



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ METODY PCR V REÁLNÉM ČASE PŘI MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZE POTRAVIN

APPLICATION OF REAL-TIME PCR IN MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF FOOD-STUFFS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

EVA NOVOTNÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0453/2009** Akademický rok: **2009/2010**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Eva Novotná**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Využití metody PCR v reálném čase při mikrobiologické analýze potravin

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Vyhodnoťte získané výsledky

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Eva Novotná
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Probiotické druhy bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* hrají důležitou roli v trávicím traktu člověka, např. chrání před patogenními mikroorganismy. Laktobacily jsou součástí různých potravinových výrobků. Detekovat a identifikovat bakterie mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* lze pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se specifickými primery LbLMA1 a R16. V experimentální části této práce byla izolována DNA z probiotického výrobku Actimel Natur metodou fenolové extrakce. Pomocí PCR v reálném čase byly amplifikovány specifické produkty PCR, které byly detegovány pomocí fluorescenčního interkalačního barviva SybrGreen. Specifita amplifikovaných produktů PCR byla ověřena pomocí křivky tání (T_m 85°C) a pomocí agarosové gelové elektroforézy (byl amplifikován produkt velikosti 250 bp).

ABSTRACT

Probiotic lactic acid bacteria of genus *Lactobacillus* play an important role in the digestive tract of human, e.g. protect against pathogenic microorganisms. Lactobacilli are often present in various food products. Lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* can be detected by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers LbLMA1 and R16. The bacterial DNA was isolated from Actimel Natur probiotic product by the phenol extraction method. DNA was amplified using real time PCR. Specific PCR products were detected using fluorescent intercalation dye SybrGreen. The specific PCR products were verified by melting curve analysis (T_m 85°C) and by agarose gel electrophoresis (PCR products of 250 bp was amplified).

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotický výrobek, izolace DNA, polymerázová řetězová reakce v reálném čase, rod *Lactobacillus*, identifikace

KEYWORDS

Probiotic product, DNA isolation, Polymerase Chain Reaction in real time, genus *Lactobacillus*, identification

NOVOTNÁ, E. *Využití metody PCR v reálném čase při mikrobiologické analýze potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 40 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za čas, cenné rady a odborné vedení, které mi věnovala při vypracování této bakalářské práce ale také Ing. Štěpánce Trachtové za poskytnutí cenných informací a praktických rad.

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Probiotika, prebiotika a synbiotika	8
2.1.1	Probiotika - definice	8
2.1.1.1	Probiotika a jejich zdraví prospěšné vlastnosti	8
2.1.2	Prebiotika	8
2.1.3	Synbiotika	9
2.2	Potraviny obsahující probiotika	9
2.2.1	Zakysané mléčné výrobky	9
2.2.2	Sýry	10
2.2.3	Tvrdé salámy	10
2.2.4	Kysaná zelenina	10
2.3	Charakteristika bakterií mléčného kvašení (BMK)	12
2.3.1	Rozdělení rodu <i>Lactobacillus</i> podle metabolismu	12
2.4	Identifikace lactobacilů v potravinách	14
2.4.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR) konvenční	14
2.4.2	Komponenty PCR a reakční podmínky	14
2.4.3	Termocyklér	15
2.4.4	Amplifikace DNA a vznik PCR produktů	15
2.4.5	Detekce PCR produktů pomocí agarosové gelové elektroforézy	16
2.5	PCR v reálném čase	16
2.5.1	Princip metody	16
2.5.2	Kvantifikace	17
2.5.3	Detekční systém	17
2.5.4	Analýza pomocí křivky tání	17
3	CÍL PRÁCE	19
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Použitý probiotický mléčný výrobek	20
4.2	Chemikálie a roztoky	21
4.2.1	Chemikálie a roztoky pro lyzi bakteriálních buněk	21
4.2.2	Chemikálie pro purifikaci DNA	21
4.2.3	Komponenty pro PCR	22
4.2.4	Chemikálie a roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu	22
4.3	Pomůcky a přístroje	22
4.4	Použité metody	23
4.4.1	Příprava hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku	23
4.4.2	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk	23
4.4.2.1	Fenolová extrakce DNA	23
4.4.2.2	Přesrážení DNA ethanolem	23
4.4.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	24
4.4.4	Agarosová gelová elektroforéza bakteriální DNA	24
4.4.5	Rodově specifická PCR s bakteriální DNA izolovanou z mléčného výrobku Actimel Natur	24
4.4.5.1	Příprava PCR směsi	24
4.4.5.2	Průběh amplifikace	25

4.4.5.3	Detekce rodově specifických PCR produktů agarósovou gelovou elektroforézou.....	25
4.4.6	PCR v reálném čase (RT-PCR) s bakteriální DNA izolovanou z mléčného výrobku Actimel Natur.....	26
4.4.6.1	Příprava PCR směsi pro RT-PCR.....	26
4.4.6.2	Průběh amplifikace.....	26
4.4.6.3	Detekce RT-PCR produktů agarósovou gelovou elektroforézou.....	27
4.4.6.4	Velikostní standard 100 bp žebříček.....	27
4.4.6.5	Detekce RT-PCR produktů pomocí fluorescence.....	28
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Izolace DNA z mléčného výrobku Actimel Natur fenolovou extrakcí.....	29
5.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobku Actimel Natur.....	30
5.3	Konvenční PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i> s bakteriální DNA z mléčného výrobku Actimel Natur.....	30
5.4	PCR v reálném čase (RT-PCR) s bakteriální DNA izolovanou z mléčného výrobku Actimel Natur.....	31
5.4.1	Analýza křivek tání pro stanovení specifických PCR produktů z RT-PCR.....	33
5.4.2	Ověření specifity PCR produktů agarósovou gelovou elektroforézou.....	34
6	DISKUSE	35
6.1	Izolace celkové DNA z mléčného výrobku Actimel Natur.....	35
6.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobku Actimel Natur.....	35
6.3	Specifická PCR rodu <i>Lactobacillus</i>	36
6.4	PCR v reálném čase (RT-PCR) s purifikovanou DNA.....	36
6.4.1	Analýza křivek tání pro stanovení specifických PCR produktů.....	36
7	ZÁVĚR.....	37
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	38
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	40

1 ÚVOD

Během posledních let je věnováno značné úsilí zlepšení zdravotního stavu populace modulací střevní mikroflóry hostitele prostřednictvím živých mikroorganismů, které jsou označovány jako probiotika. Probiotika se definují jako živé nepatogenní mikroorganismy, které po osídlení trávicího traktu působí prospěšně na zdraví hostitele [1, 2].

V současnosti jsou mezi probiotika řazeny především bakterie mléčného kvašení (BMK) rodu *Lactobacillus* a zástupci rodu *Bifidobacterium* [3]

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou skupinou těch nejvyužívanějších. Využívání probiotických druhů laktobacilů v potravinových výrobcích vyžaduje jejich charakteristiku a jednoznačnou identifikaci. K tomu se využívají především moderní molekulárně genetické metody [4].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika, prebiotika a synbiotika

2.1.1 Probiotika - definice

Označení „probiotický“ pochází z řečtiny, volně přeloženo znamená „pro život“ a je protikladem označení antibiotický [5]. Probiotika se původně definovaly jako živé nepatogenní mikroorganismy, které po osídlení trávicího traktu působí prospěšně na zdraví hostitele. Současná definice je širší: „Probiotika jsou látky nebo produkty obsahující v dostatečném množství životaschopné mikroorganismy, které po implantaci nebo kolonizaci změni mikroflóru v určitém anatomickém místě hostitele, což se projevuje zdravotně prospěšnými účinky. To znamená, že probiotické působení takových mikroorganismů není omezeno jen na trávicí trakt, ale může se uplatnit např. i v močovo-pohlavním traktu“ [2]. Obecně se jedná o bakterie, včetně pravých jogurtových bakterií, které jsou odolné vůči nepříznivému prostředí v žaludku člověka, tj. vůči nízkému pH, proteolytickým enzymům a zejména proti lysozymu, který způsobuje lyzi bakterií. Probiotické bakterie jsou v zaživacím traktu odolné i vůči žlučovým kyselinám a nízkému povrchovému napětí [5]. Probiotická terapie je zkoumána s cílem vyléčit či zabránit řadě gastrointestinálních chorob a poruch [1].

2.1.1.1 Probiotika a jejich zdraví prospěšné vlastnosti

Mikroorganismy, které jsou využívány jako probiotika, musí splňovat řadu kritérií, která zaručují jejich bezpečné užívání, a která mají prokazatelné účinky. Pokud se působení probiotik váže na oblast zaživacího traktu, zejména tlustého střeva, musí se tyto bakterie dostat úspěšně na místo svého určení [3]. Je rovněž nutné, aby měly dobré technologické vlastnosti, aby mohly být použity pro výrobu a pro začlenění do potravinářských výrobků bez ztráty životaschopnosti a funkčnosti. Nesmí vytvářet nepříjemné příchutě nebo textury [6]. Zcela zásadní je vyloučení jakýchkoliv patogenních vlastností, protože užití probiotik musí být pro lidský organismus zcela bezpečné. Podávají se zásadně v živém stavu. Příprava výrobků s probiotickými vlastnostmi musí probíhat takovým způsobem, aby nedošlo ke ztrátě životaschopnosti kultur a aby množství mikroorganismů bylo dostatečné [3].

Z existujících důkazů je způsob účinku probiotických kmenů pravděpodobně multifaktoriální. Řada probiotických kmenů byla vyhodnocena s různým stupněm úspěšnosti z hlediska protiprůjmových vlastností. Probiotické kmeny inhibují patogenní bakterie *in vitro* a *in vivo* pomocí několika různých mechanismů. Patří mezi ně syntéza inhibičních látek (např. bakteriocinů), snížení pH pomocí produkce kyseliny mléčné či mastných kyselin s krátkým řetězcem (které jsou samy o sobě přímo inhibiční pro určité patogeny), soutěž o živiny a adhezi v určitých místech střevní stěny a jiné [1].

K nejznámějším zástupcům probiotik patří zejména bakteriální druhy *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* a řada dalších. Působení těchto bakterií má obvykle shodné účinky v prevenci určitých onemocnění. V léčbě se ale mohou využívat pouze určité kmeny [3].

2.1.2 Prebiotika

Prebiotika jsou definována jako nestravitelná součást potravy, která slouží jako substrát pro růst a stimulaci funkce probiotických mikroorganismů prospěšných pro lidské zdraví. Prebiotika procházejí gastrointestinálním traktem až do tlustého střeva, aniž by byla natrávena

enzymy trávicího traktu. K jejich štěpení dochází až střevními bakteriemi, které prebiotika hydrolyzují na monomery, nezbytné pro výživu kolonocytů a mikrobiální flóry. Mezi prebiotika se řadí oligosacharidy (hlavně fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy a laktulóza), inulin, laktinol a některé polysacharidy. Zatím jsou nejlépe prozkoumané prebiotické fruktooligosacharidy (FOS) [7]. Většina v současnosti využívaných prebiotik se vyskytuje jako přirozená složka v zelenině např. v cibuli, česneku, artičokách, póru nebo čekance, v menší míře i v obilovinách, ve fazolích a hrachu. Mnoho z nich je již dnes komerčně dostupných a využívají se jako přísady do funkčních potravin. Tyto látky nemají žádné genotoxické, toxické nebo kancerogenní vlastnosti. Jsou mírně laxativní, při užívání velkých dávek ale způsobují nadýmání [8]. Podávání prebiotik způsobuje celkové zlepšení střevních funkcí, vede k úpravě zácpových a průjemových stavů a k potlačení růstu patogenů. Slibné jsou také výsledky studií, které byly zaměřeny na sledování zvýšení absorpce minerálů, především vápníku a hořčíku, které je umožněno snížením pH ve střevech (zvýšenou produkcí kyselin). Zlepšení absorpce minerálů snižuje riziko vzniku osteoporózy a „posiluje“ kosti [8].

2.1.3 Synbiotika

Tento termín se používá pro současnou přítomnost prebiotik a probiotik. Jelikož termín sám evokuje pojem synergizmu, je důsledně rezervován pro takové situace, kdy přítomné prebiotikum skutečně selektivně favorizuje přítomné probiotikum. V přísném slova smyslu produkt, který by obsahoval oligofruktosu a bifidobakterie, vyhovuje této definici synbiotika, kdežto produkt obsahující oligofruktosu a např. *Lactobacillus casei* nikoliv, neboť *Lactobacillus casei* sám oligofruktosu nemetabolizuje ač je probiotikem [9].

2.2 Potraviny obsahující probiotika

K nejběžnějším zdrojům probiotik patří zejména kysané (fermentované) mléčné výrobky. Probiotické mléčné výrobky zaznamenaly v posledních letech v mlékárenství značný rozmach. Mezi potraviny s nezanedbatelným obsahem probiotických kultur také řadíme vysokodohřívané tvrdé sýry, mléčným kysáním konzervovanou zeleninu (kysané zelí, rychlokvašené okurky) a šťávu z kysaného zelí. Opomíjeným, ale dnes také důležitým zdrojem jsou ušlechtilé suché salámy. Naopak méně výhodné z hlediska obsahu probiotických kultur jsou termizované dezerty a tavené sýry. Při výběru potravin s probiotickými kulturami je třeba se o potravinech informovat. Je totiž nutné, aby potravina obsahovala dostatečné množství probiotických kultur. Některé potraviny obsahují minimální, zákonem stanovený počet probiotik, jiné obsahují několikanásobně více těchto mikroorganismů. Takové potraviny mívají obvykle kratší dobu trvanlivost, a proto je musíme uchovávat v chladu [7]. V probiotických produktech, např. v jogurtech nebo v acidofilním mléce, mají být k datu trvanlivosti anebo při dřívější spotřebě přítomné v koncentraci více jak 10^6 KTJ/ml. Jen v této vyšší koncentraci mají ve střevě požadovaný zdraví prospěšný účinek [5].

2.2.1 Zakysané mléčné výrobky

Mezi zakysané mléčné výrobky s obsahem bakterií mléčného kvašení řadíme jogurt, jogurtové mléko, acidofilní mléko, kefír, kefirové mléko, kysané mléko nebo smetanový zákys, kysanou nebo zakysanou smetanu, kysaný mléčný výrobek s bifido kulturou a kysané podmaslí. Při výrobě zakysaných mléčných výrobků jsou v současnosti používány čisté mlékařské kultury [7]. Dnes patří k probiotickým výrobkům téměř všechny tekuté, zakysané

mléčné výrobky jogurtového typu, které obsahují především bifidobakterie nebo laktobacily. Stále větší počet mlékárenských firem rozšiřuje svůj sortiment výrobků právě o zakysané mléčné nápoje, jako jsou kyška, kefirové mléko apod. [7]. Množství a použité druhy mikroorganismů v některých mléčných výrobcích jsou uvedeny v Tab. 1. Množství je uváděno v jednotkách tvořících kolonie (KTJ)/100 g.

2.2.2 Sýry

Při výrobě tvrdých sýrů se používají termofilní sýrařské kyselivé kultury, nejčastěji *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus casei*. Tyto bakterie jsou specifické pro výrobu tvrdých sýrů ementálského a grójského typu, parmazánu, eidamu, goudy, holandské cihly a salámového sýru. Používají se také při výrobě tvarohových a měkkých sýrů. Pro ostatní tvrdé sýry se užívají jiné bakteriální rody a druhy, které nejsou řazeny mezi probiotické kmeny nebo nejsou zastoupeny v klinicky významném množství [7].

2.2.3 Tvrdé salámy

Bakterie mléčného kvašení se v masném průmyslu používají pro svou vysokou odolnost a schopnost potlačovat růst patogenních gramnegativních mikroorganismů. Od roku 1995 existuje vědecká komise pro zvažování příznivého vlivu probiotik z ušlechtilých suchých salámů na lidský organismus. V roce 2002 byl objeven a popsán nový druh, typický pro fermentované masné produkty. Jde o *Lactobacillus vermoidensis*, který je v ušlechtilých suchých salámech. Fermentované suché ušlechtilé salámy (u nás např. uherského typu) představují organolepticky vynikající a přitom vydatný zdroj probiotických kultur, které jsou pro lidský organismus prospěšné [7].

2.2.4 Kysaná zelenina

Významným zdrojem probiotických bakterií je také mléčným kysáním konzervovaná zelenina, jako je například kysané zelí, rychlokvašené okurky a šťáva z kysaného zelí [7].

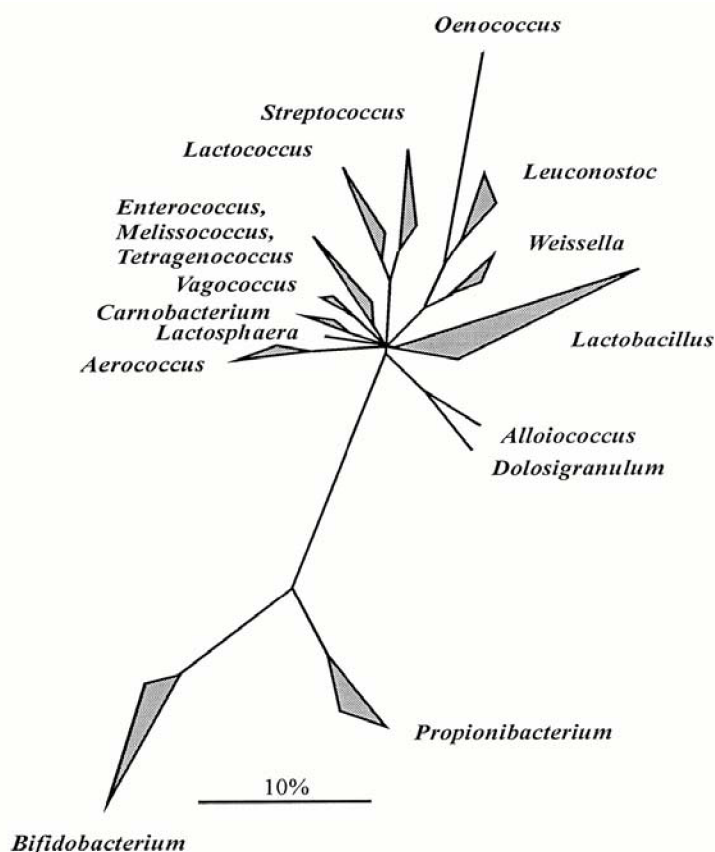
Tab.1 Množství a druh mikroorganismů obsažených v mléčných výrobcích [7].

Druh výrobku	Použité mikroorganismy	Množství mikroorganismů (KTJ/100g)
Acidofilní mléko	<i>Lactobacillus acidophilus</i> a další mezofilní, příp. termofilní kultury bakterií mléčného kvašení	10^6
Jogurty	Symbiotická směs <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	10^7
Kysané mléko včetně smetanového zákysu, podmáslí a kysaná smetana	Monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kvašení	10^6
Kefír	Zákys připravený z kefirových zrn, jehož mikroflóra se skládá z kvasinek zkvašujících laktózu a nezkašující laktózu (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) a bakterie rodu <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> a <i>Aerobacter</i>	Bakterie mléčného kvašení 10^6 , kvasinky 10^4
Kefirové mléko	Zákys skládající se z kvasinkových kultur rodu <i>Kluyveromyces</i> , <i>Torulopsis</i> nebo druhu <i>Candida valida</i> a mezofilních a termofilních kultur bakterií mléčného kvašení v symbióze	Bakterie mléčného kvašení 10^6 , kvasinky 10^2
Kysaný mléčný výrobek s bifidokulturou	<i>Bifidobacterium</i> sp. v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného kvašení	10^6 Bifidobakterie

KTJ...kolonie tvořící jednotky

2.3 Charakteristika bakterií mléčného kvašení (BMK)

Potravinářský mikrobiolog rozumí pod tímto pojmem zpravidla skupinu kokovitých i tyčinkovitých bakterií zahrnující některé druhy rodů: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium* [5]. V klasické monografii Dána Orla-Jensena (1919) [5] pojednávající o BMK se hovoří: „Pravé bakterie mléčného kvašení tvoří velkou přirozenou skupinu nesporulujících grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních podmínek a tvoří přitom hlavně kyselinu mléčnou“ [5]. Fylogenetický strom BMK a příbuzných bakterií je uveden na obr. 1.



Obr. 1 Fylogenetický strom BMK a příbuzných grampozitivních bakterií s nízkým a vysokým obsahem G+C v DNA [10].

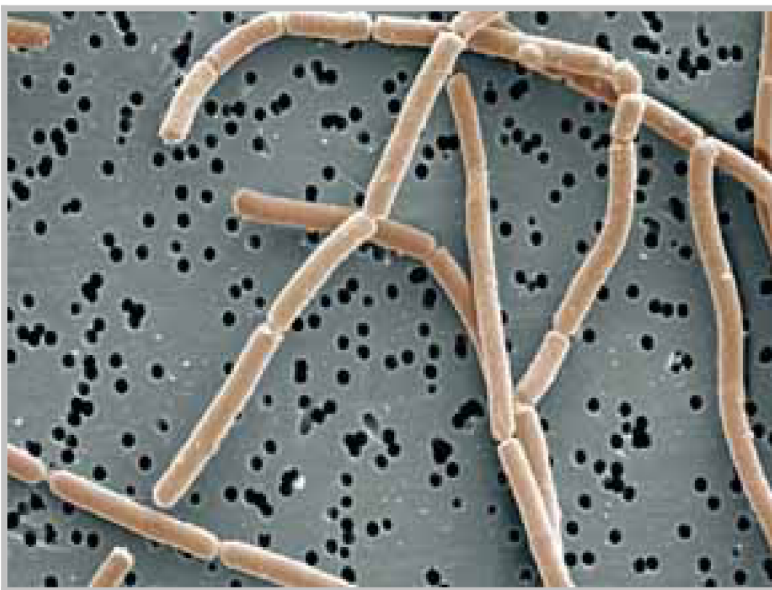
BMK se nevyskytují pouze v mléce a fermentovaných mléčných produktech, nacházejí se i na intaktních a rozkládajících se rostlinách a ve střevech lidí a zvířat [5]. Pravděpodobně nejvíce studovaná probiotika patří do rodu *Lactobacillus* [1].

2.3.1 Rozdělení rodu *Lactobacillus* podle metabolismu

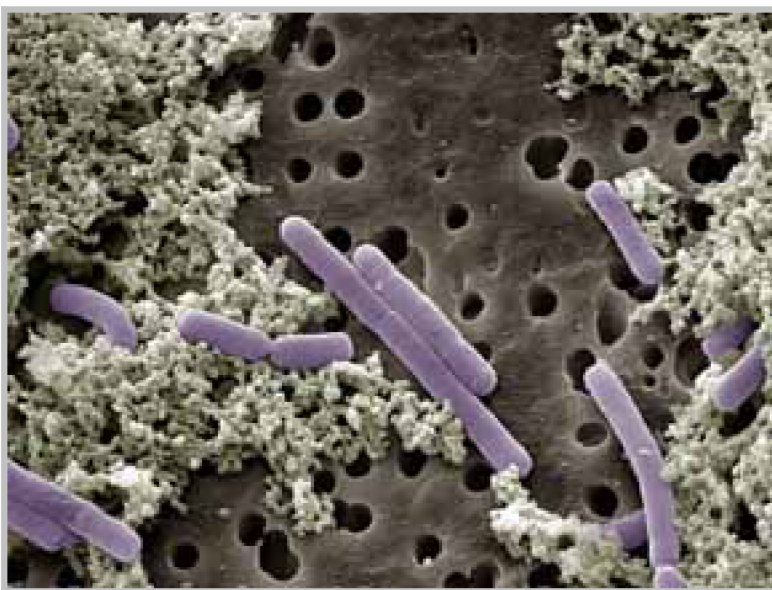
Rod *Lactobacillus* je rozdělen z hlediska typu fermentace do tří skupin. Do skupiny I patří obligátně homofermentativní lactobacily. Zkvašují hexózy téměř výlučně na kyselinu mléčnou (>90 %). Tyto bakterie rostou spíše při vyšších teplotách kolem 45°C. Do této skupiny patří všechny termobakterie a další nově popsání druhy. Patří sem např. *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. acidophilus*, *L. salivarius* a další [5].

Skupinu II tvoří fakultativně heterofermentativní laktobacily, které hexózy zkvašují hlavně na kyselinu mléčnou (>90 %). Při nedostatku glukózy produkují některé druhy kyselinu octovou, ethanol a kyselinu mravenci. Pentózy zkvašují pomocí indukovatelné fosfoketolázy. Teplota růstu se pohybuje okolo 15°C. Patří sem například *L. plantarum*, *L. pseudoplantarum*, *L. casei* ssp. *casei*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus* a další.

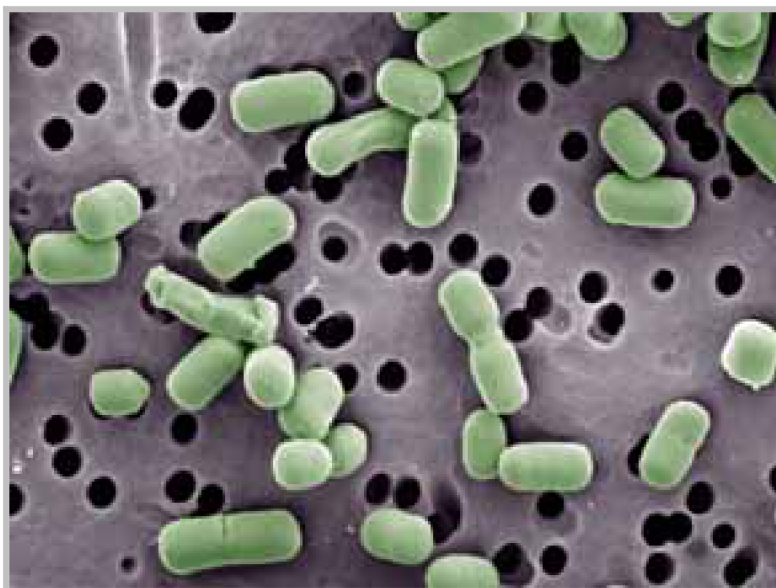
Skupinu III tvoří obligátně heterofermentativní laktobacily, které zkvašují hexózy na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou (případně ethanol) a CO₂. Pentózy zkvašují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Teplota optimálního růstu se pohybuje většinou okolo 45°C. Tato skupina obsahuje v Orla-Jensenovém pojetí heterofermentativní laktobacily tvořící plyn s původním pojmenováním betabakterie a jiné nově popsané druhy. Patří sem *L. bifementas*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. confusus*, *L. divergens*, *L. fermentum* a další [5]. Morfologie buněk některých druhů *Lactobacillus* jsou uvedeny na obr. 2, obr. 3 a na obr. 4



Obr. 2 *Lactobacillus bulgaricus* [11].



Obr. 3 *Lactobacillus casei* [11].



Obr. 4 *Lactobacillus brevis* [11].

2.4 Identifikace lactobacilů v potravinách

Identifikace laktobacilů ve vzorcích potravin byla prováděna donedávna hlavně pomocí biochemických a fenotypických metod. Tyto metody jsou složité, zdlouhavé a ne vždy dávají správné výsledky. Molekulární techniky představují velmi účinné nástroje pro typizaci, identifikaci a charakterizaci všech bakterií potravinového řetězce [12]. Velmi často se využívá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). Metoda PCR pro identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* byla popsána v roce 2002 [13].

2.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) konvenční

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je nejběžněji užívaná metoda amplifikace nukleové kyseliny. Konvenční PCR je základní metoda, která se používá jak pro výzkumné účely ve vědeckých laboratořích, tak pro diagnostiku mikroorganismů včetně probiotických bakterií v provozních laboratořích [14].

PCR je enzymová metoda *in vitro* sloužící k syntéze definovaného úseku DNA, pro nějž jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3'- a 5'-koncovým sekvencím úseku DNA, jenž má být amplifikována [15]. Metoda PCR byla zavedena v roce 1983 Kary Mullisem. Za tento objev mu byla udělena v roce 1993 Nobelova cena. Metodou PCR lze syntetizovat z jedné molekuly DNA přibližně 100 miliard kopií a to za několik hodin [12]. PCR byla popsána jako metoda pro detekci některých mikrobů [14].

2.4.2 Komponenty PCR a reakční podmínky

Na realizaci PCR jsou potřeba následující komponenty:

- **Templátová DNA**, která slouží jako matrice pro syntézu nových řetězců DNA. Do PCR se přidává v jednořetězcové nebo ve dvouřetězcové formě. Tato DNA obsahuje cílová místa pro primery [12].
- **Primery** jsou dva chemicky syntetizované oligonukleotidy složené obvykle z 20 – 25 nukleotidů, jejichž sekvence je komplementární sekvencím na okrajích úseku DNA určeného k amplifikaci. Každý primer používaný v PCR obvykle obsahuje přibližně

stejné množství všech čtyř bází s rovnoměrným zastoupením cytozinu a guaninu. Je navržen tak, aby nevznikaly sekundární struktury [12]. Pro identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* byly navrženy rodově specifické primery LbLMA1 a R16 – 1 [13].

- **DNA polymeráza** katalyzuje syntézu nového DNA řetězce ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA navázaného primery. Existuje celá řada polymeráz, které se dají pro PCR využít a které se liší ve výkonnosti, přesnosti a také účinnosti syntézy nového řetězce. Nejčastěji se používá termostabilní *Taq* polymeráza izolovaná z termofilního druhu *Thermus aquaticus*, který žije v horkých pramenech.
- **dNTP** (2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) jsou základní složky (stavební kameny) pro syntézu nového řetězce DNA. Optimální koncentrace deoxynukleosidtrifosfátů bývá 200 – 250 μM. Zvýšená koncentrace dNTP inhibuje PCR reakci tím, že vyvazuje ionty Mg²⁺ [12].
- **Mg²⁺ ionty** jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerázy. Obvyklá koncentrace hořečnatých iontů v PCR směsi je při použití *Taq* DNA polymerázy 1- 4 mM, přičemž změna jejich koncentrace může výrazně ovlivnit výsledek reakce. Vyšší koncentrace Mg²⁺ snižuje specifitu primerů a naopak nižší koncentrace vede k inaktivaci DNA polymerázy [12].
- **PCR pufr** zabezpečuje stálé pH prostředí. Jeho důležitou složkou jsou hořečnaté soli obvykle ve formě MgCl₂. Standardní reakční pufr obsahuje 10 mM Tris HCl (pH 8,3-8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂. Do základního reakčního roztoku se někdy přidávají i další složky, které zlepšují činnost DNA polymerázy nebo destabilizují sekundární struktury DNA [12].
- **PCR voda** se používá pro doplnění PCR směsi. Nejvhodnější je voda o odporu 18 MΩ nebo voda pro injekce dle ČSN [12].

2.4.3 Termocyklér

Termocyklér je programovatelný termostat, který umožňuje rychlý přechod mezi různými teplotami. Hlavní požadavky jsou kladeny na přesnost teploty a rychlost přechodu mezi jednotlivými teplotami. V současné době existuje celá řada výrobců těchto přístrojů s různými typy vyhřívání a chlazení, včetně mechanického přemísťování mezi jednotlivými teplotními lázněmi [15].

2.4.4 Amplifikace DNA a vznik PCR produktů

V PCR se amplifikuje DNA ve více cyklech za vzniku specifického PCR produktu (amplikonu). Jeden cyklus PCR se skládá ze 3 kroků:

- **Denaturace templátu:** tohoto efektu je dosaženo zvýšením teploty na 95°C. DNA je denaturována zpravidla po dobu 1 – 5 minut. Je důležité, aby došlo ke kompletnímu oddělení obou vláken. Jinak by totiž mohlo dojít k velmi rychlé renaturaci celé molekuly, což by zabránilo interakci vláken DNA s primery [15].
- **Hybridizace primerů:** tímto druhým krokem je renaturace, při níž je reakční směs ochlazená na zvolenou teplotu, která se pohybuje obvykle kolem 55°C [15]. Teplota hybridizace primerů závisí na jejich teplotě tání a na teplotě tání templátové DNA [12]. Teplota vhodná pro hybridizaci závisí na délce oligonukleotidů a na zastoupení A-T a G-C párů (tři vodíkové můstky mezi G-C, zvyšující stabilitu dvouřetězce a tím i denaturační teplotu) [15]. Pokud je teplota příliš vysoká, primery hybridizují slabě

a množství amplifikované DNA je malé. Naopak při příliš nízké teplotě dochází k nespecifické hybridizaci primerů a k amplifikaci nežádoucích fragmentů DNA [12].

- **Syntéza nového komplementárního řetězce:** dochází k elongaci DNA vlákn, během kterého DNA polymeráza přikládá k 3' OH konci primeru nukleotidy, které se vážou na nový řetězec podle komplementární sekvence templátu. Teplota je v případě použití *Taq* polymerázy při tomto kroku zvýšena na 72°C, což je teplotní optimum tohoto enzymu [12].

2.4.5 Detekce PCR produktů pomocí agarósové gelové elektroforézy

Vzniklý amplikon (PCR produkt) se v konvenční PCR detekuje pomocí gelové elektroforézy na agaróse. Agarósa se za horka rozpouští a po ochlazení tvoří gel, ve kterém se helikální vlákna agarósy spojují do trojrozměrných struktur [12]. Elektroforéza patří mezi elektromigrační metody a principem je pohyb částic v elektrickém poli. Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Současně s PCR produktem se ponechá migrovat i DNA standard, který obsahuje fragmenty DNA známé velikosti (v bp) a který umožní určit velikost amplikonu [15].

2.5 PCR v reálném čase

V současné době se stále více používá PCR umožňující přímou kvantifikaci PCR produktů v průběhu amplifikační reakce – PCR v reálném čase. Kvantifikace molekul nukleových kyselin je důležitá při stanovení množství cílové DNA v analyzovaném vzorku např. při kvantifikaci probiotik apod. [16].

PCR v reálném čase urychlila rozšíření PCR v běžných diagnostických laboratořích, protože je rychlejší, citlivější a reprodukovatelná. Rovněž nebezpečí kontaminace je minimální. Není to tedy jenom technologie, která se změnila se zavedením PCR v reálném čase, ale i praktické využívání této metody [14].

2.5.1 Princip metody

Principem PCR v reálném čase je rychlé a přesné stanovení produktů PCR bezprostředně po jejich vzniku, v každém jednotlivém cyklu PCR. PCR v reálném čase se provádí pomocí přístrojů zvaných cykléry, které umožňují jak opakovanou změnu teplot potřebnou pro amplifikaci DNA, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR [17].

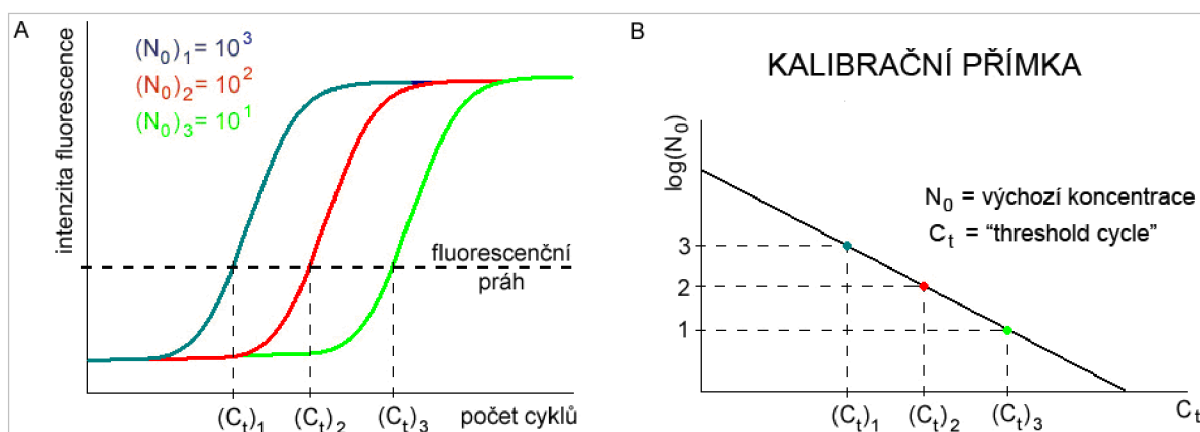
Detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu se provádí ve speciálním zařízení, kde je detekována fluorescence a monitorován postup PCR bez nutnosti detekovat produkty PCR (amplikony) elektroforeticky [16]. K detekci amplifikačních produktů mohou být použity různé postupy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace [18].

Pro detekci amplikonů v průběhu PCR v reálném čase se využívají tři postupy [16] :

- Interkalační barvivo vázající se na DNA
- Fluorescenčně značená sonda vázající se na střední část amplifikovaného produktu
- Fluorescenčně značené hybridizační sondy, které se vážou těsně vedle sebe na část amplifikovaného produktu

2.5.2 Kvantifikace

Výhodou PCR v reálném čase oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení počtu kopií templátové DNA v analyzovaném vzorku. V průběhu amplifikace se porovnává hodnota fluorescence a cyklus PCR, ve kterém je detekován nárůst fluorescence nad pozadím přirozené fluorescence (hodnota C_t , tzv. threshold cycle – fluorescenční práh). Kvantifikace je založena na zjištění, že existuje lineární vztah mezi logaritmem výchozího počtu templátových kopií DNA a hodnotou C_t příslušné amplifikační křivky. Čím větší je množství amplifikované DNA ve vzorku, tím dříve (po menším počtu cyklů PCR) je detekována fluorescence a naopak. Pro kvantifikaci se používá standardní křivka, která je konstruována s využitím amplifikace známých množství DNA. Pokud amplifikujeme vzorek o neznámé koncentraci společně se standardy o známé koncentraci, můžeme zjistit výchozí počet molekul ve vzorku [17]. Na obr. 5 A jsou uvedeny 3 amplifikační křivky získané po amplifikaci různého množství DNA $(N_0)_1$ až $(N_0)_3$. Na obr. 5 B je znázorněna kalibrační přímka. Pomocí kalibrační křivky se stanoví koncentrace DNA v neznámém vzorku.



Obr. 5 A, B Amplifikační křivky a kalibrační přímka [17].

2.5.3 Detekční systém

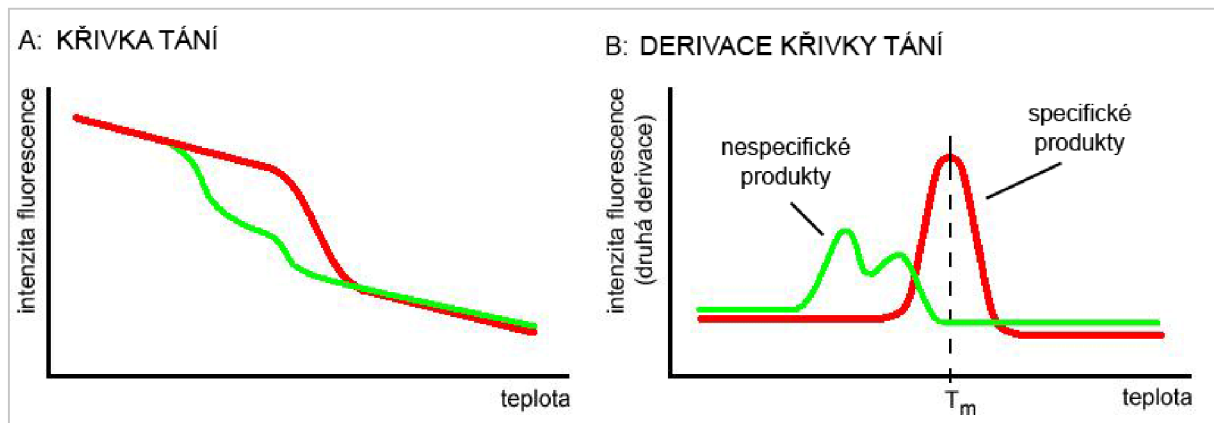
Prvními značkami, používanými pro detekci akumulace produktu během PCR v reálném čase, byla interkalační barviva např. (SYBR Green I), jejichž fluorescenční aktivita vzrůstá po vazbě na dvouřetězcovou DNA. Vzhledem k tomu, že během PCR vzniká dvouřetězcový produkt, jehož množství zpravidla výrazně převyšuje počáteční množství dsDNA, lze pomocí interkalačních barviv sledovat průběh amplifikace.

Velkou nevýhodou pro využívání interkalačních barviv je skutečnost, že detekují veškerou dsDNA přítomnou v reakční směsi včetně nescifických produktů, které i při velmi pečlivé optimalizaci metody velmi často vznikají [17]. Proto byly vypracovány další postupy s využitím DNA sond. Používá-li se k detekci amplikonů fluorescenční barvivo, je třeba ověřit specifitu amplikonů.

2.5.4 Analýza pomocí křivky tání

Analýza využívající křivky tání je metoda, která se používá při použití interkalačních barviv k odlišení specifických a nescifických produktů PCR reakce. Sleduje se teplota tání amplikonů, která je daná hodnotou T_m (teplota, při které je denaturováno 50%

dvouřetězcových amplikonů). Tání DNA můžeme po skončení PCR v reálném čase sledovat tak, že roztok obsahující dsDNA (PCR produkty) nejprve ochladíme na teplotu nižší než je očekávaná T_m produktů, a pak je postupně ohříváme až k bodu varu (na teplotu vyšší než je očekávaná T_m) a měříme přitom fluorescence. Platí, že fluorescence interkalačního barviva je přímo úměrná množství dsDNA přítomné v reakční směsi. Se zvyšující se teplotou a denaturací PCR produktů se hodnota fluorescence snižuje. Pokud vyneseme intenzitu fluorescence proti teplotě, dostaneme křivku, která náhle strmě klesá (obr. 6 A). Teplota T_m v inflexním bodě křivky se rovná teplotě tání a lze ji snadno zjistit zderivováním intenzity fluorescence (druhá derivace). V grafu závislosti druhé derivace intenzity fluorescence na teplotě se jako vrchol „peaku“ objeví hodnota T_m (v °C) (obr. 6 B). Detekce nespecifických PCR produktů při použití interkalačních barviv využívá předpokladu, že nespecifické PCR produkty mají odlišnou (obvykle nižší) hodnotu T_m než produkty specifické [17]. Hodnota T_m je specifická pro určitý PCR produkt, protože závisí na jeho sekvenci nukleotidů.



Obr. 6 A, B Analýza křivek tání [17]

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce je pojednat o potravinách obsahujících probiotika a o identifikaci bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* pomocí PCR a PCR v reálném čase. Experimentálním cílem bakalářské práce bylo izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z probiotického výrobku Actimel Natur a prokázat v něm přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus* s využitím PCR v reálném čase.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použitý probiotický mléčný výrobek

Actimel Natur (DANONE). Prodávající v ČR: DANONE a.s, Vinohradská 2828/151, 130 000 Praha 3, ČR. Fotografie výrobku je uvedena na obr. 7

Datum spotřeby: 21. 10. 2009

Složení: mléko, cukr, glukóza, jogurtová kultura a *Lactobacillus casei* Imunitass®. 100 ml výrobku obsahuje min 10% doporučené denní dávky vápníku (110 mg/100 ml) [19]. V Tab. 2 jsou uvedeny průměrné výživové hodnoty ve 100 ml výrobku Actimel.



Obr. 7 Fotografie výrobku Actimel Natur [19]

Lactobacillus casei se ve výrobku Actimel nachází v množství 10^8 (KTJ/ml), tj. 10^{10} KTJ v jedné porci. Actimel dále obsahuje bakterie *Lactobacillus bulgaricus* (10^7 KTJ/ml) a *Streptococcus thermophilus* (10^8 KTJ/ml), tj. další dva druhy běžně se vyskytující v jogurtu [19].

Tab. 2 Průměrné výživové hodnoty ve 100 ml výrobku Actimel Natur [19].

	Actimel Natur 0,1 % tuku
Využitelná energie	146 kJ / 34 kcal
Bílkoviny	2,9 g
Sacharidy	5,1 g
Tuk	méně než 0,1 g
Vláknina (inulin)	2,0 g
Objem výrobku	96,15 ml

4.2 Chemikálie a roztoky

Všechny chemikálie byly v čistotě p. a. Roztoky byly připravovány ze sterilních roztoků. Ředění bylo prováděno sterilní destilovanou H₂O.

4.2.1 Chemikálie a roztoky pro lyzi bakteriálních buněk

- EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Hydroxyd sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- SDS (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris base (Amaresco, Solon, USA)

Příprava 0,5 M EDTA (pH 8,0):

- 186,1 g EDTA rozpuštěno v 800 ml destilované vody
- pomocí 1M NaOH bylo upraveno pH na 8,0
- roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou H₂O, rozdělen do alikvotů a sterilizován autoklávováním (121°C, 20 min)

Příprava zásobního roztoku 1 M Tris HCl (pH 7,8):

- 12,1 g Tris base
- 70 ml destilované H₂O
- pomocí 1M HCl bylo upraveno pH na 7,8
- roztok byl doplněn do objemu 100 ml destilovanou vodou a sterilizován autoklávováním (121°C, 20 min)

Příprava lyzačního roztoku A:

- 10 mM Tris HCl (pH 7,8)
- 5 mM EDTA (pH 8,0)
- roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1 M Tris HCl a 0,5 M EDTA

Příprava lyzačního roztoku B:

- lyzační roztok A
- lysozym 3 mg/ml
- lysozym byl přidán do lyzačního roztoku těsně před použitím

4.2.2 Chemikálie pro purifikaci DNA

- Ethanol (Pliva-Lachema, ČR)
- Fenol (Pliva-Lachema, ČR)
- Chlorofom (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Amaresco, Ohio, USA)
- Octan sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)

Příprava TE pufru:

- 10 mM Tris HCl (pH 7,8)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)

- roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1 M Tris HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Příprava CIZ:

- směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1

4.2.3 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný); složení: 750 mM Tris HCl (pH 8,8) 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20, 15 mM MgCl₂ (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP směs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 7,5 (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)

4.2.4 Chemikálie a roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu

- Agarosa pro elektroforézu DNA (Serva, Heidenberg, SRN)
- Bromfenolová modř (Sigma, St. Luis, USA)
- Ethidium bromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)
- PCR vkladací pufr Yellow load obsahující žluté barvivo – orange G (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR vkladací pufr obsahující barviva – bromofenolovou modř a xylen cyanol (Top-Bio, Praha, ČR)
- Kyselina boritá (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- DNA standard (Malamité, v.o.s) obsahující fragmenty DNA o velikosti 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp

Příprava TBE pufru (5x koncentrovaný):

- 54 g Tris HCl
- 27,5 g H₃BO₃
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- roztok byl doplněn do objemu 1 l sterilní destilovanou vodou, před použitím 10x naředěn

4.3 Pomůcky a přístroje

- Laboratorní váhy (Kern and Sohn, Německo)
- Centrifuga Mini Spin 14 500 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exikátor (KIF LAB Freiburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 μl (Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Očkovací box (Fatran, ČR)
- Termostat Mini Incubator (Labnet, USA)
- Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Milano, Itálie)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Mini Gel (Hoefler, USA)

- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- Termocyklér RotorGene (USA)
- NanoPhotometr (Implen, Německo)
- Digitální fotoaparát (Kodak, Dánsko)
- Bežné laboratorní sklo, umělohmotný laboratorní materiál a pomůcky

4.4 Použité metody

Popsané postupy byly prováděny podle učebních textů laboratorního cvičení a osobního sdělení doc. Španové a Ing. Trachtové.

4.4.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku

- byl odebrán 1 ml mléčného výrobku (Actimel) do 1 ml eppendorfek
- vzorky byly centrifugovány při 15 000 ot. /min po dobu 3 minut
- supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal dobře okapat
- sediment se resuspendoval v 1 ml lyzačního roztoku A
- suspenze se centrifugovala při 15 000 ot. / min po dobu 3 minut a opatrně se slit supernatant
- k sedimentu se přidalo 500 µl roztoku B a dokonale se resuspendovalo
- po hodině inkubace při laboratorní teplotě bylo ke vzorku přidáno 12,5 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml)
- vzorky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 55 °C
- pomocí gelové elektroforézy na agarosovém gelu byla ověřena přítomnost DNA v hrubých lyzátech buněk

4.4.2 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk

4.4.2.1 Fenolová extrakce DNA

- k lyzátu buněk (500 µl) byl přidán stejný objem fenolu (pH upraveno na 7,8)
- směs byla kývavým pohybem promíchána po dobu 4 minut
- vzorky byly centrifugovány při 15 000 ot. / min po dobu 3 minut
- byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté eppendorfky, ke které bylo přidáno 700 µl CIZ směsi a opět kývavým pohybem promícháno asi po dobu 4 minut
- vzorky byly centrifugovány 15 000 ot. / min po dobu 3 minut
- znovu byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté eppendorfky

4.4.2.2 Přesrážení DNA ethanolem

- ke vzorku DNA (300 µl) byla přidána 1/20 objemu 3 M octanu sodného, směs byla promíchána
- bylo přidáno 800 µl 96 % ethanolu, směs byla promíchána
- DNA byla vysrážena při -20 °C po dobu 15 minut
- DNA byla sedimentována centrifugací 15 000 ot. /min po dobu 15 minut, po centrifugaci byl supernatant slit
- sediment DNA byl vysušen v exikátoru po dobu asi 15 minut
- DNA byla rozpuštěna v 100 µl TE pufri

- takto připravená DNA byla použita pro agarósovou elektroforézu a pro spektrofotometrické stanovení

4.4.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- měření bylo prováděno na spektrofotometru NanoPhotometr Implen (lid 5)
- pro nastavení spektrofotometru byl nejprve proměřen TE pufr (objem 6 μ l)
- poté byly proměřeny vzorky DNA (objem 6 μ l)
- na přístroji byla přímo odečtena hodnota A_{260}/A_{280} (posouzení čistoty DNA) a koncentrace DNA (v ng/ μ l)

4.4.4 Agarósová gelová elektroforéza bakteriální DNA

- byl připraven 0,8 % agarosový gel (0,4 g agarosy, 50 ml 0,5 \times TBE pufru)
- směs byla důkladně rozvařena v mikrovlnné troubě a nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem
- gel tuhl při laboratorní teplotě 30 až 45 minut, před nanášením vzorků byl odstraněn hřebínek
- na polyethylenovém proužku byly smíchány vzorky DNA (v objemu 15 μ l) s 3 μ l stop pufru
- směs byla nanesena do komůrek gelu, do zvláštní komůrky byl nanesen velikostní standard
- vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany, převrstvena asi 250 ml 0,5 \times TBE pufru. Elektroforéza byla spuštěna (pod napětím 60 V)
- přibližně po 2 hodinách byla elektroforéza zastavena, gel byl vyjmut a obarven v lázni připravené z 500 ml destilované vody a ethidium bromidu (výsledná koncentrace 1 μ g/ml)
- gely s DNA byly dokumentovány fotografováním digitálním fotoaparátem

4.4.5 Rodově specifická PCR s bakteriální DNA izolovanou z mléčného výrobku Actimel Natur

Při rodově specifické PCR byla prováděna amplifikace fragmentu DNA o délce asi 250 bp pomocí primerů LbLMA1 a R16-1 [13]. Tento fragment je specifický pro bakterie rodu *Lactobacillus*. Jeho teplota tání je 83°C.

4.4.5.1 Příprava PCR směsi

- všechny komponenty PCR směsi byly před použitím krátce centrifugovány
- komponenty byly míchány v pořadí, které je uvedeno v Tab. 3 (rodově specifická PCR)
- při každém přidání další složky byla směs dobře promíchána
- bylo připraveno 25 μ l PCR směsi do 200 μ l eppendorfek
- pro negativní kontrolu (kontrola kontaminace složek PCR) byla namísto DNA matrice přidána PCR voda o objemu 1 μ l
- pro pozitivní kontrolu (kontrola specifity PCR) byla jako DNA matrice použita bakteriální DNA druhu *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 35 ng/ μ l

Tab. 3 Komponenty a jejich množství v PCR směsi (25 µl) pro rodově specifickou PCR *Lactobacillus*

Pořadí	Komponenty	Množství (µl)
1.	voda pro PCR	19
2.	10× reakční pufr kompletní	2,5
3.	směs dNTP (10 mM)	0,5
4.	primer LbLMA 1 (10 pmol/ µl)	0,5
5.	primer R 16-1 (10 pmol/ µl)	0,5
6.	DNA polymerasa Top Bio 1.1 (1 U/ µl)	1
7.	DNA matrice (20 ng/ µl)	1

4.4.5.2 Průběh amplifikace

- vzorky se všemi komponenty byly opatrně promíchány a krátce centrifugovány
- vzorky byly vloženy do termocykléru, který pracoval podle předem nastaveného programu LBC ROD (Tab. 4)

Tab. 4 Program PCR s rodově specifickými primery *Lactobacillus*

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
1. Horký start	95	300
2. Denaturace DNA	95	30
3. Hybridizace primerů	55	30
4. Syntéza DNA	72	60
5. Prodloužení syntézy DNA (v posledním cyklu)	72	600

- po prvním kroku byla DNA zahřívána při 95°C po dobu 5 min. (horký start)
- po prvním cyklu byly kroky 2 – 4 zopakovány v dalších 34 cyklech, v posledním cyklu byla syntéza prodloužena na 10 minut

4.4.5.3 Detekce rodově specifických PCR produktů agarósovou gelovou elektroforézou

- byl připraven 1,8 % agarosový gel (1,8 g agarosy, 100 ml 0,5× TBE pufru)
- k množství 25 µl PCR produktu bylo přidáno 5 µl stop pufru
- do jednotlivých komůrek gelu byly nanášeny PCR produkty a do zvláštní komůrky velikostní standard
- vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany, převrstvena asi 250 ml 0,5× TBE pufru a elektroforéza byla spuštěna (pod napětím 60 V)
- přibližně po 2 hodinách byla elektroforéza zastavena, gel byl vyjmut a obarven v lázni připravené z 500 ml destilované vody a ethidium bromidu (výsledná koncentrace 1 µg/ml)
- obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru v UV světle
- výsledky byly zdokumentovány digitálním fotoaparátem

4.4.6 PCR v reálném čase (RT-PCR) s bakteriální DNA izolovanou z mléčného výrobku Actimel Natur

Při RT-PCR byla prováděna amplifikace fragmentu DNA o délce asi 250 bp pomocí primerů LbLMA1 a R16-1 [13]. Tento fragment je specifický pro bakterie rodu *Lactobacillus*. Teplota T_m tohoto PCR produktu je asi 85°C. V RT-PCR byl použit komerčně dostupný qPCR 2× SYBR Master Mix Top-Bio (Praha, Česká republika).

4.4.6.1 Příprava PCR směsi pro RT-PCR

- všechny komponenty PCR směsi byly před použitím krátce centrifugovány
- komponenty byly míchány v pořadí, které je uvedeno v Tab. 5
- při každém přidání další složky byla směs dobře promíchána
- bylo připraveno 25 µl PCR směsi do 200 µl eppendorfek
- pro negativní kontrolu (kontrola kontaminace složek PCR) byla namísto DNA matrice přidána PCR voda o objemu 1 µl
- pro pozitivní kontrolu (kontrola specifity PCR) byla jako DNA matrice použita bakteriální DNA druhu *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 35 ng/µl

Tab. 5 Komponenty a jejich množství v PCR směsi (25 µl) pro PCR v reálném čase

Pořadí	Komponenty	Množství (µl)
1.	voda pro PCR	9,5
2.	qPCR 2× SYBR Master mix; Top Bio	12,5
3.	primer LbLMA 1 (10 pmol/ µl)	1
4.	primer R 16-1 (10 pmol/ µl)	1
5.	DNA matrice (20 ng/ µl)	1

4.4.6.2 Průběh amplifikace

- vzorky obsahující všechny komponenty byly opatrně promíchány a krátce centrifugovány
- vzorky byly vloženy do přístroje na provedení RT-PCR (termocyklér RotorGene), který pracoval podle předem nastaveného programu LBC ROD (Tab. 6)

Tab. 6 Program RT-PCR s rodově specifickými primery *Lactobacillus*

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
1. Hot start	95	300
2. Denaturace DNA	95	60
3. Hybridizace primerů	55	30
4. Syntéza DNA	72	60
5. Prodloužení syntézy DNA (v posledním cyklu)	72	600

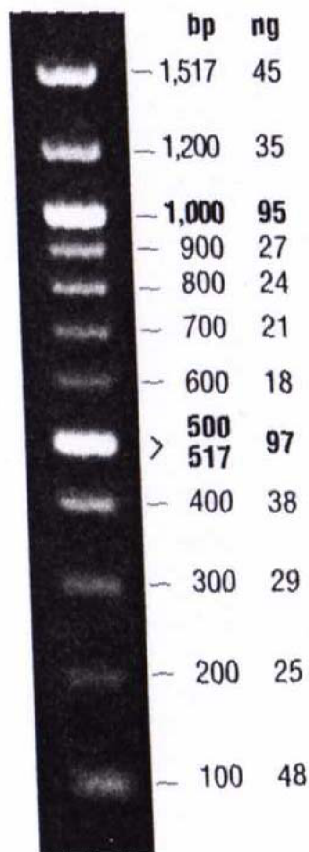
- po prvním cyklu byly kroky 2 – 4 zopakovány v dalších 34 cyklech, v posledním cyklu byla syntéza prodloužena na 10 minut

4.4.6.3 Detekce RT-PCR produktů agarósovou gelovou elektroforézou

- byl připraven 1,8 % agarosový gel (1,8 g agarosy, 100 ml 0,5× TBE pufru)
- k množství 25 µl PCR produktu bylo přidáno 5 µl stop pufru
- do jednotlivých komůrek gelu byly nanесeny PCR produkty se stop pufrém a do zvláštní komůrky velikostní standard
- vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany, převrstvena asi 250 ml 0,5× TBE pufru a elektroforéza byla spuštěna (pod napětím 60 V)
- přibližně po 2 hodinách byla elektroforéza zastavena, gel byl vyjmut a obarven v lázni připravené z 500 ml destilované vody a ethidium bromidu (výsledná koncentrace 1 µg/ml)
- obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru v UV světle
- výsledky byly zdokumentovány digitálním fotoaparátem

4.4.6.4 Velikostní standard 100 bp žebříček

Jako velikostní standard byl pro stanovení velikosti PCR produktu pomocí agarózové gelové elektroforézy použit žebříček 100 bp ladder. Obsahuje následující fragmenty DNA. Na obr. 8 je zobrazen DNA standard (100 bp žebříček).



Obr. 8 DNA standard (100 bp žebříček)

4.4.6.5 Detekce RT-PCR produktů pomocí fluorescence

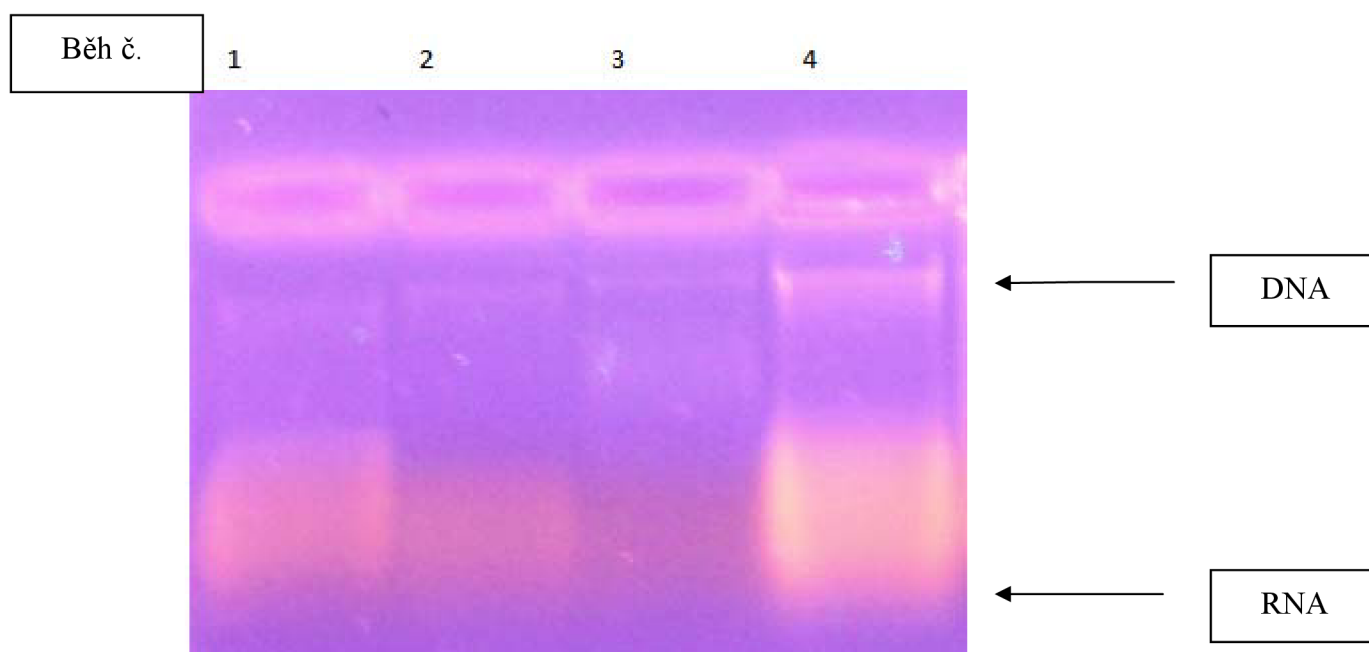
Amplifikace byla sledována v průběhu PCR (po ukončení syntézy komplementárního řetězce) pomocí nárůstu fluorescence. U jednotlivých vzorků byl sledován fluorescenční práh - hodnota Ct (cyklus, ve kterém je hodnota fluorescence nad pozadím přirozené fluorescence). Specifická PCR produktů byla ověřena konstrukcí křivky tání. Pro konstrukci křivky tání byla použita teplota od 55°C do 99°C.

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA z mléčného výrobku Actimel Natur fenolovou extrakcí

Z výrobku Actimel Natur byl po promíchání odpipetován 1 ml (ve 4 opakováních) a ty byly zpracovány dle postupu uvedeného v kapitole 4. Materiál a metody. V hrubých lyzáttech buněk byla prokázána přítomnost DNA. Hrubé lyzáty buněk byly použity pro izolaci DNA. DNA byla izolovaná z mléčného výrobku Actimel Natur fenolovou extrakcí a vysrážena ethanolem. Přítomnost izolované DNA byla zkontrolována agarósovou elektroforézou. Výsledek elektroforézy a popis gelu je znázorněn na obr. 9. Na gel bylo nanášeno 15 μ l DNA.

Obr. 9 Agarósová gelová elektroforéza purifikované DNA ve čtyřech vzorcích výrobku Actimel Natur



Běh č.	Vzorek DNA č.	Množství DNA (μ l)	Množství nanášecího pufu (μ l)	Detekce DNA
1	1	15	3	+
2	2	15	3	+
3	3	15	3	+
4	4	15	3	+

+...DNA detekována

- Z výrobku Actimel Natur byla izolována DNA ze všech čtyř vzorků. Kromě DNA byla na gelu detekována i RNA.

5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobku Actimel Natur

Pro stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA byl použit přístroj NanoPhotometer™ Implen. Hodnota absorbance $A_{260\text{nm}}$ sloužila k výpočtu koncentrace DNA a poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ k posouzení čistoty izolované DNA. Výsledky měření jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 7 Koncentrace a množství DNA izolované z výrobku Actimel Natur a absorbance při různých vlnových délkách

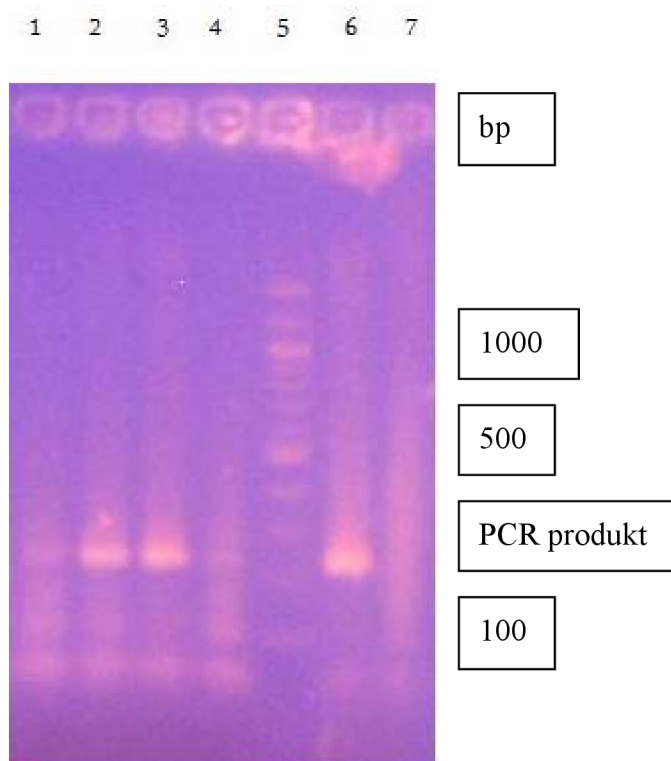
Veličina	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4
Koncentrace (ng/μl)	107	400	197	311
Množství DNA (ng)	10700	40000	19700	31100
$A_{230\text{nm}}$	0,763	0,737	0,321	0,892
$A_{260\text{nm}}$	0,461	1,610	0,797	1,261
$A_{280\text{nm}}$	0,350	0,840	0,454	0,748
$A_{320\text{nm}}$	0,035	0,011	0,009	0,018
$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	1,352	1,929	1,771	1,703

- Ze čtyř vzorků výrobku Actimel Natur byla izolována relativně čistá DNA v koncentraci 107 – 400 ng/ μl a v množství 10,7 – 40 μg.

5.3 Konvenční PCR specifická pro rod *Lactobacillus* s bakteriální DNA z mléčného výrobku Actimel Natur

Specifická PCR pro detekci bakterií rodu *Lactobacillus* byla provedena pomocí primerů LbLMA1 a R16 – 1 dle postupu uvedeného v kapitole 4. Materiál a metody. Do PCR bylo použito různé množství DNA (v 1 μl) z výrobku Actimel Natur, naředěné na koncentraci 10 ng/μl, 20 ng/μl, 20 ng/μl a 0,4 ng/μl. Výsledky agarósové gelové elektroforézy PCR produktů (asi 250 bp) jsou uvedeny na obr. 10. Srovnáním polohy ampliconů s fragmenty dané velikosti ve standardu byla stanovena velikost PCR produktu.

Obr. 10 Agarósová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA izolovaná z výrobku Actimel Natur o různé koncentraci byla amplifikována pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus*. Na gel bylo nanášeno 25 μ l PCR produktů.



Běh č.	DNA z výrobku Actimel Natur (c = ng/ μ l)	Množství DNA / PCR směs (ng)	Detekce PCR produktu
1.	10	10	+
2.	20	20	++
3.	20	20	++
4.	0,4	0,4	+
5.	DNA standard (5 μ l)		100 bp žebříček
6.	Pozitivní kontrola (c = 35 ng/ μ l)	35	+++
7.	Negativní kontrola		-

- PCR produkt nebyl detekován
- + detekován PCR produkt o slabé intenzitě
- ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě
- +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě

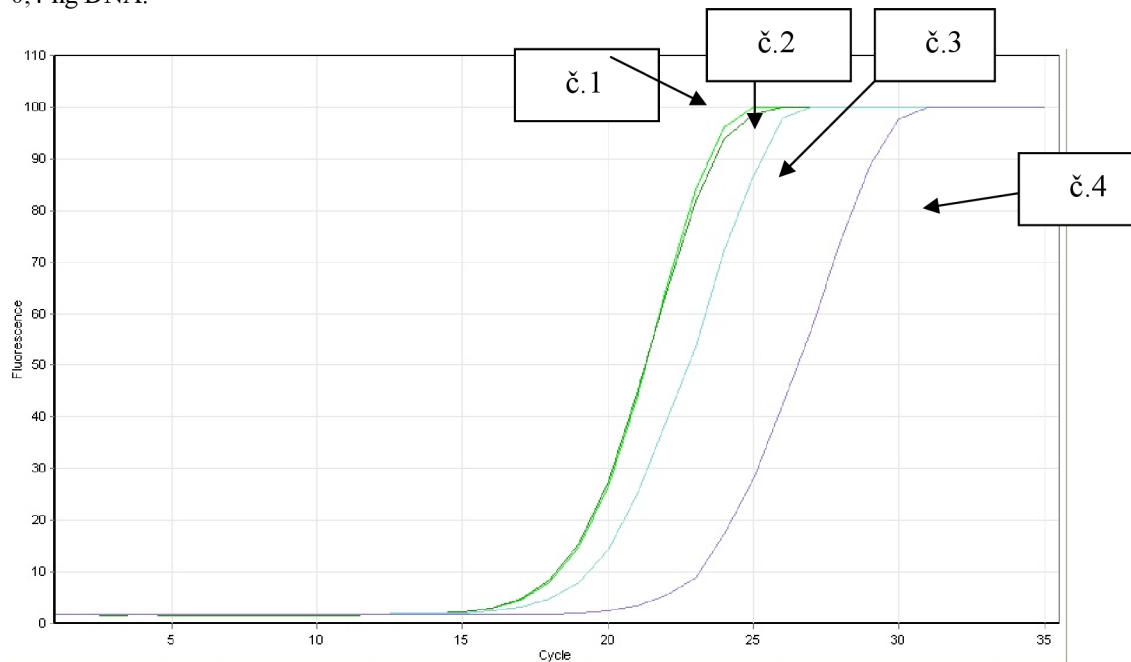
➤ PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus* byly detekovány po amplifikaci DNA všech vzorků.

5.4 PCR v reálném čase (RT-PCR) s bakteriální DNA izolovanou z mléčného výrobku Actimel Natur

Amplifikace DNA (4 vzorky) izolované z probiotického výrobku Actimel Natur byla provedena pomocí PCR v reálném čase za využití primerů LbLMA1 a R16 – 1 specifických

pro rod *Lactobacillus* dle postupu uvedeného v kapitole 4. Materiál a metody. Na obr. 11 jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost množství fluorescence na cyklu PCR. Křivky č. 1 a č. 2, jejichž fluorescence byla detekována jako první z PCR směsi s největší koncentrací DNA. Křivka, jejíž fluorescence byla detekována jako poslední, byla z PCR směsi s nejnižší koncentrací DNA. Cyklus PCR, ve kterém je detekován nárůst fluorescence (fluorescenční práh) je nepřímo úměrný množství DNA v PCR směsi.

Obr. 11 Amplifikační křivky č. 1 a č. 2 amplifikace 10 ng DNA, č. 3 amplifikace 4 ng DNA, č. 4 amplifikace 0,4 ng DNA.

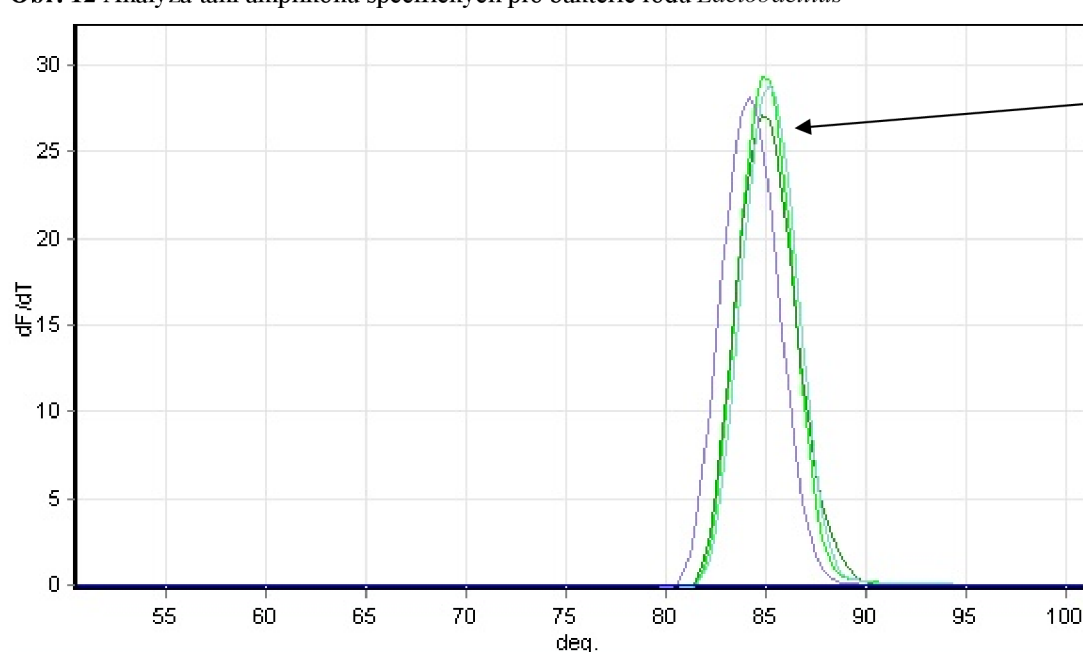


- Nárůst fluorescence byl pozorován po asi 19. cyklu, 21. cyklu a 24. cyklu v závislosti na množství DNA v PCR směsi.

5.4.1 Analýza křivek tání pro stanovení specifických PCR produktů z RT-PCR

Analýza specifických PCR produktů pomocí analýzy křivek tání je uvedena na obr. 12. Vytvořil se 1 peak, což znamená, že se amplifkovaly specifické PCR produkty. Teplota $T_m = 85^\circ\text{C}$ znamená, že byl amplifikován a detekován specifický PCR produkt.

Obr. 12 Analýza tání ampliconů specifických pro bakterie rodu *Lactobacillus*

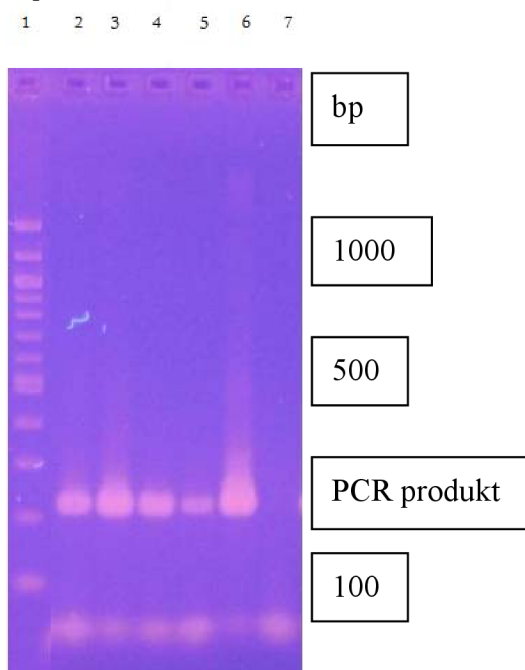


- Vytvořil se 1 peak ($T_m = 85^\circ\text{C}$) ze specifických PCR produktů. Nespecifické PCR produkty nebyly detekovány.

5.4.2 Ověření specifity PCR produktů agarósovou gelovou elektroforézou

Specifita PCR produktů získaných po amplifikaci DNA izolované z výrobku Actimel Natur s rodově specifickými primery *Lactobacillus* v RT-PCR byla ověřena pomocí agarósově gelové elektroforézy spolu se standardem (100 bp žebříček) viz kapitola 4. Materiál a metody. Výsledky agarósově gelové elektroforézy RT-PCR produktů (250 bp) jsou uvedeny na obr. 13.

Obr. 13 Agarósová gelová elektroforéza PCR produktů *Lactobacillus*. DNA izolovaná z mléčného výrobku Actimel byla amplifikována pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus*. Na gel bylo nanášeno 25 μ l PCR produktů.



Běh č.	DNA z výrobku Actimel Natur (c = ng/ μ l)	Množství DNA / PCR směs (ng)	Detekce PCR produktu (250 bp)
1.	Velikostní standard (5 μ l)		100 bp žebříček
2.	10	10	++
3.	20	20	++
4.	20	20	++
5.	0,4	0,4	+
6.	Pozitivní kontrola (c = 35 ng/ μ l)	35	+++
7.	Negativní kontrola		-

- PCR produkt nebyl detekován
- + detekován PCR produkt o slabé intenzitě
- ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě
- +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě

- Agarósovou gelovou elektroforézou byla ověřena přítomnost jednoho specifického PCR amplikonu specifického pro bakterie rodu *Lactobacillus*.

6 DISKUSE

Molekulárně diagnostické postupy, které jsou založeny na amplifikaci DNA *in vitro*, jako je polymerázová řetězová reakce, jsou v poslední době velice využívané metody pro identifikaci mikroorganismů v potravinách a jiných komplexních vzorcích. PCR se využívá k identifikaci jak prospěšných bakterií (bakterií mléčného kvašení) tak i k identifikaci patogenních mikroorganismů [20].

Tradiční diagnostické mikrobiologické testy jsou testy mikroskopické, kultivační či imunologické. Role tradičních testů je stále důležitá. Navíc PCR má některá omezení. Vyžaduje aspoň částečnou znalost sekvence DNA, kterou chceme amplifikovat. Tyto sekvence jsou dnes veřejně přístupné v databázích, ale nejsou k dispozici pro všechny druhy mikroorganismů. Neočekávané mutace v sekvencích DNA mohou negativně ovlivňovat PCR. Rovněž falešně pozitivní PCR reakce, které vznikají v důsledku kontaminace působí značné problémy v běžné praxi v diagnostické laboratoři využívající PCR. Proto je třeba dodržovat přísná pravidla pro práci s DNA v laboratořích určených pro provádění PCR. Pečlivost je nezbytná nejen při provádění PCR zkoušky, ale i při interpretaci jejich výsledků [14].

V této práci byly při provádění PCR využívány jak PCR směsi, které obsahovaly kontrolní DNA (pozitivní kontrola), tak PCR směsi bez DNA (negativní kontrola). Falešně negativní ani falešně pozitivní PCR produkty nebyly detekovány. To svědčí o dobré organizaci práce v laboratoři i o správné přípravě PCR směsi.

6.1 Izolace celkové DNA z mléčného výrobku Actimel Natur

DNA byla izolována z mléčného výrobku Actimel Natur fenolovou extrakcí. Vedle izolace DNA fenolovou extrakcí byly vypracovány i další postupy izolace DNA např. postupy využívající různé typy nosičů [20]. Správné zvládnutí metody izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR je předpokladem úspěšnosti PCR. Přítomnost bakteriální DNA byla ověřena pomocí 0,8% agarósové elektroforézy. Vedle DNA byla detekována i RNA. Jak DNA, tak RNA jsou součástí bakteriálních buněk a bývají izolovány společně. Vzorky DNA kontaminované RNA lze použít pro amplifikaci v PCR (Trachtová, ústní sdělení).

6.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobku Actimel Natur

Z výrobku Actimel Natur byla izolována celková DNA v dostatečném množství (10,7-40 µg). Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena pomocí spektrofotometrie. Byla měřena absorbance DNA při vlnových délkách 230 – 320 nm. Zkoumané vzorky DNA byly proměřeny na přístroji NanoPhotometer™ Implen, který umožňuje stanovit koncentraci v ng/µl. Z poměru hodnot A_{260}/A_{280} se stanoví čistota DNA. Poměr absorbancí čisté DNA se pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0. Obsahuje-li vzorek proteiny je $A_{260} < 1,8$, v případě obsahu RNA je poměr $A_{260}/A_{280} \geq 2,0$ [13]. Z výsledků měření DNA izolované z Actimelu Natur vyplývá, že vzorky číslo 1, 3, 4 obsahovaly určité množství proteinů. Tyto proteiny by mohly interferovat v PCR. Do PCR se DNA obvykle ředí a tím se ředí i inhibitory PCR [13]. V práci byla DNA naředěna na 20 ng/ µl, 10 ng/ µl a 0,4 ng/ µl.

6.3 Specifická PCR rodu *Lactobacillus*

Specifická PCR pro detekci bakterií rodu *Lactobacillus* byla provedena pomocí primerů LbLMA1 a R16 – 1 [13]. Velikost PCR produktu je 250 bp. DNA izolovaná z mléčného výrobku Actimel Natur byla amplifikována a detekce PCR produktů byla stanovena pomocí 1,8 % agarósové elektroforézy. Detekovaný PCR produkt svědčí o přítomnosti bakterií druhu *Lactobacillus* ve vzorku. Výrobce je ve výrobku deklarována přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus casei*. Dále je deklarována přítomnost buněk jogurtové kultury. Mezi jogurtové kultury patří druh *Lactobacillus delbrueckii*, jehož DNA se v PCR rovněž amplifikuje. Naproti tomu DNA *Streptococcus thermophilus* se v použité PCR neamplifikuje. S využitím druhově specifických PCR by bylo možné prokázat přítomnost DNA jednotlivých druhů v analyzovaných vzorcích výrobku (Španová, ústní sdělení).

6.4 PCR v reálném čase (RT-PCR) s purifikovanou DNA

Amplifikace DNA izolovaná z probiotického výrobku Actimel Natur byla provedena pomocí PCR v reálném čase za využití primerů LbLMA1 a R16 – 1 specifických pro rod *Lactobacillus* [13]. V souladu s očekáváním byly detekovány fluorescenční křivky a z nich odečteny hodnoty fluorescenčního prahu – Ct. Závisely na množství DNA použité v amplifikační směsi [16].

Určující hodnotou je hodnota Ct. Čím je vyšší, tím byla nižší koncentrace DNA v PCR směsi. Hodnota Ct udává cyklus, ve kterém hodnota fluorescence překročí pozadí [19]. V bakalářské práci bylo použito interkalační barvivo SYBR[®] Green I. Barvivo SYBR[®] Green I fluoreskuje po vazbě na menší žlábek dsDNA. Fluorescence SYBR Green I je po vazbě na dvouřetězcovou DNA až 1000× vyšší. Zároveň se fluorescenční signál zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR produktu. Signál se měří na konci elongace nebo kontinuálně [16]. Nevýhodou je, že barvivo SYBR[®] Green I se váže na dvouřetězcovou DNA nespecificky. To znamená, že se váže jak na specifické amplikony, tak na nespecifické amplikony. Proto je třeba ověřovat specifitu amplikonů. To lze provést pomocí agarósové gelové elektroforézy nebo s využitím hodnoty T_m (teplota tání). Obojí je pro daný amplikon specifické.

6.4.1 Analýza křivek tání pro stanovení specifických PCR produktů

PCR produkty různé délky a sekvence se vyznačují různou hodnotou teploty tání a odlišují se pozicí „peak“ na ose y (°C) v křivkách tání. Tato analýza křivek tání a hodnota T_m slouží k určení specifity PCR produktů, tj. zda získaný PCR produkt odpovídá hledanému amplikonu. Přítomnost PCR produktu specifického pro rod *Lactobacillus* byla prokázána přítomností jedné křivky tání s hodnotou $T_m = 85^\circ\text{C}$ po amplifikaci DNA z nezávisle připravených vzorků výrobku Actimel. Přítomnost jednoho PCR produktu byla navíc ověřena pomocí agarósové gelové elektroforézy. V práci bylo prokázáno, že PCR v reálném čase lze využít pro detekci bakterií rodu *Lactobacillus* v mléčném výrobku Actimel Natur tj. při mikrobiologické analýze potravin.

7 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářská práce pojednává o probiotických bakteriích v potravinách. Další část práce je zaměřená na bakterie rodu *Lactobacillus* v probiotických výrobcích a na jejich identifikaci pomocí konvenční PCR a PCR v reálném čase.

V experimentální části bakalářské práce byla z výrobku Actimel Natur izolována DNA metodou fenolové extrakce. Amplifikace DNA byla provedena pomocí PCR v reálném čase s primery LbLMA1 a R16 – 1 specifickými pro rod *Lactobacillus*. PCR produkt byl detekován pomocí fluorescence interkalačního barviva SYBR[®] Green I. Specificita amplikonu byla ověřena pomocí křivky tání a pomocí agarósové gelové elektroforézy (PCR product 250 bp). V probiotickém výrobku Actimel Natur byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus*.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] TUOHY, Kieran, et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health . *Drug Discovery Today*. 2003, 8, s. 692-700.
- [2] LISÁK, Vojtěch. AloeInfo.cz [online], [cit. 2010-05-16]. Probiotika. Dostupné z WWW: <<http://www.aloeinfo.cz/probiotika>>.
- [3] LUKÁŠ, Karel, et al. Pharmanews [online]. 2006 [cit. 2010-05-13]. Probiotika. Dostupné z WWW: <http://www.pharmanews.cz/2006_03/probiotika.html>.
- [4] FUJIMOTO, Junji, et al. Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain Shirota in human feces with strain-specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA . *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 126, s. 210-215.
- [5] GÖRNER, Fridrich, et al. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé centrum, 2004. 1. vydání. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [6] MATTILA-SANDHOLM, T., et al. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 2002, 12, s. 173-182.
- [7] ŠMAHELOVÁ, H. *Probiotika*. Brno: Ústav preventivního lékařství LF Masarykovy univerzity, 2008. 82 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Danuše Lefnerová, Ph.D.
- [8] Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita [online]. 2005 [cit. 2010-04-16]. *Prebiotika*. Dostupné z WWW : <<http://elanor.sci.muni.cz/mikrob/mikrofloraGIT/funkcnipotrav/odk1.htm>>.
- [9] BUBENÍKOVÁ, L. *Identifikace vybraných druhů probiotických bakterií v potravinových doplncích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 35 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [10] HOLZAPFEL, Wilhelm, et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *American Society for Clinical Nutrition*. 2001, 73, s. 365-73.
- [11] *Biology* – www.biology.usu.edu [online]. 2010 [cit. 2010-04-29]. The microscopy facility. Dostupné z WWW: <<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>>.
- [12] JUREČKOVÁ, N. *Identifikace bakterií mléčného kvašení v kysaných mléčných výrobcích s využitím amplifikačních metod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 39 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

- [13] DUBERNET, Ségolène , et al. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level . *FEMS Microbiology Letters*. 2002, 214, s. 271-275. ISSN 0378-1097
- [14] MACKAY, M., et al. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2004, 10, s. 190-212
- [15] RUMML, T. *Genové inženýrství*. Praha: VŠCHT, 2002. 1. vydání. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [16] ŠMARDA, J., et al. *Metody molekulární biologie*. Brno-Kraví Hora : Masarykova univerzita, 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [17] *O firmě GENERI BIOTECH s.r.o.* [online]. 2009 [cit. 2010-05-16]. Základní principy kvantitativní real-time PCR (qPCR). Dostupné z WWW: <<http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>>.
- [18] LYSKOVÁ, Lucie . *Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice*. Brno, 2008. 46 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [19] *Actimel – Actimel* [online]. [cit. 2010-05-2]. O Actimelu. Dostupné z WWW: <<http://www.actimel.cz/>>
- [20] ŠPANOVÁ, Alena, et al. Ferrite supports for isolation of DNA from complex samples and polymerase chain reaction amplification. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1080, s. 93-98.
- [21] CORBETT RESEARCH. *Rotor- Gene 6000*, Operator manual, ©Copyright 2006.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BMK	bakterie mléčného kvašení
bp	pár bází (base pair)
KTJ	kolonie tvořící jednotka
CIZ	chloroform-izoamylalkohol
dATP	2'-deoxyadenosin 5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin 5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
dTTP	2'-deoxythymidin 5'-trifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FOS	fruktooligosacharidy
PCR	polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsulfát sodný
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	ultrafialové světlo
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase