

Obsah

Předmluva.....	7
Úvod	8
Příprava vzorků k analýze	9
Úloha 1	10
Kultivace a lyze bakteriálních buněk	10
Protokol P1	10
Kultivace buněk rodu <i>Lactobacillus</i> sp. a <i>Bifidobacterium</i> sp.....	10
Kontrola čistoty bakteriální kultury	10
Protokol P2.....	11
Lyze bakteriálních buněk	11
Protokol P3.....	11
Fenolová extrakce bakteriální DNA	11
Protokol P4.....	12
Srážení DNA ethanolem.....	12
Protokol P5.....	13
Odstranění RNA srážením chloridem lithným (LiCl)	13
Uvedeným postupem se sráží ribosomální rRNA a mediátorová mRNA. Malé molekuly transferové tRNA a ribosomální 5SRNA zůstávají v roztoku.....	13
Štěpení RNA enzymem RNasa A	13
Tento postup neslouží k přímému odstranění RNA	13
Úloha 2	15
Kontrola čistoty a intaktnosti izolované DNA	15
UV spektrofotometrie	15
Gelová elektroforéza	15
Protokol P6.....	16
Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA.....	16
Hodnocení	16
Protokol P7.....	17
Gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	17
Úloha 3	18
Polymerázová řetězová reakce.....	18
Protokol P8.....	20
Příprava směsi pro PCR.....	20
Protokol P9.....	21
Rodově a druhově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	21
Protokol P10.....	23
Rodově a druhově specifická PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i>	23
Protokol P11.....	27
PCR s hrubým lyzátem buněk	27
Příprava směsi pro PCR.....	27
Protokol P12.....	28
PCR z jedné bakteriální kolonie	28

Úloha 4	29
Restrikční analýza amplifikované ribosomální DNA (ARDRA)	29
Protokol P13	29
Druhová identifikace bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> restrikční analýzou produktů PCR.....	29
Purifikace produktů PCR před štěpením restriktasami:	30
Štěpení produktu PCR restriktasami.....	31
Protokol P14.....	31
Druhová identifikace bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> restrikční analýzou PCR produktů.....	31
Štěpení PCR produktu restriktasami.....	32
Úloha 5	34
Interrepetitivní polymerázové řetězové reakce (rep-PCR)	34
Rep-PCR bakteriální DNA - rod <i>Lactobacillus</i>	34
Protokol P16.....	36
Rep-PCR bakteriální DNA - rod <i>Bifidobacterium</i>	36
Úloha 6	38
Náhodná polymerázová řetězová reakce (RAPD).....	38
Protokol P17.....	38
RAPD-PCR bakteriální DNA s využitím primeru M 13	38
Protokol P18.....	39
RAPD typizace bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i>	39
Úloha 7	41
Identifikace mikroorganismů v reálných vzorcích	41
Protokol P19.....	41
Příprava hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků.....	41
Příprava hrubého lyzátu buněk ze vzorku tvrdého sýru.....	42
Příprava hrubého lyzátu buněk z jogurtu	42
Protokol P20.....	42
Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z mléčných výrobků pomocí magnetických mikročástic	42
ČÁST II Speciální postupy analýzy mikrobiální DNA	44
Úloha 8	45
Imunomagnetická separace bakteriálních buněk	45
Protokol P21	45
Imunomagnetická separace (IMS) buněk <i>Salmonella</i>	45
IMS-kultivace (IMS-CM) <i>Salmonella</i>	46
IMS-polymerázová řetězová reakce (IMS-PCR) <i>Salmonella</i>	46
Úloha 9	48
Vyhledávání cílových sekvencí DNA pomocí DNA/DNA hybridizace	48
Protokol P22.....	48
Příprava DNA sond značených digoxigeninem pro detekci genů kódujících bakteriociny	48
Protokol P23.....	49
Příprava kapek DNA pro tečkovou hybridizaci.....	49

Protokol P24.....	50
Provedení DNA/DNA hybridizace	50
Protokol P25.....	51
Imunologická detekce hybridizačního produktu	51
Úloha 10	52
Izolace plasmidové DNA	52
Protokol P26.....	52
Příprava médií pro kultivace buněk <i>E. coli</i> JM 109 (pUC19).....	52
Protokol P27.....	53
Kultivace bakteriálních buněk <i>E. coli</i> JM 109 (pUC19) na pevných a tekutých médiích	53
Protokol P28.....	53
Izolace plasmidové DNA (alkalická lyze)	53
Metoda alkalické lyze je založena na skutečnosti, že chromosomální DNA se v alkalickém prostředí sráží. Naopak molekuly plasmidové DNA, které jsou menší, zůstanou v roztoku. Po neutralizaci se rozvolněná plasmidová DNA renaturuje a chromosomální DNA zůstane ve sraženině.	53
Protokol P29.....	55
Gelová elektroforéza plasmidové DNA	55
Plasmidová DNA se vyskytuje v několika formách: nadšroubovicová, kovalentně uzavřená kružnice (ccc - covalently closed circular), otevřená kružnicová forma (oc - open circular) a lineární. Postup gelové elektroforézy plasmidové DNA je stejný jako v Protokolu P7 pro bakteriální DNA s tím rozdílem, že separace různých forem plasmidové DNA se provádí na 1,0 % agarosovém gelu. Gelová elektroforéza plasmidové DNA je uvedena na Obr. 6. Na obrázku je rovněž dokumentován vliv štěpení RNA enzymem RNasa A (dle Protokolu P5).....	55
Protokol P30.....	55
Štěpení plasmidu pUC19 enzymem <i>EcoRI</i>	55
Protokol P31.....	56
Štěpení plasmidu pBR322 enzymem <i>EcoRI</i>	56
Protokol P32.....	56
Štěpení plasmidu pBR322 imobilizovaným chelátem neodymu	56
Aktivace nosiče	56
Protokol P33.....	57
Úloha 11	59
Rozlišení živých a mrtvých buněk pomocí EMA-PCR	59
Protokol P34.....	59
Rozlišení živých a mrtvých buněk rodu <i>Lactobacillus</i> ve vzorku jogurtu	59
Seznam a význam zkratk.....	61
Literatura.....	62
Příloha 1.....	66
Příprava a složení roztoků Část I.....	66
Příprava a složení roztoků Část II.....	71
Příloha 2.....	74

Obrazová příloha k vybraným úlohám	74
Příloha 3	83
Vlastnosti a fyzikální mapa plasmidu pUC19.....	83
Vlastnosti a fyzikální mapa plasmidu pBR322	85