



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV BIOCHEMIE**



**Separace PCR produktů kapalinovou chromatografií**

**Diplomová práce**

**Marta Šiborová**

**VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.**

**BRNO 2014**

## **Bibliografický záznam**

**Autor:** Bc. Marta Šiborová  
Přírodovědecká fakulta  
Masarykova univerzita  
Ústav biochemie

**Název práce:** Separace PCR produktů kapalinovou chromatografií

**Studijní program:** Biochemie

**Studijní obor:** Analytická biochemie

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc

**Akademický rok:** 2013/2014

**Počet stran:** 58

**Klíčová slova:** HPLC, IEC, HILIC, RP-HPLC, IP-RP, PCR, oligonukleotidy, nukleové kyseliny

## **Bibliographic Entry**

**Author:** Bc. Marta Šiborová  
Faculty of Science  
Masaryk university  
Department of Biochemistry

**Title of Thesis:** Separation of PCR products by liquid chromatography

**Degree Programme:** Biochemistry

**Field of Study:** Analytic biochemistry

**Supervisor:** doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.

**Academic Year:** 2013/2014

**Number of Pages:** 58

**Keywords:** HPLC, IEC, HILIC, RP-HPLC, IP-RP, PCR, oligonucleotides, nucleic acids

## **Abstrakt**

Tato diplomová práce se věnuje optimalizaci separace směsí oligonukleotidů pomocí chromatografických metod s následným použitím při identifikaci bakteriálních kmenů z environmentálních vzorků z oblastí po těžbě těžkých kovů.

Byla vypracována rešerše shrnující možnosti molekulárně biologických metod pro identifikaci bakteriálních kmenů a především rešerše týkající se možností chromatografické separace PCR produktů. Praktická část se věnuje optimalizaci iontové výměnné chromatografie, hydrofilní interakční chromatografie, chromatografie v reverzní fázi a iontově párové chromatografie v reverzní fázi pro separaci oligonukleotidů a následné použití na směsi restrikčních fragmentů 16S PCR produktu bakterií *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*.

## **Abstract**

This thesis focuses on the optimization of the separation of mixtures of oligonucleotides by chromatographic methods with subsequent use for the identification of bacterial strains from environmental samples from the areas of mining heavy metals.

Was drawn up research summarizing possibilities of molecular biological methods for identification of bacterial strains and particularly research on the possibilities of chromatographic separation of PCR products. The practical part focuses on optimizing the ion exchange chromatography, hydrophilic interaction chromatography, reverse phase chromatography and ion pair reverse phase chromatography for the separation of oligonucleotides and subsequent use of the mixture of restriction fragments of the 16S PCR product of bacteria *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*.



Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta  
Ústav biochemie  
Kotlářská 2, 611 37 Brno, CZ



## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: Biochemie

Studijní obor: Analytická biochemie

Student(ka): Bc. Marta Šiborová

Název tématu: **Separace PCR produktů kapalinovou chromatografií**

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.

Odborný konzultant:

Datum zadání diplomové práce: září 2012

Datum odevzdání diplomové práce: květen 2014

zpracovatel diplomové práce

vedoucí diplomové práce

ředitel Ústavu biochemie

V Brně, dne 1.10.2009

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Oldřichu Janiczkovi, CSc. za odborné vedení při vypracovávání této diplomové práce, Mgr. Jiřímu Kučerovi, PhD. za praktické rady a Mgr. Janu Lochmanovi, PhD. za poskytnutí pramerů.

Ráda bych také poděkovala rodině, lasičce a Kačul za podporu během studia.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím citovaných zdrojů.

V Brně 19. května 2014

.....

Marta Šiborová

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Metody pro identifikaci bakteriálních kmenů.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Metody založené na PCR .....</b>	<b>13</b>
3.1.1.1	16S PCR .....	13
3.1.1.2	RFLP.....	14
3.1.1.3	t-RFLP .....	14
3.1.1.4	RAPD PCR.....	14
3.1.1.5	RISA .....	14
3.1.1.6	ARDRA .....	15
3.1.1.7	DGGE/TGGE .....	15
3.1.1.8	SSCP.....	15
<b>3.1.2</b>	<b>PCR independentní metody .....</b>	<b>16</b>
3.1.2.1	Frakcionace celé extrahované DNA v hustotním gradientu.....	16
3.1.2.2	DNA/DNA hybridizace křížem .....	16
3.1.2.3	FISH .....	16
3.1.2.4	RSGP .....	17
3.1.2.5	ELIFA.....	17
<b>3.2</b>	<b>Chromatografické metody pro separaci PCR produktů.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.1</b>	<b>IEC .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2</b>	<b>HILIC.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.3</b>	<b>RP-HPLC.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.4</b>	<b>IP-RP.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Další chromatografické metody.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Detekce.....</b>	<b>23</b>

<b>4</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Materiál</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Chemikálie</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Mikroorganismy</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Přístroje</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Kolony</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1.5</b>	<b>Primery a oligonukleotidy</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2</b>	<b>Metody</b> .....	<b>28</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Izolace DNA</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2.2</b>	<b>16S PCR</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Restrikční štěpení</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2.4</b>	<b>HPLC</b> .....	<b>32</b>
<b>5.3</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>34</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Příprava vzorku</b> .....	<b>34</b>
<b>5.3.2</b>	<b>IEC</b> .....	<b>35</b>
<b>5.3.3</b>	<b>HILIC</b> .....	<b>39</b>
<b>5.3.4</b>	<b>RP-HPLC</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3.5</b>	<b>IP-RP</b> .....	<b>48</b>
<b>5.4</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>55</b>



## 1 ÚVOD

Těžba nerostných surovin, kovů a uhlí má dlouhodobý negativní vliv na životní prostředí. Jedním z hlavních problémů je produkce kyselých důlních průsakových vod při oxidaci pyritu a chalkopyritu, při které dochází také k uvolňování železa. Tyto kyselé vody rozkládají další minerály a uvolňují kovy v nich obsažené.

Kyselé průsakové důlní vody jsou tvořeny společenstvem bakterií a to především acidofilními bakteriemimi *Acidithiobacillus sp.*, jako je *Acidithiobacillus ferrooxidans*, který má schopnost oxidovat železné rudy a redukovat sirné sloučeniny a *Acidithiobacillus thiooxidans*. Dále také *Acidiphilium acidophilum* a *Leptospirillum ferrooxidans*.

Tyto bakterie mohou být ale také prospěšné, jsou průmyslově využívány v biohydrometalurgii pro loužení kovů z rud.

Studium těchto bakterií pomáhá k omezení jejich negativního dopadu na životní prostředí a umožňuje je lépe využívat v biotechnologiích.

Vytvoření metody pro identifikaci těchto bakterií, založené na vysoce účinné kapalinové chromatografii, by znamenalo rychlou, efektivní a přesnou možnost identifikace bakterií v environmentálních vzorcích.

Přínosem by bylo také vyloučení nutnosti provádět separace DNA fragmentů pomocí gelové elektroforézy. Při gelové elektroforéze se k vizualizaci využívají činidla jako je ethydidium bromid, které interkalují mezi páry bazí DNA a mají tak mutagenní a karcinogenní účinky na organismus.

## 2 SEZNAM ZKRATEK

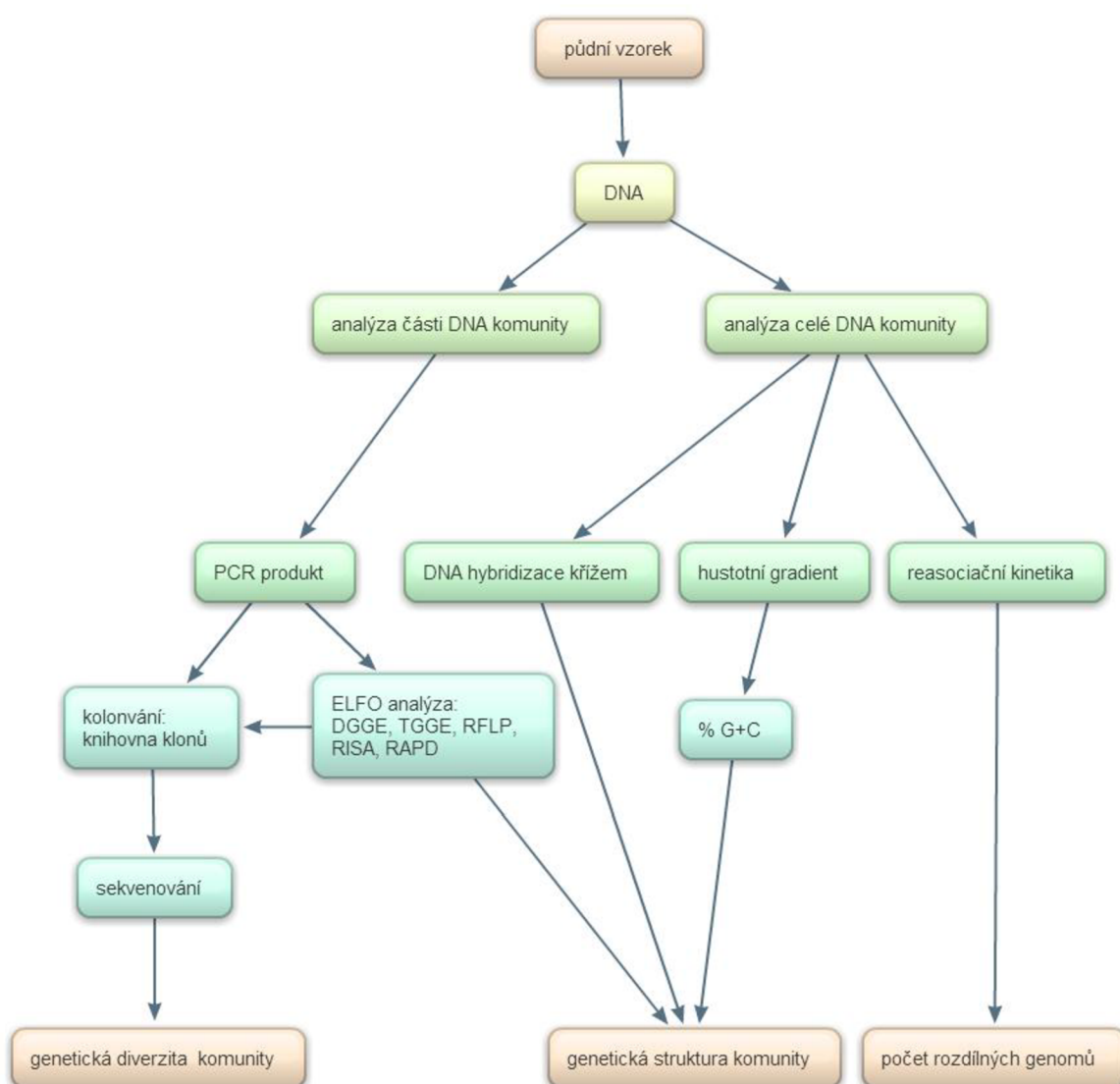
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis	Restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA
DAD	Diode array detector	Detektor s diodovým polem
DEAE	diethylaminoethyl	diethylaminoethyl
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	Denaturačně gradientová gelová elektroforéza
DHPLC	Denaturation HPLC	Denaturační HPLC
dsDNA	Double stranded DNA	Dvouřetězcová DNA
ELIFA	Enzyme-linked immunofiltration assay	Enzym-linked imunofiltrace
ESI	Electrospray ionization	Elektrosprej ionizace
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FLD	fluorescence detector	Fluorescenční detektor
GPC	Gel permeation chromatography	Gelová permeační chromatografie
HIC	Hydrophobic interaction chromatography	Hydrofobní interakční chromatografie
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography	Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	High performance liquid chromatography	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
IEC	Ion-exchange chromatography	Iontově výměnná chromatografie
IGS	integrated spacer	Integrovaný spacer
IP-RP	Ion pair reverse phase chromatography	Iontově párová chromatografie v reverzní fázi
ITS	Internal transcribed spacer	Vnitřní přepisovaný spacer
MS	Mass Spectrometry	Hmotnostní spektrometrie
NPR	Non-porous Resin	Neporézní pryskyřice
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PSL	Photostimulated luminiscence	Fotostimulovaná luminiscence

RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA	Náhodně amplifikovaná polymorfni DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism	Polymorfismus délky restrikčního fragmentu
RISA	Ribosomal RNA intergenic spacer analysis	Analýza ribozomálního integrovaného spaceru
RP-HPLC	Reversed phase High-performance liquid chromatography	Reverzně fázová vysoce účinná kapalinová chromatografie
rRNA	Ribosomal RNA	Ribozomální RNA
RSGP	reverse sample genomic probing	zpětné zkoumání genomu vzorku pomocí sond
SSCP	Single stranded conformation polymorphism	Jednořetězcový konformační polymorfismus
ssDNA	Single stranded DNA	Jednořetězcová DNA
SSU rRNA	Small subunits rRNA	Malé ribozomální podjednotky
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis	Teplotně gradientová gelová elektroforéza
TMA	tetramethylammonium	tetramethylammonium
t-RFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism	Polymorfismus délky terminálního restrikčního fragmentu
ZIC	Zwitterion Chromatography	Zwitterionová chromatografie

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Metody pro identifikaci bakteriálních kmenů

Molekulárně biologické metody umožňují analýzu mikrobiální komunity bez nutnosti kultivace. Tyto metody jako takové však nejsou schopné poskytnout komplexní informace, jako je například fyziologie neznámého mikroorganismu. Proto je dobré kombinovat metody molekulárně biologické s kultivačními technikami.



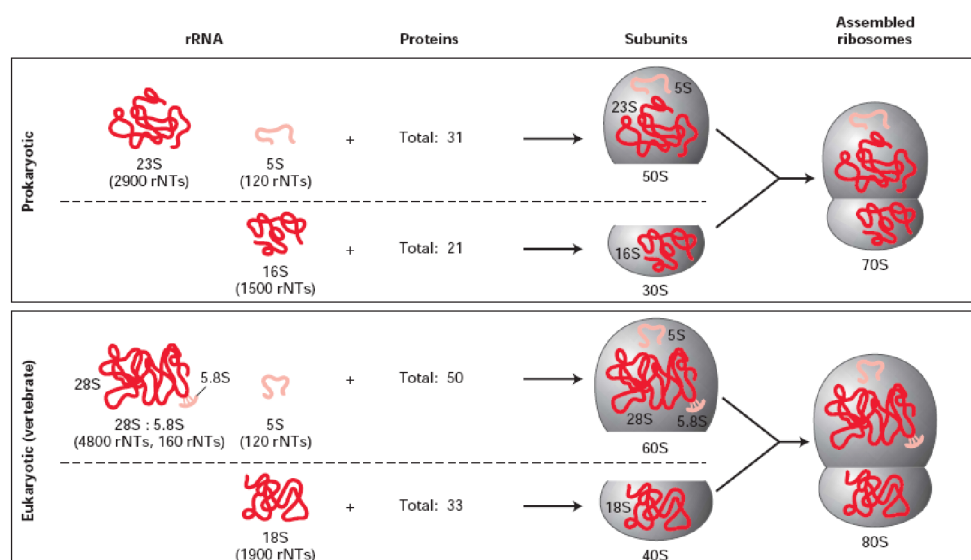
Obrázek č.1: Možnosti identifikace bakteriálních kmenů <sup>[1]</sup>

### 3.1.1 Metody založené na PCR

Nejčastějším přístupem je analýza malých podjednotek rRNA, SSU rRNA nebo ITS genů. Základem je izolace DNA a následná amplifikace SSU rRNA genů pomocí PCR. Výsledný PCR produkt může být podroben různým analytickým přístupům k mikrobiální identifikaci.

#### 3.1.1.1 16S PCR

Jedním z nejčastěji využívaných kratších fragmentů DNA pro identifikaci bakterií je 16S rRNA gen, který kóduje rRNA malé ribozomální podjednotky prokaryotických ribozomů.



**Obrázek č.2:** 16S rRNA

16S rRNA je vysoce konzervovaná molekula, sdílí vysoce shodné sekvence napříč organismy. Na tyto sekvence bývají cíleny univerzální 16S PCR primery. 16S rRNA obsahuje také vysoce variabilní oblast, na tu mohou být cíleny druhově specifické primery, může být sekvenována nebo podrobena dalším analýzám. [2, 3]

#### 3.1.1.2 RFLP

RFLP charakterizuje DNA pomocí délky jejich fragmentů po restričním štěpení. Restriční enzymy štěpí DNA podle její sekvence, vznikají restriční fragmenty o charakteristické délce pro dané mikroorganismy. Takto získané fragmenty mohou být separovány jak pomocí gelové elektroforézy, tak HPLC. Pro identifikaci bakteriálních kmenů, se pro restrikci nejčastěji používá naamplifikovaná 16S rRNA. <sup>[1]</sup>

#### 3.1.1.3 t-RFLP

Stejně jako RFLP analýza využívá t-RFLP restriční enzymy ke štěpení 16S rRNA. Při 16S PCR se ale používají fluorescenčně značené primery, naamplifikované 16S rRNA geny jsou tudíž fluorescenčně označené. Restriční fragmenty jsou elektroforeticky separovány za denaturačních podmínek (přítomost močoviny), poté se srovnávají migrační časy terminálních, fluorescenčně označených fragmentů s vnitřním standardem, který je označený jiným flouroforem. <sup>[2]</sup>

#### 3.1.1.4 RAPD PCR

RAPD využívá krátké primery, s náhodnou sekvencí a neznámou homologií k cílové DNA. PCR produkt vzniká v případě, že je ve zkoumané DNA stejná nebo velmi podobná komplementární sekvence. PCR produktem je směs různě dlouhých, druhově specifických fragmentů, které jsou následně rozseparovány na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Pro tuto metodu je třeba použít primery, které budou vytvářet po elektroforetické separaci různé profily a to i pro příbuzné kmeny. <sup>[1, 5]</sup>

#### 3.1.1.5 RISA

RISA je analýza délky IGS genu (integrovaný spacer, vzdálenost mezi 16S a 23S ribozomální podjednotkou). Velikost IGS může být 50 bp – 1,5 kb v závislosti na druhu. Amplifikované IGS jsou separovány na polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek. Tato metoda je jednoduchá, poměrně rychlá a velmi dobře reprodukovatelná. Nicméně v současné době není databanka IGS sekvencí dostatečně obsáhlá, aby umožňovala efektivní identifikaci. Následná sekvenace umožňuje taxonomickou identifikaci. <sup>[1, 4]</sup>

#### 3.1.1.6 ARDRA

Restrikční analýza amplifikované rDNA je rozšířením metody RFLP do genu kódujícího malou 16S ribozomální podjednotku bakterií. Využívá tetrauter restrikčních enzymů. Pro identifikaci bakterií je nutná shoda vzorů nejméně u tří restrikčních enzymů. Je technickou variantou ribotypizace. Místo 16S-23S rRNA se využívá pro identifikace blízce příbuzných bakteriálních kmenů. <sup>[1,4]</sup>

#### 3.1.1.7 DGGE/TGGE

DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza) a TGGE (teplotně gradientová gelová elektroforéza) jsou dvě shodné metody pro studium mikrobiální diverzity. 16S rRNA fragment s 35-40 bp CG svorkou/smyčkou na 5'konci, která zajišťuje, že alespoň část DNA zůstává dvouřetězcová. To je nezbytné pro separaci na polyakrylamidovém gelu se zvyšující se koncentrací denaturačního činidla. Pokud CG svorka chybí, dsDNA denaturuje na ssDNA a dále na jednotlivé části, které gelem migrují rozdílně. Jako denaturační činidlo se typicky používá směs močoviny a formamidu (DGGE) nebo teplota (TGGE). Dvouřetězcové DNA migruje gelem až do bodu, kde jsou částečně (z)denaturovány, což závisí na jejich sekvenci. Rozdíly v sekvenci fragmentů ovlivňují denaturaci a elektroforetickou mobilitu. <sup>[1, 2, 4]</sup>

#### 3.1.1.8 SSCP

Další metodou založenou na separaci DNA (např. 16S rRNA) pomocí gelové elektroforézy je SSCP (single strand conformation polymorphism). Separace jednořetězcové DNA probíhá na polyakrylamidovém gelu bez přítomnosti denaturačního činidla. Rozdíly v mobilitě jsou způsobeny rozdílnou sekundární strukturou. Některé sDNA mohou mít však více stabilních konformací, které se projeví na gelu jako další band. Výhodou oproti TGGE je, že není třeba připravovat gradientový gel. <sup>[2, 4]</sup>

### 3.1.2 PCR independentní metody

#### 3.1.2.1 Frakcionace celé extrahované DNA v hustotním gradientu

Poměr obsahu C + G bazí v genomové DNA jednotlivých kmenů se liší, u prokariotické DNA může být obsah těchto bazí 24-76%. Extrahovaná DNA je centrifugována v hustotním gradientu CsCl<sub>2</sub> s EtBr. Ten interkaluje mezi A a T a tím zvyšuje rozdíly vznášivé hustoty podle obsahu bazí. Frakcionace DNA v hustotním gradientu poskytuje informace o genetické struktuře bakteriální komunity. Nevýhodou této metody je nejenom poměrně velká spotřeba DNA, ale také fakt, že obsah G + C jednotlivých kmenů může být podobný. <sup>[1]</sup>

#### 3.1.2.2 DNA/DNA hybridizace křížem

Hybridizace křížem mezi DNA vzorku a radioaktivně označenou DNA sondou určuje podobnost vzorku a sondy. Po denuraci dochází ke spojení dvou komplementárních řetězců DNA podle pravidla o párování bazí. Podobnost vyšší než 70% ukazuje na vztah na úrovni druhu, zatímco hodnoty mezi 20% a 60% vypovídají o rodové podobnosti. Používá se autoradiografická detekce. <sup>[1, 5]</sup>

#### 3.1.2.3 FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je alternativou k hybridizaci DNA křížem. Funguje na podobném principu, ale radioaktivní značení je nahrazeno fluorofory. Častým cílem fluorescenční *in situ* hybridizace bývá molekula 16S rRNA (ne gen). Vzorek je pomocí ethanol nebo formaldehydu fixován na povrch. Ke vzorku je přidána genová sonda (fluorescenčně značený oligonukleotid), která se váže ke komplementární nukleotidové sekvenci na 16S rRNA molekule v cílovém mikroorganismu. Po odmytí nenavázaného fluoroforu se pomocí fluorescenčního mikroskopu pozoruje množství fluorescenčně označených buněk z původní směsné populace. <sup>[2]</sup>



#### 3.1.2.4 RSGP

Tato metoda je také založena na hybridizaci. Jako sondy jsou použity DNA známých mikroorganismů zachycené na pevném filtru. Po hybridizaci s denaturovanou DNA ze vzorku je odečítána intenzita síťové hybridizace. Ta je dána jednotkami fotostimulovatelné luminiscence po odečtení lokálního pozadí. Pro použitelnost metody je nutné, aby mezi sondami DNA neprobíhala nežádoucí hybridizace křížem.<sup>[6, 7]</sup>

#### 3.1.2.5 ELIFA

Zkoumané mikroorganismy jsou zachyceny v pórech minerálního filtru. Bakterie mohou být detegovány pomocí protilátek, které jsou cross-linkovány enzymem za produkce barevného produktu nebo fluorescence. Množství produktu je přímo úměrné počtu bakterií přítomných v mikrotitrační jamce na filtru.<sup>[2]</sup>

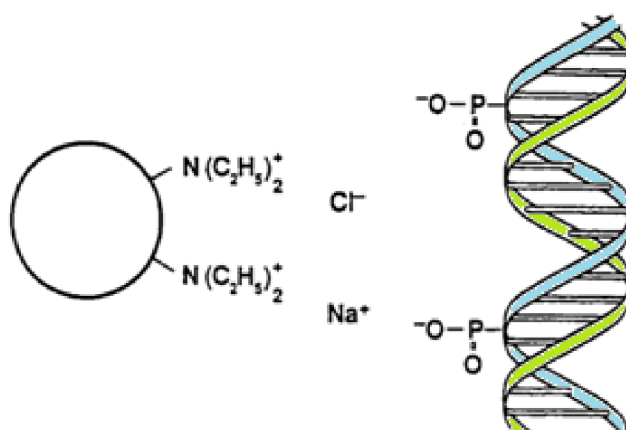
### 3.2 Chromatografické metody pro separaci PCR produktů

HPLC je považována za dobrou kvantitativní techniku v mnoha různých aplikačních oblastech, protože může poskytovat spolehlivou, přesnou a citlivou detekci vzorku s velkým dynamickým rozsahem. HPLC může být používána pro separaci, přečištění a detekci nukleových kyselin.

#### 3.2.1 IEC

Pravděpodobně nejběžnější a nejčastěji používanou metodou pro separaci nukleových kyselin a tedy i PCR produktů je iontově výměnná chromatografie (IEC). Možnost využít iontově výměnnou chromatografii se nabízí již na základě primární struktury DNA (Obr.č.3).

Retence DNA je závislá na elektrostatických interakcích mezi negativně nabitými fosfátovými skupinami DNA a kationovými pozicemi chromatografické matrix.



**Obrázek č. 3:** Elektrostatická interakce mezi DNA a aniontovou stacionární fází <sup>[8]</sup>

DNA je eluována z aniontově výměnné kolony změnou iontové síly mobilní fáze. V přítomnosti mobilní fáze, se zvyšující se iontovou silou, je retence DNA funkcí počtu negativních fosfátových nábojů.

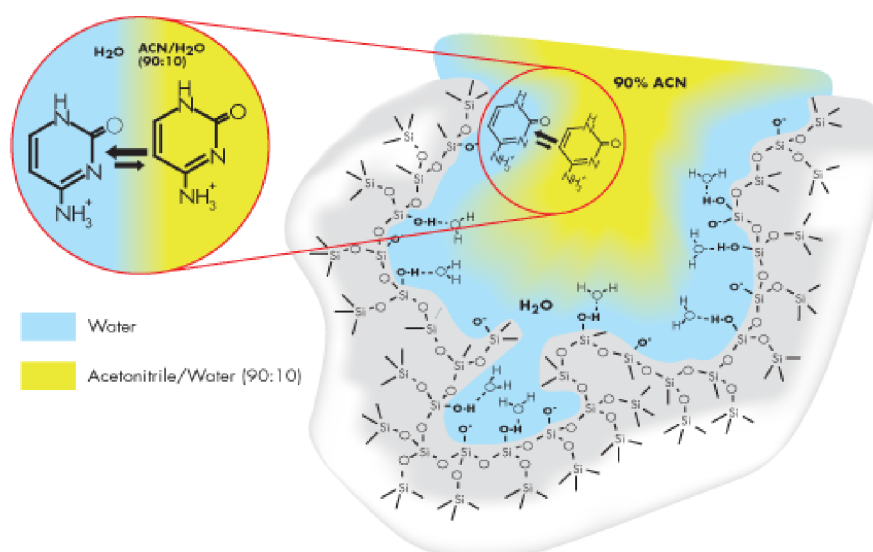
Jedním z nejčastěji iontově výměnných materiálů je imobilizovaný diethylaminoethyl (DEAE) nebo tetramethylammonium (TMA) vázaný na nosiči. Ty se ve velké míře používají k úpravě gelových nosičů, porézního mikročasticového oxidu křemičitého nebo materiálů na polymerní bázi. Při použití porézního mikročasticového oxidu křemičitého a materiálů na polymerní bázi dochází k velkému zvýšení rozlišení

kolony a ke zkrácení doby analýzy. Nicméně použití kolon s porézním nosičem není vhodné pro separaci dlouhých dvouřetězcových DNA.<sup>[8]</sup> Naopak kolony s neporézními nosiči (NPR) poskytují velmi rychlou a efektivní separaci i dlouhých dvouřetězcových vláken DNA. V porovnání s porézními nosiči zde dochází k rychlejšímu přenosu DNA mezi pevnou a kapalnou fází kolony. Zpětný výtěžek DNA z neporézní kolony je také vyšší než u kolon s porézními nosiči. Mikroperikulární kolony, které jsou v současné době komerčně k dispozici mají jako nosiče výhradně organické polymery. Mezi největší výhody patří vysoká stabilita v přítomnosti kyselých, bazických i hydroorganických rozpouštědel a homogenita polymerního povrchu bez silných vazebných míst jako jsou silanoly na silikátových nosičích.<sup>[9, 10]</sup>

### 3.2.2 HILIC

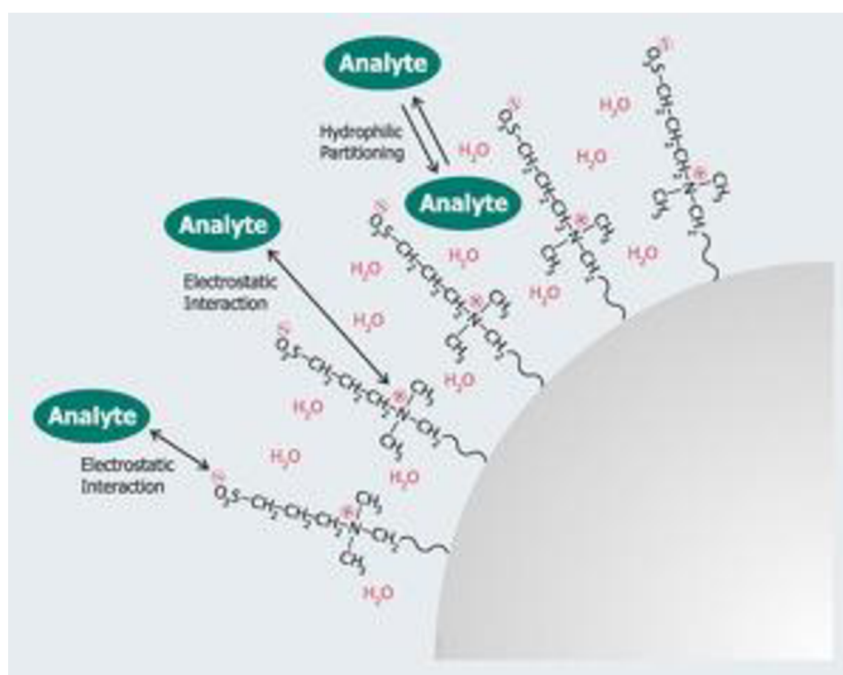
Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) umožňuje separaci polárních látek na hydrofilních stacionárních fázích a mobilní fázi, která obsahuje vodu a vysoký podíl organického rozpouštědla. Stacionární fáze musí být více polární než fáze mobilní. Dochází k separaci na základě polarit, nepolární látky se eluují v mrtvém čase, protože nemají afinitu ke stacionární fázi.<sup>[14]</sup>

HILIC kolony využívají jak částicové tak monolytické nosiče, nejčastěji klasickou silikagelovou stacionární fází nebo silikagel modifikovaný mnoha polárními funkčními skupinami. V poslední době jsou velmi rozšířené zwitteriontové (ZIC) stacionární fáze.



**Obrázek č. 4:** Retenční mechanismus HILIC<sup>[15]</sup>

Retenční mechanismus HILIC není ještě zcela objasněn. Retence analyzované látky musí být primárně řízena hydrofilními interakcemi. Ale v podstatě většina HILIC separací jsou separace multimodální a to jak kvůli elektrostatickým interakcím, tak v důsledku hydrofobních interakcí.<sup>[12]</sup> Míru elektrostatických interakcí lze ovlivňovat pomocí pH.<sup>[14]</sup>



**Obrázek č. 5:** Primární hydrofobní a sekundární elektrostatické interakce

Aby mohlo dojít k hydrofilní interakci, je třeba, aby se na povrchu stacionární fáze vytvořila hydratovaná vrstva tzv. „water-rich layer“, která je částečně nepohyblivá. Mezi touto vrstvou a pohyblivou mobilní fází s vyšším obsahem organických rozpouštědel vzniká mikroextrakční rozhraní. Analyt přechází mezi hydratovanou vrstvou, kde je hydrofilně zadržován díky vodíkovým můstkům a dipól-dipólovým interakcím a mezi mobilní fází.<sup>[12]</sup>

HILIC je velmi vhodné použít v kombinaci s MS detekcí, při které vysoký obsah organického rozpouštědla v mobilní fázi zvyšuje odezvu při ESI.<sup>[11]</sup>

### 3.2.3 RP-HPLC

Chromatografie v reverzních fázích probíhá na nepolárních stacionárních fázích, například na silikagelu modifikovaném navázáním C8 nebo C18 skupinou. S rostoucí délkou nepolárního řetězce se zvyšuje i retence. Jako mobilní fáze se používají vodní roztoky s obsahem organického rozpouštědla (MetOH, ACN...).

Díky nepolárnímu charakteru stacionární fáze, je tato metoda vhodná pro separaci nepolárních látek. Eluce se provádí izokraticky a nebo aplikováním gradientu zvyšující se koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi. <sup>[16]</sup>

Chromatografie v reverzní fázi separuje nukleové kyseliny na základě jejich hydrofobního charakteru, který je dán hydrofobitou bází. Nukleotidové složení tedy značnou mírou ovlivňuje retenci, délka fragmentu má vedlejší roli. <sup>[17]</sup> Nicméně dvouřetězcové fragmenty DNA nejsou separovány, protože obvykle prochází kolonou bez toho, že by byly zadržovány a to v důsledku stínění hydrofobních bází. Díky nízké iontové síle a těkavosti solventu je RP-HPLC plně kompatibilní s ESI-MS. <sup>[16]</sup>

### 3.2.4 IP-RP

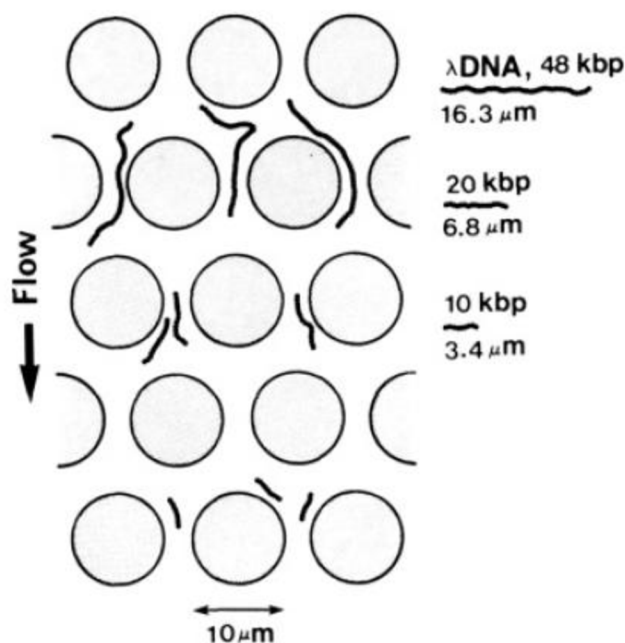
Iontově párová chromatografie v reverzní fázi (IP-RP) je rovněž použitelnou metodou pro separaci nukleových kyselin. Stacionární fáze je stejně jako u RP-HPLC nepolární. V mobilní fázi je podíl organického rozpouštědla a přídavek iontově párového činidla. Iontově párovým činidlem bývá amfifilní iont, který nese náboj, hydrofobní skupinu a malý hydrofilní protiion. Může se jednat například o trialkyl a tetraalkyl amoniové soli. Hydrofilní ionty iontově párového činidla se vážou na analyzovanou nukleovou kyselinu, čímž se neutralizuje její negativní náboj. Dále je mechanismus separace stejný jako u reverzně fázové chromatografie. Eluce se provádí zvýšením koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi. <sup>[9, 18-22]</sup>

### 3.2.5 Další chromatografické metody

**Hydrofobní interakční chromatografie** má podobný mechanismus jako RP-HPLC. Hydrofobní část separovaného analytu má afinitu k nepolární stacionární fázi. V porovnání s RP-HPLC se používají nosiče s mnohem méně hydrofobními ligandy, také hustota navázaných ligandů je mnohem nižší. Proto je síla hydrofobní interakce nižší, než u RP-HPLC.

Jako mobilní fáze se používají vodné roztoky s vysokou iontovou silou, vhodným pH a bez obsahu organického rozpouštědla. Hydrofilita mobilní fáze je zvyšována přidávkem soli. Retence analytu je závislá na teplotě, síla hydrofobní interakce roste se zvyšující se teplotou. V průběhu separace se snižuje koncentrace solí v mobilní fázi a tím dochází k eluci vzorku. [17, 23, 24]

Další alternativní metodou pro separaci relativně dlouhých dvouřetězcových DNA fragmentů je **slalomová chromatografie**. Jsou využívány size-exclusion kolony, ale retenční pořadí je opačné, než je tomu u GPC. Nejdříve se eluují krátké řetězce, poté řetězce dlouhé. Retence závisí na průtoku, teplotě, viskozitě mobilní fáze a velikosti částic stacionární fáze, ne na velikosti pórů. [25, 26]



**Obrázek č.7:** Slalomová chromatografie [26]

**Denaturační chromatografie** (DHPLC) umožňuje separaci podle primární sekvence podobně jako DGGE. Jedná se vlastně o RP-HPLC za denaturačních podmínek, kterých je často dosahováno teplotou nebo zvýšením obsahu organického rozpouštědla. [27, 28]

Další chromatografickou metodou pro separaci nukleových kyselin podle jejich primární sekvence je **afinitní chromatografie**. Využívá vysoce selektivního párování bází dvou komplementárních řetězců DNA. Používají se kolony s imobilizovaným oligonukleotidovým řetězcem, který je komplementární se vzorkem. Eluce se provádí zpravidla krokově, zvýšením iontové síly. Afinitní chromatografie nepředstavuje častou metodu pro separaci nukleových kyselin už jen proto, že pro každou novou separaci je třeba připravit specifickou stacionární fázi. [16]

### 3.2.6 Detekce

Purinové a pyrimidinové deriváty vykazují velmi vysokou absorpci v UV části spektra mezi 250 a 280 nm. To umožňuje pohodlnou spektrometrickou detekci například pomocí detektoru diodového pole (DAD). [22]

Fluorescenčně značené fragmenty lze detegovat při příslušných vlnových délkách pomocí fluorescenčního detektoru (FLD). V poslední době je velmi oblíbené spojení HPLC a hmotnostní spektrometrie.

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je otestovat možnosti chromatografických metod pro separaci oligonukleotidů s následným použitím při identifikaci bakteriálních kmenů z environmentálních vzorků z oblastí po těžbě těžkých kovů.

Dílčí cíle diplomové práce:

- optimalizovat chromatografickou metodu pro separaci DNA fragmentů, za využití směsí primerů jako známých vzorků
- připravit vzorek na HPLC z konkrétních nakultivovaných kmenů
- otestovat chromatografickou metodu na tomto vzorku a případně ji upravit
- vytvořit knihovnu chromatografických profilů pro dané bakteriální druhy, případně i kmeny
- připravit reálný vzorek a pokusit se identifikovat bakterie pomocí takto vytvořené metody



## 5 PRAKTICKÁ ČÁST

### 5.1 Materiál

#### 5.1.1 Chemikálie

DNA polymeráza KAPA Blood PCR Kit B – KAPA BIOSYSTEMS

Primer 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - ELISABETH PHARMACON

Primer 1492r (GGTTACCTTGTTACGACTT) - ELISABETH PHARMACON

Restrikční endonukleáza MnlI - Thermo scientific

Restrikční endonukleáza BseDI - Thermo scientific

10x Tango pufr – Thermo scientific

PCR voda

DMSO - Sigma-Aldrich

loadovací pufr - Thermo scientific

DNA marker - Thermo scientific

Ethidium bromid - Sigma-Aldrich

Acetonitril – Fluka analytical

metanol - Fluka analytical

TBAHS – Fluka chemika

TBAHP – Fluka chemika

TPAHS – Fluka chemika

Ultračistá deionizovaná voda Milli-Q (Milipore)

Ostatní používané chemikálie byly v čistotě p.a.

### **5.1.2 Mikroorganismy**

*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270

*Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887

### **5.1.3 Přístroje**

Flowbox: KS 12 Thermo SCIENTIFIC - HERA safe

Centrifuga: Minispin – Eppendorf

Vyhřívaný blok: Thermomixer comfort – Eppendorf

Oscilační mlýnky: MM301 – Retsch

Spektrometr ND – 1000 – Nanodrop

T3 Thermocycler – Biometra

pH metr: PHM 93 reference pH meter - RADIOMETER Copenhagen

Agarosová elektroforéza: MSMINI - Cleaver SCIENTIFIC

Zdroj napětí: MP - 3AP - Cleaver SCIENTIFIC

Transiluminátor: Vilber Lourmat

Dokumentační zařízení: Bio – Imaging Systems - MiniBis Pro

Chromatografie: Hewlett packard 1100 s DAD

mikrovlonná trouba, mrazicí box

### 5.1.4 Kolony

název	délka	velikost částic	výrobce	použití	předkolona
DEAE-NPR	4,6 x 250 mm	5 um	TSK	IEC	
Primasep SB	4,6 x 250mm	5 um	SIELC	HILIC	50um, 4,6xG mm
Hypersil ODS	4 x 125mm	5 um	HP	IP-RP RP	
Lichrosorb RP18	4 x 250mm	10 um	LKD	RP	4x30mm, 7um
Eclipse XDB-C8	4,6 x 150mm	5 um	HP	RP	

Tabulka č. 1: Přehled kolon

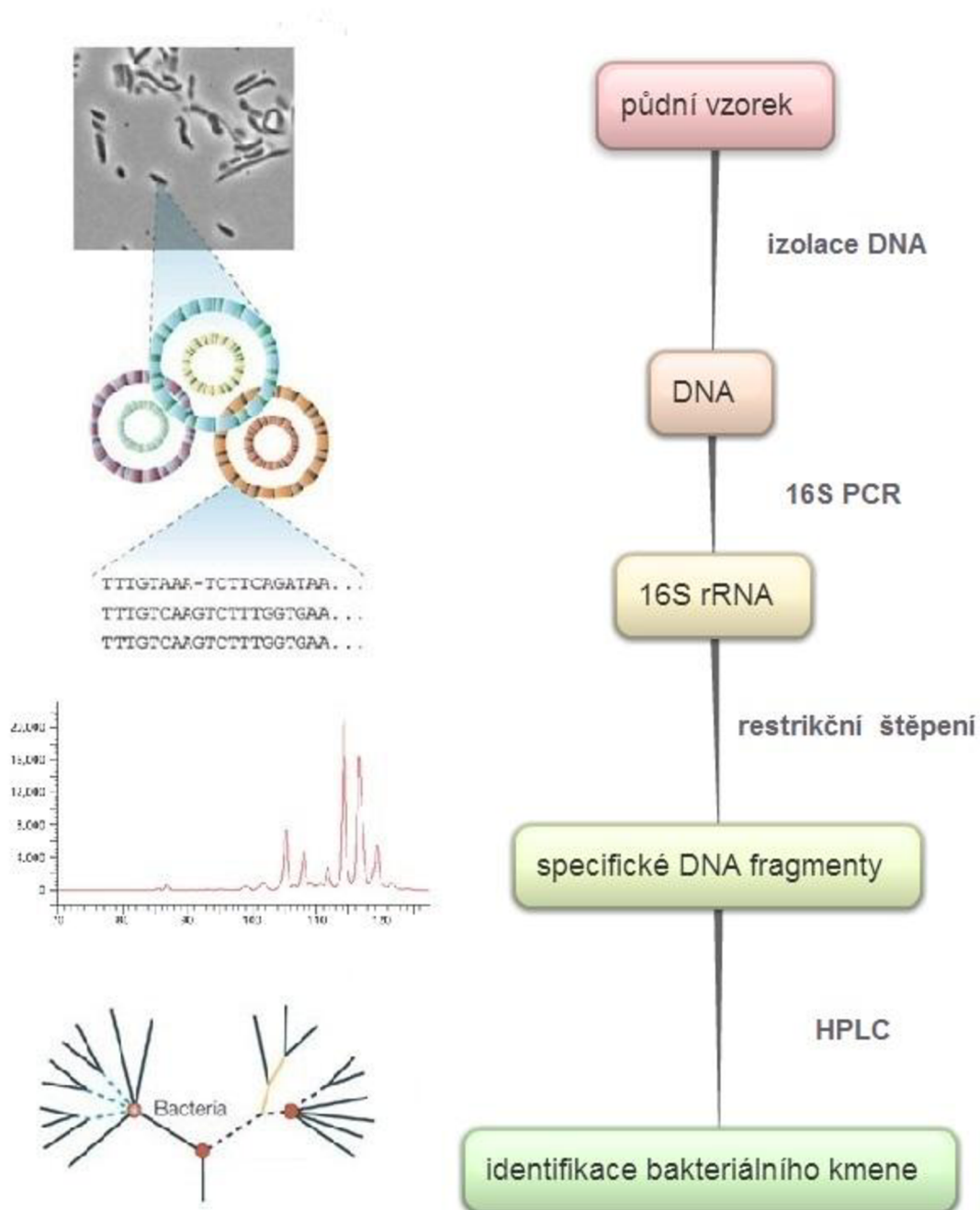
### 5.1.5 Primery a oligonukleotidy

vzorek	název	Sekvence	Mw	koncetrace	
1	R Gate HDHAR	GGACCACTTTGTACAAGA AAGCTGGGTGATTTYGAG GCAAAGCTGAGGC	15537	24,8 nmol	
2	PIP1R	GCGATCTTTGTTATGCCA AGGT	6805	25,4 nmol	
3	VVPR10 VV XhoI	TTATGACTCGTTAATAGG CAT	10830	30,6 nmol	
4	PR3Q NcoI	CATAACCATCGCACAAAGG CATTG	10445	24,0 nmol	
5	RC HISTAG	GCTGAAGCTGTGGTGGTG GTGGTGTGTGCCTACTCT GGATACCACATGGAAA	16291	23,6 nmol	
6	M13P- FAM	[6FAM]CAGGAAACAGCTA TGACC	6048	67,4 nmol	$\lambda_{exc}=494 \text{ nm}$ $\lambda_{em}=519 \text{ nm}$
dA10	dA10	AAAAAAAAAAAA	3074	100 $\mu\text{mol}$	
dC10	dT10	TTTTTTTTTTT	2982	100 $\mu\text{mol}$	
dT10	dC10	CCCCCCCCC	2832	100 $\mu\text{mol}$	
dA15	dA15	AAAAAAAAAAAAAAAAA	4641	100 $\mu\text{mol}$	

Tabulka č.2: Přehled primerů a oligonukleotidů

## 5.2 Metody

Schéma metody pro identifikaci bakteriálních kmenů pomocí separace restrikčních fragmentů 16S PCR produktu daných bakteriálních kmenů (Obr. 8).



Obrázek č. 8: Schéma metody

### 5.2.1 Izolace DNA

Bakteriální suspenze byla centrifugována 10 minut při 15 000 x g, vzniklý pelet byl následně rozsuspendován v 1,5 ml 1mM EDTA (pH 1,5 s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a opět centrifugován 10 minut při 13 000 x g. Bakteriální buňky byly takto promyty třikrát. Po posledním promytí byly rozsuspendovány 0,5 ml 0,01M Tris/HCl (pH 7,0) a bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru (1% SDS, 0,2 M NaOH), 50 µl 5M NaClO<sub>4</sub> a 0,1 g balotinových kuliček. Směs byla inkubována 15 min při 95 °C a poté mražena 15 min při -70°C. Následovalo mletí pomocí oscilačních mlýnků po dobu 20 minut při frekvenci 30/s a centrifugace 10 min při 13 000 x g. Supernatant byl odebrán do nové zkumavky se stejným množstvím směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1). Směs se nechala inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě za mírného míchání, poté byla zcentrifugována 10 minut při 13 000 x g. Horní vrstva byla převedena do nové zkumavky, do které bylo přidáno 1/10 objemu 3 M octanu sodného a dvojnásobný objem vychlazeného etanolu. Srážení probíhalo 30 minut při -20 °C. Vysrážená DNA byla centrifugována 15 minut při 13 000 x g a sušena 5 minut ve vakuové odparce. Pelet vyizolované DNA byl rozpuštěn v PCR vodě.

### 5.2.2 16S PCR

PCR směs byla napipetována podle tabulky č.3, zvortexována a krátce zcentrifugována. PCR probíhala v termocykléru na program 1 (Tab. č.4).

8 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O
12,5 $\mu$ l	polymeráza KAPA Blood
0,5 $\mu$ l	27f primer (100 $\mu$ M)
0,5 $\mu$ l	1492r primer (100 $\mu$ M)
0,5 $\mu$ l	DMSO
1 $\mu$ l	DNA templát

**Tabulka č.3:** PCR směs (do 25  $\mu$ l)

Iniciace	94°C	5 min
Denaturace	94 °C	30 s
Anneling	55°C	50s
Elongace	72°C	2 min
	od denaturačního kroku opakování 29x	
Finální elongace	72°C	8,5 min
Hold	4 °C	

**Tabulka č.4:** Program termocykléru (Program 1)

### 5.2.3 Restrikční štěpení

Štěpený PCR produkt byl naředěn vodou, byl přidán Tango pufr a restrikční endonukleáza MnII dle tabulky č.5. Směs byla zvortexována a krátce zcentrifugována. Poté byla inkubována 90 minut při 37 °C.

Po inkubaci byla přidána restrikční endonukleáza BseDI dle tabulky č.5, směs byla zvortexována a krátce zcentrifugována. Následovala 90 minutová inkubace při 55°C.

18 µl	dH <sub>2</sub> O	
2 µl	Tango pufr	
10 µl	PCR produkt	
1 µl	MnII	5' ... CCTC(N) <sub>7</sub> ↓ ... 3' 3' ... GGAG(N) <sub>6</sub> ↑ ... 5'
Inkubace 90 minut při 37 °C		
1 µl	BseDI	5' ... C↓CNNGG ... 3' 3' ... GGNNC↑C ... 5'
Inkubace 90 minut při 55 °C		

**Tabulka č.5:** Restrikční štěpení

#### 5.2.4 HPLC

Analýzy byly provedeny pomocí HPLC (HP 1100) s detektorem s diodovým polem. Kolony nebyly při analýzách temperovány. Detekce se prováděla při 254 nm.

Pro analýzu pomocí IEC se používala kolona DEAE-NPR.

Složení mobilních fází bylo: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 9

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 9 + 1 M NaCl

Gradient je uveden v tabulce č.6.

čas [min]	A [%]	B [%]	průtok [ml/min]
0	100	0	0,5
10	100	0	0,5
25	0	100	0,5
35	0	100	0,5
35,01	100	0	0,5
45	100	0	0,5

**Tabulka č.6:** Gradient pro IEC

Pro analýzu pomocí HILIC se používala kolona Primasep SB.

Složení mobilních fází bylo: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 4

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 4 + 1 M NaCl

Gradient je uveden v tabulce č.7.

čas [min]	A [%]	B [%]	průtok [ml/min]
0	100	0	0,5
25	0	100	0,5
35	0	100	0,5
35,01	100	0	0,5
45	100	0	0,5

**Tabulka č.7:** Gradient pro HILIC



Pro analýzu pomocí RP-HPLC se používala kolona Lichrosorb RP18.

Složení mobilních fází bylo: A: 25 mM Tris/HCl, pH = 8 + 5 % MetOH

B: 25 mM Tris/HCl, pH = 8 + 50 % MetOH

Gradient je uveden v tabulce č.8.

čas [min]	A [%]	B [%]	průtok [ml/min]
0	100	0	0,5
2	100	0	0,5
25	0	100	0,5
35	0	100	0,5
35,01	100	0	0,5
50	100	0	0,5

**Tabulka č.8:** Gradient pro RP-HPLC

Pro analýzu pomocí IP-RP se používala kolona Lichrosorb RP18.

Analýza probíhala izokraticky při průtoku 1 ml/min.

Složení mobilních fází bylo: 10% ACN + 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 3,5 mM TBAHS

## 5.3 Výsledky

### 5.3.1 Příprava vzorku

Z bakteriálních kultur byla vyizolována DNA pomocí fenol-chloroform-izoamylalkoholové extrakce. Koncentrace a čistota vyizolované DNA je uvedena v následující tabulce.

	<b>c [ng/μl]</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
<i>A. ferrooxidans</i>	680,5	2,001	2,084
<i>A. thiooxidans</i>	94,0	1,593	1,774

**Tabulka č. 9:** Koncentrace a čistota vyizolované DNA

Podle poměrů absorbancí lze určit, že vyizolovaná DNA není zcela čistá, pro další použití je však její čistota dostačující. Tato DNA byla použita jako templát pro 16S PCR. Vzniklý PCR produkt byl naštěpen pomocí restriktáz MnlI a BseDI (viz kapitola 5.2.3 Restriční štěpení).

### 5.3.2 IEC

Iontově výměnná chromatografie je již zavedená metoda pro separaci oligonukleotidů. Byla proměřena závislost retence na pH. Bylo také testováno, jak ovlivní přítomnost  $Mg^{2+}$  iontů v mobilní fázi retenční čas. Předpokládalo se, že retenční čas bude nižší v důsledku interakce  $Mg^{2+}$  iontů s fosfátovými skupinami.

Vhodné pH mobilní fáze bylo optimalizováno na směsi známých oligonukleotidů (Tab. 10, Obr. 9). Jako nejvhodnější bylo zvoleno pH 9. Předpoklad, že se bude se zvyšující koncentrací  $Mg^{2+}$  retence snižovat se potvrdil (Tab. 11, Obr. 12).

pH	$t_{r1}$	plocha <sub>1</sub>	$t_{r2}$	plocha <sub>2</sub>
<b>8,96</b>	16,306	2264,9	16,399	2799,5
<b>7,12</b>	15,138	1418	15,229	1125,1
<b>6,04</b>	14,427	290	15,075	1714,9
<b>5,01</b>	14,532	63,7	15,2	308,7

**Tabulka č.10:** Výběr vhodného pH pro IEC

Nástřík: 10  $\mu$ l vzorku 1+5 (zředění 20  $\mu$ l do 1 ml)

Kolona: DEAE-NPR

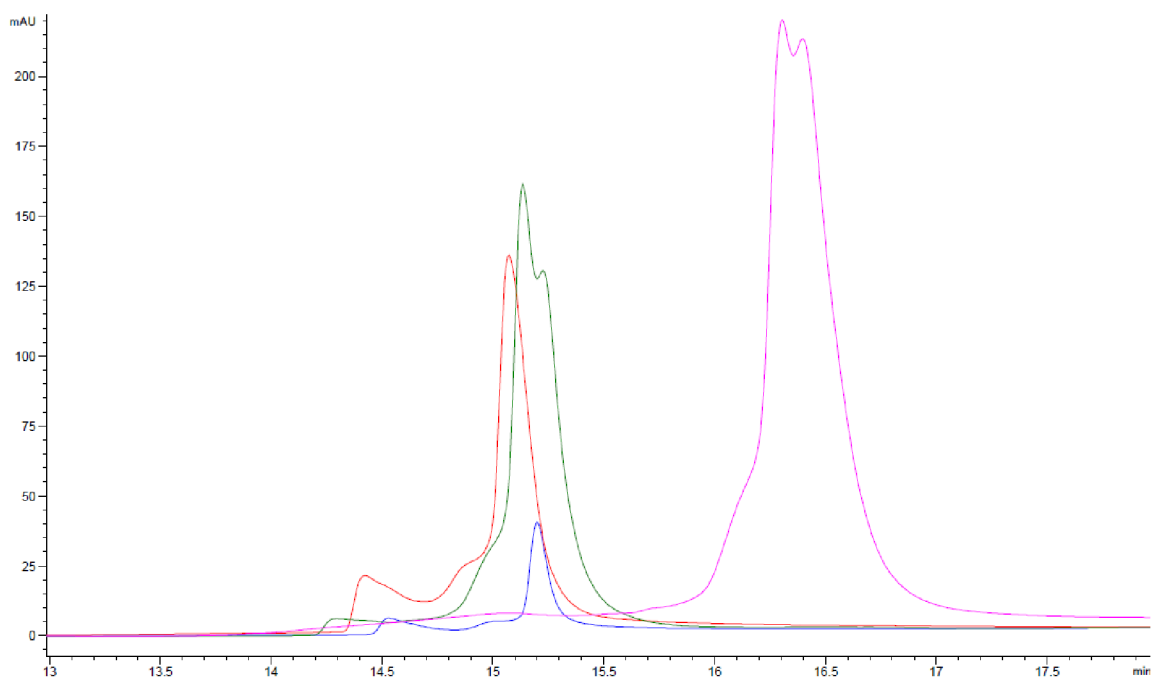
MF: A: 25 mM acetátový pufr, variabilní pH

B: 25 mM acetátový pufr, variabilní pH + 1M NaCl

Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 10. min – 25. min 0 – 100% B, 35. min 100B, 10 min 100% A

Detekce: DAD, 254 nm



**Obrázek č.9:** Optimalizace pH

Nástřík: 50  $\mu$ l vzorku 1 + 5

MF: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 5,01; 6,04; 7,12; 8,96

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 5,01; 6,04; 7,12; 8,96 + 1M NaCl

Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 10. min – 25. min 0 – 100% B, 35. min 100B, 10 min 100% A

MgSO <sub>4</sub> [mmol]	t <sub>r1</sub>	plocha <sub>1</sub>	t <sub>r2</sub>	plocha <sub>2</sub>
5	24,532	7511,1	24,987	5124,2
50	23,035	7373,1	23,622	4437,2
100	21,946	6685	22,538	3416,3
250	20,245	5618,5	20,805	4312,7

**Tabulka č.11:** Závislost retence za přítomnosti Mg<sup>2+</sup> iontů u IEC

Nástřík: 50  $\mu$ l vzorku 1+5 (zředění 20  $\mu$ l do 1 ml)

Kolona: DEAE-NPR

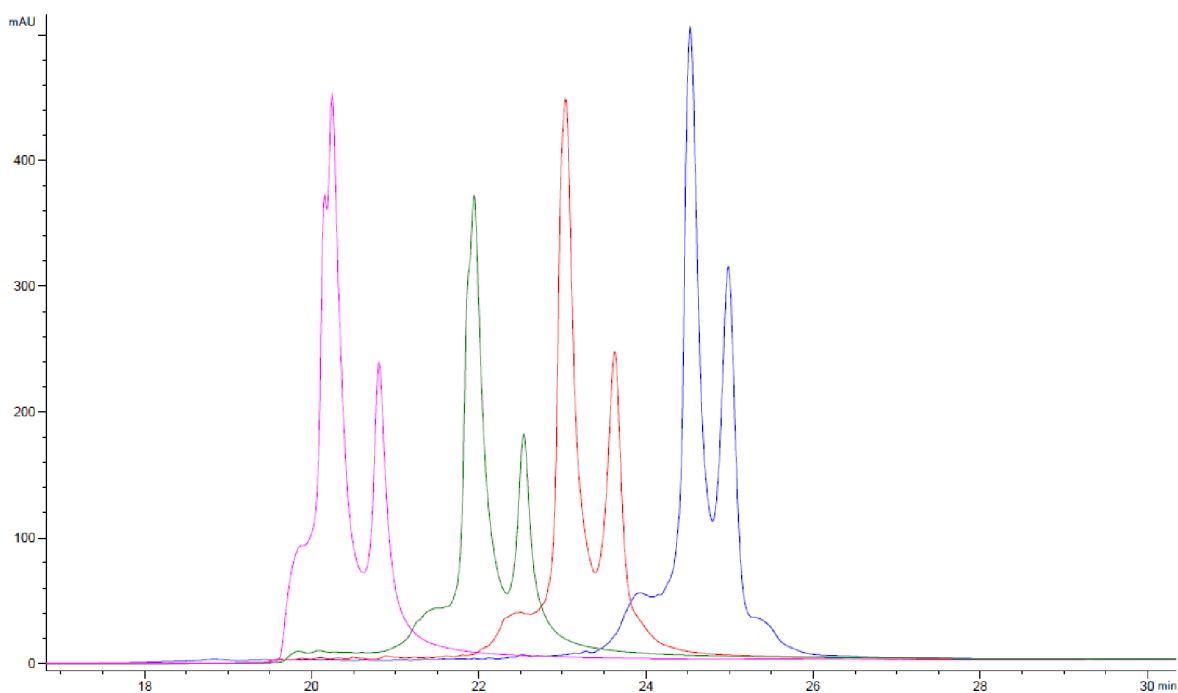
MF: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 8,99

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 8,99 + 1M NaCl

Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 10. min – 25. min 0 – 100% B, 35. min 100B, 10 min 100% A

Detekce: DAD, 254 nm



**Obrázek č.12:** Separace v přítomnosti  $Mg^{2+}$

Nástřik: 50  $\mu$ l vzorku 1 + 5

MF: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 8,96  
+ 5 mM; 50mM; 100mM; 250 mM  $MgSO_4$

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 8,96 + 1M NaCl  
+ 5 mM; 50mM; 100mM; 250 mM  $MgSO_4$

Průtok: 0,5 ml/min

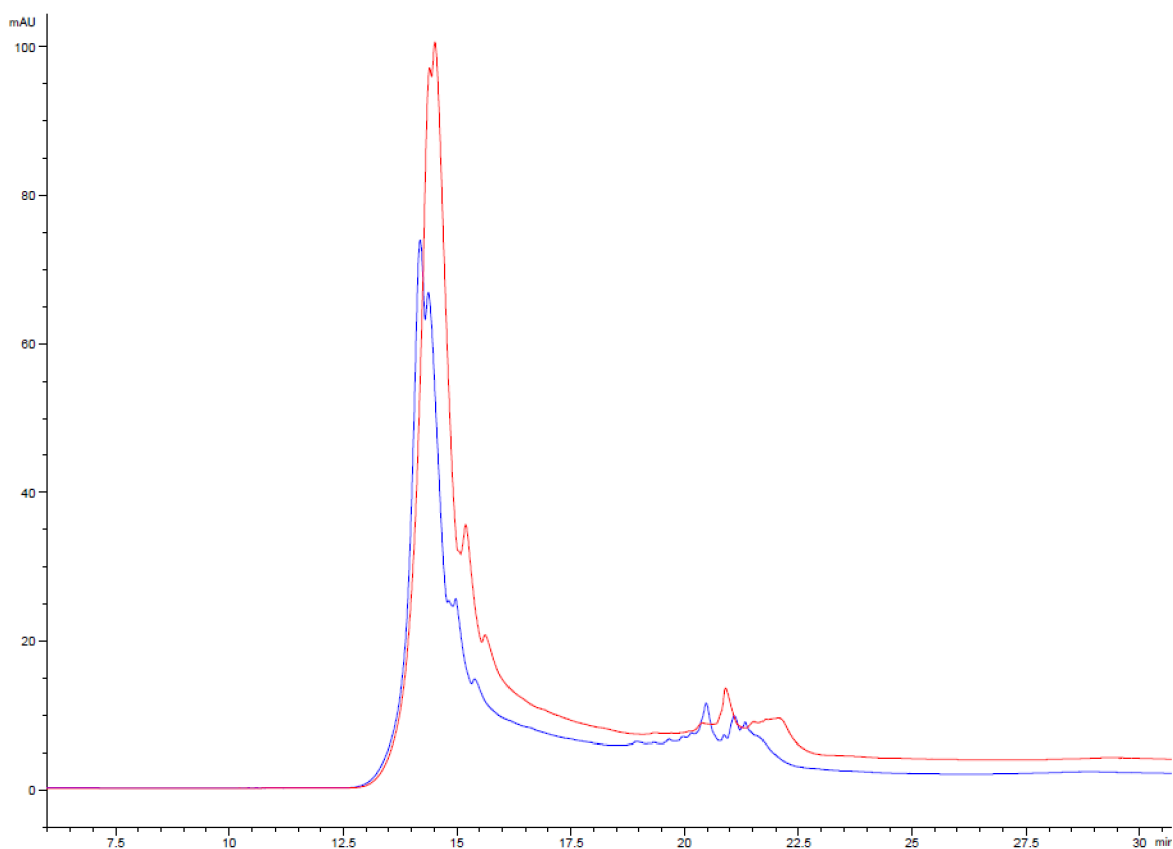
Gradient: 10. min – 25. min 0 – 100% B, 35. min 100B, 10 min 100% A

Nástřik:	50 $\mu$ l vzorku
Kolona:	DEAE-NPR
MF:	A: 25 mM acetátový pufr, pH = 9 B: 25 mM acetátový pufr, pH = 9 + 1M NaCl
Průtok:	0,5 ml/min
Gradient:	10. min – 25. min 0 – 100% B, 35. min 100B, 10 min 100% A
Detekce:	DAD, 254 nm

**Tabulka č.13:** Optimalizovaná metoda pro separaci oligonukleotidů pomocí IEC

Takto vytvořená metoda byla použita pro separaci směsi restrikčních fragmentů z 16S PCR produktu bakteriálních kmenů *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*.

Na chromatogramu lze rozeznat více píků, nicméně jejich rozlišení není ideální a neodpovídá předpokládanému počtu restrikčních fragmentů. Chromatografické profily pro *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans* jsou velice podobné, což může být způsobeno také tím, že se jedná o velmi příbuzné bakterie. Bez další úpravy chromatografické metody, vedoucí k lepšímu rozlišení není možné tyto bakteriální kmeny od sebe rozeznat. Další experimenty bych doporučila rozšířit o další méně podobné bakteriální kmeny.



**Obrázek č.11:** Použití optimalizované IEC pro separaci restrikčních fragmentů *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*

Nástřík: 50  $\mu$ l vzorku

Kolona: DEAE-NPR

MF: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 9

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 9 + 1M NaCl

Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 10. min – 25. min 0 – 100% B, 35. min 100B, 10 min 100% A

Detekce: DAD, 254 nm

### 5.3.3 HILIC

Pro hydrofilní interakční chromatografii bylo zvoleno pH 4, což je nejvyšší možné pH v rozsahu kolony. Bylo optimalizováno množství ACN v mobilní fázi a závislost retence na přítomnosti  $Mg^{2+}$  v mobilní fázi obdobně jako u IEC.

Byla testována mobilní fáze s obsahem 0%, 20% a 30% ACN. Jako nejvhodnější pro separaci bylo vybráno 30% ACN. Při analýze s mobilní fázi s vyšším obsahem ACN klesal retenční čas. Se stejným předpokladem jako u IEC bylo testováno, jak ovlivní přítomnost  $Mg^{2+}$  iontů v mobilní fázi retenční čas. Retenční čas se snížil o téměř 5 minut (Tab č.15).

%ACN	$t_{r1}$	plocha <sub>1</sub>	$t_{r2}$	plocha <sub>2</sub>
0	36,406	426,3	-	-
20	13,658	646,2	-	-
30	16,209	7510,8	16,962	9493,7

**Tabulka č. 14:** Výběr vhodného obsahu acetonitrilu v mobilní fázi pro HILIC

Nástřík: 50  $\mu$ l vzorku 1 + 3 + 4 + 6 (zředění 20  $\mu$ l do 1 ml)

Kolona: Primasep SB

MF: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 4,00, variabilní obsah ACN

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 4,00 + 1M NaCl, variabilní obsah ACN

Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 0. min - 25.min 0 – 100% B, do 35. min 100B, 10 min 100% A

Detekce: DAD, 254 nm

<b>MgSO<sub>4</sub></b> <b>[mmol]</b>	<b>t<sub>r1</sub></b>	<b>plocha<sub>1</sub></b>	<b>t<sub>r2</sub></b>	<b>plocha<sub>2</sub></b>
<b>0</b>	20,538	4967,6	20,209	1827,3
<b>10</b>	12,603	1114,3	13,271	1772,1
<b>20</b>	12,398	993,9	13,144	1641

**Tabulka č.15:** Závislost retence za přítomnosti Mg<sup>2+</sup> iontů u HILIC

Nástřík: 50 µl vzorku 2 + 5 (zředění 20 µl do 1 ml)

Kolona: Primasep SB

MF: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 3,98 + 30% ACN

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 3,98 + 30% ACN + 1M NaCl

Průtok: 0,5 ml/min

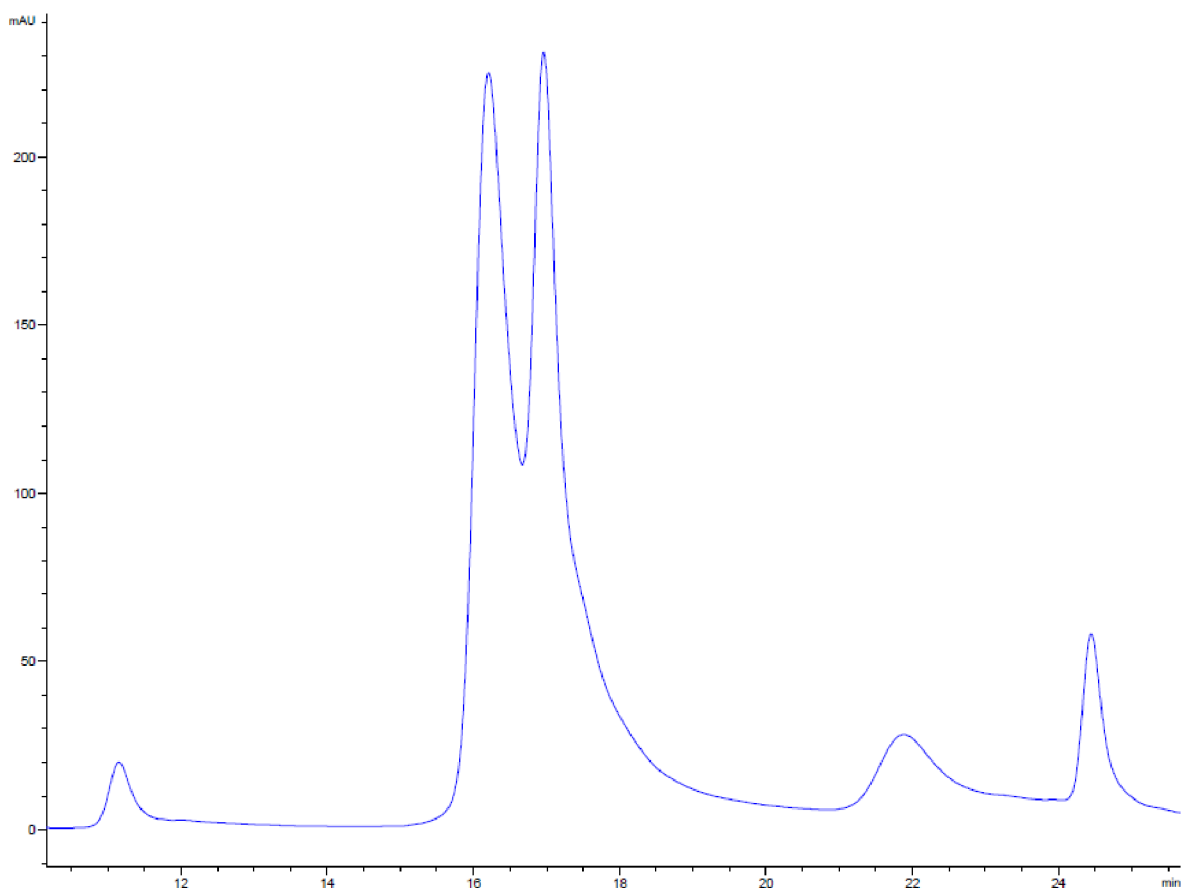
Gradient: 0. min - 25.min 0 – 100% B, do 35. min 100B, 10 min 100% A

Detekce: DAD, 254 nm

Nástřík:	50 µl vzorku
Kolona:	Primasep SB
MF:	A: 25 mM acetátový pufr, pH = 4 + 30% ACN
	B: 25 mM acetátový pufr, pH = 4 + 30% ACN + 1M NaCl
Průtok:	0,5 ml/min
Gradient:	0. min - 25.min 0 – 100% B, do 35. min 100B, 10 min 100% A
Detekce:	DAD, 254 nm

**Tabulka č.16:** Optimalizovaná metoda pro separaci oligonukleotidů pomocí HILIC





**Obrázek č.12:** Příklad separace směsi oligonukleotidů

Nástřik: 50  $\mu$ l vzorku 1+3+4+6 (20  $\mu$  do 1 ml)

Kolona: Primasep SB

MF: A: 25 mM acetátový pufr, pH = 4 + 30% ACN

B: 25 mM acetátový pufr, pH = 4 + 30% ACN + 1M NaCl

Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 0. min - 25.min 0 – 100% B, do 35. min 100B, 10 min 100% A

Detekce: DAD, 254 nm

Takto vytvořená metoda byla použita pro separaci směsi restričních fragmentů z 16S PCR produktu bakteriálních kmenů *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*. Vzorek se eluoval až po skončení analýzy okolo 50. minuty. Docházelo k nedokonalé separaci restričních fragmentů. Snížit retenční čas by bylo možné zvýšením obsahu ACN v mobilní fázi, to však není možné, protože při vyšším obsahu ACN než 30% se v mobilní fázi B s 1M NaCl tvoří dvoufázový systém.

### 5.3.4 RP-HPLC

Také používanou metodou pro separaci oligonukleotidů je reverzně fázová chromatografie. Byl vytvořen gradient metanolu a proměřena závislost retence na pH

Při optimalizaci obsahu metanolu na směsi známých oligonukleotidů bylo zjištěno, že i při relativně nízkých koncentracích metanolu se část vzorku eluuje v mrtvém objemu (Tab. 17). Proto byla použita mobilní fáze s pouze 5% metanolu s gradientem 50% metanolu, při kterém se sice část vzorku eluuje v mrtvém objemu, ale část později (Obr.12). Jako nejvhodnější bylo zvoleno pH 8, protože poskytovalo nejlepší rozlišení.

U této metody bylo sice dosaženo nejlepší rozlišení jednotlivých oligonukleotidů, ale opakovatelnost byla velmi špatná i přes dlouhé promývání a sycení kolony mobilní fází A.

<b>% MetOH</b>	<b>t<sub>r</sub></b>	<b>Plocha</b>
<b>15</b>	1,302	1665,2
<b>20</b>	1,294	2279,7
<b>50</b>	1,074	41,7

**Tabulka č. 17:** Výběr vhodné obsahu MetOH v mobilní fázi pro HIC

Nástřík: 50 µl vzorku 2 (zředění 10 µl do 1 ml)

Kolona: Lichrosorb RP18

MF: 20 mM Tris/HCl, pH = 7,97 + variabilní obsah MetOH

Průtok: 0,5 ml/min

Detekce: DAD, 254 nm

<b>pH</b>	<b>t<sub>r1</sub></b>	<b>plocha<sub>1</sub></b>	<b>t<sub>r2</sub></b>	<b>plocha<sub>2</sub></b>	<b>t<sub>r3</sub></b>	<b>plocha<sub>3</sub></b>
<b>7,01</b>	11,315	991,3	11,962	2088,5	14,089	354,4
<b>7,9</b>	9,513	1357,2	9,78	3293,5	-	-
<b>8,98</b>	9,839	2918,1	12,551	264,2	13,547	290

**Tabulka č. 18:** Výběr vhodného pH mobilní fáze pro HIC

Nástřík: 50  $\mu$ l vzorku 2 + 5 (zředění 20  $\mu$ l do 1 ml)

Kolona: Lichrosorb RP18

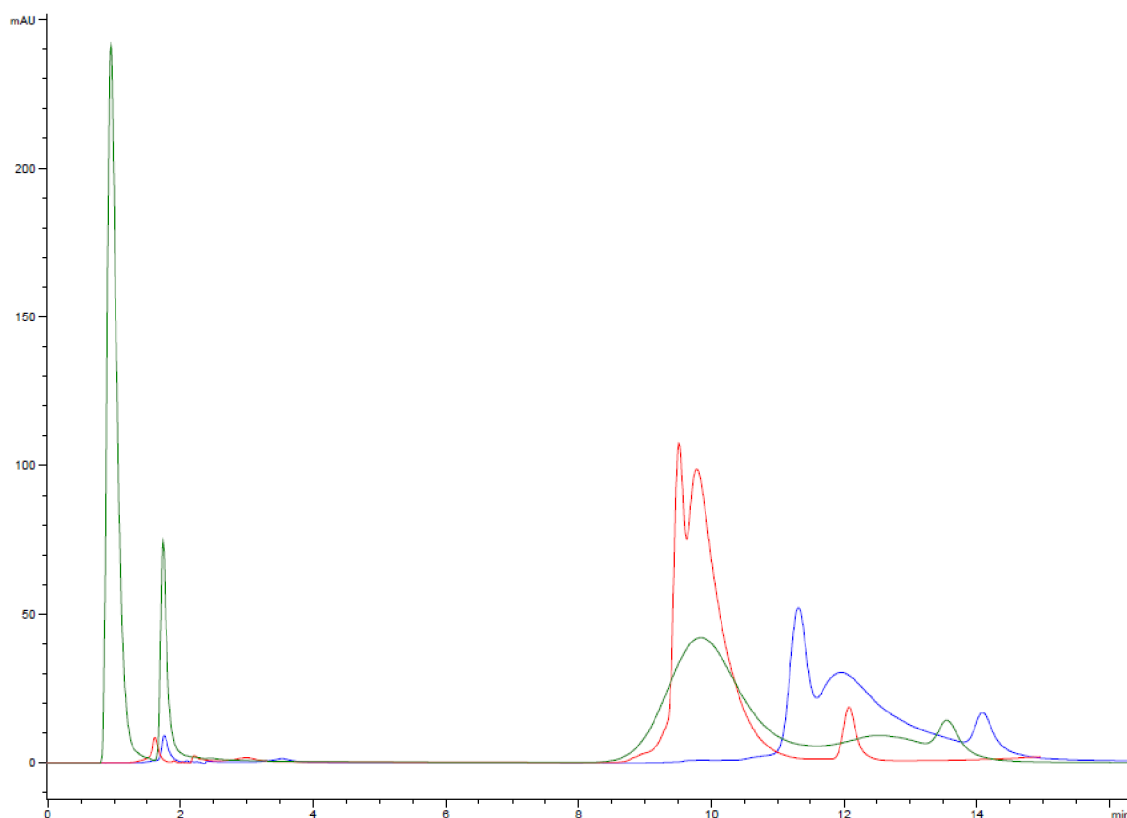
MF: A: 20 mM Tris/HCl, variabilní pH + 5% MetOH

B: 20 mM Tris/HCl, variabilní pH + 50% MetOH

Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 2.-25. min 0-100% B, do 35. min 100% B, 15 min promývání 100% A

Detekce: DAD, 254 nm



**Obrázek č.12:** Volba vhodného pH

Nástřik: 50  $\mu$ l vzorku 2 + 5 (20  $\mu$ l do 1 ml vody)

Kolona: Lichrosorb RP18

MF: A: 20 mM Tris/HCl, pH = 7,01; 7,9; 8,98 + 5% MetOH

B: 20 mM Tris/HCl, pH = 7,01; 7,9; 8,98 + 50% MetOH

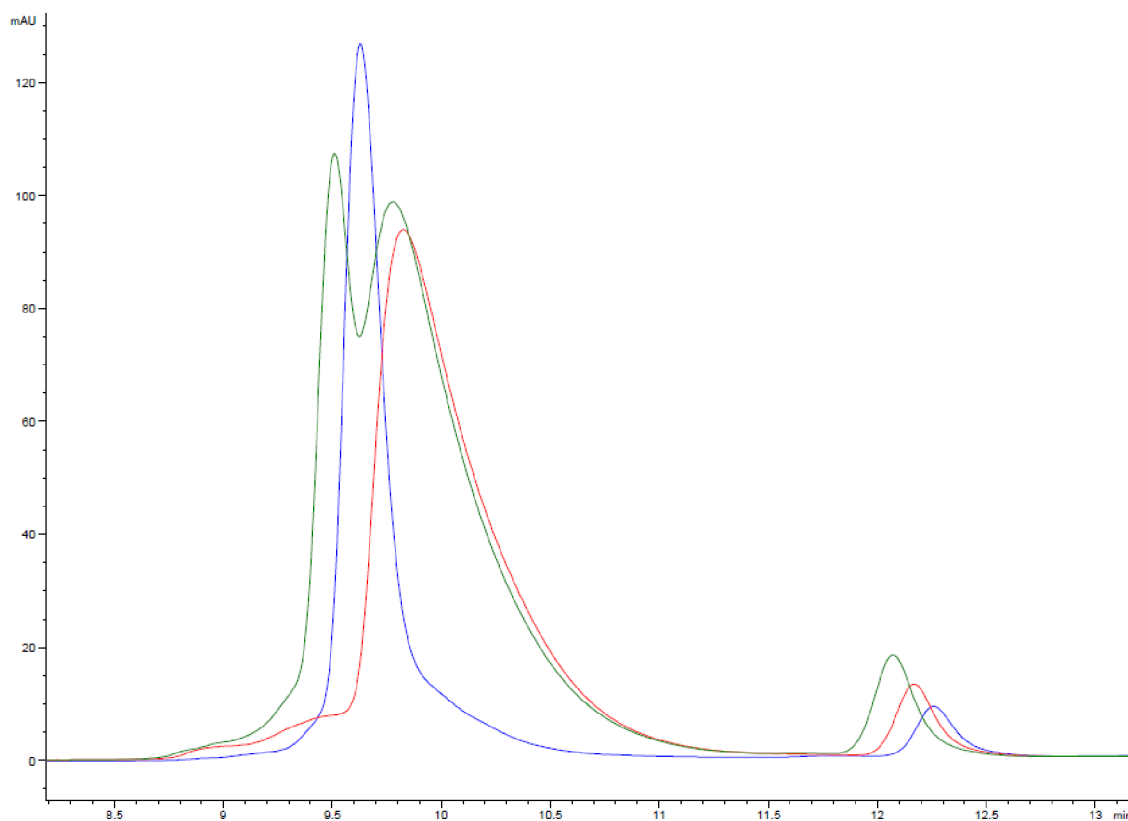
Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 2.-25. min 0-100% B, do 35. min 100% B, 15 min promývání 100% A

Detekce: DAD, 254 nm

	$t_{r1}$	plocha <sub>1</sub>	$t_{r2}$	plocha <sub>2</sub>
<b>vz 2</b>	9,63	1907,2		
<b>vz 5</b>			9,823	3342,8
<b>vz 2+5</b>	9,513	1357,2	9,78	3293,5

**Tabulka č.19:** Příklad separace směsi oligonukleotidů



**Obrázek č.13:** Příklad separace směsi oligonukleotidů

Nástrík: 50  $\mu$ l vzorku 2; 5; 2 + 5

Kolona: Lichrosorb RP18

MF: A: 20 mM Tris/HCl, pH = 8 + 5% MetOH

B: 20 mM Tris/HCl, pH = 8 + 50% MetOH

Průtok: 0,5 ml/min

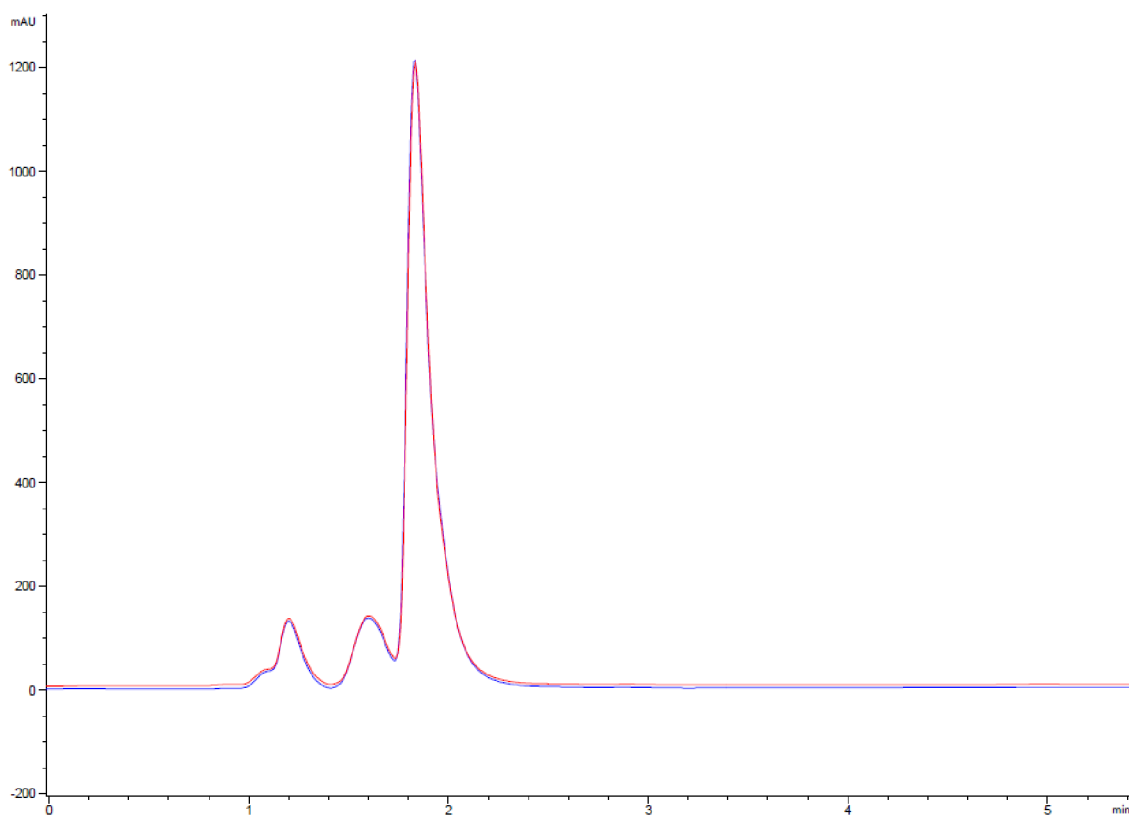
Gradient: 2.-25. min 0-100% B, do 35. min 100% B, 15 min promývání 100% A

Detekce: DAD, 254 nm

Nástřík:	50 µl vzorku
Kolona:	Lichrosorb RP18
MF:	A: 20mM Tris/HCl, pH = 8 + 5% MetOH B: 20mM Tris/HCl, pH = 8 + 50% MetOH
Průtok:	0,5 ml/min
Gradient:	2.-25. min 0-100% B, do 35. min 100% B, 15 min promývání 100% A
Detekce:	DAD, 254 nm

**Tabulka č.20:** Optimalizovaná metoda pro separaci oligonukleotidů pomocí RP-HPLC

Takto vytvořená metoda byla použita pro separaci směsi restrikčních fragmentů z 16S PCR produktu bakteriálních kmenů *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*. Retenční časy byly pod 2 minuty, což je velmi blízko mrtvého objemu. Při analýze nedocházelo k žádné separaci restrikčních fragmentů. Chromatografické profily restrikčních fragmentů jednotlivých bakterií byly totožné (Obr. 14). To může být opět způsobeno tím, že se jedná o velmi příbuzné bakterie, proto bych v dalších experimentech doporučila použít další, méně podobné bakteriální kmeny.



**Obrázek č.14:** Použití optimalizované RP-HPLC pro separaci restrikčních fragmentů *A. thiooxidans* a *A. ferrooxidans*.

Nástřík: 50  $\mu$ l vzorku

Kolona: Lichrosorb RP18

MF: A: 20mM Tris/HCl, pH = 8 + 5% MetOH

B: 20mM Tris/HCl, pH = 8 + 50% MetOH

Průtok: 0,5 ml/min

Gradient: 2.-25. min 0-100% B, do 35. min 100% B, 15 min promývání 100% A

Detekce: DAD, 254 nm

### 5.3.5 IP-RP

Poslední testovanou metodou pro separaci oligonukleotidů je reverzně fázová iontově párová chromatografie. Pro tuto metodu bylo zvoleno iontově párové činidlo a jeho vhodná koncentrace. Dále byl zvolen vhodný obsah ACN v mobilní fázi a vhodné pH. Byla také proměřena závislost retence na teplotě.

Obsah metanolu v mobilní fázi byl optimalizován na směsi známých oligonukleotidů. Jako nejvhodnější pro separaci bylo vybráno 10% ACN v mobilní fázi. S rostoucím podílem ACN v mobilní fázi se snižoval retenční čas až k mrtvému času. Byla proměřena závislost separace na pH (Tab. 22), ale nebyly pozorovány významné rozdíly. Proto byl pufr nahrazen MilliQ vodou. Snižující se teplota nevýznamně zvyšovala retenční čas (Tab. 23).

Byla testována tři iontově párová činidla, jako dále používané činidlo byl vybrán TBAHS. Retenční časy se při použití různých iontově párových činidel příliš nelišily (Tab. 24, Obr. 15). Jako nevhodnější koncentrace iontově párového činidla byla zvolena 3,5 mM TBAHS, protože při dalším zvýšení koncentrace iontově párového činidla již nedocházelo ke změně retence (Tab. 25, Obr. 16). Do mobilní fáze se také přidával 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, změny koncentrace Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> separaci nijak neovlivňovaly.

Další možností pro IP-RP je použití jiných iontově párových činidel, umožňující hmotností detekci.

% ANC	t <sub>r</sub>	Plocha
10	3,851	184,9
20	2,71	241,3
30	1,612	199,1

**Tabulka č. 21:** Výběr vhodného obsahu acetonitrilu v mobilní fázi pro IP-RP

Nástřík: 10 µl vzorku 1 + 3 + 6 (zředění 50 µl do 0,5 ml)

Kolona: Hypersil ODS

MF: 10% ACN + 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2 mM TBAHS

Průtok: 1 ml/min

Detekce: DAD, 254 nm



<b>pH</b>	<b>t<sub>r1</sub></b>	<b>plocha<sub>1</sub></b>	<b>t<sub>r2</sub></b>	<b>plocha<sub>2</sub></b>
<b>5,01</b>	1,992	37,9	2,328	27,1
<b>6,04</b>	1,95	38,6	2,358	27,2
<b>7,12</b>	1,97	42,5	2,296	27,4
<b>4</b>	1,841	37,9	2,12	27,2

**Tabulka č. 22:** Výběr vhodného pH mobilní fáze pro IP-RP

Nástřík: 10 µl vzorku 1 + 5 (zředění 10 µl do 50 µl)  
Kolona: Hypersil ODS  
MF: 50 mM acetátový pufr o variabilním pH + 20% ACN + 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
+ 3,5 mM TBAHS  
Průtok: 1 ml/min  
Detekce: DAD, 254 nm

<b>teplota</b>	<b>t<sub>r1</sub></b>	<b>plocha<sub>1</sub></b>	<b>t<sub>r2</sub></b>	<b>plocha<sub>2</sub></b>
<b>5</b>	2,208	28	2,532	28,4
<b>25</b>	2,007	28,8	2,348	29,4
<b>40</b>	1,886	29,7	2,23	29,6

**Tabulka č. 23:** Výběr vhodného teploty pro IP-RP

Nástřík: 10 µl vzorku 1 + 5 (zředění 10 µl do 50 µl)  
Kolona: Hypersil ODS  
MF: 50 mM acetátový pufr pH = 2,6 + 20% ACN + 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
+ 3,5 mM TBAHS  
Průtok: 1 ml/min  
Detekce: DAD, 254 nm

	$t_r$	Plocha
<b>2mM TBAHS</b>	3,321	104,4
<b>2mM TPAHS</b>	4,398	136,4
<b>2mM TBAHP</b>	3,462	124,5

**Tabulka č. 24:** Výběr vhodného iontově párového činidla pro IP-RP

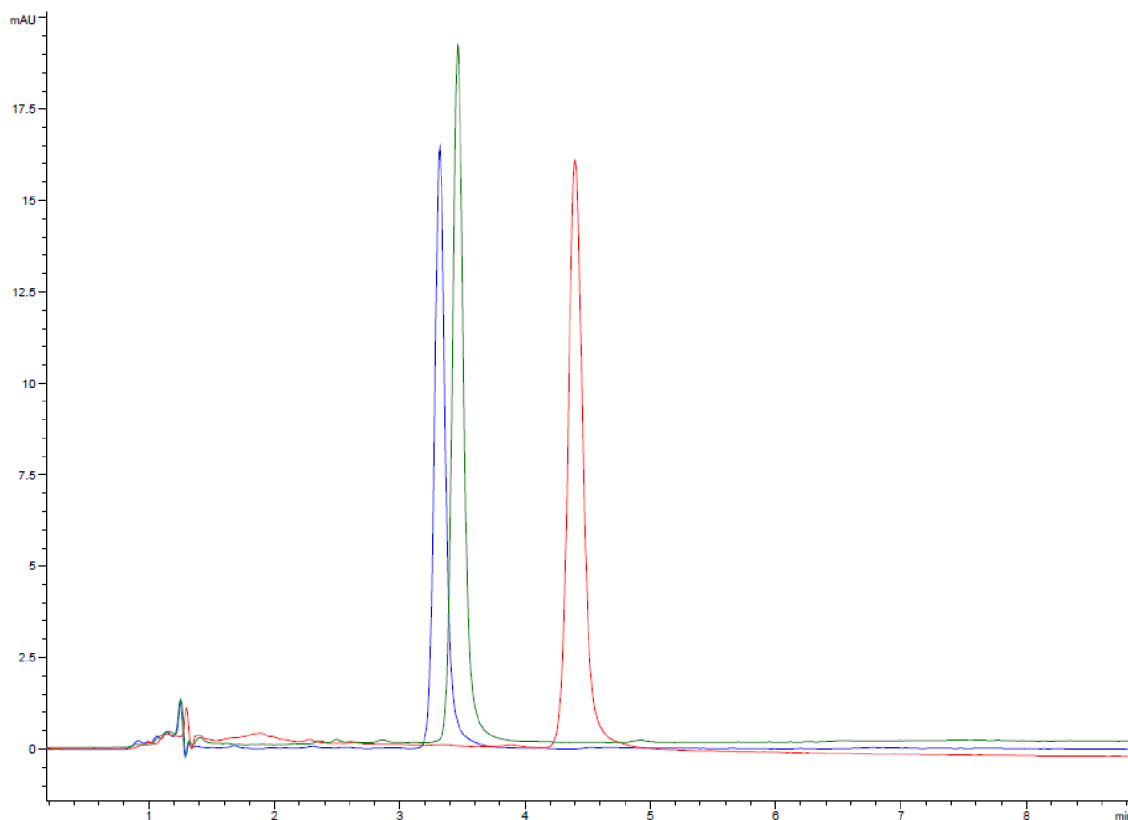
Nástřík: 10  $\mu$ l vzorku 1 + 3 + 6 (zředění 50  $\mu$ l do 0,5 ml)

Kolona: Hypersil ODS

MF: 10% ACN + 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2 mM iontově párové činidlo

Průtok: 1 ml/min

Detekce: DAD, 254 nm



**Obrázek č.15:** Výběr iontově párového činidla

Nástřík: 10  $\mu$ l vzorku 1 + 3 + 6 (zředění 50  $\mu$ l do 0,5 ml)

Kolona: Hypersil ODS

MF: 10% ACN + 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2 mM **TBAHS**, **TPAHS**, **TBAHP**

Průtok: 1 ml/min

Detekce: DAD, 254 nm

c TBAHS	t <sub>r</sub>	Plocha
2	3,321	104,4
3,5	3,667	124
5	3,661	123,7

**Tabulka č. 25:** Výběr vhodné obsahu iontově párového činidla pro IP-RP

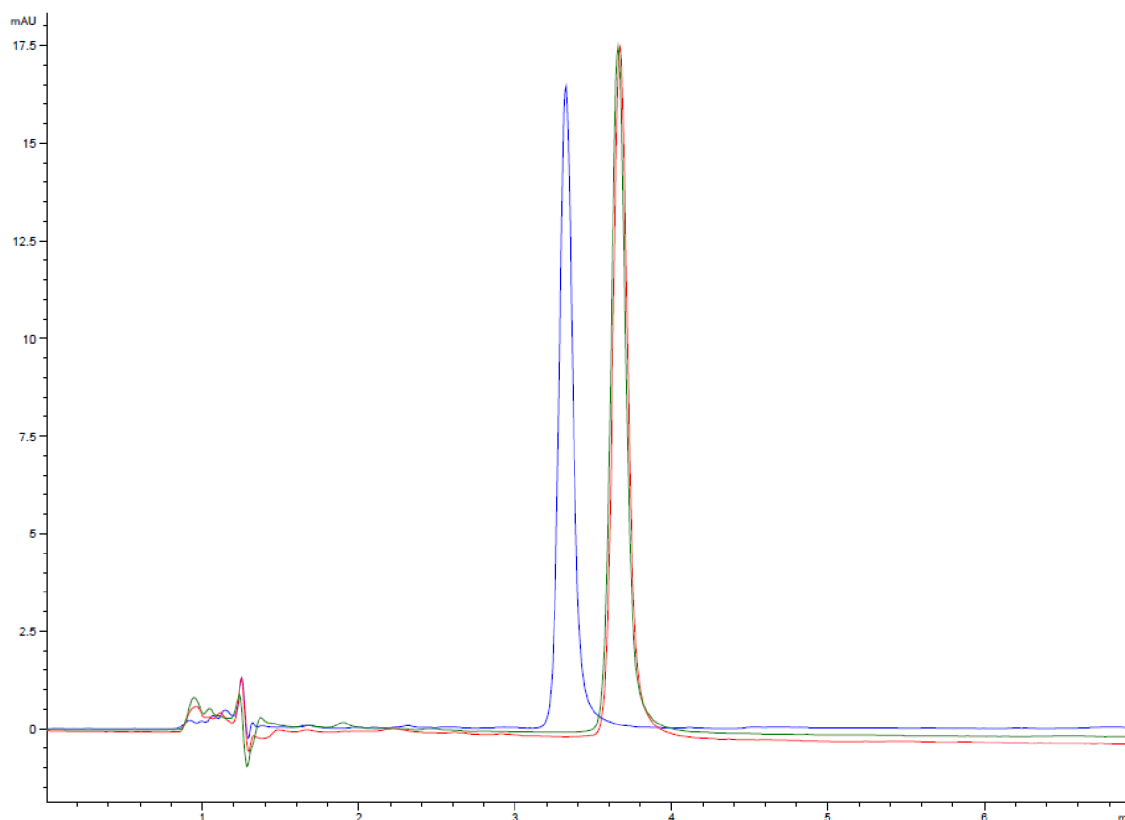
Nástřík: 10 µl vzorku 1 + 3 + 6 (zředění 50 µl do 0,5 ml)

Kolona: Hypersil ODS

MF: 10% ACN + 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + proměnlivá koncentrace TBAHS

Průtok: 1 ml/min

Detekce: DAD, 254 nm



**Obrázek č.16:** Volba koncentrace TBAHS

Nástřík: 10 µl vzorku 1 + 3 + 6 (zředění 50 µl do 0,5 ml)

Kolona: Hypersil ODS

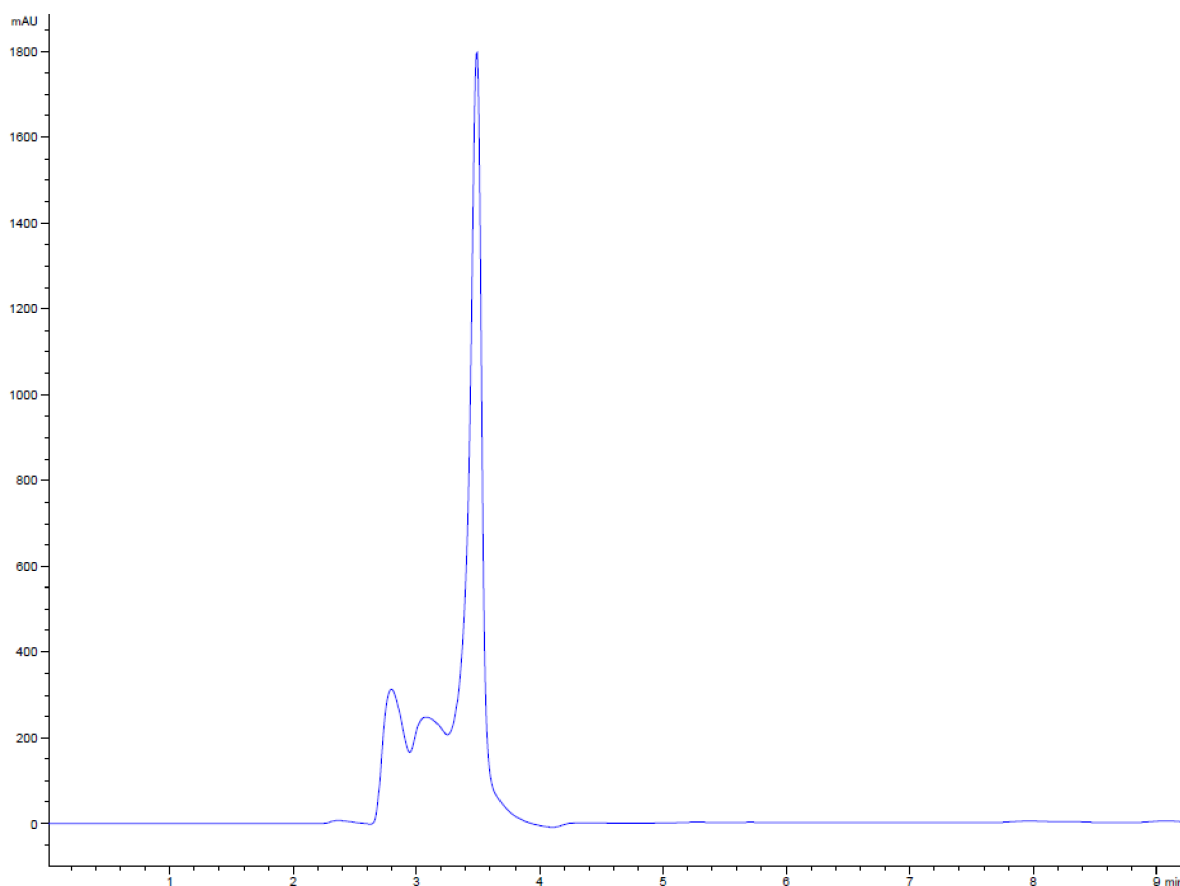
MF: 10% ACN + 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2 mM; 3,5 mM; 5 mM TBAHS

Průtok: 1 ml/min

Detekce: DAD, 254 nm

Nástřik:	10 $\mu$ l vzorku
Kolona:	Hypersil ODS
MF:	10% ACN + 1 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 3,5 mM TBAHS
Průtok:	1 ml/min
Detekce:	DAD, 254 nm

**Tabulka č. 26:** Optimalizovaná metoda pro separaci oligonukleotidů pomocí IP-RP



**Obrázek č.17:** Použití optimalizované RP-HPLC pro separaci restrikčních fragmentů *A. ferrooxidans*.

Nástřik:	10 $\mu$ l vzorku
Kolona:	Hypersil ODS
MF:	10% ACN + 1 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 3,5 mM TBAHS
Průtok:	1 ml/min
Detekce:	DAD, 254 nm

Takto vytvořená metoda byla použita pro separaci směsi restrikčních fragmentů z 16S PCR produktu bakteriálních kmenů *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*. Retenční časy byly okolo 3,5 minuty. Chromatografické profily restrikčních fragmentů jednotlivých bakterií byly totožné, proto je na obrázku č.17 pouze chromatografický profil pro *A. ferrooxidans*. Shodnost profilů je pravděpodobně způsobena příbuzností použitých bakterií, proto bych v dalších experimentech doporučila použít další, méně podobné bakteriální kmeny.

## 5.4 Závěr

V průběhu diplomové práce byly optimalizovány čtyři chromatografické metody vhodné pro separaci oligonukleotidů: IEC (Tab. 13), HILIC (Tab. 16), RP-HPLC (Tab.20) a IP-RP (Tab. 26).

Tyto metody byly dále použity pro analýzu restrikčních fragmentů 16S PCR produktu bakterií *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans*. Jako nejvhodnější metoda se jevila iontově výměnná chromatografie, kterou by ale bylo nutné dále upravit, protože bez další úpravy chromatografické metody, vedoucí k lepšímu rozlišení není možné tyto bakteriální kmeny od sebe rozeznat. Hydrofilní interakční chromatografie poskytovala velmi podobné rozlišení jako IEC, ale retenční časy byly příliš vysoké. Retenční čas nebylo možné snížit zvýšením obsahu ACN v mobilní fázi, protože při dalším zvýšení docházelo k tvorbě dvoufázového systému v mobilní fázi, která obsahovala 1M NaCl. Reverzně fázová chromatografie a reverzně fázová iontově párová chromatografie měly velmi nízké retenční časy blízké mrtvému objemu a separace nebyla ideální. Proto jsou za těchto podmínek, bez další optimalizace, pro separaci restrikčních fragmentů nevhodné.

Pokud by se dále podařilo optimalizovat HILIC pro analýzu bez gradientu NaCl a IP-RP s jiným iontově párovým činidlem, bylo by možné k HPLC analýze přidat hmotnostní detekci. To by umožnilo detekci s mnohem vyšší citlivostí a rozeznat jednotlivé fragmenty podle délky a případně i podle zastoupení nukleotidů.

Pro další experimenty bych doporučila zařadit další bakteriální kmeny. Především ty, které nejsou natolik příbuzné, tudíž poskytují jiné restrikční fragmenty.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- 1 RANJARD, L; POLY, F; NAZARET, S. (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in microbiology*, s. 167-177
- 2 JOHNSON, D.B; HALLBERG, K.B. (2007) Techniques for Detecting and Identifying Acidophilic Mineral-Oxidizing Microorganisms. *Biomining*, s. 237-261.
- 3 WEISBURG, W.G; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A; LANE, D.J. (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, s. 697-703.
- 4 KIRK, J.L; BEAUDETTE, L.A; HART, M; MOUTOGLIS, P; KLIRONOMOS, J.N; LEE, H; TREVORS, J.T. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, s. 169– 188.
- 5 BUSSE, H.J; DENNER, E.B.M; LUBITZ, W. (1996) Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology*.
- 6 LEVEILLE, S.A.; LEDUC, L.G; FERRONI, G.D. (2001) Monitoring of bacteria in acid mine environments by reverse sample genome probing. *Canadian journal of microbiology*, s. 431-442.
- 7 GREENE, E.A; VOORDOUW, G. (2003) Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *Journal of microbiological methods*, s. 211-219.
- 8 KATZ, E.D. (2000) HPLC of DNA and PCR Products. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*, s. 105-113.

- 9 HUBER, Ch. G. (1998) Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. *Journal of Chromatography A*, s. 3-30.
- 10 YAMAKAWA, H; HIGASHINO, K; OHARA, O. (1996) Sequence-Dependent DNA Separation by Anion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. s. 242-250.
- 11 BUSZEWSKI, B; NOGA, S. (2012) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. s. 231-247.
- 12 HEMSTROM, P; IRGUM, K. (2006) Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, s. 1784–1821.
- 13 IKEGAMI, T; TOMOMATSU, K.; TAKUBO, H; HORIE, K; TANAKA, N. (2008) Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, s. 474–503.
- 14 VACEK, J; ONOFREJOVÁ, L; KLEJDUS, B; KUBÁŇ, V. (2009) Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separaci polárních látek. *Chemické listy*, s. 381–385.
- 15 NEUE, U.D. (2011) Hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Separation Science*.
- 16 HUBER, Ch.G; OBERACHER, H. (2001) Analysis of nucleic acids by on-line liquid chromatography - mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, s. 310-343.
- 17 MCLAUGHLIN, L.W. (1989) Mixed-Mode Chromatography od Nucleic Acids. *Chem. Rev*, s. 309-319.



- 18 GILAR, M.; FOUNTAIN, K.J; BUDMAN, Y; NEUE, U.D; YARDLEY, K.R; RAINVILLE, P.D; RUSSELL II, R.J; GEBLER, J.C. (2002) Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of oligonucleotides: Retention prediction. *Journal of Chromatography A*, s. 167–182.
- 19 AZARANI, A; HECKER, K.H. (2001) RNA analysis by ion-pair high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Research*.
- 20 DICKMAN, M.J. (2011) Ion Pair Reverse-Phase Chromatography: A Versatile Platform for the Analysis of RNA. *Chromatography today*, s. 22-26.
- 21 HECKER, K.H; GREEN, S.M; KOBAYASHI, K. (2000) Analysis and purification of nucleic acids by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*, s. 83-93.
- 22 BABA, Yoshinobu. (2004) Chapter 19: Nucleic acids and their constituents. *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part B.*, s. 905-943.
- 23 DIOGOA, M.M; QUEIROZB, J.A; PRAZERESA, D.M.F. (2002) Hydrophobic interaction chromatography of homo-oligonucleotides on derivatized Sepharose CL-6B Application of the solvophobic theory. *Journal of Chromatography A*, s. 119-128.
- 24 KASAI, K. (1993) Size-dependent chromatographic separation of nucleic acids. *Journal of Chromatography*, s. 203-221.

- 25 PEYRINA, E; GUILLAUMEB, Y.C; GROSSETA, C; RAVELA, A; VILLETA, A; GARREL, C; ALARY, J; FAVIER, A. (2000) Mobile-phase-viscosity dependence on DNA separation in slalom chromatography. *Journal of Chromatography A*, s. 1-7.
- 26 HIRABAYASHI, J; ITO, N; NOGUCHI, K; KASAI, K. (1990) Slalom Chromatography: Size-Dependent Separation of DNA Molecules by a Hydrodynamic Phenomenon. *Biochemistry*, s. 9515-9521.
- 27 WAGNER, A.O; MAIN, C; ILLNER, P. (2008) Application of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography in Microbial Ecology: Fermentor Sludge, Compost, and Soil Community Profiling. *Applied and Environmental Microbiology*
- 28 XIAO, W; OEFNER, P.J. (2001) Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Human mutation*, s. 439-474.