

# Bakteriocinotypizace kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin

Bc. Kristýna Miková

---

Diplomová práce  
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna MIKOVÁ**  
Osobní číslo: **T090263**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Bakteriocinotypizace kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakterizujte bakteriociny, zaměřte se na koliciny a mikrociný produkované bakterií Escherichia coli.
2. Najděte informace o možnostech detekce kolicinogenie a jednotlivých typů kolicinů a mikrocinů.

### II. Praktická část

1. Zjistěte incidenci kolicinogenie u daného souborů kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin.
2. Stanovte jednotlivé typy bakteriocinů u kolicinogenních kmenů metodou PCR.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

[2] PRŮŠA, R. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. LAMBDA BIOMED spol. s r. o. a 2. lékařská fakulta UK, Praha 1997. 45 s. ISBN 80-238-0940-7.

[3] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D. Colicins-exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*. ISSN 0015-5632, 1998, vol. 43, no. 6, s. 563-582.

[4] GORDON, D. M., O'BRIEN, C. L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2006, vol. 152, s. 3239-3244.

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.**

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce:

**20. května 2011**

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: *Bc. Miková Kristýna*

Obor: *CHTP*

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 *12.5.2011*

*Miková*  
.....

<sup>1)</sup> 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.  
<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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 dílo:

(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 vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Koliciny a mikrocinny jsou antibakteriální toxiny produkované bakteriemi *Escherichia coli* a příbuznými druhy či rody čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato práce popisuje jejich základní vlastnosti a snaží se je klasifikovat. Možnosti jejich stanovení jsou nejen mikrobiologické, ale zejména pomocí metod molekulární biologie – nejběžněji metodou PCR. Cílem této práce bylo aplikovat systém typizace 21 kolicinů a 3 mikrocinů na soubor kolicinogenních kmenů *Escherichia coli* izolovaných z drůbežního masa a bažantů. Bylo nalezeno 13 kolicinogenních producentů, u kterých byla zjištěna produkce 8 typů kolicinů a 2 typů mikrocinů. Dva kmeny produkovaly pouze jeden bakteriocin, zbylé kmeny nejméně dva a více bakteriocinů. Nejčastěji byly zastoupeny koliciny B, M, Ia a Ib, z mikrocinů pak B17 a V.

Klíčová slova: koliciny, mikrocinny, *Escherichia coli*, PCR

## **ABSTRACT**

Colicins and microcins are antibacterial toxins produced by *Escherichia coli* and related species or genera of *Enterobacteriaceae*. The basic characteristics and classification of colicins were described. Possibilities of determination are not only microbiological but also by methods of molecular biology - the most common is PCR. The aim of this study was to apply the system of colicin determination (21 colicins and 3 microcins) on the collection of colicinogenic *Escherichia coli* strains isolated from poultry and pheasants. It was found 13 colicinogenic producers, which were found to produce 8 types of colicins and 2 types of microcins. Two strains produced only one bacteriocin, the remaining strains at least two or more bacteriocins. Colicins B, M, Ia and Ib, and microcins B17 and V were found the most frequently.

Keywords: colicins, microcins, *Escherichia coli*, PCR

Touto cestou bych chtěla poděkovat především vedoucí své diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, cenné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala Ing. Robertu Gálovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků bažantího masa použitých v této práci.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 BAKTERIOCINY</b> .....	<b>12</b>
1.1 KOLICINY .....	12
1.1.1 Koliciny skupiny A .....	15
1.1.2 Koliciny skupiny B.....	17
1.2 MIKROCINY .....	18
1.2.1 Mikrociny 1. skupiny .....	19
1.2.2 Mikrociny 2. skupiny .....	20
1.3 VYUŽITÍ KOLICINŮ A MIKROCINŮ.....	21
<b>2 METODY VYUŽÍVANÉ V MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII</b> .....	<b>23</b>
2.1 HYBRIDIZAČNÍ METODY .....	23
2.1.1 Southern blot .....	23
2.1.2 Metoda FISH .....	23
2.2 METODA PCR .....	23
2.2.1 Jednotlivé složky PCR reakce .....	24
2.2.2 Teplotní fáze reakčního cyklu .....	25
2.3 MODIFIKACE PCR REAKCE.....	27
2.3.1 Multiplex PCR .....	27
2.3.2 Kvantitativní PCR (QPCR).....	27
2.3.3 Real - time PCR (RT-PCR).....	27
2.3.4 Nested PCR .....	28
2.3.5 Inverzní PCR .....	28
2.4 ELEKTROFORÉZA .....	28
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
<b>3 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>31</b>
<b>4 MATERIÁL</b> .....	<b>32</b>
4.1 PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA.....	32
4.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	32
4.3 CHEMIKÁLIE .....	33
4.4 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	33
<b>5 METODY</b> .....	<b>35</b>
5.1 ENTEROTEST.....	35
5.2 KVALITATIVNÍ STANOVENÍ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ .....	35
5.3 PCR REAKCE.....	35
5.3.1 Příprava vzorků DNA.....	36



5.3.2	Složení amplifikační směsi pro detekci kolicinů a mikrocinů .....	36
5.3.3	Podmínky PCR reakce pro detekci kolicinů a mikrocinů .....	39
5.3.4	Detekce amplikonů.....	40
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>41</b>
6.1	IDENTIFIKACE KMENŮ.....	41
6.2	KVALITATIVNÍ STANOVENÍ PRODUKCE KOLICINŮ VPICHOVÝM POKUSEM.....	42
6.3	TYPIZACE KOLICINŮ A MIKROCINŮ POMOCÍ PCR.....	45
6.4	DETEKCE PRODUKTŮ ZÍSKANÝCH PCR REAKCÍ .....	46
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>53</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>62</b>

## ÚVOD

Bakteriociny jsou látky bílkovinné povahy, produkované grampozitivními i gramnegativními bakteriemi, usmrcující citlivé kmeny stejného či příbuzného bakteriálního druhu či rodu. K nejlépe prostudovaným bakteriocinům patří koliciny a mikrocin, produkované bakteriemi *Escherichia coli* a příbuznými druhy z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Koliciny jsou antibakteriální toxiny produkované buňkou ve stresu. Tvorba kolicinů je ve většině případech kódována extrachromozomálně, na plasmidech, a účinek je zprostředkován specifickými receptory ve vnější membráně buněčné stěny. Podle letálního účinku jsou děleny na koliciny depolarizující plazmatickou membránu, koliciny s endonukleázovou aktivitou, koliciny blokuující proteosyntézu a koliciny degradující peptidoglykan.

Druhou skupinu tvoří mikrocin, jejichž produkce je indukována za specifických podmínek, zejména při nedostatku živin. Mikrocin jsou děleny do dvou skupin, na nemodifikované a modifikované peptidy. Podle velikosti mohou být navíc rozděleny na malé peptidy s nízkou molekulovou hmotností (pod 3,5 kDa) a na peptidy s vyšší molekulovou hmotností (do 10 kDa).

V současnosti jsou bakteriociny předmětem zvýšené pozornosti jako potenciální náhrada za antibiotika, součást probiotických přípravků nebo jako přírodní konzervační látky. Byl také prokázán jejich účinek v boji proti rakovinovým buňkám.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BAKTERIOCINY

Bakteriociny jsou látky bílkovinné povahy, produkované grampozitivními i gramnegativními bakteriemi, pomocí kterých bakterie mezi sebou soupeří [1]. Tyto bílkoviny usmrcují citlivé kmeny stejného nebo příbuzného druhu či rodu [2]. Bakteriociny tvoří rozmanitou skupinu s odlišnými morfologickými a biochemickými vlastnostmi [3]. Naproti tomu mají některé znaky společné. Jedná se zpravidla o vysokomolekulární proteiny antibiotické povahy, většinou kódovaných na plazmidech [4]. Od tradičních antibiotik se liší především tím, že mají poměrně úzké spektrum působnosti [1]. Mezi nejlépe prostudované bakteriociny patří koliciny a mikrociny, tvořené gramnegativní bakterií *Escherichia coli* [2]. Buňky mohou produkovat koliciny i mikrociny současně nebo mohou zároveň produkovat více kolicinů, což je pro danou buňku selekční výhodou [5].

### 1.1 Koliciny

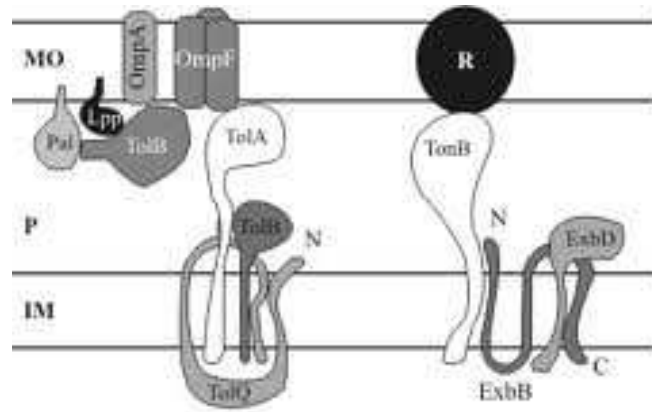
Koliciny jsou toxické exoproteiny produkované bakteriemi kolicinogenních kmenů *Escherichia coli* a některých příbuzných druhů v rámci čeledi *Enterobacteriaceae*, a to během růstu jejich kultur. Působí inhibičně na citlivé bakterie téže čeledi a jejich účinky jsou zprostředkovány specifickými receptory v buněčné stěně [6].

První kolicin byl popsán již v roce 1925 (Gratia). Jednalo se o kolicin V, který je nyní řazen k mikrocinům. Název kolicin byl vytvořen v roce 1946 (Gratia, Fredericq), kdy byla prokázána jejich bílkovinná povaha a specifická činnost [7]. Dnes je známo 34 kolicinů, ale pouze 26 z nich je podrobně popsáných [8].

Klasifikace a nomenklatura kolicinů souvisí s podstatou interakce kolicinů s citlivou buňkou. Označují se velkými písmeny dle své receptorové specifity. V případě, že se váže více typů kolicinů na jeden receptor, jsou při označování přidávány k písmenům čísla [9].

Dalším kritériem klasifikace kolicinů je typ translokačního mechanismu, který využívají k transportu přes buněčný obal [9] (Obrázek 1). To umožňuje řazení kolicinů do dvou skupin A a B. Skupina A zahrnuje koliciny, které využívají systém Tol, který se skládá z proteinů TolA, TolB, TolQ, TolR [10] a patří sem koliciny E1 až E9, K, L, N, S4, U a Y [7]. Koliciny skupiny B využívají systém Ton, který se skládá z proteinů TonB, ExbB a ExbD [10] a patří sem koliciny B, D, Ia, Ib, M, 5 a 10 [7].

Pro správnou klasifikaci kolicinu tedy musíme znát receptorovou specifitu, dále typ translokačního mechanismu, který využívá a přítomnost nebo absenci zkřížené imunity producenta vůči kolicinům, které využívají stejný receptor [9].



*Obr. 1. TonB a Tol translokační systém: OM- vnější membrána, P- periplazmatický prostor, IM- vnitřní membrána, R- receptor pro TonB, C-C-terminální část, N- N-terminální část [11].*

Na základě sekvenčních podobností v letální doméně mohou být koliciny rozděleny do dvou skupin, a to na typ A, kam jsou řazeny koliciny A, B, N a U, a typ E1, kam patří koliciny E1, 5, K, 10, Ia a Ib [12].

Podle letálního účinku jsou koliciny rozděleny do čtyř skupin:

1. Koliciny depolarizující plazmatickou membránu (A, B, E1, Ia, Ib, K, N, S4, U, Y, 5 a 10) [7]. Jsou to koliciny s molekulární hmotností okolo 40-70 kDa, jejichž baktericidní účinek spočívá ve schopnosti tvořit iontové kanály ve vnitřní membráně cílových buněk [13].
2. Koliciny s DNA endonukleázovou aktivitou (E2, E7, E8 a E9).
3. Koliciny blokuující proteosyntézu (D, E3, E4, E5, E6).
4. Koliciny degradující peptidoglykan (M) [7].

Jakmile tedy vstoupí kolicin do cílové buňky, bude záviset na typu kolicinu, jakým způsobem buňku usmrtí: tvorbou iontových kanálů v plazmatické membráně, degradací DNA nebo tím, že inhibuje syntézu proteinů [4].

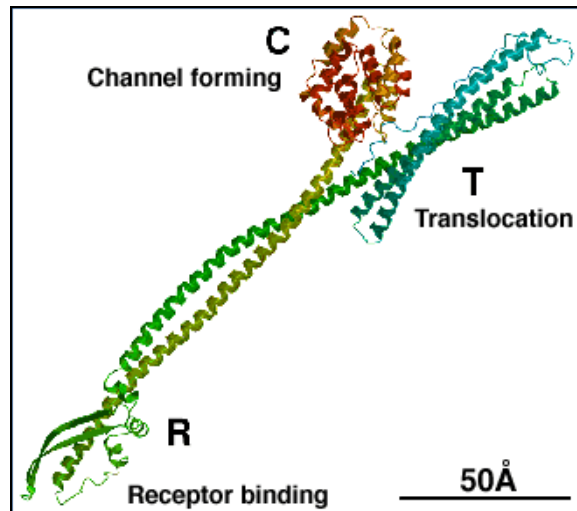
Koliciny jsou kódovány převážně na plazmidech. Syntéza kolicinů je kódovaná geny na tzv. Col – plazmidech [9]. Jsou rozlišovány dva typy Col plazmidů:

- Typ I – jedná se o malé plazmidy o velikosti 6-10 kb, může být přenášen v přítomnosti konjugativního plazmidu, kódují převážně koliciny skupiny A.
- Typ II – jde o velké plazmidy o velikosti kolem 40 kb, kódují zpravidla koliciny skupiny B; mohou nést i dva operony pro dva různé koliciny, například B a M nebo Ia a mikrocín V [7].

Kolicinový operon, nesen na Col – plazmidu, se obvykle skládá ze tří genů. Jsou to gen pro kolicin - toxin, gen pro imunitní protein a gen pro lytický protein [7]. Lytický protein usnadňuje export většiny kolicinů z produkčních buněk a způsobuje rozvolnění buněčného obalu a smrt produkční bakterie. Imunitní protein chrání produkční kmen proti letálnímu efektu kolicinu [9]. Interakce mezi volně rozpustným kolicinem a membránově vázaným imunitním proteinem je vhodným modelem pro studium protein – proteinových interakcí [14]. Imunitní protein kolicinů, které tvoří iontové kanály, je umístěn do plazmatické membrány buněk produkčního kmene a chrání je tak před účinkem exogenního kolicinu. Aktivitu endogenního kolicinu tlumí „obrácený“ membránový potenciál. Nukleázové koliciny, působící v cytoplasmě, jsou ihned po syntéze asociovány s imunitním proteinem, který chrání buňky produkčního kmene jak před exogenním, tak před endogenním kolicinem [9].

Koliciny jsou syntetizovány v buňce po stresu (SOS reakce) [4]. Existují látky, které jsou schopny vyvolat SOS reakci, nejpoužívanější při práci v laboratořích je antibiotikum mitomycin C [7].

Interakce kolicinu s citlivou bakteriální buňkou probíhá ve třech krocích. Jsou to vazba na specifický receptor ve vnější membráně bakterie (1), translokace přes buněčný obal (2) a vlastní letální účinek (3). Vazbu na receptor ve vnější membráně zprostředkovává centrální doména, vstup kolicinu přes buněčný obal zajišťuje N-terminální sekvence a C-terminální sekvence je odpovědná za letální účinky [10] a za interakci kolicinu s imunitním proteinem [6] (Obrázek 2).



Obr. 2. Struktura kolicinu a jeho jednotlivé části [15].

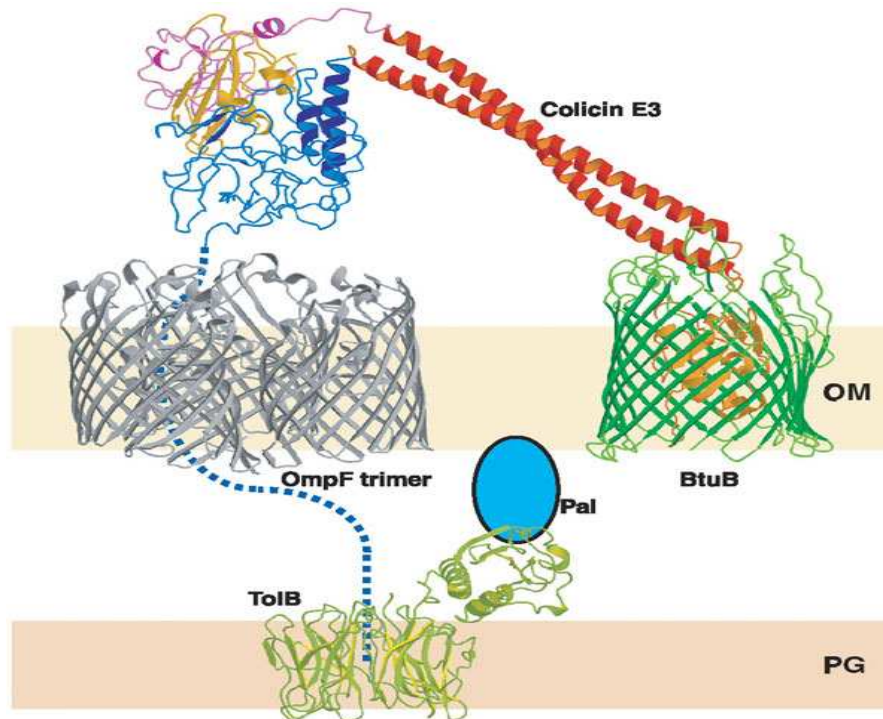
Vazba kolicinu na receptor je typickou protein-proteinovou interakcí a nevyžaduje energii ze strany buňky [9]. Různé koliciny využívají různé receptory, například FepA (ColB a D), FhuA (ColM), BtuB (ColE1 a E3), OmpF (ColA a N) [16].

### 1.1.1 Koliciny skupiny A

Do této skupiny patří koliciny E1- E9, K, N, S4, U a Y. Koliciny E2, E7, E8 a E9 vykazují DNA endonukleázovou aktivitu, koliciny E3, E4, E5 a E6 blokují proteosyntézu. Pro zbylé koliciny této skupiny je mechanismem účinku tvorba iontových kanálů ve vnitřní membráně cílových buněk [6] [7] [13].

Kolicin E1 patří do skupiny kolicinů tvořící iontové kanály, s čímž je spojena depolarizace plazmatické membrány. Je složen ze tří hlavních oblastí. Struktura kolicinu E1 byla objasněna pomocí rentgenové krystalografie [17]. Patton a kol. potvrzují, že kolicin E1 je vysoce účinný proti *Listeria monocytogenes* [18]. V jiné studii byl prokázán zvýšený výskyt kolicinu E1 u kmenů *E. coli*, izolovaných od pacientů s infekcí močových cest. Výsledky ukázaly, že kolicin E1 se zdá být potenciálně významný faktor virulence uropatogenních kmenů *E. coli* (UPEC), které tvoří podskupinu extra-střevní patogenní *E. coli*, způsobující infekci močových cest [8].

Kolicin E3 patří mezi koliciny blokující proteosyntézu. Na Obrázku 3 je znázorněn model vazby kolicinu E3 na receptor [27].



Obr. 3. Model vazby kolicinu E3 na receptor. Kolicin E3: translokační doména- modře, katalytická doména- purpurově, imunitní doména- žlutě. OM- vnější membrána, PG- peptidoglykan [27].

Kolicin A patří mezi nejčastější skupinu bakteriocinů ( E1, K, Ia, Ib, B, N). Je zajímavé, že koliciny sdílí 60-80% homologii v C-terminální doméně, ale mají různé imunitní proteiny, z nichž každý je specifický pro jeden kolicin [19]. C-terminální část kolicinu N vykazuje významnou homologii s C-terminální částí kolicinu A [20]. Molekulová hmotnost kolicinu A byla stanovena přibližně na 63 kDa [21]. Pro kolicin N je to přibližně 42 kDa [22].

Kolicin U vykazuje vysokou sekvenční homologii s kolicinem Y [14]. Přestože je mezi koliciny U a Y 87 % totožnost na úrovni aminokyselinové sekvence, nejsou jejich producenti navzájem zkříženě imunní [23].

Kolicin K je póry tvořící kolicin, u kterého byla prokázána účinnost proti kmenům způsobujícím záněty močových cest (UPEC). Studie byla prováděna na humánních izolátech v roce 2001 a 2002 ve Slovinsku [24].

N-terminální konec kolicinu K sdílí velkou homologii s N-terminálním koncem kolicinu S4. C-terminální konec kolicinu S4 sdílí určitou homologii s kolicinem A [25]. Kolicin S4 je zajímavý tím, že je složen ze čtyř částí: N- konec, dvě centrální domény a C-konec. Je to



jediný kolicin, který má dvě téměř totožné centrální domény, odpovědné za vazbu na receptor [26].

### 1.1.2 Koliciny skupiny B

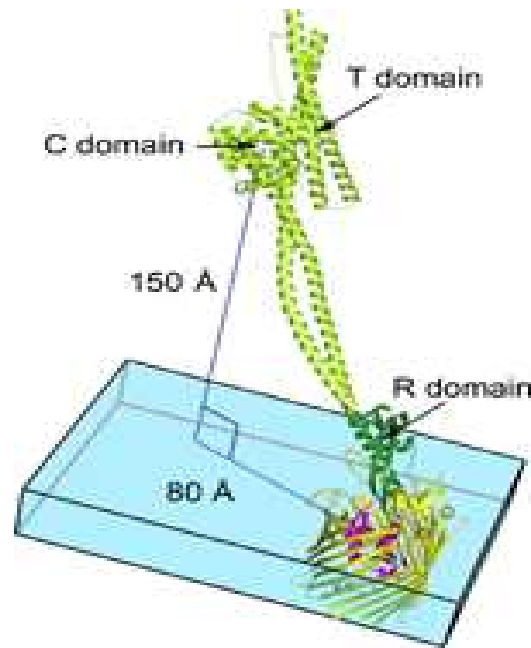
Do této skupiny patří koliciny B, M, Ia, Ib, D, 5 a 10 [7].

Kolicin M je nejmenší ze známých kolicinů, jeho molekulová hmotnost byla odhadnuta na 29 453 Da. Kolicin M blokuje syntézu peptidoglykanu, na základě čehož nastane jako druhotný efekt autolýza. Je to jediný kolicin, u kterého je známý takový mechanismus účinku. Geny pro kolicin a imunitní protein se nachází vedle sebe, ale v opačné orientaci, na ColM plazmidech [28]. Odolnost vůči tomuto kolicinu je zprostředkována pomocí *cmi* genu. Protein Cmi nepůsobí katalyticky, ale váže kolicin M do plazmatické membrány, což vede k inaktivaci kolicinu [29].

Kolicin B je cytotoxický protein s molekulovou hmotností 55 kDa. Jako receptor využívá vnější membránový transportér FepA a systém Ton pro translokaci. Po přístupu do cytoplazmatické membrány citlivých buněk *E. coli* tvoří póry, dochází k vyčerpávání elektrochemického potenciálu membrány, což nakonec vyústí ve smrt buňky. Celková struktura kolicinu B je ve tvaru činky [30].

Koliciny B a M patří k nejčastějším kolicinům u kmenů *E. coli* a běžně se vyskytují společně u jednoho izolátu, neboť jejich geny jsou kódovány na stejném plazmidu [31].

Kolicin Ia je iontové kanály tvořící a ve vodě rozpustný bakteriální toxin [32]. Kolicin Ia a Ib vykazují velkou sekvenční homologii a mají velmi podobnou molekulovou hmotnost, 69 457,7 Da pro kolicin Ia a 69 952,45 Da pro Ib [22]. Tyto dva koliciny adsorbují na stejné specifické buněčné receptory a mají také společný mechanismus účinku. I přes všechny společné rysy nejsou producenti vzájemně zkříženě imunní. Buňky schopné produkovat kolicin Ia jsou imunní k nízkým koncentracím kolicinu Ia, ale ne k Ib a naopak [33]. Na Obrázku 4 je znázorněna vazba kolicinu Ia na membránový receptor.



Obr. 4. Model vazby kolicinu Ia na Cir. Kolicin Ia: R- doména- tmavě zelená, zbytek molekuly- světle zelená. CIR- žlutá a purpurová. Modré políčko označuje tloušťku membránové dvojvrstvy (Cir je v ní obsažen) [34].

Kolicin D se od ostatních kolicinů liší vysokou molekulární hmotností a obsahem šesti cysteinových zbytků ve své molekule. Kolicin D má obdobné mechanismy působení jako kolicin E3, ale jejich molekulární vlastnosti jsou zcela odlišné. Kolicin D je jednoduchá bílkovina složená pouze z aminokyselin [35].

Koliciny 5 a 10 zabíjí citlivé buňky permeabilizací jejich buněčných membrán. Kolicin 5 je zkoumán pro velmi vhodné vlastnosti jako potenciální nové antibiotikum, zejména pro léčbu infekcí lidí a zvířat způsobené patogenními kmeny *E. coli* [36].

## 1.2 Mikrociny

Mikrociny představují druhou třídu bakteriocinů produkovaných *Escherichia coli*. Geny mohou být kódované chromozomálně nebo na plasmidech. Buňky syntetizují mikrociny za specifických podmínek, jako je například nedostatek železa [4]. Oproti kolicinům není pro-

dukce mikrocinů regulována SOS systémem a jejich syntéza není pro produkční buňku letální [37]. Způsoby, jakými mikrocin zabíjí buňku nejsou všeobecně známé, ale některé narušují membránový potenciál cílové buňky [5]. Syntéza mikrocinů je aktivována při dosažení stacionární fáze růstu buněk nebo při nedostatku oxidu dusíku a fosforečnanu (mccB17), při nedostatku uhlíku a fosforečnanu (mccJ25) nebo při nedostatku uhlíku v prostředí (mccC51). Lze předpokládat, že produkcí mikrocinů buňka inhibuje ostatní buňky citlivé k účinkům mikrocinů, čímž získá více živin pro sebe. Mikrocin by mohl působit také jako signální molekuly [38].

Mikrocin lze rozdělit do dvou skupin na základě jejich molekulové hmotnosti:

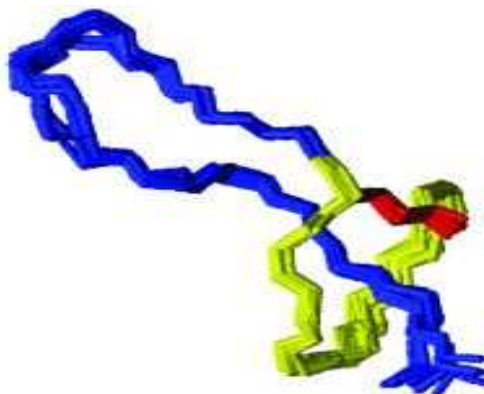
1. skupina – malé peptidy s nízkou molekulovou hmotností pod 3,5 kDa, kam patří mikrocin B17, C7, J25.
2. skupina – mikrocin s vyšší molekulovou hmotností, kam patří například mikrocin H47, E492, V a L.

Dále mohou být tyto mikrocin rozděleny na nemodifikované a modifikované peptidy. Nemodifikované mikrocin jsou vylučovány pouze s cílem působit na citlivé buňky a jejich genetické skupiny nacházející se v plazmidech jsou velmi jednoduché [39]. Do této skupiny patří mikrocin E492, H47, 24, V a L [40]. Naproti tomu modifikované mikrocin jsou peptidy, které před vyloučením podstoupí posttranslační modifikaci [39]. Patří sem mikrocin B17, C7, J25 [40].

### 1.2.1 Mikrocin 1. skupiny

Mikrocin J25, B17 a C7 patří do skupiny ribozomálně syntetizovaných peptidů s nízkou molekulovou hmotností - pro mccJ25 to je 2 106 Da, pro mccB17 to je 3093 Da a pro mcc C7 to je 1178 Da. Tyto tři mikrocin mají společnou nejen nízkou molekulovou hmotnost, ale také velmi neobvyklé struktury v důsledku rozsáhlých posttranslačních modifikací [38].

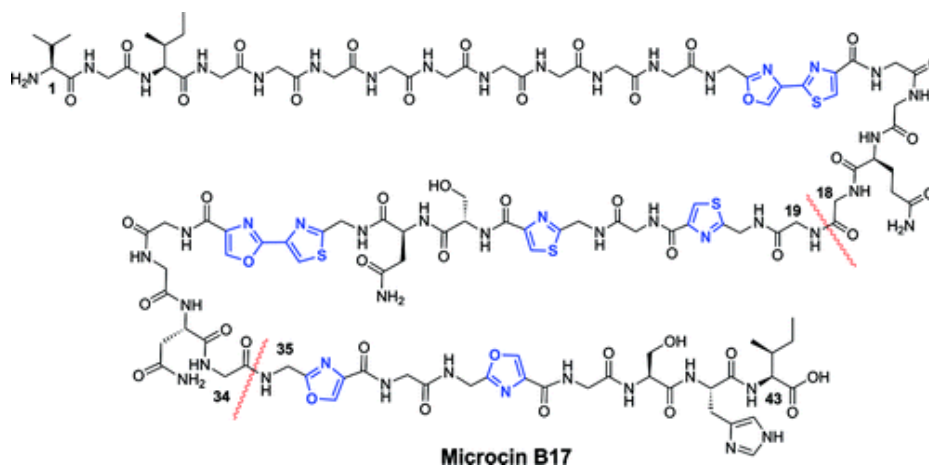
Neobvyklá struktura mccJ25, podobná zavitému lasu (Obrázek 5), je odpovědná za jeho extrémně vysokou stabilitu. Mikrocin J25 je vysoce odolný vůči proteolýze a dokonce odolává autoklávování bez ztráty aktivity [41].



Obr. 5. Struktura mikrocinu J25 [42].

Mikrocin J25 inhibuje transkripci pomocí bakteriální RNA polymerázy. Ve studii Portrait a kol.[43] byl uveden možný účinek mikrocinu J25 proti patogenním kmenům *Salmonella enteritidis*, potvrzený pokusem *in situ*. Ve studii Lopez a kol. [44] byl potvrzen vliv mikrocinu J25 na snižování počtu bakterií v játrech a slezině u myší infikovaných salmonelou.

Studie Thompsona a kol. [45] byla věnována struktuře mikrocinu B17. Je to posttranslačně modifikovaný peptid, který ve své molekule obsahuje čtyři oxazolové a čtyři tiazolové kruhy a je znázorněn na Obrázku 6.



Obr. 6. Mikrocin B17 [45].

### 1.2.2 Mikrocin 2. skupiny

Do této skupiny patří mikrocin V, L, E492 a H47 [40].

Kolicin V byl popsán Gratiou v roce 1925 jako první kolicin. V novějších studiích je již kolicin V řazen k mikrocinům, vzhledem k malé velikosti své molekuly a především proto,

že narozdíl od kolicinů není jeho produkce inducibilní na základě SOS reakce a není z buňky vylučován na základě lyze [46].

Mikrocin E492 patří mezi bakteriociny tvořící ve vnitřní membráně cílových buněk iontové kanály. Vyskytuje se ve dvou formách, jako posttranslačně modifikovaný a jako nemodifikovaný peptid. Molekulová hmotnost tohoto bakteriocinu byla stanovena na 7,887 Da [47]. Srovnání aminokyselinových sekvencí ukazuje v určité části shodu s mikrocinem V. Mikrocin E492 je termorezistentní a odolný vůči kyselinám. Je aktivní vůči kmenům *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* a *Erwinia* [48]. Tento mikrocin je zajímavý tím, že působí toxicky na zhoubné buňky prostřednictvím apoptózy [49], což je požadovaný mechanismus při léčbě rakoviny a alternativně mohou být živé bakterie použity pro produkci mikrocinu u některých nádorů [50].

Mikrocin H47 patří do skupiny mikrocinů s vyšší molekulovou hmotností, které mají 60-90 aminokyselinových zbytků a je řazen mezi modifikované peptidy (katechol mikrocinu) a vstupuje do buněk přes některý ze tří katechol receptorů (Cir, Fiu, FepA) [39]. Zároveň je ale dle studie Pons (2004) mikrocin H47 řazen i k nemodifikovaným peptidům [40].

Mikrocin L je nemodifikovaný peptid s molekulovou hmotností 8,884 Da. Jeho C-terminální část vykazuje vysokou homologii s mikrocinem V. Může být charakterizován jako termostabilní protein, odolává záhřevu až 100 °C po dobu 10 minut [40].

### 1.3 Využití kolicinů a mikrocinů

V uplynulých letech si některé bakteriociny, obecně považované za bezpečné, získaly zvláštní pozornost vzhledem k jejich potenciální aplikaci v konzervaci potravin. Yang a kol. [36] se ve své studii zabýval možným využitím kolicinu 5 jako náhrady běžných antibiotik a došel k závěru, že kolicin 5 je díky úzkému spektru působnosti vysoce efektivní pro léčbu infekcí u lidí i zvířat způsobených patogenními kmeny *E. coli*. Také James a kol. [51] ve své studii potvrzují možné využití kolicinů při vývoji nových antibiotik a konzervačních prostředků.

Rostoucí zájem o přírodní produkty naproti uměle vyrobeným chemikáliím by mohl vést k dalším možnostem aplikace bakteriocinů v oblastech jako je kontrola chorob rostlin bakteriálního původu, ale také například při kontrole zubního kazu nebo při léčbě cystické fibrózy. Trautner a kol. ve své práci vyhodnotili kolicin E2 jako vysoce účinný při inhibici

růstu uropatogenních kmenů *E. coli*, čímž je možno předcházet vzniku infekcí močových cest při používání katetru [52].

V další studii je uvedena možnost aplikace bakteriocinů v probiotických přípravcích používaných k zabránění vzniku mikrobiálních střevních patogenů [53] nebo jako prevence patogenů mimo střevní trakt, například ústní dutina nebo dýchací cesty [54].

V práci Pattona a Dicksona [18] byl hodnocen účinek kolycinu E1 proti *Listeria monocytogenes* v bujónu a na povrchu hotových jídel. Uvedené výsledky naznačují, že kolicin E1 je proti listeriím vysoce účinný.

Sable a kol. [55] hodnotí ve své práci inhibiční aktivitu mikrocinu J25 proti *E. coli* způsobující průjemová onemocnění, zejména sérotypu O157:H7, který byl příčinou několika velkých epidemií v Evropě, Severní Americe a Japonsku, většinou po požití masa nebo mléčných výrobků. Inhibiční aktivita J25 proti *E. coli* O157:H7 byla testována ve třech produktech: sterilní odstředěné mléko, vaječný žloutek a masový extrakt. Výsledky prokázaly vysokou inhibiční aktivitu mikrocinu J25 vůči tomuto patogenu.

Ve studiích [49] a [50] je uveden toxický účinek mikrocinu E492 na zhoubné buňky a jeho možné využití při léčbě rakoviny.

## 2 METODY VYUŽÍVANÉ V MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

Metody molekulární biologie umožňují analýzu biologicky významných molekul, zejména těch, které nesou a následně uskutečňují genetickou informaci, tedy nukleových kyselin a bílkovin. Rozvoj těchto metod v posledních dvaceti letech umožnil detailní analýzu genetické informace. Dnes nejužívanější metody v diagnostice jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR). Jejich výhody spočívají především ve vysoké specifičnosti, citlivosti a možnosti standardizovaného přístrojového provedení s minimálním množstvím biologického materiálu potřebného k vyšetření [56].

### 2.1 Hybridizační metody

Hybridizační metody jsou založeny na identifikaci určitých částí genomu pomocí uměle připravených úseků DNA se známou sekvencí, nazývané jako sondy, přičemž každá sonda musí být označena. Principem hybridizace je denaturace a reasociace DNA [57].

#### 2.1.1 Southern blot

Southern blot patří k variantám hybridizace na pevném nosiči. Tato metoda umožňuje přenos molekuly DNA z agarózového gelu, kde probíhala elektroforéza, na nitrocelulóзовý nebo nylonový materiál. Následně může být vzorek zvýrazněn pomocí radioaktivních nebo jiných prób [58].

#### 2.1.2 Metoda FISH

Metodou FISH lze lokalizovat cílové nukleotidové sekvence přímo v buňkách (*in situ*). Metoda je založena na schopnosti jednořetězcové DNA sondy vázat komplementární úsek cílové DNA fixované na mikroskopickém skle [59]. Při této metodě se používají specifická barviva (fluorochromy), jež se váží na konkrétní sekvenci DNA. Následně jsou preparáty pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem [60]. Citlivost metody FISH je srovnatelná s metodami založenými na amplifikaci [61].

### 2.2 Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je enzymová reakce, která slouží k rychlé syntéze velkého množství definovaného úseku DNA *in vitro* [62].

Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné PCR použít pro zjištění přítomnosti velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku. Základem úspěšné reakce je použití neporušeného úseku DNA, který má být amplifikován a navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specifita reakce. Pro PCR je nutno znát sekvence alespoň hraničních úseků fragmentu, který má být amplifikován. Řetězová reakce poskytuje exponenciální amplifikaci originální DNA, kde počet cyklů ( $n$ ) určuje kolik kopií ( $2^n$ ) je syntetizováno [62].

PCR byla zavedena Kary B. Mullisem v roce 1985. Její výhodou je zejména to, že umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech [63]. Jedná se o enzymatickou amplifikaci DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Dvouvláknová DNA je nejprve denaturována na dvě jednovláknové templátové (matricové) molekuly DNA. Nukleotidová sekvence cílové DNA nemusí být známa, ale musí být známé alespoň sekvence krátkých úseků na obou koncích cílové amplifikované DNA. Oligonukleotidové sondy (primery), které hybridizují na obou stranách cílové DNA, řídí syntézu nových vláken. Jejich syntézu katalyzuje termostabilní DNA polymeráza (např. *Taq*) od 5' konce ke 3' konci vždy začínající od primerů. Během prvního cyklu syntéza nového vlákna pokračuje dále až za sledovanou sekvenci, ale následné cykly již amplifikují převážně pouze úsek mezi dvěma vybranými sondami (primery) [64].

Reakce se provádí v zařízení zvaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech [63]. Reakční objem je obvykle mezi 20 – 100  $\mu$ l [64].

### 2.2.1 Jednotlivé složky PCR reakce

#### Templátová DNA

Množství templátové DNA potřebné pro PCR je 1,0 – 500,0 ng [64]. Na výchozí koncentraci templátové DNA je závislý optimální počet cyklů, který se většinou pohybuje v rozmezí 25 – 35 cyklů. Pro PCR je důležitá úplná počáteční denaturace templátu, k čemuž postačuje zahřátí směsi na 94 – 97°C. Při pouze částečné denaturaci dochází k nespecifické vazbě primerů (self-priming) a falešným výsledkům [63]. Templátová DNA by měla být neporušená v amplifikovaném úseku a je důležité, aby vzorek s DNA neobsahoval inhibitory reakce, například detergenty, EDTA, stopy fenolu [65].



### Primery

Oligonukleotidové primery jsou syntetizovány tak, aby hybridizovaly s komplementární sekvencí na obou vláknech dubletu DNA [64]. Optimální délka je 18 -25 nukleotidů [63]. Jejich optimální koncentrace v reakci je mezi 0,1-1,0  $\mu\text{mol/l}$ . Koncentrace primerů má své optimum v závislosti na jejich sekvenci a složení nukleotidů cílové DNA [65]. Poměr GC:AT by měl být vyvážený [62]. Primery by neměly obsahovat oblasti bohaté na AT a GC a neměly by být mezi sebou komplementární, zejména ne na 3' konci, kde překrytí dvou nebo tří bází může způsobit vznik dimeru primerů, zejména při nadbytku primeru. Může tak vzniknout nežádoucí produkt PCR, např. z 2 \* 20 bp primerů vzniká 40 bp fragment [64].

### dNTP mix

Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP mix) se používají v optimální koncentraci 200  $\mu\text{mol/l}$  každého [33]. Jedná se o vodný roztok obsahující ultračistou směs každého ze čtyř dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) o pH 7,5 [66].

### Taq DNA polymeráza

Taq DNA polymeráza, izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, je termostabilní DNA polymeráza. Podmínka termostability je nutná z toho důvodu, že jedním krokem opakovaných cyklů je denaturace DNA za vysoké teploty. V případě, že by byla DNA polymeráza během tohoto kroku inaktivována, bylo by zapotřebí ji při každém cyklu po denuraci přidat [62], zatímco tato DNA polymeráza může být opakovaně vystavena vyšší teplotě (cca 95°C). Kromě Taq polymerázy jsou používány i jiné teplotně rezistentní polymerázy, například *Pwul*, *Tth* nebo *Tbr*, které vykazují nižší procento tvorby chyb [65].

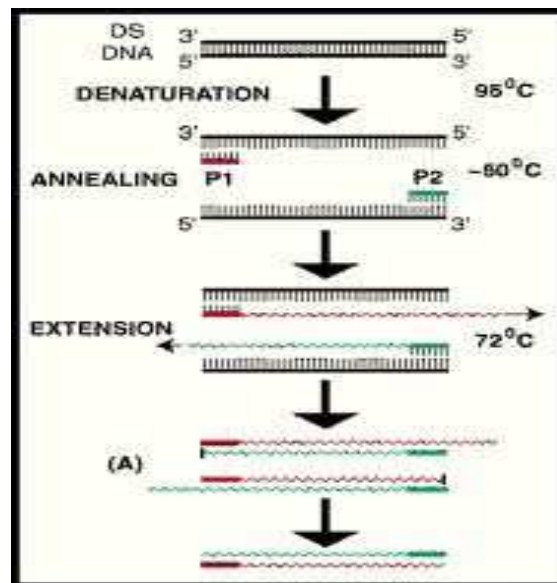
### PCR pufr

PCR pufr obsahuje Tris-HCl, KCl a želatinu. Doporučuje se používat pufr dodávaný výrobcem polymerázy [65].

### 2.2.2 Teplotní fáze reakčního cyklu

Vlastní PCR probíhá při třech teplotách, které odpovídají třem krokům v amplifikačním cyklu – denuraci, annealingu a elongaci [65]. Schéma průběhu PCR reakce je znázorněno na Obrázku 7.

- a) denaturace optimálně probíhá při 95°C, pro fragmenty do 1 kb 15 sekund, pro větší fragmenty 0,5-1,0 minutu [64].
- b) teplota, při které dochází k připojování primerů, je závislá na teplotě tání primerů a většinou se pohybuje mezi 50-65 °C [65].
- c) v této fázi jsou připojovány jednotlivé deoxyribonukleotidy ve směru 5' → 3'. Teplota je zvýšena na 75 °C, což je teplotní optimum pro *Taq* polymerázu [62].



Obr. 7. Průběh PCR reakce [67].

Počet cyklů se obvykle pohybuje v rozmezí 15-30 [64], popřípadě až 35 [63]. Výsledným produktem PCR jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp, analogické restričními fragmentům [63].

PCR je významným nástrojem pro detekci odchylek v sekvencích nukleových kyselin. Používá se například pro monitorování terapie rakoviny, k detekci bakteriálních a virových infekcí, také například viru HIV a je hojně využívána také v prenatální diagnostice [63].

## 2.3 Modifikace PCR reakce

### 2.3.1 Multiplex PCR

Multiplexová reakce je velmi výkonná metoda PCR k testování mnoha delecí a bodových mutací v jedné amplifikační reakci, v jednom elektroforetickém dělení v agaróze a obvykle s detekcí značením etidumbromidem. Do reakční směsi je přidáváno několik párů primerů rozpoznávajících několik cílových sekvencí, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi [63]. Nejsložitější je fáze přípravná, kdy je nutno vypracovat takové reakční podmínky (sekvence nukleotidů, koncentrace primerů, optimální teploty jednotlivých kroků cyklu), aby amplifikační reakce pro každý testovaný úsek genomické DNA neprobíhala pouze v případě, že se jedná o mutaci v tom kterém příslušném místě [64]. Hlavní výhodou multiplex PCR jsou nižší cenové náklady. Používá se k vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA nebo testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA. Příkladem využití této metody je diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie [63].

### 2.3.2 Kvantitativní PCR (QPCR)

Principem je amplifikace stejného množství kompetitivního templátu spolu se stejným množstvím cílové DNA. Kompetitivní templát obsahuje stejné sekvence pro vazbu primerů jako cílová DNA, ale má rozdílnou velikost. Okamžik, ve kterém jsou intenzity PCR produktů odvozených z cílové DNA a kompetitivní DNA ekvivalentní, je potom použit na stanovení množství cílové sekvence v původním vzorku [63].

### 2.3.3 Real - time PCR (RT-PCR)

Real-time PCR je založena na sledování průběhu PCR přímo během reakce pomocí fluorescenčních sond nebo barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, to znamená schopnost kvantifikace. Je prováděna pomocí přístrojů, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR [68].

### 2.3.4 Nested PCR

PCR, která využívá vnitřních a vnějších primerů, je vysoce citlivá metoda, která umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA. Amplifikace je prováděna ve dvou krocích. První zahrnuje 15- 30 cyklů s jedním párem tzv. vnějších primerů. Vzniklý produkt je převeden do nové zkumavky pro druhý krok s tzv. vnitřním párem primerů, které jsou specifické pro vnitřní část sekvence amplifikované s párem vnějších primerů. Po dokončení následuje detekce elektroforézou [63].

### 2.3.5 Inverzní PCR

Obrácená PCR je varianta, která umožňuje amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci ohraničené na obou stranách DNA se známou sekvencí [63].

## 2.4 Elektroforéza

K detekci, separaci a purifikaci fragmentů DNA, které byly získány v PCR reakci, je používána elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu [62]. Jedná se o fyzikálně-chemickou metodu pro dělení látek v elektrickém poli [65]. Fragmenty DNA jsou děleny podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje. Sacharido-fosfátová páteř nukleových kyselin je příčinou rovnoměrného rozložení negativních nábojů v molekulách DNA. Pohyb těchto vysoce elektronegativních molekul v elektrickém poli vede k jejich separaci podle jejich molekulové hmotnosti. Koncentrace agarózy se volí podle velikosti fragmentů a pohybuje se od 0,8 do 3% (Tabulka 1) [64].

*Tab. 1. Koncentrace agarózy v závislosti na velikosti fragmentů.*

<b>Velikost fragmentů</b>	<b>Koncentrace agarózy</b>
1-20 kb	0,4-0,8%
500-1000 kb	2%
100-500 kb	3%
10-100 kb	5%

Mnoho amplifikací používá horizontální elektroforézu ( $U = 80-200V$ ,  $I=20-60 \text{ mA}$ ) a gel je uložen ve svém lůžku ponořen do pufru (TE, TBE, TAE). Nanášení vzorku na start do jamek předchází smíšení s nanášecím pufrem, který obsahuje barvu viditelného spektra (např. bromfenolová modř  $0,5 \text{ g/l}$ ,  $400\text{g/l}$  sacharóza,  $20\text{mmol/l}$  EDTA). Jako kalibrační škály molekulové hmotnosti se používá krokový žebříček po 50 nebo 100 bp (*Step ladder*) nebo jiné PCR markery [64].

Gel je barven etidiumbromidem, což je interkalační činidlo, které se váže mezi vlákna DNA a červeno-oranžově fluoreskuje po ozáření UV zářením o vlnové délce 260-360nm. Komplex DNA s etidiumbromidem je následně vizualizován osvětlením pomocí zdroje UV záření (transluminátoru) [62].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo provést bakteriocinotypizaci kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin v těchto krocích:

- identifikovat bakteriální izoláty z potravin biochemickými metodami,
- s kmeny identifikovanými jako *Escherichia coli* provést vpichový pokus na zjištění produkce bakteriocinů,
- u produkčních kmenů *E. coli* aplikovat systém duplex PCR detekce bakteriocinů dle diplomové práce Janákové [69],
- výsledky vyhodnotit a diskutovat s nejnovější literaturou.

## 4 MATERIÁL

### 4.1 Přístrojová technika

- Autokláv -135 S, H+P Varioklav - H+P Labortechnik AG, Německo
- Termostat - BT 120 - Laboratorní přístroje Praha, Česká republika
- Laboratorní chlazená centrifuga 2300K - Hermle Labortechnik, Německo
- Termoblok BIO TDB-100 - Dry Block Heating Thermostat, Litva
- Digitální váha - Kern&Sohn GmbH, Německo
- Automatické mikropipety - Nichiryo, Japonsko
- Termocycler - Bio-Rad , USA
- Elektroforéza – SCIE PLAS, Anglie
- UV transluminátor - Ultra Lum Inc., USA
- Běžné laboratorní sklo

### 4.2 Kultivační média

masopeptonový bujón (MPB)

- NaCl 5 g
- Masový výtazek 10 g
- Pepton 10 g
- Destilovaná voda 1000 ml

Pro pevné živné půdy bylo přidáno 15 g/l agarů.

Soft agar (1,05%)

- NaCl 5 g
- Masový výtazek 3 g
- Pepton 5 g
- Agar 10,5 g
- Destilovaná voda 1000 ml



### 4.3 Chemikálie

- primery - Invitrogen, USA (Tabulka 4)
- *Taq* DNA polymeráza – *Taq* DNA polymerase with ThermoPol Buffer, BioLabs, USA
- dNTP Mix – směs dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Jena Bioscience, Německo
- agaróza – Sea Kem LE Agarose, Lonza, USA
- etidiumbromid – Sigma Aldrich, Německo
- nanášecí pufr – TopBio, Česká republika
  
- TAE pufr (50x koncentrovaný)
  1. TRIZMA – Sigma Aldrich, Německo
  2. EDTA (0,5M roztok EDTA, pH 8,0) – Lachema, Česká republika
  3. Kyselina octová – Ing. Petr Lukeš, Česká republika
  
- 100 bp DNA marker – New England Biolabs, USA
  1. 180  $\mu$ l vody
  2. 50  $\mu$ l nanášecího pufru
  3. 20  $\mu$ l DNA ladder

### 4.4 Použité bakteriální kmeny

Vzorky drůbežního masa byly získány od J. Rozumkové [73]. Jednalo se o 37 izolátů pocházejících z chlazené drůbeže zakoupené v tržní síti, a to u prodejců RACIOLA-JEHLIČKA s.r.o., ve zlínské podnikové prodejně, Řeznictví a uzenářství Josef Filák v podnikových prodejnách ve Zlíně a Uherském Hradišti. Tyto vzorky byly zamrazeny 9.7.2010 a až do použití v této práci byly uchovány v zamraženém stavu (-80 °C). Jednotlivé vzorky byly značeny R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R24, R25, R26, R27, R28, R31, R33, R35, R37, R38, R39, R40, R41, R45, R47, R50, R51.

Vzorky bažantího masa byly získány od Ing. Roberta Gála, Ph.D. Jednalo se o bažanty, kteří byli z části vychováni ve voliérách v bažantnici Svatobořice - Místřín (Jihomoravský kraj) a následně vypuštěni do přírody, kde byli odloveni. Dále byli zahrnuti bažanti žijící ve volné přírodě ve stejném regionu (Svatobořice – Místřín) a v těchto místech byli následně odloveni. Bažanti byli odloveni dne 6. 11. 2010 a skladováni ve visu venku při průměrné teplotě 6,3 °C pro Jihomoravský kraj [74]. První vzorky masa byly odebrány dne 9. 11. 2010. Z dalších kusů ponechaných za stejných podmínek byly odebrány vzorky masa dne 18. 11. 2010. Celkem bylo izolováno 8 kmenů, všechny z Endova agarů, což je selektivně diagnostická půda pro koliformní bakterie. Charakteristika kmenů je uvedena v Tabulce 2.

Tab. 2. Charakteristika bakteriálních kmenů izolovaných z bažantů.

Označení izolátu	Původ bažanta	Datum odlovu	Datum odběru vzorků masa	Vzorek masa
I/1	chov	6. 11. 2010	9. 11. 2010	prsí svalovina
I/2	chov	6. 11. 2010	9. 11. 2010	stehenní svalovina
I/3a	chov	6. 11. 2010	9. 11. 2010	játra
I/3b			9. 11. 2010	
I/4a	volná příroda	6. 11. 2010	9. 11. 2010	prsí svalovina
I/4b			9. 11. 2010	
I/6a	volná příroda	6. 11. 2010	9. 11. 2010	játra
I/6b			9. 11. 2010	
II/1	chov	6. 11. 2010	18. 11. 2010	prsí svalovina
II/3	chov	6. 11. 2010	18. 11. 2010	játra

## 5 METODY

### 5.1 Enterotest

U vzorků pocházejících z bažantů byly pro identifikaci bakteriálních kmenů provedeny biochemické mikrotesty. Použity byly Enterotesty 24 od firmy Lachema, které jsou určeny pro identifikaci bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, splňující podmínku gramnegativních fermentujících tyčinek

Suspenze zkoumaného kmene s fyziologickým roztokem byla napipetována do všech jamek. Označené jamky (indol, sirovodík, lysin, ornitin, ureáza, arginin) byly zakapány parafinovým olejem pro vytvoření anaerobního prostředí. Vše bylo inkubováno v termostatu při 37°C do druhého dne. Po inkubaci bylo do příslušných jamek přidáno činidlo (do jamky pro test indolu činidlo pro indol, do jamky pro test acetoinu činidla VPT I a II, do jamky pro test fenylalaninu činidlo pro fenylalanin). U fenylalaninu byla barevná reakce odečtena ihned, neboť pozitivní reakce mizí do 2 minut po přidání činidla, indol a VPT bylo ponecháno 30 minut ustát pro vývoj barevné reakce. Výsledky byly vyhodnoceny dle barevné srovnávací stupnice a zaznamenány do formulářů pro Enterotest 24. Identifikace byla provedena identifikačním programem TNW Lite, Lachema.

### 5.2 Kvalitativní stanovení produkce bakteriocinů

Biologická aktivita kolicinů byla stanovena kvalitativně vpichovým pokusem. Bakterie byly vpichem naočkovány do misky s MPA a kultivovány v termostatu 24 hodin při 37 °C. Poté byly usmrceny parami chloroformu (30 min) a přelity 3 ml 1,05% agaru s 0,1 ml kultury čerstvě narostlého indikátorového kmene pro testování produkce kolicinů. Jako indikátorové kmeny pro testování produkce kolicinů byly použity kmeny *E. coli* K12 Row, *E. coli* P400, *E. coli* B1, *E. coli* φ, *E. coli* Sabina 40 a *S. sonnei* 17 [75]. Po kultivaci v termostatu při 37 °C byla druhý den zjišťována přítomnost inhibičních zón.

### 5.3 PCR reakce

Metoda PCR reakce byla v práci použita pro určení konkrétního typu kolicinu či mikrocinu u produkčních kmenů. Jelikož práce navazuje na diplomovou práci Janákové [69], byly i

v této práci použity stejné primery pro detekci kolicinů a mikrocinů (Tabulka 3 a 4) a převzaty optimalizované podmínky pro průběh reakce.

### 5.3.1 Příprava vzorků DNA

Vzorek byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l 1x ředěného PCR pufru a tato suspenze byla inkubována v termobloku po dobu 20 minut při 95 °C. Poté byla provedena centrifugace 10 000 ot./4 minuty. Získaný supernatant, který obsahuje DNA, byl převeden do eppendorfky a sloužil jako templát do PCR reakce.

### 5.3.2 Složení amplifikační směsi pro detekci kolicinů a mikrocinů

Jednotlivé komponenty reakční směsi byly míchány ve formě master mixu, čímž dochází ke zkrácení času pro přípravu vzorků a také k eliminaci chyb způsobených pipetováním velmi malých množství komponent. Celkový objem jedné reakční směsi byl 25  $\mu$ l. Použité kolicinové a mikrocinové primery jsou uvedeny v Tabulce 3 a 4. Množství jednotlivých složek směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 5 a 6.

Primery byly podle velikosti specifického PCR produktu seřazeny do párů pro metodu duplex PCR [69]. Poslední čtyři používané primery byly přidávány jednotlivě. U každého vzorku DNA bylo tedy prováděno 14 reakcí pro detekci bakteriocinů:

- 1) colE9 (418 bp) + colU (485 bp)
- 2) colIa (473 bp) + colE2 (409 bp)
- 3) colM (429 bp) + colY (477 bp)
- 4) colE4 (409 bp) + col5 (443 bp)
- 5) colJs ( 254 bp) + col10 (448 bp)
- 6) colA (475 bp) + colD (420 bp)
- 7) colE5 (430 bp) + colB (492 bp)
- 8) colIb (464 bp) + colE3 (413 bp)
- 9) colE6 (399 bp) + colE7 (431 bp)
- 10) mccH47 (227 bp) + mccB17 (135 bp)
- 11) colE1 (649 bp)
- 12) colS4 (456 bp)
- 13) mccV (680 bp)
- 14) colE8 (449 bp)

Tab. 3. Použité kolicinové primery [8]

Označení	Typ kolicinu	Název primeru	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost produktu (bp)
1	A	ColA-F	CGTGGGGAAAAGTCATCATC	475
		ColA-R	GCTTTGCTCTTTCCTGATGC	
2	B	ColB-F	AAGAAAATGACGAGAAGACG	492
		ColB-R	GAAAGACCAAAGGCTATAAGG	
3	D	ColD-F	CTGGACTGCTGCTGGTGATA	420
		ColD-R	GAAGGTGCGCTTACTACTGC	
4	E1	ColE1-F	TGTGGCATCGGGCGAGAATA	649
		ColE1-R	CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTTT	
5	E2	ColE2-F	GATGCTGCTGCAAAAGAG	409
		ColE2-R	TTCAAAGCGTTCCTACCAC	
6	E3	ColE3-F	TAAGCACGCTGCATTTGATG	413
		ColE3-R	TCGGATTCGGACCTTTCAAC	
7	E4	ColE4-F	GAAGGCTGCATTTGATGCT	409
		ColE4-R	CGGATCCGGACCTTTAATTT	
8	E5	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	430
		ColE5-R	TTGAATTCTCGAATCGTCCA	
9	E6	ColE6-F	ACCGAACGTCCAGGTGTT	399
		ColE6-R	TTAGCCTGTCGCTCCTGAT	
10	E7	ColE7-F	GCATTCTGCCATCTGAAAT	431
		ColE7-R	CTTCTGCCCACTTTCTTTTCG	
11	E8	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	449
		ColE8-R	GACTGATTGGCTTGTCGTGA	
12	E9	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	418
		ColE9-R	GACTTTTCTCCCTCCGACCT	
13	Ia	ColIa-F	GCATGCAAATGACGCTCTTA	473
		ColIa-R	GAGGACGCCAGTTCTCTGTC	
14	Ib	ColIb-F	AACGAGTGGGTCGATGATTC	464
		ColIb-R	CCTTTTCTGCGCTCGTATTC	

Pokračování Tab. 3.

Označení	Typ kolicinu	Název primeru	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost produktu (bp)
15	<b>M</b>	ColM-F	GCTACCACTTCGCAAAACC	429
		ColM-R	GAGCGACTCTCCGATAATGC	
16	<b>U</b>	ColU-F	TGATTGCTGCGAGAAAAATG	485
		ColU-R	TCTGACAGCCTCTCCCTGTT	
17	<b>Y</b>	ColY-F	GCAGGCAGAAAAGAACAAGG	477
		ColY-R	CGGACGTTATTTGCCTTCAT	
18	<b>Js</b>	ColJs-F	TCAAAATGTTTGGGCTCCTC	254
		ColJs-R	TAATCTGCCCTGTCCCCTG	
19	<b>5</b>	Col5-F	CATTGGCAAAAGCGAAATTC	443
		Col5-R	TGCAACTCTGGAAACAATCG	
20	<b>10</b>	Col10-F	GGTTACCGGATTTCTCTGGAT	448
		Col10-R	TTCTGAATGCTTGGCCCACT	
21	<b>S4</b>	ColS4-F	TATATGGCCCAACTGCTGGT	456
		ColS4-R	CGTAAGGACGGACACCTGTT	

Tab. 4. Použité mikrocínové primery.

Označení	Typ mikrocinu	Název primeru	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost produktu (bp)
1	<b>B17</b>	MccB17-F	TCACGCCAGTCTCCATTAGG TGTTGGCATT	135
		MccB17-R	TTCCGCCGCTGCCACCGTTT CCACCACTAC	
2	<b>H47</b>	MccH47-F	CACTTTCATCCCTTCGGATT G	227
		MccH47-R	AGCTGAAGTCGCTGGCGCAC CTCC	
3	<b>V</b>	MccV-F	CACACACAAAACGGGAGCT GTT	680
		MccV-R	CTTCCC GCAGCATAGTTCCA T	

Tab. 5. Složení amplifikační směsi pro duplex PCR.

Složka PCR směsi	Objem v $\mu\text{l}$
Voda	20,4
PCR pufr	2,5
dNTP mix	0,5
Temlátová DNA	0,5
<i>Taq</i> DNA polymeráza	0,1
Primer R <sub>1</sub> /R <sub>2</sub>	0,25/0,25
Primer F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>	0,25/0,25

Tab. 6. Složení amplifikační směsi pro jednoduchou PCR.

Složka PCR směsi	Objem v $\mu\text{l}$
Voda	20,9
PCR pufr	2,5
dNTP mix	0,5
Temlátová DNA	0,5
<i>Taq</i> DNA polymeráza	0,1
Primer R <sub>1</sub>	0,25
Primer F <sub>1</sub>	0,25

### 5.3.3 Podmínky PCR reakce pro detekci kolicinů a mikrocinů

Amplifikace byla prováděna v termocykleru za podmínek uvedených v Tabulce 7.

Tab. 7. Podmínky PCR reakce:

Úvodní denaturace	95 °C/ 10 minut
Opakování cyklu	35x
Denaturace	95 °C/1 minuta
Annealing	55 °C/ 1 minuta
Extenze	72 °C/ 1 minuta
Závěrečná extenze	72 °C/3 minuty
Chlazení	4 °C/∞

#### 5.3.4 Detekce ampliconů

Pro detekci produktů získaných PCR reakcí byla použita elektroforéza v 1,3% agarózovém gelu. Rychlost migrace jednotlivých molekul v gelu byla závislá na jejich velikosti.

Pro přípravu gelu bylo naváženo 1,3 g agarózy a rozpuštěno ve 100 ml 1x koncentrovaného TAE pufru (připravený ze zásobníku 50x koncentrovaného TAE pufru). Po rozpuštění v mikrovlnné troubě bylo přidáno 6 µl etidiumbromidu a gel byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Během tuhnutí gelu bylo ke všem vzorkům DNA přidáno 5 µl nanášecího pufru. Po zatuhnutí byl gel přelit 1krát ředěným TAE pufrem a do jamek byly nanášeny vzorky DNA v objemu 15 µl. Do první a poslední jamky byl nanášen marker (100 bp). Napětí bylo nastaveno na 90 V a čas separace 50 minut. Po ukončení separace byl výsledek elektroforézy vyhodnocen v UV světle a zdokumentován pomocí programu GeneSnap od SyneGene.



## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Bakteriociny jsou látky s baktericidním účinkem [53]. Jedná se zpravidla o vysokomolekulární proteiny, kódované převážně na plazmidech [4]. *Escherichia coli* produkuje dva typy bakteriocinů, koliciny a mikrocin. Buňky mohou produkovat koliciny i mikrocin současně nebo mohou zároveň produkovat více kolicinů, což je pro danou buňku selekční výhodou [5]. V této práci byl pro detekci kolicinogenie u testovaných kmenů použit vpichový pokus. Z produkčních kmenů byla následně získána DNA metodou varu v PCR pufru a provedena PCR typizace. Detekce PCR produktů byla provedena elektroforézou v agarózovém gelu a výsledky zdokumentovány pomocí programu SynGene Ingenius. Nejdříve však byla provedena identifikace kmenů získaných z bažantího masa.

### 6.1 Identifikace kmenů

V této práci byl použit soubor kmenů izolovaných z bažantích kusů. Z Endova agaru byly izolovány laktóza pozitivní (tmavě fialové) kolonie, většinou s kovovým leskem. Pro rychlou identifikaci těchto kmenů byly provedeny Enterotesty 24. Výsledky byly zpracovány do Tabulky 8.

Tab. 8. Výsledky identifikací bakteriálních izolátů pomocí Enterotestů 24:

Číslo kmene	Identifikační skóre	T-index	Identifikovaný taxon	Kvalita identifikace
I/1	91,95	0,878	<i>Escherichia coli</i>	Dobrá identifikace
I/2	52,76	0,924	<i>Escherichia coli</i>	Druhová identifikace
I/3a	52,76	0,924	<i>Escherichia coli</i>	Druhová identifikace
I/3b	86,3	0,924	<i>Escherichia coli</i>	Druhová identifikace
I/4a	52,76	0,924	<i>Escherichia coli</i>	Druhová identifikace
I/4b	72,7	0,852	<i>Escherichia coli</i> inactive	Intermediární kmen
I/6a			Není odlišen	
I/6b	52,76	0,924	<i>Escherichia coli</i>	Druhová identifikace
II/1	52,76	0,924	<i>Escherichia coli</i>	Druhová identifikace
II/3	99,83	1,0	<i>Escherichia coli</i>	Výborná identifikace

Z 10 zkoumaných kmenů izolovaných z bažantů, byl vyřazen pouze 1 kmen (I/6a), u kterého bylo prokázáno, že se nejedná o *Escherichia coli*. Zbýlých 9 kmenů bylo dále zařazeno do souboru kmenů, které byly podrobeny detekci kolicinogenie.

Výborná identifikace vyšla u kmene II/3, kde byl jako u jediného pozitivní test na ornitin, což je pro *Escherichia coli* typické (Obrázek 8).

The image shows a handwritten 'Enterotest 24' form. At the top, it includes the 'MIKROTEST' logo and 'ENTEROtest 24' title. The form is filled with handwritten data: 'Kmen / Strain No. / Strain' is 'II/3', 'Datum / Culture Date / Date' is '99/93', and 'Lpne / Spec. / Ref. / Specimen' is '1,0'. The main table contains biochemical test results for three strains (1, 2, 3) across nine indicators (H, G, F, E, D, C, B, A). Strain 1 shows a positive result for Ornithine decarboxylase (E), which is highlighted in pink. The bottom section of the form contains the handwritten identification 'E. coli' and a note: 'Výborná identifikace u jediného pozitivního testu na ornitin'.

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	+	-	+	+	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+	+	+

Obr. 8. Záznamový formulář pro Enterotest 24. U kmene II/3 vyšel jako u jediného pozitivní test na ornitin, což je pro *Escherichia coli* typické.

U vzorků I/3a, I/4a, I/6b, I/2 a II/1 byly výsledky Enterotestů naprosto shodné. Vzorky I/4a a I/6b pochází ze stejného kusu (bažant z volné přírody) a vzorky I/2, a I/3a pochází taktéž z jednoho kusu (bažant z chovu). U těchto vzorků (I/4a a I/6b; I/3a a I/2) se dá spekulovat o tom, že se jedná o stejný kmen, kterým byly kontaminovány vzorky masa při manipulaci. U vzorku II/1 je tato možnost méně pravděpodobná, neboť odběry byly prováděny v odlišném termínu z odlišného kusu, avšak ze stejné skupiny bažantů.

## 6.2 Kvalitativní stanovení produkce kolicinů vpichovým pokusem

Pro zjištění produkce bakteriocinů byl u 46 kmenů *Escherichia coli* získaných z chlazené drůbeže a bažantů proveden vpichový pokus. Na základě vyhodnocení inhibičních účinků na 6 indikátorových kmenech (Obrázek 9) bylo zjištěno, že 13 kmenů ze 46 zkoumaných produkuje bakteriociny. Výsledky vpichového pokusu jsou zaznamenány v Tabulce 9.

Tab. 9. Vyhodnocení vpichového pokusu.

Indik.kmeny Označení kmene	Sab 40	B 1	P 400	Row	<i>S.sonnei</i> 17	<i>E.coli</i> φ
R 1	-	-	-	-	-	-
R 2	-	-	-	-	-	-
R 3	-	-	-	-	-	-
R 4	+	+	+	+	N	N
R 5	-	-	-	-	-	-
R 6	+	-	+	+	-	-
R 7	-	-	-	-	-	-
R 8	-	-	-	-	-	-
R 10	-	-	-	-	-	-
R 12	-	-	-	-	-	-
R 13	-	-	-	-	-	-
R 14	+	+	+	+	N	N
R 15	+	+	+	+	N	N
R 16	-	-	-	-	-	-
R 17	-	-	-	-	-	-
R 18	-	-	-	-	-	-
R 19	-	-	-	-	-	-
R 20	-	-	-	-	-	-
R 21	-	-	-	-	-	-
R 22	-	-	-	-	-	-
R 24	-	-	-	-	-	-
R 25	-	-	-	-	-	-
R 26	+	+	+	+	N	N
R 27	-	-	-	-	-	-
R 28	-	-	-	-	-	-
R 31	-	-	-	-	-	-
R 33	-	-	-	-	-	-
R 35	-	-	-	-	-	-
R 37	-	-	-	-	-	-
R 38	-	-	-	-	-	-
R 39	-	-	-	-	-	-
R 40	-	-	-	-	-	-
R 41	-	-	-	-	-	-
R 45	-	-	-	-	-	-
R 47	-	-	-	-	-	-
R 50	-	-	-	-	-	-
R 51	-	-	-	-	-	-
I/1	+	+	+	+	N	N
I/2	+	+	+	+	N	N
I/3a	+	+	+	+	N	N
I/3b	+	+	+	+	N	N
I/4a	+	+	+	+	N	N

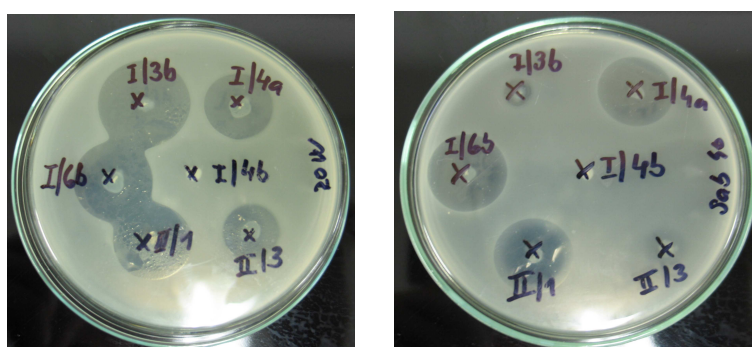
Pokračování Tab. 9.

Indik.kmeny	Sab 40	B 1	P 400	Row	<i>S.sonnei</i> 17	<i>E.coli</i> φ
<b>Označení kmene</b>						
<b>I/4b</b>	-	-	-	-	-	-
<b>I/6b</b>	+	+	+	+	N	N
<b>II/1</b>	+	+	+	+	N	N
<b>II/3</b>	+	+	+	+	N	N

+ vytvoření inhibiční zóny

- nevytvoření inhibiční zóny (daný kmen neprodukuje bakteriociny)

N nebylo provedeno



Obr. 9. Vpichový pokus - producenty bakteriocinů jsou kmeny, u kterých je viditelná kruhová inhibiční zóna okolo vpichu.

U bažantích izolátů bylo produkčních 8 kmenů z 9 a u kuřecích izolátů pouze 5 z 37 posuzovaných. Je s podivem, že u kmenů izolovaných z kuřat byla incidence kolicinogenie tak nízká ve srovnání s literaturou, kde počet produkčních kmenů přesahuje hranici 37 %. Ve studii Janalíkové a Šmajse [70] byla při testování izolátů z vepřového a drůbežího masa zjištěna 39% incidence kolicinogenie a v práci Doležalové [71] je uvedeno jako produkční 37,5 % z 56 zkoumaných kmenů *E. coli* izolovaných z povrchu chlazené drůbeže.

Vpichový pokus byl pro detekci kolicinogenních kmenů použit i ve studii Šmajse a Micenkové (2010). Bylo testováno 361 kmenů *E. coli* izolovaných od pacientů s infekcí močových cest (UTI) a 411 kontrolních kmenů izolovaných ze stolice pacientů bez bakteriální infekce. U kmenů UTI bylo vyhodnoceno 195 kmenů jako produkčních, to znamená 54 %, u kontrolních kmenů 226 produkovalo bakteriocin, to znamená 55 %. Mezi počtem kolicinogenních kmenů u kmenů UTI v porovnání s kmeny kontrolními nebyl shledán žádný statisticky významný rozdíl, což může odrážet skutečnost, že většina kmenů způsobující infekce močových cest pochází z lidského střeva [8].

Ve studii O'Brien a Chambers (1996) bylo vyšetřováno 568 izolátů *E. coli* způsobující infekce močových cest u pacientů žijících na Novém Zélandu. Jako bakteriociny produkuje bylo vyhodnoceno 42,6 % z testovaných kmenů [42].

V práci Šmardy a Obdržálka (2001) bylo v průběhu let 1993 - 1999 nashromážděno 1043 humánních izolátů. U izolátů pocházejících ze zdravého střeva bylo nalezeno 41,37 % produkčních kmenů. U pacientů trpících salmonelou byla incidence kolicinogenie stejná jako u zdravých. Významný rozdíl nebyl shledán mezi uropatogenními nehemolytickými kmeny *E. coli*, kdy incidence kolicinogenie byla stejná jako u izolátů ze zdravého tračníku, avšak u hemolytických kmenů byl výskyt kolicinogenie nižší, a to pouze 22,37 % [72]. V rámci rodu *Escherichia* byla kromě *E. coli* produkce kolicinů prokázána pouze u druhu *E. fergusonii*. Šmarda a kol. [77] izolovali 30 kmenů *E. hermannii* z lidských orgánů, dále 30 kmenů *E. vulneris* (26 humánních a 4 z čističky vod) a 50 kmenů *E. fergusonii* (48 humánních, 1 z vepře a 1 z čističky vod). Bakteriociny produkovala pouze *E. fergusonii*, kde bylo nalezeno 6 bakteriocinogenních kmenů. Ostatní neprodukovali ani jeden bakteriocin.

### 6.3 Typizace kolicinů a mikrocinů pomocí PCR

13 kmenů, vyhodnocených pomocí vpichového pokusu jako kolicinogenní, bylo podrobeno PCR typizaci k rozlišení produkujícího typu kolicinu nebo mikrocinu. U každého kmene bylo provedeno 14 reakcí (10 metodou duplex PCR a 4 jednoduchou PCR), celkem tedy bylo provedeno 182 reakcí. Nejprve byla získána bakteriální DNA metodou povaření v PCR pufru, která byla následně použita jako DNA templát pro PCR reakci. Jednotlivé komponenty reakční směsi byly míchány ve formě master mixu, čímž dochází ke zkrácení času pro přípravu vzorků a také k eliminaci chyb způsobených pipetováním velmi malých množství komponent.

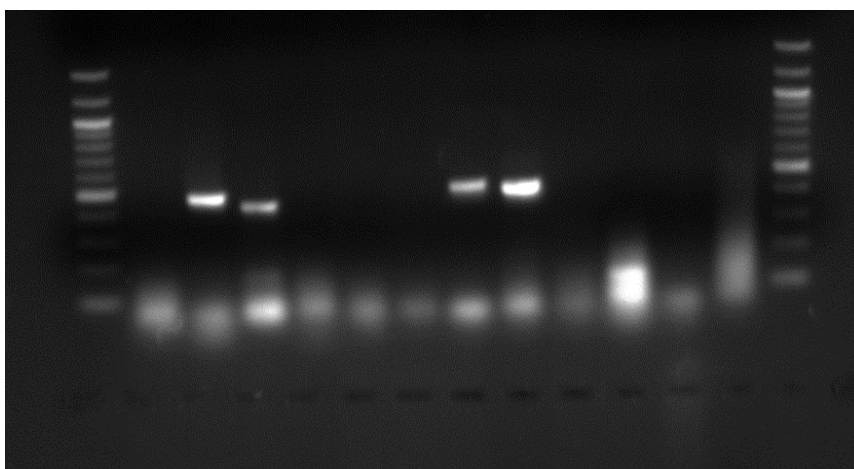
Pro amplifikaci bylo použito 24 párů primerů. Na základě optimalizace PCR převzaté od Janákové [69], bylo 20 párů seřazeno podle velikosti specifických PCR produktů do dvojic pro metodu duplex PCR, 4 zbývající byly do schématu zařazeny samostatně. Jednalo se o primery pro detekci kolicinu E1, E8, S4 a mikrocinu V. Tyto bakteriociny byly detekovány zvlášť, neboť při duplex PCR nebyly vytvořeny specifické PCR produkty.

Reakce s primery pro detekci kolicinů Ia a Ib nebyly jednoznačné, nebylo možné s jistotou určit, o který kolicin se jedná, neboť geny pro tyto dva koliciny vykazují vysokou sekvenč-

ní homologii [76]. Potvrdit, zda se jedná o kolicin Ia nebo Ib je možné sekvenací, tato však již nebyla součástí této práce. Také ve studii Šmajse a kol. [8] byla prokázána zkřížená reakce u některých sekvenčně podobných kolicinových genů, kdy pomocí Ib primerů byl detekován také kolicin Ia, E6 primery detekovaly koliciny E2, E3, E5, E8 a E9, E7 primery detekovaly i kolicin E4 a E8 primery detekovaly také kolicin E7. Produkce těchto jednotlivých kolicinů byla potvrzena sekvenací.

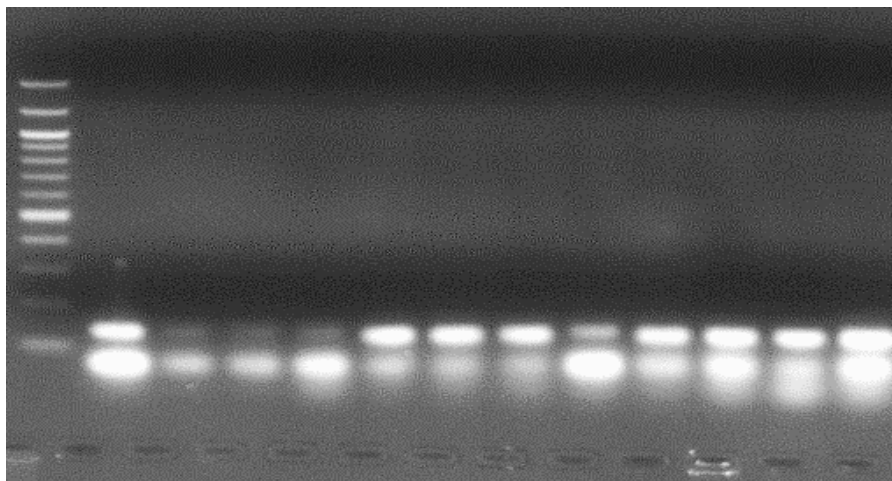
#### 6.4 Detekce produktů získaných PCR reakcí

Získané amplikony byly detekovány elektroforézou v 1,3% agarózovém gelu (Obrázek 10). Metodou PCR bylo identifikováno 8 typů kolicinů a 2 typy mikrocinu. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 10. Všechny reakce, u kterých byla na elektroforetickém gelu vizualizovaná produkce bakteriocinu, byly provedeny dvakrát pro potvrzení produkce daného kolicinu či mikrocinu. U bakteriocinů, kde byla k dispozici pozitivní kontrola, byla tato kontrola použita. Kontrolním kmenem se rozumí typický producent daného kolicinu či mikrocinu.



Obr. 10. Agarózový gel s PCR produkty. Vzorek I/2- zleva: jamka 2. - *ColIa* (473bp), 3.- *ColM* (429bp), 7.- *ColB* (492bp), 8.- *ColIb* (464bp), 10.- *mccB17* (135bp).

U vzorků I/1, I/2, I/3a, I/3b, I/4a, I/6b, II/1, II/3 nešlo s jistotou určit, zda se jedná opravdu o mikrocin B17 (Obrázek 10 - jamka 10). Mohlo by se jednat také o mikrocin H47 nebo nespécifický produkt. Pro ověření byly provedeny kontrolní reakce společně i s kontrolním kmenem (Obrázek 11).



Obr. 11. PCR s primery pro mikrocin B17. Zleva: kontrolní kmen (135 bp), kmeny R4, R6, R26, I/1, I/2, I/3a, I/3b, I/4a, I/6b, II/, II/3.

U vzorků R4, R6 a R26, kde výsledek nebyl zcela patrný, byla opět provedena PCR reakce (společně i s kontrolním kmenem) se zvýšením annealingové teploty o 5 °C, čímž by měly nejasné bandy zesílit nebo naopak vymizet. Po vyhodnocení elektroforézy se prokázalo, že tyto 3 kmeny nemají gen pro mikrocin B17.

Bylo zjištěno, že dva ze 13 zkoumaných kmenů produkovaly pouze jeden bakteriocin (mc-cV). U ostatních kmenů byla zjištěna produkce minimálně dvou a více bakteriocinů, což představuje pro produkční kmen určitou výhodu. Kmen produkující pouze jeden typ bakteriocinu může usmrtit pouze senzitivní buňky. Naproti tomu pokud získá rekombinací gen pro jiný typ bakteriocinu a stane se tak multiproducentem, může usmrtit nejen senzitivní buňky, ale i buňky monoprodukčního kmene [4]. Mezi nejčastěji detekované bakteriociny patřily mikrocin B17 a V a koliciny B, M, Ib a Ia. U jednoho kmene byl detekován kolicin E1 označený ve studii Šmajse a kol. [8] za potenciální faktor virulence uropatogenních kmenů *Escherichia coli*. Dalo by se tedy předpokládat, že se jedná o potenciálně patogenní kmen. Ve srovnání výsledků se studiemi zabývajícími se kmeny izolovanými z potravin [70, 71] je výskyt mikrocinu V u izolátů z masa zřejmě častým jevem. Ve studii Janalíkové a Šmajse [70] bylo u izolátů z vepřového a drůbežního masa identifikováno 8 typů kolicinů a 3 typy mikrocinu. Mezi nejčastěji zastoupenými koliciny byly koliciny E (E1, E7, E8, E2, E6) a Y. V menší míře Ia, B a M. Z mikrocinů byl nejčastější právě mikrocin V. V práci Doležalové a kol. [71], zabývající se izoláty z povrchu chlazené drůbeže, byla potvrzena přítomnost 10 typů kolicinů a 4 typů mikrocinů. Nejčastěji zastoupeny byly koliciny Ia, Y a E1, v menší míře B a M. Z mikrocinů byl opět nejčastější mikrocin V. Ve studii Blanco a

kol. [79] byl shledán významný rozdíl u výskytu mikrocinu V u zdravých a nemocných ptáků. Ze 458 kmenů *E. coli* izolovaných z kuřat trpících sepsí produkovalo 101 kmenů (22 %) mikrocin V, naproti tomu u zdravých produkovalo mikrocin V pouze 12 ze 167 kmenů (7 %). Dalo by se tedy naznačit, že mikrocin V se častěji vyskytuje u nemocné než u zdravé drůbeže.

Gordon a O'Brien (2006) testovali na produkci bakteriocinů 266 humánních izolátů *E. coli*. Jednalo se o humánní izoláty získané ve městě Canberra a jeho okolí. Bylo indikováno 102 produkčních kmenů (38 %). Z toho 42 % produkovalo jeden typ bakteriocinu, 41 % dva, 16 % tři a jeden kmen produkoval 4 různé bakteriociny. Mezi nejčastěji detekovaný mikrocin patřil mikrocin H47. Nejčastěji detekovanými koliciny pak byly koliciny Ia, E1, M a méně pak E7 [4]. Šmarda a kol. [77] ve své studii testovali 50 kmenů, z nichž 48 bylo humánního původu, 1 pocházel z prasete a 1 z čističky vod. Z těchto kmenů 3 produkovaly kolicin E1, 2 produkovaly kolicin Ib a 1 produkoval kolicin Ia [77].

Při výskytu kolicinu M se současně vyskytoval i kolicin B, což bylo již dříve popsáno i ve studiích Gordon a O'Brien [4] a Braun a kol. [78]. Současný výskyt kolicinů B a M byl potvrzen také v práci Christenson [31]. Produkce kolicinu B a M současně byla potvrzena u 128 ze 1304 zkoumaných kmenů *E. coli*. 619 izolátů bylo humánních, 685 pocházelo z ptáků, plazů a savců. Z těchto 128 kmenů bylo 69 % bylo pozitivních na oba koliciny, 3 % byly pozitivní pouze na kolicin M, ale u žádného z těchto kmenů se nevyskytoval samostatně pouze kolicin B.

V literatuře byl také popsán současný výskyt kolicinu Ia a mikrocinu V [4, 53]. Tyto dva bakteriociny jsou často kódovány na stejném plazmidu [53]. Neboť z ekonomických důvodů nebylo v této práci možné provést sekvenaci pro potvrzení, zda se jedná o kolicin Ia nebo Ib, bylo by možné alespoň polemizovat, že u vzorků, kde byl prokázán současně mikrocin V a kolicin Ia, by se mohlo jednat spíše o kolicin Ia než Ib.

Ve studii Gordona a O'Briena (2006) byly nalezeny i další pozitivní asociace, a to u mikrocinu M a H47. Dále byl popsán současný výskyt kolicinu E1 a M, ale pouze za předpokladu, že se nevyskytoval kolicin B, a kolicin E1 s Ia, pokud chybí mikrocin V [4].



Tab. 10. Výsledky bakteriocinotypizace.

Označení kmene	R4	R6	R14	R15	R26	I/1	I/2	I/3a	I/3b	I/4a	I/6b	II/1	II/3
bakteriociny													
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
E2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E8	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ia	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ib	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Js	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mccB17	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
mccH47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mccV	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-

+ přítomnost specifických produktů

- nepřítomnost PCR produktů

V porovnání s jinými studii, kde byly testovány humánní izoláty [4, 77] by se dalo naznačit, že vícenásobná produkce kolicinů a mikrocinů je u drůbežích a bažantích izolátů zřejmě rozšířeným jevem. Kolicin E1, považovaný za potenciálně patogenní kmen, patří u

humánních izolátů i izolátů z potravin mezi nejčastěji detekované bakteriociny [4, 70, 71, 77]. V této práci byl indikován pouze u jednoho z posuzovaných kmenů. Mezi nejčastěji detekované mikrocinny patří u humánních izolátů mikrocin H47 [4], jehož přítomnost nebyla v této práci zjištěna ani u jednoho z posuzovaných kmenů. Naproti tomu mikrocin B17, který byl v této práci u bažantích izolátů detekován nejčastěji, byl u humánních izolátů [4] nalezen pouze u 1 % produkčních kmenů (oproti 13 % pro mikrocin H47).

## ZÁVĚR

*Escherichia coli* produkuje dva typy bakteriocinů, koliciny a mikrocinu. Koliciny jsou antimikrobiální exoproteiny produkované buňkou v průběhu růstu kultur. Jsou kódovány extrachromozomálně na plazmidech. Dle typu letálního účinku jsou děleny na koliciny depolarizující plazmatickou membránu, s endonukleázovou aktivitou, blokující proteosyntézu a degradující peptidoglykan. Mikrocinu jsou menší molekuly vylučované buňkou za stresových podmínek, zejména při nedostatku živin. Vylučování není na rozdíl od kolicinů záležitostí lyze, ale jsou z buňky aktivně exportovány. Často vznikají jako prekurzory, které následně podléhají posttranslačním modifikacím. Buňky mohou produkovat koliciny i mikrocinu současně nebo mohou zároveň produkovat více kolicinů, což je pro danou buňku selekční výhodou.

Cílem této práce bylo provést bakteriocinotypizaci kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin. Neznámé bakteriální kmeny byly identifikovány pomocí biochemických mikrotestů, na jejichž základě byl vyřazen pouze 1 kmen, u kterého bylo prokázáno, že se nejedná o *Escherichia coli*.

Pro vyhodnocení produkce bakteriocinů byl u 46 kmenů *Escherichia coli* izolovaných z drůbeže a bažantů proveden vpichový pokus. Bylo zjištěno, že ze 46 kmenů bylo 13 kolicinogenních. Velmi nízká incidence kolicinogenie byla kupodivu zjištěna u drůbežích izolátů, kde ze 37 zkoumaných kmenů pouze 5 produkovalo bakteriociny. Naproti tomu u bažantích izolátů vykazovalo kolicinogenii 8 kmenů z 9 posuzovaných, což mohlo být způsobeno nízkým počtem testovaných kmenů.

U produkčních kmenů byla provedena PCR typizace. Využita byla metoda duplex PCR, jelikož je pro detekci kolicinů a mikrocinů výhodná z hlediska časového i ekonomického, pouze čtyři reakce musely být provedeny samostatně. Metodou PCR bylo zjištěno, že studované izoláty produkují 8 typů kolicinů (B, M, Ia, Ib, E1, E2, E7, E8) a 2 typy mikrocinu (B17, V). Dva ze zkoumaných kmenů produkovaly pouze 1 bakteriocin (mccV), u ostatních kmenů byla zjištěna produkce nejméně 2 či více bakteriocinů. Mezi nejčastěji detekované bakteriociny patřily mikrocinu B17 a V a koliciny B, M, Ia a Ib. Při výskytu kolicinu M se současně vyskytoval i kolicin B, což bylo již dříve popsáno u humánních izolátů. Další pozitivní asociace se dají předpokládat také u kolicinu Ia a mikrocinu V. Na základě

zjištěných výsledků by se dalo říci, že vícenásobná produkce kolicinů a mikrocinů je u drůbežích a bažantích izolátů pravděpodobně častým jevem.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] RILEY, M.A., WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*. 2002, vol. 56, s. 117-137.
- [2] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 361 s., ISBN 80-85605-71-6.
- [3] DAW, M.A., FALKINER, M.R. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*. 1996, vol. 27, s. 467- 479.
- [4] GORDON, D.M., O'BRIEN, C.L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006, vol. 152, s. 3239-3244.
- [5] RILEY, M.A., GORDON, D.M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiology*. 1999, vol. 7, s. 129-133.
- [6] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D. Koliciny -letální proteiny čeledi *Enterobacteriaceae*. *Biologické listy*. vol.62, s. 107-130.
- [7] CASCALES, E., BUCHANAN, S., DUCHÉ, D., KLEANTHOUS, C., LLOUBES, R., POSTLE, K., RILEY, M., SLATIN, S., CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007, vol. 71, s. 158-229.
- [8] ŠMAJS, D., MICENKOVÁ, L., ŠMARDA, J., VRBA, M., ŠEVČÍKOVÁ, A., VALIŠOVÁ, Z., WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology*. 2010, vol. 10, no. 288, s. 1-10.
- [9] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D. Colicins – exocellular lethal proteins. *Folia Microbiologica*. 1998, vol. 43, s. 563-582.
- [10] ŠMAJS, D., PILSL, H. BRAUN, V. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *Journal of Bacteriology*. 1997, vol. 179, s. 4919-4928.
- [11] CURSINO, L., ŠMARDA, J., CHARTONE-SOUZA, E., NASCIMENTO, A.M.A. Recent updated aspects of colicins of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002, vol. 33, s. 185-195.

- [12] PILSL, H., ŠMAJS, D., BRAUN, V. The tip of hydrofobic hairpin of colicin U is dispensable for colicin U activity but is important for interaction with the immunity protein. *Journal of Bacteriology*. 1998, vol. 180, s. 4111-4115.
- [13] LAZDUNSKI, C. J. Colicin import and pore formation: a system for studying protein transport across membranes. *Molecular Microbiology*. 1995, vol. 16, s. 1059-1066.
- [14] ŠMAJS, D., DOLEŽALOVÁ, M., MACEK, P., ŽÍDEK, L. Inactivation of colicin Y by intramembrane helix-helix interaction with its immunity protein. *FEBS Journal*. 2008, vol. 275, s. 5325-5331.
- [15] STROUD LAB - Structure gallery/colicin. [online]. [cit.20-02-2011]. Dostupné z WWW:  
<<http://www.msg.ucsf.edu/stroud/structure/colicin.html>>.
- [16] CAO, Z., KLEBBA, P.E. Mechanism of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie*. 2002, vol. 84, s. 399-412.
- [17] LINDBERG, M., CRAMER, W.A. Identification of specific residues in colicin E1 involved in immunity protein recognition. *Journal of Bacteriology*. 2001, vol. 183, s. 2132-2136.
- [18] PATTON, B.S., LONERGAN, S.M. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 2007, vol. 70, s. 1256-1262.
- [19] GELL, V., PATTUS, F., LAZDUNSKI, C.J. Topology and function of the integral membrane protein conferring immunity to colicin A. *Molecular Microbiology*. 1989, vol. 3, s. 679-687.
- [20] PUGSLEY, A.P. Nucleotide sequencing of the structural gene for colicin N reveals homology between the catalytic, C-terminal domains of colicins A and N. *Molecular Microbiology*. 1987, vol. 1, s. 317-325.
- [21] CAVARD, D., SAUVE, P., HEITZ, F., PATTUS, F., MARTINEZ, C., DIJKMAN, R., LAZDUNSKI, C. Hydrodynamic properties of colicin A. *European Journal of Biochemistry*. 1988, vol. 172, s. 507-512.

- [22] HAMMAMI, R., ZOUHIR, A., HAMIDA, B., FLISS, I. Bactibase: a web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*. 2007, vol. 7, no. 89, s. 1-6.
- [23] JANALÍKOVÁ, M., ŠMAJS, D. Molekulární interakce colicinu U se svým imunitním proteinem. *Chemické listy* 99. ČR : ČCHS, 2005, s. 364.
- [24] RIJAVEC, M., BUDIČ, M., MRAK, P., MÜLLER-PREMRU, M., PODLESEK, Z., ŽGUR-BERTOK, D. Prevalence of colE1-like plasmids and colicin K production among uropathogenic *Escherichia coli* strains and quantification of inhibitory activity of colicin K. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, s.1029-1032.
- [25] PILSL, H., ŠMAJS, D., BRAUN, V. Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Journal of Bacteriology*. 1999, vol. 181, s. 3578-3581.
- [26] ARNOLD, T., ZETH, K., LINKE, D. Structure and function of colicin S4, a colicin with a duplicated receptor-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009, vol. 284, s.6403-6413.
- [27] KURISU, G., ZAKHAROV, S.D., ZHALNINA, M.V., BANO, S., EROUKOVA, V.Y., ROKITSKAYA, T.I., ANTONENKO, Y.N., WIENER, M.C., CRAMER, W.A. The structure of BtuB with bound colicin E3 R- domain implies a translocation. *Nature Structural Biology*. 2003, vol. 10, s. 948-954.
- [28] HARKNESS, R.E., ÖLSCHLÄGER, T. The biology of colicin M. *FEMS Microbiology Letters*. 1991, vol. 88, s. 27-42.
- [29] TURBA, A., ÖLSCHLÄGER, T., BRAUN, V. Binding of the immunity protein inactivates colicin M. *Molecular Microbiology*. 1991, vol. 5, s. 1105-1111.
- [30] HILSENBECK, J.L., PARK, H., CHEN, G., BUTHYUN, Y., POSTLE, K., KANG, C. Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2,5 Å resolution. *Molecular Microbiology*. 2004, vol. 51, s. 711-720.
- [31] CHRISTENSON, J.K., GORDON, D. Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiology*, 2009, vol. 155, s. 1645-1655.

- [32] GREIG, S.L., RADJAINIA, M., MITRA, A.K. Oligomeric structure of colicin Ia channel in lipid bilayer membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009, vol. 284, s. 16126-16134.
- [33] KONISKY, J., RICHARDS, F.M. Characterization of colicin Ia and colicin Ib. *The Journal of Biological Chemistry*. 1970, vol. 245, s. 2972-2978.
- [34] BUCHANAN, S.K., LUKACIK, P., GRIZOT, S., GHIRLANDO, R., ALI, M.M, BARNARD, T.J., JAKES, K.S., KIENKER, P.K., ESSER, L. Structure of colicin I receptor bound to the R- domain of colicin Ia: implications of protein import. *The EMBO Journal*. 2007, vol. 26, s. 2594-2604.
- [35] TIMMIS, K. Purification and characterization of colicin D. *Journal of Bacteriology*. 1972, vol. 109, s. 12-20.
- [36] YANG, H., WAN, L., LI, X., CAI, H., CHEN, L., LI, S., LI, Y., CHENG, J., LU, X. High level expression of his-tagged colicin 5 in *E. coli* and characterization of its narrow-spectrum bactericidal activity and pore-forming action. *Protein Expression and Purification*. 2007, vol. 54, s. 309-317.
- [37] GILLOR, O., NIGRO, M.L.; RILEY, M.A. Genetically engineered bacteriocins and and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*. 2005, vol. 11, s. 1067-1075.
- [38] SEVERINOV, K., SEMENOVA, E., KAZAKOV, A., KAZAKOV, T., GELFAND, M.S. Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Molecular Microbiology*. 2007, vol.65, s. 1380-1394.
- [39] AZPIROZ, M.F., LAVIÑA, M. Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, vol. 51, s. 2412-2419.
- [40] PONS, A., DELALANDE, F., DUARTE, M., BENOIT, S., LANNELUC, I., SABLÉ, S., VAN DORSSELAER, A., COTTENCEAU, G. Genetic analysis and complete primary structure of microcin L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, vol.48, s. 505-513.
- [41] SEMENOVA, E., YUZENKOVA, Y., PEDUZZI, J., REBUFFAT, S., SEVERINOV, K. Structure- activity analysis of microcin J25: distinct parts of the



- threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. *Journal of Bacteriology*. 2005, vol. 187, s. 3859-3863.
- [42] O'BRIEN, C.J., CHAMBERS, S.T., PEDDIE, B., MAHANTY, H.K. The association between colicinogenicity and pathogenesis among uropathogenic isolates of *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*. 1996, vol. 20, s. 185-190.
- [43] PORTRAIT, V., GENDRON-GAILLARD, S., COTTENCEAU, G., PONS, A.M. Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Canadian Journal of Microbiology*. 1999, vol. 45, s. 988-994.
- [44] LOPEZ, F.E., VINCENT, P.A. Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of *Salmonella* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007, vol. 59, s. 676-680.
- [45] THOMPSON, R.E., JOLLIFFE, K.A., PAYNE, R.J. Total synthesis of microcin B17 via a fragment condensation approach. *Organic Letters*. 2011, vol.13, s. 680-683.
- [46] WARERS, V.L., CROSA, J.H. Colicin V virulence plasmids. *Microbiological Reviews*. 1991, vol. 55, s. 437-450.
- [47] HETZ, C., BARROS, L.F., BONO, M.R., LAGOS, R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *PNAS*. 2002, vol. 99, s. 2696-2701.
- [48] ZORN, N., PONS, A.M., VIGNON, D., DELALANDE, F., VAN DORSSELAER, A., COTTENCEAU, G. Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002, vol. 46, s. 229-230.
- [49] MERCADO, G., TELLO, M., MARÍN, M., MONASTERIO, O., LAGOS, R. The production in vivo of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *Journal of Bacteriology*. 2008, vol. 190, s. 5464-5471.
- [50] LAGOS, R., TELLO, M., MERCADO, G., GARCIA, V., MONASTERIO, O. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2009, vol. 10, s. 74-85.

- [51] JAMES, R., KLEANTHOUS, C., MOORE, G.R. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology*. 1996, vol. 142, s. 1569-1580.
- [52] TRAUTNER, B.W., HULL, R.A., DAROUICHE, R.O: Colicins prevent colonization of urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, vol. 56, s. 413-415.
- [53] JEZIOROWSKI, A., GORDON, D.M: Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2007, vol. 189, s. 7045-7070.
- [54] GILLOR, O., ETZION, A., RILEY M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 81, s. 591-606.
- [55] SABLE, S., PONS, A.M., GENDRON-GAILLARD, S., COTTENCEAU, G. Antibacterial Activity Evaluation of Microcin J25 against Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, vol. 66, s. 4595-4597.
- [56] ImaLAB, s.r.o.- Laboratoře imunodiagnostiky, biochemie, molekulární biologie, cytogenetiky a průtokové cytometrie [online]. [cit.02-03-2011]. Dostupné z WWW:  
<<http://www.imalab.cz/kategorie/molekulární-biologie.aspx>>.
- [57] KOČÁREK, E. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1.vyd. Scientia Praha. 2004, ISBN 80-7183-326-6.
- [58] The free encyclopedia Wikipedia – Southern blot [online]. [cit.12-02-2011]. Dostupné z WWW:  
<[http://en.wikipedia.org/wiki/southern\\_blot](http://en.wikipedia.org/wiki/southern_blot)>.
- [59] Webnode - Molekulární diagnostika - FISH [online]. [cit. 20-02-2011]. Dostupné z WWW:  
<<http://files.molekularnidiagnostika.webnode.cz/>>.
- [60] Otevřená encyklopedie Wikipedie – fluorescenční in situ hybridizace [online]. [cit. 12-02-2011]. Dostupné z WWW:

<[http://cs.wikipedia.org/wiki/fluorescen%C4%8Dn%C3%AD\\_in\\_situ\\_hybridizace](http://cs.wikipedia.org/wiki/fluorescen%C4%8Dn%C3%AD_in_situ_hybridizace)>.

- [61] NECAS, T., KRŠKA, B. Interaktivní databáze chorob a škůdců ovocných plodin – metoda FISH [online]. [cit. 04-03-2011]. Dostupné z WWW:  
<<http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav551>>.
- [62] KRÁLOVÁ, B. *Bioanalytické metody*. VŠ Chemicko-technologická. Praha. 2001, ISBN 80-7080-449-1.
- [63] ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 2005, ISBN 80-210-3841-1.
- [64] PRŮŠA, R. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. vyd. 2. Lékařská Fakulta UK a LAMBDA BIO-MED. Praha. 1997, ISBN 80-238-0940-7.
- [65] KNOLL, A. *Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. MZLU. Brno. 2002, ISBN 80-7157-616-6.
- [66] Top-Bio, s.r.o.- PCR dNTP mix. [online]. [cit. 20-03-2011]. Dostupné z WWW:  
<<http://www.top-bio.cz/kat.asp>>.
- [67] CGDP (Cowrie Genetic Database Project) – průběh PCR reakce. [online]. [cit.10-01-2011]. Dostupné z WWW:  
<<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>>.
- [68] GENERI BIOTECH – základní principy kvantitativní real-time PCR. [online]. [cit.20-02-2011]. Dostupné z WWW:  
<<http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativní-real-time-pcr/>>
- [69] JANÁKOVÁ, L. Optimalizace multiplex PCR pro současnou detekci kolicinů a mikrocinů. diplomová práce. 2010.
- [70] JANALÍKOVÁ, M., ŠMAJS, D., ČECHOVÁ, L., MAROUNEK, M. Bakteriocinotypizace kmenů *Escherichia coli* izolovaných z masa, 2007. Dostupné z:  
<<http://www.muni.cz/ceitech/research/publications>>.

- [71] DOLEŽALOVÁ, M., MAROUNEK, M. *Mikroflóra povrchu kuřat z obchodní sítě a zkoušky prevence kontaminace patogenními bakteriemi : Microflora of retail chicken surface and preventing the contamination by pathogens : disertační práce*. 2009. 97 s.
- [72] ŠMARDA, J., OBDRŽÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*. 2001, vol. 41, s. 367-374.
- [73] ROZUMKOVÁ, J. Výskyt antibiotické rezistence u kmenů *E. coli* izolovaných z potravin. diplomová práce. 2010.
- [74] Český hydrometeorologický ústav – historická data. [online]. [cit. 12-05-2011]. Dostupné z WWW:  
<[http://portal.chmi.cz/portal/dt?action=content&provider=JSPTabContainer&menu=JSPTabContainer/P4\\_Historicka\\_data/P4\\_1\\_Pocasi/P4\\_1\\_4\\_Uzemni\\_teploty&nc=1&portal\\_lang=cs#PP\\_Uzemni\\_teploty](http://portal.chmi.cz/portal/dt?action=content&provider=JSPTabContainer&menu=JSPTabContainer/P4_Historicka_data/P4_1_Pocasi/P4_1_4_Uzemni_teploty&nc=1&portal_lang=cs#PP_Uzemni_teploty)>.
- [75] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D., HORYNOVÁ, S. Incidence of lysogenic, colicinogenic and siderophore-producing strains among human non-pathogenic *Escherichia coli*. *Folia Microbiology*. 2006, vol. 51, s. 387-391. Sbírka mikrobiologické laboratoře ÚTMP FT UTB.
- [76] MANKOVICH, J.A., CHI-HSIN HSU, KONISKY, J. DNA and amino acid sequence analysis of structural and immunity genes of colicins Ia and Ib. *Journal of bacteriology*. 1986, vol. 168, s. 228–236.
- [77] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D., LHOTOVÁ, H. Three recently acknowledged *Escherichia* species strikingly differ in the incidence of bacteriocinogenic and lysogenic strains. *Journal of Basic Microbiology*. 2002, vol. 42, s. 429–433.
- [78] BRAUN, V., PATZER, S., HANTKE, K. Ton- dependent colicins and microcins : modular design and evolution. *Biochimie*. 2002, vol. 84, s. 365–380.
- [79] BLANCO, J. E., BLANCO, M., MORA, A., BLANCO, J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, vol. 35, s. 2953–2957.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. TonB a Tol translokační systém: OM- vnější membrána, P- periplazmatický prostor, IM- vnitřní membrána, R- receptor pro TonB, C-C-terminální část, N-N-terminální část [11].</i>	13
<i>Obr. 2. Struktura kolicinu a jeho jednotlivé části [15].</i>	15
<i>Obr. 3. Model vazby kolicinu E3 na receptor. Kolicin E3: translokační doména- modře, katalytická doména- purpurově, imunitní doména- žlutě. OM- vnější membrána, PG- peptidoglykan [27].</i>	16
<i>Obr. 4. Model vazby kolicinu Ia na Cir. Colicin Ia: R- doména- tmavě zelená, zbytek molekuly- světle zelená. CIR- žlutá a purpurová. Modré políčko označuje tloušťku membránové dvojvrstvy (Cir je v ní obsažen) [34].</i>	18
<i>Obr. 5. Struktura mikrocinu J25 [42].</i>	20
<i>Obr. 6. Mikrocin B17 [45].</i>	20
<i>Obr. 7. Průběh PCR reakce [67].</i>	26
<i>Obr. 8. Záznamový formulář pro Enterotest 24. U kmene II/3 vyšel jako u jediného pozitivní test na ornitin, což je pro Escherichia coli typické.</i>	42
<i>Obr. 9. Vpichový pokus - producenty bakteriocinů jsou kmeny, u kterých je viditelná kruhová inhibiční zóna okolo vpichu.</i>	44
<i>Obr. 10. Agarózový gel s PCR produkty. Vzorek I/2- zleva: jamka 2. - ColIa (473bp), 3.- ColM (429bp), 7.- ColB (492bp), 8.- ColIb (464bp), 10.- mccB17 (135bp).</i>	46
<i>Obr. 11. PCR s primery pro mikrocin B17. Zleva: kontrolní kmen, kmeny R4, R6, R26, I/1, I/2, I/3a, I/3b, I/4a, I/6b, II/, II/3.</i>	47

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Koncentrace agarózy v závislosti na velikosti fragmentů. ....</i>	28
<i>Tab. 2. Charakteristika bakteriálních kmenů izolovaných z bažantů. ....</i>	34
<i>Tab. 3. Použité kolicinové primery [8] .....</i>	37
<i>Tab. 4. Použité mikrocinové primery. ....</i>	38
<i>Tab. 5. Složení amplifikační směsi pro duplex PCR. ....</i>	39
<i>Tab. 6. Složení amplifikační směsi pro jednoduchou PCR. ....</i>	39
<i>Tab. 7. Podmínky PCR reakce: .....</i>	40
<i>Tab. 8. Výsledky identifikací bakteriálních izolátů pomocí Enterotestů 24: .....</i>	41
<i>Tab. 9. Vyhodnocení vpichového pokusu. ....</i>	43
<i>Tab. 10. Výsledky bakteriocinotypizace. ....</i>	49

