

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

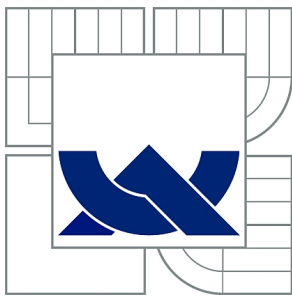
IZOLACE DNA A IDENTIFIKACE NEPATOGENNÍCH DRUHŮ
KLOSTRIDIÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

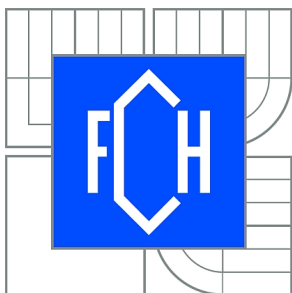
Bc. ZBYNĚK SEDLÁČEK

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOLACE DNA A IDENTIFIKACE NEPATOGENNÍCH DRUHŮ KLOSTRIDIÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

DNA ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NONPATHOGENIC SPECIES OF CLOSTRIDIA
ISOLATED FROM CHEESES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ZBYNĚK SEDLÁČEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0603/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Zbyněk Sedláček	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	

Název diplomové práce:

Izolace DNA a identifikace nepatogenních druhů klostridií izolovaných ze sýrů

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Zbyněk Sedláček
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V potravinářství jsou požadovány rychlé a přesné metody identifikace bakterií při mikrobiologickém testování produktů. Molekulárně diagnostické metody jsou založené na izolaci DNA z bakteriálních buněk, která je amplifikována v polymerázové řetězové reakci (PCR). Výsledkem je fragment DNA o specifické velikosti, charakteristický pro rod nebo druh bakterie. Cílem práce bylo izolovat bakteriální DNA v kvalitě vhodné pro použití v PCR. DNA byla izolována z 8 kmenů bakterií rodu *Clostridium*. Byl optimalizován postup lyze buněk s cílem nalézt optimální koncentraci EDTA a proteinázy K v lyzačním pufru. DNA byla izolována fenolovou extrakcí a pomocí magnetických částic. Pro izolaci DNA pomocí fenolové extrakce byly zjištěny jako nejvhodnější koncentrace pro lyzi buněk 10 mM EDTA a 10 µl proteinázy K (100 µg/ml). Pro izolaci DNA pomocí magnetických částic byly zjištěny jako nejvhodnější koncentrace pro lyzi buněk 10 mM EDTA a 15 µl proteinázy K (100 µg/ml). Izolovaná DNA byla detegována gelovou elektroforézou, kvantifikována spektrofotometricky a testována v PCR. Jednotlivé druhy byly rozlišeny pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE).

KLÍČOVÁ SLOVA *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum*, izolace DNA, PCR, DGGE

ABSTRACT

In the food industry speedy and accurate methods are requested for identification of bacteria in microbiological testing of products. Molecular diagnostic methods are based on isolation of DNA from bacterial cells which is amplified in polymerase chain reaction (PCR). The result is a DNA fragment of a specific size, characteristic for the genus or species of bacteria. The aim of the work was to isolate PCR-ready DNA. DNA has been isolated from 8 strains of genus *Clostridium*. The procedure of cell lysis was optimized in order to find the optimal concentration of EDTA and proteinase K in the lysing buffer. DNA was isolated by phenol extraction and using magnetic microspheres. Concentrations 10 mM of EDTA and 10 µl of the proteinase K (100 µg/ml) were the most suitable for the cell lysis to isolate DNA by phenol extraction. For the isolation of DNA by magnetic microspheres concentrations 10 mM of EDTA and 15 µl of the proteinase K (100 µg/ml) were the best for cell lysis. The isolated DNA was checked using a gel electrophoresis, quantificated by a spectrophotometry and tested in a PCR. Particular species were distinguished in a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

KEY WORDS *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum*, DNA isolation, PCR, DGGE

SEDLÁČEK, Z. *Izolace DNA a identifikace nepatogenních druhů klostridií izolovaných ze sýrů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 60 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych upřímně poděkoval vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. a paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za ochotu, pozitivní přístup, odborné vedení a cenné rady. Dále děkuji Ing. Barboře Gregušové a Mgr. Kristýně Turkové za jejich čas, vstřícnost a užitečné rady během praktické části v laboratoři. Poděkování patří mé rodině za podporu při studiu.

Práce byla podporována grantem 2B08070 Ministerstva školství, tělovýchovy a mládeže ČR.

OBSAH

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1. Význam bakterií v potravinářství	8
2.2. Zástupci rodu <i>Clostridium</i> významní v potravinářském průmyslu	8
2.3. Duření sýrů	8
2.4. Rod <i>Clostridium</i>	9
2.4.1. Taxonomie	10
2.4.2. Výskyt	10
2.4.3. Metabolismus	10
2.5. Využití klostridií v průmyslu, energetice a při využití odpadů	11
2.5.1. Druhy produkující vodík	12
2.5.2. Směsné kultury	12
2.5.3. Hydrogenázy	13
2.6. Izolace DNA a identifikace buněk	13
2.6.1. Lyze buněk	14
2.6.2. Izolace DNA pomocí fenolové extrakce	14
2.6.3. Izolace DNA s využitím magnetických částic	15
2.6.3.1. Magnetické polymerní částice P(HEMA-co-GMA)	15
2.6.4. Polymerázová řetězová reakce	16
2.6.5. Inhibitory PCR	17
2.6.6. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	17
3. Cíl Práce	19
4. Experimentální část	20
4.1. Materiál	20
4.1.1. Bakteriální kultura	20
4.1.2. Chemikálie	20
4.1.3. Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA	21
4.1.4. Roztoky pro gelovou elektroforézu	22
4.1.5. Komponenty pro PCR	22
4.1.6. Roztoky pro DGGE	22
4.1.7. Kultivační médium	23
4.1.8. Přístroje	23
4.2. Metody	24
4.2.1. Kultivace buněk	24
4.2.2. Měření absorbance buněk	24
4.2.3. Izolace bakteriální DNA	25
4.2.3.1. Lyze bakteriálních buněk	25
4.2.3.2. Fenolová extrakce DNA	25
4.2.3.3. Srážení DNA	25
4.2.4. Izolace DNA za využití magnetických nosičů	25
4.2.5. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	26
4.2.6. Gelová elektroforéza DNA	26
4.2.7. Polymerázová řetězová reakce	26
4.2.7.1. Složení směsi pro PCR	26

4.2.7.2.	Primery	27
4.2.7.3.	Amplifikační program	28
4.2.8.	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	28
5.	výsledky	30
5.1.	Kultivace bakterií rodu <i>Clostridium</i>	30
5.2.	Vliv koncentrace EDTA v lyzačním roztoku na kvalitu a množství DNA	30
5.2.1.	Kultivace buněk a měření optické hustoty	30
5.2.2.	Izolace DNA metodou fenolové extrakce	31
5.2.3.	Grafické vyhodnocení vlivu EDTA v lyzačním pufru na izolaci množství DNA metodou fenolové extrakce u 8 kmenů klostridií	33
5.2.3.1.	Shrnutí - vliv množství EDTA v lyzačním pufru na kvalitu a množství izolované DNA metodou fenolové extrakce	35
5.2.4.	Izolace DNA pomocí magnetických nosičů	35
5.2.5.	Grafické vyhodnocení vlivu EDTA v lyzačním pufru na izolaci DNA pomocí magnetických nosičů u 8 kmenů klostridií	37
5.2.5.1.	Shrnutí - vliv množství EDTA v lyzačním pufru na kvalitu a množství izolované DNA pomocí magnetických částic	39
5.3.	Vliv množství proteinázy K v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA	39
5.3.1.	Kultivace buněk a měření A_{600nm}	39
5.3.2.	Izolace DNA metodou fenolové extrakce	39
5.3.3.	Grafické vyhodnocení vlivu množství proteinázy K na izolaci DNA z různých kmenů klostridií	42
5.3.3.1.	Shrnutí - vliv množství proteinázy K v lyzačním pufru na kvalitu a množství izolované DNA metodou fenolové extrakce	44
5.3.4.	Izolace DNA pomocí magnetických nosičů	44
5.3.5.	Grafické vyhodnocení vlivu množství proteinázy K v lyzačním pufru na izolaci DNA pomocí magnetických nosičů u 8 kmenů klostridií	46
5.3.5.1.	Shrnutí - vliv množství EDTA v lyzačním pufru na kvalitu a množství izolované DNA pomocí magnetických částic	48
5.4.	PCR s univerzálními primery pro doménu <i>Bacteria</i>	48
5.5.	Rodově specifická PCR pro rod <i>Clostridium</i>	49
5.6.	PCR s primery pro denaturační gradientovou elektroforézu	50
5.7.	Denaturační gradientová elektroforéza	51
6.	Diskuze	53
6.1.	Kultivace bakterií rodu <i>Clostridium</i>	53
6.2.	Vliv koncentrace EDTA v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA	53
6.3.	Vliv množství proteinázy K v lyzačním roztoku na kvalitu a koncentraci izolované DNA	54
6.4.	PCR s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i> a rod <i>Clostridium</i>	55
6.5.	PCR pro denaturační gelovou elektroforézu	55
6.6.	Denaturační gradientová elektroforéza	55
7.	Závěr	56
8.	Literatura	57
9.	Přílohy	60

1. ÚVOD

Bakterie jsou nepostradatelnou součástí přírody a vyskytují se všude kolem nás. Mnoho druhů bakterií je obsaženo v potravinách, kde jim základní složky potravin poskytují zdroj energie pro růst a rozmnožování. Některé bakterie v potravinách mají prospěšnou funkci a podílí se na sensorických vlastnostech a trvanlivosti potravin. Těchto vlastností se využívá při výrobě. V opačném případě za určitých podmínek bakterie rozkládají matici potravin a jsou indikátory hnilobných procesů vedoucích k úplnému rozkladu potravin. Při rozkladných procesech dochází ke vzniku nežádoucích metabolitů, ale i toxinů, které mohou mít významný vliv na lidské zdraví.

Moderní molekulárně diagnostické metody používají pro stanovení bakterií jejich DNA. Principem je izolace molekuly DNA z bakterií přítomných v potravine a její následná analýza. Nejběžněji používanou metodou založenou na amplifikaci bakteriální DNA je polymerázová řetězová reakce (PCR). Pomocí uvedené metody lze rychle a velmi přesně identifikovat bakterie v potravinové matici.

S rozvojem biotechnologií dochází k hledání technologicky zajímavých druhů bakterií, použitelných na výrobu nejrůznějších produktů. Při výrobě sýrů polotvrdého typu (ementál, gouda, eidam, madeland) byl sledován vznik vady nazývané pozdní duření sýrů. Z těchto vadných sýrů byly izolovány bakterie schopné vysoké produkce plynů, jejichž hlavní složkou je vodík a oxid uhličitý. Ke vzniku vady dochází při nedodržení správných technologických postupů. Vadu způsobují bakterie rodu *Clostridium*, především druh *C. tyrobutyricum*. Pomocí molekulárně diagnostických metod lze identifikovat i další druhy *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. pasteurianum*, *C. tetanomorphum* atd. Tyto bakterie schopné rozkladu velkého množství substrátů a produkce vodíku jsou z průmyslového hlediska velmi zajímavé. Produkují mnoho využitelných metabolitů. Jedná se především o kyselinu máselnou, aceton a butanol.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Význam bakterií v potravinářství

Bakterie se komerčně používají v potravinářském průmyslu především z důvodu tvorby chuti, vůně a ke konzervaci potravin v procesech zrání. Mnohé produkty metabolismu bakterií patří mezi sensoricky aktivní látky, které jsou nepostradatelné pro chuť a aroma určitých typů potravin. Bakterie se v potravinách vyskytují jak na povrchu, tak i rozptýlené v textuře potravin, vytvářejí směsné kultury vzájemně napomáhající k lepší adaptaci na vnější podmínky prostředí.

Metabolity jsou získávány v procesu nazývaném fermentace. Fermentace se rozlišují podle typu produktů, přítomnosti kyslíku, typu akceptorů, donorů elektronu a dalších faktorů.

Důležitou podmínkou uvedených procesů je zajištění takových technologických postupů, které brání v rozvoji kontaminující mikroflóry. Kontaminující mikroflóra má za následek vznik nepříznivých metabolitů a ovlivňuje nežádoucím způsobem kvalitu potravin. Z hlediska spotřebitele je nejdůležitější mikrobiologická kvalita, která často souvisí se sensorickou kvalitou¹.

2.2. Zástupci rodu *Clostridium* významní v potravinářském průmyslu

V potravinářství patří rod *Clostridium* mezi významné rody a indikátory nedostatečného ošetření potravin. Tvoří odolné spory, které přežívají například při pasteraci mléka, a mohou tak způsobovat vady v mléčných výrobcích. Jedná se především o druh *Clostridium tyrobutyricum*. Některé druhy jsou psychrofilní a schopné růst při teplotách $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z potravinářského hlediska nepřipustná je tvorba toxinů, které jsou produkovány patogenními druhy *Clostridium botulinum* a *Clostridium perfringens*. Tyto toxiny jsou bílkovinné povahy a jejich vznik je příčinou špatné tepelné úpravy potravin. Botulotoxin produkováný *Clostridium botulinum* patří vůbec k nejučinnějším známým toxinům a je nazýván klobásový jed, 1 mg toxinu dokáže usmrtit až 16 000 lidí. Největší nebezpečí představují syrová jídla anebo teplá jídla, která byla opakovaně ohřívána².

Zdravotní nezávadnost a jakost potravin a krmiv je hlavním cílem hygieny potravin, a proto se při výrobě krmiv a potravin musí nastavovat podmínky zabraňující rozmnožení nežádoucích mikroorganismů, jako je rod *Clostridium*.

2.3. Duření sýrů

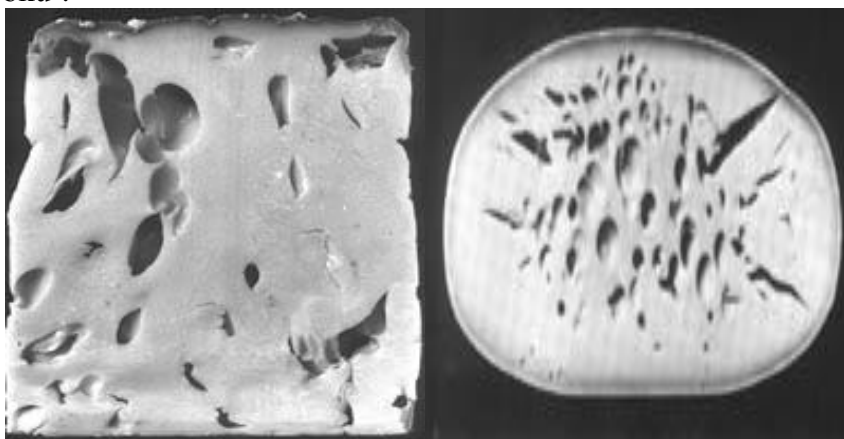
Sýr je mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčných bílkovin z mléka za působení syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením syrovátky. Sýry dělíme na přírodní a tavené sýry, podle obsahu tuku v sušině, konzistence (měkké a tvrdé sýry), sýry zrající a nezrající, s plísní na povrchu atd.

Kvalita sýrů je ovlivňována celou řadou faktorů. Mezi hlavní faktory patří jakost vstupní suroviny mléka, dále dodržení technologických podmínek výroby, správné prokysání, solení, zrání, skladování, kontaminace výrobních prostor a mnoho dalších aspektů.

Některé druhy bakterií způsobují tzv. duření sýrů (Obrázek 1). Duření je vada způsobená kontaminací sýru plynotvornými bakteriemi¹. Duření sýrů lze rozdělit na časně a pozdní. Časně duření sýrů způsobují aerobními bakterie *Enterobacter* a *Escherichia*. Fermentují laktosu za vzniku kyseliny mléčné, oxidu uhličitého a vodíku. Jedná se o koliformní bakterie působící jako indikátory kontaminace technologických zařízení a nářadí. Příčinou pozdního

duření sýrů jsou anaerobní bakterie rodu *Clostridium*². Tyto bakterie tvoří odolné spory, které často přežívají pasterační techniky a kontaminují mléčné výrobky. Přítomnost těchto spor v surovém mléce je často důsledkem použití nekvalitních a nedostatečně opracovaných krmiv obsahujících tyto spory. Bakterie rodu *Clostridium* způsobují pozdní duření tvrdých a polotvrdých sýrů tím, že fermentují kyselinu mléčnou na kyselinu máselnou, vodík a oxid uhličitý. Nepříjemný pach způsobený kyselinou mléčnou a husté drobné dírký přecházející postupem času k velkým dírákům jsou typickým znakem vady¹. *Clostridium tyrobutyricum* patří mezi nejvýznamnější druh kontaminující sýry v souvislosti s vadou pozdního duření. U sýrů postižených touto vadou s vyšším množstvím kyseliny máselné byla vždy identifikována DNA tohoto druhu³.

Sýry postižené vadou lze využít při výrobě tavených sýrů, nesmí však překročit 15 % obsahu ve směsi pro tavení. Vyšší obsah v tavící směsi by měl za následek duření tavených sýrů². Jako prevence vzniku vady se občas používá jako konzervační činidlo bakteriocin nizin. Konzervační účinky mají také bakterie rodu *Lactobacillus*, které jsou součástí mléčných výrobků³.



Obrázek 1 Pozdní duření sýrů⁴

2.4. Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* patří mezi obligátně anaerobní rody bakterií. Některé druhy jsou však aerotolerantní a mohou se rozmnožovat při nízké koncentraci kyslíku v prostředí. Optimální teplota růstu buněk je 20 – 40 °C při pH 4 – 7. Buňky jsou grampozitivní a mají tyčinkovitý tvar. Charakteristickou vlastností rodu je tvorba spor, které jsou obvykle větší než mateřská buňka a velmi odolné proti fyzikálním a chemickým činitelům. Umístění spory v buňce je jednou z identifikačních vlastností buněk sledovaných pod mikroskopem⁵ (Obrázek 2).



Obrázek 2 Bakterie rodu *Clostridium*⁶

Klostridia velmi dobře rozkládají sacharidy a proteiny za anerobních podmínek. Sacharolytické a proteolytické vlastnosti se uplatňují při utilizaci nejrůznějších druhů substrátů, jednoduchých sacharidů, hexos, pentos, oligosacharidů a polysacharidů. Glukóza je běžným zdrojem uhlíku pro butyrát nebo butanol produkovaný klostridii. Laktóza ze syrovátky, sacharóza z melasy, škrobu, brambor, pšeničné mouky nebo celulózy (*C. sacharolyticum*) a dextrózy jsou také dobře využitelné. Rozklad bílkovin neboli proteolýza je doprovázena vznikem nepříjemných zápachajících produktů, například při rozkladu masa (*C. sporogenes*). Jiné druhy klostridií hrají důležitou roli při koloběhu dusíku v přírodě. Fixují dusík ze vzduchu pomocí enzymu nitrogenáza (*C. pasteurianum*)⁵.

2.4.1. Taxonomie

Zařazení klostridií podle taxonomie:

Doména:	<i>Bacteria</i>
Kmen:	<i>Firmicute</i>
Třída:	<i>Clostridia</i>
Řád:	<i>Clostridiales</i>
Čeleď:	<i>Clostridiaceae</i>
Rod:	<i>Clostridium</i>

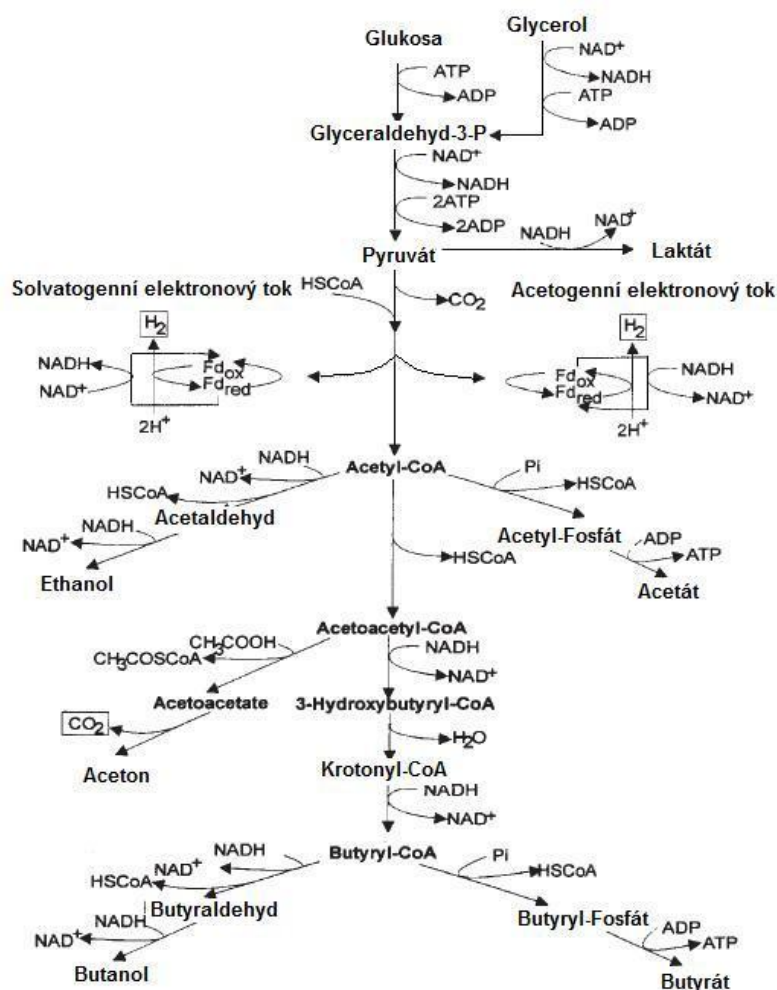
2.4.2. Výskyt

Bakterie rodu *Clostridium* se vyskytují převážně na místech s omezeným přístupem kyslíku, jako je půda, vodní sedimenty, bahno, výkaly, odpadní vody, ale i v zaživacím ústrojí živočichů. Do potravin a živočišných produktů se spory dostávají z půdy⁵. Siláže používané na výrobu krmiv je vhodné stabilizovat bakteriemi mléčného kvašení produkující kyselinu mléčnou, která má baktericidní účinky. Takto stabilizovaná siláž potlačuje růst sporotvorných druhů bakterií, jejichž spory by mohly přecházet do živočišných produktů a indikovat nežádoucí změny².

2.4.3. Metabolismus

Bakterie rodu *Clostridium* jsou charakteristické tvorbou vodíku fermentací sacharidů pomocí dvou odlišných typů metabolismu v závislosti na vnějších podmínkách. Prvním typem je acidogeneze, která vede k produkci organických kyselin acetátu a butyrátu. Druhým typem metabolismu je solvatogeneze generující rozpouštědla aceton a ethanol⁷. Výchozí dráhou pro produkci metabolitů je glykolýza jejímž hlavním produktem je pyruvát (Obrázek 3).

Pyruvát vycházející z glykolýzy je oxidačně dekarboxylován za přítomnosti koenzymu A. Reakci katalyzuje oxidoreduktáza obsahující ferredoxin jako kofaktor. Přítomnost ferredoxinu má za následek vznik plynného vodíku díky nízkému redoxnímu potenciálu kofaktoru. Kondenzací dvou acetylkoenzymů a sérií redukcí, dekarboxylací a dalšími reakcemi vznikají metabolity jako: 2-hydroxybutyrát, aceton, propanol, butanol a kyselina máselná. Produkci metabolitů lze ovlivnit pH prostředí. Při tvorbě kyseliny máselné dochází k poklesu pH v médiu a to má za následek tvorbu rozpouštědel butanolu a acetonu. Neutralizace média uhličitanem vápenatým vede k posílení produkce kyseliny máselné⁵.



Obrázek 3 Metabolismus bakterií rodu *Clostridium*⁸

2.5. Využití klostridií v průmyslu, energetice a při využití odpadů

O vodíku se už dlouhou dobu mluví jako o alternativním zdroji energie. Jako zdroj energie má vysokou perspektivu do budoucna, protože při jeho spalování vzniká vodní pára. Mnoho studií se zabývá produkcí vodíku, jednotlivé postupy se liší například typem substrátu, podmínkami reakce, mechanismy reakcí, výtěžky reakcí atd. Hledá se optimální produkční druh schopný zajistit vysokou efektivitu procesu. Bakterie rodu *Clostridium* izolované z vadných sýrů produkují vodík bez přístupu světla a vzduchu v procesu nazývaném tmavá fermentace⁹. Schopnost bakterií rodu *Clostridium* využít sacharolytické substráty, ale i potravinářské odpady, odpadní kaly a lignocelulózní materiály je velmi žádoucí¹⁰. V těchto procesech bakterie dosahují významných výtěžků vodíku na mol substrátu.

Mezi velmi diskutované substráty pro produkci vodíku patří syrovátka. Syrovátka je odpadní produkt, který vzniká v mlékárenském průmyslu při výrobě sýrů. Po srážení mléka a vzniku čerstvého sýru dochází k dezintegraci suroviny, při které je sýr zbaven přebytečné vody. Tento produkt se nazývá syrovátka a obsahuje disacharid laktosu složenou z glukózy a galaktózy. Obsahuje také mléčné proteiny a tuk. V současnosti je syrovátka minimálně zpracována a představuje problém. Jako odpadní voda obsahuje vysoké množství organických látek. Dříve se vyvážela na pole, kde byla rozstříkována, aby obohatila půdu. Kvůli nízké hodnotě pH syrovátky však tento způsob není pro půdu vhodný. Celosvětově vyprodukuje

mlékárenský průmysl 10^8 tun syrovátky za rok. Její využití pro výrobu vodíku by významně ulehčilo nakládání s tímto odpadním produktem³.

Za účelem zefektivnění fermentace jsou sestavována konsorcia buněk, která umožňují utilizaci nejrůznějších substrátů. V takto konstruovaných buněčných reaktorech je potřeba udržovat stabilní prostředí, sledovat proces fermentace a provádět kontrolní identifikační metody buněk. Optimalizace produkce za využití odpadních surovin by v budoucnu měla být hlavním smyslem dalších studií.

V průmyslu se ovšem některé druhy rodu *Clostridium* používají pro kvasnou výrobu jejich metabolitů. Kyselina máselná nachází uplatnění v potravinářském a nápojovém průmyslu. Čistá kyselina máselná se používá v mlékařství. Její estery slouží jako potravinářská aditiva pro zvýraznění chutě a aroma. Dále se uplatňuje v chemickém, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Její deriváty hrají významnou roli v průmyslu plastů⁸. Organická rozpouštědla butanol a aceton mají nejrůznější využití při organických syntézách nebo jako složky čistících prostředků. Klostridia jsou také součástí aktivního kalu při anaerobních procesech čištění odpadních vod v čistírnách.

Enzymy izolované z bakterií rodu *Clostridium* nachází uplatnění při hydrolyze proteinů a sacharidů v potravinářství¹¹. Ekologický význam mají enzymy, které degradují nejrůznější pesticidy a xenobiotika. Toxiny klostridií se používají v medicínských aplikacích na výrobu vakcín¹².

2.5.1. Druhy produkující vodík

Produkcí vodíku bakteriemi rodu *Clostridium* se zabývá řada studií a vědeckých prací, v průmyslovém měřítku však zatím uplatnění nenachází. Klostridie jsou charakteristické zvláštní formou metabolismu, pomocí kterého jsou schopny produkovat vodík. Redukovaný ferodoxin přenáší elektrony na enzym hydrogenázu, která používá protony (H^+) jako finální akceptory elektronů vedoucí k tvorbě vodíku⁷. Nízký redoxní potenciál umožňuje provedení reakce. Hodnota redoxního potenciálu pro růst bakterií rodu *Clostridium* se pohybuje kolem -300 mV^2 . Tvorba vodíku nastává při generaci mastných kyselin (acidogenezi) během exponenciální fáze růstu buněk. Bakterie rodu *Clostridium* používají 2 způsoby tvorby, máselné nebo octové kvašení. Mezi nejznámější producenty vodíku patří kmen *Clostridium butyricum* dosahující vyšších výtěžků vodíku v porovnání s ostatními druhy a kmeny při použití glukózy a sacharózy jako substrátu¹³. Významným producentem detegovaným v mléčných výrobcích je *Clostridium tyrobutyricum*. Klostridie obsahují širokou škálu enzymů a jsou schopné hydrolyzovat mnoho substrátů za tvorby vodíku. Patří sem druhy *Clostridium acetobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. thermolacticum*, *C. thermocellum*, *C. sacharoperbutylaceticum*, *C. paraputrificum*¹⁴.

Pro patogenní druhy *Clostridium botulinum* a *Clostridium perfringens* není tvorba vodíku charakteristická, jelikož hodnoty jejich redoxních potenciálů jsou vyšší a mohou dosahovat hodnot kolem $+30 \text{ mV}$, což je nepříznivé pro průběh reakce².

2.5.2. Směsné kultury

Pro produkci vodíku se v poslední době začínají uplatňovat fermentace, kterých se účastní více druhů mikroorganismů. Tento způsob lze nazvat hybridním systémem. Směs mikroorganismů poskytuje řadu výhod a zvyšuje efektivitu procesu. Odpadní substráty jsou většinou složité matrice a při použití více druhů mikroorganismů dochází k jejich rychlejšímu využití. Více druhů buněk o vhodném enzymovém vybavení je schopno zcela rozkládat

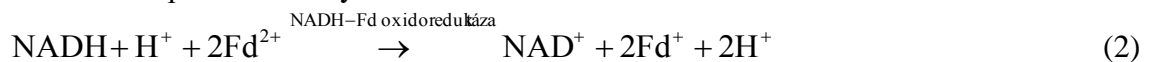
komplexní substráty. Například jeden druh štěpí laktózu na glukózu a galaktózu a druhý fermentuje glukózu až na vodík, nebo jeden z druhů produkuje metabolit, který podporuje růst a aktivitu dalších druhů buněk. V reaktorech je potřebné zajistit přesně definované složení buněk a zabránit kontaminaci z vnějšího prostředí. Příčinou problémů může být i přerůstání jedněch buněk na úkor druhých. Proto je nutné sledovat složení buněk v reaktoru a provádět pravidelné odběry a identifikace buněk⁷.

2.5.3. Hydrogenázy

Klíčovým enzymem katalyzujícím tvorbu vodíku z protonů, nebo oxidaci protonů je hydrogenáza. Reakce



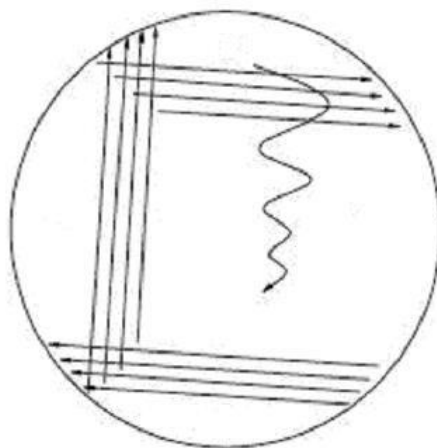
je reversibilní a je přímo závislá na redoxním potenciálu komponent, které reagují s hydrogenázami. Studium hydrogenáz je důležité pro porozumění mechanismu produkce vodíku, kontrolních buněčných mechanismů a konečnému zvýšení produkce vodíku. Hydrogenázy byly poprvé popsány v roce 1931 Stephensonem a Sticklandem. V dnešní době jsou známy různé druhy hydrogenáz, které se účastní tvorby a spotřeby vodíku¹⁰. Podle atomů kovů obsažených v aktivních místech enzymů se hydrogenázy rozdělují do 3 skupin na: (Fe) hydrogenázy, (FeFe) hydrogenázy a (NiFe) hydrogenázy⁷. (NiFe) hydrogenázy jsou nejrozsáhlejší skupinou hydrogenáz. (FeFe) hydrogenázy jsou součástí metabolismu bakterií rodu *Clostridium* a katalyzují fermentace bez přístupu světla, které jsou charakteristické pro rod *Clostridium*. Společně s enzymem oxidoreduktázou se účastní reakcí za vzniku vodíku



Aktivita enzymů je ovlivněna vnějšími podmínkami, jako jsou pH, teplota, koncentrace solí, rychlost růstu buněk a parciální tlak vodíku. Nastavením vhodných podmínek reakce pro hydrogenázy můžeme ovlivnit výtěžky vodíku. Zvýšení výtěžků vodíku je možné docílit genetickými manipulacemi. Byl sledován gen zodpovědný za expresi hydrogenázy, která vychytává vznikající vodík a významně tak snižuje výtěžek reakce. Tento gen byl nahrazen genem zodpovědným za expresi hydrogenázy, která produkuje vodík ve zvýšeném množství. Nahrazením genu jiným genem bylo docíleno vyšších výtěžků vodíku¹⁰.

2.6. Izolace DNA a identifikace buněk

Pro správnou identifikaci buněk je důležitým krokem izolace buněk. Nejčastěji se upravují podmínky růstu pro studovaný druh, který je zvýhodněn například změnou pH, teplotou, přidávkou růstových faktorů, antibiotik atd. Připravují se i tzv. selektivní půdy. Dalšími způsoby izolace jsou makroskopicky kontrolovatelné metody. Mezi tyto metody patří například izolace čárkováním nebo konvečně používaný křížový roztěr (viz Obrázek 4). Podle morfologických znaků (vzhled kolonií) poté určíme čistotu buněčné kultury¹⁵.



Obrázek 4 Postup při křížovém roztěru buněk¹⁵

Mezi hojně využívané metody patří barvení podle Grama, které nám umožňuje rozlišit mezi G^+ a G^- bakteriemi¹⁵.

Moderní metody identifikace mikroorganismů jsou založeny na izolaci a identifikaci DNA. Rozvoj molekulárně diagnostických metod nastal objevem PCR v roce 1983. Tyto metody jsou časově nenáročné, přesné a vysoce citlivé. Zavedení těchto metod umožňuje spolehlivou identifikaci a charakterizaci bakteriálních druhů používaných v potravinách¹⁶.

2.6.1. Lyze buněk

Prvním krokem při izolaci DNA je lyze bakteriálních buněk. Bakteriální buňky obsahují pevnou buněčnou stěnu složenou z vrstvy peptidoglykanů, která se vyskytuje u všech druhů bakterií. Ve vnitřním prostoru buňky jsou uloženy chromosomy obsahující DNA stabilizovanou pomocí proteinů². Pro izolaci DNA z buněk je potřebné buněčnou stěnu rozrušit a přítomnou DNA extrahovat. Pro narušení peptidoglykanových vrstev se používají detergenty, které denaturují proteiny buněčné stěny, nebo antibakteriální enzym lysozym degradující buněčnou stěnu a usnadňující extrakci DNA. Pro optimální průběh reakce je důležité zajistit vhodné reakční prostředí pomocí pufrů. Pufry obvykle obsahují EDTA (ethylendiamintetraoctovou kyselinu) a Tris-HCl. EDTA slouží jako chelatační činidlo pro vychytávání iontů kovů. Jedná se především o vápenaté ionty, které jsou kofaktory nukleáz štěpících izolovanou DNA. Tyto nukleázy jsou součástí většiny bakterií. Tris-HCl (hydroxymethyl)aminomethan je používán jako pufr, který napomáhá udržovat stabilní hladinu pH. V dalším kroku je do pufru přidáván enzym lysozym, který narušuje buněčnou stěnu bakterií. Po narušení buněčné stěny bakterií je přidáván detergent dodecylsírán sodný (SDS) snižující povrchové napětí, až dojde k prasknutí buněčné stěny. Pro zvýšení kvality izolované DNA se k lyzačním roztokům přidává enzym proteináza K, která štěpí přítomné bílkoviny vázané ke struktuře DNA. Dochází ke vzniku hrubého lyzátu buněk, který se používá k izolaci DNA¹⁷.

2.6.2. Izolace DNA pomocí fenolové extrakce

Extrakce DNA se provádí ve dvou krocích pomocí organických rozpouštědel fenolu, chloroformu a 3-methylbutan-1-olu (isoamylalkoholu). Organická rozpouštědla se nemísí s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže dochází k ustanovení rovnováhy a vzniku dvou fází. Vodná fáze (pufr) obsahuje DNA, organická fáze obsahuje proteiny a zbytky hrubého lyzátu buněk¹⁸. V prvním kroku je přidáván fenol. Po oddělení fází je v druhém kroku

přidávána směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1. Isoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu a napomáhá k odstranění jeho stop ve vodné fázi. Po protřepání je roztok centrifugován pro dokonalé oddělení fází. Na fázovém rozhraní vzniká bílá vrstva sražených proteinů. Vodná vrstva obsahující DNA je odebrána a pro zvýšení čistoty vysrážena ethanolem¹⁷.

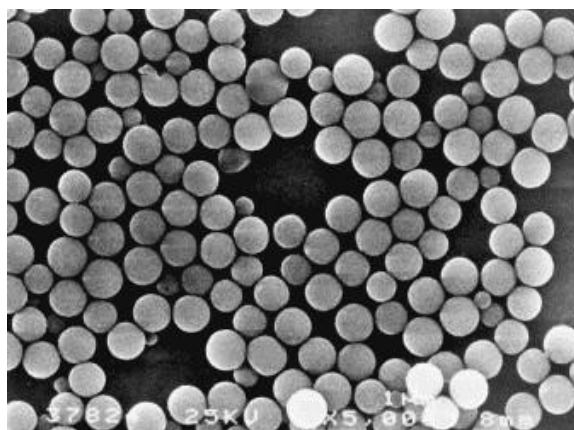
2.6.3. Izolace DNA s využitím magnetických částic

V současné době je kladen důraz na rychlost, efektivitu a bezpečnost práce. Tradiční způsoby izolace DNA pomocí organických rozpouštědel vyžadují čas, opatrnost z důvodu práce z nebezpečnými látkami a také je nelze aplikovat na vzorky obsahující DNA o nízké koncentraci. Mezi alternativy konvenčních metod patří separace pomocí magnetických částic. Tyto částice obsahují na svém povrchu funkční skupiny, pomocí kterých dochází k interakci s DNA. Uvnitř částic se nachází magnetické jádro tvořené oxidy železa umožňující separaci v magnetickém poli. Tato metoda kombinuje rychlost, jednoduchost a izolovaná DNA je získávána o vysoké čistotě¹⁹.

Pro správnou účinnost reversibilní imobilizace DNA je zapotřebí vytvořit správné podmínky. Směs pro izolaci DNA pomocí magnetických částic je tvořena sterilní vodou, NaCl, PEG 6000 (polyethylenglykolem), magnetickými nosiči a hrubým lyzátem buněk, který obsahuje DNA. Sterilní voda vytváří reakční prostředí. NaCl neutralizuje molekulu DNA a zvyšuje osmotický tlak prostředí. PEG 6000 o dostatečné koncentraci umožňuje sbalení izolované DNA přechodem šroubovice DNA do kondenzované formy kulovitého až spirálovitého tvaru²⁰. Dochází k adsorpci DNA na povrch magnetického nosiče a po inkubaci směsi při laboratorní teplotě jsou částice separovány ze směsi pomocí vnějšího magnetického pole. Po separaci magnetických částic jsou částice s navázanou DNA promyty ethanolem z důvodu zvýšení čistoty izolované DNA. Magnetické částice jsou znova separovány ve vnějším magnetickém poli a po oddělení ethanolu je k částicím přidán TE pufr. V TE pufru probíhá eluce DNA z magnetických částic¹⁹.

2.6.3.1. Magnetické polymerní částice P(HEMA-co-GMA)

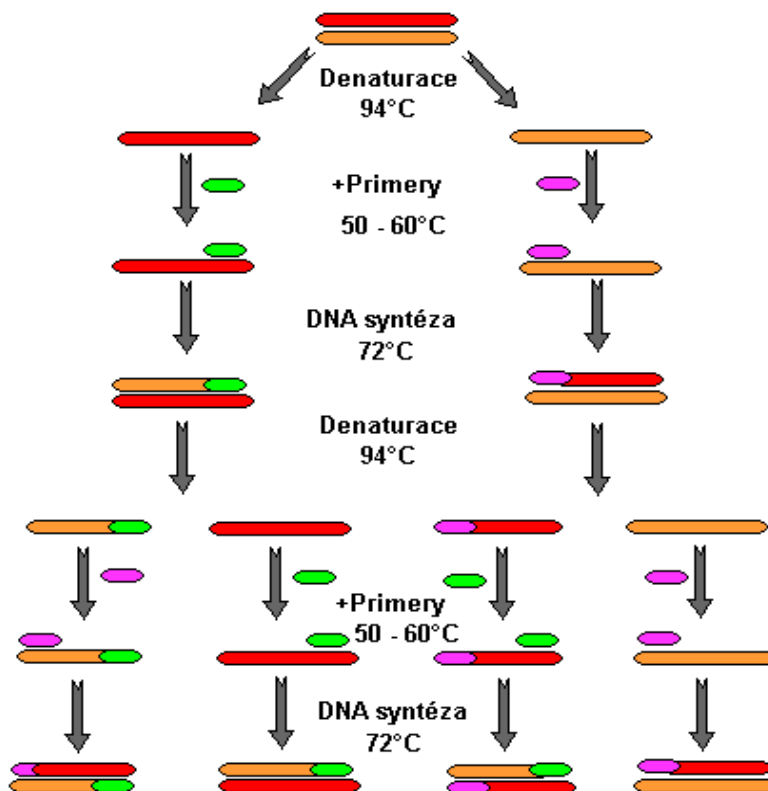
Magnetické polymerní mikronosiče P(HEMA-co-GMA) - poly(2-hydroxyethylmethakrylát-co-glycidyl-methakrylát) našly uplatnění při izolaci DNA z různých typů matic²¹ (Obrázek 5). Hydroxyethylmethakrylát je hydrofilní, biokompatibilní, inertní o neutrálním náboji. Magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA) jsou netoxické, nerozpustné ve vodě, mechanicky stabilní s nízkou afinitou na nespecifické adsorpce biologicky aktivních látek (proteinů)²². Na povrchu magnetických částic jsou hydroxylové skupiny, které jsou málo reaktivní. Pro zvýšení efektivity izolace DNA jsou hydroxylové skupiny nahrazovány karboxylovými funkčními skupinami pomocí roztoku manganistanu draselného, který oxiduje hydroxylovou funkční skupinu na karboxylovou. Jádro magnetických částic P(HEMA-co-GMA) je tvořeno oxidem železnato-železitým Fe_3O_4 ²³.



Obrázek 5 Magnetické částice P(HEMA-co-GMA)²³

2.6.4. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je molekulárně diagnostická metoda založená na opakované syntéze určitého fragmentu DNA. DNA je dlouhá, nerozvětvená, dvouřetězcová molekula složená ze 4 podjednotek deoxyribonukleotidů obsahující báze adenin, cytosin, guanin a thymin. Nukleotidy jsou spojeny spolu kovalentní fosfodiesterovou vazbou, která připojuje 5' uhlík deoxyribózy na 3' uhlík další deoxyribózy²⁴. Molekula DNA je podrobena denaturaci, při které dojde k rozrušení vazeb organických bází v dvouřetězci DNA. K volným řetězcům DNA se postupně navazují komplementární primery sloužící pro DNA polymerázu, která syntetizuje nové vlákno za přítomnosti deoxyribonukleotidů v prostředí. Cyklus se několikrát opakuje, až dojde k nahromadění specifického fragmentu DNA o stejné velikosti párů bází¹⁶ (Obrázek 6).



Obrázek 6 Princip polymerázové řetězové reakce²⁵

Základní kroky v PCR se rozlišují podle teploty na:

- Denaturace molekuly DNA (94 °C)
- Navázání primerů k odděleným řetězcům (50 – 65 °C)
- Syntéza nových řetězců DNA pomocí DNA polymerázy (65 – 75 °C)

Nastavení podmínek reakce je různé a závisí na účelu stanovení. Volí se počet cyklů, časy mezi jednotlivými kroky a teploty jednotlivých procesů. Zpravidla se počet cyklů pohybuje v rozmezí 25 – 35 cyklů. Délka výsledného fragmentu DNA se pohybuje v desítkách až tisících párů bází. Detekce je prováděna elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Další technikou detekce je kvantitativní měření množství produktu PCR v reálném čase (RT-PCR)¹⁷.

2.6.5. Inhibitory PCR

Polymerázová řetězová reakce je vysoce citlivá metoda a přítomnost nečistot může ovlivnit celkový výsledek. Během přípravy reakce v laboratoři je potřeba pracovat sterilně a pečlivě. Z některých typů komplexních vzorků nebo z kmenů některých bakterií obsahujících extrabuněčné nebo intrabuněčné inhibitory PCR je problém izolovat DNA vhodné kvality. Tyto inhibitory se rozdělují podle původu na exogenní a endogenní. Endogenní inhibitory se vyskytují jako kontaminanty ve směsi pro PCR. Může se jednat o chemikálie, které se používají při procesu izolace DNA, jako je např. fenol. V případě izolace bakteriální DNA z komplexních směsí nebo potravinářských výrobků může být zdrojem inhibitorů některá ze složek v matrici. Například u mléčných výrobků se jedná o ionty vápníku. Exogenní inhibitory jsou součástí vnějšího prostředí a mohou kontaminovat vzorek v důsledku nedostatečné purifikace DNA. Inhibitory se mohou vyskytovat přímo v buňkách a uvolňovat se během izolace DNA. Jedná se o intracelulární inhibitory, mezi které patří nukleázy, proteinázy a nejrůznější buněčné proteiny²⁶.

2.6.6. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Druhového rozlišení mikroorganismů lze docílit za použití denaturační gradientové elektroforézy, která je založená na rozdílné elektroforetické mobilitě denaturované DNA v 6% polyakrylamidovém gelu (Obrázek 7). Podél gelu je vytvořen lineární gradient koncentrace denaturačního činidla v rozmezí od 30 % do 50 % (močovina, formamid). Fragmenty DNA vzniklé v PCR migrují polyakrylamidovým gelem za působení denaturačních činidel. Pevnost dvouřetězové DNA je dána četností párů bází G-C (guanin, cytosin) v molekule DNA. Nejpevnější fragmenty DNA putují v gelu do části s vyšší koncentrací denaturačního činidla a naopak. Každý fragment DNA v závislosti na složení párů bází G-C má identickou teplotu tání. Důležitou součástí primerů, které se účastní PCR reakce pro DGGE elektroforézu, je GC svorka tvořená nukleotidy (guanin, cytosin), která po denuraci fragmentů DNA zabraňuje odpojení obou vláken DNA od sebe. Denaturační gradientová elektroforéza nachází uplatnění při analýze komplexních vzorků z potravin nebo půdy, u kterých lze za použití fingerprintového standardu jednoznačně rozlišit jednotlivé druhy mikroorganismů.²⁷



Obrázek 7 Denaturační gelová elektroforéza INGENYphorU

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z 8 vybraných kmenů rodu *Clostridium* izolovaných ze sýrů. Bylo optimalizováno složení roztoků používaných při lyzi buněk, zejména koncentrace EDTA a proteinázy K. DNA byla izolována fenolovou extrakcí a pomocí magnetického nosiče a použita v PCR. Produkty PCR byly separovány denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE) za účelem druhové identifikace kmenů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál

4.1.1. Bakteriální kultura

V diplomové práci byly použity druhy bakterií *Clostridium tyrobutyricum* a *Clostridium butyricum* izolované ze sýrů. Jednalo se o kmeny *C. butyricum* E 16 A, *C. butyricum* 581, *C. butyricum* 89K25B, *C. tyrobutyricum* S 18/2, *C. tyrobutyricum* S 5 a *C. tyrobutyricum* 580. Tyto bakterie byly dodány společností MILCOM Praha (pracoviště Tábor). Jako pozitivní kontroly byly použity kmeny *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T a *Clostridium butyricum* DSM 10702 (DSMZ – Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, SRN).

4.1.2. Chemikálie

Agaróza pro elektroforézu (Top Bio, Praha, ČR) p.a
Akrylamid (Serva, Heidelberg, SRN) p.a.
Amonium persulfát (APS) (Sigma, St. Louis, USA) p.a.
Bakteriologický pepton (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie) p.a.
DNA standard 100 bp (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200, 1 500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR) p.a.
Disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (Penta, Chrudim, ČR) p.a.
Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA) p.a.
Ethanol 96 % (Lachema, Brno, ČR) p.a.
Ethidiumbromid (5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA) p.a.
Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN) p.a.
Fenol (Lachema, Brno, ČR) p.a.
Formamid (Sigma, St. Louis, USA) p.a.
Glukóza (Lachema, Brno, ČR) p.a.
Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR) p.a.
Chloroform (Lachema, Brno, ČR) p.a.
Isoamylalkohol (3-methylbutan-1-ol) (Lachema, Brno, ČR) p.a.
Kvasničný extrakt (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie) p.a.
Kyselina boritá (Lachema, Brno, ČR) p.a.
Kyselina chlorovodíková (Merck, Darmstadt, Německo) p.a.
Kyselina octová (Lachner, Neratovice, ČR)
Lab-Lemco prášek (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie) p.a.
L-cystein (Sigma, St. Louis, USA) p.a.
Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko) p.a.
Močovina (Sigma, St. Louis, USA) p.a.
N,N – methylen bis-acrylamid (Sigma, St. Louis, USA) p.a.
N,N,N,N – tetramethylethylendiamin (Temed) (Ampreso, Solon, USA) p.a.
Octan sodný (Lachema, Brno, ČR) p.a.
Parafinový olej (Fargon, Olomouc, ČR) p.a.
PCR agaróza (Top-Bio, Praha, ČR) p.a.
Proteináza K (100 µg/ml) (Sigma, St. Louis, USA) p.a.
RCM 0149 médium (Reinforced Clostridial Medium) (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)

Tris-HCl (Serva, Heidelberg, SRN) p.a.

4.1.3. Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA

➤ 1 M Tris-HCl (pH 7,8; 8,0)

121 g Tris-HCl bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, pH roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,8 (8,0). Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 litr a sterilizován 20 min při 121 °C.

➤ 0,5 M EDTA (pH 8,0)

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, pH bylo upraveno přidáním NaOH. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1 litr a sterilizován 20 min při 121 °C.

➤ Lyzační roztok A (10 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)

Roztok A pro koncentraci EDTA 5 mM byl připraven smícháním 10 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) s 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněn destilovanou vodou do 100 ml. Obdobně smícháním 2, 3 a 4 ml 0,5M EDTA byly připraveny roztoky A o koncentraci EDTA 10, 15 a 20 mM.

➤ Lyzační roztok B (10 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; lysozym 3 mg/ml)

K lyzačnímu roztoku A bylo přidáno 3 mg/ml lysozymu.

➤ Roztok proteinázy K (10 mg/ml)

Navážka 10 mg proteinázy K byla rozpuštěna v 1 ml sterilní destilované vody. Roztok byl uchováván při -20 °C. Před použitím byl roztok zředěn na koncentraci 100 µg/ml.

➤ Roztok dodecyl sulfátu sodného (20 %)

20 g dodecyl sulfátu sodného (SDS) bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody při současném zahřívání na 68 °C, pH roztoku bylo upraveno pomocí 1M HCl na 7,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml.

➤ Směs chloroform-isoamylalkohol

Chloroform a isoamylalkohol byly smíchány v poměru 24:1.

➤ Fenol (pH 7,8)

Fenol byl předestilován a pH bylo upraveno hydrogenuhličitanem sodným na hodnotu 7,8. Poté byl fenol převrstven TE pufrům a skladován při -20 °C.

➤ Roztok octanu sodného (3 M)

40,81 g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ byl rozpuštěn v 80 ml destilované vody a pH bylo upraveno ledovou kyselinou octovou na hodnotu 5,2. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na výsledný objem 100 ml. Roztok byl sterilizován 20 minut při teplotě 121 °C a skladován při teplotě 4 °C.

➤ TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0)

1 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0) byl smíchán s 0,2 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) a roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml.

4.1.4. Roztoky pro gelovou elektroforézu

- TBE pufr (5×koncentrovaný; 54 g Tris-HCl, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0)

Navážka byla doplněna destilovanou vodou na 1 000 ml a pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 8,0. Před použitím byl TBE pufr 10× zředěn destilovanou vodou na výslednou koncentraci 45 mM Tris-báze, 45 mM kyseliny borité a 1 mM EDTA.

- Nanášecí pufr (6× koncentrovaný)
4 mg bromfenolové modři a 250 mg Ficollu 400 bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.
- PCR nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Velikostní standard DNA Malamité (100 bp žebříček) (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200, 1 500 bp) (Moravské Prusy, ČR)

- Roztok ethidiumbromidu (0,5 µg/ml)
100 µl roztoku EtBr (5 mg/ml) bylo zředěno 500 ml sterilní destilované vody.

Složení roztoků pro izolaci a purifikaci DNA, gelovou elektroforézu bylo převzato z práce Španová a Rititch²⁸

4.1.5. Komponenty pro PCR

Voda pro PCR – voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská Ľupča, SR)

Pufr pro PCR kompletní – reakční pufr 10× PCR Blue Buffer (750 mM Tris-HCl 8,8 pH; 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20, 25 mM MgCl₂) pro *Taq*-DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, Česká Republika)

PCR pufr bez MgCl₂ – reakční pufr 10× PCR Blue Buffer (750 mM Tris-HCl 8,8 pH; 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20) pro *Taq*-DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, ČR)

Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)

Oligonukleotidové primery (10 pmol/µl) – (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)

pro doménu *Bacteria* – R_eub, F_eub (Haarman²⁹)

pro rod *Clostridium* – F1, F2 (Rekha³⁰)

primery pro DGGE – Chis150f, ClostIr (Hung³¹)

Taq-DNA polymeráza 1.1 (1 U/µl) (Top-Bio, Praha, ČR)

PCR vkládající pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.6. Roztoky pro DGGE

- Tris/acetát/EDTA (TAE) pufr (0,5x koncentrovaný) (40 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM acetát sodný, 1 mM disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny)

Byl připraven 50× koncentrovaný TAE. Bylo naváženo 242 g Tris-HCl, 82 g acetátu sodného, 18,5 g disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny a vše bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Připravený roztok byl doplněn destilovanou vodou do objemu 1 l. Pro použití v DGGE byl pufr ředěn 100× na 0,5 koncentrovaný TAE.

➤ Roztok A (Roztok pro vytvoření gradientu v gelu – koncentrace močoviny 0 % a formamidu 0 %, polyakrylamid 6 %)

1 ml TAE, 20 ml 30 % polyakrylamidu bylo smícháno a doplněno vodou do 100 ml. Pro vytvoření gradientu v gelu bylo použito 24 ml 30 % roztoku A, který vznikl smícháním 12 ml zásobního roztoku A a 12 ml zásobního roztoku B.

➤ Roztok B (Roztok pro vytvoření gradientu v gelu – koncentrace močoviny 60 % a formamidu 60 %, polyakrylamid 6 %)

1 ml TAE, 20 ml 30 % polyakrylamidu, 25,2 g močoviny, 24 ml formamidu bylo smícháno a doplněno destilovanou vodou do objemu 100 ml. Pro vytvoření gradientu v gelu bylo použito 24 ml 50 % roztoku B, který vznikl smícháním 4 ml zásobního roztoku A a 20 ml zásobního roztoku B.

➤ 20 % roztok APS (Amonium persulfát)

Byl připraven 20 % roztok rozpuštěním 40 mg APS ve 200 µl vody.

4.1.7. Kultivační médium

RCM 0149 médium (Reinforced Clostridial Medium), (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie) bylo použito pro kultivaci buněk. Bylo naváženo 38 g RCM 0149 média ve formě prášku a rozpuštěno v 1 litru destilované vody pro přípravu kapalného média. Připravené médium bylo sterilizováno při 121 °C po dobu 15 minut. Seznam jednotlivých složek média a jejich hmotnostní zastoupení uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1 Složení kultivačního média RCM 0149

Složka	Množství (g/l)
Kvasničný extrakt	3,0
Lab-Lemco prášek	10,0
Bakteriologický Pepton	10,0
Škrob	1,0
Glukosa	5,0
Cystein	0,5
Chlorid sodný	5,0
Octan sodný	3,0
Agar	0,5

4.1.8. Přístroje

Anaerostat OXOID (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)

Cell Density Meter CO8000 (WPA Biowave, Cambridge, Velká Británie)

Centrifuga EBA 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)

Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)

DGGE elektroforéza (INGENYphorU, Goes, Holandsko)

Digitální fotoaparát Nikon Coolpix S560 a Dimage Z5 (Konica Minolta, USA)

Exikátor typ N 86 KN.18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, Německo)

Laboratorní váhy OHAUS CS 200, 200 g x 0,1 g (Ohaus, New Persey, USA)

Laboratorní váhy OHAUS Pioneer, 110 g x 0,0001 g (Ohaus, New Persey, USA)

Magnetická míchačka s vyhříváním (Biosan, Blučina, ČR)

Mikropipety Discovery HTL o objemu 10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1 000 μ l (PZ HTL, Varšava, Polsko)
Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, Praha, ČR)
Minicykler PTC-100TM (MJ Research, Watertown, USA)
NanoPhotometerTM (Implen, Mnichov, Německo)
Očkovací box (Fatran, ČR)
pH papírky (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Termocykler DNA Engine, Pelteir Thermal Cycler-200 (Bio-Rad Lab., Philadelphia, USA)
Termostat – Mini incubator (Labnet, Woodbridge, USA)
Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Miláno, Itálie)
Transiluminátor TVR 312A (Spectroline, Albany, USA)
Vortex lab dancer vario (Laneko, Dublin, Irsko)
Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, Rochester, USA)
Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm (Hoefer, Holliston, USA)
Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet, Woodbridge, USA)
Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, Rochester, USA)
Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a běžné laboratorní pomůcky

4.2. Metody

4.2.1. Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány v tekutém médiu RCM 0149 za anaerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. Do zkumavek bylo napipetováno 4 ml média, 1 ml buněčné kultury a 0,65 ml parafínu. Nepolární parafín vytvořil nepropustnou vrstvu na hladině média, která zabránila přístupu vzduchu do média. Byly vytvořeny anaerobní podmínky pro buňky.

4.2.2. Měření absorbance buněk

Absorbance buněk byla stanovena pomocí přístroje Cell density meter biowawe WPACO 8000, při vlnové délce 600 nm (A_{600nm}) (Obrázek 8). Jako slepý vzorek bylo použito médium RCM 0149. Buňky byly ředěny na stejnou absorbanci z důvodu sjednocení a porovnání výchozích koncentrací buněk pro jednotlivé kmény bakterií. Maximální hodnota absorbance A_{600nm} byla 2.



Obrázek 8 Přístroj pro měření optické hustoty Biowawe WPACO 8000³²

4.2.3. Izolace bakteriální DNA

4.2.3.1. Lyze bakteriálních buněk

Suspenze buněk (2 ml) byla napipetována do zkumavky Eppendorf. Suspenze byla stočena na centrifuze při 14 500 ot/min po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a sediment suspendován v 1 ml lyzačního roztoku A. Suspenze byla centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 min. Supernatant byl slit a k sedimentu bylo přidáno 0,5 ml lyzačního roztoku B. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě 1 hodinu. Ke směsi bylo přidáno 12,5 µl 20 % SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml). Po promíchání byly vzorky inkubovány do druhého dne při teplotě 55 °C. Hrubý lyzát buněk byl použit pro izolaci DNA metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů²⁸.

4.2.3.2. Fenolová extrakce DNA

K hrubému lyzátu buněk bylo přidáno stejné množství fenolu. Směs byla opatrně promíchána kývavým pohybem a centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut. Byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky. Vodní fáze byla doplněna TE pufrem a bylo přidáno 700 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1). Směs byla opatrně promíchána 4 minuty a poté centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 min. Horní vodní fáze byla opět odebrána do čisté zkumavky Eppendorf²⁸.

4.2.3.3. Srážení DNA

Ke vzorkům byla přidána 1/20 objemu 3M octanu sodného a směs byla promíchána. Dále byl přidán 2,5 násobek objemu ethanolu 96 %. Po promíchání byla DNA srážena při teplotě -20 °C po dobu 30 minut a následně centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 15 min. K sedimentu byl přidán 70% ethanol a směs byla opět centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 10 min. Sediment DNA byl vysušen v exsikátoru. DNA byla rozpuštěna v 500 µl TE pufre²⁸.

4.2.4. Izolace DNA za využití magnetických nosičů

Pro izolaci bakteriální DNA byly použity částice poly(2-hydroxyethyl-methakrylátu-co-glycidyl-methakrylátu) [P(HEMA-co-GMA)] s pracovním názvem F-kol 135x obsahující funkční karboxylové skupiny (2,61 mM/g). Částice byly připraveny na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze Ing. D. Horákem, CSc. Byla namíchána izolační směs ve složení uvedeném v Tabulce 2.

Tabulka 2 Směs pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů

Krok	Složka	Objem (µl)
1	Voda	50
2	NaCl (5 M)	200
3	DNA	100
4	PEG 6000 (40 %)	100
5	F-kol 135x (2 mg/ml)	50

Směs byla namíchána ve zkumavkách Eppendorf a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Zkumavky byly vloženy do magnetického separátoru a částice byly separovány po dobu 15 minut. Po uplynutí doby byl odebrán supernatant, zkumavky vyjmuty a bylo přidáno 500 µl 70 % ethanolu. Vzorek byl promíchán a vložen do separátoru. Po 2 minutách

byl ethanol odebrán. Zbytek ethanolu byl odpařen a DNA adsorbovaná na magnetických nosičích byla eluována do 60 μ l TE pufru 30 minut. Magnetické částice byly separovány v magnetickém pásu²⁸.

4.2.5. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno pomocí přístroje NanoPhotometer. Roztok DNA rozpuštěný v TE pufru byl napipetován pomocí automatické pipety do spektrofotometru. Byla měřena absorbance v rozmezí vlnových délek 220 – 320 nm. Jako slepý vzorek byl použit TE pufr. Byla odečtena hodnota absorbance při 260 nm (DNA), 280 nm (proteiny), 230 nm (fenol). Koncentrace DNA byla vypočtena z absorbance při 260 nm. Čistota DNA byla stanovena z poměru absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Poměr absorbancí čisté DNA se pohyboval v rozmezí 1,8 – 2,0. Poměr nižší než 1,8 byl způsoben přítomností proteinů, poměr vyšší než 2,0 byl způsoben přítomností RNA²⁸.

4.2.6. Gelová elektroforéza DNA

Byl připraven 0,8% agarózový gel. Bylo naváženo 0,8 g agarózy, která byla kvantitativně převedena do Erlenmayerovy baňky obsahující 100 ml destilované vody. Roztok agarózy byl přiveden 5 \times k varu v mikrovlnné troubě z důvodu rozpuštění agarózy. Do připravené vany s hřebínkem byl roztok nalit po mírném vychladnutí a ponechán přibližně 30 minut do ztuhnutí gelu. Na podložce z polyethylenu byla namíchána směs pro gelovou elektroforézu DNA. 10 μ l DNA, 5 μ l TE pufru a 3 μ l nanášecího pufru bylo smícháno a směs byla nanášena do komůrek v gelu. Gel byl vložen do elektroforetické vany a převrstven TBE pufr. Po správném zapojení elektrod byla spuštěna gelová elektroforéza při napětí 80 V po dobu 90 minut. Po uplynutí doby byl gel vyjmut a opatrně vložen do vaničky s ethidium bromidem, kde byl barven 30 minut. Po 30 minutách byl gel vložen do transiluminátoru a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce 305 nm. Byla provedená fotografická dokumentace²⁸.

4.2.7. Polymerázová řetězová reakce

4.2.7.1. Složení směsi pro PCR

Komponenty pro PCR byly skladovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmrazení komponent pro PCR byla směs pro PCR připravena z jednotlivých složek v pořadí uvedeném v Tabulce 3. Směs pro PCR byla připravována ve speciálním boxu, vyzářeným UV zářivkou po dobu 15 minut. Pro urychlení přípravy směsi pro PCR byl nejprve namíchán master mix, který obsahoval všechny komponenty v množství pro danou PCR a počet testovaných vzorek, kromě DNA matrice. DNA matrice byla po napipetování master mixu přidána do směsi.

Tabulka 3 Směs pro PCR

Komponenta	Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Clostridium</i>	PCR pro DGGE
	Objem (μl)		
Voda pro PCR	19,0	18,0	30,0
Reakční pufr 10x	2,5	2,5	5,0
Směs dNTP (10 mM)	0,5	0,5	2,0
Primer F1 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	2,0
Primer F2 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	2,0
Taq-DNA polymeráza (1 U/μl)	1,0	1,0	4,0
Matrice DNA (10 ng/μl)	1,0	2,0	5,0
Celkový objem (μl)	25,0	25,0	50,0

Namíchaná směs byla před použitím centrifugována. V reakci byly použity primery uvedené v Tabulce 4. Negativní kontrola byla připravena smícháním směsi pro PCR a vody pro PCR, která nahradila DNA matrici. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z buněk *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T a *Clostridium butyricum* DSM 10702. Takto připravená směs byla vložena do cyklátoru a po nastavení příslušných podmínek pro specifickou reakci byla provedena PCR. Podmínky pro PCR jsou uvedeny v Tabulce 5.

4.2.7.2. Primery

Pro PCR reakce byly použity primery uvedené v Tabulce 4.

Tabulka 4 Seznam primeru použitých pro charakterizaci bakterií rodu *Clostridium*

Specifita primerů	Název primeru	Teplota hybridizace (°C)	Velikost produktu PCR	Literatura
pro doménu <i>Bacteria</i>	R_eub, F_eub	55	466	Haarman ²⁹
pro rod <i>Clostridium</i>	F1, F2	53	619	Rekha ³⁰
primery pro DGGE	Chis150f, ClostIr, GC-svorka	57	540	Hung ³¹
Název primeru	Sekvence primeru			
F_eub	TCCTACGGGAGGCAGCAGT			
R_eub	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT			
F1	CTCAACTTGGGTGCTGCATT			
F2	ATTGTAGTACGTGTGTAGCCC			
Chis150f	AAAGGRAGATTAATACCGCATAA			
ClostIr	TTCTTCCTAATCTCTACGCA			
GC-svorka	GCCCGCCGCCCCGCCCC			

4.2.7.3. Amplifikační program

Amplifikační programy pro bakterie rodu *Clostridium* jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 Podmínky pro PCR

Krok	Doména <i>Bacteria</i>		Rod <i>Clostridium</i>		PCR pro DGGE	
	T (°C)	Čas (min)	T (°C)	Čas (min)	T (°C)	Čas (min)
1	95	5	94	5	95	3
2	95	0,5	94	0,5	95	1
3	55	0,5	53	0,5	57	1
4	72	0,5	72	1	72	1,5
5	72	10	72	8	72	20
Počet cyklů	30		30		30	

Popis jednotlivých kroků (Tabulka 5): 1. Prodloužená denaturace DNA před prvním cyklem, 2. Denaturace DNA, 3. Hybridizace primerů, 4. Syntéza nového vlákna DNA, 5. Prodloužená syntéza řetězce po posledním cyklu. Po ukončení reakce byly vzorky obsahující amplifikovanou DNA (produkty PCR) nanášeny na 1,5% agarózový gel v množství 25 μ l DNA plus 5 μ l nanášecího pufru. Na gel bylo nanášeno 5 μ l žebříčku (DNA standard). Elektroforéza byla nastavena na 90 minut při napětí 80 V. Po uplynutí doby byl gel odebrán z elektroforetické vany a barven ethidium bromidem (0,5 μ g/ml) cca 30 min. Po 30 minutách byl gel vložen na transiluminátor a byl pořízen snímek gelu.

4.2.8. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Byla provedena PCR s primery pro DGGE obsahující GC svorku. PCR produkty byly separovány v DGGE elektroforéze v systému INGENYphorU (Goes, Holandsko). Byla připravena lázeň s 0,5 \times koncentrovaným TAE puftrem. Pufr byl zahříván na pracovní teplotu 60 °C. Byla sestavena elektroforetická kazeta obsahující prostor pro denaturační gradientový gel s hřebínkem. Elektroforetická kazeta byla propojena s peristaltickou pumpou a míchadlem, na kterém byl umístěn dávkovač s roztoky pro vytvoření gradientu. Aparatura byla propojena pomocí soustavy gumových trubiček zakončených tenkou jehlou umístěnou v prostoru pro gel elektroforetické kazety. Gradientový gel byl připraven tak, aby výsledná koncentrace akrylamidového roztoku (akrylamid:bisakrylamid v poměru 37,5:1) byla 6 % a denaturační gradient byl v rozmezí od 30 % do 50 % (100 % denaturační činidlo = 40 % formamid a 7 mol/l močovina). Bylo připraveno 24 ml roztoku A o 30% koncentraci denaturačních činidel a 24 ml roztok B o 50% koncentraci denaturačních činidel. Do roztoků A a B bylo přidáno 60 μ l 20% APS a 12 μ l polymeračního činidla TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin). Po přidání činidel začali roztoky A a B polymerovat za vzniku 6% polyakrylamidového gelu. Roztoky A a B byly převedeny do dávkovače a po spuštění peristaltické pumpy byly postupně míchány, dávkovány do prostoru pro gel v elektroforetické kazetě. Vytvořený denaturační gradientový gel byl ponechán 1,5 hodiny do zatuhnutí. Po zatuhnutí gradientového gelu byl do prostoru kolem hřebínku nanášen zaostřovací 6% polyakrylamidový gel na vytvoření komůrek pro vzorky a srovnání separovaných molekul na stejnou úroveň. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byl vytažen hřebínek. Připravená elektroforetická kazeta s gelem byla umístěna do lázně s TAE puftrem. Byly zapojeny

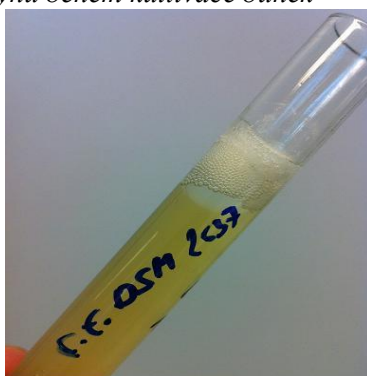
elektrody, nastaveno nízké napětí (12 V) a zapojena centrální cirkulace TAE pufru. Byly připraveny produkty PCR pro separaci smícháním 20 μ l produktů PCR a 5 μ l nanášecího pufru. Byly naneseny vzorky do komůrek zaostřovacího gelu. Byla spuštěna denaturační gradientová elektroforéza po dobu 6 h při napětí 180 V (Obrázek 7). Gel byl barven v ethidium bromidu a vizualizován pod UV světlem na transiluminátoru³³.

5. VÝSLEDKY

5.1. Kultivace bakterií rodu *Clostridium*

Byly kultivovány buňky 8 kmenů bakterií rodu *Clostridium*. Po 16 hodinách kultivace při 37 °C za anaerobních podmínek byla kultivace zastavena. Během kultivace byla sledována tvorba plynů (vodík, oxid uhličitý) formou bublinek v kultivačních zkumavkách (Obrázek 9). Po kultivaci byla proměřena absorbance buněk. Rozdílné absorbance buněk byly sjednoceny pomocí ředění médiem RCM 0149 na hodnotu podle nejnižší naměřené absorbance. Připravené buňky byly podrobeny lyzi za vzniku hrubých lyzátů buněk.

Obrázek 9 Tvorba bublinek plynů během kultivace buněk



5.2. Vliv koncentrace EDTA v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA

Byl sledován vliv koncentrace EDTA v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA. Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 8 kmenů bakterií rodu *Clostridium*. DNA byla izolována metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic. Spektrofotometricky byla stanovena čistota a koncentrace DNA. Detekce DNA byla provedena gelovou elektroforézou.

5.2.1. Kultivace buněk a měření optické hustoty

Odlíšné kmeny narostly do různé absorbance v rozmezí od 1,2 do 1,75. Hodnoty absorbancí ($A_{600\text{nm}}$) buněk byly sjednoceny na hodnotu 1,2 podle nejnižší naměřené absorbance (Tabulka 6).

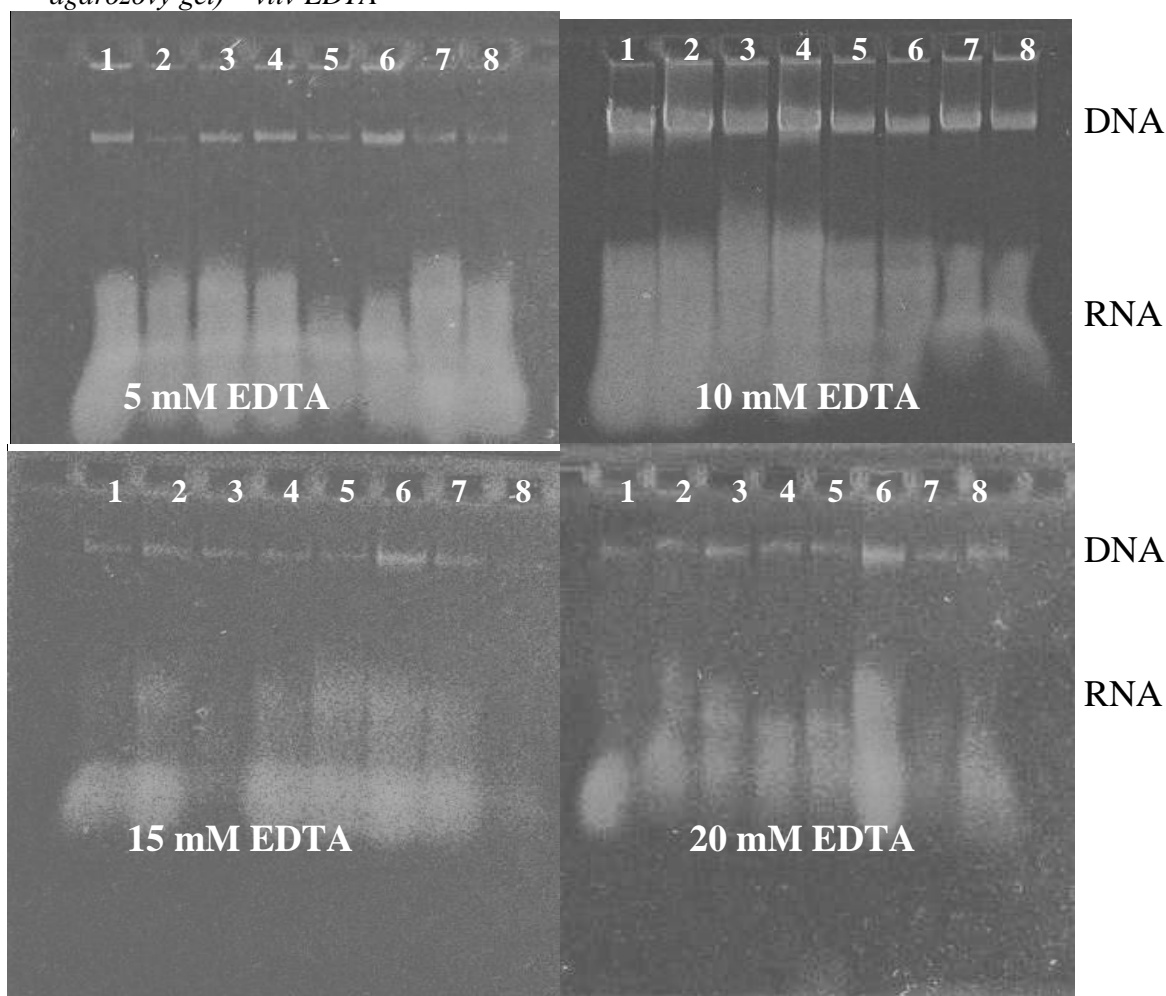
Tabulka 6 Optická hustota buněk-vliv EDTA

Kmen	$A_{600\text{nm}}$	Objem (ml)	Konečný objem (ml) pro $A_{600\text{nm}}$ 1,2
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	1,55	1,50	1,90
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5	1,38		1,73
<i>C. butyricum</i> E 16 A	1,39		1,74
<i>C. tyrobutyricum</i> 580	1,42		1,77
<i>C. butyricum</i> 581	1,20		1,50
<i>C. butyricum</i> 89K25B	1,67		2,00
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	1,71		2,10
<i>C. butyricum</i> DSM 10702	1,75		2,10

5.2.2. Izolace DNA metodou fenolové extrakce

Byla připravena sada 4 lyzačních roztoků A a B s množstvím EDTA 5, 10, 15 a 20 mM. Byla provedena lyze buněk pomocí lyzačního roztoku A a B za vzniku hrubých lyzátů buněk podle postupu uvedeném v odstavci 4.2.3.1. Do lyzační směsi bylo přidáno 10 μ l proteinázy K. Bylo připraveno 500 μ l hrubého lyzátu buněk. DNA byla izolována metodou fenolové extrakce ze 400 μ l hrubého lyzátu buněk, pro jejichž přípravu bylo použito různé množství EDTA. Po následném srážení ethanolem byla izolovaná DNA rozpouštěna přes noc ve 100 μ l TE pufru. Izolace DNA byla ověřena metodou agarózové gelové elektroforézy (Obrázek 10).

Obrázek 10 Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z různých kmenů klostridií (0,8% agarózový gel) – vliv EDTA



Tabulka 7 Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z různých kmenů klostridií – vliv EDTA

Běh	Kmen	Koncentrace EDTA v lyzačním pufru(mM)/izolace DNA			
		5	10	15	20
1	<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	++	+++	+	+
2	<i>C. tyrobutyricum</i> S 5	+	+++	++	+
3	<i>C. butyricum</i> E 16 A	++	+++	+	++

Pokračování Tabulky 7 Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z různých kmenů klostridií – vliv EDTA

Běh	Kmen	Koncentrace EDTA v lyzačním pufru(mM)/izolace DNA			
		5	10	15	20
4	<i>C. tyrobutyricum</i> 580	++	+++	+	+
5	<i>C. butyricum</i> 581	+	+++	+	+
6	<i>C. butyricum</i> 89K25B	++	+++	++	++
7	<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	+	+++	+	+
8	<i>C. butyricum</i> DSM 10702	+	+++	+	++

+, ++, +++ DNA detegovaná o různé intenzitě;

– DNA nebyla detegována

Na gelu byla detegována relativně intaktní DNA a RNA v různých množstvích bez viditelných stop degradace. Nejintenzivnější bandy byly detekovány při koncentraci 10 mM EDTA v lyzačním pufru.

DNA izolovaná z hrubých lyzátů buněk připravených pomocí lyzačních roztoků s různou koncentrací EDTA byla proměřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer (Tabulka 8). Vzorek DNA byla nanesen v množství 3 μ l při LID faktoru 10. Jednotlivé vzorky DNA byly 3 \times proměřeny.

Tabulka 8 Čistota a množství DNA stanovené spektrofotometricky po izolaci fenolovou extrakcí

Kmen	EDTA (mM)	DNA (ng/ μ l)	Absorbance				DNA		260/280	
			230	260	280	$\frac{260}{280}$	σ	IS	σ	IS
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	5	392	0,43	0,79	0,46	1,70	11,00	15,24	0,01	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		292	0,32	0,59	0,35	1,69	12,50	17,32	0,02	0,02
<i>C. butyricum</i> E 16 A		447	0,47	0,90	0,51	1,77	4,00	5,54	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		453	0,50	0,91	0,53	1,68	4,50	6,24	0,04	0,06
<i>C. butyricum</i> 581		335	0,37	0,67	0,40	1,68	17,00	23,56	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> 89K25B		279	0,32	0,56	0,33	1,68	15,00	20,79	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		248	0,27	0,50	0,29	1,77	7,00	9,70	0,02	0,02
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		326	0,39	0,66	0,40	1,66	8,00	11,09	0,01	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	10	421	0,42	0,85	0,48	1,78	7,50	10,39	0,01	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		478	0,49	0,96	0,54	1,78	4,50	6,24	0,02	0,02
<i>C. butyricum</i> E 16 A		676	0,76	1,35	0,78	1,75	14,00	19,40	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		572	0,58	1,15	0,65	1,76	3,50	4,85	0,02	0,02
<i>C. butyricum</i> 581		341	0,35	0,69	0,40	1,75	7,00	9,70	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 89K25B		317	0,34	0,63	0,37	1,67	7,50	10,39	0,03	0,04
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		558	0,62	1,12	0,65	1,73	14,00	19,40	0,01	0,02
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		470	0,51	0,94	0,56	1,69	8,50	11,78	0,03	0,04
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	15	461	0,60	0,86	0,65	1,46	8,50	11,78	0,01	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		264	0,37	0,55	0,40	1,40	12,00	16,63	0,01	0,01

Pokračování Tabulky 8 Čistota a množství DNA stanovené spektrofotometricky po izolaci fenolovou extrakcí

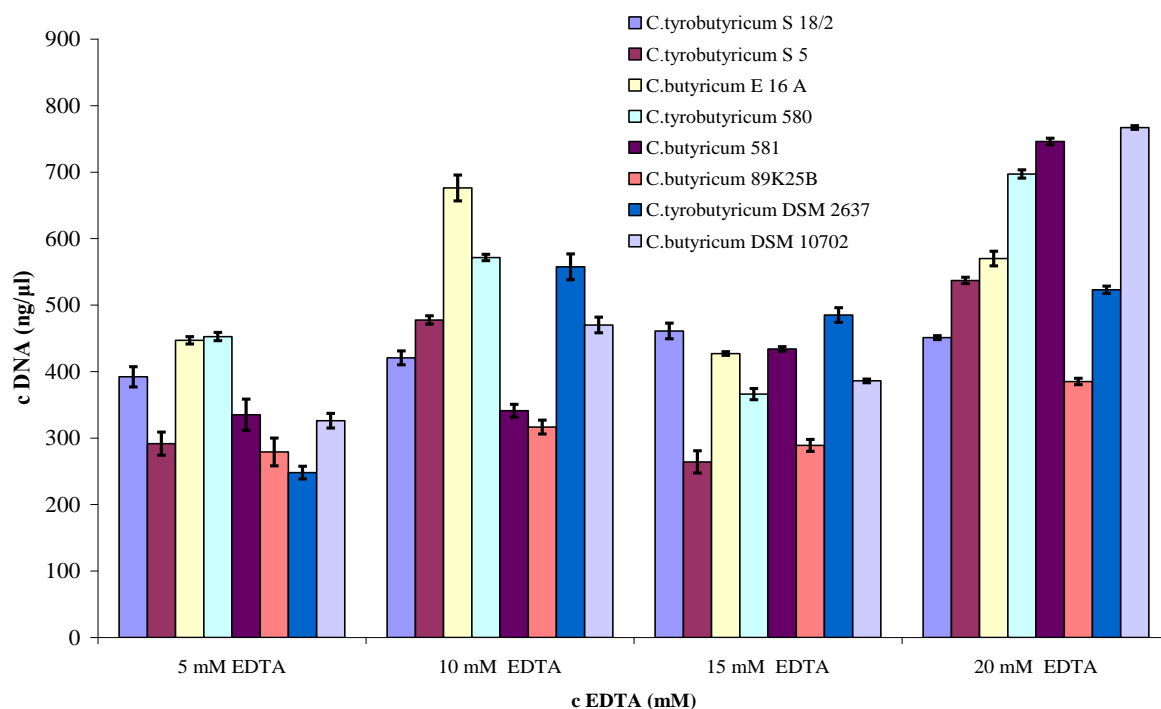
Kmen	EDTA (mM)	DNA (ng/μl)	Absorbance				DNA		260/280	
			230	260	280	$\frac{260}{280}$	σ	IS	σ	IS
<i>C. butyricum</i> E 16 A	15	427	0,60	0,87	0,55	1,62	2,00	2,77	0,02	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		366	0,50	0,75	0,52	1,45	6,00	8,32	0,06	0,08
<i>C. butyricum</i> 581		434	0,56	0,88	0,61	1,47	2,50	3,46	0,06	0,08
<i>C. butyricum</i> 89K25B		289	0,47	0,60	0,49	1,22	6,50	9,01	0,03	0,04
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		485	0,64	0,96	0,61	1,60	8,00	11,09	0,01	0,02
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		386	0,57	0,79	0,48	1,70	2,00	2,77	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	20	451	0,59	0,92	0,62	1,51	2,00	2,77	0,05	0,06
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		537	0,75	1,09	0,69	1,60	3,50	4,85	0,01	0,02
<i>C. butyricum</i> E 16 A		570	0,83	1,16	0,69	1,71	8,00	11,09	0,02	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		697	1,03	1,41	0,83	1,73	4,50	6,24	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		746	1,10	1,52	0,83	1,70	3,50	4,85	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 89K25B		385	0,54	0,79	0,33	1,53	3,50	4,85	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		523	0,73	1,06	0,63	1,70	4,00	5,54	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		767	1,10	1,53	0,88	1,74	2,00	2,77	0,01	0,02

Byla izolovaná DNA o koncentraci, která se pohybovala v rozmezí 264 – 746 ng/μl. Poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl v rozmezí od 1,40 do 1,78, což naznačilo, že vzorky obsahovaly zvýšené množství proteinů. Při koncentraci 10 mM EDTA v lyzačním roztoku byla DNA nejlépe detegována s nejlepším poměrem $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ určující čistotu.

5.2.3. Grafické vyhodnocení vlivu EDTA v lyzačním pufru na izolaci množství DNA metodou fenolové extrakce u 8 kmenů klostridií

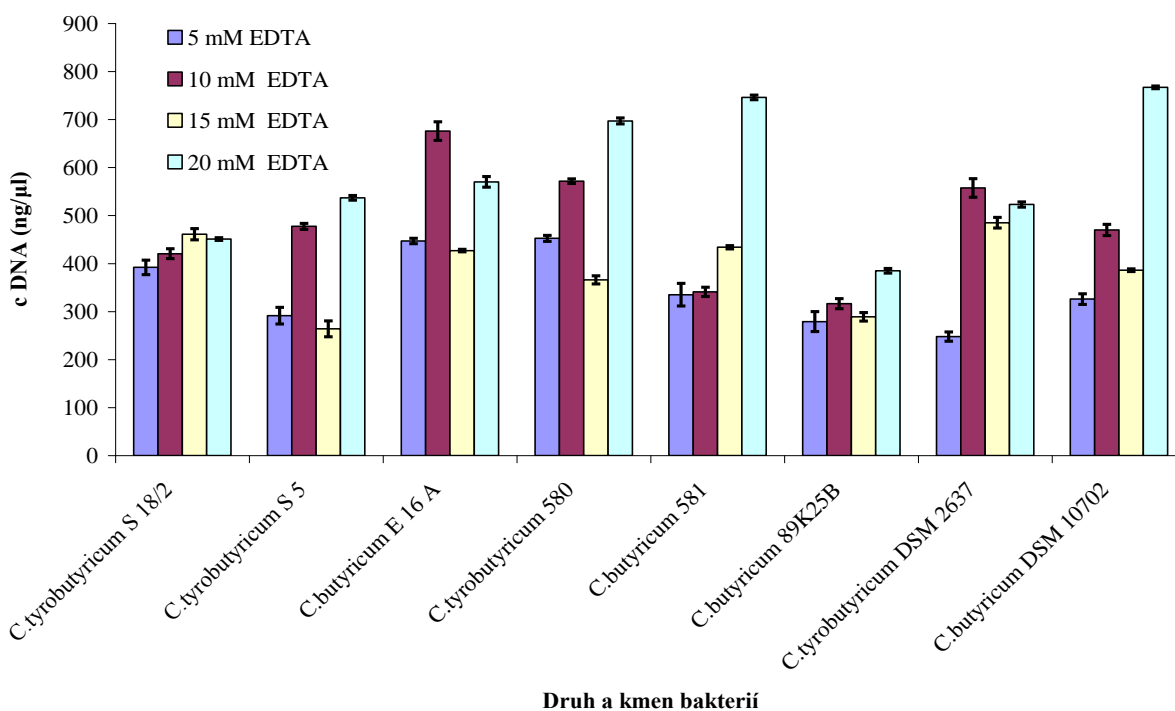
Byla sledována závislost množství EDTA v lyzačním pufru na množství izolované DNA. Z naměřených koncentrací izolované DNA pomocí spektrofotometru byl sestaven Graf 1. Stanovené koncentrace DNA z jednotlivých kmenů byly porovnány mezi sebou a byly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými kmeny (Graf 2). Byl sledován vliv množství EDTA v lyzačním pufru na výsledném poměru absorbancí A_{260}/A_{280} izolované DNA, jehož hodnota rozhoduje o čistotě izolované DNA (Graf 3). Optimální poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ se nacházel v rozmezí 1,8 – 2,0.

Graf 1 Závislost koncentrace EDTA na množství izolované DNA z 8 bakteriálních kmenů (fenolová extrakce)



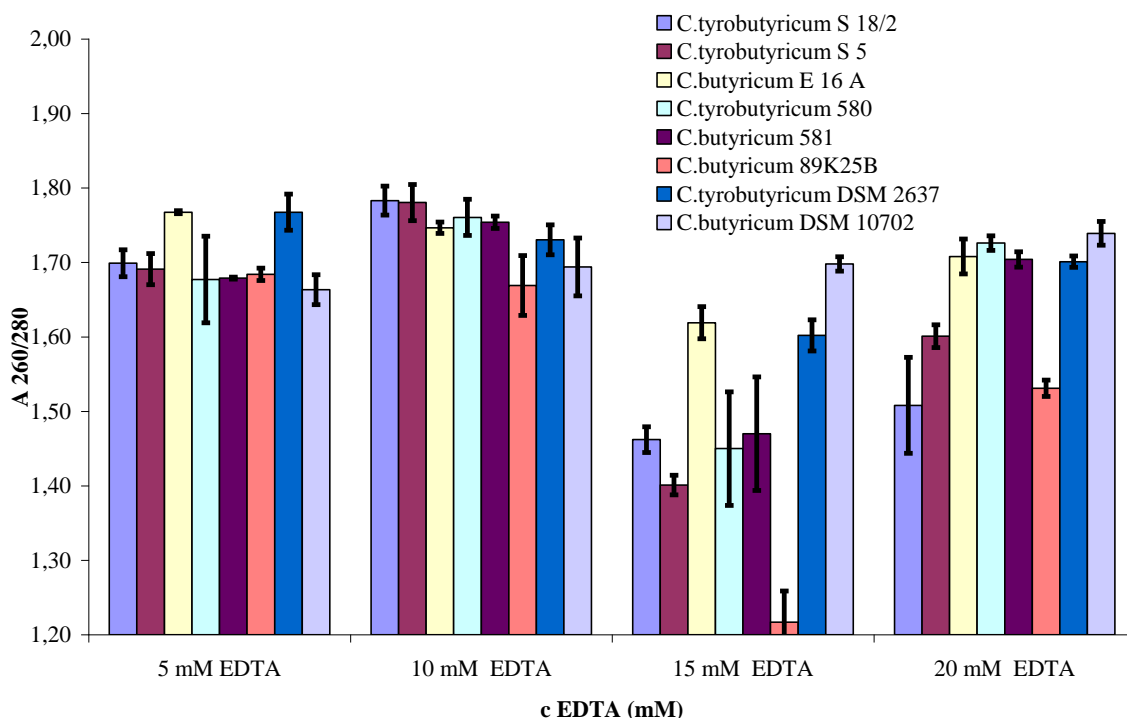
Nejvyšší koncentrace DNA byly stanoveny při koncentraci 20 mM EDTA v lyzačním roztoku.

Graf 2 Závislost koncentrace DNA jednotlivých bakteriálních kmenů na množství EDTA v lyzačním pufru (fenolová extrakce)



Na základě stejné výchozí hodnoty A_{600nm} byly porovnány koncentrace izolované DNA jednotlivých bakteriálních kmenů. Kmen *C. tyrobutyricum* 89K25B vykazoval nejnižší hodnoty koncentrací DNA. Nejvyšší hodnoty koncentrací DNA vykazoval kmen *C. butyrlicum* E 16 A.

Graf 3 Závislost koncentrace EDTA v lyzačním pufru na poměru absorpance $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ u DNA izolovanou fenolovou extrakcí



Nejlepší poměry absorpance $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byly zaznamenány při koncentraci 10 mM EDTA v lyzačním roztoku. Naopak nejnižší při koncentraci 15 mM EDTA v lyzačním roztoku.

5.2.3.1. Shrnutí - vliv množství EDTA v lyzačním pufru na kvalitu a množství izolované DNA metodou fenolové extrakce

Nejvyšší množství DNA bylo izolováno lyzačním pufrům o koncentraci 20 mM EDTA. Čistota byla v porovnání s ostatními koncentracemi nižší. S ohledem na kvalitu a množství izolované DNA byla stanovena koncentrace 10 mM EDTA v lyzačním pufru jako nejvýhodnější.

5.2.4. Izolace DNA pomocí magnetických nosičů

DNA byla izolována pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) ze 100 μl hrubého lyzátu buněk, pro jejichž přípravu bylo použito různé množství EDTA. Po přečištění částic ethanolem byla izolovaná DNA rozpouštěna přes noc v 50 μl TE pufru. DNA izolovaná ze 100 μl hrubého lyzátu buněk připravených pomocí lyzačních roztoků s různým množstvím EDTA byla proměřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer (Tabulka 9). Vzorek DNA byla nanesen v množství 3 μl při LID faktoru 10. Jednotlivé vzorky DNA byly 3 \times proměřeny.

Tabulka 9 Čistota a množství DNA stanovené spektrofotometricky po izolaci pomocí magnetických nosičů

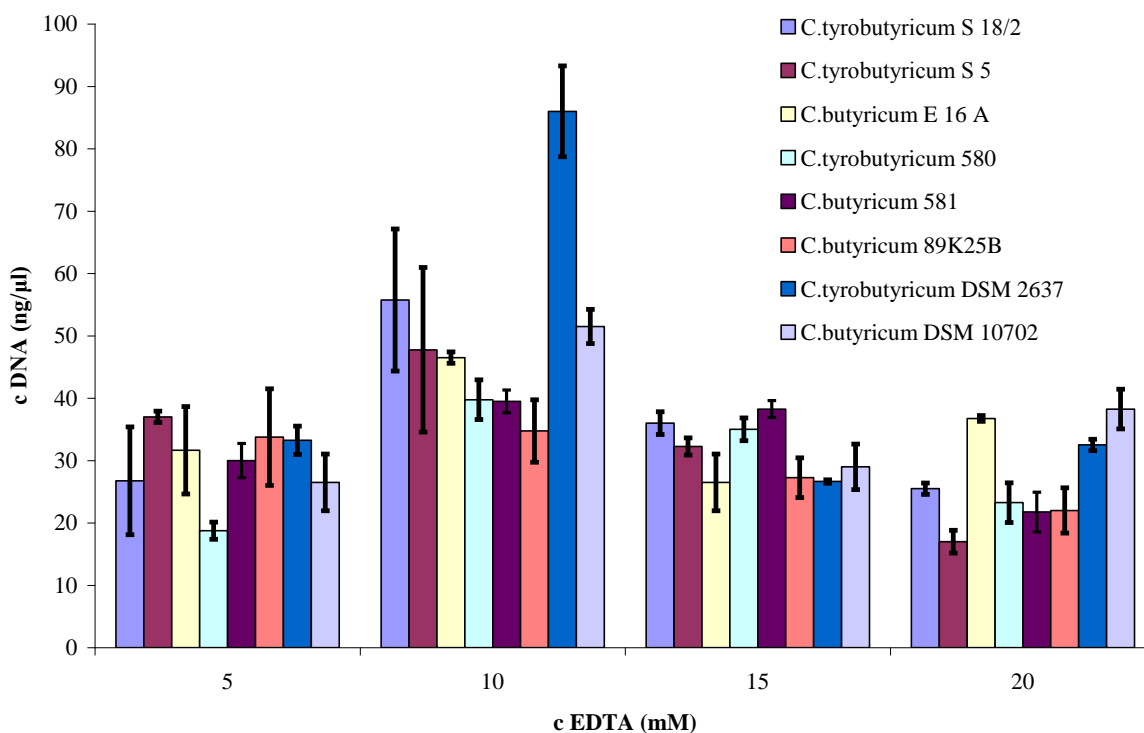
Kmen	EDTA (mM)	DNA (ng/μl)	Absorbance				DNA		260/280	
			230	260	280	$\frac{260}{280}$	σ	IS	σ	IS
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	5	26,75	0,07	0,08	0,06	1,64	4,75	8,65	0,02	0,03
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		37,00	0,10	0,11	0,09	1,70	0,50	0,91	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> E 16 A		31,65	0,09	0,12	0,10	1,49	3,85	7,01	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		18,75	0,03	0,06	0,05	1,52	0,75	1,37	0,03	0,04
<i>C. butyricum</i> 581		30,00	0,09	0,10	0,07	1,59	1,50	2,73	0,03	0,05
<i>C. butyricum</i> 89K25B		33,75	0,10	0,10	0,08	1,53	4,25	7,74	0,02	0,03
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		33,25	0,09	0,50	0,07	1,60	1,25	2,28	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		26,50	0,09	0,10	0,06	1,61	2,50	4,55	0,06	0,09
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	10	55,75	0,14	0,17	0,14	1,50	6,25	11,38	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		47,75	0,11	0,14	0,11	1,50	7,25	13,21	0,03	0,04
<i>C. butyricum</i> E 16 A		46,50	0,12	0,14	0,11	1,50	0,50	0,91	0,03	0,04
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		39,75	0,10	0,11	0,09	1,51	1,75	3,19	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		39,50	0,09	0,11	0,09	1,51	1,00	1,82	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 89K25B		34,75	0,09	0,11	0,09	1,46	2,75	5,01	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		86,00	0,14	0,20	0,15	1,44	4,00	7,29	0,02	0,03
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		51,50	0,10	0,14	0,11	1,47	1,50	2,73	0,02	0,03
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	15	36,00	0,08	0,10	0,08	1,44	1,00	1,82	0,04	0,06
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		32,25	0,07	0,09	0,08	1,47	0,75	1,37	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> E 16 A		26,50	0,10	0,08	0,06	1,52	2,50	4,55	0,02	0,03
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		35,00	0,08	0,11	0,08	1,52	1,00	1,82	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		38,25	0,11	0,12	0,10	1,43	0,75	1,37	0,02	0,03
<i>C. butyricum</i> 89K25B		27,25	0,06	0,08	0,07	1,31	1,75	3,19	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		26,65	0,05	0,09	0,08	1,53	0,15	0,27	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		29,00	0,07	0,09	0,07	1,36	2,00	3,64	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	20	25,50	0,07	0,04	0,06	1,48	0,50	0,91	0,00	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		17,00	0,05	0,05	0,04	1,55	1,00	1,82	0,02	0,03
<i>C. butyricum</i> E 16 A		36,75	0,09	0,13	0,11	1,50	0,25	0,46	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		23,25	0,07	0,33	0,05	1,60	1,75	3,19	0,00	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		21,75	0,06	0,06	0,05	1,42	1,25	2,28	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> 89K25B		22,00	0,05	0,08	0,06	1,23	2,00	3,64	0,01	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		32,50	0,12	0,11	0,08	1,63	0,50	0,91	0,03	0,04
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		38,25	0,11	0,13	0,11	1,33	1,75	3,19	0,03	0,03

Byla izolovaná DNA o koncentraci, která se pohybovala v rozmezí 17 – 86 ng/μl. Poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl v rozmezí 1,31 do 1,70. Naměřené hodnoty byly pravděpodobně způsobeny zvýšeným výskytem proteinů ve vzorcích.

5.2.5. Grafické vyhodnocení vlivu EDTA v lyzačním pufru na izolaci DNA pomocí magnetických nosičů u 8 kmenů klostridií

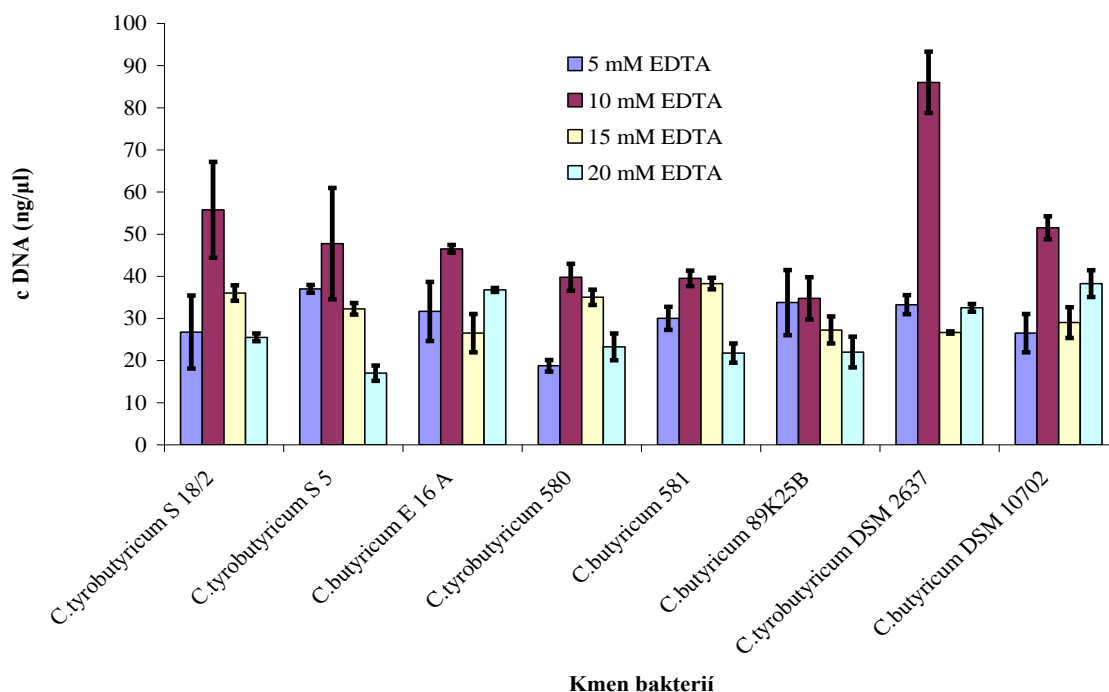
Byla porovnána různá množství EDTA v lyzačním roztoku na základě stanovené koncentrace izolované DNA pomocí magnetických nosičů. Z naměřených hodnot byl sestrojen Graf 4. Testované bakteriální kmeny byly porovnány na základě stanoveného množství izolované DNA pomocí magnetických částic (Graf 5). Byla vyhodnocena nejvýhodnější koncentrace EDTA v lyzační směsi porovnáním stanovených poměrů absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (Graf 6).

Graf 4 Závislost koncentrace EDTA na množství izolované DNA z 8 bakteriálních kmenů (magnetické částice)



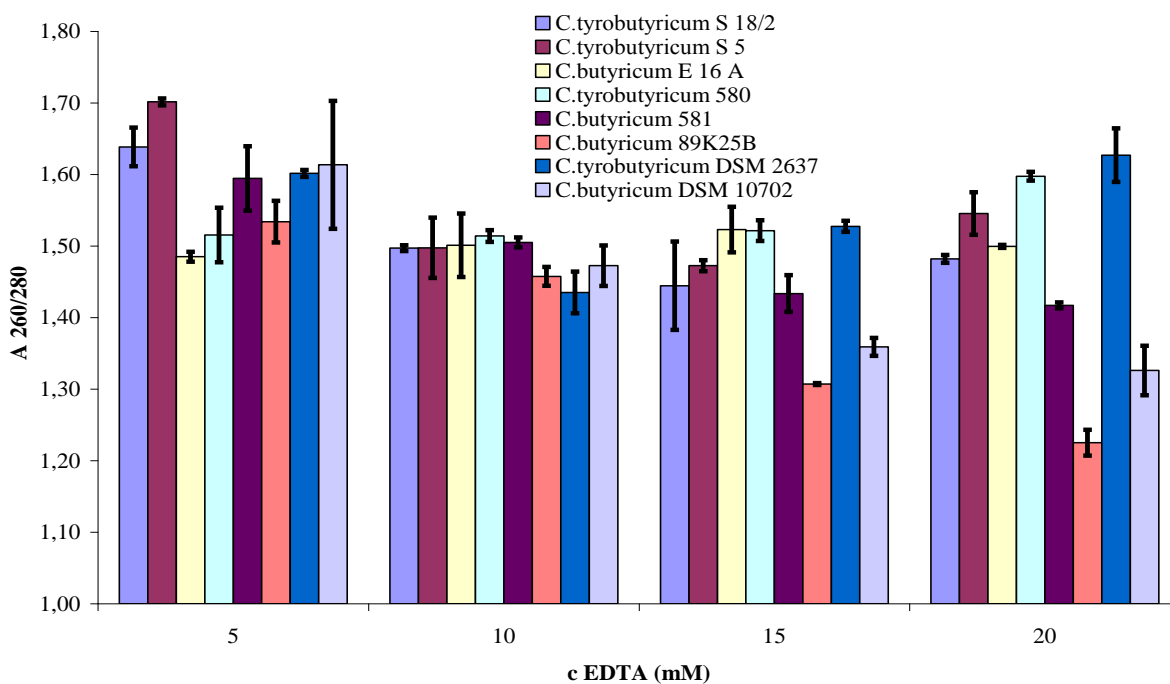
Nejvyšší koncentrace DNA u izolace pomocí magnetických nosičů byly stanoveny při koncentraci EDTA 10 mM v lyzačním roztoku.

Graf 5 Závislost koncentrace DNA jednotlivých bakteriálních kmenů na množství EDTA v lyzačním pufru (magnetické částice)



Byly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými kmeny v množství izolované DNA. Kmen *C. butyricum* 89K25B vykazoval nejnižší hodnoty stanovených koncentrací DNA. Ostatní kmeny vykazovali podobné hodnoty koncentrací izolované DNA.

Graf 6 Závislost koncentrace EDTA v lyzačním pufru na poměru absorpance $A_{260/280}$ určující kvalitu izolované DNA (magnetické částice)



Nejlepší poměry absorpance A_{260nm}/A_{280nm} byly zaznamenány při koncentraci 5 mM EDTA v lyzačním roztoku. Se zvyšujícím se koncentrací EDTA v lyzační směsi klesala čistota izolované DNA pomocí magnetických částic.

5.2.5.1. Shrnutí - vliv množství EDTA v lyzačním pufru na kvalitu a množství izolované DNA pomocí magnetických částic

S ohledem na kvalitu a množství izolované DNA byla zvolena koncentrace 10 mM EDTA v lyzačním pufru jako nejvýhodnější pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů u testovaných 8 kmenů klostridií.

5.3. Vliv množství proteinázy K v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA

Byl sledován vliv množství proteinázy K v lyzačním roztoku na kvalitu a koncentraci izolované DNA. Z 8 bakteriálních kmenů klostridií byly připraveny hrubé lyzáty buněk. Z hrubých lyzátů buněk byla izolována DNA pomocí fenolové extrakce a magnetických částic. Spektrofotometricky byla stanovena čistota a koncentrace DNA. Detekce DNA byla provedena gelovou elektroforézou.

5.3.1. Kultivace buněk a měření A_{600nm}

Byla naměřena absorbance (A_{600nm}) testovaných kmenů klostridií v rozmezí 1,4 – 1,89. Hodnoty A_{600nm} buněk byly sjednoceny ředěním pomocí RCM média na hodnotu 1,4 podle nejnižší naměřené A_{600nm} (Tabulka 10).

Tabulka 10 Optická hustota buněk- vliv proteinázy K

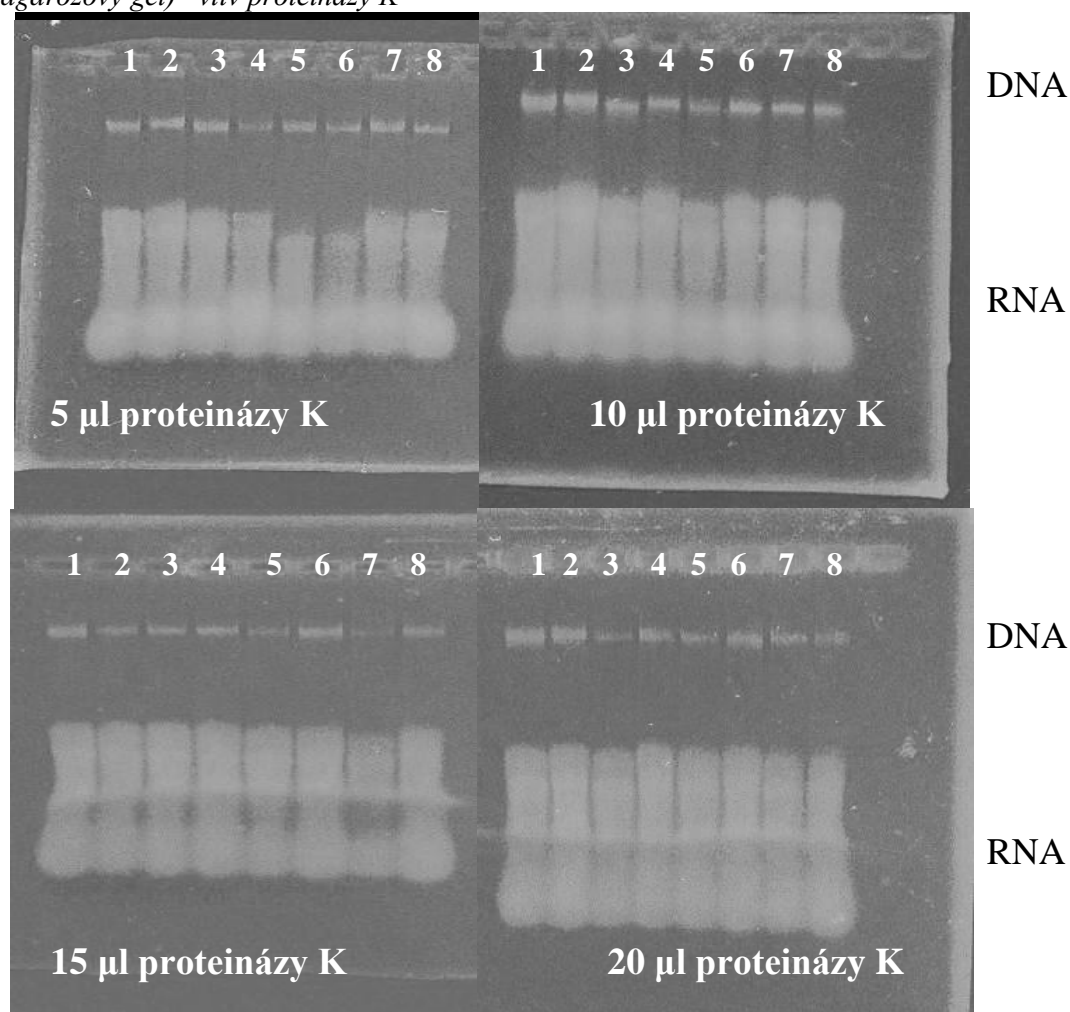
Kmen	A_{600nm}	Objem (ml)	Konečný objem pro A_{600nm} 1,4 (ml)
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	1,76	1,50	1,90
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5	1,47		1,60
<i>C. butyricum</i> E 16 A	1,51		1,60
<i>C. tyrobutyricum</i> 580	1,42		1,55
<i>C. butyricum</i> 581	1,40		1,50
<i>C. butyricum</i> 89K25B	1,74		1,90
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	1,89		2,0
<i>C. butyricum</i> DSM 10702	1,83		2,0

5.3.2. Izolace DNA metodou fenolové extrakce

Byly připraveny lyzační roztoky A a B o koncentraci EDTA 10 mM testované v předchozím měření v odstavci 5.2. K lyzačním roztokům byla během lyze buněk přidána proteináza K o koncentraci (100 μ g/ml) v množství 5, 10, 15 a 20 μ l z důvodu zvýšení čistoty směsi. Byla provedena lyze buněk pomocí lyzačních roztoku A a B za vzniku 500 μ l hrubého lyzátu buněk.

DNA byla izolována metodou fenolové extrakce ze 400 μ l hrubého lyzátu buněk, pro jejichž přípravu bylo použito různé množství proteinázy K. Po přečištění ethanolem byla izolovaná DNA rozpuštěna přes noc ve 100 μ l TE pufru. DNA byla detegována metodou agarózové gelové elektroforézy (Obrázek 11).

Obrázek 11 Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z různých kmenů klostridií (0,8% agarózový gel) –vliv proteinázy K



Tabulka 11 Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z různých kmenů klostridií – vliv proteinázy K

Běh	Kmen	Objem proteinázy K v lyzačním pufru (µl) /izolace DNA			
		5	10	15	20
1	<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	++	+++	++	++
2	<i>C. tyrobutyricum</i> S 5	++	+++	++	++
3	<i>C. butyricum</i> E 16 A	++	+++	++	+
4	<i>C. tyrobutyricum</i> 580	+	+++	++	+
5	<i>C. butyricum</i> 581	++	++	+	+
6	<i>C. butyricum</i> 89K25B	+	+++	++	+
7	<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	++	+++	+	+
8	<i>C. butyricum</i> DSM 10702	++	+++	+	+

+, ++, +++ DNA detegovaná o různé intenzitě;

– DNA nebyla detegována

Byla detegována relativně intaktní DNA u všech testovaných koncentrací proteinázy K v lyzačním pufru. Nejintenzivnější bandy bez známek degradace byly detegovány u objemu 10 µl proteinázy K v lyzační směsi.

Pomocí přístroje NanoPhotometer byla stanovena koncentrace DNA izolovaná z hrubých lyzátů buněk připravených v pufru s 10 mM EDTA a různým objemem proteinázy K (Tabulka 12). Objem vzorku byl 3 μl při LID faktoru 10. Vzorky DNA byly 3× proměřeny.

Tabulka 12 Čistota a množství DNA stanovené spektrofotometricky po izolaci fenolovou extrakcí

Kmen	EDTA (mM)	DNA (ng/μl)	Absorbance				DNA		260/280	
			230	260	280	$\frac{260}{280}$	σ	IS	σ	IS
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	5	244	0,25	0,49	0,29	1,72	14,00	19,40	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		170	0,19	0,34	0,24	1,78	13,50	18,71	0,03	0,04
<i>C. butyricum</i> E 16 A		278	0,31	0,56	0,34	1,67	4,50	6,24	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		240	0,27	0,48	0,29	1,72	10,00	13,86	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		127	0,12	0,25	0,14	1,79	2,00	2,77	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> 89K25B		233	0,29	0,43	0,29	1,66	1,50	2,08	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		287	0,33	0,58	0,36	1,61	16,00	22,17	0,02	0,03
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		243	0,31	0,49	0,29	1,69	7,50	10,39	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	10	182	0,17	0,36	0,20	1,81	2,00	2,77	0,04	0,05
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		240	0,28	0,48	0,27	1,80	9,50	13,17	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> E 16 A		285	0,29	0,57	0,34	1,66	2,50	3,46	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		360	0,41	0,72	0,43	1,68	7,50	10,39	0,02	0,02
<i>C. butyricum</i> 581		204	0,19	0,40	0,21	1,88	4,50	6,24	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 89K25B		173	0,19	0,35	0,19	1,84	23,00	31,88	0,02	0,03
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		203	0,22	0,41	0,21	1,96	7,00	9,70	0,03	0,04
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		237	0,28	0,48	0,28	1,71	13,00	18,02	0,02	0,03
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	15	316	0,35	0,64	0,40	1,63	22,00	30,49	0,02	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		258	0,28	0,52	0,36	1,45	4,00	5,54	0,03	0,05
<i>C. butyricum</i> E 16 A		329	0,36	0,67	0,42	1,60	8,00	11,09	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		321	0,39	0,66	0,43	1,71	7,50	10,39	0,03	0,04
<i>C. butyricum</i> 581		296	0,35	0,60	0,41	1,47	18,00	24,95	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 89K25B		293	0,33	0,60	0,39	1,53	5,00	6,93	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		376	0,46	0,78	0,54	1,45	2,50	3,46	0,01	0,02
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		322	0,37	0,67	0,43	1,57	3,00	4,16	0,01	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	20	243	0,24	0,49	0,33	1,50	4,50	6,24	0,02	0,03
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		338	0,42	0,70	0,45	1,61	2,00	2,77	0,01	0,02
<i>C. butyricum</i> E 16 A		309	0,35	0,63	0,42	1,52	20,00	27,72	0,02	0,03
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		320	0,38	0,66	0,42	1,59	8,50	11,78	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		256	0,30	0,53	0,35	1,54	26,00	36,03	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 89K25B		271	0,32	0,55	0,36	1,55	10,50	14,55	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		294	0,35	0,61	0,39	1,58	1,50	2,08	0,01	0,02
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		288	0,39	0,61	0,40	1,64	4,50	6,24	0,01	0,01

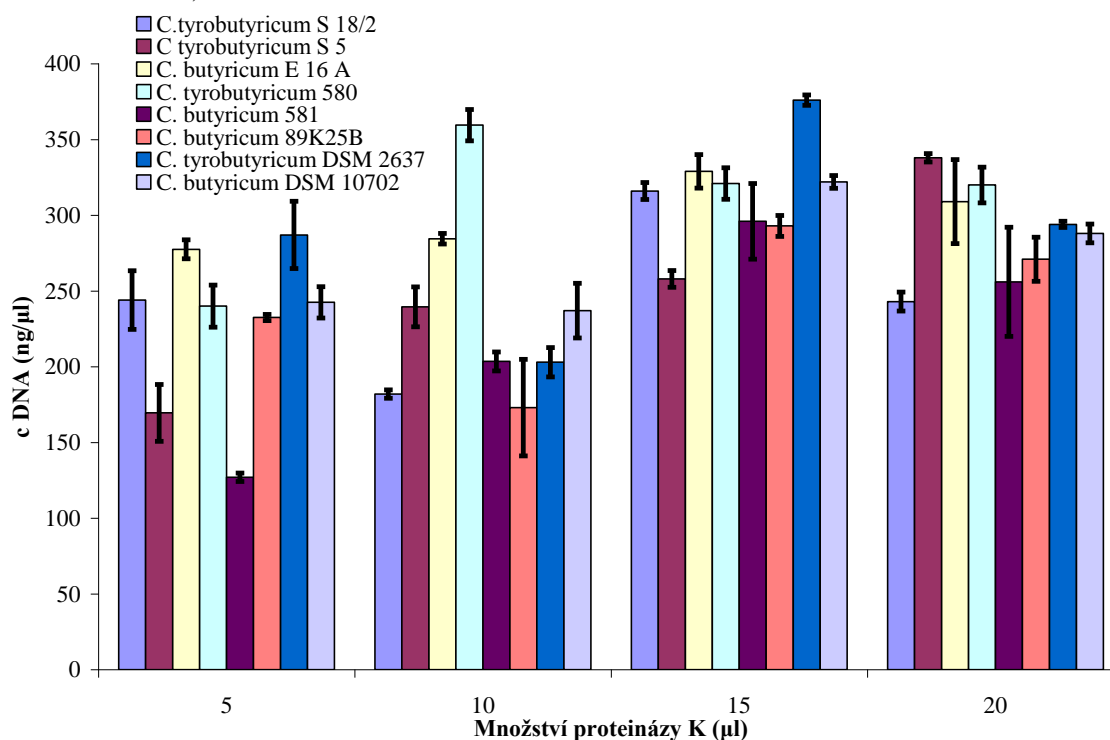
Byla izolována DNA v koncentracích 127 – 376 ng/μl. Při množství 5 a 10 μl proteinázy K

v lyzačním roztoku byly hodnoty poměru absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ v rozmezí 1,66 – 1,96 v porovnání s hodnotami pro množství proteinázy K 15 a 20 μl , které byly v rozmezí 1,45 – 1,710. Buňky podrobené působení lyzačních roztoků obsahujících 5 a 10 μl proteinázy K obsahovaly DNA o vyšší čistotě.

5.3.3. Grafické vyhodnocení vlivu množství proteinázy K na izolaci DNA z různých kmenů klostridií

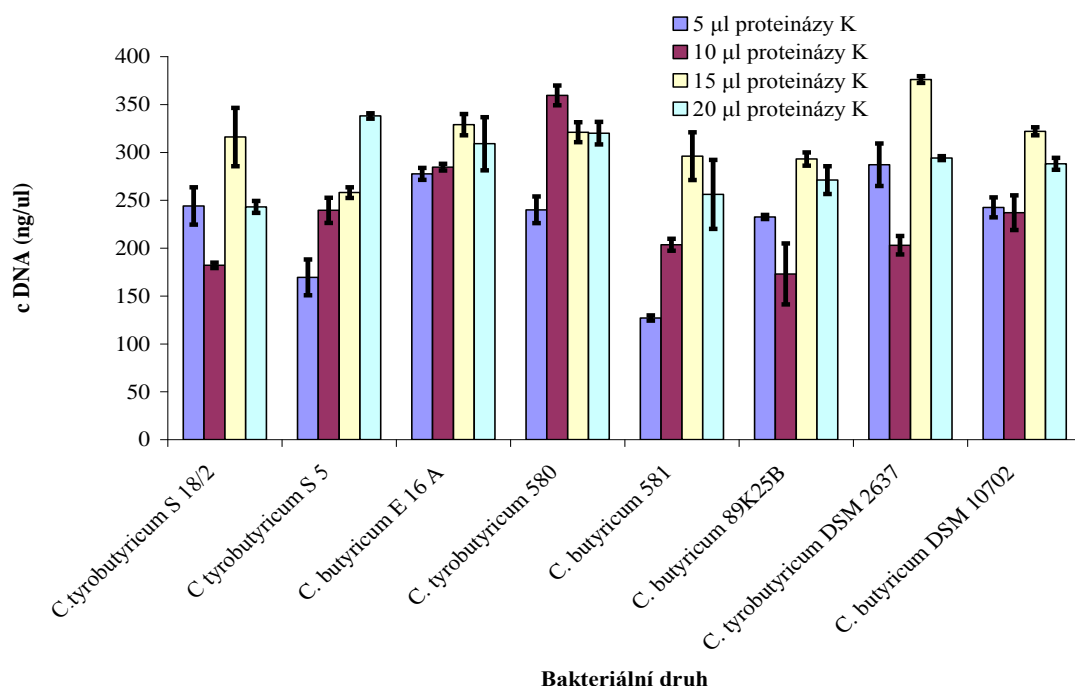
Lyzační roztoky s různým obsahem proteinázy K byly porovnány na základě stanovené koncentrace izolované DNA pomocí fenolové extrakce, z naměřených hodnot byl sestrojen Graf 7. Bakteriální kmeny byly porovnány podle stanovené koncentrace DNA izolované metodou fenolové extrakce (Graf 8) Byly porovnány naměřené hodnoty absorpance $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, pomocí kterých byl vybrán lyzační roztok s nejvhodnějším poměrem absorpance $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (viz Graf 9).

Graf 7 Závislost množství proteinázy K v lyzačním roztoku na koncentraci izolované DNA (fenolová extrakce)



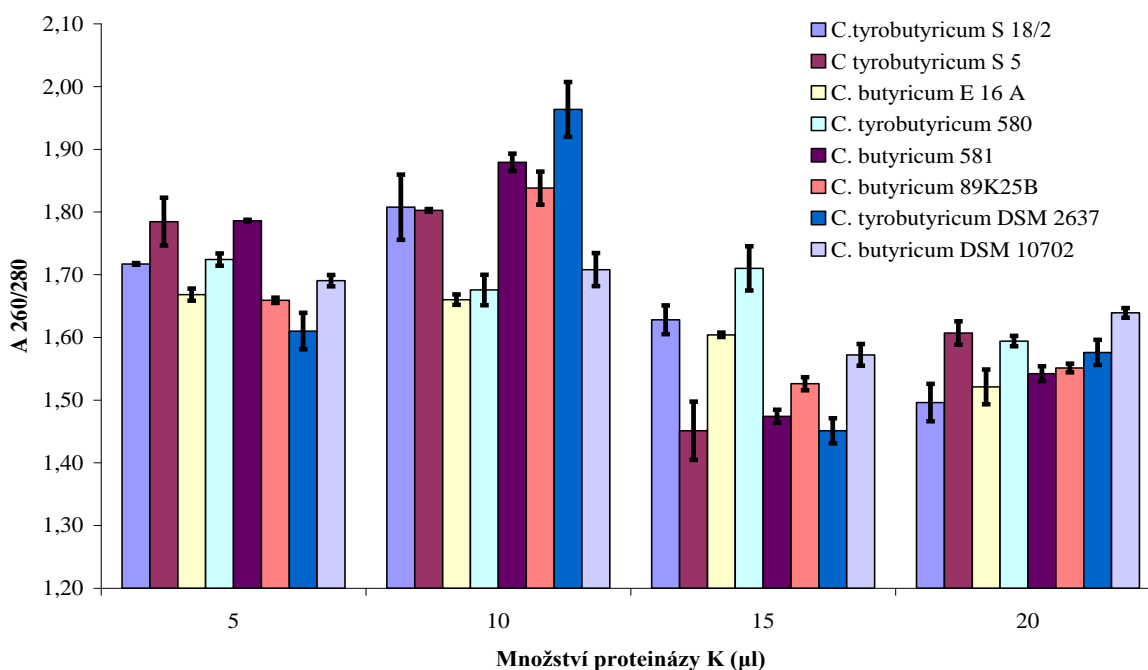
Nejvyšší hodnoty koncentrace DNA byly stanoveny po izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk připravených lyzačním puforem obsahujícím 15 μl proteinázy K.

Graf 8 Závislost množství izolované DNA na objemu proteinázy K v lyzačním pufru u bakteriálních kmenů (fenolová extrakce)



Byly zjištěny rozdíly ve stanovené koncentraci DNA mezi jednotlivými kmeny. Nejvyšších výtěžků DNA bylo dosaženo u kmenů *C. butyricum* E 16 A a *C. tyrobutyricum* 580. U kmene *C. butyricum* 89K25B byly stanoveny nejnižší koncentrace DNA v porovnání s jednotlivými kmeny.

Graf 9 Závislost množství proteinázy K v lyzačním roztoku na poměru absorpance A 260/280 určující kvalitu izolované DNA (fenolová extrakce)



Při použití 10 µl proteinázy K v lyzačním roztoku byla izolovaná a detegována DNA o nejvyšší čistotě v porovnání s ostatními množstvími proteinázy K v lyzačních roztocích.

5.3.3.1. Shrnutí - vliv množství proteinázy K v lyzačním pufru na kvalitu a množství izolované DNA metodou fenolové extrakce

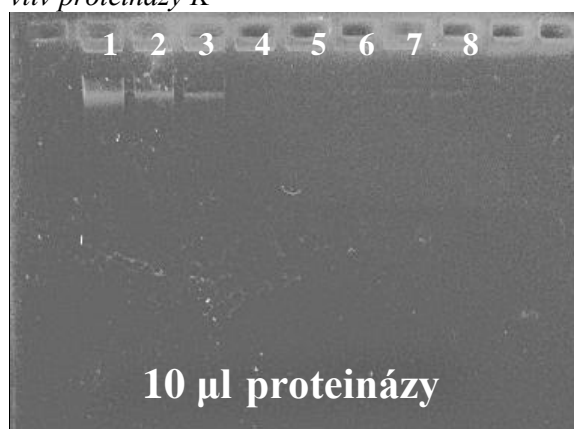
Množství 10 μ l proteinázy K v lyzačním pufru bylo stanoveno jako nejvýhodnější s ohledem na kvalitu a množství izolované DNA.

5.3.4. Izolace DNA pomocí magnetických nosičů

DNA byla izolována pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) ze 100 μ l hrubého lyzátu buněk pro jejichž přípravu bylo použito různé množství proteinázy K. Po přečištění částic ethanolem byla izolovaná DNA rozpouštěna přes noc v 50 μ l TE pufru.

Kvalita izolované DNA byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy pro vzorky s objemem 10 μ l proteinázy K v lyzačním pufru (Obrázek 12).

Obrázek 12 Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z různých kmenů klostridií (0,8% agarózový gel) – vliv proteinázy K



Tabulka 13 Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z různých kmenů klostridií – vliv proteinázy K

Běh	Kmen	Proteináza K
		10 (μ l)
1	<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	++
2	<i>C. tyrobutyricum</i> S 5	++
3	<i>C. butyricum</i> E 16 A	+
4	<i>C. tyrobutyricum</i> 580	–
5	<i>C. butyricum</i> 581	–
6	<i>C. butyricum</i> 89K25B	–
7	<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	–
8	<i>C. butyricum</i> DSM 10702	–

+, ++, +++ DNA detegovaná o různé intenzitě;

– DNA nebyla detegována

U kmenů *C.tyrobutyricum* S 18/2, *C tyrobutyricum* S 5 a *C. butyricum* E 16 A byla detegována relativně intaktní DNA (Obrázek 12). Při izolaci DNA pomocí magnetických částic nebyla detegována RNA na gelu.

DNA izolovaná ze 100 μ l hrubého lyzátu buněk připravených pomocí lyzačních roztoků s různým objemem proteinázy K byla proměřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer (Tabulka 14). Vzorek DNA byl nanesen v množství 3 μ l při LID faktoru 10. Jednotlivé vzorky DNA byly 3 \times proměřeny.

Tabulka 14 Čistota a množství DNA stanovené spektrofotometricky po izolaci pomocí magnetických nosičů

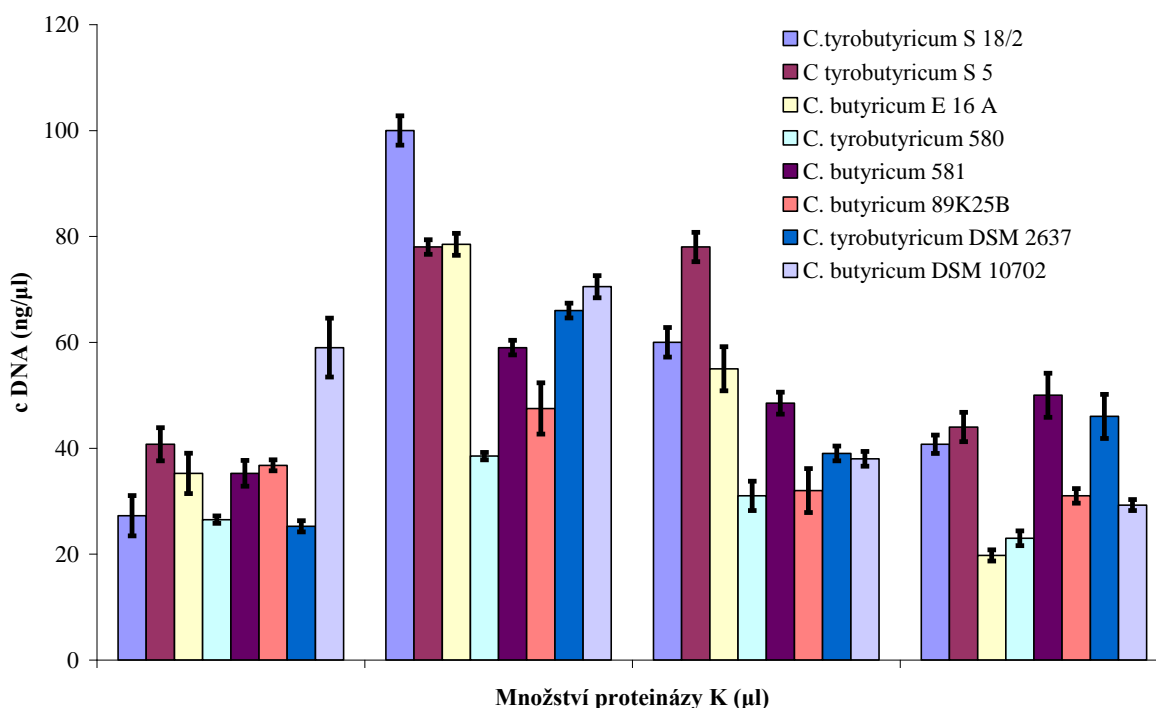
Kmen	EDTA (mM)	DNA (ng/μl)	Absorbance				DNA		260/280	
			230	260	280	$\frac{260}{280}$	σ	IS	σ	IS
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	5	27,25	0,08	0,38	0,06	1,68	2,75	3,81	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		40,75	0,16	0,13	0,10	1,54	2,25	3,12	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> E 16 A		35,25	0,10	0,12	0,09	1,65	2,75	3,81	0,03	0,04
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		26,50	0,07	0,07	0,05	1,63	0,50	0,69	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		35,25	0,11	0,10	0,07	1,70	1,75	2,43	0,02	0,03
<i>C. butyricum</i> 89K25B		36,75	0,12	0,10	0,07	1,62	0,75	1,04	0,01	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		25,25	0,06	0,07	0,04	1,65	0,75	1,04	0,01	0,02
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		59,00	0,21	0,18	0,13	1,66	4,00	5,54	0,03	0,04
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	10	100,00	0,22	0,27	0,19	1,76	2,00	2,77	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		78,00	0,17	0,23	0,17	1,59	1,00	1,39	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> E 16 A		78,50	0,27	0,25	0,21	1,54	1,50	2,08	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		38,50	0,13	0,10	0,08	1,63	0,50	0,69	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		59,00	0,17	0,19	0,15	1,55	1,00	1,39	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 89K25B		47,50	0,12	0,15	0,12	1,52	3,50	4,85	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		66,00	0,23	0,22	0,17	1,58	1,00	1,39	0,03	0,04
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		70,50	0,21	0,23	0,18	1,55	1,50	2,08	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	15	60,00	0,23	0,20	0,14	1,58	2,00	2,77	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		78,00	0,33	0,21	0,20	1,80	2,00	2,77	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> E 16 A		55,00	0,26	0,19	0,13	1,67	3,00	4,16	0,02	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		31,00	0,14	0,09	0,05	1,84	2,00	2,77	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> 581		48,50	0,16	0,17	0,13	1,76	1,50	2,08	0,00	0,00
<i>C. butyricum</i> 89K25B		32,00	0,08	0,08	0,06	1,58	3,00	4,16	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		39,00	0,10	0,10	0,06	1,79	1,00	1,39	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		38,00	0,09	0,09	0,06	1,81	1,00	1,39	0,00	0,00
<i>C. tyrobutyricum</i> S 18/2	20	40,75	0,13	0,11	0,05	1,67	1,25	1,73	0,01	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> S 5		44,00	0,14	0,12	0,09	1,66	2,00	2,77	0,02	0,03
<i>C. butyricum</i> E 16 A		19,75	0,05	0,05	0,03	1,69	0,75	1,04	0,02	0,02
<i>C. tyrobutyricum</i> 580		23,00	0,06	0,07	0,05	1,69	1,00	1,39	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 581		50,00	0,15	0,13	0,10	1,69	3,00	4,16	0,01	0,01
<i>C. butyricum</i> 89K25B		31,00	0,07	0,08	0,06	1,63	1,00	1,39	0,01	0,01
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T		46,00	0,12	0,12	0,08	1,70	3,00	4,16	0,00	0,01
<i>C. butyricum</i> DSM 10702		29,25	0,04	0,06	0,04	1,70	0,75	1,04	0,02	0,03

Byla izolovaná DNA o koncentraci, která se pohybovala v rozmezí 19,75 – 100 ng/μl. Byl naměřen poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ v rozmezí 1,52 – 1,84 určující čistotu izolované DNA pomocí magnetických částic.

5.3.5. Grafické vyhodnocení vlivu množství proteinázy K v lyzačním pufru na izolaci DNA pomocí magnetických nosičů u 8 kmenů klostridií

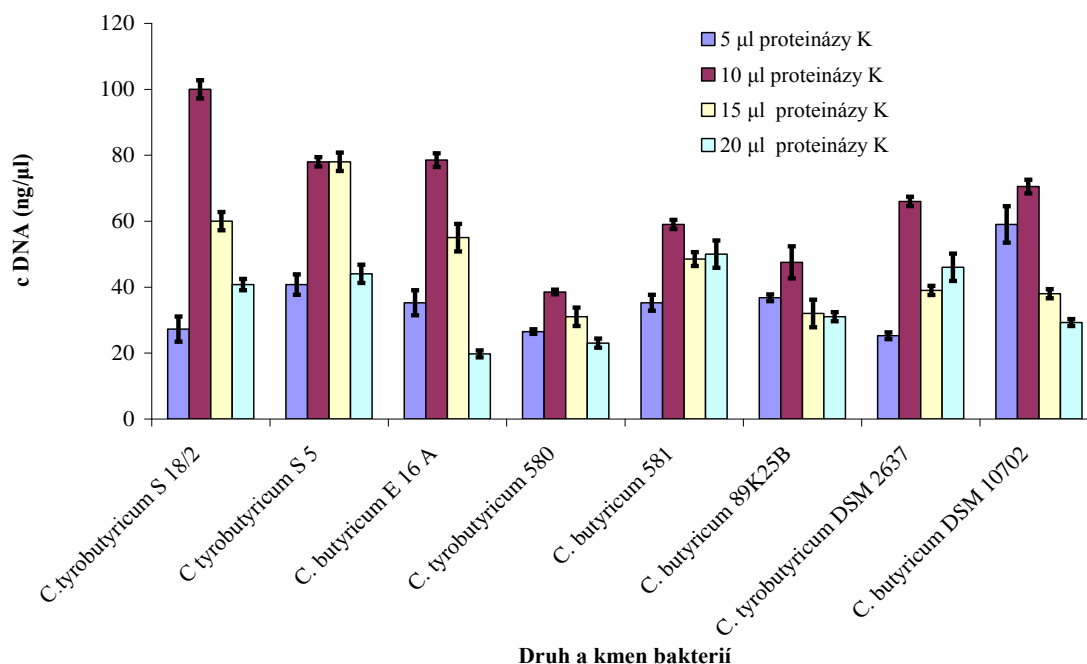
Byl se strojen graf závislosti koncentrace izolované DNA pomocí magnetických částic na množství proteinázy K v lyzačním roztoku (viz Graf 10). Na základě stejné optické hustoty buněk byly porovnány stanovené koncentrace izolované DNA mezi jednotlivými kmeny klostridií (Graf 11). Bylo vyhodnoceno nejvýhodnější množství proteinázy K v lyzační směsi podle stanovených poměrů absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (Graf 12).

Graf 10 Závislost stanovené koncentrace DNA izolované z 8 bakteriálních kmenů na množství proteinázy K (magnetické částice)



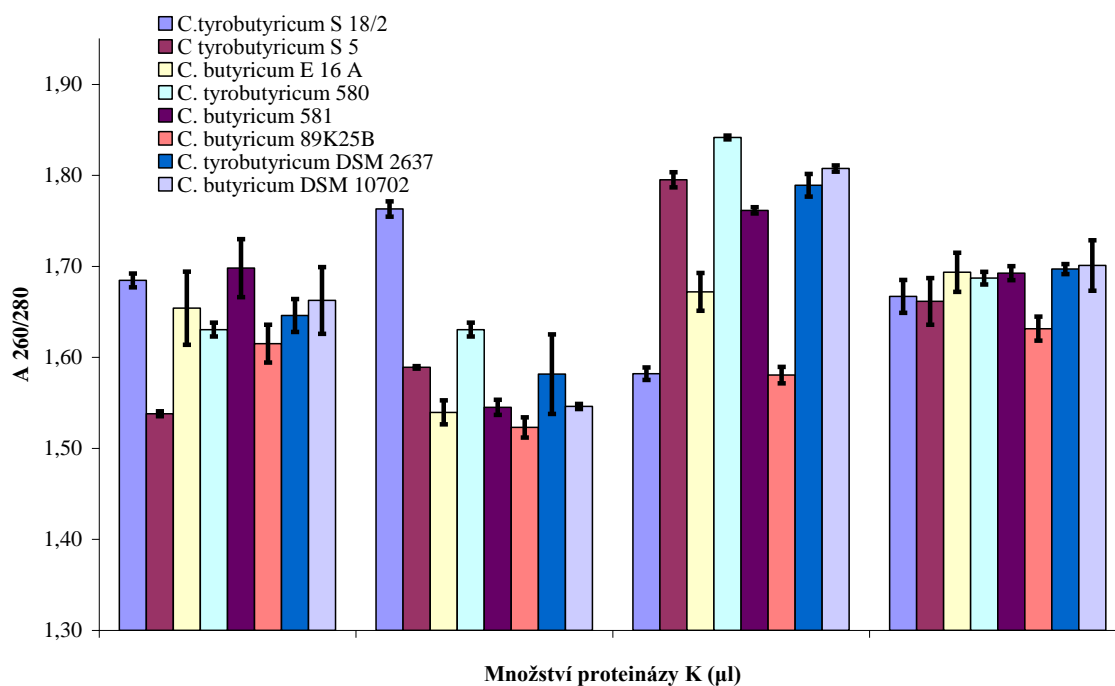
Nejvyšší koncentrace DNA u izolace pomocí magnetických nosičů byly stanoveny při objemu 10 μl proteinázy K v lyzačním roztoku.

Graf 11 Závislost množství izolované DNA na množství proteinázy K v lyzačním pufru u bakteriálních kmenů (magnetické částice)



Byly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými kmeny v množství izolované DNA pomocí magnetických částic. Kmen *C. tyrobutyricum* 580 vykazoval nejnižší hodnoty stanovených koncentrací DNA. Ostatní kmeny vykazovali podobné hodnoty koncentrací izolované DNA.

Graf 12 Závislost poměru absorpance A_{260nm}/A_{280nm} určující kvalitu izolované DNA na množství proteinázy K v lyzačním pufru (magnetické částice)



Nejvýhodnější poměry absorpance A_{260nm}/A_{280nm} byly zaznamenány při objemu 15 μl proteinázy K v lyzačním roztoku. Větší objem (15 μl a 20 μl) proteinázy K v lyzačních roztocích měl vliv na čistotu izolované DNA pomocí magnetických částic.

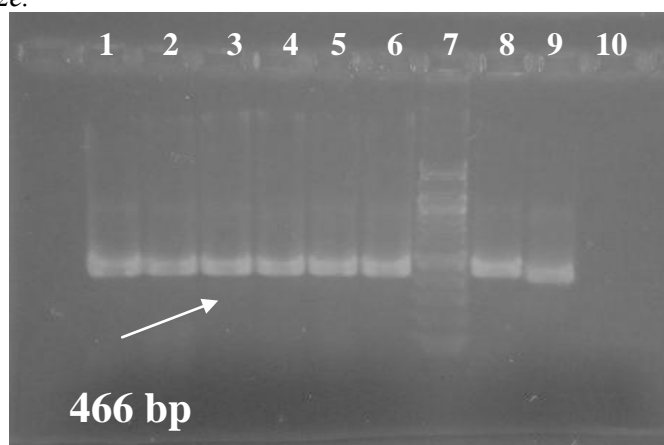
5.3.5.1. Shrnutí - vliv množství EDTA v lyzačním pufru na kvalitu a množství izolované DNA pomocí magnetických částic

S ohledem na kvalitu izolované DNA byl zvolen jako nejvhodnější objem 15 μ l proteinázy K. Nejvyšší koncentrace DNA izolované pomocí magnetických částic byly docíleny při objemu 10 μ l proteinázy K v lyzačním roztoku. Rozdíly mezi objemy 10 μ l a 15 μ l proteinázy K v lyzačním roztoku nebyly velké v závislosti na stanovené koncentraci izolované DNA.

5.4. PCR s univerzálními primery pro doménu *Bacteria*

Kvalita izolované DNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy. Bylo sledováno zda-li není izolovaná DNA degradována (viz Obrázek 10 a Tabulka 8). Amplifikace izolované DNA byla ověřena v PCR s primery R_eub a F_eub specifickými pro doménu *Bacteria* podle Haarmanové²⁹. Pro amplifikaci byla vybrána DNA izolovaná z hrubého lyzátu buněk pomocí lyzačních roztoků o koncentraci 10 mM EDTA a s objemem 10 μ l proteinázy K metodou fenolové extrakce. PCR směs byla připravena podle Tabulky 3 a programu podle Tabulky 5. DNA byla ředěna na koncentraci 10 ng/ μ l TE pufrém. Produkty PCR (466 bp) byly detegovány po amplifikaci DNA pomocí gelové elektroforézy (Obrázek 13).

Obrázek 13 PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp). Gelová elektroforéza na 1,5 % agaróze.



Tabulka 15 PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria*

Běh	Bakteriální kmen	Intenzita Produktů PCR
1	<i>C.tyrobutyricum</i> S 18/2	+++
2	<i>C tyrobutyricum</i> S 5	+++
3	<i>C. butyricum</i> E 16 A	+++
4	<i>C. tyrobutyricum</i> 580	+++
5	<i>C. butyricum</i> 581	+++
6	<i>C. butyricum</i> 89K25B	+++
7	DNA standard (100 bp)	++
8	<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	+++
9	<i>C. butyricum</i> DSM 10702	+++
10	Negativní kontrola	-

+, ++, +++ DNA detegovaná o různé intenzitě;

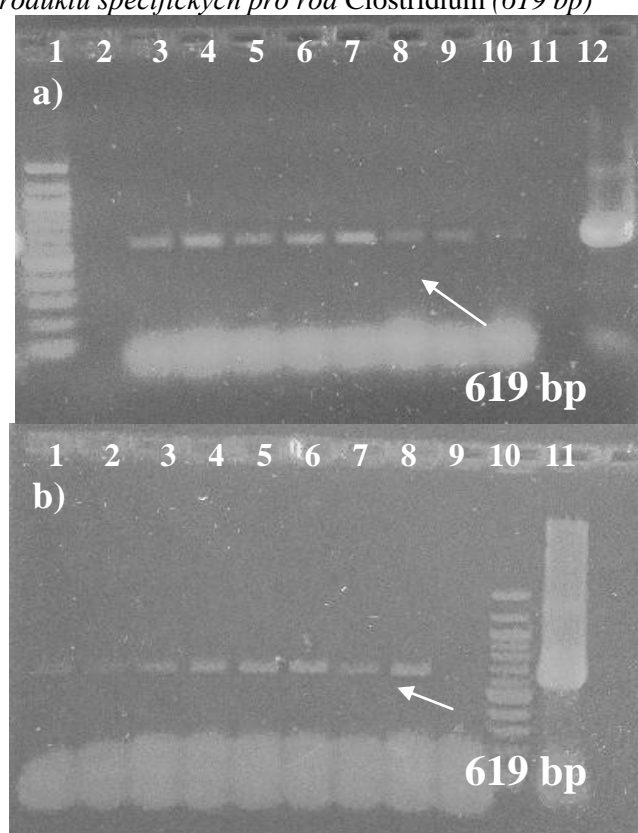
– DNA nebyla detegována

U všech kmenů klostridií byl detegován specifický PCR produkt o velikosti 466 bp a silné intenzitě.

5.5. Rodově specifická PCR pro rod *Clostridium*

Byla provedena rodově specifická PCR s primery F1 a F2 pro rod *Clostridium* podle Rekha³⁰. DNA byla izolována z hrubého lyzátu buněk pomocí lyzačních roztoků o koncentraci 10 mM EDTA a objemu 10 µl proteinázy K metodou fenolové extrakce. Pro izolaci DNA z hrubých lyzátů pomocí magnetických částic byly použity lyzační pufrы o koncentraci 10 mM EDTA a objemu 15 µl proteinázy K. DNA byla ředěna na koncentraci 10 ng/µl. PCR produkty o velikosti 619 bp byly detegovány pomocí gelové elektroforézy (Obrázek 14).

Obrázek 14 PCR produktů specifických pro rod *Clostridium* (619 bp)



Tabulka 16 PCR produktů specifických pro rod *Clostridium*

Bakteriální kmen	Běh (a)	Běh (b)	Intenzita PCR produktů	
			(a)	(b)
<i>C.tyrobutyricum</i> S 18/2	3	1	+++	+
<i>C tyrobutyricum</i> S 5	4	2	+++	+
<i>C. butyricum</i> E 16 A	5	3	+++	++
<i>C. tyrobutyricum</i> 580	6	4	+++	++
<i>C. butyricum</i> 581	7	5	+++	+++
<i>C. butyricum</i> 89K25B	8	6	++	+++

Pokračování Tabulky 16 *PCR produktů specifických pro rod Clostridium*

Bakteriální kmen	Běh (a)	Běh (b)	Intenzita PCR produktů	
			(a)	(b)
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	9	7	++	+
<i>C. butyricum</i> DSM 10702	10	8	+	+++
DNA Standard (100 bp)	1	10	+++	+++
Negativní kontrola	2,11	9	–	–
Pozitivní kontrola	12	11	+++	+++

DNA izolovaná pomocí fenolové extrakce (a), magnetických nosičů (b). Gelová elektroforéza na 1,5% agaróze.

+, ++, +++ DNA detegovaná o různé intenzitě;

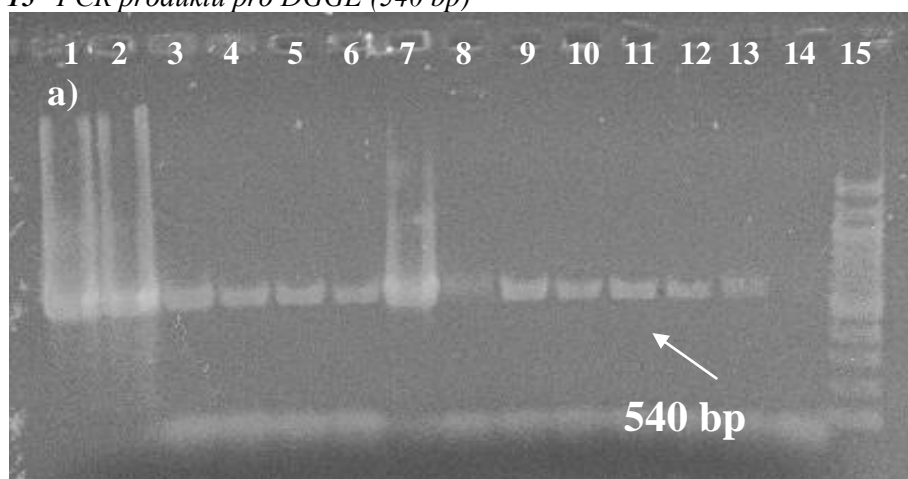
– DNA nebyla detegována

U všech kmenů klostridií byl detegován specifický produkt PCR o velikosti 619 bp. Intenzivnější amplikony byly detegovány u DNA izolované metodou fenolové extrakce než pomocí magnetických částic.

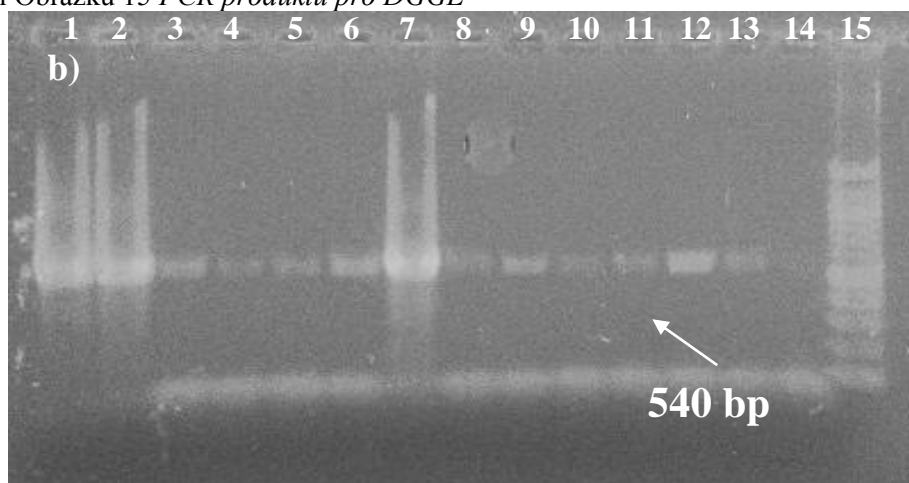
5.6. PCR s primery pro denaturační gradientovou elektroforézu

Byla provedena PCR s primery Chis150f, ClostIr pro DGGE obsahující GC svorku podle Hung³¹, která zabraňuje oddělení obou řetězců DNA v gradientu gelu. PCR byla provedena se všemi testovanými kmeny. DNA byla izolována z hrubého lyzátu buněk pomocí lyzačních roztoků o koncentraci 10 mM EDTA a objemu 10 µl proteinázy K metodou fenolové extrakce a hrubého lyzátu buněk pomocí lyzačních roztoků o koncentraci 10 mM EDTA a objemu 15 µl proteinázy K pomocí magnetických částic. DNA byla ředěna na koncentraci 10 ng/µl. PCR produkty o velikosti 540 bp byly detegovány pomocí gelové elektroforézy (Obrázek 15).

Obrázek 15 PCR produktů pro DGGE (540 bp)



Pokračování Obrázku 15 PCR produktů pro DGGE



Tabulka 17 PCR produktů pro DGGE

Bakteriální kmen	Běh	Intenzita PCR produktů	
		(a)	(b)
<i>C.tyrobutyricum</i> S 18/2	1	+++	+++
<i>C tyrobutyricum</i> S 5	2	+++	+++
<i>C. butyricum</i> E 16 A	3, 9	++/++	++/++
<i>C. tyrobutyricum</i> 580	4, 10	++/++	+/+
<i>C. butyricum</i> 581	5, 11	++/++	+/+
<i>C. butyricum</i> 89K25B	6, 12	++/++	++/++
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	7	+++	+++
<i>C. butyricum</i> DSM 10702	8, 13	+/+	+/+
DNA Standard (100 bp)	15	++	+++
Negativní kontrola	14	–	–

DNA izolovaná pomocí magnetických nosičů (a), fenolové extrakce (b). Gelová elektroforéza na 1,5% agaróze

+, ++, +++ DNA detegovaná o různé intenzitě;

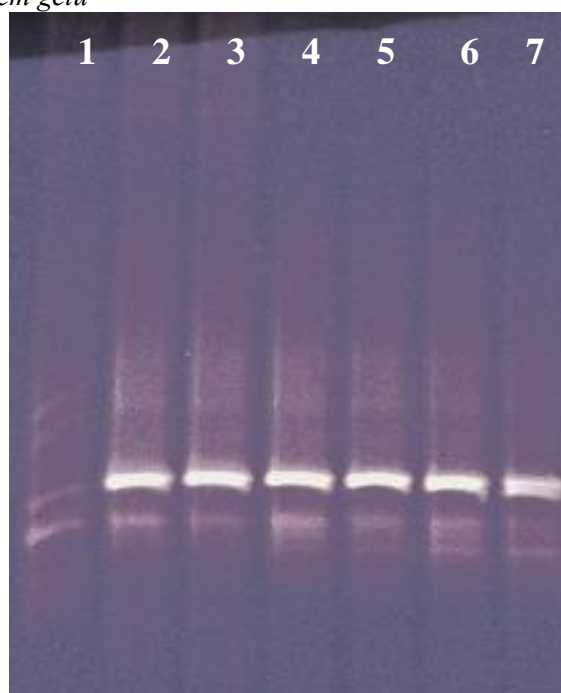
– DNA nebyla detegována

Byl detegován specifický produkt PCR o velikosti 540 bp v různých intenzitách u jednotlivých druhů klostridií. U druhů *Clostridium tyrobutyricum* byly detegovány intenzivnější amplikony v porovnání s druhem *Clostridium butyricum*. V porovnání obou metod izolace byly detegovány intenzivnější amplikony u izolace pomocí magnetických částic než u metody fenolové extrakce.

5.7. Denaturační gradientová elektroforéza

Produkty PCR obsahující GC svorku připravené v PCR pro denaturační gradientovou elektroforézu byly rozděleny v 6% polyakrylamidovém gelu v gradientu denaturačních činidel (Obrázek 16). Podle intenzity produktů PCR (viz Obrázek 15) bylo nanášeno do komůrek v gelu různé množství produktů PCR. Intenzivnější produkty PCR byly nanášeny v množství 15 μ l a 5 μ l nanášecího pufu, méně intenzivní produkty v množství 30 μ l a 10 μ l nanášecího pufu.

Obrázek 16 Denaturační gradientová elektroforéza bakterií rodu *Clostridium* v 6 % polyakrylamidovém gelu



Tabulka 18 Denaturační gradientová elektroforéza bakterií rodu *Clostridium*

Kmen	Běh	Intenzita produktů PCR
<i>C.tyrobutyricum</i> S 18/2	2, 3	+++
<i>C tyrobutyricum</i> S 5	4, 5	+++
<i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	6, 7	+++
Pozitivní kontrola	1	+

+, ++, +++ DNA detegovaná o různé intenzitě;

– DNA nebyla detegována

Pomocí denaturační gelové elektroforézy byly detegovány intenzivní amplikony u druhů *Clostridium tyrobutyricum*. Porovnáním obou metod izolace DNA byly detegovány amplikony stejné intenzity u metody fenolové extrakce i pomocí magnetických částic. Jako pozitivní kontrola byla použita směs produktů PCR druhů *C. tyrobutyricum* DSM 2637^T a *C. butyricum* DSM 10702, která vytvořila 2 bandy (Obrázek 16 běh 1).

6. DISKUZE

6.1. Kultivace bakterií rodu *Clostridium*

Bakteriální kmeny druhů *Clostridium tyrobutyricum* a *Clostridium butyricum* byly vybrány k testování v diplomové práci z důvodů výskytu komplikací během izolace DNA v předchozích experimentech. Důvodem těchto komplikací byla izolace degradované DNA, pravděpodobně činností vnitrobuněčných nukleáz degradujících DNA. Cílem práce bylo izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Bakterie rodu *Clostridium* testované v diplomové práci byly kultivovány za anaerobních podmínek podle práce Tůma a kol.³⁴. Během kultivace byl v kultivačních zkumavkách pozorován vznik bublinek plynu u kmenů *Clostridium tyrobutyricum* a *Clostridium butyricum* popsány v literatuře^{35, 36}. Buňky byly podrobeny lyzi a z hrubých lyzátů buněk byla izolována DNA podle Sambrooka³⁷.

6.2. Vliv koncentrace EDTA v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA

U bakterií rodu *Clostridium* testovaných v diplomové práci byl sledován vliv koncentrace EDTA v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA. Obecně lze předpokládat, že čím vyšší koncentrace EDTA v lyzačním roztoku, tím by se mělo dosáhnout kvalitnější DNA o vyšší koncentraci. EDTA v lyzačním roztoku vyvazovala kationy nezbytné pro aktivaci nukleáz, které způsobovaly degradaci DNA. Byla testována série lyzačních roztoků o koncentraci EDTA 5, 10, 15 a 20 mM a byla stanovena nejvýhodnější koncentrace EDTA.

DNA z vybraných kmenů bakterií rodu *Clostridium* byla dále izolována pomocí fenolové extrakce. Koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí od 264 – 746 ng/μl (viz Tabulka 8). Nejvyšších hodnot koncentrací izolované DNA bylo dosaženo při použití 20 mM EDTA v lyzačním roztoku (viz Graf 1) Koncentrace 10 mM EDTA v lyzačním roztoku poskytovala druhé nejvyšší hodnoty stanovených koncentrací DNA v porovnání s ostatními. U koncentrací 5 a 15 mM EDTA byla naměřena nižší koncentrace DNA. Druh *Clostridium butyricum* E 16 A poskytoval nejvyšší hodnoty koncentrací izolované DNA (viz Graf 2). Na kvalitu DNA stanovenou poměrem absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ měl nejlepší vliv lyzační roztok o koncentraci EDTA 10 mM (viz Graf 3). Hodnoty poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byly v rozmezí 1,40 – 1,78 (viz Tabulka 8). Vyšší koncentrace EDTA v lyzačním roztoku 15 a 20 mM měly horší vliv na čistotu izolované DNA. Důvodem mohlo být vyvázání všech kationů ve vzorcích i takových, které jsou důležité pro enzymy katalyzující proces lyze jako jsou lysozym a proteináza K³⁷. Celkové hodnoty poměrů $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byly nižší než jsou obvyklé u čisté DNA. Optimální poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ je mezi 1,8 – 2,0. Nižší hodnoty poměrů mohly být způsobeny vyšším obsahem proteinů v testovaných vzorcích. Izolovaná DNA byla detegována pomocí gelové elektroforézy (viz Obrázek 10). DNA izolovaná pomocí lyzačního roztoku o koncentraci EDTA 10 mM poskytla nejintenzivnější bandy a byla zvolena jako nejvýhodnější.

DNA z vybraných kmenů bakterií rodu *Clostridium* byla izolována pomocí magnetických částic. Na rozdíl od izolace metodou fenolové extrakce bylo použito 4× nižší množství hrubých lyzátů buněk. Nejvyšších hodnot koncentrací izolované DNA bylo dosaženo při množství 10 mM EDTA v lyzačním roztoku (viz Graf 4). Ostatní množství EDTA v lyzačním pufu poskytly podobné hodnoty koncentrací izolované DNA (viz Graf 4). Koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí 17 – 86 ng/μl (viz Tabulka 9). Druh *Clostridium butyricum* E 16 A

vykazoval nejvyšší hodnoty koncentrací izolované DNA (viz Graf 5). Na kvalitu izolované DNA stanovenou poměrem absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ mělo nejlepší vliv množství 5 mM EDTA v lyzačním pufru (viz Graf 6). Hodnoty poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byly v intervalu hodnot 1,31 – 1,70 (viz Tabulka 9). U izolace DNA pomocí magnetických částic bylo vybráno množství 10 mM EDTA v lyzačním pufru jako nejvýhodnější s ohledem na kvalitu a množství izolované DNA z testovaných kmenů klostridií. Z důvodu nižších výtěžků DNA v porovnání s fenolovou extrakcí nebyla DNA izolovaná pomocí magnetických částic podrobena gelové elektroforéze za účelem kontroly její intaktnosti.

6.3. Vliv množství proteinázy K v lyzačním roztoku na kvalitu a koncentraci izolované DNA

Během lyze buněk byl sledován i vliv množství proteinázy K v lyzačním roztoku na kvalitu a koncentraci izolované DNA. Byl předpokládán zvýšený obsah proteinů a přítomnost nukleáz degradujících DNA. Předpokládalo se, že vyšší koncentrace proteinázy K v lyzačním roztoku zvýší koncentraci a zlepší kvalitu izolované DNA. Byly připraveny lyzační roztoky o celkovém množství proteinázy K 5, 10, 15 a 20 μl a byl stanoven nejvýhodnější objem proteinázy K.

DNA byla izolována metodou fenolové extrakce. Množství 15 a 20 μl proteinázy K v lyzačním roztoku mělo lepší vliv na velikost hodnot koncentrací izolované DNA v porovnání s 5 a 10 μl proteinázy K (Graf 7). Koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí 127 – 376 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (viz Tabulka 12). Při objemu 15 μl proteinázy K v lyzační směsi bylo dosaženo nejvyšších hodnot koncentrací izolované DNA (Graf 7). Druhy *Clostridium butyricum* E 16 A a *Clostridium tyrobutyricum* 580 poskytovaly nejvyšší hodnoty koncentrací izolované DNA mezi testovanými kmeny (Graf 8). Nejlepší vliv na kvalitu izolované DNA měl objem 10 μl proteinázy K v lyzačním pufru (viz Graf 9). Hodnoty poměrů absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ se pohybovaly v rozmezí 1,45 – 1,96 (viz Tabulka 12). U objemů 15 a 20 μl byly naměřeny nižší hodnoty poměrů $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Izolovaná DNA byla podrobena gelové elektroforéze (viz Obrázek 11); izolovaná DNA nejevila stopy degradace. Nejintenzivnější bandy byly detegovány u objemu 10 μl proteinázy K v lyzačním pufru.

Z vybraných kmenů bakterií rodu *Clostridium* byla izolována DNA pomocí magnetických částic. Bylo použito 4× nižší množství hrubých lyzátů buněk než při izolaci metodou fenolové extrakce. Nejvyšších hodnot koncentrací izolované DNA bylo dosaženo při množství 10 μl proteinázy K v lyzačním pufru (viz Graf 10). Koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí 19,75 – 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (viz Tabulka 14). Bylo zjištěno, že hodnoty koncentrací DNA byly u všech analyzovaných kmenů podobné (viz Graf 11). Na kvalitu izolované DNA stanovenou poměrem absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ měl nejlepší vliv objem 15 μl proteinázy K v lyzačním pufru (viz Graf 12). Hodnoty poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byly v intervalu hodnot 1,52 – 1,84 (viz Tabulka 14). Jako nejvýhodnější množství proteinázy K, při izolaci DNA pomocí magnetických částic bylo zvoleno množství 15 μl proteinázy K v lyzačním pufru s ohledem na kvalitu a koncentraci izolované DNA. Z důvodu nižších výtěžků DNA v porovnání s fenolovou extrakcí nebyla DNA izolovaná pomocí magnetických částic podrobena gelové elektroforéze za účelem kontroly její intaktnosti. Výjimkou byly vzorky DNA jejichž lyze probíhala při koncentraci 10 mM EDTA a objemu 10 μl proteinázy K v lyzačním pufru. Gelovou elektroforézou byly detegovány 3 druhy (viz Obrázek 12 a Tabulka 13) bez stop degradace. Koncentrace detegovaných vzorků DNA se pohybovaly v rozmezí 78 – 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Na gelu nebyla detegována RNA.

6.4. PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* a rod *Clostridium*

Intaktnost izolované DNA byla prověřena v PCR reakci s primery F_eub a R_eub pro doménu *Bacteria* podle Haarmanové²⁹. U všech kmenů klostridií byl detegován intenzivní produkt PCR o velikosti 466 bp (Obrázek 13).

Dále byla provedena rodově specifická PCR pro rod *Clostridium* s primery F1 a F2 podle Rekha³⁰. Bylo potvrzeno, že testované kmeny patří do rodu *Clostridium*. Byl detegován specifický produkt PCR o velikosti 619 bp (Obrázek 14).

6.5. PCR pro denaturační gelovou elektroforézu

Byla provedena PCR pro denaturační gelovou elektroforézu. Pomocí primerů Chis150f a ClostrI r obsahujících GC svorku byla amplifikována oblast r16S DNA společná pro všechny bakterie rodu *Clostridium* podle Hung³¹. Pomocí gelové elektroforézy v 1,5 % gelu byly detegovány produkty PCR různé intenzity o velikosti 540 bp (viz Obrázek 15). Nejintenzivnější amplikony byly detegovány u kmenů *C. tyrobutyricum* S 18/2, *C. tyrobutyricum* S 5 a *C. tyrobutyricum* DSM 2637^T (viz Obrázek 15).

PCR pro DGGE byl provedena s DNA izolovanou metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic. Produkty PCR, jejichž výchozí DNA byla izolována pomocí magnetických částic, poskytovaly amplikony o vyšší intenzitě v porovnání s metodou fenolové extrakce, kromě druhů *C.tyrobutyricum* S 18/2, *C. tyrobutyricum* S 5 a *C. tyrobutyricum* DSM 2637^T, u kterých byly intenzity amplikonů srovnatelné.

6.6. Denaturační gradientová elektroforéza

Produkty PCR obsahující GC svorku byly separovány v gradientu gelu denaturačních činidel (močovina, formamid) podle Hung³¹. V DGGE byly detegovány intenzivní bandy u kmenů *C. tyrobutyricum* S 18/2, *C. tyrobutyricum* S 5 a *C. tyrobutyricum* DSM 2637^T (viz Obrázek 16).

Testovaná DNA byla izolována metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic. Byly detegovány bandy o stejné intenzitě u obou metod izolace DNA (Obrázek 16). Obě metody izolace DNA poskytovaly srovnatelné výsledky.

7. ZÁVĚR

V diplomové práci bylo analyzováno 8 kmenů bakterií rodu *Clostridium* izolovaných ze sýrů s vadou pozdního duření. U testovaných kmenů se nedařilo v předchozích experimentech izolovat DNA ve vhodné kvalitě, docházelo k její degradaci. Degradace DNA byla pravděpodobně způsobena přítomností vnitrobuněčných nukleáz. Cílem práce bylo optimalizovat postup lyze buněk a minimalizovat vliv vnitrobuněčných inhibitorů na degradaci DNA. Intaktnost izolované DNA byla ověřena pomocí PCR. Druhové rozlišení bylo provedeno pomocí denaturační gradientové elektroforézy.

Při optimalizaci postupu lyze buněk byl sledován vliv koncentrace EDTA a proteinázy K v lyzačním pufru na množství a kvalitu izolované DNA. Poté byla DNA izolována metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic. V závislosti na množství a kvalitě DNA byly stanoveny nejvhodnější koncentrace EDTA a proteinázy K v lyzačním pufru. Pro izolaci metodou fenolové extrakce byla zjištěna jako nejvýhodnější koncentrace 10 mM EDTA a 10 μ l proteinázy K. U izolace DNA pomocí magnetických částic byla zjištěna jako nejvhodnější koncentrace 10 mM EDTA a 15 μ l proteinázy K.

Intaktnost izolované DNA byla ověřena pomocí PCR pro doménu *Bacteria*, při které byl detegován specifický produkt PCR u všech testovaných kmenů. Byla provedena PCR specifická pro rod *Clostridium*, byl detegován specifický produkt PCR u všech analyzovaných kmenů.

Byla provedena PCR s primery obsahující GS svorku pro denaturační gradientovou elektroforézu (DGGE). U všech testovaných kmenů byly pomocí PCR v uspořádání pro DGGE detegovány produkty PCR. Pomocí denaturační gradientové elektroforézy byly 3 kmeny určeny jako *Clostridium tyrobutyricum*.

Z porovnání izolačních metod DNA - fenolové extrakce a izolace pomocí magnetických částic - bylo zjištěno, že obě metody poskytují srovnatelné výsledky.

8. LITERATURA

- ¹ Agronavigator [on line, cit. 14.2.2012] <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92468>
- ² GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- ³ LE BOURHIS, A.-G., K. SAUNIER, J. DORE, J.-P. CARLIER, J.-F. CHAMBA, M.-R. POPOFF a J.-L. THOLOZAN. Development and Validation of PCR Primers To Assess the Diversity of Clostridium spp. in Cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005-01-06, roč. 71, č. 1, s. 29-38. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.71.1.29-38.2005.
- ⁴ Accessscience [on line, cit. 28.2.2012] <http://accessscience.com/content/Cheese/125900>
- ⁵ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.
- ⁶ Microh2 [on line, cit. 28.2.2012] <http://www.microh2.ulg.ac.be/PROJECT3.html>
- ⁷ VALDEZ-VAZQUEZ, Idania a Héctor M. POGGI-VARALDO. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2009, roč. 13, č. 5, s. 1000-1013. ISSN 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2008.03.003.
- ⁸ ZIGOVÁ, J, ŠTURDÍK, E. Advances in biotechnological production of butyric acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000-3-1, roč. 24, č. 3, s. 153-160. ISSN 1367-5435. DOI: 10.1038/sj.jim.2900795.
- ⁹ SEDLAČEK, Z. *Produkce vodíku bakteriemi rodu Clostridium*. Brno. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010, 36 s.
- ¹⁰ KIM, Dong-Hoon a Mi-Sun KIM. Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*. 2011, roč. 102, č. 18, s. 8423-8431. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.113.
- ¹¹ RAY, Bibek. *Fundamental Food Microbiology*. 3rd ed. Hoboken: Taylor, 2003. ISBN 02-039-9825-1.
- ¹² BALTZ, Richard H, Julian E DAVIES a A DEMAİN. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2010, 766 s. ISBN 15-558-1512-X.
- ¹³ LEE, Duu-Jong, Kuan-Yeow SHOW a Ay SU. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology*. 2011, roč. 102, č. 18, s. 8393-8402. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.041.
- ¹⁴ CHONG, Mei-Ling, Vikineswary SABARATNAM, Yoshihito SHIRAI a Mohd Ali

-
- HASSAN. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2009, roč. 34, č. 8, s. 3277-3287. ISSN 03603199. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.02.010.
- ¹⁵ VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 2004, 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- ¹⁶ KRÁLOVÁ, Blanka a Pavel RAUCH. *Bioanalytické metody*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1993. ISBN 80-708-0177-8.
- ¹⁷ ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1
- ¹⁸ PERSSON, J; JOHANSSON, H, O, GALAEV, I, MATTIASSON, B, TJERNELD, F. Aqueous polymer twophase systeme formed by new thermoseparating polymers. *Bioseparation*, 2000, roč. 9, č. 2, s. 105 – 116
- ¹⁹ ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Nakladatelství Rosypal, 2006, 289 s. ISBN 80-902-5625-2
- ²⁰ HORÁK, D, SEMENYUK, N, LEDNICKÝ, F. Effect of the reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in the presence of a ferrofluid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2003-06-15, roč. 41, č. 12, s. 1848-1863. ISSN 0887-624x. DOI: 10.1002/pola.10728.
- ²¹ KŘÍŽOVÁ, J, ŠPANOVÁ, A, RITTICH, B, HORÁK, D. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*. 2005, roč. 1064, č. 2, s. 247-253. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.014.
- ²² HORÁK, D, RITTICH, B, ŠPANOVÁ A, BENEŠ, M. Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics. *Polymer*. 2005, roč. 46, č. 4, s. 1245-1255. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.11.049.
- ²³ BÍLKOVÁ, Z, J BÍLKOVÁ, J CHURÁČEK, D HORÁK a J TURKOVÁ. Oriented immobilization of chymotrypsin by use of suitable antibodies coupled to a nonporous solid support. *Journal of Chromatography A*. 1999, roč. 852, č. 1, s. 141-149. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00234-4.
- ²⁴ ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. New York: Garland Pub., c1994. ISBN 08-153-1620-8.
- ²⁵ Acccn.net[on line, cit. 15.3.2012]
<http://accn.net/Bio/book/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/lec24.html>
- ²⁶ WILSON, IG. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005-05-03, roč. 63, č. 10. ISSN 0099-2240.
- ²⁷ ERCOLINI, Danilo. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes

-
- in food. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, roč. 56, č. 3, s. 297-314. ISSN 01677012. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.006.
- ²⁸ ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčého kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- ²⁹ HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Assays To Identify and Quantify Fecal Bifidobacterium Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005-05-03, roč. 71, č. 5, s. 2318-2324. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2318-2324.2005
- ³⁰ REKHA, Rani, Moshahid Alam RIZVI a Paul JAISHREE. Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006-10-15, roč. 9, č. 5, s. 0-0. ISSN 07173458. DOI: 10.2225/vol9-issue5-fulltext-2
- ³¹ HUNG, C, C CHENG, L CHENG, C LIANG a C LIN. Application of Clostridium-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, roč. 33, č. 5, s. 1586-1592. ISSN 03603199. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.09.037.
- ³² CO 8000 Biowave Personal Cell Density meter [on line, cit. 10.4.2012] www.montreal-biotech.com
- ³³ INGENYphorU-2 Instruction Manual. Ingeny International BV. [on line, cit. 4.4.2012] www.igeny.com
- ³⁴ TŮMA, Š., KUČEROVÁ, K., PLOCKOVÁ, M. Isolation of anticlostridially active lactobacilli from semi-hard cheese. *Czech Journal of food sciences*. 2008, roč. 26, č. 5, s. 324–332. ISSN: 1212-1800
- ³⁵ BURDYCHOVÁ, R. , SLÁDKOVÁ, P. Detection of Clostridium tyrobutyricum using cultivation and biochemical methods and polymerase chain reaction. *Acta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*. 2007. sv. LV, č. 5, s. 23--28. ISSN 1211-8516.
- ³⁶ WANG, Mei-Yun, Yu-Li TSAI, Betty H. OLSON a Jo-Shu CHANG. Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous Clostridium butyricum by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, roč. 33, č. 18, s. 4730-4738. ISSN 03603199. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.06.048.
- ³⁷ SAMBROOK, Joseph a David W RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001, 3 s. ISBN 978-0-87969577-4.

9. PŘÍLOHY

Výsledky diplomové práce byly prezentovány formou posteru a ve sborníku abstraktů byl publikován abstrakt.

Konference Výživa, potraviny a zdravý životní styl (14. - 15. 4. 2012) Brno

SEDLÁČEK, Z., GREGUŠOVÁ, B., ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. Izolace a identifikace nepatogenních druhů klostridií izolovaných ze sýrů. In: *Sborník abstraktů přednášek a plakátových sdělení konference*. Brno: NutriAcademy, 2012, s. 20. ISBN 978-80-87502-05-1.

Nedodržení správných technologických postupů při výrobě polotvrdých sýrů, může docházet ke vzniku vady nazývané pozdní duření sýrů. Příčinou vzniklé vady jsou plynotvorné bakterie rodu *Clostridium*. Tyto bakterie jsou charakteristické produkcí oxidu uhličitého, vodíku a kyseliny máselné, která uděluje výrobkům nepříjemnou vůni a chuť. Vodík produkovaný biologickými činiteli za využití dostupných substrátů je předmětem mnoha studií. Významných výtěžků vodíku dosahují především druhy *C. tyrobutyricum* a *C. Butyricum*, které jsou schopny využít široké pole substrátů. Metody rychlé a přesné identifikace bakterií jsou žádané v potravinářském průmyslu při mikrobiologickém testování výrobků, ale nachází uplatnění i v biotechnologických aplikacích například u sledování bakteriálního složení v bioreaktorech. Tyto metody jsou založené na izolaci intaktní bakteriální DNA a identifikaci podle délky specifického fragmentu amplifikovaného během polymerázové řetězové reakce.

Cílem práce je izolace a identifikace bakteriální DNA o kvalitě vhodné pro použití v PCR reakci. DNA 6 kmenů bakterií rodu *Clostridium*, které jsou testovány v práci, byla při tradičních izolacích degradovaná a obtížně detekovatelná v PCR. Cílem bylo optimalizovat průběh lyze buněk a metody purifikace DNA tak, abychom zabránili degradaci. Strategií bylo najít vhodné množství EDTA a proteinázy K v lyzačních pufrech, pro dosažení co nejvyššího výtěžku relativně intaktní DNA. Vedle metody fenolové extrakce byla provedena izolace pomocí magnetických částic. Takto připravená DNA, byla detekována pomocí gelové elektroforézy, kvantifikována spektrofotometricky a testována v polymerázové řetězové reakci.

Množství EDTA v lyzačním pufru nemělo významný vliv pro izolaci, zatímco množství proteinázy K v lyzačním pufru ovlivňovalo výtěžnost DNA. Byly upraveny objemy komponent u fenolové extrakce a izolace pomocí magnetických částic pro zlepšení výtěžnosti a čistoty izolované DNA. Gelová elektroforéza detekovala DNA v koncentracích 100 ng/ μ l a vyšších. Pro druhové rozlišení DNA izolované z bakterií testovaných v práci, byla DNA podrobena denaturační gradientové elektroforéze.

Klíčová slova: *C. butyricum*, *C. Tyrobutyricum*, EDTA, proteináza K, DNA, PCR



IZOLACE DNA A IDENTIFIKACE NEPATOGENNÍCH DRUHŮ KLOSTRIDIÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

DNA ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NONPATHOGENIC SPECIES OF CLOSTRIDIA ISOLATED FROM CHEESES

Zbyněk Sedláček, Barbora Gregušová, Alena Španová, Bohuslav Rittich
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií,
Purkyňova 118, 61200 Brno

Úvod:

Rozsáhlý rod *Clostridium* je zastoupen v nejrůznějších složkách prostředí a řada kmenů se může vyskytovat za určitých podmínek i v potravinách. Výskyt bakterií rodu *Clostridium* v potravinách je nežádoucí, proto je důležité sledovat složení potravin a provádět pravidelná stanovení kvality. K identifikaci bakterií slouží molekulárně diagnostické metody, především polymerázová řetězová reakce (PCR). Pro úspěšný průběh reakce je nutné izolovat DNA o dostatečné kvalitě. Při identifikaci některých kmenů klostridií izolovaných z potravin se v průběhu PCR vyskytují komplikace, např. degradace DNA nebo zvýšené množství proteinů. Z důvodů získání DNA o kvalitě vhodné pro použití v PCR byly optimalizovány postupy izolace DNA. Bylo vybráno 8 kmenů, jejichž DNA byla při izolaci degradovaná pravděpodobně činností vnitrobuněčných nukleáz.

Cíl práce:

Cílem práce bylo izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z 8 vybraných kmenů rodu *Clostridium* izolovaných ze sýrů. Bylo optimalizováno složení roztoků používaných při lyzi buněk, zejména množství EDTA a proteinázy K. DNA byla izolována fenolovou extrakcí a pomocí magnetického nosiče a byla použita v PCR. Produkty PCR byly separovány denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE) za účelem druhové identifikace kmenů.

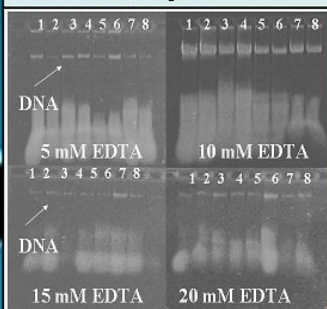
Metody:

Buňky byly kultivovány za anaerobních podmínek po dobu 18 hodin. Po kultivaci byla proměřena optická hustota buněk. Byla provedena lyze buněk působením lyzačních roztoků obsahujících různou koncentraci EDTA (5, 10, 15 a 20 mM), proteinázy K (100 µg/ml) v různých objemech (5, 10, 15 a 20 µl), SDS a lysozymu. DNA byla izolována z hrubého lyzátu buněk pomocí fenolové extrakce a magnetických nosičů. Koncentrace izolované DNA byla měřena pomocí přístroje Nanophotometr. Izolovaná DNA byla vizualizována pomocí agaróзовé gelové elektroforézy (0,8% agaróзовý gel) po obarvení ethidium bromidem a detegována pod UV světlem. DNA byla ředěna na koncentraci 10 ng/µl a testována v PCR. Detekce produktů PCR byla provedena pomocí agaróзовé gelové elektroforézy na 1,5% gelu [3] a DGGE na 6% polyakrylamidovém gelu [4].

Výsledky a diskuze:

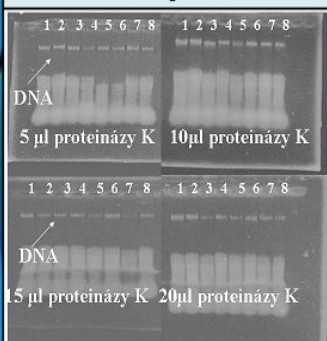
Byl sledován vliv koncentrace EDTA a proteinázy K na koncentraci a kvalitu izolované DNA. DNA o nejvyšší koncentraci a čistotě byla izolována pomocí roztoku EDTA o 10 mM koncentraci (Obr. 1). Proteináza K byla použita v množství 10 µl pro všechny koncentrace EDTA. Při sledování vlivu množství proteinázy K na koncentraci a čistotu izolované DNA byl použit pufr o 10 mM koncentraci EDTA. Nejvyšší koncentrace a čistoty DNA bylo dosaženo při použití 10 µl proteinázy K (Obr. 2). Amplifikovatelnost DNA byla ověřena pomocí PCR s primery *R_eub* a *F_eub* specifickými pro doménu *Bacteria* [1]. Produkty PCR byly detegovány u všech 8 kmenů (Obr. 3). Byla provedena rodově specifická PCR s primery F1 a F2 [2]. PCR produkty byly detegovány ve všech vzorcích (Obr. 4). Byla provedena PCR s primery *Chis150f* a *Clostr* obsahující GC svorku [4] (Obr. 5). Druhá identifikace byla provedena pomocí DGGE (Obr. 6). Dva kmény byly identifikovány jako *C. tyrobutyricum* a tři kmény jako *C. butyricum*.

Obr. 1. DNA izolované pomocí fenolové extrakce – vliv koncentrace EDTA. Gelová elektroforéza na 0,8% agaróze.



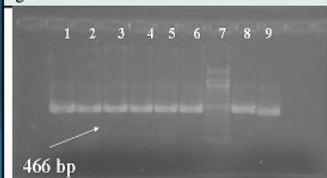
Běh č. 1–8 DNA bakterií rodu *Clostridium*

Obr. 2. DNA izolovaná pomocí fenolové extrakce – vliv množství proteinázy K. Gelová elektroforéza na 0,8% agaróze.



Běh č. 1–8 DNA bakterií rodu *Clostridium*

Obr. 3. PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* (466bp). Gelová elektroforéza na 1,5% agaróze.



Běh č. 1–6 DNA 8 kmenů rodu *Clostridium*, č. 7 DNA standard; č. 8, 9 Pozitivní kontrola; č. 10 Negativní kontrola

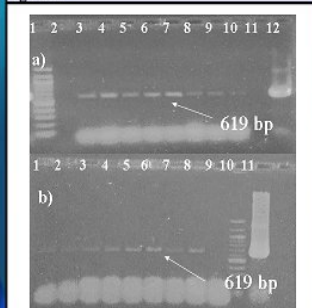
Závěr:

Byl optimalizován postup izolace DNA z hrubých lyzátu buněk druhů *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum*. Byla izolována DNA o kvalitě vhodné pro PCR. V DGGE bylo druhově identifikováno 3 kmény jako *Clostridium butyricum* a 2 kmény jako *Clostridium tyrobutyricum*.

Literatura:

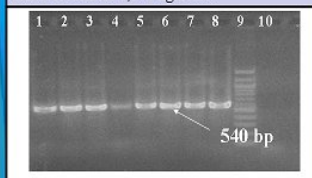
- [1] HAARMAN, M., KNOL, J.: Quantitative Real-time PCR Assays To Identify and Quantify Fecal Bifidobacterium Species in Infants a Prebiotic Infant Formula. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2005) 2318-2324.
- [2] REKHA R., RIZVI M., JAISHREE P.: Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Electronic J. Biotechnol.* 9(2006)505-511.
- [3] ŠPANOVÁ A., RITTIČ B.: Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. 2010. VUT Brno, Fakulta chemická, ISBN 987-80-214-4004-3
- [4] HUNG C., CHENG C., CHENG L., LIANG C., LIN C.: Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. *Inter. Journal of Hydrogen Energy*, 33(2008) 1586-1592

Obr. 4. PCR produktů specifických pro rod *Clostridium* (619 bp). DNA izolovaná pomocí fenolové extrakce(a), magnetických nosičů (b). Gelová elektroforéza na 1,5% agaróze.



Běh č. 3–10(a) 1–8(b) DNA 8 kmenů rodu *Clostridium*, č. 2,11(a) č. 9(b) Negativní kontrola; č.1(a) 10(b) DNA standard; č. 11(a) 12(b) Pozitivní kontrola

Obr. 5. PCR produktů určených pro separaci pomocí DGGE (540 bp). Gelová elektroforéza na 1,5% agaróze.



Běh č. 1–6 DNA 8 kmenů rodu *Clostridium*, č. 9 DNA standard; č. 7,8 Pozitivní kontrola; č. 10 Negativní kontrola

Obr. 6. Denaturační gradientová elektroforéza produktů PCR



Běh č. 1,8 Směs *C. tyrobutyricum* DSM 2637 a *C. butyricum* DSM 10702; č. 5 negativní kontrola; č. 2-4 kmény rodu *Clostridium*, č. 6 *C. tyrobutyricum* DSM 2637; č. 7 *C. butyricum* DSM 10702
T-*C. tyrobutyricum*, B-*C. butyricum*

Výsledky diplomové práce byly prezentovány na studentské vědecké konferenci a publikovány ve sborníku prací.

Celoslovenská študentská vedecká konferencia študentov 1. a 2. stupňa vysokoškolského štúdia, APLIKOVANÉ PRÍRODNÉ VEDY, 26. 4. 2012, v Trnavě

SEDLÁČEK, Z., GREGUŠOVÁ, B., ŠPANOVA, A., RITTICH, B. Izolace a identifikace nepatogenních druhů klostridií izolovaných ze sýrů. In: *Zborník prác: Celoslovenská študentská vedecká konferencia Aplikované prírodné vedy*. Trnava: Fakulta prírodných vied UCM vTrnave, 2012, s.89-93. ISBN 978-80-8105-360-3.

IZOLACE A IDENTIFIKACE NEPATOGENNÍCH DRUHŮ KLOSTRIDIÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

ZBYNĚK SEDLÁČEK, BARBORA GREGUŠOVÁ, ALENA ŠPANOVÁ,
BOHUSLAV RITTICH¹

¹*Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Vysoké učení technické v Brně,
Purkyňova 118, Brno, 612 00, (xcsedlacek2@fch.vutbr.cz)*

Abstrakt:

Nedodržení správných technologických postupů při výrobě polotvrdých sýrů, může docházet ke vzniku vady nazývané pozdní dužení sýrů. Příčinou vzniklé vady jsou plynotvorné bakterie rodu *Clostridium*. Tyto bakterie jsou charakteristické produkcí oxidu uhličitého, vodíku a kyseliny máselné, která uděluje výrobkům nepříjemnou vůni a chuť. Vodík produkovaný biologickými činiteli za využití dostupných substrátů je předmětem mnoha studií. Významných výtěžků vodíku dosahují především druhy *C. tyrobutyricum* a *C. butyricum*, které jsou schopny využít široké pole substrátů. Metody rychlé a přesné identifikace bakterií jsou žádané v potravinářském průmyslu při mikrobiologickém testování výrobků, ale nachází uplatnění i v biotechnologických aplikacích například u sledování bakteriálního složení v bioreaktorech. Tyto metody jsou založené na izolaci intaktní bakteriální DNA a identifikaci podle délky specifického fragmentu amplifikovaného během polymerázové řetězové reakce.

Cílem práce je izolace a identifikace bakteriální DNA o kvalitě vhodné pro použití v PCR reakci. DNA 6 kmenů bakterií rodu *Clostridium*, které jsou testovány v práci, byla při tradičních izolacích degradována a obtížně detekovatelná v PCR. Cílem bylo optimalizovat průběh lyze buněk a metody purifikace DNA tak, abychom zabránili degradaci. Strategií bylo najít vhodné množství EDTA a proteinázy K v lyzačních pufrách, pro dosažení co nejvyššího výtěžku relativně intaktní DNA. Vedle metody fenolové extrakce byla provedena izolace pomocí magnetických částic. Takto připravená DNA, byla detekována pomocí gelové elektroforézy, kvantifikována spektrofotometricky a testována v polymerázové řetězové reakci.

Množství EDTA v lyzačním pufru nemělo významný vliv pro izolaci, zatímco množství proteinázy K v lyzačním pufru ovlivňovalo výtěžnost DNA. Byly upraveny objemy komponent u fenolové extrakce a izolace pomocí magnetických částic pro zlepšení výtěžnosti a čistoty izolované DNA. Gelová elektroforéza detekovala DNA v koncentracích 100 ng/ μ l a vyšších. Pro druhové rozlišení DNA izolované z bakterií testovaných v práci, byla DNA podrobena denaturační gradientové elektroforéze.

KLíčové slová: *C. butyricum*, *C. Tyrobutyricum*, EDTA, proteináza K, DNA, PCR

1. Úvod

Rozsáhlý rod *Clostridium* je zastoupen v nejrůznějších složkách prostředí a řada kmenů se může vyskytovat za určitých podmínek i v potravinách. Výskyt bakterií rodu *Clostridium* v potravinách je nežádoucí, proto je důležité sledovat složení potravin a provádět pravidelná stanovení kvality. K identifikaci bakterií slouží molekulárně diagnostické metody - především

polymerázová řetězová reakce (PCR). Pro úspěšný průběh reakce je nutné izolovat DNA o dostatečné kvalitě. Při identifikaci některých kmenů klostridií izolovaných z potravin se v průběhu PCR vyskytují komplikace, např. degradace DNA nebo zvýšené množství proteinů. Z důvodů získání DNA o kvalitě vhodné pro použití v PCR byly optimalizovány postupy izolace DNA. Bylo vybráno 8 kmenů, jejichž DNA byla při izolaci degradovaná pravděpodobně činností vnitrobuněčných nukleáz.

Cílem práce bylo izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z 8 vybraných kmenů rodu *Clostridium* izolovaných ze sýrů. Bylo optimalizováno složení roztoků používaných při lyzi buněk, zejména množství EDTA a proteinázy K. DNA byla izolována fenolovou extrakcí a pomocí magnetického nosiče a byla použita v PCR. Produkty PCR byly separovány denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE) za účelem druhové identifikace kmenů.

2. Materiál a metody

Buňky byly kultivovány za anaerobních podmínek po dobu 18 hodin. Po kultivaci byla proměřena optická hustota buněk. Byla provedena lyze buněk působením lyzačních roztoků obsahujících různou koncentraci EDTA (5, 10, 15 a 20 mM), proteinázy K (100 µg/ml) v různých objemech (5, 10, 15 a 20 µl), SDS a lysozymu. DNA byla izolována z hrubého lyzátu buněk pomocí fenolové extrakce a magnetických nosičů. Koncentrace izolované DNA byla měřena pomocí přístroje Nanophotometr. Izolovaná DNA byla vizualizována pomocí agarózové gelové elektroforézy (0,8% agarózový gel) po obarvení ethidium bromidem a detegována pod UV světlem. DNA byla ředěna na koncentraci 10 ng/µl a testována v PCR. Detekce produktů PCR byla provedena pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1,5% gelu [3] a DGGE na 6% polyakrylamidovém gelu [4].

3. Výsledky a diskusia

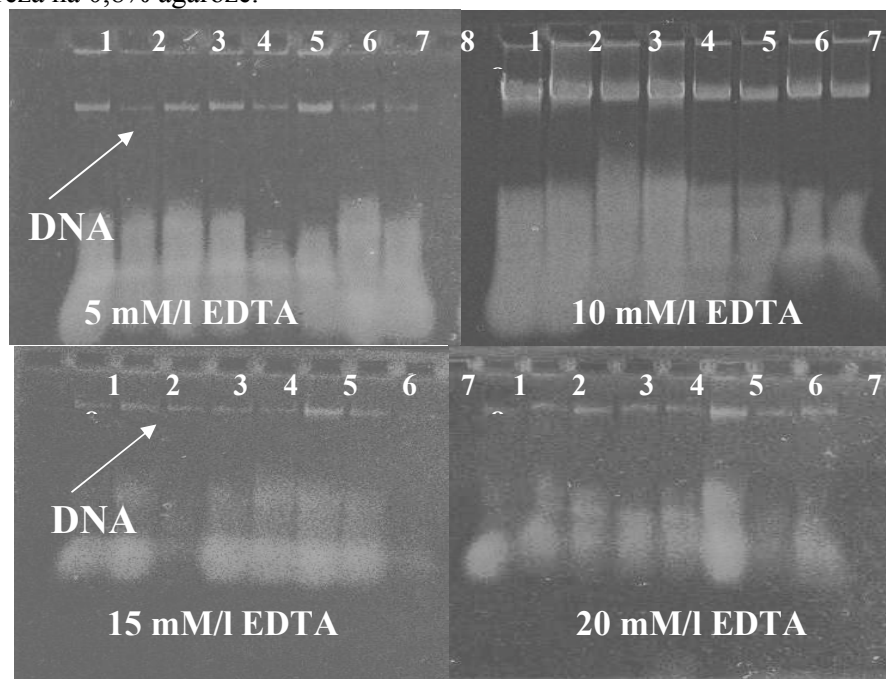
DNA byla izolována z bakterií rodu *Clostridium*. Testovány byly kmeny *C.tyrobutyricum* S 18/2, *C. tyrobutyricum* S 5, *C. butyricum* E 16 A, *C. tyrobutyricum* 580, *C. butyricum* 581 a *C. butyricum* 89K25B. Jako pozitivní kontroly byly použity sbírkové kmeny *C tyrobutyricum* DSM 2637 a *C. butyricum* DSM 10702.

Byl sledován vliv koncentrace EDTA a proteinázy K na koncentraci a kvalitu izolované DNA.

Amplifikovatelnost DNA byla ověřena v PCR. Kmeny byly druhově rozlišeny v DGGE.

3.1 Vliv koncentrace EDTA v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA

Obr. 1: DNA izolované pomocí fenolové extrakce – vliv koncentrace EDTA. Gelová elektroforéza na 0,8% agaróze.

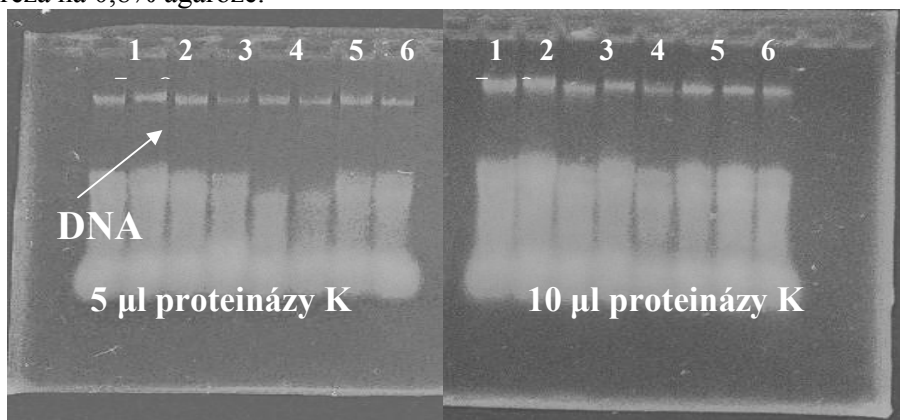


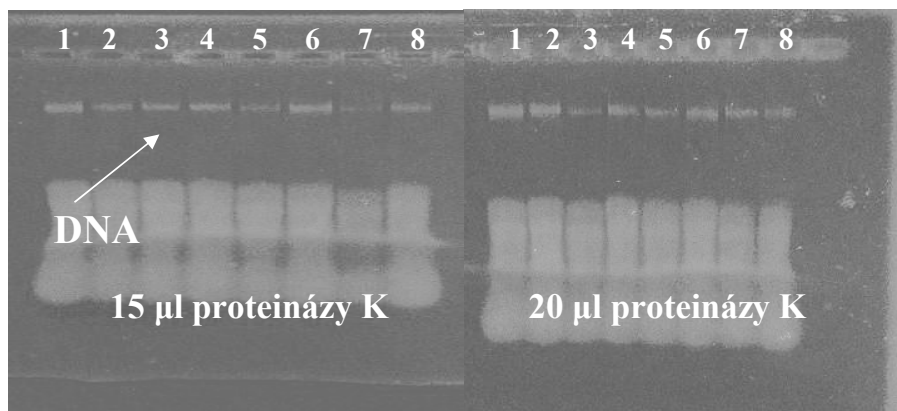
Běh č. 1–8 DNA bakterií rodu *Clostridium*

DNA o nejvyšší koncentraci a čistotě byla izolována pomocí roztoku EDTA o 10 mM koncentraci (Obr. 1.). Proteináza K byla použita v množství 10 μ l pro všechny koncentrace EDTA.

3.2 Vliv množství proteinázy K v lyzačním roztoku na kvalitu a množství izolované DNA

Obr. 2: DNA izolovaná pomocí fenolové extrakce – vliv množství proteinázy K. Gelová elektroforéza na 0,8% agaróze.



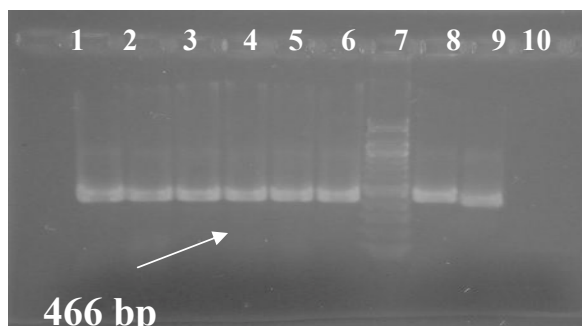


Běh č. 1–8 DNA bakterií rodu *Clostridium*

Při sledování vlivu množství proteinázy K na koncentraci a čistotu izolované DNA byl použit pufr o 10 mM koncentraci EDTA. Nejvyšší koncentrace a čistoty DNA bylo dosaženo při použití 10 µl proteinázy K (Obr. 2).

3.3. PCR s univerzálními primery pro doménu *Bacteria*

Obr. 3 PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* (466bp). Gelová elektroforéza na 1,5% agaróze.

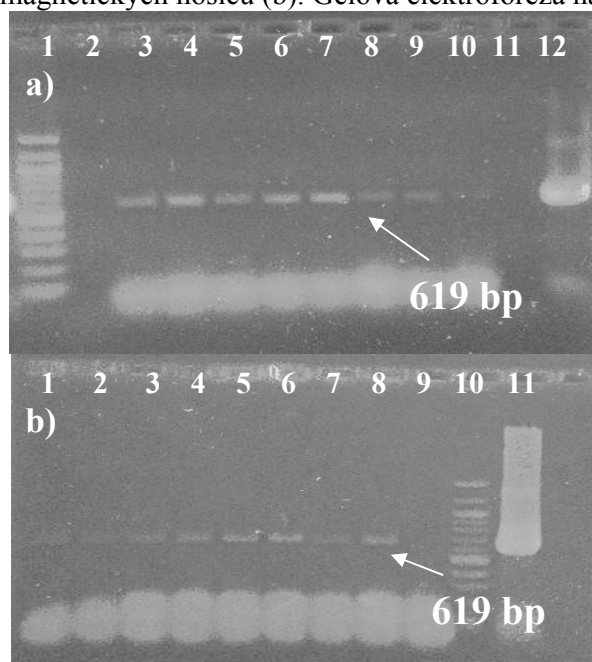


Běh č. 1–6 DNA bakterií rodu *Clostridium*; č.7 DNA standard; č. 8,9 Pozitivní kontrola; č. 10 Negativní kontrola

Amplifikovatelnost DNA byla ověřena pomocí PCR s primery R_eub a F_eub specifickými pro doménu *Bacteria* [1]. Produkty PCR byly detegovány u všech 8 kmenů (Obr. 3.).

3.4. Rodově specifická PCR pro rod *Clostridium*

Obr. 4: PCR produktů specifických pro rod *Clostridium* (619 bp), DNA izolovaná pomocí fenolové extrakce(a), magnetických nosičů (b). Gelová elektroforéza na 1,5% agaróze.

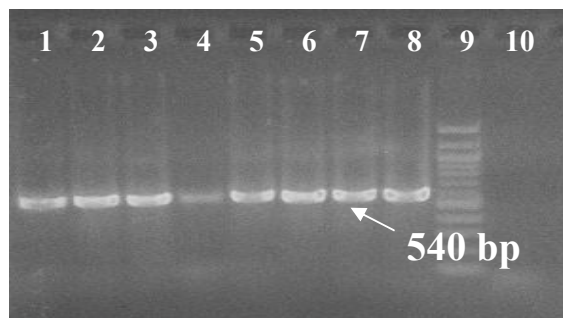


Běh č. 3–10(a) 1–8(b) DNA bakterií rodu *Clostridium*; č. 2,11(a) č. 9(b) Negativní kontrola; č.1(a) 10(b) DNA standard; č. 11(a) 12(b) Pozitivní kontrola

Byla provedena rodově specifická PCR s primery F1 a F2 [2]. PCR produkty byly detegovány ve všech vzorcích (Obr. 4).

3.5. PCR pro denaturační gradientovou gelovou elektroforézu (DGGE)

Obr. 5: PCR produktů určených pro separaci pomocí DGGE (540 bp). Gelová elektroforéza na 1,5% agaróze.

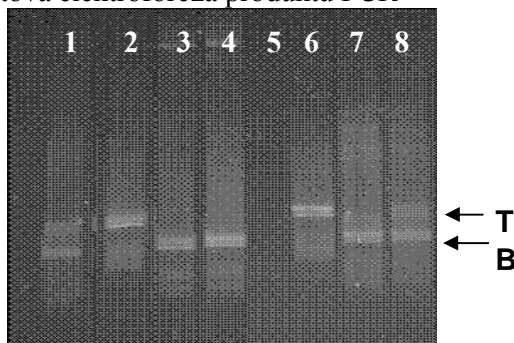


Běh č. 1–6 DNA 8 kmenů rodu *Clostridium*; č. 9 DNA standard; č. 7,8 Pozitivní kontrola; č. 10 Negativní kontrola

Byla provedena PCR s primery Chis150f a Clost1r obsahující GC svorku [4] (Obr. 5). DNA všech kmenů byla amplifikována.

3.5. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Obr. 5: Denaturační gradientová elektroforéza produktů PCR



Běh č. 1,8 Směs *C. tyrobutyricum* DSM 2637 a *C. butyricum* DSM 10702; č.5 negativní kontrola; č. 2-4 kmeny rodu *Clostridium*, č. 6 *C. tyrobutyricum* DSM 2637; č. 7 *C. butyricum* DSM 10702

T- *C. tyrobutyricum*, B- *C. butyricum*

Druhová identifikace byla provedena pomocí DGGE (Obr. 6). Dva kmeny byly identifikovány jako *C. tyrobutyricum* a tři kmeny jako *C. butyricum*.

4. Závěr

Byl optimalizován postup izolace DNA z hrubých lyzátů buněk druhů *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum*. Byla izolována DNA o kvalitě vhodné pro PCR. V DGGE bylo druhově identifikováno 3 kmeny jako *Clostridium butyricum* a 2 kmeny jako *Clostridium tyrobutyricum*.

5. Literatura

- [1] HAARMAN, M.; KNOL, J.: Quantitative Real-time PCR Assays To Identify and Quantify Fecal Bifidobacterium Species in Infants and Prebiotic Infant Formula. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2005) 2318-2324.
- [2] REKHA R., RIZVI M., JAISHREE P.: Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study, *Electronic J. Biotechnol.*, 9(2006)505-511.
- [3] ŠPANOVÁ A., RITTICH B.: Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. 2010, VUT Brno, Fakulta chemická, ISBN 987-80-214-4004-3
- [4] HUNG C., CHENG C., CHENG L., LIANG C., LIN C.: Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. *Inter. Journal of Hydrogen Energy*, 33(2008) 1586-1592