

Abstrakt

Cílem diplomové práce byla optimalizace izolace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) s využitím reversibilní adsorpce nukleových kyselin na povrch magnetických nosičů pokrytých funkčními skupinami. K izolaci DNA bylo ověřováno použití 6 nosičů: P(HEMA-co-GMA) ox, F-kol B 30 ox, F-kol 77 ox, F-kol B100 ox, F-kol 135 ox, pokrytých karboxylovými skupinami a Perovskit 439 (pokrytý silikagelem). Bakteriální DNA byla izolována metodou fenolové extrakce. DNA byla ze vzorků na magnetický nosič reversibilně navázána v prostředí vysoké koncentrace NaCl (5 M) a poly (etylenglykolu) (PEG 6000) o konečné koncentraci 16 % v separační směsi. DNA byla eluována do TE pufru. Kvalita izolované DNA magnetickými částicemi byla ověřena pomocí amplifikace v PCR. Bylo zjištěno, že i když magnetickými nosiči bylo izolováno různé množství DNA, kvalita izolované DNA byla vždy v kvalitě vhodné pro PCR. Nanočástice Perovskit 439 měly proti ostatním magnetickým nosičům nejlepší separační vlastnosti a bylo jimi izolováno největší množství DNA. Pro jejich další využití při analýze reálných vzorků je však třeba tyto částice i metodu izolace dále optimalizovat.

Abstrakt

The aim of work was an optimization of separation deoxyribonucleic acid (DNA) with the use of nucleic acid reversible adsorption to the surface of magnetic particles coated by functional groups. Six carriers were verified for DNA isolation: P (HEMA-co-GMA) ox, F-kol B 30 ox, F-kol 77 ox, F-kol B100 ox, F-kol 135 ox, coated with carboxyl groups and Perovskit 439 (coated by silicone). Bacterial DNA was isolated by phenol extraction procedure, first. DNA was reversibly bond to magnetis carrier in the presence of high concentration of NaCl (5 M) and poly (ethylene glycol) (PEG 6000). The final PEG and NaCl concentrations of 16.0 % (w/v) and 2.0 M, respectively, were used. DNA was eluted into TE buffer. The quality of extracted DNA was checked by PCR amplification. It was found out that although different quantities of DNA were isolated, the quality of isolated DNA was always compatible with PCR. Nanoparticles Perovskit 439 had the best separative characteristics in comparison to the other magnetic carriers because highest amounts of DNA was isolated. However, next optimisation of DNA separation procedure is required for the use of studied microspheres in real samples.

Klíčová slova: magnetické nosiče, izolace DNA, PCR .

Keywords: magnetic carriers, DNA isolation, PCR

KUBISZ, P. *Reverzibilní imobilizace DNA na nově syntetizovaných magnetických nosičích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 43 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Touto formou bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky a čas, který mi věnoval. Poděkování také patří slečně Ing. Štěpánce Trachtové za pomoc a rady v praktické části a rodině za podporu a trpělivost během mého studia.

Obsah:

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	3
KLÍČOVÁ SLOVA.....	3
KEYWORDS.....	3
PROHLÁŠENÍ.....	3
1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Rod <i>Lactobacillus</i>	8
2.2. Rod <i>Salmonella</i>	9
2.3. Struktura DNA.....	10
2.4. Magnetické nosiče.....	12
2.4.1. Úvod.....	12
2.4.2. Příprava magnetických mikročastic.....	13
2.4.3. Mechanismus izolace DNA.....	14
2.5. Polymerázová řetězová reakce.....	14
3. CÍL PRÁCE.....	15
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	17
4.1. Materiál.....	17
4.1.1. Použité mikroorganismy.....	17
4.1.2. Chemikálie.....	17
4.1.2.1. Chemikálie pro přípravu roztoků.....	17
4.1.2.2. Komponenty pro PCR.....	17
4.1.3. Magnetické mikročastice.....	18
4.1.4. Kultivační média a roztoky.....	18
4.1.4.1. Kultivační média.....	18
4.1.4.2. Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk.....	19
4.1.4.3. Roztoky pro izolaci DNA.....	19
4.1.4.4. Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu.....	19
4.1.5. Přístroje a pomůcky.....	20
4.2. Metody.....	20
4.2.1. Kultivace bakterií.....	20
4.2.2. Izolace a identifikace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce.....	20
4.2.2.1. Příprava buněk.....	20
4.2.2.2. Lyze buněk.....	20
4.2.2.3. Deproteinace DNA fenolovou extrakcí.....	21
4.2.2.4. Srážení DNA etanolem.....	21
4.2.2.5. Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	21
4.2.2.6. Polymerázová řetězová reakce s druhově specifickými primery pro <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	23
4.2.2.7. Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA a PCR produktů....	23
4.2.2.8. Příprava gelu pro agarózovou gelovou elektroforézu.....	23
4.2.2.9. Příprava gelů pro agarózovou gelovou elektroforézu PCR produktů...	24
4.2.2.10. Průběh elektroforézy.....	24

4.2.2.11. Izolace genomové DNA z hrubých lyzátů pomocí magnetických nosičů.....	24
4.2.2.12. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	25
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	26
5.1. Kontrola čistoty bakteriální kultury.....	26
5.2. Porovnání účinnosti magnetických nosičů F-kol a Perovskit.....	26
5.3. Izolace bakteriální DNA laboratorního kmene <i>Salmonella typhimurium</i> LT2-18 pomocí magnetických nosičů v různých reakčních objemech	30
5.4. Izolace bakteriální DNA laboratorního kmene <i>Salmonella typhimurium</i> LT2-18 pomocí magnetických nosičů při různých teplotách a různých hodnotách pH TE pufry.....	31
5.5. Izolace bakteriální DNA z hrubých lyzátů buněk <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212 s využitím magnetických nosičů Perovskit 439.....	33
6. ZÁVĚR	41
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42

1. ÚVOD

Bakterie rodu *Lactobacillus* se ve značné míře využívají při výrobě fermentovaných mléčných výrobků (kysané mléko, sýry a jogurty), fermentované zeleniny (okurky a kyselé zelí), kynutého chleba a některých druhů klobás. Rod *Lactobacillus* se řadí mezi probiotické bakterie, které mohou mít příznivé účinky na zdraví konzumentů.

Bakterie rodu *Salmonella* jsou patogenní pro člověka i zvířata a vyvolávají onemocnění nazývané salmonelózy. Její výskyt může být detekován v syrových vejcích, mléce a vodě.

Pro potřeby potravinářských výrob je důležitá rychlá identifikace mikroorganismů přítomných v potravíně. Jednou z metod přesného určení složení mikroflóry potravin je polymerázová řetězová reakce (PCR). Jedná se o velmi citlivou metodu, pomocí které lze prokázat i velmi nízké koncentrace cílové DNA v potravíně. Abychom mohli metodu PCR použít, je třeba izolovat DNA ze vzorku v požadované čistotě, protože různé složky potravin mohou inhibovat průběh PCR a být příčinou falešně negativních výsledků. Vhodným způsobem přípravy dostatečně čisté DNA je separace na magnetických nosičích. Jedná se o metodu jednoduchou, rychlou a finančně nenáročnou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Rod *Lactobacillus*

Do rodu *Lactobacillus* zařazujeme mléčné bakterie tvořící na pevné kultivační půdě většinou delší, tenké tyčinky, často seskupené do řetízků. Jsou grampozitivní, nepohyblivé a nemají schopnost tvořit spory. Z hlediska nároků na kyslík považujeme laktobacily za mikroaerofilní nebo fakultativně či striktně anaerobní. Mohou se množit i v kultivačním prostředí s optimální hodnotou pH 5,5 - 6,2. Jestliže však pH poklesne pod 4, růst většiny laktobacilů se zastavuje. Optimální růstová teplota je 30 až 40 °C. Neprodukují enzym katalázu, která katalyzuje rozklad peroxidu vodíku H₂O₂ na kyslík a vodu [1].

Laktobacily jsou široce rozšířené v prostředí, obzvláště v nejrůznějších potravinách živočišného nebo rostlinného původu, v nápojích, čisté i znečištěné vodě, kysaném zelí a silážích. Běžně osídlují gastrointestinální trakt ptáků a savců a vaginu savců, tvoří část normální ústní flory mnoha teplotokrevných živočichů včetně člověka. Pouze vzácně jsou patogenní.

Podle Taxonomického přehledu *Prokaryot* [2] rod *Lactobacillus* patří do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*, čeledi *Lactobacillaceae*. Jeho blízkými příbuznými jsou ve stejné čeledi rody *Paralactobacillus* a *Pediococcus*. Fylogeneticky příbuznou čeledí je čeleď *Leuconostocaceae*, zahrnující rody *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Weissella* [3]. V roce 2005 rod *Lactobacillus* zahrnoval 100 popsáných druhů.

Hlavní nesrovnalostí v taxonomii rodu *Lactobacillus* je rozdíl mezi fylogenetickým zařazením a metabolickými vlastnostmi. Historické dělení rodu *Lactobacillus* bylo založeno na typu jeho fermentace. Uznávaná „moderní“ definice byla stanovena Hammesem a Vogelem (1995) [4], tzn. obligátní homofermentativní laktobacily jsou schopni kvasit hexózy téměř výhradně na kyselinu mléčnou a to Embden-Meyerhof-Parnasovou (EMP) dráhou, zatím co pentózy a glukonát nejsou schopni kvasit, pro nepřítomnost fosfoketolázy. Fakultativně heterofermentativní laktobacily odbourávají hexózu na mléčnou kyselinu EMP dráhou, a jsou také schopni odbourávat pentózy a nezřídka také glukonát díky vlastní aldóze a fosfoketoláze. Konečně obligátně heterofermentativní laktobacily degradují hexózu přes fosfoglukonátovou dráhu, produkují kyselinu mléčnou, etanol nebo kyselinu octovou a oxid uhličitý, mimo to i pentózy jsou kvašeny touto cestou.

I. Obligátně homofermentativní:

- *L. delbruecki* subsp. *delbruecki* – fermentovaný rostlinný materiál
- *L. delbrueckii* subsp. *lactis* – mléko, sýr, granulované krmivo
- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – jogurt (startér), sýr
- *L. acidophilus* – střevní trakt člověka a zvířat, ústa a vagina člověka
- *L. helveticus* – syrové mléko, startér pro sýry

II. Skupina – fakultativně heterofermentativní:

- *L. casei* – mléko, sýr a v potravinách, prostředí, klinický materiál
- *L. plantarum* – potraviny, prostředí, fermentovaný rostlinný materiál, klinický materiál
- *L. sake* – původně izolován jako startér pro sake, dále zjištěn v kysaném zelí a v jiných fermentovaných rostlinných materiálech a v potravinách.

III. Skupina – obligátně heterofermentativní:

- *L. buchneri* – mléko, sýr, fermentovaný rostlinný materiál, lidská ústa
- *L. fermentum* – mléčné výrobky, fermentovaný rostlinný materiál, stokové kaly, ústa a stolice člověka
- *L. kefir* – izolován z kefiru

Anaerobní laktobacily – klinicky významná skupina mléčných tyček (taxonomicky problematická)

- *L. catenaformis* – mikroaerofilní až anaerobní; stolice člověka, humánní klinický materiál

Rod *Lactobacillus* má dlouhou historii bezpečného užívání a to zejména v mlékárenském průmyslu a hraje důležitou roli při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. V posledních desetiletích jsou hledány nové kmeny laktobacilů, které mají při užívání příznivý účinek na zdraví člověka tzv., probiotické kultury. Mezi příznivé účinky laktobacilů patří inhibice patogenních mikroorganismů – *Salmonella*, *Shigella*, *Heliobacter*, snížení nesnášenlivosti laktózy, stimulace imunitního systému, snížení rizika rakoviny tlustého střeva a asimilaci cholesterolu [5].

2.2. Rod *Salmonella*

Do tohoto rodu bakterií náleží gramnegativní, nesporulující tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*. Rostou na běžně užívaných půdách. Všechny druhy salmonel fermentují glukosu s tvorbou plynu. Typickou vlastností je také produkce sirovodíku. Většinou však nezkašují laktosu [1, 6].

Salmonely jsou primárními střevními patogeny člověka a zvířat, domácích i divokých. Často se nacházejí v odpadcích ve vodě, v půdě. Za vhodných podmínek mohou ve vodě přežívat měsíce i léta. Potraviny mohou být infikovány primárně (surovina připravená z infikovaných zvířat – maso, vejce) nebo sekundárně. Při sekundární kontaminaci je zcela nezávadná potravina kontaminovaná v průběhu výrobního procesu nebo během distribuce exkrementy nemocných lidí nebo zvířat. Nejčastějším zdrojem nákazy jsou masné produkty, vejce, vaječné výrobky, mléčné produkty, sušené mléko a také uzeniny. Některé sérotypy jsou úzce adaptovány na svého hostitele např. *S. typhi* a *S. paratyphi* na člověka, *S. dublin* na dobytek, *S. choleraesuis* na prase, *S. gallinarium* na drůbež, ale mnohé sérotypy tuto vazbu na hostitele nemají (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*) [1, 7].

Primárně zoogenní salmonely způsobují onemocnění zvané salmonelóza. Toto onemocnění patří mezi významné alimentární nákazy, vyskytuje se na celém světě a to i vyspělých zemích. Salmonelózy mají charakter enteritidy nebo gastroenteritidy s řídké kašovitémi průjmy, také se objevuje zvracení a nevolnost. Je to infekční onemocnění s krátkou inkubační dobou, která se pohybuje v intervalu 6-48 hodin, nejčastěji se však udává 6-10 hodin. K naze dochází cestou perorální, tedy ústy, a to požitím kontaminované potraviny. Salmonely se po vniknutí do zažívacího systému pomnožují v tenkém střevě, kde se projevují nejcharakterističtější formou, akutní gastroenteritidou s výše popsány příznaky. Forma bezpříznaková se vyskytuje asi u 1-5% nakažených osob. Potom ještě existuje salmonelóza s lokální manifestací postihující méně než 1% nemocných. Období nakažlivosti trvá v průběhu nákazy. Další závisí na rekonvalescentním vylučování, které je extrémně proměnlivé, od několika dní po několik týdnů. Chronická nosičství (přes rok) jsou vzácná.

Podání antibiotik neovlivní vylučování salmonel, aplikace širokospektrých antibiotik často prodlužuje pozitivitu v rekonvalescenci.

Základem prevence salmonelózových nálezů jsou důkladná a soustavná hygienická opatření týkající se chovu hospodářských zvířat, nezávadnosti krmiv a vody, sledování zdravotního stavu zvířat a soustavná dezinfekce v chovatelských a potravinářských objektech [1, 7, 8].

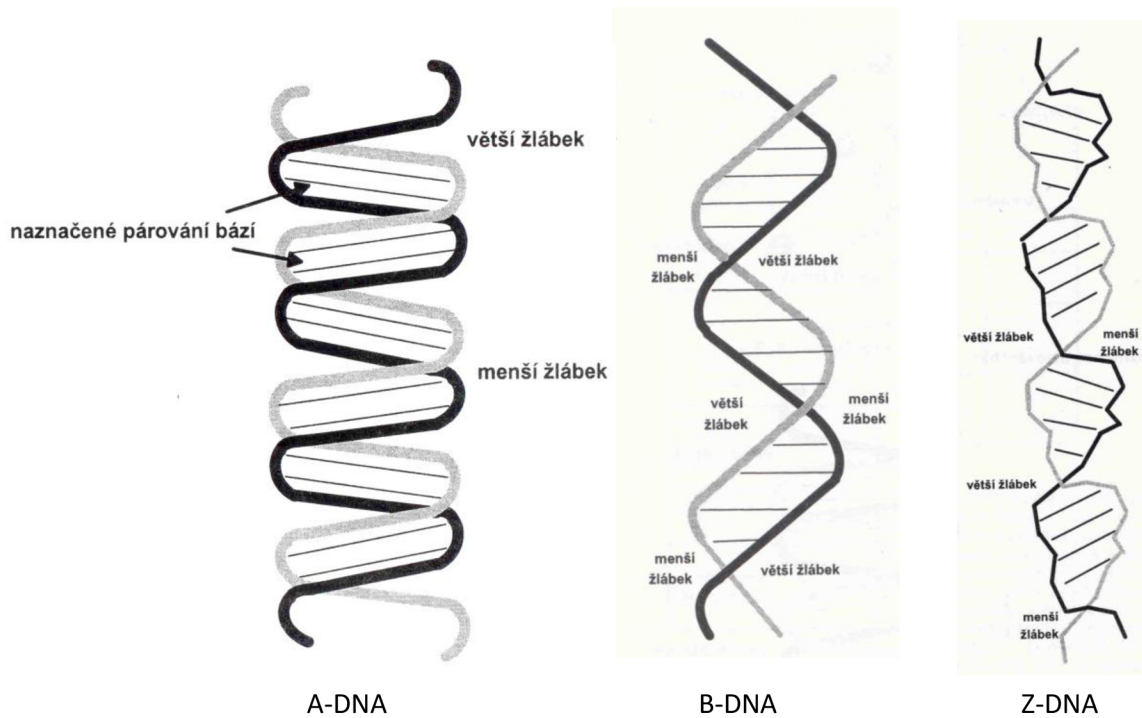
2.3. Struktura DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je chemickým nositelem buněčné genetické informace. Molekula DNA jako chemická sloučenina byla objevena v roce 1869 švýcarským lékařem Miescherem. Avšak získat čistou DNA tehdejšími postupy, aby mohl být dále zkoumán, bylo nemožné. Objevit charakteristickou, dnes známou jako sekundární, strukturu DNA se podařilo až v roce 1953 dvěma mladým vědcům z Cambridge - Američanovi Jamesi Watsonovi a Britovi Francisovi Crickovi. Strukturu DNA lze rozdělit podle uspořádání na tři úrovně: primární, sekundární a terciární struktura.

Primární strukturou DNA se rozumí seřazení deoxyribonukleotidů v polydeoxyribonukleotidových řetězcích. Genetická informace je v řetězcích uložena prostřednictvím pořadí dvou purinových bází adeninu a guaninu a dvou pyrimidinových bází cytozinu a thyminu.

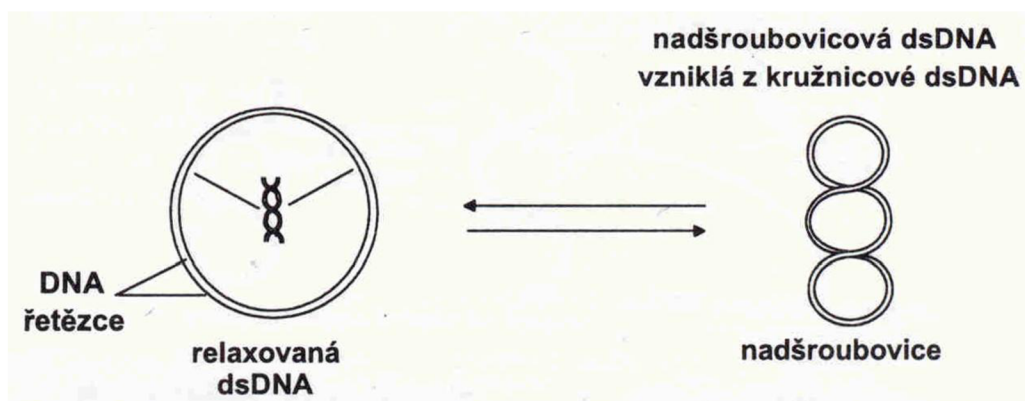
V sekundární struktuře DNA jsou polydeoxyribonukleotidové řetězce společně stočené do dvoušroubovice, v níž jsou orientovány v opačných směrech (antiparalelně) a jsou poutány vodíkovými vazbami mezi určitými dvojicemi bází. Vnější část DNA řetězce tvoří cukerné pentózoové kruhy a fosfátové zbytky, díky kterým má dvoušroubovice DNA na svém povrchu záporný náboj. Vlákna DNA se přirozeně stáčí do dvoušroubovice, avšak forma stočení není vždy za všech podmínek stejná. Existují tři formy konformací DNA: A-DNA, B-DNA a Z-DNA. Konformace A, B jsou pravotočivé, konformace Z je levotočivá. Při vysoké relativní vlhkosti je B-DNA stabilizována molekulami vody téměř u každého atomu schopného vytvářet s nimi vodíkové vazby. Takto se vytváří kolem dvoušroubovice vodní obal. Po odstranění molekul vody (dehydratací) přechází B-forma na A-formu. U všech prokaryotických a eukaryotických buněk a také v DNA viřech se vyskytuje B-konformace. A-DNA se vyskytuje ve sporách bacilů a Z-konformace byla poprvé pozorována u syntetického oligomeru.

Obr. 1. Zjednodušené konformační schéma typů DNA [9]



Terciární struktura DNA je prostorovým uspořádání sekundární struktury DNA. Jedná se o uspořádání všech atomů molekuly DNA v prostoru bez ohledu na vztahy k ostatním molekulám. Tato struktura se také označuje nadšroubovice neboli superhelix a vyskytuje se u prokaryotních a eukaryotních buněk. Nadšroubovice se může tvořit jak z lineární tak i kružnicové dsDNA. Molekula DNA nevyznačující se nadšroubovicovitým vinutím má jen sekundární strukturu, a to ve formě dvoušroubovice a je označována jako relaxovaná dsDNA (Obr. 2) [9, 10].

Obr. 2. Kovalentně uzavřená kružnicová molekula dsDNA a její nadšroubovice [9].



2.4. Magnetické nosiče

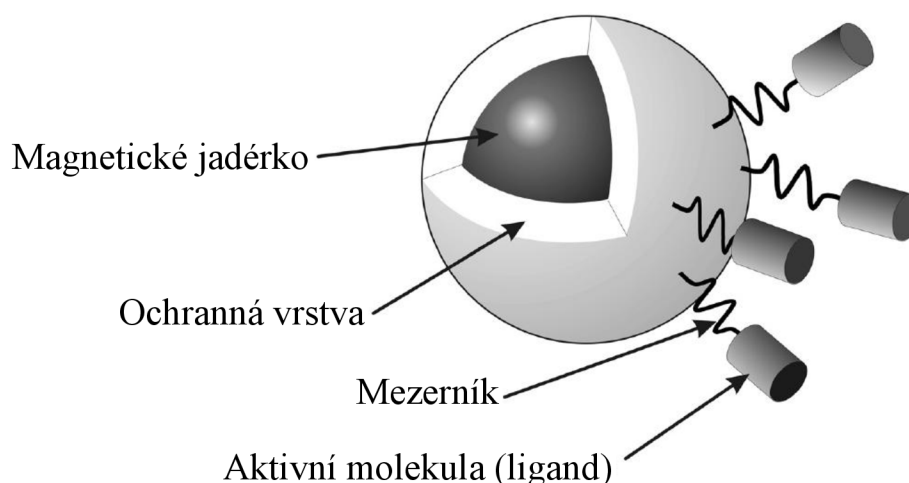
2.4.1. Úvod

Poprvé byly magnetické částice, v souvislosti s biotechnologií, použity v roce 1973 P.J. Robinsonem [11]. Ve své práci P.J. Robinson použil jako magnetických nosičů oxid železitý pokrytý oxidem křemičitým a oxid železitý pokrytý celulózą k imobilizaci dvou enzymů α -chymotrypsinu a β -galaktosidázy pro aplikace v bioreaktorech. Od té doby se techniky separace látek užitím magnetických nosičů ve formě mikročástic a nanočástic stále více pro separaci biologických molekul a buněk. Tyto techniky našly během posledních desetiletí uplatnění v mnoha vědních oborech biologie, biochemie, biotechnologie a lékařství. Výhodou užití magnetických nosičů je rychlost a jednoduchost separace látek z homogenních i heterogenních materiálů. Další výhodou, například při izolaci bakteriální DNA, je použití minimálního množství nebezpečných organických rozpouštědel (fenol). Z hlediska instrumentálního vybavení nejsou zapotřebí nákladné centrifugy. Celkově se techniky separace na magnetických nosičích jeví jako jednoduché, levné a účinné [11 - 13].

Existuje řada magnetických materiálů s širokým rozsahem magnetických vlastností. Většina magnetických nosičů má superparamagnetické vlastnosti. V nepřítomnosti jakéhokoli vnějšího magnetického pole se částice navzájem nijak nepřitahují a vytváří tak homogenní suspenzi, ze které mohou být odstraněny zavedením jakéhokoli vnějšího magnetického pole získaného například magnetickým separátorem [14].

Magnetické částice se skládají z magnetického jádérka, které zajišťuje částici její magnetické vlastnosti, ochranného obalu, chránící jádérko před vnějšími vlivy a přes raménko navázané aktivní molekuly senzitivní podle potřeby k vybraným látkám (Obr. 3).

Obr. 3. Magnetická částice pro biotechnologické aplikace . Upraveno dle [15]



Magnetické jádérko, které je základem magnetické mikročástice, je většinou tvořeno materiály na bázi magnetických oxidů železa (magnetit - Fe_3O_4 , maghemit - $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Připravené magnetické jádérko by mělo mít požadovanou velikost a magnetické vlastnosti.

Pro biologické aplikace musí být částice pokryté příslušnými vysoko- nebo nízkomolekulárními polymery, aby byly minimalizovány nežádoucí a nespecifické interakce kovu

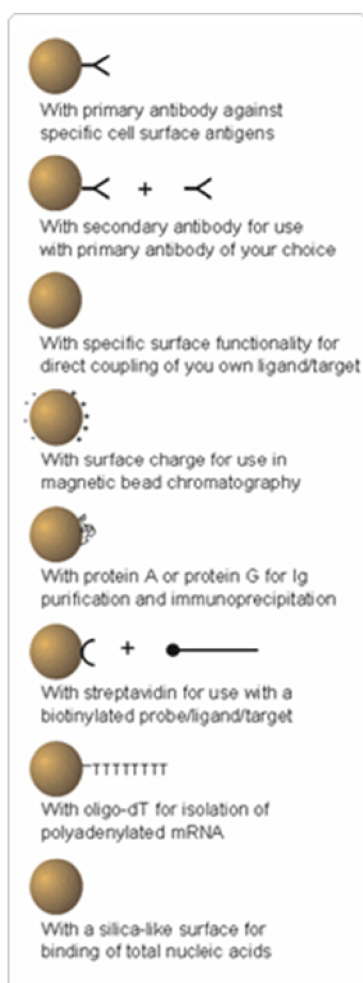
se složkami prostředí. Mezi nejčastěji používané polymery k vytvoření ochranné vrstvy magnetických jader patří poly(glycidyl methakrylát) (PGMA), poly(2-hydroxyethyl methakrylát) (P(HEMA)), a jejich kopolymery a polystyren.

Polymery P(HEMA) a PGMA se řadí mezi hydrofilní nosiče, jejichž výhodou jsou: vysoká mechanická stabilita, biokompatibilita, nízká nescifická adsorpce biologicky aktivních látek a široké využití pro biomedicínské aplikace. PGMA má navíc výhodu přítomnosti oxiranové skupiny, která sice není příliš reaktivní, ale lze ji snadno upravit hydrolyzou, aminací, oxidací atd.

Polymery založené na polystyrenu jsou v současnosti nejvíce používané, nicméně jejich hlavním nedostatkem je hydrofobní interakce s biomolekulami. Navíc příprava těchto nosičů je velmi komplikovaná

Vnější vrstvu magnetických částic tvoří aktivní molekuly, na které jsou cílové molekuly ze vzorku navázány specifickou vazbou. Podle typu funkcionalizovaného povrchu a užití lze magnetické částice rozdělit (Obr. 4) [16 - 18].

Obr. 4. Typy a užití magnetických mikročástic. Upraveno dle [17].



s primární protilátkou proti specifickým antigenům na povrchu buněk

se sekundární protilátkou pro použití primární protilátky pro dané použití

se specifickým funkčním povrchem pro přímé spojení podle daného výběru

s povrchovým nábojem pro použití v chromatografii

s proteinem A nebo proteinem G pro přečištění a srážení imunoglobulinu a pro vazbu protilátek

se streptavidinem pro užití biotinylované sondy pro vazbu molekul s navázaným biotinem

s oligo dT pro izolaci polyadenylového konce mRNA

s povrchem oxidu křemičitého pro vazbu nukleových kyselin

2.4.2. Příprava magnetických mikročásteček

Vhodným typem mikročásteček pro izolaci bakteriální DNA je poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát) - P(HEMA-*co*-GMA). K tomuto účelu lze použít neporézní částice o průměru 1 μm, které obsahují na svém povrchu karboxylové skupiny.

Magnetické mikročástečky P(HEMA-*co*-GMA) se připravují disperzní kopolymerací 2-hydroxyethyl methakrylátu (HEMA) a glycidyl methakrylátu (GMA) v přítomnosti částic koloidního magnetitu (Fe₃O₄), potažených vrstvičkou kyseliny olejové. Reakce je iniciována dibenzoylperoxidem a stabilizována acetát-butyrátem celulózy. Dalším krokem je oxidace hydroxylových skupin mikročásteček 2% vodným roztokem manganistanu draselného v kyselém prostředí 2M H₂SO₄ [16, 19, 20].

Dalším typem hydrofilních neporézních částic je poly(hydroxyethyl methakrylát-*co*-ethylendiamin methakrylát) - P(HEMA-*co*-EDMA). Příprava, vlastnosti a použití těchto částic je obdobná jako u částic P(HEMA-*co*-GMA) [20].

2.4.3. Mechanismus izolace DNA

Nukleové kyseliny mohou existovat ve více formách. V roztocích o nízké koncentraci solí (NaCl) a za nepřítomnosti poly(ethylenglykolu) (PEG 6000) se nachází v hydratované šroubovicovité formě, na magnetické mikročástečky se neváže. Po přidání PEG a solí přechází šroubovicovitá forma DNA na globulární konformaci, ve které se prostřednictvím vodíkových vazeb váže na povrch magnetických částic. Takto je DNA oddělena od ostatních složek (proteiny, sacharidy a ostatní buněčné složky). Navíc PEG 6000 upřednostňuje vazbu DNA před proteiny a sacharidy na magnetické nosiče. Převodem magnetických nosičů do pufru bez PEG a s nízkým obsahem solí dochází k přechodu DNA z globulární formy zpět na šroubovicovou formu a uvolnění do roztoku. Tímto postupem lze získat přečištěnou DNA bez sacharidů, proteinů a ostatních kontaminujících látek [21, 22].

K separaci nukleových kyselin lze použít magnetické mikročástečky funkcionalizované karboxylovými skupinami. Hlavními zástupci těchto nosičů jsou P(HEMA-*co*-GMA) a P(HEMA-*co*-EDMA) [17]. Vlastní postup separace DNA se skládá ze tří kroků:

- 1) Vazba nukleových kyselin na přidané magnetické částice ke vzorku.
- 2) Promytí magnetických částic s navázanou DNA, přičemž nenavázaný kontaminující materiál se snadno odstraní odletem. Magnetické částice s DNA jsou poutány magnetem.
- 3) Eluce DNA do vhodného pufru a oddělení magnetických mikročásteček od eluátu magnetem.

2.5. Polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulárně biologická technika pro exponenciální amplifikaci DNA, s využitím enzymatické replikace, bez použití živého organismu (buňky). PCR je technika *in vitro*, kterou je možné provést s jakoukoliv DNA. Je užívána pro amplifikaci specifické oblasti DNA. Provedení PCR vyžaduje několik hlavních komponent [23]:

- DNA templát, který obsahuje DNA fragment, který bude amplifikován.

- Jeden nebo víc primerů, které jsou komplementární k DNA a vymezují oblast mezi 5' a 3' konci DNA templátu, která bude amplifikována.
- DNA polymeráza (např. *Taq* polymeráza nebo jiná DNA polymeráza s teplotním optimem okolo 70°C), která katalyzuje syntézu DNA podle komplementárního řetězce.
- Deoxynukleotid trifosfáty (dNTPs), které slouží jako stavební kameny k syntéze nového řetězce DNA.
- PCR pufr poskytuje vhodné chemické prostředí pro optimální aktivitu a stabilitu DNA polymerázy.

Dále obsahuje:

- Jednomocné kationty - draselné ionty.
- Dvojmocné kationty - hořečné ionty.

Cyklus PCR se skládá ze 3 kroků:

- (1) Denaturace (94 – 96 °C)
- (2) Hybridizace primerů (50 – 65 °C)
- (3) Syntéza nového řetězce DNA (72 °C)

PCR obvykle sestává ze série 30-35 cyklů.

- Před prvním cyklem, během nastavení počátečního kroku, je PCR směs zahřata na 94-96 °C po dobu 5 - 10 minut. Tento první krok vede k denaturaci DNA templátu a primerů, tj. porušení vodíkových vazeb mezi komplementárními bázemi dvouřetězcové DNA. Některé PCR polymerázy vyžadují tento krok také pro svou aktivaci. Po tomto kroku následuje další denaturační krok 94 – 96 °C po 20 - 30 sekund.
- Po denaturaci následuje hybridizace primerů (annealing). V tomto kroku se reakční teplota sníží tak, že primery mohou hybridizovat s komplementárními řetězci DNA templátu. Teplota v tomto kroku závisí na T_m (teplota tání) primerů a obvykle se pohybuje mezi 50 – 65 °C po dobu 20 – 40 sekund.
- Po hybridizaci následuje syntéza nového řetězce pomocí DNA polymerázy. Teplota v tomto kroku závisí na užití DNA polymeráze. *Taq* polymeráza má teplotní optimum 70 – 74 °C; ve většině případů, je používána teplota 72 °C. Doba syntézy závisí jak na DNA polymeráze, tak na velikosti amplifikovaného DNA fragmentu. Finální krok syntézy komplementárního řetězce se prodlužuje na 5 - 15 minut (v závislosti na velikosti DNA templátu). Po amplifikaci lze cyklus nastavit na teplotu 4 – 10 °C, která slouží k uchování produktů PCR. Produkt PCR je analyzován pomocí agarózové gelové elektroforézy. Záporně nabitě molekuly DNA putují v elektrickém poli ke kladné elektrodě.

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce byla purifikace bakteriální DNA pomocí různých typů nově syntetizovaných magnetických nosičů. Postup purifikace bakteriální DNA byl optimalizován s cílem získat DNA v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Množství a kvalita izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky a amplifikací s využitím PCR.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál

4.1.1. Použité mikroorganismy

V experimentech byly použity tyto kmeny z rodu *Lactobacillus*: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212, *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190^T a *Lactobacillus paracasei* lock 0919. Dále byla použita bakteriální DNA laboratorního kmene *Salmonella typhimurium* LT2-18.

4.1.2. Chemikálie

4.1.3. Chemikálie pro přípravu roztoků

- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Ethanol p.a. (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Ethidiumbromid (EtBr) (Sigma, St.Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Amresco, Solon, USA)
- Chlorid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Praha, ČR)
- Isoamylalkohol (Amresco, Solon, USA)
- Kyselina boritá (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Octan sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- M.R.S. Broth (Oxoid, Londýn, Velká Británie)
- Polyethylenglykol (PEG 6000) (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Sigma, St.Louis, USA)
- Tris-báze (Amresco, Solon, USA)
- Tris-HCl (Amresco, Solon, USA)

4.1.2.2. Komponenty pro PCR

- Voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská Lupča, SR) - dále označovaná jako voda pro PCR
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerasu 1.1 (10x koncentrovaný)
- dNTP směs (10mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Oligonukleotidové primery LbLMA 1-rev, R16-1, F_delb_IS, R_delb_IS, (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)
- PCR vkládací pufr Yellow Load (TopBio, Praha, ČR)

4.1.3. Magnetické mikročástice

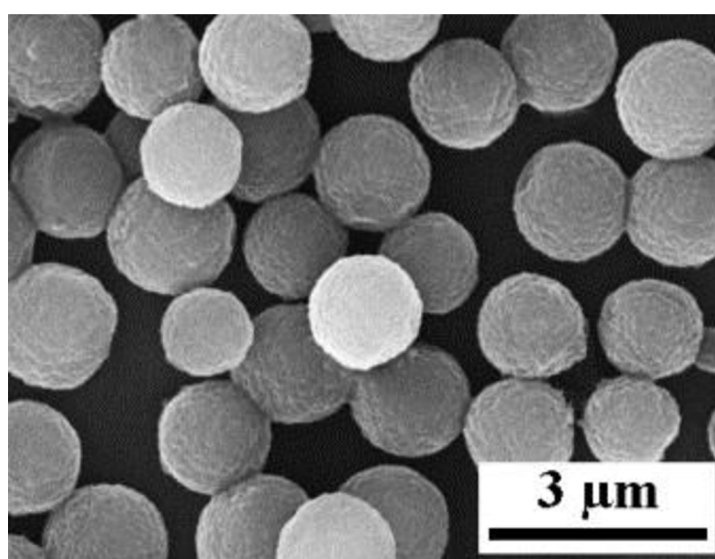
Magnetické neporézní mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) ox, byly připraveny Ing. Danielem Horákem, CSc z Makromolekulárního ústavu AV ČR v Praze. Vlastnosti testovaných částic jsou uvedeny v Tabulce 1. Magnetické částice Perovskit 439 (pokryté vrstvou silikagelu) byly připraveny doc. Ing. Emilem Pollertem, DrSc. z Fyzikálního ústavu AV ČR v Praze. Částice byly dodány ve formě stabilní suspenze. Jejich velikost byla 24 nm.

Tabulka 1: Charakteristické vlastnosti připravených magnetických částic

	Částice	Fe (% hm)	-COOH (mM/g)	Průměr (μm)	PDI
	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	6,6	2,61	1,2	1,10
F-kol B30ox	PGMA	6,0	0,42	0,7	1,07
F-kol 77 ox	P(HEMA- <i>co</i> -GMA) (1:1)	10,0	0,76	2,2	1,09
F-kol B 100 ox	PGMA	5,4	0,67	0,7	1,16
F-kol 135ox	PGMA	11,0	2,61	1,2	1,10

Průměr částic D_n byl stanoven z měření nejméně 500 mikročástic pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Rozdělení velikosti částic je charakterizováno indexem polydisperzity PDI ($PDI = \frac{D_w}{D_n}$, kde D_w je průměrná hmotnost částic) [16].

Obr. 5. Fotografie magnetických mikročástic P(HEMA-*co*-GMA) pořízená skenovacím elektronovým mikroskopem [13].



4.1.4. Kultivační média a roztoky

4.1.4.1. Kultivační média

- MRS médium s 0,05 % cysteinem

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 52 g MRS médium. Médium bylo sterilizováno autoklávováním (121 °C, 20 min), poté byl přidán cystein (ze zásobního roztoku o koncentraci 5 % byl 100x zředěn na výslednou koncentraci 0,05 %).

- MRS agar s 0,05 % cysteinem

Do 1000 ml MRS média bylo přidáno 15 g agaru. Médium bylo sterilizováno autoklávováním (121 °C, 20 min), poté byl přidán cystein.

4.1.4.2. Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk

- roztok A

10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0); roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků (1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA).

- roztok B

10mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysozym 3 mg/ml; roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků (1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA), lysozym byl přidán těsně před použitím roztoku.

4.1.4.3. Roztoky pro izolaci DNA

Roztoky pro fenolovou extrakci

- fenol (pH 7,8, predestilovaný)
- CIZ (chloroform : isoamylalkohol 24:1)

Roztoky pro srážení DNA ethanolem

- 3 M octan sodný
- ethanol 96 %

Pufr pro uchovávání DNA - TE pufr

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)

4.1.4.4. Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

TBE pufr (5x koncentrovaný)

- Tris – báze 54 g
- kyselina boritá 27,5 g
- 0,5 M EDTA (pH 8,0) 20 ml

Navážky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml. Před použitím byl pufr zředěn destilovanou vodou 10x.

Nanášecí (stop) pufr (6x koncentrovaný)

- Nanášecí pufr se připraví smícháním 0,04 g Ficoll s 0,25 g bromfenolové modři, doplněn do 100 ml vodou a 0,5 M EDTA na výslednou koncentraci 60 mM EDTA. Roztok se před použitím ředí vzorkem v poměru 1:5.

Ethidiumbromid (500 µg/ml). Roztok EtBr se ředí na koncentraci 0,5 µg/ml.

4.1.5. Přístroje a pomůcky

- Magnetická separátor Dynal MPC-S (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- Mikropipety LABMATE o objemu 10 µl, 100 µl, 1000 µl (PZ HLT, Varšava, Polsko)
- Termocycler PTC-100TM (MJ Research, Watertown, USA)
- Termocycler typ MiniCyclerTM (MJ Research, Watertown, USA)
- Transluminátor EB-20E (Ultra Lum, Paramount, USA)
- Zařízení pro elektroforézu OWL, model B3, model B1 (Own Scientific, Woburn, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Easy-Cast, model OSP-300 (Own Scientific, Woburn, USA)
- Digitální fotoaparát Konica Minolta Dynage 2
- Laboratorní sklo, umělohmotné laboratorní pomůcky

4.2. Metody

4.2.1. Kultivace bakterií

1. Lyofilizáty buněk rozpuštěné v tekutém MRS médiu s cysteinem byly naočkovány křížovým roztěrem na MRS agar s cysteinem a kultivovány za aerobních podmínek při 37 °C, 48 h.
2. Lyofilizáty buněk rozpuštěné v tekutém MRS médiu byly naočkovány do tekutého MRS média (do 5ml bylo naočkováno 200µl lyofilizátu) a kultivovány za aerobních podmínek při 37 °C, 24 h.
3. Byl zkontrolován nárůst kolonií na pevném MRS médiu a popsán vzhled kolonií.
4. Byl zkontrolován růst kultury v tekutém MRS médiu a popsán.

4.2.2. Izolace a identifikace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce

4.2.2.1. Příprava buněk

1. Nejdříve se provedla vizuální kontrolu suspenze – zda zakalené médium obsahuje buňky.
2. Poté se ověřila čistota bakteriální kultury – vyočkováním křížovým roztěrem na pevné MRS médium.
3. Kultura buněk narostlá v tekutém MRS médiu (1 ml) byla přenesena do zkumavky eppendorf.
4. Suspenze byla centrifugována při 15 000 ot/5 min.
5. Byl slit supernatan.
6. Sediment se nechal okapat.

4.2.2.2. Lyze buněk

1. Sediment byl resuspendován v 1 ml roztoku A (10 mM Tris-HCl/ 5 mM EDTA).
2. Suspenze byla centrifugována při 15 000 ot/5 min, byl slit supernatant, sediment se nechal okapat.
3. Bylo přidáno 80 µl roztoku B (10 mM Tris HCl/ 5 mM EDTA/lysozym (3 mg/ml)), směs byla resuspendována a bylo přidáno se 420 µl roztoku B.
4. Směs byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.
5. K suspenzi se přidalo 12,5 µl 20 % SDS (dodecylsulfát sodný – detergent) a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml; odstraňuje proteiny, které jsou v sedimentu s DNA), bylo promícháno.
6. Vzorky byly inkubovány při 55 °C do projasnění roztoku do druhého dne.

4.2.2.3. Deproteinace DNA fenolovou extrakcí

1. K lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaný, pH 7,8) cca 500 µl.
2. Směs byla promíchávána po dobu 4 min.
3. Směs byla centrifugována se při 15 000 ot/5 min.
4. Špičkou s ustříženým hrotem byla odebrána vodná fáze s DNA do čisté zkumavky (cca 300 µl).
5. K vodné fázi s DNA bylo přidáno 700 µl CIZ (chloroform:isoamylalkohol 24:1), promíchání po dobu 4 min.
6. Opět se centrifugovalo při 15 000 ot/5 min.
7. Vodní fázi s DNA byla odebrána do čisté zkumavky (cca 200 µl).

4.2.2.4. Srážení DNA ethanolem

1. Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného (cca 20 µl), promícháno.
2. Byl přidán 1 ml ethanolu (minimálně 2,5 násobek objemu původní směsi (cca 550 µl) a směs byla promíchána.
3. DNA se nechala vysrážet při -20 °C po dobu minimálně 15 min.
4. Poté byla směs centrifugována při 15 000 ot/30 min, slit supernatan, dále se pracovalo se sedimentem.
5. Sediment DNA byl usušen v exikátoru.
6. DNA byla rozpuštěna v 100 µl TE pufru.
7. Takto připravená DNA byla naředěna 10x v TE pufru a použita pro agarózovou gelovou elektroforézu

4.2.2.5. Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus* [24]

Byl použit pár primerů:

- **LbLMA 1-rev** 5' - CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC – 3'
je navržen z mezerníkové oblasti mezi 16S a 23S rRNA a je rodově specifický
- **R16-1** 5' - CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA – 3'
odpovídá koncové sekvenci 16S rRNA genu a je primerem univerzálním. Velikost

produktu PCR je 250 bp.

Složení PCR směsi

Složení PCR směsi (objem 25 µl):

- voda pro PCR19,0 µl
- 10x reakční pufr kompletní.....2,5 µl
- dNTP směs (10 mM)..... 0,5 µl
- primer LbLMA 1-rev (10 pmol/µl)..0,5 µl
- primer R16-1 (10 pmol/µl).....0,5 µl
- *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/µl).. 1,0 µl
- DNA matrice (10 ng/µl).....1,0 µl

Příprava PCR směsi s využitím PPP master mixu

(Top-Bio, **Taq-Purple DNA Polymerasa PCR Master Mix** s 5 mM MgCl₂)

V reakci byl použit 2x koncentrovaný PPP Master Mix, což umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti pipetování jednotlivých komponent zvlášť. PPP Master Mix obsahoval 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, příslušný pufr (150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween 20), 5 mM MgCl₂, stabilizátory, 100 U/ml *Taq Purple DNA* polymerasu, aditiva. Nanášecí pufr pro gelovou elektroforézu PCR produktů není nutno dodávat, jelikož barvivo je již ve směsi obsaženo. Komponenty reakční směsi s využitím PPP master mixu (25 µl):

- PPP master mix.....12,5 µl
- voda pro PCR.....9,5 µl
- primer LbLMA 1-rev (10pmol/µl)...0,5 µl
- primer R16-1 (10pmol/µl).....0,5 µl
- DNA matrice (10ng/µl)..... 1,0 µl

1. Do 200 µl eppendorfových zkumavek byl rozpipetován master mix (á 24 µl)
2. Do mikrozkušavek byl přidán 1 µl DNA matrice (purifikovaná DNA).
3. Mikrozkušavky byly umístěny do termocykleru, na kterém byl nastaven příslušný program.
4. Po skončení reakce se PCR produkt detekuje pomocí gelové elektroforézy (1,5 % gel, 60V/3h).

Amplifikace DNA na cykleru MJ Research 200

Program:

1. 94 °C/5min
2. 94 °C/1min – denaturace DNA
3. 55 °C/1min – hybridizace primerů
4. 72 °C/1min – syntéza DNA řetězce
5. 28x krok 2,3,4

6. 94 °C/1min – denaturace DNA
7. 55 °C/1min – hybridizace primerů
8. 72 °C/7min – syntéza DNA řetězce
9. 10 °C

Při přípravě PCR směsi byla zařazena negativní kontrola, tj. vzorek bez DNA, aby byla vyloučena kontaminace jednotlivých komponent pro PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita purifikovaná DNA.

4.2.2.6. Polymerázová řetězová reakce s druhově specifickými primery pro *Lactobacillus delbrueckii* [25]

Byl použit pár primerů:

F_delb_IS 5' - CAC TTG TAC GTT GAA AAC TGA ATA TCT TAA - 3'

R_delb_IS 5' - CGA ACT CTC TGC GTC GCT TT - 3'

Velikost produktu PCR je 94 bp.

Složení PCR směsi:

- PPP master mix.....12,5 µl
- voda pro PCR.....9,5 µl
- primer F_delb_IS (10 pmol/µl).....0,5 µl
- primer R_delb_IS (10 pmol/µl).....0,5 µl
- DNA matrice (10 ng/µl).....1,0 µl

Amplifikace DNA na cykleru MJ Research 200

Program:

1. 94 °C/10min
2. 94 °C/0,5min – denaturace DNA
3. 58 °C/0,5min – hybridizace primerů
4. 72 °C/1min – syntéza DNA řetězce
5. 28x krok 2,3,4
6. 94 °C/0,5min – denaturace DNA
7. 58 °C/0,5min – hybridizace primerů
8. 72 °C/10min – syntéza DNA řetězce
9. 10 °C

4.2.2.7. Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA a PCR produktů

Agarózová gelová elektroforéza byla používána k ověření přítomnosti a kvality izolované bakteriální DNA a k detekci produktů PCR. Byly použity gely o hustotě agarózy:

0,8 % (k zjištění přítomnosti a kvality izolované bakteriální DNA), 1,8 % (pro detekci produktů PCR – detekce fragmentu o délce 250 bp).

4.2.2.8. Příprava gelu pro agarózovou gelovou elektroforézu

1. V případě 0,8 % gelu: 0,8 g agarózy bylo smícháno se 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru.
2. Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě, tak aby vznikla homogenní směs.
3. Roztok se nechal zchladnout na teplotu zhruba 60 °C a poté byl nalit do elektroforetické vany s hřebínkem (je nutné, aby elektroforetická vana ležela na vodorovné ploše).
4. Gel se nechal 30 min tuhnout při laboratorní teplotě.
5. Před nanášením vzorku na gel byl vyjmut hřebínek.

Nanášení vzorku DNA na gel

1. Požadované množství DNA (produktu PCR (15 - 25 µl) bylo smícháno s nanášecím pufrům (3 nebo 5 µl). Při detekci produktu PCR byl použit velikostní standard (100 – 1500 bp)
2. Směs byla nanášena do komůrky gelu.
3. Gel byl vložen do elektroforetické vany. Je nutné gel vložit do elektroforetické vany tak, aby záporně nabitá DNA mohla migrovat k anodě. Gel byl převrstven 0,5x koncentrovaným TBE pufrům (do výšky 2 – 3 mm nad agarózový gel).

4.2.2.9. Příprava gelů pro agarosovou gelovou elektroforézu PCR produktů

Bylo postupováno stejně jako v kapitole 4.2.2.8. Byly připravovány 1,8 % gely o objemu 100 ml.

4.2.2.10. Průběh elektroforézy

1. Elektroforéza byla spuštěna zapnutím zdroje nastaveného na napětí 60 V. Separace probíhala tak dlouho, dokud nanášecí pufr nedomigroval do 2/3 délky agarózového gelu.
2. Po skončení elektroforézy byl gel obarven v lázni s ethidiumbromidem (0,5 µg/ml) 1 h.
3. Obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru v UV světle. Pro dokumentaci byl gel vyfotografován digitálním fotoaparátem.

4.2.2.11. Izolace genomové DNA z hrubých lyzátů pomocí magnetických nosičů

1. Směs připravená podle Tabulky 2. byla promíchána a ponechána inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.
2. Částice s navázanou DNA byly separovány pomocí magnetu 15 minut při laboratorní teplotě.
3. Supernatant byl slit nebo odpipetován. Byl uvolněn magnet z magnetického pásu.
4. Mikrozkuřavka obsahující nosič s navázanou DNA byla promyta 70% ethanolem a následovalo separování částic magnetem 2 minuty při laboratorní teplotě.

5. Mikrozkuřavky byly sušeny v horizontální poloze do vypaření ethanolu (10 minut).
6. DNA byla eluována do 25, 50, 100 μl TE pufru 15 minut při laboratorní teplotě.
7. Částice byly odseparovány magnetem 2 minuty při laboratorní teplotě a eluovaná DNA byla odpipetována do čisté mikrozkuřavky.

Tabulka 2: Příprava separační směsi

Pořadí komponent	Komponenta	PEG 6000 (16%)/(μl)		
1.	H ₂ O	0	0	0
2.	NaCl (5 M)	100	200	400
3.	PEG 6000 (40 %)	100	200	400
4.	magnetické částice	25	50	100
5.	vzorek DNA	25	50	100
Výsledný objem (μl)		250	500	1000

Separací směs byla připravována v eppendorfových mikrozkuřavkách o objemu 1,5 ml; jednotlivé komponenty byly smíchány v uvedených poměrech a pořadích, na agarózový gel bylo nanášeno 25 μl izolované DNA.

4.2.2.12. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Koncentrace DNA byla měřena pomocí přístroje NanoPhotometr, jehož výhodou je minimální spotřeba vzorku, dále proměření absorbance při různých vlnových délkách $\lambda = 230, 260, 280$ a 320 nm a výpočet koncentrace DNA daného vzorku. Jako slepý vzorek byl použit TE pufr. Při měření bylo použito víčko 1mm Lid (Factor 5), což v případě dsDNA znamená, že koncentraci DNA lze měřit v rozsahu 7 – 350 ng/ μl .

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Kontrola čistoty bakteriální kultury

Bakteriální kultury laboratorních kmenů *Lactobacillus paracasei* susp. *paracasei* CCDM 212, *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190^T a *Lactobacillus paracasei* lock 0919 byly kultivovány přes noc v tekutém MRS mediu a následně byly rozetřeny křížovým roztěrem a kultivovány při 37 °C, 48 hodin na Petriho miskách s pevným MRS mediem.

Všechny tři kmeny tvořily bílé kolonie s hladkým a lesklým povrchem, z čehož lze usuzovat, že bakteriální kultury byly čisté a tedy i vhodné pro izolaci bakteriální DNA.

5.2. Porovnání účinnosti magnetických nosičů F-kol a Perovskit

Příprava různě koncentrovaných roztoků DNA

Nejprve byla izolovaná celková DNA, narostlá v tekutém MRS mediu, bakteriálních buněk *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190^T fenolovou extrakcí. Koncentrace celkové DNA získaného hrubého lyzátu byla změřena pomocí přístroje NanoPhotometr. Ze získaných údajů koncentrací DNA byla DNA ředěna na požadovanou koncentraci. Tímto postupem byly získány vzorky Lbd1 až Lbd5 s koncentracemi DNA v rozmezí 5,5 - 104,5 µg/ml (Tabulka 3).

Tabulka 3: Koncentrace DNA vzorků Lbd1 až Lbd5 určená spektrofotometricky (Lid Factor 5, $V_{\text{vzorku}} = 6 \mu\text{l}$)

Vzorek	c (µg/ml)	A _{230 nm}	A _{260 nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
Lbd1	104,50	0,189	0,419	0,215	0,001	0,957	2,232
Lbd2	40,00	0,060	0,155	0,077	-0,006	1,951	2,483
Lbd3	25,90	0,065	0,100	0,049	-0,004	1,975	1,527
Lbd4	15,65	0,058	0,069	0,041	0,007	1,839	1,252
Lbd5	5,50	0,008	0,015	0,004	-0,007	2,070	1,080

Použité magnetické částice

Dále byly připraveny suspenze magnetických částic, F-kol 77 ox, F-kol B 100 ox, F-kol 135 ox, F-kol B 300 ox ve sterilní ve vodě tak, aby koncentrace magnetických částic byla 2 mg/ml. Magnetické částice Perovskit 439 byly dodány ve formě stabilní suspenze a byly použity bez další úpravy.

Určení koncentrace magnetických nanočástic perovskit 439

Koncentrace magnetických nanočástic Perovskit 439 byla zjištěna odpařením rozpouštědla ze 400 µl suspenze Perovskitu 439 v mikrozkuvkách. Koncentrace magnetických nanočástic byla 1,88 mg/ml.

Separace DNA užitím magnetických částic

Jednotlivé komponenty pro izolaci DNA magnetickými částicemi (500 µl) byly připraveny dle postupu uvedeného v Tabulce 2 v kapitole 4.2.2.11. DNA byla z magnetických nosičů reversibilně imobilizována do 50 µl TE pufru o pH = 8,0. Izolovaná DNA (25 µl) byla následně nanášena na agarosový gel (0,8%) a byla provedena elektroforéza (L značí DNA standard 100 bp žebříček) (Obr. 6). Jednotlivé běhy na gelu Obr. 6. jsou popsány ve schématu.

Obr. 6: Agarózová gelová elektroforéza DNA kmene *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190^T v závislosti na použitých magnetických částicích.

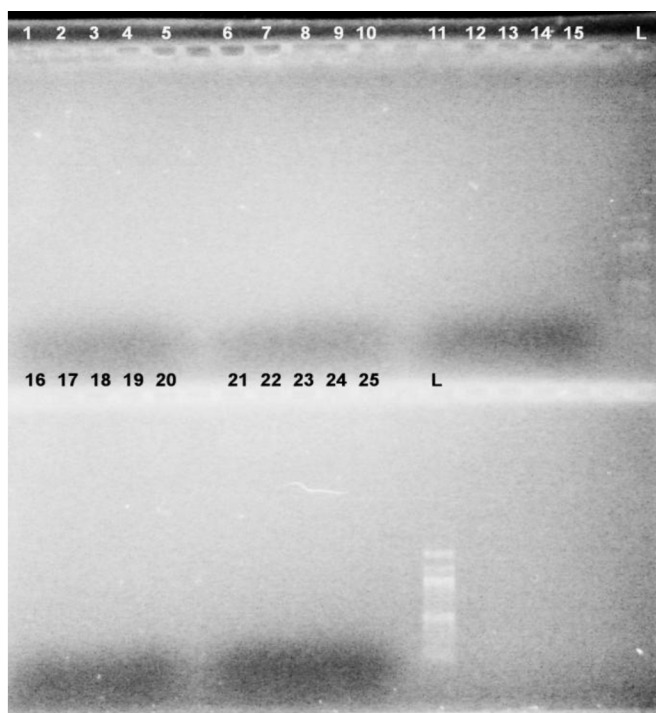


Schéma nanesení vzorků na agarózový gel

Vzorek DNA	Použité magnetické částice / běh číslo				
	F-kol B30 ox	F-kol 77 ox	F-kol B100 ox	F-kol 135 ox	Perovskit 439
Lbd1	1	2	3	4	5
Lbd2	6	7	8	9	10
Lbd3	11	12	13	14	15
Lbd4	16	17	18	19	20
Lbd5	21	22	23	24	25

Ověření kvality izolované DNA kmene *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190^T s využitím magnetických nosičů pomocí polymerázové řetězové reakce s primery specifickými pro *Lactobacillus delbrueckii* (PPP Master Mix)

Koncentrace izolované DNA byla velmi nízká (menší než 1 ng/μl) neboť nebyla měřitelná ani pomocí NanoPhotometru a nebyla detekována na agarózovém gelu (Obr. BB01). Skutečnost, že byla izolována bakteriální DNA kmene *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190^T pomocí všech testovaných magnetických nosičů byla ověřena pomocí PCR (Obr. 7). Byly získány PCR produkty (94 bp) různé intenzity. Z Obr. 7 je patrné, že množství eluované DNA závisí na množství DNA ve vzorku. Jako nejúčinnější se jevíly nosiče F-kol B100 ox, F-kol 135 ox a Perovskit 439.

Obr. 7: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (94 bp) příslušných supernatantů po izolaci DNA magnetickými částicemi (*Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190^T)

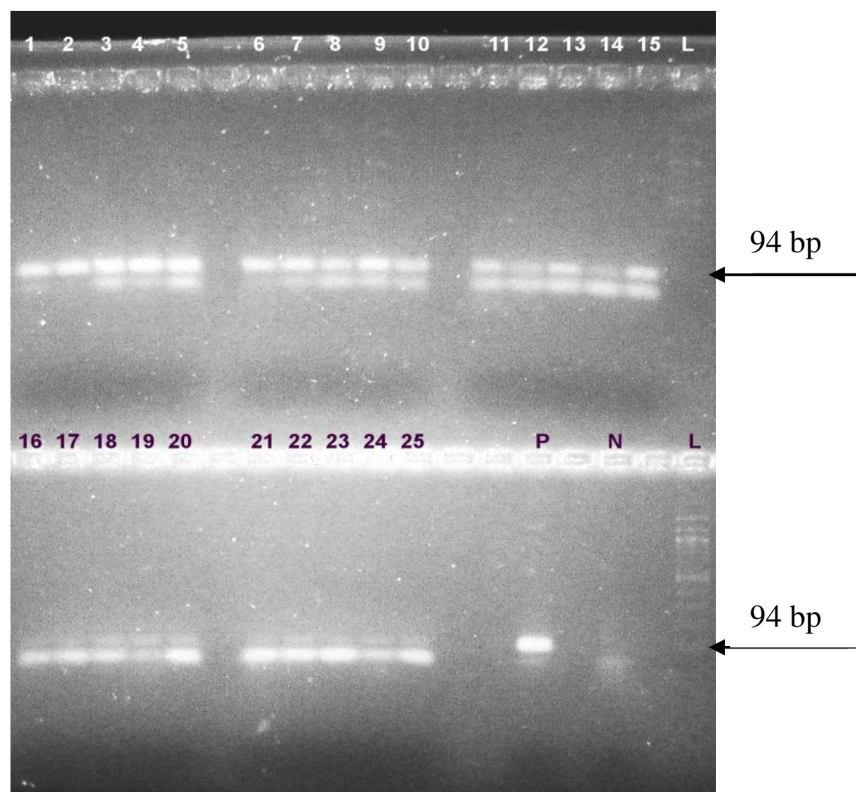


Schéma nanesení vzorků na agarózový gel

Běh	Magnetické částice	Koncentrace DNA před separací ng/μl)	PCR
1	F-kol B30 ox	104,50	++
2	F-kol 77 ox	104,50	++
3	F-kol B100 ox	104,50	+++
4	F-kol 135 ox	104,50	+++
5	Perovskit 439	104,50	+++
6	F-kol B30 ox	40,00	++
7	F-kol 77 ox	40,00	++
8	F-kol B100 ox	40,00	+
9	F-kol 135 ox	40,00	++
10	Perovskit 439	40,00	+
11	F-kol B30 ox	25,90	+
12	F-kol 77 ox	25,90	+
13	F-kol B100 ox	25,90	++
14	F-kol 135 ox	25,90	+
15	Perovskit 439	25,90	++
16	F-kol B30 ox	15,65	+/-
17	F-kol 77 ox	15,65	+/-
18	F-kol B100 ox	15,65	+
19	F-kol 135 ox	15,65	+
20	Perovskit 439	15,65	+
21	F-kol B30 ox	5,50	+/-
22	F-kol 77 ox	5,50	+/-
23	F-kol B100 ox	5,50	+/-
24	F-kol 135 ox	5,50	+/-
25	Perovskit 439	5,50	+/-
L	DNA standard 100bp	/	/
P	pozitivní kontrola (17 ng/μl)	/	+++
N	negativní kontrola	/	-

- DNA nebyla detekována
- +/- DNA byla detekována velmi slabě
- + DNA byla detekována v malém množství
- ++ DNA byla detekována ve větším množství
- +++ DNA byla detekována ve velkém množství

5.3. Izolace bakteriální DNA laboratorního kmene *Salmonella typhimurium* LT2-18 pomocí magnetických nosičů v různých reakčních objemech

Izolace bakteriální DNA laboratorního kmene *Salmonella typhimurium* LT2-18 o koncentraci DNA 65,9 ng/μl byla provedena pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA) ox a Perovskit 439 v různých výsledných objemech 500 a 1000 μl separačních směsí (Tabulka 2). Postup separace DNA magnetickými nosiči je uveden v kapitole 4.2.2.11.

Izolovaná DNA (25 μl) byla nanášena na agarózový gel (0,8%) a podrobena elektroforéze (Obr. 8)

Obr. 8: Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA kmene *Salmonella typhimurium* LT2-18 pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) ox a Perovskit 439

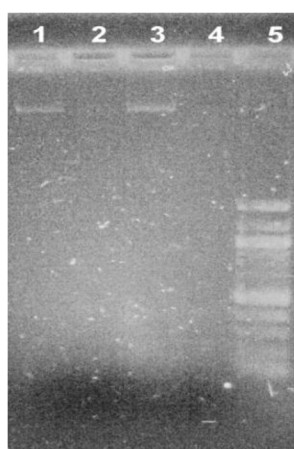


Schéma nanesení vzorků na agarózový gel

Běh	Magnetické částice / DNA	Objem separační směsi (μl)	DNA	Koncentrace DNA po eluci (ng/μl)
1	Perovskit 439	500	+	10,5
2	P(HEMA-co-GMA) ox	500	+/-	2,75
3	Perovskit 439	1000	+	5,75
4	P(HEMA-co-GMA) ox	1000	-	1,5
5	DNA standard 100bp			

- DNA nebyla detekována
- +/- DNA byla detekována velmi slabě
- + DNA byla detekována v malém množství

Z výsledků gelové elektroforézy lze usoudit, že magnetické částice Perovskit 439 jsou schopny na svůj povrch adsorbovat (a následně při eluci uvolnit) mnohem větší množství bakteriální DNA než částice P(HEMA-co-GMA) ox.

5.4. Izolace bakteriální DNA laboratorního kmene *Salmonella typhimurium* LT2-18 pomocí magnetických nosičů při různých teplotách a různých hodnotách pH TE pufru

Byla izolována bakteriální DNA laboratorního kmene *Salmonella typhimurium* LT2-18 o koncentraci DNA 20,5 ng/μl pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) ox a Perovskit 439. Eluce DNA byla prováděna pomocí TE pufrů o pH 8,0; 8,5; 9,0 při teplotách 20 a 70 °C. Dále bylo zkoumáno, zda lze dosáhnout vyšších výtěžků eluované DNA při dvojnásobném použití TE pufru stejného objemu při teplotě 70 °C. Výsledný objem separační směsi s magnetickými částicemi byl 500 μl.

Izolovaná DNA (25 μl) byla nanášena na agarózový gel (0,8 %) a podrobena elektroforéze (Obr. 9). Postup izolace bakteriální DNA je uveden v kapitole 4.2.2.11.

Obr. 9: Agarózová gelová elektroforéza supernatantů po izolaci DNA z buněk *Salmonella typhimurium* LT2-18 pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) ox a Perovskit 439. Vliv teploty a pH TE pufru na množství izolované DNA.

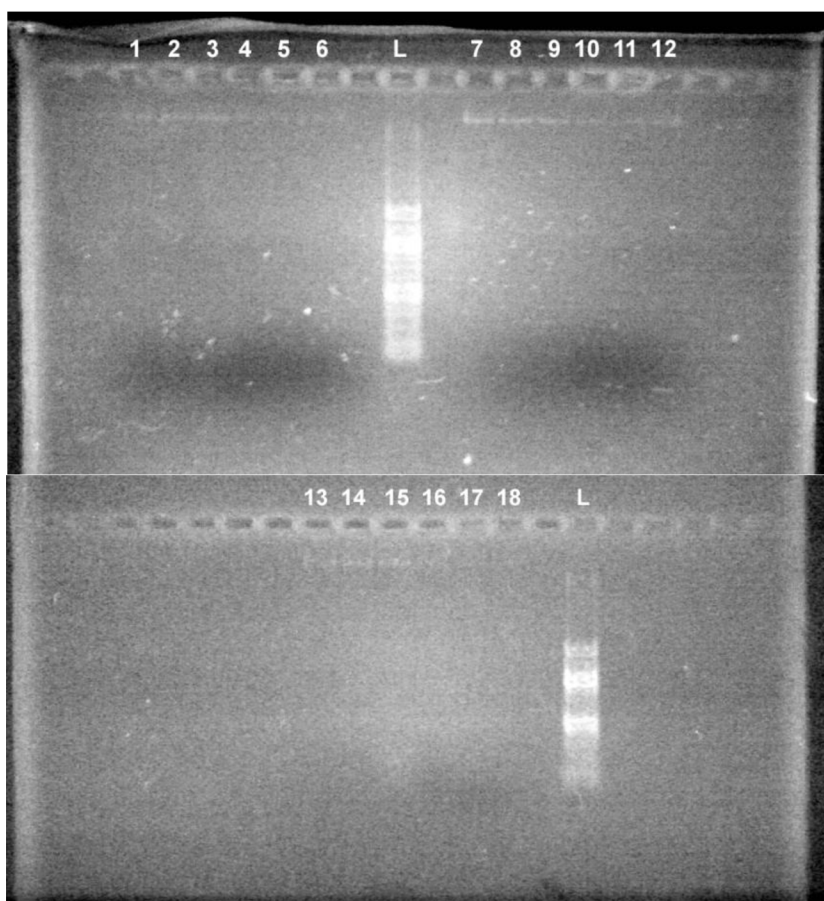


Schéma nanesení vzorků na agarózový gel

Běh	Magnetické částice / DNA	pH TE pufri	Teplota eluce (°C)	Eluce DNA	DNA	Koncentrace DNA po eluci (ng/μl)	Výtěžek separace (%)
1	Perovskit 439	8,0	20	1 x 50 μl	+	2,75	13
2	Perovskit 439	8,5	20	1 x 50 μl	+	4,75	23
3	Perovskit 439	9,0	20	1 x 50 μl	+	4,5	28
4	P(HEMA-co-GMA) ox	8,0	20	1 x 50 μl	+/-	0,5	2
5	P(HEMA-co-GMA) ox	8,5	20	1 x 50 μl	+/-	2,25	11
6	P(HEMA-co-GMA) ox	9,0	20	1 x 50 μl	+/-	1,38	7
7	Perovskit 439	8,0	70	1 x 50 μl	+	5,75	28
8	Perovskit 439	8,5	70	1 x 50 μl	+	5,25	26
9	Perovskit 439	9,0	70	1 x 50 μl	+	4,50	22
10	P(HEMA-co-GMA) ox	8,0	70	1 x 50 μl	+/-	2,00	10
11	P(HEMA-co-GMA) ox	8,5	70	1 x 50 μl	+/-	2,75	13
12	P(HEMA-co-GMA) ox	9,0	70	1 x 50 μl	+/-	2,75	13
13	Perovskit 439	8,0	70	2 x 25 μl	+/-	4,00	20
14	Perovskit 439	8,5	70	2 x 25 μl	+/-	4,25	21
15	Perovskit 439	9,0	70	2 x 25 μl	+/-	6,75	33
16	P(HEMA-co-GMA) ox	8,0	70	2 x 25 μl	-	3,00	15
17	P(HEMA-co-GMA) ox	8,5	70	2 x 25 μl	-	2,75	13
18	P(HEMA-co-GMA) ox	9,0	70	2 x 25 μl	-	4,00	20
L	DNA standard 100bp						

- DNA nebyla detekována
- +/- DNA byla detekována velmi slabě
- + DNA byla detekována v malém množství

Výtěžek separace v procentech byl počítán jako podíl hmotnosti DNA ve vzorku po separaci magnetickými částicemi ku hmotnosti DNA ve vzorku před separací mikročásticemi.

$$\text{Výtěžek separace } [\%] = \frac{m_{\text{DNA po separaci}}}{m_{\text{DNA před separací}}} * 100$$

Z výsledků gelové elektroforézy je patrné, že nejvyšší eluční schopnosti vykazovaly magnetické nanočástice Perovskit 439 při teplotě 70 °C a pH 8,0 – 8,5 (běh 7 a 8).

Pomocí magnetických nosičů Perovskit 439 i P(HEMA-co-GMA) ox byla izolována bakteriální DNA laboratorního kmene *Salmonella typhimurium* LT2-18. Koncentrace DNA, zjištěná spektrofotometricky se pohybovala při použití mikročástic P(HEMA-co-GMA) v rozmezí 0,5 - 4 ng/μl a nanočástic Perovskit 439 v rozmezí 2,75 – 6,75 ng/μl.

5.5. Izolace bakteriální DNA z hrubých lyzátů buněk *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212 s využitím magnetických nosičů Perovskit 439

Nejprve byla izolovaná celková DNA, narostlá v tekutém MRS mediu (6 ml), bakteriálních buněk *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212 fenolovou extrakcí. Koncentrace celkové DNA byla změřena spektrofotometricky. Ze získaných údajů koncentrací DNA byla tato DNA naředěna na požadovanou koncentraci. Tímto postupem byly získány vzorky Lbp1 až Lbp5 s koncentracemi DNA v rozmezí 7,87 - 192 µg/ml (Tabulka 4).

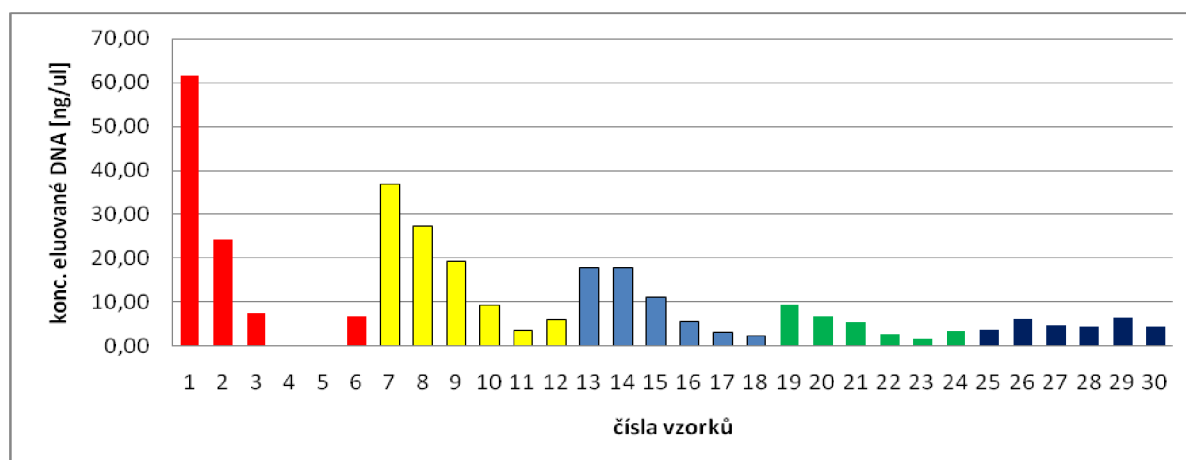
Tabulka 4: Koncentrace DNA vzorků Lbp1 až Lbp5 určená spektrofotometricky (Lid Factor 5, $V_{\text{vzorku}} = 6 \mu\text{l}$)

Vzorek	c (µg/ml)	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
Lbp1	192,00	0,352	0,806	0,368	0,008	2,140	2,231
Lbp2	97,90	0,173	0,398	0,175	0,007	2,428	2,448
Lbp3	48,65	0,068	0,187	0,085	0,008	2,105	2,637
Lbp4	17,05	0,007	0,058	0,017	0,010	2,568	-----
Lbp5	7,88	0,007	0,023	0,010	0,007	3,750	-----

Příprava nanočástic Perovskit 439 o různých koncentracích.

Postupným ředěním zásobního roztoku Perovskit 439 sterilní vodou byly připraveny roztoky Perovskit 439 o následujících koncentracích: 1,875; 0,938; 0,469; 0,234; 0,117 a 0,059 µg/ml. K izolaci bakteriální DNA laboratorního kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212 byly použity vzorky Lbp1 až Lbp5 v rozmezích koncentrací DNA 7,88 - 192 µg/ml a magnetické nanočástice Perovskit 439 o koncentracích v rozmezí 0,059 - 1,875 µg/ml (celkový objem separační směsi byl 500 µl). DNA byla následně eluována do 50 µl TE pufru o pH = 8. Na gel bylo nanášeno 25 µl DNA. (Obr. 10, Graf 1).

Graf 1: Koncentrace DNA laboratorního kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212 po magnetické separaci nanočásticemi Perovskit 439 (popis viz Obr. 10)



Obr. 10. Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA izolované z *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212 magnetickými nanočásticemi Perovskit 439

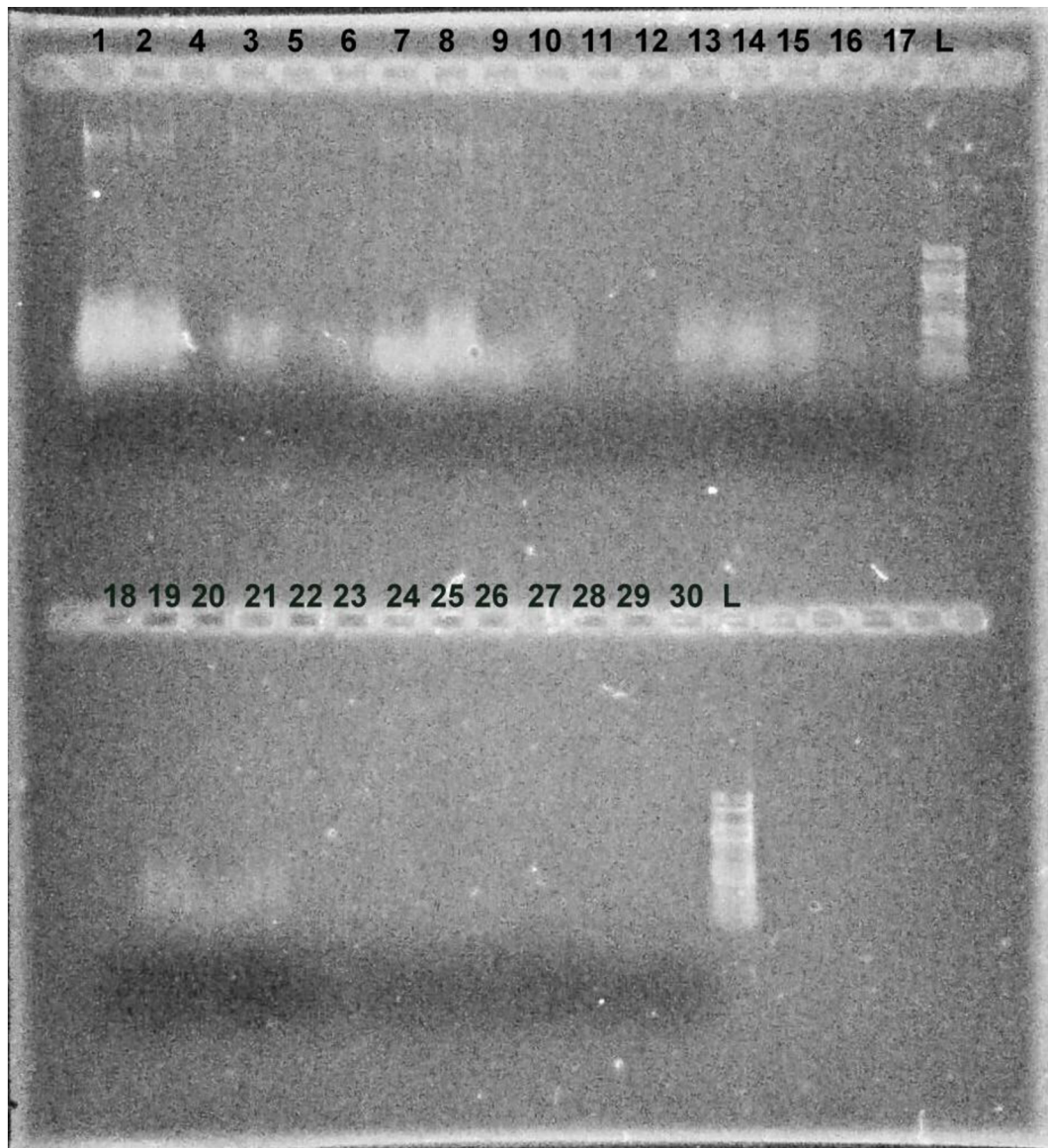


Schéma nanesení vzorků na agarózový gel

Běh	Koncentrace DNA před separací (ng/μl)	Koncentrace Perovskitu 439 (ng/μl)	DNA	Koncentrace DNA po separaci (ng/μl)	Výtěžek separace (%)
1	192,00	1,875	+++	61,5	32
2	192,00	0,938	+++	24,2	13
3	192,00	0,469	++	7,5	4
4	192,00	0,234	-	-	-
5	192,00	0,117	+/-	-	-
6	192,00	0,059	+	6,8	4
7	97,90	1,875	++	36,8	38
8	97,90	0,938	++	27,3	28
9	97,90	0,469	+	19,3	20
10	97,90	0,234	+/-	9,25	9
11	97,90	0,117	-	3,5	4
12	97,90	0,059	-	6,0	6
13	48,65	1,875	+	17,8	37
14	48,65	0,938	+	17,8	37
15	48,65	0,469	+	11,2	23
16	48,65	0,234	+/-	5,5	11
17	48,65	0,117	-	3,0	6
18	48,65	0,059	-	2,3	5
19	17,05	1,875	+/-	9,5	56
20	17,05	0,938	+/-	6,8	40
21	17,05	0,469	+/-	5,5	32
22	17,05	0,234	-	2,8	16
23	17,05	0,117	-	1,8	10
24	17,05	0,059	-	3,5	21
25	7,88	1,875	-	3,8	48
26	7,88	0,938	-	6,3	79
27	7,88	0,469	-	4,8	60
28	7,88	0,234	-	4,5	57
29	7,88	0,117	-	6,5	82
30	7,88	0,059	-	4,5	57
L	DNA standard (100 bp žebříček)				

- DNA nebyla detekována
- +/- DNA byla detekována velmi slabě
- + DNA byla detekována v malém množství
- ++ DNA byla detekována ve větším množství
- +++ DNA byla detekována ve velkém množství

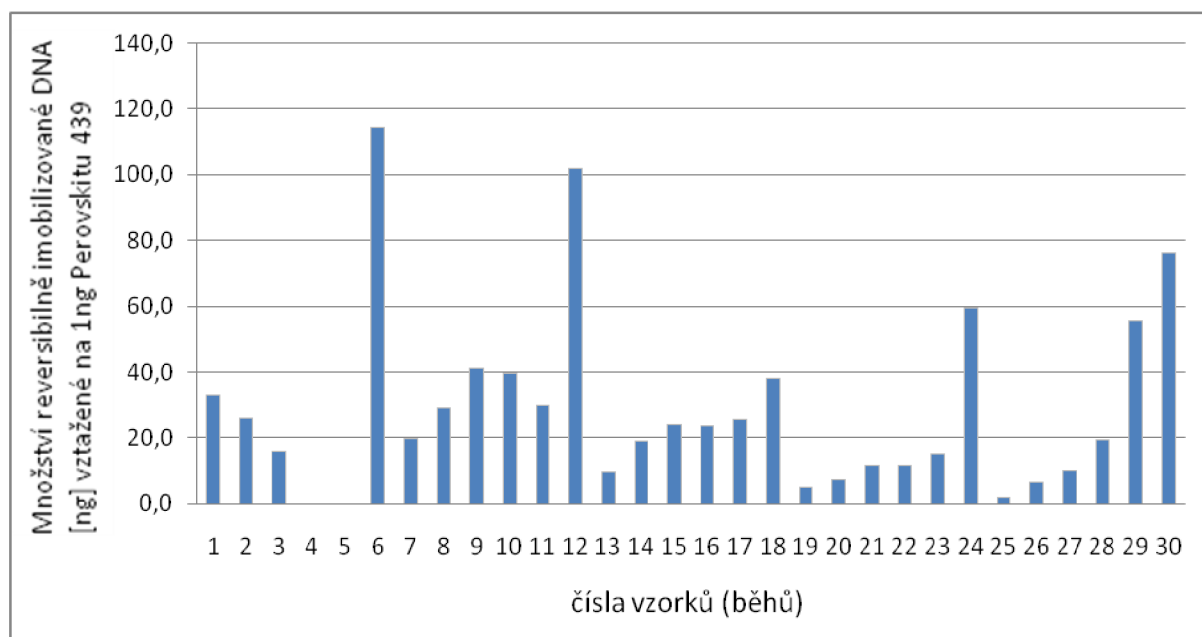
Účinnost nanočástic Perovskit 439

Dále bylo zkoumáno množství DNA (ng), které je schopno reversibilně imobilizovat užitím jednoho nanogramu (přepočteno na sušinu) Perovskitu 439 (Tabulka 5, Graf. 2).

Tabulka 5. Závislost množství reversibilně imobilizované DNA (*L. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212) na koncentraci DNA a množství magnetických nanočástic Perovskit 439.

Běh	Koncentrace DNA před separací (ng/μl)	Koncentrace DNA po separaci (ng/μl)	Perovskit 439 (ng/μl)	Imobilizovaná DNA ng / ng Perovskitu 439
1	192,00	61,5	1,875	32,8
2	192,00	24,2	0,938	25,8
3	192,00	7,5	0,469	16,0
4	192,00	-	0,234	0,0
5	192,00	-	0,117	0,0
6	192,00	6,8	0,059	114,4
7	97,90	36,8	1,875	19,6
8	97,90	27,3	0,938	29,1
9	97,90	19,3	0,469	41,2
10	97,90	9,25	0,234	39,5
11	97,90	3,5	0,117	29,9
12	97,90	6,0	0,059	101,7
13	48,65	17,8	1,875	9,5
14	48,65	17,8	0,938	19,0
15	48,65	11,2	0,469	23,9
16	48,65	5,5	0,234	23,5
17	48,65	3,0	0,117	25,6
18	48,65	2,3	0,059	38,1
19	17,05	9,5	1,875	5,1
20	17,05	6,8	0,938	7,2
21	17,05	5,5	0,469	11,7
22	17,05	2,8	0,234	11,8
23	17,05	1,8	0,117	15,0
24	17,05	3,5	0,059	59,3
25	7,88	3,8	1,875	2,0
26	7,88	6,3	0,938	6,7
27	7,88	4,8	0,469	10,1
28	7,88	4,5	0,234	19,2
29	7,88	6,5	0,117	55,6
30	7,88	4,5	0,059	76,3

Graf 2. Závislost množství reversibilně imobilizované DNA (*L. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212) na koncentraci DNA ve vzorku a množství magnetických nanočástic Perovskitu 439



Z výsledků uvedených v Tabulce 5 a Grafu 2 lze usuzovat, že při vysokých koncentracích DNA se s klesající koncentrací (množstvím) Perovskitu 439 snižuje účinnost separace. Je to způsobeno pravděpodobně tím, že množství DNA ve vzorku je ve velmi vysokém nadbytku. Dalo by se říci, že koncentrace DNA je na konstantní úrovni. Tedy účinnost reversibilní imobilizace je přímo úměrná koncentraci (množství) magnetického nosiče.

Naopak při nízkých koncentracích (množstvích) DNA a vysokých koncentracích (množstvích) magnetických nanočástic nedochází téměř k žádné desorpci DNA do vhodného analytu, TE pufru, protože imobilizace DNA není plně reversibilní. Tedy v závislosti na alespoň odhadované koncentraci (množství) DNA ve vzorku by bylo vždy vhodné volit koncentraci (množství) magnetických nanočástic.

Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerázové řetězové reakce s rodově specifickými primery pro rod *Lactobacillus*.

Kvalita izolované DNA kmene *L. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212 byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (Obr. 11.). Objemy jednotlivých komponent a program pro PCR jsou uvedeny v kapitole 4.2.2.5.

Obr. 11. Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) po izolaci DNA nanočásticemi Perovskit 439 (*L. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212)

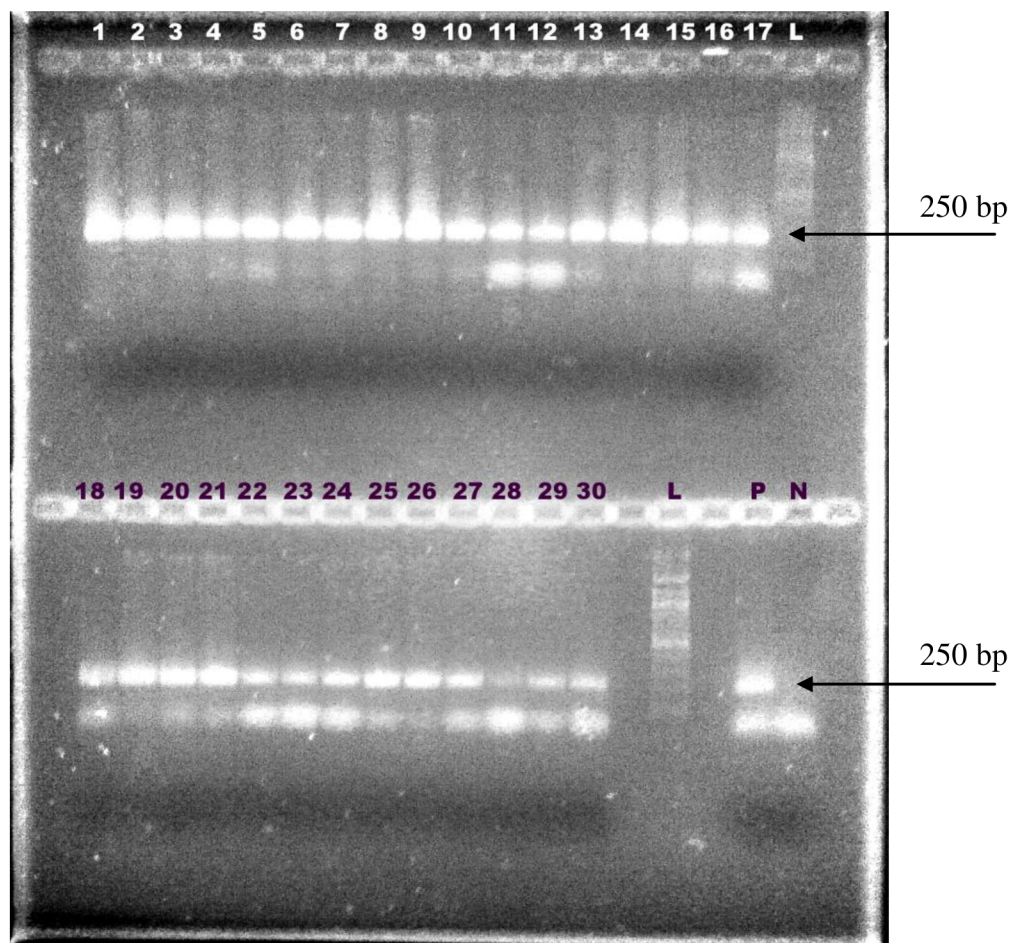


Schéma nanesení vzorků

Běh	Koncentrace DNA před. separací (ng/μl)	Perovskit 439 (ng/μl)	PCR	Koncentrace DNA po separaci (ng/μl)
1	192,00	1,875	+++	61,5
2	192,00	0,938	+++	24,2
3	192,00	0,469	+++	7,5
4	192,00	0,234	+++	-
5	192,00	0,117	+++	-
6	192,00	0,059	+++	6,8
7	97,90	1,875	+++	36,8
8	97,90	0,938	+++	27,3
9	97,90	0,469	+++	19,3
10	97,90	0,234	+++	9,3
11	97,90	0,117	++	3,5
12	97,90	0,059	++	6,0
13	48,65	1,875	++	17,8
14	48,65	0,938	+++	17,8
15	48,65	0,469	+++	11,2
16	48,65	0,234	++	5,5
17	48,65	0,117	++	3,0
18	48,65	0,059	++	2,3
19	17,05	1,875	++	9,5
20	17,05	0,938	++	6,8
21	17,05	0,469	++	5,5
22	17,05	0,234	++	2,8
23	17,05	0,117	++	1,8
24	17,05	0,059	++	3,5
25	7,88	1,875	++	3,8
26	7,88	0,938	++	6,3
27	7,88	0,469	++	4,8
28	7,88	0,234	+	4,5
29	7,88	0,117	+	6,5
30	7,88	0,059	+	4,5
L	DNA standard (100 bp žebříček)	/	/	/
P	pozitivní kontrola (10 ng/μl)	-	+++	-
N	negativní kontrola	/	/	/

- DNA nebyla detekována
- + DNA byla detekována v malém množství
- ++ DNA byla detekována ve větším množství
- +++ DNA byla detekována ve velkém množství

Kvalita izolované DNA kmene *L. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212 eluované z magnetického nosiče Perovskit 439 o různých koncentracích byla ověřena metodou PCR. Po amplifikaci 1 µl eluátů byly získány PCR produkty přibližně stejné intenzity. Z Obr. 11 je patrné že magnetickou separací nanočásticemi Perovskit 439 byla získána DNA vysoké kvality a v dostatečném množství.

ZÁVĚR

Z hrubého lyzátu buněk *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212 a *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190^T byla bakteriální DNA izolována fenolovou extrakcí. Izolovaná bakteriální DNA byla použita pro testaci 5 druhů magnetických mikročástic (F-kol 77 ox, F-kol B 100 ox, F-kol 135 ox, F-kol B 300 ox, P(HEMA-co-GMA) ox) a nově syntetizovaných magnetických nanočástic Perovskit 439. Separace byla prováděna i s DNA laboratorního kmene *Salmonella typhimurium* LT2-18.

Magnetickou separací nanočásticemi Perovskit 439 bylo získáno přibližně dvojnásobné množství DNA než při použití mikročástic P(HEMA-co-GMA). V případě izolace magnetickými částicemi Perovskit 439 bylo eluováno větší množství DNA použitím TE pufru o pH 8,0 a teplotě 70 °C. Dále bylo zjištěno, že separace vzorků s nízkým obsahem DNA je vhodnější provádět s nižším množstvím magnetických částic, protože eluce DNA z nosičů probíhá pravděpodobně jen částečně reversibilně a část DNA zůstává navázaná na nanočásticích. U vzorků s vysokým množstvím DNA je množství eluované DNA přímo úměrně množství použitých částic. Kvalita izolované DNA magnetickými částicemi byla ověřena pomocí amplifikace v PCR. Bylo zjištěno, že i když magnetickými nosiči bylo izolováno různé množství DNA, kvalita izolované DNA byla vždy v kvalitě vhodné pro PCR..

Nanočástice Perovskit 439 měly proti ostatním magnetickým nosičům nejlepší separační vlastnosti a bylo jimi izolováno největší množství DNA. Pro jejich další využití při analýze reálných vzorků je však třeba tyto částice i metodu izolace dále optimalizovat.

6. LITERATURA

[1] Klaban, V.: *Svět mikrobů*, Hradec Králové: Gaudeamus, 1999. 303 s. ISBN 80-7041-639-4.

[2] Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn, T.G. (2004): *Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn., release 5.0, Springer-Verlag, New York. 350 p.

[3] Hammes, W.P., and Hertel, C. (2003): The Genera Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd edition, release 3.15, 15 December 2003.

[4] Hammes, W.P., and Vogel, R.F. (1995): The genus *Lactobacillus*. In: Wood B.J.B. and Holzapfel W.H., eds. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol.2, Blackie Academic & Professional (UK), Glasgow, pp. 19-54.

[5] Maragkoudakis, A. P., Zoumpopoulou, G., Miaris, Ch., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E.: *Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products*. International Dairy Journal, 16: 189-199. 2006.

[6] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a pro biotechnologii*. Vyd. Academia nakladatelství Akademie věd České republiky, 3. vydání, 363 s, Praha, 2002, ISBN 80-200-1024-6.

[7] Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: *Lékařská mikrobiologie*, 1996 Marvil, Praha. 588 s.

[8] SEDLÁČEK, I. : *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

[9]] ROSYPAL, S.: *Úvod do molekulární biologie – Díl první*. Nakladatelství Rosypal, Brno, 2006. 288 s. ISBN 80-902562-5-2.

[10] Campbell, N. A., Reece, J. B.: *Biologie*. Computer Press, Brno 2008. ISBN 80-251-1178-4.

[11] Bruce, I. J., Taylor, J., Todd, M., Davies, M. J., Borioni, E., Sangregorio, C., Sen, T.: *Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 284: 145-160. 2004.

[12] Horák, D., Rittich, B., Španová, A.: *Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 311: 249-254. 2007.

[13] Sakar, T. R., Irudayaraj J.: *Carboxyl-coated magnetic nanoparticles for mRNA isolation and extraction of supercoiled plasmid DNA*. Analytical Biochemistry, 379: 130-132. 2008.

- [14] Šafařík, I., Šafaříková, M.: *Use of magnetic techniques for the isolation of cells*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, B 722: 33-53. 1999.
- [15] McBain, C. S., Yiu, HP. H., Dobson, J.: *Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery*. International Journal of Nanomedicine, 3: 169–180. 2008
- [16] Rittich, B., Španová, A., Horák, D., Beneš, M.J., Klesnilová, L., Petrová, K., Rybníkář, A.: *Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 52: 143-148. 2006.
- [17] Life Technologies Corporation – oficiální webové stránky dostupné z:
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Dynal/Dynabeads-Types-and-Uses.html>
[cit. 20. 4. 2010].
- [18] Horák, D., Rittich, B., Španová, A., Beneš M.J.: *Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics*. Polymer, 46: 1245-1255. 2004.
- [19] Křížová, J., Španová, A., Rittich, B., Horák, D.: *Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation*. Journal of Chromatography A, 1064: 247-253. 2005.
- [20] Rittich, B., Španová, A., Horák, D.: *Functionalised magnetic microspheres with hydrophilic properties for molecular diagnostic applications*. Food Research International, 42: 493-498. 2009.
- [21] Syamkumar, S., Jose, M., Sasikumar, B.: *Isolation and PCR Amplification of Genomic DNA from Dried Capsules of Cardamom (Elettaria cardamomum M.)*. Plant Molecular Biology Reporter 23: 417a–417e. 2005.
- [22] Schmitz, A., Reisner, D.: *Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000*. Analytical Biochemistry, 354: 311-313. 2006.
- [23] Sambrook, J., Russel, D.W. (2001): *Molecular cloning: A laboratory manual (II.)*, 3rd ed. Cold Spring Laboratory Harbor Press, New York.
- [24] Dubernet, S., Desmaures, N., Guéguen, M.: *A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level*. FEMS Microbiology Letters, 214: 271-275. 2002.
- [25] Haarman, M., Knol, J. (2006): *Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula*. Applied and Environmental Microbiology, 72: 2359–2365. 2006.