

Real Time-PCR - nástroj pro detekci a kvantifikaci mikroorganismů

Bc. Jitka Bakalová

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jitka Bakalová**
Osobní číslo: **T15243**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Real Time-PCR – nástroj pro detekci a kvantifikaci mikroorganismů**

Zásady pro vypracování:

- 1. Vypracovat literární rešerši, která se bezprostředně týká zadaného tématu. Pozornost věnovat možnostem izolace nukleových kyselin (DNA, RNA); základním principům, uspořádání, výhodám a nevýhodám PCR a Real Time-PCR; popsat možnosti ovlivnění exprese (sledovaných) genů.**
- 2. U zvolené skupiny bakterií (bakterie čeledi Enterobacteriaceae) sledovat vliv faktorů na genovou expresi sledovaných genů (speF a adiA) v reálných vzorcích.**
- 3. 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, Scopus, PubMed, ...), vědecká a odborná literatura.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



prof. 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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ 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, považují 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 11. 5. 2017



¹⁾ 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 nevydělečně 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.

²⁾ 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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). Odpirá-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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Gram negativní bakterie mohou produkovat biogenní amin putrescin např. dekarboxylací aminokyseliny L-ornithinu za katalytického působení enzymu ornithindekarboxylasy, který je kódován genem *speF*, nebo z L-argininu, který je dekarboxylován za katalýzy enzymem arginindekarboxylasou (kódován genem *adiA*), za vzniku agmatinu, který je dále metabolizován za vzniku zmíněného putrescinu.

Předkládaná práce je zaměřena na sledování vlivu faktorů (změny teploty a pH) na genovou expresi sledovaných genů *adiA* a *speF* u zvolené bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) kultivované v reálných vzorcích nízkotučného mléka a vepřové pomazánky (paštiky). Byla optimalizována metoda izolace bakteriální RNA ze zmíněných reálných vzorků. Dále byly ověřeny funkčnosti primerů a účinnosti reakcí (real time-PCR) pro jednotlivé geny (*adiA*, *speF*, *gapA* /housekeeping gen/) v reálných vzorcích. Bylo potvrzeno, že reakce probíhají s dostatečnou účinností (E = 90 – 110 %) i specifícností.

Vyhodnocením genové exprese metodou relativní kvantifikace dle Pfaffla bylo zjištěno, že pH je faktorem, který expresi genů *adiA* i *speF* zvyšuje ve všech testovaných vzorcích. Ve vzorcích bujony byl pozorován nárůst exprese obou genů ~ o 25 %; ve vzorku paštiky vzrostla exprese sledovaných genů daleko významněji (~ 5x). Naopak teplota je faktorem, který nejen že tlumí růst bakterií, ale snižuje i expresi obou sledovaných genů (~ o 70 %), tak jak se ukázalo ve vzorku bujony s přidavkem jednotlivých aminokyselin.

Lze konstatovat, že sledované geny *adiA* a *speF* jsou geny inducibilní, a že faktory jako jsou teplota, pH či dostupnost jednotlivých substrátů genovou expresi ovlivňují.

Klíčová slova: *adiA*, *speF*, genová exprese, putrescin, real time-PCR

ABSTRACT

Gram negative bacteria can produce biogenic amine – putrescine, e.g. by decarboxylation of amino acid L-ornithine by the ornithine decarboxylase enzyme (this enzyme is encoded by the *speF* gene), or by decarboxylation of L-arginine by the arginine decarboxylase enzyme (this enzyme is encoded by the *adiA* gene), which leads to generation of agmatine. Agmatine is further converted to putrescin.

The thesis concentrates on monitoring of the effect of factors (temperature and pH changes) on gene expression of tested genes *adiA* and *speF* possessed by some Enterobacteriaceae family members (*E. coli*) cultivated in real samples – low-fat milk and pork spread (pate). The method of bacterial RNA isolation was optimized from the real samples mentioned above. Functions of primers and efficacies of reactions (real time-PCR) for genes (*adiA*, *speF*, *gapA* /housekeeping gene/) were verified in the real samples. It was confirmed that reactions are effective (E = 90 – 110 %) and specific.

Using Pfaffl's relative quantification method, it was discovered that pH increases gene expression of *adiA* and *speF* in all tested samples. It was observed that gene expression of tested genes increases ~ by 25% in broth containing amino acids; in pate it increases even more (~ 5x). On the contrary, the temperature factor inhibits grow of bacteria and also reduces gene expression of tested genes (~ by 70%), as in broth containing amino acids.

It was observed that genes *adiA* and *speF* are inducible genes, and factors such as temperature, pH or availability of substrate influence gene expression.

Keywords: *adiA*, *speF*, gene expression, putrescine, real time-PCR

Ráda bych na tomto místě poděkovala zejména vedoucí mé diplomové práce Mgr. Petře Jančové, PhD. a konzultantce Ing. Kristýně Maršálkové za jejich odborné vedení, vstřícný přístup, cenné rady, připomínky, trpělivost a čas, který mi věnovaly. A Bc. Veronice Kučabové za ochotnou pomoc během práce v laboratoři.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům a sourozencům za velkorysou podporu, kterou mi během celého studia poskytovali.

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

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 11 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 1 NUKLEOVÉ KYSELINY | 13 |
| 1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA..... | 13 |
| 1.2 DNA | 14 |
| 1.2.1 Struktura DNA | 14 |
| 1.2.2 Vlastnosti DNA..... | 15 |
| 1.2.3 Výskyt DNA..... | 16 |
| 1.3 RNA | 16 |
| 1.3.1 Mediátorová – mRNA..... | 17 |
| 1.3.2 Transferová – tRNA..... | 17 |
| 1.3.3 Ribozomová – rRNA..... | 17 |
| 1.4 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN..... | 18 |
| 1.4.1 Metody využívající rozdílné rozpustnosti..... | 19 |
| 1.4.2 Metoda využívající adsorpce na pevný podklad | 20 |
| 1.5 REVERZNÍ TRANSKRIPCE | 21 |
| 1.5.1 Průběh reverzní transkripce..... | 21 |
| 1.5.2 Reakční směs pro reverzní transkripci | 22 |
| 2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) | 23 |
| 2.1 PRŮBĚH PCR..... | 23 |
| 2.1.1 Reakční směs..... | 24 |
| 2.1.2 Detekce produktů PCR..... | 26 |
| 2.1.3 Real time – PCR..... | 26 |
| 2.1.4 Detekce produktů real time-PCR | 27 |
| 2.1.5 Kvantitativní vyhodnocení | 31 |
| 2.1.6 Analýza křivky tání | 34 |
| 3 REGULACE GENOVÉ EXPRESE | 36 |
| 3.1 REGULACE NA ÚROVNI TRANSKRIPCE..... | 36 |
| 4 BIOGENNÍ AMINY | 37 |
| 4.1 BIOLOGICKÉ ÚČINKY NA LIDSKÝ ORGANISMUS | 37 |
| 4.2 DEKARBOXYLASOVÁ AKTIVITA U BAKTERIÍ PRODUKUJÍCÍCH PUTRESCIN | 38 |
| 4.2.1 Faktory ovlivňující dekarboxylasovou aktivitu bakterií | 40 |
| 4.2.2 Detekce a kvantifikace genů kódujících dekarboxylační enzymy | 41 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 42 |
| 5 CÍL PRÁCE | 43 |
| 6 PRACOVNÍ POSTUPY | 44 |
| 6.1 MATERIÁLNÍ VYBAVENÍ | 44 |
| 6.1.1 Chemikálie | 44 |
| 6.1.2 Přístrojové vybavení a ostatní pomůcky | 44 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6.2 | KULTIVACE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (CCM 3954) | 45 |
| 6.3 | MĚŘENÍ RŮSTU BAKTERIÍ <i>ESCHERICHIA COLI</i> (CCM 3954)..... | 45 |
| 6.4 | SLEDOVÁNÍ VLIVU VYBRANÝCH FAKTORŮ (pH, TEPLoty) NA EXPRESI GENŮ <i>ADIA</i> A <i>SPEF</i> U BAKTERIE <i>E. COLI</i> | 46 |
| 6.5 | IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN | 47 |
| 6.5.1 | Izolace bakteriální DNA | 47 |
| 6.5.2 | Izolace bakteriální RNA..... | 48 |
| 6.6 | TRANSKRIPCE BAKTERIÁLNÍ RNA DO cDNA | 50 |
| 6.7 | METODIKA PCR REAKCÍ | 51 |
| 6.7.1 | Zkouška funkčnosti primerů metodou klasické PCR..... | 51 |
| 6.7.2 | Stanovení účinnosti primerů a sledování exprese genů metodou real time-PCR..... | 52 |
| 7 | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 54 |
| 7.1 | RŮSTOVÉ KŘIVKY BAKTERIE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (CCM 3954) | 54 |
| 7.2 | IZOLACE DNA BAKTERIE <i>E. COLI</i> | 57 |
| 7.3 | OPTIMALIZACE POSTUPŮ IZOLACE RNA Z REÁLNÝCH VZORKŮ | 57 |
| 7.4 | POUŽITÉ PRIMERY | 60 |
| 7.4.1 | Primery pro referenční gen – <i>gapA</i> | 60 |
| 7.4.2 | Primery pro sledovaný gen – <i>adiA</i> | 61 |
| 7.4.3 | Primery pro sledovaný gen – <i>speF</i> | 62 |
| 7.5 | TESTOVÁNÍ PRIMERŮ..... | 63 |
| 7.5.1 | Zkouška funkčnosti navržených primerů | 63 |
| 7.5.2 | Kontrola účinnosti reakce při použití navržených sad primerů | 65 |
| 7.6 | SLEDOVÁNÍ EXPRESE A VLIVU ZMĚNY FAKTORŮ (TEPLoty A pH) NA EXPRESI SLEDOVANÝCH GENŮ <i>ADIA</i> A <i>SPEF</i> | 66 |
| 7.6.1 | Kontrolní vzorek bujony s přidávkem volných aminokyselin | 66 |
| 7.6.2 | Testovaný vzorek nízkotučného mléka..... | 72 |
| 7.6.3 | Testovaný vzorek vepřové pomazánky (paštiky)..... | 76 |
| | ZÁVĚR | 83 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 85 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 92 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 94 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 96 |
| | SEZNAM PŘÍLOH..... | 98 |

ÚVOD

V posledních letech je stále častěji kladen důraz na bezpečnost potravin a jejich analýzu, k čemuž bývají využívány i molekulárně biologické metody, jako např. metoda klasické polymerázové řetězové reakce (PCR) či její modifikace.

Jedním z ukazatelů kvality potravin a jejich vstupních surovin mohou být také biogenní aminy, které vznikají právě ve fermentovaných, zrajících a kazících se potravinách dekarboxylasovou činností některých bakterií z volných aminokyselin. Mezi dva nejnebezpečnější biogenní aminy patří histamin a tyramin, které konzumentům mohou způsobovat dokonce otravy. Na první pohled jsou kadaverin, spermin, spermidin nebo putrescin méně rizikovými zástupci, avšak tyto výrazně inhibují detoxikační pochody, kterými je lidský organismus schopný odbourat nižší koncentrace přítomných biogenních aminů, a výrazně tak přispívají jiným na jejich negativním účinku.

Metoda klasické PCR slouží ke kvalitativní analýze přítomnosti mikroorganismů s dekarboxylasovou aktivitou, tedy bakterií nesoucích geny kódující dekarboxylační enzymy, a to na základě předem vhodně zvolených primerů. Některé tyto geny mohou být inducibilní a jejich expresi může ovlivnit řada faktorů. Nicméně ke sledování takovéto genové exprese nestačí pouze identifikovat příslušnou bakterii, resp. její gen, nýbrž je zapotřebí gen detekovat a i kvantitativně vyhodnotit nárůst, popř. pokles, jeho exprese. K tomuto je využívána modifikovaná metoda real time-PCR.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NUKLEOVÉ KYSELINY

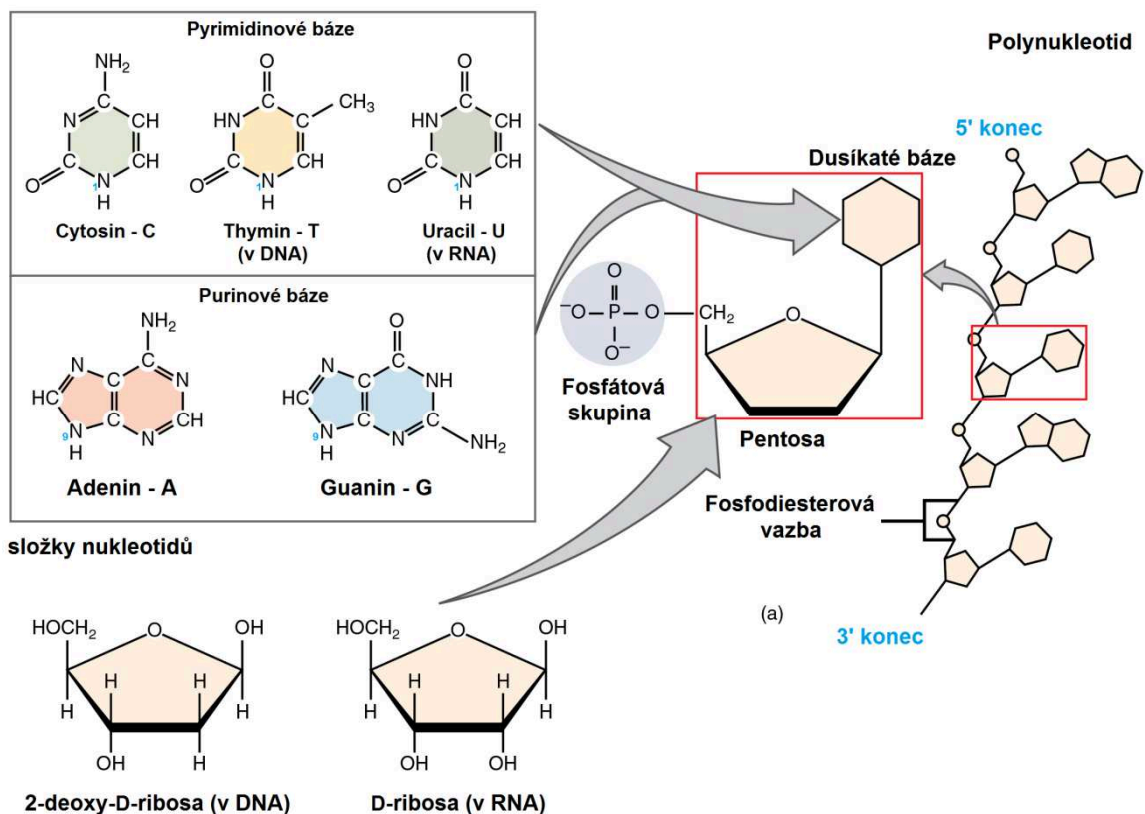
Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky kyselé povahy, jejichž základní biologickou funkcí je uchovávání a předávání genetické informace organismu. Název byl odvozen z latinského *nukleus*, tedy jádro. Právě z jader bílých krvinek byly úplně poprvé v roce 1869 izolovány švýcarským lékařem a přírodovědcem Friedrichem Meischerem (1844 – 1895) [1].

Podle chemického složení rozlišujeme nukleové kyseliny na dva typy:

- deoxyribonukleové (DNA),
- ribonukleové (RNA).

1.1 Chemická struktura

Základní stavební jednotkou nukleových kyselin, jejichž struktura je znázorněna na *obrázku 1*) je nukleotid složený z pětiuhlíkatého monosacharidu, fosfátové skupiny a dusíkaté báze. Cukernou složku tvoří v případě ribonukleových kyselin (RNA) D-ribosa a v případě deoxyribonukleových kyselin (DNA) 2'-deoxy-D-ribosa. Zbytek kyseliny fosforečné, navázaný na 5' uhlík tohoto monosacharidu, vytváří kovalentní (tzv. fosfodiesterovou) vazbu spojující jednotlivé nukleotidy mezi sebou, a to vazbou právě mezi fosfátovou skupinou na 5' uhlíku jednoho monosacharidu a hydroxylovou skupinou na 3' uhlíku druhého monosacharidu. Dusíkaté báze jsou substitučními deriváty purinu – adenin (A) a guanin (G) nebo pyrimidinu – cytosin (C) a thymin (T) u DNA, eventuálně uracil (U) u RNA. Ve struktuře nukleových kyselin jsou dusíkaté báze vázány β -*N*-glykosidovou vazbou, která je tvořena 1' uhlíkem dané pentosy a 9 dusíkem purinové báze nebo 1 dusíkem pyrimidinové báze. Pořadí těchto nukleotidů v řetězci nukleových kyselin udává jejich primární strukturu a má rozhodující význam z hlediska předávané informace. Podle zvyklostí bývá zapisováno ve směru, v jakém jsou nukleové kyseliny syntetizovány, a to od 5' konce (konec tvořený volnou 5'-OH skupinou, která může být esterifikovaná kyselinou fosforečnou) po 3' konec (nukleotid s volnou 3'-OH skupinou) polynukleotidového řetězce. [2, 3, 4]



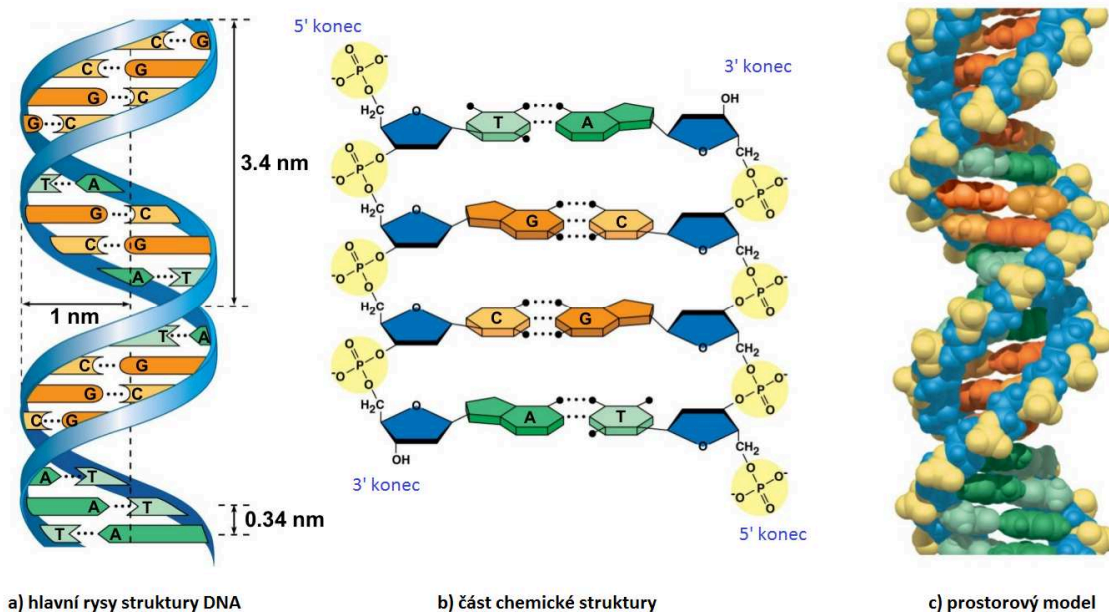
Obrázek 1: Struktura nukleových kyselin. [5]

1.2 DNA

Základní funkcí molekuly DNA je úschova a předávání genetické informace, která je v ní zapsána formou specifické sekvence nukleotidů. Daný úsek nesoucí instrukce pro výrobu jedné bílkoviny se nazývá strukturní gen. Soubor všech genů organismu se označuje jako genom. [1, 2]

1.2.1 Struktura DNA

Největší zásluhy na popisu struktury DNA jsou přisuzovány americkému biologovi Jamesi D. Watsonovi (naroden 1928) a britskému biologovi a fyzikovi Francisi Crickovi (1916 – 2004), kteří poprvé v roce 1953 publikovali v časopise Nature správný prostorový model její molekuly. Za tento objev obdrželi o 9 let později Nobelovu cenu.



Obrázek 2: Schéma struktury molekuly DNA.[6]

Molekula DNA je tvořena dvěma polynukleotidovými řetězci stočenými do pravotočivé dvoušroubovice vinoucí se okolo společné osy (viz obrázek 2). Dusíkaté báze vláken směřují dovnitř a jsou mezi sebou navzájem spojeny vodíkovými můstky. Dva vodíkové můstky vznikají mezi adeninem a thyminem a tři se vytváří mezi guaninem a cytosinem. Díky tomuto párování jsou si řetězce navzájem komplementárními. K udržení prostorové struktury molekuly DNA přispívají také nekovalentní interakce mezi jednotlivými dvojicemi bází – tzv. patrové interakce. Zejména interakce π -elektronů aromatických kruhů. Dvoušroubovice je také tím stabilnější, čím vyšší podíl G-C párů obsahuje. [1, 2, 4]

1.2.2 Vlastnosti DNA

Vzhledem k záporně nabitým fosfátovým skupinám je molekula DNA polární a tedy rozpustná ve vodě. V ethanolu však dochází k vyvázání těchto záporných nábojů vysrážením molekul ve formě bílé sraženiny.

V kyselém prostředí se hydrolyzují glykosidové vazby mezi cukernou složkou a dusíkatou bází. V zásaditém prostředí dochází k porušení nekovalentních interakcí mezi komplementárními bázemi a denaturaci molekuly. Stejný účinek má na molekulu teplota vyšší

než 90 °C nebo nízká iontová síla roztoku. Volný vodík na fosfátové skupině dává celé molekule typický kyselý charakter.

Dvouřetězcová molekula DNA absorbuje záření o vlnové délce 260 nm (oblast ultrafialového záření). Významný podíl na absorpci mají především jednotlivé báze, přičemž větší schopnost absorbovat mají heterocyklické purinové báze (A, G). Během denaturace DNA dochází k tzv. hyperchromnímu efektu (zvýšení ϵ_{\max}), kdy dochází ke zvýšení absorpce UV záření.

Zároveň dochází při denaturaci k řadě dalších změn fyzikálních a chemických vlastností DNA (např. klesá viskozita). [1, 2, 3, 4]

1.2.3 Výskyt DNA

V buňkách prokaryot se DNA nachází ve formě jediné velké kruhové molekuly, tzv. nukleoidu, a malé kruhové molekuly nazývané plazmid.

Eukaryota jsou organismy, jejichž buňky mají vytvořené buněčné jádro. Jejich genetický materiál (chromozomální DNA) je obalen membránou. V cytoplazmě obsahují semiautonomní organely mitochondrie, které mají vlastní DNA (mitochondriální – mitDNA) a proteosyntetický aparát. Semiautonomními organelami rostlinných buněk jsou plastidy vlastní chloroplastovou DNA (ctDNA).

1.3 RNA

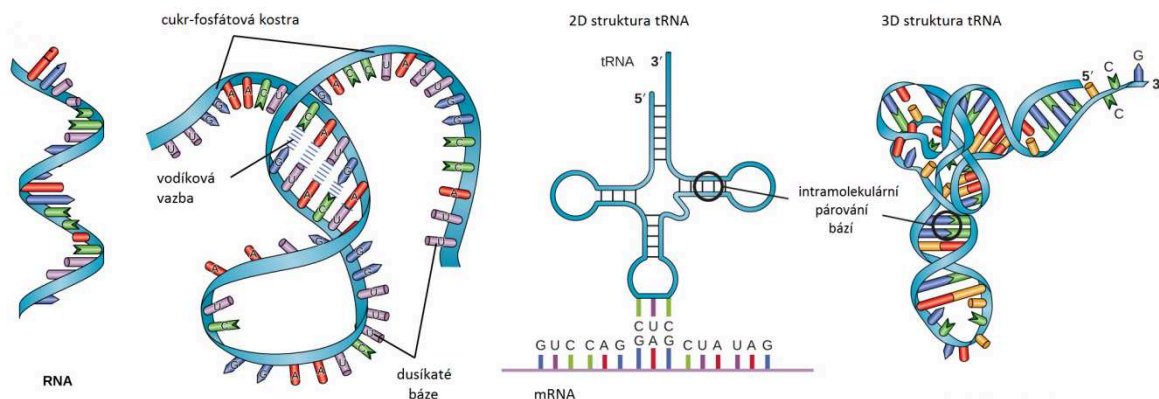
Základní funkcí RNA je řízení syntézy bílkovin během translace, také se podílí na stavbě ribozomů. Primární struktura RNA vzniká pořadím ribonukleotidů v řetězci. Sekundární struktura je tvořena dvouřetězcovými úseky vzniklými v molekule RNA. Terciární struktura může vzniknout intramolekulárními interakcemi u jednotlivých typů RNA a umožňují tak různé funkce. [1, 2] Existují tři základní druhy RNA vyskytující se v prokaryotických i eukaryotických buňkách:

- mediátorová (mRNA),
- transferová (tRNA),
- ribozomová (rRNA).

1.3.1 Mediátorová – mRNA

Základní úlohou mediátorové (informační či „messenger“) RNA je řídit vznik proteinů, k němuž dochází ve dvou krocích – tzv. transkripci a translaci.

U prokaryotických buněk tvoří produkt transkripce (přepisu z molekuly DNA) jednovláčková molekula mRNA (viz *obrázek 3*), která je transportována na ribozomy. Tady slouží jako templát a účastní se translace (překlady) genetické informace ze sekvence nukleotidů do sekvence aminokyselin. U eukaryotických buněk tvoří produkt transkripce premediátorová RNA (pre-mRNA, hnRNA), která ještě následně prochází řadou posttranskripčních úprav. [1, 7, 8]



Obrázek 3: Struktura mRNA a tRNA. [9]

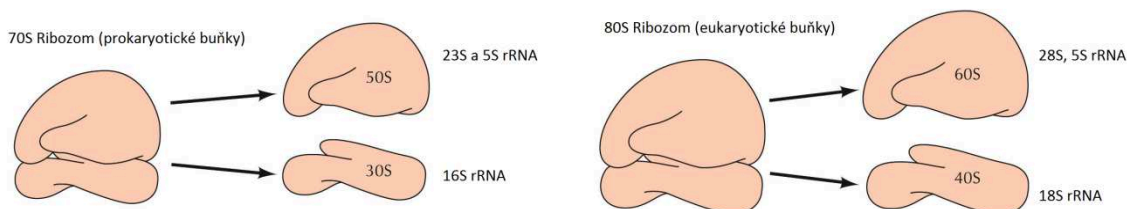
1.3.2 Transferová – tRNA

Molekula tRNA je prostředníkem při syntéze bílkovin v translačním procesu. Je tvořena asi 80 nukleotidy. Její sekundární struktura připomíná tvar jetelového listu (viz *obrázek 3*), který se v terciární struktuře balí do tvaru písmene „L“. Skrze antikodon je schopna rozpoznat a spárovat se s kodonem mRNA. Na 3' konci je esterovou vazbou vázána aminokyselina příslušná k dané kodonové sekvenci třech nukleotidů. [1, 7, 8]

1.3.3 Ribozomová – rRNA

Největší část RNA kyselin tvoří její ribozomová forma. Tvoří až 80 hm. % všech RNA v buňce. Spolu s bílkoviny se podílí na stavbě ribozomu a je zároveň zodpovědná

za jeho funkci, zejména se podílí na vytváření peptidových vazeb při syntéze bílkovin během translace. U prokaryotických buněk mohou dosahovat velikosti 23S, 16S nebo 5S (viz *obrázek 4*). U eukaryotických buněk dosahují velikostí 28S, 18S, 8S nebo 5S. [1, 7, 8]



Obrázek 4: Ribozomální RNA. [10]

1.4 Izolace nukleových kyselin

Před samotnou izolací nukleových kyselin je nutná určitá příprava vzorku, který bývá často nejprve homogenizován. Následně je potřeba provést lýzu buněk, konkrétně rozrušit jejich buněčné stěny a biomembrány, k čemuž se využívá např. [11, 12]

- mechanické síly – vortex, drcení tekutým dusíkem;
- působení enzymů – lysozymu, celulasy;
- lyzačního roztoku;
- detergentů – dodecylsulfátu sodného, který rozpustí cytoplazmatickou membránu.

Odstranění nejrůznějších kontaminantů, např. bílkovin) se provádí působením enzymů. Mezi nejčastěji používané patří:

- proteinasy K s teplotním optimem při 55 °C a pH = 5,
- proteinasy E s teplotním optimem při 38 °C a pH = 8,
- specifické nukleasy (pankreatická ribonukleasa A, DNasa). [11, 12]

Pro samotnou izolaci nukleových kyselin z biologického materiálu existuje řada metod. V praxi jsou nejčastěji využívány následující metody, založené na navzájem odlišných principech:

- rozdílné rozpustnosti,
- adsorpci na pevný povrch.

1.4.1 Metody využívající rozdílné rozpustnosti

Fenol-chloroformová extrakce

Přidáním směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu k buněčnému lyzátu dochází k rozdělení směsi na dvě fáze. Přítomnost izoamylalkoholu způsobuje zvýšenou rozpustnost fenolu v chloroformu (za současného zvýšení hustoty na hodnotu $1,49 \text{ g.cm}^{-3}$), takže organická fáze klesá a vodná fáze se drží nahoře. Protřepáváním dochází ke srážení bílkovin fenolem. Centrifugací se pak vytváří mezifáze mezi organickou a vodnou fází, kterou tvoří právě vysrážené bílkoviny. Nukleové kyseliny zůstávají ve vodné fázi. Několikanásobným opakováním tohoto postupu je odstranění bílkovin důkladnější. Jelikož se fenol částečně rozpouští i ve vodě (8,3 g fenolu na 100 ml vody), je zapotřebí směs ještě nakonec vyextrahovat směsí chloroformu s izoamylalkoholem (24:1). Z takto přečištěného vodného roztoku se nukleové kyseliny vysráží přidavkem ethanolu. Pro snadnější vysrážení je vhodné použít ethanol vychlazený na nízkou teplotu a to nejlépe na -20 až -80 °C. Zároveň je možné vysrážení nukleových kyselin podpořit přidavkem solí (např. chloridu sodného, octanu sodného nebo octanu amonného). V takovém případě je ale pak nutné provést odsolení promytím 70% ethanolem. Po konečném odstředění se nukleové kyseliny nachází v sedimentu. [11, 12, 13]

- *Izolace plazmidové DNA*

Purifikace využívá odlišností plazmidové DNA od genomové. Zatímco plazmidová DNA tvoří malé dvouřetězcové kružnicové molekuly o velmi vysoké superhelikální hustotě, genomová DNA je tvořena obrovským chromozomem o nižší superhelikální hustotě. Během purifikace je tato obrovská molekula roztržena. Samotné oddělení těchto dvou druhů nukleových kyselin bývá prováděno např. přidavkem hydroxidu sodného (tzv. alkalická lýze), který způsobí zvýšení pH nebo zvýšením teploty (tzv. lýze varem). [11, 12, 13]

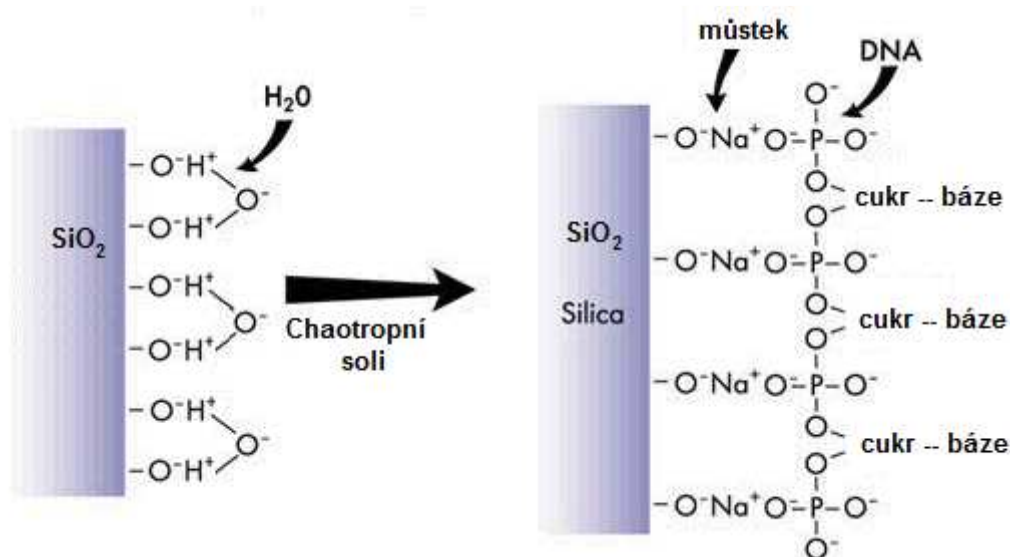
- *Izolace RNA*

Vzhledem k tomu, že RNA je mnohem náchylnější na degradaci způsobenou ribonukleasami, je proces izolace RNA mnohem náročnější, než izolace DNA. Ribonukleasy se vyskytují ve veškerém okolním prostředí a je proto nutné pracovat ve striktně sterilním prostředí a nejlépe do používaných roztoků přidávat inhibitory ribonukleas, kterým

je např. 0,1% diethylpyrokarbonát. U izolace RNA je nutné snížit hodnotu pH fenolu do hodnot v rozmezí 5 – 6 přidávkem kyselého pufru. Tím dojde k zachycení DNA a bílkovin v organické fázi. RNA zachycená ve vodné fázi je pak promývána isopropanolem a ethanolem. [11, 12]

1.4.2 Metoda využívající adsorpce na pevný podklad

Nukleové kyseliny jsou schopné se adsorbovat na povrchy silikátových materiálů z oxidu křemičitého. V tomto případě je důležitá přítomnost chaotropních solí, které narušují strukturu molekul DNA. Dojde k vytvoření můstku mezi fosfátovou skupinou a sodným kationtem dané soli (viz *obrázek 3*), přičemž síla této vzniklé vazby závisí na typu nukleové kyseliny, iontové síle a pH roztoku. K nejčastěji používaným patří např. jodid sodný, guanidin thiokyanát nebo guanidin hydrochlorid. V následujícím kroku je vzorek promýván roztokem chloroformu, čímž se odstraňují bílkoviny a další kontaminanty. Tato metoda izolace nukleových kyselin se provádí prostřednictvím speciálních komerčně připravených kitů. V posledním kroku je proto zapotřebí nukleové kyseliny uvolnit z pevného podkladu kolonky. Tato eluce se provádí promytím roztokem s nízkou iontovou silou (tzv. elučním pufrům). Velkou výhodou této metody je rychlost, vysoký výtěžek a vysoká čistota izolované nukleové kyseliny. [11, 12]



Obrázek 5: Mechanismus interakce DNA s oxidem křemičitým. [14]

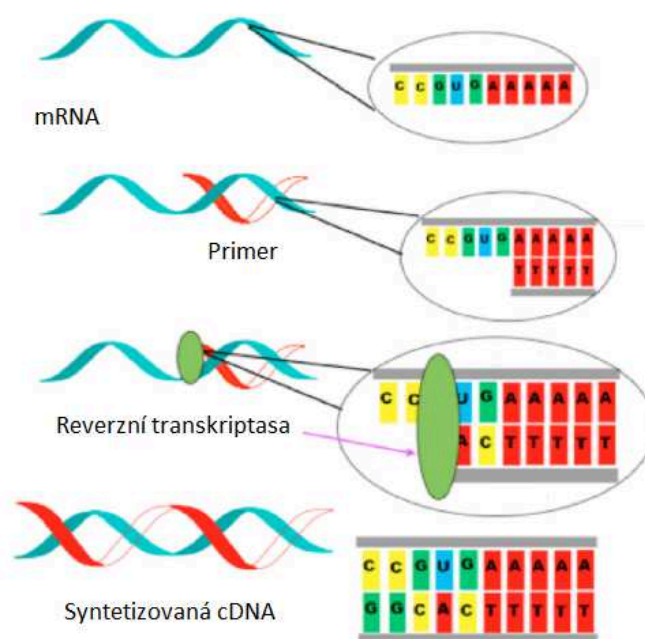
1.5 Reverzní transkripce

Jak už z názvu tohoto děje vyplývá, jedná se o obrácený proces, který probíhá při přenosu genetické informace z DNA do RNA – tzv. transkripci. V případě reverzní transkripce je genetická informace přepisována z RNA do DNA. Reakce je katalyzovaná enzymem reverzní transkriptasou.

1.5.1 Průběh reverzní transkripce

Proces reverzní transkripce znázorněný na *obrázku 6* se skládá z několika následujících kroků:

- **Denaturace RNA** – jelikož RNA částečně obsahuje sekundární struktury ve tvaru vlásenek, které průběhu reverzní transkripce brání, je nutné vzorek vyizolované RNA nejprve zahřát na teplotu okolo 65 až 70 °C, kdy se tyto struktury denaturují.
- **Syntéza cDNA řetězce** – v určitém místě templátové RNA, kam nasedá primer, začíná reverzní transkriptasa syntetizovat komplementární řetězec DNA; vzniká však dvouřetězcová hybridní molekula RNA – DNA.
- **Odstranění RNA řetězce** – k odstranění RNA řetězce ze vzniklé hybridní molekuly RNA – DNA slouží enzym RNasa. [15]



Obrázek 6: Schéma reverzní transkripce. [16]

1.5.2 Reakční směs pro reverzní transkripci

Směs k provedení reverzní transkripce se skládá z šesti komponentů:

- **Templátová RNA** – výchozí vzorek, který obsahuje požadovanou sekvenci mRNA.
- **Primer** – pro tento typ reakcí se využívají směsi tzv. *random hexamer primer*, skládající se ze všech možných sekvencí primerů o velikosti šesti nukleotidů, které umožňují nasednutí na všechna možná místa v řetězci mRNA. [17]
- **Pufr pro reverzní transkriptasu** - složený obdobně jako u PCR reakcí z Tris-HCl, chloridu draselného (pro usnadnění nasednutí primerů) a hořečnatých iontů nejčastěji ve formě chloridu hořečnatého ($MgCl_2$). Roztok pufru bývá o $pH = 8,5$ (při $25\text{ }^\circ\text{C}$).
- **RNasa** – enzym zajišťující odstranění řetězce RNA ze vzniklé hybridní molekuly.
- **Směs nukleotidů** – vodný roztok čtyř nukleotidů (dATP, dCTP, dGTP a dTTP), které jsou základními stavebními jednotkami syntetizovaného řetězce cDNA.
- **Reverzní transkriptasa** – enzym ze skupiny DNA polymeras schopný syntetizovat molekulu cDNA podle templátové mRNA. [18]

2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction), umožňující amplifikaci specifického úseku DNA *in vitro*, byla poprvé publikována americkým chemikem Kary B. Mullisem (narozen 1944) roku 1985 v časopise Science [19]. Společně s kanadským chemikem Michaelem Smithem (1932 – 2000) za ni obdrželi v roce 1993 Nobelovu cenu.

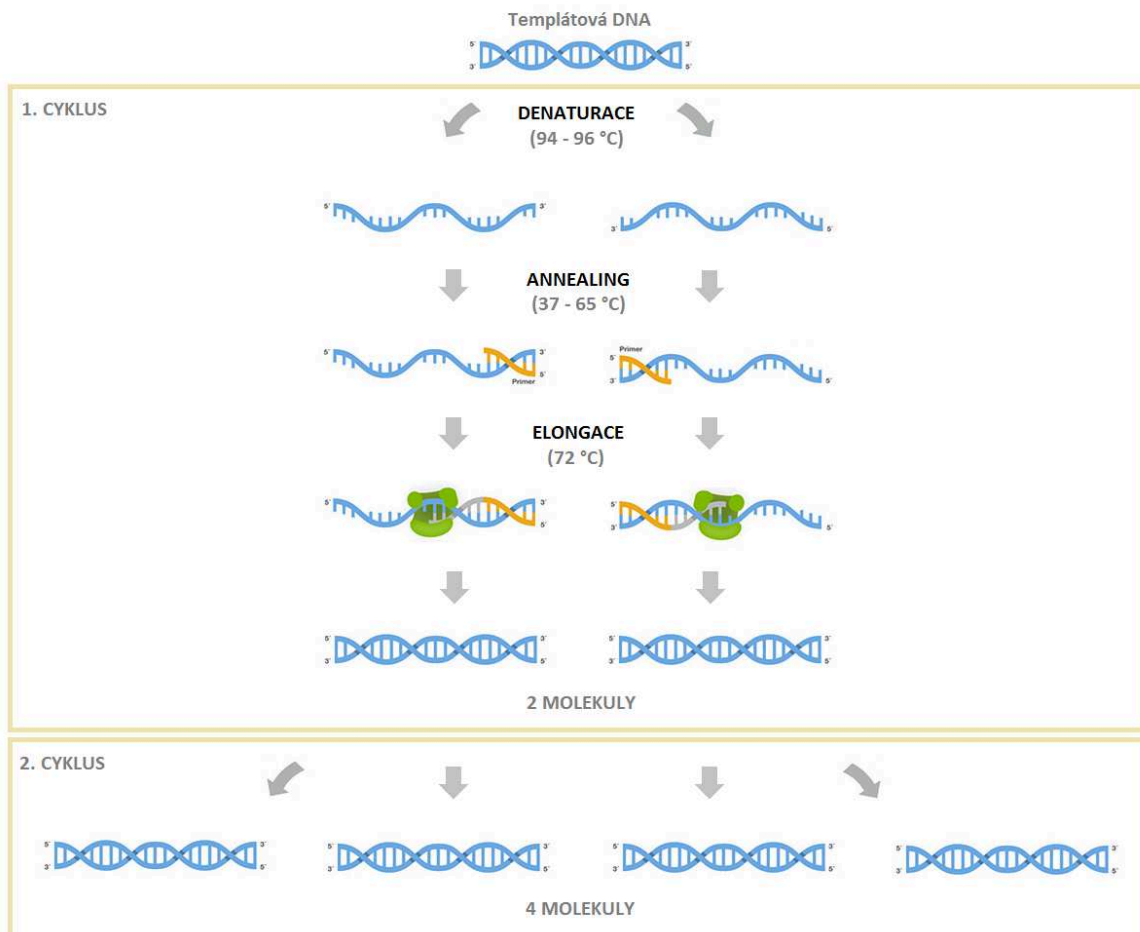
2.1 Průběh PCR

Základem metody je opakující se enzymová syntéza nových řetězců DNA (ve směru $5' \rightarrow 3'$), tvořená následujícími kroky, znázorněnými na *obrázku 7*:

- **Úvodní denaturace** – slouží k dostatečnému rozvolnění dvoušroubovic DNA při teplotě asi $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 – 5 minut.
- **Denaturace DNA** – v prvním kroku dochází k porušení nekovalentních interakcí mezi řetězci nukleové kyseliny vlivem zvýšení teploty reakčního roztoku na $94\text{--}96\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 – 50 s a jejich následnému oddálení za vzniku dvou molekul jednořetězcové DNA.
- **Annealing** – na konec úseku obou molekul jednořetězcové DNA, který chceme amplifikovat, nasedají při teplotě $37\text{--}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ tzv. primery. Teplotní režim je udržován po dobu 30 – 90 s.
- **Extense** – v posledním kroku trvajícím 45 – 90 s dochází při teplotě asi $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ k připojování dalších nukleotidů a tedy prodlužování řetězců za katalytického působení DNA-polymerasy.
- **Závěrečná extense** – slouží pro zajištění dosyntetizování všech produktů ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu asi 4 – 5 minut). [20]

Na konci prvního cyklu replikace, jak je patrné z *obrázku 7*, takto vzniknou dvě kopie výchozí dvouvláknové DNA. Během dalších opakování roste počet vzniklých kopií exponenciálně (2^n , kde n = počet cyklů). Uvádí se, že pro získání dostatečného množství výchozího úseku DNA obvykle stačí opakovat proces asi ve 30 cyklech, během kterých by se v případě stoprocentní účinnosti reakce mělo replikovat 2^{30} kopií ($\approx 1,07 \cdot 10^9$) molekul DNA. Ve skutečnosti však účinnost reakce stoprocentní není a počet vzniklých kopií se pohybuje v řádech 10^6 až 10^8 . Proto se v praxi pracuje s vyšším počtem cyklů,

avšak neměl by být příliš vysoký, aby zbytečně nedocházelo ke vzniku nespecifických PCR produktů. Nejčastěji se volí v rozmezí 25 až 35 cyklů. Produktem PCR jsou úseky DNA definované délkou – tzv. amplikony. [20]



Obrázek 7: Schématické znázornění průběhu PCR. [21]

Pro získání specifického produktu je zapotřebí předem optimalizovat a upravit všechny výše zmíněné kroky.

2.1.1 Reakční směs

Směs k provedení polymerázové řetězové reakce se skládá z šesti komponentů:

- *Templátová DNA* – výchozí vzorek, který obsahuje požadovanou sekvenci DNA.

- **DNA-polymerasa** – vzhledem k vysokým teplotám potřebným pro porušení nekovalentních vazeb v molekule DNA, je nutné použít termostabilní DNA-polymerasu, která neztratí enzymovou aktivitu při teplotách nad 90 °C. První a nejčastěji používanou byla DNA-polymerasa izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, tzv. Taq-polymerasa, která vykazuje exonukleasovou aktivitu ve směru od 5' konce ke 3' konci. Dnes je známa řada dalších, jako např. Tfl-polymerasa izolovaná z bakterie *Thermus flavus*, Tbr-polymerasa z bakterie *Thermus brockianus* nebo Tth-polymerasa z bakterie *Thermus thermophilus*, vykazující také exonukleasovou aktivitu ve směru 5' → 3'. Z DNA-polymeras, které mají exonukleasovou aktivitu ve směru 3' → 5', jsou nejčastěji využívány Tli-polymerasa získaná z bakterie *Thermococcus litoralis*, Pfu-polymerasa z bakterie *Pyrococcus furiosus*, Pwo-polymerasa z bakterie *Pyrococcus woessii* nebo Tma-polymerasa z bakterie *Thermotoga maritima*. Existuje také několik uměle připravených nebo modifikovaných enzymů [22].
- **Puf** – složený z 10 až 50 mM Tris-HCl s pH v rozmezí 8,3 – 8,8, dále může být přidáván chlorid draselný (pro usnadnění nasednutí primerů) o maximální koncentraci 50 mM, aby nedocházelo k inhibování DNA-polymerasy. V případě, že hořečnaté ionty nejsou přímo součástí pufru, bývají dodávány zvlášť a to nejčastěji ve formě chloridu hořečnatého (MgCl₂). Plní funkci kofaktoru a spolu s 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) vytváří rozpustný komplex, který je rozpoznávaný DNA-polymerasou. Také koncentrace hořečnatých iontů musí být optimalizována přímo pro danou reakci, jelikož mohou reagovat také s primery nebo templátovou DNA. Při vyšších koncentracích tak může docházet k vytváření nespecifických PCR produktů a naopak při nižších koncentracích nevznikne dostatečné množství požadovaného produktu.
- **Směs nukleotidů** - další nezbytnou složku směsi tvoří vodný roztok čtyř 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfátů (dNTP) – deoxyadenosintrifosfát (dATP), deoxycytidintrifosfát (dCTP), deoxyguanosintrifosfát (dGTP) a deoxythymidintrifosfát (dTTP), které jsou základními stavebními jednotkami nově syntetizovaného řetězce.
- **Primery** – jsou krátké řetězce asi 20 nukleotidů. Tyto sekvence musí být předem pečlivě navrženy, aby se jednalo o jedinečnou sekvenci a primery se mohly navázat pouze na jedno jediné a specifické místo v genomu. Zároveň se u primerů nesmí vyskytovat navzájem komplementární sekvence nukleotidů. Zapříčiňovalo by to

tvorbu jednak duplexů, ale v případě jednoho primeru také vznik sekundárních struktur - vlásenek ve tvaru smyčky.

- *Sterilní voda* – doplňuje reakční směs na daný objem. [20]

2.1.2 Detekce produktů PCR

Získané amplikony jsou následně detekovány, např. na elektroforetickém gelu, hybridizací se značenou sondou komplementární k amplifikovanému produktu, štěpením restriktivními enzymy a následným posouzením restriktivních fragmentů (RFLP) [22].

Nejčastěji využívanou je elektromigrační metoda využívající pohyb nabitých částic v elektrickém poli v závislosti na jejich náboji a velikosti - elektroforéza. Vzhledem k tomu, že fosfátové skupiny jsou v neutrálním prostředí plně disociovány a nesou záporný náboj [1], putují amplifikované fragmenty nukleových kyselin vždy k anodě a rychlost putování tak závisí výhradně na jejich velikosti. Delší fragmenty putují pomaleji, než fragmenty kratší.

K detekci nukleových kyselin se používají gely agarózové (separace fragmentů o velikosti 100 bp až 50 kb) nebo polyakrylamidové (separace fragmentů 10 až 1000 bp). Velikost póru gelu závisí na koncentraci polymeru. Pro lepší nanášení vzorku na gel a sledování vzorku při separaci je vhodné testovaný roztok s DNA obarvit. Nejběžnějším způsobem vizualizace molekul DNA po elektroforetické separaci je pak jejich obarvení fluorescenčními barvivy, např. etidiumbromidem, který se vmezeřuje (interkaluje) do mezimolekulových prostor mezi sousední páry bází a vytváří komplex. Po ozáření ultrafialovým světlem v tzv. transiluminátoru dochází k excitaci elektronů a uvolnění energie jako záření o vlnové délce 590 nm. Tato oblast záření se projevuje oranžovým světlem. [20]

2.1.3 Real time-PCR

V posledních letech je stále častěji v laboratořích využívána modifikovaná metoda PCR označovaná jako „real time-PCR“. Zatímco u klasické PCR je výsledný produkt detekován až po skončení celého procesu, tato modifikovaná metoda umožňuje sledovat amplifikované produkty v průběhu každého reakčního cyklu, tedy v reálném čase. Pro možnost

stanovit sledovanou sekvenci DNA kvalitativně i kvantitativně, bývá často označována také jako kvantitativní PCR (qPCR).

Výhody real time-PCR [21, 22, 23, 24]:

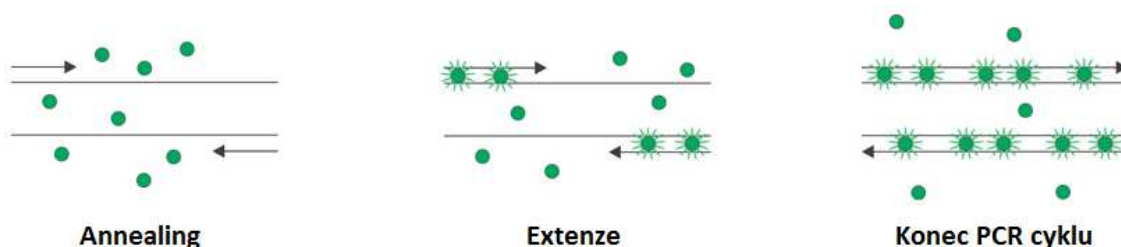
- kvantifikace v rozpětí 7 až 8 logaritmických dekád,
- vysoká citlivost (< 5 kopií),
- vysoká přesnost (< 2% standardní odchylka).

2.1.4 Detekce produktů real time-PCR

Vzniklé amplikony je možné detekovat několika následujícími způsoby:

- *Nespecifická interkalační barviva*

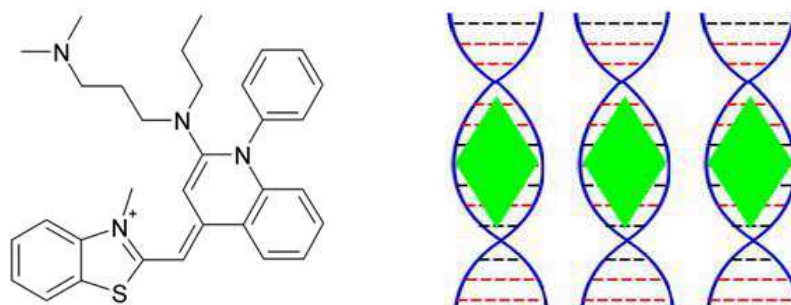
Jedná se o organické látky, které se váží do malého žlábků dvouřetězcové DNA. Zvyšováním se počtu molekul dvouřetězcové DNA během amplifikační reakce, stoupá množství vmezeřených molekul barviva, která po ozáření emitují fluorescenční záření přímo úměrné počtu vzniklých komplexů „DNA – barvivo“, jak je znázorněno na *obrázku 8*. [23, 24, 25]



Obrázek 8: Znázornění interkalace nespecifických barviv do dvoušroubovice DNA v jednotlivých krocích PCR. [26]

Nejčastěji využívaným barvivem tohoto typu je asymetrická cyaninová sloučenina uváděná pod názvem SYBR Green I (viz *obrázek 9*), které má za standardních reakčních podmínek PCR cyklu vysokou vazebnou afinitu k dsDNA (dvouvláknová DNA) a to díky dvěma pozitivním nábojům, které se nachází v jeho struktuře. Výsledný komplex absorbuje záření v oblasti modrého světla ($\lambda = 497$ nm) a následně emituje záření v oblasti zeleného světla ($\lambda = 520$ nm). V reakční směsi může docházet ke vzniku různých nespecifických produktů, např. dimery primerů, které lze odkrýt na základě analýzy křivky tání. V odborných

publikacích je uváděno, že barviva označovaná jako EvaGreen a SYTO jsou pro kvantifikaci qPCR produktů mnohem stabilnější a citlivější. [23, 24, 25, 26]



Obrázek 9: Struktura SYBR Green I a jeho fluorescence po vazbě na DNA. [28, 29]

- Hydrolyzační sondy

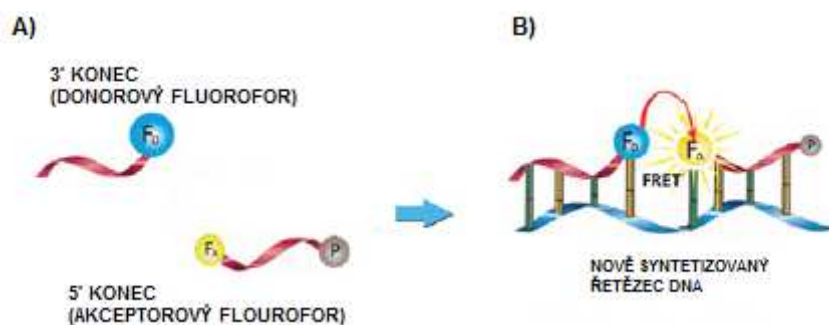
Krátké oligonukleotidové sondy, které jsou komplementární k jednomu z řetězců, mají na 5' konci navázanou látku schopnou po ozáření světlem absorbovat jeho energii a okamžitě emitovat záření o vyšší vlnové délce, tzv. fluorofor, a na 3' konci zhášec. Neaktivní forma této sondy má oba konce v takové blízkosti, že pokaždé, když dojde k emitování záření, je fluorescence okamžitě pohlcena zhášečem. Během syntetizování nového řetězce DNA-polymerasou je sonda hydrolyzovaná a dochází k oddělení fluoroforu od zhášeče. Fluorescence narůstá. [23, 24, 25, 26]

Mezi nejrozšířenější hydrolyzační sondy patří v současnosti tzv. **TaqMan** (viz obrázek 10) o 20 – 30 nukleotidech značených na obou koncích. Jako fluorofor slouží karbofluorescein a jako zhášec např. tetramethyl-6-karboxyrhodamin – TAMRA. [25, 26]



Obrázek 10: Schéma principu fungování sondy TaqMan. [30]

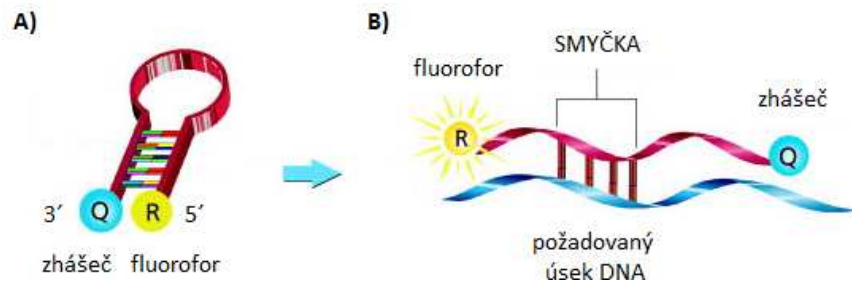
Sondy využívající přenos energie fluorescenční rezonancí (FRET) jsou tvořeny dvojicí fluorescenčně značených sond (viz *obrázek 11*). Každá tato sonda je komplementární k určité cílové sekvenci nukleové kyseliny, které jsou od sebe ve vzdálenosti asi 2 nukleotidů. To z toho důvodu, aby 5' konec jedné sondy byl v blízkosti 3' konce druhé sondy. Oba tyto konce jsou označeny barvivem. Po osvětlení a následné excitaci pak dochází k přenosu energie z jedné sondy na druhou, která fluoreskuje. [25, 26]



Obrázek 11: Model sondy na principu FRET. [26]

- A) Sondy v roztoku emitující záření o nízkých vlnových délkách.
 B) Přenos energie za uvolňování fluorescenčního záření.

Dalším typem hydrolyzačních sond jsou tzv. **molekulové majáky** (molecular beacon). Jedná se o oligonukleotidový řetězec s komplementárními sekvencemi na koncích. Jejich spojením dojde k vytvoření vlásenky. Jednovláknová smyčka je tvořena sekvencí nukleotidů komplementárních k požadovanému úseku nukleové kyseliny. Stejně jako v případě TaqMan sondy, je i tady na 5' konci navázán fluorofor a na 3' konci zhášec. Koncové skupiny jsou v takové blízkosti, že je molekula neaktivní. Ve chvíli, kdy se smyčka dostane do bezprostřední blízkosti požadované nukleové kyseliny, naruší se nekovalentní interakce mezi koncovými úseky vlásenky, smyčka se napřímí a naváže se na požadovaný úsek nukleové kyseliny. Navázaná sonda je následně hydrolyzovaná, dochází k oddělení fluoroforu a emitování fluorescenčního záření, jak je naznačeno na *obrázku 12*. [23, 24, 25, 26]



Obrázek 12: Model molekulárního majáku. [26]

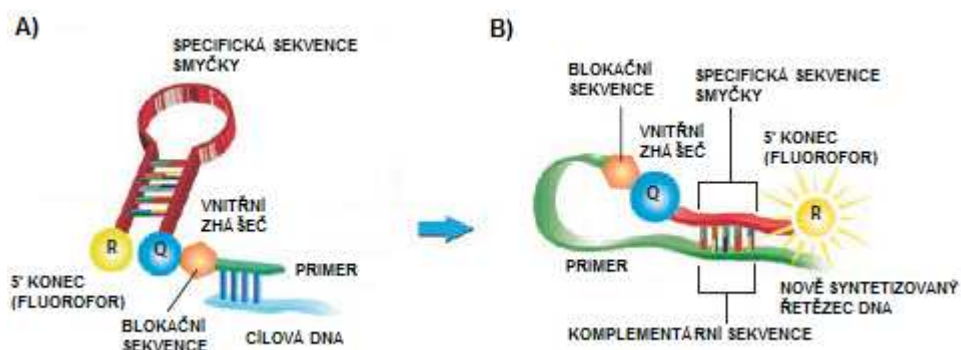
A) Neaktivní molekula ve tvaru vlásenky.

B) Aktivní molekula emitující záření.

Sondy **Scorpions** jsou specifické sondy navržené pro real time - PCR a jsou využívány ve dvou variantách:

- Uni-probes
- Bi-probes

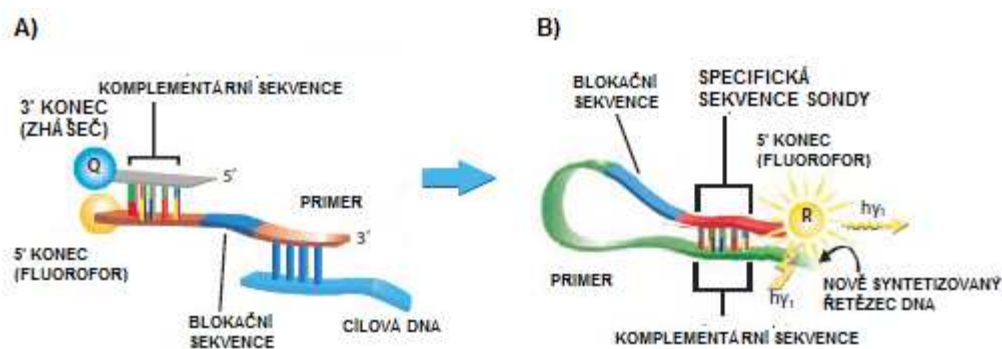
Varianta Uni-probes je tvořena 30 – 60 nukleotidy ve tvaru vlásenky (viz *obrázek 13*). Konec 5' je doplněn fluoroforem a 3' konec je přes blokovací úsek připojen na 5' konec specifického primeru, kterým sonda nasedá na cílovou sekvenci nukleové kyseliny. Následně dochází prostřednictvím Taq-polymerasy ke komplementárnímu řazení nukleotidů. Rozvolněním dvouřetězcové struktury dojde k odhalení specifické sekvence smyčky, která je komplementární k sekvenci nukleotidů za primerem. Část sondy se překlopí. Fluorofor se vymaní z blízkosti zhášedce a je schopen po ozáření světlem dané vlnové délky emitovat fluorescenční signál. [20, 25, 26]



Obrázek 13: Model sondy Scorpions – Uni-probes. [26]

A) Fluorescence je tlumená vnitřním zhášedcem. B) Fluorofor emituje záření.

Varianta Bi-probes (znázorněná na *obrázku 14*) je tvořena 15 – 45 komplementárními dvojicemi nukleotidů. 5' konec nesoucí fluorofor je navázán na blokovací úsek a primer. Na 3' konci druhého nukleotidu je navázán tlumič. Navzájem jsou pak tyto nukleotidy v úseku navzájem komplementárních sekvencí spojeny vodíkovými můstky. Obdobně jako u varianty Uni-probes se během polymerázové řetězové reakce odděluje nukleotid s navázaným tlumičem a po následné excitaci se fluoroforem emituje záření. [25, 26]



Obrázek 14: Model sondy Scorpions – Bi-probes. [26]

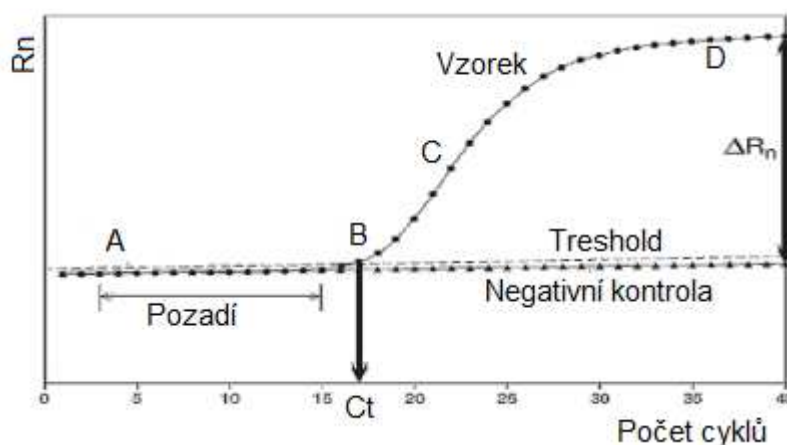
iA) Fluorescence tlumena zhášecem. B) Fluorofor emituje záření.

2.1.5 Kvantitativní vyhodnocení

Množství vzniklých produktů je sledováno díky změnám intenzity fluorescenčního záření. Množství tohoto detekovaného fluorescenčního záření – hodnota R_n , stoupá s přibývajícím počtem proběhnutých cyklů. Na základě naměřených fluorescenčních intenzit pro každý testovaný vzorek je vytvořena tzv. amplifikační křivka sigmoidního tvaru (viz *obrázek 15*), na které je možno rozlišit čtyři fáze:

- **Lineární fáze** – hodnota fluorescence je zatím natolik nízká, že nepřekračuje hodnotu fluorescence pozadí.
- **Exponenciální fáze** – intenzita fluorescence je detekována, jelikož již přesahuje prahovou hodnotu fluorescence pozadí (tzv. treshold). Právě tato hodnota označovaná C_t (slouží ke kvantifikaci templátové DNA). Při optimálním průběhu reakce je v tomto bodě (v ideálním případě), nárůst množství DNA 2^n , kde n je počet proběhnutých cyklů. Čím více molekul templátové DNA je obsaženo v reakční směsi, tím rychleji dochází k překročení prahové hodnoty pozadí [32].

- **Log-lineární fáze** – dochází k velkému nárůstu amplifikované DNA a tím i rychlému nárůstu fluorescence.
- **Fáze „Plateau“** – zpomalení průběhu reakce.



Obrázek 15: Amplifikační křivka. [31]

A – lineární fáze; B – exponenciální fáze;
C – log-lineární fáze; D – fáze Plateau.

2.1.5.1 Absolutní kvantifikace

Metoda absolutní kvantifikace vychází z lineárního vztahu mezi logaritmem počátečního množství templátové DNA (popř. RNA) a hodnoty Ct dané amplifikační křivky.

Nejprve je potřeba amplifikovat řadu standardních vzorků, tvořenou sériově ředěnými roztoky standardů nukleových kyselin o známé koncentraci, a z nich sestojit standardní křivku. Jestliže standardy i neznámé vzorky mají zhruba stejnou účinnost, lze z takto sestojené standardní křivky přímo odečíst výchozí koncentrace amplifikovaných neznámých vzorků. [32, 33, 34]

Pro vytvoření standardních roztoků mohou být použity standardy dsDNA, ssDNA nebo RNA. U standardů DNA je možné volit větší kalibrační rozsahy koncentrací standardů, jsou stabilnější než standardy RNA a také citlivost a reprodukovatelnost metody jsou větší. [33] Metoda real time-PCR pracuje s molekulami cDNA, vznikajících reverzní transkripcí (přepisem) z molekul mRNA. Standardy DNA při této metodě nemohou být využity, jelikož není možné provést kontrolu účinnosti reverzní transkripce. [33, 35]

2.1.5.2 Relativní kvantifikace

V některých matricích není snadné určit původní množství DNA metodou absolutní kvantifikace, a proto se využívá srovnání množství fluorescence testovaného vzorku s množstvím fluorescence jiného vzorku. Při kvantifikaci je ale obvykle nezbytné vyhodnotit také vnitřní kontrolu – tedy geny, jejichž transkripce by měla být stejná u všech testovaných vzorků. Používají se tzv. referenční („housekeeping“) geny. [33, 36] K výpočtu relativní exprese lze použít např. dva následující matematické modely:

- a) **Metoda delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)** – využívá pro výpočet relativních hladin exprese sledovaného genu vzhledem k referenčnímu genu při pozorování časového průběhu tzv. kontrolní vzorky, které tvoří neupravené vzorky v čase nula (viz následující rovnice).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{zkoumaný vzorek}) - \Delta Ct (\text{kontrolní vzorek}) \quad (1)$$

$$\Delta Ct (\text{zkoumaný vzorek}) = Ct (\text{sledovaný gen}) - Ct (\text{referenční gen}) \quad (2)$$

Množství sledovaného genu ve vzorku je následně vyjádřeno hodnotou poměru (*ratio*) R , jejíž výpočet je uveden v rovnici 3.

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

Pro správnost výsledků je nezbytné, aby efektivita amplifikace byla 100%, tedy hodnota E byla rovna 2 (exponenciální průběh amplifikace) a zároveň, aby efektivita amplifikace sledovaného a referenčního genu byla přibližně stejná. [33, 34]

- b) **Pfafflova metoda** – slouží pro výpočet exprese v případech, kdy efektivita není 100% (tedy rovna 2). Nejprve se podle vzorce uvedeného v rovnici 4 vypočítá ze směrnice kalibrační křivky (k) efektivita (E) pro jednotlivé geny.

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

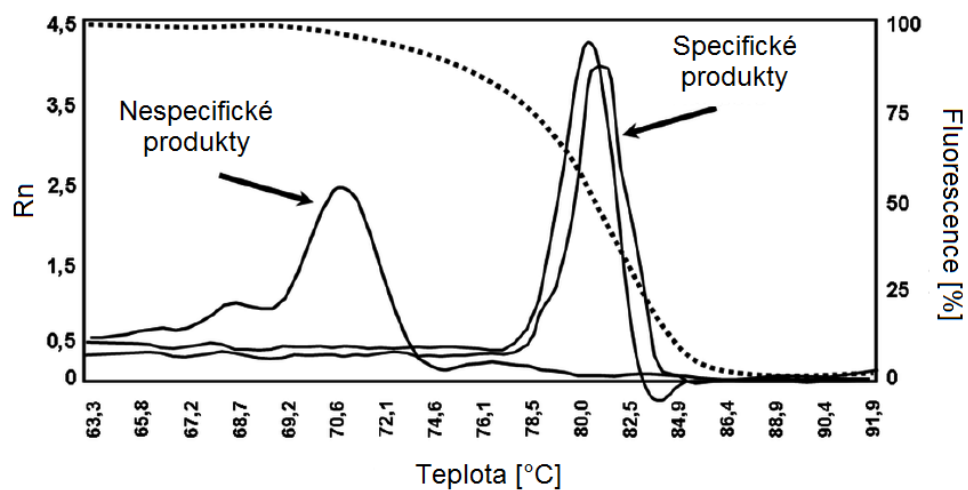
A následně se podle *rovnice 5* určí hodnota *ratio* (R), která vyjadřuje poměr množství sledovaného ku referenčnímu genu, tedy změnu exprese. [33, 37]

$$R = \frac{E_{\text{sledovaný gen}}^{\Delta Ct_{\text{sledovaný gen}}(\text{kontrola} - \text{vzorek})}}{E_{\text{referenční gen}}^{\Delta Ct_{\text{referenční gen}}(\text{kontrola} - \text{vzorek})}} \quad (5)$$

I když jsou obě výpočtové metody matematicky téměř podobné, vyjadřuje Pfafflova metoda mnohem přesnější popis změny exprese genu, jelikož používá zvlášť výpočet rozdílu Ct (*kontroly*) a Ct (*vzorku*) pro sledovaný gen a zvlášť pro referenční gen. Toto je důležité zejména v případech, kdy efektivita amplifikace není 100%, a jelikož dosažení ideální amplifikace PCR produktu, kdy dochází ke zdvojnásobení množství ampliconů mezi jednotlivými cykly a hodnota efektivity je rovna 2, není snadné, je Pfafflova metoda používána pro vyhodnocení exprese genu častěji. [32, 33, 34, 37]

2.1.6 Analýza křivky tání

Použití interkalačního barviva SYBR Green I poskytuje výhodu při vyhodnocování reakce, jelikož umožňuje kontrolu vzniklých produktů na základě jejich rozdílné teploty tání. Hodnota teploty tání T_m vyjadřuje teplotu, při níž jsou molekuly DNA denaturovány. Jelikož se jedná o rozrušení vodíkových můstků mezi páry bazí, mají vyšší hodnotu T_m molekuly s vyšším obsahem párů $G \equiv C$. Tzv. melting curve (neboli křivka tání; vyobrazená na *obrázku 16*) vyjadřuje závislost intenzity detekované fluorescence při různých teplotách. Přehlednější vyhodnocení pak poskytuje druhá derivace křivky tání. Zachycuje-li křivka pouze jeden vrchol, lze usoudit na specifickou reakci s jedním produktem. Při zachycení dvou a více vrcholů je zřejmé, že reakce proběhla nespecificky a kromě předpokládaného specifického produktu došlo ke vzniku dalších nespecifických produktů, jimiž mohou být například také dimery použitých primerů. [32, 33, 34]



Obrázek 16: Křivka tání produktu PCR jako kontrola specifičnosti reakce. [38]

3 REGULACE GENOVÉ EXPRESE

Jednobuněčné organismy regulují expresi genů v závislosti na změnách podmínek prostředí, jako jsou např. změny teploty, množství osmoticky aktivních látek, zdroj živin, ale také na vnitřních signálech organismu.

Genovou expresi je možné regulovat na několika úrovních:

- při přepisu DNA do RNA – regulace na úrovni transkripce
- při přepisu z RNA do proteinu
 - o regulace na úrovni RNA,
 - o regulace na úrovni translace,
 - o regulace na úrovni proteinů.

3.1 Regulace na úrovni transkripce

Nejčastějším místem, kde bývá genová exprese regulovaná u prokaryotických buněk, je transkripce, která vyžaduje méně energie. Podílejí se na ní tzv. regulační proteiny, které se váží na regulační oblasti. Na ně se pak dále váží molekulární efekторы, což jsou nízko-molekulární látky, které mění konformaci regulačních proteinů a tím i jejich afinitu k příslušným oblastem DNA. Dohromady pak regulační proteiny a molekulární faktory tvoří tzv. regulátory transkripce, které jsou dvojího typu:

- **pozitivní regulátory** – spouštějí transkripci (dokud není gen aktivován, nedojde k přepisu); regulační protein se váže na operátor, nebo interaguje s katabolickými produkty. Dochází k aktivaci operátoru a stimulaci transkripce;
- **negativní regulátory** – zastavují transkripci (dokud není represor vyvázán, je proces exprese zastaven); navázáním aktivního represoru na operátor dochází k zastavení transkripce operonu a případným uvolněním represoru z operátoru může znovu dojít k navození transkripce. Tato aktivní forma represoru vzniká uvolněním induktoru z represoru nebo spojením represoru s korepresorem. [39]

U prokaryontních buněk dochází ke společné regulaci několika genů, které jsou na chromozomu ve shlicích. Shluk genů je nazýván operonem. Regulace genové exprese u prokaryot na úrovni transkripce je popisována operonovým modelem. Jedna regulační oblast je společná tedy pro více genů. RNA-polymerasa nasedá na promotor. Společným přepisem těchto genů vzniká, vzhledem k přítomnosti jednoho promotoru, jedna společná mRNA. [39]

4 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární dusíkaté látky, které vznikají převážně z některých aminokyselin odštěpením oxidu uhličitého – tzv. dekarboxylací, za katalytického působení enzymů dekarboxylas, které jsou vlastní některým druhům bakterií. Tímto způsobem vznikají v potravinách, přičemž nejčastější výskyt je studiem prokázán obzvláště v mase (resp. masných výrobcích) [40] a mléce (resp. mléčných výrobcích, zejména pak v sýrech) [41]. Jejich přítomnost byla však detekována již v mnoha dalších druzích potravin. Mezi nejrozšířenější BA patří např. histamin, tryptamin, tyramin, kadaverin, spermin, spermidin nebo putrescin.

4.1 Biologické účinky na lidský organismus

Přestože jsou biogenní aminy pro zajištění některých základních životních funkcí nepostradatelné, způsobují ve vyšších koncentracích svým konzumentům značné obtíže. Jedná se o psychoaktivní a vazoaktivní látky, jejichž vlivem se mohou objevit potíže, jako např. nevolnost, bolest hlavy, různé projevy alergie nebo změny krevního tlaku. Za nejrizikovější jsou považovány histamin a tyramin [42].

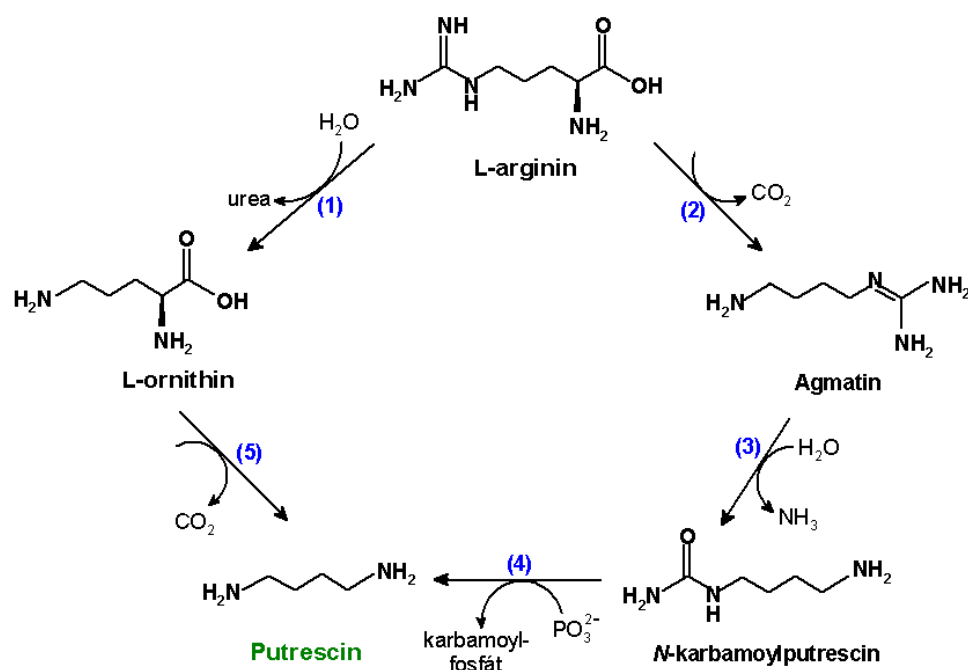
Jestliže dochází k přijímání BA z potravy ve vyšším množství, může u některých jedinců docházet k nedostatečnému enzymatickému odbourávání v játrech a střevech. Tyto detoxikační pochody mohou být zároveň inhibovány – např. působením některých druhů léků, přítomností alkoholu nebo přítomností dalších BA snižujících katabolismus nežádoucího aminu. Toho účinku je schopen především kadaverin, spermidin, spermin nebo putrescin [42, 43].

Dva posledně zmíněné biogenní aminy v kyselém prostředí reagují s nitrity a dávají vzniknout karcinogenním, mutagenním a teratogenním nitrosaminům. Tento proces byl zaznamenán v potravinách, které jsou během technologické přípravy podrobeny tepelnému ošetření. [43] Dále vědecké studie prokázaly funkci putrescinu jako promotoru při maligní transformaci buněk [44].

4.2 Dekarboxylasová aktivita u bakterií produkujících putrescin

Dekarboxylasová aktivita byla popsána u řady bakterií mléčného kvašení, mezi nimi např. gram pozitivní bakterie *Lactobacillus hilgardii*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* [45], *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus hirae* [43] *Lactobacillus colloides*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Oenococcus oeni* izolované ze vzorků jablečného vína [43], *Lactobacillus frutivorans*, *Lactobacillus paracollinoides*, *Streptococcus mutans* [42] u nichž byla potvrzena zejména produkce putrescinu, které gram pozitivní bakterie produkují dvěma metabolickými dráhami schématicky znázorněnými na obrázku 17:

- **Přímou cestou** - dekarboxylací L-ornithinu, která je katalyzovaná enzymem ornithindekarboxylasou.
- **Nepřímou cestou** – při níž je nejprve agmatin za katalytického působení agmatindeiminasy převeden na N-karbamoylputrescin a následně katalytickým působením enzymu putrescinkarbamoyltransferasy na karbamoylfosfát a putrescin.

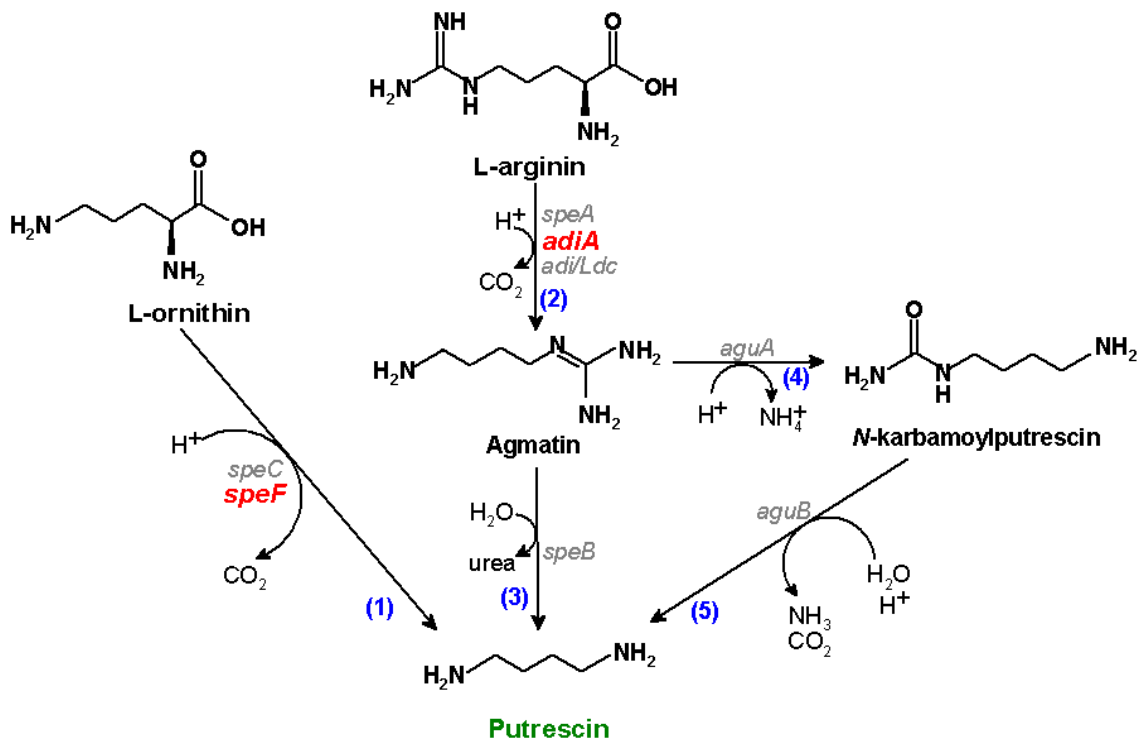


Klíčové enzymy:

(1) Arginasa (ARG); (2) Arginindekarboxylasa (ADC); (3) Agmatindeiminasa (AgDI); (4) Putrescinkarbamoyltransferasa (PCT); (5) Ornithindekarboxylasa (ODC).

Obrázek 17: Vznik putrescinu dekarboxylasovou aktivitou gram pozitivních bakterií. [46]

U gram negativních bakterií může být putrescin produkován třemi metabolickými drahami, které jsou znázorněny na *obrázku 18*.



Klíčové enzymy:

(1) Ornithindekarboxylasa (ODC); (2) Arginindekarboxylasa (ADC); (3) Agmatinasa; (4) Agmatindeiminasa; (5) *N*-karbamoylputrescineamidohydrolasa.

Obrázek 18: Vznik putrescinu dekarboxylasovou aktivitou gram negativních bakterií. [47]

- **První metabolickou dráhou** vzniká putrescin přímo z ornithinu za katalytického působení enzymu ornithindekarboxylasy (ODC), který je kódován genem *speF*, jehož kofaktorem je pyridoxal 5`-fosfát.
- **Druhou metabolickou dráhou** vedoucí ke vzniku putrescinu je nepřímá syntéza z argininu katalyzovaná enzymem arginindekarboxylasou (ADC), který je kódován genem *adiA*. Nejprve vzniká meziprodukt agmatin, který je za katalytického působení enzymu agmatinasy (kódovaného genem *speB*) metabolizován na putrescin za současného odštěpení močoviny. Tato cesta nepřímé syntézy putrescinu probíhá např. u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*.

- **Třetí metabolická dráha**, navazující na syntézu agmatinu, využívá katalytického působení agmatindeiminasy (kódované genem *aguA*), která agmatin hydrolyzuje za vzniku *N*-karbamoylputrescinu a amoniaku. *N*-karbamoylputrescin je následně za katalýzy enzymu *N*-karbamoylputrescinamidohydrolasy (kódované genem *aguB*) štěpen na putrescin, amoniak a oxid uhličitý. Takto putrescin nepřímo syntetizují např. bakterie rodu *Pseudomonas*.

Za hlavní producenty putrescinu ve fermentovaných masných výrobcích, mletém mase nebo sýrech byly na základě proběhnutých studií identifikovány zejména bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* (např. *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Yersenia* sp., *Pectobacterium carotovorum*) a bakterie rodu *Pseudomonas*, stejně jako u řady dalších druhů potravin (např. rybích výrobků, chlazené drůbeži nebo špenátu). Zároveň byl v souvislosti s přítomností uvedených gramnegativních bakterií zjištěn výskyt agmatinu, který poukazuje na skutečnost, že gramnegativní bakterie tvoří putrescin všemi výše popsány metabolickými drahami, přičemž u řady bakterií může probíhat první zmíněná metabolická dráha současně s některou z dále zmíněných drah. [48, 49]

4.2.1 Faktory ovlivňující dekarboxylasovou aktivitu bakterií

Enzymy se mohou být součástí dvou forem metabolických drah – biosyntetické nebo biodegradační. Zatímco u prvně zmíněných se předpokládá jejich stálá přítomnost o relativně konstantní koncentraci, biodegradační enzymy (např. argininové dekarboxylasy) jsou silně indukované vnějšími podmínkami a zejména jejich změnami. [49] Existuje řada známých a vědecky ověřených faktorů, které tímto způsobem dekarboxylasovou aktivitu bakterií ovlivňují.

- **Vliv pH** – mírný a pozvolný pokles hodnoty pH vede ke zvýšení produkce putrescinu [50], zatímco rychlým snížením pH dochází ke snížení růstu bakterií schopných dekarboxylasové aktivity a následně tedy i ke snížení produkce putrescinu. Vědecká skupina *Greif a kol.* [50] ve svých studiích také prokázala, že zvýšením hodnoty pH dochází k poklesu produkce putrescinu. Jako optimální hodnota pH pro aktivitu bakterií schopných dekarboxylasové aktivity se podle *Loizzo a kol.* [51] ukazuje mírně kyselá v rozmezí 5,0 až 6,5.

- **Obsah chloridu sodného** - za zvýšeného obsahu NaCl dochází k poklesu dekarboxylasové aktivity u bakterií [51].
- **Teplota** - je potřeba nalézt vhodné optimum pro růst bakterií s dekarboxylasovou aktivitou, ale také zároveň pro činnost enzymů.

Vliv pH na produkci putrescinu gram pozitivními bakteriemi sledovali *del Rio a kol.* [52]. Ve své studii popisují vliv extracelulárního pH na biosyntézu putrescinu a na genetickou regulaci cesty agmatindeiminasy, přičemž zvýšená biosyntéza putrescinu byla detekována při kyselém pH = 5 a to ve srovnání s neutrální hodnotou pH. Studium exprese inducibilních genů kódujících lysindekarboxylasu a ornitindekarboxylasu metodou RT-PCR (PCR s využitím reverzní transkripce) se ve své práci zabývali *de Phillipis a kol.* [53]

4.2.2 Detekce a kvantifikace genů kódujících dekarboxylační enzymy

Molekulárně biologické metody umožňují jednak zjistit přítomnost mikroorganismů schopných dekarboxylasové aktivity, ale také zjistit přítomnost genů kódujících enzymy podílející se na metabolismu jednotlivých biogenních aminů. Modifikovaná metoda real time-PCR navíc umožňuje sledovat průběh reakce v reálném čase nebo přímo sledovat genovou expresi.

Detekcí genů kódujících dekarboxylační enzymy u gram negativních bakterií se ve své disertační práci zabývala Leona Wunderlichová [46]. Bylo navrženo několik sad primerů pro detekci všech genů majících významnou úlohu během metabolismu putrescinu (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *adiA*, *adi/LDC* a *aguA*), které byly použity pro metodu TouchDown PCR a s předpokladem, že by mělo být možné použití těchto primerů také při detekci a kvantifikaci zmíněných genů metodou real time-PCR. Tento předpoklad se ve své diplomové práci pokusila ověřit Kristýna Maršálková [54], jejímž cílem bylo optimalizovat metodu real time-PCR pro detekci genů kódujících dekarboxylační enzymy gramnegativních bakterií, konkrétně genu *speF*. Podařilo se ověřit, že jedna z navržených sad primerů (4R+2F) je vhodná i pro detekci zmíněného genu metodou real time-PCR. Zároveň se autorce podařilo optimalizovat metodiku pro sadu primerů k detekci referenčního genu *gapA* (kóduje enzym glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenasu (GADPH)) a dále prokázat, že metodou real time-PCR je možné sledovat vliv faktorů na genovou expresi sledovaných genů.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv faktorů na genovou expresi zvolených genů u vybrané skupiny bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v reálných vzorcích.

Pro experimenty byly zvoleny dva geny kódující enzymy zapojené v metabolických drahách vzniku putrescinu u gram negativních bakterií. Těmito geny byly: *adiA* (gen kódující ornithindekarboxylasu) a *speF* (gen kódující arginindekarboxylasu), které byly sledovány u modelové bakterie *Escherichia coli* kultivované ve vzorcích mléka a vepřové pomazánky (paštiky).

Jednotlivé cíle práce byly následující:

- Otestovat funkčnost a účinnost primerů pro detekci referenčního (*gapA*) a sledovaných genů (*adiA*, *speF*) bakterie *E. coli* kultivované v reálných vzorcích.
- Analyzovat expresi sledovaných genů (*adiA*, *speF*) u *E. coli* kultivované v reálných vzorcích.
- U zvolené bakterie sledovat vliv vybraných faktorů (teploty a pH) na genovou expresi *adiA* a *speF* při její kultivaci v reálných vzorcích.

6 PRACOVNÍ POSTUPY

6.1 Materiální vybavení

6.1.1 Chemikálie

- Plate Count Agar (HiMedia)
- NaCl, p.a. (Penta)
- Pepton (HiMedia)
- Hovězí extrakt – Beef Extract powder (Protose BE; HiMedia)
- Arginin (Sigma Aldrich)
- Ornitin (Sigma Aldrich)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
- Tris-HCl (Trishydrochlorid)
- Isopropanol (Sigma Aldrich)
- Power Microbiome RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories)
- High Pure RNA Isolation Kit (Roche)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)
- Primery (Sigma Aldrich)
- Agarosa SeaKem LE (Lonza)
- Ethidium bromid (SERVA Electrophoresis)
- TAE pufr – Tris báze, Na₂EDTA, CH₃COOH (SERVA)
- Marker 100 bp DNA Ladder (Biotech)
- Voda pro molekulárně biologické metody

6.1.2 Přístrojové vybavení a ostatní pomůcky

- Třepačka Vortex GENIE 2 200 V (MO BIO Laboratories, Inc.)
- Centrifuga Eppendorf Mini Spin plus (Eppendorf)
- Centrifuga laboratorní chlazená HERMLE Z 300 K (Hermle Labor Technik)
- Termocycler Light celer CFX 96 (Real Time Systém) C 1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Váhy 440-47N KERN (Kern and Sohn)

- Termoblok Dry Block Heating Thermostat Bio TDB-100 (Biotech)
- Biohazard Box Euroflow (Schoeller)
- Počítačka kolonií Schütt count plus (Schüttkabortechnik)
- Minicentrifuga C 2000 (Benchmark Scientific)
- Centrifuga HERMLE Z 100 M (Hermle Labor Technik)
- Spektrofotometr destičkový INFINITE M200PRO (Schoeller)
- Analytické váhy – Adventurer Pro type AV513CM (Schoeller)
- UV-transiluminátor Syngene (Bioimaging Incenius)
- Zdroj napětí MP3 – 300N (Major Science)
- Elektroforéza horizontální model 4 (OWL Separation System Inc.)
- Špičky (Eppendorf, Bioplastic)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Mikrozkuřavky (Eppendorf)

6.2 Kultivace *Escherichia coli* (CCM 3954)

Čistá bakteriální kultura *Escherichia coli* CCM 3954 byla uchovávána při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro použití v následujících experimentech bylo $100\ \mu\text{l}$ této čisté bakteriální kultury zaočkováno do $4,5\ \mu\text{l}$ masopeptonového bujonu (MPB) a kultivováno při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin.

Masopeptonový bujón (MPB):

| | |
|----------------------|----------------------|
| Masový výtažek | $3\ \text{g.l}^{-1}$ |
| NaCl..... | $3\ \text{g.l}^{-1}$ |
| Pepton..... | $5\ \text{g.l}^{-1}$ |

6.3 Měření růstu bakterií *Escherichia coli* (CCM 3954)

Pro měření růstu bakterií *E. coli* v daných maticích byly zaočkovány vždy 2 ml bakteriální kultury do 400 ml nízkotučného mléka a do 400 ml masopeptonového bujonu. Dále byl zaočkován 1 ml bakteriální kultury do 190 g paštiky.

Masopeptonový bujón (MPB) s 0,2% přídatkem aminokyselin:

| | |
|----------------------|-----------------------|
| Masový výtažek | 3 g.l ⁻¹ |
| NaCl..... | 3 g.l ⁻¹ |
| Pepton..... | 5 g.l ⁻¹ |
| Arginin..... | 0,2 g.l ⁻¹ |
| Ornitin | 0,2 g.l ⁻¹ |

Takto byly směsi připravené ve dvojnásobném opakování, jelikož byly následně paralelně umístěny do termostátů temperovaných na 30 a 8 °C. Ze směsí (bujon, nízkotučné mléko a vepřová pomazánka) uchovávaných při 30 °C byly odebírány vzorky v čase 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 23, 29, 35 a 47 hodin. Ze směsí uchovávaných při 8 °C byly vzorky odebírány v čase 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 dnů. Ze zaočkovaných směsí mléka a bujonu bylo přímo odpipetováno 0,5 ml do 4,5 ml fyziologického roztoku, čímž bylo dosaženo různých ředění. U zaočkované směsi vepřové pomazánky bylo pro další postup zapotřebí odebraný vzorek homogenizovat. Proto bylo odebráno vždy cca 5 g zaočkované směsi, která byla desetkrát naředěna fyziologickým roztokem, umístěna do stomacheru a následně dále ředěna. Z jednotlivých ředění bylo zaočkováno vždy 100 µl na živnou půdu PCA (Plate Count Agar) a kultivováno při 37 °C po dobu 24 hodin.

6.4 Sledování vlivu vybraných faktorů (pH, teploty) na expresi genu***adiA* a *speF* u bakterie *E. coli***

Sledované reálné vzorky i kontrolní vzorek (kontrolní vzorkem byl zvolen bujón s 0,2% přídatkem argininu nebo ornithinu; do vzorků mléka a vepřové pomazánky volné aminokyseliny přidávány nebyly) byly zaočkovány bakteriální kulturou *E. coli* podle postupu uvedeného v kapitole 6.3. U jednotlivých vzorků byla změřena jejich hodnota pH. V čase 0 hodin byl proveden odběr (viz kapitola 6.3) a následně byly vzorky kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 12 hodin, kdy byl proveden další odběr. Čas 12 hodin byl vybrán v návaznosti na další experiment, viz dále (z růstové křivky bakterií by ve 12. hodině měli být bakterie v exponenciální fázi svého růstu /z časových důvodů byly, sledovány růstové křivky bakterie *E. coli* vždy v 11. hodině; tento čas exponenciální fázi odpovídal/).

Následně byla u poloviny vzorků upravena hodnota pH přidavkem 0,1M kyseliny chlorovodíkové a to na hodnotu v rozmezí 5,00 až 5,20. Optimální hodnota pH pro růst bakterie *E. coli* je udávána v okolí neutrální oblasti, tedy asi v intervalu od 6,00 do 8,00 [55]. Snížení pH by mělo být pro bakterii „stresujícím“ faktorem, což by se mělo projevit změnou exprese sledovaných genů (*adiA* a *speF*). Takto upravené vzorky byly dále opět kultivovány při teplotě 30 °C. Po 14, 16 a 18 hodinách kultivace (bráno od počátku kultivace; tedy po 2, 4 a 6 hodinách od úpravy pH) byly provedeny odběry vzorků a vzorky byly dále zpracovány podle metodiky popsané v kapitole 6.3.

Druhým sledovaným faktorem, který by měl ovlivnit expresi genů, byla teplota. Proto byla druhá polovina vzorků (u kterých nebylo pH upravováno přidavkem HCl) po 12 hodinách kultivace při 30 °C přemístěna do termostatu temperovaného na teplotu 8 °C. Po 14, 16 a 18 hodinách kultivace (tedy po 2, 4 a 6 hodinách od umístění vzorku do termostatu temperovaného na 8 °C) byly vzorky odebrány a opět zpracovány již výše uvedeným postupem.

6.5 Izolace nukleových kyselin

6.5.1 Izolace bakteriální DNA

K ověření funkčnosti jednotlivých primerů, které byly využívány v rámci dalších experimentů, bylo potřeba nejprve získat (izolovat) DNA z *E. coli*, která byla v těchto experimentech modelovou bakterií.

Bakteriální DNA byla izolována pomocí izolační sady High Pure PCR Template Preparation Kit vyráběného firmou Roche a bylo postupováno podle přiloženého pracovního návodu:

- Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 300 μ l bakteriálních buněk a centrifugováno při 7 600 RPM po dobu 5 minut.
- Vzniklá peletka byla suspendována ve 200 μ l fyziologického roztoku.
- Dále bylo přidáno 5 μ l lysozymu (10 mg.ml⁻¹ v 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) a inkubováno při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
- Po inkubování byla přidána směs 200 μ l vazebného pufru a 40 μ l Proteinasy K. Směs byla před samotným přidáním protřepána na vortexu a temperována v termostatu při teplotě 70 °C po dobu 10 minut.

- Po následném přidání 100 μ l isopropanolu byla směs důkladně promíchána.
- Promíchaný obsah zkumavky byl přepipetován do kolonky se speciálním filtrem umístěné ve sběrné zkumavce a centrifugován při 12 600 RPM po dobu 1 minuty.
- Kolonka se speciálním filtrem byla přemístěna do nové sběrné zkumavky. Do takto připravené kolonky bylo napipetováno 500 μ l pufru odstraňujícího inhibitory. Pak byla směs centrifugována při 12 600 RPM po dobu 1 minuty.
- Filtrační kolonka byla přesunuta do další nové sběrné zkumavky a do kolonky bylo napipetováno 500 μ l promývacího pufru. Směs byla centrifugována při 12 600 RPM po dobu 1 minuty. Tento krok byl poté ještě jednou zopakován.
- Pak byl vylit získaný filtrát ze sběrné zkumavky, do které byla zpět vsunuta filtrační kolonka a její obsah byl ještě jednou centrifugován při 12 600 RPM po dobu 1 minuty.
- Kolonka s filtrem byla vložena do mikrozkušavky. Následně bylo do kolonky přidáno 50 μ l elučního pufru předehřátého na 70 °C a směs byla ponechána po dobu 15 minut stát.
- Nakonec byl obsah zkumavky centrifugován při 12 600 RPM po dobu 1 minuty.
- Získaná DNA byla skladována při -15 až -25 °C

Čistota a koncentrace získané DNA byla změřena na spektrofotometrickém přístroji INFINITE M200PRO (Tecan).

6.5.2 Izolace bakteriální RNA

K izolaci bakteriální RNA byla použita komerční izolační sada High Pure RNA Isolation Kit vyráběná firmou Roche. Pracovní postup uvedený v příloženém návodu byl pro dosažení co nejvyššího množství RNA ve výsledném izolátu mírně upraven.

a. Příprava vzorku:

- Nejprve byl vzorek filtrován přes gázu a následně centrifugován v odstředivce vytemperované na 4 °C při 5 000 RPM po dobu 5 minut.
- Po odlití supernatantu byla získaná peletka resuspendována ve 200 μ l 10 mM Tris HCl (pH = 8).

b. Lýze buněk:

- Byly přidány 4 μl lysozymu ($50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a obsah zkumavky byl inkubován při 37°C po dobu 10 minut.
- Dále bylo přidáno 400 μl lyzačního pufru a v případě izolace RNA ze vzorků paštiky ještě 50 μl směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol v poměru 25:24:1. Vzniklá směs byla protřepána na horizontálním vortexu po dobu 15 sekund.
- Obsah zkumavky byl převeden do rezervoáru filtrační kolonky, která byla předtím umístěna do sběrné zkumavky, a centrifugován při 12 600 RPM po dobu 45 sekund.

c. Odstranění DNA:

- Poté byla přidána směs 90 μl inkubačního pufru a 10 μl DNasy I.
- Po inkubaci trvající 60 minut při teplotě $15 - 25^\circ\text{C}$ bylo přidáno 500 μl promývacího pufru I a obsah zkumavky byl centrifugován při 12 600 RPM po dobu 45 sekund.

d. Promytí:

- Odstředěná tekutina byla ze sběrné zkumavky odstraněna, bylo přidáno 500 μl promývacího pufru II a obsah zkumavky byl opět centrifugován při 12 600 RPM po dobu 45 sekund.
- Bylo přidáno 200 μl promývacího pufru II a následně proběhla centrifugace při 14 500 RPM po dobu 2 minut.
- Po odstranění odstředěné tekutiny ze sběrné zkumavky byla provedena dodatečná centrifugace při 14 500 RPM po dobu 1 minuty, která zajistila odstranění veškerého promývacího pufru.

e. Eluce:

- Filtrační kolonka byla umístěna do 1,5 ml mikrozkušavky a do rezervoáru této filtrační zkumavky bylo napipetováno 50 μl elučního pufru. Obsah byl ponechán volně stát při laboratorní teplotě po dobu 10 minut.
- Nakonec byl obsah zkumavky centrifugován při 12 600 RPM po dobu 1 minuty.

Izolovaná RNA byla uchovávána při teplotě -80°C .

6.6 Transkripce bakteriální RNA do cDNA

Bakteriální RNA vyizolovaná podle postupu uvedeného v kapitole 6.5.2 byla následně procesem reverzní transkripce přepsána do cDNA. Tento přepis byl proveden pomocí sady Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit komerčně vyráběné firmou Roche.

- Nejdříve bylo napipetováno 11 μl bakteriální RNA a 2 μl primeru (*Random Hexamer Primer*). Tato směs byla promíchána a umístěna do termocycleru na dobu 10 minut při 65 °C.
- Následně bylo k této směsi přidáno: 4 μl pufru pro reverzní transkriptasu (*Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer*) obsahujícího 8 mmol.l^{-1} MgCl_2 , 0,5 μl inhibitoru RNas (*Protector RNase Inhibitor*), 2 μl deoxynukleotidů (*Deoxynucleotidemix*) a 0,5 μl reverzní transkriptasy (*Transcriptor Reverse Transcriptase*), jak je uvedeno v Tabulka I. Takto připravená směs byla promíchána a při nižších otáčkách centrifugována.

Tabulka I: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci.

| Složka | Koncentrace | Objem [μl] |
|--|---------------------------|-------------------------|
| Random Hexamer Primer (600 $\text{pmol}.\mu\text{l}^{-1}$) | 60 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ | 2 |
| Bakteriální RNA | Variabilní | 11 |
| Celkový objem | | 13 |
| Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer | 1x | 4 |
| Protector RNase Inhibitor (40 $\text{U}.\mu\text{l}^{-1}$) | 20 U | 0,5 |
| Deoxynucleotidemix | 1 mmol.l^{-1} | 2 |
| Transcriptor Reverse Transcriptase (20 $\text{U}.\mu\text{l}^{-1}$) | 10 U | 0,5 |
| Celkový objem | | 20 |

- Nakonec byla směs opět umístěna do termocycleru, kde proběhly reakce za následujících podmínek: nejprve byla směs inkubována po dobu 10 minut při 55 °C, posléze po dobu 30 minut při 55 °C a nakonec byla při 85 °C po dobu 5 minut inaktivována reverzní transkriptasa.

Takto získaná cDNA sloužila jako templát pro real time-PCR. V případě že nebyla použita ihned, byla uchována při -15 až -25 °C.

6.7 Metodika PCR reakcí

6.7.1 Zkouška funkčnosti primerů metodou klasické PCR

Funkčnost navržených primerů byla zkoušena metodou klasické PCR, pro niž byl použit Master Mix GoTaq G2 Hot Start Green komerčně vyráběný firmou Promega Corporation. Složení reakční směsi je uvedeno v *Tabulka II*.

Tabulka II: Složení reakční směsi klasické PCR.

| Složka | Koncentrace | Objem [μ l] |
|--|---------------------------|------------------|
| GoTaq Hot Start Green Master Mix Promega | 1 | 10 |
| Voda | - | 7 |
| Forward primer ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) | 800 nmol.l^{-1} | 1 |
| Reverse primer ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) | 800 nmol.l^{-1} | 1 |
| Bakteriální DNA | variabilní | 1 |
| Celkový objem | | 20 |

Reakce proběhla za podmínek uvedených v *tabulce Tabulka III*.

Tabulka III: Podmínky klasické PCR zvolené pro zkoušku funkčnosti navržených primerů.

| Krok | Teplota [$^{\circ}$ C] | Čas [min] | Počet cyklů |
|----------------------|-------------------------|-----------|-------------|
| Počáteční denaturace | 94 | 3 | 1 |
| Denaturace | 94 | 0,5 | 45 |
| Annealing | 58 / 59 / 60 | 0,5 | |
| Extense | 72 | 0,75 | |
| Závěrečná extense | 72 | 5 | 1 |

Získané amplikony byly následně elektroforeticky detekovány. Byl připraven 1% agarosový gel s přídavkem ethidium bromidu, jakožto fluorescenčního interkalačního barviva. Elektroforéza probíhala po dobu 30 minut za přiváděného napětí 90 V a proudu 400 mA. Na gel byl zároveň nanesen tzv. marker (standard molekulové hmotnosti). Po proběhnutí elektroforetického děje byl gel umístěn na snímací plochu transiluminátoru, kde byl ozářen širokospektrým UV zářením.

6.7.2 Stanovení účinnosti primerů a sledování exprese genů metodou real time-PCR

Pro zjištění účinnosti zvolených primerů a sledování exprese jednotlivých genů byla použita metoda real time-PCR, pro jejíž účely byla použita směs FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) komerčně vyráběná firmou Roche.

- Byly připraveny roztoky zvolených primerů o koncentraci $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$.
- Následně bylo napipetováno $12,5 \mu\text{l}$ výše zmíněné komerční směsi FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) obsahující potřebné složky, dále $0,25 \mu\text{l}$ kódujícího primeru (*Forward primer*), $0,25 \mu\text{l}$ antikódujícího primeru (*Reverse primer*) a $9,5 \mu\text{l}$ vody, jak je uvedeno v *Tabulka IV*, do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Nakonec bylo přidáno $2,5 \mu\text{l}$ bakteriální DNA (cDNA), která byla získána reverzní transkripcí (viz *kapitola 6.6*).

Tabulka IV: Složení reakční směsi real time-PCR.

| Složka | Koncentrace | Objem [μl] |
|--|---------------------------|-------------------------|
| FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) | 1x | 12,5 |
| Voda | - | 9,5 |
| Forward primer ($30 \mu\text{mol.l}^{-1}$) | 300 nmol.l^{-1} | 0,25 |
| Reverse primer ($30 \mu\text{mol.l}^{-1}$) | 300 nmol.l^{-1} | 0,25 |
| Bakteriální DNA | variabilní | 2,5 |
| Celkový objem | | 25 |

- Pro experimenty, jež byly sledovány metodou real time-PCR (nejprve zjištění účinnosti reakce a dále i sledování exprese zvolených genů) byly použity reakční podmínky uvedené v *Tabulka V*. Pro sledování specifičnosti PCR byla sledována i křivka tání produktů, přičemž byl použit teplotní gradient od 60 do 95 °C, kdy byla teplota zvyšována vždy o 0,5 °C každých 5 sekund.

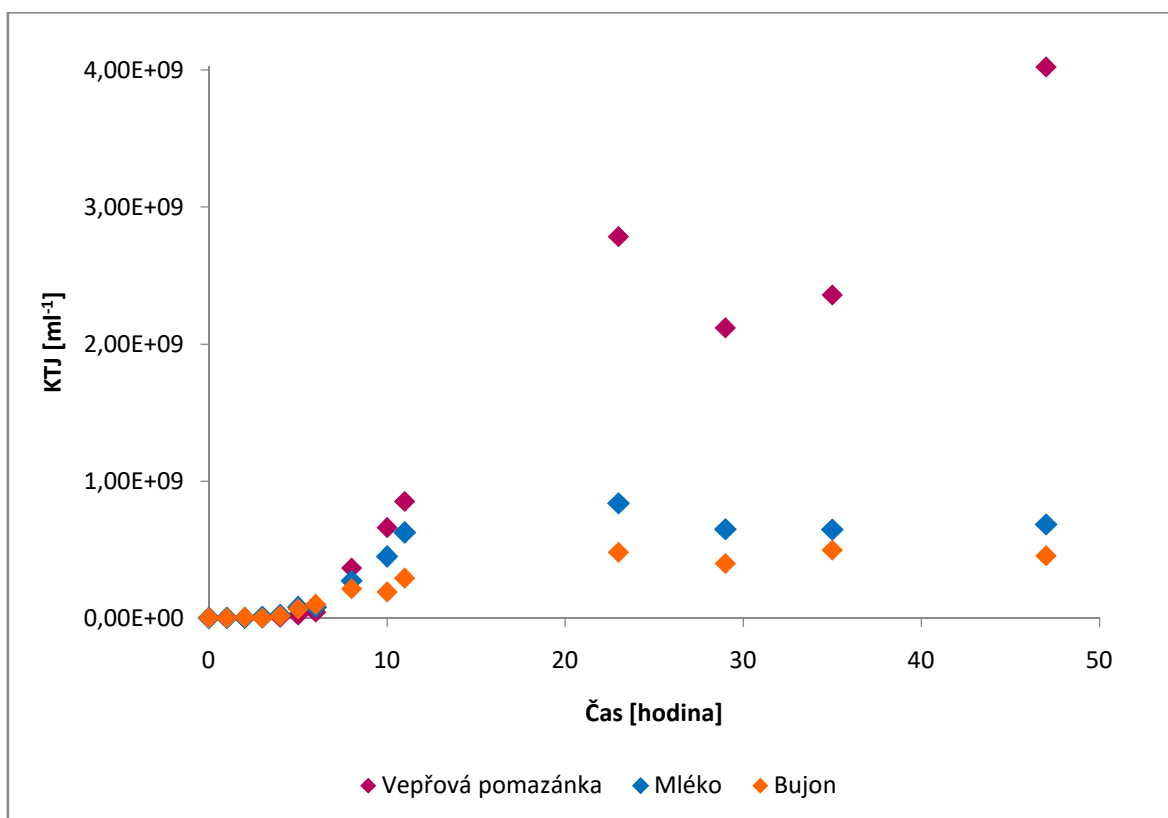
Tabulka V: Podmínky reakce real time-PCR.

| Krok | Teplota [°C] | Čas [min] | Počet cyklů |
|----------------------|---------------------|------------------|--------------------|
| Počáteční denaturace | 95 | 10 | 1 |
| Denaturace | 95 | 0,5 | 40 |
| Annealing | 60 | 0,5 | |
| Extense | 72 | 1 | |
| Křivka tání | 60 až 95 | 0,5 °C/ 5 s | |
| Závěrečná extense | 72 | 5 | 1 |

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Růstové křivky bakterie *Escherichia coli* (CCM 3954)

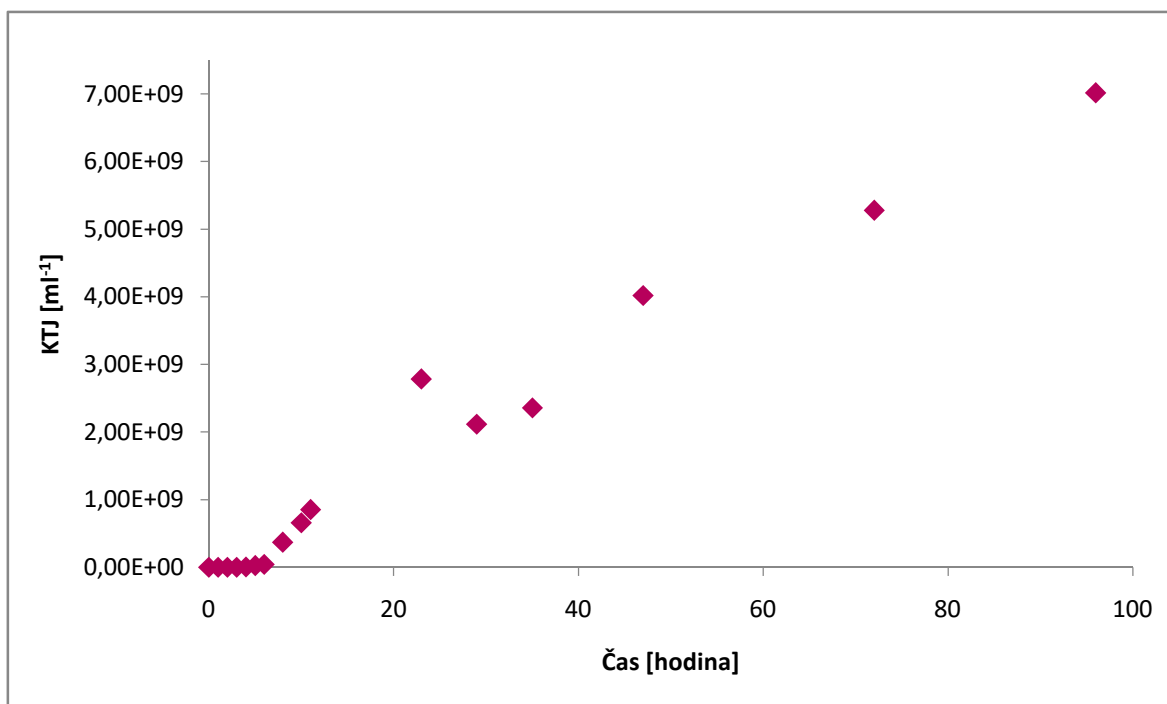
Aby bylo možné vhodně rozvrhnout experimenty, ve kterých byla sledována genová exprese zvolených genů (*adiA* a *speF*), bylo zapotřebí vybrat příhodné doby odběru jednotlivých zaočkovaných vzorků. Byly sestrojeny růstové křivky bakterie *E. coli* ve všech testovaných vzorcích (tedy v bujonu s 0,2% přidavkem aminokyselin, v nízkotučném mléce i ve vepřové pomazánce /paštice/) při 30 °C (viz obrázek 19) a 8 °C (viz obrázek 21).



Obrázek 19: Růstová křivka bakterie *Escherichia coli* v jednotlivých médiích při 30 °C.

Získaná růstová křivka bakterie *E. coli* při 30 °C vykresluje ve všech druzích vzorků veškeré fáze růstu a odumírání buněk. U všech tří pozorovaných zaočkovaných vzorků je patrná tzv. lag fáze po dobu prvních pěti hodin experimentu následující logaritmičným nárůstem počtu kolonií v čase od 5. do 12. hodiny. Z růstové křivky je také patrné, že po 29. hodině

docházelo u vzorku nízkotučného mléka a bujonu s 0,2% přídatkem aminokyselin k relativnímu ustálení, zatímco u vzorku vepřové pomazánky došlo k neočekávanému nárůstu. Proto byla kultivace bakterie *E. coli* ve vepřové pomazánce při 30 °C prodloužena na dobu 96 hodin. Její průběh je znázorněn na *obrázku 20*. Tento nárůst lze vysvětlit na základě zjištěného složení vepřové pomazánky udávaného výrobcem. Výrobce uvádí, že vedle dextrosy (neboli D-glukosy – monosacharid) je zde přítomen i dextrin, nízkomolekulární polysacharid. Ten by mohl být v případě potřeby štěpen bakteriálními enzymy [56] na maltosu, případně glukosu, která může být následně využívána jako zdroj energie, což může zapříčiňovat nárůst bakterií.

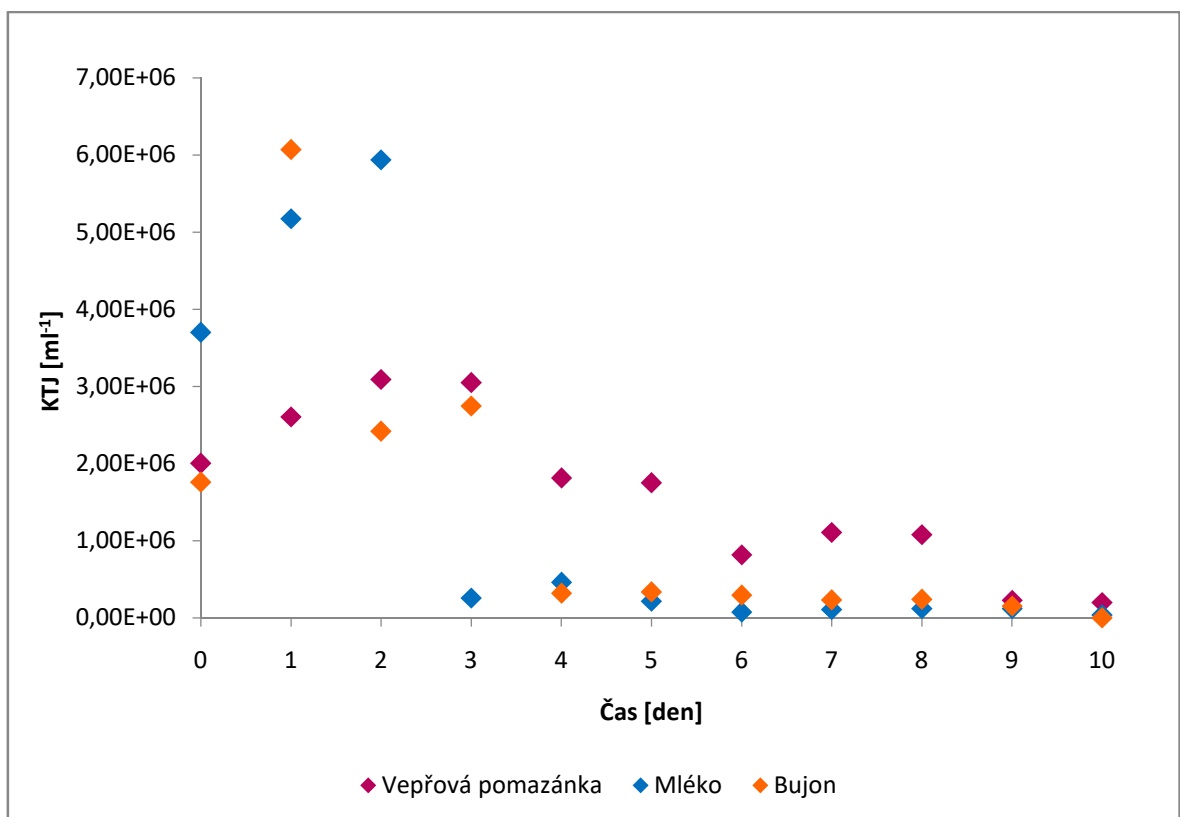


Obrázek 20: Růstová křivka bakterie *Escherichia coli* v paštice při 30 °C.

Pro sledování genové exprese byly zvoleny doby odběru tak, aby tyto fáze patřičně vystihovaly. Prvním časem odběru vzorku byla zvolena 0. hodina ihned po zaočkování kulturou, jakožto počátek experimentu. Dále byla zvolena 3. hodina, vystihující tzv. lag fázi, 8. hodina, v níž dochází k logaritmickému nárůstu buněk, a 29. hodina, ve které již dochází k výraznému poklesu počtu buněk a tedy k jejich odumírání.

Bakterie *E. coli* je schopná růst v teplotním rozmezí od 8 °C do 48 °C, přičemž optimální teplotou je 37 °C. Tato skutečnost byla vyzkoušena i z růstové křivky sestavené při 8 °C (viz obrázek 21). V porovnání s růstovými křivkami získanými při 30 °C lze konstatovat, že při teplotě 8 °C je růst bakterií inhibován.

U zaočkovaného vzorku vepřové pomazánky je patrná stacionární fáze v době 2. až 3. dne s následným pozvolným poklesem růstu. V zaočkovaném vzorku nízkotučného mléka došlo k logaritmickému nárůstu počtu kolonií v prvních dvou dnech, přičemž tento růst velmi rychle poklesl. U zaočkovaného vzorku bujonu s 0,2% přídavkem aminokyselin došlo k prudkému nárůstu počtu kolonií hned v prvních 24 hodinách. V dalších dnech byl pozorován pozvolný pokles. Z jednotlivých růstových křivek je patrné, že růst bakterií je vedle teploty ovlivněn i dostupností jednotlivých živin – v tekutém médiu jako je bujon nebo mléko budou zřejmě jednotlivé substráty dostupnější než v „polotuhém“ vzorku paštiky.



Obrázek 21: Růstová křivka bakterie *Escherichia coli* v jednotlivých médiích při 8 °C.

7.2 Izolace DNA bakterie *E. coli*

Pro ověření funkčnosti navržených primerů (viz kapitola 6.7.1 a 7.5.1) bylo nutné izolovat DNA sledované bakterie *E. coli* (CCM 3954). Bylo postupováno podle pracovního návodu uvedeného v kapitole 6.5.1. Vyizolována byla bakteriální DNA o koncentraci $20,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a čistotě (*ratio* – vyjadřující poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) 1,84. Uvedená hodnota by se měla v ideálním případě blížit hodnotě 1,8 [57].

7.3 Optimalizace postupů izolace RNA z reálných vzorků

K izolaci RNA ze vzorků byly použity dva komerčně vyráběné kity, a sice Power Microbiome RNA isolation kit vyráběný firmou MO BIO Laboratories a High Pure RNA isolation kit vyráběný firmou Roche. Jelikož jsou však nízkotučné mléko i vepřová pomazánka (paštika) pro další zpracování poměrně složité matrice, byly vzorky ještě za studena nejprve filtrovány přes sterilní gázu, kdy bylo snahou ze vzorků odstranit nedostatečně homogenizované částice případně i část tuku.

Každý izolační kit byl použit ve dvojím opakování – v jednom případě bylo nadále postupováno dle návodů přiložených výrobcem a ve druhém případě (jak je uvedeno v tabulce VI) byl do fáze lýze buněk při dán mezikrok, v němž byly ke vzorku přidány skleněné kuličky k důkladnějšímu rozbití buněk.

Tabulka VI: Množství a čistota RNA vyizolované z téhož vzorku vepřové pomazánky (paštiky) při srovnání dvou komerčních izolačních kitů.

| | | RNA izolační Kit firmy MO BIO Laboratories | | RNA izolační Kit firmy Roche | |
|---|-----------------------|---|-------|---------------------------------|------|
| Koncentrace [ng/μl] | | 17,68 | 25,52 | 98,56 | 9,36 |
| Ratio ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$) [-] | | 2,03 | 2,23 | 0,38 | 0,69 |
| Příprava vzorku | Filtrace přes gázu | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Lýze buněk | Skleněné kuličky | ✗ | ✓ | ✗ | ✓ |

Tabulka VI uvádí také množství takto vyizolované RNA a její čistotu, která je uváděna jako poměr absorbance vzorku při 260 nm ku absorbanci vzorku při 280 nm – tzv. *ratio*. Tato hodnota by se měla v případě izolace RNA ideálně blížit hodnotě 2,0 [57]. Jako velmi účinná se ukázala být izolace RNA kitem vyráběným firmou MO BIO Laboratories s využitím filtrace přes gázu a bez přídavku kuliček. Nicméně z finančních důvodů bylo vzhledem k množství plánovaných vzorků nezbytné pracovat s finančně dostupnější izolační sadou firmy Roche a proto bylo snahou optimalizovat pracovní postup k dosažení co nejčistšího izolátu RNA v odpovídajícím množství.

Tabulka VII: Srovnání postupů izolace RNA z téhož vzorku vepřové pomazánky (paštiky) pomocí High Pure RNA Isolation Kit (Roche).

| Vzorek č. | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|--|---|-------|-------|------|------|------|
| Koncentrace [ng.µl ⁻¹] | | 0 | 25,52 | 17,68 | 7,84 | 108 | 76 |
| Ratio (A _{260 nm} /A _{280 nm}) [-] | | 2 | 2,11 | 1,91 | 1,51 | 1,62 | 1,48 |
| Příprava vzorku | Filtrace přes gázu | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Centrifugace 5min /5 000 RPM/4 °C | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Resuspendace peletky ve 200 µl 10 mM Tris HCl | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Lýze buněk | 4 µl lysozymu (50 mg/ml) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Inkubace 10 min/37 °C | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✗ |
| | 400 µl lyzačního pufru | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✗ | ✗ |
| | Skleněné kuličky | ✗ | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | 500 µl Fenol:Chloroform:Izoamylalkohol (25:24:1) | ✗ | ✗ | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Protřepat 15 s | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

Proto byly zvoleny a testovány modifikace doporučeného pracovního postupu, které jsou uvedeny v tabulce VII. Jako nutná se ukázala filtrace vzorku přes gázu a jeho centrifugace za snížené teploty (z původně doporučovaných 25 °C na 4 °C), kdy dochází ke ztužení tuků, které plavou na povrchu a dají se ze vzorku poměrně snadno odstranit. Tuk může být faktorem negativně ovlivňujícím množství a čistotu izolované RNA (výrobce uvádí maximálním množstvím tuku ve vzorku ~ 40 %). Dalším přidaným mezikrokem k dosažení důkladné lýze buněk byl přídavek skleněných kuliček, které se v předchozím pokusu

s touto izolační sadou osvědčily. Přesto ale takto upravené vzorky dosahovaly nižších hodnot čistoty (*ratio*). Posledním přidaným mezikrokem byla extrakce směsí fenol:chloroform:izoamylalkohol (F:CH:I) v poměru 25:24:1, který měl zapříčinit nahromadění kontaminujících proteinů na rozhraní organické (dolní) fáze a vodné (horní) fáze, ve které zůstaly rozpuštěny nukleové kyseliny. V této fázi pokusu se jako nejúčinnější jevíly modifikace zvolené u vzorku č. 2 a 3 bez využití extrakce směsi F:CH:I.

Účinnost těchto dvou vybraných modifikací byla ověřena na dalším vzorku vepřové pomazánky (paštiky). Množství vyizolované RNA a její čistota (*ratio*) jsou uvedeny v následující *tabulce VIII*. Zároveň byla vyzkoušena modifikace postupu izolace z vepřové pomazánky dosud netestovaná, a sice s přidavkem směsi F:CH:I (25:24:1), ale bez použití skleněných kuliček (vzorek č. 3). Tento způsob izolace se zdál v této fázi jako ideální a proto bylo takto postupováno i při dalších izolacích RNA ze vzorků vepřové pomazánky. Kontrolní měření během dalších experimentů ukázala, že množství a čistota (hodnota *ratio*) izolované RNA vyhovovala našim požadavkům. Nejúčinnější optimalizovaný postup je konkrétně popsán v *kapitole 6.5.2*.

Tabulka VIII: Srovnání postupů izolace RNA z téhož vzorku vepřové pomazánky (paštiky) a téhož vzorku nízkotučného mléka pomocí High Pure RNA Isolation Kit (Roche).

| Druh vzorku | | Vepřová pomazánka | | | Nízkotučné mléko | |
|---|--|-------------------|------|-------|------------------|-------|
| Vzorek č. | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Koncentrace [ng.µl ⁻¹] | | 36,88 | 1,36 | 15,34 | 8,88 | 19,28 |
| Ratio (A _{260 nm} /A _{280 nm}) [-] | | 1,51 | 0,33 | 1,79 | 1,95 | 1,69 |
| Příprava vzorku | Filtrace přes gázu | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✗ |
| | Centrifugace 5min /5 000 RPM/4 °C | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Resuspendace peletky ve 200 µl 10 mM Tris HCl | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Lýze buněk | 4 µl lysozymu (50 mg/ml) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Inkubace 10 min/37 °C | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | 400 µl lyzačního pufru | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | Skleněné kuličky | ✗ | ✓ | ✗ | ✓ | ✓ |
| | 500 µl Fenol:Chloroform:Izoamylalkohol (25:24:1) | ✗ | ✗ | ✓ | ✗ | ✓ |
| | Protřepat 15 s | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

Dále byla aplikována modifikace s použitím skleněných kuliček a vynecháním extrakce směsí F:CH:I (25:24:1) na vzorek nízkotučného mléka, u něhož byla pro nízký obsah tuků (0,5 %) a relativně jednoduché složení předpokládána snazší a účinnější izolace RNA. Z toho důvodu byla vyzkoušena izolace bez filtrování původního vzorku přes gázu, která se ukázala jako účinná. V dalších experimentech byla RNA ze vzorků nízkotučného mléka izolována modifikovaným postupem uvedeným v *tabulce VIII* u vzorku č. 4, která i u kontrolních měření během dalších izolací RNA vykazovala hodnoty ratio o požadované hodnotě.

7.4 Použité primery

Před prováděním experimentů jež byly zaměřeny na sledování exprese sledovaných genů (*adiA* a *speF*) u *E. coli* bylo nejprve zapotřebí otestovat funkčnost primerů, které měly být používány.

Tyto primery ve své diplomové práci používala Kristýna Maršálková [54, 58] a rovněž metodiku pro sledování exprese genu *speF* u bakterií kultivovaných v bujónu s přidavkem aminokyselin, metodou real time-PCR, optimalizovala. Návrhu primerů pro gen *adiA* se ve své diplomové práci zabývala Veronika Málková [59].

Nicméně jaká je funkčnost primerů a účinnost PCR, pokud jsou sledovány exprese těchto genů u bakterií kultivovaných ve složitějších maticích (reálném vzorku potravin) zkoumáno doposud nebylo.

7.4.1 Primery pro referenční gen – *gapA*

Jako referenční („housekeeping“) gen byl vybrán *gapA*, který byl zvolen a sledován v diplomové práci Kristýny Maršálkové [54]. Tento gen kóduje enzym glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (GADPH), což je enzym glykolytické dráhy. Zároveň byly použity i shodné primery „*gapA* F + *gapA* R“, jejichž vlastnosti jsou uvedené v *tabulce IX*, přičemž výsledná délka amplikonu byla asi 200bp, což je pro metodu real time-PCR přijatelné. Autorka ve své práci také optimalizovala podmínky této metody pro sledování exprese tohoto genu. Byla zvolena optimální teplota annealingu 57,9 °C.

Tabulka IX: Vlastnosti sady primerů použité pro sledování referenčního genu *gapA*.

| Název | Sekvence | T _m [°C] | Délka |
|---------------|----------------------------------|---------------------|-------|
| <i>gapA</i> F | 5`-ACT TCG ACA AAT ATG CTG GC-3` | 56,50 | 20 |
| <i>gapA</i> R | 5`-CGG GAT GAT GTT CTG GGA A-3` | 56,81 | 19 |

T_m – teplota tání.

7.4.2 Primery pro sledovaný gen – *adiA*

Pro sledování genu *adiA* byly testovány 3 sady primerů, jejichž vlastnosti jsou uvedeny v tabulce X.

První sada primerů „*adiA1* F + *adiA1* R“ byla navržena Veronikou Málkovou v programu Blast a to speciálně pro bakterie *E. coli*. Metodika byla validována při testování exprese genů uvedené bakterie ve vzorcích bujony. Délka vzniklých ampliconů byla asi 100bp. Zároveň autorka zvolila optimální teplotu annealingu 57,5 °C a to i s ohledem na optimální teplotu annealingu zvolenou u primerů pro výše zmiňovaný referenční gen (*gapA*).

Druhá sada primerů označovaná jako „*adiA2* F + *adiA2* R“ byla navržena v rámci předkládané diplomové práce taktéž v programu Blast a to tak, aby splňovala následující podmínky:

- délka primeru v rozmezí od 18 do 25 nukleotidů;
- obsah párů G ≡ C v nukleotidové sekvenci by měl činit 40 až 60 %;
- teplota T_m by měla být minimálně 50 °C a zároveň by teplota tání sady primerů měla být blízká;
- primery nesmí tvořit dimery na základě své vzájemné komplementarity bází a zároveň nesmí vytvářet vnitřní sekundární struktury. [20]
- Pro metodu real time-PCR je ideální vznikající amplicon o délce 80 až 250bp [60].

Třetí testovanou sadou primerů pro sledování genu *adiA* byla sada navržená autory Maršálková a kol. [61], která je dále označovaná jako „*adiA* F + *adiA* R“. Tato sada primerů je univerzální pro některé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (např. *E. coli* nebo *Salmonella enterica*). Sledování genové exprese prostřednictvím této sady primerů bylo autory realizováno ve vzorcích bujony.

Tabulka X: Vlastnosti primerů použitých pro sledování genu *adiA*.

| Název | Sekvence | T _m [°C] | Délka |
|----------------|----------------------------------|---------------------|-------|
| <i>adiA1 F</i> | 5`-GCA TAG ATC GGG TTG AAA C-3` | 53,88 | 19 |
| <i>adiA1 R</i> | 5`-ATA ACG CTA AAG AAG CGC AG-3` | 56,62 | 20 |
| <i>adiA2 F</i> | 5`-TCC GGA CGA ACA TCA AAA CG-3` | 58,86 | 20 |
| <i>adiA2 R</i> | 5`-AAG TCG GCG GTA TCT TCC AG-3` | 59,54 | 20 |
| <i>adiA F</i> | 5`-CTG GTT GAA GCG GGA GAA RT-3` | 59,00 | 20 |
| <i>adiA R</i> | 5`-TGG TAC GGC TAT GCR CGY TT-3` | 60,00 | 20 |

Y = C nebo T; R = A nebo G.

Snahou bylo vybrat z uvedených sad primerů nejvhodnější dvojici pro sledování exprese genu *adiA* bakterie *E. coli* kultivované v reálných vzorcích nízkotučného mléka a vepřové pomazánky (paštiky). Z výsledků jednotlivých experimentů (viz kapitola 7.5.1) byla pro další experimenty (real time-PCR) vybrána sada s pracovním označením „*adiA F + adiA R*“.

7.4.3 Primery pro sledovaný gen – *speF*

Pomocí programu Blast byly v rámci předkládané diplomové práce navrženy i další sady primerů, tentokrát pro detekci genu *speF*. Konkrétně se jedná o tři sady označené jako „*speF1 F + speF1 R*“, „*speF2 F + speF2 R*“ a „*speF3 F + speF3 R*“, jejichž vlastnosti jsou uvedeny v tabulce XI. Čtvrtá sada primerů, uvedená ve zmíněné tabulce, byla použita na základě literární rešerše Kristýnou Maršálkovou v rámci její diplomové práce [54], v níž optimalizovala metodu real time-PCR pro detekci genu *speF*. Autorkou bylo ověřeno, že sada primerů „*speF (2F) + speF (4R)*“, původně navržená Leonou Wunderlichovou [46] pro metodu Touchdown PCR, je vhodná i pro detekci zmíněného genu metodou real time-PCR. Navržená sada by měla být univerzální pro detekci vybraných bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (rovněž i pro *E. coli*). Provedené experimenty byly ale realizovány pouze v bujónu.

V předkládané diplomové práci bylo snahou tyto sady primerů testovat při sledování exprese genu kódujícího enzym ornithindekarboxylasu v reálných vzorcích.

Tabulka XI: Vlastnosti primerů použitých pro sledování genu *speF*.

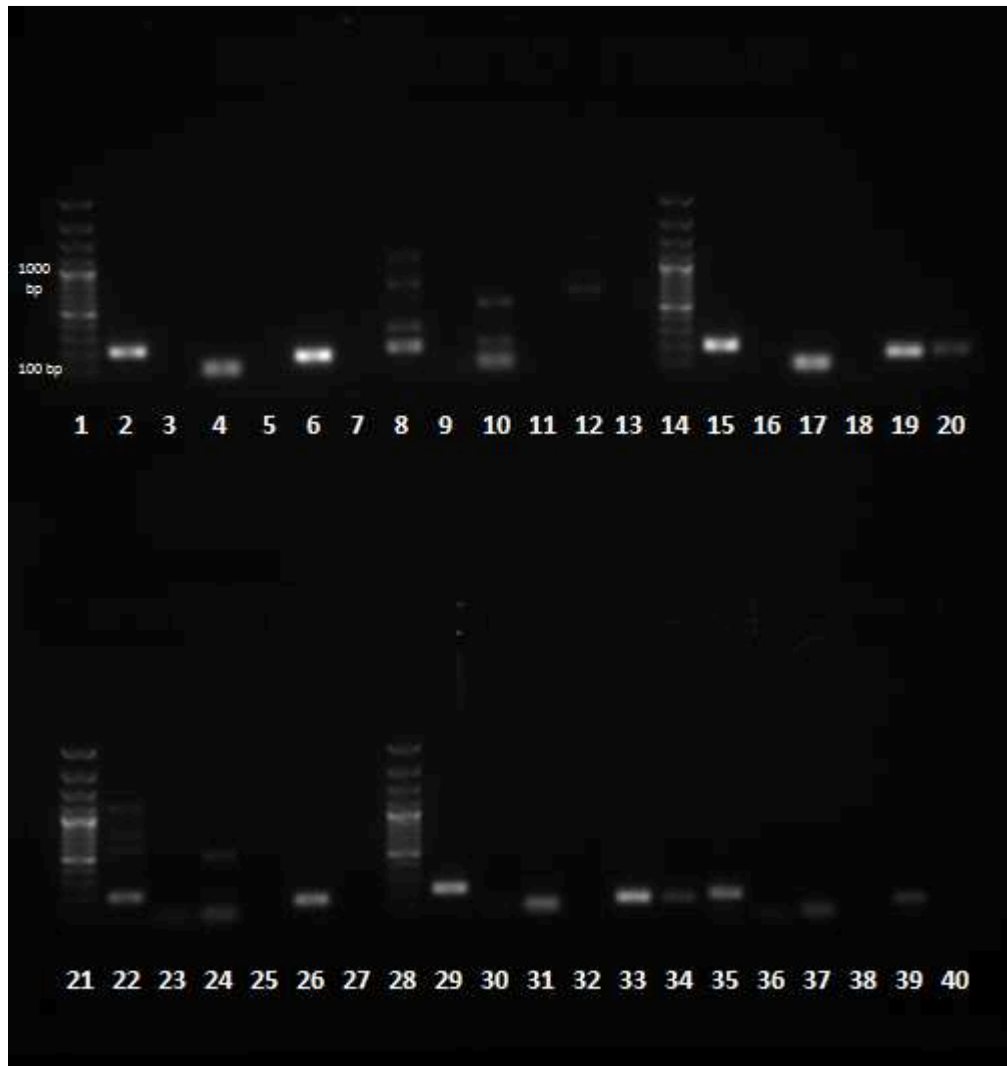
| Název | Sekvence | T _m [°C] | Délka |
|------------------|----------------------------------|---------------------|-------|
| <i>speF1</i> F | 5`-ACG CGC CAT TAG CAG AAG TG-3` | 61,36 | 20 |
| <i>speF1</i> R | 5`-AGG CGT AGT TGG CTT CTT GC-3` | 60,96 | 20 |
| <i>speF2</i> F | 5`-GCG CCA TTA GCA GAA GTG C-3` | 59,94 | 19 |
| <i>speF2</i> R | 5`-GAC ACA ACT GAC GCA GGG TA-3` | 59,97 | 20 |
| <i>speF3</i> F | 5`-GAC GCG CCA TTA GCA GAA GT-3` | 61,08 | 20 |
| <i>speF3</i> R | 5`-GCG TGG GAA GTG CTC CTT AC-3` | 61,02 | 20 |
| <i>speF</i> (2F) | 5`-TCG CCR CTG YTG CTG-3` | 52,00 | 15 |
| <i>speF</i> (4R) | 5`-GAT AGA AYG GGC TGG TGG-3` | 57,00 | 18 |

Y = C nebo T; R = A nebo G.

7.5 Testování primerů

7.5.1 Zkouška funkčnosti navržených primerů

Nejprve byla provedena zkouška funkčnosti nových sad primerů, navržených v rámci předkládané diplomové práce, která byla realizována metodou klasické PCR za podmínek uvedených v *tabulce III (kapitola 6.7.1)*. Získané amplikony byly následně elektroforeticky detekovány a snímek agarosového gelu po ozáření UV zářením je uvedený na *obrázku 22*. Lze konstatovat, že navržené primery jsou funkční pro metodu klasické PCR. U sady primerů detekující referenční gen *gapA* byla ověřena ideální teplota annealingu 58,0 °C. U sad primerů „*adiA1*“ a „*adiA2*“ byla ověřena jako vhodná také teplota 58,0 °C. Dále u primerů detekujících gen *speF* byla jako vhodná teplota zvolena 60,1 °C, konkrétně u „*speF1*“ a „*speF2*“. Band vzniklý testováním sady „*speF3*“ se na pořízeném snímku jevil jako nejzřetelnější při teplotě annealingu 59,0 °C. U všech takto testovaných primerů dosahují vzniklé amplikony velikosti okolo 200bp, vyjma sady „*adiA1*“, kdy vznikaly amplikony o velikosti okolo 100bp.



Obrázek 22: Zkouška funkčnosti primerů.

1 – marker; 2 – *gapA*; 3 – *gapA(N)*; 4 – *adiA1*; 5 – *adiA1(N)*; 6 – *adiA2*;
 7 – *adiA2(N)*; 8 – *speF1*; 9 – *speF1(N)*; 10 – *speF2*; 11 – *speF2(N)*; 12 – *speF3*;
 13 – *speF3(N)*; 14 – marker; 15 – *gapA*; 16 – *gapA(N)*; 17 – *adiA1*; 18 – *adiA1(N)*;
 19 – *adiA2*; 20 – *adiA2(N)*; 21 – marker; 22 – *speF1*; 23 – *speF1(N)*; 24 – *speF2*;
 25 – *speF2(N)*; 26 – *speF3*; 27 – *speF3(N)*; 28 – marker; 29 – *gapA*; 30 – *gapA(N)*;
 31 – *adiA1*; 32 – *adiA1(N)*; 33 – *adiA2*; 34 – *adiA2(N)*; 35 – *speF1*; 36 – *speF1(N)*;
 37 – *speF2*; 38 – *speF2(N)*; 39 – *speF3*; 40 – *speF3(N)*. 2 – 13: 58,0 °C;
 15 – 20, 22 – 27: 59,0 °C; 29 – 40: 60,1 °C. (N) – negativní kontrola.

Z časových důvodů a i vzhledem k tomu, že návrh nových sad primerů nebyl primárním cílem předkládané diplomové práce, byly vybrány pro další experimenty, pro studium regulace genové exprese v reálných vzorcích, sady primerů navržené a validované pro metodu real time-PCR v rámci diplomové práce Kristýny Maršákové, tedy sada primerů

„*speF* (2F) + *speF* (4R)“, a pro detekci genu *adiA* pak sada navržená autory *Maršálková a kol. 2017* [52] „*adiA* F + *adiA* R“.

Jelikož byly vybrané primery validovány pro metody detekce a kvantifikace genů ve vzorcích bujONU a zároveň byly skladovány v mrazicím boxu, bylo proto potřeba jejich funkčnost zkontrolovat, a vedle toho také ověřit, zda reakce budou probíhat s dostatečnou účinností (efektivitou) i během experimentů, v nichž budou vedle bujONU zpravovány i reálné vzorky (mléko a paštika).

7.5.2 Kontrola účinnosti reakce při použití navržených sad primerů

Účinnost PCR je daná účinností přisedání primerů, složením reakce nebo také přítomností PCR inhibitorů. PCR probíhá se 100% účinností (efektivitou) pouze v ideálních případech, ve skutečnosti je účinnost reakce více či méně snižena.

Během experimentů prováděných v rámci této předkládané diplomové práce byla ověřována účinnost všech reakcí nejenom na počátku experimentu (sledování exprese genů v různých fázích růstové křivky bakterií – v bujONU, mléce i paštice), ale byla sledována/kontrolována během všech experimentů (sledování vlivu faktorů /pH a teploty/ na genovou expresi – v bujONU, mléce i paštice).

Nejprve byly sledovány/kontrolovány účinnosti reakcí u experimentů prováděných v bujONU. Ze závislosti jednotlivých naměřených hodnot C_t (viz *tabulka XXV* v *příloze P I*) na množství cDNA získané reverzní transkripcí (dle postupu uvedeného v *kapitole 6.6*) byla sestrojena standardní křivka (viz *obrázek 36* v *příloze P I*) a následně z příslušných směrnic přímek „ k “ vypočítána podle *rovnice 4* efektivita amplifikace „ E “, která nabývala hodnot v rozmezí od 103 do 104 % (viz *tabulka XII*).

Na základě těchto výsledků lze usoudit, že vybrané primery jsou funkční, reakce probíhá s dostatečnou účinností (dle doporučení by se účinnost reakce měla pohybovat mezi 90 až 110 % [37]) a to i v případě aplikace metodiky na reálné vzorky (viz dále).

Tabulka XII: Vypočtené hodnoty efektivity reakce (vzorek bujONU s přidavkem aminokyselin).

| | k [-] | E [-] | E [%] |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>gapA</i> | -3,250 | 2,031 | 103 |
| <i>adiA</i> | -3,211 | 2,048 | 105 |
| <i>speF</i> | -3,233 | 2,038 | 104 |

k – směrnice přímk; *E* – účinnost (resp. efektivita) reakce.

7.6 Sledování exprese a vlivu změny faktorů (teploty a pH) na expresi sledovaných genů *adiA* a *speF*

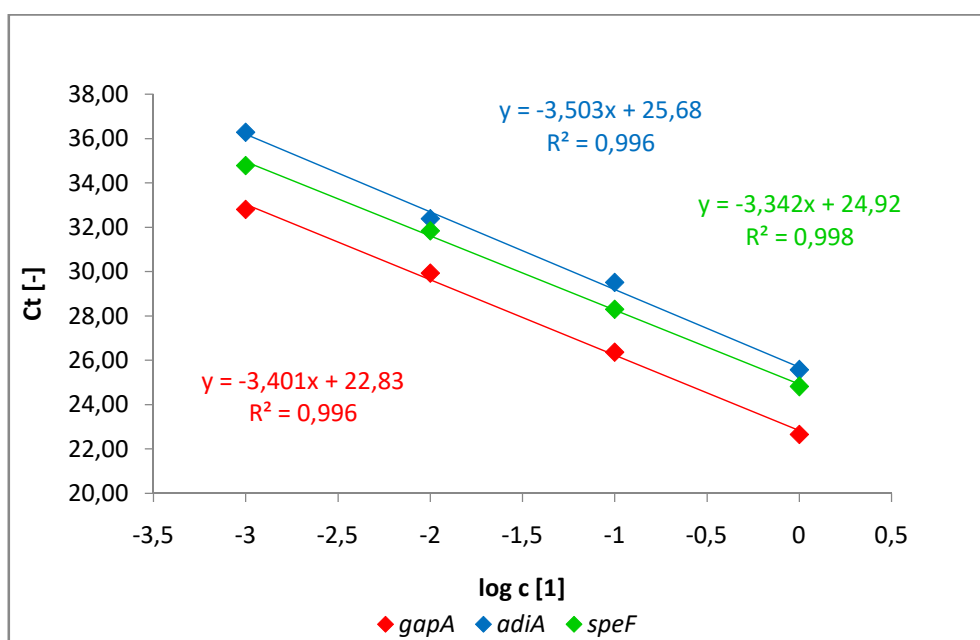
Jak již bylo uvedeno v kapitole 7.1, pro pozorování exprese sledovaných genů byly zvoleny časy odběru zaočkovaných vzorků 0, 3, 8 a 29 hodin. Tyto časy byly vybrány z toho důvodu, aby byla zaznamenána exprese sledovaných genů (*adiA* a *speF*) nejlépe ve všech fázích růstové křivky (při 30 °C) bakterie *E. coli*.

Nejprve byla sestrojena standardní křivka závislosti hodnot Ct (získaných metodou real time-PCR popsanou v kapitole 6.7.2) na množství cDNA. Následně mohla být na základě efektivity amplifikace vypočítána hodnota exprese sledovaného genu a to Pfafflovou metodou podle rovnice 5.

7.6.1 Kontrolní vzorek bujONU s přidavkem volných aminokyselin

Na obrázku 23 je uvedena standardní křivka pro jednotlivé geny ve vzorcích získaných z „kontrolního“ vzorku bujONU s přidavkem aminokyselin. Protože bylo v předchozích experimentech zjištěno, že v takovémto vzorku jsou oba geny (*adiA* a *speF*) dostatečně exprimovány, bylo na pokus s bujONem nahlíženo jako na pozitivní kontrolu, se kterou mohou být výsledky získané v experimentech s reálnými vzorky (nízkoaktučné mléko a vepřová pomazánka) diskutovány. Hodnoty efektivity pro tyto vzorky (bujON) jsou uvedeny v tabulce XIII. Jelikož se hodnoty pohybují v rozmezí od 93 do 99 %, lze považovat proběhnutou amplifikaci za účinnou. Dále jsou v tabulce XIV uvedeny hodnoty exprese sledovaných genů vypočtené dle Pfafflovi metody. Z těchto hodnot a zároveň z grafu

znázorněném na obrázku 24, je patrné, že ve vzorcích bujONU dochází k výraznému zvýšení exprese genu *speF* v 8. hodině kultivace a ve 29. hodině pak k opětovnému snížení exprese a to téměř na původní hodnotu. Zatímco u genu *adiA* v 8. hodině k tak zřetelnému nárůstu genové exprese ve vzorku bujONU nedochází, je jeho exprese i ve 29. hodině téměř shodná. Z těchto výsledků by bylo možné usuzovat na to, že v exponenciální fázi růstu bakterie *E. coli* (8. hodina) v bujONU s přidavkem volných aminokyselin (L-ornithinu a L-argininu) tato bakterie pro produkci putrescinu preferuje dráhu č. 1, tedy využívá reakci katalyzovanou enzymem ornithindekarboxylasou (přeměna L-ornithinu na putrescin) kódovanou genem *speF* a druhou aminokyselinu (L-arginin) zřejmě využívá jinak, třeba pro svůj růst [61].



Obrázek 23: Závislost Ct na množství cDNA (bujON s přidavkem aminokyselin).

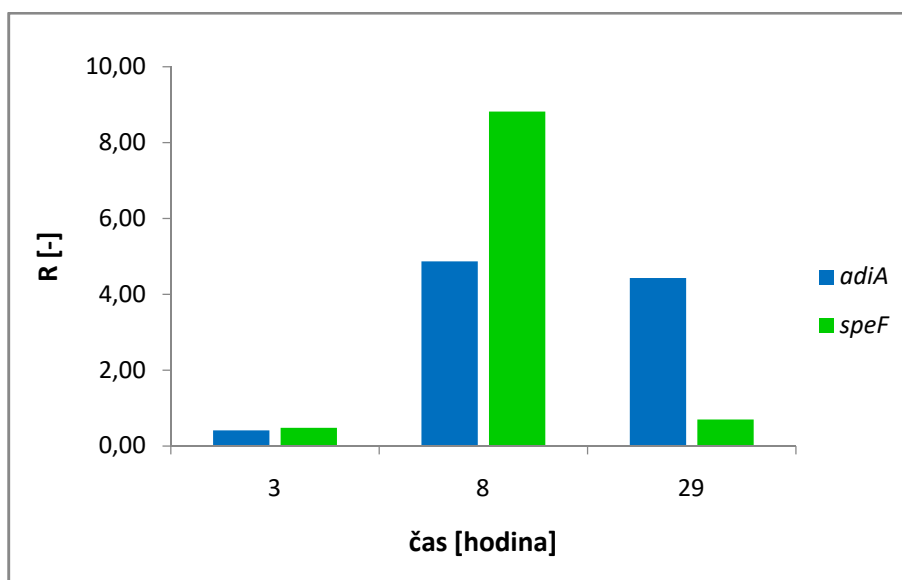
Tabulka XIII: Naměřené hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtené hodnoty efektivity reakce (v bujONU s přidavkem aminokyselin).

| | Ct [-] | | | | k [-] | E [-] | E [%] |
|-------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|--------|-------|-------|
| | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | | | |
| <i>gapA</i> | 22,65 | 26,36 | 29,93 | 32,80 | -3,401 | 1,968 | 97 |
| <i>adiA</i> | 25,57 | 29,52 | 32,39 | 36,29 | -3,503 | 1,930 | 93 |
| <i>speF</i> | 24,82 | 28,30 | 31,84 | 34,78 | -3,342 | 1,992 | 99 |

Tabulka XIV: Vypočtené hodnoty exprese (bujon s přidavkem aminokyselin).

| | R [-] | | |
|-------------|-----------|-----------|------------|
| | 3. hodina | 8. hodina | 29. hodina |
| <i>adiA</i> | 0,4 | 4,9 | 4,4 |
| <i>speF</i> | 0,5 | 8,8 | 0,7 |

Expresní poměr R zde uvádí, kolikrát se zvýšila exprese daného genu (buď *adiA* nebo *speF*), a to ve 3., 8. a 29. hodině ve srovnání s časem 0 hodin (od počátku kultivace).



Obrázek 24: Závislost exprese sledovaných genů na čase v kontrolním vzorku bujonu s přidavkem volných aminokyselin.

V další fázi experimentu byly testované reálné vzorky i kontrolní vzorek bujonu zaočkované bakteriální kulturou *E. coli* vystaveny změnám teploty a pH v průběhu kultivace, jak je popsáno v kapitole 6.4.

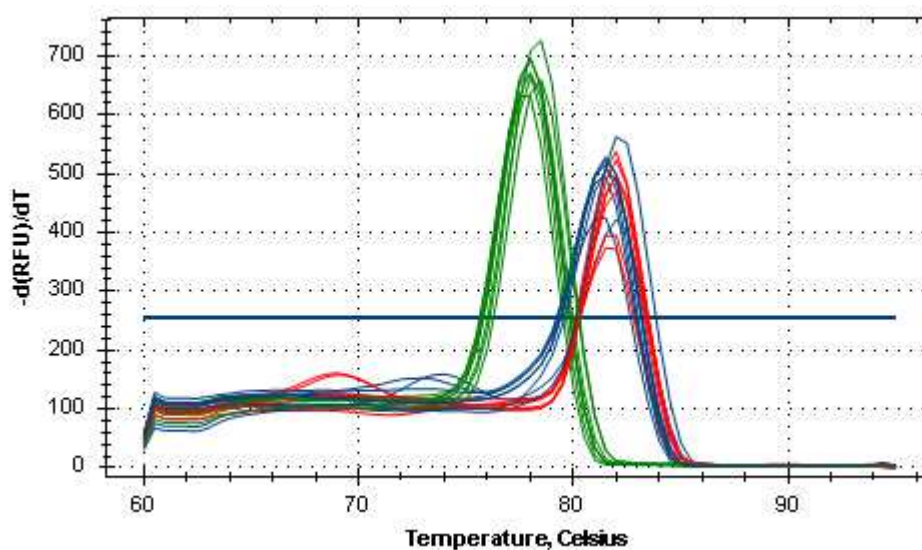
Kontrola účinnosti reakce metodou standardní křivky byla provedena v každém dalším realizovaném experimentu. V tomto případě je závislost hodnot Ct na množství cDNA uvedena na obrázku 37 v příloze P II. Směrnice jednotlivých přímek a z nich

následně vypočtené efektivita reakcí jsou pak uvedeny v *tabulce XV*. Efektivita amplifikace se v případě modelového vzorku bujonu s přidavkem aminokyselin pohybovala v rozmezí od 103 do 107 %.

Tabulka XV: Vypočtené hodnoty efektivity (bujon s přidavkem aminokyselin) při sledování regulace genové exprese.

| | k [-] | E [-] | E [%] |
|-------------|--------|-------|-------|
| <i>gapA</i> | -3,222 | 2,043 | 104 |
| <i>adiA</i> | -3,165 | 2,070 | 107 |
| <i>speF</i> | -3,255 | 2,029 | 103 |

Pro kontrolu, zda reakce probíhají nejen s dostatečnou účinností, ale i specifičností, byla softwarem pořízena druhá derivace křivky tání. Křivka tání produktu je znázorněna na *obrázku 25*; je zde potvrzena specifičnost proběhnutých reakcí, jelikož nebyly zachyceny peaky vyjadřující vznik nescifických produktů. Teplota tání vzniklých specifických produktů, v případě použití primerů detekujících gen *gapA* a *adiA*, se pohybuje okolo 81 °C, v případě genu *speF* okolo 79 °C.



*Obrázek 25: Druhá derivace křivky tání pro jednotlivá ředění při změně teploty u vzorku bujonu. (Červená – *gapA*, modrá – *adiA*, zelená – *speF*.)*

Následně byly z naměřených hodnot Ct (viz *tabulka XXV* v *příloze P II*) vypočteny hodnoty exprese sledovaných genů v jednotlivých časech odběru kultivace zaočkovaného vzorku bujonu (viz *tabulka XVI*) a to při změně teploty i pH.

Jak bylo uvedeno v *kapitole 6.4*, byl vzorek bujonu po odběru ve 12. hodině (od počátku kultivace) umístěn do termostatu temperovaného na 8 °C. V případě vzorku, u něhož byl sledován vliv změny pH, byla tato hodnota po odběru ve 12. hodině upravena přidavkem 0,1M HCl. Následně byly prováděny odběry ve 14., 16. a 18. hodině (od počátku kultivace, tedy po 2, 4 a 6 hodinách od změny daného faktoru).

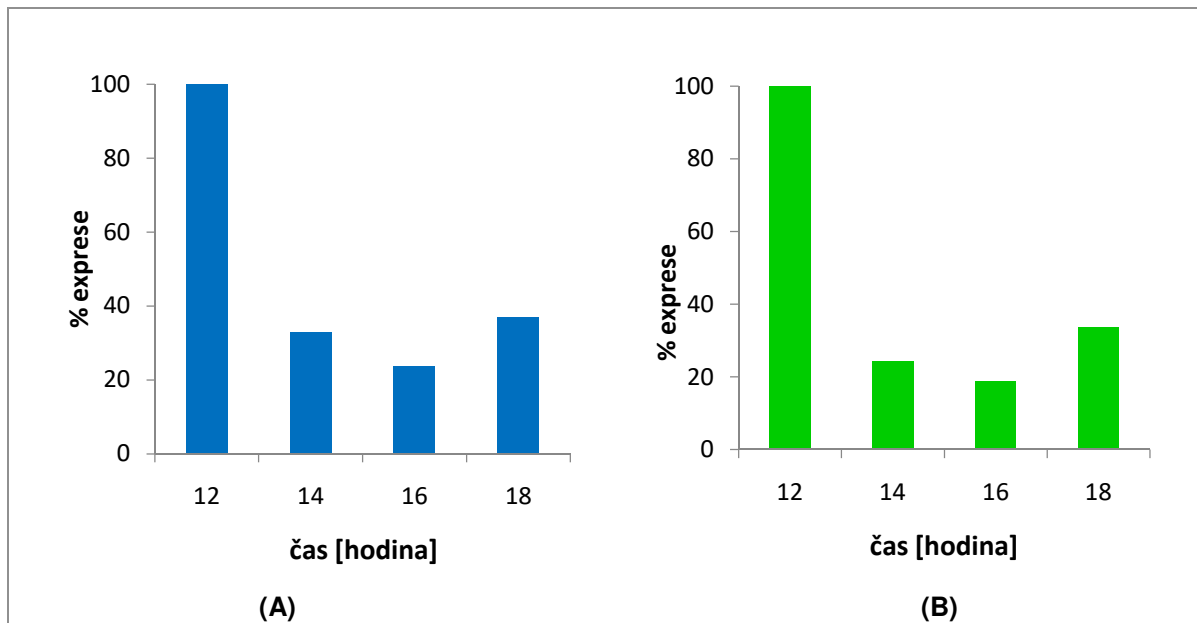
Pro další porovnání a vyhodnocení vlivu změny teploty a pH na genovou expresi (bylo sledováno, zda došlo ke zvýšení či naopak snížení exprese sledovaných genů) byla jako „srovnávací hodnota (tedy 100 %)“ zvolena vždy míra exprese jednotlivých sledovaných genů ve 12. hodině (exponenciální fáze růstu bakterií v testovaných vzorcích).

Tabulka XVI: Procentuální vyjádření změny exprese u jednotlivých časů kultivace (vzorek bujonu s přidavkem aminokyselin) při sledování vlivu změny teploty a pH na expresi sledovaných genů (adiA a speF).

| | Faktor | % exprese | | | |
|-------------|---------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 12. hodina | 14. hodina | 16. hodina | 18. hodina |
| <i>adiA</i> | změna teploty | 100 | 33 | 24 | 37 |
| <i>speF</i> | | 100 | 24 | 19 | 34 |
| <i>adiA</i> | změna pH | 100 | 117 | 127 | 96 |
| <i>speF</i> | | 100 | 125 | 112 | 107 |

Z procentuálního vyjádření změny exprese, které jsou zároveň graficky znázorněny v grafech na *obrázku 26*, je viditelné, že vzhledem k hodnotě R (% exprese) ve 12. hodině, kdy byl vzorek ještě neupraven, došlo v případě změny teploty při kultivaci bakterie *E. coli* ve vzorku k výraznému snížení míry exprese a to jak v případě genu *adiA* (o 67 %), tak i v případě genu *speF* (o 76 %). Hodnota pak dále u obou sledovaných genů klesá

i v 16. hodině. Na konci experimentu, tedy v 18. hodině, je pak viditelný mírný nárůst exprese u obou genů.

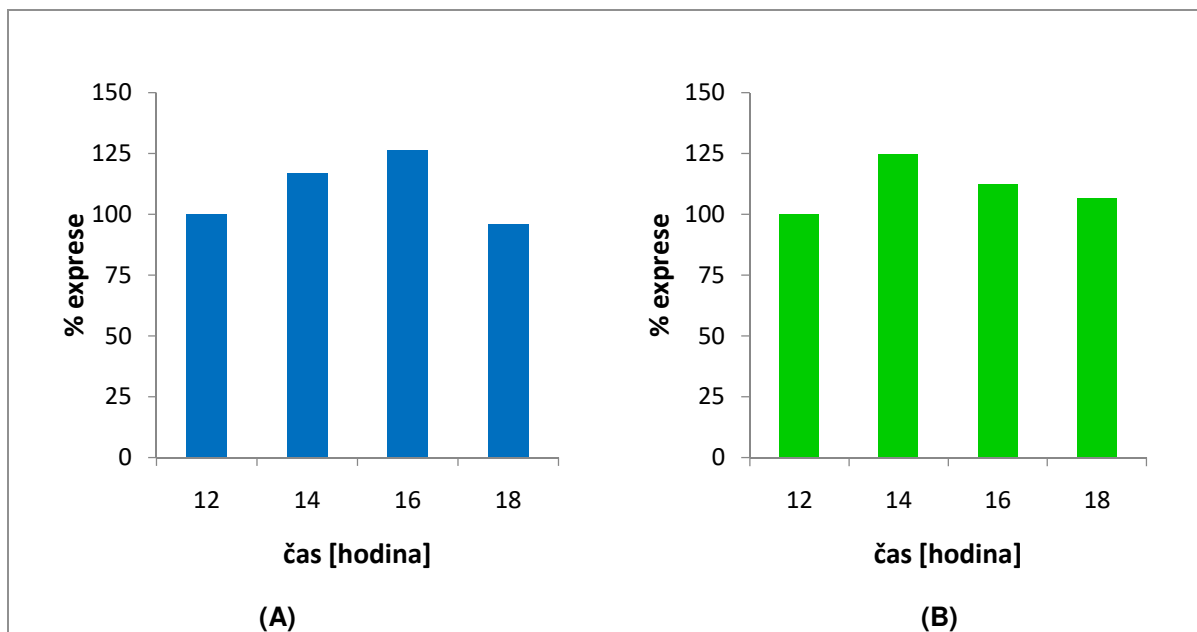


Obrázek 26: Závislost exprese sledovaných genů *adiA* (A) a *speF* (B) na čase v kontrolním vzorku bujONU s přidavkem volných aminokyselin při změně teploty.

Druhý testovaný vzorek bujONU s přidavkem aminokyselin byl po odběru ve 12. hodině okyselen z původní hodnoty pH 7,45 na 5,00. Změnu genové exprese po této změně podmínek kultivace vyjadřují grafy na obrázku 27. Z nich je vidět, že u obou sledovaných genů docházelo k nárůstu exprese. V případě sledovaného genu *adiA* s vrcholem v 16. hodině růstu bakterie (tedy 4. hodině pobytu v termostatu temperovaném na 8 °C), kdy vzrostla hodnota genové exprese oproti 12. hodině o 27 %. V případě sledovaného genu *speF* byla pozorována nejvyšší míra genové exprese ve 14. hodině, kdy došlo k nárůstu oproti hodnotě ve 12. hodině o 25 %.

Získané výsledky potvrdily naše očekávání. Teplota je faktorem, který by měl utlumit nejen růst bakterií, ale i expresi sledovaných genů, což dokumentují naše výsledky. Naopak pH je faktorem, jež by měl expresi daných genů zvyšovat. Důvodem tohoto tvrzení je fakt, že biogenní aminy (BA; v našem případě produkovaný putrescin) jsou látky bazického charakteru, které může bakterie tvořit, aby jí pomohly „překonat“ nepříznivé podmínky (právě snížení pH). Produkce BA může být tedy brána jako určitá „obranná reakce“,

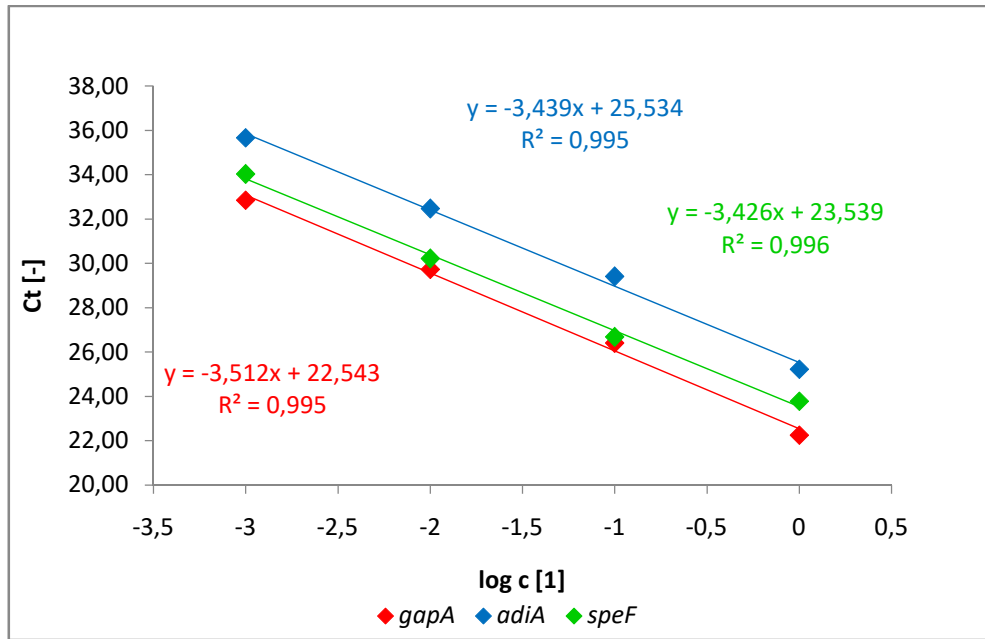
kdy si bakterie tvoří tyto látky (BA), aby docházelo k nárůstu pH prostředí (návrat na optimální hodnoty pro růst, ve kterém se nachází).



Obrázek 27: Závislost exprese sledovaných genů *adiA* (A) a *speF* (B) na čase v kontrolním vzorku bujony s přidavkem volných aminokyselin při změně pH.

7.6.2 Testovaný vzorek nízkotučného mléka

Efektivita amplifikace, vypočtená na základě směrnic jednotlivých standardních křivek (viz obrázek 28) se pohybovala v intervalu od 93 do 96 % (viz tabulka XVII), tudíž reakce probíhala s dostatečnou účinností. Z následně vypočtených hodnot exprese, uvedených v tabulce XVIII, lze konstatovat, že ve vzorcích nízkotučného mléka kultivovaných za uvedených podmínek byla exprese genu *adiA* u *E. coli* zpočátku experimentu poměrně vyrovnaná, zatímco ve 29. hodině došlo k nárůstu exprese tohoto genu (90,3), což je patrné i z grafu uvedeném na obrázku 29. Oproti tomu gen *speF* byl exprimován ve vyšší míře již z počátku kultivace. Nejvyšší hodnoty exprese byly naměřeny v 8. hodině (71,6). Ve 29. hodině nastal výrazný nárůst na hodnotu (1114,7). Poslední zmíněná byla nejvyšší naměřenou hodnotou, a to s velkým odstupem, během všech proběhnutých experimentů.



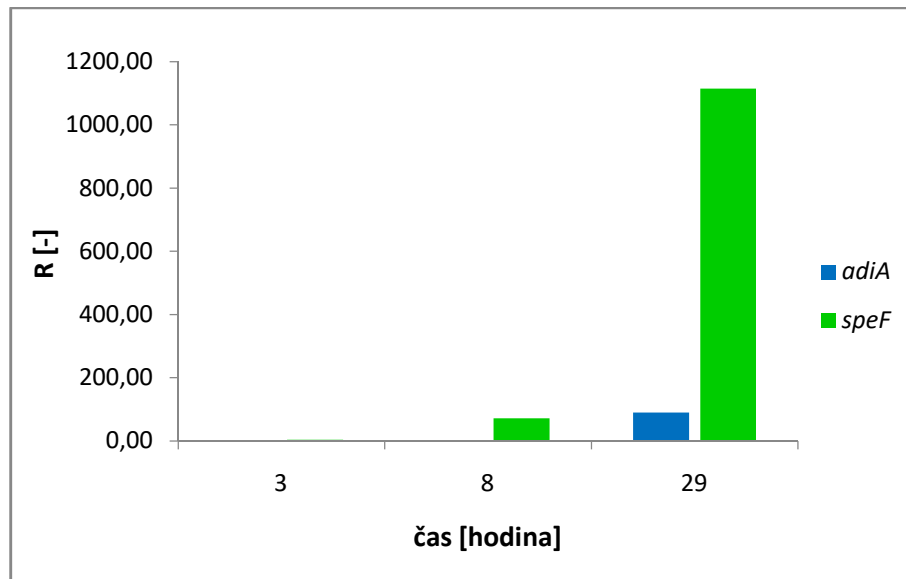
Obrázek 28: Závislost Ct na množství cDNA (nízkotučné mléko).

Tabulka XVII: Naměřené hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtené hodnoty efektivity reakce (nízkotučné mléko).

| | Ct [-] | | | | k [-] | E [-] | E [%] |
|-------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|--------|-------|-------|
| | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | | | |
| <i>gapA</i> | 22,25 | 26,40 | 29,73 | 32,85 | -3,512 | 1,926 | 93 |
| <i>adiA</i> | 25,22 | 29,41 | 32,47 | 35,67 | -3,439 | 1,953 | 95 |
| <i>speF</i> | 23,79 | 26,68 | 30,22 | 34,04 | -3,430 | 1,957 | 96 |

Tabulka XVIII: Hodnoty exprese (nízkotučné mléko).

| | R [-] | | |
|-------------|-----------|-----------|------------|
| | 3. hodina | 8. hodina | 29. hodina |
| <i>adiA</i> | 2,6 | 2,6 | 90,3 |
| <i>speF</i> | 4,2 | 71,6 | 1114,7 |



Obrázek 29: Závislost exprese sledovaných genů na čase u kontrolního vzorku nízkotučného mléka.

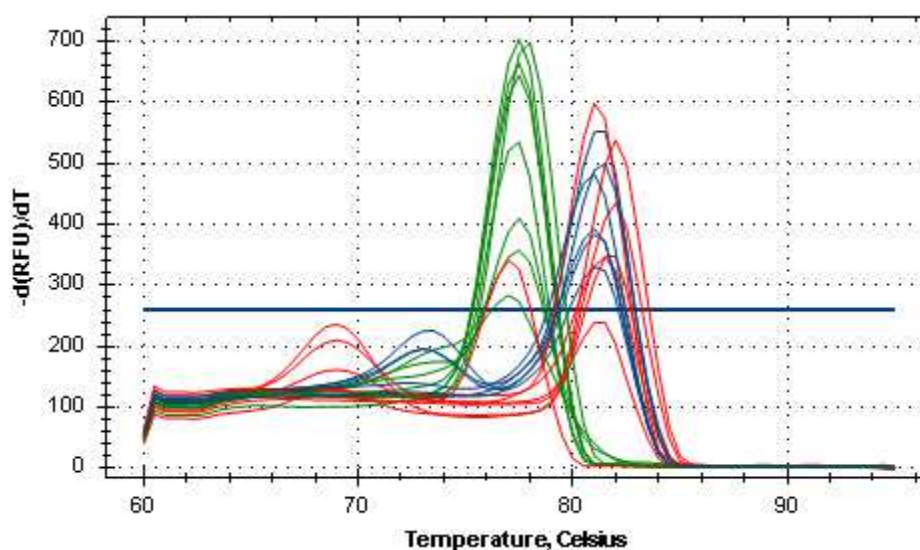
Nízkotučné mléko obsahuje asi 3 % bílkovin, z nichž největší zastoupení (cca 80 %) má kasein. Ten je vytvářen čtyřmi frakcemi – α_{S1} , α_{S2} , β (fosfoproteiny) a κ (glykoprotein), jejichž struktura je tvořena převážně dlouhými řetězci aminokyselin. V každém z těchto řetězců má své zastoupení také arginin (asi 3,3 % u kravského mléka), zatímco ornithin ve struktuře zmíněných frakcí nalezen nebyl [62]. Na základě těchto skutečností je zajímavý výše uvedený extrémní nárůst exprese genu *speF*, který kóduje enzym ornithin dekarboxylasu. Nárůst byl zaznamenán až ve 29. hodině a to po inkubaci při 30 °C. Jelikož skladováním mléka dochází k přirozenému snižování hodnoty pH (z hodnoty 6,7 až na 4,6) a to převážně činností mikroorganismů [63], které mají optimum růstu právě okolo 30 – 35 °C, je možné připsat tento nárůst právě zmíněným procesům. Zároveň se totiž jedná o teplotní rozmezí, při němž ještě nedochází k precipitaci kaseinu (kdy dochází ke vzniku silných vazeb mezi jednotlivými kaseinovými micelami) a jeho oddělení od syrovátky. [62, 63, 64]

Při sledování vlivu faktorů na genovou expresi v reálném vzorku nízkotučného mléka došlo ke komplikacím, které byly zachyceny až při pokusu o vyhodnocení hodnot Ct. Nejen že tyto hodnoty nebylo možné zachytit, jelikož k překročení fluorescence pozadí docházelo až po 40. cyklu, který byl sledován, ale v řadě případů došlo během reakce ke vzniku nescifických produktů. Vzhledem k tomu, že izolovaná RNA i následně

přepsaná cDNA vykazovaly požadovanou čistotu i byly v dostatečných koncentracích, byla znovu provedena real time-PCR reakce s použitím nově naředěných primerů, které byly dále použity i v případě práce se vzorky vepřové pomazánky. Tyto opakovaně naměřené hodnoty Ct byly vyneseny do grafu (viz *obrázek 38 v příloze P III*) v závislosti na množství cDNA. Sklon těchto standardních přímků byl však příliš malý a účinnost proběhnutých reakcí tak byly vyhodnoceny jako nedostačující. Konkrétně jsou hodnoty uvedeny v *tabulce XIX* a pohybují se v rozmezí od 116 do 144 %. Z průběhu experimentu lze vyvodit, že v prvním případě byly použité primery již nefunkční. Jelikož druhé provedení experimentu bylo opakováno až s odstupem několika dní, byly vzorky přepsané cDNA uchovávány v mrazicím boxu. Tím a následným rozmrazením mohlo dojít k určité degradaci molekul a to i přesto že spektrofotometrická kontrola prokázala dostačující hodnoty čistoty i množství nukleové kyseliny.

Tabulka XIX: Vypočtené hodnoty efektivity (nízkotučné mléko) při sledování regulace genové exprese.

| | k [-] | E [-] | E [%] |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>gapA</i> | -2,582 | 2,439 | 144 |
| <i>adiA</i> | -2,592 | 2,431 | 143 |
| <i>speF</i> | -2,988 | 2,161 | 116 |



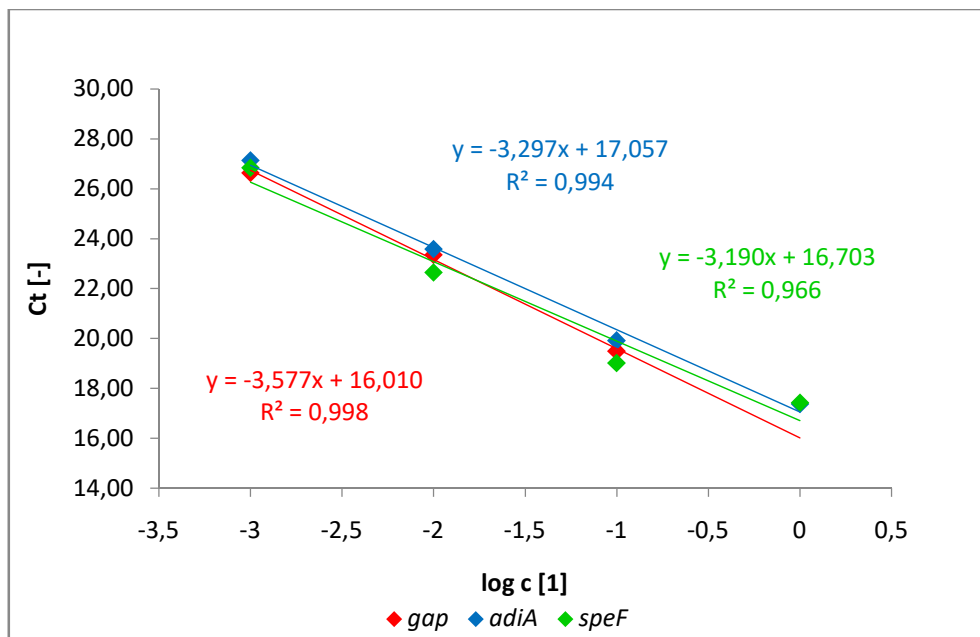
*Obrázek 30: Druhá derivace křivky tání pro jednotlivá ředění při změně pH u vzorku nízkotučného mléka. (Červená – *gapA*, modrá – *adiA*, zelená – *speF*.)*

Ze získané druhé derivace křivky tání v případě vzorků nízkotučného mléka je také vidět zvýšený vznik nespecifických produktů.

Z časových důvodů už nebylo možné pokus znovu zopakovat, tudíž nebyla získána potřebná data pro posouzení vlivu faktorů na genovou expresi sledovaných genů v reálném vzorku nízkotučného mléka.

7.6.3 Testovaný vzorek vepřové pomazánky (paštiky)

Stejně jako u předchozích vzorků, byly i v případě vzorku vepřové pomazánky nejprve testovány účinnosti reakcí. Na základě směrnic jednotlivých přímk závislosti Ct na množství cDNA, které jsou znázorněny na *obrázku 31*, byly účinnosti reakcí vypočteny. Jak je uvedeno v *tabulce XX*, hodnoty efektivity těchto reakcí se v případě testovaných genů pohybovaly v rozmezí od 90 do 106 %, což je vyhovující pro následný výpočet exprese podle Pfafflovi metody.



Obrázek 31: Závislost Ct na množství cDNA (vepřová pomazánka).

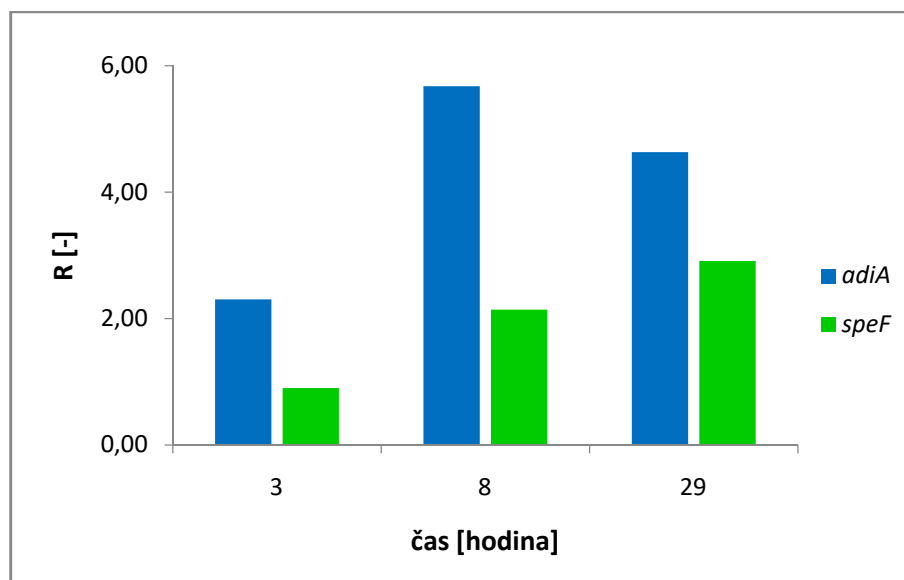
Tabulka XX: Naměřené hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtené hodnoty efektivity reakce ve vzorcích vepřové pomazánky (paštiky).

| | k [-] | E [-] | E [%] |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>gapA</i> | -3,577 | 1,904 | 90 |
| <i>adiA</i> | -3,297 | 2,011 | 101 |
| <i>speF</i> | -3,190 | 2,058 | 106 |

U obou sledovaných genů je z *tabulky XXI* vidět, že zatímco v případě genu *speF* dochází k postupnému nárůstu hodnot exprese genu (exprese nabývá ve 29. hodině hodnoty 2,9), druhý sledovaný gen *adiA* nejvíce exprimuje v 8. hodině ($R = 5,7$) a posléze dochází k mírnému snížení jeho exprese. Z *obrázku 29* je také patrné, že v reálném vzorku vepřové pomazánky je ve větší míře exprimován gen *adiA*. I tady platí, že expresní poměr R zde uvádí, kolikrát se zvýšila exprese daného genu (buď *adiA* nebo *speF*), a to ve 3., 8., a 29. hodině ve srovnání s časem 0 hodin (od počátku kultivace).

Tabulka XXI: Hodnoty exprese (vepřová pomazánka).

| | R [-] | | |
|-------------|------------------|------------------|-------------------|
| | 3. hodina | 8. hodina | 29. hodina |
| <i>adiA</i> | 2,3 | 5,7 | 4,6 |
| <i>speF</i> | 0,9 | 2,1 | 2,9 |



Obrázek 32: Závislost exprese sledovaných genů na čase (vepřová pomazánka).

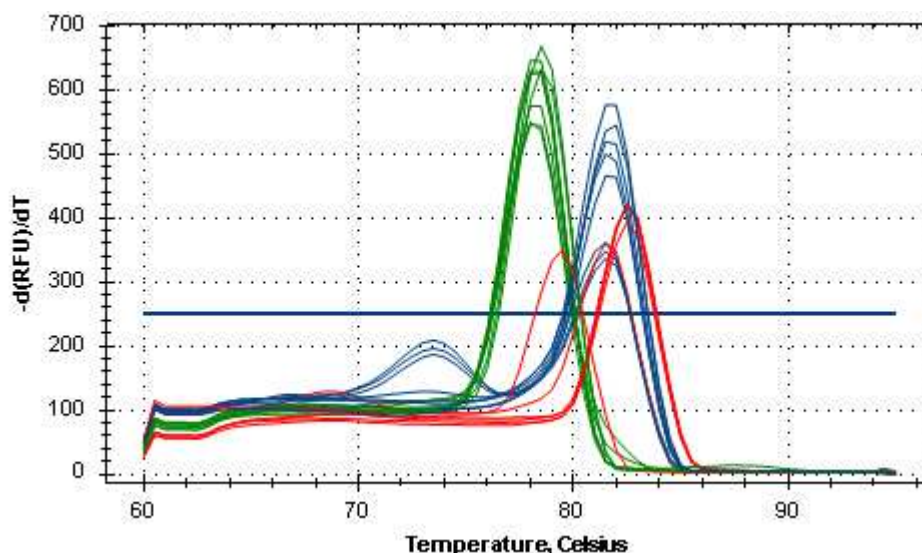
Lze říci, že použitá metodika real time-PCR, která byla původně validována na modelových vzorcích bujony, byla úspěšně realizována na testovaných reálných vzorcích. Ze získaných dat lze také konstatovat, že v reálném vzorku nízkotučného mléka kultivovaného při 30 °C docházelo u *E. coli* k expresi obou genů (*adiA* a *speF*) v mnohem větší míře, než u reálného vzorku vepřové pomazánky za stejných podmínek. A zároveň, že zatímco u zmíněného vzorku nízkotučného mléka byl u *E. coli* více exprimován gen *speF* (a to více než desetinásobně ve srovnání s genem *adiA*), v případě vzorku vepřové pomazánky došlo k výraznější expresi genu *adiA*. Vzorky vybraných reálných potravin byly odlišné z hlediska složení i dostupnosti jednotlivých aminokyselin a dalších substrátů, které *E. coli* využívá ke svému růstu. Na modelu *E. coli* kultivované v reálných vzorcích potravin, ne jen v bujony, je patrné, že oba zmiňované geny (*adiA* i *speF*) jsou geny inducibilní a je možné sledovat změny v expresi na základě řady faktorů, ne jen již zmíněné teploty a pH, ale i dostupnosti jednotlivých substrátů.

U vzorku vepřové pomazánky byla hodnota pH změněna přidávkem 0,1M HCl z hodnoty 6,39 na hodnotu 5,19. Ze směrníc standardních křivek (viz obrázek 39 v příloze P IV), do nichž byla promítnuta závislost naměřených Ct hodnot (uvedených v tabulce XXVI v příloze P IV), na množství nukleové kyseliny, byly vypočteny hodnoty efektivity

proběhnutých reakcí. Tyto hodnoty se pohybovaly pro jednotlivé geny v rozmezí od 99 do 108 % (viz *tabulka XXII*).

Tabulka XXII: Hodnoty efektivity reakce (vepřová pomazánka) při sledování regulace genové exprese.

| | k [-] | E [-] | E [%] |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>gapA</i> | -3,141 | 2,081 | 108 |
| <i>adiA</i> | -3,166 | 2,069 | 107 |
| <i>speF</i> | -3,346 | 1,990 | 99 |



*Obrázek 33: Druhá derivace křivky tání pro jednotlivá ředění při změně teploty (vepřové pomazánka /paštika/). (Červená – *gapA*, modrá – *adiA*, zelená – *speF*.)*

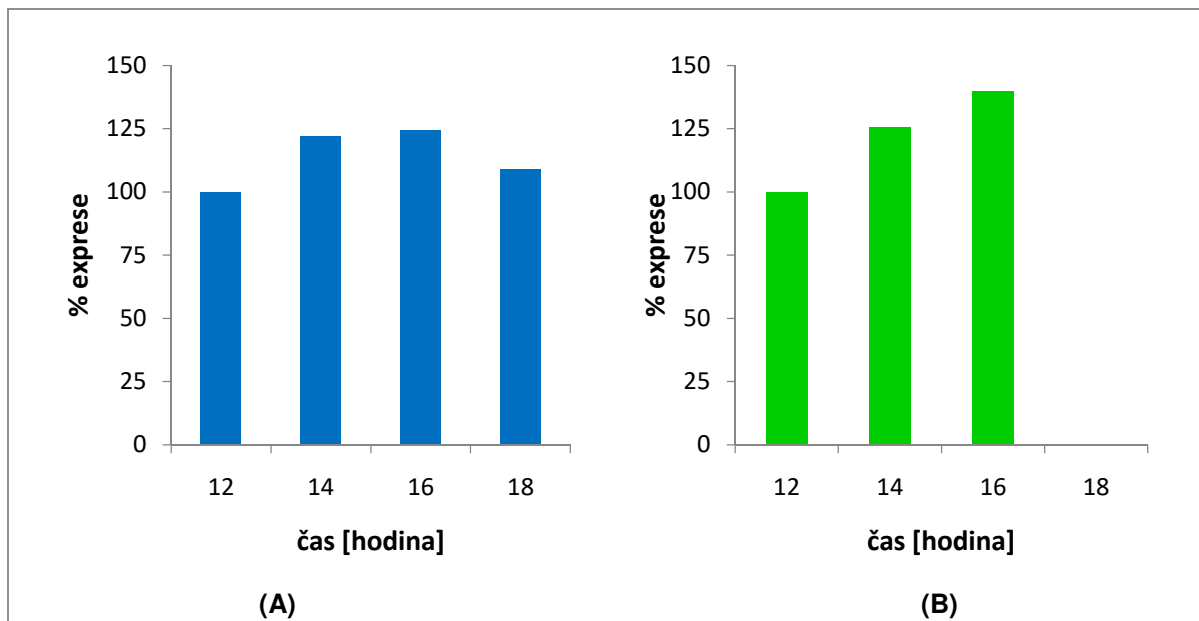
Z grafu druhé derivace křivky tání, který je vyobrazen na *obrázku 33*, lze v případě genu *speF* usoudit na specifický průběh reakce za vzniku produktů s teplotou tání cca 78 °C. Stejně tak v případě genu *adiA*, u něhož je sice v některých případech patrný peak v oblasti 74 °C, který je však pod tzv. hodnotou treshold. K odchylkám v průběhu reakce docházelo v případě referenčního genu *gapA*, kdy sice nedocházelo k zaznamenání peaku charakteri-

zujícího vznik nspecifických produktů, ale v jednom případě vznikl produkt, jehož teplota tání byla 79 °C, zatímco teplota tání vzniklého specifického produktu byla 82 ± 1 °C.

Tabulka XXIII: Vypočtené hodnoty exprese u jednotlivých časů kultivace (vzorek vepřové pomazánky) při sledování regulace genové exprese.

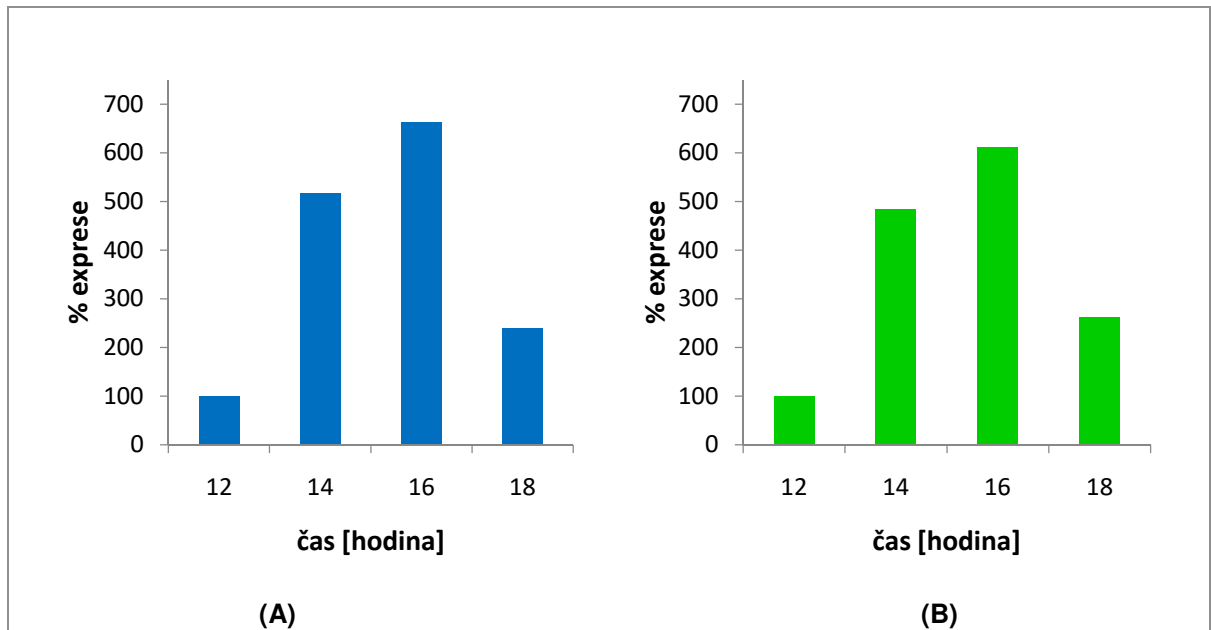
| | Faktor | % exprese | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 12. hodina | 14. hodina | 16. hodina | 18. hodina |
| <i>adiA</i> | změna T | 100 | 122 | 124 | 109 |
| <i>speF</i> | | 100 | 125 | 140 | 0,2 |
| <i>adiA</i> | změna pH | 100 | 516 | 664 | 239 |
| <i>speF</i> | | 100 | 483 | 611 | 263 |

Vypočtené procentuální změny exprese R (viz *tabulka XXIII*) vůči „standardní hodnotě“ exprese daných genů ve 12. hodině (100 %) od počátku kultivace, byly vyneseny do grafů na *obrázku 34*. Z těchto hodnot je patrné, že při změně teploty kultivace (po 12. hodině byly vzorky umístěny do termostatu temperovaného na 8 °C) došlo u obou genů k nárůstu jejich exprese. Nejvyšší míra exprese byla sledována v 16. hodině. V případě genu *adiA* se jednalo o nárůst oproti míře exprese ve 12. hodině o 24 % a v případě sledovaného genu *speF* o nárůst až o 40 %. Z těchto výsledků by se dalo usuzovat, že chlazení polotuhého vzorku (paštiky) neprobíhalo dostatečně a odběr mohl být proveden v „teplejší“ zóně vzorku, kde se nemusel vliv teploty na indukci (popř. útlum) genové exprese *adiA* a *speF* projevit. Proto by bylo vhodné experiment zopakovat a buď prodloužit dobu chlazení, nebo vzorek schladit v ledové lázni.



Obrázek 34: Závislost exprese sledovaných genů *adiA* (A) a *speF* (B) na čase ve vzorku vepřové pomazánky (paštiky) při změně teploty.

U vzorku vepřové pomazánky, u něhož byla po odběru ve 12. hodině kultivace změněna hodnota pH, byly oba geny v nejvyšší míře exprimovány v 16. hodině. Nárůst exprese genu *adiA* i genu *speF* byl v tomto čase velmi významný – exprese obou genů se zvýšila ~ 5x (viz obrázek 34). I zde je patrné, že změna pH je významným faktorem ovlivňujícím expresi genů kódující dva významné enzymy, ornithindekarboxylasu (*speF*) a arginindekarboxylasu (*adiA*), zapojené v metabolické dráze produkce putrescinu u gram negativních bakterií.



Obrázek 35: Závislost exprese sledovaných genů *adiA* (A) a *speF* (B) na čase ve vzorku vepřové pomazánky (paštiky) při změně pH.

ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na sledování vlivu faktorů na genovou expresi genů *adiA* a *speF* konkrétně u bakterie *Escherichia coli* (zástupce čeledi *Enterobacteriaceae*) kultivované v reálných vzorcích nízkotučného mléka a vepřové pomazánky (paštiky). První z uvedených genů – *adiA* – kóduje arginindekarboxylasu, tedy enzym katalyzující metabolickou přeměnu aminokyseliny L-argininu na biogenní amin agmatin, který je dále metabolizován na putrescin. Druhý z uvedených genů – *speF* – kóduje enzym ornithindekarboxylasu katalyzující dekarboxylaci aminokyseliny L-ornithinu na putrescin. Během práce byly/byla:

- Sestrojeny růstové křivky bakterie *E. coli* (CCM 3954) při teplotách 30 a 8 °C v kontrolním vzorku bujonu a v reálných vzorcích nízkotučného mléka a vepřové pomazánky. Pro sledování exprese genů byly vybrány časy:
 - 0. hodina (počátek experimentu),
 - 3. hodina (lag fáze),
 - 8. hodina (logaritmická fáze)
 - 29. hodina (fáze odumírání).
- Optimalizovány metody izolace RNA z reálných vzorků nízkotučného mléka a vepřové pomazánky za použití izolačního kitu firmy Roche – High Pure RNA Isolation Kit s modifikací filtrace vzorku přes gázu, centrifugace při 4 °C a v případě izolace RNA ze vzorku vepřové pomazánky také s přidavkem směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1).
- Ověřena funkčnost primerů a účinnost reakce (real time-PCR) pro jednotlivé geny v testovaných reálných vzorcích, přičemž efektivita reakcí u všech tří testovaných genů se pohybovala v požadovaném rozmezí od 90 do 110 %.

Ze získaných výsledků lze konstatovat následující:

- V kontrolním vzorku bujonu s přidavkem aminokyselin argininu a ornithinu došlo při snížení teploty kultivace k poklesu exprese sledovaných genů *adiA* (o 67 %) a *speF* (o 76 %) u *E. coli*, zatímco při poklesu hodnoty pH k nárůstu genové exprese (v případě genu *adiA* o 27 % a v případě genu *speF* o 25 %).
- V reálném vzorku vepřové pomazánky došlo v případě snížení kultivační teploty k nárůstu genové exprese sledovaných genů *adiA* (o 24 %) a *speF* (o 40 %).

Také při poklesu hodnoty pH následoval nárůst hodnot exprese obou sledovaných genů. Nárůst exprese byl významný, exprese obou genů se ~ 5x zvýšila.

- Z časových důvodů nebylo možné zopakovat pokus sledování vlivu změny teploty a pH na genovou expresi v reálném vzorku nízkotučného mléka, jehož dosavadní neúspěšný průběh byl způsoben nejspíše zprvu nefunkčností použitých primerů a následně degradací přeepsané cDNA způsobené podmínkami uchovávání.

Závěrem lze konstatovat, že sledované geny *adiA* a *speF* jsou geny inducibilní. Tyto závěry potvrzují výsledky experimentů, při nichž byla *E. coli* kultivována jak v bujónu s přídavkem aminokyselin, tak v reálných vzorcích potravin (nízkotučném mléce a vepřové pomazánce /paštice/).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O., HYNEK, R.: *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2015. 416 s. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [2] MCMURRY, J.: *Organická chemie*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2015. 1178 s. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [3] ČERVINKA, O., DĚDEK, V., FERLES, M.: *Organická chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1970. 1072 s.
- [4] VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 2002. 186, 134, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [5] Anatomy and Physiology, Connexions Web site, OpenStax College, 2013 [cit. 21. 2. 2017] Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/228_Nucleotides-01.jpg
- [6] REECE, J., B. et al.: *The Molecular Basis of Inheritance* (chapter 16). Pearson Education, Inc. 2011. [cit. 22. 2. 2017]
Dostupné z: <https://www.slideshare.net/veneethmathew/16-lecture-dna>
- [7] IPSEY, J.: *Úvod do studia biologie*. Ústí nad Labem: 2005.
- [8] CAMPBELL, N., REECE, J., B.: *Biologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2006. 1332 s. ISBN 80-251-1178-4.
- [9] PARKER, N., SCHNEEGURT, M. et al.: *Microbiology: Biochemistry of the Genome – Structure and function of RNA* [online]. OpenStax Microbiology. [cit. 22. 2. 2017] Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/structure-and-function-of-rna/>
- [10] JOHNSON, D., A.: *Cell and Molecular Biology: RNA Synthesis (Transcription) and RNA Processing* [online]. Department of Biological and Environmental Sciences, Samford University, 2017. [cit. 21. 2. 2017] Dostupné z: <http://faculty.samford.edu/~djohnso2/44962w/405/08/f8-04-1.jpg>
- [11] JÁCHYM: *Metody molekulární biologie*. 2012.

- [12] RACLAVSKÝ, V.: *Úvod do základních metod molekulární genetiky*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 1999. 43 s. ISBN 80-7067-892-5.
- [13] ČAPKOVÁ FRYDRYCHOVÁ, R. et al.: *Ekotech: Kurz základních metod molekulární biologie*.
- [14] DRATVOVÁ, Lenka. *Metody izolace a archivace DNA z živočišných tkání*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015, 48 s. Agronomická fakulta, Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat. Vedoucí práce: Knoll, Aleš.
- [15] BUSTIN, S., A., BENES, V., NOLAN, T. et al.: *Quantitative real-time RT-PCR – a perspective*. J. Clin. Endocrinol. **34**, 597-601 (2005).
- [16] HOSSAIN, I., LEVY, C.: *Investigating KNOX Gene Expression in Aquilegia Petal Spur Development*. Journal of Emerging Investigators **2**, 1-6 (2014).
- [17] Bioline: *Random Hexamer Primers – BIO-38028 (United Kingdom)*. [cit. 2. 5. 2017] Dostupné z: http://www.bioline.com/us/downloads/dl/file/id/2740/random_hexamer_primers_product_manual.pdf
- [18] Roche Diagnostic GmbH: *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*. (Mannheim, Germany) 2006.
- [19] ENGLIŠ, M., PRŮŠA, R.: *ROCHE diagnostics: na okraji výročí PCR*. Labor Aktuell **3**, 13-14 (2003). ISSN 1211-5665.
- [20] ŠMARDA, J. et al.: *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [21] *PCR Cycling Parameters – Six Key Considerations for Success* [online]. ThermoFisher Scientific. [cit. 18. 2. 2017] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>
- [22] MURRAY, R., K., GRANNER, D., K., MAYES P., A., RODWELL, V., W.: *Harperova Biochemie*. 4.vyd. Nakladatelství a vydavatelství H & H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [23] HUNT, M.: *Real Time-PCR* [online]. 2010. [cit. 19. 11. 2016] Dostupné z: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>

- [24] SMITH, C., J., OSBORN, A., M.: *Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology*. FEMS Microbiol Ecol **67**, 6-20 (2009).
- [25] PAVLÍK, E. et al.: *Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku*. 1. LF UK Praha: 2004. ISSN 1211-5665.
- [26] Quantitative PCR and Digital PCR Detection Methods. Sigma Aldrich. [cit. 23. 1. 2017] Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr-and-digital-pcr-detection-methods.html>
- [27] NAVARRO, E., SERRANO-HERAS, G., CASTAÑO, M., J. et al.: *Real-time PCR detection chemistry*. Clin. Chim. Acta **439**, 231-250 (2015).
- [28] BROWN, T. et al.: *Sequencing, Forensic Analysis and Genetic Analysis* [online]. ATDBio Ltd. School of Chemistry, University of Southampton, United Kingdom (2017). [cit. 30.1.2017] Dostupné z: <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>
- [29] SAFDAR, A., SHER, A.: *Differential Gene Expression and Its Possible Therapeutic Implications, Gene Therapy*. Developments and Future Perspectives, Prof. Chunsheng Kang (Ed.), ISBN 978-953-307-617-1. [cit. 22. 5. 2017] Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/gene-therapy-developments-and-future-perspectives/differential-gene-expression-and-its-possible-therapeutic-implications>
- [30] *Hydrolysis probes* [online]. BioGene House, Harvard Way Kimbolton, United Kingdom. [cit. 21. 2. 2017] Dostupné z: <http://www.biogene.com/ApplicationNotes/Amplification/Methodology/Chemistries.htm>
- [31] Centre for Genomic Science, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong. 2017 [cit. 2. 5. 2017] Dostupné z: http://cgs.hku.hk/portal/files/CGS/Genomics/Realtime-PCR/faq_q14a.png
- [32] BERÁNEK, M.: *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2016, 193 s., ISBN 978-80-246-3224-7.
- [33] WONG, M., L., MEDRANO, J., F.: *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques **39**, 75-85 (2005).
- [34] ARYA, M., SHERGILL, I., S., WILLIAMSON, M. et al.: *Basic principles of real-time quantitative PCR (Review)*. Expert Rev. Mol. Diagn. **5**, 209-218 (2005).

- [35] WHELAN, J., A., RUSSELL, N., B., WHELAN, M.,A.: *A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR*. J. Immunol. Methods **278**, 261-269 (2003).
- [36] ROWBURRY, R.,J.: *A Review: Regulatory components, including integration host factor, CysB and H-NS, that influence pH responses in Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology (J. Appl Microbiol.) **24**, 319-328 (1997).
- [37] PFFAFL, M., W.: *Quantification strategies in real-time PCR*. AZ of quantitative PCR **1**, 89-113 (2004).
- [38] PRADA, J., CASTELLANOS, J.: *Real time PCR. Application in dengue studies*. Colombia Medica **42**, 243-258 (2013).
- [39] MALÝ, J.: *Molekulární a buněčná biologie*. Ústí nad Labem: 2006.
- [40] SUZZI, G., GARDINI, F.: *Biogenic amines in dry fermented sausages: a review*. Int. J. Food Microbiol. **88**, 41-54 (2003).
- [41] BUŇKOVÁ, L., ADAMCOVÁ, G., HUDCOVÁ, K., et al.: *Monitoring of biogenic amines in cheese manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic*. Food Chem. **141**, 548-551 (2013).
- [42] WUNDERLICHOVÁ, L., BUŇKOVÁ, L., KOUTNÝ, M. et al.: *The possibilities of detection of putrescine production in gram-negative bacteria – a kick-off study*. J. of Microb. Biotech. Food Sci. **1**, 848-854 (2012).
- [43] DEL RIO, B., LINARES, D., LADERO, V. et al.: *Putrescine biosynthesis in Lactococcus lactis is transcriptionally activated at acidic pH and counteracts acidification of the cytosol*. Int. J. Food Microbiol. **236**, 83-89 (2016).
- [44] ALVAREZ, M.,A., MORENO-ARRIBAS, M.,V.: *The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution*. Trends Food Sci. Tech. **39**, 146-155 (2014).
- [45] LANDETE, J., M., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A. et al.: *PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine*. Annals of Microbil **61**, 159-166 (2011).

- [46] WUNDERLICHOVÁ, L., BUŇKOVÁ, L., KOUTNÝ, M. et al.: *Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products*. Food Microbiol. **34**, 268-276 (2013).
- [47] WUNDERLICHOVÁ, L.: *Vývoj nových molekulárně biologických metod detekce putrescín produkuujících bakterií*. Disertační práce, 2009. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 123 s. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce: Buňka, F.
- [48] STIM-HERNDON, K., P., FLORES, T., M., BENNET, G., N.: *Molecular characterization of *adiY*, a regulatory gene which affects expression of the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase gene (*adiA*) of *Escherichia coli**. Microbiology **142**, 1311-1320 (1996).
- [49] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J.: *Effect of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. Bacteria in model conditions*. J. Food Nutr. Res. **45**, 21-29 (2006).
- [50] LOIZZO, M., R., MENICHINI, F., PICCI, N. et al.: *Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese*. Trends food Sci. Tech. **30**, 38-55 (2013).
- [51] DEL RIO, B., LINARES, D., LADERO, V. et al.: *Putrescine biosynthesis in *Lactococcus lactis* is transcriptionally activated at acidic pH and counteracts acidification of the cytosol*. Int. J. Food Microbiol. **236**, 83-89 (2016).
- [52] DE FILIPPIS, F., PENNACCHIA, C., DI PASQUA, R. et al.: *Decarboxylase gene expression and kadaverine and putrescine production by *Serratia proteamaculans* in vitro and in beef*. Int. J. Food Microbiol. **165**, 332-338 (2013).
- [53] WUNDERLICHOVÁ, L., BUŇKOVÁ, L., KOUTNÝ, M., JANČOVÁ, P. et al.: *Formation, Degradation and Detoxification of Putrescine by Foodborne Bacteria: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. **13**, 1012-1025 (2014).
- [54] MARŠÁLKOVÁ, K.: *Využití metody Real Time-PCR v detekci genů pro dekarboxylační enzymy u vybraných bakterií*. Diplomová práce, 2014. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 85 s. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce: Jančová, P.

- [55] SCHILLING, A., T.: *The Effect of pH on the Bacterium E. coli*. California State Science Fair (2008). [cit. 2. 5. 2017] Dostupné z: <http://cssf.usc.edu/History/2008/Projects/J1429.pdf>
- [56] DIPPEL, R., BOOS, W.: *The Maltodextrin System of Escherichia coli: Metabolism and Transport*. J. Bacteriol. **187**, 8322-8331 (2005).
- [57] Thermo SCIENTIFIC: *Technical Bulletin T009 NanoDrop 1000&8000: 260/280 and 260/230 Ratios*. Wilmington, Delaware USA.
- [58] MARŠÁLKOVÁ, K., PUREVDORJ, K., JANČOVÁ, P., PIŠTĚKOVÁ, H., BUŇKOVÁ, L.: *Quantitative Real-Time PCR Detection of Putrescine-Producing Gram-Negative Bacteria*. Odesláno k recentnímu řízení (doi: <https://dx.doi.org/10.5219/XXX>).
- [59] MÁLKOVÁ, V.: *Identifikace a kvantifikace genů zodpovědných za produkci biogenních aminů u vybraných bakterií*. Diplomová práce, 2017, v tisku. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 85 s. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce: Jančová, P.
- [60] Roche Diagnostic GmbH: *FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)*. (Mannheim, Germany) 2016.
- [61] THAUER, R., K., JUNGERMANN, K., DECKER, K.: *Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria*. Bacteriological Reviews **41**, 100-180 (1977).
- [62] ZAMBRANO-BURBANO, G., L., ERASO-CABRERA, Y., M., SOLARTE-PORTILLA, C., E. et al.: *Relationship Between Kappa Casein Genes (CSN3) and Industrial Yield in Holstein Cows in Nariño-Colombia* [online]. Milk Protein; Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Dr. Walter Hurley (Ed.), InTech. 2012. [cit. 2. 5. 2017] Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/howtoreference/milk-protein/relationship-between-kappa-casein-genes-csn3-and-industrial-yield-in-holstein-cows-in-nari-o-colombi>
- [63] DOLEŽAL, M.: *Výskyt, složení a změny bílkovin v potravinách živočišného a rostlinného původu* [online]. Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2014. [cit. 2. 5. 2017] Dostupné z: https://web.vscht.cz/~dolezala/CHPC/5%20B%C3%ADlkoviny_cvi%C4%8Den%C3%AD.pdf

- [64] *Kasein* [online]. Informační centrum bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství ČR, 2017. [cit. 2. 5. 2017] Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92329.aspx>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------------|--|
| A | adenin |
| ADC | arginindekarboxylasa |
| <i>adiA</i> | gen kódující arginindekarboxylasu (biodegradativní) |
| <i>aguA</i> | gen kódující agmatindeiminasu |
| <i>aguB</i> | gen kódující <i>N</i> -karbamoylputrescinamidohydrolasu |
| BA | biogenní aminy |
| bp | páry bází |
| C | cytosin |
| CCM | Česká sbírka mikroorganismů (Czech collection of microorganisms) |
| cDNA | jednořetězcová (komplementární) DNA |
| Ct | cyklus, v němž hodnota fluorescence stoupá nad prahovou hodnotu pozadí |
| ctDNA | chloroplastová DNA |
| dATP | deoxyadenosintrifosfát |
| dGTP | deoxyguanosintrifosfát |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty |
| dsDNA | dvouřetězcová DNA |
| dTTP | deoxythymidintrifosfát |
| E | efektivita (účinnost) |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| F:CH:I | fenol:chloroform:izoamylalkohol |
| FRET | fluorescenční rezonanční přenos energie |
| G | guanin |
| GADPH | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa |

| | |
|----------------|---|
| k | směrnice přímky |
| mitDNA | mitochondriální DNA |
| mRNA | mediátorová RNA |
| ODC | ornithindekarboxylasa |
| PCA | Plate Count Agar |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| qPCR | kvantitativní PCR |
| R | exprese |
| RFLP | polymorfismus délky restrikčních fragmentů |
| Rn | množství fluorescenčního záření |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| rRNA | ribosomální RNA |
| RT-PCR | PCR spojená s reverzní transkripcí |
| S | Svedberg neboli Svedbergova jednotka sedimentačního koeficientu |
| <i>speA</i> | gen kódující arginindekarboxylasu |
| <i>speB</i> | gen kódující agmatindekarboxylasu |
| <i>speC</i> | gen kódující ornithindekarboxylasu (biosyntetický) |
| <i>speF</i> | gen kódující ornithindekarboxylasu (biodegradační) |
| ssDNA | jednovláknová DNA |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-acetát-EDTA pufr |
| TAMRA | tetramethyl-6-karboxyrhodamin |
| T _m | teplota tání |
| tRNA | transferová RNA |
| U | uracil |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| <i>Obrázek 1: Struktura nukleových kyselin. [5]</i> | 14 |
| <i>Obrázek 2: Schéma struktury molekuly DNA.[6]</i> | 15 |
| <i>Obrázek 3: Struktura mRNA a tRNA. [9]</i> | 17 |
| <i>Obrázek 4: Ribozomální RNA. [10]</i> | 18 |
| <i>Obrázek 5: Mechanismus interakce DNA s oxidem křemičitým. [14]</i> | 20 |
| <i>Obrázek 6: Schéma reverzní transkripce. [16]</i> | 21 |
| <i>Obrázek 7: Schématické znázornění průběhu PCR. [21]</i> | 24 |
| <i>Obrázek 8: Znázornění interkalace nespecifických barviv do dvoušroubovice DNA v jednotlivých krocích PCR. [26]</i> | 27 |
| <i>Obrázek 9: Struktura SYBR Green I a jeho fluorescence po vazbě na DNA. [28, 29]</i> | 28 |
| <i>Obrázek 10: Schéma principu fungování sondy TaqMan. [30]</i> | 28 |
| <i>Obrázek 11: Model sondy na principu FRET. [26]</i> | 29 |
| <i>Obrázek 12: Model molekulárního majáku. [26]</i> | 30 |
| <i>Obrázek 13: Model sondy Scorpions – Uni-probes. [26]</i> | 30 |
| <i>Obrázek 14: Model sondy Scorpions – Bi-probes. [26]</i> | 31 |
| <i>Obrázek 15: Amplifikační křivka. [31]</i> | 32 |
| <i>Obrázek 16: Křivka tání produktu PCR jako kontrola specifičnosti reakce. [38]</i> | 35 |
| <i>Obrázek 17: Vznik putrescinu dekarboxylasovou aktivitou gram pozitivních bakterií. [46]</i> | 38 |
| <i>Obrázek 18: Vznik putrescinu dekarboxylasovou aktivitou gram negativních bakterií. [47]</i> | 39 |
| <i>Obrázek 19: Růstová křivka bakterie Escherichia coli v jednotlivých médiích při 30 °C.</i> | 54 |
| <i>Obrázek 20: Růstová křivka bakterie Escherichia coli v paštice při 30 °C.</i> | 55 |
| <i>Obrázek 21: Růstová křivka bakterie Escherichia coli v jednotlivých médiích při 8 °C.</i> | 56 |
| <i>Obrázek 22: Zkouška funkčnosti primerů</i> | 64 |
| <i>Obrázek 23: Závislost Ct na množství cDNA (bujon s přidavkem aminokyselin).</i> | 67 |
| <i>Obrázek 24: Závislost exprese sledovaných genů na čase v kontrolním vzorku bujonu s přidavkem volných aminokyselin.</i> | 68 |
| <i>Obrázek 25: Druhá derivace křivky tání pro jednotlivá ředění při změně teploty u vzorku bujonu</i> | 69 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Obrázek 26: Závislost exprese sledovaných genů adiA (A) a speF (B) na čase v kontrolním vzorku bujonu s přidavkem volných aminokyselin při změně teploty.</i> | <i>71</i> |
| <i>Obrázek 27: Závislost exprese sledovaných genů adiA (A) a speF (B) na čase v kontrolním vzorku bujonu s přidavkem volných aminokyselin při změně pH.</i> | <i>72</i> |
| <i>Obrázek 28: Závislost Ct na množství cDNA (nízkotučné mléko).</i> | <i>73</i> |
| <i>Obrázek 29: Závislost exprese sledovaných genů na čase u kontrolního vzorku nízkotučného mléka.</i> | <i>74</i> |
| <i>Obrázek 30: Druhá derivace křivky tání pro jednotlivá ředění při změně pH u vzorku nízkotučného mléka.</i> | <i>75</i> |
| <i>Obrázek 31: Závislost Ct na množství cDNA (vepřová pomazánka).</i> | <i>76</i> |
| <i>Obrázek 32: Závislost exprese sledovaných genů na čase (vepřová pomazánka).</i> | <i>78</i> |
| <i>Obrázek 33: Druhá derivace křivky tání pro jednotlivá ředění při změně teploty (vepřové pomazánka /paštika/).</i> | <i>79</i> |
| <i>Obrázek 34: Závislost exprese sledovaných genů adiA (A) a speF (B) na čase ve vzorku vepřové pomazánky (paštiky) při změně teploty.</i> | <i>81</i> |
| <i>Obrázek 35: Závislost exprese sledovaných genů adiA (A) a speF (B) na čase ve vzorku vepřové pomazánky (paštiky) při změně pH.</i> | <i>82</i> |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| <i>Tabulka I: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci.</i> | 50 |
| <i>Tabulka II: Složení reakční směsi klasické PCR.</i> | 51 |
| <i>Tabulka III: Podmínky klasické PCR zvolené pro zkoušku funkčnosti navržených primerů.</i> | 51 |
| <i>Tabulka IV: Složení reakční směsi real time-PCR.</i> | 52 |
| <i>Tabulka V: Podmínky reakce real time-PCR.</i> | 53 |
| <i>Tabulka VI: Množství a čistota RNA vyizolované z téhož vzorku vepřové pomazánky (paštiky) při srovnání dvou komerčních izolačních kitů.</i> | 57 |
| <i>Tabulka VII: Srovnání postupů izolace RNA z téhož vzorku vepřové pomazánky (paštiky) pomocí High Pure RNA Isolation Kit (Roche).</i> | 58 |
| <i>Tabulka VIII: Srovnání postupů izolace RNA z téhož vzorku vepřové pomazánky (paštiky) a téhož vzorku nízkotučného mléka pomocí High Pure RNA Isolation Kit (Roche).</i> | 59 |
| <i>Tabulka IX: Vlastnosti sady primerů použité pro sledování referenčního genu gapA.</i> | 61 |
| <i>Tabulka X: Vlastnosti primerů použitých pro sledování genu adiA.</i> | 62 |
| <i>Tabulka XI: Vlastnosti primerů použitých pro sledování genu speF.</i> | 63 |
| <i>Tabulka XII: Vypočtené hodnoty efektivity reakce (vzorek bujonu s přidavkem aminokyselin).</i> | 66 |
| <i>Tabulka XIII: Naměřené hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtené hodnoty efektivity reakce (v bujonu s přidavkem aminokyselin).</i> | 67 |
| <i>Tabulka XIV: Vypočtené hodnoty exprese (bujon s přidavkem aminokyselin).</i> | 68 |
| <i>Tabulka XV: Vypočtené hodnoty efektivity (bujon s přidavkem aminokyselin) při sledování regulace genové exprese.</i> | 69 |
| <i>Tabulka XVI: Procentuální vyjádření změny exprese u jednotlivých časů kultivace (vzorek bujonu s přidavkem aminokyselin) při sledování vlivu změny teploty a pH na expresi sledovaných genů (adiA a speF).</i> | 70 |
| <i>Tabulka XVII: Naměřené hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtené hodnoty efektivity reakce (nízkotučné mléko).</i> | 73 |
| <i>Tabulka XVIII: Hodnoty exprese (nízkotučné mléko).</i> | 73 |
| <i>Tabulka XIX: Vypočtené hodnoty efektivity (nízkotučné mléko) při sledování regulace genové exprese.</i> | 75 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Tabulka XX: Naměřené hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtené hodnoty efektivity reakce ve vzorcích vepřové pomazánky (paštiky).</i> | <i>77</i> |
| <i>Tabulka XXI: Hodnoty exprese (vepřová pomazánka).</i> | <i>77</i> |
| <i>Tabulka XXII: Hodnoty efektivity reakce (vepřová pomazánka) při sledování regulace genové exprese.</i> | <i>79</i> |
| <i>Tabulka XXIII: Vypočtené hodnoty exprese u jednotlivých časů kultivace (vzorek vepřové pomazánky) při sledování regulace genové exprese.</i> | <i>80</i> |

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Zkoušení funkčnosti primerů – doplňující získané hodnoty (bujon)

PŘÍLOHA P II: Sledování regulace genové exprese genů *adiA* a *speF* – doplňující získané hodnoty (bujon)

PŘÍLOHA P III: Sledování regulace genové exprese genů *adiA* a *speF* – doplňující získané hodnoty (nízkotučné mléko)

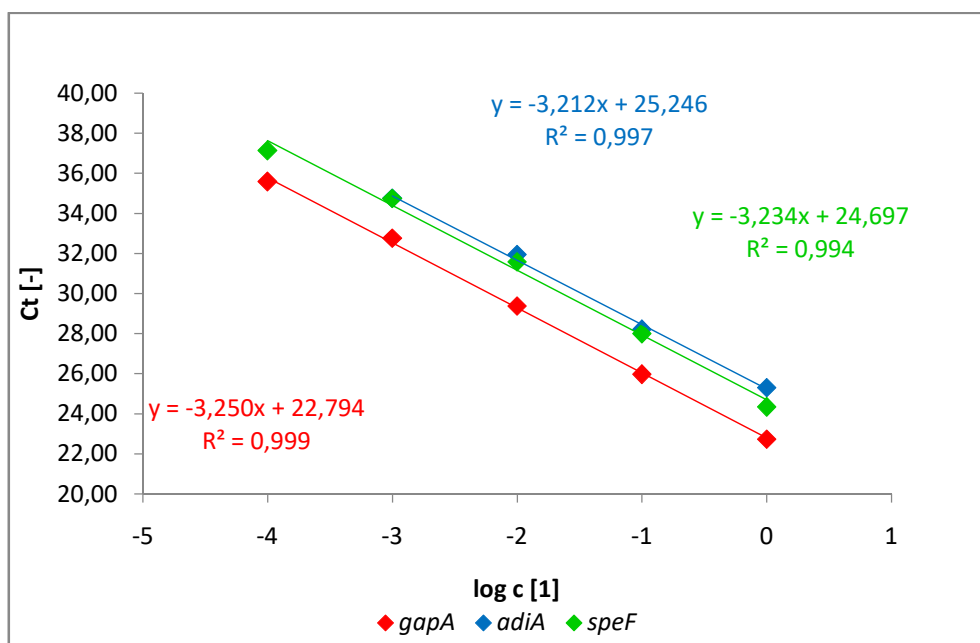
PŘÍLOHA P IV: Sledování regulace genové exprese genů *adiA* a *speF* – doplňující získané hodnoty (vepřová pomazánka)

PŘÍLOHA P I: ZKOUŠENÍ FUNKČNOSTI PRIMERŮ – DOPLŇUJÍCÍ ZÍSKANÉ HODNOTY (BUJON)

Tabulka XXIV: Naměřené hodnoty Ct pro jednotlivá ředění a vypočtené hodnoty efektivity reakce (vzorek bujonu s přidavkem aminokyselin).

| | Ct [-] | | | | | k [-] | E [-] | E [%] |
|-------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------|-------|-------|
| | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | | | |
| <i>gapA</i> | 22,74 | 25,97 | 29,39 | 2,031 | 35,59 | -3,250 | 2,031 | 103 |
| <i>adiA</i> | 25,31 | 28,21 | 31,96 | 2,048 | - | -3,211 | 2,048 | 105 |
| <i>speF</i> | 24,34 | 28,00 | 31,58 | 2,038 | 37,14 | -3,233 | 2,038 | 104 |

k – směrnice přímky; *E* – účinnost (resp. efektivita).

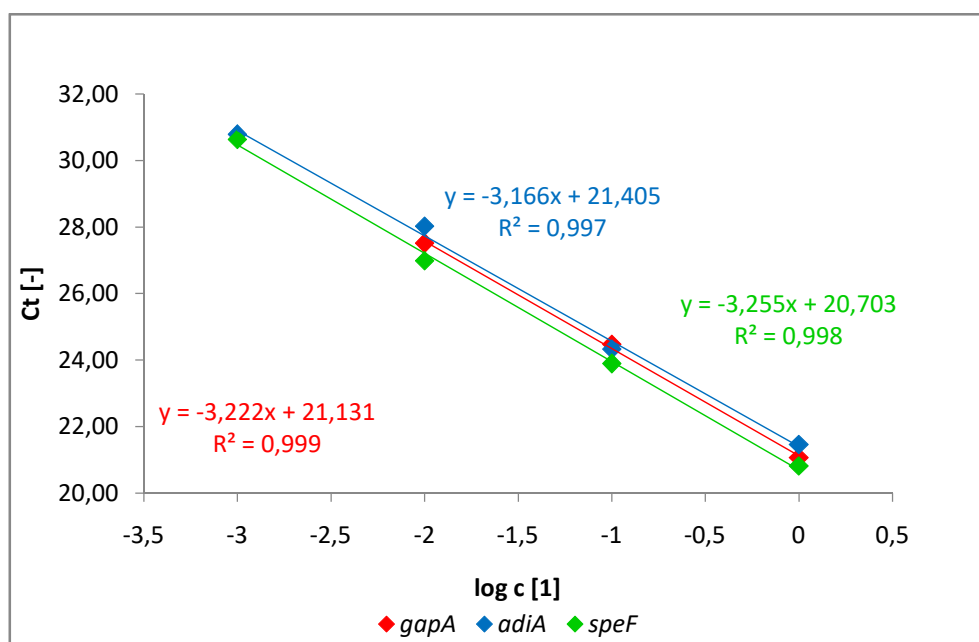


Obrázek 36: Závislost Ct na množství cDNA (bujon).

PŘÍLOHA P II: SLEDOVÁNÍ REGULACE GENOVÉ EXPRESE GENŮ *adiA* A *speF* – DOPLŇUJÍCÍ ZÍSKANÉ HODNOTY (BUJON)

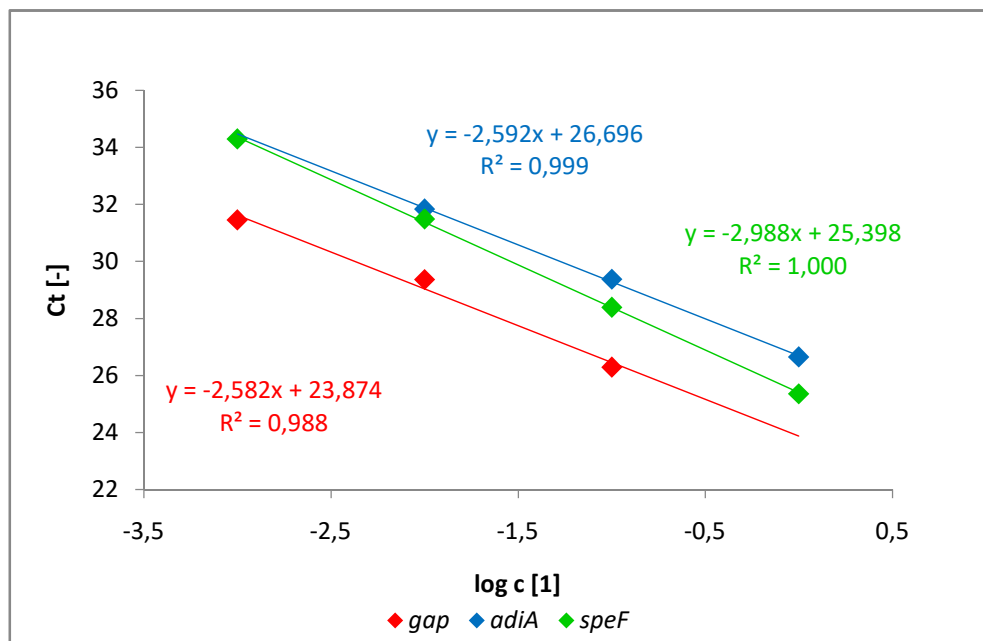
Tabulka XXV: Naměřené hodnoty Ct pro ředění 10⁻² u jednotlivých časů kultivace (vzorek bujonu) při sledování regulace genové exprese.

| | Faktor | Ct [-] | | | | |
|-------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| | | 0. hodina | 12. hodina | 14. hodina | 16. hodina | 18. hodina |
| <i>gapA</i> | změna T | 29,46 | 27,51 | 29,31 | 28,27 | 28,97 |
| <i>adiA</i> | | 31,35 | 28,03 | 29,92 | 29,48 | 30,12 |
| <i>speF</i> | | 30,64 | 26,99 | 29,12 | 28,75 | 29,31 |
| <i>gapA</i> | změna pH | 29,91 | 25,73 | 25,93 | 26,15 | 25,23 |
| <i>adiA</i> | | 31,47 | 26,30 | 26,28 | 26,39 | 25,86 |
| <i>speF</i> | | 30,36 | 25,46 | 25,34 | 25,72 | 24,86 |



Obrázek 37: Závislost Ct na množství cDNA ve vzorcích bujonu při sledování regulace genové exprese.

**PŘÍLOHA P III: SLEDOVÁNÍ REGULACE GENOVÉ EXPRESE
GENŮ *adiA* A *speF* – DOPLŇUJÍCÍ ZÍSKANÉ HODNOTY
(NÍZKOTUČNÉ MLÉKO)**

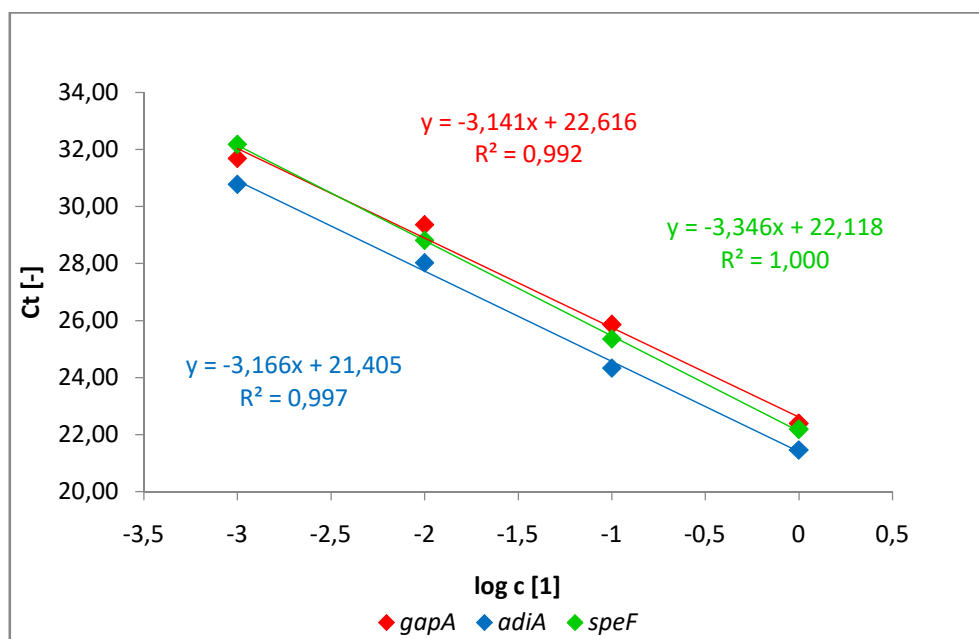


Obrázek 38: Závislost Ct na množství cDNA ve vzorcích nízkotučného mléka při sledování regulace genové exprese.

PŘÍLOHA P IV: SLEDOVÁNÍ REGULACE GENOVÉ EXPRESE GENŮ *adiA* A *speF* – DOPLŇUJÍCÍ ZÍSKANÉ HODNOTY (VEPŘOVÁ POMAZÁNKA)

Tabulka XXVI: Naměřené hodnoty Ct pro ředění 10⁻² u jednotlivých časů kultivace vzorku (vepřová pomazánka) při sledování regulace genové exprese.

| | Faktor | Ct [-] | | | | |
|-------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| | | 0. hodina | 12. hodina | 14. hodina | 16. hodina | 18. hodina |
| <i>gapA</i> | změna T | 34,93 | 29,37 | 25,62 | 27,77 | 25,27 |
| <i>adiA</i> | | 35,54 | 29,25 | 25,19 | 27,34 | 25,00 |
| <i>speF</i> | | 35,26 | 28,81 | 24,49 | 26,63 | 33,72 |
| <i>gapA</i> | změna pH | 33,89 | 28,63 | 27,09 | 30,35 | 25,81 |
| <i>adiA</i> | | 33,54 | 30,72 | 26,91 | 29,85 | 26,68 |
| <i>speF</i> | | 33,72 | 30,13 | 26,21 | 29,33 | 25,73 |



Obrázek 39: Závislost Ct na množství cDNA ve vzorcích vepřové pomazánky při sledování regulace genové exprese.