



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**ANALÝZA MIKROBIÁLNÍHO SLOŽENÍ
VYBRANÝCH PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ
METODOU PCR-HRM**

ANALYSIS OF THE COMPOSITION OF SELECTED PROBIOTIC PRODUCTS
BY PCR-HRM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Tomanová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1068/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Barbora Tomanová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Analýza mikrobiálního složení vybraných probiotických výrobků metodou PCR-HRM

Zadání diplomové práce:

Vypracování literárního přehledu zabývajícího se možnostmi analýzy mikrobiálního složení výrobků s obsahem probiotik za využití metody PCR-HRM

Optimalizace metody izolace bakteriální DNA a následné identifikace mikroorganismů přítomných v komplexních vzorcích, kterými jsou kosmetické a hygienické výrobky různého druhu s obsahem probiotik. Ověření přítomnosti vegetativních forem mikroorganismů, které by měly být v testovaných výrobcích přítomny.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Barbora Tomanová
student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na průkaz probiotických bakterií ve čtyřech různých probiotických výrobcích (probiotický krém, probiotické tampóny, orální probiotikum a sójový nápoj s probiotiky). Byla ověřena viabilita bakterií obsažených ve výrobcích. Z komplexních matic výrobků byla izolována DNA v kvalitě vhodné pro metodu PCR s následnou identifikací deklarovaných bakteriálních rodů a druhů. K amplifikaci pomocí konvenční PCR a PCR v reálném čase byly použity rodově a druhově specifické primery. Ve výrobcích byly prokázány bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bacillus* a bakteriální druhy *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. Následně byla testována možnost rozlišení směsi bakteriálních druhů v DNA izolované z probiotického tampónu metodou PCR-HRM. K tomu bylo testováno pět sad primerů. Jako nejvhodnější pro rozlišení byly vyhodnoceny 2 sady primerů (primery P1V1, P2V1 a V1F-HRM, V1R-HRM).

KLÍČOVÁ SLOVA

probiotické výrobky, izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), PCR v reálném čase, HRM analýza

ABSTRACT

This work was focused on the detection of probiotic bacteria in four different probiotic products (probiotic cream, probiotic tampons, oral probiotics and soy beverages with probiotics). The viability of the bacteria contained in the products was verified. Complex matrices of the products were used to isolate DNA in a quality suitable for the PCR method, followed by identification of the declared bacterial genus and species. Amplification was achieved with conventional PCR and real-time PCR, genus- and species-specific primers were used. Bacteria, of the genus *Lactobacillus* and *Bacillus* and bacterial species *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus gasseri*, were proven to be within the products. Subsequently, the DNA from mixed bacterial species in the probiotic tampon were distinguished using PCR-HRM. Five sets of primers were used to test this. Two sets of primers (primers P1V1, P2V1 and V1F-HRM, V1R-HRM) were evaluated as the most suitable for resolution.

KEYWORDS

probiotic products, DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, HRM analysis

TOMANOVÁ, B. *Analýza mikrobiálního složení vybraných probiotických výrobků metodou PCR-HRM*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 75 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

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 tímto poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. a paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a ochotu. Velký dík patří rovněž mojí rodině a přátelům za neustálou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Probiotika	8
2.1.1	Mechanismy probiotických účinků	8
2.1.2	Kritéria pro uplatnění probiotických vlastností.....	8
2.1.3	Hodnocení bezpečnosti probiotik.....	9
2.1.4	Využívané probiotické bakterie.....	9
2.2	Trendy ve výrobě probiotických výrobků.....	9
2.2.1	Nemléčné probiotické potraviny a nápoje.....	9
2.2.2	Doplňky stravy	11
2.2.3	Orální probiotika	11
2.2.4	Výrobky pro intimní hygienu	11
2.2.5	Kosmetické výrobky s probiotiky	11
2.3	Výzkum mikrobiálního složení probiotických výrobků.....	12
2.4	Polymerázová řetězová reakce	12
2.4.1	Komponenty PCR směsi	12
2.4.2	Průběh reakce a vznik PCR produktů.....	13
2.4.3	Detekce produktů konvenční PCR	14
2.5	PCR v reálném čase.....	14
2.5.1	Průběh reakce, složení směsi qPCR a detekce produktu reakce	15
2.5.2	Kvantifikace produktu PCR v reálném čase.....	15
2.5.3	Analýza křivky tání (Melt analýza).....	17
2.5.4	Vysokorozlišovací analýza křivky tání (HRM).....	18
2.5.5	Nevýhody metod PCR.....	19
2.5.6	Výhody metod PCR.....	20
3	CÍL PRÁCE.....	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	Materiál	23
4.1.1	Probiotické výrobky	23
4.1.2	Bakteriální kmeny	24
4.1.3	Chemikálie.....	24
4.1.4	Roztoky	25
4.1.5	Magnetické nosiče	25
4.1.6	Komponenty pro PCR	25
4.1.7	Pomůcky a přístroje.....	27
4.2	Metody	28
4.2.1	Příprava růstových médií.....	28
4.2.2	Extrakce a nabožení mikroorganismů z tampónu ellen®.....	28
4.2.3	Kultivace buněk a kontrola čistoty bakteriálních kultur	28
4.2.4	Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk	28
4.2.5	Izolace bakteriální DNA metodou fenolová extrakce	28
4.2.6	Srážení DNA ethanolem.....	29
4.2.7	Izolace bakteriální DNA pomocí magnetických nosičů.....	29
4.2.8	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA	29
4.2.9	Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA	30
4.2.10	Konvenční PCR.....	30
4.2.11	PCR v reálném čase s analýzou křivek tání (Melt analýzou).....	31

4.2.12	Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR.....	32
4.2.13	PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)	33
4.3	Výsledky.....	34
4.3.1	Kultivace buněk z výrobků.....	34
4.3.2	Izolace bakteriální DNA.....	34
4.3.3	Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	34
4.3.4	Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	34
4.3.5	Konvenční PCR.....	37
4.3.6	PCR v reálném čase.....	40
4.3.7	Shnutí výsledků amplifikace	49
4.3.8	PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)	49
4.3.9	Shnutí výsledků PCR-HRM.....	59
4.3.10	Srovnání výsledků PCR-HRM s výsledky optimalizace metody.....	60
4.4	Diskuze.....	61
4.4.1	Kultivace buněk z výrobků.....	61
4.4.2	Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	61
4.4.3	Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	61
4.4.4	Konvenční PCR a detekce produktů PCR.....	62
4.4.5	PCR v reálném čase.....	63
4.4.6	PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)	65
4.4.7	Srovnání výsledků PCR-HRM s výsledky optimalizace metody.....	66
5	ZÁVĚR.....	67
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	68
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	75

1 ÚVOD

Termín probiotika je odvozen z řeckého výrazu „pro život“. Probiotické kultury jsou užívány lidstvem od té doby, co lidé začali konzumovat fermentované potraviny a nápoje. Nicméně koncept mikroorganismů, které mají příznivé účinky na zdraví, představil až laureát Nobelovy ceny, Ilja Iljič Metchnikoff, na počátku 20. století. Jejich přínosy na zdraví hostitele a mechanismy, kterými působí, se staly v posledních letech předmětem mnoha výzkumů [1].

Na základě potvrzených benefitů významně vzrostl zájem společnosti o využívání probiotik. Kromě tradičního zastoupení fermentovaných mléčných výrobků se na trhu začaly objevovat výrobky nejrůznějších forem a aplikací. Jejich užívání se stává rostoucím celosvětovým trendem.

Znalosti o složení mikrobiální komunity, jejích změnách a potenciálních interakcích v matricích jsou zásadní pro zajištění produkce bezpečných a kvalitních výrobků. Kromě toho je stále větší důraz kladen na identifikaci a kvantifikaci deklarovaných probiotických mikroorganismů ze strany spotřebitelů, respektive kontrolních orgánů (zejména u výrobků, jejichž produkce již nabyla konkrétních legislativních rámců) [22].

Často však stanovení přesného mikrobiálního složení představuje značně nelehký úkol. Pro výzkum jsou vyžadovány rychlé a spolehlivé metody. Tradiční kultivační metody často nejsou schopny vyhovět všem požadavkům, které jsou na analýzu kladeny.

Tato skutečnost se stala podnětem pro intenzivní rozvoj nových metod především v oblasti molekulární biotechnologie a genové exprese. Jednou z nejdůležitějších a nejpoužívanějších metod je polymerázová řetězová reakce (PCR) a metody na ní založené.

PCR je metoda, která nachází uplatnění jak v základním a aplikovaném výzkumu, tak i v praxi. PCR je založená na *in vitro* amplifikaci cílových sekvencí nukleových kyselin. Tímto způsobem lze syntetizovat až 10^9 kopií vybraného úseku DNA. PCR byla zavedena v roce 1983 Kary Mullisem, za jejíž objev mu byla udělena Nobelova cena [28].

S rozvojem metody byla zavedena PCR v reálném čase. Detekce pomocí PCR v reálném čase je charakteristická svojí rychlostí, citlivostí, přesností a specifícností. Využitím fluorescenčních molekul je umožněno monitorování vznikajícího produktu již v průběhu reakce, což eliminuje nutnost manipulací po ukončení PCR. Díky možnostem této metody je možné DNA rovněž kvantifikovat a také specifikovat produkty PCR pomocí analýzy křivek tání [27]. Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) představuje citlivější verzi konvenční analýzy křivek tání. Je založena na detekci malých rozdílů v profilu křivek tání ampikonů a díky své citlivosti má, ve spojení s PCR v reálném čase, slibný potenciál pro analýzu mikrobiálního složení nejen probiotických výrobků [33].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Termín probiotika je odvozen z řeckého výrazu „pro život“. Definice probiotik podléhá historickému vývoji na základě nových poznatků. Podle současně uznávané definice Organizace pro výživu a zemědělství a Světové zdravotnické organizace (FAO/WHO) jsou za probiotika považovány „živé organismy, které při podání v dostatečném množství, přinášejí zdravotní výhody hostiteli“ [1].

2.1.1 Mechanismy probiotických účinků

Mechanismy probiotického působení se odvíjejí od vlastností konkrétního bakteriálního kmene, interakcí se specifickými mikroorganismy, způsobu a místa užití [2, 3]. Nelze je proto generalizovat.

Zásadní funkcí probiotik je působení proti patogenním mikroorganismům. Probiotika se podílejí na eliminaci patogenů produkcí antimikrobiálních látek, snižují pH prostředí produkcí organických kyselin (např. kyseliny mléčné, octové či mastných kyselin s krátkým řetězcem), což vytváří nevhodné prostředí pro některé nežádoucí bakterie, a napomáhají udržovat homeostázu. Vlastní kolonizací povrchu epitelu, omezováním apoptózy epitelových buněk či sekrecí mucinu (ve střevě) podporují bariérovou funkci kolonizovaných povrchů [2, 4]. Probiotika mají také schopnost imunomodulace stimulací množení imunitních buněk a ovlivňováním procesů imunitní odpovědi [4].

Některé pozitivní vlivy probiotik již byly dostatečně zdokumentovány a potvrzeny klinickými testy. Existuje však celá řada potenciálně prospěšných účinků, které byly popsány, ale nebyly ještě potvrzeny náležitými klinickými testy [2, 5].

2.1.2 Kritéria pro uplatnění probiotických vlastností

Aby mohl potenciálně probiotický mikroorganismus vůbec uplatnit své příznivé účinky na zdraví hostitele, musí splňovat určitá kritéria. Tyto parametry však nelze zcela zobecnit [2]. Mezi základní podmínky uplatnění probiotických účinků patří:

- Odolnost vůči podmínkám prostředí, ve kterém se probiotika vyskytují. Splnění těchto vlastností je kritické zejména při užití v gastrointestinálním traktu (probiotika musí odolat kyselému prostředí žaludku, působení žlučových solí a pankreatických šťáv).
- Schopnost dočasné adheze a kolonizace povrchů v místě působení.
- Užití probiotik v dostatečném množství k dosažení žádoucích efektů. Pro dosažení potřebné koncentrace probiotických bakterií ve střevě (udává se množství vyšší než $10^6/g$ v tenkém střevě a $10^8/g$ v tlustém střevě) mají probiotické přípravky obsahovat minimálně 10^6 buněk v denní dávce a celkový denní přísun konzumovaných probiotik by se měl pohybovat okolo 10^9 . V jiných probiotických aplikacích není minimální dávka přímo definována.
- Zachování životaschopnosti probiotického kmene během výrobního procesu a skladování výrobku. Nicméně nepřežití po celou dobu procesu neznamená automaticky absenci pozitivních účinků. Studie prokázaly, že i buněčné složky některých probiotických bakterií mohou vykazovat příznivé účinky [2, 3].

2.1.3 Hodnocení bezpečnosti probiotik

Co se týče legislativního ošetření bezpečnosti probiotik uváděných na trh, neexistují jednotné normy. Liší se v závislosti na regionu i na druhu výrobku.

V Evropě je uplatňován koncept *Qualified Presumption of Safety* (QPS, volně přeloženo jako „Kvalifikovaný odhad bezpečnosti“) pro posuzování bezpečnosti probiotických kmenů záměrně uváděných do potravního řetězce (ať už jako složka potravin, krmiv apod.) [6]. Systém QPS zahrnuje mnoho kritérií, zohledňuje praktické zkušenosti s používáním mikroorganismu již v minulosti, antibiotickou rezistenci, potenciální patogenitu, faktory virulence mnoho dalších. Používání probiotik pro jiné účely není přímo regulováno, podléhá pouze obecným požadavkům, které ukládají, že nesmí negativně ovlivňovat kvalitu výrobku a negativně působit na zdraví hostitele [3, 6].

2.1.4 Využívané probiotické bakterie

Dominantní zastoupení v probiotických výrobcích mají zástupci rodu *Lactobacillus* (např. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*), *Bifidobacterium* (např. *B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. breve*), dále pak také rody *Streptococcus* (např. *Streptococcus thermophilus*), *Enterococcus* (např. *Enterococcus faecium*), *Saccharomyces* (např. *Saccharomyces boulardii*), *Bacillus* (např. *Bacillus subtilis*), *Lactococcus* (např. *Lactococcus lactis*). Výčet všech probiotických mikroorganismů je však mnohem rozsáhlejší a zahrnuje celou řadu dalších bakterií a kvasinek [4, 6].

Je třeba zdůraznit, že probiotické vlastnosti určitého kmene nemohou být extrapolovány na jiné kmeny, byť téhož bakteriálního druhu [3]. Na druhou stranu lze ale očekávat, že probiotické účinky mohou vykazovat i některé kmeny mikroorganismů, které přímo testovány nebyly, ale které náleží do dobře prozkoumaného druhu mikroorganismů, který již patřičně otestován byl [5].

2.2 Trendy ve výrobě probiotických výrobků

Vzhledem k nahromaděným důkazům o prospěšných účincích probiotik se jejich užívání v nejrůznějších formách stává rostoucím celosvětovým trendem [7, 8]. S cílem oslovit co nejširší spektrum spotřebitelů jsou ze strany výrobců vyvíjeny snahy o rozšiřování sortimentu probiotických výrobků na trhu [8].

2.2.1 Nemléčné probiotické potraviny a nápoje

Výzkumem nejvíce podložený a prostudovaný rozsah pozitivních účinků na zdraví představuje působení probiotik v gastrointestinálním traktu (protizánětlivé účinky, redukce sérového cholesterolu, zlepšení metabolismu laktózy, antimutagenní a antikarcinogenní účinky, zmírňování průjemových onemocnění a mnoho dalších). Proto je velké množství výrobků cíleno na tuto oblast [7]. Kromě toho jsou probiotika součástí některých výrobků z důvodu zlepšení jejich senzorických vlastností [7, 8].

Tradičně jsou probiotika součástí mléčných výrobků, zejména jogurtů, ale i sýrů, zmrzliny a jiných. Sektor mléčných výrobků je stále největším na trhu s probiotickými výrobky [8].

V současnosti však roste zájem zákazníků po jiných než mléčných probiotických výrobcích, a to vede k rozšiřování sortimentu výrobků tohoto typu na trhu. Důvodem může

být nejen rozšíření „probiotického jídelníčku“, ale také u části populace problémy jako např. intolerance laktózy či alergie na mléčné proteiny, problémy se zvýšeným cholesterolem, nebo pokud konzumaci mléčných výrobků brání jiné důvody (např. životní styl) [7, 8, 9]. Příklady nemléčných probiotických výrobků jsou tedy výrobky z ovoce a zeleniny, sóji, cereálií a masné výrobky [7, 8]. Producenti se často inspiřují tradičním fermentačním zpracováváním těchto matric v různých kulturách [7].

2.2.1.1 Ovocné a zeleninové výrobky

Ovocné a zeleninové produkty jsou bohatým zdrojem vitamínů, minerálů, vlákniny a antioxidantů a mají dobrý sensorický profil. Jsou také vhodným substrátem pro probiotické bakterie z hlediska obsahu sacharidů. Ovocné a zeleninové šťávy jsou navíc vystaveny prostředí trávicího traktu poměrně krátkou dobu, což je příznivým faktorem pro zachování viability probiotických bakterií. Kromě toho, bakteriální produkce organických kyselin během fermentace snižuje pH, což může prodloužit dobu skladování výrobku [7, 8].

Jako vhodná matrice pro probiotika byla testována celá řada ovoce (jablka, banány, pomeranče, černý rybíz) a zeleniny (červená řepa, mrkev, zelí). Produkty z ovoce a zeleniny (zejména jejich šťávy) se ukázaly jako vhodná matrice, obecně lepší viabilita byla zjištěna u výrobků s nižším pH [7]. Velmi důležitá je však sensorická přijatelnost. U některých džusů bylo po přidání probiotik (*Lactobacillus plantarum*) zaznamenáno negativní ovlivnění chutě (slaná, kyselá) a vůně (mléčná). Bylo však dokázáno, že po přidavku šťávy z tropického ovoce došlo k výraznému sensorickému zlepšení. Preference jsou do značné míry ovlivněny také tím, co jsou lidé zvyklí konzumovat [7, 10].

2.2.1.2 Výrobky z obilí

Cereálie jsou další vhodnou matricí z hlediska komplexu živin, jako jsou vitamíny, minerály, proteiny, vláknina. Konzumace celozrnných obilovin přináší další velmi prospěšné látky (fyto-sloučeniny). Bakteriální fermentace navíc zvyšuje biodostupnost některých minerálů (fosfor, železo, zinek) [7, 9].

Bylo popsáno například použití mouky z čiroku pro výrobu jogurtu bez obsahu mléka se směsnou probiotickou kulturou [11]. Další studie uvedla použití obilovin (ječmene a ječmenného sladu) při výrobě probiotických (*Lactobacillus plantarum* a *L. acidophilus*) nápojů a také popsala produkci kyseliny mléčné a vliv nižšího pH na stabilitu výrobku [12]. Také obilná melasa se zdá být vhodným substrátem pro probiotické bakterie [9].

2.2.1.3 Sójové produkty

Sója je vhodným zdrojem živin, především proteinů, dále také vlákniny, vitamínů a minerálů. Fermentace sójových výrobků je rovněž výhodná z důvodu zlepšení chuti, zpracování oligosacharidů působících nadýmání a zvýšení antioxidační aktivity obsažených fenolických sloučenin [8].

Byla popsána například příprava fermentovaného sójového nápoje s probiotickými účinky za použití startovací kultury společně s probiotickou kulturou *Lactobacillus helveticus* [13] nebo výroba sójového sýra s využitím probiotické kultury *Lactobacillus rhamnosus* [14].

2.2.1.4 Masné výrobky

Další složkou probiotického jídelníčku mohou být masné výrobky. Maso působí jako vhodná ochrana probiotických bakterií při průchodu trávicím traktem.

Maso se používá převážně ve formě fermentovaných salámů. K původní startovací kultuře jsou přidávána probiotika nejen za účelem získání zdravějšího výrobku, ale i lepších sensorických vlastností. Pro udržení viability probiotických bakterií po celou dobu skladování se často používá procesů enkapsulace, což však limituje jejich inhibiční účinky vůči patogenům. Kromě toho je třeba zvažovat pozitivní přínos na zdraví s ohledem na vyšší obsah soli a tuku [7, 9].

2.2.2 Doplnky stravy

Kromě potravinových matric se mohou probiotika vyskytovat ve formě doplňků stravy. Obsahují jeden nebo více druhů probiotických bakterií, které jsou samostatně nebo společně s dalšími látkami vyráběny ve formě kapslí, tablet, dražé apod. Tato forma probiotik je vhodná pro distribuci vysokého počtu bakterií, například pro doplnění prospěšných bakterií po léčbě antibiotiky [3].

2.2.3 Orální probiotika

Orální probiotika (především ve formě pastilek) obsahují bakterie přirozeně se vyskytující ve zdravých ústech, především rodu *Streptococcus*, dále *Lactobacillus* a další. Jejich funkce spočívá v kolonizaci povrchu zubů a dásní a zabránění kolonizaci těchto ploch patogenními bakteriemi. Navíc s nimi soutěží o živiny a podílí se na jejich eliminaci produkcí peroxidu vodíku, který má antimikrobiální účinky. Orální probiotika působí snížením výskytu zubního kazu (snížením populace kazotvorných bakterií) a působí jako prevence či podpůrný prostředek při léčbě paradontózy. Kromě přínosu v dutině ústní omezují rozšíření patogenních bakterií do organismu, což má pozitivní dopad na celkové zdraví [15, 16].

2.2.4 Výrobky pro intimní hygienu

Výrobky pro intimní hygienu (tampóny, krémy, gely aj.) obsahují probiotické bakterie rodu *Lactobacillus*. U zdravých žen jsou bakterie rodu *Lactobacillus* převládající vaginální mikroflórou [17]. Tyto mikroorganismy jsou schopny kolonizovat povrchy v okolí kontaktu s probiotickým preparátem. Napomáhají udržení optimálního pH produkcí kyseliny mléčné (jiné probiotické účinky nebyly potvrzeny *in vivo* testy) a tím udržení zdravé vaginální mikroflóry. Nebylo dokázáno, že by probiotika působila jako účinná forma léčby vaginálních infekcí, zároveň však bylo potvrzeno udržení terapeutického účinku antibakteriální či antifungální léčby a doporučeno užívání probiotik v této formě jako prevence opakujících se infekcí [17, 18].

2.2.5 Kosmetické výrobky s probiotiky

Trend používání probiotik se v poslední době rozšiřuje také v kosmetice. Na trhu se vyskytují probiotické krémy, šampóny a další výrobky. Popsaných způsobů probiotických účinků kosmetických přípravků je několik. Byla například popsána zvýšená produkce ceramidu po užívání probiotického krému (s bakteriemi *Streptococcus thermophilus*), což podporuje

funkci kožní bariéry a může napomáhat ke zmírnění akné [19]. V klinické studii u pacientů s popáleninami bylo zjištěno, že lokální aplikace probiotického přípravku (*Lactobacillus plantarum*) potlačovala bakteriální infekce a podporovala hojení ran [20]. Podobný případ s použitím přípravku s *Lactobacillus plantarum* byl popsán při léčení nohou pacientů s vředy. Probiotikum snížilo bakteriální zátěž a urychlilo hojení poškozené tkáně [21].

Klinických testů dokazujících prospěšné účinky probiotické kosmetiky však není mnoho, a proto jsou tvrzení výrobců v mnoha případech jediným zdrojem informací o pozitivních účincích jejich výrobků. Proto by bylo vhodné se tomuto tématu dále zabývat a potvrdit či vyvrátit tato tvrzení relevantními výzkumy.

2.3 Výzkum mikrobiálního složení probiotických výrobků

Znalosti o složení mikrobiální komunity, změnách a potenciálních mikrobiálních interakcích v matricích jsou zásadní pro zajištění produkce bezpečných a kvalitních výrobků. Studium mikrobiálních populací umožňuje lepší pochopení a správu mikrobiálních procesů při výrobě, zpracování, manipulaci a skladování výrobků. Kromě toho je stále větší důraz kladen na identifikaci a kvantifikaci deklarovaných mikroorganismů. Tradiční kultivační metody jsou nejen zdoluhavé, ale často také obtížné (kultivace oslabených mikroorganismů, detekce mikroorganismů v silném nárůstu doprovodné mikroflóry atd.). Tato omezení vedla k rozvoji nekultivačních metod založených na amplifikaci a detekci nukleových kyselin [22].

2.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace patří v současnosti mezi nejvyužívanější molekulárně diagnostické metody [23].

Metoda PCR je založená na *in vitro* amplifikaci cílových sekvencí nukleových kyselin (především DNA). Během reakce dochází k cyklicky se opakující syntéze DNA, kdy se k opačným koncům vybraného úseku řetězců denaturované DNA hybridizují dva oligonukleotidové primery. Za katalýzy DNA polymerázou se následně od primerů začínají protisměrně utvářet nová vlákna na obou matricových řetězcích [24].

2.4.1 Komponenty PCR směsi

Směs pro PCR obsahuje následující složky:

- Matrice DNA – makromolekula izolované DNA (většinou dvouřetězcová) obsahující cílové sekvence. Pro amplifikaci je vhodné použít co nejčistší a co nejméně porušenou DNA [25].
- Primery – dva syntetické oligonukleotidy, které jsou komplementární k okrajovým sekvencím vybraného úseku DNA. Primery bývají složeny z 18–25 nukleotidů. Distribuce G+C a A+T párů bází by měla být rovnoměrná. Primery jsou navrženy tak, aby nevznikaly vnitřní sekundární struktury ani dimery primerů. Teplota tání musí být u obou primerů podobná a dosahovat alespoň 50 °C [24].
- DNA polymeráza – katalyzuje syntézu nového řetězce DNA. Existuje řada polymeráz, které se liší svými vlastnostmi a typem užití. V současnosti existují i komerčně dostupné směsi, které kombinují výhodné vlastnosti jednotlivých polymeráz. V PCR se používají termostabilní polymerázy, poněvadž musí odolávat vysokým teplotám při denaturaci

DNA. Často používaná je např. *Taq* DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* [25].

- 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) – stavební kameny pro syntézu nových řetězců DNA. Směs dNTP obsahuje ekvimolární množství dATP, dCTP, dGTP, dTTP [23].
- PCR pufr – vytváří stálé a optimální prostředí. Přesné složení je variabilní podle typu použitého pufru [23]. Nejdůležitější složkou PCR pufru jsou Mg^{2+} ionty, které tvoří rozpustný komplex s jednotlivými dNTP rozpoznávaný DNA polymerázou. Jsou tedy nezbytné pro její aktivitu. Protože hořčnaté ionty interagují s mnoha složkami směsi, je někdy třeba optimalizovat jejich koncentraci zvlášť [24].
- PCR voda – v případě potřeby doplňuje reakční směs na požadovaný objem. Používá se voda o odporu 18 mΩ nebo voda pro injekce ČSL 4 [23].

2.4.2 Průběh reakce a vznik PCR produktů

Jeden cyklus PCR zahrnuje 3 kroky, které jsou závislé na měnící se teplotě:

1. Denaturace molekul DNA (94–97 °C)

Vlivem zvýšené teploty dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA k rozvolnění matricových řetězců. Je nutné, aby došlo k jejich úplnému oddělení. V opačném případě by molekuly DNA rychle renaturovaly a docházelo by tak k nespécifickým vazbám primerů a ke zkreslení výsledků. Z tohoto důvodu bývá denaturace templátové DNA v počátečním a konečném cyklu prodloužena na několik minut. V dalších cyklech probíhá tato fáze obvykle po dobu 30–60 s (s ohledem na stabilitu DNA polymerázy) [24].

2. Hybridizace primerů k odděleným řetězcům DNA (50–68 °C)

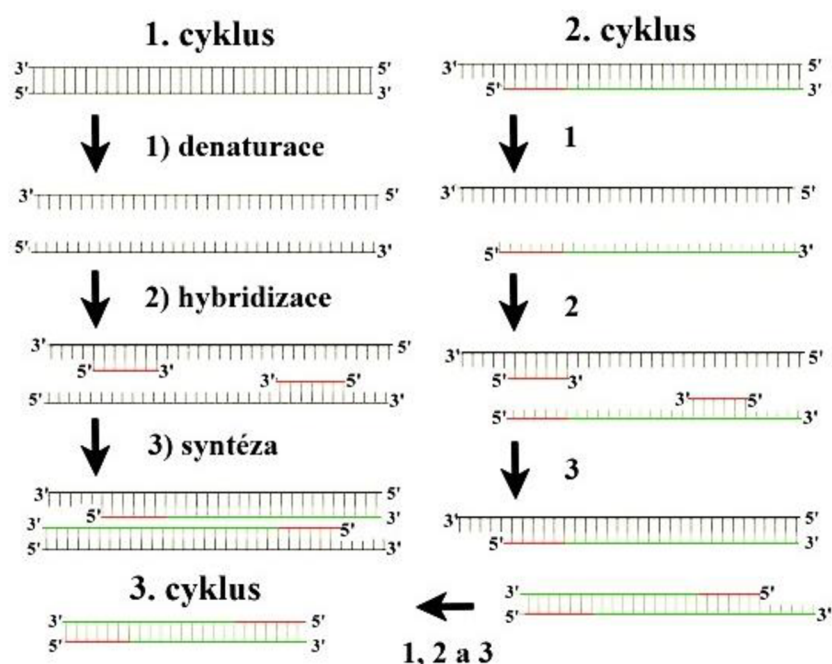
Reakční směs je ochlazená na požadovanou teplotu a primery jsou komplementárně připojeny k odděleným řetězcům DNA. Děj probíhá 30–60 s. Teplota vhodná pro hybridizaci závisí na teplotě tání primerů a DNA, na délce oligonukleotidů a na zastoupení párů bází (trojné vazby mezi G a C zvyšují stabilitu dvouřetězce a tím i denaturační teplotu) [24, 25].

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

Za katalýzy DNA polymerázou dochází k vytvoření nového vlákna DNA. Od 5' konce primeru jsou vázány nukleotidy komplementární k sekvenci původních řetězců DNA ve směru 5'→3'. Tato fáze probíhá 60–120 s. V posledním cyklu bývá též prodloužena na několik minut, aby se zajistilo kompletní dosyntetizování DNA [23]. Teplotní optimum se odvíjí od použité polymerázy [24].

Opakováním uvedených tří kroků vznikají nová vlákna, která následně rovněž slouží jako templát pro další syntézu. Tímto procesem lze exponenciálně (2^n , n – počet cyklů) syntetizovat až 10^9 kopií vybraného úseku DNA. Optimální počet cyklů se obvykle pohybuje v rozmezí 25–35 cyklů a odvíjí se od výchozí koncentrace templátové DNA. Při příliš vysokém počtu cyklů se snižuje účinnost DNA polymerázy a dochází k významnému nárůstu počtu nespecifických produktů PCR [23, 24].

Průběh reakce PCR je uveden na Obrázku 1. Obrázek mimo jiné demonstruje vznik delších produktů (lineární růst) a vznik dvouřetězce požadované délky až ve třetím cyklu (exponenciální růst).



Obrázek 1: Průběh reakce PCR. Upraveno dle [26].

2.4.3 Detekce produktů konvenční PCR

Produktem PCR jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíc párů bází (bp). Vzniklé amplikony se separují elektroforeticky (většinou na agarózovém gelu) podle jejich velikosti, resp. molekulové hmotnosti. Současně s PCR produktem se ponechá migrovat DNA standard, který obsahuje fragmenty o známé velikosti a na základě jejich porovnání je možné určit velikost amplikonu. Pro vizualizaci jsou vzniklé fragmenty obarveny interkalačními barvivy (nejčastěji ethidium bromidem), které při začlenění v dvouvláknových strukturách a ozáření UV paprsky intenzivně fluoreskují [24, 27].

Podle intenzity fluorescence jednotlivých pásů na gelu je odhadována koncentrace produktů PCR. Kvantifikace výsledků je tudíž obtížná a metoda v některých případech postrádá potřebnou přesnost [24].

2.5 PCR v reálném čase

PCR v reálném čase je modifikací konvenční PCR. Je to moderní, rychle se rozvíjející metoda umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci specifického úseku nukleových

kyselin. Na rozdíl od konvenční PCR, kde je produkt detekován elektroforeticky až po ukončení reakce, je při PCR v reálném čase umožněno monitorování vznikajícího produktu PCR během reakce v každém cyklu prostřednictvím měření fluorescenčního signálu. Další výhodou je schopnost kvantifikace výchozího množství templátové DNA v analyzovaném vzorku (odtud též označení kvantitativní PCR – qPCR) [28].

2.5.1 Průběh reakce, složení směsi qPCR a detekce produktu reakce

Průběh qPCR je obdobný jako u konvenční PCR. Základem je cyklicky se opakující denaturace templátu, hybridizace primerů a syntéza nových řetězců cílového úseku DNA. Z důvodu monitorování produktu již během reakce obsahuje qPCR směs, kromě komponent pro konvenční PCR, navíc fluorescenční molekuly. Fluorescence je měřena v každém cyklu, přičemž intenzita fluorescenčního záření je přímo úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi [28].

Fluorescenční látky jsou děleny do 3 charakteristických skupin [24]:

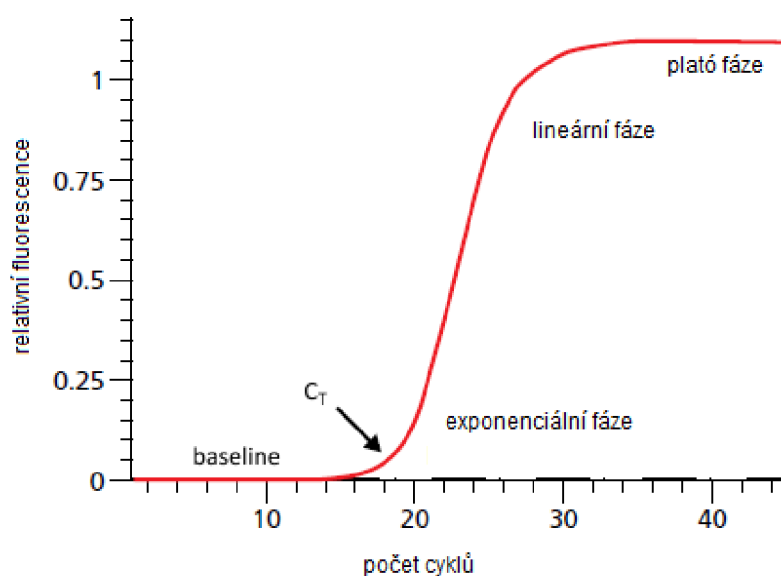
- Interkalační barviva – fluorescenční barviva, mezi nejpoužívanější patří SYBR Green I. Samostatně v PCR směsi emituje záření zanedbatelně, po začlenění do nově vzniklé dvoušroubovice DNA dochází k výraznému nárůstu fluorescence, která je přímo úměrná koncentraci produktu PCR. Měření intenzity signálu probíhá na konci fáze elongace nebo průběžně. Hlavní nevýhodou fluorescenčních barviv je nemožnost rozlišení specifických a nespecifických produktů PCR, protože se mohou vázat do jakékoli dvouvláknové struktury (např. dimery primerů). Kromě toho tato barviva nelze použít u mnohonásobných reakcí PCR. Naopak jejich předností je jednoduché použití a finanční dostupnost [24, 29].
- Fluorescenčně značené sondy – oligonukleotidové sondy, např. TaqManTM. Jsou komplementární k jednomu z řetězců templátové DNA v místě mezi oběma primery, mají vyšší hodnotou teploty tání (T_m) asi o 10 °C než je T_m primerů. Na 5'-konci obsahují fluorescenční látku a 3'-konci zhášec fluorochromu. Zhášec se nachází v blízkosti fluorochromu, a proto pohlcuje fluorescenci emitovanou fluorescenční látkou. Při syntéze komplementárního vlákna dochází 5'→3' aktivitou *Taq* DNA polymerázy k odbourání sondy. Jakmile dojde k uvolnění jednotlivých složek sondy, je ukončeno zhášení barviva a dochází k emisi fluorescence. V průběhu PCR dochází ke zvyšování počtu volných molekul fluorochromu a tím k zesílení fluorescence [24, 28]. Sondy, na rozdíl od interkalačních barviv, detekují výhradně specifické produkty. Jejich hlavní nevýhodou je vysoká cena a komplikovaná optimalizace, nelze je užít při analýze křivky tání [29].
- Fluorescenčně značené primery – primery, jako např. AmpliFluorTM nebo technologie LUX, s vlásenkovou strukturou fungují na podobném principu jako sondy, k výrazné emisi dochází až při narušení struktury primeru během syntézy DNA u specifických produktů [24].

2.5.2 Kvantifikace produktu PCR v reálném čase

Přesné určení výchozího množství templátové DNA v analyzovaném vzorku je umožněno monitorováním fluorescence v každém cyklu. Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi [28]. Naměřená fluorescence je vynesena

proti příslušnému cyklu, společně tvoří tzv. amplifikační křivky, jejichž matematickou analýzou dosáhneme kvantifikace produktu. Podle fluorescenční aktivity lze amplifikační křivku rozdělit na 3 části (Obrázek 2) [30]:

1. Fáze pozadí (*baseline*) – koncentrace amplikonů je nízká, nedochází k významnému nárůstu fluorescence [28, 30].
2. Exponenciální fáze – dochází k exponenciálnímu růstu množství amplikonů a tím i fluorescence [30].
3. Lineární fáze – se zvyšující se koncentrací templátu klesá množství dostupné DNA polymerázy a s tím klesá rychlost přírůstku produktu [33].
4. „Plató“ fáze – systém je nasycen, množství amplikonů se dále nemění a intenzita fluorescence zůstává konstantní [30].

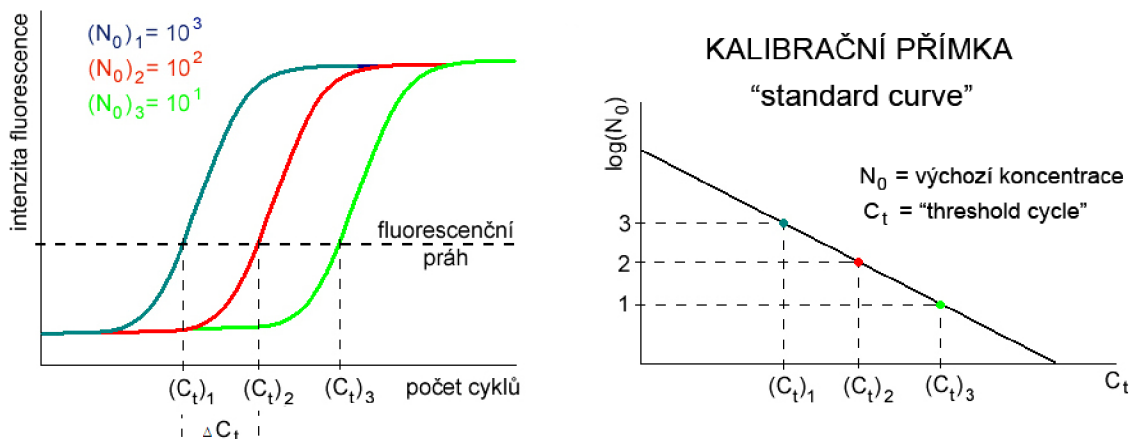


Obrázek 2: Standardní amplifikační křivka. Upraveno dle [30].

Důležitým bodem amplifikační křivky i celé reakce je C_t (*threshold cycle*), což je cyklus, ve kterém intenzita fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce [29]. Hodnota C_t je řazena do exponenciální fáze [30]. Platí, že čím vyšší je počáteční koncentrace templátu v reakční směsi, tím dříve je detekována zvyšující se fluorescence produktu a tím nižší je hodnota C_t . Parametr C_t je dobře reprodukovatelný [28].

Metoda absolutní kvantifikace, která se odvíjí od lineárního vztahu mezi logaritmem výchozího počtu templátových kopií N_0 a hodnotou C_t příslušné amplifikační křivky, umožňuje stanovení přesné výchozí koncentrace cílové DNA.

Prostřednictvím kalibrační přímky, která je získána amplifikací série standardů o známé koncentraci spolu se vzorkem analyzované DNA (Obrázek 3), lze určit efektivitu a spolehlivost reakce [30].



Obrázek 3: Grafické vyjádření metody absolutní kvantifikace – standardní amplifikační křivka, kalibrační přímka. Upraveno dle [30].

- Reakční účinnost (*efficiency*) – je určena sklonem křivek (M), v případě 100% účinnosti reakce se v každém cyklu zdvojnásobí fluorescence a sklon kalibrační křivky bude mít hodnotu $-3,333$ (Rovnice 1).

Rovnice 1: Výpočet reakční účinnosti [30].

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

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

Optimální hodnota sklonu křivek by se měla pohybovat v rozmezí $-3,9$ až $-3,0$, což odpovídá 80–110% účinnosti reakce.

- Korelační koeficient R^2 – vyjadřuje přesnost reakce, výsledky lze považovat za spolehlivé, pokud je $R^2 \geq 0,985$ [30].

2.5.3 Analýza křivky tání (Melt analýza)

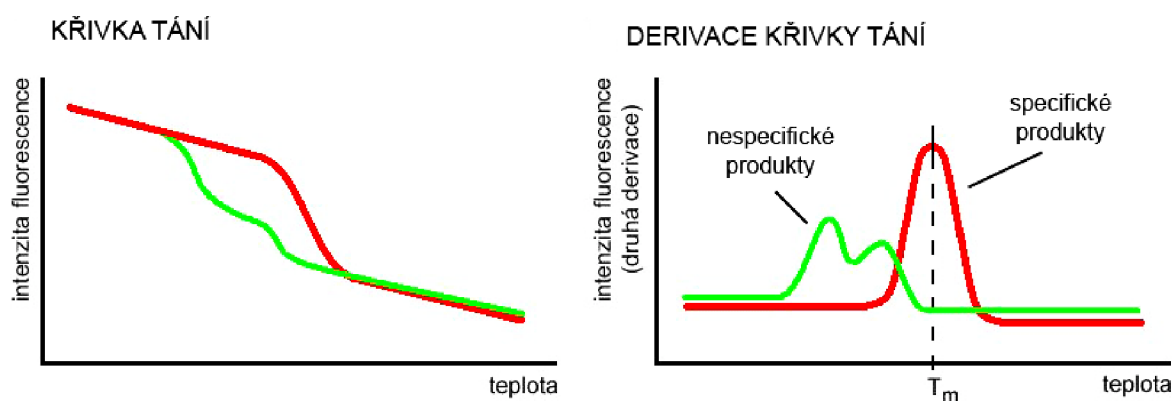
Tato metoda se nejčastěji používá k rozlišení specifických produktů PCR od nespecifických.

Po ukončení PCR je roztok s amplikonem ochlazen, a poté postupně zahříván na teplotu vyšší, než je předpokládaná teplota tání T_m amplikonu, zároveň je zaznamenávána intenzita fluorescenčního signálu. Zvýšená teplota způsobí, že se vlákna DNA začnou oddělovat, fluorescenční barvivo se uvolňuje z molekul a fluorescence se snižuje. Významný pokles fluorescence nastává v úzkém teplotním rozmezí.

Vynesením intenzity fluorescence oproti příslušné teplotě vzniká křivka tání. Z inflexního bodu křivky tání nebo z vrcholu píku získaného zápornou derivací fluorescence oproti teplotě lze stanovit T_m specifickou pro přítomné amplikony [29, 31]. T_m je teplota, při které dojde k rozvolnění právě poloviny dvouřetězcové DNA na jednotlivá vlákna.

Teplota tání T_m a tvar křivky tání jsou ovlivněny délkou amplikonu, sekvencí a obsahem GC-párů v sekvenci DNA [32]. Nespecifické produkty PCR mají hodnotu T_m obvykle nižší než specifické produkty. Pokud je přítomen pouze specifický produkt, křivka tání má jeden vrchol, pokud jsou přítomny i nespecifické produkty, křivka má více vrcholů [30] (Obrázek 4).

Analýzu je možné provést jedině s využitím interkalačních barviv [33].



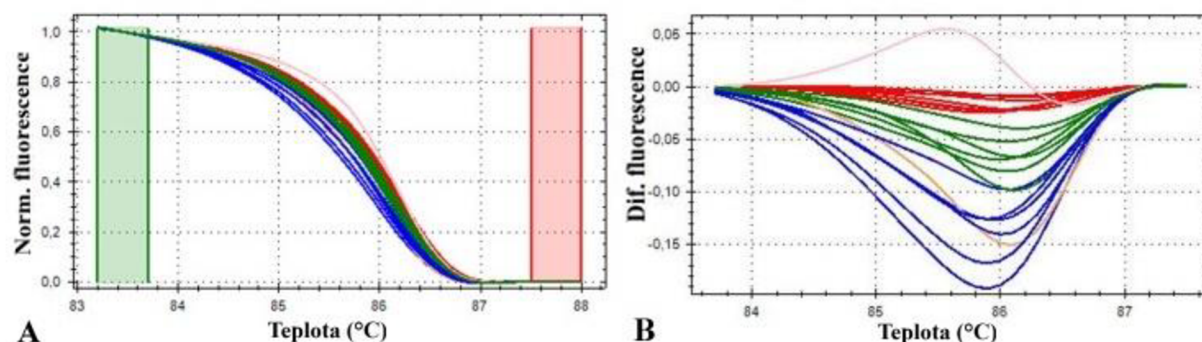
Obrázek 4: Analýza křivky tání. Upraveno dle [30].

2.5.4 Vysokorozlišovací analýza křivky tání (HRM)

Vysokorozlišovací analýza křivky tání představuje novou, citlivější verzi konvenční analýzy křivky tání. Je založena na detekci malých rozdílů v profilu křivek tání a v hodnotách teploty tání (T_m) analyzovaných vzorků DNA. HRM analýza teoreticky umožňuje detekci na úrovni jednonukleotidových rozdílů v sekvencích DNA a tím velmi přesnou specifikaci PCR produktu [34, 35].

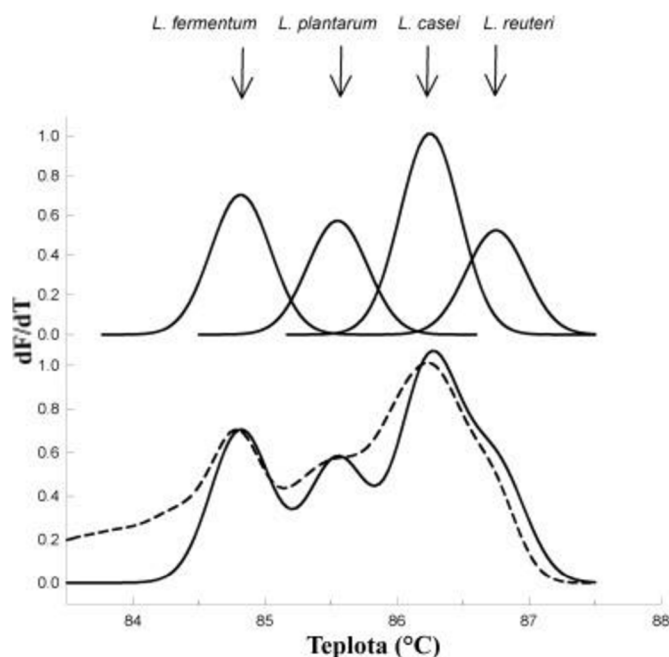
Rozdíl oproti konvenční analýze křivky tání je v použití plně saturačního fluorescenčního barviva, např. SYTO 9. Tím je eliminována redistribuce barviva během denaturace a je umožněno monitorování změn intenzity fluorescence ve vysokém rozlišení pomocí vhodných cyklierů s vysoce přesnou a stabilní kontrolou časového teplotního gradientu (citlivost až $0,01\text{ }^\circ\text{C/s}$). Ve srovnání s konvenčními fluorescenčními barvivy, je použití saturačních barviv vhodnější, protože neinhibují funkci DNA polymerázy [32].

Křivka tání, vzniklá vynesemím intenzity fluorescence oproti příslušné teplotě, bývá z důvodu lepší čitelnosti grafu převedena na tzv. normalizovanou křivku tání. Osa normalizované fluorescence nabývá hodnot 0–1, přičemž počátek tání odpovídá hodnotě 1 a konec tání odpovídá hodnotě 0 na ose (Obrázek 5A). Rozdíly mezi tvary jednotlivých křivek tání jsou dobře patrné na diferenciální křivce, kde jsou křivky tání amplitonů odčítány od křivky tání referenčního amplitonu, která tvoří základní linii (Obrázek 5B) [36, 37].



Obrázek 5: HRM analýza. Normalizovaná křivka tání (A) a diferenciální křivka (B). Upraveno dle [36].

Stejně jako bylo popsáno u Melt analýzy, lze využít křivky s derivovanou fluorescencí vytvářející píky odpovídající teplotám tání amplikonů. Tohoto přístupu se využívá především u analýzy směsné DNA. Vyhodnocení se potom provádí na základě porovnávání křivek tání amplikonů z analyzovaných vzorků DNA s kontrolními vzorky. Pro jednodušší vyhodnocování některé softwary umožňují posunout teplotní osy v určitém intervalu fluorescence (tzv. standardizaci posunem teploty), nebo zvýraznit skryté vrcholy tak, aby každý představoval místní maximum (tzv. dekonvoluci) [38, 39]. Příklad analýzy vzorku směsné DNA porovnáváním vzniklých píků na křivkách tání produktů PCR a s využitím dekonvoluce znázorňuje Obrázek 6.



Obrázek 6: HRM analýza produktů PCR vzniklých amplifikací DNA kontrolních vzorků (nahore), HRM analýza křivky tání vzniklé amplifikací vzorku směsné DNA (dole, čárkovaná křivka), stejná křivka tání po dekonvoluci (dole, plná křivka) [38].

Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi senzitivní srovnávací analýzu, je třeba dbát na jednotnost analyzovaných vzorků. Pro spolehlivost metody je vhodné, aby měly vzorky stejný objem, stejnou koncentraci DNA (v co možná nejvyšší kvalitě), fluorescenčního barviva, Mg^{2+} iontů atd. Vzorky různého stáří a způsobu izolace je třeba přechistit a rozpustit ve stejném pufru (kvůli stejnému iontovému složení).

Při navrhování primerů pro PCR-HRM je kromě dodržování běžných zásad kladen důraz na to, aby primery nevytvářely nespecifické produkty PCR [36, 40]. Pro HRM analýzu bývají navrhovány primery ohraničující úseky vybrané z hypervariabilních oblastí bakteriálního genu, které vykazují u různých druhů značné rozdíly v sekvencích DNA [41]. Senzitivitu a specifitu metody ovlivňuje také délka amplikonů (nejvhodnější jsou produkty PCR do 300 bp). Čím jsou amplikony delší, tím je dosaženo menšího odlišení jejich křivek tání [36].

2.5.5 Nevýhody metod PCR

Analýza reálných vzorků obnáší řadu komplikací, které jsou obecně spojeny se zpracováváním komplexních matic.

Kromě obtíží v konkrétních případech zahrnují tyto problémy kvalitu analyzované DNA, která je často degradována procesem zpracování, což limituje délku amplikonu (taková analýza není nemožná, ale značně obtížná). DNA může být rovněž depurinována působením kyselého pH a enzymů, čímž dochází k ovlivnění množství amplifikovatelné DNA a následně i detekce a kvantifikace.

Velký problém spojený s analýzou komplexních vzorků představuje značné množství inhibitorů PCR či látek znesnadňujících extrakci DNA [42]. Kontaminanty mohou představovat přímo složky výrobků (polysacharidy, lipidy, proteiny, polyfenoly, ionty kovů nebo komplexy uhlovodíků) nebo látky spojené s manipulací se vzorkem (složky kultivačních médií, detergenty či cizorodá DNA aj.) [35, 43]. Je proto vhodné pečlivě volit způsob izolace DNA, izolovanou DNA vždy dostatečně přečistit, případně vzorky DNA naředit. Pro případ možného zisku falešně negativních výsledků je vhodné zařazení pozitivní kontroly [23, 24].

Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je teoreticky možné, že i kontaminace jedinou molekulou cizorodé DNA může způsobit zisk falešně pozitivních výsledků. Pro minimalizaci těchto chyb je žádoucí dodržovat určité standardní postupy. Kromě sterilních podmínek se jedná o oddělené skladování reakčních komponent, přípravu komponent i vzorků do alikvotních částí, přidání složky DNA až na závěr a zařazení negativní kontroly [23].

Další omezení spolehlivosti PCR metod při analýze mikrobiálního složení vzorků bývá způsobeno tím, že analýza DNA nerozlišuje mezi živými a neživými buňkami a může tak generovat falešně pozitivní výsledky [42, 44]. Možné řešení situace představuje použití vhodných interkalačních barviv jako je propidium monoazid (PMA). PMA selektivně proniká pouze do mrtvých buněk s porušenou integritou buněčné membrány a po fotoindukci azidové skupiny se váže na DNA, která se tím stává nerozpustnou a je odstraněna v průběhu extrakce [44].

Značný problém může představovat také alespoň částečná znalost cílové sekvence DNA a návrh vhodných specifických primerů [45].

Co se použití HRM analýzy týká, poněkud limitující vlastností je, že neumožňuje konkretizovat rozdíly v sekvencích DNA. Je také obtížné detekovat změny, které neovlivňují poměrné zastoupení G a C bázi. Rozlišovací schopnost analýzy klesá s rostoucí délkou řetězce [36].

2.5.6 Výhody metod PCR

Přes uvedené obtíže disponují metody PCR nespornými výhodami, mezi něž patří zisk velkého množství kopií požadovaného úseku DNA za poměrně krátkou dobu, vysoká citlivost a specifita reakce, kromě toho lze analyzovat i velmi starou a degradovanou DNA (fragменты délky 80–120 bp), a to i ve velmi malém množství. PCR nachází užití jak v základním a aplikovaném výzkumu, tak i v praxi [24, 44].

PCR v reálném čase je moderní modifikací konvenční PCR. Velkou výhodou této metody je kvantifikace PCR produktu během reakce (v rozsahu 7–8 logaritmických dekád) a z toho plynoucí přesná kvantifikace výchozího množství templátu. Oproti konvenční PCR je PCR v reálném čase také citlivější, specifitější (sondy, Melt analýza/HRMA), přesnější (standardní odchylka < 2 %) a rychlejší, dále je možná i automatizace procesu [28, 30]. Amplifikace i analýza křivek tání probíhají ve stejné zkumavce, bez potřeby post-PCR

manipulace, což velmi urychluje proces analýzy a snižuje riziko kontaminace analyzovaného vzorku. Kromě toho je metoda analýzy křivek tání nedestruktivní, což umožňuje další využití PCR produktu i po ukončení analýzy [33].

V kombinaci s HRM analýzou je možné získat velmi přesnou specifikaci PCR produktu. HRM analýza teoreticky umožňuje detekci na úrovni jednonukleotidových záměn v sekvencích DNA [34, 35]. Metoda HRMA je také méně nákladná než např. sekvenční techniky. Použitím primerů pro amplifikaci hypervariabilních oblastí genu je navíc umožněno využití PCR jako mnohonásobné metody pro simultánní analýzu širokých mikrobiálních komunit [41].

3 CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části práce bylo prokázat přítomnost bakterií deklarovaných ve čtyřech vybraných probiotických výrobcích (probiotický krém, probiotické tampóny, orální probiotikum a sójový nápoj s probiotiky). Nejprve ověřit viabilitu bakterií obsažených ve výrobcích. Z komplexních matric výrobků izolovat DNA a tuto DNA následně použít jako matici pro rodově a druhově specifické polymerázové řetězové reakce. Pro tyto účely použít vedle konvenční PCR i PCR v reálném čase. Dosažené výsledky porovnat s údaji deklarovanými výrobcí. V poslední části práce otestovat různé sady primerů s cílem odlišení ampliconů různých bakteriálních druhů metodou PCR-HRM.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Probiotické výrobky

Testované probiotické výrobky byly zakoupeny v komerční síti. Seznam a charakteristika výrobků jsou uvedeny v následujícím textu.

- RYOR – Krém proti zarudnutí a rozšířeným žilkám
 - Výrobce: RYOR a. s.
 - Obsažené probiotické bakterie: *Lactobacillus pentosus*
 - Deklarované množství KJT: neuvedeno
 - Pomocné látky: voda, avokádový olej, glycerylester kyseliny kaprinové, cetearyl a sorbitan olivát, polyisobutan, glicerín, cetearyl alcohol, cetyl palmitát, sorbitan palmitát a oleát, fermentační lyzát buněk, kaproyl prolinát sodný, oleyl erucate, kokosový olej, extract z kořene dubu, výtažek z hnědých řas, tokoferyl acetát, jojobový olej, pentylen glykol, lecithin, alcohol, askorbyl palmitát, tokoferol, retinol, polysorbát 20, fenoxethanol, methyl-, ethyl-, propyl- a butylparaben, aroma, alfa-isomethyl ionon, benzyl salicylát, buthylfenyl methylpropional, citronellool, geraniol, hexyl cinnamal, linalool
- ProDentis – Orální probiotikum
 - Výrobce: BioGaia®
 - Obsažené probiotické bakterie: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289
 - Deklarované množství KJT: $2 \cdot 10^8$ /pastilka (0,8 g)
 - Pomocné látky: isomalt, hydrogenovaný palmový olej, mentolové aroma, mátové aroma, mátový olej, sukralosa
- ellen® – Probiotické tampóny
 - Výrobce: S&D Pharma CZ s. r. o.
 - Obsažené probiotické bakterie: *Lactobacillus gasseri* LN40, *Lactobacillus fermentum* LN99, *Lactobacillus rhamnosus* LN113
 - Deklarované množství KJT: neuvedeno
 - Pomocné látky: viskóza, bavlna, polypropylén, nosné médium (blíže nespecifikováno)
- ZAJÍC – Sójový nápoj s vlákninou a probiotiky
 - Výrobce: Mogador s.r.o.
 - Obsažené probiotické bakterie: *Bacillus coagulans*
 - Deklarované množství KJT: $1,25 \cdot 10^7$ /1 g
 - Pomocné látky: sušený kukuřičný sirup, sójová bílkovina, sójový olej, inulin, maltitol, fosforečnan draselný, emulgátor E471, kaseinát sodný, oxid křemičitý, chlorid sodný, aroma, karoteny

4.1.2 Bakteriální kmeny

Bakteriální kmeny použité jako pozitivní kontroly byly získány z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (Czech Collection of Microorganisms, CCM). Izolovaná DNA (10 ng/μl) z uvedených bakteriálních kmenů byla dodána vedoucí práce Ing. Trachtovou, Ph.D.

- *Bacillus subtilis* CCM 1999
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T
- *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T
- *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T
- *Lactobacillus pentosus* CCM 4619

4.1.3 Chemikálie

- Agar (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard (100 bp), (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecyl sulfát sodný – SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Masopeptonový agar – MPA (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indie)
- Médium de Mann, Rogosa, Sharpe – MRS (Oxoid, Londýn, Velká Británie)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol – PEG 6 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báze (Serva, Heidelberg, SRN)

4.1.4 Roztoky

- Lyzační pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 5 mM EDTA, pH 8, 3 mg/ml lysozymu)
- Směs chloroformu a isoamylalkoholu – CIZ (v poměru 24:1)
- TBE pufr (54 g Tris-HCl, 27,5 g H₃BO₃, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8, doplněno na 1 l destilovanou vodou, před použitím 10krát naředěno)
- TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, pH 8, 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 byly použity magnetické polymerní nosiče označované jako Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox (2 mg/ml), které byly připraveny Ing. Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Specifikace magnetických nosičů je uvedena v Tabulce 1.

Tabulka 1: Specifikace magnetických nosičů.

Značení	Polymer	Fe (% hm.)	Průměr nosiče (μm)	PDI	-COOH (mM/g)
Fkol B 100 ox	PGMA	5,36	0,7	1,16	0,67
Fkol 135 ox	PGMA	6,60	1,0	1,05	2,61

PDI – index polydisperzity (poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti), PGMA – polyglycidyl methakrylát.

4.1.6 Komponenty pro PCR

- dNTP (10 mM), (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10krát koncentrovaný PCR pufr (750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 25 mM MgCl₂), (Top-Bio, Praha, ČR)
- MgCl₂ (25 mM), (Top-Bio, Praha, ČR)
- primery (10 pmol/μl), (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)
pozn.: specifikace použitých primerů jsou uvedeny v Tabulce 2, 3 a 4
- qPCR 2× SYTO-9 Master Mix (2krát koncentrovaný 150mM Tris-HCl, pH 8,8; 40mM (NH₄)₂SO₄, 5mM MgCl₂, 400μM dATP, 400μM dCTP, 400μM dGTP, 400μM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva), (Top-Bio, Praha, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/μl), (Top-Bio, Praha, ČR)
- Voda pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)

Tabulka 2: Specifikace použitých primerů pro konvenční PCR.

Specifická PCR	Primer	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR (bp)	Reference
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	[46]
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMa 1	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250	[47]
	R 16	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		
Rod <i>Lactobacillus</i>	F_alllact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92	[46]
	R_alllact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT		
Rod <i>Bacillus</i>	B-K1/F	TCA CCA AGG CRA CGA TGC G	1095	[48]
	B-K1/R1	CGT ATT CAC CGC GGC ATG		

Tabulka 3: Specifikace použitých primerů pro druhově specifické PCR v reálném čase.

Specifická PCR	Primer	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR (bp)	Reference
<i>Lactobacillus pentosus</i>	pentF	CAG TGG CGC GGT TGA TAT C	218	[49]
	pREV	TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	RhamFW	TTG CAT CTT GAT TTA ATT TTG AAC	683	[50]
	UniverRV	TTC GCC ACT GGT GTT CTT CC		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FermFW	GGC CCA ATT GAT TGA TGG TGC	704	[50]
	UniverRV	TTC GCC ACT GGT GTT CTT CC		
<i>Lactobacillus gasseri</i>	GassFW	CGG ATA ACA ACA CTA GAC GC	574	[50]
	UniverRV	TTC GCC ACT GGT GTT CTT CC		

Tabulka 4: Specifikace použitých primerů pro PCR-HRM.

Primer	Sekvence primeru (5' - 3')	Reference
V3-F	CTC TGT TGT TAG GGA AGA ACA AGT	[51]
V3-R	GCT TTC TGG TTA GGT ACC GTC AAG GT	
V6-F	AAC CTT ACC AGG TCT TGA CAT CC	[51]
V6-R	AGC TGA CGA CAA CCA TGC ACC	
V1F-HRM	CCT AAT ACA TGC AAG TCG AAC G	[52]
V1R-HRM	GGT TAC CCA CGT GTT ACT CAC C	
P1V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC	[53]
P2V1	TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC	
GroHRM-F	GTT TGA TCG CGG CTA TCT GA	[54]
GroHRM-R	CCT TGT TGM ACG ATT TCT TG	

4.1.7 Pomůcky a přístroje

- Běžné laboratorní sklo, plastové a kovové pomůcky apod.
- Biologický termostat BT 120M (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)
- Centrifuga FVL-2400N Combi-Spin/Vortex (bioSan, Riga, Litva)
- Centrifuga Mini Spin 14 500 ot/min (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exikátor (KIF LAB)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New jersey, USA)
- LightCycler® Nano Instrument (Roche, Basel, Švýcarsko)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Finnpiptette F2 různých objemů (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Mikropipety Discovery HTL různých objemů (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Očkovací box (Fatran, Slovensko)
- Temperovaná třepačka ES-20 (bioSan, Riga, Litva)
- Termostat BT 50 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., 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)

4.2 Metody

Popsané postupy práce byly převzaty ze skript k laboratornímu cvičení [23] s vlastními úpravami.

4.2.1 Příprava růstových médií

MRS médium (de Man, Rogosa, Sharp) bylo připraveno smícháním práškového média a destilované vody (v poměru 55,15 g/1 l). K části směsi bylo přidáno příslušné množství agaru (15g/1 l) pro přípravu pevného média. Pro přípravu masopeptonového agaru (MPA) bylo použito 23 g práškového média na 1 l destilované vody. Roztoky byly sterilizovány v autoklávu (121 °C/15 minut). Směsi pevných médií byly nality na Petriho misky.

4.2.2 Extrakce a nabohacení mikroorganismů z tampónu ellen®

Tampón byl sterilně umístěn do Erlenmeyerovy baňky s 200 ml tekutého MRS média. Extrakce probíhala na třepače při 185 ot/min, při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

4.2.3 Zpracování výrobků pro kultivaci buněk

Byl odebrán 1 g krému RYOR a práškového nápoje ZAJÍC, 1 tableta probiotika ProDentis o hmotnosti 0,8 g a 1 ml tekutého MRS média s bakteriálními buňkami získanými z tampónu ellen®. Vzorky byly rozmíchány v 5 ml destilované vody. 100 µl z každého roztoku bylo rozetřeno sterilní hokejkou na Petriho misky s pevným médiem MRS a MPA. Každé očkování bylo provedeno ve dvou paralelách. Buňky byly kultivovány za aerobních podmínek při 37 °C po dobu 48 hodin, poté proběhla kontrola bakteriálního nárůstu.

4.2.4 Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk

Z každého výrobku byly odebrány dva paralelní vzorky – po 1 g z krému RYOR a nápoje ZAJÍC, po 1 tabletě probiotika ProDentis o hmotnosti 0,8 g a po 1 ml tekutého MRS média s bakteriálními buňkami získanými z tampónu ellen®. Ke vzorkům bylo přidáno po 1 ml lyzačního pufru s lysozymem. Vzorky byly za občasného promíchání inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 50 µl 10% SDS a 10 µl proteinázy K (0,1 mg/ml) a vše bylo promícháno. Vzorky byly inkubovány 24 hodin při 55 °C. Hrubé lyzáty byly uchovány pro další práci.

4.2.5 Izolace bakteriální DNA metodou fenolová extrakce

K 500 µl lyzátu buněk bylo přidáno 500 µl fenolu (předestilován; pH 7,8; obarven oxychynolinem). Roztoky byly 4 minuty kývavým pohybem opatrně promíchávány. Mikropipetou byla odebrána vodní fáze s DNA do nových Eppendorfových zkumavek. Vzorky byly doplněny TE pufrům na objem 500 µl. Bylo přidáno 700 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1). Roztoky byly opět 4 minuty promíchávány kývavým pohybem. Poté byly vzorky centrifugovány při 14 500 ot/min po dobu 5 minut. Opět byla odebrána vodní fáze s DNA do čistých Eppendorfových zkumavek.

4.2.6 Srážení DNA ethanolem

Vzorky byly doplněny TE pufrům na 400 μ l. Bylo přidáno 20 μ l 3 M octanu sodného a vše bylo promícháno. Byl přidán 1 ml ethanolu (96 %) vychlazeného na -20°C a obsah zkumavek byl promíchán. DNA byla srážena při -20°C po dobu 15 minut. Vzorky byly centrifugovány při 14 500 ot/min po dobu 15 minut. Supernatant byl slit a sediment se nechal okapat. Zkumavky se sedimentem byly sušeny v exikátoru. Sediment byl suspendován v 200 μ l TE pufru a vzorky uchovány při 4°C pro další práci.

4.2.7 Izolace bakteriální DNA pomocí magnetických nosičů

K separaci DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických nosičů Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox byla připravena směs (Tabulka 5) o celkovém objemu 1 000 μ l.

Tabulka 5: Složení směsi k izolaci DNA pomocí magnetických mikročástic.

Pořadí přidávaných komponent	Komponenty	Objem (μ l)
1.	NaCl (5 M)	400
2.	hrubý lyzát buněk	100
3.	PEG 6 000 (40 %)	400
4.	magnetický nosič (2 mg/ml)	100

Výsledná koncentrace PEG 6 000 ve směsi byla 16 %, NaCl 2M. Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Dále byla směs umístěna do magnetického separátoru, kde byly magnetické nosiče s navázanou DNA separovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Supernatant byl odpipetován. Zkumavky s magnetickými nosiči a DNA byly odstraněny z magnetického separátoru, promyty 1 ml 70% ethanolu, vzorky byly promíchány a separovány v magnetickém separátoru po dobu 30 s při laboratorní teplotě. Supernatant byl opatrně odpipetován. Magnetické nosiče byly znovu 2krát promývány s 500 μ l 70% ethanolu a separovány po dobu 30 s, supernatant byl následně opět odstraněn. Eppendorfovy zkumavky byly vyjmuty z magnetického separátoru a zbytek ethanolu byl odpařen v exikátoru. DNA navázaná na magnetických nosičích byla 24 hodin eluována v 50 μ l TE pufru. Následně byly v magnetickém separátoru separovány magnetické částice z roztoku po dobu 1 minuty a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých zkumavek.

4.2.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

Po kalibraci přístroje byly roztoky DNA v TE pufru o objemu 2 μ l naneseny na čočku mikrolitrové kyvety přístroje NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer. V rozmezí vlnových délek 220–320 nm byla změřena absorbance DNA oproti TE pufru. U každého vzorku byla absorbance změřena třikrát. Přístrojem byla stanovena hodnota absorbance pro vlnové délky 260 nm (maximum absorbance pro DNA) a 280 nm (maximum absorbance pro proteiny), koncentrace DNA (z hodnoty absorbance pro 260 nm) a poměry hodnot vypovídající o čistotě DNA ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ a $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$).

4.2.9 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

Byl připraven 0,8% agarózový gel směsí vhodného množství agarózy a 0,5krát koncentrovaného TBE pufru. Suspenze byla v několika fázích rozvařena. Po krátkém chladnutí a promíchání byla nalita do elektroforetických vaniček s hřebínkem a ponechána k zatuhnutí. Do vzniklých komůrek v gelu bylo následně nanášeno po 15 μl DNA izolované fenolovou extrakcí a pomocí magnetických nosičů smíchaných s 3 μl 6krát koncentrovaného nanášecího pufru. Stejným způsobem byla nanesena pozitivní kontrola bakteriální DNA kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T. Gel byl umístěn do elektroforetické vany a převrstven 0,5 \times TBE pufrem. Elektroforéza probíhala při napětí 80 V po dobu 1,5 hodiny.

Po ukončení elektroforézy byl gel barven v lázni s ethidium bromidem po dobu 30 minut a následně ozářen v transiluminátoru UV světlem o vlnové délce 305 nm. Gel byl vyhodnocen a byla provedena fotografická dokumentace.

4.2.10 Konvenční PCR

Všechny komponenty PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány. Dle Tabulky 6 byly připraveny směsi pro konvenční PCR o celkovém objemu 25 μl .

Tabulka 6: Složení směsí pro konvenční PCR.

Pořadí přidaných komponent	Komponenty	Objem (μl)		
		Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bacillus</i>
1.	voda pro PCR	19,5	18,5	16,5
2.	10 \times PCR pufr	2,5	2,5	2,5
3.	dNTP (10 mM)	0,5	0,5	1,0
4.	primer 1 (10 pmol/ μl)	0,5	1,0	1,0
5.	primer 2 (10 pmol/ μl)	0,5	1,0	1,0
6.	Taq DNA polymeráza (1 U/ μl)	0,5	0,5	2,0
7.	matrice DNA (10 ng/ μl)	1,0	1,0	1,0

Jako DNA matrice byla použita DNA izolovaná z analyzovaných výrobků, která byla zředěna na koncentraci 10 ng/ μl . Pro jednotlivé specifické PCR byly použity specifické primery. Specifikace použitých primerů je uvedena v Tabulce 2 (4.1.6).

Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola. Jako matrice byla u všech PCR použita DNA o koncentraci 10 ng/ μl izolovaná ze sbírkových kmenů. Při PCR specifických pro doménu *Bacteria* a pro rod *Lactobacillus* byla použita DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T, při PCR specifické pro rod *Bacillus* se jednalo o DNA *Bacillus subtilis* CCM 1999. Negativní kontrola byla připravena nahrazením DNA matrice v PCR směsi stejným objemem vody pro PCR.

Připravené PCR směsi byly promíchány, krátce centrifugovány a umístěny do cyklu. Byl spuštěn příslušný program pro PCR (Tabulka 7).

Tabulka 7: Amplifikační programy pro konvenční PCR.

Číslo kroku	Amplifikační program	Specifikace			
		Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i> [47]	Rod <i>Lactobacillus</i> [46]	Rod <i>Bacillus</i>
1	Prodloužená denaturace DNA	95 °C/5 min	95 °C/5 min	95 °C/5 min	95 °C/5 min
2	Denaturace DNA	95 °C/30 s	95 °C/30 s	94 °C/30 s	95 °C/1 min
3	Hybridizace primerů	55 °C/30 s	55 °C/30 s	58 °C/30 s	63 °C/1 min
4	Elongace DNA	72 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/2 min
5	Dosyntetizování DNA	72 °C/5 min	72 °C/5 min	72 °C/5 min	72 °C/5 min
Počet cyklů (krok 2–4)		30	30	30	30

4.2.11 PCR v reálném čase s analýzou křivek tání (Melt analýzou)

Pro druhovou identifikaci byla použita PCR v reálném čase.

Komponenty byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány. Dle Tabulky 8 byly připraveny směsi pro PCR v reálném čase o celkovém objemu 25 µl.

Tabulka 8: Složení směsí pro druhově specifické PCR v reálném čase.

Pořadí přidaných komponent	Komponenty	Objem (µl)	
		<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. gasseri</i>
1.	voda pro PCR	7,5	6,5
2.	qPCR 2× SYTO-9 Master Mix	12,5	12,5
3.	MgCl ₂ (25 mM)	–	1,0
4.	primer 1 (10 pmol/µl)	1,0	1,0
5.	primer 2 (10 pmol/µl)	1,0	1,0
6.	matrice DNA (neředěná)	3,0	3,0

Jako DNA matrice byla použita neředěná DNA. Pro PCR specifickou pro druh *Lactobacillus pentosus* byla použita DNA izolovaná z probiotického krému RYOR, pro druhy *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri* byla použita DNA izolovaná z probiotického tampónu ellen®. Pro jednotlivé druhově specifické PCR byly použity vhodné primery. Specifikace použitých primerů je uvedena v Tabulce 3 (4.1.6).

Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola. Jako matrice byla u všech specifických PCR použita DNA o koncentraci 10 ng/µl izolovaná ze sbírkových kmenů. Při PCR specifické pro druh *Lactobacillus pentosus* byla použita DNA *Lactobacillus pentosus* CCM 4619, pro druh *Lactobacillus rhamnosus* se jednalo o DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T, pro druh *Lactobacillus fermentum* byla použita DNA *Lactobacillus fermentum*

CCM 7192T a pro druh *Lactobacillus gasseri* byla použita DNA *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T. Negativní kontrola byla připravena nahrazením DNA matrice v PCR směsi stejným objemem vody pro PCR.

Připravené PCR směsi byly promíchány a použity pro druhově specifické PCR. Na cykleru Rotor-Gene 6000 byl spuštěn příslušný program pro PCR v reálném čase společně s Melt analýzou produktů PCR (Tabulka 9).

Tabulka 9: Amplifikační programy PCR v reálném čase včetně Melt analýzy.

Číslo kroku	Amplifikační program	Specifikace			
		<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
1	Prodloužená denaturace DNA	94 °C/5 min	94 °C/5 min	94 °C/5 min	94 °C/5 min
2	Denaturace DNA	94 °C/45 s	94 °C/1 min	94 °C/1 min	94 °C/1 min
3	Hybridizace primerů	56,8 °C/45 s	58 °C/1 min	62 °C/1 min	60 °C/1 min
4	Elongace DNA	72 °C/90 s	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min
5	Dosyntetizování DNA	72 °C/5 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min
Počet cyklů (krok 2–4)		40	35	35	40
6	Melt analýza	50 °C/90 s	50 °C/90 s	50 °C/90 s	50 °C/90 s
		50–99 °C, po 1 °C/5 s	50–99 °C, po 1 °C/5 s	50–99 °C, po 1 °C/5 s	50–99 °C, po 1 °C/5 s

Vyhodnocení výsledků PCR v reálném čase a Melt analýzy bylo provedeno pomocí softwaru cykleru Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87).

4.2.12 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR

Produkty konvenční PCR i PCR v reálném čase byly následně použity pro agarózovou gelovou elektroforézu. Pro produkty PCR specifické pro doménu *Bacteria* byl použit 1,6% gel, pro produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* s primery LbLMA 1 a R 16 byl použit 1,9% gel a s primery F_allact a R_allact byl použit 2% gel, pro produkty PCR specifické pro rod *Bacillus* byl použit 1% gel. Na agarózovou gelovou elektroforézu produktů PCR specifických pro druh *Lactobacillus pentosus* byl použit 1,9% gel, pro produkty PCR specifické pro druhy *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus fermentum* byl použit 1,4% gel a pro produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus gasseri* byl použit 1,5% gel. Gely byly připraveny směsí vhodného množství agarózy a 0,5krát koncentrovaného TBE pufru. Suspenze byla v několika fázích rozvařena. Po krátkém chladnutí a promíchání byla nalita do elektroforetických vaniček s hřebínkem a ponechána k zatuhnutí. Do vzniklých komůrek v gelu bylo následně nanášeno po 15 µl PCR produktů smíchaných s 3 µl 6krát koncentrovaného nanášecího pufru. Na gely byl nanesen rovněž hmotnostní standard (100 bp žebříček). Gely byly umístěny do elektroforetických van a převrstveny 0,5× TBE puftrem. Elektroforéza probíhala při napětí 80 V po dobu 1,5 hodiny.

Po ukončení elektroforézy byly gely ozářeny v transiluminátoru UV světlem o vlnové délce 305 nm, byly vyhodnoceny a byla provedena fotografická dokumentace.

4.2.13 PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)

Vzorky DNA izolované z probiotického tampónu ellen® byly podrobeny amplifikaci pomocí specifických PCR v reálném čase s následnou HRM analýzou produktů PCR. Směsi pro PCR-HRM byly připraveny dle Tabulky 8 (bez přídavku MgCl₂). Jako DNA matrice byla použita neředěná DNA izolovaná ze zmíněného výrobku o objemu 3 µl. Pro jednotlivé PCR byly použity vhodné primery. Specifikace použitých primerů je uvedena v Tabulce 4 (4.1.6).

Stejným postupem byla připravena série pozitivních kontrol. Jako matrice byla použita DNA o koncentraci 10 ng/µl izolovaná ze sbírkových kmenů. Pro všechny specifické PCR-HRM byla použita DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T a *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T, dále také směsi vždy dvou kontrolních DNA v poměru 1:1 a směs všech tří kontrolních DNA v poměru 1:1:1. Negativní kontrola byla připravena nahrazením DNA matrice v PCR směsi stejným objemem vody pro PCR.

Připravené PCR směsi byly promíchány, krátce centrifugovány a použity pro specifické PCR-HRM pomocí specifických primerů. Na cykleru LightCycler® Nano Instrument byl spuštěn příslušný program pro PCR v reálném čase společně s HRM analýzou (Tabulka 10).

Tabulka 10: Amplifikační programy PCR-HRM dle použitých primerů.

Číslo kroku		Specifikace			
		V3-F, V3-R a V6-F, V6-R [51]	V1F-HRM, V1R-HRM [52]	P1V1, P2V1 [53]	GroHRM-F, GroHRM-R [54]
1	PCR	50 °C/2 min	–	–	–
2		95 °C/2 min	95 °C/10 min	95 °C/5 min	98 °C/1 min
3		95 °C/15 s	95 °C/10 s	95 °C/30 s	95 °C/30 s
4		52 °C/20 s	60 °C/15 s	52 °C/30 s	59 °C/20 s
5		60 °C/20 s	72 °C/20 s	72 °C/1 min	72 °C/20 s
6		50 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/5 min	65 °C/1 min
Počet cyklů (krok 3–5)		40	50	35	45
7	HRM	65 °C/60 s	55 °C/60 s	60 °C/60 s	65 °C/60 s
		65–90 °C, po 0,05 °C/1 s	55–95 °C, po 0,25 °C/1 s	60–97 °C, po 0,05 °C/1 s	65–95 °C, po 0,1 °C/1 s

Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software –1.1.

4.3 Výsledky

4.3.1 Kultivace buněk z výrobků

Buňky z výrobků byly naočkovány na tuhá média (dle bodu 4.2.3). Po 48 hodinách aerobní kultivace bakterií proběhla kontrola bakteriálního nárůstu na pevném MRS a MPA médiu. Intenzitu bakteriálního nárůstu uvádí Tabulka 11.

Tabulka 11: Intenzita bakteriálního nárůstu na MRS a MPA.

Médium	Probiotický výrobek			
	RYOR	ProDentis	ellen®	ZAJÍC
MRS	–	+	+++	+++
MPA	++	++	++	++

– – kolonie nedetekovány, + – nízký počet jednotlivých kolonií, ++ – vysoký počet jednotlivých kolonií, +++ – souvislý nárůst.

Použitím dvou typů tuhých médií bylo docíleno nakultivování bakterií ze všech výrobků. Bakteriální nárůst nebyl detekován při kultivaci mikroorganismů z výrobku RYOR na MRS agaru.

4.3.2 Izolace bakteriální DNA

Z hrubých lyzátů buněk z každého výrobku (připravených ve dvou opakováních dle bodu 4.2.4) byla DNA vyizolována metodou fenolové extrakce (dle bodů 4.2.5 a 4.2.6) a magnetické separace (dle bodu 4.2.7).

4.3.3 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

Přítomnost DNA izolované z hrubých lyzátů buněk metodami fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou (dle bodu 4.2.9). Ve všech vzorcích byla detekována DNA. DNA byla relativně intaktní. V některých vzorcích byla DNA částečně degradovaná (obrázek neuveden).

4.3.4 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky (dle bodu 4.2.8). Absorbance byla u každého vzorku změřena třikrát a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Výsledky spektrofotometrického měření, koncentrace a čistota izolované DNA jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Koncentrace DNA izolované z výrobků a hodnoty absorbance při různých vlnových délkách.

Metoda izolace DNA	DNA výrobku	c [ng/μl]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Fenolová extrakce	RYOR 1	101,2	2,025	1,373	1,47	1,46
	RYOR 2	100,1	2,002	1,378	1,45	1,51
	ProDentis 1	1202,5	24,050	12,289	1,96	1,64
	ProDentis 2	1288,4	25,768	13,057	1,97	1,68
	ellen® 1	269,8	5,397	3,016	1,79	1,40
	ellen® 2	358,9	7,177	4,084	1,76	1,52
	ZAJÍC 1	875,6	17,512	12,302	1,42	0,92
	ZAJÍC 2	897,8	17,956	12,289	1,46	0,86
Separace magnetickými nosiči Fkol B 100 ox	RYOR 1	140,6	2,812	2,086	1,35	1,56
	RYOR 2	139,4	2,788	2,086	1,34	1,60
	ProDentis 1	127,3	2,547	1,870	1,36	1,59
	ProDentis 2	128,4	2,568	1,880	1,37	1,59
	ellen® 1	155,1	3,101	2,347	1,32	1,52
	ellen® 2	148,4	2,968	2,228	1,33	1,60
	ZAJÍC 1	47,5	0,950	0,733	1,30	0,85
	ZAJÍC 2	60,0	1,200	0,933	1,29	1,18
Separace magnetickými nosiči Fkol 135 ox	RYOR 1	204,2	4,084	3,023	1,35	1,60
	RYOR 2	202,2	4,044	3,017	1,34	1,56
	ProDentis 1	198,5	3,970	2,917	1,36	1,61
	ProDentis 2	252,4	5,048	3,730	1,35	1,56
	ellen® 1	373,8	7,476	5,587	1,34	1,43
	ellen® 2	318,9	6,377	4,758	1,34	1,47
	ZAJÍC 1	142,6	2,853	2,130	1,34	1,24
	ZAJÍC 2	169,3	3,386	2,534	1,34	1,35

Pozn.: Byla měřena DNA izolovaná ze dvou hrubých lyzátů z každého výrobku (1, 2). Pro izolaci DNA fenolovou extrakcí bylo použito 500 μl hrubých lyzátů, pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů bylo použito 100 μl hrubých lyzátů.

Bylo izolováno různé množství DNA v závislosti na použité metodě izolace a na použitém výrobku. Koncentrace nukleových kyselin ve vzorcích se pohybovala v rozmezí 47,5–1288,4 ng/μl.

Poměr absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ i A₂₆₀/A₂₃₀ se většinou pohyboval pod optimálními hodnotami (1,8 a 2). Posouzení podílu absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ naznačuje, že čistší DNA byla izolována metodou fenolové extrakce.

4.3.4.1 Přepočítání stanovené koncentrace izolované DNA

Pro porovnání byla spektrofotometricky stanovená koncentrace DNA teoreticky přepočítána na objem 100 μl použitých hrubých lyzátů buněk a na eluci izolované DNA ve 100 μl TE pufru. Pro přepočítání byly použity následující vzorce.

Vzorec 2: Teoretický přepočítání koncentrace DNA izolované fenolovou extrakcí.

$$c_{\text{teoretická}} = \frac{c_{\text{s tan o vená}} \cdot 2}{5}$$

Vzorec 3: Teoretický přepočítání koncentrace DNA izolované magnetickými nosiči.

$$c_{\text{teoretická}} = \frac{c_{\text{s tan o vená}}}{2}$$

Výsledky teoretického výpočtu koncentrace izolované DNA uvádí Tabulka 13.

Tabulka 13: Teoreticky přepočítaná koncentrace izolované DNA (ze 100 μl hrubých lyzátů, ve 100 μl TE pufru).

Metoda izolace DNA	DNA výrobku	c [ng/ μl]
Fenolová extrakce	RYOR 1	40,5
	RYOR 2	40,0
	ProDentis 1	481,0
	ProDentis 2	515,4
	ellen® 1	107,9
	ellen® 2	143,6
	ZAJÍC 1	350,3
	ZAJÍC 2	359,1
Separace magnetickými nosiči Fkol B 100 ox	RYOR 1	70,3
	RYOR 2	69,7
	ProDentis 1	63,7
	ProDentis 2	64,2
	ellen® 1	77,6
	ellen® 2	74,2
	ZAJÍC 1	23,8
	ZAJÍC 2	30,0
Separace magnetickými nosiči Fkol 135 ox	RYOR 1	102,1
	RYOR 2	101,1
	ProDentis 1	99,3
	ProDentis 2	126,2
	ellen® 1	186,9
	ellen® 2	159,5
	ZAJÍC 1	71,3
	ZAJÍC 2	84,7

Teoreticky přepočítaná koncentrace DNA ve vzorcích se pohybovala v rozmezí hodnot 23,8–515,4 ng/ μl v závislosti na použité metodě a výrobku.

Nejvyšších výtěžků nukleových kyselin bylo dosaženo u výrobku ProDentis metodou fenolové extrakce. Při porovnání efektivity separace DNA magnetickými nosiči bylo dosaženo vyšších výtěžků s použitím nosičů Fkol 135 ox oproti nosičům Fkol B 100 ox.

4.3.5 Konvenční PCR

Všechny vzorky izolované DNA (metodou fenolové extrakce a magnetické separace) zředěné na 10 ng/μl byly podrobeny amplifikaci pomocí specifických PCR (dle bodu 4.2.10). Přítomnost specifických produktů PCR byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou (dle bodu 4.2.12).

4.3.5.1 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

Byly připraveny směsi pro PCR a provedena PCR specifická pro doménu *Bacteria* (primery F_eub a R_eub [46]). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T. Výsledek elektroforézy produktů PCR a popis gelu je uveden na Obrázku 7.

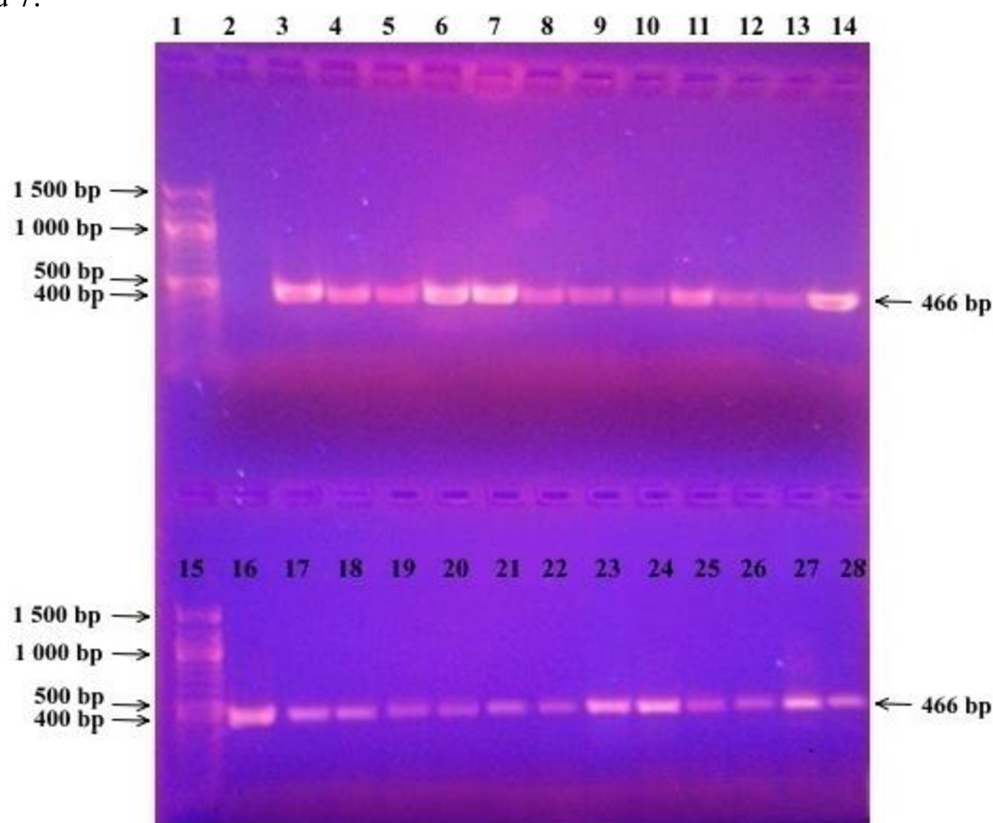


Schéma nanesení vzorků: 1 a 15 – žebříček, 2 – negativní kontrola, 3 – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T), 4–11 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí, 12–20 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, 21–28 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox. Naneseno po dvou amplikonech od každého výrobku v pořadí RYOR, ProDentis, ellen®, ZAJÍC.

Obrázek 7: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (466 bp) specifických pro doménu *Bacteria* (primery F_eub a R_eub [46]).

Ve všech vzorcích byl v různé intenzitě detekován specifický produkt PCR (466 bp), tím byla prokázána přítomnost bakteriální DNA.

4.3.5.2 PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Byla provedena PCR specifická pro rod *Lactobacillus* (primery LbLMA 1 a R 16 [47] a primery F_alllact a R_alllact [46]). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T. Výsledky elektroforézy produktů PCR a popisy gelů jsou na Obrázcích 8 a 9.

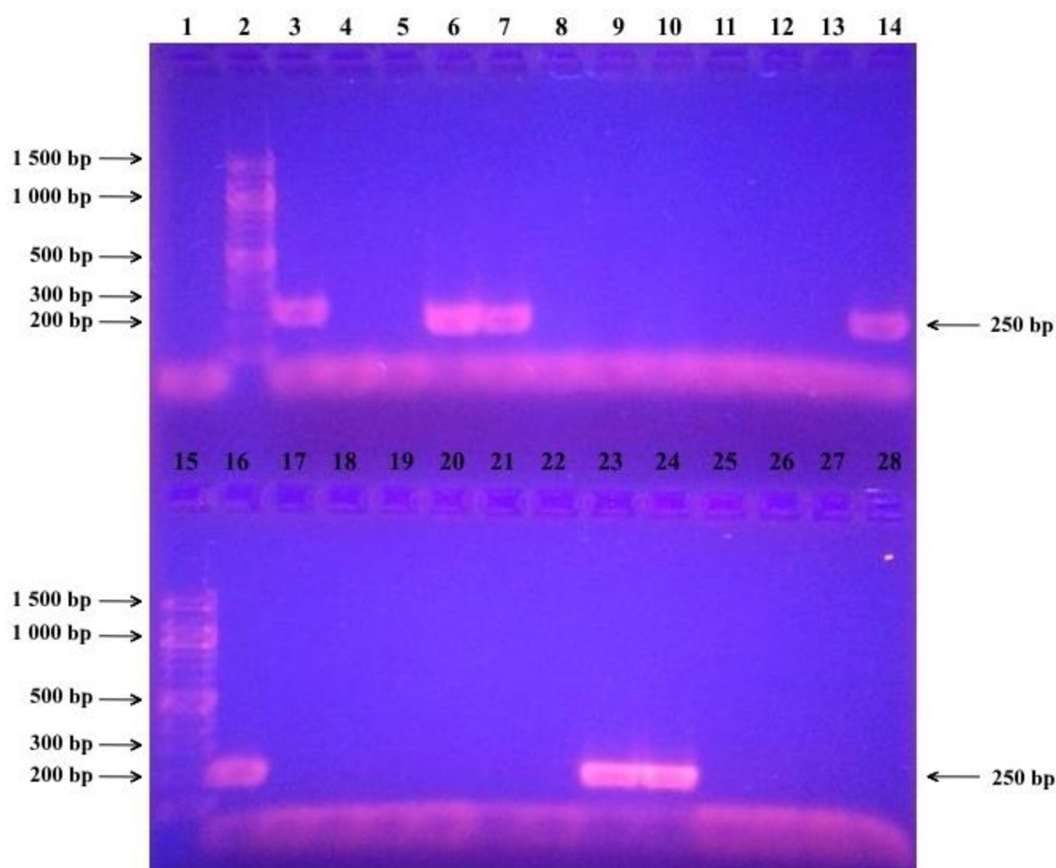


Schéma nanesení vzorků: 1 – negativní kontrola, 2 a 15 – žebříček, 3 – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T), 4–11 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, 12–20 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, 21–28 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Naneseno po dvou ampliconech od každého výrobku v pořadí RYOR, ProDentis, ellen®, ZAJÍC.

Obrázek 8: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (250 bp) specifických pro rod *Lactobacillus* (primery LbLMA 1 a R 16 [47]).

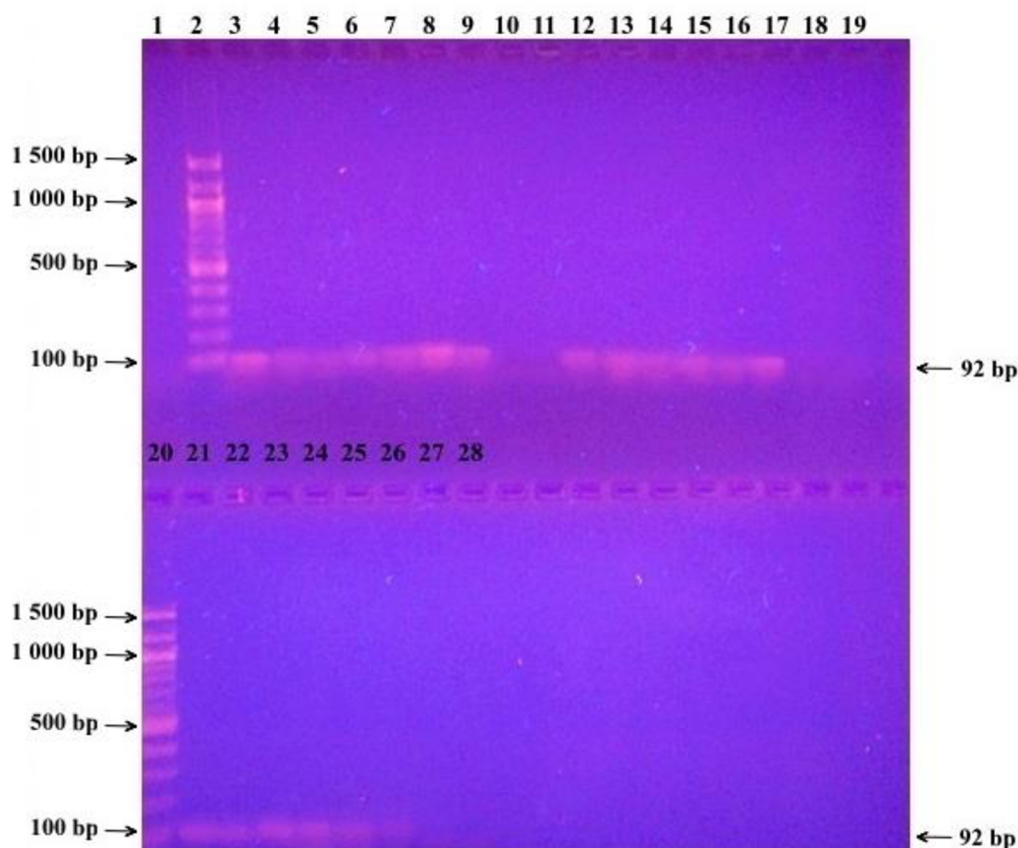


Schéma nanesení vzorků: 1 – negativní kontrola, 2 a 20 – žebříček, 3 – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T), 4–11 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, 12–19 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, 21–28 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Naneseno po dvou amplikonech od každého výrobku v pořadí RYOR, ProDentis, ellen®, ZAJÍC.

Obrázek 9: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (92 bp) specifických pro rod *Lactobacillus* (primery F_alllact a R_alllact [46]).

Za použití primerů LbLMa 1 a R 16 [47] byl specifický produkt PCR (250 bp) detekován po amplifikaci DNA z výrobku ProDentis. U zbylých výrobků nebyla za uvedených podmínek reakce prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*.

Amplifikací DNA s primery F_alllact a R_alllact [46] byl ve vzorcích DNA ze všech výrobků deklarujících přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* detekován specifický produkt PCR (92 bp). Tím byla prokázána přítomnost bakteriální DNA rodu *Lactobacillus*.

4.3.5.3 PCR specifická pro rod *Bacillus*

Byla provedena PCR specifická pro rod *Bacillus* (primery B-K1/F a B-K1/R1 [48]). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Bacillus subtilis* CCM 1999. Snímek gelu s nanesenými produkty PCR je na Obrázku 10.

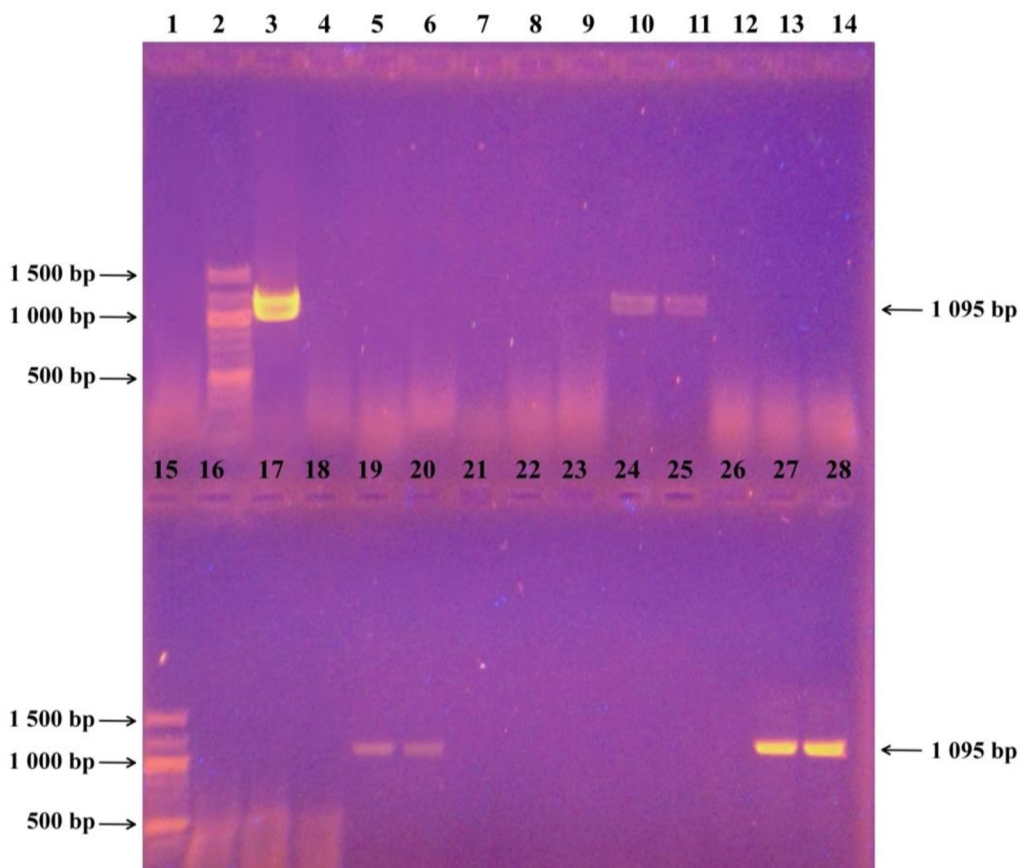


Schéma nanesení vzorků: 1 – negativní kontrola, 2 a 15 – žebříček, 3 – pozitivní kontrola (DNA *Bacillus subtilis* CCM 1999), 4–11 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, 12–20 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, 21–28 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Naneseno po dvou amplikoněch od každého výrobku v pořadí RYOR, ProDentis, ellen®, ZAJÍC.

Obrázek 10: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (1 095 bp) specifických pro rod *Bacillus* (primery B-K1/F a B-K1/R1 [48]).

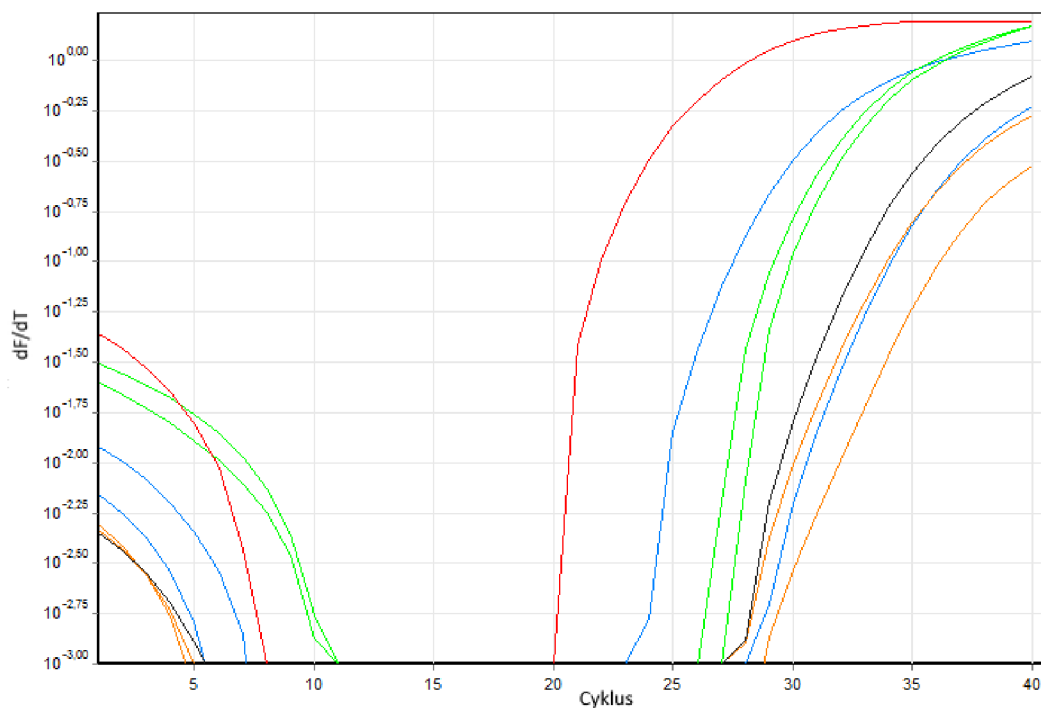
Ve všech vzorcích z výrobku ZAJÍC, deklarujícím přítomnost bakterií rodu *Bacillus*, byl v různé intenzitě detekován specifický produkt PCR (1 095 bp). Tím byla prokázána přítomnost bakteriální DNA rodu *Bacillus*.

4.3.6 PCR v reálném čase

Pro druhovou identifikaci byla použita PCR v reálném čase. Všechny druhově specifické PCR v reálném čase byly optimalizovány úpravou PCR programu. Vzorky izolované neřaděné DNA (koncentrace jednotlivých vzorků DNA uvádí Tabulka 12) byly podrobeny amplifikaci pomocí specifických PCR (dle bodu 4.2.11). Přítomnost specifických produktů PCR byla ověřena Melt analýzou (dle bodu 4.2.11) a agarózovou gelovou elektroforézou (dle bodu 4.2.12).

4.3.6.1 PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus pentosus*

Byla provedena PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus pentosus* (primery pentF a pREV [49]). Pro analýzu byla použita DNA izolovaná z probiotického krému RYOR deklarujícího přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus pentosus*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus pentosus* CCM 4619. Amplifikační křivky testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 11.

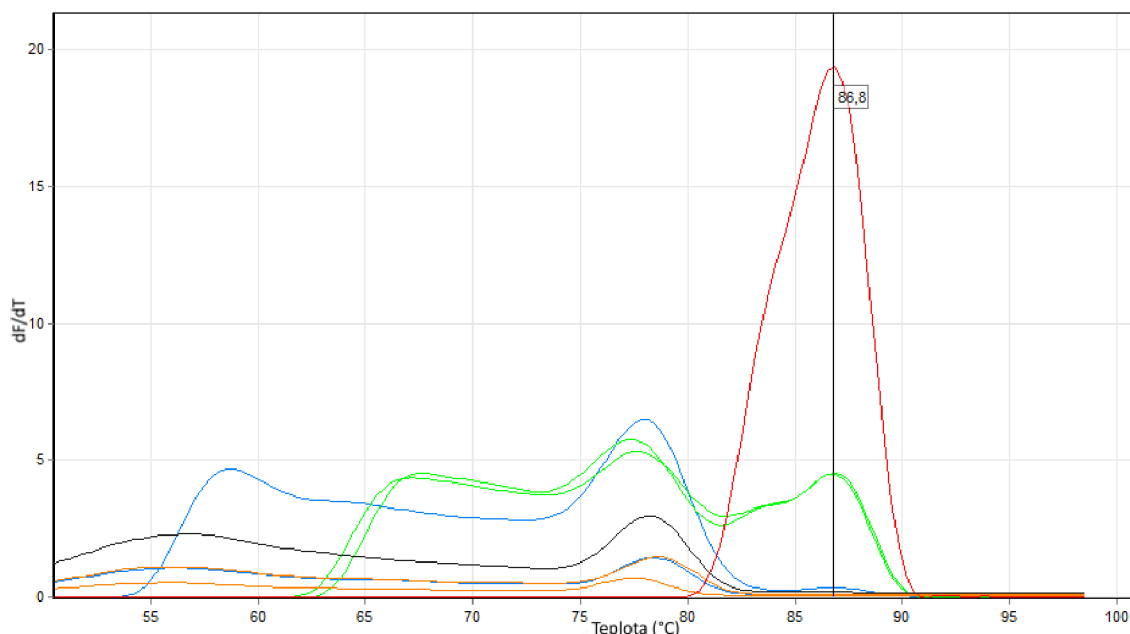


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus pentosus* CCM 4619), černá – negativní kontrola, modré – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, zelené – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, oranžové – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po dvou vzorcích DNA z každé izolační metody.

Obrázek 11: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus pentosus* (pentF a pREV [49]).

Po provedení Melt analýzy s produkty PCR byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (DNA *Lactobacillus pentosus* CCM 4619) detekován vrchol o teplotě tání (T_m) 86,8 °C. Vrchol o stejné teplotě tání byl detekován také u produktů PCR po amplifikaci DNA izolované magnetickými nosiči Fkol 135 ox a u jednoho PCR produktu z DNA izolované nosiči Fkol B 100 ox (Obrázek 12).

Ve stejných vzorcích DNA byl detekován specifický produkt PCR (218 bp) pomocí agarózové gelové elektroforézy (Obrázek 13).



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus pentosus* CCM 4619), černá – negativní kontrola, modré – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, zelené – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, oranžové – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po dvou amplikonech z každé izolační metody.

Obrázek 12: Melt analýza produktů PCR specifických pro druh *Lactobacillus pentosus* (primery *pentF* a *pREV* [49]).

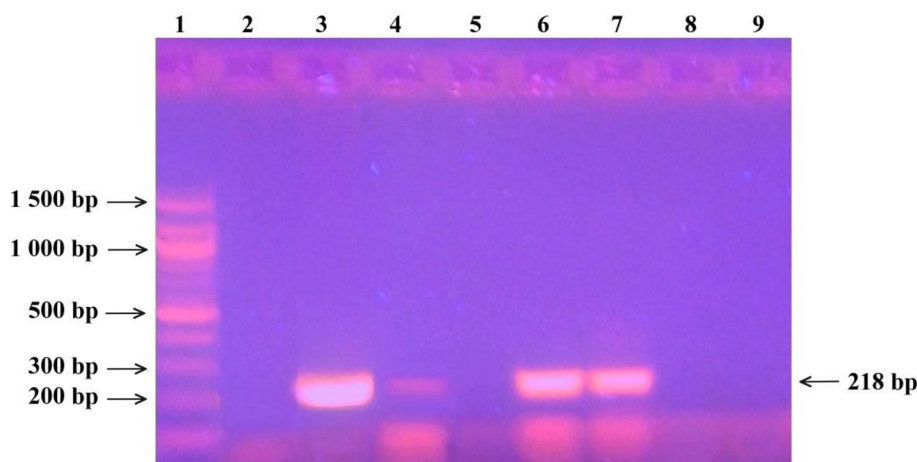


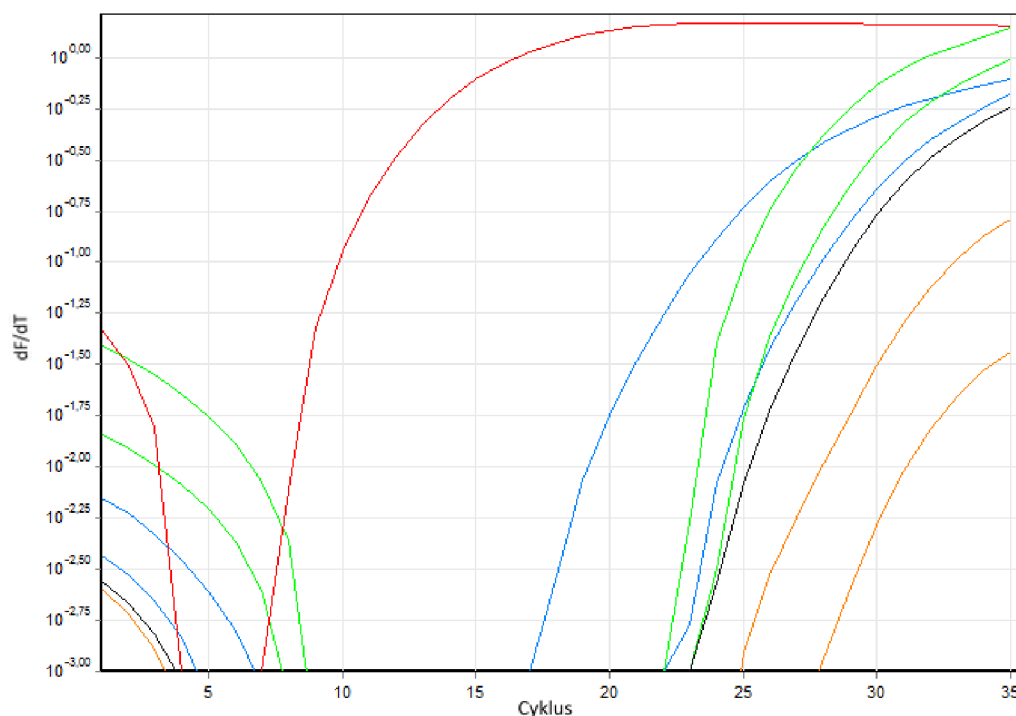
Schéma nanesení vzorků: 1 – žebříček, 2 – negativní kontrola, 3 – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus pentosus* CCM 4619), 4, 5 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, 6, 7 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, 8, 9 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Naneseno po dvou amplikonech z každé izolační metody.

Obrázek 13: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (218 bp) specifických pro druh *Lactobacillus pentosus* (primery *pentF* a *pREV* [49]).

Z výsledků obou metod vyplývá, že v probiotickém krému RYOR byla prokázána přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus pentosus*.

4.3.6.2 PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Byla provedena PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus* (primery RhamFW a UniverRV [50]). Pro analýzu byla použita DNA izolovaná z probiotického tampónu ellen® deklarujícího přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 14.

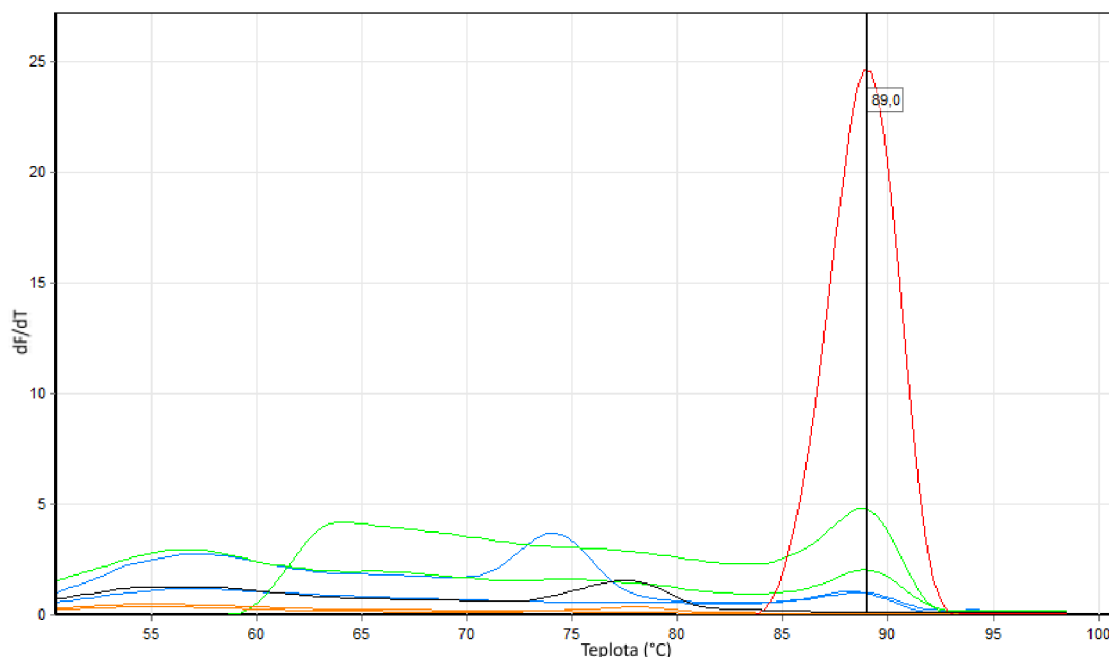


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T), černá – negativní kontrola, modré – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, zelené – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, oranžové – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po dvou vzorcích DNA z každé izolační metody.

Obrázek 14: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus rhamnosus* (RhamFW a UniverRV [50]).

Po provedení Melt analýzy s produkty PCR byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T) detekován vrchol o teplotě tání (T_m) 89,0 °C. Vrchol o stejné teplotě tání byl detekován také u produktů PCR po amplifikaci DNA izolované magnetickými nosiči Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox (Obrázek 15).

Ve stejných vzorcích byl detekován specifický produkt PCR (683 bp) pomocí agarózové gelové elektroforézy (Obrázek 16).



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T), černá – negativní kontrola, modré – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, zelené – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, oranžové – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po dvou amplikonech z každé izolační metody.

Obrázek 15: Melt analýza produktů PCR specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* (primery RhamFW a UniverRV [50]).

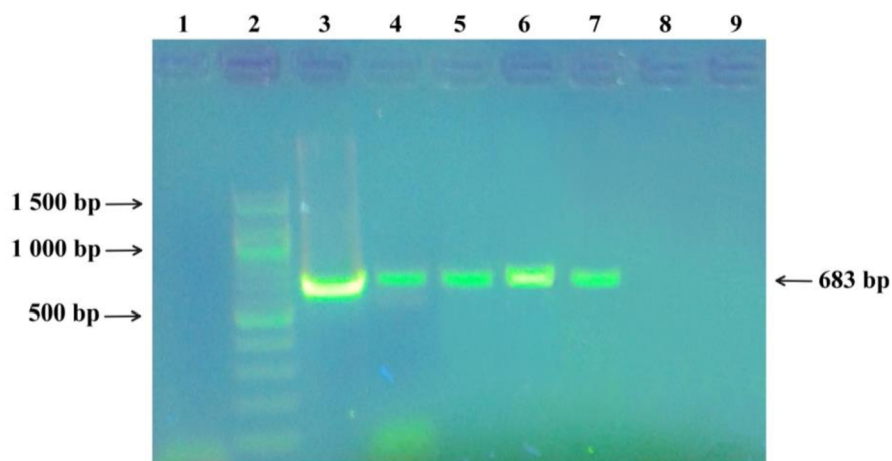


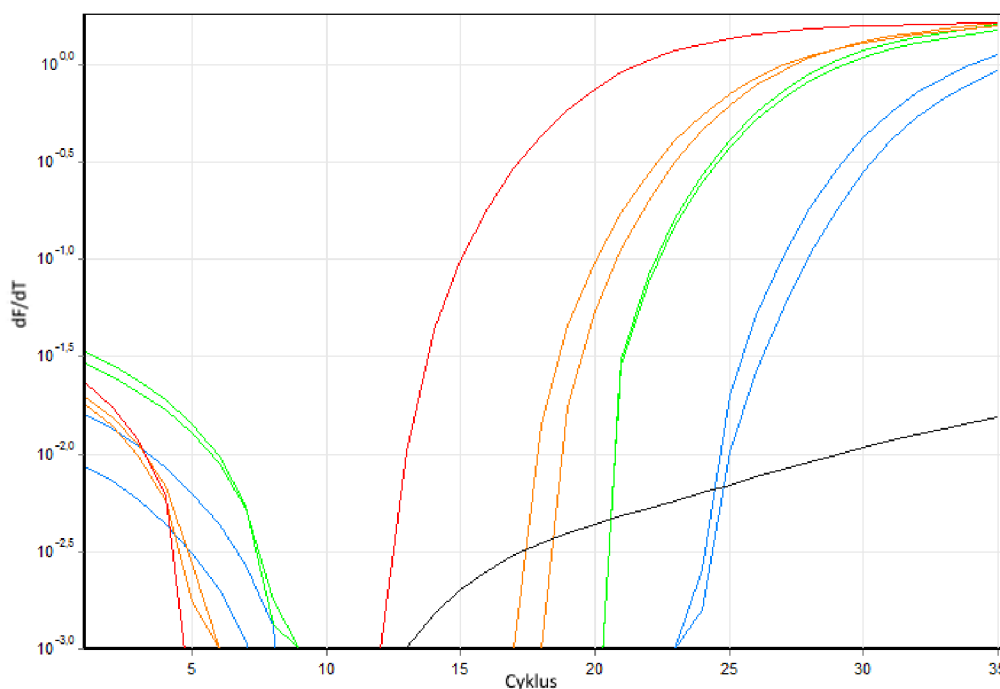
Schéma nanesení vzorků: 1 – negativní kontrola, 2 – žebříček, 3 – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T), 4, 5 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, 6, 7 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, 8, 9 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Naneseno po dvou amplikonech z každé izolační metody.

Obrázek 16: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (683 bp) specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* (primery RhamFW a UniverRV [50]).

Výsledky obou metod potvrdily přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* v probiotickém tampónu ellen®.

4.3.6.3 PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus fermentum*

Byla provedena PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus fermentum* (primery FermFW a UniverRV [50]). Kromě optimalizace PCR programu a navýšení DNA matrice byla optimalizována PCR směs přidavkem hořečnatých iontů. Pro analýzu byly použity vzorky DNA izolované z probiotického tampónu ellen® deklarující přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus fermentum*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 17.

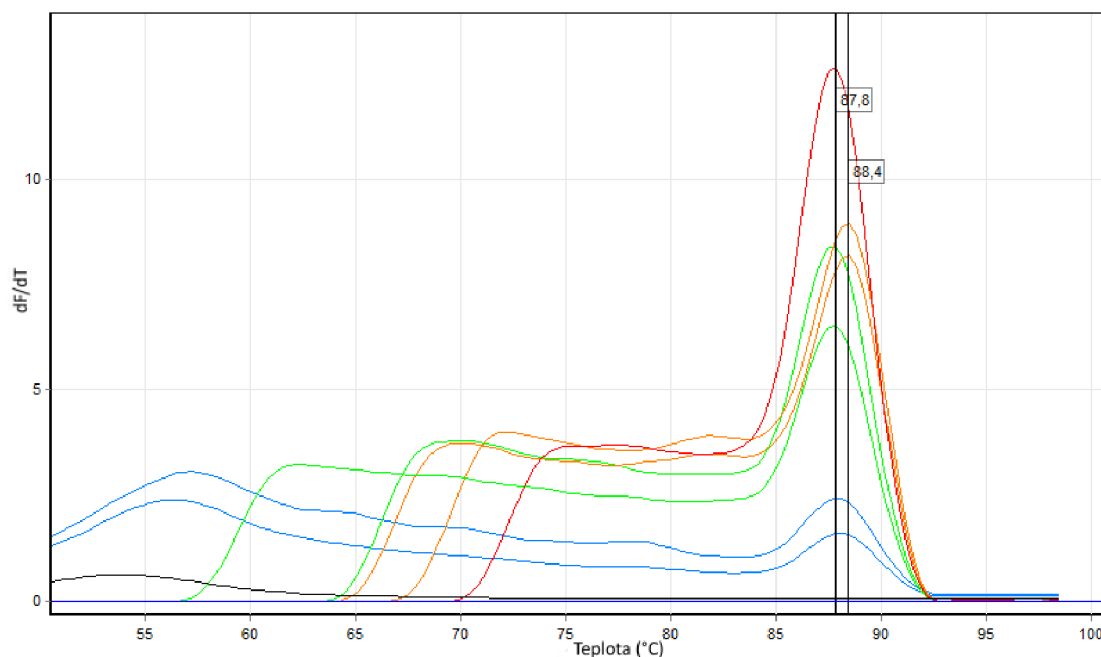


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T), černá – negativní kontrola, modré – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, zelené – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, oranžové – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po dvou vzorcích DNA z každé izolační metody.

Obrázek 17: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus fermentum* (FermFW a UniverRV [50]).

Po provedení Melt analýzy s produkty PCR byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (DNA *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T) detekován vrchol o teplotě tání (T_m) 87,8 °C. Vrchol o stejné teplotě tání byl detekován také u produktů PCR po amplifikaci DNA izolované magnetickými nosiči Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox. Vrchol křivek tání ampliconů DNA z fenolové extrakce náležel hodnotě T_m rovné 88,4 °C. (Obrázek 18).

Pomocí agaróзовé gelové elektroforézy byl ve všech vzorcích detekován specifický produkt PCR (704 bp), (Obrázek 19).



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T), černá – negativní kontrola, modré – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, zelené – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, oranžové – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po dvou amplikonech z každé izolační metody.

Obrázek 18: Melt analýza produktů PCR specifických pro druh *Lactobacillus fermentum* (primery *FermFW* a *UniverRV* [50])

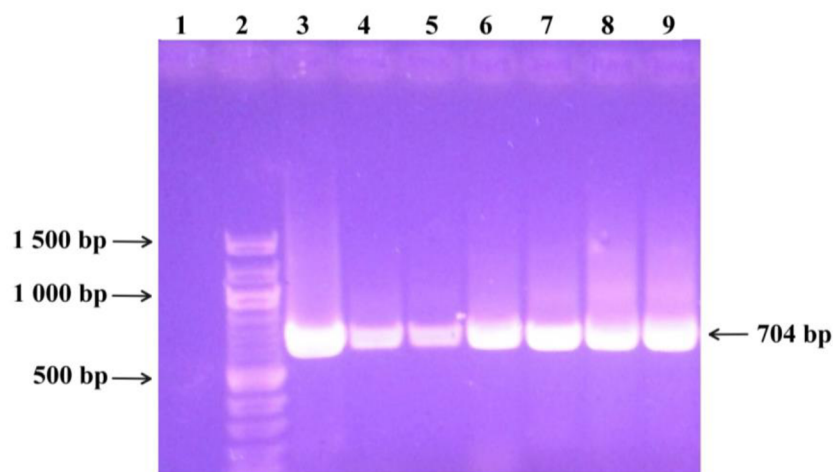


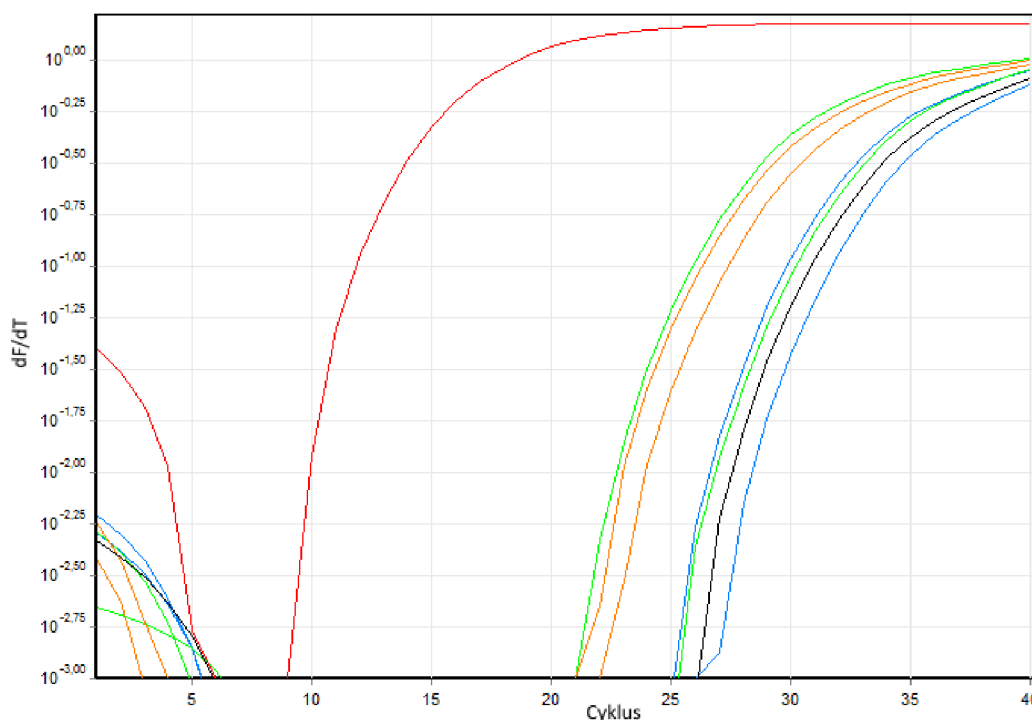
Schéma nanesení vzorků: 1 – negativní kontrola, 2 – žebříček, 3 – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T), 4, 5 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, 6, 7 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, 8, 9 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Naneseno po dvou amplikonech z každé izolační metody.

Obrázek 19: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (704 bp) specifických pro druh *Lactobacillus fermentum* (primery *FermFW* a *UniverRV* [50]).

Výsledky obou metod potvrdily přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus fermentum* v probiotickém tampónu ellen®.

4.3.6.4 PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus gasseri*

Byla provedena PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus gasseri* (primery GassFW a UniverRV [50]). Kromě optimalizace PCR programu a navýšení DNA matrice byla optimalizována PCR směs přidavkem hořečnatých iontů. Pro analýzu byly použity vzorky DNA izolované z probiotického tampónu ellen® deklarující přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus gasseri*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T. Amplifikační křivky všech testovaných vzorků DNA jsou uvedeny na Obrázku 20.

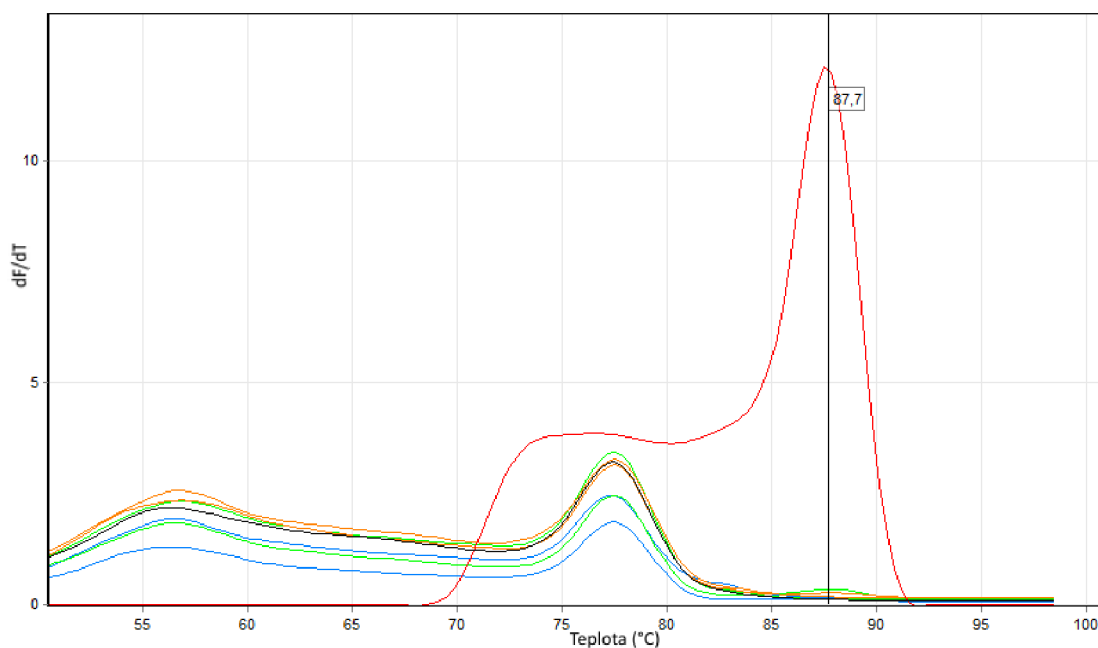


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T), černá – negativní kontrola, modré – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, zelené – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, oranžové – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po dvou vzorcích DNA z každé izolační metody.

Obrázek 20: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery specifickými pro druh *Lactobacillus gasseri* (GassFW a UniverRV [50]).

Po provedení Melt analýzy s produkty PCR byl na křivce tání amplikonu pozitivní kontroly (DNA *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T) detekován vrchol o teplotě tání (T_m) 87,7 °C. Velmi nízké píky s vrcholem o stejné teplotě tání byly detekovány také vždy u jednoho z dvojice produktů PCR po amplifikaci DNA získané všemi metodami izolace – fenolovou extrakcí, magnetickými nosiči Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox. (Obrázek 21).

Ve stejných vzorcích byl detekován specifický produkt PCR (574 bp) pomocí agarózové gelové elektroforézy (Obrázek 22).



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T), černá – negativní kontrola, modré – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, zelené – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, oranžové – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po dvou amplikonech z každé izolační metody.

Obrázek 21: Melt analýza produktů PCR specifických pro druh *Lactobacillus gasseri* (primery GassFW a UniverRV [50]).

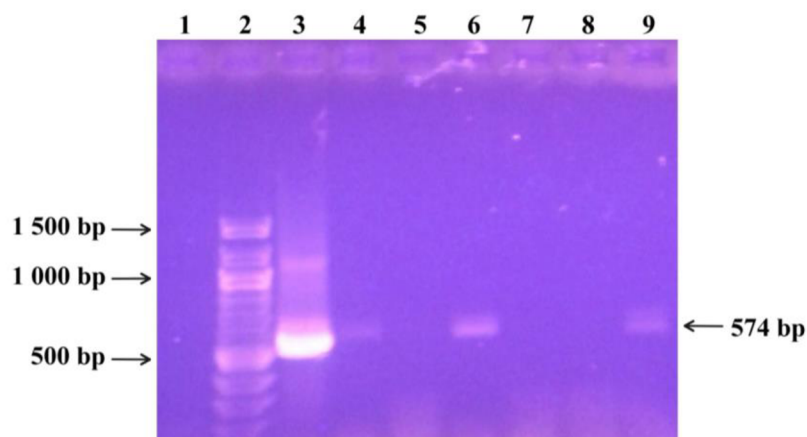


Schéma nanesení vzorků: 1 – negativní kontrola, 2 – žebříček, 3 – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T), 4, 5 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, 6, 7 – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, 8, 9 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Naneseno po dvou amplikonech z každé izolační metody.

Obrázek 22: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (574 bp) specifických pro druh *Lactobacillus gasseri* (primery GassFW a UniverRV [50]).

Výsledky obou metod potvrdily přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus gasseri* v probiotickém tampónu ellen®.

4.3.7 Shrnutí výsledků amplifikace

Přítomnost deklarovaných bakteriálních rodů a druhů ve výrobcích byla ověřena pomocí konvenční PCR a PCR v reálném čase. Identifikace druhů *Lactobacillus reuteri* ve výrobku ProDentis a *Bacillus coagulans* ve výrobku ZAJÍC nebyla prováděna, protože vhodné primery a pozitivní kontroly k analýze těchto druhů nebyly k dispozici.

Výsledky amplifikace shrnuje Tabulka 14.

Tabulka 14: Shrnutí výsledků amplifikace.

		Výrobek			
		RYOR	ProDentis	ellen®	ZAJÍC
Ověření přítomnosti specifické DNA	Doména <i>Bacteria</i>	+/+	+/+	+/+	+/+
	Rod <i>Lactobacillus</i>	+/+	+/+	+/+	-/-
	Rod <i>Bacillus</i>	-/-	-/-	-/-	+/+
	Druh <i>Lactobacillus pentosus</i>	+	N	N	N
	Druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	N	N	+	N
	Druh <i>Lactobacillus fermentum</i>	N	N	+	N
	Druh <i>Lactobacillus gasseri</i>	N	N	+	N

+/+ – přítomnost DNA deklarována a ověřena, -/- – přítomnost DNA nedeklarována a nedetekována, N – netestováno

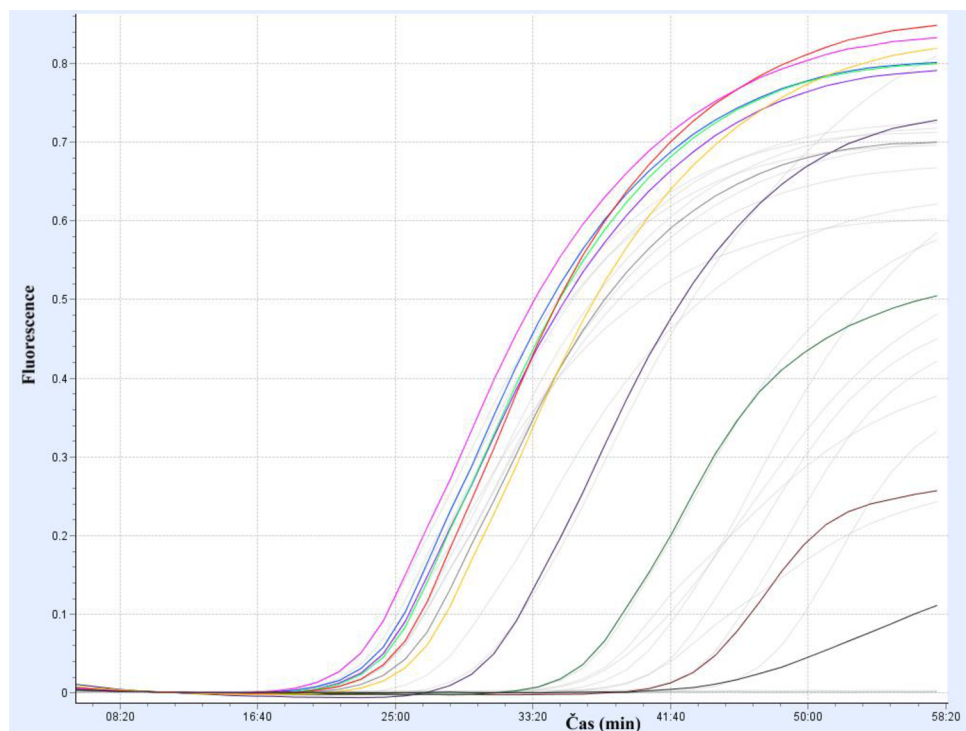
Výsledky amplifikace DNA pomocí specifických PCR potvrdily přítomnost bakteriálních rodů a druhů deklarovaných výrobcí ve výrobcích RYOR a ellen®. Ve výrobcích ProDentis a ZAJÍC byla potvrzena přítomnost DNA bakteriálních rodů *Lactobacillus* a *Bacillus*.

4.3.8 PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)

Pro rozlišení bakteriálních druhů ve směsné kultuře byla provedena PCR-HRM (dle bodu 4.2.13). Pro analýzu byly použity vzorky neředěné DNA (koncentrace jednotlivých vzorků DNA uvádí Tabulka 12) izolované z probiotického tampónu ellen® deklarující přítomnost směsné bakteriální kultury (druhy *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*). Pro všechny PCR-HRM byla použita série pozitivních kontrol DNA o koncentraci 10 ng/μl ze sbírkových kmenů *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T a *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T, dále směsi každých dvou kontrolních DNA v poměru 1:1 a směs všech tří kontrolních DNA v poměru 1:1:1. Vzorky DNA byly podrobeny amplifikaci v reálném čase s různými sadami primerů. Pro odlišení produktů PCR byla zařazena HRM analýza.

4.3.8.1 PCR-HRM s primery V3-F a V3-R

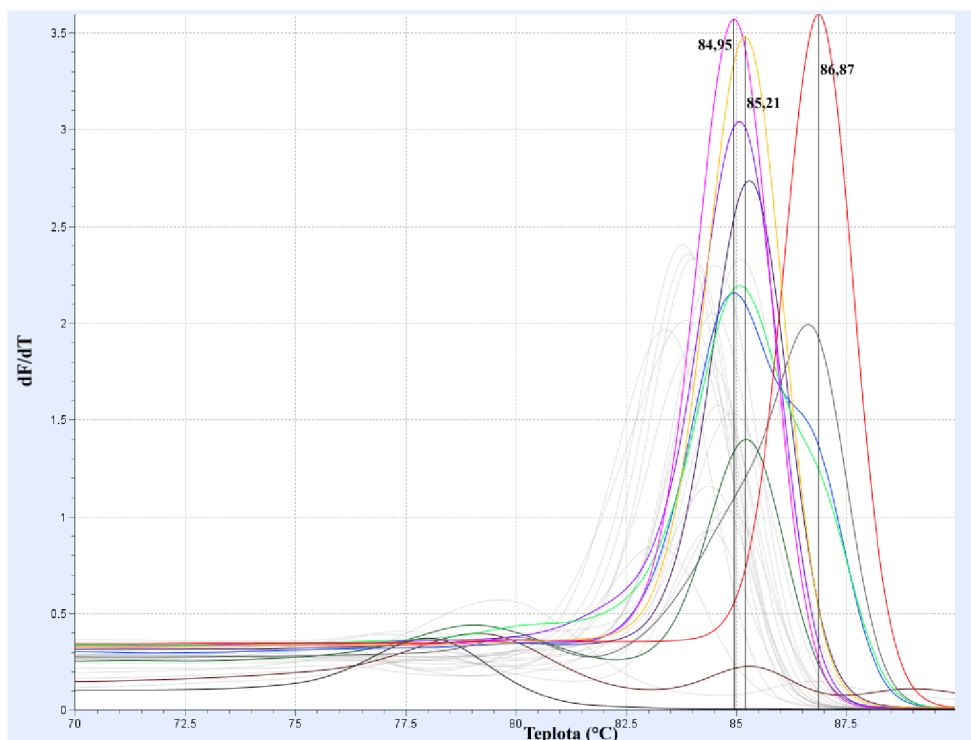
Analyzovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR v reálném čase s primery určenými pro rozlišení rozdílných druhů bakterií (V3-F a V3-R [51]). Výsledky amplifikace jsou znázorněny na Obrázku 23. (Pro přehlednost byl uveden pouze jeden z dvojice vzorků DNA z výrobku z každé izolační metody).



Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, Lbc. – *Lactobacillus*

Obrázek 23: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery V3-F a V3-R [51].

Pomocí HRM analýzy bylo možné rozlišit křivky tání PCR produktů jednotlivých pozitivních kontrol. Křivka tání s vrcholem o teplotě tání (T_m) 84,95 °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T, křivka tání s vrcholem $T_m = 85,21$ °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T a křivka tání s vrcholem $T_m = 86,87$ °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T. Vrcholy, o teplotách tání odpovídajících obsaženým bakteriálním druhům, na křivkách tání PCR produktů získaných po amplifikaci směsné DNA detekovány nebyly (Obrázek 24).



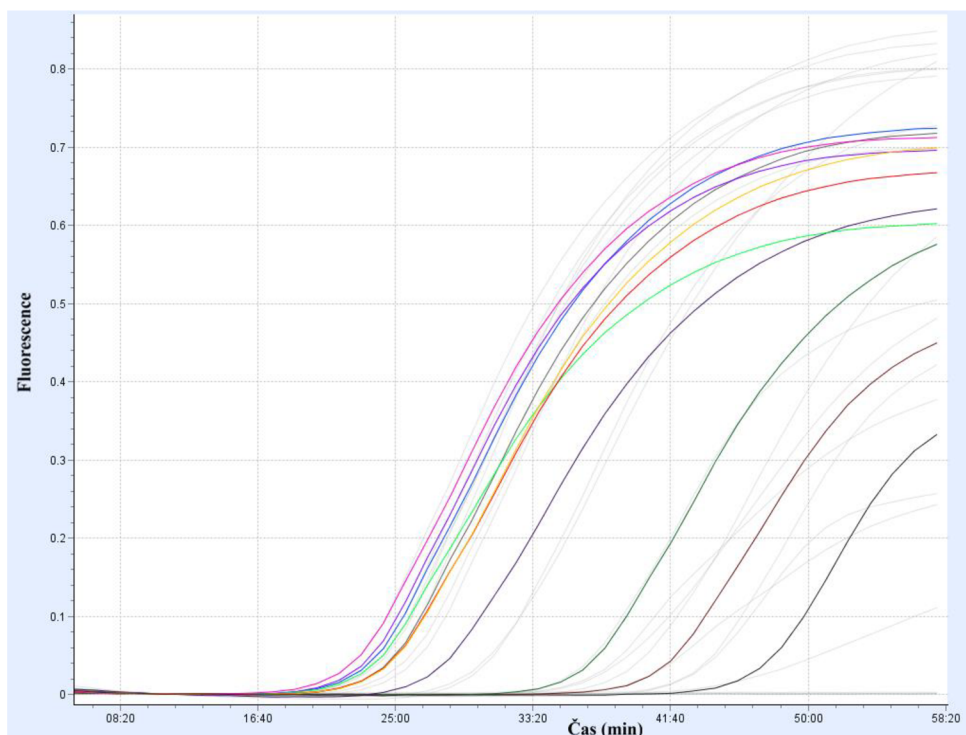
Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
 Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, Lbc. – *Lactobacillus*

Obrázek 24: HRM analýza produktů PCR po amplifikaci s primery V3-F a V3-R [51].

Pomocí HRM analýzy bylo docíleno odlišení ampliconů z jednotlivých kontrolních bakteriálních druhů *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. Bakteriální druhy v ampliconech ze směsných DNA odlišeny nebyly.

4.3.8.2 PCR-HRM s primery V6-F a V6-R

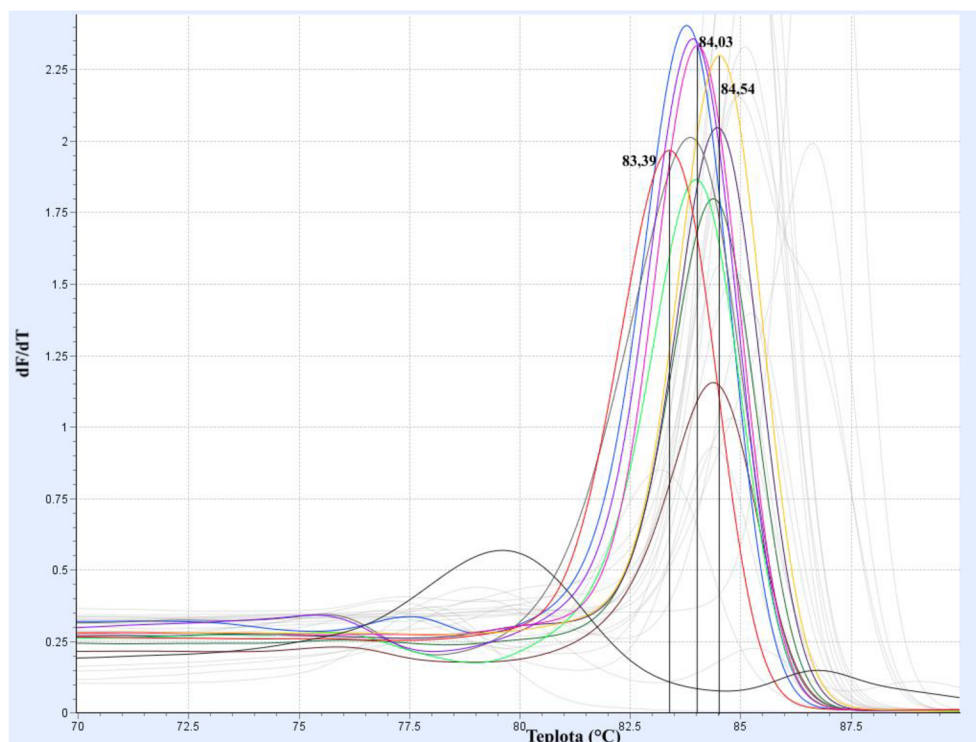
Analyzovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR v reálném čase s primery určenými pro rozlišení rozdílných druhů bakterií (V6-F a V6-R [51]). Výsledky amplifikace jsou znázorněny na Obrázku 25. (Pro přehlednost byl uveden pouze jeden z dvojice vzorků DNA z výrobku z každé izolační metody).



Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, Lbc. – *Lactobacillus*

Obrázek 25: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery V6-F a V6-R [51].

Pomocí HRM analýzy bylo možné rozlišit křivky tání PCR produktů jednotlivých pozitivních kontrol. Křivka tání s vrcholem o teplotě tání (T_m) 83,39 °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T, křivka tání s vrcholem $T_m = 84,03$ °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T a křivka tání s vrcholem $T_m = 84,54$ °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T. Vrcholy, o teplotách tání odpovídajících obsaženým bakteriálním druhům, na křivkách tání PCR produktů získaných po amplifikaci směsné DNA detekovány nebyly (Obrázek 26).



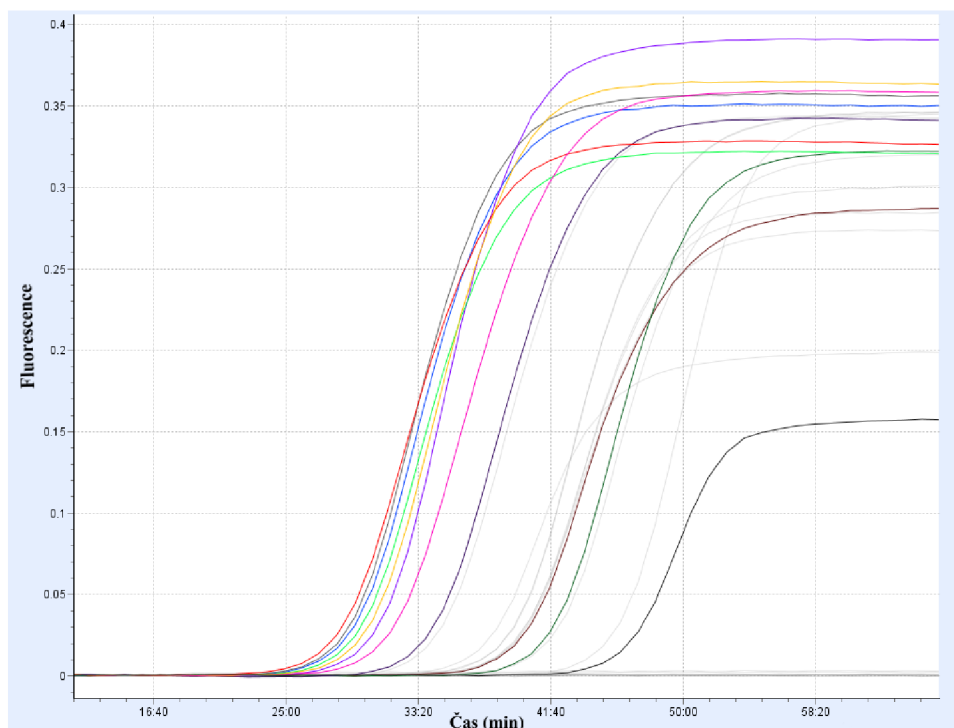
Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, Lbc. – *Lactobacillus*

Obrázek 26: HRM analýza produktů PCR po amplifikaci s primery V6-F a V6-R [51].

Pomocí HRM analýzy bylo docíleno odlišení ampliconů z jednotlivých kontrolních bakteriálních druhů *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. Bakteriální druhy v ampliconech ze směsných DNA odlišeny nebyly.

4.3.8.3 PCR-HRM s primery V1F-HRM a V1R-HRM

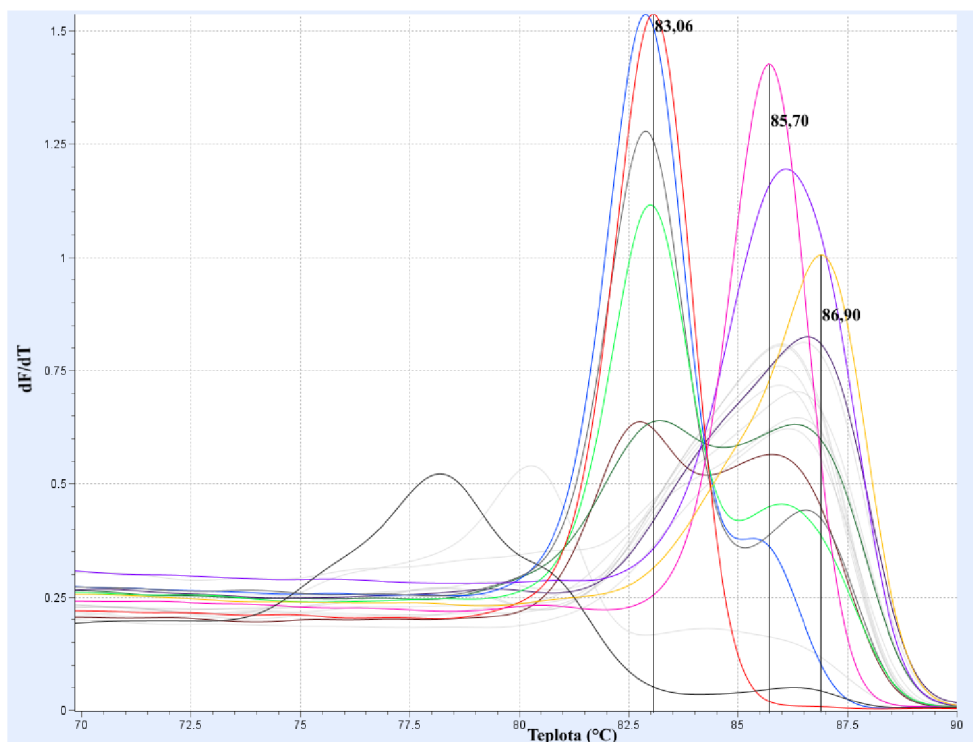
Analyzovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR v reálném čase s primery určenými pro rozlišení rozdílných druhů rodu *Lactobacillus* (V1F-HRM a V1R-HRM [52]). Výsledky amplifikace jsou znázorněny na Obrázku 27. (Pro přehlednost byl uveden pouze jeden z dvojice vzorků DNA z výrobku z každé izolační metody).



Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, Lbc. – *Lactobacillus*

Obrázek 27: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery VIF-HRM a VIR-HRM [52].

Pomocí HRM analýzy bylo možné rozlišit křivky tání PCR produktů jednotlivých pozitivních kontrol. Křivka tání s vrcholem o teplotě tání (T_m) 83,06 °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T, křivka tání s vrcholem $T_m = 85,70$ °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T a křivka tání s vrcholem $T_m = 86,90$ °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T. Dále byly detekovány dva vrcholy odpovídající obsaženým druhům na křivkách tání PCR produktů získaných amplifikací směsí DNA pozitivních kontrol *Lactobacillus rhamnosus* a *L. gasseri* a *Lactobacillus rhamnosus* a *L. fermentum*. Dva vrcholy byly detekovány také na křivkách tání ampliconů získaných amplifikací směsí DNA všech tří pozitivních kontrol a DNA izolované magnetickými nosiči Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox z výrobku – vrchol odpovídající druhu *Lactobacillus rhamnosus* a druhý vrchol nerozlišující druhy *Lactobacillus gasseri* a *L. fermentum*. Všechny amplicony získané ze směsné DNA měly vrcholy na křivkách tání mírně posunutě vůči T_m referenčních pozitivních kontrol. Výsledky HRM analýzy jsou uvedeny na Obrázku 28.



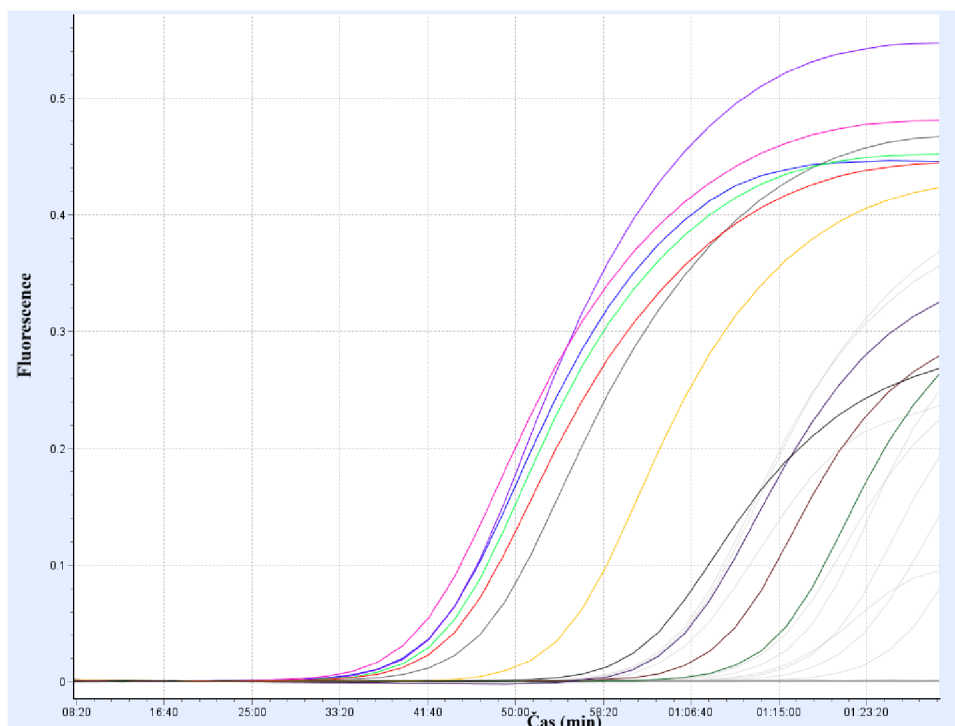
Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, *Lbc.* – *Lactobacillus*

Obrázek 28: HRM analýza produktů PCR po amplifikaci s primery V1F-HRM a V1R-HRM [52].

Pomocí HRM analýzy bylo docíleno odlišení ampliconů z jednotlivých kontrolních bakteriálních druhů *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. PCR produkty ze směsných DNA pozitivních kontrol a z DNA z analyzovaného výrobku (izolované metodou magnetické separace) umožňovaly odlišit DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus*. DNA druhů *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri* vyskytující se ve směsích společně nebyly rozlišeny.

4.3.8.4 PCR-HRM s primery P1V1 a P2V1

Analyzovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR v reálném čase s primery určenými pro rozlišení rozdílných druhů rodu *Lactobacillus* (P1V1 a P2V1 [53]). Výsledky amplifikace jsou znázorněny na Obrázku 29. (Pro přehlednost byl uveden pouze jeden z dvojice vzorků DNA z výrobku z každé izolační metody).

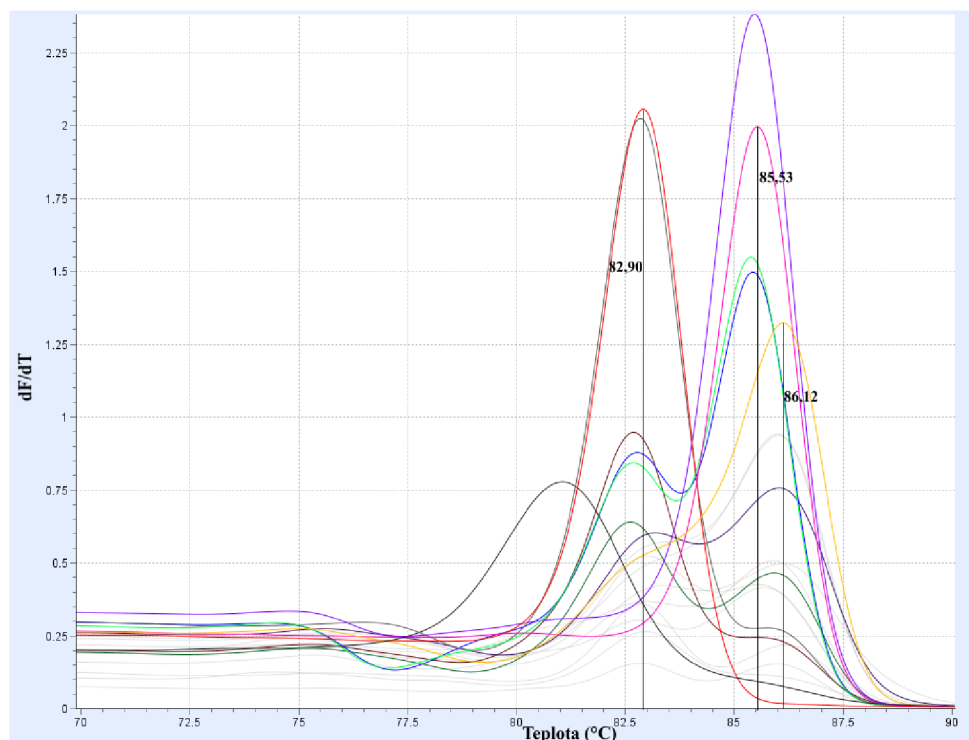


Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.

Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, *Lbc.* – *Lactobacillus*

Obrázek 29: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery P1V1 a P2V1 [53].

Pomocí HRM analýzy bylo možné rozlišit křivky tání PCR produktů jednotlivých pozitivních kontrol. Křivka tání s vrcholem o teplotě tání (T_m) 82,90 °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T, křivka tání s vrcholem $T_m = 85,53$ °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T a křivka tání s vrcholem $T_m = 86,12$ °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T. Dále byly detekovány dva vrcholy odpovídající obsaženým druhům na křivkách tání PCR produktů získaných amplifikací směsí DNA pozitivních kontrol *Lactobacillus rhamnosus* a *L. gasseri* a *Lactobacillus rhamnosus* a *L. fermentum*. Dva vrcholy byly detekovány také na křivkách tání ampliconů získaných amplifikací směsi DNA všech tří pozitivních kontrol a DNA izolované všemi metodami z výrobku – vrchol odpovídající druhu *Lactobacillus rhamnosus* a druhý vrchol nerozlišující druhy *Lactobacillus gasseri* a *L. fermentum*. Všechny produkty PCR získané amplifikací směsné DNA měly vrcholy na křivkách tání mírně posunutě vůči T_m referenčních pozitivních kontrol. Výsledky HRM analýzy jsou uvedeny na Obrázku 30.



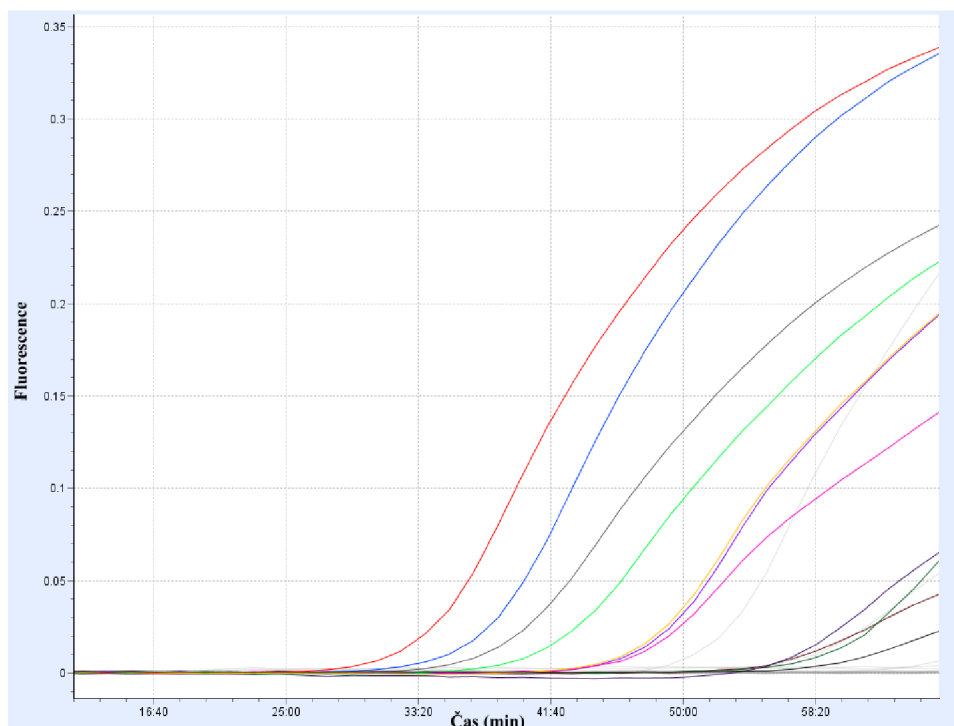
Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, Lbc. – *Lactobacillus*

Obrázek 30: HRM analýza produktů PCR po amplifikaci s primery P1V1 a P2V1 [53].

Pomocí HRM analýzy bylo docíleno odlišení ampliconů z jednotlivých kontrolních bakteriálních druhů *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. V PCR produktech získaných amplifikací směsí DNA pozitivních kontrol a DNA z analyzovaného výrobku byl odlišen druh *Lactobacillus rhamnosus*. DNA druhů *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri* vyskytující se ve směsích společně nebyly rozlišeny.

4.3.8.5 PCR-HRM s primery GroHRM-F a GroHRM-R

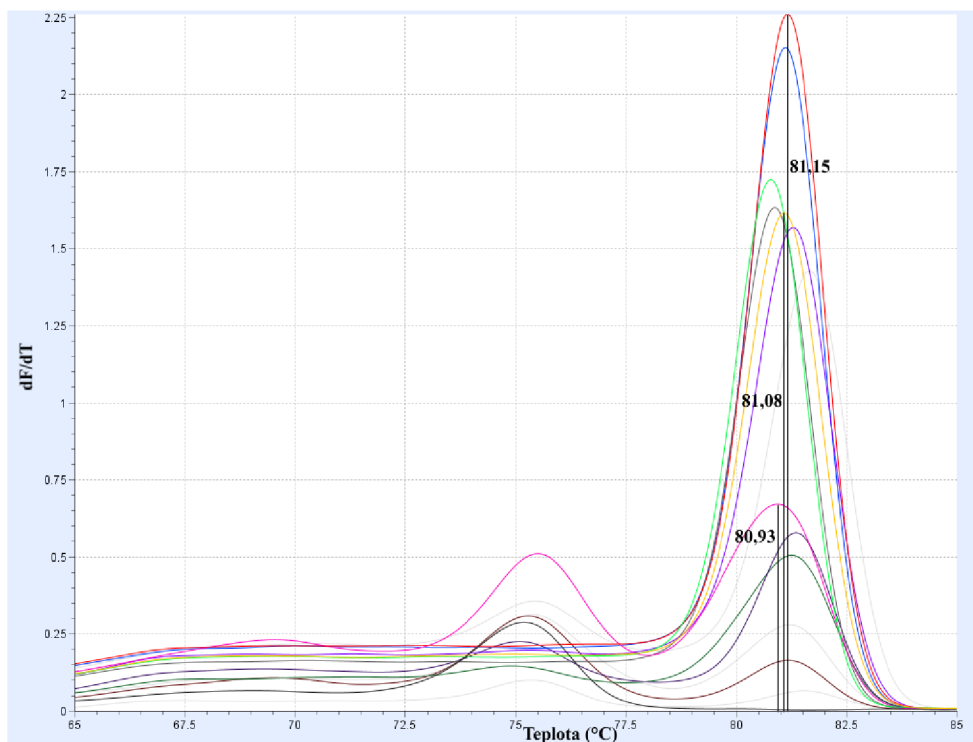
Analyzovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR v reálném čase s primery určenými pro rozlišení rozdílných druhů rodu *Lactobacillus* (GroHRM-F a GroHRM-R [54]). Výsledky amplifikace jsou znázorněny na Obrázku 31. (Pro přehlednost byl uveden pouze jeden z dvojice vzorků DNA z výrobku z každé izolační metody).



Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, Lbc. – *Lactobacillus*

Obrázek 31: Amplifikační křivky PCR v reálném čase s primery GroHRM-F a GroHRM-R [54].

Pomocí HRM analýzy bylo možné rozlišit malé rozdíly hodnot T_m na křivkách tání PCR produktů jednotlivých pozitivních kontrol. Křivka tání s vrcholem o teplotě tání T_m 80,93 °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T, křivka tání s vrcholem T_m = 81,08 °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T a křivka tání s vrcholem T_m = 81,15 °C náležela pozitivní kontrole *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T. Vrcholy, o teplotách tání odpovídajících obsaženým bakteriálním druhům, na křivkách tání PCR produktů získaných po amplifikaci směsné DNA detekovány nebyly (Obrázek 32).



Značení křivek: černá – negativní kontrola, červená – PK *Lbc. rhamnosus*, růžová – PK *Lbc. fermentum*, žlutá – PK *Lbc. gasseri*, modrá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. gasseri*, šedá – směs PK *Lbc. rhamnosus* a *Lbc. fermentum*, fialová – směs PK *Lbc. gasseri* a *Lbc. fermentum*, zelená – směs všech tří PK, hnědá – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol B 100 ox, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči Fkol 135 ox, tmavě fialová – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.
Vysvětlivky: PK – pozitivní kontrola, Lbc. – *Lactobacillus*

Obrázek 32: HRM analýza produktů PCR po amplifikaci s primery GroHRM-F a GroHRM-R [54].

Pomocí HRM analýzy bylo docíleno odlišení ampliconů z jednotlivých kontrolních bakteriálních druhů *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. Bakteriální druhy v ampliconech ze směsných DNA odlišeny nebyly.

4.3.9 Shrnutí výsledků PCR-HRM

K rozlišení bakteriálních druhů *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri* deklarovaných v probiotickém tampónu ellen® byla provedena PCR-HRM s různými sadami primerů. Výsledky dosaženého druhového rozlišení s různými primery pomocí PCR-HRM shrnuje Tabulka 15.

Tabulka 15: Výsledky druhového rozlišení pomocí PCR-HRM.

DNA druhu k rozlišení	Rozlišení dosažené s jednotlivými primery				
	V3-F, V3-R	V6-F, V6-R	V1F-HRM, V1R-HRM	P1V1, P2V1	GroHRM-F, GroHRM-R
PK <i>L. rhamnosus</i>	+	+	+	+	+
PK <i>L. fermentum</i>	+	+	+	+	+
PK <i>L. gasseri</i>	+	+	+	+	+
PK <i>L. rhamnosus</i> + PK <i>L. gasseri</i>	–	–	+	+	–
PK <i>L. rhamnosus</i> + PK <i>L. fermentum</i>	–	–	+	+	–
PK <i>L. gasseri</i> + PK <i>L. fermentum</i>	–	–	–	–	–
Směs PK <i>L. rhamnosus</i> + <i>L. fermentum</i> + <i>L. gasseri</i>	–	–	+	+	–
Směsná DNA <i>L. rhamnosus</i> + <i>L. fermentum</i> + <i>L. gasseri</i> z výrobku	–	–	+	+	–

+ – rozlišen, – – nerozlišen

Z výsledků PCR-HRM vyplývá, že z testovaných primerů dosáhly nejlepšího rozlišení testovaných bakteriálních druhů (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*) primery V1F-HRM, V1R-HRM [52] a P1V1, P2V1 [53].

4.3.10 Srovnání výsledků PCR-HRM vzhledem k optimalizaci metody

Optimalizace jednotlivých programů PCR pro použití různých primerů pro PCR-HRM byla nejprve prováděna na cykleru Rotor-Gene 6000. Byla amplifikována DNA o koncentraci 10 ng/μl ze sbírkových kmenů *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825T, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192T a *Lactobacillus gasseri* CCM 7009T s různými sadami primerů podle příslušných programů (4.2.13). Následně proběhla Melt analýza produktů PCR podle přednastaveného programu (4.2.11). Poté byla provedena stejná amplifikace na přístroji LightCycler® umožňujícím provést HRMA (4.2.13). Výsledky Melt analýzy z kontrolních kmenů byly posléze porovnány s výsledky PCR-HRM.

Výsledky ukázaly, že s použitím jednotného programu pro PCR, ale jiného programu pro analýzu křivek tání (na jiném cykleru), je dosaženo rozdílných výsledků. Pořadí křivek tání (resp. teplot tání) odpovídajících jednotlivým pozitivním kontrolám, se všemi primery, zůstalo zachováno u obou analýz stejně. Hodnota T_m se však lišila, a to nejen s použitím různých primerů (přibližně v rozmezí jednoho stupně), ale i při porovnání jednotlivých T_m s použitím jedné sady primerů (tzn. s použitím stejných primerů byla velikost posunu T_m u každé křivky tání ampliconů jiná).

4.4 Diskuze

4.4.1 Kultivace buněk z výrobků

Použitím dvou typů médií bylo docíleno nakultivování bakterií ze všech výrobků. Tím byla ověřena přítomnost vegetativních forem mikroorganismů, které by měly být v testovaných výrobcích přítomny.

Porovnáním intenzit bakteriálního nárůstu na MRS a MPA lze usuzovat, že semiselektivní živná půda, MRS, je pro kultivaci bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bacillus* vhodnější, a proto byl bakteriální nárůst intenzivnější. Při kultivaci bakterií z výrobku RYOR a ProDentis pravděpodobně došlo k inhibici růstu mikroorganismů některou z pomocných látek obsažených ve výrobcích. U těchto výrobků bylo dosaženo lepší kultivace na univerzální živné půdě, MPA. Vedle výše uvedených bakterií byly zřejmě nakultivovány i další bakterie.

Vzhled (velikost, zbarvení, morfologie) jednotlivých bakteriálních kolonií byl stejný, neumožňoval rozlišit jednotlivé bakteriální druhy.

4.4.2 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

Agarózovou gelovou elektroforézou byla analyzována přítomnost a intaktnost DNA [23] izolované fenolovou extrakcí [55] a pomocí magnetických nosičů [56]. Ve všech vzorcích byla detekována izolovaná DNA (chromosomální DNA, extrachromosomální DNA a RNA), která byla relativně intaktní. V některých vzorcích byla DNA částečně degradovaná, o čemž vypovídaly méně intenzivní, slabě rozmazané pásy v oblasti detekce chromosomální DNA. Nižší stupeň degradace vykazovala DNA izolovaná pomocí magnetických nosičů. Metoda magnetické separace je velmi šetrná ke zpracovávaným vzorkům.

4.4.3 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Spektrofotometricky byla analyzována DNA izolovaná z výrobků. Celková koncentrace nukleových kyselin se pohybovala v rozmezí 47,5–1288,4 ng/μl (stanoveno přístrojem z hodnoty A_{260}) v závislosti na výrobku a metodě izolace. Dle uvedených postupů izolace DNA (body 4.2.5–4.2.7) však nebylo použito ekvivalentní množství hrubých lyzátů buněk (při fenolové extrakci bylo použito 500 μl a při separaci magnetickými nosiči bylo použito 100 μl) a izolovaná DNA nebyla eluována v ekvivalentním množství TE pufru (pro rozpuštění DNA z fenolové extrakce bylo použito 200 μl TE pufru a pro DNA separovanou magnetickými nosiči bylo použito 50 μl TE pufru). Pro porovnání byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA teoreticky přepočítána na objem 100 μl použitých hrubých lyzátů buněk a eluci izolované DNA ve 100 μl TE pufru. Teoreticky přepočítaná koncentrace DNA ve vzorcích se pohybovala v rozmezí hodnot 23,8–515,4 ng/μl. Hodnoty koncentrací izolovaných nukleových kyselin byly ve všech vzorcích dostačující pro potřeby konvenční PCR (bývá používána DNA o koncentraci 10 ng/μl). Pro potřeby PCR v reálném čase a HRM analýzy byla použita DNA vyšší koncentrace (neředěná). Množství DNA potřebné pro jednotlivé druhově specifické PCR a PCR-HRM je třeba dále optimalizovat.

Z výsledků lze usuzovat, že pro zvolené výrobky dosahují vyšší efektivity separace magnetické nosiče Fkol 135 ox v porovnání s nosiči Fkol B 100 ox. Důvodem je zřejmě vyšší koncentrace karboxylových funkčních skupin u nosičů Fkol 135 ox, umožňující adsorpci

většího množství molekul DNA. Toto tvrzení se shoduje se závěry jiných autorů [57]. Dále také obsahují vyšší podíl železa, jakožto magnetické složky, což by mohlo být příčinou účinnější separace v magnetickém poli. Metodou fenolové extrakce bylo dosaženo poměrně vysokých výtěžků nukleových kyselin z výrobků ProDentis a ZAJÍC. Na druhou stranu, z výrobků ellen® a RYOR byly výtěžky nižší ve srovnání s výtěžky pomocí magnetické separace. Tyto výsledky naznačují, že pro každý výrobek může být vhodnější jiná metoda izolace DNA. Roli hrají i probiotika, jejich buněčná stěna může být různě lyzována v použitém lyzačním pufru.

Z výsledků měření absorbancí dále vyplývá, že vzorky obsahovaly určité množství proteinů ($A_{260}/A_{280} < 1,8$). Posouzení podílu absorbancí A_{260}/A_{280} naznačuje, že relativně čistá DNA byla izolována metodou fenolové extrakce. Hodnota $A_{260}/A_{230} < 2,0$ vypovídá o znečištění dalšími látkami. Příkladem takové nízkomolekulární látky může být fenol [55]. Zejména u DNA izolované ze sójového nápoje ZAJÍC byly hodnoty A_{260}/A_{230} výrazně nižší než u DNA izolované z ostatních výrobků. Důvodem by mohla být přítomnost interferujících polyfenolů a polysacharidů obsažených [58] v sójovém výrobku. Uvedené kontaminanty jsou nežádoucí, protože by mohly interferovat v PCR. Avšak obvykle bývá DNA pro potřeby konvenční PCR naředěna (na 10 ng/μl), čímž jsou naředěny i inhibitory PCR.

Z výše uvedeného bylo usouzeno, že byla izolována DNA v koncentraci i čistotě celkově vyhovující konvenční PCR. Pro použití v PCR v reálném čase a HRM analýze by bylo zřejmě vhodné testovat přečištění DNA.

4.4.4 Konvenční PCR a detekce produktů PCR

Pro všechny PCR byla použita DNA izolovaná z testovaných výrobků metodami fenolové extrakce a magnetické separace (s nosiči Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox). DNA byla naředěna na koncentraci 10 ng/μl z důvodu snížení možnosti interference inhibitory PCR. Takto připravená DNA byla amplifikována pomocí specifických PCR s využitím různých primerů. Byla provedena PCR specifická pro doménu *Bacteria* (primery F_eub a R_eub [46]), následně pro rod *Lactobacillus* (primery LbLMA 1 a R 16 [47] a primery F_alllact a R_alllact [46]) a pro rod *Bacillus* (primery B-K1/F a B-K1/R1 [48]). Produkty jednotlivých PCR byly analyzovány agarózovou gelovou elektroforézou v souladu s údaji publikovanými v literatuře [23].

4.4.4.1 Detekce produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria*

Ve všech vzorcích DNA izolované z výrobků byl detekován produkt PCR specifický pro doménu *Bacteria* o velikosti 466 bp, čímž byla prokázána přítomnost bakteriální DNA. Stejným způsobem byla prokázána přítomnost bakteriální DNA i jinými autory [46]. Negativní kontrola nejevila známky kontaminace, byla tedy vyloučena možnost falešně pozitivních výsledků. Pásky jednotlivých produktů PCR se vzájemně lišily svojí intenzitou, což mohla způsobit nestejná koncentrace DNA ve vzorcích (DNA byla ředěna na základě spektrofotometrického stanovení koncentrace, které mohlo být ovlivněno nadhodnocením přítomností RNA), popřípadě přítomnost částečně degradované DNA v některých vzorcích použitých k amplifikaci.

4.4.4.2 Detekce produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus*

Při analýze produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* s primery LbLMa 1 a R 16 byly detekovány pásy o velikosti 250 bp pouze u výrobku ProDentis. U zbylých výrobků nebyla za uvedených podmínek reakce prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*. Důvodem by mohla být nižší citlivost této PCR, která není dostatečná pro amplifikaci DNA z reálných vzorků. V oblasti pod 100 bp byly detekovány tzv. dimery primerů, PCR tedy není dostatečně optimalizovaná.

Při použití primerů F_alllact a R_alllact byl ve všech vzorcích deklarujících přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* detekován specifický produkt PCR o velikosti 92 bp. Tím byla prokázána přítomnost bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* (stejně jako v publikaci [46]). Tyto primery jsou proto vhodnější. Pásy produktů PCR nízké intenzity však splývaly s dimery primerů podobné velikosti. Tvorbě dimerů primerů lze předejít optimalizací PCR.

Negativní kontroly v obou případech vyloučily možnost falešně pozitivních výsledků.

4.4.4.3 Detekce produktů PCR specifických pro rod *Bacillus*

Ve všech výrobcích deklarujících přítomnost bakterií rodu *Bacillus* byl detekován specifický produkt PCR o velikosti 1 095 bp prokazující přítomnost bakteriální DNA rodu *Bacillus*. Stejným způsobem byla prokázána přítomnost DNA rodu *Bacillus* i jinými autory [48]. Negativní kontrola nejevila známky kontaminace. Pozitivní kontrola se amplifikovala za vzniku intenzivního produktu PCR. Pásy jednotlivých produktů PCR se vzájemně lišily svojí intenzitou, což indikuje nestejnou koncentraci DNA v PCR směsích, případně přítomnost částečně degradované DNA.

4.4.5 PCR v reálném čase

Pro druhovou identifikaci byla použita PCR v reálném čase. Všechny druhově specifické PCR byly optimalizovány úpravou PCR programu. Pro lepší detekci a identifikaci PCR produktů byla použita neředěná DNA (koncentrace jednotlivých vzorků DNA uvádí Tabulka 12) o objemu 3 μ l, izolovaná metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů. DNA z výrobků deklarujících konkrétní bakteriální druh byla podrobena amplifikaci pomocí příslušných PCR s využitím specifických primerů. Byla provedena PCR specifická pro druh *Lactobacillus pentosus* (primery pentF a pREV [49]) s DNA z výrobku RYOR, dále pro druh *Lactobacillus rhamnosus* (primery RhamFW a UniverRV [50]), *Lactobacillus fermentum* (primery FermFW a UniverRV [50]) a *Lactobacillus gasseri* (primery GassFW a UniverRV [50]) s DNA z výrobku ellen®. (Identifikace deklarovaných druhů *Lactobacillus reuteri* a *Bacillus coagulans* nebyla možná, protože vhodné primery a pozitivní kontroly k analýze těchto druhů nebyly k dispozici.) Přítomnost specifických produktů PCR byla ověřena Melt analýzou a agarózovou gelovou elektroforézou.

4.4.5.1 PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus pentosus*

Pomocí Melt analýzy byl na křivkách tání produktů PCR, po amplifikaci DNA izolované magnetickými nosiči Fkol 135 ox a u jednoho PCR produktu z DNA izolované nosiči Fkol B 100 ox, detekován vrchol o teplotě tání odpovídající T_m (86,8 °C) amplikonu pozitivní kontroly. Ve stejných vzorcích produktů PCR byl (v intenzitě odpovídající výšce piků)

detekován specifický produkt PCR (218 bp) pomocí agarózové gelové elektroforézy (stejně jako v publikaci [49]). Negativní kontrola nejevila známky kontaminace. Obě metody shodně prokázaly přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus pentosus* ve zmíněných vzorcích DNA izolované z probiotického krému RYOR. Neprokázání specifické DNA v ostatních vzorcích DNA z výrobku mohlo být způsobeno přítomností inhibitorů PCR (vzhledem k tomu, že navýšení objemu matrice výsledky zásadně nezměnilo) nebo přítomností částečně degradované DNA (lze usuzovat z intenzity produktu pozitivní kontroly, která byla vyředěna a měla by obsahovat nižší koncentraci DNA než vzorky DNA z výrobku).

4.4.5.2 PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Po provedení Melt analýzy s produkty PCR byl na křivkách tání produktů PCR po amplifikaci DNA izolované magnetickými nosiči Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox detekován vrchol odpovídající T_m (89,0 °C) amplikonu pozitivní kontroly. Ve stejných vzorcích byl (v intenzitě odpovídající výšce píků) detekován specifický produkt PCR (683 bp) pomocí agarózové gelové elektroforézy (což je v souladu s tvrzením dalších autorů [50]). Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost falešně pozitivních výsledků. Obě metody shodně prokázaly přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* ve vzorcích DNA izolované z probiotického tampónu ellen® magnetickými částicemi. Nedetekování specifického produktu PCR po amplifikaci DNA z výrobku izolované fenolovou extrakcí byla pravděpodobně zapříčiněna přítomností inhibitorů PCR.

4.4.5.3 PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus fermentum*

Kromě optimalizace PCR programu a navýšení DNA matrice byla optimalizována PCR směs přísadkami hořčnatých iontů. Po provedení Melt analýzy s produkty PCR byl na křivce tání amplikonu pozitivní kontroly detekován vrchol o teplotě tání (T_m) 87,8 °C. Vrchol o stejné teplotě tání byl detekován také u produktů PCR po amplifikaci DNA izolované magnetickými nosiči Fkol B 100 ox a Fkol 135 ox. Vrchol křivek tání amplikonů DNA z fenolové extrakce náležel hodnotě T_m rovné 88,4 °C. Posun vrcholu na křivkách tání produktů PCR náležitých DNA izolované fenolovou extrakcí mohl být způsoben rozdílným způsobem izolace DNA či koextrakcí nežádoucích látek. Pomocí agarózové gelové elektroforézy byl po amplifikaci ve všech vzorcích DNA (v intenzitě odpovídající výšce píků) detekován specifický produkt PCR (704 bp) [50]. Negativní kontrola nejevila známky kontaminace. Na základě výsledků obou metod byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus fermentum* v probiotickém tampónu ellen®.

4.4.5.4 PCR v reálném čase specifická pro druh *Lactobacillus gasseri*

Kromě optimalizace PCR programu a navýšení DNA matrice byla optimalizována PCR směs přísadkami hořčnatých iontů. Pomocí Melt analýzy byl na křivkách tání produktů PCR detekován velmi nízký vrchol o teplotě tání odpovídající $T_m = 87,7$ °C amplikonu pozitivní kontroly. Pomocí agarózové gelové elektroforézy byl detekován specifický produkt PCR (574 bp) [50] nízké intenzity. Negativní kontrola nejevila známky kontaminace. Obě metody shodně prokázaly přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus gasseri* ve vzorcích DNA izolované z probiotického tampónu ellen®. Vzhledem k velmi slabé intenzitě specifických

PCR produktů se dá odhadovat, že je obsah bakterií druhu *Lactobacillus gasseri* nižší oproti obsahu dalších bakteriálních druhů ve směsné kultuře probiotického tampónu. Metodu by bylo vhodné nadále optimalizovat.

4.4.6 PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRM)

Všechny PCR byly optimalizovány úpravou PCR programu. Pro amplifikaci dostatečně intenzivních PCR produktů byla použita neředěná DNA (koncentrace jednotlivých vzorků DNA uvádí Tabulka 12) o objemu 3 μ l, izolovaná metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů z probiotického tampónu ellen® deklarující přítomnost směsi bakterií (druhy *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*). Pro odlišení těchto druhů ve výrobku byla DNA amplifikována společně se sérií DNA pozitivních kontrol pomocí PCR v reálném čase. Amplikony byly následně analyzovány pomocí HRM. Byla testována sada 5 různých primerů pro rozlišení přítomných druhů.

4.4.6.1 PCR-HRM s primery V3-F a V3-R, V6-F a V6-R, GroHRM-F a GroHRM-R

Pro odlišení jednotlivých druhů laktobacilů byly použity primery o sekvencích vybraných z hypervariabilní oblasti V3 a V6 (primery V3-F, V3-R a V6-F, V6-R [51]), která je ohraničena vysoce konzervativními sekvencemi bakteriálního genu 16S rDNA. Dále byly použity primery GroHRM-F a GroHRM-R [54] pro amplifikaci krátké hypervariabilní oblasti ohraničené vysoce konzervativními sekvencemi uvnitř *groEL* genu bakterií rodu *Lactobacillus*. Pomocí HRM analýzy produktů PCR získaných po amplifikaci s uvedenými primery bylo docíleno odlišení jednotlivých kontrolních bakteriálních druhů *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. Vrcholy, o teplotách tání odpovídajících obsaženým bakteriálním druhům, na křivkách tání PCR produktů amplifikovaných ze směsné DNA detekovány nebyly. Lze tedy usuzovat, že analýza amplikonů za použití těchto primerů nebyla dostatečně citlivá k rozlišení testovaných bakteriálních druhů ve směsné DNA. Metody je třeba nadále optimalizovat. Srovnání amplikonů po amplifikaci jednotlivých DNA s různými primery (intenzity amplifikovaných produktů byly vždy různé) naznačilo částečnou degradaci testované DNA (zřejmě záleží na míře poškození konkrétního úseku DNA, který je amplifikován).

4.4.6.2 PCR-HRM s primery V1F-HRM, V1R-HRM a P1V1, P2V1

Pro odlišení jednotlivých druhů laktobacilů byly dále použity primery (V1F-HRM, V1R-HRM [52] a P1V1, P2V1 [53]) o sekvencích vybraných z V1 oblasti 16S rDNA genu. Pomocí HRM analýzy produktů PCR bylo docíleno odlišení jednotlivých kontrolních bakteriálních druhů *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. V PCR produktech ze směsi DNA pozitivních kontrol a směsné DNA z výrobku ellen® se podařilo odlišit amplikon z druhu *Lactobacillus rhamnosus*. Amplikony druhů *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri* vyskytující se ve směsi DNA společně nebyly rozlišeny z důvodu blízkých hodnot T_m , kvůli čemuž vrcholy na křivkách tání slynyly v jeden. Všechny amplikony ze směsné DNA měly vrcholy na křivkách tání mírně posunutě vůči T_m referenčních pozitivních kontrol. I přes nerozlišení produktů PCR druhů *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri* vyskytujících se společně, byly tyto primery

vyhodnoceny jako nejvhodnější (ze série testovaných primerů) pro rozlišení uvedených bakteriálních druhů ve směsné DNA.

4.4.7 Srovnání výsledků PCR-HRM s výsledky optimalizace metody

Optimalizace jednotlivých programů PCR pro použití různých primerů pro PCR-HRM byla provedena s DNA ze sbírkových kmenů na cykleru Rotor-Gene 6000. Porovnání výsledků amplifikace stejných kontrolních DNA pomocí PCR-HRM na přístroji LightCycler® ukázalo, že výsledné křivky tání jsou ovlivněny zvoleným programem analýzy křivek tání a závisí i na použitém přístroji (případně i na dostatečné optimalizaci amplifikačního programu). Pro dosažení co nejlepšího rozlišení pomocí PCR-HRM a získání relevantních výsledků je třeba metodu dále optimalizovat (jak uvádí literatura, zaměřit se na jednotnost složení vzorků, zkusit analýzu s DNA o vyšší kvalitě, optimalizovat program PCR-HRM [36, 40]).

5 ZÁVĚR

Pro experimentální část diplomové práce byly vybrány různé druhy méně známých výrobků s probiotiky (probiotický krém RYOR, probiotické tampóny ellen®, orální probiotikum ProDentis a sójový nápoj ZAJÍC s probiotiky). Kultivačně byla ověřena viabilita bakterií obsažených ve výrobcích. Z komplexních matric výrobků byla izolována DNA, která byla následně použita pro identifikaci deklarovaných bakteriálních rodů a druhů pomocí specifických PCR. Ve výrobcích byly prokázány bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bacillus* a po optimalizaci pomocí PCR v reálném čase i bakteriální druhy *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus gasseri*. Získané výsledky byly v souladu s údaji deklarovanými výrobcí. V poslední části práce byla testována možnost rozlišení bakteriálních druhů v probiotickém tampónu ellen® metodou PCR-HRM. Bylo testováno pět sad primerů (V3-F a V3-R, V6-F a V6-R, V1F-HRM a V1R-HRM, P1V1 a P2V1, GroHRM-F a GroHRM-R). Jako nejvhodnější byly vyhodnoceny sady primerů P1V1, P2V1 a V1F-HRM, V1R-HRM. Pro dosažení lepšího rozlišení jednotlivých druhů je třeba metodu PCR-HRM dále optimalizovat.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LEE, Y a S. SALMINEN. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2009. ISBN 978-047-0135-440.
- [2] KECHAGIA, M., D. BASOULIS, S. KONSTANTOPOULOU, D. DIMITRIADI, K. GYFTOPOULOU, N. SKARMOUTSOU a E. M. FAKIRI. Health Benefits of Probiotics: A review. *ISRN Nutrition* [online]. Hindawi Publishing Corporation: 2013 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.5402/2013/481651. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5402/2013/481651>
- [3] ŠPELINA, V. a D. WINKLEROVÁ. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatric pro praxi* [online]. 2009, **10**(4), 247-250 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2009/04/08.pdf>
- [4] SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J.M. SCHMITTER, P. BRESSOLLIER a S. RODRIGUES. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(1), 1-16 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812002319>
- [5] SANDERS, M. E., I. LENOIR-WIJNKOOP, S. SALMINEN, D. J. MERENSTEIN & company. Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2014, **1309**(1), 19-29 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1111/nyas.12377. ISSN 00778923. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.12377>
- [6] NOVÁČKOVÁ, Š.. Nové trendy v probiotikách. *Mlékařské listy* [online]. 2010, **120**, 19-22 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/120_s._19-22.pdf
- [7] VIJAYA KUMAR, B., S. VIJAYENDRA a O. REDDY. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. New Delhi: Springer India, 2015, **52**(10), 6112-6124 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1007/s13197-015-1795-2. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <https://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s13197-015-1795-2>
- [8] GRANATO, D., G. F. BRANCO, F. NAZZARO, A. G. CRUZ a J. A. F FARIA. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. Malden, USA: Blackwell Publishing, 2010, **9**(3), 292-302 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x/full>
- [9] RIVERA-ESPINOZA, Y. a Y. GALLARDO-NAVARRO. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* [online]. 2010, **27**(1), 1-11 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1016/j.fm.2008.06.008. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008001111>
- [10] LUCKOW, T., V. SHEEHAN, G. FITZGERALD a C. DELAHUNTY. Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite* [online]. Elsevier, 2006, **47**(3), 315-323 [cit. 2017-03-11].

- DOI: 10.1016/j.appet.2006.04.006. ISSN 0195-6663. Dostupné z:
<https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.appet.2006.04.006>
- [11] SANNI, A., Ch. FRANZ, U. SCHILLINGER, M. HUCH, C. GUIGAS a W. HOLZAPFEL. Characterization and Technological Properties of Lactic Acid Bacteria in the Production of “Sorghurt,” a Cereal-Based Product. *Food Biotechnology* [online]. Taylor, 2013, **27**(2), 178-198 [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1080/08905436.2013.781949. Dostupné z:
<http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1080/08905436.2013.781949>
- [12] RATHORE, S., I. SALMERÓN a S. S. PANDIELLA. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2012, **30**(1), 239-244 [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1016/j.fm.2011.09.001. Dostupné z:
<http://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.fm.2011.09.001>
- [13] CHAMPAGNE, C.P., J. GREEN-JOHNSON, Y. RAYMOND, J. BARRETTE a N. BUCKLEY. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International* [online]. Elsevier, 2009, **42**(5), 612-621 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.12.018. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.018>
- [14] LIU, D. M., L. LI, X. Q. YANG, S. Z. LIANG, a J. S. WANG. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. *Food Technology and Biotechnology* [online]. 2006, **44**(3), 417-422 [cit. 2017-03-18]. ISSN 1330-9862. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/profile/Dong_Mei_Liu/publication/228879416_Survivability_of_Lactobacillus_rhamnosus_during_the_Preparation_of_Soy_Cheese/links/546080650cf2c1a63bfddd68.pdf
- [15] NAGELBERG, R.. ORAL PROBIOTICS. *Dental Economics* [online]. Tulsa: PennWell Corporation, 2012, **102**(10), 16 [cit. 2017-03-21]. ISSN 00118583. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/1113769620?accountid=17115>
- [16] CHALAS, R., M. JANCZAREK, T. BACHANEK, E. MAZUR, M. CIESZKO-BUK a J. SZYMANSKA. Characteristics of oral probiotics – a review. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* [online]. 2016, **29**(1), 8-10 [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1515/cipms-2016-0002. Dostupné z:
<https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/cipms.2016.29.issue-1/cipms-2016-0002/cipms-2016-0002.pdf>
- [17] LARSSON, P., E. BRANDSBORG, U. FORSUM, S. PENDHARKAR, K. KROGH ANDERSEN, S. NASIC, L. HAMMARSTROM a H. MARCOTTE. Extended antimicrobial treatment of bacterial vaginosis combined with human lactobacilli to find the best treatment and minimize the risk of relapses. *BMC Infectious Diseases* [online]. BioMed Central, 2011, **11**(223) [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1186/1471-2334-11-223. ISSN 1471-2334. Dostupné z: <http://liu.diva-portal.org/smash/get/diva2:450519/FULLTEXT01.pdf?frbrVersion=11>
- [18] Statement of the Polish Gynecological Society Expert Group on the use of ellen probiotic tampon. *Ginekologia polska* [online]. 2012, **83**(8), 633-638 [cit. 2017-03-

- 22]. ISSN 0017-0011. Dostupné z:
https://journals.viamedica.pl/ginekologia_polska/article/view/46160/32949
- [19] DI MARZIO, L., B. CINQUE, C. DE SIMONE a M. G. CIFONE. Effect of the Lactic Acid Bacterium *Streptococcus thermophilus* on Ceramide Levels in Human Keratinocytes *In Vitro* and Stratum Corneum *In Vivo*. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. Elsevier, 1999, **113**(1), 98-106 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1999.00633.x. ISSN 0022-202X. Dostupné z:
[http://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)40540-8/fulltext](http://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)40540-8/fulltext)
- [20] PERAL, M. C., M. A. HUAMAN MARTINEZ a J. C. VALDEZ. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *International Wound Journal* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2009, **6**(1), 73-81 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2008.00577.x. ISSN 1742-4801. Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1111/j.1742-481X.2008.00577.x/full>
- [21] PERAL, M. C., M. M. RACHID, N. M. GOBBATO, M. A. HUAMAN MARTINEZ a J. C. VALDEZ. Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum*. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2010, **16**(3), 281-286 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02793.x. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02793.x>
- [22] JUSTÉ, A., B.P.H.J. THOMMA a B. LIEVENS. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2008, **25**(6), 745-761 [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.1016/j.fm.2008.04.009. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0740002008000786>
- [23] ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [24] ŠMARDA, J., J. DOŠKAŘ, R. PANTŮČEK, V. RŮŽIČKOVÁ a J. KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [25] KRÁLOVÁ, B., L. FUKAL, P. RAUCH a T. RUMML. *Bioanalytické metody*. 3. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [26] *iGEM 2007 Wiki: International Genetically Engineered Machine Competition* [online]. 2007 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://2007.igem.org/wiki/index.php/McGill/PCR>
- [27] RUMML, T., M. RUMLOVÁ a V. PAČES. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [28] 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 0862-495X.

- [29] SIBLEY, C. D., G. PEIRANO a D. L. CHURCH. *Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology*. Infection, Genetics and Evolution. 2012, **12**(3), 505-521. ISSN 15671348.
- [30] TRACHTOVÁ, Š. *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – úloha č. 4*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ZS 2014–2015.
- [31] RIRIE, K. M., R. P. RASMUSSEM, C. T. WITWER. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* [online]. Elsevier, 1997, **245**(2), 154-160 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1006/abio.1996.9916. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S000326979699169>
- [32] PORCELLATO, D., H.M. ØSTLIE, K.H. LILAND, K. RUDI, T. ISAKSSON a S.B. SKEIE. Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in Norwegian cheese by high-resolution melt analysis. *Journal of Dairy Science* [online]. Elsevier, 2012, **95**(9), 4804-4812 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.3168/jds.2012-5386. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212004948>
- [33] SIGMA-ALDRICH CO. qPCR Technical Guide. In: *Sigma-Aldrich®* [online]. 2008 [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr.html>
- [34] BLATNÝ, R.. Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) jako nástroj moderní diagnostiky. In: *XV celostátní konference DNA diagnostiky, Praha, 24.–25. listopadu 2011* [online]. 2011 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://dna2011.slg.cz/abstrakta/99>
- [35] TESAŘOVÁ Z., D. ŠÍDOVÁ, A. VRÁBLÍK, J. HODEK a J. OVESNÁ. *Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost RoundUp Ready sóji*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2013. ISBN 978-80-7427-134-2.
- [36] MARTINI, M., S. MORUZZI, P. ERMACORA, N. LOI a G. FIRRAO. Quantitative real-time PCR and high-resolution melting (HRM) analysis for strain-specific monitoring of fluorescent pseudomonads used as biocontrol agents against soil-borne pathogens of food crops. *Trends in Food Science & Technology* [online]. Elsevier, 2015, **46**(2), 277–285 [cit. 2017-04-19]. DOI:10.1016/j.tifs.2015.10.017. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0924224415002411>
- [37] HJELMSØ, M. H., L. H. HANSEN, J. BÆLUM, L. FELD, W. E. HOLBEN a C. S. JACOBSEN. High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, **80**(12), 3568–3575 [cit. 2017-04-19]. DOI:10.1128/AEM.03923-13. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4054126/>
- [38] LIN, X. B. a M. G. GÄNZLE. Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, **186**, 42-48 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.010. Dostupné z: <https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.010>

- [39] DRUML, B. a M. CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2014, **158**, 245-254 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.111. Dostupné z: <https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>
- [40] ERALI, M. a C. T. WITTEWER. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* [online]. 2010, **50**(4), 250-261 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.013. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1046202310000289>
- [41] CHAKRAVORTY, S., D. HELB, M. BURDAY, N. CONNELL a D. ALLAND. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* [online]. Elsevier, 2007, **69**(2), 330-339 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.02.005. Dostupné z: <https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- [42] LOGAN, J., K. EDWARDS a N. SAUNDERS. *Real-time PCR: Current Technology and Applications*. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2009. 284 s. ISBN: 978-1-904455-39-4.
- [43] LEES M.. *Food Authenticity and Traceability*. Woodhead: CRC Press, 2003. 612 s. ISBN: 0849317630.
- [44] IWOBI, A., I. HUBER a U. BUSCH. *The Application of PCR-Based Methods in Food Control Agencies-A Review* [online]. INTECH Open Access Publisher, 2012 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.5772/38658. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/polymerase-chain-reaction/the-application-of-pcr-based-methods-in-food-control-agencies-a-review>
- [45] TONG, S. Y. C. a P. M. GIFFARD. Microbiological applications of highresolution melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2012, **50**(11), 3418–3421 [cit. 2017-04-24]. DOI:10.1128/JCM.01709-12. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486245/>
- [46] HERBEL, S. R., B. LAUZAT, M. NICKISCH-ROSENEGK, M. KUHN, J. MURUGAIYAN, L. H. WIELER a S. GUENTHER. Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2013, **115**(6), 1402-1410 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1111/jam.12341. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1111/jam.12341/full>
- [47] DUBERNET S., N. DESMASURES a M. GUÉGUEN. A PCR-based method for identification of Lactobacillus at the genus level. *FEMS Microbiology Letters* [online]. Elsevier, 2002, **214**(2), 271-275 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/S0378-1097(02)00895-9. Dostupné z: [https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/S0378-1097\(02\)00895-9](https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/S0378-1097(02)00895-9)
- [48] WU, X., M. J. WALKER, M. HORNITZKY a J. CHIN. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods* [online]. Elsevier, 2006, **64**(1), 107-119 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.04.021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.021>

- [49] GHOTBI, M., S. SOLEIMANIAN-ZAD a M SHEIKH-ZEINODDIN. Identification of *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus plantarum* in Lighvan cheese with 4 month ripening period by means of recA gene sequence analysis. *African Journal of Biotechnology* [online]. Victoria Island: Academic Journals, 2011, **10**(10), 1902-1906 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.5897/AJB10.447.
- [50] GRILLOVÁ, L. Vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2012. Vedoucí diplomové práce Alena Španová.
- [51] CHAUHAN, K., R. DHAKAL, R. B. SEALE, H. C. DEETH, Ch. J. PILLIDGE, I. B. POWELL, H. CRAVEN a M. S. 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]. Elsevier, 2013, **165**(2), 175-183 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.007. Dostupné z: <https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.007>
- [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. 2017-04-10]. DOI: 10.1111/jam.12599. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1111/jam.12599/full>
- [53] ROY, D. a S. 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]. Elsevier, 2000, **191**(1), 17-24 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/S0378-1097(00)00364-5. Dostupné z: [https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/S0378-1097\(00\)00364-5](https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/S0378-1097(00)00364-5)
- [54] KOIRALA, R., V. TAVERNITI, S. BALZARETTI, G. RICCI, M. G. FORTINA a S. GUGLIELMETTI. Melting curve analysis of a *groEL* PCR fragment for the rapid genotyping of strains belonging to the *Lactobacillus casei* group of species. *Microbiological Research* [online]. Elsevier, 2015, **173**, 50-58 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.micres.2015.01.001. ISSN 0944-5013. Dostupné z: <https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.micres.2015.01.001>
- [55] SAMBROOK, J. a D. W. RUSSELL. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 235 p. ISBN 978-087969577-4.
- [56] RITTICH, B., A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ a A. RYBNIKÁŘ. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerferences* [online]. Elsevier, 2006, **52**(2), 143-148 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.04.012. Dostupné z: <https://doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.colsurfb.2006.04.012>
- [57] TRACHTOVÁ, Š. *Studium reversibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 138 s. Vedoucí dizertační práce Doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

- [58] POREBSKI, S., L. G. BAILEY a B. R. BAUM. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. 1997, **15**(1), 8-15 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1007/BF02772108. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772108>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp – pár bází

CCM – Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)

D_n – počet částic průměrné velikosti

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfát

D_w – hmotnost částic průměrné velikosti

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová

FAO – Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organisation)

HRM/HRMA – vysokorozlišovací analýza křivek tání (High resolution melting analysis)

MPA – masopeptonový agar

MRS – médium de Mann, Rogosa, Sharpe

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

PDI – index polydisperzity

PEG – polyetylen glykol

PGMA – polyglycidyl methakrylát

PMA – propidium monoazid

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

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

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecyl sulfát sodný

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

TE pufr – Tris-EDTA pufr

UV – ultrafialové světlo

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)