

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IDENTIFIKACE VYBRANÝCH DRUHŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ
V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

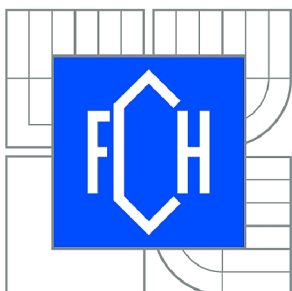
Bc. RŮŽENA VYSTAVĚLOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IDENTIFIKACE VYBRANÝCH DRUHŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

IDENTIFICATION OF SELECTED SPECIES OF LACTIC ACID BACTERIA IN DAIRY PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. RŮŽENA VYSTAVĚLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0612/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Růžena Vystavělová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	

Název diplomové práce:

Identifikace vybraných druhů bakterií mléčného kvašení v mléčných výrobcích

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

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

Bc. Růžena Vystavělová
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakterie mléčného kvašení jsou přirozenou součástí gastrointestinálního traktu člověka. Pro své probiotické účinky jsou často používány do doplňků stravy a pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků. Diplomová práce byla zaměřena na identifikaci vybraných druhů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií v sýrech a mléčných výrobcích. Bakteriální DNA byla izolována pomocí magnetických částic P(HEMA-*co*-GMA) z hrubých lyzátů buněk 9 výrobků. Izolovaná DNA byla amplifikována pomocí rodově a druhově specifické polymerázové řetězové reakce (PCR). Získané amplikony byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou. Výsledky PCR byly porovnány s údaji uvedenými výrobcem a byla konstatována shoda.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are natural part of the human gastrointestinal tract. They are often used in food supplements and for the production of fermented dairy products. This thesis focuses on the identification of selected species of lactic acid bacteria and bifidobacteria in cheese and dairy products. Bacterial DNA was isolated by magnetic particles P (HEMA-*co*-GMA) from crude cell lysates from 9 products. Isolated DNA was amplified in genus-specific and species-specific polymerase chain reactions (PCR). The obtained amplicons were detected by agarose gel electrophoresis. The results of PCR were compared with those provided by the manufacturers and there has been declared a match.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mléčné výrobky, bakterie mléčného kvašení, izolace DNA, magnetické částice, PCR

KEYWORDS

Dairy products, lactic acid bacteria, DNA isolation, magnetic particles, PCR

VYSTAVĚLOVÁ, Růžena. *Identifikace vybraných druhů bakterií mléčného kvašení v mléčných výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 60 s.
Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za cenné rady a odborný dohled při vypracování diplomové práce a paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za čas a odborné rady.

Mé poděkování patří též kolegyním z laboratoře na doktorském studiu, a to zejména Mgr. Kristýně Turkové a Ing. Zuzaně Bittnerové za jejich rady a podporu.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Bakterie mléčného kvašení.....	10
2.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	10
2.2.1 Taxonomie rodu <i>Lactobacillus</i>	11
2.2.2 Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	12
2.3 Rod <i>Bifidobacterium</i>	12
2.3.1 Taxonomie rodu <i>Bifidobacterium</i>	13
2.4 Rod <i>Lactococcus</i>	13
2.4.1 Taxonomie rodu <i>Lactococcus</i>	13
2.4.2 Druh <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	14
2.5 Probiotika	14
2.6 Prebiotika, synbiotika	16
2.7 Magnetické částice.....	17
2.8 Identifikace bakterií pomocí PCR	18
2.8.1 Požadavky kladené na primery	20
2.8.2 Termostabilní DNA polymerasa	20
2.8.3 Termocykler.....	20
2.8.4 Průběh PCR	21
2.8.5 Inhibitory PCR.....	22
2.8.5.1 Inhibitory v mléku.....	23
2.8.6 Detekce produktu PCR.....	23
3 CÍL PRÁCE	25
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1 Materiál, zařízení a metody	26
4.1.1 Bakteriální kmeny	26
4.1.2 Komplexní matrice – mléčné výrobky	26
4.1.3 Chemikálie.....	27
4.1.4 Magnetické částice pro izolaci DNA	28
4.1.5 Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA	28
4.1.6 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu	29
4.1.7 Komponenty pro PCR.....	30

4.1.7.1	Komponenty PCR	30
4.1.7.2	Oligonukleotidové primery pro jednotlivé PCR.....	30
4.2	Přístroje a pomůcky	31
4.3	Použité metody	31
4.3.1	Příprava hrubých lyzátů buněk z tekutých mléčných výrobků [41]	31
4.3.2	Příprava hrubých lyzátů buněk z 1,5 ml filtrátu vzorků sýrů [36].....	32
4.3.3	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetického nosiče [39]	32
4.3.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	33
4.3.5	Doménově, rodově a druhově specifická PCR s izolovanou DNA jako DNA matricí	33
4.3.5.1	Programy pro PCR	36
4.3.6	Detekce rodově a druhově specifických produktů PCR agarosovou gelovou elektroforézou.....	37
4.3.7	DNA standard	38
5	VÝSLEDKY	39
5.1	Zpracování vzorků výrobků a příprava hrubých lyzátů buněk výrobků	39
5.2	Izolace DNA.....	39
5.3	Doménově specifická PCR.....	40
5.4	Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	41
5.4.1	Optimalizace pro rodově specifickou PCR <i>Lactobacillus</i>	42
5.5	Rodově specifická PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i>	44
5.6	Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	45
5.7	Druhově specifická PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	46
5.8	Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	47
5.9	Shrnutí výsledků průkazu bakteriální DNA ve výrobcích s využitím PCR.....	49
5.9.1	Mléčné výrobky tekuté.....	49
5.9.2	Sýry	49
5.10	Srovnání výsledků získaných amplifikací DNA a údajů deklarovaných výrobcem	49
5.10.1	Mléčné výrobky tekuté.....	50
5.10.2	Sýry	50
6	DISKUZE.....	51
6.1	Izolace DNA z výrobků, stanovení koncentrace	51
6.2	Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	51
6.3	Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	51

6.3.1 Optimalizace polymerázové řetězové reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	51
6.3.2 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	52
6.4 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro rod <i>Bifidobacterium</i>	52
6.4.1 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	52
6.5 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro druh <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	52
6.6 Srovnání výsledků získaných amplifikací DNA a údajů deklarovaných výrobcem	53
7 ZÁVĚR	54
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	60

1 ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení (BMK), tak jak je známe z potravinářského průmyslu, jsou známy již tisíce let. V posledních desetiletích je velká pozornost zaměřena na pozitivní účinky mikroorganismů na lidské zdraví. Probiotické BMK se vyznačují celou řadou prospěšných vlastností. Svým působením na organismus mohou chránit před patogenními bakteriemi, ale také mohou působit proti vzniku rakoviny.

Cílem práce je identifikovat vybrané druhy bakterií mléčného kvašení pomocí amplifikačních metod ve vybraných mléčných výrobcích a porovnat přítomnost detegovaných bakterií s deklarovanými, které jsou uvedeny výrobcem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

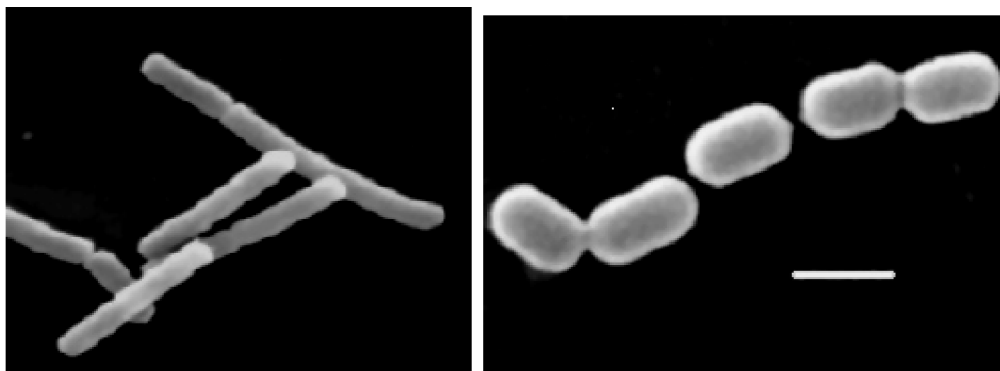
2.1 Bakterie mléčného kvašení

Termínem bakterie mléčného kvašení se neoznačuje fylogenetická skupina bakterií, ale pouze skupina bakterií, které mají podobné metabolické vlastnosti [1]. Mezi rody bakterií mléčného kvašení jsou zahrnovány *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. K této skupině jsou často řazeny i rody *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Scardovia* a *Parascardovia* a to na základě podobných biochemických a fyziologických vlastností, ačkoliv fylogeneticky patří do kmene *Actinobacteria* [2].

Bakterie mléčného kvašení jsou bakterie, které enzymaticky přeměňují sacharidy na kyselinu mléčnou (a současně další produkty, jako je kyselina máselná, kyselina octová, ethanol, oxid uhličitý aj.). Vyskytují se nejen v produktech potravinářského průmyslu, jako jsou mléko a mléčné výrobky, maso, pivo, víno, kysané zelí, siláž, kynuté těsto, ale i volně v přírodě (např. ovoce, odpadní vody) [3]. Z potravinářského hlediska má tato skupina nezanedbatelný význam [1].

2.2 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou gram-pozitivní tyčky, někdy kokotyčky tvořící řetězky, někdy palisády (Obr. 1). Jsou nesporelující, zřídka pohyblivé, kataláza negativní, fakultativně anaerobní či mikroaerofilní a někteří zástupci vyžadují při izolaci anaerobní podmínky. Rostou na bohatých komplexních médiích, přičemž 5 % CO₂ podporuje jejich růst [4].



Lactobacillus acidophilus NCFM *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323

Obr. 1: Morfologie buněk 2 druhů bakterií rodu *Lactobacillus* [5].

2.2.1 Taxonomie rodu *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* se řadí takto:

doména: *Bacteria*

kmen: *Firmicutes*

třída: *Bacilli*

řád: *Lactobacillales*

čeleď: *Lactobacillaceae*

Na taxonomii rodu *Lactobacillus* lze pohlížet z různých hledisek. Rod *Lactobacillus* můžeme rozdělit do tří skupin podle produktů fermentace [4]:

obligátně homofermentativní

obligátně heterofermentativní

fakultativně heterofermentativní

U obligátně homofermentativních bakterií dochází k přeměně sacharidů (hexos) téměř výlučně na kyselinu mléčnou (> 90 %).

U obligátně heterofermentativních bakterií je produktem kyselina mléčná (> 50 %), ale také kyselina octová, oxid uhličitý a za určitých okolností i ethanol.

Fakultativně heterofermentativní bakterie fermentují hexosu na kyselinu mléčnou jako homofermentativní bakterie, ale při nedostatku hexos fermentují další sacharidy za vzniku kyseliny mléčné, ale i kyseliny octové, oxidu uhličitého a ethanolu [6].

Hlavním produktem fermentace cukrů je kyselina mléčná. Laktobacily jsou schopné adaptace na různé podmínky a podle toho také mění svůj metabolismus, což může vést k významným rozdílům ve složení konečných produktů fermentace [2].

Vývoj a aplikace pokročilých molekulárně-biologických technik přinesl nový pohled na taxonomii rodu *Lactobacillus*, který je považován za nejvíce heterogenní mezi bakteriemi mléčného kvašení, s obsahem G+C v rozmezí 33–55 % [7]. V posledních letech stoupá počet popsáných druhů rodu *Lactobacillus* – v roce 2003 to bylo 88 druhů a 15 poddruhů, v roce 2005 již 125 druhů a 27 poddruhů [8].

V rodu *Lactobacillus* bylo popsáno více než 125 druhů, ale jen některé z nich jsou považovány za probiotické. Mezi probiotika jsou v současné době řazeny zejména tyto druhy rodu *Lactobacillus*:

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus brevis*

- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus johnsoni*
- *Lactobacillus lactis*
- *Lactobacillus paracasei*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus rhamnosus*
- *Lactobacillus salivarius*

Z vyjmenovaných laktobacilů jsou pro komerční využití nejdůležitější jen některé kmeny [9].

2.2.2 Druh *Lactobacillus acidophilus*

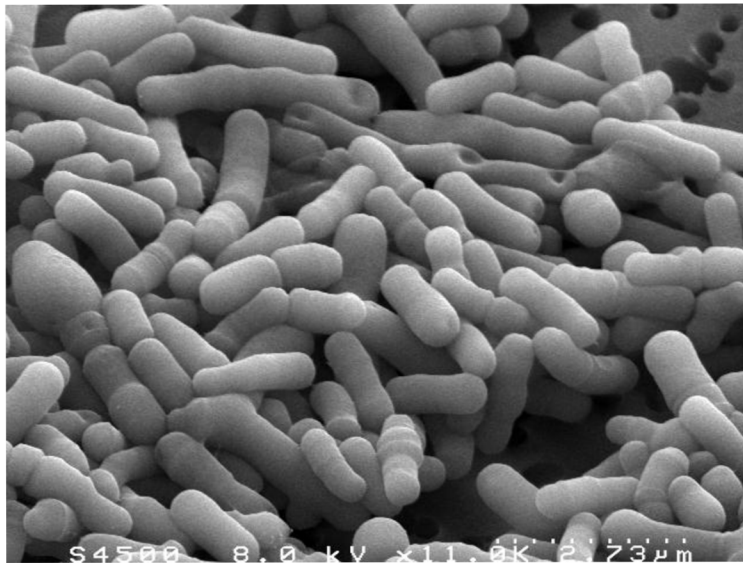
Tvoří tyčinky velikosti 0,5 až 1×10 μm, vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích anebo v krátkých řetězcích. Jsou obligátně homofermentativní. Produkuje velké množství kyseliny mléčné, která má prvořadý význam při srážení kaseinu. Nachází se v zaživacím traktu mladých i dospělých savců, kde příznivě ovlivňuje střevní mikroflóru. Působí silně antagonisticky proti hnilobným mikroorganismům. Využívá se i v průmyslovém měřítku na výrobu acidofilního mléka pro lidskou spotřebu a výrobu sušeného acidofilního mléka pro krmné účely. Acidofilní mléko a farmaceutické preparáty s obsahem tohoto mikroorganismu se používá na obnovení normálního složení střevní mikroflóry po aplikaci antibiotik v léčbě [3,6].

2.3 Rod *Bifidobacterium*

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou gram-pozitivní. Buňky jsou velmi pleomorfní (od kokovitých tvarů přes kyjovité útvary až k dlouhým větveným tyčinkám) [10]. Jsou nepohyblivé, nesporulující, kataláza negativní, obligátně anaerobní. Některé druhy tolerují přítomnost kyslíku v prostředí, ale jen za přítomnosti CO₂ [6]. Aktivně fermentují řadu cukrů za produkce převážně kyseliny octové a mléčné v molárním poměru 3:2. Netvoří CO₂ ani kyselinu máselnou nebo propionovou [4].

Nacházejí se v ústech a ve střevním traktu teplokrevných obratlovců včetně člověka, u hmyzu a v odpadních vodách. Bifidobakterie jsou prospěšnou součástí střevní flóry (u kojenců představují až 90 %), kde pomáhají udržovat rovnováhu a znesnadňují jiným patogenním mikroorganismům pomnožení ve střevech. Navíc jsou tyto bakterie vybaveny mechanismy, kterými detoxikují škodlivé složky tráveniny. Používají se v probiotických díky příznivému vlivu na zdraví konzumenta [11,12].

Morfologie buněk druhu *Bifidobacterium animalis* je na Obr. 2.



Obr. 2: Morfologie buněk druhu *Bifidobacterium animalis* [13].

2.3.1 Taxonomie rodu *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* se řadí takto:

doména: *Bacteria*

kmen: *Actinobacteria*

třída: *Actinobacteria*

řád: *Bifidobacteriales*

čeleď: *Bifidobacteriaceae*

2.4 Rod *Lactococcus*

Bakterie rodu *Lactococcus* jsou gram-pozitivní, netvoří spory, nepohyblivé a bez pouzder. Jsou fakultativně anaerobní, buňky jsou sférické nebo ovoidní, vyskytují se po dvou nebo v krátkých řetězcích. Kataláza negativní, fermentují množství cukrů a hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná bez tvorby plynu. Vyskytuje se převážně na rostlinném materiálu a v potravinách, v mléčných výrobcích slouží jako součást startovacích kultur [4].

2.4.1 Taxonomie rodu *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* se řadí takto:

doména: *Bacteria*

kmen: *Firmicutes*

třída: *Bacilli*

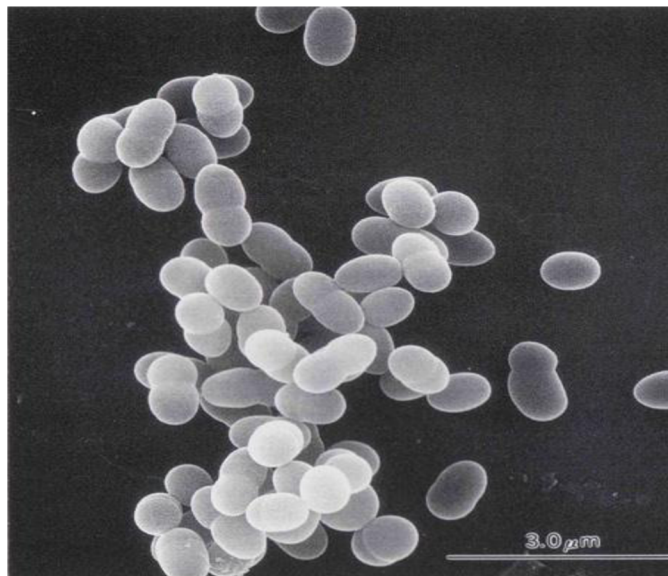
řád: *Lactobacillales*

čeleď: *Streptococcaceae*

2.4.2 Druh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Lactococcus lactis ssp. *lactis* – dříve se nazýval *Streptococcus lactis*. V mlékářství je to snad nejrozšířenější mikroorganismus. V čerstvém, za hygienických podmínek nadojeném, ochlazeném mléce se velmi dobře rozmnožuje až způsobuje kysnutí. Je neodmyslitelnou součástí používaných „čistých mlékařských kultur“ na výrobu některých zakysaných mlék, zakysaných smetan a na výrobu všech druhů sýrů. Používá se jako samostatná kultura anebo spolu s jinou specifickou kulturou mikroorganismů.

Buňky mají vejcovitý tvar o průměru 0,5 až 1,0 μm . Jsou většinou v párech nebo v krátkých řetězcích. V mléku tvoří 0,8 až 0,9 % kyseliny mléčné [6].



Obr. 3: Morfologie buněk druhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* [14].

2.5 Probiotika

Označení „probiotický“ pochází z řečtiny, volně přeloženo „pro život“ a je protikladem označení antibiotický [6]. Probiotika se původně definovaly jako živé nepatogenní mikroorganismy, které po osídlení trávicího traktu působí prospěšně na zdraví hostitele. Současná definice je širší: Probiotika jsou látky nebo produkty obsahující v dostatečném množství životaschopné mikroorganismy, které po implantaci nebo kolonizaci změni mikroflóru v určitém anatomickém místě hostitele, což se projevuje zdravotně prospěšnými účinky. Probiotické působení probiotických mikroorganismů není omezeno jen na trávicí trakt [15].

Probiotika se vyznačují celou řadou zdraví prospěšných vlastností. Mohou chránit hostitelský organismus před patogenními bakteriemi, také mohou působit proti vzniku rakoviny. Zmírňují průběh řady průjmových onemocnění a zácpy. Používají se také jako prevence těchto onemocnění [16]. Kromě toho probiotika produkují látky prospěšné pro hostitele jako thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxin, folacin nebo vitamín B₁₂ [17].

Když se působení probiotik váže na oblast zažívacího traktu, zejména tlustého střeva, musí být neporušené bakterie transportovány na místo určení [18]. Je rovněž nutné, aby měly dobré technologické vlastnosti, které umožní jejich použití v potravinářských výrobcích bez ztráty životaschopnosti a funkčnosti. Nesmí vytvářet nepříjemné příchutě nebo texturu [19]. Podávají se zásadně v živém stavu. Příprava výrobků s probiotickými vlastnostmi musí probíhat takovým způsobem, aby nedošlo k zániku životaschopnosti kultur a aby množství mikroorganismů bylo dostatečné [18]. Je pravděpodobné, že způsob účinku probiotických kmenů je multifaktoriální.

Výběr probiotických mikroorganismů probíhá podle stanovených kritérií. Posuzuje se jejich bezpečnost společně s fyziologickými a technologickými aspekty. Žádanými vlastnostmi probiotických kmenů jsou [20]:

- lidský původ;
- stabilita ve žluči a kyselém prostředí;
- adheze na buňky lidského zažívacího systému a schopnost jeho kolonizace;
- produkce antimikrobiálních látek;
- antagonismus k patogenním mikroorganismům;
- bezpečnost;
- klinicky potvrzený a zdokumentovaný vliv na zdraví;
- dobré technologické vlastnosti (odolnost a stabilita během skladování a zpracování výrobku).

Probiotické mléčné výrobky zaznamenaly v posledních letech v mlékárenství značný rozmach. Nejvýznamnější probiotickou potravinou je spolu s acidofilním mlékem jogurt. Jogurt je mléčný výrobek, který se vyrábí působením BMK v mléce po dobu 4–8 hodin při teplotě asi 40 °C [21]. Při výrobě jogurtů nebo jogurtových nápojů se využívají bakterie druhu *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, které mají symbiotický vztah a spolu se vyznačují rychlou tvorbou kyseliny mléčné. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* vzhledem ke své vysoké proteolytické aktivitě stimuluje růst *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, který má jen malou schopnost hydrolyzovat

bílkoviny. *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* tvorbou kyseliny mravenčí naopak stimuluje metabolismus *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [6].

Mezi potraviny s nezanedbatelným obsahem probiotických kultur patří dále vysokodohřívané tvrdé sýry, mléčným kysáním konzervovaná zelenina (kysané zelí, rychlokvašené okurky) a ušlechtilé suché salámy. Naopak méně výhodné z hlediska obsahu probiotických kultur jsou termizované dezerty a tavené sýry. Je nutné, aby potravina obsahovala dostatečné množství probiotických kultur. Některé potraviny obsahují minimální, zákonem stanovený počet probiotik, jiné jich obsahují několikanásobně více. Takové potraviny mívají obvykle kratší dobu trvanlivosti a je potřeba uchovávat je v chladu [22]. V probiotických produktech, např. v jogurtech nebo v acidofilním mléce, mají být k datu trvanlivosti anebo při dřívější spotřebě přítomné v koncentraci více jak 10^6 KTJ/ml. Jen v této vyšší koncentraci mají ve střevě požadovaný zdraví prospěšný účinek [6]. K nejčastěji používaným probiotickým bakteriím patří např. *Lactobacillus acidophilus* LA5, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* DN114-001, *Lactobacillus paracasei* St11, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53013 známý jako *Lactobacillus rhamnosus* „GG“, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus plantarum* 299V, *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB-12, *Bifidobacterium longum* BB 536, *Bifidobacterium breve* Yakult [23].

Množství probiotických bakterií ve fermentovaném výrobku ovlivňuje zejména:

- kombinace probiotických kmenů a tradičních kysaných kultur;
- složení fermentačního média a výše tepelného záhřevu mléka;
- množství rozpuštěného kyslíku (bifidobakterie jsou obligátně anaerobní a laktobacily mikroaerofilní);
- velikost inokula. Protože probiotické bakterie často rostou v mléce špatně, používá se pro jejich zaočkování vyšší inokulum 5–10 %. U tradičních kultur je obvyklé 1 %;
- inkubační teplota. Vzhledem k jejich intestinálnímu původu je 37 °C;
- vysoká kyselost a akumulace D(-)kyseliny mléčné. U překysaných produktů výrazně snižuje životaschopnost přítomných laktobacilů a bifidobakterií [23].

2.6 Prebiotika, synbiotika

V lidském gastrointestinálním traktu (GIT) se nachází komplexní mikrobiální ekosystém, v němž se může vyskytovat až několik set bakteriálních druhů. Zvláště silně je osídleno tlusté střevo (colon), kde se může vyskytovat více než 10^{11} bakterií v 1 g střevního obsahu. Tyto mikroorganismy a jejich aktivity mohou ovlivňovat pozitivním i negativním způsobem

zdravotní stav člověka. Udržování optimální rovnováhy mikroflóry trávicího traktu s převahou pozitivně působících bakterií je důležité pro udržování dobrého zdravotního stavu. Existují dva přístupy ke zvýšení počtu mikroorganismů pozitivně působících na organismus člověka v GIT. Prvním je příjem dostatečného množství probioticky aktivních bakterií.

Protože jsou tyto bakterie přirozenou součástí střevní mikroflóry, je druhou možností, jak zvýšit jejich počet, přísun selektivního zdroje uhlíku a energie podporujícího množení probiotických mikroorganismů. Tuto funkci zastávají přídavné látky, jako jsou laktulosa, laktitol a různé oligosacharidy. Gibson zavedl pro tyto látky pojem prebiotika a definoval je jako nestravitelné potravní doplňky, které pozitivně ovlivňují hostitele selektivní stimulací růstu a/nebo aktivity jednoho omezeného počtu bakterií v tlustém střevě tak, že zlepšují zdraví člověka

Prebiotický účinek byl testován u sacharidů se stupněm polymerizace 3–70. Nejčastěji používanými prebiotiky v průmyslovém měřítku jsou oligosacharidy, např. fruktooligosacharidy inulinového typu, glukooligosacharidy, xylooligosacharidy, galaktooligosacharidy, transgalaktooligosacharidy, isomaltooligosacharidy.

Prebiotika se přidávají do mléka pro výrobu fermentovaných mléčných nápojů s obsahem probiotických bakterií obvykle v množství 1–3 % (hm). Výrobky obsahující současně probiotika a prebiotika se nazývají synbiotika [23].

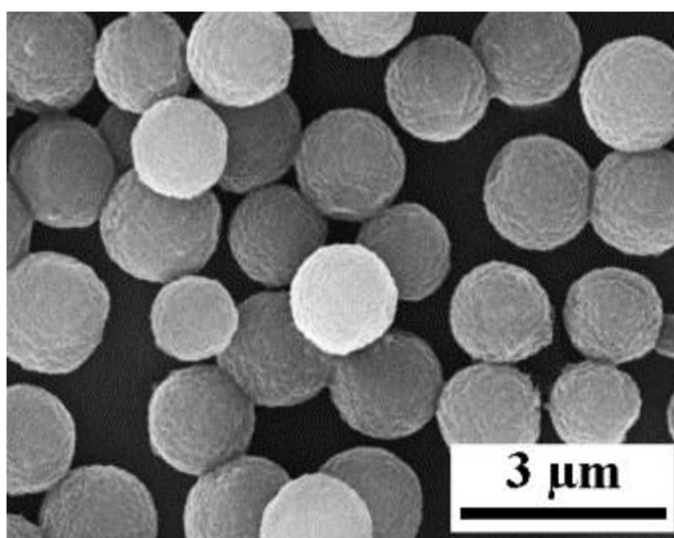
2.7 Magnetické částice

Separace pomocí magnetických částic se v biotechnologiích používá již od 70. let minulého století. Tato technika je používána pro izolaci nebo identifikaci buněk, buněčných organel nebo biologicky aktivních látek (např. nukleové kyseliny, proteiny atd.), často v kombinaci s tradičními metodami [24].

Princip izolace DNA spočívá v její reverzibilní adsorpci na magnetizovatelné částice, které jsou pokryté karboxylovými skupinami, v prostředí vysoké koncentrace solí. Magnetické částice jsou tvořeny kombinací organické polymerní matrice a anorganického jádra. Tyto částice vykazují superparamagnetické vlastnosti, což znamená, že vykazují magnetické vlastnosti jen v přítomnosti vnějšího magnetického pole [25]. Tyto požadavky dobře splňují některé oxidy železa, zejména magnetit Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) a maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [26]. Magnetit Fe_3O_4 je černý feromagnetický oxid obsahující ve své mřížce ionty Fe^{2+} a Fe^{3+} , které se projevují velmi silnou magnetizací. Stejnou strukturu mřížky má také maghemit, který obsahuje pouze ionty Fe^{3+} . Vhodné magnetické vlastnosti vykazují také sloučeniny kobaltu, chromu, niklu či manganu, ale vzhledem k jejich toxicitě je jejich použití omezené a

biomedicinské využití je vyloučeno [27]. Jádro je pokryto inertní nízko- nebo vysokomolekulární sloučeninou, která zabraňuje nežádoucí nescifické interakce a zajišťuje stabilizaci. Ochrannou vrstvu mohou tvořit různé látky, např. poly(glycidyl methakrylát) (PGMA), kopolymer poly(2-hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidyl methakrylát) (P(HEMA-*co*-GMA)) a nebo kopolymer poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-ethylen dimethakrylát) (P(HEMA-*co*-EDMA)) [28]. Na tuto vrstvu jsou pak navázány funkční skupiny (OH, COOH, PO(OH)₂, NH₂), pro izolaci různých biomolekul [26].

Magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) (Obr. 4) se připravují disperzní kopolymerací HEMA a GMA v prostředí toluenu a 2-methyl-propan-1-olu za přítomnosti koloidních částic magnetitu (Fe₃O₄) potažených vrstvičkou kyseliny olejové. Reakce je iniciována dibenzoylperoxidem a stabilizována acetát-butyrátem celulózy. Polymerizace probíhá při 70 °C 16 hodin. P(HEMA-*co*-EDMA) se připravují analogicky, rozdíl je pouze v přítomnosti maghemitu (γ-Fe₂O₃) [29].



Obr. 4: Magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) [30].

2.8 Identifikace bakterií pomocí PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je enzymová metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*. Tato metoda znamenala revoluci v metodice molekulární biologie, neboť umožňuje až 10⁶ násobné pomnožení fragmentu DNA během 2–3 hodin. PCR nachází uplatnění při:

- detekci infekčních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě;
- kontrole výrobků (např. zjišťování geneticky modifikovaných potravin);
- mapování genomů;
- charakterizaci genů;

- prenatalní diagnostice dědičných chorob;
- preimplantační diagnostice a typizaci;
- průkazu identity v kriminalistice a při určování paternity;
- analýze alelických sekvenčních změn;
- analýze prehistorických DNA z fosilií;
- izolaci určitého genu ze vzorku tkáně;
- značení DNA inkorporací značených nukleotidů – příprava DNA sond pro hybridizace;
- přípravě cDNA (komplementární DNA) na základě zpětného přepisu mRNA pomocí RT-PCR (PCR s využitím reversní transkriptasy);
- získání fragmentů DNA pro přímé klonování úseků DNA, klonování syntetických oligonukleotidů (kódujících např. peptidy vhodné pro afinitní chromatografii nebo vytvářejících proteolyticky štěpená místa);
- přípravě velkého množství templátu pro sekvenování;
- oligonukleotidově řízené mutagenezi – tj. definovanou změnu jednoho nebo více nukleotidů, případně jejich inzerci nebo delecí [31].

Jednotlivé kroky amplifikace zahrnují:

- denuraci templátu (DNA)
- připojení primerů
- extensi připojených primerů DNA polymerasou

Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné metodu PCR použít pro zjištění přítomnosti velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku. Základem úspěšné reakce je kvalitní templátová DNA, tj. neporušený úsek DNA, který má být amplifikován. Dále je velice důležitým předpokladem navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specifita reakce [32].

Pro PCR jsou nutné:

- a) 2 oligonukleotidové primery komplementární ke koncovým sekvencím obou řetězců úseku, které mají být amplifikovány.
- b) cílová DNA, která slouží jako templát pro reakci.
- c) termostabilní DNA polymerasa, stálá při teplotě 95 °C.
- d) směs všech čtyř deoxyribonukleotidů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- e) vhodný pufr obsahující ionty Mg^{2+} .

2.8.1 Požadavky kladené na primery

Vhodná sekvence a koncentrace primerů je parametrem rozhodujícím o úspěšném výsledku amplifikace. Pro návrh vhodných primerů platí několik zásad, které však nejsou univerzální, ale pouze orientační [32]. Jedná se o následující požadavky:

- zpravidla obsahují 18–24 nukleotidů;
- neobsahují sekvence, které umožňují vznik sekundární struktury (nejsou v nich inverzně opakované sekvence);
- mají vyvážený poměr G/C a A/T párů;
- nejsou vzájemně komplementární;
- mají přijatelnou teplotu tání, která dovoluje jejich připojení k templátu (55–65 °C), oba primery by měly mít podobnou teplotu tání;
- na 5' konec je možné přidat nekomplementární base, např. pro zavedení restrikčního místa.

2.8.2 Termostabilní DNA polymerasa

V PCR se využívá termostabilní DNA polymerasa pro opakovanou syntézu obou vláken. Podmínka teplotní stability enzymu je dána tím, že jedním krokem opakovaných cyklů PCR je denaturace DNA za vysoké teploty (95 °C). Pokud by byla DNA polymerasa inaktivována, bylo by nutné při každém cyklu po denaturaci přidat nendenurovanou polymerasu do směsi pro PCR, což by z této metody udělalo metodu velice nákladnou.

Použití termostabilní DNA polymerasy (*Taq* DNA polymerasa z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*) zajišťuje dostatečnou aktivitu enzymu po celou dobu amplifikace. *Taq* DNA polymerasa má pouze 5' → 3' polymerasovou aktivitu a postrádá 3' → 5' exonukleasovou aktivitu, což znamená, že tento enzym není schopen opravovat chyby vzniklé při replikaci. Výhodou tohoto enzymu je poměrně vysoká procesivita, což je termín vyjadřující schopnost syntetizovat dlouhé úseky DNA.

Kromě *Taq* DNA polymerasy jsou používány také *Pwo* a *Pfu* DNA polymerasy (zdroj – *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*). Tyto enzymy mají kromě polymerasové aktivity také 3' → 5' exonukleasovou aktivitu, umožňující opravu chybně inkorporovaných deoxynukleotidů. Nevýhodou je jejich nižší procesivita ve srovnání s *Taq* polymerasou [32].

2.8.3 Termocykler

Termocykler (Obr. 5) (běžně se pro tento přístroj používá označení „PCR cykler“) je programovatelný termostat, který umožňuje definovaně měnit jednotlivé teploty. Hlavními

požadavky jsou přesnost teploty a rychlost přechodu mezi jednotlivými teplotami. V současné době existuje celá řada výrobců těchto přístrojů s různými typy ohřevu a chlazení včetně mechanického přenášení mezi jednotlivými lázněmi [32].



Obr. 5: Termocykler [33].

2.8.4 Průběh PCR

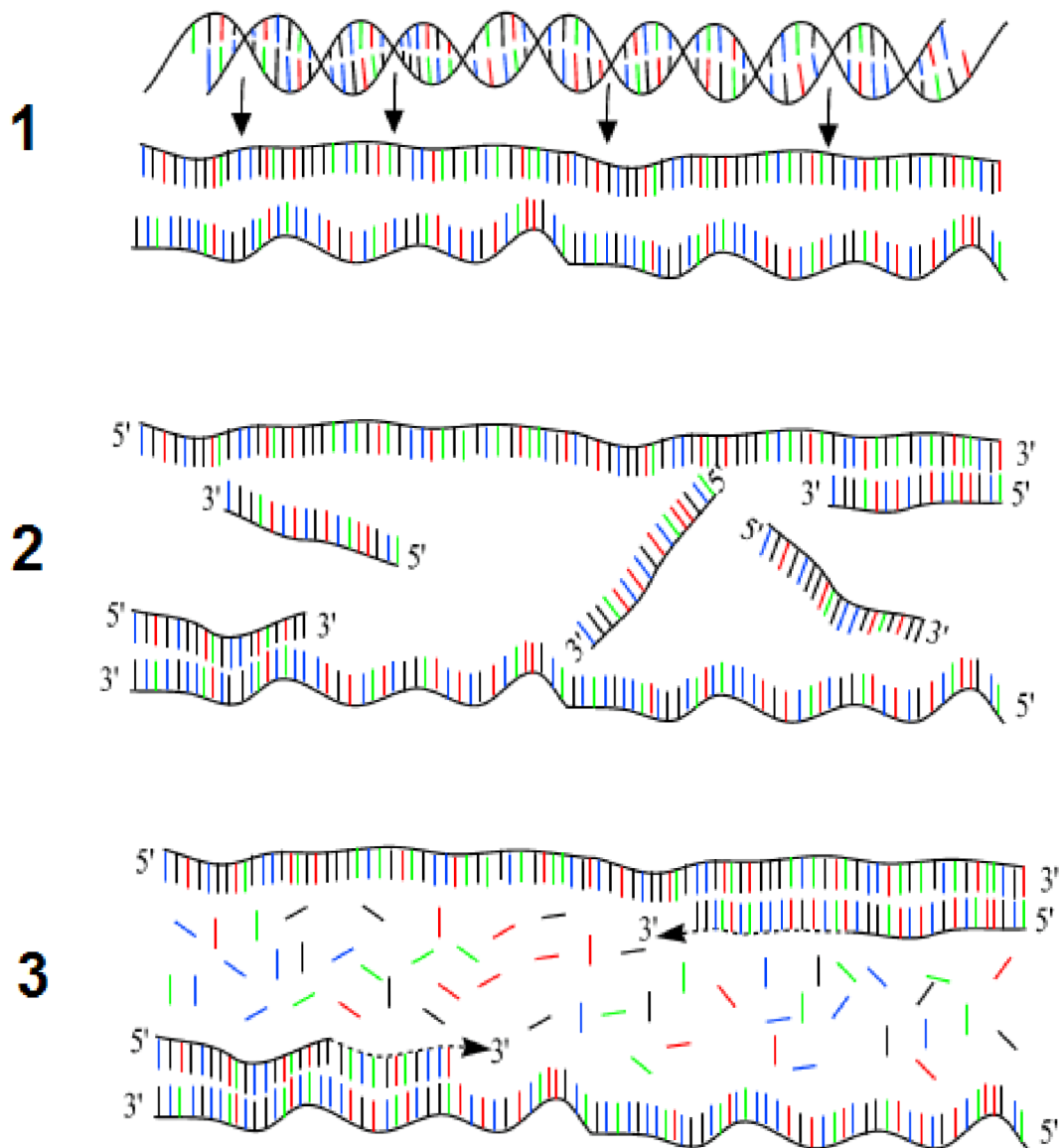
Jeden cyklus PCR se skládá ze tří kroků o definované teplotě a času:

1. Denaturace templátu. Tohoto efektu je dosaženo zvýšením teploty vzorku na 95 °C. DNA je zpravidla denaturována. Před počátkem amplifikace se zařazuje ohřev po dobu 5 minut; v jednotlivých cyklech je doba zpravidla 1 minuta. Je důležité, aby došlo ke kompletní denaturaci obou vláken. Jinak by totiž mohlo dojít k velmi rychlé renaturaci celé molekuly, což by zabránilo interakci s primery.
2. Připojení primerů (hybridizace). Druhým krokem v cyklu je renaturace vlákna templátové DNA s primerem. Reakční směs je ochlazena na zvolenou teplotu, která se pohybuje kolem 55 °C. Teplota vhodná pro tuto reakci závisí na délce oligonukleotidu a na zastoupení A-T a G-C párů. Zpravidla je o 5 °C nižší než teplota tání primeru (T_m) nebo ji lze vyčíst přímo z údajů výrobce primerů.
3. Syntetická fáze. Jedná se o extenzi připojených primerů DNA polymerasou. V této fázi jsou připojovány jednotlivé deoxynukleotidy pomocí komplementárního párování basí ve směru 5' → 3'. Teplota je v případě použití *Taq* polymerasy při tomto kroku zvýšena na 75 °C, což je teplotní optimum tohoto enzymu. Výtěžek je závislý na vhodných reakčních podmínkách,

kteří je třeba často optimalizovat. Jedná se zejména o koncentraci iontů Mg^{2+} a teplotu hybridizace (připojení) primerů.

Kromě molekuly DNA, jejíž úsek má být kopírován, jsou v mikrozkušavce přítomné další složky reakční směsi: oba primery, ekvimolární směs všech čtyř oligonukleotidů, termostabilní DNA polymerasa a pufr zajišťující optimální průběh reakce [32].

Průběh PCR je znázorněn na Obr. 6.



Obr. 6: Průběh PCR [34].

2.8.5 Inhibitory PCR

Inhibitory jsou zodpovědné za falešně negativní výsledky při PCR, které jsou značným problémem při analýze reálných vzorků. Inhibitory mohou ovlivňovat PCR několika způsoby,

např. vyvazují hořečnaté ionty nezbytné pro činnost DNA polymerasy, přímo inhibují DNA polymerasu, degradují cílové nukleové kyseliny [35].

Inhibice PCR může být částečná nebo celková a může se projevit jako úplné selhání reakce (není detegován žádný PCR produkt) nebo snížení citlivosti detekce.

Inhibitory PCR můžeme rozdělit na extracelulární a intracelulární.

- Intracelulární – inhibitory jsou přítomny uvnitř buněk (např. endogenní nukleasy, proteinasy, peptidy, polysacharidy).
- Extracelulární – dělí se na endogenní a exogenní. Endogenní inhibitory jsou kontaminanty komponent PCR a používaného materiálu (např. fenolové látky, SDS, enzymy aj.). Exogenní kontaminanty jsou různého původu. Zahrnují složky vzorků v potravinách nebo z životního prostředí [36].

2.8.5.1 Inhibitory v mléku

V mléku je pravděpodobným inhibitorem plazmin. Inhibitorem je i proteinasa přítomná v mléku, která je však inaktivována při UHT úpravě mléka [37]. Dalším inhibitorem jsou vápenaté ionty, které se vážou místo iontů hořečnatých na DNA polymerasu a tím dochází k její inaktivaci. Tato inhibice může být odstraněna zvýšením koncentrace hořečnatých iontů nebo vyvázáním vápenatých iontů chelatačními činidly [38].

2.8.6 Detekce produktu PCR

K identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA získaných pomocí PCR se používá elektroforéza v agarosovém či polyakrylamidovém gelu. Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Touto metodou může být detegován až 1 ng DNA. Rozdělené fragmenty DNA lze izolovat přímo z gelu a použít pro další práce. Volbou typu a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností [31].

Tabulka 1: Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v agarosovém gelu o různých koncentracích agarosy.

Koncentrace agarosy (% w/v)	Rozmezí molekulových hmotností separace lineárních molekul DNA (kb)*
0,3	5–60
0,6	1–20
0,7	0,8–10
0,9	0,5–7
1,2	0,4–6
1,5	0,2–3
2,0	0,1–2

*kb (kilobáze) počet bází, běžné označení pro počet nukleotidů

Agarosovou gelovou elektroforézu lze rozdělit do tří částí:

- příprava gelu vhodné hustoty, volené tak, aby bylo zajištěno optimální rozdělení očekávaných fragmentů DNA (Tabulka 1);
- vzorky DNA jsou aplikovány do jamek v gelu a děleny za napětí vhodného pro elektroforézu po dobu odpovídající optimální separaci. Rozdělení lze monitorovat na základě rozdělení proužků barviv o známých molekulových hmotnostech;
- gel je barven ethidium bromidem. Ethidium bromid (EtBr) je interkalační činidlo (jedná se o karcinogen), které se váže mezi vlákna DNA a fluoreskuje po ozáření UV zářením o vlnové délce 260–360 nm. Komplex DNA a ethidium bromidu je vizualizován osvětlením pomocí zdroje UV záření tzv. transiluminátoru [31].

Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů se používají markery molekulových hmotností, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí.

Velikost fragmentů se běžně udává jako počet párů bází – bp (base pair).

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla izolace bakteriální DNA z pěti fermentovaných mléčných výrobků a čtyř sýrů v kvalitě vhodné pro PCR.

- DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk.
- Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace DNA.
- DNA byla amplifikována v rodově a druhově specifické PCR.
- Získané výsledky byly porovnány s údaji uvedenými výrobcem.
- Jako kontrola byla použita DNA izolovaná metodou fenolové extrakce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál, zařízení a metody

4.1.1 Bakteriální kmeny

Kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM Brno).

Lactobacillus paracasei ssp. *paracasei* CCM 1753^T

Lactobacillus acidophilus CCM 4833^T

Bifidobacterium longum CCM 4990

Bifidobacterium animalis CCM 4988^T

Lactococcus lactis ssp. *lactis* CCM 1877^T

4.1.2 Komplexní matrice – mléčné výrobky

V diplomové práci byly analyzovány mléčné výrobky od různých výrobců z komerční sítě. Jednotlivé výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2. V Tabulce 3 jsou uvedeny bakteriální kultury obsažené ve výrobku, které udává výrobce.

Tabulka 2: Výrobky použité pro analýzu

Výrobek	Název výrobku	Druh výrobku	Výrobce
1	Activia	jogurt	DANONE a. s.
2	Jihočeský tradiční jogurt	jogurt	MADETA a. s.
3	Florian Active	probiotický nápoj	OLMA a. s.
4	Florian	jogurtový nápoj	OLMA a. s.
5	Smetanový jogurt z Valašska	jogurt	Mlékárna Valašské Meziříčí spol. s r. o
6	Eidam (45 %)	přírodní polotvrdý sýr	Jaroměřická mlékárna a. s.
7	Madeland (45 %)	sýr holandského typu, polotvrdý sýr	MADETA a. s.
8	Eidam (30 %)	salámový polotvrdý sýr	Miltra B s. r. o.
9	Eidam (30 %)	polotvrdý sýr	Jaroměřická mlékárna a. s.

Tabulka 3: Bakteriální kultury obsažené ve výrobcích deklarované výrobcem

Výrobek	Název výrobku	Bakteriální kultury
1	Activia	běžné jogurtové kultury, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DN - 173010
2	Jihočeský tradiční jogurt	živé jogurtové kultury
3	Florian Active	živé jogurtové kultury
4	Florian	živé jogurtové kultury a <i>Bifidobacterium</i>
5	Smetanový jogurt z Valašska	živé jogurtové kultury
6	Eidam (45 %)	mlékárenské kultury
7	Madeland (45 %)	mlékárenské kultury
8	Eidam (30 %)	mlékárenské kultury
9	Eidam (30 %)	mlékárenské kultury

živé (běžné) jogurtové kultury – *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*

mlékárenské kultury – *Lactococcus lactis*

4.1.3 Chemikálie

Pro přípravu roztoků byly použity následující chemikálie v kvalitě p.a.:

- Agarosa pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- DNA standard (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Ethanol (Lachema, Brno, ČR)
- Ethidiumbromid (5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid draselný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Nanášecí pufr (2,5 % Ficoll 400) (Top-Bio, Praha, ČR)

- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PCR komponenty (Top-Bio, Praha, ČR)
- PEG 6000 (Sigma, St. Louis, USA)
- Proteinasa K (Sigma, St. Louis, USA)
- SDS (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) (Amresco, Solon, USA)

Dále byly použity běžně dostupné chemikálie v kvalitě p.a.

4.1.4 Magnetické částice pro izolaci DNA

- Fkol 135ox

Magnetické polymerní mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) částice s navázanými karboxylovými skupinami (-COOH) - 2,61 mM/g. Částice byly připraveny na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze (Ing. Daniel Horák, CSc.). Koncentrace zásobního roztoku částic byla 2 mg/ml.

4.1.5 Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA

Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé postupy provedeny podle návodů ve skriptech [39].

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Do 800 ml destilované vody bylo kvantitativně přeneseno 202,2 g EDTA a roztok byl umístěn na magnetickou míchačku. Hodnota pH byla upravena přidáním NaOH v peletkách na pH 8,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 1000 ml, přefiltrován a sterilizován v autoklávu (121 °C, 15 minut).

- 70 % ethanol

Bylo smícháno 70 ml 96 % ethanolu s 26 ml destilované vody.

- Lyzační roztok A

Byl smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml sterilní destilované vody. Roztok byl připraven sterilně.

- Lyzační roztok B

Byl sterilně smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody. Před použitím byl do roztoku přidán lysozym (3 mg/ml). Roztok byl připravován vždy čerstvý.

- 5 M NaCl

Ve 150 ml destilované vody bylo rozpuštěno 58,4 g NaCl. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 200 ml a sterilizován v autoklávu (121 °C, 15 minut).

- 40 % PEG 6000 – poly(ethylenglykol)

V 60 ml destilované vody bylo rozpuštěno 40 g PEG 6000. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml a byl uchováván při 4 °C.

- Proteinasa K (1 mg/ml, 100 µg/ml)

Bylo naváženo příslušné množství enzymu (10 mg, 1 mg) a doplněno destilovanou vodou do 10 ml. Roztok byl uchováván při –20 °C.

- 10 % (20 %) SDS

V 90 ml (80 ml) sterilní destilované vody bylo rozpuštěno 10 g (20 g) SDS. Hodnota pH byla upravena na 7,0 několika kapkami koncentrované HCl. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml.

- 1 M Tris-HCl (pH 7,8)

V 80 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12,1 g Tris-base. Hodnota pH byla upravena pomocí koncentrované HCl. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml a byl sterilizován v autoklávu (121 °C, 15 minut).

- TE pufr

Byl smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml. Roztok byl připraven sterilně.

4.1.6 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu

Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé postupy provedeny podle návodů k laboratorním cvičením [39].

- agarosový gel (1,5 %)

1,5 g agarosy bylo rozpuštěno ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru.

- ethidium bromid (0,5 µg/ml)

100 µl roztoku EtBr (2,5 mg/ml) bylo zředěno v 500 ml sterilní destilované vody.

- 5x TBE pufr

V 600 ml destilované vody bylo rozpuštěno 54 g Tris-base a 27,5 g kyseliny borité. Dále bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Pomocí 1 M NaOH bylo upraveno pH na 8,3. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 1000 ml, přefiltrován a sterilizován v autoklávu. Před použitím byl 10x naředěn (na výslednou koncentraci 45 mM Tris-base, 45 mM kyselinu boritou a 1 mM EDTA) destilovanou vodou.

4.1.7 Komponenty pro PCR

4.1.7.1 Komponenty PCR

- dNTP směs (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Oligonukleotidové primery (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerasu 1.1 (10x koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)

100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 1 % Triton X-100, 15 mM MgCl₂

- *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/ml) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská Lupča, SR) - dále označovaná jako voda pro PCR

4.1.7.2 Oligonukleotidové primery pro jednotlivé PCR

- doména *Bacteria* (Haarman a Knol, 2006) [39]

F_eub (10 pmol/μl), R_eub (10 pmol/μl)

F_eub TCC TAC GGG AGG CAG CAG T

R_eub GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT

- rod *Lactobacillus* (Dubernet a spol., 2002) [39]

LbLMA 1-rev (10 pmol/μl), R16-1 (10 pmol/μl)

LbLMA1-rev CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC

R16-1 CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA

- druh *Lactobacillus acidophilus* (Tilsala-Timisjarvi a spol., 1997) [39]

Aci 16SI (10 pmol/μl), 16SII (10 pmol/μl)

Aci 16SI AGC TGA ACC AAC AGA TTC AC

16SII ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC

- rod *Bifidobacterium* (Roy a Sirois, 2000) [39]

Pbi F1 (10 pmol/μl), Pbi R2 (10 pmol/μl)

Pbi F1 CCG GAA TAG CTC C

Pbi R2 GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA

- druh *Bifidobacterium animalis* (Roy a Sirois, 2000) [39]

Pbi R1 (10 pmol/ μ l), Ban F2 (10 pmol/ μ l)

Pbi R1 GCA CCA CCT GTG AAC CG

Ban F2 AAC CTG CCC TGT G

- druh *Lactococcus lactis ssp. lactis* [40]

PALA 4 (10 pmol/ μ l), PALA 14 (10 pmol/ μ l)

PALA 4 CTT CAA CAG ACA AGT CC

PALA 14 GAT AAA TGA TTC CAA GC

4.2 Přístroje a pomůcky

- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a běžné laboratorní pomůcky
- Centrifuga MINI Spin 13 400 ot/min (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Digitální fotoaparát Demage Z5 (Konica Minolta, USA)
- Laboratorní váhy B0430 (Ohaus, USA)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 μ l (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Minicycler PTC-100TM (MJ Research, Watertown, USA)
- NanoPhotometerTM (Implen, Německo)
- Termocykler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm (Hofer, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP 300 (Owl Scientific, USA)

4.3 Použité metody

4.3.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z tekutých mléčných výrobků [41]

- Z mléčného výrobku byl odebrán 1 ml do sterilní Eppendorfovy zkumavky (1,5 ml).
- Po centrifugaci (15000 ot/min) po dobu 5 minut byl odstraněn supernatant a získaný sediment byl promyt v 1 ml sterilní vody.
- Po centrifugaci (15000 ot/min) po dobu 5 minut byl odstraněn supernatant a získaný sediment byl resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku B, poté byl vzorek 30 minut inkubován při laboratorní teplotě.

- K suspenzi bylo přidáno 50 μ l 20 % SDS a 5 μ l proteinasy K.
- Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne.

4.3.2 Příprava hrubých lyzátů buněk z 1,5 ml filtrátu vzorků sýrů [36]

- Bylo odváženo 5 g vzorku, byl vložen do třecí misky a rozetřen se 7,5 ml sterilní vody. Po důkladném rozetření byl vzorek zfiltrován přes sterilní gázu do sterilní zkumavky.
- Po centrifugaci (15000 ot/min) po dobu 5 minut byl odstraněn supernatant a získaný sediment byl promyt v 1 ml sterilní vody.
- Po centrifugaci (15000 ot/min) po dobu 5 minut byl odstraněn supernatant a získaný sediment byl resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku B a byl inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě.
- K suspenzi bylo přidáno 50 μ l 20 % SDS a 5 μ l proteinasy K.
- Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne.

4.3.3 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetického nosiče [39]

- Do sterilních Eppendorfových zkumavek (1,5 ml) je připravena separační směs, přičemž bylo dodrženo pořadí jednotlivých komponent které je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: Pořadí komponent při přípravě separační směsi

Pořadí	Komponenta	Objem jednotlivých komponent (μ l)
1.	Sterilní voda	100
2.	5M NaCl	400
3.	Hrubý lyzát buněk	100
4.	40 % PEG 6000	200
5.	Magnetické mikročástice (2 mg/ml)	100
výsledný objem (μl)		1000

- Připravená směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě a poté byly částice s navázanou DNA odseparovány pomocí magnetického separátoru při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.
- Zkumavky byly ponechány v magnetickém pásu a supernatant byl opatrně odpipetován.

- Následně byl odstraněn magnetický pás a zkumavky obsahující nosič s navázanou DNA byly promyty 70 % ethanolem ($V = 1000 \mu\text{l}$).
- Částice byly odseparovány magnetem 2 minuty při laboratorní teplotě.
- Bylo opakováno promytí 70 % ethanolem.
- Zkumavky byly ponechány v horizontální poloze a krátce usušeny při laboratorní teplotě (do vypaření ethanolu).
- DNA byla eluována do 100 μl TE pufru při laboratorní teplotě do druhého dne.
- Částice byly odseparovány magnetem 2 minuty při laboratorní teplotě.
- Eluovaná DNA byla přepipetována do čisté zkumavky.
- Takto připravená DNA byla použita pro spektrofotometrické měření a pro specifickou PCR.

4.3.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

- Měření bylo prováděno na spektrofotometru NanoPhotometerTM.
- Pro nastavení spektrofotometru byl nejprve proměřen TE pufr.
- Poté byl proměřen vzorek DNA.
- Na přístroji byla odečtena koncentrace vzorku DNA.

4.3.5 Doménově, rodově a druhově specifická PCR s izolovanou DNA jako DNA matricí

- doména *Bacteria*

Pro doménově specifickou PCR byla použita DNA izolovaná z výrobků a použité primery jsou uvedeny v kapitole 4.1.7.2. Velikost PCR produktu je 466 bp.

Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5: Složení směsi pro PCR pro doménu *Bacteria*

Komponenta	Objem (μl)
voda pro PCR	14,5
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	1,0
primer F_eub (10 pmol/ μl)	1,0
primer R_eub (10 pmol/ μl)	1,0
DNA polymerasa 1.1 (1 U/ μl)	2,0
DNA matrice	3,0

- rod *Lactobacillus*

Pro rodově specifickou PCR byla použita DNA izolovaná z výrobků a použité primery jsou uvedeny v kapitole 4.1.7.2. Velikost PCR produktu je 250 bp.

Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 6.

Tabulka 6: Složení směsi pro PCR pro rod *Lactobacillus*

Komponenta	Objem (μl)
voda pro PCR	19,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer LbLMA1-rev (10 pmol/μl)	0,5
primer R16-1 (10 pmol/μl)	0,5
DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl)	1,0
DNA matrice	1,0

- druh *Lactobacillus acidophilus*

Pro druhově specifickou PCR byla použita DNA izolovaná z výrobků a použité primery jsou uvedeny v kapitole 4.1.7.2. Velikost PCR produktu je 800 bp.

Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 7.

Tabulka 7: Složení směsi pro PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Komponenta	Objem (μl)
voda pro PCR	19,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer Aci 16SI (10 pmol/μl)	0,5
primer 16SII (10 pmol/μl)	0,5
DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl)	1,0
DNA matrice	1,0

- rod *Bifidobacterium*

Pro rodově specifickou PCR byla použita DNA izolovaná z výrobků a použité primery jsou uvedeny v kapitole 4.1.7.2. Velikost PCR produktu je 914 bp.

Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 8.

Tabulka 8: Složení směsi pro PCR pro rod *Bifidobacterium*

Komponenta	Objem (μl)
voda pro PCR	19,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer Pbi F1 (10 pmol/μl)	0,5
primer Pbi R2 (10 pmol/μl)	0,5
DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl)	1,0
DNA matrice	1,0

- druh *Bifidobacterium animalis*

Pro druhově specifickou PCR byla použita DNA izolovaná z výrobků a použité primery jsou uvedeny v kapitole 4.1.7.2. Velikost PCR produktu je 925 bp.

Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 9.

Tabulka 9: Složení směsi pro PCR pro druh *Bifidobacterium animalis*

Komponenta	Objem (μl)
voda pro PCR	19,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer Pbi R1 (10 pmol/μl)	0,5
primer Ban F2 (10 pmol/μl)	0,5
DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl)	1,0
DNA matrice	1,0

- druh *Lactococcus lactis ssp. lactis*

Pro druhově specifickou PCR byla použita DNA izolovaná z výrobků a použité primery jsou uvedeny v kapitole 4.1.7.2. Velikost PCR produktu je 1131 bp.

Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka 10: Složení směsi pro PCR pro druh *Lactococcus lactis*

Komponenta	Objem (μl)
voda pro PCR	16,5
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	1,0
primer PALA 4 (10 pmol/μl)	1,0
primer PALA 14 (10 pmol/μl)	1,0
DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl)	1,0
DNA matrice	1,0

4.3.5.1 Programy pro PCR

- Vzorky obsahující všechny komponenty byly opatrně promíchány a krátce cetrifugovány.
- Vzorky byly vloženy do termocykleru, který pracoval podle předem nastavených programů, které jsou uvedeny v Tabulce 11 a 12.

Tabulka 11: Programy pro doménovou a rodově specifické PCR

Krok	Program		
	BACTERIA	LBCROD	BIFI914
1.	95 °C/5 min	95 °C/5 min	94 °C/5 min
2.	95 °C/30 s	95 °C/30 s	94 °C/1 min
3.	55 °C/30 s	55 °C/30 s	50 °C/1 min
4.	72 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/2 min
5.	krok 2-4 opakovat 29×	krok 2-4 opakovat 29×	krok 2-4 opakovat 29×
6.	72 °C/5 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min
7.	10 °C	10 °C	10 °C

BACTERIA PCR pro doménu *Bacteria*

LBCROD PCR pro rod *Lactobacillus*

BIFI914 PCR pro rod *Bifidobacterium*

Tabulka 12: Programy pro druhově specifické PCR

Krok	Program		
	LBCACI	B.ANIM	PALA 4→PALA14
1.	94 °C/5 min	94 °C/5 min	94 °C/5 min
2.	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/1 min
3.	58 °C/30 s	58 °C/30 s	45 °C/1 min
4.	72 °C/1 min	72 °C/1 min	68 °C/2 min
5.	krok 2-4 opakovat 29×	krok 2-4 opakovat 29×	krok 2-4 opakovat 29×
6.	72 °C/5 min	72 °C/5 min	68 °C/10 min
7.	10 °C	10°C	10 °C

LBCACI PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

B.ANIM PCR pro druh *Bifidobacterium animalis*

PALA4→PALA14 PCR pro druh *Lactococcus lactis ssp. lactis*

Jednotlivé kroky byly následující:

1. Denaturace DNA před prvním cyklem
2. Denaturace DNA
3. Hybridizace (připojení) primerů
4. Syntéza nového DNA řetězce
5. Počet cyklů
6. Dosyntetizování nového DNA řetězce v posledním cyklu
7. Zchlazení

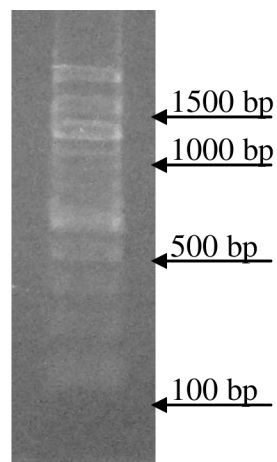
4.3.6 Detekce rodově a druhově specifických produktů PCR agarosovou gelovou elektroforézou

- Byl připraven 1,5 % agarosový gel pro detekci specifických produktů PCR.
- Na každých 5 µl produktu PCR bylo přidáno 1 µl nanášecího pufru.
- Do jednotlivých komůrek gelu byly nanášeny připravené směsi PCR a DNA standard 100 bp žebříček (100–1500 bp).
- Gel byl vložen do elektroforetické vany a byl převrstven 0,5x koncentrovaným TBE puffrem (do výšky 3–5 mm nad gel) a elektroforéza byla spuštěna (pod napětím 60 V).
- Elektroforéza byla ukončena, jakmile nanášecí pufr doputoval do 2/3 délky agarosového gelu.

- Gel byl obarven v lázni s ethidium bromidem (1 µg/ml), barvení probíhalo asi 1 hodinu.
- Obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru v UV světle.
- Výsledky byly zdokumentovány digitálním fotoaparátem.

4.3.7 DNA standard

Jako DNA standard byl použit 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR), který obsahoval fragmenty DNA délky 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp (Obr. 7).



Obr. 7: DNA standard 100 bp

5 VÝSLEDKY

5.1 Zpracování vzorků výrobků a příprava hrubých lyzátů buněk výrobků

Vzorky byly zpracovány a hrubé lyzáty byly připraveny z výrobků dle uvedených metod (4.3.1 a 4.3.2). Bylo použito 5 tekutých mléčných výrobků, z kterých byly připraveny vždy 2 hrubé lyzáty z jednoho výrobku. Byly použity také 4 sýry a to vždy 1 hrubý lyzát z 1 výrobku. Celkem tedy bylo připraveno 14 hrubých lyzátů.

5.2 Izolace DNA

DNA byla izolovaná z hrubých lyzátů buněk z mléčných výrobků a ze sýrů z komerční sítě. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace izolované DNA. Tyto koncentrace jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Hodnoty naměřené při spektrofotometrickém stanovení koncentrace DNA

Výrobek	c (ng/μl)	Absorbance (nm)					
		230	260	280	320	260/280	260/320
1A	16,8	0,19	0,10	0,09	0,03	1,24	0,41
1B	15,5	0,20	0,10	0,08	0,04	1,48	0,40
2A	38,3	0,69	0,23	0,22	0,07	1,08	0,25
2B	46,0	0,85	0,27	0,26	0,08	1,05	0,24
3A	30,3	0,44	0,19	0,17	0,07	1,18	0,32
3B	17,5	0,24	0,12	0,10	0,05	1,27	0,36
4A	23,5	0,35	0,15	0,13	0,05	1,19	0,31
4B	15,8	0,21	0,09	0,08	0,03	1,29	0,35
5A	24,2	0,34	0,15	0,13	0,05	1,20	0,34
5B	20,0	0,20	0,13	0,12	0,05	1,29	0,54
6	8,5	0,15	0,05	0,05	0,01	0,97	0,25
7	24,8	0,15	0,16	0,13	0,06	1,41	1,21
8	24,2	0,14	0,16	0,13	0,06	1,41	1,20
9	22,3	0,13	0,14	0,11	0,05	1,48	1,11

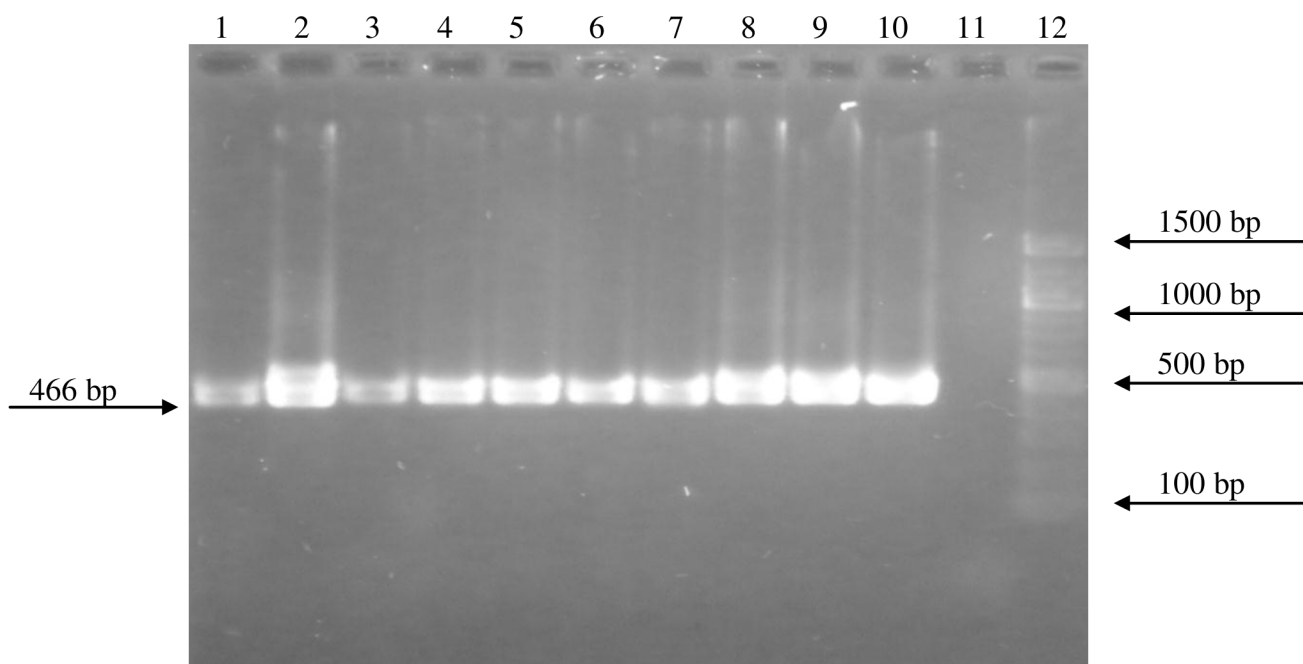
A, B.....2 různá opakování, výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2.

=>DNA byla z výrobků izolována v koncentraci 8,5 ng/μl–46 ng/μl.

5.3 Doménově specifická PCR

Doménově specifická PCR byla provedena pomocí primerů F_eub a R_eub. Směsi pro PCR byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5. Výsledky agarosové gelové elektroforézy produktů PCR a schéma nanesení vzorků na gel jsou uvedeny na Obr. 8.

Obr. 8: Agarosová gelová elektroforéza doménově specifických produktů PCR (466 bp).



Běh	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng)	Produkt PCR
1	1B	46,5	++
2	2B	138,0	+++
3	3A	90,9	++
4	4A	70,5	+++
5	5A	72,6	+++
6	6	25,5	+++
7	7	74,4	+++
8	8	72,6	+++
9	9	66,9	+++
10	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/μl)	30,0	+++
11	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
12	Velikostní standard (3 μl)		

Amplifikovány byly 3 µl DNA izolované ze všech výrobků. Výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2.

+++ byl detegován velmi silný produkt PCR

++ byl detegován silný produkt PCR

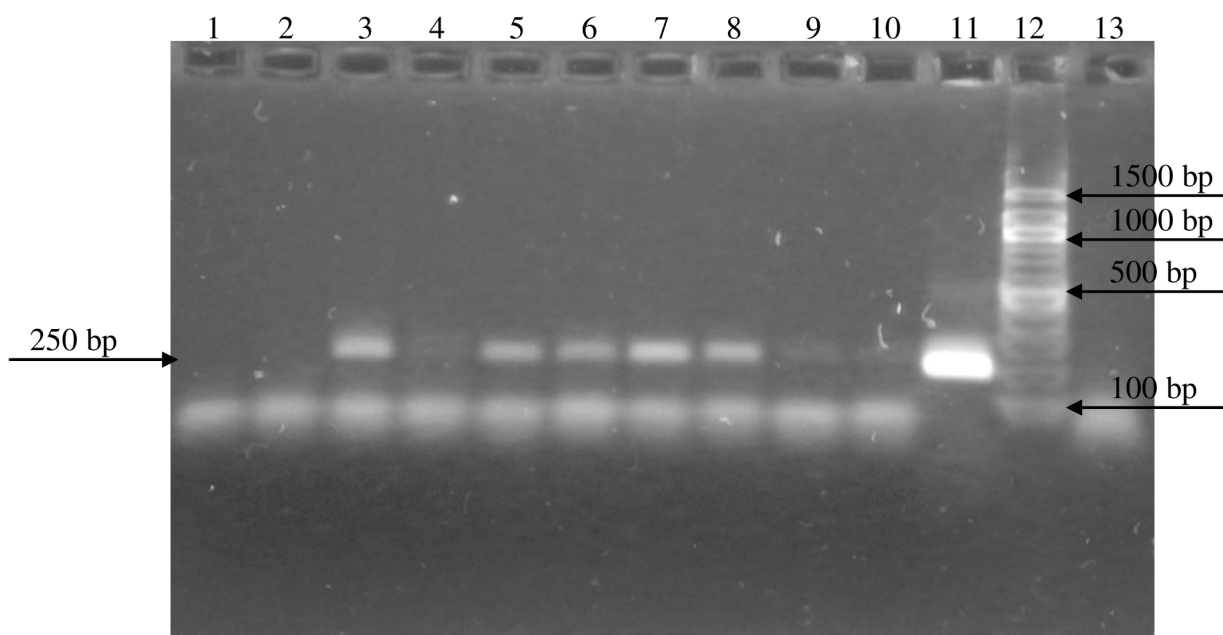
- produkt PCR nebyl detegován

=>Doménově specifické PCR produkty o velikosti 466 bp byly detegovány po amplifikaci celkové DNA izolované ze všech výrobků.

5.4 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

Rodově specifická PCR byla provedena pomocí primerů LbLMA1-rev a R16-1. Směsi pro PCR byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5. Výsledky agarosové gelové elektroforézy produktů PCR a schéma nanesení vzorků na gel jsou uvedeny na Obr. 9.

Obr. 9: Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických produktů PCR (250 bp).



Běh	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng)	Produkt PCR
1	1A	16,8	-
2	1B	15,5	-
3	2A	38,3	++
4	2B	46,0	+
5	3A	30,3	++

6	3B	17,5	++
7	4A	23,5	++
8	4B	15,8	++
9	5A	24,2	+
10	5B	20,0	+
11	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/μl)	10,0	+++
12	Velikostní standard (3 μl)		
13	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-

Amplifikován byl 1 μl celkové izolované DNA z výrobků č. 1, 2, 3, 4 a 5. Výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2.

+++ byl detegován velmi silný produkt PCR

++ byl detegován silný produkt PCR

+ byl detegován slabý produkt PCR

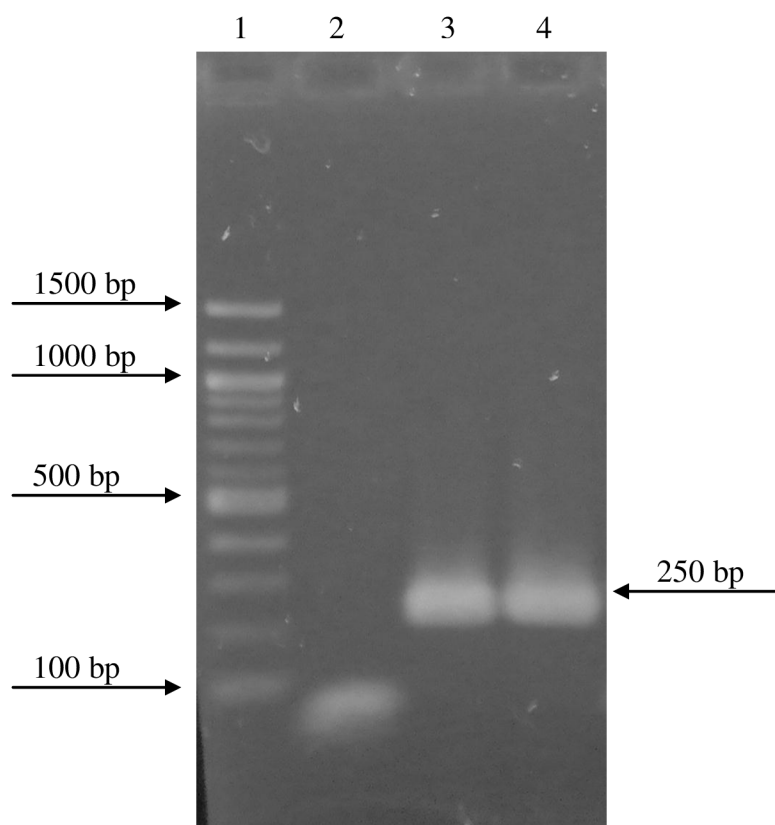
- produkt PCR nebyl detegován

=>Rodově specifické PCR produkty *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detegovány po amplifikaci celkové DNA izolované z výrobků 1, 2, 3, 4 a 5.

5.4.1 Optimalizace pro rodově specifickou PCR *Lactobacillus*

Při rodově specifické PCR *Lactobacillus*, jejíž výsledky jsou na Obr. 9, byl produkt PCR z výrobku 1 (Activia) detegován příliš slabě a na fotografii není patrný. Proto byla z výrobku znovu izolována DNA. Tato DNA byla izolována z 2 ml výrobku a při izolaci magnetickými částicemi bylo do směsi na izolaci použito 200 μl hrubého lyzátu buněk. Spektrofotometricky byla změřena koncentrace izolované DNA c = 23,5 ng/μl. Do PCR směsi bylo použito 10 μl izolované DNA. Výsledek agarosové gelové elektroforézy produktů PCR a schéma nanesení vzorků na gel jsou uvedeny na Obr. 10.

Obr. 10: Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických produktů PCR (250 bp).



Běh	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng)	Produkt PCR
1	Velikostní standard (3 µl)		
2	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
3	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/µl)	10,0	+++
4	1	235,0	+++

Amplifikováno bylo 10 µl celkové izolované DNA z výrobku č. 1. Výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2.

+++ byl detegován velmi silný produkt PCR

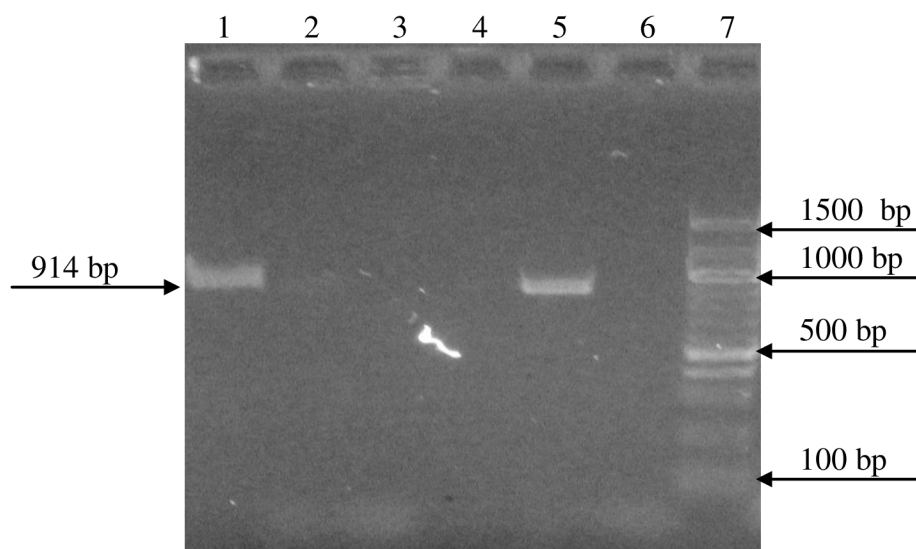
- produkt PCR nebyl detegován

=>Rodově specifické PCR produkty *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detegovány po amplifikaci celkové DNA izolované z výrobku 1.

5.5 Rodově specifická PCR pro rod *Bifidobacterium*

Rodově specifická PCR byla provedena pomocí primerů Pbi F1 a Pbi R2. Směsi pro PCR byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5. Výsledky agarosové gelové elektroforézy produktů PCR a schéma nanesení vzorků na gel jsou uvedeny na Obr. 11.

Obr. 11: Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických produktů PCR (914 bp).



Běh	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng)	Produkt PCR
1	1A	16,8	++
2	1B	15,5	+
3	4A	23,5	-
4	4B	15,8	+
5	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/μl)	10,0	++
6	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
7	Velikostní standard (3 μl)		

Amplifikován byl 1 μl celkové izolované DNA z výrobků č. 1 a 4. Výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2.

++ byl detegován silný produkt PCR

+ byl detegován slabý produkt PCR

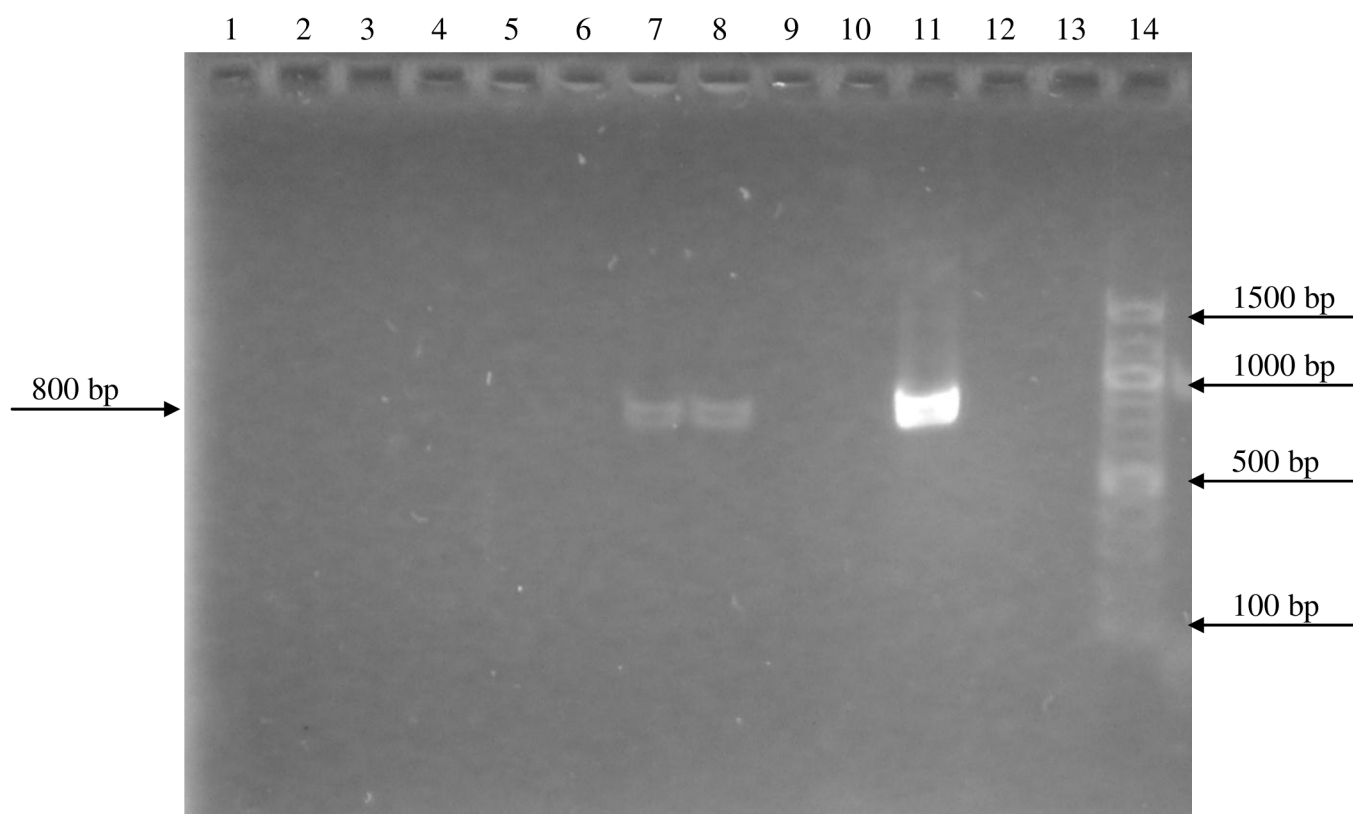
- produkt PCR nebyl detegován

=>Rodově specifické PCR produkty *Bifidobacterium* o velikosti 914 bp byly detegovány po amplifikaci celkové DNA izolované z výrobků 1 a 4.

5.6 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Druhově specifická PCR byla provedena pomocí primerů Aci 16SI a 16SII. Směsi pro PCR byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5. Výsledky agarosové gelové elektroforézy PCR produktů a schéma nanesení vzorků na gel jsou uvedeny na Obr. 12.

Obr. 12: Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických produktů PCR (800 bp).



Běh	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng)	Detekce PCR produktu
1	1A	16,8	-
2	1B	15,5	-
3	2A	38,3	-
4	2B	46,0	-
5	3A	30,3	-
6	3B	17,5	-
7	4A	23,5	++
8	4B	15,8	++
9	5A	24,2	-

10	5B	20,0	-
11	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/μl)	10,0	+++
12	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
13	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
14	Velikostní standard (3 μl)		

Amplifikován byl 1 μl celkové izolované DNA z výrobků č. 1, 2, 3, 4 a 5. Výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2.

+++ byl detegován velmi silný produkt PCR

++ byl detegován silný produkt PCR

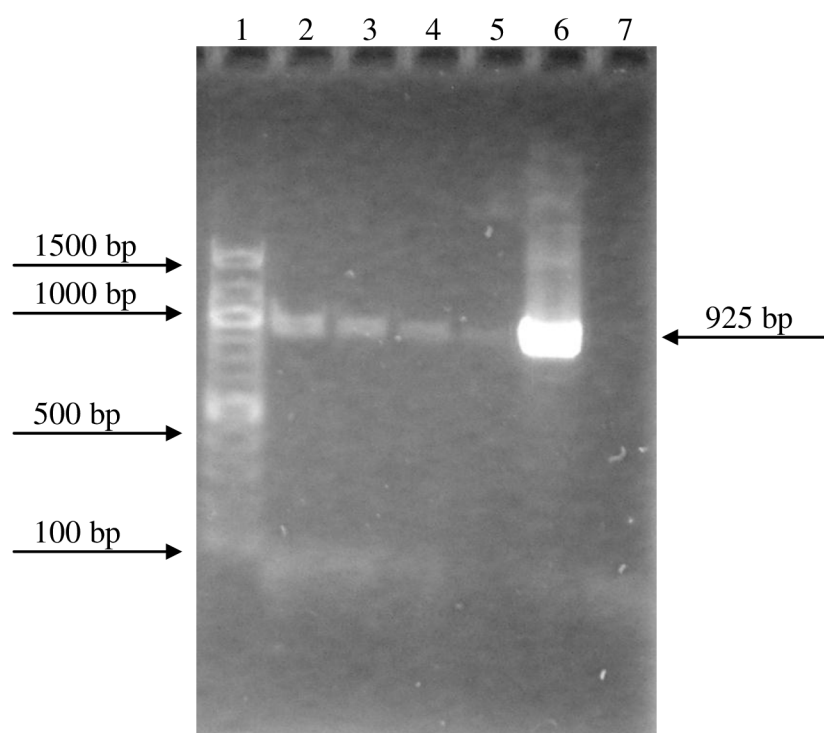
- produkt PCR nebyl detegován

=>Druhově specifické PCR produkty *Lactobacillus acidophilus* o velikosti 800 bp byly detegovány po amplifikaci celkové DNA izolované z výrobků 1, 2, 3, 4 a 5.

5.7 Druhově specifická PCR pro druh *Bifidobacterium animalis*

Druhově specifická PCR byla provedena pomocí primerů Pbi R1 a Ban F2. Směsi pro PCR byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5. Výsledky agarosové gelové elektroforézy PCR produktů a schéma nanesení vzorků na gel jsou uvedeny na Obr. 13.

Obr. 13: Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických produktů PCR (925 bp).



Běh	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng)	Produkt PCR
1	Velikostní standard (3 µl)		
2	1A	16,8	++
3	1B	15,5	++
4	4A	23,5	+
5	4B	15,8	+
6	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/µl)	10,0	+++
7	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-

Amplifikován byl 1 µl celkové izolované DNA z výrobků č. 1 a 4. Výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2.

+++ byl detegován velmi silný produkt PCR

++ byl detegován silný produkt PCR

+ byl detegován slabý produkt PCR

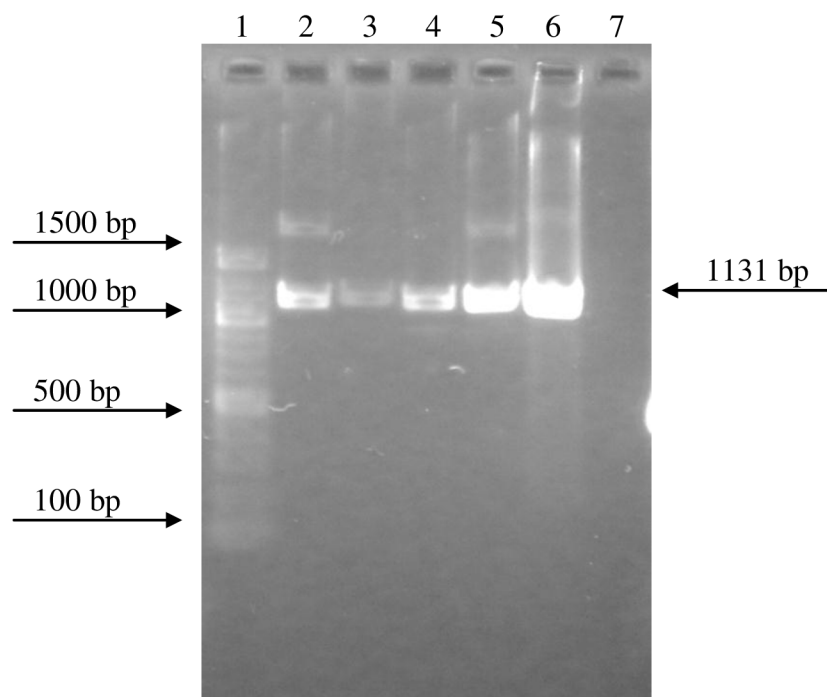
- produkt PCR nebyl detegován

=>Druhově specifické PCR produkty *Bifidobacterium animalis* o velikosti 925 bp byly detegovány po amplifikaci celkové DNA izolované z výrobků 1 a 4.

5.8 Druhově specifická PCR pro druh *Lactococcus lactis ssp. lactis*

Druhově specifická PCR byla provedena pomocí primerů PALA 4 a PALA 14. Směsi pro PCR byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5. Výsledky agarosové gelové elektroforézy PCR produktů a schéma nanesení vzorků na gel jsou uvedeny na Obr. 14.

Obr. 14: Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických produktů PCR (1131 bp).



Běh	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng)	Produkt PCR
1	Velikostní standard (3 µl)		
2	6	8,5	++
3	7	24,8	++
4	8	24,2	+
5	9	22,3	+
6	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/µl)	10,0	+++
7	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-

Amplifikován byl 1 µl celkové izolované DNA z výrobků č. 6, 7, 8 a 9. Výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2.

+++ byl detegován velmi silný produkt PCR

++ byl detegován silný produkt PCR

+ byl detegován slabý produkt PCR

- produkt PCR nebyl detegován

=>Druhově specifické PCR produkty *Lactococcus lactis ssp. lactis* o velikosti 1131 bp byly detegovány po amplifikaci celkové DNA izolované z výrobků 6, 7, 8 a 9.

5.9 Shrnutí výsledků průkazu bakteriální DNA ve výrobcích s využitím PCR

Pro průkaz bakteriální DNA ve výrobcích bylo použito 6 různých PCR.

5.9.1 Mléčné výrobky tekuté

Shrnutí výsledků průkazu bakteriální DNA v tekutých mléčných výrobcích je uvedeno v tabulce 14.

Tabulka 14: Průkaz bakteriální DNA v tekutých mléčných výrobcích.

DNA	Výrobek/přítomnost DNA				
	1	2	3	4	5
doména <i>Bacteria</i>	+	+	+	+	+
rod <i>Lactobacillus</i>	+	+	+	+	+
rod <i>Bifidobacterium</i>	+	-	-	+	-
druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-	+	-
druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	+	-	-	+	-

Seznam výrobků je uveden v Tabulce 2.

5.9.2 Sýry

Shrnutí výsledků průkazu bakteriální DNA v sýrech je uvedeno v tabulce 15.

Tabulka 15: Průkaz bakteriální DNA v sýrech.

DNA	Výrobek/přítomnost DNA			
	6	7	8	9
doména <i>Bacteria</i>	+	+	+	+
druh <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	+	+	+	+

Seznam výrobků je uveden v Tabulce 2.

5.10 Srovnání výsledků získaných amplifikací DNA a údajů deklarovaných výrobcem

Bylo provedeno srovnání přítomnosti bakteriální DNA ve výrobcích získané pomocí PCR s údaji deklarovanými výrobcem.

5.10.1 Mléčné výrobky tekuté

Shrnutí výsledků srovnání přítomnosti bakteriální DNA v tekutých mléčných výrobcích získané pomocí PCR s údaji deklarovanými výrobcem je uvedeno v Tabulce 16.

Tabulka 16: Srovnání výsledků s údaji deklarovanými výrobcem.

DNA	Přítomnost bakterií				
	Uvedená výrobcem/ověřená amplifikací				
	1	2	3	4	5
doména <i>Bacteria</i>	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
rod <i>Lactobacillus</i>	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
rod <i>Bifidobacterium</i>	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-
druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-
druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-

Seznam výrobků je uveden v Tabulce 2.

5.10.2 Sýry

Shrnutí výsledků srovnání přítomnosti bakteriální DNA v sýrech získané pomocí PCR s údaji deklarovanými výrobcem je uvedeno v Tabulce 17.

Tabulka 17: Srovnání výsledků s údaji deklarovanými výrobcem.

DNA	Přítomnost DNA			
	Uvedeno výrobcem/ověřená amplifikací			
	1	2	3	4
doména <i>Bacteria</i>	+/+	+/+	+/+	+/+
druh <i>Lactococcus lactis</i>	+/+	+/+	+/+	+/+

Seznam výrobků je uveden v Tabulce 2.

6 DISKUZE

6.1 Izolace DNA z výrobků, stanovení koncentrace

DNA z 9 mléčných výrobků (výrobky jsou uvedeny v Tabulce 2) byla izolována z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA). DNA byla izolována v dostatečném množství pro PCR.

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Vzorčky byly proměřeny v rozmezí vlnových délek 230–320 nm. Naměřené koncentrace byly v rozmezí 8,5 ng/μl–46 ng/μl.

6.2 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Amplifikace DNA s primery specifickými pro doménu *Bacteria* proběhla podle programu BACTERIA; byly použity primery F_eub a R_eub. Produkt PCR o velikosti 466 bp se amplifikoval u všech 9 testovaných výrobků. Tím byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích.

6.3 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Amplifikace DNA s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* podle programu LBCROD; byly použity primery LbLMA 1-rev a R16-1. Produkt PCR o velikosti 250 bp se amplifikoval u výrobků č. 1, 2, 3, 4 a 5, tedy u všech tekutých mléčných výrobků. Tímto byla potvrzena přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus*, které byly deklarovány výrobcem.

6.3.1 Optimalizace polymerázové řetězové reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

U výrobku č. 1 došlo k amplifikaci DNA, ale PCR produkt byl detegován příliš slabě a na Obr. 9 není patrný. Z tohoto důvodu byla provedena optimalizace postupu izolace DNA. DNA byla izolována z dvojnásobného množství vzorku a do směsi pro PCR bylo použito desetinásobné množství izolované DNA. Amplifikoval se produkt PCR o velikosti 250 bp a tím byla potvrzena přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus*, které byly deklarovány výrobcem.

6.3.2 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Amplifikace DNA s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus* proběhla podle programu LBCACI; byly použity primery Aci 16SI a 16SII. Produkt PCR o velikosti 800 bp se amplifikoval u výrobku č. 4. Tímto byla potvrzena přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* v tomto výrobku. Výrobce tento druh nebyl deklarován.

6.4 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium*

Amplifikace DNA s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* proběhla podle programu BIFI914; byly použity primery Pbi F1 a Pbi R2. Produkt PCR o velikosti 914 bp se amplifikoval u výrobků č. 1 a 4. Tímto byla potvrzena přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium*, které byly deklarovány výrobcem.

6.4.1 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium animalis*

Amplifikace DNA s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium animalis* proběhla podle programu B.ANIM; byly použity primery Pbi R1 Ban F2. Produkt PCR o velikosti 925 bp se amplifikoval u výrobku č. 1 a 4. Tímto byla potvrzena přítomnost bakterií druhu *Bifidobacterium animalis* v těchto výrobcích. Výrobce byl tento druh deklarován u výrobku č. 1, u výrobku č. 4 nebyl deklarován.

6.5 Polymerázová řetězová reakce s primery specifickými pro druh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Amplifikace DNA s primery specifickými pro druh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* proběhla podle programu PALA4→PALA14; byly použity primery PALA4 a PALA14. Produkt PCR o velikosti 1131 bp se amplifikoval u výrobku č. 6, 7, 8 a 9. Tímto byla potvrzena přítomnost bakterií druhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, které byly deklarovány výrobcem.

6.6 Srovnání výsledků získaných amplifikací DNA a údajů deklarovaných výrobcem

Analýza mléčných výrobků s použitím amplifikačních metod (PCR) prokázala, že zastoupení bakteriálních druhů odpovídá informacím od výrobce; pouze u výrobku č. 4 nebyly výrobcem uvedeny 2 bakteriální druhy, které byly analýzou prokázány.

7 ZÁVĚR

Cílem práce byla izolace bakteriální DNA z pěti fermentovaných mléčných výrobků a čtyř sýrů v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Izolace DNA byla provedena z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA) v prostředí 16 % PEG 6000 a 2 M NaCl. Bylo ověřeno, že částice jsou vhodné pro izolaci dostatečného množství DNA z analyzovaných výrobků v kvalitě vhodné pro PCR. Koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky a pohybovala se v rozmezí 8,5 ng/μl–46 ng/μl.

Pomocí rodově a druhově specifické PCR byla prokázána přítomnost bakteriálních rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, a bakteriální druhů *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Získané výsledky byly porovnány s údaji deklarovanými výrobcem a byla zjištěna shoda.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] KLAENHAMMER, Todd R., Rodolphe BARRANGOU, B. Logan BUCK, M. Andrea AZCARATE-PERIL a Eric ALTERMANN. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, roč. 29, č. 3, s. 393-409. ISSN 01686445.

[2] POT BRUNO, TSAKALIDOU EFFIE. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. In: *Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics*. Editor Åsa Ljungh, Torkel Wadström. Norfolk: Caister Academic Press, 2009, 205 s. ISBN 978-1-904455-41-7.

[3] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 2004, 99 s. ISBN 80-214-2567-9.

[4] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

[5] KLAENHAMMER, T. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, roč. 12, 1-3, s. 39-85. ISSN 01686445.

[6] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

[7] BERNARDEAU, Marion, Micheline GUGUEN a Jean Paul VERNOUX. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006, roč. 30, č. 4, s. 487-513. ISSN 01686445.

[8] List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature LPSN [online].

[cit. 2010-05-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.bacterio.cict.fr>>.

- [9] Funkční potraviny [online]. Masarykova univerzita v Brně, změněno 18. října 2005 [cit. 2010-05-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/mikrofloraGIT/funkcnipotrav/odk4.htm>>
- [10] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.
- [11] FRANK, Hanns K. *Dictionary of Food Microbiology*. 1. vyd. Lancaster: Technomic Publishing CO., INC., 1992, 298 s. ISBN 15-667-6010-0.
- [12] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9.
- [13] *Bifidobacterium animalis* [online]. [cit. 2012-05-03]. dostupný z WWW: <<http://microbiology.ucoz.com/photo/1-0-9-3>>.
- [14] *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* [online]. [cit. 2012-05-03]. dostupný z WWW: <<http://jpkc.njau.edu.cn/spwswx/cankao/ShowArticle.asp?ArticleID=314>>.
- [15] LISAK V. AloeInfo.cz [online]. [cit. 2010-05-16]. Probiotika. Dostupné z WWW: <<http://www.aloeinfo.cz/probiotika>>.
- [16] FRIC, Premysl. Probiotics and prebiotics - renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine*. 2007, roč. 2, č. 3, s. 237-270. ISSN 1895-1058.
- [17] SALMINEN, S., A.C. OUWEHAND a E. ISOLAURI. Clinical Applications of Probiotic Bacteria. *International Dairy Journal*. 1998, roč. 8, 5-6, s. 563-572. ISSN 09586946.
- [18] LUKÁŠ K., et al. Pharmanews [online]. 2006 [cit. 2010-05-13]. Probiotika. Dostupné z WWW: <http://www.pharmanews.cz/2006_03/probiotika.html>.
- [19] MATTILA-SANDHOLM, T., P. MYLLÄRINEN, R. CRITTENDEN, G. MOGENSEN, R. FONDÉN a M. SAARELA. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 2002, roč. 12, 2-3, s. 173-182. ISSN 09586946.

[20] SALMINEN, S. Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology*. roč. 44, 1-2, s. 93-106. ISSN 01681605.

[21] Jogurt [online]. Změněno 16. dubna 2010 [cit. 2010-05-12]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Jogurt> >.

[22] ŠMAHELOVÁ Hana. Probiotika. Brno: Ústav preventivního lékařství LF Masarykovy univerzity, 2008. 82 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Danuše Lefnerová, Ph.D.

[23] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.

[24] ŠAFAŘÍK, Ivo., ŠAFAŘÍKOVÁ, Mirka. Use of magnetic technique for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*, 1999, vol. 722, pp. 33-53.

[25] MA, Zhiya a Huizhou LIU. Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology*. 2007, roč. 5, 1-2, s. 1-10. ISSN 16722515.

[26] HORÁK, Daniel, Michal BABI?, Hana MACKOVÁ a Milan J. BENE?. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*. 2007, roč. 30, č. 11, s. 1751-1772. ISSN 16159306.

[27] ŠÁLEK, Petr. *Příprava a charakterizace vysoce zesítěných polymerních nosičů*. Pojednání k dizertační práci. Brno, 2010.

[28] HORÁK, Daniel, RITTICH, Bohuslav, ŠPANOVÁ, Alena, BENEŠ, Milan J.: Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 169-180.

- [29] KRÍŽOVÁ, Jana, Alena ŠPANOVÁ, Bohuslav RITTICH a Daniel HORÁK. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*. 2005, roč. 1064, č. 2, s. 247-253. ISSN 00219673.
- [30] RITTICH, B., A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M.J. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ a A. RYBNIKÁŘ. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, roč. 52, č. 2, s. 143-148. ISSN 09277765.
- [31] KRÁLOVÁ, Blanka, FUKAL Ladislav, RUMML Tomáš a Pavel RAUCH. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [32] RUMML, Tomáš. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 270 s. ISBN 80-708-0499-8.
- [33] Termocykler [online]. [cit. 2012-05-03]. dostupný z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Termocykler.htm>>.
- [34] Molekulární biologie [online] Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. [cit. 2012-05-03]. Dostupný z WWW: <http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-pcr&lang=cz>.
- [35] PRODĚLALOVÁ Jana. *Molekulární diagnostika potravinářsky významných mikroorganismů*, 2004. Dizertační práce, PřF MU Brno.
- [36] HERZOGOVÁ Jitka. *Identifikace bakterií mléčného kvašení v tvrdých sýrech s využitím amplifikačních metod*, 2008. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [37] POWELL, H., HOLDING, L. M., GARRETT, S. D., LUND, B. M., MCKEE, R. A.: Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk usány the polymerase chain reaction, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1994, 18: 59-61.

[38] PETROVÁ Kateřina. *Identifikace bakterií mléčného kvašení (BMK) v mléčných výrobcích s využitím metod amplifikace DNA*, 2004. Diplomová práce, PřF MU Brno.

[39] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.

[40] BUIST, G., KOK, J., LEENHOUTS, K. J., DABROWSKA, M., VENEMA, G., HAANDRIKMAN, A. J.: Molecular Cloning and Nukleotide Sequence of the Gene Encoding the Major Peptidoglycan Hydrolyse of *Lactococcus lactis*, a Muramidase Needed for Cell Separation, *Journal of Bacteriology*, 1995, p. 1554-1563.

[41] RIEGELOVÁ, Kristýna. *Molekulární identifikace vybraných druhů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií v doplňcích stravy*, 2011. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AT	adenin a thymin
BMK	bakteri mléčného kvašení
bp	pár basí (base pair)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection Microorganismes)
dATP	2'-deoxyadenosin 5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin 5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
dTTP	2'-deoxythymidin 5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	ethidium bromid
GC	guanin a cytosin
GIT	gastrointestinální trakt
GMA	glycidyl methakrylát
HEMA	2-hydroxyethyl methakrylát
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylen glykol
PGMA	poly(glycidyl methakrylát)
P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	poly(2-hydroxyethyl methakrylát- <i>co</i> -glycidyl methakrylát)
P(HEMA- <i>co</i> -EDMA)	poly(2-hydroxyethyl methakrylát- <i>co</i> -ethylen dimethakrylát)
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
TBE	pufr Tris-borát-EDTA
TE	pufr Tris-EDTA