

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Metody izolace DNA u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Lucie Frydrychová

Bakalářská práce

2022

University of Pardubice
Faculty of Chemical-Technology

DNA isolation methods for *Pseudomonas aeruginosa*

Lucie Frydrychová

Bachelor thesis

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lucie Frydrychová**
Osobní číslo: **C19221**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Metody izolace DNA u bakterie *Pseudomonas aeruginosa***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši o metodách izolace DNA u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.
2. V práci se zaměřte na definici rodu *Pseudomonas*, uveďte obecný princip a postup izolace DNA a v praktické části práce proveďte izolaci DNA z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* pomocí různých metod a izolačních sad od výrobců.
3. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus* apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Metody izolace DNA u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27.6.2022

Lucie Frydrychová

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Lucii Michalcové za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi při zpracování práce věnovala. Též bych jí ráda poděkovala za zadání tématu s experimentální částí, díky němuž jsem mohla pracovat v laboratoři.

Anotace

Tato práce se věnuje různým způsobům izolace DNA z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Zabývá se popisem rodu *Pseudomonas* a jeho jednotlivých zástupců. Podrobněji rozebírá bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Dále se zaměřuje na různé způsoby izolace DNA. V praktické části je popsána izolace DNA pomocí různých způsobů a sad.

Klíčová slova

Pseudomonas aeruginosa, izolace DNA, fenol-chloroform, silikátové kolonky, elektroforéza

Annotation

This Bachelor thesis focuses on different methods of DNA isolation from *Pseudomonas aeruginosa*. It deals with the description of the genus *Pseudomonas* and its individual representatives. It analyses in detail *Pseudomonas aeruginosa*. It also focuses on different methods of DNA isolation. The practical part describes the isolation of DNA using various methods and kits.

Key words

Pseudomonas aeruginosa, DNA isolation, phenol-chloroform, silicate columns, electrophoresis

Seznam zkratek

- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DNáza – deoxyribonukleáza
- EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
- LB – Luria-Bertani
- NK – nukleové kyseliny
- OD – optická hustota
- *P. a.* - *Pseudomonas aeruginosa*
- PCI – fenol-chloroform-isoamylalkohol
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- PEG – polyethylenglykol
- PMF – peptidové mapování
- qPCR – kvantitativní PCR
- RNA – ribonukleová kyselina
- RNáza – ribonukleáza
- RPM – otáčky za minutu
- SDS – dodecylsulfát sodný
- TBE – Tris-borát-EDTA
- UV – ultrafialové

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Gramovo barvení <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [3].....	14
Obrázek 2: Fluorescence kolonií <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [22].....	18
Obrázek 3: Struktura pyocyaninu [23].....	18
Obrázek 4: Pigmentace kolonií <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , převzato a upraveno z [24]....	19
Obrázek 5: Nárůst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na živné půdě [27].....	20
Obrázek 6: Struktura bází u DNA [39].	23
Obrázek 7: Struktura DNA, převzato a upraveno z [42].	24
Obrázek 8: Fenol-chloroformová extrakce, převzato a upraveno z [53].	27
Obrázek 9: Adsorpce na silikátové kolonky [57].	28
Obrázek 10: Adsorpce na magnetické částice, převzato a upraveno z [60].....	30
Obrázek 11: Gelová elektroforéza, převzato a upraveno z [64].	31
Obrázek 12: Schéma gelové elektroforézy, převzato a upraveno z [69].	32
Obrázek 13: Marker molekulových hmotností 200-1500 bp [70].	36
Tabulka 1: Shrnutí výsledků.	37
Obrázek 14: Gel z elektroforézy v UV světle.	37

Obsah

ÚVOD	13
1. TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1. ROD <i>PSEUDOMONAS</i>	14
1.1.1. Výskyt.....	14
1.1.2. Podmínky kultivace.....	14
1.1.3. Druhy.....	15
1.2. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	16
1.2.1. Výskyt.....	16
1.2.2. Virulence.....	16
1.2.3. Pigmenty.....	17
1.2.4. Onemocnění.....	19
1.2.5. Diagnostika.....	19
1.2.6. Kultivace.....	20
1.2.7. Terapie.....	21
1.2.8. Prevence.....	21
1.3. DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA.....	22
1.3.1. Historie.....	22
1.3.2. Struktura a funkce.....	23
1.3.3. Výskyt.....	24
1.4. IZOLACE DNA.....	24
1.4.1. Historie.....	25
1.4.2. Manipulace s biologickým materiálem.....	25
1.4.3. Obecný postup.....	25
1.4.4. Druhy izolace.....	26
1.4.4.1. Fenol-chloroformová extrakce.....	26
1.4.4.2. Adsorpce na silikátové kolonky.....	27
1.4.4.3. Adsorpce na magnetické částice.....	28
1.4.5. Stanovení koncentrace a čistoty.....	30
1.4.6. Elektroforéza.....	30
2. PRAKTICKÁ ČÁST	32
2.1. CHEMIKÁLIE.....	32
2.1.1. Použité kity.....	32
2.1.2. Ostatní chemikálie.....	32
2.2. POUŽÍVANÝ KMEN.....	33
2.3. PŘÍSTROJE.....	33
2.4. OSTATNÍ MATERIÁLY.....	33
2.5. METODIKA.....	34

2.5.1.	<i>Kultivace Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.5.2.	<i>Fenol-chloroformová extrakce</i>	34
2.5.3.	<i>Izolace DNA sadou od firmy Generi Biotech</i>	34
2.5.4.	<i>Izolace DNA sadou od firmy Elizabeth Pharmacon</i>	35
2.5.5.	<i>Izolace DNA sadou od firmy Top-Bio</i>	35
2.5.6.	<i>Elektroforéza</i>	35
2.6.	VÝSLEDKY	36
3.	ZÁVĚR	38
4.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39

Úvod

Tato práce se zabývá různými metodami izolace DNA z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Zaměřuje se obecně na rod *Pseudomonas* a jeho jednotlivé druhy. Podrobněji se věnuje *Pseudomonas aeruginosa*, což je oportunní patogen, který je nebezpečný především pro osoby s cystickou fibrózou. Běžně se vyskytuje v nemocničním prostředí, kde kolonizuje především vodní kohoutky a další podobné povrchy. Má řadu faktorů virulence, kvůli kterým je velmi odolná, a to i vůči některým dezinfekcím. Typické jsou pro ni pigmenty pyoverdin, pyocyanin, pyomelanin a pyorubin, jež jsou zároveň faktory virulence. Diagnostikovat ji lze několika způsoby, a to kultivačně, pomocí PCR nebo například hmotnostní spektrometrií.

DNA je nukleová kyselina, jež se nachází ve všech buňkách a některých virech. Byla objevena v roce 1869 Friedrichem Miescherem. Kóduje genetickou informaci. Skládá se z nukleotidů složených z cukerné složky, fosfátu a nukleové báze. Dvoušroubovice vzniká spojením bází z nukleotidových řetězců pomocí vodíkových vazeb. DNA je možné izolovat z jakéhokoliv biologického materiálu. Získaná DNA má mnoho využití v medicíně. Izolace DNA se skládá z několika kroků, a to lyze buněk, inaktivace nežádoucích látek a separace DNA. Izolace DNA je důležitou metodou pro další diagnostiku všech mikroorganismů, proto je více metod, pomocí nichž se dá DNA izolovat. V experimentální části porovnáváme několik způsobů izolace DNA, a to fenol chloroformovou extrakci, adsorpci na silikátové kolonky v podobě komerčně vyráběných sad a rychlou metodu izolace pomocí komerční sady.

1. Teoretická část

1.1. Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* patří do čeledi *Pseudomonadaceae*. Jsou to kataláza pozitivní saprofytické gramnegativní aerobní bakterie. Obvykle jsou to rovné nebo mírně zahnuté tyčinky, měřící 0,5-0,8 μm na šířku a 1,5-3 μm na výšku. Netvoří spory a pohybují se pomocí jednoho polárního bičíku. Jsou psychrofilní, ideální teplota pro jejich růst je 0-41 °C. Pro přežití potřebují pH 4,5 a vyšší. Vyskytují se všude v přírodě. Často se vyskytují v nemocnicích, kde infikují pacienta prostřednictvím vody. Některé druhy *Pseudomonas* jsou zodpovědné za hnilobu potravin [1, 2]. Tvar a Gramovo barvení je vidět na obrázku 1.



Obrázek 1: Gramovo barvení *Pseudomonas aeruginosa* [3].

1.1.1. Výskyt

Vyskytují se všude v přírodě, obývají půdu, vodu a vegetaci. Kolonizují též kůži a sliznice zdravých osob. Často se vyskytují v nemocnicích, kde se uchytávají na potraviny, dřezy, kohoutky, mopy a dýchací zařízení a infikují oslabené jedince. Jednotlivé druhy se rozlišují biochemickými a DNA hybridizačními testy. Antiséra na lipopolysacharidy a proteiny vnější membrány vykazují zkříženou reaktivitu mezi sérovary. *Pseudomonas* je možné kultivovat na většině univerzálních médií a identifikovat pomocí biochemických médií [4].

1.1.2. Podmínky kultivace

Zástupci rodu *Pseudomonas* jsou nenáročné mikroorganismy. Rostou na jednoduchých selektivních i neselektivních médiích. Mezi neselektivní patří například Columbia nebo Tryptic Soy agar. Selektivní jsou například King agar, MacConkey agar nebo selektivní médium pro *Pseudomonas*. To obsahuje cetrimid, kyselinu nalidixovou, cefaloridin, penicilin G, pimaricin, malachitovou zeleň a další inhibiční činidla. Rostou přibližně 24-48 hodin při 28-42 °C. Kolonie na pevném médiu jsou většinou ploché. U pacientů s cystickou fibrózou byl pozorován hlavně mukoidní nárůst. Všechny fluorescenční druhy produkují žlutý pyoverdin [5, 6].

1.1.3. Druhy

Pseudomonas (P.) maltophilia je hned po *Pseudomonas aeruginosa (P. a.)* druhým nejčastěji izolovaným druhem v klinických laboratořích. Vyskytuje se ve vodě a mléku. Je to oportunní patogen a způsobuje pneumonie, endokarditidy, infekce močových cest a ran, septikémie a meningitidy.

P. cepacia je hlavně rostlinný patogen, který je též oportunně patogenní. Jedná se o nozokomiální patogen způsobující například zápal plic, infekce ran a močových cest. Stejně jako *P. a.* napadá pacienty s cystickou fibrózou, ale působí systémově, zatímco *P. a.* působí na plíce. *P. cepacia* je velmi odolná vůči mnohým druhům antibiotik.

P. mallei a *P. pseudomallei* mohou způsobovat onemocnění u zdravých jedinců. *P. mallei* je původcem vozňřivky u koní. U lidí často způsobuje smrtelné infekce, ale někdy též chronická onemocnění. Do těla se dostává respiračním traktem nebo přes odřenou kůži. *P. pseudomallei* vyvolává melioidózu zvířat a u lidí plicní infekce [7].

P. fluorescens je rostlinná saprofytická rhizobakterie, využívá tedy ke svému životu rozkládající se části rostlin a kolonizuje povrch kořenů. Je schopna podporovat růst rostlin přímou stimulací růstu a předcházením škodlivým účinkům patogenů. Produkuje nazelenalé pigmenty, fluoreskující pod ultrafialovým (UV) světlem. Vyskytuje se na nejrůznějších místech, například v půdě, na rostlinách, nesterilních léčivech a na sprchových hlavicích. U člověka není patogenní, ale oslabeným jedincům může způsobit bakteriémi, kdy se pacient infikuje prostřednictvím kontaminovaných krevních produktů nebo zařízení na intravenózní infuzi. Bakterie může být dále spojena s některými infekcemi dýchacích cest a u některých pacientů s Crohnovou chorobou byla prokázána tvorba sérových protilátek proti *P. fluorescens* [8, 9].

P. alcaligenes je vzácný oportunní lidský patogen obývající půdu a vodu. Tento druh nedokáže využívat cukry, kromě fruktózy, jako zdroje uhlíku. Roste při teplotách až 41 °C, což je vyšší než většina druhů *Pseudomonas* [10, 11].

P. putida patří mezi fluorescenční druhy bakterií. Vyskytuje se především ve znečištěné vodě, půdách a na rostlinách. Jedná se o rychle rostoucí nenáročnou bakterii, vysoce odolnou vůči oxidačnímu stresu a toxickým chemikáliím. Málodky způsobuje onemocnění člověka, popřípadě způsobuje infekci kůže nebo měkkých tkání u oslabených jedinců. Dále byly

zaznamenány případy, kdy *P. putida* způsobila pneumonii, tonzilitidy nebo například infekci krevního řečiště [12, 13].

P. aeruginosa, jakožto nejznámější zástupce rodu *Pseudomonas*, bude popsána ve vlastní kapitole.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní aerobní bakterie, vyskytující se všude v přírodě. Je to oportunní nozokomiální patogen, který způsobuje mnoho akutních i chronických onemocnění. Nejvíce ohroženou skupinou jsou pacienti s cystickou fibrózou. Kvůli řadě mechanismů adaptace, přežití a rezistence vůči mnohým léčivům, dezinfekcím a antibiotikům, může *P. a.* způsobovat život ohrožující infekce [14].

1.2.1. Výskyt

Vyskytuje se všude v přírodě. Dokáže tvořit biofilmy, a tak se snadno přichytává na nejrůznější povrchy. Velkým problémem jsou biofilmy ve zdravotnictví, kdy se *P. a.* přichytává například na kontaktní čočky, katetry a implantáty. Tímto způsobem zasahuje i do potravinářského průmyslu, kdy se *P. a.* zachytává v kádích či nádržích [15].

1.2.2. Virulence

P. a. má řadu buněčných a extracelulárních faktorů virulence, které přispívají k její patogenezí a jsou řízeny vzájemně propojenými regulačními okruhy a signalizačními systémy. Nejdůležitějšími faktory virulence jsou:

- Vnější membrána
- Biofilm
- Bičík (Flagellum)

Vnitřní strana membrány je fosfolipidová a vnější lipopolysacharidová a je v ní uloženo kolem 300 proteinů. Zabraňuje průniku škodlivých látek do buňky.

Biofilm, který *P. a.* tvoří, je velmi odolný k antibiotikům, dezinfekcím a obranným mechanismům hostitele. Kvůli biofilmu je odstraňování této bakterie náročnější. Tvoří ho hlavně kapsulární polysacharid, alginát (mukoidní exopolysacharid) a agregátní polysacharidy. Mimo jiné obsahuje také extracelulární deoxyribonukleovou kyselinu a proteiny. Zralé biofilmy mají houbovitou strukturu a tvoří síť kanálků, která rozvádí živiny a kyslík do buněk a odstraňuje odpadní látky.

P. a. má jeden polární bičík, který jí umožňuje pohyb ve vodném prostředí nebo v prostředí s nízkou viskozitou. Dochází k rotaci vývrtkovým způsobem, čímž vzniká síla schopná bakterii posouvat. Pohyblivost je důležitá pro vazbu *P. a.* na epitel dýchacích cest. Přichycení bičíku pomáhá počátečnímu vytvoření biofilmu.

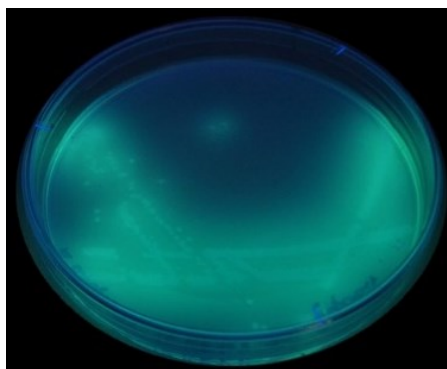
Dalším faktorem virulence jsou pily, vláskovité bičíky, skládající se z pilinu. Podílejí se na hybnosti a adhezi buněk a zároveň napomáhají tvorbě houbovité struktury biofilmu.

P. a. má také sekreční systémy, vylučující různé druhy toxinů z buňky. Nejtoxičtějším je exotoxin A, způsobující nekrózu v místě kolonizace. Dalšími vylučovanými látkami jsou barviva. Pyocyanin, jenž poškozují několik enzymů a deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), čímž způsobuje lýzu buňky, je jedním z nich. Mimo jiné zodpovídá za modrozelenou barvu kolonií. Pyoverdin pravděpodobně slouží k získávání železa z hostitele. Pyomelanin chrání *P. a.* proti oxidačnímu stresu a pomáhá jí v získávání železa. Posledním barvivem je pyorubin, který potlačuje tvorbu jiných mikroorganismů. Mezi další vylučované látky patří například ramnolipidy a antioxidační enzymy [16, 17, 18, 19, 20].

1.2.3. Pigmenty

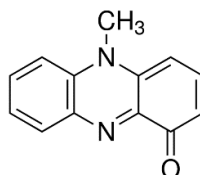
P. a. produkuje čtyři pigmenty, zelený pyoverdin, modrý pyocyanin, hnědý pyomelanin a červený pyorubin. Tyto pigmenty hrají roli v odolnosti a virulenci bakterie.

Pyoverdin je velmi stabilní fluorescenční sideroforní barvivo (obr. 2). Dříve byl označován jako fluorescein a díky schopnosti chelátovat železo, se označoval také jako enterobactin. Kromě *P. a.* je produkován také *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas putida*. Skládá se ze tří částí, a to chinolinového kruhu, peptidu a dikarboxylové kyseliny nebo amidu. Peptid má šest až dvanáct aminokyselin. Fluorescenční vlastnosti má pyoverdin díky chinolinovému kruhu, který působí jako chromofor. Pyoverdin je nejvíce produkován při pH 8 a jeho tvorba může být stimulována prolinem. Výroba pyoverdinu souvisí s koncentrací železa. Pokud se ke kultuře přidá látka chelatující železo, produkce pyoverdinu stoupne [21].



Obrázek 2: Fluorescence kolonií *Pseudomonas aeruginosa* [22].

Pyocyanin je modrozelené fenazinové barvivo typické pouze pro *P. a.* (obr. 3). Může inhibovat růst bakterií a plísní. Pyocyanin má redoxní vlastnosti a pokud je redukován na leukopyocyanin, může redukovat železo a kyslík, a tak vytvářet hydroxylové radikály. Leukopyocyanin může mimo jiné extrahovat železo z transferinu jeho redukcí na železnatý kationt. Pyocyanin inaktivuje katalázu a superoxidázu, což jsou enzymy odpovědné za snižování účinků reaktivních forem kyslíku [21].

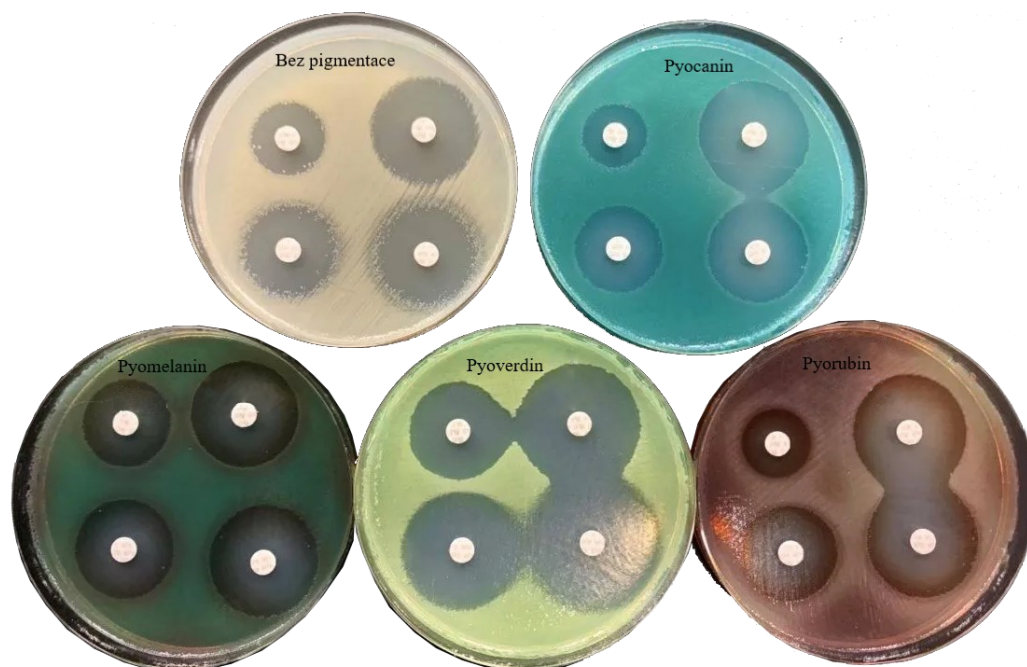


Obrázek 3: Struktura pyocyaninu [23].

Pyomelanin je tmavý pigment patřící mezi melaninová barviva. Má mnoho funkcí, podílí se na odolnosti vůči oxidativnímu stresu, příjmu železa a virulenci. Vyšší produkce melaninu se často vyskytuje u pacientů s cystickou fibrózou a při zánětech močových cest [19].

Pyorubin je červený pigment, který pravděpodobně chrání bakterii před působením kyslíkových radikálů. Kromě toho má antibakteriální aktivitu způsobující potlačení růstu jiných bakterií. *P. a.* je jednou z mála bakterií produkujících tento pigment [20].

Na obrázku 4 jsou kolonie *P. a.* se všemi zmíněnými pigmenty.



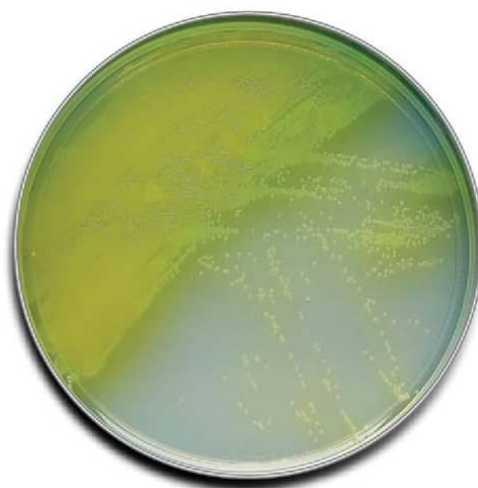
Obrázek 4: Pigmentace kolonií *Pseudomonas aeruginosa*, převzato a upraveno z [24].

1.2.4. Onemocnění

P. a. je oportunně patogenní mikroorganismus a využívá oslabeného hostitele. Nejohroženější skupinou jsou pacienti s cystickou fibrózou, u kterých způsobuje infekce dýchacích cest. Způsobuje mnoho druhů infekcí od téměř neškodných až po život ohrožující. Vyvolává infekce kůže v místě jejího poranění a očí u pacientů používajících kontaktní čočky. Mezi další postižené orgány patří uši, srdce, měkké tkáně, klouby, dýchací cesty, gastrointestinální trakt, močové cesty a centrální nervový systém. Pneumonie a sepse způsobuje především u pacientů na jednotkách intenzivní péče [25, 26].

1.2.5. Diagnostika

Pro zajištění včasné a účinné léčby je důležitá rychlá a přesná diagnostika *P. a.* Lze ji rozpoznat při nárůstu na živných půdách. Nejedná se však o spolehlivou metodu, protože *P. a.* má různorodou morfologii. Může tvořit malé kolonie, které budou hrubé, vrásčité nebo mohou tvořit biofilm a tehdy se jedná o lepivé kolonie (obr. 5). Existuje mnoho přístrojů, které poskytují přesnější diagnostiku, avšak většinou postrádají specifickou, vyžadují vysoce kvalifikovaný personál a časté referenční testy. Kromě kultivace sputa existují nové rychlejší a přesnější metody.



Obrázek 5: Nárůst *Pseudomonas aeruginosa* na živné půdě [27].

Mezi molekulárně biologické metody patří polymerázová řetězová reakce (PCR). Využívá se na amplifikaci a detekci sekvencí DNA a RNA. Pomocí této metody můžeme stanovit virovou infekci v počátečním stádiu, mikroorganismy ve vodě, vzduchu, půdě a potravinách. Je to rychlá a vysoce citlivá metoda, která vyžaduje minimální matici. Kromě klasické PCR v dnešní době existuje několik dalších druhů této metody. Multiplexní PCR je zaměřena na amplifikaci více genů zároveň v jedné reakci. Uplatňuje se několik párů specifických primerů, které jsou komplementární k určitým sekvencím. Kvantitativní PCR (qPCR) se používá pro kvantitativní stanovení dané bakterie ve vzorku. Používají se při ní fluorescenční barviva, která se vážou na dvouvláknovou DNA a následně se měří fluorescence. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství replikované DNA.

Dalšími způsoby diagnostiky jsou hmotnostní spektrometrie a detekce biosenzorem s nanočásticemi. Hmotnostní spektrometrie vytváří peptidové mapování (PMF) zkoumaných mikroorganismů na bázi ribozomálních proteinů, které se porovnávají s referenční databází PMF za účelem identifikace a charakterizace bakterií v klinických vzorcích. Metoda není ovlivněna kultivačními podmínkami, jako jsou kultivační média a délka kultivace. Jedním z barviv produkovaných *P. a.* je pyoverdin, což je fluorescenční siderofor, obsahuje tedy železo. Z toho důvodu je možné *P. a.* stanovit biosenzory pomocí nanočástic zlata. Jedná se o rychlou a spolehlivou metodu [28, 29, 30].

1.2.6. Kultivace

P. a. nejlépe roste při 37 °C, ale je to psychrofilní bakterie a přežívá tedy v rozmezí teplot od 4 °C do 42 °C. Teplota pod 30 °C výrazně snižuje virulenci bakterie. Narostlé bakterie se

skladují při 4 °C ideálně po dobu jednoho týdne. *P. a.* je aerobní bakterie, ale je možné ji kultivovat též anaerobně na některých zdrojích uhlíku za přídavku dusičnanů jako akceptorů dusíku.

P. a. roste na krevním, Endově a MacConkey agaru a mnoha dalších univerzálních médiích. Velmi se jí daří na médiu Luria-Bertani. Na krevním agaru tvoří často β -hemolýzu z důvodu tvorby fosfolipázy C a termostabilního glykolipidu. Na Endově agaru tvoří nepravidelné kolonie s nerovnými okraji a perleťovým leskem. Kolonie *P. a.* mají charakteristickou ovocnou vůni. Dále se využívají média speciálně určená pro *P. a.*, která jsou upravená pro studium vlivu uhlíku, dusíku a síry na růst a virulenci bakterie. Pro izolaci čisté kolonie *P. a.* se využívá *Pseudomonas* izolační agar, selektující *P. a.* od *Escherichia coli* a King agar, jež stimuluje produkci pyocyaninu [31, 32].

1.2.7. Terapie

Léčba infekcí způsobených *P. a.* je složitá, protože se jedná o velmi rezistentní druh. Standardně se závažné infekce léčí intravenózně kombinovanou léčbou piperacillinu nebo ceftazidimu s aminoglykosidem. Kmeny *P. a.* jsou citlivé na širokospektré peniciliny a cefalosporiny, aminoglykosidy, monobaktamy, karbapenemy a fluorochinolony. Avšak objevují se i kmeny rezistentní, proti nimž je třeba využít jiných léčiv. Jako další se používaly například kolistin a polymyxin B, což jsou starší léčiva. Od těchto látek se upustilo z důvodu toxicity a vedlejších účinků. Proti těmto léčivům si však kmeny *P. a.* brzy také vybudovaly rezistenci. Z důvodu vysoké rezistence se začala používat kombinovaná léčiva. Používá se kombinace cefalosporinů a β -laktamáz, konkrétně ceftazidim-avibaktam a ceftolozan-tazobaktam. Nově se používá ceftiderocol, který je strukturně příbuzný cefalosporinům a z betalaktamových antibiotik je v současné době nejúčinnější na záněty močových cest. Za zmínku též stojí plazomicin na močové infekce a murepavadin na infekce dolních cest dýchacích [26, 33].

1.2.8. Prevence

V minulosti byla snaha o vytvoření vakcíny proti *P. a.* V 90. letech 20. století byla vyvinuta vakcína pro imunizaci pacientů s cystickou fibrózou. Vakcína byla relativně účinná, ale nepokračovalo se v její výrobě. Další vakcína byla zaměřena proti bičíkům a prokázala se aktivní imunizace pacientů s cystickou fibrózou. Třetím pokusem byl dvacet let dlouhý vývoj vakcín založený na fúzních proteinech vnější membrány jako antigenu. Vakcína byla velmi

nadějná, ale nebyla schválena. Nyní tedy neexistuje žádná vakcína, ale jsou známy antigeny, které by do budoucna potencionálně mohly být užitečné.

P. a. je nozokomiální patogen a z tohoto důvodu jsou v nemocnicích zavedeny postupy, které chrání pacienty i nemocniční personál. Důležitá je hygiena rukou a dezinfekce prostředí. *P. a.* si velmi snadno vytváří rezistenci na antibiotika, a proto je třeba se vyhnout dlouhodobému užívání antibiotik. Vzhledem k tomu, že často kontaminuje vodní kohoutek a následně ruce při mytí, instalují se do vodovodních baterií speciální filtry, které brání vzniku bakterií [26, 34].

1.3. Deoxyribonukleová kyselina

Deoxyribonukleová kyselina je organická chemická látka složitě molekulární struktury. Nachází se ve všech prokaryotických a eukaryotických buňkách a v některých virech. Kóduje genetickou informaci organismu. Obsahuje tedy všechny informace potřebné k vybudování a udržení organismu. V jádře tvoří DNA komplex s proteiny zvaný chromatin. Je velmi stabilní a z tohoto důvodu může sloužit jako templát pro replikaci dalších molekul DNA nebo pro produkci RNA [35, 36].

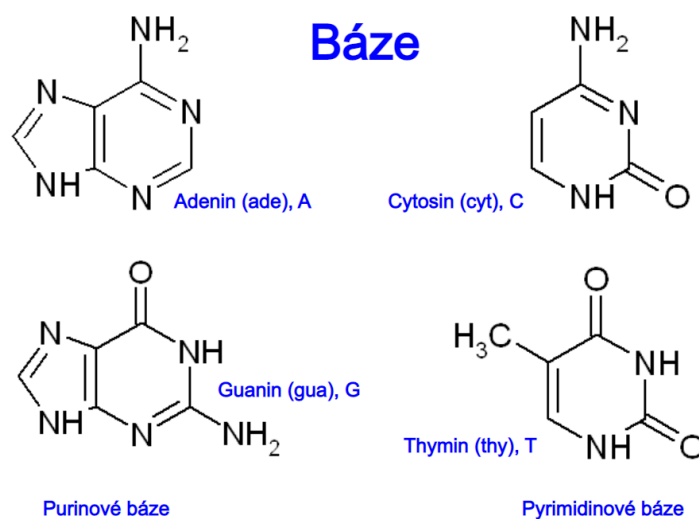
1.3.1. Historie

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) byla objevena v roce 1869 švýcarským biochemikem Friedrichem Miescherem, když chtěl zjistit chemické složení leukocytů. Při pozorování buněk se brzy zaměřil na jádro. Při působení kyseliny na jádro vznikala sraženina, kterou nazval nuklein. Později byl tento název změněn na nukleovou kyselinu. DNA se zabýval též Albrecht Kossel, který dokázal, že nukleová kyselina (NK) se skládá z purinové a pyrimidinové báze, cukru a fosfátu. Theodor Boveri a Walter Sutton v roce 1902 zjistili, že jednotky dědičnosti jsou umístěny na chromozomech. V roce 1909 byla objevena ribonukleová kyselina (RNA), nazvaná podle ribózy, kterou obsahuje. Ve 30. letech 20. století byly objeveny čtyři báze a deoxyribóza, podle níž se DNA nazývá. Další významný objev učinil americký biochemik Erwin Chargaff, který zjistil, že molekuly DNA určitého druhu obsahují vždy stejné množství bází adenin, thymin, cytosin a guanin. V roce 1941 bylo dokázáno, že za produkci jednoho enzymu je zodpovědný jeden gen. Prvními vědci, co sestavili strukturu molekuly DNA, byli James Watson a Francis Crick. Dále byla v roce 1956 objevena DNA polymeráza, která je zodpovědná za replikaci DNA. Na konci 50. let Francis Crick zavedl pojem, označovaný jako centrální dogma molekulární biologie, kde říká, že informace je přepsána z DNA do RNA a následně je převedena na protein. Dále přinesl informaci o tom, že tři báze v DNA vždy kódují

jednu aminokyselinu v proteinu. Mechanismus replikace DNA poprvé popsali Matthew Meselson a Franklin Stahl v roce 1958 [37, 38].

1.3.2. Struktura a funkce

Molekula DNA se skládá ze dvou dlouhých polynukleotidových řetězců složených ze čtyř typů nukleotidových podjednotek. Základní části nukleotidů jsou pospojovány pomocí vodíkových vazeb. Nukleotidy jsou složeny z cukru, ke kterému je připojena jedna či více fosfátových skupin pomocí fosfodiesterové vazby a báze obsahující dusík. U DNA je cukr deoxyribóza spojena s jednou fosfátovou skupinou. Báze u DNA jsou adenin – A, guanin – G, cytosin – C a thymin – T (obr. 6). U RNA je místo thyminu uracil – U. Fosfátová skupina je tvořena atomem fosforu se čtyřmi atomy kyslíku. Nukleotidy jsou v řetězci spojeny kovalentní vazbou přes cukry a fosfáty.

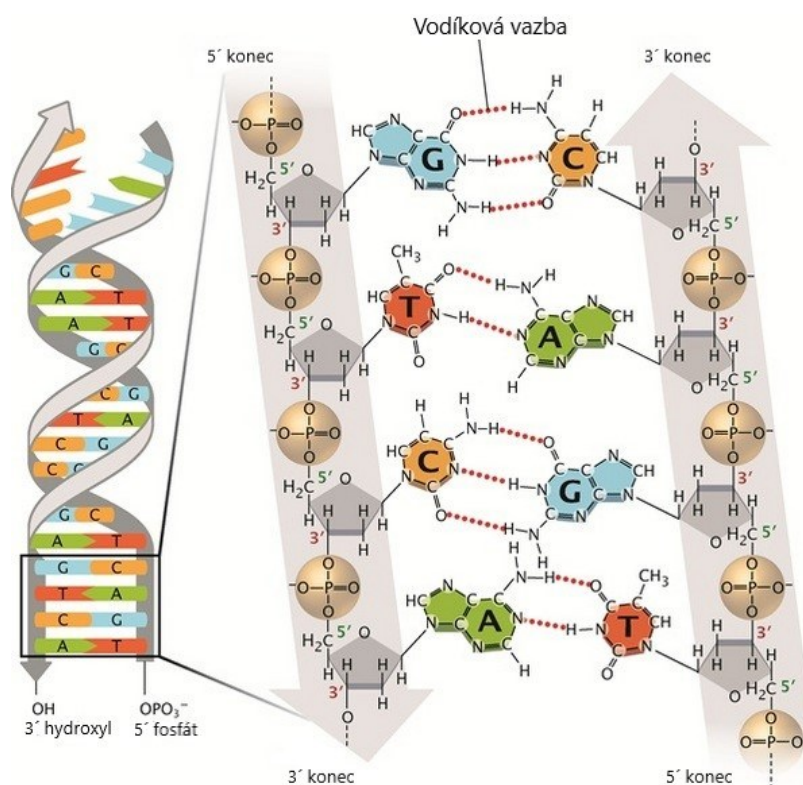


Obrázek 6: Struktura bází u DNA [39].

Chemická polarita řetězce je dána způsobem, jakým jsou spojeny nukleotidové podjednotky. Každý cukr má na jedné straně 5'fosfát a na druhé straně 3'hydroxyl, které do sebe vždy zapadají a jsou orientovány stejným směrem.

Dvoušroubovice je tvořena spojením bází z nukleotidových řetězců pomocí vodíkových vazeb. Báze jsou na vnitřní straně dvoušroubovice a cukr s fosfátem jsou na vnější straně. Vodíkovými vazbami se páruje vždy purinová báze (adenin a guanin) s pyrimidinovou bází (thymin a cytosin). Párování bází poskytuje DNA schopnost sbalit páry bází uvnitř dvoušroubovice v energeticky nejvýhodnějším uspořádání. Každý pár bází má při tomto uspořádání podobnou šíři a může tak držet cukry a fosfáty ve stejné vzdálenosti od sebe.

Dvoušroubovici vytváří nukleotidy stočené do sebe, což maximalizuje účinnost sbalení bází. Vlákna dvoušroubovice musí být vždy opačně orientované, aby do sebe mohly zapadnout jednotlivé páry bází. Struktura DNA je zobrazena na obrázku 7 [40, 41].



Obrázek 7: Struktura DNA, převzato a upraveno z [42].

1.3.3. Výskyt

DNA je možné izolovat z jakéhokoliv biologického materiálu. Většina DNA se nachází v buněčném jádře, kterému se říká jaderná DNA. Část DNA také obsahují mitochondrie, což jsou buněčné organely, které využívají energii k buněčnému dýchání. DNA v nich obsažená se nazývá mitochondriální [43].

1.4. Izolace DNA

Extrakce NK a proteinů je základ v molekulární biologii. Tyto molekuly mohou být izolovány z jakéhokoli biologického materiálu. DNA, izolovaná z biologických vzorků, se může používat pro mnoho dalších aplikací. Příkladem takové aplikace je sekvenace DNA, PCR, qPCR nebo příprava genomové knihovny. V medicíně se využívá těchto aplikací DNA pro diagnostiku genetických onemocnění, genovou terapii, farmakogenomiku pro predikci účinnosti léků nebo nežádoucích reakcí na léky. V mikrobiologii je možné pomocí analýzy NK určit mutace vedoucí k rezistenci na antibiotika [44, 45].

1.4.1. Historie

Jak již bylo řečeno v kapitole Historie deoxyribonukleové kyseliny, objevil ji Friedrich Miescher v roce 1869. Následně se snažil oddělit DNA od proteinů. Vymyslel nový způsob k oddělení buněčných jader od cytoplazmy a následně izoloval DNA. Při prvním pokusu získal pouze malé množství DNA. Následně vyvinul způsob, kterým získal dostatečné množství DNA. Po Miescherovi se o izolaci DNA pokusilo mnoho dalších. Z počátku byly laboratorní postupy založeny na centrifugaci v hustotním gradientu. Jako další se využívalo rozdílné rozpustnosti chromozomální DNA, plazmidů a proteinů v alkalickém pufru. Dnes existuje mnoho specializovaných metod nejen na extrakci DNA, ale i RNA a proteinů. Velká část metod je v dnešní době v komerčních sadách, které zjednodušují izolaci [46, 44].

1.4.2. Manipulace s biologickým materiálem

U biologického materiálu je třeba brát ohled na to, že analyzované biomolekuly jsou náchylné k degradaci způsobené fyzikálními, chemickými a biologickými faktory. Dále je třeba brát v potaz, že buňky v biologickém materiálu zůstávají nativní a může u nich docházet ke stresové reakci, která může mít vliv na transkriptom daného vzorku. Při manipulaci se vzorkem je proto nutné dodržovat zásady, jež ho co nejvíce ochrání před znehodnocením. Vzorek se nesmí kontaminovat a musí se co nejdříve uložit do stabilizačního roztoku nebo zamrazit. Při zamrazování DNA stačí teplota $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ale obecně platí, že by biologický materiál měl být uchováván v co nejnižší teplotě [47].

1.4.3. Obecný postup

Obecný postup izolace NK se skládá ze tří kroků, a to z lýzy buněk, inaktivace nežádoucích látek a separace požadované NK.

Nejprve je třeba z buněk uvolnit genetický materiál, což se provádí detergenty nebo fyzikálně-chemickými postupy. Detergenty jsou buď iontové povahy nebo neionogenní. Iontové jsou například dodecylsulfát sodný (SDS) nebo soli žlučových kyselin. Neionogenní je například Triton X100. Mezi fyzikálně-chemické metody patří rozrušení membrány ultrazvukem. Během rozpadu buňky se uvolňují též proteiny. Tyto proteiny je nutné rozložit, protože mohou znehodnotit DNA. Na jejich odstranění se používá proteinkináza A. Dalšími nežádoucími látkami jsou dvojmocné ionty, které jsou kofaktory pro činnost deoxyribonukleázy (DNáza). Odstraňují se pomocí chelatačních činidel, například ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). DNA může být znečištěna RNA, a proto je třeba ji rozložit pankreatickou ribonukleázou (RNáza). Pro extrakci požadované NK existuje

v dnešní době řada metod. Některé z těchto metod byly upraveny pro použití ve formě soupravy, což může zjednodušit celý extrakční proces. Nejvíce se využívají metody založené na roztoku (fenol-chloroformová extrakce) nebo koloně (adsorpce na silikátové kolonky). Jednou z novějších metod je adsorpce na magnetické částice [48, 49].

1.4.4. Druhy izolace

Extrakce DNA se dělí do dvou kategorií, a to na chemické metody (metody založené na roztoku) a metody extrakce DNA na pevné bázi. Metody založené na roztoku využívají organické a anorganické roztoky. Jako organické látky se používají fenol a chloroform a při izolaci založené na bázi anorganického roztoku se používají soli, jako jsou chlorid sodný, octan draselný a octan amonný v kombinaci s proteinázou K. Mezi metody izolace DNA na pevné bázi patří adsorpce na silikátové kolonky a magnetická separace. Při izolaci na silikátové kolonky se DNA adsorbuje na kuličky nebo membrány z oxidu křemičitého. Tato metoda je jednodušší a rychlejší než fenol-chloroformová extrakce. Separace na magnetické částice je založena na reverzibilní vazbě DNA na magnetické kuličky, které jsou potaženy protilátkou vázající DNA. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu, jež je však nákladnější [50, 51].

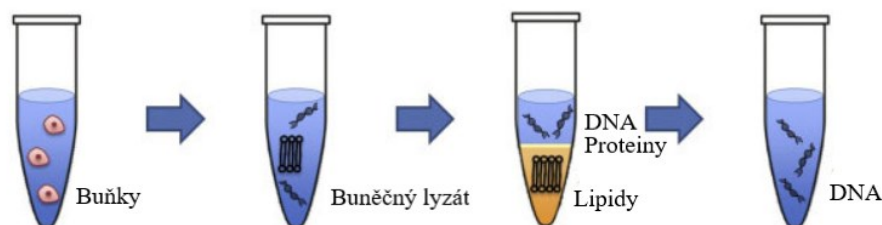
1.4.4.1. Fenol-chloroformová extrakce

Velmi častou metodou k izolaci DNA je extrakce vzorků organickými rozpouštědly, kdy se používá směs fenolu s chloroformem. Roztok je možné doplnit o isoamylalkohol, který zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu a snižuje tak kontaminaci vodné fáze fenolem.

Smícháním vzorku s fenol-chloroformem vzniká dvoufázová emulze, jež se odstředováním rozdělí na dvě fáze. Dolní organická fáze obsahuje fenol a horní vodná fáze obsahuje DNA. Na rozhraní fází se vytváří bílý prstenec vysrážených proteinů. Pro dokonalé odstranění proteinů z roztoku se může opakovat extrakce, dokud nepřestane vznikat mezifáze s proteiny. Roztok se nakonec zbavuje zbytků fenolu extrakcí směsí chloroformu s isoamylalkoholem.

Ve vodném roztoku dochází k interakcím mezi fosfáty obsaženými v DNA a polárními molekulami vody. Po přidání ethanolu nebo isopropanolu, tedy látkou méně polární než voda, se interakce mezi vodou a DNA zeslabí. K úplnému ukončení interakcí dochází, když se do roztoku přidají jednovazebné soli, například sodné, amonné nebo lithné. Aby se předešlo rozkladu DNA, sráží se při nízkých teplotách. Doba srážení závisí na velikosti a koncentraci DNA, přičemž platí, že čím jsou menší fragmenty a nižší koncentrace, tím je potřeba delší doba. Po vysrážení se DNA odstředuje a vzniká tak peleta obsahující kromě DNA také nežádoucí

soli, které musí být odstraněny promytím 70% ethanolem. Po odstranění supernatantu se peleta rozpustí ve vodě nebo pufru a obsahuje již jen čistou DNA. Schéma fenol-chloroformové extrakce je zobrazeno na obrázku 8 [48, 49, 52].



Obrázek 8: Fenol-chloroformová extrakce, převzato a upraveno z [53].

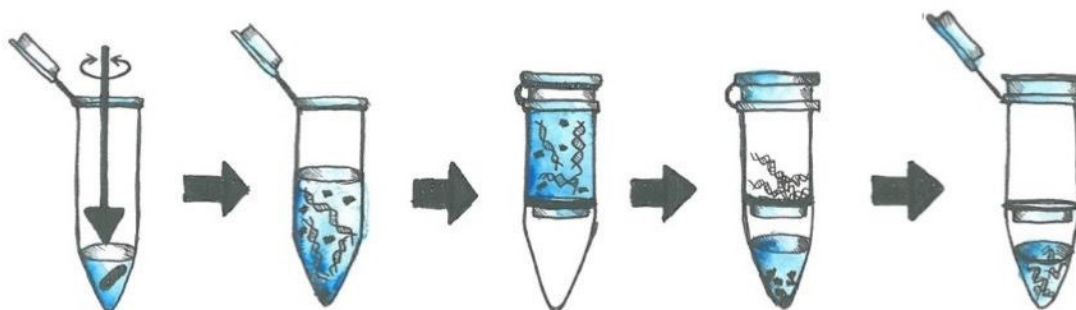
1.4.4.2. Adsorpce na silikátové kolonky

Metoda izolace na pevnou fázi je založena na navázání molekul DNA na matici na bázi oxidu křemičitého za přítomnosti chaotropních látek. Jedná se o velmi rychlou, jednoduchou a spolehlivou metodu [51].

Silikagel je syntetická amorfni forma oxidu křemičitého. Vyrábí se buď v podobě nepravidelných zrn nebo jako kuličky. Na povrchu silikagelu jsou póry poskytující velký povrch a to až 800 m²/g. Podle průměru se póry dělí na mikropóry s poloměrem menším než 1 nm, mezopóry o poloměru 1,25 nm a makropóry s poloměrem nad 25 nm. Silikagel je vyráběn reakcí alkalických silikátů s minerální kyselinou. Nejčastěji se používá křemičitan sodný a kyselina sírová. Silikagel je rozpustný ve vodě. Pro vznik voděodolného materiálu se do něho přidává oxid hlinitý. Při vyšším množství oxidu hlinitého se snižuje jeho adsorpční schopnost. Dobře se na něj váže voda a organické sloučeniny pomocí Van der Waalsových sil. Je možné ho regenerovat několika způsoby. Jednou z možností je zahřátí silikagelu. Pro odstranění vody se používá teplota 120 °C a pro odstranění organických sloučenin teplota 110 °C. Další možností je přidání adsorbentu, na nějž se látka váže silněji. Tím je například aktivní uhlí [54].

Nejdříve se buňky musí rozložit pomocí detergentu a proteázy v lyzačním pufru. Následně se vzorek smíchá s chaotropní látkou, jenž narušuje vazby v DNA a ta pak adhezuje na silikátové kolonky. Během centrifugace projde roztok s kontaminujícími složkami přes

membránu. DNA navázaná na membráně se promývá směsí chaotropního pufru se solí. Po promytí DNA se kolonka přenesse na další zkumavku. DNA se vyváže z membrány pomocí roztoku obsahujícího minimální množství solí [55, 56]. Schéma adsorpce na silikátové kolonky je zobrazena na obrázku 9.



Obrázek 9: Adsorpce na silikátové kolonky [57].

1.4.4.3. Adsorpce na magnetické částice

Magnetické částice se uplatňují v biomedicínských a biotechnologických oborech. Používají se pro transport léčiv, magnetickou rezonanci, izolaci biomolekul nebo například pro značení buněk [58].

Magnetická separace je jednou z moderních bioseparačních metod. Využívá se k separaci DNA ze vzorků biologického původu. DNA izolovaná touto metodou bývá velmi čistá [59].

Magnetické částice s malým průměrem mají některé vlastnosti jiné než běžné materiály. Lze je rozdělit do tří skupin na oxidy kovů, čisté kovy a magnetické slitiny. V biomedicínských aplikacích se používají hlavně částice s kobaltem, železem a niklem. Pro práci s nukleovými kyselinami se nejvíce používá magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Na syntézu magnetických částic se používají fyzikální, chemické a biologické metody. Fyzikální metody nevyžadují chemická činidla ani ruční obsluhu. Jejich nevýhodou je špatná kontrola velikosti částic. Biologické metody zahrnují pěstování bakterií, hub, kvasinek a virů, které jsou schopné tvořit magnetické částice. Tyto metody jsou ekologické, nízkenergetické s vysokou mírou regenerace. Jedinou nevýhodou je dlouhá doba inkubace mikroorganismů. Nejvyužívanějšími metodami pro syntézu magnetických mikročástic jsou metody chemické. Používá se například oxidace, chemická koprecipitace, syntéza sol-gel a další. Pomocí chemické syntézy vznikají částice přesného tvaru a velikosti.

Vzniklé magnetické částice lehce oxidují. Pro vyšší stabilitu a dispergovatelnost v roztoku, se na povrch aplikuje povlak, který vytvoří jakýsi plášť. Do povrchové vrstvy je možné přidat různé chemické skupiny podle toho, k čemu chceme částice použít. Nejvíce se používají magnetické částice potažené oxidem křemičitým, aminoskupinou nebo karboxylovou skupinou [60, 61].

Oxid železitý je schopný adsorbovat DNA, ale vznikem agregátů dochází ke zmenšení adsorbční plochy. Proto se koloidní magnetit povrchově modifikuje silanizací. Sloučeniny silanu navázané na magnetit, který je derivatizovaný karboxylovými skupinami, jsou schopny extrahovat DNA z roztoků s polyethylenglykolem (PEG). DNA je možné izolovat též pomocí modifikovaných bakteriálních magnetitových částic za přítomnosti aminosilanových sloučenin a hyperrozvětveného polyamidoaminového dendrimeru. Další možností je povrchová modifikace magnetických nanočástic alkoxyxilany nebo polyethyleniminem.

Kvůli malé velikosti částic se magnetické koloidy špatně oddělují klasickými magnety, protože Brownovy síly jsou vyšší než magnetická síla. Pro lepší oddělení fází se připravují magnetické latexy interagující s NK [60].

Postup při separaci magnetickými částicemi je tvořen čtyřmi kroky a to promývání, imobilizace, promývání a eluce. Před izolací je třeba smíchat vzorek s lyzačním roztokem pro rozrušení buněk. Při promývání se magnetické částice napipetují do mikrozkušavky, která se umístí na magnetický stojánek. Částice se shluknou u stěny mikrozkušavky a odpipetuje se přebytečný roztok. Ke shluku částic se přidá promývací roztok a promíchají se, čímž se promyjí. Dále se částice magnetem přitáhnou ke stěně a promývací roztok se odpipetuje. Promytí se může několikrát opakovat. Po odstranění promývacího roztoku následuje imobilizace. K částicím se přidá lyzovaný vzorek a imobilizační roztok. Mikrozkušavka se nejdříve protřepává a následně centrifuguje. Jako další se provádí promývání, kdy se částice několikrát promyjí promývacím pufrem. Posledním krokem je eluce. K magnetickým částicím s navázanou DNA se přidá eluční roztok, který oddělí DNA od částic. Pomocí magnetu se částice shluknou ke stěně zkumavky a DNA se odpipetuje do nové zkumavky [58]. Postup izolace DNA magnetickými částicemi je na obrázku 10.



Obrázek 10: Adsorpce na magnetické částice, převzato a upraveno z [60].

1.4.5. Stanovení koncentrace a čistoty

Nedílnou součástí izolace DNA je zjištění, v jaké koncentraci a čistotě se DNA podařilo získat. Běžnou metodou pro stanovení koncentrace DNA je spektrofotometrické stanovení. Využívá schopnosti dusíkatých bází, obsahujících aromatické struktury, absorbovat ultrafialové (UV) záření o určitých vlnových délkách. Absorpční maximum nukleových kyselin je při 260 nm. Z Lambert-Beerova zákona vyplývá, že absorbance vzorku je přímo úměrná množství NK ve vzorku. NK mohou být znečištěny proteiny, které nebyly dostatečně odstraněny nebo organickými a anorganickými látkami, které vzorek kontaminovaly během izolace. Měří se poměr mezi absorbancemi při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. U čistého vzorku DNA je poměr absorbancí uvedených vlnových délek 1,7 – 2, přičemž ideální hodnota je 1,8. Při znečištění proteiny se hodnoty pohybují pod 1,7 a při znečištění ribonukleovou kyselinou a organickými látkami nad 2.

Další možností stanovení koncentrace NK je fluorescenční stanovení. Tato metoda je citlivější než absorbance, především u vzorků s nízkou koncentrací. NK se obarví fluorescenčním barvivem a měří se intenzita fluorescence navázaného barviva. Množství molekul v roztoku je přímo úměrné intenzitě fluorescence. Použitím barviva vázajícího DNA umožní specifičtější měření DNA, než u spektrofotometrických metod [47, 62, 63].

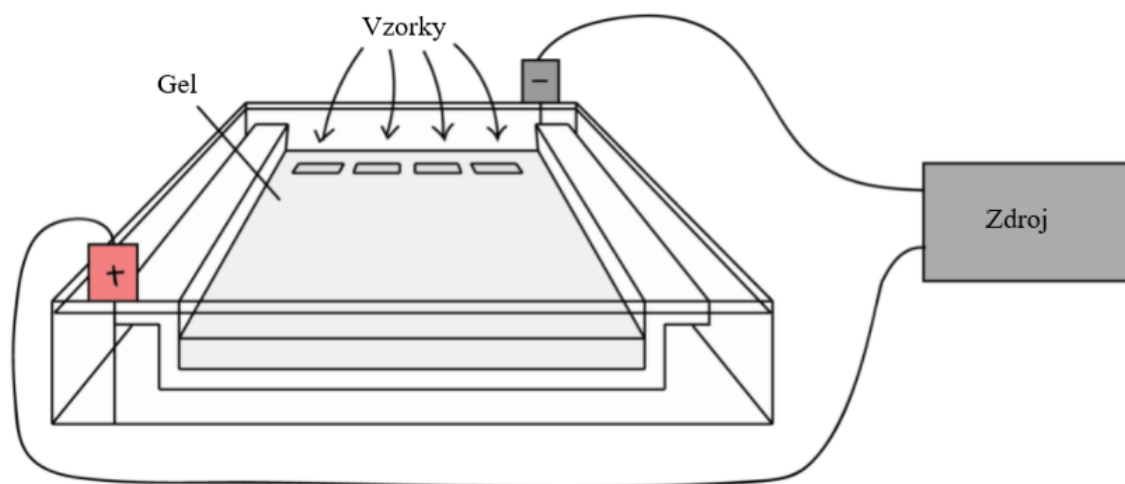
1.4.6. Elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, při které dochází k migraci nabitých částic. Separuje se DNA, RNA nebo proteiny na základě jejich pohyblivosti, jež je dána jejich velikostí. Pohyb v elektrickém poli od záporného pólu (katody) ke kladnému pólu (anodě) je dán záporně nabitým fosfátem v NK. Molekuly jsou separovány přes póry v gelu, které fungují jako síto a umožňují menším molekulám rychlejší pohyb k anodě. Je možné separovat molekuly v požadovaném rozmezí úpravou podmínek.

Obecně platí, že větší částice migrují pomaleji než menší. Existují však výjimky, protože některé molekuly jsou kruhové a jiné lineární, a tak procházejí gelem různě. Další výjimkou jsou plazmidy, jež mohou existovat ve formě supercoiled neboli nadšroubovicové vinutí. Tato forma jim umožňuje rychlejší průchod gelem, než by na svou velikost měly mít.

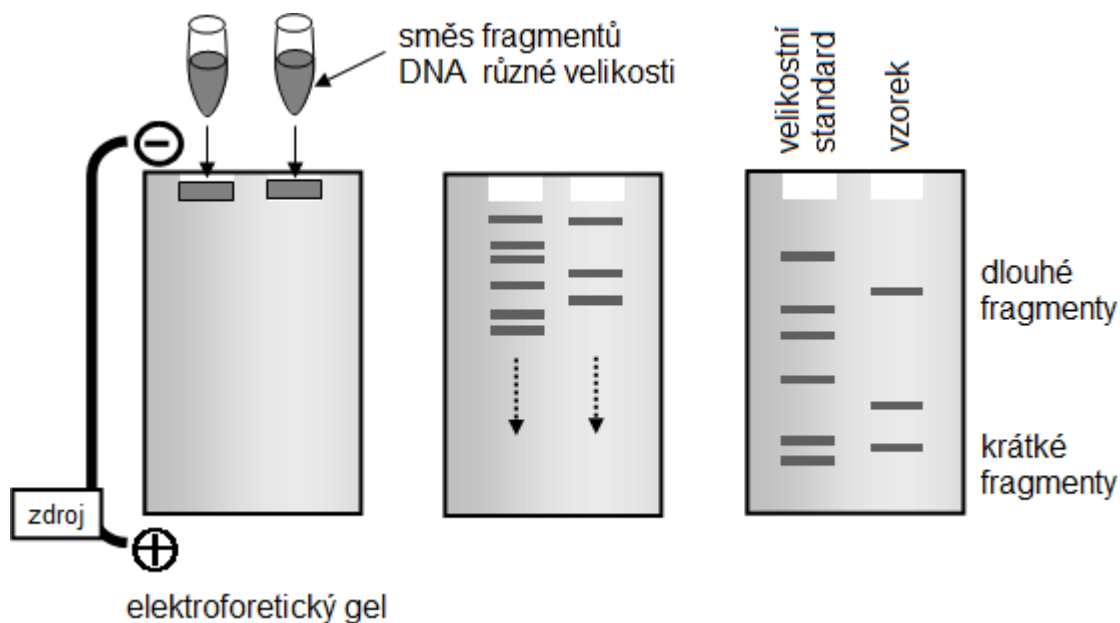
Jednotlivé molekuly se rozdělí podle své velikosti do fragmentů. Čím menší molekuly, tím dál budou od startovacího místa. Velikost fragmentů DNA je možné určit porovnáním se standardním měřítkem složeným z fragmentů DNA známých velikostí.

Gel pro separaci je často vyroben z agarózy. Tento polysacharid v suché, vločkovité formě, se zahřeje v pufru a po zchladnutí se přemění na pevný gel. Tento gel je tvořen molekulami agarózy spojenými pomocí vodíkových vazeb a tvoří póry. Jeho koncentrace závisí na předpokládané velikosti separovaných molekul. Gel má na jednom konci jamky, vytvořené pomocí tzv. hřebínku, kde se umísťuje vzorek. Ještě před přidáním vzorku se gel umístí do elektroforetické vany, která je připojena k elektrodám. Box je naplněn tlumivým roztokem se solí, který vede proud. Aby fragmenty migrovaly, musí se gel do vany umístit správně. Částice migrují od katody k anodě, a proto se část se vzorky umísťuje směrem ke katodě. Schéma elektroforézy je na obrázku 11.



Obrázek 11: Gelová elektroforéza, převzato a upraveno z [64].

Do jamek se nanese vzorky obarvené barvivem, díky kterému je migrace molekul vidět. Do jedné z jamek se nanese standard se známými velikostmi fragmentů DNA. Pomocí něho se následně určují velikosti fragmentů vzorku [65, 66, 67, 68]. Rozdělení fragmentů podle velikosti je zobrazeno na obrázku 12.



Obrázek 12: Schéma gelové elektroforézy, převzato a upraveno z [69].

2. Praktická část

2.1. Chemikálie

2.1.1. Použité kity

- DEP-25 DNA Extraction Kit od firmy Top-Bio
- EliGene Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit od firmy Elisabeth Pharmacon
- Kit for isolation of DNA from microorganisms od firmy Generi Biotech

2.1.2. Ostatní chemikálie

- Agaróza (Sigma-Aldrich)
- DNA marker 200-1500 (Top-Bio)
- Ethanol 95% a 70% (Lach-Ner)
- Ethidium bromid (Top-Bio) 10 mg/l
- Extrakční roztok (roztok A + roztok B 1:1)
- LB médium – Luria-Bertani (Duchefa Biochemie)
- Octan sodný (NaOAc) 3M, pH 5,2 (Penta)
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
 - 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,42 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄
- PCI: fenol-chloroform-isoamylalkohol 50:50:1 (Sigma-Aldrich)
- PCR ethidium bromid (Top-Bio)
- PCR vkládací pufr (Top Bio)

- Roztok A
 - 0,2 M NaCl, 20 mM EDTA, 10% SDS (sodium dodecylsulphate)
- Roztok B
 - 100 mM TRIS-HCl, pH 5,7
- TBE (Tris-borát-EDTA) pufr
 - 108 g Tris substance, 55 g kyseliny borité a 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; směs se doplní destilovanou vodou na 1 litr a pro účely pokusu se ředí 1:10

2.2. *Používaný kmen*

- Kmen *P. aeruginosa* – CCM1960 – Česká sbírka mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně

2.3. *Přístroje*

- Blokovaný termostat SBH 200D (Stuart)
- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- Centrifuga Sorvall LYNX 6000 (Thermo Scientific)
- Enviromental Shaker-Incubator ES-20/60 (Biosan)
- FTIR spektrometr Nicolet 6700 s ATR nástavcem Pike MIRacle™ osazený krystalem ZnSe (Scinco)
- Inkubátor INCU-Line (VWR)
- Mikrovlnná trouba (LG)
- PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad)
- Třepačka Reax Top (Heidolph)
- UV transluminátor (Ultra-Lum)
- Váhy EMB 200-3 (Kern)

2.4. *Ostatní materiály*

- Elektroforetická vana
- Erlenmayerova baňka
- Hřebínek
- Plastový materiál na jednorázové použití (bakteriologické misky, pipetovací špičky, rukavice, mikrozkušavky, zkumavky)
- Odměrný válec
- Parafilm
- Skleněné korálky – acid washed, 425-600 μm (Sigma-Aldrich)

2.5. Metodika

2.5.1. Kultivace *Pseudomonas aeruginosa*

Vzorek *P. a.* zmražený na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se naočkoval na Luria-Bertani (LB) agar a inkuboval se v termostatu po dobu 24 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po inkubaci se narostlé mikroorganismy převedly pomocí sterilního párátko do 5 ml tekutého LB média. Dále se daly do třepačky na 24 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla u vzorku změřena optická hustota (OD) při 600 nm. OD u všech vzorků byla přibližně 1,2. Vzorek byl odstředován 5 minut při 3000 RPM. Vzniklá peleta byla převedena do mikrozkušavky a připravena na izolaci.

2.5.2. Fenol-chloroformová extrakce

Buňky byly převedeny do sterilní mikrozkušavky a odstředovány 5 minut při 3000 otáčkách za minutu (RPM), supernatant byl odstraněn. Peleta byla resuspendována v 0,6 ml extrakčního roztoku, bylo přidáno 0,6 ml fenol-chloroform-isoamylalkoholu (PCI). Suspenze byla převedena do zkumavky se skleněnými korálky. Následovalo promíchávání 5 min pomocí vortexu při maximální rychlosti a odstředování na centrifuze 5 min při 13 000 RPM. Horní vodná fáze byla převedena do nové mikrozkušavky. K ní bylo přidáno 500 μl roztoku PCI, směs se promíchala pomocí vortexu a opět odstředila 5 min při 13 000 RPM. Vodná fáze byla opět převedena do nové mikrozkušavky, bylo přidáno 35 μl octanu sodného (3 M, pH 5,2) a 1 ml 95% ethanolu. Roztok byl promíchán a dal se na 30 min srážet do mrazáku. Po srážení byl roztok odstředován 5 min při 13 000 RPM, supernatant byl odstraněn a peleta opláchnuta v 75% ethanolu. Nakonec byla peleta resuspendována v 50 μl sterilní vody.

2.5.3. Izolace DNA sadou od firmy Generi Biotech

Bakteriální kultura se odstředovala 2 min při 13 400 RPM a následně byl odstraněn supernatant. Peleta se resuspendovala v 180 μl Buffer BL0. Dále bylo přidáno 25 μl proteinasy K a zkumavka se promíchala pomocí vortexu. Směs se inkubovala v blokovém termostatu 45 min při $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorek se promíchal pomocí vortexu a odstředoval se 5 s při 3000 RPM. Do vzorku se přidalo 200 μl roztoku Buffer BL1. Vzorek se promíchal pomocí vortexu, krátce se odstředoval při 3000 RPM a inkuboval 10 min při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zkumavka se 5 s odstředovala při 3000 RPM a přidalo se do ní 210 μl 96% ethanolu. Vzorek se promíchal pomocí vortexu a odstředoval 5 s při 3000 RPM. Kolonka se umístila do 2 ml sběrné zkumavky a přepipetoval se na ni vzorek. Vzorek se odstředoval 1 min při 13 400 RPM. Sběrná zkumavka s filtrátem se odstranila a kolonka se vložila do nové sběrné zkumavky. Na kolonku se

napipetovalo 500 μ l Buffer BL2. Směs se centrifugovala 1 min při 13 400 RPM. Tekutina ze sběrné zkumavky se odstranila a kolonka se vložila zpět do sběrné zkumavky. Na kolonku se napipetovalo 600 μ l Wash Buffer BL3 a byla odstředována 2 min při 13 400 RPM. Sběrná zkumavka s filtrátem se odstranila a kolonka se vložila do nové 1,5 ml zkumavky. Na kolonku se napipetovalo 100 μ l Buffer BL4 předeřátého na 70 °C. Směs se inkubovala 1 min při laboratorní teplotě a následně se odstředovala 1 min při 13 400 RPM. Kolonka se odstranila. Sběrná zkumavka obsahovala genomovou DNA.

2.5.4. Izolace DNA sadou od firmy Elizabeth Pharmacon

Byl připraven lyzační roztok smícháním 5 μ l Solution M a 1 ml Lysis Buffer. Do 1,5 ml zkumavky se napipetovalo 200 μ l vzorku. Ke vzorku se přidalo 200 μ l lyzačního roztoku a vše se promíchalo na vortexu. Obsah se prepipetoval do kolonky ve sběrné zkumavce a odstředoval při 12 000 RPM po dobu 1 min. Filtrát se odstranil a sběrná zkumavka znovu použila. Do kolonky se přidalo 500 μ l Wash Buffer 1 a kolonka se odstředovala při 12 000 RPM po 1 min. Filtrát se odstranil a zkumavka znovu použila. Do kolonky se přidalo 500 μ l Wash Buffer 2 a odstředovala se 1 min při 12 000 RPM. Filtrát se odstranil a sběrná zkumavka se tentokrát vyhodila. Kolonka se vložila do nové sběrné zkumavky a odstředovala 1 min při 12 000 RPM, aby došlo k úplnému odstranění ethanolu. Kolonka se vložila do nové sběrné zkumavky, přidalo se 50 μ l Elution Buffer. Po 1 min stání se roztok odstředoval 1 min při 12 000 RPM. Kolonka se odstranila a DNA ze zkumavky se převedla do zkumavky s víčkem.

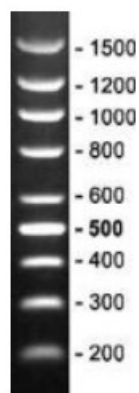
2.5.5. Izolace DNA sadou od firmy Top-Bio

Do mikrozkušavky se přenesla buněčná kultura v PBS. Buňky se odstředovaly tak, aby vznikla peleta a supernatant se odstranil. K buňkám se přidalo 75 μ l DEP-25 START-Blue reagens tak, aby byly kompletně ponořeny v reagens. Vzorek se 10 minut zahřívá na 95 °C v termobloku. Vzorek se ochladil na pokojovou teplotu. Přidalo se 75 μ l DEP-25 STOP reagens a obsah se promíchal. Po přidání STOP reagens se START-Blue odbarvil. Zkušavka obsahovala vyizolovanou templátovou DNA.

2.5.6. Elektroforéza

Mikrozkušavky se vzorky vyizolované DNA se vyjmuly z mrazáku a nechaly se rozmraznout při laboratorní teplotě. Do baňky se navázilo 0,6 g agarózového prášku a následně se přidalo 60 ml TBE pufru. Suspenze agarózy byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Roztok se ochladil pod tekoucí vodou na 50 °C a byly do něho přidány 4 μ l roztoku ethidium bromidu (10 mg/ml). Po promíchání se roztok přelil do elektroforetické vany

s vloženým hřebínkem. Vzniklé bubliny se odstranily. Gel se nechal 20 minut ztuhnout. Nosič gelu s gelem se otočil tak, aby jamky pro nanášení byly blíže katodě, protože DNA putuje v alkalickém prostředí k anodě. Vertikálním tahem byl hřebínek vyjmut. Do elektroforetické vany se nalil TBE pufr, tak aby došlo k vodivému spojení s elektrodami. Na parafilm se napipetovaly 2 μ l nanášecího pufru a 10 μ l vzorku DNA. Kapky se promísily a vzorky se nanasly mikropipetou do jamek. Do každé jamky se nanaslo 10 μ l vzorku. Do první jamky bylo nanaseno 6 μ l markeru molekulových hmotností smíchaných se 2 μ l nanášecího pufru. Po nanasení vzorku se uzavřela elektroforetická vana víkem a připojila se ke zdroji elektrického napětí s nastavením na 110 V. Bromfenolová modř začala po několika minutách migrovat z jamek směrem k anodě. Elektroforéza se nechala běžet asi 40 minut. Následně se vypnul zdroj elektrického napětí a odpojily se kabely. Gel se vyjmul z vany a přenesl se na UV transluminátor, kde se prohlížel v UV světle přes UV filtr. Molekuly DNA s navázaným ethidium bromidem v UV světle fluoreskovaly.



Obrázek 13: Marker molekulových hmotností 200-1500 bp [70].

2.6. Výsledky

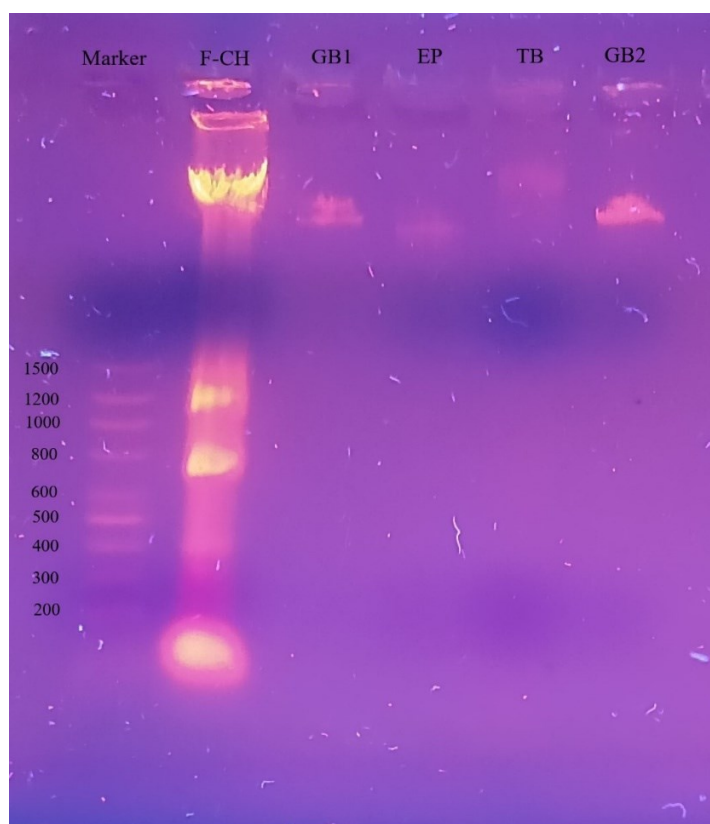
Podle zaznamenaných výsledků (tabulka 1) jsme zjistili, že největší množství DNA se získalo pomocí sady od firmy Top Bio. Vyextrahovalo se 457,32 ng/ μ l DNA. Z hodnoty čistoty však plyne, že byla velmi znečištěna proteiny. Při fenol-chloroformové extrakci se získalo druhé největší množství DNA a to 228,81 ng/ μ l o čistotě 2,06. To vypovídá o mírném znečištění ribonukleovou kyselinou a organickými látkami. Sadou od Generi Biotech se extrahovalo 112,6 ng/ μ l DNA o čistotě 2,08, což stejně jako u fenol chloroformové extrakce značí znečištění ribonukleovou kyselinou a organickými látkami. Nejmenší množství DNA bylo získáno

pomocí sady od Elisabeth Pharmacon a to 38,26 ng/μl o čistotě 1,45. DNA byla tedy znečištěna proteiny.

Tabulka 1: Shrnutí výsledků.

Metoda izolace	Čistota	Koncentrace [ng/μl]
Fenol-chloroformová extrakce	2,06	228,81
Generi Biotech	2,08	112,60
Elisabeth Pharmacon	1,45	38,26
Top Bio	1,26	457,32

Z výsledku elektroforézy (obrázek 14) lze pouze odhadnout velikost fragmentů DNA, protože DNA ze všech izolací je mimo hodnoty DNA markeru. Fragmenty všech izolací mají velikost kolem 3000 párů bází. U fenol-chloroformové extrakce se vyskytovaly mimo jiné fragmenty o velikosti 1200, 800 a přibližně 100 párů bází, což nám značí, že DNA byla znečištěna RNA.



Obrázek 14: Gel z elektroforézy v UV světle: F-CH - DNA získaná fenol-chloroformovou extrakcí, GB - DNA vyizolovaná sadou od firmy Generi Biotech, EP - DNA extrahovaná sadou od firmy Elisabeth Pharmacon, TB - DNA izolovaná sadou od Top-Bio.

3. Závěr

Cílem této práce bylo prozkoumat různé metody izolace DNA u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Dále jednotlivé metody a sady porovnat z hlediska čistoty a výtěžku.

Teoretická část se zabývá rodem *Pseudomonas*, jehož zástupci jsou přítomni všude v přírodě. Jako pokusný mikroorganismus jsme používali bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Ačkoliv se jedná o oportunní patogen, může způsobit závažné infekce dýchacích cest u pacientů s cystickou fibrózou. Je to velmi rezistentní bakterie s mnoha faktory virulence. Díky tvorbě odolného biofilmu se těžko odstraňuje z povrchů, které kolonizuje. Pro bakterii jsou typické čtyři pigmenty, jež jsou též faktory virulence.

Izolace DNA je důležitou součástí molekulární biologie. Získaná nukleová kyselina se následně používá pro nejrůznější účely. V práci jsou uvedeny tři druhy izolace. Starší, ale stále využívanou metodou je fenol-chloroformová extrakce. Jako další je adsorpce na silikátové kolonky, kde se využívá přichycení DNA na silikagel. Poslední uvedenou metodou je poměrně moderní adsorpce na magnetické částice, která z finančních důvodů nebyla provedena.

V praktické části jsme provedli čtyři izolace. Jako první jsme provedli fenol-chloroformovou extrakci. Ačkoliv je tato metoda starší, měla relativně dobré výsledky. Získali jsme při ní druhé největší množství DNA, která však byla znečištěna ribonukleovou kyselinou a organickými látkami, což jsme si potvrdili i pomocí elektroforézy. Izolaci na silikátové kolonky jsme dělali dvěma sadami, a to od firmy Generi Biotech a Elisabeth Pharmacon. U obou sad jsme získali poměrně malý výtěžek. DNA získaná sadou od Generi Biotech byla znečištěna ribonukleovou kyselinou a organickými látkami. Sadou od firmy Elisabeth Pharmacon jsme získali nejmenší množství DNA a byla znečištěna proteiny. Poslední izolaci jsme provedli pomocí sady od firmy Top Bio. Tuto izolaci jsme prováděli dvakrát, protože poprvé došlo k odbarvení směsi již před přidáním STOP reagens a po izolaci směs obsahovala nerozpuštěné části kolonií. Při druhém pokusu směs reagovala podle očekávání a získali jsme největší množství DNA. Tato DNA však byla silně znečištěna proteiny. Shrnutím výsledků tedy můžeme říct, že metodu izolace si vždy musíme vybrat podle toho, k jakým účelům budeme DNA dále používat, tzn. v jak velké koncentraci a čistotě DNA potřebujeme.

4. Seznam použité literatury

- [1] MARTINEZ, Augusto Julio a kol. *Medical Microbiology* [online]. 4th ed. 1996 [cit. 2022-03-28]. ISBN 10: 0-9631172-1-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>
- [2] Genus *Pseudomonas*. FEINER, Gerhard. *Meat Product Handbook: Practical Science and Technology* [online]. Elsevier Science, 2006 [cit. 2022-03-29]. ISBN 9781845691721. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C5TRI1/meat-products-handbook/genus-bacillus>
- [3] TODAR, Kenneth. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- [4] GOMILA, Margarita, Arantxa PENYA, Magdalena MULET, Jorge LALUCAT a Elena GARCÍA-VALDÉS. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.00214
- [5] *Pseudomonas* Media and Tests: DETECTION, IDENTIFICATION, DIFFERENTIATION, AND CULTIVATION OF *PSEUDOMONAS* SPECIES. *Merck* [online]. Germany: Merck, 2022 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/food-and-beverage-testing-and-manufacturing/microbiological-analysis-for-food-and-beverage/pseudomonas-media>
- [6] WISPLINGHOFF, Hilmar a Harald SEIFERT. *Pseudomonas spp., Acinetobacter spp.* and miscellaneous Gram-negative bacilli. *Infectious Diseases* [online]. Elsevier, 2010, 1704-1727 [cit. 2022-04-28]. ISBN 9780323045797. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-04579-7.00170-2
- [7] IGLEWSKI, Barbara H. *Pseudomonas*. MARTINEZ, Augusto Julio a kol. *Medical Microbiology* [online]. 4th. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996 [cit. 2022-04-11]. ISBN 10: 0-9631172-1-1. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/?fbclid=IwAR1I0UF-DJy2k_EhMPJ4cUYbYIW8iWbV3lqIEa4pqMvGFpJO_hT1AxEZkKA

- [8] BERGEAU, Dorian, Sylvie MAZURIER, Corinne BARBEY, et al. Unusual extracellular appendages deployed by the model strain *Pseudomonas fluorescens* C7R12. *PLOS ONE*. 2019, **14**(8). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0221025
- [9] SCALES, Brittan S., Robert P. DICKSON, John J. LIPUMA a Gary B. HUFFNAGLE. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, **27**(4), 927-948. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00044-14
- [10] SUZUKI, Masato, Satowa SUZUKI, Mari MATSUI, Yoichi HIRAKI, Fumio KAWANO a Keigo SHIBAYAMA. Genome Sequence of a Strain of the Human Pathogenic Bacterium *Pseudomonas alcaligenes* That Caused Bloodstream Infection. *Genome Announcements*. 2013, **1**(5), e00919-13. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.00919-13
- [11] RALSTON-BARRETT, E., N. J. PALLERONI a M. DOUDOROFF. Phenotypic Characterization and Deoxyribonucleic Acid Homologies of the "*Pseudomonas alcaligenes*" Group. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1976, **26**(4), 421-426. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-26-4-421
- [12] WEIMER, Anna, Michael KOHLSTEDT, Daniel C. VOLKE, Pablo I. NIKEL a Christoph WITTMANN. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, (104), 7745-7766. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9
- [13] THOMAS, Benjamin S., Koh OKAMOTO, Matthew J. BANKOWSKI a Todd B. SETO. A Lethal Case of *Pseudomonas putida* Bacteremia Due to Soft Tissue Infection. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2013, **21**(3), e13-e15. ISSN 1056-9103. Dostupné z: doi:10.1097/IPC.0b013e318276956b
- [14] MORADALI, M. Fata, Shirin GHODS a Bernd H. A. REHM. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017, **7**. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00039

- [15] TRAN THI, Minh Tam, David WIBOWO a Bernd HA REHM. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, (vol 21), **25** [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- [16] JURADO-MARTÍN, Irene, Maite SAINZ-MEJÍAS a Siobhán MCCLEAN. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(6), 35. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:[10.3390/ijms22063128](https://doi.org/10.3390/ijms22063128)
- [17] ALONSO, Beatriz, Laia FERNÁNDEZ-BARAT, Ernea Gino DI DOMENICO, et al. Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infectious Diseases: Infectious Diseases*. 2020, **20**(909). Dostupné z: doi:[org/10.1186/s12879-020-05534-1](https://doi.org/10.1186/s12879-020-05534-1)
- [18] VASIL, Michael L. "*Pseudomonas aeruginosa*." Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *The Journal of Pediatrics* [online]. Denver: University of Colorado Medical School, 1986, 108(number 5), 800-805 [cit. 2022-06-27]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(86\)80748-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(86)80748-X)
- [19] BEN-DAVID, Yossi, Elena ZLOTNIK, Itzhak ZANDER, Gal YERUSHALMI, Sivan SHOSHANI a Ehud BANIN. SawR a new regulator controlling pyomelanin synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*. 2018, **206**, 91-98. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:[10.1016/j.micres.2017.10.004](https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.004)
- [20] RAJYAGURU, Neal, Ana VELEZ, Ramon L. SANDIN, Abraham T. YACCOUB a John N. GREENE. Pyorubin Producing *Pseudomonas* Scalp Infection. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2014, **22**(4), e91-e92. ISSN 1056-9103. Dostupné z: doi:[10.1097/IPC.0000000000000151](https://doi.org/10.1097/IPC.0000000000000151)
- [21] CORRY, Janet E. L., Gordon D. W. CURTIS a Rosamund M. BAIRD. *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology* [online]. 3. The Royal Society of Chemistry, 2012 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: https://app.knovel.com/kn/resources/kpHCMFWME3/toc?issue_id=kt00AA14JE&hierarchy=undefined

- [22] NEWMAN, Hans. *microbiologypictures.com* [online]. [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/pseudomonas-aeruginosa-photos/pseudomonas-aeruginosa-fluorescence.html>
- [23] PYOCYANIN. *Merck* [online]. [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/p0046>
- [24] SALISU, Nurudeen. *Different strains of Pseudomonas aeruginosa producing different pigments* [online]. [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://www.kooapp.com/koo/NSMaishinkapha/31458688-d0d8-44b6-aa7e-ca000ec823b7>
- [25] RUFFIN, Manon a Emmanuelle BROCHIERO. Repair Process Impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in Epithelial Tissues. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019, **9**. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2019.00182
- [26] TÜMMLER, Burkhard. Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000Research*. 2019, **8**. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.19509.1
- [27] BATRA, Sahil. *Paramedics World: Developed To Incredible Paramedics* [online]. [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://paramedicsworld.com/pseudomonas-aeruginosa/morphology-culture-characteristics-of-pseudomonas-aeruginosa/medical-paramedical-studynotes>
- [28] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0.
- [29] NOSRATI, Rahim, Sadegh DEHGHANI, Bahareh KARIMI, Meysam YOUSEFI, Seyed Mohammad TAGHDISI, Khalil ABNOUS, Mona ALIBOLANDI a Mohammad RAMEZANI. Siderophore-based biosensors and nanosensors; new approach on the development of diagnostic systems. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, **117**, 1-14 [cit. 2022-03-23]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2018.05.057

- [30] NEIDLER, Sarah. What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR?. *Enzo* [online]. [cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>
- [31] *Pseudomonas aeruginosa*. *Univerzita Karlova* [online]. [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/rep/psae.htm>
- [32] LABAUVE, Annette E. a Matthew J. WARGO. Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Protocols in Microbiology*. 2012, **25**(1). ISSN 1934-8525. Dostupné z: doi:10.1002/9780471729259.mc06e01s25
- [33] SYED, Yahiya Y. Cefiderocol: A Review in Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2021, **81**(13), 1559-1571. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-021-01580-4
- [34] CHEN, Wen-Sen, Fu QIAO, Yue YANG, et al. Interpretation and clinical practice of regulation for prevention and control of healthcare associated infection in outpatient and emergency department in healthcare facilities. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2019, **7**(1), 10-10 [cit. 2022-03-25]. ISSN 23055839. Dostupné z: doi:10.21037/atm.2018.12.05
- [35] Deoxyribonucleic acid / DNA. *Scitable: by nature education* [online]. 2014 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/definition/dna-deoxyribonucleic-acid-107/>
- [36] DNA: Chemical compound. *Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, 2022 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/DNA>
- [37] MINCHIN, Steve a Julia LODGE. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Portland press*. Portland Press Limited, 2019, (63), 24. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20180038
- [38] RICKE, Steven C., Turki M. DAWOUD a Young Min KWON. Application of Molecular Methods for Traceability of Foodborne Pathogens in Food Safety Systems. *Food Safety*. Elsevier, 2015, 37-63. ISBN 9780128002452. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800245-2.00004-6

- [39] PEŠKOVÁ, Marcela. *SlidePlayer* [online]. [cit. 2022-03-16]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/6077889/>
- [40] ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Molecular biology of the cell* [online]. 4th ed. New York: Garland Science, 2002 [cit. 2022-03-24]. ISBN 08-153-3218-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/>
- [41] DNA structure and function. *Khan Academy* [online]. 2008 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biomolecules/dna/a/dna-structure-and-function>
- [42] PRAY, Leslie A. *Scitable by nature education* [online]. [cit. 2022-03-16]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397/>
- [43] What is DNA?. *Medline Plus: Trusted Health Information for You* [online]. National Library of Medicine, 2021 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/basics/dna/>
- [44] TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, 1-10. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398
- [45] J SHETTY, Preetha. *The Evolution of DNA Extraction Methods*. 2020, **8**(1), 39-45. ISSN 26421747. Dostupné z: doi:10.34297/AJBSR.2020.08.001234
- [46] DAHM, Ralf. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* [online]. 2005, **278**(2), 274-288 [cit. 2022-05-17]. ISSN 0012-1606. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>
- [47] ŠÁNA, Jiří, Ondřej SLABÝ, Andrej BEŠŠE, Jaroslav JURÁČEK, Pavel LÍZAL, Jana NEKVINDOVÁ a Lenka RADOVÁ. Úvod do molekulární medicíny: cvičení (biomarkerové studie). 1. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8538-1.

- [48] BURNS, Malcom, Lucy FOSTER a Michael WALKER. DNA Techniques to Verify Food Authenticity: Applications in Food Fraud [online]. Royal Society of Chemistry, 2020 [cit. 2022-03-24]. ISBN 978-1-5231-4161-6. Dostupné z: https://app.knovel.com/kn/resources/kpDNATVFA1/toc?issue_id=kt012VPMU1&hierarchy=undefined
- [49] GERCZEI, Timea a Scott PATTISON. Biochemistry Laboratory Manual for Undergraduates. Elsevier [online]. 2014, 8 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010RE6N2/biochemistry-laboratory/column-purification>
- [50] Different Types of DNA Extraction Methods. Genetic Education [online]. 2022, [cit. 2022-05-17]. Dostupné z: https://geneticeducation.co.in/different-types-of-dna-extraction-methods/#Different_types_of_DNA_extraction_methods
- [51] DHALIWAL, Anandika. DNA Extraction and Purification. Materials and Methods [online]. 2013, 3(5) [cit. 2022-05-17]. ISSN 2329-5139. Dostupné z: [doi://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.191](https://doi.org/10.13070/mm.en.3.191)
- [52] PANDA, Barsa Baisalini, Arup Shankar MEHER a Rupenangshu Kumar HAZRA. Srovnání mezi různými metodami izolace DNA ze sušených krevních skvrn pro stanovení malárie za účelem stanovení specifčnosti a nákladové efektivity. Journal of Parasitic Diseases [online]. 2019, 43 (3), 337-342 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: [doi:10.1007/s12639-019-01136-0](https://doi.org/10.1007/s12639-019-01136-0)
- [53] FENOL-CHLOROFORMOVÁ EXTRAKCE DNA. OneLab [online]. [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://onelab.andrewalliance.com/library/phenol-chloroform-gdna-extraction-8ZnNjAb>
- [54] Silikagely. Silcarbon [online]. [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://www.silcarbon.cz/inpage/silikagely/>
- [55] Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek. Lab Guide [online]. 2019 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-dna-pomoci-gravitacnich-kolonek/>

- [56] SCHRÖFFELOVÁ, Daniela, Lucie NĚMCOVÁ, Jarmila HROMÁDKOVÁ, Josef KUČERA, David LIPOVSKÝ, Vladimír ŠTEIGER a Michaela PŘIBÁŇOVÁ. Optimalizace odběru alternativních biologických vzorků pro návaznou kvalitní izolaci genomické DNA. Českomoravská společnost chovatelů. 2018, 24. ISSN 978-80-87633-01-4.
- [57] IZOLACE DNA POMOCÍ KOLONEK. Doba genová [online]. [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://doba-genova.cz/izolace-dna/>
- [58] VLČNOVSKÁ, Marcela, Kristýna ŠMERKOVÁ, Simona DOSTÁLOVÁ, Jiří SOCHOR a René KIZEK. Izolace DNA pomocí magnetizovatelných částic a jejich využití v diagnostice nádorových onemocnění. Linkos: Lékař a multidisciplinární tým [online]. Česká onkologická společnost J.E.P., [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/izolace-dna-pomoci-magnetizovatelnych-castic-a-jejich-vyuziti-v-diagnostice-nado/>
- [59] Izolace DNA z mléčných a probiotických výrobků pomocí magnetických mikročástic. Mlékárenské listy. Praha: MILCOM a.s.-Výzkumný ústav mlékárenský v Praze ve spolupráci s Českomoravským svazem mlékárenským a s Českým národním komitétem IDF., 2011, (126), 7-10.
- [60] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Applied Microbiology and Biotechnology. 2006, 73(3), 495-504. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0675-0
- [61] CHEN, Yanju, Yang LIU, Ya SHI, Jianfeng PING, Jian WU a Huan CHEN. Magnetic particles for integrated nucleic acid purification, amplification and detection without pipetting. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2020, 127. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2020.115912
- [62] How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?. Promega [online]. Promega corporation, 2022 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>

- [63] How to determine the concentration and purity of a DNA sample?. Hercuvan: Lab Systems [online]. 2022 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://hercuvan.com/how-to-determine-the-concentration-and-purity-of-a-dna-sample/>
- [64] GELOVÁ ELEKTROFORÉZA. Khan Academy [online]. [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
- [65] LOPEZ, Fernando Silva, Daniela DANIEL a Claudimir Lucio DO LAGO. Electrophoresis. Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications [online]. 2nd. Elsevier, 2020, s. 499-523 [cit. 2022-04-04]. ISBN 978-0-12-813267-8. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpCAFTA02/cid:kt012LJIX1/viewerType:khtml//root_slug:chemical-analysis-food/url_slug:electrophoresis?b-q=electrophoresis&include_synonyms=no&sort_on=default&page=1&view=collapsed&zoom=1&q=electrophoresis
- [66] Gel electrophoresis. Khan Academy [online]. 2006 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
- [67] Elektroforetická separace nukleových kyselin. Lab Guide [online]. 2019 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
- [68] Electrophoresis. National Human Genome Research Institute [online]. 1988 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis>
- [69] GELOVÁ ELEKTROFORÉZA. Molekulární biologie - VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat [online]. [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
- [70] ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE DNA MARKERU 200-1500. Top Bio [online]. [cit. 2022-06-23]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/dna-markery-1-20.html?dna-marker-200-1500>