

# Využití metody Real Time-PCR v detekci genů pro dekarboxylační enzymy u vybraných bakterií

Bc. Kristýna Maršálová

---

Diplomová práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Maršálková**  
Osobní číslo: **T12369**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Využití metody Real Time-PCR v detekci genů pro dekarboxylační enzymy u vybraných bakterií**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši, která se bezprostředně týká daného tématu.
2. Zavést metodu RT-PCR pro detekci vybraného genu.
3. Analyzovat genovou expresi relativní kvantifikací.
4. V závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty s reálnými vzorky.
5. Teorii, metodiku, výsledky experimentů a diskusi sepsat do formy diplomové práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Vědecké databáze (Web of Science), vědecká a odborná literatura.**

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Petra Jančová, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**10. února 2014**

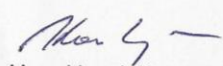
Termín odevzdání diplomové práce:

**16. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



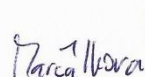
  
doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 13. 5. 2014

  
.....

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>31</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Předkládaná diplomová práce se zabývá zavedením metody Real Time-PCR pro detekci *speF* genu, tedy genu kódujícího ornithindekaboxylasu. Tento enzym katalyzuje dekarboxylaci L-ornithinu na putrescin u Gram negativních bakterií. Putrescin je jedním z hlavních biogenních aminů, jehož výskyt je úzce spojován s mikrobiálním kažením potravin. V průběhu práce byla rovněž sledována exprese daného genu, metodou relativní kvantifikace, u *Escherichia coli* v závislosti na rozdílných kultivačních podmínkách.

Získané výsledky dokumentují, že byla zavedena a optimalizována metoda Real Time-PCR pro detekci *speF* genu. Pomocí této metody je rovněž možné sledovat úroveň exprese daného genu v závislosti na různých podmínkách.

Klíčová slova: Biogenní aminy, putrescin, *speF* gen, Real Time-PCR, genová exprese, relativní kvantifikace

## **ABSTRACT**

Presented thesis concentrates on the establishment of Real Time-PCR method for detection of *speF* gene which encodes ornithine decarboxylase. This enzyme is responsible for decarboxylation of L-ornithine to putrescine in Gram-negative bacteria. Putrescin is one of the main biogenic amines and its occurrence is linked to microbial degradation of food. Furthermore, the role of various cultivating conditions on the expression of particular gene in *Escherichia coli* using relative quantification approach was also tested in this thesis.

Results obtained in experimental part of this work confirm development and optimization of realtime PCR method for detection of *speF* gene. Moreover, this method can be useful tool for evaluation of *speF* gene expression dependent on different cultivating conditions.

Keywords: Biogenic amines, putrescine, *speF* gene, Real Time-PCR, gene expression, relative quantification

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí paní Mgr. Petře Jančové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu a cenné připomínky, které mi poskytla při vypracování této diplomové práce. Zároveň velmi děkuji paní laborantce Bc. Veronice Kučabové za velkou ochotu, pomoc a věcné připomínky. Dále velké díky patří paní konzultantce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D.

Rovněž bych chtěla velmi poděkovat mé rodině za podporu, kterou mi poskytla při studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 BIOGENNÍ AMINY.....</b>	<b>12</b>
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA A KLASIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ .....	12
1.2 VZNIK.....	13
1.2.1 Mikrobiální produkce .....	14
1.3 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH.....	15
1.3.1 Nefermentované potraviny.....	16
1.3.2 Fermentované potraviny .....	17
1.4 TOXICITA.....	17
1.5 STANOVENÍ.....	19
<b>2 POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....</b>	<b>20</b>
2.1 PRINCIP PCR.....	20
2.1.1 Průběh reakce .....	20
2.1.2 Složky reakční směsi .....	22
2.1.3 Detekce amplikonů .....	23
2.2 MODIFIKACE PCR.....	24
2.2.1 PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR).....	24
2.2.2 Inverzní PCR.....	24
2.2.3 Asymetrická PCR .....	25
2.2.4 Multiplex (mnohonásobná) PCR.....	25
2.2.5 Nested (odstupňovaná) PCR .....	26
2.2.6 Kvantitativní PCR (QPCR).....	26
2.3 REAL TIME-PCR (QPCR) .....	26
2.3.1 Princip.....	27
2.3.2 qPCR fluorescenční markery – interkalační barviva a hybridizační sondy.....	27
2.3.2.1 SYBR Green I .....	28
2.3.2.2 Sonda TaqMan .....	29
2.3.2.3 Molekulární majáky (MB, Molecular Beacons) .....	30
2.3.2.4 Scorpions.....	31
2.3.3 Kvantitativní analýza .....	32
2.3.3.1 Absolutní kvantifikace.....	32
2.3.3.2 Relativní kvantifikace.....	33
<b>3 VYUŽITÍ METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE V DETEKCI A KVANTIFIKACI BAKTERIÍ S DEKARBOXYLASOVOU AKTIVITOU.....</b>	<b>34</b>
3.1 METODY PCR A REAL TIME-PCR .....	34
3.1.1 Detekce a kvantifikace bakterií s histidindekarboxylasovou a tyrosindekarboxylasovou aktivitou.....	35
3.1.2 Detekce a kvantifikace bakterií produkujících putrescin.....	37
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>39</b>
<b>4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>40</b>
<b>5 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY .....</b>	<b>41</b>



5.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE .....	41
5.1.1	Přístrojové vybavení a pomůcky .....	41
5.1.2	Chemikálie .....	41
5.1.3	Živná média .....	42
5.1.3.1	Minerální médium s přísávkem glukosy a směsi vitamínů .....	42
5.1.3.2	Masopeptonový bujon .....	43
5.2	KULTIVAČNÍ A IZOLAČNÍ POSTUPY .....	43
5.2.1	Kultivace <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 .....	43
5.2.2	Kultivace <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 .....	43
5.2.3	Izolace nukleových kyselin .....	43
5.2.3.1	Izolace bakteriální DNA .....	44
5.2.3.2	Izolace bakteriální RNA .....	45
5.2.4	Transkripce bakteriální RNA do cDNA .....	46
5.3	REAKČNÍ SMĚSI PCR .....	47
5.3.1	Klasická PCR .....	47
5.3.2	Reakční směs pro Real Time-PCR .....	48
5.4	POUŽITÉ PRIMERY .....	49
5.4.1	Primery pro <i>speF</i> gen .....	49
5.4.2	Primery pro referenční geny .....	49
5.5	RELATIVNÍ KVANTIFIKACE .....	50
5.5.1	Vyhodnocení exprese .....	50
5.5.1.1	Metoda $\Delta\Delta Ct$ .....	51
5.5.1.2	Pfafflova metoda .....	51
5.6	ANALÝZA KŘIVKY TÁNÍ .....	52
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>53</b>
6.1	IZOLACE DNA – KONTROLA KVALITY IZOLOVANÉ DNA .....	53
6.2	KONTROLA FUNKČNOSTI NAVRŽENÝCH PRIMERŮ (TOUCHDOWN-PCR; TD-PCR) A VELIKOSTI AMPLIKONU .....	54
6.3	VÝBĚR VHODNÉ SADY DÁLE POUŽÍVANÝCH PRIMERŮ PRO GEN <i>SPEF</i> A VOLBA OPTIMÁLNÍ TEPLoty ANNEALINGU .....	55
6.4	IZOLACE RNA – KONTROLA KVALITY IZOLOVANÉ RNA .....	56
6.5	REAL TIME-PCR .....	58
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>73</b>
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	81
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>84</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>85</b>

## ÚVOD

Nejnovější trendy v oblasti bezpečnosti potravin, se zaměřují na zkoumání látek vyskytujících se v potravinách, které mohou mít vliv na lidské zdraví. Mezi tyto látky jsou řazeny i biogenní aminy (BA), jež jsou produktem běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin i mikroorganismů. Jedná se o látky se značnou biologickou aktivitou, které jsou nepostradatelné pro živé organismy, v nichž zajišťují řadu důležitých fyziologických funkcí (proliferace, růst, diferenciací). Na druhé straně se ale také jedná o látky, které se účastní patologických procesů (zánětlivé a alergické reakce).

Prakticky ve všech potravinách obsahujících bílkoviny nebo volné aminokyseliny lze předpokládat výskyt BA. Zvláště pokud jsou zde poskytnuty vhodné podmínky pro biochemickou aktivitu přítomných mikroorganismů vlastních dekarboxylasovou aktivitu. Pokud se zde BA vyskytují ve vysokých koncentracích, pak za určitých podmínek mohou mít negativní vliv na lidské zdraví a takovéto potraviny se pro citlivé jedince mohou stát „nevhodnými“.

V případě skladování potravin může být obsah BA ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování. Je ale potřeba mít k dispozici nástroje, kterými je možné v potravinách sledovat obsah/produkcí BA. Jednotlivé BA je možné přímo detekovat a kvantifikovat klasickými metodami instrumentální analýzy (např. HPLC/MS). Pro identifikaci producentů BA ve výrobcích je vhodné použít metody molekulární biologie, které se ukazují být vhodné pro rychlou detekci mikroorganismů produkujících BA, a to nejen v hotových výrobcích, ale i během technologického procesu. Z metod molekulární biologie je využívána zejména metoda polymerasové řetězové reakce (PCR), pomocí které lze rychle zachytit bakterie nesoucí příslušné geny kódující jednotlivé dekarboxylační enzymy. Nevýhodou stanovení pomocí klasické PCR je detekce i neživotoschopných buněk a získaný výsledek má pouze kvalitativní charakter. Moderní technikou molekulární biologie je metoda Real Time-PCR, která je využívána k přímé kvantifikaci nukleových kyselin. Tato varianta umožňuje monitorování fluorescence emitované v průběhu PCR jakožto indikátoru amplifikace požadovaného fragmentu v každém cyklu. Takto získané informace, amplifikační křivky, mohou být použity nejen pro kvantifikaci počátečního množství templátu s vysokou přesností v širokém rozsahu koncentrace, ale i pro sledování exprese daných genů kódující příslušné dekarboxylační enzymy.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOGENNÍ AMINY

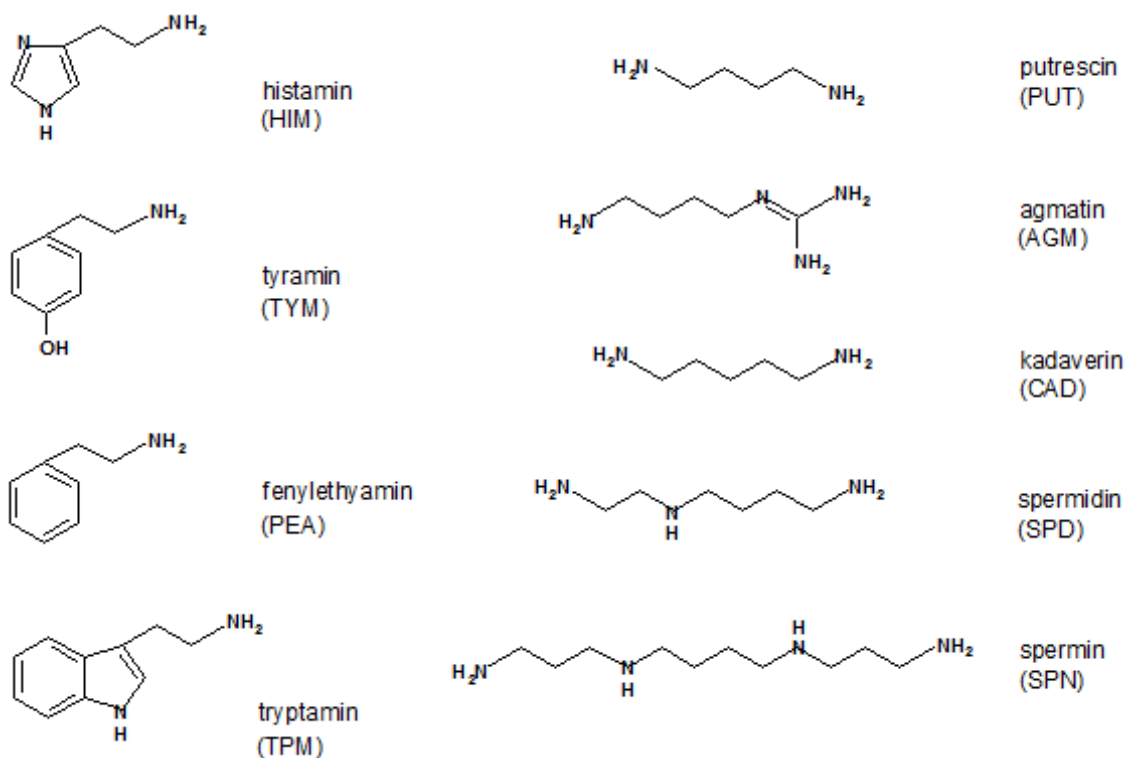
Biogenní aminy (BA) jsou přirozeně se vyskytující nízkomolekulární organické látky vznikající v buňkách převážně enzymovou dekarboxylací aminokyselin s eventuální další úpravou. Tyto aminy jsou označeny jako biogenní proto, že jsou vytvořeny působením živých organismů. Mezi nejvýznamnější biogenní aminy lze zařadit: putrescin, kadaverin, tyramin, 2-fenylethylamin, histamin, tryptamin, spermin, spermidin, dopamin a serotonin. [1-3]

Vyskytují se v rostlinných i živočišných buňkách, kde zajišťují řadu důležitých funkcí. V rostlinném organismu se účastní širokého spektra fyziologických procesů, mezi něž patří např. buněčné dělení, růst, diferenciaci, stárnutí listů nebo také jsou tyto látky zapojeny do obranné odezvy rostlin na biotický nebo abiotický stres. [4]

Rovněž v živočišných buňkách jsou BA významnými metabolickými meziprodukty a produkty, které vykazují biologickou aktivitu. Polyaminy se podílejí na rozmanitých fyziologických procesech, jejichž společným motivem je úzký vztah k buněčné proliferaci a růstu. Mají také rozmanité vlivy na syntézu proteinů, biosyntézu DNA a RNA. Biologicky aktivní amin (histamin) má centrální úlohu v mnoha alergických reakcích. [5] Biogenní aminy jsou i důležitými neuroaktivními látkami v centrálním nervovém systému a to jak u obratlovců tak bezobratlých. V nadměrném množství mohou ale způsobovat nežádoucí až toxické účinky. [6]

### 1.1 Chemická struktura a klasifikace biogenních aminů

Na základě chemické struktury je možné dělit biogenní aminy do několika skupin. Chemická struktura BA (viz *Obr. 1*) může být alifatická (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatická (tyramin, fenylethylamin) nebo heterocyklická (histamin, tryptamin). Někdy se klasifikují kadaverin, putrescin, agmatin, spermin a spermidin jako polyaminy. Putrescin, kadaverin mohou být považovány za diaminy a agmatin, spermidin a spermin za polyaminy. Z toho vyplývá, že klasifikace polyaminů není zcela jednotná. [1]



Obr. 1. Chemická struktura nejdůležitějších biogenních [7]

## 1.2 Vznik

Biogenní aminy jsou jednoduché bazické dusíkaté sloučeniny, které vznikají především dekarboxylací aminokyselin, nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů.

Proteolýza, a to buď autolytická nebo bakteriální, může hrát významnou roli právě v uvolňování volných aminokyselin z proteinů. Dekarboxylační reakce aminokyselin jsou enzymově katalyzované reakce, přičemž kofaktorem těchto enzymů bývá nejčastěji pyridoxal-5'-fosfát (PLP). Pro katalýzu je důležitá aldehydová skupina PLP. Pyridinový kruh usnadňuje průběh reakcí díky schopnosti odtahovat elektrony z  $\alpha$ -uhlíku substrátu a stabilizovat tak Shiffovu bázi. [1; 3]

Prekurzory hlavních biogenních aminů (viz Obr. 2) jsou:

histidin  $\rightarrow$  histamin

tyrosin  $\rightarrow$  tyramin

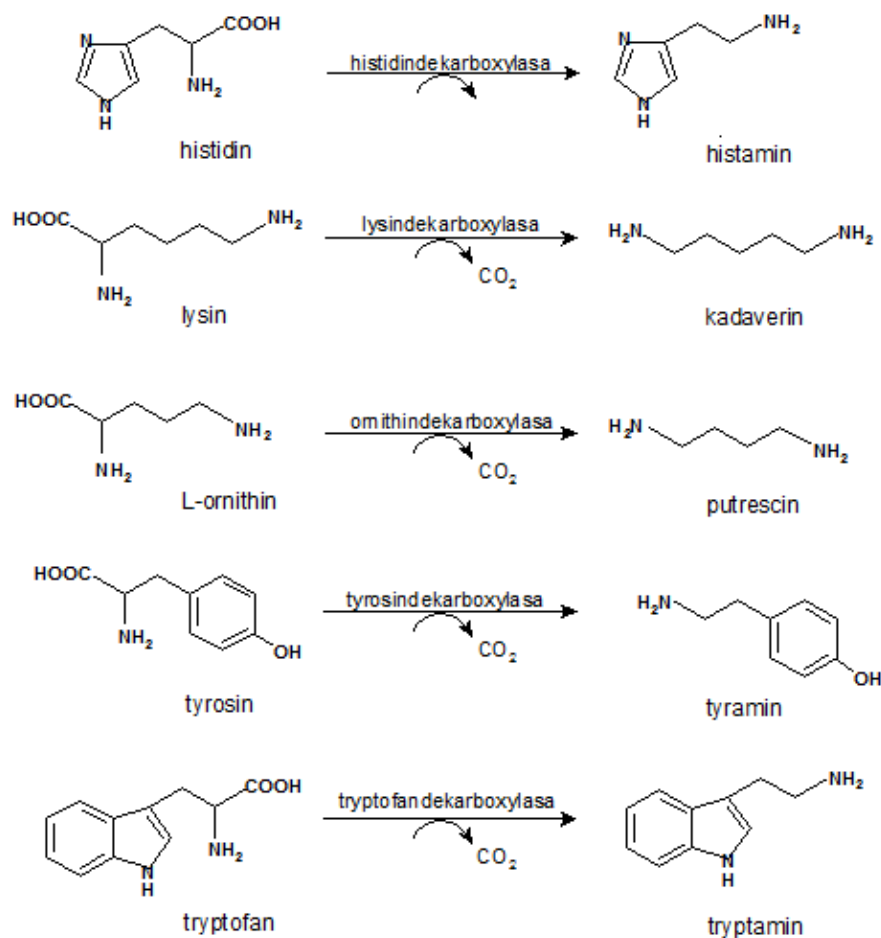
hydroxytryptofan  $\rightarrow$  serotonin

tryptofan  $\rightarrow$  tryptamin

lysin  $\rightarrow$  kadaverin

ornithin  $\rightarrow$  putrescin

arginin  $\rightarrow$  agmatin  $\rightarrow$  putrescin  $\rightarrow$  spermidin  $\rightarrow$  spermin [1]



Obr. 2. Biogenní aminy a jejich prekurzory [7]

### 1.2.1 Mikrobiální produkce

Základním faktorem pro tvorbu BA v potravinách je nejen obsah volných aminokyselin, ale i přítomnost bakteriálních kmenů se schopností dekarboxylace těchto aminokyselin. Tato schopnost byla popsána jak u Gram pozitivních tak i Gram negativních bakterií. Rody jako jsou *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* a mléčné bakterie rodů *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* jsou schopné dekarboxylace jedné nebo více aminokyselin. [3]

Histamin je vytvářen z histidinu pomocí specifické katalýzy histidine dekarboxylasy (HDC). Bakteriální HDC byly důkladně studovány a charakterizovány v různých organismech. Byly rozlišeny dva druhy enzymů s rozdílnými vlastnostmi. HDC závislé na pyridoxal-5'-fosfátu se vyskytují u Gram negativních bakterií (např. *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Photobacterium phosphoreum*, *Raoultella planticola*,

atd.), které jsou spojeny s kažením výrobků z ryb. HDC závislé na pyruvoylu jsou přítomné u Gram pozitivních bakterií používaných při fermentaci (např. *Clostridium perfringens*, *Tetragenococcus muriticus*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* a *Lactobacillus buchneri*).

Bakterie jako *Morganella morganii* (*Proteus morganii*), určité kmeny *Klebsiella pneumoniae* a několik kmenů *Hafnia alvei*, jsou producenty histaminu a jejich přítomnost je nežádoucí u výrobků z ryb. [3]

Ačkoli byl *Oenococcus oeni* původně považován za majoritní bakteriální druh zodpovědný za produkci histaminu ve víně, nedávné studie ukázaly, že kmeny *Lactobacillus hilgardii* a *Pediococcus parvulus* mohou být hlavními producenty histaminu. [8]

Jako producenti tyraminu byly popsány jen Gram pozitivní bakterie. Mezi tyto patří bakterie rodu *Lactobacillus*, *Enterococcus* nebo *Carnobacterium*. Sekvence genů kódujících tyrosindekarboxylasy (TDC) různých mikroorganismů ukázaly vysokou podobnost. [9] Tyramin je běžně a nejvíce detekován v sýru a fermentovaných masných výrobcích, kde jsou hlavními producenty kmeny *Enterococcus* a *Lactobacillus*. [8]

Syntéza putrescinu byla původně spojována s Gram negativními bakteriemi, zejména se zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Nedávné studie popisují schopnost některých laktobacilů produkovat putrescin z agmatinu deaminací. [8]

Ornithindekarboxylasa (ODC) je enzym, který je závislý na PLP, katalyzující přeměnu ornithinu na putrescin. Bylo zjištěno, že geny pro ODC jsou exprimovány jak u Gram pozitivních bakterií, např. u laktobacilů, tak bakterií Gram negativních. Jako zástupce Gram negativních bakterií je zde možno uvést např. *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* nebo *Yersinia pestis*. [3; 9]

### 1.3 Biogenní aminy v potravinách

Prakticky ve všech potravinách obsahujících bílkoviny nebo volné aminokyseliny, zvláště pokud jsou zde poskytnuty vhodné podmínky pro biochemickou aktivitu přítomných mikroorganismů, lze předpokládat výskyt biogenních aminů. Mezi potraviny s pravděpodobným výskytem biogenních aminů patří ryby, výrobky z ryb, masné výrobky, vejce, sýry, fermentované zeleniny, sójové produkty, piva a vína. [8; 10]

Nejdůležitější biogenní aminy vyskytující se v potravinách jsou histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, p-fenylethylamin, spermin a spermidin. [3; 11]

Biogenní aminy mohou mít roli ukazatelů jakosti, anebo přijatelnosti některých potravin. Celkové množství produkovaných biogenních aminů je závislé na několika faktorech. Mezi faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů v potravinách, patří: dostupnost volných aminokyselin; přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou a příznivé podmínky pro růst těchto mikroorganismů optimální - pH, přítomnost sacharidů (D-glukosa), redox potenciál média, množství kyslíku, teplota, přítomnost solí nebo přídavek vhodných startérových kultur. [1; 3; 12]

### 1.3.1 Nefermentované potraviny

V nefermentovaných potravinách je přítomnost biogenních aminů nad určitou úroveň považována za známku nežádoucí mikrobiální aktivity. Z tohoto důvodu může být obsah BA použit jako indikátor mikrobiálního kažení. Nicméně, přítomnost biogenních aminů v potravinách nemusí korelovat s růstem mikroorganismů způsobujících kažení. Úroveň histaminu, putrescinu a kadaverinu se ale obvykle zvyšuje právě během kažení ryb. [1]

K otravě z ryb (scombroid poisoning) dochází po konzumaci ryb, u nichž se aminokyselina histidin v syrovém rybím masě mění působením enzymu histidindekarboxylasy, produkovaného bakteriemi, na histamin. Bakterie se pomnožují v nesprávně skladovaných rybách, kterými jsou např. tuňák, makrela, sled' nebo sardinky. Histamin je termostabilní a odolává i následnému tepelnému zpracování ryb. Ryby mohou obsahovat až 1000-2000 mg.kg<sup>-1</sup> histaminu. [13] Další biogenní aminy, které byly v rybách detekovány, jsou také putrescin, kadaverin, tyramin, spermin a spermidin. [1]

Ryby nejsou jedinou nefermentovanou potravinou, kde byl prokázán výskyt biogenních aminů. Také v některých šťávách, nektarech a limonádách vyrobených z pomerančů, malin, citrónů, grapefruitů, mandarinek, jahod, rybízu nebo hroznů, byly detekovány různé koncentrace biogenních aminů. V těchto produktech byl častý výskyt zejména putrescinu. [1; 3; 12]

Rovněž čerstvé i zpracované vepřové maso může obsahovat významné koncentrace biogenních aminů. Některé studie ukazují, že ve vepřovém masu byly detekovány vysoké hladiny zejména adrenalinu, spermidinu a sperminu. Z dalších BA byly detekovány



noradrenalin, putrescin, histamin, kadaverin a tyramin, ale jejich koncentrace byly daleko nižší. [1]

Biogenní amin, 2-fenylethylamin, je přirozenou součástí např. některých druhů hub nebo také kakaových bobů, a proto se může vyskytovat v čokoládě a čokoládových výrobcích. [1]

### 1.3.2 Fermentované potraviny

Při přípravě fermentovaných potravin lze očekávat přítomnost mnoha druhů mikroorganismů, z nichž některé mohou vlastnit dekarboxylasovou aktivitu a být tedy schopné produkovat biogenní aminy. [1]

Různé aminy, jako je například histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, tryptamin a fenyletylamin byly nalezeny v mnohých druzích sýrů. [14]

Agmatin, kadaverin, ethanolamin, histamin, putrescin a tyramin jsou produkovány ve vyšších množstvích během alkoholového kvašení. Histamin a tyramin byly nalezeny jako hlavní biogenní aminy v červeném víně. Vedle nich byly ve vínech, ať už červených nebo bílých, detekovány: tyramin, histamin, tryptamin, monomethylaminonitrát, 2-fenethylamin, putrescin, kadaverin, spermidin, iso- a n-amylamin, pyrrolidin, iso- a n-butylamin, iso- a n-propylaminu a ethylamin. [1; 8]

Z experimentu Buňkové et al., (2010) vyplynulo, že se produkce příslušného aminu zvyšuje se zvyšujícím množstvím prekurzoru. Proto je vhodné při výrobě fermentovaných potravin kontrolovat nejen kmeny mikroorganismů, ale také sledovat koncentraci prekurzorů. [15]

## 1.4 Toxicita

Histamin, tryptamin, 2-fenylethylamin a tyramin jsou biologicky aktivní aminy, které mají významné fyziologické účinky na člověka, obvykle buď psychoaktivní nebo vazoaktivní. Psychoaktivní aminy ovlivňují nervový systém tím, že působí jako neurotransmitery, zatímco vazoaktivní aminy působí na cévní systém. Toxikologické účinky jsou shrnuty v tabulce (*Tab. 1*). [13]

Tab. 1. Toxikologické účinky biogenních aminů [3]

Biogenní amin	Toxikologické účinky BA
Histamin	uvolňuje adrenalin a noradrenalin
	dráždí hladké svalstvo dělohy, střev a dýchacích cest
	stimuluje jak senzorické tak motorické neurony
	kopřivka
	řídí sekreci žaludeční kyseliny
Tyramin	periferní vazokonstrikce
	zvyšuje srdeční tep
	příčina slzení
	zvyšuje dýchání
	zvyšuje hladinu cukru v krvi
	uvolňuje noradrenalin ze sympatického nervového systému
	způsobuje migrény
Putrescin a kadaverin	hypotenze
	bradykardie (zpomalení srdečního tepu)
	křeč žvýkacího svalu
	paréza (neúplná obrna) končetin
	zesiluje toxicitu jiných aminů
2-fenylethylamin	uvolňuje noradrenalinu ze sympatického nervového systému
	zvyšuje krevní tlak
	způsobuje migrény
Tryptamin	zvyšuje krevní tlak

Už příjem histaminu vyšší než 40 mg může způsobit otravy s různou intenzitou. Přípustná maximální hladina tyraminu v potravinách je 100-800 mg.kg<sup>-1</sup>, kdy je příjem 1080 mg.kg<sup>-1</sup> tyraminu toxický pro člověka. [3] Studie prokázaly toxicitu při orálním podání putrescinu (2000 mg.kg<sup>-1</sup>), kadaverinu (2000 mg.kg<sup>-1</sup>), tryptaminu (2000 mg.kg<sup>-1</sup>), spermidinu (600 mg.kg<sup>-1</sup>) a sperminu (600 mg.kg<sup>-1</sup>). [11; 16]

Biogenní aminy přítomné v potravinách jsou v zažívacím traktu saveců metabolizovány detoxikačním systémem. Hlavní úlohu v něm sehrávají dva enzymy, monoaminoxidasa (MAO) a diaminoxidasa (DAO), které působí ve střevním epitelu. Jejich účinkem jsou BA metabolizovány na fyziologicky méně aktivní metabolity. Tyto enzymy mají však jen určitou kapacitu, která nezvládá nadměrný příjem BA. [17] Proto příjem potravin s vysokým obsahem BA může představovat nebezpečí pro zdraví. Z biogenních aminů jsou z hlediska toxicity a alimentárních otrav diskutovány zejména histamin a tyramin. Symptomy otravy histaminem, tzv. scombroid poisoning, se projevují velmi rychle

(od 10 minut do 2 hodin) a projevují se vyrážkou v horních částech těla, zarudnutím, otoky, zvracením, průjmami, bolestmi hlavy a poklesem krevního tlaku. [13]

Jisté problémy mohou také pociťovat psychiatrickí pacienti léčení inhibitory MAO, pokud se v jejich jídelníčku objevují potraviny obsahující vysoký obsah tyraminu (např. vyzrálé sýry, játra, kaviár, avokádo nebo banány). Pomalá detoxikace může mít za následek jeho toxické působení, projevující se bolestmi hlavy, hypertenzí nebo zvracením. V těžkých případech může tento stav končit smrtelně. [17]

Biogenní aminy byly také studovány jako potenciální karcinogeny. Nebezpečí přítomnosti polyaminů putrescinu a kadaverinu spočívá v jednoduchosti, s jakou mohou reagovat s dusitany nebo oxidy dusíku při skladování nebo úpravě potravin. Touto reakcí totiž mohou vznikat karcinogenní cyklické nitrosaminy. [1]

## 1.5 Stanovení

Detekce BA je důležitou součástí při zkoumání potenciálních otrav jídlem, pro ověření procesu výroby potravin a také jako měřítko kvality (čerstvosti) surovin a hotových výrobků. Metody běžné kvantifikace BA lze rozdělit do dvou skupin. Buď je možné přímo detekovat a kvantifikovat jednotlivé BA nebo se využívá metod, které detekují mikroorganismy mající příslušnou dekarboxylasovou aktivitu. [12]

Pro detekci BA byla vyvinuta celá řada metod. Ty nejpoužívanější jsou založeny na chromatografických metodách. Mezi nejvíce používané patří vysoko účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní nebo fluorescenční detekcí (HPLC/MS, HPLC/FLD). Z chromatografických metod nacházejí uplatnění také plynová chromatografie s hmotnostní nebo plamenově ionizační detekcí (GC/MS, GC/FID) nebo chromatografie na tenké vrstvě. Dále jsou používány i metody jako je kapilární zónová elektroforéza nebo metody infračervené spektrometrie. [7; 12]

Současné moderní techniky dovolují sledovat nejen jednotlivé BA, ale také umožňují přímo detekovat a kvantifikovat jednotlivé bakterie produkující BA. Protože je detekce těchto bakterií pomocí běžných kultivačních technik zdoluhavá a nespolehlivá, využívají se v dnešní době metody molekulární biologie. Uplatnění zde nachází zejména PCR, pomocí které lze s využitím specifických primerů rychle zachytit bakterie nesoucí příslušné geny zodpovědné za produkci dekarboxylačních enzymů. Metody molekulární biologie se stávají zajímavou alternativou k řešení nedostatků tradičních metod.

## 2 POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Zkratka PCR pochází z anglického **P**olymerase **C**hain **R**eaction. Polymerasová řetězová reakce byla objevena Kary B. Mullisem v roce 1985. PCR je metoda zmnožení určité sekvence DNA. Má hlavně tu výhodu, že umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA *in vitro* bez jejího předchozího klonování ve vektorech. Další neméně významnou výhodou je, že PCR vyžaduje pro analýzu jen malé množství genetického materiálu, který může být dokonce i poškozený. Pomocí PCR se nyní může detekovat podstatě jakýkoliv gen z jakéhokoliv organismu. Z PCR se stala rutinní laboratorní technika, díky její zdánlivé jednoduchosti a snadnosti použití je zpřístupněna početným laboratořím. Existuje mnoho vědeckých prací popisujících nové aplikace nebo nové metody PCR. A také existuje nesčetně komerčních produktů a sad pro aplikace PCR pro výzkum a diagnostiku. [18; 19]

### 2.1 Princip PCR

Polymerasová řetězová reakce využívá možnost amplifikace DNA v *in vitro* podmínkách. Princip PCR je obdobou replikace nukleových kyselin, tedy základního molekulárního procesu všech živých organismů. [18; 20]

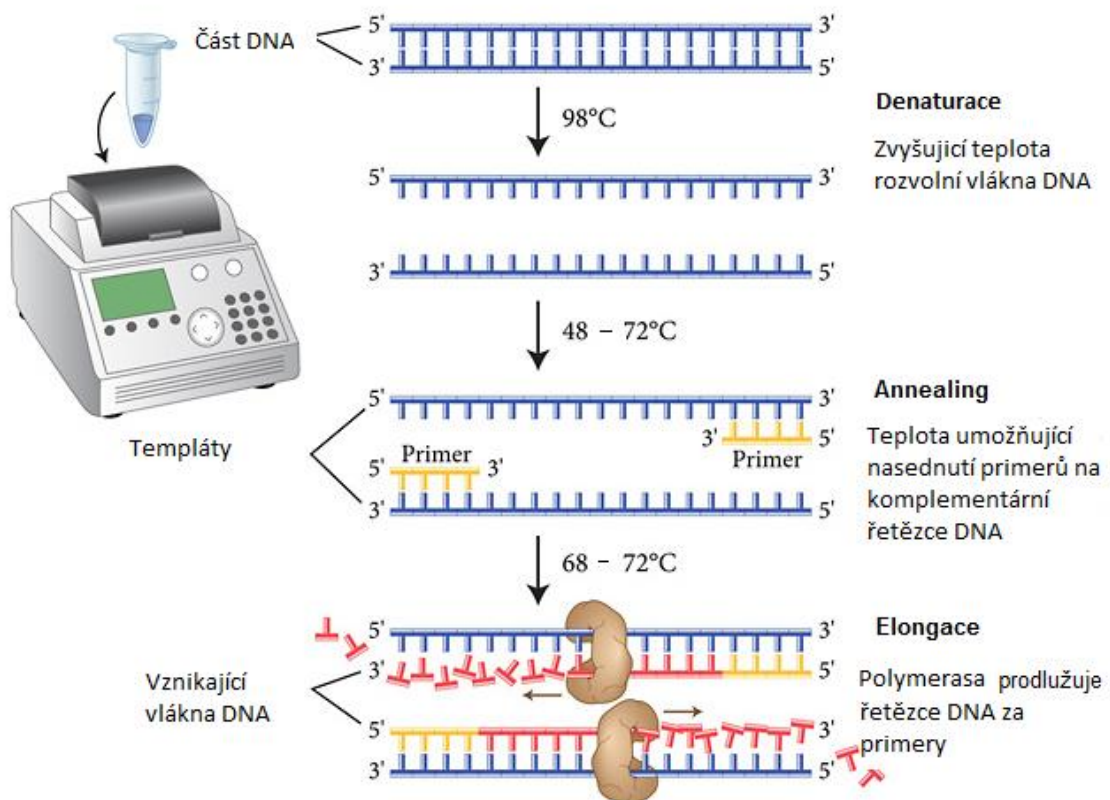
PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' pomocí DNA-polymerasy. DNA-polymerasa, která se v reakci využívá, je termostabilní enzym, který katalyzuje prodlužování polydeoxyribonukleotidových řetězců. Využití nachází zejména *Taq* DNA-polymerasa izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. [18; 20]

Specifičnost reakce je založena na použití dvou výchozích primerů (syntetických oligonukleotidů – krátkých jednořetězcových úseků DNA), které hybridizují s komplementární sekvencí opačných vláken DNA a ohraničují žádanou sekvenci. Vzorek DNA je nejdříve zahříván, aby se oddělila obě vlákna, primery se nechají navázat na DNA a každé vlákno je kopírováno DNA-polymerasou počínajíc od primeru. Dvě vlákna DNA slouží jako matrice pro syntézu nové DNA ze dvou primerů. [18; 20]

#### 2.1.1 Průběh reakce

Metodu PCR lze shrnout ve třech krocích, které jsou vyobrazeny na obrázku (*Obr. 3*). Nejprve probíhá denaturace. Dochází k oddělení vláken DNA při teplotě nad 90 °C, kdy

jsou rozrušeny vodíkové můstky, kterými jsou spojeny purinové a pyrimidinové báze komplementárních nukleotidů. Vznikají dvě jednořetězcové vlákna DNA. Po tomto procesu následuje tzv. annealing, kdy probíhá komplementární nasednutí (hybridizace) primerů při specifické teplotě (obvykle mezi 50 °C až 60 °C), kdy primery ohraničují oblast DNA, která bude nadále amplifikována. A v posledním třetím kroku probíhá prodlužování (elongace) řetězce při teplotě 65 °C až 75 °C. Na 3' konce primerů nasedá DNA-polymerasa, která připojuje nové deoxynukleosidtrifosfáty a dochází k prodlužování řetězce ve směru 5' → 3'. [19; 21]



Obr. 3. Průběh polymerasové řetězové reakce [22]

PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, ve kterém se teplota mění v naprogramovaných časových úsecích. Tato automatizace je jedním z důležitých pokroků, které vedly k tomu, aby se PCR stala široce dostupná. Než byly termocyklery k dispozici, PCR byla prováděna s použitím tří vodních lázní nastavených na teplotu obvykle 95 °C, 55 °C a 72 °C a reakční zkumavky ve stojanech byly přesouvány ručně mezi lázněmi. Množství DNA, která je syntetizována se zvyšuje exponenciálně ( $2^n$ , n je počet cyklů).

Několik kopií cílové DNA může být namnoženo na miliony kopií po 30-40 cyklech. [20; 23]

Teplota a doba trvání jednotlivých kroků jsou velmi důležitými parametry pro optimalizaci. Počet cyklů závisí na počáteční koncentraci DNA a obvykle je v rozpětí od 25 do 35 cyklů. Při velkém počtu cyklů se příliš zvyšuje množství vznikajících nespecifických produktů. [19]

### 2.1.2 Složky reakční směsi

Reakční směs pro PCR se skládá z templátové DNA, *Taq* DNA-polymerasy, hořečnatých iontů, pufru, 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfátů (dNTP) a dvojice primerů.

Puftr se skládá ze síranu amonného nebo chloridu draselného a jsou v něm obsaženy Tris-HCl a chlorid hořečnatý. pH Tris-HCl pufru je závislé na teplotě, proto se během PCR pH reakční směsi pohybuje mezi 6,8 a 8,3. Hořečnaté ionty jsou jednou z nejdůležitějších součástí reakční směsi PCR, jejich koncentrace může mít vliv na specifitu a účinnost reakce. Tvoří rozpustný komplex s dNTP rozpoznávaný DNA-polymerasou. Jelikož ionty  $Mg^{2+}$  interagují nejen s dNTP, ale i s primery a DNA, je třeba stanovit pro každou aplikaci optimální koncentraci těchto iontů. [18]

Při amplifikacích je většinou používána *Taq* DNA-polymerasa. Vykazuje pouze 5' → 3' polymerasovou aktivitu, postrádá 3' → 5' exonukleasovou aktivitu. Pro většinu aplikací je však přesnost řazení nukleotidů *Taq* DNA-polymerasy dostačující. Výhodou této polymerasy je její vysoká procesivita. Mimo *Taq* DNA-polymerasy se používají také polymerasy vykazující 3' → 5' exonukleasovou aktivitu např. *Pfu*, *Pwo* a *Ultma* DNA-polymerasy, které byly izolovány z *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* a *Thermotoga maritima*. [18]

Vodný roztok dNTP obsahuje směs čtyř nukleotidů. Jedná se o směs tvořenou deoxyadenosintrifosfátem (dATP), deoxycytidintrifosfátem (dCTP), deoxyguanosintrifosfátem (dGTP) a deoxythymidintrifosfátem (dTTP), které řadí DNA-polymerasa do nově vznikajícího řetězce. [24]

Cílová DNA může být získána z mnohých biologických materiálů, tělních tekutin, kultur mikroorganismů, buněk tkáňových kultur, atd. Jelikož je metoda PCR velmi citlivá je vhodné provést hrubou extrakci. U vzorků by měla být věnována pozornost případným nečistotám, které mimo jiné mohou inhibovat *Taq* DNA-polymerasu. Pro PCR je třeba

pouze malé množství templátové DNA, proto mohou být tyto nečistoty ve většině případů odstraněny dostatečným naředěním vzorku. [19]

Pro většinu PCR jsou potřebné dvě sady primerů s odlišnými sekvencemi, které nasedají na komplementární řetězce templátové DNA. Při amplifikaci určitého genu je přesnost a úspěšnost závislá na obou primerech, které by měly splňovat určité požadavky:

- zpravidla obsahovat 18-25 nukleotidů
- obsah G+C by se měl pohybovat mezi 40 % až 60 %
- mít vyvážený poměr G/C a A/T párů
- primery by měly mít obdobnou teplotu tání ( $T_m$ )
- teplota  $T_m$  (teplota, kdy se váže primer na templát) by měla být nejméně 50 °C
- primery by neměly být vzájemně komplementární, aby netvořily vzájemně dimery
- neměly by obsahovat vnitřní sekundární struktury.

[19]

Primery lze navrhovat v mnohých počítačových programech, ve kterých lze dodržet výše popsaná pravidla. Dostupné syntetizátory mají dostatečnou čistotu vyrobených primerů (> 98 %) a primery mohou být použity bez přečistění. Příliš vysoká koncentrace některé ze složek reakce může vést k chybám a vzniku nesespecifických produktů. [19]

Pro polymerasové řetězové reakce jsou k dispozici komerční PCR kity a premixy. Ty obsahují pufr, dNTP a *Taq* DNA-polymerasu v koncentraci, která umožňuje jen přidání templátové DNA a primerů za vzniku konečného reakčního objemu. V některých případech jsou premixy bez obsahu  $Mg^{2+}$ , což umožňuje pokusy, které mají optimalizovat množství těchto iontů v reakční směsi. [18]

### 2.1.3 Detekce amplikonů

Produktem PCR jsou amplikony - úseky DNA definované délkou a velikostí (obvykle desítky až tisíce nukleotidů). [19] Nejjednodušší metodou analýzy PCR produktu je gelová elektroforéza. V závislosti na očekávané velikosti amplifikovaného fragmentu je produkt PCR nanesen do 0,8-3% agarosového gelu s obsahem ethidium bromidu. Ke vzorku by měl být přidán marker (např. bromfenolová modř), pokud nebyla použita reakční směs již obsahující barvivo, aby se usnadnila vizualizace migrace vzorku přes gel. Na elektroforetickém gelu je dosaženo rozdělení amplikonů rozdílných velikostí tím,

že v husté síti gelu procházejí větší molekuly pomaleji a jsou tedy nalezeny v menší vzdálenosti od nanášecí jamky. [18]

## 2.2 Modifikace PCR

Vedle standardní metody PCR se používá řada modifikací, z nichž některé budou zmíněny, podrobněji bude rozepsána metoda Real Time-PCR v kapitole 2.3.

### 2.2.1 PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR)

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly mRNA do DNA. Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptasou, která se vyskytuje u řady retrovirů. V současné době lze reverzní transkripci provádět také v podmínkách *in vitro*, kdy různé komerční firmy dodávají různé typy rekombinantních reverzních transkriptas.

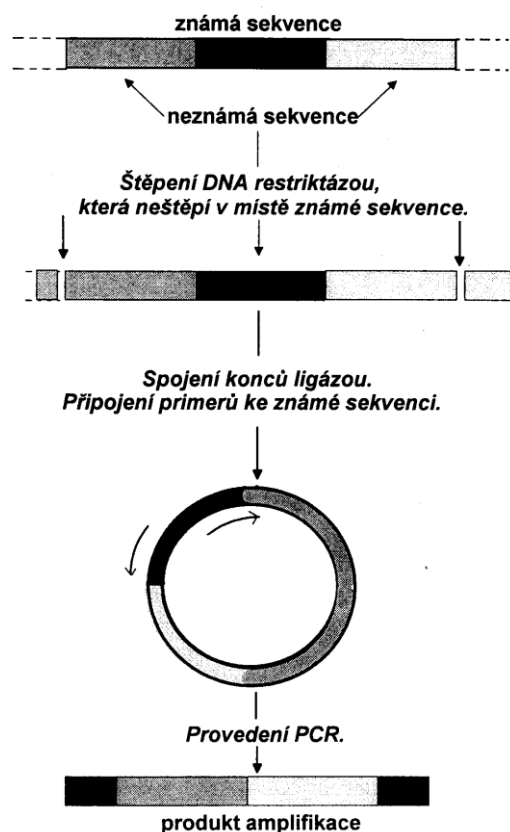
Detekce a analýza molekul RNA patří k důležitým molekulárně biologickým postupům. Molekuly mRNA se podílejí pouze 1-2 % na celkovém množství izolované RNA (převážnou část tvoří rRNA). Reverzní transkripcí je získána molekula DNA, která je označována jako cDNA (jednořetězcová komplementární DNA), a ta je následně amplifikována standardním postupem. RT-PCR je velmi hodnotná metoda k analýze genové exprese, k detekci infekčních agens nebo k detekci genetických nemocí. [21]

### 2.2.2 Inverzní PCR

Předpokladem klasického formátu PCR je znalost pořadí bází na začátku a na konci požadované sekvence DNA. Inverzní PCR umožňuje amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci, které jsou na obou stranách ohraničeny úseky o známé sekvenci (viz *Obr. 4*). Při této metodě je nejprve neznámý úsek DNA štěpen vhodnými restrikcími enzymy. Druhým krokem je vytvoření cirkulární molekuly pomocí DNA ligasy. Primery navržené pro inverzní PCR jsou komplementární ke známé sekvenci DNA, ale jejich 3' konce jsou v původní molekule orientovány od sebe, na rozdíl od klasické PCR, kdy 3' konce směřují k sobě (*Obr. 4*).

K linearizaci cirkulární DNA je využívána druhá restrikcí endonukleasa, která štěpí cílové místo v nám známé sekvenci. Tím se sekvence komplementární k primerům dostanou na okraje fragmentu a může proběhnout klasická PCR. [19; 21]





Obr. 4. Inverzní PCR [21]

### 2.2.3 Asymetrická PCR

Asymetrická PCR je modifikace PCR, která umožňuje preferenční syntézu jenom jednoho vlákna z duplexu DNA. Tato modifikace PCR se od klasického formátu liší tím, že výchozí koncentrace primerů se liší faktorem 100, to znamená, že jeden primer má 100x vyšší koncentraci než druhý. Jako produkt reakce tak vzniká jednovláknová DNA (ssDNA, single-stranded DNA), která je vhodná např. pro Sangerovu metodu sekvenování, dnes jednu z nejběžnějších metod. [19; 21]

### 2.2.4 Multiplex (mnohonásobná) PCR

V této variantě PCR je do reakční směsi přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Reakční podmínky je třeba empiricky krok za krokem optimalizovat. Výhodou této varianty je nižší cena než při jednotlivých, separovaných, reakčních procesech. Používá se pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA,

testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a hlavně pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky. [19]

### **2.2.5 Nested (odstupňovaná) PCR**

Během této modifikace PCR probíhá amplifikace dvoufázově. Nested PCR využívá vnějších a vnitřních primerů, proto je to metoda vysoce citlivá oproti standardní PCR a umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA. Nejprve probíhá v první fázi s 15-30 amplifikačními cykly a s jedním párem tzv. vnějších primerů namnožení delší sekvence nukleové kyseliny. Vzniklý produkt je převeden do nové zkumavky a probíhá druhý amplifikační krok, opět o 15-30 cyklech, s dalším párem tzv. vnitřních primerů. V této druhé fázi je amplifikována kratší vnitřní sekvence. Výhodou této techniky je vysoká výtěžnost a specifita, která je dána 2 dvojicemi primerů. Přenos produktů z první reakce do druhé umožňuje naředění inhibitorů polymerasy, ale na druhou stranu se zvyšuje možné riziko kontaminace. Pro tuto metodu byly popsány i možnosti provedení reakce v jedné zkumavce. [19; 25]

### **2.2.6 Kvantitativní PCR (QPCR)**

To, že při PCR dochází k exponenciální amplifikaci cílové sekvence nukleové kyseliny, naznačuje, že by se PCR mohlo používat jako kvantitativní metoda. Avšak již dříve byly popsány metody kvantifikace DNA pomocí mnohonásobné PCR s kvantitativně kompetitivním stanovením (QC-PCR). Zde je amplifikováno známé množství kompetitivního templátu se stejným množstvím cílové DNA. Okamžik, ve kterém jsou intenzity PCR-produktů odvozených z cílové DNA a kompetitivní DNA ekvivalentní, je potom použit ke stanovení množství cílové sekvence v původním vzorku. [19]

## **2.3 Real Time-PCR (qPCR)**

Tato moderní metoda umožňuje přímou kvantifikaci nukleových kyselin v reálném čase. Real Time-PCR je metoda založena na klasickém PCR. Rozdíl je ale v tom, že Real Time-PCR umožňuje monitorování fluorescence emitované v průběhu polymerasové řetězové reakce jakožto indikátoru amplifikace požadovaného fragmentu v každém cyklu. U klasické PCR je detekován až finální produkt. [21; 26]

Od vzniku Real Time-PCR v roce 1996, byly vyvinuty různé formáty testů a Real Time-PCR přístroje odlišné konstrukce. Tato kvantifikace nukleových kyselin je důležitá při studiu genové exprese, nebo diagnostice některých patogenů. Real Time-PCR se používá k mnoha různým účelům, zejména ale pro kvantifikaci nukleových kyselin a pro stanovení genotypu. [21; 26]

Hlavní výhody Real Time-PCR ve srovnání s jinými metodami pro kvantifikaci nukleových kyselin jsou, že mají mimořádně široký dynamický rozsah (více než osm řádů) a výrazně vyšší spolehlivost výsledků v porovnání s konvenční PCR, protože při Real Time-PCR je znám celý profil amplifikace. Jednotlivé odchylky v účinnosti (způsobené například inhibitory polymeras) lze snadno identifikovat. [26]

### 2.3.1 Princip

Specifikem Real Time-PCR je, že proces amplifikace je monitorován v reálném čase. Je sledována intenzita fluorescence v průběhu PCR ve speciálním zařízení, které kromě cyklického střídání teplot umožňuje právě tuto detekci bez nutnosti detekce produktů PCR elektroforeticky. Takto získané informace, amplifikační křivky, mohou být použity pro kvantifikaci počátečního množství templátu s vysokou přesností v širokém rozsahu koncentrace. Kromě optimalizace faktorů ovlivňujících standardní PCR je nutné optimalizovat také kinetiku reakce. [27; 28]

### 2.3.2 qPCR fluorescenční markery – interkalační barviva a hybridizační sondy

V současné době je stále více využívána kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR, Real Time-PCR) založená na monitorování kinetiky polymerasové řetězové reakce. Pro detekci lze využít barviva se schopností zvýšené interkalace do dvouřetězové DNA nebo fluorescenčně značené jednořetězové sondy, které hybridizují s analyzovanou sekvencí.

Prvním použitým fluorescenčním barvivem pro účely kvantifikace byl ethidium bromid. Jedná se o látku, která se váže velmi intenzivně a specificky na nukleové kyseliny a to tak, že svou plochou molekulou interkaluje mezi ploché páry bází v molekule DNA. Další interkalační barviva jako jsou například YO-PRO-1 nebo SYBR Green I jsou používány dodnes. Barviva, která se vážou na DNA, nemohou být použita u mnohonásobných reakcí a jejich hlavním omezením je nemožnost odlišení nespecifických produktů. Daleko specifičtější je použití hybridizačních sond. Jedná se o krátké úseky nukleových kyselin nesoucí vhodnou značku (např. fluorescenční barvičku, chemiluminofor, enzym, aj.),

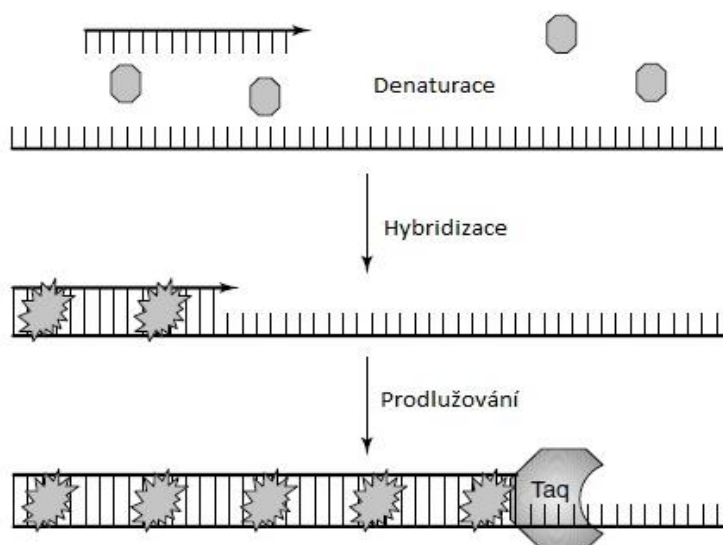
kteří jsou schopny se specificky vázat prostřednictvím vodíkových můstků ke komplementárním sekvencím řetězce nukleové kyseliny. [18; 29]

V následujících podkapitolách budou popsány techniky využívající jak hybridizační sondy, tak technika využívající interkalační barvivo.

### 2.3.2.1 SYBR Green I

SYBR Green I je v dnešní době nejčastěji používaným specifickým fluorescenčním cyaninovým barvivem. Princip interkalace barviva je vyobrazen na obrázku (Obr. 5). Vazebná afinita tohoto interkalačního barviva je více než 100x vyšší než ethidium bromidu. Fluorescence barviva vmezeřeného do dsDNA (dvouřetězcové DNA) je více než 1000x vyšší, než volného barviva, a proto je velmi vhodný pro sledování nárůstu amplifikovaného PCR produktu. Se vzrůstajícím množstvím PCR produktu se signál zvyšuje. SYBR Green I může být buzen modrým světlem o vlnové délce 480 nm. Jeho emisní spektrum je srovnatelné s fluoresceinem s maximem při 520 nm. Nicméně, na rozdíl od TaqMan sond, SYBR Green se váže na všechny dvouvláknové DNA ve vzorku, včetně nespecifických produktů. [28]

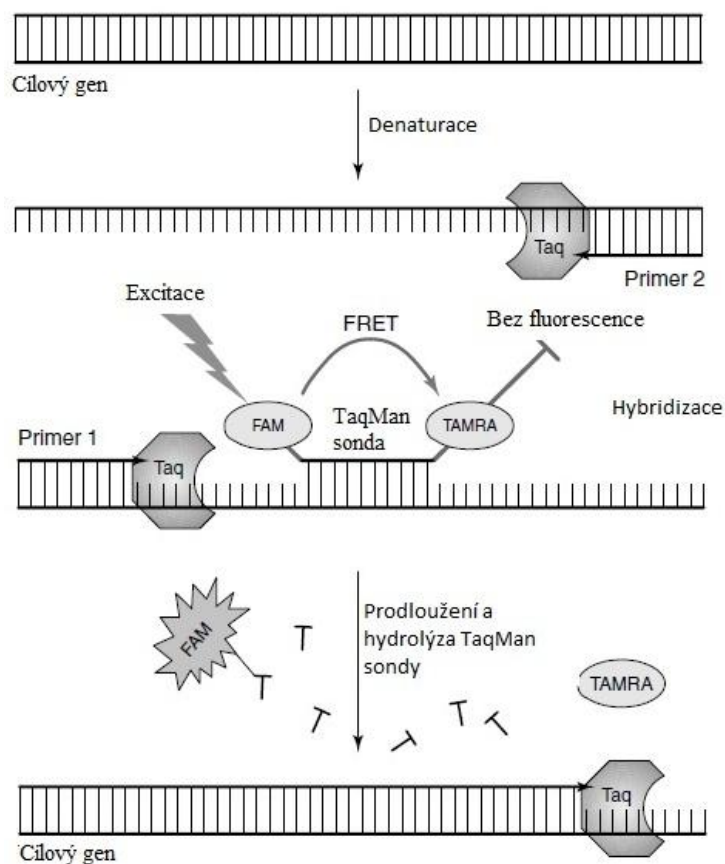
Nespecifické produkty mohou měnit účinnost amplifikace specifických produktů. Zesílení nespecifických produktů (dimerů primerů) má za následek systematickou chybu pro kvantifikaci. Proto je nutná optimalizace. Za předpokladu, že stanovení je optimalizováno, detekce SYBR Green I je dostatečně citlivá i k identifikaci jedné cílové molekuly v reakční směsi. [26]



Obr. 5. Schéma působení barviva SYBER green I [18]

### 2.3.2.2 Sondy TaqMan

TaqMan sondy jsou oligonukleotidy značené na obou koncích. Na 5'-konci je vázán vhodný fluorofor (např. FAM 6 – karboxyfluorescein) s krátkou vlnovou délkou emitovaného záření, na 3'-konci je pak zhášeč (např. TAMRA – Tetramethyl-6-karboxyrhodamin) s delší vlnovou délkou záření. Fluorofor s kratší vlnovou délkou předává energii zhášeči (fluorescenční rezonanční přenos energie, FRET), který v důsledku toho emituje záření s delší vlnovou délkou. Původní záření fluoroforu je utlumen a tento stav zůstává i po nasednutí sondy. Sonda nasedá současně s primery na komplementární sekvenci cílové DNA. Nově syntetizovaný řetězec je postupně prodlužován za katalýzy *Taq* DNA-polymerasy. V okamžiku dosažení místa, kde je navázána sonda se aktivuje exonukleasová podjednotka *Taq* DNA-polymerasy a sonda je hydrolyzována. Při rozpadu sondy je fluorofor vymaněn z vlivu zhášeče a začne emitovat fluorescenční záření (viz Obr. 6) krátké vlnové délky, které je registrováno jako fluorescenční signál. Takto je registrován každý nově vytvořený řetězec. [19; 29; 30]



Obr. 6. Schéma znázorňující princip Real Time-PCR s použitím TaqMan sondy [18]

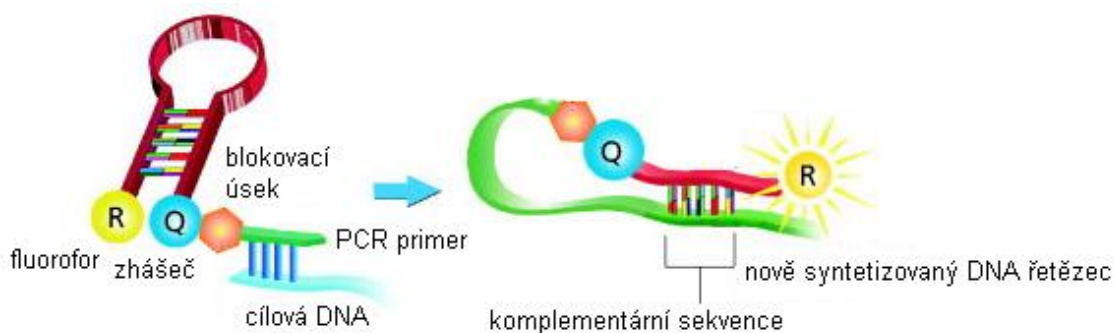


### 2.3.2.4 Scorpions

Mezi další specifické fluorescenční sondy, které jsou navrženy pro PCR v reálném čase, patří tzn. Scorpions<sup>TM</sup>. Jsou využívány dvě varianty: Uni-probes ve tvaru vlásenky nebo Bi-probes v duplexním formátu.

Scorpions<sup>TM</sup> Uni-probe je tvořena jedním řetězcem a podobně jako u molekulárních majáků můžeme rozlišit komplementární úseky kmene i středovou sekvenci smyčky. Na 5'-konci kmenového úseku je vázán fluorofor. 3'-konec sondy je pak napojen na 5'-konec specifického primeru prostřednictvím blokovacího úseku (viz Obr. 8), a zároveň nese zhášec (quencher). Uni-probe nasedá primerem na komplementární úsek cílové nukleové kyseliny a od jeho 3'-konce začíná prodlužování polydeoxyribonukleotidového řetězce za katalýzy *Taq* DNA-polymerasou. Rozvolněním dvojřetězcového kmene dochází k reorganizaci sondy. Tím, že je ve smyčce sondy sekvence totožná s úsekem řetězce cílové nukleové kyseliny blízko za místem, kam nasedá primer, může tato sekvence hybridizovat s úsekem nově syntetizovaného řetězce blízko za 3'-koncem primeru Uni-probe. Část sondy se překlápí, tím se fluorofor dostává z vlivu zhášeče a po excitaci světlem vhodné vlnové délky emituje fluorescenční signál. Intenzita fluorescence je pak přímo úměrná počtu vytvořených ampliconů.

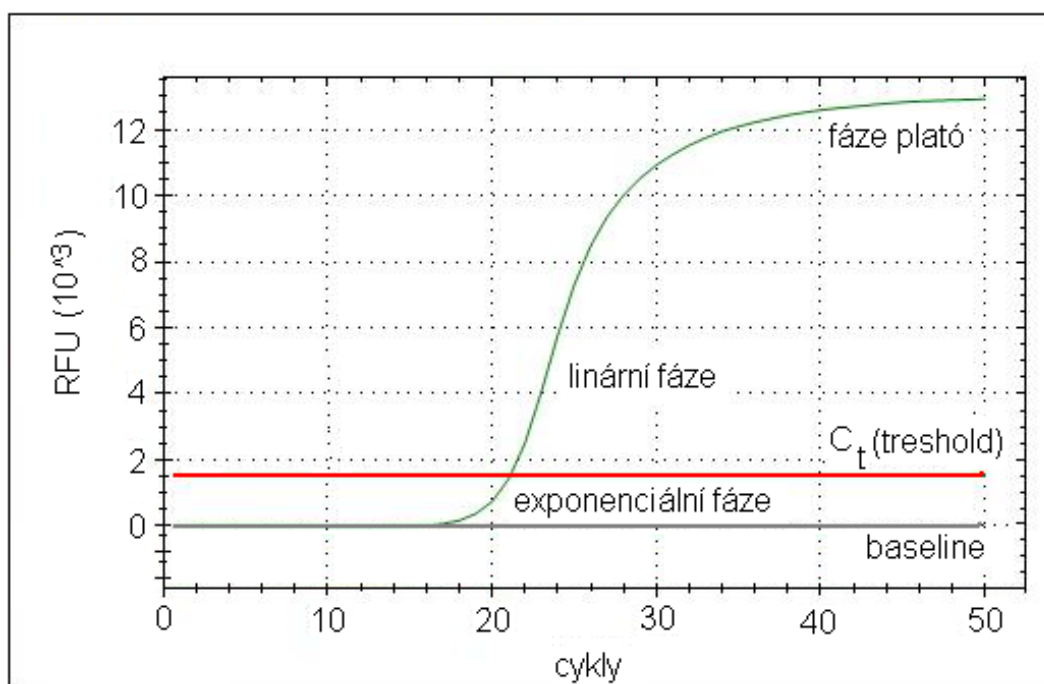
Scorpions<sup>TM</sup> Bi-probe je tvořena dvojicí komplementárních značených oligonukleotidů. První oligonuklid má na 5'-konci navázán fluorofor a nese blokovací úsek a primer. Zhášec je navázán na 3'-konci druhého nukleotidu. Funkční princip je podobný jako u Uni-probes. V průběhu PCR dochází k oddělení oligonukleotidu se zhášečem, a po excitaci je fluoroforem emitováno záření. [19; 29]



Obr. 8. Scorpion (Uni-probe) – zhášení a emise fluorescence [32]

### 2.3.3 Kvantitativní analýza

V průběhu Real Time-PCR reakce je měřena intenzita fluorescence, která je zaznamenána pomocí amplifikačních křivek. Typická amplifikační křivka má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části: exponenciální fázi (vysoce přesná; kvantifikace v Real Time analýze), lineární fázi a variabilní fázi plató (genotypizace jednonukleotidových polymorfismů; kvalitativní analýza), viz *Obr. 9*. [33] Fluorescence barviva nebo sondy je monitorována během každého cyklu PCR. Cílovou (templátovou) nukleovou kyselinou může být DNA, cDNA nebo RNA. Bod, kde fluorescence stoupá nad treshold, tedy prahovou hodnotu pozadí (šum) je označován jako  $C_t$ . Z tohoto důvodu, může být hodnota  $C_t$  spojena s počáteční koncentrací cílové nukleové kyseliny a slouží jako základ pro absolutní nebo relativní kvantifikaci. [27; 34]



*Obr. 9. Amplifikační křivka [33]*

#### 2.3.3.1 Absolutní kvantifikace

Absolutní kvantifikace využívá sériově řaděných standardů známých koncentrací pro vytvoření standardní křivky. Standardní křivka vytváří lineární vztah mezi  $C_t$  a počátečním množstvím celkové RNA nebo cDNA, což umožňuje stanovení koncentrace neznámých vzorků na základě jejich hodnot  $C_t$ . Tato metoda předpokládá, že všechny standardy a vzorky mají přibližně stejnou efektivitu amplifikace. Pokud je použit standard



DNA, pak má metoda větší citlivost, reprodukovatelnost, větší rozsah kvantifikace a také standard DNA je stabilnější než RNA standardy. Nicméně, standart DNA nemůže být použit pro jednokrokovou RT-PCR v důsledku absence kontroly účinnosti reverzní transkripce. [35; 36]

### 2.3.3.2 *Relativní kvantifikace*

Protože může být obtížné absolutně kvantifikovat celkové množství DNA v různých vzorcích, výsledky testovaného genu jsou často normalizovány na referenční gen a je tedy používána metoda relativní kvantifikace. [27]

Metody relativní kvantifikace jsou založeny na principu poměru počtu kopií cílové DNA (RNA) k počtu kopií DNA (RNA) referenčního genu. Tímto jsou vyváženy rozdíly v efektivitě reverzní transkripce. Referenční gen je často tzv. *housekeeping* gen (gen, který je exprimován ve všech typech buněk a ve všech vývojových stádiích), jehož cDNA (vzniklá přepisem mRNA) je amplifikován společně se zkoumaným genem. Proto relativní kvantifikace nevyžaduje standard o známé koncentraci. Pro kvantifikaci exprese cílového (target) genu ve vztahu k odpovídajícímu referenčnímu/*housekeeping* genu je možno použít několik metod. [36] Tyto metody jsou popsány v kapitole 5.5.

### **3 VYUŽITÍ METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE V DETEKCI A KVANTIFIKACI BAKTERIÍ S DEKARBOXYLASOVOU AKTIVITOU**

Včasná detekce bakterií produkujících BA je důležitá v potravinářském průmyslu, jelikož výskyt BA by mohl být příčinou různých nežádoucích účinků a otrav. PCR a hybridizace DNA se staly významnými metodami v detekci a kvantifikaci sledovaných bakterií. Tyto metody přináší celou řadu výhod: citlivost, jednoduchost, možnost specifické detekce bakterií a rychlejší dosažení požadovaných výsledků. Na druhé straně, je ale velkou nevýhodou PCR to, že se ve svém základním uspořádání používá především ke kvalitativním stanovením a neumožňuje rozlišení DNA izolované z živých a mrtvých buněk. Tato schopnost rozlišovat mezi životaschopnými a neživými organismy je důležitá, pokud se PCR používá pro posouzení rizika množení bakterií a kumulace BA v jednotlivých typech potravin. [9]

Z toho důvodu jsou v dnešní době zaváděny a používány různé varianty a modifikace PCR, které tyto nedostatky odstraňují. O tom svědčí i řada publikací z posledních let zaměřených nejen na detekci, ale i kvantifikaci bakterií nesoucích příslušné geny kódující dekarboxylační enzymy.

#### **3.1 METODY PCR A REAL TIME-PCR**

Uceleným přehledem o molekulárně biologických metodách využívaných pro detekci bakterií s dekarboxylasovou aktivitou (Gram pozitivních i Gram negativních) je přehledový článek, publikovaný v roce 2007, kolektivem španělským autorů. Tento článek pojednává o metodě PCR, která může být úspěšně použita pro rutinní detekci bakteriálních kmenů potenciálně vytvářejících histamin, tyramin, putrescin a kadaverin v potravinách. Tato molekulárně biologická metoda je vysoce specifická a její výsledky jsou snadno interpretovatelné ve srovnání s běžnými chromatografickými metodami detekce a kvantifikace jednotlivých BA. V práci je popsána detekce důležitých genů kódujících enzymy podílející se na tvorbě nejčastěji se vyskytujících biogeních aminů. Je zde také přehled primerů navržených pro detekci bakterií produkujících histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Autoři zde rovněž upozorňují i na stinné stránky PCR v klasickém uspořádání a zdůrazňují potenciál Real Time-PCR (qPCR) analýzy. [9]

Řada prací se zabývá rovněž metodikou qPCR (Real Time-PCR) a možnostmi jejího využití při sledování mikrobiální kontaminace potravin. Jednou z nich je práce Martínez et al., [37]. V této práci jsou shrnuty výhody metody Real Time-PCR při zjišťování kvality potravin. qPCR pro kvantifikaci mikroorganismů nabízí mnoho výhod oproti jiným molekulárně biologickým technikám (PCR, DNA-array). Jsou jimi např. univerzálnost, rychlost a citlivost, spolu se schopností kvantifikovat cílový organismus ve složitých matricích. Identifikace a kvantifikace mikroorganismů obvyklými mikrobiologickými metodami trvá několik dní, ale s qPCR je možné identifikaci a kvantifikaci provést během několika hodin. [37]

### **3.1.1 Detekce a kvantifikace bakterií s histidinokarboxylasovou a tyrosinokarboxylasovou aktivitou**

Z biogenních aminů jsou z hlediska toxicity a alimentárních otrav diskutovány zejména histamin a tyramin. O tom svědčí i řada publikovaných prací zaměřených zejména na sledování exprese genu kódujícího histidinokarboxylasu, nebo tyrosinokarboxylasu. [37]

Sledováním exprese genu kódujícího histidinokarboxylasu pomocí metody Real Time-PCR se zabývá práce autorů Björnsdóttir-Butler et al. [38]. Práce je zaměřena na detekci bakterií, jejichž přítomnost přispívá k otravě histaminem, vyskytujícím ve výrobcích z ryb. V této studii bylo sledováno celkem 148 Gram negativních bakterií produkujících (79) a neprodukujících histamin (69) k navržení a posouzení specifčnosti primerů a použité sondy. Detekce histaminu produkujících bakterií pomocí tradičních kultivačních metod je jak zdlouhavá, tak značně nespolehlivá, jak bylo v této studii potvrzeno. Tradiční kultivační metody udávají mnoho falešně pozitivních a negativních výsledků. Výsledky této studie ukazují, že Real Time-PCR metoda použitá v této studii, je rychlá a citlivá. [38]

Další práci, zabývající se sledováním genů kódujících histidinokarboxylasu u Gram pozitivních bakterií, je článek autorů Ladero et al. [39]. Autoři zde sledovali nejen přítomnost histamin produkujících bakterií, ale i obsah histaminu v sýrech prodávaných v obchodech. K analýze využili metody HPLC/FLD a Real Time-PCR, resp. porovnávali výsledky a závislost mezi oběma metodikami. U metodiky Real Time-PCR navrhli určitou hodnotu Ct (prahová hodnota), která sloužila jako indikátor vysoké bakteriální produkce histaminu. Byla provedena také analýza teploty tání (melting temperature) za účelem stanovení specifčnosti reakce. Takto byla zjištěna linearita každého templátu za použití

celkové DNA, a také jejího ředění (1:10 a 1:100). Hodnota Ct pro ředění 1:10 byla zvolena jako srovnávací a vzorek byl považován za pozitivní v případě, že hodnota Ct byla alespoň o 2 jednotky menší než negativní kontrola. Tato metoda byla použita k detekci přítomnosti histamin produkujících kmenů v 80 vzorcích sýrů a výsledky byly porovnány s výsledky HPLC/FLD analýzy. Histamin byl detekován pomocí HPLC/FLD v 63,5 % vzorků, které byly metodou Real Time-PCR stanoveny jako pozitivní. Koncentrace histaminu stanovená metodou HPLC/FLD a Ct hodnota (Real Time-PCR) byly nepřímo úměrné, tudíž nižší hodnoty Ct byly zjištěny v sýrech s vyšším množstvím histaminu. Z této studie vyplynulo, že Real Time-PCR je snadná, rychlá a preventivní metoda pro analýzu velkého množství vzorků a je pomocí ní možné zachytit histamin produkující bakterie dříve, než samotný histamin metodou HPLC/FLD. [39]

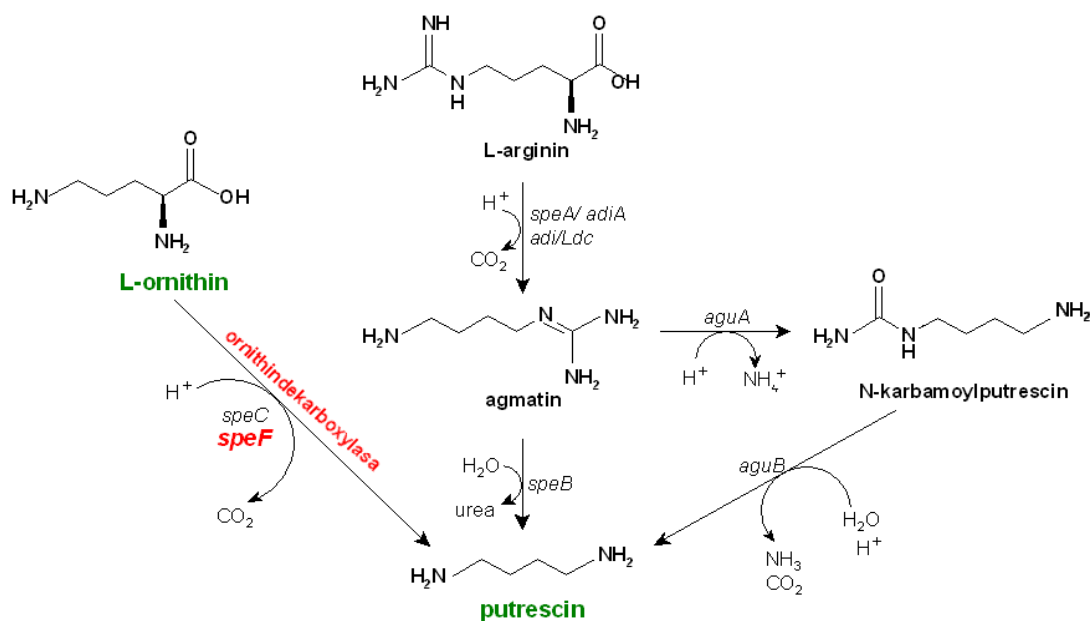
Real Time-PCR metodou pro sledování genů kódujících histidindekarboxylasu se zabývala i skupina Fernándezet et al. [40]. Jejich cílem bylo vyvinout a optimalizovat Real Time-PCR metodu pro přímou detekci a kvantifikaci histamin produkujících kmenů v mléce a sýru. Navrhli sadu primerů pro gen kódující histidindekarboxylasu u Gram pozitivních bakterií. I zde výsledky potvrdily (s ověřením HPLC/FLD), že Real Time-PCR je rychlou, specifickou a vysoce citlivou metodou pro detekci potenciálně produkujících kmenů. [40]

Sledováním exprese genů kódujících tyrosindekarboxylasu a agmatindeiminasu u *Lactobacillus brevis*, pomocí metody Real Time-PCR, se zabývá práce autorů Arena et al. [41]. *Lactobacillus brevis* je schopen produkovat tyramin i putrescin pomocí enzymů tyrosindekarboxylasy a agmatindeiminasy, při kultivaci v syntetických médiích. Cílem této studie bylo sledovat expresi genů *aguA1* a *tdc*, během fermentace vína a dále vyhodnotit vliv dostupnosti substrátu a pH, jakož to významných faktorů ovlivňujících produkci tyrosinu. Relativní exprese genu *aguA1* a *tdc* u *L. brevis* byla analyzována ve vzorcích vína pomocí kvantitativní Real Time-PCR během 30-ti denní inkubační periody. Životaschopnost buněk, hodnoty pH, koncentrace putrescinu a tyraminu byly monitorovány po celou dobu experimentu. Pro výpočet exprese byla použita metoda relativní kvantifikace  $\Delta\Delta Ct$ . V této práci byla také provedena analýza křivky tání pro ověření specifity reakce. Pokusy ukázaly, že *L. brevis* IOEB 9809 je schopen produkovat jak tyramin, tak putrescin během kvašení vína. Real Time-PCR analýza naznačuje silný vliv dostupnosti substrátu na expresi genů kódujících tyrosindekarboxylasu a agmatindeiminasu. [41]

### 3.1.2 Detekce a kvantifikace bakterií produkujících putrescin

Také putrescin je velmi diskutovaným BA, jehož výskyt je úzce spojován s mikrobiálním kažením potravin. Ladero et al. [42] navrhli multiplex metodu qPCR, pro detekci Gram pozitivních bakterií produkujících putrescin v mléčných produktech. Sledovaným genem zde byl *aguA* kódující enzym agmatindeiminasu. V této studii byly testovány tři na sobě nezávislé sady primerů (multiplex analýza), které byly použity pro studium laktobacilů a jejich produkce putrescinu v 29 komerčně dostupných sýrech. Práce poukazuje na to, že tato metoda může být velmi užitečným nástrojem pro včasnou identifikaci a kvantifikaci nežádoucích putrescin produkujících kmenů. [42]

Putrescin jsou schopny produkovat vedle Gram pozitivních bakterií, také bakterie Gram negativní. Ty mohou vytvářet putrescin třemi metabolickými dráhami, zahrnujícími osm enzymů, tak jak je znázorněno na obrázku (Obr. 10), Cílem práce Wunderlichová et al. [43] bylo navrhnout sady primerů schopné detekovat všechny důležité geny (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *adiA*, *adi/LDC* a *aguA*) Gram negativních bakterií, kódující enzymy podílející se na produkci putrescinu. Jako vhodná metoda pro detekci těchto genů se ukázala být metoda Touchdown PCR, která eliminovala tvorbu nespecifických amplikonů. Produkty PCR pro každou sadu primerů, byly sekvenovány, pro potvrzení identity amplikonů a specifčnosti této metody. Autoři uvádějí, že tyto navržené primery jsou také použitelné v multiplex PCR a v Real Time-PCR ke zkoumání vlivu faktorů na genovou expresi cílových genů zahrnutých v produkci putrescinu gram negativními kmeny. [43; 44]



Obr. 10. Schéma metabolismu putrescinu u Gram negativních bakterií [43]

Protože informace o vlivu faktorů na expresi těchto genů v literatuře chybí, bylo na tuto práci navázáno s cílem zavést a validovat metodu Real Time-PCR pro detekci *speF* genu. Jak je patrné z *Obr. 10* putrescin může být tvořen přímou dekarboxylací L-ornithinu prostřednictvím enzymu ornithindekarboxylasy (ODC). Biosyntetická forma tohoto enzymu je kódována genem *speC*, která se vyskytuje v celé řadě bakterií podílejících se na tvorbě putrescinu. Katabolické forma ODC je kódován genem *speF*, který mají jen některé bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, jako jsou např. *Escherichia coli*, *Salmonella* a *Enterobacter*. [43]

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce bylo zavést metodu Real Time-PCR pro detekci vybraného genu u Gram negativních bakterií. Tímto vybraným genem byl *speF*, tedy gen kódující ornithindekaboxylasu.

Konkrétní cíle:

- vypracovat literární rešerši týkající se daného tématu
- otestovat funkčnost navržených sad primerů pro detekci *speF* genu; zvolit optimální teplotu annealingu; zkontrolovat uváděnou velikost amplikonu a zjistit vhodnost těchto primerů pro metodu Real Time-PCR
- analyzovat genovou expresi pomocí relativní kvantifikace u modelové bakterie *Escherichia coli*
- v závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty s reálnými vzorky.



## **5 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY**

### **5.1 Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie**

#### **5.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky**

Autokláv Varioklav H+P, SN 98681104

Automatická pipeta, Nicciipet, Eppendorf (2, 10, 20, 100, 200, 500 a 1000  $\mu$ l)

Bio Vortex V1 dotykový, BioTech

Box Aura PCR BIOAIR MP-300N, Major Science

Centrifuga Hermlr z 100M

Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf AG

Dry block heating termostat, Bio TDB-100, Biotech

Elektroforéza horizontální model 4, OWL Separation System Inc.

Eppendorfové zkumavky, Eppendorf

Chladnička kombinovaná CSA 31020, BEKO

Laboratorní sklo

Mikrovlnná trouba, Electrolux

Nitrilové rukavice, Vasco

PCR Tube Strips, Flat Cap Strips, Bio-Rad

Špičky různých velikostí, Bioplastic

Termocykler CFX 96 Real-Time, Systém BIO RAD

UV-Transiluminátor, Syngene (bioimaging, Incenius)

Váhy KERN KB800, Kern&Sohn GmbH

Zdroj napětí MP3 – 300N, MAJOR SCIENCE

#### **5.1.2 Chemikálie**

Agarosa SeaKem LE Agarose, Lonza,

DNA marker 200-1600 bp, Ascoprot Biotech

Ethidium bromid  $10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-1}$ , SERVA Electrophoresis GmbH,  
Fast Start Universal SYBR Green Master, Rox  
GoTaq® Hot Start Green MasterMix, Promega  
High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche  
High Pure RNA Isolation Kit, Roche  
Marker 100 kbp DNA Ladder , Biolabs  
Marker 100 Bp DNA Ladder, Biolabs  
MEM vitamins 100x, PAA Laboratories GmbH  
Nanášecí pufr (loading buffer) 6x  
Primery - zásobní roztok ( $100 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), KRD - obchodní společnost s.r.o.  
TAE pufr 50x ( $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris báze,  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$ )  
Tris HCl (Trishydrochlorid), SERVA  
Voda pro molekulárně biologické metody, SIGMA

### 5.1.3 Živná média

#### 5.1.3.1 Minerální médium s přidavkem glukosy a směsi vitamínů

100 ml média obsahovalo následující složky:

glukosa	1 g
roztok $\text{KH}_2\text{PO}_4\cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ( $23,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	8 ml
roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ( $9,078 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).	2 ml
roztok $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1 ml
roztok $\text{MgSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ( $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1 ml
roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)\cdot(\text{SO}_4)_2\cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	1 ml
roztok $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ ( $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1 ml
roztok stopových prvků	0,1 ml
roztok vitamínů	1 ml
destilovaná voda	cca 85 ml (doplněno do 100ml odměrné baňky)

### 5.1.3.2 Masopeptonový bujon

Bujon se skládá z chloridu sodného o koncentraci  $3 \text{ g.l}^{-1}$ , masového extraktu o koncentraci  $3 \text{ g.l}^{-1}$ , peptonu o koncentraci  $5 \text{ g.l}^{-1}$ .

## 5.2 Kultivační a izolační postupy

### 5.2.1 Kultivace *Escherichia coli* CCM 3954

*E. coli* byla pro izolaci DNA a RNA kultivována ve dvou mediích.

Čistá kultura bakterií je uchovávána při teplotě  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $100 \mu\text{l}$  suspenze buněk *E. coli* bylo nejprve pipetováno do  $4,5 \text{ ml}$  sterilního masopeptonového bujónu. Kultura byla ponechána při teplotě  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hodin nebo po dobu 48 hodin při teplotě  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Po 24, nebo 48 hodinách bylo  $0,5 \text{ ml}$  výchozí suspenze buněk přeočkováno do  $4,5 \text{ ml}$  sterilního masopeptonového bujónu, do kterého bylo přidáno  $0,2 \%$  argininu, ornithinu a lyzinu (dekarboxylační médium). Bakterie kultivované v tomto médiu jsou v této práci nazývány jako nestresované a označeny písmenem N. Dále bylo přeočkováno  $1 \text{ ml}$ , nebo  $0,5 \text{ ml}$  výchozí suspenze buněk do  $4,5 \text{ ml}$  sterilního minerálního média, které je popsáno v kapitole 5.1.3.1, do kterého byla přidána glukosa a vitamíny. Bakterie kultivované v tomto médiu jsou v této práci nazývány jako stresované a označeny písmenem S. Oba typy médií s naočkovanými bakteriemi byly ponechány po dobu 48 hodin při teplotě  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.2 Kultivace *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

*Pseudomonas aeruginosa* byla kultivována pro izolaci RNA po dobu 24 hodin v termostatu při teplotě  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $100 \mu\text{l}$  suspenze buněk bylo nejprve pipetováno do  $4,5 \text{ ml}$  sterilního masopeptonového bujónu.

### 5.2.3 Izolace nukleových kyselin

Izolace DNA i RNA *E. coli* byla provedena po 48 hodinové kultivaci, viz kapitola kultivace *Escherichia coli* 5.2.1.

### 5.2.3.1 Izolace bakteriální DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí komerční izolační sady High Pure PCR Template Preparation Kit od firmy Roche. Tato sada umožňuje rychlou a účinnou izolaci DNA z nejrůznějších vzorků. Bylo postupováno dle přiloženého návodu:

1. Do 1,5 ml zkumavky (mikrozkumavka typu Eppendorf) bylo pipetováno 200  $\mu$ l bakteriálních buněk (*E. coli.*). Poté byl obsah zkumavky centrifugován při 7715 RPM po dobu pěti minut. Vzniklá peletka byla suspendována v PBS (pufrovaný fyziologický roztok).
2. Následně bylo přidáno 5  $\mu$ l lysozymu (10 mg.ml<sup>-1</sup>) poté byla směs inkubována 15 min při teplotě 37 °C.
3. Bylo přidáno 200  $\mu$ l vazebného pufru (Binding buffer) a 40  $\mu$ l Proteinasy K. Směs byla řádně protřepána pomocí Vortexu a následně temperována po dobu 10 min při teplotě 70 °C v termostatu.
4. Po temperaci bylo přidáno 100  $\mu$ l isopropanolu a směs byla promíchána.
5. Poté byla směs přemístěna na kolonky se speciálním filtrem, společně se sběrnými zkumavkami, a centrifugována při 12 600 RPM po dobu 1 minuty.

Po těchto krocích následně probíhalo promývání a eluce.

1. Filtrát byl vylit a filtrační kolonka byla umístěna do nové tuby, poté bylo přidáno 500  $\mu$ l speciálního pufru na odstranění inhibitorů (Inhibitor removal Buffer) a následně byla provedena centrifugace při 12 600 RPM dobu 1 min.
2. Filtrát byl opět vylit a kolonky umístěny do sběrných zkumavek a bylo napipetováno 500  $\mu$ l promývacího pufru (Washing Buffer) a centrifugováno při 12 600 RPM po dobu 1 min.
3. Krok 2 byl ještě jednou opakován.
4. Po vylití filtrátu byla provedena opakovaná centrifugace po dobu 10 s při maximální rychlosti.
5. Následovala eluce DNA. Filtrační kolonka byla umístěna do zkumavky a bylo přidáno 200  $\mu$ l předehřátého (70 °C) elučního pufru (Elution buffer) do vrchní části filtrační kolonky. Po 10-15 minutách proběhla centrifugace při 12 600 RPM po dobu jedné minuty.
6. Zkumavka obsahuje eluovanou DNA, která má být skladována při -15 až -25 °C.

### 5.2.3.2 Izolace bakteriální RNA

K izolaci RNA bylo použito cca 4 ml média s čistou kulturou *Escherichia coli* CCM 3954 k dosažení maximálního množství RNA. Izolace byla provedena pomocí komerční sady High Pure RNA Isolation Kit od firmy Roche a s pomocí přiloženého návodu:

1. Vzorek (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) byl centrifugován při 10 000 RPM po dobu 10 min a přebytečná kapalina byla vylita. Peletka byla suspendována v 200  $\mu$ l 10 mmol.l<sup>-1</sup> Tris (pH 8,0).
2. Byly přidány 4  $\mu$ l lysozymu (50 mg.ml<sup>-1</sup>) a směs byla inkubována při 37 °C po dobu 10 minut.
3. Poté bylo přidáno 400  $\mu$ l vazebného pufru (Lysis/Binding buffer) a obsah mikrozkušavky byl promíchán pomocí Vortexu.
4. Následně byla suspenze přepipetována do kolonky jejíž součástí byl speciální filtr a sběrné zkumavky.
5. Kolonka se sběrnou zkumavkou byla centrifugována po dobu 15 s při 12 600 RPM. Poté byl filtrát vylit a kolonka s filtrem zkombinována s novou zkumavkou.
6. Ve sterilní mikrozkušavce bylo smícháno 90  $\mu$ l inkubačního pufru (DNase Incubation Buffer) a 10  $\mu$ l DNase I (deoxyribonukleasa I). Tato směs byla pipetována na filtrační kolonku a inkubace probíhala při teplotě +15 až + 25 °C.

Po těchto krocích následovalo promývání a eluce.

1. Nejprve bylo pipetováno 500  $\mu$ l promývacího pufru I (Washing Buffer I). Po centrifugaci při 12 600 RPM po dobu 15 s. byl filtrát vylit a kolonka zkombinována s novou zkumavkou.
2. Bylo napipetováno 500  $\mu$ l promývacího pufru II (Washing Buffer II) a centrifugováno při 12 600 RPM po dobu 15 s. Filtrát byl vylit a kolonka zkombinována s novou zkumavkou.
3. Po té bylo pipetováno 200  $\mu$ l promývacího pufru II (Washing Buffer II). Centrifugace při maximálních otáčkách po dobu 2 min zajistila odstranění veškerého promývacího pufru.
4. Filtrát byl vylit a kolonka zkombinována s novou 1,5ml zkumavkou.
5. Následovala eluce RNA. Bylo pipetováno 50  $\mu$ l elučního pufru (Elution buffer) do vrchní části filtrační kolonky. Po 10-15 min. inkubaci při pokojové teplotě proběhla centrifugace při 12 600 RPM po dobu 1 min.

6. Eluovaná RNA by měla být skladována při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.2.4 Transkripce bakteriální RNA do cDNA

Vyizolovaná RNA byla ihned reverzní transkripcí přepsána do cDNA pomocí komerční sady Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Bylo postupováno dle návodu.

Složení celé reakční směsi je zaznamenáno v tabulkách *Tab. 2* a *Tab. 3*. Dle doporučení výrobce by se koncentrace RNA při reverzní transkripci měla pohybovat kolem  $1\text{ }\mu\text{g}$  v reakční směsi.

Směs komponentů uvedených v *Tab. 2*, byla promíchána a vložena do termocyklu. Zde byla ponechána po dobu 10 min při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Poté byla namíchána směs následujících komponentů, které jsou uvedeny v tabulce *Tab. 3*, následně byla tato směs přidána ke směsi uvedené v tabulce *Tab. 2*. Objem celé směsi tedy činil  $20\text{ }\mu\text{l}$ . Finální směs byla jemně promíchána a krátce centrifugována při nízkých otáčkách a poté byla vložena do termocyklu a inkubována při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 min a následně při teplotě  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 min. Inaktivace reverzní transkriptasy byla uskutečněna inkubací směsi při teplotě  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 min. Získaná cDNA může být skladována delší dobu při  $-15$  až  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Tab. 2. Komponenty a jejich koncentrace (mix templátu a primerů) pro reverzní transkripci*

Komponent	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	Koncentrace
Random Hexamer Primer ( $600\text{ pmol }\mu\text{l}^{-1}$ )	2	$60\text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$
Voda	variabilní	-
RNA	variabilní	variabilní
<b>Finální objem [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>13</b>	

Tab. 3. Složení a koncentrace zbývajících složek pro reverzní transkripci

Komponent	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	Koncentrace
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Bufer	4	1 x (s obsahem 8 $\text{mmol.l}^{-1}$ $\text{MgCl}_2$ )
Protector RNase Inhibitor (40 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,5	20 U
Deoxynucleotidemix	2	1 $\text{mmol.l}^{-1}$ každý
Transkriptor Reverse Transcriptase (20 U. $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,5	10 U
<b>Finální objem [<math>\mu\text{l}</math>]</b>		<b>20</b>

### 5.3 Reakční směsi PCR

#### 5.3.1 Klasická PCR

Pro účely klasické PCR byl použit komerční Master MIX (GoTaq Hot Start Green Master Mix Promega). Složení a koncentrace jednotlivých složek použitých ve směsi je uvedeno v následující tabulce (Tab. 4). Jako negativní kontrola byla použita reakční směs obsahující uvedené komponenty vyjma templátové DNA.

Tab. 4. Reakční směs – složení a koncentrace jednotlivých složek pro PCR analýzu

Komponent	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	Koncentrace
GoTaq Hot Start Green Master Mix Promega	12,5	1x
Voda	9,5	-
Kódující („Forward“) primer (20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	1	800 $\text{nmol.l}^{-1}$
Antikódující („Reverse“) primer (20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	1	800 $\text{nmol.l}^{-1}$
DNA	1	variabilní
<b>Finální objem [<math>\mu\text{l}</math>]</b>		<b>25</b>

Po proběhnutí PCR byly výsledné amplikony (ohraňované amplifikované úseky DNA) analyzovány pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu s přidavkem fluorescenčního interkalačního barviva ethidium bromidu. Elektroforéza probíhala při napětí 90 V po dobu 1 hodiny.

Gel byl následně umístěn na plochu transiluminátoru, kde je po zapnutí širokospektrého UV-záření filtrem propouštěno jen záření určité vlnové délky, které je potřebné pro excitaci fluorescence použitého fluorescenčního barviva. Tím dochází k vizualizaci gelu. Jako standardy (markery) molekulové hmotnosti byly použity: DNA marker 200-1600 bp, 100bp DNA Ladder a 100kbp DNA Ladder. Jedná se o směs molekul nukleových kyselin o známé velikosti, které jsou tříděny v jedné nebo více drahách gelové elektroforézy souběžně s neznámými vzorky. Srovnáním polohy neznámého pruhu s pruhy markeru o známé velikosti lze odhadnout velikost neznámé molekuly.

### 5.3.2 Reakční směs pro pro Real Time-PCR

Metoda Real Time-PCR vyžaduje odlišné složení reakční směsi než klasická PCR. V tomto případě byla použita komerční směs Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) od firmy Roche, obsahující všechny potřebné komponenty. Koncentrace jednotlivých složek použitých při jedné reakci jsou zaznamenány v následující tabulce (Tab. 5).

Tab. 5. Reakční směs – složení a koncentrace jednotlivých složek pro Real Time-PCR

Komponent	Objem [μl]	Koncentrace
Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)	12,5	1x
Voda	9,5	-
Kódující („Forward“) primer (30 μmol.l <sup>-1</sup> )	0,25	300 nmol.l <sup>-1</sup>
Antikódující („Reverse“) primer (30 μmol.l <sup>-1</sup> )	0,25	300 nmol.l <sup>-1</sup>
DNA	2,5	variabilní
<b>Finální objem [μl]</b>	<b>25</b>	



## 5.4 Použité primery

### 5.4.1 Primery pro *speF* gen

Jak již bylo uvedeno, gen *speF* kóduje enzym ornithindekarboxylasu, tedy enzym katalyzující přeměnu L-ornithinu na putrescin u Gram negativních bakterií. Mgr. Wunderlichová, Ph.D. ve své disertační práci navrhla několik sad primerů vhodných pro detekci tohoto genu metodou PCR. [44] Nicméně, ne všechny primery jsou vhodné pro metodu Real Time-PCR. Proto bylo potřeba vybrat a otestovat funkčnost a vhodnost jednotlivých sad pro sledování genu právě touto metodou.

Pro detekci genu *speF* byly zkoušeny dvě navržené sady primerů – sada 4R+2F s výsledným amplikonem o velikosti 196 bp a sada 1R+3F s výsledným amplikonem 199 bp. Sekvence těchto sad primerů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6).

Tab. 6. Sekvence a názvy primerů použitých pro sledování testovaného genu *speF* (kódujícího enzym ornithindekarboxylasu)

Název	Sekvence
4R	5'-GATAGAAYGGGCTGGTGG-3'*
2F	5'-TCGCCRCTGYTGCTG-3'***
1R	5'-AGAAYGGGCTGGTGGAGG-3'*
3F	5'-TCGCCRCTGYTGCTGG-3'***

\*Y=C nebo T; \*\*R= A nebo G

### 5.4.2 Primery pro referenční geny

Jako referenční geny (tzv. *housekeeping* geny) bývají voleny takové geny, které jsou exprimovány ve všech typech buněk a ve všech vývojových stádiích. Na základě literární rešerše byl nejprve vybrán gen *GyrA* kódující gyrasu, tedy enzym důležitý pro správný průběh replikace DNA. [45; 46] Nicméně v průběhu práce se tento referenční gen projevil jako „nehodný“, proto byl vybrán druhý gen *GapA* kódující enzym glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenasu (GADPH), enzym glykolytické dráhy. Pro tento gen byly testovány dvě

sady primerů. [47; 48] Sekvence všech testovaných sad primerů a jejich názvy jsou uvedeny v tabulce. (Tab. 7).

*Tab. 7. Sekvence a názvy primerů použitých pro sledování referenčních genů GyrA a GapA (kódujících enzymy gyrasu a glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenasu)*

Název	Sekvence
GyrA <sub>1</sub> F	5'-TAAAAAACTTTGTCACGAATATGCC-3'
GyrA <sub>1</sub> R	5'-GAGACATTATGCTTCACCTTCTG-3'
GyrA <sub>2</sub> F	5'-TGCGAGAGAAATTACACC-3'
GyrA <sub>2</sub> R	5'AATATGTTCCATCAGCCC-3'
GAPDH F	5'-TCCGTGCTGCTCAGAAACG-3'
GAPDH F	5'-CACTTTCTTCGCACCAGCG-3'
GapA F	5'-ACTTCGACAAATATGCTGGC-3'
GapA R	5'-CGGGATGATGTTCTGGGAA-3'

## 5.5 Relativní kvantifikace

Relativní kvantifikace zjišťuje změny v množství mRNA určitého genu ve skupině vzorků a tuto změnu vyjadřuje jako relativní poměr k množství RNA referenčního genu. Kvantitativní koncový bod Real Time-PCR je hodnota Ct. Hodnota Ct vyjadřuje počet cyklů, ve kterých fluorescence dosáhne prahové (threshold) hodnoty. Číselná hodnota Ct je nepřímo úměrná množství vytvořeného ampliconu – tzn., že čím menší je hodnota Ct, tím větší množství ampliconu je detekováno (tím větší množství cDNA je přítomno ve vzorku).

### 5.5.1 Vyhodnocení exprese

Pro výpočet poměru množství cílového ku referenčnímu genu existují různé matematické modely. Lze využít model bez korekce efektivity tzv. komparativní delta-delta metodu a model s korekcí efektivity, nazývaný Pfafflova metoda. [35]

### 5.5.1.1 Metoda $\Delta\Delta Ct$

Pro svou jednoduchost je často využívána metoda delta-delta Ct, která využívá k výpočtu poměru množství cílového ku referenčnímu genu vzorec (1). Tato metoda je však výhodná výhradně pro PCR probíhající v exponenciální fázi amplifikace se 100% účinností (tzn. za zdvojnásobení počtu ampliconů mezi jednotlivými cykly). Základním předpokladem je tedy stejná efektivita amplifikace jak cílového (target), tak i referenčního (housekeeping) genu. Ratio (v rovnicích označeno písmenem R) udává relativní změnu exprese (násobek změny exprese cílového genu mezi kontrolou a cílovým (target) genem). [49]

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (1)$$

kdy:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{testovaného vzorku}} - \Delta Ct_{\text{kontrolního vzorku}} \quad (2)$$

$$\Delta Ct_{\text{testovaného vzorku}} = Ct_{\text{cílového genu}} - Ct_{\text{housekeeping genu}} \quad (3)$$

### 5.5.1.2 Pfafflova metoda

Mnohem přesnější a korektnější přístup k posouzení míry exprese je stanovení reálné efektivity konkrétní PCR pro cílový i referenční gen a jejich zohlednění při matematickém hodnocení míry exprese. Pfafflova metoda je metodou beroucí v potaz možný rozdíl mezi rychlostí - efektivitou amplifikace u jednotlivých genů.

Pro výpočet je tedy nezbytné stanovit efektivity pro každý gen. Tyto se jednoduše určí ze směrnice kalibrační křivky (závislost Ct na logaritmu koncentrace) pomocí vzorce. [50]

$$E = 10^{-1/\text{směrnice}} \quad (4)$$

Pokud je hodnota efektivity rovna 2 je tato hodnota považována za ideální a amplifikace probíhá exponenciálně.

Samotný výpočet poměru množství cílového ku referenčnímu genu se potom řídí vzorcem:

$$R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{kontrola-vzorek})}}{E_{\text{housekeeping}}^{\Delta Ct_{\text{housekeeping}}(\text{kontrola-vzorek})}} \quad (5)$$

Výpočet dle Pfaffla je matematicky ekvivalentní k metodě  $\Delta\Delta C_t$ , ale s tím rozdílem, že se normalizuje  $C_t$  kontroly ku  $C_t$  vzorku zvlášť pro hledaný a zvlášť pro referenční gen. Ve skutečnosti je komparativní  $\Delta\Delta C_t$  speciální jednoduchý případ metody Pfaffla, kde se efektivita cílového i referenčního (housekeepingového) genu rovná hodnotě 2. [27; 51]

## 5.6 Analýza křivky tání

Jelikož jsou během Real Time-PCR reakce, při použití interkalačního fluorescenčního barviva SYBR Green I, detekovány amplikony nespecificky, musí být specifita PCR produktu ověřena analýzou křivek tání (melting analýza).

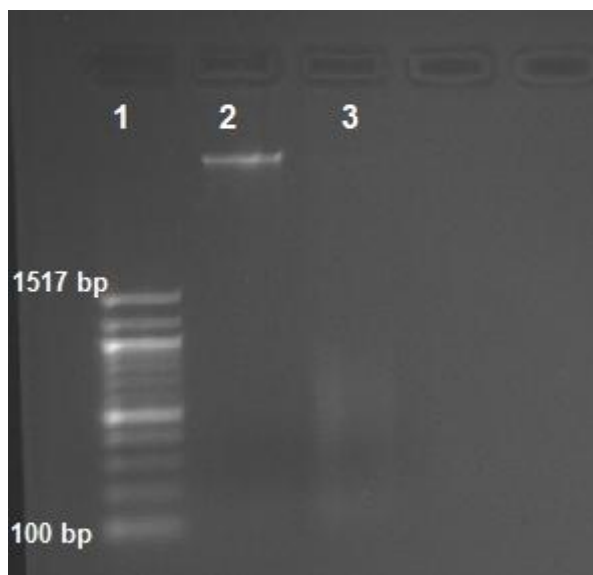
Jako tání DNA se označuje proces separace komplementárních řetězců dsDNA indukovaný zvyšováním teploty. Se vzrůstající teplotou se vlákna DNA oddělují a SYBR Green I se uvolňuje z DNA, tím se snižuje intenzita fluorescence. Takto lze jednoduše detekovat teplotu tání amplikonu a lze zjistit kontaminující DNA, vznikající dimery primerů nebo jejich nesprávné vazby. Tyto nespecifické produkty lze rozlišit pomocí druhé derivace křivky tání. [26; 52]

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Izolace DNA – kontrola kvality izolované DNA

Kontrola kvality DNA probíhala pomocí elektroforetické separace na agarosovém gelu s přídavkem ethidium bromidu.

DNA byla izolována dle uvedeného postupu v kapitole 5.2.3.1, z bakterie *E. coli* kultivované v různých médiích (dekarboxylační, minerální). Poté co byl vzorek smíchán s nanášecím pufrem a nanesen na gel, probíhalo elektroforetické dělení při napětí 90 V po dobu cca 1 hodiny. Na fotografii (Obr. 11) lze vidět tuto izolovanou DNA, která byla nanesena na 1% agarosový gel. Izolovaná DNA z bakterií kultivovaných v dekarboxylačním médiu (nestresované bakterie, N) se nachází v dráze číslo 2. Do dráhy číslo 3 byla nanesena DNA izolovaná z bakterií kultivovaných v minerálním médiu (stresované bakterie, S). I když je v tomto případě patrné, že koncentrace izolované DNA ze stresovaných bakterií jsou velmi nízké, lze izolaci DNA považovat za úspěšnou. Jako marker molekulových hmotností byl použit Marker 100 Bp DNA LEADER Biolab, který byl nanesen do první jamky.



Obr. 11. Izolovaná DNA\*

\*1-Marker; 2-DNA *E.coli*, N; 3-DNA *E.coli*, S

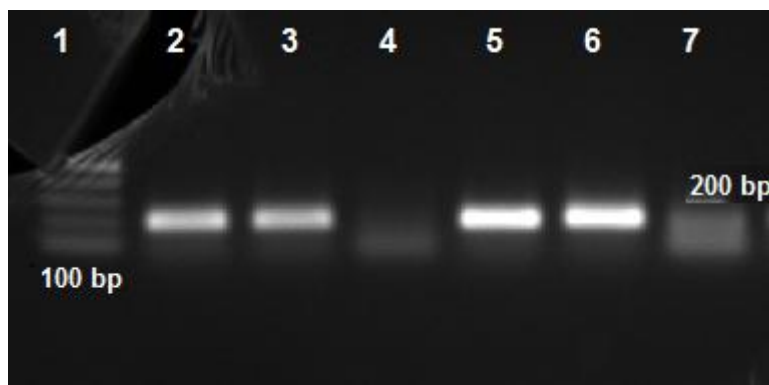
## 6.2 Kontrola funkčnosti navržených primerů (Touchdown-PCR; TD-PCR) a velikosti amplikonu

Jak již bylo v práci uvedeno, Wunderlichová et al. [43; 44] navrhla sady primerů schopné detekovat gen *speF*. V prvním kroku práce bylo třeba zjistit, zda primery uchované v mrazicím boxu jsou vůbec funkční, a také to, zda výsledná délka amplikonu dosahuje požadované hodnoty. Ne každý primer je totiž pro metodu Real Time-PCR vhodný. Je doporučováno, aby výsledný amplikon (metoda Real Time-PCR s použitím fluorescenčního barviva SYBR green I) měl délku 80 – 250 bp. [33; 53]

Nejprve byla funkčnost primerů testována s izolovanou DNA nestresovaných bakterií (N) pomocí TD-PCR. Tato metoda se využívá pro zvýšení specificity PCR. TD-PCR používá cyklický program, kde je teplota annealingu postupně snižována (např. o 1-2 ° C/ každý cyklus). Počáteční teplota nasedání primerů by měla být o několik stupňů vyšší než je odhadovaná  $T_m$  primerů. Tato teplota se pak v průběhu reakce postupně snižuje. [43] Pomocí této metody byly zkoušeny sady primerů 4R+2F a 1R+3F, jejichž sekvence jsou uvedeny v *Tab. 6*. Reakční podmínky TD-PCR jsou shrnuty v tabulce (*Tab. 8*). Produkty byly elektroforeticky rozděleny v 1% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí UV transilumilátoru. Výsledek reakce je na *Obr. 12*. Touto analýzou byla ověřena funkčnost primerů při použití této metody, pro kterou byly primárně navrženy. [44] Na fotografii (*Obr. 12*) lze také vidět, že amplikony dosahují přibližné délky 200 bp.

*Tab. 8. Reakční podmínky TD-PCR*

Fáze reakce	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů [-]
Počáteční denaturace	94	10	1
Denaturace	94	0,5	35
Annealing (nasednutí primerů)	62-47	1	
Elongace (prodlužování)	72	1	
Závěrečná amplifikace	72	10	1



Obr. 12. TD-PCR testování primerů\*

\*1-Marker; 2-DNA *E. coli*, N (primery 4R+2F); 3-DNA *E. coli*, N (primery 4R+2F); 4-negativní kontrola bez DNA (primery 4R+2F); 5-DNA *E. coli*, N (primery 1R+3F); 6-DNA *E. coli*, N (primery 1R+3F); 7-negativní kontrola bez DNA (primery 1R+3F)

### 6.3 Výběr vhodné sady dále používaných primerů pro gen *speF* a volba optimální teploty annealingu

Tento pokus byl proveden pro zjištění optimální teploty annealingu, tedy teploty se kterou bylo dále pracováno také v Real Time-PCR.

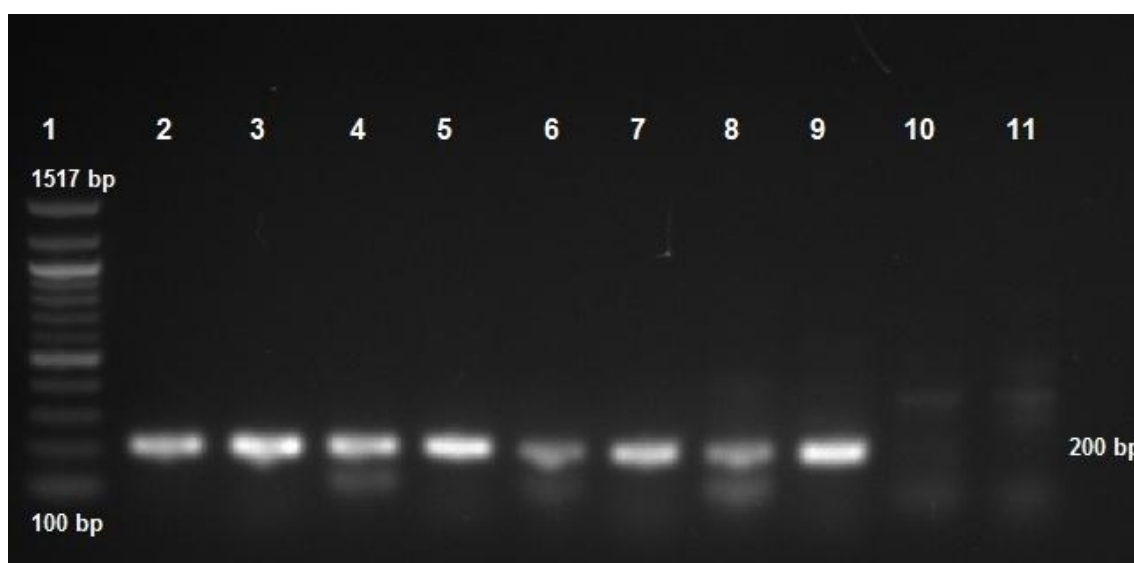
K tomuto účelu bylo využito klasické PCR; testovány byly dvě sady primerů – 4R+2F a 1R+3F, při třech různých teplotách annealingu. Teploty byly voleny v závislosti na  $T_m$  jednotlivých primerů. Reakční směs obsahovala všechny komponenty, tak jak bylo popsáno v kapitole 5.3.1. Do reakce byla použita vyizolovaná DNA z nestresované i ze stresované *E.coli*. Reakční podmínky tohoto experimentu jsou shrnuty v Tab. 9.

Tab. 9. Reakční podmínky PCR-optimalizace teploty annealingu

Fáze reakce	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů [-]
Počáteční denaturace	94	3	1
Denaturace	94	0,5	35
Annealing (nasednutí primerů)	50; 53,3; 57,9	1	
Elongace (prodlužování)	72	1	
Závěrečná amplifikace	72	10	1

Po proběhnutí PCR byl obsah mikrozkušavky opět nanesen na 1% agarosový gel, a výsledek je vyfocen na obrázku (*Obr. 13*).

Pro další testování, metodu Real Time-PCR, byla vybrána sada primerů 4R+2F a jako vhodná teplota annealingu byla zvolena teplota 57,9 °C. Důvodem tohoto výběru byla nejenom optimální délka amplikonu, ale i fakt, že při těchto podmínkách byl PCR produkt na gelu nejostřejší.



*Obr. 13. Kontrola primerů - optimalizace teploty anealingu\**

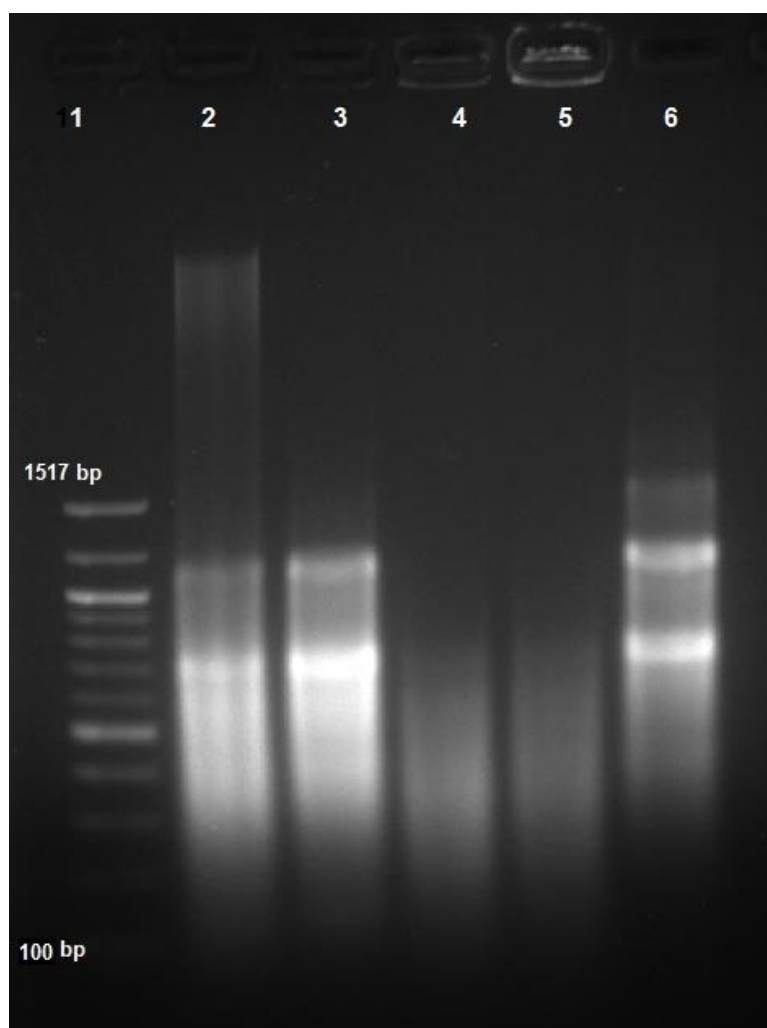
\*1-Marker; 2-T=57,9 °C; N (primery 4R+2F); 3-T=57,9 °C, N (primery 1R+3F); 4-T=53,3 °C, N (primery 4R+2F); 5-T=53,3 °C, N (primery 1R+3F); 6-T=53,3 °C, S (primery 4R+2F); 7-T=53,3 °C, S (primery 1R+3F); 8-T=50 °C, S (primery 4R+2F); 9-T=50 °C, S (primery 1R+3F); 10-T=50 °C, negativní kontrola (primery 4R+2F); 11-T=50 °C, negativní kontrola (primery 1R+3F)

#### **6.4 Izolace RNA – kontrola kvality izolované RNA**

Správné provedení metody Real Time-PCR je podmíněno použitím dostatečného množství vysoce kvalitní RNA. Z tohoto důvodu bylo potřeba tuto nukleovou kyselinu z buněk izolovat. Po izolaci, která je popsána v kapitole 5.2.3.2, byla RNA nanesena na 1% agarosový gel. Na fotografii (*Obr. 14*) lze vidět izolovanou RNA; v drahách č. 2 a 3 je RNA izolovaná z nestresovaných bakterií (N), v drahách č. 4 a 5 pak RNA izolovaná ze stresovaných bakterií (S). Markerem molekulových hmotností byl Marker 100 Bp DNA



LEADER Biolab nanesený do první jamky gelu. Podobně jak tomu bylo u izolace DNA, kdy u stresovaných bakterií (S) byly zaznamenány jen nízké koncentrace izolované molekuly, tak i v případě izolace RNA byly sledovány nižší koncentrace této nukleové kyseliny u stresovaných bakterií. Nicméně izolaci RNA je možno považovat za úspěšnou.



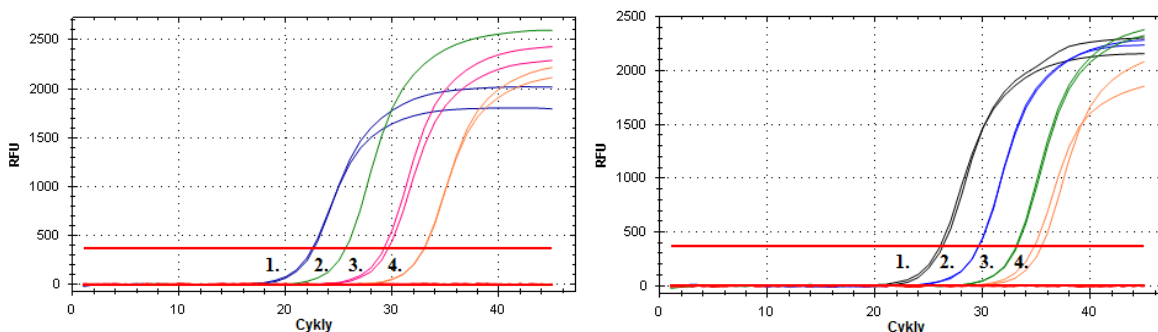
Obr. 14. Izolovaná RNA<sub>2</sub>\*

\*1-Marker; 2-*E.coli* N; 3-*E.coli* N; 4-*E.coli* S; 5-*E.coli* S, 5-*Pseudomonas aeruginosa*

## 6.5 Real Time-PCR

Testovaným genem v této práci byl *speF*, gen kódující enzym ornithindekarboxylasu u Gram negativních bakterií. Po ověření funkčnosti sad primerů navržených pro detekci tohoto genu [43; 44], volbě optimální teploty annealingu vybrané sady primerů (4R+2F), úspěšné izolaci RNA z nestresovaných (N) i stresovaných (S) *E. coli*, následovala reverzní transkripce (popsána v kapitole 5.2.4), kdy byla izolovaná RNA přepsána do molekuly cDNA. Takto získaná molekula se potom stala templátovou pro vlastní analýzy Real Time-PCR.

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.3.3 je v průběhu Real Time-PCR měřena intenzita fluorescence, která je zaznamenána pomocí amplifikačních křivek. Bod, kde fluorescence stoupá nad treshold tedy prahovou hodnotu pozadí (šum) je označován jako Ct. Obecně platí, že čím je hodnota Ct nižší, tím vyšší je koncentrace DNA přítomna ve vzorku. Pro potvrzení tohoto pravidla, ale také pro další potřebné výpočty (viz dále), bylo vycházeno z dekadicky ředěné základní koncentrace cDNA<sub>1</sub> (1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000). Testovány byly vzorky z *E. coli*, N i S. Získaná data jsou znázorněna na Obr. 15.



Obr. 15. Amplifikační křivky sledovaného genu *speF* u *E. coli*, N (vlevo) a S (vpravo)

\*1-ředění 1:10; 2-ředění 1:100; 3-ředění 1:1 000;4-ředění 1:10 000

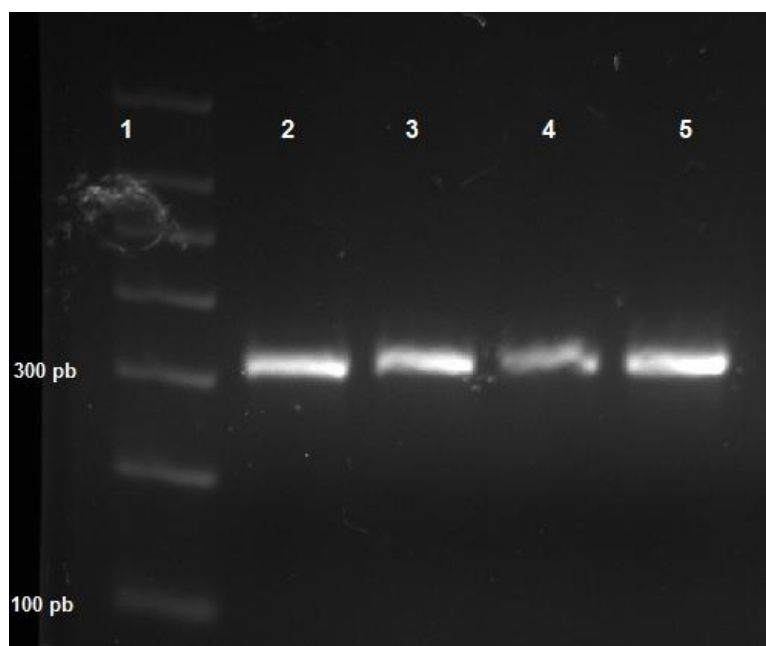
Protože bylo cílem práce analyzovat genovou expresi pomocí relativní kvantifikace u modelové bakterie *E. coli*, bylo z tohoto důvodu potřeba zvolit vhodný referenční (housekeeping) gen, viz kapitola 2.3.3

Nejprve byl tímto genem, na základě literární rešerše, zvolen gen *GyrA* kódující enzym gyrasu. [45; 46] Sekvence těchto použitých sad primerů jsou uvedeny v Tab. 7. Poté byla s těmito primery provedena klasická PCR pro zjištění jejich funkčnosti. Teplota annealingu

byla volena na základě  $T_m$  jednotlivých primerů. Podmínky PCR jsou uvedeny v *Tab. 10* následný výsledek elektroforézy v 1% agarosovém gelu pak znázorňuje *Obr. 16*.

*Tab. 10. Podmínky reakce PCR-kontrola funkčnosti primerů pro GyrA*

Fáze reakce	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů [-]
Počáteční denaturace	94	10	1
Denaturace	94	1	35
Annealing (nasednutí primerů)	54	1	
Elongace (prodlužování)	72	1	
Závěrečná amplifikace	72	10	1



*Obr. 16. Kontrola funkčnosti primerů GyrA \**

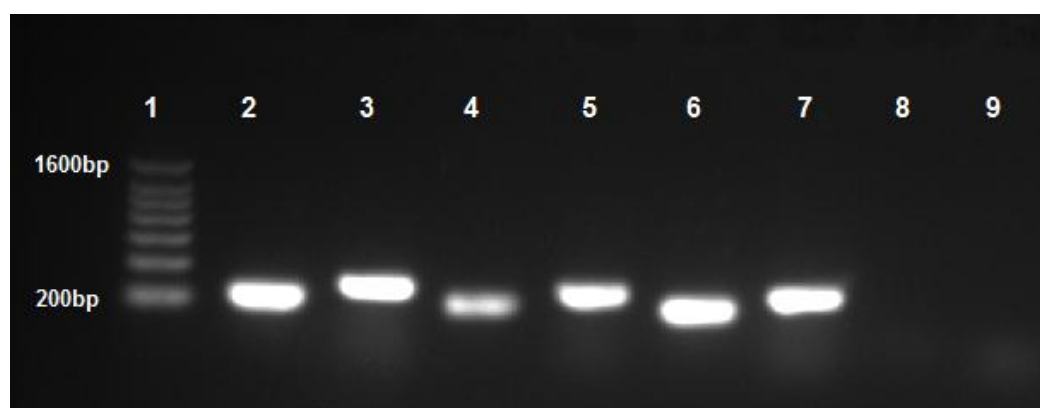
\*1-Marker; 2-*E.coli*, N (primery GyrA<sub>1</sub>); 3-*E.coli*, N (primery GyrA<sub>2</sub>); 4-*E.coli*, S (primery GyrA<sub>1</sub>); 5-*E.coli*, S (primery GyrA<sub>2</sub>)

V průběhu různých Real Time-PCR experimentů se *GyrA*, což by referenční gen, projevil jako nevhodný, jelikož při jeho použití nebylo možné dosáhnout stálé exprese ve všech

vzorcích za odlišných podmínek. Z tohoto důvodu bylo potřeba zvolit jiný referenční gen. Jako další možnost nabízejí literární studie *GapA*, tedy gen kódující glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenasu, enzym glykolitické dráhy. [47; 48] Pro dvě sady primerů (*GapA* a *GAPDH*) byla zjišťována optimální teplota annealingu během klasické PCR. Mezi teplotami byla také  $T=57,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tedy teplota optimální pro hybridizaci primerů (sady 4R+2F) určených pro sledování *speF* genu. Pro tuto kontrolu byla použita vyizolovaná DNA z *E. coli*, N a byly testovány tři teploty, tak jak uvádí *Tab. 11*. Výsledek elektroforézy v 1% agarosovém gelu znázorňuje *Obr. 17*.

*Tab. 11. Podmínky reakce PCR-kontrola primerů GapA a GAPDH*

Fáze reakce	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [min]	Počet cyklů [-]
Počáteční denaturace	94	10	1
Denaturace	94	0,5	34
Annealing (nasednutí primerů)	58,9; 57,9; 56,1	1	
Elongace (prodlužování)	72	1	
Závěrečná amplifikace	72	10	1

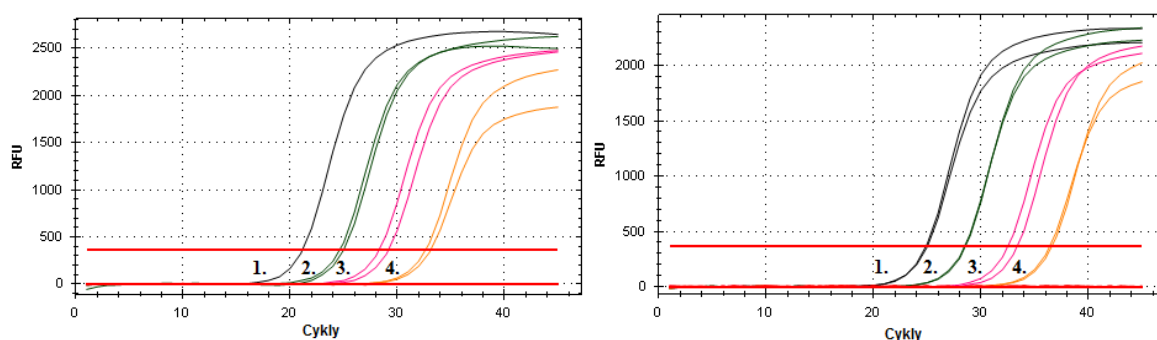


*Obr. 17. Kontrola primerů GapA a GAPDH při rozdílné teplotě anealingu\**

\*1-Marker; 2-GapA,  $56^{\circ}\text{C}$ ; 3-GAPDH,  $56^{\circ}\text{C}$ ; 4-GapA,  $57,9^{\circ}\text{C}$ ; 5-GAPDH,  $57,9^{\circ}\text{C}$ , 6-GapA,  $59^{\circ}\text{C}$ ; 7-GAPDH,  $59^{\circ}\text{C}$ ; 8-GapA,  $57,9^{\circ}\text{C}$ , negativní kontrola bez DNA; 9-GAPDH,  $57,9^{\circ}\text{C}$ , negativní kontrola bez DNA

Z výsledků vyplynulo, že teplota annealingu 57,9 °C je pro tyto primery (GapA i GAPDH) vhodná. Do dalších experimentů byla vybrána sada primerů GapA, z toho důvodu, že délka amplikonu byla přibližně 200 bp, na rozdíl od druhé sady (GAPDH), kde výsledný amplikon byl o cca 100 bp delší. Tento výsledek ukazuje, že tyto vybrané GAPDH primery jsou Real Time-PCR “nevhodné“.

Podobně jako v případě sady primerů 4R+2F (sada pro testování *speF* genu), byla sada primerů GapA (sada pro testování *GapA* genu) testována Real Time-PCR. I v tomto případě byla templátová cDNA<sub>1</sub> z *E. coli*, N i S ředěna dekadickou řadou (1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000). Záznam amplifikačních křivek zachycuje Obr. 18.



Obr. 18. Amplifikační křivky referenčního genu *gapA* u *E. coli*, N (vlevo) a S (vpravo)\*

\*1-ředění 1:10; 2-ředění 1:100; 3-ředění 1:1 000; 4-ředění 1:10 000

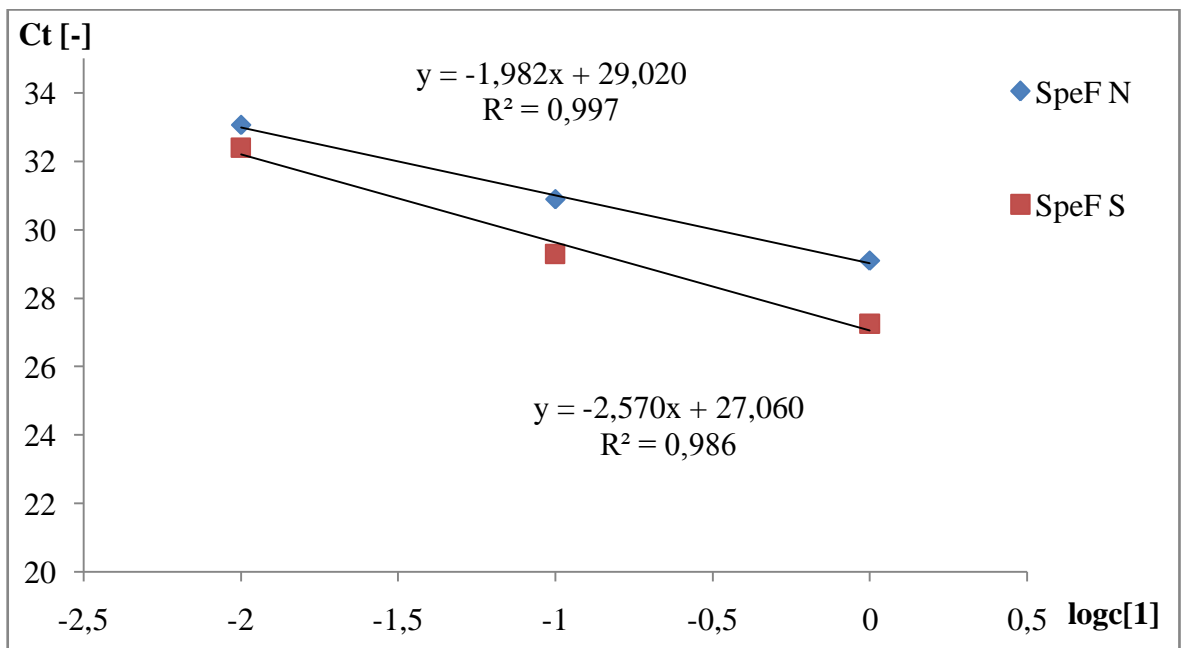
Optimalizované podmínky pro Real Time-PCR, pro sledování exprese obou genů (*speF* i *GapA*), shrnuje Tab. 12.

Tab. 12. Podmínky reakce Real Time-PCR – počet cyklů: 40

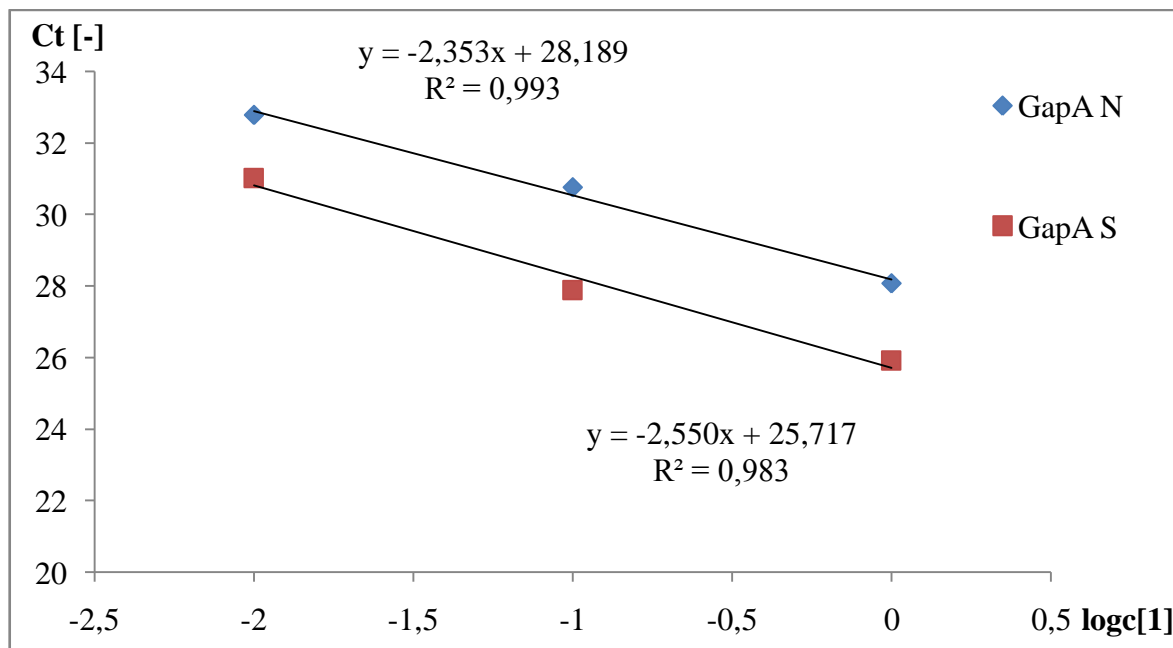
Fáze reakce	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů [-]
Počáteční denaturace	95	3	1
Denaturace	95	0,5	39
Annealing (nasednutí primerů)	57,9	0,5	
Elongace (prodlužování)	70	0,5	
Závěrečná amplifikace	72	5	1

Aby bylo možné hodnotit genovou expresi, je potřeba vedle hodnot Ct vyhodnotit efektivitu amplifikace (účinnost reakce) pro každý gen.

Hodnoty Ct byly vyneseny spolu s dekadickým logaritmem ředění do grafů (Obr. 19, Obr. 20), a byly získány směrnice křivek pro jednotlivé geny a jednotlivou cDNA<sub>1</sub> stresované i nestresované bakterie. Z výpočtů pro tento pokus byla vyřazena hodnota pro ředění 1:1 000, kde se již projevila nedostatečná koncentrace vstupního templátu.



Obr. 19. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>1</sub> pro gen speF (sledovaný gen)



Obr. 20. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>1</sub> pro gen gapA (referenční gen)

Hodnoty efektivity křivky pro tuto reakci jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 13.), kde byla výsledná efektivita pro jednotlivé geny a jednotlivou cDNA<sub>1</sub> stresované i nestresované bakterie vypočítána pomocí vzorce, který byl popsán v kapitole 5.5.1.1. Směrnice křivky pro reakci s ideální efektivitou by se měla pohybovat kolem hodnoty -3,32 [20]. Z Tab. 13 je patrné, že této ideální hodnoty není ani přibližně dosaženo.

Tab. 13. Hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtená efektivita reakce pro cDNA<sub>1</sub>

Ředění	SpeF N	SpeF S	Gap A N	Gap A S
cDNA	Ct [-]	Ct [-]	Ct [-]	Ct [-]
<b>1</b>	29,09	27,24	28,07	25,90
<b>1:10</b>	30,88	29,28	30,77	27,85
<b>1:100</b>	33,05	32,38	32,71	31,01
<b>1:1 000</b>	33,05	32,60	26,43	28,90
<b>E [-]</b>	<b>3,19</b>	<b>2,45</b>	<b>2,66</b>	<b>2,47</b>

V reakcích s testovanou cDNA<sub>1</sub> se projevila nedostatečná koncentrace templátu, tudíž nebyly splněny ideální podmínky pro průběh reakce. Z tohoto důvodu byla provedena nová série pokusů, zahrnujících opětovnou kultivaci bakterií, izolaci a následný přepis RNA do cDNA<sub>2</sub>.

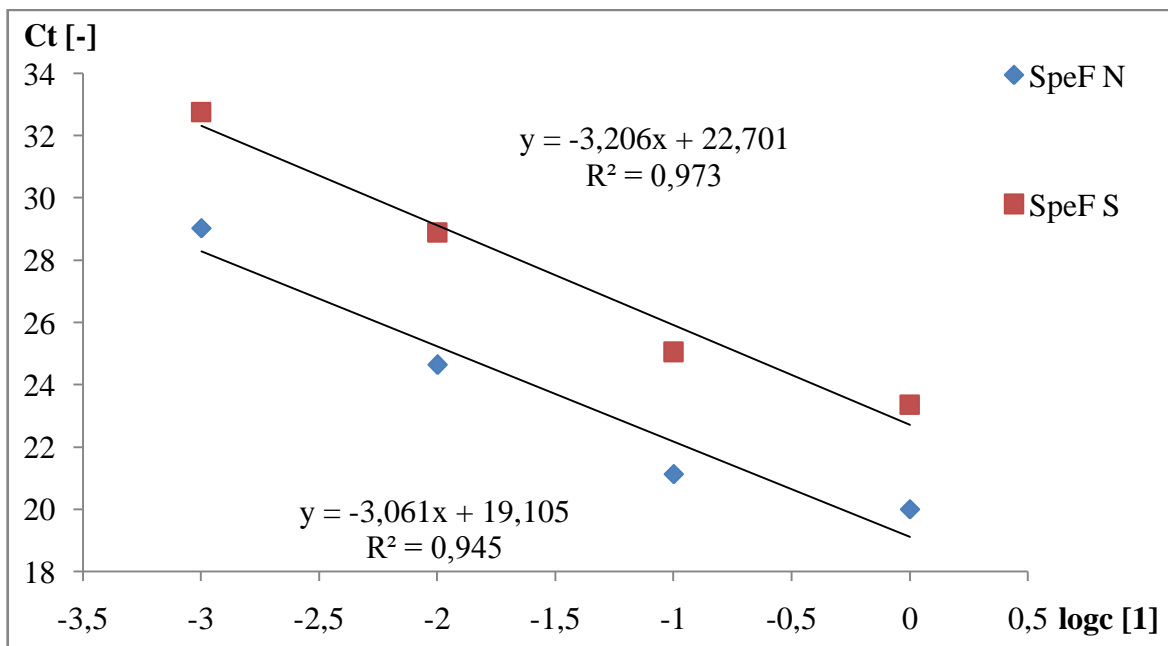
V dalším pokusu byla získána cDNA<sub>2</sub> z maximálního možného objemu RNA (11 µl) při reverzní transkripci. Real Time-PCR probíhala za podmínek zaznamenaných v tabulce (Tab. 14.). Pro lepší zhodnocení průběhu reakce byla analýza provedena při 45 cyklech na rozdíl od obvyklých 40 cyklů. Získané směrnice jsou zaznamenány v následujících grafech (Obr. 21, Obr. 22).

Tab. 14. Podmínky reakce Real Time-PCR s cDNA<sub>2</sub> – počet cyklů: 45

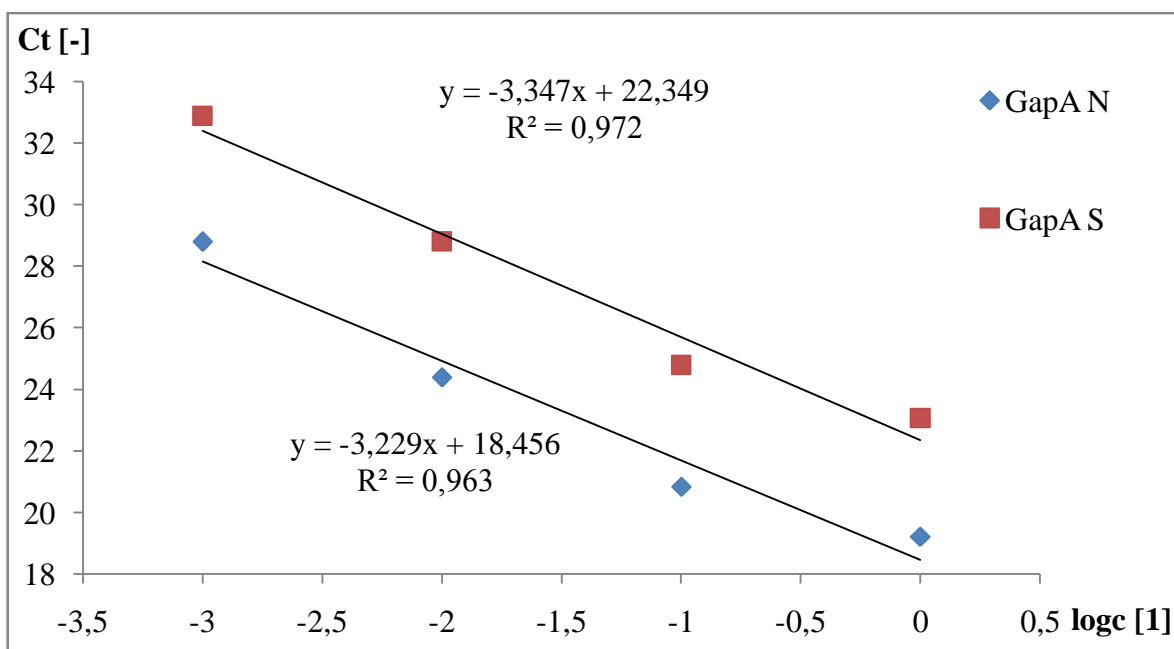
Fáze reakce	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů [-]
Počáteční denaturace	95	3	1
Denaturace	95	0,5	44
Annealing (nasednutí primerů)	57,9	0,5	
Elongace (prodlužování)	70	0,5	
Křivka tání	50-95	**	
Závěrečná amplifikace	72	5	1

\*\*teplota byla zvyšována každé 0:05 sekundy o 0,5 °C





Obr. 21. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>2</sub> pro gen *speF* (sledovaný gen); pokus 1



Obr. 22. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>2</sub> pro gen *gapA* (referenční gen); pokus 1

Hodnoty efektivity pro tuto reakci jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 15). Výsledná efektivita reakce pro jednotlivé geny a jednotlivou cDNA<sub>2</sub> stresované i nestresované bakterie byla vypočítána pomocí vzorce, který byl popsán v kapitole 5.5.1.1.

Tab. 15. Hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtená efektivita reakce, cDNA<sub>2</sub>; pokus 1

Ředění	SpeF N	SpeF S	Gap A N	Gap A S
cDNA	Ct [-]	Ct [-]	Ct [-]	Ct [-]
<b>1</b>	19,99	23,35	19,20	23,05
<b>1:10</b>	21,13	25,04	20,82	24,77
<b>1:100</b>	24,63	28,89	24,40	28,79
<b>1:1 000</b>	29,02	32,75	28,78	32,86
<b>E [-]</b>	<b>2,12</b>	<b>2,05</b>	<b>1,99</b>	<b>2,04</b>

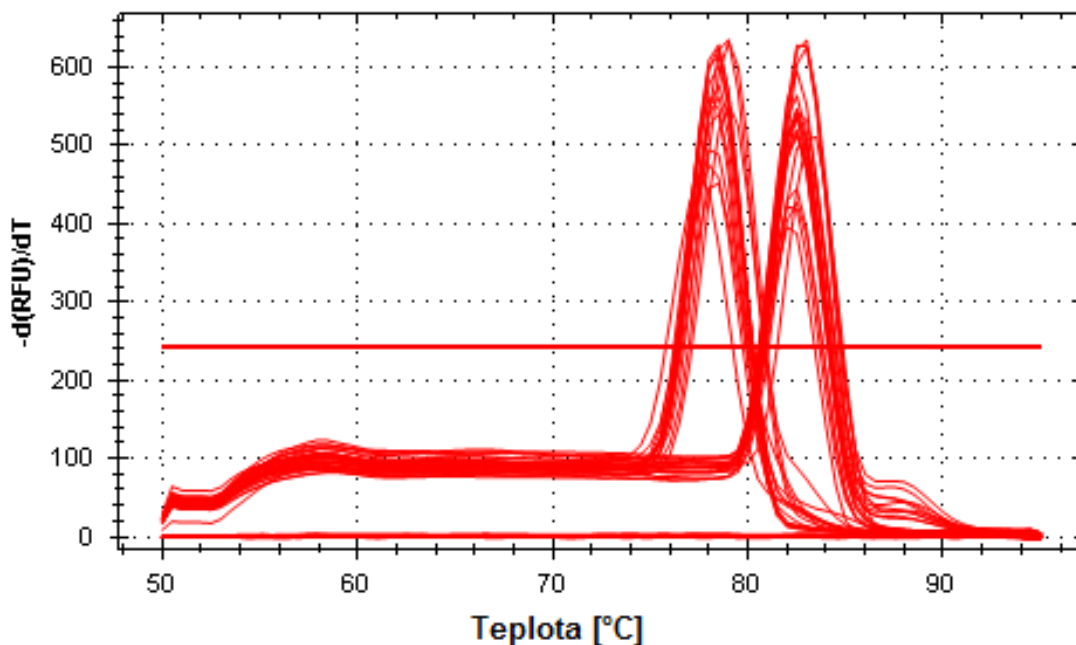
Výsledná hodnota exprese byla vypočítána pomocí obou matematických modelů uvedených v kapitole 5.5. Její výsledky jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 16). Průměrná hodnota exprese (R) je počítána geometrickým průměrem, jehož výpočet je vhodný pro exponenciální extrapolaci. [33]

Tab. 16. Výsledky exprese (R) pro cDNA<sub>2</sub>; pokus 1

Ředění cDNA	R <sub>ΔΔCt</sub> [-]	R <sub>Pfaffel</sub> [-]
<b>1</b>	1,40	1,13
<b>1:10</b>	1,03	0,80
<b>1:100</b>	1,09	0,83
<b>1:1 000</b>	1,28	1,00
<b>Průměr</b>	<b>1,19</b>	<b>0,93</b>

V průběhu všech experimentů byly do pokusů zařazeny i negativní kontroly. Tyto reakční směsi obsahovaly všechny komponenty, které uvádí Tab. 5, vyjma templátové DNA. Byla zaznamenána amplifikační křivka s hodnotou Ct přibližně 34. V případě negativní kontroly by však měla být tato křivka sledována při hodnotě Ct 37 a více. [33] Z tohoto důvodu byla

analyzována křivka tání (melting křivka) pro vyhodnocení specifičnosti vzniklých produktů. Druhou derivaci křivky tání, pro lepší hodnocení, znázorňuje Obr. 23.

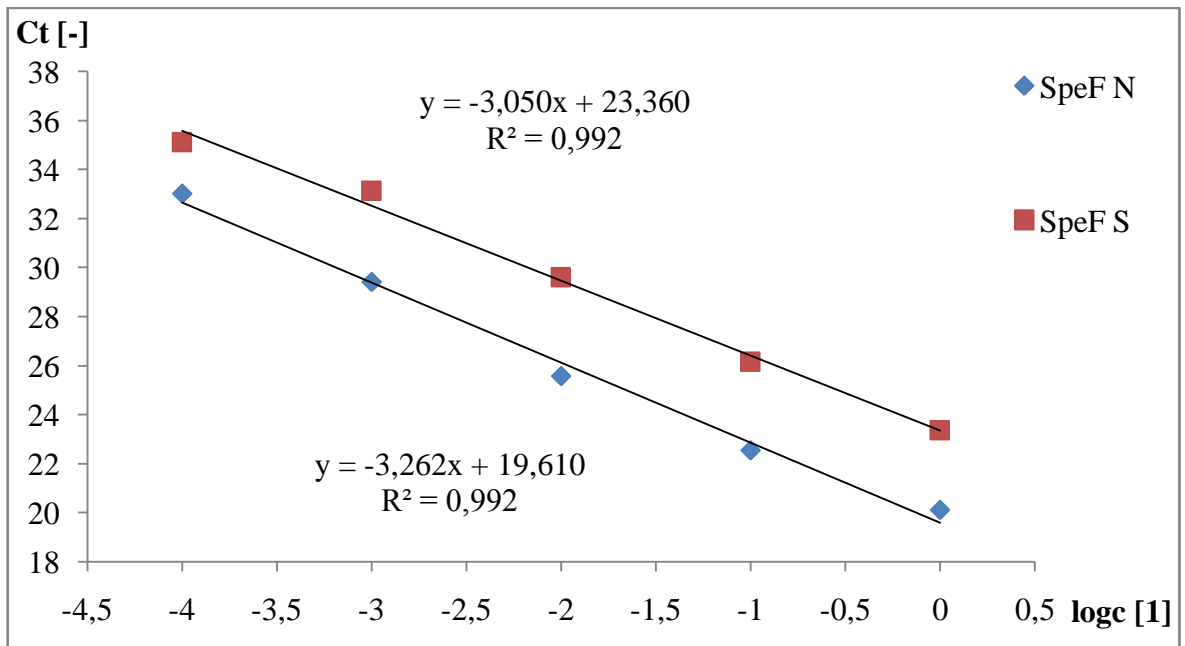


Obr. 23. Druhá derivace křivky tání; pokus 1

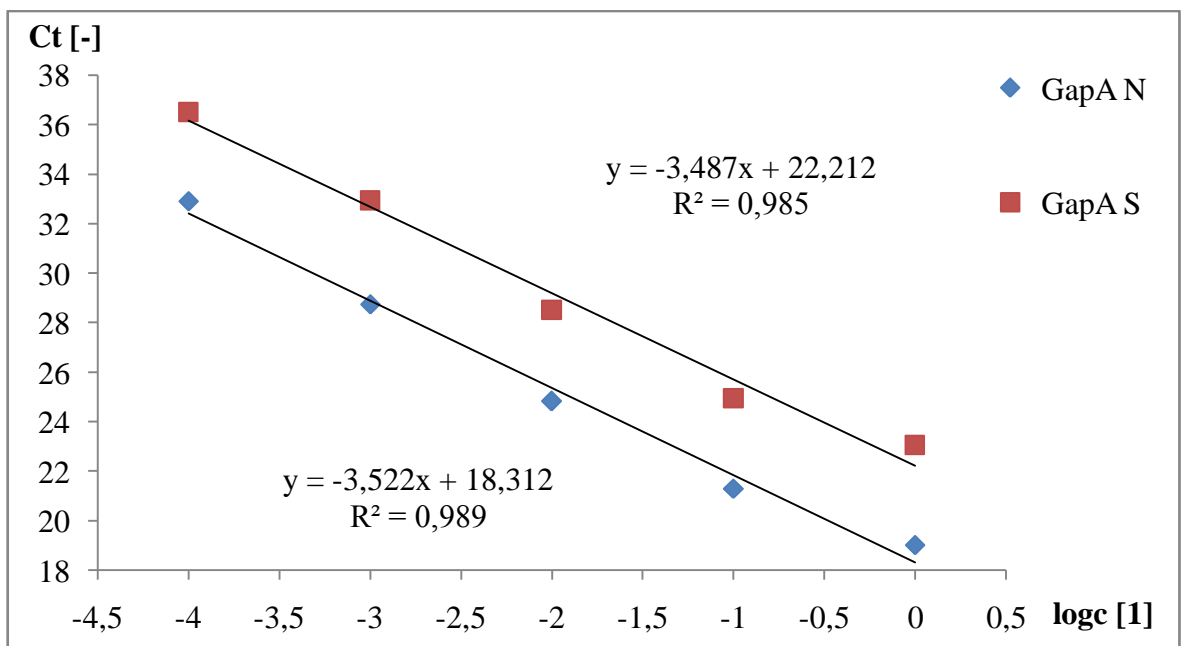
Tímto byla potvrzena kontaminace testované sady primerů (4R+2F), neboť nevznikal žádný nespecifický produkt a ani nebyla zjištěna rozdílná teplota tání pro negativní kontrolu a obvyklou reakční směs s cDNA. Tato kontaminace by neměla ovlivnit hodnotu exprese, ale přesto byl proveden další pokus s nově syntetizovanými primery.

Pro kontrolu specifičnosti primerů byla také použita i cDNA *Pseudomonas aeruginosa*, která vlastní sledovaný gen *speF*. [44]

Sada nově syntetizovaných primerů byla zkoušena za stejných podmínek, jež byly použity u předešlé analýzy uvedené v tabulce (Tab. 14). Pouze bylo k obvyklé řadě ředění přidáno nové ředění výchozí cDNA a to 1:10 000. Získané směrnice této reakce jsou zaznamenány na následujících grafech (Obr. 24 a Obr. 25).



Obr. 24. Graf závislosti Ct na množství  $cDNA_2$  pro gen *speF* (sledovaný gen); pokus 2



Obr. 25. Graf závislosti Ct na množství  $cDNA_2$  pro gen *gapA* (referenční gen); pokus 2

Hodnoty efektivity pro pokus 2 s  $cDNA_2$  jsou zaznamenány v následující tabulce (Tab. 17), kde byla výsledná efektivita pro jednotlivé geny a jednotlivou  $cDNA_2$  stresované i nestresované bakterie vypočítána pomocí vzorce, který byl popsán v kapitole 5.5.1.1.

Tab. 17. Hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtená efektivita reakce; cDNA<sub>2</sub>, pokus 2

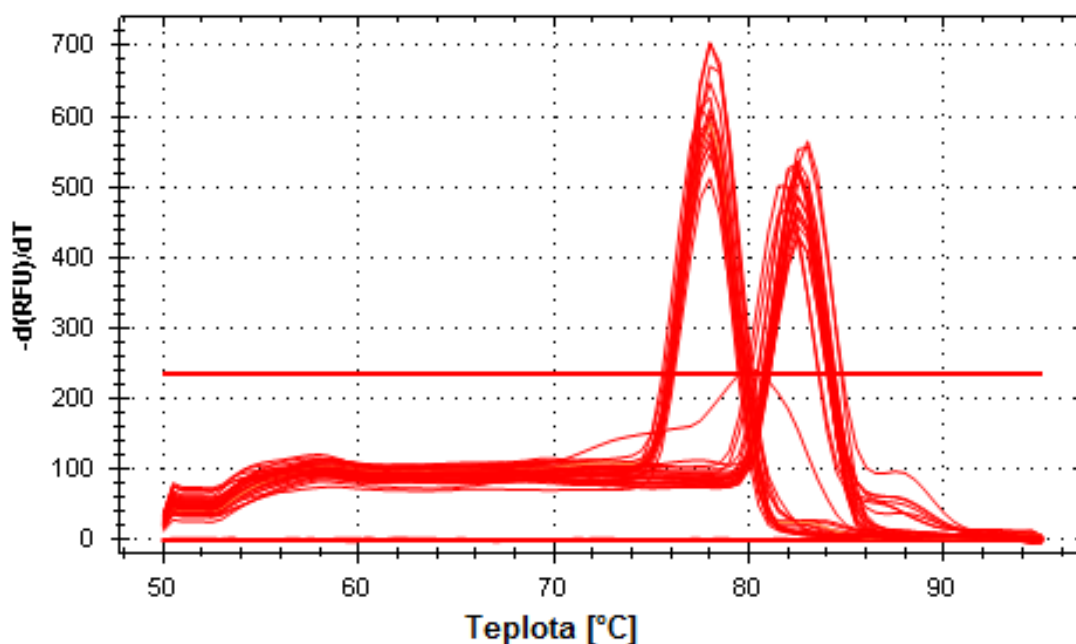
Ředění	SpeF N	SpeF S	Gap A N	Gap A S
cDNA	Ct [-]	Ct [-]	Ct [-]	Ct [-]
<b>1</b>	20,13	23,35	19,01	23,05
<b>1:10</b>	22,55	26,14	21,30	24,94
<b>1:100</b>	25,59	29,59	24,82	28,51
<b>1:1 000</b>	29,41	33,13	28,75	32,93
<b>1:10 000</b>	33,01	35,11	32,89	36,49
<b>E[-]</b>	<b>2,03</b>	<b>2,13</b>	<b>1,92</b>	<b>1,94</b>

Výsledná hodnota exprese (R) byla vypočítána pomocí obou matematických modelů uvedených v kapitole 5.5.1, její výsledky jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 18). Průměrná hodnota exprese (R) je počítána geometrickým průměrem, jehož výpočet je vhodný pro exponenciální extrapolaci. [33] Z výpočtů pro tento pokus byla vyřazena hodnota pro ředění 1:10 000, kde se již projevila nedostatečná koncentrace vstupního templátu.

Tab. 18. Výsledky exprese (R) pro cDNA<sub>2</sub>; pokus 2

Ředění cDNA	R <sub>ΔΔCt</sub> [-]	R <sub>Pfaffel</sub> [-]
<b>1</b>	1,76	1,44
<b>1:10</b>	1,04	0,86
<b>1:100</b>	0,80	0,66
<b>1:1 000</b>	1,38	1,12
<b>1:10 000</b>	2,82	2,39
<b>Průměr</b>	<b>1,19</b>	<b>0,98</b>

I pro tento pokus byla provedena analýza křivky tání, také pro vyhodnocení specifčnosti vzniklých produktů a dále pro porovnání nově připravených primerů. Výsledky jsou zaznamenány na obrázku (Obr. 26), kde pro lepší vyhodnocení byla také použita druhá derivace této křivky.



Obr. 26. Druhá derivace křivky tání 2

Provedené experimenty s těmito nově syntetizovanými primery proběhly dle očekávání. Potvrdily kontaminaci předešlé sady primerů (4R+2F). Výsledné hodnoty  $C_t$  pro jednotlivá ředění si byly značně podobné a ani tato kontaminace neovlivnila výslednou hodnotu exprese. Vzniklý nespecifický produkt v 35,71 cyklu je možné pozorovat, u negativní kontroly pro směs s nově syntetizovanými primery 4R+2F, na Obr. 26. Tuto hodnotu lze brát jako negativní, protože při analýze křivky tání byl vzniklý produkt zjištěn při rozdílné teplotě tání, než amplikony s cDNA, kdy má výsledný nespecifický produkt přibližnou teplotu tání 80 °C. Amplifikační křivka negativní kontroly směsi s primery GapA se projevuje při hodnotě  $C_t$  cirka 38. Tato hodnota je považována za negativní. [33]

Po řadě pokusů se podařilo dosáhnout efektivity udávané literaturou tedy 1,9 - 2,1 [33], kdy je hodnota 2 brána jako 100% účinnost. Využívání dekadické řady ředění se prokázalo být vhodným, zejména v koncentracích 1:10, 1:100 a při dostatečně vysoké koncentraci vstupní cDNA i ředění 1:1 000. Pokud bylo pracováno s neředěnou cDNA, téměř vždy se

projevil negativní vliv obsahu inhibitorů. Naopak nedostatečná koncentrace vstupního cDNA se projevila u ředění 1:1 000 a výše, nevhodným průběhem reakce a tedy nedostačující efektivitou. Proto se při reverzní transkripci osvědčilo do reakce vložit maximální objem přepisované RNA, kdy při této koncentraci je již pro výpočet efektivity křivka složena z nejméně 3 bodů a je dosahováno ideální efektivity kolem hodnoty 2, tedy 100% účinnosti.

Řada pokusů byla uskutečněna i s druhou navrhovanou sadou primerů detekujících *speF* gen, tedy sadou 1R+3F. V tomto případě, ale nebylo dosaženo dostatečné účinnosti, jako tomu bylo při použití sady 4R+2F.

Hodnota R (ratio) neboli relativní exprese byla počítána uvedenými matematickými modely uvedenými v kapitole 5.5.1. Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách *Tab. 16* a *Tab. 18*. Při užití obou modelů vychází podobná hodnota R. Pouze při použití modelu s korelací efektivity, byla hladina exprese nižší. Tento výsledek lze brát jako přesnější, neboť byla aplikována korekce o efektivitu, která vypovídá o účinnosti reakce. Při hodnocení exprese pomocí Pfafflovi metody lze říct, že nestresovaná bakterie má vůči stresované bakterii 0,95 hladinu exprese, což je výsledek velmi významný. Neboli exprese genu se u stresované bakterie kultivované v prostředí s nedostatkem aminokyselin 0,95 krát snížila oproti expresi genu nestresovaných bakterií kultivovaných v prostředí s nadbytkem aminokyselin.

Bylo by třeba doplnit další série pokusů, např. kultivace *E. coli* nejen v různých médiích a různých časových intervalech. Z časových důvodů nebyly tyto pokusy uskutečněny a další experimenty, které budou v blízké době realizovány, se zaměří nejen na toto, ale i na reálné vzorky.

## ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zabývá optimalizací metody Real Time-PCR v detekci genů pro dekarboxylační enzymy u bakterií. Sledovaným genem je zde *speF*, kódující ornithindekarboxylasu, tedy enzym katalyzující přeměnu L-ornithinu na putrescin u Gram negativních bakterií.

Ze získaných výsledků lze vyvodit následující závěry:

- \* Výsledky ukazují, že sada primerů 4R+2F navržená Mgr. Leonou Wunderlichovou, Ph.D. v její disertační práci, je vhodná pro detekci genu *speF* metodou Real Time-PCR.
- \* Bylo dosaženo toho, že směrnice křivek pro jednotlivé reakce se blíží hodnotě -3,32; tedy pohybují se kolem ideální hodnoty, kde účinnost reakce je 100 %.
- \* Z výsledků je patrné, že nestresovaná bakterie má vůči stresované 0,95 hladinu exprese. Tento závěr ukazuje, že metodou Real Time-PCR (relativní kvantifikací) je možné zkoumat vliv různých faktorů na genovou expresi cílových genů.
- \* Tato metoda je vhodná pro detekci producentů putrescinu, a je možné pomocí ní hodnotit potenciál Gram negativních bakterií tento biogenní amin produkovat (potravinářství).



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. [online]. 1996, vol. 29, no. 2–3, s. 213-231. [cit. 2013-25-11]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160595000321>>.
- [2] YONGMEI, L., L. XIN, C. XIAOHONG, J. MEI, et al. A survey of biogenic amines in Chinese rice wines. In *Food Chemistry*. [online]. 2007, vol. 100, s. 1424-1428. [cit. 2013-20-12] Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605010782>>
- [3] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, 29(7), s. 675-690. ISBN 0963-9969 Dostupné z:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399699600066X> >
- [4] ADÁMKOVÁ, Š. a M. PETŘIVALSKÝ. Vztah metabolismu a signálních funkcí oxidu dusnatého a polyaminů v rostlinách. *Chem. listy* 106, 2012 , s. 166-173.
- [5] MURRAY, K. M., D. K. GRANNER, P. A. MAYES a V. W. RODWELL *Harperova Biochemie*. Edtion ed.: Nakladatelství a vydavatelství H & H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [6] FAROOQUI, A. A. a T. FAROOQUI. Biogenic Amines : Pharmacological, Neurochemical and Molecular Aspects in the CNS. *Pharmacology--research, Safety Testing and Regulation Series*. 2010. ISSN 9781608766253, 9781617615757.
- [7] LOIZZO, M. R., F. MENICHINI, N. PICCI, F. PUOCI, et al. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology*. [online]. 2013, vol. 30, no. 1, s. 38-55. [cit. 2013-20-12]. ISSN 0924-2244. Dostupné z:<<Go to ISI>://WOS:000317449300004>.



- [13] LADERO, V., M. CALLES-ENRIQUEZ, M. FERNÁNDEZ a M. A ALVAREZ. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*. 2010, vol. 6, no. 2, s. 145-156. ISSN 1573-4013.
- [14] BUŇKOVÁ, L., G. ADAMCOVÁ, K. HUDCOVÁ, H. VELICHOVÁ, et al. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry* [online]. 2013, vol. 141, no. 1, pp. 548-551. [cit. 2013-15-12].ISSN 0308-8146. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613003397>>.
- [15] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, V. DRÁB, et al. Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení *Potravinářstvo*. 2010, s. 372-380.
- [16] NAILA, A., S. FLINT, G. C. FLETCHER, P. J. BREMER, et al. Biogenic amines and potential histamine – Forming bacteria in Rihaakuru (a cooked fish paste). In *Food Chemistry*. 2011, vol. 128, s. 479-484.
- [17] KOHAJDOVÁ, Z. a J. KAROVIČOVÁ. Biogénne amíny – vznik, metódy stanovenia a výskyt v potravinách. 2001, vol. 40, s. 75-89.
- [18] MCPHERSON, M. J. a S. G. MOLLER. PCR. *Polymerase Chain Reaction*. 2000 Oxford. BIOS. ISSN 9781859960172, 9780585425306.
- [19] ŠMARDA *Metody molekulární biologie*. editováno J.A.P. JAN A DOŠKAŘ, ROMAN A RŮŽIČKOVÁ, VLADISLAVA A KOPTÍKOVÁ, JANA. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [20] MACKAY, I. M. *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Edtion ed.: Caister Academic, 2007. ISBN 9781904455189.
- [21] ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie*. edited by KOLEKTIV. Edtion ed. Brno, 2002. 300 p. ISBN 80-902562-4-4.

- [22] BIOLABS, N. E. PCR. 2013, [online]. [cit. 2013-16-12]. Dostupné z: <<https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>>.
- [23] CAI, H. Y., C. L. ARCHAMBAULT M FAU - GYLES, J. F. GYLES CL FAU - PRESCOTT a J. F. PRESCOTT. Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. 2003, 4.02: s.73-94.
- [24] CARSON, S., D. S. WITHEROW a H. B. MILLER. Molecular Biology Techniques : A Classroom Laboratory Manual. 2012. ISSN 9780123855442, 9780123855459.
- [25] PAVLÍK, E. P., ANDREA. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 3. [online]. 1999, [cit. 2013-16-12]. ISSN 1211-5665. Dostupné z: <<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>>.
- [26] WILHELM, J. a A. PINGOUD. Real-time polymerase chain reaction *Chembiochem*, 2003, 4.11: 1120-1128.
- [27] HUNT, M. Real time PCR. 2010. [online]. [cit. 2014-5-1]. Dostupné z: <<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>>
- [28] BOWYER, V. Real-time PCR. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. [online]. 2007, vol. 3, no. 1, s. 61-63. [cit. 2014-5-1]. ISSN 1547-769X. Dostupné z: <<http://dx.doi.org/10.1385/FSMP%3A3%3A1%3A61>>.
- [29] PAVLÍK, E. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 11. 2004, [online]. [cit. 2014-5-1]. ISSN 1211-5665. Dostupné z: <<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0304/pcr.pdf>>.
- [30] PAVLÍK, E. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 2, [online]. 1999, [cit. 2014-6-1]. Dostupné z: <<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0304/pcr.pdf>>.

- [31] Molekulární majáky. 2014, [online].[cit. 2014-6-1] Dostupné z: <<http://aem.asm.org/content/77/15/5517/F1.large.jpg>>.
- [32] Scorpion (Uni-probe). 2014. [online].[cit. 2014-21-1]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/lifescience/customoligos/dnaprobes/productlines/fluorescent-probes/scorpions-probes.html>>.
- [33] SEQME a S.R.O. Kurz Real-Time PCR. In. Praha: SEQme s.r.o., 2013.
- [34] POSTOLLEC, F., H. FALENTIN, S. PAVAN, J. COMBRISSEON, et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. [online]. *Food Microbiology*. 2011, vol. 28, no. 5, s. 848-861. [cit. 2014-21-1]. ISSN 0740-0020. Dostupné z:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002011000505>>.
- [35] WONG, M. L. a J. F. MEDRANO. Real-time PCR for mRNA quantitation EATON PUBLISHING, *Biotechniques*, 2005, 39.1: 75.
- [36] ARYA, M., I. S. SHERGILL, M. WILLIAMSON, L. GOMMERSALL, et al. Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR. [online]. 2005, s. 209-219. [cit. 2014-21-1]. ISSN 1473-7159. Dostupné z:<<http://dx.doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>>.
- [37] MARTÍNEZ, N., M. C. MARTÍN, A. HERRERO, M. FERNÁNDEZ, et al. qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. *Trends in Food Science & Technology*. 2011, vol. 22, no. 7, s. 367-376. ISSN 0924-2244.
- [38] BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER, K., G. E. BOLTON, L.-A. JAYKUS, P. D. MCCLELLAN-GREEN, et al. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. [online]. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 139, no. 3, s. 161-167. [cit. 2014-21-1]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510001571>>.

- [39] LADERO, V., D. M. LINARES, M. FERNÁNDEZ a M. A. ALVAREZ. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. [online]. *Food Research International*. 2008, vol. 41, no. 10, pp. 1015-1019. [cit. 2014-22-1] ISSN 0963-9969. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996908001695>>.
- [40] FERNÁNDEZ, M., B. DEL RÍO, D. M. LINARES, M. C. MARTÍN, et al. Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *Journal of dairy science*. 2006, vol. 89, no. 10, s. 3763-3769. ISSN 0022-0302.
- [41] ARENA, M., A. ROMANO, V. CAPOZZI, L. BENEDUCE, et al. Expression of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 tyrosine decarboxylase and agmatine deiminase genes in wine correlates with substrate availability. *Letters in applied microbiology*. 2011, vol. 53, no. 4, s. 395-402. ISSN 1472-765X.
- [42] LADERO, V., E. CAÑEDO, M. PÉREZ, M. C. MARTÍN, et al. Multiplex qPCR for the detection and quantification of putrescine-producing lactic acid bacteria in dairy products. *Food Control*. 2012, vol. 27, no. 2, s. 307-313. ISSN 0956-7135.
- [43] WUNDERLICOVA, L., L. BUNKOVA, M. KOUTNY, T. VALENTA, et al. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiology*. 2013, vol. 34, no. 2, s. 268-276. ISSN 0740-0020.
- [44] WUNDERLICOVÁ, L. Vývoj nových molekulárně biologických metod detekce putrescin produkujících bakterií. Dizertační práce Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2014.
- [45] YIN, H., G. CAO L FAU - QIU, D. QIU G FAU - WANG, L. WANG D FAU - KELLOGG, et al. Molecular diversity of 16S rRNA and gyrB genes in copper mines. 2008, no. 0302-8933.

[46] WEIGEL, L. M., F. C. STEWARD CD FAU - TENOVER a F. C. TENOVER. gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of Enterobacteriaceae. 1998, no. 0066-4804.

[47] CAREY, C. M., S. KOSTRZYNSKA M FAU - THOMPSON a S. THOMPSON. Escherichia coli O157:H7 stress and virulence gene expression on Romaine lettuce using comparative real-time PCR. 2009, no. 1872-8359.

[48] FITZMAURICE, J., G. GLENNON M FAU - DUFFY, J. J. DUFFY G FAU - SHERIDAN, C. SHERIDAN JJ FAU - CARROLL, et al. Application of real-time PCR and RT-PCR assays for the detection and quantitation of VT 1 and VT 2 toxin genes in E. coli O157:H7. 2004, no. 0890-8508

[49] SCHMITTGEN, T. D. a K. J. LIVAK. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008, vol. 3, no. 6, s. 1101-1108. ISSN 1754-2189.

[50] PFAFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*. 2004, vol. 1, s. 89-113.

[51] BUSTIN, S., V. BENES, J. GARSON, J. HELLEMANS, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009, vol. 55, no. 4, s. 611-622. ISSN 0009-9147.

[52] VAN DER VELDEN, V. H. J., A. HOCHHAUS, G. CAZZANIGA, T. SZCZEPANSKI, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. [online]. *Leukemia*. 2003, vol. 17, no. 6, s. 1013-1034.[cit. 2014-22-1]. ISSN 08876924.

Dostupné z:

<[http://sfx.utb.cz/sfxlcl3?url\\_ver=Z39.882004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%3Ahealthcompleteshell&atitle=Detection+of+minimal+residual+disease+in+hematologic+malignncies+by+realtime+quantitative+PCR%3A+principles%2C+approaches%2C+and+laboratory+aspects&title=Leukemia&issn=08876924&date](http://sfx.utb.cz/sfxlcl3?url_ver=Z39.882004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%3Ahealthcompleteshell&atitle=Detection+of+minimal+residual+disease+in+hematologic+malignncies+by+realtime+quantitative+PCR%3A+principles%2C+approaches%2C+and+laboratory+aspects&title=Leukemia&issn=08876924&date)>

=20030601&volume=17&issue=6&spage=1013&au=V+H+J+van+der+Velden%3BHochhaus%2C+A%3BCazzaniga%2C+G%3BSzczepanski%2C+T%3BGabert%2C+J%3BJ+J+M+van+Dongen&isbn=&jtitle=Leukemi&btitle=&rft\_id=info:eric/>.

[53] CORPORATION, I. Real-Time PCR: From theory to practice. [online] 2008, [cit. 2014-1-5] Dostupné z:

<<http://corelabs.cgrb.oregonstate.edu/sites/default/files/Real%20Time%20PCR.From%20Theory%20to%20Practice.pdf>>.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

A	nukleová báze adenin
<i>adiA</i>	gen kódující enzym a argininedekarboxylasa (biodegradativní)
<i>aguA</i>	název genu kódující enzym agmatindeiminasu
BA	biogenní aminy
bp	páry bází (base pare)
C	nukleová báze cytosin
cDNA	jednořetězcová komplementární DNA
Ct	bod, kdy fluorescence stoupá nad prahovou hodnotu
DAO	diaminooxidasa
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfát
dsDNA	dvouřetězcová DNA
dTTP	deoxythymidintrifosfát
F	kódující (forvard) primer
FAM	6 – karboxyfluorescein
FRET	fluorescenční resonanční přenos energie
G	nukleová báze guanin
GADPH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa
<i>GapA</i>	název genu kódujícího glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasu
GC/FID	plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

---

<i>Gyr A</i>	název kódující enzym gyrasu
HDC	histidindekarboxylasa
HPLC/FLD	vysoko účinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
HPLC/MS	vysoko účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
MAO	monoaminoxidasa
mRNA	mediátorová RNA
N	nestresovaná bakterie
ODC	ornithindekarboxylasa
PCR	polymerasová řetězová reakce
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
PM	přípustné množství
QPCR	kvantitativní PCR
qPCR	Real Time-PCR
R	antikódující (reverse) primer
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu (revolutions per minute)
rRNA	ribozomální RNA
RT-PCR	polymerasová řetězová reakce s reverzní transkripcí
S	stresovaná bakterie
<i>speA</i>	gen kódující arginindekarboxylasu (biosyntetická)
<i>speB</i>	gen kódující agmatindekarboxylasu
<i>speC</i>	gen kódující ornithindekarboxylasu (konstitutivní)
<i>speF</i>	gen kódující ornithindekarboxylasu (inducibilní)
ssDNA	jednovláknová DNA
T	nukleová báze thymin

TAMRA      tetramethyl-6-karboxyrhodamin

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Chemická struktura nejdůležitějších biogenních [7].....</i>	13
<i>Obr. 2. Biogenní aminy a jejich prekurzory [7] .....</i>	14
<i>Obr. 3. Průběh polymerasové řetězové reakce [22] .....</i>	21
<i>Obr. 4. Inverzní PCR [21] .....</i>	25
<i>Obr. 5. Schéma působení barviva SYBER green I [18] .....</i>	28
<i>Obr. 6. Schéma znázorňující princip Real Time-PCR.....</i>	29
<i>Obr. 7. Molekulární majáky * [31] .....</i>	30
<i>Obr. 8. Scorpion (Uni-probe) – zhasení a emise fluorescence [32] .....</i>	31
<i>Obr. 9. Amplifikační křivka [33].....</i>	32
<i>Obr. 10. Schéma metabolismu putrescinu u Gram negativních bakterií [43].....</i>	37
<i>Obr. 11. Izolovaná DNA* .....</i>	53
<i>Obr. 12. TD-PCR testování primerů* .....</i>	55
<i>Obr. 13. Kontrola primerů - optimalizace teploty anealingu* .....</i>	56
<i>Obr. 14. Izolovaná RNA<sub>2</sub>* .....</i>	57
<i>Obr. 15. Amplifikační křivky sledovaného genu speF u E. coli, N (vlevo) a S (vpravo) .....</i>	58
<i>Obr. 16. Kontrola funkčnosti primerů GyrA * .....</i>	59
<i>Obr. 17. Kontrola primerů GapA a GAPDH při rozdílné teplotě anealingu* .....</i>	60
<i>Obr. 18. Amplifikační křivky referenčního genu gapA u E. coli, N (vlevo) a S (vpravo)* .....</i>	61
<i>Obr. 19. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>1</sub> pro gen speF (sledovaný gen) .....</i>	62
<i>Obr. 20. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>1</sub> pro gen gapA (referenční gen) .....</i>	63
<i>Obr. 21. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>2</sub> pro gen speF (sledovaný gen); pokus 1 .....</i>	65
<i>Obr. 22. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>2</sub> pro gen gapA (referenční gen ); pokus 1 .....</i>	65
<i>Obr. 23. Druhá derivace křivky tání; pokus 1 .....</i>	67
<i>Obr. 24. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>2</sub> pro gen speF (sledovaný gen); pokus 2.....</i>	68
<i>Obr. 25. Graf závislosti Ct na množství cDNA<sub>2</sub> pro gen gapA (referenční gen); pokus 2.....</i>	68
<i>Obr. 26. Druhá derivace křivky tání 2 .....</i>	70

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Toxikologické účinky biogenních aminů [3]</i> .....	18
<i>Tab. 2. Komponenty a jejich koncentrace (mix templátu a primerů) pro reverzní transkripci</i> .....	46
<i>Tab. 3. Složení a koncentrace zbývajících složek pro reverzní transkripci</i> .....	47
<i>Tab. 4. Reakční směs – složení a koncentrace jednotlivých složek pro PCR analýzu</i> .....	47
<i>Tab. 5. Reakční směs – složení a koncentrace jednotlivých složek pro Real Time-PCR</i> ....	48
<i>Tab. 6. Sekvence a názvy primerů použitých pro sledování testovaného genu speF (kódujícího enzym ornithindekarboxylasu)</i> .....	49
<i>Tab. 7. Sekvence a názvy primerů použitých pro sledování referenčních genů GyrA a GapA (kódujících enzymy gyrasu a glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasu)</i> .....	50
<i>Tab. 8. Reakční podmínky TD-PCR</i> .....	54
<i>Tab. 9. Reakční podmínky PCR-optimalizace teploty annealingu</i> .....	55
<i>Tab. 10. Podmínky reakce PCR-kontrola funkčnosti primerů pro GyrA</i> .....	59
<i>Tab. 11. Podmínky reakce PCR-kontrola primerů GapA a GAPDH</i> .....	60
<i>Tab. 12. Podmínky reakce Real Time-PCR – počet cyklů: 40</i> .....	61
<i>Tab. 13. Hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtená efektivita reakce pro cDNA<sub>1</sub></i> .....	63
<i>Tab. 14. Podmínky reakce Real Time-PCR s cDNA<sub>2</sub>– počet cyklů: 45</i> .....	64
<i>Tab. 15. Hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtená efektivita reakce, cDNA<sub>2</sub>; pokus 1</i> .....	66
<i>Tab. 16. Výsledky exprese (R) pro cDNA<sub>2</sub>; pokus 1</i> .....	66
<i>Tab. 17. Hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtená efektivita reakce; cDNA<sub>2</sub>, pokus 2</i> .....	69
<i>Tab. 18. Výsledky exprese (R) pro cDNA<sub>2</sub>; pokus 2</i> .....	69