

Speciální metody analýzy mikroorganismů I

(Bi6721)

***Jana Kopecká
Milan Bartoš***

***Přírodovědecká fakulta MU Brno,
Ústav experimentální biologie, Oddělení mikrobiologie***

Obsah

Vzor protokolu.....	1
Amplifikace genu pro 16S rRNA z bakteriálních lyzátů kultur z čeledi Pasteurellaceae	3
Elektroforéza produktů PCR v agarózovém gelu	7
Purifikace produktů PCR.....	11
Elektroforéza purifikovaných produktů PCR, kvantifikace, příprava pro sekvenování	12
Analýza výsledku sekvenování	13
Izolace bakteriální DNA z Escherichia coli.....	16
Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky	18
Izolace genomové DNA z biologického materiálu.....	20
Detekce Chlamydia trachomatis metodou PCR (end-point).....	22
Detekce Chlamydia trachomatis metodou real-time PCR.....	25
Izolace DNA z kvasinek, gelová elektroforéza, PCR ITS regionu pro odlišení komplexu Saccharomyces sensu stricto	27
Informační panel - Základní data o nukleových kyselinách a proteinech.....	33
Informační panel - Vzorce užitečné pro design PCR.....	34
Informační panel - informace užitečné pro práci s PCR.....	35
Informační panel - Tabulka standardního genetického kódu	36
Informační panel- Parametry prokaryotické buňky	37

Vzor protokolu

Protokol, zpracujte ve formě laboratorního deníku, tzn., že si jej předem připravte a vyplňte (možno i elektronicky). Ve cvičení pak do protokolu vyplňujte pozorování, výpočty, získaná data. Následně pak (nejlépe v rámci cvičení) vypracujte Závěry a Diskusi.

Záznamy z přístrojů získané v průběhu cvičení nebo sekvenační data doložte jako Přílohu.

Protokol odevzdejte ihned po skončení cvičení, nejpozději ve cvičení následujícím.

Protokol z laboratorního cvičení [Název cvičení]

Jméno studentky/ta:

Datum provedení:

Princip úlohy:

Stručně v jedné větě

Změny oproti návodu:

Uveďte rovněž, pokud změny oproti návrhu nebyly

Řešení doprovodných úloh:

Řešení úloh uvedených na konci příslušného návodu ke cvičení

Výsledky:

Sem napište veškerá pozorování, získaná data, výpočty

Diskuse:

Podrobně diskutujte získané výsledky

Závěr:

Napište, co vám cvičení přineslo

Přílohy:

Přiložte záznamy získané z přístrojů v průběhu cvičení, sekvenanční záznamy apod.

Amplifikace genu pro 16S rRNA z bakteriálních lyzátů kultur z čeledi Pasteurellaceae **(cvičení č. 1)**

Úvodní slovo

Přesná klasifikace řady bakteriálních druhů, a nejen zástupců čeledi *Pasteurellaceae*, není někdy standardními mikrobiologickými a biochemickými testy možná, a proto se stále častěji používá analýza sekvencí některých evolučně konzervativních genů. Jako vhodným se jeví sekvence genu pro 16S rRNA. Tento gen obsahuje jak konzervativní oblasti, které jsou vhodným místem pro návrh primerů pro sekvenování, tak i variabilní úseky, kterými se jednotlivé bakteriální druhy a poddruhy liší. Úsek genu vyznačený dvěma konzervativními primery je amplifikován a poté sekvenován. Získaná sekvence je opravena, nepřesné úseky jsou eliminovány a výsledný sled nukleotidů je porovnán s obdobnými sekvencemi v genové bance (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). K tomu lze použít standardních prohlížečů umístěných na www stránkách „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Jedním z nich je prohlížeč označovaný jako BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pracovat s tímto nástrojem se naučíte ve cvičení č. 3b.

Pro diferenciaci mezi zástupci rozsáhlé čeledi významných zvířecích i lidských patogenů se používá také dalších genů, např. provozního genu *rpoB*, který kóduje β podjednotku RNA polymerázy nebo provozního genu *infB*, který kóduje translační iniciační faktor IF2. Tyto geny jsou vhodné např. pro diferenciaci druhů *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Moraxella*. Postup je stejný jako v případě amplifikace a sekvenování genu pro 16S rRNA. Jen primery a podmínky PCR jsou odlišné.

Toto cvičení sestává ze dvou částí

- 1) Přípravy bakteriálních lyzátů z kultur čeledi *Pasteurellaceae*
- 2) Amplifikace jednoho ze tří výše jmenovaných genů, my provedeme amplifikaci genu pro 16S rRNA

Pro amplifikaci genu pro 16S rRNA použijeme primerů podle publikace (**podle Simmon et al. 2006**), a to jako **forward primer sekvenci 5F** (5'- TTG GAG AGT TTG ATC CTG GCT C - 3') a jako **reverse primer sekvenci 1194R** (5'- ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC - 3'). Délka výsledných aplikonů bude pro zástupce čeledi *Pasteurellaceae* přibližně 1 190 bp.

Cíl cvičení

Připravit jednoduchou metodou lyzáty z kultur bakterií čeledi *Pasteurellaceae* rostoucích na pevné půdě ve formě kolonií pro provedení metody PCR.

Provést amplifikaci genu pro 16S rRNA, který lze následně použít pro diferenciaci bakterií sekvenováním.

Seznam přístrojů

- laminární box
- vodní lázeň nebo suchý blok
- třepačka Vortex
- centrifuga na 1,5 ml mikrozkušavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)
- pikofuga na 1,5 ml mikrozkušavky s otáčkami do 6 000 rpm
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 μ l
- termocykler

Vlastní pracovní postup

Příprava bakteriálního lyzátu

- 1) Naberte bakteriální kolonii kličkou a resuspendujte ji v 50 μ l deionizované vody
- 2) Povařte v suchém bloku 5 min. při 98°C
- 3) Centrifugujte 3 min. při 14 000g
- 4) Lyzát uchovávejte v ledničce při 4°C až 8°C
- 5) Pro PCR odeberte 2 μ l supernatantu

Polymerázová řetězová reakce

- 1) Vytáhněte polymerázu (Maxima™ Probe qPCR Master Mix 2X, „FERMENTAS“), primery a vodu z mrazničky a nechejte rozpustit při laboratorní teplotě (asi 5 minut)
- 2) Uracil-DNA glykosyláza vyndejte z mrazničky bezprostředně před použitím
- 3) Namíchejte směs pro 10 reakcí PCR podle následující tabulky:

Komponenta	Množství na 1 reakci (v μl)	Množství na 10 reakcí (v μl)
MasterMix	18,0	180,0
Primer 5F (100 μ M)	0,1	1,0
Primer 1194R (100 μ M)	0,1	1,0
Uracil DNA glykosyláza	0,1	1,0
Deionizovaná voda	7,7	77,0
DNA (lyzát)	2,0	-
CELKEM	20,0	á 18,0

- 4) Dobře promíchejte pipetou opatrným natažením a vypuštěním (neprobublávat, nevytvářet bublinky) asi 5x
- 5) Rozpipetujte směs do jednotlivých zkumavek po 18 μ l
- 6) Přidejte po 2 μ l lyzátu a do poslední zkumavky jen vodu

- 7) Zkumavky dobře uzavřete, krátce stočte kapalinu na pikofúze a vložte zkumavky do termocyklu
- 8) Amplifikujte podle následujícího programu pro amplifikaci:

Program pro amplifikaci

Krok	Teplota	Čas
1	37°C	2 min.
2	94°C	15 min.
3	94°C	30 s
4	60°C	30 s
5	72°C	2 min.
6	GO TO 2	29x
7	72°C	2 min.
8	10°C	∞

- 9) Po ukončení amplifikace proveďte elektroforézu v 1% agarózovém gelu podle cvičení 2a.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Christensen H. and Bisgaard M. 2010: Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of *Pasteurellaceae* of veterinary importance. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 123, Heft ½, Seiten 20-30.

Simmon K.E., Croft A.C., Petti C.A. 2006: Application of SmartGene IDNS Software to Partial 16S rRNA Gene Sequences for a Diverse Group of Bacteria in a Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 44(12), 4400-4406.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Limit detekce DNA na transluminátoru je přibližně 5 ng. Kolik cyklů PCR musí proběhnout, aby bylo možno detekovat amplifikační produkt genu pro 16S-rRNA o délce 1 190 bp, jestliže na počátku reakce máte ve směsi pouze jedinou kopii genu?
- 2) *Taq* polymeráza připojuje nukleotidy rychlostí 150 nukleotidů/sekundu. Jak dlouho trvá tomuto enzymu, než syntetizuje fragment o délce 1 190 bp?
- 3) Jaké množství dNTP potřebujete dát minimálně do PCR reakce, abyste měli dostatek stavebního materiálu k amplifikaci fragmentu o délce 1 190 bp (za předpokladu, že

ve fragmentu je rovnoměrné zastoupení všech nukleotidů)? Předpokládejte, že chcete získat 200 ng fragmentu a máte k dispozici zásobní roztok směsi všech čtyř nukleotidů, ve které má každý nukleotid koncentraci 25 mM.

- 4) Jak dlouhý amplicon může vzniknout na níže popsaném úseku DNA (je uveden pouze jeden z komplementárních řetězců) pokud má experimentátor k dispozici následující dvojici primerů?

Primer forward:

5' - ATG TGA GCG GTC TAC TGG - 3'

Primer reverse:

5' - GAT AGC TAG AAT TGA TAG - 3'

Sekvence, na které probíhá amplifikace:

5' - ATG TGA GCG GTC TAC TGG AAA TGC AGT GCA TCA GTC AGC GAT GGG TGA GTC ACC CCC
GTC ACG TCA GAT TCA TGA CTA AGC GTC CGT GCT TGA TCG AGT CTA TCA ATT CTA GCT ATC
ATC ATG GTT GAC ATC - 3'

- 5) Jedna jednotka enzymu *Taq* polymerázy inkorporuje 10 nmol nukleotidů za 30 minut při teplotě 72 °C. Přepočtete tuto hodnotu na počet inkorporovaných nukleotidů za minutu.
- 6) Jestliže frekvence začlenění chybného nukleotidu činí u *Taq* polymerázy 285×10^{-6} , kolikrát může tento enzym chybovat při syntéze 200 ng ampliconu o délce 1 190 bp? Co můžete říct o počtu chybných ampliconů v takovém výsledném vzorku DNA?

Elektroforéza produktů PCR v agarózovém gelu **(cvičení č. 2a)**

Úvodní slovo

Elektroforéza v agarózovém gelu je standardní metoda pro dělení, identifikaci a purifikaci fragmentů DNA. Touto relativně jednoduchou metodou je možné rozdělit i komplexní směsi fragmentů DNA, které nelze rozdělit jinými způsoby, například centrifugací v hustotním gradientu. Kromě toho je při elektroforéze možné přímo sledovat polohu jednotlivých fragmentů a tím stanovit jejich velikost. Díky fluorescenci po „obarvení“ ethidiumbromidem odhadnout i koncentraci DNA.

Princip elektroforézy spočívá v protlačování fragmentů DNA (nebo v principu jakýchkoli jiných makromolekul) rozpuštěných v tekutém prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli molekulovým sítem, který tvoří gel agarózy. Chemická struktura agarózy, to jsou střídající se zbytky D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-laktózy, vzájemně spojené střídavě glykosidickými vazbami β -1-4 a α -1-3.

Elektroforetickou pohyblivost ovlivňuje řada faktorů. Základní silou, která určuje pohyb DNA je skutečnost, že součástí struktury DNA jsou zbytky kyseliny fosforečné, které dávají molekule DNA celkový záporný náboj. Proto DNA putuje ve stejno-směrném elektrickém poli od záporného ke kladnému pólu. Rychlost pohybu DNA v elektrickém poli však není dána velikostí náboje, ale především jejími rozměry. Lineární fragmenty DNA se pohybují rychlostí, která je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Dalším důležitým faktorem je koncentrace agarózového gelu. Čím je vyšší koncentrace agarózy, tím hustší je síť, kterou musí fragmenty DNA procházet. Existují různé komerčně dostupné druhy agaróz, ale obecně platí, že na běžném agarózovém gelu (používají se koncentrace 0,6 % až 3,0 %) lze úspěšně rozdělit fragmenty o velikostech od 100 bp do 20 000 bp (20 kbp). Větší fragmenty vyžadují jiné uspořádání, tzv. pulsní gelovou elektroforézu.

Rovněž konformace DNA má vliv na její pohyb v elektrickém poli. Jinou rychlostí se pohybují kompaktní struktury CCC plasmidové DNA, jinou její OC formy a jinou lineární fragmenty. Kromě toho je elektroforéza ovlivňována intenzitou elektrického pole, složením elektroforetického média (pufru) a teplotou.

V tomto cvičení provedete elektroforézu v 1 % agarózovém gelu, v tris-borátovém pufru, při laboratorní teplotě, při napětí 10 V/cm gelu (optimální je 5 V/cm).

DNA je v gelu detekována po „obarvení“ ethidiumbromidem. Ethidiumbromid, který má planární strukturu, se vmezuje mezi báze v nukleové kyselině. Po ozáření krátkovlnným ultrafialovým zářením fluoreskuje červeným světlem o vlnové délce 590 nm, které je možno zachytit fotografickým zařízením. Ethidiumbromid vmezeřený v DNA září asi 80x intenzivněji než ve volném stavu.

Cíl cvičení

Detekovat amplifikační produkty z předchozích cvičení.

Seznam přístrojů

- váhy s váživostí +/- 0,1 g
- aparatura pro elektroforézu
- mikrovlnná trouba
- sada pipet o objemech 10, 50 a 200 μ l

Příprava gelu

- 1) Připravte 1 litr 0,5x TBE pufru ze základního roztoku 5x TBE.
- 2) Změřte velikost gelu, jehož výška musí být 6 mm.
- 3) Spočítejte objem gelu a navážku agarózy na 2% gel.
- 4) Navážku agarózy vsypte do Erlenmeyerovy baňky o objemu alespoň 2x větším, než je uvažovaný objem gelu.
- 5) Odměřte objem 0,5x TBE pufru a nalijte do Erlenmeyerovy baňky s agarózou.
- 6) Vynulujte váhy s Erlenmeyerovou baňkou.
- 7) Dokonale rozvařte agarózu v mikrovlnné troubě, tzn. za průběžného míchání, přiveďte 3 až 4x k varu. **Pozor na utajený var!**
- 8) Znovu zvažte Erlenmeyerovu baňku s rozvařenou agarózou a úbytek hmotnosti doplňte destilovanou vodou.
- 9) Zchladte rozvařenou agarózu na teplotu 50 až 60 °C (odhadem).
- 10) Přidejte roztok ethidium bromidu (0,15 mg/ml) v množství stanoveném podle objemu gelu. Platí, že množství přidaného objemu roztoku ethidiumbromidu v mikrolitrech musí být stejné jako objem gelu v mililitrech.
- 11) V průběhu zchlazování agarózy upevněte matici pro tvorbu komůrek (hřebínek) do nalévací aparatury. Dolní okraj hřebínku se nesmí dotýkat dna - optimální je výška 1mm nad dnem. Nalévací aparatura musí být umístěna na vodorovné podložce.
- 12) Ochlazenou agarózu nalijte po opatrném, ale důkladném zamíchání do nalévací aparatury, čistou špičkou odstraňte případné bubliny.
- 13) Nechte gel zatuhnout (asi 30 min).
- 14) V průběhu tuhnutí nalijte elektroforetický pufr do elektroforetické vany.
- 15) Po zatuhnutí gelu vložte nalévací aparaturu včetně hřebínku do elektroforetické vany.
- 16) Tahem kolmo vzhůru vyjměte hřebínek.
- 17) Zkontrolujte neporušenost komůrek pro nanášení vzorku.
- 18) Zkontrolujte výšku hladiny pufru nad gelem – musí být alespoň 1mm nad gelem.

Nanesení vzorků, elektroforéza

- 1) Upravte polohu černé fólie pod nanášecí komůrky.
- 2) Do vzorku po provedené PCR napipetujte koncentrovaný nanášecí pufr (6 x GLB) v poměru 5 : 1 (vzorek : 6 x GLB).
- 3) Pipetou naneste 10 μ l směsi do komůrek pod hladinu elektroforetického pufru.
- 4) Připojte elektroforetické kabely k vaně, zasuňte bezpečnostní kryt a připojte kabely ke zdroji - černý kabel k zápornému pólu, červený kabel ke kladnému pólu. Pozor na správnou orientaci vany. **DNA putuje od minus k plus pólu!**
- 5) Proveďte elektroforézu při 10 V/cm gelu.
- 6) Po 5 minutách zkontrolujte průběh elektroforézy, zejména správný směr pohybu detekční barvičky (bromfenolová modř) obsažené v 6 x GLB pufru.

- 7) Poté, co detekční barvička dosáhne asi 2/3 gelu (nebo uběhne předepsaná doba po kterou se má elektroforéza provádět, což je v našem případě asi 30 min), ukončete elektroforézu.
- 8) Odpojte elektrické kabely od zdroje.
- 9) Nasaďte si rukavice.
- 10) Odsuňte bezpečnostní kryt z elektroforetické vany.
- 11) Přeneste gel na UV-transluminátor, proveďte vizuální kontrolu gelu, případně vyfotografujte na dokumentačním zařízení.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Sambrook, J. a Russell, D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Složení roztoků

5 x Tris-borátový pufr (5xTBE pufr)

(0,089M tris-borát/0,089M kyselina boritá/0,002M EDTA)

- 1) Navažte a postupně rozpusťte v 900 ml destilované vody 54 g trishydroxymethyl-aminomethanu a 27,5 g kyseliny borité.
- 2) Přidejte 20 ml 0,5M EDTA (pH 8,0).
- 3) Doplněte objem na 1 000 ml v analytické odměrné baňce.
- 4) Přelijte roztok do 1 000 ml láhve se šroubovacím uzávěrem.
- 5) Skladujte při 4 až 8 °C, při tomto způsobu skladování možno používat 6 měsíců.

Zásobní roztok ethidiumbromidu (10 mg/ml)

Ethidiumbromid je červená krystalická látka. **Je to mutagen a karcinogen, proto je nutné při jakékoli manipulaci s touto látkou nebo roztoky, které ethidiumbromid obsahují, pracovat v rukavicích a dodržovat zásady manipulace s mutageny a karcinogeny !**

- 1) Na analytických vahách navažte 100 mg krystalického ethidiumbromidu do umělohmotné zkuševky s uzávěrem.
- 2) Přidejte 10 ml destilované vody.
- 3) Po rozpuštění ethidiumbromidu skladujte roztok při laboratorní teplotě ve tmě, možno skladovat po dobu 5 let.

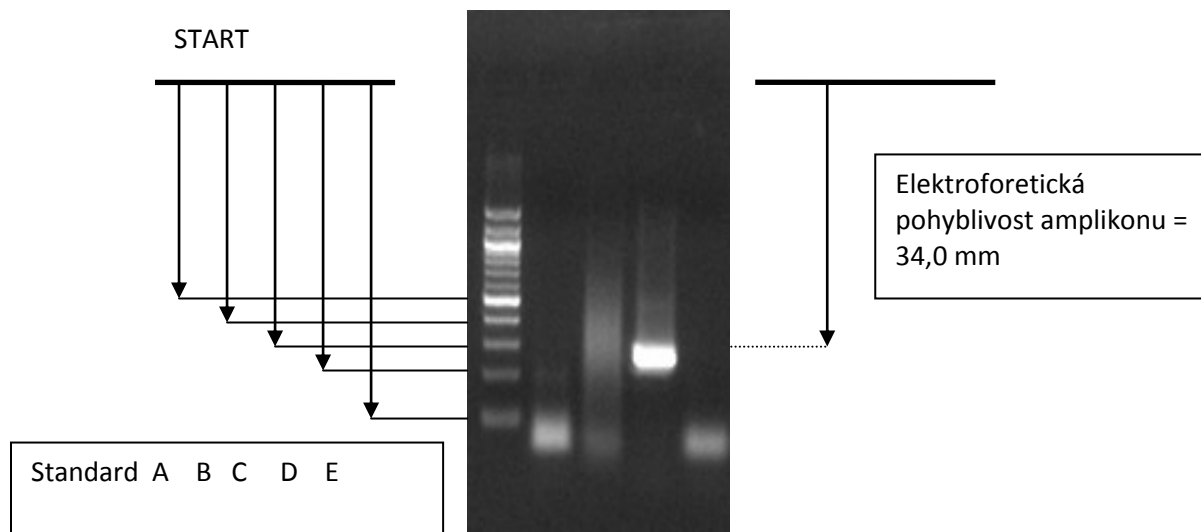
Nanášecí elektroforetický pufr s barvičkou (6 x GLB)

Pufr se připravuje v šestinásobném zahuštění, obsahuje detekční barvičku bromfenolová modř.

- 1) Na analytických vahách navažte 0,5 g bromfenolové modři
- 2) Rozpusťte v 50 ml 1 x TBE pufru.
- 3) Přidejte 50 ml glycerolu.
- 4) Doplněte objem do 200 ml pomocí 1 x TBE pufru v analytické odměrné baňce.
- 5) Sterilizujte v přehřáté páře při 112 °C/30min.
- 6) Část roztoku po 1 ml sterilně rozpipetujte do sterilních 1,5 ml mikrozkuševek.
- 7) Rozpipetované dávky a zbytek uskladněte při 4 až 8 °C, lze skladovat po dobu 10 let.

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Závislost velikosti DNA na elektroforetické pohyblivosti není lineární. V určitém zjednodušení může být vyjádřena logaritmickou funkcí. Stanovte délku amplifikačního produktu z obrázku výsledné elektroforézy.



Velikost standardů	Elektroforetická pohyblivost
A = 500 bp	29,0 mm
B = 400 bp	32,5 mm
C = 300 bp	35,5 mm
D = 200 bp	38,0 mm
E = 100 bp	45,0 mm

Návod řešení:

Vyneste hodnoty přirozeného logaritmu velikosti standardů a elektroforetické pohyblivosti do grafu a z něho pak odečtěte velikost amplikonu.

$$N = \ln X$$

kde

N = elektroforetická pohyblivost v cm

X = velikost DNA fragmentu v bp

- 2) Jaká je výsledná koncentrace ethidiumbromidu ve vámi připraveném agarózovém gelu?
- 3) Kolik ml zásobního roztoku ethidiumbromidu (10 mg/ml) použijete pro přípravu 100 ml roztoku o koncentraci 0,15 mg/ml?

Purifikace produktů PCR (cvičení č. 2b)

Úvodní slovo

Během PCR reakce vznikají v malém množství i nespecifické amplikony. Pro některé aplikace (*in vitro* translace, klonování) je nutné získat potřebné úseky DNA ve velmi čisté podobě, bez příměsí nespecifických amplikonů a v roztoku, který by neinhiboval následné reakce. Po rozdělení produktů takové PCR reakce v agarózovém gelu je možné požadovaný fragment DNA (amplikon) z gelu vyříznout a izolovat ho.

PCR produkty se používají také k sekvenování. I v tomto případě je vhodné amplikony purifikovat a zbavit je přebytečných solí, zbytků polymerázy, nespotřebovaných nukleotidů a primerů. Pokud při PCR nevznikají nespecifické produkty, je purifikace jednodušší, není zapotřebí elektroforézy a vyřezávání amplikonů z gelu.

K výše uvedeným purifikačním procesům (vyčištění PCR směsi nebo izolace amplikonů vyřezaných z gelu) byly vyvinuty komerčně dostupné soupravy, které to umožňují. Základem je pufr, který rozpustí agarózu a uvolní tak DNA do roztoku. Z roztoku je pak DNA vyvázána na silikagel a zachycena na filtr „chromatografické“ kolonky. Následuje promytí kolonky, které je spojeno s odstraněním všech kontaminujících látek a eluce čisté DNA do požadovaného roztoku. Takto izolovaný PCR fragment je velmi čistý, bez přítomnosti nespecifických produktů a solí.

Cíl cvičení

Izolovat PCR amplikon z roztoku nebo z gelu pro účely sekvenování

Seznam přístrojů

- sada pipet o objemech 10, 100 a 1000 μ l
- suchý termoblok
- centrifuga na 1,5 ml mikrozkušavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)

Vlastní pracovní postup

K purifikaci použijeme některou z komerčně dostupných souprav a budeme postupovat přesně podle návodu výrobce. Návod je veden v anglickém jazyce a studenti tak budou mít možnost zdokonalit se v porozumění psaného odborného textu.

Získané produkty prověří studenti elektroforézou v agarózovém gelu v následujícím cvičení.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Sambrook, J. a Russell, D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Manuály společnosti QIAGEN (Germany)

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Spočítejte, jaké přetížení působí na dně zkumavky na materiál, jestliže jste na vaší centrifuze použili maximální otáčky, tj. 14 000 rpm. Poloměr rotoru je 7 cm.

Elektroforéza purifikovaných produktů PCR, kvantifikace, příprava pro sekvenování **(cvičení č. 3a)**

Úvodní slovo

Poznámky k agarózové elektroforéze jsou uvedeny ve cvičení č. 2a

Cíl cvičení

Provést kontrolu purifikace produktů PCR, odhadnout koncentraci produktu a připravit vzorek k odeslání komerční firmě pro účely sekvenování

Seznam přístrojů

- pomůcky k elektroforéze podle cvičení č. 2a
- UV spektrofotometr podle cvičení 4a
- pikofuga na 1,5 ml mikrozkuřavky s otáčkami do 6 000 rpm

Vlastní pracovní postup

Elektroforéza a odhad koncentrace

- 1) Provedeme elektroforézu malého množství PCR produktu ze cvičení 2b
- 2) Součástí nanášených vzorků bude i vhodný kvantifikační standard, který umožní odhad koncentrace DNA

Kvantifikační standard je sériově naředěná směs různě dlouhých fragmentů dsDNA o známé koncentraci. Odhad koncentrace se provádí porovnáním intenzity fluorescence fragmentu kvantifikačního standardu s intenzitou fluorescence purifikovaného PCR produktu. Hodnota je ovšem velmi orientační a nelze jí nahradit spektrofotometrií nebo fluorometrií. Nicméně v některých případech může být pro další manipulace s DNA dostačující.

Příprava vzorku pro sekvenování

- 1) Purifikovaný amplikon nezaměnitelně označíme, uvedeme informaci o stanovené koncentraci DNA a vložíme do transportního sáčku – poštovní obálky
- 2) Na stránkách společnosti Macrogen (<http://dna.macrogen.com/eng/>) se seznámíme s nabídkou firmy týkající se sekvenování, způsoby sekvenování, objednávání a odesílání vzorků na sekvenování. O zjištěných skutečnostech sepíšeme krátkou zprávu. Rovněž zjistíme, na jakou adresu odešleme naše vzorky a co dalšího ještě musíme vložit do obálky.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Sambrook, J. a Russell, D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Internetové stránky společností Macrogen (<http://dna.macrogen.com/eng/>) a Generi-Biotech (<http://www.generi-biotech.com>)

Analýza výsledku sekvenování (cvičení č. 3b)

Úvodní slovo

Toto cvičení je přímým pokračováním cvičení č. 1. Pro druhové zařazení může postačovat sekvence části genu pro 16S rRNA. Ověření a přesnější klasifikace lze dosáhnout porovnáním sekvencí více genů v databázi. Pro účely klasifikace vybraných zástupců čeledi *Pasteurellaceae* jsme zvolili kromě genu pro 16S rRNA provozní geny *rpoB* a *infB*.

Sekvenování se provádí z jednoho z primerů pro sekvenování nebo lze navrhnout vhodnou sekvenci uvnitř ampliconu. V našem případě je takovou sekvencí primer 810R, který leží uvnitř ampliconu získaného amplifikací genu pro 16S rRNA. Nepoužívá se primer amplifikační (1194R). Přehled amplifikačních a sekvenačních primerů je uveden v této tabulce:

Gen	Primer	Účel	Sekvence	Citace
16S rRNA	5F	A, S	5'- TTG GAG AGT TTG ATC CTG GCT C - 3'	Simmon et al. 2006
	1194R	A	5'- ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC - 3'	Simmon et al. 2006
	810R	S	5'- GGC GTG GAC TTC CAG GGT ATC T - 3'	Simmon et al. 2006
<i>rpoB</i>	PasrpoB-L	A, S	5'- GCA GTG AAA GAR TTC TTT GGT TC - 3'	Korczak et al. 2004
	RpoB-R	A, S	5'- GTT GCA TGT TNG NAC CCA T - 3'	Korczak et al. 2004
<i>infB</i>	infB-F1241	A, S	5'- CCT GAC TAY ATT CGT AAA GC - 3'	Christensen et al. 2004
	infB-R1727	A, S	5'- GTA GCA ACC GGA CCA CGA CCT TTA T - 3'	Christensen et al. 2004

A = amplifikace, S = sekvenování

Délka ampliconu z genu pro 16S rRNA je přibližně 1 190 bp

Délka ampliconu z genu pro *rpoB* je přibližně 558 bp

Délka ampliconu z genu pro *infB* je přibližně 486 bp

Pro porovnávání námi získaných sekvencí s celosvětovou databází použijeme algoritmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), který je v současnosti asi nejrozšířenějším heuristickým algoritmem, který umožňuje prohledávat rozsáhlé databáze. Pro účely srovnávání nukleotidových DNA sekvencí bakterií je nejvhodnější využít databáze BLASTN. Po seznámení se s vzhledem příslušných www stránek zvolíme nastavení default, je ale možné zvolit vlastní parametry prohledávání.

Cíl cvičení

Analyzovat výsledky sekvenování

Seznam přístrojů

Toto je pouze teoretické cvičení, potřebovat budete pouze záznamy o sekvenování a výsledné protokoly

Analýzy provedete s využitím volně dostupných internetových nástrojů

Jediným přístrojem pro toto cvičení je počítač napojený na internet

Vlastní pracovní postup

- 1) Stáhněte si v elektronické formě "Záznamy o sekvenování", vyberte si 3 záznamy k libovolnému vzorku označenému čísly 22 až 44**
- 2) Vyžádejte si od vyučujícího "Výsledné protokoly ze sekvenování"**
- 3) Zkontrolujte a opravte sekvence**
 - 1) Prohlédněte si záznamy sekvencí jednotlivých genů a vyhledejte ty nukleotidy, které nejsou dobře čitelné.
 - 2) Opravte v záznamu software neurčené nukleotidy, případně vyřadte ty, které jsou nečitelné.
 - 3) Zkontrolujte, jestli na záznamu dokážete najít jeden z primerů, které byly použity k amplifikaci. Je to ten druhý primer než ten, který byl použit pro sekvenování.
 - 4) Zkontrolujte, jak dlouhý je získaný sekvenační záznam oproti délce amplikonu.
 - 5) Vyznačte v sekvenci celistvý úsek, který už po opravě neobsahuje žádné nečitelné nebo špatně čitelné nukleotidy.
- 4) Prohledejte databázi a zařaďte výsledky**
 - 6) Vyhledejte prohlédávač označovaný jako BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
 - 7) Vložte sekvenci celistvého úseku do prohlédávače.
 - 8) Vyčkejte, až program provede porovnání vaší sekvence s databází.
 - 9) Odečtěte výsledek a zaznamenejte nejpravděpodobnější zařazení druhu do vyhodnocovací tabulky.
 - 10) Postupně proveďte vyhledání a zařazení podle všech tří sekvencí, genů pro 16S rRNA, *rpoB* a *infB*.
 - 11) Určete, o jaký druh bakterie se nejspíš jednalo.
 - 12) Porovnejte svůj výsledek s tabulkou, ve které jsou uvedeny výsledky zařazující bakterie podle biochemických charakteristik

Vzor vyhodnocovací tabulky

Vzorek č.	Zařazení podle			Závěr
	16S rRNA	<i>rpoB</i>	<i>infB</i>	
22				
24				
30				
33				
35				
36X				
37X				
38				
40				
41				
42				
43				
44				
45	<i>Gallibacterium anatis</i> (<i>Actinobacillus sp.</i>)	<i>Gallibacterium anatis</i>	<i>Gallibacterium anatis</i>	<i>Gallibacterium anatis</i>

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Cvrčková, F. 2006: Úvod do praktické bioinformatiky. Academia, Praha.

Šmarda et al. 2005: Metody molekulární biologie, Masarykova Universita, Brno

Simmon K.E., Croft A.C., Petti C.A. 2006: Application of SmartGene IDNS Software to Partial 16S rRNA Gene Sequences for a Diverse Group of Bacteria in a Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 44(12), 4400-4406.

Korczak B., Christensen H., Emler S., Frey J., Kuhnert P. (2004): Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1393-1399.

Christensen H., Kuhnert P., Olsen J.E., Bisgaard M. (2004): Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1601-1609.

Izolace bakteriální DNA z *Escherichia coli* (cvičení č. 4a)

Úvodní slovo

Obecný postup izolace bakteriální DNA sestává ze čtyř základních kroků:

- Růstu kultury a sedimentace buněk
- Rozbití buněk a jejich obsahu
- Zpracování buněčného extraktu – odstranění všeho kromě DNA
- Zahuštění výsledného roztoku

Nízkomolekulární relativně znečištěnou DNA jsme izolovali jako hrubý lyzát buněk v úloze č. 1. Analýza bakteriálních genů však vyžaduje často izolaci i vysokomolekulární genomové DNA, která musí být kromě toho získána ve vysoké čistotě. V současné době je na trhu k dispozici celá řada výtečných komerčních souprav, které jsou pro mikrobiologa metodou první volby. Teprve když komerční souprava nedokáže poskytnout dostatečně kvalitní izolát pro analýzu, je třeba sáhnout do teorie a zajistit s pomocí dostupné literatury nebo konzultace s molekulárním biologem jinou metodu.

Principem soupravy, kterou budeme v této úloze používat, je lyze buněk aniontovým detergentem v přítomnosti DNA stabilizátoru. Stabilizátor inhibuje aktivitu vnitrobuněčných DNáz a také DNáz, které by se mohly do izolovaného materiálu dostat z vnějšího prostředí. RNA je ze vzorku odstraněna působením RNázy. Další kontaminanty, např. proteiny, jsou odstraněny precipitací v roztoku s vysokou koncentrací solí. Genomová DNA je získána precipitací v alkoholu a precipitát je rozpuštěn v roztoku 1mM EDTA/10 mM Tris.Cl pH= 7,5. Izolovaná DNA by měla mít poměr absorbance A260/A280 mezi 1,7-1,9.

Cíl cvičení

Izolovat genomovou DNA bakterie *Escherichia coli* komerční soupravou

Seznam přístrojů

- vodní lázeň nebo suchý blok
- třepačka Vortex
- centrifuga na 1,5 ml mikrozkuřavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)
- pikofúga na 1,5 ml mikrozkuřavky s otáčkami do 6 000 rpm
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 μ l
- stopky

Vlastní pracovní postup

K izolaci použijeme některou z komerčně dostupných souprav a budeme postupovat přesně podle návodu výrobce. Návod je veden v anglickém jazyce a studenti tak budou mít možnost zdokonalit se v porozumění psaného odborného textu.

Prvním krokem izolace bude stanovení počtu bakterií ve vzorku. Pro *Escherichia coli* platí, že při vlnové délce 600 nm hodnota optické hustoty $OD_{600} = 1$ odpovídá asi 8×10^8 buněk/ml. Předpokládejme dále, že je závislost počtu buněk na OD_{600} lineární.

Koncentraci a čistotu izolované DNA proměříme spektrofotometricky ve cvičení č. 4b.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Marmur, J. 1961: A procedure for isolation of DNA from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3, 208-218. Jedná se o první článek, ve kterém jsou popsány základní principy izolace DNA.

Sambrook, J. a Russell, D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Manuál společnosti QIAGEN (Germany)

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jakou hmotnost má chromozóm *Escherichia coli*, u něhož bylo zjištěno celkem 4×10^6 párů nukleotidů? Průměrná molekulová hmotnost jednoho bp je 650.
- 2) Jestliže máte koncentraci *Escherichia coli* v suspenzi 8×10^8 buněk/ml, jaké maximální množství DNA můžete teoreticky izolovat ze 2 ml této suspenze?
- 3) Kolik molekul chromozómu *Escherichia coli* by bylo obsaženo v 1 μg DNA?
- 4) Jak dlouhý je v lineárním stavu chromozóm *Escherichia coli*? Připomeňme si, že vzdálenost mezi dvěma páry bazí je 0,34 nm.
- 5) Doplňte následující tabulku týkající se genomové DNA různých organismů

Organismus	Velikost DNA (bp)	Molekulová hmotnost	Hmotnost 1 molekuly	Počet molekul v 1 g
<i>Escherichia coli</i>	$4,0 \times 10^6$			
Bakteriofág λ	48 514			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,6 \times 10^7$			
Člověk	$3,2 \times 10^9$			

Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky **(cvičení č. 4b)**

Úvodní slovo

Rychlou a jednoduchou metodu stanovení koncentrace nukleových kyselin představuje proměření spektra v rozsahu 230 až 320 nm. Báze v nukleových kyselinách mají absorpční maximum při 260 nm. Obecně platí, že pokud je hodnota absorbance A_{260} v 1 cm kyvetě rovná 1,0, je koncentrace dvouřetězcové DNA v kyvetě 50 µg/ml. Pro jednořetězcovou DNA a RNA platí hodnota 38 µg/ml. Čistota DNA je nejčastěji odhadována na základě poměru absorbancí při různých vlnových délkách. Pro čistou DNA platí poměr:

$$A_{260}/A_{280} = 1,80$$

Tento parametr je nejdůležitější a v běžné praxi nejčastěji používaný. Pokud je hodnota jiná než 1,80, pak je vzorek DNA kontaminován proteiny nebo RNA.

Druhý poměr, který je vhodné sledovat je

$$A_{260}/A_{230} > 2,00$$

Pokud je tento poměr pod 2,00, pak není izolát čistý a obsahuje zbytky roztoků z izolační soupravy. Poměr A_{260}/A_{230} nesmí přesáhnout hodnotu 3,00.

Cíl cvičení

Stanovit koncentraci a posoudit čistotu izolované bakteriální DNA

Seznam přístrojů

- UV-VIS spektrofotometr
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 µl

Vlastní pracovní postup

- 1) Zapněte spektrofotometr.
- 2) Do kyvety napipetujte 100 µl roztoku AE (eluční pufr ze cvičení č. 1) a proveďte nastavení nulového pozadí (tzv. blank).
- 3) DNA izolovanou ve cvičení č. 1 naředte 10x tak, že k 10 µl DNA napipetujte 90 µl roztoku AE.
- 4) Naředěnou DNA napipetujte do kyvety a změřte hodnoty absorbance při 230, 260 a 280 nm.

- 5) Je-li naměřená hodnota A_{260} mimo hodnoty 0,1 až 0,3, opakujte ředění vzorku DNA. Jen v rozsahu hodnot 0,1 až 0,3 je závislost koncentrace na absorbanci lineární a naměřené hodnoty jsou přesné.
- 6) Vyhodnoťte dosažené výsledky.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Manchester, K. L. 1995: Calue of $A_{260/280}$ ratios for measurements of purity of nucleic acids. *BioTechniques* 19, 208-219.

Sambrook, J. a Russell, D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Kolik μl vzorku DNA nanese do reakce, potřebujete-li 2 ng a máte k dispozici roztok DNA o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$?
- 2) Kolik molekul DNA plasmidu pCR2.1 o velikosti 3 900 bp je obsaženo ve 100 μl vzorku o koncentraci DNA 50 $\mu\text{g/ml}$?
- 3) Kolikrát musíte naředit roztok DNA o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, aby byla jeho absorbance při 260 nm rovna hodnotě 0,2?
- 4) Kolik ředícího roztoku přidáte do 30 μl vzorku DNA o koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$ tak, aby koncentrace DNA po zředění klesla na 15 $\text{ng}/\mu\text{l}$?
- 5) Kolik molekul plasmidové DNA o velikosti 50 000 bp obsahuje 100 μl roztoku, u něhož byla hodnota absorbance při 260 nm po 10 násobném zředění rovna 0,15?

Izolace genomové DNA z biologického materiálu (cvičení č. 5a)

Úvodní slovo

Chlamydia trachomatis jsou gramnegativní bakterie, které parazitují uvnitř vnímavých buněk sliznic. Jedná se o jednoho ze tří původců chlamydiózy. *Chlamydia trachomatis* se přenáší pohlavním stykem a může u mužů i u žen způsobit vážné zdravotní komplikace. Předpokládá se, že ročně je chlamydiemi infikováno asi 90 milionů lidí.

Laboratorně se chlamydie vyšetřují již od počátku 80. let minulého století. Zpočátku byly chlamydie stanovovány cytologicky a tento test byl doplněn kultivací na buněčných kulturách. V 80. a 90. letech pak byly vyvinuty komerční soupravy na detekci antigenů a později i nukleových kyselin.

Klinické vzorky, které se používají k detekci chlamydií, jsou stěry z různých tělesných částí nebo tělní tekutiny, jak je uvedeno v tabulce. V tabulce jsou taky uvedeny doporučené diagnostické metody podle typu vzorku, všimněte si, že metoda stanovení z DNA je univerzální pro všechny typy vzorků.

Vzorek	Diagnostická metoda				
	Mikroskopie	Kultivace	Imunoanalýza	Hybridizace	PCR
Spojivkový	+	+	+	+	+
Nasofaryngeální	-	+	-	-	+
Cervikální	-	+	+	+	+
Uterální	-	+	+	+	+
Rektální	-	-	-	-	+
Poševní	-	-	-	-	+
Vaginální	-	-	-	-	+
Introitální	-	-	-	-	+
Moč	-	-	-	-	+
Lymfatický	-	+	-	-	+
Semeno	-	-	-	-	+

V praxi nepoužijeme přímo klinický materiál, ale vzorky imitující moč obohacené umělou DNA, obsahující část sekvence genomu *Chlamydia trachomatis*. Přesto budeme ke vzorkům přistupovat jako k potenciálně nebezpečnému klinickému materiálu a budeme dodržovat příslušné bezpečnostní předpisy a pravidla bezpečnosti práce.

Izolovanou DNA použijeme pro metodu polymerázové řetězové reakce ve standardním systému a v modifikaci real-time PCR.

Cíl cvičení

Izolovat genomovou DNA bakterie *Chlamydia trachomatis* komerční soupravou z klinického materiálu.

Seznam přístrojů

- vodní lázeň nebo suchý blok
- třepačka Vortex

- centrifuga na 1,5 ml mikrozkuřavky s otáčkami do 14 000 rpm (20 000 g)
- pikofuga na 1,5 ml mikrozkuřavky s otáčkami do 6 000 rpm
- sada pipet o objemech 20, 200 a 500 μ l
- stopky

Vlastní pracovní postup

K izolaci použijeme některou z komerčně dostupných souprav a budeme postupovat přesně podle návodu výrobce. Návod je veden v anglickém jazyce a studenti tak budou mít možnost zdokonalit se v porozumění psaného odborného textu.

Koncentraci a čistotu izolované DNA proměříme spektrofotometricky ve cvičení č. 4b.

Pak provedeme vlastní detekci metodou PCR ve cvičeních 5a a 5b.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Marmur, J. 1961: A procedure for isolation of DNA from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3, 208-218. Jedná se o první článek, ve kterém jsou popsány základní principy izolace DNA.

Sambrook, J. a Russell, D. 2001: Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Manuál společnosti QIAGEN (Germany)

Chernesky, M.A. 2005: The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 16(1):39-44.

<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Chlamydia>

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jakou hmotnost má chromozóm *Chlamydia trachomatis*, u něhož bylo zjištěno celkem 1 042 519 párů nukleotidů? Průměrná molekulová hmotnost jednoho bp je 650.
- 2) Kolik molekul chromozómu *Chlamydia trachomatis* by bylo obsaženo v 1 μ g DNA?
- 3) Jak dlouhý je v lineárním stavu chromozóm *Chlamydia trachomatis*? Připomeňme si, že vzdálenost mezi dvěma páry bazí je 0,34 nm.
- 4) Kolik párů nukleotidů bylo nalezeno u *Ch. pneumoniae*?
- 5) Kolik strukturních genů bylo popsáno u *Chlamydia trachomatis*, porovnejte s *Ch. pneumoniae*?
- 6) V kolika genech se oba druhy liší/shodují?

Detekce *Chlamydia trachomatis* metodou PCR (end-point) **(cvičení č. 5b)**

Úvodní slovo

Souprava, se kterou budete ve cvičení pracovat je určena k detekci chromozomální DNA bakterie *Chlamydia trachomatis* na principu amplifikace sekvence vícekopiového genu pro 16S RNA metodou polymerázové řetězové reakce. Detekční souprava využívá technologii “hot start”, která minimalizuje nespecifické reakce a zajišťuje maximální citlivost reakce. Součástí MasterMixu je jako stavební komponenta DNA nukleotid dUTP a enzym uracil-DNA-glykosyláza (UDG), který umožňuje odstranění případných kontaminací produkty amplifikace.

Souprava obsahuje tzv. “interní kontrolu”, která je komponentou „MasterMixu“; interní kontrola je určena ke kontrole inhibice PCR.

Cíl cvičení

Provést detekci *Chlamydia trachomatis* ve vzorcích ze cvičení 5a polymerázovou řetězovou reakci metodou end-point PCR

Seznam přístrojů

- termocykler
- PCR box
- sada pipet o objemech 2, 20, 200 a 500 μ l
- stojánky na zkumavky a PCR zkumavky

Vlastní pracovní postup

Namíchání reakce

Všechny kroky je možno provádět při laboratorní teplotě

- 1) Nechejte rozpustit MasterMix po dobu asi 5 minut a poté promíchejte několikerým, ale opatrným převrácením zkumavky
- 2) Rozpipetujte MasterMix po 36 μ l do PCR zkumavek
- 3) Přidejte po 4 μ l izolované DNA
- 4) Do samostatné zkumavky přidejte 4 μ l pozitivní kontroly
- 5) Výsledný objem reakčních směsí je 40 μ l
- 6) Uzavřete PCR zkumavky, krátce zcentrifugujte veškerou tekutinu ke dnu, vložte do termocyklu a proveďte amplifikaci

Amplifikace

Proces	Teplota	Čas
Opracování UDG	37°C	2 min.
Aktivace reakce	95°C	15 min.
PCR	opakovat 45x	
Denaturace	95°C	20 s
Annealing	58°C	20 s
Polymerace	72°C	40 s
Finalizace		
Konečná extenze	72°C	2 min.
Zchlazení	12°C	nekonečno

Vyhodnocení

Provedete elektroforézou ve 2% agarózovém gelu postupem podle cvičení č. 2a. Specifický amplikon pro *Chlamydia trachomatis* má velikost 300 bp, interní kontrola pak 600 bp.

	Specifický amplikon	Interní kontrola	Výsledek
Pozitivní kontrola	ANO	ANO	POZITIVNÍ
	ANO	NE	POZITIVNÍ
Negativní kontrola	NE	ANO	NEGATIVNÍ
Vzorek	ANO	ANO	POZITIVNÍ
	ANO	NE	POZITIVNÍ
	NE	ANO	NEGATIVNÍ
	NE	NE	NEHODNOTITELNÝ

V protokolu řádně popište elektroforetický záznam a vypracujte tabulku, ve které uvedete výsledky pro jednotlivé vzorky

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Persing (2011): Molecular Microbiology - second edition, ASM Press , Washington, D.C.

Manuál dodavatele detekční soupravy

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Limit detekce DNA na transluminátoru je přibližně 5 ng. Kolik cyklů PCR musí proběhnout, aby bylo možno detekovat amplifikační produkt o délce 300 bp, jestliže na počátku reakce máte ve směsi pouze jedinou kopii genu pro 16S *Chlamydia trachomatis*?
- 2) *Taq* polymeráza připojuje nukleotidy rychlostí 150 nukleotidů/sekundu. Jak dlouho trvá tomuto enzymu, než nasyntetizuje fragmenty o délce 300 a 600 bp?
- 3) Jedna jednotka enzymu *Taq* polymerázy inkorporuje 10 nmol nukleotidů za 30 minut při teplotě 72 °C. Přepočtete tuto hodnotu na počet inkorporovaných nukleotidů za minutu.
- 4) Jestliže frekvence začlenění chybného nukleotidu činí u *Taq* polymerázy 285×10^{-6} , kolikrát může tento enzym chybovat při syntéze 200 ng ampliconu o délce 600 bp? Co můžete říct o počtu chybných ampliconů v takovém výsledném vzorku DNA?

Detekce *Chlamydia trachomatis* metodou real-time PCR

(cvičení č. 6)

Úvodní slovo

Souprava, se kterou budete ve cvičení, zaciňuje stejný gen a má stejné použití jako ta, která byla použita ve cvičení 5b, ale obsahuje kromě sady primerů i TaqMan sondy umožňující detekci produktů PCR v reálném čase. Souprava není určena ke kvantitativnímu stanovení, ale pouze k detekci přítomnosti genomu *Chlamydia trachomatis*. Přesto je možné na základě získaných hodnot Ct odhadnout množství genomů, které byly přítomny ve vzorku na počátku.

Výhodou této metody je, že nevyžaduje žádnou post-PCR detekci, výsledek je hodnotitelný přímo ze záznamu o průběhu reakce. Odpadá tak mimo jiné možnost kontaminace vzorků amplikony z předchozích reakcí, což je častým problémem u metod, kdy detekce amplikonů probíhá po ukončení PCR na elektroforéze.

Cíl cvičení

- 1) Vyhodnotit amplifikaci ze cvičení 5b standardní gelovou elektroforézou
- 2) Provést detekci *Chlamydia trachomatis* ve vzorcích ze cvičení 5a polymerázovou řetězovou reakci metodou real-time PCR

Seznam přístrojů

- termocykler
- PCR box
- sada pipet o objemech 2, 20, 200 a 500 μ l
- stojánky na zkumavky a PCR zkumavky

Vlastní pracovní postup

Namíchání reakce

Všechny kroky je možno provádět při laboratorní teplotě

- 1) Nechejte rozpustit MasterMix po dobu asi 5 minut a poté promíchejte několikerým, ale opatrným převrácením zkumavky
- 2) Rozpipetujte MasterMix po 30 μ l do PCR zkumavek
- 3) Přidejte po 10 μ l izolované DNA
- 4) Do samostatné zkumavky přidejte 10 μ l PK
- 5) Výsledný objem reakčních směsí je 40 μ l
- 6) Uzavřete PCR zkumavky, krátce zcentrifugujte veškerou tekutinu ke dnu, vložte do termocyklu a provedte amplifikaci

Amplifikace

Program pro amplifikaci:

Proces	Teplota	Čas
Opracování UDG	37°C	2 min.
Aktivace reakce	95°C	15 min.
PCR	opakovat 45x	
Denaturace	95°C	5 s
Annealing	60°C	40 s
Polymerace	72°C	20 s

Vyhodnocení

	Kanál FAM/Sybr	Kanál JOE/HEX	Výsledek
Pozitivní kontrola	ANO	ANO	POZITIVNÍ
	ANO	NE	POZITIVNÍ
Negativní kontrola	NE	ANO	NEGATIVNÍ
Vzorek	ANO	ANO	POZITIVNÍ
	ANO	NE	POZITIVNÍ
	NE	ANO	NEGATIVNÍ
	NE	NE	NEHODNOTITELNÝ

K protokolu doložte záznam z real-time PCR a vypracujte tabulku s výsledky pro jednotlivé izoláty

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

Persing (2011): Molecular Microbiology - second edition, ASM Press , Washington, D.C.

Manuál dodavatele detekční soupravy

Kontrolní otázky a příklady

1) Popište základní princip kvalitativního a kvantitativního stanovení genotypu pomocí real-time PCR

Izolace DNA z kvasinek, gelová elektroforéza, PCR ITS regionu pro odlišení komplexu *Saccharomyces sensu stricto*

(cvičení č. 7)

Úvodní slovo

Identifikace kvasinek, a to nejen rodu *Saccharomyces*, pomocí běžných mikrobiologických a biochemických testů je často nepřesná a nedostatečná, neboť testy mohou být ovlivněny kultivačními podmínkami a jednotlivé rodu či druhy poskytují shodné či variabilní výsledky. Proto se, jako i u bakterií, stále více používá analýza sekvencí některých evolučně konzervativních genů či oblastí na DNA. U bakterií je to především gen pro 16S rRNA, u kvasinek potom oblast ITS (Internal Transcribed Spacer), která se nachází mezi podjednotkami genů pro rDNA, 18S, 5,8S a 26S. Po gelové elektroforéze rozlišíme rody, případně druhy na základě odlišné délky, případně jiného restriktivního profilu při použití RFLP. V některých případech je analýzy dále nutno doplnit, např. NTS region (Non-Transcribed Spacer), RFLP mtDNA, amplifikace genů charakteristických pouze pro daný rod/druh, atd.

Při izolaci DNA u kvasinek je nejprve nutné odstranit buněčnou stěnu, která má odlišné vlastnosti než buněčná stěna bakterií. Metodicky je nejvýhodnější připravit protoplasty nebo sferoplasty. Po jejich narušení - rozbití se již při izolaci DNA postupuje klasickou fenol-chloroformovou metodou. Pro odstranění RNA použijeme enzym RNázu, pro přečištění DNA izopropanol. O čistotě, množství DNA a odstranění RNA se přesvědčíme gelovou elektroforézou (viz. cvičení č. 2a).

Pro amplifikaci ITS regionu použijeme naši izolovanou DNA a komerční směs PPP Master-mix (Top-Bio, ČR), která obsahuje komponenty potřebné pro PCR. Produkty PCR ověříme gelovou elektroforézou – 1% gel (viz. cvičení 1 a 2a) a následně přečistíme a můžeme použít pro restrikci enzymem *HaeIII* či pro sekvenaci.

Cíl cvičení

Cílem cvičení je osvojit si techniku fenol-chloroformové extrakce DNA, získat čistou DNA v dostatečném množství, která bude následně použita pro PCR. Po přečištění je možné se získanými PCR produkty dále pracovat - sekvenace, RFLP.

Seznam přístrojů

- termostat
- třepačka
- sada pipet o objemech 20, 200 a 1000 µl
- termocykler
- centrifuga
- váhy
- aparát pro elektroforézu

Vlastní pracovní postup

1. Izolace DNA

Příprava suspenze kvasinek pro izolaci DNA

Do 5 ml YPD bujónu (2 % kvasničný extrakt, 1 % pepton, 2 % dextróza; pH 8,0) ve zkumavkách se zaočkuje 1 kolonie kultury a kultivace probíhá při teplotě 28°C, 48-72 hod za intenzivního třepání.

Lyze buněk

- 1) Centrifugace kultury kvasinek (množství buněk cca $1-2 \times 10^8$ buněk / ml) 4000 rpm, 4°C, 10 min, pelet následně resuspendujte v 10 ml 0,1 M EDTA (pH 7,5) a poté znovu zcentrifugujte
- 2) Sediment resuspendujte v 1 ml roztoku pro sféroplasty (0,9 M sorbitol; 0,1 M EDTA; 50 mM dithiothreitol; pH 7,5)
- 3) Přidejte 50 μ l lytikázy (výsledná koncentrace 500 U / ml), suspenze je inkubována při teplotě 37°C přibližně 60 min (do vzniku viskózní a projasněné suspenze). Asi po 10 min. suspenzi protřepávejte
- 4) Přidejte 240 μ l 0,5 M EDTA (pH 8) a 25 μ l proteinázy K (výsledná koncentrace EDTA 0,1 M a proteinázy K 0,2 mg / ml), následuje inkubace 5 min při teplotě 37°C
- 5) Pro dokončení lyze buněk se k suspenzi přidá 150 μ l 10 % SDS; inkubace při teplotě 37°C/10 min

Purifikace chromozomální DNA

- 1) Buněčný lyzát smíchejte se 750 μ l nasyceného a neutralizovaného fenolu, promíchejte 10 min
- 2) Přidejte 750 μ l směsi chloroform/izoamylalkohol (24:1) a míchejte 5 min
- 3) Centrifugace 4000 rpm, 4°C, 10 min - oddělení vodné a organické fáze se zbytky buněk
- 4) Horní vodnou fázi, obsahující nukleové kyseliny, odpipetujte plastovou špičkou s ustříhlým okrajem do nové zkumavky. Přidejte 1,5 ml směsi chloroform/izoamylalkohol a směs míchejte po dobu 5 min
- 5) Po centrifugaci (4000 rpm, 4°C, 10 min), opět zkrácenou špičkou, odeberte horní vodnou vrstvu (hrubý extrakt nukleových kyselin) do nové zkumavky
- 6) Jako kontrolní vzorek odeberte 20 μ l a smíchejte s 5 μ l vkladacího pufru
- 7) Přidejte 20 μ l RNázy A do směsi nukleových kyselin a inkubujte 15 min při teplotě 37°C
- 8) Odeberte 20 μ l vzorku, smíchejte s 5 μ l vkladacího pufru (kontrola odstranění RNA)

Přesrážení hrubého extraktu DNA

- 1) K hrubému extraktu DNA přidejte izopropanol (v poměru 1:0,7; např. 900 µl extraktu + 630 µl izopropanolu), směs inkubujte 10 min při teplotě -20°C
- 2) Centrifugace 12000 rpm, 4°C, 10 min; opatrně odpipetujte supernatant
- 3) DNA na dně zkumavky je vysušena při pokojové teplotě, poté přidejte 50 µl TE pufru. Takto se nechá přes noc rozpouštět v chladničce (4°C), kde je DNA i dále uchovávána

2. Gelová elektroforéza (kontrola DNA, odstranění RNA)

- 1) Připravte 1 % agarózový gel (viz. Cvičení 2a)
- 2) Na gel naneste 5 µl DNA markeru (Gene Ruler DNA Ladder Mix 100 – 10 000bp, Fermetas), 10 µl hrubého lyzátu před a po přidání RNázy a 2 µl čisté DNA
- 3) Gel se vzorky vložte do elektroforetické vany a zalijte TAE pufrem tak, aby byl ponořen zhruba 3 mm
- 4) Nastavte stálé napětí 90 V, separace bude probíhat cca 45 min
- 5) Gel se barví v roztoku ethidiumbromidu (0,05 µl/ml) po dobu nejméně 1 hodiny **PRACUJTE V RUKAVICÍCH!!!!**
- 6) Pozorujte gel na transluminátoru pod UV světlem o vlnové délce 302 nm a zdokumentujte

3. PCR (ITS region)

- 1) Použijte DNA izolovanou metodou fenol-chloroform. Pro ověření, že kmeny patří do skupiny *Saccharomyces sensu stricto*, použijte primery ITS1 a ITS4 (Valente et al. 1996 - pokud je velikost amplifikovaného produktu větší než 800 bp, patří kmen do skupiny *S. stricto*)

Primery

ITS1 - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G

ITS4 - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

PCR směs (celkový objem 50 µl):

Master Mix Combi PPP 25 µl
PCR voda 22 µl
primer I 1 µl
primer II 1 µl
DNA matrice 1 µl

PCR program:

Krok	Teplota	Čas
1	95°C	3 min
2	95°C	45 sec
3	55°C	30 sec
4	72°C	45 sec
5	Go to 2	33x
6	72°C	7 min
7	4°C	∞

4 . Gelová elektroforéza (ověření PCR produktu)

- 1) Připravte 1 % agarózový gel (viz. Cvičení 2a)
- 2) Na gel naneste 5 µl DNA markeru (Gene Ruler DNA Ladder Mix 100 – 10 000bp, Fermetas) a následně 5 µl každého PCR produktu
- 3) Gel se vzorky vložte do elektroforetické vany a zalijte TAE pufrem tak, aby byl ponořen zhruba 3 mm
- 4) Nastavte stálé napětí 90 V, separace bude probíhat cca 45 min
- 5) Gel se barví v roztoku ethidiumbromidu (0,05 µl/ml) po dobu nejméně 1 hodiny **PRACUJTE V RUKAVICÍCH!!!!**
- 6) Pozorujte gel na transluminátoru pod UV světlem o vlnové délce 302 nm a zdokumentujte

5a. Štěpení PCR produktu (RFLP)

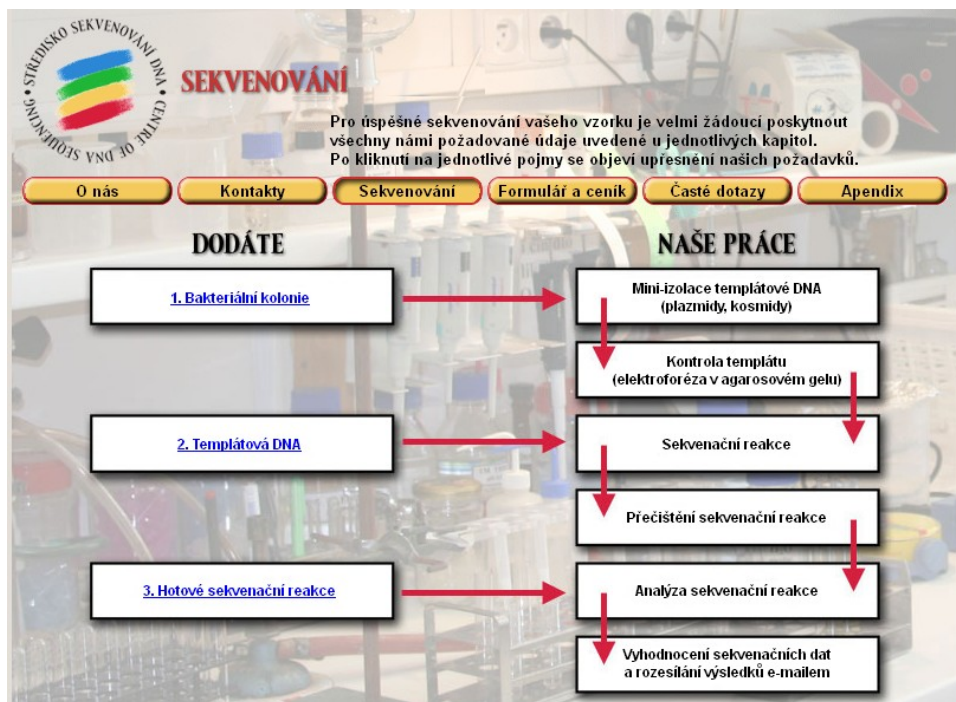
- 1) Ke štěpení enzymem *HaeIII* použijte ITS region – buď produkt přečistěte (viz. Cvičení 2b) nebo použijte hrubý PCR produkt, štěpení probíhá min. 2 hod při 37°C
- 2) Výsledek ověřte gelovou elektroforézou (2% gel), kdy nanese 8 µl vzorku + 2 µl vkladacího pufru

Směs pro štěpení ITS regionu (celkový objem 20 µl):

Voda.....12,5 µl
Pufr pro enzym.....2,0 µl
PCR produkt/DNA4,5 µl
Enzym *HaeIII*1,0 µl

5b. Sekvence PCR produktu

- 1) Pro sekvenaci se využije ITS region – produkt se přečistí (viz. cvičení 2b) a zašle na Středisko sekvenování DNA, MBÚ AV ČR (www.biomed.cas.cz/mbu/lab119/index.htm)
- 2) Výsledkem sekvenační reakce je soubor ve formátu .abi, se kterým můžeme dále pracovat (viz. Cvičení 3b)



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře:

Giudici P., Pulvirenti A. (2002): Molecular methods for identification of wine yeasts. Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeast, 35-52, ISBN: 81-7736-120-1.

Nguyen Huu-Vang, Lepingle A., Gaillardin C. (2000): Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. Systém. Appl. Microbiol. 23, 71-85.

Valente P., Gouveia F.C., de Lemos G.A., Pimentel D., van Elsas J.D., Mendonca-Hagler L.C., Hagler A.N. (1996): PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. FEMS Microbiol. Lett. 137, 253-256.

Kontrolní otázky

- 1) Jaký je výsledný náboj molekuly DNA? Odkud kam putuje při elektroforéze?
- 2) Jaké jsou odlišnosti ve stavbě a složení buněčné stěny Gram-negativních, Gram-positivních bakterií a kvasinek?
- 3) Jaký útvar vznikne po odstranění buněčné stěny kvasinek?

- 4) Proč musíme pracovat s etidiumbromidem v rukavicích?
- 5) Ve které fázi roztoku (vodné či organické) se nachází DNA při izolování pomocí fenol-chloroformové metody?

Informační panel - Základní data o nukleových kyselinách a proteinech

Převzato z: Bartoš et al. (2009): Biotechnologie a farmakogenetika pro farmaceuty
(Návody k praktickým cvičením), VFU Brno, ISBN: 978-80-7305-089-4

Počet částic v jednom molu = $6,023 \times 10^{23}$

Průměrná molekulová hmotnost páru bazí v DNA = 650

Průměrná molekulová hmotnost bazí v RNA = 360

Průměrná molekulová hmotnost aminokyseliny = 110

Pro dsDNA když $A_{260} = 1,0$ v 1 cm kyvetě, pak koncentrace dsDNA = $50 \mu\text{g/ml} = 0,15 \text{ mM}$

Pro ssDNA když $A_{260} = 1,0$ v 1 cm kyvetě, pak koncentrace ssDNA = $33 \mu\text{g/ml} = 0,10 \text{ mM}$

Pro ssRNA když $A_{260} = 1,0$ v 1 cm kyvetě, pak koncentrace ssRNA = $40 \mu\text{g/ml} = 0,11 \text{ mM}$

Molekulová hmotnost dsDNA = (počet bp) x 650

Počet molů konců dsDNA = $2 \times (\text{hmotnost DNA v gramech}) / (\text{molekulová hmotnost})$

Počet molů konců vytvořených restričním štěpením

a) kružnicová DNA = $2 \times (\text{moly DNA}) \times (\text{počet štěpných míst})$

b) lineární DNA = $2 \times (\text{moly DNA}) \times (\text{počet štěpných míst}) + 2 \times (\text{moly DNA})$

$1 \mu\text{g}$ DNA o délce 1 000 bp = $1,5 \text{ pmol} = 9,1 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA plasmidu pUC18/19 (délka 2 686 bp) = $0,57 \text{ pmol} = 3,4 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA plasmidu pBR322 (délka 4 361 bp) = $0,35 \text{ pmol} = 2,1 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA fága M13mp18/19 (délka 7 249 bp) = $0,21 \text{ pmol} = 1,3 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA fága λ (délka 48 502 bp) = $0,03 \text{ pmol} = 1,8 \times 10^{10}$ molekul

1 pmol DNA o délce 1 000 bp = $0,66 \mu\text{g}$

1 pmol DNA plasmidu pUC18/19 (délka 2 686 bp) = $1,77 \mu\text{g}$

1 pmol DNA plasmidu pBR322 (délka 4 361 bp) = $2,88 \mu\text{g}$

1 pmol DNA fága M13mp18/19 (délka 7 249 bp) = $4,78 \mu\text{g}$

1 pmol DNA fága λ (délka 48 502 bp) = $32,01 \mu\text{g}$

DNA o délce 1,0 kb má kódovací kapacitu 333 aminokyselin = protein o $M = 37\,000$

Protein o $M = 10\,000$ může být kódován DNA o velikosti 270 bp

Protein o $M = 50\,000$ může být kódován DNA o velikosti 1,55 kbp

Informační panel - Vzorce užitečné pro design PCR

Převzato z: Bartoš et al. (2009): Biotechnologie a farmakogenetika pro farmaceuty
(Návody k praktickým cvičením), VFU Brno, ISBN: 978-80-7305-089-4

Přepočty koncentrací

Pro oligonukleotid platí, když $A_{260} = 1,0$ v 1 cm kyvetě, pak jeho koncentrace = 20-30 $\mu\text{g/ml}$

Molekulová hmotnost (M)

$$M = (N_A \times 312,2) + (N_G \times 328,2) + (N_C \times 288,2) + (N_T \times 303,2) + P$$

kde

N_x = počet specifických nukleotidů (A, T, C nebo G) v oligonukleotidu

P = + 17 pro fosforylované oligonukleotidy

P = - 61 pro defosforylované oligonukleotidy

Přepočet μg na pmol

$$\begin{aligned} \text{pmol oligonukleotidu} &= \mu\text{g (oligonukleotidu)} \times (10^6 \text{ pg} / 1 \mu\text{g}) \times (1 \text{ pmol} / 330 \text{ pg}) \times (1/N) = \\ &= [\mu\text{g (oligonukleotidu)} \times 3,030] / N \end{aligned}$$

kde N = počet nukleotidů v oligonukleotidu

např. 1 μg oligonukleotidu o délce 20 bazí je přibližně 151,5 pmol

Přepočet pmol na μg

$$\begin{aligned} \mu\text{g oligonukleotidu} &= \text{pmol (oligonukleotidu)} \times (330 \text{ pg} / 1 \text{ pmol}) \times (1 \mu\text{g} / 10^6 \text{ pg}) \times (N) = \\ &= \text{pmol (oligonukleotidu)} \times N \times 3,3 \cdot 10^{-4} \end{aligned}$$

kde N = počet nukleotidů v oligonukleotidu

např. 1 pmol oligonukleotidu o délce 20 bazí je přibližně 0,0066 μg

Přepočet μM na pmol

1 μl X μM roztoku primeru obsahuje X pmol primeru

např. 1 μl 2,5 μM roztoku primeru obsahuje 2,5 pmol primeru

Přepočet pmol na μM

1 μl roztoku primeru o koncentraci X pmol/ μl má koncentraci primerů X μM

např. 1 μl roztoku primeru o koncentraci 20 pmol/ μl má koncentraci primerů 20 μM

Informační panel - informace užitečné pro práci s PCR

Převzato z: Bartoš et al. (2009): Biotechnologie a farmakogenetika pro farmaceuty
(Návody k praktickým cvičením), VFU Brno, ISBN: 978-80-7305-089-4

Zkratky používané pro označení bází v nukleotidech
používá se např. při objednávání oligonukleotidů pro PCR

Kód	Značí	Kód	Značí
A	adenin	K	keto (T a G)
T	thymín	M	amino (C a A)
G	guanin	D	všechny kromě C
C	cytosin	V	všechny kromě T
Y	pyrimidiny (C a T)	H	všechny kromě G
R	puriny (A a G)	B	všechny kromě A
W	„weak“ (A a T)	N	všechny
S	„strong“ (G a C)	X	neznámý

Výpočty teplot annealingu

pro oligonukleotidy dlouhé 14 až 25 nukleotidů

$$T_m = [2 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{počet bází A a T})] + [4 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{počet bází G a C})] +$$

pro oligonukleotidy delší než 25 nukleotidů

$$T_m = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 [\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ for}) - 500/N$$

kde

[Na⁺] = koncentrace Na⁺ iontů

% GC = podíl nukleotidů G a C v sekvenci

% for = podíl formamidu v hybridizačním roztoku

Vybrané odkazy na důležité www stránky

- 1) www.ncbi.nlm.nih.gov = databáze sekvencí (Genová banka) a literárních odkazů
- 2) www.dgb.org = umístění lidských genů, fragmentů DNA, populace, polymorfismy, mapy, mutace
- 3) www.rebase.neb.com = restriční enzymy a metylázy
- 4) www.scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop = klasifikace struktur proteinových domén
- 5) www.expasy.ch/sprot = databáze proteinových sekvencí SWISS-PROT

Informační panel - Tabulka standardního genetického kódu

Převzato z: Bartoš et al. (2009): Biotechnologie a farmakogenetika pro farmaceuty

(Návody k praktickým cvičením), VFU Brno, ISBN: 978-80-7305-089-4

kodony					
první nukleotid	druhý nukleotid				třetí nukleotid
	U	C	A	G	
U	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	U
	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	C
	Leu (L)	Ser (S)	terminace	terminace, SeC Pyr (O)	A
	Leu (L)	Ser (S)	terminace	Trp (W)	G
C	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	U
	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	C
	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	A
	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	G
A	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	U
	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	C
	Ile (I)	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	A
	Met nebo iniciace	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	G
G	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	U
	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	C
	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	A
	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	G

SeC = selenocystein

Pyr = pyrolysin

Tučně jsou vyznačeny kodonové rodiny

Informační panel- Parametry prokaryotické buňky

Převzato z: Bartoš et al. (2009): Biotechnologie a farmakogenetika pro farmaceuty
 (Návody k praktickým cvičením), VFU Brno, ISBN: 978-80-7305-089-4

Složení bakteriální buňky

Hodnoty platí pro *Escherichia coli*, případně *Salmonella typhimurium*

Parametr	Na buňku	Na litr kultury (10 ⁹ buněk/ml)
Vlhká hmotnost	950 fg	950 mg
Suchá hmotnost	280 fg	280 mg
Obsah proteinů	155 fg	155 mg
Obsah genomové DNA	17 fg	17 mg
Obsah RNA	100 fg	100 mg
Objem	1,15 μm ³ = 1 pikolitr	
Vnitrobuněčná koncentrace proteinů	135 μg/ml	

Antibiotika používaná v buněčných kulturách

Antibiotikum	Koncentrace	Gram ⁺ bakterie	Gram ⁻ bakterie	Mycoplasmata	Kvasinky	Stabilita při 37°C
ampicilin	50-100 mg/ml	+	+	-	-	3 dny
amfotericin B	0,25-25 μg/ml	-	-	-	+	3 dny
carbenicilin	100 U/ml	+	+	-	-	3 dny
ciprofloxacin	10 μg/ml			+		5 dnů
erythromycin	100 μg/ml	+	+	+	-	3 dny
gentamycin	5-50 μg/ml	+	+	+	+	3 dny
kanamycin	100 μg/ml	+	+	+/-	-	5 dnů
lincomycin	50 μg/ml	+	-	-	-	4 dny
neomycin	50 μg/ml	+	+	-	-	5 dnů
nystatin	100 U/ml	-	-	-	+	3 dny
penicilin G	50-100 U/ml	+	-	-	-	3 dny
polymixin B	100 U/ml	-	+	-	-	5 dnů
streptomycin	50-100 μg/ml	+	+	-	-	5 dnů
tetracyklin	5-10 μg/ml	+	+	+	-	3 dny