

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Jihočeská univerzita



**Izolace jednotlivých klonů evropských druhů *Borrelie afzelii* a
Borrelie finlandensis a detekce plasmidů**

Bakalářská práce

Eva Drsková

Vedoucí práce: Ryan O. M. Rego, PhD.

Fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

České Budějovice 2013

Bakalářská diplomová práce

Drsková E., 2013: Izolace jednotlivých klonů evropských druhů *Borrelia afzelii* a *Borrelia finlandensis* a jejich kmenů a detekce plasmidů. [Isolation of individual clones from isolates of *Borrelia afzelii* and *Borrelia finlandensis* and the detection of their plasmid content] Bc. Thesis, in Czech. 43p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Lyme disease is a serious disease transmitted by ticks of the genus *Ixodes*. This disease is transmitted by the spirochete *Borrelia burgdorferi*. In Europe under the *Borrelia burgdorferi* sensu lato group are eighteen different species including *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia garinii* which are known to be causative agents of the disease in humans. The genomes consist of a linear chromosome and a variable set of linear and circular plasmids. Some of these plasmids have been shown to be important for their infectious cycle in both the tick and animal. They are also known to be lost during in vitro passaging and during genetic manipulations. This project describes for the first time the use of plasmid specific PCR primers for the detection of plasmid content of individual clones, obtained by plating, from isolates of the European species *Borrelia afzelii* and *Borrelia finlandensis*.

Bakalářská diplomová práce byla financována z grantů FP7 EC project ANTIGONE, Project number – 278976.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou

Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 12. 12. 2013

.....

Eva Drsková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ryanu Regovi, PhD. za trpělivost a ochotu, kterou mi věnoval, za odborné vedení mé bakalářské práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Zároveň bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc. za možnost pracovat v laboratoři Molekulární biologie vektorů a parazitů a také všem členům laboratoře za nastolení příjemné atmosféry. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Strnadovi a Mgr. Zuzce Vavruškové. Poděkování náleží i celé mé rodině, příteli Honzovi a kolegyním z ročníku za neustálou podporu a dodávání pozitivní energie.

Seznam použitých zkratek

bp – báze

BSA – albumin z hovězího séra (bovine serum albumin)

DNA – deoxynukleová kyselina

kDa – kilodalton

LB – Lysogeny Broth

Mw – molekulová hmotnost

OspA/C – outer surface protein A nebo C

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

SDS – dodecylsírán sodný

Obsah

Úvod.....	7
1 Lymeská borelióza	8
1.1 Příznaky Lymeské Boreliózy	9
2 Genom <i>Borrelie burgdorferi</i>	10
3 Plasmidy	10
4 Evropské druhy borrelií	11
4.1 <i>Borrelia afzelii</i>	11
4.2 <i>Borrelia finlandensis</i>	12
4.3 Geny nezbytné pro infekčnost.....	12
4.3.1 Gen pncA	12
4.3.2 Gen adeC	12
4.3.3 Gen vlsE	13
5 Cíle práce.....	14
6 Metody.....	15
6.1 Výroba tekutého média BSK II	15
6.2 Výroba tuhého média 1,5x BSK ⁺ a 1,5 x MKP ⁺	15
6.3 Růst borrelií v tuhém médiu 1,5x BSK ⁺ a 1,5 x MKP ⁺	16
6.3.1 Počítání v Petroff-Hausserově počítací komůrce	16
6.3.2 Zandavání na Petriho misky (na 16reakcí).....	16
6.4 Vypěstování kultury	17
6.5 Izolace genomické DNA	17
6.6 Maxipreparativní izolace plasmidové DNA.....	18
6.7 Polymerázová řetězová reakce	18
6.7.1 Primery	19
6.7.2 Podmínky PCR reakce	19
6.8 Elektroforéza.....	20
6.9 Klonování DNA	20
6.9.1 Ligace	20
6.10 Kultivace <i>E. coli</i>	21
6.10.1 Izolace a růst kolonií <i>E. coli</i>	21
6.11 Mini preparativní izolace plasmidové DNA	21

6.12	Restrikční analýza.....	22
6.13	Sekvenování	22
6.14	SDS – page.....	22
6.15	Western blot (Immunoblot).....	23
6.16	Dot blotting	24
6.16.1	Postup.....	25
6.16.2	Příprava roztoků	26
7	Výsledky.....	28
7.1	Detekce a ověření obsahu plasmidů a validace primerů.....	28
7.2	Detekce a ověření obsahu plasmidů u ostatních kmenů borélií	30
7.3	PCR screening plasmidů jednotlivých klonů	32
7.4	SDS – PAGE.....	34
7.5	Immunoblotting	35
7.6	Dot blotting	36
8	Diskuze	38
9	Závěr.....	40
10	Použitá literatura	41

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Úvod

Lymeská borelióza se na území České republiky a v celé Evropě jeví jako nejvíce se vyskytující infekční onemocnění přenášené klíšťaty rodu *Ixodes*. Původcem se stává mikroaerofilní pohyblivá spirochéta *Borrelia burgdorferi*, která je řazena do třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales* a čeledi *Spirochaetaceae*. Tato bakterie patří do kladu 18 ti genomických skupin nazvaných *Borrelia burgdorferi* sensu lato. (Rudenko et al., 2011) V Evropě je nejčastějším původcem tohoto onemocnění *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Postihuje nejenom člověka, ale i hlodavce, ptáky, psy a mnoho dalších druhů zvířat. Lymeská borelióza je svým výskytem již šestkrát častějším onemocněním, než je onemocnění klíšťová encefalitida, jejímž vektorem je, stejně jako u Lymeské boreliózy, klíště. (Bolehovská et al., 2009)

Do roku 2011 byl znám pouze genom *Borrelie burgdorferi* sensu stricto kmen B31. Zástupci rodu *Borrelie burgdorferi* mají nejsložitější genom ze všech doposud známých bakterií. Chromozom kmenu B31 zahrnuje 1 Mb lineární chromozom a škálu lineárních a kruhových plasmidů, které jsou velmi důležité v patogenezi. (Radolf D. et al., 2012) Do roku 2013 ale zatím nikdo nedělal genetické manipulace s jinými druhy *Borrelie burgdorferi* než s kmenem B31. Je to dáno tím, že genomy jiných kmenů borelií zatím nebyly sekvenovány a proto počet plasmidů přítomných v kmenu, které by mohly být použity pro genetické manipulace, byl neznámý. Během genetických transformací a pasážování *Borrelie burgdorferi* v in vitro podmínkách dochází ke ztrátám plasmidů. Ztráta plasmidů je spojena s poklesem infekčnosti u myši a se změnami v expresi proteinů spirochét. (Purser E. and Norris J., 2000). Fenotypy vykazující vysokou nebo nízkou infekčnost koexistují u neklonovaných populací. Se zvyšujícím se počtem in vitro pasáží klesá infekčnost fenotypů. Pro genetické manipulace je důležité pracovat s populací, která je úplně klonální (celá populace obsahuje stejnou sadu plasmidů). Heterogenní populace nezahrnuje všechny plasmidy, a to i takové, které jsou nezbytné pro infekčnost. Z toho vyplývá, že heterogenní populace není vhodná pro budoucí genetické manipulace.

1 Lymeská borelióza

Spektrum klinických projevů způsobené infekcí *Borrelia burgdorferi sensu lato* je známo pod názvem Lymeská borelióza. Lymeskou boreliózu způsobují tři úzce související genové druhy Borrelií – *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* a *B. afzelii*– kolektivně se uvádí jako *B. burgdorferi sensu lato*. Druhy borélií, které způsobují Lymeskou boreliózu, jejich vektory a hostitelé jsou zaznamenány v Tab. I. V Tab. II je uveden počet plasmidů ke každému kmenu.

Tab. I: Evropské druhy borélií, jejich vektory, hostitelé a geografické rozšíření (převzatá data: Wang et al., 1999b; Masuzawa, 2004)

Taxon	Vektor	Hostitel
<i>B. burgdorferi s. s.</i>	<i>I. ricinus</i>	savci, ptáci
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i>	ptáci, drobní savci
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i>	drobní savci
<i>B. japonica</i>	<i>I. ricinus</i>	drobní savci
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i>	ptáci
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	neznámý
<i>B. finlandesis</i>	<i>I. ricinus</i>	??
<i>B. bissetti</i>	<i>Ixodes pacificus</i>	??
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	??

Tab. II: Izoláty pro různé druhy *Borrelie* (Mongodin et al., 2013)

Druh	Kmen	Počet plasmidů	Genom
<i>B. burgdorferi</i>	B31	21	Kompletní
	Bol26	13	Návrh
	ZS7	14	Návrh
	64b	18	Návrh
	297	20	Kompletní
	156a	20	Kompletní
	WI-91-23	21	Návrh
	94a	14	Návrh
	JDI	20	Kompletní
	CA-11.2a	12	Návrh
	118a	19	Návrh
	N40	17	Kompletní
	72a	13	Návrh
	29805	15	Návrh
<i>B. finlandesis</i>	SV1	10	Návrh
<i>B. valaisiana</i>	VS116	11	Návrh
<i>B. bissetti</i>	DN127	16	Kompletní
<i>B. afzelii</i>	PKo	17	Kompletní
	ACA-1	14	Návrh
<i>B. garinii</i>	PBr	12	Návrh
	Far04	7	Návrh
<i>B. bavariensis</i>	PBi	11 ¹	Nekompletní
<i>B. spielmanii</i>	A14S	13	Návrh

¹kompletní sekvence pro kmen PBi nebyla zveřejněna

1.1 Příznaky Lymeské Boreliózy

Lymeská borelióza má akutní a přetrvávající fáze, které jsou rozděleny do tří etap. První etapa, která je nazývána jako časně lokalizovaná Lymeská borelióza, zahrnuje přechodné zánětlivé kožní vyrážky známé jako erythema migrans. Zde jsou spirochéty naočkovány do kůže kousnutím nakažených klíšťat. Jak spirochéty migrují z místa kousnutí, pronikají

cévami a jsou obsažené v krvi, kterou se šíří skrz celé tělo. Druhým stádiem je rozšířená nákaza. V tomto stádiu spirochéty opouští krev a vstupují do různých tkání a orgánů např. klouby, srdce, nebo nervový systém, kde mohou vytvořit trvalé infekce. Třetí stádium, tzv. chronická infekce, je nejtěžším stádiem nemoci s chronickou artritidou, neuroborreliózou a kožními problémy. V Evropě je nejvíce kožních projevů způsobeno *Borrelia afzelii*, neuroborreliózy se přičítají k *Borrelia garinii*. Arthritidy a karditidy jsou v Evropě méně časté. Způsobuje je *Borrelia burgdorferi*, která na rozdíl od jiných zemí, jako je Severní Amerika, není v Evropě tak rozšířená. (Rosa et al., 2005)

2 Genom *Borrelia burgdorferi*

Kompletní genomová sekvence plasmidu byla definována pouze u jednoho kmenu *Borrelia burgdorferi* sensu stricto – B31. Genom kmenu B31 se skládá z lineárního chromozomu o 910 725 kilobázích (kbp) a 12 lineárních a 9 kruhových plasmidů o celkové velikosti 610 694 kbp. (Hinnebusch, et al., 1993) Různé kmeny *Borrelia burgdorferi* mají odlišný počet plasmidů. Největší obsah plasmidů nese kmen B31. Obsahuje 21 plasmidů. Důležité ovšem nejsou všechny plasmidy. Existují plasmidy, které se ztratí, ale infekce přetrvává. To je dáno plasmidy, které jsou důležité pro infekci. (Fraser et al., 1997)

3 Plasmidy

Lineární plasmidy a chromozomy byly u prokaryot neznámé do roku 1993. V tomto roce byly nalezeny ve spirochétách borélií. (Hinnebusch, et al., 1993) Plasmidy *Borrelia burgdorferi* se liší svou stabilitou. Plasmidy jsou často ztraceny během in vitro kultivace *Borrelia burgdorferi*. Ztráta vnějších variabilních proteinů vede ke ztrátě virulence borélie. Důsledky ztráty plasmidů pro růst *Borrelia burgdorferi* in vivo se ale liší. Některé plasmidy kódují funkce, které jsou důležité pro přežití v přirozeném hostiteli, zatímco jiné plasmidy jsou ztraceny bez vlivu na infekční cyklus. (Rosa et al., 2005)

Ztráta plasmidů u *B. burgdorferi* sensu stricto způsobujících Lymeské onemocnění má za následek vznik heterogenní populace spirochéty a to se projeví na proteinovém složení. Na ztrátu plasmidů má vliv genetická manipulace a následná studie infekcí. (Grimm et al. 2003) Studie Joyea E. Pursera a Stevena J. Norrise z roku 2000, která se zaměřila na stanovení klonů u *Borrelia burgdorferi* kmenu B31, izolovaných po pěti pasážích in vitro ukázala, že pouze 3 klony z 19 klonů obsahovaly plný počet všech 21 zkoumaných plasmidů. Při této studii bylo zjištěno, že plasmidy cp26, cp32-1, cp32-2, cp32-4, cp32-6, cp32-7, cp32-8, cp32-9, lp17, lp28-3, lp36, lp38 a lp54, byly přítomny u všech 19 zkoumaných izolátů.

Druhá skupina plasmidů cp9, cp32-3, lp21, lp28-2, lp28-4 a lp56 nebyla zodpovědná za infekci. Při absenci 28 – kb plasmidu, lp28-1, ale přítomnosti 25 – kb plasmidu, lp25, fenotyp laboratorních zvířat nebo klíšťat vykazoval střední infekčnost. Lineární plasmidy lp25 a lp28-1 jsou tedy plasmidy potřebné pro přetrvávající infekci u myši. To znamená, že tyto plasmidy se do značné míry zapojují do interakce borélií se svými hostiteli. (Casjens et al. 2012) Plasmidy cp26, lp54 a cp32 mají do značné míry konzervované struktury a jsou přítomny u všech studovaných izolátů. (Casjens et al. 2012) Jsou tedy velmi stabilní a neztrácí se při genetických manipulacích. Kruhový plasmid cp26 kóduje jeden z nejdůležitějších vnějších povrchových proteinů OspC, který je exprimován v savčím hostiteli. Tento gen je důležitým faktorem virulence nutný pro vytvoření infekce u savců a stává se velmi důležitým v úsilí rozvoje vakcíny v oblasti lidské a psí Lymeské boreliózy. (Rhodes et al., 2013) Plasmid lp54 kóduje vnější povrchové proteiny OspA a OspB a mnoho dalších proteinů. Bylo zjištěno, že některé z nich jsou důležité v přenosu infekce z klíštěte na hlodavce. Členové rodiny kruhových plasmidů cp32 jsou přítomny ve všech izolátech *B. burgdorferi* a nesou geny kódující celou řadu proteinů. Genom B31 obsahuje 9 členů rodiny cp32. Z této rodiny se stal stabilním plasmidem pouze plasmid cp32-9. Úloha lineárního plasmidu lp17, který reguluje expresi genu OspC od plasmidu cp26, je zatím v patogenezi nejasná. (Rhodes et al. 2013)

Lineární chromozom nesou i ostatní členové rodu borélie. Ten je svou velikostí podobný chromozomu kmene B31. Chromozomy ostatních druhů borélií se výrazně neliší od chromozomu B31 a tím se stávají poměrně evolučně stabilní. Druhy *B. garini*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. finlandensis*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii* a *B. bissetti* jsou v podstatě kolineární s chromozomem *B. burgdorferi* B31. Mezi těmito druhy je pouze velmi malý počet rozdílů týkající se obsahu chromozomálních genů. (Casjens et al. 2012)

4 Evropské druhy borrelií

4.1 *Borrelia afzelii*

Borrelia afzelii je považována za druh borélie homologní k *Borrelia burgdorferi*. Bylo provedeno osekvenování celého genomu a to na třech lidských izolátech a jeden na ptačím izolátu z Evropy. V Německu byl izolován kmen PKo. Tento izolát byl získán v roce 1993 od pacienta s Lymeskou borreliózou z kožní léze, kde se necházela erythema migrans. (Canica M., 1993) Další izolát, ACA-1, byl izolován ve Švédsku z lidského acrodermatitis chronica atrophicans. (Casjens et al. 2011) Kmen CB43 byl izolován v České republice z klíštěte *Ixodes ricinus*. (Kopecký et al. 2000) Stejně jako ostatní druhy borélií, obsahují

všechny zmíněné izoláty lineární chromozom s lineárními a kruhovými plasmidy. Kmen PKo nese 17 plasmidů, z toho 9 lineárních a 8 kruhových. ACA-1 obsahuje 9 lineárních a 5 kruhových plasmidů.

4.2 *Borrelia finlandensis*

Borrelia finlandensis je nejbližší příbuzná k *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, ale z genetického hlediska se liší. Izolát SV1 byl izolován z klíštěte *Ixodes ricinus* ve Finsku. Jeho genomová sekvence obsahuje 1 281 782 bp a lineární a kruhové plasmidy. V roce 2011 bylo představeno 10 plasmidů, ale pro plasmid cp32-6 prozatím není hotový chromozom. (Casjens et al., 2010)

4.3 Geny nezbytné pro infekčnost

Geny zodpovědné za infekci, geny *pncA*, *vlsE* a *adeC*, jsou obsaženy ve všech evropských druzích borelií. Tyto geny jsou u různých druhů borelií presentovány na jiném plasmidu, viz Tab. III – Tab. V. Mezi geny však existuje homologie, z čehož se dá vyvodit, že gen *vlsE* nacházející se na plasmidu lp28-1 u kmene B31 bude homologní ke genu *vlsE*, který leží na plasmidu lp17 u kmene PKo. U *Borrelia burgdorferi* kmene B31 jsou tři lineární plasmidy, lp25, lp28-1 a lp36, relativně nestabilní během růstu v kultuře a zároveň jsou potřebné pro vytvoření trvalých infekcí v savčím hostiteli.

4.3.1 Gen *pncA*

Gen *pncA*, který se nachází na plasmidu lp25, kóduje nicotinamidasu a mutace aminokyseliny v aktivním místě. Ztráta tohoto lineárního plasmidu v *in vitro* růstu činí mutanty neinfekčními. Tato ztráta může být opravena znovuzavedením genu *pncA* na shuttle vector. (Jewett et al., 2007) V Tab. III je ukázáno, na jakých plasmidech je presentován gen *pncA* u různých druhů borelie.

4.3.2 Gen *adeC*

Byl zkoumán klon *B. burgdorferi*, kterému chyběl plasmid lp36, ale obsahoval všechny ostatní plasmidy, jenž jsou potřebné pro infekčnost. Výsledky ukázaly, že plasmid lp36 nebyl nutný pro přežití spirochét ve vektoru klíštěte, ale ztrátou tohoto plasmidu došlo ke snížení infekčnosti u savčího hostitele. Při obnovení plasmidu lp36 na mutantním kmenu se potvrdilo, že snížení infekčnosti bylo v důsledku ztráty genu *adeC* kódující adenin deaminázu a ležící na plasmidu lp36. (Jewett et al., 2007) V Tab. IV je znázorněno, na jakých plasmidech je presentován gen *adeC* u různých druhů borelie.

4.3.3 Gen vlsE

Tím, že dojde ke ztrátě plasmidu lp28-1 se výrazně snižuje infekčnost u myši. (Casjens et al., 2012) V blízkosti telomer tohoto plasmidu se nachází gen vlsE, který v průběhu infekce u savců podstoupí antigenní variaci. Tento krok umožní únik před hostitelským imunitním systémem a vytvoří se trvalá nákaza. (Ohnishi et al., 2003; Jewett et al., 2007) V Tab. V je znázorněno, v jakých plasmidech je obsažen gen vlsE u různých druhů borélie.

Tab. III: Gen pncA obsažený na plasmidech různých druhů borélie

Druh	Kmen	Plasmid obsahující gen pncA
<i>B. burgdorferi</i>	B31	lp25
<i>B. garinii</i>	PBr	lp25
<i>B. afzelii</i>	PKo	lp28-2
	ACA-1	lp28-2
<i>B. finlandensis</i>	SV1	lp28-2

Tab. IV: Gen adeC obsažený na plasmidech různých druhů borélie

Druh	Kmen	Plasmid obsahující gen adeC
<i>B. burgdorferi</i>	B31	lp36
<i>B. garinii</i>	PBr	lp25
<i>B. afzelii</i>	PKo	lp28-2
	ACA-1	lp38
<i>B. finlandensis</i>	SV1	-

Tab. V: Gen vlsE obsažený na plasmidech různých druhů borélie

Druh	Kmen	Plasmid obsahující gen vlsE
<i>B. burgdorferi</i>	B31	lp28-1
<i>B. garinii</i>	PBr	lp28-4
<i>B. afzelii</i>	PKo	lp17
	ACA-1	lp17
<i>B. finlandensis</i>	SV1	lp17

PRAKTICKÁ ČÁST

5 Cíle práce

1. Literární studie k problematice.
2. Určení rozsahu rozdílů v obsahu plasmidů u klonů v rámci jedné populace v kmenech různých druhů borélie.
3. Potvrzení primerů pro detekci plasmidů různých evropských druhů borelií.
4. Interpretace výsledků a zkušenosti se zvolenými metodami.

6 Metody

6.1 Výroba tekutého média BSK II

Do 2000 ml Erlenmayerovy baňky se smíchá 10x CMRL, Neopeptone, BSA a 850 ml milliQ H₂O a nechá se míchat na magnetickém míchadle, dokud se směs plně nerozpustí. Poté se přidají ostatní složky uvedené v Tab. VI a opět se vše rozpustí. Po rozpuštění všech složek se upraví pH na 7,6 pomocí NaOH, baňka se doplní vodou do 1000 ml a nechá se přibližně 5 minut míchat. Takto připravené médium se může přefiltrovat. Filtrace se provádí ve flow boxu, aby se předešlo kontaminaci. Posledním krokem je přidání 30 ml králíčoho séra, které podporuje růst borrelií a uskladnění na -20 °C.

Tab. VI: Ingredience pro výrobu BSK II

Složky	Množství na 1000 ml [g/l]
10x CMRL	9,7
Neopeptone	5,0
BSA	50,0
Yeastolate	2,0
Hepes acid	6,0
Glukóza	5,0
Sodium citrate	0,7
Sodium pyruvát	0,8
N-acetyl glukosamine	0,4
Sodium bicarbonate	10,0

6.2 Výroba tuhého média 1,5x BSK⁺ a 1,5 x MKP⁺

BSA se rozpustí v 850 ml milliQ H₂O a poté se přidá zbytek chemikálií. Použitím NaOH se upraví pH na 7,5 a přidá se milliQ H₂O tak, aby konečný objem byl 1000 ml. Opět se vše nechá rozpustit. Médium se přefiltruje, přidá se 12 ml králíčoho séra a uskladní v -20 °C. Rozdíl mezi médii 1,5x BSK⁺ a 1,5x MKP⁺ je znázorněn v Tab. VII.

Tab. VII: Ingredience pro výrobu tuhých médií

Chemikálie pro 1,5xBSK⁺	Množství na 1000ml [g/l]	Ingredience pro 1,5x MKP⁺	Množství na 1000ml [g/l]
BSA	69,4	BSA	69,4
Neopeptone	6,9	Neopeptone	4,14
Hepes acid	8,3	Hepes acid	8,3
Glokóza	6,9	Glokóza	4,14
Sodium citrate	1,0	Sodium citrate	1,0
Sodium pyruvate	1,1	Sodium pyruvate	1,1
N-acetyl glucosamine	0,6	N-acetyl glucosamine	0,6
Sodium bicarbonate	6,4	Sodium bicarbonate	6,4
Yeastolate	3,5	Yeastolate	-
10x CMRL	12,7	10x CMRL	12,7

6.3 Růst borelií v tuhém médiu 1,5x BSK⁺ a 1,5 x MKP⁺

6.3.1 Počítání v Petroff-Hausserově počítací komůrce

Na Petroff – Hausserovu počítací komůrku se převede 6 ul narostlé kultury, která je zředěna v poměru 1 : 10 a pod mikroskopem temného pole (Leica DM1000 LED) se určí počet borelií na počet čtverců. Daná hodnota se vynásobí číslem $1,25 \times 10^7$. Tím se získá počet borelií na 1 ml.

6.3.2 Zandavání na Petriho misky (na 16reakcí)

Narostlá kultura se naředí tak, aby konečný počet borelií v médiu byl 1000 borelií/ 1 ml.

Následně se 200 ml 1,7 % agarózy (Seakem LE, autoklávovaný v milliQ H₂O a skladovaný při laboratorní teplotě) rozeřeje na 55 °C a smíchá s 300 ml média 1,5x BSK⁺ nebo 1,5x MKP⁺. Do každé Petriho misky se napipetuje 10 ul média smíchané s agarózou a zbytek se uchová ve vodní lázni na 55 °C. Podle toho, jaký má být konečný počet borelií, se do 50 ml zkumavek napipetuje dané množství naředěné kultury a přidá 40 ml média s agarózou. Na dvě Petriho misky se zatuhlým médiem se přidá 20 ml připraveného média s danou kulturou a opět se nechá zatuhnout. Petriho misky se uchovávají v boxu s anaerobním prostředím ve

34 °C. Anaerobní prostředí je vytvořeno pomocí sáčků obsahující 2,5 % CO₂. Kolonie na Petriho miskách narostou během 3 týdnů. Jakmile kolonie narostou, nasají se jednotlivé kolonie do 8 ml tekutého média a nechají růst ve 37 °C. Po 8 – 10 dnech se ze zkumavky s narostlou kulturou odebere 1 ml a zandá do kryozkumavky s 350 ul 80% glycerolu. Tyto zkumavky se poté uchovávají v -80 °C. Zkumavka s narostlou kulturou se doplní 1 ml tekutého média a nechá přibližně 3 dny růst ve 34 °C.

6.4 Vypěstování kultury

Do 8 ml zkumavky se napipetuje 7 ml média BSK II. Z roztoku, který je uskladněn v -80 °C, se na špičku laboratorní špičky odebere malé množství kultury a zandá do 8 ml zkumavky s médiem. Kultura se nechá inkubovat ve 34 °C. Poté, co kultura naroste, se ze zkumavky odebere 1 ml kultury a zředí v poměru 1 : 10. Pod mikroskopem temného pole (Leica DM1000 LED) se poté stanoví množství živých borelií v 10 µl zředěné kultury.

6.5 Izolace genomické DNA

Pro získání plasmidu z buněk je potřeba nejdříve rozrušit buňky. K tomu se běžně využívají komerční kity. Pro izolaci genomické DNA byl používán kit Wizard[®] Genomic DNA Purification.

Narostlá kultura se centrifuguje při 9000 rpm/ min po dobu 10 minut při 25 °C. Supernatant se odstraní. Pelet se rozsuspenduje v 600 ul Nuclei Lysis Solution a přenese do 1,5 ml eppendorfky. Následuje inkubace při 80 °C po dobu 5 minut. V tomto kroku dojde k lýze buněk. Poté se eppendorfka přenese na 2 minuty na led. K buněčnému lyzátu se následně přidají 3 ul RNase solution a 2-5x se eppendorfka převrátí. Dalším krokem je inkubace při 37 °C na 15 minut a poté přidání 200 ul Protein Precipitation Solution, čímž dojde k ošetření buněčného lyzátu. Opět se eppendorfka 2-5x převrátí a inkubuje na ledu po dobu 5 minut. Následuje centrifugace při 13000 rpm/ min po dobu 5 minut. Supernatant, který obsahuje DNA, se přenese do čisté 1,5 ml eppendorfky, pročistí se 600 ul isopropanolu mající laboratorní teplotu a eppendorfka se pouhým převrácením opět lehce promíchá. Poté se vše centrifuguje při 13000 rpm/ min po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant se odstraní a přidá se 600 ul 70% ethanolu. Opakovaným převrácením eppendorfky se pročistí pelet, který obsahuje DNA. Následuje centrifugace při 13000 rpm/ min na 10 minut. Supernatant se pomocí pipety opatrně odebere a pelet se nechá na 10 minut stát na laboratorní teplotě pro úplné odstranění ethanolu. Nakonec se přidá 100 ul DNA Rehydration Solution a uskladní

ve 4 °C. Tím dojde k rehydrataci DNA. Druhý den se roztok v eppendorfci promíchá a uchovává při 4 °C.

6.6 Maxipreparativní izolace plasmidové DNA

Izolace plasmidové DNA byla provedena maxipreparativní metodou pomocí komerčního kitu od společnosti QIAGEN® (HiSpeed® Plasmid Maxi Kit). Tento kit umožňuje rychlou purifikaci plasmidové DNA. Takto purifikovaná plasmidová DNA neobsahuje genomovou DNA, buněčné proteiny a endotoxiny.

Narostlá kultura o celkovém objemu 200 ml se centrifuguje 10 minut při 8 000 rpm/ min. při 20 °C. Supernatant se odleje a pelet se rozsuspenduje v 10 ml pufru P1 obsahující RNasu. K těmto buňkám se přidá 10 ml lyzačního pufru P2, vše se promíchá převrácením zkumavky a nechá 5 minut inkubovat na laboratorní teplotě. Připraví se filtrační stříkačka, která se nasadí na stříkačku s vazebnou kolonou. Do této stříkačky se přidá 10 ml pufru QBT a nechá se přefiltrovat. K buňkám je dále přidáno 10 ml neutralizačního pufru P3 a opět se vše promíchá převrácením zkumavky. Lyzát se přelije do filtrační stříkačky a nechá se 10 minut inkubovat na laboratorní teplotě. Poté se přefiltruje filtrační stříkačkou do stříkačky s vazebnou kolonou, která je nasazena na 50 ml zkumavku. V tomto kroku se na filtr v koloně navážou proteiny a čistá DNA je následně přefiltrována přes vazebnou kolonu. Nyní je na filtru navázaná DNA, která je promývána 60 ml pufru QC. Do této stříkačky je poté přidáno 15 ml elučního pufru QF, pomocí kterého se DNA uvolní do nové 50 ml zkumavky. Do této zkumavky se přidá 10,5 ml isopropanolu, promíchá a 5 minut se nechá inkubovat. Tímto krokem se DNA vysráží. Vše se přemístí do velké stříkačky, na níž je připojený filtr a přefiltruje. DNA se zachytí na filtr. Filtr se nechá okapat, znova se nasadí na malou stříkačku a pročistí se 2 ml etanolu. Opět se filtr nechá okapat a zpět nasadí na stříkačku. Pro úplné odstranění etanolu z kolony se proces pročištění opakuje. Takto pročištěný filtr se nasadí na malou stříkačku, přidá 1 ml elučního pufru TE a přefiltruje do 2 ml eppendorfky. Filtrát se vrátí zpět do stříkačky a znova přefiltruje. Vyizolované DNA se uchovává v 4 °C. Následně se provede PCR screening plasmidů.

6.7 Polymerázová řetězová reakce

Enzymatická amplifikace plasmidů byla provedena na genomické DNA s použitím specifických primerů. Reakce probíhala v 0,2 ml tenkostěnné zkumavce, v přístroji T100™ Thermal cycler od firmy BIO-RAD. Složení reakční směsi pro PCR reakci je uvedeno v Tab. VIII.

6.7.1 Primery

Primery byly navrženy v databázi NCBI tool Primer design a objednány byly pouze ty primery, které dostatečně amplifikovaly požadovaný PCR produkt in silico. Primerové sekvence dosud nejsou zveřejněné a budou předloženy jako součást rukopisu. Tyto sekvence budou až do předložení rukopisu vyjmuty z této práce. Před jejich zveřejněním poskytne Dr. Rego sekvence primerů pro vědecké účely osobně.

6.7.2 Podmínky PCR reakce

Tab. VIII: Složení reakční směsi pro PCR reakci

Chemikálie	Objem [ul]
Voda	12,9
Pufr	2,0
10mM dNTP's	2,0
20mM FW primer	1,0
20mM RF primer	1,0
Templát	1,0
Polymeráza	0,1

Všechny PCR reakce byly prováděny za standardních podmínek:

Použitím polymerázy HotStart:

Denaturace	96°C 5 min	}	tyto kroky se 30x opakují
Denaturace	95°C 45 s		
Nasedání primerů	55°C 45 s		
Elongace	72°C 1 min		
Finální elongace	72°C 10 min		
	16°C ∞		

Použitím polymerázy OneTaq:

Denaturace	95°C 45 s	}	tyto kroky se 30x opakují
Nasedání primerů	55°C 45 s		
Elongace	72°C 1 min		
Finální elongace	72°C 10 min		
	16°C ∞		

6.8 Elektroforéza

Bylo použito 2 μ l nanášecího pufru (6x Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific) s 5x koncentrovaným barvivem SYBR Green (SYBR Green I, Nucleic acid stain) a přidáno k 10 μ l PCR produktu. Ten byl následně rozdělen elektroforetickou separací v 1 % agarózovém gelu. Separace byla prováděna pomocí aparatury Liberty 120 High-Speed Gel System při napěti 250V přibližně 15 – 20 minut. Výsledný produkt byl vizualizován pod UV transiluminátoru a fotograficky zdokumentován.

6.9 Klonování DNA

6.9.1 Ligace

Adaptory (tzv. krátké úseky DNA) se pomocí enzymu ligázy napojují na restriční místa. Tyto úseky DNA slouží jako templát pro nasednutí primerů. K ligaci fragmentů DNA se používá enzym T4 DNA ligáza, která pochází z T4 bakteriofága.

6.9.1.1 Postup Ligace

Ligační pufr a ligáza se nechá na ledu a pGEM – T Easy Vector se krátce zcentrifuguje. Do 0,5 ml eppendorfky se připraví ligační směs, viz tab. IX a vše se nechá inkubovat přes noc na 4 °C. V případě urychlení reakce je možno reakci inkubovat 1 – 4 hodiny na laboratorní teplotě. Do 1,5 ml eppendorfky se přidá 25 μ l kompetentních buněk *E. coli*. (C 2987, získána z laboratoře New England BioLabs). Do této eppendorfky se napipetuje 2 μ l ligandu. Tato reakce se nechá stát 30 minut na ledu. Následuje transformace tepelným šokem. Reakce se na 45sec inkubuje při 42 °C a ihned poté se reakce umístí na 2 minuty na led. V dalším kroku se do reakce přidá 250 μ l SOC media o laboratorní teplotě a nechá se inkubovat při 37 °C a 220 rpm po dobu 1 hodiny na třepačce. V kultivační misce se na povrch tuhého media tvořeného LB a carbenicillinem nanese 40 μ l subtrátu x-Gal (Thermo Fisher Scientific), pomocí sterilní skleněné kličky se rovnoměrně rozetře a nechá přibližně 15 minut stát na laboratorní teplotě. Poté se přidá 50 μ l nebo 100 μ l suspenzní kultury a opět se pomocí sterilní kličky rozetře. Takto připravené kultivační misky necháme inkubovat dnem vzhůru při 37 °C po dobu alespoň 16 hodin.

Tab. IX: Složení ligační směsi pro reakci

Složky	Objem [μ l]
2x Rapid ligační pufr	2,0
T4 DNA ligáza	1,0
pGEM – T Easy Vector	1,0
PCR produkt	3,0
Celkem	6 μ l

6.10 Kultivace *E. coli*

Pro kultivaci *E. coli* se používají živná média. Tato média zajišťují během kultivace optimální podmínky. Pro růst *E. coli* je důležité médium Lysogeny Broth (dále jen LB).

6.10.1 Izolace a růst kolonií *E. coli*

Kolonie bílé barvy obsahují plasmid, který se bude klonovat. Do 15 ml zkumavky se přidá 5 ml média LB. Špičkou o velikosti 10 μ l se sebere bílá kolonie a ta se vloží společně se špičkou do 15 ml zkumavky s médiem. Zkumavky se inkubují přes noc při 37 °C a 220 rpm.

6.11 Mini preparativní izolace plasmidové DNA

Izolace plasmidové DNA byla provedena minipreparativní metodou pomocí komerčního kitu od společnosti QIAGEN® (QIAprep® Spin Miniprep Kit).

Buňky obsahující daný plasmid se nechají přes noc kultivovat v LB médiu, poté se při laboratorní teplotě po dobu 5 minut centrifugují při 8 000 rpm/ min a odstraní se supernatant. Následně se buněčný pelet rozsuspenduje ve 250 μ l pufru P1, který obsahuje RNasu. Tím dojde k rozložení molekuly RNA. Poté se přidá 250 μ l lyzačního pufru P2, pomocí kterého dochází k lýze buněk. Lyzát se převrácením zkumavky promíchá. Dalším krokem je přidání 350 μ l neutralizačního pufru N3, který vysráží buněčné zbytky. Poté se zkumavka míchá, dokud není roztok bezbarvý. Následuje centrifugace při 13 000 rpm/ min po dobu deseti minut. Tento krok je nezbytný pro rozdělení frakcí. Vzniklý supernatant obsahuje požadovaný plasmid, který převedeme na kolonu dodávanou s kitem a centrifugujeme 1 minutu při 13 000 rpm/ min. DNA se zachytí na koloně, která se promyje 750 μ l pufru PE obsahující etanol. Pomocí etanolu dojde k odstranění nežádoucích proteinů. Opět následuje centrifugace trvající 1 minutu při 13 000 rpm/ min. Pro úplné odstranění etanolu z kolony se proces centrifugace opakuje. Do kolony se přidá 50 μ l pufru EB. Kolona se nasadí na 1,5 ml

eppendorfku, nechá se stát 1 min na laboratorní teplotě a centrifuguje 1 min při 13 000 rpm/min. Plasmid se tímto způsobem vymyje z kolony.

6.12 Restrikční analýza

Restrikční analýza se provede pomocí pufru a enzymu Eco RI. Do 0,5 ml eppendorfky se smíchají všechny složky reakce, viz Tab. X a vše se nechá inkubovat 1 hodinu ve 37 °C. Poté se provede elektroforéza na 1 % gelu při napětí 110 V.

Tab. X: Složení reakce pro restrikční analýzu

Složky	Objem [μl]
Pufř EcoR I.	2
Enzym EcoR I.	0,5
DNA	3
H₂O	14,0
Celkem	20,5

6.13 Sekvenování

Tímto procesem se čtou nukleotidové báze v molekule DNA. Sekvenování se používá ke stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA. Primery se naředí v poměru 1 : 200 s milli-Q H₂O. Složení reakce pro sekvenování je ukázáno v Tab. XII.

Tab. XII: Složení reakce pro sekvenování

Složky	Objem [μl]
5 μM T7 primer	5,0
5 μM SP6 primer	5,0
Templát	5,0

6.14 SDS – page

Buněčný pelet se centrifuguje při 8000 rpm po dobu 10 minut ve 20 °C. Supernatant se odlije a zbylý pelet se promyje v 5 ml HN – pufru a centrifuguje 10 minut při 8000 rpm/min ve 20 °C. Tento krok se ještě 2x opakuje a nakonec se k buněčnému peletu přidá 600 μl HN-Pufřu. Použitím Quant – ti SYPRO[®] pufru, který se smíchá s barvou Qubit[®] protein Reagent (Life technologies) v poměru 1 : 200 se v přístroji Qubit[™] stanoví koncentrace proteinů ve

2 μ l vzorku. Do vzorku s HN – pufrem se přidá 5 μ l Loading Dye Laemelli buffer (BIORAD). Následně se vzorek ohřeje na 100 °C po dobu 10 minut. Množství vzorku nanášeného na SDS – page gel se odvíjí od stanovené koncentrace proteinů ve vzorku.

SDS – gel je připraven pomocí 12 % SDS - gelu. Elektroforéza probíhá při napětí 120 V po dobu 1 hodiny v přístroji PowerPac BasicTM BIORAD. Po rozdělení proteinů se gel 3x promyje v milli-Q H₂O a výsledek se analyzuje pomocí roztoku Coomassie.

6.15 Western blot (Immunoblot)

Vzorky se ohřejí na 100 °C po dobu 10 minut a poté se nanáší na 12 % SDS-page gel. Množství nanášeného vzorku závisí na koncentraci proteinů ve vzorku. Elektroforéza probíhá pod napětím 120 V 1 hodinu v PowerPac BasicTM BIORAD. Blotující papíry a membrána se na přibližně 2 minuty navlhčí v 1x TBS + Tween 20. Poté se blotující papír umístí do blotujícího přístroje SEMI-PHORTM Hoefer Scientific Instruments: jeden dolů na něj se přiloží membrána, dále gel a druhý navrhlčený blotující papír. Reakce běží půl hodiny při 25 V. Po přeblování proteinů se membrána přenesse na 1 – 1,5 hodiny do 5 % blokovacího roztoku. Membrána se následně přesune do uzavíratelného pytlíčku, přidá se 5% blokující roztok, ke kterému se přidá sérum z myši, které byly infikované kmenem CB43. Tento roztok se zředí v poměru 1 : 200 a nechá 1 hodinu na laboratorní teplotě. Membrána se druhý den 3x po 15 minutách promyje v 1x TBS + Tween 20 a poté se přidá sekundární protilátka Anti-Mouse IgG (Peroxidase Conjugate) v poměru 1 : 10 000. Membrána se ponechá na jednu hodinu na laboratorní teplotě a následně se 3x po 15 minutách promyje v 5 % blokujícím roztoku. Výsledek se poté vyhodnotí pomocí ChemiDocTMMP Imaging Systému (BIORAD). Příprava jednotlivých roztoků pro Western blotting jsou znázorněny v Tab. XIII.

Tab. XIII: Příprava roztoků pro Western blotting (Immunoblotting)

Název chemikálie	Použité chemikálie
1x TBS + Tween 20	50 ml 10x TBS
	450 ml milli-Q H ₂ O
	500 µl Tween 20
5% blokující roztok	10 g sušeného mléka
	150 ml 1x TBS + Tween 20

6.16 Dot blotting

V Tab. XIV a Tab. XV jsou uvedeny jednotlivé složky pro přípravu sondy pro dot blotting.

Tab. XIV: Komponenty pro přípravu značené experimentální sondy

Složky	Objem [ul]
DNA templát	2,0
Pufr (NEB)	2,5
PCR DIG Probe Dynthesis Mix	2,5
20mM F primer	2,0
20mM R primer	2,0
Směs enzymu	0,3
Voda	Doplnit do 25,0

Tab. XV: Komponenty pro přípravu neznačené kontrolní sondy

Složky	Objem [ul]
DNA templát	2,0
Pufř (NEB)	2,5
dNTP's zásobní roztok	2,5
20mM FW primer	2,0
20mM RF primer	2,0
Směš enzymu	0,3
Voda	Doplnit do 25,0

6.16.1 Postup

Nejprve se spočítá koncentrace DNA ve vzorku. Na membránu se vzorky nanosou tak, aby výsledná koncentrace byla 25, 50 a 100 ng/ul na jamku. Po nanesení vzorků následuje „UV-crosslink“ DNA na membránu pomocí přístroje Stratalinker. Membrána je poté půl hodiny inkubována v 2x SSC. Následně se membrána přenesse do 40 ml prehybridizačního roztoku a 6 hodin se nechá houpat při 65 °C. Do 1,5 ml zkumavky se připraví 95 ul milli-Q H₂O a 5 ul PCR produktu a po dobu 15 minut se nechá na 100 °C. Tento roztok se poté přidá do 15 ml zkumavky a smíchá s 2,5 ml prehybridizačního roztoku. Obsah zkumavky se přemístí na membránu, která se umístí do hybridizační pece (ProBlot - Labnet) a nechá přes noc hybridizovat na 55°C. Druhý den se membrána 2x po 5 minutách promyje v 2x SSC/0,1% SDS a následně 2x po 15 minutách v 0,3x SSC/0,1% SDS temperovaného na 65 °C. Membrána se propláchne v Pufřu I a poté 30 minut blokuje v Pufřu 2. Poté se membrána 30 minut inkubuje v Anti-Dioxigenin-AP antibody a následně se 2x po 15 minutách promyje v Pufřu 1. Membrána se promyje 5 minut v Pufřu 3 a poté zakápně 20 kapkami CDP-Star připraveného k použití (Roche). Posledním krokem je vložení membrány mezi dvě průhledné folie a inkubace 5 minut v temnu při laboratorní teplotě. Pro vyhodnocení výsledku se použije ChemiDocTMMP Imaging Systém (BIORAD). Příprava vzorků pro dot blotting je znázorněn v Tab. XVI.

6.16.2 Příprava roztoků

Tab. XVI: Příprava vzorků pro dot blotting

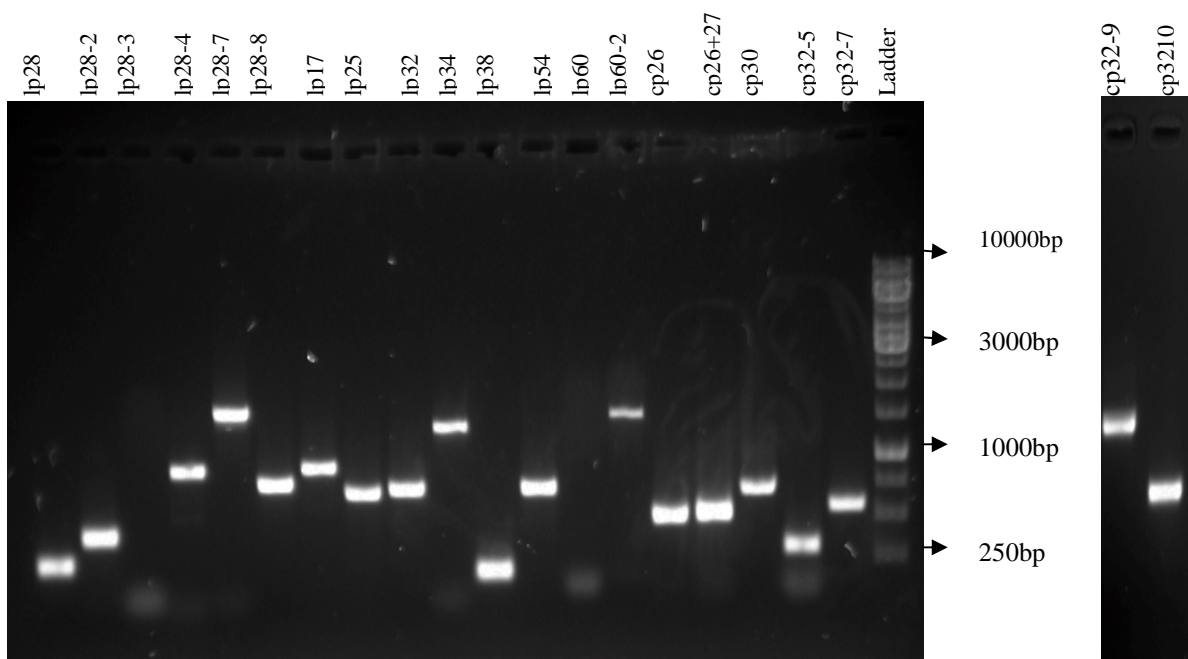
Název	Chemikálie
2M Tris – HCl pH 7,5	96,91 g Tris HCl (mw 121,1) Doplnit do 250 ml dH ₂ O Upravení pH na 7,5 Doplnit do 400 ml dH ₂ O
2M Tris – HCl pH 9,5	96,91 g Tris HCl (mw 121,1) Doplnit do 250 ml dH ₂ O Upravení pH na 9,5 Doplnit do 400 ml dH ₂ O
Pufr 1 – 100mM Tris – HCl pH 7,5/150mM NaCl	50 ml 2 M Tris pH 7,5/11 30 ml 5 M NaCl
Pufr 2	300 ml Pufr 1 2 g Blocking Reagent (Roche)
Pufr 3 – 100mM Tris – HCl pH 9,5/100mM NaCl	50 ml 2 M Tris pH 9,5/11 20 ml 5 M NaCl
Prehybridizační roztok	25 ml 20x SSC 0,1 g sarkosyl 200 ul 10 % SDS 6g Blocking reagent (Roche) 74 ml H ₂ O

2x SSC/0,1% SDS	100 ml 20x SSC/11
	10 ml 10% SDS
0,3x SSC/1% SDS	15 ml 20x SSC/11
	10 ml 10% SDS
Anti-Dioxigenin-AP antibody	4,5 ul anti-digoxigenin-AP Fab fragments (Roche)
	65 ml Pufu 2

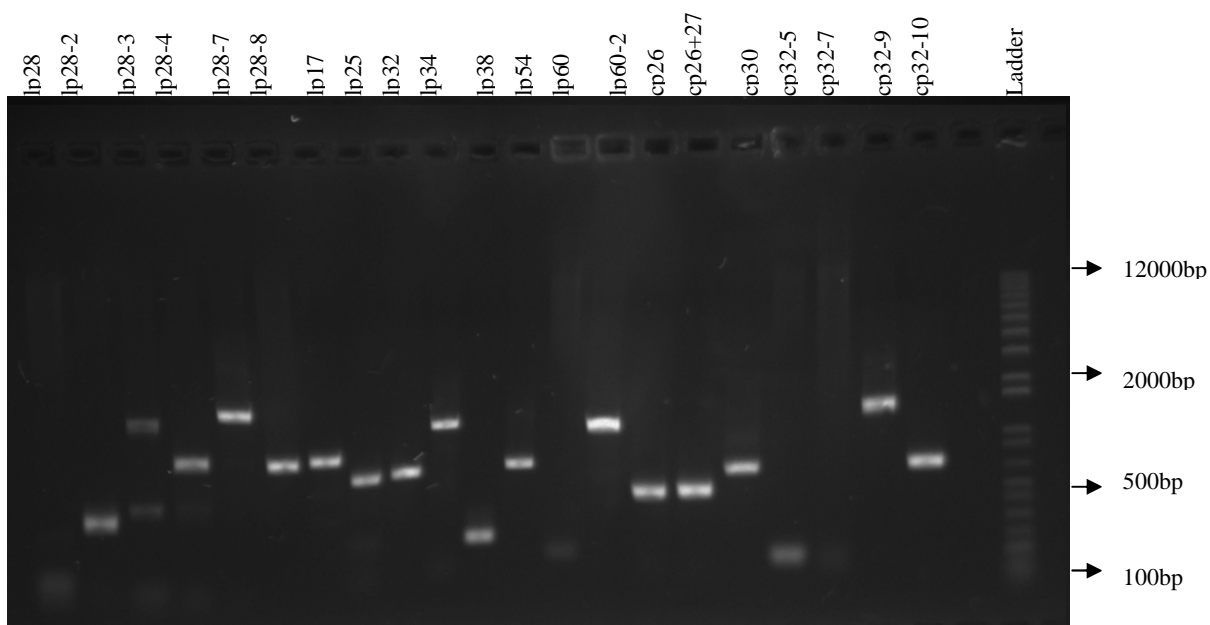
7 Výsledky

7.1 Detekce a ověření obsahu plasmidů a validace primerů

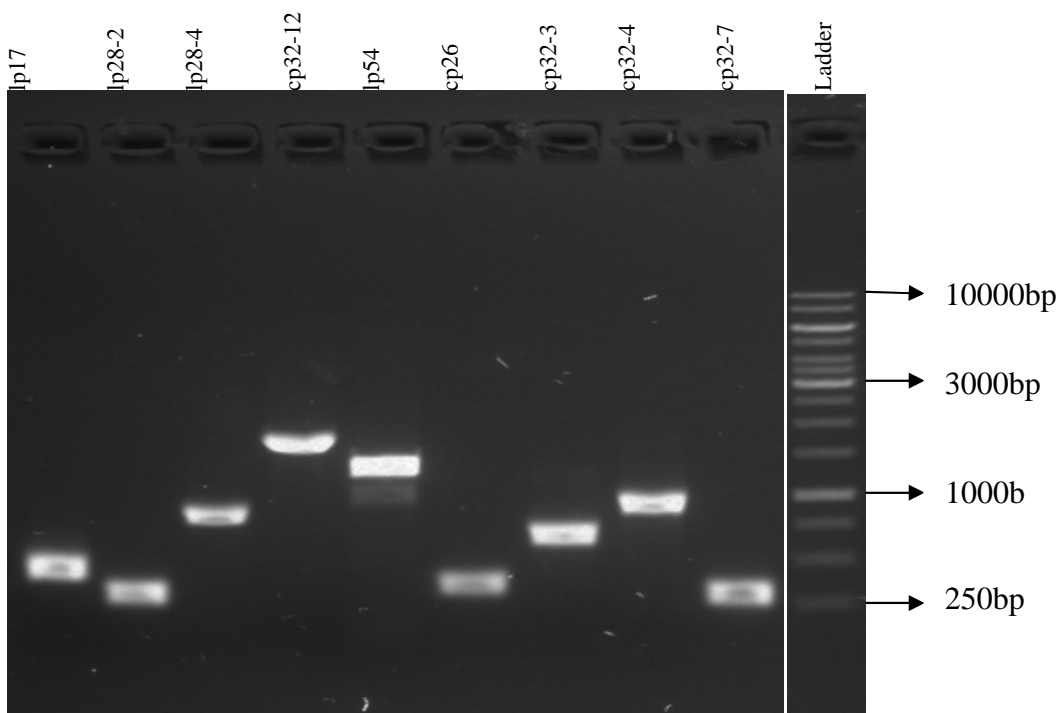
Genomová DNA byla izolována maxipreparativní metodou u kmenů PKo, SV1, ACA-1, CB43, ZS7, ATCC a PBr. Primery vytvořené pro detekci amplifikované DNA uvnitř genomu PKo a SV1, byly použity k detekci přítomnosti / nepřítomnosti plasmidů. Genomová DNA všech izolátů následně sloužila jako pozitivní kontrola pro další analýzy. K vytvoření pozitivní kontroly PKo byla použita sada o 21 primerech. Z celkového počtu použitých primerů obsahovala pozitivní kontrola PKo 19 plasmidů (Obr. 1). Kmen CB43, u kterého byly použity primery PKo, měl celkem 17 plasmidů z 21 detekovatelných (Obr. 2). Izolát SV1 zahrnoval 9 plasmidů z celkového počtu 9 použitých primerů (Obr. 3) U kmene ACA-1 bylo detekováno 8 plasmidů ze 14 detekovatelných plasmidů. Všechny PCR produkty byly klonovány a sekvenovány k posouzení sekvenační podobnosti a to zejména mezi izoláty CB43 a PKo.



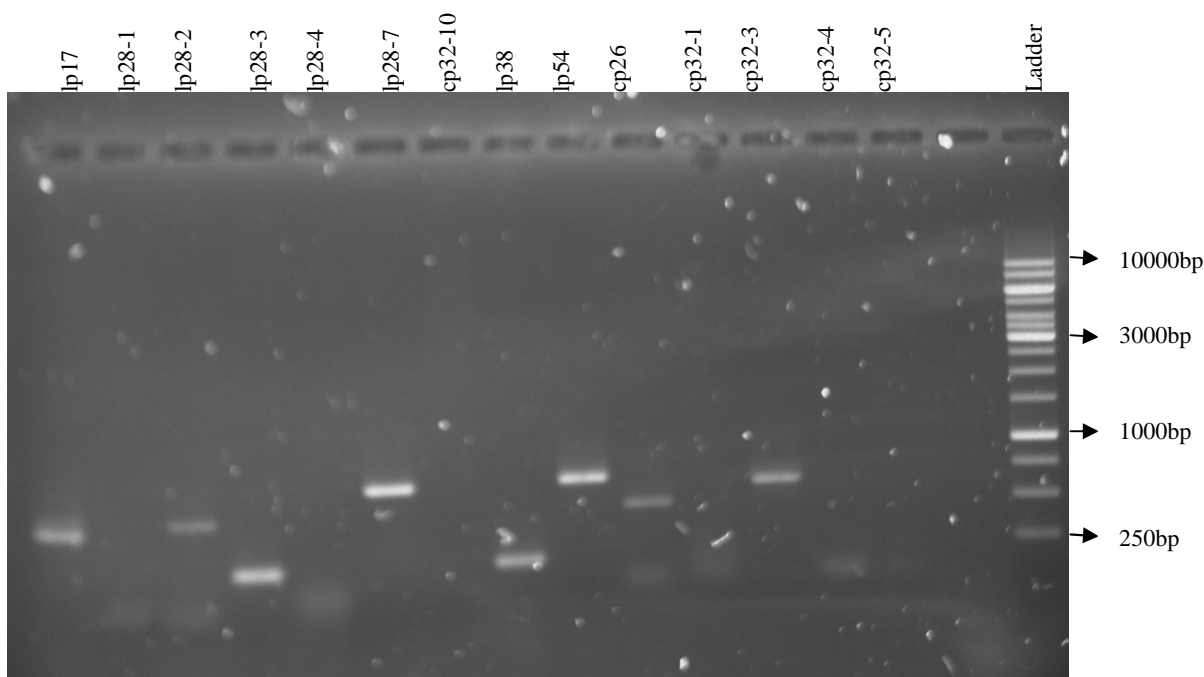
Obr. 1: Detekce PKo primerů na izolátu PKo



Obr. 2: Detekce PKo plasmidů na izolátu CB43 19



Obr. 3: Detekce SV1 primerů na izolátu SV1



Obr. 4: Detekce ACA-1 primerů na izolátu ACA-1

7.2 Detekce a ověření obsahu plasmidů u ostatních kmenů borélií

Část plasmidu, která je amplifikována metodou PCR nemůže být detekována u všech druhů borélie. V Tab. XVII – XIX jsou uvedené jednotlivé plasmidy detekované u ostatních evropských druhů borélií.

Tab. XVII: Obsah plasmidů PKo u ostatních evropských druhů borélií a jejich kmenů

	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. afzelii</i>		<i>B. garinii</i>	<i>B. finlanfensis</i>
	<i>s. s.</i>				
Plasmidy	ZS7	ACA-1	PBr	ATCC	SV1
PKo					
lp28	-	-	-	-	-
lp28-2	-	✓	-	-	-
lp28-3	-	✓	-	-	-
lp28-4	-	✓	-	✓	-
lp28-7	-	✓	-	-	-
lp28-8	-	-	-	-	-
lp17	✓	✓	-	-	-
lp25	-	✓	-	-	-

lp32	-	✓	-	-	-
lp34	-	✓	-	-	-
lp38	✓	✓	✓	-	-
lp54	✓	✓	✓	-	-
lp60	-	-	✓	✓	✓
lp60-2	-	✓	-	-	-
cp26	✓	✓	✓	-	-
cp26+27	✓	✓	✓	✓	✓
cp30	✓	✓	✓	✓	✓
cp32-5	✓	-	-	✓	✓
cp32-7	-	-	✓	-	-
cp32-9	✓	✓	✓	-	-
cp32-10	-	✓	✓	✓	✓

Tab. XVIII: Obsah plasmidů SV1 u ostatních evropských druhů borélií a jejich kmenů

Plasmidy SV1	<i>B. burgdorferi s. s.</i>		<i>B. afzelii</i>		<i>B. garinii</i>	
	ZS7	PKo	ACA-1	CB43	PBr	ATCC
lp17	✓	-	-	-	✓	✓
lp28-2	-	✓	-	✓	-	-
lp28-4	-	-	-	-	-	-
cp32-12	-	-	-	-	-	-
lp54	✓	-	-	-	-	✓
cp26	✓	✓	✓	✓	✓	✓
cp32-3	-	✓	✓	-	✓	-
cp32-4	✓	✓	✓	✓	-	✓
cp32-7	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tab. XIX: Obsah plasmidů ACA-1 u ostatních evropských druhů borélií a jejich kmenů

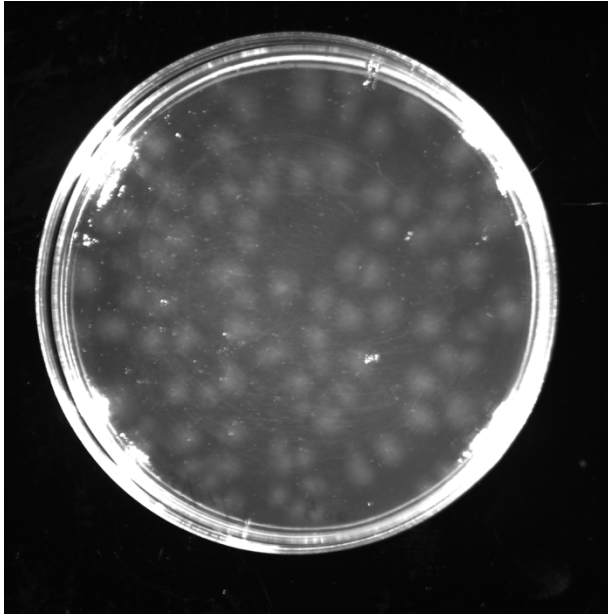
Plasmidy	<i>B. burgdorferi s. s.</i>		<i>B. afzelii</i>		<i>B. garinii</i>		<i>B. finlanfensis</i>	
	ZS7	PKo	CB43	PBr	ATCC	SV1		
ACA-1								
lp28	-	✓	-	-	✓	-		
lp28-2	✓	-	-	✓	✓	-		
lp28-3	-	✓	-	-	-	-		
lp28-4	-	✓	-	-	-	-		
lp28-7	-	-	✓	-	-	-		
lp28-8	-	✓	✓	-	✓	-		
lp17	✓	-	-	-	-	-		
lp25	-	✓	✓	-	✓	-	✓	
lp32	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
lp34	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
lp38	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	
lp54	✓	✓	-	-	-	-	-	
lp60	-	-	-	-	-	-	-	
lp60-2	-	✓	-	✓	✓	-	-	

7.3 PCR screening plasmidů jednotlivých klonů

Kultury CB43, PKo a SV1 se nechaly růst na Petriho miskách s tuhým médiem, viz Obr. 5 a za přibližně 3 týdny po nanesení byly získány kolonie, viz Obr. 9, Obr. 10. Jednotlivé kolonie, které byly vyizolovány se nechaly růst v tekutém médiu a následně byla ze zbytku kultury, která zbyla po přípravě glycerolové zásoby, extrahována genomová DNA. Každá genomová DNA byla testována pomocí plné sady plasmidových primerů. PKo a CB43 klony byly testovány s PKo plasmidovými primery viz Obr. 11, Obr. 12. S SV1 plasmidovými primery byl testován SV1 klon, viz Obr. 13. Výsledky screeningu jsou uvedeny v Tab. XX.

Tab. XX: Výsledky stanovení obsahu plasmidů u jednotlivých klonů po PCR screeningu

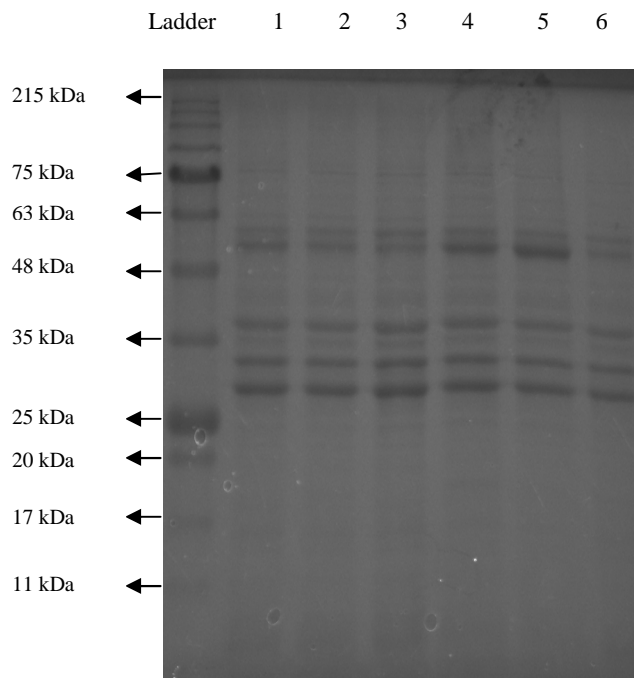
Klon	PKo (<i>B. afzelii</i>)	CB43 (<i>B. afzelii</i>)	SV1 (<i>B. finlandensis</i>)
	s PKo primery	s PKo primery	s SV1 primery
	Počet plasmidů / celkový počet plasmidů		
1	19/19	16/17	8/9
2	19/19	17/17	9/9
3	18/19	16/17	9/9
4	18/19	17/17	8/9
5	18/19	17/17	9/9
6	18/19	17/17	9/9
7	18/19	16/17	9/9
8	18/19	16/17	9/9
9	18/19	16/17	9/9
10	18/19	16/17	9/9
11	19/19	17/17	8/9
12	19/19	17/17	9/9
13	18/19	16/17	9/9
14	18/19	16/17	8/9
15	19/19	16/17	8/9
16	18/19	17/17	-
17	19/19	16/17	-
18	18/19	16/17	-
19	18/19	17/17	-
20	18/19	16/17	-
21	-	16/17	-
22	-	16/17	-
23	-	16/17	-
24	-	16/17	-
25	-	16/17	-



Obr. 5: Kultura CB43 narostlá na médiu 1,5x BSK⁺

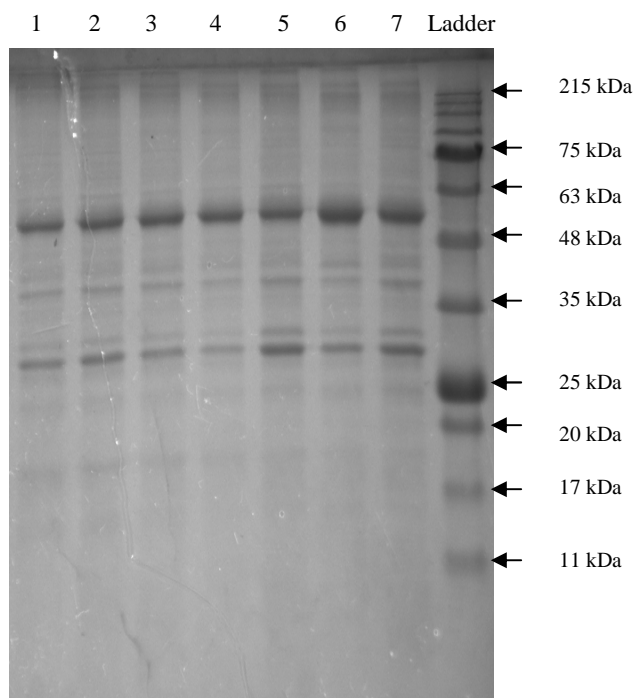
7.4 SDS – PAGE

Metoda SDS – PAGE byla provedena u vzorků SV1 a CB43, viz Obr. 6, 7. Z výsledků není mezi jednotlivými izoláty vidět žádný rozdíl.



Obr. 6: SDS-PAGE vzorků CB43

Jamka č. 1 – CB43 (1), č. 2 – CB43 (6), č. 3 – CB43 (7), č. 4 – CB43 (17), č. 5 - CB43 (18),
č. 6 – CB43 (2)

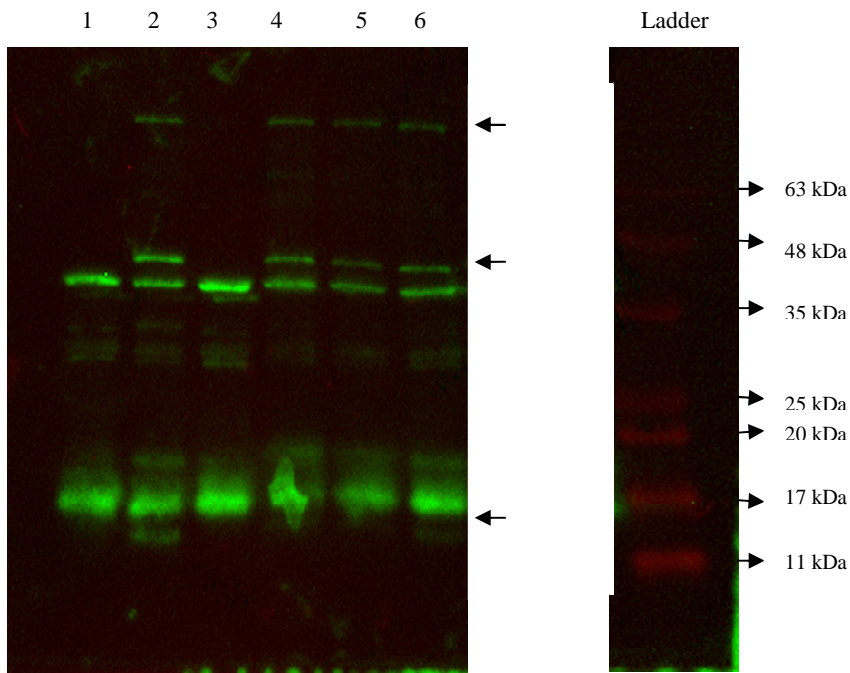


Obr. 7: SDS – PAGE vzorků SV1

Jamka č. 1 – SV1 (1), č. 2 – SV1 (2), č. 3 – SV1 (4), č. 4 – SV1 (6), č. 5 – SV1 (10),
 č. 6 – SV1 (11), č. 7 – SV1 (12)

7.5 Immunoblotting

Výsledky z immunoblottingu ukázaly 3 antigeny, které nebyly rozeznány ve vzorcích 1 a 7, viz Obr. 7. Jedná se o chybějící lineární plasmidy lp28-3 chybějící u vzorku 1 a lp28-8, který chybí u vzorku 7. Většina antigenů, které jsou rozpoznávané myším sérem, jsou vnější povrchové proteiny borélií a proto je velmi pravděpodobné, že tyto proteiny se vyskytovaly pod detekovatelným limitem a tím nemohly být detekované v in vitro.



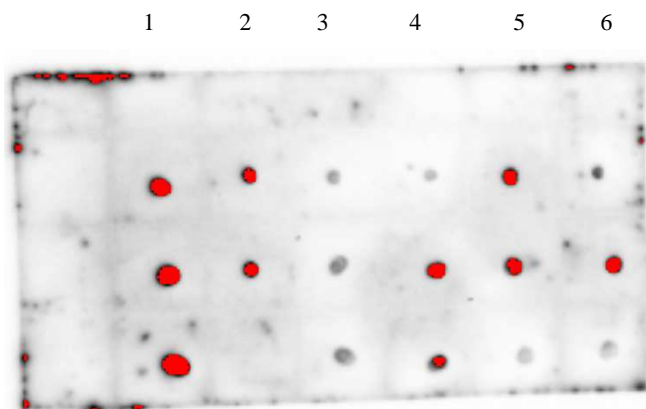
Obr. 8: Immunoblotting vzorků CB43

← místo absence antigenu

Jamka č. 1 – CB43 (1), č. 2 – CB43 (6), č. 3 – CB43 (7), č. 4 – CB43 (17), č. 5 - CB43 (18),
 č. 6 – CB43 (2)

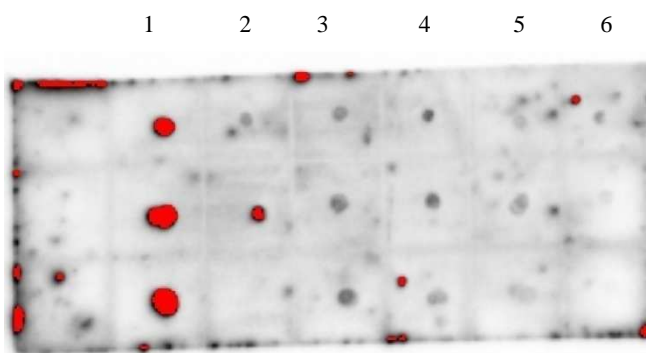
7.6 Dot blotting

Pomocí metody Dot blotting byl ověřován obsah plasmidů v SV1 izolátu, viz Obr. 9, 10. Koncentrace DNA, ve která byla použita k detekci plasmidů, byla 25 ng/ ul, 50 ng/ ul a 100 ng/ ul. Jako pozitivní kontrola sloužila maxipreparativní DNA SV1. Absence plasmidu byla patrná u 15 izolátu kmene SV1.



Obr. 9: Detekce plasmidů lp28-2 u SV1 izolátu

Jamka č. 1 – SV1 (maxiprep), č. 2 – SV1 (1), č. 3 – SV1 (4), č. 4 – SV1 (11),
 č. 5 – SV1 (14), č. 6 – SV1 (15)



Obr. 10: Detekce plasmidů lp54 u SV1 izolátu

Jamka č. 1 – SV1 (maxiprep), č. 2 – SV1 (1), č. 3 – SV1 (4), č. 4 – SV1 (11),
 č. 5 – SV1 (14), č. 6 – SV1 (15)

8 Diskuze

Až do vydání kompletní genomové sekvence izolátů PKo a ACA-1 *B. afzelii* a izolátu SV1 *B. finlandensis*, probíhalo pouze velmi málo studií se snahou pochopit podobnosti / odlišnosti těchto evropských kmenů v porovnání s dobře prostudovanými izoláty *Borrelie burgdorferi* B31, 297 nebo N40. Důvodem k tomu byl nedostatek veškerých informací týkajících se počtu plasmidů obsažených v genomu a jejich sekvencí. Zveřejnění genomů výše zmíněných izolátů v roce 2011, umožnilo předběžné navržení primerů, které pomáhají rozpoznat jednotlivé plasmidy u těchto evropských druhů borélií. V tomto projektu jsem byla schopna poprvé úspěšně ukázat, že všechny tyto primery navržené pro plasmidy v rámci PKo genomu jsou schopné amplifikovat konkrétní plasmidové PCR produkty *Borrelie afzelii*. Schopnost většiny těchto primerů specificky detekovat plasmidy PKo-příbuzných izolátů *B. afzelii* ukazuje jejich užitečnost pro budoucí studie izolátů *B. afzelii*. Bude tak možné stanovit obsah plasmidů izolátů *B. afzelii* z přírody nebo z klinických vzorků. Nespecifické (ty které amplifikovaly i plasmidy jiných druhů borelií) se ukázaly být primery pro ty nejběžnější plasmidy, tím je kruhový plasmid cp26 (obsahuje gen pro OspC) a lineární plasmid lp54 (nese geny pro OspA a B) Tato nespecifita je oboustranná. Specifické primery *B. burgdorferi* s. s. kmene B31 jsou rovněž schopny amplifikovat tyto plasmidy u různých evropských kmenů.

Navržené primery pro plasmidy *B. finlandensis* kmene SV1 se také ukázaly být specifickými pro tento kmen. U tohoto kmenu jsme byli schopni detekovat pouze ty nejběžnější plasmidy. Je zřejmé, že izolát SV1 se skládá z heterogenní populace. Tento výsledek byl ověřen metodou SDS-page.

Pomocí PKo a ACA-1 specifických primerů jsem byla schopná ukázat, že izolát *B. afzelii* CB43 je daleko více příbuzný ke kmenu PKo než k ACA-1. Tyto primery byly schopné prokázat rozdíly v obsahu plasmidů mezi klony získaných z izolátů borélií PKo a CB43. Znalost rozdílů mezi jednotlivými klony je důležitá především pro infekční studie. Je známo, že in-vitro pasážírováním kmenů borélií dochází ke ztrátám plasmidů a tím k možné ztrátě infekčnosti (v závislosti na ztraceném plasmidu). (Purser a Norris, 2000) Díky tomu, že disponujeme specifickými primery pro všechny plasmidy, jsme vždy schopni ověřit infekčnost studovaných kmenů/druhů borélií, např. inokula připraveného pro myš. To lze zjistit nanesením inokula na Petriho misku a následným screeningem jednotlivých kolonií.

Ztráta infekčnosti v důsledku ztráty plasmidů je takto snadno identifikovatelná. Výsledky z imunoblotu ukazují, že ztráta plasmidů může vést ke ztrátě některých antigenních vnějších povrchových proteinů, které mohou hrát důležitou roli v infekčnosti. Takové porovnání obsahu plasmidů a proteinových profilů by mohlo pomoci v identifikaci genů / proteinů, které jsou antigenní a nebyly dosud identifikovány vzhledem k nedostupnosti sekvenovaných genomů. Pomocí genového knockoutu poté můžeme odhalit skutečnou funkci důležitých vnějších povrchových proteinů.

Použití specifických primerů pro zjištění plasmidů v místním infekčním izolátu *B. afzelii* CB43 nás přiblíží k využívání genetických manipulací na evropských kmenech. To je důležité, jelikož každá genetická transformace, která vede k fenotypu, musí být ze zavedené mutace nikoli způsobená ztrátou plasmidu. Nepřítomnost některých plasmidů u jednotlivých CB43 klonů naznačuje, že původní populace CB43 sama o sobě není ideální pro genetické manipulace. Klon, který obsahuje všechny plasmidy může být vhodný pro takovéto studie. Pro vybraný geneticky manipulovaný kmen je tedy vždy důležité stanovit obsah plasmidů, protože u mutantů může dojít k jejich ztrátě. Proto je vždy nutné porovnat obsah plasmidů u mutantů a použitého rodičovského kmene.

Metoda dot-blot sloužící k prokazování specifity primerů a potvrzení nepřítomnosti jednotlivých plasmidů, je jedním ze způsobů, jak potvrdit nepřítomnost nebo přítomnost určitého plasmidu. Druhou možností je metoda Southern blotting, která by mohla poskytnout podobné výsledky.

9 Závěr

Dostupnost genomů různých evropských druhů borélií zahrnující *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*, umožnilo porozumět podobnosti a odlišnosti mezi těmito druhy. Díky tomu budou genetické manipulace snazší a srovnání fenotypů mezi mutanty a rodičovskými kmeny může být spojena s určitou mutací. Může být stanovena ztráta plasmidu a specifické fenotypy mohou být spojené s částí plasmidu.

10 Použitá literatura

- Canica, M. M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J. C., Baranton, G., & Postic, D. (1993). Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 25(4), 441–8.
- Casjens, S. R., Mongodin, E. F., Qiu, W.-G., Dunn, J. J., Luft, B. J., Fraser-Liggett, C. M., & Schutzer, S. E. (2011). Whole-genome sequences of two *Borrelia afzelii* and two *Borrelia garinii* Lyme disease agent isolates. *Journal of bacteriology*, 193(24), 6995–6.
- Casjens, S. R., Mongodin, E. F., Qiu, W.-G., Luft, B. J., Schutzer, S. E., Gilcrease, E. B., ... Fraser, C. M. (2012a). Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *PloS one*, 7(3), e33280.
- Casjens, S. R., Mongodin, E. F., Qiu, W.-G., Luft, B. J., Schutzer, S. E., Gilcrease, E. B., ... Fraser, C. M. (2012b). Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *PloS one*, 7(3), e33280.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., ... Venter, J. C. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660), 580–6.
- Grimm, D., Elias, A. F., Tilly, K., & Rosa, P. A. (2003). Plasmid stability during in vitro propagation of *Borrelia burgdorferi* assessed at a clonal level. *Infection and immunity*, 71(6), 3138–45.
- Hinnebusch, J., & Tilly, K. (1993). Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Molecular microbiology*, 10(5), 917–22.
- Jewett, M. W., Lawrence, K., Bestor, A. C., Tilly, K., Grimm, D., Shaw, P., ... Rosa, P. A. (2007). The critical role of the linear plasmid lp36 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology*, 64(5), 1358–74. Linear plasmids and chromosomes in bact - PubMed Mobile. (n.d.).
- Masuzawa, T. (2004). Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. *Japanese journal of infectious diseases*, 57(6), 229–35.
- Mongodin, E. F., Casjens, S. R., Bruno, J. F., Xu, Y., Drabek, E. F., Riley, D. R., ... Luft, B. J. (2013). Inter- and intra-specific pan-genomes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: genome stability and adaptive radiation. *BMC genomics*, 14, 693.
- Ohnishi, J., Schneider, B., Messer, W. B., Piesman, J., & de Silva, A. M. (2003). Genetic variation at the *vlsE* locus of *Borrelia burgdorferi* within ticks and mice over the course of a single transmission cycle. *Journal of bacteriology*, 185(15), 4432–41.

- Purser, J. E., & Norris, S. J. (2000). Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13865–70.
- Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B., & Hu, L. T. (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature reviews. Microbiology*, 10(2), 87–99.
- Rhodes, D. V. L., Earnhart, C. G., Mather, T. N., Meeus, P. F. M., & Marconi, R. T. (2013). Identification of *Borrelia burgdorferi* ospC genotypes in canine tissue following tick infestation: Implications for Lyme disease vaccine and diagnostic assay design. *Veterinary journal (London, England □: 1997)*, 198(2), 412–8.
- Rosa, P. A., Tilly, K., & Stewart, P. E. (2005). The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature reviews. Microbiology*, 3(2), 129–43.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and tick-borne diseases*, 2(3), 123–8.
- Schutzer, S. E., Fraser-Liggett, C. M., Casjens, S. R., Qiu, W.-G., Dunn, J. J., Mongodin, E. F., & Luft, B. J. (2011). Whole-genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of bacteriology*, 193(4), 1018–20.
- untitled - 2009-1-Bolehovska.pdf. (n.d.).
- Wang, G., van Dam, A. P., Schwartz, I., & Dankert, J. (1999). Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 633–53.