

Využití PCR pro studium mikrobiologických biodegradačních procesů

Bc. Tereza Dobešová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza DOBEŠOVÁ**
Osobní číslo: **T09630**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Využití PCR pro studium mikrobiologických
biodegradačních procesů**

Zásady pro vypracování:

- 1. Ověřit použitelnost skupiny PCR primerů pro přípravu vstupního materiálu pro TGGE.**
- 2. Optimalizovat podmínky PCR pro vybrané primery.**
- 3. V závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty.**
- 4. Provést literární rešerši a zpracovat výsledky experimentů do formy DP.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

14. února 2011

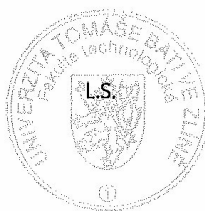
Termín odevzdání diplomové práce:

13. května 2011

Ve Zlíně dne 14. února 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

ředitel ústavů



Příjmení a jméno: DOBĚŠOVÁ TEREZA

Obor: 10ŽP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 17.5.2011

Teréza

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

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

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

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

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

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

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

(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 přihlíádně k větší výdělku dosaženému školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo ověřit funkčnost a optimalizovat podmínky primerů, jejichž produkty je možno aplikovat na TGGE. Skupiny použitých primerů byly převzaty z literatury a to jak universální primery pro *Eubacteria*, tak vybrané specifické primery pro některé taxonomické skupiny bakterií v rámci říše *Eubacteria*. Testovány byly primery pro *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* a *Actinobacteria*. Rovněž byly optimalizovány některé parametry reakce s těmito primery. Jako templátová DNA byla použita DNA izolovaná z aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod. Byla ověřena funkčnost všech primerů, avšak výjimkou byla *Alfaproteobacteria*, která se stanovovanou DNA opakovaně neposkytla očekávaný produkt. Jako obecný závěr můžeme konstatovat, že u optimalizace primerů je nejvhodnější snížení koncentrace primerů na 0,8 pmol/μl.

Klíčová slova: PCR, TGGE, DNA, primer, optimalizace

ABSTRACT

The aim of this thesis was to verify the functionality and optimize the conditions for primers, whose products can be applied to TGGE. Primers were obtained from literature both universal primers for *Eubacteria* and selected specific primers for some taxonomic groups of bacteria in the *Eubacteria* group. Primers were tested for *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Actinobacteria*. Also, some reaction parameters were optimized with these primers. DNA isolated from activated sludge from wastewater treatment plants was used as the template DNA. The functionality of all primers were verified, except *Alfaproteobacteria* which repeatedly failed to provide the expected product together with determining DNA. As a general conclusion it can be said that reducing concentration of primers to 0,8 pmol/μl is the most proper for primer optimization.

Keywords: PCR, TGGE, DNA, primer, optimalizatoin

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Mgr. Markovi Koutnému, Ph.D. za vedení, rady i připomínky, kterými mě vedl a motivoval. A dále rodičům a přátelům, kteří mi pomáhali a podporovali mne.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 PCR	13
1.1 TEMPLÁT	14
1.2 PRIMERY	15
1.3 POLYMERÁZA	15
2 OPTIMALIZACE PCR	16
2.1 KONCENTRACE Mg^{2+} IONTŮ	16
2.2 ANNEALING („NASEDACÍ“) TEPLOTA	16
2.3 TOUCHDOWN PCR	17
2.4 NESTED (NÁSLEDNÁ) PCR	17
2.5 PCR DLOUHÝCH AMPLIKONŮ	18
2.6 PRIMEROVÉ DIMERY	19
2.7 „HOT START“ PCR	19
2.8 NEGATIVNÍ KONTROLA	19
3 TGGE	20
3.1 ANALYZOVÁNÍ ROZMANITOSTI	20
3.1.1 GC svorka.....	21
4 EUBACTERIA VE VZORKU AKTIVOVANÉHO KALU	22
4.1 AKTIVOVANÝ KAL	22
4.2 EUBACTERIA	22
4.3 ALFAPROTEOBACTERIA	23
4.4 BETAPROTEOBACTERIA	24
4.5 GAMMAPROTEOBACTERIA	24
4.6 ACTINOBACTERIA	25
II PRAKTICKÁ ČÁST	27
5 MATERIÁL	28
5.1 POUŽITÝ MATERIÁL	28
6 METODY	30
6.1 PRÁCE S ROZTOKY PRO PCR	30
6.1.1 Příprava primerů.....	30
6.1.2 Příprava roztoků	30
6.1.3 Příprava PCR reakce	30

6.2	PROVEDENÍ PCR	31
6.3	OVĚŘENÍ VÝSLEDKU PCR REAKCE POMOCÍ ELEKTROFORÉZY.....	32
6.3.1	Příprava 2% agarózového gelu.....	32
6.3.2	Dokumentace PCR produktu.....	32
7	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	33
8	VÝSLEDKY	34
8.1	UNIVERSÁLNÍ PRIMERY PRO EUBACTERIA	34
8.1.1	PCR s primery FD1 a RD1 pro kompletní sekvenci 16s rRNA genu	35
8.1.2	Nested PCR s universálními primery s GC svorkou	36
8.1.3	Nested PCR s různou koncentrací primerů GC341f a 518r	36
8.1.4	Nested PCR s různou annealing teplotou pro primery GC341f a 518r	38
8.1.5	Nested PCR pro různou koncentraci Mg ²⁺ iontů s primery GC341f a 518r	40
8.1.6	Porovnání přímé a nested PCR pro primery GC341f a 907r.....	43
8.1.7	Nested PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací DNA	44
8.1.8	PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací Mg ²⁺ iontů	46
8.1.9	PCR pro primery GC341f a 907r s rostoucí koncentrací Mg ²⁺ iontů.....	48
8.2	PRIMERY SPECIFICKÉ PRO VYBRANÉ SKUPINY BAKTERIÍ	51
8.3	BETAPROTEOBACTERIA	51
8.3.1	PCR pro primery B359f a B682r.....	52
8.3.2	Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací DNA	54
8.3.3	Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací primerů	55
8.3.4	Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací Mg ²⁺ iontů.....	57
8.4	GAMMAPROTEOBACTERIA.....	59
8.4.1	PCR pro primery 395f a 871r s různým množstvím DNA.....	60
8.4.2	Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různým množstvím DNA	62
8.4.3	Nested PCR pro primery GC518f a 785r s jejich různou koncentrací	63
8.4.4	Nested PCR pro primery GC518f 785r s různou koncentrací Mg ²⁺ iontů.....	66
8.5	ALFAPROTEOBACTERIA	68
8.5.1	PCR pro primery Alf28 a Alf684	68
8.5.2	Nested PCR pro primery Alf28 a Alf684	69
8.6	ACTINOBACTERIA.....	71
8.6.1	Nested PCR pro primery 243f a 1378r.....	71
8.6.2	Nested PCR pro primery F1378 a F984GC s různým množstvím DNA	73
8.6.3	Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různou koncentrací Mg ²⁺ iontů.....	75
8.6.4	PCR pro primery Act235 a Act878	77
8.6.5	Nested PCR pro GC341F a 518r s různým množstvím DNA.....	79
	ZÁVĚR	81
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	83
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	86

SEZNAM OBRÁZKŮ	87
SEZNAM TABULEK.....	91

ÚVOD

Biodegradací se obecně rozumí biologické odbourávání organických látek. Biodegradace jsou prováděny zejména mikroorganismy. Biologický rozklad se týká jak přírodních látek, tak látek, které se do životního prostředí dostaly lidskou činností (antropogenní původ). Většinu těchto látek nazýváme polutanty. Schopnost mikroorganismů rozkládat polutanty samozřejmě vede ke snaze využít je prakticky pro odstraňování ekologických zátěží. Jedním z nejdůležitějších faktorů, které mohou ovlivnit jak výběr biodegradační dráhy určitého polutantu, tak i rychlost jeho rozkladu, je kyslík. Obecně je aerobní biodegradace rychlejší než anaerobní a mikroorganismy touto cestou získají větší množství energie.

Nejvýznamnější postavení mezi degradačními organismy mají bakterie, které často disponují celými metabolickými drahami pro rozklad nejrůznějších polutantů.

Bakterie jsou jednoznačně nejrozšířenější skupinou organismů na světě. Můžeme je nalézt v půdě, vodě, ovzduší a jako symbionty i uvnitř a na povrchu mnohobuněčných organismů. Je možno mezi nimi nalézt i druhy, které jsou přizpůsobeny k osidlování prostředí, ve kterém by ostatní organismy nepřežily (vroucí voda v sopečných jezerech, nejvyšší vrstvy atmosféry).

Význam DNA pro studium biodegradace v poslední době stále roste. Na důležitosti získává analýza DNA, díky níž je možné v daném vzorku identifikovat nejen zastoupení organismů, ale i celých společenstev s daleko větší přesností než dříve.

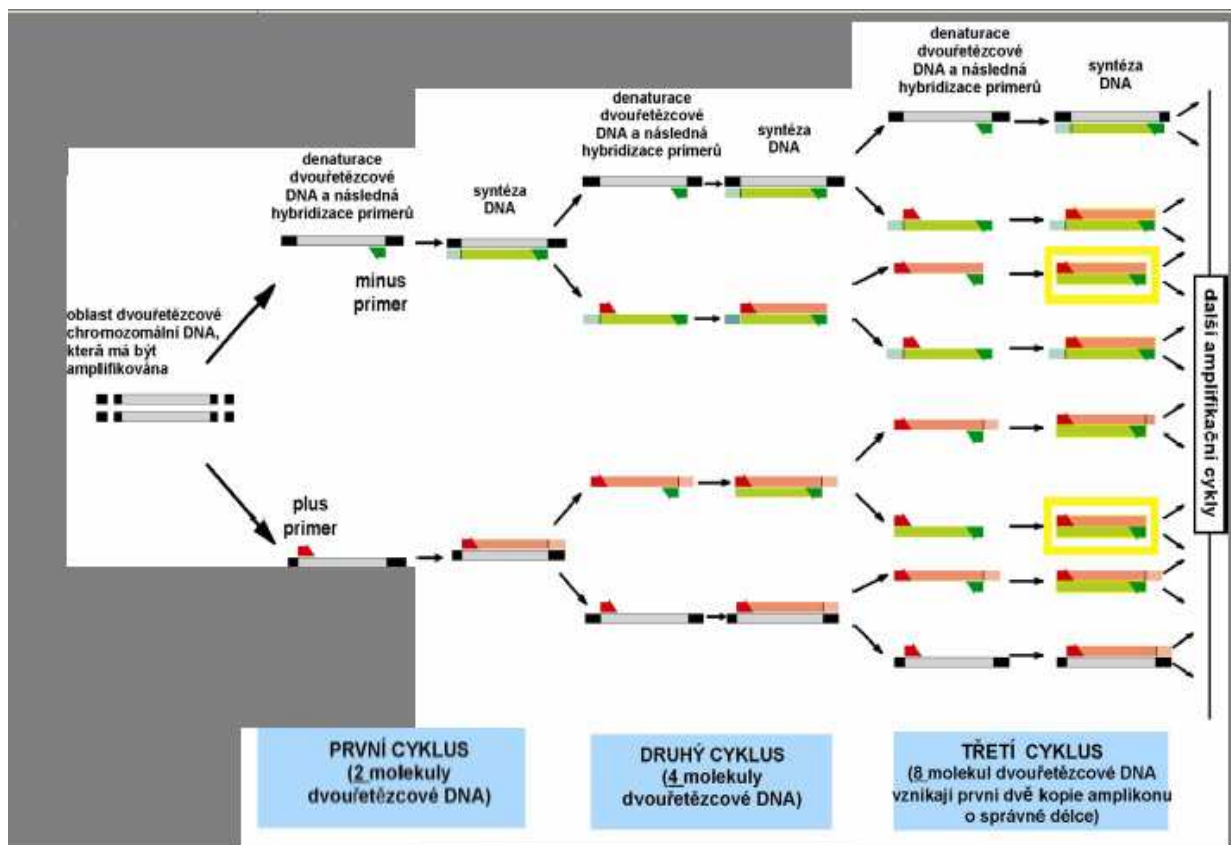
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PCR

PCR je zkratkou z anglického Polymerase Chain Reaction což znamená polymerázová řetězová reakce.

Pro molekulární rozbor je často potřeba získat poměrně velké množství určitého úseku DNA. Až do roku 1983 existoval jen jediný způsob, jak úsek DNA namnožit. Postup byl takovýto: úsek DNA byl v dostatečném množství izolován z odebraného materiálu, vnesen do bakteriálního plazmidu a naklonován. Dnes se pomocí polymerázové řetězové reakce totéž dělá ve stále větším měřítku zcela *in vitro*.

Cílovou sekvencí pro PCR se stává gen nebo úsek DNA či část celkové DNA vložené do reakce. Za několik desítek minut může být tato cílová sekvence milionkrát namnožená následujícím postupem: Nejprve jsou komplementární řetězce dvoušroubovicové DNA rozpleteny teplem (denaturovány). Jsou použity dva krátké úseky DNA, kdy každý z nich je komplementární ke specifické sekvenci a oba slouží jako startéry PCR (viz. Obr. 1). Každý z primerů se váže k cílové sekvenci dle Watson-Crickova pravidla o párování bází (vždy adenin proti thyminu, cytozin proti guaninu). Polymeráza začne z každého navázaného primeru syntetizovat nový, dceřinný řetězec podle vzoru cílové sekvence. Za minutu je vytvořena přesná replika cílové sekvence a tím je první cyklus PCR ukončen. V dalších cyklech je opětovně rozplétána dvoušroubovice cílové sekvence i jejích replik, primery se znovu komplementárně váží a polymeráza vytváří další repliky cílové sekvence. Po dokončení dalších třiceti cyklů je ve zkumavce se směsí DNA fragmentů obrovský nadbytek cílové sekvence a tato amplifikovaná genetická informace je připravena pro další analýzu. Z uvedených informací však není hned zřejmé, že z obou stran vymezená cílová sekvence je poprvé syntetizovaná až ve třetím cyklu PCR. V prvním a druhém cyklu nejméně jeden řetězec končí na nedefinovaném místě, kde se polymeráza odpojí od templátu [1, 2].



Obr. 1. Princip polymerázové řetězové reakce

Na Obr. 1 je zobrazen průběh PCR. Tento obrázek byl použit z literatury [3].

1.1 Templát

Požadavky na templátovou DNA pro PCR nejsou vysoké, pro reakci stačí i velmi malé množství nukleové kyseliny. Zvláště pokud používáme universální primery, je nutné, aby vzorek nebyl kontaminován žádnou jinou DNA, která by se do něj mohla dostat (z nedostatečně čistých pomůcek, rukou pracovníka, a podobně). I nepatrná příměs kontaminující DNA by se mohla v průběhu reakce namnožit natolik, že by vzniklo detekovatelné množství produktu a výsledek pokusu by byl zcela zkreslen. Kromě toho vzorek s templátovou DNA nesmí obsahovat látky, které by inhibovaly DNA polymerázu. Jde často o běžné reagenty používané při izolaci, čištění a zpracování DNA (fenol, proteináza K, vyšší koncentrace solí, heparin, kyselina boritá, ethanol, EDTA apod.) [4].

1.2 Primery

Pro metodu PCR se používají vždy dva primery : jeden, kterým začíná 5'-konec sekvence genu a v průběhu PCR se elonguje ve směru transkripce = forward a druhý, který je označován jako reverse.

Jako primery se zpravidla používají oligonukleotidy o délce 17 až 28 nukleotidů. Aby reakce proběhla správně, měly by primery splňovat některá kritéria:

- musí být specifické pro amplifikovanou sekvenci a měly by být komplementární k úseku, na kterém mají dosedat.
- neměly by být vzájemně komplementární, jinak by se samy mohly začít chovat jako templáty.

Teploty, při kterých použité primery dosedají, by měly být podobné [5].

1.3 Polymeráza

Pro PCR se používají termostabilní DNA polymerázy, které byly původně izolovány z bakterií žijících v horkých pramenech. Nejvýznamnějším zástupcem je tzv. Taq polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*. Teplotní optimum termostabilní DNA polymerázy se pohybuje kolem 75 °C, kdy k primeru dokáže přidat asi 150 bází za sekundu. Při teplotě nad 90 °C není termostabilní DNA polymeráza aktivní, ale dostatečně dokáže odolávat denaturaci [5].

2 OPTIMALIZACE PCR

Nespecifická amplifikace vzorku za neoptimálních podmínek může vést k vytvoření vícenásobných, nedefinovatelných nebo dokonce nežádoucích produktů a to i s možností vyloučení požadovaného produktu. Dalším extrémem může být to, že žádný z vytvořených produktů nebude dost jasný. Klasickým postupem v tomto bodě je změna jednoho nebo více parametrů, které jsou známy tím, že přispívají k primer-templátové spolehlivosti a účinnosti amplifikace. Nejvýše na seznamu optimalizačních proměnných jsou koncentrace Mg^{2+} iontů, pH pufrů a podmínky cyklu. Některé proměnné jsou vzájemně závislé [6].

V současné době je PCR, díky své citlivosti, specifičnosti a rychlosti, asi nejpoužívanější technikou v oboru molekulární biologie.

2.1 Koncentrace Mg^{2+} iontů

Mg^{2+} ionty využíváme k tomu, aby výsledný produkt dosahoval co nejvyšší čistoty. Koncentrace Mg^{2+} iontů je nejnadhěji nastavitelným parametrem, protože všechny možnosti pokusu mohou být spuštěny v samostatných zkumavkách současně. Dodavatelé Taq polymerázy nyní pro zjednodušení poskytují roztok $MgCl_2$ oddělený od ostatních reaktantů a pufrů. Klasická dvoustupňová optimalizační série může zahrnovat začátek pokusu s koncentrací Mg^{2+} iontů od 0,5 mmol/l a po 0,5 mmol/l krocích pokračovat až k 5 mmol/l. Jsou-li však kroky po 0,5 mmol/l nedostatečné, může pokus obsahovat i několik zkumavek, kde se koncentrace Mg^{2+} iontů zvyšuje po 0,2 mmol/l či 0,3 mmol/l Mg^{2+} iontů [6].

2.2 Annealing („nasedací“) teplota

Optimalizace teploty začíná výpočtem annealing teploty (T_m). Pro výpočet annealing teploty lze použít tento vzorec : $T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$. Je možné použít i složitější vzorce, ale v praxi je annealing teplota ovlivněna různými individuálními složkami pufru, každého primeru a koncentrací templátu, a proto je jakákoliv vypočítaná teplota pouze orientační. Teplota, při níž hybridizace probíhá, je velmi důležitá a pro výsledek PCR je kritická, a proto musí být pro použitou sadu primerů vhodně nastavena. Kdyby byla annealing

teplota příliš nízká mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen z části a vytvoří se nesespecifický produkt. Naopak, při příliš vysoké annealing teplotě zase budou primery málo hybridizovat a proto se nevytvoří dostatečné množství produktu [5, 6].

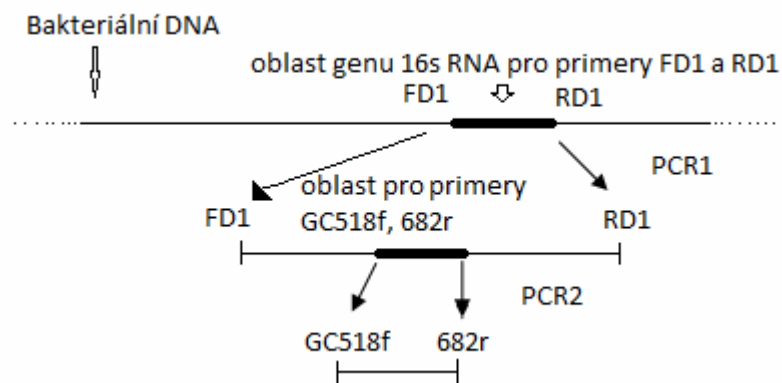
2.3 Touchdown PCR

Touchdown PCR (TD PCR) představuje zásadně odlišný přístup k optimalizaci PCR. V prvních cyklech PCR je použita vyšší hybridizační teplota, než je teplota, která by odpovídala zvoleným primerům. Proto budou primery hůře nasedat na templát a výtěžek reakce bude nižší. Primery však budou nasedat velmi přesně a vytvoří pouze specifický produkt. Více násobné cykly jsou naprogramovány tak, aby úseky v sekvenčním cyklu s nižší teplotou byly spouštěny postupně. Jak opakování cyklu postupuje, annealing teplota postupně klesá k cílové teplotě. Tato strategie pomáhá zajistit, aby nasednutí primerů v prvních cyklech nastalo jen pro templáty s největší komplementaritou (tj. ty, které přinášejí cílový amplicon). I když annealing teplota klesne až na nejnižší hodnotu nastavené teploty nespecifického křížení, cílový amplicon už provádí svou geometrickou amplifikaci a je tak v pozici, kdy během zbývajících cyklů zabraňuje vzniku jakýchkoliv nesespecifických PCR produktů. Protože cílem je zabránit amplifikaci při nízké teplotě, je nezbytné, aby byla s TD PCR využita „Hot start“ modifikace polymerázy. TD PCR je třeba vnímat nikoli jako metodu stanovení optimálních podmínek pro opakující se cykly specifické PCR, ale jako potenciální jednokrokovou metodu blížící se optimální amplifikaci [5, 6].

2.4 Nested (následná) PCR

Nested PCR je často docela úspěšná metoda používaná ke snížení množství nežádoucích produktů. U první sady primerů rozpletené části DNA je žádoucí především amplifikace produktu za standardních podmínek. Alikvotní množství směsi reakčního produktu se pak podrobí dalšímu kolu amplifikace za pomoci primerů komplementárních k vnitřní sekvenci prvního setu primerů (viz. Obr. 2). Ve druhé PCR je amplifikován kratší úsek DNA. Ve druhém kole PCR by měly být amplifikovány pouze žádané produkty. Tento postup je často úspěšný i v případě, že požadovaný produkt je pod úrovní detekce

ethidiumbromidu a nebo jsou přítomny viditelné rušivé produkty. Neúplně amplifikované produkty se občas mohou překřížit se sousedním úsekem DNA, který má podobný genový prvek, na nezamýšlený primární produkt. V takových případech bude sekvence uvnitř jednoho nebo obou primerů stále přítomná, ale velikost amplifikace se bude lišit. Pokud se předpokládá použití metody nested PCR, může být lepší výsledek získán v případě, že první a druhé kolo amplifikace je ukončeno po dvaceti cyklech místo obvyklých třiceti až třicetipěti cyklů. Tato úprava minimalizuje pravděpodobnost tvorby nežádoucích produktů o vysoké molekulové hmotnosti. Tyto produkty často obsahují značné množství jednořetězcové DNA [6].



Obr. 2. Nested PCR pro námi použité primery GC518f a 682r.

2.5 PCR dlouhých amplikonů

PCR snadno pracuje v případě produktů, které mají velikost dva až tři tisíce párů bází. Nicméně, nad touto velikostí výtěžek produktu často klesá se zvyšujícím se množstvím stochastických jevů. Například proces může být předčasně ukončen, protože polymeráza od templátového řetězce odpadne. S pomalejším ohřevem a speciální polymerázou je možné amplifikovat delší úseky až do délky 50 000 párů bází [7, 8].

2.6 Primerové dimery

Párování 3' konce jednoho primeru na sebe nebo na druhý primer může způsobit amplifikaci primeru, což má za následek vznik takzvaných základních dimerů, viditelných jako nízkomolekulární signály na gelu. Tvorba dimerů primerů často konkuruje nasedání primerů na zájmové části DNA. Tomu je možné předejít pomocí primerů, které jsou navrženy tak, že jim chybí komplementarita na 3' konci k sobě, nebo k jiným primerům použitým v reakci. Optimalizace PCR může v tomto případě zahrnovat také optimalizaci koncentrace Mg^{2+} iontů nebo zvýšení annealingové teploty [9].

2.7 „Hot start“ PCR

Dokonce i krátká inkubace reakční směsi PCR při teplotách výrazně pod optimální teplotou může mít za následek vznik nežádoucích produktů. „Hot start“ je metoda PCR, která může tyto problémy podstatně snížit. Cílem je udržet alespoň jeden z reaktantů neaktivní dokud se teplota v prvním cyklu nedostane nad annealingovou teplotu primerů. Současné možnosti „Hot start“ PCR zahrnují použití komplexu Taq polymerázy s její specifickou termolabilní protilátkou. Protilátka brání polymeráze v činnosti od začátku až do doby, kdy vysoká teplota při počáteční denaturaci způsobí inaktivaci protilátek [6].

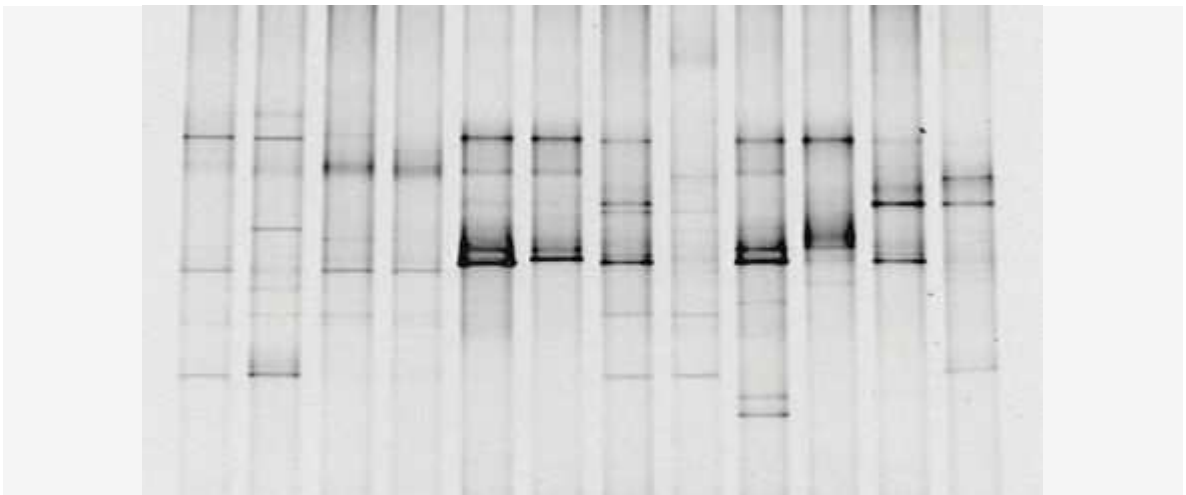
2.8 Negativní kontrola

Negativní kontrolu je nutné provádět u každé PCR, aby byly vyloučeny falešné produkty, které jsou způsobeny kontaminací. Všechny sady primerů i každý nový alikvotní podíl pufru musí být otestovány. Negativní kontrolu lze provést v jedné nebo ve dvou zkumavkách a to tak, že ve zkumavce jsou smíchána všechna činidla reakce kromě templátové DNA [6].

3 TGGE

Gelová elektroforéza v teplotním gradientu (TGGE) a denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) se dnes běžně používají v mnoha mikrobiologických laboratořích po celém světě jako molekulární nástroje pro porovnávání rozmanitosti mikrobiálních společenstev a sledování dynamiky populace. Nedávné pokroky těchto technik prokázaly jejich význam v mikrobiální ekologii [10].

Rozdělení částí DNA o identické délce v DGGE a TGGE je založeno na snížení elektroforetické mobility částečně denaturované dvoušroubovice DNA v polyakrylamidovém gelu s obsahem lineárního denaturačního gradientu DNA (směs močoviny a formamidu) nebo lineárního teplotního gradientu. Molekuly s různými sekvencemi se budou chovat různě, a proto budou denaturovány na různých místech gradientu [10].



Obr. 3. Příklad vzhledu výsledného DGGE gelu [11].

3.1 Analyzování rozmanitosti

DGGE/TGGE může být použita k určení genetické rozmanitosti celkového bakteriálního společenstva nebo populace, zejména k další charakterizaci jejich jednotlivých členů. Curtis a Craine [12] uvádějí, že díky použití DGGE můžeme porovnat rozmanitost celkového mikrobiálního společenství prezentovaného v různých typech aktivovaných kultur na čistírně odpadních vod. Heuer, *et al.* [13] se zabírá myšlenkou, že použitím specifického PCR a DGGE a TGGE lze analyzovat komunity *Actinomycetes* v různých půdách.

Pomocí speciální zesilovací strategie (tj. především zesílením se specifickými primery pro *Actinomycetes* následuje nested PCR s primery pro bakterie) mohli autoři odhadnout zastoupení *Actinomycetes* v bakteriální komunitě. Oba DGGE a TGGE analýzou zesílené produkty PCR přinesly podobné výsledky [10].

V roce 1998, Smalla *et al.* [14] použil DGGE a TGGE analýzy k určení bakteriálních populací na základě rozkladu substrátu BIOLOG. Byly testovány dvě mikrobiální komunity, jedna z rhizosféry na bramborách a další z aktivovaného kalu obohaceného glukózou a peptonem. Výsledky DGGE/TGGE ukázaly nárůst specifických bakteriálních populací v inokulu u obou komunit. Obohacené kmeny ze vzorku rhizosféry nebylo možné v původním inokulu nalézt. Zato obohacené kmeny z aktivovaného kalu v jeho inokulu nalezeny byly. Hybridizační analýza DGGE/TGGE vzorků ukázala obohacení kmenů náležících do skupiny *Gammaproteobacteria*, které byly dominantními členy komunity v reaktoru s aktivovaným kalem, ale jen minoritní složkou mikrobiálního společenstva rhizosféry.

PCR–DGGE může být také použita jako nástroj pro úspěšnou izolaci bakteriálních kmenů v čistých kulturách [15, 16].

3.1.1 GC svorka

GC svorka je nutná pro aplikaci PCR produktů na TGGE. GC svorka předchází komplementární části forward primeru a obsahuje asi 40 nukleotidů. GC svorka, jak je patrné z názvu, obsahuje pouze GC páry a tudíž je velmi odolná vůči denaturaci. V teplotním gradientu nebo při denaturaci činidel se chová tak, že drží komplementární části separovaného fragmentu u sebe i ve fázi kdy je denaturačně separována. Bylo zjištěno, že použitím GC svorky při TGGE/DGGE je dosahováno ostřejších signálů.

4 EUBACTERIA VE VZORKU AKTIVOVANÉHO KALU

4.1 Aktivovaný kal

V aktivovaném kalu se z bakteriálních rodů vyskytují nejčastěji rody *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Azotobacter*, *Chromobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium* aj. Kromě různých druhů bakterií mohou být v aktivovaném kalu přítomny v menším množství také houby, plísně, kvasinky a prvoci. Pravidelně bývají přítomny i nitrifikační bakterie rodu *Nitrobacter* a *Nitrosomonas*. Rovněž jsou často přítomny různé vláknité mikroorganismy [17].

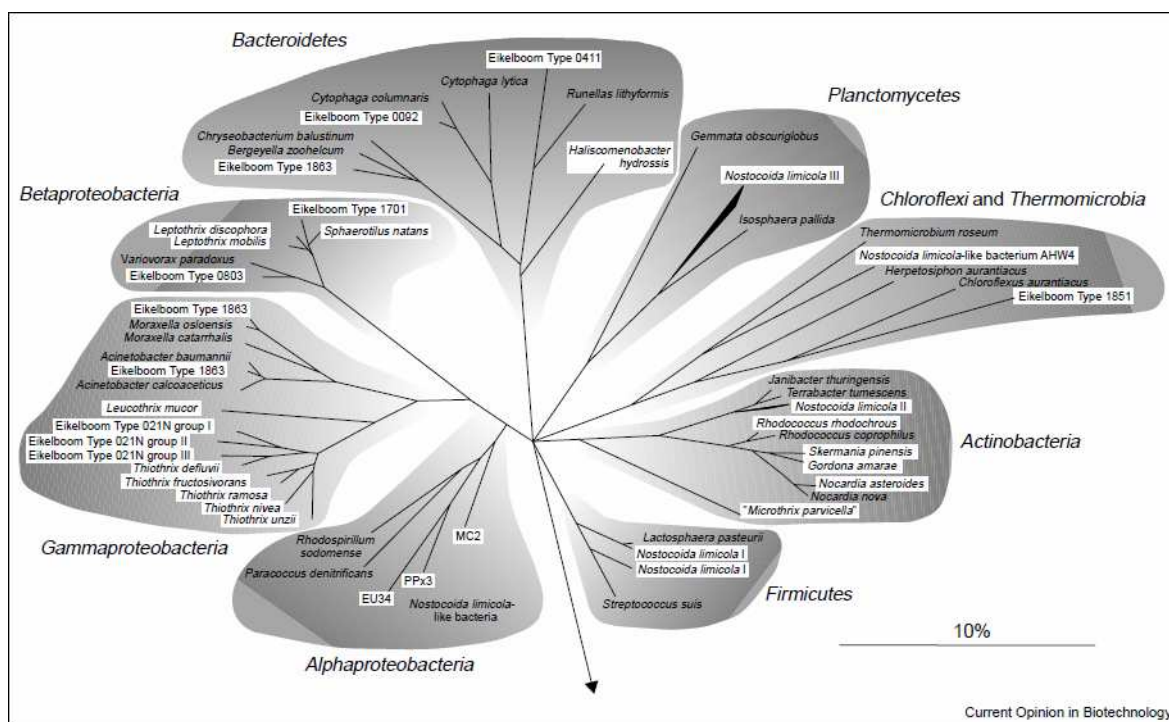
4.2 Eubacteria

Z říše *Eubacteria* jsou pro biodegradace významná především *Proteobacteria*. *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria* jsou třídami kmene *Proteobacteria* a patří ke gram-negativním mikroorganismům. Další skupinou významnou pro biodegradace jsou *Actinobacteria*, která patří ke gram-pozitivním bakteriím.

Jako templátová DNA byla použita bakteriální DNA purifikovaná z kalu z čistírny odpadních vod. Tato DNA představuje bohatou bakteriální směs. Na základě literatury bylo zjištěno, že zastoupení jednotlivých bakteriálních skupin v kalu se liší. Každý aktivovaný kal se liší. Různost kalu je způsobena tím, že do každé čistírny odpadních vod přitéká odpad z různých zdrojů, a proto obsahuje i jiné složky. To způsobuje, že i bakteriální kultury na jednotlivých čistírnách odpadních vod jsou různé. Podle publikace Kong, Y.H., *Microbiology* 2007 [18] je to pro *Alfaproteobacteria* 7 %, pro *Betaproteobacteria* 38 %, pro *Gammaproteobacteria* 9 % a pro *Actinobacteria* 13 %. Publikace Wagner M., *Bacterial community composition and function in sewage treatment systems* 2002 [19] však uvádí, že zastoupení těchto organismů je následující: *Alfaprotobacteria* 11 %, *Betaproteobacteria* 29 %, *Gammaproteobacteria* 10 % a *Actinobacteria* 7%.

Tab. 1. Zastoupení bakterií v aktivovaném kalu

Bakteriální organismy	reference [18]; % zastoupení v AK	reference [19]; % zastoupení v AK
<i>Alfaproteobacteria</i>	7	11
<i>Betaproteobacteria</i>	38	29
<i>Gammaproteobacteria</i>	9	10
<i>Actinobacteria</i>	13	7



Obr. 4. Strom znázorňující příslušnost vláknitých bakterií v aktivovaném kalu

4.3 Alfaproteobacteria

Alfaproteobacteria zahrnují většinu fototrofních rodů, ale také několik rodů metabolizujících C1-sloučeniny (např. *Methylobacterium spp.*), symbiontů rostlin (např. *Rhizobium spp.*) a živočichů a skupinu patogenů *Rickettsiaceae*. Navíc předchůdci mitochondriálních buněk eukaryot podle mínění vědců pocházeli z rodu *Rickettsia spp.* (viz. Endosymbiotická teorie).

Alfaproteobacteria jsou aerobní anoxygenní fototrofní bakterie, které jsou hojně rozšířeny v mořském planktonu, tyto bakterie mohou představovat více než 10% z mikrobiálního společenstva otevřeného oceánu [20, 21].

Další rody:

Anaplasmataceae, Bartonellaceae, Beijerinckiaceae, Bradyrhizobiaceae, Brucellaceae, Caulobacteraceae, Holosporaceae, Hyphomicrobiaceae, Kiloniellaceae, "Kopriimonadaceae", Kordiimonadaceae, Methylobacteriaceae, Methylocystaceae, "Parvularculaceae", Rhizobiaceae, Rhodobacteraceae, Rickettsiaceae, Sneathiellaceae, Sphingomonadaceae [20, 21]

4.4 Betaproteobacteria

Betaproteobacteria se skládají z několika skupin aerobních či fakultativních bakterií, které jsou často velmi všestranné v degrační kapacitě, ale také obsahují chemolitotrofní rody (např. čpavek-oxidační rod *Nitrosomonas*) a některé fototrofní organismy (členové rodu *Rhodocyclus* a *Rubrivivax*). *Betaproteobacteria* hrají důležitou roli při fixaci dusíku u rostlin. Mnoho těchto bakterií se nachází v environmentálních vzorcích, jako jsou odpadní vody nebo půdy. Patogenními druhy v této třídě jsou *Neisseriaceae* (gonorea a meningitida) a druhy rodu *Burkholderia* [20, 21].

Další rody:

Burkholderiales: Alcaligenaceae, Burkholderiaceae, Comamonadaceae, Oxalobacteraceae

Neisseriales: Neisseriaceae

Hydrogenophilales: Hydrogenophilaceae

Methylophilales: Methylophilaceae

Nitrosomonadales: Gallionellaceae, Nitrosomonadaceae, Spirillaceae

Rhodocyclales: Rhodocyclaceae [20, 21]

4.5 Gammaproteobacteria

Gammaproteobacteria patří mezi několik lékařsky a vědecky významných skupin bakterií, jako jsou *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*), *Vibrionaceae* a *Pseudomonadaceae*. Do této třídy patří velké množství významných patogenů, např. *Salmonella* (enteritida a břišní tyfus), *Yersinia* (mor), *Vibrio* (cholera), *Pseudomonas aeruginosa* (plicní infekce

u hospitalizovaných pacientů s cystickou fibrózou), *Klebsiella pneumoniae* (původce zápalu plic).

Stavebními prvky rodu *Chromatia* jsou fotosyntetické bakterie, které oxidují sirovodík místo vody a produkují síru jako odpad. Některá *Gammaproteobacteria* oxidují metan a mnohá z nich jsou v symbióze s geotermickými mořskými organismy [20, 21].

Další rody

Acidithiobacillaceae, Aeromonadaceae, Alcanivoracaceae, Alteromonadaceae, Cardiobacteriaceae, Chromatiaceae, Coxiellaceae, Ectothiorhodospiraceae, Enterobacteriaceae, Francisellaceae, Halomonadaceae, Legionellaceae, Methylococcaceae, Moraxellaceae, Oceanospirillaceae, Pasteurellaceae, Piscirickettsiaceae, Pseudomonadaceae, Shewanellaceae, Succinivibrionaceae, Thiotrichaceae, Vibrionaceae, Xanthomonadaceae [20, 21].

4.6 Actinobacteria

Actinobacteria patří mezi gram-pozitivní bakterie a jsou jedním z dominantních kmenů bakterií. Mohou být jak vodní tak terestrické.

Actinobacteria jsou důležitou součástí života v půdě a sladké i slané vodě. Hrají důležitou roli při rozkladu organických materiálů, jako jsou celulóza a chitin a proto jsou důležitou součástí uhlíkového cyklu. Tento přísun půdních živin je důležitou součástí tvorby humusu. Ostatní *Actinobacteria* se vyskytují na rostlinách nebo zvířatech, včetně několika patogenů jako jsou *Mycobacterium, Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus* a několik druhů *Streptomyces* [20, 21].

V roce 1940 Selman Waksman studiem půdních bakterií zjistil, že vytvářejí actinomyctin. Od té doby byla u těchto půdních organismů objevena stovka přirozeně se vyskytujících antibiotik. Zejména u rodu *Streptomyces* [20, 21].

Některé formy rodu *Actinobacteria* mají větvení vláken, které poněkud připomíná houby, mezi které byla *Actinobacteria* původně zařazena pod názvem *Actinomycetes* [20].

Většina druhů rodu *Actinobacteria* je aerobní, ale jen málo druhů, jako třeba *Actinomyces israelii* může růst za anaerobních podmínek [20, 21].

Jiné druhy rodu *Actinobacteria* způsobují zvláštní zápach vycházející z půdy po dešti (petrichor), a to především v teplejších klimatech. Chemická látka, která vytváří tento zápach je známá jako geosmin [20, 21].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL

5.1 Použitý materiál

Špičky: 10 µl pipet Tips, Schoeller

Stripy: Finnzymes instruments

Pipety: Gilson pipetman, ultra starter kit, Francie

PCR box: Bioair instruments, aura PCR, Itálie

Mikrozkumavky: 0,5ml; Merci

Primery

Tab. 2. Přehled použitých primerů

Primer	Koncentrace [nmol]	Sekvence
Beta 682r	34,1	ACG CAT TTC ACT GCT ACA CG
Beta359f	25,4	GGG GAA TTT TGG ACA ATG GG
518r	62,2	ATT ACC GCG GCT GCT GG
GC518f	23,5	CCA GCA GCC GCG GTA AT
GC341f	30,39	CCT ACG GGA GGC AGC AG
395f	33,1	CMA TGC CGC GTG TGT GAA
785r	36,6	GAC TAC WGG GGT ATC TAA TCC
871r	36,0	ACT CCC CAG GCG GTC DAC TTA
FD1	67,1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
RD1	30,0	CAG ATG CAG AAG GAG GTG ATC
907r	90,7	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT
243f	50,1	GGA TGA GCC CGC GGC CTA
GC984f	73,4	AAC GCG AAG AAC CTT AC
1378f	54,4	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG
Alf 28	31,1	ARC GAA CGC TGG CGG CA
Alf 684	31,8	TAC GAA TTT YAC CTC TAC A
Act235	28,11	CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG
Act878	22,77	CCG TAC TCC CCA GGC GGG G

Pozn.GC svorka = CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG

Degenerované báze: typ kódu udává více variant nukleových bází

M = A, C

W = A, T

Y = C, T

R = A, G

D = G, A, T [22]

8 methoxy psoralen; xanthotoxin: *7H*-furo[3,2-*g*]chromen-7-one; Fluka Biochemika

DNA: vyextrahovaná z bakterií aktivovaného kalu

Voda pro molekulární biologii: Nuklease free water, Promega, USA

Go Taq Hot Start Master Mix; Promega, USA

Go Taq Hot Start Green Master Mix; Promega, USA

Thermo cycler: piko thermal cycler, Finnzymes instruments

Centrifuga: Hermle Z100M

Centrifuga: eppendorf, mini spin plus

Rukavice: gumové nitrilové

Agarosa: Agarose for routine use; Sigma - Aldrich

10x TAE pufr: 0,4M Tris-Acetate, 0,01M EDTA; LONZA

6 METODY

6.1 Práce s roztoky pro PCR

6.1.1 Příprava primerů

Primery jsou dodávány v lyofylizované podobě o určité koncentraci. Do takovéto směsi se přidá desetinásobné množství vody neobsahující nukleázu.

Např. pro primer Beta 682r, kde je koncentrace primeru 34,1 nmol se přidá 341 μ l vody neobsahující nukleázu a vzniklá koncentrace primeru je 100 pmol/ μ l.

6.1.2 Příprava roztoků

1x TAE pufr

Nejvíce byl používán 1x TAE pufr. Ten byl vyráběn z komerčně koupeného 10x TAE pufru. K přípravě 1x TAE pufru je potřeba 100 ml 10x TAE pufru a 900 ml destilované vody.

LOADING (vzorkový) pufr 5x TAE

0,1% triton- x 100 => 25 mg

0,01% bromophenol blue dye

Na přípravu 50 ml 5x TAE pufru bylo dávkováno 25 ml 10x TAE pufru a 25 ml destilované vody.

6.1.3 Příprava PCR reakce

Příprava PCR směsi byla prováděna v PCR boxu, který byl před započítím práce vysvícen UV světlem po dobu alespoň dvaceti minut. Všechny úkony byly prováděny v rukavicích. Nejprve byly do stojanu nachystány roztoky potřebné pro přípravu PCR směsi a strip, který se skládá z 8 mikrokumavek a do kterého byly jednotlivé roztoky postupně

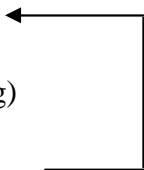
dávkovány. Tab. 3 uvádí množství a druh roztoků, které byly dávkovány. Do mikrokumavky se 100 μl Go Tag Hot Start Master Mixu (master mix se skládá z termostabilní DNA polymerázy, DTP = deoxyribonukleotidů a pufru) byly přidány 2 μl 8-nethoxy-psoralenu, aby bylo zabráněno kontaminaci. Do každé mikrokumavky bylo dávkováno množství roztoků dle Tab. 3. Do třetí mikrokumavky nebyla dávkována DNA z důvodu negativní kontroly. Negativní kontrola se provádí u každé PCR z důvodu zjištění kontaminace PCR směsi. Před dávkováním DNA byla PCR směs ve stripu promíchána a stočena v centrifuze, aby se všechny kapičky směsi, které ulpěly na stěnách mikrokumavek spojily se směsí ve špičkách mikrokumavek a nechána 4 minuty pod UV světlem.

Tab. 3. Příprava PCR směsi

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix [μl]	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer 1f [μl]	1	1	1	1
Primer 2r [μl]	1	1	1	1
Voda [μl]	8,5	8,5	10,5	8,5
DNA [μl]	2	2	-	2

6.2 Provedení PCR

Po nadávkování DNA byla směs opět stočena v centrifuze a vložena do thermocycleru. V thermocycleru byl nastaven program teplot vhodný pro použité primery. Jako příklad je možno uvést následující program:

Program: 94 °C 5 minut	počáteční denaturace	
94 °C 1 minuta	denaturace	
63 °C 30 sekund	nasedání primerů (annealing)	
72 °C 1 minuta	polymerace (extension)	
72 °C 10 minut	závěrečná polymerace (final extension)	
4 °C nekonečně dlouho	uchovávání	

Také byly testovány programy pro tzv. touchdown PCR. V našem případě byla teplota snižována vždy po 0,5 °C během deseti cyklů. Po skončení programu v thermocycleru byla směs ve stripu opět stočena v centrifuze, aby byly všechny kapičky směsi, které ulpěly na stěnách smíchány se zbytkem směsi ve špičce mikrozkuřavky.

6.3 Ověření výsledku PCR reakce pomocí elektroforézy

6.3.1 Příprava 2% agarózového gelu

Následným krokem byla gelová elektroforéza. Na přípravu dvouprocentního roztoku gelu byl potřeba 1 g agarózy a 50 ml roztoku 1x TAE pufru. Směs na gel byla povařena v mikrovlnné troubě při teplotě 500 °C po dobu asi 3 minut. Po povaření byla směs ponechána zchladnout na teplotu, při které byla baňka udržitelná v ruce. Při této teplotě byly do tekutého gelu nadávkovány 2 µl ethidiumbromidu. Poté byl gel vlit do vaničky s hřebínkem v těle aparatury pro elektroforézu, aby zatuhnul. Po zatuhnutí gelu byla vanička z těla aparatury pro elektroforézu vyjmuta a z gelu byl vyjmut i hřebínek. Do vzniklých jamek byl dávkován produkt PCR reakce v objemu 10 µl. Do první jamky byl jako ukazatel počtu párů bází PCR produktu ve stejném objemu dávkován marker v rozsahu 200 - 1400 párů bází. Po nadávkování vzorku byl gel vložen zpět do těla aparatury pro elektroforézu a zalit roztokem 1x TAE pufru. Poté byla spuštěna elektroforéza za procházejícího napětí 90 voltů. Po padesáti minutách byla elektroforéza ukončena a gel byl vložen pod UV světlo, kde bylo následně zjištěno, zda a v jakém množství byl produkt vytvořen.

6.3.2 Dokumentace PCR produktu

Když byl gel položen v transiluminátoru a osvětlen UV světlem, na připojeném počítači byl otevřen program pro zhotovení fotografií takto připraveného gelu.

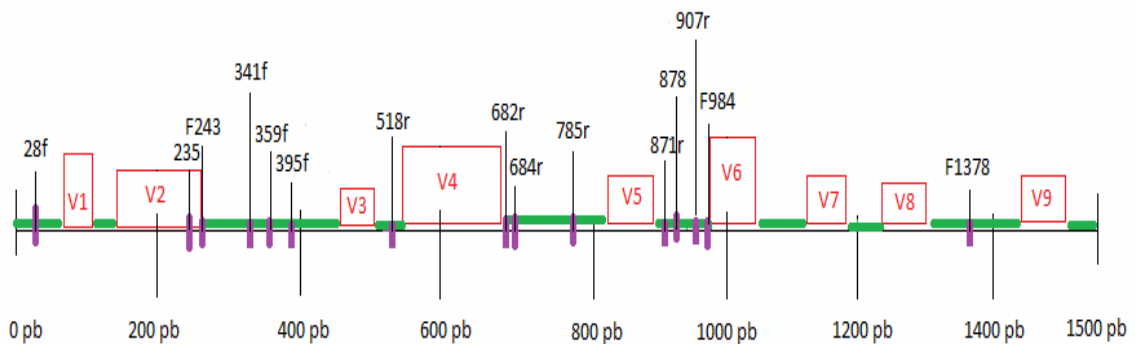
7 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

- Otestovat přípravu PCR produktů vhodných pro aplikaci na TGGE. Bylo testováno několik sad primerů nalezených v literatuře, přičemž byly testovány jednak univerzální primery a jednak primery specifické pro vybrané skupiny bakterií. Všechny použité primery jsou cíleny na vybrané úseky 16S rRNA genu.
- Optimalizovat některé parametry PCR reakčních podmínek pro tyto primery. Optimalizací parametrů se rozumí nastavení annealing teploty pro jednotlivé skupiny primerů.
- Zohlednit vliv koncentrace reakčních komponent. Otestovat různé koncentrace primerů a Mg^{2+} iontů.

8 VÝSLEDKY

Použité primery jsou cíleny na gen 16S rRNA, který obsahují všechny bakterie. Gen je kódující molekulou DNA pro molekulu RNA, která tvoří zásadní část bakteriálního ribozomu. Gen obsahuje úseky, které jsou silně konzervativní a úseky variabilní. Variabilní úseky se liší jak mezi skupinami bakterií, tak mezi jednotlivými bakteriemi. Variabilní úseky je možné použít pro identifikaci organismů. Sekvence genu jsou shromažďovány v databázích sekvencí přístupných například na <http://rdp.cme.msu.edu/>. [23].



Obr. 5. Variabilní (červené úseky V1-V9) a konzervované (zelené úseky) oblasti genu 16s RNA a oblasti nasednutí u námi použitých primerů.

Obr. 5 byl vytvořen na základě podkladů ze zdroje (<http://rdp.cme.msu.edu/>) [23]. Obr. 5 zobrazuje variabilní (červené úseky) a konzervativní (zelené úseky) oblasti genu. Fialovou barvou jsou vyznačeny přibližné pozice nasednutí primeru. Variabilní oblasti: V1 = 69-99; V2 = 137 – 242; V3 = 433 – 497; V4 = 576 – 682; V5 = 822 – 879; V6 = 986 – 1043; V7 = 1117 – 1173; V8 = 1243 – 1294; V9 = 1435 – 1465.

8.1 Universální primery pro Eubacteria

První testovaná sada primerů by měla být universální pro všechna *Eubacteria*. Byly použity primery, které amplifikují fragment, jež zahrnuje téměř celou sekvenci 16S rRNA genu. Tyto primery jsou označovány jako FD1 a RD1 a zahrnují variabilní oblasti V1-V9. Další testovanou skupinou universálních primerů byly GC341f a 518r, které zahrnují variabilní oblast V3 a primery GC341f a 907R mezi jejichž místy nasednutí se nacházejí variabilní oblasti V3-V5.

8.1.1 PCR s primery FD1 a RD1 pro kompletní sekvenci 16s rRNA genu

Nejprve byla provedena PCR s primery FD1 a RD1, jež amplifikují fragment, který zahrnuje téměř celou sekvenci 16S rRNA genu. Často používanou technikou využívanou pro získání PCR produktů pro TGGE je ta, kdy se v první PCR použijí primery, které zahrnují větší úsek DNA, tedy FD1, RD1 a v následující PCR se použijí primery, kde forward primer obsahuje GC svorku. Bylo zjištěno a je obvyklé, že tento postup vede k lepšímu výsledku než přímé použití primerů s GC svorkou, kde je templátová DNA kompletní směsnou bakteriální DNA ze vzorku. Tyto primery zahrnují variabilní oblasti V1-V9. Předpokládaná délka produktu byla asi 1529 pb. Jako templátová DNA byla dávkována purifikovaná DNA ze vzorku kalu z čistírny odpadních vod. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola. Do PCR směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 4.

Sekvence použitých primerů jsou následující:

FD1: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

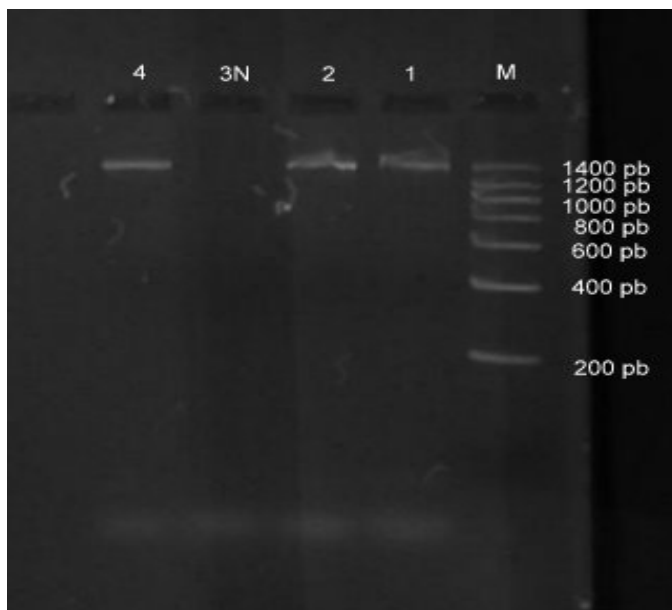
RD1: CAG ATG CAG AAG GAG GTG ATC

Tab. 4. PCR směs pro primery FD1 a RD1 (objemy v μl)

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix (Green) [μl]	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer FD1 [konc. 100 pmol/ μl]	1	1	1	1
Primer RD1 [konc. 100 pmol/ μl]	1	1	1	1
Voda [μl]	8,5	8,5	10,5	8,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g/ml}$]	2	2	-	2
Celkový objem [μl]	25	25	25	25

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 5 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 63 °C, 30 s; polymerace

72°C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace jsou opakovány 29x.



Obr. 6. PCR pro primery *FD1* a *RD1*. Dávkování: 4,2, a 1, dávkováno shodně; 3N,negativní kontrola. M, DNA marker.

Produkt se vytvořil o předpokládané délce asi 1529 pb (viz. Obr. 6). Negativní kontrola vyšla čistě. Ve všech drahách jsou dávkovány shodné chemikálie podle Tab. 4. V dolní části Obr. 6 jsou slabě viditelné pozůstatky primerů, nebo nízkomolekulární nespecifické produkty.

8.1.2 Nested PCR s universálními primery s GC svorkou

V následujících PCR byly použity primery s GC svorkou, která je nutná pro aplikaci produktů na TGGE.

8.1.3 Nested PCR s různou koncentrací primerů GC341f a 518r

Další testovaná sada primerů byla opět universální pro všechna *Eubacteria*. V tomto pokusu byla snaha o optimalizaci vhodné koncentrace primerů v reakční směsi tak, aby žádaný produkt vznikl v co nejvyšší čistotě. Pomocí nested PCR s těmito primery měla být získána směs produktů odpovídajících všem zástupcům skupiny *Eubacteria* přítomných

ve vzorku. Byly použity primery označované jako GC341f a 518r, jejich sekvence byly získány z publikace Mühling, *et al.* [24]. Označení GC u prvního z primerů znamená, že komplementární sekvenci předchází GC svorka nutná pro aplikaci produktů na TGGE. Čísla v označení primerů odpovídají přibližnému počátku příslušné sekvence v genu pro 16S rRNA u *E. coli*. Námi použité primery zahrnují variabilní oblast V3. Předpokládaná délka produktu byla 217 pb. Jako templátová DNA byla použita DNA, která byla produktem PCR reakce s primery FD1, RD1. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 5.

Sekvence použitých primerů jsou následující:

GC341f: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG'CCTACGGGAGGCAGCAG

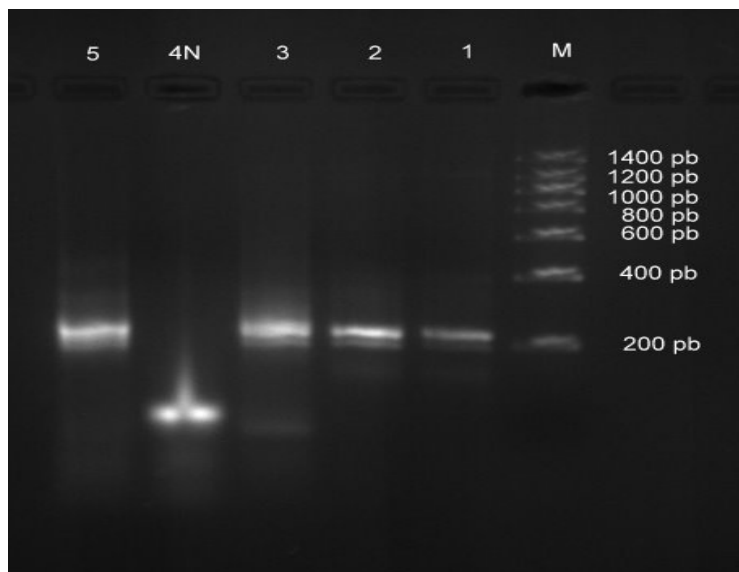
518r: ATT ACC GCG GCT GCT GG

Tab. 5. PCR směs pro primery GC341f a 518r (objemy v μl)

Reakční směs/dráha	1	2	3	4	5
Master mix (Green)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC341f [konc. 100 pmol/ μl]	1 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	0,5	1	1
Primer 518r [konc. 100 pmol/ μl]	1 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	0,5	1	1
Voda	9,5	7,5	10,5	10,5	9,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g}/\text{ml}$]	1	1	1	-	1
Celkový objem	25	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok.

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 5 min; denaturace 94 °C, 30 s; annealing 61-56 °C, 30 s (teplota snižována (touchdown) o 0,5 °C na cyklus v průběhu 10 cyklů); polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 7. Pokus s různou koncentrací primerů GC341f a 518r. Koncentrace primerů: 5, 1 μ l základního roztoku primerů; 4N, negativní kontrola; 3, 0,5 μ l základního roztoku primerů; 2, 2 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů; 1, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů. M, DNA marker.

Produkt se vytvořil o předpokládané délce 217 pb (viz. Obr. 7). Produkt byl jasně viditelný ve všech drahách. Negativní kontrola vyšla čistá. V 5. dráze, kde byl objem primerů 1 μ l o koncentraci 100 pmol/ μ l byl produkt velmi jasný, ale bohužel zde bylo i větší množství nespecifických produktů. Větší množství nespecifických produktů bylo také v dráze 3, kde bylo dávkováno 0,5 μ l primerů o koncentraci 100 pmol/ μ l. U dráhy 2 byl produkt dobře vidět a nespecifické produkty zde byly v minimálním množství, proto je pro nás množství 2 μ l 10x ředěných základních roztoků primerů v této dráze považováno za nejlepší. V 1. dráze je koncentrace primerů nejnižší a proto je produkt viditelný slabě.

8.1.4 Nested PCR s různou annealing teplotou pro primery GC341f a 518r

U následujícího pokusu bylo snahou nalézt nejvhodnější annealing teplotu pro primery GC341f a 518r. Annealingová teplota ovlivňuje specifitu nasedání primerů, proto je možno jejím nastavením zvýšit výtěžek produktu a snížit množství nespecifických produktů. Jako templátová DNA byla dávkována DNA z produktu PCR reakce s primery FD1,

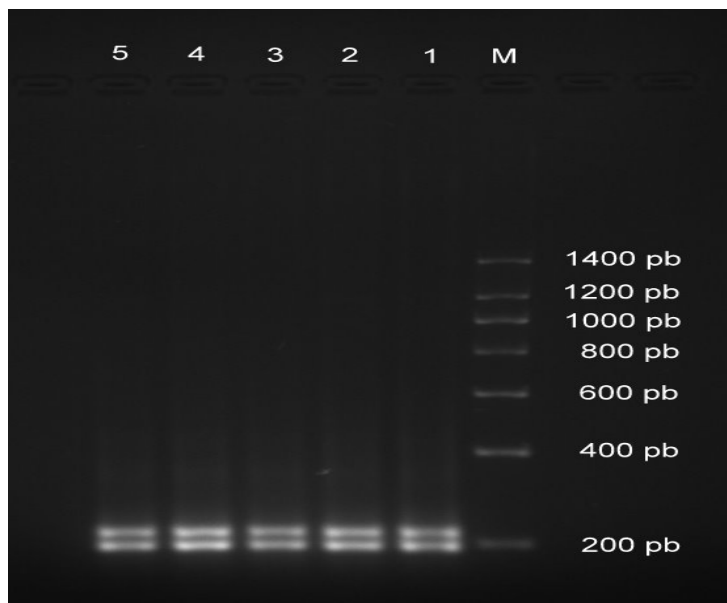
RD1. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 6.

Tab. 6. *Nested PCR s různou annealing teplotou pro primery GC341f a 518r (objemy v μl)*

Reakční směs	1	2	3	4	5	6	7	8
Master mix (bezbarvý)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC341f [konc. 100 pmol/ μl]	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)
Primer 518r [konc. 100 pmol/ μl]	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)
Voda	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g}/\text{ml}$]	1	1	1	1	1	1	-	1
Annealing teplota [$^{\circ}\text{C}$]	53	54,2	55	56	57,2	58	59	60
Celkový objem	25	25	25	25	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok.

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; denaturace 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; annealing 53-60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s (zvyšováno po 1 $^{\circ}\text{C}$ na cyklus v průběhu 10 cyklů); polymerace 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; závěrečná polymerace 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; uchování 4 $^{\circ}\text{C}$, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 8. Pokus s různou annealing teplotou pro primery GC341f a 518r. Teplota: 5, 60 °C; 4, 58 °C; 3, 56 °C; 2, 55 °C; 1, 53 °C. M, DNA marker.

Produkt se vytvořil o předpokládané délce 217 pb (viz. Obr. 8). Na Obr. 8 je produkt zobrazen ve všech 5 drahách. Pokus byl prováděn v 8 mikrozkušavkách, ale při programu v thermocycleru došlo k vypaření produktu z mikrozkušavek u kterých byla nastavena teplota 54,2 °C; 57,2 °C a 59 °C, zřejmě z důvodu, že víčka mikrozkušavek úplně netěsnila. Nejjasnější produkt byl v dráze 4, kde byla annealingová teplota 58 °C. Z toho jsme usoudili, že teplota 58 °C je pro tyto primery nejvhodnější.

8.1.5 Nested PCR pro různou koncentraci Mg^{2+} iontů s primery GC341f a 518r

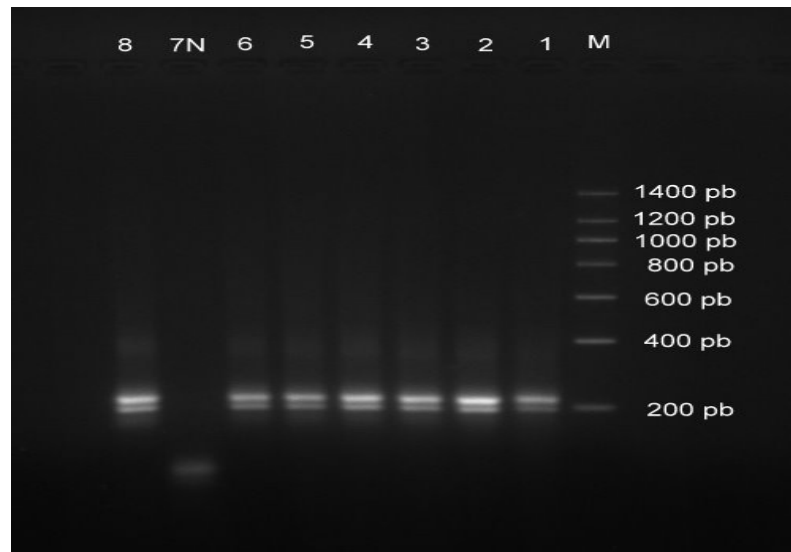
V následujícím pokusu byla optimalizována vhodná koncentrace Mg^{2+} iontů v reakční směsi tak, aby byl žádaný produkt získán v co největší čistotě. Použitou sadou primerů byly opět primery GC341f a 518r. Podle Tab. 7 byly do reakční směsi dávkovány roztoky. Námi předpokládaná délka produktu byla 204 pb. Jako templátová DNA byla dávkována DNA z PCR reakce s primery FD1, RD1. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 7. Různá koncentrace Mg^{2+} iontů s primery GC341f a 518r (objemy v μ l)

Reakční směs/dráha	1	2	3	4	5	6	7	8
Master mix (bezbarvý)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC341f [konc. 100 pmol/ μ l]	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)
Primer 518r [konc. 100 pmol/ μ l]	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)
Mg^{2+} ionty [mmol/l]	2	2,5	3	3,5	4	4,5	2	5
Voda	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	8,5	4,5
Templátová DNA [konc. 2,82 μ g/ml]	1	1	1	1	1	1	-	1
Celkový objem	25	25	25	25	25	25	25	25

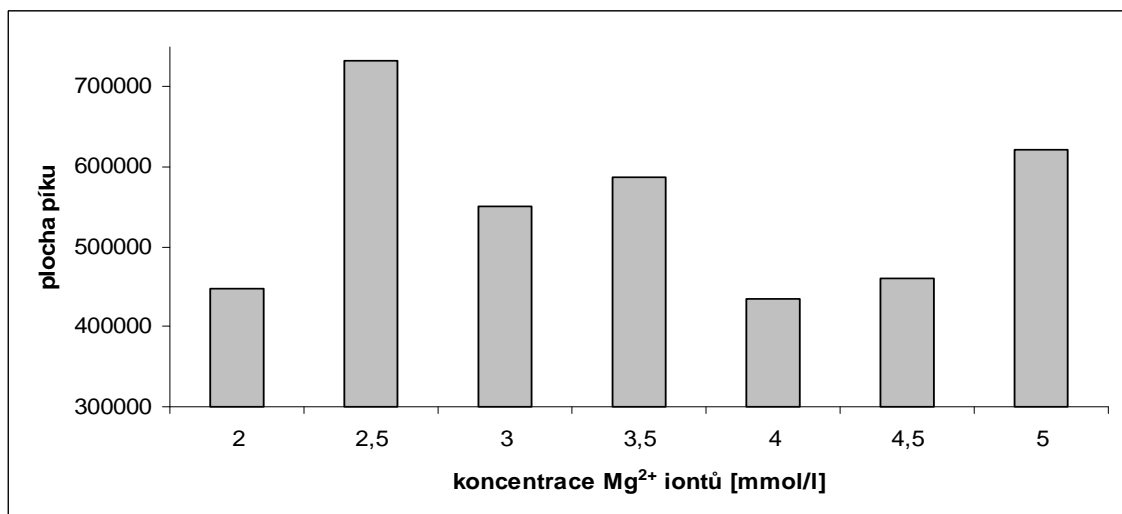
Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok.

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 5 min; denaturace 94 °C, 30 s; annealing 61-56 °C, 30 s (teplota snižována (touchdown) o 0,5 °C na cyklus v průběhu 10 cyklů); polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 9. Různá koncentrace Mg^{2+} iontů s primery GC341f a 518r. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4 mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg^{2+} iontů. M, DNA marker.

Produkt vznikl o předpokládané délce 204 pb (viz. Obr. 9). Nejjasněji byl produkt viditelný ve 2. dráze, kde byla koncentrace Mg^{2+} iontů 2,5 mmol/l a v 8. dráze, kde byla koncentrace Mg^{2+} iontů 5 mmol/l. Negativní kontrola provedená v 7. dráze vyšla čistě. Bohužel zde byly v malé míře viditelné i nespecifické produkty. Produkt je viditelný i u ostatních koncentrací Mg^{2+} iontů.



Obr. 10. Graf závislosti koncentrace Mg^{2+} iontů na ploše píku

Podle grafu zobrazeném na Obr. 10 je vidět, že nejvhodnější koncentrace Mg^{2+} iontů pro primery GC341f a 907r byla 2,5 mmol/l.

8.1.6 Porovnání přímé a nested PCR pro primery GC341f a 907r

Další testovanou sadou universálních primerů byly primery označované GC341f, 907R, jejichž sekvence byly získány z publikace Zhongtang *et al.*, [25]. U tohoto pokusu šlo o srovnání přímé PCR a nested PCR. Snahou bylo zjistit zda tyto dvě PCR fungují stejně nebo zda některá z nich funguje lépe. Označení GC u prvního z primerů znamená, že komplementární sekvenci předchází GC svorka nutná pro aplikaci produktů na TGGE. Čísla v označení primerů odpovídají přibližnému počátku příslušné sekvence v genu pro 16S rRNA u *E. coli*. Primery zahrnují variabilní oblasti V3, V4 a V5. Očekávaná délka produktu byla 606 pb. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky dle Tab. 8. U tohoto pokusu byly dávkovány dvě různé DNA. U prvních dvou sloupců Tab. 8 byla dávkována 10x ředěná DNA z PCR FD1, RD1. Ve 4. sloupci Tab. 8 byl dávkován 10x ředěný základní roztok DNA. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Sekvence použitých primerů jsou následující:

GC341f:CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGG'CCTACGGGAGGCAGCAG

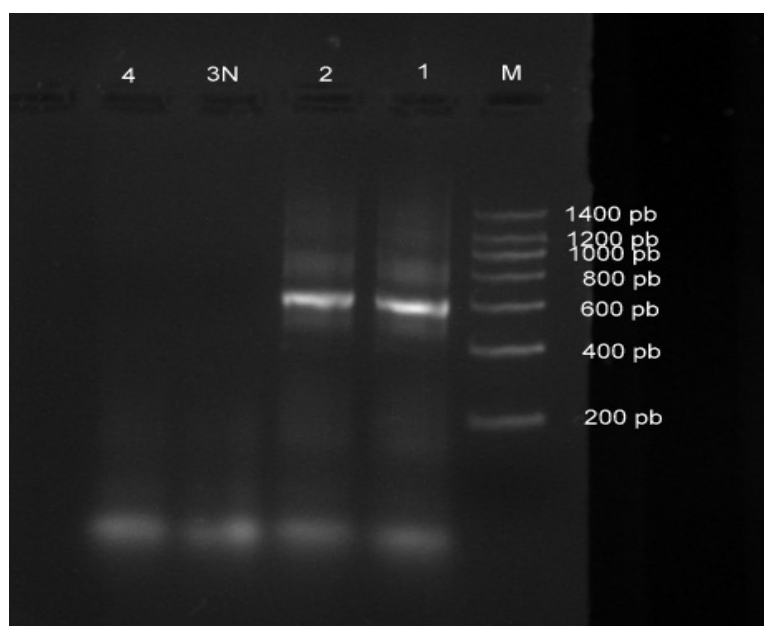
907R: CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT

Tab. 8. PCR pro GC341f a 907r s různou DNA (objemy v μ l)

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix (Green)	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC341f [konc. 100 pmol/ μ l]	1	1	1	1
Primer 907r [konc. 100 pmol/ μ l]	1	1	1	1
Voda	9,5	7,5	10,5	9,5
Templátová DNA [konc. 2,82 μ g/ml]	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	-	1 ($\times 10^{-1}$)
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný základní roztok.

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 5 min; denaturace 94 °C, 30 s; annealing 61-56 °C, 30 s (teplota snižována (touchdown) o 0,5 °C na cyklus v průběhu 10 cyklů); polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 11. PCR pro GC341f a 907r s různou DNA. Koncentrace DNA: 4, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; V prvních dvou drahách stejná DNA v množství 1 μ l 10x ředěné DNA z PCR FD1, RD1. M, DNA marker.

Délka produktu byla dle předpokladu 606 pb (viz. Obr. 11). Produkt byl viditelný pouze u prvních dvou drah, kde byl dávkován 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA z PCR FD1, RD1. Negativní kontrola byla v pořádku. Bohužel ve 4. dráze, která obsahovala 1 μ l 10x ředěného roztoku základní DNA se produkt nevytvořil.

8.1.7 Nested PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací DNA

Dalším pokusem s primery GC341f a 907r byla snaha o optimalizaci koncentrace DNA v reakční směsi. Námi očekávaná délka produktu byla 606 pb. Do reakční směsi byly roztoky dávkovány dle Tab. 9. Do mikrozkušavek byla jako templátová DNA dávkována

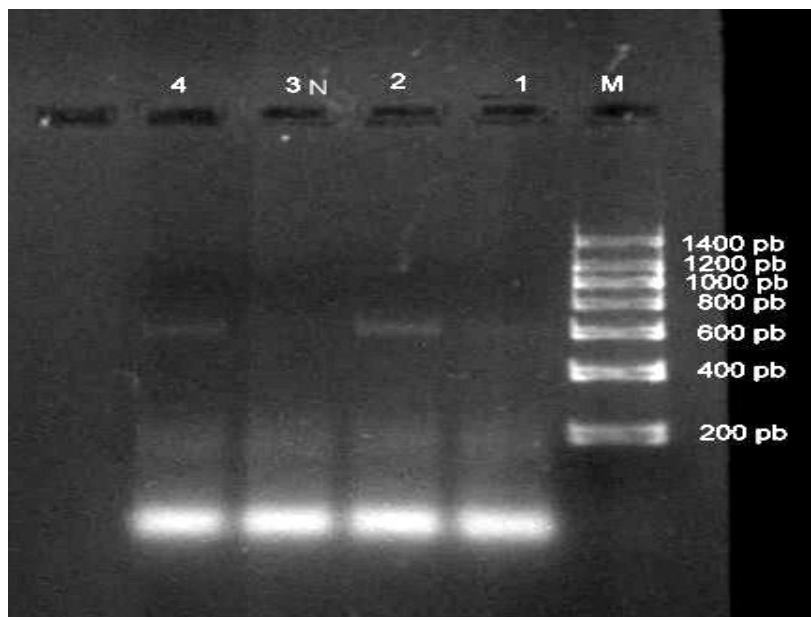
purifikovaná DNA ze vzorku kalu z čistírny odpadních vod. V prvních dvou mikrozku-
mavkách byla DNA dávkována v množství 1 μl 10x ředěného základního roztoku, ve 4.
mikrozku-
mavce to byl 1 μl základního roztoku DNA. Do předposlední zkumavky nebyla
DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 9. *Nested PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací DNA (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix (Green)	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC341f [konc. 100 pmol/ μl]	1	1	1	1
Primer 907r [konc. 100 pmol/ μl]	1	1	1	1
Voda	9,5	9,5	10,5	9,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g/ml}$]	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	-	1
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 5 min; denaturace 94 °C, 30 s; annealing 61-56 °C, 30 s (teplota snižována (touchdown) o 0,5 °C na cyklus v průběhu 10 cyklů); polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 12. *Nested PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací DNA. Koncentrace DNA: 4, 1 μ l neředěného roztoku DNA o koncentraci 2,82 μ g/ml; 3N, negativní kontrola; 2, a 1, 1 μ l 10x zředěného základního roztoku DNA. M, DNA marker.*

Produkt se vytvořil o očekávané délce 606 pb (viz. Obr. 12). V 1. dráze s dávkováním 1 μ l 10x zředěného základního roztoku DNA však bylo produktu velmi malé množství, spíše se můžeme dohadovat, zda tam vůbec nějaký byl. Zato ve 2. dráze byl produkt velmi zřetelný. Negativní kontrola byla v pořádku. V poslední, 4. dráze, kde byla dávkována základní DNA, se produkt nacházel v malém množství. Opět zde můžeme vidět dimery, které pravděpodobně vznikly jako důsledek nadbytku primerů nebo vytvořením nespecifických produktů.

8.1.8 PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů

V následujícím experimentu s primery GC341f a 907r byla optimalizována koncentrace Mg^{2+} iontů pomocí roztoku $MgCl_2$. Koncentrace Mg^{2+} iontů byla v rozmezí 2 – 4 mmol/l. Předpokládaná délka produktu byla 606 pb. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 10. Jako templátová DNA byla dávkována 10x ředěná základní DNA

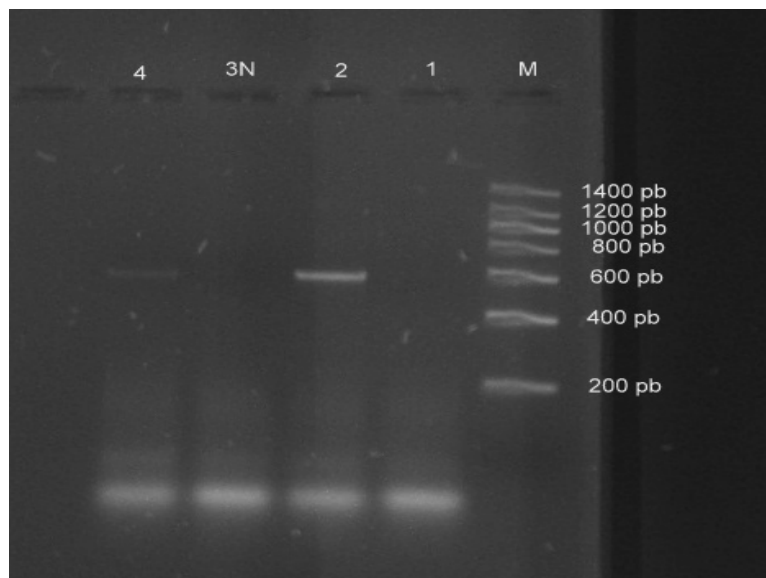
purifikovaná ze vzorku kalu z čistírny odpadních vod. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 10. *Nested PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix (Green)	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC341f [konc. 100 pmol/ μl]	1	1	1	1
Primer 907r [konc. 100 pmol/ μl]	1	1	1	1
MgCl ₂ [mmol/l]	2	3	2	4
Voda	9,5	7,5	10,5	9,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu g/ml$]	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	-	1 ($\times 10^{-1}$)
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 5 min; denaturace 94 °C, 30 s; annealing 61-56 °C, 30 s (teplota snižována (touchdown) o 0,5 °C na cyklus v průběhu 10 cyklů); polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 13. PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 4, 4 mmol/l; 3, negativní kontrola; 2, 3 mmol/l; 1, 2 mmol/l. M, DNA marker.

Produkt měl dle předpokladu délku 606 pb (viz. Obr. 13). V 1. dráze s koncentrací Mg^{2+} iontů 2 mmol/l nebyl produkt z neznámých důvodů viditelný. Ve 2. dráze byla koncentrace Mg^{2+} iontů 3 mmol/l a produkt byl jasně viditelný. Negativní kontrola provedená ve 3. dráze vyšla čistě a ve 4. dráze s koncentrací Mg^{2+} iontů 4 mmol/l byl produkt viditelný slabě.

8.1.9 PCR pro primery GC341f a 907r s rostoucí koncentrací Mg^{2+} iontů

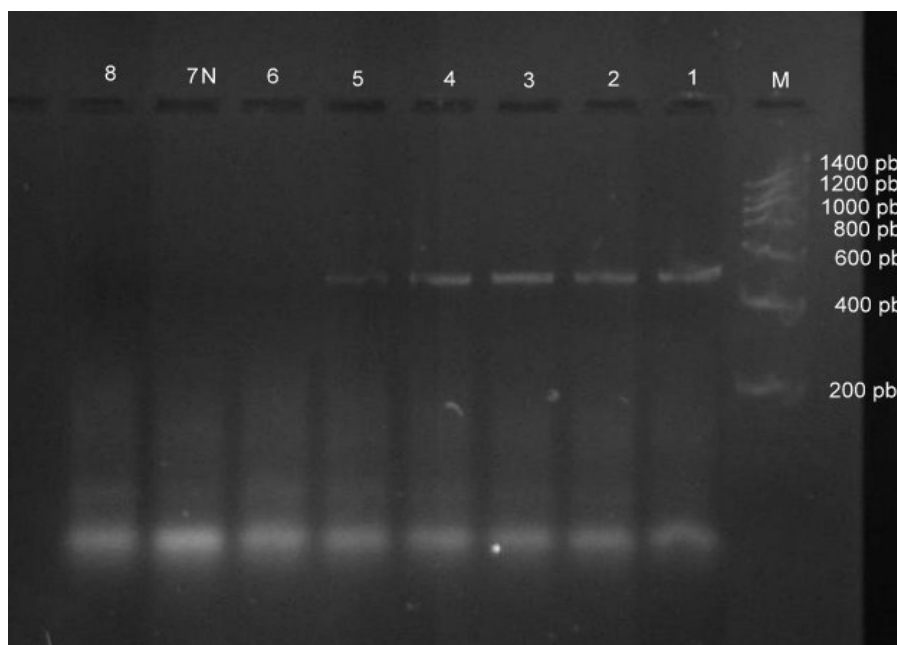
U tohoto pokusu byl zopakován předešlý experiment s primery GC341f a 907r se změnou koncentrace Mg^{2+} iontů pomocí roztoku $MgCl_2$. Zvolená koncentrace Mg^{2+} iontů v této PCR směsi byla v rozmezí 2-5 mmol/l, s nárůstem 0,5 mmol/l. Námi očekávaný produkt by se měl vytvořit o délce 606 pb. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 11. Jako templátová DNA byla dávkována purifikovaná DNA ze vzorku kalu z čistírny odpadních vod, která byla 10x zředěna. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 11. *Nested PCR pro primery GC341f a 907r s rostoucí koncentrací Mg²⁺ iontů (objemy v μ l)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4	5	6	7	8
Master mix (bezbarvý)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC341f [konc. 100 pmol/ μ l]	1	1	1	1	1	1	1	1
Primer 907r [konc. 100 pmol/ μ l]	1	1	1	1	1	1	1	1
Mg ²⁺ ionty [mmol/l]	2	2,5	3	3,5	4	4,5	2	5
Voda	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	8,5	4,5
Templátová DNA [konc. 2,82 μ g/ml]	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	-	1 ($\times 10^{-1}$)
Celkový objem	25	25	25	25	25	25	25	25

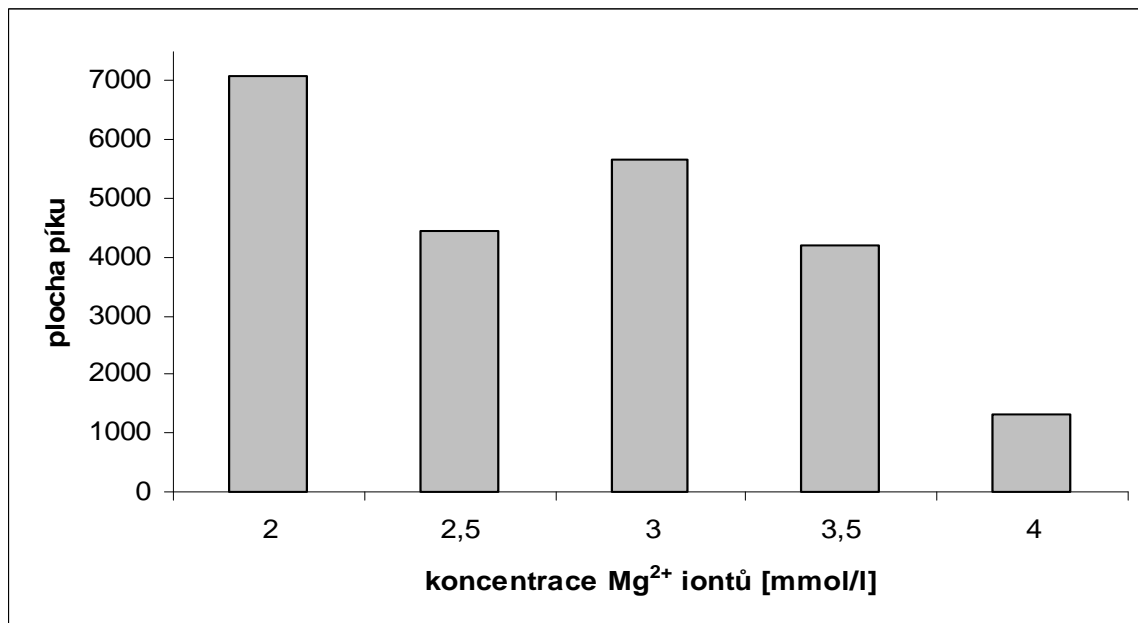
Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocyleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 5 min; denaturace 94 °C, 30 s; annealing 61-56 °C, 30 s (teplota snižována (touchdown) o 0,5 °C na cyklus v průběhu 10 cyklů); polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 14. PCR GC341f a 907r s rostoucí koncentrací Mg^{2+} iontů. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4 mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg^{2+} iontů. M, DNA marker.

Produkt se dle předpokladu vytvořil o délce 606 pb (viz. Obr. 14). Dráha s markerem byla krajní a zřejmě proto se nám marker jako ukazatel délky bází hodně zdeformoval. V 1. dráze s koncentrací Mg^{2+} iontů 2 mmol/l se band trochu zdeformoval a proto je možné, že je jeho hodnota vyšší než kdyby byl pravidelný. Bandy v 1.-5. dráze vyšly pozitivně a produkt byl viditelný. V 6. dráze byl produkt neznatelný, negativní kontrola vyšla čistá. V 8. dráze se produkt nezobrazil, což bylo zřejmě způsobeno vysokou koncentrací Mg^{2+} iontů.



Obr. 15. Graf závislosti plochy píku na koncentraci Mg^{2+} iontů

Podle Obr. 14 byly programem pro získávání fotek denzitometricky spočítány signály bandů produktu a ze získaných hodnot byl vytvořen graf (viz. Obr. 15). Produkt v první dráze byl deformovaný, což způsobilo větší plochu píku. Avšak jinak měl největší plochu pík pro koncentraci Mg^{2+} iontů 3 mmol/l, což znamená, že to je nejvhodnější koncentrace.

8.2 Primery specifické pro vybrané skupiny bakterií

Dále byly testovány skupiny bakterií, které jsou známy tím, že se mohou významně podílet na biodegradčních procesech. Takovýmito skupinami jsou například *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* nebo *Actinobacteria*.

8.3 Betaproteobacteria

První sadou primerů použitých pro *Betaproteobacteria* byly primery B359f, B682r, které jsou pro tuto skupinu bakterií specifické. PCR produkt těchto primerů byl použit jako templátová DNA pro druhou sadu primerů GC518f a B682r pro nested PCR. Sekvence těchto primerů byly získány z publikace Mühlhling, *et al.* [24]. Označení GC u prvního

primeru ze sady primerů, která je universální znamená, že komplementární sekvenci předchází GC svorka nutná pro aplikaci produktů na TGGE. Čísla v označení primerů odpovídají přibližnému počátku příslušné sekvence v genu pro 16S rRNA u E.coli. Primery nasedají tak, že zahrnují variabilní oblasti V3 a V4.

Sekvence použitých primerů jsou následující:

B359f: GGG GAA TTT TGG ACA ATG GG

B682r: ACG CAT TTC ACT GCT ACA CG

GC518f :CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCAGCAGCCGCGGTAAT

8.3.1 PCR pro primery B359f a B682r

První testovanou sadou primerů pro *Betaproteobacteria* byly primery B359f, B682r, roztoky byly dávkovány dle Tab. 12. Očekávaná délka tohoto PCR produktu byla 363 pb. Primery zahrnují variabilní oblasti V3 a V4. Jako templátová DNA byla dávkována purifikovaná DNA ze vzorku kalu z čistírny odpadních vod. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Sekvence primerů použitých pro PCR jsou tyto:

B359f: GGG GAA TTT TGG ACA ATG GG

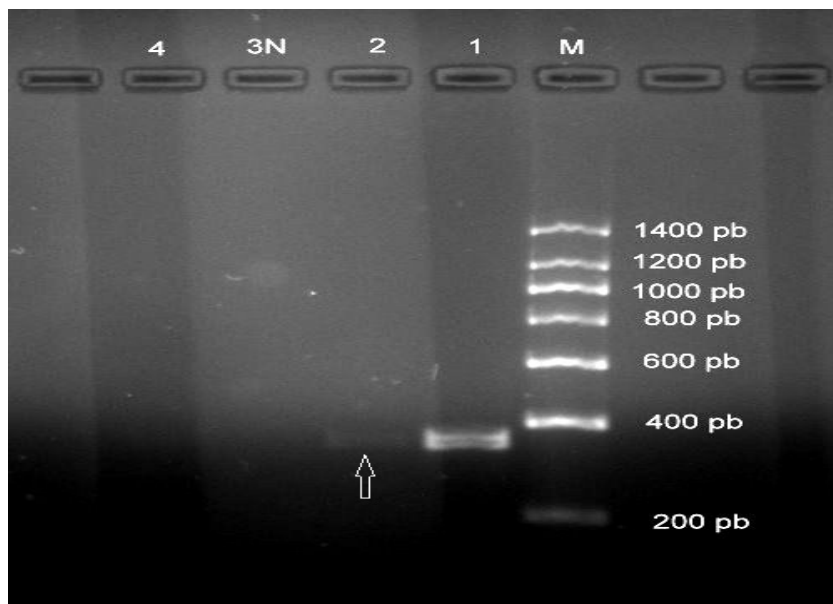
B682r: ACG CAT TTC ACT GCT ACA CG

Tab. 12. PCR směs pro primery B359f a B682r s různou koncentrací DNA (objemy v μl)

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix (bezbarvý)	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer B 359f [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer 682r [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g/ml}$]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocyleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 63 °C, 30 s; polymerace 72 °C, 30 s; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 16. Pokus s primery B359f a B682r s různou koncentrací DNA. Množství DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA; 1, 1 μ l neředěného základního roztoku DNA. M, DNA marker.

Produkt se vytvořil o očekávané délce 363 pb (viz. Obr. 16). Negativní kontrola ve 3. dráze byla v pořádku. V 1. dráze, kde byl dávkován 1 μ l neředěného základního roztoku DNA byl produkt jasně viditelný. Ve 2. dráze s dávkováním 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA je viditelný pouze velmi slabě. Ve 4. dráze byla DNA dávkována v množství 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA a produkt zde viditelný není, což může být způsobeno tím, že je zde dávkováno vysoké ředění DNA.

8.3.2 Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací DNA

V tomto pokusu byla provedena nested PCR. V této PCR se jednalo o optimalizaci vhodné koncentrace DNA. Označení GC u prvního z primerů znamená, že komplementární sekvenci předchází GC svorka nutná pro aplikaci produktů na TGGE. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 13. Očekávaná délka produktu byla 204 pb. Nasedající primery zahrnují variabilní oblast V4. Tento vzorek templátové DNA je produktem PCR B359f a B682r. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Sekvence použitých primerů jsou následující:

GC518f :CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCAGCAGCCGCGGTAAT

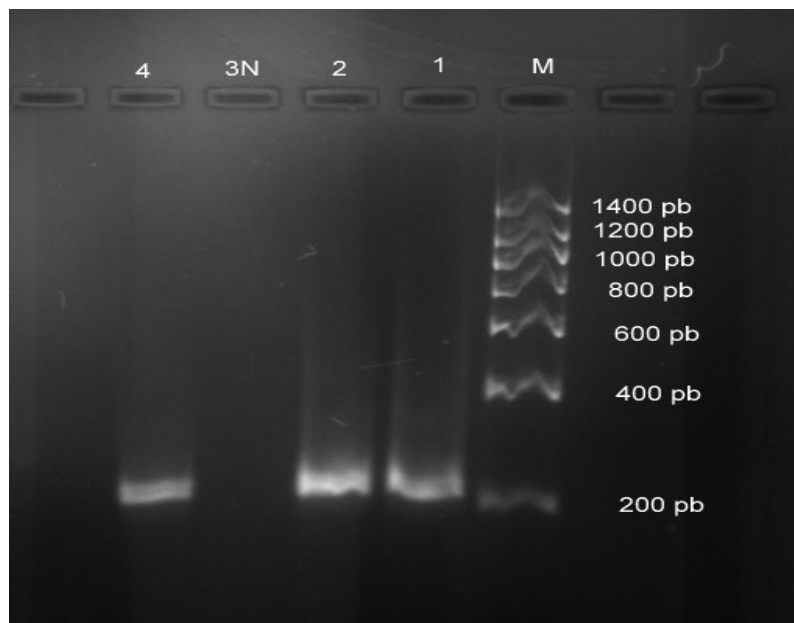
B 682r: ACG CAT TTC ACT GCT ACA CG

Tab. 13. *Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací DNA (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC 518f [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer 682r [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g/ml}$]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocyleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 60 °C, 30 s; polymerace 72 °C, 30 s; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 17. *Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací DNA. Množství DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného roztoku DNA z PCR B359f a B682r; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA z PCR B359f a B682r; 1, 1 μ l neředěného roztoku DNA z PCR B359f a B682r. M, DNA marker.*

Produkt byl vytvořen o předpokládané délce 204 pb (viz. Obr. 17). Produkt byl dobře viditelný ve všech drahách. Nejlépe byl produkt viditelný ve 2. dráze, kde byl dávkován 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA z PCR B359f a B682r. Negativní kontrola vyšla čistá. Z neznámého důvodu došlo ke zdeformování markeru a částečně i produktů.

8.3.3 Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací primerů

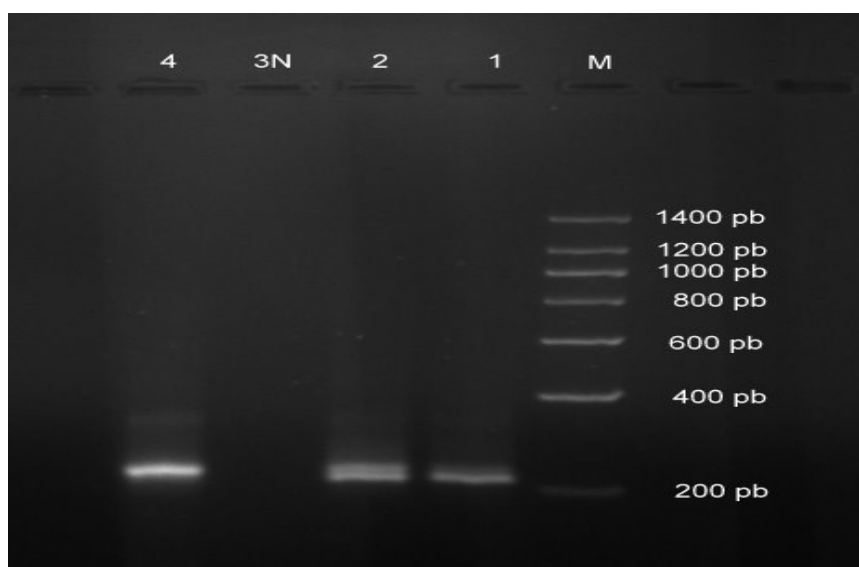
U této nested PCR bylo cílem optimalizace zjištění nejvhodnější koncentrace primerů. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 14. Námí předpokládaná délka produktu byla 204 pb. Jako templátová DNA zde byl použit 10x ředěný roztok DNA z PCR B359f a B682r. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 14. *Nested PCR, směs pro primery GC518f a 682r (objemy v μ l)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC 518f [konc. 100 pmol/ μ l]	1 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	1
Primer 682r [konc. 100 pmol/ μ l]	1 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	1
Voda	9,5	7,5	8,5	9,5
Templátová DNA [konc. 2,82 μ g/ml]	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	-	1 ($\times 10^{-1}$)
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocyleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 60 °C, 30 s; polymerace 72 °C, 30 s; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 18. *Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací primerů. Koncentrace primerů: 4, 1 μ l základního roztoku primerů o koncentraci 100 pmol/ μ l; 3N, negativní kontrola; 2, 2 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů; 1, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů. M, DNA marker.*

Produkt měl očekávanou délku 204 pb (viz. Obr. 18). Ve všech drahách s DNA (dle Tab. 14) byl vytvořen viditelný produkt. Negativní kontrola vyšla čistě. Produkt v dráze 4 s koncentrací primerů 1 μl o koncentraci 100 pmol/ μl byl viditelný nejjasněji, avšak byly zde vytvořeny i slabě viditelné nespecifické produkty o vyšším počtu pb, které byly nejspíše způsobeny právě vysokou koncentrací primerů. Produkt v dráze 2 s koncentrací 2 μl 10x ředěného základního roztoku primerů nebyl sice tak jasný, ale zato se zde nevyskytovaly žádné nespecifické produkty. V první dráze byl produkt viditelný nejslaběji zřejmě z důvodu nízké koncentrace primerů.

8.3.4 Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů

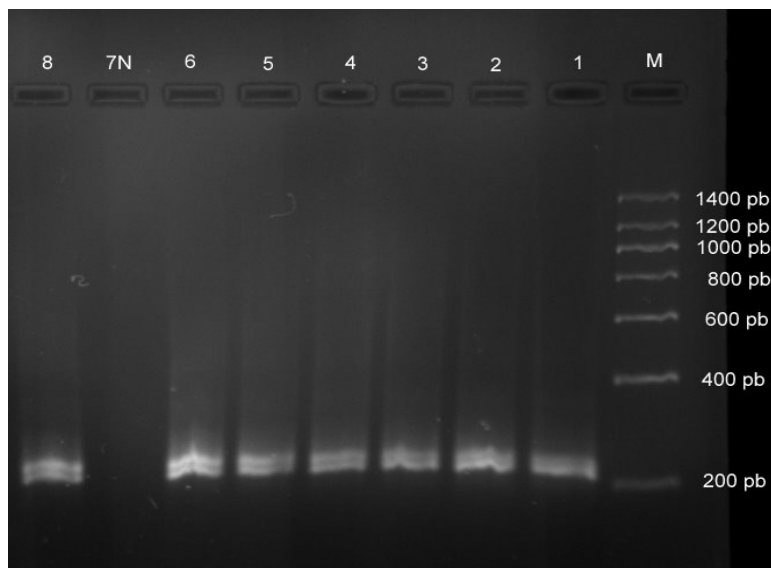
V této nested PCR byla optimalizována koncentrace Mg^{2+} iontů. Tímto jsme se snažili docílit co největší čistoty PCR produktů. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 15. U produktu byla očekávána délka 204 pb. Pro pokus byla použita 10x ředěná DNA z PCR B359f a B682r. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 15. *Nested PCR pro primery GC518f a 682r s rostoucí koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4	5	6	7	8
Master mix (bezbarvý)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC518f [konc. 100 pmol/ μl]	1	1	1	1	1	1	1	1
Primer 682r [konc. 100 pmol/ μl]	1	1	1	1	1	1	1	1
Mg^{2+} ionty [mmol/l]	2	2,5	3	3,5	4	4,5	2	5
Voda	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	8,5	4,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g/ml}$]	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	-	1 ($\times 10^{-1}$)
Celkový objem	25	25	25	25	25	25	25	25

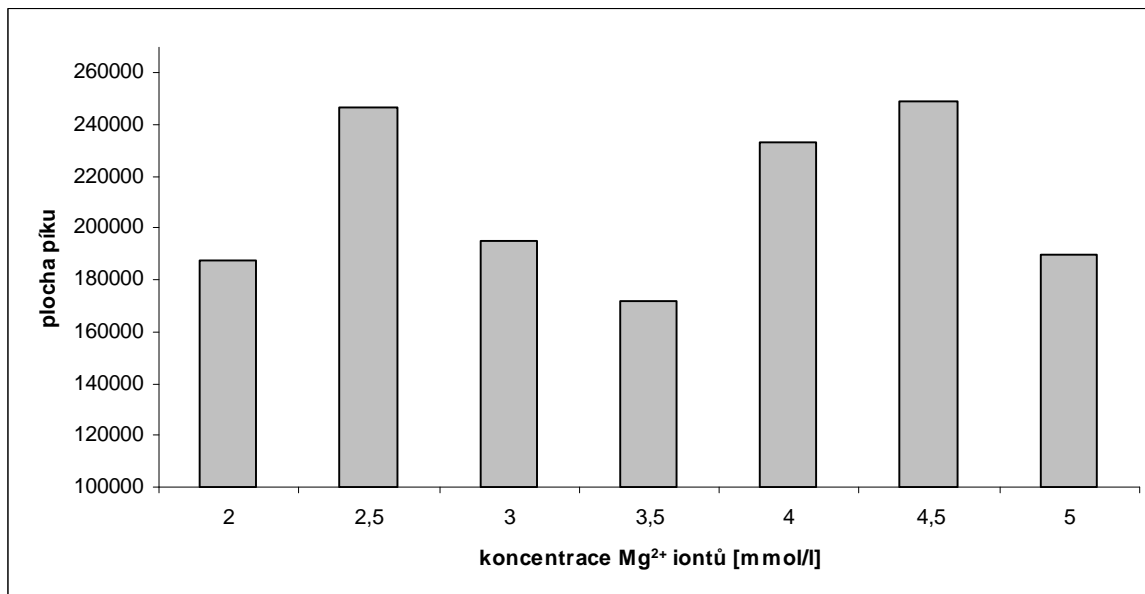
Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný základní roztok

PCR byla provedena v thermocyleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 60 °C, 30 s; polymerace 72 °C, 30 s; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 19. *Nested PCR pro primery GC518f a 682r s rostoucí koncentrací Mg^{2+} iontů. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg^{2+} iontů. M, DNA marker.*

Produkt se vytvořil o předpokládané délce 204 pb (viz. Obr. 19). Produkt byl dobře viditelný ve všech drahách. Nejjasněji byl viditelný produkt ve 2. a 6. dráze. Ve 2. dráze byla koncentrace Mg^{2+} iontů 2,5 mmol/l a v 6. dráze byla koncentrace Mg^{2+} iontů 4,5 mmol/l. Negativní kontrola vyšla čistě.



Obr. 20. Graf závislosti plochy píku na koncentraci Mg²⁺ ionů

Graf na Obr. 20 zobrazuje, že nejvhodnější koncentrace Mg²⁺ ionů byla 2,5 a 4,5 mmol/l. Další nejvyšší koncentrací byla podle grafu koncentrace 4 mmol/l Mg²⁺ ionů. Z toho lze usoudit, že použitý program na denzitometrický výpočet není zřejmě úplně optimální a že počítá s určitou chybou, jelikož na Obr. 19 není viditelné, že by band v dráze s koncentrací 4 mmol/l Mg²⁺ ionů, byl příliš jasný.

8.4 Gammaproteobacteria

Specifickými primery pro *Gammaproteobacteria* byly primery 359f a 871r. Použitou sadou primerů pro nested PCR byly primery GC518f a 785r. Pro nested PCR byl jako templátová DNA použit produkt PCR s primery 395f a 871r. Sekvence primerů byly získány z publikace Mühling, *et al.* [24]. Primery 359f, 871r a 785r obsahují degenerované báze zajišťující specifitu pro *Gammaproteobacteria*. Degenerované báze, které primery obsahují, jsou zaznamenány v Tab. 2. Čísla označující primery odpovídají přibližnému počátku příslušné sekvence v genu pro 16S rRNA u *E. coli*. Primery nasedají tak, že zahrnují variabilní oblast V3 – V5.

Sekvence primerů pro následující PCR jsou:

395f: CMA TGC CGC GTG TGT GAA

871r: ACT CCC CAG GCG GTC DAC TTA

GC518f:CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGACGGGGGG'CCAGCAGCCGCGGTAAT

785r: CTA CCA GGG TAT CTA ATC C

8.4.1 PCR pro primery 395f a 871r s různým množstvím DNA

Gammaproteobacteria byla testována na primerech 395f a 871r. U této PCR reakce bylo optimalizováno množství použité DNA. Roztoky do reakční směsi byly dávkovány podle Tab. 16. Předpokládaná délka produktu byla 516 pb. Primery zahrnují variabilní oblasti V3 – V5. Pro pokus byla použita DNA vyextrahovaná z kalu z čistírny odpadních vod. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Sekvence primerů použitých v PCR:

395f: CMA TGC CGC GTG TGT GAA

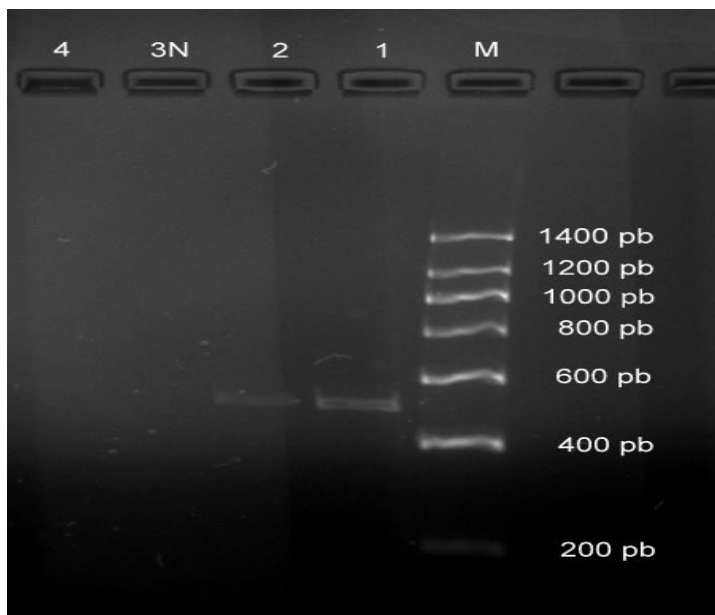
871r: ACT CCC CAG GCG GTC DAC TTA

Tab. 16. PCR pro primery 395f a 871r s různým množstvím DNA (objemy v μl)

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC 395f [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer 871r [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g/ml}$]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 54 °C, 30 s; polymerace 72 °C, 30 s; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 21. PCR pro primery 395f a 871r s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA; 1, 1 μ l neředěného základního roztoku DNA. M, DNA marker.

Produkt se viditelně zobrazil pouze v prvních dvou drahách. Jeho očekávaná délka byla 516 pb (viz. Obr. 21). Marker je bohužel trochu deformovaný. Nejjasněji byl viditelný produkt v 1. dráze, kde byl dávkován základní roztok DNA. Ve 2. dráze byl dávkován 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA a produkt byl viditelný slabě. Ve 3. dráze byla provedena negativní kontrola, která vyšla čistě. Ve 4. dráze s dávkovaným 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA se produkt bohužel nezobrazil, což mohlo být způsobeno vysokým ředěním DNA.

8.4.2 Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různým množstvím DNA

V následující nested PCR bylo optimalizováno množství DNA, aby bylo zjištěno, které z dávkovaného množství DNA je nejvhodnější pro produkt o vysoké čistotě. Do PCR směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 17. Námi očekávaná délka produktu byla 307 pb. Primery zahrnují variabilní oblast V4. Označení GC u prvního z primerů znamená, že komplementární sekvenci předchází GC svorka nutná pro aplikaci produktů na TGGE. Pro pokus byla použita DNA z PCR reakce s primery 359f a 871r, která byla ve 2. dráze ředěna 10x a ve 4. dráze 100x. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Sekvence použitých primerů:

GC518f:CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG'CCAGCAGCCGCGGTAAT

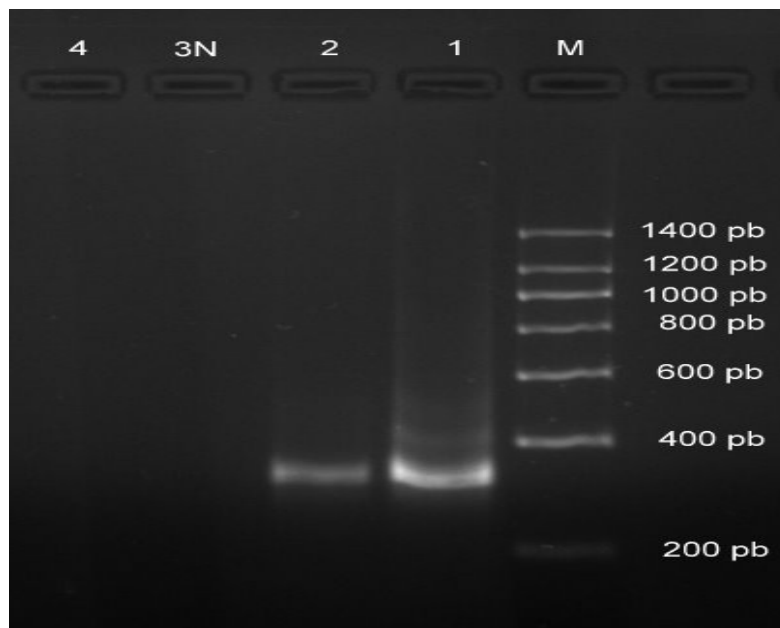
785r: CTA CCA GGG TAT CTA ATC C

Tab. 17. *Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různým množstvím DNA (objemy v μ l)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC 518f [konc. 100 pmol/ μ l]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer 785r [konc. 100 pmol/ μ l]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda [μ l]	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 μ g/ml]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem [μ l]	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 56 °C, 30 s; polymerace 72 °C, 30 s; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 22. *Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různou koncentrací DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného roztoku DNA z PCR 395f a 871r; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA z PCR 395f a 871r; 1, 1 μ l 10x neředěného roztoku DNA z PCR 395f a 871r. M, DNA marker.*

Produkt se vytvořil o předpokládané délce 307 pb (viz. Obr. 22). Produkt se zobrazil pouze v prvních dvou drahách. V 1. dráze byl produkt jasný, avšak byly zde vytvořeny i nescifické a pro nás nežádoucí produkty, což mohlo být způsobeno vysokou koncentrací DNA. Ve 2. dráze, kde byl dávkován 1 μ l 10x ředěné DNA z PCR 395f a 871r byl produkt viditelný slaběji, ale stále to bylo dostačující. V této dráze se nescifické produkty nevytvořily. Ve 3. dráze byla provedena negativní kontrola a vyšla čistě. Ve 4. dráze se produkt bohužel nezobrazil. To mohlo být způsobeno vysokým ředěním použité DNA.

8.4.3 Nested PCR pro primery GC518f a 785r s jejich různou koncentrací

V následující nested PCR byla optimalizována koncentrace použitých primerů GC518f a 785r, aby bylo možno posoudit její vliv na čistotu produktu. Do PCR směsi byly dávkovány roztoky dle Tab. 18. Předpokládaná délka produktu byla 307 pb. Pro pokus byla

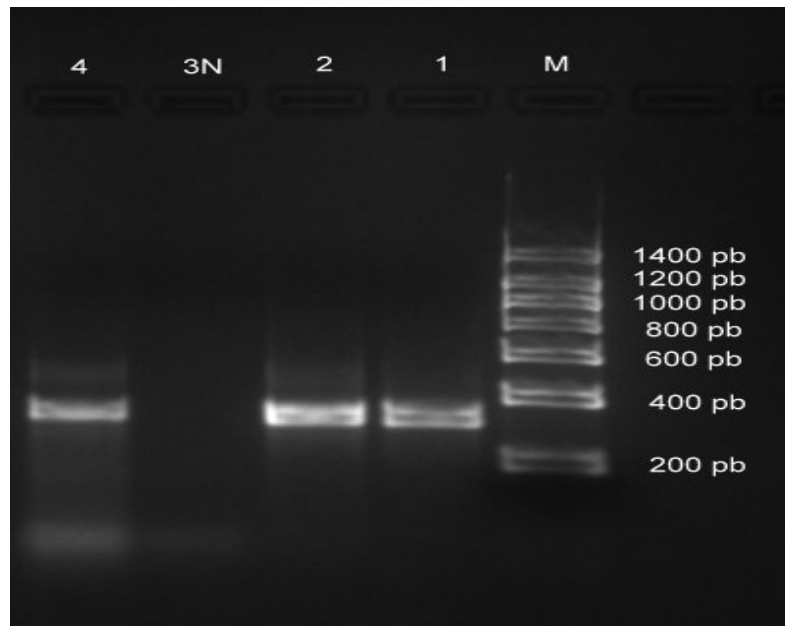
použita 10x ředěná DNA z PCR reakce s primery 359f a 871r. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 18. *Nested PCR pro primery GC518f a 785r s jejich různou koncentrací (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC 518f [konc. 100 pmol/ μl]	1 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	1
Primer 785r [konc. 100 pmol/ μl]	1 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	1
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g}/\text{ml}$]	1	1	-	1
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 56 °C, 30 s; polymerace 72 °C, 30 s; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 23. *Nested PCR pro primery GC518f a 785r s jejich různou koncentrací. Koncentrace primerů: 4, 1 μ l neředěného roztoku primerů o koncentraci 100 pmol/ μ l; 3N, negativní kontrola; 2, 2 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů; 1, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů. M, DNA marker.*

Produkt se vytvořil o předpokládané délce 307 pb (viz. Obr. 23). V 1. dráze s množstvím 1 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů se produkt zobrazil dost viditelně a nebyl zde vytvořen žádný nespecifický produkt. Nejjasnější byl produkt ve 2. dráze, kde byly dávkovány 2 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů. Zde se v malém množství vytvořil nespecifický produkt. Ve 3. dráze byla provedena negativní kontrola, která vyšla čistá. Do směsi ve 4. dráze byl dávkován 1 μ l neředěného základního roztoku primerů s koncentrací 100 pmol/ μ l. Produkt zde není nejjasnější a je zde větší množství nespecifických produktů než u 1. a 2. dráhy.

8.4.4 Nested PCR pro primery GC518f 785r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů

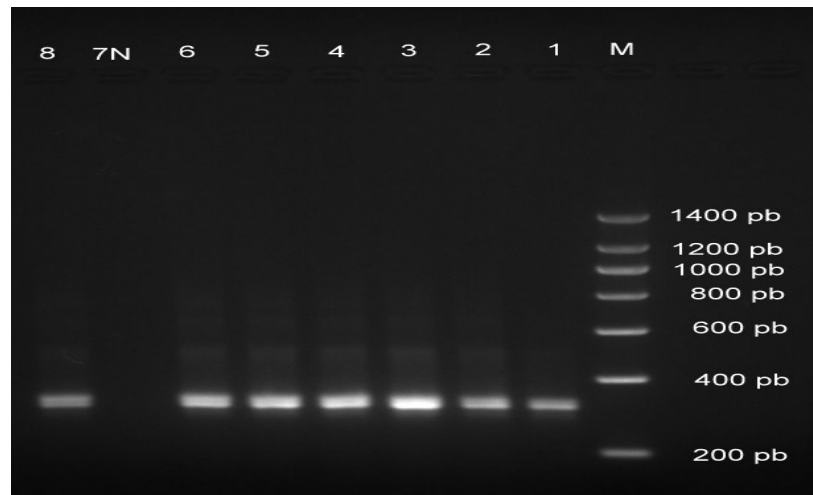
Tato nested PCR byla optimalizací pro použití různé koncentrace Mg^{2+} iontů. Mg^{2+} ionty byly dávkovány v roztoku $MgCl_2$ s koncentrací zvyšující se o 0,5 mmol/l. Roztoky do PCR směsi byly dávkovány podle Tab. 19. Očekávaná délka produktu byla 307 pb. Pro pokus byla použita 10x ředěná DNA z PCR reakce s primery 359f a 871r. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 19. *Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4	5	6	7	8
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC 518f [konc. 100 pmol/ μl]	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)
Primer 785r [konc. 100 pmol/ μl]	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)
Mg^{2+} ionty [mmol/l]	2	2,5	3	3,5	4	4,5	2	5
Voda	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	8,5	4,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu g/ml$]	1	1	1	1	1	1	-	1
Celkový objem	25	25	25	25	25	25	25	25

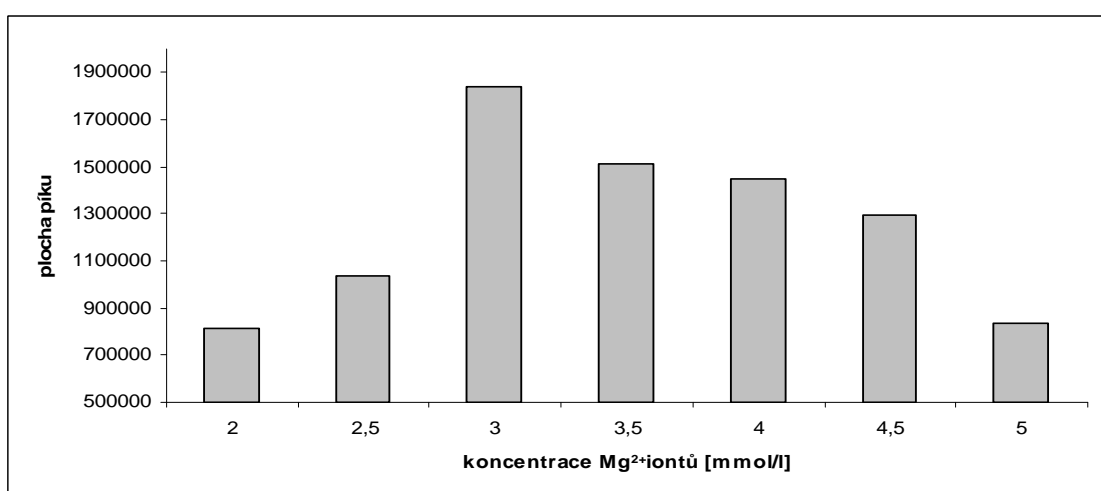
Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 56 °C, 30 s; polymerace 72 °C, 30 s; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 24. Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4 mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg^{2+} iontů. M, DNA marker.

Produkt měl předpokládanou délku 307 pb (viz. Obr. 24). Produkty se zobrazily ve všech drahách. V 7. dráze byla provedena negativní kontrola, která vyšla čistě. Nejjasněji je produkt viditelný ve 3. dráze, kde je koncentrace Mg^{2+} iontů 3 mmol/l. Velmi jasné jsou i produkty ve 4. a 5. dráze. Ve všech drahách, kromě 1. dráhy se v malém množství vytvořily i nespecifické produkty, což pro nás není příliš žádoucí.



Obr. 25. Graf závislosti koncentrace Mg^{2+} iontů na ploše píku

Podle grafu na Obr. 25 můžeme vidět, že nejlepší koncentrace Mg^{2+} iontů pro dané primery je 3 mmol/l.

8.5 Alfaproteobacteria

Pro skupinu *Alfaproteobacteria* byla testována sada primerů Alf28f a Alf684. Sekvence těchto primerů byly získány z publikace Mühlings, *et al.* [24]. Primery Alf28f a Alf684 obsahují degenerované báze, aby byla zajištěna specifita pro *Alfaproteobacteria*. Tyto degenerované báze jsou zaznamenány v Tab. 2. Čísla v označení primerů odpovídají přibližnému počátku příslušné sekvence v genu pro 16S rRNA u *E. coli*. Primery zahrnují variabilní oblasti V1 – V4.

Sekvence pro použité primery jsou následující:

Alf 28: ARC GAA CGC TGG CGG CA

Alf 684: TAC GAA TTT YAC CTC TAC A

8.5.1 PCR pro primery Alf28 a Alf684

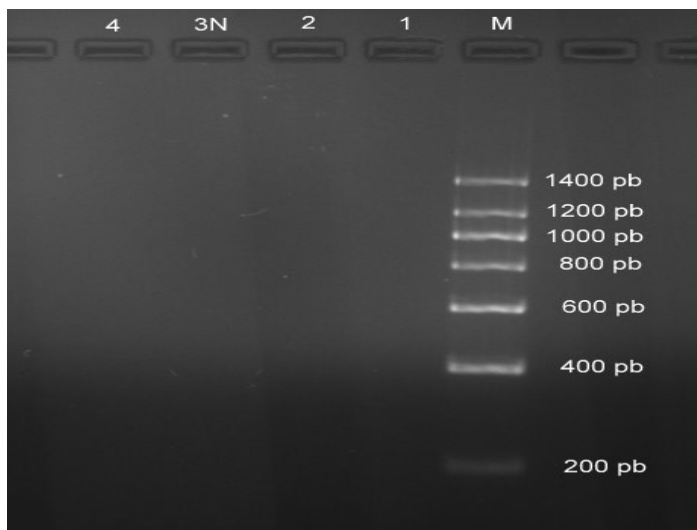
Jako první byla provedena PCR s primery Alf28f a Alf684. Roztoky do reakční směsi byly dávkovány podle Tab. 20. Námí očekávaná délka produktu byla 696 pb. Pro pokus byla použita DNA vyextrahovaná z kalu z čistírny odpadních vod. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 20. PCR pro primery Alf28f a Alf684 (objemy v μl)

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer Alf 28f [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer Alf 684 [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g/ml}$]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 69 °C, 1 min; polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 26. PCR pro primery Alf28f a Alf684. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA; 1, 1 μ l neředěného základního roztoku DNA o koncentraci 2,82 μ g/ml. M, DNA marker.

U tohoto PCR nám bohužel žádný produkt nevznikl, jak je patrné z Obr. 26.

8.5.2 Nested PCR pro primery Alf28 a Alf684

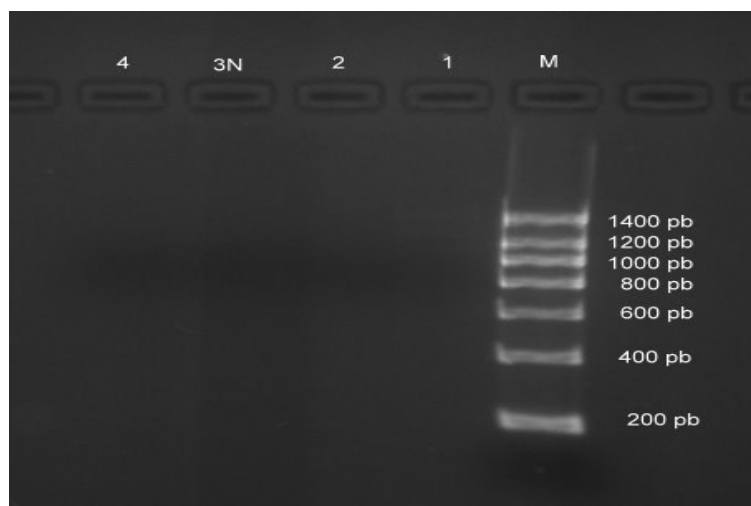
V dalším pokusu byla opět provedena PCR s primery Alf28f a Alf684, ale byl zde použit jiný roztok DNA. Roztoky do reakční směsi byly dávkovány podle Tab. 21. Primery zahrnují variabilní oblasti V1 – V4. Předpokládaná délka produktu byla 696 pb. Pro pokus byla použita DNA z PCR FD1 a RD1. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 21. *Nested PCR pro primery Alf28f a Alf684 (objemy v μ l)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer Alf 28f [konc. 100 pmol/ μ l]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer Alf 684 [konc. 100 pmol/ μ l]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 μ g/ml]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 69 °C, 1 min; polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 27. *Nested PCR pro primery Alf 28f a Alf 684. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného roztoku DNA z PCR FDI, RDI; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA z PCR FDI; 1, 1 μ l neředěného roztoku DNA z PCR FDI, RDI. M, DNA marker.*

U tohoto pokusu nám bohužel žádné pozitivní výsledky nevyšly. Tato situace by mohla být dána tím, že *Alfaproteobacteria* se v aktivovaném kalu vyskytují ve velmi malém množství.

8.6 Actinobacteria

Pro *Actinobacteria* byly pomocí metody PCR jako první testovány primery GC984f a 1378r, jejichž produkt byl použit jako templátová DNA pro následující nested PCR. Pro nested PCR byly použity primery 243f a 1378r. Sekvence těchto primerů byly získány z publikace Heuer, et al. [13]. Označení GC u prvního z primerů znamená, že komplementární sekvenci předchází GC svorka nutná pro aplikaci produktů na TGGE. Čísla v označení primerů odpovídají přibližnému počátku příslušné sekvence v genu pro 16S rRNA u *E. coli*. Primery zahrnují variabilní oblasti V3 – V8.

Sekvence použitých primerů pro následující PCR:

243f: GGA TGA GCC CGC GGC CTA

GC984f: GC. –AA CGC GAA GAA CCT TAC

1378r: CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG

8.6.1 Nested PCR pro primery 243f a 1378r

Byla použita metoda nested PCR. U tohoto pokusu byla snaha optimalizovat dávkování DNA. Předpokládaná délka produktu byla 1175 pb. Do reakční směsi byly dávkovány roztoky podle Tab. 22. Pro pokus byla použita DNA z PCR FD1, RD1. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec z důvodu negativní kontroly.

Sekvence použitých primerů:

243f: GGA TGA GCC CGC GGC CTA

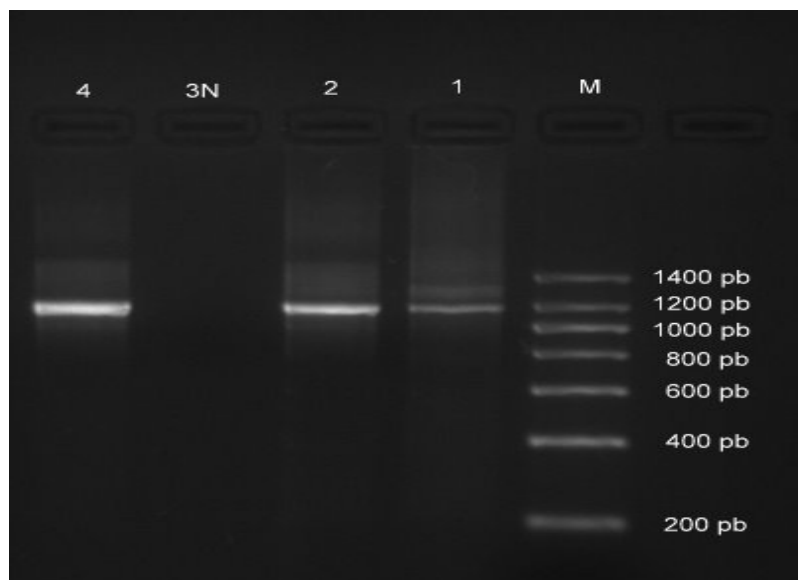
1378r: CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG

Tab. 22. *Nested PCR pro primery 243f a 1378r s různým množstvím DNA (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer 243f [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer 1378r [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g/ml}$]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 63 °C, 1 min; polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 28. *Nested PCR pro primery 243f a 1378r s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μl 100x ředěného roztoku DNA z PCR FDI a RD1; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μl 10x ředěného roztoku DNA z PCR FDI a RD1; 1, 1 μl neředěného roztoku DNA z PCR FDI a RD1. M, DNA marker.*

Produkt se vytvořil o očekávané délce 1175 pb (viz. Obr. 28). Produkt byl dobře viditelný ve všech drahách. V 1. dráze, kde byla DNA dávkována v množství 1 µl neředěného roztoku DNA z PCR FD1 a RD1 byl produkt viditelný slaběji než v dalších dvou drahách. Ve 2. dráze byla DNA dávkována v objemu 1 µl 10x ředěného roztoku DNA z PCR FD1 a RD1 a ve 4. dráze s množstvím 1 µl 100x ředěného roztoku DNA z PCR FD1 a RD1 byl produkt velmi jasný. Avšak v těchto drahách bylo také větší množství vytvořených nespecifických produktů. Tento nedostatek by se mohl dát optimalizovat změnou annealingové teploty nebo změnou počtu cyklů u PCR. Negativní kontrola vyšla čistě.

8.6.2 Nested PCR pro primery F1378 a F984GC s různým množstvím DNA

Pro nested PCR byly použity primery F1378 a F984GC. V této PCR bylo optimalizováno množství dávkované DNA. Primery zahrnují variabilní oblasti V6 – V8. Roztoky do reakční směsi byly dávkovány podle Tab. 23. Námi očekávaná délka produktu byla 434 pb. Pro nested PCR byla použita DNA z PCR 243f a 1378r. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec z důvodu negativní kontroly.

Sekvence primerů použitých v PCR:

1378r: CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG

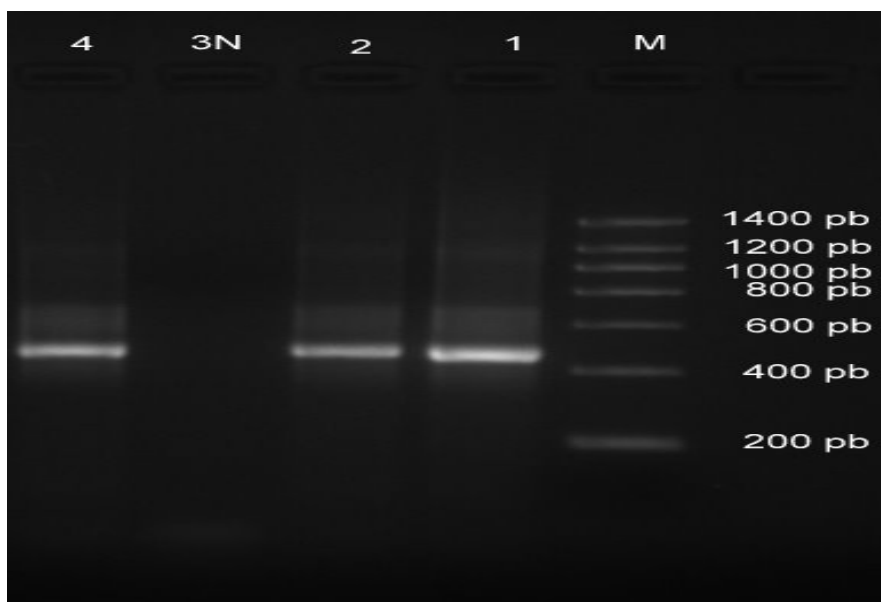
GC984f: GC. –AA CGC GAA GAA CCT TAC

Tab. 23. *Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různým množstvím DNA (objemy v μ l)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC984f [konc. 100 pmol/ μ l]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer 1378r [konc. 100 pmol/ μ l]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 μ g/ml]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 53 °C, 1 min; polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 29. *Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného roztoku DNA z PCR 243f a 1378r; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA z PCR 243f a 1378r; 1, 1 μ l neředěného roztoku DNA z PCR 243f a 1378r. M, DNA marker.*

Produkt se vytvořil v očekávané délce 434 pb (viz. Obr. 29). Produkt byl zobrazen ve všech drahách. Nejjasněji byl produkt viditelný v 1. dráze, kde byla nejvyšší koncentrace DNA, avšak bylo zde i největší množství dalších nespecifických produktů. Ve 2. dráze s množstvím 1 μl 10x ředěného roztoku DNA z PCR 243f a 1378r byl produkt viditelný slaběji, ale pořád byl viditelný dost jasně. Zde bylo množství nespecifických produktů nižší. Negativní kontrola vyšla. Ve 4. dráze, kde byla DNA dávkována v množství 1 μl 100x ředěného roztoku DNA z PCR 243f a 1378r byl produkt také viditelný slaběji s náznakem nespecifických produktů.

8.6.3 Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různou koncentrací Mg^{2+} iontů

Pro následující nested PCR byla optimalizována koncentrace Mg^{2+} iontů. Roztoky do PCR směsi byly dávkovány dle Tab. 24. Předpokládaná délka produktu byla 434 pb. Pro nested PCR byla použita DNA z nested PCR pro primery 1378r a 243f. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec z důvodu negativní kontroly.

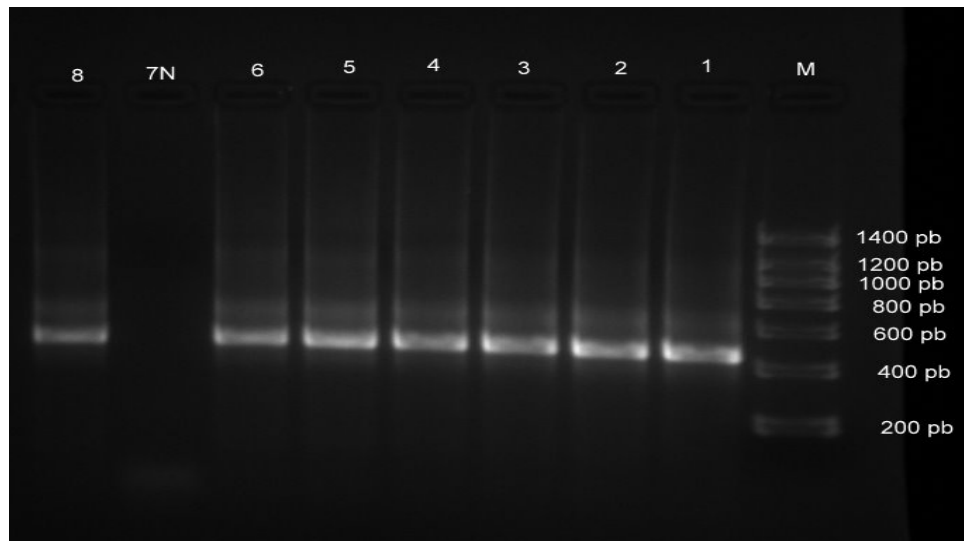
Tab. 24. *Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různou koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4	5	6	7	8
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer 1378r [konc. 100 pmol/ μl]	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)
Primer GC984f [konc. 100 pmol/ μl]	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)	2 ($\times 10^{-1}$)
Mg^{2+} ionty [mmol/l]	2	2,5	3	3,5	4	4,5	2	5
Voda	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	8,5	4,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g}/\text{ml}$]	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	1 ($\times 10^{-1}$)	-	1 ($\times 10^{-1}$)
Celkový objem	25	25	25	25	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok

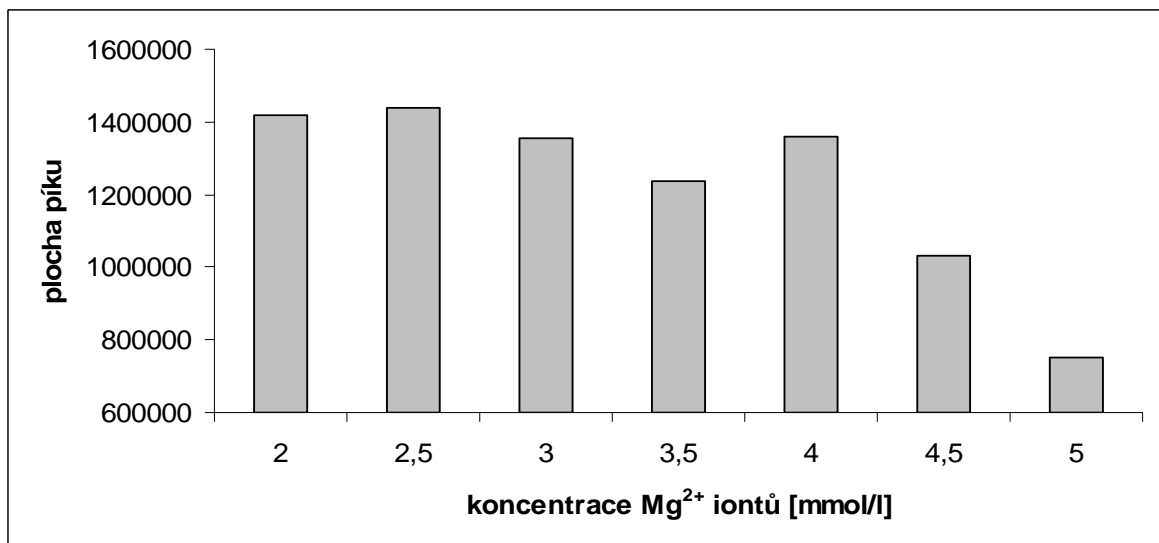
PCR byla provedena v thermocyleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 53 °C, 1 min; polymerace

72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 30. Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různou koncentrací Mg^{2+} iontů. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4 mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg^{2+} iontů. M, DNA marker.

Produkt se zobrazil v očekávané délce 434 pb (viz. Obr. 30). Produkt se vytvořil a zobrazil ve všech drahách. Negativní kontrola vyšla čistě. Bohužel z Obr. 30 není patrné, která použitá koncentrace Mg^{2+} iontů je nejvhodnější.



Obr. 31. Graf závislosti koncentrace Mg^{2+} iontů na ploše píku

Z grafu zobrazeného na Obr. 31 je vidět, že nejvyšší hodnoty pro koncentraci Mg^{2+} iontů jsou u koncentrací 2; 2,5 a 4 mmol/l. Úplně nejvyšší je hodnota pro 2,5 mmol/l Mg^{2+} iontů. Proto je tato koncentrace nejvhodnější.

8.6.4 PCR pro primery Act235 a Act878

Další testovanou sadou primerů byly primery Act235 a Act878 specifické pro *Actinobacteria*. Tato PCR sloužila k ověření funkčnosti primerů. Předpokladem bylo, že vytvořený produkt vznikne o délce 683 pb. Pro pokus byla použita DNA purifikovaná z kalu z čistírny odpadních vod. DNA byla dávkována v objemu 1 μ l neředěného základního roztoku DNA, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA a 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola. Roztoky pro PCR směs byly dávkovány podle Tab. 25.

Sekvence primerů použitých pro následující PCR:

Act235: CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG

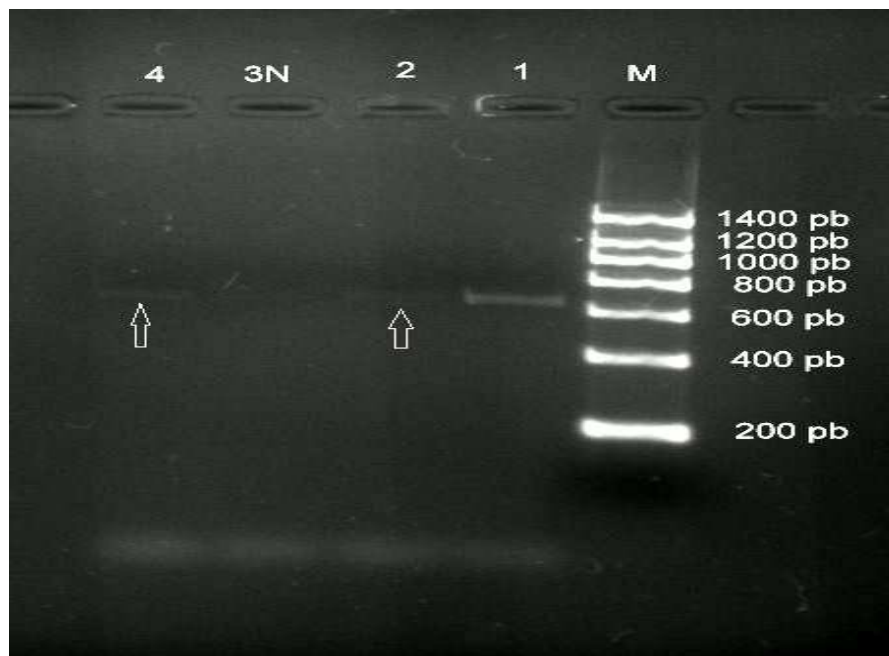
Act878: CCG TAC TCC CCA GGC GGG G

Tab. 25. PCR pro primery Act235 a Act878 s různým množstvím DNA (objemy v μ l)

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer Act235 [konc. 100 pmol/ μ l]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer Act878 [konc. 100 pmol/ μ l]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 μ g/ml]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocycleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 7 min; denaturace 94 °C, 1 min; annealing 68 °C, 40 s; polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 32. PCR pro primery Act235 a Act878 s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA; 1, 1 μ l neředěného základního roztoku DNA. M, DNA marker.

Produkt se vytvořil v očekávané délce 683 pb (viz. Obr. 32). Nejjasněji byl produkt viditelný v 1. dráze, kde byl dávkován 1 μ l neředěného základního roztoku DNA o koncentraci 2,82 μ g/ml. Ve 2. dráze, kde bylo dávkování 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA a ve 4. dráze s dávkováním 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA byly produkty viditelné slabě. Negativní kontrola ve 3. dráze vyšla čistě.

8.6.5 Nested PCR pro GC341F a 518r s různým množstvím DNA

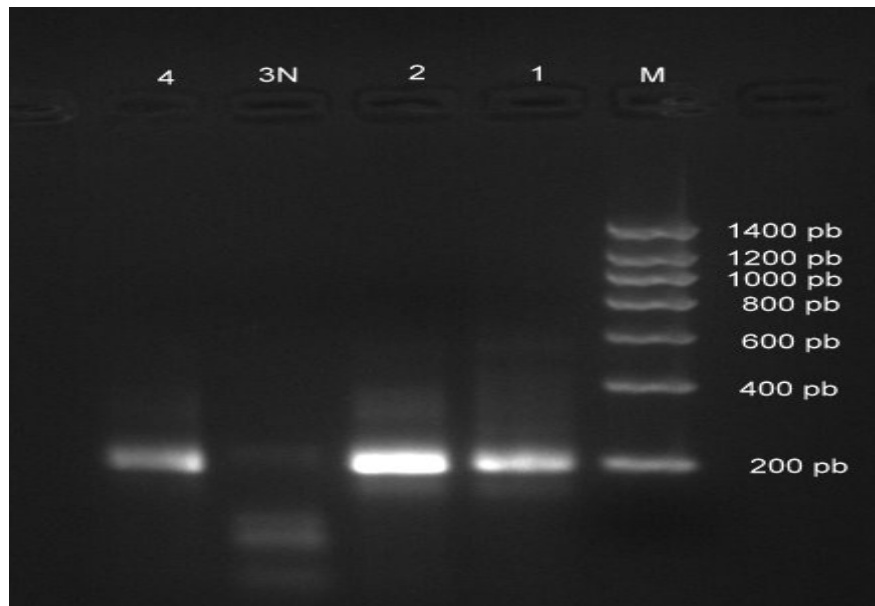
Následná nested PCR byla provedena s primery GC341f a 518r. Podle předpokladu měl vzniknout produkt o délce 207 pb. Roztoky pro PCR směs byly dávkovány podle Tab. 26. Pro pokus byla použita DNA z PCR s primery Act235 a Act878. DNA byla dávkována v množství: 1 μl neředěného roztoku DNA z PCR Act235 a Act878, 1 μl 10x ředěného roztoku DNA z PCR Act235 a Act878 a 1 μl 100x ředěného roztoku DNA z PCR Act235, Act878. Do předposlední zkumavky nebyla DNA dávkována vůbec, tato směs sloužila jako negativní kontrola.

Tab. 26. *Nested PCR pro primery GC341f a 518r s různým množstvím DNA (objemy v μl)*

Reakční směs/dráha	1	2	3	4
Master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer GC341f[konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Primer 518r [konc. 100 pmol/ μl]	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$	$2 (\times 10^{-1})$
Voda	7,5	7,5	8,5	7,5
Templátová DNA [konc. 2,82 $\mu\text{g}/\text{ml}$]	1	$1 (\times 10^{-1})$	-	$1 (\times 10^{-2})$
Celkový objem	25	25	25	25

Pozn. $\times 10^{-1}$ znamená desetkrát ředěný roztok, $\times 10^{-2}$ znamená stokrát ředěný roztok

PCR byla provedena v thermocyleru s programem třiceti cyklů. Program: počáteční denaturace 94 °C, 5 min; denaturace 94 °C, 30 s; annealing 61-56 °C, 30 s (teplota snižována (touchdown) o 0,5 °C na cyklus v průběhu 10 cyklů); polymerace 72 °C, 1 min; závěrečná polymerace 72 °C, 10 min; uchování 4 °C, nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a polymerace se opakují v 29 cyklech.



Obr. 33. *Nested PCR pro primery GC341f a 518r s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného roztoku DNA z PCR Act235 a Act878; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA z PCR Act235 a Act878; 1, 1 μ l neředěného roztoku DNA z PCR Act235 a Act878. M, DNA marker.*

Produkt se vytvořil o předpokládané délce 207 pb (viz. Obr. 33). Nejjasnější produkt se vytvořil ve 2. dráze, kde bylo dávkováno množství 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA z PCR Act235 a Act878. Negativní kontrola ve 3. dráze vyšla čistě. V 1. dráze bylo množství DNA 1 μ l neředěného roztoku DNA z PCR Act235 a Act878 a ve 4. dráze byl dávkován 1 μ l 100x ředěného roztoku DNA z PCR Act235 a Act878. V těchto dvou drahách byly produkty jasné.

ZÁVĚR

V diplomové práci bylo snahou ověřit funkčnost bakteriálních PCR primerů, které byly zjištěny z publikací a poté testovány. Testované sady primerů byly FD1, RD1, 518r, GC 341f a 907r pro universální primery, dále 359f, 682r a GC518f pro *Betaproteobacteria*, pro *Gammaproteobacteria* to byly primery 395f, 871r, GC518f a 785r, pro *Alfaproteobacteria* 28f a 684r a pro *Actinobacteria* byly testovány primery GC984f, 1378r a 243f.

Jako první byly testovány universální primery. Tyto primery amplifikují variabilní oblasti V1-V9. Dále byly testovány primery pro *Alfaproteobacteria* s variabilními oblastmi V1-V4, *Betaproteobacterie* s variabilními oblastmi V3 a V4, *Gammaproteobacteria* s oblastmi variability V3-V5 a *Actinobacteria* s variabilními oblastmi V3-V8.

U všech PCR primerů byla optimalizována koncentrace Mg^{2+} iontů, teplota a koncentrace primerů. Při optimalizaci koncentrace Mg^{2+} iontů nebyly zaznamenány velké změny ve specifitě a výtěžku produktů. Produkty vznikaly při každé změně koncentrace Mg^{2+} iontů od dávkovaných 2 mmol/l až k 5 mmol/l. U sady universálních primerů GC341f a 518r, sady primerů pro *Betaproteobacteria* GC518f a 682r a sady primerů pro *Actinobacteria* 1378 a GC984f byla zjištěna nejvhodnější koncentrace Mg^{2+} iontů 2,5 mmol/l. Zato pro skupinu universálních primerů GC341f a 907r a pro primery GC518f a 785r skupiny *Gammaproteobacterií* se jevila jako nejvýhodnější koncentrace 3 mmol/l Mg^{2+} iontů.

Dále jsme se pokusili optimalizovat annealingovou teplotu. U této proměnné také nedocházelo k výraznějším změnám. Vypočítané annealingové teploty nebo teploty převzaté z literatury se jevily jako optimální pro vytvoření produktů.

Při optimalizaci koncentrace primerů bylo zlepšení výsledků jasně patrné. Nejvhodnější množství primerů bylo 2 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů o koncentraci 100 pmol/ μ l, kdy nevznikaly žádné nespecifické produkty a produkty vznikaly v dostatečném výtěžku. Výsledná dávkovaná koncentrace primerů tedy byla 0,8 pmol/ μ l.

Asi nejlépe fungujícími primery byly primery pro skupinu *Betaproteobacteria*. To bylo nejspíše způsobeno tím, že *Betaproteobacteria* jsou v námi testované skupině bakterií z kalu z čistíren odpadních vod zastoupeny v největším množství.

Dobře fungovaly i primery pro *Gammaproteobacteria* a *Actinobacteria*. Tyto dvě skupiny bakterií jsou v kalu zastoupeny ve velmi podobném množství, jehož hodnota se nachází mezi hodnotou pro *Betaproteobacteria* a *Alfaproteobacteria*.

U skupiny primerů pro *Alfaproteobacteria* se nám nepodařilo získat žádný produkt. Nejspíše to bylo způsobeno tím, že *Alfaproteobacteria* jsou v kalu z čistíren odpadních vod zastoupeny ve velmi malém množství.

V průběhu diplomové práce se při pokusech v PCR produktech objevovaly dvojité bandy. Zpočátku jsme tomuto jevu nevěnovali pozornost, avšak později jsme se o tento problém začali zajímat. Jednou z příčin by mohl být tvar dna jamky, který může prostorově rozdělit roztok vzorku. Dále mohou být dvojité produkty způsobeny dokumentačním systémem, který může zdvojit výsledek. Tomuto jevu by nasvědčoval i fakt, že u čtyř pokusů byly dvojité i markery.

Domníváme se, že dvojité produkty mohou být způsobeny přítomností GC svorky u jednoho z primerů. Této domněnce nasvědčuje i fakt, že všechny dvojité produkty u výsledků jsou v případě, kdy jeden z primerů obsahuje GC svorku. Výjimkou je pouze jeden případ (Obr. 16), kdy použité primery GC svorku neobsahují.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] DRÁBEK, J. Optimalizace polymerázové řetězové reakce pro získání genotypizačních dat za vyhraněných podmínek. *Habilitační práce*. Univerzita Palackého, Olomouc, 2007. 54 s.

[2] Genetic Science Learning Center (2011, January 24) PCR Virtual Lab. *Learn.Genetics*. Retrieved January 25, 2011, from <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>

[3] ZDEŇKOVÁ, K. Polymerasová řetězová reakce a její variace. *Polymerasová řetězová reakce a její variace* [online]. [cit. 2011-04-18]. Dostupné z WWW: <<http://biomikro.vscht.cz/documents/metmiklab/Metmiklab9.pdf>>.

[4] BALIN B.J., GÉRARD H.C., ARKING E.J., *et al.* Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med. Microbiol. Immunol.* **187**, 1, 23–42. (1998).

[5] *WikiSkripta* [online]. 2010 [cit. 2011-01-27]. Polymerázová řetězová reakce. Dostupné z WWW: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce>.

[6] ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Res.* 1995, s. 185 – 194.

[7] PAVLOV A.R., BELOVA G.I., KOZYAVKIN S.A., SLESAREV A.I. Helix-hairpin-helix motifs confer salt resistance and processivity on chimeric DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci.* **99**, 21, (2002).

[8] DEMIDOV V.V. A happy marriage: advancing DNA polymerases with DNA topoisomerase supplements. *Trends Biotechnol.* **20**: 491. (2002).

[9] KRAMER M.F., COEN D.M. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr Protoc Cytom* **Appendix 3**: Appendix 3K. (August 2006).

[10] DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 1999, 2, [cit. 2011-01-27].

[11] Temperature gradient gel electrophoresis. *Temperature gradient gel electrophoresis* [online]. [cit. 2011-05-01]. Dostupné z WWW: <<http://reference.findtarget.com/search/Temperature%20gradient%20gel%20electrophoresis/>>.

[12] CURTIS T.P., CRALNE N.G. The comparison of the diversity of activated sludge plants. *Wet Sci Tech.* 1998, 37, s. 71-78.

[13] HEUER H., KRSEK M., BAKER P., SMALLA K., WELLINGTON E.M.H. Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16s rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol.* 1997, 63, s. 3233 – 3241.

[14] SMALLA K., WACHTERDORF U., HEUER H., LIU W-T, FORNEY L. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 1998, 64, s. 1220 – 1225.

[15] TESKE A., SIGALEVICH P., COHEN Y., MUYZER G. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16s ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62, s. 4210 – 4215.

[16] BRINKHOFF T., MUYZER G. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63, s. 3789-3796.

[17] Zpracování kalů, Charakteristika čistírenských kalů. *Zpracování kalů Multi-mediální učební texty zaměřené na problematiku zpracování kalů* [online]. [cit. 2011-04-29]. Dostupné z WWW: <<http://homen.vsb.cz/hgf/546/Materialy/Bara/charakter.html>>.

[18] KONG, Y.H., XIA, Y., NIELSEN, J.L., and NIELSEN, P.H. Structure and function of the microbial community in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant. *Mikrobiology.* 2007, **153**, s. 4061 – 4073.

[19] WAGNER, M., LOY, A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology.* 2002, **13**, s. 218–227.

[20] PRESCOTT–HARLEY–KLEIN *Microbiology.* 5th edition. Front Matter Preface © The McGraw–Hill Companies, 2002. ISBN 0-07-282905-2.

[21] MAIER, R. M., et al. *Environmental microbiology*. Canada, Academic press, 2000. ISBN 0-12-497570-4

[22] *Http://www.cortec.ca/iubcodes.htm* [online]. 2009 [cit. 2011-05-03]. IUB Co des. Dostupné z WWW: <<http://www.cortec.ca/iubcodes.htm>>.

[23] Ribosomal database project. [online]. 2011, [cit. 2011-05-01]. Dostupný z WWW: <<http://rdp.cme.msu.edu/>>.

[24] MÜHLING, M., et al. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal*. 2008, 2, s. 379–392.

[25] ZHONGTANG, Y., MORRISON, M. Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*. 2004, vol. 70, no. 8, s. 4800–4806.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DNA: deoxyribonukleová kyselina

PCR: polymerase chain reaction, polymerázové řetězová reakce

TD: touchdown PCR

pb: páry bází

TGGE: gelová elektroforesa v teplotním gradientu

DGGE: denaturační gradientová gelová elektroforesa

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Princip polymerázové řetězové reakce	14
Obr. 2. Nested PCR pro námi použité primery GC518f a 682r.....	18
Obr. 3. Příklad vzhledu výsledného DGGE gelu [11].	20
Obr. 4. Strom znázorňující příslušnost vláknitých bakterií v aktivovaném kalu.....	23
Obr. 5. Variabilní (červené úseky V1-V9) a konzervované (zelené úseky) oblasti genu 16s RNA a oblasti nasednutí u námi použitých primerů.	34
Obr. 6. PCR pro primery FD1 a RD1. Dávkování: 4,2, a 1, dávkováno shodně; 3N, negativní kontrola. M, DNA marker.	36
Obr. 7. Pokus s různou koncentrací primerů GC341f a 518r. Koncentrace primerů: 5, 1 μ l základního roztoku primerů; 4N, negativní kontrola; 3, 0,5 μ l základního roztoku primerů; 2, 2 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů; 1, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku primerů. M, DNA marker.	38
Obr. 8. Pokus s různou annealing teplotou pro primery GC341f a 518r. Teplota: 5, 60 °C; 4, 58 °C; 3, 56 °C; 2, 55 °C; 1, 53 °C. M, DNA marker.	40
Obr. 9. Různá koncentrace Mg^{2+} iontů s primery GC341f a 518r. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4 mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg^{2+} iontů. M, DNA marker.	42
Obr. 10. Graf závislosti koncentrace Mg^{2+} iontů na ploše píku	42
Obr. 11. PCR pro GC341f a 907r s různou DNA. Koncentrace DNA: 4, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; V prvních dvou drahách stejná DNA v množství 1 μ l 10x ředěné DNA z PCR FD1, RD1. M, DNA marker.	44
Obr. 12. Nested PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací DNA. Koncentrace DNA: 4, 1 μ l neředěného roztoku DNA o koncentraci 2,82 μ g/ml; 3N, negativní kontrola; 2, a 1, 1 μ l 10x zředěného základního roztoku DNA. M, DNA marker.	46
Obr. 13. PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 4, 4 mmol/l; 3, negativní kontrola; 2, 3 mmol/l; 1, 2 mmol/l. M, DNA marker.	48

- Obr. 14. *PCR GC341f a 907r s rostoucí koncentrací Mg²⁺ iontů. Koncentrace Mg²⁺ iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4 mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg²⁺ iontů. M, DNA marker.* 50
- Obr. 15. *Graf závislosti plochy píku na koncentraci Mg²⁺ iontů.....* 51
- Obr. 16. *Pokus s primery B359f a B682r s různou koncentrací DNA. Množství DNA: 4, 1 μl 100x ředěného základního roztoku; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μl 10x ředěného základního roztoku; 1, 1 μl neředěného základního roztoku DNA. M, DNA marker.* 53
- Obr. 17. *Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací DNA. Množství DNA: 4, 1 μl 100x ředěné DNA z PCR B359f a B682r; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μl 10x ředěné DNA z PCR B359f a B682r; 1, 1 μl DNA z PCR B359f a B682r. M, DNA marker.....* 55
- Obr. 18. *Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací primerů. Koncentrace primerů: 4, 1 μl o koncentraci 100 pmol/μl; 3N, negativní kontrola; 2, 2 μl 10x ředěného základního roztoku primerů; 1, 1 μl 10x ředěného základního roztoku primerů. M, DNA marker.* 56
- Obr. 19. *Nested PCR pro primery GC518f a 682r s rostoucí koncentrací Mg²⁺ iontů. Koncentrace Mg²⁺ iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg²⁺ iontů. M, DNA marker.* 58
- Obr. 20. *Graf závislosti plochy píku na koncentraci Mg²⁺ iontů.....* 59
- Obr. 21. *PCR pro primery 395f a 871r s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μl 100x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μl 10x ředěného základního roztoku DNA; 1, 1 μl neředěného základního roztoku DNA. M, DNA marker.* 61
- Obr. 22. *Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různou koncentrací DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μl 100x ředěné DNA z PCR 395f a 871r; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μl 10x ředěné DNA z PCR 395f a 871r; 1, 1 μl 10x neředěné DNA z PCR 395f a 871r. M, DNA marker.* 63
- Obr. 23. *Nested PCR pro primery GC518f a 785r s jejich různou koncentrací. Koncentrace primerů: 4, 1 μl neředěného roztoku primerů o koncentraci 100 pmol/μl; 3N, negativní kontrola; 2, 2 μl 10x ředěného základního roztoku primerů; 1, 1 μl 10x ředěného základního roztoku primerů. M, DNA marker.* 65

- Obr. 24. *Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4 mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg^{2+} iontů. M, DNA marker. 67*
- Obr. 25. *Graf závislosti koncentrace Mg^{2+} iontů na ploše píku 67*
- Obr. 26. *PCR pro primery Alf28f a Alf684. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA; 1, 1 μ l neředěného základního roztoku DNA o koncentraci 2,82 μ g/ml. M, DNA marker. 69*
- Obr. 27. *Nested PCR pro primery Alf 28f a Alf 684. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného roztoku DNA z PCR FDI, RD1; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného roztoku DNA; 1, 1 μ l neředěného roztoku DNA z PCR FDI, RD1. M, DNA marker. 70*
- Obr. 28. *Nested PCR pro primery 243f a 1378r s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěné DNA z PCR FDI a RD1; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěné DNA z PCR FDI a RD1; 1, 1 μ l neředěné DNA z PCR FDI a RD1. M, DNA marker. 72*
- Obr. 29. *Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěné DNA z PCR 243f a 1378r; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěné DNA z PCR 243f a 1378r; 1,1 μ l neředěné DNA z PCR 243f a 1378r. M, DNA marker. 74*
- Obr. 30. *Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různou koncentrací Mg^{2+} iontů. Koncentrace Mg^{2+} iontů: 8, 5 mmol/l; 7N, negativní kontrola; 6, 4,5 mmol/l; 5, 4 mmol/l; 4, 3,5 mmol/l; 3, 3 mmol/l; 2, 2,5 mmol/l; 1, 2 mmol/l Mg^{2+} iontů. M, DNA marker. 76*
- Obr. 31. *Graf závislosti koncentrace Mg^{2+} iontů na ploše píku 76*
- Obr. 32. *PCR pro primery Act235 a Act878 s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěného základního roztoku DNA; 3N, negativní kontrola; 2, 1 μ l 10x ředěného základního roztoku DNA; 1, 1 μ l neředěného základního roztoku DNA. M, DNA marker. 78*
- Obr. 33. *Nested PCR pro primery GC341f a 518r s různým množstvím DNA. Dávkování DNA: 4, 1 μ l 100x ředěné DNA z PCR Act235 a Act878; 3N,*

*negativní kontrola; 2, 1 μl 10x ředěné DNA z PCR Act235 a Act878; 1, 1 μl
neředěné DNA z PCR Act235 a Act878. M, DNA marker. 80*

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Zastoupení bakterií v aktivovaném kalu	23
Tab. 2. Přehled použitých primerů	28
Tab. 3. Příprava PCR směsi	31
Tab. 4. PCR směs pro primery FD1 a RD1 (objemy v μl).....	35
Tab. 5. PCR směs pro primery GC341f a 518r (objemy v μl).....	37
Tab. 6. Nested PCR s různou annealing teplotou pro primery GC341f a 518r (objemy v μl).....	39
Tab. 7. Různá koncentrace Mg^{2+} iontů s primery GC341f a 518r (objemy v μl).....	41
Tab. 8. PCR pro CG341f a 907r s různou DNA (objemy v μl)	43
Tab. 9. Nested PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací DNA (objemy v μl).....	45
Tab. 10. Nested PCR pro primery GC341f a 907r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl).....	47
Tab. 11. Nested PCR pro primery GC341f a 907r s rostoucí koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl).....	49
Tab. 12. PCR směs pro primery B359f a B682r s různou koncentrací DNA(objemy v μl).....	52
Tab. 13. Nested PCR pro primery GC518f a 682r s různou koncentrací DNA (objemy v μl).....	54
Tab. 14. Nested PCR, směs pro primery GC518f a 682r (objemy v μl).....	56
Tab. 15. Nested PCR pro primery GC518f a 682r s rostoucí koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl).....	57
Tab. 16. PCR pro primery 395f a 871r s různým množstvím DNA (objemy v μl).....	60
Tab. 17. Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různým množstvím DNA (objemy v μl).....	62
Tab. 18. Nested PCR pro primery GC518f a 785r s jejich různou koncentrací (objemy v μl).....	64
Tab. 19. Nested PCR pro primery GC518f a 785r s různou koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl).....	66
Tab. 20. PCR pro primery Alf28f a Alf684 (objemy v μl).....	68
Tab. 21. Nested PCR pro primery Alf28f a Alf684 (objemy v μl).....	70

Tab. 22. <i>Nested PCR pro primery 243f a 1378r s různým množstvím DNA (objemy v μl)</i>	72
Tab. 23. <i>Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různým množstvím DNA (objemy v μl)</i>	74
Tab. 24. <i>Nested PCR pro primery 1378r a GC984f s různou koncentrací Mg^{2+} iontů (objemy v μl)</i>	75
Tab. 25. <i>PCR pro primery Act235 a Act878 s různým množstvím DNA (objemy v μl)</i>	77
Tab. 26. <i>Nested PCR pro primery GC341f a 518r s různým množstvím DNA (objemy v μl)</i>	79

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení diplomové práce)	Univerzitní knihovna UTB ve Zlíně
Název diplomové práce	Využití PCR pro studium mikrobiologických biodegradačních procesů
Autor diplomové práce	Bc. Tereza Dobešová
Vedoucí diplomové práce	Doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	Náměstí T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Technologická
Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství životního prostředí
Rok obhájení DP	2011
Počet stran	92
Počet svazků	3
Vybavení (obrázky, tabulky...)	54
Klíčová slova	PCR, TGGE, DNA, primer, optimalizace