



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC PŘI DETEKCI  
NUKLEOVÝCH KYSELIN**

NUCLEIC ACID DETECTION USING MAGNETIC MICROPARTICLES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Aneta Pešková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.**

**BRNO 2016**



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1029/2015** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Aneta Pešková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí práce **doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Využití magnetických mikročástic při detekci nukleových kyselin

### Zadání bakalářské práce:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. V praktické části provést izolaci bakteriální DNA magnetickými částicemi a její amplifikaci metodou PCR.
3. V teoretické části vyhodnotit získané poznatky formou diskuse.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

-----  
Aneta Pešková  
Student(ka)

-----  
doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

## **ABSTRAKT**

Moderním a rychlým separačním postupem při izolaci nukleových kyselin v běžné laboratorní praxi je použití magnetických mikročásteček.

Bylo provedeno srovnání účinnosti izolace DNA z výrobků Pangamin pomocí tří typů magnetických mikročásteček P(HEMA-*co*-GMA) (A, B), PGMA a magnetických nanočásteček poly-L-lysine (PLy). Kvalita a množství izolované DNA byly ověřeny spektrofotometricky a agarózovou gelovou elektroforézou. Amplifikovatelnost izolované DNA byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se specifickými primery pro kvasinky a vyhodnocena agarózovou gelovou elektroforézou.

Množství izolované DNA se lišilo podle výrobku i podle typu magnetických částic. Z hlediska nejvyššího izolovaného množství DNA bylo nejvhodnější použití magnetických nanočásteček poly-L-lysine (PLy) a magnetických mikročásteček P(HEMA-*co*-GMA) (A).

## **ABSTRACT**

Modern and fast separation process for nucleic acids isolation uses magnetic microparticles in routine laboratory practise.

The comparison of DNA isolation effectivity by three types of magnetic microparticles P(HEMA-*co*-GMA) (A, B), PGMA and magnetic nanoparticles covered by poly-L-lysine (PLy) from probiotic products Pangamin was carried out. The quality and quantity of isolated DNA were verified by spectrophotometric measurements and gel electrophoresis. Possibility of amplifying of isolated DNA was verified by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers for yeast and evaluated by agarose gel electrophoresis.

The quantity of isolated DNA depended on the product and the type of magnetic particles. The highest amount of DNA was isolated by magnetic nanoparticles of poly-L-lysine (PLy) and magnetic microparticles P(HEMA-*co*-GMA) (A).

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

magnetické mikročástečky  
izolace DNA  
PCR

## **KEY WORDS**

magnetic microparticles  
DNA isolation  
PCR

PEŠKOVÁ, A. *Využití magnetických mikročástic při detekci nukleových kyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 42 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc..

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chci především poděkovat doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za odborné vedení a pomoc při psaní této bakalářské práce.

# OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Izolace nukleových kyselin	8
2.1.1	Obecné podmínky	8
2.1.2	Fenol-chloroformová extrakce	9
2.1.3	Izolace DNA pomocí magnetických částic	10
2.1.3.1	Vlastnosti	11
2.1.3.2	Příprava	13
2.1.3.3	Využití	14
2.1.4	Kontrola kvality izolované DNA	14
2.1.4.1	UV spektrofotometrie	14
2.1.4.2	Gelová elektroforéza	14
2.2	Identifikace DNA pomocí PCR	15
2.3	Probiotika	17
3	Cíl práce	18
4	Experimentální část	19
4.1	Materiál	19
4.1.1	Použité potravinové doplňky	19
4.1.2	Magnetické mikročástice	21
4.1.3	Chemikálie	22
4.1.4	Přístroje	22
4.1.5	Roztoky	23
4.1.5.1	Roztoky pro lyzi buněk	23
4.1.5.2	Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických mikročástic	23
4.1.5.3	Komponenty pro PCR	24
4.1.5.4	Roztoky pro gelovou elektroforézu	24
4.2	Metody	24
4.2.1	Izolace DNA z tablet výrobků Pangamin	24

4.2.1.1	Příprava hrubých lyzátů buněk	24
4.2.1.2	Izolace DNA pomocí magnetických mikročastic	25
4.2.1.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	26
4.2.2	Polymerázová řetězcová reakce pro kvasinky	26
4.2.3	Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR	28
5	Výsledky	28
5.1	Příprava vzorků z potravinových doplňků Pangamin pro analýzu	28
5.1.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	28
5.1.2	Srovnání množství DNA izolované magnetickými mikro- a nanočasticemi	30
5.1.3	Srovnání magnetických mikro- a nanočastic pro izolaci DNA	31
5.1.4	Srovnání množství DNA izolovaného z výrobků	31
5.2	Důkaz přítomnosti kvasinkové DNA pomocí PCR	32
5.2.1	Shrnutí výsledků	34
6	Diskuze	35
6.1	Izolace kvasinkové DNA z potravinových doplňků	35
6.1.1	Hodnocení výstupu NanoPhotometru Implen	35
6.2	Důkaz přítomnosti kvasinkové DNA	35
6.3	Srovnání výrobků a magnetických mikročastic	35
7	Závěr	37
8	Seznam použité literatury	38
9	Seznam zkratk a symbolů	42

# 1 ÚVOD

Jedním z cílů potravinářského průmyslu je hledání a výběr vhodných kmenů bakterií pro dosažení vysoké kvality výrobků a jejich následná spolehlivá identifikace a charakterizace před použitím v potravinách. Pro tyto účely je důležité mít rychlé, přesné a správné metody za účelem jejich identifikace v různých typech vzorků [1]. Široce využívanou metodou identifikace mikroorganismů je polymerázová řetězová reakce (PCR).

Důležitým krokem při molekulární diagnostice mikroorganismů je vysoká kvalita izolované DNA. DNA ze vzorků lze izolovat klasickými metodami jako je fenol-chloroformová extrakce s následným srážením DNA ethanolem nebo moderními postupy – například chromatografickými technikami či magnetickými pevnými částicemi [2].

Je to separační metoda využívající magnetismus, někdy také v kombinaci s běžnými separačními nebo identifikačními metodami, pro čištění buněk, buněčných organel a biologicky aktivních sloučenin (nukleových kyselin a proteinů) přímo ze surových vzorků [3].

Jelikož mnoho organických a anorganických sloučenin, které jsou koextrahovány při izolaci DNA z reálných vzorků, inhibuje průběh amplifikace, je velká pozornost věnována vývoji rychlých a efektivních metod izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR [4].

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Izolace nukleových kyselin

Izolace DNA je důležitým krokem před mnoha biochemickými a diagnostickými procesy. Mnoho navazujících procesů jako je detekce, klonování, sekvencování, amplifikace, hybridizace, syntéza cDNA, atd. nemůže být prováděno se vzorkem, kvůli velkému množství znečišťujících látek, jako jsou proteiny, fenoly, huminové kyseliny, ionty některých kovů a polysacharidy. DNA je rovněž kontaminována RNA. Proto jsou důležité efektivní a spolehlivé metody izolace DNA z komplexních směsí. Tyto metody jsou hojně využívány při diagnostice mikrobiálních infekcí, ve forenzních vědách, typizaci tkáně a krve, detekci genetických chorob a dalších [5].

Před vynalezením moderních technik izolace DNA byly využívány pracné a časově náročné techniky, jako fenol-chloroformová extrakce a srážení DNA ethanolem, založené na mnohanásobných extrakčních a centrifugačních krocích. Tyto metody nebyly vhodné k automatizaci a zavedení do laboratoří, ve kterých se analyzuje velké množství vzorků. Během posledních let byly vyvinuty magnetické mikročástice, které umožňují rychlou a účinnou izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk [5].

#### 2.1.1 Obecné podmínky

Pro úspěšnou izolaci nukleových kyselin je v první řadě nutné šetrně narušit buňky nebo tkáně, ve kterých se nachází nukleové kyseliny, aby nedošlo k poškození nukleových kyselin (inaktivace, denaturace a degradace).

Existuje několik metod lyze buněk, které lze rozdělit na procesy mechanické a chemické. Mezi mechanické procesy řadíme použití kuličkových nebo vysokotlakých homogenizátorů a ultrazvuku. Chemické metody zahrnují lyzi buněk pomocí detergentů, enzymů, tepla, zmrazením a rozmrazením buněk. Shrnutí lyzačních metod a jejich nevýhody jsou uvedeny v Tabulce 1 [6] [7] [8].

Tabulka 1 Shrnutí lyzačních metod a jejich nevýhod. Převzato z [7]

Lyzační metoda	Nevýhody
Zmrazení a rozmrazení	velmi pomalé
Chemická lyze	způsobuje změny struktury proteinu, obtížná purifikace, drahé detergenty
Enzymatická lyze	dlouhá inkubační doba, nutnost odstranění lyzačních enzymů, drahé scale-up, častá kombinace s dalšími nezbytnými metodami
Vysokotlaký homogenizátor	drahé příslušenství, nákladná údržba, náchylnost na ucpání trysek
Centrifugace	jen pro velmi slabé buněčné stěny
Kuličkové homogenizátory	nerovnoměrné zpracování = nekompletní lyze, denaturace proteinů, nízká účinnost, vysoká spotřebou energie časově náročné čištění
Ultrazvuk	nelze využít ve velkém měřítku, většina absorbované energie se mění na teplo

Při lyzi buněk jsou využívány detergenty, jako například dodecylsulfát sodný (SDS), které denaturují proteiny a vytváří komplexy protein-detergent [8].

Během procesu izolace DNA je nutné zabránit inaktivaci, denaturaci a degradaci nukleových kyselin.

Inaktivace endonukleáz je klíčovým krokem v extrakčním procesu. DNázy jsou inaktivovány použitím chelatačních činidel (například EDTA), které se vážou na ionty kovů, které jsou nezbytné pro aktivitu nukleáz (EDTA také inhibuje amplifikaci při koncentraci 0,1  $\mu\text{M}$ ). Alternativní metodou inaktivace DNáz je zvýšení teploty nad 65 °C nebo přidání proteinázy K a následná inkubace při 56 °C. Proteináza K je také inhibitorem amplifikace PCR, snadno se však vyloučí prací s roztoky o pH nižším než 8,5. Inaktivace RNáz je náročnější vzhledem k vysoce odolné povaze a rychlého katalytického působení na RNA [8].

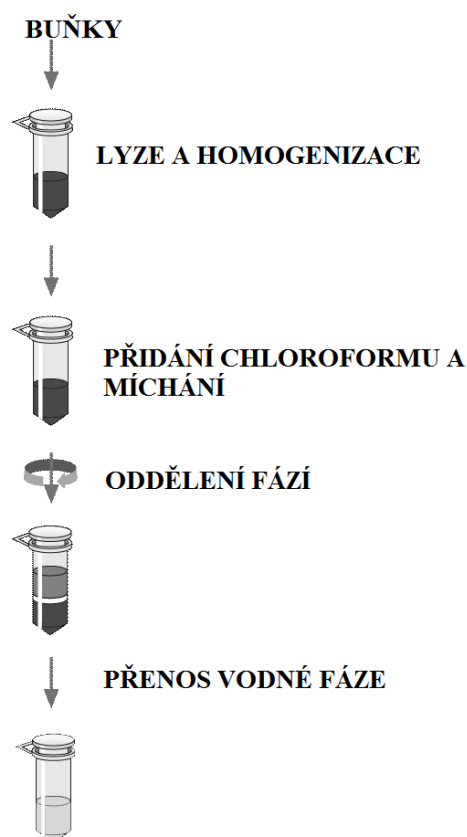
Při izolaci DNA je v některých případech nutné odstranit RNA, pro tyto účely se využívá enzym RNáza A nebo srážení LiCl. Při izolaci RNA je nutné odstranit DNA pomocí enzymu DNáza I [9].

### **2.1.2 Fenol-chloroformová extrakce**

Pro amplifikaci je nutné použít DNA v čistotě vhodné pro PCR, tj. zbavenou kontaminujících látek (inhibitorů PCR), které snižují citlivost PCR nebo jsou příčinnou falešně negativních výsledků.

Fenol-chloroformová extrakce je v současné době stále hojně využívanou metodou izolace DNA. Slouží k odstranění nežádoucích složek ze vzorků na základě jejich různé rozpustnosti [10].

Metoda je založena na přidání roztoku fenolu a chloroformu ke stejnému podílu vodného roztoku vzorku (homogenizované tkáně) obsahujícího DNA. Typický poměr fenolu a chloroformu je 1:1 nebo 5:1 [10] [11] [12]. Dochází k rozdělení směsi na dvě fáze, spodní organickou a horní vodnou. Při protřepání se tyto fáze smísí a fenol sráží proteiny ve vodném roztoku. Na rozhraní těchto dvou fází se vytváří prstenec proteinů. Spodní, organická fáze, ve které dojde k denaturaci proteinů, se centrifugací oddělí od horní, vodné fáze, obsahující DNA. Horní fáze se následně převede do čisté mikrokumavky. Nukleové kyseliny se následně vysráží přidáním ethanolu. Po promytí ethanolem a odstředění se na dně mikrokumavky objeví bílý sediment. Po odstranění supernatantu nukleové kyseliny se rozpustí v TE pufru. Schéma fenolové extrakce je zobrazeno na Obrázku 1.



Obrázek 1 Postup fenol chloroformové extrakce, poté se produkt čistí. Převzato z [10]

I když fenol-chloroformová extrakce je snadno proveditelná, má i četná omezení a nevýhody. Zásadním předpokladem při fenol-chloroformové extrakci je správná hodnota pH. Při slabě zásaditém pH fenolu (obvykle 7,8) nedochází k denaturaci DNA, ale k jeho extrakci do vodné fáze spolu s RNA. Při kyselém pH fenolu (4,8–5,2) a použití čisté vody jako rozpouštědla do vodné fáze přechází pouze RNA a DNA se stává součástí proteinové dvojvrstvy. V obou případech lipidy přecházejí do organické fáze a denaturované proteiny vytvářejí vrstvu mezi vodnou a organickou fází.

Fenol-chloroformová extrakce je metoda časově náročná, zejména v případě testování mnoha vzorků. Spolu s DNA se izoluje i RNA a vzhledem k četným převodům fází se také zvyšuje riziko kontaminace vzorků. Metoda je navíc nevhodná pro malé objemy vzorků (asi 10  $\mu$ l) a vyžaduje centrifugaci, která se obtížně automatizuje. Často je využívána jako kontrolní metoda při vývoji nových postupů izolace a purifikace DNA [2] [11].

### 2.1.3 Izolace DNA pomocí magnetických částic

Magnetická separace je metoda využívaná od 70. let minulého století, mnohdy v kombinaci s dalšími separačními metodami [3].

V posledních letech došlo k výraznému nárůstu použití magnetických mikročástic pro purifikaci nukleových kyselin. Oproti ostatním metodám izolace DNA nabízí magnetická separace několik výhod, jako je možnost automatizace procesu a omezení možnosti

kontaminace vzorku. Navíc je tato metoda rychlá, jednoduchá, dostatečně citlivá a bezpečná [13].

Principem magnetické separace je využití vnějšího magnetického pole (magnetu) při získání dočasných magnetických vlastností mikročásteček, které jsou používány při separaci nukleových kyselin v několika krocích, uvedených na Obrázku 2 [5].

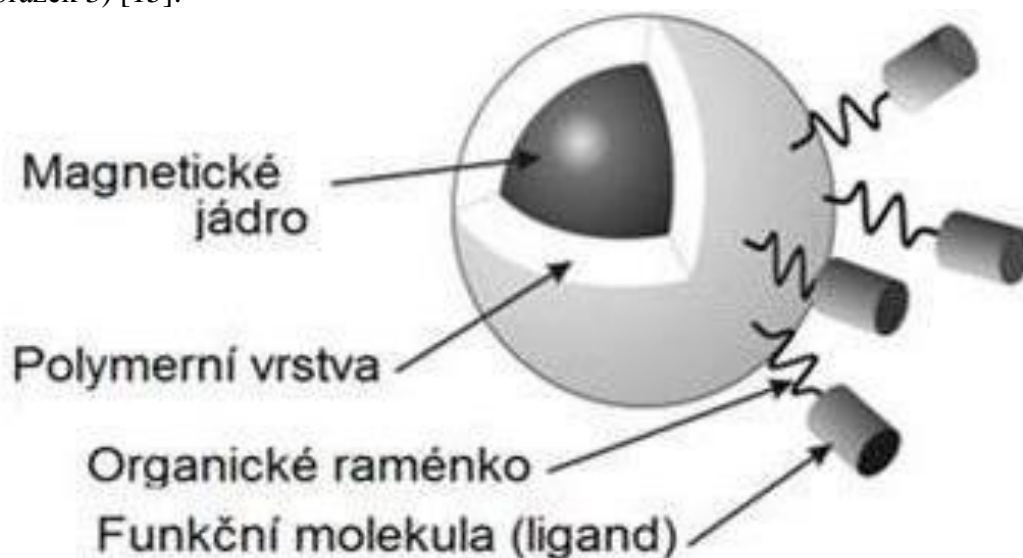


Obrázek 2 Schéma průběhu magnetické separace nukleových kyselin. Převzato z [5]

### 2.1.3.1 Vlastnosti

Použití magnetických materiálů závisí na jejich vlastnostech, včetně magnetizace, morfologie, tvaru, velikosti, polydisperzity a dalších. Z pohledu hydrodynamických vlastností a manipulace je pro praktické využití nejvýhodnějším tvarem mikročásteček kulička a z hlediska velikosti jsou výhodnější mikrometrové částice, díky většímu specifickému povrchu a tím i lepšímu zajištění dispozic pro navázání funkčních skupin nebo pro imobilizaci biologicky aktivních látek. V praxi je tedy nutné najít nejvhodnější poměr mezi specifickým povrchem a magnetickými vlastnostmi [14].

Magnetické mikročástečky mají většinou charakter kompozitních materiálů. Jsou složeny z anorganického magnetického jádra, které je zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem a zajišťuje magnetické vlastnosti mikročásteček, dále z ochranného pláště a funkčního povrchu, který zajišťuje požadovanou interakci s biologickými systémy (viz Obrázek 3) [15].



Obrázek 3 Stavba magnetického nosiče. Převzato z [16]

## MAGNETICKÉ JÁDRO

Magnetické jádro musí být tvořeno materiály s paramagnetickými vlastnostmi, které zajistí, že v přítomnosti magnetického pole vykazuje magnetické vlastnosti. Je obvykle tvořeno oxidy železa například magnetitem ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), maghemitem ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) nebo skupinami kovů přechodných prvků (železo, kobalt, hořčík, nikl, zinek).

Látky vykazující paramagnetismus mají atomy s dipólovým momentem i bez působení vnějšího pole, který je však náhodný a tudíž výsledné magnetické pole je nulové. Působením vnějšího magnetického pole dojde k uspořádání dipólových momentů a látka vykazuje magnetické vlastnosti. Po odstranění vnějšího magnetického pole tyto vlastnosti opět zmizí.

Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) je černý minerál, vykazující feri- nebo feromagnetické vlastnosti. Strukturou se řadí mezi skupinu spinelů s obecným vzorcem  $\text{AB}_2\text{O}_4$  [14] [17].

Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) vzniká oxidací magnetitu. Má stejnou mřížkovou strukturu, ale všechny atomy železa jsou v oxidačním stavu  $\text{Fe}^{3+}$ . Je nejvhodnějším materiálem pro výrobu jader částic využívaných v medicíně, protože není toxický [14] [18].

Ferity jsou sloučeniny přechodných kovů (Mn, Co, Zn, Cu, Ni) obecně vyjádřené vzorcem  $\text{MO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Mají strukturu podobnou spinelům. Použití těchto materiálů v biomedicíně je však omezeno kvůli toxicitě těchto přechodných kovů. Při využití je nutné nepropustných obalů, aby se zabránilo prosakování těchto kovů [14] [18].

Vzhledem k obtížné funkcionalizaci povrchu železa jsou využívanými materiály i slitiny kovů, například FePt nebo FeAu. [14] [17].

## POVRCH ČÁSTIC

Úkolem obalového, často polymerního materiálu, je stabilizace mikročástic, ochrana jádra před interakcemi s analytem, zajištění dispergace a funkcionalizace povrchu [15].

Mezi běžně využívané povrchové materiály magnetických částic patří přírodní polymery (polysacharidy) syntetické organické polymery na bázi styren-divinylbenzoových kopolymerů, hydroxyethylmethakrylátu, poly(ethylenglykolu) (PEG), polyvinylchloridu (PVA) nebo poly-L-mléčné kyseliny (PLA). Volba tohoto materiálu závisí na povrchových vlastnostech požadovaných pro konkrétní aplikace.

Dalším používaným materiálem je oxid křemičitý ( $\text{SiO}_2$ ). Povlak oxidu křemičitého se připravuje hydrolýzou tetraethyl orthosilikátu při pH 8–10 nebo neutralizací kyseliny křemičité. Byla popsána i příprava použití magnetických částic pokrytých zlatem, které je velmi stabilní a snadno funkcionalizovatelné thiolovými skupinami (-SH) [15] [17] [19].

## FUNKČNÍ POVRCH ČÁSTIC

Interakce magnetických částic s biomolekulami jsou závislé na jejich funkcionalizaci. Seznam využívaných funkčních skupin je uveden v Tabulce 2 [17].

Tabulka 2 Přehled funkčních skupin. Převzato z [17]

Funkční skupina	Vzorec	Vlastnosti	Cílové biomolekuly
aminová	-NH <sub>2</sub>	Pozitivně nabité. Tvorba amidové vazby s -COOH.	proteiny, nukleové kyseliny
	-NHR		
	-NR <sub>2</sub>		
karboxylová	-COOH	Negativně nabité. Tvorba amidové vazby s -NH <sub>2</sub> a esterové s -OH.	proteiny
aldehydová	-CHO	Tvorba imidové vazby s -NH <sub>2</sub> .	proteiny
thiolová	-SH	Tvorba disulfidických můstků (-S-S-) s dalšími -SH skupinami.	proteiny obsahující cystin

### 2.1.3.2 Příprava

Velké množství magnetických nosičů je komerčně dostupných. Přes mnoho existujících způsobů jejich syntézy však žádný postup není univerzální pro všechny typy částic. Syntéza mikročástic sestává ze dvou kroků. Příprava magnetických nanočástic a jejich pokrytí vhodnou vrstvou (anorganickou nebo organickou).

#### PŘÍPRAVA MAGNETICKÉHO JÁDRA

Metody jsou obecně zaměřeny na přípravu nanočástic maghemitu ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), magnetitu (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, FeO·Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), směsných oxidů železa nebo feritů pro přípravu magnetických kapalin a pro syntézu.

#### Precipitace

Precipitace je srážecí reakce, která zahrnuje nukleaci a růst jader a umožňuje uniformní tvorbu částic. Proces je zahájen nukleací, která nastává po dosažení kritické koncentrace. Takto získaná jádra poté mohou růst pomocí difúze rozpuštěných látek z roztoku na jejich povrch. Pro dosažení monodisperzity je nutné tyto dva procesy od sebe oddělit a potlačit nukleaci ve fázi růstu jader. Jinými možnostmi jsou mnohonásobná nukleace nebo agregace bez růstu jader difúzí [20].

#### Koprecipitace

Existují dva hlavní způsoby syntézy magnetitu v roztoku. V prvním se železné hydroxidové suspenze částečně oxidují různými oxidačními činidly. Druhý spočívá ve stárnutí směsi železnatých a železitých solí ve vodném prostředí.

#### Sol-gel reakce

Tato reakce je založena na přechodu systému z kapaliny (sol) na pevnou látku (gel). Prekurzory jsou podrobeny sérii hydrolytických a polymeračních reakcí za vzniku koloidní suspenze a částice poté agregují do fáze gelu. Parametry ovlivňujícími proces jsou teplota, pH, koncentrace solného prekurzoru, druh rozpouštědla a míchání.

## **Mikroemulzní techniky**

Mikroemulze voda v oleji je transparentní, izotropní, termodynamicky stabilní médium. Spočívá v zachycení mikrokapek vodné fáze do povrchově aktivních molekul rozptýlených v kontinuální povrchové fázi.

Dalšími metodami jsou termické rozklady prekurzorů obsahujících železo, srážecí reakce solí železa, sonochemické techniky aj [14] [15] [20].

### **2.1.3.3 Využití**

Využití magnetické separace je výhodné zejména při izolaci biologicky aktivních látek, jelikož vzorky obsahují příměsi snižující citlivost detekčních metod. Spojením magnetických nosičů (nano- i mikročástic) s biologicky aktivní látkou můžeme dosáhnout unikátních vlastností vzniklých materiálů využitelných v biochemii, molekulární a buněčné biologii, biotechnologii, medicíně i jinde [15].

### **2.1.4 Kontrola kvality izolované DNA**

Před amplifikací PCR je třeba ověřit množství a kvalitu izolované DNA, protože doprovodné látky při izolaci DNA mohou působit jako inhibitory PCR. Kvalitu izolované DNA lze ověřit pomocí elektroforetické separace DNA na agarózovém gelu s přídatkem ethidium bromidu, kdy se vysokomolekulární nedegradovaná DNA vizualizuje pod UV světlem jako ostrý proužek svítící na gelu v pozici podle své velikosti. Množství izolované DNA se stanoví např. pomocí fluorimetrie, UV spektroskopie nebo odečtením intenzity proužku DNA z agarózového gelu [1] [21].

#### **2.1.4.1 UV spektrofotometrie**

Hojně používaným způsobem detekce a kontroly kvality izolovaných nukleových kyselin je UV spektrofotometrie. DNA v roztoku absorbuje UV záření v rozmezí od 220 do 320 nm, s absorpčním maximem 260 nm. Protože DNA, RNA a nukleotidy mají stejné absorpční maximum (260 nm), nelze v roztoku stanovit koncentraci individuálních složek (DNA a RNA). Koncentrace DNA se počítá z Lambert-Beerova zákona podle Rovnice 1.

Rovnice 1 Rovnice Lambert-Beerova zákona. Převzato z [1]

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Čistotu izolované DNA z hlediska kontaminace bílkovinami je možné získat z poměru absorbcí při vlnových délkách 260 a 280 nm ( $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ ). Optimální hodnota tohoto poměru je mezi 1,7–1,9 [1] [22] [23] [24].

#### **2.1.4.2 Gelová elektroforéza**

Elektroforéza je separační metoda, která využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost částic je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly. Obvykle probíhá buď volně v pufru nebo na vhodném nosiči jako je celulóza nebo polymerní gel.

Běžně využívanými gely jsou agarózový a polyakrylamidový, lze u nich ovlivnit velikost pórů a tím ovlivnit dělení nukleových kyselin nejen podle náboje, ale i na základě velikosti

molekuly. Délka doby elektroforetické separace je závislá na požadované délce dráhy migrace, protékajícím elektrickém proudu, použitém elektroforetickém pufru a na koncentraci agarózového gelu.

Agarózová gelová elektroforéza se využívá především k dělení látek s velkou molekulovou hmotností (DNA, RNA). Nejčastějším uspořádáním agarózové gelové elektroforézy je horizontální a její princip je závislý na velikosti nukleové kyseliny. Jelikož nukleové kyseliny obsahují fosfátové skupiny, nesou záporný náboj a pohybují se od katody k anodě.

DNA na agarózovém gelu není vidět, proto je nutné ji vizualizovat. Nejčastěji používaným barvivem pro DNA je ethidium bromid, který po ozáření UV světlem fluoreskuje. Je také možné používat další barviva jako je například Gold View. Vyhodnocení délky produktu a stupně jeho degradace probíhá srovnáním pozice fluoreskujícího proužku s pozicemi pásu standardu DNA [1] [21] [22] [25] [26].

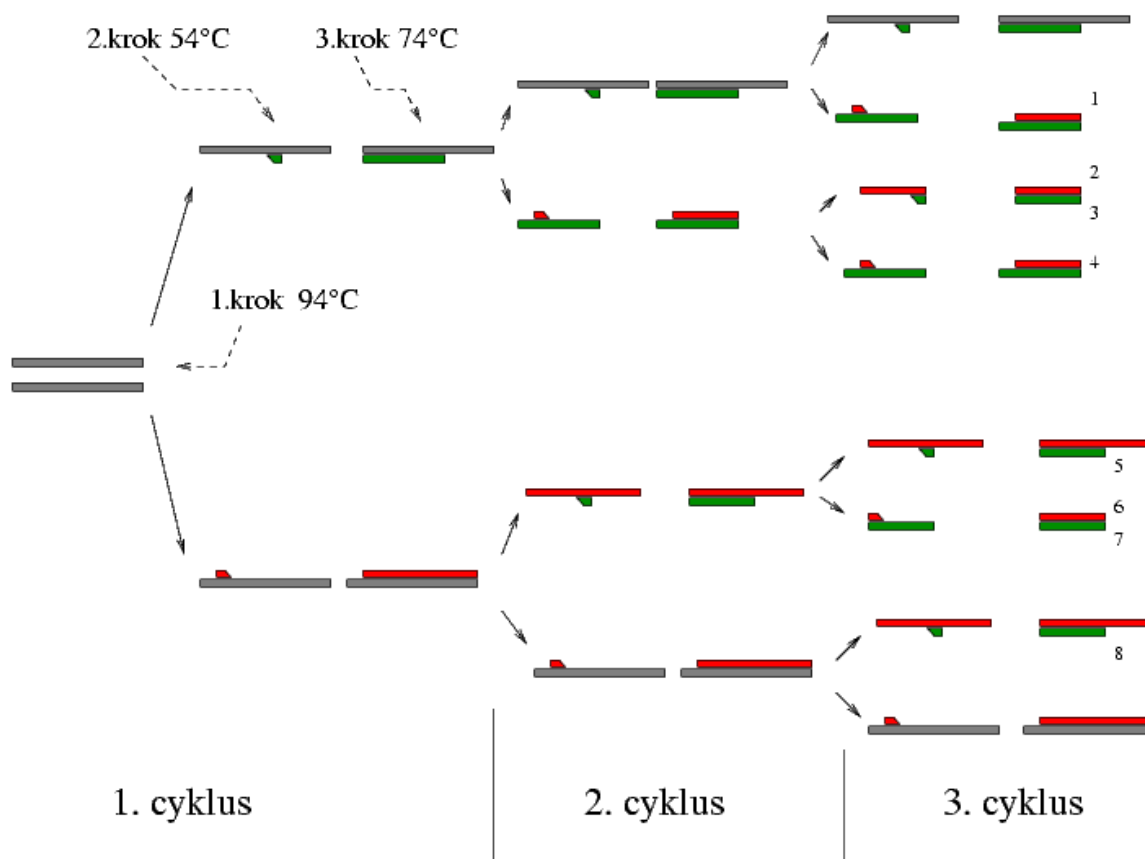
## 2.2 Identifikace DNA pomocí PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla jako laboratorní technika koncipována Kary Mullisem v roce 1983. Proces byl automatizován pro rutinní využívání v laboratořích po celém světě. Metoda závisí na množství a kvalitě izolované DNA. Vysoká citlivost a specifita této reakce způsobuje, že přítomnost i jedné molekuly exogenní nebo neznámé DNA stačí k získání falešně pozitivního výsledku. PCR má široké využití ve výzkumu i v lékařské diagnostice.

Podstatou PCR je cyklicky se opakující primery zprostředkovaná enzymatická syntéza určitého úseku DNA. K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA se hybridizací připojí krátké syntetické oligonukleotidy (primery), od nichž probíhá syntéza nového řetězce DNA. Syntéza řetězců je katalyzována dependentní DNA polymerázou ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od 5' konce primeru. Cyklus PCR se skládá ze tří kroků závislých na teplotě reakční směsi:

- V prvním kroku je templát (dvoušroubovicová DNA, sloužící polymeráze jako vzor pro kopírování) denaturován na dvě samostatná vlákna v reakční směsi zahřáté na 94 °C.
- Ve druhém kroku dochází k ochlazení reakční směsi asi na 50–65°C v závislosti na složení primerů, které se při hybridizují k odděleným řetězcům DNA.
- Třetím krokem je syntéza nových řetězců DNA katalyzovaná *Taq*-polymerázou, která umožní prodloužením primerů vytvoření požadované kopie sekvence DNA při 65–75 °C.

Tento tříkrokový cyklus se opakuje v závislosti na množství přítomné DNA, lze tak exponenciálně ( $2^n$ ;  $n$  = počet cyklů) vytvořit až  $10^9$  kopií vybraného úseku DNA. Optimální počet cyklů PCR závisí na výchozí koncentraci templátové DNA a kvalitě použité polymerázy, obvykle se pohybuje mezi 25–35 cykly. Reakce probíhá v termocykleru, ve kterém se podle naprogramovaných časových intervalů mění teplota. Výsledným produktem jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle 100–1 000 párů bází (bp). Přítomnost amplikonů ve směsi se dokazuje pomocí agarózové nebo polyakrylamidové elektroforézy nebo kvantitativním měřením fluorescence produktu v reálném čase (qPCR) [1] [22] [26] [27] [28] [29].



Obrázek 4 Princip amplifikace PCR. Převzato z [30]

Úspěšnost amplifikace může být ovlivněna přítomností inhibitorů PCR. Inhibitory jsou látky různé chemické povahy. Jejich přítomnost může být dána povahou matrice vzorku, ze kterého byla DNA extrahována nebo vzorky kontaminují během manipulace s nimi či s používanými chemikáliemi. Tyto látky jsou schopné výrazně omezit, případně zcela zastavit aktivitu *Taq* DNA polymerázy a tím znemožnit amplifikaci DNA. Prokázanými inhibitory PCR jsou prostředky používané na vysypávání ochranných gumových rukavic – talek, škrobový pudr – a zbytky fosfátů z mycích prostředků na laboratorním skle. V potravinářských matricích mohou mít inhibiční účinek například kationty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , těžké kovy a dále další látky uvedené v Tabulce 3 [22].

Tabulka 3 Vybrané PCR inhibitory. Převzato z [22]

Inhibitor	Koncentrace inhibitory
EDTA	> 0,5 $\mu\text{M}$
Ethanol	> 1% (v/v)
Fenol	> 0,2% (v/v)
$\text{CH}_3\text{COONa}$	> 5 $\mu\text{M}$
Isopropanol	> 1% (v/v)
$\text{NaCl}$	> 25 $\mu\text{M}$
Dodecylsulfát sodný (SDS)	> 0,005% (w/v)

## 2.3 Probiotika

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které při aplikaci v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav uživatele. Jsou využívána k přípravě fermentovaných mléčných výrobků nebo lyofilizovaných kultur a v potravinových doplňcích [31].

Mezi probiotika se obvykle řadí pouze organismy bakteriálního původu, které jsou za normálních podmínek přirozenou součástí střevní mikroflóry, probiotický efekt byl ale prokázán i u kvasinek. Hlavními zástupci probiotických kmenů jsou především bakterie mléčného kvašení, zvláště rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, nejčastěji *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* [32] [33].

Nejdůležitějšími charakteristikami probiotik jsou jejich prospěšné účinky na zdraví jako antagonistický vliv na patogenní flóru, schopnost tvorby antimikrobiálních substancí, schopnost imunomodulace a především měřitelná a klinicky dokumentovatelná užitečnost pro zdraví příjemce. Dále jsou důležité mikrobiologické bezpečnostní požadavky, například možnost přesného taxonomického zařazení, mikroorganismus nesmí být toxický ani patogenní. Mikroorganismy musí být rezistentní proti žaludeční kyselině a žlučovým kyselinám, a v neposlední řadě musí mít průmyslové parametry, jako jsou stabilita žádaných vlastností během výroby, transportu a skladování a příznivé organoleptické vlastnosti [34]. Nejčastěji využívaná probiotika jsou uvedena v Tabulce 4.

Tabulka 4 Nejčastěji využívaná probiotika. Převzato z [34]

<b>Lactobacily</b>	<b>Bifidobakterie</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. casei</i> , ssp. <i>rhamnosus</i> ( <i>Lactobacillus GG</i> )	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. casei</i> Shirota	<i>B. animalis</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. thermophilum</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<b>Gram pozitivní koky</b>
<i>L. curvatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremonis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<b>Kvasinkovité mikroorganismy</b>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Sacharomyces boulardii</i>	<i>Escherichia coli</i>

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem bakalářské práce bylo porovnání čtyř druhů magnetických částic při izolaci a následné detekci DNA z doplňků stravy Pangamin. Kvalita izolované DNA byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

K tomu bylo potřebné provést:

- izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR
- ověření amplifikovatelnosti izolované DNA pomocí PCR

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Použité potravinové doplňky

K izolaci DNA byly použity tři druhy Pangaminu (Pangamin BIFI (synbiotikum), Pangamin B12 a Pangamin BIFI Plus (synbiotikum)) zakoupené v běžné obchodní síti. Následující informace pocházejí z příbalových letáků a z popisů na obalech (Obrázky 5–7):

#### 1. PANGAMIN B12

Sušené pivovarské kvasnice se sladovým extraktem.

Výrobce: RAPETO a.s., 349 53, Kokašice

Složení: pivovarské kvasnice *Sacharomyces cerevisiae*, sladový extrakt

Vitaminy: B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (kyselina pantotenová), B6 (pyridoxin), B12 (kobalamin), B15 (kyselina pangamová), kyselina listová, kyselina p-aminobenzoová, , D (kalciferol), cholin

Minerální látky: Ca, P, K, Mg, Na

Stopové prvky: Fe, I, Cu, Zn, Mn



Obrázek 5 Pangamin B12

#### 2. PANGAMIN BIFI (SYNBIOTIKUM)

Sušené pivovarské kvasnice se sladovým extraktem.

Výrobce: RAPETO a.s., 349 53, Kokašice

Složení: pivovarské kvasnice *Sacharomyces cerevisiae*, sušená syrovátka, rozpustná vláknina inulin, čisté bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis subspecies Lactis*

Vitaminy: B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (kyselina pantotenová), B6 (pyridoxin), B12 (kobalamin), B15 (kyselina pangamová), kyselina listová, biotin, cholin

Minerální látky: Ca, P, K, Mg

Stopové prvky: Fe, Cu, Zn, Mn



Obrázek 6 Pangamin BIFI

### 3. PANGAMIN BIFI Plus (SYNBIOTIKUM)

Sušené pivovarské kvasnice se sladovým extraktem.

Výrobce: RAPETO a.s., 349 53, Kokašice

Složení: sušené pivovarské kvasnice *Sacharomyces cerevisiae*, sušené mléko s pupalkovým olejem, rozpustná vláknina inulin, laktogenní mikroflóra *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*

Vitaminy: B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (kyselina pantotenová), B6 (pyridoxin), B12 (kobalamin), B15 (kyselina pangamová), kyselina listová, kyselina p-aminobenzoová, D (kalciferol), cholin

Minerální látky: Ca, P, K, Mg, Na

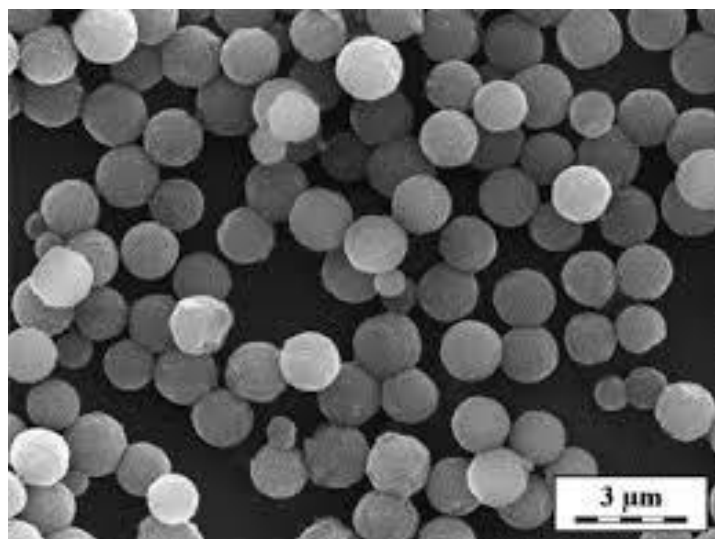
Stopové prvky: Fe, I, Cu, Zn, Mn, a další



Obrázek 7 Pangamin BIFI Plus

#### 4.1.2 Magnetické mikročástice

K izolaci DNA byly použity tři druhy magnetických mikročástic – dva druhy mikročástic P(HEMA-co-GMA) (A, B), mikročástice PGMA (C) a magnetické nanočástice pokryté polylysinem (D). Magnetické částice byly připraveny Ing. D. Horákem, CSc. z Makromolekulárního ústavu AV ČR, v.v.i., Praha. Nosiče byly resuspendovány ve sterilní vodě o koncentraci 2 mg/ml. Fotografie magnetického nosiče je uvedena na Obrázku 8.



Obrázek 8 Magnetický nosič PGMA o průměru 0,7 μm

Charakterizace nosičů jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 Vlastnosti magnetických mikročastic a nanočastic

Značení	Nosič	Fe [%hm]	-COOH [μm/g]	Průměr [μm]	PDI
A	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	10,0	0,76	2,2	1,09
B	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	6,6	2,61	2,2	1,9
C	PGMA	5,4	0,67	0,7	1,16
D	poly-L-lysine (PLy)	4,0 (obj)	/	0,007	0,52

#### 4.1.3 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva Electrophoresis, Německo)
- Dodecylsulfát sodný, SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Ethidium bromid EtBr (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Gold-View (Ecoli, Bratislava Slovensko)
- Poly(ethylenglykol), PEG 6 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, Německo)
- DNA standard (1 500, 1 200, 1 000–100 bp) (MALAMITÉ, Moravské Prusy, Česká republika)
- Nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, Vestec, Česká republika)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina, EDTA (Serva Electrophoresis, Německo)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, Česká republika)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Tris-báze (Serva, Heidelberg, SRN)
- Další běžné chemikálie byly z komerční sítě v kvalitě p.a.

#### 4.1.4 Přístroje

- Magnetický separátor DynaMag-2 (Invitrogen, Oslo, Norsko)
- MiniCycler<sup>TM</sup> PTC 150 (JM Research, Watertown, USA)
- Transiluminátor Spectroline TVR-312A/F (Spectronic Corporation, Westbury, USA)
- NanoPhotometer (Implen, Mnichov, Německo)
- Elektroforetická vana (Thermo Scientific Owl Separation Systems, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300V (Labnet, USA)
- Laboratorní váhy CS 200 (Ohaus, USA)
- Centrifuga MINI Spin (Eppendorf, Německo)
- Termostat – Mini Incubator 230 V (Labnet, USA)
- Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA? Miláno, Itálie)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, Česká republika)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky.

#### **4.1.5 Roztoky**

Roztoky byly připraveny podle skript Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie Španová a Rittich (2010) [1].

##### **4.1.5.1 Roztoky pro lyzi buněk**

###### **0,5 M EDTA (pH 8,0)**

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody; pH bylo upraveno přidáním NaOH na 8,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 l, rozdělej do alikvotních podílů a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.

###### **1 M Tris-HCl (pH 7,8)**

121,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody; pH roztoku bylo upraveno koncentrovanou HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 l, rozdělen do alikvotních podílů a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.

###### **Lyzační roztok A**

Roztok byl připraven ze sterilních zásobních roztoků 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Bylo smícháno 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody.

###### **Lyzační roztok B**

K lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3 mg/ml.

###### **10% SDS**

10 g dodecyl sulfátu sodného (SDS) bylo rozpuštěno v 90 ml destilované vody při současném zahřívání na 68 °C. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a rozdělen do alikvotních podílů. Roztok nebylo nutné sterilizovat.

###### **Proteináza K (1 mg/ml)**

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

##### **4.1.5.2 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických mikročástic**

###### **5 M NaCl**

58,4 g NaCl bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 200 ml a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.

###### **40% PEG 6 000**

Navážka 40 g PEG 6 000 byla rozpuštěna v 60 ml sterilní destilované vody. Roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou do 100 ml. Roztok byl uchováván při 4 °C.

### **70% ethanol**

Bylo smícháno 70 ml 96% ethanolu a 26 ml destilované vody.

### **TE pufr (pH 7,8)**

Roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Byl smíchán 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200  $\mu$ l EDTA (pH 8,0) a 87 ml destilované vody.

#### **4.1.5.3 Komponenty pro PCR**

- Voda pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr kompletní pro Taq DNA polymerázu 1.1. (10x koncentrovaný); složení: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25 °C), 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Tween 20, 25 mM  $\text{MgCl}_2$  (Top-Bio, Praha, ČR)
- Směs dNTP 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 7,5 (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (10 pmol/ $\mu$ l) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/ $\mu$ l) (Top-Bio, Praha, ČR)

#### **4.1.5.4 Roztoky pro gelovou elektroforézu**

##### **0,5 $\times$ TBE pufr**

54 g Tris-base a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 200 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou na 1 l. Před použitím byl roztok 10x naředěn.

##### **Agarózový gel**

1,2%: 0,8 g agarózy bylo rozpuštěno v 70 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Agaróza byla zahřátím rozpuštěna a po nalití do formy ponechána ztuhnout.

##### **Barvicí lázeň**

100  $\mu$ l roztoku ethidium bromidu (5 mg/ml) bylo zředěno 500 ml destilované vody.

##### **Nanášecí pufr Yellow load**

Roztok 6x koncentrovaný, obsahující žluté barvivo oranž G.

## **4.2 Metody**

Všechny uvedené postupy byly prováděny podle skript Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie Španová a Rittich (2010) [1].

### **4.2.1 Izolace DNA z tablet výrobků Pangamin**

#### **4.2.1.1 Příprava hrubých lysátů buněk**

- 3 tablety od každého výrobku (asi 1,4 g) byly přes noc rozpuštěny ve zkumavkách v 5 ml lyzačního roztoku B při laboratorní teplotě.

- Vzorky byly promíchány a do tří Eppendorfových zkumavek bylo odebráno po 1 ml vzorku.
- Vzorky byly centrifugovány při 14 500 ot/min po dobu 3 minut a následně byl slit supernatant.
- Usazeniny byly resuspendovány v asi 500  $\mu$ l lyzačního roztoku B.
- Poté bylo přidáno 25  $\mu$ l 10% SDS a po promíchání ještě 5  $\mu$ l proteinázy K (100  $\mu$ g/ml).
- Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne (asi 22 hod).
- Z připravených hrubých lyzátů buněk byla DNA izolována pomocí magnetických mikročastic a nanočastic.

#### 4.2.1.2 Izolace DNA pomocí magnetických mikro- a nanočastic

- Izolace DNA byla provedena ze 150  $\mu$ l hrubých lyzátů buněk (asi 0,042 g tablet) za využití třech typů magnetických mikročastic a jednoho typu magnetických nanočastic (2 mg/ml).
- Směs komponentů pro izolaci DNA magnetickými mikročasticemi a jejich pořadí je uvedeno v Tabulce 6.

Tabulka 6 Složení směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických mikročastic

Krok	Komponenta	Objem [ $\mu$ l]
1	voda	0
2	NaCl (5 M)	200
3	hrubý lyzát buněk	150
4	PEG 6 000 (40%)	100
5	magnetický nosič (2 mg/ml)	50
Celkem		500

- Po smíchání komponent byla směs inkubována 15 minut při laboratorní teplotě.
- Směs byla umístěna do magnetického separátoru (se zasunutým magnetickým pásem) a magnetické částice s navázanou DNA byly separovány 15 minut při laboratorní teplotě.
- Po uplynutí uvedené doby byl odebrán supernatant.
- Z magnetického separátoru byl vyjmut magnetický pás, do Eppendorfových zkumavek s částicemi bylo přidáno 500  $\mu$ l 70% ethanolu. Vzorek byl promíchán, do separátoru zasunut magnetický pás a po 2 minutách byl ethanol opatrně odebrán.
- Z magnetického separátoru byl opět vyjmut magnetický pás a bylo přidáno 250  $\mu$ l 70% ethanolu, vzorek byl promíchán a po 2 minutách byl ethanol opatrně odebrán.
- Eppendorfovy zkumavky byly vyjmuty ze separátoru a ethanol odpařen.
- DNA absorbovaná na magnetických částicích byla eluována do 50  $\mu$ l TE pufru (pH 7,8), 30 minut při laboratorní teplotě.
- Poté byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

#### 4.2.1.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- DNA izolovaná magnetickými mikročásticemi a nanočásticemi byla použita pro spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty a pro PCR.
- Koncentrace a čistota izolované DNA byly měřeny spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer Implen.
- V závislosti na očekávané koncentraci bylo zvoleno víčko s odpovídajícími parametry, uvedenými v Tabulce 7.

Tabulka 7 Parametry měření podle zvoleného víčka

Víčko	Optická dráha [mm]	Faktor	Objem vzorku [μl]	Měřitelný rozsah DNA [ng/μl]
Lid 5	2	50	6–10	7–350

- Vzorky byly před měřením centrifugovány a řádně zamíchány.
- Jako referenční vzorek byl použit TE pufr (pH 7,8), ve kterém byla DNA rozpuštěna.
- Z displeje přístroje byla odečtena absorbance vlnových délek 230, 260, 280 a 320 nm, poměr absorbancí při vlnových délkách  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  a koncentrace (ng/μl), pro kterou je určující hodnota absorbance při 260 nm.

#### Postup měření na NanoPhotometru

- Byl zapnut přístroj a vložena kyveta LabelGuard.
- Byl vybrán soubor 1. Labelguard Applications, požadavky na měření → 1. Nucleic acids → 1. dsDNA, zkontrolovány parametry (Lid factor podle víčka) a potvrzeny.
- Dále byl změřen slepý vzorek a vzorky podle zvoleného víčka viz Tabulka 7.
- Po změření byla kyveta očištěna, otřena ethanolom a osušena.
- Přístroj byl vypnut.

#### 4.2.2 Polymerázová řetězcová reakce pro kvasinky

- Sekvence primerů specifických pro kvasinky jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8 Sekvence primerů specifických pro kvasinky

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu PCR (bp)	Citace
F-Oli	5'-CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC-3'	152	[35]
R-Oli	5'-ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC-3'		

- Reakce byla provedena na přístroji PTC-MiniCycler.
- Všechny komponenty byly před použitím rozmrazeny a krátce centrifugovány.
- Dále byla připravena směs komponent tzv. Master Mix (směs reakčních komponent vynásobených počtem vzorků ples jeden).

- Zvolený násobící koeficient byl 15, pořadí a množství přidávaných komponent je uvedeno v Tabulce 9.

Tabulka 9 Master Mix pro 15 amplifikačních reakcí

Pořadí	Komponenta	Objem [ $\mu$ l]/celkové kvasinky
1	voda pro PCR	262,5
2	reakční pufr (kompletní/10x)	37,5
3	dNTP (mM)	15
4	primer F-Oli (10 pmol/ $\mu$ l)	15
5	primer R-Oli (10 pmol/ $\mu$ l)	15
6	<i>Taq</i> DNA polymeráza (1 U/ $\mu$ l)	15

- Připravená PCR směs byla řádně promíchána a pipetována po 24  $\mu$ l do 200 ml Eppendorfových zkumavek, poté byl přidán 1  $\mu$ l analyzované DNA. Výsledné složení směsi pro PCR pro 1 reakci je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka 10 Komponenty pro jednu amplifikaci

Pořadí	Komponenta	Objem [ $\mu$ l]/doména <i>Bacteria</i>
1	voda pro PCR	17,5
2	reakční pufr	2,5
3	dNTP	1
4	primer F-Oli	1
5	primer R-Oli	1
6	<i>Taq</i> DNA polymeráza	1
7	DNA	1

- Byla připravena negativní kontrola, kdy byla použita směs pro PCR bez DNA, místo které byl přidán 1  $\mu$ l PCR vody.
- Dále byla připravena pozitivní kontrola, ve které byla použita DNA kvasinek *Sacharomyces cerevisiae* 21-21-16 od Ing. Štěpánky Trachtové, Ph.D. z FCH, VUT v Brně.
- Vzorky obsahující všechny složky pro PCR byly promíchány a krátce centrifugovány.
- Vzorky byly umístěny do termocykleru a provedena PCR pro celkové kvasinky.
- Jednotlivé kroky PCR jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tabulka 11 PCR pro celkové kvasinky

Krok	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas [min]	Počet cyklů
1. počáteční denaturace	94	5	30
2. denaturace	94	1	
3. připojení primerů	51	0,5	
4. syntéza DNA	72	1	
5. poslední cyklus	72	5	

- Vyhodnocení produktů PCR pro celkové kvasinky bylo provedeno gelovou elektroforézou.

#### 4.2.3 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR

- Byl připraven 1,2% agarózový gel (0,8 g agarózy/70 ml 0,5 × TBE pufru).
- Suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, bylo přidáno interkalační barvivo Gold-Wiev (0,5 μl).
- Směs byla nechána vychladnout asi na 60 °C, nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a nechána půl hodiny tuhnout.
- Před nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut.
- Ke vzorkům PCR bylo přidáno 5 μl nanášecího pufru, celý objem byl promíchán a nanesen do komůrek gelu ve směru zprava doleva.
- Dále bylo naneseno 5 μl DNA standardu.
- Gel byl vložen do elektroforetické vaničky tak, aby záporně nabitá DNA migrovala k anodě, a zalit asi 600 ml 0,5 × TBE pufru do výšky asi 5 mm nad gel.
- Bylo zvoleno napětí 60 V a zapnut zdroj gelové elektroforézy.
- Gelová elektroforéza byla ukončena po 2,5 hodinách, kdy barvivo dosáhlo asi poloviny délky agarózového gelu.
- Po skončení byl gel opláchnut destilovanou vodou, umístěn na transiluminátor a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce  $\lambda = 305 \text{ nm}$ .
- Po pořízení fotografie byl gel nechán dobarvovat v roztoku s ethidium bromidem (0,5 μl/ml) do druhého dne a poté byla znovu pořízena fotografie na transiluminátoru pod UV světlem.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Příprava vzorků z potravinových doplňků Pangamin pro analýzu

Tři tablety od každého vzorku Pangaminu (asi 1,4 g), viz kapitola 4.2.1.1, byly přes noc rozpouštěny ve zkumavkách v 5 ml lyzačního roztoku B. Vzorky byly hnědě zbarveny a tvořily hustý sediment. Po promíchání byl odebrán 1 ml suspenze do Eppendorfovy zkumavky a byla provedena centrifugace při 14 500 ot/min po dobu 3 minut a následně byl slit supernatant. Dále bylo postupováno podle postupu uvedeném v kapitole 4.2.1.1.

Z 1 000 μl hrubých lyzátů buněk připravených z Pangaminu bylo 150 μl (asi 0,042 g tablet) použito, pro separaci DNA magnetickými mikro- a nanočásticemi, postupem uvedeným v kapitole 4.2.1.2.

#### 5.1.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Ve vzorcích DNA izolovaných pomocí magnetických mikročástic a magnetických nanočástic byly stanoveny koncentrace a čistoty. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 230, 260, 280 a 320 nm. Celková hmotnost izolované DNA byla vypočtena převedením koncentrace na objem 50 μl TE pufru, do kterého byla DNA eluována dle Rovnice 2.

Rovnice 2 Výpočet celkové hmotnosti izolované DNA.

$$m = c \cdot V$$

Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 12 a v Tabulce 13.

Tabulka 12 Koncentrace DNA izolované z výrobků Pangamin

Výrobek	Nosič	Koncentrace DNA [(ng/μl)]	Celková hmotnost [(ng)]
Pangamin B12	A	83,0	4 000
	B	38,5	1 925
	C	57,0	2 850
	D	89,0	4 450
Pangamin BIFI	A	37,2	1 860
	B	21,3	1 065
	C	13,0	650
	D	28,3	1 415
Pangamin BIFI Plus	A	17,0	850
	B	9,75	487,5
	C	33,2	1 660
	D	80,2	4 010

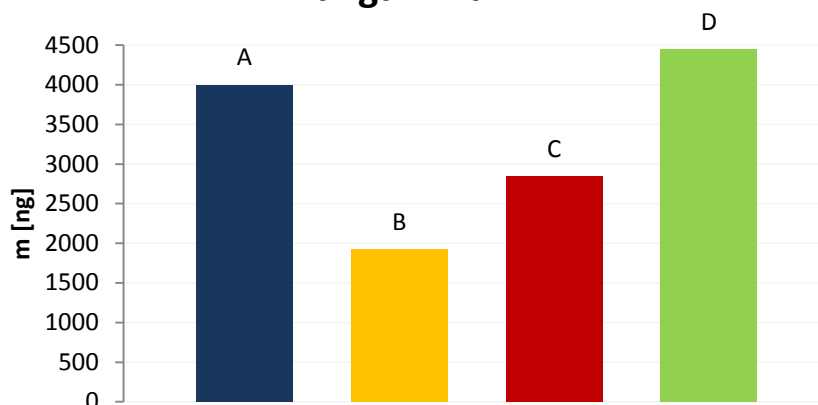
Tabulka 13 Hodnoty absorbance při různých vlnových délkách

Výrobek	Nosič	A <sub>230 nm</sub>	A <sub>260 nm</sub>	A <sub>280 nm</sub>	A <sub>320 nm</sub>	A <sub>260 nm</sub> /A <sub>280 nm</sub>
Pangamin B12	A	0,17	0,42	0,31	0,09	1,50
	B	0,21	0,23	0,19	0,08	1,43
	C	0,17	0,25	0,14	0,02	1,85
	D	0,45	0,43	0,26	0,07	1,90
Pangamin BIFI	A	0,25	0,20	0,15	0,05	1,60
	B	0,11	0,11	0,07	0,02	1,67
	C	0,02	0,05	0,03	0,01	1,68
	D	0,14	0,14	0,10	0,02	1,45
Pangamin BIFI Plus	A	0,31	0,06	0,07	0,01	0,92
	B	0,10	0,02	0,03	0,02	0,83
	C	0,30	0,17	0,13	0,03	1,40
	D	0,47	0,38	0,25	0,06	1,63

### 5.1.2 Srovnání množství DNA izolované magnetickými mikro- a nanočásticemi

Srovnání množství izolované DNA třemi různými magnetickými mikročásticemi a nanočásticemi je znázorněno v Grafech 1–3.

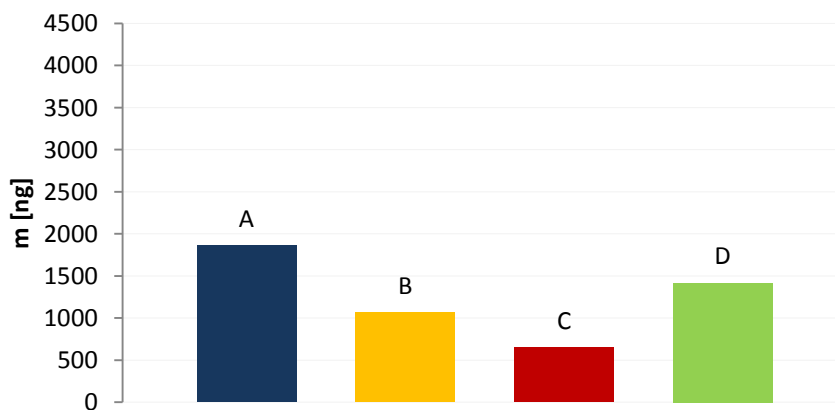
#### Srovnání vyizolovaného množství DNA v Pangaminu B12



Graf 1 Srovnání množství DNA izolované různými mikročásticemi z Pangaminu B12

Z výrobku Pangamin B12 bylo izolováno 1 925–4 450 ng DNA:  $D > A > C > B$ .

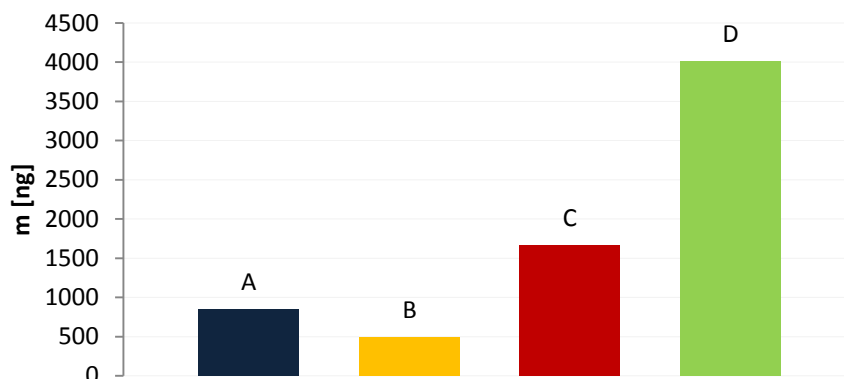
#### Srovnání vyizolovaného množství DNA v Pangaminu BIFI



Graf 2 Srovnání množství DNA izolované různými mikročásticemi z Pangaminu BIFI

Z výrobku Pangamin BIFI bylo izolováno 650–1 860 ng DNA:  $A > D > B > C$ .

### Srovnání vyizolovaného množství DNA v Pangaminu BIFI Plus



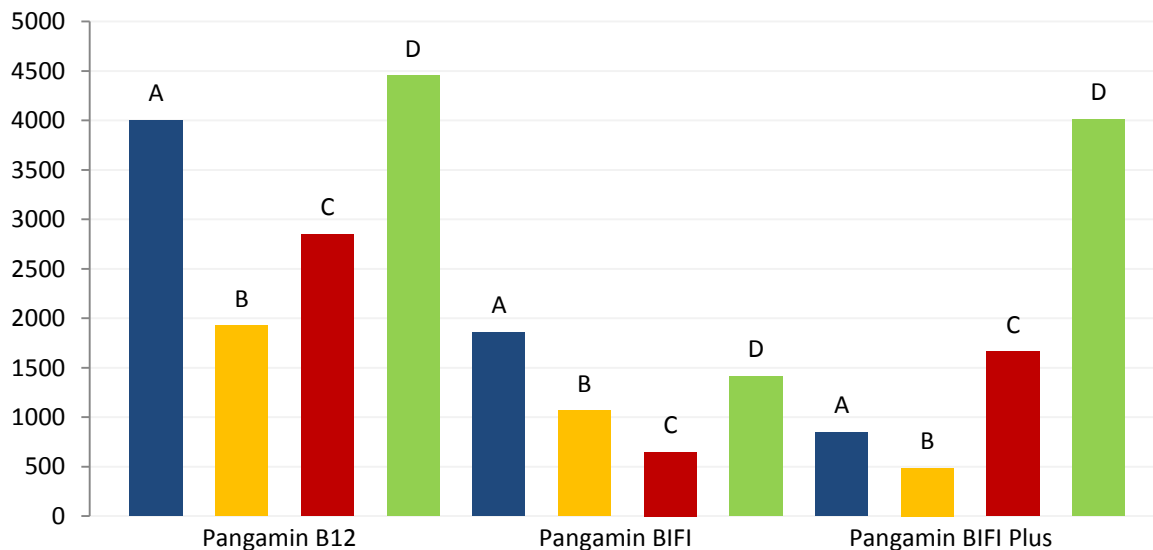
Graf 3 Srovnání množství DNA izolované různými mikročásticemi z Pangaminu BIFI Plus

Z výrobku Pangamin BIFI Plus bylo izolováno 850–4 010 ng DNA:  $D > C > A > B$ .

#### 5.1.3 Srovnání magnetických mikro- a nanočástic pro izolaci DNA

Srovnání jednotlivých magnetických mikro- a nanočástic pro izolaci DNA z výrobků je uvedeno v Grafu 4.

### Srovnání magnetických částic pro izolaci DNA

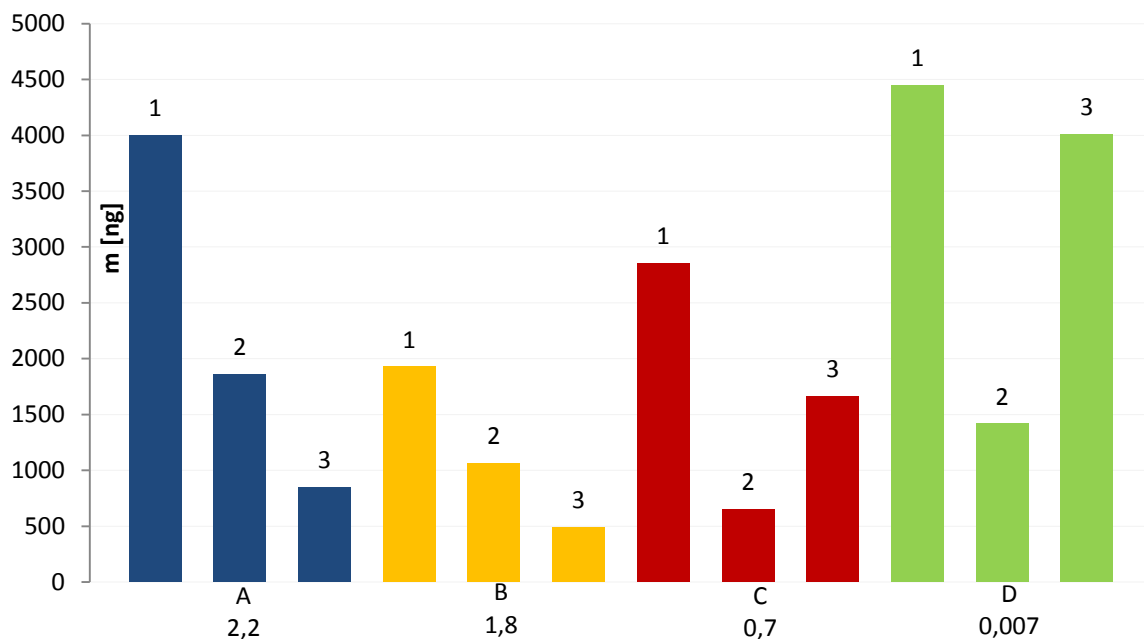


Graf 4 Srovnání magnetických mikro- a nanočástic

#### 5.1.4 Srovnání množství DNA izolovaného z výrobků

Srovnání výrobků Pangamin B12, Pangamin BIFI, Pangamin BIFI Plus a vyizolovaného množství různými mikro- a nanočásticemi je uvedeno v Grafu 5.

## Srovnání množství DNA vyizolovaného jednotlivými magnetickými mikro- a nanočásticemi z výrobků



Graf 5 Srovnání izolovaného množství DNA

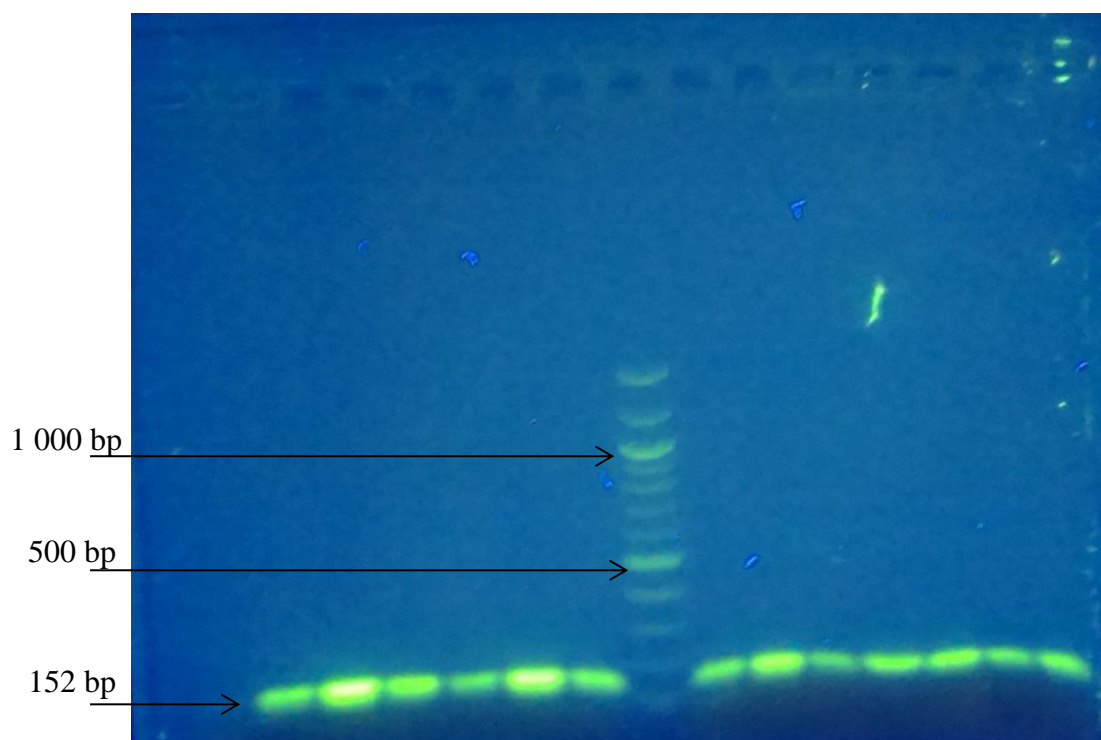
1 Pangamin B12

2 Pangamin BIFI

3 Pangamin BIFI Plus

### 5.2 Důkaz přítomnosti kvasinkové DNA pomocí PCR

Přítomnost kvasinkové DNA byla ověřena pomocí PCR s primery specifickými pro celkové kvasinky. Práce byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.2. Produkty PCR byly následně identifikovány pomocí agarózní gelové elektroforézy dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.3. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 9.



Běh č.	Výrobek	Nosič	Množství DNA [(ng)]/25 µl směsi pro PCR	Detekce produktu PCR
1	Negativní kontrola	–		–
2	Pangamin BIFI	A	83,0	++
3	Pangamin B12		37,2	+++
4	Pangamin BIFI Plus		17,0	++
5	Pangamin BIFI	B	38,5	+
6	Pangamin B12		21,3	+++
7	Pangamin BIFI Plus		9,75	++
8	DNA standard	–		100 bp žebříček
9	Pangamin BIFI	C	57,0	++
10	Pangamin B12		13,0	+++
11	Pangamin BIFI Plus		33,2	+
12	Pangamin BIFI	D	89,0	++
13	Pangamin B12		28,3	++
14	Pangamin BIFI Plus		80,2	+
15	Pozitivní kontrola	–		++

Obrázek 9 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (152 bp)

Detekce produktů PCR:

- amplicon nedetegován
- + detegován amplicon o slabé intenzitě
- ++ detegován amplicon o střední intenzitě
- +++ detegován amplicon o silné intenzitě

### 5.2.1 Shrnutí výsledků

Ze 150  $\mu\text{l}$  připravených hrubých lyzátů buněk ze tří výrobků Pangaminu (Pangamin B12, Pangamin BIFI, Pangamin BIFI Plus) byla izolována DNA třemi typy magnetických mikročásteček (P(HEMA-*co*-GMA) (A), P(HEMA-*co*-GMA) (B), PGMA) a jedním typem magnetických nanočásteček poly-L-lysine (PLy). Dále byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota a vypočtena celková hmotnost izolované DNA. Shrnutí naměřených hodnot koncentrace, čistoty a vypočtených hmotností pro srovnání použitých výrobků je uvedeno v Tabulce 14. Shrnutí naměřených hodnot koncentrace, čistoty a vypočtených hmotností pro srovnání magnetických mikro- a nanočásteček je uvedeno v Tabulce 15.

Tabulka 14 Srovnání naměřených hodnot výrobků Pangamin

Výrobek	Koncentrace [ng/ $\mu\text{l}$ ]	Hmotnost [ng]	Čistota DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$
Pangamin B12	38,5–89,0	1 925–4 450	1,43–1,90
Pangamin BIFI	13,0–37,2	650–1 860	1,45–1,68
Pangamin BIFI Plus	9,75–80,20	487,5–4 010,0	0,83–1,63

Tabulka 15 Srovnání naměřených hodnot použitých magnetických nosičů

Nosiče	Koncentrace [ng/ $\mu\text{l}$ ]	Hmotnost [ng]	Čistota DNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$
A	17,0–83,0	850–4 000	0,92–1,60
B	9,75–38,5	487,5–1 925	0,83–1,67
C	13,0–57,0	650–2 850	1,40–1,85
D	28,3–89,0	1 415–4 450	1,45–1,90

Izolovaná DNA byla následně prokázána amplifikací v PCR pro celkové kvasinky. Ve všech třech výrobcích byl detekován produkt PCR dlouhý 152 bp, tudíž byla ve všech výrobcích prokázána přítomnost kvasinkové DNA, viz Tabulka 16.

Vizualizace PCR produktu proběhla pomocí agarózové gelové elektroforézy. Nejvyšší detekované množství kvasinkové DNA po amplifikaci PCR bylo u výrobku Pangamin B12 a u magnetických nanočásteček poly-L-lysine (PLy).

Tabulka 16 Přítomnost kvasinek ve zkoumaných výrobcích

Výrobek	Přítomnost kvasinek
Pangamin B12	+
Pangamin BIFI	+
Pangamin BIFI Plus	+

+ přítomnost kvasinek byla detegována

## 6 DISKUZE

### 6.1 Izolace kvasinkové DNA z potravinových doplňků

Z tablet tří různých druhů Pangaminu byly připraveny hrubé lyzáty buněk. Tablety se špatně rozpouštěly, proto bylo nutné je nechat rozpouštět přes noc.

#### 6.1.1 Hodnocení výstupu NanoPhotometru Implen

K hodnocení čistoty izolované DNA byla použita následující kritéria:

Nejvyšší množství (koncentrace) izolované DNA kvasinek byla stanovena u výrobku Pangamin B12 magnetickými nanočásticemi poly-L-lysine (PLy). Nejnižší množství (koncentrace) izolované DNA kvasinek byla stanovena u výrobku Pangamin BIFI Plus částicemi P(HEMA-*co*-GMA) (B).

Hodnota poměru absorbancí  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} < 1,8$  značí znečištění DNA bílkovinami, což je způsobeno izolací DNA z reálných vzorků potravinových doplňků. Při použití uvedeného kritéria nejvyšší čistota izolované DNA kvasinek byla zjištěna u výrobku Pangamin B12 při použití magnetických nanočástic poly-L-lysine (PLy) a nejnižší hodnota čistoty izolované DNA kvasinek byla zjištěna u výrobku Pangamin BIFI Plus při použití magnetických mikročástic P(HEMA-*co*-GMA) (B).

### 6.2 Důkaz přítomnosti kvasinkové DNA

Přítomnost DNA kvasinek izolované čtyřmi typy magnetických nosičů byla prokázána pomocí PCR s primery F-Oli a R-Oli specifickými pro celkové kvasinky. Byl amplifikován produkt o velikosti 152 bp, který byl detegovaný agarózovou gelovou elektroforézou na 1,2% gelu.

Ve všech vzorcích bylo amplifikované dostatečné množství produktu PCR o různé intenzitě, která se shodovala se zjištěnými koncentracemi. Ve všech výrobcích byla potvrzena přítomnost DNA kvasinek.

### 6.3 Srovnání výrobků a magnetických mikročástic

Z grafů Grafů 1–3 vyplývá, že nejvíce DNA bylo izolováno z výrobku Pangamin B12 pomocí magnetických nanočástic poly-L-lysine (PLy) a to 4 450 ng. Nejméně DNA u téhož výrobku bylo izolováno pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-*co*-GMA) (B) 1 925 ng. U Pangaminu BIFI bylo nejvíce DNA izolováno pomocí mikročástic P(HEMA-*co*-GMA) (A) 1 860 ng a nejméně pomocí mikročástic PGMA 650 ng. Z Pangaminu BIFI Plus bylo izolováno nejvíce DNA lysinovými magnetickými nanočásticemi (PLy) 4 010 ng a nejméně mikročásticemi P(HEMA-*co*-GMA) (B) 487,5 ng.

Celkově nejvyšší bylo množství kvasinkové DNA izolováno z Pangaminu B12, dále pak u Pangaminu BIFI Plus a nejnižší izolované množství DNA bylo v Pangaminu BIFI.

Z hlediska izolovaného množství DNA byly pro izolaci vhodnější magnetické nanočástice (PLy) než magnetické mikročástice. Z použitých magnetických mikročástic byly nejvýhodnější mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) (A), dále pak PGMA a P(HEMA-*co*-GMA)

(B). Na kvalitu a množství izolované DNA mohly mít vliv i doprovodné látky, což mohlo ovlivnit citlivost amplifikace DNA.

Nejnižší detegované množství DNA kvasinek po amplifikaci PCR bylo u DNA izolované magnetickými mikročásticemi P(HEMA-*co*-GMA) (B) z výrobku Pangamin BIFI, dále mikročásticemi PGMA z výrobku Pangamin BIFI Plus a magnetickými nanočásticemi poly-L-lysine (PLy) z výrobku Pangamin BIFI Plus. Nejvíce detegovaného množství DNA kvasinek po amplifikaci v PCR bylo ve všech třech případech u Pangaminu B12 a to magnetickými mikročásticemi P(HEMA-*co*-GMA) (A), P(HEMA-*co*-GMA) (B) a PGMA.

Výsledky detekce produktu PCR se shodovaly se zjištěnou koncentrací izolované DNA.

## 7 ZÁVĚR

V experimentální části práce byly připraveny hrubé lyzáty buněk z potravinových doplňků stravy Pangamin B12, Pangamin BIFI a Pangamin BIFI Plus. Byla provedena izolace DNA třemi typy magnetických mikročastic a jedním typem magnetických nanočastic. Výsledná koncentrace izolované DNA a čistota byly stanoveny spektrofotometricky.

Množství izolované DNA se lišilo podle výrobku i podle typu magnetických častic. Z hlediska nejvyššího izolovaného množství DNA bylo nejvhodnější použití magnetických nanočastic poly-L-lysine (PLY) a magnetických mikročastic P(HEMA-*co*-GMA) (A).

Amplifikovatelnost izolované DNA byla ověřena pomocí PCR se specifickými primery pro kvasinky a vyhodnocena agarózovou gelovou elektroforézou. Ve všech výrobcích byla prokázána přítomnost kvasinkové DNA. Výsledky amplifikace se shodují s izolovaným množstvím DNA.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [2] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, 36(15), 2472-2485 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>
- [3] ŠAFAŘÍK, Ivo a Mirka ŠAFAŘÍKOVÁ. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1999, 722(1-2), 33-53 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00338-7. ISSN 03784347. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434798003387>
- [4] PRODĚLALOVÁ, Jana, Bohuslav RITTICH, Alena ŠPANOVÁ, Kateřina PETROVÁ a Milan BENEŠ Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, 1056(1-2), 43-48 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.090. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304014487>
- [5] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, 73(3), 495-504 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>
- [6] BALASUNDARAM, Bangaru, Sue HARRISON a Daniel BRACEWELL Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends in Biotechnology* [online]. 2009, 27(8), 477-485 [cit. 2016-04-09]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.04.004. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016777990900105X>
- [7] Ultrasonic Lysis: Cell Disruption & Extraction Read more: <https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm?42910>. *Hielscher – Ultrasound Technology* [online]. b.r. [cit. 2016-04-09]. Dostupné z: <https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm>
- [8] ROGACS, Anita, Lewis MARSHALL a Juan SANTIAGO Purification of nucleic acids using isotachopheresis. *Journal of Chromatography A: Editors' Choice VIII* [online]. 2014, 1335(8), 105-120 [cit. 2016-04-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.12.027. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313018918>
- [9] BURDYCHOVÁ, Radka a Pavla SLÁDKOVÁ. *Mikrobiologická analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 208 s., [6] l. barev. obr. příl. ISBN 978-80-7375-116-6.
- [10] ZUMBO, P. *Phenol-chloroform extraction* [online]. In: . b.r. [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENOL-CHLOROFORM.pdf>

- [11] PRICE, Carol, Daniel LESLIE a James LANDERS Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab on a Chip* [online]. 2009, 9(17), 2484- [cit. 2016-04-08]. DOI: 10.1039/b907652m. ISSN 14730197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b907652m>
- [12] TANG, Yi-Wei a Charles STRATTON. *Advanced techniques in diagnostic microbiology*. Second edition. New York,: Springer, 2013, xv, 957 pages. ISBN 1461439698. Dostupné také z: [http://download.springer.com/static/pdf/554/bok%253A978-1-4614-3970-7.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Fbook%2F10.1007%2F978-1-4614-3970-7&token2=exp=1460145365~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F554%2Fbok%25253A978-1-4614-3970-7.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Fbook%252F10.1007%252F978-1-4614-3970-7\\*~hmac=21d31e52bcde70117015cb3d88309d2c223789340ee2fa6a7a7a2939f03a2a33](http://download.springer.com/static/pdf/554/bok%253A978-1-4614-3970-7.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Fbook%2F10.1007%2F978-1-4614-3970-7&token2=exp=1460145365~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F554%2Fbok%25253A978-1-4614-3970-7.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Fbook%252F10.1007%252F978-1-4614-3970-7*~hmac=21d31e52bcde70117015cb3d88309d2c223789340ee2fa6a7a7a2939f03a2a33)
- [13] KOVAČEVIĆ, Nives. *Magnetic Beads Based Nucleic Acid Purification for Molecular Biology Applications* [online]. New York: Springer Science+Business Media New York, 2016, s. 53-67 [cit. 9.4.2016]. DOI: 10.1007/978-1-4939-3185-9\_5. ISBN 978-1-4939-3184-2. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3185-9\\_5](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3185-9_5)
- [14] HORÁK, Daniel, Michal BABIČ, Hana MACKOVÁ a Milan BENEŠ Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, 30(11), 1751-1772 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1002/jssc.200700088. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700088>
- [15] PEČOVÁ, Michaela. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2011, 105(7), 524-530 [cit. 2016-04-04]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: [http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_07\\_524-530.pdf](http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_07_524-530.pdf)
- [16] TRACHTOVÁ, Štěpánka. *Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích: zkrácená verze PhD. thesis* [online]. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011, 107 s., 30 s. příl. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=43544](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=43544)
- [17] MCBAIN, Stuart, Humphrey YIU a Jon DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. [online]. 2008, 3(2), 169-180, 169-180 s. [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Jon\\_Dobson/publication/23155654\\_Magnetic\\_nano\\_particles\\_for\\_gene\\_and\\_drug\\_delivery/links/09e41510140c02f0d7000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jon_Dobson/publication/23155654_Magnetic_nano_particles_for_gene_and_drug_delivery/links/09e41510140c02f0d7000000.pdf)
- [18] RITTICH, Bohuslav, Alena ŠPANOVÁ a Daniel HORÁK. Functionalised magnetic microspheres with hydrophilic properties for molecular diagnostic applications. *Food Research International* [online]. 2009, 42(4), 493-498 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.01.020. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996909000337>

- [19] HORÁK, Daniel a Nataliya BENEDYK. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2004, 42(22), 5827-5837 [cit. 2016-04-09]. DOI: 10.1002/pola.20406. ISSN 0887624x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.20406>
- [20] TARTAJ, Pedro, Mar MORALES, Sabino VEINTEMILLAS-VERDAGUER, Teresita GONZ LEZ-CARRE O a Carlos SERNA. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2003, 36(13), R182-R197 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1088/0022-3727/36/13/202. ISSN 0022-3727. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0022-3727/36/i=13/a=202?key=crossref.a2adf492ddb094e3fa1b0ef0c95a015>
- [21] GALUSZKA, Petr a Lenka LUHOVÁ. *Laboratorní technika pro biochemiky* [online]. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003, 101 s. [cit. 2016-04-10]. ISBN 80-244-0640-3. Dostupné z: [http://www.molbio.upol.cz/stranky/FRVS/L\\_Tskripta.pdf](http://www.molbio.upol.cz/stranky/FRVS/L_Tskripta.pdf)
- [22] OVESNÁ, Jaroslava a Jan HODEK. *Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované papáji* [online]. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010, 22 l. [cit. 2016-04-10]. ISBN 978-80-7427-063-5. Dostupné z: <http://invenio.nusl.cz/record/113907/files/metodyextrakcedna.pdf>
- [23] NI, Y, D LIN a S KOKOT. Synchronous fluorescence and UV/vis spectrometric study of the competitive interaction of chlorpromazine hydrochloride and Neutral Red with DNA using chemometrics approaches. *Talanta* [online]. 2005, 65(5), 1295-1302 [cit. 2016-04-09]. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.09.008. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914004005582>
- [24] KOTEK, Jan. *Laboratorní technika* [online]. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2007, 105 s. [cit. 2016-04-10]. ISBN 978-80-246-1441-0. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/anorchem/LabTech/Text/LT.pdf>
- [25] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, vi, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [26] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [27] KOLMODIN, Lori a David BIRCH. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Routine Practice. *PCR Cloning Protocols: Basic Principles and Routine Practice* [online]. 2. New Jersey: Humana Press, 2002, s. 3-18 [cit. 6.4.2016]. DOI: 10.1385/1-59259-177-9:003. ISBN 1592591779. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-177-9:003>
- [28] PAVLÍK, Emil. *Molekulární biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 3* [online]. In: . b.r. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://objednavky.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>
- [29] BARTUŇEK, Petr. *Lymeská borelióza*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2013, 157 s., viii s. obr. příl. ISBN 978-80-247-4355-4. Dostupné také z:

- [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=anqVAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA57&dq=polymer%C3%A1zov%C3%A1+%C5%99et%C4%Bzov%C3%A1+reakce&ots=kDO84PtRed&sig=tu23BIif3EPuCFGEOkdiKFNYSFA&redir\\_esc=y#v=onepage&q=polymer%C3%A1zov%C3%A1%20%C5%99et%C4%Bzov%C3%A1%20reakce&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=anqVAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA57&dq=polymer%C3%A1zov%C3%A1+%C5%99et%C4%Bzov%C3%A1+reakce&ots=kDO84PtRed&sig=tu23BIif3EPuCFGEOkdiKFNYSFA&redir_esc=y#v=onepage&q=polymer%C3%A1zov%C3%A1%20%C5%99et%C4%Bzov%C3%A1%20reakce&f=false)
- [30] Namnožení DNA pomocí PCR. *Robotika.cz* [online]. 2002 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://robotika.cz/articles/gerda/cs>
- [31] BRONSKÝ, Jiří. Probiotika v pediatrické praxi. In: HORANSKÝ, Viktor. *Pediatric pro praxi: příručka obvodního pediatra a obvodní dětské sestry* [online]. 3., přeprac. vyd., (1. čes. vyd.). Praha: Avicenum, 2010 [cit. 2016-04-04]. ISSN 1213-0494. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2010/03/05.pdf>
- [32] FRIČ, P. Probiotics in Gastroenterology. *Zeitschrift für Gastroenterologie* [online]. 2002, 40(3), 197-201 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1055/s-2002-22328. ISSN 00442771. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2002-22328>
- [33] HRONEK, Miroslav, Zdeňka KUDLÁČKOVÁ a Jana NEKVINDOVÁ. Probiotika a prebiotika v profylaxi a terapii poruch GIT a v prevenci karcinogeneze. In: *Medicina pro praxi* [online]. 2009 [cit. 2016-04-04]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: [file:///D:/Solen\\_med-200902-0003.pdf](file:///D:/Solen_med-200902-0003.pdf)
- [34] PREBIOTIKA, PROBIOTIKA A SYNBIOTIKA. In: HORANSKÝ, Viktor. *Pediatric pro praxi: příručka obvodního pediatra a obvodní dětské sestry* [online]. 2. Praha: Avicenum, 2005 [cit. 2016-04-09]. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2005/02/02.pdf>
- [35] TOFALO, Rosanna, Maria SCHIRONE, Giorgia PERPETUINI, Giovanna SUZZI a Aldo CORSETTI. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control* [online]. 2012, 23(2), 356-362 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.07.032. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713511003057>

## 9 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

bp	páry bází
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleotid-5'-trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
HEMA	hydroxyethylmethakrylát
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDI	index polydisperzity
PEG	poly(ethylenglykol)
PGMA	poly(glycidylmethakrylát)
P(HEMA)	poly(2-hydroxyethylmethakrylát)
P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát- <i>co</i> -glycidylmethakrylát)
PLA	poly-L-mléčné kyseliny
PVA	polyvinylchlorid
rtPCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SDS	dodecylsulfát sodný
UV	ultrafialové záření