

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

NUKLEOVÉ KYSELINY JAKO TERAPEUTICKÉ AGENS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

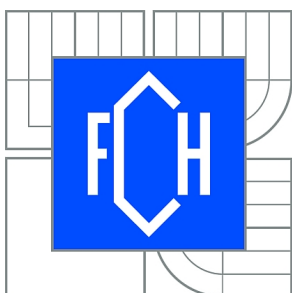
LUCIE RÁČKOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

NUKLEOVÉ KYSELINY JAKO TERAPEUTICKÉ AGENS

NUCLEIC ACIDS AS TERAPEUTIC AGENT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LUCIE RÁČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0897/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Lucie Ráčková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce **doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Nukleové kyseliny jako terapeutické agens

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Vyhodnoťte získané výsledky

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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

Lucie Ráčková
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

S rozvojem molekulární biologie dochází i k rozvoji v onkoterapii. Hlavním směrem moderní medicíny je genová terapie. V genové terapii jsou používány dvě kategorie vektorů, a to virové vektory a neviróvé vektory. K neviróvým vektorům patří plazmidy. Plazmidová DNA využívána v medicíně musí být dokonale čistá. V současnosti jsou k izolaci a purifikaci plazmidové DNA využívány hlavně chromatografické metody. Výzkum a vývoj se ale zabývá i jinými metodami, například dvoufázovými vodnými systémy a magnetickými nosiči. V experimentální části byla provedena izolace plazmidové pUC 19 DNA z kultury buněk *Escherichia coli* JM 109 (pUC 19) metodou alkalické lýze. Izolovaná plazmidová DNA byla purifikována pomocí třech metod: RNA v plazmidové DNA byla vysrážena chloridem lithným, RNA byla degradována imobilizovanou RNázou A a plazmidová DNA byla purifikována pomocí dvoufázového systému. Kvalita izolované plazmidové DNA byla ověřena spektrofotometricky a agarózovou gelovou elektroforézou.

ABSTRACT

With the development of molecular biology development of oncotherapy proceeds. The major progress of modern medicine is gene therapy. In the gene therapy are two categories, namely, viral vectors and nonviral vectors which are used mainly. Nonviral vectors include plasmids. Plasmid DNA used in medicine must be perfectly purified. Chromatographic methods are mainly used at present. Research and development deals with other methods for example two-phase aqueous systems and magnetic carriers. In experimental part of this thesis, isolation of pUC 19 plasmid DNA from *Escherichia coli* JM 109 (pUC 19) cell culture was performed via method of alkaline lysis. Quality of isolated plasmid DNA was verified spectrophotometrically and by agarose gel electrophoresis. Isolated plasmid DNA was purified using three methods: RNA in plasmid DNA was precipitated by lithium chloride, RNA was degraded by immobilized RNase A and plasmid DNA was purified using two-phase aqueous system.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plazmidová DNA, genová terapie, *Escherichia coli*, purifikace, dvoufázový vodný systém

KEYWORDS

Plasmid DNA, gene therapy, *Escherichia coli*, purification, two-phase aqueous system

RÁČKOVÁ, L. *Nukleové kyseliny jako terapeutické agens*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 43 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za odborné vedení, připomínky a čas, který mi věnoval.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Nukleové kyseliny	8
2.1.1	Chemické složení nukleových kyselin	8
2.1.2	Typy nukleových kyselin	10
2.1.3	Plazmidová DNA	11
2.2	Nukleové kyseliny jako terapeutické agens	11
2.3	Genová terapie	12
2.4	Použití pevných magnetických nanometrových vektorů v léčbě nádorů	13
2.5	Izolace a purifikace plazmidové DNA	13
2.5.1	Separace nukleových kyselin pomocí dvoufázových vodných systémů	13
2.5.2	Srážení plazmidové DNA	14
2.5.3	Využití magnetických nosičů při izolaci DNA	15
2.5.4	Chromatografické metody purifikace	15
2.6	Detekce nukleových kyselin	16
2.6.1	Elektroforéza	16
2.6.2	Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin	17
3	Cíl práce	18
4	Experimentální část	19
4.1	Bakteriální kultury	19
4.2	Chemikálie	19
4.3	Roztoky	20
4.3.1	Média pro kultivaci buněk	20
4.3.2	Roztoky pro lýzu bakteriálních buněk a izolaci plazmidové DNA	20
4.3.3	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu a vizualizaci DNA	20
4.3.4	Roztoky pro purifikaci plazmidové DNA	21
4.4	Přístroje a pomůcky	21
4.5	Metody	22
4.5.1	Kultivace bakteriálních buněk <i>E. coli</i> JM 109, <i>E. coli</i> JM 109 (pUC19) a ověření přítomnosti plazmidů v buňkách	22
4.5.2	Kontrola čistoty bakteriální kultury	22
4.5.3	Izolace plazmidové DNA (alkalická lyze)	22

4.5.4	Gelová elektroforéza plazmidové DNA	23
4.5.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA... ..	23
4.5.6	Separace nukleových kyselin v dvoufázovém vodném systému	24
4.5.7	Elektroforéza plazmidové DNA pUC 19 na agarózovém gelu.....	24
4.5.8	Srážení RNA chloridem lithným	24
4.5.9	Štěpení RNA imobilizovanou RNázou A	25
5	Výsledky	26
5.1	Kultivace bakteriálních buněk <i>E. coli</i> JM 109, <i>E. coli</i> JM 109 (pUC19) a ověření přítomnosti plazmidů v buňkách.....	26
5.1.1	Kultivace v tekutém médiu	26
5.1.2	Růst bakteriálních buněk na pevném médiu	26
5.2	Izolace plazmidové DNA pUC19.....	28
5.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA.....	28
5.4	Purifikace plazmidové DNA	29
5.4.1	Separace nukleových kyselin pomocí dvoufázových vodných systémů ..	29
5.4.2	Srážení RNA chloridem lithným	33
5.4.3	Purifikace plazmidové DNA imobilizovou RNázou A	34
6	Diskuze	36
6.1	Ověření přítomnosti plazmidů v buňkách	36
6.2	Izolace plazmidové DNA	36
6.3	Purifikace plazmidové DNA	36
6.3.1	Separace nukleových kyselin v dvoufázovém vodném systému	36
6.3.2	Purifikace plazmidové DNA chloridem lithným	37
6.3.3	Purifikace plazmidové DNA nosičem s imobilizovou RNázou A	37
7	Závěr	38
8	Seznam použitých zdrojů	39
9	Seznam použitých zkratk	43

1 ÚVOD

K obávaným onemocněním patří nádorové choroby – rakovina. Podle dostupných statistik zhoubné novotvary jsou v ekonomicky rozvinutých zemích po srdečních a cévních chorobách druhou nejčastější příčinou úmrtí. Nelze se proto divit, že se lékaři snaží vypátrat její příčiny a vyvinout nové terapeutické postupy. Výzkum je však velmi složitý, protože nádorová onemocnění jsou velmi různorodá. Je třeba nádory odlišit podle lokalizace v jednotlivých orgánech a tkáních, podle období, kdy se vytvářejí, podle průběhu a závažnosti onemocnění a podle mnoha dalších hledisek. Moderní genetické poznatky umožňují nejen poznat podstatu těchto chorob, ale přispívají také k jejich diagnostice a stanovení účinného způsobu léčby [1].

Genová terapie byla uznána jako hlavní směr moderní medicíny. Spouštěčem úspěšné genové terapie je transport genu do cílového místa v organismu. Aby bylo možné distribuovat plazmidovou DNA do jádra a vložit ji do specifického místa DNA, je velmi důležité vybrat systém pro správné doručení genu. Přes omezení mnohých faktorů genová terapie zatím nedosahuje ideálních efektů. Tento obtížný problém vyžaduje řešení řady dílčích cílů: zlepšení účinnosti transfekce, efektivní dodání cílového genu do cílového místa v organismu a aby dodaný gen nevykazoval vedlejší účinky. To znamená, že je třeba dosáhnout účinků léčiva na molekulární úrovni.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou nepostradatelnými makromolekulárními látkami (biopolymery) živých soustav. Jsou to biomolekuly s vysokou variabilitou sekundární struktury, které kódují genetické informace [2]. Mezi nejpodstatnější vlastnost nukleových kyselin patří jejich schopnost obsahovat informace, přijímat je a uvolňovat [3]. Nukleové kyseliny byly objeveny v roce 1869 švýcarským lékařem Friedrichem Miescherem, který zkoumal složení bílých krvinek extrahovaných z hnisu z nemocničních obvazů. Z jader bílých krvinek izoloval chemickou sloučeninu, kterou pojmenoval nuklein. Miescher objevil nukleové kyseliny i v jiných biologických materiálech [4].

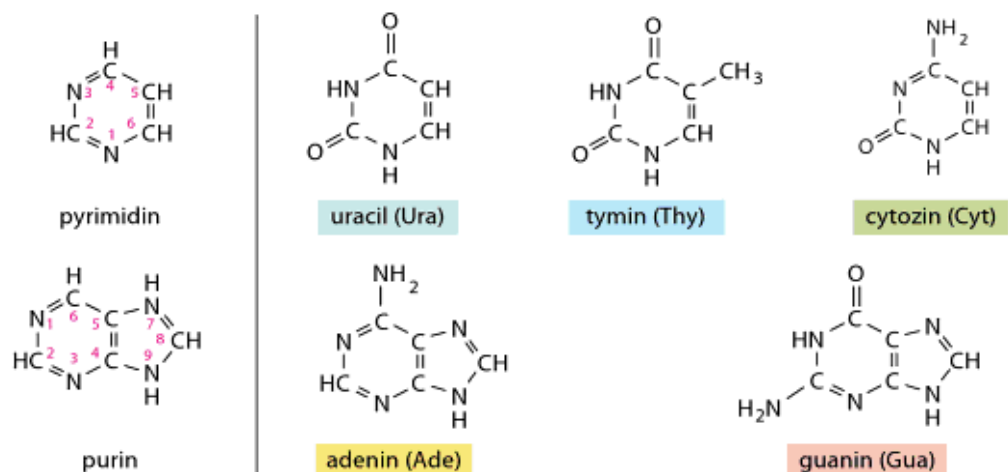
Experimentální studium nukleových kyselin tvoří hlavní součást moderního biologického a lékařského výzkumu, biotechnologií a farmaceutického průmyslu.

2.1.1 Chemické složení nukleových kyselin

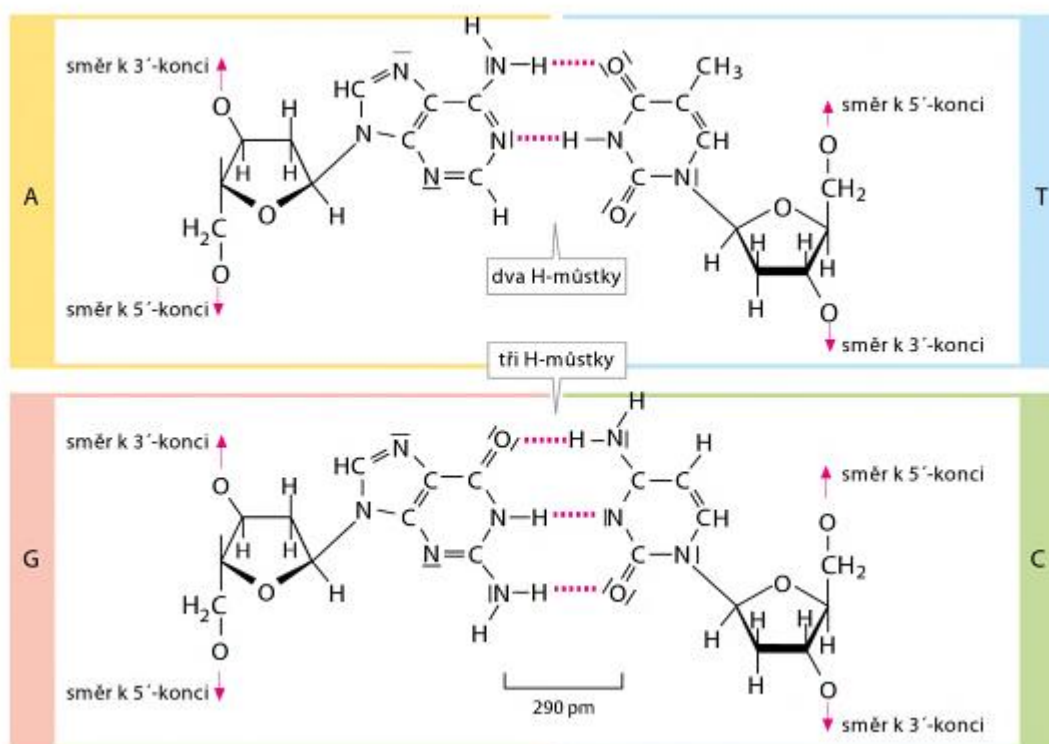
Nukleové kyseliny tvoří řetězce nukleotidů sestávající ze tří složek: dusíkaté báze, cukerné složky – pentózy a zbytku kyseliny fosforečné – fosfátu.

2.1.1.1 Báze nukleových kyselin

Dusíkaté báze, které se vyskytují v nukleových kyselinách, jsou odvozeny od heterocyklických sloučenin. Od purinu jsou odvozeny báze adenin (zkratka: A) a guanin (G), které se spolu s pyrimidinovou bází cytozinem (C) vyskytují v DNA i RNA [5, 6]. Z pyrimidinových bází se v RNA nachází pouze uracil (U); v DNA se místo něj objevuje thymin (T). Některé typy DNA vyšších organismů mohou obsahovat ještě minoritní množství dalších bází, což jsou pozměněné molekuly bází např. methylací – methylcytozin. Struktura purinových a pyrimidinových bází je znázorněna na Obrázku 1. [5]. Komplementární báze tvoří dvojice vždy jedné pyrimidinové a jedné purinové báze. Mezi komplementárními bázemi vznikají vazebné interakce (vodíkové vazby) [6]. Párování bází v DNA je uvedeno na Obrázku 2 [5]. Vazbu mezi A a T je spojují dvě vodíkové vazby, zatímco antiparalelní postavení bází C a G spojují tři vodíkové vazby, tudíž tato vazba je pevnější [3].



Obrázek 1: Báze nukleových kyselin



Obrázek 2: Párování bází v DNA

2.1.1.2 Nukleosidy, nukleotidy

Po spojení dusíkaté báze a cukerné složky, kterou tvoří ribóza nebo 2 – deoxyribóza, vzniká nukleosid. Tyto dvě složky jsou spojeny N – glykosidickou vazbou, která vzniká mezi dusíkem báze a prvním uhlíkovým atomem cukerné složky. Pokud je cukernou složkou β-D-ribofuranóza, vzniká adenzin, guanozin, uridin, cytidin a tymin. V případě přítomnosti 2-deoxy-β-D-ribofuranózy vzniká deoxyadenozin, deoxyguanozin, deoxyuridin, deoxycytidin či deoxytymidin. Připojením zbytku kyseliny fosforečné esterickou vazbou, nejčastěji na pozici 5' pentózy, vzniká nukleotid. Hydroxylová skupina vázaná na uhlíkovém řetězci reaguje

s kyselinou fosforečnou. Spojením jednotlivých nukleotidů fosfodiesterovou vazbou vzniká polynukleotidový řetězec, který je základem struktury nukleových kyselin [5, 6].

2.1.2 Typy nukleových kyselin

Existují dva typy nukleových kyselin – kyselina deoxyribonukleová (DNA), a kyselina ribonukleová (RNA). Uvedené nukleové kyseliny se liší ve složení, struktuře a funkci [5].

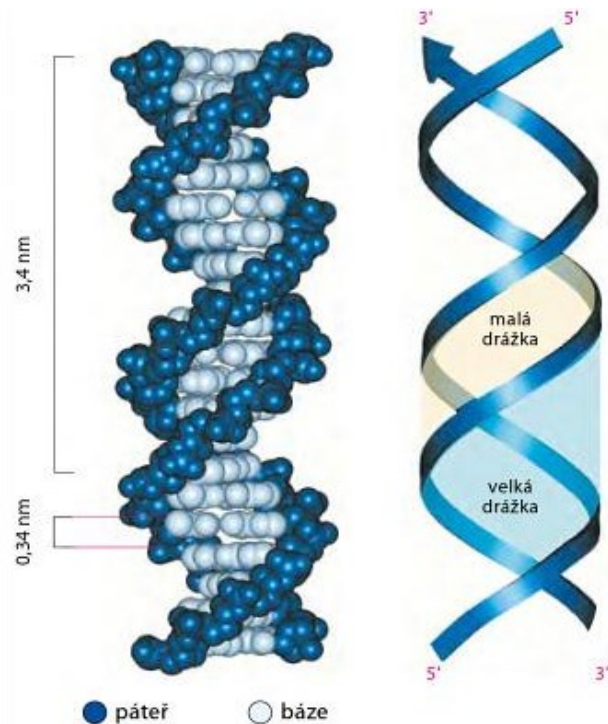
2.1.2.1 Ribonukleová kyselina

Ribonukleové kyseliny (RNA) jsou polymery nukleosidfosfátů, propojených fosfodiesterovými vazbami, které se podílejí na genové expresi a biosyntéze bílkovin. Molekuly RNA mohou být jednovláknové nebo dvouvláknové. Ribonukleové kyseliny se dělí na tři typy, které se liší velikostí, funkcí a strukturou molekul. Nejčastěji vyskytujícím se typem buněčné RNA je ribozomová RNA (rRNA), která je základním stavebním materiálem buněčných organel ribozomů a představuje až 80 % RNA v buňce [6]. Transferová RNA (tRNA) tvoří asi 10 – 15 % celkové buněčné RNA a uplatňuje se při translaci, při spojování proteinů s nukleovými kyselinami. Funkce tRNA spočívá v přenosu aminokyselin z cytoplazmy na ribozomy. Pro každou kódovanou aminokyselinu existuje nejméně jedna specifická tRNA. Posledním typem je mediátorová RNA (messenger RNA), která přenáší genetickou informaci z jádra do cytoplazmy a tvoří 5 – 10 % RNA buňky. Životnost mRNA je krátká, protože po translaci je hydrolyzována. Všechny typy RNA se tvoří při transkripci v buněčných jádrech [5, 6].

2.1.2.2 Deoxyribonukleová kyselina

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je tvořena kombinací deoxyribonukleotidů a je nositelkou genetické informace. Struktura DNA byla objasněná v roce 1953 Watsonem a Crickem, kteří vytvořili model struktury molekuly DNA. Molekulu DNA tvoří dva polydeoxyribonukleotidové řetězce, které jsou svinuté do pravotočivých šroubovic kolem pomyslné osy. Dvoušroubovice DNA vzniká díky vodíkovým vazbám mezi komplementárními bázemi [6]. Páry bází, které jsou orientovány směrem dovnitř, jsou od sebe rozmístěny ve vzdálenosti 0,34 nm. Na jednu otáčku dvoušroubovice připadá 10,5 párů bází, které tvoří úsek o délce 3,4 nm. Molekula dvoušroubovice DNA obsahuje dva typy žlábků, které se liší svojí šířkou, hloubkou a jsou důležité při interakci DNA s proteiny [7]. Struktura dvoušroubovice DNA je znázorněna na Obrázku 3 [5]. Forma stáčení vláken do dvoušroubovice není vždy stejná. Jsou známy různé formy konformace DNA, a to A-DNA a B-DNA, které jsou pravotočivé a levotočivá Z-DNA [6].

Při vysokých teplotách, změně pH, vlivem organických rozpouštědel či tenzidů dochází k denaturaci DNA. Jedná se o oddělení dvou komplementárních vláken za vytvoření neuspořádané struktury. Opačným dějem denaturace je renaturace, kdy dochází opět k obnovení dvoušroubovice [6].



Obrázek 3: Struktura DNA

2.1.3 Plazmidová DNA

Bakterie obsahují v buňce kromě chromozomální DNA ještě extrachromozomální DNA - plazmidy. Plazmidová DNA má mnohem nižší molekulovou hmotnost, tvoří uzavřené struktury, přičemž oba konce řetězce DNA jsou kovalentně vázané. Po chemické stránce se plazmidová DNA stavbou neliší od chromozomální DNA. Plazmidová DNA se vyskytuje v několika formách - nadšroubovicová, kovalentně uzavřená kružnice (ccc – covalently closed circular), otevřená kružnice (oc – open circular) a lineární [4]. Přirozenou formou plazmidové DNA je kovalentně uzavřená kružnice. Počet kopií určitého plazmidu v bakteriální buňce je nepřímo úměrný jeho molekulové hmotnosti. Nejčastěji je to 1 až 100, ale může se dosáhnout až několik set. Molekuly plazmidové DNA mohou být stejného, ale i různého druhu. Plazmidová DNA je pro buňku postradatelná ale její přítomnost jí může přinášet výhody. Plazmidová DNA může obsahovat geny s rezistencí proti antibiotikům, těžkým kovům, toxickým látkám apod. Její využití v genovém inženýrství spočívá hlavně ve vlastnosti replikovat se nezávisle na chromozomální DNA. Molekuly plazmidové DNA představují samotné replikony [8, 9].

Pro klinické účely je nejvhodnější kovalentně uzavřená kružnice (ccc) plazmidové DNA. Umělé připravené plazmidy jsou široce používány jako vektory při molekulárním klonování [10].

2.2 Nukleové kyseliny jako terapeutické agens

Řada onemocnění, která jsou výsledkem nadprodukce normálního proteinu, může být léčena za použití nukleotidových sekvencí, které se vážou na specifické mRNA a zabraňují

translaci. Nukleotidové sekvence se pevně vážou k široké škále molekul, včetně proteinů, léků nebo k malé dvouřetězcové molekule RNA a vytvářejí organizovanou sekundární a terciární strukturu. Tyto techniky mohou být také použity ke zmírnění nebo k prevenci onemocnění způsobené patogenními viry a jinými patogenními organismy [11]

Největší překážkou vývoje terapeutických agens na bázi nukleových kyselin jsou obtíže při doručení těchto agens do cílových tkání. Další možnosti pro dodání agens na bázi nukleových kyselin umožňuje intravenózní injekce, kationické liposomy, fyzikální metody, např.: elektroporace, sonoporace nebo konjugace nukleové kyseliny na jiné molekuly, jako jsou např.: lipidové molekuly, cholesterol, kolagen, fragment protilátky nebo aptamer [11].

2.3 Genová terapie

Genová terapie je nová technika pro léčbu mnoha závažných, nevléčitelných nemocí, jako je rakovina a genetické poruchy. Základním principem je náhrada mutantní alely normálními funkčními geny. To lze docílit vložením funkčního genu, který hraje roli léčiva, do cílené buňky nebo opravením dysfunkce způsobené genetickým defektem. Byly vyvinuty virové a nevirové nosiče pro dodávku terapeutických genů. Vektorem v genové terapii se rozumí molekula DNA, do které může být začleněna určitá sekvence (např. gen), jež je následně vnesena do buňky. Zde je pak vnesena sekvence uchovávána, replikována a exprimována. Virové vektory využívají schopnosti efektivního přenosu do cílové buňky a chrání DNA před degradací. Bylo ale zjištěno, že nejsou zcela bezpečné. Nevirový přenos genů do systému zahrnuje např. vstříkování čisté DNA, bombardování cílové tkáně s částicemi obalenými DNA a buněčné vychytávání DNA, která je uzavřena uvnitř lipidového obalu. Hlavními nedostatky současné genové terapie vektorových vektorů jsou schopnost navodit tvorbu protilátek tzv. imunogenita a neefektivní přenos genů [1, 11, 12, 13].

Genovou terapii je možné rozdělit do dvou hlavních kategorií, podle charakteru cílové buňky.

Somatická genová terapie

Napravená genetická vada se přenesou do somatických či tělních buněk pacienta, tedy všech buněk kromě pohlavních buněk. Změna se projeví pouze u jednoho jedince a nemůže být zděděna [14, 15].

Zárodečná genová terapie

Funkční gen je vložen do zárodečných buněk (spermie, vajíčka). Změna se projeví i u všech potomků léčeného jedince. V současné době je z etických důvodů zakázáno provádět tento způsob léčby [14, 15].

Genovou terapii lze provádět pouze tehdy, není-li možná prevence a léčba standardními postupy. Výzkum se zaměřuje na závažné dědičné choroby a vady, kde je znám příslušný gen a příslušná mutace. Experimentální léčbu je možné provádět po jejím úspěšném otestování, schválení k použití, a po souhlasu pacienta nebo jeho zákonného zástupce. Genová terapie je nástavba proteinové terapie, při které vznikaly určité nedostatky. Mezi přednosti

genové terapie oproti proteinové terapii patří delší efekt ustálené produkce bílkoviny a exprese transgenu [12, 16].

2.4 Použití pevných magnetických nanometrových vektorů v léčbě nádorů

Nosič musí chránit genovou informaci (DNA), aby nedošlo k jejímu poškození, a nesmí reagovat s krevními buňkami. Nosič musí být dostatečně malý, aby pronikl do buňky a dosáhl jádra. V současné době s rozvojem nanobiotechnologií se staly aplikace magnetických a zlatých nanočástic v oblasti biomedicíny jedním z cílů výzkumu. Umožňují mimořádně vysokou účinnost transfekce do cílových buněk. Aplikace magnetických nanočástic v genové transfekci je interdisciplinární oblast výzkumu. Vývoj a vědecký výzkum je zaměřen na magnetické nanočástice a na neviróvu genovou transfekci. Transfekci magnetických nanočástic může urychlit sedimentace magnetických částic na povrchu buňky prostřednictvím aplikace vnějšího magnetického pole. Studie ukazují, že při magnetické transfekci nemůže magnetického pole přímo vtáhnout magnetické částice do buněk nebo změnit mechanismus fagocytózy genových komplexů. Magnetické pole zvyšuje sedimentaci DNA (genetických materiálů) na povrchu buňky. Proto je značně podporována fagocytóza genových komplexů a tudíž se zvýší účinek genové transfekce. Byly připraveny nanočástice nesoucí anti-lidský β -glukan choriový gonadotropin tetraoxidu železitého. Komplex se spojí s glyceraldehyd-3-fosfátem pomocí nukleotidového řetězce nesoucí fluorescein na 5' konci oligonukleotidu. V pokusech *in vivo* bylo u myši zjištěno, že pod vlivem anti-lidského β -glukan choriového gonadotropinu, se můžou modifikované magnetické nanočástice pohybovat k cíli nádoru. Experimenty ukázaly, že magnetická transfekce má své výhody, jako je nízká toxicita, vysoká účinnost a široká škála aplikací. Rekombinantní plazmidové DNA nebo uměle syntetizované malé interferující RNA mohou být účinně transfekovány do buněk. Výhodou je možnost shromáždit větší množství DNA na povrchu cílových buněk, což umožňuje optimální výběr lokální aplikace *in vivo* v cílené genové terapii [12, 14].

2.5 Izolace a purifikace plazmidové DNA

Vývoj genové terapie a plazmidových DNA vakcín zvyšuje potřebu dokonale čisté plazmidové DNA. Izolace plazmidové DNA se provádí metodou alkalické lýze. Tato metoda je založena na skutečnosti, že v alkalickém prostředí se sráží chromozomální DNA, která je centrifugací odstraněna. Molekuly plazmidové DNA, které jsou menší, zůstanou v roztoku. Po neutralizaci se rozvolněná plazmidová DNA renaturuje [17]. Izolovaná plazmidová DNA je kontaminována proteiny, RNA, solemi nebo různými fragmenty degradované DNA. K purifikaci plazmidové DNA se používají různé postupy, které se liší jak výslednou čistotou, tak samotným výtěžkem. Důležitou roli hrají i náklady.

2.5.1 Separace nukleových kyselin pomocí dvoufázových vodných systémů

Významnou separační metodou biomakromolekul je extrakce. Jedná se o velmi dobře propracovanou a v chemickém a farmaceutickém průmyslu využívanou metodu. Extrakce je založena na principu rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze – organickou a vodnou.

Klasická extrakce však není vhodná k izolaci hydrofilních biomakromolekul (proteinů, nukleových kyselin). Uvedené látky nejsou v organické fázi rozpustné a při styku s ní dochází ke ztrátě jejich biologické aktivity (denaturaci).

Vhodnými systémy pro extrakci biomakromolekul jsou dvoufázové vodné systémy, které lze připravit přidáním polymeru do vodného roztoku vhodné soli. Zvolením vhodných koncentrací se vytvoří dvě nemísitelné fáze, z nichž vodná fáze je příznivá pro biologicky aktivní makromolekuly. Nukleové kyseliny, jakožto hydrofilní látky, přecházejí častěji do dolní fáze, zatímco proteiny, které obsahují polární i nepolární skupiny, extrahují jak do horní PEG fáze, tak do dolní hydrofilní fáze [18].

Nejčastěji používanými a prozkoumanými dvoufázovými systémy jsou systémy tvořené polyethylenglykolem (PEG) a dextranem a různé kombinace polyethylenglykolu se síranem amonným, dihydrogenfosforečnanem draselným nebo citrátem sodným [19, 20]. Systém s PEG a citrátem sodným v porovnání s PEG a síranem amonným vykazuje větší výtěžky, zatímco dvoufázový systém s PEG a síranem amonným poskytuje vyšší čistotu plazmidové DNA, což je pro tuto metodu žádoucí. Pro zvýšení čistoty plazmidové DNA a minimalizaci ředění se používá vícestupňová extrakce, spočívající v opakované extrakci spodní fáze obsahující plazmidovou DNA novou horní fází [21]. Tento postup společně se zvětšujícím se poměrem objemů fází může být úspěšně použit při purifikaci plazmidové DNA, přičemž se minimalizuje její zředění. Úspěch této metody je závislý na množství spodní fáze, která je přenášena z prvního do druhého systému. Zvolení správné koncentrace a typu soli je rozhodující pro úspěšné oddělení plazmidové DNA a RNA. Výtěžnost purifikace plazmidové DNA je až 100% bez přítomnosti RNA jen s malým množstvím kontaminujících bílkovin [19]. Pro příznivou separaci hraje důležitou roli molekulová hmotnost použitého polymeru, pH a koncentrace jednotlivých složek směsi [18]. Tato metoda purifikace je vysoce efektivní a výhodná jak z ekonomického hlediska, tak možností jejího použití ve velkém měřítku. Dále není nutné používat toxických ani škodlivých chemikálií a manipulace při této metodě je vcelku jednoduchá [19, 20].

2.5.2 Srážení plazmidové DNA

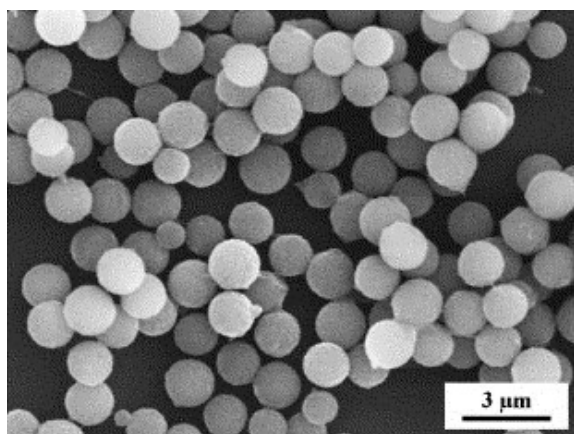
Za účelem odstranění RNA z plazmidové DNA a dalších nežádoucích doprovodných látek (např. chromozomální DNA, proteinů a endotoxinů), se používají roztoky solí. Mezi nejlepší srážecí činidla patří chlorid vápenatý, který poskytuje vysoké odstranění RNA za velmi krátkou dobu. Touto metodou se získá čistá plazmidová DNA pro farmaceutické účely, přičemž není potřeba žádného speciálního vybavení [22]. Velmi efektivní, rychlou a pohodlnou metodou pro srážení RNA je použití chloridu lithného, který sráží RNA již v malých koncentracích. Plazmidová DNA po srážení LiCl už nevyžaduje další purifikace pro použití v genových technologiích. Další výhodou je skutečnost, že srážením chloridem lithným se účinně odstraňují nukleosid trifosfáty (NTP), což umožňuje přesnější kvantifikaci v UV spektrofotometrii. Hlavními aspekty při volbě této metody je zvolení účinné koncentrace LiCl, vhodná doba pro srážení a centrifugaci. Dalšími účinnými látkami pro srážení plazmidové DNA jsou ethanol a isopropanol [23].

2.5.3 Využití magnetických nosičů při izolaci DNA

K izolaci DNA z bakteriálních buněk byly použity různé magnetické částice. DNA lze izolovat přímo z lyzátů buněk bez použití fenolové extrakce [24]. Na Obrázku 4 jsou zobrazeny magnetické částice P(HEMA-*co*-EDMA), které byly připraveny kopolymerizací monomerů 2-hydroxyethyl methakrylátu (HEMA) a ethylen dimethakrylátu (EDMA) [25]. Základem magnetických nosičů je magnetické jádro, které tvoří různé magnetické materiály, jejichž průměr je menší než 30 nm [26]. Nejčastěji tvoří magnetické jádro oxidy železa - magnetit Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) a maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Aby došlo k navázání biologicky aktivních látek na nosič, pokrývá se povrch jader biokompatibilními polymery. Může se jednat jak o přírodní - polyethylenimin, kyselinu laurovou, kyselinu alginovou, oxid křemičitý, tak o syntetické látky – polystyren (PS), polyethylenglykol (PEG) [24, 27]. Jedná se o vysoce hydrofilní a biokompatibilní hydrogel s dobrou chemickou stabilitou a nízkou nespecifickou adsorpcí proteinů. Tento hydrogel nasává velké množství vody a jeho hydroxylové skupiny mohou být snadno modifikovány [24]. Magnetické částice používané při purifikaci DNA mají superparamagnetické vlastnosti, tzn., že vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Obvykle nemají žádný zbytkový magnetismus, a tedy bez přítomnosti vnějšího magnetického pole se částice neshlukují. Magnetické částice se ze vzorku odstraňují pomocí magnetického separátoru.

Tato technika má značné výhody, mezi které patří např.: rychlost, snadná a nenáročná manipulace, není zapotřebí používání filtrace ani centrifugace. Při této metodě se nepracuje s organickými rozpouštědly, tudíž další výhodou je nízká toxicita, možná analýza ve větším měřítku či výhoda automatizace [26].

Magnetické částice P(HEMA-*co*-EDMA) s imobilizovanou RNázou A (která degraduje přítomnou bakteriální RNA) byly použity rovněž k purifikaci plazmidové DNA. [28].



Obrázek 4: Elektronový mikrosnímek magnetických částic P(HEMA-*co*-EDMA)

2.5.4 Chromatografické metody purifikace

Chromatografie patří mezi nejlepší metodu purifikace plazmidové DNA. Její využití je při analýze nebo při preparativních účelech. Při chromatografické purifikaci mimo čištění od hlavních kontaminantů, dochází k oddělení požadované supercoiled (sc) plazmidové DNA od

ostatních topoizomerů, vzniklých degradací tohoto topoizomeru, jako jsou lineární a otevřená cirkulární forma plazmidové DNA [29, 30]. Základní princip všech chromatografických technik spočívá v nestejném rozdělování složek směsi mezi stacionární a mobilní fází. Výsledkem je rozdílná rychlost migrace rozpuštěných látek [18]. Nejčastěji používané chromatografické techniky při purifikaci plazmidové DNA jsou: gelová, iontoměničová a afinitní chromatografie, chromatografie založená na hydrofobních interakcích či chromatografie s obrácenými fázemi [30].

2.6 Detekce nukleových kyselin

K detekci nukleových kyselin se nejčastěji používá agarózová gelová elektroforéza a UV spektrofotometrie.

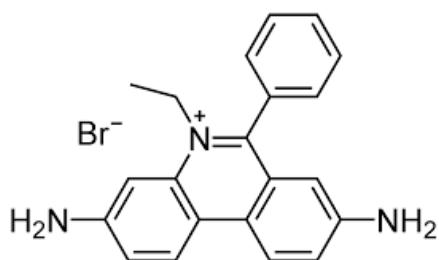
2.6.1 Elektroforéza

Agaróza je polysacharid, který se získává izolací z mořských řas. Za zvýšené teploty je rozpustný ve vodě. Agar tuhne při teplotě 45 – 48 °C [31]. Vzniklý hustý koloidní roztok se nalévá do ploché formy, kde po vychladnutí vytvoří vhodný gel pro elektroforézu. Elektroforéza v agarózovém gelu se používá k identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA. Jedná se o separační metodu, která je založená na migraci iontů a nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli. Náboj DNA v neutrálním roztoku je negativní, protože nukleové kyseliny obsahují záporně nabitě fosfátové skupiny. DNA se v elektrickém poli pohybuje od katody k anodě. Rychlost migrace je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a nepřímo úměrná logaritmu délky řetězce, proto krátké řetězce gelem migrují rychleji, než dlouhé řetězce. Při dělení se kromě elektrostatických sil uplatňuje i síťový efekt, takže se rozdělí i fragmenty se stejným efektivním nábojem, ale s rozdílnou délkou resp. molekulovou hmotností [7, 32, 33]

Jednoduchost a reprodukovatelnost patří mezi hlavní výhody gelové elektroforézy. Touto metodou je možné detegovat až 1 ng DNA. Koncentrace gelu ovlivňuje dělení fragmentů v různých rozmezech molekulových hmotností. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin od velikosti několika set bp až po zhruba 50 kb [7, 32, 33]

2.6.1.1 Vizualizace gelu

Po skončení elektroforézy je nutné identifikovat polohy rozdělených molekul, které jsou bezbarvé ve viditelném záření. Rozdělené fragmenty se vizualizují fluorescenčními barvivy, která se vážou na molekulu DNA. Nejčastěji používaným barvivem je ethidiumbromid, jehož strukturní vzorec je na Obrázku 5. Ethidiumbromid se vmezeřuje (interkaluje) mezi sousední páry bází v DNA a vytváří komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA po obarvení jsou na gelu viditelné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA [33, 34].



Obrázek 5: Strukturální vzorec ethidiumbromidu

2.6.2 Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin

Jednou z nejčastěji používaných a nejjednodušších technik pro stanovení čistoty a koncentrace nukleových kyselin je spektrofotometrické stanovení v ultrafialové (UV) oblasti spektra. Heterocykly bází nukleových kyselin jsou zodpovědné za absorpci UV záření s maximem v okolí vlnové délky 260 nm [35].

Koncentraci nukleových kyselin lze vypočítat podle empirických vztahů, kdy u nativní (dvouřetězcové) DNA $A_{260\text{nm}} = 1,0$ odpovídá koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota je závislá na chemickém složení (zastoupení AT a GC párů bází) analyzované DNA. U denaturované (jednořetězcové) DNA je absorbance asi o 40 % vyšší než dvouřetězcové molekuly ($c = 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a RNA, která absorbuje ve stejném rozsahu vlnových délek $A_{260\text{nm}} = 1,0$ odpovídá koncentraci $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [17].

Stupeň čistoty nukleových kyselin je možné stanovit z poměru absorbance při 260 a 280 nm. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ udává míru kontaminace izolované nukleové kyseliny proteiny a RNA. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ udává míru znečištění nukleové kyseliny nízkomolekulárními látkami (fenol, EDTA) [7, 17].

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo vypracování literárního přehledu týkajícího se metod izolace a purifikace nukleových kyselin (se zaměřením na různé formy DNA).

Cílem praktické části práce byla izolace plazmidové DNA metodou alkalické lýze a purifikace izolovaných vzorků plazmidové DNA s využitím dvoufázových vodných systémů, odstranění RNA srážením chloridem lithným a štěpení RNA enzymem RNázou A.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Bakteriální kultury

K izolaci plazmidové DNA byl použitý kmen *Escherichia coli* JM 109 (pUC19). Jako kontrola byl použit kmen *Escherichia coli* JM 109. Kultury narostlé v LB mediu byly získány od doc. RNDr. Aleny Španové, CSc. (VUT v Brně, Fakulta chemická).

4.2 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidiumbromid (EtBr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Hydrogen fosforečnan draselný (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid lithný (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (H_3BO_3) (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (PENTA, Praha, ČR)
- Kyselina octová (PENTA, Praha, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan draselný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Síran amonný (Lachema, Brno, ČR)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Amresco, Solon, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl) (Amresco, Solon, USA)
- Magnetické mikročástice P(HEMA-co-EDMA) s imobilizovanou RNázou A byly připraveny Ing. Danielem Horákem, CSc. z Makromolekulárního ústavu AV ČR v.v.i. v Praze.

Ostatní chemikálie byly čistoty p.a. a pocházely z běžných komerčních zdrojů.

4.3 Roztoky

Všechny roztoky pro lýzi buněk, izolaci plazmidové DNA a její purifikaci byly připraveny podle návodů k laboratorním cvičením Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie s drobnými změnami [17].

4.3.1 Média pro kultivaci buněk

- LB agar – k 1 l LB média bylo přidáno 12 g agaru a byla provedena sterilizace při 121 °C po dobu 20 minut. Připravený LB agar byl podle potřeby rozvařen v mikrovlnné troubě a rozlit do Petriho misek.
- Ampicilin (100 mg/ml)

4.3.2 Roztoky pro lýzu bakteriálních buněk a izolaci plazmidové DNA

- GLC roztok s lysozymem – 25 µl 1 M glukózy, 10 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 12,5 µl 1M Tris-HCl (pH 8,0) byl doplněn 425,5 µl destilované vody; těsně před použitím byl k roztoku přidán lysozym tak, aby výsledná koncentrace byla 0,2 mg·ml⁻¹.
- 0,5 M EDTA (pH 8,0) – 186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za stálého míchání na magnetické míchače. Pomocí NaOH bylo upraveno pH na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou vodou, rozdělen do alikvotních podílů a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C
- 1M Tris-HCl (pH 7,8) – 12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.
- LYZ roztok – 50 µl 2 M NaOH a 50 µl 10% SDS bylo doplněno 400 µl sterilní destilované vody.
- Roztok SDS (10 %) – 10 g SDS bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody při teplotě 68 °C. Pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na 7,0. Roztok byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou. Sterilizace roztoku nebyla nutná.
- HS roztok – 60 ml 5 M octanu sodného bylo doplněno 40 ml kyseliny octové (p.a.) na výsledné pH 4,8. Roztok byl sterilizován po dobu 20 minut.
- TE pufr – roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5M EDTA (pH 8,0). Byl smíchán 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody.

4.3.3 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu a vizualizaci DNA

- Agarózový gel (1%) – 0,7 g agarózy bylo rozvařeno v 70 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru

- TE pufr – 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) a 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) bylo doplněno sterilní destilovanou vodou do 100 ml.
- 0,5x TBE pufr – 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl TBE pufr 10x zředěn na výslednou koncentraci.
- Nanášecí pufr Yellow load (6x koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR) – roztok byl před použitím smíchán se vzorkem plazmidové DNA v poměru 1:5.
- Barvicí lázeň – 100 μ l roztoku ethidiumbromidu (2,5 mg·ml⁻¹) bylo zředěno 500 ml destilované vody.

4.3.4 Roztoky pro purifikaci plazmidové DNA

- 40% PEG 6000 – navážka 40 g PEG 6000 byla rozpuštěna v 60 ml sterilní destilované vody. Roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou do 100 ml. Roztok byl uchováván při 4 °C.
- K₂HPO₄ (26,41%) – navážka 13,205 g K₂HPO₄ byla rozpuštěna v 30 ml sterilní destilované vody. Roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou do 50 ml.
- (NH₄)₂SO₄ (20%) – navážka 10 g (NH₄)₂SO₄ byla rozpuštěna v 50 ml odměrné baňce ve 30 ml sterilní destilované vody a roztok byl doplněn po značku.

4.4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Centrifuga MINI Spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet Int., New Jersey, USA)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor DynaMag (Invitrogen, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 μ l (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, ČR)
- NanoPhotometer (Implen, Mnichov, Německo)
- Termostat BT 120 (Praha, ČR)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Třepačka MS2 Minishaker (IKA, Německo)

- Zařízení pro elektroforézu Easy – Cast, model B1 a B3 (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet Int., Woodbridge, USA)
- Běžné laboratorní sklo, plastové nádobí a pomůcky

4.5 Metody

Jednotlivé postupy byly provedeny podle návodů k laboratorním cvičením Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie s drobnými změnami [17].

4.5.1 Kultivace bakteriálních buněk *E. coli* JM 109, *E. coli* JM 109 (pUC19) a ověření přítomnosti plazmidů v buňkách

Za účelem ověření přítomnosti plazmidu v buňkách byly připravené dvě kultury buněk: *E. coli* JM 109 bez plazmidu a *E. coli* JM 109 (pUC19) nesoucí plazmid pUC19. Kultury byly kultivovány pomocí submerzní kultivace ve dvou sériích po dvou baňkách s tekutým LB médiem. V každé baňce se nacházelo 10 ml LB média. Do dvou baňek bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku ampicilinu; výsledná koncentrace ampicilinu v médiu byla 50 μ l·ml⁻¹. Obě kultury *E. coli* JM 109 byly očkovány v objemu 0,1 ml tak, že každá kultura byla očkována do tekutého LB média s obsahem antibiotik a tekutého LB média bez obsahu antibiotik. Všechny kultury byly ponechané na kultivaci v termostatu při 37 °C do druhého dne.

4.5.2 Kontrola čistoty bakteriální kultury

4.5.2.1 Křížový roztěr

Vyžíhanou očkovací kličkou byla asepticky odebrána malá množství kultury buněk narostlých v LB médiu: *E. coli* JM 109 bez plazmidu a *E. coli* JM 109 (pUC19) nesoucí plazmid pUC19. Každá kultura byla naočkována křížovým roztěrem na misky s LB agarem a ampicilinem a na misky s LB agarem bez ampicilinu. Bylo nadzvednuto víčko Petriho misky s LB agarem a ampicilinem a udělány kličkou 3 - 4 vodorovné čáry po povrchu agaru. Klička byla vyžíhána a byly provedeny další 3 - 4 tahy kolmo přes první čáry. Klička byla opět vyžíhána a byly udělány další čáry. Klička byla vyžíhána potřetí a přes poslední nanesené čáry byla udělána vlnovka. Mezi jednotlivými kroky roztěru bylo přiklopeno víčko misky. Stejným způsobem byl proveden křížový roztěr na Petriho misku s pevným LB agarem bez ampicilinu. Inkubace probíhala v termostatu při 37 °C po dobu 30 hodin.

4.5.3 Izolace plazmidové DNA (alkalická lyze)

Plazmidová DNA byla izolována ve dvanácti opakováních z tekuté bakteriální kultury, která byla kultivována v LB médiu. Po 1,5 ml bakteriální kultury *E. coli* JM 109 (pUC19) bylo pipetovaných do šesti Eppendorfových zkumavek a centrifugovaných po dobu 1 minuty při 14 500 ot/min. Jedním převrácením zkumavky byl odlit oddělený supernatant.

K sedimentu bylo přidáno 100 μ l roztoku GLC s lysozymem. Směs byla roztřepána a ponechána na inkubaci po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo ke směsi přidáno 150 μ l roztoku LYZ s obsahem NaOH, promícháno a ponecháno na inkubaci v ledové lázni po dobu přesně 5 minut při teplotě 0 °C. Po uplynutí 5 minut bylo do každé zkumavky přidáno 150 μ l roztoku HS, roztoky byly 5x promíchány převrácením a ponechány na inkubaci 15 minut při 0 °C. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 14 500 ot/min. Oddělený sediment obsahovat vysráženou chromozomální DNA a zbytky lyzovaných buněk. Dále se pracovalo se supernatantem, který obsahoval plazmidovou DNA. Supernatant byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek. Ke každému vzorku bylo přidáno 900 μ l ethanolu, směs byla promíchána a ponechána na inkubaci po dobu 15 minut při teplotě -20 °C, přičemž došlo k vysrážení plazmidové DNA. Vzorky byly následně centrifugované po dobu 5 minut při 14 500 ot/min a tím došlo k oddělení vysrážené plazmidové DNA a supernatantu. Supernatant byl šetrně jedním převrácením zkumavky vylit, zbytky roztoku byly vysušeny buničinou a zkumavky se sedimentem byly vysušeny v exikátoru po dobu 15 minut. Vysušené vzorky byly rozpuštěny v 50 μ l TE pufru a všechny vzorky izolované plazmidové DNA byly slité do jedné Eppendorfovy zkumavky.

4.5.4 Gelová elektroforéza plazmidové DNA

Byl připraven 1 % agarózový gel (0,33 g agarózy v 33 ml 0,5x TBE pufru). Suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě a byla ochlazená na teplotu asi 60 °C. Suspenze byla nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a ponechána 0,5 – 1 hodinu tuhnout. Před nanášením vzorků na gel byl opatrně vyjmut hřebínek. Na podložce (parafilmu) byly připraveny 3 vzorky o různých koncentracích izolované plazmidové DNA. Byl smíchán 1 μ l plazmidové DNA, 14 μ l sterilní vody a 3 μ l nanášecího pufru. Druhý vzorek obsahoval 3 μ l plazmidové DNA, 12 μ l sterilní vody a 3 μ l nanášecího pufru a třetí vzorek obsahoval 5 μ l plazmidové DNA, 10 μ l sterilní vody a 3 μ l nanášecího pufru. Poté byly směsi nanášeny do komůrek gelu. Gel byl vložen do elektroforetické vaničky v takové orientaci, aby záporně nabitá DNA migrovala k anodě. Vanička s gelem byla opatrně převrstvena 0,5x TBE pufrům do výšky 2-3 mm nad gel a byl zapnut zdroj gelové elektroforézy (60 V – 1 hod). Separace byla ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru doputovala do 2/3 délky agarózového gelu. Po skončení elektroforézy byl gel obarven ethidium bromidem (0,5 μ g·ml⁻¹) po dobu 0,5 - 1 hod. Gel byl opláchnut v destilované vodě, umístěn na transiluminátor a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305$ nm. Byla provedena fotografická dokumentace pomocí digitálního fotoaparátu.

4.5.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

Koncentrace izolované plazmidové DNA byla měřena spektrofotometricky přístrojem NanoPhotometer pomocí speciálních kyvet Laber Gard. V závislosti na očekávané koncentraci DNA bylo vybráno víčko (lid) s odpovídajícími parametry pro NanoPhotometer, jak je uvedeno v Tabulce 1. Před samotným měřením byly vzorky DNA vytemperovány na laboratorní teplotu a pečlivě promíchány. Jako referenční vzorek byl používán TE pufr. Byla měřena absorbance v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm. Z displeje přístroje byly odečteny hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230, 260, 280 a 320 nm a jejich poměry

$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ a $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$. Koncentrace DNA byla stanovena dle hodnoty absorbance při vlnové délce 260 nm [36].

Tabulka 1: Parametry pro NanoPhotometer

Víčko	Lid 10	Lid 50
Optická dráha (nm)	1	0,2
Objem vzorku (μl)	3 – 5	0,7 – 4
Měřitelný rozsah DNA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	15 – 700	250 – 4000

4.5.6 Separace nukleových kyselin v dvoufázovém vodném systému

Složení použitých směsí dvoufázových vodných systémů je uvedeno v Tabulce 2. Dle Tabulky 3 byly připraveny směsi do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky. Vzorky byly promíchány a ponechány v temně při laboratorní teplotě do druhého dne. Byla odebrána horní vrstva 15 μl a spodní vrstva 15 μl . Byla změřena koncentrace a provedena elektroforéza.

Tabulka 2: Dvoufázové systémy

a	PEG 6000 (40%)
b₁	K_2HPO_4 (26,41%)
b₂	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20%)
c	plazmidová DNA

Tabulka 3: Složení dvoufázových systémů

	a (μl)	b₁, b₂ (μl)	c (μl)
1	60	20	20
2	50	30	20
3	40	40	20
4	30	50	20
5	20	60	20
6	10	70	20

4.5.7 Elektroforéza plazmidové DNA pUC 19 na agarózovém gelu

Podle kapitoly 4.5.4 byl připraven agarózový gel. Na podložce bylo připraveno 12 vzorků odebraných z horní vrstvy dvoufázového systému. 6 vzorků o různých koncentracích purifikované plazmidové DNA bylo s K_2HPO_4 a 6 vzorků s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Dalších 12 vzorků bylo odebraných ze spodní vrstvy dvoufázového systému s K_2HPO_4 a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o různých koncentracích purifikované plazmidové DNA. Všech 24 vzorků bylo připraveno smícháním vždy 10 μl purifikované plazmidové DNA se 2 μl nanášecího pufru. Dále bylo pokračováno dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4.

4.5.8 Srážení RNA chloridem lithným

Pomocí této metody se sráží ribosomální rRNA a mediátorová mRNA. Malé molekuly transferové tRNA a ribosomální 5SRNA zůstávají v roztoku.

K 50 μ l plazmidové DNA bylo přidáno 100 μ l TE pufru a 50 μ l 10 M LiCl (konečná koncentrace LiCl byla 2,5 M). Směs byla promíchána a inkubována na ledě po dobu 30 minut při 0 °C. Následně byla směs centrifugována 10 minut při 14 000 ot/min. a oddělený supernatant obsahující plazmidovou DNA byl odebrán do čisté Eppendorfovy zkumavky. Plazmidová DNA v supernatantu byla vysrážena 500 μ l 96% ethanolu (2,5 násobek odebraného supernatantu o objemu 200 μ l), směs byla inkubována po dobu 15 minut při teplotě -20 °C. Vysrážená plazmidová DNA byla centrifugována po dobu 10 minut při 14 000ot/min. Supernatant byl důkladně slit a plazmidová DNA v podobě sedimentu byla vysušena v exikátoru do úplného vyschnutí. Získaný vysušený sediment byl rozpuštěn v 50 μ l TE pufru. Následující den byla změřena koncentrace purifikované plazmidové DNA a byla provedena elektroforéza stejným způsobem jako u plazmidové DNA bez přídavku chloridu lithného.

4.5.9 Štěpení RNA imobilizovanou RNázou A

Do pěti Eppendorfových zkumavek byl pipetován 1 μ l plazmidové DNA, 1 μ l imobilizované RNázy A a 13 μ l TE pufru. Připravené směsi byly inkubovány při 37 °C v různých časech 0, 30, 60, 120 a 180 minut. Po uplynutí doby inkubace byly zkumavky umístěny na 20 minut do magnetického separátoru a magnetický nosič s imobilizovanou RNázou A byl odseparován. V přítomnosti magnetu byl supernatant opatrně odpipetován ze zkumavky. Byla provedena agarózová gelová elektroforéza takto ošetřených vzorků a vzorku, který neobsahoval imobilizovanou RNázu A (1 μ l izolované plazmidové DNA a 14 μ l TE pufru). Na parafilmu bylo 10 μ l supernatantu smícháno se 2 μ l nanášecího pufru.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kultivace bakteriálních buněk *E. coli* JM 109, *E. coli* JM 109 (pUC19) a ověření přítomnosti plazmidů v buňkách

Bakteriální buňky *E. coli* JM 109 a *E. coli* JM 109 (pUC19) byly kultivovány v tekutém a na pevném LB médiu za účelem dokázání čistoty kultury a životaschopnosti mikroorganismů.

5.1.1 Kultivace v tekutém médiu

Bakteriální kolonie narostlé na pevném médiu byly přeočkovány do tekutého LB média (inokulace 1 %) s obsahem antibiotik a tekutého LB média bez obsahu antibiotik. Po 30 hodinách kultivace byl pozorován krémový sediment a krémový zákal. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Vyhodnocení růstu buněk v LB médiu

Kultura	LB médium (ampicilin, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	LB médium
<i>E. coli</i> JM 109	–	+
<i>E. coli</i> JM 109 (pUC19)	+	+

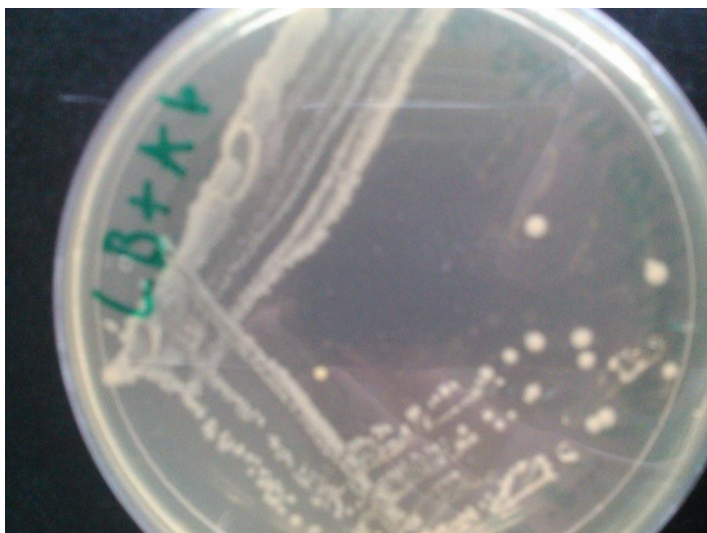
+ přítomnost zákalu,

– absence zákalu

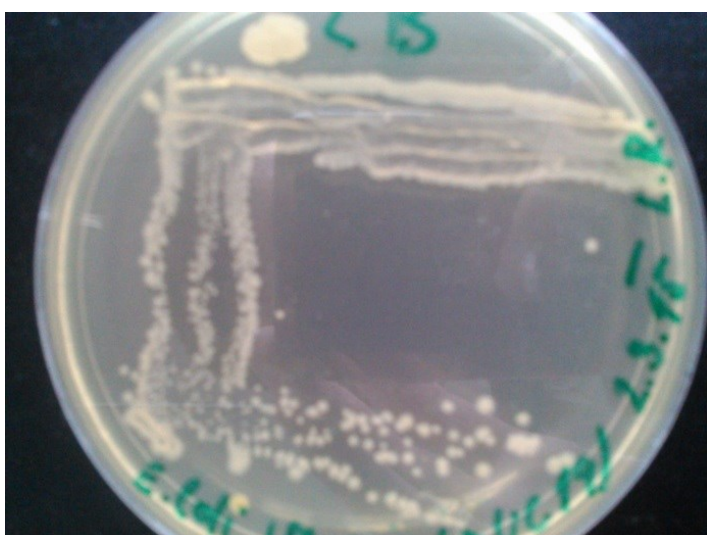
→ Na médiu s ampicilinem rostly a vytvářely zákal média buňky kultury *E. coli* JM 109 (pUC19). Buňky kultury *E. coli* JM 109 v přítomnosti ampicilinu nerostly a netvořily zákal.

5.1.2 Růst bakteriálních buněk na pevném médiu

Z buněk narostlých v tekutém médiu byl proveden křížový roztěr na pevné médium s LB agarem. Po 30 hodinách kultivace v termostatu při teplotě 37 °C hustě narostly krémově-mléčné malé kolonie okolo 0,5 mm v průměru. Kolonie narostlé z bakteriální kultury *E. coli* JM 109 (pUC19) v přítomnosti ampicilinu jsou uvedeny na Obrázku 6, kolonie narostlé z bakteriální kultury *E. coli* JM 109 (pUC19) jsou uvedeny na Obrázku 7. Vyhodnocení experimentů je uvedeno v Tabulce 5.



Obrázek 6: Kolonie bakteriální kultury *E. coli* JM 109 (pUC19) narostlé na LB agaru v přítomnosti ampicilinu



Obrázek 7: Kolonie bakteriální kultury *E. coli* JM 109 (pUC19) narostlé na LB agaru

Tabulka 5: Vyhodnocení růstu buněk na pevném agarovém médiu

Kultura	LB médium (ampicilin, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	LB agar
<i>E. coli</i> JM 109	–	+
<i>E. coli</i> JM 109 (pUC19)	+	+

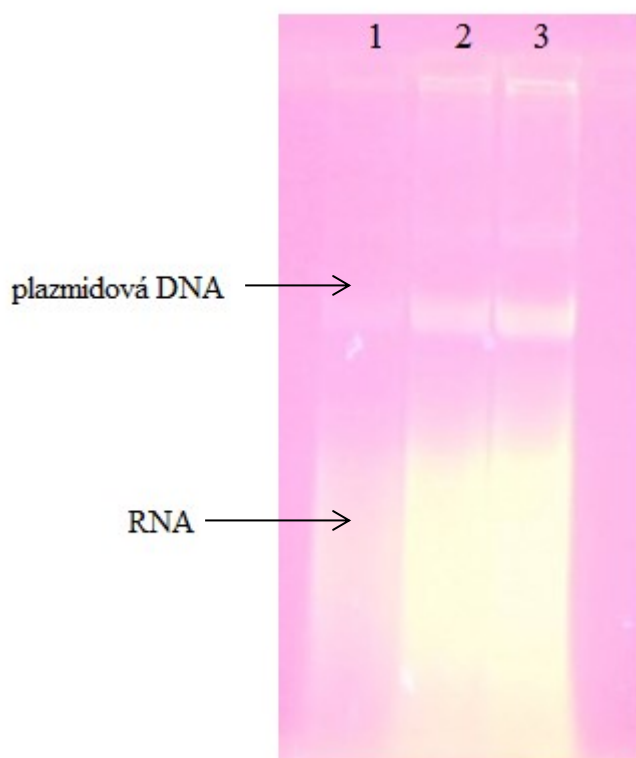
+ přítomnost zákalu,

– absence zákalu

→ Bylo ověřeno, že na pevném médiu s ampicilinem rostly kolonie buněk *E. coli* JM 109 (pUC19) na rozdíl od kolonií kmene *E. coli* JM 109.

5.2 Izolace plazmidové DNA pUC19

Plazmidová DNA byla izolována z 1,5 ml bakteriální kultury *E. coli* JM 109 (pUC19) metodou alkalické lýze ve dvanácti opakováních dle kapitoly 4.5.3. Přítomnost plazmidové DNA byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 1% agaróze (kapitola 4.5.4). Výsledky jsou uvedené na Obrázku 8.



Obrázek 8: Agarózová gelová elektroforéza plazmidové DNA pUC19

Běh	DNA	DNA (μl)	H ₂ O (μl)	Objem nanášecího pufru (μl)	Detekce plazmidové DNA
1	pUC19	1	14	3	+
2	pUC19	3	12	3	+
3	pUC19	5	10	3	+

+ DNA byla detegována

→ Izolovaná plazmidová DNA byla v různých koncentracích detegována na agarózovém gelu. Izolovaná plazmidová DNA obsahovala velké množství RNA.

5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA

Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.5. Zároveň byla zaznamenána hodnota poměru absorpance při vlnových délkách $\lambda = 260$ nm a $\lambda = 280$ nm. Výsledky spektrofotometrického stanovení jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Spektrofotometrické stanovení koncentrace plazmidové DNA

DNA	c ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	A _{260/280nm}	A _{260/230nm}
pUC19	810	0,12	0,33	0,15	0	2,15	2,82

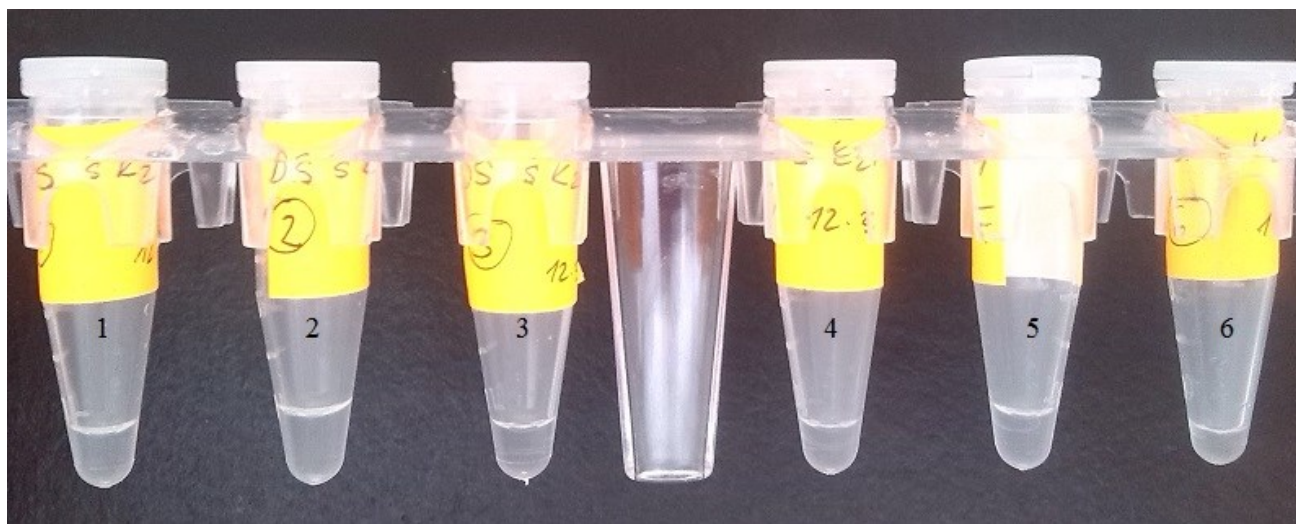
→ Izolovaná plazmidová DNA měla koncentraci $810 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Plazmidová DNA obsahovala RNA ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} > 2,0$).

5.4 Purifikace plazmidové DNA

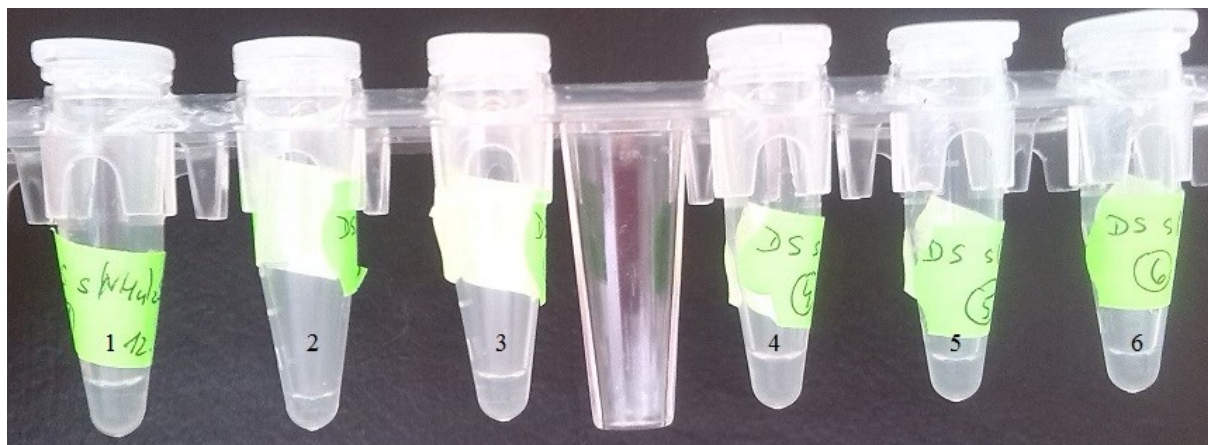
Byla ověřována purifikace izolované plazmidové DNA různými metodami. Cílem bylo odstranit ze vzorků RNA. Výsledky byly ověřeny spektrofotometricky a pomocí agarózové gelové elektroforézy.

5.4.1 Separace nukleových kyselin pomocí dvoufázových vodných systémů

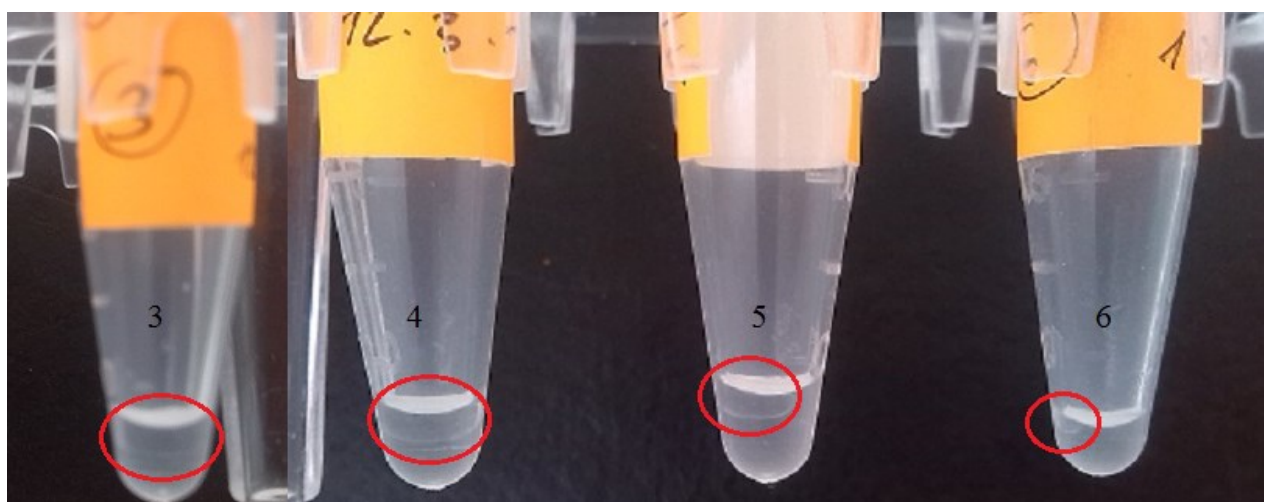
Byla provedena purifikace plazmidové DNA pomocí dvoufázových vodných systémů podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.6. Na Obrázku 9 jsou dvoufázové systémy s použitím K_2HPO_4 a na Obrázku 10 je systém s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Detail vrstev je na Obrázku 11. Číslo na Eppendorfově zkumavce je shodné s číslem dané směsi dle Tabulky 3. Spektrofotometricky byla ověřená koncentrace nukleových kyselin horních a spodních vrstev dvoufázových systémů, jak pro systémy s hydrogenem fosforečnanem draselným, tak pro systémy se síranem amonným. Výsledky spektrofotometrického stanovení jsou uvedeny v Tabulce 7 a Tabulce 8.



Obrázek 9: Dvoufázový systém s K_2HPO_4



Obrázek 10: Dvoufázový systém s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



Obrázek 11: Detail vrstev dvoufázových systémů s K_2HPO_4

Tabulka 7: Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin ve vrstvách dvoufázového systému s K_2HPO_4

vzorek	vrstva	c ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$A_{230\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$	$A_{320\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$
1	Horní	95	0,06	0,05	0,04	0,01	1,52	0,81
	Spodní	183	0,09	0,09	0,07	0,02	1,46	1,01
2	Horní	153	0,15	0,10	0,08	0,04	1,61	0,58
	Spodní	288	0,31	0,37	0,25	0,06	1,67	1,27
3	Horní	203	0,22	0,15	0,12	0,07	1,59	0,54
	Spodní	385	0,25	0,22	0,15	0,07	1,81	0,85
4	Horní	242	0,19	0,15	0,11	0,05	1,67	0,71
	Spodní	338	0,16	0,17	0,11	0,04	1,82	1,11
5	Horní	113	0,10	0,06	0,05	0,02	1,67	0,60
	Spodní	245	0,08	0,11	0,06	0,01	1,92	1,31
6	Horní	145	0,11	0,07	0,05	0,01	1,66	0,63
	Spodní	182	0,09	0,09	0,06	0,02	1,70	1,04

→ Koncentrace nukleových kyselin (plazmidové DNA) v horní vrstvě byla v rozmezí 95 až 242 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace nukleových kyselin (plazmidové DNA) ve spodní vrstvě byla v rozmezí 182 až 385 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

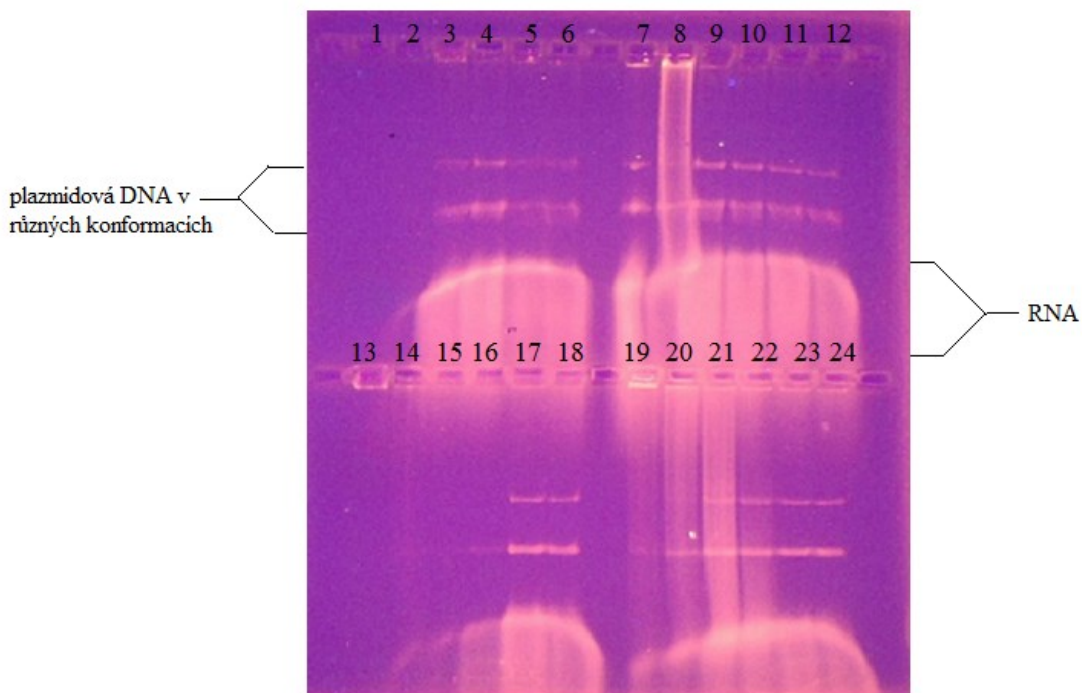
Tabulka 8: Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin ve vrstvách dvoufázového systému s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

vzorek	vrstva	c ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	A _{230 nm}	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{320 nm}	A _{260nm} / A _{280 nm}	A _{260nm} / A _{230 nm}
1	Horní	40	0,05	0,03	0,03	0,01	1,33	0,43
	Spodní	85	0,05	0,04	0,03	0,01	1,62	0,72
2	Horní	47,5	0,03	0,02	0,01	0	1,46	0,73
	Spodní	170	0,08	0,09	0,08	0,01	1,21	1,21
3	Horní	108	0,05	0,05	0,03	0,01	1,54	0,94
	Spodní	238	0,18	0,16	0,13	0,06	1,34	0,84
4	Horní	103	0,04	0,05	0,03	0	1,58	1,03
	Spodní	158	0,05	0,07	0,05	0	1,54	1,34
5	Horní	270	0,22	0,17	0,13	0,06	1,64	0,67
	Spodní	358	0,20	0,20	0,14	0,06	1,66	1,03
6	Horní	423	0,20	0,21	0,14	0,04	1,84	1,08
	Spodní	593	0,31	0,31	0,20	0,07	1,84	1,00

→ Koncentrace plazmidové DNA v horní vrstvě byla v rozmezí 40 až 423 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace plazmidové DNA ve spodní vrstvě byla v rozmezí 85 až 593 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.4.1.1 Elektroforéza purifikované plazmidové DNA

Pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1% agaróze byla ověřena přítomnost plazmidové DNA pro horní i spodní vrstvu dvoufázového systému obsahujícím K_2HPO_4 nebo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 12.



Obrázek 12: Agarózová gelová elektroforéza plazmidové DNA po separaci pomocí dvoufázového vodného systému

Běh	Vzorek č.	Vrstva	Koncentrace plazmidové DNA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Množství plazmidové DNA (μg)	UV detekce	
					DNA	RNA
K_2HPO_4						
1	1	horní	95	1,0	–	–
2	2		153	1,5	–	–
3	3		203	2,0	••	••
4	4		242	2,4	•••	•••
5	5		113	1,1	••	•••
6	6		145	1,5	••	•••
7	1	spodní	183	1,8	•••	•••
8	2		288	2,9	•••	•••
9	3		385	3,9	•••	•••
10	4		338	3,4	•••	•••
11	5		245	2,5	•••	•••
12	6		182	1,8	•••	•••
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$						
13	1	horní	40	0,4	–	–
14	2		47,5	0,5	•	•
15	3		108	1,1	•	•
16	4		103	1,0	•	••
17	5		270	2,7	•••	•••
18	6		423	4,2	•••	•••

19	1	spodní	85	0,9	••	•
20	2		170	1,7	••	•
21	3		238	2,4	•••	•••
22	4		158	1,6	•••	•••
23	5		358	3,6	•••	•••
24	6		593	5,9	•••	•••

Pozn.: •, ••, •••: detekce malého, středního resp. většího množství plazmidové DNA

→ Na gelu byla detegována plazmidová DNA a RNA. Nejvíce plazmidové DNA bylo detegováno v běhu 24.

5.4.2 Srážení RNA chloridem lithným

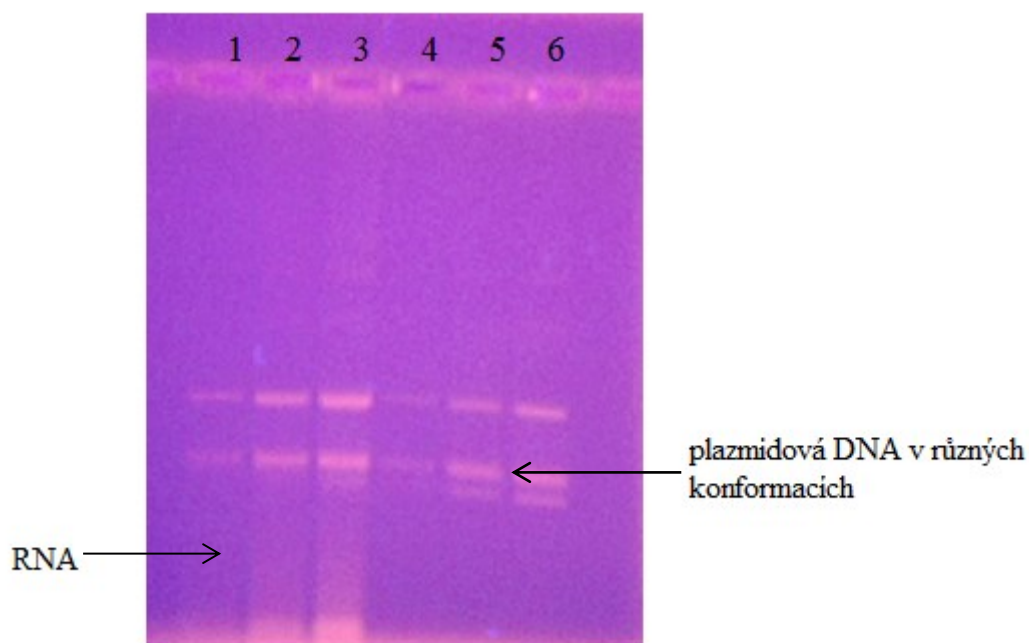
Podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.8 bylo provedeno srážení RNA chloridem lithným. Spektrofotometricky stanovené koncentrace plazmidové DNA po srážení RNA pomocí LiCl jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9: Spektrofotometrické stanovení koncentrace plazmidové DNA po přesrážení RNA LiCl

DNA	c ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	A _{260nm/280nm}	A _{260nm/230nm}
pUC19	1088	0,23	0,44	0,25	0,01	1,78	1,95

→ Koncentrace plazmidové DNA po purifikaci (srážení RNA pomocí LiCl) byla 1088 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Vzorek plazmidové DNA byl lehce znečištěn proteiny ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$).

Agarózovou gelovou elektroforézou na 1% agaróze byla ověřena purifikace plazmidové DNA a srovnána s nepurifikovanou plazmidovou DNA. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 13.



Obrázek 13: Agarózová gelová elektroforéza vzorků plazmidové DNA pUC19 po srážení RNA chloridem lithným

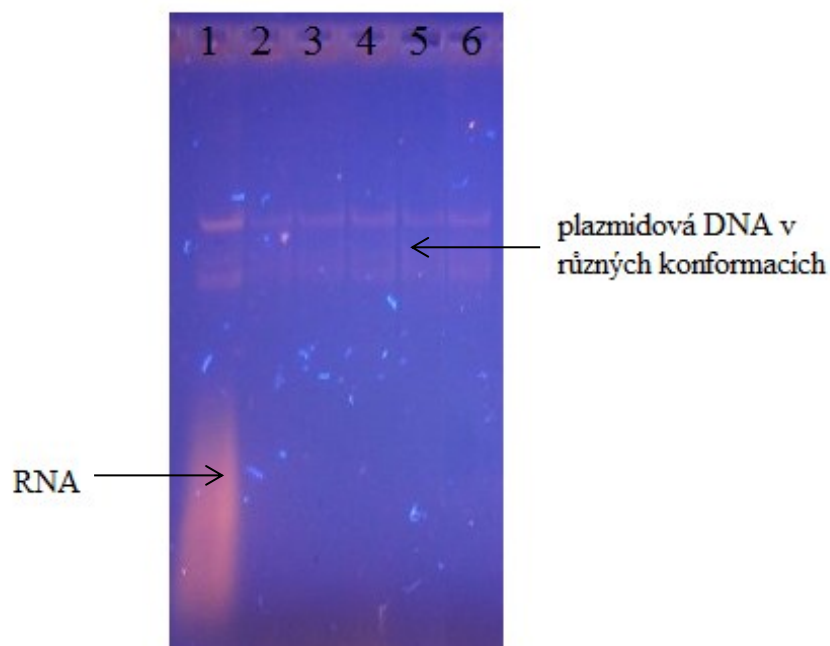
Běh	DNA	Množství plazmidové DNA (μl)	Množství H ₂ O (μl)	Objem nanášecího pufru (μl)	Detekce plazmidové DNA	Detekce RNA
1	pUC19	1	14	3	+	+
2	pUC19	3	12	3	+	+
3	pUC19	5	10	3	+	+
4	pUC19 po srážení LiCl	1	14	3	+	-
5	pUC19 po srážení LiCl	3	12	3	+	-
6	pUC19 po srážení LiCl	5	10	3	+	-

→ Plazmidová DNA byla v různých koncentracích detegována na agarózovém gelu. Po srážení RNA pomocí chloridu lithného nebyla detegována RNA.

5.4.3 Purifikace plazmidové DNA imobilizovou RNázou A

K odstranění RNA byla použita imobilizovaná RNáza A dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.9.

Purifikována plazmidová DNA byla v různých časech inkubace detegována na agarózovém gelu. Po degradaci RNA pomocí imobilizované RNázy A nebyla detegována RNA. Vyčištěná plazmidová DNA byla vizuálně srovnána s nepurifikovanou plazmidovou DNA, která obsahovala velké množství RNA. Výsledky jsou uvedené na Obrázku 14.



Obrázek 14: Agarózová gelová elektroforéza purifikované plazmidové DNA pUC19 po degradaci RNA

Běhy: Na gel bylo nanášeno vždy 10 μ l degradované plazmidové DNA a 2 μ l nanášecího pufru.

Běh	Vzorek	Imobilizovaná RNáza A (μ l)	Čas inkubace (min)	Detekce plazmidové DNA	Detekce RNA
1	pUC19 (kontrola)	–	0	+	+
2	pUC19 po degradaci RNA	+	0	+	–
3	pUC19 po degradaci RNA	+	30	+	–
4	pUC19 po degradaci RNA	+	60	+	–
5	pUC19 po degradaci RNA	+	120	+	–
6	pUC19 po degradaci RNA	+	180	+	–

→ Plazmidová DNA byla v různých koncentracích detegována na agarózovém gelu. Po degradaci RNA imobilizovanou RNázou A nebyla detegována RNA.

6 DISKUZE

6.1 Ověření přítomností plazmidů v buňkách

Po kultivaci obou bakteriálních kultur *E. coli* JM 109 a *E. coli* JM 109 (pUC19) byla potvrzena přítomnost plazmidu v kultuře *E. coli* JM 109 (pUC19). Růst kultury *E. coli* JM 109 (pUC19) se projevil vytvořením zákalu v médiu. Výskyt antibiotika v LB médiu neměl vliv na růst kultury *E. coli* JM 109 (pUC19), protože plazmid pUC19 obsahuje gen pro rezistenci na ampicilin. Bakteriální kultura *E. coli* JM 109 se po kultivaci v médiu projevila absencí zákalu. Z tohoto výsledku je patrné, že bakteriální kultura *E. coli* JM 109 nemá rezistenci vůči antibiotiku, tedy neobsahuje plazmid pUC19. Obě kultury *E. coli* JM 109 narostly v nepřítomnosti ampicilinu, jak na Petriho miskách, kde vytvořené kolonie prokázaly čistotu kultury, tak i v LB médiu. Bylo prokázáno, že bakteriální kultura *E. coli* JM 109 (pUC19) nese plazmid, a proto je možné ji použít na izolaci plazmidové DNA.

6.2 Izolace plazmidové DNA

Z 1,5 ml kultury buněk *E. coli* JM 109 (pUC19), která byla narostlá v LB médiu s ampicilinem, byla získána alkalickou lýzou plazmidová DNA. Přítomnost izolované plazmidové DNA byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy. Po obarvení gelu interkalačním činidlem byly výsledkem proužky tzv. bendy, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA a reprezentuje různé konformace DNA. Dále bylo ve spodní části elektroforeogramu (Obrázek 8) možné pozorovat intenzivní pásy, které představovaly znečištění RNA.

Pro zjištění koncentrace a čistoty plazmidové DNA bylo provedeno měření absorbance na NanoPhotometru v rozmezí vlnových délek 230 - 320 nm. Koncentrace DNA byla vypočítána z hodnoty $A_{260\text{nm}}$. Poměr absorbance při vlnových délkách $\lambda = 260\text{ nm}$ a $\lambda = 280\text{ nm}$ vyjadřuje míru znečištění vzorku proteiny (pokud je $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$) nebo RNA (když je $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} > 2,0$). Pro čistou DNA (vhodnou pro další použití při amplifikaci) by měl být poměr 1,8 – 2,0. Plazmidová DNA byla izolována z buněčné kultury o koncentraci $810\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jak již bylo zjištěno z agarózové gelové elektroforézy, plazmidová DNA byla znečištěna RNA. Poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl větší než 2.

6.3 Purifikace plazmidové DNA

6.3.1 Separace nukleových kyselin v dvoufázovém vodném systému

Při purifikaci plazmidové DNA byly použity dva dvoufázové systémy s různými koncentracemi a druhy solí (K_2HPO_4 nebo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). V závislosti na složení systému byla spektrofotometricky stanovena koncentrace nukleových kyselin v obou fázích a pomocí poměru absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ stanovována míra znečištění plazmidové DNA pUC19 proteiny a RNA. Naměřené poměry $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, které stanovují čistotu plazmidové DNA, byly vyhovující, pokud byly v rozmezí 1,8 - 2,0. Z výsledků, při použití systému s K_2HPO_4

(Tabulka 7) je patrné, že tomuto kritériu vyhovuje pouze spodní vrstva vzorků 4, 5 a 6. Ostatní vzorky byly znečištěny proteiny. Při použití systému s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabulka 8) vyplývá, že čistota plazmidové DNA byla vyhovující jen u vzorku 6.

6.3.2 Purifikace plazmidové DNA chloridem lithným

Agarózovou gelovou elektroforézou byla detegována plazmidová DNA po srážení chloridem lithným. Vyčištěná plazmidová DNA byla vizuálně srovnána s nepurifikovanou plazmidovou DNA, která obsahovala velké množství RNA (Obrázek 13). Po purifikaci chloridem lithným došlo k efektivnímu odstranění RNA. Purifikovaná plazmidová DNA byla v malé míře znečištěna proteiny, což bylo dokázáno spektrofotometricky.

6.3.3 Purifikace plazmidové DNA nosičem s imobilizovou RNázou A

Po purifikaci plazmidové DNA nosičem s imobilizovanou RNázou A došlo k výraznému odstranění RNA. Při této metodě bylo pomocí agarózové gelové elektroforézy detegováno menší množství DNA, což bylo zřejmě způsobeno zředěním vzorků.

7 ZÁVĚR

Genové technologie umožňují genové úpravy buněk nejrůznějších organismů. V současné době je genová terapie otázkou výběru genu, vektorů a transfekce. Dodání genu do cílové buňky (organismu) je klíčem k úspěšné genové terapii. Ideální vektor pro doručení by měl mít vysokou účinnost transfekce a dobrou biokompatibilitu. Lze předpokládat, že v blízké budoucnosti budou připraveny nové nanočástice využitelné jako vektory pro přenos DNA v lékařském výzkumu a léčbě.

V experimentální části práce byla provedena izolace a následná purifikace plazmidové DNA pUC19. Při srážení plazmidové DNA chloridem lithným došlo k efektivnímu odstranění RNA. Při použití degradace RNA pomocí imobilizované RNázy A byla RNA degradována. Koncentrace plazmidové DNA byla ale vůči výše uvedenému postupu nižší (v důsledku zředění vzorků). Dále byla testována izolace plazmidové DNA pUC19 pomocí dvoufázových vodných systémů. Byly použity 2 systémy s různými koncentracemi a druhy solí (K_2HPO_4 nebo $(NH_4)_2SO_4$). V závislosti na složení systému byla spektrofotometricky stanovena koncentrace nukleových kyselin v obou fázích a pomocí poměru absorbancí A_{260nm}/A_{280nm} stanovována míra znečištění plazmidové DNA pUC19 proteiny a RNA. Pomocí gelové elektroforézy bylo zjišťováno, zda dochází k preferenční separaci plazmidové DNA a RNA do některé z fází. Metoda vyžaduje delší optimalizaci, přičemž je nutné hledat vhodný poměr směsi dané soli a polyethylenglykolu PEG 6000.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOČÁREK, Eduard. Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004, 211 s. ISBN 80-718-3326-6.
- [2] NEČAS, Oldřich. Obecná biologie: pro lékařské fakulty. 3. přeprac. vyd. Praha: H, 2000, 554 s. ISBN 80-860-2246-3.
- [3] BRDIČKA, Radim. *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2001, 249 s. ISBN 80-247-0118-9.
- [4] BLACKBURN, G. *Nucleic acids in chemistry and biology*. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Pub., c2006, xxxi, 470 p. ISBN 08-540-4654-2.
- [5] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, xiv, 498 s. ISBN 978-802-4729-770.
- [6] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.
- [7] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000, s. 904 - 1200. ISBN 80-902-5624-4.
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [9] KLABAN, Vladimír. *Ekologie mikroorganismů: ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů*. 1. vyd. Praha: Galén, c2011, ix, 549 s. ISBN 978-807-2627-707.
- [10] GHANEM, Ashraf, Robert HEALEY a Frady G. ADLY. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, roč. 760, s. 1-15 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.006.
Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [11] GLICK, Bernard R a Jack J PASTERNAK. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. Washington, D.C.: ASM Press, 1994, xix, 500 p. ISBN 15-558-1071-3.
- [12] IBRAHEEM, D., A. ELAISSARI a H. FESSI. Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, vol. 459, 1-2, s. 70-83 [cit.2014-11-29]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.041.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [13] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004, 171 s. ISBN 80-708-0551-X.

- [14] WIRTH, Thomas, Nigel PARKER a Seppo YLÄ-HERTTUALA. History of gene therapy. *Gene* [online]. 2013, vol. 525, issue 2, s. 162-169 [cit. 2015-01-04]. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.137. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [15] STRIBLEY, John M, Khurram S REHMAN, Hairong NIU a Gregory M CHRISTMAN. Gene therapy and reproductive medicine. *Fertility and Sterility*. 2002, vol. 77, issue 4, s. 645-657. DOI: 10.1016/S0015-0282(01)03233-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [16] PTÁČEK, Radek a Petr BARTŮŇEK. *Etika a komunikace v medicíně*. Praha: Grada, c2011, 528 p. ISBN 978-802-4739-762.
- [17] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [18] BÍLKOVÁ, Kateřina. *Izolace biomakromolekul*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997, 206 s. ISBN 80-708-0288-X.
- [19] DUARTE, Sónia P., António G. FORTES, Duarte M.F. PRAZERES a João C. MARCOS. Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, roč. 1164, č. 1, s. 105-112 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.06.061. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [20] HUDDLESTON, J. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. *Trends in Biotechnology* [online]. 1991, vol. 9, issue 1, s. 381-388 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/0167-7799(91)90130-A. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [21] GOMES, Gabriela A., Ana M. AZEVEDO, M. Raquel AIRES-BARROS a D. Miguel F. PRAZERES. Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Separation and Purification Technology* [online]. 2009, roč. 65, č. 1, s. 22-30 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.seppur.2008.01.026. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [22] EON-DUVAL, Alex, Karlene GUMBS a Christopher ELLETT. Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: Use of experimental design to determine reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003-09-05, vol. 83, issue 5, s. 544-553. DOI: 10.1002/bit.10704. Dostupné z: <http://doi.wiley.com>
- [23] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. ALL RIGHTS RESERVED. *The Use of LiCl Precipitation for RNA Purification* [online]. 2015. vyd. 2015 [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: www.lifetechnologies.com

- [24] RITTICH, B., A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M. J. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ a A. RYBNÍKÁŘ. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, vol. 52, issue 2, s. 143-148. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.04.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [25] KŘÍŽOVÁ, Jana, Alena ŠPANOVÁ, Bohuslav RITTICH a Daniel HORÁK. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1064, issue 2, s. 247-253. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [26] HORÁK, Daniel a Nataliya BENEDYK. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004-11-15, vol. 42, issue 22, s. 5827-5837. DOI: 10.1002/pola.20406. Dostupné z: <http://doi.wiley.com>
- [27] CHIANG, Chen-Li, Ching-Shan SUNG, Ting-Feng WU, Chuh-Yean CHEN a Chiung-Yuen HSU. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *Journal of Chromatography B*. 2005, vol. 822, 1-2, s. 54-60. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.05.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [28] HORÁK, Daniel, Milan J. BENEŠ, Bohuslav RITTICH a Alena ŠPANOVÁ. Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics. In: *Polymer* [online]. 2005, s. 1245-1255 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.11.049. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com>
- [29] SOUSA, Fani, Duarte M.F. PRAZERES a João A. QUEIROZ. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in Biotechnology*. 2008, vol. 26, issue 9, s. 518-525. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.05.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [30] GHANEM, Ashraf, Robert HEALEY a Frady G. ADLY. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2013, vol. 760, s. 1-15. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [31] KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007, 218 s. ISBN 978-807-0134-504.
- [32] RUML, Tomáš, Michaela RUMPLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 270 s. ISBN 80-708-0499-8.
- [33] ROBERTSON, J., A.M. ROSS a L.A. BURGOYNE. *DNA in forensic science: theory, techniques and applications*. New York [u.a.]: Horwood, 1990. ISBN 01-321-7506-1.

- [34] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. 1. vydání. ISBN 80-210-3841-1.
- [35] KEER, Jacquie T a Lyndsey BIRCH. *Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, c2008, xxiii, 248 p. ISBN 978-085-4043-675.
- [36] SINDEN, Richard R. *DNA structure and function*. San Diego: Academic Press, 1994, xxiii, 398 p. ISBN 01-264-5750-6.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

RNA – Ribonukleová kyselina

mRNA – Mediátorová RNA

rRNA – Ribozomální RNA

tRNA – Transferová RNA

kbp – kilo párů bází

oc plazmidová DNA – otevřená kružnicová plazmidová deoxyribonukleová kyselina

sc plazmidová DNA – nadšroubovicová plazmidová deoxyribonukleová kyselina

P(HEMA-*co*-GMA) - poly(hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidylmethakrylát)

UV – Ultrafialové záření

EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina

PEG - polyethylenglykol

SDS – dodecyl sulfát sodný

TBE – Tris-borát-EDTA

TE – Tris-EDTA

Tris-HCl – Tris hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid