

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

ANALÝZA DNA IZOLOVANÉ Z PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ S
VYUŽITÍM MAGNETICKÝCH MIKROCÁSTIC

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. JAN OLIVA

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA DNA IZOLOVANÉ Z PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ S VYUŽITÍM MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC

ANALYSIS OF DNA ISOLATED FROM PROBIOTIC PRODUCTS USING MAGNETIC
MICROPARTICLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. JAN OLIVA

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2015



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0908/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Jan Oliva**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**
Konzultanti: doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Analýza DNA izolované z probiotických výrobků s využitím magnetických mikročástic

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: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jan Oliva
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na izolaci a průkaz probiotických bakterií ve třech různých probiotických výrobcích pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR). DNA v kvalitě vhodné pro PCR byla izolována z hrubých lyzátů buněk pomocí tří druhů magnetických částic a pomocí fenolové extrakce. Identifikace rodů a druhů probiotických bakterií byla ověřena pomocí rodově a druhově specifických PCR. Získané výsledky byly v souladu s údaji prezentovanými výrobcí.

ABSTRACT

This thesis is interested in isolation and identification of probiotic bacteria in three different probiotic products using polymerase chain reaction (PCR). DNA in quality suitable for PCR was isolated from crude lysates using three different types of magnetic microparticles and phenol extraction. Identification genera and species of probiotic bacteria was proven using genus and species specific PCRs. Results were in accordance with data presented by manufacturers.

KLÍČOVÁ SLOVA

probiotické výrobky, izolace DNA, magnetické mikročástice, polymerázová řetězová reakce (PCR), rod *Lactobacillus*, rod *Bifidobacterium*

KEYWORDS

probiotic products, DNA isolation, magnetic microparticles, polymerase chain reaction (PCR), genera *Lactobacillus*, genera *Bifidobacterium*

Oliva, J. Analýza DNA izolované z probiotických výrobků s využitím magnetických mikročástic. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. počet stran 85, Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou úplně a správně citovány. 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

Mé poděkování patří především vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za cenné rady, odborné vedení a trpělivost. Současně bych také rád poděkoval za pomoc Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. Probiotika	10
2.1.1. Základní definice	10
2.1.2. Historie	10
2.1.3. Právní hledisko	11
2.1.4. Přínos probiotik	11
2.1.5. Probiotické mikroorganismy	12
2.1.6. Identifikace probiotických mikroorganismů	12
2.2. Prebiotika a synbiotika	13
2.2.1. Prebiotika	13
2.2.2. Synbiotika	13
2.3. Funkční potraviny	14
2.3.1. Základní definice	14
2.3.2. Právní hledisko	14
2.4. Bakterie mléčného kvašení	15
2.4.1. Obecné informace	15
2.4.2. Mléčné kvašení	15
2.4.2.1. Homofermentativní kvašení	15
2.4.2.2. Heterofermentativní kvašení	16
2.4.3. Rod <i>Lactobacillus</i>	18
2.4.3.1. Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
2.5. Rod <i>Bifidobacterium</i>	19
2.5.1. Druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	20
2.6. Doména <i>Bacteria</i>	20
2.7. Polymerázová řetězová reakce	21
2.7.1. Princip	21
2.7.2. Primery	22
2.7.3. Další druhy PCR	23
2.8. Bioinformatika	24
2.8.1. Definice	24
2.8.2. Základní bioinformatické problémy	24

2.8.3. Bioinformatické databáze	24
2.9. Magnetické mikročástice k izolaci DNA	25
3. CÍL PRÁCE	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1. Materiál a přístroje	27
4.1.1. Chemikálie	27
4.1.2. Magnetické částice Fkol135ox, FkolB30ox a Dynabeads	27
4.1.3. PCR komponenty	28
4.1.4. Primery pro PCR	28
4.1.4.1. Primery specifické pro doménu <i>Bacteria</i>	28
4.1.4.2. Primery specifické pro rod <i>Lactobacillus</i>	28
4.1.4.3. Primery specifické pro rod <i>Bifidobacterium</i>	28
4.1.4.4. Primery specifické pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	29
4.1.4.5. Primery specifické pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	29
4.1.4.6. Primery specifické pro druh <i>Lactobacillus casei</i>	29
4.1.4.7. Primery specifické pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	29
4.1.4.8. Primery specifické pro druh <i>Bifidobacterium bifidum</i>	29
4.1.4.9. Primery specifické pro druh <i>Bifidobacterium breve</i>	30
4.1.4.10. Primery specifické pro gen ODC (ornitidekarboxyláza) u druhu <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	30
4.1.5. Roztoky	30
4.1.5.1. Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk	30
4.1.5.2. Roztoky k izolaci DNA	31
4.1.5.3. Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu	31
4.1.6. Pomůcky a přístroje	32
4.1.7. Probiotické výrobky (doplňky stravy)	33
4.1.7. DNA kontrolních bakteriálních kmenů	35
4.2. Metody	35
4.2.1. Příprava hrubých lyzátů buněk z výrobků	35
4.2.2. Izolace DNA metodou fenolové extrakce	35
4.2.3. Srážení DNA etanolem	35
4.2.4. Izolace DNA pomocí magnetických částic	36
4.2.5. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	36

4.2.6. Příprava směsi pro PCR	36
4.2.7. Provedení PCR	37
4.2.8. Agarosová gelová elektroforéza bakteriální DNA a produktů PCR	38
4.2.9. Vyhodnocení gelů	38
5. VÝSLEDKY	39
5.1. Izolace DNA metodou fenolové extrakce z výrobku Linex Forte	39
5.1.1. Nanospektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	39
5.1.2. Agarózová gelová elektroforéza DNA	39
5.1.3. PCR s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	40
5.1.4. PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	41
5.1.5. PCR s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	43
5.1.6. PCR s primery specifickými pro rod <i>Bifidobacterium</i>	44
5.1.7. PCR s primery specifickými pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	45
5.1.8. Shrnutí výsledků amplifikace DNA izolované z výrobku Linex Forte fenolovou extrakcí	46
5.2. Izolace DNA z výrobků pomocí magnetických nosičů	46
5.2.1. Nanospektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	47
5.2.2. Agarózová gelová elektroforéza DNA	47
5.2.3. PCR s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	48
5.2.4. PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	52
5.2.4. PCR s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	56
5.2.5. PCR s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus casei</i>	58
5.2.6. PCR s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	60
5.2.7. PCR s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus plantarum</i>	62
5.2.8. PCR s primery specifickými pro gen ODC (ornithindekarboxyláza) u <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	65
5.2.9. PCR s primery specifickými pro rod <i>Bifidobacterium</i>	66
5.2.10. PCR s primery specifickými pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	69
5.2.11. PCR s primery specifickými pro druh <i>Bifidobacterium bifidum</i>	71
5.2.12. PCR s primery specifickými pro druh <i>Bifidobacterium breve</i>	73
5.2.13. Srovnání amplifikace DNA izolované testovanými nosiči	76
5.3. Srovnání amplifikace DNA izolované fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči u výrobku Linex Forte	76
6. DISKUSE	78

7. ZÁVĚR	80
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	81
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	85

1. ÚVOD

Probiotické výrobky se od doby svého uvedení na trh v Japonsku roku 1984 rozšířily téměř po celém světě a zaujímají stabilní místo na trhu s potravinovými doplňky a v některých zemích světa i s léčivy. V České republice jsou dostupné volně a bez receptu a navzájem se liší jak cenou, tak množstvími obsažených mikroorganismů a jejich druhy. Většina těchto probiotických organismů nicméně patří do velké skupiny bakterií mléčného kvašení nebo se jedná o bakterie rodu *Bifidobacterium*. Tato práce se zabývá identifikací některých probiotických bakterií přítomných v třech komerčně dostupných probiotických výrobcích.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Probiotika

2.1.1. Základní definice

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které poskytují určité zdravotní benefity (Seale a kol., 2013). Tyto benefity se liší podle druhu mikroorganismu. Účinek jednoho druhu mikroorganismu nemůže být automaticky předpokládán i u druhu mikroorganismu jiného. Rozdíly jsou i mezi jednotlivými kmeny. (Rijkers a kol., 2011). Probiotické organismy používané v potravinářství jsou obvykle lidského původu (Caselli a kol., 2013). Jako doplňkové látky v potravinách se probiotika využívají od sedmdesátých let dvacátého století, ale k prvním experimentům s jejich využitím v potravinářství a farmacii docházelo již od let dvacátých (Reuter, 2001). První a dodnes platná definice probiotik byla zavedena roku 1989 Fullerem. Tato definice říká, že probiotika jsou živé mikrobiální potravní a krmné doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenózy. Pro úplnost, současná definice probiotik podle WHO (Světová zdravotnická organizace) zní: Probiotika jsou živé organismy, které při podání v dostatečných množstvích mají pozitivní efekt na hostitele (Seale a kol., 2013).

2.1.2. Historie

Pojem probiotikum byl poprvé použit roku 1965. Zavedli ho Lilly a Stillwell, aby jím označili látku produkovanou jedním prvokem, která stimulovala růst prvoka jiného. Časem se tento pojem začal používat pro krmné a potravní doplňky, které byly určeny k výživě hospodářských zvířat a později také lidí. Termín zahrnoval buďto živé bakteriální kultury, ale taktéž i určité substance jako jsou mikrobiální metabolity, aminokyseliny, enzymy atd., které pozitivně ovlivňují mikroflóru trávicího traktu. Tato definice by ale zahrnovala i některá antibiotika. Význam slova probiotikum však znamená „pro život“, což je tedy přímým opakem slova antibiotikum.

Probiotika lidé konzumovali, ať již vědomě či nevědomě, i před rokem 1965. Jako počátek teorie probiotik je však často uváděn rok 1907. V tomto roce Ilja Mečnikov publikoval tzv. „Optimistickou studii o prodlužování věku“, ve které se zabýval srovnáváním dlouhověkosti lidí žijících na Balkánském poloostrově. Jejich dlouhověkost přisoudil pravidelné konzumaci kysaných mléčných výrobků obsahujících živé bakterie, která je v těchto zemích běžná. Postuloval také teorii o potlačování hnilobných procesů pomocí jogurtových bakterií, která je dodnes uznávána jako jeden z mechanismů, jakým probiotika působí.

Ne přímo jako začátek rozmachu probiotik, ale spíše jako první krůček k probiotikům, se dá označit také rok 1899. Tehdy Henry Tissier poprvé izoloval ze stolice kojenců bifidobakterie (Rada, 2010).

2.1.3. Právní hledisko

V průběhu minulých dvaceti let byl poměrně intenzivně zkoumán terapeutický potenciál probiotik a byla věnována značná vědecká pozornost jejich použití v rozdílných klinických podmínkách. Přesto na mezinárodní úrovni neexistuje shoda v tom, zda lze probiotické výrobky definovat i jako léčiva, nebo nikoliv. V jednotlivých státech jsou definice rozdílné. Například v Německu mohly donedávna být některé výrobky definovány dokonce jako léky, což záviselo na koncentraci probiotik (Caselli a kol., 2013).

V jiných zemích je zase problém s definicí probiotik jako látek, které tvoří součást potravin a probiotik jako samotných potravních doplňků. V takových případech se používají názvy jako bioterapeutické agens a mikroorganismy se zdravotním přínosem (beneficial microorganisms) (Pineiro a kol., 2007).

Mezinárodní autority včetně WHO a EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) vydaly společně doporučení zaměřené na bezpečnost probiotik. Tato doporučení zmiňují použití probiotik jako doplňků stravy u zdravé populace. Doporučení dále říká, že probiotika nemohou být přímo aplikovaná při léčení v nemocnicích apod., tedy jako léky.

Důvodem, proč probiotika nemohou být definovány jako léky je, že lék má jasně dané chemické složení. Můžeme popsat jeho neměnné účinky a jejich rozsah. Probiotika jsou mikroorganismy a nemohou být proto takto popsány. Podléhají změnám, rozmnožují se, mění se v čase a interagují jak mezi sebou navzájem, tak s tělem hostitele různými způsoby (Seale a kol., 2013).

2.1.4. Přínos probiotik

Probiotika mohou v mezích fyziologických limitů zlepšovat některé funkce trávicího ústrojí, jako je pravidelnost stolice nebo určité subjektivní charakteristiky. Konzumace probiotik může být přínosná pro předcházení vzniku určitých chorob a mírnění jak objektivních, tak i subjektivních symptomů. Zdravotní přínos probiotik je velice těžké sledovat ve zdravé populaci a testy se proto provádějí na jedincích s nějakou poruchou (Aureli a kol., 2011)

Mezi nejčastější zdravotní účinky probiotik patří prevence a léčba průjmů způsobených antibiotiky, léčba zánětů tenkého a tlustého střeva a zápalu tlustého střeva (pouchitis). Dále mají účinek na prevenci průjmů obecně, zlepšení funkčnosti střev (průchod

tráveniny, pravidelnost pohybů střev sloužících k úpravě tráveniny) nebo zlepšení kvality stolice (Rijkers a kol., 2011).

Probiotika jsou také běžně používána v dětském lékařství k posílení imunity, prevenci alergií a obezity (Waikar, 2013) Na druhou stranu velký pokrok se očekává také ve využití probiotik ve stárnoucí populaci. Osídlení střeva mikroorganismy se totiž v průběhu života mění a tyto změny mohou souviset se záněty, metabolickými poruchami i slábnutím organismu v důsledku stáří (Duncan a kol., 2013).

2.1.5. Probiotické mikroorganismy

Výčet probiotických mikroorganismů je poměrně pestrý a zahrnuje kromě samotných bakteriálních druhů probiotik také plísňe a kvasinky. Přehled probiotických organismů poskytuje tabulka 2.1 (Heyman a kol., 2002; Rada, 2010).

Tab. 2.1: Seznam některých probiotických organismů (Heyman a kol., 2002; Rada, 2010)

Probiotické organismy		
druhy rodu <i>Lactobacillus</i>	druhy rodu <i>Bifidobacterium</i>	další mikroorganismy
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactobacillus casei</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>		
<i>Lactobacillus lactis</i>		

2.1.6. Identifikace probiotických organismů

Probiotické organismy lze identifikovat řadou metod. Kromě polymerázové řetězové reakce (PCR), kterou se zabývá tato práce, to může být např. denaturační gradientová gelová elektroforéza, pulsní gelová elektroforéza, metoda RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů), náhodná amplifikace polymorfní DNA, interrepetivní PCR nebo kvantitativní PCR v reálném čase. Tyto výše popsané metody jsou metody molekulárně biologické. (Videňská, 2010).

Lze použít také biochemické nebo fyziologické metody, jako jsou např. růstové testy při 4 °C a 15 °C ve zkumavkách s MRS médiem, nebo fermentační zkoušky. Při identifikaci mikroorganismu se také používá určení antimikrobiální aktivity a sledování produkce bakteriocinů, tedy látek, které inhibují růst jiných mikroorganismů. (Jafari a kol., 2011).

2.2. Prebiotika a synbiotika

2.2.1. Prebiotika

Definice prebiotik, kterou navrhl Glenn Gibson, jeden z autorů tohoto pojmu, zní následovně. Jedná se o selektivně fermentované ingredience, umožňující specifické změny ve složení a/nebo aktivitě střevní mikroflóry, což má příznivý vliv na hostitelovo zdraví. Současně byly druhým z dvojice autorů tohoto termínu, Marcelem Roberfroidem, postulovány tři kritéria pro nebiotické substance. Musí se jednat o látky odolné vůči žaludečním kyselinám a vůči hydrolytickým enzymům v trávicím traktu, musí být fermentovatelné střevními bakteriemi a nakonec musí selektivně stimulovat růst a/nebo aktivitu střevních bakterií, které mají pozitivní účinek na zdraví hostitele, tedy bakterií probiotických. Jedná se tedy o jakousi „potravu pro probiotika“ (Rada, 2010).

Prebiotika jsou nestavitelné součásti potravin, které jsou-li konzumovány v dostatečném množství, selektivně stimulují růst a/nebo aktivitu jednoho druhu mikroorganismu, popřípadě omezeného počtu druhů mikroorganismů ve střevě, což vede k různým zdravotním benefitům pro organismus hostitele. V současné době se jako prebiotika používají sacharidy nízké stravitelnosti, které se přirozeně vyskytují v potravinách a zahrnují manooligosacharidy, pektooligosacharidy, xylooligosacharidy, galaktooligosacharidy a chitooligosacharidy. V současnosti se výzkum zaměřil také na arabinoxylanoligosacharidy. Velmi časté je také zaměření studií prebiotik na inulin a fruktooligosacharidy (Duncan a kol., 2013)

Prvním a nejlepším zdrojem prebiotik pro člověka je mateřské mléko, které obsahuje značné množství výše uvedených nestavitelných oligosacharidů (Rada, 2010).

2.2.2. Synbiotika

Synbiotickým účinkem označujeme synergistickou kombinaci probiotik a prebiotik (Vrese, 2008). Tento termín je ze skupiny pro/pre/syn-biotik nejmladší. Jedná se o směs probiotik a prebiotik, přičemž se očekává synergický účinek obou složek. Nejjednodušším příkladem synbiotika je jogurt, který obsahuje probiotické bifidobakterie a prebiotickou oligofruktózu (Rada, 2010).

Poměrně novým trendem v technologii potravin, konkrétně dětské výživy, je v současné době přidávání synbiotik do kojenecké výživy (Mugambi a kol., 2014)

2.3. Funkční potraviny

2.3.1. Základní definice

Pojem „funkční potravina“ byl poprvé použit v Japonsku roku 1984 jako výsledek studie vztahu mezi výživou, smyslovým uspokojením, upevněním a modulací fyziologických systémů. Cílem bylo vymezit potravinářské výrobky vylepšené speciálními složkami s výhodnými fyziologickými účinky. Tyto složky nemusejí být nutně pouze probiotické povahy (Hardy, 2000; Kwak a kol., 2001).

Přínosy funkčních potravin jsou rozmanité - od celkového posílení těla (např. ovlivnění imunitního systému probiotiky nebo prebiotiky) přes snížení rizika vzniku nemoci (např. probiotika snižující hladinu cholesterolu) až po léčení určitých nemocí (Bigliardi, 2013).

Základní konflikt u funkčních potravin a jejich přijetí společností v různých zemích je trojí. Některé země odmítají na potravinách jak výživová tvrzení, tak zdravotní tvrzení. Další odmítají zdravotní tvrzení, ale výživová tvrzení přijímají. Poslední skupinou jsou země, které u potravin schvalují jak zdravotní, tak výživová tvrzení (Farr, 1997)

2.3.2. Právní hledisko

V Evropské unii ani v České republice doposud neexistuje dokument nebo předpis, který by definoval nebo jiným způsobem uváděl pravidla a podmínky pro výrobu funkčních potravin. Existují ale předpisy, které se týkají především označování tohoto druhu potravin, neboť každá takováto potravina nese na svém obalu zdravotní tvrzení, které dává spotřebiteli informaci o zdravotním přínosu potraviny nebo její složky či části na lidský organismus.

Na konci roku 2006 bylo Evropskou komisí vydáno nařízení EP (Evropský parlament) a rady č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. Toto nařízení mělo za úkol zajistit, aby u látek, které jsou předmětem tvrzení, bylo opravdu vědecky prokázáno, že mají příznivý efekt, který deklarují. Jednotlivá tvrzení posuzuje EFSA (Evropská organizace pro bezpečnost potravin). Existuje tak seznam tvrzení, která se vždy vážou k určité živině. O taková tvrzení, která v seznamu nejsou uvedena, musí výrobce žádat EFSA.

Problematiky se dotýká ještě nařízení č. 258/1997 o nových potravinách a o nových složkách potravin. Toto nařízení říká, že potraviny, které se ve velké míře nekonzumovaly před datem vydání nařízení, tj. 15. 5. 1997 jsou považovány za nové potraviny nebo nové složky potravin. (Beránková, 2009)

2.4. Bakterie mléčného kvašení

Z důvodu, že většina probiotických organismů jsou bakterie mléčného kvašení, je na místě pojednat o této skupině mikroorganismů (Zhang, 2014).

2.4.1. Obecné informace

Skupina bakterií mléčného kvašení (BMK) sestává z mikroorganismů, konkrétněji bakterií, které se podobají určitými vlastnostmi. Mezi tyto vlastnosti patří morfologie, metabolismus a fyziologické vlastnosti. Určité bakterie mléčného kvašení jsou si také relativně blízké fylogeneticky. Základní popis těchto bakterií zahrnuje pojmy jako gram-positivní, nesporulující tyčinky nebo koky, které prostřednictvím fermentace produkují ze sacharidů kyselinu mléčnou jakožto hlavní metabolický produkt.

Běžně byly do skupiny bakterií mléčného kvašení řazeny 4 tradiční rody, ale nové výzkumy ukázaly, že tato skupina může být rozšířena o rody nové. Původní tradiční 4 rody jsou *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Mezi nové rody patří mimo jiné například *Aerococcus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus* nebo *Carnobacterium* (Khalisanni, 2011). Často jsou k bakteriím mléčného kvašení řazeny také rody *Propionibacterium*, *Lactococcus* a *Bifidobacterium* (Todar, 2014).

2.4.2. Mléčné kvašení

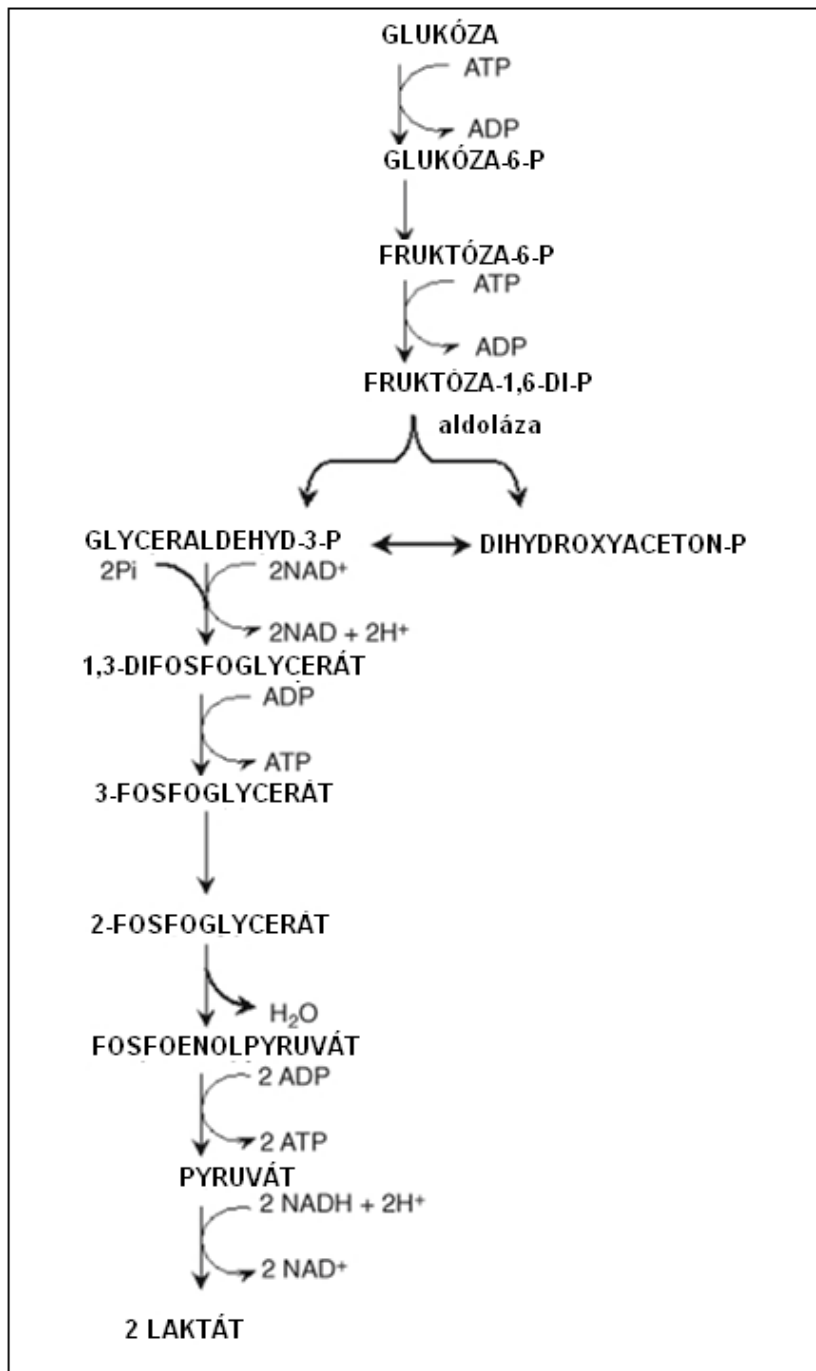
Kvašení obecně je děj, při kterém v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů probíhají chemické přeměny organických látek, obvykle sacharidů. Mléčné kvašení je anaerobní, probíhá tedy bez přítomnosti kyslíku. Mezi další anaerobní kvašení patří např. kvašení alkoholové. Kvašení může probíhat i v přítomnosti kyslíku – aerobně. Příkladem takového typu je kvašení octové (Kodíček, 2015).

Existují dva typy mléčného kvašení, homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní kvašení lze pozorovat u některých druhů *Lactobacillus*, dále u druhu *Lactococcus*, *Pediococcus* nebo *Streptococcus*. Heterofermentativním kvašením se vyznačují rovněž některé druhy *Lactobacillus*, dále pak *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella* a *Bifidobacterium* (Todar, 2014).

2.4.2.1. Homofermentativní kvašení

Za podmínek nadbytku glukózy a limitovaného množství kyslíku homofermentativní bakterie mléčného kvašení katabolizují jeden mol glukózy v Embden – Meyerhofově dráze k získání dvou molů pyruvátu. Vnitrobuněčná redoxní rovnováha je zajištěna prostřednictvím oxidace NADH a současné redukce pyruvátu na kyselinu mléčnou. Tímto procesem se získávají dva moly ATP na jeden mol glukózy. Homofermentativní mléčné kvašení je schematicky popsáno na obrázku 2.1. (Todar, 2014).

Obr. 2.1: Schéma homofermentativního mléčného kvašení (Todar, 2014)

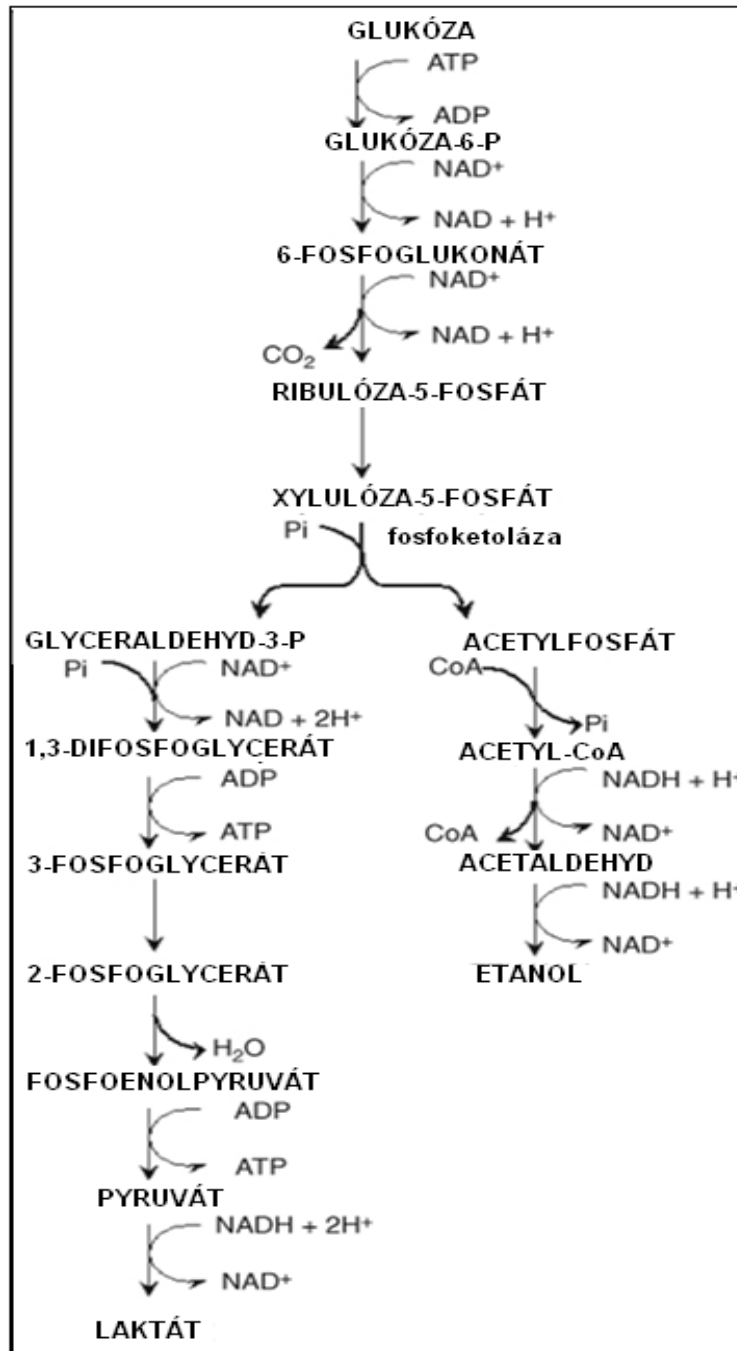


2.4.2.2. Heterofermentativní kvašení

Heterofermentativní mléčné kvašení využívá k disimilaci sacharidů pentosa – fosfátovou dráhu. Jeden mol glukosa-6-fosfátu je dehydrogenován na 6-fosfoglukonát a následně dekarboxylován na jeden mol oxidu uhličitého. Výsledná pentosa-5-fosfát se následně rozštěpí na jeden mol glyceraldehydfosfátu a jeden mol acetylfosfátu. Glyceraldehydfosfát je dále metabolizován na laktát homofermentativně s acetylfosfátem

redukovaným přes acetylkoenzym A a acetaldehyd na etanol. Koncové produkty (oxid uhličitý, laktát a etanol) by teoreticky měly být v ekvimolárním množství. Schematický popis heterofermentativního mléčného kvašení je na obrázku 2.2 (Todar, 2014).

Obr. 2.2: Schéma heterofermentativního mléčného kvašení (Todar, 2014)



2.4.3. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je řazen mezi bakterie mléčného kvašení, protože koncovým produktem jeho metabolismu sacharidů je kyselina mléčná (Lebeer a kol., 2008). Z tabulky 2.1 uvedené výše také vyplývá, že z bakterií mléčného kvašení má nejpočetnější zastoupení druhů mezi probiotickými výrobky (Heyman a kol., 2002; Rada, 2010).

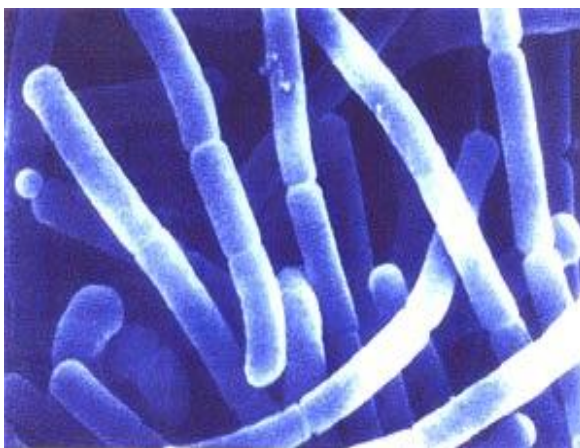
Jedná se o gram- pozitivní, nesportující a anaerobní bakterie. Z taxonomického hlediska patří rod *Lactobacillus* do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledě *Lactobacillaceae*. K růstu potřebuje bohatá média, která obsahují sacharidy, aminokyseliny, peptidy, estery mastných kyselin, deriváty nukleových kyselin a vitamíny.

Kromě role v potravinářství (fermentace) se rod *Lactobacillus* nachází v gastrointestinálním traktu člověka i zvířat v různých množstvích, které závisí na druhu hostitele, jeho stáří i umístění ve střevě. Kromě lidského střeva byly druhy rodu *Lactobacillus* nalezeny také v ženském pohlavním ústrojí, kde fungují jako ochrana proti různým infekcím (Lebeer a kol., 2008)

Rod *Lactobacillu* se člení na tři skupiny: A, B a C.

Skupina A je tvořena striktně homofermentativními druhy. Zahrnuje patnáct druhů. Nefermentují pentózy a rostou až do 45 °C. Do této skupiny patří například *Lactobacillus acidophilus*. Skupina B sestává z fakultativně heterofermentativních druhů fermentujících glukózu a produkujících kromě kyseliny mléčné i etanol, kyselinu mravenčí a kyselinu octovou v Embden- Meyerhofově metabolické dráze. Zástupcem z této skupiny je např. *Lactobacillus plantarum*. Skupina C zahrnuje striktně heterofermentativní druhy, produkujícími kyselinu mléčnou a octovou. Teplotní optima se liší podle druhu, příkladem zástupce je *Lactobacillus brevis* (Anjum a kol., 2014).

Obr. 2.3: *Lactobacillus acidophilus* – morfologie buněk (Todar, 2014)



2.4.3.1. Druh *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus je homofermentativní, mikroaerofilní mikroorganismus s tyčinkovitou morfologií. Tyčinky tvoří krátké řetězce (viz obr. 2.3). Jedná se o gram-pozitivní mikroorganismus, který je mimo jiné zajímavý především svou schopností produkovat bakteriociny, z nichž některé byly izolovány a charakterizovány.

Lactobacillus acidophilus se často používá v mnoha fermentovaných výrobcích a podílí se tak na utváření chuti, zbarvení a textury konečného produktu – potraviny. Výše zmíněnou produkcí bakteriocinů také ochraňuje potravinu před působením nežádoucích mikroorganismů. Na této ochraně se podílí také kyselina mléčná, kterou *Lactobacillus acidophilus* produkuje (Anjum a kol., 2014).

Lactobacillus acidophilus byl testován i klinickými zkouškami. Společně s druhem *Bifidobacterium animalis* BB-12 byl testován účinek druhu *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (oba druhy obsaženy ve výrobku Linex Forte) na prevenci průjmů způsobených antibiotiky. Zkouška prokázala, že jak *Bifidobacterium animalis* BB-12, tak *Lactobacillus acidophilus* LA-5 neomezily významně výskyt průjmu. Bylo však prokázáno, že tyto probiotické organismy mají vliv na dobu trvání průjmu, kterou významně zkracují (Chatterjee a kol., 2013).

2.5. Rod *Bifidobacterium*

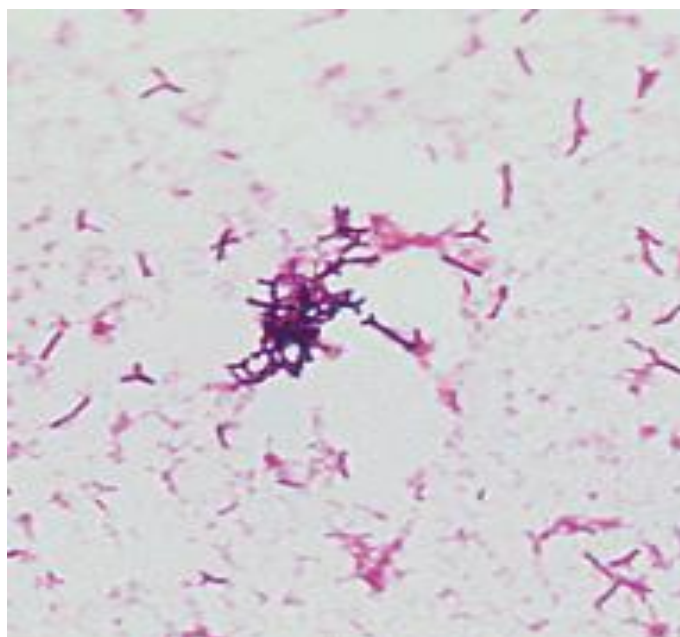
Přestože je rod *Bifidobacterium* fylogeneticky nepříbuzný s ostatními bakteriemi mléčného kvašení, je často uváděn společně s nimi z důvodu podobných vlastností jak biochemických, tak fyziologických i ekologických (Adams, 1999).

Obecně jsou bakterie rodu *Bifidobacterium* charakterizovány jako gram- pozitivní, nesporulující, nepohyblivé a anaerobní mikroorganismy. Buňky mohou mít různé tvary od krátkých zahnutých tyčinek přes nesymetrické tyčinky rozšiřující se k jednomu konci až k tyčinkám tvaru Y (viz obr. 2.4).

V současnosti se do rodu *Bifidobacterium* zařazuje 30 druhů, z nichž 10 se vyskytuje i u člověka (ústní dutina, vagína, gastrointestinální trakt), 18 u zvířat (intestinální trakt, bachor) a 2 v odpadní vodě.

Jedná se o sacharolytický organismus, který produkuje octovou a mléčnou kyselinu bez koprodukcce oxidu uhličitého (s výjimkou fáze degradace glukonátu). Kromě glukózy dovedou také všechny druhy lidského původu využít jako zdroj uhlíku galaktózu, laktózu a fruktózu (Gomes a kol., 1999).

Obr. 2.4: *Bifidobacterium bifidum*- morfologie buněk (Todár, 2014)



2.5.1. Druh *Bifidobacterium animalis*

Působení tohoto druhu je velmi obdobné, jako v případě jiných probiotických organismů. Široké využití nachází *Bifidobacterium animalis* při prevenci různých dětských onemocnění (Taipale a kol., 2013)

Další zajímavé využití druhu *Bifidobacterium animalis* může být např. pro stimulaci mozkové aktivity. V klinickém testu byl skupinám zdravých žen podáván po 4 týdny fermentovaný mléčný výrobek obohacený o probiotikum, kterým byly právě buňky druhu *Bifidobacterium animalis*. Ve zkoušce bylo prokázáno, že aktivita úseků mozku, které kontrolují zpracování emocí a pocitů, se zvýšila (Tillisch a kol., 2013).

2.6. Doména *Bacteria*

Výše popsané druhy patří všechny do domény *Bacteria*. To je skupina jednobuněčných mikroorganismů s prokaryotickou buňkou. Genetický materiál (DNA) je uložen v cytoplasmě. Jaderná membrána se zde nevyskytuje, což odlišuje prokaryontní organismy od eukaryotních. Protože až donedávna byly bakterie jedinými známými organismy majícími prokaryontní typ buňky, část biologie, která se zabývá prokaryontními organismy, se nazývá bakteriologie. Teprve roku 1980 umožnil rozvoj technik molekulární biologie vyčlenění další domény – *Archaea*. Celkem tedy existují tři buněčné domény života – *Archaea*, *Bacteria* a *Eukarya* (Todár, 2015)

2.7. Polymerázová řetězová reakce

2.7.1. Princip

Polymerázová řetězová reakce byla zavedena do praxe roku 1985 nositelem Nobelovy ceny Kary B Mullisem. Je to metoda, jejíž princip je založen na replikaci nukleových kyselin *in vitro*. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců určitých úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3'. PCR je umožněna působením termostabilní DNA-polymerázy (Šmarda a kol., 2005).

Úsek molekuly DNA, který je amplifikován, je vymezen pomocí dvojice primerů, které dosednou na protilehlé řetězce DNA tak, aby jejich 3'-konce směřovaly proti sobě. Primery jsou pro průběh PCR velmi důležité, mají hlavní vliv na specifitu PCR. Proto záleží na jejich délce a nukleotidovém složení. V PCR dále záleží také na velikosti produktu PCR, koncentracích PCR komponent nebo i na vzniku sekundárních struktur (např. nežádoucí je tvorba dimerů primerů) (Chuang a kol, 2013). Primery jsou detailněji popsány v kapitole 2.7.2. níže.

Jak je zmíněno výše, PCR funguje způsobem amplifikace určitého úseku DNA cyklickým procesem. Tento proces se skládá ze tří kroků. V prvním z nich dochází k denuraci dvouřetězcové DNA na dva oddělené řetězce. Toto probíhá při vysoké teplotě. V druhém kroku dochází k dosednutí dvou syntetických oligonukleotidů (specifických primerů), na komplementární úseky DNA. Teplota hybridizace záleží na DNA, která má být prokázána (např. DNA rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* atd). To je následováno polymerizačním procesem (třetí krok), kdy od primerů komplementárních k jednořetězcové DNA jsou z přítomných deoxyribonukleotidů syntetizována nová vlákna DNA termostabilní DNA-polymerázou.

Na PCR mají vliv mimo jiné i další faktory. Jedním z nich je přítomnost hořčnatých iontů, které jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerázy. Pro každou kombinaci primerů je nutné koncentraci hořčnatých iontů optimalizovat. Pokud by byla jejich koncentrace příliš vysoká, specifita PCR by byla nízká. Pokud jsou však primery bohaté na C a G báze, potom se doporučuje použití vyšší koncentrace hořčnatých iontů.

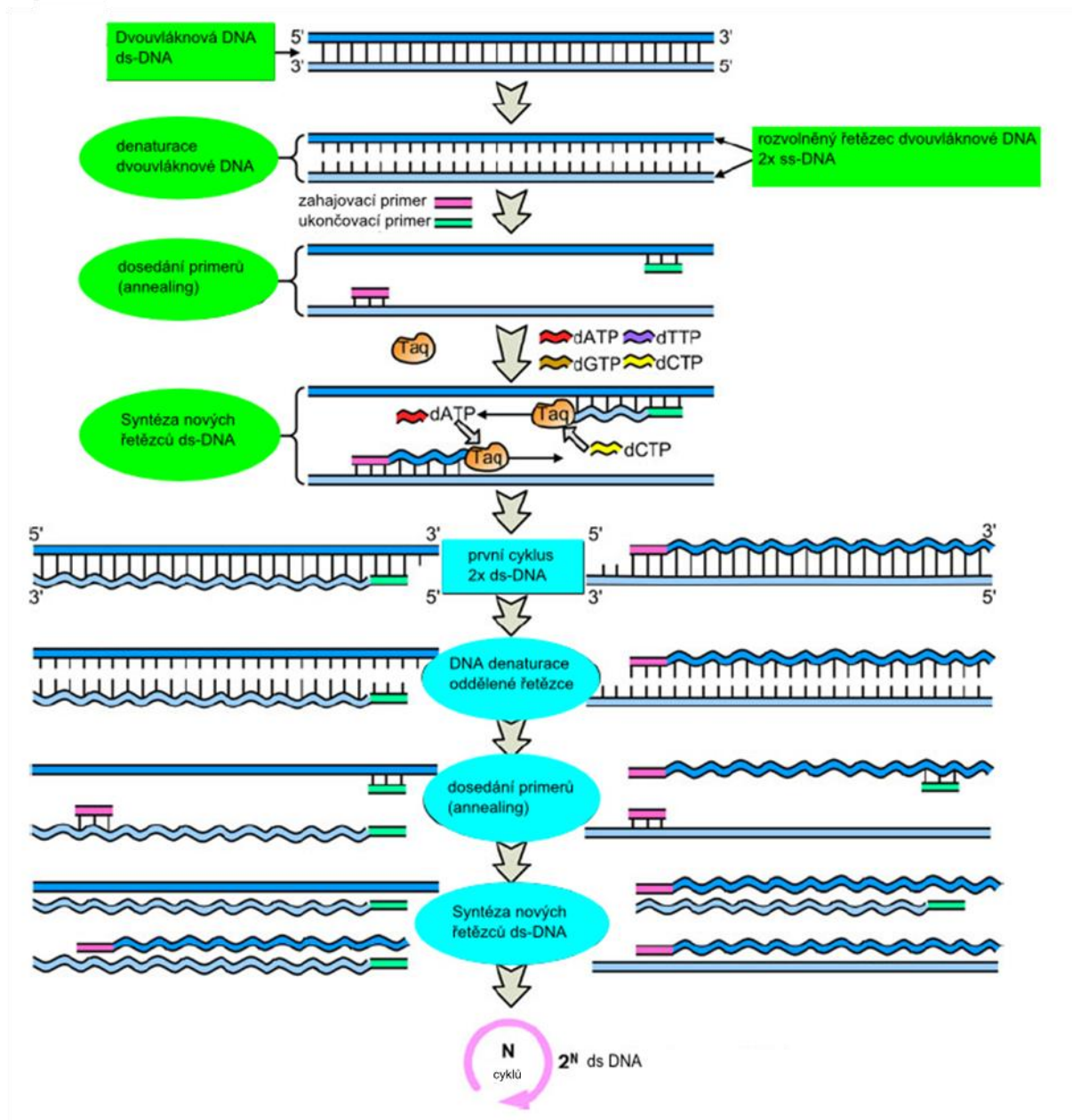
Dalším faktorem, který PCR ovlivňuje, je přítomnost pufru. Podobně jako u hořčnatých iontů, i složení pufru je přizpůsobeno DNA-polymeráze, pro kterou vytváří optimální prostředí.

Reakční směs pro konvenční PCR obsahuje primery, DNA-polymerázu, pufr, hořčnaté ionty, vodu pro PCR (k doplnění směsi na požadovaný objem), 2'-deoxynukleosid-

5'-trifosfáty (stavební kameny pro syntézu nových řetězců) a samozřejmě matrici DNA (Španová a kol, 2010).

Schéma PCR je uvedeno na obrázku 2.5 (Law a kol., 2015).

Obr. 2.5: Schéma PCR (Law a kol., 2015)



2.7.2. Primery

Oligonukleotidové primery musejí být komplementární k templátové DNA, která má být amplifikována. Primery mají běžně mezi 18 až 30 nukleotidy a obsahují 40 – 60 % GC

bází. Neměly by být mezi sebou komplementární, aby nedocházelo k nasedání jednoho primeru na druhý a vzniku dimerů primerů (Španová a kol., 2010)

Výše již byla zmíněna důležitost primerů pro PCR. Před provedením PCR musí být vhodné primery navrženy. Při navrhování primerů se bere v potaz současně několik podmínek, které jsou rovněž zmíněny výše (viz 2.6.1.) (Chuang a kol, 2013).

Bere-li se v úvahu i optimalizace teploty pro nasednutí primerů, je návrh primerů poměrně složitá záležitost. V praxi se proto při takovémto navrhování využívá predikce teploty tání komplexu DNA a primerů a případných nežádoucích sekundárních struktur dimerů oligonukleotidů, jejichž sekvence musí být známá (Cvrčková, 2006).

V případě manuálního návrhu primerů může snadno dojít k chybným výsledkům, preferuje se proto návrh automatizovaný, pomocí počítače. Takových metod, sloužících k automatizovanému navrhování primerů bylo vyvinuto několik a řada z nich byla aplikována jak v biologii, tak v medicíně (např. klinické diagnostické aplikace, identifikace patogenů nebo mikrobiologické testy), tak i v biotechnologii nebo chemii životního prostředí. Přesto však množství různých PCR metod potřebuje korespondující metody k počítačovému navrhování primerů a celá tato problematika je stále ve svých počátcích. Zabývá se jí nový vědní obor Bioinformatika (Chuang a kol, 2013).

2.7.3. Další druhy PCR

Kromě konvenčních PCR prováděných v této diplomové práci, existují i její další různé variace. Příkladem je multiplexová PCR. Ta umožňuje současnou amplifikaci více genů, díky čemuž je rychlejší než jednotlivé konvenční PCR. Označuje se jako mPCR a od konvenční PCR se liší především tím, že používáme více sad specifických primerů, zatímco u konvenční PCR se používá jen jeden pár primerů. Důležité je, aby primery k mPCR měly stejnou teplotu tání a tudíž stejnou teplotu pro nasednutí na DNA matrici. Pro úspěšné provedení mPCR je také důležitá optimální koncentrace primerů. Je to dáno jejich větším množstvím a tudíž vyšším rizikem tvorby dimerů (primer nasedne na jiný primer).

Dalším druhem je PCR v reálném čase. Často se jí říká také kvantitativní PCR, proto z angličtiny zkratka qPCR. Od konvenční PCR se liší tím, že k detekci produktů PCR není potřeba agarózová gelová elektroforéza. PCR je monitorována po celou dobu svého trvání prostřednictvím fluorescenčního signálu umožněného speciálními fluorescenčními sondami, nebo fluorescenčním interkalačním barvivem. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství amplikonů.

Příkladem interkalačního barviva je SYBR green. Toto barvivo se váže k ds-DNA a po navázání dochází k vyzáření fluorescenčního signálu. O něco sofistikovanější jsou tzv.

TaqMan sondy. Jedná se o oligonukleotidy, které obsahují fluorescenční barvivo navázané na 5'-konec a zhášec fluorescencí navázaný na 3' konec. Pro amplifikaci se používá *Taq* DNA polymerasa s 5' – 3' exonukleázovou aktivitou, která štěpí sondu a oddělí barvivo a zhášec tak, aby se generoval fluorescenční signál (Law a kol., 2015).

2.8. Bioinformatika

2.8.1. Definice

Tento nový obor lze definovat jako vědu na pomezí biologie a informatiky, která se zabývá hlavně zpracováním, prohledáváním a analýzou dat o sekvenci (pořadí monomerů) a struktuře biologických makromolekul (*www.Bioinformatics.org*, 2015)

Je možné setkat se ale i s širším chápáním termínu bioinformatika, které ji popisuje jako využití počítačů k hledání odpovědí na biologické otázky. Tato definice ale nereflektuje skutečnost, že bioinformatika se zabývá především biologickými makromolekulami.

Stejně tak existuje i velmi úzká definice, která říká, že bioinformatika je pouze vývoj softwaru pro automatizované nebo algoritmicizované zpracování a analýzu sekvenčních dat nebo tvorba a správa databáze těchto dat (Cvrčková, 2006).

2.8.2. Základní bioinformatické problémy

Mezi základní problémy, kterými se bioinformatika zabývá a kterým se nevyhne žádný bioinformatik, patří sestrojování fyzikálních map úseků DNA. Může se jednat o gen, klon nebo plazmid. Základním úkolem je nalézt restriční místa, kódující oblasti, odvodit sekvenci kódujícího řetězce DNA od nekódujícího a navrhnout primery pro PCR (viz 2.7.2.). Dále je nutno získat co nejvíce informací (literárních, sekvenčních, strukturních) o konkrétním genu nebo proteinu. Důležité je také nalezení homologů známých genů nebo proteinů v biologickém materiálu, porovnání sekvencí vzájemně příbuzných genů a určení rozdílů nebo v neposlední řadě posouzení míry příbuznosti genů (Cvrčková, 2006).

2.8.3. Bioinformatické databáze

Existují desítky veřejně dostupných databází, z nichž některé jsou i značně specializované (např. databáze sekvencí odvozených od virů). V případě sekvencí DNA jsou tu však tři hlavní databáze, které jsou vzájemně provázány. Jedná se o GenBank, EMBL a DDBJ. Počet databází vzhledem k rozvoji bioinformatiky rychle narůstá a proto časopis *Nucleic Acids Research* každoročně zveřejňuje aktuální přehled bioinformatických databází ve speciálním čísle.

Orientace v databázích je umožněna existencí jednotných identifikačních čísel, která jsou sdílena všemi třemi hlavními databázemi. Po zařazení do databáze získává každý záznam přístupový kód a následně ještě číslo GI (GenBank Identifier) (Cvrčková, 2006).

2.9. Magnetické částice k izolaci DNA

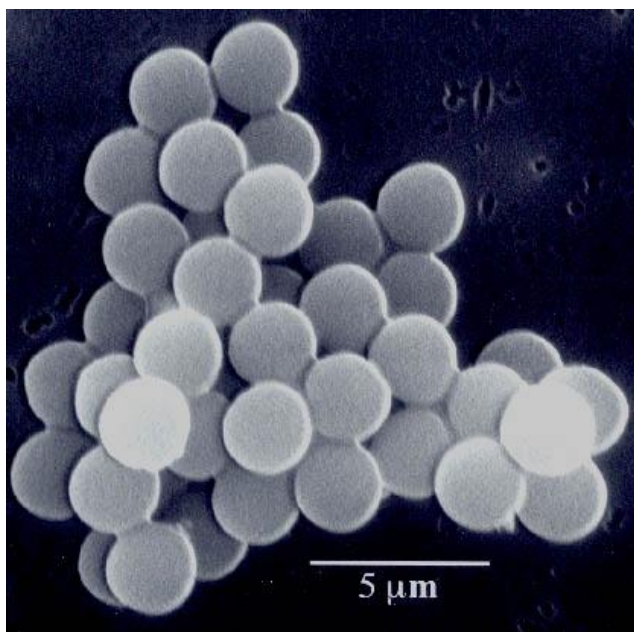
Magnetické mikro- nebo nanočástice mají v biotechnologii široké uplatnění. Kromě izolace DNA nebo jiných makromolekul se používají také k transportu léčiv, zobrazování pomocí magnetické rezonance nebo např. značení buněk (Gupta a kol., 2005). Jako materiál při výrobě takovýchto částic se používají oxidy železa a to především magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Bulte a kol., 2004). Díky svým paramagnetickým nebo superparamagnetickým vlastnostem reagují takovéto částice na vnější magnetické pole. Díky tomu lze magnetické částice s navázanou látkou (např. DNA) nahromadit na jedno místo, popřípadě rozptýlit v roztoku (Hsing a kol., 2007).

Povrch magnetických částic je pokryt několika vrstvami organického polymeru nebo anorganického kovu. Může být pokryt také různými oxidy (např. SiO_2). Povrch se tak stává modifikovatelným a lze na něj navázat různé bioaktivní molekuly, popřípadě se dá použít právě pro izolaci nebo separaci látek (Berry a kol., 2003)

K izolaci DNA se používají částice, které mají funkční povrch tvořený silanolovými skupinami. Samotná magnetická separace je pak založena na elektrostatické interakci DNA s povrchem částic (Kang a kol., 2009).

Snímek magnetických mikročástic pořízený pomocí elektronového mikroskopu zachycuje obrázek 2.6.

Obr. 2.6: Magnetické mikročástice (Suslick, 2014)



3. CÍL PRÁCE

Cílem práce byla izolace DNA z kapslí tří různých probiotických výrobků (doplňků stravy) a druhová identifikace bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* pomocí polymerázových řetězových reakcí. Pro izolaci DNA byly použity troje různé druhy magnetických mikročástic.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a přístroje

4.1.1. Chemikálie

- Agarosa pro gelovou elektroforézu (Top-Bio, ČR)
- DNA standard 100 bp (Malamité, ČR)
- DNA standard 20 bp (MO BIO Laboratories, USA)
- Dodecylsulfát sodný SDS (Sigma, USA)
- Ethanol (Lachema, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma, USA)
- Fenol (Selva, N)
- GoldviewTM (SBS Genetech, Co., Ltd, ČLR)
- Chlorid sodný (Lachema, ČR)
- Chloroform (Penta, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, ČR)
- Lysozym (Reanal, Maďarsko)
- Nanášecí pufr 10x Blue Load (Top-Bio, ČR)
- Octan sodný (Lachema, ČR)
- Polyethylen PEG 6000 (Lachema, ČR)
- PCR vkládací pufr 6x Yellow Load (Top-Bio, ČR)
- Proteinasa K (Sigma, USA)
- RNasa A (Sigma, USA)
- Tris-báze (Penta, ČR)
- Ultra Clean pufr 6x Gel Dye (MO BIO Laboratories, USA)

4.1.2. Magnetické částice Fkol135ox, FkolB30ox a Dynabeads

Použité magnetické částice jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Tab. 4.1: Používané magnetické částice

označení částic	polymer	průměr částic	hustota	obsah Fe
Fkol135ox	poly (glycidylmetakrylát)	1,16 μm	1,27 g/cm ³	11%
FkolB30ox	poly (glycidylmetakrylát)	0,74 μm	0,79 g/cm ³	5,95%
Dynabeads				
DNA	polystyren	4,5 μm	1,5 g/cm ³	20%
Direct				

Mikročástice Fkol135ox a FkolB30ox byly získány z ÚMCH AV ČR, mikročástice Dynabeads jsou komerčně dostupné (Invitrogen, Norsko).

4.1.3. PCR komponenty

- Voda pro PCR (Top-Bio, ČR)
- 10x reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, ČR)
- dNTP směs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Top-Bio, ČR)
- *Taq* DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top-Bio, ČR)

4.1.4. Primery pro PCR

4.1.4.1. Primery specifické pro doménu *Bacteria*

- primer F eub (10 pmol/μl) (Haarman a kol., 2006)
- primer R eub (10 pmol/μl) (Haarman a kol., 2006)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
F_eub	5'- TCCTACGGGAGGCAGCAGT - 3'	466
R_eub	5'- GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT - 3'	

4.1.4.2. Primery specifické pro rod *Lactobacillus*

- primer LbLMA-1 (10 pmol/μl) (Dubernet a kol., 2002)
- primer R 16-1 (10 pmol/μl) (Dubernet a kol., 2002)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
LbLMA 1-rev	5'- CTCAAAACTAAACAAAGTTTC - 3'	250
R16-1	5'- CTTGTACACACCGCCCGTCA - 3'	

- primer F allact_IS (10 pmol/μl) (Haarman a kol., 2006)
- primer R allact_IS (10 pmol/μl) (Haarman a kol., 2006)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
F-allact_IS	5'-TGGATGCCTTGGCACTAGGA - 3'	92
R-allact_IS	5'-AAATCTCCGGATCAAAGCTTACTTAT - 3'	

4.1.4.3. Primery specifické pro rod *Bifidobacterium*

- primer Pbi F1 (10 pmol/μl) (Roy a Sirois, 2000)
- primer Pbi R2 (10 pmol/μl) (Roy a Sirois, 2000)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
Pbi F1	5'- CCGGAATAGCTCC - 3'	914
Pbi R2	5'- GACCATGCACCACCTGTGAA - 3'	

4.1.4.4. Primery specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus*

- primer Aci 16SI (10 pmol/μl) (Tilsala-Timisjarvi a kol., 1997)
- primer 16SII (10 pmol/μl) (Tilsala-Timisjarvi a kol., 1997)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
Aci 16SI	5' - TCCAAGGAAGCGAAGGAT - 3'	750
16SII	5' - CTCTTCTCGGTCGCTCTA - 3'	

4.1.4.5. Primery specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

- primer FWRham (10 pmol/μl) (Grillová, 2012)
- primer UniverRV (10 pmol/μl) (Grillová, 2012)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
FWRham	5' - TTGCATCTTGATTTAATTTTGAAC - 3'	683
UniverRV	5' - TCGCCACTGGTGTCTCTCC - 3'	

4.1.4.6. Primery specifické pro druh *Lactobacillus casei*

- primer FCaseIS (10 pmol/μl) (Haarman a kol, 2006)
- primer RCaseIS (10 pmol/μl) (Haarman a kol, 2006)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
FcaseIS	5' - CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATT - 3'	132
RCaseIS	5' - CTTCTTGCGGGTACTGAGATGT - 3'	

4.1.4.7. Primery specifické pro druh *Bifidobacterium animalis*

- primer Ban F2 (10 pmol/μl) (Roy a Sirois, 2000)
- primer Pbi R1 (10 pmol/μl) (Roy a Sirois, 2000)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
Ban F2	5' - AACCTGCCCTGTG - 3'	925
Pbi R1	5' - GCACCACCTGTGAACCG - 3'	

4.1.4.8. Primery specifické pro druh *Bifidobacterium bifidum*

- primer BiBIF-1 (10 pmol/μl) (Matsuki a kol., 1999)
- primer BiBIF-2 (10 pmol/μl) (Matsuki a kol., 1999)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
BiBIF-1	5'-CCACATGATCGCATGTGATTG - 3'	278
BiBIF-2	5'-CCGAAGGCTTGCTCCCAAA - 3'	

4.1.4.9. Primery specifické pro druh *Bifidobacterium breve*

- primer BiBRE-1 (10 pmol/μl) (Matsuki a kol., 1999)
- primer BiBRE-2 (10 pmol/μl) (Matsuki a kol., 1999)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
BiBRE-1	5'-CCGGATGCTCCATCACAC - 3'	288
BiBRE-2	5'-ACAAAGTGCCTTGCTCCCT - 3'	

4.1.4.10. Primery specifické pro gen *odc* (ornitidekarboxyláza) u druhu *Lactobacillus rhamnosus*

- primer LrODFW (10 pmol/μl) (Grillová, 2012)
- primer LrODRV (10 pmol/μl) (Grillová, 2012)

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
LrODFW	5'-CCATGCTGATGAAACCTACT - 3'	1274
LrODRV	5'-CCGTTGGAATGTTGTTGGTC - 3'	

4.1.5. Roztoky

4.1.5.1. Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk

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

12,1 Tris-báze se rozpustí v 70 ml destilované vody. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové se pH upraví na hodnotu 7,8. Roztok je následně doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml a sterilizován v autoklávu (121 °C/20 min).

- 0,5 mM EDTA

186,1 g EDTA se rozpustí v 800 ml destilované vody, pH se upraví přidáním asi 20 g hydroxidu sodného. Nejprve se přidá 15 g NaOH, poté se hydroxid přidává po jednotlivých perličkách za stálé kontroly pH roztoku. EDTA se rozpustí při hodnotě pH 8,0. Rozpouštění probíhá za stálého míchání na magnetické míchačce. Roztok se doplní destilovanou vodou na 1 l, rozdělí se do alikvotů a sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

- lyzační roztok A

Roztok se připravuje sterilně ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5M EDTA (pH 8,0). Smíchá se 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody.

- lyzační roztok B

Roztok se připraví rozpuštěním 60 mg lysozymu ve 20 ml roztoku A. Roztok se před použitím připravuje vždy čerstvý.

- 20% SDS

20 g SDS se rozpustí v 80 ml sterilní destilované vody při teplotě 68 °C. Roztok se doplní do 100 ml destilovanou vodou.

- proteinasa K (1 mg/ml)

Na analytických vahách se naváží 10 mg proteiny K, roztok se doplní destilovanou vodou do 10 ml a rozdělí do alikvotů. Roztok se uchovává při teplotě -20 °C.

- RNasa A (1 mg/ml)

Na analytických vahách se naváží 10 mg RNasy A, navážka se rozpustí v 10 ml pufru (10 mM Tris-HCl (pH 7,8) a 15 mM NaCl) a roztok se rozdělí do alikvotních podílů. Uchovává se při teplotě -20 °C.

4.1.5.2. Roztoky k izolaci DNA

- fenol

Destilovaný fenol nasycený TE pufrem o pH 7,8.

- CIZ

Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1.

- 3M octan sodný

408,1 g trihydrátu octanu sodného se rozpustí v 800 ml destilované vody. Roztok se doplní destilovanou vodou do objemu 1000 ml a rozdělí do alikvotů. Sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po 20 minut.

- TE pufr

Roztok se připraví sterilně ze zásobních roztoků 1M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5M EDTA (pH 8,0). Smíchá se 1 ml pufru Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody.

4.1.5.3. Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu

- 5 x TBE pufr

54 g Tris-báze se smíchá s 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) a doplní se destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml.

- 0,5 x TBE pufr

100 ml 5 x TBE pufru se smíchá s 900 ml destilované vody.

- roztok ethidiumbromidu

100 µl ethidium bromidu (500 µg/ml) se nepipetuje do 500 ml destilované vody v barvicí lázni. Uchovává se v temnu.

4.1.6. Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy Pioneer TM PA 114 (Ohaus, USA)
- Centrifuga Spectafuge Mini (Labnet international, Jižní Korea)
- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Německo)
- Exsikátor (KIF LAB, Německo)
- Fotoaparát Lumix DMC-F2 (Panasonic, ČLR)
- Laboratorní váhy CS200 (Ohaus, USA)
- inkubátor Mini incubator (Labnet international, Jižní Korea)
- Magnetický separátor DynaMag 2 (Invitrogen Dynal AS, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 μl (PZ HTL, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, ČR)
- NanoPhotometer (Implen, Německo)



- Transiluminátor TVR 312 A (Spectroline, USA)



- Termocycler PTC 200 (Bio-Rad Lab., USA)



- Termocycler TC-24H (Bioer Technology, ČLR)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, B1 (Owl Scientific, USA) a zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Endurion (Labnet, Jižní Korea)



- Vortex (BioSan, Lotyšsko)
- Běžné laboratorní sklo a umělohmotné laboratorní pomůcky

4.1.7. Probiotické výrobky (doplňky stravy)

- Linex Forte (Lek Pharmaceuticals d.d., Slovinsko)



Složení: 1 tobolek obsahuje 10^9 kolonií bakterií (CFU) *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) jako lyofilizát a 10^9 kolonií bakterií *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BB-12). Dále obsahuje dextrosu, mikrokrytalickou celulosu, bramborový škrob, stearan hořečnatý, inulin a oligosacharidy.

- Multilac synbiotikum (Genexo Sp. z o.o., Polsko)



Složení: 1 tobolka obsahuje lyofilizované probiotické bakterie 9 různých kmenů v následujících množstvích: *Lactobacillus helveticus* ($9 \cdot 10^8$ CFU), *Lactococcus lactis* ($9 \cdot 10^8$ CFU), *Bifidobacterium longum* ($6,75 \cdot 10^8$ CFU), *Bifidobacterium breve* ($4,50 \cdot 10^8$ CFU), *Lactobacillus rhamnosus* ($4,50 \cdot 10^8$), *Streptococcus thermophilus* ($4,50 \cdot 10^8$), *Bifidobacterium bifidum* ($2,25 \cdot 10^8$), *Lactobacillus casei* ($2,25 \cdot 10^8$) a *Lactobacillus plantarum* ($2,25 \cdot 10^8$). Tobolka dále obsahuje oligofruktózu jako prebiotickou složku a dále kukuřičný škrob, předbobtnalý kukuřičný škrob, stearan hořčnatý a kyselinu askorbovou.

- Rebiomax (Dr. Max Pharma Ltd., Spojené Království)



Složení: 1 tobolka obsahuje komplex 6 následujících kmenů: *Lactobacillus helveticus* Rosell-52, *Lactococcus ssp. lactis* Rosell-1058, *Bifidobacterium longum* Rosell-175, *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11, *Bifidobacterium breve* Rosell-70 a *Bifidobacterium bifidum* Rosell-71 v celkovém množství 14 miliard CFU. Tobolka dále obsahuje bramborový škrob, hydroxypropylmethylcelulózu, stearan hořčnatý a kyselinu askorbovou.

4.1.7. DNA kontrolních bakteriálních kmenů

DNA kontrolních kmenů byla izolována z čistých kultur fenolovou extrakcí a následně vyředěna na 10 ng/μl. DNA byla získána od vedoucí diplomové práce. Jednalo se o DNA těchto bakteriálních kmenů.

- *Lactobacillus gasseri* K7
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T
- *Lactobacillus casei* CCM 4798
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1823^T
- *Lactobacillus plantarum* CCM 7039
- *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T
- *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762
- *Bifidobacterium breve* CCM 3763

4.2. Metody

4.2.1. Příprava hrubých lyzátů buněk z výrobků

1 tobolek se opatrně rozřízne skalpelem a její obsah se opatrně převede do sterilní zkumavky. Přidá se 1,5 ml lyzačního roztoku B a důkladně se promíchá. Vzorky se inkubují při laboratorní teplotě 1 hodinu, občas se promíchají. K suspenzi se následně přidá 12,5 μl 20% SDS a 5 μl proteinasy K (100 μg/ml) a promíchá se. Vzorky se inkubují při 55 °C za občasného promíchání asi 3 hodiny, případně přes noc. Takto připravená směs je označována jako hrubý lyzát buněk. Z lyzátu buněk se izoluje DNA.

4.2.2. Izolace DNA metodou fenolové extrakce

K 500 μl lyzátu buněk se přidá stejný objem fenolu. Směs se kývavým pohybem opatrně promíchává 4 minuty. Následně se směs centrifuguje při 15000 ot/min po dobu 5 minut. Pomocí špičky s ustřiženým hrotem se pak odebere vodní fáze s DNA do čisté eppendorfky tak, aby nedošlo k odebrání proteinové mezivrstvy. Vodní fáze s DNA se doplní TE pufrem do 500 μl a poté se přidá 700 μl směsi chloroform – isoamylalkohol (24:1). Směs se opatrně kývavým pohybem promíchává 4 minuty a následně se centrifuguje 15000 ot/min po dobu 5 minut. Horní vodní fáze s DNA se odebere do čisté eppendorfky a následně se přistoupí k přesrážení DNA etanolem.

4.2.3. Srážení DNA etanolem

Objem vzorku v mikrozkuhavce se změří pomocí automatické pipety a upraví se TE pufrem na 400 μl. Ke vzorku DNA se přidá 1/20 objemu 3 M octanu sodného (20 μl) a promíchá se. Pak se přidá 1 ml (2,5 násobek) etanolu (96%), který je vychlazen na –20 °C a opět se promíchá. Pak se DNA nechá srážet po dobu 15 – 60 minut při teplotě – 20 °C. Centrifuguje

se při 15000 ot/min po dobu 15 minut a pak se opatrně odlije supernatant. Sediment se opláchne 70% etanolem a směs se opět centrifuguje při 15000 ot/min po dobu 10 minut. Sediment se vysuší v exsikátoru 10 minut a DNA se pak rozpustí v 500 μ l TE pufru. Uchovává se při 4 °C.

4.2.4. Izolace DNA pomocí magnetických částic

Izolace pomocí magnetických částic je provedena z hrubého lyzátu buněk v prostředí 16% polyetylglykolu (PEG) a 2M NaCl. Do sterilních eppendorfk je připravena separační směs, přičemž je nutné dodržet pořadí jednotlivých komponent.

Tab. 4.2: Složení separační směsi při izolaci DNA magnetickými částicemi

komponenta	objem (μl)
sterilní voda	0
5M NaCl	400
hrubý lyzát buněk	100
40% PEG	400
částice (2 mg/ml)	100
celkem	1000

Připravená směs je inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Poté jsou částice s navázanou DNA odseparovány pomocí magnetického separátoru při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Zkumavky jsou ponechány v magnetickém pásu a supernatant je opatrně odpipetován. Následně je ze separátoru odstraněn magnetický pás. Zkumavka obsahující nosič s navázanou DNA je promyta 70% etanolem v objemu 1 ml. Částice se odseparují magnetem 2 minuty při laboratorní teplotě a roztok etanolu je opatrně slit. Promytí 70% etanolem je opakováno ještě jednou objemem 500 μ l. Zkumavky jsou pak ponechány v horizontální poloze a krátce usušeny při laboratorní teplotě. DNA je eluována do 500 μ l TE pufru při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Částice se odseparují 2 minuty při laboratorní teplotě a eluovaná DNA se nepipetuje do čisté eppendorfky.

4.2.5. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Roztok DNA v TE pufru se nanáší v podobě malé kapky na speciální kyvetu nanospektrofotometru (délka optické dráhy 1 cm). Měří se absorbance v rozmezí vlnových délek 220 – 320 nm proti TE pufru. Z hodnoty $A_{260 \text{ nm}}$ se vypočte koncentrace DNA. Čistota DNA se stanoví z poměru $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$.

4.2.6. Příprava směsi pro PCR

Směs PCR se připraví smícháním jednotlivých komponent podle tabulky 4.3.

Tab. 4.3: Složení PCR směsi

komponenta	objem (μl)
PCR voda	19
reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný)	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer 1 (10 pmol/μl)	0,5
primer 2 (10 pmol/μl)	0,5
<i>Taq</i> DNA- polymerasa (1U/μl)	1
matrice DNA	1
celkem	25

4.2.7. Provedení PCR

Teplotní programy pro jednotlivé PCR reakce jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Tab. 4.4: Teplotní programy pro PCR

krok	teplota [°C]	čas [s]
PCR pro doménu Bacteria		
denaturace DNA	94	30
hybridizace primerů	55	30
syntéza řetězce DNA	72	60
PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>		
denaturace DNA	94	60
hybridizace primerů	55	60
syntéza řetězce DNA	72	120
PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>		
denaturace DNA	95	30
hybridizace primerů	62	30
syntéza řetězce DNA	72	60
PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i>		
denaturace DNA	92	30
hybridizace primerů	58	30
syntéza řetězce DNA	72	60
PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>		
denaturace DNA	92	30
hybridizace primerů	58	30
syntéza řetězce DNA	72	60
PCR pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>		
denaturace DNA	94	60
hybridizace primerů	58	60
syntéza řetězce DNA	72	120
PCR pro druh <i>Lactobacillus plantarum</i>		
denaturace DNA	94	60
hybridizace primerů	62	60

syntéza řetězce DNA	72	120
PCR pro gen <i>odc</i>		
denaturace DNA	94	60
hybridizace primerů	58	60
syntéza řetězce DNA	72	120
PCR pro druh <i>Bifidobacterium breve</i>		
denaturace DNA	94	20
hybridizace primerů	55	20
syntéza řetězce DNA	72	30
PCR pro druh <i>Bifidobacterium bifidum</i>		
denaturace DNA	94	20
hybridizace primerů	55	20
syntéza řetězce DNA	72	30

Před prvním cyklem se směs pro PCR vždy zahřívá po dobu 5 minut na teplotu 94 °C. V posledním cyklu se doba syntézy řetězce DNA prodlouží na 7 minut. Cyklů je vždy 30.

4.2.8. Agarosová gelová elektroforéza bakteriální DNA a produktů PCR

Připraví se agarosový gel (0,8% pro bakteriální DNA, 1,8 % pro produkty PCR, 2,5 % pro produkty PCR při použití primerů F all a R all) rozpuštěním agarózy v 0,5x TBE pufru. Suspenze se pečlivě rozvaří v mikrovlnné troubě a po vychladnutí na teplotu asi 60 °C se nalije do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Nechá se 0,5 h – 1 h tuhnout. Po zatuhnutí se hřebínek opatrně vyjme. Na podložce (proužek polyetyleny) nebo v mikrozkuhavce se smíchá 10 µl DNA s 3 µl nanášecího pufru (6x koncentrovaný), případně v eppendorfci 25 µl produktů PCR s 5 µl nanášecího pufru. Směs se nanáší do komůrek gelu. V případě nanášení velikostního standardu se nanáší 5 µl. Gel se vloží do elektroforetické vany tak, aby záporně nabitá DNA migrovala směrem k anodě. Vanička s gelem se opatrně převrství 0,5x TBE puftrem do výšky 2 – 3 mm nad gel a zapne se zdroj elektroforézy (80 V). Elektroforéza zůstává spuštěná, dokud bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru nedoputuje do 2/3 délky agarosového gelu.

4.2.9. Vyhodnocení gelů

Po skončení elektroforézy se gel barví v ethidium bromidu (0,5 µg/ml) minimálně 0,5 hodiny. Po obarvení se gel opláchne destilovanou vodou a vyhodnocuje se na transiluminátoru při vlnové délce 305 nm. Gel se fotograficky dokumentuje.

5. VÝSLEDKY

5.1. Izolace DNA metodou fenolové extrakce z výrobku Linex Forte

DNA byla izolována metodou fenolové extrakce z hrubých lyzátů buněk, připravených z probiotického výrobku Linex Forte. DNA byla izolována ve třech opakováních (ze 3 tobolek).

5.1.1. Nanospektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Hodnoty spektrofotometrického měření shrnuje tabulka 5.1. Koncentrace DNA byla zjištěna u tobolek 1 na 485 ng/μl, u tobolek 2 na 337 ng/μl a u tobolek 3 na 272 ng/μl. Hodnota $A_{260/280}$ není v rozmezí 1,8 – 2,0 a ukazuje na znečištění proteiny.

Tab. 5.1: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované z 3 tobolek

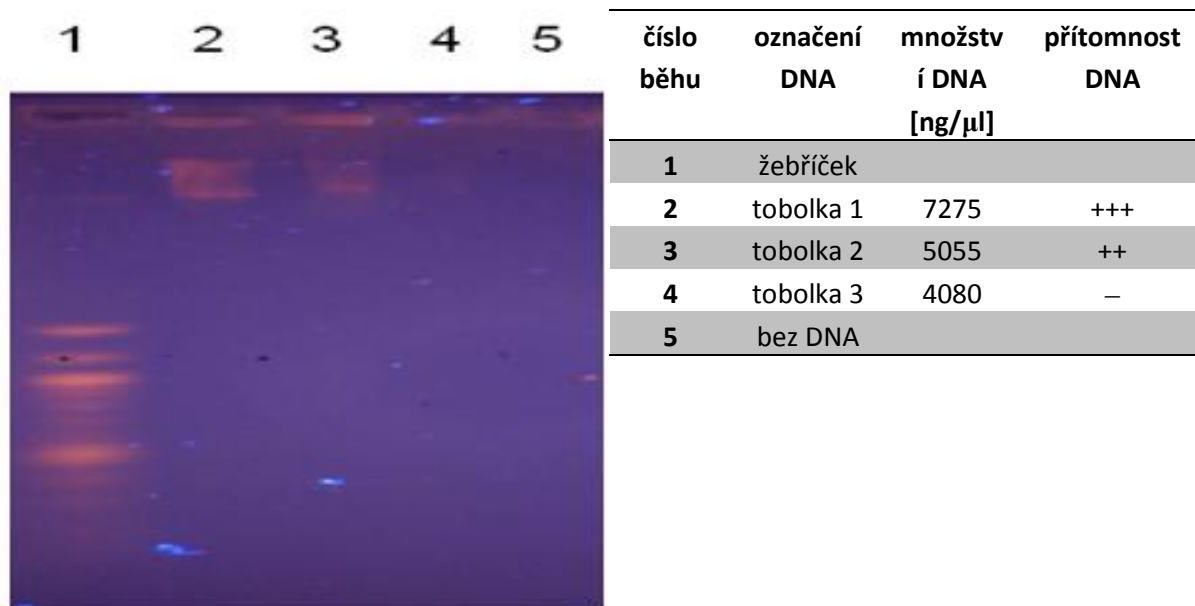
	tobolka 1	tobolka 2	tobolka 3
koncentrace [ng/μl]	485	337	272
A₂₃₀	0,696	0,406	0,266
A₂₆₀	1,103	0,743	0,581
A₂₈₀	0,869	0,472	0,365
A₃₂₀	0,134	0,07	0,036
A_{260/280}	1,624	1,674	1,657

5.1.2. Agarózová gelová elektroforéza DNA

Obrázek 5.1 zachycuje agarózovou gelovou elektroforézu bakteriální DNA izolovanou ze tří tobolek výrobku Linex Forte.

Pro průkaz přítomnosti DNA (později i PCR produktů) necht' platí nadále v celé práci systém:
+++ ... DNA prokázána velmi zřetelně, ++ ... DNA prokázána zřetelně, + ... DNA prokázána, – ... DNA neprokázána

Obr. 5.1: Agarózová gelová elektroforéza DNA izolovaná z výrobku Linex Forte



DNA z tobolek 2 a tobolek 3 byly relativně intaktní. Pro další práci byla používána DNA z tobolek 1, která byla označena jako DNA LF-FE (Linex Forte-fenolová extrakce).

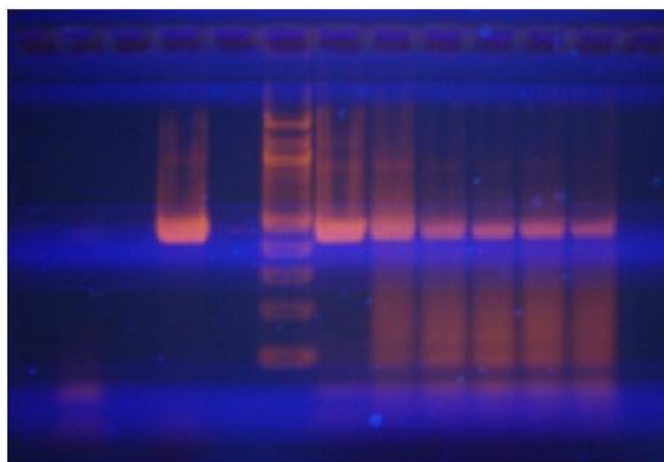
5.1.3. PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Byla připravena směs pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií domény *Bacteria* ve vzorku. Na elektroferogramu na obrázku 5.2 je vidět, že specifický PCR produkt o velikosti 466 bp získaný po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byl detekován v běhu 7. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

Obr. 5.2: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp)

Amplifikováno bylo různé množství DNA LF-FE.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



číslo běhu	označení DNA	množství DNA	přítomnost produktů PCR
1	bez DNA	0 μ l	
2	negativní kontrola	15 μ l	–
3	bez DNA	0 μ l	
4	pozitivní kontrola	15 μ l	+++
5	bez DNA	0 μ l	
6	žebříček	5 μ l	
7	DNA LF-FE (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++
8	DNA LF-FE (1 ng/ μ l)	15 μ l	+++
9	DNA LF-FE (100 pg/ μ l)	15 μ l	++
10	DNA LF-FE (10 pg/ μ l)	15 μ l	++
11	DNA LF-FE (1 pg/ μ l)	15 μ l	++
12	DNA LF-FE (100 fg/ μ l)	15 μ l	++
13	bez DNA	0 μ l	

DNA LF-FE v množství 10 ng/ μ l až 100 fg/ μ l se amplifikovala v PCR. Produkty PCR byly detekované pomocí gelové elektroforézy na agaróze (Obr. 5.2). Po amplifikaci různých množství DNA LF-FE byly detekovány produkty PCR specifické pro doménu *Bacteria*.

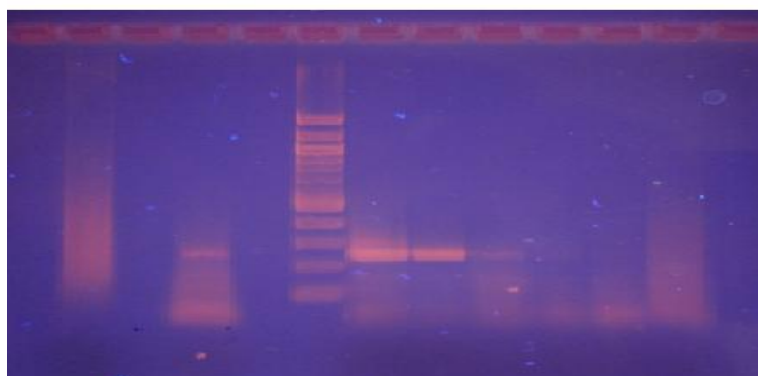
5.1.4. PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií rodu *Lactobacillus* ve DNA LF-FE podle postupu uvedeného v tabulce

4.3 a 4.4. Na elektroferogramu na obrázku 5.3 je vidět, že specifický PCR produkt o velikosti 250 bp po amplifikaci DNA LF-FE o koncentraci 10 ng/μl byl detekován v běhu 7. Bylo také provedeno ověření citlivosti PCR. DNA byla naředěna desítkovým ředěním a specifické produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Obr. 5.3: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp) Amplifikováno bylo různé množství DNA LF-FE.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



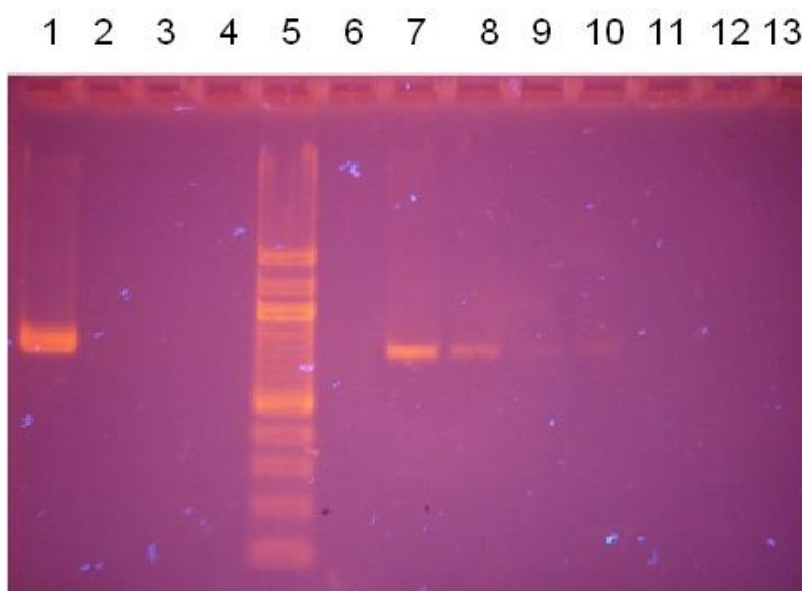
číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů
		DNA	PCR
1	bez DNA	0 μl	
2	negativní kontrola	15 μl	–
3	bez DNA	0 μl	
4	pozitivní kontrola	15 μl	++
5	bez DNA	0 μl	
6	žebříček	5 μl	
7	DNA LF-FE (10 ng/μl)	15 μl	+++
8	DNA LF-FE (1 ng/μl)	15 μl	+++
9	DNA LF-FE (100 pg/μl)	15 μl	+
10	DNA LF-FE (10 pg/μl)	15 μl	–
11	DNA LF-FE (1 pg/μl)	15 μl	–
12	DNA LF-FE (100 fg/μl)	15 μl	–
13	bez DNA	0 μl	

Specifické produkty PCR pro rod *Lactobacillus* o délce 250 bp byly pomocí agarózové gelové elektroforézy detekovány až do koncentrace 100 pg/μl. Pro DNA o nižších koncentracích nebyly specifické produkty PCR detekovány.

5.1.5. PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií rodu *Lactobacillus acidophilus* v DNA LF-FE podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Na elektroferogramu na obrázku 5.4 je vidět, že specifický PCR produkt o velikosti 750 bp po amplifikaci DNA LF-FE o koncentraci 10 ng/μl byl detekován v běhu 7. Bylo také provedeno ověření citlivosti PCR. DNA byla naředěna desítkovým ředěním a specifické produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Obr. 5.4: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus* (750 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA LF-FE.



číslo běhu	označení DNA	množství DNA	přítomnost produktů	
			DNA	PCR
1	pozitivní kontrola	15 μl		+++
2	bez DNA	0 μl		
3	negativní kontrola	15 μl		–
4	bez DNA	0 μl		
5	žebříček	5 μl		
6	bez DNA	0 μl		
7	DNA LF-FE (10 ng/μl)	15 μl		++
8	DNA LF-FE (1 ng/μl)	15 μl		+
9	DNA LF-FE (100 pg/μl)	15 μl		–
10	DNA LF-FE (10 pg/μl)	15 μl		–

11	DNA LF-FE (1 pg/μl)	15 μl	–
12	DNA LF-FE (100 fg/μl)	15 μl	–
13	bez DNA	0 μl	

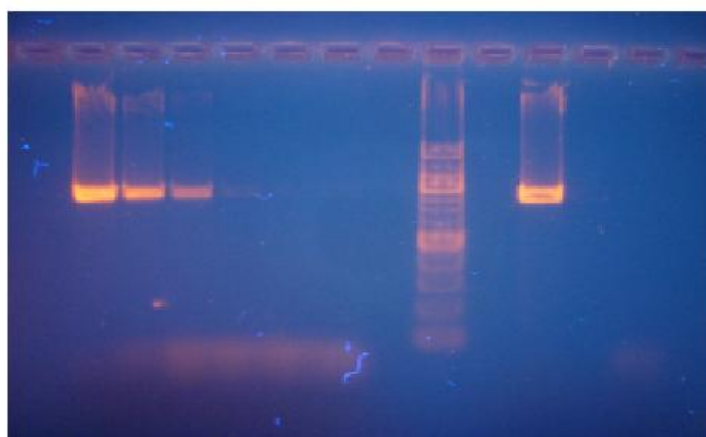
Specifické produkty PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* o délce 750 bp byly pomocí agarózové gelové elektroforézy detekovány až do koncentrace 10 pg/μl. Pro DNA o nižších koncentracích nebyly specifické produkty PCR detekovány.

5.1.6. PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium*

Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií rodu *Bifidobacterium* v DNA LF-FE podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Na elektroferogramu na obrázku 5.5 je vidět, že specifický PCR produkt o velikosti 914 bp po amplifikaci DNA LF-FE o koncentraci 10 ng/μl byl detekován v běhu 2. Bylo také provedeno ověření citlivosti PCR. DNA byla naředěna desítkovým ředěním a specifické produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Obr. 5.5: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Bifidobacterium* (914). Amplifikováno bylo různé množství DNA LF-FE.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



číslo běhu	označení DNA	množství DNA	přítomnost DNA
1	bez DNA	0 μl	
2	DNA LF-FE (10 ng/μl)	15 μl	+++
3	DNA LF-FE (1 ng/μl)	15 μl	+++
4	DNA LF-FE (100 pg/μl)	15 μl	++
5	DNA LF-FE (10 pg/μl)	15 μl	–

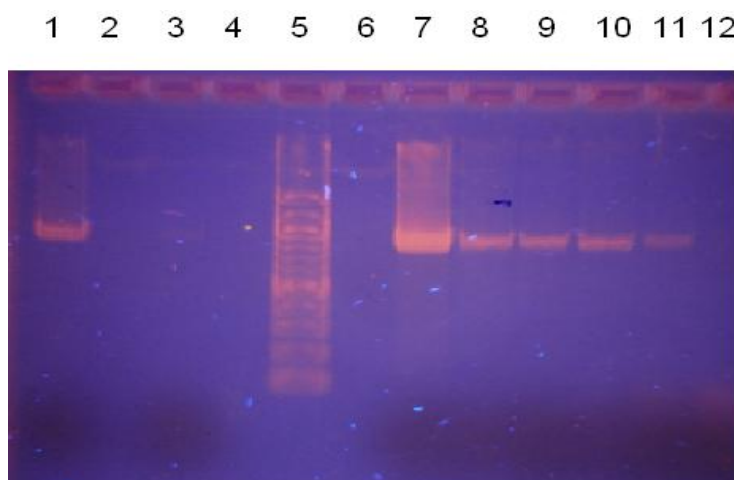
6	DNA LF-FE (1 pg/μl)	15 μl	–
7	DNA LF-FE (100 fg/μl)	15 μl	–
8	bez DNA	0 μl	
9	žebříček	5 μl	
10	bez DNA	0 μl	
11	pozitivní kontrola	15 μl	+++
12	bez DNA	0 μl	
13	negativní kontrola	15 μl	–

Specifické produkty PCR pro rod *Bifidobacterium* o délce 914 bp byly pomocí agarózové gelové elektroforézy detekovány až do koncentrace 100 pg/μl. Pro DNA o nižších koncentracích nebyly specifické produkty PCR detekovány.

5.1.7. PCR s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium animalis*

Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií druhu *Bifidobacterium animalis* v DNA LF-FE podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Na elektroferogramu na obrázku 5.6 je vidět, že specifický PCR produkt o velikosti 925 bp po amplifikaci DNA LF-FE o koncentraci 10 ng/μl byl detekován v běhu 7. Bylo také provedeno ověření citlivosti PCR. DNA byla naředěna desítkovým ředěním a specifické produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Obr. 5.6: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Bifidobacterium animalis* (925). Amplifikováno bylo různé množství DNA LF-FE.



číslo běhu	označení DNA	množství DNA	přítomnost produktů PCR
1	pozitivní kontrola	15 μl	

2	bez DNA	0 μ l	–
3	negativní kontrola	15 μ l	
4	bez DNA	0 μ l	++
5	žebříček	5 μ l	
6	bez DNA	0 μ l	
7	DNA LF-FE (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++
8	DNA LF-FE (1 ng/ μ l)	15 μ l	++
9	DNA LF-FE (100 pg/ μ l)	15 μ l	++
10	DNA LF-FE (10 pg/ μ l)	15 μ l	++
11	DNA LF-FE (1 pg/ μ l)	15 μ l	+
12	DNA LF-FE (100 fg/ μ l)	15 μ l	–

5.1.8. Shrnutí výsledků amplifikace DNA izolované z výrobku Linex Forte fenolovou extrakcí

Výsledky amplifikace různého množství DNA LF-FE s různými primery shrnuje tabulka 5.2

Tab. 5.2: Shrnutí výsledků amplifikace DNA izolované z výrobku Linex Forte fenolovou extrakcí

	doména <i>Bacteria</i>	rod <i>Lactobacillus</i>	druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	rod <i>Bifidobacterium</i>	druh <i>Bifidobacterium animalis</i>
nejmenší detegované množství DNA/PCR směs	100 fg	100 pg	1 ng	100 pg	1 pg

Jednotlivé PCR se lišily svou citlivostí, nejcitlivější byla PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*, nejméně citlivá byla PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus*.

5.2. Izolace DNA z výrobků pomocí magnetických nosičů

Byly připraveny hrubé lyzáty z výrobků Linex Forte, Multilac a Rebiomax dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.1. Z těchto hrubých lyzátů byla izolována DNA pomocí magnetických mikročástic Fkol135ox, FkolB30ox a Dynabeads.

Pro jednotlivé vzorky necht' platí označení:

DNA_ první písmeno druhu výrobku-zkratka názvu magnetických částic

5.2.1. Nanospektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Hodnoty spektrofotometrického měření shrnuje tabulka 5.3.

Tab. 5.3: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované z výrobků pomocí magnetických mikročástic Fkol135ox, FkolB30ox a Dynabeads

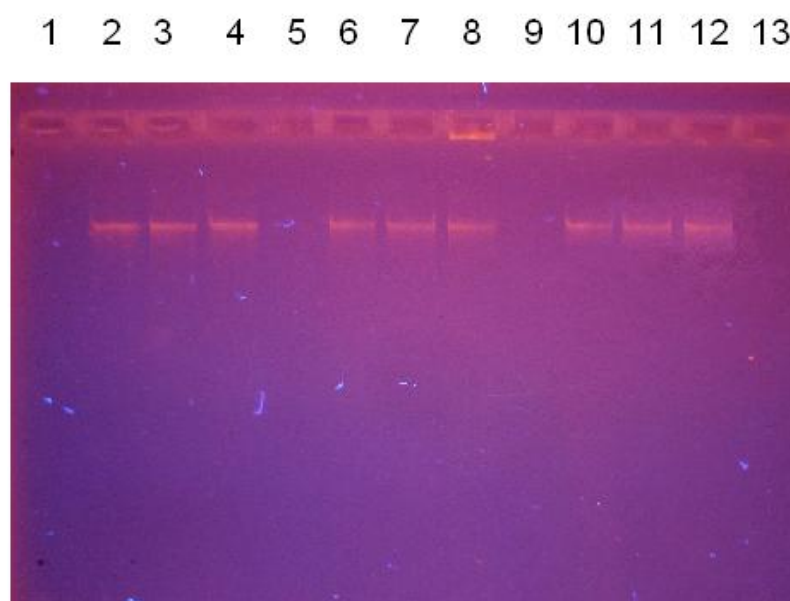
		Fkol135ox	FkolB30ox	Dynabeads
Linex Forte	označení DNA	DNA LF-135ox	DNA LF-30ox	DNA LF-D
	koncentrace [ng/μl]	295	245	144
	A₂₃₀	0,58	0,443	0,43
	A₂₆₀	0,59	0,49	0,469
	A₂₈₀	0,412	0,342	0,341
	A₃₂₀	0,111	0,098	0,09
	A_{260/280}	1,432	1,433	1,375
Multilac	označení DNA	DNA M-135ox	DNA M-30ox	DNA M-D
	koncentrace [ng/μl]	270	239	164
	A₂₃₀	0,497	0,433	0,329
	A₂₆₀	0,541	0,478	0,288
	A₂₈₀	0,373	0,331	0,213
	A₃₂₀	0,097	0,089	0,077
	A_{260/280}	1,45	1,444	1,352
Rebiomax	označení DNA	DNA R-135ox	DNA R-30ox	DNA R-D
	koncentrace [ng/μl]	270	275	141
	A₂₃₀	0,987	0,512	0,079
	A₂₆₀	0,562	0,55	0,083
	A₂₈₀	0,372	0,376	0,056
	A₃₂₀	0,095	0,114	0,008
	A_{260/280}	1,454	1,463	1,356

Ze všech výrobků bylo všemi nosiči izolováno dostatečné množství DNA v množství 270 – 295 ng/μl nosičem Fkol135ox, 239 – 275 ng/μl nosičem FkolB30ox a 141 – 164 ng/μl nosičem Dynabeads.

5.2.2. Agarózová gelová elektroforéza DNA

Obrázek 5.7 zachycuje agarózovou gelovou elektroforézu bakteriální DNA izolované testovanými nosiči.

Obr. 5.7: Agarózová gelová elektroforéza DNA izolovaná z výrobků magnetickými nosiči



číslo běhu	označení DNA	množství DNA [ng/μl]	přítomnost DNA
1	bez DNA		
2	DNA R-135ox	4050	+
3	DNA M-135ox	4050	+
4	DNA LF-135ox	4425	+
5	bez DNA		
6	DNA R-30ox	4125	+
7	DNA M-30ox	3585	+
8	DNA LF-30ox	3675	+
9	bez DNA		
10	DNA R-D	2115	+
11	DNA M-D	2460	+
12	DNA LF-D	2160	+
13	bez DNA		

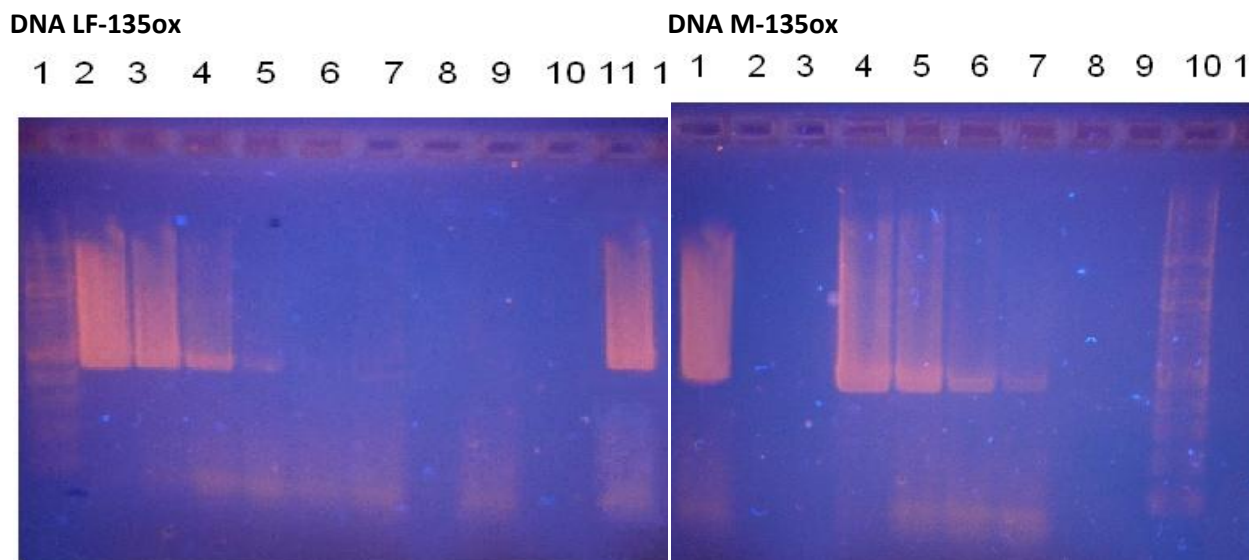
Pomocí magnetických nosičů byla ze všech výrobků izolována relativně intaktní DNA. RNA nebyla na gelu detegována.

5.2.3. PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií domény *Bacteria* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.8 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 466 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byly detekovány ve všech případech.

Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

Obr. 5.8: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp)
Amplifikováno bylo různé množství DNA.

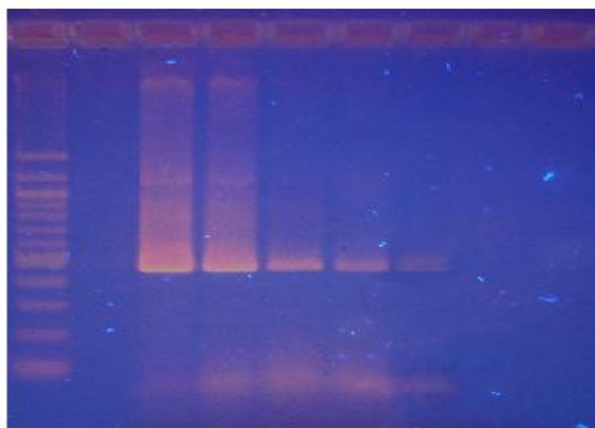


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	žebříček	5 μl		
2	DNA LF-135ox (10 ng/μl)	15 μl	+++	
3	DNA LF-135ox (1 ng/μl)	15 μl	++	
4	DNA LF-135ox (100 pg/μl)	15 μl	++	
5	DNA LF-135ox (10 pg/μl)	15 μl	+	
6	DNA LF-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–	
7	DNA LF-135ox (100 fg/μl)	15 μl	–	
8	bez DNA	0 μl		
9	negativní kontrola	15 μl	–	
10	bez DNA	0 μl		
11	pozditivní kontrola		+++	

číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	pozditivní kontrola	15 μl	+++	
2	bez DNA	0 μl		
3	negativní kontrola	15 μl	–	
4	DNA M-135ox (10 ng/μl)	15 μl	+++	
5	DNA M-135ox (1 ng/μl)	15 μl	++	
6	DNA M-135ox (100 pg/μl)	15 μl	++	
7	DNA M-135ox (10 pg/μl)	15 μl	+	
8	DNA M-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–	
9	DNA M-135ox (100 fg/μl)	15 μl	–	
10	žebříček	5 μl		

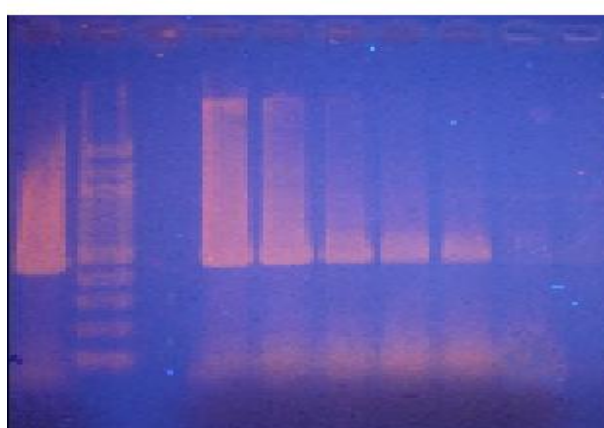
DNA R-135ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9



DNA LF-B30ox

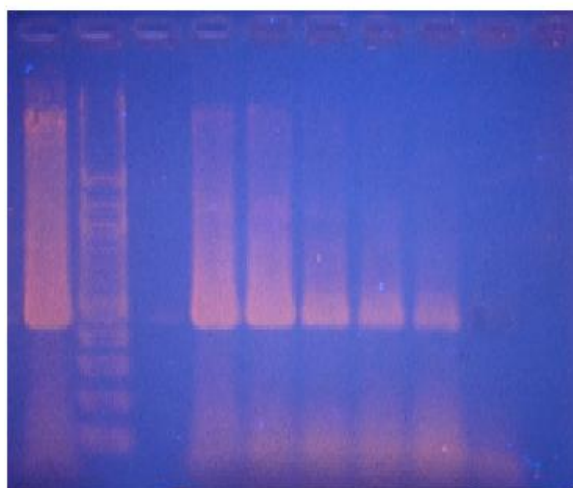
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	žebříček	5 μ l			1	pozitivní kontrola	15 μ l	+++	
2	negativní kontrola	15 μ l	-		2	žebříček	5 μ l		
3	pozitivní kontrola	15 μ l	+++		3	negativní kontrola	15 μ l	-	
4	DNA R-135ox (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++		4	DNA LF- B30ox (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++	
5	DNA R- 135 (1 ng/ μ l)	15 μ l	++		5	DNA LF- B30ox (1 ng/ μ l)	15 μ l	+++	
6	DNA R- 135ox (100 pg/ μ l)	15 μ l	++		6	DNA LF- B30ox (100 pg/ μ l)	15 μ l	++	
7	DNA R- 135ox (10 pg/ μ l)	15 μ l	+		7	DNA LF- B30ox (10 pg/ μ l)	15 μ l	++	
8	DNA R- 135ox (1 pg/ μ l)	15 μ l	-		8	DNA LF- B30ox (1 pg/ μ l)	15 μ l	++	
9	DNA R- 135ox (100 fg/ μ l)	15 μ l	-		9	DNA LF- B30ox (100 fg/ μ l)	15 μ l	-	
					10	bez DNA	0 μ l		

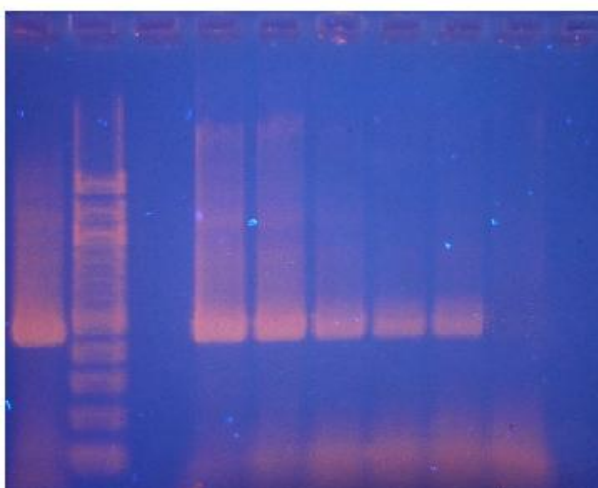
DNA M-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



DNA R-B30ox

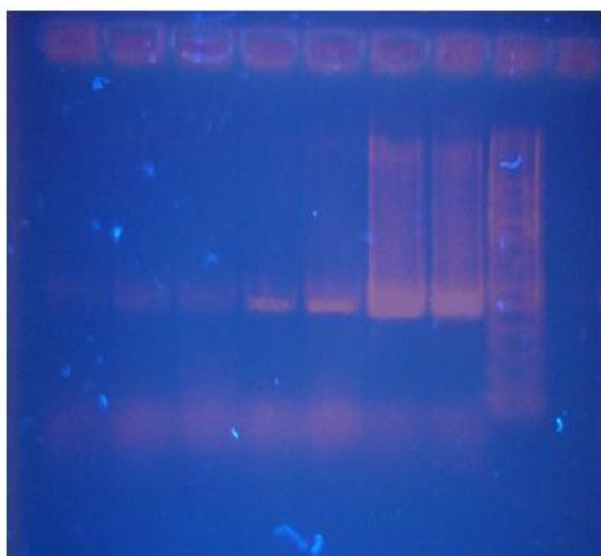
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	pozitivní kontrola	15 μ l	+++		1	pozitivní kontrola	15 μ l	+++	
2	žebříček	5 μ l			2	žebříček	5 μ l		
3	negativní kontrola	15 μ l	–		3	negativní kontrola	15 μ l	–	
4	DNA M- B30ox (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++		4	DNA R- B30ox (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++	
5	DNA M- B30ox (1 ng/ μ l)	15 μ l	+++		5	DNA R- B30ox (1 ng/ μ l)	15 μ l	+++	
6	DNA M- B30ox (100 pg/ μ l)	15 μ l	++		6	DNA R- B30ox (100 pg/ μ l)	15 μ l	++	
7	DNA M- B30ox (10 pg/ μ l)	15 μ l	++		7	DNA R- B30ox (10 pg/ μ l)	15 μ l	++	
8	DNA M- B30ox (1 pg/ μ l)	15 μ l	+		8	DNA R- B30ox (1 pg/ μ l)	15 μ l	++	
9	DNA M- B30ox (100 fg/ μ l)	15 μ l	–		9	DNA R- B30ox (100 fg/ μ l)	15 μ l	–	
10	bez DNA	0 μ l			10	bez DNA	0 μ l		

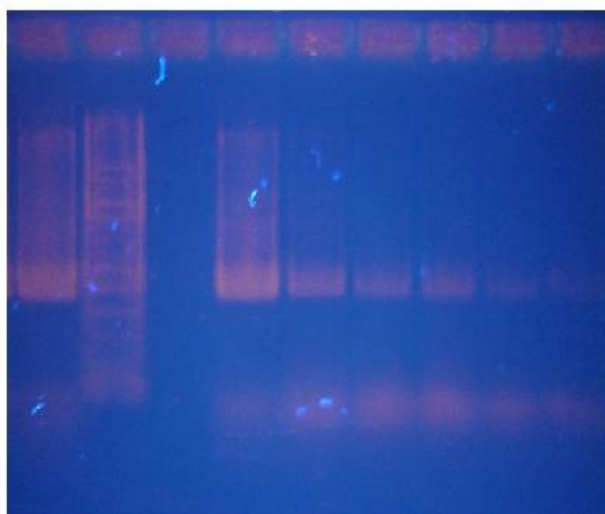
DNA LF-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



DNA M-D

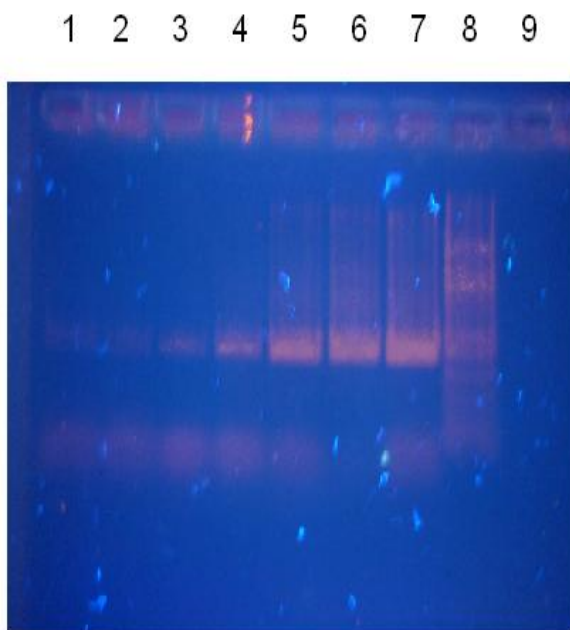
1 2 3 4 5 6 7 8 9



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	DNA LF-D (100 fg/ μ l)	15 μ l	–		1	pozitivní kontrola	15 μ l	++	
2	DNA LF- D (1 pg/ μ l)	15 μ l	–		2	žebříček	5 μ l		
3	DNA LF- D (10 pg/ μ l)	15 μ l	–		3	negativní kontrola	15 μ l	–	
4	DNA LF- D (100 pg/ μ l)	15 μ l	+		4	DNA M- D (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++	
5	DNA LF- D (1 ng/ μ l)	15 μ l	+		5	DNA M- D (1 ng/ μ l)	15 μ l	++	

6	DNA LF- D (10 ng/ μ l)	15 μ l	++	6	DNA M- D (100 pg/ μ l)	15 μ l	+
7	pozitivní kontrola	15 μ l	++	7	DNA M- D (10 pg/ μ l)	15 μ l	+
8	žebříček	5 μ l		8	DNA M- D (1 pg/ μ l)	15 μ l	–
9	negativní kontrola	15 μ l	–	9	DNA M- D (100 fg/ μ l)	15 μ l	–

DNA R-D



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA R-D (100 fg/ μ l)	15 μ l	–
2	DNA R- D (1 pg/ μ l)	15 μ l	–
3	DNA R- D (10 pg/ μ l)	15 μ l	+
4	DNA R- D (100 pg/ μ l)	15 μ l	+
5	DNA R- D (1 ng/ μ l)	15 μ l	++
6	DNA R- D (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++
7	pozitivní kontrola	15 μ l	+++
8	žebříček	5 μ l	
9	negativní kontrola	15 μ l	–

V PCR specifické pro doménu *Bacteria* byly detegovány specifické produkty PCR až pro koncentrace 1 pg/ μ l, v případě nosičů Fkol135ox pro koncentrace o řád vyšší, tedy 10 pg/ μ l.

5.2.4. PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií rodu *Lactobacillus* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.9 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 250 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/ μ l byly detekovány ve všech případech. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/ μ l – 100 fg/ μ l), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR. V případě nosičů FkolB30ox byly z důvodů problémů (nízká citlivost) při použití primerů LbLMA 1-rev a R16-1 použity primery F-all a R-all, u nichž délka specifického PCR produktu byla 92 bp. Na příslušném elektroferogramu na obrázku 5.9 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 92 bp byly po amplifikaci DNA detegovány až po koncentraci 100 fg/ μ l, z důvodů

problémů s velikostním standardem však bylo přistoupeno zpět k primerům poskytujícím produkt PCR o velikosti 250 bp.

Obr. 5.9: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp, 92 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA.

DNA LF-135ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



DNA M-135ox

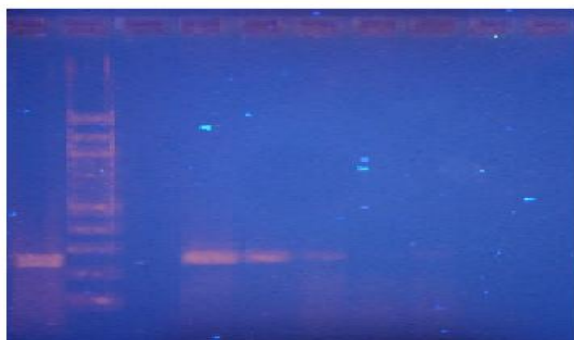
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	produktů
			PCR	PCR
1	pozitivní kontrola	15 μ l	+++	+++
2	žebříček	5 μ l		
3	negativní kontrola	15 μ l	-	-
4	DNA LF -135ox (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++	+++
5	DNA LF -135ox (1 ng/ μ l)	15 μ l	++	++
6	DNA LF -135ox (100 pg/ μ l)	15 μ l	+	+
7	DNA LF -135ox (10 pg/ μ l)	15 μ l	-	-
8	DNA LF -135ox (1 pg/ μ l)	5 μ l	-	-
9	DNA LF -135ox (100 fg/ μ l)	15 μ l	-	-
10	bez DNA	0 μ l		

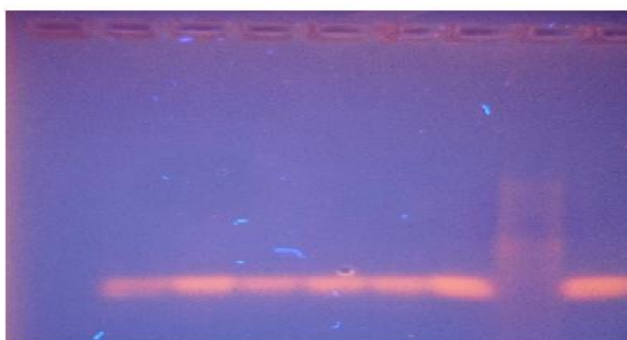
DNA R-135ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



DNA LF-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9

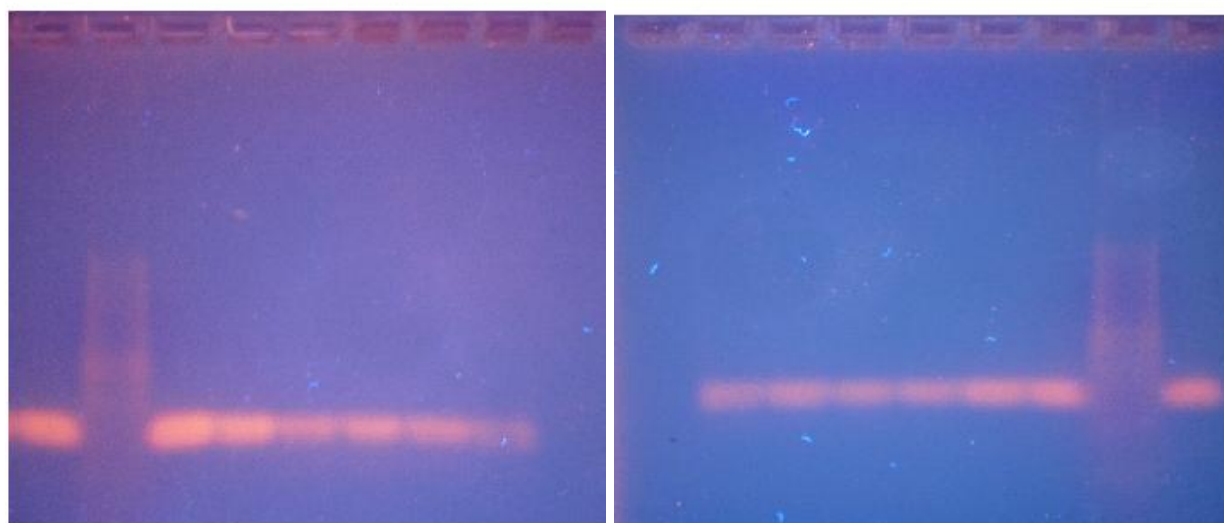


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	pozitivní kontrola	15 μ l		+++	1	negativní kontrola	15 μ l		–
2	žebříček	5 μ l			2	DNA LF –B30ox (100 fg/ μ l)	15 μ l		++
3	negativní kontrola	15 μ l		–	3	DNA LF - B30ox (1 pg/ μ l)	15 μ l		+++
4	DNA R -135ox (10 ng/ μ l)	15 μ l		+++	4	DNA LF - B30ox (10 pg/ μ l)	15 μ l		+++
5	DNA R -135ox (1 ng/ μ l)	15 μ l		++	5	DNA LF - B30ox (100 pg/ μ l)	15 μ l		+++
6	DNA R -135ox (100 pg/ μ l)	15 μ l		+	6	DNA LF - B30ox (1 ng/ μ l)	15 μ l		+++
7	DNA R -135ox (10 pg/ μ l)	15 μ l		–	7	DNA LF - B30ox (10 ng/ μ l)	15 μ l		+++
8	DNA R -135ox (1 pg/ μ l)	5 μ l		–	8	žebříček	5 μ l		
9	DNA R -135ox (100 fg/ μ l)	15 μ l		–	9	pozitivní kontrola	15 μ l		+++
10	bez DNA	0 μ l			10	bez DNA	0 μ l		

DNA M-B30ox

DNA R-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 2 3 4 5 6 7 8 9

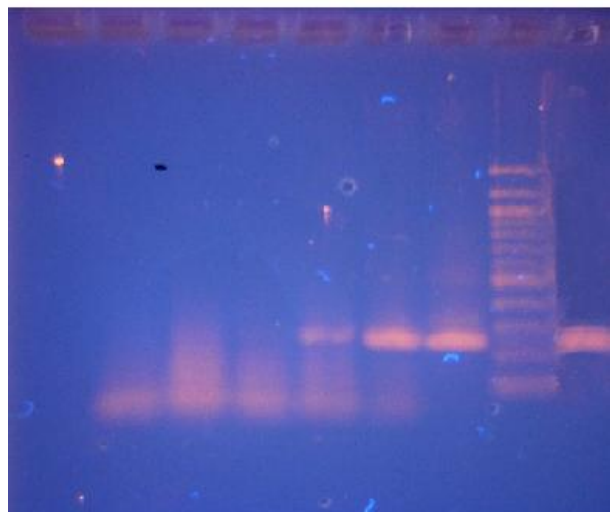


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	pozitivní kontrola	15 μ l		+++	1	negativní kontrola	15 μ l		–
2	žebříček	5 μ l			2	DNA R –B30ox (100 fg/ μ l)	15 μ l		++
3	DNA M - B30ox (10 ng/ μ l)	15 μ l		+++	3	DNA R - B30ox (1 pg/ μ l)	15 μ l		++
4	DNA M - B30ox (1 ng/ μ l)	15 μ l		++	4	DNA R - B30ox (10 pg/ μ l)	15 μ l		++
5	DNA M - B30ox (100 pg/ μ l)	15 μ l		+	5	DNA R - B30ox (100 pg/ μ l)	15 μ l		++
6	DNA M - B30ox (10 pg/ μ l)	15 μ l		+	6	DNA R - B30ox (1 ng/ μ l)	15 μ l		+++
7	DNA M - B30ox	5 μ l		+	7	DNA R - B30ox	15 μ l		+++

(1 pg/ μ l)				(10 ng/ μ l)			
8	DNA M - B30ox (100 fg/ μ l)	15 μ l	+	8	žebříček	5 μ l	
9	negativní kontrola	15 μ l	-	9	pozitivní kontrola	15 μ l	+++

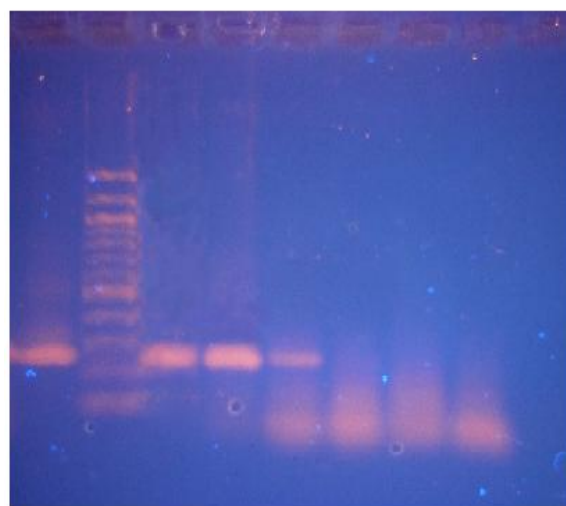
DNA LF-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



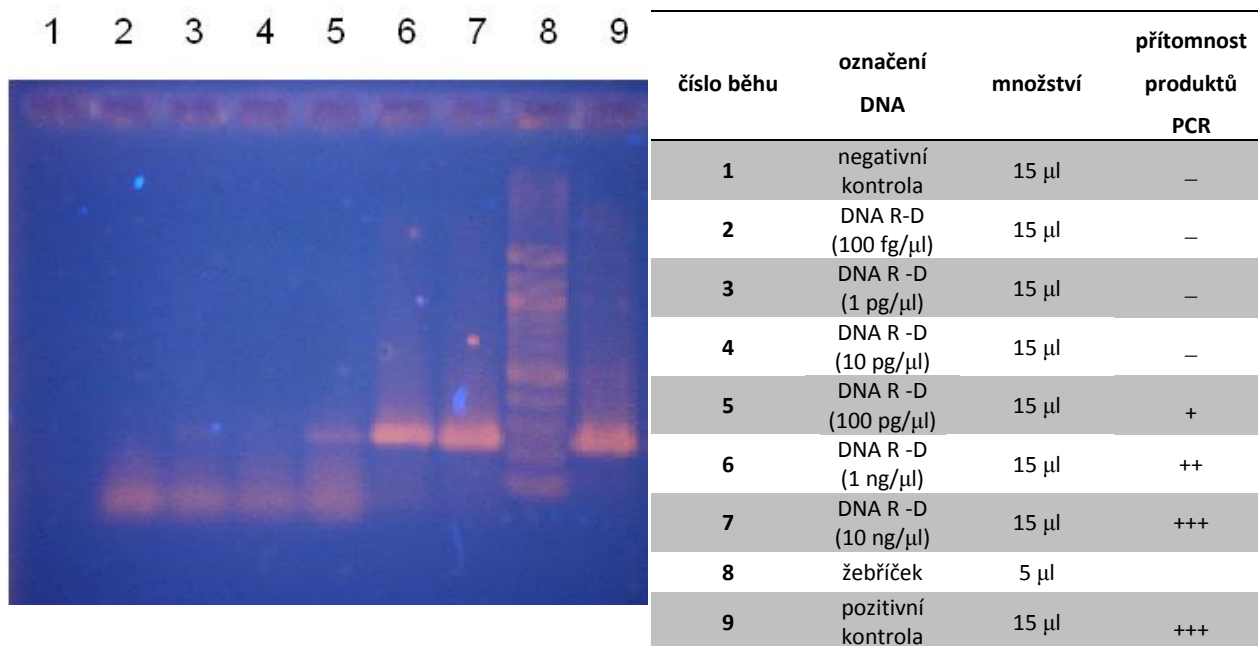
DNA M-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	negativní kontrola	15 μ l	-	1	pozitivní kontrola	15 μ l	+++
2	DNA LF-D (100 fg/ μ l)	15 μ l	-	2	žebříček	5 μ l	
3	DNA LF-D (1 pg/ μ l)	15 μ l	-	3	DNA M -D (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++
4	DNA LF-D (10 pg/ μ l)	15 μ l	-	4	DNA M -D (1 ng/ μ l)	15 μ l	++
5	DNA LF-D (100 pg/ μ l)	15 μ l	+	5	DNA M -D (100 pg/ μ l)	15 μ l	+
6	DNA LF-D (1 ng/ μ l)	15 μ l	++	6	DNA M -D (10 pg/ μ l)	15 μ l	-
7	DNA LF-D (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++	7	DNA M -D (1 pg/ μ l)	15 μ l	-
8	žebříček	5 μ l		8	DNA M -D (100 fg/ μ l)	15 μ l	-
9	pozitivní kontrola	15 μ l	+++	9	negativní kontrola	15 μ l	-

DNA R-D

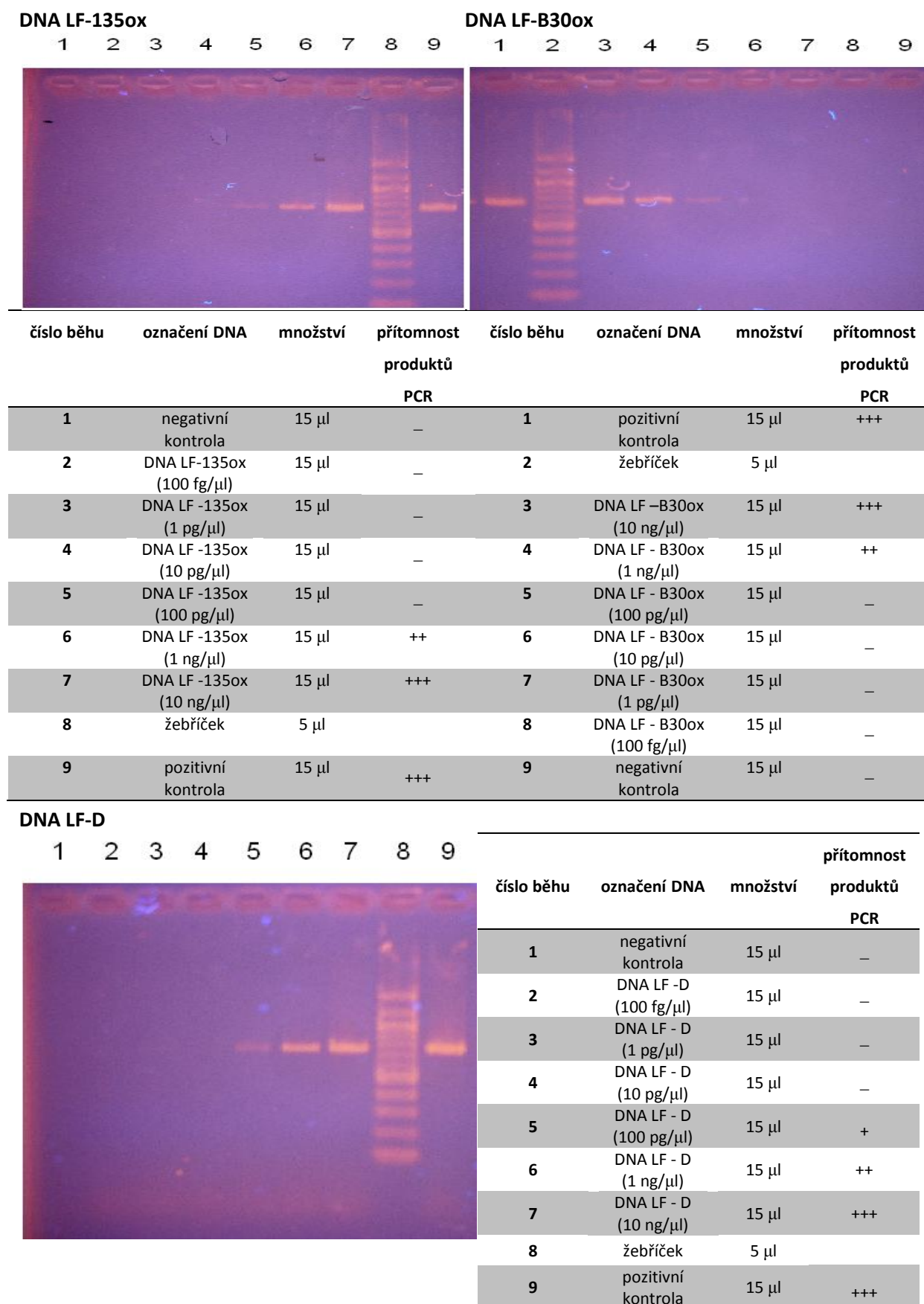


V PCR specifické pro rod *Lactobacillus* byly detegovány specifické produkty PCR až pro koncentrace 100 pg/μl, v případě použití primerů F-all a R-all až pro 100 fg/μl, standard však byl v tomto případě nevyhovující.

5.2.4. PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.10 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 750 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byly detekovány ve všech případech. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

Obr. 5.10: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus* (750 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA.

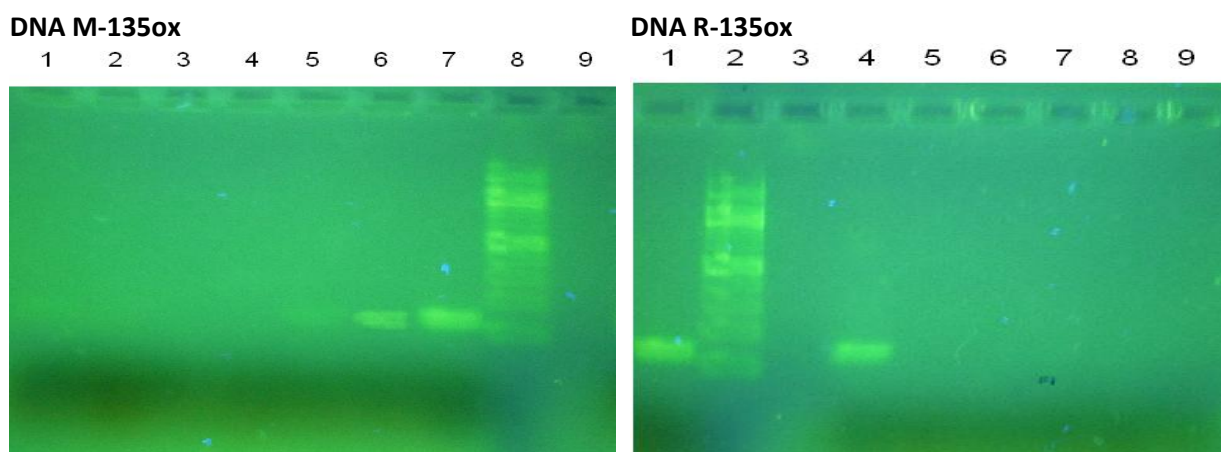


V PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* byly detegovány specifické produkty PCR až pro koncentrace 1 ng/μl, jen v případě DNA LF-D po 100 pg/μl.

5.2.5. PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus casei*

Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií druhu *Lactobacillus casei* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.11 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 132 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byly detekovány ve všech případech. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl).

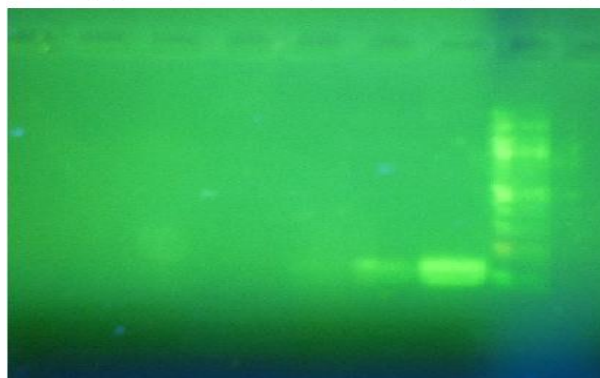
Obr. 5.11: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus casei* (132 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA.



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA M-135ox (100 fg/μl)	15 μl	–	1	pozitivní kontrola	15 μl	++
2	DNA M-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–	2	žebříček	5 μl	
3	DNA M-135ox (10 pg/μl)	15 μl	–	3	negativní kontrola	15 μl	–
4	DNA M-135ox (100 pg/μl)	15 μl	–	4	DNA R-135ox (10 ng/μl)	15 μl	++
5	DNA M-135ox (1 ng/μl)	15 μl	–	5	DNA R-135ox (1 ng/μl)	15 μl	–
6	DNA M-135ox (10 ng/μl)	15 μl	++	6	DNA R-135ox (100 pg/μl)	15 μl	–
7	pozitivní kontrola	15 μl	++	7	DNA R-135ox (10 pg/μl)	15 μl	–
8	žebříček	5 μl		8	DNA R-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–
9	negativní kontrola	15 μl	–	9	DNA R-135ox (100 fg/μl)	15 μl	–

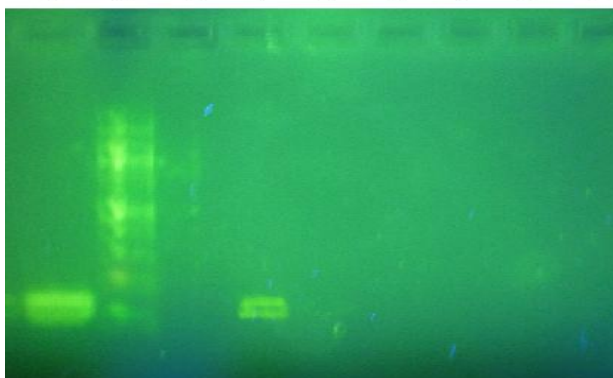
DNA M-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9



DNA R-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9

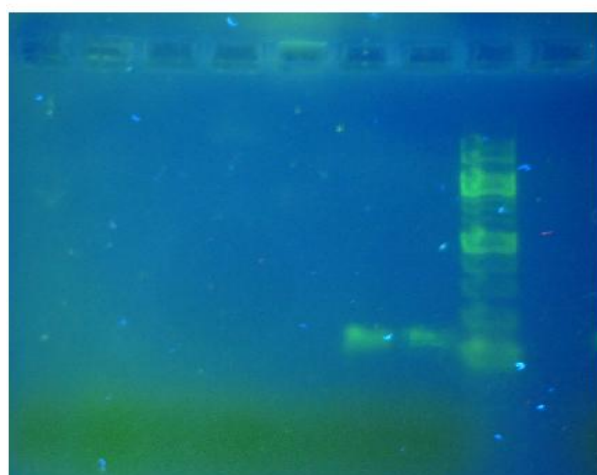


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	DNA M-B30ox (100 fg/μl)	15 μl	-	
2	DNA M- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	-	
3	DNA M- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	-	
4	DNA M- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	-	
5	DNA M- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	-	
6	DNA M- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+	
7	pozitivní kontrola	15 μl	+++	
8	žebříček	5 μl		
9	negativní kontrola	15 μl	-	

číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	pozitivní kontrola	15 μl	+++	
2	žebříček	5 μl		
3	negativní kontrola	15 μl	-	
4	DNA R- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	++	
5	DNA R- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	-	
6	DNA R- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	-	
7	DNA R- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	-	
8	DNA R- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	-	
9	DNA R- B30ox (100 fg/μl)	15 μl	-	

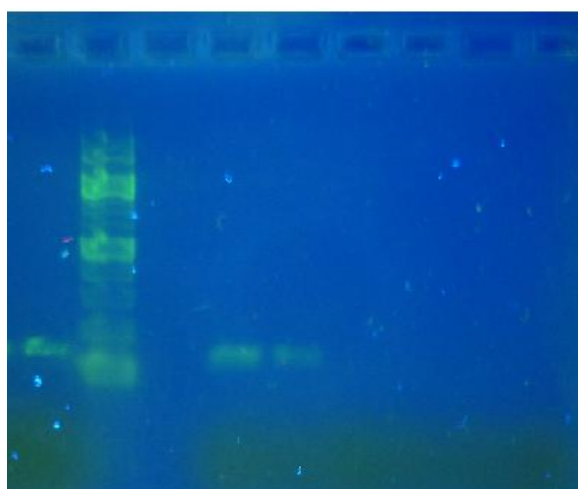
DNA M-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



DNA R-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



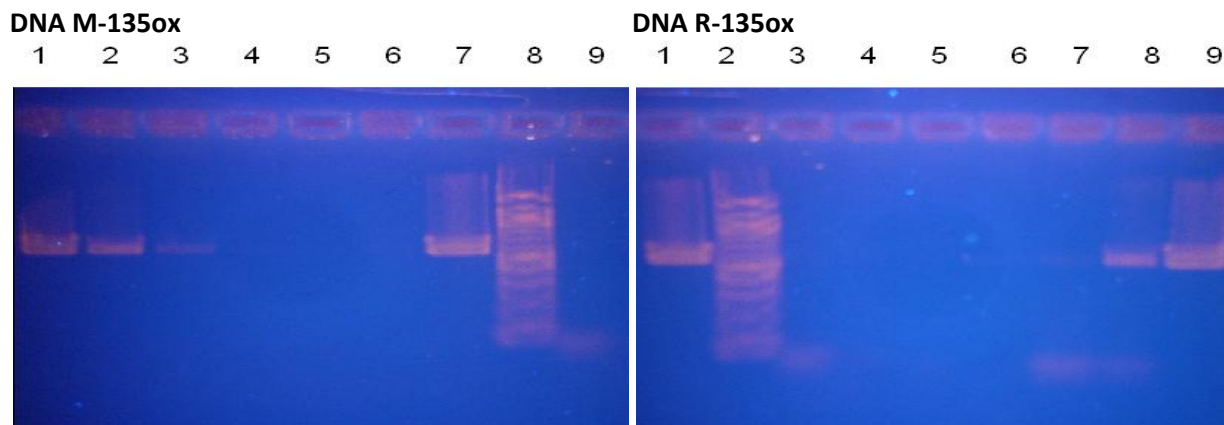
číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	DNA M-D (100 fg/μl)	15 μl	–		1	pozitivní kontrola	15 μl	+	
2	DNA M- D (1 pg/μl)	15 μl	–		2	žebříček	5 μl		
3	DNA M- D (10 pg/μl)	15 μl	–		3	negativní kontrola	15 μl	–	
4	DNA M- D (100 pg/μl)	15 μl	–		4	DNA R- D (10 ng/μl)	15 μl	+	
5	DNA M- D (1 ng/μl)	15 μl	–		5	DNA R- D (1 ng/μl)	15 μl	+	
6	DNA M- D (10 ng/μl)	15 μl	+		6	DNA R- D (100 pg/μl)	15 μl	–	
7	pozitivní kontrola	15 μl	+		7	DNA R- D (10 pg/μl)	15 μl	–	
8	žebříček	5 μl			8	DNA R- D (1 pg/μl)	15 μl	–	
9	negativní kontrola	15 μl	–		9	DNA R- D (100 fg/μl)	15 μl	–	

V PCR specifické pro druh *Lactobacillus casei* byly s výjimkou DNA R-D detegovány specifické produkty PCR jen pro koncentrace 10 ng/μl.

5.2.6. PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.12 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 683 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byly detekovány ve všech případech. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

Obr. 5.12: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* (683 bp), amplifikováno bylo různé množství DNA

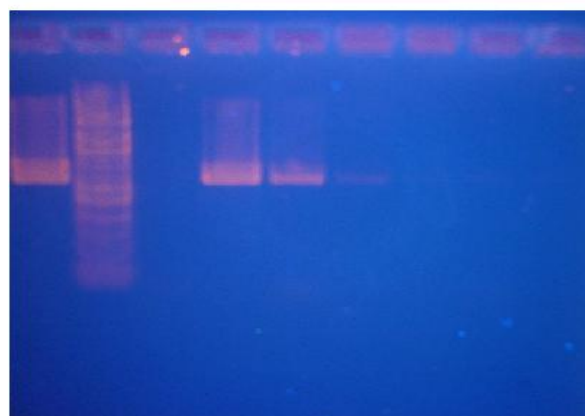


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	DNA M-135ox (10 ng/μl)	15 μl	+++		1	pozitivní kontrola	15 μl	+++	
2	DNA M-135ox (1 ng/μl)	15 μl	++		2	žebříček	5 μl		
3	DNA M-135ox (100 pg/μl)	15 μl	+		3	negativní kontrola	15 μl	–	
4	DNA M-135ox (10 pg/μl)	15 μl	–		4	DNA R-135ox (100 fg/μl)	15 μl	–	
5	DNA M-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–		5	DNA R-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–	
6	DNA M-135ox (100 fg/μl)	15 μl	++		6	DNA R-135ox (10 pg/μl)	15 μl	–	
7	pozitivní kontrola	15 μl	+++		7	DNA R-135ox (100 pg/μl)	15 μl	–	
8	žebříček	5 μl			8	DNA R-135ox (1 ng/μl)	15 μl	++	
9	negativní kontrola	15 μl	–		9	DNA R-135ox (10 ng/μl)	15 μl	+++	

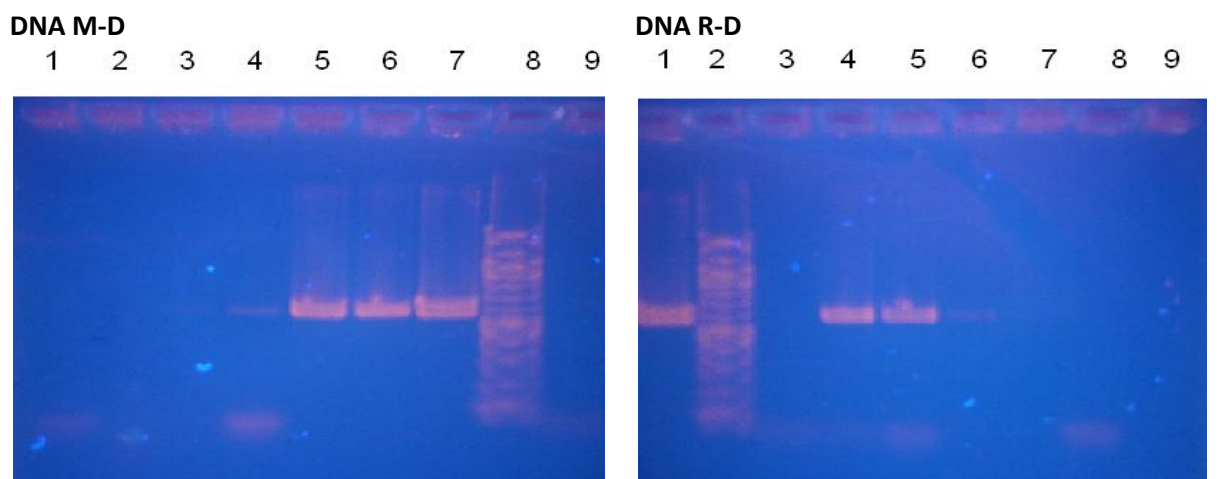
DNA M-B30ox

DNA R-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 2 3 4 5 6 7 8 9



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	DNA M-B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–		1	pozitivní kontrola	15 μl	+++	
2	DNA M- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–		2	žebříček	5 μl		
3	DNA M- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–		3	negativní kontrola	15 μl	–	
4	DNA M- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	–		4	DNA R- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+++	
5	DNA M- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	+		5	DNA R- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	++	
6	DNA M- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	++		6	DNA R- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	–	
7	pozitivní kontrola	15 μl	+++		7	DNA R- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–	
8	žebříček	5 μl			8	DNA R- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–	
9	negativní kontrola	15 μl	–		9	DNA R- B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–	



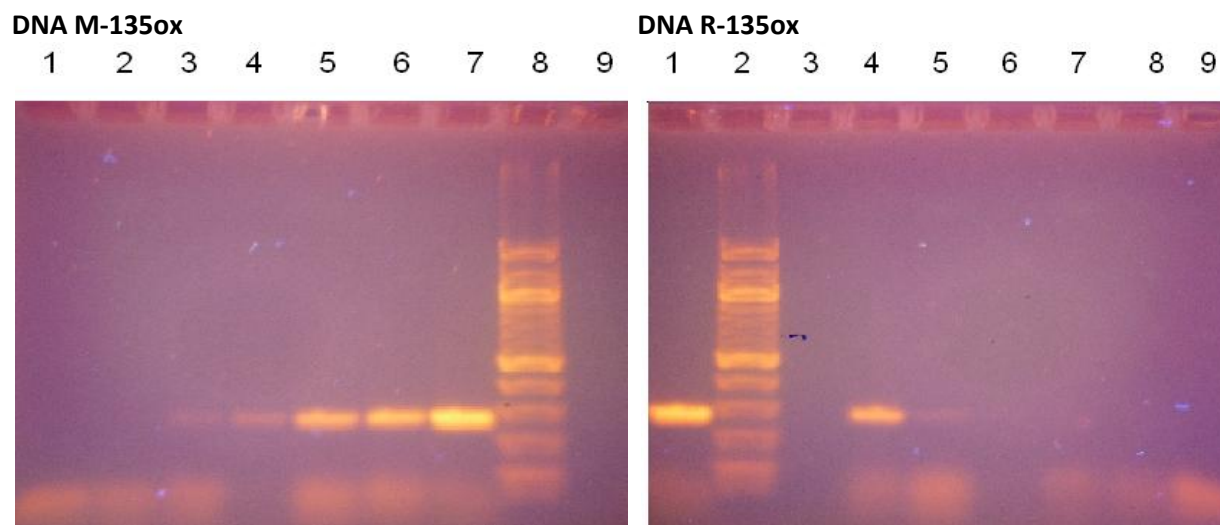
číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA M-D (100 fg/μl)	15 μl	–	1	pozitivní kontrola	15 μl	+++
2	DNA M- D (1 pg/μl)	15 μl	–	2	žebříček	5 μl	
3	DNA M- D (10 pg/μl)	15 μl	–	3	negativní kontrola	15 μl	–
4	DNA M- D (100 pg/μl)	15 μl	–	4	DNA R- D (10 ng/μl)	15 μl	++
5	DNA M- D (1 ng/μl)	15 μl	+++	5	DNA R- D (1 ng/μl)	15 μl	++
6	DNA M- D (10 ng/μl)	15 μl	+++	6	DNA R- D (100 pg/μl)	15 μl	–
7	pozitivní kontrola	15 μl	+++	7	DNA R- D (10 pg/μl)	15 μl	–
8	žebříček	5 μl		8	DNA R- D (1 pg/μl)	15 μl	–
9	negativní kontrola	15 μl	–	9	DNA R- D (100 fg/μl)	15 μl	–

V PCR specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus* byly u DNA izolované z výrobku Multilac detegovány specifické produkty PCR až pro koncentrace 100 pg/μl, zatímco u DNA izolované z výrobku Rebiomax byly specifické produkty PCR detegovány jen do koncentrace 10 ng/μl.

5.2.7. PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus plantarum*

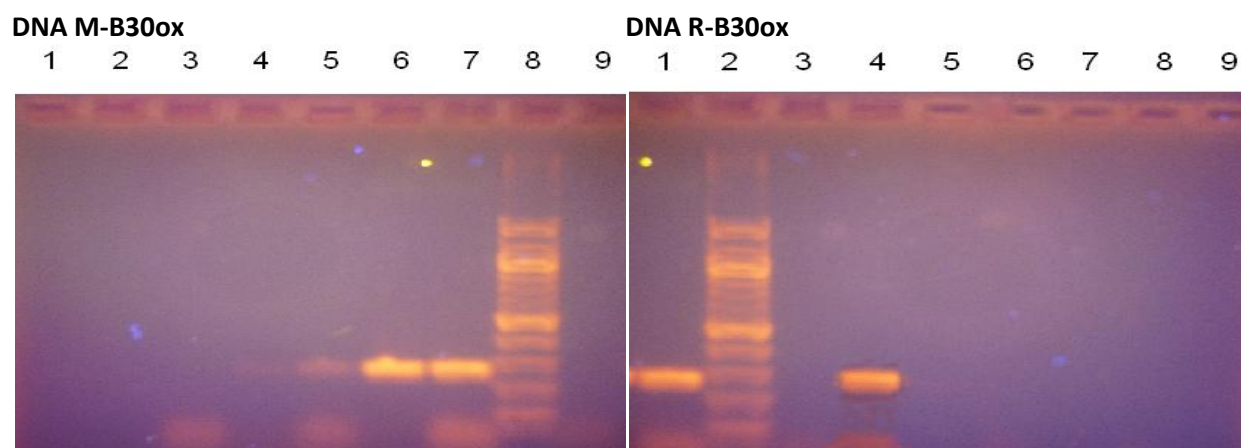
Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií druhu *Lactobacillus plantarum* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.13 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 277 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byly detekovány ve všech případech. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

Obr. 5.13: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus plantarum* (277 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	DNA M-135ox (100 fg/μl)	15 μl	–	–
2	DNA M-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–	–
3	DNA M-135ox (10 pg/μl)	15 μl	–	–
4	DNA M-135ox (100 pg/μl)	15 μl	–	–
5	DNA M-135ox (1 ng/μl)	15 μl	++	–
6	DNA M-135ox (10 ng/μl)	15 μl	++	–
7	pozitivní kontrola	15 μl	+++	–
8	žebříček	5 μl	–	–
9	negativní kontrola	15 μl	–	–

číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	pozitivní kontrola	15 μl	+++	–
2	žebříček	5 μl	–	–
3	negativní kontrola	15 μl	–	–
4	DNA R-135ox (10 ng/μl)	15 μl	++	–
5	DNA R-135ox (1 ng/μl)	15 μl	–	–
6	DNA R-135ox (100 pg/μl)	15 μl	–	–
7	DNA R-135ox (10 pg/μl)	15 μl	–	–
8	DNA R-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–	–
9	DNA R-135ox (100 fg/μl)	15 μl	–	–



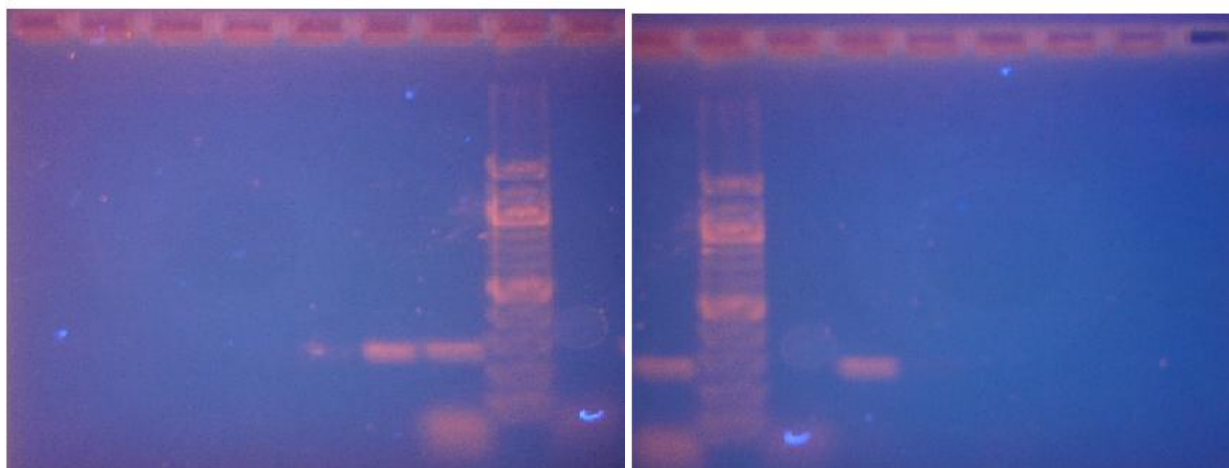
číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA M-B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–	1	pozitivní kontrola	15 μl	+++
2	DNA M- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–	2	žebříček	5 μl	
3	DNA M- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–	3	negativní kontrola	15 μl	–
4	DNA M- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	–	4	DNA R- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+++
5	DNA M- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	–	5	DNA R- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	–
6	DNA M- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+++	6	DNA R- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	–
7	pozitivní kontrola	15 μl	+++	7	DNA R- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–
8	žebříček	5 μl		8	DNA R- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–
9	negativní kontrola	15 μl	–	9	DNA R- B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–

DNA M-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9

DNA R-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA M-D (100 fg/μl)	15 μl	–	1	pozitivní kontrola	15 μl	+
2	DNA M- D (1 pg/μl)	15 μl	–	2	žebříček	5 μl	–
3	DNA M- D (10 pg/μl)	15 μl	–	3	negativní kontrola	15 μl	–
4	DNA M- D (100 pg/μl)	15 μl	–	4	DNA R- D (10 ng/μl)	15 μl	+
5	DNA M- D (1 ng/μl)	15 μl	–	5	DNA R- D (1 ng/μl)	15 μl	–
6	DNA M- D (10 ng/μl)	15 μl	+	6	DNA R- D (100 pg/μl)	15 μl	–
7	pozitivní kontrola	15 μl	+	7	DNA R- D (10 pg/μl)	15 μl	–
8	žebříček	5 μl		8	DNA R- D (1 pg/μl)	15 μl	–

9	negativní kontrola	15 µl	–	9	DNA R- D (100 fg/µl)	15 µl	–
---	--------------------	-------	---	---	----------------------	-------	---

V PCR specifické pro druh *Lactobacillus plantarum* byly detegovány specifické produkty PCR jen pro koncentrace 10 ng/µl. Jen v případě DNA M-135ox byly specifické produkty PCR detegovány i pro koncentraci 1 ng/µl.

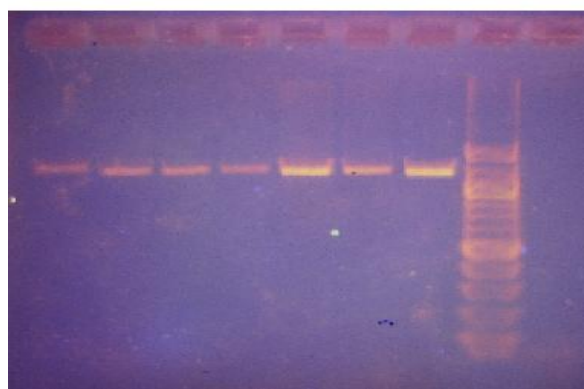
5.2.8. PCR s primery specifickými pro gen *odc* (ornithindekarboxyláza) u *Lactobacillus rhamnosus*

Dále byla také provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti genu pro ornithindekarboxylázu u druhu *Lactobacillus rhamnosus* ve vzorku DNA M-135ox, DNA-R-135ox, DNA M-B30ox, DNA R-B30ox, DNA M-D a DNA R-D. Gen *Odc* je enzym katalyzující dekarboxylaci aminokyseliny ornitin na BA putrescin. Na elektroferogramu na obrázku 5.14 je vidět, že specifický PCR produkt o velikosti 1274 bp získaný po amplifikaci výše uvedených DNA o koncentraci 10 ng/µl byl detekován ve všech případech.

Obr. 5.14: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro gen *odc* u druhu

Lactobacillus rhamnosus (1274 bp)

1 2 3 4 5 6 7 8 9

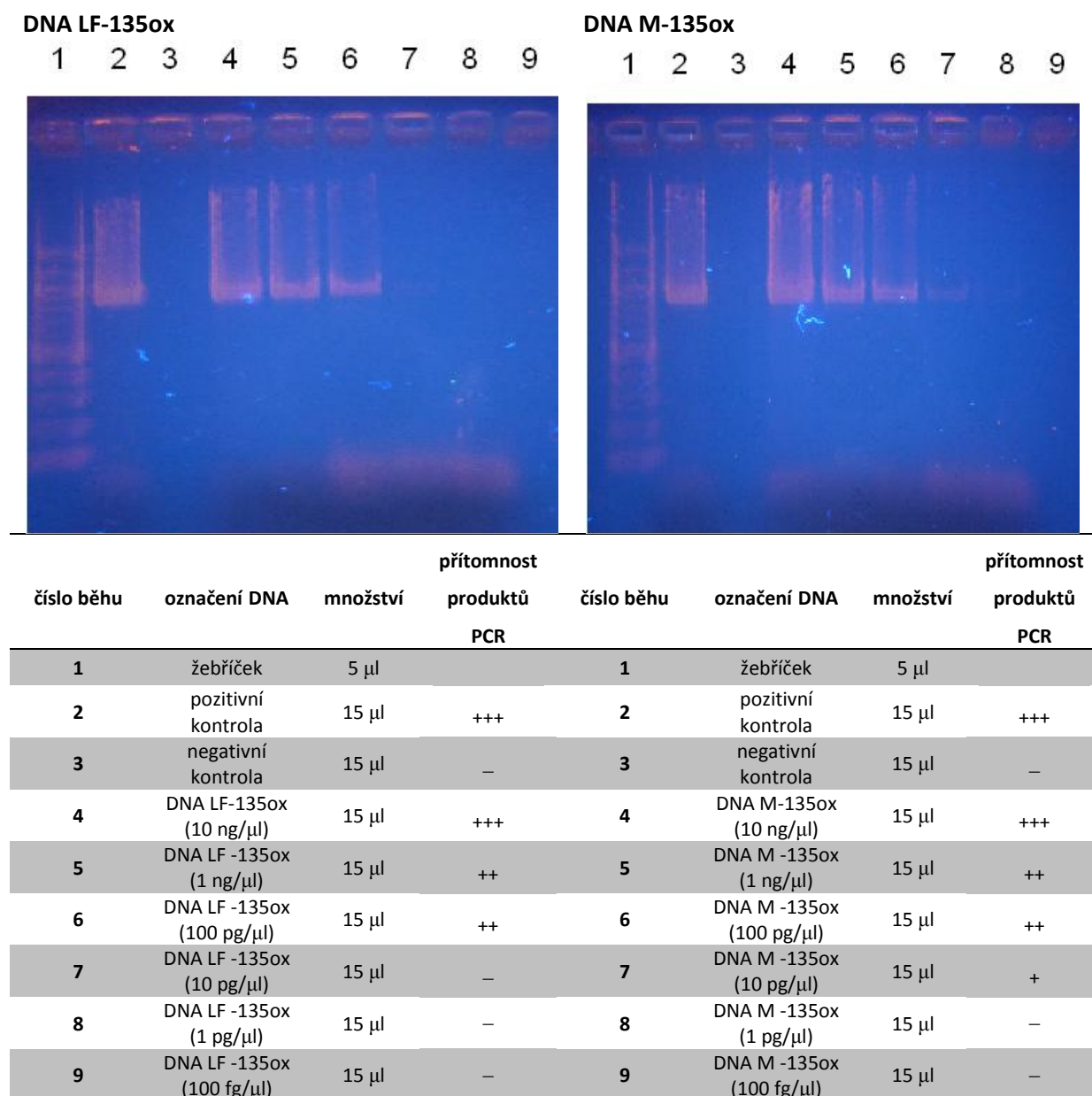


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA R-D (10 ng/µl)	15 µl	+
2	DNA M-D (10 ng/µl)	15 µl	++
3	DNA R-B30ox (10 ng/µl)	15 µl	++
4	DNA M-B30ox (10 ng/µl)	15 µl	+
5	DNA R-135ox (10 ng/µl)	15 µl	+++
6	DNA M-135ox (10 ng/µl)	15 µl	++
7	pozitivní kontrola	15 µl	+++
8	žebříček	5 µl	
9	negativní kontrola	15 µl	–

5.2.9. PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium*

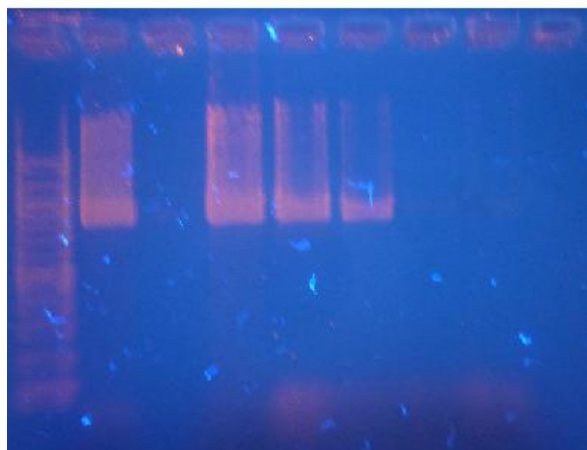
Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií rodu *Bifidobacterium* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.15 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 914 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byly detekovány ve všech případech. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

Obr. 5.15: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Bifidobacterium* (914 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA



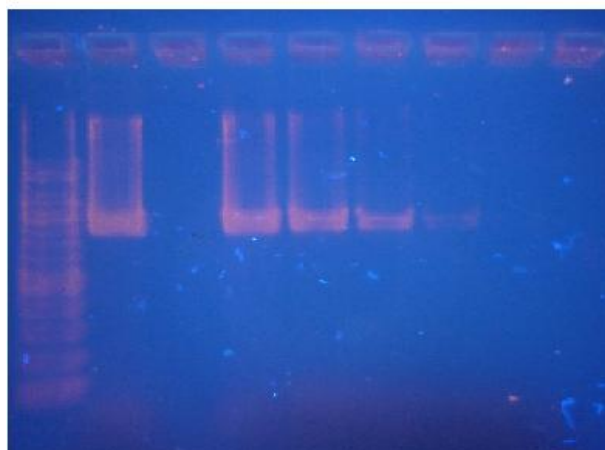
DNA R-135ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9



DNA LF-B30ox

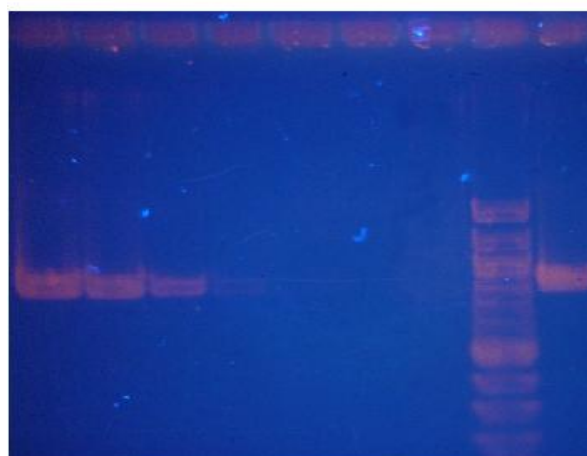
1 2 3 4 5 6 7 8 9



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	žebříček	5 μ l			1	žebříček	5 μ l		
2	pozitivní kontrola	15 μ l	+++		2	pozitivní kontrola	15 μ l	+++	
3	negativní kontrola	15 μ l	-		3	negativní kontrola	15 μ l	-	
4	DNA R-135ox (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++		4	DNA LF-B30ox (10 ng/ μ l)	15 μ l	+++	
5	DNA R-135ox (1 ng/ μ l)	15 μ l	+++		5	DNA LF-B30ox (1 ng/ μ l)	15 μ l	++	
6	DNA R-135ox (100 pg/ μ l)	15 μ l	++		6	DNA LF-B30ox (100 pg/ μ l)	15 μ l	++	
7	DNA R-135ox (10 pg/ μ l)	15 μ l	-		7	DNA LF-B30ox (10 pg/ μ l)	15 μ l	-	
8	DNA R-135ox (1 pg/ μ l)	15 μ l	-		8	DNA LF-B30ox (1 pg/ μ l)	15 μ l	-	
9	DNA R-135ox (100 fg/ μ l)	15 μ l	-		9	DNA LF-B30ox (100 fg/ μ l)	15 μ l	-	

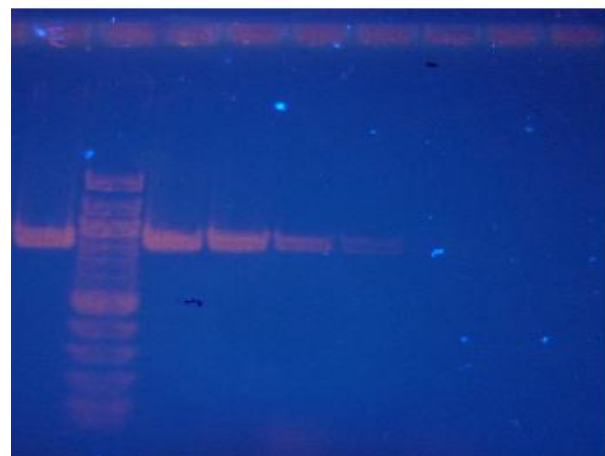
DNA M-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9



DNA R-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9

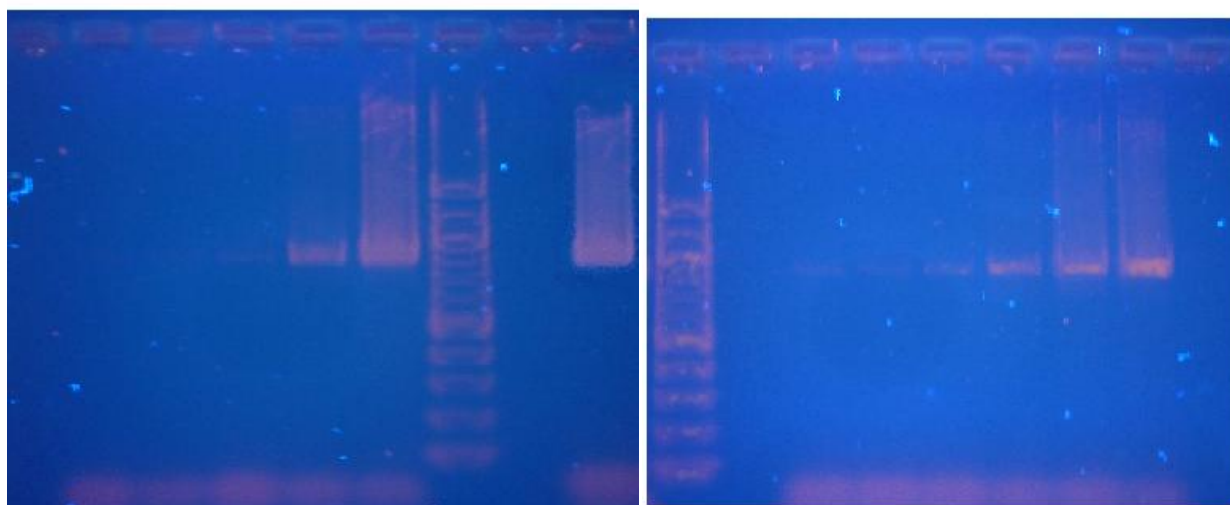


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	DNA M- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+++		1	pozitivní kontrola	15 μl	+++	
2	DNA M- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	+++		2	žebříček	5 μl		
3	DNA M- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	+		3	DNA R-B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+++	
4	DNA M- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–		4	DNA R - B30ox (1 ng/μl)	15 μl	+++	
5	DNA M- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–		5	DNA R - B30ox (100 pg/μl)	15 μl	+	
6	DNA M- B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–		6	DNA R - B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–	
7	negativní kontrola	15 μl	–		7	DNA R - B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–	
8	žebříček	5 μl			8	DNA R - B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–	
9	pozitivní kontrola	15 μl	+++		9	negativní kontrola	15 μl	–	

DNA LF-D

DNA M-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 2 3 4 5 6 7 8 9

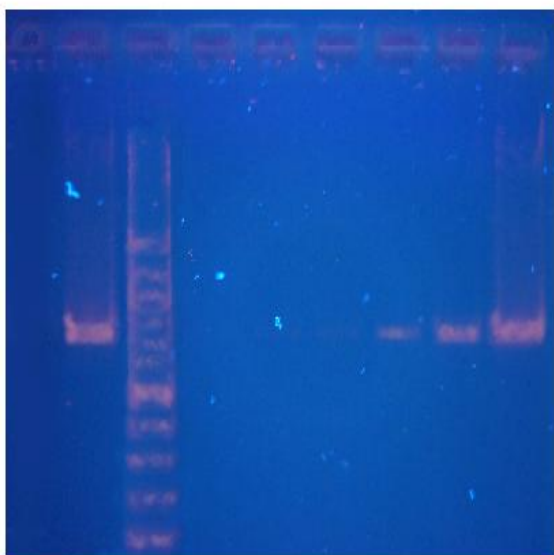


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost		číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR				produktů	PCR
1	DNA LF-D (100 fg/μl)	15 μl	–		1	žebříček	5 μl		
2	DNA LF- D (1 pg/μl)	15 μl	–		2	DNA M-D (100 fg/μl)	15 μl	–	
3	DNA LF- D (10 pg/μl)	15 μl	–		3	DNA M- D (1 pg/μl)	15 μl	–	
4	DNA LF- D (100 pg/μl)	15 μl	–		4	DNA M- D (10 pg/μl)	15 μl	–	
5	DNA LF- D (1 ng/μl)	15 μl	++		5	DNA M- D (100 pg/μl)	15 μl	–	
6	DNA LF- D (10 ng/μl)	15 μl	+++		6	DNA M- D (1 ng/μl)	15 μl	+	

7	žebříček	5 µl		7	DNA M- D (10 ng/µl)	15 µl	++
8	negativní kontrola	15 µl	–	8	pozitivní kontrola	15 µl	++
9	pozitivní kontrola	15 µl	+++	9	negativní kontrola	15 µl	–

DNA R-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	negativní kontrola	15 µl	–
2	pozitivní kontrola	15 µl	+++
3	žebříček	5 µl	
4	DNA R-D (100 fg/µl)	15 µl	–
5	DNA R- D (1 pg/µl)	15 µl	–
6	DNA R- D (10 pg/µl)	15 µl	–
7	DNA R- D (100 pg/µl)	15 µl	+
8	DNA R- D (1 ng/µl)	15 µl	+
9	DNA R- D (10 ng/µl)	15 µl	++

V PCR specifické pro rod *Bifidobacterium* byly detegovány specifické produkty PCR až pro koncentrace 100 pg/µl. Jen v případě DNA LF-D byly specifické produkty PCR detegovány jen pro koncentraci 1 ng/µl a 10 ng/µl.

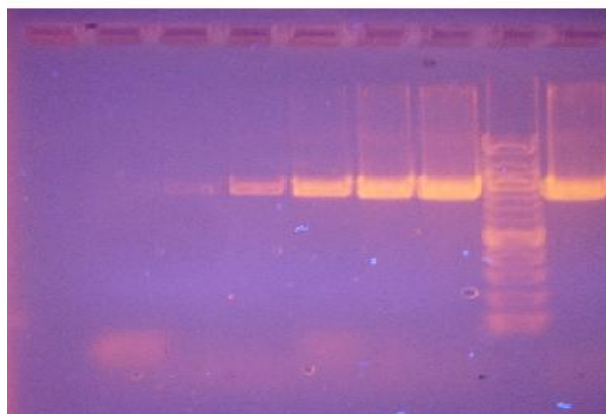
5.2.10. PCR s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium animalis*

Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií druhu *Bifidobacterium animalis* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.16 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 925 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/µl byly detekovány ve všech případech. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/µl – 100 fg/µl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

Obr. 5.16: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Bifidobacterium animalis* (925 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA

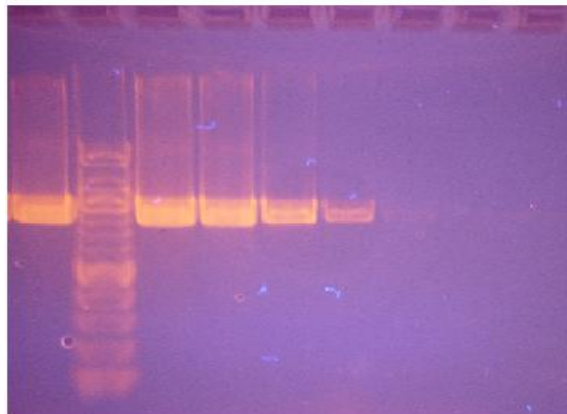
DNA LF-135ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9



DNA LF-B30ox

1 2 3 4 5 6 7 8 9

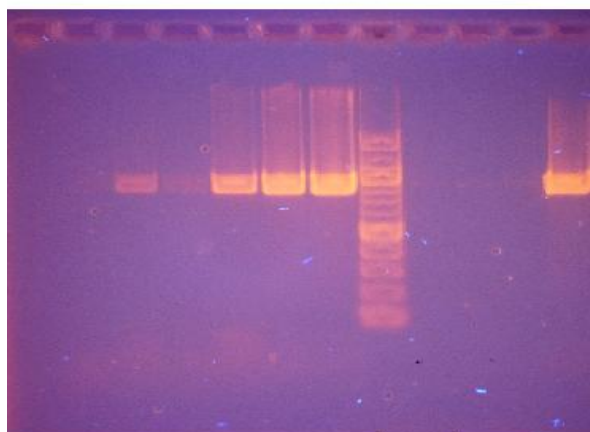


číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	negativní kontrola	15 µl	-	-
2	DNA LF-135ox (100 fg/µl)	15 µl	-	-
3	DNA LF-135ox (1 pg/µl)	15 µl	-	-
4	DNA LF-135ox (10 pg/µl)	15 µl	+	-
5	DNA LF-135ox (100 pg/µl)	15 µl	++	-
6	DNA LF-135ox (1 ng/µl)	15 µl	+++	-
7	DNA LF-135ox (10 ng/µl)	15 µl	+++	-
8	žebříček	5 µl	-	-
9	pozitivní kontrola	15 µl	+++	-

číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	pozitivní kontrola	15 µl	+++	-
2	žebříček	5 µl	-	-
3	DNA LF-B30ox (10 ng/µl)	15 µl	+++	-
4	DNA LF-B30ox (1 ng/µl)	15 µl	+++	-
5	DNA LF-B30ox (100 pg/µl)	15 µl	++	-
6	DNA LF-B30ox (10 pg/µl)	15 µl	+	-
7	DNA LF-B30ox (1 pg/µl)	15 µl	-	-
8	DNA LF-B30ox (100 fg/µl)	15 µl	-	-
9	negativní kontrola	15 µl	-	-

DNA LF-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	
			produktů	PCR
1	negativní kontrola	15 µl	-	-
2	DNA LF-D (100 fg/µl)	15 µl	-	-
3	DNA LF-D (10 pg/µl)	15 µl	++	-
4	DNA LF-D (1 pg/µl)	15 µl	-	-
5	DNA LF-D (100 pg/µl)	15 µl	++	-
6	DNA LF-D (1 ng/µl)	15 µl	+++	-

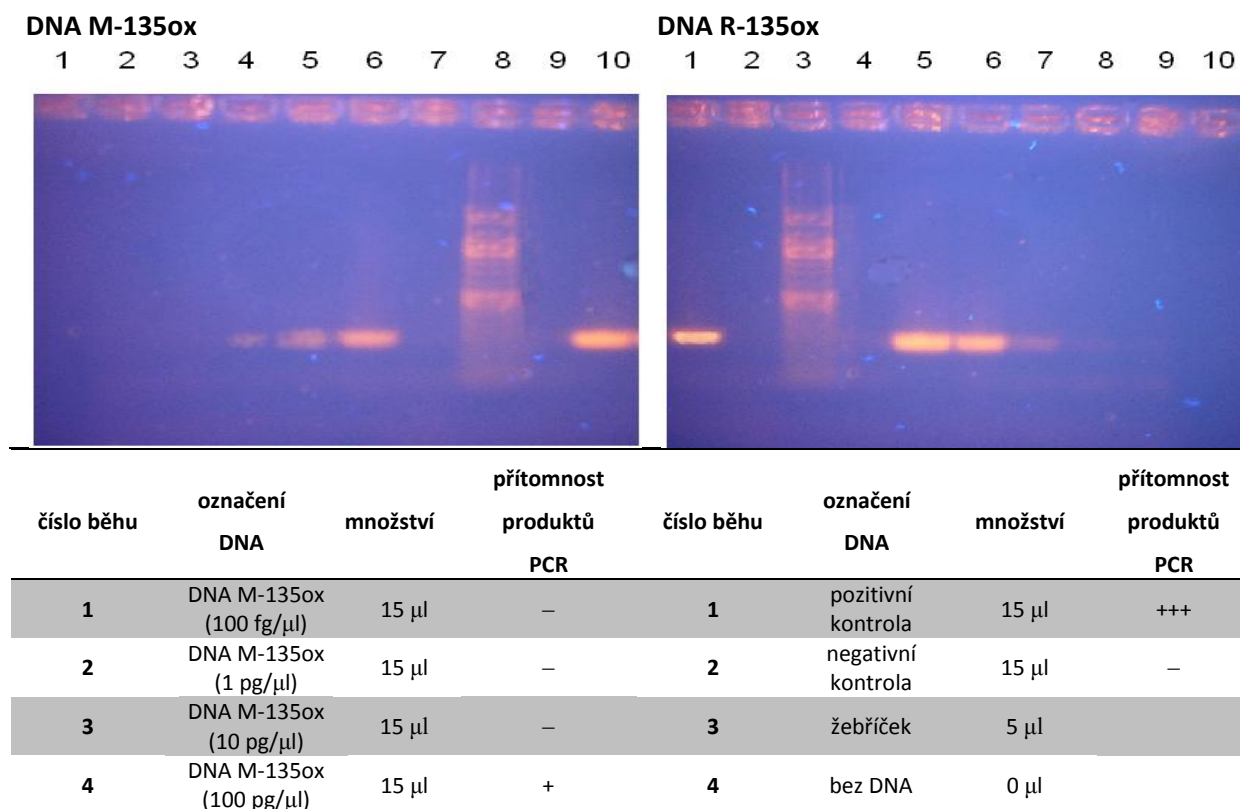
7	DNA LF-D (10 ng/μl)	15 μl	+++
8	žebříček	5 μl	
9	bez DNA	0 μl	
10	bez DNA	0 μl	
11	bez DNA	0 μl	
12	potitivní kontrola	15 μl	+++

V PCR specifické pro druh *Bifidobacterium animalis* byly detegovány specifické produkty PCR až pro koncentrace 10 pg/μl.

5.2.11. PCR s primery specifickými pro pro druh *Bifidobacterium bifidum*

Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií druhu *Bifidobacterium bifidum* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.17 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 278 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byly detekovány ve všech případech. Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

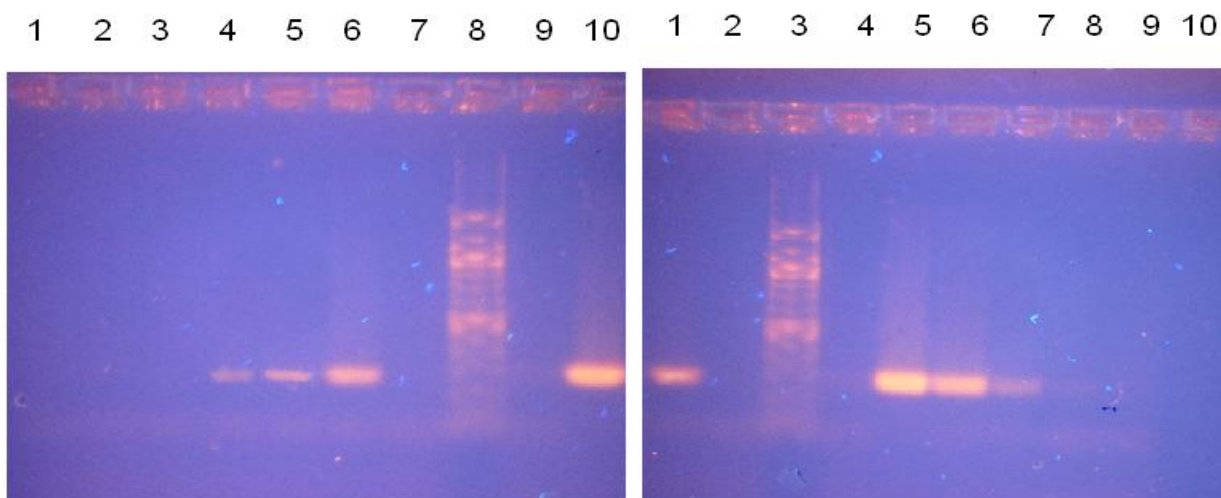
Obr. 5.17: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Bifidobacterium bifidum* (278 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA



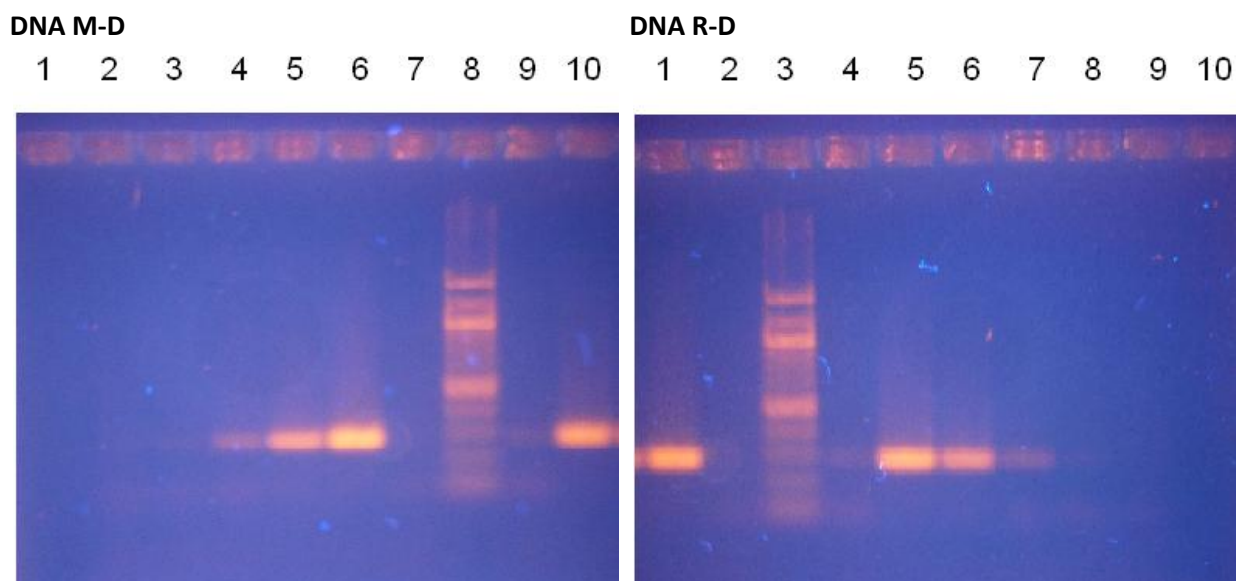
5	DNA M-135ox (1 ng/μl)	15 μl	++	5	DNA R-135ox (10 ng/μl)	15 μl	+++
6	DNA M-135ox (10 ng/μl)	15 μl	+++	6	DNA R-135ox (1 ng/μl)	15 μl	++
7	bez DNA	0 μl		7	DNA R-135ox (100 pg/μl)	15 μl	+
8	žebříček	5 μl		8	DNA R-135ox (10 pg/μl)	15 μl	–
9	negativní kontrola	15 μl	–	9	DNA R-135ox (1 pg/μl)	15 μl	–
10	potitivní kontrola	15 μl	+++	10	DNA R-135ox (100 fg/μl)	15 μl	–

DNA M-B30ox

DNA R-B30ox



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA M-B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–	1	pozitivní kontrola	15 μl	++
2	DNA M- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–	2	negativní kontrola	15 μl	–
3	DNA M- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–	3	žebříček	5 μl	
4	DNA M- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	+	4	bez DNA	0 μl	
5	DNA M- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	++	5	DNA R-B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+++
6	DNA M- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+++	6	DNA R- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	++
7	bez DNA	0 μl		7	DNA R- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	+
8	žebříček	5 μl		8	DNA R- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–
9	negativní kontrola	15 μl	–	9	DNA R- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–
10	potitivní kontrola	15 μl	+++	10	DNA R- B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost
			produktů PCR				produktů PCR
1	DNA M-D (100 fg/μl)	15 μl	–	1	pozitivní kontrola	15 μl	++
2	DNA M- D (1 pg/μl)	15 μl	–	2	negativní kontrola	15 μl	–
3	DNA M- D (10 pg/μl)	15 μl	–	3	žebříček	5 μl	
4	DNA M- D (100 pg/μl)	15 μl	+	4	bez DNA	0 μl	
5	DNA M- D (1 ng/μl)	15 μl	++	5	DNA R-D (10 ng/μl)	15 μl	+++
6	DNA M- D (10 ng/μl)	15 μl	+++	6	DNA R- D (1 ng/μl)	15 μl	++
7	bez DNA	0 μl		7	DNA R- D (100 pg/μl)	15 μl	+
8	žebříček	5 μl		8	DNA R- D (10 pg/μl)	15 μl	–
9	negativní kontrola	15 μl	–	9	DNA R- D (1 pg/μl)	15 μl	–
10	potitivní kontrola	15 μl	+++	10	DNA R- D (100 fg/μl)	15 μl	–

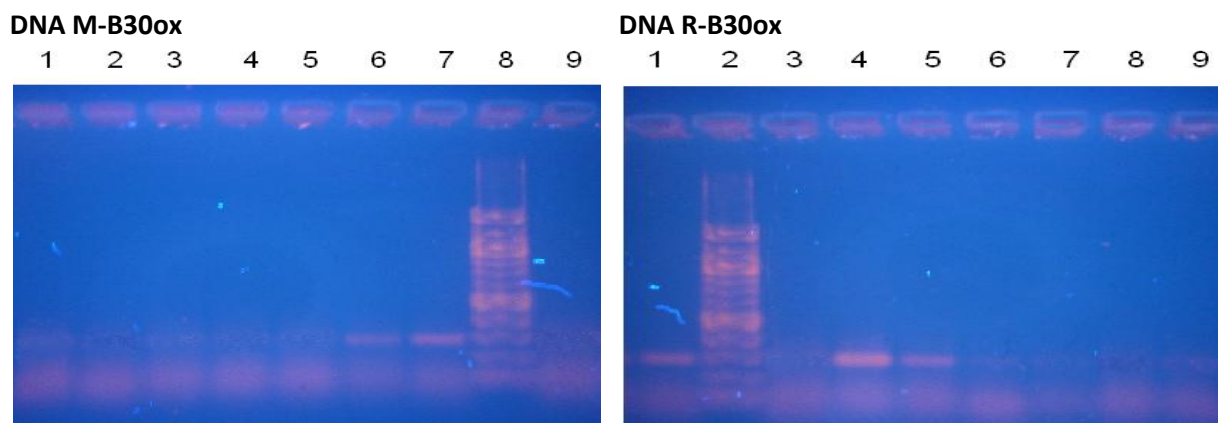
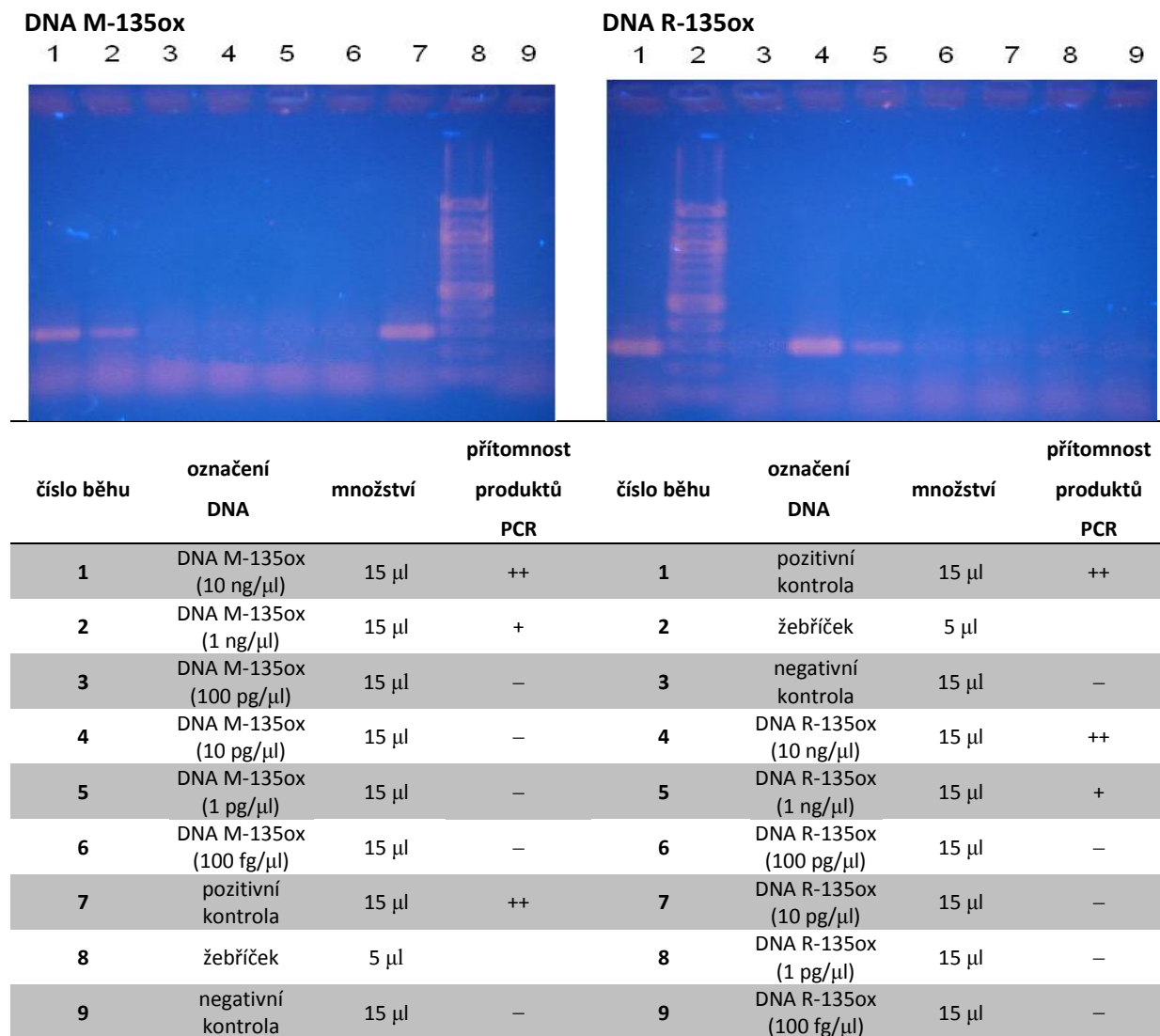
V PCR specifické pro druh *Bifidobacterium bifidum* byly detegovány specifické produkty PCR až pro koncentrace 100 pg/μl.

5.2.12. PCR s primery specifickými pro pro druh *Bifidobacterium breve*

Byly připraveny směsi pro PCR podle postupu uvedeného v tabulce 4.3 a 4.4. Byla provedena PCR a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR za účelem prokázání přítomnosti bakterií druhu *Bifidobacterium breve* ve vzorcích DNA izolovaných magnetickými nosiči. Na elektroferogramech na obrázku 5.18 je vidět, že specifické PCR produkty o velikosti 288 bp získané po amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/μl byly detekovány ve všech případech.

Současně bylo provedeno desítkové ředění DNA (10 ng/μl – 100 fg/μl), její amplifikace a agarózová gelová elektroforéza specifických produktů pro ověření citlivosti PCR.

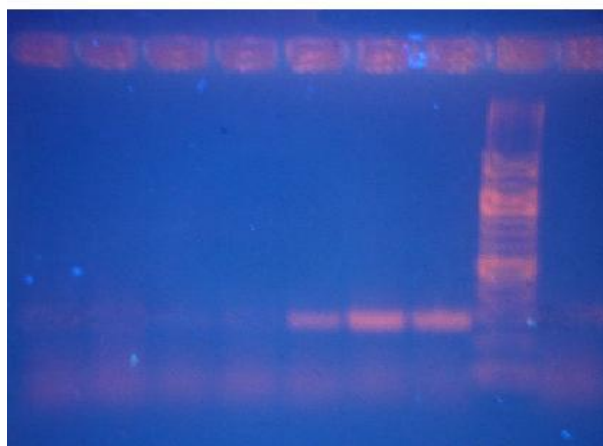
Obr. 5.18: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Bifidobacterium breve* (288 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA M-B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–	1	pozitivní kontrola	15 μl	++
2	DNA M- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–	2	žebříček	5 μl	
3	DNA M- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–	3	negativní kontrola	15 μl	–
4	DNA M- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	–	4	DNA R-B30ox (10 ng/μl)	15 μl	++
5	DNA M- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	–	5	DNA R- B30ox (1 ng/μl)	15 μl	+
6	DNA M- B30ox (10 ng/μl)	15 μl	+	6	DNA R- B30ox (100 pg/μl)	15 μl	–
7	pozitivní kontrola	15 μl	+	7	DNA R- B30ox (10 pg/μl)	15 μl	–
8	žebříček	5 μl		8	DNA R- B30ox (1 pg/μl)	15 μl	–
9	negativní kontrola	15 μl	–	9	DNA R- B30ox (100 fg/μl)	15 μl	–

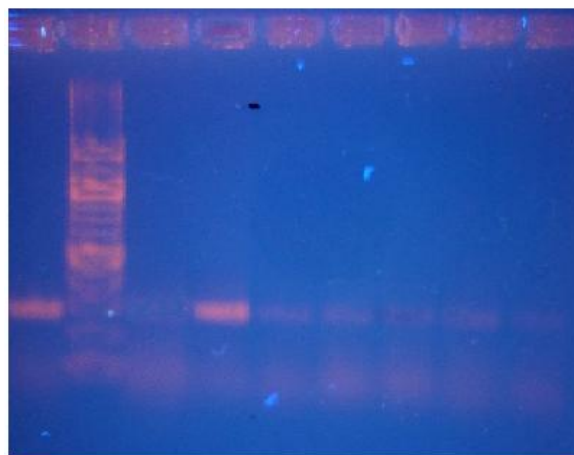
DNA M-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



DNA R-D

1 2 3 4 5 6 7 8 9



číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR	číslo běhu	označení DNA	množství	přítomnost produktů PCR
1	DNA M-D (100 fg/μl)	15 μl	–	1	pozitivní kontrola	15 μl	++
2	DNA M- D (1 pg/μl)	15 μl	–	2	žebříček	5 μl	
3	DNA M- D (10 pg/μl)	15 μl	–	3	negativní kontrola	15 μl	–
4	DNA M- D (100 pg/μl)	15 μl	–	4	DNA R-D (10 ng/μl)	15 μl	++
5	DNA M- D (1 ng/μl)	15 μl	+	5	DNA R- D (1 ng/μl)	15 μl	–
6	DNA M- D (10 ng/μl)	15 μl	++	6	DNA R- D (100 pg/μl)	15 μl	–
7	pozitivní kontrola	5 μl	++	7	DNA R- D (10 pg/μl)	15 μl	–
8	žebříček	15 μl	–	8	DNA R- D (1 pg/μl)	15 μl	–

9	negativní kontrola	15 µl	–	9	DNA R- D (100 fg/µl)	15 µl	–
---	--------------------	-------	---	---	----------------------	-------	---

V PCR specifické pro druh *Bifidobacterium breve* byly detegovány specifické produkty PCR až pro koncentrace 1 ng/µl, v případě DNAM-B30ox a DNA R-D jen pro 10 ng/µl.

5.2.13. Srovnání amplifikace DNA izolované testovanými nosiči

Srovnání amplifikace DNA izolované různými magnetickými mikročásticemi je uvedeno v tabulce 5.4.

Tab. 5.4: Srovnání amplifikace DNA izolované testovanými nosiči

				D	N	A			
	LF-135ox	M-135ox	R-135ox	LF-B30ox	M-B30ox	R-B30ox	LF-D	M-D	R-D
doména <i>Bacteria</i>	10 pg/µl	10 pg/µl	10 pg/µl	1 pg/µl	1 pg/µl	1 pg/µl	1 pg/µl	1 pg/µl	1 pg/µl
rod <i>Lactobacillus</i>	100 pg/µl	100 pg/µl	100 pg/µl	100 fg/µl*	100 fg/µl*	100 fg/µl*	100 pg/µl	100 pg/µl	100 pg/µl
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 ng/µl			1 ng/µl			100 pg/µl		
<i>Lactobacillus casei</i>	10 ng/µl	10 ng/µl	10 ng/µl	10 ng/µl	10 ng/µl	10 ng/µl	10 ng/µl	10 ng/µl	1 ng/µl
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		100 pg/µl	10 ng/µl		100 pg/µl	10 ng/µl		100 pg/µl	10 ng/µl
<i>Lactobacillus plantarum</i>		1 ng/µl	10 ng/µl		10 ng/µl	10 ng/µl		10 ng/µl	10 ng/µl
rod <i>Bifidobacterium</i>	100 pg/µl	100 pg/µl	100 pg/µl	100 pg/µl	100 pg/µl	100 pg/µl	1 ng/µl	100 pg/µl	100 pg/µl
<i>Bifidobacterium animalis</i>	10 pg/µl			10 pg/µl			10 pg/µl		
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		100 pg/µl	100 pg/µl		100 pg/µl	100 pg/µl		100 pg/µl	100 pg/µl
<i>Bifidobacterium breve</i>	1 ng/µl	1 ng/µl	1 ng/µl	1 ng/µl	10 ng/µl	1 ng/µl	1 ng/µl	1 ng/µl	10 ng/µl

* ... byly použity primery F all a R all (Haarman a kol, 2006)

Ze tří testovaných výrobků byla pomocí magnetických mikročástic izolována DNA, která se v testovaných PCR amplifikovala přibližně stejně. Rozdíly byly zjištěny u rodu *Lactobacillus rhamnosus* při amplifikaci DNA z výrobku Multilac a Rebiomax.

5.3. Srovnání amplifikace DNA izolované fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči u výrobku Linex Forte

Srovnání amplifikace DNA izolované fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči u výrobku Linex Forte je uvedeno v tabulce 5.5.

Tab. 5.5: Srovnání amplifikace DNA izolované fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči u výrobku Linex Forte

		D	N	A	
		LF-FE	LF-135ox	LF-B30ox	LF-D
nejmenší detegované množství DNA/PCR směs	doména <i>Bacteria</i>	100 fg/μl	10 pg/μl	1 pg/μl	1 pg/μl
	rod <i>Lactobacillus</i>	100 pg/μl	100 pg/μl	100 fg/μl*	100 pg/μl
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 ng/μl	1 ng/μl	1 ng/μl	100 pg/μl
	rod <i>Bifidobacterium</i>	100 pg/μl	100 pg/μl	100 pg/μl	1 ng/μl
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	1 pg/μl	10 pg/μl	10 pg/μl	10 pg/μl
	* ... byly použity primery F all a R all (Haarman a kol, 2006)				

Z tabulky 5.5 vyplývá, že v případě domény *Bacteria* byla u DNA izolované fenolovou extrakcí citlivost PCR s primery specifickými pro tuto doménu vyšší. U PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* byly citlivosti PCR shodné (LF-B30ox nelze zahrnout do srovnání z důvodu použití jiných primerů) což až na DNA LF-D platí rovněž pro PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium*. PCR s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium animalis* byla o jeden řád citlivější při amplifikaci DNA izolované fenolovou extrakcí.

6. DISKUSE

Nejkoncentrovanější DNA se z výrobků podařilo získat pomocí fenolové extrakce. Tato metoda je pomalá a zdlouhavá, je to však klasický způsob izolace DNA a získání nejvíce koncentrované DNA právě tímto způsobem byl tedy očekáván (viz Tab. 5.1). Poměrně odlišné koncentrace DNA u tří tobolek, ze kterých byla DNA izolována, mohou být způsobeny větším množstvím mezikroků v průběhu fenolové extrakce, kdy mohlo dojít ke ztrátám.

Izolace pomocí magnetických částic (viz. Tab. 5.3) byla oproti fenolové extrakci podstatně jednodušší a také rychlejší. DNA byla izolována v nižších koncentracích, které však byly pro následnou amplifikaci pomocí PCR dostačující. DNA o nejvyšších koncentracích byla izolována pomocí mikročástic Fkol135ox, následovaly mikročástice FkolB30ox. Jen u výrobku Rebiomax byla nejkoncentrovanější DNA získána pomocí částic FkolB30ox, rozdíl oproti DNA získané pomocí Fkol135ox činil však jen 5 ng. Nejnižších koncentrací DNA bylo dosaženo za použití částic Dynabeads. Tyto mikročástice nebyly na rozdíl od Fkol135ox a FkolB30ox při práci v eppendorfci zřetelně vidět (rezavě hnědá vrstvička), nižší koncentrace DNA při použití mikročástic Dynabeads tedy mohla být způsobena také chybami při manipulaci s nimi.

Jak při fenolové extrakci, tak při použití magnetických částic poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm nepřekročil hodnotu 1,8. To indikuje znečištění bílkovinami. Je to způsobeno tím, že tobolky probiotických výrobků neobsahují jen čistou kulturu, ale i další příměsi, plnidla atd. a jedná se tedy o komplexní vzorky. Také při přípravě hrubých lyzátů nedošlo nikdy k tomu, že by lyzáty byly čiré, což bylo opět způsobeno komplexností vzorků.

V další části bylo přistoupeno k samotnému průkazu přítomnosti DNA probiotických bakterií, nejprve u výrobku Linex Forte, kdy DNA byla izolována fenolovou extrakcí (viz Tab. 5.2). Specifické PCR produkty na elektroferogramu prokázaly přítomnost domény *Bacteria* s vysokou citlivostí až do koncentrace 100 fg/μl. Přítomnost rodu *Lactobacillus* byla také prokázána. Citlivost PCR zde byla poměrně nízká, pro její zvýšení by byla potřeba optimalizace PCR. *Lactobacillus acidophilus* byl následně prokázán také. Vyšší citlivost vykazovala PCR pro rod *Bifidobacterium*. Na závěr byla ještě ověřena přítomnost DNA druhu *Bifidobacterium animalis*. Citlivost PCR byla velmi dobrá. Tímto byla prokázána přítomnost DNA jak druhu *Lactobacillus acidophilus*, tak DNA druhu *Bifidobacterium animalis* ve výrobku Linex Forte.

Následovala práce s DNA izolovanou pomocí magnetických částic (viz Tab. 5.4). Nejprve byla opět provedena PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* a to i pro Linex Forte, kde již tato doména prokázána byla pomocí fenolové extrakce. Citlivost PCR byla pro doménu *Bacteria* tradičně vysoká.

Také PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* probíhala podobně jako v případě DNA získané fenolovou extrakcí a citlivost byla poměrně nízká. Z důvodů této nízké citlivosti byly vyzkoušeny jiné primery a jiný standard. Citlivost se sice značně zvýšila, ale standard se pořádně nerozdělil, a protože s tímto problémem se setkali i jiní studenti v laboratoři, bylo přistoupeno zpátky k původním primerům.

Provedena byla také PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus* u výrobku Linex Forte. *Lactobacillus acidophilus* byl sice již prokázán u DNA izolované metodou fenolové extrakce, podobné výsledky u DNA izolované pomocí magnetických částic však posloužily pro ujištění se o správném postupu.

DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* byl prokazována ve výrobcích Multilac a Rebiomax. Pro zvýšení citlivosti PCR by byla opět potřeba optimalizace.

Dále byla provedena PCR s primery specifickými pro DNA druhu *Lactobacillus plantarum*. Za povšimnutí stojí vyšší citlivost PCR u DNA z výrobku Multilac.

U druhu *Lactobacillus rhamnosus* byl také prokázán gen pro ornithindekarboxylázu. Nejlépe je vidět PCR produkt pro DNA z výrobku Rebiomax izolované pomocí částic Fkol135ox, výrazný je také PCR produkt pro DNA z výrobku Multilac izolovanou stejnými částicemi. To koresponduje i s tabulkou 5.3, kde je vidět, že při použití magnetických částic Fkol135ox byla vyzolována DNA o nejvyšší koncentraci.

Následovalo prokazování přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* a jeho různých druhů. Na obrázcích jsou vidět PCR produkty specifické pro rod *Bifidobacterium* až po koncentraci 100 pg/μl. Ve skutečnosti byly vidět PCR produkty i pro nižší koncentrace, kvůli špatné kvalitě snímků však tyto PCR produkty moc zřetelné nejsou.

U DNA izolované z výrobku Linex Forte byla také opět ověřena přítomnost DNA druhu *Bifidobacterium animalis*.

Na obrázcích jsou dále vidět elektroferogramy s PCR produkty specifickými pro *Bifidobacterium bifidum*. PCR by opět potřebovala optimalizaci, citlivost je poměrně nízká.

Ještě nižší citlivost však měla PCR s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium breve*.

Pomocí metody PCR byla prokázána přítomnost DNA u všech testovaných bakterií, které byly výrobci deklarovány.

7. ZÁVĚR

Byla izolována DNA z probiotických výrobků Linex Forte, Multilac a Rebiomax pomocí tří druhů magnetických částic Fkol135ox, FkolB30ox a Dynabeads. V případě výrobku Linex Forte byla k izolaci DNA použita také fenolová extrakce. DNA byla izolována v dostatečném množství a kvalitě vhodné pro následnou amplifikaci. DNA byla amplifikována pomocí PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a různé druhy těchto rodů. Všemi nosiči bylo izolováno srovnatelné množství DNA, která byla prokázána po amplifikaci stejných množství DNA po detekci produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy. Citlivosti PCR při použití různých částic byly shodné. Použití magnetických nosičů bylo oproti fenolové extrakci výhodné z důvodů vyšší rychlosti a jednoduchosti izolace DNA. Dále se použití magnetických nosičů k izolaci DNA obešlo bez použití nebezpečných organických látek (fenol).

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

Adams, M. R.: Safety of industrial lactic acid bacteria, *Journal of Biotechnology*, 1999, vol. 68, p. 171 – 178

Anjum, N., Maqsood, S., Masud, T., Ahmad, A., Sohail, A., Momin, A: Lactobacillus acidophilus: Characterisation of the Species and Application in Food Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, vol. 54, no. 9, p. 1241 – 1251

Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, M. A., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, V. G.: Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological research*, 2011, vol. 63, p. 366 – 376

Beránková, J.: *Funkční potraviny a legislativa* [online]. 2009, poslední revize 10. 12. 2014 [cit. 10. 12. 2014]. Dostupné z: <[http:// www.bezpecnostpotravin.cz/funkcni-potraviny-a-legislativa.aspx](http://www.bezpecnostpotravin.cz/funkcni-potraviny-a-legislativa.aspx)>

Berry, C. C., Curtis, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for application in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2003, vol. 36, p. 198 – 206

Bigliardi, B., Galati, F.: Innovation trends in the food industry: The case of functional food. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, vol. 31, p. 118 – 129

Bioinformatics organisation [online]. 2015, poslední revize 24. 2. 2015 [cit. 24. 2. 2015]. Dostupné z: <[http:// www.bioinformatics.org/](http://www.bioinformatics.org/)>

Bulte, J. W. M., Kraitchman, D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* 2004, vol. 17, p. 484 – 499

Caselli, M., Cassol, F., Calô, G., Holton, J., Zuliani, G., Gasbarrini, A.: Actual concept of “probiotics” : Is it more functional to science or business?. *World Journal of Gastroenterology*, 2013, vol. 19, p. 1527 – 1540

Cvrčková, F., *Úvod do praktické bioinformatiky*. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1360-1

Dubernet, S., Desmasures, N., Gueguen, M.: Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterisation of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, vol. 51, p. 91 – 99

Duncan, A. S., Flint, J. H.: Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, 2013, vol. 75, p. 44 – 50

Farr, D. R.: Functional fous. *Cancer Letters*, 1997, vol. 114, p. 59 – 63

- Grillová, L. Vyhledání genů kódujících probiotické a další vlastnosti vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2012, vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
- Gupta, A. K., Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005, vol. 26, p. 3995 – 4021
- Haarman, M., Knol, J.: Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, p. 2359 – 2365
- Hardy, G.: Nutraceutical and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*, 2000, vol. 16, p. 688 – 698
- Heyman, M., Ménard, S.: Probiotic microorganisms: how They affect intestinal pathophysiology. *Cellular and molecular life sciences*, 2002, vol. 59, p. 1 - 15
- Hsing, I. M., Xu, Y., Zhao, W. T. Micro- and nano-magnetic particles for application in biosensing. *Electroanalysis*, 2007, vol. 19, p. 755 – 768
- Chatterjee, S., Kar, P., Das, T., Ray, S., Ganguly, S., Rajendiran, C., Mitra, M. randomised placebo-controlled double blind multicentric trial on efficacy and safety of Lactobacillus acidophilus LA-5 and Bifidobacterium BB-12 for preventiv of antibiotik-associated diarrhoea. *Journal of The Association of Physicians of India*, 2013, vol. 61, p. 708 – 712
- Chuang, L., Cheng, L., Yang, Ch.: Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 2013, vol. 35, p. 1541 – 1549
- Jafari, B., Rezaie, A., Alizadeh, S.: Isolation and identification of potentially probiotic bacteria from Traditional Dairy Products of Ardabil region in Iran. *Annals of Biological Research*, 2011, vol. 2, p. 311 – 317
- Kang, K., Choi, J., Nam, J. H., Lee, S. C., Kim, K. J., Lee, S. W., Chang, J. H. Preparation and Characterisation of Chemically Functionalized Silica-Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Separator. *Journal of physical chemistry B*, 2009, vol. 113, p. 536 – 543
- Khalisanni, K.: An overview of lactic acid bakteria. *International Journal of Biosciences*, 2011, vol. 1, no. 3, p. 1 – 13
- Kodíček, M.: *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. 2007, poslední revize 8. 10. 2008 [cit. 23. 1. 2015]. Dostupné z <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/index.html>
- Kwak, N. S., Jukes, D. J.: Functional foods: Part 1: The development of a regulatory concept. *Food Control*. 2001, vol. 13, p. 99 – 107

- Law, J.W., Ab Mutalib, N., Chan, K., Lee, L.: Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in mikrobiology*, 2015, vol. 5, p. 1 – 19
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J.: Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2008, vol. 72, no. 4, p. 728 – 764
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., Oyaizu, H.: Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene targeted species-specific primers. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, p. 4506 – 4512
- Mugambi, D. M., Young, T., Blaauw, R.: Application of evidence on probiotics, prebiotics and synbiotics by food industry: a descriptive study. *BMC Research Notes*, 2014, vol. 7, p. 1-8
- Pineiro, M., Stanton, C.: Probiotic bacteria: legislative framework – requirements to evidence basis. *The Journal of nutrition*, 2007, vol. 137, no. 3, p. 8505 – 8535
- Rada, V: Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi.*, 2010, roč. 12, č. 2, s. 92 – 97
- Reuter, G.: Probiotics – Possibilities and limitations of their application in food, animal feed and in pharmaceutical preparations for man and animals. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift*, 2001, vol. 114, issue 11 – 12, p. 410 – 419
- Rijkers, G. T., De Vos, W. M., Brummer, R. J., Morelli, L., Corthier, G., Marteau, P.: Horizons in nutritional science: Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *British journal of nutrition*, 2011, vol. 106, p. 1291 – 1296
- Roy, D., Sirois, S.: Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short region of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, vol. 191, p. 17 – 24
- Seale, J. V., Millar, M.: Probiotics: a new frontier for infection control. *Journal of hospital infection*, 2013, vol. 84, p. 1 – 4
- Suslick, S. K. *Executive summary: The chemical and physical effects of ultrasound* [online] 2015, poslední revize 22. 7. 2014 [cit. 8. 3. 2015]. Dostupné z <<http://www.scs.illinois.edu/suslick/sonochemistry.html>>
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova Univerzita, 2010. ISBN 9788021038417

Španová, A., Rittich, B.: *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3

Taipale, T., Pienihäkkinen, K., Alanen, P., Jokela, J., Söderling, E.: Administration of *Bifidobacterium animalis* SČSP. lactis BB-12 in early childhood: a post-trial effect on caries occurrence at four years of age. *Caries Research*, 2013, vol. 47, p. 364 – 372

Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain-Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., Mayer, E. A.: Consumption of Fermented Milk Product With Probiotic Modulates brain Activity. *Gastroenterology*, 2013, vol. 144

Tilsala-Timisjarvi, A., Alatossava, T.: Development of oligonucleotide primers from thr 16S – 23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR, *Internal Journal of Food Microbiology*, 1997, vol. 35, p. 49 – 56

Todar, K.: *Todars online textbook of bacteriology* [online] 2014, poslední revize 30. 4. 2014 [cit. 23. 1. 2015]. Dostupné z <http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html>

Vídeňská, P.: *identifikace probiotických bakterií v reálných vzorcích- doplňky stravy a farmakologické preparáty*. Brno, 2010. Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální mikrobiologie

Vrese, M., Schrezenmeir, J.: Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2008, vol. 111, p. 1 – 66

Waikar, J.: Review of probiotics in children. *Pediatric infectious disease*, 2013, vol. 5, p. 9 – 12

Zhang, W., Bai, M., Zhang, H.: Genetic stability of probiotic lactic acid bacteria – a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2014, vol. 54, isme 4, p. 361 - 366

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	adenosintrifosfát
bp	pár bází
BMK	bakterie mléčného kvašení
EFSA	European Food Safety Authority [Evropská organizace pro bezpečnost potravin]
NAD	nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadeninukleotid (redukovaná forma)
PEG	polyethylenglykol
SDS	dodecylsulfát sodný
WHO	World Health Organisation [Světová zdravotní organizace]