 Použité PCR primery a ich sekvencie (GC-svorka je zvýraznená) [10]

Primer	Sekvencia
NL1-GC	5'- <u>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG</u> GCCATATCAATAAG-3'
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
LS2	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'

3.4.2 Príprava reakčnej zmesi pre PCR

Reakčnú zmes pre PCR, tzv. mastermix, tvoria jednotlivé zložky uvedené v tab. 6. Každá zložka reakčnej zmesi bola pred vlastným použitím zvortexovaná a krátko (cca 5 s) centrifugovaná. PCR komponenty boli miešané v danom poradí v boxe vopred vysterilizovanom UV žiarením. Reakčná zmes bola pripravená v príslušnom objeme (vždy podľa počtu reakcií) v sterilnej 1,5 ml skúmavke typu Eppendorf a rozpipetovaná do 0,2 ml PCR skúmaviek, kde k nej bola pridaná templátová DNA. Negatívna kontrola bola pripravená rovnakým spôsobom, miesto templátovej DNA bola použitá sterilná PCR voda. Zmes bola krátko zvortexovaná a vložená do termocykleru s vopred nastaveným PCR profilom.

Tabuľka 6 Zloženie reakčnej zmesi pre PCR

komponenty PCR	konečná koncentrácia v reakčnej zmesi	objem pre 25 μ l reakciu	objem pre 50 μ l reakciu
sterilná PCR voda	-	19,90 μ l	39,80 μ l
10 \times reakčný pufor (konc. MgCl ₂ 15 mM)	1 \times	2,50 μ l	5 μ l
MgCl ₂ zvlášť (25 mM)	2,0 mM	0,50 μ l	1,00 μ l
dNTP mix (10 mM každý)	0,2 mM každý	0,50 μ l	1,00 μ l
priamy primer (100 μ M)	1,0 μ M	0,25 μ l	0,50 μ l
reverzný primer (100 μ M)	1,0 μ M	0,25 μ l	0,50 μ l
Taq-DNA polymeráza (5 U/ μ l)	0,5 U	0,10 μ l	0,20 μ l
templátová DNA	podľa potreby	1 μ l	2 μ l

3.4.3 Prvý amplifikačný krok

Pre prvý amplifikačný krok bola ako templát použitá DNA izolovaná z čistých kultúr mikroorganizmov. Použitý bol pár vonkajších primerov NL1/NL4. Celkový objem reakcie v jednej skúmavke bol 25 μ l (kap. 3.4.2, tab. 6). Výsledkom bol amplikón veľkosti približne 600 bp. Priebeh vlastnej reakcie PCR je uvedený v tab. 7.

Tabuľka 7 Teplotný a časový profil prvého amplifikačného kroku nested PCR

Jednotlivé kroky PCR		Teplota	Trvanie
	počiatočná denaturácia	95 °C	3 min
30 cyklov	denaturácia	95 °C	30 s
	anelácia	55 °C	30 s
	elongácia	72 °C	30 s
	záverečná elongácia	72 °C	3 min
	chladenie	10 °C	3 min

3.4.4 Druhý amplifikačný krok

PCR produkt prvého amplifikačného kroku (kap. 3.4.3) bol vhodne nariadený (1 μ l v 99 μ l, prípadne v 49 μ l PCR vody) a použitý ako templát pre druhý amplifikačný krok. Použitý bol pár vnútorných primerov NL1/LS2. Celkový objem reakcie v jednej skúmavke bol 50 μ l (kap. 3.4.2, tab. 6). Výsledkom bol amplikón približnej veľkosti 250 bp. Vlastný priebeh reakcie PCR je uvedený v tab. 8.

Tabuľka 8 Teplotný a časový profil druhého amplifikačného kroku nested PCR

Jednotlivé kroky PCR		Teplota	Trvanie
	počiatočná denaturácia	95 °C	5 min
30 cyklov	denaturácia	95 °C	1 min
	anelácia	52 °C	2 min
	elongácia	72 °C	2 min
	záverečná elongácia	72 °C	7 min
	chladenie	10 °C	3 min

3.4.5 Elektroforetická detekcia fragmentov PCR produktov

Úspešnosť amplifikácie (po prvej i druhej PCR reakcii) bola overená elektroforetickou separáciou získaných PCR produktov v 1,8% agarózovom géli (1,8 g agarózy na 100 ml TAE pufru) s koncentráciou EtBr 1,5 μ g/ml (viď. kap. 3.3.3.2). Vzorky (vrátane negatívnej kontroly) boli ofarbené roztokom brómfenolovej modrej (vždy 1 μ l farbiva na 5 μ l vzorky, kap. 3.3.3.1) a takto nanosené na gél. Ako štandard bol použitý DNA ladder RTU 100 bp (Nippon Genetics) v objeme 5 μ l. Postup, ako aj podmienky vlastnej elektroforézy boli rovnaké ako v kap. 3.3.3.3.

3.5 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza

3.5.1 Príprava polyakrylamidového gélu s lineárnym gradientom denurantov

Najprv boli pripravené zásobné roztoky 40% AA/BIS v pomere:

- 37,5 : 1 (38,93 g akrylamidu a 1,07 bis-akrylamidu na 100 ml redestilovanej vody),
- 19 : 1 (38 g akrylamidu a 2 g bis-akrylamidu na 100 ml redestilovanej vody).

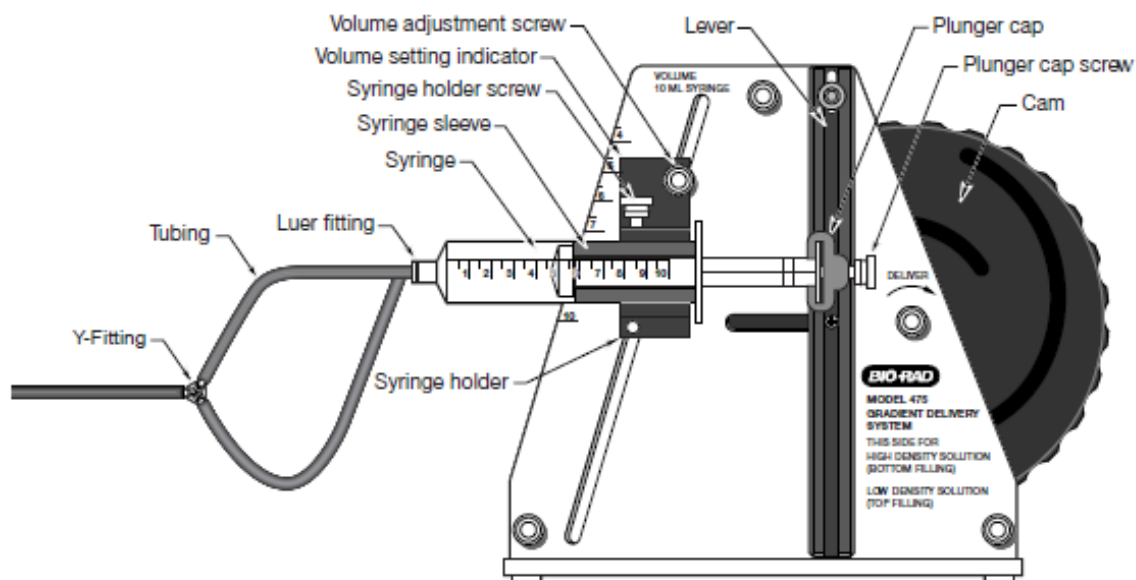
Takto pripravené roztoky boli prefiltrované cez filtračný papier a uchované v chlade pri 4 °C pre ďalšie použitie. Pre separáciu získaných PCR fragmentov veľkosti 250 bp bol použitý 8% polyakrylamidový gél (kap. 2.7.3.1, tab. 1). Vlastný roztok AA/BIS s obsahom denurantov bol pripravený zmiešaním 20 ml AA/BIS, 2 ml 50 \times TAE pufru (242 g Tris; 57,1 ml ľadovej kyseliny octovej; 100 ml 0,5 mol/l EDTA, pH 8 na 1 l redestilovanej vody), príslušného objemu formamidu a hmotnosti močoviny v závislosti od zvoleného denaturačného gradientu (tab. 9) a doplnený na 100 ml redestilovanou vodou. (Roztok 100% chemického denurantu zodpovedá 7 M močovine a 40% formamidu.) Pre vizualizáciu gradientu v naliatom géli bol k roztoku s vyššou koncentráciou denurantov pridaný roztok brómfenolovej modrej (0,05 g brómfenolovej modrej na 10 ml 1 \times TAE pufru), a to v objeme 100 μ l farbiva na 5 ml roztoku.

Tabuľka 9 Množstvá denaturantov pre 8% PA gél [35]

Denaturačný roztok	30%	45%	50%	60%
Formamid (ml)	12	18	20	24
Močovina (g)	12,6	18,9	21	25,2

Vlastný separačný gél s lineárnym gradientom denaturantov bol pripravený nasledovne: k 14 ml nízko-denaturačného a 14 ml vysoko-denaturačného roztoku bolo pridaných 15 μ l TEMEDu (N,N'-tetrametyléndiamínu) a 45 μ l iniciačného činidla APS (vždy čerstvo pripravený: 0,1 g persíranu amónneho v 1 ml redestilovanej vody). Zmes bola jemným pohybom premiešaná a nasatá do injekčných striekačiek. Tie boli upevnené po stranách aparatury na prípravu gradientu a hadičkami pripojené k ihle, ktorá bola zavedená medzi sklenené dosky v nalievacom stojane. Pomalým otáčaním kola aparatury bol vytvorený zvolený lineárny gradient denaturantov v géli; naliaty gél bol prevrstvený 1 \times TAE pufrom.

Po ukončení polymerácie vlastného separačného gélu (90 až 120 min) bola vrstva TAE pufru z povrchu odliata a zvyšok odsatý filtračným papierom. Zvyšný priestor bol vyplnený tzv. stacking gélom – čistým 8% PA gélom bez obsahu denaturačných činidiel. K 5 ml 0% denaturačného roztoku bolo pridaných 10 μ l TEMEDu a 30 μ l iniciačného činidla APS. Zmes bola jemným pohybom premiešaná a nasatá do injekčnej striekačky s pripojenou ihlou. Rýchlym, avšak opatrným vytlačení zmesi zo striekačky bol naliaty gél, do ktorého bol vložený hrebeň, aby tak vytvoril jamky pre nanášanie vzoriek.



Obr. 14 Aparatúra pre prípravu gradientu v DGGE [35]

3.5.2 Príprava vzoriek pre separáciu DGGE

Vzorky pre DGGE (produkty nested PCR) boli ofarbené roztokom brómfenolovej modrej (0,5 ml 2% brómfenolovej modrej a 7 ml glycerolu na 10 ml redestilovanej vody) v pomere 1 : 1 a takto nanosené do jamiek v géli.

3.5.3 Postup pri elektroforéze

Elektroforetická vaňa bola naplnená 7 l 1× TAE pufru a prikrytá ovládacím panelom, pomocou ktorého bolo zapnuté ohrievanie na 60 °C. Jamky vzniknuté po vytiahnutí hrebeňa z gélu boli prepláchnuté 1× TAE pufrom, čím boli odstránené zvyšky nespolymerizovaného akrylamidu. Sklenené dosky s naliatym gélom boli zo stojana presunuté na DGGE kazetu. Pri dosiahnutí teploty cca 50 °C bolo ohrievanie prerušené, do vane bola vložená DGGE kazeta s gélom a do jamiek boli nanesené vzorky s farbivom (kap. 3.5.2) v objeme 30 µl. Elektroforetická aparátúra bola prikrytá ovládacím panelom a pripojená ku zdroju napätia. Pred vlastnou separáciou bolo na gél aplikované napätie 30 V, až kým nebola dosiahnutá požadovaná teplota 60 °C (15 až 20 min). Ďalej prebiehala elektroforéza pri podmienkach: 120 V, 90 mA, a to po dobu štyroch hodín.

3.5.4 Farbenie DGGE gélov

Pre vizualizáciu fragmentov DNA separovaných v DGGE géli boli použité dva rôzne prístupy: farbenie EtBr a striebrom.

3.5.4.1 Farbenie striebrom

Metodický postup pre farbenie DGGE gélu striebrom bol prevzatý z [45].

Po skončení elektroforézy bol gél prepláchnutý studeným fixačným roztokom (10% ethanol a 0,5% kyselina octová, cca 10 °C) a farbený vo vlastnom farbiacom roztoku AgNO₃ (1,5 g AgNO₃ a 1,5 ml 37% formaldehydu na liter redestilovanej vody) 6 až 7 minút. Gél bol dvakrát prepláchnutý destilovanou vodou a ponechaný vo vyvíjacom roztoku (15 g NaOH a 2 ml formaldehydu na liter redestilovanej vody) po dobu asi 5 minút. Vyvíjanie obrazu bolo ukončené pridaním fixačného roztoku. Celý proces farbenia prebiehal v plastovej nádobe pri neustálom trepaní na trepačke; po jeho ukončení bol gél opatrne prenesený medzi dve fólie, naskenovaný a uložený v počítači.

3.5.4.2 Farbenie EtBr

Pre farbenie ethidium bromidom bola pripravená farbiaca lázeň: do 250 ml 1× TAE pufru bolo vmiešaných 50 µl EtBr (zásobný roztok 10 mg/ml), takže jeho konečná koncentrácia bola 20 µg/ml. Gél bol v lázni ponechaný po dobu 15 – 20 minút a následne odfarbovaný v 250 ml 1× TAE pufru asi 5 minút. Farbenie i odfarbovanie gélu prebiehalo pri podmienkach stáleho trepania. Napokon bol gél prenesený do komory vizualizačného systému, získaný obrázok bol spracovaný programom Scion Image a uložený v počítači.

3.6 Manipulácia s reálnymi vzorkami muštu vínnej révy

Pre izoláciu a následnú analýzu mikrobiálnej DNA z reálnych vzoriek muštu bola použitá jednak priama extrakcia DNA zo vzoriek nezávislá na kultivácii, ako aj kultivačný prístup s použitím tuhého i tekutého živného média.

3.6.1 Kultivačné prístupy

3.6.1.1 Kultivácia na tuhom médiu

Pre kultiváciu mikroorganizmov prítomných vo vzorkách muštov bolo použité tuhé YPD médium, ktorého zloženie je uvedené v tab. 10. Pasterácia prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút. Objem 300 ml sterilného média v Erlenmeyerovej banke bol asepticky rozliaty na Petriho misky. Po stuhnutí média bola živná pôda zaočkovaná 0,1 ml zo vzorky muštu. Petriho misky boli uložené do termostatu a kultivované pri teplote 26 °C po dobu piatich dní.

Z kolónií vyrastených na Petriho miskách bola izolovaná DNA postupom uvedeným v kap. 3.3.2.

Tabuľka 10 YPD médium

Zložky média	Množstvo
glukóza	20 g
bakteriologický peptón	20 g
kvasničný autolyzát	10 g
agar	20 g
voda	1 000 ml

3.6.1.2 Kultivácia v tekutom médiu

Pre kultiváciu mikroorganizmov prítomných vo vzorkách muštov bolo rovnako použité i tekuté LB médium (20 g/liter vody). Pasterácia prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút. Objem 50 ml sterilného média v Erlenmeyerovej banke s objemom 250 ml bol zaočkovaný 2 ml zo vzorky muštu. Kultivácia prebiehala submerzne pri podmienkach stáleho trepania (120 rpm) a teplote 26 °C po dobu 36 hodín.

Mikrobiálna biomasa bola získaná postupom uvedeným v kap. 3.2.4, a ďalej použitá pre izoláciu DNA pomocou izolačného kitu (kap. 3.3.2).

3.6.2 Priama izolácia komplexnej DNA z reálnych vzoriek muštu

Pre priamu izoláciu komplexnej genómovej DNA zo vzoriek muštu vínnej révy bola použitá komerčná súprava UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit; postup je uvedený v kap. 3.3.2.

3.6.3 Amplifikácia a analýza fragmentov DNA

DNA získaná priamou izoláciou zo vzoriek muštu i po kultivácii bola použitá ako templát pre reakciu PCR s použitím univerzálnych eukaryotických primerov (kap. 3.4). Získané amplikóny (250 bp) boli analyzované metódou DGGE (kap. 3.5).

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Príprava čistých (referenčných) kultúr mikroorganizmov

Ako čisté kultúry kvasiniek boli používané kvasinky pochádzajúce zo zbierky CCY (Chemický ústav SAV, Bratislava). Kvasinkový mikroorganizmus *Aureobasidium pullulans* a vláknitá huba *Fusarium solani* boli získané zo zbierky CCM (PrF MU, Brno).

Kultiváciou referenčných kmeňov bola získaná mikrobiálna biomasa, ktorá bola použitá pre izoláciu DNA; tá bola následne amplifikovaná v reakcii PCR a získané amplikóny tak mohli byť analyzované metódou DGGE.

4.1.1 Izolácia mikrobiálnej DNA

Testované boli dva rôzne prístupy izolácie s ohľadom na výťažok a čistotu DNA v kvalite vhodnej pre PCR; pre ďalšiu prácu bola ako efektívna metóda zvolená rýchla izolácia DNA pomocou izolačného kitu.

4.1.1.1 Izolácia DNA fenol-chloroformovou extrakciou

Extrakcia zmesou fenol-chloroform je časovo náročným postupom izolácie DNA. Dôvodom je niekoľkonásobná centrifugácia, precipitácia, zdĺhavé prečisťovanie a postupné pridávanie činidiel. Ďalšou nevýhodou je pomerne častá kontaminácia získanej DNA proteínmi či RNA, a to aj napriek precíznej a starostlivej práci.

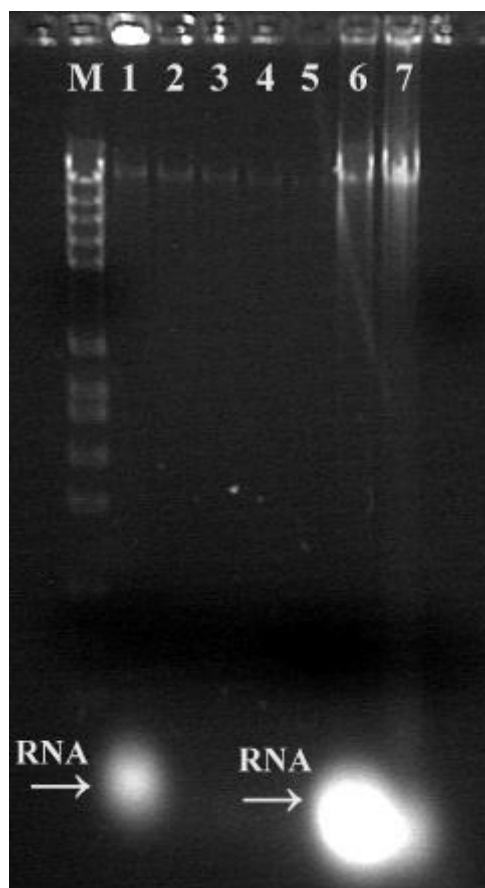
Tento postup izolácie DNA bol zvolený len pre jedného zástupcu červených kvasiniek – *Rhodotorula glutinis* a pre kontrolný kmeň *S. cerevisiae*. V oboch prípadoch bola získaná DNA znečistená RNA, čo potvrdila ako elektroforetická separácia, tak i spektrofotometrické meranie čistoty (dáta nie sú uvedené). Pre odstránenie kontaminujúcej RNA bol aplikovaný enzým ribonukleáza A (obr. 15), získané pomery hodnôt absorbančností A_{260}/A_{280} kvasinkovej DNA však ďalej naznačovali prítomnosť proteínov.

Fenol-chloroformová extrakcia sa tak ukázala ako metóda nevhodná pre získanie intaktnej DNA v kvalite vhodnej pre PCR.

4.1.1.2 Izolácia DNA izolačnou súpravou UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit

Pre izoláciu genómovej DNA z referenčných kmeňov bola tiež použitá komerčná sada Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit. Súprava umožňuje rýchlu a jednoduchú izoláciu, čo sa prejaví najmä pri práci s väčším množstvom vzoriek. Nespornou výhodou je získanie DNA s vyšším stupňom čistoty; na druhej strane poskytujú komerčné kity iba malé výťažky izolovanej DNA nedetekovateľné elektroforetickou separáciou. Pre PCR však teoreticky postačí už jediná molekula templátovej DNA.

Pre uvedené atribúty bola izolácia DNA týmto postupom zvolená pre všetky referenčné kmene.



Obr. 15 Vzorky kvasinkovej DNA po fenol-chloroformovej extrakcii delené v 1% agarózovom géli; M označuje štandard (marker); dráha č. 1 je vzorka *Rh. glutinis* bez RNAázy, dráhy č. 2 – 5 s aplikáciou RNAázy, dráha č. 6 je *S. cerevisiae* bez RNAázy a napokon dráha č. 7 – *S. cerevisiae* s použitím RNAázy (RNA detekovaná v dráhe č. 6 prekryla detekciu v dráhe č. 7, možno sa však domnievať, že enzymatická degradácia RNA bola úspešná)

4.1.2 Amplifikácia izolovanej DNA

Pre namnoženie špecifického úseku DNA bola zvolená kódujúca oblasť 26S rDNA; tá bola amplifikovaná s použitím univerzálnych eukaryotických primerov. Amplifikácia prebiehala ako nested PCR v dvoch reakciách: prvý amplifikačný krok využíva pár vonkajších primerov NL1/NL4, kým primery použité v druhej reakcii (NL1/LS2) majú väzbové miesto vnútri prvej amplifikovanej sekvencie. GC-svorka prisyntetizovaná na 5'-konci primeru NL1 je začlenená do výsledného amplikónu a zamedzuje tak úplnej disociácii dsDNA na jednoreťazcové formy, čo je dôležité pri ďalšej analýze produktu metódou DGGE. Hniezdová PCR bola zvolená ako modifikácia PCR zvyšujúca citlivosť a špecifitu reakcie. Použité primery, ako aj podmienky vlastnej reakcie boli prevzaté z [10].

Pre všetky elektroforezy (a teda i získané elektroforeogramy) bolo zavedené pracovné označenie jednotlivých dráh, ktoré je uvedené v tab. 11. Toto označenie platí, pokiaľ nie je uvedené inak.

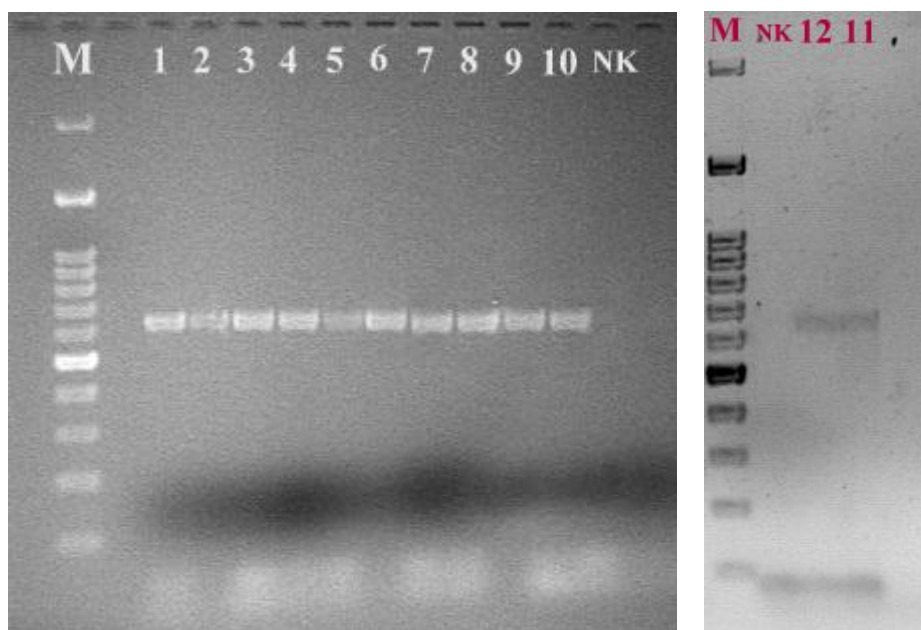
Tabuľka 11 Označenie dráh a zodpovedajúci PCR produkt

označenie	referenčný kmeň kvasinky
1	<i>Sporobolomyces roseus</i>
2	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
3	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>
4	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
5	<i>Rhodotorula rubra</i>
6	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> (CCY 10-1-1)
7	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> (CCY 10-1-2)
8	<i>Phaffia rhodozyma</i>
9	<i>Rhodotorula glutinis</i>
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
11	<i>Aureobasidium pullulans</i>
12	<i>Fusarium solani</i>
M	štandard (molecular weight marker)
NK	negatívna kontrola

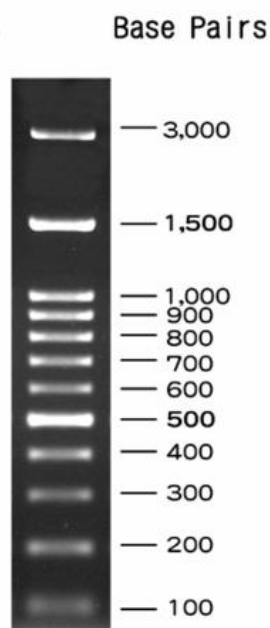
4.1.2.1 Prvý amplifikačný krok

Fragmenty amplifikované použitím páru vonkajších primerov NL1/NL4 boli detekované horizontálnou elektroforézou v 1,8% agarózovom géli (obr. 16). Porovnaním so štandardom (DNA ladder RTU 100 bp, Nippon Genetics) bola veľkosť PCR produktov určená na cca 600 bp. S ohľadom na uspokojivú separáciu amplifikovaných fragmentov a neprítomnosť nešpecifických produktov nebola optimalizácia parametrov PCR (koncentrácia MgCl₂, primerov a DNA-polymerázy) potrebná.

Získané amplikóny boli použité ako templát pre druhý amplifikačný krok. Aby sa zabránilo amplifikácii pôvodnej templátovej DNA, bolo potrebné PCR produkty vhodne nariediť. Ako optimálne sa ukázalo zriedenie 1 µl PCR produktu v 99 µl PCR vody.



Obr. 16 Amplikóny (600 bp) po prvej PCR reakcii, popis vzoriek vid' tab. 11

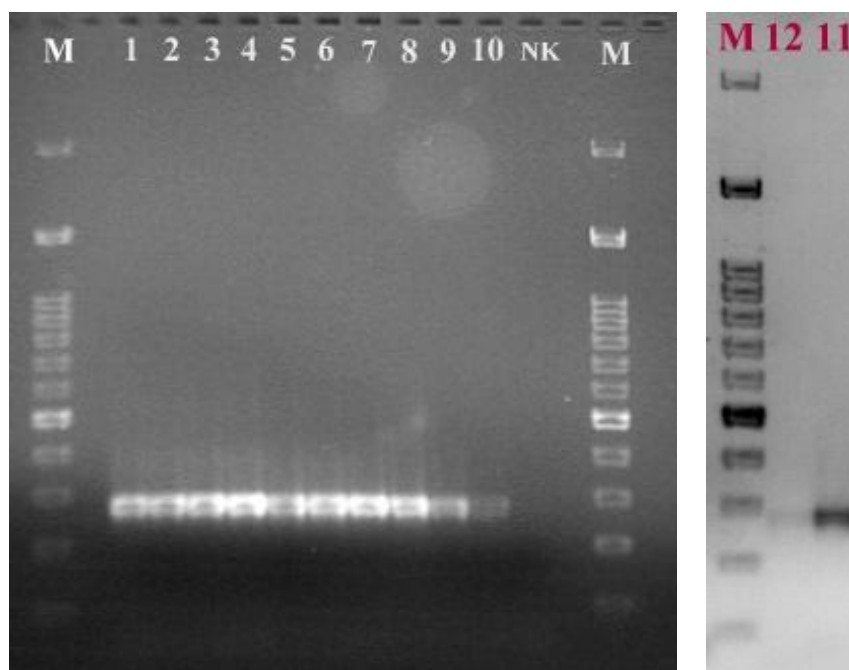


Obr. 17 Štandard používaný pre overenie PCR produktov s naznačenými veľkosťami jednotlivých zón (DNA ladder Ready-to-Use 100 bp, Nippon Genetics) [46]

4.1.2.2 Druhý amplifikačný krok

Použitím páru vnútorných primerov NL1/LS2 bola amplifikovaná vnútorná oblasť pôvodného amplikónu. Získané PCR produkty boli elektroforeticky detekované v 1,8% agarózovom géli, porovnaním so štandardom bola ich veľkosť určená na cca 250 bp. Rovnako ako pri prvom kroku, ani v tomto prípade optimalizácia parametrov PCR nebola uskutočnená.

Metóda PCR-DGGE umožňuje separáciu fragmentov s veľkosťou najviac 500 bp, takže získané amplikóny sú pre tento spôsob analýzy vhodné.



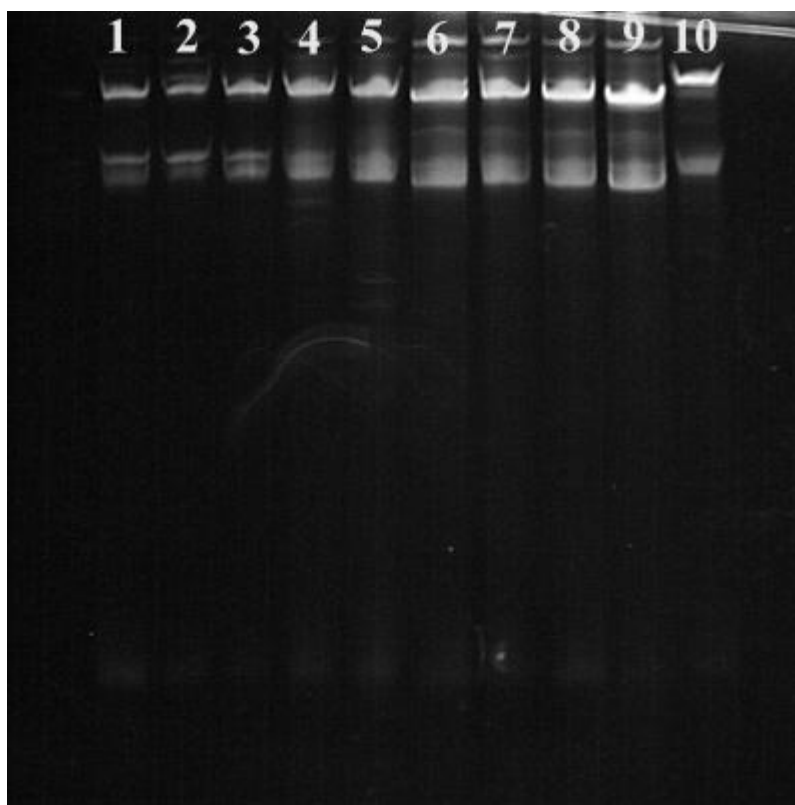
Obr. 18 Amplikóny (250 bp) po druhej PCR reakcii, popis vzoriek vid' tab. 11

4.2 Analýza PCR produktov referenčných kultúr metódou DGGE

4.2.1 Optimalizácia denaturačného gradientu

Vychádzajúc z väčšiny aplikácií techniky DGGE pre kvasinkové spoločenstvá bol zvolený denaturačný gradient v rozsahu 30 – 60 %. Polyakrylamidový gél bol pripravený zo zásobného roztoku AA/BIS v pomere 37,5 : 1. V získanom DGGE profile (obr. 19) možno pozorovať neuspokojivú separáciu fragmentov DNA, migrácia zón v géli bola nedostatočná – zastavila sa príliš vysoko. Preto bolo žiaduce zúženie rozsahu denaturačného gradientu. Zároveň je možné si povšimnúť privysokú intenzitu získaných fragmentov – v tomto prípade boli použité PCR produkty neriedené po prvej reakcii.

Lepšie rozlíšenie separovaných fragmentov v géli možno dosiahnuť použitím roztoku AA/BIS v pomere 19 : 1, ktorý sa vyznačuje vyšším podielom zosieťovacieho činidla bisakrylamidu a teda menšou veľkosťou pórov [10]. Pre všetky ďalšie (nie optimalizačné) experimenty tak bol zvolený polyakrylamidový gél pripravený zo zásobného roztoku AA/BIS v pomere 19 : 1 a rozsah gradientu 30 – 45 % pre kvasinky (prípadne 30 – 50 % pri separácii ďalších referenčných kultúr).



Obr. 19 DGGE profil referenčných kultúr kvasiniek (AA/BIS – 37,5 : 1, gradient 30 – 60 %), popis vzoriek je uvedený v tab. 11

4.2.2 Optimalizácia farbenia DGGE gélov

Pre vizualizáciu separovaných fragmentov v DGGE géloch bolo použité farbenie EtBr (viď obr. 19). Po niekoľkých neúspešných experimentoch bolo zistené, že farbiaca lázeň a v nej prítomný 1× TAE pufor je veľmi náročný na kvalitu použitej vody. Tá nesmie byť skladovaná v plastových fľašiach, ale výhradne v sklenených nádobách (fľaše, banky). To isté možno

konštatovať i o $1 \times$ TAE pufri, ktorý je prítomný v priebehu vlastnej elektroforézy. V opačnom prípade sú zóny v DGGE géli nedetekovateľné.

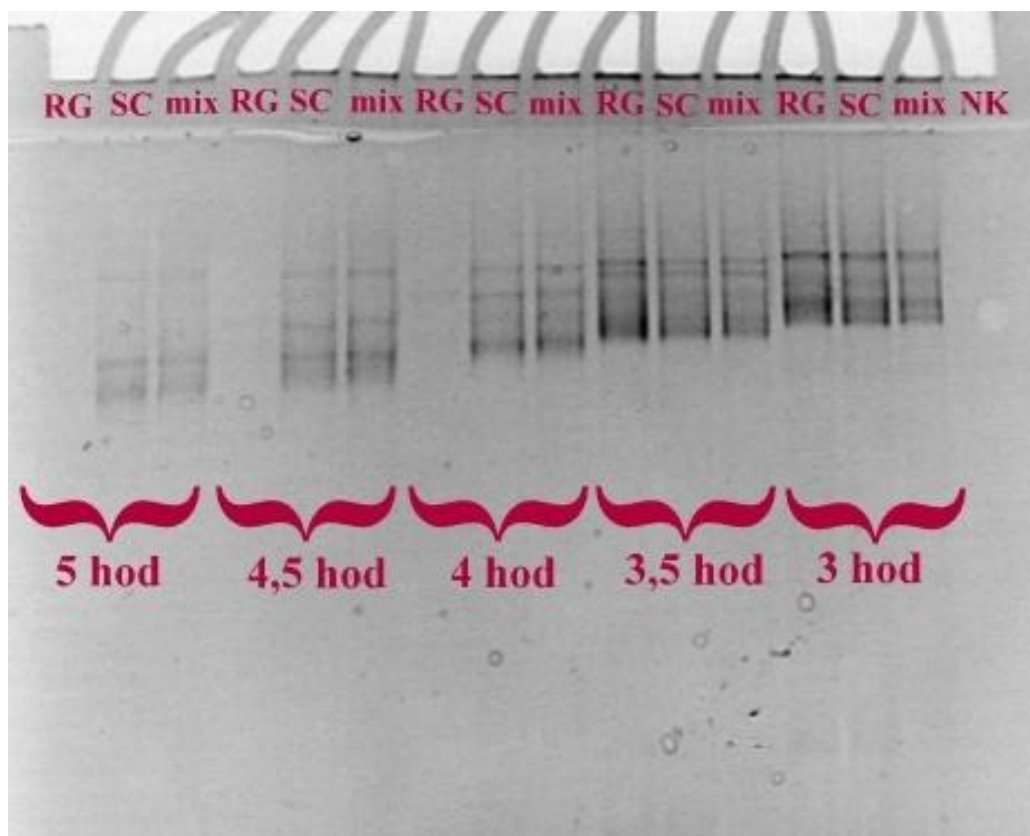
Medzitým bolo testované farbenie striebrom, ktoré je uvádzané ako vôbec najcitlivejšia metóda farbenia. Túto skutočnosť potvrdzuje obr. 20: vzorka nanosená do dráhy č. 10 (*S. cerevisiae*) difundovala do vedľajšej dráhy v množstve len jednej kvapky (označená menším písmom), čo však postačilo pre detekciu AgNO_3 . Nevýhodou tohto prístupu je niekoľkonásobná výmena roztokov a oplachovanie gélu, ako aj nadmerná, a v niektorých prípadoch nežiaduca senzitivita. Za štandardný postup tak bolo zvolené farbenie EtBr.



Obr. 20 DGGE gél po farbení striebrom (AA/BIS – 19 : 1, gradient 30 – 45 %), popis vzoriek je uvedený v tab. 11

4.2.3 Optimalizácia trvania separácie

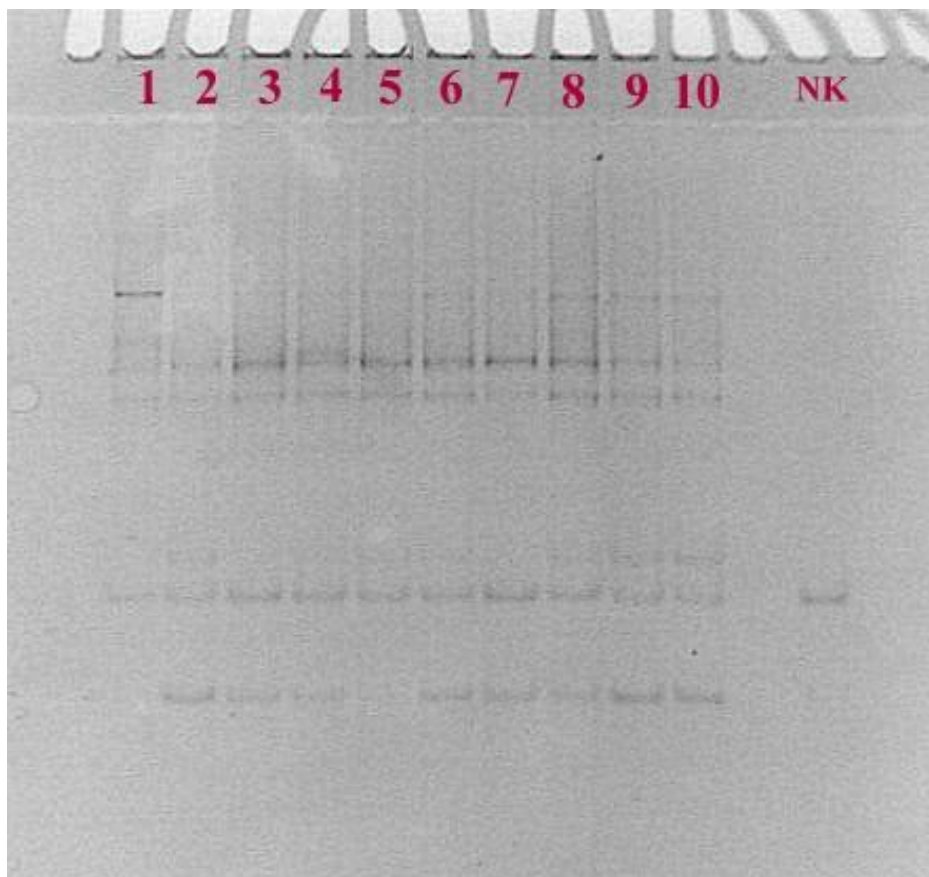
Pre určenie optimálneho času elektroforetickej separácie bol uskutočnený tzv. time-travel experiment (obr. 21). V určitých konštantných časových intervaloch (30 min) boli na DGGE gél nanosené vzorky v tomto poradí: *Rh. glutinis* (RG), *S. cerevisiae* (SC) a ich zmes získaná zmiešaním alikvotných objemov amplikónov. Čas separácie pre jednotlivé série vzoriek sa pohyboval v rozmedzí 3 až 5 hodín. I keď separácia neposkytla optimálne výsledky (jeden fragment pre jeden kvasinkový druh a dva fragmenty pre zmes amplikónov), pre všetky ďalšie experimenty bol ako optimálny čas pre elektroforézu zvolený čas 4 hodiny.



Obr. 21 Negatívna snímka time-travel experimentu (AA/BIS – 19 : 1, gradient 30 – 60 %); popis vzoriek: RG – *Rh. glutinis*, SC – *S. cerevisiae*, mix – zmes amplikónov *Rh. glutinis* a *S. cerevisiae*

4.2.4 Vlastná analýza referenčných kmeňov

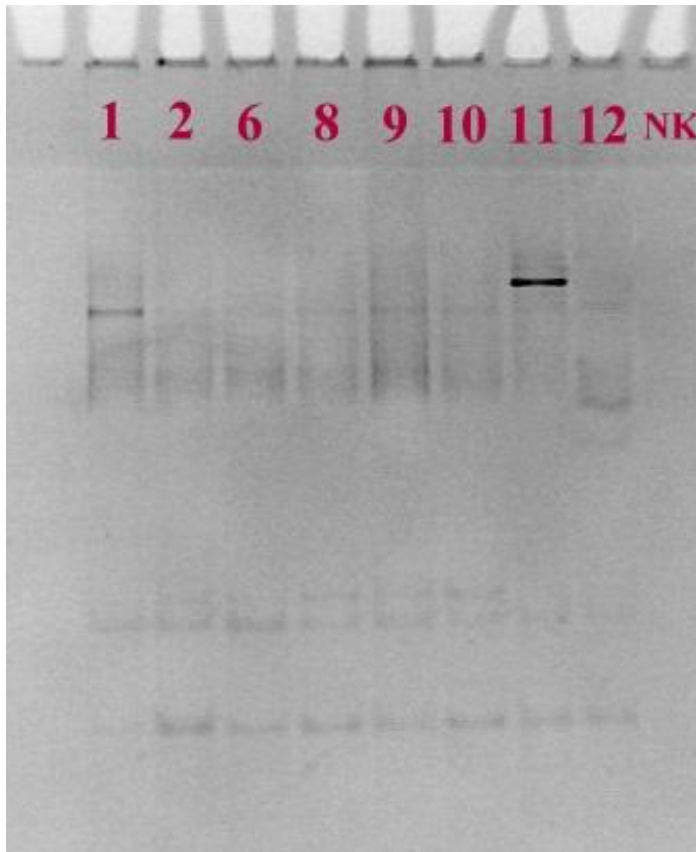
Optimálnu separáciu analyzovaných fragmentov metódou DGGE možno dosiahnuť optimalizáciou uvedených parametrov (rozsah denaturačného gradientu, celkový čas separácie, postup farbenia, prípadne iné). Výrazný podiel na zisku optimálnych výsledkov má však aj vlastná amplifikácia týchto fragmentov, ktorá môže byť významným zdrojom chýb. U všetkých experimentov možno v získanom DGGE profile pozorovať vždy niekoľko fragmentov pre jeden referenčný druh kvasinky. Dôvodom môže byť vzájomná kontaminácia zdrojového materiálu pri príprave reakčnej zmesi pre PCR. Tejto teórii však odporuje skutočnosť, že pri práci boli dodržiavané všetky odporúčané postupy pre zamedzenie kontaminácie. Pravdepodobnejšia možnosť je tá, že anelačná teplota pre pripojenie primerov nebola dostatočne špecifická. Primery tak mohli hybridizovať nielen s cieľovou sekvenciou templátu, ale i podobnými sekvenciami líšiacimi sa už dvoma nukleotidmi. Výsledkom je séria niekoľkých fragmentov reprezentujúcich jeden referenčný kvasinkový druh. Neoptimálna separácia sa prejavila i spoločnou migráciou zón – všetky separované fragmenty majú vo výslednom profile rovnakú pozíciu a nie je tak možné ich vzájomné rozlíšenie (obr. 22). Ako uvádzajú niektoré štúdie, rozlíšenie medzi jednotlivými druhmi toho istého kvasinkového rodu metódou DGGE v niektorých prípadoch nie je realizovateľné (viď kap. 2.7.3.4).



Obr. 22 DGGE profil referenčných kultúr kvasiniek (gradient 30 – 45 %), popis vzoriek je uvedený v tab. 11

Ako bolo uvedené vyššie, každý referenčný druh kvasinky je reprezentovaný niekoľkými fragmentmi, čo dokladá ako obr. 22, tak i obr. 23. Rovnako je na oboch obrázkoch možné pozorovať dve, v niektorých prípadoch až tri zóny v spodnej časti gélu, ktoré sú spoločné pre všetky dráhy. Môže ísť o fragmenty jednovláknovej DNA, ktorá migrovala gélom ďalej, alebo o zvyšky primerov, ktoré sa nezúčastnili reakcie PCR. Tieto zóny tak nie sú súčasťou ďalších úvah, čo sa týka interpretácie získaných DGGE profilov. Zároveň možno dodať, že pre tieto experimenty bol na základe optimalizácie zvolený užší rozsah denaturačného gradientu, čo sa prejavilo podstatne lepšou separáciou fragmentov.

Pre experiment i s ostatnými mikrobiálnymi druhmi (*A. pullulans*, *F. solani*) boli zvolené len niektoré referenčné kultúry kvasiniek (obr. 23). Kvasinkový mikroorganizmus *A. pullulans* sa pre analýzu metódou DGGE javí ako najvhodnejší porovnávací kmeň, keďže poskytuje jeden zreteľný fragment primeranej intenzity. Amplifikácia *F. solani* použitím univerzálnych primerov poskytla iba slabý výtlačok (obr. 18), čo sa prejavilo i pri separácii technikou DGGE. Ako už bolo uvedené, vzájomné rozlíšenie medzi jednotlivými kmeňmi zvolených červených kvasiniek je prakticky nemožné, čo dokladajú i obr. 22 a obr. 23. Dôvodom môže byť blízka príbuznosť vybraných kvasinkových druhov. Je možné, že aplikácia iného – špecifického páru primerov by poskytla lepšie výsledky. Odlíšiť vybrané mikroskopické huby od červených kvasiniek je pomerne jednoduché, rovnako tak aj *A. pullulans* a *F. solani* navzájom medzi sebou.



Obr. 23 DGGE profil vybraných druhov mikroorganizmov (gradient 30 – 50 %), popis vzoriek je uvedený v tab. 11

4.3 Spracovanie reálnych vzoriek muštov vínnej révy

Najväčšou prednosťou metódy DGGE ako molekulárnej techniky je jej nezávislosť na kultivácii študovaných mikroorganizmov. Identifikácia mikrobiálneho spoločenstva je založená na priamej extrakcii komplexnej DNA z reálnej vzorky – prirodzeného prostredia analyzovaných druhov. Tento prístup bol zvolený i pre vzorky muštov vínnej révy niekoľkých odrôd získaných z Výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho, Bratislava.

Na základe výsledkov izolácie DNA z referenčných kmeňov (kap. 4.1.1) bola pre reálne vzorky zvolená rýchla izolácia DNA pomocou komerčného kitu. Priama extrakcia však neposkytla požadované výsledky – DNA nebolo možné amplifikovať (dáta nie sú uvedené). Pravdepodobnou príčinou je prítomnosť ďalších látok v zmesi izolovanej DNA, ktoré pôsobia ako inhibítory reakcie PCR. Je zrejmé, že postup priamej extrakcie DNA z konkrétnej potravinovej matrice vyžaduje optimalizáciu. Tá však nie je v tejto práci z časových dôvodov zahrnutá.

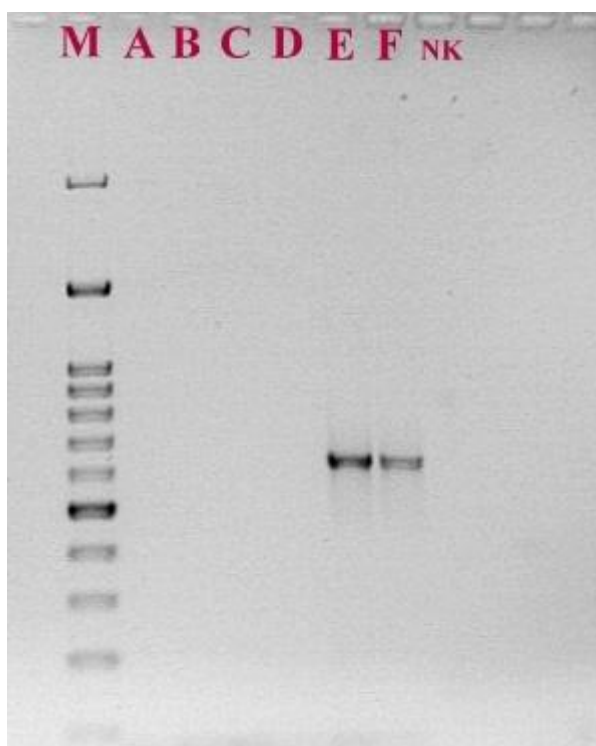
Vzorky muštov tak boli spracované štandardným postupom založeným na zmesnej kultivácii. Použité bolo ako tuhé médium na Petriho miskách, tak i médium tekuté. Opätovne bol pre izoláciu mikrobiálnej DNA zvolený špeciálny izolačný kit. Amplifikácia DNA izolovanej z kultúr narastených na agare na Petriho miskách však bola rovnako neúspešná; v tomto prípade sa podľa všetkého nepodarilo dostatočne rozbiť bunky, pracovalo sa s veľkým množstvom biomasy a je možné, že rozbíjajúci pufor nebol plne účinný.

Požadované výsledky boli napokon dosiahnuté kultiváciou v tekutom médiu – DNA bola úspešne naamplifikovaná. Ako dokladá obr. 24, v prvej PCR reakcii sa podarilo získať amplikóny len pre dve vzorky z celkového počtu šesť. Po druhom amplifikačnom kroku je však možné pozorovať štyri PCR produkty (obr. 25). Túto skutočnosť možno prisúdiť práve vysokej citlivosti zvolenej modifikácie PCR s použitím vonkajšieho a vnútorného páru primerov.

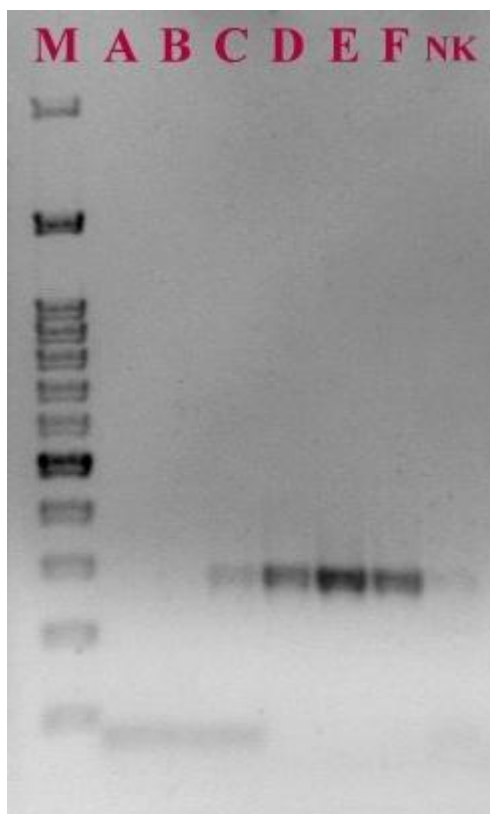
Amplifikované fragmenty boli detekované v 1,8% agarózovom géli, pre jednotlivé dráhy v géli bolo zavedené pracovné označenie (tab. 12). Toto označenie platí i v ďalšom texte, pokiaľ nie je uvedené inak.

Tabuľka 12 Označenie dráh a zodpovedajúci PCR produkt reálnych vzoriek

označenie	reálna vzorka muštu vínnej révy príslušnej odrody
A	<i>Chardonnay</i>
B	<i>Rizling vlašský</i>
C	<i>Dunaj</i>
D	<i>Svätovavrinské</i>
E	<i>Rulandské modré</i>
F	<i>Modrý Portugal</i>
M	štandard (molecular weight marker)
NK	negatívna kontrola



Obr. 24 PCR produkty (600 bp) DNA izolovanej z muštov vínnej révy po prvej reakcii, popis vzoriek je uvedený v tab. 12

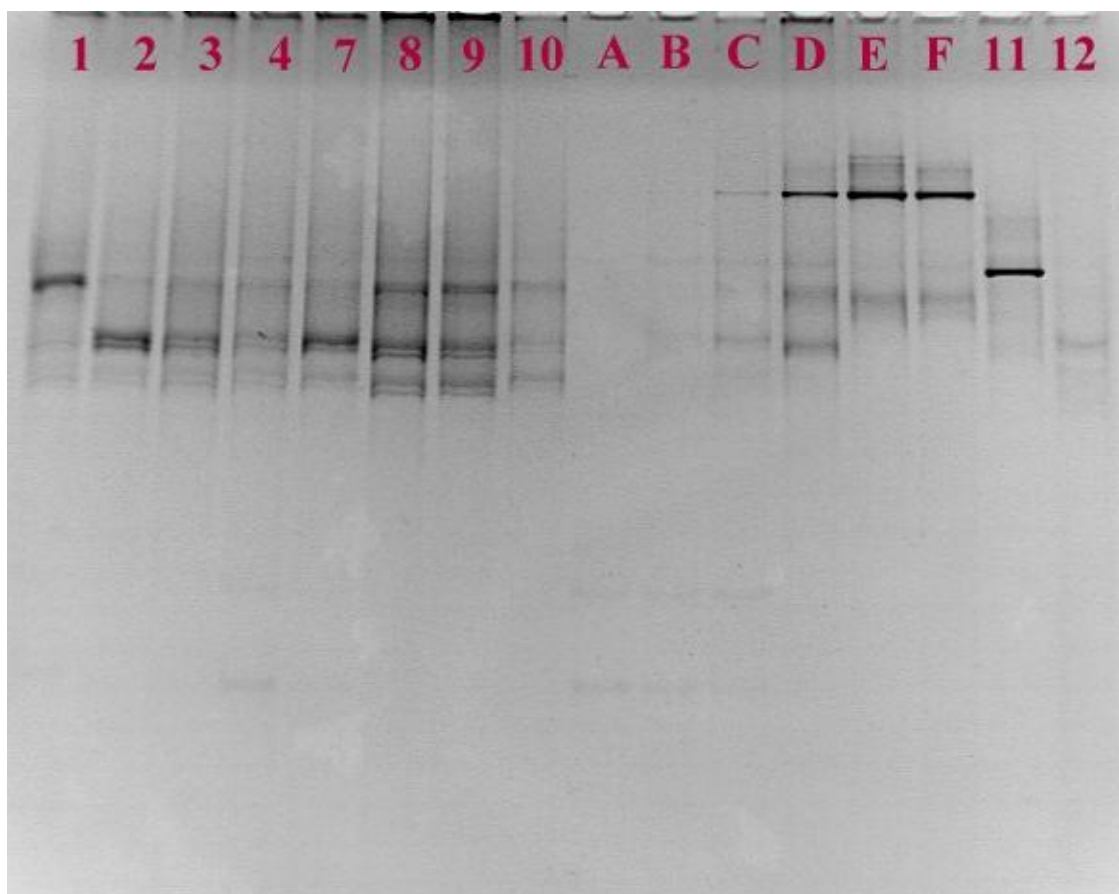


Obr. 25 PCR produkty (250 bp) DNA izolovanej z muštov vínnej révy po druhej reakcii, popis vzoriek je uvedený v tab. 12

4.4 Analýza reálnych vzoriek metódou DGGE

Získané amplikóny reálnych vzoriek boli na DGGE gél nanosené spoločne s amplikónmi referenčných druhov (obr. 26). Tzv. interný štandard zostrojený ako zmes amplikónov rDNA reprezentatívnych druhov v tomto prípade nemal význam, keďže všetky referenčné druhy kvasiniek majú veľmi podobný DGGE profil. Z pôvodných šiestich vzoriek muštu bolo metódou DGGE možné analyzovať štyri, prípadne päť vzoriek. Amplifikácia DNA zo vzorky muštu odrody Chardonnay (A) bola neúspešná, čo potvrdila i separácia DGGE. V dráhe B (Rizling vlašský) možno pozorovať len nepatrné fragmenty. V oboch prípadoch ide o vzorky muštov bieleho vína, ktoré v porovnaní s červenými poskytli menšie množstvo biomasy (hodnotené vizuálne). Táto skutočnosť môže znamenať, že prítomné mikroorganizmy sú pod hranicou detekčného limitu metódy DGGE. Zvyšné vzorky muštu spracovanej vínnej révy boli úspešne separované technikou DGGE.

V DGGE profile všetkých ostatných muštov (dráhy C až F) sú prítomné výrazné fragmenty, ktoré nekorešpondujú so žiadnym z referenčných kmeňov. Ich pôvod možno prisúdiť nesacharomycétnym kvasinkám, ktoré sú bežne prítomné v prvých fázach kvasného procesu (najmä rody *Kloeckera* a *Candida*). Tento záver je v súlade s výsledkami štúdie [40], ktorá rovnakou metódou potvrdzuje prítomnosť rodu *Candida* po celú dobu fermentácie muštu, a to i po tom, čo procesu dominuje *S. cerevisiae*.



Obr. 26 DGGE profil referenčných vzoriek mikroorganizmov a reálnych vzoriek muštu vínnej révy (gradient 30 – 50 %), popis vzoriek je uvedený v tab. 11 a tab. 12

Ďalej je možné pozorovať len málo výrazné fragmenty zodpovedajúce *A. pullulans* (dráha 11). Tento kvasinkový mikroorganizmus je bežne prítomný na bobuliach vínnej révy a dostáva sa tak i do kvasiaceho muštu, kde ale postupom času pre zvyšujúcu sa koncentráciu ethanolu odumiera. Túto skutočnosť potvrdzuje len veľmi nízka intenzita pozorovaných zón. V získaných profiloch sú ďalej viditeľné fragmenty naznačujúce prítomnosť kvasiniek patriacich k rodu *Saccharomyces*. U odrôd Dunaj a Svätovavrinecké (dráhy C a D) je možné si povšimnúť ďalšie dodatočné pásy, ktoré by mohli signalizovať prítomnosť i niektorých červených kvasiniek. Toto tvrdenie je ale potrebné brať s rezervou, nakoľko uspokojuvité porovnanie s referenčnými kultúrami nie je možné. Podporujú ho však výsledky kultivácie mikroorganizmov na tuhom médiu, kde boli pozorované ružové až červené kolónie v počte 1 až 2 na Petriho miskú.

V prípade odrôd Rulandské modré a Modrý Portugal (dráhy E a F) možno v blízkosti hlavných fragmentov pozorovať ďalšie pásy vo veľmi tesnej vzájomnej blízkosti. Tie môžu reprezentovať ďalšie kvasinkové populácie prítomné vo vzorkách muštu. Ich uspokojuvú separáciu a teda i prípadnú identifikáciu by bolo možné dosiahnuť zmenou rozsahu denaturačného gradientu a zaradením ďalších referenčných kmeňov. Prípadne môže ísť o heteroduplexy, ktorých prítomnosť môže byť potvrdená alebo vylúčená rovnakým spôsobom. Plne spoľahlivú identifikáciu by však zaručilo jedine sekvenovanie všetkých pozorovaných fragmentov.

Možno však konštatovať, že vhodne optimalizovaná metóda DGGE môže byť s výhodou použitá aj pre analýzu mikroflóry zložitejších potravinárskych matric.

5 ZÁVER

Súčasný trendy v identifikácii a klasifikácii mikroorganizmov spočívajú najmä vo využití molekulárno-biologických metód. Ich prednosťou je analýza mikrobiálneho spoločenstva bez potreby kultivácie. V poslednom období je vedecký záujem zameraný viac na štúdium mikrobiálnej diverzity v prirodzených prostrediach než na analýzu jednotlivých druhov a ich taxonomické zaradenie.

Fingerprintové molekulárne techniky, kam patrí i DGGE, sú zvlášť vhodné pre detekciu dominantných druhov a štúdium dynamických zmien v zložení mikrobiálnej komunity. Naopak, nevýhodou DGGE je relatívne nízka rozlišovacia schopnosť či možné skreslenie výsledkov vďaka reakcii PCR. Preto je vhodné tieto metódy skombinovať s tradičnými technikami kultivácie.

V predloženej diplomovej práci bola novo zavedená a postupne optimalizovaná technika PCR-DGGE pre vybrané mikroorganizmy. Tá bola následne využitá pre analýzu kvasiniek v reálnych vzorkách muštu vínnej révy. Práca teda vyžadovala optimalizáciu izolačného postupu pre získanie DNA z heterogénnej zmesi mikroorganizmov, a to s dostatočným výťažkom; ďalej optimalizáciu oboch krokov nested PCR, optimalizáciu vlastnej DGGE a interpretáciu výsledkov.

Získané experimentálne výsledky sú zhrnuté v nasledovných bodoch:

- Intaktnú DNA v kvalite vhodnej pre PCR možno získať izoláciou pomocou špeciálneho, komerčne dostupného kitu. Klasický postup izolácie fenol-chloroformovou extrakciou sa pre tento účel ukázal ako nevyhovujúci.
- Pre amplifikáciu bola zvolená kódujúca oblasť D1/D2 veľkej ribozomálnej podjednotky 26S rRNA a univerzálne eukaryotické primery. Použitá bola modifikácia polymerázovej reťazovej reakcie – nested PCR so zvýšenou citlivosťou a špecifitou využívajúca vonkajší a vnútorný pár primerov (konkrétne NL1/NL4 pre prvý amplifikačný krok a NL1/LS2 pre druhý krok).
- Amplifikované fragmenty (250 bp) boli po overení horizontálnou elektroforézou v agarózovom géli analyzované metódou DGGE. Elektroforetické podmienky však pred vlastnou analýzou vyžadovali optimalizáciu.
- Bola uskutočnená optimalizácia koncentračného rozsahu denaturačného gradientu, celkového času separácie, postupu farbenia gélu a prípravy referenčných štandardov. Na základe výsledkov optimalizačných experimentov boli podmienky DGGE zvolené nasledovne: rozsah denaturačného gradientu 30 – 45 % pre kvasinky, prípadne 30 – 50 % pri separácii ďalších mikroorganizmov; celkový čas elektroforézy 4 hod; vizualizácia separovaných fragmentov DNA v géli farbením EtBr.
- Napriek optimalizácii sú získané DGGE profily referenčných druhov kvasiniek navzájom veľmi podobné. Vzájomné rozlíšenie medzi jednotlivými testovanými kmeňmi tak nie je možné. Tento fakt možno pripísať blízkej príbuznosti vybraných kvasinkových druhov. Je možné, že aplikácia iného – špecifického páru primerov by poskytla lepšie výsledky a optimálnu separáciu analyzovaných fragmentov. Zároveň je každý jeden referenčný druh reprezentovaný nie jedným, ale sériou niekoľkých fragmentov DNA. Dôvodom môže byť existencia niekoľkých kópií génu pre 26S rRNA, alebo málo špecifická anelačná teplota pre hybridizáciu primerov. Z uvedeného vyplýva, že reakcia PCR by vyžadovala ďalšiu optimalizáciu či testovanie iných párov

primerov. A to aj napriek tomu, že kontrola amplifikovaných fragmentov horizontálnou elektroforézou poskytla viac ako uspokojujúce výsledky.

- Kvasinkový mikroorganizmus *A. pullulans* sa pre analýzu DGGE javí ako najvhodnejší porovnávací kmeň, keďže jeho profil je tvorený jediným fragmentom primeranej intenzity. Mikroskopická huba *F. solani* sa vyznačovala pomerne slabým výťažkom v reakcii PCR, v DGGE profile je možné pozorovať zónu len slabšej intenzity.
- Reálne vzorky muštov vínnej révy boli podrobené priamej extrakcii komplexnej DNA pomocou komerčného kitu. Amplifikácia takto izolovanej DNA však bola neúspešná, preto sa pristúpilo ku kultivácii zmesnej kultúry za účelom získania dostatočného množstva DNA. I v tomto prípade sa však podarilo amplifikovať DNA len v štyroch vzorkách muštu z celkového počtu šesť. Práve postup priamej izolácie z reálnej vzorky ako základný krok si žiada ďalšiu optimalizáciu.
- V DGGE profile reálnych vzoriek muštu vínnej révy je prítomných niekoľko fragmentov reprezentujúcich istú rozmanitosť sledovanej populácie. Možno sa domnievať, že kvasinkovému spoločenstvu dominujú predovšetkým apikulátne kvasinky, v malej miere je prítomný kvasinkový mikroorganizmus *A. pullulans*. Ďalej sú pravdepodobne prítomné kvasinky rodu *Saccharomyces* a menej zastúpené červené kvasinky.
- Väčšiu diverzitu a teda viac separovaných fragmentov v získaných DGGE profiloch by mohla poskytnúť komplexná DNA získaná priamou izoláciou z potravinovej matrice. Je možné, že rast niektorých kvasiniek bol použitím kultivačnej metódy zvýhodnený na úkor iných.

Záverom možno konštatovať, že dobre optimalizovaná metóda DGGE je vhodnou alternatívou ku klasickým kultivačným technikám v prípade potreby identifikácie mikrobiálnej populácie v reálnych potravinových matriciach.

6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] Veselá M.: *Praktikum z obecné mikrobiologie*, Brno: FCH VUT, 2004. 3. vyd. 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [2] Janderová B., Bendová O.: *Úvod do biologie kvasinek*, Praha: Karolinum, 1999. 1. vyd. 108 s. ISBN 80-7184-990-1.
- [3] Kocková-Kratochvílová A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*, Bratislava: Alfa, 1990. 1. vyd. 699 s.
- [4] Šilhánková L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Praha: Academia, 2002. 3. opr. a dopl. vyd. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [5] Halienová A.: *Změny proteomu a metabolomu u vybraných organismů ve stresových podmínkách*. Dizertačná práca. Brno: FCH VUT, 2010. 184 s.
- [6] Jankeje K.: *Produkce metabolitů vybranými kmeny průmyslových kvasinek v průběhu různých fází buněčného růstu*. Bakalárska práca. Brno: FCH VUT, 2008. 53 s.
- [7] Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha: *Miniatlas mikroorganizmů* [online]. [cit. 2011-03-30].
Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/aureob.htm>.
- [8] Florentina M., Brinduse E., Nicoale G., Tudorache A., Teodorescu R.: Yeast biodiversity evolution over decades in Dealu Mare-Valea Calugareasca vineyard. *Romanian Biotechnological Letters*, 2011, Vol. 16, No. 1, pp. 113-120.
- [9] Bester L.: *Detection and identification of wine spoilage microbes using PCR-DGGE analysis*. Master Thesis. Stellenbosch University: Department of Food Science, 2009. 98 p.
- [10] Prakitchaiwattana J., Fleet G. H., Heard G. M.: Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 2004, Vol. 4, Issue 8, pp. 865-877.
- [11] Cocolin L., Bisson L. F., Mills D. A.: Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, Vol. 189, Issue 1, pp. 81-87.
- [12] Vytřasová J., Bílková Z.: *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*, Pardubice: Univerzita Pardubice, 1999. 1. vyd. 140 s. ISBN 80-7194-174-3.
- [13] Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc: *Vybrané molekulární metody v mikrobiální ekologii vod* [online]. [cit. 2011-03-03].
Dostupné z: <http://ekologie.upol.cz/ku/miev/miekovod.htm>.
- [14] Vodrážka Z.: *Biochemie*, Praha: Academia, 1996. 2. oprav. vyd. ISBN 80-200-0600-1.
- [15] Navrátil M.: *Základní praktická cvičení z molekulární biologie*, Olomouc: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, 2004.
- [16] Alberts B.: *Základy buněčné biologie*, Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. 2. vyd. 332 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [17] Rosypal S.: *Nový přehled biologie*, Praha: Scientia, 2003. 1. vyd. 797 s. ISBN 80-7183-268-5.
- [18] Králová B.: *Bioanalytické metody*, Praha: VŠCHT, 2001. 3. preprac. vyd. 254 s. ISBN 80-7080-449-1.
- [19] Pančík P., Marcišová D.: *Replikácia DNA* [online]. 2003, posledná revízia 2011 [cit. 2011-03-05].
Dostupné z: <http://www.bioweb.genezis.eu/index.php?cat=11&file=replikacia>.

- [20] Šmarda J.: *Metody molekulární biologie*, Brno: Masarykova univerzita, 2005. 1. vyd. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [21] Janochová J.: *Izolace DNA: Výťažnost a kvalita*. Bakalárska práca. Brno: PŘF MU, 2009. 48 s.
- [22] Ruml T.: *Genové inženýrství*, Praha: VŠCHT, 2002. 1. vyd. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [23] Takara Bio USA: *Successful PCR Guide*, 3rd Edition [online]. Last revision 27th of May 2008 [cit. 2011-04-10]. Dostupné z: <http://www.takaramirusbio.com/files/guides/64d88143e0cc5a51b47fea9c690fae7b.pdf>
- [24] McPherson M. J. & Moller S. G. *PCR – The Basics*. Oxon: Bios Scientific Publishers, 2006. 292 p. ISBN 0-415-35547-8.
- [25] Corbett Life Science: *Palm-Cycler™, gradient thermal cycling* [online]. [cit. 2011-04-01]. Dostupné z: http://www.saixxtechnologies.com/PDF%20Corbett/palmcycler_a4_72dpi.pdf.
- [26] Muyzer G., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, Vol. 73, pp. 127-141.
- [27] Muyzer G.: DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, Vol. 2, Issue 3, pp. 317-322.
- [28] Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A.: Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, Vol. 75, pp. 149-164.
- [29] Fleet G. H.: Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, Vol. 18, pp. 170-175.
- [30] Giraffa G.: Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, Vol. 28, Issue 2, pp. 251-260.
- [31] Muyzer G.: Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, 1999.
- [32] Fischer S. G., Lerman L. S.: DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983, Vol. 80, pp. 1579-1583.
- [33] Ercolini D.: PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, Vol. 56, Issue 3, pp. 297-314.
- [34] Zwart G., Bok J.: *Protocol DGGE*, Netherlands Institute of Ecology: Department of Microbial Ecology [online]. Last revision March 2004 [cit. 2011-04-15]. Dostupné z: http://omega.rc.unesp.br/mauricio/curso/bibliografia/25/415/protocolo_DGGE.pdf.
- [35] Manuál k DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad Laboratories, Inc.
- [36] Sigler W. V., Miniaci C., Zeyer J.: Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, Vol. 57, Issue 1, pp. 17-22.
- [37] Radojkovic D., Kusic J.: Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clinical Chemistry*, 2000, Vol. 46, No. 6, pp. 883-884.
- [38] Hovda M. B.: *Application of PCR and DGGE to characterise the microflora of farmed fish*. Dissertation Thesis. University of Bergen, 2007. 119 p.

- [39] Lopez I., Cocolin L., Mills D. A.: Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, Vol. 69, No. 11, pp. 6801-6807.
- [40] Cocolin L., Heisey A., Mills D. A.: Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2001, Vol. 52, pp. 49-53.
- [41] Janse I., Bok J., Zwart G.: A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, Vol. 57, Issue 2, pp. 279-281.
- [42] Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, Vol. 59, Issue 3, pp. 695-700.
- [43] Mills D. A., Johannsen E. A., Cocolin L.: Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, Vol. 68, No. 10, pp. 4884-4893.
- [44] Cocolin L., Aggio D., Manzano M.: An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 2002, Vol. 12, Issue 5, pp. 407-411.
- [45] Benbouza H., Jacquemin J., Baudoin J., Mergeai G.: Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2006, Vol. 10, No. 2, pp. 77-81.
- [46] Špecifikácia produktu DNA ladder Ready-to-Use 100 bp, Nippon Genetics [online]. [cit. 2011-04-16]. Dostupné z: <http://www.nippongenetics.eu/dnarna-electrophoresis/dna-ladder-molecular-weight-marker/>.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

AA/BIS	akrylamid/N,N-methylén-bis-akrylamid
A-T	adenín-tymínová väzba
APS	persíran amónny (<i>angl.</i> ammonium persulfate)
bp	páry báz (<i>angl.</i> base pair)
CCM	Česká zbierka mikroorganizmov
CCY	Zbierka kultúr kvasiniek (<i>angl.</i> Culture Collection of Yeasts)
CFU	kolónia tvoriaca jednotku (<i>angl.</i> colony forming unit)
DGGE	denaturačná gradientová gélová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>angl.</i> deoxyribonucleic acid)
dATP	deoxyadenozíntrifosfát
dCTP	deoxycytidíntrifosfát
dGTP	deoxyguanozíntrifosfát
dNTP	deoxyribonukleozidtrifosfát
dsDNA	dvojreťazcová deoxyribonukleová kyselina
dTTP	deoxytymidíntrifosfát
EDTA	kyselina ethyléndiaminotetraoctová
EtBr	ethidium bromid
G-C	guanín-cytozínová väzba
kb	počet kilobáz
PCR	polymerázová reťazová reakcia (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
PA	polyakrylamid
RNA	ribonukleová kyselina (<i>angl.</i> ribonucleic acid)
rDNA	ribozomálna DNA
rRNA	ribozomálna RNA
SDS	dodecylsíran sodný (laurylsíran sodný)
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
TEMED	N,N'-tetramethyléndiamín
TAE	trisacetátový pufor
TGGE	teplotná gradientová gélová elektroforéza
UV	ultrafialové žiarenie
VIS	žiarenie vo viditeľnej oblasti svetla

8 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha č.1: Primery pre PCR a ich špecifikácia

9 PRÍLOHY

Príloha 1 Primery pre PCR a ich špecifikácia

OligoName: NL1

Oligo Number: 01123A12B11 1/3

5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3'

Delivered:	58.8 OD 1742.0 μg 96.4 nmol	No. Bases:	55	Synthesis Scale:	200 nmol
Conc.:	100.0 μM	GC %:	74.5	Purification:	Desalted
MW:	17153	A	C	G	T
Tm:	88.0	11	16	25	3
				Delivery Form:	lyophilisiert
				Quality Control:	DMT-Monitoring
				Dissolve in (μl):	964

DNA

OligoName: NL4

Oligo Number: 01123A13C10 2/3

5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'

Delivered:	18.2 OD 547.8 μg 88.8 nmol	No. Bases:	19	Synthesis Scale:	200 nmol
Conc.:	100.0 μM	GC %:	57.9	Purification:	Desalted
MW:	5860	A	C	G	T
Tm:	58.8	3	4	7	5
				Delivery Form:	lyophilisiert
				Quality Control:	DMT-Monitoring
				Dissolve in (μl):	888

DNA

OligoName: LS2

Oligo Number: 01123A13C05 3/3

5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'

Delivered:	19.2 OD 563.7 μg 89.3 nmol	No. Bases:	20	Synthesis Scale:	200 nmol
Conc.:	100.0 μM	GC %:	45.0	Purification:	Desalted
MW:	5990	A	C	G	T
Tm:	55.3	7	8	1	4
				Delivery Form:	lyophilisiert
				Quality Control:	DMT-Monitoring
				Dissolve in (μl):	893

DNA