

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Telomerová sekvence *Mortierella antarctica*

Tudor-Alexandru Stoican
Jihomoravský kraj

Brno 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Telomerová sekvence *Mortierella antarctica*

The telomere sequence of *Mortierella antarctica*

Autor: Tudor-Alexandru Stoican

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Brno, Žižkova 55, příspěvková organizace, Žižkova 980, 616 00 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Mgr. Vratislav Peška, Ph.D.

Brno 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 28. 2. 2023

Tudor-Alexandru Stoican

Poděkování

Především děkuji Mgr. Vratislavu Peškovi, Ph.D. za jeho pomoc, odborný dohled, profesionalitu a trpělivost v průběhu celé práce. Dále děkuji Biofyzikálnímu ústavu AV ČR za poskytnutí přístupu k laboratořím a potřebným materiálům a za příjemnou, přátelskou atmosféru. Děkuji prof. RNDr., DrSc. Jozefu Noskovi z Univerzity Komenského v Bratislavě za poskytnutí experimentálního materiálu, vzorku *M. antarctica*. Děkuji přátelům a rodině za jejich povzbuzení a podporu.

Anotace

Cílem této práce bylo potvrdit vytipovanou telomerovou sekvenci TTTTTTAGGG v DNA houby *Mortierella antarctica*. Součástí práce bylo osvojení si metod kultivace a zacházení se zkoumaným druhem v laboratorních podmínkách. Dále jsem optimalizoval izolaci DNA, přičemž jsem srovnával účinnost dvou z možných postupů. Zkoumaná DNA byla štěpena exonukleázou BAL31 a následně fragmentována pomocí restričních enzymů. Sondy pro studovanou telomerovou sekvenci označené izotopy ^{32}P byly použity v hybridizaci po Southernově blottingu. V této tzv. analýze terminálních restričních fragmentů jsem potvrdil telomerovou sekvenci zkoumaného druhu jako skutečně telomerovou.

Klíčová slova

Mortierella antarctica; telomery; DNA; gelová elektroforéza; TRF analýza; Southernův přenos

Annotation

The aim of this work was a confirmation of the candidate telomere sequence TTTTTTAGGG in the genome of the fungus *Mortierella antarctica*. The work included an optimization the methods of cultivation and handling of the species studied in laboratory conditions. Furthermore, I optimized the DNA isolation, comparing the efficiency of two possible procedures. The examined DNA was cleaved by BAL31 exonuclease and subsequently fragmented using restriction enzymes. Probes labeled with ^{32}P isotopes were used in hybridization after Southern blotting. In this so-called terminal restriction fragment analysis, I confirmed the telomeric sequence of the species studied as truly telomeric.

Keywords

Mortierella antarctica; telomeres; DNA; gel electrophoresis; TRF analysis; Southern blot

Obsah

1	Úvod.....	6
1.1	Teoretický úvod	6
1.1.1	Rod <i>Mortierella</i>	6
1.1.2	Telomery	9
2	Materiály a metody	11
2.1	Popis kmene <i>M. antarctica</i> použitého v této práci.....	11
2.2	Potato dextrose broth (PD).....	11
2.3	Czapek-Dox (CZD).....	12
2.4	Pasážování kultur	12
2.5	Izolace DNA metodou s použitím CTAB	12
2.6	Příprava CTAB buffer (pufru)	13
2.7	Izolace DNA pomocí E.Z.N.A.® DNA/RNA Isolation Kit.....	14
2.8	Kontrola kvality a integrity genomové DNA pomocí gelové elektroforézy.....	14
2.9	Příprava agarózového gelu	14
2.10	Postup při elektroforéze.....	14
2.11	TRF metoda	15
2.12	Southernův přenos	15
2.13	Značení oligonukleotidové sondy radioaktivním izotopem ³² P	16
2.14	Hybridizace membrány s radioaktivně značenou sondou a detekce signálů pomocí Typhoon™ FLA 9500.....	17
3	Výsledky	18
3.1	Optimalizace izolace DNA	21
3.2	Nález telomerové sekvence pomocí TRF a Southernova přenosu.....	24
4	Závěr	27
5	Použitá literatura	28
6	Seznam obrázků.....	29

1 Úvod

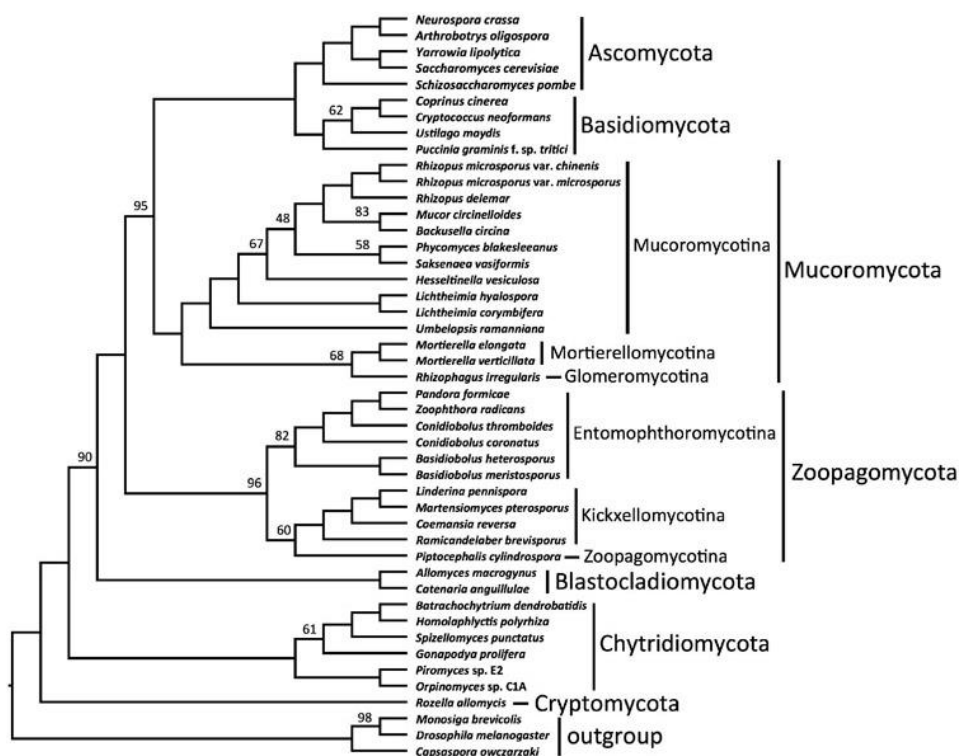
Mezi nespornými výhodami práce s rodem *Mortierella*, ale i dalším podobnými houbovými organismy, patří jejich jednoduchost kultivace, rychlost růstu a snadná manipulace. Proto se jeví jako vhodní kandidáti pro výzkum v molekulární biologii, genetice a evoluční biologii. Mnoho principů a poznatků získaných u těchto modelů lze aplikovat na většinu živých organismů. Jedním příkladem mohou být telomery chránící konce chromozomů. Ačkoliv byly poprvé jednoznačně prokázány u modelového prvoka *Tetrahymena thermophila* (Blackburn a Gall, 1978), dnes se staly cílem intenzivního bádání medicíny kvůli jejich souvislosti se stárnutím či rakovinou. (Fan et al., 2021)

Cílem této práce je pochopení a optimalizace laboratorních metod molekulární biologie a potvrzení kandidátní telomerové sekvence houby *Mortierella antarctica* právě pomocí těchto metod.

1.1 Teoretický úvod

1.1.1 Rod *Mortierella*

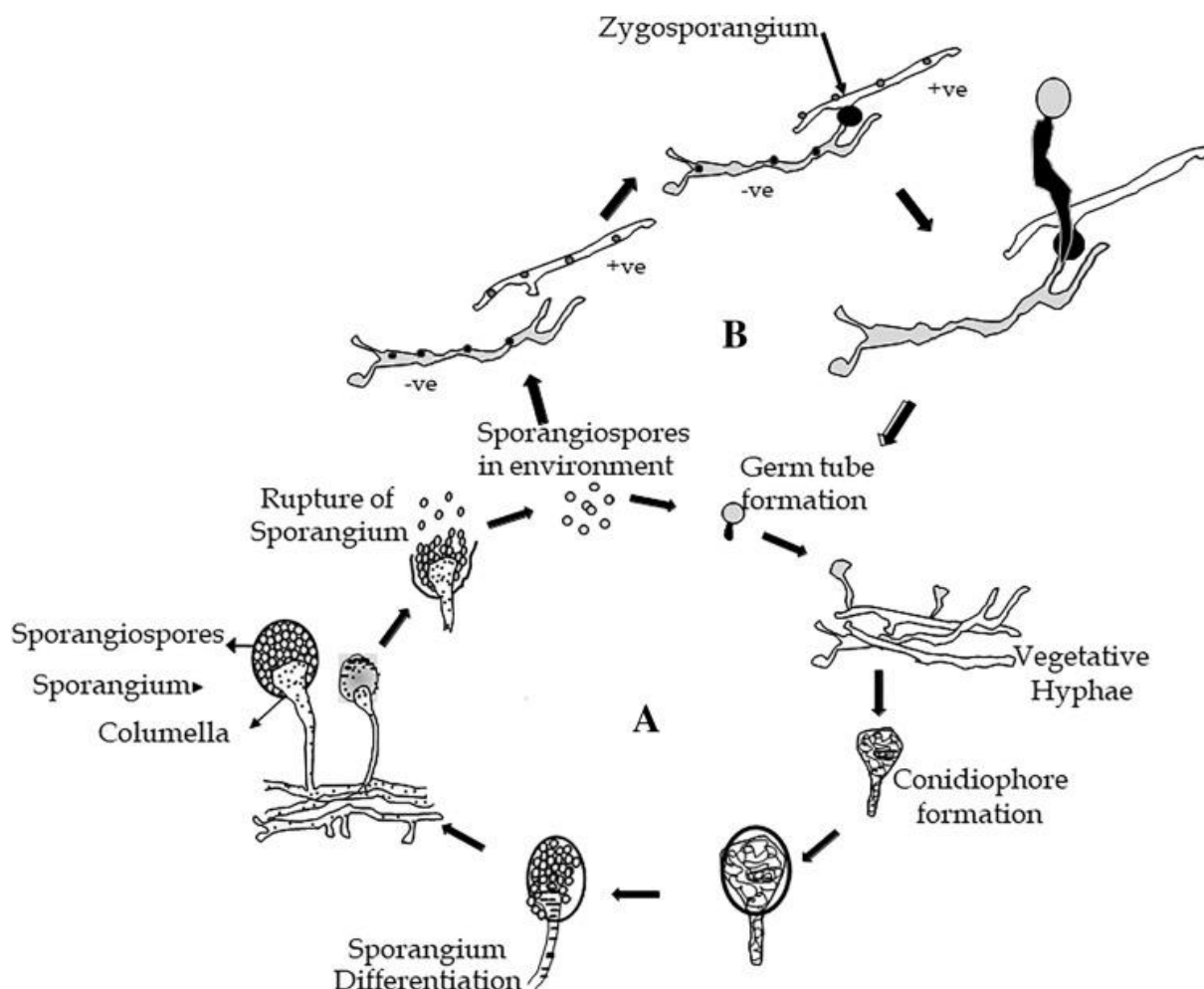
Rod *Mortierella* se z hlediska taxonomie nachází v čeledi Mortierellaceae, řádu Mortierellales, třídě Mortierellomycetes, podkmenu Mortierellomycotina, kmenu Mucoromycota, říše Fungi (houby) (Wagner et al., 2013). Dále se řadí do skupiny zygomycetních hub, viz Obrázek 1, na kterém je začlenění taxonu Mucoromycota mezi ostatní zygomycetní houby v rámci fylogenetického stromu (Spatafora et al., 2016). Do rodu *Mortierella* řadíme zhruba devadesát známých druhů. Mezi nejznámější zástupce patří druhy *M. alpina*, *M. antarctica*, *M. bisporalis*, *M. indohii*, *M. polycephala* nebo *M. reticulata* (Sang et al., 2022). Tyto houby se nejčastěji vyskytují v půdě či v rhizosféře, tedy svrchní vrstvě půdy prostoupené kořeny rostlin, a dále na živočišných a rostlinných zbytcích. Právě na odumřelých organických pozůstatcích se tyto houby živí (Webster a Weber, 2007).



Obrázek 1: Fylogenetický strom skupiny zygomycetních hub. Znázorňuje podobnost mezi jednotlivými taxonomickými jednotkami.

Zástupce tohoto rodu lze nalézt na každém kontinentu, včetně Antarktidy (Vandepol et al., 2020). Tomu přispívá jejich schopnost přežít jak v teplém, tak i studeném prostředí. Některé druhy považujeme za psychrofilní organismy, díky jejich schopnosti snášet i polární podnebí (Webster a Weber, 2007).

Životní cyklus zygomycetních hub, kam rod *Mortierella* patří, je znázorněn na Obrázku 2. Z hlediska morfologie pozorujeme, že mycelia (podhoubí) často nejsou rozdělena septy (přepážkami mezi buňkami) a mohou mít více jader v buňkách. Mycelia bývají velmi jemná a na agarových médiích vytvářejí typické kruhové útvary a uvádí se, že mají zápach podobný česneku. Typické pro ně je redukce columelly (centrálního jádra) v sporangii, jež se nachází na větvených či nevětvených sbíhajících se sporangioforech. Sporangia obsahují druhově jen malý počet spor, což závisí i na vnějším prostředí. (Webster a Weber, 2007)



Obrázek 2: Životní cyklus zygomycetných hub. A – Spodní cyklus zobrazuje fázi nepohlavního rozmnožování. Hyfy produkují sporangia obsahující množství haploidních sporangiospor pomocí mitózy. Tato sporangia následně puknou a uvolňují spory, z nichž se znovu vytvoří hyfy. B – Horní cyklus ukazuje fázi pohlavního rozmnožování. V této fázi se plus a minus haploidní (n) typy sloučí v heterokaryotické zygosporangium ($2n$), něhož vzniká splynutím jader diploidní zygotní útvar. (Pasrija a Naime, 2022)

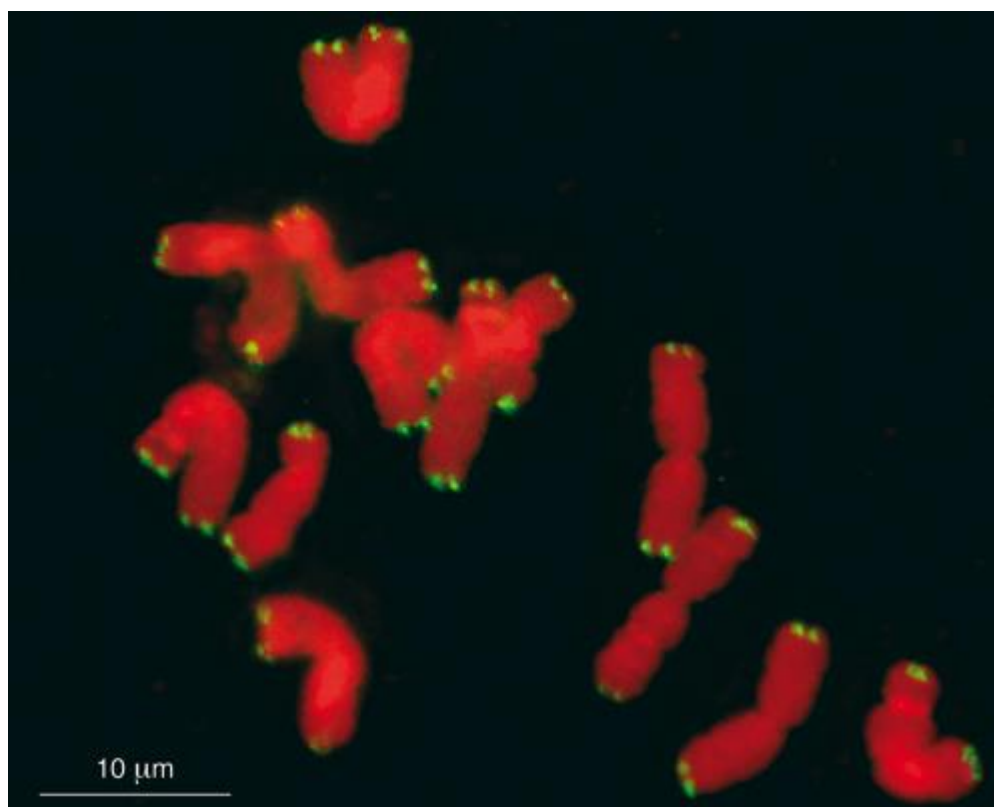
U tohoto rodu se vyskytují i méně obvyklé a známé metody rozmnožování. V agarovém prostředí se sníženým obsahem živin se druhově vyvíjí zygospory, jež slouží jako prostředek pohlavního rozmnožování. Tyto zygospory mohou být obaleny vrstvou sterilní hyfy, ale mohou být i nahé. Za zhoršených podmínek se některé druhy mohou nepohlavně množit tvorbou chlamydospor, které se usadí na povrchu a mohou přežít do doby, než se zlepší okolní podmínky. V rodu *Mortierella* se nacházejí druhy jak heterothalické, které mají ve stélce rozmnožovací orgány jen jednoho pohlaví, tak homothalické, jež v jedné stélce mohou mít rozmnožovací orgány obou pohlaví. (Webster a Weber, 2007)

Poslední dobou se ve vědě o houby rodu *Mortierella* projevuje zvyšující se zájem. Má to hned několik důvodů. Tyto houby mohou hrát důležitou roli v půdních mikrobiomech a podporovat růst rostlin díky schopnosti proměňovat nerozpustné formy fosforu v rozpustné (Sang et al., 2022). Jiné druhy se mohou chlubit schopností produkovat mastné kyseliny, a tak se

prozkoumává jejich potenciální využití v potravinářství (Telagathi et al., 2021). Druh *M. wolfii* spojen s infekcemi vyvolávajícími aborty u chovného skotu (Davies et al., 2010).

1.1.2 Telomery

Telomery se nachází na koncích lineárních chromozomů u valné většiny eukaryotických buněk. Příkladovou vizualizaci telomerové DNA na chromozomech se nachází na obrázku 3. Jedná se o nukleoproteinové struktury, jejichž nosnou konstrukcí je repetitivní sekvence DNA, která zdánlivě neplní žádnou funkci. U člověka, stejně jako u všech ostatních obratlovců, a dalších organismů jsou telomery tvořeny sekvencí TTAGGG (tj. dvě báze thyminu, jedna adeninu a tři guaninu), která se neustále opakuje. V případě rodu *Mortierella* byla telomerová sekvence predikována z dostupných sekvenčních dat nové generace jako minisatelit TTTTITAGGG a publikována v bakalářské práci o evoluci telomer napříč eukaryotickou říší (Bubeník, 2020). Telomery jsou součástí životně důležitého ochranného mechanismu. Řeší dva zásadní problémy, se kterými se DNA potýká, konkrétně problém ochrany konců a problém replikace konců (Peska a Garcia, 2020).



Obrázek 3: Vizualizace telomerové DNA na chromozomech rostliny kladivníku nádherného (*Cestrum elegans*, Solanaceae). Červeně zvýrazněny chromozomy a zeleně jejich telomery značené sondou pro sekvenci TTTTITAGGG, která je shodou okolností stejná jako kandidátní telomerová sekvence *M. antarctica*. (Peška, 2017, upraveno)

Vlivem metabolických procesů v buňkách či ionizujícího záření z okolního prostředí dochází v buňkách ke dvouřetězcovým zlomům, jež ohrožují celistvost chromozomů. Tím, že se konce opatřené telomerami liší od zbytku chromozomu, je možné tyto zlomy napravit. (Peška, 2017)

Druhý problém, spojený s replikací (end-replication problem), je způsoben mechanismem, jakým se lineární DNA kopíruje z jedné molekuly do dvou dceřiných. Během replikace DNA se původní mateřské řetězce oddělí a na každém z nich vznikají dceřiné řetězce tím, že na mateřský nasedá RNA primer, od něhož začne DNA polymeráza replikovat DNA podle předlohy mateřského řetězce. Problém nastává na koncích, kde už není kam primerovou RNA nasadit, a tudíž zde polymeráza nedokáže dostavět řetězec úplně. Kvůli těmto procesům se s každou replikací ztrácí část terminální DNA. Telomery zde fungují jako „nárazníková zóna“, která nabízí rezervu při replikaci pro DNA. Jejím částečným úbytkem není nijak pozměněna funkce chromozomového konce, jelikož se jedná o nekódující část DNA. (Peška, 2017) V průběhu života organismů se tyto telomery zkracují, což může být spojeno se stárnutím (Blackburn a Gall, 1978).

Telomery mohou být prodlouženy enzymem telomerázou, která pomocí reverzní transkripce dokáže vyrábět DNA podle svojí předlohy (templátového místa uvnitř molekuly RNA, která tvoří podjednotku celého enzymu), a tím umí doplnit konce telomer *de novo*. Avšak u člověka se telomeráza přirozeně vyskytuje pouze v embryonálních, kmenových a rakovinných buňkách. (Peška, 2017)

2 MATERIÁLY A METODY

2.1 Popis kmene *M. antarctica* použitého v této práci

Výchozím materiálem byl vzorek *M. antarctica* CBS 609.70(T) ze sbírky prof. RNDr. Jozefa Noska, DrSc. (Univerzita Komenského v Bratislavě). Na jeho doporučení jsme testovali kultivaci na různých médiích (PD a CZ-D, viz níže) při teplotě 21 °C. Na obrázku 4 vidíme ukázkou *M. antarctica* z předem zmíněné sbírky. Druh byl poprvé popsán roku 1969 po jeho nalezení v antarktické půdě (Embree, 1971). Odhadovaná velikost genomu příbuzných kmenů *M. antarctica* je 35.46-39.63 Mbp (Vandepol et al., 2020).



Obrázek 4: Kolonie *M. antarctica* na misce s kultivačním médiem YPD. Sněhově bílý nárůst přibližně týdenní kolonie. Foto získáno od prof. J. Noska (UK Bratislava).

Tento organismus je řazen do bezpečnostní kategorie „BioSafetyLevel 1“, již označujeme organismy, které nepředstavují pro člověka žádné významné nebezpečí. Jedná se nejčastěji známe o mikroorganismy, které obvykle nezpůsobují žádné nemoci. V laboratořích pro tuto bezpečnostní kategorii stále platí základní pravidla, jako je mytí rukou a zákaz jezení či pití. Dle potřeby se nosí laboratorní pláště, rukavice a ochranné brýle, ale obvykle není potřeba dodržovat žádná zvláštní opatření nebo podstoupit speciální výcvik.

2.2 Potato dextrose broth (PD)

Toto kultivační médium na bázi glukózy a bramborového extraktu je doporučováno pro kultivaci bakterií, plísní, kvasinek či hub z rodu *Mortierella*. Ve své práci jsem používal komerčně dostupný polotovár od firmy MERCK (obj. č. P6685) ve formě sypké směsi. Pro konečnou přípravu jsem použil destilovanou vodu, 24 g/l PD směsi a případně 14 g/l agarů od firmy DUCHEFA, pokud jsem chtěl vytvořit pevné PDA místo tekutého PD. Agar dává médiím pevnou gelovou konzistenci. Roztok jsem přelil do nádoby a její víčko zavřel jen volně, aby se

mohl vyrovnávat tlak při stoupání teploty. Dále jsem upevnil víčko jen alobalem. Nechal jsem vařit přibližně 30 min v papíňáku. Po důkladném rozmíchání jsem mohl produkt sterilně přelít do misek či baněk.

2.3 Czapek-Dox (CZD)

Při přípravě jsem postupoval podobně jako u PD. Do destilované vody jsem namíchal 30 g/l třtinového cukru, 1 g/l K_2HPO_4 , 0,5 g/l $MgSO_4$, 0,5 g/l KCl, 0,01 g/l $FeSO_4$ a 2 g/l $NaNO_3$. Pokud jsem vyráběl pevné CZDA, musel jsem přidat i 15 g/l agaru. Dále jsem roztok míchal a vařil obdobně jako u PD.

2.4 Pasážování kultur

Přemísťování vzorku kultur do nových médií se musí provádět v digestoři za sterilních podmínek. Práce se nejlépe provádí poblíž hořícího kahanu, který spálí případnou kontaminaci, např. cizorodé spory plísní. Zároveň ožiháváme hrdla sterilních baněk, lahví s kultivačními médii, jejich víčka a hliníkové krytky, mikrobiologické kličky a podobné nástroje pro manipulaci biologického materiálu sterilním způsobem. Například jsem zaočkovával čistá média kousky kolonií hub z pevného média, pomocí kovové mikrobiologické kličky, kterou jsem před každým použitím vyžíhal.

V případě, že jsem vyséval vzorek z tekutého média na agarovou misku, použil jsem pipetu a sterilní špičku pro nabrání suspenze buněk z kultury a skleněnou hokejku pro rovnoměrné rozprostření. Hokejku jsem vždy před použitím namočil do 75% ethanolu, vyžíhal a nechal vychladnout na laboratorní teplotu, nebo ochladil o sterilní médium v misce. Hokejkou jsem po médiu pohyboval bez vyvíjení tlaku.

2.5 Izolace DNA metodou s použitím CTAB

Nejprve jsem oddělil zkoumané buňky od média použitím odstředivky na 5 minut a při síle 2000 g. Buňky sedimentují, zatímco horní vrstvu tvoří čiré médium. Získaný vzorek buněk ještě lze osušit stlačením mezi dvěma silnými vrstvami filtračního papíru a pak jsem jej umístil do třetí misky. Za postupného přilévání tekutého dusíku, díky kterému buňky ztuhnou a stanou se křehčí, jsem drtil přibližně 10 min. Drcením a mražením se naruší buněčné stěny a obsah buněk, včetně solubilní DNA, se v dalším kroku dostává do kontaktu s vodným extrakčním pufrem.

Výsledný produkt, jemný zmrzlý prášek smícháme s extrakčním pufrem na bázi vodného roztoku detergentů, solí a inhibitorů nukleáz v objemovém poměru 1 : 1. Suspenzi jsem řádně promíchal, ale snažil jsem se zamezit nadbytečnému vzniku pěny. Pak jsem suspenzi vložil i se zkumavkou do vodní lázně o teplotě 65 °C na 15 minut (občas se promíchá). Potom jsem přidal 1/5 objemu 3M octanu draselného a po promíchání jsem položil na led na 5 min. Vzniklou suspenzi jsem odstředil (15 min, 5000 g při 4 °C) a sesbíral jsem supernatant (tj. tekutina nad sedimentem) do čisté zkumavky. Přidal jsem 1 ml fenol-chloroform-isoamylalkoholu (25 : 24 : 1) a vzniklý roztok jsem znovu zamíchal za vzniku mléčné suspenze, kterou jsem

odstředil (5 min, 10000 g). Odebral jsem horní (vodní) fázi do čisté zkumavky a pak přidal 1V chloroform-isoamylalkoholu (24 : 1) a opakoval jsem odstředění (5 min na 10000 g) a odebírání vodní fáze do čisté zkumavky.

Nyní se může přidat do zkumavky 0,5 μ l RNázy A (nukleázy specifické pro RNA, zatímco DNA zůstává neštěpena, 10 mg/ml). Vzorek jsem promíchal a ponechal na 30 min v inkubátoru při 37 °C. Potom jsem přidal 0,6V isopropanolu, znovu rozmíchal a nechal jsem 1 hodinu precipitovat DNA při laboratorní teplotě. Vzniklý precipitát jsem opláchl v 75% etanolu (což znamená centrifugaci a odstranění isopropanolu, pelety 3 min vysušit v exsikátoru, a přidat ethanol) promíchal, centrifugoval, odstranil ethanol a dosušil v exsikátoru. Nakonec jsem precipitát rozpustil v malém množství vody (např. 30–100 μ l) 10 min při 37 °C nebo přes noc při 4 °C.

2.6 Příprava CTAB buffer (pufru)

K základním laboratorním znalostem jistě patří používání mikropipet s nastavitelným objemem. Obvykle se používá více pipet, přičemž každá má jiný rozsah pro kapacitu a je třeba se udržet mezi minimálním a maximálním objemem. Samotná pipeta se do kontaktu s kapalinami nedostává, jelikož se používají jednorázové špičky, jež se vyměňují po každém použití. Nejprve se na pipetě se špičkou nastaví objem, který je třeba nabrat, a stlačí se píst na vršku do prostřední polohy. Nyní se ponoří špička do vzorku a nabere se spuštěním pístu nahoru. Pro vylití obsahu stačí stisknout píst do spodní polohy.

Extrakční pufr vzniká smícháním 650 μ l pufru A, 650 μ l pufru B, 260 μ l pufru C, 175 μ l 1% PVP (polyvinylpyrrolidon) a 10 μ l proteinázy K (20 mg/ml). Pufry A, B a C mají následující složení:

- | | |
|---------|----------------------|
| pufr A: | - 0,35M sorbitol |
| | - 0,1M TRIS-HCl pH 9 |
| | - 5mM EDTA pH 8 |
| pufr B: | - 2% CTAB |
| | - 0,2M TRIS-HCl pH 9 |
| | - 50mM EDTA pH 8 |
| | - 2M NaCl |
| pufr C: | - 5% roztok SDS |

2.7 Izolace DNA pomocí E.Z.N.A.® DNA/RNA Isolation Kit

Oproti předchozí metodě umožňuje tato metoda současně izolovat DNA i RNA. Podobně jako u předchozí metody izolace DNA jsem musel homogenizovat buňky v tekutém dusíku a přidat pufr pro lýzu (lysis buffer), jenž se nalézá v soupravě pro tuto metodu. Homogenizuje se buď za pomoci rotor-stator homogenizátoru, nebo opakovaným protlačením vzorku úzkou jehlou. Následně se provádí izolace přidáváním roztoků z této komerční soupravy, odstředěním a nanášením vzorku na malou kolonku, která váže nukleové kyseliny. Celý postup a dokumentaci k soupravě/kitu lze nalézt na stránkách výrobce. (Omega Bio-tek, Inc., 2023)

2.8 Kontrola kvality a integrity genomové DNA pomocí gelové elektroforézy

Princip elektroforézy spočívá v tom, že DNA, která je záporně nabitá, se v elektroforéze vlivem elektrického proudu začne posouvat směrem k anodě (+). V závislosti na délce fragmentů DNA se molekuly separují v agarózovém gelu a putují s různou rychlostí, tedy krátké molekuly migrují rychleji než dlouhé. Pokud je genomová DNA intaktní (neporušená degradací nukleáz a podobně), lze ji pozorovat jako kompaktní proužek blízko za startovní jamkou, v takzvané zóně komprese. V případě izolované celkové RNA jsou viditelné výrazné pruhy ribozomálních RNA (rRNA). Neštěpená intaktní eukaryotická genomová DNA by měla být po izolaci ve stavu tak dlouhých fragmentů, že se v konvenční elektroforéze nedokáže rozdělit a jen velmi pomalu putuje zmíněným způsobem směrem k anodě. Porovnat ji lze s proužky velikostního markeru o definovaných délkách a množství. Pokud by genomová DNA byla degradována nukleázami, vznikala by namísto kompresní zóny výrazná šmouha místo pruhů.

2.9 Příprava agarózového gelu

Agarózový (též separační) gel jsem připravoval namícháním 1% roztok agarózy ve 120 ml TAE pufru. Roztok jsem postupně ohříval v mikrovlnné troubě a každých 20–30 s zastavoval m. troubu a opatrně promíchal obsah baňky, aby její obsah nevyvřel z nádoby. Takto jsem pokračoval, dokud nebylo dosaženo kompletního rozpuštění agarózy a nezůstal jen čirý horký roztok. Do něj jsem přidal 0,01% ETBR (12 µl ethidiumbromidu), což je barvivo, jež se váže na nukleové kyseliny, a tím se zvýší jeho fluorescence po ozáření UV světlem. Horký gel jsem pak opatrně nalil do formy s hřebínkem na startovní jamky a ponechal ho vychladnout na laboratorní teplotu v digestoři, dokud gel neztuhl.

2.10 Postup při elektroforéze

Nejprve jsem vložil formu s gelem bez hřebínku do odpojené a vypnuté elektroforézy. Soustavu jsem zalil pufrům 1x TAE tak, aby byl gen ponořený. Do jedné jamky od hřebínku jsem nanesl roztok velikostního markeru a pak vzorky smíchané s nanášecím pufrům (barvou 6x koncentrovanou) v poměru 1 : 5. Následně jsem zaklopil a zapnul elektroforézu (ve správném směru el. pole) a počkal, než se vzorky dostatečně separují. Výsledek jsem mohl vyfotografovat pod UV světlem ve speciálním přístroji s kamerou (transiluminátor s dokumentačním systémem).

2.11 TRF metoda

TRF analýza (ang. Terminal Restriction Fragment analysis) se používá během zkoumání telomer. Obecně pracuje s restrikčními enzymy, které štěpí DNA na konkrétních sekvencích – specifických restrikčních místech. Jestli ale je známa zkoumaná telomerová sekvence, lze využít enzymů, které nebudou štěpit telomerovou DNA tak, aby se na nich nevyskytla cílová restrikční místa, ale štěpil se zbytek DNA na krátké fragmenty (desítky bp). Tím se netelomerová DNA postupně cíleně degraduje a v elektroforéze putuje v oblasti velmi krátkých fragmentů, zatímco telomerová DNA se zachová ve své přirozené délce.

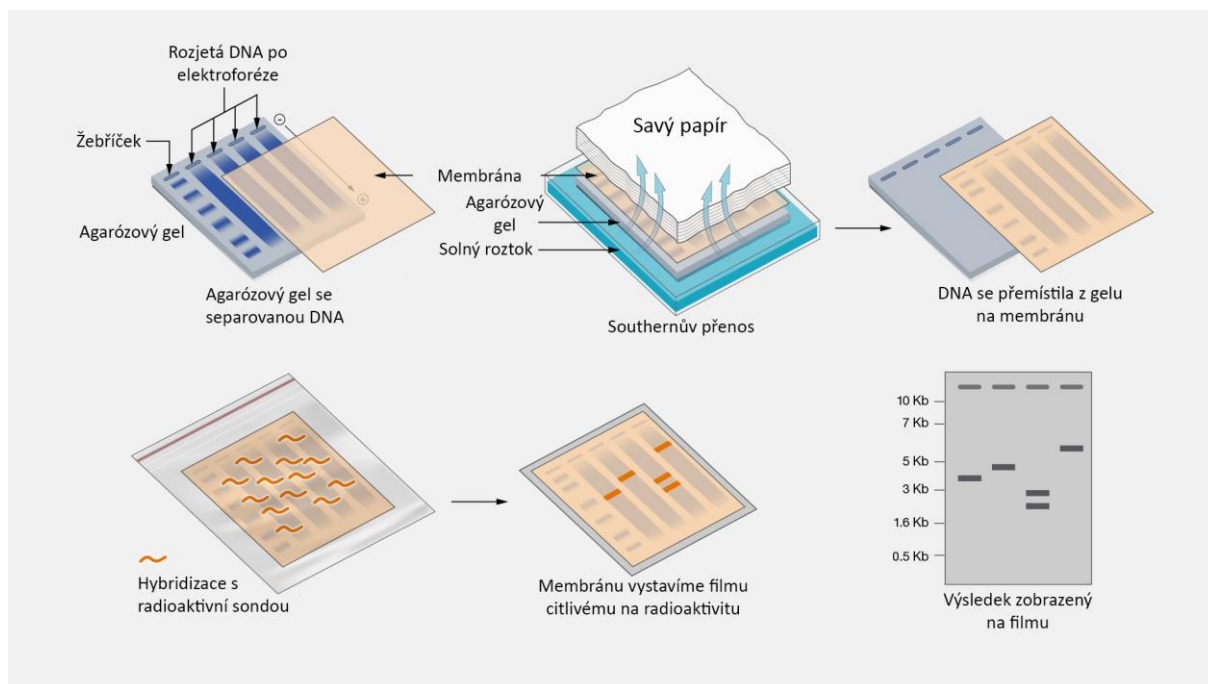
Izolovanou DNA *M. antarctica* jsem štěpil v několika časových intervalech pomocí exonukleázy BAL31. Tento enzym postupně štěpí celou DNA, ale začíná ji štěpit vždy od konců fragmentů. Působení BAL31 může být zastaveno chelatonovým činidlem, který inhibuje tento enzym. S narůstajícím časovým úsekem by mělo být možné pozorovat výrazný posun fragmentů telomerové DNA do kratších délek. Abych odlišil telomerovou DNA od zbytku genomu, rozštěpil jsem vzorky po BAL31 za použití restrikčních enzymů MseI, NcoI a HaeIII.

První gen, MseI, původem z rodu *Micrococcus*, nachází své restrikční místo na sekvenci AATT ve směru 3' do 5' (pokaždé platí i obrácená sekvence v opačném směru). Gen z NcoI pochází z druhu *Nocardia corallina*. Jeho restrikční místo se nachází na sekvenci GGTACC ve směru 3' do 5'. Gen HaeIII z *Haemophilus aegypticus* zase štěpí na úseku CCGG ve směru 3' do 5'.

Všechny tyto enzymy působí na úsecích, jež se nevyskytují ve vytipované telomerové sekvenci TTTTITAGGG. Takto zpracovaná a fragmentovaná DNA se separuje v elektroforéze a přenáší pomocí metody Southernova přenosu na nitrocelulózovou membránu, kterou je možné hybridizovat s radioaktivně značenou sondou a vizualizovat specifický signál odpovídající telomerové DNA.

2.12 Southernův přenos

Tato metoda umožňuje přenést DNA z agarózového gelu na membránu. DNA na membráně se vystaví sondám s radioaktivním izotopem, jež hybridizují na molekule DNA, a tím ji radioaktivně označí. Záření se zobrazí na citlivé vrstvě detekčních fosforescenčních desek, díky čemuž lze poznat místa, kde se sondy připojily k cílové molekule DNA. Grafické znázornění obecného postupu Southernova přenosu najdeme na obrázku 5.

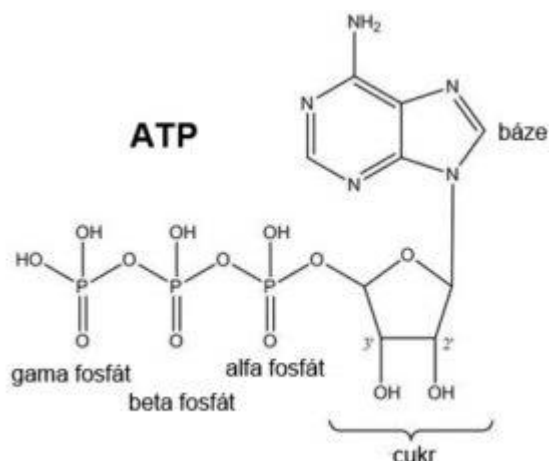


Obrázek 5: Schéma Southernova přenosu. (Bell, 2022, upraveno)

Elektroforeticky separovanou DNA v gelu jsem depurinoval (částečně se tím dále fragmentuje) pomocí 0,25N HCl. Potom jsem krátce opláchl gel destilovanou vodou a denaturoval DNA ponořením do alkalického roztoku hydroxidu sodného. Gel jsem vyjmul a položil na papírový knot, jehož konce jsou ponořené do roztoku NaOH. Na gel jsem umístil čistou membránu, na kterou se DNA z gelu bude přenášet pomocí kapilárního vztlaku NaOH, který je nasáván vrstvou buničité vaty položenou na membránu. Pro tento účel se vyrábí membrány obvykle z nitrocelulózy nebo nylonu. Nad membránu jsem umístil více vrstev savého papíru, buničitou vatu a závaží, aby se systém lehce zatížil a všechny vrstvy k sobě těsně doléhaly. Vlivem kapilárních toků roztok NaOH vytlačí DNA z gelu na membránu.

2.13 Značení oligonukleotidové sondy radioaktivním izotopem ^{32}P

Dalším krokem je radioaktivní značení oligonukleotidových sond, v tomto případě (CCCTAAA)₃. Využije se enzymatické aktivity T4 polynukleotid kinázy (PNK), u níž je fosfát obsahující ^{32}P v pozici gama (γ - ^{32}P), na 5'-hydroxylovou skupinu DNA (viz obrázek 6, kde je ilustrována struktura ATP se třemi fosfátovými skupinami). Enzym je aktivní především na jednořetězcových molekulách nukleové kyseliny nebo na 5' převisech u dvouřetězcové nukleové kyseliny. V principu takto označené sondy hybridizují na komplementárních úsecích denaturované DNA. Radioaktivní rozpad koncového fosfátu zajišťuje signál detekovatelný na fotografický film nebo sensitivní vrstvu detekčních desek.



Obrázek 6: Schéma ATP se třemi fosfátovými skupinami. V této práci se využívalo koncového značí, tedy jen gama fosfát byl nahrazen fosfátem s izotopem ^{32}P . (PerkinElmer, 2023, upraveno)

2.14 Hybridizace membrány s radioaktivně značenou sondou a detekce signálů pomocí Typhoon™ FLA 9500

Hybridizace značených sond jsem dosáhl umístěním membrány do skleněného válce a následným přidáním hybridizačního roztoku se sondou. Válec se točí v tzv. hybridizační pídce, která zajišťuje kontakt membrány s roztokem otáčením válce a také udržuje požadovanou teplotu optimální pro hybridizaci ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$). Druhý den se membrána odmyvá od nenavázané sondy pomocí roztoku 2x SDS (dodecylsírán sodný) a 0,1 % SSC pufru. Takto připravenou membránu jsem nakonec umístil do desek s vrstvou citlivou k ionizujícímu záření, na níž se zobrazí rozmístění označených sond na membráně. Toto rozmístění lze porovnat s fotografií gelové elektroforézy s ETBR v UV světle před Southernovým přenosem.

3 VÝSLEDKY

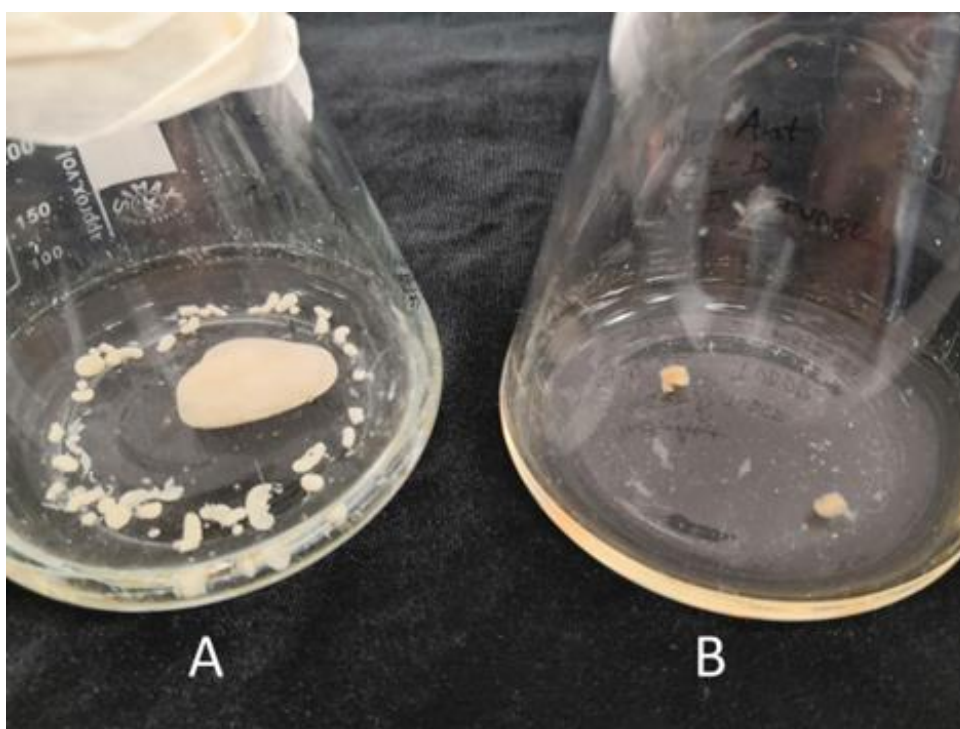
V průběhu celé práce jsem pracoval s houbami *M. antarctica*, které byly kultivovány ve speciálních médiích. *M. antarctica* dokáže růst jak v tekutých, tak na pevných médiích, přičemž nejlépe se rozrostla v médiu PD, jak lze pozorovat na obrázcích 7 až 9. Misky a baňky byly uchovávány ve tmě na třepačce, díky které se obsah baněk vždy promíchával, a za stálé teploty 21 °C. Při kultivaci bylo nutné, abych předešel kontaminaci médií plísněmi, bakteriemi a jinými organismy, což vyžadovalo opatrné zacházení.



Obrázek 7: 13denní *M. antarctica* na pevném médiu PDA. Lze pozorovat větvený růst kolonie do kruhu spolu s typickým bílým zbarvením. Na okrajích není růst tak hustý jako uvnitř kruhu.

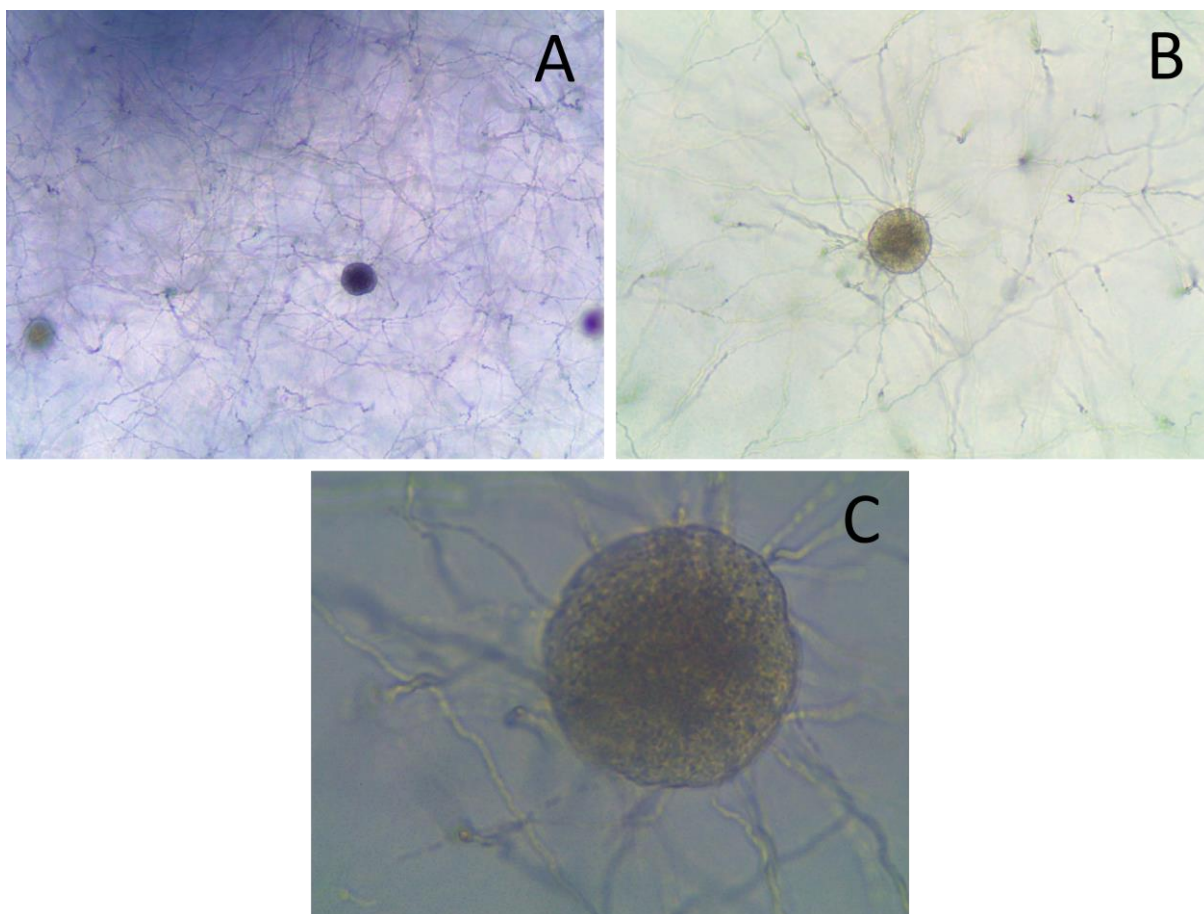


Obrázek 8: 13denní *M. antarctica* v tekutých médiích. **A** – Médium PD (vlevo). Růst většího množství bílých kolonií o různých velikostech. **B** – Médium CZD (vpravo). Zde vyrostla jen jediná malá pozorovatelná kolonie s oranžovým zbarvením. Při srovnání jasně vidíme, že v médiu PD roste *M. antarctica* mnohem lépe než v médiu CZD.

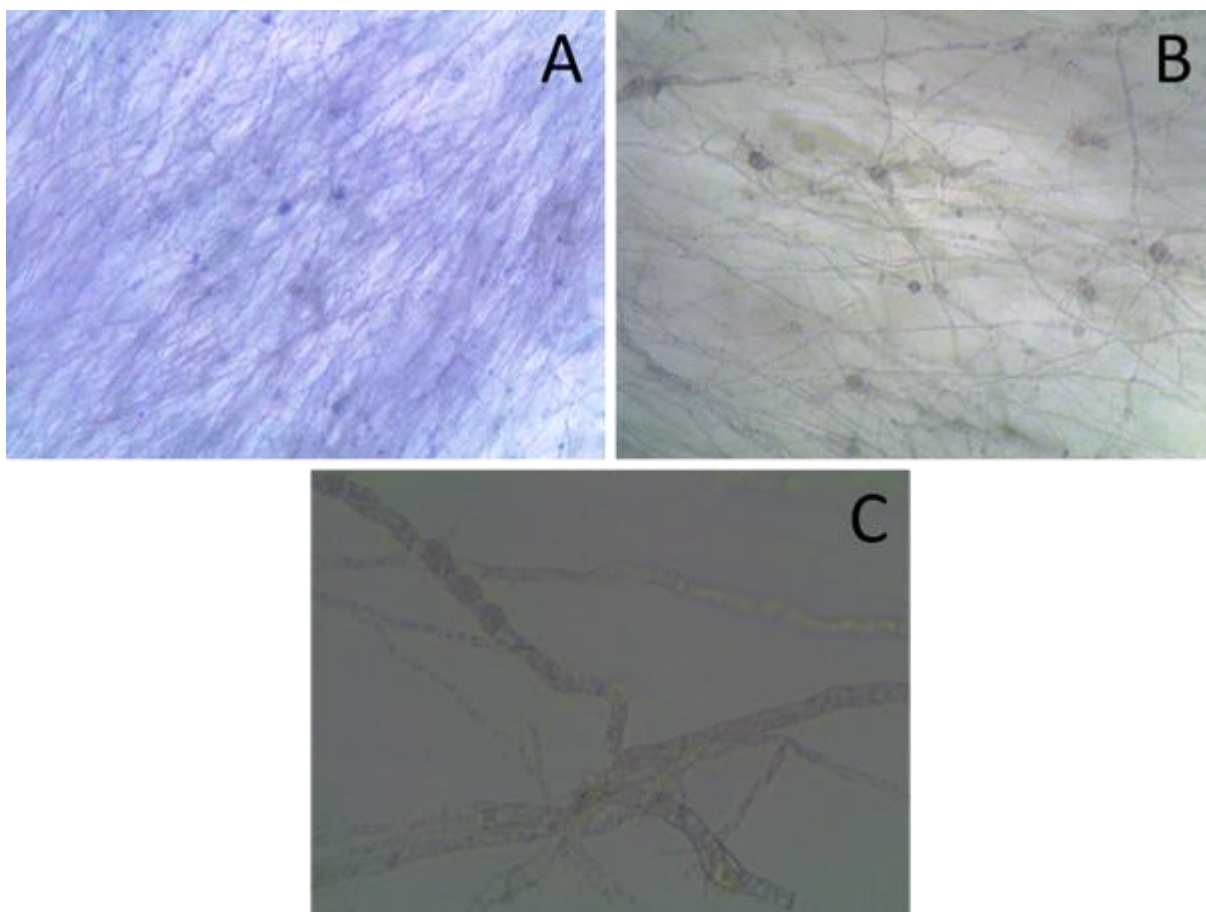


Obrázek 9: 20denní *M. antarctica* v tekutých médiích vyfoceno zblízka. **A** – Médium PD (vlevo). **B** – Médium CZD (vpravo). Kultury se příliš neliší od obrázku 7, jen v médiu CZD se

nachází dvě menší kolonie namísto jedné větší, což přičítám roztřepání původní větší kolonie v době mezi zachycením obou fotografií.



Obrázek 10: *M. antarctica* na pevném médiu CZDA pod mikroskopem. **A** – pětinasobné zvětšení. **B** – desetinásobné zvětšení. **C** – čtyřicetinasobné zvětšení. Na všech fotografiích pozorujeme větvenou strukturu hyf *M. antarctica*. Tmavé „kuličky“ jsou zygospory, které se často tvoří u tohoto rodu v prostředích s nedostatkem živin a špatnými podmínkami, jako to je u média CZDA.

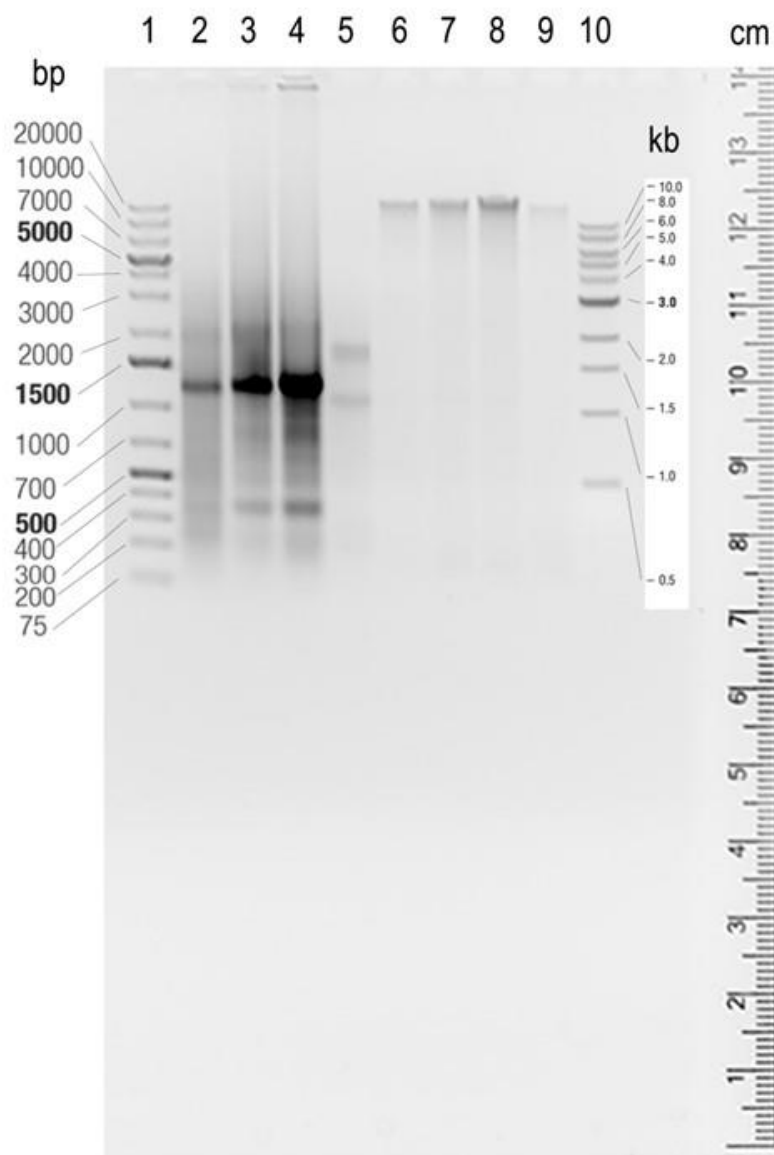


Obrázek 11: *M. antarctica* na pevném médiu PDA pod mikroskopem. **A** – pětínásobné zvětšení. **B** – desetínásobné zvětšení. **C** – čtyřicetínásobné zvětšení. Znovu můžeme vidět, že médium PDA *M. antarctica* prospívá. Ve srovnání s obrázkem 10 je plocha mnohem hustěji zarostlá a zároveň tu nenacházíme zygospory, jak se dalo pozorovat na chudším médiu CZDA.

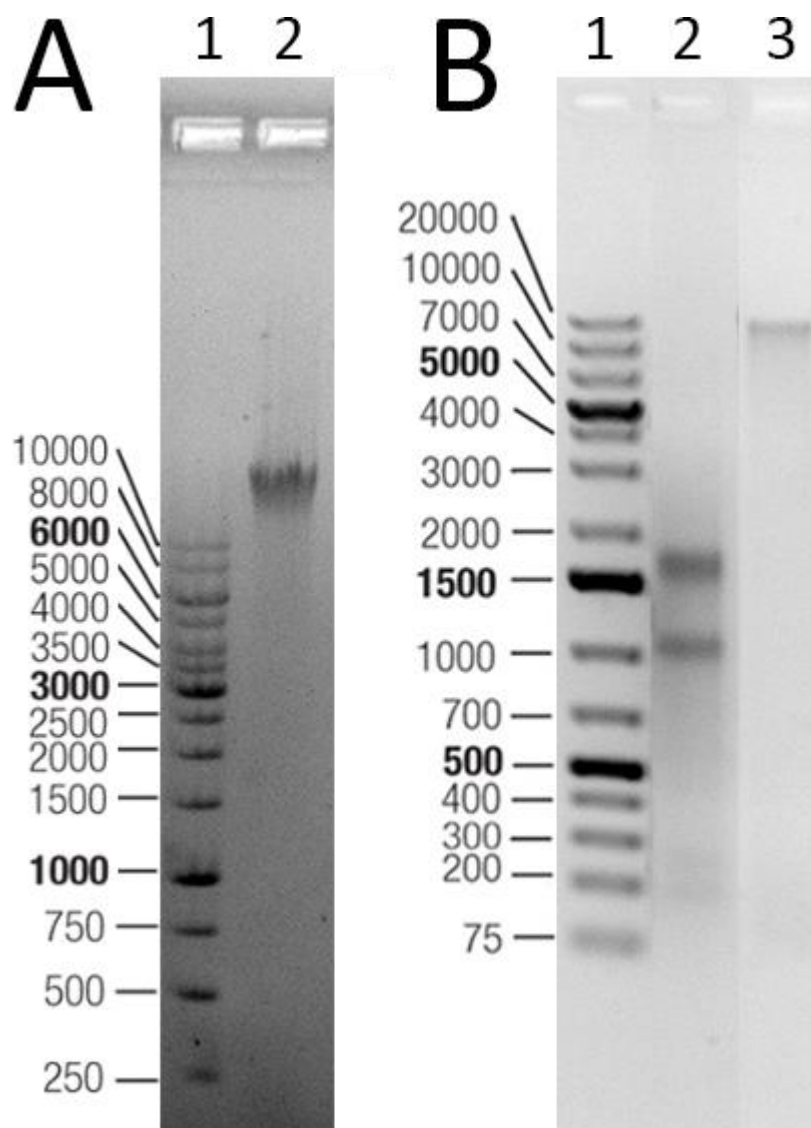
3.1 Optimalizace izolace DNA

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, která z těchto metod pomůže získat nejlepší výsledek, abych mohl tuto metodu používat nadále. Vhodnou metodu jsem vybíral na základě celistvosti produktu separovaného na elektroforéze. Očekával jsem, že méně fragmentovaná DNA by na elektroforéze vytvořila jasně definované oblasti podobné „čárkám“, zatímco produkt z metody, která by vyústila v méně kvalitní výsledek, by se na elektroforéze zobrazil jako dlouhá nejasná „šmouha“.

Pro izolaci nukleových kyselin mně byly dostupné dvě metody – CTAB metoda a E.Z.N.A.® DNA/RNA Isolation Kit. Obě metody byly použity pro zkoumání vzorků *M. antarctica*, s nímž jsem pracoval v průběhu celé práce. Produkt obou postupů byl zobrazen na gelové elektroforéze a výsledné obrazy jsem navzájem porovnal.



Obrázek 12: Kontrola kvality izolované celkové RNA a genomové DNA pomocí gelové elektroforézy. Nukleové kyseliny byly izolovány použitím E.Z.N.A.® DNA/RNA Isolation Kit. Dráhy 1 a 10 obsahují žebříčky 1 - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) a 10–1 kb DNA Ladder (NEB). Startovní jamky jsou na obrázku nahoře, čelo elektroforézy dole. Jejich proužky odpovídají fragmentům s předem známou velikostí. Dráhy 2–5 obsahují celkovou RNA z různých organismů (dráha 5 – *M. antarctica*). Dráhy 6–9 obsahují genomovou DNA z různých organismů, 9 z *M. antarctica*. Z obrázku vyplývá, že celková RNA a genomová DNA byla izolována v dostatečném množství a kvalitě. DNA zůstávala v kompresní zóně nad 10 kb.



Obrázek 13: Srovnání integrity izolované DNA. **A** – Elektroforéza DNA *M. antarctica* izolované pomocí CTAB metody. 1 – Dráha žebříčku GeneRuler 1kb DNA Ladder s rozsahem 250–10000 bp. 2 – Dráha zkoumané DNA. Při srovnání s žebříčkem lze vidět, že DNA je delší než 10 tisíc páru bází. **B** – Elektroforéza DNA *M. antarctica* izolované pomocí E.Z.N.A.® DNA/RNA Isolation Kit. 1 – Dráha žebříčku GeneRuler 1kb DNA Plus Ladder s rozsahem 75–20000 bp. 2 – Dráha RNA *M. antarctica*. 3 – Dráha DNA *M. antarctica*. RNA se rozdělila do dvou výrazných „čárek“ a kolem nich vidíme „šmouhu“. DNA je také poměrně fragmentovaná, jelikož vidíme jednu výraznější oblast, ale od ní pokračuje směrem dolů dlouhá postupně mizející „šmouha“.

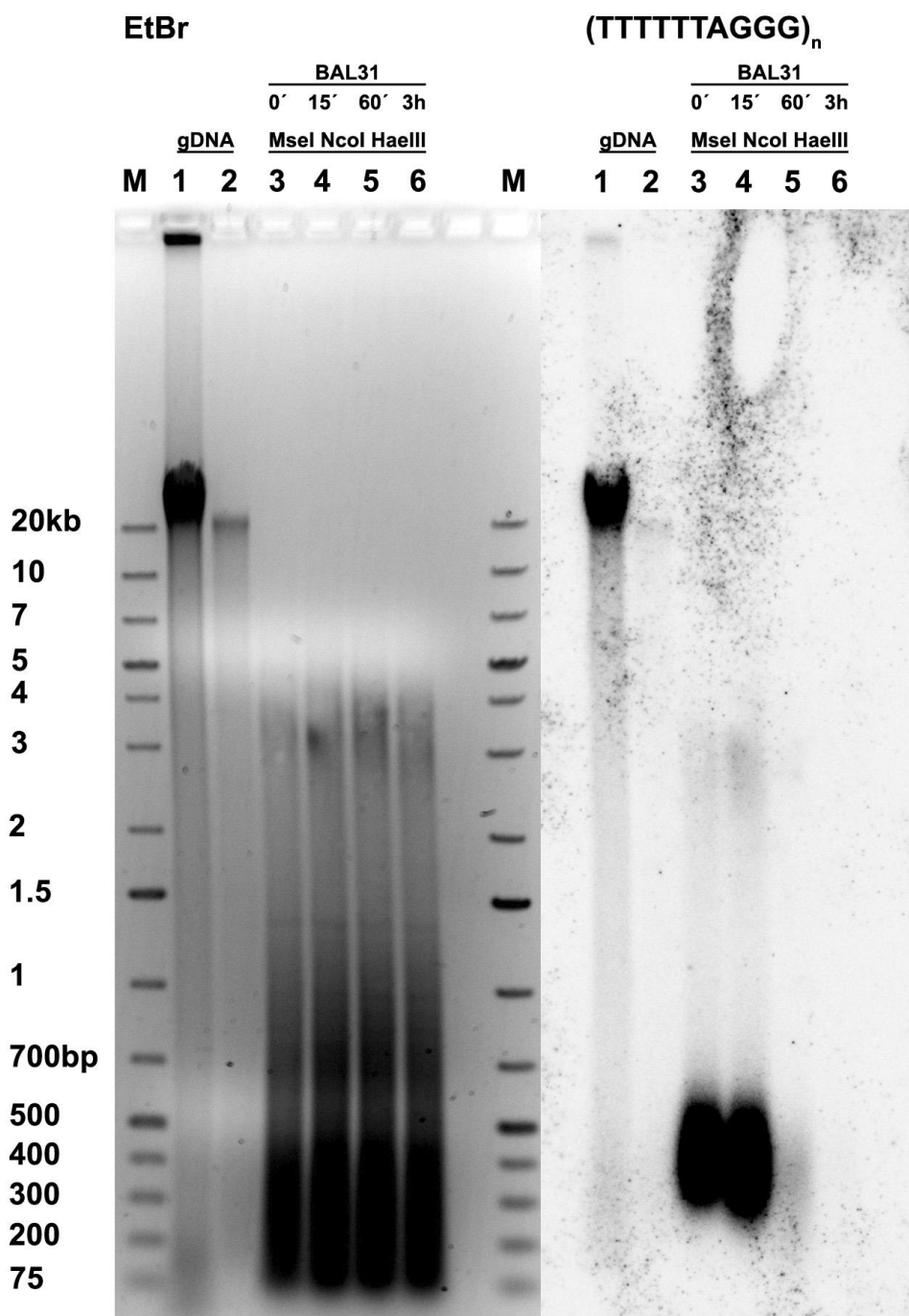
Z výsledků v obrázku 13 je zřejmé, že CTAB metoda dokáže získat produkt vyšší kvality, jelikož její DNA byla méně fragmentovaná a lišila se vyšší integritou ve srovnání s produkty druhé metody. Avšak nesmíme zapomenout, že toto srovnání metod slouží jen pro účely této práce s *M. antarctica*. Je možné, že méně úspěšná metoda v tomto pokusu by fungovala lépe při jiných aplikacích, a tudíž by nebylo správné odvozovat, že by jedna metoda byla obecně „lepší“ či „horší“ než ta druhá.

3.2 Nález telomerové sekvence pomocí TRF a Southernova přenosu

Posledním úkolem bylo použití Southernova přenosu pro důkaz vytipované sekvence TTTTTTAGGG jako telomerové sekvence pomocí označených sond, které by se nasadily právě na hledanou sekvenci. Při této metodě jsem produkt rozložil pomocí TRF a přenesl na membránu, kde jsem denaturovanou DNA vystavil radioaktivně označeným sondám, které hybridizují na korespondujících úsecích DNA.

Izolovanou DNA jsem nejprve rozdělil do čtyř vzorků a štěpil jsem je využitím BAL31 exonukleázy, ale pokaždé na jinou dobu a s výjimkou jednoho kontrolního vzorku. První nebyl štěpen BAL31 a byl tak ponechán, druhý se štěpil po dobu 15 minut, než byl BAL31 inhibován. Třetí byl tak ponechán na 60 minut a čtvrtý na 180 minut. Následně jsem štěpil všechny čtyři enzymy pomocí MseI, NcoI a HaeIII.

Takto fragmentovanou DNA jsem pomocí Southernova blottingu přenesl na membránu, kterou jsem vystavil roztoku s označenými telomerovými sondami, jež se hybridizovaly na cílových úsecích v telomerách. Umístění radioaktivních sond jsem zmapoval pomocí filmu, který je citlivý na radioaktivní záření, a vzniklý obraz jsem srovnal s fotografií elektroforézy rozštěpené DNA před přenosem na membránu.



Obrázek 14: Srovnání DNA *M. antarctica* rozložené pomocí TRF. **Vlevo** – Fotografie separované DNA zbarvené pomocí ETBR. Zobrazuje se veškerá DNA. Dráhy M – Velikostní marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) s rozpětím 75–20000 bp. Dráhy 1 a 2 – Původní izolovaná genomová DNA *M. antarctica*. Dráha 2 obsahuje zředěný vzorek. Lze pozorovat, že většina DNA zůstala při délce vyšší než 20 kb. Dráha 3–6 – vzorky DNA, které byly rozštěpen pomocí TRF (enzymy MseI, NcoI a HaeIII). Vzorek na dráze 3 nebyl předem štěpen s BAL31. Vzorek na dráze 4 byl štěpen BAL31 15 min. Vzorek na dráze 5 byl štěpen BAL31 60 min. Vzorek na dráze 6 byl štěpen BAL31 3 hodiny. Štěpená DNA zbarvena pomocí ETBR vypadá na všech drahách podobně. Fragmenty dosahují od zhruba 75 do 4000 bp, přičemž nejvyšší koncentrace se nachází od 75 bp do 500 bp. **Vpravo** – Stejně vzorky separované DNA, ale zobrazeno je pouze záření z radioaktivně označených sond TTTTTTAGGG, takže jsou viditelné pouze

fragmenty s hybridizovanými telomerovými sondami. Dráha 1 – Podobný výsledek jako při zobrazení pomocí ETBR. Dráha 3 – Hybridizace sond proběhla na fragmentech o velikostech od 300 do 500 bp. Dráha 4 – Podobný výsledek jako na dráze 3, ale fragmenty jsou vlivem BAL31 trochu kratší, některé jen 200 bp dlouhé. Na všech ostatních drahách nedokážeme pozorovat téměř žádný signál ze sond, což vypovídá o tom, že BAL31 už rozštěpil fragmenty obsahující telomery natolik, že už jejich sondy nedokážeme pozorovat. Jen na dráze 5 lze vidět stopové množství v zóně kolem 300 bp. Tento obrázek slouží jako důkaz o nalezení telomerové sekvence TTTTTTAGGG u druhu *M. antarctica*.

Na obrázku 14 nakonec vidíme, jak hybridizovaly telomerové sondy na separovanou DNA *M. antarctica*. Vlivem štěpení konců enzymem BAL31 zmizely telomerové fragmenty do jedné hodiny štěpení. BAL31 typicky štěpí DNA od konců, kde se právě telomery nacházejí. Vzhledem k tomu je zřejmé, že štěpit se vždy budou nejprve fragmenty telomer.

Dále můžeme odhadnout i délky telomer na koncích chromozomů. Z výsledků elektroforézy vyplývá, že většina telomerových fragmentů, které nebyly štěpeny enzymem BAL31, dosahuje délek 300 až 500 bp. Tento rozhas můžu použít jako hrubý odhad délek telomer *M. antarctica*.

Tím se potvrzuje kandidátní sekvence TTTTTTAGGG jako telomerová pro houbu *M. antarctica*, tedy bylo dosaženo stěžejního cíle této práce.

4 ZÁVĚR

V úvodu jsem si vytyčil cíl optimalizovat metody pro laboratorní práci. Proto byly srovnány dvě možné metody pro izolaci DNA u zkoumaného druhu, z nichž CTAB metoda vzešla jako nejvhodnější díky kvalitnějšímu a více neporušenému produktu.

Avšak za významnější výsledek považuji zobrazení telomer a potvrzení jejich sekvence použitím telomerových sond. Zde jsem pomocí vybraných enzymů rozštěpil izolovanou DNA *M. antarctica* v rámci TRF. Takto zpracovanou DNA jsem přesunul podle Southernova přenosu na membránu, na níž jsem označil fragmenty pomocí telomerových sond obsahující radioaktivní izotopy ^{32}P . Hybridizaci těchto sond na telomerách jsem potvrdil díky zobrazení záření zachyceného na deskách citlivých na radiaci.

Tato práce navazuje na poznatky a data jiných prací, a tím rozšiřuje znalosti o druhu *M. antarctica*. Získané výsledky mohou být využity i pro další výzkum, např. evoluční genetiky či samotných telomer a chromozomů tohoto druhu, a mohou být aplikovány v molekulární biologii.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- BELL, Daphne W., 2022. Southern Blot. *Genome.gov* [online] [vid. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Southern-Blot>
- BLACKBURN, E. H. a J. G. GALL, 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of Molecular Biology* [online]. **120**(1), 33–53. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(78)90294-2
- BUBENÍK, Michal, 2020. *Vysokokapacitní screening telomerových sekvencí ve veřejně dostupných databázích sekvenčních dat nové generace* [online]. B.m. [vid. 2023-02-23]. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/zmjd9/?lang=cs;cop=3217670;id=307206>
- DAVIES, Jennifer L., Musangu NGELEKA a Gary A. WOBESER, 2010. Systemic infection with *Mortierella wolffii* following abortion in a cow. *The Canadian Veterinary Journal*. **51**(12), 1391–1393. ISSN 0008-5286.
- FAN, Hueng-Chuen, Fung-Wei CHANG, Jeng-Dau TSAI, Kao-Min LIN, Chuan-Mu CHEN, Shinn-Zong LIN, Ching-Ann LIU a Horng-Jyh HARN, 2021. Telomeres and Cancer. *Life* [online]. **11**(12), 1405. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life11121405
- OMEGA BIO-TEK, INC., 2023. *E.Z.N.A.® DNA/RNA Isolation Kit | Omega Bio-tek* [online] [vid. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://www.omegabiotek.com/product/e-z-n-a-dna-rna-kit/>
- PASRIJA, Ritu a Mohammad NAIME, 2022. Resolving the equation between mucormycosis and COVID-19 disease. *Molecular Biology Reports* [online]. **49**(4), 3349–3356. ISSN 0301-4851. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-021-07085-3
- PERKINELMER, 2023. Which Formulation Should I Choose | Application Support Knowledgebase | Lab Products & Services. *PerkinElmer* [online] [vid. 2023-02-25]. Dostupné z: <https://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/radiometric/which-formulation.html>
- PESKA, Vratislav a Sònia GARCIA, 2020. Origin, Diversity, and Evolution of Telomere Sequences in Plants. *Frontiers in Plant Science* [online]. **11**, 117. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2020.00117
- PEŠKA, Vratislav, 2017. Výlet na konec genomu, 1: Jak se kopírují telomery. *Živa: časopis pro popularizaci biologie*. **65** (103)(2), 53–57. ISSN 0044-4812.
- SANG, Yue, Long JIN, Rui ZHU, Xing-Ye YU, Shuang HU, Bao-Teng WANG, Hong-Hua RUAN, Feng-Jie JIN a Hyung-Gwan LEE, 2022. Phosphorus-Solubilizing Capacity of *Mortierella* Species Isolated from Rhizosphere Soil of a Poplar Plantation. *Microorganisms* [online]. **10**(12), 2361. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10122361
- SPATAFORA, Joseph W., Ying CHANG, Gerald L. BENNY, Katy LAZARUS, Matthew E. SMITH, Mary L. BERBEE, Gregory BONITO, Nicolas CORRADI, Igor GRIGORIEV, Andrii GRYGANSKYI, Timothy Y. JAMES, Kerry O'DONNELL, Robert W. ROBERSON, Thomas N. TAYLOR, Jessie UEHLING, Rytas VILGALYS, Merlin M. WHITE a Jason E. STAJICH, 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale

data. *Mycologia* [online]. **108**(5), 1028–1046. ISSN 0027-5514. Dostupné z: doi:10.3852/16-042

TELAGATHOTI, Anusha, Maraike PROBST, Iuliia KHOMENKO, Franco BIASIOLI a Ursula PEINTNER, 2021. High-Throughput Volatilome Fingerprint Using PTR–ToF–MS Shows Species-Specific Patterns in *Mortierella* and Closely Related Genera. *Journal of Fungi* [online]. **7**(1), 66. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof7010066

VANDEPOL, Natalie, Julian LIBER, Alessandro DESIRÒ, Hyunsoo NA, Megan KENNEDY, Kerrie BARRY, Igor V GRIGORIEV, Andrew N MILLER, Kerry O'DONNELL, Jason E. STAJICH a Gregory BONITO, 2020. Resolving the *Mortierellaceae* phylogeny through synthesis of multi-gene phylogenetics and phylogenomics. *Fungal diversity* [online]. **104**(1), 267–289. ISSN 1560-2745. Dostupné z: doi:10.1007/s13225-020-00455-5

WAGNER, L., B. STIELOW, K. HOFFMANN, T. PETKOVITS, T. PAPP, C. VÁGVÖLGYI, G.S. DE HOOG, G. VERKLEY a K. VOIGT, 2013. A comprehensive molecular phylogeny of the *Mortierellales* (*Mortierellomycotina*) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* [online]. **30**, 77–93. ISSN 0031-5850. Dostupné z: doi:10.3767/003158513X666268

WEBSTER, John a Roland WEBER, 2007. *Introduction to fungi*. 3rd edition. Cambridge: Cambridge University Press, s. 1–3, 165–167, 197–200. ISBN 978-0-521-01483-0.

6 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Fylogenetický strom skupiny zygomycetních hub.	7
Obrázek 2: Životní cyklus zygomycetních hub.	8
Obrázek 3: Vizualizace telomerové DNA na chromozomech rostliny kladivníku nádherného (<i>Cestrum elegans</i> , <i>Solanaceae</i>).	9
Obrázek 4: Kolonie <i>M. antarctica</i> na misce s kultivačním médiem YPD.	11
Obrázek 5: Schéma Southernova přenosu.	16
Obrázek 6: Schéma ATP se třemi fosfátovými skupinami.	17
Obrázek 7: 13denní <i>M. antarctica</i> na pevném médiu PDA.	18
Obrázek 8: 13denní <i>M. antarctica</i> v tekutých médiích.	19
Obrázek 9: 20denní <i>M. antarctica</i> v tekutých médiích vyfoceno zblízka.	19
Obrázek 10: <i>M. antarctica</i> na pevném médiu CZDA pod mikroskopem.	20
Obrázek 11: <i>M. antarctica</i> na pevném médiu PDA pod mikroskopem.	21
Obrázek 12: Kontrola kvality izolované celkové RNA a genomové DNA pomocí gelové elektroforézy.	22
Obrázek 13: Srovnání integrity izolované DNA.	23
Obrázek 14: Srovnání DNA <i>M. antarctica</i> rozložené pomocí TRF.	25