



FUNKČNÍ VZOREK

**Technické řešení: Postup přípravy nukleové kyseliny
v kvalitě vhodné pro stanovení přítomnosti a kvantity
entomopatogenních bakterií**

**RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.
Mgr. Petra Straková, Ph.D.**

5110
2025

Funkční vzorek

5110/2025

Technické řešení: Postup přípravy nukleové kyseliny v kvalitě vhodné pro stanovení přítomnosti a kvantitativní množství entomopatogenních bakterií

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

Mgr. Petra Straková, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

2025

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QL24010336 Nové poznatky pro snižování rizik chovu hmyzu pro lidskou spotřebu z pohledu ekosystému, chovatele i konzumenta.

ISBN 978-80-7672-072-5

OBSAH

1.	Úvod	3
2.	Cíl metodiky funkčního vzorku	3
3.	Popis funkčního vzorku	3
4.	Seznam použití literatury	7
5.	Srovnání novosti postupů	7
6.	Popis uplatnění funkčního vzorku	7
7.	Ekonomické aspekty	8
8.	Dedikace	8
9.	Příloha 1 (SOP)	9
10.	Příloha 2 (SOP)	12

1. Úvod

Zatímco viry hmyzu obvykle vykazují vysokou míru hostitelské specifity, entomopatogenní bakterie mají širší spektrum hostitelů. K nákaze dojde obvykle orální cestou. Mezi entomopatogenní druhy bakterií se řadí zejména zástupci rodů *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Photorhabdus*, *Proteus* a *Xenorhabdus*. Tyto bakterie napadají zejména larvy hmyzu. Do chovu se mohou dostat kontaminovaným krmivem, podestýlkou a mechanickými vektory. Vnímavost hmyzu k onemocnění zvyšuje stres v podobě environmentálních faktorů, zejména potom špatné hygieny chovu. Významným intracelulárním parazitem bezobratlých včetně hmyzu je *Rickettsiella grylli*.

Jedlý a krmný hmyz může být také přenašečem genů pro rezistenci k antibiotikům, obdobně jsou tyto geny detekovány i u dalších druhů hmyzu, zejména škůdců a parazitů, ale také u včely medonosné.

Pro diagnostiku entomopatogenních bakterií i genů pro antibiotickou rezistenci je metodou volby využití polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje rychlou detekci cílových genů nebo jejich částí v genomu virů.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem metodiky funkčního vzorku je technické řešení izolace bakteriální deoxyribonukleové (DNA) kyseliny z celého hmyzu v případě podezření z nákazy nebo potřeby izolovat DNA z bakteriálních kolonií získaných kultivací homogenátu hmyzu. DNA je získána v kvalitě vhodné pro provedení PCR i celogenomovou sekvenací.

Tento protokol je používán jako standardní operační postup (SOP, viz Přílohy č. 1 a 2) pro izolaci bakteriální DNA v Laboratoři molekulární epidemiologie virových nákaz VÚVeL.

3. Popis funkčního vzorku

Sběr a skladování vzorků

Pro izolaci nukleových kyselin z hmyzu lze využít živé i uhynulé jedince. Hmyz lze před zpracováním usmrtit zamrazením; nicméně transportovat je potřeba hmyz nejlépe živý ve vhodném obalu, v případě hmyzu uhynulého je potřeba použít prodyšný papírový obal, aby se předešlo rozvoji plísní. Pro uchování nezpracovaných vzorků je nutné použít hlubokomrazicí box (-80 °C) z důvodů možné degradace virové RNA.

Pro kultivační záchyt bakterií se používá ideálně hmyz čerstvý, nezamražený.

Příprava homogenátu hmyzu

Pro homogenizaci se používá kuličkový homogenizátor umožňující homogenizaci v 50 ml zkumavkách se šroubovacím uzávěrem (např. *Omni Bead Ruptor Elite s rotorem pro 50 ml zkumavky*). Jako rozbíjecí částice jsou vhodné keramické kuličky o průměru 2,8 mm ve zkumavkách dodávaných výrobcem (např. *Hard Tissue Homogenizing Mix 2.8 mm Ceramic, 50 ml Tubes, Omni, kat.č. 19-6508-3*).

Homogenizace se provádí ve fyziologickém roztoku (např. *DPBS, Biosera, kat. č. LM-S2041/500*). Na 5 g hmotnosti hmyzu se přidává 30 ml DPBS. Hmotnost hmyzu závisí na druhu a vývojovém stádiu. Orientační údaje o hmotnosti nejběžnějších druhů jedlého hmyzu jsou uvedeny v Tabulce 1.

Vlastní homogenizace probíhá dle návodu k daného homogenizátoru. V případě *Omni Elite* jsou použity následující parametry: rychlost 5 m/s, celkem 3 homogenizační cykly, délka trvání cyklu 30 s, pauza mezi cykly 20s.

Připravený homogenát lze rozdělit do alikvotů a dlouhodobě skladovat v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

Pro kultivační záchyt bakterií je ideální použít homogenát čerstvý.

Tabulka 1: Přibližná hmotnost jedlého hmyzu

Hmyz	Hmotnost
Saranče stěhovavá - dospělec	1,5-2 g
Cvrček domácí - dospělec	1-1,5 g
Potemník (moučný, stájový) - larva	0,1 g

Získaný homogenát hmyzu se použije pro extrakci DNA a/nebo pro kultivační záchyt bakterií.

Pro rychlé provedení diagnostické PCR lze připravit také hrubý lyzát bakteriální kultury.

Pro extrakci DNA z izolovaných bakteriálních kolonií se použije komerční souprava *QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, kat.č. 51304)*.

Extrakce celkové DNA z homogenátu hmyzu

- nejprve je potřeba připravit **promývací roztok** (0,1 M citronan trisodný dihydrát, 10 % ethanol) smícháním 100 ml ultračisté vody (např. *Water, BPC Grade, Sigma-Aldrich*,

kat. č. W3513), 2,941 g dihydrátu citronanu trisodného, (např. *Citric Acid Trisodium Salt Dihydrate, Amresco, Reagent Grade*) a 11,1 ml absolutního etanolu (např. *ethanol, min. 99,8 %, pro UV spektroskopii, bezvodý, P-Lab, kat. č. E03501*). Roztok se sterilizuje filtrací přes 0,22 µm filtr a uchovává při +4 °C;

- k 1 ml TRI REAGENT® přidat 100 µl homogenátu a promíchat na třepačce;
- inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, aby došlo k oddělení nukleoproteinového komplexu (pokud vzorek obsahuje hodně tuku, vytvoří se na hladině vrstva, kterou je nutno odstranit, v takovém případě čirý supernatant přepipetovat do novémikrozkumavky);
- přidat 0,1 ml bromochloropropanu (*1-bromo-1-chloropropan, např. Sigma-Aldrich, kat. č. B9673*); promíchat po dobu 15 s na třepačce a nechat inkubovat 2 – 15 minut při pokojové teplotě;
- odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při +4 °C; dojde k rozdělení směsi do tří barevně odlišených vrstev; DNA se nachází ve spodní červené (tj. organické fázi); objemově se jedná zhruba o 60 % původně použitého objemu TRI REAGENT®;
- je nutné zcela odstranit horní bezbarvou fázi, protože její zbytky mají negativní vliv na kvalitu DNA;
- k červené organické fázi (na ni se nachází bílá vrstvička proteinů, pokud je plánováno izolovat i celkový protein, tato vrstva se nesmí odstranit) přidat 300 µl absolutního etanolu (např. *ethanol, min. 99,8 %, pro UV spektroskopii, bezvodý, P-Lab kat. č. E03501*), promíchat překlopením a inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě;
- odstředit po dobu 5 minut při 2000 g a teplotě +4 °C;
- odstranit supernatant, který lze použít v případě požadavku na izolaci proteinů;
- k peletě přidat 1 ml promývacího roztoku; inkubovat 30 minut při pokojové teplotě za občasného opatrného promíchání překlopením; odstředit po dobu 5 minut při 2000 g a teplotě +4 °C; a odstranit supernatant. **Tento krok opakovat celkem 3x;**
- přidat 1,5 ml 75 % etanolu (např. *PCR Ethanol 75 %, Top-Bio, kat.č. P044*), promíchat a inkubovat 15 minut při pokojové teplotě; v tomto kroku lze izolaci DNA přerušit a vzorky skladovat při +4 °C;
- odstředit po dobu 5 minut při 8 000 g a teplotě +4 °C;

- opatrně odstranit supernatant překlopením, zbylé kapky otřít ze stěn zkumavky pomocí sterilního bavlněného tamponu (*např. Odběrový tampon bavlněný, plastová tyčinka, sterilní, Dispolab, kat. č. 1673*) a vzorek sušit vzduchem 5 minut;
- pelet rozpustit v 200 μ l TE pufru (*např. Tris-EDTA buffer solution, BioUltra, for molecular biology, pH 8, Fluka, kat. č. 93283-100ML*) a DNA uchovávat při -20 °C.

Příprava lyzátu buněk z bakteriální kolonie nebo suspenze,

- pelet z 1 ml bakteriální kultury nebo jedna setřená izolovaná kolonie se resuspenduje v 1 ml fyziologického roztoku a zcentrifuguje při 12 000 g po dobu 5 minut;
- pelet se resuspenduje v 600 μ l sterilní destilované vody a inkubuje při 100 °C po dobu 15 minut;
- lyzát se uchovává v mrazicím boxu při -20 °C. Lze použít přímo do PCR reakce.

Extrakce a purifikace DNA z izolovaných bakteriálních kolonií pomocí QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen):

- všechny kroky včetně odstředění probíhají při pokojové teplotě;
- v případě použití bakteriálních kolonií z agarové plotny: resuspendovat množství maximálně jedné inokulační kličky v 180 μ l ATL pufru;
- v případě použití bakteriální suspenze: 1 ml bakteriální kultury odstředít při 5 000 g po dobu 5 minut, přidat ATL pufr do celkového objemu 180 μ l;
- přidat 20 μ l proteinázy K, promíchat na třepačce a inkubovat při teplotě 56 °C, dokud nedojde k úplné lyzi buněk (to trvá 1-3 hodiny): Během inkubace občas promíchat;
- přidat 200 μ l AL pufru, promíchat na třepačce po dobu 15 minut;
- inkubovat při 70 °C po dobu 10 minut, krátce stočit;
- přidat 200 μ l absolutního etanolu, promíchat na třepačce po dobu 15 vteřin a krátce stočit;
- směs přepipetovat do QIAamp Mini Spin kolonky umístění ve sběrné zkumavce a odstředít po dobu 1 minuty při 6000 g;
- přemístit kolonku do nové sběrné zkumavky, přidat 500 μ l AW2 pufru, odstředít po dobu 1 minuty při 6000 g;

- přemístit kolonku do nové sběrné zkumavky přidat 500 µl AW1 pufru, odstředit po dobu 3 minut při plné rychlosti 20 000 g;
- vylít tekutinu ze sběrné zkumavky, kolonku do ní znovu umístit a odstředit po dobu 1 minuty při plné rychlosti 20 000 g;
- umístit kolonku do nové 1,5 ml mikrozkušavky, přidat 200 µl AE pufru a inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě, odstředit po dobu 1 minuty při 6000 g. Pro vyšší výtěžek lze tento krok zopakovat;
- DNA uchovávat při -20 °C.

4. Seznam použité literatury

Milanović, V., Osimani, A., Pasquini, M., Aquilanti, L., Garofalo, C., Taccari, M., Cardinali, F., Riolo, P., Clementi, F. Getting insight into the prevalence of antibiotic resistance genes in specimens of marketed edible insects.

Prodělalová, J., Moutelíková, R., Straková, P., Čukanová, E. Infekční onemocnění hmyzu chovaného pro lidskou spotřebu. *Veterinářství* 2024;75(12), 684-688.

5. Srovnání novosti postupů

Popsané postupy izolace DNA z homogenátu hmyzu nebo z bakteriálních kultur jsou běžně používány pro následnou diagnostiku nebo sekvenční postupy. Nové je však téma detekce bakteriálních patogenů a genů pro antibiotickou rezistenci u jedlého hmyzu. Výsledná DNA získaná uvedenými postupy byla použita k detekci zástupců grampozitivních bakterií rodu *Lactococcus* a k detekci genů pro antibiotickou rezistenci. Získané PCR produkty byly úspěšně sekvenovány, DNA získaná z bakteriálních kolonií byla taktéž úspěšně použita k celogenomovému sekvenování.

6. Popis uplatnění funkčního vzorku

Technické řešení popsané ve funkčním vzorku může nalézt uplatnění v laboratořích zaměřených na detekci chorob hmyzu.

Postup je v současnosti používán jako standardní operační postup (SOP) pro zpracování vzorků hmyzu a izolaci bakteriální DNA v Laboratoři molekulární epidemiologie virových nákaz VÚVeL.

7. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty funkčního vzorku nelze v danou chvíli hodnotit vzhledem k novosti tématu. Na postup extrakce nukleových kyselin z hmyzu nutně navazuje diagnostická PCR, která by mohla být využita chovateli v případě problémů v chovu hmyzu způsobených virovou infekcí.

8. Dedikace

Funkční vzorek je dedikován projektu QL24010336 „Nové poznatky pro snižování rizik chovu hmyzu pro lidskou spotřebu z pohledu ekosystému, chovatele i konzumenta“ v rámci programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství ZEMĚ II.

Příloha č. 1

Standardní operační postup – izolace celkové DNA z homogenátu jedlého a krmného hmyzu

- nejprve je potřeba připravit **promývací roztok** (0,1 M citronan trisodný dihydrát, 10 % ethanol) smícháním 100 ml ultračisté vody (*např. Water, BPC Grade, Sigma-Aldrich, kat. č. W3513*), 2,941 g dihydrátu citronanu trisodného, (*např. Citric Acid Trisodium Salt Dihydrate, Amresco, Reagent Grade*) a 11,1 ml absolutního etanolu (*např. ethanol, min. 99,8 %, pro UV spektroskopii, bezvodý, kat. č. E03501*). Roztok se sterilizuje filtrací přes 0,22 µm filtr a uchovává při +4 °C;
- k 1 ml TRI REAGENT® přidat 100 µl homogenátu a promíchat na třepačce;
- inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, aby došlo k oddělení nukleoproteinového komplexu (pokud vzorek obsahuje hodně tuku, vytvoří se na hladině vrstva, kterou je nutno odstranit, v takovém případě čirý supernatant přepipetovat do nové mikrozkušavky);
- přidat 0,1 ml bromochloropropanu (*1-bromo-1-chloropropan, např. Sigma-Aldrich, kat. č. B9673*); promíchat po dobu 15 s na třepačce a nechat inkubovat 2 – 15 minut při pokojové teplotě;
- odstředit při 12 000 g po dobu 15 minut při +4 °C; dojde k rozdělení směsi do tří barevně odlišených vrstev; DNA se nachází ve spodní červené (tj. organické fázi); objemově se jedná zhruba o 60 % původně použitého objemu TRI REAGENT®;
- je nutné zcela odstranit horní bezbarvou fázi, protože její zbytky mají negativní vliv na kvalitu DNA;
- k červené organické fázi (na ni se nachází bílá vrstvička proteinů, pokud je plánováno izolovat i celkový protein, tato vrstva se nesmí odstranit) přidat 300 µl absolutního etanolu (*např. ethanol, min. 99,8 %, pro UV spektroskopii, bezvodý, kat. č. E03501*), promíchat překlopením a inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě;
- odstředit po dobu 5 minut při 2000 g a teplotě +4 °C;
- odstranit supernatant, který lze použít v případě požadavku na izolaci proteinů;
- k peletu přidat 1 ml promývacího roztoku; inkubovat 30 minut při pokojové teplotě za občasného opatrného promíchání překlopením; odstředit po dobu 5 minut při 2000 g a teplotě +4 °C; a odstranit supernatant. **Tento krok opakovat celkem 3x;**

- přidat 1,5 ml 75 % etanolu (*např. PCR Ethanol 75 %, Top-Bio, kat.č. P044*), promíchat a inkubovat 15 minut při pokojové teplotě; v tomto kroku lze izolaci DNA přerušit a vzorky skladovat při +4 °C;
- odstředit po dobu 5 minut při 8 000 g a teplotě +4 °C;
- opatrně odstranit supernatant překlopením, zbylé kapky otřít ze stěn zkumavky pomocí sterilního bavlněného tamponu (*např. Odběrový tampon bavlněný, plastová tyčinka, sterilní, Dispolab, kat. č. 1673*) a vzorek sušit vzduchem 5 minut;
- pelet rozpustit v 200 µl TE pufru (*např. Tris-EDTA buffer solution, BioUltra, for molecular biology, pH 8, Fluka, kat. č. 93283-100ML*) a DNA uchovávat při -20 °C.

Příloha č. 2

Standardní operační postup: Extrakce a purifikace DNA z izolovaných bakteriálních kolonií pomocí QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen):

- *podrobný návod lze stáhnout na adrese: www.qiagen.com/KB-0329*
- *při otevření nové soupravy je potřeba do pufrů AW1 a AW2 přidat etanol dle návodu;*
- *pokud je v pufrch ATL nebo AL sraženina, je potřeba ji rozpustit při 56 °C;*
- *všechny kroky včetně odstředění probíhají při pokojové teplotě, proto se mražené nebo chlazené vzorky musí nechat temperovat na pokojovou teplotu;*
- *je potřeba připravit termobloky temperované na 56 °C a 70 °C;*

- *v případě použití bakteriálních kolonií z agarové plotny: resuspendovat množství maximálně jedné inokulační kličky v 180 µl ATL pufru;*
- *v případě použití bakteriální suspenze: 1 ml bakteriální kultury odstředit při 5 000 g po dobu 5 minut, přidat ATL pufr do celkového objemu 180 µl;*
- *přidat 20 µl proteinázy K, promíchat na třepačce a inkubovat při teplotě 56 °C, dokud nedojde k úplné lyzi buněk (to trvá 1-3 hodiny): Během inkubace občas promíchat;*
- *přidat 200 µl AL pufru, promíchat na třepačce po dobu 15 minut;*
- *inkubovat při 70 °C po dobu 10 minut, krátce stočit;*
- *přidat 200 µl absolutního etanolu (např. ethanol, min. 99,8 %, pro UV spektroskopii, bezvodý, kat. č. E03501), promíchat na třepačce po dobu 15 vteřin a krátce stočit;*
- *směs přepipetovat do QIAamp Mini Spin kolonky umístění ve sběrné zkumavce a odstředit po dobu 1 minuty při 6000 g;*
- *přemístit kolonku do nové sběrné zkumavky, přidat 500 µl AW2 pufru, odstředit po dobu 1 minuty při 6000 g;*
- *přemístit kolonku do nové sběrné zkumavky přidat 500 µl AW1 pufru, odstředit po dobu 3 minut při plné rychlosti 20 000 g;*
- *vylít tekutinu ze sběrné zkumavky, kolonku do ní znovu umístit a odstředit po dobu 1 minuty při plné rychlosti 20 000 g;*
- *umístit kolonku do nové 1,5 ml mikrozukavky, přidat 200 µl AE pufru a inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě, odstředit po dobu 1 minuty při 6000 g. Pro vyšší výtěžek lze tento krok zopakovat;*
- *DNA uchovávat při -20 °C.*

VU^{Ve}L 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz