

Detekce nežádoucích mikroorganismů pomocí izotermální amplifikace DNA

Jiří Los

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Jiří LOS
Osobní číslo: T09723
Studijní program: B 2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

Téma práce: Detekce nežádoucích mikroorganismů pomocí izotermální amplifikace DNA

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Navrhněte experimenty vedoucí k ověření metody.
3. Provedte příslušné experimenty.
4. Teorii, výsledky a diskuzi sepište v předepsané formě.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Databáze vědecké literatury.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

13. února 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

18. května 2012

Ve Zlíně dne 13. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na aplikovatelnost metody izotermální amplifikace DNA (LAMP) pro přímou detekci mykobakterií ve vodách. Shromažďuje současné teoretické poznatky, na jejichž základě proběhly experimenty potvrzující danou metodu a představuje tak ucelený úvod do dané problematiky. Podařilo se nám optimalizovat reakční podmínky pro detekci *Mycobacterium phlei* pomocí LAMP a detekce barvivem SYBR Green. Optimální reakční podmínky byly 63°C a koncentrace Mg^{2+} 4 mM. Produkt lze bezpečně detekovat po 90 minutách. Zjistili jsme, že detekce *M. phlei* pomocí fluorescenčního DNA barviva GelStar v UV je výrazně méně citlivá a spolehlivá. *M. phlei* se nám podařilo ve všech případech detekovat gelovou elektroforézou v agarosovém gelu.

Klíčová slova: LAMP, PCR, DNA, primer, izotermální amplifikace, GelStar, SYBR Green

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the applicability of the loop mediated isothermal DNA amplification (LAMP) for the direct detection of Mycobacteria in water. It reviews contemporary theoretical information together with practical experimental testing of the LAMP method and also represents coherent introduction to the LAMP issues. We optimized reaction conditions for the detection of *Mycobacteria phlei* with SYBR Green DNA stain. The optimal conditions were 63°C and 4 mM of Mg^{2+} . The Product could be securely detected after 90 minutes of the reaction. We found out, that the detection of *Mycobacteria phlei* by fluorescence GelStar DNA stain in UV is not reliable and enough sensitive. By agarose gel electrophoresis we successfully detected *Mycobacteria phlei* in all cases.

Keywords: LAMP, PCR, DNA, primer, Isothermal Amplification, Gel Star, SYBR Green

Poděkování

Tímto bych chtěl velmi poděkovat vedoucímu své bakalářské práce, panu Doc. Mgr. Markovi Koutnému, Ph.D. za cenné rady při konzultacích, trpělivost, odborné vedení, ochotu a energii v průběhu vypracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat paní Ing. Lucii Husárové za její ochotu, čas a odbornou pomoc s gelovou elektroforézou.

Rádost vidět a rozumět, to je nejkrásnější dar přírody.

A. Einstein

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BAKTERIE	12
1.1 MYKOBakterie.....	12
1.1.1 Mycobacterium phlei	13
1.2 PRINCIP DETEKCE A IDENTIFIKACE	13
1.2.1 Princip detekce a identifikace – kultivace na živné půdě	13
1.2.2 Princip detekce a identifikace – PCR a LAMP.....	14
1.3 BAKTERIÁLNÍ DNA.....	14
2 PŘIROZENÁ SYNTÉZA DNA	15
2.1 INICIACE.....	15
2.2 ELONGACE	15
2.3 TERMINACE.....	15
3 PCR	16
3.1 FÁZE CYKLU PCR A PRODUKT.....	16
4 LAMP	17
4.1 PRINCIP LAMP	17
4.2 DETEKCE PRODUKTU LAMP.....	21
5 PRIMERY	22
5.1 KRITÉRIA PRO NÁVRH PRIMERŮ.....	22
5.2 VÝROBA PRIMERŮ	22
5.3 NÁVRH PRIMERŮ	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
6 KULTIVACE M. PHLEI	25
7 IZOLACE DNA M. PHLEI	26
8 STANOVENÍ KONCENTRAEC IZOLOVANÉ DNA	27
9 REAKČNÍ ROZTOK	29
9.1 KOMPONENTY	29
9.1.1 Primery.....	29
9.1.2 Bst polymeráza.....	29
9.1.3 DNA, dNTP, Voda a MgCl ₂	29
9.1.4 Betain	29
9.2 KONCENTRACE JEDNOTLIVÝCH KOMPONENT REAKČNÍHO ROZTOKU	30
10 VÝSLEDKY A DISKUSE	31

10.1	OPTIMALIZACE KONCENTRACE Mg^{2+}	31
10.2	OPTIMALIZACE KONCENTRACE DNA A Mg^{2+}	32
10.3	KOREKCE REAKČNÍ TEPLoty	33
10.4	DETEKCE PRODUKTU GELOVOU ELEKTROFORÉZOU	34
10.5	STANOVENÍ OPTIMÁLNÍ REAKČNÍ TEPLoty	35
10.6	STANOVENÍ PRODUKTU POMOCÍ SYBR GREEN	36
10.7	STANOVENÍ REAKČNÍ DOBY PRO DETEKCI POMOCÍ SYBR GREEN	36
ZÁVĚR		38
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		39
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		42
SEZNAM OBRÁZKŮ		44
SEZNAM TABULEK		46
SEZNAM PŘÍLOH		47

ÚVOD

Cílem této práce bylo navrhnout metodu pro snadnou a rychlou detekci mykobakterií ve vodách. Mykobakterie jsou většinou patogení mikroorganismy - způsobují nejrůznější onemocnění jako např. tuberkulózu, lepru, paratuberkulózu a jiná závažná onemocnění člověka, skotu, ryb apod. Mykobakterie velice pomalu rostou, a proto je jejich detekce standardní metodou kultivace na živné půdě obtížná, neboť se jedná o velmi pomalý proces. Nabízí se však i jiné způsoby jejich detekce. Zavedenou metodou jsou polymerázové řetězové reakce, zkráceně PCR, kterým cca před 14 ti lety vznikla „konkurence“ v podobě metody izotermální amplifikace DNA (LAMP). Principem je kopírování specifických úseků DNA, které následně slouží ke stanovení daných mikroorganismů. Jelikož se LAMP jeví jako elegantnější nástroj oproti PCR, je cílem práce rovněž vypracovat literární rešerši k této metodě a danou metodu potvrdit realizací navržených experimentů. Domnívám se, že bude vhodné věnovat část práce také PCR a poté objektivně zhodnotit výhody a nevýhody obou metod. Rovněž se domnívám, že pro bezproblémové pochopení problematiky bude nutné budoucí čtenáře seznámit s některými důležitými fakty, díky jejichž znalosti bude práce srozumitelná od začátku až do konce. V této práci se tedy čtenář seznámí s přírodními mechanismy replikace DNA, tak i modifikovanými metodami jako jsou PCR nebo LAMP. Se všemi těmito informacemi se čtenář seznámí v teoretické části práce. V praktické části budou provedeny experimenty potvrzující nebo vyvracející aplikovatelnost LAMP pro detekci mykobakterií. Velmi vhodnou metodou detekce mykobakterií by byla možnost rozhodnout o jejich přítomnosti ve vodách přímo pouhým okem. LAMP nám tuto možnost nabízí. Síla a krása izotermální amplifikace spočívá v její rychlosti a finanční nenáročnosti a své uplatnění zcela jistě najde jak v ochraně životního prostředí, potravinářském průmyslu, tak v klinické medicíně.

Závěrem si nemohu odpustit zvážit lidský rozměr LAMP ve smyslu rychlých a levných lékařských testů pro rozvojové země, např. v Africe, kde tato metoda představuje obrovský pokrok oproti stávající situaci, jelikož včasná detekce bakteriálních nebo virových onemocnění může zachránit bezpočet životů nebo minimálně zkrátit dobu léčebného procesu a tím pádem ušetřit nemalé finanční prostředky.

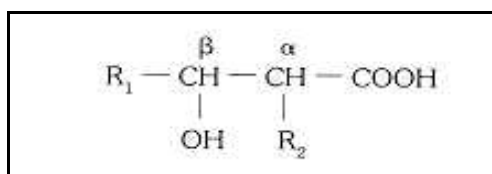
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE

Bakterie patří mezi jednoduché organismy, které lze nalézt prakticky na jakémkoliv místě na Zemi. Mohou žít v nejrůznějších chemicko-fyzikálních podmínkách, jako jsou teplota nebo pH prostředí. Vyskytují se v nejrůznějších tvarech a velikostech. Existuje mnoho druhů bakterií. Nacházejí také v ochraně životního prostředí, v průmyslu apod., ale najdeme i takové druhy, jejichž přítomnost v určitém prostředí lze považovat za nežádoucí.

1.1 Mykobakterie

Do rodu *Mycobacterium* náleží kolem 70 druhů mykobakterií, přičemž většina z nich je medicínsky významná pro svoji patogenitu [1]. Jsou řazeny do kmene *Actinobacteria*. Mykobakterie jsou striktně aerobní mikroorganismy. Mezi typické charakteristiky této skupiny bakterií patří vysoká acidorezistence [2]. Ta souvisí s vysokým podílem komplexních lipidových frakcí a vosků v buněčné stěně. Základem lipidů jsou mykolové kyseliny, odtud název Mykobakterie.



Obr. 1: Struktura kyseliny mykolové

Jedná se o vůbec nejdelší mastné kyseliny vyskytující se v přírodě, kde R1 a R2 obsahují 60 – 90 atomů C [3], [6]. Mykobakterie jsou špatně barvitelné organickými barvivy. Většinou se jedná o gram pozitivní bakterie, barvení se avšak provádí Ziehl-Neelsenovým barvivem [4]. Acidorezistencí rozumíme odolnost vůči odbarvení kyselinami, zásadami a alkoholem. Mykobakterie jsou pomalu rostoucí bakterie (generační doba řádově 1 den), z tohoto důvodu je nutná dlouhá kultivační doba (několik týdnů), tím pádem i obtížná detekce [3]. Mykobakterie netvoří toxiny, avšak jsou původci závažných onemocnění u člověka, jako je například tuberkulóza (TBC) způsobená *M. tuberculosis*. Téměř polovina z netuberkulózních mykobakterií je spojena s oportunními infekcemi u zvířat a lidí a některá mohou způsobit i sporadická vzplanutí. Netuberkulózní mykobakterie (NTM) lze získat ze zevního prostředí po kontaktu s vodou, aerosolem, půdou, nebo prachem – cestou inhalační, perorální, nebo poraněnou kůží v důsledku zranění či chirurgických zákroků. Na

rozdíl od *M. tuberculosis* nedochází k mezilidskému přenosu s výjimkou *M. leprae*, způsobující lepru, která vyžaduje dlouhodobý úzký kontakt. NTM mohou způsobit plicní infekce napodobující tuberkulózu, infekce lymfatických uzlin, infekce kostí, abscesy a infekce kůže a měkkých tkání, které mohou být lokalizované, nebo delokalizované. *M. leprae* může způsobit poškození periferních nervů a kožní léze. Jak již bylo řečeno, většina NTM se pomalu množí, což má za následek, že se infekce projeví za týdny, měsíce, nebo dokonce roky po prvotní expozici [1]. Podle údajů SVS z let 1990 až 1999 byly při veterinárně-hygienických prohlídkách na jatkách 41.458.565 poražených prasat zjištěny tuberkulózní změny u 134.088 (0,32%) zvířat. Laboratorně byly vyšetřeny orgány od 17.326 prasat, z nichž byly mykobakterie izolovány ze 7.246 (41,8%) zvířat. *M. bovis* (původce bovinní tuberkulózy) bylo izolováno pouze od 5 (0,07%) zvířat pocházejících z posledního ohniska bovinní tuberkulózy skotu v České republice v roce 1995. Prevalence aviární tuberkulózy (původce je *M. avium subsp. avium*) v laboratorně došetřených orgánech za sledované období představovala 55,7%. Druhým nejčastěji izolovaným zástupcem komplexu *M. avium* bylo *M. avium subsp. hominissuis* (jedná se nový poddruh), který tvořil 39,2% u prasat. Ostatní druhy podmíněně patogenních mykobakterií (*M. chelonae*, *M. terrae*, a *M. fortuitum*) byly izolovány od 5,1% prasat [27].

1.1.1 Mycobacterium phlei

V této práci bude náš nežádoucí mikroorganismus představovat *M. phlei*. Tato bakterie byla zvolena z důvodu nepatogenity. *M. phlei* patří mezi tzv. rychle rostoucí mykobakterie s kultivační dobou 48 – 72 hodin. Jedná se o gram pozitivní acidorezistentní bakterii, produkující nápadný žlutý pigment. Je chemoautotrofní, redukuje nitráty. Buněčná stěna patří do IV chemotypu a obsahuje meso-diaminopimelovou kyselinu, menachinon MK-8 a mykolové kyseliny s 64 -78 C a 1-6 dvojnými vazbami. *M. phlei* patří mezi tzv GC-rich mikroorganismy, tzn., že podíl G-C (Guanin-Cytosin) párů v její DNA je majoritní (60 – 72 mol %) [2].

1.2 Princip detekce a identifikace

1.2.1 Princip detekce a identifikace – kultivace na živné půdě

Obecně kultivací rozumíme množení bakterií v laboratorních podmínkách např. na Petriho misce. Pro růst bakterií jsou navozeny podmínky, podobné těm přírodním. Používají se

umělé půdy (např. agarové) obsahující veškeré živiny pro růst bakterií. Složení půd se liší v závislosti na druhu bakterie. Dalšími významnými faktory ovlivňující rychlost růstu jsou teplota, vlhkost prostředí a pH půdy. Rod a druh bakterie je poté možno určit na základě nejrůznějších biochemických testů [5].

1.2.2 Princip detekce a identifikace – PCR a LAMP

V DNA mykobakterií existují úseky, které jsou pro daný druh bakterie zcela jedinečné. Tyto úseky jsou ohraničeny známými sekvencemi nukleotidů. Toho lze využít při kopírování daných úseků. Za předpokladu jejich selektivního namnožení, lze při použití vhodných detekčních metod tyto vzniklé úseky detekovat. Toho lze dosáhnout vhodnou modifikací přirozené syntézy DNA. Nejrozšířenější takovou metodou je polymerázová řetězová reakce, PCR. Princip PCR bude vysvětlen ve 3. Kapitole. Novou metodu představuje izotermální amplifikace DNA (LAMP – Loop Mediated Isothermal Amplification). Této metodě bude věnována kapitola 4.

1.3 Bakteriální DNA

Nejčastěji bývá bakteriální DNA přítomna ve formě uzavřeného kruhu jako dvouvláknová šroubovice [7]. Vlákna jsou navzájem antiparalelní. DNA je z chemického hlediska polykondenzát kyseliny fosforečné, 2-deoxy-D-ribózy a N-báze. N-bází rozumíme deriváty purinu (Adenin, Guanin) a pirimidinu (Cytosin, Thymin). Prostorový tvar N-bází dovoluje jejich specifické spojení v rámci dvou řetězců DNA prostřednictvím H-můstků. Tento fakt označujeme jako komplementaritu N-bází. Tu můžeme schematicky znázornit jako A-T, C-G, kde velká písmena značí začátky názvů jednotlivých bází a „-“ jsou vodíkové můstky, v případě AT se jedná o spojení dvěma můstky a u GC třemi můstky. Tato skutečnost je podstatou uchování tzv. genetické informace [8]. Tu je možné využít také k detekci a identifikaci jednotlivých druhů bakterií.

2 PŘIROZENÁ SYNTÉZA DNA

Ke vzniku nových organismů v prostředí je nezbytnou podmínkou replikace DNA mateřského organismu. Samotná replikace se skládá ze tří částí: iniciace, elongace a terminace.

2.1 Iniciace

DNA je tvořena paralelním a antiparalelním vláknem. Replikace začíná na specifickém místě, označovaném jako replikační počátek, nukleofilním atakem hydroxylové skupiny nesené třetím uhlíkem tzv. primeru na fosfátovou část prvního nukleotidu syntetizované DNA. Primer je část komplementární RNA (DNA) k danému úseku DNA o délce řádově 10 – 100 nukleotidů. Je syntetizován pomocí enzymu primázy. Enzym helikáza následně rozplétá DNA. Znovu zapletení vláken brání SSB proteiny. Iniciace končí navázáním enzymu DNA polymerázy III na řetězec orientovaný ve směru 3' – 5'[9] – [11].

2.2 Elongace

DNA polymeráza III je protein umožňující plynulou syntézu nového řetězce pouze z templátového řetězce orientovaného ve směru 3' – 5'. Růst nového řetězce probíhá tedy ve směru 5' – 3' (antiparalelně). DNA polymeráza je na řetězec uchycena tzv. svorkovými proteiny. Ty zvyšují stabilitu elongace a umožňují růst dlouhých řetězců. Syntetizované antiparalelní vlákno z antiparalelního vlákna templátu je orientováno ve směru 3' – 5', a proto nemůže být plynule replikováno. Tato skutečnost je vyřešena pomocí RNA primerů, které postupně nasedají na antiparalelní vlákno templátu a umožní tak DNA polymeráze III syntetizovat v požadovaném směru, avšak po částech. Vznikají tzv. Okazakiho fragmenty o délce 100 – 200 nukleotidů. Primery jsou poté z vlákna vystřiženy DNA polymerázou I a nahrazeny odpovídajícími nukleotidy DNA polymerázou III. Jednotlivé úseky jsou spojeny enzymem DNA ligázou. Replikace antiparalelního vlákna probíhá tedy pomaleji [9] – [11].

2.3 Terminace

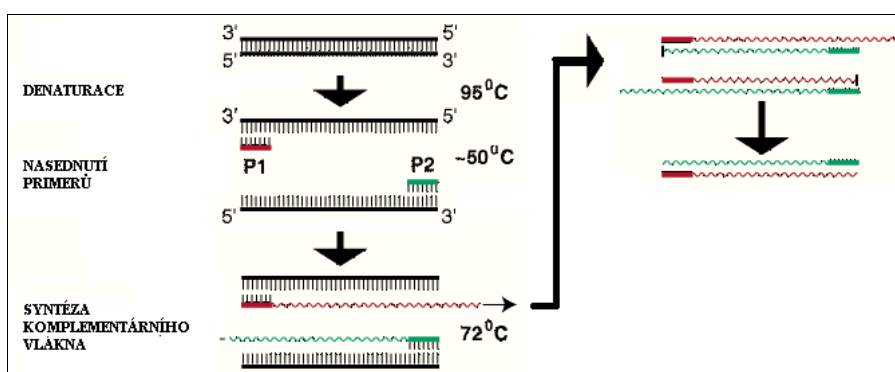
Replikace DNA končí po zhotovení celé její kopie.

3 PCR

Jednou z klasických metod amplifikace specifických úseků DNA je metoda PCR (z ang. Polymerase Chain Reaction). Jedná se o polymerázové řetězové reakce, které umožňují amplifikovat specifickou část DNA pomocí konkrétně navržených párů DNA-primerů a vhodných polymeráz. Jedná se o vysoce citlivé metody, nacházející uplatnění např. v lékařské diagnostice. Samotná reakce probíhá v zařízení zvaném termocykler při požadovaném počtu cyklů, přičemž každý cyklus se skládá ze tří fází. Termocykler je zařízení schopné během krátkých časových intervalů měnit stabilně v cyklech naprogramovanou teplotu [12].

3.1 Fáze cyklu PCR a produkt

V první fázi cyklu PCR dochází k zahřátí mikrozkumavky se vzorkem DNA na teplotu kolem 95°C . Při této teplotě dojde k rozrušení H-můstků a rozdělení DNA na jednotlivá vlákna. Tento proces označujeme jako denaturaci DNA. V druhé fázi nasedají na specifická místa předem připravené párové DNA primery. K tomu dochází při teplotě cca $50 - 60^{\circ}\text{C}$. Třetí fáze probíhá přibližně za teploty 75°C . Dochází k syntéze komplementárního vlákna. Většina DNA polymeráz při této teplotě není schopna existence, proto je použito polymeráz izolovaných z termofilních bakterií. Nejznámější termostabilní polymerázou je tzv. *Taq polymeráza* izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Ta snáší i extrémní teploty kolem 90°C . Ve druhém cyklu vznikají obdobným způsobem z produktů prvního cyklu požadované úseky DNA, sloužící dále jako templáty v dalších cyklech amplifikace. Celá reakce trvá přibližně 2 hodiny [12]. Vše popisuje následující obrázek. Výsledkem je vznik lineárního homogenního dvouvláknového produktu o koncentraci zpravidla $4 - 40 \mu\text{g/ml}$ a délce $100 - 1000 \text{ bp}$ (z ang.: base pair). Výhodou PCR je možnost provádět více typů reakcí v jedné reakční nádobě [14].



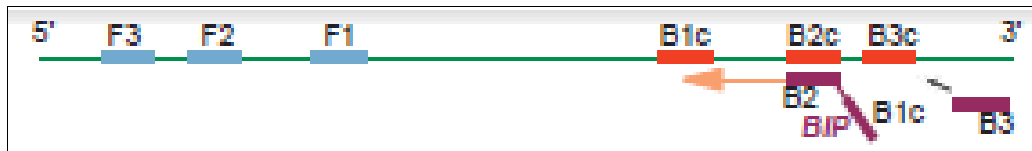
Obr. 2: Schéma průběhu PCR

4 LAMP

Na rozdíl od PCR dochází k amplifikaci kontinuálně při stálé teplotě kolem 63°C. Podstatou jsou rovněž speciálně navržené páry primerů pro cílenou amplifikaci požadované části DNA a specifické polymerázy. Není možné použít klasickou *Taq* polymerázu, ale *Bst* polymerázu z organismu *Bacillus stearothermophilus*, která se vyznačuje tzv. dislokázovou aktivitou, tj. dokáže oddělovat kódující vlákno DNA a nahrazovat ho řetězcem, který sama syntetizuje. Zároveň je však možné i použití speciálně navržených loop-primerů, které rychlost amplifikace značně zvýší. Doba takové amplifikace může být několikanásobně nižší než u PCR [13]. Velkou výhodou je rovněž netřeba drahého vybavení pro amplifikaci nebo detekci produktu, možnost provádět amplifikaci mimo laboratoř a získání řádově více produktu než u PCR [14]. Zdá se, že izotermální amplifikace je v tomto ohledu elegantnější nástroj, umožňující urychlit detekci mykobakterií ve vodách, než klasická PCR. Samotný proces amplifikace také probíhá v několika fázích.

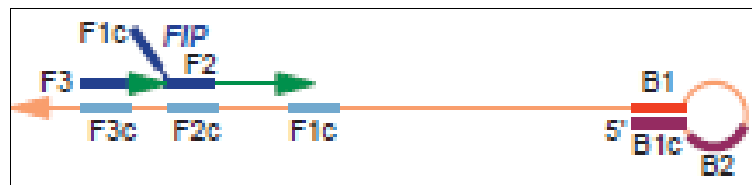
4.1 Princip LAMP

Předpokládáme, že při teplotě reakce např. 63°C je část DNA denaturovaná. V popisu mechanismu amplifikace dále budeme uvažovat jedno denaturované vlákno. Pro druhé vlákno je popis logicky ekvivalentní. Denaturované vlákno obsahuje cílový úsek, který je ohraničen známými sekvencemi nukleotidů, pro něž jsou primery navrženy. Takových cílových úseků se v DNA nachází většinou 6 – 8 [13]. Tyto primery budeme dále popisovat jako FIP, BIP, F3 a B3, kde FIP a BIP rozumíme přední a zadní vnitřní primer a F3 a B3 jako přední a zadní vnější primer (FIP – Forward Inner Primer, BIP – Backward Inner Primer). Amplifikace může být akcelerována loop primery (loop – smyčka), ty budeme značit Loop B a Loop F. Na první vlákno nasedá (hybridizuje) při dané teplotě BIP primer. Polymeráza dosyntetizuje komplementární řetězec. Jelikož BIP primer se skládá z B2 komplementární části nasedající na řetězec a nekomplementární B1C části, která na řetězec nenedá (Obr. 3), avšak je komplementární k části nově syntetizovaného řetězce, může být tento řetězec oddělen od templátového řetězce navázáním B3 primeru a dislokázové aktivitě polymerázy, která od B3 primeru syntetizuje dělicí vlákno.



Obr. 3: Nasednutí BIP a B3 primerů

Oddělené vlákno začíná BIP sekvencí a vlivem dostatečné délky BIP sekvence dochází ke stočení tohoto konce, kde jak už bylo řečeno, nekomplementární část BIP primeru B1C je komplementární k nově syntetizované části DNA a mezi těmito částmi dojde ke spárování. Na nově syntetizovaný řetězec poté nasedá FIP primer a F3 primer a celý proces je ekvivalentní.



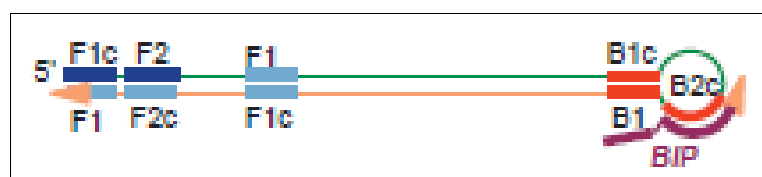
Obr. 4: Nasednutí FIP a F3 primerů

Výsledkem je produkt cílové sekvence nukleotidů, ohraničený stočenými konci, smyčkami (loop), jak je patrné z následujícího obrázku.



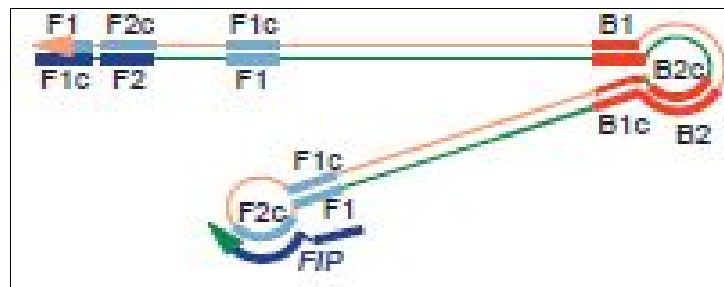
Obr. 5: Výchozí produkt pro LAMP

Oranžová šipka (Obr. 5) naznačuje směr syntézy dalšího komplementárního vlákna, přičemž si můžeme povšimnout, že daný oblouk B2C (Obr. 5) je jednovláknový a tudíž vhodný k navázání BIP primeru (Obr. 6).



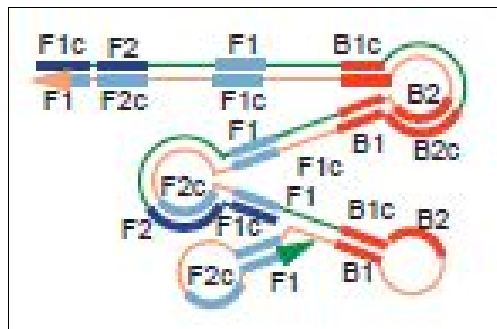
Obr. 6: Nasednutí BIP na výchozí produkt LAMP

DNA polymeráza vážící se na BIP primer syntetizuje ve směru šipky komplementární vlákno k zelenému vláknu (Obr. 6). Oranžové vlákno je tímto procesem postupně oddělováno a v důsledku komplementarity jeho F1 a F1C sekvencí dochází k jeho stočení a vytvoření smyčky. Z této F1 sekvence je syntetizován nový řetězec a výsledný produkt vypadá následovně.



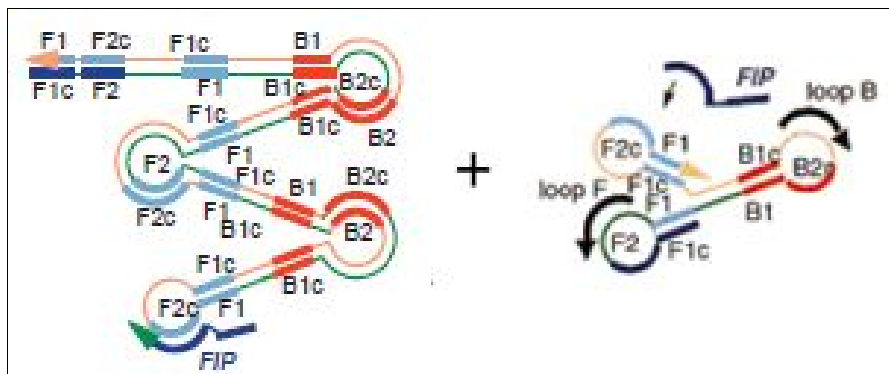
Obr. 7: Průběh amplifikace po syntéze vlákna z BIP a sednutí FIP

Opět si všimněme (Obr. 7) komplementární jednovláknové F2C produktu části k FIP primeru. FIP primer na F2C úsek produktu nasedá a následně je syntetizováno nové vlákno ve směru zelené šipky. Přitom dochází k postupnému oddělování vlákna a jeho stočení. Toto vlákno je označeno oranžovou šipkou (Obr. 7). Výsledek je znázorněn na obrázku níže.



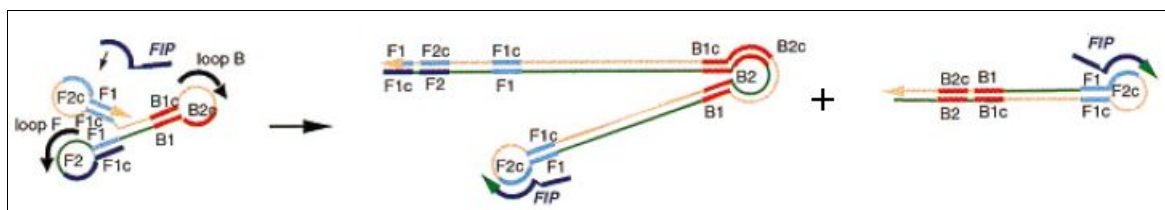
Obr. 8: Výsledný produkt syntézy FIP vlákna

Nyní se syntetizuje nové vlákno ve směru zelené šipky (Obr. 8), kde zelená šipka náleží původně oddělenému a stočenému vláknu (viz. Obr. 7, vlákno označené oranžovou šipkou). Výsledkem jsou dva produkty s cílovou sekvencí nukleotidů, které dále podléhají amplifikaci, neboť při tomto kroku dochází úplnému rozdělení produktu (Obr. 8) na dva dílčí produkty. Takto postupně geometrickou řadou vznikají nové produkty podléhající amplifikaci. Oba produkty jsou znázorněny na obrázku níže.



Obr. 9: Vznik dvou nezávisle amplifikovatelných produktů

Amplifikace dále pokračuje na základě výše popsaných mechanismů. Tento mechanismus je znám zkratkou LAMP, znamenající Loop-mediated isothermal amplification. Na výše uvedeném obrázku je znázorněna možnost, kdy loop primery hybridizují druhý produkt. Loop-primery jsou komplementární k úseku mezi B1c a B2, resp. F1c a F2 produktu (lépe vidět na obrázku č. 11). Zvyšují tak počet výchozích pozic pro amplifikaci DNA. Amplifikace tohoto produktu by mohla pokračovat bez této hybridizace, avšak díky loop-primerům vzniká extra produkt, který poslouží k rychlejšímu průběhu amplifikace. Na obrázku č. 10 vidíme průběh amplifikace druhého produktu z předešlého obrázku pomocí loop primerů.



Obr. 10: Amplifikace za přítomnosti loop primerů, druhý z produktů vznikl z loop B primeru

Izotermální amplifikace se provádí nejčastěji v objemu 25 μL při teplotách 60 – 65°C. V závislosti na počtu použitých primerů (4 nebo 6) trvá doba reakce 30 – 60 min. Koncentrace primerů FIP a BIP bývá zpravidla 1,6 M, u F3 a B3 0,2 M a Loop F a Loop B 0,8 M. Koncentrace *Bst* polymerázy bývá 8 U [13] – [17].

4.2 Detekce produktu LAMP

Koncentrace produktu se pohybují v rozmezí 400 – 800 $\mu\text{g/mL}$, což umožňuje jeho snazší detekci různými metodami. První metodou je gelová elektroforéza v agarosovém gelu. Jedná se o levný způsob detekce, avšak nevýhodou je její časová náročnost, probíhá až po skončení LAMP a výsledný produkt nelze kvantifikovat ani kvalifikovat. Tato metoda byla v práci použita. Další metodou je turbidimetrie. V průběhu LAMP vzniká sraženina magnézium-pyrofosfátu, která může být detekována turbidimetrem nebo spektrofotometrem a to po skončení LAMP. Je to rychlý způsob detekce, leč není kvantitativní a kvalitativní. Vzhledem k nutnosti detekčních přístrojů se jedná i o drahý způsob detekce. Alternativu představuje centrifugace, po níž se sraženina pyrofosfátu usadí na dně reakční nádoby a může být snáze detekována pouhým okem, což je do značné míry dosti subjektivní způsob detekce. Vznik pyrofosfátu lze detekovat také v průběhu reakce, hovoříme o takzvané Real-Time turbidimetrii. Výhodou je možnost kvantifikovat vzniklý produkt. Dalším způsobem detekce je použití DNA barviv a pozorování fluorescence reakčního roztoku. Jedná se o rychlý způsob, který může být proveden i bez použití fluorimetru a to pouhým okem, za použití vhodného DNA barviva, což je výhodné pro rychlou detekci a finanční nenáročnost. Oba způsoby byly v práci použity. Pomocí Real-Time fluorimetrie můžeme vzniklý produkt taktéž kvantifikovat. Kvalifikovat produkt lze pomocí systému enzymové imunoanalýzy (Lateral Flow System). Jedná se o poměrně rychlou a levnou metodu. Posledním způsobem detekce je tzv. ABC-LAMP (Alternately Binding quenching probe Competitive LAMP). Produkt lze rychle kvantifikovat a kvalifikovat (tj. určení specifických sekvencí produktu). K tomu je zapotřebí fluorimetru a speciálně navržené sondy. Ta se váže na specifické místo v produktu a snižuje tak jeho fluorescenci [14] – [17].

5 PRIMERY

Primery jsou krátké úseky DNA např. 20 nt, které slouží k vyznačení místa zahájení syntézy řetězce DNA. Je společnou vlastností DNA polymeráz, že nemohou začít syntetizovat komplementární řetězec od „nuly“, ale potřebují počátek = primer. Vlastnosti a funkce primerů byly popsány v předešlých kapitolách. V následujících kapitolách bude nastíněno, na jaké okolnosti je třeba klást pozornost při jejich návrhu.

5.1 Kritéria pro návrh primerů

Při navrhování vhodných DNA-primerů je třeba přihlídnout ke skutečnostem, že oba párové primery FIP a BIP musí nasedat na templát (DNA) při shodné teplotě. Oba navrhované primery proto musí mít přibližně stejnou teplotu tání. Teplotu tání příslušných primerů můžeme získat početně. Platí, že teplota tání nukleových kyselin je úměrná jejich délce. Obecně pozorovanou skutečností je, že pro denuraci jednoho páru A-T je potřeba zvýšit teplotu přibližně o 2°C, kdežto pro denuraci páru C-G o 4°C. Získáme tak jednoduchou rovnici pro výpočet přibližné teploty tání T_m nukleových kyselin.

$$T_m = 2 \times AT + 4 \times CG, \quad (1)$$

V rovnici značí AT a CG počet párů příslušných bází. Je možno změřit T_m i experimentálně, pakliže budeme měřit absorbanci při 260 nm v průběhu denurace dvouvláknové DNA. Další komplikace mohou nastat, pakliže pár primerů vytvoří tzv. dimer. Podstatou je přítomnost delší sekvence nukleotidů v jednom primeru, která je komplementární k sekvenci na druhém primeru. Rovněž může nastat situace, kdy navrhovaný primer má navzájem komplementární části svých konců a dostatečnou délku na to, aby se tyto konce mohly navzájem párovat. Při nedodržení těchto podmínek PCR nebo LAMP neproběhne [12], [18].

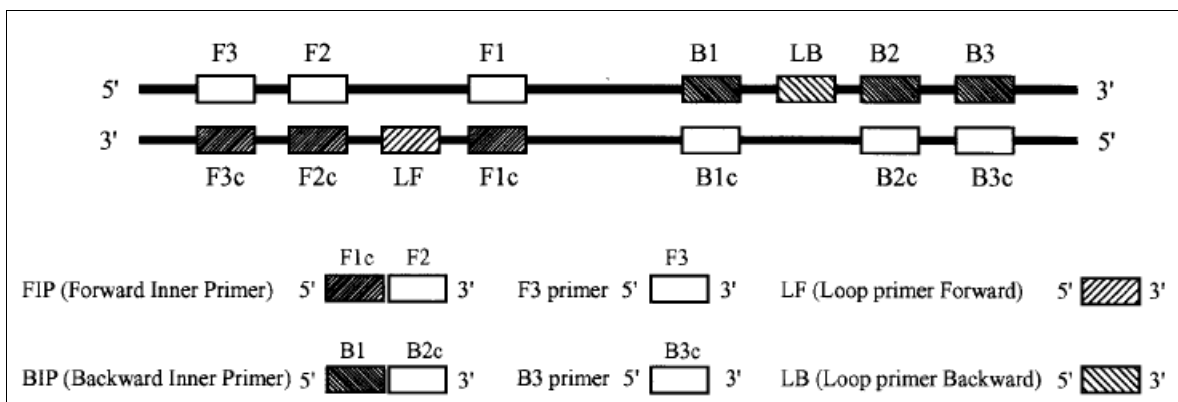
5.2 Výroba primerů

Navržený primer lze vyrobit syntézou jednotlivých nukleotidů v daném pořadí. První nukleotid bývá vázán na pevný podklad 5' koncem, 3' konec je volný. Na 3' volný konec prvního nukleotidu může být navázán další požadovaný nukleotid. Jeho 3' konec bývá blokován např. dimethoxytritem (DMT) a proto může dojít ke správnému napojení 5' koncem na základní nukleotid. Dalším krokem je odstranění DMT z druhého nukleotidu a vytvoření tak podmínky pro vznik fosfodiesterové vazby, umožňující napojení třetího

nukleotidu. Toho lze dosáhnout například změnou pH. Syntézu primerů provádí specializované firmy pomocí automatizovaných systémů na základě objednávky. Běžně jsou syntetizovány oligonukleotidy do délky 80 nt [12], [20].

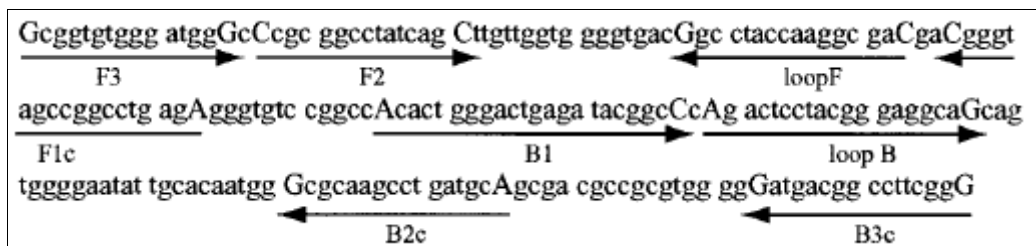
5.3 Návrh primerů

Pro návrh primerů je zapotřebí využít tzv. evolučně stabilních úseků. Ty v průběhu evoluce nepodléhají mutacím a jsou tedy vhodné pro návrh primerů univerzálních pro určitou skupinu bakterií. Tyto úseky najdeme v např. v genech *gyrB*, 16s rDNA, *hsp60*, *recA* aj. [16], [20]. V této práci bude pro návrh primerů použito úseku z 16s rDNA. Tyto primery by měly být univerzální pro 30 známých druhů mykobakterií (viz. Příloha) [16]. Navržené primery by měly být schopny amplifikovat námi hledanou sekvenci nukleotidů *M. phlei*. Schéma pro návrh primerů popisuje následující obrázek.



Obr. 11: Schéma konfigurace jednotlivých primerů [16]

Následující obrázek znázorňuje jednotlivé sekvence nukleotidů genu 16s rDNA spolu s šipkovými instrukcemi pro tvorbu jednotlivých primerů. Velká písmena označují začátek a konec primeru. Pravá šipka odpovídá právě takové sekvenci nukleotidů, které je třeba použít, levá šipka znázorňuje, že je potřeba použít komplementární sekvence.



Obr. 12: schéma tvorby primerů použitím genu 16s rDNA [16]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 KULTIVACE *M. PHLEI*

M. phlei v lyofilizované formě byla oživena pomocí kultivačního média č. 27 na Petriho miskách. Vše probíhalo za sterilních podmínek. Doba inkubace byla 48 hodin při teplotě 37°C. Kultivační médium č. 27 obsahuje 2,0 g kvasničného extraktu, 2,0 g proteose pepton č. 3, 2,0 g casitone, 2,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g KH_2PO_4 , 1,5 g citrátu sodného, 0,6 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g Tween 80, 50,0 mL glycerolu, 20,0 g agaru, 1,0 L destilované vody. Výsledné pH = 7 [21]. Po uplynutí kultivační doby byl pozorován vznik kolonie *M. phlei*. Z této kolonie pak byl odebrán vzorek pro izolaci bakteriální DNA. Tvar kolonie a její žluté zbarvení způsobené produkcí žlutého pigmentu *M. phlei* můžeme vidět na následujícím obrázku.



Obr. 13: Kultivovaná kolonie *M. phlei*

7 IZOLACE DNA *M. PHLEI*

Pro izolaci bakteriální DNA byl použit PowerSoil DNA isolation kit (Elizabeth Pharmacon s.r.o., Brno). Přibližně 0,25 g půdy s kolonií *M. phlei* bylo vloženo do rozbíjecích zkumavek obsahující skleněné částice a 750 μL pufru (chrání DNA před degradací) rozkládající půdu. Po 5 sekundách vortexování bylo přidáno 60 μL roztoku C1 obsahující SDS napomáhající buněčnému rozkladu. Po 5 sekundách vortexování byly rozbíjecí zkumavky vloženy do rozbíjecího přístroje kde 3 krát po 10 minutách byly mechanickým kmitáním buňky *M. phlei* rozemlety. Poté byla zkumavka po dobu 30 sekund centrifugována při 10 000 g. 500 μL supernatantu bylo přeneseno do sterilní 2 mL mikrozukavky a smícháno s 250 μL roztoku C2, který obsahuje složky srážející organické a anorganické látky (kromě DNA). Roztok byl centrifugován 1 minutu při 10 000 g, vzniklá sraženina se usadila na dně mikrozukavky. 600 μL supernatantu (kromě sraženiny) bylo přeneseno do 2 mL sterilní mikrozukavky a poté bylo přidáno 250 μL roztoku C3. Výsledný roztok byl 5 sekund vortexován a poté inkubován po dobu 5 minut při 4°C. Roztok C3 má analogickou funkci jako C2. Roztok byl dále centrifugován 1 minutu při 10 000 g. 750 μL supernatantu (kromě sraženiny) bylo přeneseno do 2 mL sterilní mikrozukavky spolu s 1200 μL roztoku C4. Jedná se o koncentrovaný solný roztok usnadňující stálou vazbu DNA na křemičitou membránu kolonky použité v následujícím kroku. Po 5 sekundách vortexování bylo 675 μL roztoku pipetováno do středu kolonky obsahující křemičitou membránu a následně centrifugováno 1 min. při 10 000 g. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a dalších 675 μL roztoku bylo pipetováno do středu kolonky. Celý proces je dále analogický. Nakonec bylo na střed kolonky pipetováno 500 μL roztoku C5. Jedná se o promývací roztok na bázi ethanolu sloužící k čištění DNA zachycené na membráně. Odstraňuje zbytky solí, organických a anorganických látek, které mohly zůstat na membráně kolonky. Po 30 sekundách centrifugace při 10 000 g byla přebytečná kapalina odstraněna a zbytek byl centrifugován znovu po dobu 1 min. při 10 000 g. Kolonka byla poté přenesena do sterilní 2 mL mikrozukavky a na střed kolonky bylo pipetováno 100 μL roztoku C6. Jedná se sterilní eluční pufr, který při průchodu membránou snižuje koncentraci solí z roztoku C4 a tím umožní uvolnění DNA z membrány. Po 30 sekundách centrifugace při 10 000 g byla kolonka vyjmuta z mikrozukavky. Mikrozukavka obsahovala roztok vyizolované DNA, jejíž koncentrace byla následně stanovena [22].

8 STANOVENÍ KONCENTRAEC IZOLOVANÉ DNA

Pro stanovení DNA byl použit DNA Quantification Kit obsahující pufr 10X TNE (tris(hydroxymethyl)aminomethan, EDTA, disodná sůl, NaCl, HCl), kalibrační roztok DNA (standart) o koncentraci 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a barvivo (bisBenzimidine H 33258) o koncentraci 10 mg/mL . Doporučená teplota pro uchovávání je -20 až -80°C . Na změření hodnoty fluorescence byl použit Luminometr s UV fluorescenčním modulem 20/20n (Turner Biosystems, USA). Excitační vlnová délka fluorescenčního modulu byla 365 nm a k emisi záření docházelo v tomto modulu při 440 – 470 nm [23]. Následující tabulka zobrazuje složení kalibračních roztoků.

Tab. 1. Složení kalibračních roztoků

kalibrační roztoky, c. standartu DNA = 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$				
č. roztoku	1	2	3	4
V H_2O [μl]	225	220	215	210
V DNA [μl]	0	5	10	15
V pufr 10X TNE [μl]	25	25	25	25
V roztoku [μl]	250	250	250	250
c. kalibračních roztoků [ng/mL]	0	40	80	120

Následující tabulka představuje složení roztoků s neznámou koncentrací izolované DNA.

Tab. 2. Složení roztoků izolované DNA pro stanovení její koncentrace

Roztoky izolované DNA <i>M. phlei</i>		
č. roztoku	1	2
V H_2O [μl]	224,2	223
V DNA [μl]	0,8	2
V 10X TNE [μl]	25	25
V roztoku [μl]	250	250

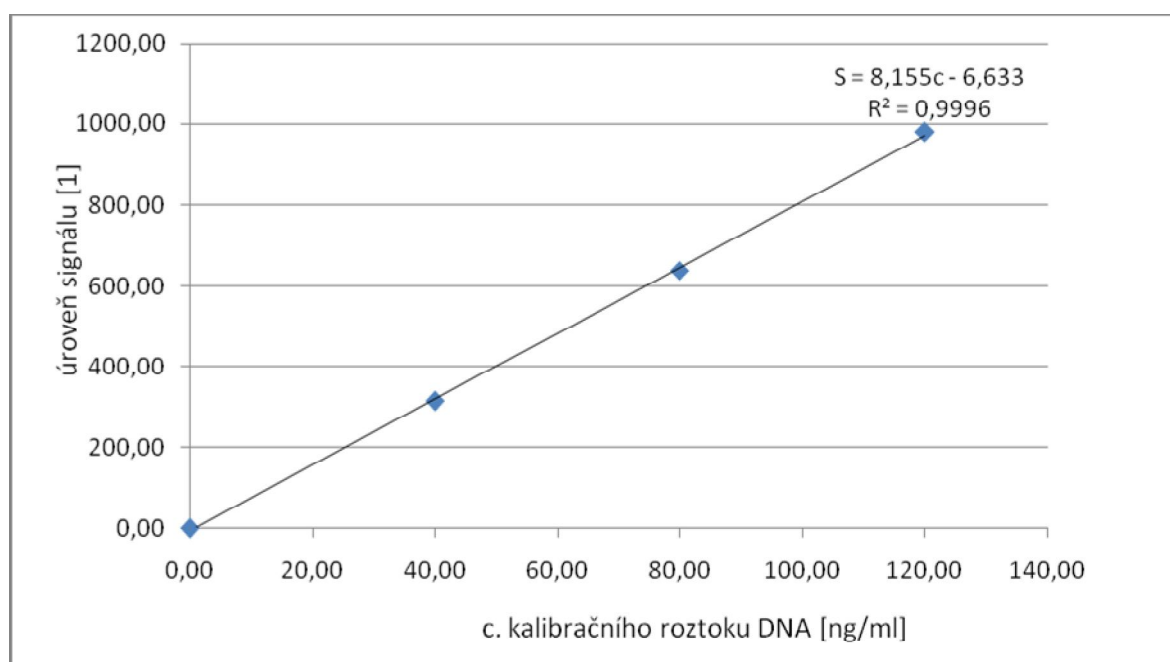
Ze zásobního roztoku bisBenzimidine H 33258 byl vytvořen pracovní roztok o koncentraci 0,2 mg/mL . Pro měření fluorescence bylo pipetováno 100 μL kalibračního roztoku DNA do mikrokvyety a smícháno s pracovním roztokem bisBenzimidine H 33258 v poměru 1:1[23], analogicky pro měření fluorescence izolované DNA.

Následující tabulka popisuje naměřené hodnoty signálu odpovídající fluorescenci kalibračních roztoků.

Tab. 3. Naměřené hodnoty signálů fluorescence kalibračních roztoků

Naměřené hodnoty signálu [1] kalibračních roztoků					
č. roztoku	signál 1	signál 2	signál 3	průměr	výsledek
1	864	858	856	859	0
2	1157	1180	1181	1173	314
3	1490	1504	1499	1498	640
4	1822	1873	1820	1838	979

Následující obrázek představuje kalibrační graf přístroje, rovnici kalibrační přímky a hodnotu regresního koeficientu.



Obr. 14: Graf závislosti neměřeného signálu na koncentraci kalibračních roztoků

Na základě hodnoty regresního koeficientu 0,9996 kalibrační přímky lze naměřené hodnoty signálů kalibračních roztoků považovat za dostatečně přesné. Po změření fluorescence vzorků s izolovanou DNA byla koncentrace izolované DNA stanovena na 5,34 $\mu\text{g/mL}$. Cílem stanovení koncentrace izolované DNA bylo ověřit, zda izolace DNA proběhla v pořádku. Na základě výsledků lze tvrdit, že izolace DNA proběhla úspěšně.

9 REAKČNÍ ROZTOK

9.1 Komponenty

9.1.1 Primery

Následující tabulka popisuje strukturu navržených primerů. Primery byly objednány u společnosti EAST PORT Praha s. r. o., Praha.

Tab. 4. Struktura navržených primerů

FIP	TCTCAGGCCGGCTACCCG CCGCGGCCTATCAGC
BIP	ACACTGGGACTGAGATACGGCC TGCATCAGGCTTGCGC
F3	GCGGTGTGGGATGGG
B3	CCCGAAGGCCGTCATC
Loop F	GTCGCCTTGGTAGGCC
Loop B	AGACTCCTACGGGAGGCAG

9.1.2 Bst polymeráza

Bst polymeráza *Bst* DNA Polymerase, Large Fragment Catalog. # M0275S (New England Biolabs inc.) byla objednána u společnosti Biotech A. S., Praha. Balení obsahuje *Bst* polymerázu o koncentraci 8000 U/mL a množství 1600 U. Součástí balení je reakční pufr 10X obsahující 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100. [26]

9.1.3 DNA, dNTP, Voda a MgCl₂

Množství izolované templátové DNA v reakčním roztoku se pohybovalo v rozmezí 1 – 2 μL izolované DNA, popřípadě 1 μL 10X zředěné izolované DNA. Koncentrace dNTP byla 1,6 mM. Je nutné používat vodu pro molekulární biologii. Přidavky MgCl₂ mohou mít pozitivní vliv na průběh reakce, více v kapitole 10.

9.1.4 Betain

Jedná se o kvartérní amoniovou sůl, která byla v reakčním roztoku použita v důsledku velkého počtu GC párů v templátové DNA. Přítomnost Betainu oslabuje soudržnost vodíkových můstků a má tak pozitivní vliv na průběh reakce [28].

9.2 Koncentrace jednotlivých komponent reakčního roztoku

Koncentrace reakčního roztoku pro jednotlivé primery byla 1,6 μM pro FIP a BIP, 0,2 μM pro F3 a B3, 0,8 μM pro Loop F a Loop B. Jedná se o doporučené a běžné koncentrace [14] – [17]. Vzhledem k této skutečnosti byly z objednaných primerů vytvořeny zásobní a pracovní roztoky. Vše popisuje následující tabulka.

Tab. 5. Vytvoření zásobních a pracovních roztoků primerů

	A	B	C	D	E	F
primery	V prac. \emptyset primerů [μL]	c reakč. \emptyset [μM]	n primerů [nmol]	V H_2O [μL] pro 100 μM zás. \emptyset primerů	V zás. \emptyset primerů [μL] pro 100 μL prac. \emptyset	c prac. \emptyset pr. [μM]
FIP	0,5	1,6	22,74	227,4	40,0	40,0
BIP	0,5	1,6	25,60	256,0	40,0	40,0
F3	0,5	0,2	20,53	205,3	5,0	5,0
B3	0,5	0,2	21,23	212,3	5,0	5,0
Loop F	0,5	0,8	21,75	217,5	20,0	20,0
Loop B	0,5	0,8	16,64	166,4	20,0	20,0

Sloupec A představuje taková pipetovaná množství pracovních roztoků primerů, aby výsledná koncentrace jednotlivých primerů v reakčním roztoku odpovídala koncentraci ve sloupci B. Sloupec C představuje látkové množství objednaných a následně dodaných primerů. Sloupec D představuje množství vody potřebné pro vytvoření 100 μM zásobních roztoku primerů. Sloupec E představuje množství zásobního roztoku primerů potřebného k vytvoření 100 μL pracovních roztoků primerů o koncentraci odpovídající sloupci F. Reakční roztok dále obsahoval 1- 2 μL temp. DNA o $c= 5,33 \mu\text{g}/\text{mL}$ (popřípadě 1 μL 10X zředěné temp. DNA), 1,25 μL reakčního pufru 10X, 1,5 μL 1 M zásobního roztoku Betainu, 2 μL 10 mM zásobního roztoku dNTP, 0,5 μL zásobního roztoku *Bst* polymerázy o $c 8000 \text{ U}/\text{mL}$. 1 – 3 μL 25 mM zásobního roztoku MgCl_2 , 0 – 4,75 μL H_2O pro molekulární biologii. Celkový objem reakčního roztoku činil 12,5 μL . Po skončení reakce bylo pro stanovení produktu pipetováno k reakčnímu roztoku 1 μL 100X zředěného základního roztoku DNA barviva Gel Star pro fluorescenční stanovení produktu v UV spektru, nebo 1 μL 10X zředěného základního roztoku DNA barviva SYBR Green pro detekci produktu ve VIS spektru pouhým okem.

10 VÝSLEDKY A DISKUSE

Součástí experimentů bylo optimalizovat reakční podmínky a detekovat případně vzniklý produkt. LAMP je velice citlivá metoda na přesné složení reakčního roztoku a reakční teploty.

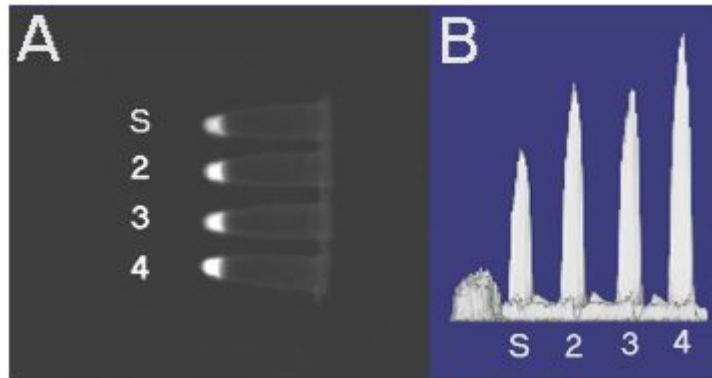
10.1 Optimalizace koncentrace Mg^{2+}

LAMP probíhala po dobu 2 hod. při teplotě $63^{\circ}C$. Složení vzorků popisuje následující tabulka. První sloupec představuje slepý pokus.

Tab. 6. Složení vzorků experimentu č. 5

komponenty	S. V [μ L]	2. V [μ L]	3. V [μ L]	4. V [μ L]
FIP	0,50	0,50	0,50	0,50
BIP	0,50	0,50	0,50	0,50
F3	0,50	0,50	0,50	0,50
B3	0,50	0,50	0,50	0,50
Loop F	0,50	0,50	0,50	0,50
Loop B	0,50	0,50	0,50	0,50
dNTP	2,00	2,00	2,00	2,00
Bst p.	0,50	0,50	0,50	0,50
DNA	0,00	1,00	1,00	1,00
puf. 10X	1,25	1,25	1,25	1,25
H ₂ O	4,25	3,25	2,25	1,25
MgCl ₂	0,00	0,00	1,00	2,00
betain	1,50	1,5	1,50	1,5
celkový V [μ L]	12,5	12,5	12,5	12,5

Po uplynutí reakční doby byla reakce terminována zvýšením teploty na $84^{\circ}C$ po dobu 4 min. k deaktivaci polymerázy. Cílem experimentu bylo detekovat produkt a zjistit optimální koncentraci Mg^{2+} . Mg^{2+} v reakčním roztoku vzniká disociací $MgCl_2$ na Mg^{2+} a $2 Cl^-$. Mg^{2+} vytváří komplex s dNTP, jenž je substrátem pro *Bst* polymerázu. Bez těchto komplexů LAMP neproběhne [24]. Koncentrace Mg^{2+} byla zvýšena na 4 mM, resp 6 mM (tab. 6. Sloupec 3 a 4). Produkt byl detekován srovnáním fluorescence slepého vzorku a vzorku s temp. DNA UV zářením, vždy po 2 minutách od přidavku 1 μ L 100X zředěného základního roztoku DNA barviva GelStar. Vliv koncentrace Mg^{2+} byl zjištěn 2D projekcí intenzit fluorescence jednotlivých reakčních roztoků, vytvořených programem GeneSnap.

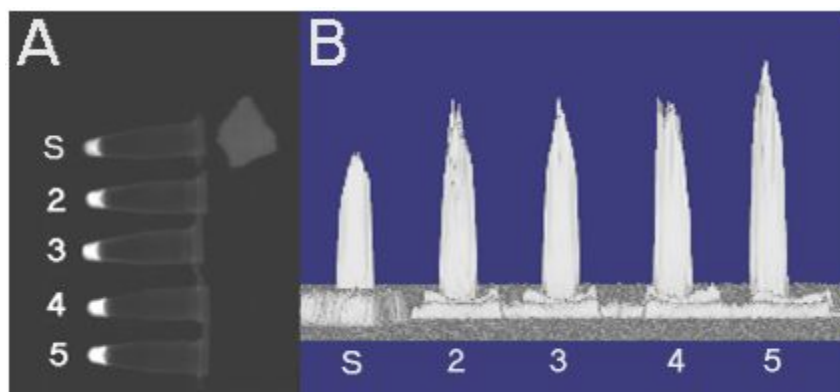


Obr. 15: **A)** Intenzita fluorescence, vz. S: slepý pokus, vz. 2: 2 mM Mg^{2+} , vz. 3: 4 mM Mg^{2+} , vz. 4 : 6 mM Mg^{2+} **B)** 2D projekce intenzity vzorků S-4 programem GeneSnap

Zvýšením koncentrace Mg^{2+} na 6 mM byla naměřena vyšší intenzita fluorescence (obr. 15: B. vzorek 4), z čehož lze usuzovat, že vzniklo více produktu.

10.2 Optimalizace koncentrace DNA a Mg^{2+}

LAMP probíhala po dobu 2 hod. při teplotě 63°C. Cílem pokusu bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňuje reakci počáteční koncentrace templátové DNA. Dále jsme chtěli zjistit, jaký vliv na reakci bude mít zvýšení koncentrace Mg^{2+} na 8 mM. Reakční objem byl opět 12,5 μ L. Reakce byla terminována zvýšením teploty na 84°C po dobu 4 minut.

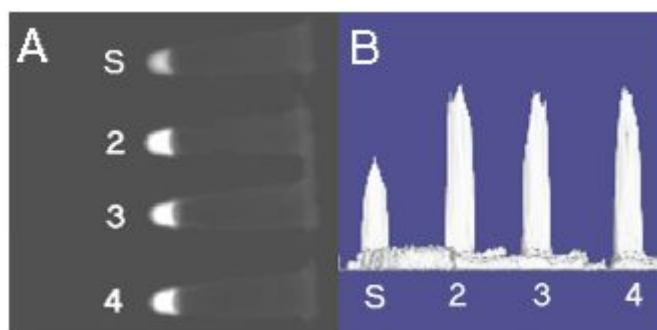


Obr. 16: **A)** Intenzita fluorescence, vz. S: slepý pokus, vz. 2: 6 mM Mg^{2+} , vz. 3: 8 mM Mg^{2+} , vz. 4: 4 mM Mg^{2+} , DNA 1 μ L 0,852 μ g/mL, vz. 5: 4mM Mg^{2+} , DNA 1 μ L 0,042 μ g/mL. **B)** 2D projekce intenzity vzorků S-5 programem GeneSnap

Zvýšení koncentrace DNA nevedlo k nárůstu intenzity (obr. 16: B, vzorek 4, srovnej se vzorkem 5). Zvýšení koncentrace Mg^{2+} na 8 mM nemělo významnější vliv na průběh reakce (obr. 16: B, vzorek 3, srovnej se vzorkem 2).

10.3 Korekce reakční teploty

LAMP probíhala po dobu 2 hod. Změna koncentrace Mg^{2+} do značné míry ovlivňuje optimální teplotu reakce. Pomocí PCR-primer kalkulačky [26] byla vypočítána přibližná optimální reakční teplota s korekcí na strukturu primerů a koncentraci Mg^{2+} . Teplota reakce byla snížena na 60°C. Rovněž jsme chtěli zjistit, zda vyšší intenzita fluorescence vzorků není způsobena pouhou fluorescencí templátu a nepředstavuje tak falešnou detekci produktu. Reakce byla ukončena deaktivací polymerázy zvýšením reakční teploty na 84°C po dobu 4 minut.

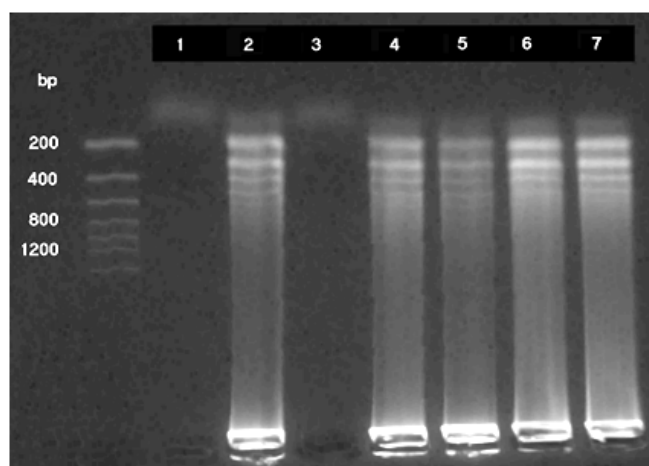


Obr. 17 A) Intenzita fluorescence, vz. S: slepý pokus, DNA 0,43 $\mu\text{g/mL}$ (bez polymerázy), vz. 2: 4 mM Mg^{2+} , vz. 3: 6 mM Mg^{2+} , vz. 4: 8 mM Mg^{2+} B) 2D projekce intenzity vzorků S-4 programem GeneSnap

Srovnáním relativní změny fluorescence slepého a pozitivního vzorku (Obr. 17: B, vzorek S a 2) s relativní změnou fluorescence slepého a pozitivního pokusu předešlého experimentu (Obr. 15: B, vzorek S a 3) lze předpokládat pozitivní ovlivnění průběhu reakce snížením reakční teploty. Podařilo se prokázat, že původní množství templátu v reakčním roztoku má na výsledné intenzitě fluorescence zanedbatelný podíl a předešlé pozitivní detekce produktu nebyly falešné.

10.4 Detekce produktu gelovou elektroforézou

Abychom potvrdili pozitivní fluorescenční detekci produktu, rozhodli jsme se provést gelovou elektroforézu. Elektroforéza probíhala na 1 % agarosovém gelu při napětí 90V a době 1 hod. Produkt byl detekován fluorescenčně ethidium bromidem pod UV lampou. Vzorky byly vybrány z předešlých experimentů. Tímto jsme se snažili pokrýt doposud upravované reakční podmínky, jako byla rozdílná teplota, změna koncentrace Mg^{2+} nebo DNA.

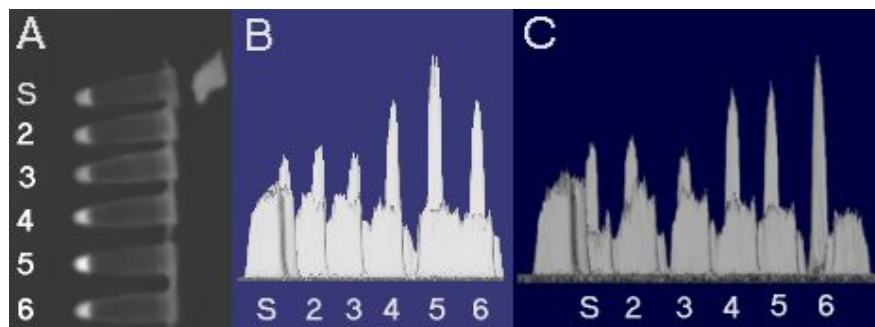


Obr. 18: vz. 1: slepý pokus, vz. 2: 4 mM Mg^{2+} , T 63°C, vz. 3: 6 mM Mg^{2+} , T 63°C, vz. 4: 4 mM Mg^{2+} , DNA 1 μ L 0,852 μ g/mL, vz. 5: 4 mM Mg^{2+} , DNA 1 μ L 0,042 μ g/mL, vz. 6: c Mg^{2+} 4 mM, T 60°C, vz. 3: 6 mM Mg^{2+} , T 60°C

Negativní detekce (obr. 18, vzorek 3) byla způsobena ztrátou podstatné části produktu při manipulaci se vzorkem. Pokus byl proveden se zbytkem vzorku, ten však už neobsahoval dostatečné množství produktu, potřebného k jeho detekci. Nižší výchozí koncentrace templátu nevedla k větší koncentraci produktu (obr. 18, vzorek 5, srovnej intenzitu jasu se vzorkem 4), což odporuje předešlým závěrům. (viz, kapitola 10.2). To může být vysvětleno degradací GelStar v důsledku opakovaného ozařování UV, nebo dobou, po kterou dochází k vazbě GelStar na produkt. Vznikají natolik významné interference, které mohou zkreslovat skutečnou realitu. Z obrázku 18 je patrná struktura produktu, která je v dobré shodě s teorií. Zvýšení koncentrace Mg^{2+} na 6 mM nevedlo k lepším výsledkům, než při zvýšení koncentrace Mg^{2+} na 4 mM (Obr. 18, vzorek 6 a 7).

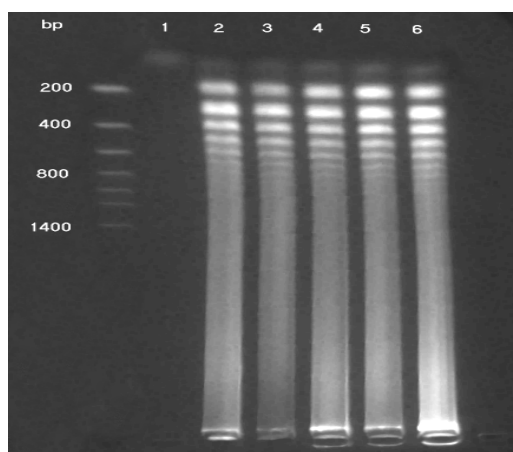
10.5 Stanovení optimální reakční teploty

Cílem bylo zjistit optimální reakční teplotu pro koncentraci Mg^{2+} 4 mM. Reakce probíhala v gradientovém termocykleru v rozmezí teplot 57 – 63°C po dobu 2 hodin. Poté byla reakce terminována zvýšením teploty na 84°C po dobu 4 minut.



Obr. 19: **A)** vz. S: slepý pokus, vz. 2: T 57°C, vz. 3: T 57,5°C, vz. 4: T 60,6°C, vz. 5: T 62,6°C, vz. 6: T 63°C. **B)** 2D projekce intenzity fluorescence po 2 minutách. **C)** 2D projekce intenzity fluorescence po 10 minutách

Jak již bylo řečeno, doba po kterou dochází k vazbě DNA barviva GelStar na produkt může způsobovat významné interference v pozorované fluorescenci. To lze pozorovat srovnáním části B a C obrázku 19 (srovnej vzorek 5 a 6 v části B a C). Produkt nebyl detekován u vzorků 2 a 3 (obrázek 19). Z tohoto důvodu byla provedena gelová elektroforéza v 1% agarosovém gelu. Ta probíhala při napětí 90V po dobu 1 hod. Ta prokázala přítomnost produktu u vzorku 2 a 3 jak je patrné z následujícího obrázku.

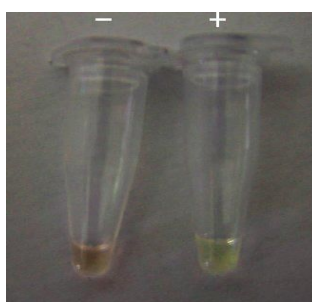


Obr. 20: vz. S: slepý pokus, vz. 2: T 57°C, vz. 3: T 57,5°C, vz. 4: T 60,6°C, vz. 5: T 62,6°C, vz. 6: T 63°C

Je rovněž patrné, že nejvíce produktu vzniklo při 63°C (Obr. 20: vzorek 6). To dokazuje, že srovnávání kvantit vzniklého produktu fluorescenčně pomocí GelStar není vhodnou metodou. Tato metoda rovněž detekovala 2 pozitivní vzorky jako negativní. To je způsobeno citlivostí barviva na koncentraci vzniklého produktu, což potvrzuje skutečnost, že při teplotě reakce pod 60°C nevzniká dostatečné množství produktu, pro takový způsob detekce.

10.6 Stanovení produktu pomocí SYBR Green

Rozhodnutí o přítomnosti mykobakterií ve vodách pouhým okem by bylo nejvýhodnější vzhledem k rychlosti stanovení a finanční náročnosti. V tomto pokusu byl vybrán slepý a čtvrtý vzorek z experimentu kapitoly 10.3 (Korekce reakční teploty). K těmto vzorkům byl přidán 1 µL 10X zředěného základního roztoku DNA barviva SYBR Green.



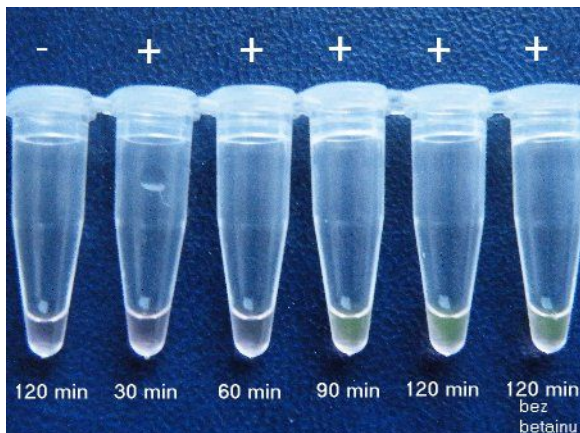
Obr. 21: Detekce produktu pomocí SYBR Green

Na první pohled je patrná barevná odlišnost obou roztoků. Odlišnost je tím výraznější, čím více produktu vznikne [16]. Lze tedy konstatovat, že stanovení produktu pouhým okem za běžných podmínek, vzhledem k vyšší koncentraci produktů, kterou nám LAMP umožňuje získat, je možné.

10.7 Stanovení reakční doby pro detekci pomocí SYBR Green

Z předešlých experimentů je patrné, že DNA barviva jsou citlivá na množství produktu ve smyslu jeho detekce. Cílem tohoto experimentu bylo stanovit takovou dobu reakce, při které by vzniklo dostatečné množství produktu pro jeho bezpečné stanovení pomocí SYBR Green. V předešlých pokusech jsme se snažili reakci optimalizovat pomocí přidavku betainu, jelikož přísady betainu pozitivně ovlivňují PCR u DNA s vysokým podílem GC. V tomto experimentu jsme se rozhodli provést jeden pokus bez betainu, abychom ověřili,

zda jeho nepřítomnost v reakčním roztoku bude mít zásadní vliv na průběh reakce. Koncentrace Mg^{2+} byla 4 mM. Reakce jednotlivých vzorků byly standardním způsobem postupně terminovány v půlhodinových intervalech.



Obr. 22 Detekce produktu v závislosti na reakční době. Vzorek označen znaménkem „-“ představuje slepý pokus.

Z obrázku č. 22 je patrné, že produkt byl poprvé bezpečně detekován po 90 minutách reakce. Optimální doba reakce pro detekci pomocí SYBR Green se bude pohybovat v rozpětí 60 až 90 minut. Reakce proběhla po 2 hodinách i bez přídavku betainu. Ten se však pro optimalizaci reakčních podmínek běžně používá.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo vypracovat literární rešerši na dané téma, navrhnout experimenty k ověření metody a tyto experimenty provést. Domnívám se, že se tak podařilo a práce po teoretické stránce umožňuje čtenáři porozumět a orientovat se v dané problematice bez výraznějších obtíží s ohledem na odbornost čtenáře a odbornost samotné práce. LAMP je bezesporu výhodnější metoda v mnoha ohledech než PCR a z tohoto důvodu se dostává poslední dobou do popředí zájmu studia. Těmito výhodami jsou rychlost, finanční nenáročnost, možnost provádět amplifikaci mimo laboratoř, stejně tak detekci mikroorganismů mimo laboratoř a navíc bez přístrojového vybavení. Výhodou PCR je naopak možnost provádět více různých reakcí v jedné reakční nádobě. LAMP tedy není vhodnou metodou, pakliže testujeme veliký soubor vzorků. K navržení experimentů bylo použito poznatků z dostupné literatury, a tyto experimenty aplikovatelnost metody potvrdily. Podařilo se nám zjistit, že stanovení produktu pomocí fluorescenčně barvivem GelStar může představovat určité problémy. Tato metoda poskytuje relativně dobré výsledky, avšak může docházet k významným interferencím, které mohou výsledek detekce zásadním způsobem zkreslit. Tato metoda nebyla vhodná pro detekci produktu, pokud reakce probíhala při teplotě nižší než 60°C. Tím jsme prokázali, že reakční teplota má zásadní vliv na průběh reakce. Pro lepší výsledky je vhodnější detekovat produkt alespoň po 10 minutách od přidavku GelStaru do reakčního roztoku. Gelovou elektroforézou se nám podařilo detekovat produkt ve všech případech s dobrou shodou s teoretickými předpoklady. Možnost detekce produktu pouhým okem je možné pomocí DNA barviva SYBR Green. Detekce produktu pouhým okem byla provedena s pozitivním výsledkem, znamenajícím, že metodou vzniká dostatečné množství produktu, pro takový způsob stanovení. Tímto barvivem se nám podařilo bezpečně detekovat produkt po 90 minutách reakce. Experimenty byly prováděny ve dvakrát menším objemu, než je běžné a to s dobrými výsledky, což je výhodné vzhledem k úspoře materiálu. Zjistili jsme, že u mykobakterií obsahujících v DNA vysoký podíl GC párů bází se reakce běžně pozitivně ovlivňuje přidavkem betainu, jehož použití v našem případě je diskutabilní. Jako pozitivní se ukázalo zvýšení koncentrace Mg^{2+} oproti původní koncentraci v pufru. Zjistili jsme, že vyšší koncentrace Mg^{2+} než 4 mM nezpůsobují výrazné zlepšení reakčních podmínek a jsou proto zbytečné. Optimální reakční teplota je 63°C, což odpovídá teoretickým předpokladům a námi pozorovaným skutečnostem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Netuberkulózní mykobakterie* [online]. [cit. 8-5-2012]. dostupné z <http://www.labtestsonline.cz/condition/Nontuberculosis_Mycobacteria.html>
- [2] *Mycobacterium phlei* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mycob.htm>>
- [3] *Mycobacteria and Nocardia* [online]. [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7812/#A1810>>
- [4] *ACID-FAST BACTERIA ZIEHL-NEESEN (AFB)* [online]. USA: The University of Utah [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/AFB.PDF>>
- [5] *Praktikum č. 3: Kultivace bakterií, bakteriologické půdy, podmínky inkubace, vznik a morfologie bakteriálních kolonií, růstové fáze, množení bakterií v tekutých médiích. Selektivní pomnožení a izolace bakterií* [online]. Brno: Veterinární a Farmaceutická Univerzita [cit. 8-5-2012]. dostupné z <http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum03/index.html>
- [6] *MYCOLIC ACIDS* [online]. [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.cyberlipid.org/fa/acid0006.htm>>
- [7] *Bacterial Chromosome Structure* [online]. USA: Kenyon College [cit. 8-5-2012]. dostupné z <http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap01/chrom_struct.html>
- [8] *Struktura nukleových kyselin* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://biologie.upol.cz/metody/Struktura%20nukleovych%20kyselin.htm>>
- [9] *E. coli DNA Replication* [online]. USA: Oregon State University [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://oregonstate.edu/instruction/bb492/lectures/DNAII.html>>

- [10] *DNA - Replication* [online]. USA: Elmhurst College [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/582dnarep.html>>
- [11] *DNA Replication* [online]. [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.johnkyrk.com/DNAreplication.html>>
- [12] *Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)*. [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm>>
- [13] *Eiken Chemical Co.,Ltd.:The principle of LAMP method* [online]. [cit. 13-4-2012]. dostupné z <<http://www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>>
- [14] BAKER, Brian R., *Performance-Based Design Considerations for Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays for Pathogen Detection* [online]. Release date: February 23. 2009 [cit. 13-4-2012]. dostupné z <<http://www.youtube.com/watch?v=winbqUBCVyk>>
- [15] K. Nagamine et al., *Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers*. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, č.16, s. 223- 229
- [16] Iwamoto et al., *Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples*. *Journal of clinical microbiology*, 2003, roč. 41, č. 6, s. 2616–2622
- [17] Yasuyoshi Mori et al., *Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, č. 289, s. 150–154
- [18] *Výpočet teploty tání (Tm) molekul nukleových kyselin* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Vypocet%20Tm.htm>>
- [19] Erko Stackebrandt et al., *Gene Sequence Phylogenies of the Family Microbacteriaceae*, *Current Microbiology*, 2007, roč. 55, č. 1, s. 42-46

- [20] *Syntéza oligonukleotidů* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://biologie.upol.cz/metody/Synteza%20oligonukleotidu.htm>>
- [21] *Kultivační média* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/media.htm#c.27>>
- [22] *Power Soil DNA Isolation Kit manual*, [online]. [cit. 8-5-2012]. dostupné z <http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12888.pdf>
- [23] BÖHMOVÁ, Lenka. Stanovení DNA fluorimetricky. Zlín, 2011. bakalářská práce (Bc.). Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická
- [24] *PCR Reaction Components*. [online]. [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.biocompare.com/Application-Notes/43012-PCR-Reaction-Components/>>
- [25] *BioMath Calculators*. [online]. [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>>
- [26] *Bst DNA Polymerase, Large Fragment* [online]. [cit. 8-5-2012]. dostupné z <<http://www.neb.com/nebecomm/products/productm0275.asp>>
- [27] L. Mátlová a kol., *TUBERKULÓZA PRASAT? NEJČASTĚJŠÍ ZDROJE INFEKCE*, [online] Brno: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 4. 6. 2003, [cit. 9-5-2012]. dostupné z <<http://www.genoservis.cz/cz/poradenstvi/clanky/zdravi-prasat/166-tuberkuloza-prasat-nejcastejsi-zdroje-infekce>>
- [28] William A. Rees et al., *Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting*, *Biochemistry*, 1993, roč. 32, č. 1, s. 137–144

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

LAMP	Izotermální amplifikace (z ang. Loop Mediated Isothermal Amplification)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z ang. Polymerase Chain Reaction)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
TBC	Tuberkulóza
NTB	Netuberkulózní mykobakterie
SVS	Státní veterinární správa ČR
AT	Adenin-Thymin
GC	Guanin-Cytosin
bp	Pár bází (z ang. base pair)
FIP	Přední vnitřní primer (z ang. Forward Inner Primer)
BIP	Zadní vnitřní primer (z ang. Backward Inner Primer)
F3	Přední primer (z ang. Forward primer)
B3	Zadní primer (z ang. Backward primer)
Loop F	Přední smyčkový primer (z ang. Loop primer Forward)
Loop B	Zadní smyčkový primer (z ang. Loop primer Backward)
M	Jednotka koncentrace 1M = 1mol/L
U	Enzymová jednotka, 1 U = 1 μmol/min
gyrB	B subjednotka DNA gyrázy
hsp60	Protein teplotního šoku 60 (z ang. heat shock protein 60)
recA	Rekombináza A
16s rDNA	16s ribozomální DNA
DMT	Dimethoxytritol
dNTP	Deoxyribonukleotid trifosfát

TNE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
NaCl	Chlorid sodný
HCl	Kyselina chlorovodíková
SDS	Dodecyl sulfát sodný
MgSO ₄	Síran hořečnatý
MgCl ₂	Chlorid hořečnatý
(NH ₄) ₂ SO ₄	Síran amonný
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Heptahydrát síranu hořečnatého
KH ₂ PO ₄	Dihydrogenfosforečnan draselný
Mg ²⁺	Hořečnatý kation
SO ₄ ²⁻	Síranový anion
°C	Jednotka teploty (stupeň Celsia)
UV	Ultrafialová oblast záření
VIS	Viditelná oblast záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura kyseliny mykolové.....	12
Obr. 2: Schéma průběhu PCR.....	16
Obr. 3: Nasednutí BIP a B3 primerů	18
Obr. 4: Nasednutí FIP a F3 primerů	18
Obr. 5: Výchozí produkt pro LAMP.....	18
Obr. 6: Nasednutí BIP na výchozí produkt LAMP.....	18
Obr. 7: Průběh amplifikace po syntéze vlákna z BIP a	19
Obr. 8: Výsledný produkt syntézy FIP	19
Obr. 9: Vznik dvou nezávisle amplifikovatelných produktů.....	20
Obr. 10: Amplifikace za přítomnosti loop primerů, druhý z produktů vznikl z loop B primeru	20
Obr. 11: Schéma konfigurace jednotlivých primerů [16].....	23
Obr. 12: schéma tvorby primerů použitím genu 16s rDNA [16].....	23
Obr. 13: Kultivovaná kolonie <i>M. phlei</i>	25
Obr. 14: Graf závislosti neměřeného signálu na koncentraci kalibračních roztoků	28
Obr. 15: A) Intenzita fluorescence, vz. S: slepý pokus, vz. 2: 2 mM Mg ²⁺ , vz. 3: 4 mM Mg ²⁺ , vz. 4 : 6 mM Mg ²⁺ B) 2D projekce intenzity vzorků S-4 programem GeneSnap	32
Obr. 16: A) Intenzita fluorescence, vz. S: slepý pokus, vz. 2: 6 mM Mg ²⁺ , vz. 3: 8 mM Mg ²⁺ , vz. 4: 4 mM Mg ²⁺ , DNA 1 μL 0,852 μg/mL, vz. 5: 4mM Mg ²⁺ , DNA 1 μL 0,042 μg/mL. B) 2D projekce intenzity vzorků S-5 programem GeneSnap	32
Obr. 17 A) Intenzita fluorescence, vz. S: slepý pokus, DNA 0,43 μg/mL (bez polymerázy), vz. 2: 4 mM Mg ²⁺ , vz. 3: 6 mM Mg ²⁺ , vz. 4: 8 mM Mg ²⁺ B) 2D projekce intenzity vzorků S-4 programem GeneSnap.....	33
Obr. 18: vz. 1: slepý pokus, vz. 2: 4 mM Mg ²⁺ , T 63°C, vz. 3: 6 mM Mg ²⁺ , T 63°C, vz. 4: 4 mM Mg ²⁺ , DNA 1 μL 0,852 μg/mL, vz. 5: 4 mM Mg ²⁺ , DNA 1 μL 0,042 μg/mL, vz. 6: c Mg ²⁺ 4 mM, T 60°C, vz. 3: 6 mM Mg ²⁺ , T 60°C.....	34
Obr. 19: A) vz. S: slepý pokus, vz. 2: T 57°C, vz. 3: T 57,5°C, vz. 4: T 60,6°C, vz. 5: T 62,6°C, vz. 6: T 63°C. B) 2D projekce intenzity fluorescence po 2 minutách. C) 2D projekce intenzity fluorescence po 10 minutách.....	35

Obr. 20: vz. S: slepý pokus, vz. 2: T 57°C, vz. 3: T 57,5°C, vz. 4: T 60,6°C, vz. 5: T 62,6°C, vz. 6: T 63°C	35
Obr. 21: Detekce produktu pomocí SYBR Green	36
Obr. 22 Detekce produktu v závislosti na reakční době. Vzorek označen znaménkem „-“ představuje slepý pokus.....	37

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Složení kalibračních roztoků	27
Tab. 2. Složení roztoků izolované DNA pro stanovení její koncentrace.....	27
Tab. 3. Naměřené hodnoty signálů fluorescence kalibračních roztoků.....	28
Tab. 4. Struktura navržených primerů	29
Tab. 5. Vytvoření zásobních a pracovních roztoků primerů	30
Tab. 6. Složení vzorků experimentu č. 5	31

SEZNAM PŘÍLOH

P I Seznam mykobakterií, které lze detekovat navrženými primery

**PŘÍLOHA P I: SEZNAM MYKOBAKTERIÍ, KTERÉ LZE
DETEKOVAT NAVRŽENÝMI PRIMERY**

TABLE 1. Specificity of LAMP primers for identification of mycobacterial species				
Strain	Amplification by LAMP primer ^a :			
	MTB	MAV	MIN	Muniv
Mycobacteria				
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	+	-	-	+
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	+	-	-	+
<i>M. tuberculosis</i> clinical isolate 1	+	-	-	+
<i>M. tuberculosis</i> clinical isolate 2	+	-	-	+
<i>M. bovis</i> BCG Tokyo	+	-	-	+
<i>M. avium</i> ATCC 15769 ^b	-	+	-	+
<i>M. avium</i> ATCC 25291	-	+	-	+
<i>M. avium</i> ATCC 35718	-	+	-	+
<i>M. avium</i> clinical isolate 1	-	+	-	+
<i>M. avium</i> clinical isolate 2	-	+	-	+
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	-	-	+	+
<i>M. intracellulare</i> ATCC 35847	-	-	+	+
<i>M. intracellulare</i> ATCC 35762	-	-	+	+
<i>M. intracellulare</i> clinical isolate 1	-	-	+	+
<i>M. intracellulare</i> clinical isolate 2	-	-	+	+
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	-	-	-	+
<i>M. marinum</i> ATCC 927	-	-	-	+
<i>M. simiae</i> ATCC 25275	-	-	-	+
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	-	-	-	+
<i>M. gordonae</i> ATCC 14470	-	-	-	+
<i>M. lentiflavum</i> clinical isolate	-	-	-	+
<i>M. szulgai</i> ATCC 35799	-	-	-	+
<i>M. xenopi</i> ATCC 19250	-	-	-	+
<i>M. gastri</i> ATCC 15754	-	-	-	+
<i>M. nonchromogenicum</i> ATCC 19530	-	-	-	+
<i>M. triviale</i> ATCC 23292	-	-	-	+
<i>M. terrae</i> clinical isolate	-	-	-	+
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	-	-	-	+
<i>M. chelonae</i> ATCC 19237	-	-	-	+
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	-	-	-	+
<i>M. smegmatis</i> ATCC 14468	-	-	-	+
<i>M. flavescens</i> ATCC 14474	-	-	-	+
<i>M. phlei</i> ATCC 11758	-	-	-	+
<i>M. diemhoferi</i> ATCC 19340	-	-	-	+
<i>M. vaccae</i> ATCC 15483	-	-	-	+

^a +, amplification was found after 35 min of incubation; -, amplification was not found after 60 min of incubation.

^b Source, American Type Culture Collection.

Sigla (místo uložení bakalářské práce)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Název bakalářské práce	Detekce nežádoucích mikroorganismů pomocí izotermální amplifikace DNA
Autor bakalářské práce	Jiří Los
Vedoucí bakalářské práce	Doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín
Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická nám T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení DP	2012
Počet stran	47
Počet svazků	3
Vybavení (obrázky, tabulky...)	Obrázky 22, tabulky 6
Klíčová slova	LAMP, PCR, DNA, primer, izotermální amplifikace, GelStar, SYBR green