

Identifikace a kvantifikace genů zodpovědných za produkci biogenních aminů u vybraných bakterií

Bc. Veronika Málková

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Málková**
Osobní číslo: **T13363**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Identifikace a kvantifikace genů zodpovědných za produkci biogenních aminů u vybraných bakterií**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši, která se bezprostředně týká daného tématu. Pozornost zaměřit zejména na metodu Real Time-PCR.
2. Zavést metodu Real Time-PCR pro detekci vybraného genu.
3. Analyzovat genovou expresi relativní kvantifikací.
4. V závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty s reálnými vzorky.
5. Teorii, metodiku, výsledky experimentů a diskusi sepsat do formy diplomové práce.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecké databáze (Web of Science), vědecká a odborná literatura.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2016

Ve Zlíně dne 2. února 2016

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: MÁLONOVÁ VERONIKA.....

Obor: IOFP.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16.5......

Veronika Malonová.....

²¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

²²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

²³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce se zabývá zavedením a optimalizací metody Real time-PCR pro detekci a kvantifikaci genu *adiA*. Tento gen kóduje arginindekarboxylasu, enzym, který je zapojen v metabolické dráze produkce putrescinu u gramnegativních bakterií. Putrescin je jeden z biogenních aminů; je to látka v potravinách nežádoucí, protože její výskyt je spojován s kažením potravin.

V rámci diplomové práce byly speciálně pro Real time-PCR navrženy specifické sady primerů, které slouží k ohraničení úseku DNA (v genu *adiA*), který má být sledován a dále amplifikován. Bylo potvrzeno, že vybraná/použitá sada primerů je opravdu specifická a reakce probíhají s optimální účinností (90 – 110 %).

V průběhu práce byla sledována genová exprese genu *adiA*, metodou relativní kvantifikace (dle Pfaffla), u *Escherichia coli* CCM 3954 v závislosti na časových podmínkách kultivace. Nejvyšší exprese ($R= \sim 2000$) genu *adiA* bylo dosaženo po 12 hodinách kultivace této bakterie v kultivačním médiu s přidavkem L-argininu. Toto zjištění potvrzuje fakt, že gen *adiA* je opravdu genem indukibilním.

Klíčová slova: putrescin, Real time-PCR, relativní exprese, *adiA*

ABSTRACT

The present thesis deals with an implementation and optimization of the Real time-PCR method for a detection and quantification of the *adiA* gene. This gene is able to encode an arginine decarboxylase enzyme, which is involved in the metabolic pathway of putrescine production in gramnegative bacteria. It is known that putrescine belongs to the group of biogenic amines, and it is an undesirable substance in food because its occurrence is often associated with deterioration of foodstuffs. In the experimental part of this thesis, specific sets of primers were designed specifically for the Real-time PCR. These sets of primers were used for a determination of a particular DNA section in the *adiA* gene that was further studied and amplified. It was found that the used sets of primers are truly specific with optimum reaction efficiency varied between 90 to 110 percent. Further, gene expression of the *adiA* gene has been monitored by using Relative Quantification method (Pfaffl) in

Escherichia coli CCM 3954 during different time cultivation. The highest expression of the *adiA* gene in CCM 3954 ($R = \sim 2000$) was achieved after 12 hours of cultivation in growth medium supplemented with L-arginine. It may be concluded that this finding clearly confirms the inducibility of the *adiA* gene.

Keywords: putrescine, Real time-PCR, relative expression, *adiA*

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce paní Mgr. Petře Jančové, PhD. a konzultantce Ing. Kristýně Maršákové za jejich vedení, trpělivost, vstřícnost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování práce věnovaly. Dále bych ráda poděkovala laborantce mikrobiologické laboratoře paní Bc. Veronice Kučabové, za její pomoc při práci v laboratoři. Také bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za podporu během studia a při sepisování této práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIOGENNÍ AMINY	13
1.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	13
1.2 VZNIK	14
1.3 KLASIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	14
1.4 VÝZNAM	14
1.5 TOXIKOLOGICKÉ EFEKTY	15
1.6 VÝSKYT	17
1.7 METODY REGULACE MNOŽSTVÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	18
1.8 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	20
1.8.1 Analytické metody stanovení biogenních aminů v potravinách	20
1.8.2 Kvantifikace genů kódující dekarboxylační enzymy u bakterií pomocí molekulárně biologických metod	20
2 POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	22
2.1 POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	22
2.2 SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI	22
2.3 PRŮBĚH PCR REAKCE	24
2.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRŮBĚH PCR	26
2.5 VYUŽITÍ	26
2.6 DETEKCE.....	27
2.7 REAL TIME-PCR.....	27
2.7.1 Využití.....	28
2.7.2 Detekce.....	28
2.7.3 SYBR GREEN I.....	28
2.7.4 Sondy TaqMan	30
2.7.5 Molekulární majáky	31
2.7.6 Scorpions.....	32
2.7.7 Vyhodnocení Real time-PCR.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	41
3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	42
4 MATERIÁLY A METODIKA	43
4.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	43
4.2 CHEMIKÁLIE A KULTIVAČNÍ MÉDIA	43
4.2.1 Chemikálie	43
4.2.2 Kultivační média	43
4.2.2.1 Minerální médium s přísadkou glukosy a směsí vitamínů	43
4.2.2.2 Masopeptonový bujon.....	44
4.2.3 Bakteriální kmen	44
4.3 IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA.....	44
4.3.1 Primery – návrh.....	45
4.3.1.1 Primery pro detekci genu adfA	45

4.3.1.2	Primery pro detekci referenčních genů	46
4.3.2	Primery – potvrzení funkčnosti (PCR, elektroforéza).....	47
4.4	KLASICKÁ PCR	48
4.5	AGAROSOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	48
4.6	IZOLACE BAKTERIÁLNÍ RNA.....	49
4.7	KONTROLA ČISTOTY A STANOVENÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ RNA	50
4.7.1	Spektrální stanovení RNA.....	50
4.8	PŘEPIS REVERZNÍ RNA NA cDNA	50
4.9	KULTIVACE <i>E. COLI</i> CCM 3954 V RŮZNÝCH ČASOVÝCH INTERVALECH	51
4.10	KULTIVACE <i>E. COLI</i> CCM 3954 V MLÉČE S/BEZ AMINOKYSELIN.....	51
4.11	REAL-TIME PCR.....	52
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
5.1	KONTROLA IZOLACE DNA	54
5.2	OVĚŘENÍ FUNKČNOSTI NAVRŽENÝCH PRIMERŮ METODOU TOUCHDOWN-PCR (TD-PCR), VELIKOSTI AMPLIKONU A VÝBĚR VHODNÉ SADY PRIMERU GENU <i>ADIA</i>	55
5.3	VÝBĚR VHODNÉ TEPLoty ANNEALINGU GENU <i>ADIA</i> CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
5.4	REAL TIME-PCR.....	56
6	ZÁVĚR.....	72
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	82
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM TABULEK.....	85

ÚVOD

Z hlediska bezpečnosti potravin a ochrany lidského zdraví je důležité sledovat chemické látky vyskytující se v potravinách. K těmto sledovaným látkám patří i biogenní aminy. V malých koncentracích jsou pro člověka nepostradatelné. Mají významné fyziologické, farmakologické účinky a vykazují významnou biologickou aktivitu. Ve vysokých koncentracích mohou způsobovat řadu zdravotních potíží. Mezi nejčastější znaky intoxikace způsobené vysokou koncentrací biogenních aminů v potravinách patří například bolesti hlavy, zvýšení nebo snížení krevního tlaku, dýchací potíže nebo zvracení. Množství biogenních aminů v potravinách indikuje také čerstvost a kvalitu potravin. Tvorba biogenních aminů je závislá na množství rostoucích dekarboxylujících bakterií. V potravinách jsou některé mikroorganismy s dekarboxylační aktivitou používány jako startovací kultury.

Biogenní aminy vznikají v potravinách dekarboxylací přirozených aminokyselin. Tato reakce je katalyzována enzymy nazývanými dekarboxylasy. Dekarboxylasy jsou produkovány některými druhy bakterií, nejčastěji bakteriemi mléčného kvašení. Při nadměrné tvorbě těchto dekarboxylačních enzymů může dojít k nežádoucímu kažení potravin nebo mohou tyto enzymy svou činností produkovat metabolity ohrožující lidské zdraví, a proto je velmi důležité detekovat geny kódující dekarboxylační enzymy. K detekci genů se používají metody molekulární biologie nebo instrumentální metody pro detekci a kvantifikaci jednotlivých biogenních aminů. Mezi instrumentální metody patří např. HPLC/MS. V posledních letech se daleko víc uplatňují pro svoji rychlost, spolehlivost a specifickou metodu molekulární biologie a to nejčastěji metody polymerasové řetězové reakce. Metoda polymerasové řetězové reakce spočívá v identifikaci DNA vyskytující se v genomu bakterií.

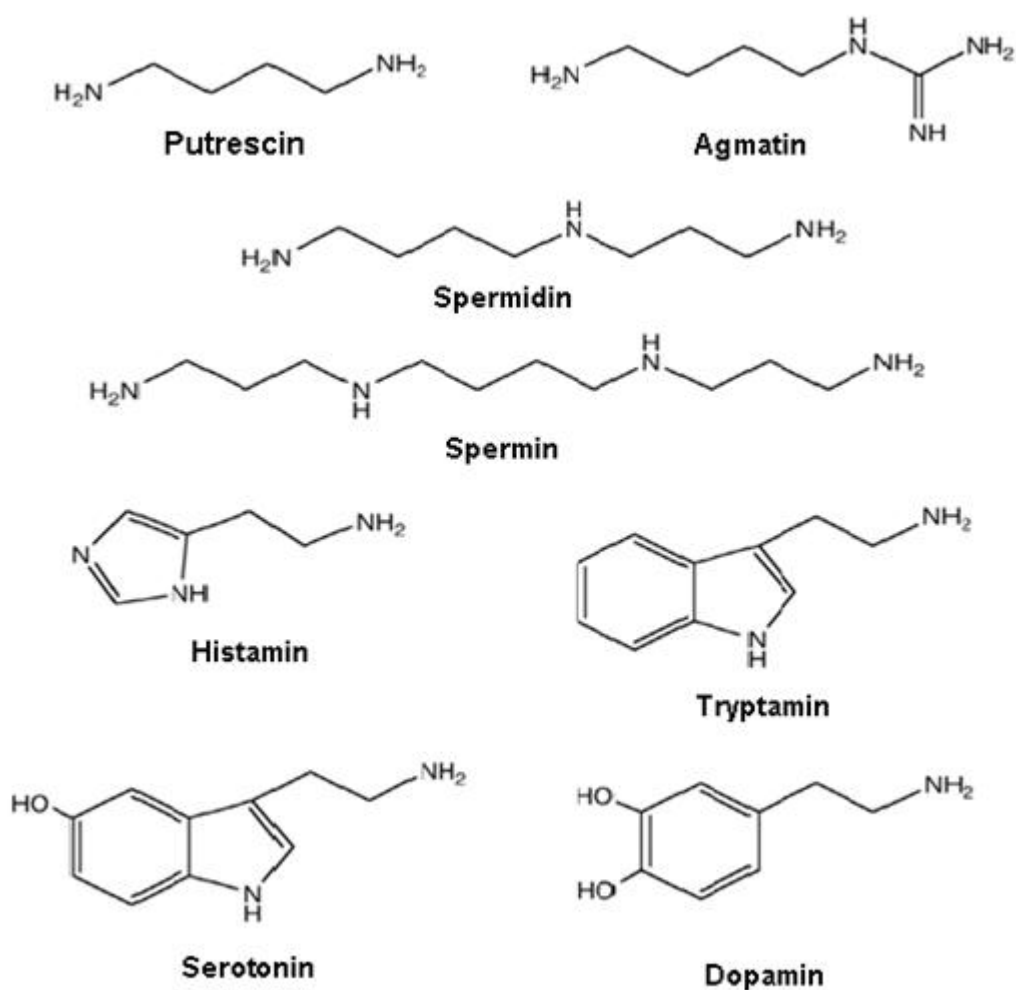
Tato diplomová práce se zabývá využitím jedné z modifikovaných metod molekulární biologie, a to polymerasovou řetězovou reakcí v reálném čase (Real time-PCR).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

1.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy jsou přírodní dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností. Taktéž jsou charakterizovány jako polykationty organického původu. Jsou skupinou alifatických, aromatických nebo heterocyklických bází odvozených od aminokyselin. Všechny biogenní aminy (viz obr. 1: Struktura biogenních aminů a polyaminů) obsahují jeden nebo více kladných nábojů a jsou tvořeny hydrofobní kostrou [1, 2, 3].



Obr. 1: Struktura biogenních aminů a polyaminů [4]

1.2 Vznik

Biogenní aminy jsou produkty metabolismu a nejčastěji vznikají v buňkách enzymovou dekarboxylací aminokyselin. Vytvářejí se a degradují jako produkty metabolické aktivity živočichů, rostlin a mikroorganismů. Vznikají i při aminaci a transaminaci aldehydů a ketonů [3, 4].

Název biogenních aminů je často odvozen od názvu aminokyseliny, ze které biogenní aminy vznikají [2].

U mikroorganismů jsou považovány za důležité pro syntézu biogenních aminů tyto předpoklady: dostupnost volných aminokyselin, přítomnost dekarboxylasa pozitivních mikroorganismů, podmínky umožňující dobrý růst bakterií a aktivní dekarboxylaci [4].

1.3 Klasifikace biogenních aminů

Biogenní aminy se rozlišují na základě jejich chemické struktury na [4]:

alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin)

aromatické (tyramin, β -fenylethylamin)

heterocyklické (histamin, tryptamin)

Dále mohou být klasifikovány podle počtu aminoskupin na: monoaminy, diaminy nebo polyaminy [4].

1.4 Význam

V lidském těle plní endogenně syntetizované biogenní aminy řadu funkcí. Důležitou roli sehrávají při buněčném metabolismu eukaryotických buněk. Jsou zdrojem dusíku, prekurzorem pro tvorbu hormonů nadledvinek živočichů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Jsou významné při oxidaci polynenasycených mastných kyselin, buněčné proliferaci a diferenciaci, podílejí se na tvorbě DNA, RNA a na syntéze proteinů [2, 5]. Jsou stavebními jednotkami koenzymů, jako polyaminy se podílejí i na výstavbě ribozomů a chromozomů [6].

Mají vliv na regulaci tělesné teploty, příjem živin nebo na zvyšování či snižování krevního tlaku. Polyaminy jsou velmi důležité pro normální růst, obnovu a metabolismus každého

orgánu v těle a jsou nezbytné pro udržování vysoké metabolické aktivity a s tím spojené imunologické funkce střevního epitelu [5].

Některé polyaminy mají taktéž vliv na řadu fyziologických funkcí u rostlin. Mají vliv na buněčné dělení, kvetení, vývoj plodu nebo stárnutí. Taktéž ovlivňují reakci rostliny na stresové faktory prostředí [5].

Předpokládá se, že biogenní aminy jsou velice důležité k udržení normálního růstu a diferenciaci buněk u dospělého člověka, zvláště buněk střevní tkáně [4].

Naproti tomu mohou být nebezpečné pro pacienty s onkologickým onemocněním (kvůli regulaci fyziologických funkcí v eukaryotických buňkách). U pacientů s tímto typem onemocnění je potřeba hladinu biogenních aminů v těle regulovat jejich minimalizovaným příjmem [5].

1.5 Toxické efekty

Potraviny mohou obsahovat řadu látek, které mohou ohrozit zdraví člověka. Tyto cizorodé látky nazýváme kontaminanty [6].

Některé druhy biogenních aminů se mohou v nadměrném množství stát pro organismus toxickými. Histamin může ve zvýšené koncentraci způsobit otravu jídlem (viz tab. 1). Uvádí se, že přiměřená denní dávka příjmu histaminu by se měla pohybovat v rozmezí 50-100 mg. Pokud překročí denní příjem histaminu hranici 100 mg hrozí, že způsobí lehkou, střední nebo intenzivní otravu. Totéž hrozí v případě tyraminu [6]. K otravě jídlem (vlivem biogenních aminů) dochází často ve spojení s potenciaálními faktory, kterými jsou např. inhibice monoaminoxidasy (MAO), požití drog, alkoholu nebo gastrointestinální onemocnění. Další ze skupiny heterocyklických biogenních aminů, tryptamin může způsobit zvýšení krevního tlaku (hypertenzi). Obecně jsou histamin a tryptamin potenciaálně toxikologicky nebezpečné v kombinaci s jinými látkami, které zesilují jejich účinek a to především u náchylných jedinců [5].

Stanovit prahovou koncentraci biogenních aminů, která by mohla vyvolat nežádoucí reakce je velmi obtížné, protože každý jedinec je jinak citlivý. Tato citlivost souvisí zejména s detoxikačním mechanismem daného jedince. Za normálních okolností dochází, během příjmu potravy, ve střevech vlivem specifických enzymů detoxikačního systému (např. za účasti diaminoxidasy DAO) k rozkladu určitého množství biogenních aminů na méně aktivní metabolity. Histamin může být také detoxifikován methylací nebo acetylací [7]. Avšak v případě požití potravy s vysokou dávkou biogenních aminů může dojít k tomu, že detoxikační systém jedince není schopen pomocí enzymů rozložit dostatečné množství

biogenních aminů a ty se mohou stát pro organismus v nadbytečném množství toxickými. Není vyloučena toxicita i malých množství biogenních aminů. V některých případech totiž může být aktivita enzymů redukována u daného jedince vlivem gastrointestinálního onemocnění nebo genetickými predispozicemi a tím dochází k nedostatečnému odbourávání biogenních aminů detoxikačním systémem [5].

Obecně jsou podle závažnosti projevených příznaků účinky biogenních aminů (po jejich požití) popisovány jako reakce, intolerance nebo intoxikace. Mezi symptomy reakce patří nevolnost, pocení, výskyt vyrážek, kolísání krevního tlaku nebo mírné bolesti hlavy. Mezi nežádoucí účinky patří také zvracení, průjem, zrudnutí obličeje, červené vyrážky, hypo- nebo hypertenze, tachykardie a migrény. Tyto příznaky se projevují v případě, kdy detoxikační systém daného jedince není schopen v dostatečné míře požitou biogenní aminy biotransformovat. V případech těžkých intoxikací dochází ke zvýšení krevního tlaku nad hranici 180/120 mm Hg, což může vést k poškození srdce nebo centrálního nervového systému [5]. Nebezpečí hrozí hlavně při konzumaci více rizikových potravin najednou (fermentované výrobky, pivo a víno) [7].

U jednotlivých biogenních aminů je velmi obtížné stanovit přípustné maximální množství, jelikož jejich toxické účinky jsou závislé na vedlejších faktorech, jako je typ biogenních aminů, kombinace se sloučeninami a také na detoxikačním mechanismu daného jedince. V současnosti je pouze jediný biogenní amin (histamin), u kterého byl stanoven maximální limit pro požití, který se vztahuje na Evropskou unii a Spojené státy americké. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv ve Spojených státech amerických (The US Food and Drug Administration (FDA)) stanovil množství histaminu v potravinách, které může být pro člověka už nebezpečné na $\geq 500 \text{ mg.kg}^{-1}$ [5].

Tab. 1: Přehled symptomů intoxikace nejběžnějšími biogenními aminy [4]

Název	Symptomy intoxikace
Histamin	bolesti hlavy, pálení v oblasti nosních dutin, pocení, zrudnutí v obličeji, jasně červené vyrážky, závratě, kopřivka, zhoršené polykání, zhoršení dýchání, průjem, tachykardie, zrychlený srdeční tep, zvýšení krevního tlaku
Tyramin	bolesti hlavy, migréna, neurologické potíže, nevolnost, zvracení, respirační potíže, hypertenze
Putrescin	zvýšení srdečního tepu, tachykardie, hypotenze, karcinogenní projevy

1.6 Výskyt

Významným zdrojem biogenních aminů jsou potraviny. Prakticky všechny potraviny, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny tím vytvářejí podmínky pro biochemické děje a mikrobiální aktivitu, což představuje hlavní předpoklad pro syntézu biogenních aminů [4, 5]. Mikroorganismy s dekarboxylasovou aktivitou se mohou dostat do potravin spontánně nebo jsou součástí kyselých kultur, které jsou přidávány do potravin záměrně [7].

Biogenní aminy se přirozeně vyskytují v nízkých koncentracích v široké škále potravin. Nejvíce jsou obsaženy v mléčných výrobcích, rybím masu a výrobcích z ryb, masu a masných výrobcích a fermentovaných potravinách. Dále pak v pivu, vínu, ovoci, zelenině, v ořechách, čokoládě a v sójových výrobcích [9, 10, 11].

Z fermentovaných mléčných výrobků jsou z hlediska přítomnosti biogenních aminů nejvíce sledovány přírodní sýry [12]. V mléku, jogurtech, tvarohu a nezrajících sýrech lze očekávat množství nepřesahující jednotky, případně desítky $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [7].

Množství biogenních aminů se liší mezi jednotlivými druhy potravin [12]. Více biogenních aminů bývá zpravidla detekováno v sýrech, které jsou vyrobené z nepasterovaného mléka. U sýrů je tvorba biogenních aminů (BA) spojována s bakteriemi mléčného kvašení (LAB) (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* a *Enterococcus*) [3].

Tvorba biogenních aminů u sýrů závisí na obsahu aminokyselin a peptidů v mléce, na přítomnosti bakterií schopných dekarboxylace, na pH, na koncentraci soli, na aktivitě vody, použité technologii, době zrání a skladování, množství a druhu mikroorganismů a přítomnosti kofaktorů. Na vzniku toxického množství biogenních aminů se podílí proteolýza, která je při zrání sýrů považována za jeden z nejdůležitějších pochodů ovlivňujících kvalitu sýra. K rozkladu mléčných bílkovin dochází působením nativní proteasy z mléka, proteasy kyselých kultur, syřidlové enzymy a proteasy kontaminující mikroflóry [3].

Obsah biogenních aminů vzrůstá při výrobě fermentovaných salámů a některých sýrů, a to zejména zrajících. Tento nárůst je patrný hlavně v počátečních fázích fermentace výrobků a je závislý na druhu přítomných mikroorganismů, proto by používané startovací kultury mikroorganismů neměly vykazovat dekarboxylační aktivitu, popř. jen velmi nízkou. Při skladování masa dochází vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry k nárůstu obsahu biogenních aminů, a proto lze některé z těchto biogenních aminů využít jako indikátor čerstvosti masa [2].

U sójových výrobků se vytvářejí také při fermentačních procesech. Sója v surovém stavu obsahuje velké množství bílkovin, což je důležitý předpoklad pro vznik biogenních aminů. Na fermentaci se podílejí některé druhy plísní a kvasinek (mléčné kvasinky). Produkty fermentace sójových výrobků jsou např. histamin nebo tyramin. Na produkci biogenních aminů u sójových, ale i jiných druhů potravin mohou mít významný vliv také fyzikální veličiny, jako jsou teplota, vlhkost, hodnota pH a množství NaCl (chloridu sodného) [5].

V ovoci a zelenině jsou obsaženy jako produkty nebo meziproducty metabolismu bakterií [4]. Biogenní aminy jsou obsaženy také v nápojích, často těch alkoholických, jako je např. pivo nebo víno [9]. V ostatních potravinách a nápojích se vytvářejí mikrobiální dekarboxylací aminokyselin v průběhu jejich skladování. Mezi nejvýznamnější biogenní aminy, které jsou obsaženy v potravinách a nápojích patří histamin, β -fenylethylamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin, spermin a spermidin [4].

1.7 Metody regulace množství biogenních aminů v potravinách

Teplota prostředí se jeví jako jeden z hlavních fyzikálních faktorů ovlivňující tvorbu biogenních aminů v potravinách. Se snižující se teplotou prostředí, dochází ke snížení tvorby biogenních aminů. Při nízkých teplotách dochází k inhibici růstu mikroorganismů a také ke snížení aktivity enzymů. Chlazení představuje tedy jeden ze způsobů, kdy může být regulována hladina biogenních aminů v potravinách. U potravin, které již obsahují větší množství biogenních aminů, se procesem chlazení hladina biogenních aminů stabilizuje.

S rostoucím časem, kdy je potravina chlazená však může dojít k opětovnému mírnému zvýšení množství biogenních aminů [8].

Další, efektivnější způsob regulace množství biogenních aminů v potravinách je zmrazení. Např. u bakterií jako jsou *Morganella morganii* a *Proteus vulgaris*, které se podílejí na tvorbě biogenních aminů, byla pomocí zmrazení potravin inhibována produkce biogenních aminů právě těmito bakteriemi [8].

Množství biogenních aminů v potravinách lze regulovat i vysokoteplným ošetřením potravin. Vyšší teploty jsou efektivní především u bakteriální tvorby biogenních aminů. Při teplotách již kolem 50 °C dochází u některých druhů bakterií k poměrně vysoké úmrtnosti. Usmrcené bakterie nejsou tedy schopny se aktivně podílet na tvorbě aminů a tím se jejich hladina snižuje. V případě použití metody, při které dochází k tepelnému ošetření potravin, je rozhodující nejen teplota (°C), ale i doba po kterou toto ošetření probíhá. Vysoké teploty regulují především bakteriální tvorbu histaminu. Avšak je důležité zmínit, že i když je potravina tepelně zpracovaná, nelze v ní zaručit stejnou hladinu histaminu jako bezprostředně po procesu tepelného zpracování. Po tepelném ošetření dané potravin totiž může stále docházet k opětovné tvorbě biogenních aminů a tím tedy dochází k nárůstu množství histaminu v ní [8].

Z širšího hlediska jsou tepelné metody zpracování potravin za účelem regulace množství biogenních aminů v nich účinné, ale i přesné dodržování pracovních postupů nemusí zajistit vždy efektivní výsledek. Některé bakterie podílejší se na tvorbě biogenních aminů v potravinách jsou totiž rezistentní proti extrémním teplotám. Tepelným opracováním potravin, u kterých se takové druhy bakterií vyskytují, lze sice minimalizovat produkci biogenních aminů, avšak kvůli těmto rezistentním bakteriím jsou biogenní aminy nadále v potravinách produkovány [8].

K metodám regulujícím množství biogenních aminů v potravinách patří taktéž konzervace potravin. Při konzervaci potravin se uplatňují metody s využitím ozařování, hydrostatického tlaku, různých způsobů balení potravin, aditiv a konzervačních látek, změn podmínek prostředí pro mikroorganismy vytvářející biogenní aminy (např. inkubace, vakuování, regulace kyslíku) nebo přidáním kultur, které degradují histamin. V současné době se při konzervaci potravin využívají i enzymy, které poškozují biogenní aminy (např. DAO diaminoxidas) a organismy, které jsou těmito enzymy vybaveny [8].

Tyto metody se využívají v potravinářském průmyslu a podléhají určitým kritériím. V praxi však dochází poměrně běžně k porušování těchto kritérií a hygienických předpisů, čímž se efektivita těchto metod v takovém případě snižuje [8].

1.8 Stanovení biogenních aminů

1.8.1 Analytické metody stanovení biogenních aminů v potravinách

Analytické metody k detekci biogenních aminů v potravinách se využívají zpravidla ze dvou důvodů. Jednak kvůli jejich potencionální toxicitě pro člověka a také kvůli jejich možnému použití jako indikátorů kvality potravin. Bylo publikováno mnoho metod, ale ne všechny se dají použít pro stanovení určitého biogenního aminu. Typickými problémy jsou přítomnost potenciálně interferujících sloučenin, komplex matrice vzorku a výskyt současně několika biogenních aminů ve stejné alikvotní části extraktu. Pro extrakci se běžně používají činidla jako je kyselina chloristá, kyselina trichloroctová, kyselina chlorovodíková a organická rozpouštědla [5].

Mezi analytické metody stanovení biogenních aminů se řadí: tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GLC), kapilární elektroforéza (CE) a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Nejčastěji se využívají chromatografické metody na reverzních fázích s fluorescenční nebo UV detekcí. Biogenní aminy lze stanovit také iontově párovou (IP-RP-HPLC) nebo iontově výměnnou chromatografií s postkolonovou derivatizací. V poslední době se řadí mezi velmi spolehlivé a vysoce citlivé metody kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (LC/MS). Při analýze biogenních aminů se často využívají také různá derivatizační a chemická činidla jako jsou např. ninhydrin, o-oftaldehyd nebo 9-fluorenylmethyl chloroformát pro pre-kolonovou derivatizaci [5,11].

TLC umožňuje detekci analytů v nepřítomnosti mobilní fáze, proto může být citlivější metodou. HPLC a GLC metody jsou velmi cenné při analýze biogenních aminů v potravinách. Chromatografické metody jsou poměrně jednoduché, dostatečně citlivé, přesné, rychlé, ovšem vyžadují nákladné přístrojové vybavení [5,13].

1.8.2 Kvantifikace genů kódující dekarboxylační enzymy u bakterií pomocí molekulárně biologických metod

Molekulárně biologická metoda polymerasové řetězové reakce (PCR) je v současné době moderní metodou, využívanou k detekci a kvantifikaci mikroorganismů (v případě různých

modifikací této metody), které svou dekarboxylasovou aktivitou produkují biogenní aminy. Oproti původně používaným klasickým kultivačním metodám, umožňují současné moderní mikrobiologické metody jako je metoda PCR rychlejší stanovení mikroorganismů v potravinách. Pomocí detekce určité části genomu, který je charakteristický pro daný mikroorganismus, lze stanovit jeho přítomnost v potravine. Kromě zjištění přítomnosti daného mikroorganismu ve vzorku na základě jeho detekované DNA, lze pomocí různého uspořádání, např. při využití metody Real time-PCR také jeho DNA kvantifikovat [14, 15].

2 POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

2.1 Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (PCR; anglicky *polymerase chain reaction*) se používá k amplifikaci vybrané sekvence DNA *in vitro*. Byla objevena v roce 1985 Kary B. Mullisem, který získal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii.

Principem této metody je využití enzymu DNA-polymerasy pro opakovanou replikaci templátové molekuly DNA. Syntéza probíhá ve směru 5' → 3' a je řízena navázáním dvou oligonukleotidů (tzv. primerů), které nasedají na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerasy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken na obou řetězcích DNA protisměrně. K syntéze se nejčastěji používají termostabilní polymerasy izolované z termofilních mikroorganismů např. (*Taq* DNA-polymerasa z *Thermus aquaticus*), které jsou schopné odolávat teplotám 94 °C, při nichž DNA denaturuje. Syntéza DNA probíhá v cyklech, a každý cyklus má 3 fáze s odlišnými teplotami [16, 17].

2.2 Složení reakční směsi

Reakční směs obsahuje několik nezbytných složek pro průběh polymerasové řetězové reakce:

- Vzorek DNA
- Primery
- Směs všech 4 deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP)
- PCR pufr
- Hořečnaté ionty (Mg^{2+})
- *Taq* DNA-polymerasa [18]

Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi hraje roli při získání požadovaného výtěžku, produktu a specifčnosti, jestliže některá ze složek dosáhne příliš vysoké koncentrace, může to vést k chybám a vzniku nespecifických produktů [16].

Vzorek DNA je možné použít z různých biologických materiálů, např. buňky z tkáňových kultur, z tělních tekutin, kultur mikroorganismů, atd. Případné nečistoty z těchto vzorků lze odstranit dostatečným naředěním vzorku. Pro přesnou a úspěšnou amplifikaci nukleových kyselin je důležité pečlivě navrhnout oba primery, proto je nutné brát v úvahu několik základních pravidel. Vhodná velikost primerů se pohybuje zpravidla v délce od 18–25 nukleotidů, obsah G+C by měl být 40–60 % [16].

Důležitá je počáteční denaturace templátu při teplotě 94-95 °C po dobu 30-60 s, jinak dochází k nespecifické vazbě primeru s následkem nižšího výtěžku požadovaného produktu [19].

Dále je důležité zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C v sekvenci na 3'-koncích primerů pro zajištění přesné vazby na templát. Měla by být zajištěna rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry. Teplota tání u obou primerů by měla být podobná a měla by dosahovat minimálně 50 °C. Rovněž důležitá je také specifčnost primerů na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa. Dále nepřítomnost vnitřních sekundárních struktur tzv. vlásenek a také absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbě nežádoucích duplexů [16].

Pro výběr vhodného primeru existuje řada počítačových programů. Primery běžných velikostí mohou být u PCR používány bez předčištění, avšak komerčně připravované primery poskytují dostatečnou čistotu, větší než 98 % [16].

Důležitá je také koncentrace hořečnatých iontů, které tvoří rozpustný komplex s dNTP, ale interagují i s ostatními složkami [15].

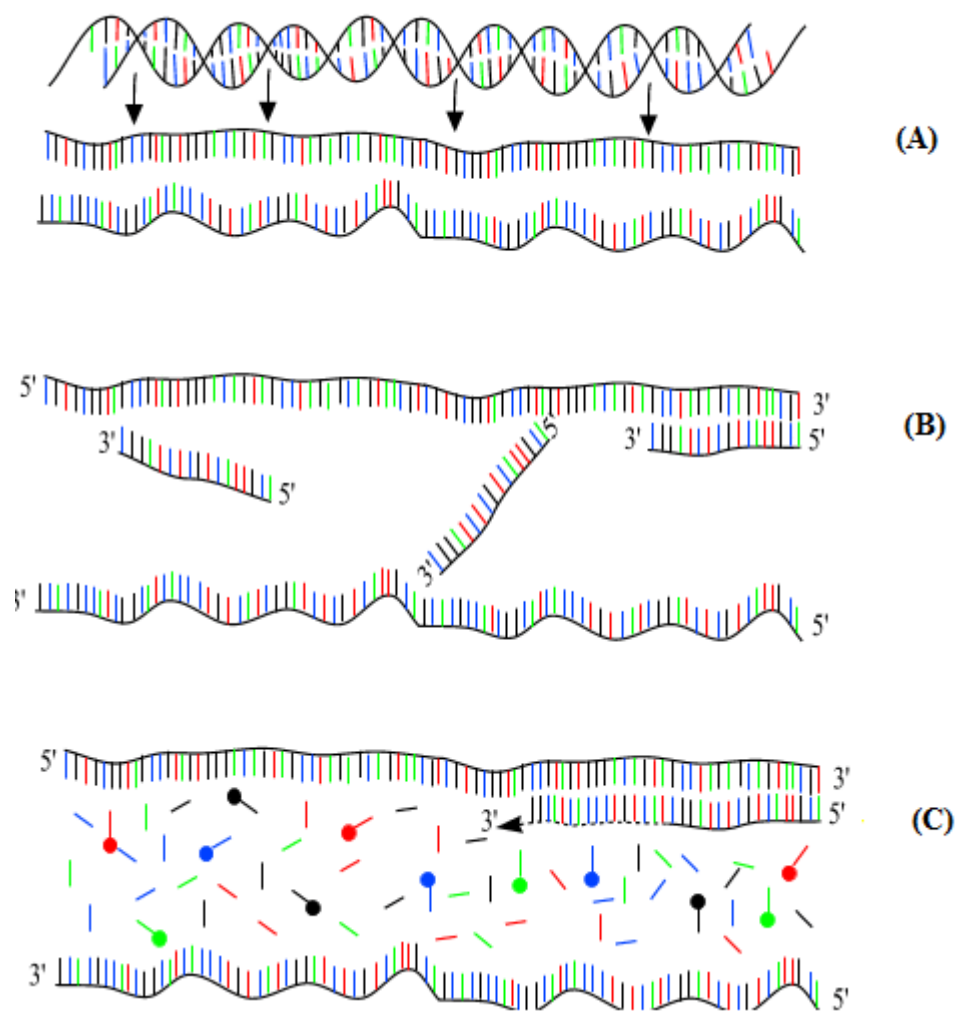
Vhodná koncentrace Mg^{2+} iontů by se měla pohybovat v rozmezí 0,5 až 2,5 $mmol.l^{-1}$ na celkovou koncentraci dNTP. Přítomnost EDTA nebo jiných chelatačních činidel může ovlivnit optimum hořečnatých iontů. Koncentrace iontů hořčíku ovlivňuje annealing (připojení určitého úseku řetězce nukleové kyseliny k druhému komplementárnímu), teplotu tání DNA a enzymovou aktivitu [16, 19].

Kromě již zmiňovaných složek reakční směsi hraje důležitou roli enzym *Taq* DNA-polymerasa. Tento enzym začleňuje nukleotidy do rostoucího (nově syntetizovaného) řetězce dle komplementarity bází k původnímu vlákně, což vede k terminaci řetězce a ukončení syntézy DNA. Chybné začlenění nukleotidu do řetězce je problémem při klonování PCR produktu, jelikož jsou všechny tyto klony odvozeny z jediné molekuly DNA. Četnost těchto chyb je závislá na rovnovážném stavu jednotlivých složek reakce, koncentraci Mg^{2+} , změnách pH pufru a vyváženosti koncentrace jednotlivých dNTP. Problém lze odstranit použitím většího množství DNA při zahájení reakce, menšího počtu cyklů a použitím *Pfu* DNA-polymerasy z *Pyrococcus furiosus* nebo *Pwo* DNA-polymerasy z *Pyrococcus woesei*, které mají 3'-exonukleasovou aktivitu. Nevýhodou je to, že tato exonukleasová aktivita způsobuje také degradaci primeru. DNA-polymerasa v kombinaci s polymerasou s 3'-exonukleasovou aktivitou našly uplatnění při amplifikaci dlouhých úseku DNA. *Taq* DNA-polymerasa zajišťuje syntézu části produktu PCR v těsném napojení na polymerasu s

3'-exonukleasovou aktivitou, která chybně začleněný nukleotid opraví a *Taq* DNA-polymerasa může dále pokračovat v syntéze. Postačuje tak pouze stopové množství polymerasy s 3'-exonukleasovou aktivitou [16].

2.3 Průběh PCR reakce

V závislosti na teplotě reakční směsi se pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu, průběh PCR je zobrazen na obr. 2. Přesnou teplotu a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat. Tyto odlišné změny teploty umožňuje regulovat přístroj nazývaný termocykler. Nejdříve dochází k denaturaci dvouřetězcové molekuly DNA zpravidla při teplotě 94 °C, (viz obr. 2A). Toto je způsobeno rozpadem vodíkových můstků spojující purinové a pyrimidinové báze vzájemně komplementárních nukleotidů, čímž jsou od sebe oddělovány jednotlivé řetězce DNA. Výsledkem je jednořetězcová DNA (ssDNA). Tato jednořetězcová DNA v další fázi slouží jako matrix (templátová molekula) pro syntézu nového komplementárního řetězce. Po ochlazení na teplotu 50-65 °C nasedají primery k odděleným řetězcům DNA (obr. 2B) a dochází k prodlužování (elongaci) řetězců DNA za primery při teplotě 65-75 °C. Na 3'-konci primerů prodlouženého řetězce nasedá DNA-polymerasa (obr. 2C), která připojuje nové deoxynukleosidtrifosfáty a dochází k prodlužování řetězců ve směru 5'→3'. Opakováním těchto 3 kroků (denaturace, nasednutí primerů a prodlužování řetězců) se exponenciálně (2^n , n = počet cyklů) vytváří až miliarda kopií vybraného úseku dvouřetězcové DNA (dsDNA), označovaného též jako tzv. amplikon [16, 20, 21].



Obr. 2: Znázornění průběhu polymerasové řetězové reakce [22]

2.4 Faktory ovlivňující průběh PCR

Taq DNA-polymerasa katalyzuje prodlužování primerů již při laboratorní teplotě, což může vést, jak k chybám, tak i vzniku nespecifických produktů a to zejména, pokud je templátová DNA dostupná pouze v nízkých koncentracích. Toho se lze vyvarovat použitím metody zvané Hot start PCR, kdy jsou složky reakční směsi odděleny od ostatních do doby nasazení primeru (55-65 °C). Například tím, některé složky reakce jako DNA-polymerasa nebo ionty Mg^{2+} jsou v původní reakční směsi vynechány a manuálně přidány až po dosažení teploty > 70 °C, přidavkem teplotně nestabilních látek specifických pro *Taq* DNA-polymerasu, které se navážou na DNA-polymerasu a tím ji dočasně inaktivují nebo tím, že reakční komponenty jsou rozděleny do dvou směsí, které jsou odděleny fyzikální bariérou (voskovou přepážkou), kdy během počáteční denaturace vosk roztaje a umožní smíchání složek reakce [16].

Z důvodu vysoké citlivosti a specifity PCR snadno může dojít ke kontaminaci, a tím pádem i k získání falešného pozitivního signálu, proto jsou při práci s touto metodou doporučeny určité standardní postupy. Mezi tyto postupy patří např. používání UV-světla a to k odstranění exogenních nukleových kyselin, používání jednorázových rukavic, autoklavování roztoků, fyzikální separace používaných PCR-složek od templátové DNA a produktů PCR, příprava reagensů i vzorků do alikvotních částí a přidávání DNA do reakce jako poslední složky [16].

2.5 Využití

Metoda PCR našla široké uplatnění v molekulární biologii, je cenným nástrojem pro celou řadu analýz. Využívá se pro detekci odchylek v sekvencích nukleových kyselin, k monitorování terapie rakoviny, přičemž se sleduje přítomnost maligních buněk. Díky své vysoké citlivosti může být využívána při detekci bakteriální a virové infekce a to už v počátečních stadiích. Ze sekvence se jako primery se při této reakci používají krátké úseky DNA a po několika násobné amplifikaci lze dokázat přítomnost, či absenci i jediné kopie v malém vzorku krve. Postupně nahrazuje např. dříve používanou metodu detekce viru založenou na použití protilátek namířených proti pláštěvým proteinům viru [16, 17].

Obrovské využití našla PCR také v soudním lékařství, kdy stačí k identifikaci osoby jen malé množství vzorku krve nebo tkáně. Významnou roli našla také tato metoda v prenatální diagnostice, ke stanovení pohlaví [17].

Dále může být použita pro klonování úseku DNA (například genu), přičemž templátem může být DNA i RNA [16, 17].

2.6 Detekce

Výsledný produktem PCR jsou tzv. amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítek až tisíců bp (párů bází), jejichž velikost se stanovuje elektroforeticky v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase [16].

Elektroforetická pohyblivost se mění nepřímo úměrně s jejich molekulovou hmotností. Použitím tohoto gelu mohou být děleny poměrně dlouhé molekuly DNA o různé velikosti. Po elektroforéze je gel ponořen do roztoku ethidiumbromidu, omyt a fotografován pod UV-lampou. Fluorescence ethidiového kationtu je značně zesílena jeho vazbou na DNA, takže každý fluoreskující proužek označuje fragment DNA o jiné velikosti [23].

2.7 Real time-PCR

Real time-PCR je metoda, která je založená na klasickém PCR, avšak s tím rozdílem, že umožňuje přímou kvantifikaci PCR-produktu v průběhu reakce, tzn., že detekce vznikajících produktů probíhá již v průběhu všech cyklů a nikoliv až po jejich ukončení [16, 23]. Základním předpokladem je přítomnost specifického, či nespecifického fluorescenčního substrátu, který se naváže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované DNA [24].

Výhodou oproti klasické PCR je kvantifikace výsledného produktu a to buď relativní (porovnáním s jinou skupinou vzorků), nebo absolutní (z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známém množství). Ve srovnání s klasickou PCR je doba vlastního provedení reakce kratší, neboť odpadá elektroforetická detekce. Při výsledném hodnocení platí skutečnost, že čím vyšší je obsah nukleových kyselin v testovaném vzorku, tím rychlejší je přírůstek fluorescence [24].

Mezi další výhody patří velký dynamický rozsah, vysoká sekvenční specifita (zejména při použití sond), reprodukovatelnost, nízké riziko kontaminace, kratší čas, přesnost a citlivost. Hlavní nevýhodou Real time-PCR je, že vyžaduje drahé vybavení a činidla. Omezujícím vlivem mohou být inhibitory PCR přítomné ve vzorku a přítomnost jakékoliv degradované (znehodnocené) DNA. Kromě toho, díky své vysoké citlivosti požaduje důkladnou znalost normalizace techniky a přesnou práci [20, 25, 26].

2.7.1 Využití

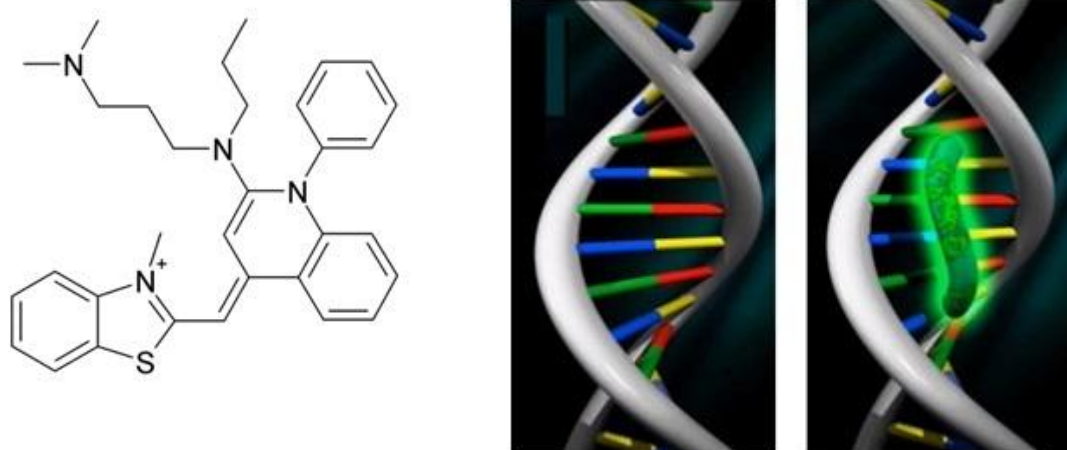
Real time-PCR je metoda, která se využívá v mnoha laboratořích při potravinářských a diagnostických aplikacích. Tato technologie prokázala všestrannost a užitečnost v různých oblastech výzkumu, včetně biomedicíny, mikrobiologie, veterinářství, zemědělství, farmakologie, biotechnologie a toxikologie [13]. Kvantifikace PCR-produktu se využívá při studiu genové exprese, diagnostice některých patogenů, mikroRNA analýze, methyloci DNA, validaci DNA microarray dat, rozlišování alel a genotypu (detekce bodových mutací, delecí nebo chromozomových aberací), ověřování účinnosti farmakoterapie, forenzních studiích a kvantifikaci geneticky modifikovaných organismů (GMO) [25].

2.7.2 Detekce

Detekce amplikonu se může provádět celou řadou technik. Provádí se ve speciálním zařízení, které kromě cyklického střídání teplot umožňuje také detekci fluorescence. K detekci vzniklého produktu se běžně používají specifické nebo nespecifické sondy. Specifická sonda je značená fluorescenčně a je synteticky připravena z krátkých sekvencí, které jsou komplementární k hledanému úseku. Hybridizací specifické sondy s hledaným úsekem nukleové kyseliny dochází k nárůstu fluorescence. Ve druhém případě nespecifická sonda (např. SYBR green) se váže nespecificky do dvouřetězcové DNA. Při použití obou metod shodně platí, že se zvyšující se mírou fluorescence narůstá počet molekul dvouřetězcové DNA [16, 25].

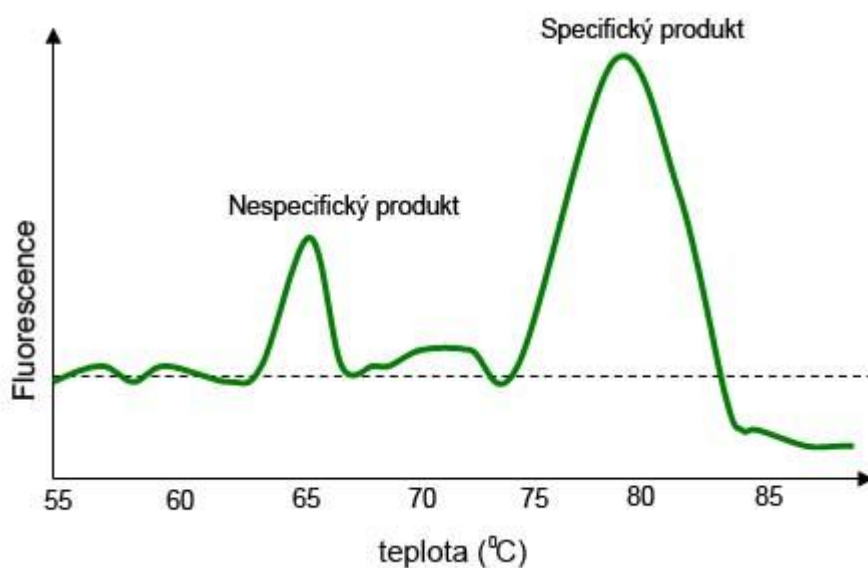
2.7.3 SYBR GREEN I

SYBR GREEN I (viz obr. 3) je nejběžněji používané fluorescenční kyaninové barvivo. Míra fluorescence SYBR GREEN I se po navázání na DNA až 1000 krát zvýší, což souvisí s narůstajícím množstvím molekul dvouřetězcové DNA. Vznikající fluorescenční signál se měří na konci elongace nebo kontinuálně. Hlavní nevýhodou tohoto barviva je, že detekuje veškerou DNA přítomnou v reakční směsi včetně nespecifických produktů tvořených dimery primerů [16, 28].



Obr. 3: Struktura SYBR Green I (vlevo), fluorescence SYBR green I po vazbě na DNA (vpravo) [29]

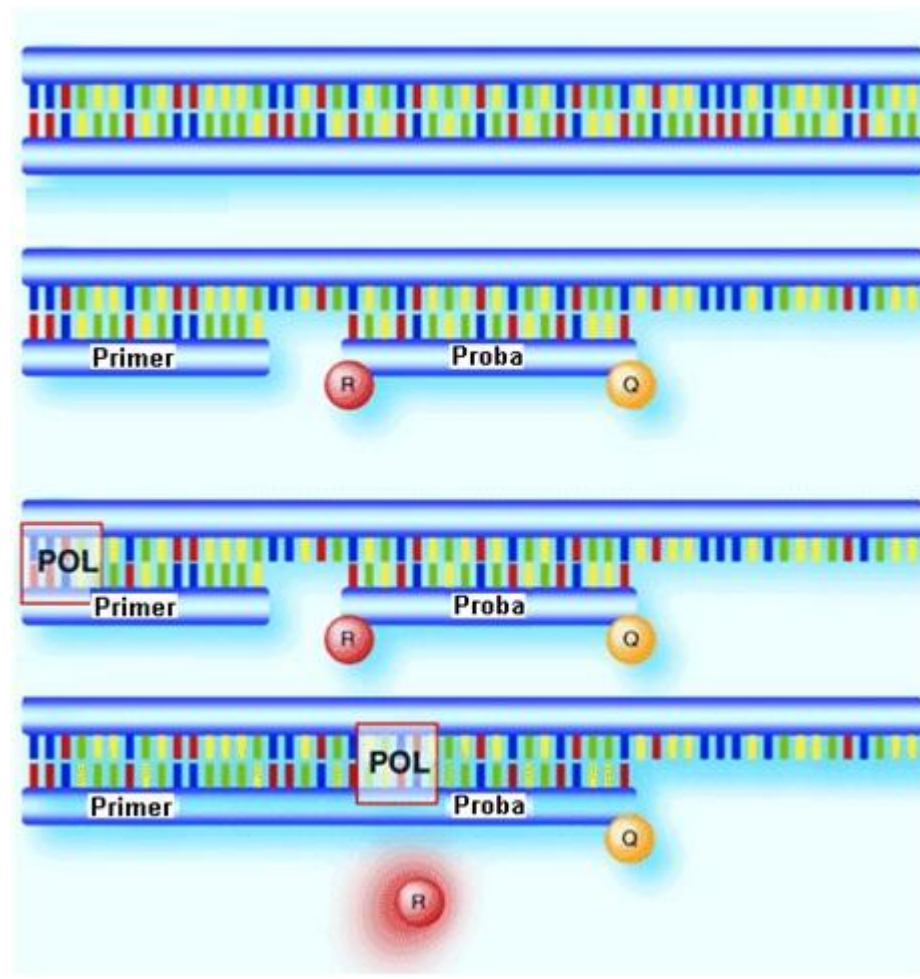
Tím, že je SYBR GREEN I dsDNA specifické interkalační barvivo (váže se na všechny produkty DNA ve vzorku, i ty nespecifické) může docházet ke vzniku falešně pozitivních výsledků. Z tohoto důvodu se k analýze specifického produktu využívají tzv. křivky tání. Tato analýza spočívá v aplikaci tepla na vzorek (od 50 °C do 95 °C) a monitorování emise fluorescence v průběhu procesu. Teplota denaturace DNA je zobrazena jako prudký pokles fluorescenčního signálu vzhledem k disociaci barviva. Nespecifické produkty a dimery primerů jsou různé délky a jsou denaturovány při nižších teplotách, než konkrétní produkty. Pokud má křivka tání pouze jeden vrchol, reakce je čistě specifická, pokud má ovšem dva a více vrcholů, znamená to, že kromě specifických produktů vznikají také nespecifické (viz obr. 4) [7]. Vzhledem k různým denaturačním teplotám se tyto nespecifické produkty rozlišují pomocí derivace fluorescence v závislosti na teplotě ($-dT/DF$) [25, 26].



Obr. 4: Křivka tání a nespecifické produkty [30]

2.7.4 Sondy TaqMan

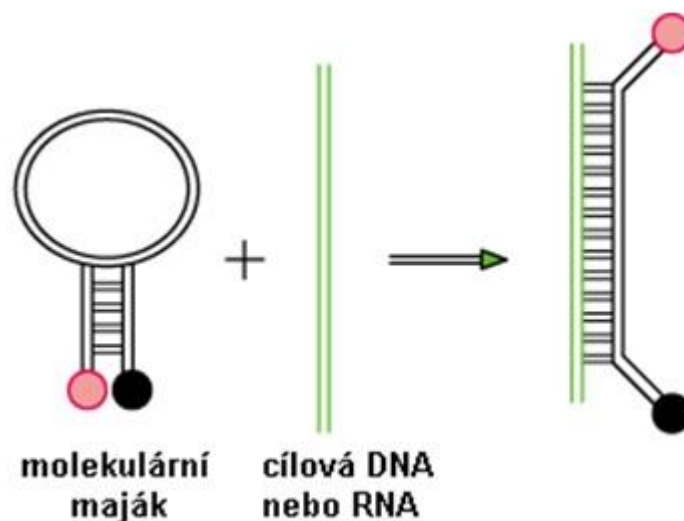
Sondy TaqMan jsou oligonukleotidy delší než primery s fluorescenční značkou neboli reporterem na 5'-konci a zhášecem na 3'-konci. Reporter s kratší vlnovou délkou předává energii zhášeci s delší vlnovou délkou záření, přičemž v důsledku toho emituje záření s delší vlnovou délkou. Původní záření reporteru je utlumeno. V tomto stavu zůstává i po nasednutí sondy (proby). Sonda se váže na vnitřní část amplifikované sekvence, a pokud vytváří homoduplex, je rozložena 5'-exonukleasovou aktivitou *Taq* DNA-polymerasy (viz obr. 5). To způsobí ukončení zhášení a emisi fluorescence [16, 31].



Obr. 5: Princip sondy (proby) TaqMan [32]

2.7.5 Molekulární majáky

Sondy označené jako molekulární majáky (MB) (viz obr. 6) jsou složeny z oligonukleotidů vytvářející sekundární strukturu vlásenky se smyčkou, která slouží k detekci přítomnosti nukleové kyseliny v roztoku. Vlásenka je tvořena komplementárními řetězci a udržuje v těsné blízkosti na koncích připojený fluorofor a zhášec, smyčka je komplementární s cílovými sekvencemi. Po navázání na DNA projdou sondy konformační změnou. Pokud je molekulární maják v konformaci vlásenky, nedochází k emisi fluorescence, jelikož zhášec v blízkosti fluoroforu absorbuje jeho emitovanou energii. Po hybridizaci sondy s cílovou molekulou DNA se fluorofor dostává z dosahu zhášec, což vede k emisi fluorescence [16, 33].



Obr. 6: Molekulární maják (molecular beacon) [34]

2.7.6 Scorpions

Sondy Scorpions jsou k dispozici ve dvou variantách:

- a) Uni-probes ve tvaru vlásenky
- b) Bi-probes v duplexním formátu nukleotidů

U obou těchto sond dochází k efektivní emisi fluorescenčního záření. Ve srovnání s jinými bi-molekulárními mechanismy umožňují silnější signál v kratších reakčních časech a lepší rozlišení.

Uni-probes jsou tvořeny jedním řetězcem tvořícím po obou stranách vzájemně komplementární úseky kmene. Na 5'-konci jednoho kmenového úseku je navázán fluorofor a 3'-konec sondy je napojen na 5'-konec specifického primeru prostřednictvím blokovacího úseku. Zároveň nese interní zhášeč, který při reakci s fluoroforem brání emisi záření. Chemickou změnou dojde k rozvolnění dvojřetězcového kmene. Sekvence totožná s úsekem řetězce cílové nukleové kyseliny hybridizuje s úsekem nově syntetizovaného řetězce blízko za 3'-koncem primeru Uni-probe. Část sondy se kvůli tomu překlápá a fluorofor se uvolní ze zhášeče a zafixuje se. Po excitaci světlem vhodné vlnové délky emituje fluorescenční signál.

Bi-funkční molekuly Scorpions jsou tvořeny dvojicí komplementárních oligonukleotidů obsahující PCR-primer kovalentně vázaný k hybridizační sondě. Tato sonda poskytuje vyšší intenzitu signálu než Uni-probes. Molekula obsahuje na 5'-konci fluorofor, který interaguje se zhášečem vázaným na střední část téhož oligonukleotidu (monomolekulární

škorpión) nebo 3'-konec druhého komplementárního oligonukleotidu (bimolekulární škorpión). Po dokončení cyklu PCR dojde k intramolekulárnímu přeskupení škorpiónu v důsledku hybridizace sondy k cílové sekvenci. Fluorofor je tím oddělen od zhasěče, což vede k emisi světelného signálu [16, 31].

2.7.7 Vyhodnocení Real time-PCR

Fluorescenční signál je automaticky zaznamenáván přístrojem po každém reakčním cyklu a to pomocí amplifikačních křivek, jejichž průběh je poté analyzován. Síla fluorescenčního signálu se úměrně zvyšuje s narůstající koncentrací DNA v reakční směsi [15]. Všeobecně jsou rozlišovány čtyři hlavní části amplifikační křivky (viz obr. 7): základní linie (tzv. baseline), exponenciální fáze, lineární fáze a fáze plató. V základní fázi je fluorescenční signál v souladu s obvyklými hodnotami pozadí. Jakmile se fluorescenční signál zvyšuje nad tuto úroveň (nad baseline), dostane se do exponenciální fáze. Bod, ve kterém exponenciální fáze začíná, se označuje jako C_t (hodnota C_t , tzv. threshold cycle – fluorescenční práh). Tato hodnota značí výchozí počet kopií v původní matrici a používá se k výpočtu relativní exprese nebo koncentrace v neznámém vzorku. Během fáze exponenciálního růstu PCR produktu jsou všechna přítomná činidla v optimálním množství. Platí pravidlo, že čím je počáteční koncentrace templátu v reakční směsi vyšší, tím nižší je hodnota C_t . Nakonec polymerasa a činidla jsou zcela vyčerpány a PCR vstupuje do fáze plató, kde koncentrace produktu zůstává konstantní [26, 27].

Množství templátu ve vzorku může být kvantifikováno relativně nebo absolutně. Absolutní kvantifikace umožňuje určit přesný počet kopií templátu ve vzorku, zatímco relativní kvantifikace umožňuje kvantifikovat a porovnat relativní změny genové exprese vzorků [27, 35].

Princip absolutní kvantifikace je založen na použití standardů o známé koncentraci. Při amplifikaci série standardů o známé koncentraci získáme kalibrační přímku. Kalibrační přímka vytváří lineární vztah mezi C_t hodnotou analyzovaného vzorku a počátečním množstvím celkové RNA nebo DNA, z níž je možné odečíst koncentraci neznámého vzorku [27, 35].

Relativní kvantifikace je metoda umožňující stanovení míry genové exprese zkoumaného genu, která nevyžaduje, na rozdíl od kvantifikace žádné standardy známé koncentrace. Popisuje změny množství cílové DNA (RNA) zkoumaného genu ku genu referenčnímu. Referenčním genem je většinou tzv. *housekeeping gen*, ten by měl mít stálou úroveň geno-

vé exprese ve všech typech pozorovaných vzorků. Kvantifikaci genové exprese testovaného vzorku lze provést pomocí různých matematických modelů [27, 35, 36].

Genová exprese může být vypočítána na základě např. metody komparativní delta - delta ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) nebo metody dle Pfaffla [35].

Metoda delta–delta je nejčastěji užívaná metoda, která umožňuje přímé porovnávání získaných C_t hodnot (poměr množství zkoumaného genu ku genu referenčnímu). Tato metoda předpokládá, že efektivita reakcí amplifikace zkoumaného i referenčního genu je 100 % (rovná se číslu 2), což platí pouze v ideálních případech, ve skutečnosti je účinnost reakce více či méně snižená. Pokud jsou efektivita srovnatelné, lze ji vypočítat dle vzorce [7, 27, 35]:

$$\Delta C_t(\text{testovaný vzorek}) = C_t \text{ vz. studovaný gen} - C_t \text{ vz. referenční gen} \quad (1)$$

$$\Delta C_t(\text{kontrolní vzorek}) = C_t \text{ vz. kontrolní gen} - C_t \text{ vz. referenční gen} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{testovaný vzorek}) - \Delta C_t(\text{kontrolní vzorek}) \quad (3)$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{normalizovaný expresní poměr} \quad (4)$$

Jestliže se tato efektivita liší a je normalizována, používá se k výpočtu metoda dle Pfaffla [27]. K výpočtu efektivita reakce se užívá následující vztah:

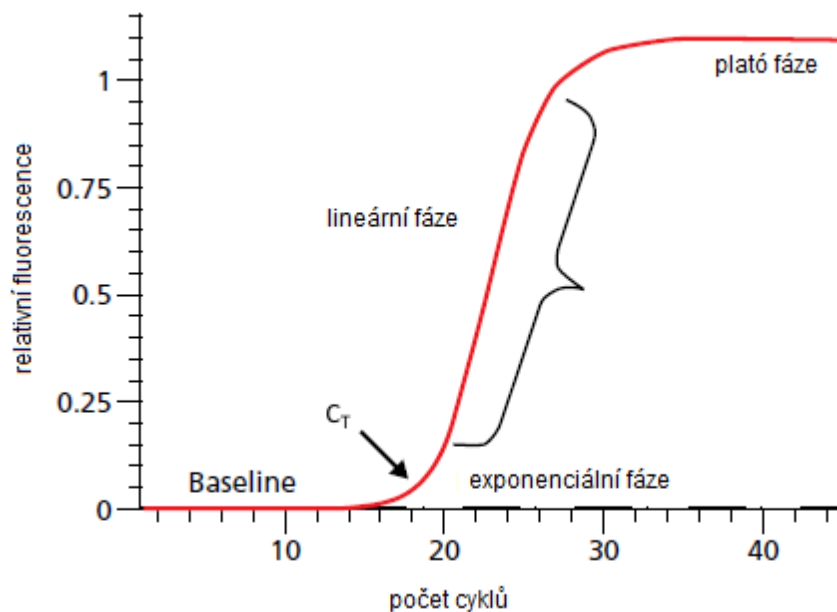
$$E = 10^{-1/\text{směrnice}} \quad (5)$$

Efektivita reakce je dána účinností přisedání primerů, složením reakční směsi nebo přítomností PCR inhibitorů [7].

Výpočet průměrné normalizované genové exprese (poměr množství cílového a referenčního genu) se vypočítá dle:

$$R = \frac{E_{\text{cílový}}^{\Delta C_t \text{ cílový (kontrola - vzorek)}}}{E_{\text{referenční}}^{\Delta C_t \text{ referenční (kontrola - vzorek)}}} \quad (6)$$

Metoda dle Pfaffla a komparativní metoda delta–delta je matematicky ekvivalentní, liší se akorát v tom, že dle Pfaffla se normalizuje C_t kontrolního k C_t vzorku zvlášť pro testovaný a pro referenční gen. Hodnota efektivita je 100 %, pokud je rovna 2 a platí, že v každém cyklu dojde ke zdvojnásobení množství molekul DNA, tzn. reakce běží dle 2^n , kde n je počet proběhlých cyklů [36, 37].



Obr. 7: Amplifikační křivka [38]

Existuje řada prací, které se zabývají detekcí genů kódujících dekarboxylační enzymy pomocí metod PCR/Real time-PCR.

V práci Fernández et al. [39] je stanovena koncentrace BA u různých komerčních sýrů pomocí HPLC/FLD. Zkoumané sýry byly vyrobeny z nepasterizovaného nebo pasterizovaného mléka různého původu a byly podrobeny různé době zrání. Při delší době zrání byla u nich zjištěna rozdílná koncentrace BA. U sýrů vyrobených z nepasterizovaného mléka byla naměřena koncentrace BA více než dvojnásobná oproti sýrům vyrobených z pasterizovaného mléka. Bylo zjištěno, že koncentrace BA v sýru závisí víc na mikrobiologické kvalitě mléka, než na typu použitého mléka. V sýrech se vyskytoval nejvíce z BA, tyramin. Tyramin produkovaný skupinou bakterií mléčného kvašení byl stanoven pomocí HPLC/FLD a výsledky byly porovnány s výsledky získanými pomocí metody PCR. Touto metodou byla analyzována přítomnost genu *tdc*, který kóduje tyrosindekarboxylasu, enzym přeměňující tyrosin (dekarboxylace) na tyramin. U devíti vzorků sýrů nebyl tyramin metodou HPLC/FLD vůbec zaznamenán, avšak PCR metodou byla prokázána přítomnost genu *tdc*. Z výsledků této studie vyplývá, že pro detekci a kvantifikaci BA je zapotřebí využít více metod. HPLC je analýza nezbytná pro stanovení přesné koncentrace tyraminu ve

vzorcích, zatímco PCR je snadná a rychlá metoda detekce bakterií, díky níž je možné otestovat velké množství vzorků [39].

Obdobnou problematikou se zabývá práce Ladero et al. [40]. Byl zde analyzován histamin. Testování proběhlo u 80 vzorků sýrů, které byly vyrobeny z různých druhů mléka a vystaveny různě době zrání. Vytvořit přímou detekci a kvantifikaci tohoto BA bylo důležité především proto, že je jednou z nejčastějších příčin otravy jídlem. Pomocí metody Real time-PCR byla v 52 vzorcích prokázána přítomnost histidindekarboxylasy, jež je kódovaná genem *hdc*. Pro detekci genu *hdc* u gram negativních bakterií byla navržena sada primerů, pro Real time-PCR pak byla navržena hodnota C_t , která sloužila jako indikátor vysoké bakteriální výroby histaminu. Metodou HPLC/FLD byl histamin detekován v 51 vzorcích, které byly metodou Real time-PCR označeny jako histidindekarboxylasa pozitivní. Nejvyšší koncentrace histaminu byly zaznamenány při dlouhé době zrání sýrů vyrobených z nepasterizovaného mléka. Chromatografická metoda (HPLC/FLD) ověřila schopnost správně kvantifikovat v reálném čase gen *hdc* kvantitativní metodou PCR. Koncentrace histaminu, stanovené metodou HPLC a C_t hodnoty byly nepřímo úměrné, tudíž nižší hodnoty C_t byly detekovány v sýrech s vyšším množstvím histaminu [40].

Histamin v práci Diaz et al. [41] produkovaný bakteriálním kmenem *Lactobacillus vaginalis* byl také detekován v sýru s modrou plísní nazývaným CABRALES. Přítomnost genu histidindekarboxylasy (*hdc*) byla potvrzena pomocí PCR. Detekce produktů PCR byla provedena elektroforézou v pulzujícím poli (PFGE). PFGE se používá pro rozdělení velkých fragmentů (až 5000 kb). U bakterií mléčného kvašení bylo prokázáno, že dochází k horizontálnímu přenosu genetické informace, kdy může docházet k přenosu genů bakterií mléčného kvašení na patogenní bakterie. U bakterie *Lactobacillus vaginalis* byla tato možnost potvrzena [41, 42].

V současné době se stále více začínají rozvíjet modifikované metody PCR. Příkladem je metoda RAPD-PCR. Založena je na principu amplifikace fragmentů náhodnými primery o libovolné sekvenci, které nasedají náhodně na více míst obou řetězců cílové DNA 3'-konci směrem k sobě. Tato metoda byla např. využita k detekci genů LAB v práci Carafa et al. [43]. Devadesát pět LAB bylo izolováno ze sýru Malga v alpském regionu Trentino. Sýr Malga byl vyrobený ze syrového kravského mléka s bohatou mikrobiální flórou. Tento výzkum byl zaměřen na charakterizaci autochtonních LAB a zdraví prospěšných látek ob-

sažených v sýru, kdy metodou RAPD-PCR bylo zjištěno, že konkrétně jeden druh *Lactobacillus brevis* produkuje GABA, kyselinu γ -aminomáselnou v množství 129 mg.l^{-1} , dále bylo prokázáno, že dominantním druhem byly bakterie *Pediococcus pentosaceus* a *Lactobacillus paracasei* [42, 43].

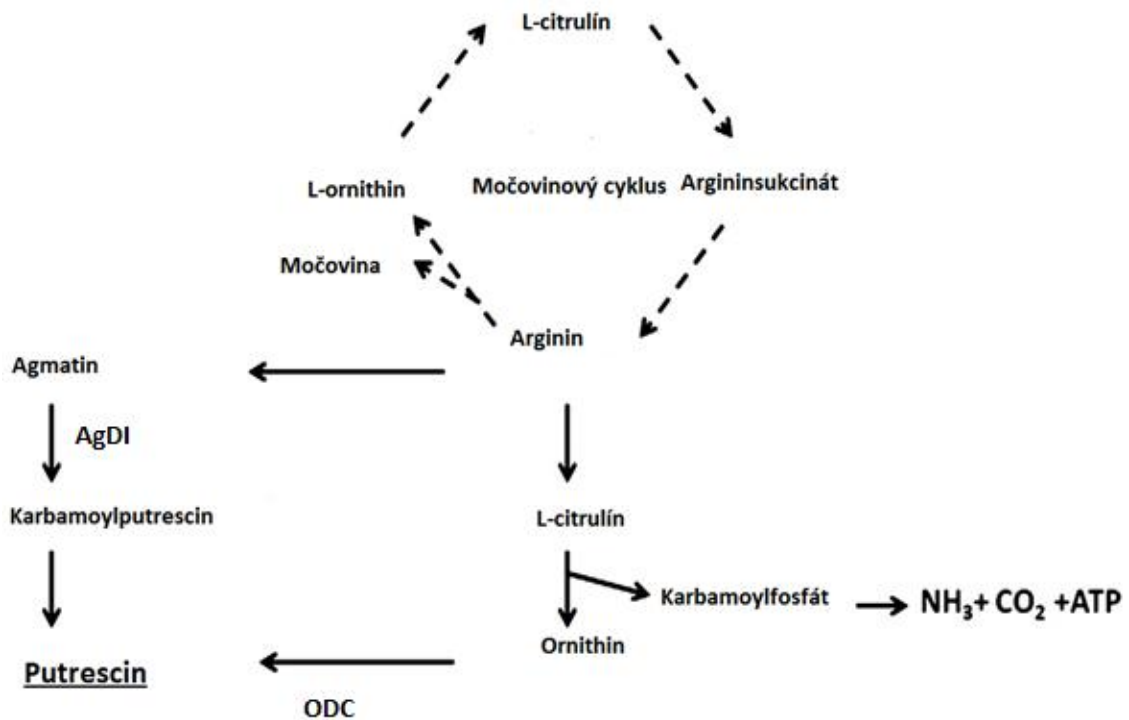
Další prací, kdy byly použity modifikované metody PCR je práce brazilských autorů Perin et al. [44], kteří zkoumali BA v sýru Minas. Jedná se o oblíbený mléčný výrobek používaný v Brazílii, který se tradičně vyrábí ze syrového, nebo pasterovaného kravského mléka. Studie se zabývala sledováním skupiny BA produkované kmenovou bakterií *Lactococcus lactis* sp. *lactis* GLc05 s přidavkem bakteriocinu nisinu. Sýr Minas byl vyroben alternativním postupem za použití syrového kozího mléka a to s (A) nebo bez (B) přidání kmene *Lactococcus lactis* sp. *lactis* GLc05 ve třech nezávislých opakováních. Kozí sýr má bohatou autochtonní mikroflóru, která vyvíjí smyslové vlastnosti fermentovaných potravin. Autochtonní LAB jsou schopné produkovat antimikrobiální látky nazývané bakteriociny. Bakteriociny vyráběny širokou škálou různých druhů bakterií jsou antimikrobiální peptidy s antibiotickým účinkem. Hlavním problémem jejich antimikrobiální účinnosti je, že může být negativně ovlivněna různými faktory, např. vazbou se složkami potravin, inaktivací proteasami, změnami chemických a fyzikálních vlastností jídla (pH, bílkovin, tuku a škrobu), nebo změnami v buněčné membráně cílových bakterií. Z toho důvodu byla také zkoumána doba zrání mezi *L. lactis* sp. *lactis* GLc05 a autochtonní mikroflórou. Metody REP-PCR a PCR-DGGE byly použity k charakterizaci mikroflóry a ukazují rozdíly mikroflóry a tvorby BA. REP-PCR metoda je založena na amplifikaci úseků ohraničených stále se opakujícími sekvencemi, zatímco PCR-DGGE umožňuje separaci DNA molekul na základě odlišné sekvence (liší se v jednom nukleotidu). Množství BA bylo měřeno pomocí HPLC/DAD. Byla prokázána vysoká koncentrace tyraminu u obou druhů sýrů (A, B) v určité době zrání, avšak u sýrů (B) byl zaznamenán vyšší podíl. U sýrů (A) byla zjištěna přítomnost antimikrobiální látky nisinu s inhibiční aktivitou proti některým kmenům *Staphylococcus aureus* po 5 dnech zrání [15, 42, 44].

Během skladování působením kontaminující mikroflóry vznikají BA hlavně v rybách a v mase [2]. Studie zabývající se vznikem BA působením kontaminující mikroflóry v tradiční koňské klobáse je práce autorů Shiling et al. [46]. Tato studie hodnotila účinky startovacích kultur (*Lactobacillus sakei* a *Staphylococcus xylosus*) a rostlinných extraktů

(esenciální oleje ze skořice, hřebíčku, zázvoru a anýzu) na akumulaci biogenních aminů v koňském mase pomocí mikrobiologických metod a PCR-DGGE analýzy. Výsledky ukázaly, že rostlinné extrakty a startovací kultury potlačily růst kontaminujících mikroorganismů [46].

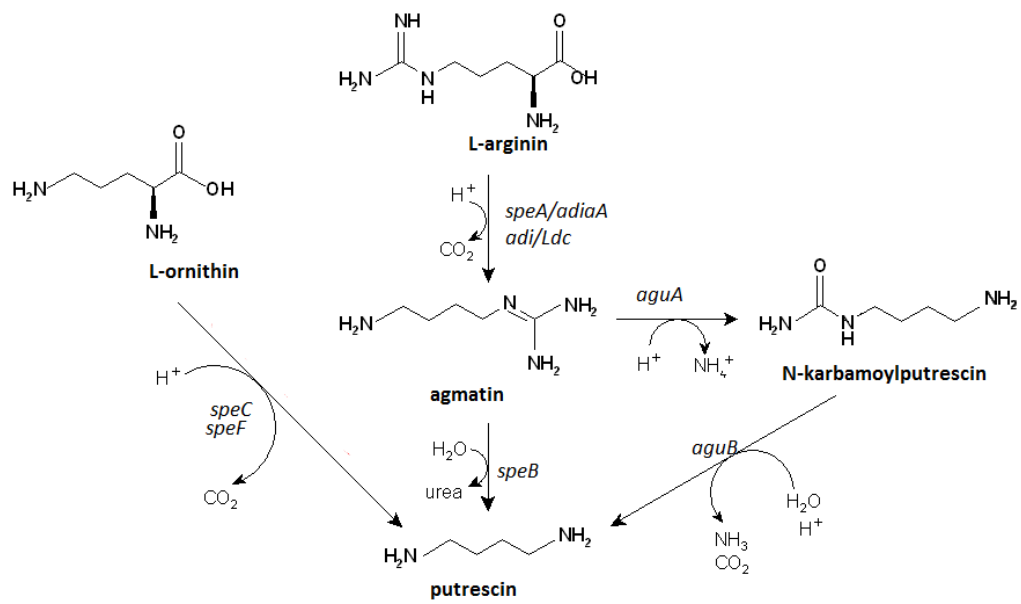
Studii zabývající se otravou histaminem, způsobenou konzumací ryb, provedli Lin et al. [47]. V práci bylo testováno 42 vzorků ryb mahi-mahi a jejich 17 sušených produktů prodávaných v maloobchodních trzích na Tchajwanu. 4 ze 17 vysušených vzorků měly hladiny histaminu vyšší, než udává směrnice FDA ($5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Identifikace bakterií s dekarboxylasovou aktivitou byla provedena pomocí PCR. *R. ornithinolytica* izolovaná z jednoho vzorku sušených ryb obsahujícího nejvyšší obsah histaminu (z $68,15 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) byla identifikována jako bakterie schopná produkovat histamin. Konzumace ryb z čeledi *Scrombridae* (makrelovité) a *Scomberesocidae* (rohoretkovité) bývá nejčastější příčinou otravy histaminem, jedná se o tzv. skombrotoxicitu. Mezi nejčastější příznaky skombroidní otravy patří vyrážky, kopřivka, nevolnost, zvracení, průjem, návaly horka, brnění nebo svědění kůže. Svalové tkáně skombroidních ryb (tuňák, makrela, sled' a sardinky) obsahují vysoké množství volného histidinu ($1-15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) [47].

Za hlavní zdroj BA ve víně jsou považovány LAB [48]. V práci Constantini et al. [49] byla zjišťována produkce zejména putrescinu z různých prekurzorů ve vzorku vína a jablečném moštu. Biosyntetická dráha produkce putrescinu byla zkoumána u 23 kmenů LAB. Ve studii byly využity zejména techniky PCR a TLC. Studované kmeny LAB byly izolovány z vína a ze zkvašeného moštu, přičemž ODC (ornithindekarboxylasova dráha) se vyskytuje spíše u bakterií izolovaných z vína a AgDI (agmatindeiminasova dráha) u bakterií izolovaných z moštů. Metabolismus putrescinu u grampozitivních bakterií je znázorněn na obrázku (viz obr. 8). Putrescin byl získán pomocí různých prekurzorů k určení jeho metabolické dráhy. Výsledky ukazují, že putrescin byl převážně z vybraných bakteriálních kmenů mléčného kvašené vyroben z AgDI [49].



Obr. 8: Metabolismus putrescinu u Grampozitivních bakterií [49]

Gramnegativní bakterie mohou tvořit putrescin třemi metabolickými cestami (viz obr. 9), které mohou zahrnovat osm různých enzymů. Cílem práce Wunderlichové et al. [50] bylo navrhnout nové sady primerů pro detekci genů (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *adiA*, *adi/Ldc* a *aguA*) kódujících dekarboxylační enzymy, jež jsou zapojeny v metabolických drahách produkce putrescinu u gramnegativních bakterií. Nově vyvinutá Touchdown metoda polymerasové řetězové reakce za použití těchto primerů byla úspěšně aplikována. Následně byly vybrané PCR produkty sekvenovány a jejich vysoká podobnost sekvencí (99-91 %) se známými sekvencemi odpovídajících genů potvrdila vysokou specifitu vyvinutých sad primerů [50].



Obr. 9: Metabolismus putrescinu u Gramnegativních bakterií [50]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu Real Time-PCR pro hodnocení exprese genu *adiA*, tedy genu kódujícího arginindekarboxylasu (enzym katalyzující přeměnu L-argininu na agmatin) u *Escherichia coli* (gramnegativní bakterie).

Konkrétní cíle:

- vypracovat literární rešerši, která se bezprostředně týká daného tématu
- zavést metodu Real time-PCR pro detekci vybraného genu
- analyzovat genovou expresi relativní kvantifikací
- v závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty s reálnými vzorky
- teorii, metodiku, výsledky experimentů a diskusi sepsat do formy diplomové práce

4 MATERIÁLY A METODIKA

4.1 Přístrojové vybavení

Stolní centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Německo), centrifuga Hermlr z 100M, vortex-BIOSAN (BioTech, Česká republika), termocykler CFX 96 Real-time (BIO-RAD), analytické váhy Kern KB800 (Kern, Německo), elektroforéza horizontální model 4 (OWL Separation System Inc.), zdroj napětí MP3-300N (MAJOR SCIENCE), UV-Transiluminátor Syngene (Bioimagin, Incenius), mikrovlnná trouba (Electrolux), chladnička kombinovaná CSA 31020 (BEKO), dry block heating termostat Bio TDB-100 (BioTech, Česká republika), box Aura PCR BIOAIR MP-300 N (MAJOR SCIENCE), autokláv Varioklav H+P SN 98681104 (VARIOKLAV), PCR Tube Strips, Flat Cap Strips (BIO-RAD), Fotometr TECAN Sunrise TW/TC (TECAN).

4.2 Chemikálie a kultivační média

4.2.1 Chemikálie

Agarosa SeaKem LE Agarose (Lonza), primery – zásobní roztok $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (SIGMA, Aldrich), voda pro molekulárně biologické metody (SIGMA), $50\times$ TAE pufr ($2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris báze, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Na_2EDTA , $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CH_3COOH), 100 bp Marker DNA Ladder (Bio-Labs), $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-1}$ ethidium bromid (SERVA), tris HCl (SERVA), $6\times$ nanášecí pufr (loading buffer), $100\times$ MEM vitamins, PAA Laboratories GmbH, Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox), Go Taq[®], Hot Start Green Master Mix (Promega), High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), High Pure RNA Isolation Kit (Roche).

4.2.2 Kultivační média

4.2.2.1 Minerální médium s přidavkem glukosy a směsi vitamínů

100 ml minerálního média se skládá z: 1 g glukosy, 1 ml roztoku vitamínů, 8 ml roztoku $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($23,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), 2 ml roztoku Na_2HPO_4 ($9,078 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), 1 ml roztoku NH_4Cl ($30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), 1 ml roztoku $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), 1 ml roztoku $\text{Fe}(\text{NH}_4) \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 ml roztoku $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), 0,1 ml roztoku stopových prvků a 85 ml destilované vody.

4.2.2.2 Masopeptonový bujon

Masopeptonový bujon se skládá z roztoku NaCl (3 g.l⁻¹), masového extraktu (3 g.l⁻¹) a peptonu (5 g.l⁻¹).

4.2.3 Bakteriální kmen

K následné izolaci bakteriální RNA a DNA (viz kapitola 4.3 a 4.6) byla vybrána z gramnegativních bakterií, bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 z čeledi *Enterobacteriaceae*, která byla získána ze sbírkového kmene mikrobiologické laboratoře Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí fakulty technologické (UIOŽP FT), kde je dlouhodobě uchována při teplotě -80 °C.

4.3 Izolace bakteriální DNA

DNA byla izolována pomocí komerční sady High Pure PCR Template Preparation Kit od firmy Roche dle přiloženého návodu:

200 µl bakteriální kultury bylo centrifugováno při 7715 RPM po dobu pěti minut. Centrifugovaná bakteriální kultura byla rozsuspendována v pufrovaném fyziologickém roztoku.

Bylo přidáno 5 µl lysozymu (10 mg.ml⁻¹), obsah byl jemně zamíchán a 15 minut inkubován při teplotě 37 °C.

Poté byla přidána směs složená z 200 µl vazebného pufru a 40 µl Proteinasy K, která byla promíchána pomocí vortexu a temperována po dobu 10 minut v termostatu při teplotě 70 °C.

Po temperaci bylo přidáno 100 µl isopropanolu a směs byla promíchána, čímž došlo k vysrážení bakteriální DNA.

Poté byla směs nanášena na vazebnou kolonku, která byla vložena do sběrné zkumavky. Kolonka se sběrnou zkumavkou byla centrifugována po dobu 1 minuty při 12 400 RPM.

Následovala purifikace a vymývání.

Obsah sběrné zkumavky byl odstraněn a kolonka s filtrem vložena do nové mikrozukumavky. Bylo přidáno 500 µl speciálního pufru na odstranění inhibitorů a směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 12 400 RPM.

Obsah sběrné zkumavky byl opět odstraněn, vazebná kolonka vložena do nové sběrné zkumavky. Bylo přidáno 500 µl promývacího pufru a proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 12 400 RPM.

Předešlý krok byl znovu zopakován.

Po odstranění sběrné zkumavky byla provedena centrifugace po dobu 10 sekund při maximálních otáčkách.

Kolonka s filtrem byla umístěna do nové zkumavky, do středu kolonky bylo přidáno 200 µl elučního pufru předehřátého na teplotu 70 °C elučního pufru, aby došlo k vyvázání DNA z kolonky centrifugací do čisté sběrné kolonky. Centrifugace probíhala po dobu 1 minuty při 12 400 RPM a byla provedena po 15 minutách inkubace vzorku při pokojové teplotě.

Výsledným produktem byla izolovaná DNA, která byla skladována při teplotách -15 °C až -25 °C.

Kontrola kvality vyizolované bakteriální DNA byla provedena pomocí metody agarosové gelové elektroforézy (viz kapitola 5.1).

4.3.1 Primery – návrh

4.3.1.1 Primery pro detekci genu *adiA*

Sada primerů pro detekci genu *adiA* kódujícího enzym arginindekarboxylasu navržená Wunderlichovou et al. (2013) [50] byla nevhodná, jelikož měla příliš dlouhé amplikony pro metodu Real time-PCR. Z literární rešerše byl nalezen článek autorů Baez et al. (2009) [51], který ve své práci používal sadu primerů 1F+1R viz Tab. 2 vhodnou k detekci *adiA* u *E. coli*. Jelikož z literární rešerše byla vybrána jen jedna sada, byly vybrány v programu Blast na základě nukleotidové sekvence genu *adiA* a dalších požadavků na primery viz kapitola 2.2 další dvě sady 2F+2R a 3F+3R viz Tab. 3. Pro detekci tohoto genu byly testovány všechny tři výše uvedené sady primerů: 1R+1F, 2R+2F a 3R+3F.

Tab. 2: Sekvence sady primerů 1F+1R pro detekci genu *adiA*

Označení primeru		Sekvence	Tm (°C)	Délka amplikonu (bp)
1F+1R	F	AAATATGCCGCACGCGTA TT	59,06	101
	R	TTATCGGTCATGCAAGCCT G	58,33	

Tab. 3: Sekvence sad primerů 2F+2R a 3F+3R pro detekci genu *adia*

Označení primeru		Sekvence	Tm (°C)	Délka amplikonu (bp)
2F+2R	F	GCATAGATCGGGTTGAAAC G	56,98	100
	R	ATAACGCTAAAGAAGCGC AG	56,62	
3F+3R	F	TAGTGATCGGCATAGATCG G	56,41	140
	R	GTGACCAACTGCACCTATG A	57,53	

4.3.1.2 Primery pro detekci referenčních genů

Pro referenční geny je charakteristická jejich konstantní exprese, proto jsou vhodné jako interní kontrola. Jako referenční gen byl vybrán v diplomové práci Maršálkové (2014) [52] na základě detekce PCR gen *gapA*, kódující enzym glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenasu (GADPH), enzym glykolytické dráhy. Pro detekci genu *gapA* byla navržena jedna sada primerů viz Tab. 4.

Tab. 4: Sekvence sady primerů F+R pro detekci genu *gapA*

Označení primeru	Sekvence	Tm (°C)	Délka amplikonu (bp)
F	ACTTCGACAAATATGCTGG C	56,50	215
R	CGGGATGATGTTCTGGGAA	56,81	215

4.3.2 Primery – potvrzení funkčnosti

Nejprve proběhlo teoretické testování primerů; k tomuto byl využit počítačový software Primer blast, který potvrdil, že cílovou bakterií všech tří sad primerů (1F+1R, 2F+2R a 3F+3R) je *E. coli*. Pro praktický test primerů byl použit sbírkový kmen *E. coli* CCM 3954. Z těchto bakterií byla za použití izolačního kitu izolována DNA, následovalo provedení klasické PCR s detekcí amplikonů v agarosovém gelu.

4.4 Klasická PCR

V případě přípravy reakční směsi pro PCR bylo postupováno dle doporučení výrobce použité komerční sady Master MIX (GoTaq Hot Start Green Master Mix Promega):

Na jednu reakci byly použity následující složky: 12,5 µl Go Taq Hot Start Green Master Mix Promega, 9,5 µl vody, 1 µl kódujícího (*Forward*) primer (20 µmol.l⁻¹), 1 µl antikódujícího (*Reverse*) primer (20 µmol.l⁻¹) a 1 µl DNA. Objem celé směsi byl 25 µl.

Detekce výsledných ampliconů byla provedena pomocí agarosové gelové elektroforézy.

Tab. 5: Teploty a doba trvání jednotlivých kroků PCR

Krok		Počet opakování (-)	Teplota (°C)	Čas (min)
1. Počáteční denaturace		1	94	3
2. Prodlužování řetězce	Denaturace	35	94	0,5
	Navázání primeru*		58,8, 57,5, 55,8	1
	Elongace		72	1
3. Amplifikace a chlazení		1	72	10

* Byly zvláště testovány tři různé teploty annealingu: 58,8 °C; 57,5 °C; 55,8 °C

4.5 Agarosová gelová elektroforéza

1 % agarosový gel byl připraven navážením 1 g agarosy do Erlenmayerovy baňky, ke které bylo přidáno 100 ml 1×TAE pufru. Suspenze byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Po vyjmutí z mikrovlnné trouby byla směs ochlazená při pokojové teplotě na 55-60 °C. Následně bylo přidáno 2 µl barviva ethidium bromidu. Ochlazený agarosový gel byl poté nalit do formy pro přípravu gelů a okamžitě byl do něj vložen elektroforetický hřeben. Tuhnutí agarosového gelu probíhalo po dobu zhruba 30-60 minut při pokojové teplotě. Po ztuhnutí byl hřeben vyndán a forma s připraveným gelem umístěna do elektroforetické vany.

Do elektroforetických drah byly postupně aplikovány DNA standardy (markery) molekulové hmotnosti a neznámé vzorky.

Elektroforéza DNA na agarosovém gelu byla provedena v horizontálním uspořádání s využitím systému, na zdroji byla nastavena konstantní hodnota napětí 100 V. Elektroforéza byla ukončena, jakmile detekční barvivo urazilo vzdálenost odpovídající $\frac{3}{4}$ délky gelu. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetické vany a umístěn na plochu UV-transiluminátoru, nasnímám digitální kamerou s vysokým rozlišením a vyhodnocen pomocí softwaru. Molekuly DNA s interkalovaným fluorescenčním barvivem pod zdrojem UV záření v transiluminátoru intenzivně fluoreskují.

4.6 Izolace bakteriální RNA

RNA byla izolována pomocí komerční sady High Pure RNA Isolation Kit od firmy Roche dle přiloženého návodu:

Do centrifugační zkumavky bylo napipetováno cca 4 ml bakteriální kultury. Zkumavka byla centrifugována při 10 000 RPM po dobu 10 minut, supernatant byl odlit a poté byla bakteriální kultura suspendována v 200 μ l 10 mmol.l⁻¹ TE pufru o pH 8 tak, aby nevytvářela žádné shluky.

K směsi byly přidány 4 μ l lysozymu a zkumavka byla inkubována při 37 °C 10 minut. Dále bylo přidáno 400 μ l vazebného pufru, směs byla promíchána pomocí vortexu a nanesena na vazebnou kolonku, která byla vložena do sběrné zkumavky.

Kolonka se sběrnou zkumavkou byla centrifugována po dobu 15 sekund při 12 400 RPM, aby došlo k navázání RNA na kolonku a roztok prošlý kolonou byl odstraněn.

Do mikrozukumavky bylo přidáno 90 μ l inkubačního pufru (DNase Incubation Buffer) a 10 μ l Dnase I (deoxyribonukleasa I) a tato směs byla nanesena do středu vazebné kolonky a inkubována byla 60 minut při teplotě 15 až 25 °C.

Následovala purifikace a vymývání.

Do vazebné kolonky bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru, kolonka byla centrifugována po dobu 15 sekund při 12 400 RPM. Obsah sběrné kolonky byl odstraněn. Tento krok byl znovu zopakován s 500 μ l promývacího pufru. Kolonka byla opět centrifugována při 12 400 RPM po dobu 15 sekund. Obsah sběrné kolonky byl opět odstraněn.

Bylo napipetováno 200 μl promývacího pufru. Kolonka byla centrifugována po dobu 2 minut maximální rychlostí, aby došlo k odstranění veškerého promývacího pufru.

Kolonka s filtrem byla přendána do nové 1,5ml sběrné zkumavky, do středu kolonky bylo napipetováno 50 μl elučního pufru, aby došlo k vyvázání RNA z kolonky centrifugací do čisté sběrné kolonky. Proběhla centrifugace 1 minutu při 12 400 RPM.

Výsledným produktem byla izolovaná RNA, která se poté skladovala při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7 Kontrola čistoty a stanovení koncentrace izolované RNA

4.7.1 Spektrální stanovení RNA

Bylo odebráno 2 μl z celkové vyizolované RNA a měření bylo provedeno na přístroji fotometr TECAN Sunrise TW/TC (TECAN) proti elučnímu pufru (slepý vzorek). Na přístroji byla odečtena hodnota A_{260}/A_{280} (posouzení čistoty RNA) a koncentrace RNA (v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).

4.8 Přepis reverzní RNA na cDNA

Vyizolovaná RNA byla přepsána pomocí komerční sady Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) dle přiloženého návodu:

Byla připravena směs RNA a primerů, na jednu reakci bylo použito 2 μl Random Hexamer Primer ($600\text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a 11 μl vyizolované RNA.

Směs byla promíchána a vložena do termocyklu po dobu 10 minut při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

K směsi byly přidány 4 μl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer ($5\times$), 0,5 μl Protector RNase Inhibitor ($40\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 2 μl Deoxynucleotidemix ($1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ každého deoxynukleotidu) a 0,5 μl Transkriptor Reverse Transkriptase ($20\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Objem celé směsi byl 20 μl .

Směs byla jemně promíchána, centrifugována a vložena do termocyklu po dobu 10 minut při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté 30 min při teplotě $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro inaktivaci Transcriptor Reverse Transcriptase byla směs inkubována při teplotě $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut.

Výsledná cDNA byla skladována při teplotě v rozmezí -15 až -25 °C.

Kontrola výtěžku a čistoty přešpané cDNA byla provedena pomocí spektrálního stanovení na přístroji fotometr TECAN Sunrise TW/TC (TECAN) proti Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Bufer (kontrola).

4.9 Kultivace *E.coli* CCM 3954 v různých časových intervalech

Po rozmražení bylo z bakteriálních buněk suspenze této bakterie přeneseno 100 µl do 5 ml sterilního masopeptonového bujónu.

Směs byla promíchána na vortexu a kultivována v termostatu při teplotě 37 °C za intenzivního třepání po dobu 24 hodin.

Po 24 hodinové inkubaci bylo dvakrát přeočkováno 1 ml narostlého inokula do 9 ml minerálního média s glukosou, kdy kultivace probíhala po dobu 48 hodin při teplotě 30 °C.

Z připravené suspenze bylo odebráno 5 ml vzorku, který byl přidán do 45 ml sterilního masopeptonového bujónu. Směs vzorku a bujónu o objemu 50 ml se nechala kultivovat v časovém intervalu: 0, 6, 12, 24, 30 a 36 hodin. Po každém časovém intervalu proběhla 10 minutová centrifugace při maximálních otáčkách. Poté byl supernatant odstraněn a peletka zmrazena při teplotě -20 °C a použita k izolaci RNA.

Ze zbylých 5 ml suspenze bylo odebráno 500 µl, které byly použity k následnému desítkovému ředění. V časovém intervalu 0 bylo ředění 10^{-4} a 10^{-5} , pro ostatní časové intervaly ředění 10^{-6} a 10^{-7} . Z jednotlivých ředění bylo napipetováno 100 µl na dvě Petriho misky s agarem a rozetřeno po povrchu agaru sterilní hokejkou. Naočkované misky byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C obrácené dnem vzhůru. Po 24 hodinové kultivaci byly odečteny narostlé kolonie.

4.10 Kultivace *E. coli* CCM 3954 v mléce s/bez aminokyselin

Vzorek: 3,5 % plnotučné mléko

Bylo napipetováno 100 µl bakteriální suspenze *E.coli* do 5 ml sterilního masopeptonového bujónu.

Směs byla promíchána na vortexu a kultivována při teplotě 37 °C za intenzivního třepání po dobu 24 hodin.

Po 24 hodinové inkubaci byla kultivace ukončena a bylo přeočkováno 5 ml narostlého inokula do 45 ml minerálního média s glukosou.

Vzorky byly rozděleny do 8 plastových zkumavek po čtyřech do dvou skupin. V jedné skupině byly bakterie s 45 ml mléka s přidavkem aminokyselin (0,2 % L-argininu, L-ornitinu) a v druhé s 45 ml mléka bez přidavku aminokyselin.

Poté probíhala kultivace vzorků 48 hodin při teplotě 30 °C. Po 48 hodinové kultivaci bylo odebíráno 5 ml vzorku mléka s přidavkem aminokyselin a 5 ml mléka bez přidavku aminokyselin v časových intervalech: 0, 6, 12, 24, 30 a 36 hodin. Vzorky byly 10 minut centrifugovány při maximálních otáčkách, zbylý roztok odstraněn a vzorky zmrazeny při teplotě -20 °C a použity k následné izolaci RNA.

4.11 Real time-PCR

V případě přípravy reakční směsi pro Real time-PCR bylo postupováno dle doporučení výrobce použité komerční sady Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) od firmy Roche.

V případě, že byla komplementární cDNA zmrazena, byla ponechána při pokojové teplotě, aby roztála a následně byla jemně promíchána za pomoci pipety. V boxu byla napipetována na 96 jamkovou mikroadestičku předem připravená reakční směs, která se skládala z 12,5 µl Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox), 9,5 µl vody, 0,25 µl kódujícího (*Forward*) primer (30 µmol.l⁻¹), 0,25 µl antikódujícího (*Reverse*) primer (30 µmol.l⁻¹) a 2,5 µl DNA. Objem celé směsi byl 25 µl. Jako negativní kontrola byla použita reakční směs obsahující předešlé reakční složky bez DNA (místo ní bylo pipetováno 2,5 µl PCR H₂O). Mikroadestička byla následně zapečetěna speciální fólií a přenesena do podavače termocykleru s programem sumarizovaným v Tab. 6:

Tab. 6: Reakční podmínky Real time-PCR

Krok		Počet opakování (-)	Teplota (°C)	Čas (min)
1. Počáteční denaturace		1	95	3
2. Prodlužování řetězce	Denaturace	44	95	0,5
	Navázání primeru		57,5	0,5
	Elongace		70	0,5
3. Křivka tání			50-95	-
4. Závěrečná amplifikace		1	72	5

-teplota zvyšována každé 0:05 sekundy o 0,5 °C

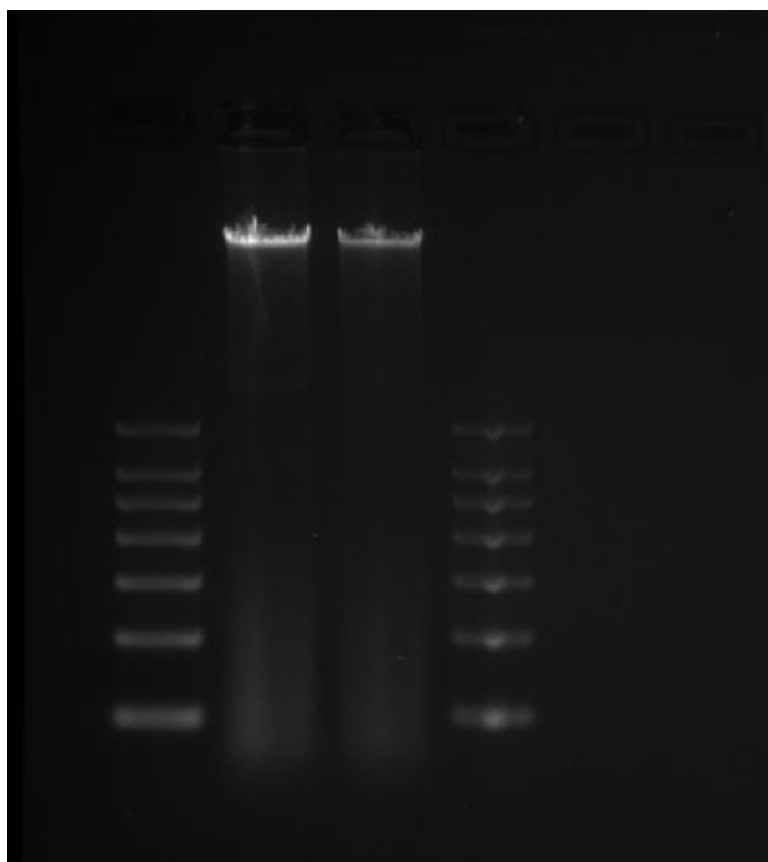
Jako referenční gen byl zvolen: *gapA* (gen kódující glycerinaldehyd 3-fosfátdehydrogenasu)

Jako gen cílový byl zvolen: *adiA* (gen kódující arginindekarboxylasu, viz obr. 9)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kontrola izolace DNA

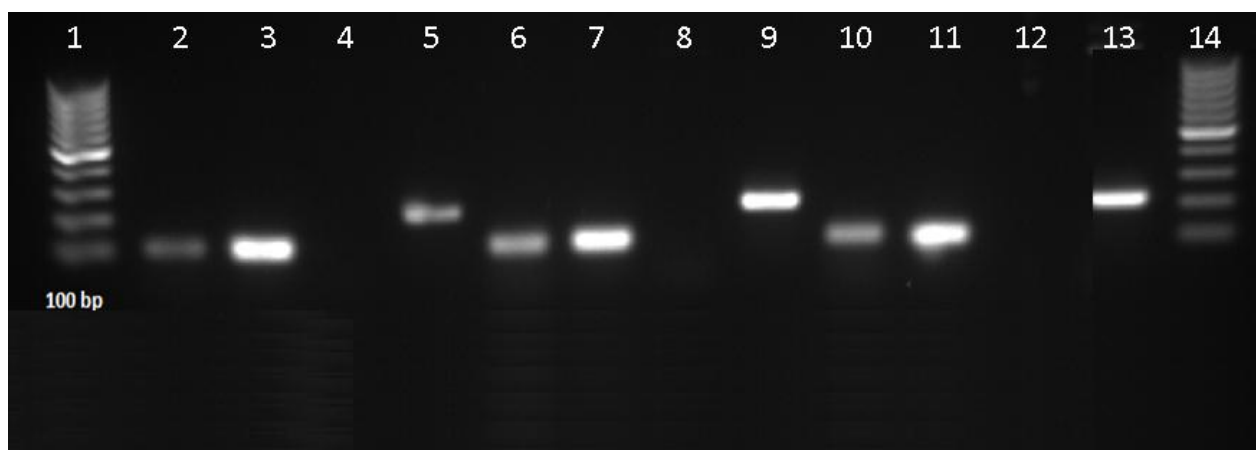
Jelikož nebyl v počátcích této experimentální diplomové práce k dispozici přístroj TECAN, který by posoudil kvalitu izolované DNA pomocí komerční sady High Pure PCR Template Preparation Kit, byly první pokusy izolované DNA kontrolovány/ověřovány elektroforetickou separací v 1 % agarosovém gelu v prostředí TAE pufru (postup dle kapitoly 4.5 Agarosová gelová elektroforéza). Do jednotlivých jamek byly nanášeny jednotlivé vzorky (viz obr. 10), do první a čtvrté jamky gelu byly nanášeny Markery 100 bp DNA LEADER Biolab, v druhé a třetí jamce se nachází vyizolovaná fluoreskující DNA z gramnegativní bakterie *E. coli*. DNA je vizualizovaná po obarvení ethidium bromidem na UV transiluminátoru. Z obrázku je patrné, že se DNA podařilo izolovat (na gelu v dráze č. 2 a 3 jsou viditelné dva proužky). Pokud by místo proužku byla „šmouha“ značilo by to, že DNA byla degradována.



Obr. 10: Izolovaná DNA z *E. coli*

5.2 Ověření funkčnosti navržených primerů klasickou metodou PCR, velikosti amplikonu, výběr vhodné sady primeru a teploty annealingu pro gen *adiA*

Jak již bylo uvedeno, primery navržené v práci Wunderlichová et al. (2013) [50] byly nevhodné, jelikož měly příliš dlouhé amplikony (délka amplikonu okolo 500 bp) pro metodu Real time-PCR. Pro detekci vybraného genu *adiA* byla ověřena funkčnost tří sad vybraných primerů 1F+1R, 2F+2R a 3F+3R klasickou metodou PCR za podmínek reakce viz Tab. 5. Nejdřív bylo potřeba primery otestovat na DNA *E. coli*. Proto bylo potřeba oživit bakterie *E. coli*, izolovat z nich DNA a využít klasickou PCR, kdy PCR-produkty byly elektroforeticky rozděleny v 1 % agarosovém gelu a vizualizovány pomocí UV transilumátoru. Vhodná délka amplikonu pro metodu Real time-PCR s využitím fluorescenčního barviva SYBR GREEN I je 80-250 bp [53, 54, 55]. Testovány byly všechny tři navržené sady primerů s teplotami annealingu: 55,8 °C, 57,5 °C a 58,8 °C. Z obr. 11 je patrné, že navržená sada 3F+3R je pro naše experimenty nevhodná, protože při jejich použití, nebyl zaznamenán žádný produkt ani při jedné z testovaných teplot. Naopak, jako úspěšná sada primerů byla označena sada 2F+2R s teplotou annealingu 57,5 °C. Důvodem je nejen vhodná délka amplikonu přibližně 100 bp, ale taky to, že PCR-produkt svítí na gelu nejostřeji a teplota 57,5 °C je vhodná nejenom pro primery detekující *adiA*, ale i pro sadu primerů, která detekuje *gapA*.



Obr. 11: Ověření funkčnosti primerů, velikosti amplikonů a výběr vhodné teploty annealingu

1-Marker molekulových hmotností, 2-primer *adiA* (1F+1R) při T=58,8 °C, 3-primer *adiA* (2F+2R) při T=58,8 °C, 4- primer *adiA* (3F+3R) při T=58,8 °C, 5-primer *gapA* (F+R) při T=58,8 °C, 6-primer *adiA* (1F+1R) při T=57,5 °C, 7-primer *adiA* (2F+2R) při T=57,5 °C,

8-primer *adiA* (3F+3R) při T=57,5 °C, 9-primer *gapA* (F+R) při T=57,5 °C, 10-primer *adiA* (1F+1R) při T=55,8 °C, 11-primer *adiA* (2F+2R) při T=55,8 °C, 12-primer *adiA* (3F+3R) při T=55,8 °C, 13-primer *gapA* (F+R) při T=55,8 °C, 14-Marker molekulových hmotností (100 bp)

5.3 Real time-PCR

Po stanovení počtu kolonií *E. coli* (viz Tab. 6), izolaci RNA z *E. coli*, přepisu RNA do molekuly cDNA, kontroly čistoty a koncentrace RNA (viz Tab. 7) a přeepsané cDNA (viz Tab. 8) a úspěšné volbě primerů (2F+2R) s vybranou teplotou 57,5 °C došlo k samotnému měření metodou Real time-PCR.

Pomocí Real time-PCR byla sledována relativní genová exprese genu *adiA* u bakterie *E. coli* v závislosti na kultivačních podmínkách. Současně bylo provedeno desítkové ředění koncentrace DNA (1:10, 1:100 a 1:1000). Požadavkem pro zmíněnou metodu je dostupnost reakčních směsí vhodných pro amplifikaci DNA fragmentů. V současné době nabízí výrobci několik reakčních směsí tvořených několika složkami a je důležité, aby tyto komponenty byly v reakci vyvážené. Tyto reakční směsi jsou poté určeny pro amplifikaci DNA fragmentů metodou Real time-PCR v přítomnosti fluorescenčního DNA barviva nebo sondy.

V reakční směsi byl použit SYBR Green I (fluorescenční DNA barvivo, interkalační); přičemž byla monitorována fluorescence v jednotlivých cyklech qPCR. Výhodou Real time-PCR je také to, že pokud je využíván SYBR Green I, může být snadno kontrolováno, jestli v průběhu reakce nevznikají nespecifické produkty (či dimery primerů). K této kontrole lze využít křivku tání (melting curve), která vychází z předpokladu, že různé PCR produkty mají různé teploty tání [30].

Tab. 7: Stanovení počtu kolonií *E. coli* v různých časových intervalech

Čas (h)	Ředění (-)	Počet kolonií (-)	Počet kolonií (KTJ/ml vzorku)
0	10^{-4}	4	$4 \cdot 10^4$
	10^{-5}	1	$1 \cdot 10^5$
6	10^{-6}	9	$9 \cdot 10^6$
	10^{-7}	3	$3 \cdot 10^7$
12	10^{-6}	20	$20 \cdot 10^6$
	10^{-7}	4	$4 \cdot 10^7$
24	10^{-6}	8	$8 \cdot 10^6$
	10^{-7}	3	$3 \cdot 10^7$
30	10^{-6}	6	$6 \cdot 10^6$
	10^{-7}	2	$2 \cdot 10^7$
36	10^{-6}	5	$5 \cdot 10^6$
	10^{-7}	2	$2 \cdot 10^7$

Byl stanovován počet kolonií *E. coli* v různých časových intervalech, aby se zjistilo, zda počty kolonií korespondují s výsledky exprese. Z Tab. 7 lze vidět, že největší počet kolonií byl zaznamenán po 12 hodinové kultivaci, jelikož bakterie měly dostatek živin k expresi genu *adiaA*. Měření růstu bakterií proběhlo jednou z variant kultivační metody tzv. plotnovou metodou v různých časových intervalech. Množení bakterií souvisí s růstovou křivkou. V pozdějších časových intervalech po 24, 30 a 36 hodinách počet kolonií klesal, protože docházelo k vyčerpání živin a k inhibici zplodinami a tím pádem k autolýze buňky. Také se ukázalo, že čím víc vzorek byl naředěn, tím byl počet kolonií menší.

Tab. 8: Kontrola čistoty a stanovení koncentrace izolované RNA

Čas (h)	Koncentrace (ng.μl ⁻¹)	Čistota (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
0	28,60	1,08
6	19,36	1,30
12	158,32	1,13
24	46,64	1,05
30	128,00	1,58
36	32,72	1,27

Tab. 9: Kontrola čistoty a stanovení koncentrace přepsané cDNA

Čas (h)	Koncentrace (ng/μl)	Čistota (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
0	2657,40	1,80
6	2740,70	1,79
12	2958,70	1,80
24	2319,20	1,78
30	2364,40	1,79
36	912,20	1,83

Dalším krokem pro úspěšnost reakce Real time-PCR byla izolace RNA i cDNA v dostačující kvantitě (koncentrace) a kvalitě (čistota). Při izolaci RNA bylo postupováno dle doporučení výrobce použité komerční sady High Pure RNA Isolation Kit a při přepisu (transkripci) RNA do cDNA pomocí komerční sady Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit.

Hlavním problémem u izolace RNA je přítomnost inhibitorů především ribonukleas (RNas), viz níže. Přítomnost inhibitorů poté ovlivňuje aktivitu reversní transkriptasy nebo polymerasy a tím i spolehlivost celé reakce, proto bylo důležité pracovat v rukavicích a používat sterilní zkumavky a pipety. Vzorky přepsané cDNA mohou být snadno ovlivněny

kontaminanty. Týká se to vzorků, které nebyly přečištěny od reakčních komponent, proto se využívá purifikačních kolonek nebo musí být dostatečně naředěny vodou.

Kvalita a kvantita izolované RNA a cDNA byla zkontrolována fotometricky.

Při měření čistoty RNA platí: $A(260\text{ nm})/A(280\text{ nm}) = 2,0$ čistá RNA, $A(260\text{ nm})/A(280\text{ nm}) < 2,0$ znečištěná RNA.

Při měření čistoty cDNA platí: $A(260\text{ nm})/A(280\text{ nm}) \in \langle 1,7; 1,8 \rangle$ čistá cDNA, $A(260\text{ nm})/A(280\text{ nm}) < 1,7$ znečištěná cDNA a u $A(260\text{ nm})/A(280\text{ nm}) > 1,9$ cDNA znečištěná RNA. Poměr absorbancí 260/280 menší než 1,75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin.

Doporučená koncentrace RNA by se měla pohybovat okolo $40\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a koncentrace cDNA $50\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ [56].

Z Tab. 8 při kontrole čistoty a stanovení izolované RNA je patrné, že ani u jednoho vzorku nebylo požadované čistoty dosaženo a koncentrace jen při odběru vzorků po 12, 24 a 30 hodině, ale tyto hodnoty nehrajou tak důležitou roli, jelikož doporučené hodnoty jsou pouze orientační a při průběhu reakce Real time-PCR se pracuje až s přeepsanou cDNA. Po prepisu RNA na cDNA z Tab. 9 lze vidět, že požadované čistoty a koncentrace bylo dosaženo. Tato přeepsaná cDNA byla následně použita jako matrice pro Real time-PCR

Samotná metoda Real time-PCR byla tedy provedena v 96-ti jamkových destičkách, kdy úroveň fluorescence byla zaznamenána v jednotlivých jamkách, v jednotlivých cyklech.

Pro každý vzorek je konečným výstupem amplifikační křivka. Na základě dané prahové hodnoty pro každou amplifikační křivku byl určen bod C_t . Z C_t hodnoty v závislosti na použité sérii vzorků s desítkovým ředěním byla vytvořena tzv. standardní křivka pro každý odběrový čas. Pomocí hodnot sklonu křivky byla vypočítána účinnost reakce, jak již bylo uvedeno viz kapitola 2.7.7 dle vzorce:

$$E = 10^{-1/\text{směrnice}}$$

Následným odečtením čísla jedna a vynásobením $100\times$ byla získána hodnota efektivity reakce v % viz Tab. 11, 13, 15, 17, 19 a 21.

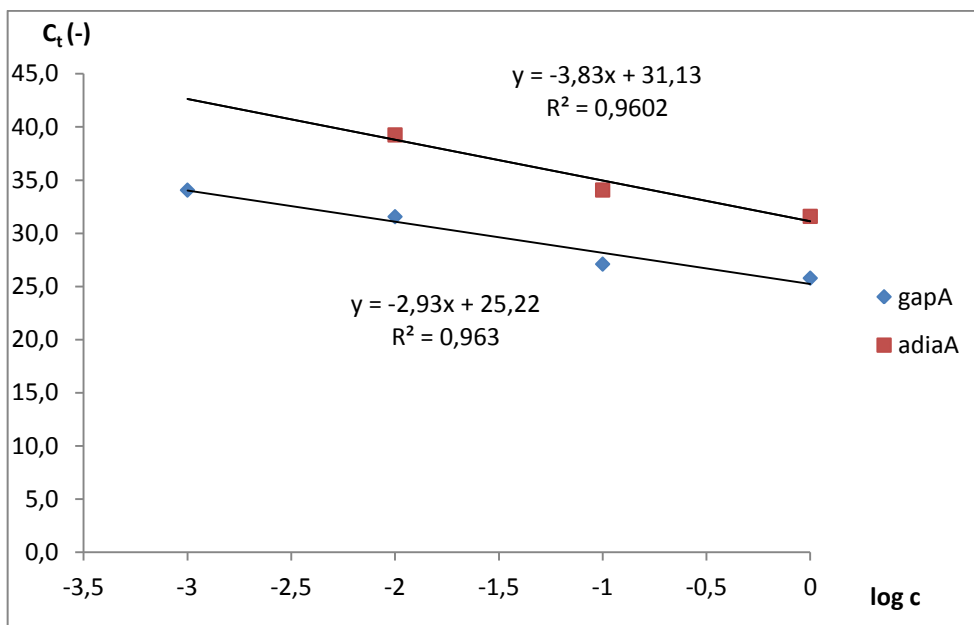
Ze získaných C_t hodnot v dubletech (jeden vzorek ve dvou reakcích) byla vypočítána geometrickým průměrem C_t hodnota pro výpočet efektivity a to jak pro gen *adiA*, tak pro gen *gapA* v různých odběrových časech viz Tab. 10, 12, 14, 16, 18, 20 a byly vytvořeny stan-

dardní křivky pro jednotlivé odběrové časy (0, 6, 12, 24, 30 a 36 hodin), viz Obr. 12-Obr. 17.

Tab. 10: C_t hodnoty pro gen *gapA* a gen *adiA* v odběrovém čase 0 hodin

Ředění	Gen <i>gapA</i> C_t (-)	Gen <i>adiA</i> C_t (-)
1:1	25,77	31,58
1:10	27,09	34,06
1:100	31,55	39,24
1:1000	34,05	-

Z Tab. 10 lze vyčíst, že v případě, kdy byla DNA naředěna v poměru 1:1000, nebylo možno již detekovat hodnotu C_t pro *adiA*. Z tohoto důvodu byla i relativní exprese (R) stanovena pouze pro neředěnou DNA (1:1) a DNA ředěnou 1:10 a 1:100.



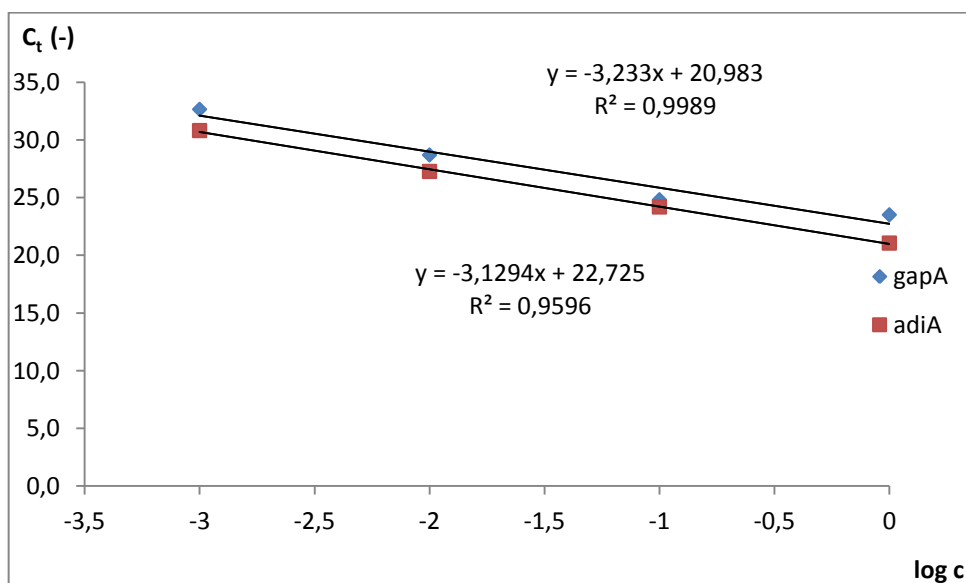
Obr. 12: Standardní křivka v odběrovém čase 0 hodin

Tab. 11: Efektivita reakce v odběrovém čase 0 hodin

Gen	Sklon křivky (-)	Hodnota efektivity (-)	Efektivita (%)
<i>gapA</i>	2,93	2,19	119
<i>adiA</i>	3,83	1,82	82

Tab. 12: C_t hodnoty pro gen *gapA* a gen *adiA* v odběrovém čase 6 hodin

Ředění	Gen <i>gapA</i> C_t (-)	Gen <i>adiA</i> C_t (-)
1:1	23,51	21,06
1:10	24,82	24,19
1:100	28,69	27,27
1:1000	32,65	30,81



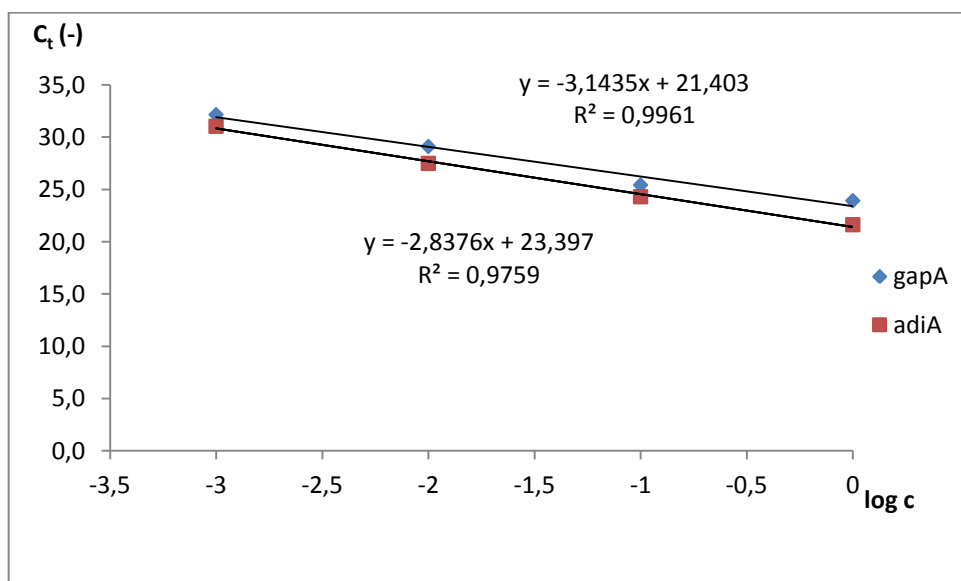
Obr. 13: Standardní křivka v odběrovém čase 6 hodin

Tab. 13: Efektivita reakce v odběrovém čase 6 hodin

Gen	Sklon křivky (-)	Hodnota efektivity (-)	Efektivita (%)
<i>gapA</i>	3,23	2,04	104
<i>adiA</i>	3,13	2,09	109

Tab. 14: C_t hodnoty pro gen *gapA* a gen *adiA* v odběrovém čase 12 hodin

Ředění	Gen <i>gapA</i> C_t (-)	Gen <i>adiA</i> C_t (-)
1:1	23,92	21,63
1:10	25,42	24,30
1:100	29,11	27,49
1:1000	32,15	31,04



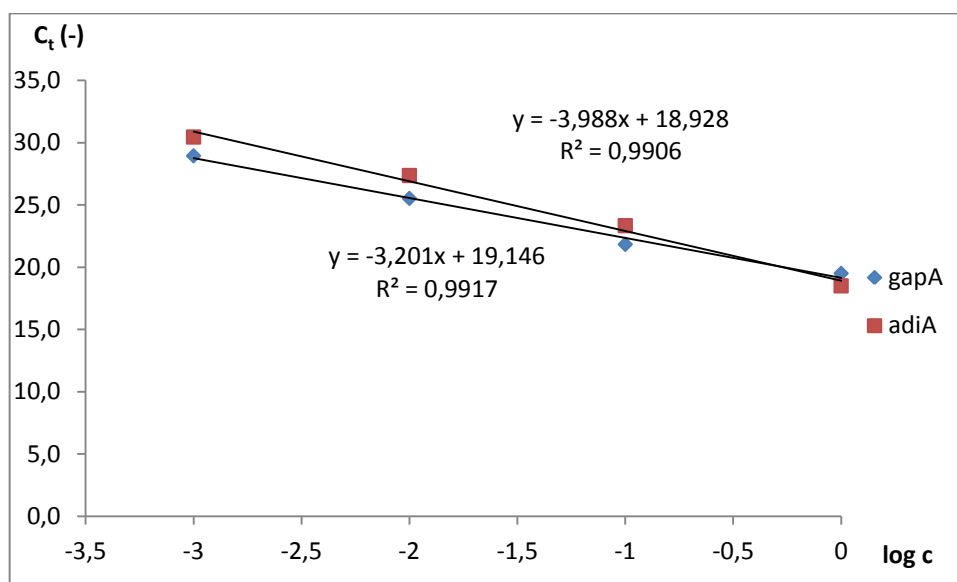
Obr. 14: Standardní křivka v odběrovém čase 12 hodin

Tab. 15: Efektivita reakce v odběrovém čase 12 hodin

Gen	Sklon křivky (-)	Hodnota efektivity (-)	Efektivita (%)
<i>gapA</i>	3,14	2,08	108
<i>adiA</i>	2,83	2,25	126

Tab. 16: C_t hodnoty pro gen *gapA* a gen *adiA* v odběrovém čase 24 hodin

Ředění	Gen <i>gapA</i> C_t (-)	Gen <i>adiA</i> C_t (-)
1:1	19,5	18,5
1:10	21,83	23,33
1:100	25,52	27,36
1:1000	28,94	30,45



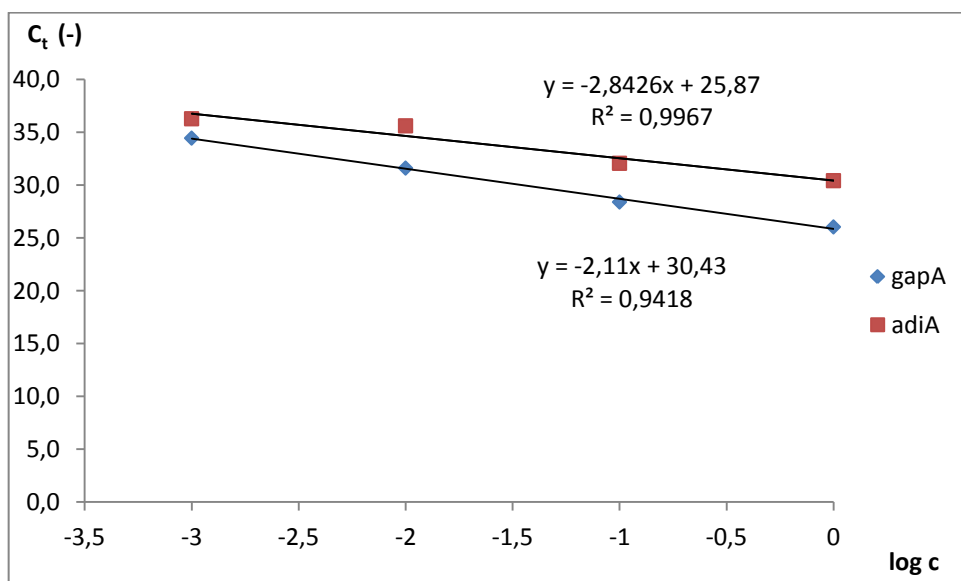
Obr. 15: Standardní křivka v odběrovém čase 24 hodin

Tab. 17: Efektivita reakce v odběrovém čase 24 hodin

Gen	Sklon křivky (-)	Hodnota efektivity (-)	Efektivita (%)
<i>gapA</i>	3,20	2,05	105
<i>adiA</i>	3,99	1,78	78

Tab. 18: C_t hodnoty pro gen *gapA* a gen *adiA* v odběrovém čase 30 hodin

Ředění	Gen <i>gapA</i>	Gen <i>adiA</i>
	C_t (-)	C_t (-)
1:1	26,05	30,43
1:10	28,41	32,07
1:100	31,62	35,62
1:1000	34,45	36,29



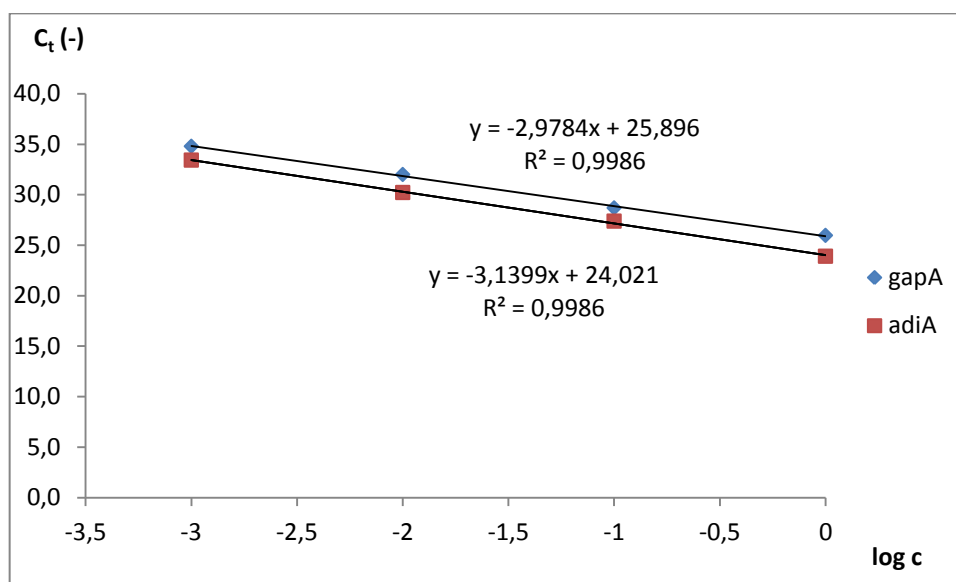
Obr. 16: Standardní křivka v odběrovém čase 30 hodin

Tab. 19: Efektivita reakce v odběrovém čase 30 hodin

Gen	Sklon křivky (-)	Hodnota efektivity (-)	Efektivita (%)
<i>gapA</i>	2,11	2,98	198
<i>adiA</i>	2,84	2,25	125

Tab. 20: C_t hodnoty pro gen *gapA* a gen *adiA* v odběrovém čase 36 hodin

Ředění	Gen <i>gapA</i> C_t (-)	Gen <i>adiA</i> C_t (-)
1:1	25,97	23,90
1:10	28,69	27,38
1:100	32,00	30,21
1:1000	34,79	33,42



Obr. 17: Standardní křivka v odběrovém čase 36 hodin

Tab. 21: Efektivita reakce v odběrovém čase 36 hodin

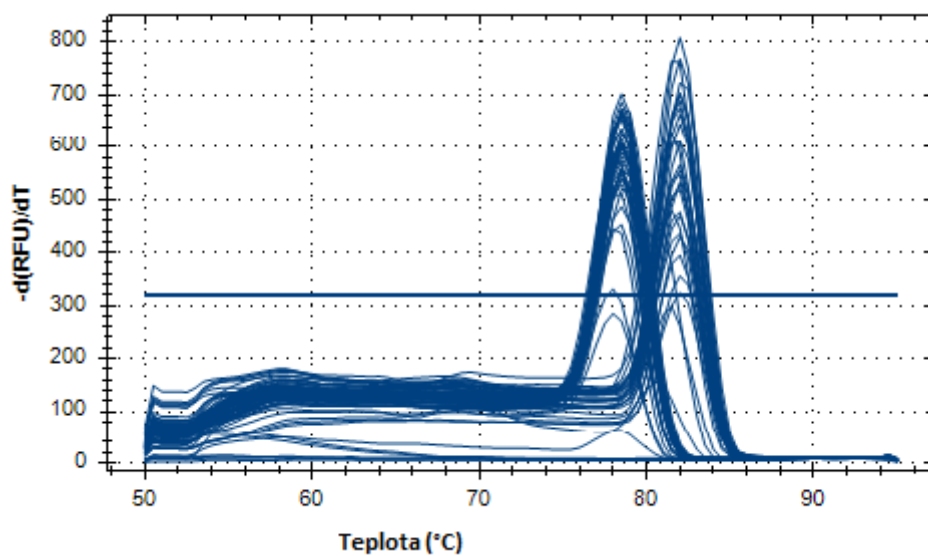
Gen	Sklon křivky (-)	Hodnota efektivity (-)	Efektivita (%)
<i>gapA</i>	2,98	2,17	117
<i>adiA</i>	3,14	2,08	108

Velice důležitou součástí při relativní kvantifikaci je stanovení efektivity reakce pro studovaný i referenční gen (potřeba hodnot E do výpočtu R; viz Obr. 19 a Tab. 21).

Při ideální efektivitě reakce 100 % (efektivita (E)=2) je hodnota sklonu křivky rovna -3,32. Rozdíly v efektivitě mezi analyzovanými vzorky vytvářejí standardní křivky s různými hodnotami sklonu. Ze získaných hodnot z tabulek a grafů vyplývá, že ani u jednoho vzorku se nepodařilo dosáhnout 100 % účinnosti reakce. Ačkoliv hodnoty blíží se ke 100 % , byly pozorovány po 6 hodinové kultivaci. Obecně jsou považovány za přijatelné efektivity v rozmezí 90-110 %. Ovšem platí, pokud je účinnost výrazně nižší (např. -3,6), snižuje se přesnost kvantifikace, nebo naopak pokud je hodnota sklonu vyšší (např. -3,2) indikuje to nízkou kvalitu vzorku, či problémy při přípravě reakce. Vypočítané hodnoty efektivity byly geometricky způměrovány, jak pro gen *adiA*, tak pro gen *gapA*. Průměrná hodnota efektivity pro gen *adiA* je 2,04 a pro gen *gapA* je 2,23. Z výsledků lze už posoudit, že účinnosti reakce bylo optimálně dosaženo a reakce je efektivní.

Mezi další faktory, které mohly ovlivnit přesnost reakce Real time-PCR patří: nepřesné pipetování, špatné promíchání, či přítomnost kontaminace.

Přítomnost nespecifických produktů je kontrolována pomocí křivky tání viz Obr. 18. Křivka tání ukazuje změnu intenzity fluorescence při různých teplotách. Nespecifické produkty mají obvykle teplotu tání nižší než specifické, také platí, že pokud má křivka pouze jeden vrchol, reakce je čistě specifická, pokud má dva a více vrcholů, znamená to, že kromě specifických produktů vznikají také nespecifické. U specifických produktů se teplota pohybuje okolo 80 °C, je-li výrazně nižší, jedná se už o nespecifické produkty. Tímto bylo potvrzeno, že reakce je nejen efektivní, ale také i specifická, protože na křivce není žádný jiný „nechtěný“ produkt.



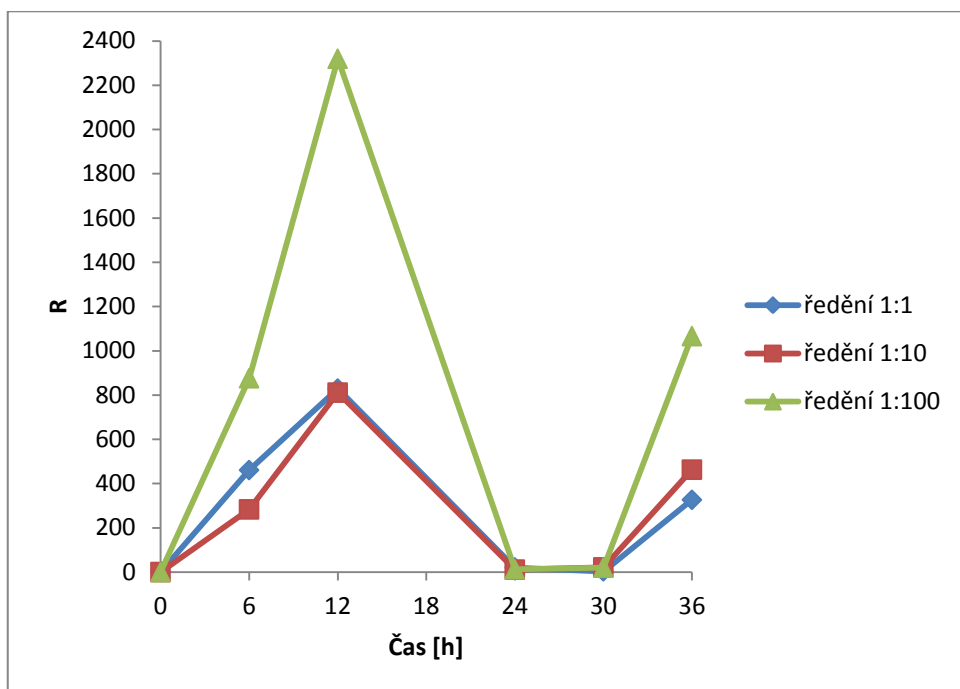
Obr. 18: Křivka tání

Z C_t hodnot byla vypočítána v závislosti na kultivačních podmínkách relativní exprese v různých časech 6, 12, 24, 30 a 36, kdy byla sledována změna exprese genu *adiA*. K výpočtu změny genové exprese byla použita Pfafflova metoda viz kapitola 2.77, která kombinuje kvantifikaci a současně normalizaci do jediného výpočtu. Výsledky tohoto výpočtu sumarizuje tabulka 22.

Tab. 22: Hodnoty relativní exprese genu *adiA* vypočítané metodou dle Pfaffla

Čas (h)	Ředění (-)	R (-)
6	1:1	461
	1:10	283
	1:100	876
12	1:1	829
	1:10	811
	1:100	2319
24	1:1	21
	1:10	11
	1:100	12
30	1:1	3
	1:10	21
	1:100	20
36	1:1	326
	1:10	463
	1:100	1066

Vyhodnocení genové exprese v závislosti na kultivačních podmínkách v kultivačním médiu



Obr. 19: Změna exprese genu *adiA* u *E. coli* CCM 3954 v závislosti na délce kultivace (v kultivačním médiu)

Z obr. 19 je patrné, že nejvyšší relativní exprese bylo dosaženo (při všech ředěních DNA – 1:1, 1:10, 1:100) po 12h kultivaci *E. coli* v kultivačním médiu s přidavkem aminokyseliny L-argininu, při ředění DNA 1:100. Rozdíly v expresi byly pozorovány v souvislosti s ředěním DNA přítomné v roztoku. Při ředění 1:100 byla exprese nejvyšší ve všech časech (s výjimkou 24 h). Po 24 h kultivaci relativní exprese značně klesá a po 36h kultivaci dochází k opětovnému růstu. Příčinou může být fakt, že v 24 h bakterii dochází živiny; nárůst expresev 36. hodině by se dal vysvětlit možnou autolýzou bakterií, kdy dochází k rozkladným procesům (možnému uvolnění aminokyselin) a bakterie čerpají živiny právě z těchto procesů (dochází i ke změně exprese genu *adiA*). Vysvětlením proč je zaznamenána nejvyšší exprese právě při ředění 1:100 může být to, že čím víc se ředí DNA, tím méně působí PCR inhibitory.

Sledování exprese genu *adiA* v mléce v závislosti na délce kultivace *E. coli* CCM3954

Po vyhodnocení genové exprese v závislosti na kultivačních podmínkách v kultivačním médiu následoval další pokus a to s reálným vzorkem (s 3,5% plnotučným mlékem).

Taktéž následovalo oživení bakterií, kultivace bakterií *E. coli* v mléce bez přídavku aminokyseliny L-argininu a s přídavkem aminokyseliny L-argininu. Pokus v mléce byl koncipován obdobně, jako pokus v kultivačním médiu, i zde bylo v plánu sledovat relativní expresi genu *adiA* v závislosti na různých časových podmínkách kultivace. Kultivace opět trvala 36 hodin, a v jednotlivých časech (0, 6, 12, 24, 30, 36 h) byly odebírány vzorky, z nichž byla následně izolována RNA. Následovala izolace RNA, jejíž čistota a koncentrace byly měřeny spektrometricky (TECAN) při vlnové délce 260 a 280 nm. Výsledky tohoto měření sumarizuje tabulka 23.

Tab. 23: Kontrola čistoty a stanovení koncentrace RNA izolované ze vzorků mléka

Mléko bez přídavku aminokyseliny			Mléko s přídavkem aminokyseliny		
Čas (h)	Koncentrace (ng·μl ⁻¹)	Čistota (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Čas (h)	Koncentrace (ng·μl ⁻¹)	Čistota (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
0	48	0,97	0	154,16	1,63
6	21,92	0,96	6	237,04	0,42
12	4,32	0,62	12	19,2	0,48
24	30	0,54	24	6,96	0,86
30	3,68	0,79	30	10,56	0,8
36	35,44	0,65	36	9,68	0,79

Z výsledků je patrné, že se nepodařilo izolovat RNA v dostatečné čistotě, a v některých případech ani v dostatečném množství.

Mezi důležité faktory, které právě ovlivňují izolaci RNA, patří zejména přítomnost ribonukleas (RNAs), enzymů které RNA degradují. RNasy jsou běžné laboratorní kontaminanty z bakteriálních a lidských zdrojů, které se uvolňují během procesů vedoucích k buněčné

lýzi [57]. Navíc byl jako reálný vzorek použit vzorek kravského mléka a i v kravském mléce se vyskutuje RNasa; tento enzym se zde nachází ve dvou izoformách. S největší pravděpodobností se jedná o pankreatickou RNasu, která se ze střev zvířete dostává do krve a z krve následně do mléka. Protože byl jako reálný vzorek použit vzorek mléka se 3,5 % tuku, nedá se zcela vyloučit ani tento faktor (tuk), který mohl působit negativně na celkovou koncentraci a také čistotu izolované RNA [58]. Rovněž relativně vyšší obsah kaseinu v tomto mléce mohl izolaci negativně ovlivnit. Během několika hodinové kultivace došlo navíc k vysrážení mléka – toto je další faktor, který může následnou izolaci RNA ovlivnit. Z těchto důvodů by bylo vhodné pokus zopakovat s mlékem, jež má nižší obsah tuku, v případě vysrážení mléka vzorek před izolací RNA podrobit účinkům mechanického homogenizátoru a optimalizovat izolaci RNA z tohoto reálného vzorku. Teprve poté, co bude optimalizována metoda izolace RNA z reálného vzorku, můžou následovat další kroky jako je transkripce (přepis z RNA do molekul cDNA), následně vlastní Real time-PCR a vyhodnocení sledované relativní exprese. V současné době je pokus znovu opakován, ale z časových důvodů nebudou výsledky tohoto experimentu součástí této diplomové práce.

Ukázalo se, že již vlastní izolace RNA zde hraje klíčovou roli. Obecně by se dalo konstatovat, že základním cílem přípravy RNA je rychlá a efektivní lýze buněk, inaktivace RNas, denaturace komplexů nukleových kyselin s proteiny, ale také oddělení RNA od proteinů a DNA. Ochranou před působením RNas by zajisté mohlo být nejen používání rukavic, zkumavek „bez RNas“, špiček a chemikálií, ale také používání inhibitorů RNas, především chaotropních činidel, které mohou ve zvýšené koncentraci navodit denaturaci proteinů [59].

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zavést a optimalizovat metodu Real time-PCR pro detekci a kvantifikaci vybraného genu *adiA* kódujícího arginindekarboxylasu, enzymu, který u gramnegativních bakterií katalyzuje přeměnu bazické aminokyseliny L-argininu na agmatin, jež je následně přeměněn na putrescin.

Byly navrženy a testovány 3 sady primerů (1F+1R, 2F+2R, 3F+3R) pro detekci a kvantifikaci genu *adiA* metodou Real time-PCR. Byla vybrána sada s pracovním označením 2F+2R s teplotou annealingu 57,5 °C (teplota optimální pro primery detekující jak *adiA* /sledovaný gen/, tak *gapA* /referenční gen/) a délkou amplikonu 100 bp. V průběhu experimentů byla metoda optimalizována, bylo dosaženo optimální účinnosti reakce (90–110 %).

Metodou dle Pfaffla byla analyzována genová exprese v závislosti na kultivačních podmínkách; jednalo se o metodu relativní kvantifikace. Nejvyšší exprese genu *adiA* ($R= \sim 2000$) bylo dosaženo po 12 hodinách kultivace *E. coli* CCM 3954 v kultivačním médiu s přídatkem L-argininu. Bylo prokázáno, že gen *adiA* je opravdu inducibilním genem.

Snahou bylo popsat i relativní expresi genu *adiA* také v reálném vzorku, vzorku mléka (bez přídatku a s přídatkem aminokyselin), ale z důvodu experimentálních potíží zejména při izolaci RNA (o vhodné čistotě a koncentraci) nebylo z časových důvodů dosaženo požadovaného výsledku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] MEDINA, Miguel Ángel, José Luis URDIALES, Carlos RODRÍGUEZ-CASO, Francisco Javier RAMÍREZ a Francisca SÁNCHEZ-JIMÉNEZ. Biogenic Amines and Polyamines: Similar Biochemistry for Different Physiological Missions and Biomedical Applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2008, **38**(1), 23-59 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1080/713609209. ISSN 1040-9238. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/713609209>

[2] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-00-3.

[3] *VÝSKYT MIKROORGANISMŮ S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU V SÝRECH* [online]. 2009 [cit. 2015-08-18].

Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2009/116_s._16-18.pdf

[4] STADNIK, Joanna, J.DOLATOWSKI, Zbigniew. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.*, 2010, 9.3: 251-263.

[5] SHUKLA, Shruti, Jong-Kyu KIM a Myunghee KIM. Occurrence of Biogenic Amines in Soybean Food Products. *Soybean and Health*[online]. InTech, 2011 [cit. 2015-05-4]. DOI: 10.5772/19021. ISBN 978-953-307-535-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-health/occurrence-of-biogenic-amines-in-soybean-food-products>

[6] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 2007. ISBN 80-200-0600-1.

[7] *MONITORING VÝSKYTU BIOGENNÍCH AMINŮ VE FERMENTOVANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH V ČR* [online]. 2012 [cit. 2015-08-19]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2012/134_s.i-iii.pdf

[8] NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approa-

ches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, **75**(7), R139-R150 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147.

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>

[9] LANDETE, José María, Blanca DE LAS RIVAS, Angela MARCOBAL a Rosario MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, **117**(3), 258-269 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001. ISSN 01681605.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507002644>

[10] FIALOVÁ, Jana, Jana CHUMCHALOVÁ, Kamila MÍKOVÁ, Mária GREIFOVÁ a Gabriel GREIF. Výskyt rodu *Lactobacillus* a biogenních aminů v laboratorně vyrobené majonéze a tatarské omáčce. *Chemické listy*. 2013, (107), 308-312.

[11] SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, (98), 432-437.

[12] SLEDOVÁNÍ KVALITY FARMÁŘSKÝCH SÝRŮ [online]. 2012 [cit. 2015-08-18]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2012/133_s.i-iv.pdf

[13] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* [online]. 1996, **29**(7), 675-690 [cit. 2016-02-16]. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X. ISSN 09639969.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399699600066X>

[14] WUNDERLICHOVÁ, Leona. *Vývoj nových molekulárně biologických metod detekce putrescin produkujících bakterií*. Zlín, 2014. Disertační práce.

- [15] DEMNEROVÁ, Kateřina. *Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní kontrolu*. *Chemické listy*. 2012, (106), 920-925.
- [16] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [17] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4.
- [18] BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
- [19] FERNÁNDEZ, M., B. DEL RÍO, D.M. LINARES, M.C. MARTÍN a M.A. ALVAREZ. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production. *Journal of Dairy Science* [online]. 2006, **89**(10), 3763-3769 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72417-1. ISSN 00220302.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030206724171>.
- [20] *Polymerázová řetězová reakce* [online]. [cit. 2015-01-22].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>
- [21] PAVLÍK, Emil. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 3. *Labor aktuell Czech*, 1999, č. 2, s. 22-25. ISSN: 1211-5665.
- [22] *Princip PCR* [online] [cit.20150122].
Dostupné z: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/seq.html>

[23] VOET, Donald. a Judith G. VOET. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, c2011. ISBN 0470917458.

[24] ŠTÁSTKOVÁ, Zora, Renata KARPÍŠKOVÁ a Ivana BORKOVCOVÁ. Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. *Chemické listy*. 2012, (106), 745-749.

[25] NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M.J. CASTAÑO a J. SOLERA. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, **439**, 231-250 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017. ISSN 00098981. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898114004483>

[26] BOWYER, Victoria L. Real-time PCR. *Forensic Science, Medicine and Pathology*. 2007, **3**(1), 61-63.

[27] FERNÁNDEZ, María, Daniel M LINARES, Beatriz DEL RÍO, Victor LADERO a Miguel A ALVAREZ. HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research* [online]. 2007, **74**(03), 276- [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1017/S0022029907002488. ISSN 0022-0299.

Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029907002488

[28] WONG, Marisa L. a Juan F. MEDRANO. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005, **1**(39), 75-85.

[29] *Základní principy kvantitativní real-time PCR (qPCR)*. [online]. [cit. 2015-11-11]. Dostupné z WWW: <<http://www.generibiotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>>

[30] *Struktura SYBR Green I a Fluorescence SYBR Green I po vazbě na DNA* [online]. [cit. 2015-01-22].

Dostupné z:<http://www.innovateus.net/innopedia/what-does-sybr-green-mean>

[31] *Kvantitativní real time-PCR* [online]. [cit. 2015-04-22].

Dostupné z:<http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

[32] PAVLÍK, Emil a Andrea PAVLÍKOVÁ. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 11. *Labor aktuell Czech*, 2004, č. 3, s. 10-13. ISSN: 1211-5665.

[33] *Princip sondy (proby) TaqMan* [online]. [cit. 2015-01-22].

Dostupné z: <http://www.medscape.com/viewarticle/568619> 3

[34] *Sondy PCR* [online]. [cit. 2015-01-22].

Dostupné z: <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>

[35] *Molekulární maják (molecularbeacon)* [online]. [cit. 2015-01-22].

Dostupné z:<http://spie.org/x25380.xml>

[36] PFAFFL, Michael W. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 2004, 1: 89-113.

[37] LIVAK, Kenneth J. a Thomas D. SCHMITTGEN. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$

Method. *Methods* [online]. 2001, **25**(4), 402-408 [cit. 2016-05-15]. DOI:

10.1006/meth.2001.1262. ISSN 10462023.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>

[38] BUSTIN, Stephen A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 2009, 55.4: 611-622.

[39] TOMANOVÁ, Barbora. *PCR V REÁLNÉM ČASE A JEJÍ VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ*. Brno, 2015. Bakalářská práce.

[40] LADERO, Victor, Daniel M. LINARES, María FERNÁNDEZ a Miguel A. ALVAREZ. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. *Food Research International* [online]. 2008, **41**(10), 1015-1019 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.08.001. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996908001695>

[41] DIAZ, Maria, Beatriz DEL RIO, Victor LADERO, Begoña REDRUELLO, María FERNÁNDEZ, Maria Cruz MARTIN a Miguel A. ALVAREZ. Isolation and typification of histamine-producing *Lactobacillus vaginalis* strains from cheese. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2015, **215**, 117-123 [cit. 2016-02-14]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.026. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515301136>

[42] PRŮŠA, Richard. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. Praha: Univerzita Karlova, 1997. ISBN 80-238-0940-7.

[43] CARAFA, Ilaria, Tiziana NARDIN, Roberto LARCHER, Roberto VIOLA, Kieran TUOHY a Elena FRANCIOSI. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese. *Food Microbiology* [online]. 2015, **48**, 123-132 [cit. 2016-02-14]. DOI: 10.1016/j.fm.2014.12.003. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014002974>

[44] PERIN, LuanaMartins, Barbara DAL BELLO, Simona BELVISO, Giuseppe ZEPPA, AntônioFernandes de CARVALHO, Luca COCOLIN a Luís Augusto NERO.

Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisinproducer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2015, **214**, 159-167 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.006. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515300933>

[45] PERIN, LuanaMartins, RodrigoOtávio MIRANDA, Svetoslav Dimitrov TODOROV, Bernadette Dora Gombossy de Melo FRANCO a Luís Augusto NERO. Virulence, antibioticresistance and biogenic amines of bacteriocinogeniclactococci and enterococciisolated from goat milk. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2014, **185**, 121-126 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160514002852>

[46] LU, Shiling, Hua JI, Qingling WANG, Baokun LI, Kaixiong LI, Chengjian XU a Caihong JIANG. The effects of startercultures and plant extracts on the biogenic amine accumulation in traditionalChinesesmokedhorsemeatsausages. *Food Control* [online]. 2015, **50**, 869-875 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.08.015. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514004642>

[47] LIN, Chung-Saint, Hsin-Chuan TSAI, Chia-Min LIN, Chun-Yung HUANG, Hsien-Feng KUNG a Yung-Hsiang TSAI. Histamine content and histamine-forming bacteria in mahi-mahi (*Coryphaenahippurus*) fillets and driedproducts. *Food Control* [online]. 2014, **42**, 165-171 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.004. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514000632>

[48] BUŇKA, František, Barbora IVIČIČOVÁ, Leona BUŇKOVÁ, Radka FLASAROVÁ a Stanislav KRÁČMAR. BIOGENIC AMINES CONTENT IN SELECTED WINES DURING WINEMAKING. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2012, **1**(4): 785-793.

[49] COSTANTINI, Antonella, Roberta PIETRONIRO, Francesca DORIA, Enrica PESSIONE a Emilia GARCIA-MORUNO. Putrescine production from different amino

acid precursors by lactic acid bacteria from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2013, **165**(1), 11-17 [cit. 2016-02-15]. DOI:

10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.011. ISSN 01681605.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160513001955>

[50] WUNDERLICHOVÁ, Leona, Leona BUŇKOVÁ, Marek KOUTNÝ, Tomáš VALENTA a František BUŇKA. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiology* [online]. 2013, **34**(2), 268-276 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.024. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002012002341>

[51] BAEZ, Antonino, Noemí FLORES, Francisco BOLÍVAR a Octavio T. RAMÍREZ. Metabolic and transcriptional response of recombinant *Escherichia coli* to elevated dissolved carbon dioxide concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2009, **104**(1), 102-110 [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1002/bit.22379. ISSN 00063592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22379>

[52] MARŠÁLKOVÁ, Kristýna. *Využití metody Real Time-PCR v detekci genů pro dekarboxylační enzymy u vybraných bakterií*. Zlín, 2014. Diplomová práce.

[53] Touchdown PCR. *Protocol Touchdown PCR* [online]. [cit. 2016-03-10].

Dostupné z: http://www.techne.com/adminimages/P01_001B_Touchdown_PCR.pdf

[54] *Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU* [online]. [cit. 2016-03-10].

Dostupné z: <http://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>

[55] *Molecular Biology Core Facility* [online]. [cit. 2016-03-23].

Dostupné z: <http://www.etsu.edu/com/mbcf/Services/RealTimePCR.aspx>

[56] NAVRÁTIL, Milan, Lenka UVÍROVÁ, Petr NÁDVORNÍK, Marie KUBALÁKOVÁ a Jana KLUKÁČKOVÁ. Základní praktická cvičení z molekulární bio-

logie. Olomouc, 2004 [online]. [cit. 2016-05-9].
Dostupné z: genetika.upol.cz/download.aspx?id=224&t=0

[57] *Izolace RNA* [online]. [cit. 2016-05-09].

Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/Bi6725/um/61250753/vondracek-izolace_RNA.pdf

[58] Buňka, František., Pachlová, Vendula., Buňková, Leona., Černíková, Michaela. *Mlékárenská technologie I* 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2013. s. 7-73. ISBN 978-80-7454-254-1.

[59] *Izolace RNA* [online]. [cit. 2016-05-09]. Dostupné z:

http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Molekularni_a_bunecna_biologie.pdf

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	nukleová dusíkatá báze adeninu
<i>adiA</i>	gen kódující enzym argininedekarboxylasu
AgDI	agmatindeiminasa
<i>aguA</i>	gen kódující enzym agmatindeiminasu
BA	biogenní aminy
bp	páry bází
C	nukleová dusíkatá báze cytosinu
cDNA	jednořetězcová komplementární DNA
CE	kapilární elektroforéza
C_t	bod, kdy fluorescence stoupá nad prahovou hodnotu
DAO	diaminooxidasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfát
dsDNA	dvouřetězcová DNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoocová
F	kódující (forvard) primer
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
G	nukleová dusíkatá báze guaninu
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GADPH	glyceraldehyd 3-fosfátdehydrogenasa
<i>gapA</i>	gen kódující glyceraldehyd 3-fosfátdehydrogenasu
GC/FID	plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GMO	geneticky modifikované organismy

HDC	histidindekarboxylasa
HPLC/FLD	vysoko účinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
HPLC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC/DAD	kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
LAB	mikroorganismy mléčného kvašení
MAO	monoaminoxidasa
MB	molekulární maják
mRNA	mediátorová RNA
ODC	ornithindekarboxylasa
PCR	polymerasová řetězová reakce
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
R	antikódující (reverse) primer
RNA	ribonukleová kyselina
IP-RP-HPLC	Iontově párová vysoce účinná kapalinová chromatografie
RPM	počet otáček za minutu
rRNA	ribozomální RNA
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
ssDNA	jednořetězová DNA
T	nukleová dusíkatá báze thyminu
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UIOZP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura biogenních aminů a polyaminů [4].....	13
Obr. 2: Znárodnění průběhu polymerasové řetězové reakce [22].....	25
Obr. 3: Struktura SYBR Green I(vlevo), fluorescence SYBR green I po vazbě na DNA (vpravo) [29].....	29
Obr. 4: Křivka tání a nespecifické produkty [30].....	30
Obr. 5: Princip sondy (proby) TaqMan [32].....	31
Obr. 6: Molekulární maják (molecular beacon) [34].....	32
Obr. 7: Amplifikační křivka [38].....	35
Obr. 8: Metabolismus putrescinu u Grampozitivních bakterií [49].....	39
Obr. 9: Metabolismus putrescinu u Gramnegativních bakterií [50].....	40
Obr. 10: Izolovaná DNA z <i>E. coli</i>	54
Obr. 11: Ověření funkčnosti primeru, velikosti amplikonu a výběr vhodné teploty annealingu	55
Obr. 12: Standardní křivka v odběrovém čase 0 hodin.....	60
Obr. 13: Standardní křivka v odběrovém čase 6 hodin.....	61
Obr. 14: Standardní křivka v odběrovém čase 12 hodin.....	62
Obr. 15: Standardní křivka v odběrovém čase 24 hodin.....	63
Obr. 16: Standardní křivka v odběrovém čase 30 hodin.....	64
Obr. 17: Standardní křivka v odběrovém čase 36 hodin.....	65
Obr. 18: Křivka tání	67
Obr. 19: Změna exprese genu <i>adiA</i> u <i>E. coli</i> CCM 3954 v závislosti na délce kultivace (kultivačním médiem)	69

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Přehled symptomů intoxikace nejběžnějšími biogenními aminy	17
Tab. 2: Sekvence sady primerů 1F+1R pro detekci genu <i>adiA</i>	46
Tab. 3: Sekvence sad primerů 2F+2R a 3F+3R pro detekci genu <i>adia</i>	46
Tab. 4: Sekvence sady primerů F+R pro detekci genu <i>gapA</i>	47
Tab. 5: Teploty a doba trvání jednotlivých kroků PCR.....	48
Tab. 6: Reakční podmínky Real time-PCR	53
Tab. 7: Stanovení počtu kolonií <i>E. coli</i> v různých časových intervalech.....	57
Tab. 8: Kontrola čistoty a stanovení koncentrace izolované RNA.....	58
Tab. 9: Kontrola čistoty a stanovení koncentrace přepsané cDNA	58
Tab. 10: C _t hodnoty pro gen <i>gapA</i> a gen <i>adiA</i> v odběrovém čase 0 hodin.....	60
Tab. 11: Efektivita reakce v odběrovém čase 0 hodin	61
Tab. 12: C _t hodnoty pro gen <i>gapA</i> a gen <i>adiA</i> v odběrovém čase 6 hodin.....	61
Tab. 13: Efektivita reakce v odběrovém čase 6 hodin	62
Tab. 14: C _t hodnoty pro gen <i>gapA</i> a gen <i>adiA</i> v odběrovém čase 12 hodin.....	62
Tab. 15: Efektivita reakce v odběrovém čase 12 hodin.....	63
Tab. 16: C _t hodnoty pro gen <i>gapA</i> a gen <i>adiA</i> v odběrovém čase 24 hodin.....	63
Tab. 17: Efektivita reakce v odběrovém čase 24 hodin	64
Tab. 18: C _t hodnoty pro gen <i>gapA</i> a gen <i>adiA</i> v odběrovém čase 30 hodin.....	64
Tab. 19: Efektivita reakce v odběrovém čase 30 hodin	65
Tab. 20: C _t hodnoty pro gen <i>gapA</i> a gen <i>adiA</i> v odběrovém čase 36 hodin.....	65
Tab. 21: Efektivita reakce v odběrovém čase 36 hodin	66
Tab. 22: Hodnoty relativní exprese genu <i>adiA</i> vypočítané metodou dle Pfaffla.....	68
Tab. 23: Kontrola čistoty a stanovení koncentrace RNA izolované ze vzorků mléka	70