



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## MAGNETICKÉ NOSIČE A JEJICH PRAKTICKÉ VYUŽITÍ

MAGNETIC CARRIERS AND THEIR PRACTICAL USE

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Chlopková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

BRNO 2016



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1015/2015** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Barbora Chlopková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí práce **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Magnetické nosiče a jejich praktické využití

### Zadání bakalářské práce:

1. Vyhledání a zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. V praktické části provést izolaci bakteriální DNA z vybraného výrobku magnetickými částicemi a její amplifikaci metodou PCR.
3. V teoretické části vyhodnotit získané poznatky formou diskuse

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Barbora Chlopková  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Alena Španová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty



## **ABSTRAKT**

Teoretická část shrnuje dosavadní poznatky pro praktické využití magnetických nosičů v molekulární diagnostice. Zahrnuje jak již používané metody, tak i metody s potenciálním využitím do budoucna. V experimentální části bylo testováno využití magnetických nosičů pro izolaci DNA z mléčného výrobku a bakteriální kultury. Bylo potvrzeno, že magnetickými nosiči byla izolována DNA v kvalitě a množství vhodném pro provedení polymerázové řetězové reakce.

## **ABSTRACT**

The theoretical part summarizes the current knowledge for practical use of magnetic carriers in molecular diagnostics. It includes both already used methods and methods with potential for the future. In the experimental part was tested by use of magnetic media for isolation of DNA from a dairy product and a bacterial culture. It was confirmed that the magnetic carrier DNA was isolated in quantity and quality suitable for carrying out polymerase chain reaction.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

magnetické nosiče  
nosič léčiv  
magneticky zprostředkovaná hypertermie  
izolace DNA  
polymerázová řetězová reakce (PCR)

## **KEYWORDS**

magnetic particles  
drug delivery  
magnetically mediated hyperthermia  
DNA isolation  
polymerase chain reaction (PCR)

CHLOPKOVÁ, B. *Magnetické nosiče a jejich praktické využití*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 35 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěla poděkovat především vedoucí práce doc. RNDr. Aleně Španové CSc. a Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za jejich odborné rady, čas a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat starším kolegům v laboratoři. A nesmím opomenout moji rodinu a přátele, kteří mě celou dobu všestranně podporovali.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Magnetické nosiče .....	8
2.1.1	Magnetické jádro .....	8
2.1.2	Povrchové materiály .....	9
2.1.3	Funkcionalizace .....	9
2.2	Praktické využití magnetických nosičů .....	9
2.2.1	Izolace/purifikace DNA.....	9
2.2.2	Použití v biotechnologii.....	9
2.2.3	Aplikace magnetických nosičů v medicíně .....	10
2.3	Polymerázová řetězcová reakce .....	11
3	CÍL PRÁCE.....	13
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	14
4.1	Materiál .....	14
4.1.1	Magnetické nosiče .....	14
4.1.2	Bakteriální kultury a DNA .....	14
4.1.3	Výrobek .....	14
4.1.4	Chemikálie .....	15
4.1.5	Přístroje.....	16
4.1.6	Roztoky.....	16
4.2	Metody .....	18
4.2.1	Kultivace buněk rodu <i>Lactobacillus</i> .....	18
4.2.2	Kontrola čistoty bakteriální kultury.....	18
4.2.3	Lýze bakteriálních buněk.....	18
4.2.4	Fenolová extrakce bakteriální DNA .....	19
4.2.5	Srážení DNA ethanolem .....	19
4.2.6	Příprava hrubého lyzátu buněk z tekutého mléčného výrobku.....	19
4.2.7	Metoda magnetické separace DNA .....	19
4.2.8	UV Spektrofotometrie .....	20
4.2.9	Gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	20
4.2.10	Polymerázová řetězcová reakce pro doménu <i>Bacteria</i> .....	21
4.2.11	Gelová elektroforéza produktů PCR.....	22
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	23
5.1	Výsledky spojené s metodou fenol-chloroformové extrakce.....	23
5.1.1	Kontrola čistoty bakteriální kultury na MRS agaru.....	23
5.1.2	Potvrzení intaktnosti DNA pomocí agarosové gelové elektroforézy .....	24
5.1.3	Stanovení koncentrace DNA .....	24
5.2	Výsledky pro metodu magnetické separace DNA z mléčného výrobku .....	25
5.2.1	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk mléčného výrobku pomocí magnetických mikročástic.....	25
5.3	Společné vyhodnocení produktů PCR pro první pokus.....	25
5.3.1	Polymerázová řetězová reakce pro doménu <i>Bacteria</i> .....	25

5.3.2	Agarosová gelová elektroforéza pro detekci PCR produktů .....	25
5.4	Výsledky pro metodu magnetické separace DNA z bakteriální kultury pomocí 5 různých magnetických nosičů (druhý pokus).....	26
5.4.1	lýze bakteriálních buněk <i>Lactobacillus casei ssp casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup> .....	26
5.4.2	metoda magnetické separace pomocí 5 různých magnetických nosičů .....	27
5.4.3	Stanovení koncentrace DNA .....	27
5.4.4	Polymerázová řetězová reakce pro doménu <i>Bacteria</i> .....	27
5.4.5	Agarosová gelová elektroforéza pro detekci PCR produktů .....	28
5.5	Souhrn .....	29
6	ZÁVĚR.....	31
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	32
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	35

# 1 ÚVOD

Magnetické nosiče mají jedinečné magnetické vlastnosti a schopnosti interakce s biomolekulami. Mají mikro- až nanorozměry. Většinou se skládají ze tří hlavních částí, a to jádra tvořeného superparamagnetickým nebo paramagnetickým kovem, povrchovým krytím (například organickými polymery) a funkčními skupinami, které zajišťují interakci s analytem. Magnetické nosiče jsou vhodným nástrojem pro separaci a purifikaci DNA. Na rozdíl od klasické fenol-chloroformové extrakce, jde o rychlejší metodu se získáním čistšího analytu. Fenol-chloroformová extrakce je časově náročná a je nutné provést řadu kroků, abychom vyizolovali čistou DNA ze vzorku. Navíc se pracuje s toxickými chemikáliemi a s velkým počtem kroků roste i možnost chyby a kontaminace vzorku. Z tohoto pohledu se magnetické nosiče jeví jako lepší volba. Další výhodou je, že povrchově upravené magnetických nosičů můžeme funkcionalizovat podle potřeby v závislosti na povaze analytu a použité aplikaci a docílit tak optimálních podmínek pro separaci.

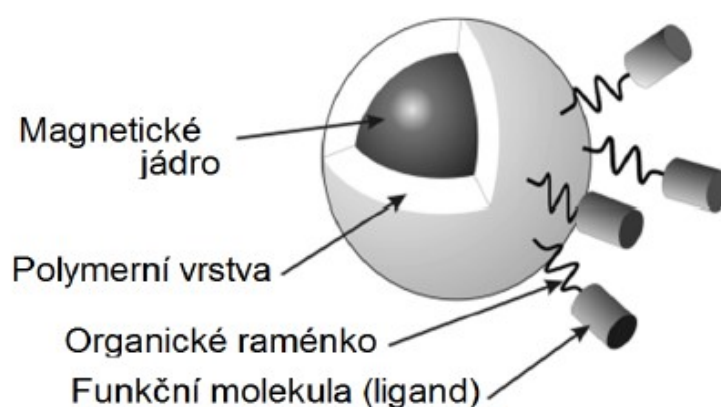
Jedním z možných způsobů využití magnetických nosičů je již zmíněná izolace DNA, což je důležitý krok pro použití v dalších možných aplikacích. Využití nachází v molekulární diagnostice mikroorganismů a virů, a to například při kontrole potravinových výrobků, ať už pro zjištění prospěšných mikroorganismů (probiotické kultury v mléčných výrobcích a potravinových doplncích), tak mikroorganismů patogenních, které mohou potraviny zkažit. Dále při genových manipulacích (šlechtění rostlin), v lékařské diagnostice a léčbě (nosič léčiv), v environmentálních vědách (čištění vody od polutantů), biotechnologii (produkce enzymů, kontrola výrobků), kriminalistice (určení pachatele), případně dalších odvětvích. DNA izolovaná pomocí magnetických nosičů dosahuje vysoké kvality, která je potřebná pro amplifikaci DNA pomocí PCR, ligaci DNA fragmentů do plazmidových vektorů, přípravu DNA sond nebo pro přímé sekvencování [1-6], [15].



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Magnetické nosiče

Magnetické nosiče se obvykle skládají ze tří hlavních částí. Z jádra, které je tvořeno magnetickým materiálem, povrchovým materiálem, kterým je jádro pokryto a brání případným nežádoucím interakcím a funkčními skupinami, které zajišťují požadovanou reaktivitu s analytem. Jádro nemusí být nutně pokryto polymerní vrstvou, záleží vždy, pro jakou aplikaci bude použito. Základní schematický popis magnetického nosiče je možno znázornit tímto obrázkem (Obrázek 1). [1]



Obrázek 1: Schematické znázornění magnetického nosiče. Převzato z [7].

#### 2.1.1 Magnetické jádro

Magnetické jádro je tvořeno materiálem vykazujícím paramagnetické popřípadě superparamagnetické vlastnosti. Paramagnetické látky vykazují magnetické vlastnosti jen v přítomnosti magnetického pole a po odstranění vnějšího magnetického pole nevykazují žádný zbytkový magnetismus. Supermagnetické látky vykazují kombinaci paramagnetických a feromagnetických vlastností a po odstranění vnějšího magnetického pole nevykazují téměř žádný zbytkový magnetismus. Této vlastnosti lze využít a magnetické nosiče dle potřeby separovat ze vorku pomocí magnetického separátoru. Zato v nepřítomnosti magnetického zdroje nosiče nevykazují zbytkový magnetismus a nedochází k jejich nechtěné agregaci [8]. Částice mají mikro- až nanorozměry a jsou anorganické povahy. Superparamagnetické materiály jsou nejčastěji založeny na oxidech železa, jako je například magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , maghemit  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ferity –  $\text{MO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}$  (M: Co, Cu, Mn, atd.) připraveny spolu srážením  $\text{M}^{2+}$  a  $\text{M}^{3+}$  solí a  $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$  manganatého peroskvitu. Materiály založené na oxidech železa jsou relativně bezpečné, netoxické a obvykle dobře tolerovány *in vivo*. Na druhou stranu některé druhy nanočástic můžou poškodit DNA. Jsou známy případy, kdy oxid titaničitý rozbil dvou-šroubovici DNA, a u kobaltu železitého se ukázalo, že vykazuje genotoxické působení na jaterní tkáň. [1]

### 2.1.2 Povrchové materiály

Magnetické jádro je vhodné pokrýt biokompatibilními polymery, které brání nežádoucím reakcím s analytem, živým systémem, popřípadě zabrání případné inhibici při polymerové řetězcové reakci (PCR). Jako příklad můžeme uvést kyselinu alginovou, poly(vinylalkohol), dextran a další nízko či vysoko molekulární sloučeniny. Povrchové materiály dále zlepšují koloidní stabilitu ve fyziologických médiích, zabráňují případné toxicitě a minimalizují absorpci proteinu na povrch nanočástic. Zvláště polyethylenglykoly (PEGs) s dlouhými polymerními řetězci které jsou vysoce rozpustné ve vodě a netoxické, nachází význam aplikací stabilizující systém a roznos léčiv biologickými molekulami. Krycí vrstva může být dále připravena z inertních materiálů, jako je fosforečnan vápenatý nebo apatit. Vzácně se můžeme setkat s nanočásticemi pokrytými zlatem, které jsou obvykle funkcionalizovány oligonukleotidy s thiolovou skupinou na jednom konci a jedno-řetězcovým nukleotidem. Nanočástice oxidu železitého pokrytého zlatem s imobilizovanou DNA sondou byly použity jako součást elektrochemického DNA biosenzoru. [1]

### 2.1.3 Funkcionalizace

Funkční skupiny zajišťují reaktivitu s požadovaným analytem a jsou ukotveny na povrchovém krytu magnetických částic. Povrch může být funkcionalizován pozitivně nabitými molekulami jako jsou například amino skupiny ( $-NH_2$ ), které zvyšují elektrostatickou afinitu k fosfátové páteři DNA případně RNA (je negativně nabitá) a umožňují tak separaci a purifikaci DNA/RNA ze vzorku. I záporně nabitá funkční skupina jako je například skupina karboxylová ( $-COOH$ ) může být překvapivě použita pro izolaci nukleových kyselin, plasmidové DNA a bakteriální DNA z různých komplexních vzorků. Je však nezbytné dodržet podmínky kondenzace DNA, kdy je nutná přítomnost PEG 6000 (nebo PEG 8000) a NaCl. [1]

## 2.2 Praktické využití magnetických nosičů

### 2.2.1 Izolace/purifikace DNA

Izolace DNA je důležitý krok pro mnohé další aplikace. DNA lze izolovat z různých vzorků, jako jsou například výrobky denní spotřeby, půda, mikroorganismy a tělní tekutiny. DNA lze ze vzorku izolovat pomocí magnetických nosičů s vhodnými funkčními skupinami. Vzorek obsahující DNA se smíchá s magnetickými částicemi. Po době potřebné na navázání DNA na nosiče se vzorek umístí do magnetického separátoru, kde magnet drží částice na místě a supernatant obsahující nečistoty se odebere. Potom se přidá promývací roztok pro důkladné promytí a zbavení všech nečistot, který se následně odebere jako v předchozím případě. Nakonec se přidá pufr, do kterého se DNA eluuje, DNA obsažená v tomto pufru se odebere a může použít pro různé aplikace. [1], [8]

### 2.2.2 Použití v biotechnologii

Na magnetické nosiče je možno imobilizovat enzymy. Ty je možno umístit do některých typů reaktorů se substrátem a po ukončení reakce je vyjmou pomocí magnetického separátoru, což je výhodné například při použití drahých enzymů, které je možno pak opakovaně používat anebo v případě kdy potřebujeme odstranit enzym z produktu. [9]

## 2.2.3 Aplikace magnetických nosičů v medicíně

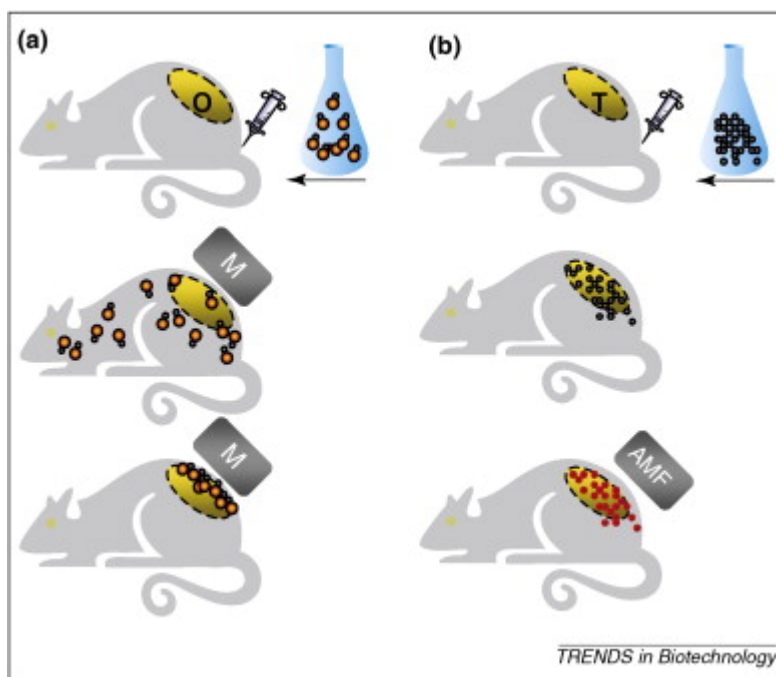
### 2.2.3.1 Diagnostika rakoviny

Na magnetické nosiče je možné imobilizovat protilátky. Pokud je ve vzorku obsažen příslušný antigen naváže se na danou protilátku umístěnou na nosiči. Tímto způsobem jde stanovit příslušné antigeny ve vzorku. Například karcinom jater je možno stanovit na základě zvýšené koncentrace antigenu  $\alpha$ -fotoproteinu (APF) obsaženém v krevním séru. [9]

### 2.2.3.2 Cílený nosič léčiv

Při podání perorálním nebo injekcí mohou být některé části léčiva zničena, nedostatečně absorbována nebo nedostatečně distribuována. Léčiva navázána na magnetických nosičích mohou být lépe navigována na potřebné místo a zvýšit, tak účinnost léčiva a zároveň snížit jeho toxicitu. Nosič léčiv je možno kombinovat s metodou uvedenou dále. [10]

Schéma použití magnetických nanočástic jako nosiče léčiv a aplikaci metody magnetické zprostředkované hypertermie je uvedeno na Obrázku 2 [10].



Obrázek 2: Použití magnetických nanočástic *in vivo* v terapeutických aplikacích a) Cílený nosič léčiv: magnetické částice jsou spojeny s terapeutickými molekulami (zobrazeny jako oranžové kuličky), které působí jako nosiče pro podávání léků, po podání jsou částice soustředěny do cílového orgánu (O) pomocí magnetu (M). b) Magneticky zprostředkovaná hypertermie: systémově podávané magnetické částice (černé kuličky) se hromadí v nádoru (T), Částice v nádoru se pak zahřívají (ilustruje změna barvy kuliček na červeno) pomocí externí aplikace střídavého magnetického pole (AMF) a to má za následek smrt nádorových buněk. Převzato z [10].

### 2.2.3.3 Magneticky zprostředkovaná hypertermie

Tuto metodu je možné využít k selektivnímu ničení nádorových buněk. Částice magnetitu je možné aplikovat přímo do nádoru a ty jsou pak vystaveny externímu střídavému magnetickému poli, při kterém se zahřívají. Nádorové buňky jsou citlivější a jsou usmrceny

při teplotách nad 43 °C, zatímco normální buňky při těchto vyšších teplotách přežívají. Na magnetické částice lze také imobilizovat konjugované protilátky (imunolipozomy), které jsou dostatečně specifické pro nádorové antigeny vystavené na povrchu nádorových buněk. Magnetické částice se "nalepí" na nádor a pak se aplikuje střídavé magnetické pole jako v předešlém případě. Tato metoda v jistých případech prošla 3. fází klinické studie a lze použít například k léčbě rakoviny prsu, rakoviny děložního čípku a sarkomů měkkých tkání.

Další zajímavou aplikací je využití magnetických lipidových nanočástic ve kterých je umístěno léčivo. Ty jsou při tělesné teplotě v pevném skupenství, ale tají přibližně při 45 až 55 °C. Tyto částice s léčivem se spojí se super-paramagnetickými  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanočásticemi a jsou na určeném místě následně vystaveny externímu střídavému magnetickému poli, při kterém uvolňované teplo rozpustí lipidovou schránku a uvolní léčivo řízeným způsobem [10].

#### 2.2.3.4 *Magnetic particle imaging*

Magnetic particle imaging (MPI) neboli metoda zobrazování pomocí magnetických částic se jeví jako potenciální zobrazovací metoda, která by mohla vylepšit a doplnit další zobrazovací metody jako je tomografie a MRI. Při tomografii se často používají látky pro zlepšení kontrastu a mohou u některých jedinců vyvolat alergické reakce a navíc pacienta zatěžují radičním zářením. Metoda MPI je zatím ve fázi pokusů na laboratorních hlodavcích. Tento unikátní výzkum provádí v Centru pokročilého preklinického zobrazování na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Při testech se používají superparamagnetické nanočástice oxidu železa tzv. SPIONs, které by mohly nahradit dosud používané kontrastní látky. [16], [17]

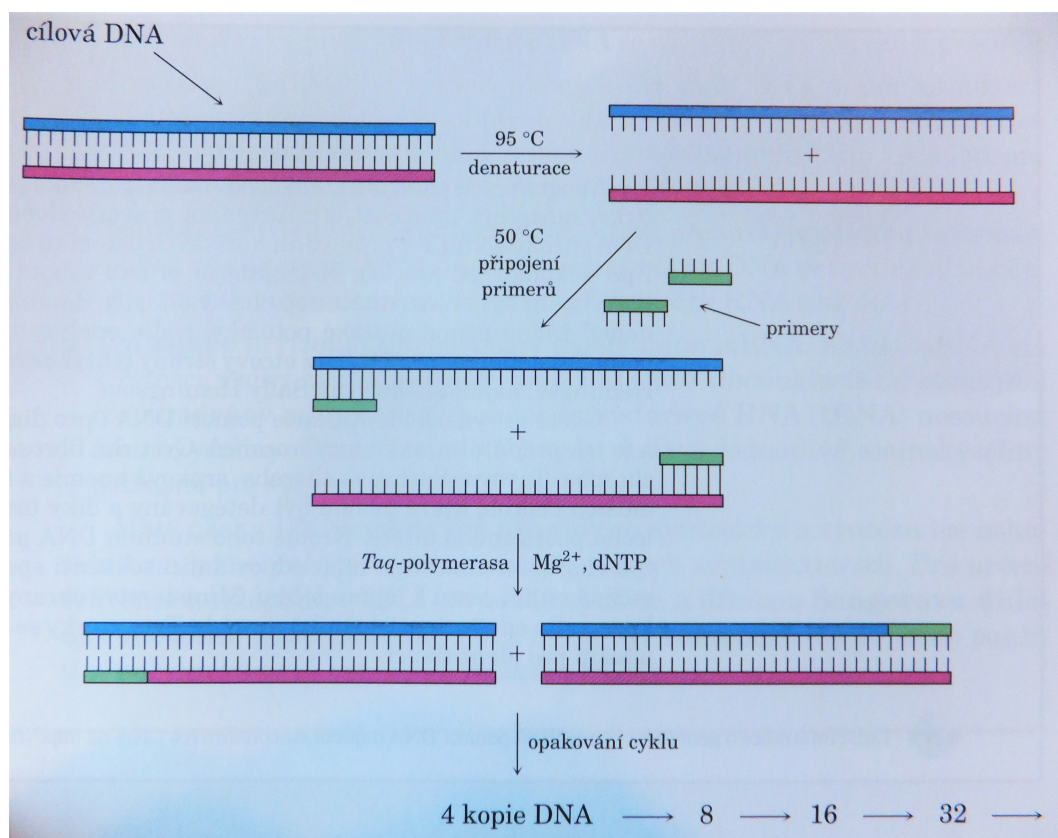
### 2.3 Polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce nebo-li PCR je metoda, při které se amplifikuje vybraný úsek DNA. Přístroj, ve kterém probíhá PCR se nazývá termocyklér. Do termocykléru se vloží reakční směs pro PCR a naprogramuje se na příslušné teploty a časy potřebné pro danou reakci. Metoda PCR je založena na třech hlavních fázích. V první fázi dochází k denuraci dvoušrobovice DNA při teplotě 94 °C. Vodíkové můstky mezi bázemi držící pohromadě dvoušrobovici DNA se vlivem vysoké teploty rozdělí a vzniknou dvě samostatné vlákna DNA. Ve druhé fázi se teplota sníží na (50 - 60 °C) a na jednotlivé vlákna v určitém specifickém místě se hybridizují (připojí) primery. A ve třetí fázi se teplota zvýší na (65 – 75 °C) a za přítomnosti DNA-polymerasy dochází k syntéze nových řetězců DNA. Tyto tři fáze se cyklicky opakují. Schéma PCR reakce je zobrazeno na (Obrázku 3) [14]. Většinou jde o 25 až 35 cyklů, čímž dostaneme až  $10^9$  kopií vybraného úseku DNA. Produktem PCR jsou fragmenty DNA o určité velikosti označované také jako amplikony. Jde o velikost desítek až tisíce párů bází (bp). **Reakční směs pro PCR** se skládá z těchto komponent: DNA matrice, primerů, DNA-polymerasy, 3'-deoxynukleosid-5'-trifosfátů,  $\text{Mg}^{2+}$  iontů, pufru pro PCR a vody pro PCR. **DNA matrice** označovaná taktéž jako DNA templát je vlastně vzorek DNA, který slouží jako předloha pro syntézu nových řetězců DNA. **Primery** jsou oligonukleotidy skládající se z 20 – 30 nukleotidů. Pro reakci jsou potřeba dva primery, které označí místa kde se mají začít syntetizovat nové vlákna. Sekvence nukleotidů v primeru je specifická, tak aby byly báze komplementární k DNA templátu. **DNA-polymerasa**

je enzym, který katalyzuje reakci a syntetizuje novou DNA. Syntéza nové DNA probíhá ve směru  $5' \rightarrow 3'$ . Pro PCR je potřeba použít termostabilní enzymy. Jako nejčastěji se používá *Taq* DNA-polymerasa, která je izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Dále je možno použít *Vent*-polymerasu a *Pfu*-polymerasu, které byly taktéž získány z termofilních bakterií. **3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty** označované také souhrnně pod zkratkou jako dNTP popřípadě konkrétně podle obsažené báze jako dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Jednotlivé dNTP slouží jako základní stavební prvky pro tvorbu nové DNA. **Mg<sup>2+</sup> ionty** jsou nezbytné pro činnost polymerasy. Koncentrace musí být v optimálním rozpětí, což se určuje v závislosti na použitých primerech a vzorku DNA. **Puftr pro PCR** optimalizuje prostředí pro DNA polymerasu. Nejčastěji se skládá z 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl a 10 mM Tris-HCl o pH 8,3 - 8,8. Může obsahovat i Tween 20, acetamid, želatinu nebo albumin. **Voda pro PCR** je sterilní a zbavena iontů. Slouží k doplnění PCR směsi na daný objem. [3], [8], [14].

PCR směs můžeme připravit buď smícháním 7 výše uvedených komponent nebo využít předpřipravené mixy, které již obsahují směs 4 komponent obsahující DNA-polymerasu, směs dNTP v ekvimolárních množstvích, Mg<sup>2+</sup> iontů a pufru pro PCR. Označení může nést např. PPP master mix. Použití je vhodné zvláště pro přípravu většího počtu vzorků pro PCR. [8]

Za objev polymerázové řetězové reakce roku 1986 vdčíme Kary Banks Mullisovi, což usnadnilo rozvoj nových oborů. Za PCR mu byla následně roku 1993 udělena Nobelova cena za chemii. [14]



Obrázek 3: Schéma PCR zobrazující základní 3 fáze reakce. Převzato z [14].

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem teoretické části práce bylo shrnout poznatky pro využití magnetických nosičů. V experimentální části provést izolaci DNA z mléčného výrobku pomocí magnetických částic, následně její amplifikaci pomocí metody PCR a vyhodnotit poznatky formou diskuze.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Magnetické nosiče

Na izolaci DNA bylo použito 5 různých druhů částic a jejich vlastnosti jsou uvedeny v (Tabulka 1). Z toho 3 mikročástice byly syntetizovány na Ústavu makromolekulární chemie, Akademie věd ČR týmem Ing. Daniela Horáka, CSc. a jsou určeny pro biotechnologické aplikace. Jedná se o částice Fkol 77ox, Fkol 135ox a Fkol B100ox. Další dvě částice byly komerční. Částice Dynabeads<sup>®</sup> DNA DIRECT<sup>™</sup> Universal, (DynaL, Norsko) a částice MPG<sup>®</sup> uncoated (MCPG0510), (Millipore Corp., USA).

**Tabulka 1: Vlastnosti částic použitých pro izolaci DNA**

částice	Fe (%hm.)	průměr částice (μm)	hustota (g/cm <sup>3</sup> )	PDI	-COOH (mM/g)	Polymer
Fkol 77ox	10,02	2,23	2,42	1,81	0,76	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)
Fkol 135ox	11,00	1,16	1,27	1,05	2,61	PGMA
Fkol B100ox	5,36	0,70	0,81	1,16	0,67	PGMA
Dynabeads <sup>®</sup> DNA DIRECT <sup>™</sup>	20	4,50	1,5	-	-	PS
MPG <sup>®</sup>	-	5,00	-	-	-	-

Fe (%) je hmotnostní obsah železa v magnetickém nosiči, PDI je index polydispersity (poměr hmotnosti a počtu nosičů průměrné velikosti), P(HEMA-*co*-GMA) je poly(hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidylmethakrylát), PGMA je poly(glycidylmethakrylát), PS je polystyren

#### 4.1.2 Bakteriální kultury a DNA

Bakteriální kultury použité pro izolaci DNA byly následující:

*Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 (získána z Kolekce průmyslových mikroorganismů (LOCK), Polsko)

*Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup> (získána z České sbírky mikroorganismů (CCM), Brno, ČR)

Dále byla použita DNA (pozitivní kontrola při PCR):

*Lactobacillus gasseri* K7 (koncentrace DNA 10 ng/μl)

*Bifidobacterium longum* CCM 4990 (koncentrace DNA 10 ng/μl)

Vzorky DNA použité pro pozitivní kontrolu byly získány od doc. RNDr. Aleny Španové CSc.

#### 4.1.3 Výrobek

Mléčný výrobek Imunel, jogurtový probiotický nápoj, příchuť jahoda, slazený, obsahující kulturu Synbiotec. Tento výrobek obsahuje podle výrobce dva specifické kmeny a to

*Lactobacillus rhamnosus* IMC 501<sup>®</sup> a *Lactobacillus paracasei* IMC 502<sup>®</sup> [11]. Výrobek je zobrazen na Obrázku 4.



Obrázek 4: Výrobek Imunel, jogurtový probiotický nápoj. Převzato z [12].

#### 4.1.4 Chemikálie

destilovaná voda (VUT FCH, Brno, ČR)  
fenol (pH = 7,8 – 8,2), (Lachema, Brno ČR)  
ethanol (Penta, Chrudim, ČR)  
agaróza (Serva, Heidelberg, SRN)  
SDS (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA)  
proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)  
ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA)  
EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)  
chloroform (Penta, Chrudim, ČR)  
isoamylalkohol (Lachema, Brno ČR)  
octan sodný (Lachema, Brno ČR)  
PEG 6000 (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA)  
NaCl (Lachema, Brno ČR)  
Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)

##### 4.1.4.1 Komponenty pro PCR

**voda pro PCR** (Top-Bio, Praha, ČR)  
**PPP master mix** (Top-Bio, Praha, ČR) o složení 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerasy, stabilizátory a aditiva.  
**primery** (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)  
Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 2.



**Tabulka 2: použité primery specifické pro doménu *Bacteria* [13].**

<b>Primer</b>	<b>Sekvence (5' → 3')</b>	<b>délka produktu PCR</b>
<b>F<sub>eub</sub></b>	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
<b>R<sub>eub</sub></b>	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

#### **4.1.5 Přístroje**

termocyklér MJ Research Programme Cycler PTP-100 (Watertown, USA)  
UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramout, USA)  
Elektroforetická vana model Owl D2 Wide Gel System s elektrickým zdrojem  
centrifuga MINI spin 13 400 min<sup>-1</sup> (Eppendorf, Německo)  
Termostat – Mini incubator (Labnet, 37 USA)  
Analytické váhy Kern ew (Novot', SK)  
Laboratorní váhy B0430 (Ohaus, USA)  
Magnetický separátor Dynal (Oslo, Norsko)  
NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen, Německo)  
mikrovlánná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)  
fotoaparát FUJIFILM digital camera FINEPIX F660EXR (Tokyo, Japonsko)  
a další běžné laboratorní pomůcky

#### **4.1.6 Roztoky**

Návody na přípravu roztoků jsou převzaty ze skript doc. Španové a doc. Ritticha [8].

##### **4.1.6.1 Roztoky pro kultivaci**

###### **MRS médium**

Pro přípravu 1 litru roztoku bylo použito 52 g MRS brothu který byl rozpuštěn v destilované vodě a pH upraveno 1 M NaOH na hodnotu 6,5. Médium bylo sterilizováno 20 minut při 121 °C.

###### **MRS agar**

Do MRS média byl přidán agar v množství 15 g/l. Hodnota pH byla upravena 1 M NaOH na hodnotu 6,5 a médium bylo následně sterilizováno 20 minut při 121 °C.

##### **4.1.6.2 Roztoky pro hrubou lýzu bakteriálních buněk**

###### **1 M Tris-HCl (pH 7,8)**

12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 70 ml destilované vody a pH upraveno koncentrovanou HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a sterilizován 20 minut při 121 °C.

###### **0,5 M EDTA (pH 8,0)**

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody a pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu pH 8,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 litru a sterilizován 20 minut při 121 °C.

### **Lyzační roztok A**

Roztok byl připraven smícháním ze zásobních roztoků (1 M Tris-HCl pH 7,8 a 0,5 M EDTA (pH 8,0)). Na přípravu bylo použito 1 ml 1 M Tris-HCl a 1 ml 0,5 M EDTA. Následně byl roztok doplněn sterilní vodou na konečný objem 100 ml.

### **Lyzační roztok B**

K lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym, tak aby byla výslednou koncentrace lysozymu 3,0 mg/ml. Roztok se připravuje vždy čerstvý.

### **Roztok proteinázy K**

Bylo naváženo 10 mg proteinázy K, která byla rozpuštěna v 1 ml sterilní destilované vody. Roztok byl uchovávan při -20 °C a před použitím naředěn na konečnou koncentraci 100 µl/ml.

### **SDS (20 %)**

20 g dodecyl sulfátu sodného (SDS) bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody při současném zahřívání na 68 °C a pH bylo pomocí HCl upraveno na hodnotu 7,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a rozdělen do alikvótních podílů.

#### ***4.1.6.3 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA fenol-chloroformovou metodou***

##### **CIZ**

Roztok byl připraven smícháním chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1.

##### **Fenol (pH 7,8)**

Předestilovaný fenol nasycený TE pufrem o pH 7,8.

##### **Roztok octanu sodného (3 M)**

40,81 g octanu sodného bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody a pH bylo upraveno ledovou kyselinou octovou na hodnotu 5,2. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na výsledný objem 100 ml a dále byl sterilizován 20 minut při 121 °C.

##### **TE pufr**

Roztok byl připraven smícháním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněn sterilní destilovanou vodou do 100 ml.

#### ***4.1.6.4 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů***

##### **5 M NaCl**

58,4 g NaCl bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 200 ml a následně sterilizován v autoklávu (121 °C/15 minut).

##### **40 % PEG 6000**

40 g PEG 6000 bylo rozpuštěno v 60 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml. Roztok byl uchovávan při 4 °C.

##### **70 % ethanol**

Byl připraven smícháním 96 % ethanolu s destilovanou vodou.

##### **TE pufr**

Roztok byl připraven smícháním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněn sterilní destilovanou vodou do 100 ml.

#### **4.1.6.5 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu**

##### **0,5×TBE pufr**

V 600 ml destilované vody bylo rozpuštěno 54 g Tris-báze; 27,5 g kyseliny borité a napipetováno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Roztok byl doplněn na necelý litr, bylo upraveno pH na 8,0 pomocí 1 M NaOH a doplněn na celkový objem 1 litru. Před použitím byl TBE pufr 10krát naředěn destilovanou vodou na koncentraci 0,5 M.

**barvivo Gold view** (SBS Genetech, Čína)

**Nanášecí pufr Yellow load (6×koncentrovaný)**, (Top-Bio, Praha, ČR)

Obsahuje barvivo orange G.

##### **Barvicí lázeň ethidiumbromidu**

100 µl roztoku ethidiumbromidu (5 mg/ml) bylo zředěno 500 ml destilované vody.

**DNA standard (100 bp)**, (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

Obsahoval fragmenty DNA o velikostech 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp.

## **4.2 Metody**

Použité metody jsou s menšími úpravami převzaty ze skript doc. Španové a doc. Ritticha [8].

### **4.2.1 Kultivace buněk rodu *Lactobacillus***

Do 50 ml tekutého MRS (de Mann, Rogosa, Sharp) média bylo naočkováno 500 µl kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup> (*Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908). Kultivace probíhala 2 dny při 37 °C.

### **4.2.2 Kontrola čistoty bakteriální kultury**

Bakteriální kultura *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 narostlá v tekutém živném médiu byla naočkována pomocí křížového roztěru na Petriho misku s pevným MRS (de Mann, Rogosa, Sharp) agarem a kultivována při 37°C 2 dny.

### **4.2.3 Lýze bakteriálních buněk**

- a. 1 ml buněčné kultury v 1,5 ml Eppendorfové zkumavce bylo centrifugováno při 10 000 ot/min po dobu 3 minut.
- b. Supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal dobře okapat.
- c. Sediment byl resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A. Nejprve bylo přidáno 100 µl lyzačního roztoku A, dobře promícháno a následně přidáno zbývajících 900 µl a suspenze byla opět promíchána.
- d. Suspenze byla centrifugována při 13 400 ot/min po dobu 3 minut.
- e. K sedimentu bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku B a dokonale resuspendováno.
- f. Vzorek byl inkubován asi 30 minut při laboratorní teplotě, za občasného promíchání.
- g. K suspenzi bylo přidáno 12,5 µl 20% SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml) a vzorek byl promíchán.
- h. Vzorek byl inkubován při 55 °C do projasnění roztoku 30 minut za občasného promíchání.

#### 4.2.4 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- K 500  $\mu$ l lyzátu buněk *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 byl přidán stejný objem fenolu (pH 7,8). Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána 4 minuty.
- Směs byla centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut. Došlo k oddělení fází.
- Byla odebrána vrchní vodní fáze s obsahem nukleových kyselin do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- Vodná fáze byla doplněna TE puforem na objem 500  $\mu$ l a poté bylo přidáno 700  $\mu$ l CIZ. Směs byla opatrně promíchávána 4 minuty kývavým pohybem.
- Směs byla centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- Horní vodná fáze byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky.

#### 4.2.5 Srážení DNA ethanolem

- Pomocí automatické pipety byl změřen objem vzorku DNA ve zkumavce a celkový objem byl upraven TE puforem na 400  $\mu$ l.
- Ke vzorku bylo přidáno 20  $\mu$ l 3 M octanu sodného (1/20 objemu vzorku) a vzorek byl promíchán.
- DNA byla srážena při -20 °C po dobu 15 minut.
- Směs byla centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 15 minut (při 4 °C). Opatrně byl slit supernatant a dále se pracovalo jen se sedimentem.
- Sediment DNA byl vysušen v exikátoru.
- Nakonec byla DNA rozpuštěna v 200  $\mu$ l TE pufru a uchována při 4 °C.

#### 4.2.6 Příprava hrubého lyzátu buněk z tekutého mléčného výrobku

- Z tekutého mléčného výrobku byl odebrán 1 ml vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky.
- Vzorek byl centrifugován při 14 000 ot/min po dobu 5 minut.
- Supernatant byl opatrně slit, sediment byl resuspendován a promyt 1 ml sterilní vody a opět centrifugován jako v předešlém bodu.
- Promytí bylo opakováno celkem pětkrát.
- K sedimentu byl přidán 1 ml lyzačního roztoku B ve kterém byl sediment resuspendován.
- Vzorek byl inkubován hodinu při laboratorní teplotě.
- Ke směsi bylo přidáno 50  $\mu$ l 20 % SDS a 5  $\mu$ l proteinasy K (1 mg/ml).
- Vzorek byl následně inkubován při 55 °C do druhého dne.

#### 4.2.7 Metoda magnetické separace DNA

- Složky separační směsi byly napipetovány do mikrozkušavky v následovném pořadí a objemech, které jsou uvedeny v (Tabulce 3). Po promíchání komponent byla směs 10 min inkubována při laboratorní teplotě.
- Pak byla zkumavka se směsí umístěna do magnetického separátoru (se zásuvným magnetickým pásem) a magnetické částice se separovaly 5 min při laboratorní teplotě.
- Po uplynuté době se opatrně odebral supernatant (zkumavka zůstala stále v separátoru).

- Z magnetického separátoru se vyjmul magnetický pás a do mikrozkušavky s částicemi bylo přidáno 1000  $\mu$ l 70% ethanolu.
- Vzorek byl promíchán, do separátoru byl zpět zasunut magnetický pás a po 30 sekundách byl ethanol opatrně odebrán. Tento krok byl opakován s přidáním 500  $\mu$ l 70% ethanolu.
- Po odebrání ethanolu byla zkušavka vyjmuta ze separátoru a ethanol se nechal odpařit.
- DNA adsorbována na magnetických částicích byla eluována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut do 50  $\mu$ l TE pufru.
- Po 15 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát (supernatant) obsahující DNA byl odebrán do čisté mikrozkušavky.

**Tabulka 3: Složení separační směsi**

Komponenta	Hrubý lyzát z:	
	Mléčného výrobku	Bakteriální kultury
	objem ( $\mu$ l)	
5 M NaCl	400	200
Hrubý lyzát buněk (DNA)	100	50
40 % PEG 6000	400	200
Magnetický nosič (2 mg/ml)	100	50
<b>Celkem</b>	<b>1000</b>	<b>500</b>

#### 4.2.8 UV Spektrofotometrie

Tato metoda se používá pro zjištění koncentrace DNA a kontrolu čistoty izolované DNA, případně k zjištění přítomnosti dalších látek, které by mohly působit jako inhibitory PCR. Nukleové kyseliny (DNA a RNA) mají absorpční maximum při 260 nm a z této hodnoty se určí koncentrace DNA ve vzorku. [8]

Vzorky vyizolované DNA byly pomocí NanoPhotometru<sup>TM</sup> (Implen) proměřeny v rozmezí vlnových délek 220 – 320 nm. Pro měření bylo použito víčko Lid 10 a jako referenční vzorek byl použit TE pufr.

#### 4.2.9 Gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Byl připraven 0,8% agarosový gel (0,8 g agarosy/100 ml 0,5×TBE pufr); suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, nechala se vychladnout asi na teplotu 60 °C, přidalo se barvivo Gold view (5  $\mu$ l), roztok se promíchal a nalil se do elektroforetické vaničky s hřebínkem a nechal se cca 1 hodinu tuhnout. Před nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut.
- V mikrozkušavce bylo smícháno 15  $\mu$ l DNA v TE pufru s 3  $\mu$ l nanášecího pufru (6×koncentrovaný). Směs byla nanesena do komůrky gelu.
- Gel byl vložen do elektroforetické vaničky, tak aby záporně nabitá DNA putovala k anodě. Vanička s gelem byla opatrně převrstvena 0,5×TBE puftrem do výšky 2-3 mm nad gel a byl zapnut zdroj gelové elektroforézy (80 V/cm, cca 2 hodiny).

- Po skončení separace byl gel ponořen do roztoku ethidiumbromidu pro dobarvení.
- Gel byl vyjmut a umístěn na transiluminátor a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce  $\lambda = 305 \text{ nm}$ .
- Byla provedena fotografická dokumentace gelu.

#### 4.2.10 Polymerázová řetězcová reakce pro doménu *Bacteria*

PCR byla provedena za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* F\_eub a R\_eub [13]. Detekce specifických produktu PCR o velikosti 466 bp byla následně provedena metodou agarosové gelové elektroforézy.

##### 4.2.10.1 Příprava směsi pro PCR

- Příslušné komponenty byly přidány a smíchány v následujícím pořadí a objemech uvedených v (Tabulka 4).
- DNA matrice získaná ze vzorků byla přidána nakonec.
- Negativní kontrola byla připravena smícháním prvních čtyř komponent, tvořící směs pro PCR a místo DNA matrice byl přidán 1  $\mu\text{l}$  vody pro PCR.
- Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 10 ng/ $\mu\text{l}$ . Ve druhém pokusu byla pro pozitivní kontrolu použita DNA *Bifidobacterium longum* CCM 4990 (koncentrace DNA 10 ng/ $\mu\text{l}$ ).
- Všechny komponenty PCR byly před použitím promíchány a centrifugovány.

**Tabulka 4: komponenty pro přípravu PCR směsi**

Komponenta	Objem ( $\mu\text{l}$ )
Voda pro PCR	9,5
PPP master mix	12,5
Primer 1	1,0
Primer 2	1,0
Matrice DNA	1,0
<b>Celkem</b>	<b>25,0</b>

##### 4.2.10.2 Program PCR pro doménu *Bacteria*

- PCR směsi připravené v předchozím postupu byly umístěny do termocykléru s příslušným programem uvedeným v (Tabulka 5). PCR probíhala v 30 cyklech.
- Před prvním cyklem byla PCR směs zahřátá na 94°C po dobu 5 minut. V posledním cyklu byla doba syntézy řetězce DNA prodloužena na 5 minut.

**Tabulka 5: Podmínky pro PCR**

krok	teplota (°C)	čas (min)	počet cyklů
před 1. cyklem	94	5,0	30
1.	94	0,5	
2.	55	0,5	
3.	72	1,0	
v posledním 30. cyklu	72	5,0	

#### 4.2.11 Gelová elektroforéza produktů PCR

- Byl připraven 1,8% agarosový gel (1,8 g agarosu/100 ml 0,5×TBE pufr); suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, nechala se vychladnout asi na teplotu 60 °C, přidalo se barvivo Gold view (5 µl), roztok se promíchal a nalil se do elektroforetické vaničky s hřebínkem a nechal se cca 1 hodinu tuhnout. Před nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut.
- V mikrozkušavce bylo smícháno 25 µl produktu PCR s 5 µl nanášecího pufru (6×koncentrovaný). Směsi byly naneseny do komůrek gelu.
- Dále byl na gel nanesen hmotnostní standard DNA (100 bp) 5 µl.
- Gel byl vložen do elektroforetické vaničky tak, aby záporně nabitá DNA putovala k anodě. Vanička s gelem byla opatrně převrstvena 0,5×TBE pufrem do výšky 2-3 mm nad gel a byl zapnut zdroj gelové elektroforézy (80 V/cm, cca 2 hodiny).
- Po skončení separace byl gel ponořen do roztoku ethidiumbromidu pro dobarvení.
- Gel byl vyjmut a umístěn na transiluminátor a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce  $\lambda = 305$  nm.
- Byla provedena fotografická dokumentace gelu.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

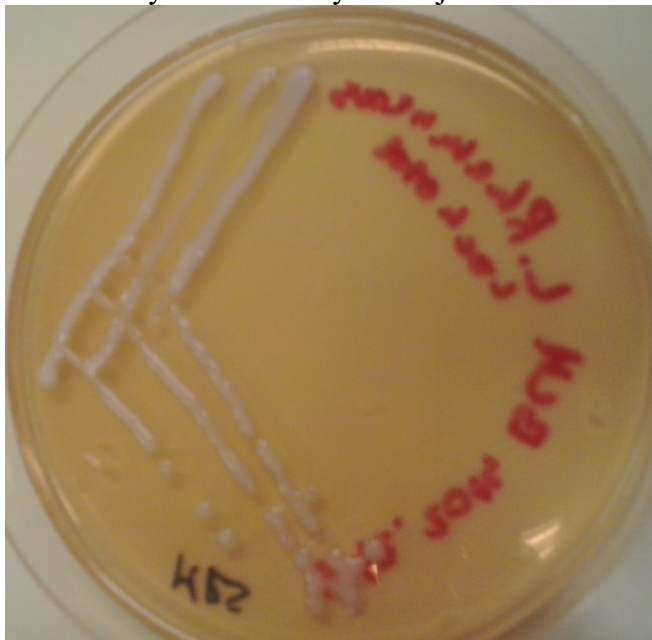
V prvním pokusu byla paralelně provedena izolace DNA z mléčného výrobku a fenolová extrakce z bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908. Společně byla provedena PCR a následná agarosová gelová elektroforeza PCR produktů. Výsledky a diskuze bude pro tyto dva kroky tudíž uvedena dohromady jako první pokus. Jinak budou uvedeny výsledky zvlášť pro každou metodu. Ve druhém pokusu bylo použito 5 druhů magnetických nosičů, pomocí kterých byla izolovaná DNA z bakteriální kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup>.

### 5.1 Výsledky spojené s metodou fenol-chloroformové extrakce

Pro tuto metodu byly provedeny následující kroky: kultivace bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 podle postupu uvedeného v bodu (4.2.1), kontrola čistoty této bakteriální kultury (4.2.2), lýze bakteriálních buněk čisté kultury (4.2.3), fenolová extrakce bakteriální DNA (4.2.4) a srážení DNA ethanolem (4.2.5). Získaný vzorek DNA v TE pufru byl podroben UV spektrometrii (4.2.8), agarosové gelové elektroforéze bakteriální DNA (4.2.9), PCR pro doménu *Bacteria* (4.2.10) a agarosové gelové elektroforéze pro detekci PCR produktů (4.2.11).

#### 5.1.1 Kontrola čistoty bakteriální kultury na MRS agaru

Byla provedena kontrola čistoty bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 podle bodu (4.2.2). Bakteriální kultura narostlá v tekutém živném médiu byla přenesena pomocí křížového roztěru na Petriho misku s pevným MRS agarem. Po proběhlé kultivaci bylo zjištěno, že kultura *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 byla čistá, jednotlivé kolonie byly bílé barvy, bez dalších odlišných kolonií. Výsledek je možno vidět na Obrázku 5.



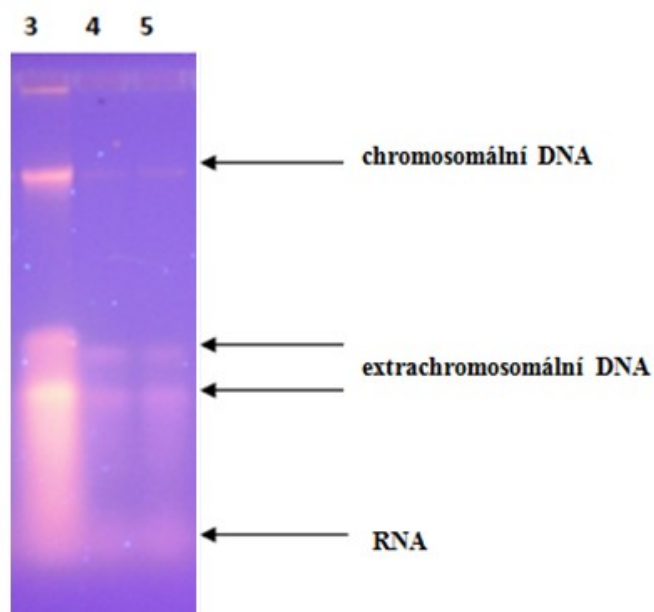
Obrázek 5: MRS agar s koloniemi *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 po kultivaci



### 5.1.2 Potvrzení intaktnosti DNA pomocí agarosové gelové elektroforézy

Konkrétní postup je uveden v bodu (4.2.9). Byl připraven 0,8% agarosový gel na, který byly nanášeny vzorky vy-izolované DNA z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 pomocí fenolové extrakce. Na (Obrázku 6) je vidět výsledek. V běhu č. 5 byl vzorek o koncentraci nukleových kyselin 41 ng/μl. Ostatní vzorky byly kolegů s různými koncentracemi.

Agarózová gelová elektroforéza potvrdila přítomnost bakteriální DNA a její intaktnost. Byla detekována chromosomální DNA, tak i extrachromosomální DNA a RNA.



Obrázek 6: Schéma nanesení vzorků: Běh č. 3 - 4 neznámé vzorky, 5 - vzorek o koncentraci nukleových kyselin 41 ng/μl

### 5.1.3 Stanovení koncentrace DNA

U izolované DNA z čisté kultury *Lactobacillus rhamnosus* pomocí fenol-chloroformové extrakce byla pomocí NanoPhotometru<sup>TM</sup> (Implen) změřena koncentrace a čistota v rozmezí vlnových délek 220 – 320 nm. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v (Tabulce 6).

Tabulka 6: Naměřené hodnoty absorbance pro vzorek z fenol-chloroformové extrakce

označení	λ (nm)	naměřená absorbance
A <sub>230</sub>	230	0,000
A <sub>260</sub>	260	0,058
A <sub>280</sub>	280	0,025
A <sub>320</sub>	320	0,000
A <sub>260/280</sub>		1,673
	<b>koncentrace DNA</b>	<b>41 ng/μl</b>

Z hodnoty A<sub>260</sub> byla stanovena koncentrace vzorku DNA, která činila 41 ng/μl. Z poměru hodnot A<sub>260/280</sub> byla stanovena čistota DNA. Optimální rozmezí absorbančí s poměrem A<sub>260/280</sub> při které se považuje DNA za dostatečně čistou je 1,8-2. Naměřená absorbance byla

1,673. Když je poměr  $A_{260/280}$  menší jak 1,8 poukazuje to na to, že vzorek mohl být kontaminován proteiny. [8]

## 5.2 Výsledky pro metodu magnetické separace DNA z mléčného výrobku

U této metody byly provedeny následující kroky: příprava hrubého lyzátu buněk z tekutého mléčného výrobku Imunel jogurtový probiotický nápoj podle postupu (4.2.6) a metoda magnetické separace DNA (4.2.7). Metodou magnetické separace byl získán vzorek DNA v 50  $\mu$ l TE pufru, který byl dále podroben PCR pro doménu *Bacteria* (4.2.10) a agarosové gelové elektroforéze pro detekci PCR produktů (4.2.11).

### 5.2.1 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk mléčného výrobku pomocí magnetických mikročástic

Izolace DNA byla provedena z mléčného výrobku Imunel, jogurtový probiotický nápoj, příchut' jahoda, slazený, obsahující kulturu Synbiotec. Tento výrobek obsahuje podle výrobce dva specifické kmény a to *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501<sup>®</sup> a *Lactobacillus paracasei* IMC 502<sup>®</sup> [11]. DNA bylo izolováno pomocí polyglycidyl methakrylátových magnetických mikročástic P(GMA) Fkol 135ox (2 mg/ml) z hrubého lyzátu buněk tohoto mléčného výrobku.

## 5.3 Společné vyhodnocení produktů PCR pro první pokus

### 5.3.1 Polymerázová řetězová reakce pro doménu *Bacteria*

Postup a podmínky pro PCR jsou uvedeny v bodu (4.2.10). Jako DNA matrice byla použita DNA vy-izolovaná fenolovou extrakcí z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908, která byla zředěna na koncentraci 10 ng/ $\mu$ l, dále pak DNA vy-izolovaná pomocí magnetických mikročástic P(GMA) Fkol 135ox z hrubého lyzátu buněk mléčného výrobku Imunel Smart Drink a jako pozitivní kontrola byla použita DNA z *Lactobacillus gasseri* K7 (10 ng/ $\mu$ l). Produkty PCR byly pak dále porobeny agarosové gelové elektroforéze.

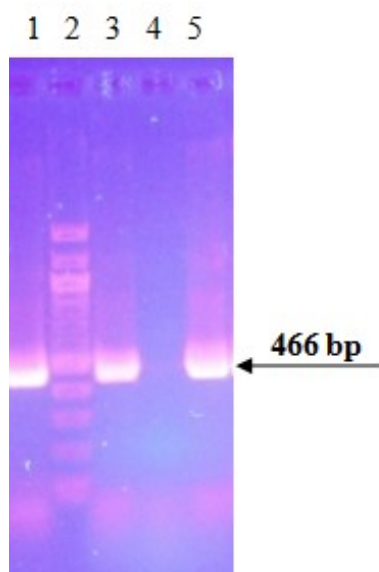
### 5.3.2 Agarosová gelová elektroforéza pro detekci PCR produktů

Podle postupu (4.2.11) byla provedena agarosová gelová elektroforéza PCR produktů z předchozího bodu. Výsledný gel s detekovanými PCR produkty je zobrazen na (Obrázku 7). Jednotlivé výsledky jsou v (Tabulce 7).

Tabulka 7: Výsledky detekce PCR produktů z Obrázku 7

Běh číslo	vzorek DNA	metoda izolace DNA	detekce PCR produktů
1	Pozitivní kontrola <i>Lbc. gasseri</i> K7 (10 ng/ $\mu$ l)	fenolová extrakce	+++
2	standard DNA		
3	<i>Lbc. rhamnosus</i> LOCK 0908 (10 ng/ $\mu$ l)	fenolová extrakce	+++
4	negativní kontrola		-
5	Imunel Smart Drink	magnetické částice	+++

+++ PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován



**Obrázek 7:** Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (466 bp) získaných po amplifikaci DNA z bakteriální kultury a z výrobku. Schéma nanesení vzorků: Běh č. 1 - pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus gasseri* K7 (10 ng/μl); 2 - žebříček 100 bp; 3 - *Lbc. rhamnosus* LOCK 0908 (10 ng/μl); 4 - negativní kontrola; 5 - Imunel Smart Drink

Pomocí metody polymerázové řetězové reakce byla ověřena kvalita DNA vy-izolované z probiotického mléčného výrobku pomocí magnetického nosiče a DNA z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 pomocí fenol-chloroformové extrakce. PCR byla provedena za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [13]. Jako kontrola byla použita čistá bakteriální kultura *Lactobacillus gasseri* K7. Detekce specifického produktu PCR o velikosti 466 bp byla provedena metodou agarózové gelové elektroforézy. U všech vzorků byly detekovány produkty PCR o velikosti 466 bp a potvrzena, tak přítomnost bakteriální DNA. U negativní kontroly nebyl detekován PCR produkt, takže nedošlo ke kontaminaci přidávaných komponent.

#### **5.4 Výsledky pro metodu magnetické separace DNA z bakteriální kultury pomocí 5 různých magnetických nosičů (druhý pokus)**

Byly provedeny následující kroky: kultivace bakteriální kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup> podle postupu (4.2.1), lýze bakteriálních buněk (4.2.3), metoda magnetické separace pomocí 5 různých magnetických nosičů (4.2.7). Metodou magnetické separace byly získány vzorky DNA v 50 μl TE pufru, které byly dále podrobeny UV spektrometrii (4.2.8), PCR pro doménu *Bacteria* (4.2.10) a agarosové gelové elektroforéze pro detekci PCR produktů (4.2.11).

##### **5.4.1 Lýze bakteriálních buněk *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup>**

Bylo připraveno 10 hrubých lyzátů z bakteriální kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup>. Postup byl proveden podle (4.2.3) s následujícími změnami: bod a) a b) byl

třikrát opakován. U bodu h) byla doba inkubace prodloužena do druhého dne (15 h). Jinak byl postup stejný.

#### 5.4.2 metoda magnetické separace pomocí 5 různých magnetických nosičů

DNA byla vyizolována z hrubých lyzátů bakteriální kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup> pomocí následujících 5 magnetických nosičů Fkol 77ox, Fkol 135ox, Fkol B100ox, Dynabeads<sup>®</sup> DNA DIRECT<sup>™</sup> Universal a MPG<sup>®</sup> uncoated (MCPG0510). Postupovalo se podle návodu (4.2.7). Každý druh částice byl použit na dva hrubé lyzáty buněk. Bylo tedy získáno 10 vzorků vyizolované DNA, každý v 50 µl TE pufru.

#### 5.4.3 Stanovení koncentrace DNA

U izolované DNA z čisté kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup> pomocí 5 magnetických nosičů byla pomocí NanoPhotometru<sup>™</sup> (Implen) změřena koncentrace a čistota v rozmezí vlnových délek 220 – 320 nm. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v (Tabulce 8). Z hodnoty A<sub>260</sub> byly stanoveny koncentrace DNA. Hodnoty koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí 20-101 ng/µl v závislosti na použití druhu magnetického nosiče. Největších hodnot koncentrací bylo při použití magnetického nosiče Fkol 135ox. Hodnoty A<sub>260/280</sub> poukazují na možnou kontaminaci proteiny. [8]

Tabulka 8: Naměřené hodnoty absorbance při použití 5 typů nosičů

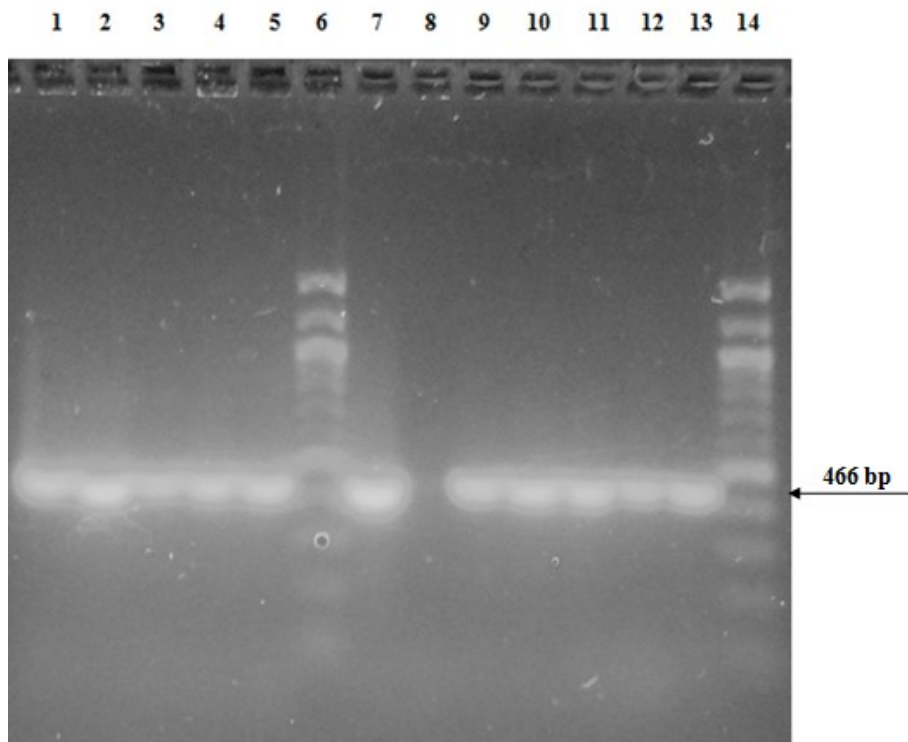
magnetický nosič	č. vz.	c DNA (ng/µl)	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
MPG <sup>®</sup>	1	38,5	0,119	0,115	0,087	0,038	1,559	0,945
	2	28,0	0,083	0,070	0,048	0,014	1,647	0,812
Fkol B100ox	3	31,3	0,080	0,079	0,056	0,017	1,583	1,200
	4	37,5	0,116	0,105	0,079	0,030	1,523	0,846
Dynabeads <sup>®</sup> DNA DIRECT <sup>™</sup>	5	29,8	0,094	0,090	0,070	0,030	1,484	0,934
	6	20,0	0,036	0,061	0,050	0,021	1,379	2,667
Fkol 135ox	7	101,0	0,277	0,310	0,240	0,108	1,536	1,198
	8	95,0	0,237	0,277	0,211	0,087	1,532	1,267
Fkol 77ox	9	35,0	0,088	0,095	0,071	0,025	1,537	1,102
	10	29,5	0,087	0,089	0,068	0,030	1,545	1,004

#### 5.4.4 Polymerázová řetězová reakce pro doménu *Bacteria*

Byla provedena PCR pro doménu *Bacteria* podle postupu (4.2.10). Jako DNA matrice byla použita DNA izolovaná pomocí 5 druhů magnetických mikročástic z hrubého lyzátu buněk *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup> a jako pozitivní kontrola byla použita DNA z *Bifidobacterium longum* CCM 4990 (10 ng/µl). PCR produkty byly následně podrobeny agarosové gelové elektroforéze.

### 5.4.5 Agarosová gelová elektroforéza pro detekci PCR produktů

Podle postupu (4.2.11) byla provedena agarosová gelová elektroforéza PCR produktů z předchozího bodu. Výsledný gel s detekovanými PCR produkty je zobrazen na (Obrázku 8). Jednotlivé výsledky jsou v (Tabulce 9).



Obrázek 8: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR (466 bp) získaných po amplifikaci DNA z bakteriální kultury *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088<sup>T</sup>. Schéma nanesení vzorků: Běh č. 1 – vzorek (38,5 ng/μl); 2 – vzorek (28 ng/μl); 3 – vzorek (31,3 ng/μl); 4 – vzorek (37,5 ng/μl); 5 – vzorek (29,8 ng/μl); 6 – žebříček 100 bp; 7 – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium longum* CCM 4990 (10 ng/μl)); 8 – negativní kontrola; 9 – vzorek (20 ng/μl); 10 – vzorek (101,1 ng/μl); 11 – vzorek (95 ng/μl); 12 – vzorek (35 ng/μl); 13 – vzorek (29,5 ng/μl); 14 – žebříček 100 bp

**Tabulka 9: Výsledky detekce PCR produktů z Obrázku 8**

běh č.	vzorek DNA o koncentraci (ng/μl)	DNA izolována pomocí magnetického nosiče	detekce PCR produktů
1	38,5	MPG <sup>®</sup>	+++
2	28,0	MPG <sup>®</sup>	+++
3	31,3	Fkol B100ox	+++
4	37,5	Fkol B100ox	+++
5	29,8	Dynabeads <sup>®</sup> DNA DIRECT <sup>™</sup>	+++
6	standard DNA		
7	pozitivní kontrola <i>B. longum</i> CCM 4990 (10 ng/μl)		+++
8	negativní kontrola		-
9	20,0	Dynabeads <sup>®</sup> DNA DIRECT <sup>™</sup>	+++
10	101,1	Fkol 135ox	+++
11	95,0	Fkol 135ox	+++
12	35,0	Fkol 77ox	+++
13	29,5	Fkol 77ox	+++
14	standard DNA		

+++ silná pozitivní detekce PCR produktu, - negativní detekce PCR produktu

Byla provedena polymerázová řetězová reakce pro doménu *Bacteria* s použitím specifických primerů pro tuto reakci [13]. Produkty PCR byly následně podrobeny agarosové gelové elektroforéze. U všech vzorků vy-izolované DNA z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup> pomocí 5 různých částic byly detekované produkty PCR o velikosti 466 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z *Bifidobacterium longum* CCM 4990 (10 ng/μl). U všech vzorků byla prokázána přítomnost bakteriální DNA. U negativní kontroly k detekci nedošlo, takže kontaminace přidávaných komponent se neprokázala.

## 5.5 Souhrn

Byla izolovaná DNA jak pomocí magnetických nosičů, tak pomocí klasické fenol-chloroformové extrakce.

Klasickou fenol-chloroformovou extrakcí byla DNA izolována z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908. Její kvalita byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou DNA a koncentrace a čistota byla potvrzena spektrofotometricky.

Pomocí magnetických mikročástic P(GMA) Fkol 135ox byla DNA izolována z hrubého lyzátu buněk mléčného výrobku Imunel Smart Drink. DNA byla amplifikována pomocí PCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*. [13]. U obou vzorků byla podle předpokladů bakteriální DNA prokázána výskytem PCR produktů o příslušné velikosti 466 bp.

Ve druhém pokusu bylo použito 5 druhů magnetických nosičů pro izolaci DNA z bakteriální kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup>. Jednalo se o magnetické nosiče Fkol 77ox, Fkol 135ox, Fkol B100ox, Dynabeads<sup>®</sup> DNA DIRECT<sup>™</sup> Universal a MPG<sup>®</sup> uncoated (MCPG0510). Všechny byly vhodné pro izolaci DNA v kvalitě dostačující pro PCR.

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části práce byla věnována pozornost popisu magnetických nosičů a jejich dosavadnímu i potenciálnímu praktickému využití do budoucna.

V experimentální byly představeny metody izolace DNA jak pomocí klasické fenolové extrakce, tak pomocí magnetických nosičů.

Mikrobiologicky byla ověřena čistota bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908, která byla použita pro přípravu hrubého lyzátu buněk ze kterého byla následně metodou fenolové extrakce izolována DNA. Intaktnost izolované DNA byla potvrzena agarózovou gelovou elektroforézou. Spektrofotometricky byla zjištěna koncentrace vy-izolované DNA, která činila 41 ng/μl.

Pomocí magnetických mikročastic P(GMA) Fkol 135ox byla izolována DNA z hrubého lyzátu buněk mléčného výrobku Imunel Smart Drink (jogurtový probiotický nápoj). Tento výrobek má obsahovat kulturu Synbiotec se dvěma specifické kmeny a to *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501<sup>®</sup> a *Lactobacillus paracasei* IMC 502<sup>®</sup>. [11]

Z bakteriální kultury *Lactobacillus casei ssp casei* CCM 7088<sup>T</sup> byla vy-izolována DNA pomocí 5 různých magnetických nosičů. Jednalo se o magnetické nosiče Fkol 77ox, Fkol 135ox, Fkol B100ox, Dynabeads<sup>®</sup> DNA DIRECT<sup>™</sup> Universal a MPG<sup>®</sup> uncoated (MCPG0510).

Pomocí PCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* bylo potvrzeno, že všech uvedených případech byla získána DNA v kvalitě i množství vhodném pro PCR. [13].



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, vol. 36, issue 15, s. 2472-2485 [cit. 2014-12-01]. DOI: 10.1002/jssc.201300331.

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>

[2] LINDEMANN, Antje, Bianca M. FRAEDERICH, Ralph PRIES, Barbara WOLLENBERG, Kerstin LÜDTKE-BUZUG a Ksenija GRAEFE. Biological impact of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic particle imaging of head and neck cancer cells. *International Journal of Nanomedicine* [online]. s. 5025-5040 [cit. 2015-01-06]. DOI: 10.2147/IJN.S63873. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/biological-impact-of-superparamagnetic-iron-oxide-nanoparticles-for-ma-peer-reviewed-article-IJN>

[3] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUML. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.

[4] OKOLI, Chuka, Magali BOUTONNET, Sven JÄRÅS a Gunaratna RAJARAO-KUTTUA. Protein-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles: time efficient potential-water treatment. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2012, vol. 14, issue 10, [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1007/s11051-012-1194-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-012-1194-9>

[5] CHUA, Trina a Arvind A. BHAGWAT. A rapid and simple DNA extraction procedure to detect *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* from fresh produce using real-time PCR. *Food Analytical Methods* [online]. 2009, vol. 2, issue 2, s. 96-101 [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1007/s12161-008-9032-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-008-9032-5>

[6] KURAMAE, Eiko E., Etienne YERGEAU, Lina C. WONG, Agata S. PIJL, Johannes A. VEEN a George A. KOWALCHUK. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2012, vol. 79, issue 1, s. 12-24 [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x>

[7] TRACHTOVÁ, Štěpánka. *Studium reversibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích*. Brno, 2011. Dizertační práce. Vyoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

[8] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.

[9] PEČOVÁ, Michaela, Ludmila ZAJONCOVÁ, Kateřina POLÁKOVÁ, Jan ČUDA, Mirka ŠAFAŘÍKOVÁ, Marek ŠEBELA a Ivo ŠAFAŘÍK. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy* [online]. 2011, roč. 105, č. 7, s 524-530 [cit. 2015-01-06]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_07\\_524-530.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_07_524-530.pdf)

[10] CORCHERO, José Luis a Antonio VILLAVARDE. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology* [online]. 2009, vol. 27, issue 8, s. 468-476 [cit. 2015-01-06]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.04.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016779909001061>

[11] Synbiotec Imunel, jogurtový probiotický nápoj [online]. [cit. 2015-01-05]. Dostupné z: <http://www.synbiotec.cz/imunel>

[12] Mlékárna Valašské Meziříčí s.r.o., Imunel - jogurtové mléko Jahoda slazené - kultura Synbiotec [online]. [cit. 2015-01-05]. Dostupné z: <http://www.mlekarna-valmez.cz/eshop/pouze-na-objednavku>

[13] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus species* in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006-04-05, vol. 72, issue 4, s. 2359-2365 [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>

[14] MCMURRY, John. *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.

[15] RÖDIGER, Stefan, Claudia LIEBSCH, Carsten SCHMIDT, Werner LEHMANN, Ute RESCH-GENGER, Uwe SCHEDLER a Peter SCHIERACK. Nucleic acid detection based on the use of microbeads: a review. *Microchimica Acta* [online]. Vienna: Springer Vienna, 1408, **181**(11), 1151-1168 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1007/s00604-014-1243-4. ISSN 00263672. Dostupné z: <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=72cef01e-6ca3-47d5-8e53-07f4077a2fc6%40sessionmgr104&vid=1&hid=102>

[16] *Univerzita Karlova 1. lékařská fakulta: Centrum pokročilého preklinického zobrazování* [online]. ©2006-2016 [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.lf1.cuni.cz/centrum-pokrocileho-preklinickeho-zobrazovani>

[17] *Univerzita Karlova 1. lékařská fakulta: Magnetické částice jako špioni v organismu* [online]. ©2006-2016 [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.lf1.cuni.cz/magneticke-castice-jako-spioni-v-organismu>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

bp	páry bázi
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
MPI	Magnetic particle imaging
PDI	index polydispersity
PEG	polyethylenglykol
P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát- <i>co</i> -glycidylmethakrylát)
PS	polystyren
P(GMA)	poly(glycidylmethakrylát)
PCR	polymerázová řetězcová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecyl sulfát sodný
SPIONs	superparamagnetické nanočástice oxidu železa
UV	ultrafialové záření