

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

Fakulta biotechnológie
a potravinárstva

Katedra mikrobiológie

Ing. Juraj Medo, PhD.

MIKROBIÁLNA GENETIKA

Nitra 2019

Vydala Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
vo Vydavateľstve SPU

Autor: Ing. Juraj Medo, PhD. (9,81 AH)
Katedra mikrobiológie
FBP, SPU v Nitre

Recenzenti: prof. Ing. František Strejček, PhD.
doc. Ing. Martina Miluchová, PhD.

Publikácia vznikla v rámci projektu KEGA č. 014SPU-4/2017, Inovácia vzdelávania v predmetoch z oblasti mikrobiológie pre študijné programy aplikovaná biológia a agrobiotechnológie.

Schválila rektorka Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre dňa 18. 12. 2019 ako skriptá pre študentov SPU.

© J. Medo, Nitra 2019

ISBN 978-80-552-2132-8

Obsah

Úvodný príhovor	5
1. Laboratórium pre molekulárne analýzy v mikrobiológii.....	7
1.1. Vybavenie laboratória molekulárnej mikrobiológie.....	7
1.1.1. Základné nástroje a pomôcky pre prácu s mikroorganizmami	7
1.1.2. Zariadenia pre prácu s mikroorganizmami.....	8
1.1.3. Zariadenia pre kultiváciu mikroorganizmov	9
1.1.4. Zariadenia pre sterilizáciu	9
1.1.5. Zariadenia pre uchovávanie	10
1.1.6. Centrifúgy (odstredivky).....	10
1.1.7. Homogenizátory a trepačky	11
1.1.8. Zariadenia pre prácu s nukleovými kyselinami.....	12
1.1.9. Termocykléry	12
1.1.10. Elektroforézy	14
1.1.11. Transiluminátory a dokumentačné systémy	15
1.1.12. Zariadenia na meranie množstva nukleových kyselín.....	15
1.1.13. Kapilárne sekvenátory	16
1.1.14. Sekvenátory ďalšej generácie.....	17
1.2. Organizačná štruktúra laboratória molekulárnej mikrobiológie.....	24
2. Izolácia nukleových kyselín z mikroorganizmov	25
2.1.1. Príprava vzorky na izoláciu mikrobiálnych nukleových kyselín	26
2.1.2. Lýza buniek a uvoľnenie nukleových kyselín.....	26
2.1.3. Odstránenie proteínov	28
2.1.4. Purifikácia a koncentrácia nukleových kyselín.....	28
2.1.5. Izolácia plazmidovej a vírusovej DNA	29
2.1.6. Špinavá izolácia DNA.....	30
2.1.7. Izolácia RNA.....	30
2.1.8. Meranie kvantity a kvality vyizolovaných nukleových kyselín.....	32
3. Metódy analýzy nukleových kyselín z mikroorganizmov	33
3.1. Polymerázová reťazová reakcia.....	33
3.1.1. Priebeh PCR cyklu	33
3.1.2. Zložky PCR.....	35
3.1.3. Úpravy PCR využívané pri analýze mikroorganizmov.....	40
3.1.4. Opatrenia na zamedzenie kontaminácie pri PCR.....	41
3.1.5. Príprava PCR zmesi	41
3.1.6. Vizualizácia DNA a analýza PCR produktu	42
3.2. Elektroforéza	43
3.3. Kvantifikácia DNA pomocou qPCR	45
3.3.1. Real Time PCR - qPCR.....	45
3.3.2. Kvantifikácia DNA s použitím nešpecifických farbív	47
3.3.3. Melting analýza.....	47
3.3.4. Využitie značených sond v qPCR.....	48
3.3.5. Normalizácia qPCR.....	50
3.4. Kvantifikácia DNA pomocou ddPCR	50
3.5. Slučkami sprostredkovaná izotermálna amplifikácia DNA (LAMP).....	51
3.5.1. Priebeh LAMP.....	51
3.5.2. Použitie LAMP.....	53
3.6. Štiepenie reštrikčným enzýmom RFLP	53
3.7. Sekvenovanie.....	55

3.7.1.	Kvalita vyvolaných báz a sekvencií	56
3.7.2.	Ukladanie sekvencií	57
3.8.	Analýza RNA s použitím reverznej transkriptázy	59
4.	Detekcia mikroorganizmov pomocou FISH	60
5.	PCR detekcia a kvantifikácia mikroorganizmov	63
5.1.	Problémy detekcie mikroorganizmov	65
5.2.	Kvantifikácia mikroorganizmov pomocou qPCR	65
5.3.	Kontroly pri detekcii a kvantifikácii PCR	67
5.4.	Použitie PCR a qPCR v diagnostike	68
6.	Taxonómia a klasifikácia mikroorganizmov	69
6.1.	Fenotypová klasifikácia	70
6.2.	Genotypová klasifikácia a kladistika	70
7.	Molekulárne hodnotenie podobnosti a fylogenetická analýza mikroorganizmov	73
7.1.	Určenie pomeru báz v DNA	73
7.2.	Hybridizácia DNA	73
7.3.	DNA čipy	74
7.4.	Metódy založené na PCR	74
7.4.1.	Nešpecifické metódy	74
7.4.2.	Špecifické metódy	75
7.5.	Fylogenetické markery	77
7.5.1.	Markery pre prokaryotické mikroorganizmy	77
7.5.2.	Markery pre eukaryotické mikroorganizmy	79
7.6.	Fylogenetická analýza	82
7.6.1.	Zarovnanie (alignment)	82
7.6.2.	Tvorba stromov	82
8.	Identifikácia mikroorganizmov	85
9.	Analýza vlastností mikroorganizmov	88
9.1.	Analýza genotypových znakov	88
9.1.1.	Celogenómové sekvenovanie	88
9.2.	Analýza expresie	90
9.2.1.	Analýza expresie pomocou qPCR	90
9.2.2.	Analýza expresie pomocou sekvenovania RNAseq	91
10.	Analýza zloženia mikrobiálnych spoločenstiev	92
10.1.	Metódy využívajúce klonovanie	92
10.2.	Denaturačné elektroforézne metódy	93
10.3.	T-RFLP	94
10.4.	Biočipy	94
10.5.	Sekvenovanie ďalšej generácie v analýze mikrobiómov	94
10.5.1.	Amplikónové sekvenovanie	95
10.5.2.	Shotgun sekvenovanie	99
	Zoznam použitej a odporúčanej literatúry:	100

Úvodný príhovor

Molekulárne metódy v posledných desaťročiach zmenili podobu analýzy a diagnostiky v mnohých odboroch biológie. V mikrobiológii sa stali molekulárne metódy dominantným spôsobom identifikácie či detekcie mikroorganizmov a bez nich je prakticky nemožné získať výsledky na aktuálnej úrovni poznania. Cieľom tejto publikácie je oboznámiť čitateľov so zariadením a vybavením laboratória molekulárnej mikrobiológie a zásadami práce v takomto laboratóriu. Ďalej predstaviť moderné molekulárne techniky s využitím v mikrobiológii, predovšetkým práve v detekcii, kvantifikácii a identifikácii mikroorganizmov, ako aj v analýze mikrobiómov, ktorá sa v posledných rokoch stala významnou témou. Okrem teoretického základu jednotlivých metód sú v publikácii uvedené aj výhody a nevýhody ich použitia, ukážky konkrétneho použitia a tipy na riešenie problémov, s ktorými sa používateľ môže stretnúť.

Autor predkladá publikáciu ako učebnú pomôcku pre predmet Mikrobiálna genetika. Je určená pre poslucháčov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity, študijného programu „Aplikovaná biológia“. Táto publikácia čiastočne nadväzuje na vedomosti študentov získané pri štúdiu predmetov z odboru mikrobiológie, ako aj molekulárnej biológie. Autor verí, že publikácia bude vhodná aj pre študentov iných programov, ale aj doktorandov, vedeckovýskumných pracovníkov, či pre odbornú verejnosť, ktorá potrebuje využívať molekulárne metódy pre detekciu, kvantifikáciu alebo iné analýzy mikroorganizmov.

autor

Autor	Ing. Juraj Medo, PhD.
Názov	MIKROBIÁLNA GENETIKA
Určené	Pre študentov SPU
Vydavateľ	Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Vydanie	Prvé
Vytlačené	Január 2020
Náklad	100 kusov
Počet strán	100
AH-VH	9,81-9,99
Tlač	Vydavateľstvo SPU v Nitre
ISBN 978-80-552-2132-8	Cena 1,70 €

Rukopis neprešiel redakčnou úpravou vo vydavateľstve.
 Za odbornú náplň vydania zodpovedajú autori.

