

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Detekce živých a mrtvých buněk

Markéta Kovárníková

Bakalářská práce

2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta Kovárníková**
Osobní číslo: **C09584**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **DETEKCE ŽIVÝCH A MRTVÝCH BUNĚK**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**


Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte přehled metod pro detekci živých a mrtvých buněk.
2. Podrobněji se zaměřte na metodu PCR (polymerázová řetězová reakce).
3. Vyhledejte různé varianty metody PCR.
4. U všech metod detekce živých a mrtvých buněk stručně shrňte: kde se používají, jejich výhody a nevýhody.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Hana Nesnídalová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Markéta Kovárníková

Poděkování:

Velice ráda bych na tomto místě poděkovala mé vedoucí práce Ing. Haně Nesnídalové za vedení, rady, připomínky a odborné konzultace při zpracování této bakalářské práce.

Také bych chtěla poděkovat celé rodině a přátelům za trpělivost a podporu během tvorby práce a po celou dobu studia.

ANOTACE

Práce je věnována především stanovení viability buněk. Zabývá se tradičními principy a trendy, ale také podtrhuje nově používané metody. Nejvíce se v práci objevuje metoda polymerázová řetězová reakce, která patří na první místa žebříčku používaných molekulárně biologických metod v tomto oboru.

KLÍČOVÁ SLOVA

detekce, buňka, životaschopnost, polymerázová řetězová reakce

TITLE

Detection of live and dead cells

ANOTATION

The work devoted to determination with of cell viability. It deals with traditional principles and trends, but also highlights new methods used. Most is engaged polymerase chain reaction, which is one the most used of molecular biological methods in this field.

KEYWORDS

detection, cell, viability, polymerase chain reaction

SEZNAM ZKRATEK

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dNTP - deoxyribonukleotid

dUTP - deoxyuridin trifosfát

EMA - ethidium monoazid

EMA-PCR - ethidium monoazid – polymerázová řetězová reakce

FDA - fluorescein diacetát

PCR - polymerázová řetězová reakce

RT - reverzní transkripce

ssDNA - single stranded DNA

T_m - melting temperature

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	METODY DETEKCE VIABILITY BUNĚK.....	12
2.1	Test viability založené na schopnosti buněk vylučovat barvivo.....	12
2.1.1	Trypanová modř	12
2.1.2	Propidium jodid	13
2.1.3	MTT test	14
2.2	Detekce pomocí funkčního metabolismu buněk.....	15
2.2.1	Průtokový cytometr	16
2.2.2	Fluorescenční sondy k detekci viability	17
2.3	Stanovení životaschopnosti buněk kultivačně	20
2.3.1	Plotnové metody	21
2.3.2	Stanovení životaschopnosti (viability) buněk ve tkáňových kulturách.....	22
3	Kryobiologie.....	24
4	PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	26
4.1	Historie PCR	26
4.2	Princip PCR	28
4.2.1	Denaturace	28
4.2.2	Hybridizace.....	29
4.2.3	Syntéza chybějícího komplementárního úseku DNA.....	29
4.3	Složení reakční směsi.....	29
4.3.1	Templátová DNA	29
4.3.2	Primery	30
4.3.3	Pufrovací roztok – pufr.....	30
4.3.4	DNA polymeráza	30
4.3.5	dNTP.....	31
4.3.6	MgCl ₂	32
4.3.7	PCR – voda.....	32
4.4	Detekce amplifikovaného produktu PCR	32
4.5	Varianty PCR.....	34
4.5.1	Kvantitativní PCR v reálném čase.....	34

4.5.2	Alu-PCR	35
4.5.3	Asymetrická PCR	36
4.5.4	Multiplex PCR.....	36
4.6	Využití metody PCR.....	37
4.6.1	Biomedicínské aplikace.....	38
4.7	Výhody a nevýhody PCR	40
5	EMA-PCR.....	41
6	ZÁVĚR.....	43
7	SEZNAM LITERATURY	44
8	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	49

1 ÚVOD

Zastoupení viabilních buněk v populaci patří mezi nejdůležitější informace využívané k hodnocení kontrol bioproců, fyziologických stavů buněčných kultur, biologických rizik atd.

Z ekologického i lékařského hlediska nám např. stanovení metabolické aktivity mikroorganismů poukazuje na zjištění substrátové preference, celkové produktivity biomasy, potažmo k pochopení environmentálních faktorů regulujících aktivitu/inaktivitu a natalitu/mortalitu mikroorganismů v daném prostředí. Celý proces rozhodování o kvalitě pitné vody, uchování léčiv, zjištění případné nákazy potravin různými patogeny, původce epidemií a nerůznějších nemocí, či o kvalitě dezinfekčních prostředků je založeno na stanovení viability buněk.

Mezi nejčastější metody stanovení životaschopnosti patří kultivace mikroorganismů na pevných médiích. Tyto metody mají však svá omezení, mezi které patří například časová náročnost, díky které je nemožná okamžitá zpětná odezva na získaný výsledek.

Stanovení životaschopnosti buněk je nejčastěji založeno na detekci životně důležitých funkcí, které jsou sledovány pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami, kdy se používá hlavně fluorescenční mikroskop, který poskytuje náhled na jednotlivé buňky.

Velká část mé práce patří metodě polymerázové řetězové reakci (PCR), která je v dnešní době jedna z nejpoužívanějších a nejúspěšnějších molekulárně genetických metod, používá se v nejrůznějších vědeckých i aplikovaných oborech. PCR detekuje buňky, avšak nedokáže rozlišit živé mikrobiální buňky od mrtvých. Přítomnost mrtvých buněk může vést k falešně pozitivním výsledkům, na základě kterých by mohlo dojít ke stahování výrobku z trhu. Tomu zamezila nová metoda k rozlišení mrtvých a živých buněk EMA-PCR (ethidium bromide monoazide). EMA neproniká živými buňkami, ale dostává se do mrtvých buněk. V mrtvých buňkách se EMA váže k molekulám DNA, ty se stávají nerozpustnými a pro PCR testy neviditelnými.

2 METODY DETEKCE VIABILITY BUNĚK

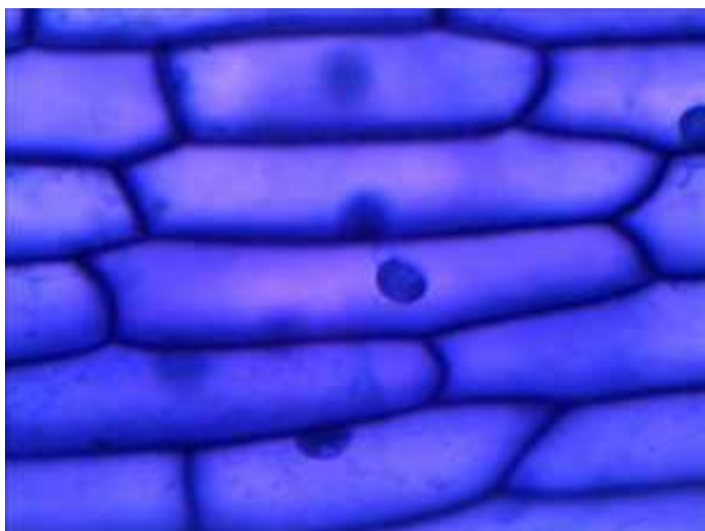
2.1 Test viability založené na schopnosti buněk vylučovat barvivo

Živé a mrtvé buňky je možno rozlišit barvením. U buněk s narušenou plazmatickou membránou dochází k hromadění barviva a tím k obarvení buňky, nepoškozené živé buňky zůstávají neobarvené. Nejčastěji používanými metodami jsou barvení trypanovou modří a barvení fluoreskujícím propidium jodidem.

2.1.1 Trypanová modř

Pro stanovení aktuální viability buněk ve vzorku je velmi často používaná metoda využívající trypanovou modř (sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftoldisulfonové kyseliny). Tato metoda, kterou vidíme na obrázku č. 1, byla vyvinuta pro použití v oblasti klinické hematologie a v roce 1950 byla adaptována pro studium buněčných kultur.

Test vylučování trypanové modři je používán pro určení porušení strukturální integrity buněčné membrány. Barvivo nemůže prostoupit do buněk s neporušenou buněčnou membránou (živých buněk), to znamená, že tyto buňky zůstávají neobarvené. Pro vstup barvy musí být buněčná membrána již značně poškozená (mrtvé buňky), makromolekuly barviva těmito mezerami projdou a buňku obarví modře. S trypanovou modří je možno detekovat asi 60% mrtvých buněk, protože pro detekci musí být buňky barvivem silně prostoupeny [Mascotti 2000].



Obrázek 1: Epidermis cibule obarvené methylenovou modří, zvětšení 400x (převzato z http://microscopetalk.files.wordpress.com/2010/05/micam_blue_methylene_blue_1024.jpg; on-line 2011-12-12)

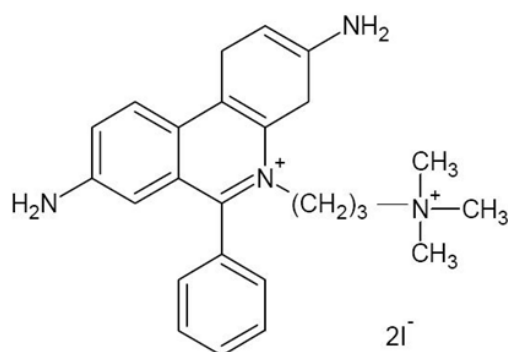
Nevýhodou stanovení je statisticky nízký počet buněk (hodnotí se např. zastoupení živých a mrtvých buněk v deseti zorných polích). Trypanová modř má navíc silné cytotoxické účinky na buňky, hodnocení musí být ukončeno do 5 minut od přidání chemikálie, jinak začnou barvivo vychytávat i dosud živé buňky [Altman 1993].

2.1.2 Propidium jodid

Propidium jodid, viz obrázek č. 2, je interkalární fluorescenční barvivo, které se používá k označení nukleové kyseliny (NK). Přemístí se mezi nukleotidové báze, ale nepreferuje žádné sekvence. Jedna molekula barviva se naváže ke 4-5-ti párům bází. Barvivo neprojde neporušenými membránami živých buněk, a pokud mají buňky cytoplazmatickou membránu porušenou, barvivo volně proudí do buněk. Díky vysoké afinitě k nukleovým kyselinám se po vazbě na NK jeho fluorescence zvýší až 40x a fluorescenční excitační maximum se posouvá o 30-40 nm do červené oblasti. Toho se využívá hlavně ke značení mrtvých buněk, kde barviva uvnitř do buňky po excitaci zářením při vlnové délce 535 nm emitují intenzivně červené záření při vlnové délce 617 nm [Nieminen 1992].

Jako alternativa propidium jodidu mohou být využita barviva řady SYTOX®. Jsou k dispozici v nejrůznějších spektrálních variantách a disponují až 500-ti násobným zesílením fluorescence po vazbě na nukleové kyseliny. Jsou tak vhodnou volbou především pro bakterie, u kterých díky jejich malé velikosti a nižšímu obsahu

nukleových kyselin, v porovnání s kvasinkami a živočišnými buňkami, může být signál propidium jodidu pro některé méně citlivé přístroje nedostatečný [Roth 1997].

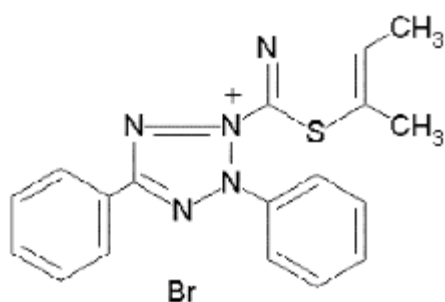


Obrázek 2: Strukturní vzorec Propidium jodidu
(převzato z <http://www.invitrogen.com/1/1/13720-propidium-iodide-1-0-mg-ml-solution-water.html>; on-line 2012-03-27)

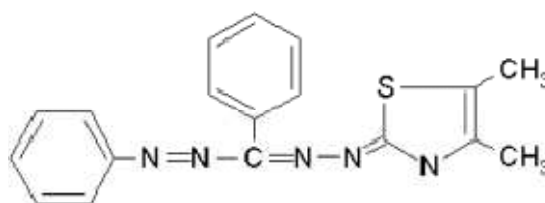
2.1.3 MTT test

Test je založen na redukci žlutého barviva MTT, obr. č. 3 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na fialový nerozpustný formazan, obr. č. 4 mitochondriálními dehydrogenázami. Rychlost tvorby formazanu odpovídá aktivitě dýchacího řetězce a odráží tak metabolickou aktivitu buňky.

Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk). Princip konverze byl popsán v roce 1954 Blackem a Speerem, metoda byla zavedena do laboratorní praxe Mosmanem v roce 1983 (tzv. kolorimetrický test stanovení životnosti buněk). [Ústav lékařské biochemie, Laboratoř experimentální medicíny 2011]



Obrázek 3: Vzorec MTT



Obrázek 4: Vzorec redukované formy – formazanu

(převzato z <http://chem.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>; on-line 2011-11-15)

2.2 Detekce pomocí funkčního metabolismu buněk

Jedná se o zjišťování přítomnosti produktu metabolismu, který má odlišné vlastnosti než substrát, ze kterého vzniká. Principem těchto testů je tedy schopnost živé buňky metabolizovat substrát na derivát, který je možno následně detekovat či kvantifikovat například měřením fluorescence. Stejný princip obsahuje také test životnosti buněk pomocí FDA (fluorescein diacetát). FDA je nepolární látka, která lehce prochází přes plazmatickou membránu. V živých buňkách je však FDA metabolizována na vysoce polární fluorescein, pro který je už membrána nepropustná, proto dochází k jeho nahromadění uvnitř buňky. Fluorescein se navíc na rozdíl od FDA vyznačuje fluorescencí, kterou je možné detekovat, jak je vidět na obrázku č. 5. Fluorescence fluoresceinu je však poměrně závislá na pH. Excitační/emisní vlnová délka záření pro fluorescein je 490/513 nm při pH 9. FDA je v současné době nahrazován dalšími indikátory životnosti buněk jako je například calcein AM, acetoxymetyl ester, karboxyeosin diacetát, karboxyfluorescein diacetát, které prokazují vysoký záchyt v živých buňkách a silnou fluorescenci [Coder 1997].

Ke sledování značených buněk je využíván fluorescenční mikroskop, který nám poskytuje náhled na jednotlivé buňky, ale počet analyzovaných částic za určitou dobu je omezený a s využitím analyzátorů obrazu velice náročný. Fluorimetry jsou naopak schopny měřit velký počet buněk, ale neumožňují pohled na vlastnosti konkrétní buňky. K velkému rozvoji fluorescenčního značení vedlo především rozšíření průtokové

cytometrie, která umožňuje analýzu jednotlivých buněk rychlostí až 100 000 částic za sekundu [Branská 2011].



*Obrázek 5: Stanovení životnosti protoplastů pomocí fluorescein diacetátu a ultrafialového záření (červené zbarvené protoplasty nejsou vitální)
(převzato z <http://www.vurv.cz/ogsm/fot2.htm#nogo>;
on-line 2011-12-26)*

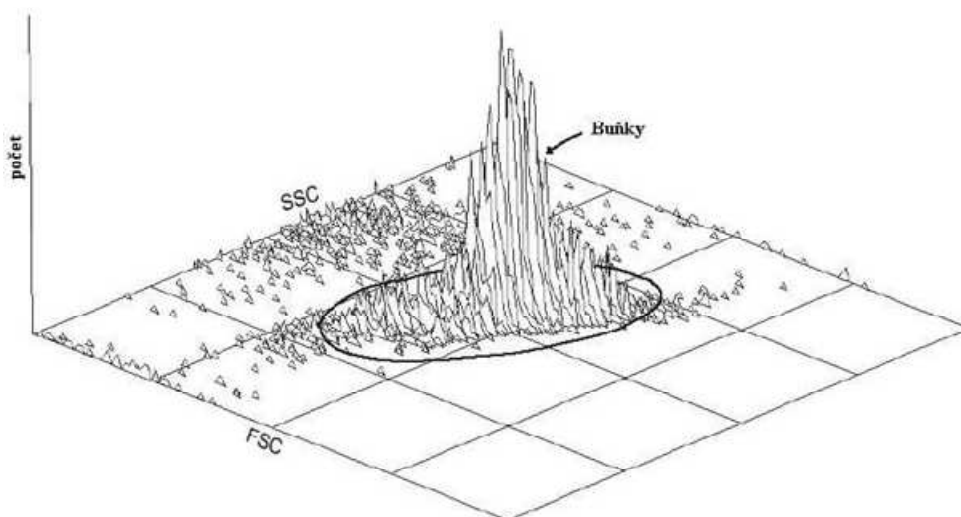
2.2.1 Průtokový cytometr

Průtokový cytometr je integrovaný systém, využívá principů mikroskopie a citlivé detekce světelného signálu. Buňky jsou odnášeny proudem nosné kapaliny do měrné cely, kde jsou analyzovány. Nejjednodušší průtokové cytometry detekují částice na základě tzv. Coulterova principu, kdy je průchod částice (buňky) měrnou celou zaznamenán jako změna elektrické vodivosti nebo rezistivity. Velikost změny je úměrná objemu procházející částice a je využívána také ke stanovení jejich velikosti [Shapiro 1995].

Odlišnou možností je měření světelného signálu, kdy je při průchodu částice paprskem světla analyzováno kvantum fotonů dopadajících na fotodetektor zařazený jednak ve směru původního paprsku (označovaný jako „forward scatter“ – FSC nebo „forward angle lights scatter“ - FALS) a dále pod úhlem 90° („side scatter“ - SSC, „right angle lights scatter“ - RALS), jak je patrné na obrázku č. 6. Velikost prvně jmenovaného rozptylu je úměrná velikosti procházejících částic a množství odraženého světla odpovídá naopak jejich strukturální rozmanitosti [Shapiro 1995].

U mikroorganismů, které se velikostně pohybují na hranici rozlišovací schopnosti dnešních průtokových cytometrů, je potřeba při využití těchto signálů, jakožto obrazu morfologických parametrů určité obezřetnosti [Shapiro 2000].

Vedle systému detekce buněk jsou fluorescenční průtokové cytometry vybaveny zdrojem excitace fluorochromů, kterým bývá nejčastěji argonový laser nebo rtuťová výbojka, případně jejich kombinace a detekčním systémem s předřazenými filtry a zrcadly různých spektrálních vlastností ke specifické detekci fluorescence určité vlnové délky [Branská 2011].



Obrázek 6: Oddělení buněk *Saccharomyces cerevisiae* od nebuněčných částic na průtokovém cytometru pomocí „forward scatter“ a „side scatter“ signálů (převzato z http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_8-volume_105-year_2011.html; online 2011-12-10)

2.2.2 Fluorescenční sondy k detekci viability

Z hlediska principu detekce životaschopnosti lze fluorescenční sondy rozdělit do několika skupin: jedny z nejpoužívanějších jsou měření intracelulární esterázové aktivity, sledování membránové integrity a existence transmembránového potenciálu, v menší míře je u mikroorganismů využívána detekce respirační aktivity či měření intracelulárního pH [Branská 2011].

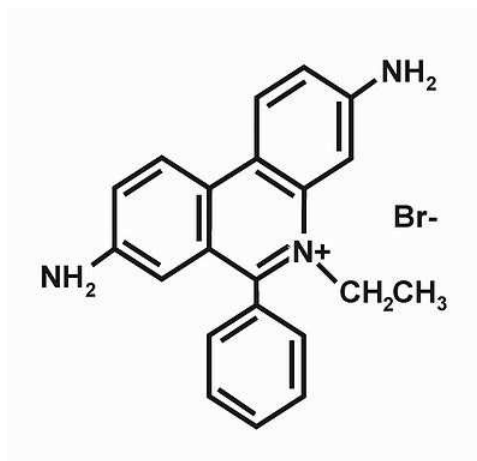
2.2.2.1 Integrita cytoplazmatické membrány

Stanovení viability buněk pomocí detekce membránové integrity je založeno na aplikaci látek, které za běžných podmínek nejsou schopny projít neporušenými buněčnými membránami, případně jsou hned zpětně vylučovány do extracelulárního prostředí. Naopak, je-li cytoplazmatická membrána porušena tolik, že mohou do buňky

projít, dochází k vazbě na složky buněčné hmoty a následně k zesílení nebo posunu spektra fluorescence. Buňky s těmito narušenými membránami či membránovými funkcemi nejsou považovány za životaschopné. Téměř výhradně se využívají látky, které se v buňce váží na nukleové kyseliny, protože se vyskytují ve všech buňkách v dostatečném množství a umožňují tak univerzální použití u většiny mikroorganismů. Do této skupiny patří vůbec nejrozšířenější fluorescenční sonda propidium jodid, který je využíván v celé řadě mikrobiologických studií, jak pro detekci viability kvasinek, tak bakterií.

Ethidium bromid, viz obrázek č. 7, je strukturně podobný propidium jodidu, ale nese jen jeden kladný náboj a může procházet intaktní cytoplazmatickou membránou bakterií i kvasinek, aktivní buňka je však schopná jej pumpovat opět ven a není tak značena. Této vlastnosti se s výhodou využívá k detekci menších poškození buněčných funkcí, než je možné zachytit pomocí propidium jodidu.

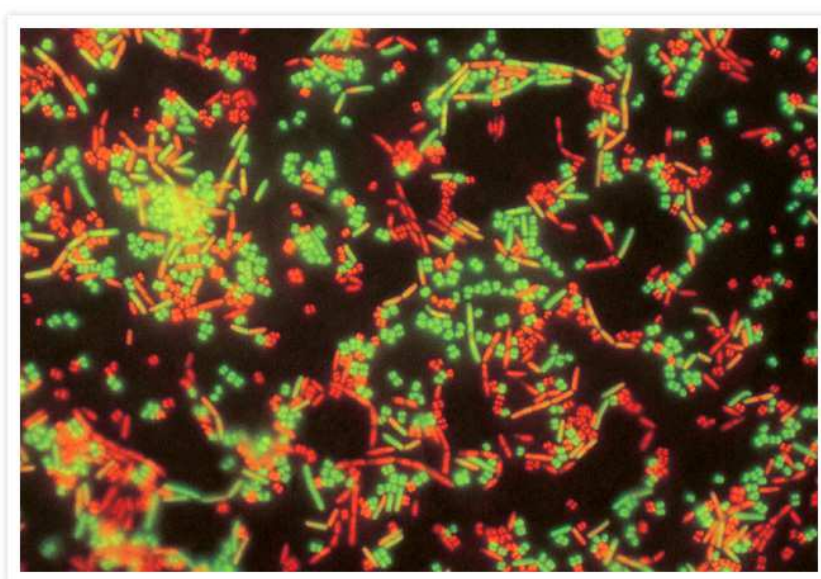
Za bližší zmínku stojí také ethidium monoazid (EMA), který se po fotolýze váže na DNA kovalentně a umožňuje tak pozdější analýzu životaschopnosti i ve fixovaném vzorku. Této vlastnosti je v posledních letech využíváno zejména v kombinaci s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), tzv. EMA-PCR, kdy kovalentní vazba znemožní DNA amplifikaci a selektivně je amplifikována pouze DNA z viabilních buněk [Branská 2011].



Obrázek 7: Strukturní vzorec Ethidium bromid
(převzato z <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/EtBr.htm>; on-line 2012-02-12)

Příkladem komerčního využití metody založené na membránové integritě je LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen). Sada je schopná rychle a citlivě stanovit viabilitu pomocí fluorescence, kdy využívá kombinace dvou

barviv – SYTO 9 a propidium jodidu. Barviva se liší schopností pronikat do neporušených buněk. Po vazbě na nukleové kyseliny u nich dochází k posunu a zesílení intenzity emitované fluorescence. Syto 9 volně proniká do všech buněk a po vazbě na NK emituje fluorescenci v zelené oblasti spektra. Propidium jodid není membránově permeabilní, to znamená, že proniká pouze do buněk, které mají narušenou membránovou integritu, a po vazbě na NK emituje fluorescenci v červené oblasti spektra, což zároveň redukuje signál barviva SYTO 9, pokud je přítomno, viz obrázek č. 8. Poškození membrány buňky při vstupu barviva PI je z pohledu viability neslučitelná s další aktivní existencí buňky.



Obrázek 8: Příklad fluorescenčního značení živých a mrtvých buněk pomocí komerční sady LIVE/DEAD® BacLight™; živé buňky zeleně, mrtvé červeně (převzato z <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/L7007>; on-line 2012-04-06)

2.2.2.2 Intracelulární aktivita esteráz

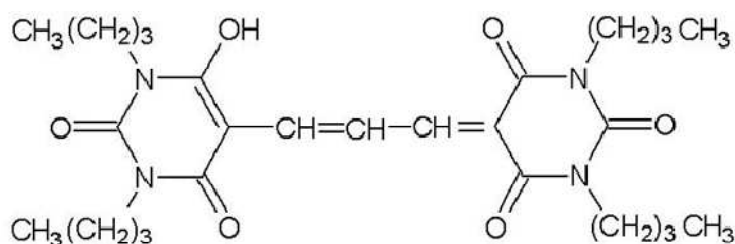
Další možností, jak lze zjistit životaschopnost mikroorganismu, je sledování intracelulární enzymové aktivity. Využívají se převážně lipofilní nefluorescentní sondy, které jsou schopné procházet volnou difuzí do buněk. Činností enzymů jsou přeměněny na fluorescentní látky nesoucí náboj, díky čemu jsou v buňce zadržovány a koncentrovány. Vedle enzymové aktivity jde zároveň o stanovení membránové integrity, protože když je cytoplazmatická membrána buňky narušena, fluorochromy jsou opět vyplavovány ven do extracelulárního prostoru. Nejběžnější jsou substráty intracelulárních esteráz, které jsou ve všech žijících organismech přirozeně přítomné [Branská 2011].

2.2.2.3 Transmembránový potenciál

Indikátorem životaschopnosti buněk je také transmembránový potenciál, který je udržovaný na cytoplazmatické membráně pomocí činnosti iontových pump. K měření se používají tzv. „distribuční sondy“. Jedná se o lipofilní barviva, která mají tu možnost volně procházet cytoplazmatickou membránou a hromadí se v nich v závislosti a jejich náboji.

Rozlišují se kationické sondy akumulované polarizovanými buňkami, kdy se využívá hlavně rhodaminu, ale v poslední době mu konkurují cyaninová barviva. Anionické sondy jsou akumulovány depolarizovanými buňkami a nejčastěji je využíván bis-oxonol, viz obrázek č. 9.

Využití potenciometrických sond k detekci viability je poměrně komplikované, protože koncentrace je v intracelulárním prostoru ovlivněna velikostí membránového potenciálu a také velikostí buněk samotných, přítomností vazebných míst, činností transmembránových pump a v neposlední řadě propustností obalových vrstev, kdy u G- bakterií je toto často limitujícím faktorem [Branská 2011].



Obrázek 9: Strukturální vzorec bis-oxonolu
(převzato z http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf;
on-line 2012-02-26)

2.3 Stanovení životaschopnosti buněk kultivačně

Přesné určení živých a mrtvých bakterií je důležitá v mnoha odvětvích mikrobiologie. Tradičně, životaschopnost bakterií je synonymem schopnosti tvořit kolonie na pevném médiu, růst a množit se v tekuté živné půdě. Testy založené na této tradici jsou časově náročné a občas nemohou správně fungovat u pomalu rostoucích nebo nekultivovatelných organismů. Neposkytují v reálném čase výsledky nebo včasné informace, které jsou potřeba v aplikacích, jako jsou průmyslový a zpracovatelský průmysl [Biosciences 2002].

Nejčastější v klinické praxi stanovení viability buněk je kultivace mikroorganismů na pevných médiích. Technika má kořeny již v začátcích práce Louise Pasteura v 19. století. Kultivace má určitá kritéria, jako je výběr kultivační půdy a vhodných kultivačních podmínek, sterilita používaných půd, pomůcek a aseptická práce během celého procesu od odběru materiálu až po konečné odečtení výsledku.

Avšak i tato metoda má své nevýhody, mezi které patří hlavně časová náročnost, díky které není možné rychle získat výsledek. Další nevýhodou je samozřejmě využití u těžko kultivovatelných mikroorganismů, které za určitých podmínek nerostou, ačkoliv mají zachované všechny životní funkce.

2.3.1 Plotnové metody

Plotnové kultivační metody počítání buněk umožňují zjištění počtu živých buněk v nejširším rozmezí jejich koncentrací a na nejrůznějším materiálu. Za použití vhodných selektivních půd umožňují také rozlišení jednotlivých skupin rodu mikroorganismů. Během práce je u kultivační metody nutno dodržovat přísně aseptické podmínky, zvláště je-li používáno několika násobné zředění, neboť kontaminace ze vzduchu nebo nesterilního náčiní by mohla způsobit zkreslení výsledku. Počet vyrostlých kolonií zjišťujeme po inkubaci při optimální teplotě po optimální dobu dle mikroorganismů.

Celkové počty mikroorganismů se vypočítávají jako aritmetický průměr z výsledku dvou paralelních misek ze zředění poskytujícím vyhovující počet kolonií (tj. 30 – 300 u celkového počtu bakterií nebo kvasinek). Tento výsledek přepočteme na 1 g nebo na 1 ml vzorku nebo se může přepočítávat na jeden kus výrobku nebo na plochu původního vzorku a vyjádříme číslem $1,0 - 9,9 \times 10^n$ buněk na např. 1 g. Jestliže požadovanému rozmezí počtu kolonií na miskách vyhovují dvě po sobě jdoucí zředění, vypočte se počet mikroorganismů v 1 g (ml) vzorku pro každé zředění zvláště a nelíší-li

se získané hodnoty více jak 2x, je konečný výsledek jejich průměr. V opačném případě se pokládá za konečný výsledek nižší z obou hodnot [Kaprálek 1980].

Množství živých buněk v kultuře se stanovuje výsevem známých objemů vhodně ředěných suspenzí na plotny. Při této metodě se předpokládá, že při inkubaci vyrostou z každé buňky jedna kolonie (CFU = colony forming units).

Průměrný počet kolonií na plotně násobíme zředěním suspenze a přepočítáme na 1 ml, čímž dostaneme počet živých buněk v 1 ml původní kultury.

Optimální počet kolonií na plotně je 50–200, neboť je tak minimalizována možnost dopadu dvou buněk do jediného místa (a tím překryv kolonií). Rozetřením 0,1 ml zředěné suspenze na povrchu plotny, která je dostatečně suchá, aby plotna rychle vsála rozetřenou tekutinu.

Roztíráme sterilní skleněnou zahnutou tyčinkou „L-hokejkou“. Kolonie vyrostou na povrchu plotny a jsou přibližně stejně velké. Nevýhodou je chyba způsobená ulpěním části suspenze na tyčince nebo lidský faktor, kdy může dojít ke špatnému rozetření suspenze a tím znemožní možnost počítání [Kaprálek 1980].

2.3.2 Stanovení životaschopnosti (viability) buněk ve tkáňových kulturách

Životaschopnost buněk patří mezi základní parametry, které se posuzují při práci s buněčnými nebo tkáňovými kulturami. Například při zakládání buněčných kultur by životnost buněk měla dosahovat minimálně 90 %. Jako kritérium životaschopnosti buněk se nejčastěji používá neporušenost jejich cytoplazmatické membrány. Živé buňky mají neporušenou (intaktní) cytoplazmatickou membránu, která volně nepropouští ani malé molekuly nesoucí kladný nebo záporný náboj. Pro posouzení intaktnosti se proto využívá různých barviv s nízkou molekulovou hmotností, které nesou alespoň jeden kladný nebo záporný náboj a barví buď bílkoviny nebo DNA. Takové barvivo pak „obarví“ pouze buňky, do kterých může vniknout, tj. mrtvé buňky s porušenou membránou. Podle povahy barviva lze viabilitu buněk posuzovat buď ve světelném nebo fluorescenčním mikroskopu [Vachtenheim 1992].

Buňky pro založení kultury získáváme z pokusných zvířat nebo člověka, méně často se používají rostlinné buněčné kultury a kultury buněk hmyzu. Lidské kultury dále rozdělujeme na buňky dospělého jedince a embryonální, které mají obecně delší životnost, ale bývají náchylnější ke změnám fenotypu. Buněčná kultura může vzniknout z kousku izolované tkáně za vhodných podmínek. Izolace je buď mechanické rozvolnění tkáně nebo enzymatické natrávení matrixu enzymy jako je např. trypsin. Po

izolaci nazýváme buněčnou kulturu jako primární. Dalším krokem je namnožení buněk a přenesení do kultivačních nádob, kdy vzniká sekundární buněčná kultura.

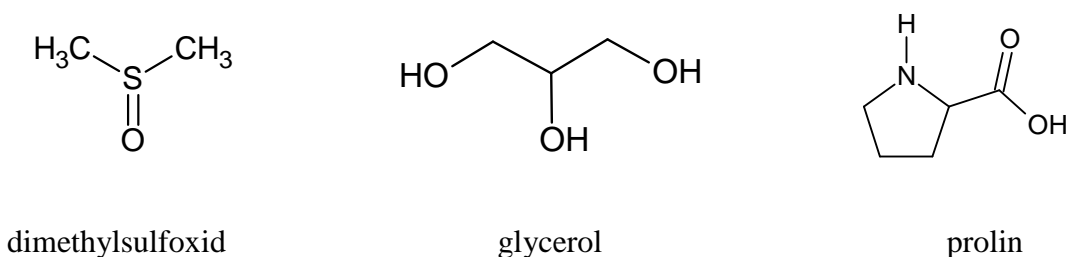
K barvení tkáňových kultur nejčastěji používáme tropanovou modř, v úvahu připadá také MTT test [Vejražka 2011].

3 Kryobiologie

Kryobiologie je obor zabývající se účinkem chladu a nízkých teplot na živé organismy, tkáně a buňky. Při zamrazení buněk na teplotu $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nezamrzá ještě ani voda uvnitř buněk, ale dochází ke ztrátám vody z buněk vlivem osmotických dějů. Voda v okolí buňky zamrzá, čímž se vytváří pro buňky nepříznivé hypertonické prostředí. Při zamrazení na $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ zamrzá i voda uvnitř buněk. Vznikají zde ledové krystaly, které ničí jemné struktury buňky.

Aby se daly buňky a tkáně zamrazit a nedošlo k jejich poškození, je nutné předem buňky ošetřit kryoprotektory. Mezi nejčastěji používané kryoprotektory patří glycerol a DMSO (dimethylsulfoxid), z dalších lze pak jmenovat ethylenglykol, propylenglykol, glukózu, sacharózu nebo prolin, viz obrázek č. 10. Obecně se jedná o látky s nízkou teplotou bodu mrazu. Buňky jsou těmito látkami během kryoprezervace nasyceny, tím dochází k vytěsnění vody z buněk a buňky se stávají mrazu odolnými.

Takto upravené buňky jsou uskladněny při velmi nízkých teplotách okolo $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nevýhodou látek používaných jako kryoprotektory je jejich toxicita, proto je nutné je po rozmrazení opět odstranit a určit viabilitu buněk [Coder 1997].

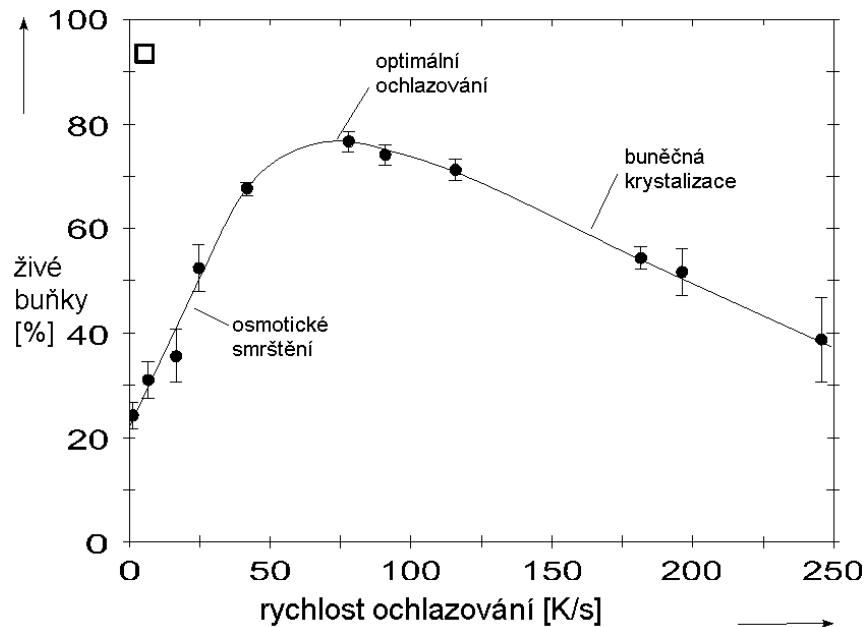


Obrázek 10: Přehled strukturních vzorců nejdůležitějších kryoprotektiv (ChemSketch)

Poznatků kryobiologie se využívá k uchovávání buněk v životaschopném stavu po dlouhou dobu. To je umožněno díky rychlému a hlubokému zmrazení buněk či malých kousků tkání. Takto lze uchovávat například spermie pro umělou inseminaci a vajíčka pro pozdější *in vitro* oplození, dále také jednoduché tkáně složené pouze z malého počtu buněčných typů, jako jsou například kostní štěpy, srdeční chlopně, rohovka, cévy či raná embrya, aby došlo k rovnoměrnému promražení. Z tohoto důvodu nelze použít kryoprezervaci k uchovávání celých orgánů, ty lze udržovat

v životaschopném stavu pouze několik hodin při teplotě okolo 0 °C. Významná je kryoprezervace také pro konzervaci potravin [Coder 1997].

Kryokonzervací nedosáhneme zachování všech buněk, přežije asi 85 %, jak je patrné z obrázku č. 11.



Obrázek 11: Vliv rychlosti ochlazování na počet buněk, které přežijí
(převzato z: <http://staff.utia.cas.cz/filip/courses/FMM/kryobio.htm>; on-line 2012-06-13)

4 PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

4.1 Historie PCR

První zveřejněná práce o PCR, která popisovala hlavní principy, to znamená replikaci části DNA použitím primerů, byl dvacetí stránkový dokument publikovaný v časopise *Journal of Molecular Biology* v roce 1971 norským vědcem Kjellem Kleppeem a laureátem Nobelovy ceny za lékařství pro rok 1968 Harem Gobundem Khoranaou. Rozvoj metody byl na několik let pozastaven vzhledem k problémům se syntézou primerů a čištěním DNA polymerázy.

Za objevitele této metody je však považován Dr. Kary Banks Mullis, který přišel s myšlenkou PCR na jaře roku 1983, kdy pracoval pro nejmenovanou společnost v souvislosti s novým způsobem analýzy mutací DNA. Téhož roku se pokusili s asistentem Fredem Fallonou tuto myšlenku realizovat. Brzy se k nim připojili další zaměstnanci společnosti, protože viděli, že tato metoda má velký potenciál. Část týmu tvořili vědci, kteří se zabývali diagnostikou DNA a identifikací mutací lidského genomu. První článek popisující tuto metodu byl stručný a byl publikován v roce 1985 v časopise *Science*. Metody PCR bylo použito ke stanovení mutace genomické DNA způsobující srpkovitou anémií. Detaily a použití PCR byly odhaleny v plné šíři v článkách uveřejněných v následujících dvou letech. Nakonec se z metody na analýzu mutací DNA stala také metoda na amplifikaci jakékoli části DNA.

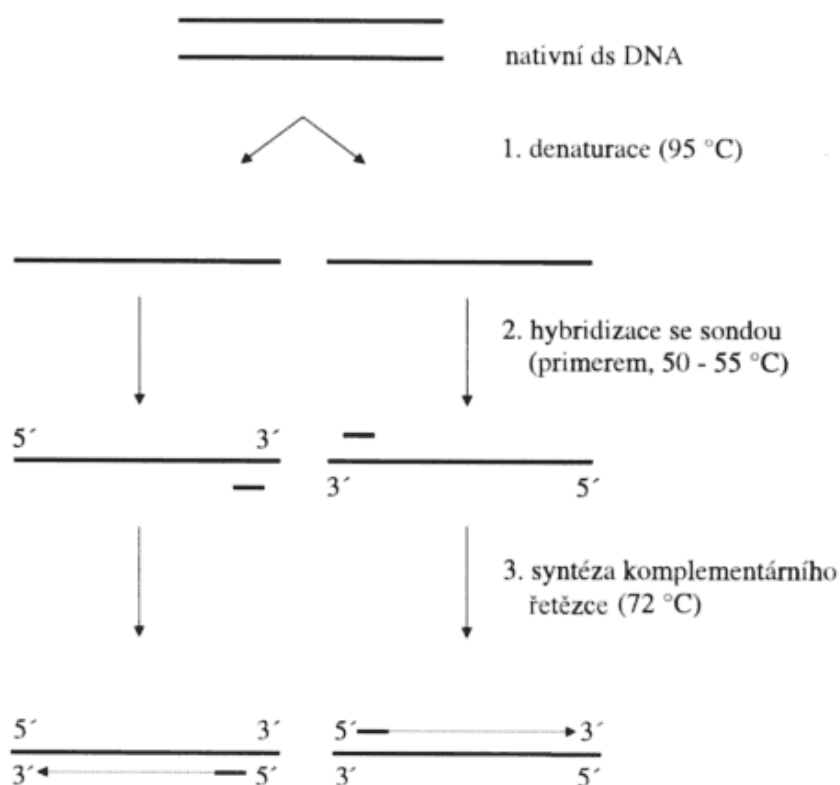
Metodu Dr. Mullis postupně zdokonaloval – od teoretického schématu k praktickému provedení. Jeho pracovní postup byl následující: malé množství DNA obsahující požadovaný gen, velká skupina volných oligonukleotidů a primery se vložily do zkumavky, která se zahřála na teplotu blízko 100 °C a poté zchladila. Ke směsi se následně přidala DNA polymeráza a tím došlo k syntéze DNA. Proces zahřátí a zchlazení se několikrát opakoval. Vzhledem k tepelné denaturaci DNA polymerázy ji bylo nutné přidat k reakční směsi před každým cyklem. Tento proces zajišťoval mnohonásobnou amplifikaci daného úseku DNA a tedy jeho pozdější snadnější detekci. Postup byl ovšem velmi neefektivní, protože vyžadoval neustálou pozornost, byl časově náročný a měl velkou spotřebu DNA polymerázy. Časová náročnost způsobená nutností přidávat DNA polymerázu před každým cyklem přiměla vědce hledat způsob automatizace procesu. To vedlo ke konstrukci prvního termocykleru, který pomohl celý proces urychlit. Jejich spolupráce vedla nejen k vývoji termocyklerů, ale také reakčních souprav pro lékařský výzkum. Dalším problémem byla termolabilita přidávané DNA

polymerázy. Díky ní byla spotřeba této látky během reakce vysoká a otevíráním zkumavky po každém cyklu se zvyšovala možnost kontaminace reakční směsi a tím znehodnocení celé analýzy. Proto bylo vynaloženo velké úsilí v hledání látky, která by měla stejné vlastnosti jako přidávaná DNA polymeráza, ale její termolabilita by byla minimální. Po několika letech výzkumu byla představena termostabilní DNA polymeráza, která byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v termálních pramenech v Yellowstone National Parku. Spojení termocyklerů a termostabilní DNA polymerázy učinilo tuto metodu plně automatickou a nyní vyžaduje obsluhu pouze na vložení reakční směsi, zapnutí a poté vypnutí přístroje. Díky těmto vylepšením se metoda stala citlivější a přesnější. V roce 1993 obdržel Dr. Kary B. Mullis Nobelovu cenu za chemii za objev PCR techniky [Konrad 2011].

4.2 Princip PCR

DNA amplifikace (zmnožení DNA) spočívá v cyklickém opakování 3 kroků, které vidíme na obrázku č. 12:

1. denaturace
2. hybridizace
3. syntéza chybějícího komplementárního úseku DNA



Obrázek 12: Průběh PCR

(převzato z <http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>;
on-line 2012-10-12)

4.2.1 Denaturace

Každá PCR začíná tepelnou denaturací vzorků DNA na dva jednoduché řetězce při teplotě 95° C. Reakce je založena na schopnosti dvouvláknové DNA denaturovat při vysoké teplotě a opětovně renaturovat po jejím snížení za zachování pravidla komplementarity bází. Jestliže jsou známy nukleotidové sekvence na koncích určitého úseku DNA, je možné úsek amplifikovat pomocí této polymerázové řetězové reakce [Bartůňková 2005].

4.2.2 Hybridizace

Další fáze spočívá v ochlazení vzorku na 30 až 65° C. Při této teplotě dochází k nasednutí primerů na komplementární 3' konce cílové DNA. Primery, tzv. startéry jsou synteticky připravené jednovláknové oligonukleotidy, které mají sekvenci komplementární k sekvencím na 3' konci obou vláken rozmnožovaného úseku. Skládají se z přibližně 20 nukleotidů a jejich syntéza dnes probíhá na plně automatizovaných přístrojích a není finančně nákladná [Bartůňková 2005].

4.2.3 Syntéza chybějícího komplementárního úseku DNA

Jako základ pro syntézu nových vláken slouží právě primery. Aby bylo dostatek substrátu pro syntézu nových vláken, je v PCR reakci přítomno nadbytečné množství deoxynukleotidtrifosfátů. Syntézu nových vláken katalyzuje termostabilní DNA polymeráza.

Nejčastěji používanou je DNA polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech. Tato DNA polymeráza je označována jako Taq polymeráza a prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od 5' konce ke 3' konci při optimální teplotě 72°C, a zůstává aktivní i po zahřátí na 95° C, nutných k denaturaci. Když je syntéza obou vláken skončena, je zkumavka s PCR reakcí opět zahřátá na 95°C, aby došlo k denaturaci nově vytvořených DNA duplexů, a celý cyklus začne znovu. Produkty PCR se nazývají amplikony a jsou to úseky DNA definované délkou, jejichž velikost se pohybuje obvykle v desítkách či tisících párů bází (bp). Přítomnost amplikonů v reakční směsi se prokazuje obvykle stanovením jejich velikosti pomocí elektroforézy v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu PCR [Bartůňková 2005].

4.3 Složení reakční směsi

4.3.1 Templátová DNA

Tato DNA obsahuje gen (cílovou sekvenci), který chceme amplifikovat a slouží jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců. Jako zdroj této DNA se používají mikroorganismy, buňky tkáňových kultur, tělní tekutiny, bioptické vzorky, stěry, vlasy a podobně [Bustin 2004].

4.3.2 Primery

Primery jsou krátké oligonukleotidy (obvykle 18 - 25 bp dlouhé), které jsou komplementární k začáteční a konečné oblasti amplifikovaného úseku DNA. Nasedají na příslušnou sekvenci templátové DNA a pomocí DNA polymerázy jsou řetězce prodlužovány. DNA polymeráza nemůže iniciovat polymeraci bez přítomnosti primerů. Pokud jsou primery příliš krátké, nebo obsahují sekvenci častou v DNA templátu, nasedají nespecificky na různá místa, a tak vzniká nežádoucí směs produktů. Při navrhování primerů je třeba se vyvarovat sekvencí, které tvoří smyčky nebo jsou navzájem komplementární. Délka a zastoupení různých nukleotidů v sekvenci primeru určuje jeho teplotu tání (melting temperature – T_m). Tato hodnota je důležitá pro optimalizaci PCR reakce – pro určení optimální teploty nasedání primerů (teplota je obvykle o 5°C nižší než vypočítaná T_m). Oba primery v páru by měly mít stejnou (nebo velmi podobnou) T_m . Pro primery o délce 15 až 40 bází je ideální T_m 55 - 65°C. Dalším důležitým parametrem je zastoupení GC bází v sekvenci, které by mělo být 40-60 % [Vlášková, Trešlová 2008].

4.3.3 Pufrovací roztok – pufr

Pufr je nezbytná součást reakční směsi, která zajišťuje vytvoření potřebných podmínek pro aktivitu DNA polymerázy. Určuje hodnotu pH, která se pohybuje v rozmezí 8,3 až 9,0. Ve většině případů obsahuje HCl, KCl a někdy také $MgCl_2$ [Bustin 2004].

4.3.4 DNA polymeráza

DNA polymeráza je enzym, v důsledku jehož činnosti dochází k syntéze DNA. Jeho typickou vlastností je schopnost rozpoznávat ssDNA jako templát a současně vázat deoxynukleotid. Váže se na primer, vzniká tak řetězec komplementární s templátem, a slouží k jeho prodloužení, k čemuž se používají jednotlivé druhy volných dNTP. V dnešní době se již používá termostabilní DNA polymeráza, která odolává teplotám až 98°C. Výběr vhodné DNA polymerázy pro danou reakci se řídí několika vlastnostmi tohoto enzymu - délkou života při 95°C, rychlostí prodlužování řetězce, přesností, RT aktivitou, 5' – 3' a 3' – 5' exonukleázovou aktivitou. Aktivita DNA polymerázy je ovlivněna reakčními podmínkami, a to například pH nebo koncentrací přítomných solí.

V tabulce č. 1 jsou zmíněny nejčastěji používané DNA polymerázy s jejich charakteristickými vlastnostmi, [Bustin 2004].

Polyméřaza	3'→5' Exonukleáza	Zdroj a vlastnosti
Taq	Ne	Thermus aquaticus Poločas rozpadu při 95°C je 1,6 hod.
Pfu	Ano	Pyrococcus furiosus Má nejnižší chybovost z termofilních DNA polymeráz.
Vent	Ano	Thermococcus litoralis (také známá jako Tli polymeráza) Poločas rozpadu při 95°C je asi 7 hod.

Tabulka 1: Přehled vlastností nejběžněji používaných DNA polymeráz
(převzato z Vlášková, Trešlová 2008)

- *Taq* – *Thermus aquaticus* (k dostání od mnoha dodavatelů)

Patří mezi první, nejnámější a nejlevnější termostabilní DNA polymerázu, která má RT aktivitu při teplotě 68 – 78°C s rychlostí prodloužení řetězce 2 – 6 nukleotidů za vteřinu. Nemá 3' – 5' exonukleázovou aktivitu a optimální přesnosti je dosaženo při 70°C a pH 5 – 6.

- *Pfu* – *Pyrococcus furiosus* (dodavatel Stratagene)

Velmi stabilní a přesný enzym, má ale nízkou rychlost prodlužování řetězce. Nepoužívá se v přítomnosti dUTP.

- *Vent* – *Thermococcus litoralis* (dodavatel NEB)

Enzym s vysokou přesností, který neprodukuje templáty obsahující dUTP.

4.3.5 dNTP

dNTP jsou deoxynukleotidtrifosfáty, které se vyskytují v roztoku samostatně. Cukernou složkou je deoxyribóza, mezi přítomné nukleové kyseliny patří adenin, cytosin, guanin, thymin a poslední jsou tři zbytky kyseliny fosforečné. Tyto dNTP, se v reakční směsi vyskytují ve formě sodných nebo litných solí. Během prodlužování primeru se váží svou OH-skupinou poslední kyseliny fosforečné na 3'-OH konec posledního nukleotidu prodlužovaného řetězce. Váže se vždy ten dNTP, který je komplementární k nukleotidu na templátovém řetězci [Bustin 2004].

4.3.6 MgCl₂

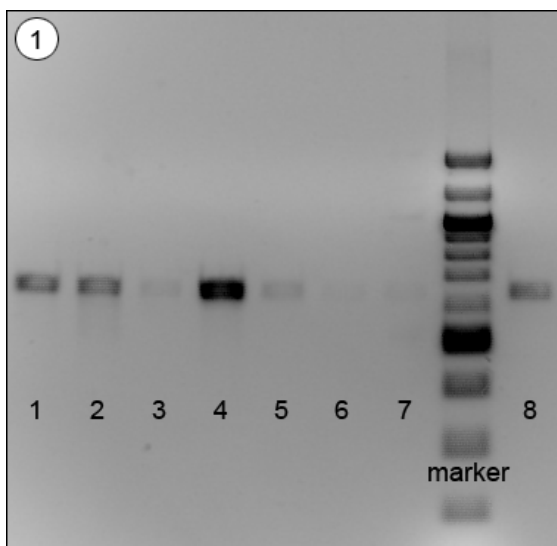
Mg²⁺ iont tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytvářejí substrát, který rozpoznává DNA polymerázu. Přítomnost volných Mg²⁺ iontů je nezbytná pro aktivitu DNA polymerázy, ale jejich nadbytek snižuje je přesnost a zvýšení hladiny nespecifických amplifikací. Koncentrace Mg²⁺ závisí na konečné koncentraci dNTP, primerů a templátů a ovlivňuje T_m duplexů primer-templát, primer-primer a templát-templát vznikajících během cyklů [Bustin 2004].

4.3.7 PCR – voda

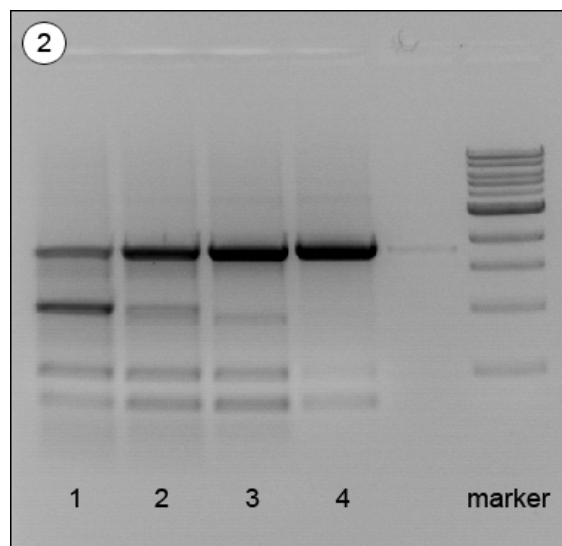
Přidávání vody do reakčních směsí musí probíhat opatrně. Voda totiž může být zdrojem kontaminace a může dojít ke znehodnocení pokusu. Používá se speciálně upravená voda, většinou redestilovaná [Bustin 2004].

4.4 Detekce amplifikovaného produktu PCR

Výsledek PCR amplifikace lze detekovat na gelu (viz obr. č. 13, 14), to znamená, že vzorek reakční směsi nanese na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a spustíme elektroforézu. Pokud primery nasedaly jen na vybraná protisměrně umístěná místa, vznikly jako produkt reakce molekuly stejné sekvence a délky. Při dělení v gelu budou všechny tyto molekuly putovat stejnou rychlostí a po obarvení a zobrazení uvidíme jen jeden pruh. Není-li zobrazen žádný pruh, PCR neproběhla, pokud je zobrazeno více pruhů, tak sice PCR proběhla, ale primery nasedaly na více místech, které byly shodou okolností také orientovány protisměrně, takže došlo k amplifikaci více produktů. V takovém případě je nutné optimalizovat podmínky reakce (pozměnit teplotu a čas jednotlivých kroků) [Vlášková, Trešlová 2008].



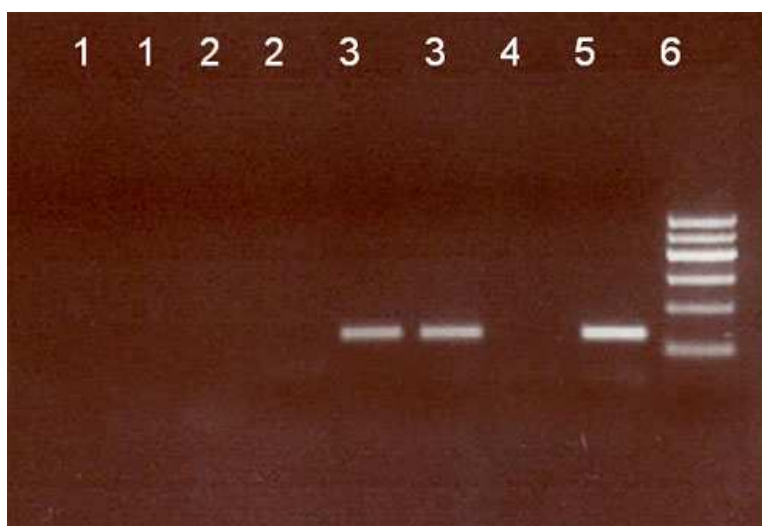
Obrázek 13: Odhad koncentrace PCR produktu po amplifikaci za různých podmínek



Obrázek 14: Elektroforéza PCR

(převzato z <http://www.generi-biotech.com/qpcr-seq-pozadavky-pcr-produkt/>; on-line 2012-02-24)

Na obrázku č. 13 se odhaduje koncentrace, dostačující je na dráze č. 1, 2, 4, 8. Hraniční koncentrace je na dráze č. 5 a nedostatečná koncentrace je na drahách č. 3, 6 a 7. Na obrázku č. 14 hodnotíme nejvhodnější produkt elektroforézy produktu k izolaci – vhodný je produkt v dráze č. 4. Markery jsou na úrovni DNA, dokážou detekovat odlišnosti v primární genetické informaci. Na obrázku č. 15 jsou výsledky PCR s pozitivní a negativní kontrolou.



Obrázek 15: Agarózový gel s produkty jednoduché PCR – 1,2 negativní vzorky, 3-pozitivní vzorek, 4-negativní kontrola, 5-pozitivní kontrola, 6-markery

(převzato z: <http://www.biopticka.cz/sluzby/molekularni-genetika/obr-bkvjcv-1.html>; on-line 2012-06-14)

4.5 Varianty PCR

4.5.1 Kvantitativní PCR v reálném čase

Principem kvantitativního PCR v reálném čase (Real-time PCR) je rychlé a přesné zaznamenávání produktu PCR bezprostředně po jejich vzniku, v každém jednotlivém cyklu reakce. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Tato metoda se od klasické metody PCR (viz kapitola PCR) liší přesným určením množství produktu měřením nárůstu fluorescence během vlastní PCR reakce. Vzrůstající množství DNA ve vzorku je přímo úměrné narůstající fluorescenci.

K měření fluorescence se využívají dva systémy:

1. Nespecifická fluorescenční barviva, která se přesouvají mezi dvouřetězcovou DNA (např. SYBR Green, LC Green).
2. Specifické fluorescenčně značené sondy, tzv. próby.

V současnosti je pro svou specifitu asi více rozšířená druhá metoda fluorescenčně značené sondy, využívající exonukleázové aktivity DNA polymerázy, která má kromě schopnosti syntetizovat komplementární vlákno také schopnost sondu odbourávat. Jako sondy (próby) se využívají oligonukleotidy, které se specificky váží na sekvenci mezi oběma primery (např. nejčastěji používaná TaqMan sonda). Sonda musí být navržena tak, aby hybridizovala s templátovou DNA v místě mezi místy nasednutí obou protisměrně orientovaných primeru. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhášečem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymeráza TaqMan sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenávána v reálném čase [Vlášková, Trešlová 2008].

Speciální termocyklery, určené pro kvantitativní PCR v reálném čase, jsou schopny v průběhu PCR ozářit vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva. Tuto fluorescenci přístroj po každém cyklu změří a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžné (v reálném čase) množství uvolněné fluorescence, odpovídající množství vzniklého produktu. Výsledek reakce tak známe často dřív, než proběhnou všechny cykly. Kromě tohoto urychlení je tato technika hlavně výhodná tam, kde potřebujeme znát přesné množství vstupní templátové DNA zejména u sledování exprese genu pomocí tzv. reverzní transkripce - polymerázové

řetězové reakce (RT-PCR). Nevýhodou této metody je složitější optimalizace a vysoké nároky na vlastnosti primerů, jinak jsou výsledky měření nepřesné. PCR v reálném čase se používá i při detekci jednobodových záměn v genetické diagnostice [Vlášková, Trešlová 2008].



Obrázek 16: Termocycler

(převzato z <http://www.molecularstation.com/molecular-biology-images/509-pcr-pictures/72-pcr-machine-thermal-cycler.html>; on-line 2011-12-18)

4.5.2 Alu-PCR

Tato metoda patří do skupiny tzv. interrepetitivních PCR, kdy se využívá přítomnosti repetitivních elementů v lidském genomu. Metoda používá primery, které amplifikují oblast mezi dvěma obráceně orientovanými alusekvencemi, které jsou přítomny v množství asi 900 000 kopií v lidském genomu. Pro amplifikaci se připraví dva primery, každý pro jeden směr, přičemž se využívá nejvíce konzervativních úseků těchto sekvencí. Primery nelze použít společně, neboť vzájemně hybridizují. Lidské sekvence se amplifikují, pokud leží mezi sousedními alurepeticemi, které jsou orientovány v opačných směrech. Tato technika je často používána pro odlišení lidské DNA od ostatních a k získání specifického fingerprintu pruhu neznámé lidské DNA [Vlášková, Trešlová 2008].

4.5.3 Asymetrická PCR

Asymetrická PCR je modifikace polymerázové řetězové reakce, která umožňuje preferenční syntézu pouze jednoho vlákna z dvouvláknové DNA tím, že jeden z primerů je v nadbytku (asi ve 100x vyšší koncentraci). Dvouřetězcové fragmenty DNA se tvoří až do okamžiku, kdy se jeden z primerů vyčerpá. Druhý primer pak syntetizuje pouze jeden z řetězců. Vlákna DNA se touto metodou nemnoží exponenciálně, ale téměř lineárně, přesto je množství produktu dostatečné. Asymetrická PCR může být prováděna rovněž pouze s jedním primerem [Vlášková, Trešlová 2008].

4.5.4 Multiplex PCR

Při mnohonásobné PCR je do reakční směsi přidáno několik páru primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožňuje amplifikaci a detekci několika PCR produktu současně v jedné reakční směsi. Reakční podmínky (sekvence nukleotidu, koncentrace primeru, optimální teploty jednotlivých kroků cyklu atd.) pro současnou amplifikaci všech produktů je nutné sjednotit. Hlavní výhodou jsou nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích, proto se používá pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA (např. detekce delegovaných exonů), testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky. Příkladem využití mnohonásobné PCR je metoda MLPA (MultiplexLigation-dependent Probe Amplification) např. pro detekci axonových delecí. Dále se Multiplex PCR využívá při QFPCR (kvantitativní fluorescenční PCR) k vyloučení materiální kontaminace vzorku DNA z choriových klků nebo k určení ancestrální alely [Vlášková, Trešlová 2008].

4.6 Využití metody PCR

PCR má široké uplatnění v různých vědních disciplínách, kde se pracuje se vzorky DNA nebo RNA. Nejedná se jen o lékařství a biologii, ale také o ekologii, archeologii, trestní právo a další, viz tabulka č. 2.

Základní výzkum	Aplikovaný genetický výzkum	Klinické disciplíny	Ostatní
izolace genů nebo jejich částí	Detekce mutací v genech	detekce patogenních bakterií, virů, prvoků a hub	archeologie
sekvence lidského genomu	studium polymorfizmu genů	typizace patogenních mikroorganismů	kriminalistika
mutageneze in vitro, modifikace konců DNA	populační genetika	identifikace onkogenů	Soudnictví
analýza klonů z genových knihoven		typizace nádorů	
příprava značených sond		diagnostika genetických chorob stanovení pohlaví Prenatální diagnostika dědičných chorob	

Tabulka 2: Využití PCR a jejích modifikací ve výzkumu a praxi (převzato z knihy - Šmarda J. 2005)

4.6.1 Biomedicínské aplikace

Klonování genů

Metoda PCR se používá k amplifikaci určitého genu, jež má specifické vlastnosti, jednoho organismu, který je poté vložen do jiného organismu (např. plazmidu). Tento gen je včleněn do genomu do DNA tohoto organismu. Organismům s takto upravenou DNA se říká geneticky upravené (GMO). Exprese daného genu probíhá v mnoha těchto organismech, což má za následek vznik velkého množství proteinu, který se dále používá například při výrobě léků nebo enzymů.

Určování otcovství

Na specifické lokusy se naváží specifické primery z důvodu, že genetická příbuznost může být dána jedním či více znaky, které jsou pro tyto jedince společné.

Zjišťování virových a bakteriálních onemocnění

V tomto případě se zjišťuje přítomnost genetického materiálu, který se u zdravého jedince nevyskytuje, pomocí metody PCR lze detekovat cizorodou DNA či RNA již ve velmi malých koncentracích, kdy běžně prováděné testy žádnou infekci neodhalily. Cizorodý genetický materiál může pocházet z bakterií a virů.

V souvislosti s tímto virem se hovoří o virové pandemii, která je daleko většího rázu než infekce virem HIV.

Diagnostika pomocí imunoserologických testů se opírá o fakt, že imunitní systém lidí nakažených HCV (virem Hepatitidy C) produkuje protilátky, na které jsou tyto testy specifické. Přítomnost protilátek je sice ukazatelem expozice HCV, ale neznamená, že člověk byl v době testování infikován.

Dalším ukazatelem je hladina ALT (alaninaminotransferáza - enzym). Jedná se ovšem o hrubý indikátor, který není přímou mírou přítomnosti virů v krvi, protože hladina ALT může být zvýšena při celé řadě jiných příčin zánětu jater. Přímá detekce metodami kultivace virů není doposud k dispozici.

Metoda PCR se používá ke stanovení HCV v krevním séru nebo plazmě a používá se ve spojení s klinickými nálezy a dalšími laboratorními markery jako pomůcka k posouzení virové odezvy na antivirovou terapii měřením změn koncentrace RNA, která se určuje jako sekvence 244 nukleotidů ve vysoce konzervovaném 5'-UTR genomu HCV. Nepřítomnost detekovatelné RNA HCV v séru po léčbě bývá spojena

s ústupem poškození jater, poklesem hepatické fibrózy a nízkou pravděpodobností recidivy HCV. PCR se rovněž používá při testech, které určují konkrétní genotyp HCV. Podle zjištěného genotypu se určuje druh léčby. Tyto testy se provádějí u pacientů s potvrzenou pozitivitou na chronickou infekci HCV [Roche 1, 2003].

- *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je významným lidským patogenem, je zdrojem onemocnění žaludku a dvanáctníku. Tato bakterie způsobuje vředy trávicího traktu (dvanáctníku a žaludku), záněty žaludku a je spojována se vznikem rakoviny těchto dvou orgánů. Klinické projevy nakažení se projevují desítky let po infikaci, u takto postižených lidí se může za tu dobu rozvinout zánět žaludku, vředy, druh lymfomu vázaný na sliznici a žaludeční atrofie s nebo bez střevní metaplazie [Czinn 2005].

Rozbory prováděné v dnešní době založené na PCR metodě zjišťují přítomnost DNA *H. pylori* pomocí několika určitých genů, a to *cagA*, *ureC*, *vacA* a *iceA*. *CagA* gen kóduje protein o molekulární hmotnosti od 120 do 140 kDa, která závisí na počtu vnitřních repetitivních genu. Tento protein je spojován s produkcí cytotoxinu a se zvýšeným rizikem vzniku vředů trávicího traktu, atrofického zánětu žaludku a rakoviny žaludku [Lage 1995, Vaira 2002]

Sexuálně přenosné nemoci:

- *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis způsobuje onemocnění děložního čípku, zánětlivá onemocnění ledvinové pánvičky, zánět očních spojivek u dětí, dětskou pneumonii, zánět močové trubice, zánětlivé onemocnění nadvarlete a zánět sliznice konečníku.

K detekci *Chlamydia trachomatis* v klinických vzorcích se používá přímé Giemsovo barvení, zjišťování přítomnosti shluků chlamydiálních inkluzí fluorescenčním barvením protilátek, přímou detekcí antigenu měřením fluorescence obarvených protilátek a sond nukleových kyselin. Kultivace je sice vysoce specifická, ale v běžné klinické praxi není stoprocentně citlivá, proto se u vzorků, které byly při kultivaci vyhodnoceny jako negativní, používají násobné nekultivační testy.

Nekultivační zkušební testy zjišťují přítomnost proteinů nebo nukleových kyselin infekčních organismů. Vzhledem k tomu, že se nejedná o metody stoprocentně specifické, doporučuje se ověření přítomnosti antigenu nebo nukleové kyseliny *Chlamydia trachomatis* některou z dalších metod. Pro provedení identifikace metodou

PCR se používá část kryptického plazmidu (sekvence o délce zhruba 207 nukleotidů), který je izolován z buněk získaných z moči žen i mužů nebo z poševního výtěru u žen [Roche 2, 2005].

- *Neisseria gonorrhoeae*

Jedná se o původce kapavky. Onemocnění postihuje muže i ženy a je doprovázeno záněty a hnisavými výtoky.

Stanovení diagnózy je založeno na zjištění přítomnosti *Neisseria gonorrhoeae* v kultuře a následném morfologickém vyšetření, které zjišťuje přítomnost cytochromoxidázy. Jiné testy potvrzující správnost diagnózy *Neisseria gonorrhoeae* jsou založeny na spotřebě sacharidů, aglutinací, fluorescencí obarvených DNA sond. Pro provedení PCR se musí provést odběr vzorků moči mužů i žen, výtěr močové trubice u mužů in vitro a výtěr děložního krčku u žen. Detekuje se v nich přítomnost nukleových kyselin, kdy se jako vzor používá vysoce konzervativní část genomu *Neisseria gonorrhoeae* [Roche 3, 2003].

4.7 Výhody a nevýhody PCR

Pro medicínu jsou důležité výhody PCR, jako je relativně krátký čas na trvání celého procesu, potřeba malého množství DNA, vysoká citlivost. DNA může být degradována.

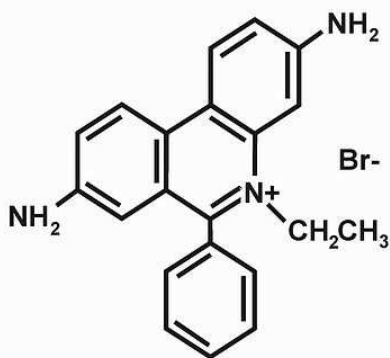
Co se týče nevýhod, mezi ně patří paradoxně také vysoká citlivost, která zároveň může způsobit fatální chybu způsobenou kontaminací jednou jedinou molekulou. Nevýhodná je také nutnost rozpoznání sekvencí bází amplifikovaného úseku molekuly DNA nebo minimálně primerů.

5 EMA-PCR

Kvantitativní PCR je výkonný nástroj pro studium populační dynamiky bakterií ve složitých vzorcích, např. populační dynamika startovací kultury při zrání sýrů. Bohužel DNA z mrtvých bakterií je v biologických vzorcích stabilní a ohrožuje kvalitu od qPCR po data. Metoda pro rozlišování živých a mrtvých Gram negativních bakterií pomocí ethidium monoazide bylo již dříve zveřejněno. [Bennedsen, Koivalo 2007]

Metoda stanovení je založena na PCR – rychlé, spolehlivé detekci a identifikace patogenů v potravinách. PCR však nedokáže rozlišit živé mikrobiální buňky od mrtvých. Přítomnost mrtvých buněk může vést k falešně pozitivním výsledkům, na základě kterých by mohlo dojít ke stahování výrobku z trhu. Aby se tomuto zamezilo, výzkumníci barví vzorky barvivem nazvaným EMA (ethidium bromide monoazide), jehož vzorec je na obrázku č. 17. Tyto metody jsou založeny na teorii, že EMA (ethidium monoazide) proniká pouze odumřelými buňkami s oslabenou membránovou integritou a DNA s navázanou EMA nemůže být amplifikován. [Rudi et al 2005].

Neporušenost DNA živých buněk je zesílen PCR, zatímco DNA z mrtvých buněk s navázanou EMA nemůže být zesílen [Nocker et al. 2006; Nocker et al. 2009; Rudi et al, 2005].



Obrázek 17: Strukturní vzorec ethidium monoazid bromid
(převzato z <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/EtBr.htm>; on-line 2012-02-26)

EMA je barvivo s azidovou skupinou, které se kovalentně váže na DNA. Absorpční maximum tohoto barviva je 460 nm. V DNA mrtvých buněk vznikají křížové vazby, které inhibují její amplifikaci při PCR [Nocker et al. 2006].

Barvivo EMA, které se nenaváže, zůstává volně v roztoku, kde později reaguje s molekulami vody [DeTralgia et al. 1978]. Látka, která vzniká, se nazývá hydroxylamin a není schopen kovalentní vazby na DNA [Kell et al. 1998].

Napříč všem výhodám, které tato nová technika poskytuje, byly zjištěny i její nedostatky. EMA může pronikat v některých případech přes membránu živých buněk. Využitím EMA před extrakcí DNA byla zjištěna hlavní nevýhoda a to podcenění živých buněk. [Flekna et al. 2007].

Zjištění tohoto nedostatku vedlo ke snížení jeho použitelnosti, proto se pracovalo na vyvinutí nové alternativní látky, kterou je propidium monoazid (PMA).

Propidium monoazide v kombinaci s polymerázovou řetězovou reakcí se projevil jako slibná, rychlá a reprodukovatelná metoda pro přístup k buněčné integritě [Burger 2010].

PMA je hodně podobný propidium jodidu (PI) a vzhledem k přítomnosti azidových skupin stojí za vznikem křížových vazeb. Stejně jako propidium jodid je vysoce nepropustný membránou živých buněk a může být použit k identifikaci mrtvých buněk v kulturách a to i směsných. Propidium jodid se váže na DNA mezi báze bez specifity sekvencí. Jedna molekula barviva vychází vždy na 4-5 párů bází. Selektivní zbarvení mrtvých buněk pomocí propidium jodidu bylo úspěšně použito na široké spektrum buněk a tím se nabízí tvrzení, že použití PMA by nemuselo mít takové nevýhody, jaké byly pozorovány u barviva EMA. Protože je však PMA nově vyvinutá molekula, je nutné tuto metodu ještě optimalizovat [Nocker et al. 2006].

Několik studií prokazuje, že PMA by mohl překonat EMA v selektivním odstranění odumřelých buněk v kombinaci s real-time PCR. [Cawthorn, Witthuhn 2008; Nocker et al, 2006; Pan, Breidt, 2007].

6 ZÁVĚR

V této práci byly popsány dostupné metody, které slouží k detekci viability buněk. Mezi základní i nejjednodušší metody patří barvení a kultivační stanovení, ale kultivace má 2 hlavní nevýhody a těmi je časová náročnost a využití u těžko kultivovatelných mikroorganismů.

Další metodou, která má velkou úspěšnost je detekce pomocí funkčního metabolismu buněk. Jedná se o schopnost živé buňky metabolizovat substrát na derivát, který je možno následně detekovat či kvantifikovat například měřením fluorescence. Mezi principy, na nichž je možno měřit životaschopnost pomocí fluorescence, patří integrita cytoplasmatické membrány, intracelulární aktivita esteráz a transmembránový potenciál.

Detekce buněk pomocí tkáňových kultur podléhá v současné době velkému rozvoji a má poměrně vysoké využití.

Největší část práce patří polymerázové řetězové reakci. Hlavní výhodou PCR je krátký čas procesu, vysoká citlivost a také potřeba malého množství DNA. Díky PCR se velice rychle odhalí onemocnění způsobené právě různými patogeny a mikroorganismy. Samotná metoda PCR však nedokáže rozlišit mrtvé buňky od živých a proto se v poslední době začalo využívat barvivo ethidium bromid monoazid. K tomu vedla skutečnost, že EMA je schopná prostupovat poškozenou membránou mrtvé buňky a váže se na DNA, to znamená, že DNA živých buněk je neposkvrněná a tím je zesílen metodou PCR. Má ovšem nevýhodu, EMA může pronikat i do živých buněk. Proto se používá propidium monoazid, který je vysoce nepropustný membránou živých buněk a může být tím pádem použit k identifikaci mrtvých buněk.

Jsem si jistá, že v budoucnu tato metoda projde dalším vývojem a dosáhne se ještě lepších výsledků, které pomohou v problematice odhalená mikroorganismů v lékařství, potravinářství, ekologii a dalších oborech.

7 SEZNAM LITERATURY

MASCOTTI K., MCCULLOUGH J. et al.: *HPC viability measurement: trypan blue versus akridine orange and propidium iodide*, TRANSFUSION, 2000; 40 (6),

s. 693-696

ALTMAN SA., RANDERS L., et al.: *Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and fluorimetric Assay for Mammalian Cell Viability Determinations*, BIOTECHNOLOGY PROGRESS, 1993, 9 (6): s. 671-674

NIEMINEN, A. L., GORES, G. J., et al.: *A novel cytotoxicity Screening assay using a multiwell fluorescence scanner*, TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMATOLOGY, 1992, s. 147-155

ROTH, B. L., POOT M., YUE, S. T, MILLIARD, P. J.: *Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleid acid stain* APPLIED ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1997, 63 (6), s. 2421-2431

CODER, M. D.: *Current Protocols in Cytometry – studies of cell function*; University Washington - School of Medicine, Seattle, Washington [on-line] [cit. 2012-03-19]. Dostupné z: <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/0471161314/0471161314-sampleUnit.pdf>

SHAPIRO, H. M.: *Practical Flow Cytometry*, USA 1995; 3. vyd.; Wiley-Liss, Inc.

SHAPIRO, H. M.: *Journal of microbiological methods*, 42 (1), 2000, Elsevier

BRANSKÁ, B., et al.: *Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy*. Chemické listy 105, 2011, 586-593; [on-line] [cit. 2011-12-10]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_8-volume_105-year_2011.html

KONRAD, M.: *A (short) history of PCR*, 2011, [on-line] [cit. 2011-12-10] Dostupné z: http://www.scienceisart.com/A_PCR/PCRhistory_2.html

BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M.: *Vyšetřovací metody v imunologii*, 1. vyd., Praha 2005, GRADA, ISBN 80-247-0691-1

BUSTIN, S. A.: *A-Z of quantitative PCR.*, International University Line, 2004, (5) s.4-29

VLÁŠKOVÁ, H., TREŠLOVÁ, H.: *Sborník textů: Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*, Ústav dědičných metabolických poruch, Všeobecná fakultní nemocnice Praha a 1. Lékařská Fakulta Univerzity Karlovy Praha, Praha 2008

KAPRÁLEK, F.: *Základní mikrobiologické praktikum*. Univerzita Karlova, Praha 1980

VACHTENHEIM, J., DUCHOŇ J.: *Molekulární biologie pro mediky a lékaře*. Karolinum Praha, Praha 1992, ISBN 8070665815

ROCHE 1: COBAS AMPLICOR™; *Hepatitis C Virus Test*, version 2.0., 2003.

[on-line] [cit. 2011-12-08] Dostupné z:

<http://www.rochediagnostics.cz/download/mol/virologicke/hcv/CCOBAS%20AMPLICOR%20Hepatitis%20C%20Virus%20Test%20verze%202.0.pdf>

ROCHE 2: COBAS AMPLICOR™ *Chlamydia trachomatis Test*, 2005. [on-line]

[cit.2011-12-08] Dostupné z:

http://www.rochediagnostics.cz/download/mol/mikrobiologicke/ct_ng/Cobas%20Amplior%20Chlamydia%20Trachomatis%20Test.pdf

ROCHE 3: COBAS AMPLICOR™ *Neisseria gonorrhoeae Test*, 2003. [on-line]

[cit.2011-12-08] Dostupné z:

http://www.rochediagnostics.cz/download/mol/mikrobiologicke/ct_ng/Cobas%20Amplior%20Neisseria%20Gonorrhoeae%20Test.pdf

CZINN, S. J.: *Helicobacter pylori infection: Detection, investigation and management*.

THE JOURNAL OF PEDIATRICS, 2005; 146 (3) s. 21-6

LAGE, A. P., et al.: *Diagnostic of Helicobacter pylori infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens.* JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY; 1995, 33 (10), st. 2752-2756

VAIRA, D., GATTA L., et al.: *Diagnosis of Helicobacter pylori infection.* ALIMENTARY PHARMACOLOGY AND THERAPY; 2002, 16 (1), s. 16-23

VEJRAŽKA, M.: *Buněčné kultury*, 2011 [on-line] [cit. 2011-05-28] Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textovaverzeprednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>

CAWTHORN, D.M., WITTHUHN, R.C.: *Selective PCR detection of viable Enterobacter sakazakii cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide*, JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 2008, 105 (4), s. 1178-1185

FLEKNA, G., et al.: *Insufficient differentiation of live and dead Campylobacter jejuni and Listeria monocytogenes cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR.* RESEARCH IN MICROBIOLOGY. 2007, 158 (5), s. 405-12

PAN, Y., BREIDT, F.: *Enumeration of viable Listeria monocytogenes cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells.* APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2007, 73 (24), s.8028-8031

NOCKER, A., CAMPER, A.K.: *Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide.* APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2006, 72 (3)

BENNEDSEN M., KOIVALO S.: *Quantification of live bacteria by quantitative EMA-PCR*, Department of Molecular Strain Characterization , Chr. Hansen A/S, 2007

LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, DĚTSKÁ KLINIKA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY, FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUC: *MTT test*, cop. 2011, Olomouc [on-line] [cit 2012-05-19]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>

ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy: *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami* [on-line] [cit. 2012-05-19]. Dostupné z: <http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>

RUDI, K., et al: *Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples*, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2005, 71 (2), s. 1018-1024

BD BIOSCIENCES, GODFREY, W., ALSHARIF, R.: *Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry*, San Joe, CA 2002

BURGER, E. CH.: *16S rRNA coding gene PCR for the early detection of bacterial contamination of cell culture and reagents used for FMD valine production*, Department of Biomedical Sciences, Faculty of science - TSHWANE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 2010

DETRAGLIA, M. C., BRAND J. S., et al: *Characterization of azidobenzamidines as photoaffinity labeling for trypsin*. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1978, 253, s. 1846-1852

KELL, D. B., Harwood C. R., et al: *Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues*, Antonie Van Leeuwenhoek, 1998, 73, s. 169–187.

NOCKER, A., et al: *Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology*. JOURNAL OF MICROBIOLOGY METHODS, 2009, 76, s. 253-261.

ŠMARDA J.: *Metody molekulární biologie*, 1. vyd., Brno, Vydavatelství MU, Brno-Kraví Hora, 2005 ISBN 80-210-3841-1

INTERNETOVÉ ODKAZY OBRÁZKŮ

http://microscopetalk.files.wordpress.com/2010/05/micam_blue_methylene_blue_1024.jpg; on-line 2011-12-12

<http://www.invitrogen.com/1/1/13720-propidium-iodide-1-0-mg-ml-solution-water.html>; on-line 2012-03-27

<http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>; on-line 2011-11-15

<http://www.vurv.cz/ogsm/fot2.htm#nogo>; on-line 2011-12-26

http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_8-volume_105-year_2011.html; on-line 2011-12-10

<http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/EtBr.htm>; on-line 2012-02-12

<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/L7007>; on-line 2012-04-06

http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf; on-line 2012-02-26

vlastní zpracování v ChemSketch

<http://staff.utia.cas.cz/filip/courses/FMM/kryobio.htm>; on-line 2012-06-13

<http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>; on-line 2012-10-12

<http://www.generi-biotech.com/qpcr-seq-pozadavky-pcr-produkt/>; on-line 2012-02-24

<http://www.biopticka.cz/sluzby/molekularni-genetika/obr-bkvjcv-1.html>; on-line 2012-06-14

<http://www.molecularstation.com/molecular-biology-images/509-pcr-pictures/72-pcr-machine-thermal-cycler.html>; on-line 2011-12-18

<http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/EtBr.htm>; on-line 2012-02-26

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Epidermis cibule obarvené methylenovou modří, zvětšení 400x	13
Obrázek 2: Strukturní vzorec Propidium jodidu.....	14
Obrázek 3: Vzorec MTT	
Obrázek 4: Vzorec redukované formy – formazanu.....	15
Obrázek 5: Stanovení životnosti protoplastů pomocí fluorescein diacetátu a ultrafialového záření (červené zbarvené protoplasty nejsou vitální)	16
Obrázek 6: Oddělení buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> od nebuněčných částic na průtokovém cytometru pomocí „forward scatter“ a „side scatter“ signálů	17
Obrázek 7: Strukturní vzorec Ethidium bromid	18
Obrázek 8: Příklad fluorescenčního značení živých a mrtvých buněk pomocí komerční sady LIVE/DEAD® BacLight™	19
Obrázek 9: Strukturní vzorec bis-oxonolu.....	20
Obrázek 10: Přehled strukturních vzorců nejdůležitějších kryoprotektiv	24
Obrázek 11: Vliv rychlosti ochlazování na počet buněk, které přežijí.....	25
Obrázek 12: Průběh PCR.....	28
Obrázek 13: Odhad koncentrace PCR produktu po amplifikaci za různých podmínek .	33
Obrázek 14: Elektroforéza PCR	33
Obrázek 15: Agarózový gel s produkty jednoduché PCR	33
Obrázek 16: Termocycler	35
Obrázek 17: Strukturní vzorec ethidium monoazid bromid	41
Tabulka 1: Přehled vlastností nejběžněji používaných DNA polymeráz	31
Tabulka 2: Využití PCR a jejích modifikací ve výzkumu a praxi	37