



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra zootechnických věd

Bakalářská práce

Porovnání metod izolace plazmidové DNA s ohledem na
kvantitu a kvalitu získaných plazmidů

Autorka práce: Kristýna Vaňáčová

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant práce: doc. Ing. Vladimír Mařha, DrSc.

České Budějovice
2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Bakterie *Escherichia coli* je využívána jak laboratorně, tak průmyslově pro produkci rekombinantních proteinů. Genetická informace aktivující syntetickou dráhu daného proteinu je součástí plazmidové DNA vnesené do buňky. Právě izolace plazmidů v dostatečném množství, čistotě a formě je jedním ze základů tvorby rekombinantních proteinů. Tato bakalářská práce se zaměřuje na porovnání metod izolace plazmidové DNA ve velkých objemech. V první části práce popisuje formou literárního přehledu bakterii *E. coli* a plazmidovou DNA. Experimentální části pak popisuje vliv metody izolace na množství a kvalitu izolované plazmidové DNA. Výsledné hodnocení bylo provedeno pomocí agarozové elektroforézy a spektrofotometrie s přístrojem NanoDrop. Nejvyšší koncentrace plazmidové DNA a s nejvyšší čistotou poskytovala izolační metoda založená na alkalické lýze.

Klíčová slova: *Escherichia coli*, plazmidová DNA, izolace, kvantifikace

Abstract

Escherichia coli bacteria are commonly used in laboratory and industrial settings for recombinant protein production. The genetic information that activates the synthetic pathway for such proteins is encoded within plasmid DNA, which is inserted into the cell. The isolation of plasmids in sufficient quantity, purity, and proper form is a fundamental step in recombinant protein production.

This bachelor's thesis focuses on comparing different methods for isolating plasmid DNA on a large scale. The initial section provides a literature review on *Escherichia coli* bacteria and plasmid DNA. The experimental part examines how the isolation method affects the amount and quality of the isolated plasmid DNA. Assessment was conducted using agarose electrophoresis and spectrophotometry with a NanoDrop device. The highest concentration of plasmid DNA, along with the highest purity, was achieved using an isolation method based on alkaline lysis.

Keywords: *Escherichia coli*, plasmid DNA, isolations, quantification

Poděkování

V této části bych chtěla poděkovat panu prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Vladimíru Mařhovi, DrSc. za pomoc a cenné rady při osobních konzultacích.

1. Obsah

Úvod.....	7
1 Literární rešerše.....	8
1.1 Bakterie <i>Escherichia coli</i>	8
1.2 Kultivace	11
1.3 Plazmid.....	13
1.4 Izolace plazmidové DNA.....	14
1.5 Druhy izolace plazmidové DNA.....	16
1.6 Faktory ovlivňující výtěžnost izolací plazmidové DNA.....	18
1.7 Hodnocení koncentrace, čistoty plazmidové DNA.....	21
2 Cíl práce	25
3 Metodika	26
3.1 Popis kmene <i>Escherichia coli</i>	26
3.2 Kultivace	26
3.2.1 Inokulace, kultivace vegetativního média.....	26
3.2.2 Inokulace, kultivace produkčního média	27
3.3 Izolace plazmidové DNA.....	28
3.3.1 Alkalická lýze.....	28
3.3.2 Izolace s isopropanolem.....	30
3.3.3 Termická lýze.....	32
3.3.4 Měření koncentrace, čistoty a prokázání plazmidu.....	33
4 Výsledky a diskuze	36
4.1 Alkalické lýze.....	36
4.2 Lýze s isopropanolem	37
4.3 Termická lýze.....	39
4.4 Návrh optimálního postupu izolace pDNA.....	40

Závěr	42
Seznam použité literatury.....	43
Seznam obrázků	48
Seznam tabulek	49
Seznam použitých zkratk.....	50

Úvod

Bakterie *Escherichia coli* se od 40. let těší velké pozornosti mikrobiologických laboratoří. Bakterie se používá jako hostitel pro tvorbu rekombinantních proteinů za pomoci expresních systémů. Velice oblíbená je především díky své schopnosti rychlého růstu a vysoké produkce za snadných kultivačních podmínek. Klíčový okamžik byla tvorba inzulínu za pomoci expresních systémů, dále příprava růstového hormonu, ale i tvorba aminokyselin.

V současnosti je hojně využívána ve farmaceutickém průmyslu. Je pokládána za velmi ceněnou bakterii, sloužící jako efektivní produkční platforma pro různá terapeutika, prebiotika, nutraceutika a pigmenty. *E. coli* se vyskytuje ve dvou typech patogenní a komenzální. Zdánlivě neškodná bakterie v gastrointestinálním traktu ptáků a savců, ale také žije v prostředích, jako je voda, půda a v potravinářských výrobcích, jako je krůtí a kuřecí maso. *E. coli* je i primárním zdrojem infekcí močových cest a může také vést k sepsi a meningitidě. Způsobuje průjemová onemocnění a úmrtí na následky dehydratace v rozvojových zemích, díky prevenci však případů ubývá.

Cílem této bakalářské práce je popsat kultivaci kmene bakterie *Escherichia coli* a porovnat různé metody izolace plazmidové DNA, zhodnotit koncentraci získaných plazmidů a jejich čistotu a posoudit vhodnost metod izolace plazmidové DNA pro přípravu vektorů pro produkci rekombinantních proteinů.

1 Literární rešerše

1.1 Bakterie *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* byla poprvé izolována rakouským bakteriologem Theodorem von Escherichem roku 1885. *E. coli* řadíme mezi gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie. Má tyčinkovitý tvar s bičíky. Bakterie *E. coli* patří mezi podmíněně patogenní bakterie. Má širokou enzymatickou aktivitu. Dle fylogenetických skupin se kmeny *E. coli* dělí na komenzální a patogenní (Elbing a Breut, 2021).

Obvykle se *E. coli* vyskytuje v gastrointestinálním traktu savců a ptactva (Ježková, 2022), kde působí pozitivně na trávení. Osídlování gastrointestinálního traktu bakterií *E. coli* probíhá již krátce po narození jedince. V současnosti se objevují problémy se stále se zvyšující rezistencí *E. coli* na antibiotika. Mezi nejčastěji sledované rezistence bakterií *E. coli* patří rezistence k β -laktamovým antibiotikům, tetracyklínům a chinolonům, zejména díky jejich časté aplikaci v humánní i veterinární medicíně (Taylor a Son, 2021). S výskytem rezistentních kmenů bakterií a tím se prohlubuje problém s efektivním léčením nemocí způsobených bakterií *E. coli*, jakou jsou například průjemová onemocnění nebo zánět močového měchýře a další. Přenos je velmi snadný z důvodu výskytu bakterií ve vodě a v půdě (Ježková, 2022). Z těchto důvodů je nutné dodržování správné zoohygieny chovu a zpracování surovin pro potravinářský průmysl. Avšak ne všechny kmeny *E. coli* způsobují tato onemocnění. Kmeny *E. coli* můžeme použít i v náš prospěch jako probiotika, která dopomáhají dotvořit nebo obnovit mikroflóru v gastrointestinálním traktu.

V životním cyklu bakterie *E. coli* existuje několik klíčových procesů: buněčný růst, replikace a dekatence chromozomů, dělení nukleoidů, tvorba septa a dělení buněk (Nordström et al., 1991). V *E. coli* byly identifikovány geny potřebné pro tvorbu biofilmu, z nichž mnohé kódují adhesiny. Biofilmy jsou povrchově připojená mnohobuněčná mikrobiální společenství. Jejich genetika byla rozsáhle studována, ale morfogenetické události jejich tvorby v buněčném měřítku jsou z velké části neznámé (Puri et al., 2023).

Vzhledem k dlouhé historii experimentů lze *E. coli* považovat za dobře probádanou bakterii. V oblibě laboratoří je z mnoha důvodů. Má dobré vlastnosti, poměrně krátkou dobu růstu s vysokou tvorbou biomasy, dále její kultivační podmínky jsou ekonomicky i časově nenáročné. Od počátku 40. let 20. století byly dobře popsány kmeny *E. coli* používané jako modelový výzkumný a výukový organismus. V oblasti

molekulární biologie se proslavila díky znalosti genomu a tím otevřela dveře pro mnoho dalších metod a pokusů.

E. coli byla prvním buněčným hostitelem, který produkoval rekombinantní proteiny, jako například inzulin, za pomoci expresních systémů.

V oblasti průmyslových biotechnologií slaví velký úspěch při výrobě L-aminokyselin, ovšem také vstoupila na trh cenných molekul, stává se flexibilní, efektivní produkční platformou pro různá terapeutika, prebiotika, nutraceutika a pigmenty (Becker, 2016). Díky rychlému růstu a produkci s vysokým výnosem je *E. coli* preferovanou volbou a tahounem pro expresi neglykosylovaných proteinů v biotechnologickém průmyslu. Téměř 30 % v současnosti schválených rekombinantních terapeutických proteinů je produkováno v *E. coli* (Huang et al. 2012).

Struktura a funkce genomu *E. coli* je velmi dobře charakterizována. Dnes většina, ne-li všechny běžně používané laboratorní kmeny *E. coli* mohou mít své linie zpětně vysledovány buď ke kmenům *E. coli* K-12 nebo B (Taylor a Son, 2021).

Kmeny *E. coli* K-12 a B patří mezi nejčastěji používané bakteriální hostitele pro produkci rekombinantních proteinů v průmyslovém měřítku (Marisch et al, 2013). Dále také slouží k produkci metabolitů s malými molekulami jako jsou aminokyseliny, biopaliva, karboxylové kyseliny, diaminy a další (Han, 2016).

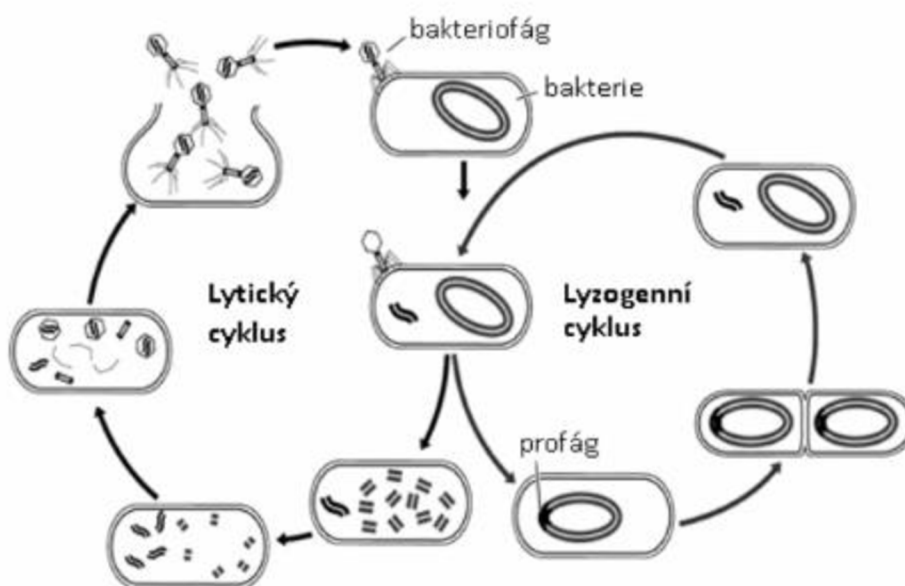
Tyto dva hlavní kmeny jsou významné pro jejich nepatogenní povahu, která je činí bezpečnými pro práci s rekombinantní DNA (Son a Taylor, 2021). Kmeny *E. coli* K-12 a B vykazují výrazně odlišné genotypové a fenotypové atributy, i když byly odvozeny od stejného předka. Mezi těmito dvěma reprezentativními kmeny byly nalezeny významné rozdíly v proteinech spojených s klíčovými buněčnými vlastnostmi, včetně některých metabolických drah, biosyntézy a degradace aminokyselin, integrity membrány, buněčné tolerance a motility (Han, 2017).

Kmeny mají odlišné metabolické dráhy ve zpracování glukózy. Při kultivaci v médiu obohaceném o větší množství glukózy B buňky dosáhnou většího množství biomasy a rychlejšího růstu, než K-12 buňky (Marisch et al, 2013).

Jedním z mnoha způsobů, jak vložit například gen s rezistencí je umělá infekce bakterie *E. coli* pomocí Lambda fágu (Valdez-Crus et al., 2010).

Lambda fág je dsDNA virus, který infikuje bakterii *E. coli* a představuje dvě cesty životního cyklu. První, nazývaná lytická dráha, která spočívá v infekci bakterie, rychlé replikaci, sestavování a uvolňování virových částic, které mohou zahájit nový cyklus infikování jiných hostitelů. Zdá se, že lytický cyklus je upřednostňován,

když je hostitel zdravý. Druhou je lyzogenní dráha, při které je DNA lambda fága vložena do hostitelského chromozomu a je replikována se zbytkem bakteriální DNA, přičemž zůstává neaktivní v latentní formě (Valdez-Crus et al., 2010).



Obr. 1.1.2. Životní cyklus bakteriofága infikující bakterii *E. coli* (Herbalus, 2023)

E. coli je také oceňována pro své produkční schopnosti a nízkonákladové nenáročné kultivační podmínky s vysokými výtěžky. Ke správné kultivaci je nutné, aby médium obsahovalo široké zdroje uhlíku. Může rychle růst na minimálním médiu, které obsahuje glukózu jako zdroj uhlíku i zdroj energie a soli, které dodávají dusík, fosfor a stopové prvky. *E. coli* však roste rychleji na bohatém médiu, které buňkám poskytuje aminokyseliny, nukleotidové prekurzory, vitamíny a další metabolity, které by si buňka jinak musela syntetizovat (Elbing a Breut, 2019). Nejčastěji používané médium pro kultivaci je Luria-Bertani (LB), které lze použít jak v tekuté formě pro kultivaci v submerzi, tak i v pevné formě na miskách (Son a Taylor, 2021). LB médium se skládá z tryptonu, chloridu sodného a kvasnicového extraktu. V případě pevné formy LB média se přidává bakteriologický agar. Zástupci médií s minimálním obsahem živin jsou M9 skládajícím se z Na_2HPO_4 (hydroxyfosforečnanu sodného), KH_2PO_4 (dihydroxy fosforečnanu draselného), NH_4Cl (chloridu amonného) a NaCl (chloridu sodného) nebo M63 skládajícího se z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (síranu amonného), KH_2PO_4 (dihydroxy fosforečnanu draselného), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (síranu železnatého heptahydrátu). Zástupci médií s vysokým obsahem živin mohou být použiti H médium skládající se z tryptonu a NaCl (chloridu sodného) nebo médium TNT ve stejné

složení jako H médium s přidáním thiaminu (Elbing a Breut, 2019). Typické laboratorní kmeny jsou považovány za nepatogenní mikroorganismy a rychle rostou na široké škále pevných a tekutých médií, zejména v přítomnosti kyslíku, ale mohou také růst za anaerobních podmínek (Son a Taylor, 2021). Kultivace na vhodném živém médiu probíhá optimálně při teplotě 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.

Namnoženou kulturu s *E. coli* můžeme uchovávat více způsoby. Jedním z krátkodobých způsobů je uchování na pevném médiu v lednici při 4 °C. Z dlouhodobých způsobů můžeme využít uchování v mrazáku přidáním 50% glycerolu ve finální koncentraci 30 % a uchováním v mrazáku alespoň při -20 °C až -80 °C (Taylor a Son, 2021). Doporučuje se při vyšších skladovacích teplotách pravidelně vyzkoušet životaschopnost bakteriální konzervy vyšetím na pevnou půdu při 32 – 37 °C v inkubátoru, popřípadě obnovit kulturu v LB médiu z konzervy a poté vytvořit nové konzervy. Opakované rozmrazování a zmrazování jedné kultury způsobuje snižování produkce a životaschopnosti *E. coli* (Taylor a Son, 2021).

1.2 Kultivace

Kultivace se využívá k pomnožení bakterií, selekci kmenů a ověření výsledků experimentů. Dříve byl pozorován růst bakterií na předmětech denní potřeby, jako jsou některé potraviny. Tato pozorování zdůraznila význam přirozeného prostředí bakterií a jejich nutriční potřeby při vývoji kultivačních médií pro jejich extrakci a zpracování. První tekuté umělé kultivační médium vytvořil Louis Pasteur v roce 1860. Louis Pasteur popsal uměle vytvořené růstové médium vyrobené z popela, cukru, amonických solí a kvasinek v roce 1860. Následně na to v roce 1876 Koch popsal médium bohaté na živiny, vyrobené z kravského séra a hovězího extraktu, což umožnilo mnoha bakteriálním druhům dobře růst (Bonnet et al., 2019).

Klíčovým prvkem byl vývoj pevného růstového média. V roce 1881 Koch demonstroval použití pevného média vyrobeného přidáním želatiny do média bohatého na živiny v otevřené misce se zvonovým skleněným krytem (Elbing a Breut, 2021). Výsledné pevné médium umožnilo identifikaci jednotlivých kolonií možnost rozlišení odlišných kmenů či druhů bakterií. Později se ukázalo, že želatina nebyla optimální z několika důvodů například, při použití želatina při teplotách blízkých 40 °C velmi změkla a jakákoliv bakteriální kolonie, která vylučovala proteázy, měla tendenci želatinu zkapalňovat. To zabránilo možnosti dobré manipulace a další práce

s pevným médiem. V roce 1882 Fannie Hesse se svým manželem Dr. Walther Hesse v Kochově laboratoři navrhli použití agaru jako gelujícího činidla (Hesse, 1992). Použití pevného média na bázi agaru se rychle rozšířilo poté, co Richard Julius Petri ukázal, že otevřené misky a zvonové skleněné kryty lze nahradit „Petriho miskami“, kruhovými skleněnými miskami s volně padnouchými vršky (Elbing a Breut, 2021).

V té době se poměrně často vyskytovaly problémy s kontaminací a bylo nutné najít nějaký jistější způsob, jak vysterilizovat použité chemické sklo a zamezit rozšiřování kontaminace, jinak než sušení za vysokých teplot.

Díky Pasteurově poznatku, že vlhké teplo účinkuje lépe než teplo suché, byl sestaven kolem roku 1880 první tlakový parní sterilizátor. Na sestrojení vysokotlakého parního sterilizátoru se podílel německý bakteriolog Robert Koch spolu s dalšími vědci (STERIS, 2018).

Využití vysokotlaké páry a vysokých teplot poskytuje spolehlivý prostředek k zabíjení živých bakterií a bakteriálních spor. Také můžeme sterilizovat média a používané chemické nádoby.

Vývoj parního sterilizátoru byl velkým milníkem ve sterilizaci, a tudíž i přesnosti a čistoty výsledků. Začala se v parním sterilizátoru sterilizovat média tekutá i pevná před inokulací bakteriemi a také po ukončení experimentu za účelem likvidace bakterií a následné umytí a opětovná sterilizace použitého chemického nádobí. Sterilizace parním autoklávem je jedno z ekonomičtějších a ekologičtějších možností na rozdíl například od jednorázově zakázkově vyrobených Petriho misek či jiného náčiní (Sung et. al., 2013).

Kultivační médium je v podstatě složeno ze základních prvků, kterými jsou voda a živiny. K základním prvkům je nutné přidávat různé růstové faktory, které budou specifické pro každou bakterii a nezbytné pro její růst (Bonnet et al., 2019).

Kultivace je považována za nejdůležitější metodu přímé diagnostiky bakterií. Pro úspěšnou kultivaci je třeba vhodné složení kultivačního média doplněné o vhodné podmínky pro kultivaci. Průběh kultivace bakterií *in vitro* může ovlivnit teplota, zdroj energie a živin, dostupnost kyslíku, kultivace v anaerobních podmínkách a pH prostředí. Je také nutno udržovat konstantní optimální teplotu dle kmene bakterie v inkubátoru.

Kultivační média se dělí dle složení na přirozená a syntetická, dále dle konzistence na tekutá a tuhá a také dle složení a účelu na základní, obohacená, selektivní, diagnostická a selektivně-diagnostická. Je nutno zdůraznit význam živin v médiích,

pro méně náročné bakterie je možno použít z ekonomických důvodů jen pár nejnütnějších základních živin, i přesto mohou mít dobré výnosy (Elbing a Breut, 2021).

Tekuté půdy slouží pro pomnožení bakterií a skládají se ze směsi živin rozpuštěných ve vodě. Směsi jsou složeny převážně ze solí a peptidů. Kultivaci v tekutém médiu napomáhá třepání pro rovnoměrné vstřebání živin a tím dělá živiny dostupnější pro bakterie. Tuhé půdy v podobě agarových gelů slouží k nárůstu kolonií. Nejvíce vhodné k vizuální selekci. Narostlé kolonie jsou uchovávány na Petriho miskách v termostatu. Jako základní média považujeme vegetativní média, která slouží k namnožení bakterií. Selektivní médium je složeno ze základního média, do kterého lze přidat antibiotika, chemikálie, barviva, antiseptika, sodné soli nebo fágy (Bonnet et al., 2019).

Antibiotika přidáváme do základního média po menších dávkách, které postupně zvyšujeme na požadovanou koncentraci, dle zvyšující se rezistence bakterií. Barviva přispívají k selekci na základě změny pH média během růstu bakterií a tím dochází k barevné změně v okolí kolonie. Speciální média sloužící pro kultivaci pouze jednoho druhu mikroorganismu. Dle druhu jsou upraveny kultivační podmínky a složení kultivačního média. Diagnostická média fungují na principu indikátorů např. barviva, změna pH (Elbing a Breut, 2021).

1.3 Plazmid

Plazmidy jsou kruhové extrachromozomální molekuly DNA, které se nacházejí v cytoplazmě některých bakterií (Shintani et al., 2015). Většina plazmidů je kruhová, i když existují některé lineární formy plazmidů. Plazmidy vnímáme jako mimořádně cenné nástroje v oblasti molekulární biologie a genetiky, konkrétně v oblasti genetického inženýrství. Plazmidy jsou využívány k poznání základních molekulárně biologických procesů v bakteriálních buňkách a horizontálního přenosu genů mezi dvěma bakteriemi (konjugace). Přenos plazmidu může být dosažen konjugací (nebo mobilizací), fágem zprostředkovanou transdukcí a přirozenou transformací (Garcillán – Barcila et al., 2022).

Během konjugace se plazmid přenáší jednosměrně z jedné bakterie na druhou. Konjugace stejně jako transdukcce a transformace je zásadní v získávání a šíření genů virulence s antibiotickou rezistencí (Frankel et al., 2023).

Každý plazmid je schopný nést pouze několik genů. Plazmidy se replikují nezávisle na bakteriálním chromozomu a některé typy plazmidů se nacházejí v mnoha (dokonce stovkách) kopiích v každé bakteriální buňce (Garcillán – Barcila et al., 2022). Vzhledem k různorodosti plazmidů mají také různé velikosti. Malé plazmidy mají velikost 2-3 kb a velké mohou mít i více než 500 kb (Drlica a Gennaro, 2001). Plazmidy využíváme zejména proto, že díky nim můžeme transformovat do hostitelské buňky užitečné vlastnosti, které zahrnují rezistenci na antibiotika, faktory virulence a extra metabolické schopnosti. Vlastnosti jsou ovlivněny dvěma základními typy plazmidů (Clark et al., 2019). R plazmidy, které jsou odpovědné za antibiotickou rezistenci, řada z nich je konjugativní a F plazmidy, které jsou odpovědné za konjugaci nebo případnou mobilizaci jiných plazmidů. Objevením R plazmidů došlo k značnému zvýšení zájmu o plazmidy jako klinicky důležitého příspěvku k šíření rezistence na antibiotika (Dewan a Uecker, 2023).

Plazmidy hrají zásadní roli v postupech, jako je klonování genů, produkce rekombinantních proteinů (např. lidského inzulínu) a výzkum genové terapie. V takových postupech je plazmid štěpen na specifickém místě (nebo místech) pomocí enzymů nazývaných restriční endonukleázy. Cizí vlákno DNA (jako je právě gen pro inzulín) je pak vkládáno do plazmidu. Výsledná kruhová struktura nazývaná rekombinantní molekula DNA, je pak zavedena do bakteriálních buněk procesem zvaným transformace.

Znalost takových regulačních procesů je také velmi důležitá pro ty, kteří používají plazmidy jako expresní vektory k produkci velkého množství rekombinantních proteinů (Wegrzyn a Wegrzyn, 2002).

1.4 Izolace plazmidové DNA

Izolace plazmidové DNA z bakterií je základní a jednou z nejdůležitějších technik molekulární biologie, používaná při výrobě templátové DNA pro specifické následné reakce (SynbiCITE, 2023).

Povědomí o existenci plazmidu bylo zaznamenáno již dříve, ovšem samotné zavedení termínu plazmid uskutečnil J. Lederberg v roce 1952. Klíčovým okamžikem ve vývoji biotechnologií byl pokus, který provedli Boyer a Cohen v roce 1972. Vypozorovali, že je možné odříznout a navázat konce plazmidové DNA na konce jiného plazmidu, a tak vložili antibiotickou rezistenci z bakterie *Salmonella typhimurium* do

plazmidu *E. coli*, čímž sestrojili rekombinantní DNA. Dalším z jejich už komplikovanějších pokusů bylo spojení plazmidů rezistentními na tetracyklin s plazmidy rezistentními na kanamycin a vložili je do *E. coli* (DNA Learning center, 2022).

Na základě poznatků o možnostech tvorby rekombinantních DNA se vědci začali zabývat tvorbou syntetických nových genů, které by mohly fungovat v bakteriích. Důležitý okamžik přišel v roce 1979. V bakteriích *E. coli* bylo možné produkovat lidský inzulin, který se následně povedlo izolovat z bakteriální kultury (Riggs, 2021). Do bakterie byly vloženy upravené sekvence genu A, který se skládá ze 77 párů bází a gen B, který se skládá ze 104 párů bází. Oba geny se exprimují v bakterii *E. coli* (Crea, 1978). Zpočátku nebylo dosahováno dostatečně vysoké produkce, ale následné práce produkci navýšily až po možnost komerční produkce inzulinu. Následně roku 1982 byl syntetický lidský inzulin schválen pro léčbu diabetu. Lidský inzulin se stal prvním proteinovým terapeutickým produktem založeným na technologii rekombinantní DNA, který byl FDA (Federální úřad pro léčiva) schválen pro použití u lidí. Úspěch s produkcí inzulinu odstartoval rozvoj biotechnologického průmyslu, který v současnosti poskytuje stovky dříve nedostupných terapeutických látek (Riggs, 2021).

Plazmidy mají širokou škálu využití v humánních vědách a také v laboratorním výzkumu. Díky jejich variabilitě a univerzálnosti můžeme do plazmidů vložit různé geny s různými rezistencemi na antibiotika, těžké kovy a v neposlední řadě i na UV záření. A za pomoci bakterie *E. coli* je můžeme snadno, rychle a levně namnožit, izolovat a dále pracovat a vylepšovat vlastnosti a odolnost na vybranou a vloženou rezistenci.

První práce na plazmidech zahrnovaly strukturní a genetické mapování těchto molekul, po kterém následoval vývoj porozumění tomu, jak se plazmidy replikují a segregují během buněčného dělení. Zajímavé vlastnosti přenosu plazmidu mezi bakteriemi a mezi bakteriemi a eukaryoty byla věnována značná pozornost. Jsou popsány prospěšné a široce využitelné aspekty plazmidů, včetně příkladů různých systémů plazmidových vektorů (Kado, 2014).

Bakteriální plazmidy mohou být izolovány z jakéhokoli biologického materiálu, jako jsou živé nebo konzervované tkáně, buňky nebo jiné vzorky pro analytické nebo preparativní účely (Tan a Yiap, 2009). Vhodná metoda izolace umožní získat čistou plazmidovou DNA, která není kontaminována bakteriální chromozomální DNA a proteiny. Úspěšná izolace a purifikace nukleové kyseliny obecně vyžadovala čtyři

důležité kroky: účinné rozrušení buněk nebo tkáně, dále denaturace nukleoproteinových komplexů a inaktivace nukleáz, například RNázy pro extrakci RNA a DNázy pro extrakci DNA, odstranění proteinových a dalších kontaminantů a vlastní izolace čisté DNA.

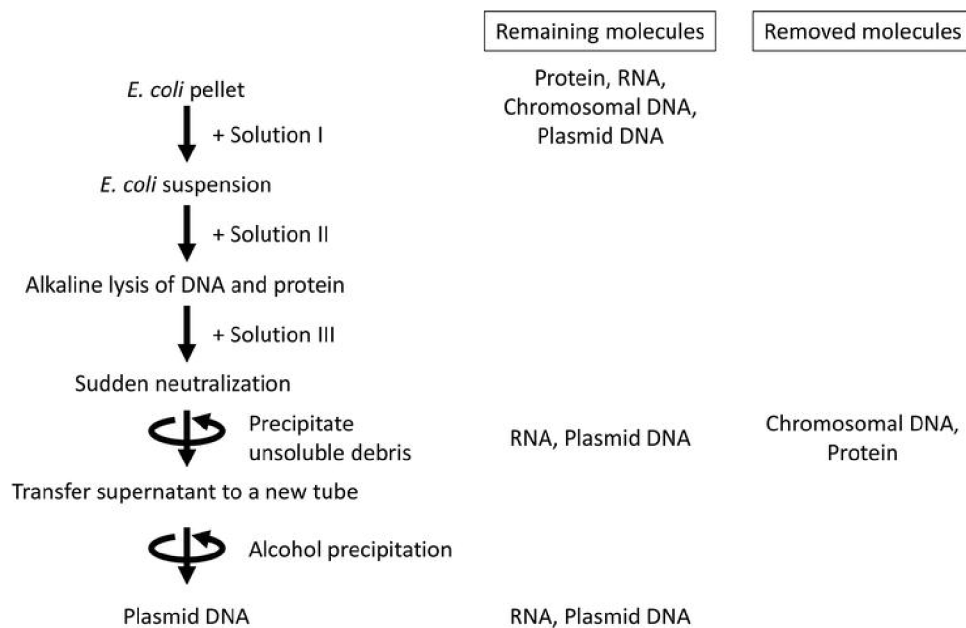
V současné době provádíme převážně izolace v mikro množstvích za pomoci kitů. Metody izolace plazmidu jsou relativně přímočaré, ale vysoce výkonná extrakce plazmidové DNA z velkých objemů bakteriální biomasy se ukázala jako obtížná, s běžnými problémy, jako je kontaminace genomovou DNA a nízkým výtěžkem.

1.5 Druhy izolace plazmidové DNA

Existuje řada metod, kterými lze izolovat plazmidovou DNA. V tomto přehledu jsou uvedeny metody vhodné pro izolaci plazmidů z velkých objemů kultivačních médií.

Lýzi bakteriálních buněk provádíme za účelem extrakce nukleových kyselin nebo proteinů. Základem alkalické lýze bakteriálních buněk je správně zvolený způsob narušení či rozbití buněčné stěny, aby došlo k uvolnění mezibuněčného materiálu jako je DNA, RNA, proteiny. Bakteriální lýzi můžeme provádět chemickými, fyzikálními nebo biologickými metodami. Metody, kterými je možné narušit buněčnou stěnu jsou nejčastěji používány lýze pomocí detergentu, enzymů, osmotického šoku, alkalická lýze a tepelná lýze. Pro kompletní buněčnou lýzi slouží úplná dezintegrace buněčné membrány pro analýzu DNA a RNA (Islam et al. 2017).

Prvním metodickým postupem je izolace za pomoci alkalická lýze, která je jednou z nejpoužívanějších metod chemické lýze. Tato metoda alkalické lýze se začala používat, jako jedna z prvních kolem roku 1979. Alkalická lýze je založena na destrukci buněk v silně alkalickém prostředí (NaOH) následovaném rychlým okyselením lyzátu pomocí roztoku octanu draselného, což způsobí vysrážení proteinu a chromozomální DNA. Po odstranění sraženiny je plazmidová DNA vysrážena z roztoku pomocí ethanolu a pelet je promýván 70% ethanolem. Poté se pelet rozpustí v TE pufru (Tris – EDTA, pH 8) (Sambrook et al., 2001). TE pufr je široce používán jako zásobní nebo ředící roztok pufru v molekulární biologii, zejména v postupech zahrnujících DNA, RNA.



1.1.4. Průběh alkalické lýze (Sasagawa, 2018)

Existuje velké množství modifikací procesu alkalické lýze. Základní tři kroky jsou vždy stejné, modifikace lišící se v prostředí, přidávání chemikálií a enzymů, jako například RNáza či proteináza nebo koncentrací chemikálií, množství roztoků.

Maximalizaci čistoty plazmidové DNA lze docílit přidáním dalších dvou kroků po vysrážení výsledného supernatantu isopropanolem, a to ošetření RNázou a opětovné vysrážení isopropanolem. Výsledkem byla sraženina prostá od zbytků RNA, chromozomální DNA a ostatní kontaminace (Feliciello a Chinali, 1993).

Byl studován i vliv fyzikálních podmínek při izolaci plazmidů. Vzorky byly při izolaci míchány a byl zkoumán vliv rychlosti míchání, koncentrace NaOH vůči výtěžnosti a minimalizování kontaminace chromozomální DNA. V průběhu celé izolace byla biomasa míchána, při míchání na pomalé otáčky nedošlo k požadovanému rozpadu a tím nebylo dosaženo maximální výtěžnosti. Jako druhá možnost byla zkoušena vysoká rychlost otáček, ta vedla k vysokému rozpadu chromozomální DNA a tím byla výsledná sraženina vysoce kontaminována. Jako poslední pokus byla použita střední rychlost míchání, která se ukázala jako ideální vzhledem k množství a čistotě výsledné sraženiny. Dále byl zkoumán vliv koncentrace NaOH. Při koncentraci vyšší než 0,15 M dochází k nevratné denaturaci DNA. K denaturaci také napomáhá prodlužování času působení lýze, čím delší čas působení, tím větší denaturace probíhá (Meacle et al., 2004)

Při alkalické lýze se tvoří sraženiny, které obsahují zbytky buněk, denaturované proteiny a nukleové kyseliny, které je nutno odstranit. Pro odstranění těchto zbytků je nejběžnější operací centrifugace na rotoru s pevným úhlem. Tento krok však omezuje rychlost pro přípravu ve velkém měřítku (Zhu et al., 2006).

Druhou vybranou extrakcí je frakční srážení isopropanolem. Je možné ji popsat jako modifikovanou metodu alkalické lýze. DNA je méně rozpustná v roztocích obsahujících isopropanol než v roztocích obsahujících ethanol. Na rozdíl od srážení ethanolem, které vyžaduje 2-3 objemy alkoholu, se srážení isopropanolem provádí s 0,6-0,7 objemového dílu alkoholu. Isopropanol je často lepší volbou při precipitaci DNA z velkých objemů roztoku. Srážení isopropanolem, jak je popsáno zde, se provádí při pokojové teplotě, aby se snížilo riziko, že rozpuštěné látky, jako je sacharóza nebo chlorid sodný, budou koprecipitovány s DNA (Sambrook et al., 2001). Lyzačními pufrů, které mají stejné složení jako v případě alkalické lýze dojde k dezintegraci buněk a vysrážení proteinů a chromozomální DNA. V dalších krocích různými objemy isopropanolu opakovaně přesrážen vzorek. Pelet plazmidové DNA je promýván 70% ethanolem. Poté rozpuštěn v TE pufru (Paalme et al. 2021).

Třetí, metodou je termická lýza. Termická lýza se začala používat v roce 1981 dle protokolu Holmese a Quigleye (Lefkothea – Vasiliki, 2013). Jeden z prvních pokusů o termickou lýzu byl založen na vaření bakterií 15 – 40 sekund a nerozpustná sraženina genomové DNA a zbytky se odstraní nízkorychlostní centrifugací. Plazmidy jsou získány ze supernatantu srážením isopropanolem a mohou být resuspendovány v pufru (Holmes a Quigley, 1981). V současné době jsou často využívány postupy termické lýze buněk dle Zhu et. al. (2007). Termická lýza je založená na principu lýzy lyzačním pufrů a působení vysoké teploty. Buňky jsou v lyzačním pufru inkubovány ve vodní lázni při 70 °C. Ihned po uplynutí doby inkubace je lyzát přemístěn do ledové lázně. Chladový šok vede k precipitaci proteinů a membrán. V dalším kroku dochází pomocí isopropanolu k vysrážení peletu a jeho promytí ethanolovým roztokem. Poté je DNA eluována v TE pufru (Zhu et al., 2006; Sambrook et al., 2001).

1.6 Faktory ovlivňující výtěžnost izolací plazmidové DNA

Nejběžnějšími problémy snižující výtěžnost plazmidové DNA (pDNA) ve výsledcích izolace bývají kontaminace genomickou DNA (gDNA) a kontaminace RNA (Norgard, 1981). Na výtěžnost pDNA má vliv zejména počet kopií plazmidu a velikost

samotného plazmidu, který přímo ovlivňuje množství plazmidu obsaženého v každé buňce.

Množství pDNA může být nízké z důvodu zpracování buněčné kultury, která nebyla dostatečně čerstvá. Nejvíce ideální je zpracovat buněčnou kulturu ihned po sklizení a promytí. Popřípadě pokud není možné provést izolaci ihned uchováme v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Nguyen et al., 2018).

Další z příčin nízké výnosnosti pDNA může být plazmid s nízkým počtem kopií. Počet kopií plazmidu v bakteriálních buňkách závisí hlavně na frekvenci iniciace replikace plazmidu, která se může značně lišit v závislosti na rychlosti buněčného růstu. Ideální počet kopií na buňku je průměrně 300–500 (Tonga et al., 1993).

Závažnou příčinou by mohlo být zavinění na straně člověka, který izolaci prováděl, a to tak že buďto nedostatečně anebo neopatrně promíchal buněčnou kulturu s lyzačními roztoky a tím izolovanou pDNA degradoval. (Felicciello a Chinali, 1993). Hlavním faktorem výtěžnosti izolace je zejména úspěšný růst bakteriálních buněk, který je ovlivněný kultivačními podmínkami a výběrem vhodného vegetativního a produkčního média. Vhodná kultivační média nalezneme v kapitole 1.2 Kultivace. Udržování antibiotické selekce během růstu také zajišťuje, že se plazmid během růstu neztratí a že kultura není utlačena rychleji rostoucí populací buněk bez plazmidu. V případě výskytu kontaminace gDNA mohlo být u metody alkalické lýze zapříčiněním příliš intenzivním a neopatrným mícháním po přidání lyzačních roztoků.

Pokud byla získaná pDNA kontaminována zbytky RNA byl důvodem neopatrným odběrem supernatantu s izolovanou pDNA. Pokud se tento problém vyskytne je možné použít v průběhu izolace RNázu a po jejím použití vzorek znovu přečistit (Felicciello a Chinali, 1993; Norgard, 1981).

Produkce pDNA je ovlivněna hostitelským kmenem, typem a velikostí plazmidu, genetickou modifikací hostitelského kmene, typem kultury, složením média a podmínkami růstu, jako jsou: specifická rychlost růstu (u); procento rozpuštěného kyslíku (% DO); zvýšení teploty a rychlosti ohřevu; a kontrola pH (Grijalva-Hernández et al., 2019).

Bakterie *E. coli* mohou být kultivovány v různých médiích podporujících různé rychlosti růstu, dle obsahu živin. Ve složení kultivačního média má vliv na výsledek izolace pDNA využitý zdroj uhlíku. Dle Xu et al. (2005) se jako optimální zdroj uhlíku jeví glukóza. Kultivaci prováděl v erlenmayerových baňkách, přičemž nejvyšší výtěžek pDNA byl 58,3 mg/l za použití glukózy v koncentraci 5 g/l.

Vysokých výtěžků však bylo dosaženo i při použití nižší koncentrace tryptonu. Ukázalo se, že tento přístup je účinným nástrojem pro podporu amplifikace plazmidu, udržení požadované struktury plazmidu a podporující dosažení požadované kvality. Výsledky Filomena et al., 2009 naznačují, že použitím samotného tryptonu jako zdroje aminokyselin se amplifikace pDNA zlepšuje a dosáhli specifického výtěžku 20,43 mg/l, což dokládá, že tato strategie může zlepšit výtěžek pDNA i v malém měřítku.

V literatuře se uvádí $\text{pH } 7 \pm 0,2$ jako optimální hodnota kultivačního média (Son a Taylor, 2021). S rostoucí teplotou kultivace ($37 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$) mohou být získány vyšší výtěžky pDNA. Při udržování nižších teplot dochází ke zpomalení růstu bakteriální kultury, to znamená i nižší počet kopií plazmidu, a tedy nízkou výnosnost pDNA. Naopak při vyšších teplotách dochází u bakteriální kultury k degradaci buněk a tím přímo ovlivnění výtěžnosti pDNA (Filomena et. al., 2009). Rozpuštěný kyslík (DO) je klíčovým faktorem ovlivňujícím růst kultury v bioreaktorech. Optimální množství rozpuštěného kyslíku se pohybuje okolo 30 % (% DO) (Grijalva – Hernández et al., 2019).

Použití plazmidu s vyšším počtem kopií vykazuje vyšší množství získané plazmidové DNA, což znamená, že použití plazmidů s vysokým počtem kopií představuje příležitost pro vyšší výtěžek plazmidové DNA (Tonga, 1993).

V posledních letech se pro výzkum produkce pDNA stále používá pDNA obsahující gen rezistence na kanamycin a další geny rezistence na antibiotika, i když současným trendem je použití plazmidu bez antibiotik při výrobě vakcín pDNA kvůli riziku závažných reakcí z přecitlivělosti u pacientů. Kanamycin není běžně používaným antibiotikem k léčbě lidských infekcí a je schválen regulačními orgány pro použití při vývoji pDNA (Grijalva – Hernández et al., 2019).

Při zkoumání vlivu koncentrace antibiotik na produkci pDNA v médiu bylo zjištěno, že vysoká koncentrace kanamycinu (300 mg/l) byla vyhodnocena v kultuře s vysokou hustotou buněk (50 g sušiny/l), které bylo dosaženo použitím příkrmem kultury s vysokým obsahem živin, zvýšením teploty řízeným zahříváním a rychlostí růstu. Výsledný výtěžek pDNA byl 759 mg/l, dvakrát vyšší než u kontroly s koncentrací kanamycinu 50 mg/l. Proces založený na stresu současně způsobený teplotou a vysokou koncentrací kanamycinu lze úspěšně použít ke zvýšení produkce pDNA (Grijalva – Hernández et al., 2019).

1.7 Hodnocení koncentrace, čistoty plazmidové DNA

Hodnocení koncentrace a čistoty pDNA zjišťujeme za účelem možnosti zhodnocení kvality a ověření správnosti metody a provedení. Pokud se výsledky nebudou slučovat s hodnotami v literatuře je nejspíše chybně nastavená metoda či jiné faktory viz. kapitola Faktory ovlivňující výtěžnost izolací plazmidové DNA. Spolehlivé měření koncentrace DNA je také důležité pro mnoho aplikací molekulární biologie (Lucena – Aguilar et al., 2016).

Po kultivaci a následné izolaci je třeba vyhodnotit úspěšnost prováděné izolace. Úspěšnost metod můžeme zhodnotit pomocí čistoty, získaného množství plazmidové DNA, či prokázat existenci izolovaného plazmidu. Plazmid vizuálně prokážeme provedením elektroforézy na agarozovém gelu. Elektroforéza je pokládána za nejúčinnější metodu pro izolaci fragmentů DNA o velikosti od 100 bp do 25 kb. Elektrické pole se používá k pohonu nabitých molekul přes agarozovou matici a biomolekuly jsou v matici agarozového gelu segregovány podle velikosti (Tantray et al., 2023). Abychom si ověřili kvalitu získané pDNA využijeme k tomu právě elektroforézu na agarozovém gelu, který nám dle velikosti ukáže, jaké formy pDNA jsme získali. Na výsledném gelu jasně uvidíme formu získaného plazmidu (superstočený, lineární nebo kruhový). Dále uvidíme množství a druh kontaminace, z pravidla to bývá genomická DNA nebo RNA. Nakonec vám gel ukáže, zda jste vzorek příliš lyzovali nebo došlo k denaturaci.

Dále se používá k rozlišení fragmentů DNA na základě jejich molekulové hmotnosti. Menší fragmenty migrují rychleji než větší. Vzdálenost migrovaná na gelu se mění nepřímě s logaritmem molekulové hmotnosti fragmentu. Velikost fragmentů lze tedy určit kalibrací gelu za použití známých velikostních standardů a porovnáním vzdálenosti, kterou neznámý fragment migroval (Lee et al., 2012). Technika je jednoduchá, rychlá a schopná rozdělit fragmenty DNA, které nelze adekvátně oddělit jinými postupy, jako je centrifugace v hustotním gradientu. Umístění pruhů DNA v gelu lze určit přímo barvením nízkými koncentracemi fluorescenčních interkalačních barviv, jako je ethidium bromid, SYBR Gold či SYBR Green. Proužky obsahující pouze 20 pg dvouvláknové DNA pak mohou být detekovány přímým zkoumáním gelu v ultrafialovém (UV) světle. V případě potřeby mohou být tyto proužky DNA získány z gelu. Zkoumaný vzorek velmi krátce stočíme a smícháme s barvou a můžeme jej vidět i bez použití UV osvětlení a transiluminátoru (Sambrook a Green, 2001).

Jednou z možností kvantifikace na gelu je za použití ethidium bromidu. Je přidáván do elektrodového pufru při separaci fragmentů DNA elektroforézou na agarózovém gelu. Používá se proto, že po navázání molekuly na DNA a osvětlení zdrojem UV světla lze zviditelnit vzor pruhů DNA. Způsob vazby EtBr je interkalace mezi páry bází. Tato vazba mění náboj, hmotnost, konformaci a flexibilitu molekuly DNA. Vzhledem k tomu, že molekuly DNA jsou dimenzovány na základě jejich pohybu gelem ve srovnání se standardem molekulové hmotnosti, může být měření mobility kritické pro stanovení velikosti (Sigmon a Larcom, 1996).

K přesnému stanovení velikosti analyzovaných fragmentů DNA dále můžeme použít velikostní marker. Markery jsou široce používány v molekulární biologii a hrají klíčovou roli při určování fragmentů DNA a zajištění spolehlivé analýzy. Markery jsou univerzální pro všechny gely, aby nedocházelo k neshodám a nesprávnosti určení velikostí fragmentů DNA. Velikostní marker volíme dle předpokládané velikosti fragmentů DNA. Z předpokládané velikosti zvolíme správný rozsah komerčního markeru 200 bp – 20 kb, ale také můžeme vybrat citlivější. V případě očekávání menších fragmentů můžeme zvolit marker o velikosti 100–1000 bp (Sekhavati et al., 2015). V případě nevyhovujícího rozsahu je možnost si marker připravit samostatně dle naší představy. Dále nám markery poskytují možnost porovnat migraci fragmentované DNA s migrací velikostních markerů a můžeme tedy vypočítat délky fragmentů DNA.

Dále můžeme využít fluorimetické stanovení. Metoda se používá u vzorků s nízkou koncentrací DNA a u vzorků znečištěných jinými látkami. Kvantifikace pomocí fluorimetru je založená na intenzitě fluorescence vazby fluorescenčního barviva na dvouvláknovou DNA za pomoci fluorescenčního činidla přidaného do měřeného vzorku. Fluorimetrická kvantifikace je obecně považována za kontrolu kvality DNA před sekvenováním nové generace (Nakayama et al., 2016). Před měřením provedeme kalibraci přístroje pomocí standardů na požadovanou citlivost měření. Po kalibraci připravíme měřenou směs smícháním fluorescenčního činidla s měřeným vzorkem, lehce promícháme a krátce stočíme na centrifuze (Benchmark my FUGE™ Mini) pro usazení roztoku na dno mikrozkuřavky. Poté jsou vzorky jednotlivě měřeny.

Jako třetí variantu můžeme využít spektrofotometrické stanovení. Spektrofotometrické stanovení je založeno na poznatku, že roztoky DNA pohlcují UV záření. Záření je pohlcováno pyrimidinovými a purinovými bázemi DNA. Dochází k excita-

ci jejich chemických vazeb, což má za následek postupnou degradaci DNA. Čistá DNA absorbuje maximálně UV záření o vlnové délce 260 nm, přičemž přibližně platí, že absorbanci 1 má roztok DNA o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při 260 nm však absorbují i bílkoviny, jejichž spektrum má díky tyrosinovým skupinám široký vrchol s maximem při 280 nm. V praxi se často odhaduje čistota DNA podle poměru absorbancí při 260/280 nm a také 260/230 (Lucena – Aguilar et al., 2016).

Měřené vzorky porovnáváme s nulovým vzorkem. Jako nulový vzorek použijeme roztok, ve kterém byl získaný pelet rozpuštěn. Kyselé roztoky budou nižší představovat poměr A_{260}/A_{280} o 0,2–0,3, zatímco bazický roztok bude tento poměr převyšovat o 0,2–0,3. Pokud tedy porovnáváte poměr A_{260}/A_{280} pro různé vzorky DNA, je důležité zajistit, aby pH a iontová síla použitých elučních pufrů byly stejné. Navíc absorbance při 260 nm a hodnoty A_{260}/A_{280} jsou reprodukovatelné, když se jako eluční pufr použije pufr s nízkým obsahem soli, ale ne voda (Lucena – Aguilar et al., 2016).

Čistá pDNA má A_{260}/A_{280} přibližně 1,8. Při hodnotách nižších než 1,6 je vzorek kontaminovaný proteiny. V případě A_{260}/A_{230} čistá pDNA v rozmezí 2,0 – 2,2. Pokud jsou hodnoty nižší vzorek je kontaminovaný například fenoly, lipidy nebo solemi. Zjištění možností, čím je vzorek kontaminován řešíme pomocí absorbancí za lomítkem. Tato absorbance poukazuje na kontaminanty, které absorbují různé vlnové délky. Nejčastěji tedy jako druhou absorbanci používáme 280 a 230 nm (Lucena – Aguilar et al., 2016).

Výhodou spektrofotometrického stanovení je jeho přesnost a současná možnost posoudit čistotu preparátu. Čistotu pDNA lze stanovit z poměrů absorbancí při různých vlnových délkách. Při kontaminaci preparátu proteiny jsou vypočtené poměry absorbancí výrazně nižší a koncentraci pDNA nelze přesně stanovit. Stupeň znečištění pDNA lze posoudit rovněž proměřením absorbance vzorku v rozsahu vlnových délek 230 – 300 nm a vyhodnocením získané křivky. V případě silného znečištění pDNA je třeba provést její přečištění. Přečištění nejčastěji provádíme chloroformem nebo směsí fenol:chloroformu. Je také možné provést přečištění vzorku RNázou za účelem odstranění přebytku RNA (Nakayama, 2016).

Koncentrace pDNA se obecně vypočítává pomocí Lambert-Beerova zákona ze spektrofotometrické analýzy absorpce při 260 nm (A_{260}). A_{260} mezi 0,1 a 1,0 odpovídá reprodukovatelným a spolehlivým hodnotám a vysoce koncentrované vzorky DNA by měly být naředěny. Měření koncentrace DNA v nižším rozsahu může být

silně ovlivněno rozptylem světla na prachových částicích přítomných ve vzorku. Tato metoda měření koncentrace je relativně necitlivá, protože 0,1 odpovídá 5 ng/μl dvouvláknové DNA (dsDNA) (Lucena – Aguilar et al., 2016).

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat různé metody izolace plazmidové DNA, zhodnotit množství a koncentraci získané DNA a jejich čistotu a posoudit vhodnost metod pro produkci rekombinantních proteinů ve velkých objemech. V získaném izolátu prokázat existenci plazmidové DNA a popsat její čistoty. Na základě získaných údajů pak určit metodu, která dosahuje jak kvalitativně i kvantitativně nejlepších výsledků.

3 Metodika

3.1 Popis kmene *Escherichia coli*

Buněčná kultura byla dodána od vedoucího bakalářské práce prof. Ing. Vladislava Čurna, Ph.D. – kmen EC_ABB1992 odvozený z buněk BL21(DE3) s používaný pro expresi rekombinantních proteinů s vloženým plazmidem pET24a.

3.2 Kultivace

3.2.1 Inokulace, kultivace vegetativního média

	Trypton [g/l]	Kvasincový extrakt [g/l]	NaCl [g/l]	Bakteriologický agar [g/l]
Luria Bertani – LB (tekuté) pH 7,3	10	5	10	
Luria Bertani – LB (pevné) pH 7,3	10	5	10	20

Tabulka 3.2.1.1. Složení tekutého a pevného LB média

Tekuté LB médium bylo připraveno rozpuštěním 0,5 g tryptonu, 0,5 g NaCl a 0,25g kvasnicového extraktu v 50 ml vody do 250 ml Erlenmayerovy baňky. pH bylo upraveno na 7,3 pomocí 2M HCl a 2M NaOH s pH metrem (Violab) a sterilizováno v parním autoklávu. Pevné LB médium bylo připraveno rozpuštěním 4 g tryptonu, 4 g NaCl, 2 g kvasnicového extraktu a 8 g bakteriologického agaru ve 400 ml vody do 500 ml Erlenmayerovy baňky. pH bylo upraveno na 7,3 pomocí 2M HCl a 2M NaOH s pH metrem (Violab) a sterilizováno v parním autoklávu. Po sterilizaci necháno médium vychladnout na 60 °C poté sterilně přidáno 200 µl antibiotika kanamycin ze zásobního roztoku, který byl připraven rozpuštěním 1 g kanamycinu v 10 ml demineralizované vody. Po rozpuštění byl roztok přefiltrován přes filtr 0,22 µm a sterilně rozdělen do 1,5 ml zkumavek, uchováván v -20 °C na finální koncentraci 50mg/l, důkladně promícháno a poté sterilně v laminárním boxu nalito do Petriho misek.

Ze zmražené zásobní kultury *E. coli* byla sterilně v laminárním boxu naočkována očkovací kličkou bakteriální kultura na pevné LB médium s antibiotikem kanamycin v koncentraci 50 mg/l a kultivováno 24 hodin při 32 °C v inkubátoru. Po 24 hodinách bylo sterilně inokulováno plnou očkovací kličkou do 50 ml tekutého LB média s kanamycinem v koncentraci 50 mg/l a inkubováno v třepačce při 32 °C 250 RPM dalších 24 hodin. Z kultivovaného LB média byly sterilně v laminárním boxu

odebrány 2 ml buněčné kultury *E. coli* do čisté zkumavky o objemu 2 ml pro stanovení optické denzity. Před samotným měřením odebraného vzorku bylo třeba zkalibrovat spektrofotometr (SHIMADZU) 2 ml sterilního vzorku LB média, který byl odebrán před inokulací. Kalibrace byla prováděna při vlnové délce 595 nm. Po kalibraci byl odebraný vzorek vegetativního média změřen na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Pokud se naměřené hodnoty pohybovaly mezi OD₅₉₅ 0,5 – 0,7 bylo sterilně v laminárním boxu inokulováno produkční médium 5 % vegetativního média.

3.2.2 Inokulace, kultivace produkčního média

Složení použitých médií a roztoků:

	Kvasnicový extrakt [g/l]	Tryptone [g/l]	Glycerol [ml/l]	Fosfátový pufr [ml/l]
Terrific broth – TB pH 7	24	20	4	100

Tabulka 3.2.2.1. Složení tekutého produkčního média (TB)

Tekuté produkční médium (TB) bylo připraveno rozpuštěním 1,2 g kvasnicového extraktu, 1 g tryptonu ve 45 ml vody do 250 ml Erlenmayerovy baňky. Po rozpuštění bylo přidáno 400 µl 50% glycerolu ze zásobního roztoku, který byl připraven smícháním 100 ml glycerolu a 100 ml demineralizované vody. Bylo srovnáno pH pomocí 2M HCL, 2M NaOH s pH metrem (Violab) na pH 7, poté bylo sterilizováno v parním autoklávu. Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním 25,04 g K₂HPO₄ ve 100 ml destilované vody, poté přidáno 4,6 g KH₂PO₄ poté bylo doplněno do 200 ml demineralizovanou vodou. Po rozpuštění následovala sterilizace v autoklávu. Po sterilizaci TB média a fosfátového pufru následovalo dokončení přípravy média před inokulací, tak že do 45 ml sterilního tekutého TB média bylo sterilně přidáno 5 ml sterilního fosfátového pufru a poté antibiotikum kanamycin ze zásobního roztoku na finální koncentraci 50 mg/l.

Po dokončení přípravy tekutého TB média bylo sterilně v laminárním boxu nainokulováno 5 % vegetativního média. Nainokulované produkční médium bylo ponecháno v třepačce při 32 °C 250 RPM. Po vizuální kontrole TB média byly sterilně odebrány 2 ml do zkumavky o objemu 2 ml pro měření optické denzity. Před samotným měřením vzorku bylo třeba zkalibrovat spektrofotometr při vlnové délce 595 nm předem odebraným sterilním vzorkem neinokulovaného TB média. Po kalibraci byl

odebraný vzorek změřen na spektrofotometru (SHIMADZU) při vlnové délce 595 nm. Pokud OD_{595} dosahovalo hodnoty mezi 0,5 – 0,9 byla rostoucí buněčná kultura sterilně naindukováno přidáním 0,5 ml IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid) [WVR] na 50 ml tekutého TB média. Po indukci bylo produkční médium ponecháno v třepačce při 32 °C 250 RPM do druhého dne. Poté sterilně v laminárním boxu byla buněčná kultura sklizena po 5 ml do 50 ml zkumavek a stočena 4500 RPM po dobu 30 minut. Po stočení byl supernatant odebrán a sediment byl postupně třikrát promyt 15 ml TE pufru (Tris – EDTA, pH 8). Po promytí byly vzorky připraveny pro provedení izolací.

3.3 Izolace plazmidové DNA

3.3.1 Alkalická lýze

Použité roztoky:

- Roztok alkalické lýze I

50 mM glukóza

25 mM Tris-HCl (pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

Na přípravu 2M glukózy bylo rozpuštěno 36 g glukózy v 50 ml demineralizované vody, po rozpuštění bylo doplněno do 100 ml objemu demineralizovanou vodou. Po přípravě byl roztok sterilizován v autoklávu a následně uchováván ve 4 °C.

Na přípravu 1M Tris – HCl bylo rozpuštěno 121,1 g Tris – base v 500 ml demineralizované vody a poté bylo doplněno do 1000 ml objemu demineralizované vody. Poté provedeno srovnání pH metrem na pH 8 pomocí 35% HCl, poté sterilizováno v autoklávu a uchovávat v pokojové teplotě.

Na přípravu 200 ml lyzačního pufru I bylo smícháno 5 ml ze zásobního roztoku 2M glukózy, 5 ml 1M Tris-HCl a 4 ml 0,5M EDTA, po smíchání doplnit do 200 ml demineralizovanou vodou.

- Roztok alkalické lýze II

0,2 M NaOH

1 % SDS

Na přípravu lyzačního pufru II bylo třeba připravit zásobní roztok 2M NaOH (hydroxidu sodného) rozpuštěním 8 g v 80 ml demineralizované vody. Po rozpuštění byl roztok doplněn do 200 ml. Při přípravě lyzačního pufru II byl rozpuštěn 1 g SDS

v 50 ml demineralizované vody. Po rozpuštění přidáno ze zásobního roztoku 2M NaOH 10 ml a doplnit do 100 ml objemu demineralizovanou vodou. Lyzační pufr II je vždy nutno připravit čerstvý a uchovávat v pokojové teplotě.

- Roztok alkalické lýze III

5 M octan draselný	60 ml
ledová kyselina octová	11,5 ml
demineralizovaná voda	28,5 ml

Před přípravou lyzačního roztoku III bylo nutné připravit 5M octan draselný rozpuštěním 98 g octanu draselného ve 100 ml demineralizované vody, po rozpuštění bylo doplněno do 200 ml. 100 ml lyzačního pufru III bylo připraveno smícháním 60 ml 5M octanu draselného, 11,5 ml ledové kyseliny octové a 28,5 ml demineralizované vody. Po namíchání uchovávat ve 4 °C.

- směs fenol: chloroform: isoamylalkohol

V poměru 25:24:1

Na přípravu 500 ml směsy fenol:chloroform:isoamylalkoholu bylo smícháno 192 ml chloroformu, 8 ml isoamylalkoholu a 200 ml fenolu. Připravenou směs uchovávat je nutné uchovávat ve 4 °C.

Průběh izolace:

Buněčná biomasa po kultivaci v TB médiu, byla rozdělena po 5 ml do 50 ml sterilních zkumavek. Pro porovnání byly použity 4 sterilní 50 ml zkumavky s 5 ml sedimentu. K sedimentům bylo přidáno 5 ml roztoku alkalické lýze I, poté bylo roztřepáno. Po roztřepání bylo přidáno 10 ml roztoku alkalické lýze II, následovalo opatrné promíchání pohyby rukou a inkubace po dobu 2 minut na ledu. Po inkubaci bylo přidáno 7,5 ml roztoku alkalické lýze III a bylo promícháno pohyby rukou a bylo inkubováno po dobu 5 minut na ledu. Po inkubaci byla kultura s lyzačními roztoky odstředěna v centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM 4 °C po dobu 5 minut. Po dostatečném odstředění byl odebrán supernatant s plazmidovou DNA do nové zkumavky a přečištěn fenol:chloroformem v poměru 1:1. Po přidání směsi fenol:chloroformu bylo promícháno otáčením ruky a odstředěno na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po dokonalém oddělení organické a vodné fáze byla odpipetována vodná fáze do čisté zkumavky (50 ml). K vodné fázi byl přidán isopropanol v poměru 1:1, poté bylo opět promícháno pohyby rukou. Po promíchání bylo inkubováno při pokojové teplotě po dobu

10 minut. Po inkubaci odstředěno na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) maximální RPM při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Ze zkumavky byl odebrán supernatant, zbylá vyprecipitovaná plazmidová DNA v podobě peletu zabarveného do bíla. Pelet byl promyt přidáním 10 ml 70% ethanolu (70% ethanol byl připraven smícháním 140 ml 96% ethanolu a doplněno do 200 ml demineralizovanou vodou), následně promícháno krouživými pohyby a odstředěno na centrifuze 13 000 RPM při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Po odstředění byl supernatant odebrán a pelet byl odsušen při pokojové teplotě dnem vzhůru. Po vysušení byl pelet rozpuštěn ve 2,5 ml TE pufru (Tris – EDTA, pH 8). TE pufr byl připraven smícháním 10 ml Tris – HCl, 2 ml 0,5M EDTA a roztok byl doplněn do 1000 ml demineralizovanou vodou. Po namíchání byl roztok sterilizován v autoklávu a uchováván ve 4 °C.



Obrázek 3.3.1 Buněčná kultura po alkalické lýze roztoky I., II., III. (autor)

3.3.2 Izolace s isopropanolem

Modifikace alkalické lýze dle Sambrook (2003), podmínky upraveny dle buněčné kultury. Byly upraveny centrifugační podmínky 9000 RPM na 13 000 RPM.

Použité roztoky:

- Lyzační pufr I

25 mM Tris-HCl (pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

Na přípravu 200 ml lyzačního pufru I bylo smícháno, 5 ml 1M Tris-HCl a 4 ml 0,5M EDTA, po smíchání bylo doplněno do 200 ml demineralizovanou vodou.

Připravit 100 ml pufru I a sterilizovat a v autoklávu 15 minut, uchováváno v lednici při 4 °C. Zásobí roztok 1M Tris – HCl byl použit stejný jako při alkalické lýze.

- Lyzační pufr II

0,1 M NaOH

1 % SDS (w/v)

Na přípravu lyzačního pufru II bylo třeba připravit zásobní roztok 2M NaOH (hydroxidu sodného) rozpuštěním 8 g v 80 ml demineralizované vody. Po rozpuštění bylo doplněno do 200 ml. Při přípravě lyzačního pufru II byl rozpuštěn 1 g 1% SDS v 50 ml demineralizované vody. Po rozpuštění bylo přidáno ze zásobního roztoku 2M NaOH 10 ml a doplněno do 100 ml objemu demineralizovanou vodou. Lyzační pufr II je vždy nutno připravit čerstvý a uchovávat v pokojové teplotě.

- Lyzační pufr III

5 M octan draselný 60 ml

ledová kyselina octová 11,5 ml

demineralizovaná H₂O 28,5 ml

Před přípravou lyzačního roztoku III bylo třeba připravit 5M octan draselný rozpuštěním 98 g octanu draselného ve 100 ml demineralizované vody, po rozpuštění byl roztok doplněn do 200 ml.

Na 100 ml lyzačního pufru III bylo smícháno 60 ml 5M octanu draselného s 11,5 ml ledové kyseliny octové a 28,5 ml demineralizované vody. Po namíchání bylo uchováváno ve 4 °C.

Modifikace postupu izolace:

Modifikace provedeny v klasickém protokolu pDNA miniprep popsaném Green a Sambrook (2016). Z lyzačního roztoku I byla vynechána glukóza. Množství lyzačních roztoků I-III bylo zdvojnásobeno. Všechny centrifugační kroky byly prováděny při pokojové teplotě.

Průběh izolace:

Buněčná biomasa po kultivaci v LB médiu ve fermentoru, byla rozdělena po 2 ml do sterilní 2 ml zkumavky. Pro porovnání byly použity 4 zkumavky s 2 ml sedimentu. Ze vzorku bylo odebráno 200 µl do nové 1,5 ml zkumavky. Do 1,5 ml zkumavky s odebranou buněčnou biomasou bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru I a poté bylo

roztřepáno. Po roztřepání následovalo přidání 400 µl lyzačního pufru II a bylo promícháno překlápěním v ruce. Poté bylo inkubováno na ledu po dobu 2 minut. Po inkubaci bylo přidáno 150 µl lyzačního pufru III. Poté bylo znovu inkubováno na ledu 5 minut. Po inkubaci bylo odstředěno na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM po dobu 5 minut. Po centrifugaci bylo odebráno 800 µl lyzátu do nové předem připravené 1,5 ml zkumavky s 264 µl isopropanolu a po přidání bylo ihned promícháno. Po promíchání bylo odstředěno na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM po dobu 5 minut. Po stočení byl supernatant odebrán do nové předem připravené 1,5 ml zkumavky s 216 µl isopropanolu a po přidání ihned promícháno otáčením v ruce. Po promíchání bylo inkubováno 3 minuty při pokojové teplotě, poté odstředěno na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM po dobu 8 minut. Po odstředění byl odebrán supernatant a pelet ponechán volně vyschnout dnem vzhůru. Následně byl získaný pelet promyt 70% ethanolem, poté byl promíchán a odstředěn na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM po dobu 2 minut. Po stočení byl 70% ethanol odebrán a výsledný pelet ponechán volně vyschnout. Výsledný pelet byl rozpuštěn v 50 µl TE pufru (Tris – EDTA, pH 8).

3.3.3 Termická lýze

Použité roztoky:

- Lyzační pufr I – TE pufr

25 mM Tris – HCl (pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

Na přípravu 200 ml lyzačního pufru I bylo smícháno, 5 ml 1M Tris-HCl a 4 ml 0,5M EDTA, po smíchání doplnit do 200 ml demineralizovanou vodou, srovnáno pH pomocí pH metru (Violab) na pH 8. Poté sterilizováno v autoklávu 15 minut a po vychladnutí uchovávat ve 4 °C.

- 10x lyzační pufr

100 µl lysozym

1 M NaCl

20 % Triton-X-100

Lyzační pufr je nutno vždy připravit čerstvý.

- 3M octan sodný
- IPA (isopropanol)
- 70% ethanol

70% ethanol byl připraven smícháním 140 ml 96% ethanolu a bylo doplněno do 200 ml demineralizovanou vodou.

Průběh izolace:

Buněčná biomasa po kultivaci v LB médiu, byla rozdělena po 5 ml do 50 ml zkumavek. Po odebrání byla biomasa odstředěna na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM po dobu 10 minut. Po odstředění byl supernatant odebrán a sediment byl postupně třikrát promyt 15 ml TE pufru (Tris – EDTA, pH 8). Do sedimentu bylo přidáno 5 ml TE pufru (Tris – EDTA, pH 8). Sediment s TE pufrem (Tris – EDTA, pH 8) roztřepán a po 1ml rozdělen do osmi 1,5 ml zkumavek. K tomu bylo přidáno 1/10 objemu 10x lyzačního pufru a promícháno v ruce. Po promíchání bylo inkubováno po dobu 20 minut 37 °C při mírném míchání (20 RPM) v termobloku (BIOER). Po inkubaci byla provedena lýza při 70 °C a 80 °C po dobu 20 sekund nebo 3 minut. Vzorky očíslované 1–8.

Vzorky	Stupně	Čas inkubace
1 + 2	70 °C	20 sekund
3 + 4	70 °C	3 minut
5 + 6	80 °C	20 sekund
7 + 8	80 °C	3 minut

Tabulka 3.3.3.1. Přehled vzorků a podmínek termické lýzy

Po lýze byl ihned proveden chladový šok. Vzorky 1+3+5+7 byly odstředěny na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM po dobu 5 minut a vzorky 2+4+6+8 byly odstředěny na centrifuze (Hettich ROTINA 380 R) 13 000 RPM po dobu 30 minut. Po stočení byl supernatant napipetován do nové předem připravené 1,5 ml zkumavky, do které bylo předem přidáno 0,1ml objemu 3M octanu sodného (60 µl) a 0,6 objemu IPA (360 µl). Vzorky byly lehce promíchány a inkubovány po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byly stočeny 13 000 RPM po dobu 5 minut. Následovalo 2x promytí 1 ml 70% ethanolu, protřepáno cvrnkáním a stočeno 13 000 RPM po dobu 2 minut. Poté byl odebrán 70% ethanol a získaný pelet byl ponechán volně odsušit dnem vzhůru při pokojové teplotě. Po odsušení výsledný pelet rozpuštěn v 100 µl TE pufru (Tris – EDTA, pH 8).

3.3.4 Měření koncentrace, čistoty a prokázání plazmidu

Hodnocení plazmidové DNA na gelu

Použité chemikálie:

-
- 10x TBE pufr

Připraveno smícháním 108 g Tris – base, 55 g kyseliny borité a 9,3 g EDTA rozpuštěno v 1000 ml demineralizované vody. Pro použití bylo třeba 10x TBE naředit na 1x TBE smícháním 100 ml 10x TBE s 900 ml demineralizované vody.

- Agaróza
- Ethidium bromid
- Loading DYE Buffer

Pro prokázání plazmidové DNA byl použit 1% agarózový gel. Na přípravu 1 cm vysokého 1% agarozového gelu rozpuštěním 1,5 g agarozy ve 150 ml TBE pufru při zahřívání. Po rozpuštění zchladeno a přidáno 7 μ l Ethidium bromidu, důkladně promícháno a nalito do předem připravené formy.

Do vzorku bylo pro obarvení přidáno 3,75 μ l Loading DYE Buffer a promícháno s 15 μ l získané plazmidové DNA. Po přípravě vzorku bylo 18,75 μ l nanášeno do jamek v připraveném vychladném 1% agarozovém gelu. Elektroforetická separace probíhala při 70 V po dobu 5 minut pro prvotní migraci vzorku do gelu. Po uplynutí 5 minut bylo navýšeno na 120 V po dobu 90 minut. Po ukončení elektroforézy byl vyjmut gel z elektroforetické vany a byl vložen pro vizuální kontrolu do dokumentačního zařízení na UV transiluminátor (Labmark).

Měření koncentrace pomocí Nanodrop (Thermo scientific)

Měření založeno na změření rozdílu koncentrace DNA v nulovém vzorku a v izolovaném vzorku. Jako nulový vzorek byl použit TE pufr (Tris – EDTA, pH 8), ve kterém byl rozpuštěn pelet pDNA z důvodu, že absorpce pDNA závisí na rozpouštědle, ve kterém byl získaný pelet rozpuštěn. Vzorky byly měřeny ve dvojnásobném rozmezí spektra a to jsou A260/A280 a A260/A230. Na Nanodrop bylo nanášeno 0,5 μ l nulového vzorku pro kalibraci pro měření. Po kalibraci bylo nanášeno 0,5 μ l měřeného vzorku s DNA a byla změřena koncentrace. Na konci byly porovnány tabulkové hodnoty jednotlivých vzorků.

Měření koncentrace pomocí Qubit® fluorimetr

Fluorescenční stanovení DNA je založeno na detekci proteinů a nukleových kyselin za pomoci fluorescenčního činidla přidaného do měřeného vzorku. Před měřením byla nutná kalibrace přístroje pomocí standardů na požadovanou citlivost měření. Po kalibraci byly připraveny vzorky smícháním fluorescenčního činidla s měřeným

vzorkem. Vzorky byly lehce promíchány a krátce odstředěny na centrifuze (Benchmark my FUGETM Mini). Poté byly vzorky jednotlivě měřeny.



Obrázek 3.3.4. Qubit™ fluorimetr pro měření koncentrace DNA (autor)

4 Výsledky a diskuze

4.1 Alkalické lýze

Čistota plazmidové DNA byla změřena spektrofotometricky pomocí Nanodropu (Thermo scientific).

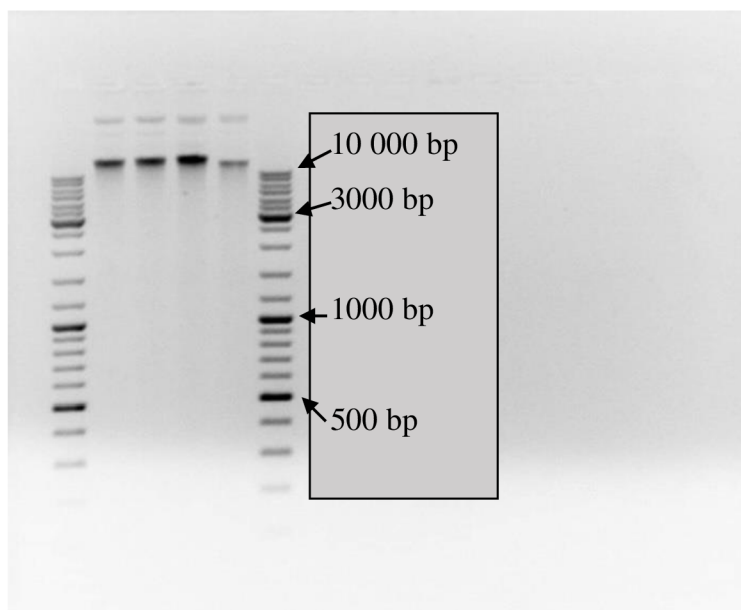
vzorky	pDNA [$\mu\text{g/ml}$]	OD 260/280	OD 260/230
1	19,2	1,91	2,16
2	20,7	1,83	2,23
3	21,0	1,95	2,20
4	18,6	1,84	2,09

Tabulka 4.1.1. Naměřené hodnoty vzorku izolované plazmidové DNA metodou alkalické lýze

Dle naměřených hodnot (viz tabulka 4.1.1) bylo zjištěno, že vzorky při A260/A280 se pohybují od 1,83 – 1,95. Vzorek označený číslem 2 s hodnotou 1,83 je nejbližší uváděným hodnotám z literatury, a to je 1,8 – 2,0 (Zhu et al., 2007). Z těchto výsledků je zřejmé, že při této absorbanci jsou měřené vzorky prosté od proteinů. V případě A260/A230 byly naměřeny hodnoty od 2,09 – 2,23. Z toho vyplývá, že vzorek 3, 4 a 6 jsou stále v rozmezí hodnot (1,8 – 2,0), které určují že měřené vzorky nejsou tedy kontaminované a jsou považované za čisté. Hodnota vzorku číslo 2 se v uváděném rozmezí se vyskytuje lehce nad hranicí ideální čistoty. To znamená, že vzorek obsahuje zbytek fenolu, EDTA, lipidů nebo soli. Možností řešení čistoty je vzorek při izolaci opětovně přechistit.

Literatura uvádí ideální čistotu izolovaného vzorku při OD A260/A280 1,8, pokud se vyskytuje čistota nižší než 1,6 vzorek je kontaminován proteiny. Při OD A260/A230 se uvádí ideální čistota 2,0 – 2,2, v případě nižších hodnot vzorek obsahuje fenoly, guanidin, lipy a soli (Zhu et al., 2007).

Naměřené hodnoty koncentrace pDNA dosahují rozmezí 19,6 – 21,0 $\mu\text{g/ml}$. Dle výsledků Sambrook (2003) se jeví jako ideální koncentrace pDNA: 20 ($\mu\text{g/ml}$). Po porovnání naměřených výsledků se jeví všechny vzorky jako vhodné pro následnou práci z důvodu, že se shodují s naměřenými hodnotami dle literatury.



Obrázek 4.1.1. Agarozová elektroforéza po alkalické lýze

Jako další metoda pro prokázání plazmidové DNA byla provedena agarozová elektroforéza k potvrzení existence pDNA a určení její velikosti. Výsledek izolace byl porovnáván s 1 kb markerem. Izolovaná plazmidová DNA má velikost přibližně 12 000 bp dle obrázku 4.1.1. V literatuře se uvádí rozmezí 4800 – 16 700 bp (Zhu et al., 2007). Na gelu vidíme plazmid o velikosti nad 10 000 bp. Tudíž se výsledek vyskytuje v rozmezí z uvedené literatury.

Metoda alkalické lýze je kvantitativně velice dobře výnosná. Také je vhodná pro použití ve velkých objemech bez použití kitů. Výsledky této izolace jsou i bez vyššího podílu fragmentů DNA a RNA a dalších zbytků.

4.2 Lýze s isopropanolem

Měření čistoty plazmidové DNA pomocí Nanodropu (Thermo scientific).

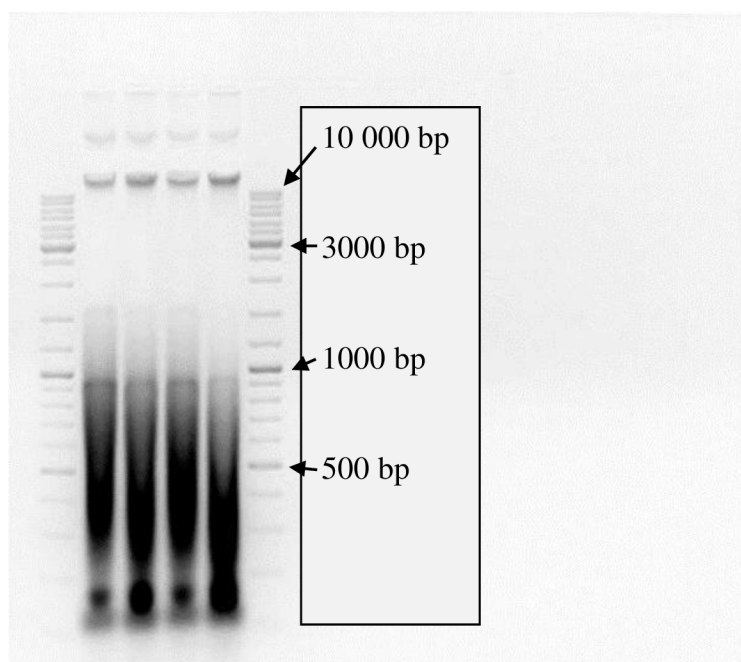
vzorky	pDNA [$\mu\text{g/ml}$]	OD 260/280	OD 260/230
1	17,4	1,72	1,89
2	17,9	1,79	1,99
3	14,2	1,69	1,87
4	15,9	1,81	1,95

Tabulka 4.2.1. Naměřené hodnoty vzorku izolované plazmidové DNA metodou lýze isopropanolem
(autor)

Z výše uvedené tabulky 4.2.1. vyplývají hodnoty čistoty měřených vzorků od 1,69 – 1,81 při A260/A280, což částečně odpovídá ideální čistotě izolované pDNA 1,8 – 2,0

dle literatury (Kachkin et al., 2020). Z dosažených výsledků odpovídá ideální čistotě měřený vzorek číslo 4 s hodnotou 1,81, zbylé tři vzorky nebyly dostatečně přečištěny a byly kontaminovány proteiny. Při A260/A230 bylo dosaženo výsledků 1,87 – 1,99. Literatura udává hodnoty ideální čistoty od 2,0 – 2,2 (Kachkin et al., 2020). Když porovnáme naměřené hodnoty a hodnoty uvedené v literatuře zjistíme, že jediný vzorek blížící se svou hodnotou čistoty hodnotám z literatury je vzorek číslo 2 s naměřenou hodnotou 1,99. Zbylé vzorky vykazují kontaminaci zbytky fenolu, lipidů či solí.

Naměřené hodnoty koncentrace pDNA dosahují rozmezí 15,2 – 17,9 $\mu\text{g/ml}$. Dle výsledků Sambrook (2003) se ukazuje jako ideální koncentrace pDNA: 20 ($\mu\text{g/ml}$). Po porovnání naměřených výsledků se jeví vzorky jako nevhodné pro následnou práci z důvodu, že nedosahují naměřených hodnot dle literatury. Ve vzorcích se nachází vysoké množství RNA z důvodu nedostatečného přečištění.



Obrázek 4.2.1. Agarozová elektroforéza po izolaci isopropanolem (autor)

Jako další metoda byla provedena agarozová elektroforéza. Izolovaná plazmidová DNA má velikost přibližně 12 000 bp dle obrázku 4.2.1. V literatuře se uvádí rozmezí 4800 – 16 700 bp. Výsledek izolace byl srovnáván s 1 kb markerem.

Izolace s isopropanolem poskytuje, v porovnání s termickou lýzí, podstatně vyšší výtěžky pDNA. Bohužel s vyšší výnosností plazmidové DNA je zde i větší

množství fragmentů DNA i zbylá RNA. Bylo by nutné přidávat další předčišťovací kroky pro odstranění těchto zbytků.

4.3 Termická lýze

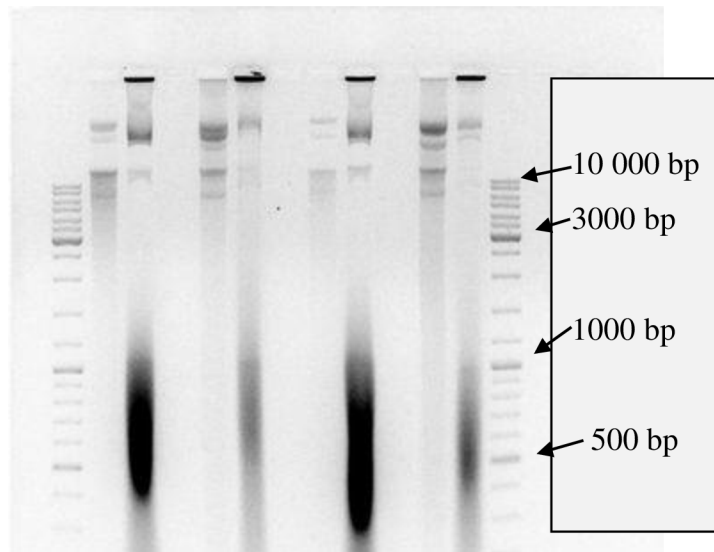
První metoda měření čistoty plazmidové DNA byla změřena za pomoci Nanodropu (Thermo scientific).

vzorky	pDNA [$\mu\text{g/ml}$]	OD 260/280	OD 260/230
1	16,05	1,78	2,04
2	10,0	1,39	1,64
3	12,5	1,80	2,14
4	9,06	1,55	1,76
5	11,06	1,76	2,03
6	9,08	1,34	1,53
7	14,6	1,74	2,12
8	10,02	1,56	1,89

Tabulka 4.3.1. Naměřené hodnoty izolované plazmidové DNA metodou termické lýze

Při termické lýze byly pomocí Nanodropu zjištěny hodnoty vzorků, které měly odlišné teploty a časy lýze viz tabulka 3.3.3.1. Naměřené hodnoty při A260/280 jsou od 1,34 – 1,80. Ideální hodnoty čistoty uvedené v literatuře jsou 1,8 – 2,0 (Zhu et al. 2007). Po porovnání hodnot se ideální hodnotám čistoty nejvíce blíží vzorek číslo 3 s hodnotou 1,80. Ostatní vzorky se vyskytují pod hranicí čistoty, a to značí kontaminaci proteiny. V případě A260/A230 se naměřené hodnoty pohybují od 1,53 – 2,12. Dle literatury je ideální čistota vyjádřená hodnotami 2,0 – 2,2 (Zhu et al., 2007). Z hodnot naměřených a porovnaných s hodnotami z literatury vyplývá, že vzorky odpovídající čistotě jsou 1, 3, 5 a 7 s hodnotami od 2,04 – 2,14. Zbylé vzorky obsahují zbytky fenolu, lipidů a solí.

Naměřené hodnoty koncentrace pDNA dosahují rozmezí 9,06 – 14,6 $\mu\text{g/ml}$. Dle výsledků Sambrook (2003) se ukazuje jako ideální koncentrace pDNA: 20 ($\mu\text{g/ml}$). Po porovnání naměřených výsledků se jeví vzorky jako naprosto nevhodné pro následnou práci z důvodu, že nedosahují naměřených hodnot dle literatury. Ve vzorcích se nachází vysoké množství RNA z důvodu nedostatečného přečištění a také se ve vzorcích nachází různé typy DNA (genomická a superstočená), než jen plazmidová DNA.



Obrázek 4.3.1. Agarozová elektroforéza po termické lýze

Jako další z ukazatelů výnosnosti metody, množství a čistoty plazmidové DNA byla provedena agarozová elektroforéza. Izolovaná plazmidová DNA má velikost přibližně 12 000 bp dle obrázku 4.3.1. V literatuře se uvádí rozmezí mezi 4800 – 16 700 bp (Yang a Yang, 2012). Výsledek izolace byl srovnáván s 1 kb markerem.

Vyskytuje se více druhů DNA (genomická, plazmidová superstočená) a metoda termické lýze neposkytuje konzistentní výsledky (Zhu et al., 2007). Nekonzistentní výsledky vidíme přehledně na obrázku 4.3.1 kde vzorky za stejných lyzačních podmínek byly poskládány na gel po dvou vedle sebe. Každá dvojice měla odlišné lyzační teplotní a časové podmínky viz tabulka 3.3.3.1.

4.4 Návrh optimálního postupu izolace pDNA

Dle zjištěných výsledků byla alkalická lýze zhodnocena jako metoda poskytující nejvyšší výtěžek pDNA, ale také nejvhodnější s ohledem na čistotu a konzistentnost výsledků.

Pomocí této metody byly získány vysoké výtěžky plazmidové DNA o vysoké čistotě, bez kontaminace fragmenty DNA a RNA. Vzhledem k získanému množství plazmidů a jejich čistotě se tento postup izolace jeví jako nejvhodnější pro následnou přípravu rekombinantních plazmidových vektorů, štěpení plazmidů a ligaci inzertů.

Optimální postup pro celkovou izolaci pDNA z buněk *E. coli* obsahující požadovaný plazmid by byl následující: kultivace bakterií ve vegetativním médiu (LB) a následná inokulace produkčního média (TB) s indukcí produkce v momentě dosažení optimální optické denzity při OD₅₉₅ v rozsahu 0,5-0,9. Po kultivaci je vhodné buňky

promýt a následně využít alkalickou lýzy k získání pDNA. Během izolace je třeba dbát na preciznost provedení, dodržení časů inkubací. Popřípadě můžeme do postupu izolace přidat krok přečištěním RNázou abychom se zbavily nechtěných zbytků RNA.

Po zhodnocení jednotlivých kvantitativních a kvalitativních výsledků vybraných metod izolací plazmidové DNA byla vyhodnocena jako nejúčinnější metoda izolace alkalické lýze.

Jako finální krok je pak vizualizace pDNA na agarózovém gelu, stanovení čistoty a koncentrace pDNA at' už spektrofotometricky (přístroj NanoDrop) nebo fluorimetricky (přístroj Qubit).

Závěr

Práce byla rozdělena na dvě části. V první části bylo cílem vypracovat literární přehled o možnostech kultivace, popis a využití bakterie *E.coli*, možnosti izolace pDNA, dále přehled o plazmidech a faktorech ovlivňujících výtěžnost izolace pDNA a v neposlední řadě možnosti detekce a změření koncentrace a čistoty plazmidové DNA. Ve druhé, experimentální části práce bylo cílem zhodnotit a vybrat neúčinnější metodu pro izolaci plazmidové DNA a následně detekovat získanou plazmidovou DNA.

Přesto, že se v literárních zdrojích uvádí přesné postupy provedení metod, bylo třeba metody upravit, dle dostupných podmínek a povahy buněčné kultury *E.coli*. Po modifikaci metod bylo dosaženo uspokojivých výsledků, se kterými je možné nadále pracovat a postupovat v tvorbě rekombinantních plazmidových vektorů.

Z dosažených výsledků je zřejmé, že nejvhodnější metodou pro izolaci plazmidové DNA je alkalická lýze. Ukazuje to výtěžnost čistoty a množství plazmidové DNA z vybraných metod izolací uvedených v experimentální části práce. Metodou alkalické lýze bylo dosaženo čistoty pDNA v rozmezí 1,83 – 1,95 při A260/A280. Naměřené množství pDNA ve vzorcích po alkalické lýze bylo dosaženo hodnot v rozmezí 19,6 – 21,0 $\mu\text{g/ml}$.

Použitá metoda nevyužívá komponenty izolačních kitů ani zvláštní chemické sloučeniny, nepožaduje speciální laboratorní vybavení (větší množství izolované pDNA je možné kvalitativně vyhodnotit jak pomocí agarózové elektroforézy, tak pomocí UV-VIS spektrofotometru). Z těchto důvodů je možné metodu zavést a modifikovat dle laboratorních podmínek dané instituce a dosahovat přijatelných výsledků.

Seznam použité literatury

Birnboim H.C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7(6): 1513-1516

Bonnet M., Lagier J. C., Raoult D., Khelifia S. (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infection*, 34:100622

Clark D.P., Pazdernik N.J., Mc Gehee M.R. (2019). Plasmids. *Molecular Biology*, 3(32): 712–748

Dewan I., Uecker H. (2023). A mathematician's guide to plasmids: an introduction to plasmid biology for modellers. *Microbiology*, 169(7): 001362

Elbing K., Breut R. (2019). Recipes and tools for culture of *Escherichia coli*. *Current protocols in Molecular biology*. 125(1): e83

Feliciello I., Chinali G. (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 212(2): 394-401

Filomena S., Luis P., Fani S., Queiroz J. A., Domingues F. C. (2009). Influence of growth conditions on plasmid DNA production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11): 1408–1414

Frankel G., Davidová S., Low W.W., Seddonová Ch., Wong J. LC, Beis K. (2023). Plasmids pick a bacterial partner before committing to conjugation. *Nucleic Acids Research*, 51(17): 8925–8933

Garcillán – Barcia M. P., Pluta R., Lorenzo – Díaz F., Bravo A., Espinosa M. (2022). The Facts and Family Secrets of Plasmids That Replicate via the Rolling-Circle Mechanism. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 86(1): e00222 –20

Grijalva – Hernández F., Vega – Estrada J., Escobar – Rosales M., Ortega – Gupta S. K., Shukla P. (2016). Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspective and applications. *Critical reviews in Biotechnology*, 36(6):1089-1098

Han Mee-Jung (2016). Exploring the proteomic characteristics of the *Escherichia coli* B and K-12 strains in different cellular compartments. *Journal of bioscience and bioengineering*. 122(1): 1-9

-
- Han Mee-Jung (2017).** Comprehensive Analysis of Proteomic Differences between *Escherichia coli* K-12 and B Strains Using Multiplexed Isobaric Tandem Mass Tag (TMT) Labeling. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11): 2028-2036
- Holmes D.S., Quigley M. (1981).** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biotechnology*, 114(1): 193-197
- Islam M. S., Aryasomyajula A., Selvaganapathy P. R. (2017).** A review on macroscale and microscale cell lysis method. *Micromachines (Basel)*, 8(3) :83
- Kachkin D.V., Khrolyskaya J.I., Ivanova J.S., Rubel A.I. (2020).** An Efficient Method for Isolation of Plasmid DNA for Transfection of Mammalian Cell Cultures. *Methods and protocols*, 3(4):69
- Kaichun Z., Huali J., Zhonghuai H., Qinghong Z., Bin W. (2006).** A countinous method for the large-scale extraction of plasmid DNA by modified boiling lysis. *Nature protocols* 1, 3088-3093
- Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu Ch., Kim Y.H. (2012).** Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62):3923
- Lefkothea-Vasiliki A. (2013).** Isolation of plasmid DNA from bacteria. *Methods in enzymatology*. 692: 135-142
- Lopez J., Aguilar – Lopez R., Lara A. R., Montes – Horcasitas M. del C. (2019).** High Kanamycin concentration as another stress factor additional to temperature to increase pDNA production in *E. coli*. *Microorganisms*, 7(12): 711
- Lopez-Guerrero J., Aguilar-Quada R. (2016).** DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4): 264-270
- Lucea-Aguilar G., Sánchez-Lopez A.M., Barberán-Aceituno C., Carrilo-Ávila J., Meacle FJ, Lander R., Shamlou P.A., Titchener – Hooker NJ. (2004).** Impact of engineering flow conditions on plasmid DNA yield and purity in chemical cell lysis operations. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(3): 293-302
- Nakayama Y., Yamaguchi H., Einaga N., Esumi M. (2016).** Pitfalls of DNA quantification using DNA-binding fluorescent dyes and suggested solutions. *PLOS ONE*, 11(3): e0150528
- Nguyen H.H., Park J., Park S.J., Lee Ch.S., Hwang S., Shin Y. B., Ha T. H., Kim M., (2018).** Long-Term Stability and Integrity of Plasmid-Based DNA Data Storage. *Polymers*, 10(1): 28
-

-
- Norgard M. V. (1981).** Rapid and simple removal of contaminating RNA from plasmid DNA without to use of RNase. *Analytical Biochemistry*. 113 (1): 34–42
- Riggs A.D. (2021).** Making, Cloning and the Expression of human insulin genes in bacteria: The Path to Humulin. *Endocrine reviews*. 42(3): 374-380
- Ruiz N., Silhavy T. J. (2022).** How Escherichia coli Became the Flagship Bacterium of Molecular Biology. *Journal of Bacteriology*, 204(9): e00230-22
- Sambrook J., Green M.R. (2001).** Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Molecular Cloning A Laboratory manual*, 1(3): 492-495
- Sambrook J., Green M.R. (2001).** Preparation of plasmid DNA by Alkaline lysis with SDS. *Molecular Cloning A Laboratory manual*, 1(3): 56-66
- Sambrook J., Green M.R. (2001).** Preparation of plasmid DNA by Boiling Lysis. *Molecular Cloning A Laboratory manual*, 1(3): 68-75
- Sambrook J., Green M.R. (2001).** Purification of Plasmid DNA by Precipitation with Polyethylen glycol. *Molecular Cloning A Laboratory manual*, 1(3): 84-86
- Sasagawa N. (2018).** *Plasmid*. ISBN 978–1-83881-126-6.
- Sekvahati M., Tadayon K., Ghaderi R., Banihashemi R., Jabbari A. R., Shokri G., Karimnasab N. (2015).** “ In house“ production of DNA size marker from a vac-cinal *Bacillus anthracis* strain. *Irian Journal of Microbiology*, 7(1): 45-49
- Shintani M., Sanchez Z. K., Kimbara K. (2015).** Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, 6: 242
- Sigmon J., Larcom L.L. (1996).** The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 17(10): 1524-1527
- Son M.S., Taylor R.K. (2021).** Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current protocols*. 1(1): e20
- Sung S., Huh J., Yun M., Chang B.M.W., Jeong Ch., Jeon Y. (2013).** Sterilization effect of atmospheric pressure non-thermal air plasma on dental instruments. *The journal of advanced prothodontics*, 5(1): 2-8
- Tan S.Ch., Yiap B.Ch. (2009).** DNA, RNA and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009: 574398
- Tonga AP, Shuler ML, Wilson DB (1993).** Effects of plasmid copy number and runaway plasmid replication on overproduction and excretion of beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*, 9(1): 31-9
-

Valdez – Crus N.A., Caspeta L., Pérez N.O., Ramírez O.T., Trujillo – Roldán M.A. (2010). Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories*. 9:18

Wegrzyn G., Wegrzyn A. (2002). Stress responses and replication of plasmids in bacterial cells. *Microbial cell factories*, 1(2)

Xu Z., Shen W., Chen H., Cen P. (2005). Effect of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. *Journal of Zhejiang University Science B.*, 6(5): 396–400

Yang J., Yang Y. (2012). Plasmid size can affect the ability of *Escherichia coli* to produce high – quality plasmids. *Biotechnology Letters*, 34: 2017–2022

Yang W. K., Henley, D. C. (1991). A simple and economical procedure for large-scale plasmid DNA isolation. *Nucleic Acid Research*, 19(9): 2507–2508

Zhu K., Jin H., Zhu G., Wang B. (2007). A continuous method for the large-scale extraction of plasmid DNA by modified boiling lysis. *Nature protocols*, 1(6): 3088–3093

Citace webových zdrojů

bmedic-online.cz Buněčný cyklus a mitóza. [online] [cit. 27.3. 2024]. Dostupné z: <https://bmedic-online.cz/lekce/mitoza/?v=928568b84963>

dnac.cshl.edu, (2022). *DNA Learning Center*. [online] [cit. 5.3. 2024]. Dostupné z: <https://dnac.cshl.edu/view/16033-Stanley-Cohen-and-Herbert-Boyer-1972.html>

herbalus.cz (2023). Viry – co jsou zač? Neviditelní nepřátelé nezbytní pro chod planety. [online] [cit. 27.3. 2024]. Dostupné z: <https://www.herbalus.cz/blog/5914235-viry-co-jsou-zac-neviditelni-nepratele-nezbytni-pro-chod-planety>

news-medical.net, (2023). *News medical life sciences*. [online] [cit. 5.3. 2024]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20200929/Plasmid-DNA-Isolation-from-Bacteria-Cells.aspx>

naschov.cz, (2022). Přenos kmenů *E. coli* z hospodářských zvířat na člověka? [online] [cit. 5.3. 2024]. Dostupné z: <https://naschov.cz/prenos-kmenu-e-coli-z-hospodarskych-zvirat-na-cloveka/>

sigmaaldrich.com (2024). Odstraňování problémů s přípravou plazmidové DNA. [online] [cit. 10.4. 2024]. Dostupné z:

<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/dna-and-rna-purification/problems-during-plasmid-dna-preparation>
steris-ims.co.uk (2018). The history of sterilisationpart 2. [online] [cit. 13.4. 2024].
Dostupné z: <https://www.steris-ims.co.uk/blog/the-history-of-sterilisation-part-2/>

Seznam obrázků

Obrázek 1.1.2. Životní cyklus bakteriofága infikujícího bakterii <i>Escherichia coli</i> (Herbalus, 2023)	10
Obrázek 1.1.4. Průběh alkalické lýze (Sasagawa, 2018)	17
Obrázek 3.3.1. Buněčná kultura po alkalické lýze roztoky I., II., III. (autor)	29
Obrázek 3.3.4. Qubit TM fluorimetr pro měření koncentrace DNA (autor)	34
Obrázek 4.1.1. Agarozová elektroforéza po alkalické lýze (autor)	36
Obrázek 4.2.1. Agarozová elektroforéza po izolaci isopropanolem (autor)	37
Obrázek 4.3.1. Agarozová elektroforéza po termické lýze (autor)	38

Seznam tabulek

Tabulka 3.2.1.1 Sožení tekutého a pevného LB média (autor)	25
Tabulka 3.2.2.1. Složení tekutého prokučného média (TB) (autor)	26
Tabulka 3.3.3.1. Přehled vzorků a podmínek termické lýze (autor)	32
Tabulka 4.1.1. Naměřené hodnoty vzorku izolované plazmidové DNA metodou alkalické lýze (autor)	35
Tabulka 4.2.1. Naměřené hodnoty vzorku izolované plazmidové DNA lýze isopropanolem (autor)	36
Tabulka 4.3.1. Naměřené hodnoty vzorku izolované plazmidové DNA metodou termické lýze (autor)	38

Seznam použitých zkratek

A – absorbance

DO – rozpuštěný kyslík

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EtBr – ethidium bromid

FDA – Federální úřad pro léčiva

FPI – frakční srážení isopropanolem

IPTG – Isopropyl β -D-1 – thiogalaktopyranosid

LB – Luria – Bertani

OD – optická denzita

pDNA – plazmidová deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecyl síran sodný

TE – Tris/EDTA pufr

TBE – Tris/borát/EDTA pufr

TB – Terrific broth

UV – ultrafialové záření

RPM – otáčky za minutu
