



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**POUŽITÍ VYSOKOROZLIŠOVACÍ ANALÝZY KŘIVEK
TÁNÍ KE STUDIU BAKTÉRIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ**

USE OF HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS FOR THE STUDY OF LACTIC ACID BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Monika Knápková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1382/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Monika Knápková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Použití vysokorozlišovací analýzy křivek tání ke studiu bakterií mléčného kvašení

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše, izolace DNA bakterií mléčného kvašení, RT-PCR a HRM analýza.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Monika Knápková
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V současné době roste zájem o užívání probiotických výrobků a na trhu je jich celá řada. S rostoucím zájmem je kladen i větší důraz na identifikaci deklarovaných probiotických mikroorganismů. Přesná identifikace mikrobiálního složení je často nelehkým úkolem a je zapotřebí pokročilejších metod, zejména z oblasti molekulární diagnostiky.

Diplomová práce byla zaměřena na ověření přítomnosti deklarovaných probiotických mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy GS Laktobacily Forte 21, Biopron 9 Premium a Linex® Forte. DNA byla z komplexních matric izolována fenolovou extrakcí, komerčním kitem a magnetickými nosiči F79/L3-PLL v kvalitě vhodné pro PCR. Následně byla izolovaná DNA amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase s využitím rodově a druhově specifických primerů. Specifický PCR produkt byl podroben agarózové gelové elektroforéze, přičemž druhová identifikace nebyla vždy v souladu s údaji deklarovanými výrobcí.

Další část práce se zabývala polymerázovou řetězovou reakcí s vysokorozlišovací analýzou křivek tání za účelem rozlišení bakteriálních kmenů patřících do skupiny *Lactobacillus* a za účelem identifikace probiotických mikroorganismů přítomných ve směsi v probiotických doplňcích stravy. Bylo testováno osm sad primerů (V1F-HRM a V1R-HRM, CHAU-V3F a CHAU-V3R, CHAU-V6F a CHAU-V6R, LAC2 a LAC4, LAC1 a LAC2, P1V1 a P2V1, poxcDNAFw a poxPromRVC, poxcDNAFw a poxPromRVT). Jako nejvhodnější pro rozlišení bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus* byly vyhodnoceny tři dvojice primerů (V1F-HRM a V1R-HRM, poxcDNAFw a poxPromRVC, poxcDNAFw a poxPromRVT).

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotika, izolace DNA, magnetické částice, polymerázová řetězová reakce (PCR), PCR v reálném čase, vysokorozlišovací analýza křivek tání, *Lactobacillus*

ABSTRAKT

Currently, there is a growing interest in the use of probiotic products, and there are many of them in the market. With the growing interest, greater emphasis is placed on the identification of declared probiotic microorganisms. Precise identification of microbial composition is often a difficult task and it requires more advanced methods especially in the field of molecular diagnostics.

The diploma thesis was focused on the verification of the presence of declared probiotic microorganisms in probiotic food supplements GS Laktobacily Forte 21, Biopron 9 Premium and Linex® Forte. DNA was isolated from the complex matrices by phenol extraction, commercial kit and magnetic carriers F79/L3-PLL in the quality suitable for PCR. Subsequently, the isolated DNA was amplified by real-time polymerase chain reaction using genus- and species-specific primers. The specific PCR product was subjected to agarose gel electrophoresis, whereas species identification was not always in compliance with the data declared by producers.

The next part of the thesis was focused on polymerase chain reaction with high-resolution melting analysis to distinguish bacterial strains belonging to the *Lactobacillus* group and to identify probiotic microorganisms present in the complex matrices of the probiotic food supplements. Eight primer sets were tested (V1F-HRM a V1R-HRM, CHAU-V3F a CHAU-V3R, CHAU-V6F a CHAU-V6R, LAC2 a LAC4, LAC1 a LAC2, P1V1 a P2V1, poxcDNAFw a poxPromRVC, poxcDNAFw a poxPromRVT). Three primer pairs (V1F-HRM a V1R-HRM, poxcDNAFw a poxPromRVC, poxcDNAFw a poxPromRVT) were evaluated as the most suitable for distinguishing *Lactobacillus* bacterial strains.

KEYWORDS

Probiotics, DNA isolation, magnetic particles, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, high-resolution melting analysis, *Lactobacillus*

KNÁPKOVÁ, M. *Použití vysokorozlišovací analýzy křivek tání ke studiu bakterií mléčného kvašení*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 85 s. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Mgr. Václavu Brázdovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Konečné za její čas a poskytnuté rady při tvorbě této práce. Velký dík patří také mé rodině a příteli za neustálou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Probiotika	10
2.1.1	Probiotické mikroorganismy	10
2.1.2	Probiotické vlastnosti mikroorganismů	11
2.1.3	Účinky probiotik na zdraví člověka	12
2.1.4	Principy působení probiotik	13
2.1.5	Hodnocení bezpečnosti probiotik	14
2.1.6	Probiotické doplňky stravy	14
2.2	Magnetické částice	14
2.2.1	Struktura magnetických částic	15
2.2.2	Jádro magnetických částic	15
2.2.3	Povrchová úprava magnetických částic	16
2.2.4	Charakteristika magnetických nanočástic F79/L3 – PLL	16
2.2.5	Využití magnetických částic v biotechnologii	17
2.3	Identifikace mikrobiálního složení	18
2.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	18
2.4.1	Komponenty PCR směsi	19
2.4.2	Průběh polymerázové řetězové reakce	20
2.5	PCR v reálném čase (real-time PCR)	21
2.5.1	Princip kvantifikace produktu real-time PCR	22
2.6	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)	23
3	CÍL PRÁCE	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Materiál	27
4.1.1	Probiotické výrobky	27
4.1.2	Bakteriální kultury	28
4.1.3	Chemikálie	28
4.1.4	Roztoky	29
4.1.5	Magnetické nosiče	29
4.1.6	Přístroje a pomůcky	29

4.1.7	Komponenty pro PCR	30
4.2	Metody.....	31
4.2.1	Příprava růstového média	31
4.2.2	Oživování a uchovávání bakteriálních kultur	31
4.2.3	Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk	32
4.2.4	Izolace DNA z hrubých lyzátů.....	32
4.2.5	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	33
4.2.6	Amplifikace DNA	33
4.2.7	Gelová elektroforéza	36
5	VÝSLEDKY.....	37
5.1	Izolace bakteriální DNA	37
5.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA.....	37
5.2.1	Přepočtení stanovené koncentrace izolované DNA	38
5.3	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase a detekce specifického produktu PCR agarózovou gelovou elektroforézou.....	39
5.3.1	Prokázání přítomnosti DNA specifické pro doménu <i>Bacteria</i>	40
5.3.2	Prokázání přítomnosti DNA rodu <i>Lactobacillus</i>	43
5.3.3	Prokázání přítomnosti DNA rodu <i>Bifidobacterium</i>	44
5.3.4	Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus casei</i>	46
5.3.5	Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus plantarum</i>	47
5.3.6	Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	48
5.3.7	Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus paracasei</i>	50
5.3.8	Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus acidophilus</i>	51
5.3.9	Shrnutí výsledků ověření přítomnosti deklarovaných bakteriálních rodů a druhů v testovaných probiotických výrobcích.....	52
5.4	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)	53
5.4.1	PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM	53
5.4.2	PCR-HRM s využitím primerů CHAU-V3F a CHAU-V3R	56
5.4.3	PCR-HRM s využitím primerů CHAU-V6F a CHAU-V6R	58
5.4.4	PCR-HRM s využitím primerů LAC2 a LAC4	60
5.4.5	PCR-HRM s využitím primerů LAC1 a LAC2	62

5.4.6	PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1	64
5.4.7	PCR-HRM s využitím primerů poxDNAFw a poxPromRVC	66
5.4.8	PCR-HRM s využitím primerů poxDNAFw a poxPromRVT	68
5.4.9	Shrnutí výsledků PCR-HRM analýzy	70
6	DISKUZE	72
6.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	72
6.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase a detekce specifického produktu PCR agarózovou gelovou elektroforézou	72
6.2.1	Detekce PCR produktu specifického pro doménu <i>Bacteria</i>	73
6.2.2	Detekce PCR produktu specifického pro rod <i>Bifidobacterium</i>	73
6.2.3	Detekce PCR produktu specifického pro rod <i>Lactobacillus</i> a pro bakteriální druhy spadající do tohoto rodu	73
6.3	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)	75
7	ZÁVĚR	77
8	POUŽITÁ LITERATURA	78
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	84
10	SEZNAM PŘÍLOH	85

1 ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou heterogenní skupinou grampozitivních mikroorganismů, které jsou schopny fermentovat různé typy živin za vzniku kyseliny mléčné. Díky jejich pozitivnímu vlivu na zdraví hostitele se řadí mezi mikroorganismy (MO) s probiotickými vlastnostmi. BMK přispívají k udržení homeostázy organismu, rovnováhy střevní mikroflóry a také zvyšují odolnost organismu vůči gastrointestinálním patogenům. Probiotické bakterie mléčného kvašení jsou využívány již celou řadu let v potravinářském průmyslu pro produkci fermentovaných mléčných výrobků. V současné době je průmyslová výroba zaměřena také na produkci nejrůznějších probiotických doplňků stravy, nemléčných probiotických výrobků a dalších fermentovaných potravin a nápojů.

Zájem o užívání probiotických výrobků roste celosvětově a je kladen stále větší důraz na identifikaci a kvantifikaci deklarovaných probiotických mikroorganismů. Přesná identifikace mikrobiálního složení je často nelehkým úkolem, neboť fenotypové vlastnosti BMK jsou velmi podobné a tradiční kultivační metody obvykle nejsou pro tyto účely dostačující. Z tohoto důvodu je zapotřebí pokročilejších metod, zejména z oblasti molekulární diagnostiky.

Jednou z nejvyužívanějších a v poslední době nejvíce se rozvíjejících metod je polymerázová řetězová reakce (PCR), která je založena na *in vitro* amplifikaci cílových DNA úseků. Její rychlejší, přesnější a citlivější variantou je PCR v reálném čase (real-time PCR), která umožňuje kvantifikaci vybrané nukleotidové sekvence přímo v průběhu reakce díky využití fluorescenčních barviv vázajících se na amplifikované úseky DNA.

Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) je velmi rychlá a citlivá metoda, která je založena na detekci jedno- i vícenukleotidových záměn v DNA. Vysokého rozlišení je dosaženo díky použití přístrojů s přesnou kontrolou teplotního gradientu a díky použití fluorescenčních barviv, které se inkorporují během PCR reakce do struktury DNA. Ve spojení s PCR má tato metoda velký potenciál při identifikaci a analýze mikrobiálního složení nejen v potravinových doplňcích stravy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Střevní prostředí jedince, zejména tlusté střevo, obsahuje 300 až 500 různých druhů bakterií a tento ekosystém interaguje se zdravím hostitele (např. přispívá k ochraně organismu vůči patogenům, zánětlivým střevním onemocněním, rakovině tlustého střeva a dalším). Některé střevní bakterie jsou považovány za škodlivé, jiné za přínosné [1]. Mezi hlavní zdraví prospěšné bakterie se řadí skupina bakterií mléčného kvašení, do které patří zejména rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Tyto dva bakteriální rody nezahrnují žádné významné patogenní druhy, jsou bezpečně užívány již celou řadu let a jsou považovány za GRAS (generally recognized as safe), tedy obecně uznávané za bezpečné. Jsou také hlavními obyvateli lidského střeva. Bakterie mléčného kvašení se řadí do skupiny probiotických mikroorganismů [2].

Probiotika jsou přípravky nebo potraviny obsahující živé mikroorganismy, které jsou považovány za bezpečné pro lidské použití [3]. Pokud jsou podávána v odpovídajícím množství, mají pro hostitele zdravotní přínos. Přispívají k udržení rovnováhy střevní mikroflóry, podporují imunitní systém, snižují krevní tlak a hladinu cholesterolu a napomáhají lepšímu využití živin [1; 2]. Dále bylo zjištěno, že zmírňují intoleranci laktózy, potlačují průjem a snižují symptomy dráždivého střeva [4].

2.1.1 Probiotické mikroorganismy

Mezi probiotické mikroorganismy se řadí zejména různé druhy bakterií. Nejčastěji používanými jsou bakterie mléčného kvašení, které se běžně vyskytují ve střevním traktu. V posledních letech je pozornost věnována i jiným MO, které by mohly být využity jako potenciální probiotika, např. kvasinky *Saccharomyces*, bakterie rodu *Bacillus* nebo bakterie *Escherichia coli*, které nedisponují mléčným kvašením. Obě tyto skupiny mají různé mechanismy účinku, jiný metabolismus a různou citlivost na antibiotika [2; 5].

2.1.1.1 Probiotické bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou známy převážně díky jejich roli v potravinářském průmyslu. Jsou heterogenní skupinou mikroorganismů, které jsou schopny fermentace různých typů živin za vzniku kyseliny mléčné [6]. Jedná se tedy o poměrně jednoduchý metabolismus uhlíku a energie, kdy je zdroj cukru převáděn převážně na kyselinu mléčnou. To vede k okyselení potravinářské suroviny, což je hlavním parametrem při uchovávání potravin. BMK dále přispívají také chuti výrobku [7; 8].

Mezi BMK patří převážně grampozitivní, anaerobní, nesporulující bakterie, které jsou tolerantní vůči kyselinám. Z biochemického hlediska lze BMK rozdělit na heterofermentativní a homofermentativní. Druhá skupina produkuje primárně kyselinu mléčnou, kdežto první skupina produkuje i další vedlejší produkty, jako oxid uhličitý, ethanol, kyselinu mravenčí a kyselinu octovou. Přirozeně se BMK mimo střevní trakt vyskytují například v ovoci a zelenině, ve kterých může volně docházet ke kvasným procesům [6].

Mezi probiotické bakterie mléčného kvašení se řadí rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Enterococcus*. V Tabulce 1 jsou uvedeni někteří známí zástupci běžně používaných probiotických mikroorganismů [2; 5].

Tabulka 1: Probiotické mikroorganismy [2; 5; 6]

Rod	Druh
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> ,
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Ent. faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. mutans</i> ,
Probiotické MO neprodukující kyselinu mléčnou	<i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i>

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou fakultativně anaerobní, grampozitivní, nesporulující tyčinky nebo koky a jsou převážně lidského původu. Existuje mnoho druhů laktobacilů, které jsou běžně dostupné v potravinářských výrobcích nebo ve farmakologických přípravcích.

Bifidobakterie jsou, stejně jako laktobacily, producenti kyseliny mléčné. Jsou striktně anaerobní, grampozitivní a jsou taktéž převážně lidského původu. Vytváří nepravidelné nesporulující tyčinky. Podávány jsou v potravinách převážně v kombinaci s jinými MO [9; 10].

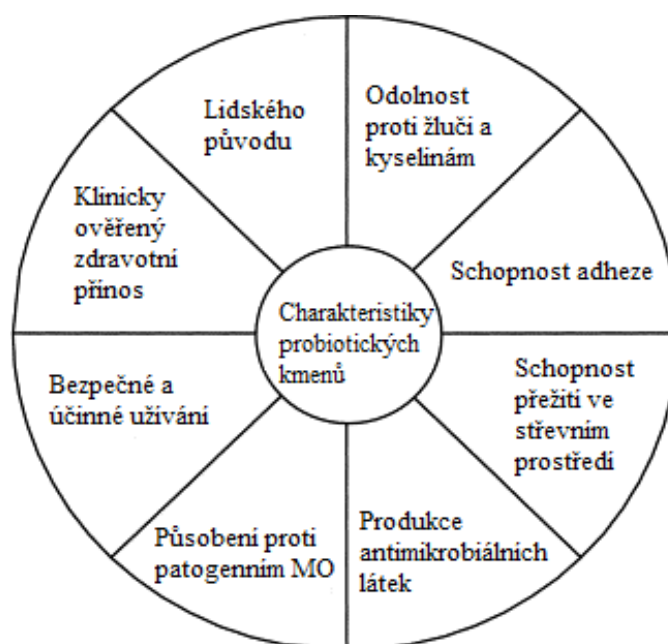
Rod *Enterococcus* je taktéž lidského původu a lze jej využít jako probiotika v lidské stravě. Tvoří grampozitivní koky vyskytující se v párech nebo v krátkých řetězcích [11].

Bakterie rodu *Streptococcus* mají sférický nebo ovoidní tvar. Netvoří endospory, jsou nepohyblivé, grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie a vyskytují se po dvou nebo v řetězcích rozmanité délky. Některé druhy streptokoků jsou vysoce patogenní [10].

2.1.2 Probiotické vlastnosti mikroorganismů

Skupina MO, které se řadí mezi probiotika, je rozsáhlá a neustále se rozšiřuje. Aby však mohl být daný mikroorganismus zařazen do skupiny probiotik, musí splňovat určitá kritéria.

MO musí mít příznivý dopad na hostitele, neměl by být patogenní, toxický ani virulentní. Ideálně by měl být lidského původu a geneticky stabilní. V případě orálního podání musí mikroorganismus projít bez poškození trávicím traktem, a tudíž musí být odolný vůči žluči a žaludečním kyselinám. Důležitá je také schopnost adheze, kolonizace střevního prostředí a produkce antimikrobiálních látek [12]. Probiotické bakterie nekolonizují střevo natrvalo, ale jen po dobu přijímání probiotického výrobku [13]. Probiotické kmeny nesmí přenášet geny pro rezistenci k antibiotikům. Probiotikum musí být stabilní a životaschopné po celou dobu trvanlivosti produktu. V neposlední řadě je důležité také snadné podávání probiotika [9; 12; 14]. Zmíněné charakteristiky jsou přehledně shrnuty na Obrázku 1.



Obrázek 1: Vlastnosti probiotických kmenů. Upraveno dle [14].

2.1.3 Účinky probiotik na zdraví člověka

Cílem užívání probiotik je změnit složení střevní mikroflóry, a to z potenciálně škodlivého na složení, které bude pro hostitele přínosné. Příkladem může být zvýšení množství prospěšných bifidobakterií a laktobacilů, a naopak snížení množství koliformních bakterií a klostridií [5].

Objevuje se stále více důkazů, které přispívají ve prospěch tvrzení o příznivých účincích probiotik. Zdravotní účinky jsou specifické pro každý bakteriální kmen. Některé z nich jsou již dobře zdokumentované a potvrzené, jiné vyžadují dodatečné studie [15].

Mezi klinické příznaky, které mohou být léčeny nebo mají potenciál v léčbě probiotiky, patří akutní průjemová onemocnění, průjmy spojené s léčbou antibiotiky, zánětlivá onemocnění střev, syndrom dráždivého tračníku, alergie, onemocnění jater, rakovina, intolerance laktózy a další. V Tabulce 2 jsou uvedeny příklady klinických účinků některých probiotických kmenů [12; 15].

Tabulka 2: Příklady klinických účinků některých probiotických kmenů. Upraveno dle [14].

Probiotický kmen	Klinický účinek pro člověka
<i>Lactobacillus casei</i>	Modulace střevní mikroflóry, pozitivní účinek na rakovinu děložního čípku.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Snížení počtu průjmů u dětí spojených s léčbou antibiotiky, zmírnění příznaků atopické dermatitidy u dětí, léčba a prevence rotaviru a akutních průjmů u dětí, modulace imunitní odpovědi.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prevence průjmu spojeného s léčbou antibiotiky, prevence průjmu u kriticky nemocných pacientů.
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Prevence průjmu u cestujících, léčba virových průjmů včetně rotavirového, modulace střevní mikroflóry, zmírnění příznaků atopické dermatitidy u dětí, zlepšení zácpy, modulace imunitní odpovědi.

2.1.4 Principy působení probiotik

Mechanismy účinků probiotik jsou různé a liší se v závislosti na bakteriálním kmenu a místu působení [15].

Důležitou součástí ochranné bariéry střev je střevní mikroflóra [5]. Aby měla probiotika příznivý účinek na zdraví hostitele, musí být probiotický mikroorganismus schopný adherovat na střevní povrch a následně kolonizovat trávící trakt. Adherentní kmeny přetrvávají ve střevním prostředí déle, díky čemuž mají vyšší pravděpodobnost imunomodulačního účinku ve srovnání s kmeny neadherentními. Adheze umožňuje kontakt se střevní lymfoidní tkání, která zajišťuje regulaci imunitní odpovědi [14]. Adheze probiotických kmenů na střevní epitel může také mimo jiné zabránit adhezi patogenních bakterií blokováním adhezních míst [10].

Mikroorganismy přítomné v trávícím traktu zlepšují dostupnost a stravitelnost některých živin. Bakterie mléčného kvašení uvolňují do střevního prostředí různé vitamíny a enzymy, což zlepšuje trávení potravy. Vyprodukovaná kyselina mléčná snižuje pH prostředí a přispívá tak k inhibici patogenních kmenů. Některé bakteriální kmeny (např. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*) přítomné ve fermentovaných mléčných výrobcích mohou zmírňovat intoleranci laktózy prostřednictvím enzymu laktázy, který dodávají do trávícího traktu. Tento enzym degraduje vzniklou laktózu, čímž dojde ke zmírnění příznaků laktóзовé intolerance [12].

Proti patogenním bakteriím působí probiotika produkcí antimikrobiálních látek. Příkladem může být produkce bakteriocinů, avšak bakteriociny inhibují pouze blízké příbuzné bakteriální druhy. V současnosti je však více pozornosti věnováno sekundárním metabolitům, které vykazují širší inhibiční spektrum. Příkladem takových metabolitů může být peroxid vodíku, kyselina octová a kyselina mléčná [14].

V západním světě narůstá výskyt atopických onemocnění (např. atopická dermatitida, alergie na potraviny). Hygienická hypotéza spojuje tento nárůst se sníženým počtem infekcí v raném věku života. To je zapříčiněno očkovaním, konzumací téměř sterilních potravin a hygienickými postupy v důsledku kterých je omezena expozice člověka mikroorganismům. V tomto kontextu

poskytují probiotika bezpečnou alternativní mikrobiální stimulaci, která je důležitá pro správný vývoj imunitního systému [5; 15].

2.1.5 Hodnocení bezpečnosti probiotik

Aby mohla být probiotika součástí potravinových produktů, je nejprve nutné posoudit jejich bezpečnost [12].

Pro vyhodnocování bezpečnosti probiotik využívaných v potravinářství neexistuje jednotný standard pro celý svět. Například v USA musí mít mikroorganismus použitelný pro lidskou výživu status GRAS vydávaný úřadem Food and Drug Administration (FDA). Pro Evropu byl úřadem European Food Safety Authority (EFSA) zpracován koncept Qualified Presumption of Safety (QPS, volně přeloženo jako „Kvalifikovaný odhad bezpečnosti“), který shrnuje principy uplatňované při posuzování probiotických kmenů zaváděných do potravinového řetězce. Systém QPS je v porovnání se statutem GRAS flexibilnější a zahrnuje více kritérií, jako např. antibiotickou rezistenci, faktory virulence a další [13; 16].

2.1.6 Probiotické doplňky stravy

V současnosti je v ČR registrováno více jak 100 druhů doplňků stravy obsahující probiotika [13].

Doplňky stravy jsou definovány v souladu s ustanovením § 2 písm. i) zákona č. 110/97 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, v aktuálním znění (dále jen zákon o potravinách) „doplňkem stravy je potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích“ [17].

Mezi nejčastěji užívané formy probiotických doplňků stravy patří kapsle, tobolky, žvýkácí tablety a dražé. Naopak velmi málo využívané jsou suspenze, roztoky a práškové formy probiotik. Obsah mikroorganismů je obvykle vyjadřován jako 10^n v jedné tobolce/kapsli/denní dávce. Deklarované množství organismů se pohybuje v rozpětí řádů 10^7 až 10^{10} . Nejčastěji zastoupenými MO v probiotických doplňcích stravy jsou *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *B. longum*, *L. plantarum*, *L. lactis* [13].

2.2 Magnetické částice

Magnetické částice si v posledních letech získaly značnou pozornost. Jejich magnetické vlastnosti jsou využívány v celé řadě medicínských a biotechnologických aplikací [18]. Představují jeden z nejčastěji používaných materiálů v separačních metodách, např. při imobilizaci enzymů, proteinů, DNA [19] a mají obrovský potenciál při cílené distribuci léčiv, magnetické hypertermii a magnetické rezonanci [20].

Povrch magnetických částic lze funkcionalizovat, díky čemuž jsou schopny specificky nebo nespecificky interagovat s jinými látkami, které jsou předmětem zájmu. Takto vzniklé systémy umožňují separaci a purifikaci sloučenin a biopolymerů z roztoku působením vnějšího magnetického pole. Izolace a purifikace magnetickými nosiči je jednoduchá a rychlá [21].

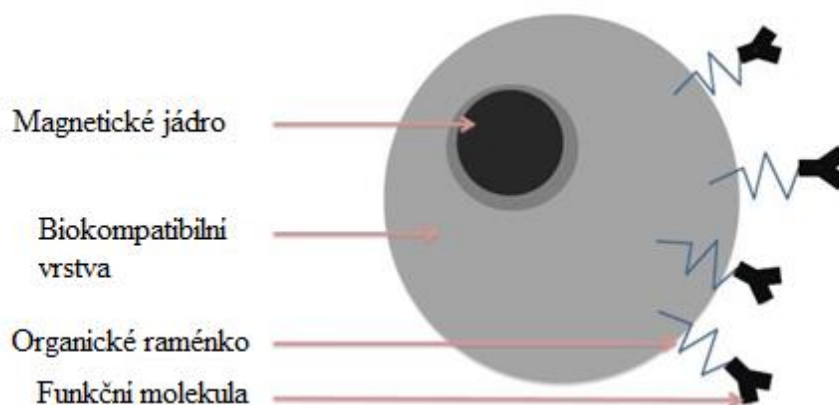
Složení, velikost a morfologie magnetických nosičů jsou vlastnosti, které ovlivňují jejich výsledné chování a lze je přizpůsobit konkrétní aplikaci [22].

2.2.1 Struktura magnetických částic

Typickou strukturou magnetického nosiče je „jádro-skořápka“ [21]. Anorganické jádro zajišťuje magnetické vlastnosti, díky nimž lze s částicemi manipulovat pomocí externího magnetického pole. Jádro je obvykle potaženo polymerní vrstvou, která umožňuje modifikaci a chrání nosiče před agregací a nespecifickými interakcemi s buňkami [23; 24].

Velikost magnetických částic se pohybuje v mikro- a nano- měřítku a průměr anorganického jádra je obvykle menší než 30 nm [24]. Tato velikost jim zajišťuje průchod nejúžšími krevními cévami a buněčnými membránami, vysokou stabilitu a velký efektivní povrch pro imobilizaci biologicky aktivních sloučenin. Příliš velké částice by mohly mít tendenci sedimentovat [20; 18]. Na Obrázku 2 je znázorněna struktura magnetického nosiče.

Ze všech možných tvarů (trubka, drát, membrána, deska) je pro praktické aplikace nejvhodnější forma kuliček, a to z důvodu nejlepších tokových vlastností. Tato forma umožňuje snadnou manipulaci a v porovnání s nepravidelnými tvary je sférický mnohem méně náchylnější k mechanickému oděru a rozpadu. Neméně důležitá je u těchto systémů také monodisperzita, která poskytuje jednotné fyzikální a chemické vlastnosti [21].



Obrázek 2: Zjednodušené schéma struktury magnetického nosiče. Upraveno dle [25].

2.2.2 Jádro magnetických částic

Magnetická jádra mohou být rozdělena podle chování v magnetickém poli do dvou skupin, a to slabá (paramagnetická a diamagnetická) a silná (feromagnetická). Superparamagnetické chování může být popsáno jako kombinace feromagnetického a paramagnetického chování, což znamená, že částice tohoto typu vykazují magnetické vlastnosti v přítomnosti vnějšího magnetického pole, ale v jeho nepřítomnosti je nevykazují. To je důvodem, proč jsou částice v nepřítomnosti externího magnetického pole dobře dispergovány v médiu, aniž by docházelo k jejich agregaci. Superparamagnetické částice poskytují dostatečnou odezvu na aplikované magnetické pole a zároveň mají téměř nulovou remanenci (zbytkovou magnetizaci). Koloidní disperze magnetických nosičů se nazývají ferrofluidy [23; 21].

Superparamagnetismus vykazují nosiče o velikosti 1-30 nm a toto chování závisí kromě materiálového složení také na teplotě a je ovlivňováno i okolními částicemi [21].

Jádro nosičů je nejčastěji tvořeno minerály železa a magnetickými oxidy železa, jako je magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Jsou však využívány i další oxidy kovů, např. ferit manganu, ferit kobaltu aj. [19]. Dalšími materiály mohou být přechodné kovy (Fe, Co, Ni), magnetické slitiny (Sm-Co), avšak výběr materiálu je značně omezen aspekty, jako je toxicita, a biokompatibilita. Nejvyšší saturační magnetizaci vykazují čisté kovy, ale oproti tomu jsou vysoce náchylné k oxidaci, jsou toxické a z toho důvodu nejsou příliš využívány. Nevýhoda magnetických slitin spočívá v nutnosti aplikace velmi silného vnějšího pole, aby mohlo být chování částic ovlivněno. Oxidy kovů jsou netoxické, nekarcinogenní, chemicky stabilní, biokompatibilní a jsou méně náchylné k oxidaci, tudíž mohou poskytovat stabilní magnetickou odezvu [18; 23].

2.2.3 Povrchová úprava magnetických částic

Aby mohly být magnetické částice využívány v biomedicínské a biotechnologické oblasti, je nutná jejich povrchová úprava. Bez této úpravy mají částice tendenci agregovat, což vede ke změně jejich velikosti a ke ztrátě superparamagnetického chování. Modifikace povrchu působí proti přitažlivým silám, zvyšuje stabilitu nosičů, zlepšuje biodistribuci a zvyšuje biokompatibilitu [22].

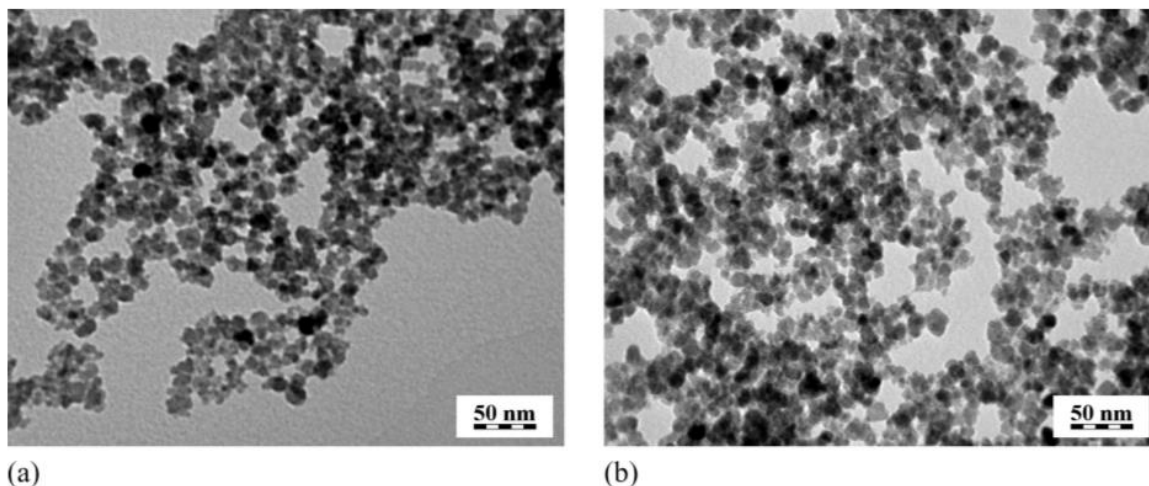
Obalová vrstva částic může být tvořena anorganickými i polymerními materiály. Polymerní materiály lze rozdělit na přírodní a syntetické. Typickým příkladem syntetických polymerů jsou polyethylenglykol (PEG) a polyvinylpyrrolidon (PVP). Mezi přírodní polymery se řadí želatina, dextran, pullulan a chitosan [26]. Z dalších materiálů lze pro povrchovou úpravu využít zlato, oxid křemičitý, oxid hlinitý, aktivní uhlí aj. [18]. Nevýhodou některých materiálů může být jejich nízká mechanická pevnost [27].

Pro povrchovou modifikaci již byla úřadem FDA schválena řada polymerů, kterými jsou polykaprolakton (PCL), polyethylenglykol (PEG), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA), polymléčná kyselina (PLA), chitosan a dextran. Tyto polymery mohou být dále funkcionalizovány cíleně pro interakci s určitými sloučeninami [28].

Existují však i kritické aspekty polymerních materiálů, které mohou ovlivňovat chování systému magnetických částic. Tyto aspekty zahrnují chemickou strukturu polymeru (např. hydrofilnost/hydrofobnost), molekulovou hmotnost polymeru, délku řetězců, stupeň krytí povrchu, konformaci polymeru nebo způsob, jakým je řetězec zakotven na povrchu nosiče [18].

2.2.4 Charakteristika magnetických nanočástic F79/L3 – PLL

Polylysinové (PLL) nanočástice jsou povrchově modifikované poly(L-lysinem). Byly připraveny srážením železnatých a železitých solí spolu s hydroxidem amonným. Vzniklý magnetit byl oxidován roztokem chlornanu sodného na maghemit. Na závěr byl přidán vodný roztok poly(L-lysinu). Index polydisperzity těchto nanočástic je 1,30. Povlak primárního koloidního oxidu železa s PLL nezměnil velikost ani morfologii částic (Obrázek 3) [29].



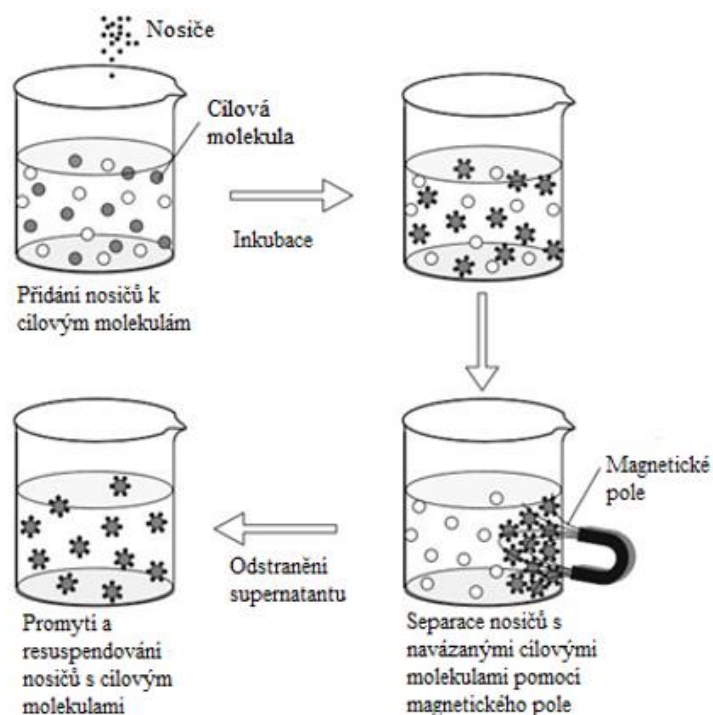
Obrázek 3: TEM snímek a) nanočástic oxidu železa, b) nanočástic oxidu železa modifikovaných poly(L-lysinem) [29].

2.2.5 Využití magnetických částic v biotechnologii

Díky možnosti funkcionalizace povrchu jsou dnes magnetické částice velice atraktivní v celé řadě oblastí (biochemie, ochrana životního prostředí, molekulární diagnostika, analytická chemie, biotechnologie, aj.).

Nejčastěji jsou nosiče využívány pro zakoncentrování, izolaci, purifikaci a imobilizaci analytu, přičemž jsou všechny tyto procesy prováděny přímo v komplexních vzorcích. To dává magnetickým částicím výhodu oproti jiným separačním metodám, neboť vzorky nemusí být před použitím speciálně upravovány. Výhodou je také snadná a reprodukovatelná manipulace se vzorky [19].

Separace pomocí magnetických nosičů je využívána pro sloučeniny, které jsou v analytu zastoupeny v malých množstvích. Je založena na rozdílné afinitě cílových molekul k částicím a k jejich okolí. Funkcionalizované částice jsou na určitý čas inkubovány spolu se vzorkem cílových molekul. Tyto molekuly se postupně naváží na povrchové skupiny a utvořený komplex lze dále separovat za použití vnějšího magnetického pole (viz. Obrázek 4) [30]. Nevýhodou při těchto izolacích může být fakt, že spolu s cílovými molekulami dochází mnohdy také k navázání jiných nežádoucích molekul (např. spolu s DNA bývá separována také RNA nebo proteiny) [31].



Obrázek 4: Princip separace pomocí magnetických částic. Upraveno dle [30].

Izolace a purifikace DNA je důležitým krokem pro možnost další práce s nukleovými kyselinami, neboť nukleové kyseliny se nachází v biologickém materiálu s celou řadou jiných látek a biomolekul. Vysoká čistota a kvalita izolované DNA je nezbytná také pro amplifikaci DNA metodou polymerázové řetězové reakce [23].

2.3 Identifikace mikrobiálního složení

Aby byla zajištěna bezpečnost a kvalita potravin obsahujících MO, je nutné znát složení mikrobiální komunity. V současnosti je kladen stále větší důraz na identifikaci a kvantifikaci deklarovaných mikroorganismů. Klasické kultivační metody pro studium MO jsou časově náročné a často nedokáží charakterizovat menší populace v silném nárůstu doprovodné mikroflóry. V důsledku těchto omezení byly vyvinuty metody, které nevyžadují kultivaci. Tyto metody jsou založeny na amplifikaci specifických úseků DNA polymerázovou řetězovou reakcí, což umožňuje studium a identifikaci mikroorganismů v daných ekosystémech [32].

2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázovou řetězovou reakci zavedl v roce 1985 Kary B. Mullis [33] a v současnosti patří mezi nejvyužívanější molekulárně diagnostické metody [27].

Principem PCR je replikace nukleových kyselin [33]. Jedná se o enzymovou metodu, která slouží k rychlé syntéze velkého množství definovaného úseku DNA *in vitro*. Díky vysoké citlivosti lze detekovat již velmi malá množství nukleových kyselin ve vzorku [34]. V průběhu PCR dochází k cyklicky se opakující syntéze vybraného úseku DNA, přičemž velikost amplifikovaného (pomnoženého) úseku ohraničují dva oligonukleotidy (primery). Reakce je

katalyzována DNA dependentním enzymem (nejčastěji *Taq* DNA-polymerázou izolovanou z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*) [27; 33]. Celý proces probíhá v jediné mikrozkuhavce, ve které je DNA smíchána s komponentami potřebnými pro danou reakci. Mikrozkuhavka je následně vložena do termálního cykleru (thermocycler), což je zařízení, které umožňuje inkubování směsi při různých teplotách dle zadaného programu [35].

PCR nachází uplatnění např. při charakterizaci genů, prenatální diagnostice dědičných chorob, detekci infekčních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě, přípravě velkého množství templátu (vzoru) pro sekvenování apod. [34].

2.4.1 Komponenty PCR směsi

Aby mohla reakce správně proběhnout, musí každá PCR směs obsahovat příslušné komponenty:

- DNA matrice – makromolekula izolované DNA obsahující cílovou sekvenci. Jako zdroj nukleových kyselin jsou používány různé biologické materiály (tělní tekutiny, kultury mikroorganismů, extrakty z krve apod.). Z důvodu vysoké citlivosti metody je vhodné nejprve provést extrakci vzorků. Pozornost by měla být věnována možným nečistotám, které by mohly inhibovat enzym *Taq* DNA-polymerázu (např. vysoká koncentrace solí, detergenty, komponenty červených krvinek). Vzhledem k tomu, že pro PCR je potřeba jen velmi malé množství templátové DNA, lze tyto nečistoty ve většině případů eliminovat dostatečným naředěním vzorku [33].
- Primery – ohraničují v reakci přesný úsek DNA, který má být amplifikován. Jsou to dva krátké syntetické oligonukleotidy s definovanou sekvencí, která je komplementární k okrajovým sekvencím vybraného DNA úseku [36]. Vhodná sekvence a koncentrace primerů je rozhodujícím parametrem o úspěšném výsledku. Jsou navrhovány tak, aby byly složeny z 18–24 nukleotidů, neobsahovaly sekundární strukturu, nebyly vzájemně komplementární, měly vyvážený poměr G/C a A/T párů a aby měly podobnou teplotu tání (cca 55–65 °C) [34].
- 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfáty (dNTP) – jsou stavebními kameny, které slouží k syntéze příslušného PCR produktu. Směs dNTP obsahuje ekvimolární množství dATP, dCTP, dGTP, dTTP [37].
- DNA-polymeráza – je klíčovým enzymem, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku PCR produktu [36]. Tento enzym musí být termostabilní, neboť jedním z kroků v průběhu reakce je denaturace DNA, tzn. rozvolnění komplementárních vláken templátu za vysoké teploty (cca 95 °C). Nejčastěji používanou je *Taq* DNA-polymeráza, která má teplotní optimum při 75 °C a poločas inaktivace je zhruba 40 min při teplotě 95 °C. Tento enzym má 5' → 3' polymerázovou aktivitu [34].
- PCR pufr – má za úkol vytvořit stálé a optimální prostředí pro danou reakci. Složení se může lišit v závislosti na typu použitého pufru [37]. Jeho nejdůležitější složkou jsou Mg^{2+} ionty, které tvoří s jednotlivými dNTP rozpustný komplex rozpoznávaný DNA-polymerázou. Tyto ionty však interagují také s jinými složkami směsi, je proto nutné optimalizovat jejich koncentraci pro každou aplikaci [33].
- PCR voda – používá se v případě potřeby pro doplnění reakční směsi na požadovaný objem [37].

2.4.2 Průběh polymerázové řetězové reakce

V průběhu PCR se v závislosti na teplotě reakční směsi střídají opakovaně tři děje:

1. Denaturace molekul DNA (94 °C):

Vlivem zvýšené teploty dochází k rozrušení vodíkových můstků, které přispívají ke stabilizaci dvoušroubovicové struktury DNA. Následně ztrácí molekula svou přirozenou strukturu, řetězce se od sebe oddělí a zaujmou konformaci náhodného klubka. Teplota, při které dochází k denaturaci se nazývá teplota tání (T_m) a je závislá zejména na obsahu guaninu (G) a cytosinu (C). Tyto dvě báze jsou vázány třemi vodíkovými můstky a jsou tepelně stabilnější na rozdíl od adeninu (A) a thyminu (T), které jsou vázány pouze dvěma vodíkovými můstky. Se zvyšujícím se obsahem cytosinu a guaninu roste tedy i teplota potřebná k denaturaci [34]. Počáteční a konečná denaturace je prodloužena a trvá 2–5 minut, aby došlo ke kompletnímu rozvolnění dvoušroubovice a nedocházelo k renaturaci molekul DNA a nespecifickým vazbám primerů. Ve zbylých cyklech je doba trvání denaturace pouze 15–45 s [33].

2. Připojení primerů k rozvolněným řetězcům DNA (50–68 °C):

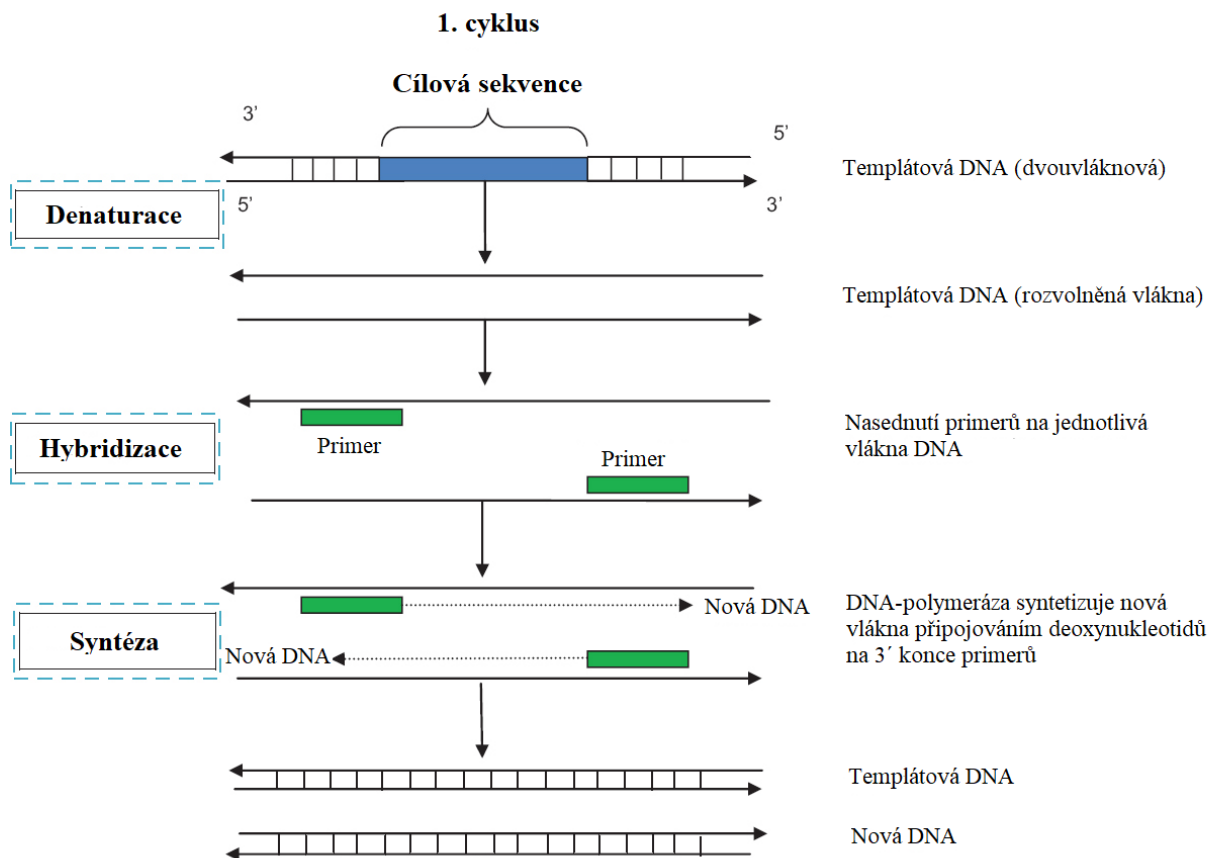
Ve druhém kroku je reakční směs ochlazena na teplotu potřebnou pro nasednutí primerů na specifická místa řetězců DNA. Tento děj obvykle trvá 30–60 s a je nazýván hybridizací primerů. Teplota potřebná pro hybridizaci závisí na délce oligonukleotidů a na zastoupení A-T a G-C párů [33; 34].

3. Syntéza nových řetězců DNA (65–75 °C):

Ve třetím kroku je teplota reakční směsi zvýšena na teplotu, která je optimální pro aktivitu použité polymerázy. DNA-polymeráza připojuje jednotlivé deoxynukleotidy k jednomu konci každého primeru podle komplementarity bazí a syntetizuje tak nová vlákna DNA [35]. Deoxynukleotidy jsou připojovány ve směru 5'→3', přičemž tato fáze trvá 60–120 s [37].

Výše popsané kroky se pravidelně opakují, čímž dochází k amplifikaci DNA. Nově vzniklé fragmenty slouží jako templát pro další cyklus PCR. Množství vznikajících molekul roste exponenciálně (2^n , n – počet cyklů) a vzniká až miliarda kopií vybraného úseku DNA. Optimální počet cyklů závisí na výchozí koncentraci templátu, zpravidla se však pohybuje v rozmezí 25–35 cyklů. Příliš vysoký počet cyklů vede ke vzniku nespecifických produktů PCR a ke snížení účinnosti polymerázy [33].

Jednotlivé kroky jsou schematicky znázorněny na Obrázku 5.



Obrázek 5: Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce. Upraveno dle [38].

Výsledným produktem polymerázové řetězové reakce jsou tzv. amplikony – úseky DNA definované délky o velikosti obvykle desítky až tisíce bp. Jejich přítomnost v reakční směsi se prokazuje elektroforézou v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu, kdy jsou fragmenty DNA v elektrickém poli separovány v závislosti na jejich velikosti. Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů se využívají DNA standardy (komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí). Pro vizualizaci je gel následně barven interkalačními činidly, která se vážou do dvoušroubovice DNA a následně po ozáření UV světlem fluoreskují. Z intenzity fluorescence pak lze odhadovat koncentraci PCR produktů. Kvantifikace a vyhodnocení výsledků je touto metodou zdlouhavé, obtížné a často nepřesné [33; 34].

2.5 PCR v reálném čase (real-time PCR)

Real-time PCR neboli kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) je moderní metoda molekulární biologie umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA [39].

Je odvozena od konvenční PCR, avšak vznikající produkty jsou detekovány přímo v průběhu reakce, tzn. v reálném čase [40; 41]. Výhodou qPCR oproti klasické PCR je tedy možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, dále vysoká specifita, rychlost a možnost automatizace procesu [27; 39].

Principem metody je sledování průběhu polymerázové řetězové reakce přímo během reakce, a to díky využití fluorescenčních sond či interkalačních barviv, které umožňují detekovat vznikající PCR produkty v reálném čase [39]. Zvýšení fluorescenčního signálu je přímo úměrné množství ampliconů vznikajících v průběhu reakce a fluorescence je měřena během každého cyklu [40]. SONDY jsou navrženy tak, aby hybridizovaly s templátem mezi dvěma primery. Použití sond označených různými barvami umožňuje současnou detekci a kvantifikaci více cílových úseků v jedné tzv. multiplexní reakci [42].

Způsob identifikace vznikajících ampliconů lze rozdělit do tří skupin:

1. Interkalační barviva vázající se do struktury dvoušroubovice (SYBR Green 1, LC Green, SYTO 9).
2. Fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část amplifikovaného produktu (TaqMan, Molecular beacons).
3. Fluorescenčně značené primery (Amplifluor, Scorpions) [27; 33].

Nejjednodušší možností je využití interkalačních fluorescenčních barviv, která se vážou do dvoušroubovice DNA. Barvivo volně rozptýlené v PCR směsi emituje minimální záření. K zesílení fluorescenčního signálu dochází mnohonásobně (až 1000x vyšší signál) jakmile dojde k vmezení barviva do struktury DNA vzniklé po hybridizaci primeru a syntéze komplementárního řetězce. Nevýhodou fluorescenčních interkalačních barviv je nemožnost rozlišení specifických a nespecifických produktů a také je nelze použít v případě multiplexních reakcí, které umožňují detekci několika různých úseků nukleových kyselin v jedné reakci. Výhodou je jejich nízká finanční náročnost [27].

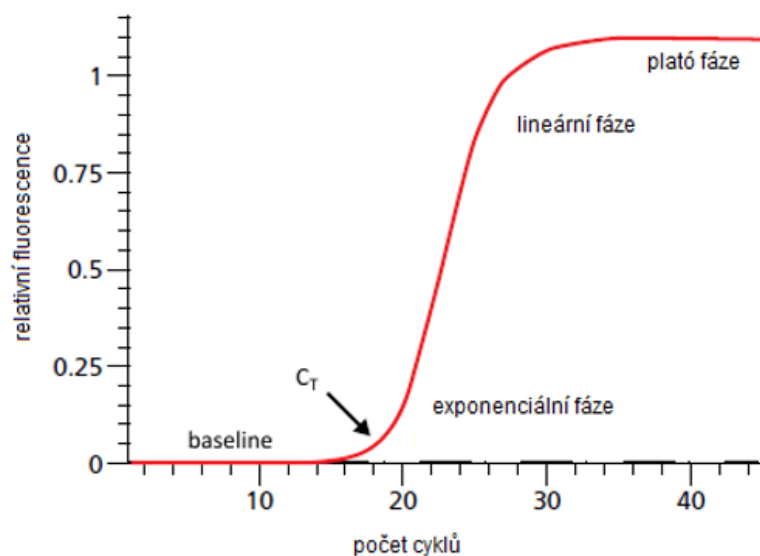
Fluorescenčně značené sondy jsou komplementární k jednomu vlákně templátové DNA, přičemž mají asi o 10 °C vyšší hodnotu teploty tání, než je T_m použitých primerů. SONDY jsou vysoce specifické a omezují detekci nespecifických produktů [33]. Na 5'-konci mají navázanou fluorescenční látku a na 3'-konci obsahují zhasič fluorescence. V intaktní formě je zhasič v blízkosti fluorochromu, absorbuje vyzářenou fluorescenci a ta je neměřitelná. Při syntéze komplementárních vláken dochází vlivem polymerázy k hydrolyze sondy, separaci zhasiče od fluorescenční molekuly a tím k nárůstu fluorescenčního signálu [40].

Složení směsi pro real-time PCR je stejné jako v případě konvenční polymerázové řetězové reakce, liší se pouze v přítomnosti fluorescenční látky [39].

2.5.1 Princip kvantifikace produktu real-time PCR

Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy tzv. amplifikačních křivek, které vzniknou vynesením naměřené fluorescence oproti příslušnému cyklu. Tvar typické amplifikační křivky je esovitý a lze ji rozdělit na 3 základní části (Obrázek 6) [39]:

1. Fáze pozadí (baseline) – koncentrace ampliconu je nízká, nedochází k výraznému nárůstu fluorescence [40].
2. Exponenciální fáze – tato fáze trvá asi 4-8 cyklů, dochází k exponenciálnímu nárůstu množství produktu a tím i fluorescenčního signálu.
3. „Plató“ fáze – v této fázi dochází k nasycení systému a množství amplifikovaného produktu se dále nemění. Fluorescenční signál je konstantní [39].



Obrázek 6: Typická amplifikační křivka. Upraveno dle [39].

V počátečních cyklech reakce tedy intenzita fluorescence dosahuje minimálních hodnot. Jakmile dojde ke zvýšení signálu nad tzv. prahovou hodnotu, začíná se hromadit PCR produkt. Hodnota C_t (threshold cycle) vyjadřuje číslo cyklu, kdy intenzita fluorescence vzrostla nad prahovou hodnotu. Čím vyšší je počáteční koncentrace molekul DNA ve vzorku, tím dříve je detekována zvyšující se fluorescence a tím nižší je hodnota C_t . Parametr C_t se nachází v exponenciální fázi a jeho výhodou je dobrá reprodukovatelnost.

Metoda absolutní kvantifikace je využívána při detekci specifických molekul DNA. Je založena na stanovení přesného počtu kopií templátu ve vzorku a vychází z lineárního vztahu mezi logaritmem počátečního množství templátových kopií (N_0) a C_t hodnoty příslušné amplifikační křivky [39; 40].

Kalibrační přímka získaná amplifikací série standardů o známé koncentraci slouží pro určení efektivity a přesnosti reakce.

- Reakční účinnost (efficiency) je stanovována ze sklonu kalibračních křivek (slope) dle rovnice (2.5.1.1). V případě 100% účinné reakce je v každém cyklu nárůst fluorescence zdvojnásoben a sklon křivky (M) bude mít hodnotu $-3,333$, viz. rovnice (2.5.1.2). Optimální hodnota sklonu křivek se nachází v rozmezí $-3,9$ až $-3,0$ a to odpovídá účinnosti reakce 80–100%.

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \quad (2.5.1.1)$$

$$\text{Efficiency} = 100\% = 10^{(-1/-3,333)} - 1 \quad (2.5.1.2)$$

- Korelační koeficient (R^2) je měřítkem přesnosti reakce. Výsledky nelze považovat za spolehlivé v případě, že $R^2 \leq 0,985$ [39].

2.6 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Analýza křivek tání je metoda využívána ke zjištění nukleotidového složení produktu po skončení qPCR. Oproti konvenční analýze křivek tání vykazuje vysokorozlišovací analýza

křivek tání mnohem vyšší citlivost. Je založena na postupném zvyšování teploty po posledním cyklu PCR [39]. Tato metoda je velice rychlá, citlivá a je schopna zachytit jednovicenukleotidové záměny v DNA. HRM sleduje malé rozdíly v profilech křivek tání a hodnotách teplot tání analyzovaných vzorků [43]. Pomocí této metody je také možné identifikovat nespecifické produkty PCR nebo dimery primerů [44].

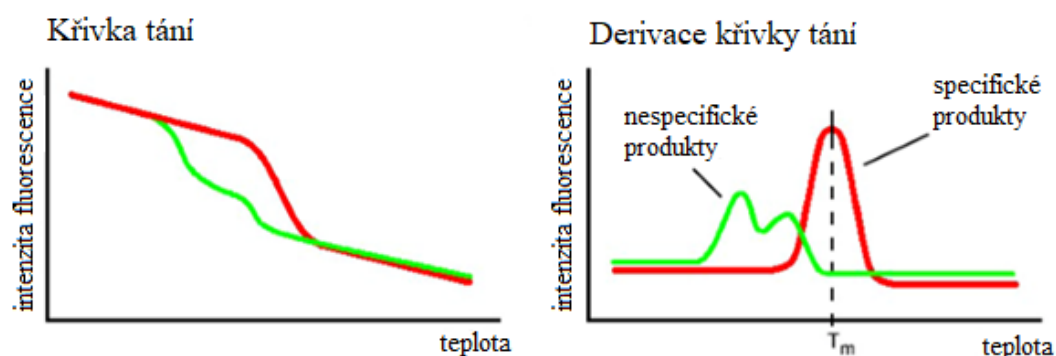
HRM analýza využívá plně saturačního fluorescenčního barviva (např. SYTO 9). To znamená, že dochází k plné saturaci všech míst na dvouřetězcových molekulách DNA, což zajišťuje maximální fluorescenční signál [39]. Pokud barvivo není vázáno ve dvoušroubovici poskytuje velmi nízký fluorescenční signál [45].

Po posledním cyklu polymerázové řetězové reakce je reakční směs postupně zahřívána (s citlivostí 0,1 °C/2 s) na teplotu vyšší, než je předpokládaná teplota tání daného PCR produktu. S rostoucí teplotou dochází k denaturaci dvouřetězcové struktury DNA, dokud nejsou řetězce zcela odděleny. V důsledku denaturace DNA dochází k uvolnění fluorescenčního barviva a poklesu intenzity fluorescence, což je zaznamenáváno.

Závislost klesajícího fluorescenčního signálu na zvyšující se teplotě se nazývá křivka tání. Z inflexního bodu křivky tání lze určit teplotu tání (T_m) daného amplikonu. To je teplota, při které dojde k rozvolnění právě poloviny z celkového množství dvouřetězcové DNA (dsDNA). Teplota tání je ovlivněna řadou faktorů a v důsledku toho vykazují různé molekuly dsDNA různou teplotu tání. Nejvýznamnějšími faktory jsou délka amplikonu a obsah GC vazeb. Čím vyšší je obsah GC párů bazí, tím vyšší je teplota tání dané molekuly DNA. T_m je tedy specifická pro každý PCR produkt.

Pomocí analýzy křivek tání lze odlišit nejen jednotlivé specifické produkty, ale i specifické produkty od produktů nespecifických. Nespecifické produkty se liší jak teplotou tání, tak i průběhem křivky tání. Křivka tání nespecifických produktů obsahuje obvykle více vrcholů, kdežto křivka produktů specifických vykazuje jeden vrchol (Obrázek 7) [39].

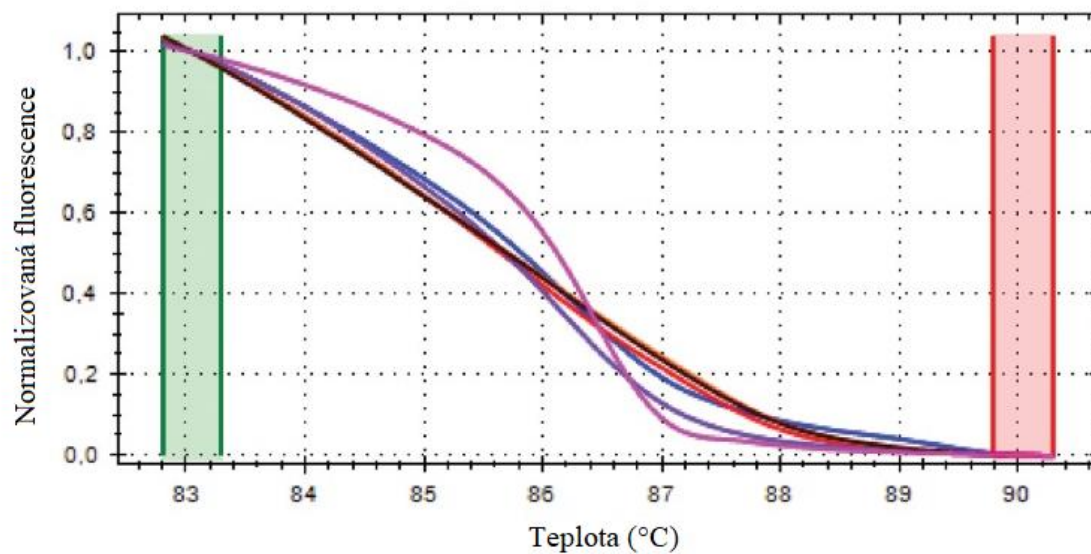
Derivací křivky tání se získá pik, ze kterého lze taktéž odečíst teplotu tání. Tohoto přístupu se využívá především při analýze směsné DNA, kdy jsou porovnávány křivky tání kontrolních a neznámých vzorků [46].



Obrázek 7: Analýza křivky tání. Upraveno dle [39].

Pro lepší přehlednost grafu se obvykle křivka tání převádí na normalizovanou křivku tání, kdy osa normalizované fluorescence nabývá hodnot od 0 do 1. Hodnotě 1 odpovídá počátek

tání a hodnotě 0 konec tání (viz. Obrázek 8). Po této úpravě jsou rozdíly v křivkách tání vidět zřetelněji [46].



Obrázek 8: Normalizovaná křivka tání. Upraveno dle [44].

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracování literární rešerše na zadané téma.

Experimentální část práce byla zaměřena na izolaci nukleových kyselin pomocí 3 izolačních metod, a to komerčního kitu, fenolové extrakce a magnetických částic. Následně bylo cílem práce vyhodnocení kvality izolované DNA s ohledem na čistotu a množství a na závěr využití metody PCR-HRM za účelem rozlišení bakteriálních kmenů patřících do skupiny *Lactobacillus*.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Probiotické výrobky

Testované probiotické výrobky (probiotické tablety) použité pro izolaci DNA byly zakoupeny v komerční síti. Seznam a charakteristika výrobků je uvedena v Tabulce 3.

Tabulka 3: Seznam a charakteristika použitých výrobků

Název	Výrobce	Mikroorganismy deklarované výrobcem	Deklarované množství KTJ na 1 tabletu/tobolku	Pomocné látky	Forma
Linex® Forte	Sandoz s.r.o.	<i>L. acidophilus</i> (LA-5), <i>B. animalis ssp. lactis</i> (BB-12)	2 x 10 ⁹	dextróza, mikrokrytalická celulóza, bramborový škrob, stearan hořečnatý, inulin, oligosacharidy	tobolka
Biopron 9 premium	Valosun a.s.	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	10 x 10 ⁹	fruktooligosacharidy, želatina, barvivo E171	tobolka
GS Laktobacily Forte 21	Green-Swan Pharmaceuticals CR, a. s	<i>Pediococcus acidolactici</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei ssp. paracasei</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i>	10,5 x 10 ⁹	inulin, selen, stearan hořečnatý, oxid titaničitý, želatina, kyselina askorbová, maltodextrin	tobolka

4.1.2 Bakteriální kultury

Bakteriální kultury použité v práci jako pozitivní kontroly (viz. Tabulka 4) byly získány z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (Czech Collection of Microorganisms, CCM) a poskytnuty vedoucím práce doc. Mgr. Václavem Brázdou, Ph.D.

Tabulka 4: Čisté bakteriální kultury

	Bakteriální kultura
1	<i>Lactobacillus casei</i> 7088 ^T
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> 7039 ^T
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1823 ^T
4	<i>Lactobacillus casei</i> 4798
5	<i>Lactobacillus paracasei</i> 1753 ^T
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833 ^T

4.1.3 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- MRS agarem (Sigma-Aldrich, USA)
- MRS médium (de Mann, Rogosa, Sharpe) (Sigma-Aldrich, USA)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Serva, Heidelberg, SRN)
- UltraClean®Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.),

4.1.4 Roztoky

4.1.4.1 Roztoky

- Lyzační pufr A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)
- Lyzační pufr B (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; 3 mg/ml lysozymu)
- TBE pufr (54 g Tris-HCl, 27,5 g H₃BO₃, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, doplněno na 1 l destilovanou vodou, před použitím desetkrát naředěno)
- TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0, destilovaná voda)
- Tris-HCl (1 M: 12,1 g Tris-báze, doplněno na 100 ml destilovanou vodou, upraveno HCl na pH 7,8)

4.1.5 Magnetické nosiče

Pro izolaci DNA byl použit 1 typ magnetických nosičů, jehož charakteristika je uvedena v Tabulce 5. Magnetické nosiče označené jako F79/L3-PLL byly syntetizovány Ing. Danielem Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze.

Tabulka 5: Vlastnosti použitých nosičů

Částice	Fe (%hm.)	Průměr nosiče	Koncentrace (mg/ml)	PDI	-NH ₂ (mM/g)
F79/L3-PLL	69,80	6,20 nm	0,10	1,37	0,28

Legenda: Fe (%) je hmotnostní obsah železa v magnetické částici, PDI je index polydispersity (poměr hmotnosti a počtu nosičů průměrné velikosti).

4.1.6 Přístroje a pomůcky

- Azure c200 Gel Imaging Workstation (Azure biosystems)
- Běžné laboratorní sklo, kovové a plastové pomůcky
- Centrifuga FVL-2400N Combi-Spin/Vortex (bioSan, Riga, Litva)
- Centrifuga miniSpin plus 14 500 ot/min (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exikátor typ N 86 KN. 18 (KNF NeubergerLabport, Freiburg, SRN)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Laboratorní váhy (Kern&Sohn, Německo)
- LightCycler® Nano Instrument (Roche, Basel, Švýcarsko)
- Magneticky separátor Invitrogen™ (InvitrogenDyal AS, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Pipette (Labnet international, Inc., USA)
- Mikropipety Discovery HTL (Discover HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniIncubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- Transiluminátor TVR-3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)

- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)

4.1.7 Komponenty pro PCR

- qPCR 2× SYTO 9 Master Mix (2krát koncentrovaný 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva), (TopBio, Praha, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR, Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR),
pozn.: specifikace použitých primerů jsou uvedeny v Tabulce 6 a Tabulce 7.

Tabulka 6: Specifikace primerů použitých pro PCR v reálném čase

Specifická PCR	Primer	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)	Reference
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	[47]
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMA1-rev	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250	[48]
	R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		
Rod <i>Bifidobacterium</i>	Pbi F1	CCGGAATAGCTCC	914	[49]
	Pbi R2	GACCATGCACCACCTGTGAA		
Druh <i>Lactobacillus paracasei</i>	F_paca_IS	ACA TCA GTG TAT TGC TTG TCA GTG AAT AC	80	[47]
	R_paca_IS	CCT GCG GGT ACT GAG ATG TTT C		
Druh <i>Lactobacillus plantarum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	400	[50; 51]
	PlanII	TTACCTAACGGTAAATGCGA	200	
Druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	PrI	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G	400	[50]
	RhaII	GCG ATG CGA ATT TCT ATT ATT	200	
Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Aci 16SI	AGCTGAACCAACAGATTAC	750	[50]
	Aci 16SII	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
Druh <i>Lactobacillus casei</i>	F_case_IS	CTA TAA GTA AGC TTT GAT CCG GAG ATT T	132	[47]
	R_case_IS	CTT CCT GCG GGT ACT GAG ATG T		

Tabulka 7: Specifikace primerů použitých pro PCR-HRM

Primer	Sekvence primerů (5'-3')	Reference
V1F-HRM	CCT AAT ACA TGC AAG TCG AAC G	[52]
V1R-HRM	GGT TAC CCA CGT GTT ACT CAC C	
CHAU-V3F	CTC TGT TGT TAG GGA AGA ACA AGT	[53]
CHAU-V3R	GCT TTC TGG TTA GGT ACC GTC AAG GT	
CHAU-V6F	AAC CTT ACC AGG TCT TGA CAT CC	
CHAU-V6R	AGC TGA CGA CAA CCA TGC ACC	
LAC1	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	[54]
LAC2	ATT TCA CCG CTA CAC ATG	[54; 55]
LAC4	AGG CAG CAG TAG GGA ATC TTC	[55]
P1V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC	[56]
P2V1	TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC	
poxcDNAFw	CAGACGCAATGATCAAGGTG	[57]
poxPromRVC	AATGCGCCCACTTCTTCATG	
poxPromRVT	AATGCGCCTACTTCTTCATG	

4.2 Metody

Uvedené postupy byly s úpravami prováděny dle práce Španová a Rittich [37].

4.2.1 Příprava růstového média

MRS médium (de Mann, Rogosa, Sharpe) (Sigma-Aldrich, USA) bylo připraveno podle návodu výrobce uvedeného na obalu. Médium bylo následně vysterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

4.2.2 Ožívání a uchování bakteriálních kultur

Zmražené bakteriální kultury (Tabulka 4) byly naočkovány do 10 ml tekutého MRS média. Kultivace probíhala ve zkumavkách při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Následně byly kultury přeočkovány (1% inokulum) a dále kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Kultury byly následně skladovány při teplotě 4 °C.

Za účelem ověření čistoty bakteriálních kultur byl proveden křížový roztěr na pevném MRS médiu. Po 48 hodinách kultivace byla provedena kontrola nárůstu kolonií.

4.2.3 Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk

4.2.3.1 Příprava hrubého lyzátu buněk z bakteriálních kultur

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 1 ml bakteriální kultury připravené kultivací v MRS mediu. 1 ml bakteriální kultury byl centrifugován při 14 000 ot/min po dobu 3 minut. Supernatant byl slit a sediment byl následně rozsuspendován v 1 ml lyzačního pufru A. Suspenze byla centrifugována při 14 000 ot/min po dobu 3 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit. K sedimentu bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru B a sediment byl dokonale rozsuspendován. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě. K suspenzi bylo následně přidáno 25 µl 10% SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml) a vzorky byly inkubovány při 55 °C po dobu 24 hodin.

4.2.3.2 Příprava hrubého lyzátu buněk z probiotických výrobků

Hrubé lyzáty potravinových doplňků stravy (Tabulka 3) byly připraveny z probiotické tablety/tobolky, kdy 1 tobolka byla rozříznuta skalpelem a její obsah byl převeden do sterilní zkumavky. Následně byl přidán 1 ml lyzačního pufru B a směs byla důkladně promíchána. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě. K suspenzi bylo následně přidáno 25 µl 10% SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml) a vzorky byly inkubovány při 55 °C po dobu 24 hodin.

4.2.4 Izolace DNA z hrubých lyzátů

4.2.4.1 Izolace DNA metodou fenolové extrakce a srážení DNA ethanolem

K 500 µl hrubého lyzátu buněk bylo přidáno 500 µl fenolu (předestilovaného; pH 7,8). Směs byla opatrně kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minut. Po centrifugaci (10 000 ot/3 min) byla odebrána vodní fáze obsahující DNA. K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (CIZ, 24:1) a směs byla opět kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minut. Následně byla směs centrifugována (10 000 ot/3 min) a po centrifugaci byla odebrána vodní fáze do čisté mikrozkušavky.

Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného, směs byla promíchána a po promíchání byl přidán 2,5násobek objemu 96% ethanolu. Obsah mikrozkušavky byl důkladně promíchán a DNA byla srážena při -20 °C po dobu 30 minut [58]. Po srážení ethanolem byla směs centrifugována (14 000 ot/15 min). Sediment byl následně vysušen a DNA byla poté rozpuštěna v 50 µl TE pufru (pH 7,8).

4.2.4.2 Izolace DNA komerčním kitem

Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk bakteriálních kultur a reálných vzorů (potravinových doplňků stravy) byla provedena pomocí komerčního izolačního kitu QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle doporučení výrobce.

4.2.4.3 Izolace DNA pomocí magnetických nosičů

Jednotlivé komponenty separační směsi byly smíchány podle Tabulky 8 v uvedeném pořadí. Výsledná koncentrace PEG 6 000 ve směsi byla 16% (hm), NaCl 2M. Po smíchání komponent byly směsi inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Směsi byly umístěny do magnetického separátoru na 5 minut při laboratorní teplotě, kdy došlo k separaci magnetických nosičů s navázanou DNA. Následně byl odebrán supernatant a z magnetického separátoru byl vyjmut magnetický pás. Magnetické částice byly promyty 500 μ l 70% ethanolu a odseparovány v magnetickém separátoru. Ethanol byl odpipetován a Eppendorfovy zkumavky spolu s částicemi byly umístěny do exsikátoru na vysušení. Adsorbovaná DNA byla z magnetických částic eluována do 50 μ l TE pufru (pH 7,8) při laboratorní teplotě. Magnetické nosiče byly po 24 hodinách odseparovány v magnetickém separátoru a roztok s DNA byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

Tabulka 8: Složení separační směsi

	Složka	Objem (μl)
1	5 M NaCl	200
2	DNA	50
3	40% PEG 6000	200
4	Magnetický nosič (2; 0,1 mg/ml)	50
Celkem		500

4.2.5 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena za použití přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), na kterém lze měřit velmi malé objemy vzorku (μ l). Měřený objem vzorku DNA byl 2 μ l. Přístroj byl kalibrován za použití TE pufru (2 μ l). Absorbance vzorku byla měřena při vlnových délkách 230 nm (absorpční maximum pro fenol), 260 nm (absorpční maximum pro nukleové kyseliny) a při 280 nm (absorpční maximum pro proteiny). Čistota izolované DNA byla stanovena z poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) [59]. Poměr absorbancí čisté DNA se pohybuje v rozmezí 1,8-2,0 [37].

4.2.6 Amplifikace DNA

4.2.6.1 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)

Pro rodovou a druhovou identifikaci byla použita PCR v reálném čase. Komponenty byly před použitím nejprve rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány. Amplifikační směs byla připravena o celkovém objemu 25 μ l. Pořadí jednotlivých komponent pro PCR v reálném čase a jejich objemy byly použity v souladu s doporučením výrobce použitého qPCR SYTO 9 Master Mixu a jsou uvedeny v Tabulce 9. Specifikace použitých primerů je uvedena v Tabulce 6. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase probíhala dle programu uvedeného

v Tabulce 10. Pro PCR v reálném čase byl použit thermo cycler Rotogene 6000 (Corbett Research, Austrálie).

Tabulka 9: Složení qPCR směsí

	Komponenta	Objem (μl)
1	Voda pro PCR	9,5
2	Syto 9 Master Mix	12,5
3	Primer 1 (10 pmol/μl)	1,0
4	Primer 2 (10 pmol/μl)	1,0
5	Matrice DNA	1,0
	Celkem	25,0

Jako DNA matrice byla použita naředěná DNA izolovaná pomocí magnetických nosičů, komerčního kitu a fenolové extrakce. DNA izolovaná ze sbírkových kmenů byla použita pro pozitivní kontroly. DNA byla do reakční směsi přidávána jako poslední. Dále byla připravena negativní kontrola, ve které byla matrice DNA nahrazena stejným množstvím vody pro PCR.

Tabulka 10: Amplifikační programy pro PCR v reálném čase

Specifikace	Amplifikační krok				
	Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Elongace DNA	Dosyntetizování DNA
Doména <i>Bacteria</i>	95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/5 min
		30 cyklů			
Rod <i>Bifidobacterium</i>	95 °C/5 min	95 °C/60 s	50 °C/60 s	72 °C/120 s	72 °C/5 min
		30 cyklů			
Rod <i>Lactobacillus</i>	95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/10 min
		30 cyklů			
<i>Lactobacillus paracasei</i>	95 °C/5 min	95 °C/30 s	60 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/5 min
		35 cyklů			
<i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i>	95 °C/5 min	95 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/5 min
		30 cyklů			
<i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i>	95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/5 min
		30 cyklů			

4.2.6.2 Polymerázová řetězová reakce s analýzou křivek tání (PCR-HRM)

Postup přípravy amplifikační směsi byl stejný jako v případě polymerázové řetězové reakce v reálném čase (4.2.6.1). Složení PCR směsi je uvedeno v Tabulce 9 a specifikace použitých primerů je uvedena v Tabulce 7. Pro PCR-HRM analýzu byl použit LightCycler® Nano (Roche Life Science, USA). Polymerázová řetězová reakce s vysokorozlišovací analýzou křivek tání probíhala dle programu uvedeného v Tabulce 11.

Tabulka 11: Amplifikační programy včetně melt analýzy pro PCR-HRM

Specifikace	Amplifikační krok					Melt analýza
	Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Elongace DNA	Dosyntetizování DNA	
V1F-HRM/ V1R-HRM	95 °C/10 min	95 °C/15 s	55 °C/15 s	72 °C/20 s	72 °C/5 min	od 55 °C
		50 cyklů				do 95 °C
						po 0,05 °C/s
CHAU-V3F/ CHAU-V3R	95 °C/2 min	95 °C/15 s	52 °C/20 s	60 °C/20 s	50 °C/5 min	od 65 °C
		40 cyklů				do 95 °C
						po 0,05 °C/s
CHAU-V6F/ CHAU-V6R	95 °C/2 min	95 °C/15 s	52 °C/20 s	60 °C/20 s	50 °C/2 min	od 65 °C
		40 cyklů				do 95 °C
						po 0,05 °C/s
LAC2/LAC4	95 °C/15 min	95 °C/30 s	61 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/10 min	od 65 °C
		40 cyklů				do 95 °C
						po 0,05 °C/s
poxDNAFw/ poxPromRVC poxDNAFw/ poxPromRVT	95 °C/10 min	95 °C/15 s	60 °C/15 s	72 °C/15 s	72 °C/10 min	od 65 °C
		40 cyklů				do 95 °C
						po 0,05 °C/s
P1V1/P2V1	95 °C/5 min	95 °C/10 s	60 °C/30 s	72 °C/10 s	72 °C/7 min	od 65 °C
		45 cyklů				do 95 °C
						po 0,05 °C/s
LAC1/LAC2	95 °C/5 min	95 °C/30 s	61 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/5 min	od 70 °C
		45 cyklů				do 95 °C
						po 0,05 °C/s

4.2.7 Gelová elektroforéza

Specifické PCR produkty byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Pro elektroforézu byly použity 1,5% gely, které byly připraveny smícháním vhodného množství agarózy a 0,5krát koncentrovaného TBE pufru. Připravená směs byla za opakovaného promíchávání rozvařena v mikrovlnné troubě a následně byla po krátkém chladnutí nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem, kde byla ponechána k zatuhnutí.

Následně bylo 25 μ l PCR směsi smícháno s 5 μ l vkládacího pufru Yeallow load a 15 μ l takto vzniklé směsi s vkládacím pufrem bylo nanášeno na gel. Dále bylo na gel nanášeno 5 μ l DNA standardu (100 bp). Gel byl vložen do elektroforetické vany a převrstven 0,5krát koncentrovaným TBE pufrem. Takto připravená souprava byla zapojena do zdroje stejnosměrného elektrického pole a elektroforéza probíhala po dobu 2 hodin při napětí 80 V. Gel byl po skončení elektroforézy barven v roztoku ethidium bromidu po dobu 20 minut. Po dobarvení byl gel pozorován pod UV světlem, dokumentován fotograficky a vyhodnocen.

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace bakteriální DNA

Z hrubých lyzátů buněk probiotických výrobků a čistých bakteriálních kultur byla DNA izolována třemi různými metodami, a to pomocí magnetických částic (dle bodu 4.2.4.3), fenolovou extrakcí (dle bodu 4.2.4.1) a komerčním kitem (dle bodu 4.2.4.2).

5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky za použití přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) (dle bodu 4.2.5). Měření bylo provedeno v rozmezí vlnových délek 230–280 nm a na základě naměřených absorbancí byly stanoveny koncentrace nukleových kyselin (NK) ve vzorcích (viz. Tabulka 12). Současně byla touto metodou prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích.

Tabulka 12: Spektrofotometrické stanovení NK izolovaných z čistých bakteriálních kultur a probiotických výrobků

Vzorek	Metoda izolace	Koncentrace NK (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}
1	Magnetické částice F79/L3-PLL	6,7	0,133	0,086	1,56
2		9,0	0,180	0,097	1,85
3		18,5	0,370	0,238	1,56
4		8,4	0,168	0,097	1,74
5		5,6	0,112	0,070	1,60
6		10,3	0,207	0,112	1,84
Linex		2,5	0,049	0,036	1,36
Laktobacily		10,1	0,203	0,126	1,61
Biopron		2,4	0,048	0,033	1,47
1		Fenolová extrakce	471,3	9,427	4,563
2	534,9		10,699	5,134	2,08
3	773,0		15,460	7,513	2,06
4	686,5		13,730	6,717	2,04
5	788,9		15,778	7,482	2,11
6	290,8		5,815	2,804	2,07
Linex	404,3		8,086	3,949	2,05
Laktobacily	3931,2		78,624	37,698	2,09
Biopron	272,1		5,442	2,734	1,99
1	Komerční kit		26,7	0,533	0,281
2		47,9	0,958	0,494	1,94
3		23,2	0,463	0,241	1,92

4	Komerční kit	28,5	0,569	0,291	1,96
5		31,1	0,622	0,317	1,96
6		45,0	0,900	0,453	1,99
Linex		17,5	0,351	0,177	1,98
Laktobacily		42,3	0,846	0,429	1,97
Biopron		22,5	0,450	0,237	1,90

Legenda: 1 – *Lbc. casei* 7088^T, 2 – *Lbc. plantarum* 7039^T, 3 – *Lbc. rhamnosus* 1823^T, 4 – *Lbc. casei* 4789, 5 – *Lbc. paracasei* 1753^T, 6 – *Lbc. acidophilus* 4833^T

Bakteriální DNA se podařilo úspěšně izolovat všemi výše zmíněnými izolačními metodami. Koncentrace DNA se v závislosti na použité separační metodě lišila a její hodnoty se pohybovaly v rozmezí 2,4–3931,2 ng/μl. Poměr A_{260}/A_{280} vypovídá o čistotě DNA. Pro čistou DNA spadá hodnota tohoto poměru do rozmezí 1,8–2,0. Nižší hodnota značí znečištění DNA proteiny, které vykazují absorpční maximum při 280 nm. Vyšší hodnota poměru absorpencí pak značí přítomnost RNA ve vzorku. Nejvíce znečištěná byla DNA izolovaná magnetickými nosiči.

5.2.1 Přepočítání stanovené koncentrace izolované DNA

Pro izolaci DNA magnetickými nosiči bylo použito 50 μl hrubého lyzátu buněk a DNA byla nakonec eluována do 50 μl TE pufru. V případě fenolové extrakce bylo použito 500 μl hrubého lyzátu a DNA byla eluována do 50 μl TE pufru. Při izolaci kitem bylo použito 200 μl hrubého lyzátu a DNA byla eluována do 200 μl TE pufru.

Pro porovnání množství DNA získané jednotlivými separačními metodami byla spektrofotometricky stanovená koncentrace přepočítána (dle vzorců (5.2.1.1) a (5.2.1.2)) na objem 50 μl použitých hrubých lyzátu buněk a na eluci DNA do 50 μl TE pufru. Vzorce použité pro přepočítání jsou uvedeny v Tabulce 13 a výsledky teoretického výpočtu koncentrací izolované DNA v Tabulce 14.

Tabulka 13: Vzorce pro přepočítání koncentrace izolované DNA

Magnetické nosiče + Kit	$C_{\text{teoretická}} = C_{\text{stanovená}}$	(5.2.1.1)
Fenolová extrakce	$C_{\text{teoretická}} = C_{\text{stanovená}}/10$	(5.2.1.2)

Tabulka 14: Teoreticky přepočítané hodnoty koncentrace izolované DNA

Vzorek	Metoda izolace	Koncentrace NK (ng/μl)
1	Magnetické částice F79/L3-PLL	6,70
2		9,00
3		18,50

4	Magnetické částice F79/L3-PLL	8,40
5		5,60
6		10,30
Linex		2,50
Laktobacily		10,10
Biopron		2,40
1	Fenolová extrakce	47,13
2		53,49
3		77,30
4		68,65
5		78,89
6		29,08
Linex		40,43
Laktobacily		393,12
Biopron		27,21
1	Komerční kit	26,70
2		47,90
3		23,20
4		28,50
5		31,10
6		45,00
Linex		17,50
Laktobacily		42,30
Biopron		22,50

Hodnoty teoreticky přepočítané koncentrace izolované DNA ve vzorcích se pohybovaly v rozmezí 2,4–393,12 ng/ μ l v závislosti na použité separační metodě a na vzorku. Nejnižších koncentrací bylo dosaženo v případě izolace pomocí magnetických nosičů, naopak nejvyšší koncentrace nukleových kyselin byly získány fenolovou extrakcí. V rámci probiotických doplňků stravy byl nejvyšší výtěžek získán v případě výrobku GS Laktobacily Forte 21 fenolovou extrakcí.

5.3 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase a detekce specifického produktu PCR agarózovou gelovou elektroforézou

Za účelem ověření přítomnosti bakteriální DNA ve vzorcích byla provedena polymerázová řetězová reakce v reálném čase s využitím primerů pro rodovou a druhovou identifikaci. Specifikace jednotlivých primerů je uvedena v Tabulce 6, složení PCR směsi v Tabulce 9 a použité amplifikační programy v Tabulce 10. Polymerázová řetězová reakce byla provedena dle postupu 4.2.6.1. Vzorky DNA o koncentraci vyšší než 10 ng/ μ l (viz. Tabulka 12) byly před

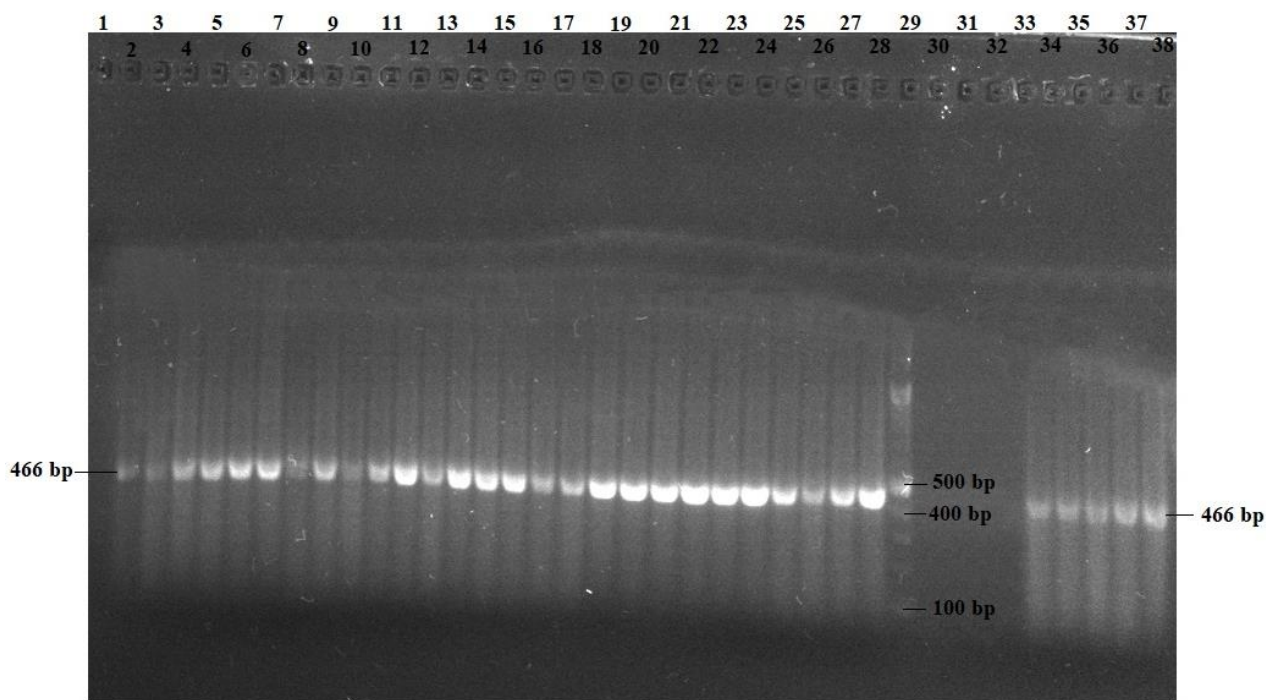
zahájením qPCR zředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl (objem 50 μl). Specifické PCR produkty byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou (dle bodu 4.2.7).

5.3.1 Prokázání přítomnosti DNA specifické pro doménu *Bacteria*

Přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích byla ověřena metodou real-time PCR s využitím primerů specifických pro doménu *Bacteria* (primery F_eub, R_eub [47]) a produkty polymerázové řetězové reakce byly následně detekovány agarózovou gelovou elektroforézou.

Jako pozitivní kontrola byla použita bakteriální DNA *Escherichia coli* (SigmaAldrich) poskytnutá doc. Mgr. Václavem Brázdou, PhD. Vzorky byly zředěné desítkovým ředěním na výslednou koncentraci v rozsahu 10–0,001 ng/μl.

Amplifikační křivky lze vidět na Obrázku 10 (z důvodu přehlednosti jsou zobrazeny pouze křivky standardů a vzorků, u kterých byla DNA izolována fenolovou extrakcí). Snímek agarózového gelu lze vidět na Obrázku 9. Schéma nanesení PCR produktů na gel je uvedeno v Tabulce 15.

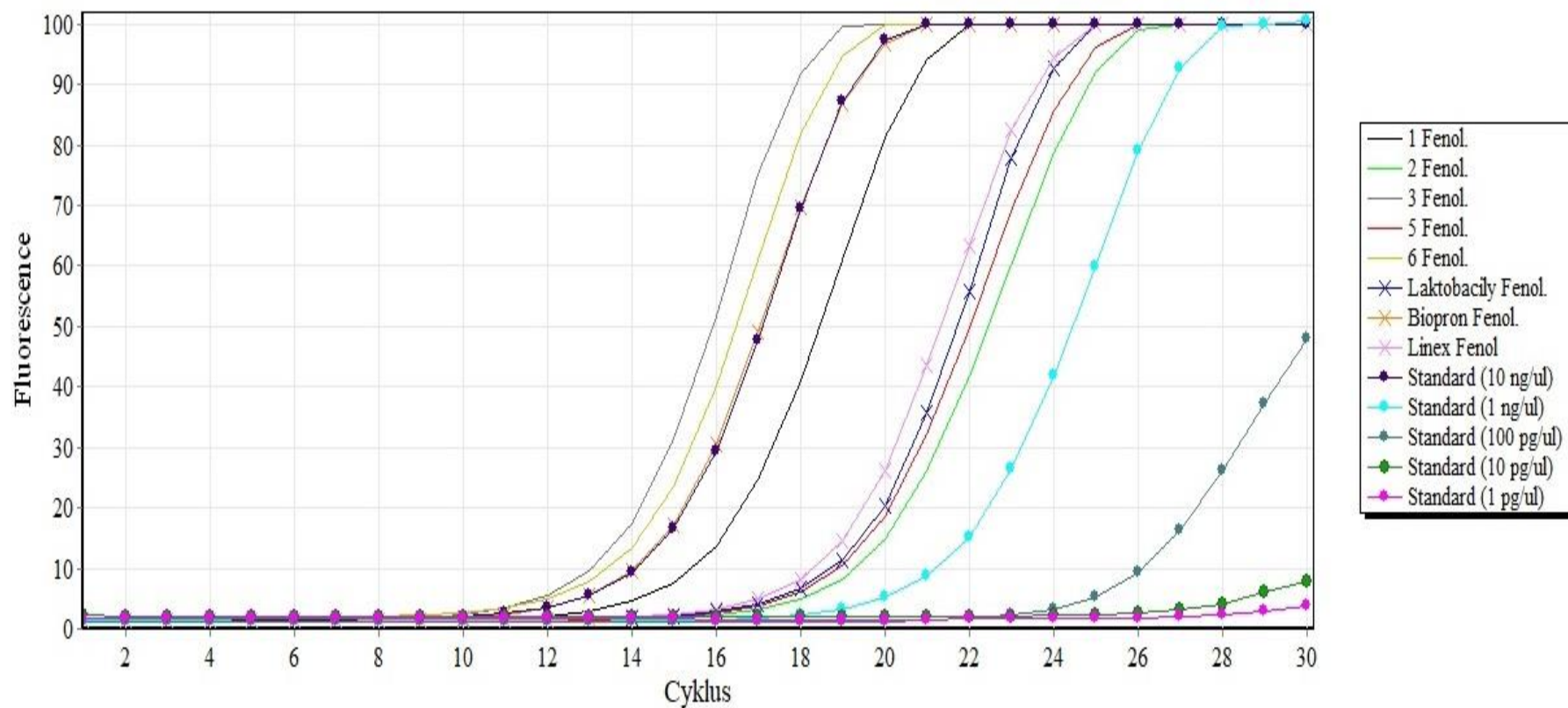


Obrázek 9: Gelová elektroforéza PCR produktu specifického pro doménu *Bacteria*

Tabulka 15: Schéma nanesení PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* na agarózový gel (Obrázek 9)

Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu	Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu
2	1	MČ	+	20	1	Kit	+++
3	2		+	21	2		+++
4	3		++	22	3		+++
5	4		++	23	4		+++
6	5		+++	24	5		+++
7	6		+++	25	6		+++
8	Linex		+	26	Linex		+
9	Laktobacily		++	27	Laktobacily		++
10	Biopron		+	28	Biopron		+++
11	1		F	++	29		Standard
12	2	+++		32	NK		-
13	3	++		34	<i>E. coli</i> 10 ng/μl	-	++
14	4	+++		35	<i>E. coli</i> 1 ng/μl	-	++
15	5	+++		36	<i>E. coli</i> 0,1 ng/μl	-	++
16	6	+++		37	<i>E. coli</i> 0,01 ng/μl	-	++
17	Linex	++		38	<i>E. coli</i> 0,001 ng/μl	-	++
18	Laktobacily	++					
19	Biopron	+++					

Legenda: MČ – magnetické částice (F79/L3-PLL), F – fenolová extrakce, NK – negativní kontrola, + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován, 1-6 označení čistých bakteriálních kultur (viz. bod 4.1.2)



Obrázek 10: Amplifikační křivky qPCR produktů specifických pro doménu *Bacteria*

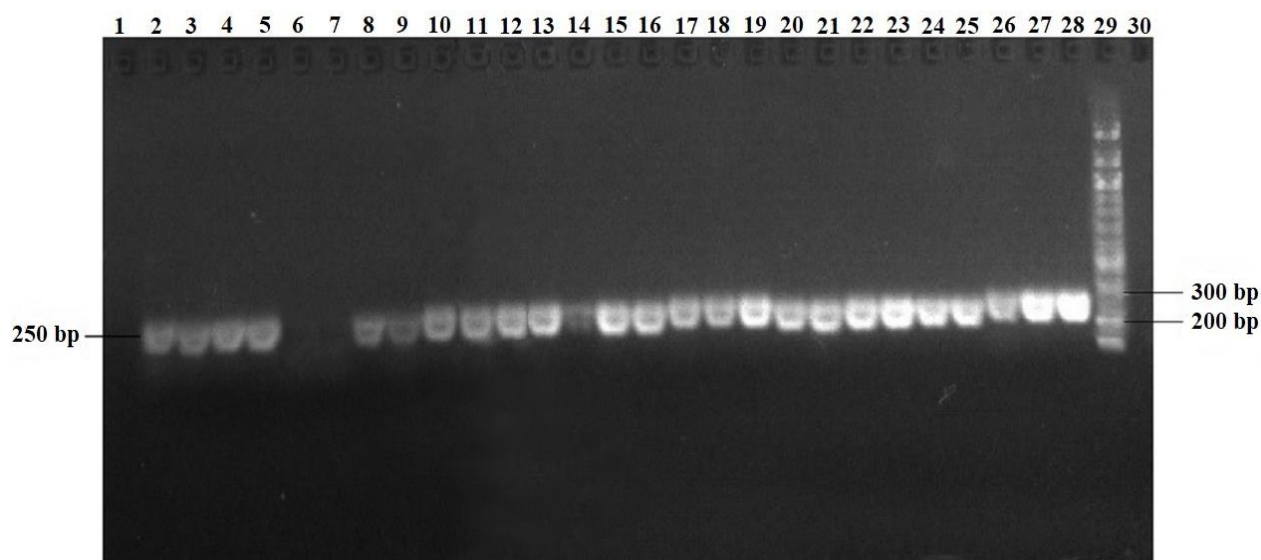
1 – *Lbc. casei* 7088^T, 2 – *Lbc. plantarum*, 3 – *Lbc. rhamnosus*, 4 – *Lbc. casei* 479, 5 – *Lbc. paracasei*, 6 – *Lbc. acidophilus*; Standard – DNA *Escherichia coli*, Fenol. – fenolová extrakce

Gelovou elektroforézou byl detekován specifický produkt PCR pro doménu *Bacteria* (466 bp), a tím byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA ve všech vzorcích.

Amplifikační křivky PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* jsou v této diplomové práci uvedeny pouze pro ukázkou a nebudou zde detailně diskutovány. Uvedeny budou dále pouze výsledky z gelové elektroforézy PCR produktů. Zbylé amplifikační křivky rodově a druhově specifických real-time PCR má ve své diplomové práci uvedené Bc. Eva Chvalková, se kterou jsem na tomto experimentu spolupracovala a jejíž práce se přímo zabývá polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase.

5.3.2 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Lactobacillus*

Přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Použitím primerů specifických pro tento rod (primery LbLMA1-rev, R16-1 [48]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 250 bp. Produkty PCR byly naneseny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA čistých bakteriálních kultur (viz. bod 4.1.2). Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obrázku 11. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tabulce 16.



Obrázek 11: Gelová elektroforéza PCR produktu specifického pro rod *Lactobacillus*

Tabulka 16: Schéma nanesení PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* na agarózový gel (Obrázek 11)

Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu	Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu
2	1	MČ	++	17	Linex	Kit	+++
3	2		++	18	Laktobacily		+++
4	3		++	19	Biopron		+++
5	4		++	20	1	F	+++

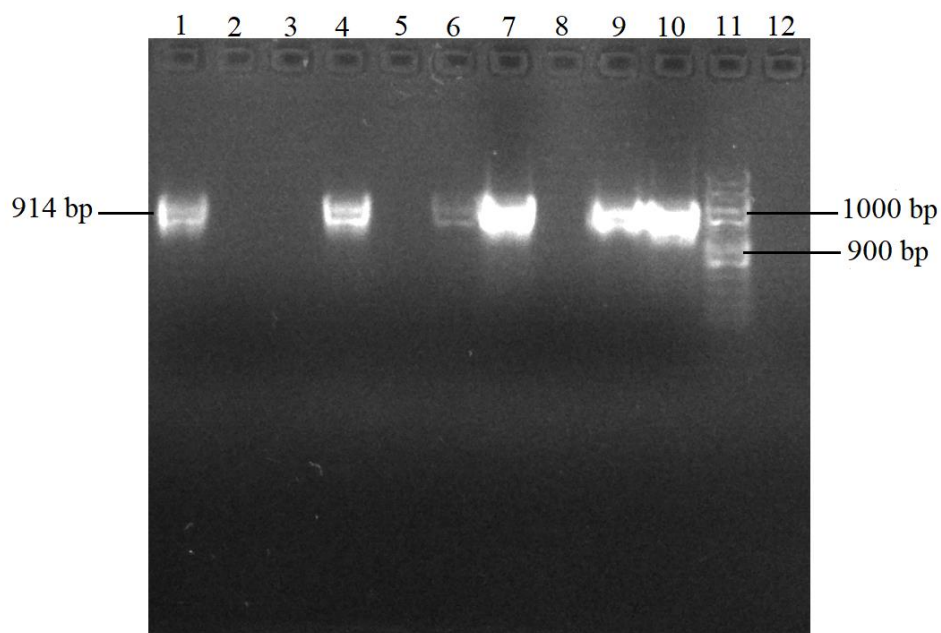
6	Linex	MČ	–	21	2	F	+++
7	Biopron		–	22	3		+++
8	6		+	23	4		+++
9	5		+	24	5		+++
10	Laktobacily		++	25	6		+++
11	2	Kit	++	26	Laktobacily	+++	
12	1		++	27	Linex	+++	
13	3		+++	28	Biopron	+++	
14	4		+	29	Standard		
15	5		+++	30	NK	–	
16	6		+++				

Legenda: MČ – magnetické částice (F79/L3-PLL), F – fenolová extrakce, NK – negativní kontrola, + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován, 1-6 označení čistých bakteriálních kultur (viz. bod 4.1.2)

Agarózovou gelovou elektroforézou byl detekován specifický PCR produkt (250 bp) ve všech pozitivních kontrolách i ve všech výrobcích. Tím byla prokázána přítomnost bakteriální DNA rodu *Lactobacillus*.

5.3.3 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium*

Přítomnost DNA bakterií rodu *Bifidobacterium* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Použitím primerů specifických pro tento rod (primery Pbi F1, Pbi R2 [49]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 914 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Bifidobacterium animalis* 4988^T z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (Czech Collection of Microorganisms, CCM) poskytnutá vedoucím práce. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obrázku 12. Schéma nanášení vzorků je uvedeno v Tabulce 17.



Obrázek 12: Gelová elektroforéza PCR produktu specifického pro rod *Bifidobacterium*

Tabulka 17: Schéma nanesení PCR produktů specifických pro rod *Bifidobacterium* na agarózový gel (Obrázek 12)

Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu
1	Linex	MČ	++
2	Laktobacily		-
3	Biopron		-
4	Linex	Kit	++
5	Laktobacily		-
6	Biopron		+
7	Linex	F	+++
8	Laktobacily		-
9	Biopron		+++
10	PK		+++
11	Standard		
12	NK		-

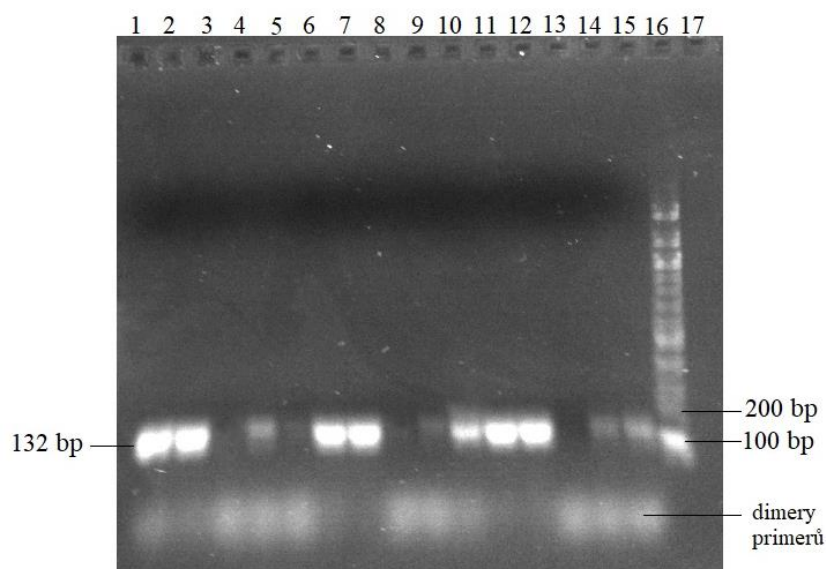
Legenda: MČ – magnetické částice (F79/L3-PLL), F – fenolová extrakce, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola, + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován

Všechny testované probiotické výrobky mají deklarovanou přítomnost bakteriální DNA rodu *Bifidobacterium*. Specifický PCR produkt (914 bp) byl však detekován pouze u výrobků

Biopron 9 premium a Linex® Forte, v případě výrobku GS Laktobacily Forte 21 k detekci specifického PCR produktu nedošlo. Měření bylo provedeno dvakrát, přičemž byl získán stejný výsledek. Přítomnost bakteriální DNA rodu *Bifidobacterium* byla tedy prokázána pouze u dvou ze tří probiotických výrobků.

5.3.4 Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus casei*

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus casei* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Použitím primerů specifických pro tento druh (primery F_case_IS, R_case_IS [47]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 132 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei* 7088^T a *Lactobacillus casei* 4798 (viz. bod 4.1.2). Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obrázku 13. Schéma nanášení vzorků je uvedeno v Tabulce 18.



Obrázek 13: Gelová elektroforéza PCR produktu specifického pro druh *Lactobacillus casei*

Tabulka 18: Schéma nanášení PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus casei* na agarózový gel (Obrázek 13)

Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu
1	1	MČ	+++
2	4		+++
3	Linex		–
4	Laktobacily		+
5	Biopron		–
6	1	F	+++
7	4		+++

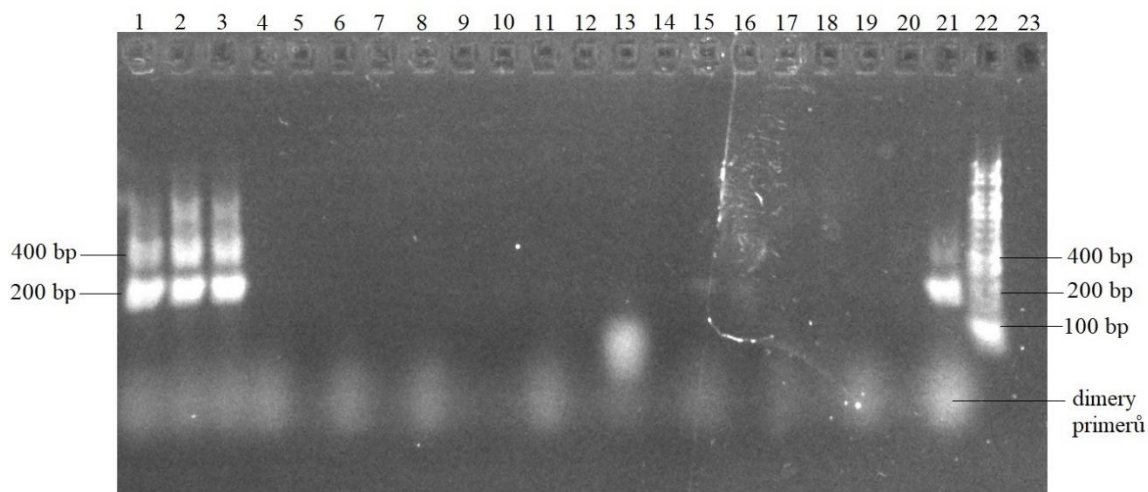
8	Linex	F	–
9	Laktobacily		+
10	Biopron		++
11	1	Kit	+++
12	4		+++
13	Linex		–
14	Laktobacily		+
15	Biopron		+
16	Standard		
17	NK		–

Legenda: MČ – magnetické částice (F79/L3-PLL), F – fenolová extrakce, NK – negativní kontrola, + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován, 1 a 4 – označení čistých bakteriálních kultur (viz. bod 4.1.2)

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus casei* má deklarovaný probiotický výrobek Biopron 9 premium. Specifický PCR produkt (132 bp) byl detekován v případě 2 výrobků, a to Biopron 9 premium a GS Laktobacily Forte 21. U obou těchto výrobků byla tedy prokázána přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus casei*. Výrobce probiotika Linex® Forte nedeklaruje přítomnost tohoto bakteriálního druhu, což se potvrdilo agarózovou gelovou elektroforézou, kdy specifický PCR produkt nebyl detekován.

5.3.5 Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus plantarum*

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus plantarum* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Použitím primerů specifických pro tento druh (primery Lfpr, PlanII [50; 51]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 400 a 200 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum* 7039^T (viz. bod 4.1.2). Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obrázku 14. Schéma nanášení vzorků je uvedeno v Tabulce 19.



Obrázek 14: Gelová elektroforéza PCR produktu specifického pro druh *Lactobacillus plantarum*

Tabulka 19: Schéma nanesení PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus plantarum* na agarózový gel (Obrázek 14)

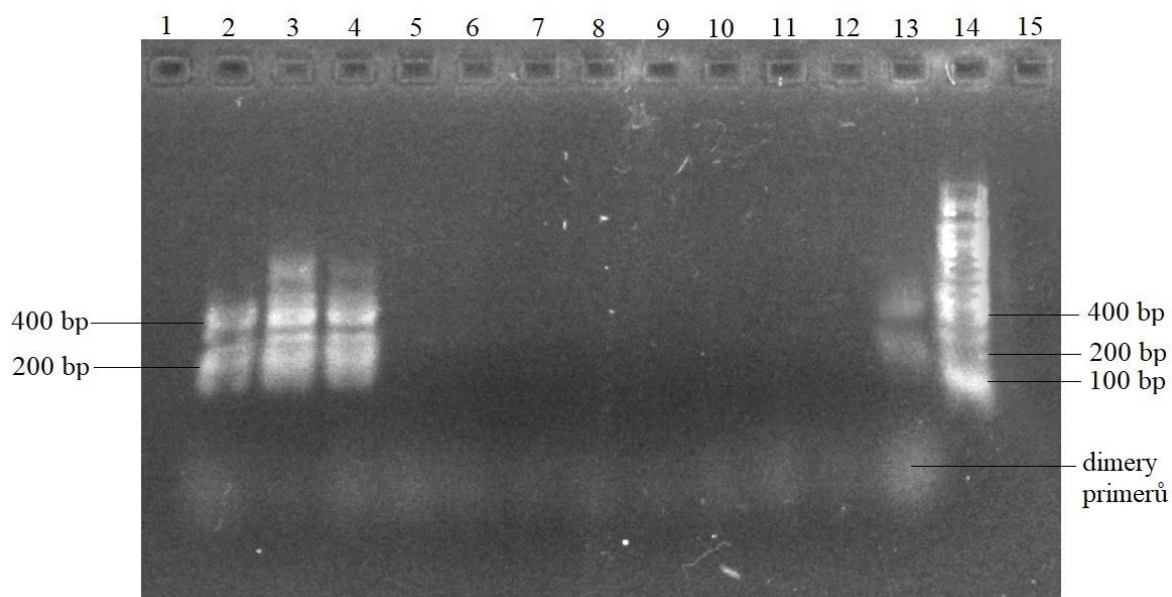
Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu
1	2	MČ	+++
2	2	Kit	+++
3	2	F	+++
4	Linex	MČ	–
6	Laktobacily	MČ	–
8	Biopron	MČ	–
11	Linex	Kit	–
13	Laktobacily	Kit	–
15	Biopron	Kit	–
17	Linex	F	–
19	Laktobacily	F	–
21	Biopron	F	++
22	Standard		
23	NK		–

Legenda: MČ – magnetické částice (F79/L3-PLL), F – fenolová extrakce, NK – negativní kontrola, + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován, 2 – čistá bakteriální kultura (viz. bod 4.1.2)

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus plantarum* mají deklarovanou výrobky Biopron 9 premium a GS Laktobacily Forte 21. Specifický PCR produkt (400 a 200 bp) byl však detekován pouze u výrobků Biopron 9 premium, v případě výrobku GS Laktobacily Forte 21 k detekci specifického PCR produktu nedošlo. Měření bylo provedeno dvakrát, přičemž byl získán stejný výsledek. Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus plantarum* byla tedy prokázána pouze u jednoho probiotického výrobku.

5.3.6 Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus*

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Použitím primerů specifických pro tento druh (primery PrI, RhaII [50]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 400 a 200 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T (viz. bod 4.1.2). Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obrázku 15. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tabulce 20.



Obrázek 15: Gelová elektroforéza PCR produktu specifického pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Tabulka 20: Schéma nanesení PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* na agarózový gel (Obrázek 15)

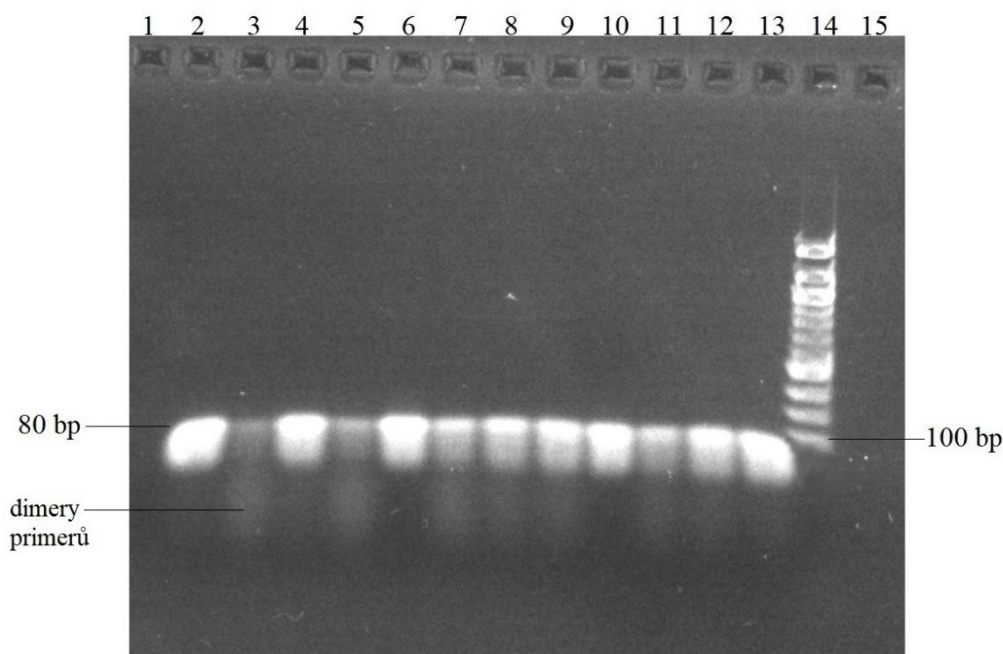
Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu
2	3	MČ	+++
3	3	Kit	+++
4	3	F	+++
5	Linex	MČ	–
6	Linex	Kit	–
7	Linex	F	–
8	Laktobacily	MČ	–
9	Laktobacily	Kit	–
10	Laktobacily	F	–
11	Biopron	MČ	–
12	Biopron	Kit	–
13	Biopron	F	+
14	Standard		
15	NK		–

Legenda: MČ – magnetické částice (F79/L3-PLL), F – fenolová extrakce, NK – negativní kontrola, + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován, 3 – čistá bakteriální kultura (viz. bod 4.1.2)

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* mají deklarovanou výrobky Biopron 9 premium a GS Laktobacily Forte 21. Specifický PCR produkt (400 a 200 bp) byl však detekován pouze u výrobků Biopron 9 premium, v případě výrobku GS Laktobacily Forte 21 k detekci specifického PCR produktu nedošlo. Měření bylo provedeno dvakrát, přičemž byl získán stejný výsledek. Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* byla tedy prokázána pouze u jednoho probiotického výrobku.

5.3.7 Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus paracasei*

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus paracasei* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Použitím primerů specifických pro tento druh (primery F_paca_IS, R_paca_IS [47]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 80 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus paracasei* 1753^T (viz. bod 4.1.2). Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obrázku 16. Schéma nanášení vzorků je uvedeno v Tabulce 21.



Obrázek 16: Gelová elektroforéza PCR produktu specifického pro druh *Lactobacillus paracasei*

Tabulka 21: Schéma nanášení PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus paracasei* na agarózový gel (Obrázek 16)

Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu
2	5	MČ	+++
3	Linex		+
4	Laktobacily		+++
5	Biopron		+

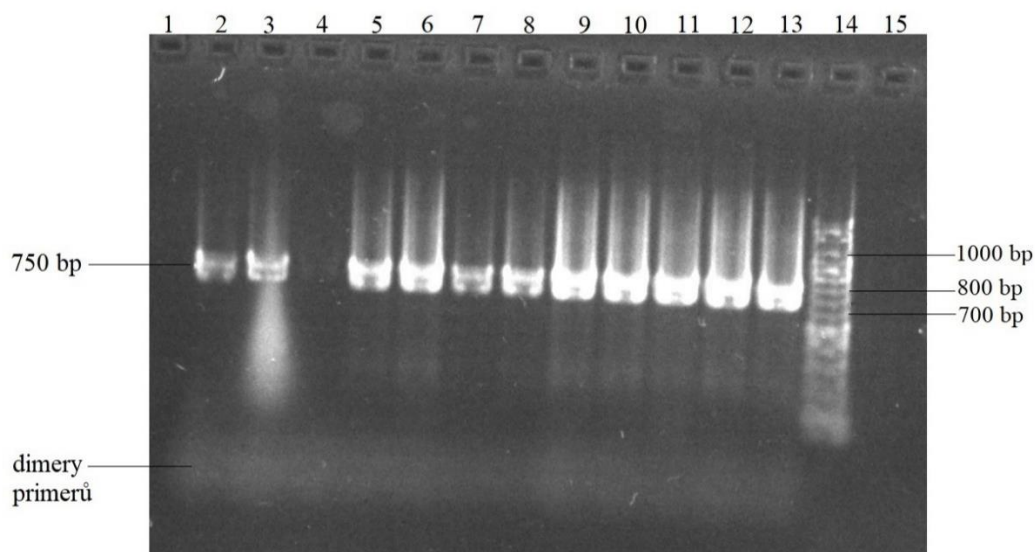
6	5	Kit	+++
7	Linex		++
8	Laktobacily		+++
9	Biopron		+++
10	5	F	+++
11	Linex		++
12	Laktobacily		+++
13	Biopron		+++
14	Standard		
15	NK		–

Legenda: MČ – magnetické částice (F79/L3-PLL), F – fenolová extrakce, NK – negativní kontrola, + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován, 5 – čistá bakteriální kultura (viz. bod 4.1.2)

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus paracasei* má deklarovanou výrobek GS Laktobacily Forte 21. Specifický PCR produkt (80 bp) byl však detekován v případě všech testovaných výrobků, tedy GS Laktobacily Forte 21, Biopron 9 premium i Linex® Forte. Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus paracasei* byla tedy prokázána u všech testovaných probiotických doplňků stravy.

5.3.8 Prokázání přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus*

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Použitím primerů specifických pro tento druh (primery Aci 16SI, Aci 16SII [50]) byly amplifikovány úseky DNA o délce 750 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus acidophilus* 4833^T (viz. bod 4.1.2). Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na Obrázku 17. Schéma nanášení vzorků je uvedeno v Tabulce 22.



Obrázek 17: Gelová elektroforéza PCR produktu specifického pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Tabulka 22: Schéma nanesení PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus* na agarózový gel (Obrázek 17)

Běh	Vzorek	Izolace	Detekce PCR produktu
2	6	MČ	++
3	6	F	++
4	6	Kit	+
5	Linex	MČ	+++
6	Laktobacily		+++
7	Biopron		++
8	Linex	Kit	++
9	Laktobacily		+++
10	Biopron		+++
11	Linex	F	+++
12	Laktobacily		+++
13	Biopron		+++
14	Standard		
15	NK		–

Legenda: MČ – magnetické částice (F79/L3-PLL), F – fenolová extrakce, NK – negativní kontrola, + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován, 5 – čistá bakteriální kultura (viz. bod 4.1.2)

Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* mají deklarovanou výrobky Biopron 9 premium a Linex® Forte. V případě výrobku GS Laktobacily Forte 21 tento bakteriální druh deklarovaný není. Specifický PCR produkt (750 bp) byl však detekován u všech testovaných výrobků, tedy Biopron 9 premium, Linex® Forte i GS Laktobacily Forte 21. Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* byla tedy prokázána ve všech probiotických doplňcích stravy.

5.3.9 Shrnutí výsledků ověření přítomnosti deklarovaných bakteriálních rodů a druhů v testovaných probiotických výrobcích

Přítomnost deklarovaných bakteriálních rodů a druhů v probiotických výrobcích byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase a specifické PCR produkty byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 23.

Tabulka 23: Shrnutí výsledků ověření přítomnosti deklarovaných bakteriálních rodů a druhů

	Výrobek		
	Linex® Forte	Biopron 9 premium	GS Laktobacily Forte 21
Doména <i>Bacteria</i>	+/+	+/+	+/+
Rod <i>Lactobacillus</i>	+/+	+/+	+/+
Rod <i>Bifidobacterium</i>	+/+	+/+	+/-
Druh <i>Lbc. casei</i>	-/-	+/+	-/+
Druh <i>Lbc. plantarum</i>	-/-	+/+	+/-
Druh <i>Lbc. rhamnosus</i>	-/-	+/+	+/-
Druh <i>Lbc. paracasei</i>	-/+	-/+	+/+
Druh <i>Lbc. acidophilus</i>	+/+	+/+	-/+

Legenda: +/+ – přítomnost DNA deklarována a ověřena, +/- – přítomnost DNA deklarována ale neověřena, -/+ – přítomnost DNA nedeklarována ale ověřena, -/- – přítomnost DNA nedeklarována a neověřena

Přítomnost výrobcem deklarovaných bakteriálních rodů a druhů byla ověřena v případě probiotického výrobku Linex® Forte a Biopron 9 premium, přičemž v obou těchto výrobcích byla navíc detekována přítomnost bakteriálního druhu *Lbc. paracasei*, který není výrobcem deklarován.

V rámci výrobku GS Laktobacily Forte 21 nebyla ověřena přítomnost deklarovaného bakteriálního rodu *Bifidobacterium* a bakteriálních druhů *Lbc. plantarum* a *Lbc. rhamnosus*. Naopak byla detekována přítomnost bakteriálního druhu *Lbc. casei* a *Lbc. acidophilus*, které však nejsou výrobcem deklarovány.

5.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)

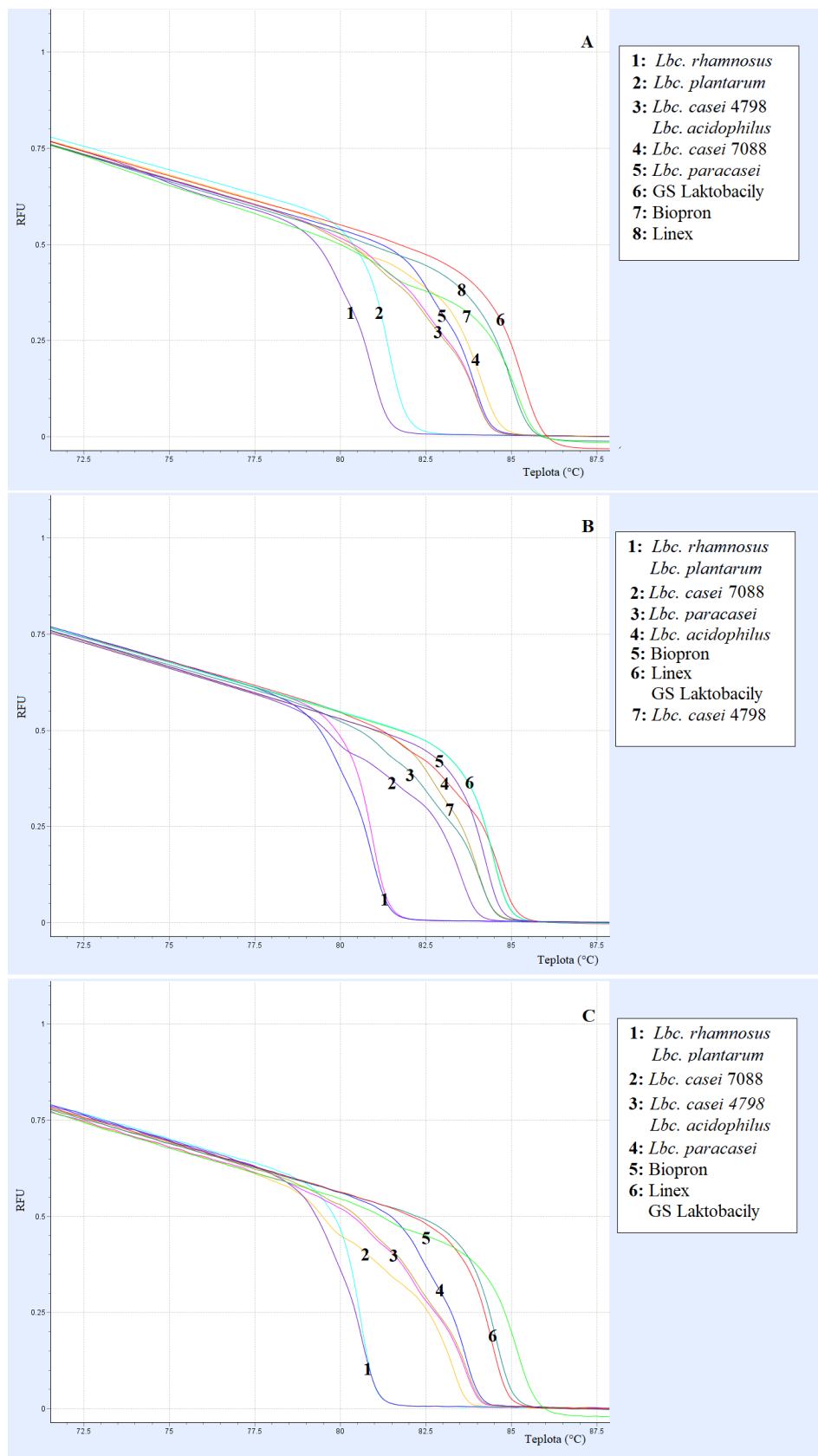
Polymerázová řetězová reakce spolu s vysokorozlišovací analýzou křivek tání byla použita za účelem rozlišení bakteriálních kmenů patřících do skupiny *Lactobacillus*. Použité primery pro PCR-HRM jsou uvedeny v Tabulce 7, složení PCR směsi v Tabulce 9 a použité bakteriální kultury jsou uvedeny v Tabulce 4. Amplifikační programy včetně melt analýzy jsou uvedeny v Tabulce 11 a polymerázová řetězová reakce byla provedena dle postupu 4.2.6.2. Vzorky DNA o koncentraci vyšší než 10 ng/μl (viz. Tabulka 12) byly před zahájením PCR-HRM analýzy zředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl (objem 50 μl).

5.4.1 PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM

Vzorky DNA byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a následně byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání s primery V1F-HRM a V1R-HRM [52] navrženými pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* včetně rozlišení blízké příbuzných druhů *Lbc. casei*, *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. paracasei*. Zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 24 a křivky tání na Obrázku 18.

Tabulka 24: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM

	F79/L3-PLL	Fenolová extrakce	Komerční kit
	T_m (°C)		
<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	83,90	82,98	83,28
<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	81,27	80,45	80,79
<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	80,63	80,31	80,62
<i>Lbc. casei</i> 4798	83,57	83,18	83,68
<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	83,56	83,26	83,73
<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T	83,57	83,23	84,42
Linex® Forte	84,77	84,38	84,28
Biopron 9 premium	84,93	85,01	84,04
GS Laktobacily Forte 21	85,16	84,24	84,30



Obrázek 18: Normalizované křivky tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů V1F-HRM a V1R-HRM.

A: izolace DNA magnetickými nosiči F79/L3-PLL; B: izolace DNA komerčním kitem; C: izolace DNA fenolovou extrakcí

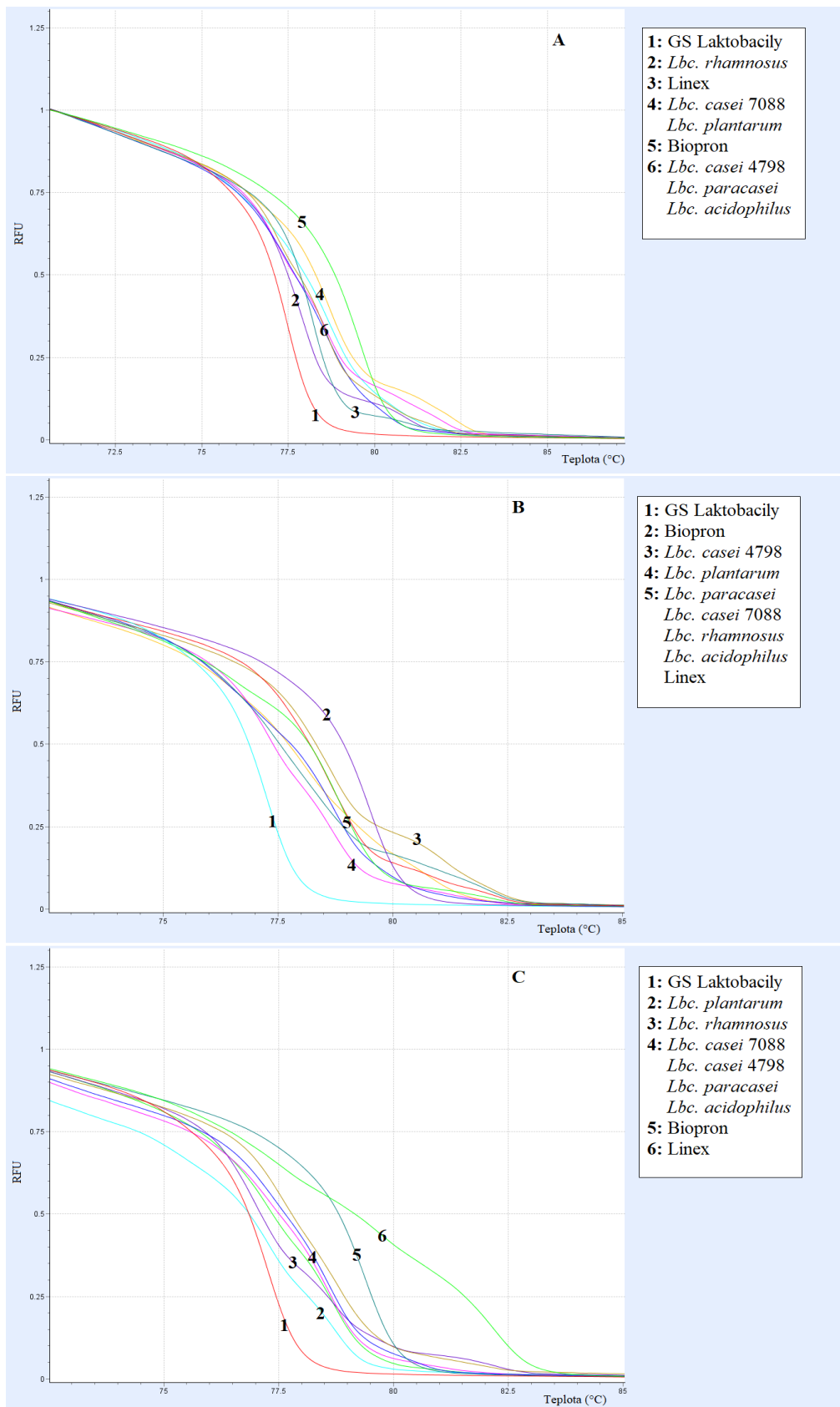
Dle naměřených křivek tání a dle teplot tání lze říci, že se podařilo pomocí primerů V1F-HRM a V1R-HRM rozlišit bakteriální kmen *Lactobacillus casei* 7088^T a *Lactobacillus paracasei* 1753^T od všech ostatních vzorků u všech typů izolace DNA. Blízce příbuzné druhy *Lbc. casei*, *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. paracasei* se podařilo rozlišit nezávisle na typu izolace DNA. Bakteriální kmeny vyskytující se ve směsích v probiotických výrobcích se rozlišit nepodařilo. Probiotické výrobky se podařilo od sebe rozlišit pouze v případě izolace DNA magnetickými nosiči.

5.4.2 PCR-HRM s využitím primerů CHAU-V3F a CHAU-V3R

Vzorky DNA byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a následně byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání s primery CHAU-V3F a CHAU-V3R [53] navrženými pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus*. Zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 25 a křivky tání na Obrázku 19.

Tabulka 25: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů CHAU-V3F a CHAU-V3R

	F79/L3-PLL	Fenolová extrakce	Komerční kit
	T _m (°C)		
<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	78,57	78,12	78,06
<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	78,50	77,49	77,72
<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	77,68	77,05	78,53
<i>Lbc. casei</i> 4798	77,96	78,25	78,41
<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	78,23	78,25	77,77
<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T	78,16	78,17	78,46
Linex® Forte	78,10	81,90	78,74
Biopron 9 premium	79,39	79,25	79,35
GS Laktobacily Forte 21	77,38	77,12	77,12



Obrázek 19: Normalizované křivky tání charakterické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů CHAU-V3F a CHAU-V3R.

A: izolace DNA magnetickými nosiči F79/L3-PLL; *B:* izolace DNA komerčním kitem; *C:* izolace DNA fenolovou extrakcí

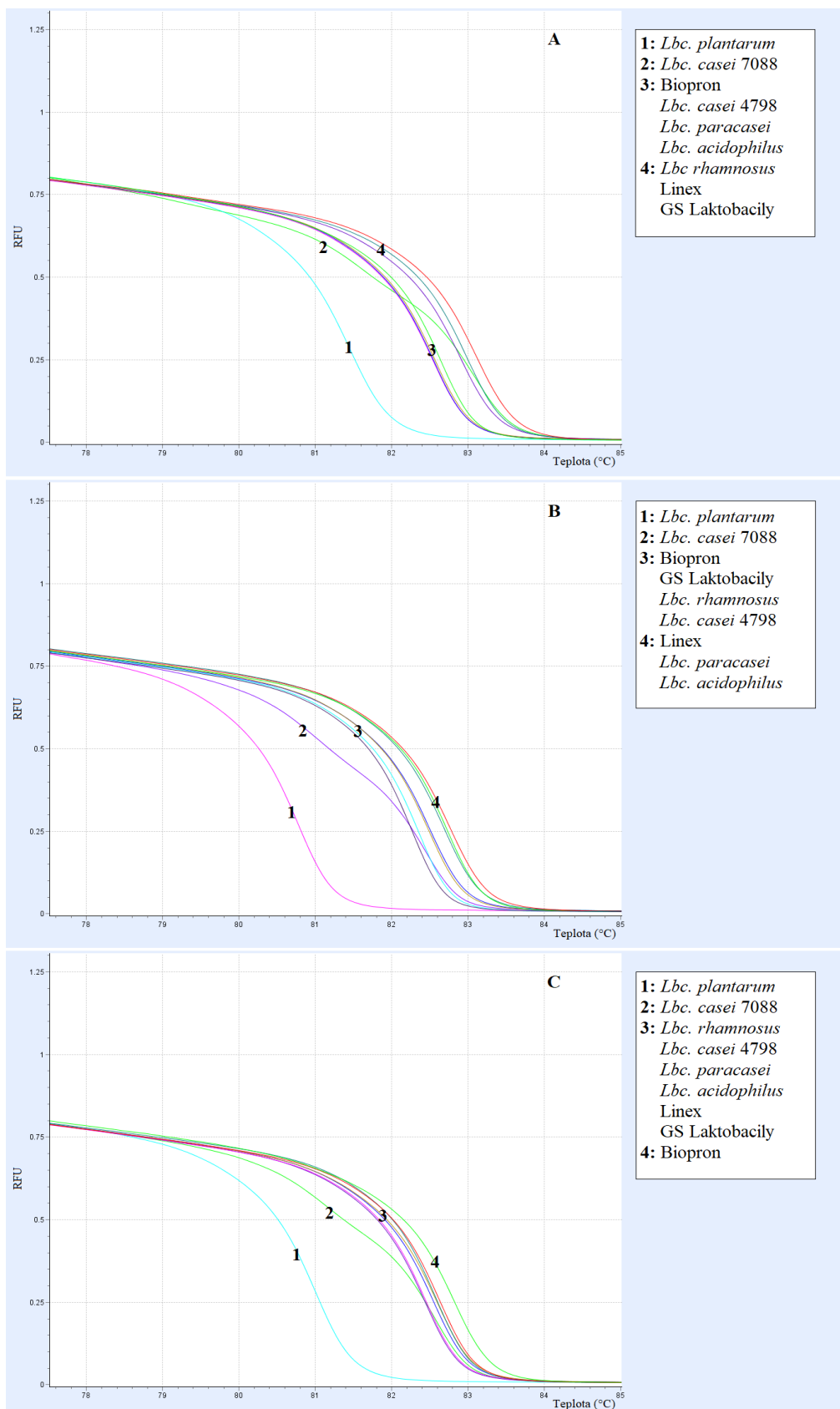
Podle křivek tání a podle naměřených teplot tání jednotlivých vzorků lze říci, že s využitím primerů CHAU-V3F a CHAU-V3R se nepodařilo rozlišit bakteriální druhy rodu *Lactobacillus*. Bakteriální kmeny vyskytující se ve směsi v probiotických výrobcích se rozlišit nepodařilo. Probiotické výrobky se podařilo rozlišit v případě izolace DNA fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči.

5.4.3 PCR-HRM s využitím primerů CHAU-V6F a CHAU-V6R

Vzorky DNA byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a následně byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání s primery CHAU-V6F a CHAU-V6R [53] navrženými pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus*. Zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 26 a křivky tání na Obrázku 20.

Tabulka 26: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů CHAU-V6F a CHAU-V6R

	F79/L3-PLL	Fenolová extrakce	Komerční kit
	T _m (°C)		
<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	82,80	82,27	82,09
<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	81,29	80,84	80,60
<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	82,73	82,25	82,32
<i>Lbc. casei</i> 4798	82,34	82,27	82,29
<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	82,35	82,37	82,51
<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T	82,37	82,41	82,59
Linex® Forte	82,82	82,42	82,55
Biopron 9 premium	82,46	82,65	82,08
GS Laktobacily Forte 21	82,95	82,46	82,16



Obrázek 20: Normalizované křivky tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů CHAU-V6F a CHAU-V6R.

A: izolace DNA magnetickými nosiči F79/L3-PLL; B: izolace DNA komerčním kitem; C: izolace DNA fenolovou extrakcí

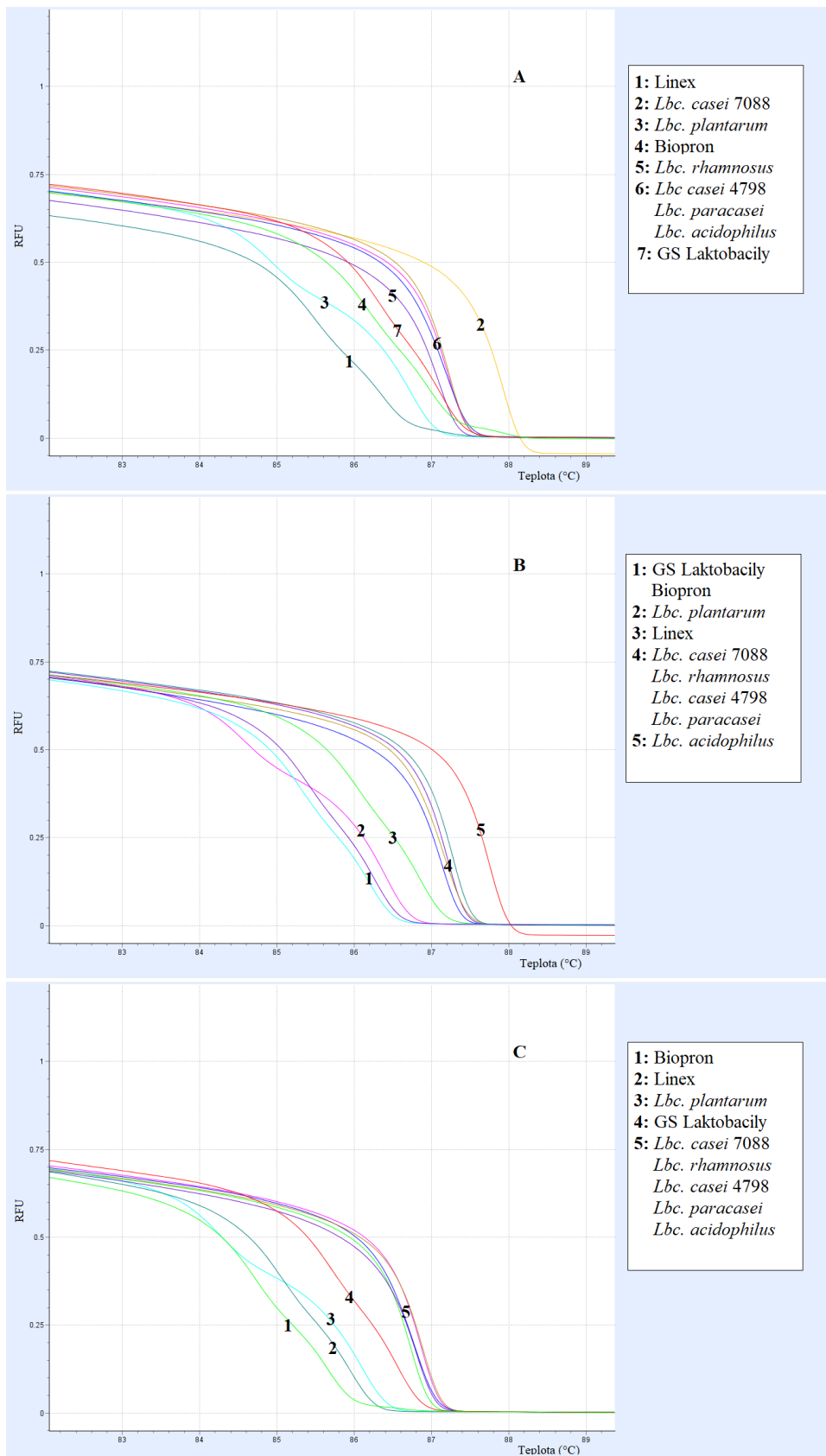
Dle naměřených křivek tání a dle teplot tání lze říci, že se podařilo pomocí primerů CHAU-V6F a CHAU-V6R oddělit bakteriální kmen *Lactobacillus plantarum* 7039^T a bakteriální kmen *Lactobacillus casei* 7088^T v případě všech typů izolace DNA. Bakteriální kmeny vyskytující se ve směsích probiotických výrobcích se rozlišit nepodařilo. Probiotické výrobky se nepodařilo od ostatních vzorků rozlišit

5.4.4 PCR-HRM s využitím primerů LAC2 a LAC4

Vzorky DNA byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a následně byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání s primery LAC2 [54] a LAC4 [55] navrženými pro rozlišení bakterií mléčného kvašení. Zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 27 a křivky tání na Obrázku 21.

Tabulka 27: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů LAC2 a LAC4

	F79/L3-PLL	Fenolová extrakce	Komerční kit
	T _m (°C)		
<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	87,72	86,54	87,02
<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	86,33	85,68	86,05
<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	86,85	86,58	86,92
<i>Lbc. casei</i> 4798	87,01	86,67	86,98
<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	86,98	86,58	87,09
<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T	87,03	86,69	87,57
Linex® Forte	85,73	85,36	86,34
Biopron 9 premium	86,42	85,01	85,73
GS Laktobacily Forte 21	86,59	86,04	85,61



Obrázek 21: Normalizované křivky tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů LAC2 a LAC4.

A: izolace DNA magnetickými nosiči F79/L3-PLL; B: izolace DNA komerčním kitem; C: izolace DNA fenolovou extrakcí

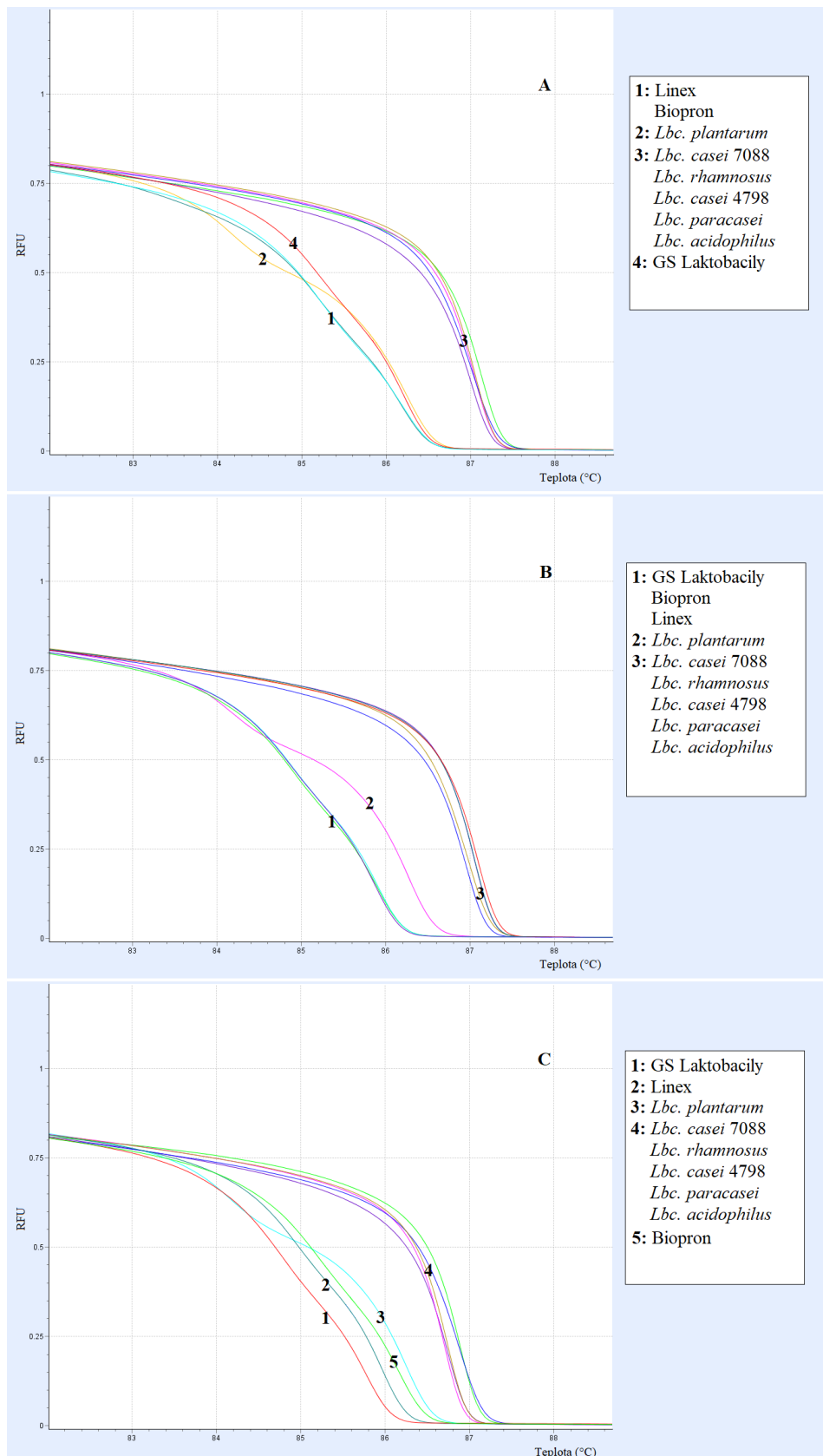
Dle naměřených křivek tání a dle teplot tání lze říci, že se podařilo pomocí primerů LAC2 a LAC4 oddělit bakteriální kmen *Lactobacillus plantarum* 7039^T u všech typů izolace DNA. Bakteriální kmeny vyskytující se ve směsích v probiotických výrobcích se však rozlišit nepodařilo. Probiotické výrobky se podařilo rozlišit v případě izolace DNA magnetickými nosiči a fenolovou extrakcí.

5.4.5 PCR-HRM s využitím primerů LAC1 a LAC2

Vzorky DNA byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a následně byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání s primery LAC1 a LAC2 [54] navrženými pro rozlišení bakterií mléčného kvašení. Zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 28 a křivky tání na Obrázku 22.

Tabulka 28: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů LAC1 a LAC2

	F79/L3-PLL	Fenolová extrakce	Komerční kit
	T _m (°C)		
<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	86,93	86,70	86,87
<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	85,91	85,95	85,99
<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	86,77	86,53	86,75
<i>Lbc. casei</i> 4798	86,84	86,53	86,78
<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	86,82	86,68	86,87
<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T	86,86	86,56	86,90
Linex® Forte	85,56	85,47	85,33
Biopron 9 premium	85,53	85,63	85,35
GS Laktobacily Forte 21	85,71	85,18	85,36



Obrázek 22: Normalizované křivky tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů LAC1 a LAC2.

A: izolace DNA magnetickými nosiči F79/L3-PLL; B: izolace DNA komerčním kitem; C: izolace DNA fenolovou extrakcí

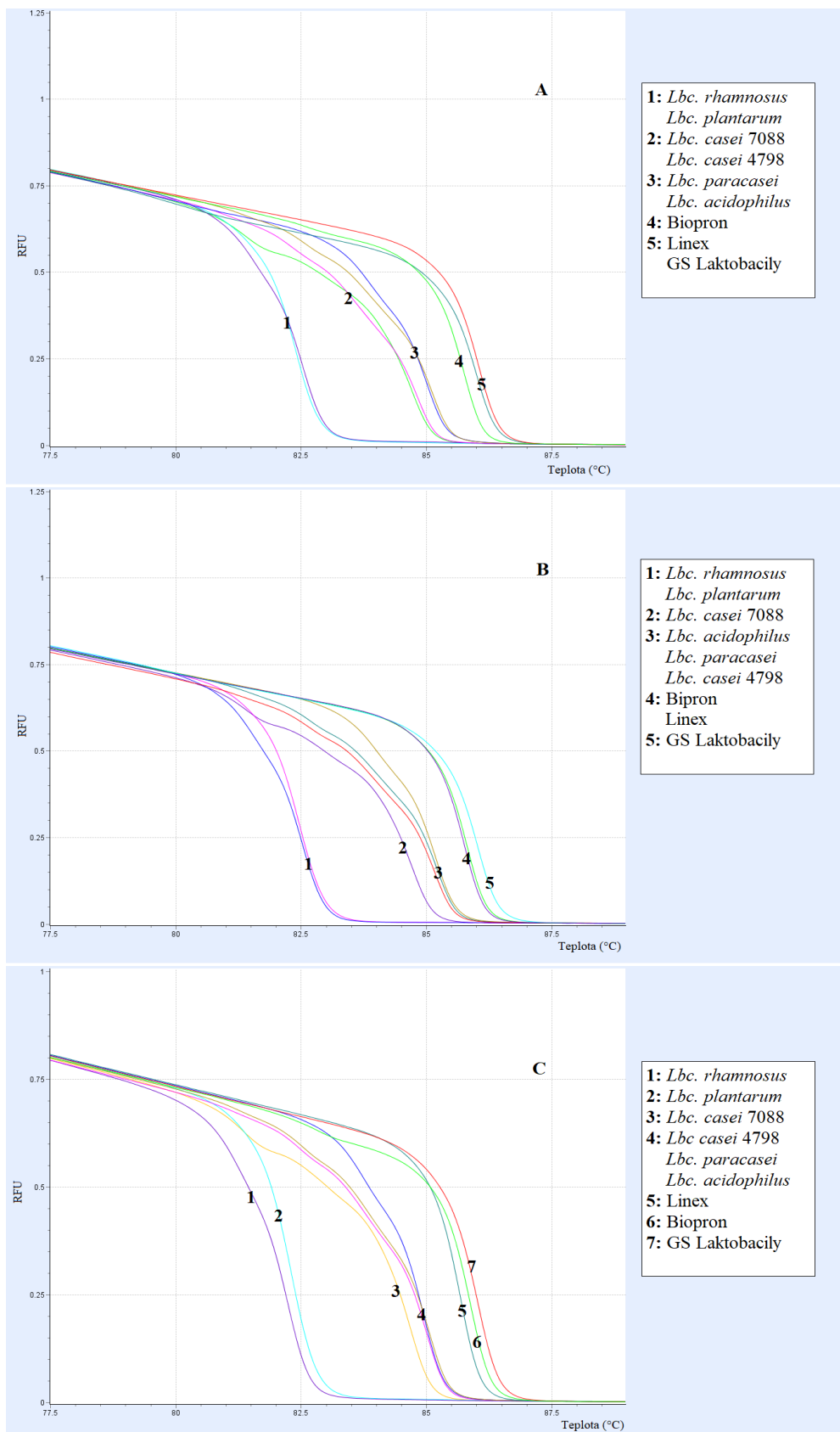
Dle naměřených křivek tání a dle teplot tání lze říci, že se podařilo pomocí primerů LAC1 a LAC2 oddělit bakteriální kmen *Lactobacillus plantarum* 7039^T u všech typů izolace DNA. Bakteriální kmeny vyskytující se ve směsích v probiotických výrobcích se však rozlišit nepodařilo. Probiotické výrobky se podařilo rozlišit pouze v případě izolace DNA fenolovou extrakcí.

5.4.6 PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1

Vzorky DNA byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a následně byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání s primery P1V1 a P2V1 [56] navrženými pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus*. Zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 29 a křivky tání na Obrázku 23.

Tabulka 29: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1

	F79/L3-PLL	Fenolová extrakce	Komerční kit
	T _m (°C)		
<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	84,43	84,44	84,45
<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	82,26	82,20	82,35
<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	82,28	81,98	82,28
<i>Lbc. casei</i> 4798	84,40	84,69	84,91
<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	84,69	84,68	84,89
<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T	84,77	84,74	84,82
Linex® Forte	85,82	85,55	85,65
Biopron 9 premium	85,58	85,75	85,60
GS Laktobacily Forte 21	85,90	85,87	85,86



Obrázek 23: Normalizované křivky tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů P1V1 a P2V1.

A: izolace DNA magnetickými nosiči F79/L3-PLL; B: izolace DNA komerčním kitem; C: izolace DNA fenolovou extrakcí

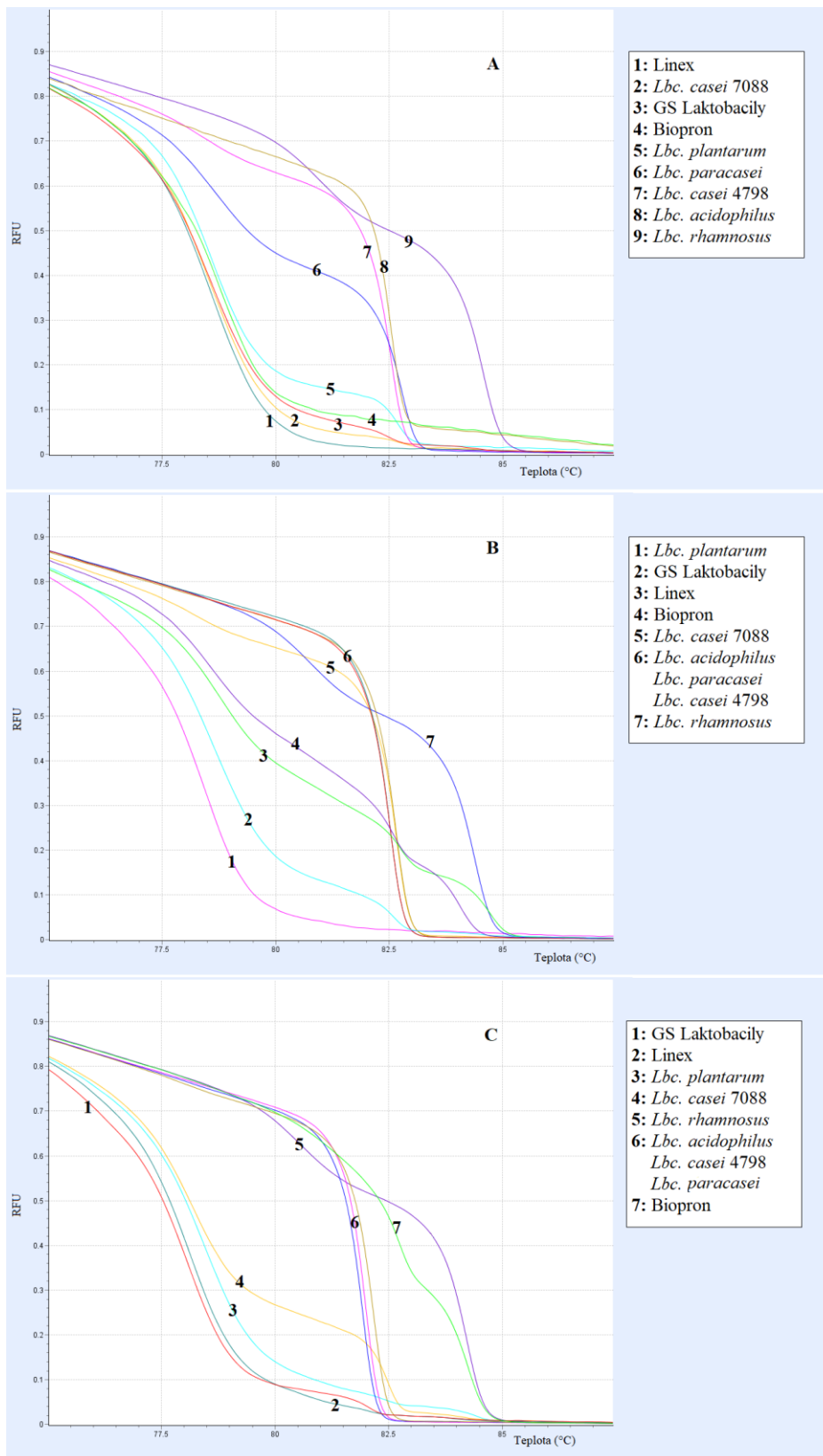
Pomocí primerů P1V1 a P2V1 se nepodařilo rozlišit bakteriální kmeny vyskytující se ve směsi v probiotických výrobcích. Podařilo se však od sebe rozlišit bakteriální druhy *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T, *Lactobacillus plantarum* 7039^T a *Lactobacillus casei* 7088^T v případě izolace DNA fenolovou extrakcí. Probiotické výrobky se podařilo rozlišit pouze v případě izolace DNA fenolovou extrakcí.

5.4.7 PCR-HRM s využitím primerů poxDNAFw a poxPromRVC

Vzorky DNA byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a následně byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání s primery poxDNAFw a poxPromRVC [57] navrženými pro rozlišení bakteriálních kmenů skupiny *Lactobacillus casei*. Zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 30 a křivky tání na Obrázku 24.

Tabulka 30: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů poxDNAFw a poxPromRVC

	F79/L3-PLL	Fenolová extrakce	Komerční kit
	T _m (°C)		
<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	78,52	78,10	82,51
<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	78,54	78,38	78,32
<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	84,41	84,07	84,22
<i>Lbc. casei</i> 4798	82,37	81,87	82,49
<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	82,59	81,78	82,37
<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T	82,43	82,02	82,37
Linex® Forte	78,53	78,05	78,73
Biopron 9 premium	78,70	83,68	82,67
GS Laktobacily Forte 21	78,51	77,98	78,61



Obrázek 24: Normalizované křivky tání charakterické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů poxcDNAFw a poxcPromRVC.

A: izolace DNA magnetickými nosiči F79/L3-PLL; B: izolace DNA komerčním kitem; C: izolace DNA fenolovou extrakcí

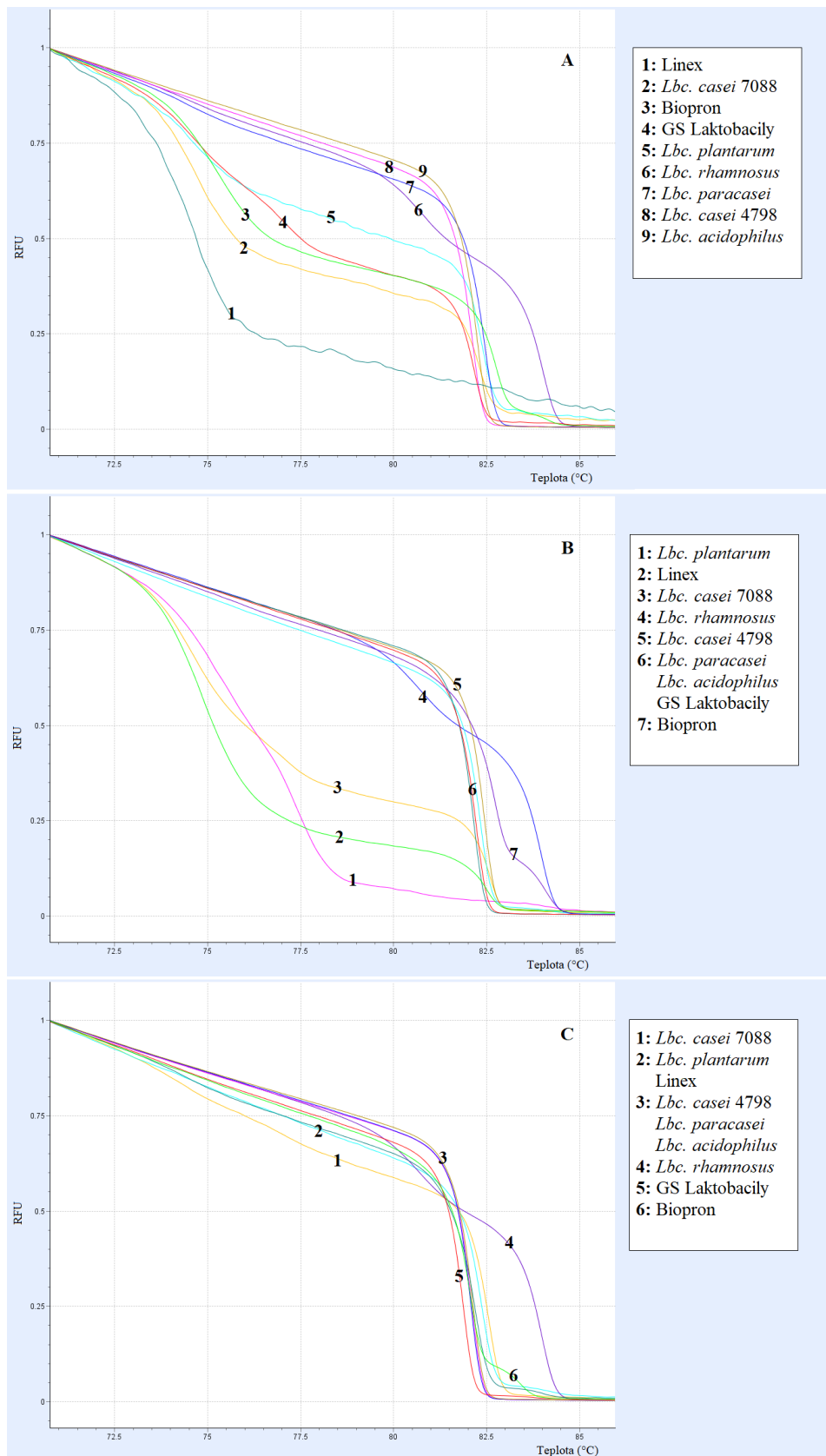
Dle křivek tání na Obrázku 24 A lze vidět, že se podařilo rozlišit všechny analyzované vzorky, přičemž DNA těchto vzorků byla izolována magnetickými částicemi F79/L3-PLL. V případě izolace DNA komerčním kitem (Obrázek 24 B) a fenolovou extrakcí (Obrázek 24 C) se podařilo od sebe rozlišit bakteriální kmeny *Lactobacillus plantarum* 7039^T, *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T a *Lactobacillus casei* 7088^T. Bakteriální kmeny vyskytující se ve směsích v probiotických výrobcích se však rozlišit nepodařilo. Probiotické výrobky se podařilo rozlišit nezávisle na typu izolace DNA.

5.4.8 PCR-HRM s využitím primerů poxcDNAFw a poxPromRVT

Vzorky DNA byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a následně byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání s primery poxcDNAFw a poxPromRVT [57] navrženými pro rozlišení bakteriálních kmenů skupiny *Lactobacillus casei*. Zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulce 31 a křivky tání na Obrázku 25.

Tabulka 31: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů poxcDNAFw a poxPromRVT

	F79/L3-PLL	Fenolová extrakce	Komerční kit
	T _m (°C)		
<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	74,65	82,41	74,63
<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	82,29	82,23	77,12
<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	83,81	83,80	83,76
<i>Lbc. casei</i> 4798	81,94	81,95	82,30
<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	82,28	81,94	82,00
<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T	82,07	81,98	82,05
Linex® Forte	74,49	82,01	74,84
Biopron 9 premium	82,63	81,93	82,60
GS Laktobacily Forte 21	82,02	81,72	82,19



Obrázek 25: Normalizované křivky tání charakteristické pro jednotlivé vzorky při PCR-HRM s využitím primerů *poxcDNAFw* a *poxcPromRVT*.

A: izolace DNA magnetickými nosiči F79/L3-PLL; B: izolace DNA komerčním kitem; C: izolace DNA fenolovou extrakcí

Dle křivek tání na Obrázku 25 A lze vidět, že se podařilo rozlišit všechny analyzované vzorky, přičemž DNA těchto vzorků byla izolována magnetickými částicemi F79/L3-PLL. V případě izolace DNA komerčním kitem (Obrázek 25 B) se podařilo rozlišit bakteriální kmeny *Lactobacillus plantarum* 7039^T, *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T, *Lactobacillus casei* 4798 a *Lactobacillus casei* 7088^T. V případě izolace DNA fenolovou extrakcí (Obrázek 25 C) se podařilo od sebe rozlišit bakteriální kmeny *Lactobacillus plantarum* 7039^T, *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T a *Lactobacillus casei* 7088^T. Bakteriální kmeny vyskytující se ve směsích v probiotických výrobcích se však rozlišit nepodařilo. Probiotické výrobky se podařilo rozlišit v případě izolace DNA magnetickými nosiči a fenolovou extrakcí.

5.4.9 Shrnutí výsledků PCR-HRM analýzy

V Tabulce 32 jsou uvedeny výsledky rozlišení jednotlivých bakteriálních druhů a v Tabulce 33 jsou uvedeny výsledky rozlišení probiotických doplňků stravy od ostatních vzorků pomocí PCR-HRM analýzy s využitím různých sad primerů.

Tabulka 32: Shrnutí výsledků rozlišení bakteriálních druhů pomocí PCR-HRM analýzy

		Bakteriální kmen					
Primery	Typ izolace	<i>Lbc. casei</i> 7088 ^T	<i>Lbc. plantarum</i> 7039 ^T	<i>Lbc. rhamnosus</i> 1823 ^T	<i>Lbc. casei</i> 4798	<i>Lbc. paracasei</i> 1753 ^T	<i>Lbc. acidophilus</i> 4833 ^T
V1F-HRM V1R-HRM	MČ	+	+	+	-	+	-
	K	+	-	-	+	+	+
	F	+	-	-	-	+	-
CHAU-V3F CHAU-V3R	MČ	-	-	+	-	-	-
	K	-	+	-	+	-	-
	F	-	+	+	-	-	-
CHAU-V6F CHAU-V6R	MČ	+	+	-	-	-	-
	K	+	+	-	-	-	-
	F	+	+	-	-	-	-
LAC2 LAC4	MČ	+	+	+	-	-	-
	K	-	+	-	-	-	+
	F	-	+	-	-	-	-
LAC1 LAC2	MČ	-	+	-	-	-	-
	K	-	+	-	-	-	-
	F	-	+	-	-	-	-
poxcDNAFw poxPromRVC	MČ	+	+	+	+	+	+
	K	+	+	+	-	-	-
	F	+	+	+	-	-	-

poxcDNAFw poxPromRVT	MČ	+	+	+	+	+	+
	K	+	+	+	+	-	-
	F	+	+	+	-	-	-
P1V1 P2V1	MČ	-	-	-	-	-	-
	K	+	-	-	-	-	-
	F	+	+	+	-	-	-

Legenda: - nerozlišen, + rozlišen, MČ – magnetické částice, K – komerční kit, F – fenolová extrakce

Tabulka 33: Shrnutí výsledků rozlišení probiotických výrobků od ostatních vzorků pomocí PCR-HRM analýzy

		Probiotický výrobek		
Primery	Typ izolace	Linex	Biopron	GS Laktobacily
V1F-HRM V1R-HRM	MČ	+	+	+
	K	-	+	-
	F	-	+	-
CHAU-V3F CHAU-V3R	MČ	+	+	+
	K	-	+	+
	F	+	+	+
CHAU-V6F CHAU-V6R	MČ	-	-	-
	K	-	-	-
	F	-	+	-
LAC2 LAC4	MČ	+	+	+
	K	+	-	-
	F	+	+	+
LAC1 LAC2	MČ	-	-	+
	K	-	-	-
	F	+	+	+
poxcDNAFw poxPromRVC	MČ	+	+	+
	K	+	+	+
	F	+	+	+
poxcDNAFw poxPromRVT	MČ	+	+	+
	K	+	+	-
	F	-	+	+
P1V1 P2V1	MČ	-	+	-
	K	-	-	+
	F	+	+	+

Legenda: - nerozlišen, + rozlišen, MČ – magnetické částice, K – komerční kit, F – fenolová extrakce

Dle uvedených výsledků PCR-HRM analýzy lze říci, že pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* jsou z testovaných primerů nejvhodnější primery poxcDNAFw a poxPromRVC, poxcDNAFw a poxPromRVT [57], V1F-HRM a V1R-HRM [52]. Naopak nejhoršího rozlišení bylo dosaženo za použití primerů LAC1 a LAC2 [54], P1V1 a P2V1 [56].

Probiotické doplňky stravy byly od ostatních vzorků nejlépe rozlišeny pomocí primerů CHAU-V3F a CHAU-V3R [53], poxcDNAFw a poxPromRVC [57]. Naopak nejhorších výsledků bylo dosaženo za použití primerů CHAU-V6F a CHAU-V6R [53].

6 DISKUZE

6.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Celková koncentrace nukleových kyselin naměřená spektrofotometricky se v jednotlivých vzorcích pohybovala v rozmezí 2,4–3931,2 ng/μl a lišila se v závislosti na použité izolační metodě (viz. Tabulka 12). Pro porovnání množství DNA získané jednotlivými separačními metodami byla spektrofotometricky stanovená koncentrace přepočítána na objem 50 μl použitých hrubých lyzátů buněk a na eluci DNA do 50 μl TE pufru (viz. bod 5.2.1). Hodnoty teoreticky přepočítané koncentrace izolované DNA se pohybovaly v rozmezí 2,4–393,12 ng/μl. Nejnižších koncentrací bylo dosaženo při izolaci pomocí magnetických částic, naopak nejvyšších koncentrací bylo dosaženo izolací DNA fenolovou extrakcí.

Co se týče probiotických výrobků, nejvyšší výtěžky nukleových kyselin byly získány z výrobku GS Laktobacily Forte 21 nezávisle na typu izolace, přičemž celkově největšího výtěžku nukleových kyselin bylo dosaženo v případě výrobku GS Laktobacily Forte 21 fenolovou extrakcí.

Poměr absorbcí A_{260}/A_{280} pro jednotlivé vzorky je uveden v Tabulce 12 a pohyboval se v rozmezí 1,36–2,11. Z naměřených hodnot lze vidět, že nejčistší DNA byla získána izolací pomocí komerčního kitu. Vzorky získané izolací magnetickými nosiči byly znečištěny proteiny, naopak vzorky izolované fenolovou extrakcí obsahovaly malé množství RNA. Míra znečištění probiotických výrobků se v rámci jedné izolační metody téměř nelišila. Uvedené kontaminanty jsou pro PCR a PCR-HRM analýzy nežádoucí, neboť by mohly interferovat. Vzorky jsou však před použitím v rámci těchto analýz zředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl, čímž jsou naředěny i kontaminanty a inhibitory PCR.

6.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase a detekce specifického produktu PCR agarózovou gelovou elektroforézou

Za účelem ověření přítomnosti bakteriální DNA ve vzorcích a přítomnosti výrobcem deklarovaných mikroorganismů v probiotických výrobcích (viz. Tabulka 3) byla provedena polymerázová řetězová reakce v reálném čase (amplifikační programy viz. Tabulka 10) s využitím primerů pro rodovou a druhovou identifikaci (viz. Tabulka 6). Pro všechny qPCR byla použita DNA izolovaná magnetickými částicemi, komerčním kitem a fenolovou extrakcí. Specifické PCR produkty byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou.

Shrnutí výsledků ověření přítomnosti výrobcem deklarovaných bakteriálních rodů a druhů v probiotických doplňcích stravy je uvedeno v Tabulce 23.

Výsledky samotné polymerázové řetězové reakce v reálném čase blíže diskutuje ve své diplomové práci Bc. Eva Chvalková, se kterou jsem na tomto experimentu spolupracovala a jejíž závěrečná práce se blíže zabývá izolačními metodami a real-time PCR.

6.2.1 Detekce PCR produktu specifického pro doménu *Bacteria*

Přítomnost bakteriální DNA deklarují výrobci všech testovaných probiotických doplňků stravy. Na agarózovém gelu jsou pro všechny vzorky izolované DNA i pro pozitivní kontrolu zřetelně viditelné pásy v oblasti 466 bp. Tyto pásy dokazují přítomnost bakteriální DNA ve všech probiotických výrobcích. Přítomnost bakteriální DNA byla stejným způsobem prokázána i jinými autory [47]. Intenzita pásů jednotlivých vzorků se od sebe liší, což může být způsobeno nestejnou koncentrací DNA ve vzorcích nebo nedostatečnou čistotou izolované DNA. Ve startu s negativní kontrolou není PCR produkt detekovatelný a v průběhu práce tedy nedošlo ke kontaminaci.

6.2.2 Detekce PCR produktu specifického pro rod *Bifidobacterium*

Přítomnost bakteriální DNA rodu *Bifidobacterium* deklarují výrobci všech testovaných probiotických doplňků stravy. Zřetelně viditelné pásy v oblasti 914 bp byly detekovány pouze v případě výrobku Linex® Forte a Biopron 9 Premium. V případě výrobku GS Laktobacily Forte 21 k detekci specifického PCR produktu nedošlo a přítomnost bakteriální DNA rodu *Bifidobacterium* v tomto probiotickém doplňku stravy za uvedených podmínek reakce potvrzena nebyla. Rodově specifické primery Pbi F1 a Pbi R2 byly stejným způsobem použity také autory v rámci jiné studie [49]. Deklarované údaje výrobku GS Laktobacily Forte 21 nejsou plně v souladu s výsledky této analýzy. Ve startu s negativní kontrolou není PCR produkt detekovatelný a v průběhu práce tedy nedošlo ke kontaminaci. Přítomnost bakteriální DNA rodu *Bifidobacterium* byla potvrzena pouze u dvou ze tří testovaných probiotických výrobků.

6.2.3 Detekce PCR produktu specifického pro rod *Lactobacillus* a pro bakteriální druhy spadající do tohoto rodu

Přítomnost bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* deklarují výrobci všech testovaných probiotických doplňků stravy. Zřetelně viditelné pásy v oblasti 250 bp byly detekovány v případě všech pozitivních kontrol i všech testovaných probiotických výrobků. Stejným způsobem byla DNA rodu *Lactobacillus* prokázána i jinými autory [48]. Přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* byla potvrzena ve všech testovaných probiotických výrobcích a výsledky jsou v souladu s údaji deklarovanými výrobcí.

Následně bylo provedeno 5 druhově specifických PCR, a to pro bakteriální druhy *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*.

Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus casei* je deklarována u probiotika Biopron 9 Premium. Zřetelně viditelné pásy v oblasti 132 bp byly detekovány v případě obou pozitivních kontrol a dvou probiotických výrobků, a to Biopron 9 Premium a GS Laktobacily Forte 21. Druhově specifické primery F_case_IS a R_case_IS byly pro identifikaci bakteriálního druhu

Lactobacillus casei použity i autory publikace [47]. Výrobce probiotika GS Laktobacily Forte 21 deklaruje přítomnost DNA druhu *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*. *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei* jsou blízké příbuzné bakteriální kmeny, které se řadí do skupiny *Lbc. casei* a které je těžké odlišit vzhledem k jejich vysoké podobnosti hypervariabilní oblasti 16S RNA. Pro rozlišení těchto bakteriálních druhů je zapotřebí vysoce specifických primerů, které však není jednoduché vytvořit. To je pravděpodobně příčinou přítomnosti jasně viditelných pásů i v případě výrobku GS Laktobacily Forte 21. Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus casei* byla ve výrobku Biopron 9 Premium potvrzena. Výrobce probiotika Linex® Forte nedeklaruje přítomnost tohoto bakteriálního druhu, což se potvrdilo agarózovou gelovou elektroforézou, kdy specifický PCR produkt nebyl detekován.

Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus plantarum* je deklarována u probiotika Biopron 9 Premium a GS Laktobacily Forte 21. Zřetelně viditelné pásy v oblasti 400 a 200 bp [50] byly detekovány pouze v případě výrobku Biopron 9 Premium a tím byla prokázána přítomnost DNA druhu *Lactobacillus plantarum*. V případě výrobku GS Laktobacily Forte k detekci specifického PCR produktu nedošlo. Výrobce probiotika Linex® Forte nedeklaruje přítomnost tohoto bakteriálního druhu, což se potvrdilo agarózovou gelovou elektroforézou, kdy specifický PCR produkt nebyl detekován.

Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* je deklarována u probiotika Biopron 9 Premium a GS Laktobacily Forte 21. Zřetelně viditelné pásy v oblasti 400 a 200 bp [50] byly detekovány pouze v případě výrobku Biopron 9 Premium, v případě výrobku GS Laktobacily Forte k detekci specifického PCR produktu nedošlo. Výrobce probiotika Linex® Forte nedeklaruje přítomnost tohoto bakteriálního druhu, což se potvrdilo agarózovou gelovou elektroforézou, kdy specifický PCR produkt nebyl detekován. Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* byla tedy prokázána pouze u jednoho probiotického výrobku.

Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus paracasei* je deklarována pouze u probiotika GS Laktobacily Forte 21. Zřetelně viditelné pásy v oblasti 80 bp byly detekovány v případě všech tří testovaných výrobků, tedy GS Laktobacily Forte 21, Biopron 9 Premium i Linex® Forte. Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus paracasei* byla stejným způsobem prokázána v rámci jiného experimentu autory publikace [47]. Přítomnost DNA bakterií druhu *Lactobacillus paracasei* byla prokázána u všech testovaných probiotických doplňků stravy, což v případě probiotika Linex® Forte a Biopron 9 Premium není plně v souladu s deklarovanými údaji na obalu.

Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* je deklarována u probiotika Linex® Forte a Biopron 9 Premium. Zřetelně viditelné pásy v oblasti 750 bp [50] byly detekovány v případě všech tří testovaných výrobků, tedy Linex® Forte, Biopron 9 Premium i GS Laktobacily Forte 21. Přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* byla prokázána v případě všech testovaných probiotických doplňků stravy a výsledky analýzy nejsou plně v souladu s údaji deklarovanými na obalu výrobku GS Laktobacily Forte 21.

Ve startu s negativní kontrolou není PCR produkt detekovatelný a v průběhu práce tedy nedošlo ke kontaminaci. Intenzita pásů jednotlivých vzorků se od sebe liší, což může být způsobeno nestejnou koncentrací DNA ve vzorcích nebo nedostatečnou čistotou izolované DNA.

Výsledky analýzy nebyly vždy v souladu s údaji deklarovanými výrobcí. V některých případech nedošlo k amplifikaci specifických PCR produktů. DNA daného bakteriálního druhu mohla být v probiotickém výrobku zastoupena v nižším množství, než je metoda qPCR schopna detekovat. Naopak v některých případech byl detekován PCR produkt specifický pro bakteriální druh, který není výrobcem deklarován.

K odchylkám od deklarovaných údajů došlo v případě všech tří testovaných probiotických preparátů. Nejvíce se s údaji na obalu shodovaly výsledky výrobků Linex® Forte a Biopron 9 premium. Nejméně v souladu s deklarovanými údaji byly výsledky pro probiotikum GS Laktobacily Forte 21.

6.3 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)

Polymerázová řetězová reakce spolu s vysokorozlišovací analýzou křivek tání byla použita za účelem rozlišení bakteriálních kmenů patřících do skupiny *Lactobacillus* a za účelem identifikace probiotických mikroorganismů přítomných ve směsi v probiotických doplňcích stravy. Pozornost byla zaměřena na šest referenčních vzorků (*Lactobacillus casei* 7088^T, *Lactobacillus plantarum* 7039^T, *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T, *Lactobacillus casei* 4798, *Lactobacillus paracasei* 1753^T a *Lactobacillus acidophilus* 4833^T) a tři probiotické doplňky stravy (GS Laktobacily Forte 21, Linex® Forte a Biopron 9 Premium). DNA všech vzorků byla izolovaná magnetickými částicemi, komerčním kitem a fenolovou extrakcí. Bylo testováno 8 různých párů primerů a výsledky analýz jsou shrnuty v Tabulce 34 a Tabulce 35.

Druhově specifické primery V1F-HRM a V1R-HRM [52], které jsou zaměřené na oblast V1 genů 16S rDNA byly navrženy pro rozlišení blízké příbuzných bakteriálních druhů (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*) spadajících do skupiny *Lactobacillus casei*. Dle výsledků PCR-HRM analýzy lze vidět, že se podařilo pomocí těchto primerů vzájemně rozlišit blízké příbuzné bakteriální kmeny (stejně jako autorům publikace [52]), konkrétně *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T, *Lactobacillus casei* 7088^T, *Lactobacillus casei* 4798 a *Lactobacillus paracasei* 1753^T nezávisle na typu izolace. Na křivkách tání příslušících směsným DNA nebyly detekovány inflexní body o teplotách tání odpovídajících obsaženým bakteriálním druhům a bakteriální kmeny vyskytující se ve směsi v probiotických výrobcích se tedy rozlišit nepodařilo. Z testovaných sad primerů byly tyto primery vyhodnoceny jako vhodné pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus*.

Dalšími primery vyhodnocenými jako vhodné pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* jsou poxcDNAFw a poxPromRVC/poxPromRVT [57]. Tyto primery jsou zaměřené na *spxB* gen kódující pyruvát oxidázu, který je součástí genomu bakterií patřících do skupiny *Lbc. casei*. Autorům publikace [57] se podařilo pomocí těchto primerů rozlišit blízké příbuzné bakteriální kmeny *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*. Dle výsledků PCR-HRM analýzy lze vidět, že se i v rámci tohoto experimentu podařilo rozlišit všechny testované bakteriální druhy (včetně blízké příbuzných druhů), přičemž DNA těchto vzorků byla izolována magnetickými částicemi F79/L3-PLL. V případě izolace DNA komerčním kitem a fenolovou extrakcí se podařilo rozlišit bakteriální kmeny *Lactobacillus plantarum* 7039^T, *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T a *Lactobacillus casei* 7088^T. Na křivkách tání příslušících směsným DNA nebyly detekovány inflexní body o teplotách tání

odpovídajících obsaženým bakteriálním druhům a bakteriální kmeny vyskytující se ve směsi v probiotických výrobcích se tedy rozlišit nepodařilo. Primery poxcDNAFw a poxPromRVT byly v porovnání s primery poxcDNAFw a poxPromRVC účinnější. Ačkoliv se primery poxPromRVT a poxPromRVC liší pouze v jediné bázi, i přesto lze pozorovat rozdíly mezi křivkami tání.

Primery LAC2 a LAC4 zaměřené na hypervariabilní oblast V3 genů 16S rRNA byly úspěšně použity autory publikace [55] pro identifikaci kmene *Lactobacillus plantarum* v silážích pšenice. Rozlišení bakteriálního kmene *Lbc. plantarum* od ostatních testovaných kmenů se v rámci tohoto experimentu podařilo, avšak nepodařilo se jej identifikovat ve směsi v probiotických výrobcích. Ostatní testované bakteriální kmeny se rozlišit nepodařilo.

Dále byly testovány primery CHAU-V3F a CHAU-V3R [53] zaměřené na hypervariabilní oblast V3 genů 16S rDNA, primery CHAU-V6F a CHAU-V6R [53] zaměřené na hypervariabilní oblast V6 genů 16S rDNA, primery LAC2 a LAC1 [54] zaměřené na hypervariabilní oblast V3 genů 16S rRNA a primery P1V1 a P2V1 [56] zaměřené na hypervariabilní oblast V1 genů 16S rRNA. Dle výsledků PCR-HRM analýzy lze vidět, že se pomocí těchto primerů nepodařilo rozlišit jednotlivé bakteriální druhy a nepodařilo se je rozlišit ani v jejich směsi v probiotických výrobcích. Křivky tání jednotlivých referenčních vzorků vykazovaly velmi podobné tvary a teploty tání se od sebe také příliš nelišily. Z testovaných sad primerů byly tyto primery vyhodnoceny jako nevhodné pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus*.

Ne všechny testované primery umožnily druhové rozlišení jednotlivých kmenů, je proto vhodné použít kombinaci více metod k jednoznačnému průkazu jejich přítomnosti.

7 ZÁVĚR

V experimentální části diplomové práce byla pozornost zaměřena na šest referenčních bakteriálních kmenů (*Lactobacillus casei* 7088^T, *Lactobacillus plantarum* 7039^T, *Lactobacillus rhamnosus* 1823^T, *Lactobacillus casei* 4798, *Lactobacillus paracasei* 1753^T, *Lactobacillus acidophilus* 4833^T) a na tři probiotické doplňky stravy (Linex® Forte, Biopron 9 Premium, GS Laktobacily Forte 21), které se vzájemně odlišují škálou obsažených bakteriálních druhů a jejich množstvím. DNA byla z čistých bakteriálních kultur a z komplexních matric výrobků izolována třemi různými metodami izolace (magnetickými částicemi F79/L3-PLL, komerčním kitem a fenolovou extrakcí). Kvalita izolované bakteriální DNA byla vyhodnocena s ohledem na množství a čistotu spektrofotometricky. Izolovaná DNA byla následně použita za účelem ověření přítomnosti deklarovaných bakteriálních rodů a druhů pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase a specifické PCR produkty byly podrobeny agarózové gelové elektroforéze.

Největších výtěžků DNA bylo dosaženo izolací fenolovou extrakcí, naopak nejnižší výtěžky byly získány izolací magnetickými nosiči. Z hlediska čistoty DNA bylo pro izolaci nejvhodnější použití komerčního kitu, naopak nejvíce znečištěná byla DNA izolovaná magnetickými částicemi.

Přítomnost výrobcem deklarovaných bakteriálních rodů a druhů byla ověřena v případě probiotického výrobku Linex® Forte a Biopron 9 Premium, přičemž v obou těchto výrobcích byla navíc zjištěna přítomnost bakteriálního druhu *Lbc. paracasei*, který není výrobcem deklarován. V rámci výrobku GS Laktobacily Forte 21 nebyla ověřena přítomnost deklarovaného rodu *Bifidobacterium* a bakteriálních druhů *Lbc. plantarum* a *Lbc. rhamnosus*. Naopak zde byla zjištěna přítomnost bakteriálního druhu *Lbc. casei* a *Lbc. acidophilus*, které však nejsou výrobcem deklarovány.

V poslední části diplomové práce bylo testováno osm sad primerů (V1F-HRM a V1R-HRM, CHAU-V3F a CHAU-V3R, CHAU-V6F a CHAU-V6R, LAC2 a LAC4, LAC1 a LAC2, P1V1 a P2V1, poxcDNAFw a poxPromRVC, poxcDNAFw a poxPromRVT) za účelem rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* a za účelem jejich identifikace ve směsi v probiotických doplňcích stravy. Jako nejvhodnější pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* byly vyhodnoceny primery V1F-HRM a V1R-HRM, poxcDNAFw a poxPromRVC/poxPromRVT. Dále bylo zjištěno, že metoda izolace DNA může částečně ovlivnit výsledné křivky tání komplexních vzorků. Kombinace několika molekulárně biologických metod je zásadní pro jednoznačnou analýzu obsahu jednotlivých kmenů.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MCDOUGALL, I.a. The Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients - Health Benefits and Food Applications. *International Journal of Dairy Technology* [online]. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2011, **64**(3), 456-456 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2011.00670.x. ISSN 1364727X. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/876174164/>
- [2] TRIPATHI, M.k. a GIRI. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* [online]. Elsevier Ltd, 2014, **9**(1), 225-241 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.jff.2014.04.030. ISSN 1756-4646.
- [3] NEUMANN ELISABETH, , TEIXEIRA SANTUZA MR, HORTA MARIA F, MOTA RODRIGO M, MOREIRA JOÃO, NICOLI JACQUES R a NUNES ÁLVARO C. Identification to the species level of Lactobacillus isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology* [online]. BMC, 2005, **5**(1), 15 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1186/1471-2180-5-15. ISSN 1011-8614. Dostupné z: <https://doaj.org/article/c72d06813e014be9ab5741fa903d3477>
- [4] BAQUERIZO NOLE, Katherine a YIM. Probiotics and prebiotics in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. Elsevier Inc, 2014, **71**(4), 814-821 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/j.jaad.2014.04.050. ISSN 0190-9622.
- [5] OUWEHAND, Arthur a SALMINEN. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002, **82**(1), 279-289 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1023/A:1020620607611. ISSN 0003-6072.
- [6] KLAENHAMMER, Todd a BARRANGOU. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2005, **29**(3), 393-409 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1016/j.fmre.2005.04.007. ISSN 0168-6445.
- [7] KLEEREBEZEM, Michiel a HUGENHOLTZ. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. Elsevier Ltd, 2003, **14**(2), 232-237 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00033-8. ISSN 0958-1669.
- [8] HUGENHOLTZ, Jeroen a SYBESMA. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002, **82**(1), 217-235 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1023/A:1020608304886. ISSN 0003-6072.
- [9] MOMBELLI, Barbara a GISMONDO. The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. Elsevier B.V, 2000, **16**(4), 531-536 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1016/S0924-8579(00)00322-8. ISSN 0924-8579.
- [10] KRAHULCOVÁ, A. *Vývoj probiotického doplňku stravy*. Brno, 2011, 114 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

- [11] LEE, Terence, Stanley PANG, Sam ABRAHAM a Geoffrey COOMBS. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. Elsevier Ltd, 2019, **16**, 36-47 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.08.016. ISSN 2213-7165.
- [12] PARVEZ, S. a MALIK. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2006, **100**(6), 1171-1185 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x. ISSN 1364-5072.
- [13] ŠPELINA, Vladimír a Daniela WINKLEROVÁ. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik: Principles of benefit and safety evaluation of probiotics and characterization of registered food supplements containing probiotics and prebiotics. *Pediatrica pre prax.* Bratislava: SOLEN, 2009, **10**(6), 315-318. ISSN 1336-8168.
- [14] SAARELA, Maria a MOGENSEN. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* [online]. Elsevier B.V, 2000, **84**(3), 197-215 [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00375-8. ISSN 0168-1656.
- [15] KECHAGIA, Maria a BASOULIS. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition* [online]. Hindawi Publishing Corporation, 2013, **2013** [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.5402/2013/481651.
- [16] HORÁČKOVÁ, Š. Nové trendy v probiotikách. *Mlékařské listy* [online]. 2010, (120), 19-22 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/120_s._19-22.pdf
- [17] ČR. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů České republiky*. ČR, 1997, ročník 2008, částka 70, číslo 224, s. 3189-3228.
- [18] KARIMI, Z., L. KARIMI a H. SHOKROLLAHI. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2013, **33**(5), 2465-2475 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.045. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113000581>
- [19] AGUILAR-ARTEAGA, K., J.a. RODRIGUEZ a E. BARRADO. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, 2010, **674**(2), 157-165 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043. ISSN 0003-2670.
- [20] MCBAIN, Stuart, Humphrey YIU a Jon DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. Dove Medical Press, 2008, **3**(2), 169-180 [cit. 2019-02-21]. ISSN 1176-9114.
- [21] HORAK, Daniel, Michal BABIC, Hana MACKOVA, Milan BENES a Daniel HORAK. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, **30**(11), 1751-1772 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1002/jssc.200700088. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/30053297/>

- [22] LIMA-TENÓRIO, M.k., E.a. GÓMEZ PINEDA, N.m. AHMAD, H. FESSI a A. ELAISSARI. Magnetic nanoparticles: In vivo cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V, 2015, **493**(1-2), 313-327 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.07.059. ISSN 03785173.
- [23] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(15), 2472-2485 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>
- [24] HORÁK, Daniel a Nataliya BENEDYK. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2004, **42**(22), 5827-5837 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1002/pola.20406. ISSN 0887-624X.
- [25] SEIFALIAN, Alexander, Elizabeth BULL, MADANI, SHETH, Mark GREEN a Amelia SEIFALIAN. Stem cell tracking using iron oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* [online]. b.r., , 1641- [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.2147/IJN.S48979. ISSN 11782013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/stem-cell-tracking-using-iron-oxide-nanoparticles-peer-reviewed-article-IJN>
- [26] GUPTA, Ajay, Mona GUPTA a Ajay GUPTA. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(18), 3995-4021 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012. ISSN 0142-9612. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/28637716/>
- [27] TRACHTOVÁ, Štěpánka. *Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2011 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/7787>. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Bohuslav Rittich.
- [28] FILIPPOUSI, Maria, Sofia PAPADIMITRIOU, Dimitrios BIKIARIS et al. Novel core-shell magnetic nanoparticles for Taxol encapsulation in biodegradable and biocompatible block copolymers: Preparation, characterization and release properties. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **448**(1), 221-230 [cit. 2019-02-22]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/1367486106/>
- [29] BABIČ, Michal, Daniel HORÁK, Miroslava TRCHOVÁ et al. Poly(1-lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2008, **19**(3), 740-750 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1021/bc700410z. ISSN 10431802. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc700410z>
- [30] RAMANUJAN, Raju. Magnetic Particles for Biomedical Applications. *Biomedical Materials* [online]. Boston, MA: Springer US, 2009, s. 477 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1007/978-0-387-84872-3_17. ISBN 9780387848716. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-84872-3_17

- [31] PHILIPPOVA, Olga, Anna BARABANOVA, Vyacheslav MOLCHANOV a Alexei KHOKHLOV. Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. *European Polymer Journal* [online]. 2011, **47**(4), 542-559 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2010.11.006. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305710004350>
- [32] JUSTÉ, Annelies, B.p.h.j. THOMMA a Bart LIEVENS. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* [online]. 2008 [cit. 2019-02-26]. ISSN 0740-0020.
- [33] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. : il., tab. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [34] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-7080-449-1.
- [35] BROWN, T. *Klonování genů a analýza DNA*. 1. české vyd. Olomouc: Universita Palackého v Olomouci, 2007, 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [36] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. Elsevier Inc, 2013, **133**(3), 1-4 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISSN 0022-202X.
- [37] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 9788021440043.
- [38] MAHEASWARI, Rajendran, JaishreeTukaram KSHIRSAGAR a Nallasivam LAVANYA. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. 2016, **0**(0), 0- [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.4103/0972-124X.176391. ISSN 0972124x. Dostupné z: <http://www.jisponline.com/preprintarticle.asp?id=176391>
- [39] TRACHTOVÁ, Š. *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady - úloha č. 4*. ZS 2016-2017. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, b.r.
- [40] DUDOVÁ, S. a R. HÁJEK. Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*. ApS Brno: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2008, **21**, 220-222. ISSN 0862-495 X.
- [41] VALASEK, M. The power of real-time PCR. *AJP: Advances in Physiology Education* [online]. 2005, **29**(3), 151-159 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1152/advan.00019.2005. ISSN 10434046. Dostupné z: <http://ajpadvan.physiology.org/cgi/doi/10.1152/advan.00019.2005>
- [42] Quantitative PCR: A Technical Guide to PCR Technologies. *Sigma-Aldrich* [online]. b.r. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr.html>

- [43] BLATNÝ, R. Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) jako nástroj moderní diagnostiky. *XV. celostátní konference DNA diagnostiky* [online]. Praha, 2011 [cit. 2019-03-01]. Dostupné z: <http://dna2011.slg.cz/abstrakta/99>
- [44] HJELMSOE, Mathis, Lars HANSEN, Jacob BAELUM, Louise FELD, William HOLBEN, Carsten JACOBSEN a Mathis HJELMSOE. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, **80**(12), 3568-3575 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1128/AEM.03923-13. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/1534843558/>
- [45] LI, Huaizhong, Ruiting LAN, Niancai PENG, Jing SUN a Yong ZHU. High resolution melting curve analysis with MATLAB-based program. *Measurement* [online]. Elsevier Ltd, 2016, **90**(), 178-186 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/j.measurement.2016.04.057. ISSN 0263-2241.
- [46] TOMANOVÁ, Barbora. *Analýza mikrobiálního složení vybraných probiotických výrobků metodou PCR-HRM*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2017, 75 stran : ilustrace.
- [47] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, **72**(4), 2359-2365 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. ISSN 00992240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>
- [48] DUBERNET, Ségolène, Nathalie DESMASURES a Micheline GUÉGUEN. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters* [online]. Elsevier B.V, 2002, **214**(2), 271-275 [cit. 2018-10-29]. DOI: 10.1016/S0378-1097(02)00895-9. ISSN 0378-1097.
- [49] ROY, Denis a Stéphane SIROIS. Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters* [online]. Blackwell Publishing Ltd, 2000, **191**(1), 17-24 [cit. 2018-10-29]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x. ISSN 0378-1097.
- [50] WALTER, J, G TANNOCK, A TILSALA-TIMISJARVI, S RODTONG, D LOACH, K MUNRO, T ALATOSSAVA a G TANNOCK. Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, **66**(1), 297-303 [cit. 2018-10-19]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/17469946/>
- [51] GOSIEWSKI, Tomasz, Agnieszka CHMIELARCZYK, Magdalena STRUS, Monika BRZYCHCZY-WŁOCH a Piotr HECZKO. The application of genetics methods to differentiation of three Lactobacillus species of human origin. *Annals of Microbiology* [online]. Springer-Verlag, 2012, **62**(4), 1437-1445 [cit. 2018-10-29]. DOI: 10.1007/s13213-011-0395-2. ISSN 1590-4261.

- [52] SZÉN, O.P., A. KISS, Z. NAÁR a K. PÁL. Evaluation of high-resolution melting and other molecular methods in discrimination of *Lactobacillus* isolates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2014, **117**(4), 1113-1121 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1111/jam.12599. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12599>
- [53] CHAUHAN, Kanika, Rajat DHAKAL, R. SEALE, Hilton DEETH, Christopher PILLIDGE, Ian POWELL, Heather CRAVEN a Mark TURNER. Rapid identification of dairy mesophilic and thermophilic sporeforming bacteria using DNA high resolution melt analysis of variable 16S rDNA regions. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2013, **165**(2), 175-183 [cit. 2018-10-29]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.007. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160513002304>
- [54] PORCELLATO, D., H. GRØNNEVIK, K. RUDI, J. NARVHUS a S. SKEIE. Rapid lactic acid bacteria identification in dairy products by high- resolution melt analysis of DGGE bands. *Letters in Applied Microbiology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2012, **54**(4), 344-351 [cit. 2018-10-29]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03210.x. ISSN 0266-8254.
- [55] OGIY, Svetlana, Yaira CHEN, Ronit PASVOLSKY, Zwi WEINBERG a Moshe SHEMESH. High resolution melt analysis to confirm the establishment of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* from silage inoculants during ensiling of wheat. *Grassland Science* [online]. 2016, **62**(1), 29-36 [cit. 2018-10-29]. DOI: 10.1111/grs.12102. ISSN 1744-6961.
- [56] KLIJN, N., A. WEERKAMP a W. DE VOS. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1991, **1991**(5711), 3390-3393 [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/57/11/3390.short>
- [57] SAVO SARDARO, Maria, Alessia LEVANTE, Valentina BERNINI, Monica GATTI, Erasmo NEVIANI a Camilla LAZZI. The *spxB* gene as a target to identify *Lactobacillus casei* group species in cheese. *Food Microbiology* [online]. Elsevier Ltd, 2016, **59**, 57-65 [cit. 2018-10-29]. DOI: 10.1016/j.fm.2016.05.004. ISSN 0740-0020.
- [58] SAMBROOK, Joseph a David RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001, 3 sv. (různé stránkování) : il. ISBN 978-0-87969577-4.
- [59] DESJARDINS, Philippe a Deborah CONKLIN. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: JoVE* [online]. 2010, (45) [cit. 2018-11-01]. DOI: 10.3791/2565.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AT pár – adenin-thyminový pár

bp – pár bazí

BMK – bakterie mléčného kvašení

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfát

dsDNA – dvojitá DNA

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EFSA – European Food Safety Authority

FDA – Food and Drug Administration

GC pár – guanin-cytosinový pár

GRAS – generally recognized as safe

HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání

MO – mikroorganismus

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

QPS – Qualified Presumption of Safety („Kvalifikovaný odhad bezpečnosti“)

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecyl sulfát sodný

Taq DNA-polymeráza – termostabilní enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

TEM – transmisní elektronový mikroskop

TE pufr – Tris-EDTA pufr

UV – ultrafialové světlo

10 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Autorka diplomové práce se podílela na konferenčním příspěvku v podobě recenzovaného full textu

KONEČNÁ, J.; CHVALKOVSKÁ, E.; KNÁPKOVÁ, M.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.; BRÁZDA, V. High resolution melting analysis for identification of strains belonging to the *Lactobacillus casei* group. In *Študentská vedecká konference PriF UK 2018 Zborník recenzovaných príspevkov*. 2018. s. 302-307. ISBN: 978-80-223-4517-0.

High resolution melting analysis for identification of strains belonging to the *Lactobacillus casei* group

Jana Konečná, Monika Knápková, Eva Chvalkovská, Alena Španová, Bohuslav Rittich, Václav Brázda

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and Biotechnology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic, xckonecnaj@fch.vut.cz

Abstract

Molecular methods based on the amplification of 16S ribosomal RNA gene analysis are more rapid, reliable, and reproducible and have greater sensitivity. High resolution melting (HRM) curve analysis is a simple, low-cost, closed tube method for amplicon discrimination and easy connection with real-time polymerase chain reaction (PCR). In this contribution, we report rapid species identification of strains belonging to the *Lactobacillus casei* group using HRM-PCR. Three different DNA isolation methods were used in this work: phenol extraction, separation using magnetic particles and commercial kit. Two sets of targeted gene fragments primers (groEL, BSH) were tested for amplification of the 16S rRNA gene. Use of groEL primers pair successfully identify strains belong to the *Lactobacillus casei* group. The variance between used extraction methods for evidence of HRM curves was found.

Keywords: *Lactobacillus casei*; DNA isolation; High-Resolution Melting Analysis