



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Zvápenatění včelího plodu a jeho vliv na včelstvo

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**

Autor: Tereza Prokopová

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem „*Zvápenatění včelího plodu a jeho vliv na včelstvo*“ jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2019

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Ireně Hoštičkové za trpělivý a obětavý přístup a za možnost pracovat na zajímavém tématu. Dále bych chtěla poděkovat panu Antonínu Zrnovi za odborné rady z oblasti včelařství. A v neposlední řadě bych chtěla vyjádřit díky celé rodině za velké množství podpory.

Zvápenatění včelího plodu a jeho vliv na včelstvo

Abstrakt

Zvápenatění včelího plodu je onemocnění, které způsobuje houbový patogen *Ascospaera apis*, který napadá a hubí včelí larvu. Nejčastěji se vyskytuje u slabých včelstev, která mají slabý čistící pud a tím řádně neodstraňují původce zwápenatění. Ideálním řešením je výměna včelí matky, díky které se zvýší čistící pud včel, které pak nákazu zcela odstraní.

Cílem mé bakalářské práce bylo praktické zvládnutí metodiky analýzy výskytu *Ascospaera apis* pomocí metody PCR, osvojení si rutinních postupů používaných v laboratoři včetně izolace DNA a vypracování odborné rešerše na dané téma.

V teoretické části bakalářské práce popisují houbové onemocnění zwápenatění včelího plodu a jeho vliv na nakažené včelstvo. Dále podrobně popisují metody, které jsou využívány pro detekci onemocnění, jako je izolace DNA, PCR a gelová elektroforéza.

V praktické části, kterou jsem vykonala v laboratořích Biotechnologického centra, které je součástí katedry genetiky a rostlinné produkce na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, se zabývám podrobným popsáním přesných postupů metod využitých při detekci tohoto onemocnění a vyhodnocením vlastních výsledků.

Klíčová slova

Včela medonosná; *Ascospaera apis*; optimalizace PCR; izolace DNA; diagnostika

Chalkbrood disease detection in honey bees

Abstract

Chalkbrood disease is a disease caused by the fungal pathogen *Ascosphaera apis*, which attacks and kills bee larvae. It's most common in weak colonies, that have a poor cleansing soil and don't properly remove calcareous agents. The ideal solution is to exchange the bee mother, which will increase the cleansing instinct of the bees, which then completely removes the infection.

The aim of my bachelor thesis was to master the methodology of the analysis of the occurrence of *Ascosphaera apis* using the PCR method, to acquire routine procedures used in the laboratory including DNA isolation and to elaborate a professional research on the topic.

In the theoretical part of the thesis I describe the fungal disease of chalkbrood and its influence on the infected bee. Further, I describe in detail methods that are used for the detection of diseases such as DNA isolation, PCR and gel electrophoresis.

In the practical part, which I did in the laboratories of the Biotechnology Center, which is part of the Department of Genetics and Plant Production at the Faculty of Agriculture of the University of South Bohemia in České Budějovice, I describe in detail the exact methods used in the detection of this disease and the evaluation of my own results.

Key words

Honeybee; *Ascosphaera apis*; PCR optimization; DNA isolation; diagnostics

Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Rešeršní část	8
2.1	Včela medonosná	8
2.2	Zvápenatění včelího plodu	10
2.3	Izolace DNA.....	13
2.4	Polymerázová řetězová reakce	18
3.	Cíl práce	29
4.	Materiál a metody	30
4.1	Izolace DNA.....	30
4.2	PCR	34
4.3	Gelová elektroforéza	37
5.	Výsledky	39
6.	Diskuze	43
7.	Závěr	45
8.	Seznam použité literatury	46

1. Úvod

Zvápenatění včelího plodu je mykotické onemocnění, které postihuje včelí plod. Vyskytuje se po celém světě a ani v České republice není výjimečné. V minulosti se vyskytovalo poměrně často a dnes tomu není v podstatě jinak. Jedná se o typické onemocnění včelstev, které mají špatné hygienické chování (Čermák, 2016). Nejlepším způsobem léčby tohoto onemocnění je výměna staré matky, která má špatné hygienické návyky, za matku novou s lepšími genetickými předpoklady pro hygienické chování.

Onemocnění je způsobováno mikroskopickou houbou *Ascosphaera apis*, která se může přenášet infikovanou potravou nebo výtrusy. Dále se zvápenatění včelího plodu může šířit při kočování s nakaženými včelstvy nebo infikovanými matkami (Veselý, 2013). Také se často šíří zkrmováním pylu získaného od nemocných včelstev. Napadané včelstvo se projevuje slábnutím, před úly nacházíme mumifikované larvy a nebo velkým množstvím napadaných zvápenatělých kukel na dně úlu (Čermák, 2016).

Spory *Ascosphaera apis* jsou velmi odolné, zůstávají infekční až 15 let a zejména dlouho vydrží v medu, vosku a v pylu. Tato houba dokáže přežít i na stěnách úlů, na včelařském nářadí a v půdě před úly. Častým faktorem při rozvoji onemocnění je oslabení včelstev jinou nemocí, zejména virovým onemocněním včelího plodu. V České republice bývá tato viróza zjištěna přibližně u 30% případů zvápenatění včelího plodu (Veselý, 2013).

Zvápenatění včelího plodu způsobuje úbytek dospělých včelích jedinců a to má za důsledek nižší produkci medu. Z tohoto důvodu se této nemoci po celém světě věnuje pozornost, i když nepatří mezi nebezpečné nákazy.

2. Rešeršní část

2.1 Včela medonosná

Včela medonosná má zajímavou a segmentovanou vnější stavbu těla. Tělo je tvořeno třemi hlavními částmi: hlavou, hrudí a zadečkem, které jsou od sebe odděleny tenkou stopkou, a proto se řadí mezi štíhloпасý hmyz (Přidal, 1996).

Taxonomické zařazení včely medonosné

- kmen členovci (*Anthropoda*)
- podkmen vzdušnicovci (*Tracheata*)
 - třída hmyz (*Insecta*)
- podtřída křídlatí (*Pterygota*)
- řád blanokřídli (*Hymenoptera*)
- podřád štíhloпасí (*Apocrita*)
- nadčeled' včely (*Apoidea*)
- čeled' včelovití (*Apidea*)
- rod včela (*Apis*)
- druh včela medonosná (*Apis mellifera* L.)

Stavba těla

Vnější kostra těla

Vnější kostra těla je tvořena pokožkou (*integumentum*) a slouží jako ochrana vnitřních měkkých tělních orgánů, zabezpečuje pevnost a stálý tvar jednotlivých částí včely.

Pokožka se skládá ze tří vrstev: kutikuly, epidermis a podstavné blány.

Vnitřní kostra těla

Nejpevnější vnitřní kostra se nachází v hlavě včely a nazývá se *tentorium*. Vnitřní kostra vznikla tak, že se dovnitř hrudi vchlípily silně chitinizované švy, které spojují jednotlivé hrudní články. Slouží k upínání létacích svalů a svalů pohybujících nohama.

Důležitá je také tzv. mesofragma, která je napjatá v nejzadnějším oddílu hrudi a upínají se na ni podélně létací svaly, jejichž pohyb umožňuje pohyb křídel (Veselý, 2013).

Jednotlivé články zadečku včely jsou spojeny velmi volně, nemá žádné vnitřní vyztužení. Svaly se upínají přímo k výběžkům hřbetní a břišní části zadečkových článků.

Hlava včely je zploštělá ve směru podélné osy těla. Ústní ústrojí směřuje dolů, kolmo k podélné ose těla. Tvar hlavy je trojúhelníkový s zaokrouhlením tvořeným složenými očima. Tvoří ji pevný jednolitý chitinizovaný krunýř, na kterém jsou oči,

tykadla, ústní ústrojí a většina smyslových orgánů. S hrudí je spojena úzkým hrdlem, takže je velmi pohyblivá (Peroutka, Drobníková, 1987).

Hrud' (*thorax*) včely je složena ze tří původních hrudních článků (předohrudí, středohrudí a zadohrudí) a tzv. bedra, což je první článek zadečku. Předohrud' (*prothorax*) je úzký proužek navazující na hrdlo. Středohrud' (*mesothorax*) je největší a nejnápadnější z hrudních článků. Zadohrud' (*metathorax*) je nejmenším hrudním článkem včely. Bedro (*propodeum*) uzavírá svou hřbetní částí hrud' shora, břišní část vytváří stopečku, která spojuje hrud' se zadečkem. Prochází jí aorta, nervová páska, jícen a vzdušnice.

Včela má dva páry blanitých křídel (*alae*), které jsou pokryty jemnými chloupky, pouhým okem neviditelnými. Jsou to vychlípeniny pokožky, do nichž ve stadiu kukly pronikly vzdušnice a nervy a kolem nichž proudí do křídel i hemolymfa. Vzdušnice tvoří výztuž křídel a zároveň jejich typickou žilnatinu.

Jednotlivé články zadečku včely jsou spojeny velmi volně, nemá žádné vnitřní vyztužení. Svaly se upínají přímo k výběžkům hřbetní a břišní části zadečkových článků (Veselý a kol., 2013).

Včelstvo

Včelstvo je početné společenstvo, ve kterém včela medonosná žije a je to ze sociologického hlediska rodina, která je tvořena oplozenou matkou a jejími potomky – dělnicemi a trubci. Pohromadě žijí nejméně dvě generace včel a mezi nimi je aktivní součinnost, jelikož žádná včela medonosná nemůže žít delší dobu sama, je odkázána na pomoc svých družek.

Včelstvo jako společenská jednotka nevzniklo náhodně, ale je výsledkem přizpůsobování se včel životním podmínkám v dlouhé vývojové době.

Ve vrcholném období rozvoje tvoří včelstvo jedna matka, 50 000 – 60 000 dělnic, 300 – 600 trubců, vajíčka a plod, zásoby medu a pylu a včelí dílo z vosku – plodové a medné pláсты. Matčíným úkolem je klást vajíčka a zjišťovat růst a rozmnožování včelstva. Trubci jsou včelí samci, kteří mají za úkol osemnit mladé matky. Všechny potřebné práce ve včelstvu konají dělnice – přinášejí nektar, medovici, pyl, propolis a vodu, zpracovávají sladinu v med, pečují o výživu plodu, stavějí voskové pláсты a chrání včelstvo před vetřelci. Činnost dělnic je založena na dělbě práce, podmíněné feromony (Veselý a kol., 2003).

V poslední době byla věnována pozornost dopadu stěhování včelstev na šířící se choroby, jelikož například migrační včelařství napomáhá šíření nejrůznějších patogenů. Šíření patogenů bylo uváděno jako jedna z hlavních příčin prudkého poklesu populace včel.

Ascosphaera apis, původce onemocnění v larvách včel medonosných, může přežít až jeden rok v medu a až dva roky v pylu. Tato choroba se vyskytuje po celém světě a je obvykle běžná hlavně v období jara a způsobuje značné škody na populačním růstu a produktivitě ve slabých koloniích prostřednictvím úbytku tvorby medu (Jara et.al.,2018).

2.2 Zvápenatění včelího plodu

Toto onemocnění způsobuje mikroskopická houba *Ascosphaera apis*. Snížený počet dospělých má za následek nižší produkci medu, a proto se této chorobě věnuje na celém světě pozornost. Zvápenatění nepatří mezi nebezpečné nákazy včel (Peroutka, Drobníková, 1987).

Výskyt nákazy

V Evropě bylo známo zwápenatění včelího plodu už před 50.lety 20. století a teprve v roce 1968 bylo objeveno v Severní Americe, později v Kanadě a v Jižní Americe (Veselý a kol.,2013). Nyní postihuje hlavně včely na severní polokouli. (Teixeira,et al.,2018). V dnešní době se ale toto onemocnění vyskytuje po celém světě, dokonce existují náznaky, že incidence zwápenatění může být na vzestupu (Aronstein, Murray, 2010).

V Česku v posledních desetiletích pozorujeme zvýšený výskyt zwápenatění (Veselý a kol.,2013), neboť výskyt onemocnění mohou podporovat některé pesticidy či antibiotika (Čermák a kol., 2016).

Původce nákazy

Ascosphaera apis vytváří dvě samostatná, pohlavně rozdělená mycelium, která jsou článkovaná a při dotyku vytvoří samčí a samičí gametangia.

Původce se může vyskytovat ve dvou formách, kdy na první nacházíme menší plodničky a na druhé plodničky větší. V plodničce se tvoří velké množství drobných oválných výtrusů – askospor, které jsou viditelné pouze v mikroskopu. Askospory jsou

odolné a mohou přežívat až 15 let. Nejčastěji v medu, vosku, pylu, ale také na stěnách úlů, včelařském nářadí a v půdě před úly (Čermák et al., 2016). Pouhým okem můžeme pozorovat velkoplodé formy, které jsou šedočerné a maloplodé formy jsou zelenošedé.

Nakonec plodnice prasknou, zralá vřečka se sporami se vyhrnou ven, po prasknutí vřeček se uvolní výtrusy a ty infikují včelí larvy. *A. apis* zabíjí larvu tím, že jí odčerpává živiny (Peroutka, Drobníková, 1987).

Nákazy

Ascospaera apis se přenáší infikovanou potravou nebo výtrusy, které se dostanou na pokožku včelí larvy. Nejnáchylnější jsou k nákaze larvy staré 3-6 dnů a citlivější je dělničí plod.

Průběh onemocnění je rychlý, nakažené larvy umírají během dvou dnů po zavíčkování. *A. apis* také roste a vytváří výtrusy na uhynulých larvách, ale nemumifikuje je. Dospělých včelám nákaza neškodí, ale rozšiřují ji v úlu a mimo něj. Zvápenatění se také může šířit kočováním s nakaženými včelstvy, infikovanými matkami, a nebo nákazu přenese včelař při práci ve včelstvech. Snadněji se nakazí včelstvo se špatnými hygienickými návyky, které jsou na dělnice přenášeny dědičně z matky, a nebo je krmeno nevhodným krmivem (Veselý a kol., 2013). Včely infikované larvy odstraňují a zabraňují tak dalšímu šíření zwápenatění včelího plodu ve včelstvu (Svoboda a kol., 1968).

Klinické příznaky

Víčka buněk s nakaženým plodem jsou skvrnitá a lehce propadlá. Takový plod se z počátku mění v nažloutlou kašovitou hmotu, později je možné pozorovat chomáčky bělavých hyf. Při vnější infekci vidíme na pokožce larvy jemné chmýří nažloutlé barvy (Peroutka, Drobníková, 1987).

Plíseň vyklíčí v žaludku a prorůstá až na povrch larviček, tím vytvoří v buňkách doslova mumie plodu. Ty se poté nachází v plodových buňkách nebo na dně včelího úlu. Pokud ještě není plíseň zralá a je tvořena vlákny, je její zbarvení bílé. Po dozrávání se mění její barva na šedou až černou (Čermák et al., 2016)

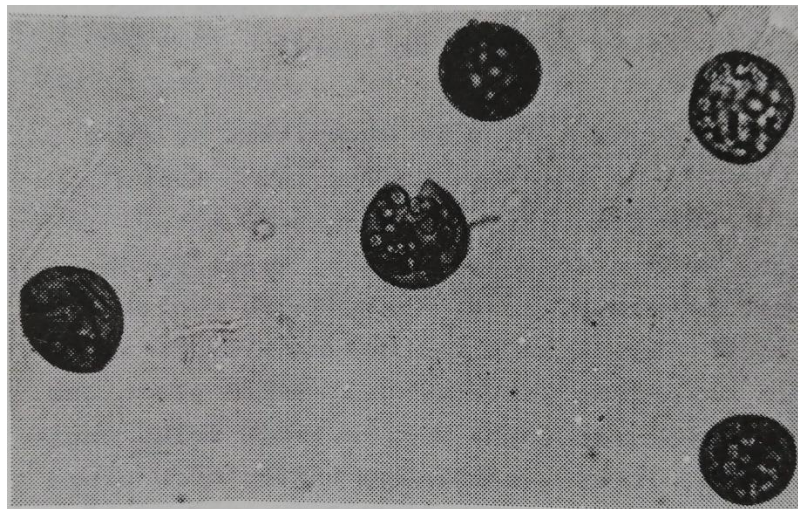
Onemocnění se projevuje slábnutím včelstva, před úly se objevují vynesené mumifikované larvy, ty se mohou objevovat i na dně úlu, a v plodišti se nachází zavíčkované nebo nezavíčkované buňky s mumiiemi. Uhynulé larvy ve stadiu

vzpřímeného červa jsou ve formě bílých mumií a připomínají kousky uschlého vápna (Čermák et al., 2016).

Mikroskopická a kultivační diagnostika

Průkaz onemocnění se stanovuje především na základě klinických příznaků a patologických změn. Při stanovení je nutné zvápenatění odlišit od jiných chorob plodu, jako je například zkamenění včeliho plodu (Čermák et al., 2016).

Diagnostika u tohoto onemocnění je poměrně snadná. V mikroskopickém preparátu jsou vidět z tmavých mumií plodnice s charakteristicky se otevíracími vřecy s výtrusy. Na vyšetření jsou odesílány mumifikované zbytky mrtvých larev a také vzorek plástu s podezřelým plodem.



Obrázek 1: *Ascospaera apis*, původce zvápenatění (Peroutka, Drobníková, 1987).

Opatření

Včelstva, ve kterých byla zjištěna nákaza je potřeba co nejvíce zúžit. V silně napadeném včelstvu je minimální odolnost včelstva a mají malý čistící pud, který nedokáže zabránit šíření nákazy (Švancer, 1977). V infikovaném včelstvu je potřeba mumifikované larvy, postiženou část plástu nebo plásty odstranit a spálit. Úl se vydezinfikuje běžnými dezinfekčními prostředky. Stejným způsobem se dezinfikují ruce, pracovní oděv a nářadí (Peroutka, Drobníková, 1987).

Terapie

Proti zvápenatění včelího plodu se s úspěchem používají odparné desky s kyselinou mravenčí – Formidol (Veselý a kol., 2013). Tento lék ničí spóry houby *A. apis*, usmrcuje nemocné larvy a stimuluje čistící pud včel. Používá se také při léčbě varroázy a noseμόzy. Tento přípravek se nepoužívá, když je ve včelstvu zralý med připravený na vytočení (<http://www.beedol.cz/lezeni/leky/>).

Zkoušelo se také používat různé fungicidy nebo antibiotika s fungicidními účinky (například kyselina sorbová), ale bohužel jejich použití bylo bez patřičného účinku, a nebo hrozilo nebezpečí reziduí ve včelích produktech.

Dalším možným řešením je odstranění a spálení postiženého plodu včetně plodových plástů, přeložení včelstva do čistého úlu nebo dezinfekce úlů, plástů a podložek. Důležitá je hlavně výměna matky s genetickými předpoklady lepšího hygienického chování.

Jako je prevence se doporučuje nepoužít staré plásty a nedávat včelám produkty neznámého původu, a také odchov matek od včelstev s dobrými genetickými předpoklady lepšího hygienického chování (Čermák et al., 2016). Hygienické chování je skupinová obrana, při které se vylučují mrtví nebo nemocní jedinci. U včel se hygienické chování týká odlupování a odstraňování mrtvých nebo nemocných larev a kukel z uzavřených plodových buněk. Pokud má včelstvo vysoké hygienické návyky, nakažené plody odstraní ještě předtím, než se stanou infekčními (Al Toufialia et al., 2018).

2.3 Izolace DNA

Zvolení vhodné metody izolace DNA závisí na tom, pro co ji chceme dále používat. Někdy stačí i DNA horší kvality a nízké koncentrace, a v nejhorších případech lze použít buňky zlyzované, ale samozřejmě se pracuje lépe s kvalitně izolovanou DNA.

Ve většině případů izolujeme DNA nacházející se v nitrobuněčném obsahu. Jestliže je ve vzorku přítomno více druhů buněk, je možné tyto druhy od sebe oddělit například pomocí centrifugace, poté lze izolovat DNA pouze určitého druhu (Anzenbacher, Kovář, 1986). Pokud chceme izolovat DNA obsaženou v určité buněčné organelle, musíme nejprve separovat z buněčného obsahu dané organely. K uvolnění obsahu buněk musíme použít detergenty rozrušující membrány, které mohou být buďto iontové povahy nebo neionogenní (nenabité). Jinou možností může být použití různých fyzikálních nebo fyzikálně-chemických postupů, jako je například rozrušení membrán

ultrazvukem. Poté je potřeba oddělit izolovanou látku z roztoku buněčného obsahu, pomocí dočasné denaturace.

Tkáně vhodné k izolaci DNA

Izolovat DNA můžeme z každé živočišné tkáně obsahující živé buňky. U velmi malých organismů můžeme klidně použít i celého jedince, ale je zde větší pravděpodobnost, že by mohlo dojít ke kontaminaci například různými parazity, symbionty a nebo částecami potravy. U obojživelníků a malých ptáků můžeme DNA izolovat z krve, tato izolace je vhodná také u savců, kde ale potřebujeme větší množství krve. K izolaci je možné použít i například chlup nebo trus, ale na to je potřeba speciální a obtížnější technika. DNA lze izolovat i z velmi starých vzorků (hmyz v jantaru, fosílie) za velice specifických podmínek, které zamezují kontaminaci (Zima, et al., 2004)

Jednoduché izolační metody

Vsolování a vysolování

Tato metoda izolace DNA se řadí mezi jednu z nejjednodušších, je snadná, rychlá, bezpečná, levná a poskytuje nám vysoce kvalitní DNA. Princip spočívá na změně rozpustnosti molekul DNA, u kterých se změní koncentrace iontů v roztoku tak, že s rostoucí koncentrací iontů roste nejprve rozpustnost a DNA je do roztoku vsolováno. Když se dosáhne maxima, začne rozpustnost molekuly klesat a DNA se tím z roztoku vysoluje.

Pro tuto metodu se nejčastěji používá síran amonný, který má velkou rozpustnost a ta se příliš nemění s teplotou (Káš et al., 2005).

Srážení organickými rozpouštědly

Tato metoda je poměrně stará a v dnešní době se už příliš nepoužívá, je nahrazována metodami modernějšími.

Při srážení organickými rozpouštědly se používají nepolární, vodou mísitelná organická rozpouštědla, která snižují dielektrickou konstantu prostředí a tím snižují rozpustnost a přispívají k vysrážení biopolymeru.

Nejčastěji se využívá srážení koncentrovaným ethanolem, tzv. ethanolové srážení, jeho výhodou je, že už není potřeba provádět dialýzu. Ethanol může být nahrazen isopropanolem, propanolem, methanolem nebo diethyletherem. Srážení by mělo probíhat za nízkých teplot, kolem 0°C, jinak by mohlo dojít k denaturaci vysrážených proteinů (Káš et al.)

Moderní metody

Fenol-chloroformová extrakce

Klasická metoda odstranění proteinů z buněčných lyzátů s využitím organických rozpouštědel (Penka, 2011). Nejprve se směs fenolu a chloroformu důkladně promíchá s vzorkem DNA v mikrocentrifugační zkumavce a pomocí centrifugace se směs rozdělí do dvou fází - na lehkou vodnou, těžší organickou a mezi nimi vznikne prstenec vysrážených proteinů. DNA se nachází ve vodné fázi. Horní vrstva se opatrně přenesse do nové zkumavky. Tento supernatant se pak podrobí dalším dvěma extrakcím za účelem odstranění zbytkového fenolu (Stock, 2009).

Následně se DNA precipituje z vodného roztoku okyselením a přidáním 96% etanolu. Precipitace probíhá cca 30 minut při teplotách -20 až -80° C. Poté se sediment DNA purifikuje s 70% vodným roztokem etanolu a získaný pelet se suší na vzduchu. Dále se rozpustí v TE pufru nebo v demineralizované vodě. Tento celý proces trvá několik hodin.

Důležitá je také přítomnost chelatačních činidel (nejpoužívanější je EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová), jejichž úkolem je z roztoku vychytat dvojmocné ionty, které jsou nezbytné pro činnost DNáz, které se běžně vyskytují v buňce kvůli nutným úpravám DNA (Raška, 2006).

Výhodou této extrakční metody je velmi čistý extrakt a velký výtěžek DNA. Ale nachází se zde i nevýhody v podobě zdravotního a bezpečnostního rizika pro laboratorní personál při práci s fenolem a chloroformem (Beránek, 2016).

Chelex

Chelex je pryskyřice, která se skládá z divinylbenzen kopolyméru (což je makromolekulární látka, která má molekuly tvořeny nejméně dvěma různými monomery)

a z párových iminodiacetátových iontů. Tyto ionty vážou polykovalentní kovové ionty. Chelex za alkalických podmínek zvyšuje afinitu ke kationtům těžkých kovů (Hirak, 2018). Tato skutečnost má velký význam při extrakci DNA, protože tyto ionty mohou při vysokých teplotách poškodit DNA.

Izolace DNA pomocí Chelexu je poměrně rychlá a její velkou výhodou je minimální riziko kontaminace vzorku, jelikož celý proces probíhá v jedné zkumavce.

Principem izolace u této metody je fyzická homogenizace, následná destrukce a degradace buněčných membrán, proteinů a denaturace DNA za vysokých teplot. Dále se provádí centrifugace kvůli oddělení pryskyřice a zbytků buněčných částí od supernatantu, který obsahuje DNA (Čapková Frydrychová, 2013).

Izolace pomocí magnetických částic

Magnetické částice jsou kulovité útvary, jejich jádro je tvořeno nejčastěji magnetitem nebo maghemitem a mají speciálně upravený povrch pro navázání DNA. DNA se specificky váže na magnetické částice a vzniknou komplexy, které jsou zachyceny magnetem. Nukleové kyseliny jsou uvolněny pomocí přidání správného pufru a odebrány do sběrné zkumavky (Penka, 2011).

Postup pro izolaci DNA založený za použití magnetických částic je dobrým řešením, jak poměrně lehce získat DNA, která není kontaminována RNA nebo proteiny, a obsahuje minimální množství inhibitorů PCR. Při této izolační metodě se nevyužívají žádná zdraví škodlivá organická rozpouštědla. I když není zdlouhavá, pro rutinní používání v moderních laboratořích se využívá její automatizace. I přestože automatizované nebo poloautomatizované systémy poskytují nižší výtěžek a samozřejmě jsou finančně náročnější.

Silika kolonky

Tato metoda je poměrně stará, ale poměrně rychlá a jednoduchá a využívá se v ní absorpce na silikátový povrch. Dříve se používalo přírodních materiálů jako například křemelina, ale dnes se používá synteticky připravený silikagel. Metoda je založena na membránovém principu.

Silikagel se už i dříve používal k separaci různých látek – jedovaté látky, kovové ionty, proteiny nebo nukleové kyseliny. Má silně polární charakter, a proto absorbuje i polární sloučeniny. Na silikagel se také můžou připojit chelatační skupiny, to se hlavně

využívá při separaci proteinů. Mezi hlavní výhody silikagelu patří jeho vlastnosti. Není toxický, hořlavý a je stabilní a nereaktivní.

Postup

Tato izolace pomocí silikagelové membrány je založená na jednoduchém procesu vazby, promytí a uvolnění.

Nejprve se k buňkám, ze kterých chceme DNA izolovat, přidáme extrakční pufr, aby uvolnil buněčný obsah. Chaotropní soli potom denaturují DNA pomocí rozrušení intramolekulárních vodíkových vazeb, potom DNA adhuje na povrch membrány. Po centrifugaci roztok obsahující kontaminující složky, přejde přes membránu a DNA zůstává navázána na silikagelové membráně. Dále DNA promýváme opakovaným přidáváním promývacího roztoku a odstředováním. Poté přeneseme kolonku na novou zkumavku. Nyní se bude DNA uvolňovat z membrány přidáním roztoku, který má nízký nebo žádný obsah solí. Po centrifugaci se DNA nachází v roztoku, který přešel přes membránu, a je připravena k dalšímu použití.

V současnosti je tato metoda součástí automatizovaných přístrojů a moderních kitů, které obsahují předem připravené roztoky. Ale složení jednotlivých roztoků se může měnit, proto je nutné postupovat vždy podle postupů konkrétního výrobce.

Shrnutí

Tato metoda izolace DNA pomocí silika kolonek je pohodlná a ekonomicky poměrně výhodná. Je časově nenáročná díky jednoduchému základnímu principu vazby, promytí a uvolnění. Také nevyžaduje zdouhavé kroky, jako je například extrakce organickými rozpouštědly, ani srážení ethanolem nebo polyethylenglykolem. Čistota získané DNA je poměrně vysoká, možné je znečištění sloučeninami, které se nachází v samotném systému a to je nevýhoda oproti metodám založeným na iontové výměně.

Měření koncentrace DNA

Před tím, než budeme s DNA dále pracovat, je vhodné změřit koncentraci a čistotu izolátu nukleových kyselin. Nejjednodušší metodou pro toto stanovení je měření absorbance v ultrafialové oblasti, jelikož nukleové kyseliny absorbují maximum záření při vlnové délce 260 nm. A také při této vlnové délce odpovídá míra absorbance koncentraci DNA v měřeném vzorku (Kočárek,2007; Slabý, 2015). Tato metoda se také používá pro stanovení míry kontaminace izolované DNA proteiny, které mají absorpční

maximum při vlnové délce 280 nm. Míra znečištění vzorku se zjistí stanovením poměru obou absorbancí a hodnota poměru by se měla pohybovat v rozmezí 1,8-2,0. Pokud jsou hodnoty nižší než 1,75, jedná se o vysoké znečištění vzorku a proto je vhodné izolovanou DNA znovu purifikovat (Kočárek, 2007).

Běžně se v laboratořích používají dvě metody k měření nukleových kyselin a jejich použití je závislé na předpokládané koncentraci a čistotě (Kočárek, 2007). Je to spektrofotometrická metoda, která využívá přímé stanovení v oblasti UV-záření, a fluorimetrická metoda, kdy se do vzorku přidává fluorescenční barvivo, nejčastěji se využívá ethidiumbromid, který se váže na DNA a koncentrace se pak stanovuje z intenzity fluorescence emitované barvivem (Kočárek, 2007).

Spektrofotometry, které se využívají k měření koncentrace DNA, generují veškeré hodnoty automaticky. Nejnovější přístroje nanášejí malé množství vzorku přímo do místa k vyústění optického vlákna analyzátoru a díky tomu odpadá použití kyvet a předchozí ředění vzorku (Slabý, 2015)

2.4 Polymerázová řetězová reakce

Principem polymerázové řetězové reakce (Polymerase chain reaction, PCR) je enzymatická amplifikace DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích (Bartůňková, Paulík, 2011). DNA se nejprve musí vyizolovat a poté ji můžeme použít v této technice. Amplifikací jedné molekuly získáme až miliardu stejných kopií (Ishamael, 2008).

Výchozím materiálem pro PCR může být DNA z různých zdrojů, například z tkání, parafinovaného materiálu nebo ze starých archeologických vzorků. PCR lze také použít k amplifikaci RNA, která musí být nejprve převedena na cDNA enzymovou reverzní transkriptázou (RT-PCR) (Theophilus, Rapley, 2002).

Hlavním významem PCR je schopnost poskytnout velké množství genových úseků o specifické sekvenci, které můžeme dále analyzovat. Jednoznačné vymezení konkrétní oblasti genu zajišťují primery (Kuciel a Urban, 2016).

Historie

Polymerázová řetězová reakce se stala od svého vývoje základním nástrojem v molekulárním výzkumu a v klinické diagnostice.

Před PCR byly molekulární metody vícestupňové, pracné a časově náročné. Pro namnožení DNA bylo nutné klonovat do plazmidů, plazmidy vložit do bakterie, bakterie pěstovat v kultuře, plazmidy izolovat z bakterií a DNA inzerty oddělit od plazmidové DNA. Před PCR bylo jedinou možností Southern blot, který vyžadoval několik kroků štěpení restrikcí enzymem, elektroforézu, blotování na membrány, hybridizaci s radioaktivně značenými oligonukleotidovými sondami a vývoj na rentgenovém filmu. Tyto techniky vyžadovali velké množství DNA a silné odborné znalosti pro správné výsledky.

Mnoho komponentů potřebných pro PCR bylo k dispozici již před vynalezením roku 1980 Karym Mullisem a jeho kolegy z Cetus Corporation. Syntéza DNA oligonukleotidů byla zdokonalena a probíhaly kroky k její automatizaci.

Sangerova metoda sekvenování, která byla oceněna Nobelovou cenou v roce 1980, prokázala prodlužování DNA polymerázy jednotlivých oligonukleotidových primerů vázaných na jejich komplementární řetězce.

Kary Mullis získal v roce 1993 Nobelovu cenu za zlepšení polymerázové řetězové reakce (Kennedy, Oswald, 2011).

Princip metody PCR

PCR je metoda pro mnohonásobné zmnožení specifického úseku DNA *in vitro* založená na principu replikace (Theophilus, Rapley, 2002). Tato reakce je založena na schopnosti DNA denaturovat při vysoké teplotě a zase zpátky renaturovat po jejím snížení. Přitom jsou zachována pravidla komplementarity bází (Bartůňková, Paulík, 2011). K opakující se enzymové syntéze komplementárních řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA dochází, když se připojí dva primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě. PCR umožňuje získat požadovanou specifickou sekvenci bez jakéhokoliv klonování (Theophilus, Rapley, 2002).

Průběh PCR reakce:

1. Počáteční denaturace PCR

Postačuje zahřátí směsi na 95°C po dobu 2 až 5 minut, důležitá je kompletní denaturace templátu. Pokud dojde jen k částečné denaturaci, molekuly

DNA se velice rychle renaturují a to může vést k nespecifické vazbě primerů a možným falešným výsledkům.

Vlastní řetězová reakce:

2. Denaturační krok

Dochází k separaci řetězců. Směs se zahřívá na 94- 95°C po dobu 10 až 45 sekund, záleží na objemu reakce a nebo tloušťce stěn zkumavek. Pokud je DNA nedostatečně denaturovaná, neumožňuje přístup primerům. Naopak pokud je denaturace příliš dlouhá, snižuje aktivitu DNA polymerázy.

3. Připojení primerů

Směs se ochlazuje na teplotu 55-65°C po dobu 15 až 90 sekund. Teplota určuje specifčnost a závisí na teplotě připojení primeru a templátu. Pro oba primery by se měla teplota připojení podobat a optimalizuje se v teplotním gradientu nebo se stanovuje empiricky.

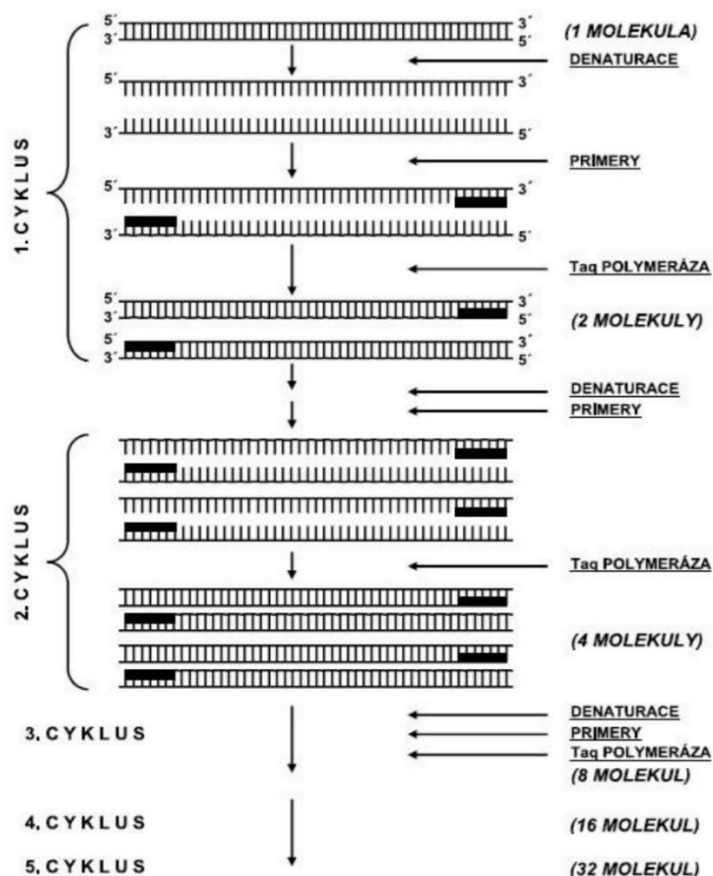
4. Polymerační reakce

Primery se prodlužují. Tato reakce probíhá obvykle při teplotě 72°C po dobu 15 až 90 sekund. DNA se syntetizuje pomocí Taq DNA polymerázy při této teplotě rychlostí 60 bazí za sekundu. Řetězce, které se nově syntetizují, slouží jako templáty pro další cyklus.

Kroky 2 – 4 se cyklicky střídají přibližně 30 – 40x, kvůli dostatečnému namnožení DNA. Cyklické střídání teplot zajišťuje průběh PCR reakce.

5. Závěrečná extenze se obvykle provádí po posledním cyklu , kdy je směs zahřáta na 72°C po dobu 5 minut, a slouží k dokončení syntézy a renaturaci jednořetězcových produktů (Pantůček, 2016).

Po každém cyklu dochází k zdvojnásobení počtu kopií úseku mezi nasedlými primery (Bartůňková, Paulík, 2011). Celý tento proces PCR reakce probíhá v přístrojích, kterým se říká thermocyclery a dokáží velmi rychle a přesně měnit požadované teploty.



Obrázek 2: Průběh amplifikace DNA pomocí PCR metody (Otová a Mihalová, 2012)

PCR reakce obsahuje několik součástí, které jsou potřebné pro průběh reakce:

- vzorek, ve kterém je obsažen zkoumaný úsek;
- primery (syntetické oligonukleotidy), které slouží jako základ pro syntézu nových vláken, obvykle jsou dlouhé 18-30 nukleotidů a musí se syntetizovat tak, aby byly schopny hybridizace s komplementárními sekvencemi na dvojvláknové DNA;
- směs čtyř deoxynukleotidtrifosfátů
- Mg^{2+} ionty
- Taq polymerázu
- PCR pufr, který obsahuje Tris-HCl, KCl a $MgCl_2$ (Bartůňková, Paulík, 2011)
-

Výběr primerů

Bohužel výběr účinných a specifických primerů zůstává poněkud empirický. Neexistuje žádná sada pravidel, která by zajistila syntézu účinného primerového páru. Přesto kvůli primerům nejčastěji dochází k selhání amplifikační reakce (Theophilus, Rapley, 2002). Následující pokyny pomohou při správném výběru:

1. Pokud je to možné, vybereme primery s náhodnou základní distribucí a s obsahem GC, který je podobný obsahu amplifikovaného fragmentu. Snažíme se vyhnout primerům s úseky polypurinů, polypyrimidinů nebo jiných neobvyklých sekvencí.
2. Vyhneme se sekvencím s významnou strukturou.
3. Zkontrolujeme vzájemné doplňování primerů proti sobě navzájem.

Tato pravidla pouze zvyšují šanci, že některá daná dvojice oligonukleotidů správně funguje, nejsou to absolutní požadavky (Erlich, 1989).

Primery se v PCR reakci nacházejí ve velké koncentraci na rozdíl dlouhých řetězců analyzované DNA, které v této fázi zůstávají odděleny. Jako základ pro syntézu nových vláken slouží hybridizované primery. Syntéza nových vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou – Taq polymeráza - tento enzym prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od 5' konce ke 3' konci při teplotě 72°C, a zůstává aktivní po zahřátí na 95°C nutných k denaturaci (Bartůňková, Paulík, 2011).

Sekvence, které nejsou komplementární k templátům, mohou být přidány do 5' konce primerů. Tyto exogenní sekvence jsou začleněny do dvouvláknového PCR produktu a poskytují prostředky pro zavedení restrikčních míst nebo regulačních prvků (promotory) na konci amplifikované cílové sekvence. Pokud je to požadováno mohou být použity kratší primery nebo degenerované primery

„Primer dimer“ je amplifikační artefakt, který se často pozoruje v produktu PCR, zvláště když se provádí mnoho cyklů amplifikace na vzorku obsahujícím velmi málo počátečních kopií šablony (Erlich, 1989).

Reakční prostředí pro PCR

Polymerázovou řetězovou reakci lze provést například v plastových zkumavkách, mikrotitrační destičce, mikrofluidní kartě, skleněné kapiláře nebo na podložním sklíčku, ale také v kapce emulze -emulzní PCR.

Výtěžek závisí na tom, z čeho se skládá reakční směs, na teplotním profilu a počtu cyklů PCR. Efektivita reakce je důležitá hlavně tam, kde se požaduje vysoká citlivost reakce, zejména tedy při práci s DNA o nízké koncentraci v extraktu nebo při analýze s velkým podílem degradované DNA. Existují také systémy o velké robustnosti, které mají přijatelnou účinnost PCR i v případě velkého podílu GC sekvencí v DNA a v reakčních směsích, které obsahují zbytky ethanolu, soli, SDS nebo interkalačních látek (Beránek, 2016).

Termocyklery

Od vzniku PCR bylo navrženo a vyrobeno mnoho typů a modelů termocyklerů. Na začátku se jako termocycler používal ohřívač spojený s chladícím systémem pro kapalnou komprese. S potřebou navrhnout rychlejší termocyklery byly zavedeny Peltierovy tepelné cykly a staly se nejběžnějším typem. Princip spočívá v tom, že se buď ohřívá nebo ochlazuje v závislosti na tom, jak je aplikován elektrický proud na prvek.

Termocyklery jsou navrženy tak, aby udržovaly definovanou stálou teplotu po určitý čas, poté měnily teplotu a znovu udržovaly stálou teplotu během daného času (Nolan et al., 2013). Mají programovatelný teplotní profil v rozsahu 4-100 °C a udržují dosažené teploty s přesností na desetiny °C. Je možné také závěrečné chlazení vzorku, pokud by PCR probíhala například přes noc.

K detekci ampliconů se používají elektroforetické metody, sekvenační techniky, chromatografické kolony, hybridizace nebo se provádí analýza PCR v reálném čase (real-time PCR) (Beránek, 2016).

Real time PCR (qPCR, RT-PCR)

Tato metoda je modifikace konvenční PCR a je vysoce citlivá i velmi specifická (Kubista, 2006). Tato technika je založena na použití fluorescenčně značených sond a detekčního systému, který je schopen měřit intenzitu fluorescence a ta je úměrná množství PCR produktu. Pomocí standardní křivky, která je sestrojena při použití známých množství cílové DNA, je možné přesně kvantifikovat množství cílové DNA ve vzorku (Paulík, 2005).

Při RT-PCR se množství vzniklého produktu monitoruje v průběhu reakce sledováním fluorescence barviv nebo sond zavedených do reakce, která je úměrná

množství vytvořeného produktu a počtu amplifikačních cyklů potřebných k získání určitého množství molekul DNA. S vysoce účinnými detekčními chemickými látkami, citlivými přístroji a optimalizovanými testy, které jsou dnes k dispozici, může být počet molekul DNA určité sekvence v komplexním vzorku stanoven s přesností a citlivostí postačující k detekci jedné molekuly.

Typické použití RT-PCR zahrnuje detekci patogenů, analýzu genové exprese, analýzu jednonukleotidového polymorfismu, analýzu chromozomových aberací a v poslední době také detekci proteinu pomocí imunoRT-PCR (Kubista, 2006).

Elektroforéza PCR produktů

Elektroforéza se používá jako základní metoda pro separaci PCR produktů a jejich dalších rozštěpených fragmentů. Tato separace probíhá na základě rozdílné velikosti analyzovaných molekul a na pohyblivosti (mobilitě) DNA fragmentů v elektrickém poli (Kuciel a Urban, 2016).

Elektroforéza využívá nabitých částic, které jsou schopny pohybovat se v elektrickém poli. Toto elektrické pole se tvoří vložení konstantního stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody, kdy na nabitou částici o náboji Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly - elektrostatická síla F_1 , která jí uvádí do pohybu a odpor viskózního prostředí F_2 , který jí brzdí. Rozdíl mezi elektrostatickou silou F_1 a odporem prostředí F_2 je hnací silou pohybu částice. Na začátku je rychlost nulová a částice je uvedena do pohybu elektrostatickou silou. S rostoucí rychlostí roste i síla odporu prostředí tak dlouho, dokud se obě síly působící na částici nevyrovnejí a poté nastane stacionární stav ($F_1 = F_2$). Elektrickou energii dodává napájecí zdroj, který umožňuje provoz v podmínkách konstantního proudu, napětí nebo výkonu které jsou nastavitelné (Gottwaldová, 2016).

Elektroforetické metody rozdělujeme na volnou elektroforézu, která se provádí na vodných roztocích, kde částice putují k elektrodě s opačnou polaritou. Dále rozdělujeme na zónovou elektroforézu na nosičích, kdy jsou nosiče hydrofilní (ve vodě nerozpustné) porézní, s co nejmenší absorpční schopností. Prvními nosiči byl neklížený (chromatografický) papír, acetát celulózy, škrob a celulóza. V současné době se jako nosiče používají hlavně gely – a to gel agarózový (AGE) a polyakrylamidový (PAGE). Při přípravě gelu můžeme ovlivňovat stupeň polymerace, tedy velikost pórů (Gottwaldová, 2016).

V roce 1948 získal švédský chemik Arne Tiselius Nobelovu cenu. Ve 30. letech minulého století postavil aparaturu separující proteiny krevního séra na základě jejich elektroforetických mobilit.

Gelová elektroforéza

Tato metoda se řadí mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Separace jednotlivých molekul je založena elektroforetické pohyblivosti dělených látek a na gelové filtraci.

Gely, které se používají pro separaci nukleových kyselin nebo bílkovin, se nejčastěji tvoří z polyakrylamidu nebo agarózy. Ty vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry a jejich velikost můžeme ovlivňovat složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul DNA a RNA o velikosti několika set bp až po zhruba po 50 bp. Polyakrylamidové gely se používají k separaci menších molekul (Rosypal a Doškař, 2005).

Elektroforéza na agarózovém gelu (AGE)

Elektroforéza na agarózovém gelu se používá k separaci sérových proteinů v rutinní klinické analýze. Tato metoda se vyznačuje dobrou reprodukovatelností jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní analýzu a lze jí považovat za nejjednodušší.

Rychlost migrace závisí na různých faktorech, jako je například náboj částic, teplota a povaha suspendovaného média. Gelová elektroforéza je technika, při které jsou makromolekuly, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny, nuceny procházet přes póry želatinového média pomocí elektrického proudu. Makromolekuly jsou separovány přes gel na základě velikosti elektrického náboje a dalších fyzikálních vlastností (Srivastava, 2017).

Agarózový gel připravujeme o různé hustotě. Agaróza se rozpouští v pufru, který se také nachází v elektrolytické vaně jako elektrolyt.

Vzorky se nanášejí do jamek v gelu, které se vytvořily pomocí tzv. hřebínku. DNA se zatíží pomocí tzv. nanášecího pufru, který je tmavě zbarvený a je tak umožněna kontrola vložení PCR produktu do příslušné jamky. Tento pufr také zajišťuje migraci DNA v gelu.

Aby se snadno odhadla velikost pozorovaných fragmentů DNA, nanáší se do jedné jamky gelu velikostní marker (DNA ladder), který má definovanou velikost jednotlivých fragmentů (např. 100 bp ladder) (Beránek, 2016).

Když proběhne elektroforéza je potřeba zviditelnit separované DNA fragmenty. Pro jejich vizualizaci se používá značení barvivem, které se váže na DNA. Barvivem může být například ethidiumbromid (EtBr), který se považuje za mutagen, a dalším barvivem může být SYBR Green, který se spíše používá při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu. Čím větší množství DNA se v proužku nachází, tím více se ethidiumbromid váže a tím je intenzita fluorescence větší. Ethidiumbromid se včleňuje mezi sousedící báze DNA a po ozáření UV světlem fluoreskuje. EtBr se může přidat přímo do gelu při jeho přípravě a nebo se gel barví až po elektroforetické separaci.

Agarózový gel

Agaróza je přírodní koloid extrahovaný z mořských řas. Jedná se o lineární polysacharid, který je tvořen základním opakovatelným jednotkovým agarobiose a ten je tvořen alternativními jednotkami galaktózy a 3,6-anhydrogalaktosy. Agaróza se obvykle používá v gelu v koncentraci mezi 0,7 – 3 %, což určuje velikost pórů. Nižší koncentrace mají za následek větší póry, zatímco vyšší koncentrace mají za následek menší velikosti pórů. Agarózové gely se obecně používají k oddělení větších molekul, jako jsou například nukleové kyseliny DNA a RNA, protože velikosti pórů jsou dostatečně velké, aby tyto molekuly mohly procházet gelem. Vlastnosti gelování jsou přisuzovány jak mezilehlé, tak i intramolekulární vodíkové vazbě uvnitř a mezi dlouhými řetězci agarózy. Tato zesíťovaná struktura poskytuje gelu dobré protikonvekční vlastnosti (Srivastava, 2017).

Pufry elektroforézy na agarózovém gelu

Typ použitého elektroforetického pufru může také ovlivnit rozlišení separace DNA. Používají se dva pufry. Jeden je TAE pufr (Tris-acetát-EDTA), který poskytuje lepší rozlišení fragmentů větších než 4 kb. A druhý je TBE pufr (Tris-borát-EDTA) a ten poskytuje lepší rozlišení fragmentů o velikosti 0,1- 3 kb. Pufry TBE mohou být několikrát znovu použity, než budou nahrazeny a také má silnější pufrovací kapacitu při

elektroforézách, které trvají delší dobu a nebo při elektroforézách běžících při vysokém napětí (Pelt-Vertikuil et.al., 2008).

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) je klíčovým postupem při charakterizaci proteinu v tom smyslu, že analytické reakce zkoumající strukturu a složení cílového proteinu jsou prováděny před a po separaci komplexní směsi makromolekul pomocí PAGE. Tato metoda nám umožňuje získat množství informací, například stanovení molekulové hmotnosti, čistotu proteinů, posttranslační modifikace, strukturu podjednotek, enzymovou aktivitu, zpracování proteinů nebo aminokyselinovou sekvenci (Rosenberg, 2005).

Použití PAGE gelů mělo velký vliv na naši schopnost rozlišovat proteiny v komplexních směsích, odhadovat jejich velikost a určovat některé jejich vlastnosti. Je to jedna ze standardních metod v biomedicíně, PAGE gely jsou tak univerzální.

PAGE gely jsou pozoruhodně univerzální pro provádění separace proteinů a nukleových kyselin s vysokým rozlišením (např. pro štěpení DNA ladderů v DNA sekvenčních reakcích nebo pro testy na ochranu RNázy). V případě proteinů mohou být PAGE gely použity k jejich oddělení podle velikosti nebo náboje v závislosti na jiných vlastnostech gelové matrice.

Polyakrylamidový gel

Polyakrylamidový gel (PAG) vzniká polymerací akrylamidu a bisakrylamidu za přítomnosti persulfátu, který je zdrojem volných radikálů, a tetramethylandiaminu, který má úlohu stabilizátoru radikálové reakce. Separace může probíhat buďto vertikálně nebo horizontálně. PAG jsou schopny rozlišit i fragmenty nukleových kyselin, které se vzájemně liší v délce třeba i o jediný nukleotid při velikosti separovaných řetězců do 500 nukleotidů.

Při elektroforetické separaci jednořetězcových molekul DNA bývá součástí gelu denaturační činidlo, kterým je například močovina nebo formamid - vznikne tzv. denaturační gel. Při denaturaci dvouřetězců, například při analýze bodových mutací, můžeme použít variantu PAG s rostoucím gradientem denaturačního činidla ve směru separace nukleových kyselin (Beránek, 2016).

Kromě chemického gradientu můžeme také použít gradient tepelný, kterého dosáhneme vložení gelu na kovovou desku, jejíž segmenty jsou zahřáty na různou nastavenou teplotu. Stoupající vliv denaturačních sil vede v průběhu separace k oddělování dvouřetězců a snížení rychlosti jejich pohybu. Pokud má nukleová kyselina kratší vzdálenost od startu než DNA obsahující běžnou alelu, svědčí to o přítomnosti mutace (Beránek, 2016).

Nevýhodou této metody je pouze toxicita monomeru, ze kterého se gel připravuje. Vzhledem k tomu většina pracovišť upřednostňuje již hotové komerčně vyrobené gely, které jsou sice dražší, ale bez zdravotního rizika (Bartůňková, Paulík, 2011)

SDS-PAGE

SDS (dodecylsulfát sodný; laurylsulfát sodný) - PAGE je jednou z nejpoužívanějších metod pro analýzu proteinů. Je kvantitativní a odděluje proteiny podle jejich velikosti. Proto je SDS-PAGE široce používána pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů (i když v některých případech může být nepřesná), pro sledování čistoty proteinů a ve spojení s analýzou Western blot pro identifikaci přítomnosti proteinů v komplexních směsích

Většina SDS-PAGE gelů se připravuje s úzkým stohovacím gelem nad primárním separačním gelem. Stohovací gel je polyakrylamid s nízkým procentem. Když proteiny migrují přes stohovací gel a narazí na štěpící gel, vytvoří to ,co bylo označováno jako „dopravní zácpa“, takže všechny proteiny vstupují do štěpícího gelu v podstatě ve stejnou dobu, což zlepšuje rozlišení a reprodukovatelnost (Corley, 2004).

3. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- Optimalizace metody izolace DNA z mrtvých včelích dělnic a plodu pro následnou PCR analýzu.
- Optimalizace PCR metody pro detekci *Ascosphaera apis*.
- Sběr a vyšetření vzorků včel ve vybraných včelstvech na přítomnost houbového patogena *Ascosphaera apis*.

4. Materiál a metody

Praktickou část ke své bakalářské práci jsem vykonávala v laboratořích Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích pod vedením a odborným dohledem paní Ing. Ireny Hoštičkové.

Detekce *Ascospaera apis* zahrnovala nejprve izolaci DNA z mrtvých včelích dělnic, poté její optimalizaci pomocí metody PCR a následné zobrazení pomocí gelové agaróзовé elektroforézy.

Pro detekci Zvápenatění včelího plodu pomocí metody PCR jsme použily celkem 20 vzorků včel od odlišných včelařů a včelstev. Vzorek č. 21 je čistá kultura *Ascospaera apis*, která nám sloužila jako pozitivní kontrola.

Tabulka 1: Vzorky odebrané od jednotlivých včelařů

včelstvo	včelař
1	Jiří Brabenec
2	Jiří Brabenec
3	Jiří Brabenec
4	Jiří Brabenec
5	Jiří Brabenec
6	Jiří Brabenec
7	Jiří Brabenec
8	Jiří Brabenec
9	Jiří Brabenec
10	Jiří Brabenec
11	Irena Hoštičková
12	Irena Hoštičková
13	Jan Kulík
14	Jan Kulík
15	Jan Kulík
16	Jan Kulík
17	Jan Kulík
18	Jan Kulík
19	Jan Kulík
20	Jan Kulík

4.1 Izolace DNA

Vzorky pro izolaci DNA byly odebrány z 20 včelstev. Nejprve musíme jednotlivé vzorky (včely) homogenizovat. Do jednotlivých mikroskopavek rozdělíme včely, ke

každé přidáme přibližně 3-4 skleněné kuličky. Všechny mikrozkušavky umístíme do stojánku, přiklopíme víkem a umístíme do homogenizátoru. Stojánek důkladně upevníme do držáku a zajistíme zámkem. Homogenizátor zapneme a přibližně po 4 minutách vzorky vyjmeme.



Obrázek 3: Homogenizátor

Izolace DNA pomocí kitu E.Z.N.A.

Tento produkt má inovativní systém, který radikálně zjednodušuje extrakci a čištění nukleových kyselin z různých zdrojů. Klíčem k tomuto systému je nová matice HiBind, která specificky a reverzibilně za určitých optimálních podmínek váže DNA nebo RNA, což umožňuje odstranění proteinů a dalších kontaminantů. Nukleové kyseliny se snadno eluují deionizovanou vodou nebo puftrem s nízkým obsahem soli.

Souprava poskytuje snadnou a rychlou metodu izolace genomové DNA pro konzistentní metodu PCR nebo Southern. Umožňuje také jednorázové nebo vícenásobné současné zpracování vzorků. Purifikovaná DNA může být přímo použita pro většinu aplikací jako je PCR, Southern blotting a štěpení restričními enzymy.

Tato metoda je vhodná pro izolaci DNA až z 30 mg tkáně. Výtěžky se liší v závislosti na zdroji.

Materiály a vybavení:

Tabulka 2: Materiály a vybavení

- Stolní centrifuga schopná 14000 x g
- Vodní lázně, tepelné bloky nebo inkubátory, které jsou schopné zahřívat na 55° -70° C
- Vortex
- 100 % ethanol
- 100 % isopropanol
- Automatické pipety
- mikrokolonky
- 2ml zkumavky
- OB Protease Solution
- TL Buffer
- HBC Buffer
- DNA Wash Buffer
- Elution Buffer
- BL Buffer

Před začátkem si nastavíme vodní lázně, tepelné bloky nebo inkubátory na 55°C a na 70°C. Připravíme si DNA Wash Buffer a HBC Buffer podle návodu. Dáme si zahřívat do inkubátoru Elution Buffer na 70°C.

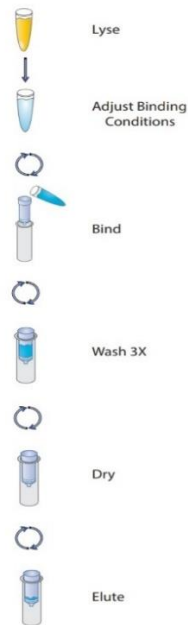
Postup:

1. Navážíme si 30 mg tkáně od každého vzorku a přeneseme jí do 1,5 mL mikrozkuvek.
2. Přidáme 200µl TL Buffer. Pro rychlejší lýzu, rozmělníme tkáň na malé kousky.
3. Dále přidáme 25 µl OB Protease Solution a pomocí vortexu důkladně promícháme.
4. Necháme inkubovat po dobu 90-ti minut při 55° C.
Pokud nemáme k dispozici třepací vodní lázeň, vortexujeme vzorky každých 20-30 minut. Doba lýzy závisí na množství a typu použité tkáně.
5. Necháme vzorky centrifugovat po dobu 5 minut při 14000 x g otáčkách
6. Přeneseme supernatant do sterilní mikrocentrifugační mikrokolonky o objemu 1,5 ml, opatrně bez jakýchkoliv usazenin.
7. Přidáme 220 µl BL Buffer. Upravíme si objem BL Bufferu na základě množství výchozího materiálu. A pomocí vortexu důkladně promícháme.

Poznámka: Po přidání BL Bufferu se může vytvořit sraženina, to neinterferuje s obnovou DNA.

8. Vzorky dále inkubujeme po dobu 10-ti minut při 70°C.

9. Přidáme 220µl 100% ethanolu. Objem potřebného ethanolu si můžeme upravit na základě množství materiálu. Opět důkladně zvertexujeme.
10. Vložíme HiBind DNA minikolonku do 2ml zkumavky.
11. Přeneseme celý vzorekz kroku 9 do minikolony HiBind DNA, včetně všech vzniklých precipitátů, které se vytvořily.
12. Opět necháme všechny vzorky centrifugovat na maximum (14000 x g) po dobu 1 minuty.
13. Odstráníme filtrát a znovu použijeme zkumavky.
14. Do zkumavek přidáme 500µl HCB Buffer. HCB Buffer musí být před použitím naředěný 100% isopropanolem podle návodu.
15. Centrifugujeme při maximální rychlosti (14000 x g) po dobu 30-ti sekund.
16. Po vyjmutí z centrifugy odstráníme filtrát i se zkumavkou.
17. Vložíme mikrokolonku do nové 2ml odběrové zkumavky.
18. Přidáme 700 µl DNA Wash Buffer.
Poznámka: DNA Wash Buffer musí být před použitím naředěn 100% ethanolem.
19. Opět centrifugujeme při maximální rychlosti po dobu 30 sekund.
20. Poté odstráníme filtrát a znovu použijeme zkumavky
21. Opakujeme korky 18-20 pro druhý promývací krok pomocí DNA Wash Buffer.
22. Zcentrifugujeme prázdné mikrokolonky s odběrovými zkumavkami maximální rychlostí po dobu 2 minut, aby se kolonka vysušila. Tento krok je důležitý pro odstranění stopového ethanolu, který by mohl rušit následné aplikace.
23. Přeneseme mikrokolonky do prázdných mikrocentrifugačních zkumavek bez nukleázy.
24. Přidáme 100 µl Elution Buffer, který je zahřátý na 70°C. Necháme temperovat při pokojové teplotě po dobu 2 minut.
25. Nakonec centrifugujeme při maximální rychlosti po dobu 1 minuty.



Obrázek 4: Průběh izolace DNA; inkubátor pro izolaci DNA

Čistotu a množství vyzolované DNA změříme na přístroji BioSpec-nano a naměřené hodnoty zaznamenáme.



Obrázek 5: Přístroj pro měření koncentrací DNA BioSpec-Nano

4.2 PCR

Tato metoda slouží k rychlému a snadnému zmnožení úseku DNA a je založená na principu replikace nukleových kyselin. Úseky DNA, které chceme amplifikovat, musí být na začátku a na konci ohraničeny primery, což jsou krátké oligonukleotidy DNA. K syntéze nového vlákna potřebujeme termostabilní Taq polymerázu.

Polymerázová řetězová reakce probíhá v přístrojích zvaných termocykler. Toto zařízení dokáže během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia.

Výsledkem je obrovské množství kopií původní sekvence DNA. Metoda je velice citlivá, jelikož dokáže odhalit i jedinou molekulu DNA ve vzorku. Při práci musíme být velice pečliví a opatrní, aby nedošlo ke kontaminaci.

Reakční složky:

Tabulka 3: Reakční složky

Master mix	5 µl
H2O	3 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl
Vzorek DNA	1 µl

Tabulka 4: Použité primery

primer	sekvence	velikost	zdroj
AscFOR	TGTGTCTGTGCGGCTAGGTG	136 bp	Garrido-Bailón et al., 2013
AscREV	GCTAGCCAGGGGGGAATAA		
Ame actin F	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	236 bp	Calla et al., 2018
Ame actin R	AGAATTGACCCACCAATCCA		

Příprava reakční směsi:

Všechny reakční složky jsou uloženy v mrazáku, proto je musíme před pipetováním rozmrazit. Připravíme si a řádně označíme mikrozkušavky, do kterých budeme reakční směs pipetovat.

Pro přesnější práci si nejprve připravíme směs pro všechny vzorky a po rozpipetování přesných objemů přidáme jako poslední 1 μl DNA, aby se snížilo riziko kontaminace. Směs připravíme pro 21 vzorků a jednu negativní kontrolu.

Tabulka 5: Použité reagentie pro přípravu reagenční směsi

Reagentie	pro 1 vzorek	pro 22 vzorků
Master mix	5 μl	110 μl
H ₂ O	3 μl	66 μl
Forward primer	0,5 μl	11 μl
Reverse primer	0,5 μl	11 μl

Do každé mikrozkušavky pipetujeme 9 μl připravené reakční směsi a 1 μl DNA a jako negativní kontrolu máme pouze reakční směs bez DNA.

PCR reakce

Ihned po namíchání reakční směsi vložíme vzorky do termocykleru a řádně utáhneme víko. Poté nastavíme potřebné teploty a časy.

95 °C / 5 minut

95 °C / 10 sekund

60 °C / 30 sekund

72 °C / 1 minuty

72 °C / 10 minut

4 °C

Kroky 2 – 4 opakujeme 35x



Obrázek 6: Termocyklér pro PCR

4.3 Gelová elektroforéza

Příprava agarózového gelu:

Nejprve si navážíme na analytických vahách 1,5 g agarózy a kvantitativně převedeme do baňky. Dále si naměříme v odměrném válci 120 ml TBE pufru, který obsahuje Tris kyselinu boritou a EDTA, a smícháme s připravenou agarózou. Vše důkladně promícháme.

Po promíchání vložíme baňku do mikrovlnné trouby a zahříváme, dokud se roztok nezačne vařit (cca 4 minuty) a nebude obsahovat žádné kousky. Průběžně roztokem mícháme.

Když je roztok bez jakýchkoliv částic, mikrovlnnou troubu vypneme a baňku ochladíme pod tekoucí vodou přibližně na 60°C.

Po ochlazení na danou teplotu baňku přeneseme do digestoře a automatickou pipetou do roztoku přidáme 6 µl ethidium bromidu pro obarvení a pro vizualizaci DNA pod UV světlem. Opět roztok důkladně promícháme.

Dále roztok přelijeme do předem připravené vaničky, ve které jsou umístěny hřebínky, které vytvoří v gelu jamky pro nanesení vzorků. Odstraníme případné bubliny, které se nám vytvořily. Gel necháme cca 10 minut ztuhnout.

Když nám gel ztuhne, odstraníme hřebínky a gel přeneseme velmi opatrně do elektrofororetické vany, která je naplněna TBE pufrem. Gel ve vaně musí být zcela překryt tímto elektrodovým pufrem.

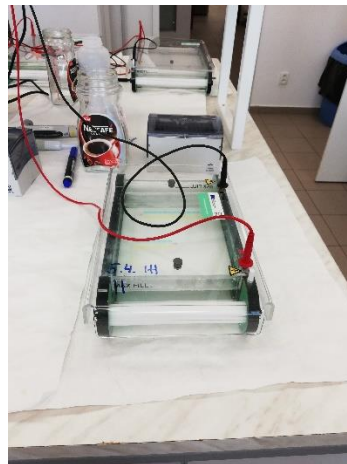
Nanesení vzorků na gel:

Nejprve je nutné zkontrolovat správnou orientaci jamek vůči elektrodám. Vzorky budeme nanášet vždy směrem ke katodě.

Do první jamky naneseme pomocí automatické pipety 9 μ l DNA standardu (DNA ladder, neboli velikostní marker), podle kterého můžeme odhadnout velikost fragmentů vzorků DNA. Druhou jamku naplníme analyzovaným vzorkem DNA. Následujících dvacet jamek naplníme našimi vzorky, do další jamky naneseme negativní kontrolu a do poslední opět DNA standard.

Průběh separace:

Po nanesení vzorků do jamek v gelu, opatrně a správně nasadíme víko elektroforetické vany a elektrody zapojíme do zdroje napětí. Dělení vzorků probíhá při 120 V po dobu 45 minut. Po chvíli zkontrolujeme, zda-li nám dělení probíhá správným směrem.



Obrázek 7: Elektroforetická vana

Po ukončení elektroforetické separace odpojíme zdroj napětí a z vany sejmemé víko. Agarózový gel opatrně vyjmeme z elektroforetické vany a pomocí plastové nádoby přeneseme gel do transiluminátoru, kde dojde k vizualizaci fragmentů DNA.

5. Výsledky

Byla vyizolována DNA z 20 včelstev a čisté kultury houby *Ascosphaera apis*, který sloužil jako pozitivní vzorek. U všech vzorků DNA byla změřena koncentrace DNA. Dále byla provedena PCR reakce nejprve na přítomnost DNA včely, za použití specifických primerů pro gen Actin, a poté PCR na přítomnost původce onemocnění zvápenatění včelího plodu ve včelstvech za použití primerů specifických pro *Ascosphaera apis*.

Koncentrace získané DNA

Tabulka 6: Naměřená koncentrace DNA

včelstvo	koncentrace DNA (ng/μl)
1	30,96
2	54,53
3	46,48
4	70,1
5	72,03
6	223,4
7	29,33
8	69,89
9	55,67
10	122,35
11	55,57
12	90,74
13	45,84
14	44,69
15	137,15
16	32,85
17	18,1
18	28,85
19	122,81
20	30,77
A. apis	-0,65

V tabulce č. 6 jsou uvedeny naměřené koncentrace vyizolované DNA. Nejvyšší koncentrace je u vzorku č. 15 a naopak nejnižší koncentraci má vzorek č. 17. U některých

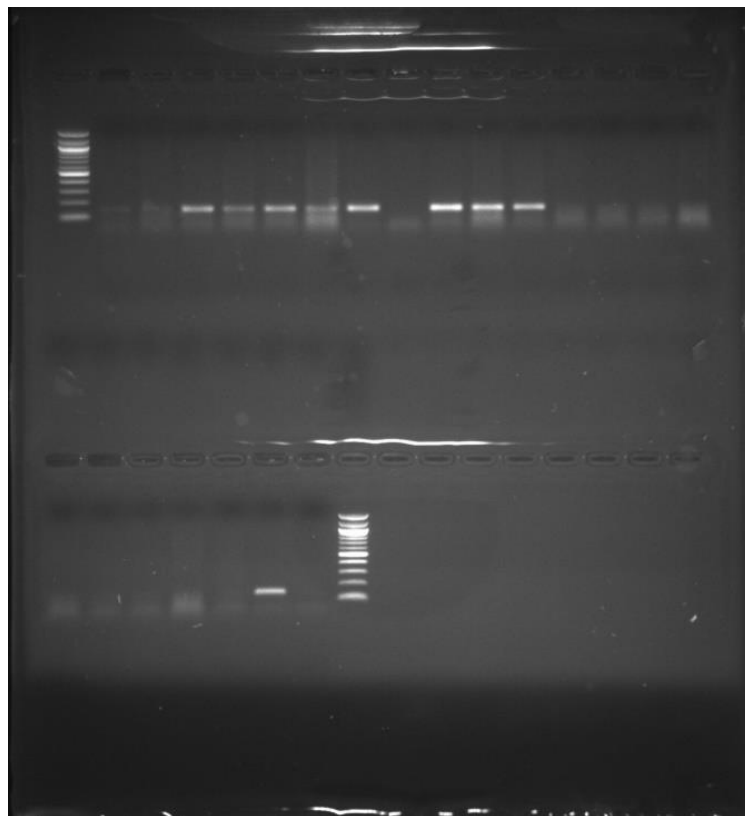
vzorků se nám podařilo získat velmi čistou DNA a u některých méně čistou. Koncentrace u jednotlivých vzorků se poměrně liší, není stabilní

Vlastní PCR detekce *Ascospaera apis*

Pro detekci onemocnění a včelí DNA pomocí PCR jsme použili primery, které jsou zobrazeny s přesnou velikostí a sekvencemi v tabulce č. 4.

Na obr. č. 8 je vyobrazen elektroforeogram PCR detekce DNA včely. U většiny vzorků je detekována přítomnost PCR fragmentu, která odpovídá očekávané velikosti (136 bp), což ukazuje dostatečné množství DNA pro úspěšný průběh PCR reakce. Pouze u včelstva č.16 je výsledek negativní, jelikož zde pravděpodobně došlo k chybě při izolaci DNA.

Obrázek 8: Elektroforeogram fragmentů získaných PCR reakcí při použití primerů specifických pro DNA včely. Pozice vzorků v horním řádku zleva: velikostní marker, včelstvo č. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, pozice vzorků ve spodním řádku zleva:

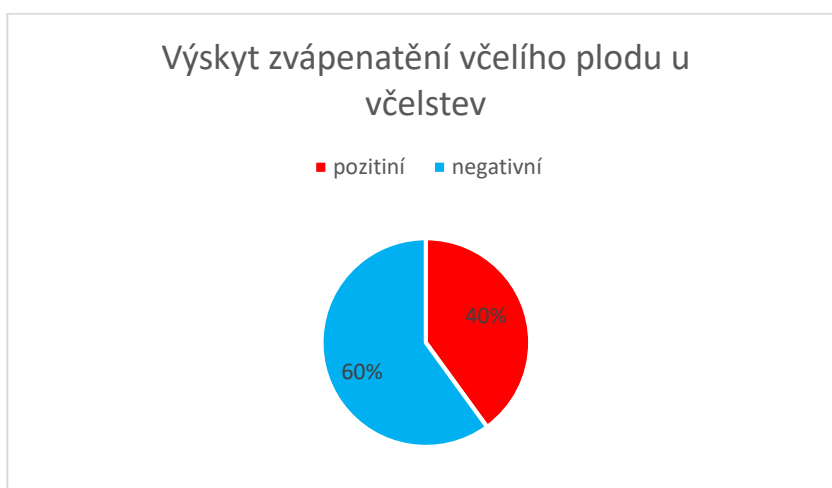


*Obrázek 9: Elektroforeogram fragmentů získaných PCR reakcí při použití primerů specifických pro *Ascospaera apis*. Pozice vzorků v horním řádku zleva: velikostní marker, včelstvo č. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, pozice vzorků ve spodním řádku*

Na elektroforeogramu (obrázek č. 9) jsou zobrazeny fragmenty získané PCR reakcí při použití primerů specifických pro *Ascospaera apis*. Na elektroforeogramu jsou také zobrazeny DNA laddery (100 bp), které se nachází na první a poslední pozici. Dále se na 23. pozici nachází negativní kontrola, která nám vyšla správně negativně. A na 22. pozici se nachází vyšetřovaná houba *Ascospaera apis*, které vyšla také správně pozitivně. Do ostatních jamek byli umístěny vzorky včelstev pro vyšetření na přítomnost *A. apis*. Můžeme vidět, že výsledkem jsou přibližně 140 bp, což by přibližně odpovídalo velikosti použitých primerů (136 bp).

Tabulka 7: Souhrn výsledků vyšetření včelstev u jednotlivých včelařů na přítomnost původce zvápenatění včelího plodu *A. apis*

včelstvo	včelař	výskyt <i>A. apis</i>
1	Jiří Brabenec	-
2	Jiří Brabenec	-
3	Jiří Brabenec	+
4	Jiří Brabenec	+
5	Jiří Brabenec	+
6	Jiří Brabenec	+
7	Jiří Brabenec	+
8	Jiří Brabenec	-
9	Jiří Brabenec	+
10	Jiří Brabenec	+
11	Irena Hoštičková	+
12	Irena Hoštičková	-
13	Jan Kulík	-
14	Jan Kulík	-
15	Jan Kulík	-
16	Jan Kulík	-
17	Jan Kulík	-
18	Jan Kulík	-
19	Jan Kulík	-
20	Jan Kulík	-
A. apis		+



Graf 1: Grafické znázornění výskytu *A. apis* u vyšetřovaných včelstev

Celkem nám při vyšetřování vyšlo 8 včelstev pozitivních (40%) a 12 včelstev negativních (60%).

6. Diskuze

Zvápenatění včelího plodu je invazivní mykotické onemocnění, které napadá včely medonosné (*Apis mellifera*) a je způsobováno mikroskopickou houbou *Ascosphaera apis* (Borum, Ulgen, 2015). Toto onemocnění se týká výhradně včelího plodu, ale pravděpodobně jsou spory přenášeny na tělech dělnic. Obvykle nezničí celé včelstvo, může však způsobit značné ztráty, pokud jde o počet včel a jejich produktivitu (Aaronstein, Murray, 2010). Patogeny mohou být přítomny také ve včelích produktech, jako je med, pyl nebo mateří kašička (Teixeira, 2018). Vnější nebo vnitřní faktory mohou ovlivnit přežití mikroorganismů v těchto produktech (Franco, 1996). Zvápenatění se vyskytuje ve včelstvech po celém světě a existují náznaky toho, že se výskyt zvyšuje (Aronstein, Murray, 2010). Larvy přijímají při krmení spóry houby, což dovoluje vyvinutí onemocnění uvnitř larev. Nakažené larvy jsou zabity, později uschnou a zanechávají mumifikované mrtvoly, které připomínají malý kousek křídla (Jensen et al., 2015). Navíc toto onemocnění vyžaduje predispoziční stav v náchylném plodu, aby se mohl vyvíjet. Larvy jsou několik hodin po zapečetění nejvíce citlivé na možný stres, který vyvolává onemocnění (Flores et al., 2005). Kvůli nedostatku léčebných přípravků a potřebě, aby se zachovaly zdravé a přirozené vlastnosti včelařských produktů, musí být vyvinuty alternativní metody pro kontrolu zwápenatění (Maxfield-Taylor, 2015). Pro určení nejlepších kontrolních opatření je důležité vědět více o tom, jak je nemoc přenášena a o možných predispozičních podmínkách, které vyvolávají onemocnění. Byly vyvinuty techniky, které umožnily experimentální vyjádření klinických symptomů kontrolovaným způsobem při zachování přirozených podmínek (Flores et al., 2005).

Zvápenatění včelího plodu lze vyšetřovat více způsoby. Jedním ze způsobů může například být vyšetřování pomocí metody PCR, které je použito v této bakalářské práci a dále ho také využil Garrido-Bailón (2013), Hornitzky (2001) nebo Rehner a Evans (2009). Dalším způsobem může být například mikroskopické vyšetření, které použili vědci z Kanady (Gohnauer, Hughes, 2012).

Rychlá detekce a identifikace *Ascosphaera apis* může být prováděna pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Podle Reynaldiho (2015) je při identifikaci onemocnění pomocí PCR důležitá kompatibilita primeru, pečlivý návrh primeru a kontrola reakčních podmínek.

V této práci jsem použila specifické primery pro *A. apis* (Garrido-Bailón et al., 2013), pomocí kterých jsem úspěšně amplifikovala fragmenty očekávané velikosti, které

byly snadno rozlišeny elektroforézou na agarozovém gelu. . Pro detekci včelí DNA jsem použila primery pro včelí *Actin* s očekávanou délkou amplifikovaného fragmentu 136 bp a (Calla et al., 2018). Získaná délka fragmentů tomu odpovídala.

Celkem jsem vyšetřovala 20 vzorků od tří různých včelařů a jejich včelstev. Jako 21 vzorek byla čistá kultura mikroskopické houby *Ascosphaera apis*, která sloužila jako pozitivní kontrola. Pro izolaci DNA z této kultury jsem použila stejnou metodu, jako pro izolaci DNA z ostatních vzorků včel. To ovšem nebyl dobrý způsob, jelikož se vyzolovalo velmi malé množství DNA. Pro příští izolaci bych použila jinou metodu, kterou například použil Reynaldi et al. (2015).

Z mých výsledků vyplývá, že z celkem 20 zkoumaných včelstev bylo 8 (40%) pozitivních na *Ascosphaera apis*. Garrido-Bailón et al., (2013), který se zabýval mimo jiné i výskytem zvápenatění ve včelstvech, zaznamenal výskyt *A. apis* u méně než 5% zkoumaných včelstev. Další výzkum probíhal například v Jižní Africe, kde Strauss et al., (2013) zaznamenal výskyt zvápenatění u 46 % zkoumaných včelstev v průběhu jednoho roku. Z mých výsledků a výsledků ve zmíněných publikacích vyplývá, že výskyt nakažených včelstev může být poměrně vysoký. Vzhledem k tomu, že toto onemocnění může mít za následek snížení produkce medu o 5 - 37 % (Aaronstein, Murray, 2010) a celkové oslabení včelstev, je toto zjištění podle mého názoru alarmující. Ve své práci jsem testovala vzorky pouze ze 3 včelnic, pro ověření nálezové situace v ČR bude v budoucnu potřeba analyzovat více vzorků z většího území.

7. Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabývala především popisem houbového onemocnění zvápenatění včelího plodu a jeho vlivem na nakažené včelstvo. Celkem jsem vyšetřovala 20 vzorků od tří různých chovatelů. Od pana včelaře Jiřího Brabence jsem měla celkem 10 vzorků, z toho vyšly 3 včelstva (30%) pozitivně a 7 včelstev (70%) negativně na *Ascosphaera apis*. U vzorků od paní včelařky Ireny Hoštičkové vyšel 1 vzorek negativně (50%) a jeden pozitivně (50%) a u pana Jana Kulíka vyšla všechna včelstva negativně (100%). Celkové procento nakaženosti u mnou vyšetřovaných včelstev je 40%.

Z mých výsledků vyplývá, že výskyt nakažených včelstev je poměrně vysoký. Vzhledem k tomu, že toto onemocnění může mít za následek snížení produkce medu až téměř o polovinu a celkové oslabení včelstev, je toto zjištění podle mého názoru alarmující. Ve své práci jsem testovala vzorky pouze ze 3 včelnic, pro ověření nakažové situace v ČR bude v budoucnu potřeba analyzovat více vzorků z většího území.

8. Seznam použité literatury

AL TOUFALIA, Hasan, Sophie E. F. EVISON, William O. H. HUGHES a Francis L. W. RATNIEKS. Both hygienic and non-hygienic honeybee, *Apis mellifera*, colonies remove dead and diseased larvae from open brood cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2018, **373**(1751) [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1098/rstb.2017.0201. ISSN 0962-8436. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rstb.2017.0201>

ANZENBACHER, Pavel a Jan KOVÁŘ. *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*. Praha: Československá redakce VN MON, 1986.

ARONSTEIN, K.A. a K.D. MURRAY. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2010, **103**, S20-S29 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.018. ISSN 00222011. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002220110900189X>

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada, 2005. ISBN 8024706911.

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

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

BORUM, A. Ebru a Mihriban ULGEN. Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) infection and fungal agents of honey bees in North-West Turkey. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2015, **47**(2), 170-171 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1080/00218839.2008.11101447. ISSN 0021-8839. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2008.11101447>

CALLA, B., M. MACLEAN, L.-H. LIAO, I. DHANJAL, C. TITTIGER, G.J. BLOMQUIST a M.R. BERENBAUM. Functional characterization of CYP4G11-a highly conserved enzyme in the western honey bee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* [online]. 2018, **27**(5), 661-674 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1111/imb.12516. ISSN 09621075. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/imb.12516>

CORLEY, Ronald B. *A guide to methods in the biomedical sciences: Ronald B. Corley*. New York: Springer, 2004. ISBN 0387228446.

ČAPKOVÁ FRYDRYCHOVÁ, Radmila. *Ekotech: Kurz základních metod molekulární biologie* [online]. České Budějovice [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/10436559-Kurz-zakladnich-metod-molekularni-biologie.html>

ČERMÁK, Květoslav et al. *Včelařství*. České Budějovice: PSNV, 2016-. ISBN 978-80-260-9090-8.

ERLICH, Henry A. *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. New York: Stockton Press, 1989. ISBN 093585956x.

FLORES, J.M., I. GUTIERREZ a R. ESPEJO. The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia* [online]. 2005, **97**(6), 1171-1176 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.3852/mycologia.97.6.1171. ISSN 0027-5514. Dostupné z: <http://www.mycologia.org/cgi/doi/10.3852/mycologia.97.6.1171>

GARRIDO-BAILÓN, Encarna, Mariano HIGES, Amparo MARTÍNEZ-SALVADOR, Karina ANTÚNEZ, Cristina BOTÍAS, Aránzazu MEANA, Lourdes PRIETO a Raquel MARTÍN-HERNÁNDEZ. The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascospaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial Biotechnology* [online]. 2013, , n/a-n/a [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1111/1751-7915.12070. ISSN 17517915. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12070>

GOCHNAUER, T. A. a S. J. HUGHES. DETECTION OF ASCOSPHAERA APIS IN HONEY BEE LARVAE (HYMENOPTERA: APIDAE) FROM EASTERN CANADA. *The Canadian Entomologist* [online]. 2012, **108**(09), 985-988 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.4039/Ent108985-9. ISSN 0008-347X. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0008347X00037913

ISHAMEAL, Faoud a Cristiana STELLATO. *Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician*. [online]. [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60323-7.

JARA, Laura, Diego MARTÍNEZ-LÓPEZ, Irene MUÑOZ a Pilar DE LA RUA. Epidemiological Survey of *Ascosphaera apis* in Small-Scale Migratory *Apis mellifera iberiensis* Colonies. *Sociobiology* [online]. 2018, **65**(2), 285-290 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.13102/sociobiology.v65i2.2685. ISSN 2447-8067. Dostupné z: <http://periodicos.uefs.br/index.php/sociobiology/article/view/2685>

JENSEN, Annette Bruun, Kathrine ARONSTEIN, José Manuel FLORES, Svjetlana VOJVODIC, María Alejandra PALACIO a Marla SPIVAK. Standard methods for fungal brood disease research. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2015, **52**(1), 1-20 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.1.13. ISSN 0021-8839. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3896/IBRA.1.52.1.13>

KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.

KENNEDY, Suzanne a Nick OSWALD. *PCR troubleshooting and optimization: the essential guide*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, c2011. ISBN 1904455727.

KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-.

KUCIEL, Jiří a Tomáš URBAN. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2016. ISBN 978-80-7509-385-1.

MAXFIELD-TAYLOR, Sarah A., Alija B. MUJIC, Sujaya RAO a James C. NIEH. First Detection of the Larval Chalkbrood Disease Pathogen *Ascosphaera apis* (Ascomycota: Eurotiomycetes). *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(4) [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1371/journal.pone.0124868. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124868>

NOLAN, Tania a Stephen A. BUSTIN. *PCR Technology: Current Innovations*. 3 rd. CRC Press, 2013. ISBN 9781439848135.

OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. V Praze: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8.

PANTŮČEK, Roman. *Polymerázová řetězová reakce*. Masarykova univerzita, 2016. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi6400/um/PCR.pdf>

PELT-VERKUIL, Elizabeth van, Alex van BELKUM a John P. HAYS. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Dordrecht: Springer, c2008. ISBN 9781402062414.

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 9788024734590.

PŘIDAL, Antonín a Květoslav ČERMÁK. *Včelařství*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005. ISBN 80-7157-850-9.

REHNER, STEPHEN A. a JAY D. EVANS. Microsatellite loci for the fungus *Ascosphaera apis*: cause of honey bee chalkbrood disease. *Molecular Ecology Resources* [online]. 2009, **9**(3), 855-858 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02455.x. ISSN 1755098X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0998.2008.02455.x>

REYNALDI, Francisco J, Ana Claudia LÓPEZ, Graciela N ALBO a Adriana M ALIPPI. Differentiation of *Ascosphaera apis* isolates by rep-PCR fingerprinting and determination

of chalkbrood incidence in Argentinean honey samples. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2015, **42**(4), 68-76 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1080/00218839.2003.11101096. ISSN 0021-8839. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2003.11101096>

ROSENBERG, Ian M. *Protein analysis and purification: benchtop techniques*. 2nd ed. Boston: Birkhäuser, c2005. ISBN 0817643419.

ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 4., (inovované) vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2005. ISBN 80-902562-5-2.

SLABÝ, Ondřej. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-121-.

SRIVASTAVA, Neeraj. *Protocols in semen biology (comparing assays)*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 9789811051999.

STOCK, Patricia. *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques* [online]. CABI, 2009 [cit. 2019-02-12]. ISBN 9781845934798.

STRAUSS, Ursula, Hannelie HUMAN, Laurent GAUTHIER, Robin M. CREWE, Vincent DIETEMANN a Christian W.W. PIRK. Seasonal prevalence of pathogens and parasites in the savannah honeybee (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2013, **114**(1), 45-52 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/j.jip.2013.05.003. ISSN 00222011. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022201113000748>

SVOBODA, Jaroslav, ed. *Nemoci a škůdci včely medonosné*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1968. ISBN 07-059-68.

ŠVANCER, Ľudovít. *Boj proti chorobám včiel*. Bratislava: Príroda, 1977. Knižnica včelára (Príroda). ISBN 64-075-77. 64-075-77.

TEIXEIRA, Érica Weinstein, Lubiane GUIMARÃES-CESTARO, Maria Luisa Teles Marques Florêncio ALVES, Dejair MESSAGE, Marta Fonseca MARTINS, Cynthia Fernandes Pinto da LUZ a José Eduardo SERRÃO. Spores of *Paenibacillus* larvae, *Ascosphaera apis*, *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in bee products supervised by the Brazilian Federal Inspection Service. *Revista Brasileira de Entomologia* [online]. 2018, **62**(3), 188-194 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/j.rbe.2018.04.001. ISSN 00855626. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085562617301760>

THEOPHILUS, Bimal D. M. a Ralph RAPLEY. *PCR mutation detection protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2002. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 187. ISBN 0896036170.

VESELÝ, Vladimír. *Včelařství*. Praha: Brázda, 2003. ISBN 80-209-0320-8.

VESELÝ, Vladimír. *Včelařství*. Vyd. 3. Praha: Brázda, 2013. ISBN 978-80-209-0399-0.

ZIMA, Jan. *Genetické metody v zoologii*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN isbn80-246-0795-6.

DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors [online]. Springer Singapore, 2018 [cit. 2019-02-12]. ISBN 978-981-13-1583-1. Dostupné z: DOI: 10.1007/978-981-13-1583-1

Spores of Paenibacillus larvae, Ascosphaera apis, Nosema ceranae and Nosema apis in bee products supervised by the Brazilian Federal Inspection Service [online]. , 7 [cit. 2018-11-23]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.04.001>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085562617301760?via%3Dihub>

<http://www.beedol.cz/leceni/leky/>

Raška, M. – Základní postupy práce s nukleovými kyselinami (2006, dostupné 11.5.2009)) http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/II.workshop/II.%20workshop_Mil