



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

MAGNETICKÉ ČÁSTICE A JEJICH VYUŽITÍ V BIOTECHNOLOGII

MAGNETIC PARTICLES AND THEIR APPLICATIONS IN BIOTECHNOLOGY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Monika Knápková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1144/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Monika Knápková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Magnetické částice a jejich využití v biotechnologii

Zadání bakalářské práce:

Vypracování literárního přehledu na téma využití magnetických nano– a mikročástic a jejich potenciální praktické aplikace v biotechnologii. Využití vybraných typů magnetických částic za účelem izolace nukleových kyselin, vyhodnocení kvality izolované DNA s ohledem na čistotu a množství pomocí metody polymerázové řetězové reakce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Monika Knápková
student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Práce je zaměřena na magnetické částice, které jsou využívány v řadě biotechnologických aplikací. Teoretická část práce pojednává o specifických vlastnostech těchto částic, o materiálech, kterými mohou být tvořeny a dále jsou zmíněny některé biotechnologické aplikace využívající magnetické částice.

V experimentální části byly využity vybrané druhy magnetických částic za účelem izolace nukleových kyselin. Kvalita izolované DNA s ohledem na čistotu byla vyhodnocena za použití metody polymerázové řetězové reakce a jejích modifikací. Dále byla využita vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM analýza) za účelem ověření kvality izolované DNA a pro rozlišení bakterií *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Izolace DNA pomocí magnetických nosičů byla úspěšná, přičemž z hlediska koncentrace byly nejvhodnější komerčně dostupné mikronosiče MPG a magnetické mikročástice typu Fkol 77ox. Z hlediska čistoty byly pro izolaci DNA nejlepší magnetické nanočástice F79/L3-PLL. Bakteriální druhy *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* se pomocí HRM analýzy nepodařilo rozlišit.

ABSTRACT

The thesis is focused on the magnetic particles which are used in several biotechnological applications. The theoretical part deals with the specific properties of these nanoparticles and materials of which the nanoparticles can be made. There are also mentioned some of the biotechnological applications of magnetic particles.

During the experimental part, selected types of magnetic particles were used to isolate nucleic acid. The quality of the isolated DNA with respect to purity was evaluated using the polymerase chain reaction and its modifications. High resolution analysis (HRM analysis) was also used to verify the quality of the isolated DNA and to resolution *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus*. DNA isolation using magnetic carriers was successful. Commercially available MPG microcarriers and magnetic microparticles Fkol 77ox were the most suitable. In terms of purity magnetic nanoparticles F79/L3-PLL were the most suitable for the DNA isolation. The resolution of bacterial strains of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* was not successful.

KLÍČOVÁ SLOVA

Magnetické částice, biotechnologie, PCR, PCR v reálném čase, HRM analýza, izolace DNA

KEYWORDS

Magnetic particles, biotechnology, PCR, real-time PCR, HRM analysis, DNA isolation

KNÁPKOVÁ, M. *Magnetické částice a jejich využití v biotechnologii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 58 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D..

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

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat starším kolegyním v laboratoři a velké dík patří také mé rodině za neustálou podporu.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Magnetické částice	9
2.1.1	Magnetické vlastnosti.....	9
2.1.1.1	Diamagnetické materiály	9
2.1.1.2	Feromagnetické materiály.....	9
2.1.1.3	Paramagnetické materiály	10
2.1.2	Velikost magnetických částic.....	11
2.1.3	Struktura magnetických částic	11
2.1.3.1	Jádro magnetických částic	12
2.1.3.2	Povrchová vrstva magnetických částic	13
2.2	Charakteristika magnetických částic	13
2.3	Biotechnologické aplikace magnetických částic	14
2.3.1	Cílená distribuce látek	15
2.3.2	Bioseparace	15
2.3.3	Imobilizace biologicky aktivních látek	16
2.3.4	Izolace a purifikace DNA.....	17
2.3.5	Molekulární diagnostika.....	18
2.4	Polymerázová řetězová reakce	18
2.4.1	Real-time PCR.....	19
2.4.2	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM).....	20
3	Cíl práce	21
4	Experimentální část.....	22
4.1	Materiál.....	22
4.1.1	Chemikálie	22
4.1.2	Přístroje	22
4.1.4	Roztoky	23
4.1.4.1	Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk	23
4.1.4.2	Roztoky pro izolaci DNA	23
4.1.4.3	Roztoky pro gelovou elektroforézu	23
4.1.5	Komponenty pro PCR a qPCR.....	23
4.1.6	Magnetické nosiče.....	23

4.1.7	Použité bakteriální kmeny a DNA	24
4.1.7.1	Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly	24
4.1.8	Kultivační média	24
4.1.8.1	MRS médium	24
4.2	Metody.....	24
4.2.1	Oživování a uchovávání bakteriálních kultur.....	24
4.2.2	Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk.....	25
4.2.3	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických nosičů	25
4.2.4	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA	26
4.2.5	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR).....	26
4.2.6	Konvenční polymerázová řetězová reakce.....	27
4.2.6.1	PCR primery	27
4.2.6.2	PCR programy	28
4.2.7	PCR-HRM.....	29
4.2.8	Gelová elektroforéza	30
5	Výsledky.....	31
5.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované bakteriální DNA... 31	
5.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase a detekce specifického produktu PCR.....	32
5.2.1	Ověření přítomnosti bakteriální DNA domény Bacteria metodou real-time PCR.....	32
5.2.2	Ověření přítomnosti DNA bakterií druhu Lactobacillus rhamnosus metodou real-time PCR.....	40
5.3	Konvenční PCR a detekce produktu PCR.....	41
5.3.1	Ověření přítomnosti DNA bakterií rodu Lactobacillus metodou PCR	41
5.3.2	Ověření přítomnosti DNA bakterií druhu Lactobacillus rhamnosus metodou PCR.....	43
5.3.3	Ověření přítomnosti DNA bakterií druhu Lactobacillus casei metodou PCR ...	44
5.4	PCR-HRM	46
5.4.1	PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM	46
5.4.2	PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1	48
6	Diskuze.....	50
6.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	50
6.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	51

6.3	Polymerázová řetězová reakce specifická pro rod <i>Lactobacillus</i>	52
6.4	Polymerázová řetězová reakce specifická pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	52
6.5	Polymerázová řetězová reakce specifická pro druh <i>Lactobacillus casei</i>	53
6.6	PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM	53
6.7	PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1	53
7	Závěr.....	54
8	Použitá literatura	55
9	Seznam použitých zkratk.....	58

1 ÚVOD

Magnetické částice si v poslední době získávají více pozornosti, a to převážně v oblastech biotechnologie, medicíny, inženýrství a v oblastech životního prostředí. Zásahu na tomto rozmachu mají jejich magnetické vlastnosti a jedinečná velikost.

Biotechnologické aplikace patří mezi oblasti, které se nejvíce soustřeďují na magnetické částice z důvodu jejich potencionálního využití při cílené distribuci látek, separaci buněk nebo molekul, izolaci nukleových kyselin a mnoho dalších. Schopnost částic reagovat na působení vnějšího magnetického pole umožňuje jejich řízený pohyb uvnitř organismu nebo uvnitř zkoumaného materiálu a tato vlastnost je pro biotechnologické aplikace klíčová. Jelikož jsou magnetické částice tvořeny anorganickým materiálem, jako je např. magnetit, je neméně důležitá také povrchová úprava částic, která zajišťuje jejich biokompatibilitu a umožňuje navázání a přenos potřebných látek. Kovové magnetické částice bez povrchové úpravy jsou náchylné k oxidaci, což může vést ke ztrátě magnetismu a k agregaci částic.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Magnetické částice

Aplikace magnetických částic je založena na jejich magnetických vlastnostech, materiálech, ze kterých jsou částice tvořeny, na velikosti a na možnosti navázání dalších látek na jejich povrch. Magnetické vlastnosti částic zajišťuje jejich anorganické jádro. Imobilizaci molekul na povrch magnetických nosičů umožňuje jejich povrchová úprava, která také zajišťuje biokompatibilitu a stabilitu daných nosičů. [1]

2.1.1 Magnetické vlastnosti

Podstata magnetismu, jakožto silového působení na nabitě částice a schopnost nanočástic reagovat na působení vnějšího magnetického pole se odvíjí od typu magnetického materiálu, kterým je příslušná částice tvořena. Existují tři základní druhy těchto materiálů, dělené podle jejich magnetického momentu a jejich odezvy na magnetické pole - feromagnetické, diamagnetické a paramagnetické. [2]

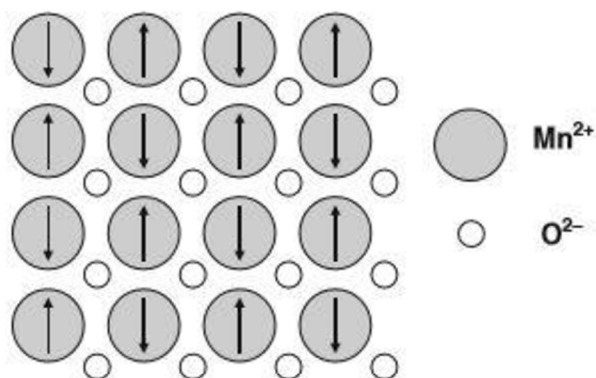
2.1.1.1 Diamagnetické materiály

Diamagnetické materiály vykazují diamagnetismus, což je magnetismus, který je velmi slabý a není permanentní. To znamená, že přetrvává jen tak dlouho, dokud je přítomno působení magnetického pole. V nepřítomnosti magnetického pole je magnetický moment takovýchto látek nulový. Magnetické momenty působícího pole a diamagnetické látky mají opačný směr, což vyvolá zeslabení vnějšího magnetického pole. [2]

2.1.1.2 Feromagnetické materiály

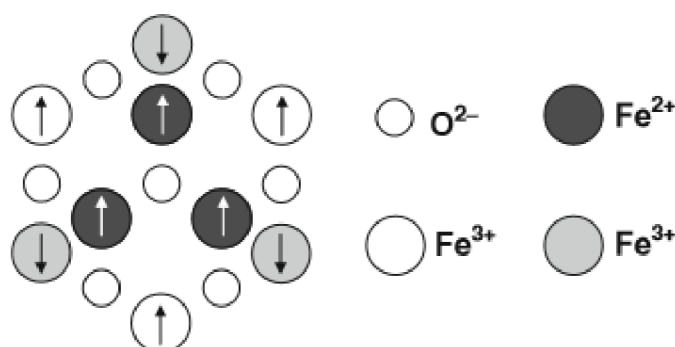
Feromagnetismus patří mezi nejznámější a nejčastěji se vyskytující formu magnetismu. Tato forma magnetismu vykazuje permanentní magnetický moment, tedy i v nepřítomnosti působení vnějšího magnetického pole. Citlivost těchto materiálů na působení magnetického pole je velmi vysoká. To je způsobeno tím, že magnetické momenty jednotlivých atomů mají tendenci se mezi sebou spojovat a orientovat se ve směru vnějšího magnetického pole.

Některé látky vykazují antiferomagnetismus, což je zvláštní forma feromagnetismu. V důsledku spojování magnetických momentů mezi atomy dochází k tomu, že spiny sousedících částic mají obrácený směr. V tomto případě nedochází ke vzniku sítě magnetických momentů, jelikož se tyto momenty vzájemně vyruší. Příkladem antiferomagnetické látky může být oxid manganatý. [2] Obr. 1 znázorňuje obrácený směr spinů sousedících atomů.



Obr. 1 Opačné smery spinů sousedících atomů oxidu manganatého. Převzato z [2]

Další formou feromagnetismu je ferimagnetismus. Látky vykazující tento magnetismus jsou sloučeny z částic s různým nábojem a jejich magnetické momenty jsou také rozdílné. Díky tomu se magnetické momenty zcela nevyruší a v tomto případě dochází ke vzniku sítě magnetických momentů. [2] Obr. 2 znázorňuje magnetické momenty ferimagnetické látky.

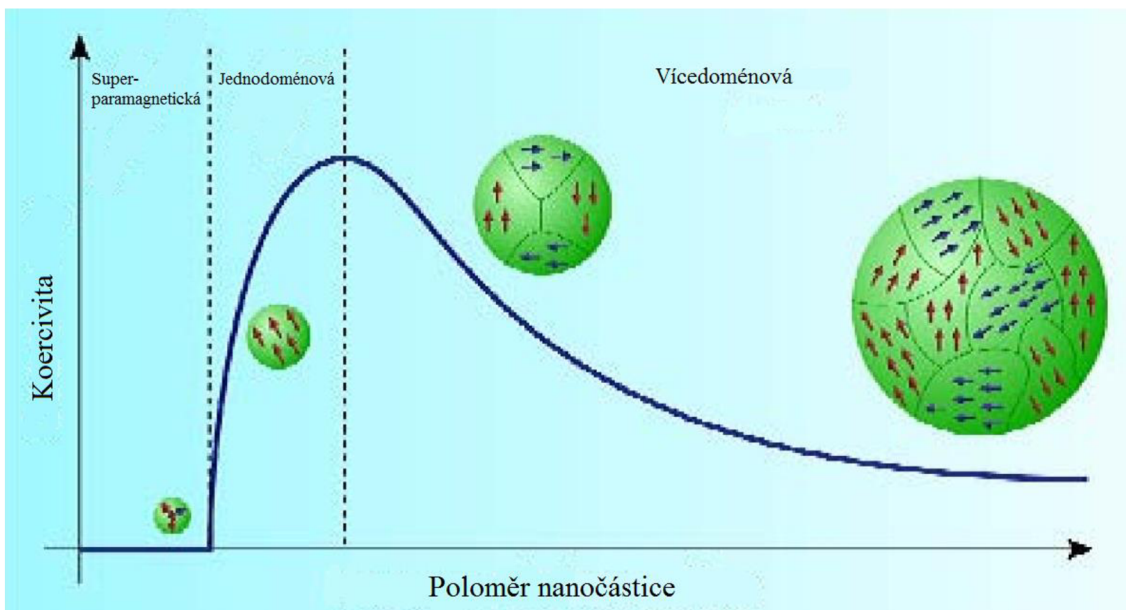


Obr. 2 Magnetické momenty ferimagnetického Fe_3O_4 . Převzato z [2]

2.1.1.3 Paramagnetické materiály

Paramagnetické materiály se vyznačují paramagnetismem. Tato forma magnetismu se vyskytuje jen za přítomnosti působení vnějšího magnetického pole. Atomy tvořící tyto látky mají permanentní dipólový moment díky neúplnému vyrušení magnetických momentů jejich elektronů. Po aplikaci vnějšího magnetického pole dojde k natočení magnetických dipólů ve směru magnetického pole a tím dojde ke vzniku výsledného magnetického momentu, který má stejnou orientaci jako byla původní orientace vnějšího magnetického pole.

Superparamagnetismus je formou paramagnetismu. Superparamagnetické částice mají nulovou magnetizaci v nepřítomnosti magnetického pole, avšak po jeho aplikaci je jejich magnetizace velmi silná. Také zbytková magnetizace, tzv. remanence, a odolnost magnetických částic vůči změnám v magnetizaci, tzv. koercivita, je nulová. Tendence k aglomeraci částic se v tomto případě téměř nevyskytuje. [3] Na Obr. 3 je znázorněna závislost koercivity na poloměru částice.



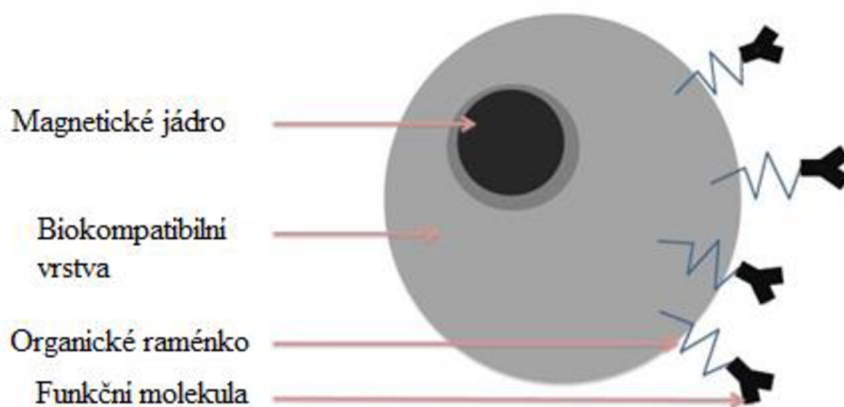
Obr. 3 Závislost koercivity na poloměru nanočástice. Upraveno dle [4]

2.1.2 Velikost magnetických částic

Velikost magnetických částic se pohybuje nejčastěji v nano- a v mikroměřítku. Upřednostňovaná velikost nanonosičů je v rozmezí 10 až 20 nm. Takovéto nanočástice jsou superparamagnetické, mají tedy jednodoménovou strukturu a jejich koercivita i zbytková magnetizace je nulová. V případě mikronosičů se jejich velikost pohybuje většinou v rozmezí 0,1 až 100 μm . Příliš malé magnetické částice jsou velmi málo citlivé na působení vnějšího pole a příliš velké částice vykazují odolnost vůči působení magnetického pole. [1] Výhodou nanočástic je však jejich koloidní stabilita, což umožňuje jejich přesnější dávkování v porovnání s mikročásticemi. Větší částice mohou mít naopak tendenci sedimentovat. V poměru k jejich velikosti však mají nano- a mikročástice obrovský povrch, na který lze navázat různé látky. Nanočástice jsou vhodnější pro adsorpci malých molekul, naopak mikročástice snadněji vážou větší molekuly. [5]

2.1.3 Struktura magnetických částic

Biotechnologické aplikace vyžadují enkapsulaci magnetických částic vhodnou biokompatibilní a biodegradabilní vrstvou. Enkapsulace se provádí buďto během, nebo po přípravě magnetických částic. Povrchová úprava nosičů je důležitá převážně ze dvou hlavních důvodů, a to, aby nedocházelo k agregaci částic, a aby mohly být částice vystaveny kontaktu s biologickým materiálem, aniž by docházelo k nežádoucím vedlejším efektům, jako jsou například toxicita nebo různé mutagenní reakce. Na obal částic lze dále navázat léky nebo jiné molekuly. Navázání látek je většinou zprostředkováno adsorpcí nebo kovalentními vazbami. [4] Obr. 4 znázorňuje strukturu částice.



Obr. 4 Struktura magnetické částice. Upraveno dle [6]

Magnetické nosiče jsou také charakterizovány látkami, které tvoří magnetické jádro částice a povrchovou vrstvu. [3]

2.1.3.1 Jádru magnetických částic

Jádru magnetických nosičů zodpovídá za magnetické vlastnosti a je schopné reagovat na působení vnějšího magnetického pole. V nepřítomnosti magnetického pole mají částice nulovou magnetizaci. Magnetické plnivo tedy musí být tvořeno materiálem vykazujícím superparamagnetické vlastnosti. Jádra částic mohou být tvořena přechodnými kovy (např. Fe, Ni), magnetickými slitinami (např. Sm-Co) nebo oxidy kovů (např. Fe_3O_4). Nejčastěji využívanými jsou jádra tvořená oxidy kovů, jako jsou oxidy železa, manganu, zinku a kobaltu, neboť jsou méně toxická a méně náchylná k oxidaci oproti čistým kovům. [3]

Jádra magnetických částic tvořená čistými kovy, jako například železem, kobaltem nebo niklem, vykazují vysokou hodnotu saturační magnetizace. Oproti tomu jsou ale vysoce toxická a náchylná k oxidaci. [3] Kovová jádra jsou většinou chráněna vrstvou zlata nebo křemíku. [7]

Jádra tvořená oxidy železa disponují vysokou citlivostí na magnetické pole, chemickou stabilitou, biodegradabilitou, biokompatibilitou, nejsou toxické, nejsou karcinogenní a jejich příprava je relativně snadná. Příkladem může být magnetit (Fe_3O_4) nebo maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Tyto materiály jsou využívány například při magnetické rezonanci jako kontrastní činidla nebo v různých amplifikačních technikách. [3] [5]

Magnetické částice mohou být také tvořeny kovem dopovanými oxidy železa. Příkladem kovem dopovaných oxidů železa mohou být ferit kobaltu (CoFe_2O_4), ferit manganu (MnFe_2O_4) a ferit niklu (NiFe_2O_4). Tyto materiály disponují vysokou hodnotou saturační magnetizace a chemickou stabilitou. Ferit manganu je citlivější na působení magnetického pole než ostatní ferity, a proto by mohl být využíván jako ultracitlivá sonda při magnetické rezonanci. Kovem dopované oxidy železa jsou však stále studovány, protože některé částice mají škodlivý vliv na DNA. Například částice tvořené feritem kobaltu jsou genotoxické pro jaterní tkáň. [5]

2.1.3.2 Povrchová vrstva magnetických částic

Povrchová úprava magnetických částic hraje klíčovou roli pro možnost jejich dalšího využití v biotechnologických aplikacích. Částice bez této úpravy mají tendenci k agregaci kvůli jejich vysoké povrchové energii a jejich hydrofobním vlastnostem. [7] Shlukování částic pak vede k nárůstu jejich velikosti a tím ztrácejí své superparamagnetické vlastnosti. Magnetická plniva bez povrchové úpravy vykazují toxické vlastnosti, které jsou v oblastech biotechnologie nežádoucí.

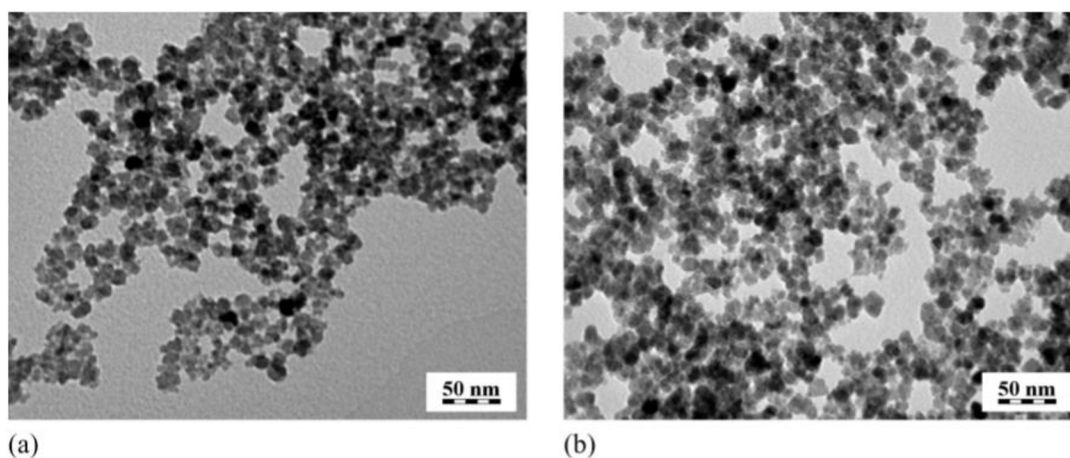
Povrchová úprava nosičů závisí na tom, do jakého prostředí má být částice aplikována nebo jaká látka má být na částici navázána. Povrchový náboj nosičů hraje také důležitou roli. Nejvýhodnější je stejný náboj u všech částic, neboť jejich disperze je díky tomu stabilnější.

Existuje celá řada materiálů, které mohou být použity pro povrchovou úpravu magnetických nosičů, jako například organické i anorganické materiály a polymery. Z anorganických materiálů může být jako příklad uveden uhlík, zlato, které je velmi stabilní, nebo oxid křemičitý. Mezoporézní vlastnosti oxidu křemičitého zvyšují velikost povrchu částic, aniž by byla výrazně ovlivněna magnetizace dané částice. [3] Z polymerů mohou být pro povrchovou úpravu použity například kyselina hyaluronová nebo alginová, z polysacharidů albumin, celulóza, chitin nebo chitosan. Výhodou těchto materiálů je jejich inertnost, biokompatibilita a netoxičita. Nevýhodou u některých z těchto materiálů může být jejich nízká mechanická pevnost. [1]

2.2 Charakteristika magnetických částic

V předkládané bakalářské práci budou testovány 4 druhy magnetických nosičů pro izolaci DNA. Z nanočástic budou použity polylysinové částice (F79/L3-PLL) a nanonosiče manganatého peroskvitu pokryté vrstvou silikagelu. Z mikročástic budou testovány komerčně dostupné MPG částice a glycidylmethakrylátové částice (Fkol 77ox).

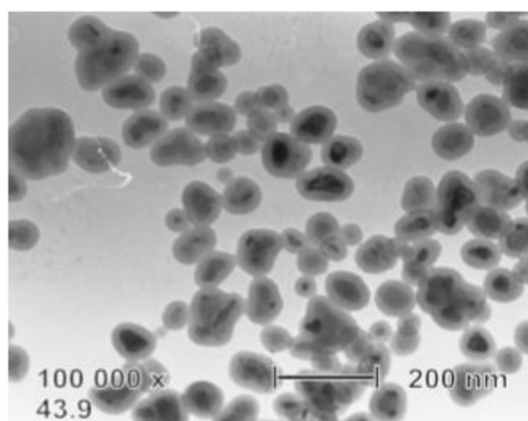
Polylysinové nanočástice jsou povrchově modifikované poly(L-lysinem). Byly připraveny srážením železnatých a železitých solí spolu s hydroxidem amonným. Vzniklý magnetit byl oxidován roztokem chlornanu sodného na maghemit. Na závěr byl přidán vodný roztok poly(L-lysinu). [8] Polylysinové částice lze vidět na Obr. 5.



Obr. 5 TEM snímek a) nanočástic oxidu železa, b) polylysinových nanočástic. Převzato z [8]

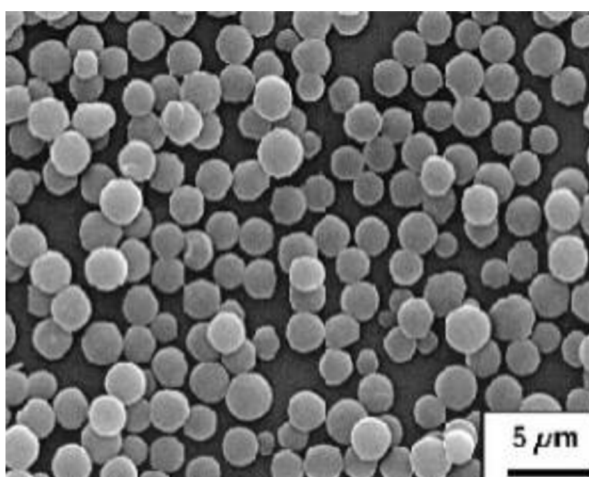
Peroskvitové nanočástice ($\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$) byly připraveny metodou sol-gel. Následně byly mechanicky a tepelně opracované. Magnetická jádra byla potažena rovnoměrnou vrstvou

oxidu křemičitého za použití tetraethoxysilanu (TEOS). Koloidně stabilní suspenze byly získány frakcionalizací částic dle velikosti. [1] Nosiče peroskvitu manganatého potažené vrstvou silikagelu jsou zobrazeny na Obr. 6.



Obr. 6 Elektronový snímek nanočástic peroskvitu manganatého $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$. Převzato z [1]

P(HEMA-*co*-GMA) - Poly(hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidylmethakrylátové) mikročástice byly získány disperzní kopolymerizací polymerů HEMA (hydroxyethylmethakrylát) a GMA (glycidylmethakrylát) ve směsi toluen-2-methylpropan-1-ol stabilizované acetát-butyrát celulosy (CAB). Nosiče byly dále funkcionalizovány zavedením karboxylových skupin oxidací methylen hydroxylových skupin. [1] P(HEMA-*co*-GMA) částice jsou zobrazeny na Obr. 7.



Obr. 7 Mikročástice P(HEMA-*co*-GMA). Převzato z [1]

Pro kontrolu byly v této práci použity komerčně dostupné magnetické mikronosiče MPG ® uncoated (MCPG0510), (Millipore Corp., USA). [1]

2.3 Biotechnologické aplikace magnetických částic

Magnetické částice jsou v biotechnologických aplikacích stále častěji využívány díky možnosti jejich manipulace prostřednictvím působení vnějšího magnetického pole. Velký povrch

magnetických nosičů umožňuje navázání celé řady ligandů a dále rychlou imobilizaci a separaci biologicky aktivních látek. [1] Výhodou je také možnost automatizace procesu a snadná manipulace s magnetickými nosiči. Magnetické separace jsou rychlé, není tudíž zapotřebí časově náročných metod jako jsou například filtrace nebo centrifugace, při kterých dochází ke zředování vzorku nebo může docházet ke ztrátám nosičů během promývání. [9]

2.3.1 Cílená distribuce látek

Klasické metody a léčebné způsoby (jako např. injekční nebo perorální podání léku) nejsou schopny dopravit požadovanou látku nebo léčivo přímo na cílové místo a dané látky jsou distribuovány i do míst, kde nejsou zapotřebí a kde mohou způsobovat vedlejší efekty. Nedostatečná absorpce léčiva v požadované oblasti může být dalším negativním jevem. Cílená distribuce látek pomocí magnetických nosičů představuje vhodnou metodu pro dopravení navázané látky na požadované místo prostřednictvím působení vnějšího magnetického pole. [4]

Magnetické částice nejdříve slouží jako nosič látky. Daná látka je navázána na povrch částice a poté jsou nosiče vpraveny do organismu nebo do zkoumaného systému. Následně je aplikováno vnější magnetické pole, pomocí kterého jsou částice dopraveny do cílové oblasti. [2] V cílové oblasti je pak nutné uvolnění navázané látky z částicového povrchu, které je možné uskutečnit difúzí látky z povrchu částice do prostředí, degradací polymerního obalu nebo bobtnáním navázaných látek, které je následováno jejich difúzí. [10]

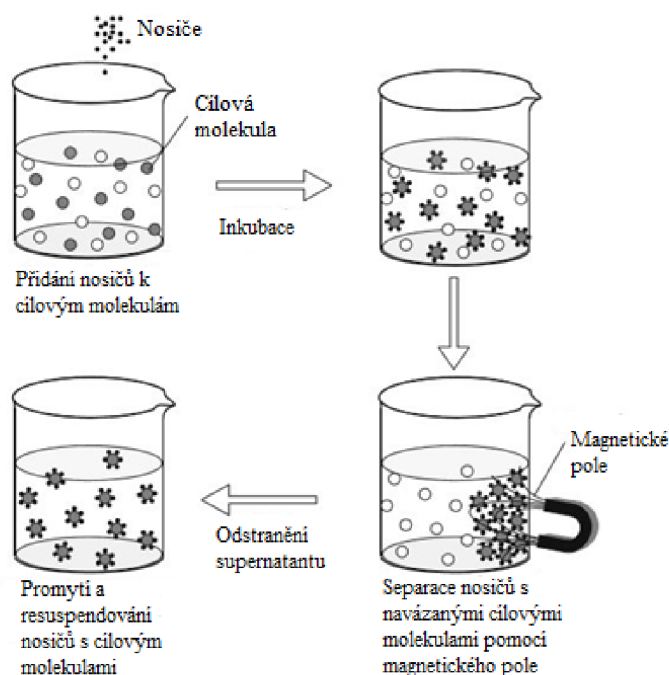
Výhodou nanočástic v případě cílené distribuce léčiv je jejich velikost, díky které jsou hůře rozpoznatelné pro fagocyty. Příliš malé nanočástice však mohou být odplaveny tělními tekutinami z cílené oblasti dříve, než dojde k uvolnění požadované dávky léčiva. Mikročástice jsou naopak pro fagocytární buňky snadněji rozpoznatelné. [4]

2.3.2 Bioseparace

Bioseparace využívající magnetické částice jsou rychlé, účinné a umožňují separovat různé biomolekuly, jako například proteiny, nukleové kyseliny, sacharidy a jiné biologicky aktivní látky z jejich přirozeného prostředí.

Bioseparace je založena na rozdílné afinitě cílových molekul k magnetickým částicím a k jejich okolí. [2] Separace může být prováděna přímou nebo nepřímou metodou.

Přímá metoda spočívá v tom, že se na magnetické nosiče nejprve naváže ligand, který bude dále zprostředkovávat vazbu s cílovými molekulami. Částice s ligandem jsou na určitý čas inkubovány spolu se vzorkem cílových molekul. Tyto molekuly se postupně navážou na ligandy a utvořený komplex lze dále separovat za použití vnějšího magnetického pole. [10] Přímá metoda je schematicky znázorněna na Obr. 8.



Obr. 8 Přímá metoda bioseparace. Upraveno dle [2]

V nepřímé metodě nejdříve reagují cílové molekuly s ligandem. Sekundární protilátka je imobilizovaná na magnetických nosičích a tento celek je následně přidán do roztoku, ve kterém jsou cílové molekuly navázané na ligandy. Protilátky poté reagují s ligandy a separace je prováděna působením vnějšího magnetického pole. [11]

Nevýhodou při bioseparacích může být to, že spolu s cílovými molekulami mnohdy dochází k separaci jiných molekul. Například v případě izolace DNA může být spolu s DNA izolována také RNA nebo proteiny. [10]

Významné využití nachází bioseparace pomocí magnetických částic při separaci enzymů, protilátek, nádorových a kmenových buněk nebo při separaci patogenních mikroorganismů z potravin apod. [9]

2.3.3 Imobilizace biologicky aktivních látek

Na magnetické nosiče byla imobilizována celá řada vysokomolekulárních i nízkomolekulárních biologicky aktivních látek, například proteiny, protilátky, enzymy, nukleové kyseliny, hormony, léčiva apod. Jejich imobilizaci lze provádět různými způsoby, jako je například imobilizace kovalentními vazbami, fyzikální sorpcí anebo zabudování biologicky aktivních látek do magnetické gelové matrice. Tyto gelové matrice jsou tvořeny syntetickými polymery, proteiny a polysacharidy a jejich hlavní výhodou je schopnost zadržovat vodu, což je nezbytné pro uchování biologické aktivity imobilizovaných látek. Gelová matrice má vlastnosti blízké fyziologickým podmínkám, díky čemuž se snižuje riziko denaturace těchto látek. Nevýhodou gelového prostředí může být postupné uvolňování imobilizované látky.

Enzymy jsou významnými biopolymery a slouží jako katalyzátory chemických reakcí, které probíhají v živých organismech. Imobilizací enzymu na magnetický nosič lze dosáhnout vyšší

stability a aktivity enzymu, rozšíření rozsahu optimální teploty nebo vyšší afinity enzymu k substrátu. Mezi největší výhody imobilizovaných enzymů na magnetických nosičích patří to, že takto modifikované enzymy lze použít opakovaně, což se hodí v případě, kdy je využíván drahý enzym. Další výhodou je jejich snadná manipulace na rozdíl od volných enzymů. To může být výhodné v případě, kdy je přítomnost enzymu ve výsledném produktu nežádoucí. [12] [13]

Dalšími významnými proteiny jsou protilátky, které se využívají pro stanovení biologicky aktivních látek a xenobiotik a hrají důležitou roli v rámci imunitního systému. Imobilizace protilátek na magnetický nosič poskytuje výhodu v možnosti snadného odstranění komplexu antigen-protilátka z roztoku. Problém v tomto případě může být s vhodnou orientací rozpoznávacího místa a se zachováním biologické funkce dané protilátky. Řešením tohoto problému je využití sekundární protilátky jakožto spojovacího prvku mezi pevným nosičem a primární protilátkou. Sekundární protilátka zároveň umožňuje vhodnou orientaci protilátky primární. [12]

2.3.4 Izolace a purifikace DNA

Izolace a purifikace DNA je důležitým krokem pro možnost další práce s nukleovými kyselinami, neboť nukleové kyseliny se nachází v biologickém materiálu s celou řadou dalších látek a biomolekul. DNA může být izolovaná z rostlin, půdy, tkání, tělních tekutin nebo z mikroorganismů. Spolu s DNA se může na povrch částic navázat ale také RNA, což může zkreslovat výsledky další analýzy. Vysoká čistota a kvalita izolované DNA je nezbytná také pro amplifikaci DNA metodou polymerázové řetězové reakce.

Velmi často používanou metodou pro izolaci DNA je fenol-chloroformová extrakce. Tato metoda je však časově náročná a vyžaduje centrifugaci. Z toho důvodu jsou pro izolaci DNA využívány i jiné metody, mezi které patří i izolace DNA pomocí magnetických částic.

Izolace DNA spočívá ve dvou krocích. Nejdříve musí dojít k navázání molekul DNA na povrch částic a následně jsou magnetické částice spolu s DNA odseparovány ze vzorku. Aby se molekula DNA mohla navázat na magnetický nosič, musí tento nosič na svém povrchu nést vhodné funkční skupiny.

Povrch magnetických částic může být pokryt oxidem křemičitým, který má vysokou vazebnou kapacitu pro molekuly DNA. Z tohoto důvodu jsou tyto částice často využívány pro izolaci DNA v řadě aplikací. Příkladem může být izolace DNA z půdy nebo z bakteriálních buněk. Nevýhodou u těchto nosičů je to, že ne všechny molekuly DNA se z matrice oxidu křemičitého eluují. Určitá část navázaných nukleových kyselin zůstává zachycena na povrchu nosičů.

Magnetické částice mohou být pokryty také vrstvou polymeru. Velmi často používaným je v tomto případě polystyren. Kvůli jeho hydrofobním vlastnostem však může docházet v průběhu purifikace nukleových kyselin k navázání proteinů na magnetický nosič. Dalšími často používanými magnetickými nosiči jsou nosiče pokryté vrstvou P(HEMA-*co*-EDMA) (poly(2-hydroxyethylmethakrylát-*co*-ethylendimethakrylátu)), P(HEMA-*co*-GMA) nebo PGMA (poly(glycidylmethakrylátu)), jejichž hydroxidové skupiny byly oxidovány na karboxylové skupiny. Aby však mohlo dojít k adsorpci záporně nabitých molekul DNA

na karboxylové skupiny, musí být v reakčním roztoku přítomen PEG 6000 (polyethylenglykol) a chlorid sodný. Pomocí těchto magnetických nosičů byla úspěšně izolovaná plazmidová i bakteriální DNA z různých komplexních vzorků. [5]

2.3.5 Molekulární diagnostika

Magnetické nosiče nachází uplatnění také na poli molekulární diagnostiky. Využívají se k detekci mikroorganismů, přítomnosti protilátek a antigenů nebo k detekci různých onemocnění. Detekce spočívá ve specifické interakci protilátky a antigenu. Magnetické částice mají na svém polymerním obalu navázané primární protilátky, které specificky interagují s určitým antigenem. Po přidání sekundární fluorescenčně značené protilátky lze detekovat přítomnost hledané látky. [14]

2.4 Polymerázová řetězová reakce

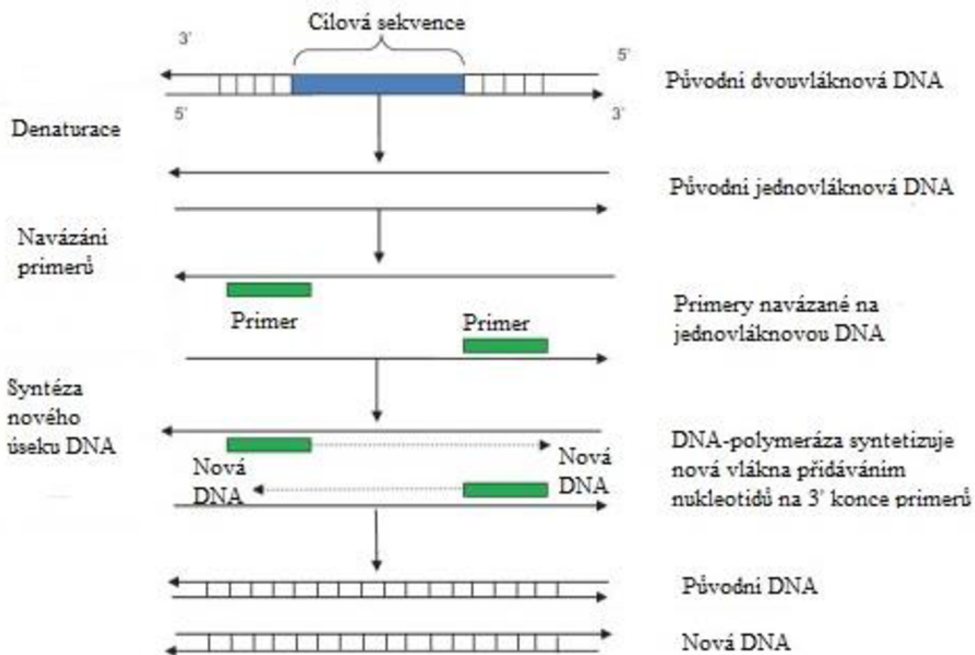
Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, kterou experimentálně provedl jako první Kary Mullis v letech 1980. [15] Průběh PCR je řízen enzymy za účelem amplifikace krátkých cílových úseků DNA. Tato reakce probíhá *in vitro*. Aby mohla být DNA amplifikována, je nutné znát přesné pořadí nukleotidů daného cílového úseku DNA. Na základě této sekvence nukleotidů jsou vybrány a do reakční směsi přidány krátké oligonukleotidy, které se nazývají primery a které jsou pro hledaný úsek komplementární. Primery se na základě komplementarity bází naváží na cílové místo v molekule DNA. [16] Samotné kopírování deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je zprostředkováno enzymem, který se nazývá DNA-polymeráza. Nejčastěji využívanou je termostabilní *Taq* DNA-polymeráza, která je izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. [15] Amplifikace DNA spočívá ve 3 krocích, které se cyklicky opakují.

Termostabilita použitého enzymu je důležitá z toho důvodu, že v prvním kroku PCR musí být molekula DNA denaturována. V průběhu denaturace je roztok s DNA zahřát na 94 °C, přičemž se dvouvláknová molekula deoxyribonukleové kyseliny rozvolní za vzniku dvou samostatných jednovláknových DNA.

Druhým krokem v amplifikaci DNA je ochlazení reakční směsi na 50-58 °C a přidání primerů. Primery se následně naváží dle komplementarity bází na cílový úsek jednovláknových molekul DNA. Navázané primery slouží jako základ pro syntézu nového komplementárního vlákna DNA.

Jakmile dojde k navázání primerů, je reakční směs zahřata na 72 °C. DNA polymeráza následně začíná syntetizovat nové vlákno ve směru 5'→3' připojováním jednotlivých nukleotidů ke koncům primerů dle komplementarity bází.

Poté co jsou vytvořeny dvě nové dvouvláknové molekuly deoxyribonukleové kyseliny, je reakční směs zahřata znovu na 94 °C, aby mohlo opět dojít k denuraci a amplifikaci nových molekul DNA. [17] Průběh PCR je znázorněn na Obr. 9.



Obr. 9 Princip polymerázové řetězové reakce. Upraveno dle [17]

Počet amplifikačních produktů tedy vzrůstá exponenciálně a po n cyklech by v reakční směsi bylo 2^n molekul DNA s danou specifickou sekvencí. Ve skutečnosti však po několika cyklech dojde k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se již dále nemění a reakce se ustálí. Přítomnost amplikonů v reakční směsi u klasické PCR je pak zjišťováno většinou stanovením jejich velikosti pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu. [17] Tato metoda je však časově náročná, proto se i tento fakt stal jedním z důvodů, proč byla vyvinuta real-time PCR. [15]

2.4.1 Real-time PCR

Real-time PCR je metoda umožňující sledování množství amplikonů v průběhu reakce. Odtud také název polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Real-time PCR měří množství amplikonů v průběhu exponenciální fáze PCR. Množství produktů PCR závisí na množství templátové DNA, která byla do reakce na začátku přidána. Existují různé způsoby kvantifikace produktů v průběhu PCR, jako jsou například metody využívající interkalační barviva vázající se na DNA, fluorescenčně značené sondy nebo fluorescenčně značené primery. Interkalační barviva, fluorescenčně značené sondy a primery jsou látky, které v průběhu amplifikace vykazují změnu v intenzitě fluorescence. V průběhu PCR je tedy měřena změna intenzity fluorescenčního záření na počtu cyklů PCR. S rostoucím počtem cyklů roste množství amplikonů a tím vzrůstá i intenzita fluorescence. [15]

Real-time PCR je rychlá, extrémně citlivá metoda, která dokáže kvantifikovat DNA ve velmi širokém rozmezí koncentrací a umožňuje analýzu malých množství vzorku. Pomocí této metody je možné stanovit množství templátové DNA, které bylo v roztoku přítomno před začátkem PCR.

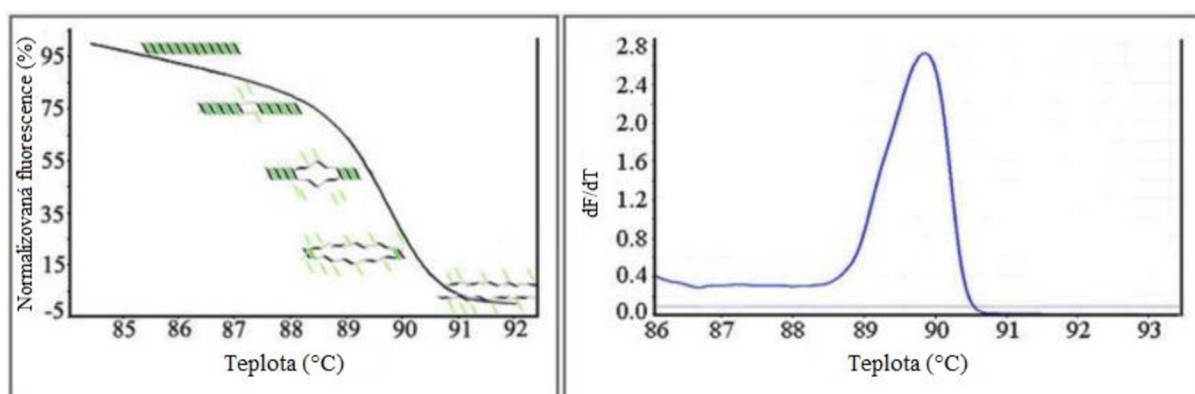
Nevýhodou polymerázové řetězové reakce je to, že v reakční směsi mohou být přítomny inhibiční látky, které negativně ovlivňují průběh PCR. Také sekvence primerů používaných v průběhu amplifikace musí být přesná a specifická, proto je nutné znát přesné pořadí nukleotidů cílového úseku DNA. [15] [17]

Real-time PCR nachází uplatnění v celé řadě odvětví. Jako příklad oborů, kde je tato metoda velmi oblíbenou a často aplikovanou, lze uvést genetickou analýzu, klonování a sekvenování genů, detekci mikroorganismů, nedílnou součástí tato metoda tvoří také při detekci onkologických onemocnění a genetických mutací. [17]

2.4.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Vysokorozlišovací analýza křivek tání je relativně nová post-PCR metoda, která se využívá k detekci mutací a změn v sekvenci DNA. Tato metoda je velmi citlivá a je založena na rozpoznávání malých rozdílů ve tvaru křivek tání a v hodnotách teplot tání jednotlivých analyzovaných vzorků. [18] HRM metoda umožňuje detekci jednonukleotidových změn v sekvencích DNA, čímž je umožněna velmi přesná identifikace a specifikace PCR produktu. [19]

Cílový úsek DNA je nejdříve amplifikován pomocí real-time PCR za přítomnosti fluorescenčního barviva. Toto barvivo je vysoce fluoreskující, pokud je navázané na dsDNA. V případě, že navázané není, nevykazuje téměř žádnou fluorescenci. Právě tyto změny v intenzitě fluorescence umožňují sledovat průběh amplifikace DNA. Po posledním cyklu PCR je amplifikovaný úsek DNA zahříván, čímž dochází k denaturaci dvoušroubovice DNA a tím dochází k postupnému uvolňování fluorescenčního činidla, a tedy i k poklesu intenzity fluorescence. K nejvyššímu poklesu intenzity fluorescence dochází v případě dosažení teploty tání (T_m) amplifikovaného produktu. Teplota tání je definována jako teplota, při které došlo k denaturaci 50% amplifikovaného produktu PCR. Tato teplota je tím vyšší, čím je vyšší je obsah GC párů bází v sekvenci amplikonu. Výsledkem je křivka závislosti klesající intenzity fluorescence na zvyšující se teplotě a tato křivka se nazývá křivka tání. Derivací křivky tání se získá pík, na základě kterého se určí teplota tání (Obr. 10). [20]



Obr. 10 Křivka tání (vlevo) a derivace křivky tání (vpravo). Upraveno dle [21]

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování literárního přehledu na téma využití magnetických nano- a mikročástic a jejich potenciální a praktické aplikace v biotechnologii.

Experimentální část práce byla zaměřena na aplikaci vybraných typů magnetických částic za účelem izolace nukleových kyselin a vyhodnocení kvality izolované DNA s ohledem na čistotu a množství DNA pomocí metody polymerázové řetězové reakce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný, 10% (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol, 70% (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Chlorid sodný, 5M (Lachema, Brno, ČR)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Polyethylen glykol, 40% (PEG 6000) (FLUKA BioChemika, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)

4.1.2 Přístroje

- Centrifuga FVL-2400N Combi-Spin/Vortex (bioSan, Riga, Litva)
- Centrifuga miniSpin plus 14 500 ot/min (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exsikátor (KIF LAB)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- LightCycler® Nano
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikropipety Finnpipeette F2 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniIncubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- Thermocycler Minicycler™ (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR-3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Špičky z umělé hmoty
- Laboratorní sklo
- Další laboratorní pomůcky (buničina...)

4.1.4 Roztoky

4.1.4.1 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk

- Lyzační pufr I (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)
- Lyzační pufr II (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; 3 mg/ml lysozymu)

4.1.4.2 Roztoky pro izolaci DNA

- TE pufr (1 M Tris-HCl (pH 7,8), 0,5 M EDTA (pH 8) a destilovaná voda)

4.1.4.3 Roztoky pro gelovou elektroforézu

- 0,5 × TBE pufr (Tris-base (54 g/l), kyselina boritá (27,5 g/l), destilovaná voda (980 ml) a 0,5 M EDTA (20 ml))

4.1.5 Komponenty pro PCR a qPCR

- qPCR 2× SYTO 9 Master Mix (2krát koncentrovaný 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva), (TopBio, Praha, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Bacteria* [22]
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* [22]
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus casei* [23]
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [23] [24]

4.1.6 Magnetické nosiče

Pro izolaci DNA byly použity 4 typy magnetických nosičů, jejichž charakteristika je uvedena v Tab. 1. Magnetické nosiče označené jako Fkol 77ox, F79/L3 PLL byly syntetizovány Ing. Danielem Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Nanonosiče manganatého perovskitu La_{0,75}Sr_{0,25}MnO₃ byly získány od Doc. Ing. E. Pollerta, DrSc. z Fyzikálního ústavu Akademie věd ČR v Praze. Magnetické nosiče MPG[®] uncoated (MCPG0510) byly zakoupeny v komerční síti (Millipore Corp., USA).

Tab. 1 Vlastnosti použitých částic

Částice	Fe (%hm.)	Průměr částice	Koncentrace (mg/ml)	PDI	-COOH (mM/g)	-NH ₂ (mM/g)	Polymer
Fkol 77ox	10,02	2,23 μm	2,00	1,81	0,764	-	P(HEMA-co-GMA)
MPG	-	5,00 μm	2,00	-	-	-	-
F79/L3-PLL	69,8	6,20 nm	0,10	1,37	-	69,8	-
Peroskvit	-	6,05 nm	2,00	n	-	-	-

Legenda: Fe (%) je hmotnostní obsah železa v magnetické částici, PDI je index polydispersity (poměr hmotnosti a počtu nosičů průměrné velikosti), P(HEMA-co-GMA) je poly(hydroxyethylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát), n – údaj nezjištěn.

4.1.7 Použité bakteriální kmeny a DNA

V průběhu experimentální části práce byly používány bakteriální kmeny získané z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms (CCM)) sídlící na Masarykově universitě v Brně (ČR):

- *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T

4.1.7.1 Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly

- *Lactobacillus gasseri* K7 (10 ng/μl)
- *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T (15,8 ng/μl)
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T (10 ng/μl)

Izolovaná DNA z uvedených bakteriálních kmenů byla poskytnuta Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D.

4.1.8 Kultivační média

4.1.8.1 MRS médium

MRS médium (Oxoid) bylo připraveno podle návodu výrobce uvedeného na obalu. Médium bylo následně vysterilizováno v autoklávu při 135 °C po dobu 10 minut.

4.2 Metody

Uvedené postupy byly s úpravami prováděny dle práce Španová a Rittich. [25]

4.2.1 Ožívování a uchovávání bakteriálních kultur

- Do 3 skleněných zkumavek bylo sterilně napipetováno po 10 ml tekutého MRS média.

- Do 2 zkumavek byly naočkovány příslušné bakteriální kultury a poslední zkumavka sloužila jako slepý vzorek. Kultury byly kultivovány po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C.
- Po 48 hodinách bylo 100 µl každé bakteriální kultury přeočkováno do 10 ml MRS média. Přeočkované kultury byly kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Kultury byly následně skladovány při teplotě 4 °C.

4.2.2 Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk

- Do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek bylo napipetováno po 1 ml bakteriální kultury. Kultura byla centrifugována při 13 400 ot/min po dobu 3 minut.
- Supernatant byl slit a sediment byl ponechán k okapání.
- Sediment byl následně rozsuspendován v 1 ml lyzačního pufru A a suspenze byla centrifugována při 13 400 ot/min po dobu 3 minut.
- K sedimentu bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru B a sediment byl dokonale rozsuspendován.
- Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě.
- K suspenzi bylo následně přidáno 25 µl 10% SDS a 5 µl proteinasy K a vzorky byly inkubovány při 55 °C po dobu 24 hodin.

4.2.3 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických nosičů

- Do 16 Eppendorfových zkumavek byly napipetovány jednotlivé komponenty podle Tab. 2 v uvedeném pořadí.
- Po smíchání komponent byly směsi inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.
- Směsi byly umístěny do magnetického separátoru na 5 minut při laboratorní teplotě.
- Následně byl odebrán supernatant a z magnetického separátoru byl vyjmut magnetický pás.
- Magnetické částice byly promyty 500 µl 70% ethanolu a odseparovány v magnetickém separátoru.
- Ethanol byl odpipetován a Eppendorfovy zkumavky spolu s částicemi byly umístěny do exsikátoru na vysušení.
- Adsorbovaná DNA byla z magnetických částic eluována do 50 µl TE pufru (pH 7,8) při laboratorní teplotě.
- Po 24 hodinách byly magnetické nosiče odseparovány v magnetickém separátoru a roztok s DNA byl přepipetován do čistých Eppendorfových zkumavek.

Tab. 2 Složení směsi pro izolaci DNA

Krok	Složka	Podíl (hm)
1	Voda	100
2	5 M NaCl	200
3	DNA	50
4	40% PEG 6000	100
5	Magnetický nosič (2 mg/ml)	50
Celkem		500

4.2.4 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

- Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena za použití přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).
- Měřený objem vzorku DNA byl 2 μ l.
- Přístroj byl kalibrován za použití TE pufru.
- Absorbance vzorku byla měřena při vlnových délkách 230 nm (vysoká hodnota absorbance při této vlnové délce značí znečištění fenolem), 260 nm (při této vlnové délce absorbují záření nukleové kyseliny maximálně) a při 280 nm (maximum absorbance při této vlnové délce značí znečištění proteiny).

4.2.5 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)

- Komponenty pro qPCR byly nejprve rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány.
- Směs pro qPCR byla připravena o celkovém objemu 25 μ l.
- Pořadí jednotlivých komponent pro PCR v reálném čase a jejich objemy byly použity v souladu s doporučením výrobce použitého qPCR SYTO 9 Master Mixu a jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3 Příprava směsi pro qPCR

	Komponenta	Objemy (μ l)	
		Doména <i>Bacteria</i>	Druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
1	Voda pro PCR	9,5	5,5
2	qPCR SYTO 9	12,5	12,5
3	Primer 1 (10 pmol/ μ l)	1,0	1,0
4	Primer 2 (10 pmol/ μ l)	1,0	1,0
5	Matrice DNA	1,0	5,0
Celkem		25,0	25,0

- Jako matrice DNA byla použita DNA jednotlivých vzorků izolovaná pomocí magnetických nosičů. DNA byla do reakční směsi přidávána jako poslední.

- Dále byla připravena negativní kontrola. Matrice DNA byla nahrazena stejným množstvím vody pro PCR.

4.2.6 Konvenční polymerázová řetězová reakce

- Komponenty pro PCR byly rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány.
- Směs pro PCR byla připravena o celkovém objemu 25 μ l.
- Pořadí jednotlivých komponent pro PCR a jejich objemy jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Příprava směsi pro konvenční PCR

	Komponenta	Objemy (μ l)		
		Rod <i>Lactobacillus</i>	Druh <i>Lactobacillus casei</i>	Druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
1	Voda pro PCR	19,0	19,0	19,0
2	10x reakční pufr kompletní	2,5	2,5	2,5
3	dNTP směs (10 mM)	0,5	0,5	0,5
4	Primer 1 (10 pmol/ μ l)	0,5	0,5	0,5
5	Primer 2 (10 pmol/ μ l)	0,5	0,5	0,5
6	Taq DNA polymeráza (1 U/ μ l)	1,0	1,0	1,0
7	Matrice DNA	1,0	1,0	1,0
Celkem		25,0		

- Jako matrice DNA byla použita DNA jednotlivých vzorků izolovaná pomocí magnetických nosičů. Do reakční směsi byla DNA přidána jako poslední.
- Dále byla připravena negativní kontrola. Matrice DNA byla nahrazena stejným množstvím vody pro PCR.
- Pro přípravu pozitivní kontroly byla jako matrice DNA použita DNA ze sbírkového kmene příslušného rodu nebo druhu.

4.2.6.1 PCR primery

- Na přípravu PCR směsi byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub) [22], rod *Lactobacillus* (F_all lact, R_all lact [22]) a pro druhy *Lactobacillus casei* (Cas/ParFW, UniverRV [23]) a *Lactobacillus rhamnosus* (RhamFW, UniverRV [23]; Pr I, Rha II [24]).
- Sekvence primerů specifických pro doménu *Bacteria* jsou uvedeny v Tab. 5 a pro rod *Lactobacillus* v Tab. 6. Sekvence primerů specifických pro druh *Lactobacillus casei* jsou uvedeny v Tab. 7 a pro druh *Lactobacillus rhamnosus* v Tab. 8.

Tab. 5 Primery specifické pro doménu *Bacteria* [22]

Primery	Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost PCR produktů
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

Tab. 6 Primery specifické pro rod *Lactobacillus* [22]

Primery	Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost PCR produktů
F_allact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp
R_allact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	

Tab. 7 Primery specifické pro druh *Lactobacillus casei* [23]

Primery	Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost PCR produktů
F_case_IS	CTA TAA GTA AGC TTT GAT CCG GAG ATT T	132 bp
R_case_IS	CTT CCT GCG GGT ACT GAG ATG T	

Tab. 8 Primery specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Primery	Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost PCR produktů	Reference
RhamFW	TTG CAT CTT GAT TTA ATT TTG ACC	683 bp	[23]
UniverRV	TTC GCC ACT GGT GTT CTT CC		
Pr I	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G	410 a 200 bp	[24]
Rha II	GCG ATG CGA ATT TCT ATT ATT		

4.2.6.2 PCR programy

- Amplifikace DNA byla provedena při různých teplotních programech v závislosti na použitých primerech.
- Teplotní program pro doménu *Bacteria* je uveden v Tab. 9. Teplotní program pro rod *Lactobacillus* je uveden v Tab. 10. Teplotní programy pro druh *Lactobacillus casei* a druh *Lactobacillus rhamnosus* jsou uvedeny v Tab. 11 a v Tab. 12.

Tab. 9 Teplotní program pro doménu *Bacteria*

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
30 cyklů				

Tab. 10 Teplotní program pro rod *Lactobacillus*

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
95 °C/5 min	94 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	30 cyklů			

Tab. 11 Teplotní program pro druh *Lactobacillus casei*

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
94 °C/5 min	94 °C/1 min	55 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/10 min
	30 cyklů			

Tab. 12 Teplotní program pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Primery	Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
RhamFW	94 °C/5 min	94 °C/1 min	58 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/10 min
UniverRV		35 cyklů			
Pr I	94 °C/5 min	94 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
Rha II		30 cyklů			

4.2.7 PCR-HRM

- Směs pro PCR-HRM byla připravena stejně jako v případě kvantitativní PCR (bod 4.2.5).
- Byly použity dva druhy primerů specifických pro rod *Lactobacillus*, a to primery V1F-HRM, V2F-HRM [26] a primery P1V1, P2V1 [27] (Tab. 13).

Tab. 13 Specifikace primerů použitých pro PCR-HRM

Primery	Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost PCR produktů	Reference
P1V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC	110 bp	[27]
P2V1	TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC		
V1F-HRM	CCT AAT ACA TGC AAG TCG AAC G	100 bp	[26]
V2R-HRM	GGT TAC CCA CGT GTT ACT CAC C		

- Byl spuštěn příslušný qPCR program specifický pro rod *Lactobacillus* společně s HRM analýzou. Amplifikační programy pro PCR-HRM jsou uvedeny v Tab. 14.

Tab. 14 Amplifikační programy pro PCR-HRM

Číslo kroku	Krok	Primery	Primery
		P1V1, P2V1	V1F-HRM, V2R-HRM
		Amplifikační program	
1	Prodloužená denaturace DNA	95 °C/5 min	95 °C/10 min
2	Denaturace DNA	95 °C/30 s	95 °C/10 s
3	Hybridizace primerů	52 °C/30 s	60 °C/15 s
4	Syntéza nových řetězců DNA	72 °C/1 min	72 °C/20 s
5	Dosyntetizování DNA	75 °C/5 min	72 °C/2 min
Počet cyklů (krok 2-4)		35	45
6	Analýza křivek tání (HRM)	Počáteční teplota	60 °C/1 min
		Krok	0,05 °C/1 s
		Konečná teplota	97 °C
			95 °C

- Vyhodnocení výsledků PCR-HRM analýzy bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software 1.1.

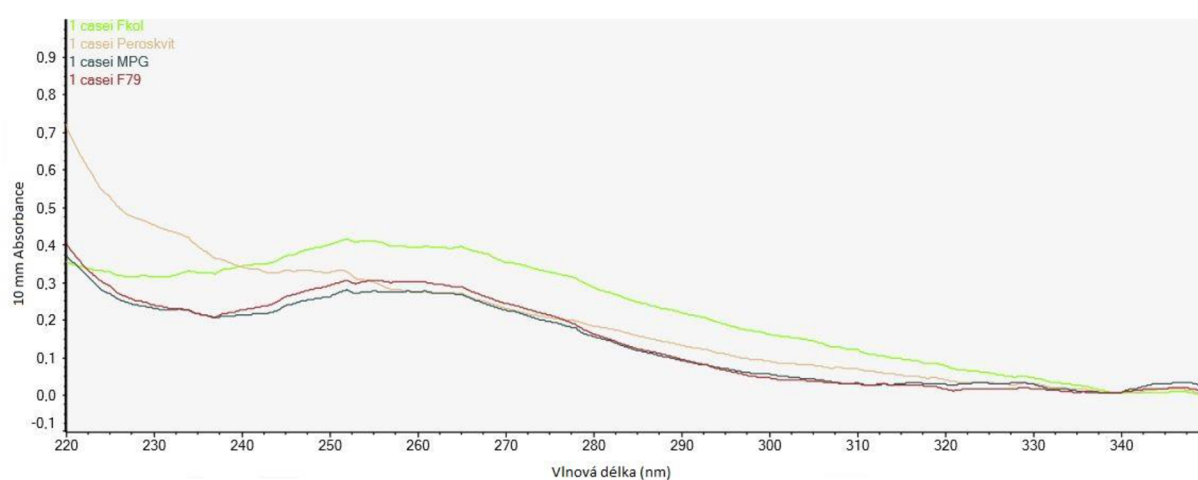
4.2.8 Gelová elektroforéza

- 1,6% gel: 1,6 g agarózy / 100 ml 0,5× TBE pufu
- 1,6 g agarózy bylo smícháno se 100 ml 0,5% TBE pufu, směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě a nalita do vaničky s hřebínkem, kde byla ponechána 30 minut ztuhnout. Po ztuhnutí byl z gelu odstraněn hřebínek.
- Jednotlivé vzorky po PCR byly po 15 µl smíchány se 3 µl PCR vkladacím pufrem Yeallow load a směsi byly nanášeny na gel.
- Na závěr bylo na gel naneseno 5 µl DNA standardu (100 bp).
- Gel byl vložen ve správné orientaci do elektroforetické vany a převrstven 0,5× TBE pufrem.
- Takto připravená souprava byla zapojena do zdroje stejnosměrného elektrického pole a elektroforéza probíhala po dobu 3 hodin při napětí 80 V.
- Gel byl po skončení elektroforézy barven v roztoku ethidium bromidu po dobu 30 minut.
- Po dobarvení byl gel pozorován pod UV světlem na transiluminátoru, vyhodnocen a dokumentován fotograficky.

5 VÝSLEDKY

5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované bakteriální DNA

Použitím přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) byla spektrofotometricky změřena absorbance jednotlivých vzorků izolované DNA. Měření bylo provedeno v rozmezí vlnových délek 230 – 280 nm. Na základě naměřených absorbancí byly stanoveny koncentrace vzorků nukleových kyselin, které jsou uvedeny v Tab. 15, Tab. 16 a Tab. 17. Současně byla touto metodou prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích. Na Obr. 11 je znázorněn výstup výsledků z přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) pro vzorky *Lactobacillus casei* z první paralely vzorků.



Obr. 11 Výstup z přístroje NanoDrop 2000c - závislost absorbance nukleových kyselin na vlnové délce

Tab. 15 Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin (NK) izolovaných z bakteriálního kmene *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T, které byly použity jako DNA matrice pro qPCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*

Vzorek	Paralela	Magnetický nosič	Koncentrace NK (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
<i>Lbc. casei</i>	1	F79/L3-PLL	14,7	0,294	0,157	1,87	1,26
	2	F79/L3-PLL	14,1	0,283	0,189	1,50	0,54
	1	MPG	13,4	0,269	0,150	1,80	1,20
	2	MPG	13,1	0,262	0,165	1,59	0,85
	1	Peroskvit	13,4	0,268	0,177	1,51	0,60
	2	Peroskvit	13,0	0,260	0,159	1,64	0,68
	1	Fkol 77ox	19,3	0,387	0,280	1,38	1,25
	2	Fkol 77ox	22,2	0,444	0,324	1,37	1,19

Tab. 16 Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin (NK) izolovaných z bakteriálního kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, které byly použity jako DNA matrice pro qPCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*

Vzorek	Paralela	Magnetický nosič	Koncentrace NK (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
<i>Lbc. rhamnosus</i>	1	F79/L3-PLL	7,3	0,147	0,084	1,75	0,54
	2	F79/L3-PLL	44,2	0,884	0,482	1,83	1,72
	1	MPG	42,9	0,859	0,595	1,44	0,60
	2	MPG	18,0	0,359	0,244	1,48	2,09
	1	Peroskvit	50,0	1,000	0,530	1,89	1,08
	2	Peroskvit	39,2	0,783	0,439	1,78	0,69
	1	Fkol 77ox	51,0	1,020	0,747	1,37	0,59
	2	Fkol 77ox	31,7	0,635	0,438	1,45	0,91

Tab. 17 Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin (NK) izolovaných z bakteriálních kmenů *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, které byly použity jako DNA matrice pro konvenční PCR za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus*, druh *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* a pro qPCR s využitím primerů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Vzorek	Magnetický nosič	Koncentrace NK (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
<i>Lbc. casei</i>	Fkol 77ox	31,3	0,627	0,479	1,31	1,67
	Peroskvit	9,6	0,192	0,241	0,8	0,62
	MPG	6,6	0,133	0,146	0,91	0,45
	F79/L3-PLL	3,5	0,069	0,055	1,26	5,25
<i>Lbc. rhamnosus</i>	Fkol 77ox	26,3	0,526	0,4	1,31	1,26
	Peroskvit	41,7	0,834	0,665	1,25	0,27
	MPG	7,6	0,153	0,114	1,34	1,13
	F79/L3-PLL	6,6	0,132	0,111	1,19	0,58

DNA z bakteriálních kmenů *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T se podařilo pomocí magnetických částic úspěšně izolovat.

5.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase a detekce specifického produktu PCR

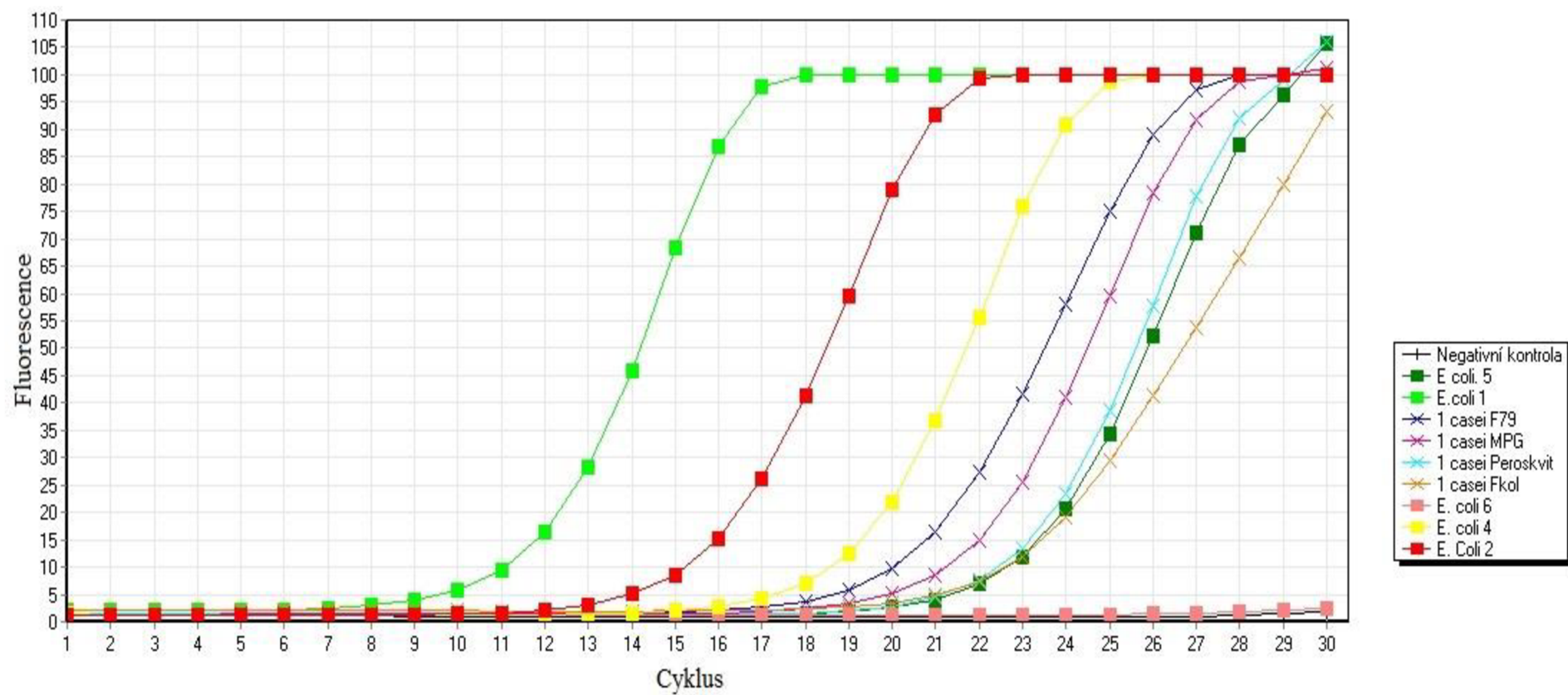
5.2.1 Ověření přítomnosti bakteriální DNA domény *Bacteria* metodou real-time PCR

Přítomnost bakteriální DNA byla ověřena ve dvou paralelách pro každou buněčnou kulturu metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase s využitím primerů specifických pro

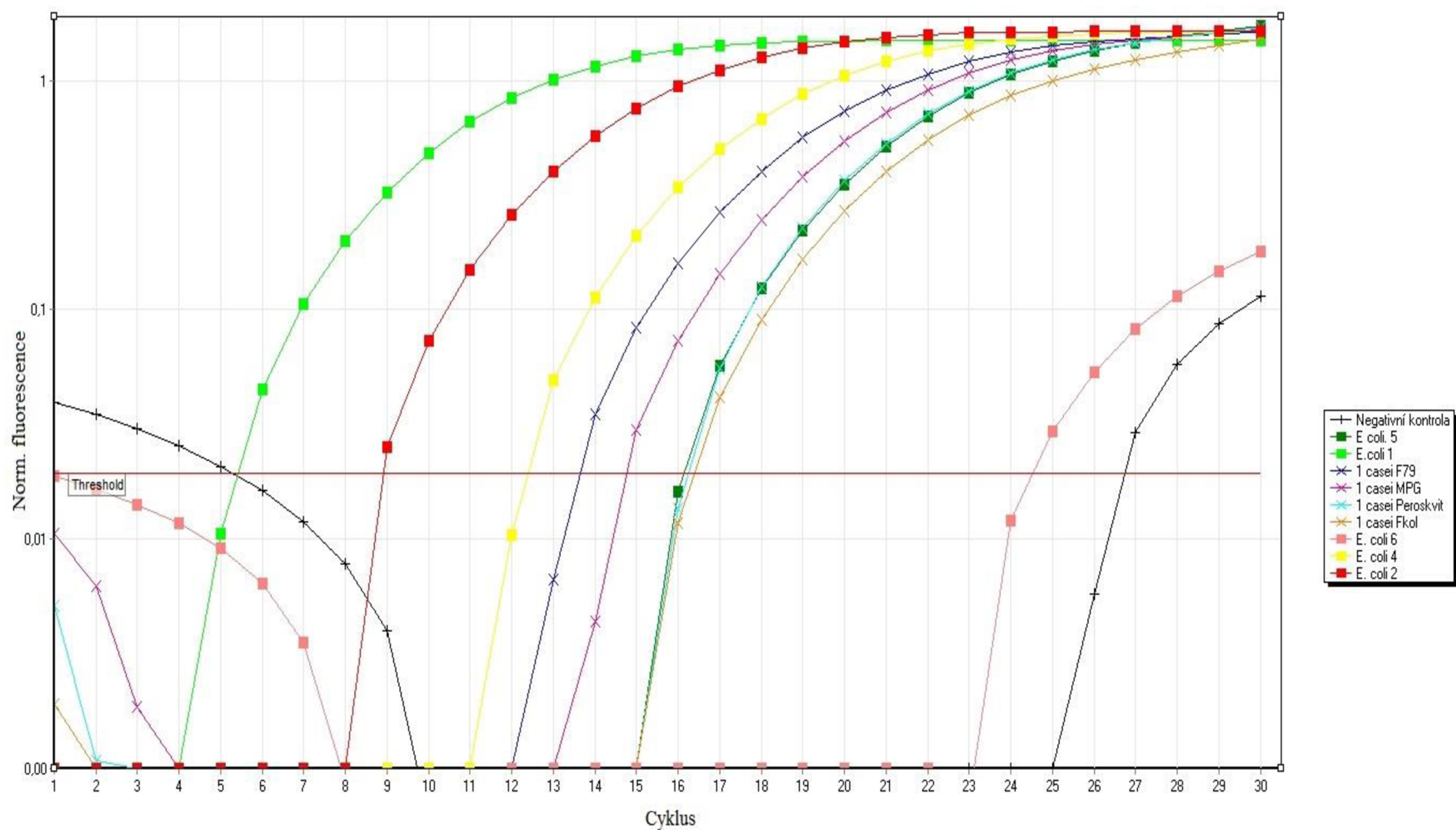
doménu *Bacteria* (primery F_eub, R_eub [22]) a zároveň byla zjištěna přesná koncentrace bakteriální DNA ve vzorcích.

Vzorky DNA o koncentraci vyšší než 20 ng/μl byly před zahájením qPCR vyředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl (objem 50 μl).

Kalibrační křivka byla sestrojena ze vzorků bakteriální DNA *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) poskytnutých Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D. Vzorky byly vyředěné desítkovým ředěním na výslednou koncentraci v rozsahu 100–0,001 ng/μl. Závislost intenzity fluorescence na počtu cyklů je zobrazena na Obr. 12, na Obr. 13 je zobrazena závislost normalizované fluorescence na počtu cyklů (z důvodu přehlednosti jsou zobrazeny pouze křivky standardů a vzorků první paralely nukleových kyselin izolovaných z bakteriálního kmene *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T).

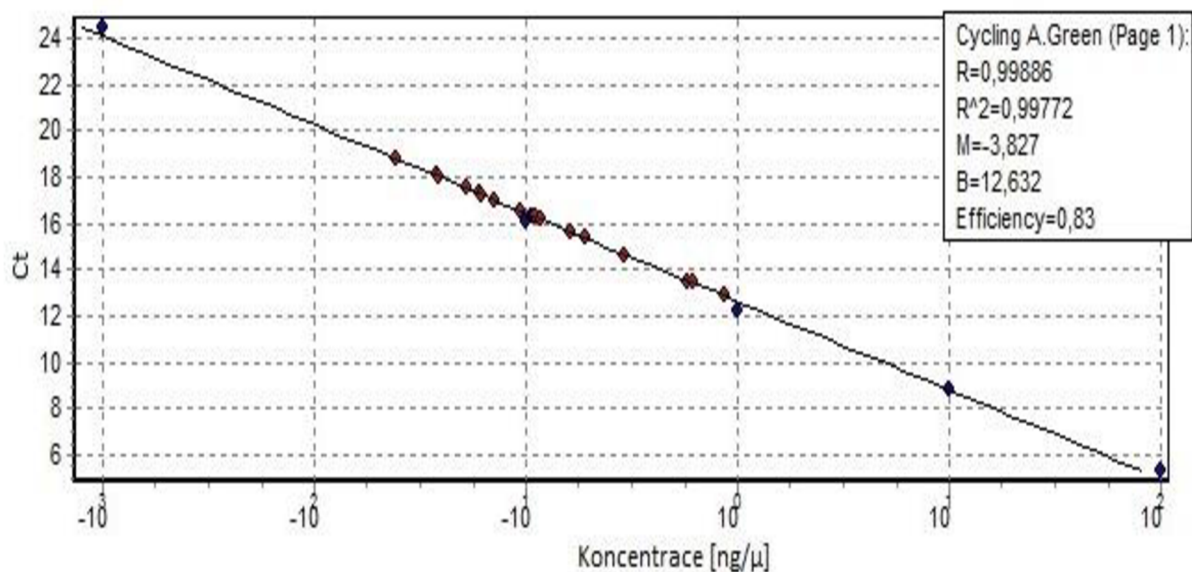


Obr. 12 Amplifikační křivky qPCR produktů specifických pro doménu *Bacteria*



Obr. 13 Závislost normalizované fluorescence na počtu cyklů

Koncentrace cílové DNA ve vzorcích v rozmezí 0,025–0,586 ng/μl byla stanovena pomocí softwaru cyklieru Rotor-gene 6000 (verze 1.7) ze závislosti C_t (prahový cyklus) hodnoty na koncentraci ve srovnání s kalibrační křivkou (v rozmezí 100 ng/μl–1 pg/ μl), (bod 0,01 ng/μl nebyl do výpočtu zahrnut z důvodu nesprávného naředění a tedy i nesprávné koncentrace vzorku). Hodnota reakční účinnosti (*Efficiency*) byla vypočítána ze sklonu amplifikačních křivek (*M*) a stanovena na 83 %. Dále byla z korelačního koeficientu lineární regrese (R^2) odhadnuta hodnota spolehlivosti reakce přibližně na 0,998 (Obr. 14). Výsledky kvantifikace jsou uvedeny v Tab. 18.



Legenda: červené body – analyzované vzorky, modré body – kalibrační křivka

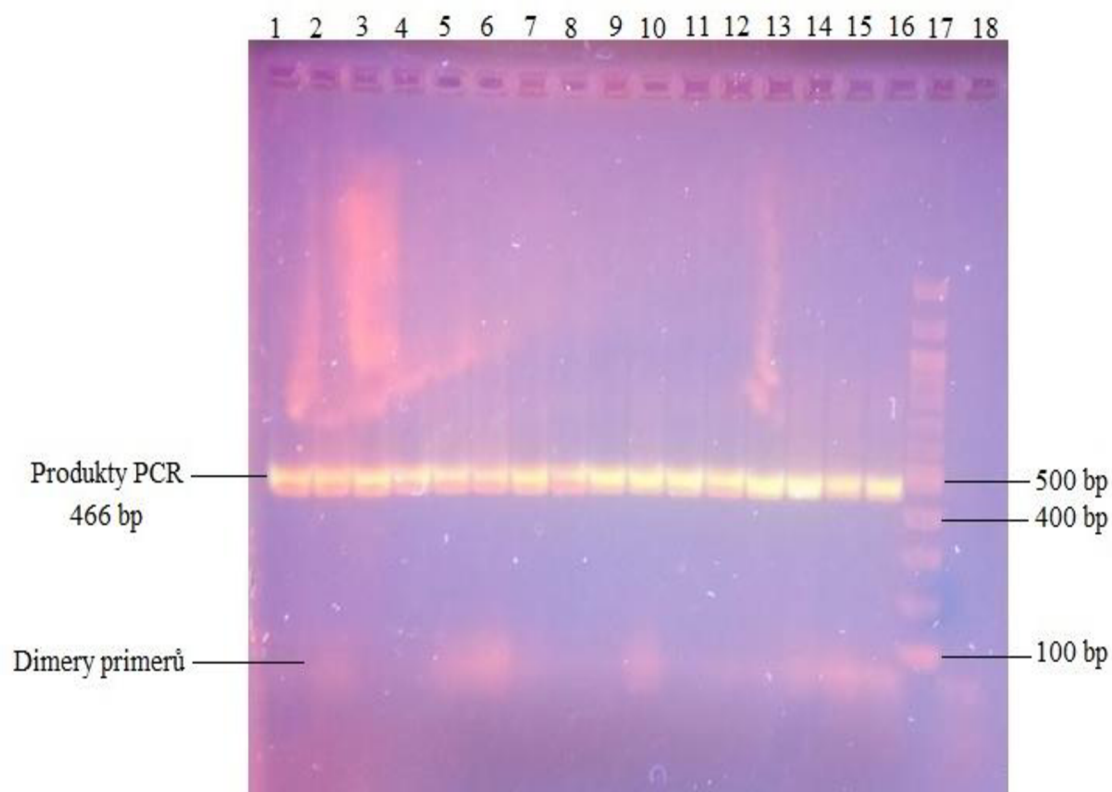
Obr. 14 Závislost C_t hodnoty na koncentraci DNA

Tab. 18 Výsledky kvantifikace bakteriální DNA jednotlivých vzorků

Vzorek	Magnetický nosič	C _t	Koncentrace DNA (ng/μl)	Průměr cDNA (ng/μl) ze dvou paralel
<i>E. coli</i> 100 ng/μl	–	5,34	81,279	–
<i>E. coli</i> 10 ng/μl	–	8,84	9,888	–
<i>E. coli</i> 1 ng/μl	–	12,30	1,238	–
<i>E. coli</i> 0,1 ng/μl	–	16,11	0,125	–
<i>E. coli</i> 0,001 ng/μl	–	24,50	0,001	–
Negativní kontrola	–	–	0,000	–
1 <i>Lbc. casei</i>	F79/L3-PLL	13,54	0,586	0,340
2 <i>Lbc. casei</i>	F79/L3-PLL	16,58	0,094	
3 <i>Lbc. rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	17,55	0,053	0,109
4 <i>Lbc. rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	15,65	0,165	
1 <i>Lbc. casei</i>	MPG	14,68	0,296	0,244
2 <i>Lbc. casei</i>	MPG	15,41	0,191	
3 <i>Lbc. rhamnosus</i>	MPG	16,30	0,112	0,366
4 <i>Lbc. rhamnosus</i>	MPG	13,45	0,620	
1 <i>Lbc. casei</i>	Peroskvit	16,19	0,119	0,1134
2 <i>Lbc. casei</i>	Peroskvit	16,35	0,108	
3 <i>Lbc. rhamnosus</i>	Peroskvit	17,04	0,071	0,055
4 <i>Lbc. rhamnosus</i>	Peroskvit	18,05	0,039	
1 <i>Lbc. casei</i>	Fkol 77ox	16,33	0,109	0,067
2 <i>Lbc. casei</i>	Fkol 77ox	18,81	0,025	
3 <i>Lbc. rhamnosus</i>	Fkol 77ox	18,08	0,038	0,050
4 <i>Lbc. rhamnosus</i>	Fkol 77ox	17,30	0,061	

Legenda: 1 a 2 označují paralelu pro *Lbc. casei*, 3 a 4 označují paralelu pro *Lbc. rhamnosus*

Přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích byla ověřena gelovou elektroforézou na agarosovém gelu (Obr. 15). Snímek agarózového gelu s PCR produkty vzorků standardů jsou uvedeny na Obr. 16. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tab. 19 a Tab. 20.



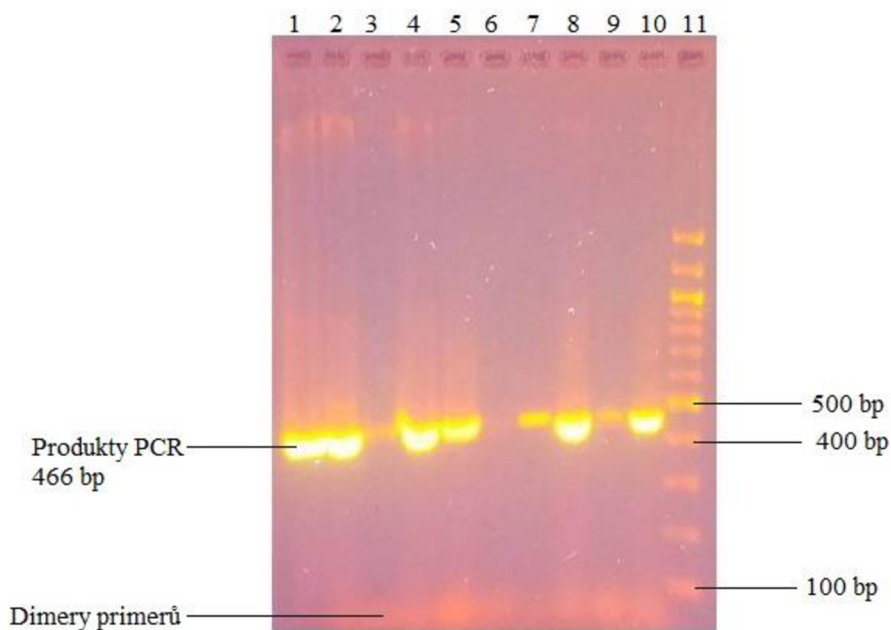
Obr. 15 Gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro doménu *Bacteria*

Tab. 19 Schéma nanesení PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* na agarózový gel (Obr. 15)

Běh	Vzorek DNA	Magnetický nosič	Koncentrace DNA (ng/μl)	Detekce PCR produktu
1	1 <i>Lbc. casei</i>	F79/L3-PLL	0,586	+
2	1 <i>Lbc. casei</i>	MPG	0,296	+
3	1 <i>Lbc. casei</i>	Peroskvit	0,119	+
4	1 <i>Lbc. casei</i>	Fkol 77ox	0,109	+
5	2 <i>Lbc. casei</i>	F79/L3-PLL	0,094	+
6	2 <i>Lbc. casei</i>	MPG	0,191	+
7	2 <i>Lbc. casei</i>	Peroskvit	0,108	+
8	2 <i>Lbc. casei</i>	Fkol 77ox	0,025	+
9	3 <i>Lbc. rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	0,053	+
10	3 <i>Lbc. rhamnosus</i>	MPG	0,112	+
11	3 <i>Lbc. rhamnosus</i>	Peroskvit	0,071	+
12	3 <i>Lbc. rhamnosus</i>	Fkol 77ox	0,038	+
13	4 <i>Lbc. rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	0,165	+
14	4 <i>Lbc. rhamnosus</i>	MPG	0,620	+
15	4 <i>Lbc. rhamnosus</i>	Peroskvit	0,039	+

Běh	Vzorek DNA	Magnetický nosič	Koncentrace DNA (ng/μl)	Detekce PCR produktu
16	4 <i>Lbc. rhamnosus</i>	Fkol 77ox	0,061	+
17	DNA standard			
18	Negativní		0,0	–

Legenda: + produkty PCR byly detekovány, – produkt PCR nebyly detekován, 1 a 2 označují paralelu pro *Lbc. casei*, 3 a 4 označují paralelu pro *Lbc. rhamnosus*



Obr. 16 Gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro doménu *Bacteria* – vzorky standardů

Tab. 20 Schéma nanesení PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* na agarózový gel (Obr. 16)

Běh	Vzorek DNA	Koncentrace DNA v PCR směsi (ng/μl)	Detekce PCR produktu
1	<i>E. coli</i> 100 ng/μl	81,279	+
2	<i>E. coli</i> 10 ng/μl	9,888	+
3	<i>E. coli</i> 1 ng/μl	1,238	+
4	<i>E. coli</i> 0,1 ng/μl	0,125	+
5	<i>E. coli</i> 0,01 ng/μl	N	+
6	<i>E. coli</i> 0,001 ng/μl	0,001	+
11	DNA standard		+

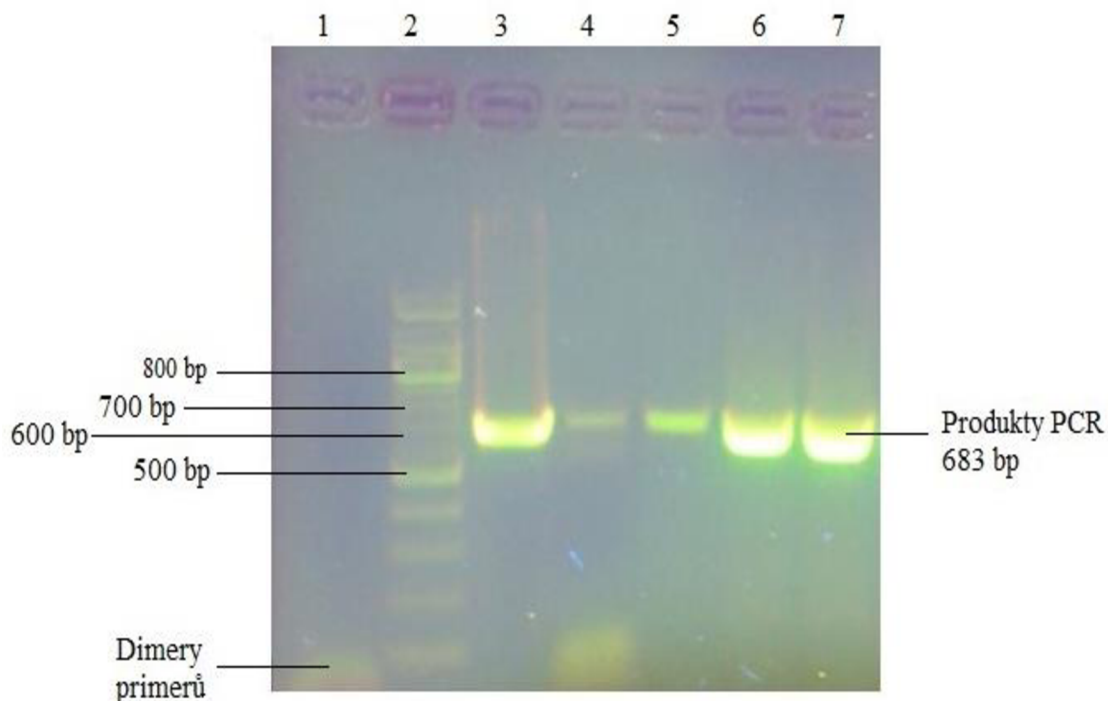
Legenda: N – koncentrace nezjištěna (koncentrace nebyla zahrnuta do kvantifikace z důvodu nesprávného naředění vzorku), + produkty PCR byly detekovány, vzorky 7-10 nesouvisí s touto experimentální prací

Gelovou elektroforézou byl detekován specifický produkt PCR pro doménu *Bacteria* (466 bp) a tím byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích.

5.2.2 Ověření přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* metodou real-time PCR

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* byla ověřena metodou real-time PCR. Použitím primerů specifických pro tento druh (primery RhamFW, UniverRV [23]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 683 bp. Produkty PCR byly nanесeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza.

Vzorky DNA o koncentraci vyšší než 20 ng/μl byly před zahájením PCR vyředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl a výsledný objem 50 μl. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obr. 17. Schéma nanесení vzorků je uvedeno v Tab. 21.



Obr. 17 Výsledek agarózové gelové elektroforézy PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [23]

Tab. 21 Schéma nanesení PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* na agarózový gel

Běh	Vzorek DNA	Magnetický nosič	Koncentrace DNA v PCR směsi (ng/μl)	Detekce PCR produktu
1	Negativní kontrola		0,0	–
2	DNA standard			
3	Pozitivní kontrola (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T)		10,0	+
4	<i>Lbc. rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	6,6	+
5	<i>Lbc. rhamnosus</i>	MPG	7,6	+
6	<i>Lbc. rhamnosus</i>	Peroskvit	10,0	+
7	<i>Lbc. rhamnosus</i>	Fkol 77ox	10,0	+

Legenda: + produkty PCR byly detekovány, – produkt PCR nebyly detekován

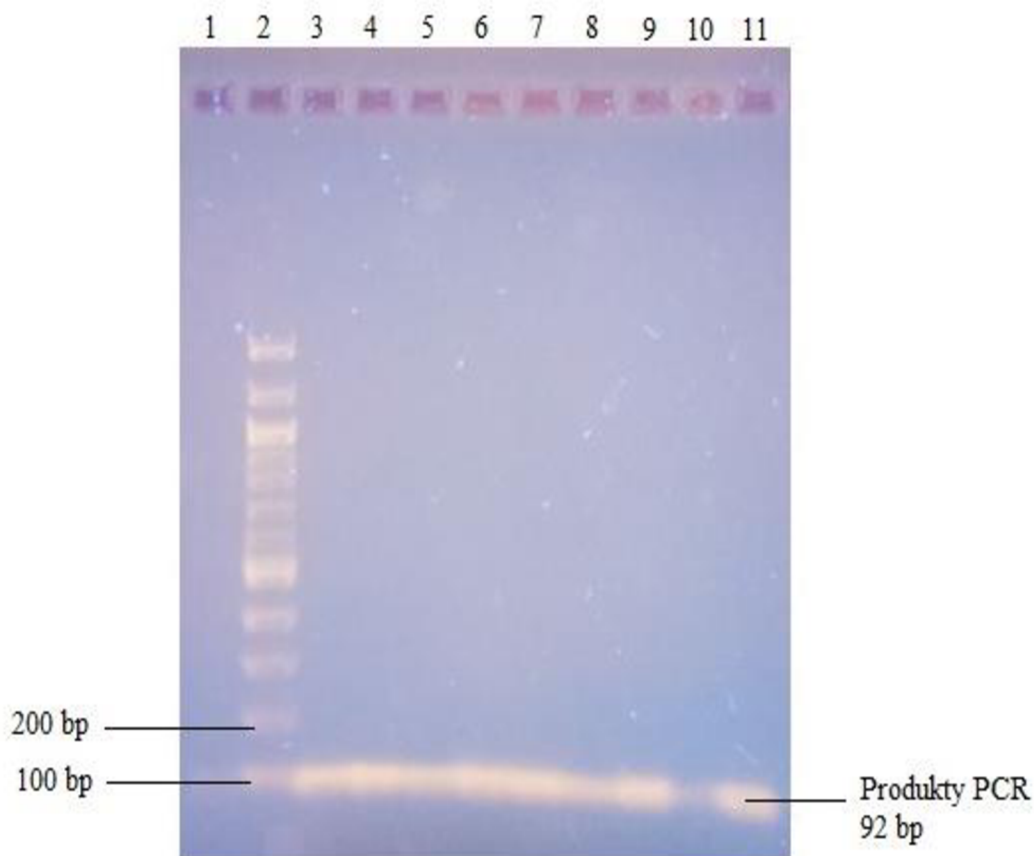
Přítomnost PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* byla prokázána agarózovou gelovou elektroforézou ve všech nanesených vzorcích.

5.3 Konvenční PCR a detekce produktu PCR

5.3.1 Ověření přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus* metodou PCR

Přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce. Použitím primerů specifických pro tento rod (primery F_alllact, R_alllact [22]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 92 bp. Produkty PCR byly naneseny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza.

Vzorky DNA o koncentraci vyšší než 20 ng/μl byly před zahájením PCR vyředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl a výsledný objem 50 μl. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obr. 18. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tab. 22.



Obr. 18 Výsledek agaróзовé gelové elektroforézy PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* [19]

Tab. 22 Schéma nanesení PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* na agaróзовý gel

Běh	Vzorek DNA	Magnetický nosič	Koncentrace DNA v PCR směsi (ng/μl)	Detekce PCR produktu
1	Negativní kontrola		0,0	–
2	DNA standard			
3	Pozitivní kontrola (<i>Lactobacillus gasseri</i> K7)		10,0	+
4	<i>Lbc. rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	6,6	+
5	<i>Lbc. rhamnosus</i>	MPG	7,6	+
6	<i>Lbc. rhamnosus</i>	Peroskvit	10,0	+
7	<i>Lbc. rhamnosus</i>	Fkol 77ox	10,0	+
8	<i>Lbc. casei</i>	F79/L3-PLL	3,5	+
9	<i>Lbc. casei</i>	MPG	6,6	+
10	<i>Lbc. casei</i>	Peroskvit	9,6	+
11	<i>Lbc. casei</i>	Fkol 77ox	10,0	+

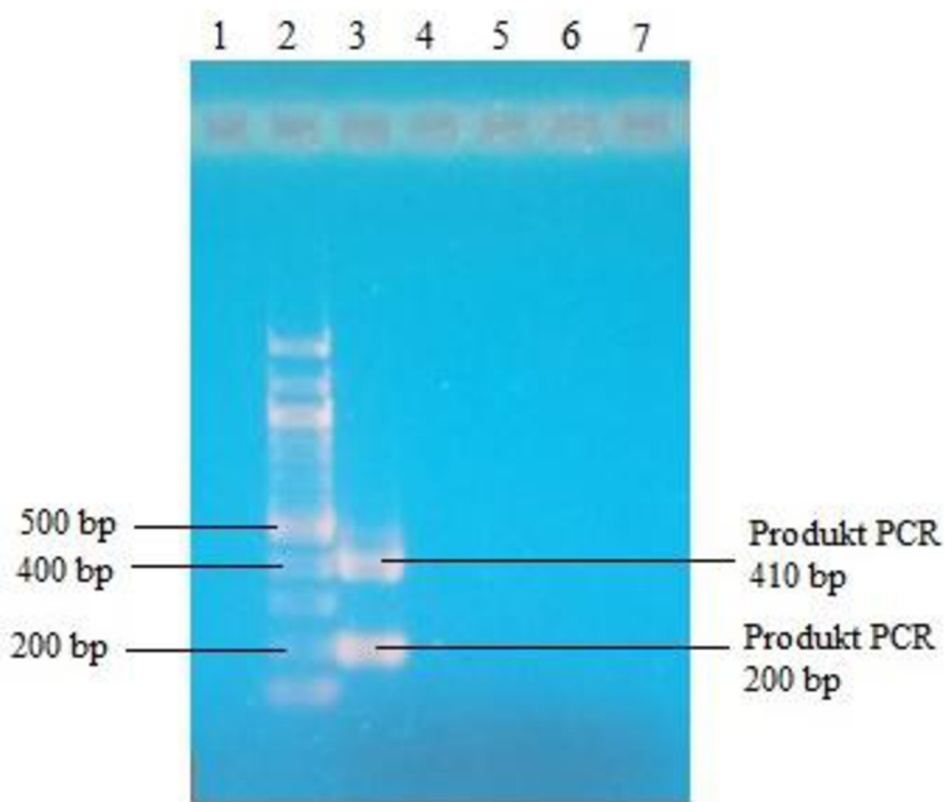
Legenda: + produkty PCR byly detekovány, – produkt PCR nebyly detekován

Přítomnost PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* byla prokázána agarózovou gelovou elektroforézou ve všech nanesených vzorcích.

5.3.2 Ověření přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* metodou PCR

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce. Použitím primerů specifických pro tento druh (primery Pr I, Rha II [24]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 410 a 200 bp. Produkty PCR byly naneseny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza.

Vzorky DNA o koncentraci vyšší než 20 ng/μl byly před zahájením PCR vyředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl a výsledný objem 50 μl. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obr. 19. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tab. 23.



Obr. 19 Výsledek agarózové gelové elektroforézy PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [24]

Tab. 23 Schéma nanesení PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* na agarózový gel

Běh	Vzorek DNA	Magnetický nosič	Koncentrace DNA v PCR směsi (ng/μl)	Detekce PCR produktu
1	Negativní kontrola		0,0	–
2	DNA standard			
3	Pozitivní kontrola (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T)		10,0	+
4	<i>Lbc. rhamnosus</i>	Fkol 77ox	10,0	–
5	<i>Lbc. rhamnosus</i>	Peroskvit	10,0	–
6	<i>Lbc. rhamnosus</i>	MPG	7,6	–
7	<i>Lbc. rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	6,6	–

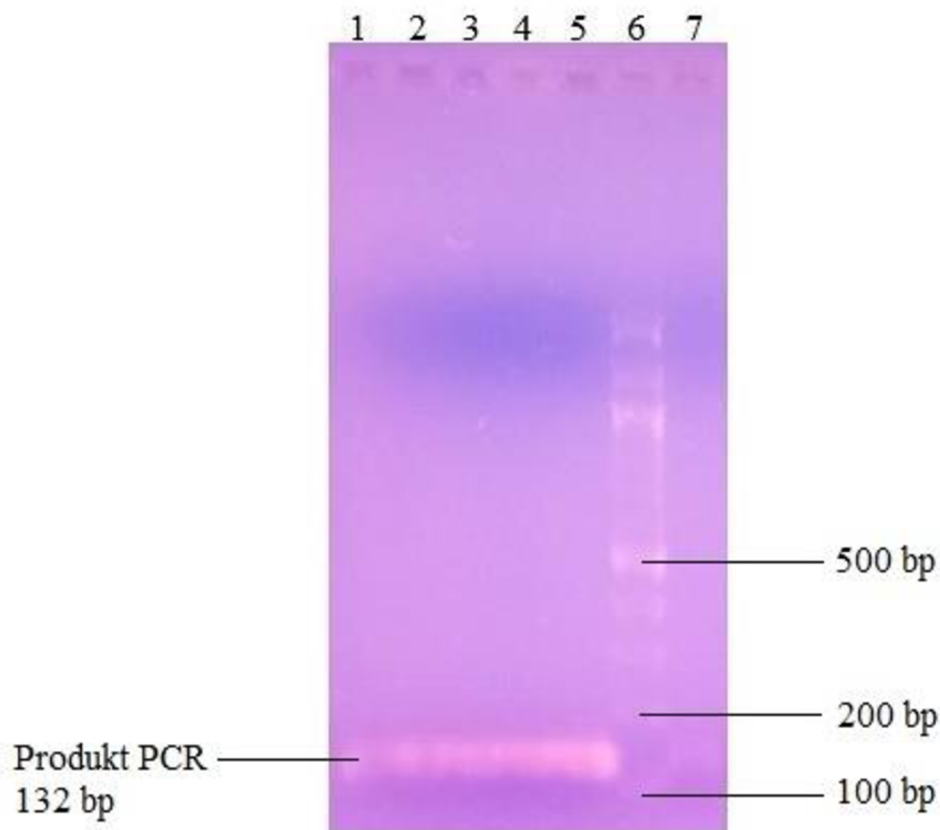
Legenda: + produkty PCR byly detekovány, – produkty PCR nebyly detekovány

Přítomnost PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* byla prokázána agarózovou gelovou elektroforézou ve vzorku pozitivní kontroly. Produkty PCR v ostatních vzorcích nebyly detekovány zřejmě z důvodu nízké citlivosti metody PCR za použití uvedených primerů a podmínek amplifikace.

5.3.3 Ověření přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus casei* metodou PCR

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus casei* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce. Použitím primerů specifických pro tento druh (primery F_case_IS, R_case_IS [23]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 132 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza.

Vzorky DNA o koncentraci vyšší než 20 ng/μl byly před zahájením PCR vyředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl a výsledný objem 50 μl. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obr. 20. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tab. 24.



Obr. 20 Výsledek agarózové gelové elektroforézy PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus casei* [23]

Tab. 24 Schéma nanesení PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus casei* na agarózový gel

Běh	Vzorek DNA	Magnetický nosič	Koncentrace DNA v PCR směsi (ng/μl)	Detekce PCR produktu
1	<i>Lactobacillus casei</i>	Fkol 77ox	10,0	+
2	<i>Lactobacillus casei</i>	Peroskvit	9,6	+
3	<i>Lactobacillus casei</i>	MPG	6,6	+
4	<i>Lactobacillus casei</i>	F79/L3-PLL	3,5	+
5	Pozitivní kontrola (<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> CCM 7088 ^T)		15,8	+
6	DNA standard			
7	Negativní kontrola		0,0	–

Legenda: + produkty PCR byly detekovány, – produkty PCR nebyly detekovány

Přítomnost PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus casei* byla prokázána agarózovou gelovou elektroforézou ve všech nanesených vzorcích.

5.4 PCR-HRM

Za účelem rozlišení bakteriálních druhů *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* byla použita PCR-HRM metoda s využitím dvou různých druhů primerů navržených za tímto účelem, a to primerů V1F-HRM, V1R-HRM [26] a primerů P1V1, P2V1, [27] Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T.

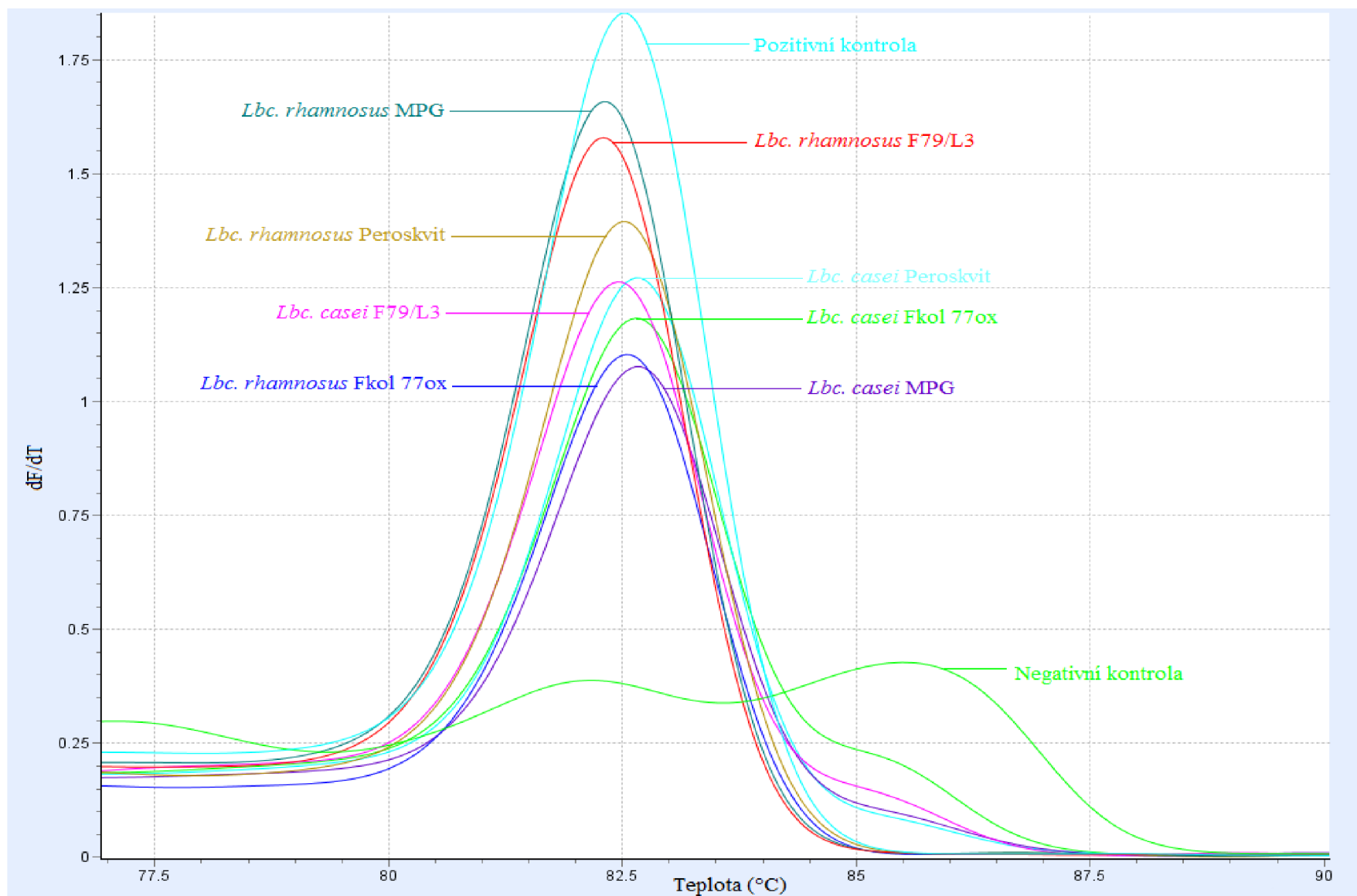
5.4.1 PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM

Za použití této metody a primerů navržených pro rozlišení bakteriálních druhů *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* byly zjištěny teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky. Tyto teploty jsou uvedeny v Tab. 25. Křivky tání jednotlivých vzorků jsou uvedeny na Obr. 21.

Tab. 25 Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM [26]

Vzorek	Použité částice pro izolaci DNA	T _m (°C)
<i>Lactobacillus casei</i>	Fkol 77ox	82,65
<i>Lactobacillus casei</i>	Peroskvit	82,66
<i>Lactobacillus casei</i>	MPG	82,67
<i>Lactobacillus casei</i>	F79/L3-PLL	82,46
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Fkol 77ox	82,55
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Peroskvit	82,52
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MPG	82,31
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	82,30
Pozitivní kontrola (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T)		82,52

Podle křivek tání a podle naměřených teplot tání lze říci, že s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM se nepodařilo rozlišit bakteriální druhy *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*.



Obr. 21 Křivky tání jednotlivých vzorků pro PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM [26]

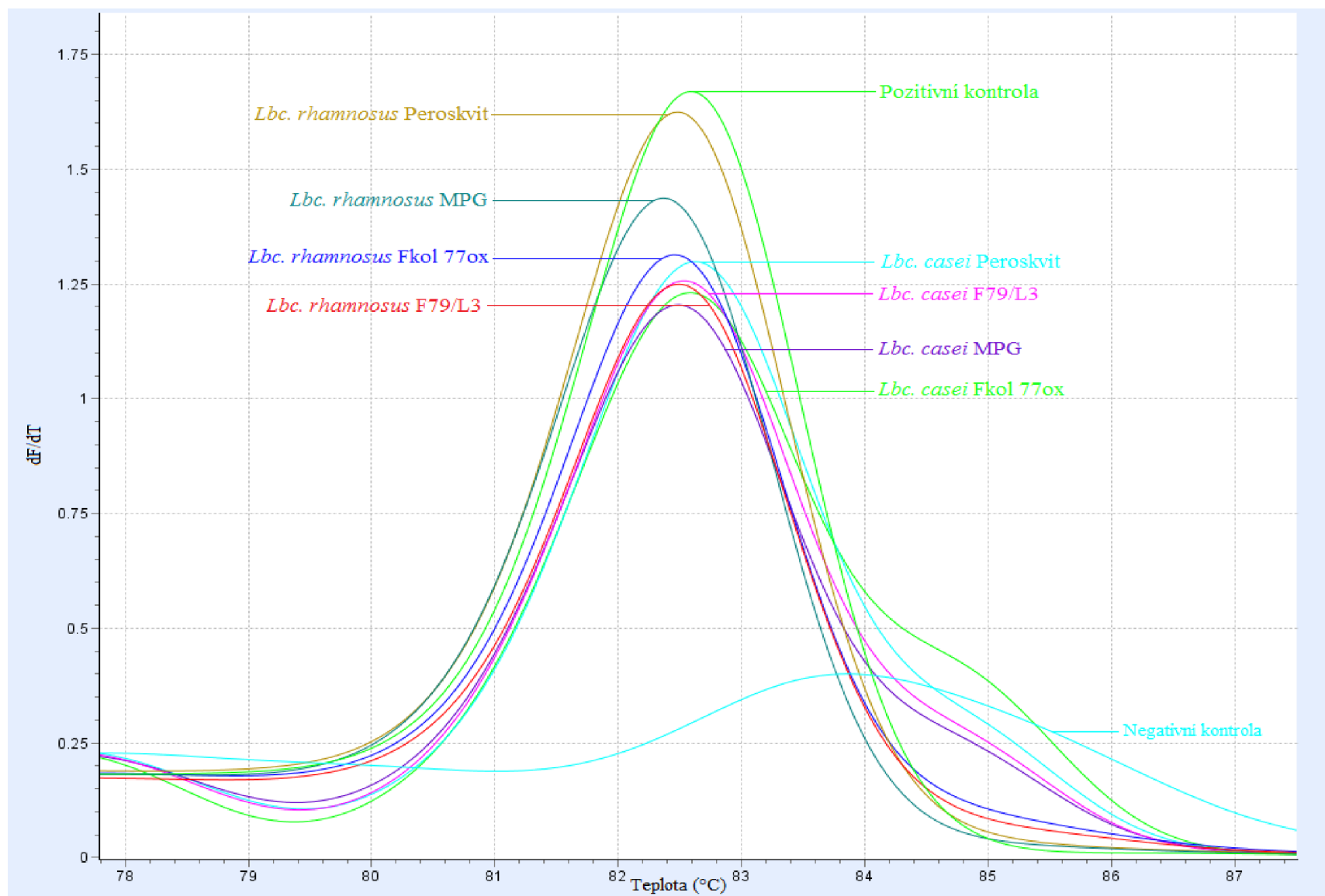
5.4.2 PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1

Za použití PCR-HRM metody a primerů navržených pro rozlišení bakteriálních druhů *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* byly zjištěny teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky. Tyto teploty jsou uvedeny v Tab. 26. Křivky tání jednotlivých vzorků jsou uvedeny na Obr. 22.

Tab. 26 Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1 [27]

Vzorek	Použité částice pro izolaci DNA	T _m (°C)
<i>Lactobacillus casei</i>	Fkol 77ox	82,58
<i>Lactobacillus casei</i>	Peroskvit	82,62
<i>Lactobacillus casei</i>	MPG	82,49
<i>Lactobacillus casei</i>	F79/L3-PLL	82,53
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Fkol 77ox	82,46
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Peroskvit	82,48
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MPG	82,36
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F79/L3-PLL	82,49
Pozitivní kontrola (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T)		82,59

Podle křivek tání a podle naměřených teplot tání lze říci, že s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM se nepodařilo rozlišit bakteriální druhy *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*.



Obr. 22 Křivky tání jednotlivých vzorků pro PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1 [27]

6 DISKUZE

6.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Pomocí přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) byla spektrofotometricky změřena absorbance jednotlivých vzorků izolované DNA. Měření bylo provedeno v rozmezí vlnových délek 230 – 280 nm.

Celková koncentrace nukleových kyselin v jednotlivých vzorcích se pohybovala v rozmezí 3,5 – 51,0 ng/μl. Nejvyšší koncentrace nukleových kyselin byla přítomna ve vzorcích, u kterých byly k izolaci nukleových kyselin využity magnetické mikronosiče typu Fkol 77ox. Navázání záporně nabitých nukleových kyselin na tyto magnetické nosiče, které na svém povrchu obsahují -COOH funkční skupiny, umožňuje polymerem a solí indukovaná kondenzace. [5] Dalším vhodným nosičem pro izolaci nukleových kyselin jsou magnetické nanočástice Peroskvit. Částice toho typu obsahují na svém povrchu Si-OH a Si-O⁻ skupiny, které mají vysokou vazebnou kapacitu pro nukleové kyseliny. [5] Nejnižší koncentrace byla naopak naměřena ve vzorcích, u kterých byly k izolaci nukleových kyselin použity magnetické nanočástice typu F79/L3-PLL (Tab. 27). Tato nízká hodnota koncentrace izolovaných nukleových kyselin mohla být způsobena tím, že samotná výchozí koncentrace magnetického nosiče (0,1 mg/ml) byla nižší než u ostatních magnetických nosičů.

Poměr absorbcí A_{260}/A_{280} udává čistotu izolované DNA. Pro čistou DNA je hodnota tohoto poměru 1,8. Nižší hodnota značí znečištění DNA proteiny, které vykazují absorpční maximum při 280 nm. Vyšší hodnota poměru absorbcí pak značí přítomnost RNA ve vzorku. Poměr absorbcí A_{260}/A_{280} pro jednotlivé vzorky je uveden v Tab. 28. Z průměru hodnot A_{260}/A_{280} lze vidět, že z hlediska čistoty byly pro izolaci DNA nejlepší magnetické nanočástice F79/L3-PLL. Nejvíce znečištěné pak byly vzorky, jejichž DNA byla izolovaná pomocí magnetických mikronosičů Fkol 77ox. Převážná většina vzorků byla znečištěna proteiny. Proteiny se v buněčném materiálu vyskytují spolu s nukleovými kyselinami a vzájemně spolu interagují, což způsobuje mnohdy obtížnou izolaci NK.

Tab. 27 Koncentrace nukleových kyselin izolovaných různými typy magnetických nosičů

Č.	Vzorek		Fkol 77ox	Peroskvit	MPG	F79/L3-PLL
1	<i>Lbc. casei</i>	c (ng/μl)	31,3	13,4	13,4	14,7
2	<i>Lbc. casei</i>		22,2	13,0	13,1	14,1
3	<i>Lbc. casei</i>		19,3	9,6	6,6	3,5
4	<i>Lbc. rhamnosus</i>		51,0	50,0	42,9	44,2
5	<i>Lbc. rhamnosus</i>		31,7	41,7	18,0	7,3
6	<i>Lbc. rhamnosus</i>		26,3	39,2	7,6	6,6
		Průměr c (ng/μl)	30,3	27,8	16,9	15,1

Tab. 28 Čistota izolované DNA

Č.	Vzorek		Fkol 77ox	Peroskvit	MPG	F79/L3-PLL
1	<i>Lbc. casei</i>	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,38	1,51	1,80	1,87
2	<i>Lbc. casei</i>		1,37	1,64	1,59	1,50
3	<i>Lbc. casei</i>		1,31	0,8	0,91	1,26
4	<i>Lbc. rhamnosus</i>		1,37	1,89	1,44	1,75
5	<i>Lbc. rhamnosus</i>		1,45	1,78	1,48	1,83
6	<i>Lbc. rhamnosus</i>		1,31	1,25	1,34	1,19
		Průměr A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,365	1,478	1,427	1,567

6.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase specifická pro doménu *Bacteria* (primery F_eub, R_eub [22]) byla provedena za účelem ověření přítomnosti bakteriální DNA a zjištění přesné koncentrace izolované bakteriální DNA v jednotlivých vzorcích.

DNA izolovaná magnetickými nosiči byla pomocí primerů specifických pro doménu *Bacteria* [22] amplifikována a PCR produkt byl podroben agarózové gelové elektroforéze. Pro pozitivní kontrolu byla použita bakteriální DNA *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich). Na 1,6% agarózovém gelu jsou pro všechny vzorky izolované DNA i pro pozitivní kontrolu zřetelně viditelné pásy v oblasti 466 bp. Tyto pásy dokazují, že bakteriální DNA byla izolována z kultur náležejících pod doménu *Bacteria*. [22]

Výsledky měření byly vyhodnoceny pomocí softwaru cykleru Rotor-gene 6000 (verze 1.7). Kalibrační křivka (rozsah 100–0,001 ng/μl) byla sestrojena ze vzorků bakteriální DNA *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) poskytnutých Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D. Pro jednotlivé vzorky byla stanovena hodnota C_t, která vyjadřuje prahový cyklus, při kterém dochází k statisticky významnému nárůstu fluorescence. V případě prahového cyklu platí, že čím vyšší je původní množství DNA ve vzorku, tím nižší je hodnota C_t. Stanovené hodnoty prahového cyklu odpovídají původním koncentracím DNA v jednotlivých vzorcích, které se pohybovaly v rozmezí hodnot 0,025–0,620 ng/μl (Tab. 29). Nejvíce DNA bylo průměrně izolováno pomocí komerčních mikročastic MPG, nejméně DNA pak bylo izolováno pomocí magnetických mikronosičů typu Fkol 77ox.

Pomocí spektrofotometrie byly stanoveny koncentrace odpovídající celkovému obsahu nukleových kyselin (DNA i RNA) ve vzorcích. Metoda qPCR stanovuje koncentraci pouze cílové DNA, což způsobuje rozdíl mezi hodnotami naměřenými spektrofotometricky a pomocí qPCR.

Tab. 29 Koncentrace izolované DNA

Č.	Vzorek		Fkol 77ox	Peroskvit	MPG	F79/L3-PLL
1	<i>Lbc. casei</i>	cdNA (ng/μl)	0,109	0,119	0,296	0,586
2	<i>Lbc. casei</i>		0,025	0,108	0,191	0,094
3	<i>Lbc. rhamnosus</i>		0,038	0,071	0,112	0,053
4	<i>Lbc. rhamnosus</i>		0,061	0,039	0,620	0,165
		Průměr cdNA (ng/μl)	0,058	0,084	0,305	0,225

Metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase byla ověřena také přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus*. Pomocí primerů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [23] byla izolovaná bakteriální DNA amplifikována. PCR produkt byl nanesen na 1,6% agarózový gel a vyhodnocen elektroforeticky. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T. Všechny vzorky izolované DNA mají na agarózovém gelu jasně viditelné pásy v oblasti 683 bp stejně jako pozitivní kontrola. V případě běhu 4 a 5 jsou pásy méně jasné z důvodu nižší koncentrace DNA ve vzorcích. Pásy v oblasti 683 bp dokazují, že bakteriální DNA byla izolována z kultur náležejících k druhu *Lactobacillus rhamnosus*. Běh pro negativní kontrolu nevykazuje jasně viditelný pás a v průběhu práce tedy nedošlo ke kontaminaci negativní kontroly a nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek.

6.3 Polymerázová řetězová reakce specifická pro rod *Lactobacillus*

Metodou polymerázové řetězové reakce byla ověřena přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus*. Pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [22] byla izolovaná bakteriální DNA amplifikována. PCR produkt byl nanesen na 1,6% agarózový gel a vyhodnocen elektroforeticky. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus gasseri* K7. Všechny vzorky izolované DNA mají na agarózovém gelu jasně viditelné pásy v oblasti 92 bp stejně jako pozitivní kontrola. Tyto pásy dokazují, že bakteriální DNA byla izolována z kultur náležejících k rodu *Lactobacillus*. Běh pro negativní kontrolu nevykazuje jasně viditelný pás a v průběhu práce tedy nedošlo ke kontaminaci negativní kontroly.

6.4 Polymerázová řetězová reakce specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Metodou polymerázové řetězové reakce byla ověřena přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus*. Pomocí primerů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* [24] byla izolovaná bakteriální DNA amplifikována. PCR produkt byl nanesen na 1,6% agarózový gel a vyhodnocen elektroforeticky. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T. Jasně viditelné pásy v oblasti 410 a 200 bp byly detekovány pouze u pozitivní kontroly. U ostatních vzorků k detekci těchto pásů nedošlo. To mohlo být způsobeno nízkou citlivostí metody polymerázové řetězové reakce. Běh pro negativní kontrolu nevykazuje jasně viditelné pásy a v průběhu práce tedy nedošlo ke kontaminaci negativní kontroly.

6.5 Polymerázová řetězová reakce specifická pro druh *Lactobacillus casei*

Metodou polymerázové řetězové reakce byla také ověřena přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus casei*. Pomocí primerů specifických pro druh *Lactobacillus casei* [23] byla izolovaná bakteriální DNA amplifikována. PCR produkt byl nanesen na 1,6% agarózový gel a vyhodnocen elektroforeticky. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088^T. Všechny vzorky izolované DNA mají na agarózovém gelu viditelné pásy v oblasti 132 bp stejně jako pozitivní kontrola. Tyto pásy dokazují, že bakteriální DNA byla izolována z kultur náležejících k druhu *Lactobacillus casei*. Běh pro negativní kontrolu nevykazuje jasně viditelný pás a v průběhu práce tedy nedošlo ke kontaminaci negativní kontroly.

6.6 PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM

S využitím primerů navržených pro rozlišení bakterií *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus* (V1F-HRM, V1R-HRM [26]) byla provedena PCR-HRM metoda. Pro pozitivní kontrolu byl použit kmen *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T.

Dle naměřených hodnot teplot tání charakteristických pro jednotlivé vzorky je zřejmé, že za použití primerů V1F-HRM a V1R-HRM se nepodařilo rozlišit bakteriální kmeny *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088^T a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T. Ze vzorků bakteriální DNA izolované z kmene *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088^T vybočuje vzorek, u kterého byly pro izolaci DNA použity magnetické nanočástice F79/L3-PLL. U vzorků bakteriální DNA izolované z kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T vybočují dva vzorky, u kterých byly pro izolaci DNA použity magnetické mikronosiče MPG a nanočástice F79/L3-PLL. Koncentrace DNA izolované pomocí magnetických nosičů MPG a F79/L3-PLL je vyšší než u ostatních vzorků. Tato skutečnost zřejmě způsobila odchylky mezi jednotlivými vzorky DNA téhož bakteriálního druhu.

6.7 PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1

Izolovaná DNA byla použita jako DNA matrice do PCR-HRM s využitím primerů P1V1, P2V1 [27] navržených za účelem rozlišení bakterií *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Pro pozitivní kontrolu byl použit kmen *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T.

Dle naměřených hodnot teplot tání charakteristických pro jednotlivé vzorky je zřejmé, že za použití primerů P1V1 a P2V1 se nepodařilo rozlišit bakteriální kmeny *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088^T a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T. Teplota tání pro bakteriální DNA izolovanou z kmene *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088^T pomocí magnetických částic MPG byla stejná jako teplota tání pro bakteriální DNA izolovanou z kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T pomocí magnetických částic F79/L3-PLL.

7 ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce se zabývá magnetickými nosiči a jejich vlastnostmi. Dále také pojednává o jejich praktickém a potencionálním využití v biotechnologiích.

V experimentální části byly využity 4 druhy vybraných magnetických částic pro izolaci bakteriální DNA. Kvalita izolované bakteriální DNA byla dále vyhodnocena s ohledem na množství a čistotu použitím metody polymerázové řetězové reakce a jejich modifikací. Pomocí konvenční polymerázové řetězové reakce a specifických primerů byla ověřena příslušnost izolované bakteriální DNA k odpovídajícím rodům a druhům. Dále byla zavedena metoda PCR-HRM za použití dvou sad různých primerů navržených za účelem rozlišení bakterií *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*.

Z hlediska čistoty byly pro izolaci DNA nejlepší magnetické nanočástice F79/L3-PLL. Z hlediska kvantity bylo průměrně nejvíce DNA izolováno pomocí komerčních mikročástic MPG a dále pomocí nanočásti F79/L3-PLL. Příslušnost izolované bakteriální DNA k odpovídajícím rodům a druhům byla prokázána metodu PCR. Metodou PCR-HRM za použití vybraných sad primerů se nepodařilo rozlišit blízké příbuzné kmeny *Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088^T a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T. Testované sady primerů tedy nejsou vhodné pro tento účel.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] TRACHTOVÁ, Štěpánka. *Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2011 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/7787>. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Bohuslav Rittich.
- [2] RAMANUJAN, Raju. Magnetic Particles for Biomedical Applications. *Biomedical Materials* [online]. Boston, MA: Springer US, 2009, s. 477 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1007/978-0-387-84872-3_17. ISBN 9780387848716. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-84872-3_17
- [3] KARIMI, Z., L. KARIMI a H. SHOKROLLAHI. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2013, **33**(5), 2465-2475 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.045. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113000581>
- [4] AKBARZADEH, Abolfazl, Mohamad SAMIEI a Soodabeh DAVARAN. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2012, **7**(1), 144- [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1186/1556-276X-7-144. ISSN 1556276x. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-7-144>
- [5] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(15), 2472-2485 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>
- [6] SEIFALIAN, Alexander, Elizabeth BULL, MADANI, SHETH, Mark GREEN a Amelia SEIFALIAN. Stem cell tracking using iron oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* [online]. b.r., , 1641- [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.2147/IJN.S48979. ISSN 11782013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/stem-cell-tracking-using-iron-oxide-nanoparticles-peer-reviewed-article-IJN>
- [7] SUN, C, J LEE a M ZHANG. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(11), 1252-1265 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.018. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08001014>
- [8] BABIČ, Michal, Daniel HORÁK, Miroslava TRCHOVÁ et al. Poly(1-lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2008, **19**(3), 740-750 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1021/bc700410z. ISSN 10431802. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc700410z>
- [9] BORLIDO, L., A.M. AZEVEDO, A.C.A. ROQUE a M.R. AIRES-BARROS. Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnology Advances* [online]. 2013, **31**(8), 1374-1385

- [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.009. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013000906>
- [10] PHILIPPOVA, Olga, Anna BARABANOVA, Vyacheslav MOLCHANOV a Alexei KHOKHLOV. Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. *European Polymer Journal* [online]. 2011, **47**(4), 542-559 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2010.11.006. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305710004350>
- [11] LU, An-Hui, E. L. SALABAS a Ferdi SCHÜTH. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2007, **46**(8), 1222-1244 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1002/anie.200602866. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200602866>
- [12] PEČOVÁ, M., L. ZAJONCOVÁ, K. POLÁKOVÁ, J. ČUDA, M. ŠAFAŘÍKOVÁ, M. ŠEBELA a I. ŠAFAŘÍK. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy* [online]. 2011, **105**(7), 524-530 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_07_524-530.pdf
- [13] ŠAFAŘÍKOVÁ, M. a I. ŠAFAŘÍK. Magnetické separace v přírodních vědách a biotechnologiích. *Chemické Listy* [online]. 1995, **89**(5), 280-287 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <http://www.nh.cas.cz/people/safarik/Chem-listy-biotechnologie-1995.pdf>
- [14] OLSVIK, O., T. POPOVIC, E. SKJERVE, K. CUDJOE, E. HORNES, J. UGELSTAD a M. UHLÉN. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1994, **7**(1), 43-54 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/7/1/43.short>
- [15] VALASEK, M. The power of real-time PCR. *AJP: Advances in Physiology Education* [online]. 2005, **29**(3), 151-159 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1152/advan.00019.2005. ISSN 10434046. Dostupné z: <http://ajpadvan.physiology.org/cgi/doi/10.1152/advan.00019.2005>
- [16] YANG, Samuel a Richard ROTHMAN. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2004, **4**(6), 337-348 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)01044-8. ISSN 14733099. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309904010448>
- [17] MAHEASWARI, Rajendran, JaishreeTukaram KSHIRSAGAR a Nallasivam LAVANYA. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. 2016, **0**(0), 0- [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.4103/0972-124X.176391. ISSN 0972124x. Dostupné z: <http://www.jisponline.com/preprintarticle.asp?id=176391>
- [18] TESAŘOVÁ, Zuzana. *Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost RoundUp Ready sóji: metodika pro praxi*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2013. ISBN 9788074271342.

- [19] JILBERTO, Felipe, Cristián ARANEDA a María LARRAÍN. High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species. *Food Chemistry* [online]. 2017, **229**, 716-720 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.109. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617303114>
- [20] LI, Huaizhong, Ruiting LAN, Niancai PENG, Jing SUN a Yong ZHU. High resolution melting curve analysis with MATLAB-based program. *Measurement* [online]. 2016, **90**, 178-186 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.measurement.2016.04.057. ISSN 02632241. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263224116301233>
- [21] SUN, Wei, Jing-jian LI, Chao XIONG, Bo ZHAO a Shi-lin CHEN. The Potential Power of Bar-HRM Technology in Herbal Medicine Identification. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2016, **7**, - [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.3389/fpls.2016.00367. ISSN 1664462x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00367/abstract>
- [22] 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, **72**(4), 2359-2365 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. ISSN 00992240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>
- [23] GRILLOVÁ, Linda. *Vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií*. 2012. PhD Thesis. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Alena Španová.
- [24] BALOGOVÁ, Petra. *Izolace a identifikace DNA probiotických bakterií v komplexních maticích: Isolation and identification of DNA from probiotic bacteria in complex matrices*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Bohuslav Rittich.
- [25] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 9788021440043.
- [26] SZÉN, O.P., A. KISS, Z. NAÁR a K. PÁL. Evaluation of high-resolution melting and other molecular methods in discrimination of Lactobacillus isolates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2014, **117**(4), 1113-1121 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1111/jam.12599. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12599>
- [27] KLIJN, N., A. WEERKAMP a W. DE VOS. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1991, **1991**(5711), 3390-3393 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/57/11/3390.short>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp – pár bází

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfát

dsDNA – dvojitá DNA

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

GC pár – guanino-cytosinový pár

HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecyl sulfát sodný

Taq DNA-polymeráza – termostabilní enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

TEM – transmisní elektronový mikroskop

TE pufr – Tris-EDTA pufr

UV – ultrafialové světlo