

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
Fakulta chemická

TEZE

Brno, 2019

Ing. Michaela Čutová

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOLACE A ANALÝZA DNA SE ZAMĚŘENÍM NA MIKROORGANISMY DŮLEŽITÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ

DNA ISOLATION AND ANALYSIS FOCUSED ON MICROORGANISMS IMPORTANT IN FOOD PRODUCTION

TEZE

THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Michaela Čutová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2019

1 ABSTRAKT

Identifikace bakteriální DNA se skládá z několika kroků: lyze buněk, izolace a purifikace DNA, precipitace ethanolem a identifikace bakteriálního kmene pomocí PCR, případně i jiných molekulárně biologických metod. Každý krok musí být optimalizován. Nukleové kyseliny lze z buněk izolovat pomocí magnetických nosičů. Molekuly DNA jsou na povrch magnetického nosiče navázány na základě elektrostatických interakcí a posléze jsou eluovány do pufru.

Cílem práce bude optimalizace jednotlivých kroků identifikace bakteriální DNA: buněčná lyze, izolace DNA, charakterizace pevných magnetických nosičů funkcionalizovaných aminoskupinami pro izolaci nukleových kyselin. Přítomnost DNA v eluátu bude ověřena pomocí gelové agarosové elektroforézy a množství eluované DNA bude stanoveno spektrofotometricky. Izolovaná DNA bude amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Dále je práce zaměřena na studium sekundárních struktur nukleových kyselin – křížových struktur a kvadruplexů. Tyto struktury se podílí na regulaci buněčných procesů jako např. exprese genů a jsou cílové struktury pro regulační proteiny. Byla provedena analýza genomu *in silico* u mikroorganismů významných v potravinářském průmyslu. Sekvence genomů mikroorganismů byly získány z databáze NCBI (National Center for Biotechnology). Pro analýzu byl použit software Palindrome Analyser a G4Hunter. Ve všech testovaných genomech bylo zjištěno zastoupení těchto lokálních struktur.

2 KLÍČOVÁ SLOVA

Magnetické částice

DNA

PCR

Invertované repetice

Kvadruplexy

3 OBSAH

1 ABSTRAKT	2
2 KLÍČOVÁ SLOVA.....	2
3 OBSAH.....	3
4 TEORETICKÁ ČÁST.....	4
4.1 Úvod.....	4
4.2 Izolace nukleových kyselin.....	5
4.2.1 Magnetické separační metody.....	5
4.3 Amplifikační metoda – PCR.....	7
4.4 Analýza výskytu invertovaných repetitív a kvadrupektů v genomu	7
5 CÍL PRÁCE.....	10
6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	11
6.1 Vybrané výsledky	11
6.1.1 Příprava buněčných lysátů.....	11
6.1.2 Izolace DNA z buněk bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> metodou vysolování	14
6.1.3 Optimalizace reakčních podmínek adsorpce a desorpce nukleových kyselin z <i>P(HEMA-GMA)-NH₂</i> nosičů	15
6.1.4 Izolace DNA z mléčných výrobků.....	16
6.1.5 Bioinformatická analýza DNA mikroorganismů využívaných v potravinářském průmyslu.....	19
7 ZÁVĚR.....	28
8 POUŽITÁ LITERATURA.....	30
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	36
10 STRUČNÝ ŽIVOTOPIS AUTORKY	37
11 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI, KONFERENČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ A PROJEKTŮ	39

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 ÚVOD

V potravinářském průmyslu je pro praktické využití důležitá identifikace kmenů, tj. jejich přiřazení do stávajících taxonů. Moderní bakteriální taxonomie využívá analýzy makromolekul, zejména DNA. Identifikace bakteriální DNA se skládá z několika kroků: lyze buněk, izolace a purifikace DNA, precipitace ethanolem (*Sambrook a Russel, 2001*) a identifikace bakteriálního kmene pomocí PCR, případně i jiných molekulárně biologických metod. Každý tento krok musí být optimalizován. Pro efektivní výzkum je nutné zvolit metody rychlé, šetrné a účinné.

Prvním krokem při identifikaci bakterií je buněčná lyze. Enzymy způsobující lyzi buněčné stěny jsou cenné nástroje pro biotechnology, využívají se i v lékařství, potravinářském průmyslu a zemědělství pro získání intracelulárních produktů z kvasinek nebo bakterií (*Salazar a Asenjo, 2007*). Byla popsána celá řada protokolů přípravy buněčných lyzátů bakterií, včetně chemických, enzymatických a mechanických metod nebo jejich kombinace (*De Bruin a spol., 2019*).

Na základě struktury buněčné stěny jsou bakterie rozděleny na Gram-pozitivní a Gram-negativní. Buněčná stěna se skládá z peptidoglykanů, jejichž chemické složení a struktura je podobná u obou typů bakterií (*Salazar a Asenjo, 2007*). Avšak u Gram-negativních bakterií je peptidoglykanová vrstva mnohem tenčí (*Salazar a Asenjo, 2007*). Polymer tvořící buněčnou stěnu je tvořen N-acetyl-D-glukosaminovými jednotkami připojenými $\beta(1-4)$ vazbou na N-acetylmuramovou kyselinu a je zodpovědný za sílu buněčné stěny (*Koch, 1998*). V peptidoglykanových vrstvách se u Gram-pozitivních bakterií vyskytují aminokyseliny a aminokyselinové deriváty, které tvoří glykan-tetrapeptid, který se mnohokrát opakuje v buněčné stěně (*Salazar a Asenjo, 2007*). Tetrapeptidy sousedních polymerů jsou spojeny penta-glycinovými můstky polymerů a směrem k vnější straně je peptidoglykan spojen s kyselinou teichovou a polysacharidy (*Salazar a Asenjo, 2007*).

Pro uvolnění DNA z buněk je nutné provést disrupci buněčné stěny a cytoplazmatické membrány. Enzymy, které štěpí peptidoglykany bakterií, tvořící buněčnou stěnu, jsou souhrnně nazývané mureinové hydrolázy (*Salazar a Asenjo, 2007*). Nejznámějším lytickým enzymem je lysozym, který se vyrábí převážně ze slepičího vaječného bílku (*Salazar a Asenjo, 2007*). Rozsáhlá hydrolýza peptidoglykanu lysozymem vede k buněčné lyzi a smrti při změně osmotického prostředí (*Salazar a Asenjo, 2007*).

Silné nebo jinak obtížně rozrušitelné bakterie obvykle vyžadují mechanickou lyzi (*Vandeventer a spol. 2011*). Gram-negativní bakterie mají dvouvrstvou buněčnou stěnu s periplazmatickým prostorem (*Salazar a Asenjo, 2007*). Vnější membrána (složená z proteinů, fosfolipidů, lipoproteinů a lipopolysacharidů a vnitřní tuhé peptidoglykanové vrstvy) zabraňuje přístupu lytickým enzymům (*Salazar a Asenjo, 2007*).

Po buněčné lyzi následuje separace nukleových kyselin z buněčných lyzátů. Jedním ze způsobu izolace DNA je využití magnetických nosičů. Magnetické separační techniky se uplatňují od počátku 70. let zejména v oblastech biotechnologie, v molekulární diagnostice a mikrobiologii. Z těchto odvětví se přenesla i do lékařství (*Zhang a spol., 2015*) pro diagnostiku geneticky podmíněných onemocnění (*Horák a spol., 2007*).

4.2 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Nukleové kyseliny se extrahují do vodných roztoků pufru. K pufrům jsou přidávány tenzidy, které uvolňují nukleové kyseliny z vazby s bílkovinami, a také inhibitory enzymů, které zabraňují štěpení nukleových kyselin. Z extraktu lze nukleové kyseliny vysrážet přidáním ethanolu (propanolu a octanu amonného). Nejběžnějším postupem izolace DNA je fenol-chloroformová extrakce. (*Sambrook a Russel, 2001*) V uvedeném postupu se používají toxické organické látky. Dalším způsobem izolace DNA je alkalická lyze v kombinaci s SDS (dodecylsírán sodný). Působením silného detergentu při vyšším pH dochází k otevření buněčné stěny a DNA je uvolněna do supernatantu (*Sambrook a Russel, 2001*). Metoda izolace DNA vysolováním je alternativou ke dříve zmíněným metodám. Dosažené výsledky jsou srovnatelné s metodou fenol-chloroformové extrakce. Jednou z možností izolace nukleových kyselin je použití magnetických nosičů. Je to metoda velmi šetrná k životnímu prostředí.

4.2.1 Magnetické separační metody

Principem magnetických technik je působení magnetického pole na magnetické nano/mikročástice, které jsou suspendované v pufru či destilované vodě. Magnetické nosiče používané při izolaci DNA jsou zpravidla superparamagnetické. Magnetické vlastnosti částic se projevují pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Bez přítomnosti vnějšího magnetického pole částice neagregují. Pro separaci magnetických částic od vzorku je nutné použít magnetický separátor. Na magnetických nosičích mohou být navázány ligandy afinitní k cílovým molekulám.

Využití elektrostatických sil při reverzibilní adsorpci na magnetické nosiče

Směr difuze molekuly DNA by měl vést přímo k magnetickému nosiči. Omezujícím faktorem je možnost afinity jiných molekul (jiných než nukleových kyselin) k magnetickému nosiči. Elektrostatické interakce musí být dominantní oproti dalším možným interakcím ve směsi, jako jsou například hydrofobní interakce (*Rhaman a spol., 2011*). Elektrostatické vazby se využívají k navázání DNA na magnetický nosič (*Knopp a spol., 2009*). Adsorpce na povrch nosičů probíhá lépe v prostředí s vysokou iontovou silou, naopak eluce DNA je efektivnější v prostředí s nízkou iontovou silou (*Shan a spol., 2012; Lee a spol., 2008*).

Makromolekula DNA se záporným nábojem, tvořeným fosfátovými zbytky, se váže na částice s pozitivním povrchovým nábojem v neutrálním pH (*Knopp a spol., 2009*). Povrch magnetického nosiče se funkcionalizuje například aminoskupinami ($-NH_2$), které jsou schopné protonace a vytvořit tak kladný náboj (*Rhaman a spol., 2011; Yoza a spol., 2002*). Aminoskupinami se obvykle funkcionalizují částice pokryté polymerní matricí s volnými karboxylovými (*Horák a spol., 2007; Ramanathan a spol., 2005*) nebo hydroxylovými skupinami (*Lee a spol., 2008*), případně částice s polystyrenovou matricí (*Yang a spol., 2008; Haihui a spol., 2012*). Pro extrakci a purifikaci nukleových kyselin se využívají křemičité částice nesoucí aminoskupiny ($-NH_2$), které poskytují kationtový povrchový náboj (*Veyret a spol., 2005; Del Compo a spol., 2005*). Silanizací skleněných substrátů aminosilanem získáme hustě posetý povrch aminoskupinami, které slouží pro upevnění DNA (*Nakagawa a spol., 2006*). Princip izolace DNA, pomocí vazby na aminoskupiny je uplatňován u křemičitých částic, které jsou funkcionalizované diethylaminoethanolem (DEAE) a jsou obsažené v agarosovém gelu. Tento způsob izolace DNA byl srovnán s metodou sloupcové ionexové chromatografie s křemíkovou náplní. Experiment prokázal, že DNA získána magnetickou izolací měla sice nižší čistotu, ale výtěžky byly vyšší a metoda byla rychlejší (*Levison a spol., 1999*).

Dalším typem magnetických částic využívajících aminoskupiny k zachycení nukleových kyselin, které se využívá zejména v lékařské diagnostice, jsou hydrofilní magnetické nosiče nesoucí aminodextran (*Mouaziz a spol., 2009*). Chitosanové částice s navázaným glutaraldehydem rovněž obsahují množství aminoskupin, které se podílí na izolaci cílových molekul. Navázání a uvolnění cílové molekuly je podmíněno mnoha vlivy. Náboj chitosanové částice je ovlivněn převážně pH suspenze. Optimální pH pro adsorpci cílových molekul na chitosanové částice se pohybuje v kyselé oblasti. Taktéž uvolnění molekuly z chitosanových částic je rychlejší v kyselém pH (acetátový pufr), pak následuje alkalické a neutrální oblast pH (fosfátový pufr) (*Keawchaon a spol., 2011*). Chitosanové modifikované magnetické částice byly použity pro extrakci DNA z geneticky modifikovaných sojových bobů (*Jiang a spol., 2012*). Chitosanem potažené částice křemičitanu byly použity jako alternativa, ke standardní izolaci DNA pomocí silika částic, pro extrakci DNA (*Hagan a spol., 2009*).

4.3 AMPLIFIKAČNÍ METODA – PCR

Identifikací bakterií se rozumí porovnání určované bakterie se známou bakterií, obvykle se sbírkovým nebo typovým kmenem. Jedná se o proces, při kterém se zjišťuje, ke kterému známému taxonu (druhu) lze izolát přiřadit (*Ben Amor, 2007*). Klasické metody identifikace bakterií jsou založeny na studiu fenotypových vlastností (*Watson a Crieck, 1953*). Běžně využívané kultivační metody jsou složité, časově náročné, a ne vždy plně spolehlivé. Kultivovat lze pouze 1 % mikroorganismů přítomných v prostředí. Kromě toho lze fyziologické vlastnosti mikroorganismů ovlivnit podmínkami kultivace (*Turková a spol., 2011*). Proto se k detekci, identifikaci a kvantifikaci bakterií stále častěji používají nekultivační molekulárně-biologické metody. Nejpoužívanější metodou je polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR), která se používá k amplifikaci DNA (*Ehrmann a Vogel, 2005; Ben Amor, 2007; Švec, 2010*). Metodu PCR objevil v roce 1983 Kary Mullis, který za svůj objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Díky rychlosti analýzy a specifitě zažívá v posledních desetiletích velký rozmach také v potravinářském průmyslu. PCR je molekulárně-diagnostická metoda založená na cyklicky se opakující syntéze specifického úseku DNA. K vybranému úseku DNA se hybridizují krátké oligonukleotidy, tzv. primery, od nichž začíná syntéza nového řetězce. Syntéza je katalyzována termostabilní DNA polymerázou, která byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus* (proto se označuje jako *Taq* polymeráza) (*Lorenz, 2012; Bloomfield a spol., 2000*).

4.4 ANALÝZA VÝSKYTU INVERTOVANÝCH REPETIC A KVADRUPLEXŮ V GENOMU

V genomech jsou přítomny specifické sekvence DNA, které za vhodných podmínek mohou vytvořit kromě klasického duplexu i speciální struktury. Mezi takovéto typy sekvencí patří invertované repetice (IR) (tvoří vlásenky a křížové struktury), guaninové trakty (tvoří kvadruplexy), sekvence bohaté na tyminy a adeniny (tvoří triplexy) a sekvence bohaté na cytosiny (tvoří i-motivy - interkalované cytosinové kvadruplexy/motivy). Tyto sekvence se vyskytují ve všech organismech (prokaryotických i eukaryotických) (*Wang a Leung., 2009; Warburton, 2004; van Holde a spol., 1994*) a jejich lokalizace není náhodná, což koreluje s funkčně důležitými genomovými oblastmi (*Rhodes a Lipps, 2015; Bartas a spol., 2018; Brázda a spol., 2016; Strawbridge a spol. 2010*). Genomy a transkriptomy různých organismů, včetně modelového organismu *Escherichia coli* (*Rawal, 2006*), *Saccharomyces cerevisiae* (*Hershman a spol., 2008*) a lidí, obsahují řadu invertovaných repetic a sekvencí bohatých na G báze (*Huppert a spol., 2005*).

Původně byly tyto struktury prokázány v podmínkách *in vitro*, později byly také prokázány *in vivo* (Rhodes a Lipps, 2015).

Palindrom je specifický případ inverzní repetice, kde chybí nukleotidy oddělující jednotlivé inverzní repetice. Pokud invertovaná repetice neobsahuje žádnou chybu, nazývá se IR perfektní, pokud je v sekvenci přítomná chyba, nazývá se imperfektní. IR přítomné v regulačních oblastech DNA zůstaly evolučně konzervované (Strawbridge a spol. 2010), zatímco IR nepříznivě působící na genetickou stabilitu byly eliminovány (Strawbridge a spol. 2010). Nadměrný výskyt IR byl zaznamenán v promotorových oblastech a v místech iniciace replikace (Čechová a spol., 2017). Z inverzní repetice vhodné délky (šesti a více nukleotidů) mohou vznikat intramolekulárním párováním komplementárních bází křížové struktury – tzv. kruciformy. Křížové struktury obsahují čtyřcestné spojení, stopku a smyčku o různé velikosti (Wang a Leung, 2006). Kruciformy jsou cílové struktury pro histony, proto-onkogenní protein DEK a mnoho dalších strukturních a regulačních proteinů (Brázda a spol., 2016). Například protein p53 (hlavní nádorový supresor) se přednostně váže na sekvence obsahující invertované repetice, které mají schopnost vytvářet křížové struktury (Jagelská a spol. 2010), což demonstruje důležitost těchto struktur. Tento protein reguluje transkripci genů zapojených do zastavení buněčného cyklu, apoptózy a senescence (Jost a spol., 1997; Espinosa, 2008; Mazur a spol., 1999).

„Poloviční křížovou strukturou“ vyskytující se na jednom vlákně nukleových kyselin je vlásenka. Vlásenky jsou nejběžnější sekundární strukturou vytvářející se na RNA pomocí Watson-Crickova párování uvnitř molekuly. Sekvence na DNA, která kóduje vlásenku, musí být také IR. Vlásenka přítomná v transkriptu bude mít pravděpodobně opět regulační funkci (Strawbridge a spol. 2010; Miura a spol. 2019; Dai a spol., 1997; Bikard a spol., 2010; Brázda a spol., 2011; Shlyakhtenko a spol., 2000).

Během posledních desetiletí byly objeveny čtyřvláknové struktury známé pod názvem Guaninové kvadruplexy (G-kvadruplexy). G-kvadruplex je tvořen sekvencemi bohatými na guanin, které se také označují jako G-trakty. Jedna čtveřice na sebe navázaných Guaninů se označuje jako G-kvartet/G-tetráda (Huppert, 2005). Vznik vodíkových vazeb mezi guaniny je umožněn Hoogsteenovým párováním bází (Bedrat a spol., 2016; Kikin a spol., 2006). G-kvadruplexové struktury, se často vyskytují v telomerách, promotorech a dalších biologicky významných oblastech genomu savců (Bartas a spol., 2018; Kikin a spol., 2006). Výskyt telomerních kvadruplexů je spojován se snížením aktivity enzymu telomerázy, která je zodpovědná za prodloužení telomer. Přibližně 85 % onkologických onemocnění je způsobeno v důsledku vysoké aktivity telomerázy, a proto je výzkum G-kvadruplexů důležitý pro vývoj léčiv (Huppert, 2005; Yang a spol., 2018).

Pomocí výpočetní techniky lze provádět hlubší analýzu genomu (Zuker, 2003). Pro analýzu potenciálních G-kvadruplexových struktur (PQS) existuje celá řada algoritmů (Bedrat a spol. 2016). Jedním z nevíce používaných algoritmů je G4Hunter (Bedrat a spol. 2016; Mishra a spol., 2019). Pro vyhodnocení obsahu G

(resp. C na komplementárním řetězci), ve sledované sekvenci nukleových kyselin, tento algoritmus dává jednotlivým sekvencím G, GG, GGG a GGGG skóre 1, 2, 3 a 4 (*Bedrat a spol. 2016*). Cytosinové báze (C) jsou také hodnoceny, ale všechny hodnoty jsou negativní (*Bedrat a spol. 2016*). Obsah AT je irelevantní, takže skóre pro báze adeninu a thyminu je 0 (*Bedrat a spol. 2016*). Konečně, skóre G4Hunter je aritmetický průměr všech těchto hodnot (*Bedrat a spol. 2016*).

5 CÍL PRÁCE

Cílem dizertační práce je:

- Optimalizace přípravy buněčných lyzátů. Volba vhodného lyzačního činidla, jeho koncentrace, volba doby působení na buňky. Testování přídatku Proteinázy a SDS.
- Testování alternativních metod izolace nukleových kyselin z buněčných lyzátů
- Optimalizace reakčních podmínek izolace nukleových kyselin z buněčných lyzátů pomocí polymerních nosičů. Testování reakčních pufrů pro adsorpci nukleových kyselin na nosiče a elučních pufrů.
- Izolace nukleových kyselin z potravinových matric pomocí nosičů
- Studium sekundárních struktur nukleových kyselin pomocí bioinformatické analýzy u mikroorganismů využívaných v potravinářském průmyslu.

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 VYBRANÉ VÝSLEDKY

6.1.1 Příprava buněčných lyzátů

Tato kapitola se zaměřuje na testování různých lyzačních činidel. Zahrnuje optimalizaci doby působení lyzačních činidel na buňky, nalezení optimální koncentrace lyzačního činidla. Dále se zabývá vlivem SDS a Proteinázy K při přípravě buněčných lyzátů.

Testování vlivu SDS a Proteinázy K při přípravě buněčných lyzátů

V tomto experimentu byly použity buňky kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212. Pro přípravu buněčných lyzátů byl použit roztok obsahující lysozym 3 mg/ml a 4% roztok pracího přípravku Prášku A. Doba působení lyzačního roztoku byla 1 h a 3 h. Po uplynutí této doby bylo k některým vzorkům přidáno SDS a Proteináza K dle Tabulky 1.

Tabulka 1: Přehled použitých lyzačních činidel, doby působení lyzačních činidel a přidavek SDS a Proteinázy K při přípravě buněčných lyzátů

	Lyzační činidlo	Doba lyze (h)	SDS	Proteináza K
1.	Roztok s lysozymem 3 mg/ml	1	+	+
2.	4% roztok Prášku A	1	-	-
3.	4% roztok Prášku A	1	+	-
4.	4% roztok Prášku A	1	+	+
5.	Roztok s lysozymem 3 mg/ml	3	+	+
6.	4% roztok Prášku A	3	-	-
7.	4% roztok Prášku A	3	+	-
8.	4% roztok Prášku A	3	+	+

+ s komponentou; - bez komponenty

Ze získaných buněčných lyzátů byla izolována DNA pomocí metody magnetické separace. V tomto experimentu byly využity magnetické nosiče Fkol 135ox. Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR.

Bylo zjištěno, že při přípravě buněčných lyzátů pomocí roztoku pracího prostředku Prášku A, není zapotřebí použít přídavek SDS a Proteinázy K. Tento prací prostředek pravděpodobně obsahuje detergenty a enzymy potřebné k rozrušení buněčné stěny a k prasknutí cytoplazmatické membrány. Lepších výsledků bylo dosaženo u vzorků, které byly podrobeny hodinové inkubaci v průběhu lyze buněk, oproti vzorkům, kde byla doba působení lyzačního činidla 3 hod. Z připravených buněčných lyzátů lze izolovat DNA, která je vhodná pro použití do PCR. Roztoky pracích prášků tedy mohou nahradit běžně využívané enzymy a detergenty po přípravu buněčných lyzátů. Tento postup je finančně výhodnější.

Optimalizace koncentrace lysozymu v lyzačním roztoku a následná detekce izolované DNA metodou PCR

Cílem experimentu bylo najít optimální koncentraci lysozymu v lyzačním roztoku pro lyzi bakteriálních buněk. Lyze byla provedena s bakteriálními kulturami: *Lactobacillus casei subsp. casei* CCM 7088, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* CCDM 212/106, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039 a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825. Byly zvoleny tři různé koncentrace lysozymu v roztoku: 3 mg/ml, 5 mg/ml a 10 mg/ml. Doba působení lyzačního činidla byla 1 h při laboratorní teplotě. Poté byl k buněčné suspenzi přidán SDS (25 µl, 10%) a Proteináza K (5 µl, 100 mg/ml). Ze získaných buněčných lyzátů byla magneticky separována bakteriální DNA pomocí nosičů Fkol 135ox. Zároveň byla provedena fenol-chloroformová extrakce bakteriální DNA.

U vzorků DNA získaných magnetickou separací pomocí nosičů Fkol 135ox se jeví jako optimální koncentrace 5 mg/ml lysozymu v lyzačním roztoku pro druh *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus rhamnosus*. Pro druh *Lactobacillus paracasei* a *casei* byla optimální koncentrace lysozymu v lyzačním roztoku 3 mg/ml. Největší množství DNA separované magnetickými nosiči Fkol 135ox bylo naměřeno u druhů *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* a nejmenší množství u *Lactobacillus paracasei*. U fenol-chloroformové extrakce bylo naměřeno největší množství u vzorků *Lactobacillus plantarum* a nejmenší množství u *Lactobacillus paracasei*. Při přepočtu na 100 µl buněčného lyzátu bylo množství získané DNA pomocí magnetických nanočástic větší než množství DNA získané fenol-chloroformovou extrakcí. Při fenol-chloroformové extrakci jsou používány toxické organické látky jako fenol a chloroform, a proto byly další pokusy prováděny s magnetickými nanočásticemi.

Testování enzymů obsažených v pracích prostředcích pro lyzi bakteriálních buněk a následná detekce izolované DNA metodou PCR

Cílem pokusu bylo otestovat vhodnost enzymů, obsažených v pracích práscích, pro lyzi bakteriálních buněk. Z pracího Prášku A byly připraveny lyzační roztoky o různé koncentraci (1%, 2%, 3% a 4% roztok). Jako kontrola byl použit lyzační roztok B s obsahem lysozymu 3 mg/ml. Byly lyzovány buňky kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212/106. Doba působení lyzačního roztoku na bakteriální buňky byla 1 h a 3 h. Při lyzi byl použit SDS a Proteináza K. Z buněčných lyzátů byla izolována DNA pomocí magnetických nosičů Fkol 135ox. Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR.

Koncentrace DNA získaná po lyzi buněk byla vyšší u kontrolních vzorků, kde byl použit lysozym. Avšak DNA získaná z buněk pomocí roztoku pracího prášku A, byla v dostatečném množství a kvalitě vhodné pro metodu PCR. Nejintenzivnější PCR produkt byl detekován u vzorku, kde byl použit 4% roztok pracího prášku A s dobou trvání lyze 3 hod. Enzymy obsažené v pracím prášku A je možné využít pro lyzi bakteriálních buněk. Pro další pokusy byl použit 4% roztok pracího prášku jako lyzační činidlo.

Srovnání účinnosti pracích prostředků obsahujících enzymy pro lyzi bakteriálních buněk a následná detekce izolované DNA metodou PCR

Cílem experimentu bylo najít nejvhodnější prací prostředek, který obsahuje enzymy, pro lyzi bakteriálních buněk. Bylo použito pět různých pracích prostředků. Byly testovány jak sypké prací prostředky, tak tekuté gely. Z pracích prostředků byly namíchány 4% lyzační roztoky a doba lyze byla 1 a 3 h. Na konci lyze byl k suspensi přidán 20% roztok SDS a Proteináza K. Byly lyzovány buňky *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212/106. Ze získaných buněčných lyzátů byla magneticky separována DNA pomocí nosičů Fkol 135ox. Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR.

Bakteriální DNA byla amplifikována u všech vzorků. Nejintenzivnější PCR produkty byly detekovány u vzorků, kde jako lyzační činidlo byl použit roztok pracího prostředku Prášek A, Prášek B a Prášek E. Naopak nejméně intenzivní PCR produkt byl stanoven u vzorku, kde pro lyzi buněk byl použit roztok Prášku C. Příprava lyzačních roztoků z tekutých gelových pracích prostředků je snadnější než příprava lyzačních roztoků ze sypkých pracích prostředků. Proto byl pro další pokusy jako optimální lyzační činidlo zvolen 4% lyzační roztok Prášku E.

Testování enzymů obsažených v pracích prostředcích pro lyzi bakteriálních buněk z potravinářských matric a následná detekce izolované DNA metodou PCR

V experimentu byly použity potravinářské matrice: Acidofilní mléko – plnotučné (Mlékárny Valašské Meziříčí), Jogobella jogurt – příchut' mango (Zott) a Bílý jogurt (Madeta). Byly připraveny buněčné lyzáty působením 4% roztoku Prášku E. Ze získaných buněčných lyzátů byla magneticky separována DNA pomocí nosičů Fkol 135ox. Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR.

Nejintenzivnější PCR produkty byly u vzorků Bílého jogurtu (Madeta). U vzorků Acidofilního mléka (Valašské Meziříčí) a Jogobella jogurtu – mango (Zott) byly také detekovány PCR produkty, ale nižší intenzity. Z výsledku lze usoudit, že enzymy obsažené v pracích prostředcích lze použít pro lyzi bakteriálních kultur mléčných výrobků. Půl hodinová doba lyze byla dostačující. Při provedení PCR reakce je lepší použít směs s obsahem DNA 3 µl.

Srovnání různých metod lyze bakteriálních buněk a následná detekce izolované DNA metodou PCR

V tomto pokusu byly srovnány tři různé lyzační metody bakteriálních buněk *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* CCDM 212/106. Jako lyzační činidla byly použity: roztok s obsahem lysozymu 3 mg/ml, imobilizovaný lysozym a 4% roztok pracího Prášku A. Zároveň byla provedena lyze roztokem A, který neobsahuje lysozym. Tento roztok byl použit jako kontrola. Zároveň byla testována doba působení lyzačního činidla: 1 h, 3 h a 5 h. Z buněčných lyzátů byla izolovaná bakteriální DNA pomocí magnetických nosičů Fkol 135ox. Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR.

Nejintenzivnější PCR produkty byly detekovány u vzorků, kde byl pro lyzi buněk použit roztok Prášku A. Optimální doba působení lyzačního činidla byla stanovena na 3 hodiny. U vzorků, kde byl lyzačním činidlem roztok s lysozymem (3 mg/ml), byla optimální doba lyze také 3 hod. Při použití imobilizovaného lysozymu byla optimální doba lyze kratší, 1 hodina. Bylo vyhodnoceno, že při použití imobilizovaného lysozymu byl detekován pouze jeden PCR produkt. Proto bylo použití lyzačního činidla, imobilizovaný lysozym, vyhodnoceno jako málo efektivní a drahé.

6.1.2 Izolace DNA z buněk bakterií rodu *Lactobacillus* metodou vysolování

V tomto experimentu byly analyzované kmeny *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, *Lactobacillus casei subsp. casei* CCM 7088. Při izolaci DNA byly testovány různé koncentrace NaCl (0,55 - 2,75 M), viz. Tabulka 2. Po provedení celého postupu

vysolování DNA dle Tabulky 2 byla získána DNA. Bakteriální DNA byla amplifikována pomocí PCR.

Tabulka 2: Izolace DNA vysolováním s použitím chloridu sodného

Postup	Buněčný lyzát (μl)	5,5 M NaCl (μl)	H ₂ O (μl)	Koncentrace NaCl (M)
1	500	100	400	0,55
2	500	200	300	1,10
3	500	300	200	1,65
4	500	400	100	2,20
5	500	500	0	2,75

Jako nejvhodnější koncentrace NaCl pro izolaci DNA byla zjištěna koncentrace 1,65 M a 2,2 M (postupy 3 a 4 - viz. Tabulka 2). V těchto případech byly, po amplifikaci DNA izolované ze všech testovaných bakteriálních druhů, detekovány specifické produkty PCR. Při použití nižších koncentrací NaCl (0,55 a 1,10 M) byly detekovány PCR produkty nižší intenzity. Postup 5 s 2,75 M NaCl byl vyhodnocen jako nejméně účinný, protože po amplifikaci DNA nebyly PCR produkty detekovány. Z výsledků vyplývá, že pro lyzi bakteriálních buněk lze použít roztok pracího prášku. Metoda izolace DNA z lyzátu buněk vysolováním roztokem chloridu sodného se jeví jako vhodná pro lyzi buněk rodu *Lactobacillus*. Rozdíly v intenzitě PCR produktů získaných po amplifikaci DNA, izolované vysolováním stejnou koncentrací NaCl, mohou odrážet rozdíly v lyzi buněk pracím prostředkem. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdíly ve složení buněčných stěn testovaných druhů. Výsledky dosažené uvedenými postupy jsou srovnatelné s výsledky metod izolace DNA magnetickými nosiči či fenol-chloroformovou extrakcí. Výhodou této metody je skutečnost, že se nemusí pracovat s organickými toxickými látkami.

6.1.3 Optimalizace reakčních podmínek adsorpce a desorpce nukleových kyselin z P(HEMA-GMA)-NH₂ nosičů

V této kapitole byl testován vliv iontové síly pufrů při adsorpci nukleových kyselin na nosiče P(HEMA-GMA)-NH₂ a eluce nukleových kyselin do příslušného pufru z nosičů P(HEMA-GMA)-NH₂. Pro optimalizaci reakčních podmínek byla použita vysokomolekulární DNA izolovaná z kuřecích erythrocytů.

Testování reakčních pufrů Tris o různé hodnotě pH

V jednotlivých krocích separace DNA pomocí nosičů P(HEMA-GMA)-NH₂ byla sledována koncentrace DNA. Byly testovány Tris pufrы o hodnotách pH 5,2; 7,0; 7,6 a 8,0. Nejvyšší adsorpce DNA na nosiče byla zjištěna při použití Tris pufru o hodnotě pH 5,2. Z důvodu vyšší adsorpce DNA na nosiče, lze vyvozovat i vyšší obsah DNA v elučním pufru. Z tohoto experimentu je patrné, že čím je nižší pH reakčního pufru (v rámci testované řady pH), tím je adsorpce DNA na magnetické nosiče vyšší.

Dále byly testovány koncentrace nosičů použitých do separační směsi – 2 mg/ml a 10 mg/ml, kdy nebyly zjištěny významné rozdíly. Jako eluční pufrы byly vybrány TE pufrы o hodnotách pH 7,8 a 9,0. V obou případech docházelo k eluci pouze minimálního množství DNA, proto byl k elučním pufrům byl přidán KCl. Ani přidavek KCl neovlivnil množství DNA v elučním pufru.

Testování reakčních fosfátových pufrů o různé hodnotě pH

Opět byly sledovány koncentrace DNA v jednotlivých krocích separace DNA pomocí nosičů P(HEMA-GMA)-NH₂. Cílem experimentu bylo zvolit optimální reakční pufr (fosfátové pufrы o hodnotách pH 6,0; 7,0 a 7,8) pro adsorpci DNA na nosiče, eluční pufr (TE pH 7,8; TE pH 7,8 + 10mM KCl, TE pH 9,0 a TE pH 9,0 + 10mM KCl) a koncentraci nosičů (2 mg/ml a 10 mg/ml).

Dále byly použity fosfátové pufrы o hodnotách pH 5,59; 5,91 a 6,24 pro adsorpci DNA na nosiče. Ve všech případech se na nosiče adsorbovalo více než 50 % původního množství DNA obsaženého v separační směsi. Přítomnost DNA v elučním roztoku nebyla detekována. Z výsledku lze vyvodit, že v rozmezí pH 5,59 – 6,24 se vlastnosti separace DNA nemění. Oproti předešlému pokusu, kde byly použity fosfátové pufrы o vyšším pH, lze konstatovat, že účinnost adsorpce DNA na polymerní nosiče *P(HEMA-co-GMA)-NH₂* je nižší a následná eluce nulová. Jako optimální reakční pufr pro adsorpci DNA na nosiče byl zvolen fosfátový pufr o hodnotě pH 7,8.

Při sledování vlivu koncentrace nosičů na adsorpci DNA v příslušných reakčních pufrech nebyly pozorovány rozdíly. Rovněž rozdíly mezi použitím různých elučních pufrů nebyly zaznamenány.

6.1.4 Izolace DNA z mléčných výrobků

V této kapitole byly testovány vzorky mléčných výrobků s deklarovanou přítomností bakterií mléčného kvašení (Tabulka 3). Bakteriální DNA byla izolována pomocí polymerních nosičů (P(HEMA-co-GMA)-NH₂, polyLYSINE (F79_L3)) v prostředí reakčních pufrů. Tato metoda byla srovnávána s izolací DNA pomocí

nosičů (P(HEMA-co-GMA)–NH₂, polyLYSINE (F79_L3)) v prostředí PEG a NaCl a fenol-chloroformovou extrakcí DNA.

Tabulka 3: Přehled testovaných mléčných výrobků použitých pro izolaci bakteriální DNA pomocí magnetické separace částicemi P(HEMA-co-GMA)-NH₂

Typ mléčného výrobku	Mléčný výrobek
Bílý jogurt	Bílý jogurt z Valašska Smetanový bílý jogurt Kunín Klasik bílý jogurt OLMA
Tekuté mléčné výrobky	Actimel bílý Acidofilní mléko plnotučné
Ochucené jogurty (jahodové)	Smetanový jogurt Florian – jahoda Smetanový jogurt jahoda z Valašska Naše BIO jogurt jahodový

Testování nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ pro izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí fosfátového pufru pH 7,8

Pomocí polymerních nosičů (P(HEMA-co-GMA)–NH₂ (2 mg/ml) byla provedena separace bakteriální DNA v prostředí fosfátového pufru pH 7,8 z mléčných výrobků. Bakteriální DNA byla použita jako matrice pro provedení PCR.

Získaná DNA je v kvalitě vhodné pro použití v PCR. Pomocí PCR byla potvrzena přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* v mléčných výrobcích: Bílý jogurt z Valašska, Smetanový bílý jogurt Kunín, Actimel, Acidofilní mléko a Smetanový jogurt jahoda z Valašska.

Testování nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ pro izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí PEG a NaCl

Druhou metodou byla separace bakteriální DNA z mléčných výrobků pomocí polymerních nosičů (P(HEMA-co-GMA)–NH₂ (2 mg/ml) v prostředí PEG a NaCl. Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR. Intenzita PCR produktů byla velice nízká.

Testování nosičů polyLYSINE (F79_L3) pro izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí fosfátového pufru pH 7,8

Magnetické nosiče polyLYSINE (F79_L3) (2 mg/ml) byly použity pro separaci bakteriální DNA v prostředí fosfátového pufru pH 7,8 z mléčných výrobků. Získaná DNA byla použita jako matrice do PCR

Po amplifikaci bakteriální DNA pomocí PCR byly detekovány následující PCR produkty vzorků Bílého jogurtu z Valašska, Smetanového bílého jogurtu Kunín, Actimelu, Acidofilního mléka a Smetanového jogurtu Florian jahoda. Všechny detekované PCR produkty byly nízké intenzity. U ochucených jogurtů nebyly PCR produkty detekovány. Ve vzorcích, kde nedocházelo k amplifikaci DNA, se pravděpodobně nacházely inhibitory PCR.

Testování nosičů polyLYSINE (F79_L3) pro izolaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí PEG a NaCl

Magnetické nosiče polyLYSINE (F79_L3) byly použity pro separaci bakteriální DNA z mléčných výrobků v prostředí PEG a NaCl. Získaná DNA byla amplifikována v PCR. PCR produkty byly detekovány pouze u vzorku Bílého jogurtu z Valašska. U ostatních vzorků mléčných výrobků nebyly detekovány PCR produkty.

Fenol-chloroformová extrakce bakteriální DNA z mléčných výrobků

Z připravených buněčných lyzátů byla extrahována bakteriální DNA organickými činidly (fenol, chloroform). Získaná DNA byla amplifikována pomocí PCR.

Velmi intenzivní PCR produkty byly detekovány u vzorků Bílého jogurtu z Valašska, Smetanového bílého jogurtu Kunín, Actimelu, Acidofilního mléka a Smetanového jogurtu Florian jahoda a jahodového jogurtu Naše BIO OLMA. U vzorku Klasik bílý jogurt OLMA nebyl PCR produkt opět detekován.

Srovnání izolačních metod DNA ze vzorků mléčných výrobků

Po srovnání různých izolačních metod separace bakteriální DNA z mléčných výrobků byly zjištěny následující závěry. Při použití nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ ve fosfátovém pufru pH 7,8 byla separována bakteriální DNA z mléčných výrobků, která byla použita jako matrice do PCR směsi. PCR produkty byly detekovány u všech vzorků. Druhou metodou byla separace kondenzované DNA pomocí P(HEMA-co-GMA)-NH₂ v prostředí PEG a NaCl. Získané vzorky DNA byly amplifikovány pomocí PCR. U většiny vzorků nebyla prokázána přítomnost PCR produktů. Pouze u některých vzorků byly detekovány PCR produkty slabé

intenzity. Pravděpodobně došlo k nespecifické sorpci malého množství bakteriální DNA na polymerní nosiče. Při použití nosičů polyLYSINE (F79_L3) v prostředí fosfátového pufru pH 7,8 byly získány PCR produkty nízké intenzity, a to pouze u některých vzorků mléčných výrobků. Separace bakteriální DNA z mléčných výrobků pomocí nosičů polyLYSINE (F79_L3) v prostředí PEG a NaCl byla vyhodnocena jako neúčinná, jelikož byl detekován PCR produkt pouze u jednoho vzorku. Poslední metodou byla fenol-chloroformová extrakce bakteriální DNA z mléčných výrobků. Rovněž tato DNA byla amplifikována v PCR. Při detekci na agarosové gelové elektroforéze byly na gelu PCR produkty vysoké intenzity.

Výhodou separace DNA pomocí nosičů P(HEMA-co-GMA)-NH₂ je omezení použití toxických organických rozpouštědel. Metodu separace DNA v prostředí fosfátového pufru lze s výhodami použít pro detekci bakteriální DNA v mléčných výrobcích. Takto získaná DNA je vhodná pro amplifikaci pomocí PCR. PCR produkty byly dostatečné intenzity. Tato metoda je rychlá, jednoduchá a ekologická.

6.1.5 Bioinformatická analýza DNA mikroorganismů využívaných v potravinářském průmyslu

Pomocí softwaru Palindrom Analyser a G4Hunter byla provedena analýza výskytu sekundárních struktur DNA v genomu vybraných organismů, zejména významných v potravinářství.

Bioinformatická analýza výskytu kvadruplexových formací u vybraných bakterií využívaných v potravinářství

Součástí dizertační práce je přiložená publikace, která se zabývá studiem přítomností a lokalizací PQS v doméně Bakteria. Z této studie byly vybrány bakteriální druhy, které se využívají v potravinářství. Pomocí softwaru G4Hunter byla provedena analýza výskytu kvadruplexů v genomu vybraných bakteriálních druhů. V Tabulce 4 jsou uvedené vybrané druhy pro analýzu DNA a velikosti chromozomů.

Tabulka 4: Vybrané druhy a velikosti chromozomů

Druh	Kmen	Sekvence (bp)
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	Firmicutes	2291220
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> ZW3		2113023
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp, <i>paracasei</i> JCM 8130		2995875
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956		2098685
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG		3010111
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	Actinobacteri a	2089645
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp, <i>lactis</i> DSM 10140		1938483
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20213 = JCM 1192		2269415

Byly zadány parametry analýzy: zobrazovací okno 25 a citlivost 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 a 2. Největší počet potenciálních kvadruplexových struktur byl zjištěn v genomu *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 (3834 PQS) a nejmenší počet v genomu *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 (169 PQS). Nejvyšší frekvence PQS byla zjištěna v genomu *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 – 1,8269 PQS/kbp a nejnižší frekvence PQS v genomu *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 – 0,0800 PQS/kbp.

Bioinformatická analýza genomu Saccharomyces cerevisiae

Byla provedena analýza výskytu IR a kvadruplexů v genomu *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), který obsahuje 16 chromozomů (Chr) a mitochondriální DNA (mtDNA). Dále byl sledován výskyt IR a kvadruplexů uvnitř a vně sekvencí anotovaných znaků. Velikosti Chr a mtDNA jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Velikosti chromozomů a mtDNA *S. cerevisiae*

Chromosom/mtDNA	Velikost sekvence (bp)
ChrI	230218
ChrII	813184
ChrIII	31662
ChrIV	1531933
ChrV	576874
ChrVI	270161
ChrVII	1090940
ChrVIII	562643
ChrIX	439888
ChrX	745751
ChrXI	666816
ChrXII	1078177
ChrXIII	924431
ChrXIV	784333
ChrXV	1091291
ChrXVI	948066
mtDNA	85779

Z Tabulky 5 je patrné, že nejdelší sekvenci má chromozom IV a nejkratší sekvenci mtDNA.

Analýza výskytu IR v genomu *Saccharomyces cerevisiae*

Pomocí Palindrome Analyseru byl stanoven počet nalezených IR a mtDNA v jednotlivých chromozomech, je uveden v Tabulce 6. Výsledky byly tříděny dle následujících parametrů: délka IR (Tabulka 7), velikost smyčky (Tabulka 8), a počet nespárovaných (párů) bází (Tabulka 9).

Tabulka 6: Počet nalezených IR, frekvence IR a nejdelší IR nalezený v jednotlivých chromozomech a mtDNA

Chromozom/mtDNA	Počet IR	IR/kbp	Nejdelší IR [bp]
I	96	0,42	16
II	476	0,59	23
III	262	0,83	29
IV	866	0,57	23
V	337	0,58	19
VI	172	0,64	16
VII	662	0,61	21
VIII	321	0,57	19
IX	253	0,58	18
X	392	0,53	20
XI	414	0,62	20
XII	602	0,56	24
XIII	448	0,48	18
XIV	418	0,53	22
XV	605	0,55	20
XVI	481	0,51	20
mtDNA	2146	25,02	23

Celkem bylo analyzováno 12 157 105 bp a bylo nalezeno 8 951 IR. Celková frekvence v genomu *S. cerevisiae* byla 0,74 IR/kbp. V mtDNA bylo nalezeno nejvíce IR (2146 IR), naopak nejméně v chromozomu I (96 IR). Nejvyšší frekvence výskytu IR byla nalezena u mtDNA (25,02 IR/kbp) a nejnižší u chromozomu I (0,42 IR/kbp).

Tabulka 7: Počet IR a frekvence IR v genomu *S. cerevisiae* dle délky IR

Velikost IR	Počet IR	IR/1000b p	Velikos t IR	Počet IR	IR/1000b p
10	4610	0,3792	21	14	0,0012
11	2017	0,1659	22	10	0,0008
13	947	0,0779	23	4	0,0003
14	540	0,0444	24	1	0,0001
15	321	0,0264	25	0	0
16	187	0,0154	26	1	0,0001
17	73	0,0060	27	0	0
18	59	0,0049	28	0	0
19	35	0,0029	29	1	0,0001
20	27	0,0022	30	0	0

Tabulka 8: Počet IR a frekvence IR v genomu *S. cerevisiae* dle délky smyčky

Velikost IR	Počet IR	IR/1000b p	Velikos t IR	Počet IR	IR/1000b p
0	2942	0,2731	6	554	0,0514
1	942	0,0875	7	537	0,0499
2	664	0,0616	8	542	0,0503
3	549	0,0510	9	534	0,0496
4	618	0,0574	10	523	0,0486
5	546	0,0507			

Tabulka 9: Počet IR a frekvence IR v genomu *S. cerevisiae* dle délky a počtu nespárovaných (párů) bází

Velikost IR	Počet IR	IR/1000b p
0	827	0,0768
1	8124	0,7542

S vzrůstající velikostí IR klesal jejich počet (Tabulka 7), třetina zcela postrádala smyčku (Tabulka 8). Z celkového množství nalezených IR byla jen zhruba desetina, neobsahující chybu sekvence (Tabulka 9).

Analýza výskytu kvadruplexů v genomu *S. cerevisiae*

Pro analýzu výskytu PQS v genomu *S. cerevisiae* pomocí programu G4Hunteru byly zadány parametry: zobrazovací okno 25 a citlivost 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 a 2. Počty nalezených kvadruplexů v genomu, při různé citlivosti analýzy, jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Počet kvadruplexů a frekvence kvadruplexů v genomu *S. cerevisiae* dle citlivosti

Citlivost	Počet PQS	PQS/1000b p
1,2	3072	0,2852
1,4	1012	0,0940
1,6	230	0,0214
1,8	137	0,0127
2,0	53	0,0049

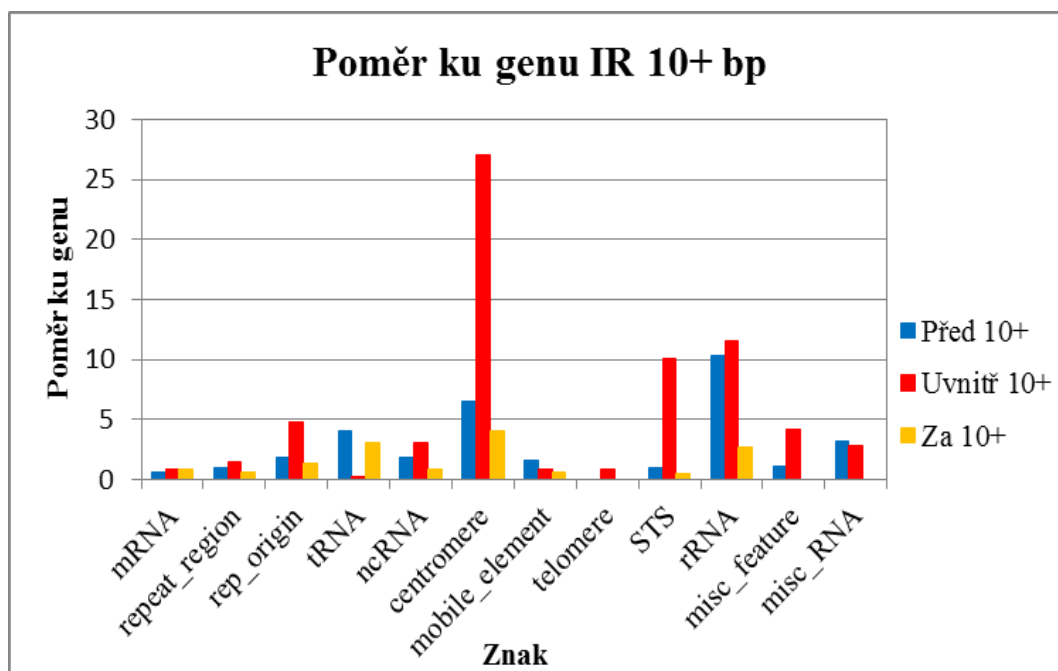
Analýza výskytu IR a kvadruplexů v oblastech anotovaných znaků

Byla provedena analýza výskytu IR a kvadruplexů uvnitř a v okolí sekvencí anotovaných znaků. Seznam anotovaných znaků je uveden v Tabulce 11. Nejčastěji popsaná sekvence „gene“, byla použita jako standard pro srovnání s jinými sekvencemi anotovaných znaků (Čechová a spol., 2017): *mRNA* (mediátorová RNA), *repeat_region* (repetitivní sekvence), *rep_origin* (počátek replikace), *tRNA* (transferová RNA), *ncRNA* (nekódující RNA), *centromere*, *mobile_element* (mobilní jednotka), *telomere* a *STS* (sequence-tagged site).

Tabulka 11: Seznam anotovaných znaků

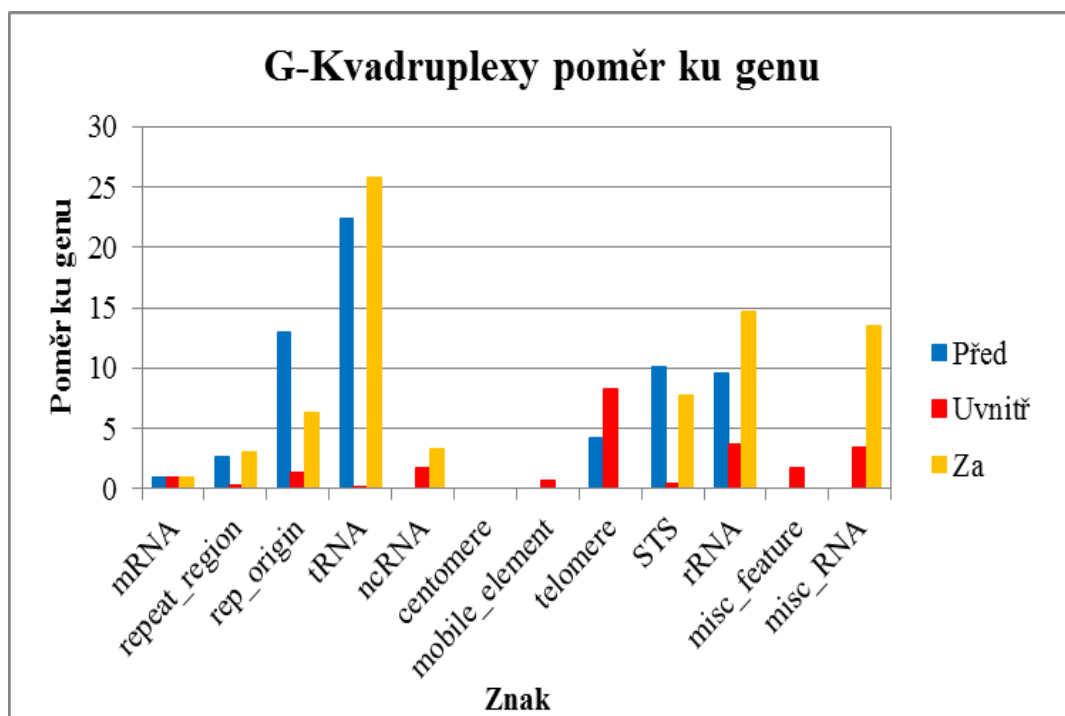
Znak	Počet znaků	Velikost všech znaků (bp)	Průměrná velikost znaku
gene	6445	9026186	1400
<i>mRNA</i>	5995	8587452	1432
repeat_region	383	111937	292
rep_origin	360	107618	299
tRNA	299	19630	66
<i>ncRNA</i>	102	33448	328
centromere	64	3702	58
mobile_element	50	291801	5836
telomere	32	140679	4396
STS	17	7297	429
rRNA	14	15327	1095
misc_feature	14	12429	888
misc_RNA	10	16714	1671

Byl sledován výskyt IR o velikost 8 bp a delších, 10 bp a delších a 12 bp a delších. Na *Obrázku 1* je uvedeno srovnání výskytu IR o velikost 10 bp a delších uvnitř a v okolí anotovaných znaků ku genu. Nejvyšší obohacení IR bylo zjištěno u centromer (uvnitř sekvence), dále pak rRNA (uvnitř sekvence a před sekvencí), STS (uvnitř sekvence) a rep_origin (uvnitř sekvence).



Obrázek 1: Srovnání frekvence IR o velikost 10 bp a delších uvnitř a v okolí anotovaných znaků ku genu

Dále byl sledován výskyt kvadruplexů uvnitř a v okolí sekvencí anotovaných znaků. Byly zvoleny podmínky pro citlivost analýzy: 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 a 2. Na *Obrázku 2* je uvedeno srovnání výskytu PQS uvnitř a v okolí anotovaných znaků ku genu pro všechny nalezené PQS.



Obrázek 2: Srovnání frekvence PQS uvnitř a v okolí anotovaných znaků ku genu pro všechny nalezené PQS

Nejvyšší výskyt kvadruplexových struktur byl zaznamenán v okolí sekvence tRNA, rep_origin (v okolí sekvence), rRNA (v okolí i uvnitř sekvence), viz. Obrázek 2. Velké množství kvadruplexů bylo zaznamenáno také před a uvnitř sekvencí telomer, STS (v okolí sekvence) a misc_RNA (uvnitř a za sekvencí).

7 ZÁVĚR

V předložené práci s názvem Izolace a analýza DNA se zaměřením

na mikroorganismy důležité v potravinářství byl optimalizován postup přípravy buněčných lyzátů buněk rodu *Lactobacillus*. Jako lyzační činidlo byl zvolen roztok pracího prostředku. Jako optimální koncentrace lyzačního činidla byl zvolen 4% roztok pracího prostředku s dobou působení lyze 3 hodiny. Při použití tohoto lyzačního postupu nebylo nutné použití přídavku Proteinázy K a SDS. Roztok pracího prostředku Prášek E byl zvolen jako nejvhodnější.

Druhá část se zabývala alternativní metodou izolace nukleových kyselin z bakteriálních buněk. Byly testovány různé koncentrace NaCl, které působily na buněčné lyzáty získané z čistých bakteriálních kultur rodu *Lactobacillus* působením roztoku pracího prostředku. Jako nejvhodnější koncentrace NaCl pro izolaci DNA byly zjištěny koncentrace 1,65 M a 2,2 M.

Třetí část práce byla věnována testování reakčních pufrů a hledání optimálního prostředí pro adsorpci na nosiče a desorpci nukleových kyselin z nosičů. Fosfátový reakční pufr o hodnotě pH 7,8 pro adsorpci nukleových kyselin na polymerní nosiče byl vyhodnocen jako nejúčinnější. Docházelo k vysoké adsorpci DNA na nosiče, a proto byl tento reakční pufr vybrán pro experimenty prováděné s mléčnými výrobky. Pro desorpci nukleových kyselin z nosičů byl zvolen optimální eluční pufr: TE pufr v rozmezí pH 7,8, - 9,0.

Čtvrtá část dizertační práce byla zaměřena na studium různých typů magnetické separace DNA aplikované na reálné vzorky – mléčné výrobky. Při porovnání metod magnetické separace DNA aplikované na mléčné výrobky: magnetická separace DNA v prostředí reakčního pufru a magnetická separace kondenzované DNA v prostředí PEG a NaCl lze konstatovat, že pomocí metody magnetické separace DNA v prostředí reakčního pufru (fosfátový pufr pH 7,8) byla získána DNA o vyšší koncentraci. Také při detekci PCR produktů byly PCR produkty pozitivní u téměř všech vzorků získaných magnetickou separací v prostředí pufru, oproti druhé metodě (izolace kondenzované DNA), kde byly detekovány jen některé PCR produkty.

V poslední části dizertační práce věnované bioinformatické analýze byly analyzovány genomy vybraných bakteriálních druhů využívaných v potravinářství. Byl sledován výskyt PQS při různých citlivostech analýzy. Ve všech genomech byly nalezeny PQS.

Dále byla provedena bioinformatická analýza přítomnosti křížových struktur kompletního genomu *S. cerevisiae*. Celkem bylo analyzováno 12 157 105 bp a bylo nalezeno 8951 IR. Celková frekvence v genomu *S. cerevisiae* byla 0,74 IR/kbp. Se vzrůstající velikostí IR klesal počet nalezených IR. Asi třetina IR zcela postrádala smyčku. IR neobsahujících chybu v sekvenci byla jen zhruba desetina z celkového množství nalezených IR. V mtDNA bylo nalezeno nejvíce IR. Množství IR u mtDNA bylo mnohonásobně vyšší oproti obsahu IR v chromozomech.

Dále byl sledován výskyt IR a kvadruplexů uvnitř sekvencí a v okolí anotovaných znaků. Nejvyšší obohacení IR bylo zjištěno pro centromeru, dále pak rRNA, rep_origin a STS. Frekvence IR lokalizovaná v centromerách je 5krát vyšší než u IR lokalizovaných v genu. Nejvyšší výskyt PQS byl pozorován v sekvencích telomer, dále pak rRNA a misc_RNA. Velké množství PQS bylo zjištěno kolem tRNA, rep_origin, rRNA a STS.

8 POUŽITÁ LITERATURA

BARTAS M., BRÁZDA V., KARLICKÝ V., ČERVENÝ J., PEČINKA P.: Bioinformatics analyses and in vitro evidence for five and six stacked G-quadruplex forming sequences. *Biochimie*. 2018, 150, 70-75. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.05.002

BEDRAT A., Laurent L., Jean-Louis M.: Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Research*. 2016, 44(4), 1746-1759. DOI: 10.1093/nar/gkw006

BEN AMOR K., VAUGHAN E. E., DE VOS W. M.: Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Nutrition*. 2007, 137(3), 741-747. DOI: 10.1093/jn/137.3.741 S

BIKARD D., LOOT C., BAHAROGLU Z., MAZEL D.: Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010, 74(4), 570-588. DOI: 10.1128/MMBR.00026-10

BRÁZDA V., KOLOMAZNÍK J., LÝSEK J., HÁRONÍKOVÁ L., COUFAL J., ŠT'ASTNÝ J.: Palindrome analyser – A new web-based server for predicting and evaluating inverted repeats in nucleotide sequences. *Biochemical and Biophysical Research*. 2016, 478(4), 1739-1745. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.015

BRÁZDA V., LAISTER R. C., JAGELSKÁ E. B., ARROWSMITH Ch.: Cruciform structures are a common DNA feature important for regulating biological processes. *BMC Molecular Biology*. 2011, 12(1). DOI: 10.1186/1471-2199-12-33

ČECHOVÁ J., LÝSEK J., BARTAS M., BRÁZDA V., HANCOCK J.: Complex analyses of inverted repeats in mitochondrial genomes revealed their importance and variability. *Bioinformatics*. 2018, 34(7), 1081-1085. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx729

DAI X., GREIZERSTEIN M. B., NADAS-CHINNI K., ROTHMAN-DENES L. B.: Supercoil-induced extrusion of a regulatory DNA hairpin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, 94(6), 2174-2179. DOI: 10.1073/pnas.94.6.2174

DE BRUIN O. M., CHIEFARI A., WROBLEWSK D., EGAN Ch., KELLY-CIRINO C. D.: A novel chemical lysis method for maximum release of DNA from difficult-to-lyse bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 2019, 126, 292-297. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.008

DEL CAMPO, A., T. SEN, J.-P. LELLOUCH a I. J. BRUCEA. Multifunctional magnetite and silica–magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, č. 293, 33–40. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.01.040

EHRMANN M. A., VOGEL R. F.: Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*. 2005, 16 (1-3), 31-42. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.06.004

ESPINOSA J. M.: Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. *Oncogene*. 2008, 27(29), 4013-4023. DOI: 10.1038/onc.2008.37

HAGAN, K. A., MEIER W. L., FERRANCE J. P., LANDERS J. P.: Chitosan-Coated Silica as a Solid Phase for RNA Purification in a Microfluidic Device. *Analytical Chemistry*. 2009, roč. 81, č. 13, s. 5249-5256. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac900820z

HAIHUI J., HAN X., LI Z., CHEN X., HOU Y., GAI L., LI D., LU X., F. TILING: Superparamagnetic core–shell structured microspheres carrying carboxyl groups as adsorbents for purification of genomic DNA. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012, roč. 401, č. 5, s. 74-80. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.03.024

HERSHMAN S. G., CHEN Q., LEEJ. Y., KOZAK M. L., YUE P., WANG L.-S., JOHNSON F. B.: Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 2008, 36(1), 144-156. DOI: 10.1093/nar/gkm986

VAN HOLDE K., ZLATANOVA J.: Unusual DNA structures, chromatin and transcription. *BioEssays*. 1994, 16(1), 59-68. DOI: 10.1002/bies.950160110

HORÁK D., BABIČ M., MACKOVÁ H., M. J. BENEŠ: Preparation and properties of magnetic nano-and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*. 2007, roč.30, č. 11, s. 1751-1772. DOI: 10.1002/jssc.200700088

HUPPERT J. L.: Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Research*. 2005, 33(9), 2908-2916. DOI: 10.1093/nar/gki609

JAGELSKÁ E. B., PIVOŇKOVÁ H., FOJTA M., BRÁZDA V.: The potential of the cruciform structure formation as an important factor influencing p53 sequence-specific binding to natural DNA targets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, 391(3), 1409-1414. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.076

JIANG CH., XU S., ZHANG S., L. JIA: Chitosan functionalized magnetic particle-assisted detection of genetically modified soybeans based on polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 2012, roč. 420, č. 1, s. 20-25. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/j.ab.2011.09.004

JOST Ch. A., MARIN M. C., Kaelin JR. W.G.: P73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. 1997, 389(6647), 191-194. DOI: 10.1038/38298

KEAWCHAOON, L. a R.YOKSAN. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, č. 84, 163–171. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.12.031

KIKIN O., D'ANTONIO L., BAGGA P. S.: QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*. 2006, 34, 676-682. DOI: 10.1093/nar/gkl253

KNOPP D., TANG D., NIESSNER R.: Review: Bioanalytical applications of biomolecule – functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Analytica Chimica Acta*. 2009, roč. 647, s. 14-30. DOI: 10.1016/j.aca.2009.05.037

KOCH A.L.: Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*. 1998, 149(10), 689-701. DOI: 10.1016/S0923-2508(99)80016-3

LEE J., CHANG J. H.: Magnetic DNA Separation Process with Functionalized Magnetic Silica Nanoparticles. *Biomedical Applications of Micro- and Nanoengineering IV and Complex Systems*. 2008, roč. 7270, s. 153-801 DOI: 10.1117/12.814120

LEVISON P. R., BADGER S. EHATHI P., DAVIES M. J., BRUCE I. J., V. GRIMM V.: New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998, č. 827, 337–344. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00681-5

LORENZ T. C.: Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (63). DOI: 10.3791/3998

MAZUR S. J., SAKAGUCHI K., APPELLA E., WANG X. W., HARRIS C. C., BOHR V. A.: Preferential binding of tumor suppressor p53 to positively or negatively supercoiled DNA involves the C-terminal domain 1 Edited by K. Yamamoto. *Journal of Molecular Biology*. 1999, 292(2), 241-249. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3064

MISHRA S. K., SHANKAR U., JAIN N., SIKRI K., TYAGI J. S., SHARMA, Jean-Louis MERGNY T. K., KUMAR A.: Characterization of G-Quadruplex Motifs in espB, espK, and cyp51 Genes of Mycobacterium tuberculosis as Potential Drug Targets. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2019, 16, 698-706. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.04.022. ISSN 21622531

MIURA O., OGAKI T., YONEYAMA H., KIKUCHI Y., OHYAMA T.: A strong structural correlation between short inverted repeat sequences and the polyadenylation signal in yeast and nucleosome exclusion by these inverted repeats. *Current Genetics*. 2019, 65(2), 575-590. DOI: 10.1007/s00294-018-0907-8

MOUAZIZ H., VEYRET R., THERETZ A., GINOT F., ELAISSARI A.: Aminodextran Containing Magnetite Nanoparticles for Molecular Biology Applications: Preparation and Evaluation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2009, č. 2, s. 172-181. DOI: 10.1166/jbn.2009.1023

NAKAGAWA T., HASHIMOTO R., MARUYAMA K., TANAKA T., TAKEYAMA H., MATSUNAGA T.: Capture and release of DNA using aminosilane-modified bacterial magnetic particles for automated detection system of single nucleotide polymorphisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, č. 94, 862–868. DOI: 10.1002/bit.20904

RAHMAN M., M. A. ELAISSARI: Temperature and magnetic dual responsive microparticles for DNA separation. *Separation and Purification Technology*. 2011, roč. 81, č. 3, s. 286-294. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.07.030

RAMANATHAN T., FISHER T., RUOFF R. S., L. C. BRINSONET: Amino-Functionalized Carbon Nanotubes for Binding to Polymers and Biological Systems. *Chemistry of Materials*. 2005, roč. 17, č. 6, s. 1290-1295 DOI: 10.1021/cm048357f

RAWAL P.: Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: Role in Escherichia coli global regulation. *Genome Research*. 2006, 16(5), 644-655. DOI: 10.1101/gr.4508806

RHODES D., LIPPS H.J.: G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Research*. 2015, 43(18), 8627-8637. DOI: 10.1093/nar/gkv862

SALAZAR O., ASENJO J. A.: Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology Letters*. 2007, 29(7), 985-994. DOI: 10.1007/s10529-007-9345-2

SAMBROOK J., RUSSELL D. W.: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 3 sv. ISBN 978-0-87969577-4

SHAN Z., LI X., GAO Y., WANG X., LI Ch., Q. WU: Application of magnetic hydroxyapatite nanoparticles for solid phase extraction of plasmid DNA. *Analytical Biochemistry*. 2012, roč. 425, č. 2, s. 125-127. DOI: 10.1016/j.ab. 012.03. 013

SHLYAKHTENKO L. S., HSIEH P., GRIGORIEV M., POTAMAN V. N., SINDEN R. R., LYUBCHENKOY. L.: A cruciform structural transition provides a molecular switch for chromosome structure and dynamics 1 Edited by I. Tinoco. *Journal of Molecular Biology*. 2000, 296(5), 1169-1173. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3542

STRAWBRIDGE E. M., BENSON G., GELFAND Y., BENHAM C. J.: The distribution of inverted repeat sequences in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Current Genetics*. 2010, 56(4), 321-340 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1007/s00294-010-0302-6

ŠVEC P., KUKLETOVÁ M., SEDLÁČEK I.: Comparative evaluation of automated ribotyping and RAPD-PCR for typing of *Lactobacillus* spp. occurring in dental caries. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010, 98(1), 85-92. DOI: 10.1007/s10482-010-9432-6

TURKOVÁ K., RITTICH B., ŠPANOVÁ A.: Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods. *Chemical Papers*. 2012, 66(9). DOI: 10.2478/s11696-012-0206-7

VANDEVENTER P. E., WEIGEL K. M., SALAZAR J., et al.: Mechanical Disruption of Lysis-Resistant Bacterial Cells by Use of a Miniature, Low-Power, Disposable Device. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, 49(7), 2533-2539. DOI: 10.1128/JCM.02171-10

VEYRET R., DELAIR T., PICHOT CH., ELAISSARI A.: Amino-containing magnetic nanoemulsions: elaboration and nucleic acid extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, č. 295, 55–163. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.01.008

WATSON J. D., CRICK F. H. C.: Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953, roč. 171, č. 4356, s. 737-738. DOI: 10.1038/171737a0

WANG Y., LEUNG F. C. C.: A study on genomic distribution and sequence features of human long inverted repeats reveals species-specific intronic inverted repeats. *FEBS Journal*. 2009, 276(7), 1986-1998. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06930.x

WARBURTON P. E.: Inverted Repeat Structure of the Human Genome: The X-Chromosome Contains a Preponderance of Large, Highly Homologous Inverted Repeats That Contain Testes Genes. *Genome Research*. 2004, 14(10a), 1861-1869. DOI: 10.1101/gr.2542904. ISSN 1088-9051

YANG, CH., GUAN Y., XING J., H. LIU: Surface Functionalization and Characterization of Magnetic Polystyrene Microbeads. *Langmuir*. 2008, roč. 24, č. 16, s. 9006-9010. DOI: 10.1021/la7040

YANG Y., ZHU W., FENG L, et al.: G-Quadruplex-Based Nanoscale Coordination Polymers to Modulate Tumor Hypoxia and Achieve Nuclear-Targeted Drug Delivery for Enhanced Photodynamic Therapy. *Nano Letters*. 2018, 18(11), 6867-6875. DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b02732

ZHANG J., ZHI X., ZHANG M., et al. Efficacy and feasibility of the immunomagnetic separation based diagnosis for detecting sentinel lymph node metastasis from breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2015. DOI: 10.2147/IJN.S72263

ZUKER, M.: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*. 2003, 31(13), 3406-3415. DOI: 10.1093/nar/gkg595

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
G	guanin
G-kvadruplex	Guaninový kvadruplex
Chr	chromozom
IR	invertovaná repetice
misc_feature	miscellaneous feature
misc_RNA	miscellaneous RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
mRNA	mediátorová RNA
mobile_element	mobilní jednotka
NCBI	National center for biotechnology information
ncRNA	nekódující RNA
PCR	polymerázova řetězová reakce
PEG	poly(ethylenglykol)
rep_origin	počátek replikace
PQS	potenciální sekvence kvadruplexů
repeat_region	repetitivní sekvence
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
STS	sequence-tagged site
Taq	Thermus aquaticus
tRNA	transferová RNA

10 STRUČNÝ ŽIVOTOPIS AUTORKY

Osobní údaje:

Jméno a příjmení:	Ing. MICHAELA ČUTOVÁ
Rodné příjmení:	Fričová
Místo narození:	Opava, Česká republika
Státní příslušnost:	česká

Dosažené vzdělání:

2010 – dosud: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická: Chemie a technologie potravin: Potravinářská chemie – PhD. (18. 6. 2013 vykonání Státní doktorské zkoušky)

2008–2010: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická: Chemie a technologie potravin: Potravinářská chemie a biotechnologie – Ing. (diplomová práce: Transientní transfekce bezsérové buněčné kultury pomocí polyethyleniminů)

2005–2008: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická: Chemie a technologie potravin: Biotechnologie – Bc. (bakalářská práce: Stanovení chloridů ve farmaceutických substancích)

2001–2005: Mendelovo gymnázium Opava

Odborná praxe:

2006–2007: IVAX Pharmaceuticals s.r.o. (TEVA) Opava, oddělení Výzkumu a vývoje, Ostravská 29, 74770 Opava – laborant - příprava vzorků pro analýzu, Titrační metody, HPLC

2009–2010: *BioVendor – Laboratorní medicína a.s.* divize Laboratorní medicína, CTPark, Modřice, oddělení Výzkumu a vývoje – Proteinová chemie, Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, laborant – kultivace buněk, izolace plazmidů, transientní transfekce

2014–2016: McBride Czech a.s., oddělení Kontroly a řízení jakosti, Dusíkova 795/7 638 00 Brno, laborant fyzikální chemie, kontrola kvality vstupních surovin, vyrobených meziproduktů a finálních výrobků.

Jazykové znalosti:

Angličtina –pokročilý
Němčina –pokročilý
Španělština – pasivně

Dovednosti:

Řidičský průkaz sk. B – aktivní řidič

Počítačové znalosti: Microsoft office, MATLAB, ChemSketch, Helios green,
Comes

11 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI, KONFERENČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ A PROJEKTŮ

Konferenční příspěvky:

Čuta R., Fričová M., Rittich B., Španová A. *Testing different types lysis method for the preparation of the bacterial cell lysates with subsequent isolation and amplification of DNA*. 2014. s. 170-171.

Fričová, M., Rittich, B., Španová, A. *The use of iont potencial at the bacterial DNA separatio by amino functionalized magnetic nanopartocles*. 2014.

Fričová, M.; Čuta, R.; Trachtová, Š.; Španová, A.; Rittich, B. *Identifikace mikroorganismů v přípravku pro biodegradaci lipidů molekulárně biotechnologickými metodami*. 2012. s.26.

Čuta, R., Fričová, M., Španová, A., Rittich, B. *Zjednodušený postup izolace DNA z buněk bakterií rodu Lactobacillus*. Brno: 2012. s. 20.

Čuta, R.; Fričová, M.; Španová, A.; Rittich, B. *Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk rodu Lactobacillus připravených působením enzymů a detergentů obsažených v pracích práscích*. Brno: Masarykova univerzita, 2011. s. 65.

Čuta, R.; Fričová, M.; Španová, A.; Rittich, B.. *The use of enzymes contained in the washing powders to the preparation of the crude lyzates of Lactobacillus cells for magnetic DNA isolation*. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. s1009 (s1009 s.) ISSN: 0009-2770.

Fričová, M.; Čuta, R.; Španová, A.; Rittich, B. *Alternative procedure for preparation of Lactobacillus cell lysates*. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. s1011 (s1011 s.) ISSN: 0009-2770.

Přednáška na konferenci:

Fričová, M.; Čuta, R.; Křížová, J.; Španová, A.; Rittich, B. *Simply method of DNA isolation from Lactic acid bacteria*. Book of abstracts. first. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2015. s. 98-99. ISBN: 978-80-214-5228-2.

Publikační činnost:

Fričová, M.; Čuta, R.; Trachtová, Š.; Španová, A.; Rittich, B. *Jednoduchý postup izolace DNA z buněk bakterií rodu. Lactobacillus*. Mlékařské listy. 2014, č. 142, s. 3-5.

Bartas, M.; Čutová, M.; Brázda, V.; Kura, P.; Šťastný, J.; Kolomazník, J.; Coufal, J.; Goswami, P.; Červeň, J.; Pečinka, P. *The Presence and Localization of G-Quadruplex Forming Sequences in the Domain of Bacteria*. Molecules. 2019, 24(9). DOI: 10.3390/molecules24091711. ISSN 1420-3049; Impact Factor: 3.060 (2018); 5-Year Impact Factor: 3.380 (2018)

Čutová M., Manta J., Porubiaková O., Kaura P., Šťastný J., Jagelská E. B., Goswami P., Brázda V.: Genomic distribution of inverted repeats and G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Odesláno do: *Genomics*. 2019

Projekty:

IS1601/2012: FRVŠ 1601 G4: Identifikace bakterií z přípravku pro biodegradaci lipidů molekulárně biotechnologickými metodami IS1601/2012