



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA DNA IZOLOVANÉ Z RŮZNÝCH TYPŮ PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ S VYUŽITÍM PCR V REÁLNÉM ČASE A HRM ANALÝZY

THE ANALYSIS OF DNA ISOLATED FROM DIFFERENT TYPES OF PROBIOTIC PRODUCTS USING REAL-TIME PCR AND HRM ANALYSIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Sedláková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0979/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lucie Sedláková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	

Název diplomové práce:

Analýza DNA izolované z různých typů probiotických výrobků s využitím PCR v reálném čase a HRM analýzy

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma za využití aktuální literatury
2. Izolace DNA z vybraného probiotického výrobku
3. Amplifikace bakteriální DNA pomocí konvenční PCR a PCR-HRMA
4. Vyhodnocení získaných dat na základě porovnání výsledků analýzy DNA izolované z probiotického výrobku s DNA vybraných čistých bakteriálních kultur (sbírkové kmeny).

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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. Lucie Sedláková
Student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo zavedení metody PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání pro rod *Bifidobacterium*.

V současné době je dostupné malé množství publikací, které se zabývají rozlišením kmenů rodu *Bifidobacterium* pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání. Dle publikací, které byly zaměřeny na rozlišení bakterií mléčného kvašení, byly vybrány primery P1V1 a P2V1, LAC1 a LAC2, LspUPF a LspUPR, V3F a V3R, V6F a V6R. Bakteriální DNA sbírkových kmenů byla pomocí těchto primerů amplifikována metodou PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání. Po vyhodnocení naměřených výsledků byla účinnost vybraných primerů rovněž ověřena na DNA izolované z komplexního vzorku probiotického výrobku.

Po další optimalizaci by za pomoci vybraných primerů mohla být metoda PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání vhodná i pro rod *Bifidobacterium*.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to introduce real-time PCR with high-resolution melting analysis for *Bifidobacterium* species.

Currently a small number of publication, dealing with identification of *Bifidobacterium* species using high-resolution melting analysis, is available. According to publications dealing with identification of lactic acid bacteria were selected primers P1V1 and P2V1, LAC1 and LAC2, LspUPF and LspUPR, V3F and V3R, V6F and V6R. Using this primers bacterial DNA was amplified by real-time PCR with high-resolution melting analysis. After evaluation of the measured results efficiency of selected primers was verified on DNA isolated from complex sample of probiotic product.

After further optimisation real-time PCR with high-resolution melting analysis could be suitable using selected primers for *Bifidobacterium* species.

KLÍČOVÁ SLOVA

Vysokorozlišovací analýza křivek tání, *Bifidobacterium*, bakterie mléčného kvašení, probiotika, polymerázová řetězová reakce

KEYWORDS

High-resolution melting analysis, *Bifidobacterium*, lactic acid bacteria, probiotics, polymerase chain reaction

SEDLÁKOVÁ, L. *Analýza DNA izolované z různých typů probiotických výrobků s využitím PCR v reálném čase a HRM analýzy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 61 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení, mnoho cenných rad, čas a poskytnutí vhodných podmínek při vypracovávání této diplomové práce.

OBSAH

1 Úvod do problematiky	8
2 Teoretická část	9
2.1 Využití bakterií mléčného kvašení v potravinářském průmyslu	9
2.1.1 Probiotika	9
2.1.2 Prebiotika	9
2.1.3 Rod <i>Bifidobacterium</i>	9
2.1.4 Rod <i>Lactobacillus</i>	11
2.2 Polymerázová řetězová reakce	11
2.2.1 Princip PCR	12
2.2.2 Komponenty PCR	13
2.2.3 Detekce PCR produktu	14
2.2.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	14
2.2.5 Analýza křivek tání (Melt analýza)	15
2.2.6 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM analýza)	17
2.2.6.1 Důležité aspekty při navrhování HRM analýzy	18
2.2.6.2 Komponenty HRM analýzy	18
2.2.6.3 Analýza dat	18
2.2.6.4 Přístroj ECO™ Real-time PCR system (Illumina)	19
2.2.6.5 Výhody HRM analýzy	19
2.2.6.6 Použití HRM analýzy	20
3 Cíl práce	21
4 Experimentální část	22
4.1 Materiál	22
4.1.1 Bakteriální kmeny	22
4.1.2 Komplexní vzorek	22
4.1.3 Chemikálie a roztoky	22
4.1.3.1 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk z komplexního vzorku ...	23
4.1.3.2 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů	23
4.1.3.3 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	23
4.1.3.4 Magnetické částice pro izolaci DNA	24
4.1.3.5 PCR komponenty	24

4.1.4	Přístroje a pomůcky	24
4.2	Metody	25
4.2.1	Izolace DNA z komplexního vzorku	25
4.2.1.1	Příprava hrubého lyzátu buněk z komplexního vzorku	25
4.2.1.2	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických částic	25
4.2.2	Stanovení koncentrace DNA	26
4.2.3	Agarózová gelová elektroforéza DNA	26
4.2.4	Polymerázová řetězová reakce	26
4.2.4.1	Složení PCR směsí pro konvenční PCR	26
4.2.4.2	Programy amplifikace pro konvenční PCR	27
4.2.5	Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů	27
4.2.6	PCR v reálném čase a vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM analýza)	27
4.2.6.1	Bioinformatická analýza	27
4.2.6.2	Složení PCR směsí pro PCR v reálném čase a HRM analýzu	28
4.2.6.3	Programy amplifikace pro PCR v reálném čase a HRM analýzu	28
4.2.7	Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů	28
5	Výsledky a diskuze	29
5.1	Stanovení koncentrace DNA	29
5.1.1	Sbírkové kmeny	29
5.1.2	Komplexní vzorek	30
5.2	Agarózová gelová elektroforéza DNA	30
5.3	Polymerázová řetězová reakce	31
5.3.1	PCR s primery pro doménu <i>Bacteria</i>	31
5.3.2	Rodově specifická PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i>	33
5.4	PCR v reálném čase a vysokorozlišovací analýza křivek tání	36
5.4.1	PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů P1V1, P2V1	36
5.4.2	PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů LAC1, LAC 2	40
5.4.3	PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů LspUPR, LspUPF	42
5.4.4	PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů V3F, V3R	47

5.4.5	PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů V6F, V6R	50
5.4.6	PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání u komplexního vzorku	54
6	Závěr	57
7	Seznam použitých zdrojů	58
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	61

1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Bakterie mléčného kvašení mají velký ekonomický význam pro mlékárenský a jiný potravinářský průmysl vyrábějící fermentované výrobky. Pro jejich základní výzkum a použití v potravinářském průmyslu jsou vyžadovány spolehlivé a jednoduché metody pro jejich identifikaci. Mnoho bakterií mléčného kvašení má podobné výživové a růstové požadavky, proto je velmi obtížné je rozlišit klasickými metodami [1].

Specifické a citlivé analytické metody jsou také nezbytné při ověřování, zda komerční potraviny vyhovují národním a mezinárodním právním předpisům. Díky stabilitě DNA hrají metody založené na DNA vzrůstající roli v kontrole bezpečnosti potravin a při odhalování falšování potravin. Nedávné studie ukazují, že vysokorozlišovací analýza křivek tání, moderní metoda založená na vlastnostech tání dvoušroubovicové DNA, by mohla být novou a zajímavou metodou [2].

Do významné skupiny probiotik patří i rod *Bifidobacterium*. V současné době je dostupné pouze malé množství publikací, které se zabývají rozlišením jednotlivých kmenů rodu *Bifidobacterium* pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání. Dle publikací, které byly zaměřeny na rozlišení bakterií mléčného kvašení, bylo vybráno několik primerů. V diplomové práci bylo testováno, zda by byly tyto primery vhodné pro rozlišení kmenů rodu *Bifidobacterium*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Využití bakterií mléčného kvašení v potravinářském průmyslu

Bakterie mléčného kvašení jsou nejčastěji studovaným probiotikem za posledních několik desetiletí. Jsou žádoucí mikroflórou gastrointestinálního traktu, a jsou tedy obecně považovány za bezpečné. Dále jsou zapojeny do procesu fermentace a tvoří dominantní mikroflóru fermentovaných výrobků. Hrají zásadní roli při konzervaci potravin, protože produkcí kyseliny mléčné, kyseliny octové, peroxidu vodíku, bakteriocinu, diacetylu a oxidu uhličitého inhibují růst mikroorganismů způsobujících kažení potravin nebo potravinových patogenů [3].

2.1.1 Probiotika

Kysané mléčné výrobky byly často terapeuticky používány dlouho před tím, než byla uznána existence mikroorganismů a je faktem, že použití mikrobů při fermentaci potravin, je jednou z nejstarších metod při výrobě a konzervaci potravin [4]. Slovo probiotika je odvozené z řečtiny a znamená "pro život" [5]. Probiotika jsou nepatogenní mikroorganismy, které mají při konzumaci v přiměřeném množství pozitivní zdravotní přínos [3]. Existuje několik komerčně dostupných doplňků obsahujících životaschopné mikroorganismy s probiotickými vlastnostmi. Nejčastěji používanými probiotiky jsou bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a nepatogenní kvasinky [5]. Bylo prokázáno, že konzumace probiotik je užitečná při překonávání různých klinických stavů od dětských průjmů, průjmů spojených s antibiotiky, recidivujících kolitid způsobených *Clostridium difficile*, infekcí *Helicobacter pylori*, zánětlivých onemocnění střev až po rakovinu a ženské uro-genitální infekce. K dalším prospěšným účinkům probiotik patří zlepšování nesnášenlivosti laktózy, snížení hladiny cholesterolu v krvi, zvýšení využití živin a snížení používání antibiotik. Pro viditelný zdravotní přínos bylo doporučeno množství log 6 až log 7 probiotických bakterií na mililitr nebo gram potravy [3].

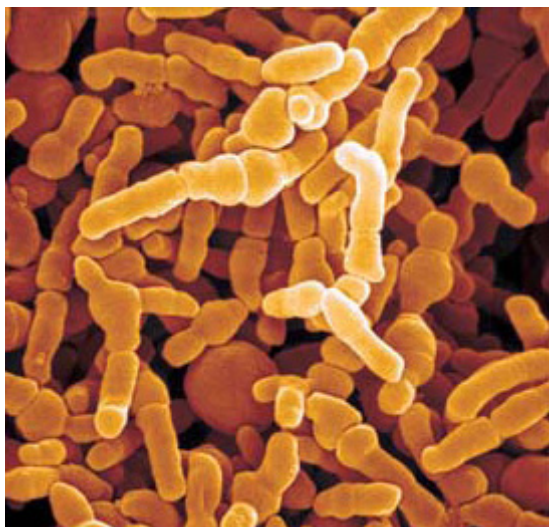
2.1.2 Prebiotika

Prebiotika jsou definovány jako nestravitelné fermentující potraviny, které příznivě ovlivňují hostitele tím, že selektivně stimulují růst a aktivitu jednoho druhu nebo omezeného počtu druhů bakterií v tlustém střevě a to zejména, ne však výhradně, laktobacilů a bifidobakterií [6]. Aby byla prebiotika účinná, nesmí dojít k trávení v horní části gastrointestinálního traktu a musí být přednostně využity prospěšnými mikroby, které jsou součástí střevní mikroflóry, často členy rodu *Bifidobacterium*. Prebiotika jsou typicky oligosacharidy a jejich prebiotický potenciál vychází z jejich selektivní fermentace bakteriemi rodu *Bifidobacterium*. Prebiotika mají v zásadě stejný cíl jako probiotika, a to zlepšení zdraví hostitele prostřednictvím úpravy střevní mikroflóry [4].

2.1.3 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* (Obr. 1) patří fylogeneticky do domény *Bacteria*, kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* [7].

Bifidobakterie byly původně izolovány a popsány v období 1899-1900 Henrym Tissierem. Tyto gram-pozitivní, anaerobní bakterie byly původně nazvány *Bacillus bifidus*. Nicméně, dánský mikrobiolog Orla-Jensen navrhl, aby byl *B. bifidus* klasifikován jako samostatný rod pod názvem *Bifidobacterium*. Vysvětlil, že bifidobakterie nepochybně tvoří samostatný rod, případně tvoří spojovací článek mezi bakteriemi mléčného kvašení a bakteriemi produkujícími kyselinu propionovou. Nicméně, tehdy ještě nevznikl nový rod a ve 20. století byly tyto bakterie klasifikovány jako členové rodu *Lactobacillus* kvůli jejich tyčinkovitému tvaru a fermentačním vlastnostem. Po podrobných studiích DNA hybridizace, obsahu guaninu a cytosinu a jedinečných metabolických funkcích vznikl rod *Bifidobacterium* [4].



Obr. 1: *Bifidobacterium infantis* [8]

Bifidobakterie jsou v současné době zastoupeny více než 30 druhy, které byly izolovány převážně z gastrointestinálního traktu zvířat a lidí. Bifidobakterie mají charakteristickou morfologii a fyziologii. Jsou nesporující, kataláza negativní, nevytváří plyny, jsou nepohyblivé a velmi pleomorfní – od kokovitých tvarů přes kyjovité útvary až k dlouhým větveným tyčinkám [4, 9, 10]. V nepříznivých podmínkách na médiu bifidobakterie vykazují větvení a pleomorfismus, ačkoliv v přirozeném prostředí mají většinou tvar tyček. Bifidobakterie jsou popsány jako striktně anaerobní, avšak některé druhy mohou tolerovat kyslík. Citlivost na kyslík se může u druhů a u různých kmenů v rámci druhu lišit [4]. V poslední době bylo prokázáno, že kmen *B. psychrophilum* izolovaný ze slepého střeva prasete snáší vysoké hladiny kyslíku a roste na agarovém médiu za aerobních podmínek [11]. Většina lidských kmenů bifidobakterií roste při optimální teplotě 36 - 38°C, zatímco zvířecí kmeny mají vyšší optimální teploty růstu a to 41 - 43°C, s výjimkou kmene *B. thermacidophilum*, který vykazuje maximální teplotu růstu při 49,5°C [4] a kmene *B. psychraerophilum*, u kterého bylo prokázáno, že roste při teplotách 4°C [11]. Optimální pH pro růst je mezi 6,5 a 7,0. Kmeny *B. lactis* a *B. animalis* mohou přežít při pH 3,5, kmeny *Bifidobacterium* v prostředí s pH vyšším než 8,5 nepřežijí. Buněčné stěny bifidobakterií mají typickou gram-pozitivní strukturu, která se skládá ze silné vrstvy peptidoglykanu obsahující polysacharidy, proteiny a kyselinu teichovou. Aminokyselinové složení základních tetrapeptidů z mureinu se mohou lišit mezi různými druhy, a dokonce i mezi kmeny stejného druhu, a v důsledku toho

může být v některých případech použita pro jejich diferenciaci. Bifidobakterie jsou sacharolytické organismy a všechny kmeny mají schopnost fermentovat glukózu, galaktózu a fruktózu. Glukóza se fermentuje pomocí fruktóza-6-fosfát na kyselinu octovou a kyselinu mléčnou. Rozdíl se vyskytuje mezi druhy v jejich schopnosti fermentovat jiné sacharidy a alkoholy [4]. Bifidobakterie obsahují také extracelulární enzymy, které katalyzují hydrolýzu polysacharidů, jako jsou amylopektin, amylosa a xylan [10].

2.1.4 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* (Obr. 2) patří fylogeneticky do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae* [7]. Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou pravidelné nesporulující grampozitivní tyčinky. Mají fakultativně anaerobní, mikroaerofilní nebo anaerobní metabolismus. Jsou negativní na katalázu. Většina druhů zkvašuje laktózu a je schopna růstu při 45 °C [12].



Obr. 2: *Lactobacillus casei* [13]

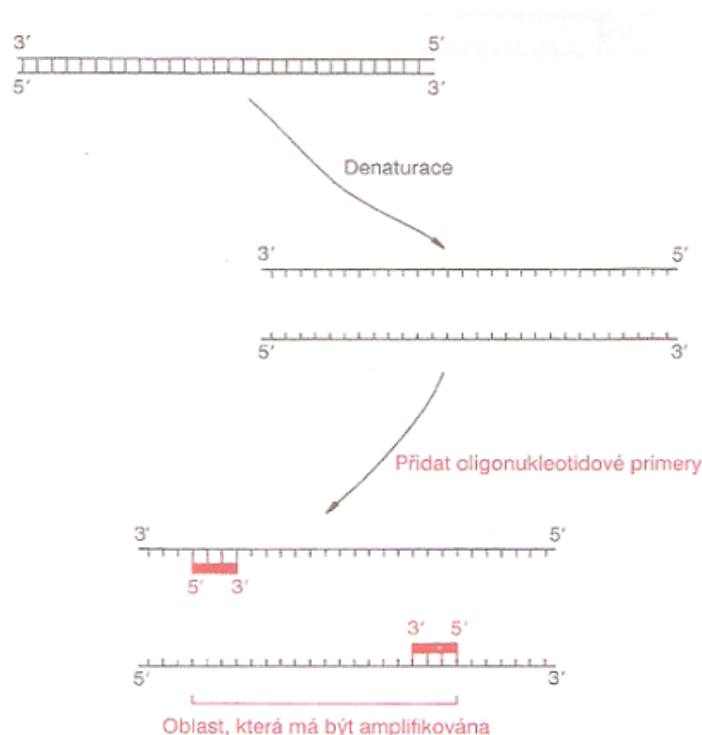
Podle produktů katabolického metabolismu rozdělujeme rod *Lactobacillus* na homofermentativní mléčné bakterie, které při fermentaci sacharidů produkují pouze kyselinu mléčnou a na heterofermentativní mléčné bakterie, které produkují mimo kyseliny mléčné značné množství ethanolu a oxidu uhličitého. Kyselina mléčná zastavuje rozmnožování hníložných bakterií a stafylokoků, proto jsou mléčné bakterie využívány ke konzervaci zeleniny i některých krmiv. Homofermentativní druhy rodu *Lactobacillus* např. *L. casei* se používají v mlékárenském průmyslu při přípravě sýrů. Některé druhy rodu *Lactobacillus* např. *L. acidophilus* se používají při přípravě kvašeného mléka a např. *L. delbruckii subsp. bulgaricus* při přípravě jogurtů. Rod *Lactobacillus* je velmi rozšířený v přírodě, jeho druhy se vyskytují v mléce, kde vyvolávají přirozené zkvašování laktózy v kyselinu mléčnou, dále v ústech a trávicím traktu savců, na travinách, obilí i jiných rostlinách a v půdě [9].

2.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem. Její výhodou je zejména to, že umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech [14].

2.2.1 Princip PCR

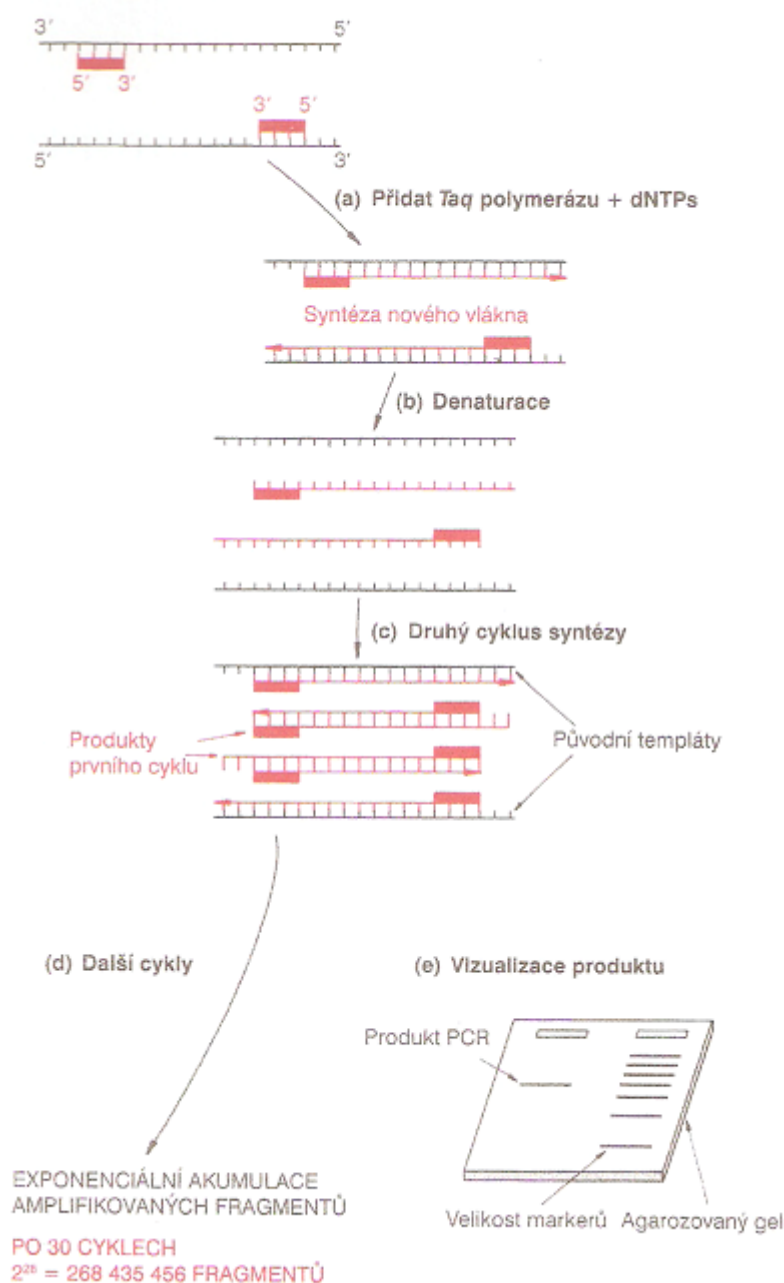
PCR je založena na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Princip PCR spočívá v cyklicky se opakující enzymové syntéze nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA polymerázy. Požadovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě (Obr. 3), proto po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně (Obr. 4). K syntéze DNA jsou používány termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. Tím je umožněno, aby DNA probíhala opakovaně formou cyklů (Obr. 4).



Obr. 3: Princip PCR – denaturace, připojení primerů [15]

Při PCR se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu [14]:

- Denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 – 96°C). Dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a vzniká ssDNA. V prvním cyklu bývá zpravidla prodloužena, aby proběhla kompletní denaturace templátu (Obr. 3).
- Annealing - připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30 – 65°C). Teplota závisí na teplotě tání primerů. Primery nasedají na specifická místa DNA (Obr. 3).
- Elongace - syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65 – 75°C), teplota závisí na použité DNA-polymeráze (Obr. 4). Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA. Doba syntézy v posledním cyklu bývá prodloužena, aby byl řetězec dosyntetizován a byl vyloučen výskyt neúplných fragmentů kratší délky [14, 16].



Obr. 4: Princip PCR - elongace [15]

Reakce probíhá v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly [14].

2.2.2 Komponenty PCR

Aby PCR reakce proběhla správně, musí směs pro PCR nezbytně obsahovat DNA templát, primery, teplotně stabilní DNA polymerázu a deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs). Primery jsou oligonukleotidy, které jsou komplementární k hraničním úsekům templátové DNA a jsou nezbytné pro vytvoření specifického PCR produktu. DNA polymeráza je zásadní enzym při syntéze PCR produktu. Deoxynukleosidtrifosfáty jsou fosforylované nukleosidy, které jsou pomocí DNA polymerázy spojovány ve výsledný PCR produkt. Mezi nukleotidy, které jsou

přítomny v deoxyribonukleové kyselině, řadíme adenin (A), thymín (T), cytosin (C) a guanin (G). Dalšími složkami reakční směsi jsou PCR voda, která se používá na doplnění PCR směsi do požadovaného objemu a PCR pufr, který vytváří optimální prostředí pro DNA polymerázu. Nejdůležitější složkou PCR pufru jsou ionty Mg^{2+} , které ovlivňují specifčnost i výtěžek PCR reakce a jsou potřebné na udržení enzymatické aktivity DNA polymerázy [14,16].

Přesnost a úspěšnost PCR reakce závisí na pečlivém návrhu obou primerů. Při návrhu primerů je proto třeba se řídit několika důležitými pravidly, mezi něž patří:

- délka zpravidla 18 – 25 nukleotidů,
- obsah G + C 40 % až 60 %,
- rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry,
- teplota tání primeru alespoň 50°C,
- podobná teplota tání u obou primerů,
- specifčnost primerů – na templátové DNA nesmí být nesespecifická vazebná místa

Při navrhování primerů lze využít řadu počítačových programů, které umožňují zohlednit výše uvedená pravidla [14]. Jedním z nich je Primer-BLAST, což je veřejně dostupný nástroj, který pomáhá uživatelům při návrhu specifických primerů. Primer-BLAST je dostatečně přizpůsobivý k různým potřebám při navrhování primerů. Uživatelům umožňuje nejen navrhování nových primerů, ale i kontrolu specifity již existujících primerů [17].

2.2.3 Detekce PCR produktu

Výsledným produktem PCR reakce jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp. Jejich přítomnost v reakční směsi se obvykle prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu [14]. Po obarvení ethidium bromidem se amplifikovaná DNA objeví jako pruh (Obr. 4) [18].

2.2.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase je moderní metoda molekulární biologie, která umožňuje rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA.

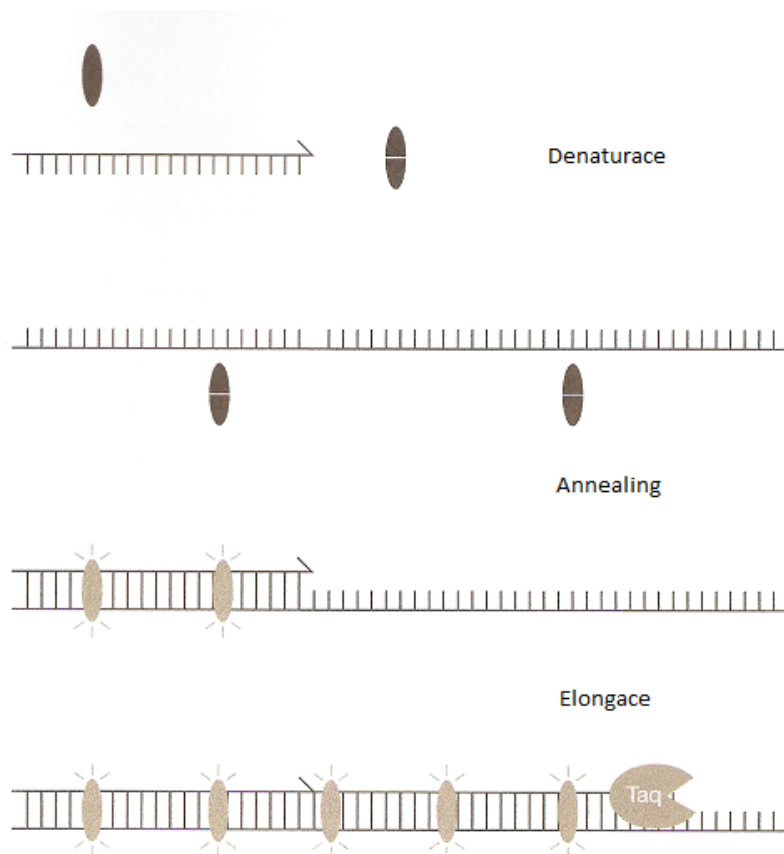
Podstata PCR v reálném čase je stejná jako u konvenční PCR s tím rozdílem, že PCR v reálném čase umožňuje sledování průběhu reakce přímo během reakce pomocí fluorescenčních sond či barviv, které umožňují detekovat množství PCR produktu zvýšením fluorescenční aktivity. Její výhoda oproti konvenční PCR spočívá v možnosti přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, tedy schopnost kvantifikace. Provádí se v cyklerech, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR [16].

Stejně jako směs na konvenční PCR musí směs na PCR reakci v reálném čase obsahovat DNA templát, dva oligonukleotidové primery komplementární k DNA sekvenci, která má být amplifikována, dNTPs, což jsou čtyři nukleotidové trifosfáty, teplotně stabilní DNA-polymerasu a ionty Mg^{2+} , které jsou součástí PCR pufru [19].

Existují tři základní metody běžně používané při detekci množství amplikonů. Podle toho, která metoda je použita, jsou navíc v PCR směsi obsaženy:

- interkalační barviva vázající se na DNA
- fluorescenčně značené sondy
- fluorescenčně značené primery [16].

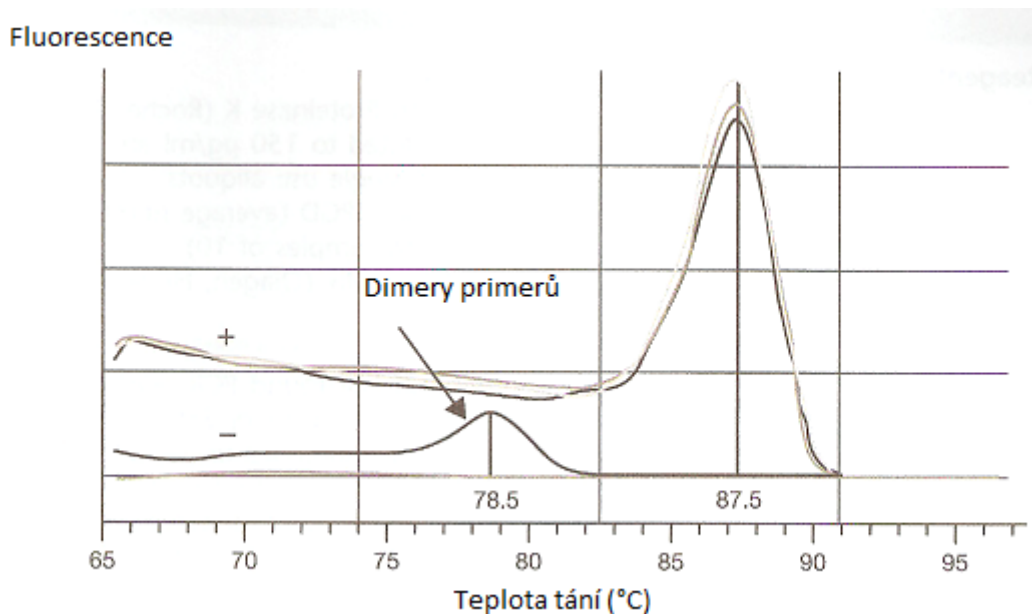
Nejjednodušší z nich je metoda využívající fluorescenčních barviv, která se interkalují do šroubovice DNA. Nejčastěji používané je fluorescenční kyaninové barvivo SYBR Green I. Volně rozptýlené barvivo v roztoku PCR směsi emituje pouze nízké fluorescenční záření. Po začlenění do vznikající dvoušroubovicové struktury DNA, dojde k vysokému nárůstu fluorescence. Fluorescenční signál se zvyšuje s narůstajícím množstvím PCR produktu (Obr. 5) [18]. Nevýhodou při použití fluorescenčních barviv je nemožnost rozlišení nespecifických PCR produktů od specifických, protože barvivo SYBR Green I je nespecificky vázáno do jakékoli dvoušroubovice DNA, např. i dimerů primerů. Pozitivem je jeho finanční dostupnost [16].



Obr. 5: Princip detekce produktů při PCR v reálném čase [18]

2.2.5 Analýza křivek tání (Melt analýza)

Analýza křivek tání je často používána v polymerázové řetězové reakci (PCR) v reálném čase k ověření, jestli byl nasyntetizován správný PCR produkt, a že na reakci nemají nepříznivý vliv žádné dimery primerů (Obr. 6) [18].

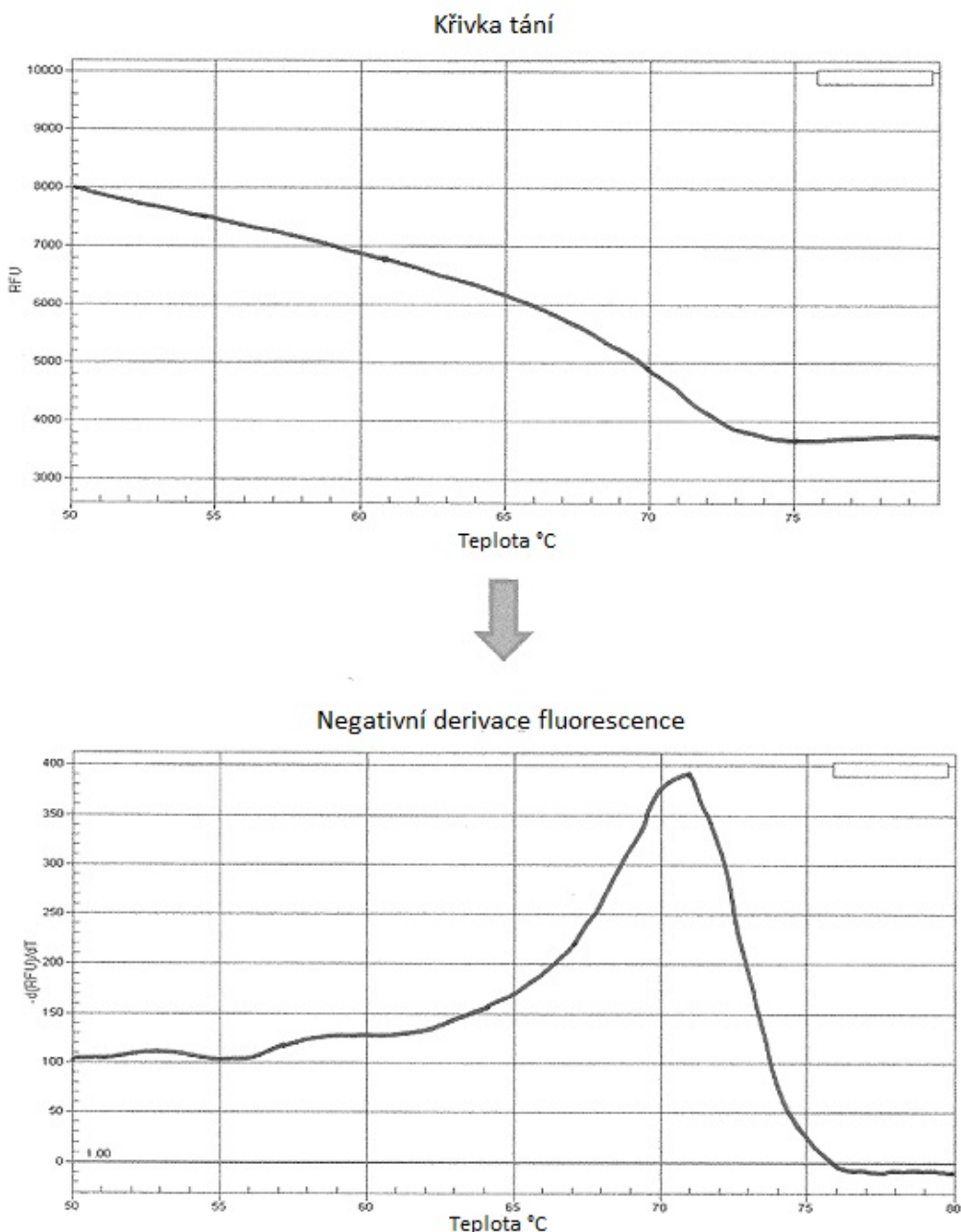


Obr. 6: Použití analýzy křivek tání k rozlišení mezi specifickými a nespecifickými PCR produkty [18]

Dvoušroubovicová DNA (dsDNA) je velmi stabilní při pokojové teplotě. Se vzrůstající teplotou začínají šroubovice disociovat, dokud nejsou úplně separovány. Teplota, při které je 50 % DNA rozdělena na jednotlivé šroubovice, se nazývá teplota tání (T_m). Teplota tání závisí na délce a na obsahu párových bází guaninu a cytosinu v DNA. Protože jsou párové báze guanin a cytosin vázány třemi vodíkovými vazbami, jsou více stabilní než párové báze adeninu a thyminu, které jsou vázány pouze dvěma vodíkovými vazbami. DNA sekvence s vyšším obsahem vazebných párů guaninu a cytosinu má proto vyšší teplotu tání než DNA sekvence obsahující menší počet těchto vazebných párů [2].

Analýza křivek tání je založena na postupném zvyšování teploty po posledním cyklu PCR reakce. Předpokladem pro uskutečnění analýzy křivek tání je amplifikace templátu za přítomnosti fluorescenčního barviva, které se váže do dsDNA, například barviva SYBR Green. Barvivo SYBR Green se váže do menšího žlábků dsDNA v závislosti na jeho nukleotidové sekvenci. Interkalace molekul barviva mezi dsDNA způsobí dramatický nárůst signálu fluorescence. Z počátku je signál fluorescence vysoký kvůli vysokému počtu dvoušroubovicových amplikonů přítomných v PCR směsi. Se vzrůstající teplotou dsDNA disociuje, barvivo je uvolňováno a signál fluorescence klesá [2, 18]. Největší pokles nastává v úzkém teplotním rozmezí [20]. Teplota tání amplikonu může být určena z inflexního bodu křivky tání nebo z píku získaného zápornou derivací fluorescence oproti teplotě (Obr. 7) [2].

Barvivo SYBR Green je často používáno v analýze křivek tání k ověření délky a čistoty amplikonů. Analýza křivek tání s použitím tohoto barviva ale nedokáže rozlišit mezi amplikony, které vykazují pouze malé rozdíly v sekvencích [2].



Obr. 7: Analýza křivek tání [2]

2.2.6 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM analýza)

Pokročilá forma analýzy křivek tání, takzvaná vysokorozlišovací analýza křivek tání (high resolution melting), umožňuje identifikaci mikroorganismů, genotypizaci či předsekvenční skenování amplifikačních produktů, analýzu genových polymorfismů a mutací, metylační analýzu, kvantifikaci nebo může být použita jako alternativa ke gelové elektroforéze [21].

Teplota tání DNA byla dříve měřena UV absorbancí. K tomuto měření bylo potřeba několik mikrogramů DNA a teplotní přírůstek se pohyboval od 0,1 do 1,0 °C/min. Naproti tomu, fluorescenční analýza křivek tání DNA je citlivější a k uskutečnění analýzy stačí pouze nanogramy DNA. Metody měřící teplotu tání DNA pomocí fluorescence se staly populárními s objevem PCR v reálném čase. Kapilární forma a menší objem vzorku umožnily lepší kontrolu teploty a zrychlení teplotního přírůstku na 0,1 až 1,0 °C/s [22].

Předpokladem pro HRM analýzu je použití plně saturačního barviva, například LC Green PLUS, Eva Green, SYTO9 nebo ResoLight. S vysokorozlišovacími nástroji může být získána detailní analýza průběhu křivek tání - profil tání, a to díky vyšší přesnosti kontroly teploty, detekci malých teplotních přírůstků (0,01 – 0,2 °C) a lepšímu získávání dat v porovnání s běžnými přístroji [2].

2.2.6.1 Důležité aspekty při navrhování HRM analýzy

HRM analýza v kombinaci s PCR zahrnuje amplifikaci templátu za přítomnosti saturačního barviva. Následně je provedeno vysokorozlišovací tání ampliconů s konečnou analýzou a interpretací dat. Specifická a účinná amplifikace templátu je předpokladem pro získávání spolehlivých a reprodukovatelných profilů tání.

Navržení primerů a optimalizace podmínek při PCR reakci jsou proto rozhodující kroky v rozvoji metod založených na HRM analýze. V navrhování primerů pro HRM analýzu se lze řídit obecnými pravidly pro navrhování primerů se speciálním důrazem na vyhnutí se vzniku nespecifických produktů, např. dimerů primerů. Délka ampliconů ovlivňuje citlivost následné HRM analýzy, amplicony by neměly být složeny z více než tří set párů bazí. Čím jsou amplicony delší, tím menší bude rozdíl v křivkách tání, který bude způsobený malými sekvenčními rozdíly.

Podmínky PCR reakce musí být optimalizovány tak, aby bylo dosaženo účinné amplifikace, což se projeví nízkou hodnotou Ct. Koncentrace MgCl₂ je jedním z parametrů, které silně ovlivňují profil tání dsDNA. Proto musí být tyto podmínky optimalizovány velmi důkladně. Jinými důležitými aspekty jsou kvalita a množství vzorku DNA. DNA by měla být intaktní a vysoce čistá [2].

2.2.6.2 Komponenty HRM analýzy

Primery pro HRM analýzu bývají navrhovány z hypervariabilních oblastí. Bakteriální geny pro 16S rRNA obsahují devět hypervariabilních oblastí (V1 – V9), které vykazují u odlišných druhů bakterií značné sekvenční rozdíly. Druhově specifické sekvence v rámci dané hypervariabilní oblasti představují užitečný cíl pro diagnostické testy a další vědecké zkoumání [23]. Při analýze bakterií mléčného kvašení jsou často používány primery z hypervariabilní oblasti V1 nazývané P1V1, P2V1 [1, 24, 25]. V současné době je sekvenování genu pro 16S rRNA jednou z nejpoužívanějších metod pro identifikaci mikroorganismů [26].

Při HRM analýze je vhodné použít plně saturační fluorescenční barvivo např. SYTO9. Skupina barviv SYTO9 má mnoho vlastností, díky kterým jsou vhodné k označování buněk, např. dobrou prostupností membránou a nízkou cytotoxicitou. Stejně jako barvivo SYBR Green I se po navázání na dvouvláknovou DNA stává silně fluorescentním. Na rozdíl od barviva SYBR Green I barvivo SYTO9 umožňuje amplifikaci DNA již při nízkých koncentracích a vytváří robustní křivky tání, které nejsou ovlivněny koncentrací DNA [27].

2.2.6.3 Analýza dat

Tání ampliconů je způsobeno postupně se zvyšující teplotou po posledním PCR cyklu. Navzdory amplifikaci za optimalizovaných podmínek a použití podobného počátečního množství DNA, mohou nastat rozdíly ve fluorescenčním signálu. Tyto rozdíly jsou obvykle

přičítány standardizaci celkových fluorescenčních hodnot získaných před a po tání ze 100 % na 0 %. Proto, aby se rozlišily a zdůraznily malé odlišnosti mezi jednotlivými křivkami tání, jsou použity rozdílné děje získané odečtením křivky tání vzorku od křivky tání referenčního vzorku. Obecně, úplné překrytí křivek vzorků s referenční křivkou ukazuje, že oba amplikony mají stejnou sekvenci. Některé přístroje umožňují upravit teplotu překrytí křivek tání v určitém intervalu fluorescence, tzv. standardizaci posunem teploty [2].

2.2.6.4 Přístroj ECOTM Real-time PCR system (Illumina)

Přístroj ECOTM Real-time PCR system (Illumina) (Obr. 8) umožňuje PCR v reálném čase, dále absolutní a relativní kvantifikaci, metodu alelické diskriminace, analýzu křivek tání, vysokorozlišovací analýzu křivek tání a multiplexní PCR v reálném čase. Přístroj je rychlý, 40 cyklů PCR zvládne za 40 minut. Jeho optický systém obsahuje dvě sady 48 LED světel, které zajišťují excitační energii pro širokou škálu fluoroforů. Jako detektor je používána CCD kamera se 4 filtry. Do přístroje se vejde až 48 vzorků o objemu 5 – 20 μ l. Při HRM analýze je fluorescence snímána v každé 0,1 $^{\circ}$ C [28].



Obr. 8: Přístroj ECOTM Real-time PCR system (Illumina)

2.2.6.5 Výhody HRM analýzy

Použití PCR v reálném čase spolu s HRM analýzou má několik výhod oproti konvenční PCR. První výhodou je, že není nutné připravovat gely a používat tak nebezpečné chemikálie. Metoda je též rychlejší než elektroforéza [21]. Analýza probíhá v uzavřeném systému, čímž je sníženo riziko kontaminace [29]. Vzhledem k tomu, že je tato metoda nedestruktivní, mohou být amplikony, pokud je získán nejednoznačný výsledek, analyzovány na gelu [21].

Vysokorozlišovací analýza křivek tání je rychlejší, jednodušší a levnější než alternativní metody vyžadující separaci nebo označené sondy [30].

2.2.6.6 Použití HRM analýzy

K identifikaci druhů mikroorganismů je používána HRM analýza ribozomálních genů. Jednou z prvních uveřejněných aplikací HRM analýzy byla identifikace druhů rodu *Mycobacterium*. Pomocí HRM analýzy je možné rozlišit i plísně např. rodu *Cryptococcus* [31].

S využitím HRM analýzy lze identifikovat např. nestrartující bakterie mléčného kvašení, mezi které patří zejména bakterie rodu *Lactobacillus*, a které mají významnou roli u mnoha sýrů zvláště ve fázi zrání [25], dále lze identifikovat bakterie skupiny *L. casei* a zařadit je do druhů *L. casei*, *L. paracasei* nebo *L. rhamnosus* [24]. Metoda byla rozvíjena i pro identifikaci nozokomiálních bakterií *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* [29].

V potravinářství byla pomocí HRM analýzy ověřována identita kultivarů révy vinné, rýže Basmati. Dále je možné rozlišit druhy citrusů a jejich hybridů, kultivary třešní a čočky.

Z patogenních mikroorganismů vyskytujících se v potravinách lze rozlišit rody *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*.

Některé studie dokládají použití HRM analýzy v analýze geneticky modifikovaných organismů a detekci alergenů v potravinách, např. mandlí [2].

Lin et al., 2014 zkoumal použití HRM analýzy v kvásku z červené a bílé mouky čiroku, kde byly k fermentaci použity *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. paracasei* a *L. reuteri* [38].

V klinickém výzkumu a diagnostice je využíváno toho, že HRM analýza umožňuje analýzu genových polymorfismů a mutací, genotypizaci a identifikaci a rozlišení homozygotních a heterozygotních variant genů [21, 22, 32, 33].

3 CÍL PRÁCE

Tématem práce je zavedení metody PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRMA) za účelem analýzy mikroflóry ve vybraném komplexním vzorku potravin (probiotický výrobek) obsahujícím směs mikroorganismů.

Dosaženo by mělo být těchto cílů:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma za využití aktuální literatury
2. Izolace DNA z vybraného probiotického výrobku
3. Amplifikace bakteriální DNA pomocí konvenční PCR a PCR-HRMA
4. Vyhodnocení získaných dat na základě porovnání výsledků analýzy DNA izolované z probiotického výrobku s DNA vybraných čistých bakteriálních kultur (sbírkové kmeny).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny

V diplomové práci byly používány sbírkové kmeny (Tabulka 1) pocházející z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, ČR), ze Sbírký mlékařských mikroorganismů (CCDM, Tábor, ČR) a ze sbírky mikroorganismů American Type Culture Collection (ATCC). Dále byly použity kultury (označení RB), které byly přečištěny z izolátů vzorků stolice zdravých, plně kojených dětí (prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc., ČZU, Praha).

Tabulka 1: Sbírkové kmeny

Kmen	Označení kmene	Kmen	Označení kmene
<i>Bifidobacterium longum</i>	CCM4990	<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-19A MRS C6
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 1570-7	<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-50p MRS C6
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CCM 4988 ^T	<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-14p MRS C6
<i>Bifidobacterium animalis</i>	RB1-M8	<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-39 AP
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CCM 3762	<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-17P MRS C6
<i>Bifidobacterium infantis</i>	CCDM 232	<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-48P
<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC17930	<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-40P
<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-20A VGA 06	<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB-38BP

4.1.2 Komplexní vzorek

Jako komplexní vzorek byla použita tableta **ProbioActiv** s vitamínem B od firmy Liftea. Složení jedné tablety je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Složení 1 tablety

Složení 1 tablety	Přídavné látky	Probiotické bakterie	Deklarované množství buněk
inulín 130 mg čekanika obecná suchý extrakt 65 mg kyselina nikotinová 18,0 mg pyridoxin hydrochlorid 2,0 mg thiamin hydrochlorid 1,4 mg riboflavin 1,6 mg	plnidlo: stearan hořečnatý obal tobolek: želatina, barvivo oxid titaničitý E171	B. longum B. infantis B. bifidum L. casei L. acidophilus L. bulgaricus	$9 \cdot 10^8$ $9 \cdot 10^8$ $9 \cdot 10^8$ $9 \cdot 10^8$ $9 \cdot 10^8$ $2,5 \cdot 10^8$

4.1.3 Chemikálie a roztoky

Na přípravu médií a roztoků byly použity následující chemikálie:

Destilovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Brno, ČR)

Ethanol (Lachema, Brno, ČR)

Ethidiumbromid (Sigma, St. Louis, USA)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
Kyselina boritá (Lachema, Brno, ČR)
Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
PCR agaróza (Top-Bio, Praha, ČR)
Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
PEG 6000 (Sigma, St. Louis, USA)
Proteináza K (100 mg/ml) (Serva, Heidelberg, SRN)
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Amresco, Solon, USA)

4.1.3.1 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk z komplexního vzorku

Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé postupy provedeny podle návodu ve skriptech Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biotechnologie [34].

0,5 M EDTA (pH 8,0)
1 M Tris-HCl (pH 7,8)
Lyzační roztok B (obsah lysozymu 10mg/ml)
Roztok SDS (20%)
Proteináza K

4.1.3.2 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů

Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé postupy provedeny podle návodu ve skriptech Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biotechnologie [34].

5 M NaCl
40 % PEG 6000
70 % ethanol
1 x TE pufr

4.1.3.3 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé postupy provedeny podle návodu ve skriptech Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biotechnologie [34].

5 x TBE pufr
0,5 x TBE pufr
Nanášecí pufr (6× koncentrovaný)
PCR vkladací pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
0,5 µg/ml ethidiumbromid
Agarozový gel o hustotě 0,8 %
Agarozový gel o hustotě 1,8 %

4.1.3.4 Magnetické částice pro izolaci DNA

Částice byly syntetizovány ing. D. Horákem, CSc. z Makromolekulárního ústavu Akademie věd ČR, Praha. Poly-(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylát (P(HEMA-co GMA)) (1:1) byly pokryty karboxylovými skupinami. Průměr částic byl 2,2 μm s obsahem COOH skupin 2,67 mM/g a obsahem železa 6,5%.

4.1.3.5 PCR komponenty

PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)

PCR pufr kompletní – reakční pufr 10 x PCR Blue Buffer (obsahující MgCl₂) pro Taq DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, ČR)

dNTP směs (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)

primery (10 pmol/μl) – Tabulka 3 a 4 (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)

Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)

qPCR 2x SYTO 9 Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)

DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

Tabulka 3: Seznam použitých primerů pro PCR

Primer	Sekvence primerů (5' - 3')	Produkt PCR (bp)	Reference
R_eub F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466	[35]
Pbi F1 Pbi R2	CCG GAA TAG CTC C GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA	914	[36]

Tabulka 4: Primery pro HRM analýzu

Primer	Sekvence primerů (5' - 3')	Produkt PCR (bp)	Reference
P1V1 P2V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC	90	[1]
LAC1 LAC2	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A ATT TCA CCG CTA CAC ATG	350	[37]
LsppUPF LsppUPR	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	-	[38]
V3-F V3-R	CCA GAC TCC TAC GGG AGG CAG CGT ATT ACC GCG GCT GCT G	-	[39]
V6-F V6-R	TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A AGC TGA CGA CAG CCA TGC A	-	[39]

4.1.4 Přístroje a pomůcky

Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a běžné laboratorní pomůcky

Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)

ECO™ Real-time PCR system (Illumina, USA)

Laboratorní váhy B0430 (Ohaus, USA)

Magnetický separátor Invitrogen™ (Invitrogen Dyal AS, Oslo, Norsko)
 Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
 Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
 Minicykly PTC-100™ (MJ Research, Watertown, USA)
 Nanodrop ND-2 000/2 000c (Thermo Scientific, USA)
 Očkovací box (Fatran, ČR)
 Rotor-Gene 6000 (Corbett, Austrálie)
 Termocykly PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
 Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
 Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
 Zdroj elektrického napětí Enduro Power supplies, model E0303 (Labnet international, Inc., USA)

4.2 Metody

Jednotlivé metody a postupy byly provedeny podle skript pro laboratorní cvičení Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biotechnologie [2].

4.2.1 Izolace DNA z komplexního vzorku

4.2.1.1 Příprava hrubého lyzátu buněk z komplexního vzorku

Tableta, byla sterilně odebrána a rozdrcena. K 1 tabletě bylo přidáno 2,25 ml lyzačního roztoku B (obsah lysozymu 10 mg/ml) a tableta byla rozpuštěna. Po 1 hodině inkubace při laboratorní teplotě bylo k vzorku přidáno 50 µl 20 % SDS a 5 µl proteinázy K (1 mg/ml). Vzorek byl inkubován při teplotě 55 °C do druhého dne. Následně byl vzorek zamražen při teplotě -20 °C.

4.2.1.2 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických částic

Hrubý lyzát buněk byl rozmražen a promíchán. Podle Tabulky 5 byla připravena směs, která byla promíchána a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě.

Tabulka 5: Složení směsi na izolaci DNA pomocí magnetických částic

Pořadí komponent	Komponenty	Objem jednotlivých komponent (µl)
1	NaCl (5M)	400
2	Hrubý lyzát buněk	100
3	PEG (40 %)	400
4	Magnetické částice (2 mg/ml)	100

Částice s navázanou DNA byly odseparovány pomocí magnetického separátoru při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Supernatant byl odpipetován. Zkumavka s magnetickým nosičem s navázanou DNA byla promyta 1 ml 70 % ethanolu. Částice s navázanou DNA byly odseparovány pomocí magnetického separátoru při laboratorní teplotě

po dobu 2 minut. Ethanol byl odpipetován a zkumavky byly ponechány v horizontální poloze při laboratorní teplotě do vypřechání ethanolu. DNA byla eluována do TE pufru s pH 7,8 při laboratorní teplotě do následujícího dne. Částice byly odseparovány po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Eluovaná DNA byla odpipetována do čisté zkumavky. Takto připravená směs byla použita pro konvenční PCR, PCR v reálném čase a HRM analýzu.

4.2.2 Stanovení koncentrace DNA

Vzorky DNA sbírkových kmenů, které byly obdrženy od vedoucí diplomové práce, a reálný vzorek byly promíchány a zcentrifugovány. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje nanodrop. Jednotlivé vzorky byly proměřeny při vlnové délce 230 – 280 nm proti TE pufru (pH 7,8). Z poměru hodnot $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla stanovena čistota DNA. Poměr absorbancí čisté DNA se pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0, pokud je poměr menší než 1,8, vzorek obsahuje proteiny, pokud je poměr větší než 2,0, vzorek obsahuje RNA.

4.2.3 Agarózová gelová elektroforéza DNA

DNA byla vyředěna na koncentraci 100 ng/μl a objem 100 μl. Na gelovou elektroforézu byl připraven agarózový gel o hustotě 0,8 %.

Do nanášecí komůrky gelu bylo nanášeno 20 μl DNA a 4 μl nanášecího pufru (6x koncentrovaného). Byla spuštěna elektroforéza, která běžela 90 minut při napětí 80 V. Poté se gel barvil v lázni ethidium bromidu (0,5 μg/ml) a po obarvení byl umístěn do UV transiluminátoru a vyfotografován.

4.2.4 Polymerázová řetězová reakce

Veškeré komponenty byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Všechny komponenty pro přípravu směsi pro PCR byly před použitím rozmrazeny, zkontrolovány a krátce zcentrifugovány. PCR směs se míchala v boxu, který byl vysterilizovaný UV zářením.

4.2.4.1 Složení PCR směsi pro konvenční PCR

Používané směsi jsou uvedené v Tabulce 6.

Tabulka 6: Používané PCR směsi (objem v [μl])

Komponenty PCR	Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>
PCR voda	18,5	19
PCR pufr	2,5	2,5
dNTP (10 mM)	0,5	0,5
5' primer (10 pmol/μl)	1,0	0,5
3' primer (10 pmol/μl)	1,0	0,5
DNA polymeráza (1U/ μl)	1,0	1,0
DNA matrice o koncentraci 100 ng/ μl pro doménu <i>Bacteria</i> a 10 ng/ μl pro rod <i>Bifidobacterium</i>	0,5	1,0

4.2.4.2 Programy amplifikace pro konvenční PCR

Programy amplifikace používané v této diplomové práci jsou zaznamenány v Tabulce 7, kde jednotlivé řádky odpovídají krokům:

1. Denaturace DNA před prvním cyklem
2. Denaturace DNA
3. Hybridizace primerů
4. Syntéza řetězců DNA
5. Počet cyklů (opakování kroků 2 až 4)
6. Dosyntetizování řetězce v posledním kroku
7. Ochlazení PCR produktu

Tabulka 7: Seznam použitých amplifikačních programů

	Eubacter	BIFI914
1.	94°C/5 min	94°C/5 min
2.	94°C/30 s	94°C/1 min
3.	56°C/30 s	50°C/1 min
4.	72°C/1 min	72°C/2 min
5.	34 cyklů	29 cyklů
6.	72°C/7 min	72°C/10 min
7.	10°C	10°C

4.2.5 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů

Na gelovou elektroforézu PCR produktů byl připraven agarózový gel o hustotě 1,8 %. Do vzorku byl přidán nanášecí pufr v poměru 5:1, k 25 µl PCR směsi bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru (6x koncentrovaného).

Do nanášecích komůrek gelu bylo naneseno 15 µl směsi PCR a nanášecího pufru a do jedné komůrky bylo naneseno 5 µl DNA standardu (100 bp). Po umístění gelu do vaničky a přelití gelu 0,5x TBE puftrem byla špuštěna elektroforéza, která běžela 90 minut při napětí 80 V. Poté byl gel barven ethidium bromidem (0,5 µg/ml), po obarvení byl umístěn do UV transiluminátoru a vyfotografován.

4.2.6 PCR v reálném čase a vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM analýza)

Veškeré komponenty byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Všechny komponenty pro přípravu směsi pro PCR byly před použitím rozmrazeny, zkontrolovány a krátce zcentrifugovány. PCR směs se míchala v boxu, který byl vysterilizovaný UV zářením. Na HRM analýzu bylo směs nutné nanést na destičku určenou do přístroje ECO™ Real-time PCR system (Illumina).

4.2.6.1 Bioinformatická analýza

Pro bioinformatickou analýzu nukleotidových sekvencí byl použit BLAST dostupný na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Analýzou byla kontrolována specifita primerů.

4.2.6.2 Složení PCR směsi pro PCR v reálném čase a HRM analýzu

Používané směsi pro amplifikaci PCR v reálném čase s následnou HRM analýzou jsou uvedené v Tabulce 8.

Tabulka 8: Používané PCR směsi pro HRM analýzu [40]

Komponenty	P1V1	LAC1	LsppUPF	V3F	V6F
	P2V1	LAC2	LsppUPR	V3R	V6R
PCR voda	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
qPCR SYTO 9 Master Mix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer 1 (10 pmol/μl)	1	1	1	1	1
Primer 2 (10 pmol/μl)	1	1	1	1	1
DNA matrice (10ng/μl)	1	1	1	1	1
Celkem	25	25	25	25	25

4.2.6.3 Programy amplifikace pro PCR v reálném čase a HRM analýzu

Programy amplifikace používané v této diplomové práci jsou zaznamenány v Tabulce 9, kde jednotlivé řádky odpovídají krokům:

1. Denaturace DNA před prvním cyklem
2. Denaturace DNA
3. Hybridizace primerů
4. Syntéza řetězců DNA
5. Počet cyklů (opakování kroků 2 až 4)
6. Dosyntetizování řetězce v posledním kroku
7. HRM analýza

Tabulka 9: Seznam použitých amplifikačních programů pro HRM analýzu

	P1V1 P2V1	LAC1 LAC2	LsppUPR LsppUPF	V3F V3R	V6F V6R
1.	95°C/5 min	95°C/5 min	95°C/5 min	95°C/5min	
2.	95°C/30 s	95°C/30 s	95°C/10 s	95°C/30s	
3.	53°C/30 s	61°C/30 s	60°C/30 s	60°C/60s	
4.	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/10 s	72°C/60s	
5.	30 cyklů	30 cyklů	45 cyklů	45cyklů	
6.	72°C/5 min	72°C/5 min	72°C/5 min	95°C/30s 28°C/30s 72°C/5min	
7.	95°C/15 s	95°C/15 s	95°C/15 s	95°C/15s	
	55°C/15 s	55°C/15 s	55°C/15 s	55°C/15s	
	95°C/15 s	95°C/15 s	95°C/15 s	95°C/15s	

4.2.7 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů

Specifické PCR produkty byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.5.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje nanodrop.

5.1.1 Sbírkové kmeny

Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometricky (Tabulka 10) a poté byla vyředěna na $c = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Tabulka 10: Koncentrace a čistota DNA

Kmen	c (ng/ μl)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}
<i>B. longum</i> CCM4990	1186,3	23,727	11,983	1,98	2,07
<i>B. longum</i> ATCC 1570-7	328	6,56	3,199	2,05	1,99
<i>B. animalis</i> CCM 4988T	490,9	9,817	4,724	2,08	2,09
<i>B. animalis</i> RB1-M8	222,1	4,443	2,189	2,03	1,93
<i>B. bifidum</i> CCM 3762	408,8	8,177	3,941	2,07	2,01
<i>B. infantis</i> CCDM 232	1084,1	21,681	11,327	1,91	2,23
<i>B. infantis</i> ATCC17930	767	15,34	7,976	1,92	2,18
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	268,1	5,362	2,771	1,94	1,7
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	497,7	9,953	5,261	1,89	2
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	360,6	7,211	4,035	1,79	1,67
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	304,3	6,086	3,385	1,8	1,84
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	146,3	2,927	1,48	1,98	1,4
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	371,8	7,436	3,954	1,88	1,98
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	135	2,701	1,386	1,95	1,68
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	226,4	4,527	2,191	2,07	0,87
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	134,1	2,683	1,309	2,05	1,6

Z poměru hodnot $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla stanovena čistota DNA. Poměr absorbancí čisté DNA se pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0, pokud je poměr menší než 1,8, vzorek obsahuje proteiny, pokud je poměr větší než 2,0, vzorek obsahuje RNA. DNA ve vzorcích sbírkových kmenů byla většinou čistá, pouze v několika případech vyšel poměr absorbancí větší než 2,0, vzorky obsahovaly RNA. U jednoho vzorku vyšel poměr absorbancí menší než 1,8, vzorek obsahoval proteiny.

5.1.2 Komplexní vzorek

Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometricky (Tabulka 11) a poté byla vyředěna na $c = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Z poměru hodnot $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla stanovena čistota DNA v komplexním vzorku. DNA ve vzorku 3 byla čistá, ve vzorcích 1 a 2 vyšel poměr absorbancí menší než 1,8, vzorky obsahovaly proteiny.

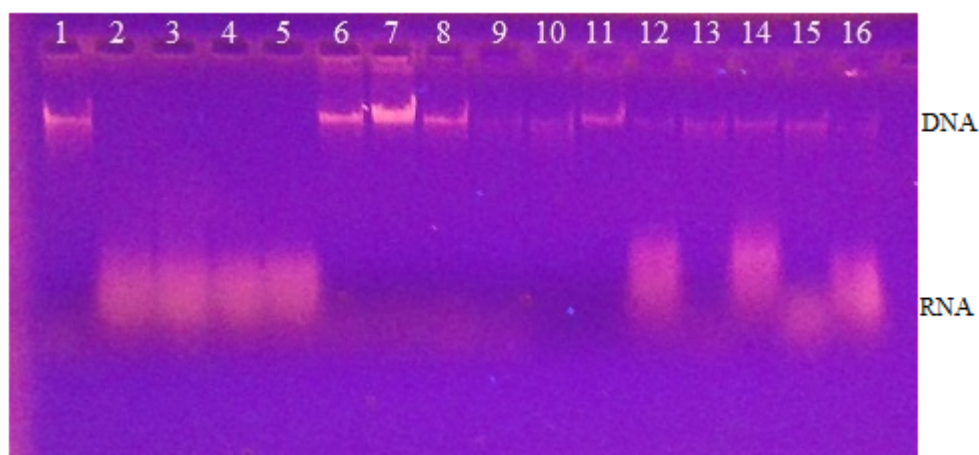
Tabulka 11: Koncentrace a čistota DNA v komplexním vzorku

Vzorek	c (ng/ μl)	A 260	A 280	260/280	260/230
1	139,3	2,786	1,552	1,79	0,99
2	140,3	2,806	1,684	1,67	1,1
3	115,6	2,312	1,19	1,94	0,88

5.2 Agarózová gelová elektroforéza DNA

Pomocí agarózové gelové elektroforézy (0,8 % agarózový gel) byla ověřena intaktnost DNA ve vzorcích sbírkových kmenů (Obr. 9).

DNA ve vzorcích byla relativně intaktní, v běhu 2 – 5 byla DNA částečně degradovaná, což mohlo být způsobeno stářím vzorků DNA. Některé vzorky obsahovaly i RNA.



Běh	Kmen	Intaktnost DNA
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	++
2.	<i>B. longum</i> ATCC 1570-7	-
3.	<i>B. animalis</i> CCM 4988T	-
4.	<i>B. animalis</i> RB1-M8	-
5.	<i>B. bifidum</i> CCM 3762	-
6.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	+++
7.	<i>B. infantis</i> ATCC17930	+++
8.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	++
9.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	-/+
10.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	+
11.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	++
12.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	-/+
13.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	+
14.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	+
15.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	+
16.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	-/+

-/+,+,++,+++různá intenzita detekce DNA

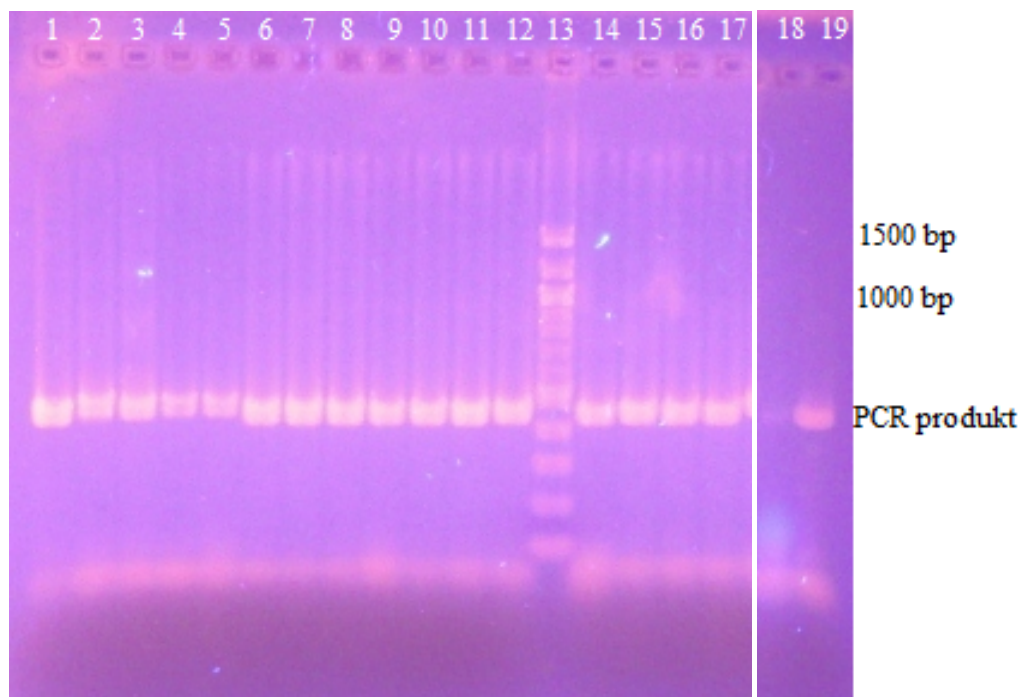
-.....DNA nedetekována

Obr. 9: Gelová elektroforéza DNA – ověření intaktnosti DNA

5.3 Polymerázová řetězová reakce

5.3.1 PCR s primery pro doménu *Bacteria*

DNA sbírkových kmenů (o koncentraci 100 ng/μl) a komplexního vzorku (o koncentraci 10 ng/μl) byla amplifikována metodou polymerázové řetězové reakce s primery pro doménu *Bacteria* (Tabulka 3). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus gasseri* K7 (10 ng/μl). PCR reakce probíhala podle programu Eubacter (Tabulka 7) a složení PCR směsi je uvedené v Tabulce 6. Po amplifikaci byly metodou agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) detekovány specifické PCR produkty o velikosti 466 bp (Obr. 10 a Obr. 11). U vzorků sbírkových kmenů i u komplexního vzorku (Obr. 10) sice byla negativní kontrola kontaminovaná, ale intenzita byla mnohonásobně nižší než u vzorků, tudíž se lze domnívat, že vzorky obsahovaly bakteriální kmen.

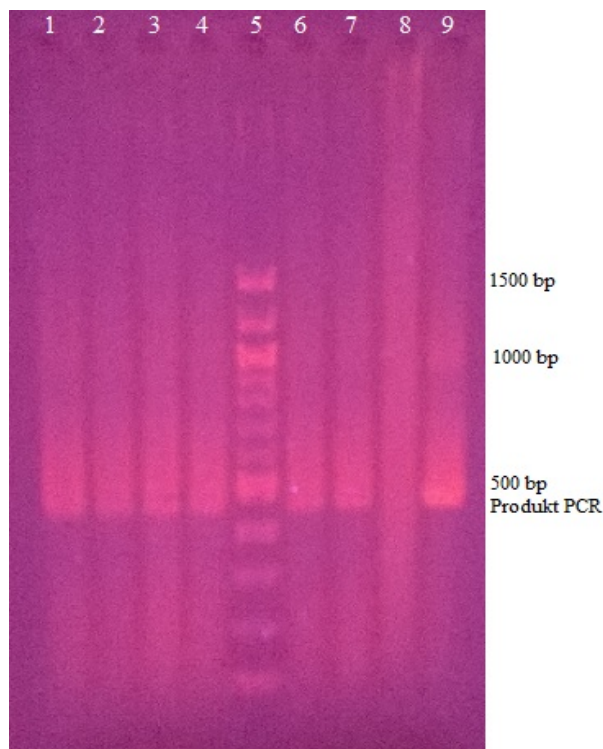


Běh	Kmen	PCR produkt
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	+++
2.	<i>B. longum</i> ATCC 1570-7	++
3.	<i>B. animalis</i> CCM 4988T	+++
4.	<i>B. animalis</i> RB1-M8	++
5.	<i>B. bifidum</i> CCM 3762	++
6.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	+++
7.	<i>B. infantis</i> ATCC17930	+++
8.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	+++
9.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	+++
10.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	+++
11.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	+++
12.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	+++
13.	DNA standard (100 bp)	
14.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	+++
15.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	+++
16.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	+++
17.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	+++
18.	Negativní kontrola	-/+
19.	Pozitivní kontrola	++

-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 10: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp) sbírkových kmenů



Běh	Vzorek	PCR produkt
1.	Komplexní vzorek 1	+
2.	Komplexní vzorek 1	+
3.	Komplexní vzorek 2	+
4.	Komplexní vzorek 2	+
5.	DNA standard (100 bp)	
6.	Komplexní vzorek 3	+
7.	Komplexní vzorek 3	+
8.	Negativní kontrola	-
9.	Pozitivní kontrola	++

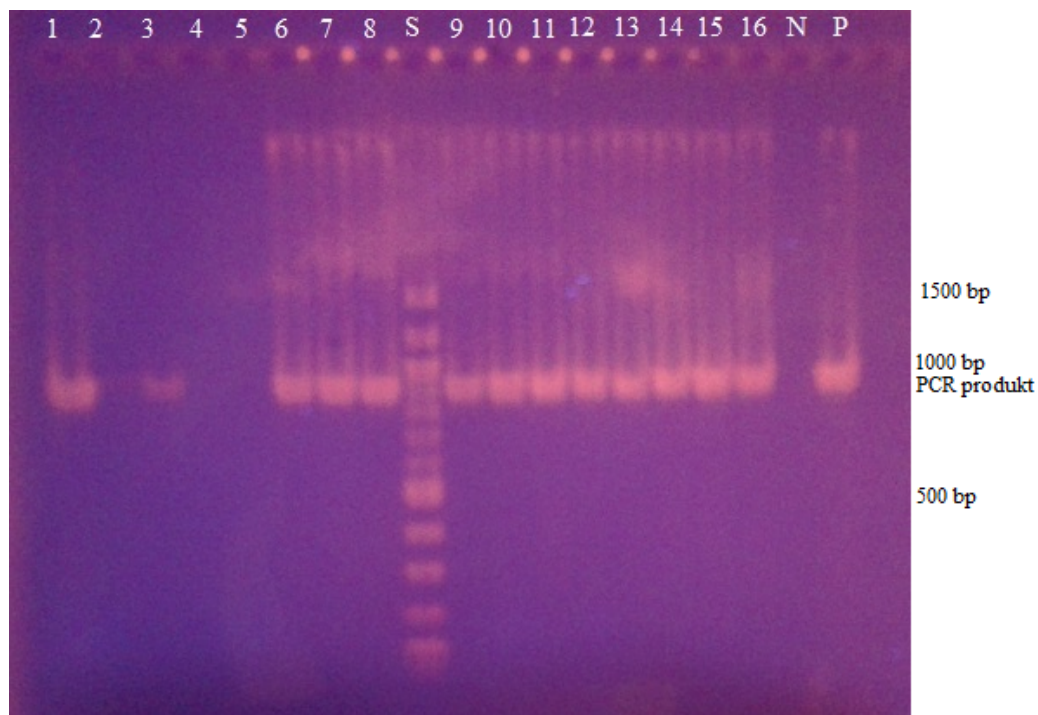
-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 11: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp) komplexního vzorku

5.3.2 Rodově specifická PCR pro rod *Bifidobacterium*

Vzorky sbírkových kmenů byly vyředěny na koncentraci 10 ng/μl. DNA všech vzorků byla amplifikována metodou polymerázové řetězové reakce s rodově specifickými primery Pbi F1 a Pbi F2 (Tabulka 3). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Bifidobacterium infantis* ATCC 17930 (10 ng/μl). PCR reakce probíhala podle programu BIFI rod (Tabulka 7) a složení PCR směsi je uvedené v Tabulce 6. Po amplifikaci byly metodou agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) detekovány specifické PCR produkty o velikosti 914 bp (Obr. 12 a Obr. 13). Lze se tedy domnívat, že vzorky obsahovaly DNA rodu *Bifidobacterium*. Vzorky, u nichž byla DNA nedetekovatelná nebo byla detekovatelná pouze slabě, byly vyřazeny.

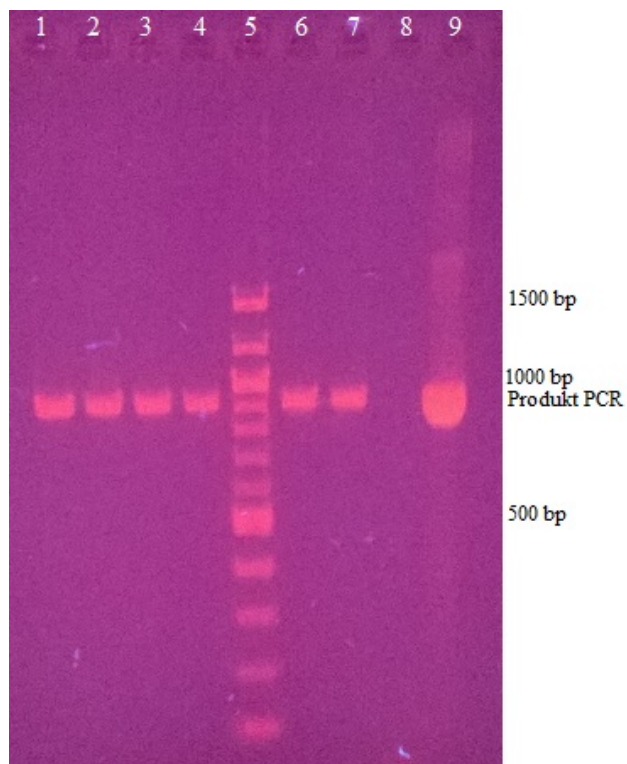


Běh	Kmen	PCR produkt
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	+++
2.	<i>B. longum</i> ATCC 1570-7	-/+
3.	<i>B. animalis</i> CCM 4988T	+
4.	<i>B. animalis</i> RB1-M8	-
5.	<i>B. bifidum</i> CCM 3762	-
6.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	+++
7.	<i>B. infantis</i> ATCC17930	+++
8.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	+++
9.	DNA standard (100 bp)	
10.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	+++
11.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	+++
12.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	+++
13.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	+++
14.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	+++
15.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	+++
16.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	+++
17.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	+++
18.	Negativní kontrola	-
19.	Pozitivní kontrola	+++

-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 12: Agarózová gelová elektroforéza specifických PCR produktů pro rod *Bifidobacterium* (914 bp) u vzorků sbírkových kmenů



Běh	Vzorek	PCR produkt
1.	Komplexní vzorek 1	++
2.	Komplexní vzorek 1	++
3.	Komplexní vzorek 2	++
4.	Komplexní vzorek 2	++
5.	DNA standard (100 bp)	
6.	Komplexní vzorek 3	++
7.	Komplexní vzorek 3	++
8.	Negativní kontrola	-
9.	Pozitivní kontrola	+++

-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 13: Agarózová gelová elektroforéza specifických PCR produktů pro rod *Bifidobacterium* (914 bp) u komplexního vzorku

5.4 PCR v reálném čase a vysokorozlišovací analýza křivek tání

DNA vybraných sbírkových kmenů rodu *Bifidobacterium* (o koncentraci 10 ng/μl) byla amplifikována metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase s primery dle Tabulky 4. PCR reakce probíhala podle programů uvedených v Tabulce 9 a složení PCR směsi je uvedené v Tabulce 8. Následně byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání podle programů uvedených v Tabulce 9. Po amplifikaci byly metodou agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) detekovány specifické PCR produkty.

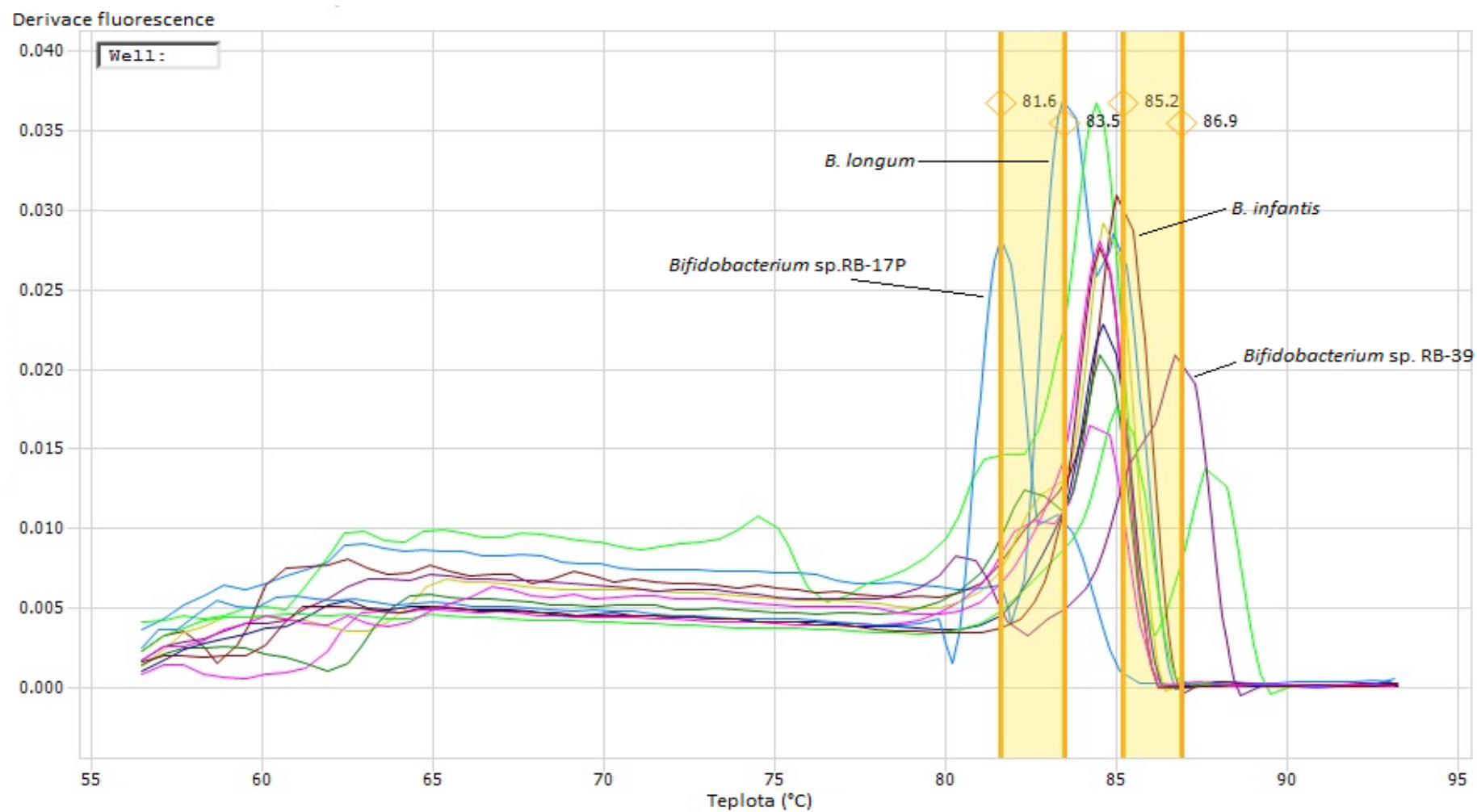
5.4.1 PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů P1V1, P2V1

Bylo provedeno několik měření. Výsledky byly vyhodnoceny na základě analýzy v cykleru ECO™ Real-time PCR system (Illumina) (Obr. 14).

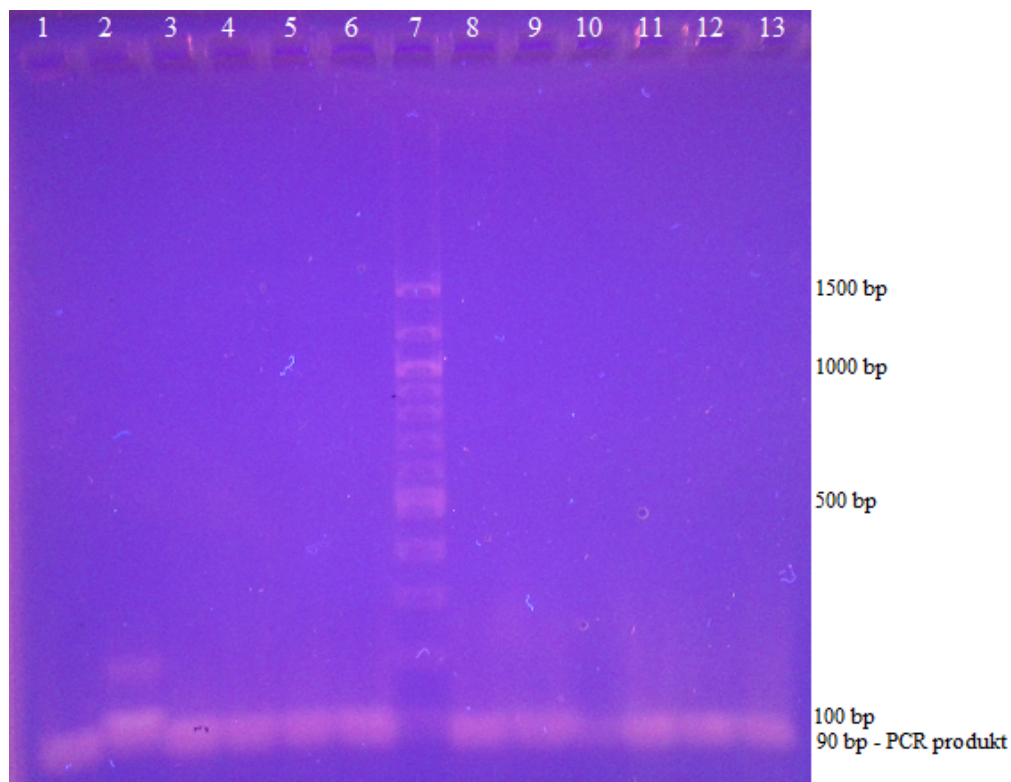
ECO™ Real-time PCR system Illumina měří při vysokorozlišovací analýze křivek tání teplotu tání na 1 desetinné místo. Přesto, že v publikacích, kde byly také používány primery P1V1 a P2V1, jsou uvedeny jako teploty tání různých kmenů teploty odlišné o 0,03 – 0,09 °C, v této práci budou vzhledem k možnostem přístroje jako teploty tání různých kmenů brány teploty odlišné o 0,1 °C. Teplotu tání Tm1 (Tabulka 12) analytický program cykleru přiřadil nejvýraznějšímu píku. Tato teplota odpovídá teplotě tání specifického produktu. Teploty tání Tm2 a Tm3 odpovídaly pravděpodobně teplotám tání nespecifických produktů, protože při ověření gelovou agarózovou elektroforézou (Obr. 15) byl na gelu detekován u všech vzorků jeden specifický produkt. U *B. animalis* (běh č. 2) byl zobrazen i nespecifický produkt. Nespecifické produkty mohly vzniknout z důvodu, že primery P1V1, P2V1 nebyly zcela specifické pro rod *Bifidobacterium*.

Tabulka 12: Naměřené hodnoty Tm [°C] s použitím primerů P1V1, P2V1

Bakteriální kmen/primery	P1V1, P2V1		
	Tm1	Tm2	Tm3
<i>B. longum</i> CCM4990	83,5	85	
<i>B. animalis</i> CCM 4988T	84,4	87,8	74,5
<i>B. infantis</i> CCDM 232	85,2		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	84,5		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	84,8		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	84,6	82,5	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	84,7		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	86,9	80,6	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	81,6	83,1	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	85,1		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	84,5		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	84,5		



Obr. 14: HRM analýza křivek tání s použitím primerů P1V1, P2V1



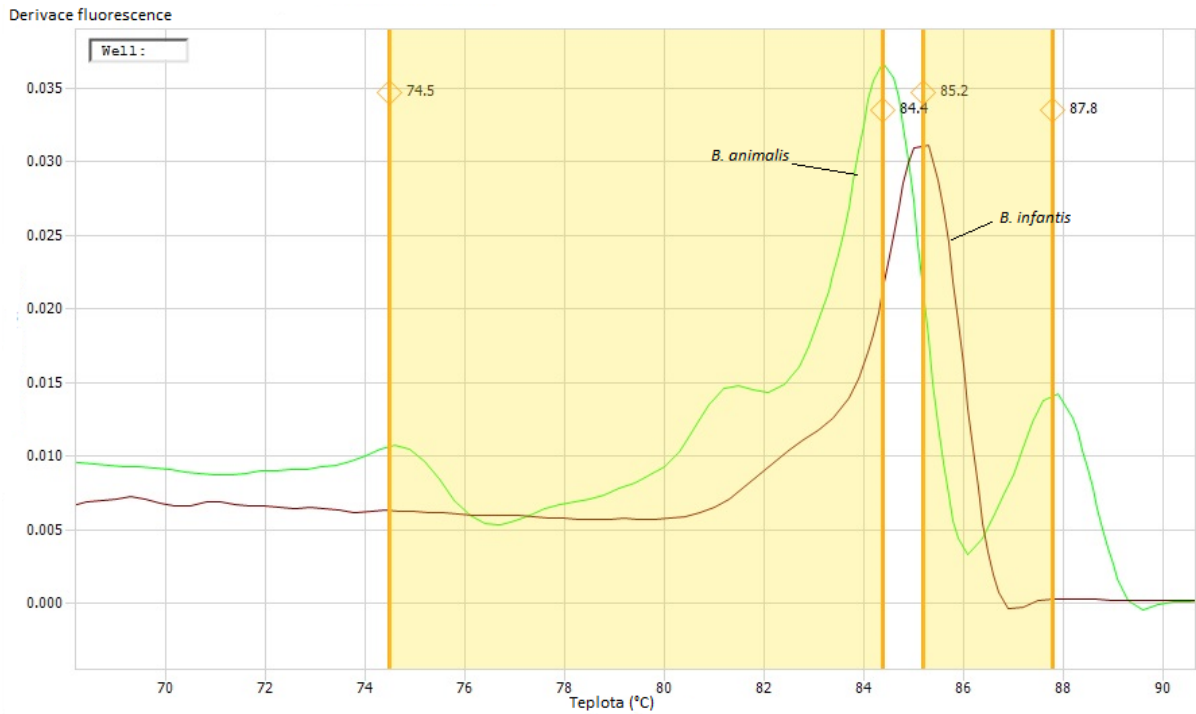
Běh	Kmen	PCR produkt
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	++
2.	<i>B. animalis</i> CCM 4988T	++
3.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	++
4.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	++
5.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	++
6.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	++
7.	DNA standard (100 bp)	
8.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	++
9.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	++
10.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	+
11.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	++
12.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	++
13.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	++

-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

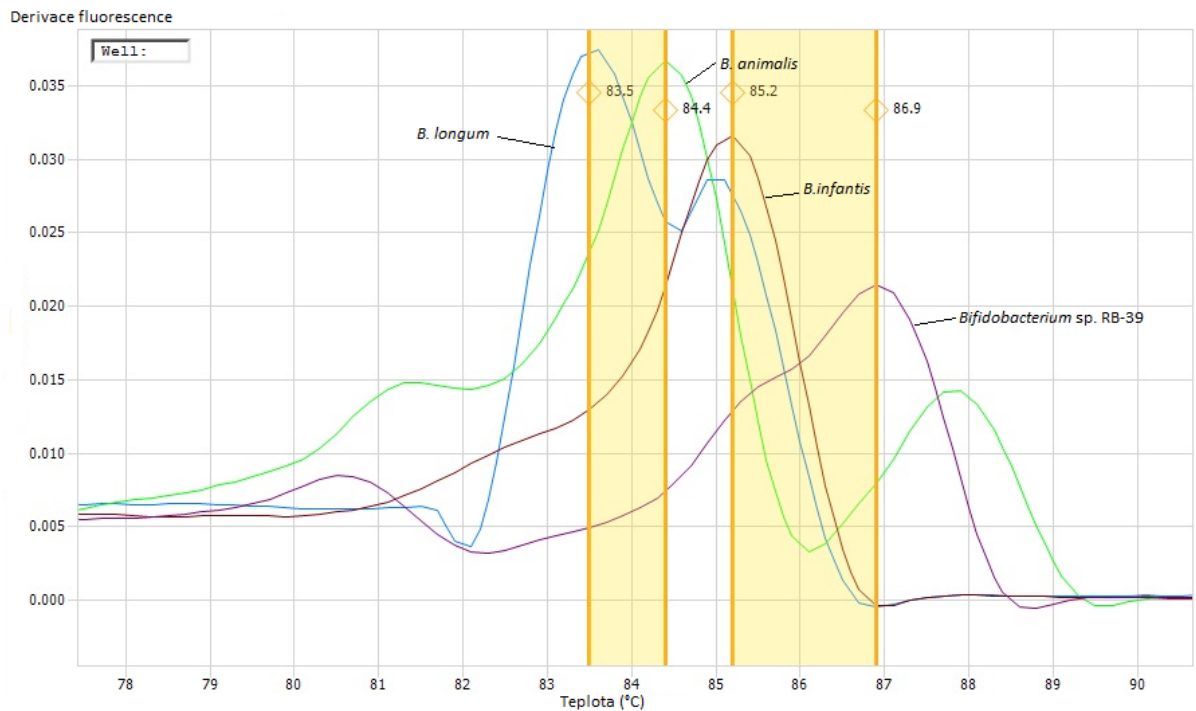
Obr. 15: Gelová agarózová elektroforéza PCR produktů po amplifikaci s použitím primerů P1V1, P2V1

Na Obr. 16 jsou zobrazeny křivky tání *B. animalis* (zelená křivka) a *B. infantis* (červená křivka). Na příkladu *B. animalis* lze v porovnání s výsledky v Tabulce 12 pozorovat, že nejvýraznější pík nemusí odpovídat nejvyšší naměřené teplotě tání. U obou křivek jsou viditelné píky nescifických produktů.



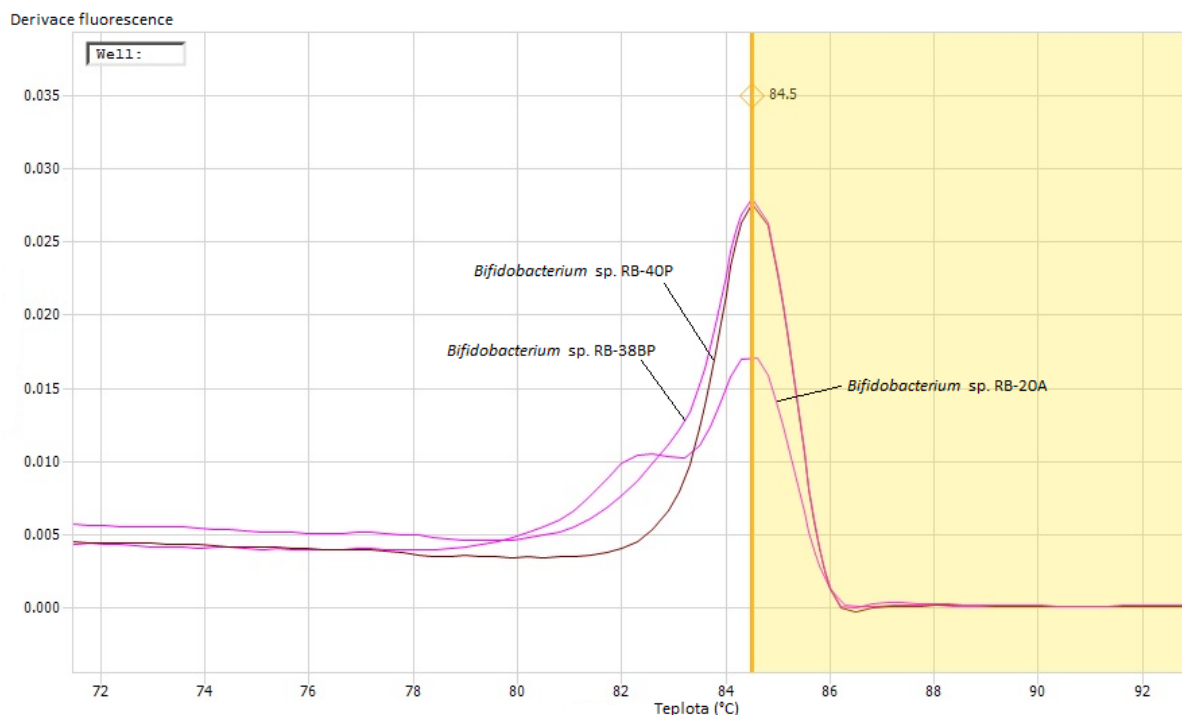
Obr. 16: Primery P1V1, P2V1 – nespecifické produkty

Cykler ECO™ Real-time PCR system (Illumina) měří teploty tání na jedno desetinné místo, přesto by bylo možné s primery P1V1 a P2V1 rozlišit několik různých kmenů rodu *Bifidobacterium*, např. *B. longum*, *B. animalis*, *B. infantis*, *Bifidobacterium* sp. RB-39AP, u nichž byly teploty tání výrazně odlišné (Obr. 17).



Obr. 17: Primery P1V1, P2V1 – rozlišitelné kmeny

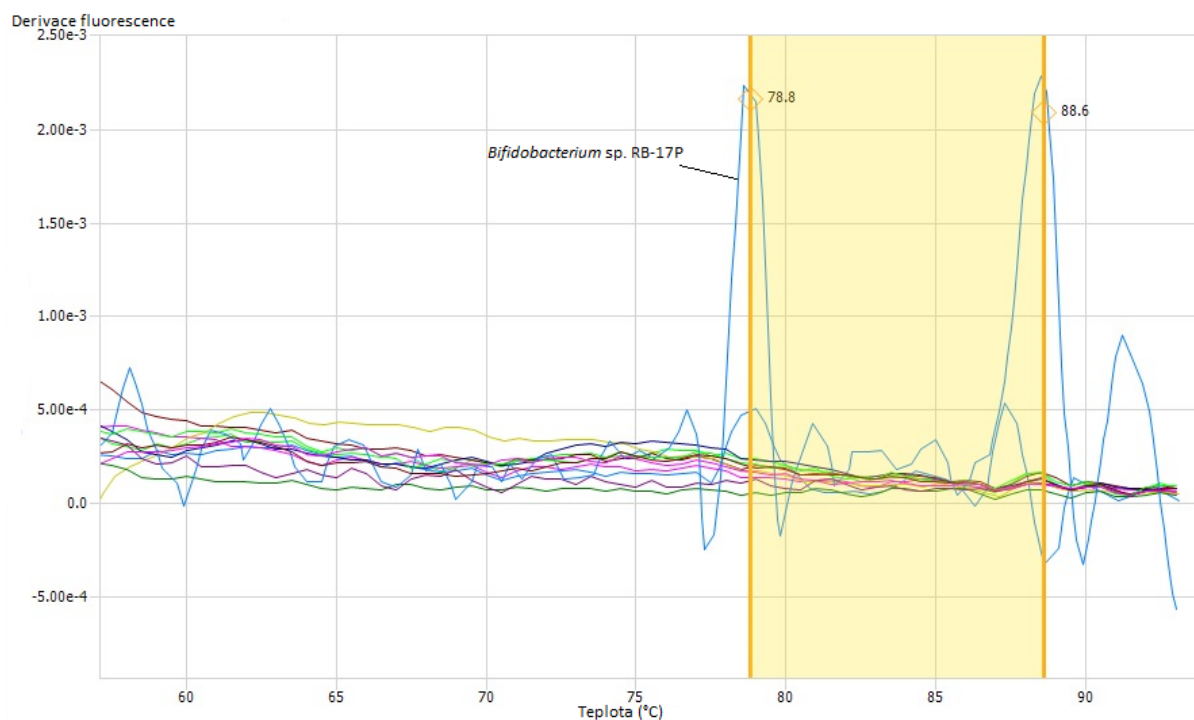
Několik kmenů, např. *Bifidobacterium* sp. RB-38BP, *Bifidobacterium* sp. RB-40P, *Bifidobacterium* sp. RB-20A, mělo naopak teplotu tání i křivku tání téměř stejnou (Obr. 18). Bylo by tedy obtížné je rozlišit.



Obr. 18: Primery P1V1, P2V1 – nerozlišitelné kmeny

5.4.2 PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů LAC1, LAC 2

Bylo provedeno několik měření. Výsledky byly vyhodnoceny na základě analýzy v cykleru ECO™ Real-time PCR system (Illumina). Výsledné křivky tání (Obr. 19) i naměřené teploty tání (Tabulka 13) naznačují, že primery LAC1 a LAC2 nejsou pravděpodobně vhodné pro rod *Bifidobacterium*. Pouze u *Bifidobacterium* sp. RB-17P se zobrazila křivka a teplota tání, ale gelová agarózová elektroforéza potvrdila, že se při reakci nenaamplifikoval žádný PCR produkt (Obr. 20).



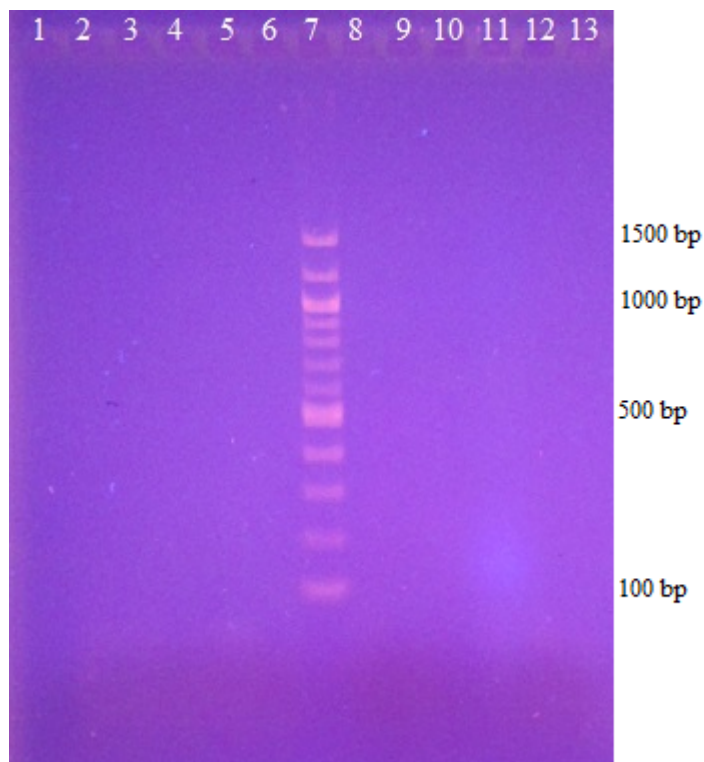
Obr. 19: HRM analýza křivek tání s použitím primerů LAC1, LAC 2

Tabulka 13: Naměřené hodnoty Tm [°C] s použitím primerů LAC1, LAC2

Bakteriální kmen/primery	LAC1, LAC2	
	Tm1	Tm2
<i>B. longum</i> CCM4990	N/A	
<i>B. animalis</i> CCM 4988T	N/A	
<i>B. infantis</i> CCDM 232	N/A	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	N/A	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	N/A	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	N/A	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	N/A	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	N/A	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	78,8	88,6
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	N/A	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	N/A	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	N/A	

N/A.....nebyl detekován produkt PCR

Byla provedena optimalizace hybridizačních teplot, ale nevedla k výsledkům. Zároveň bylo bioinformatickou analýzou programem Primer-BLAST potvrzeno, že primery LAC1, LAC2 nejsou ve většině případů vhodné pro rod *Bifidobacterium*.



Běh	Kmen	PCR produkt
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	-
2.	<i>B. animalis</i> CCM 4988T	-
3.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	-
4.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	-
5.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	-
6.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	-
7.	DNA standard (100 bp)	
8.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	-
9.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	-
10.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	-
11.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	-
12.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	-
13.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	-

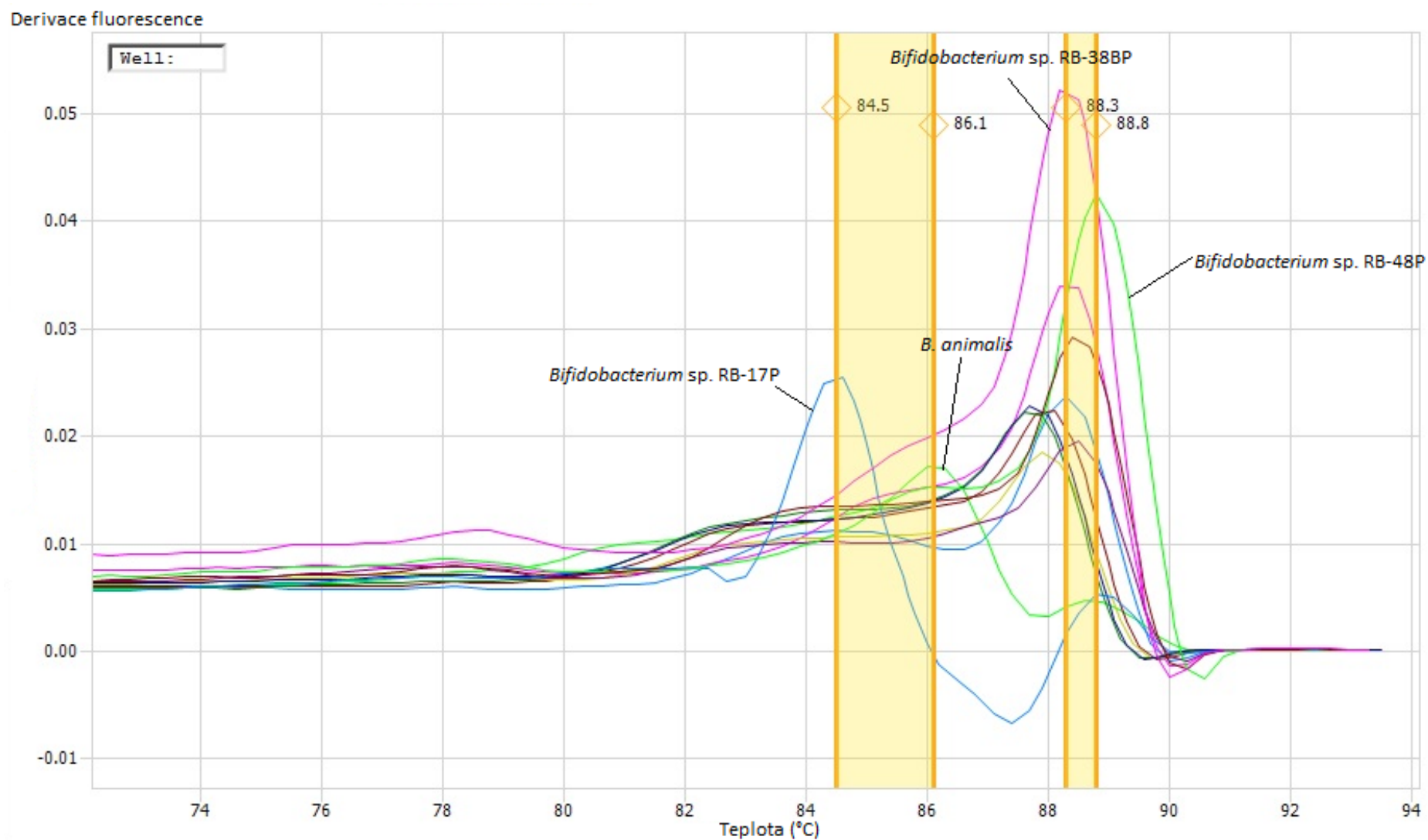
-/+,+,++,++++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 20: Gelová agarózová elektroforéza PCR produktů po amplifikaci s použitím primerů LAC1, LAC2

5.4.3 PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů LspUPF, LspUPR

Bylo provedeno několik měření. Výsledky byly vyhodnoceny na základě analýzy v cyklu ECO™ Real-time PCR system (Illumina) (Obr. 21).

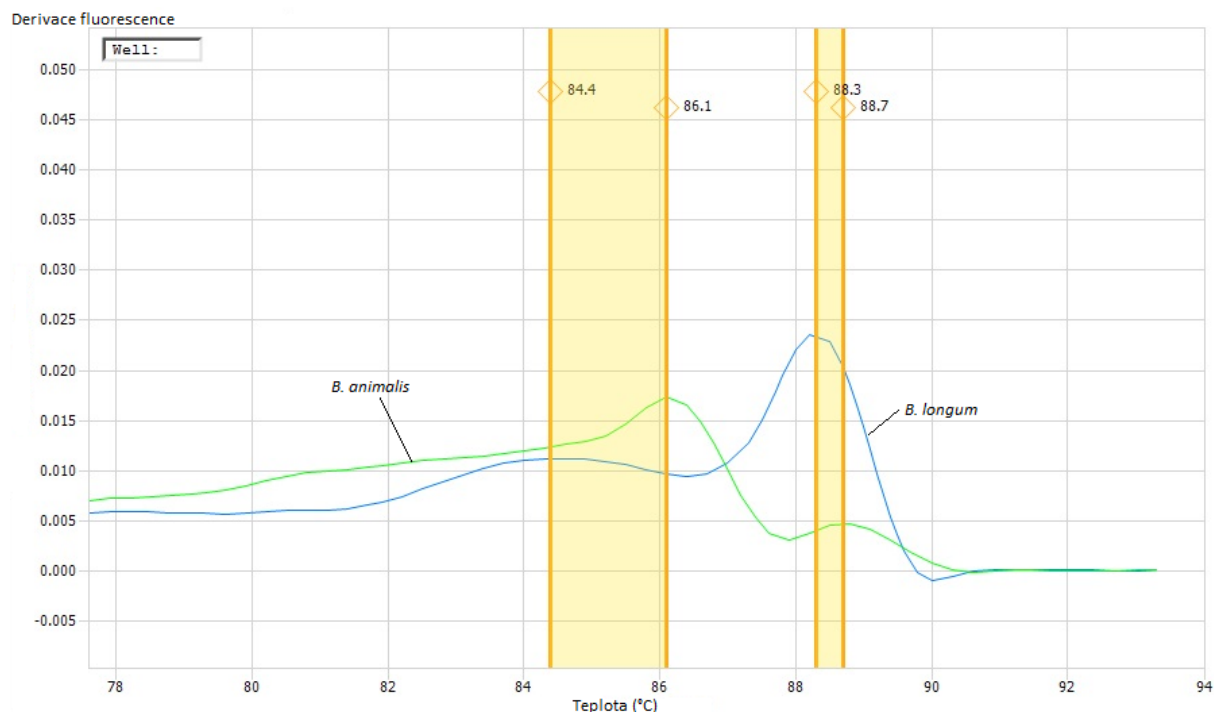


Öbr. 21: HRM analýza křivek tání s použitím primerů LspUPF, LspUPR

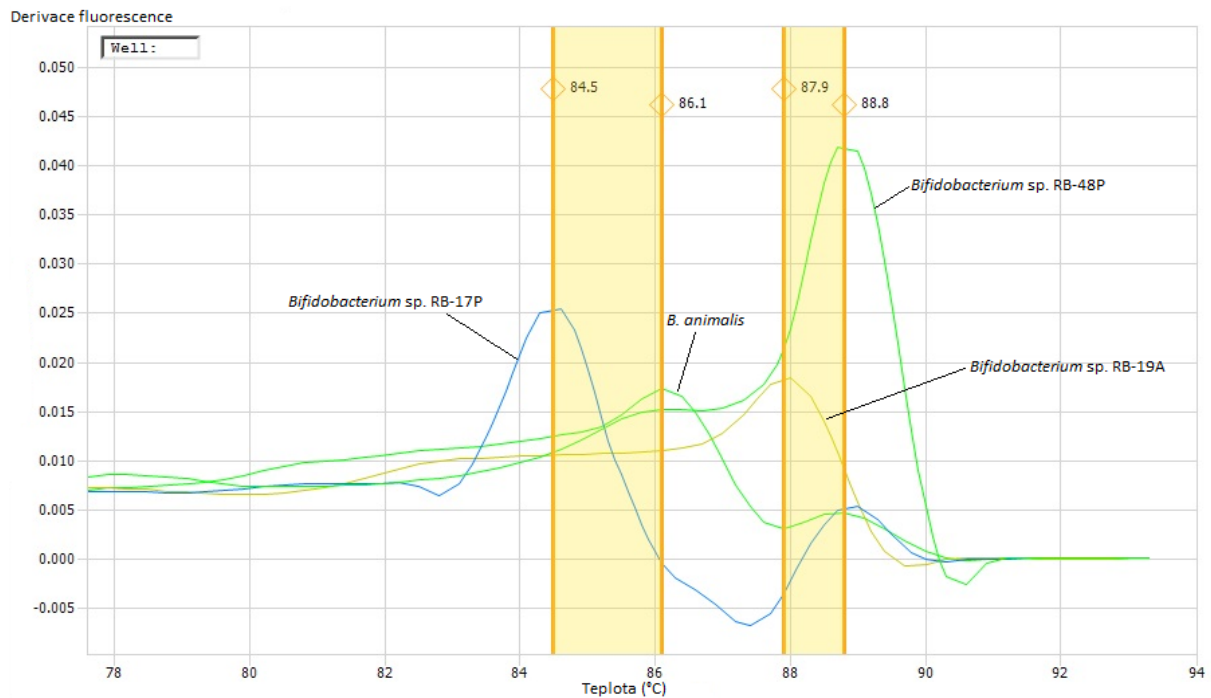
Tabulka 14: Naměřené hodnoty Tm [°C] s použitím primerů LspUPF, LspUPR

Bakteriální kmen/primery	LspUPF, LspUPR	
	Tm1	Tm2
<i>B. longum</i> CCM4990	88,3	84,4
<i>B. animalis</i> CCM 4988T	86,1	88,7
<i>B. infantis</i> CCDM 232	88	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	88,3	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	87,9	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	87,7	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	87,8	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	88,4	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	84,5	88,9
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	88,8	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	88,5	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	88,3	58,7

Teplotu tání Tm1 (Tabulka 14) analytický program cyklu přiřadil nejvýraznějšímu píku. Tato teplota odpovídá teplotě tání specifického produktu. Teplota tání Tm2 odpovídala pravděpodobně teplotě tání nespecifických produktů (Obr. 22), protože při ověření gelovou agarózovou elektroforézou (Obr. 25) byl na gelu u vzorků detekován jeden specifický produkt. U většiny vzorků byly na gelu detekovány i nespecifické produkty. Nespecifické produkty mohly vzniknout z důvodu, že primery LspUPF, LspUPR nebyly zcela specifické pro rod *Bifidobacterium*.



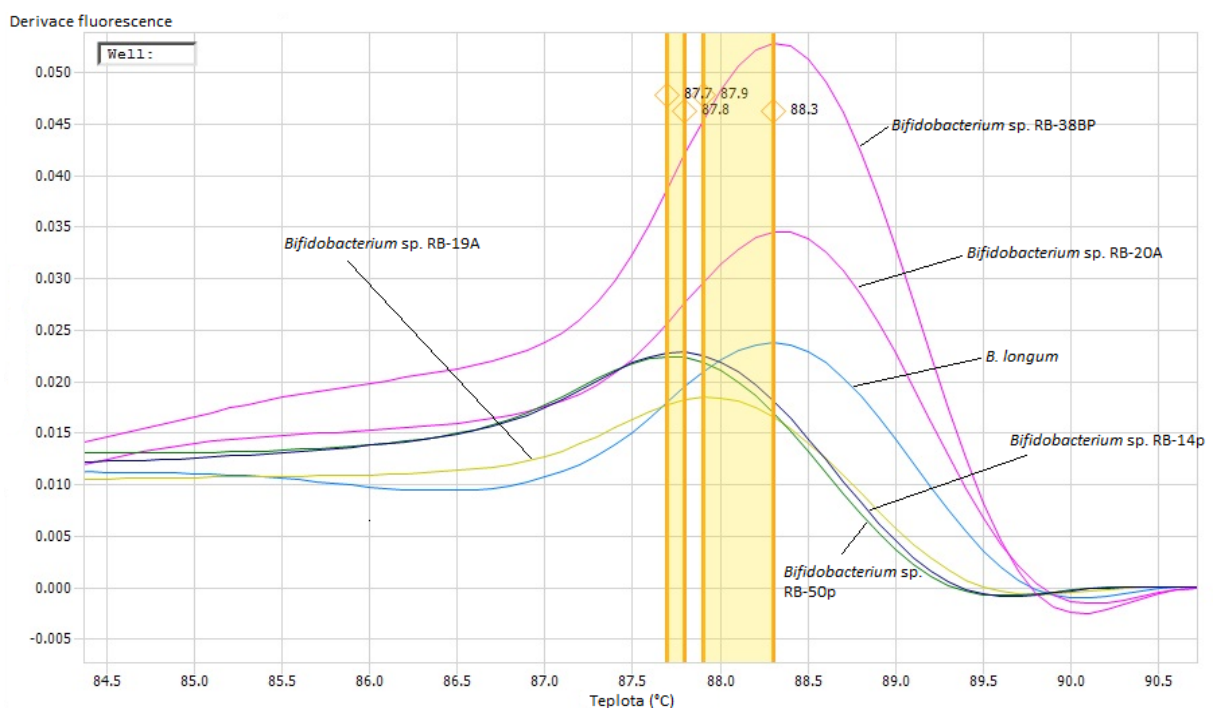
Obr. 22: Primery LspUPF, LspUPR – nespecifické produkty



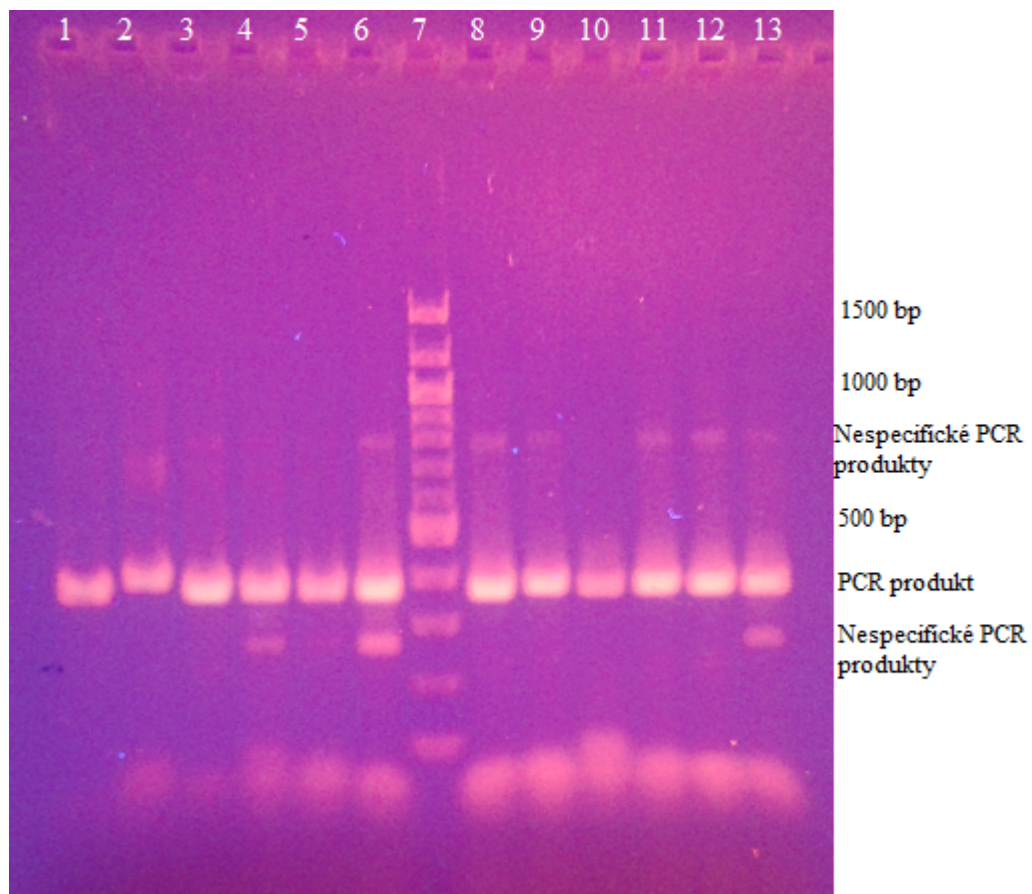
Obr. 23: Primery LsspUPF, LsspUPR – rozlišitelné kmeny

S primery LsspUPF, LsspUPR by bylo možné rozlišit několik různých kmenů rodu *Bifidobacterium*, např. *B. animalis*, *Bifidobacterium* sp. RB-17P, *Bifidobacterium* sp. RB-48P, *Bifidobacterium* sp. RB-19A, u nichž byly teploty tání výrazně odlišné (Obr. 23).

Několik kmenů, např. *Bifidobacterium* sp. RB-38BP, *Bifidobacterium* sp. RB-20A, *B. longum* nebo kmeny *Bifidobacterium* sp. RB-19A, *Bifidobacterium* sp. RB-50p, *Bifidobacterium* sp. RB-14p, mělo naopak teplotu tání i křivku tání téměř stejnou (Obr. 24). Bylo by tedy obtížné je rozlišit.



Obr. 24: Primery LsspUPF, LsspUPR – nerozlišitelné kmeny



Běh	Kmen	PCR produkt
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	++
2.	<i>B. animalis</i> CCM 4988T	++
3.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	+++
4.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	++
5.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	++
6.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	+++
7.	DNA standard (100 bp)	
8.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	+++
9.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	+++
10.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	++
11.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	+++
12.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	+++
13.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	+++

-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 25: Gelová agarózová elektroforéza PCR produktů po amplifikaci s použitím primerů LsppUPF, LsppUPR

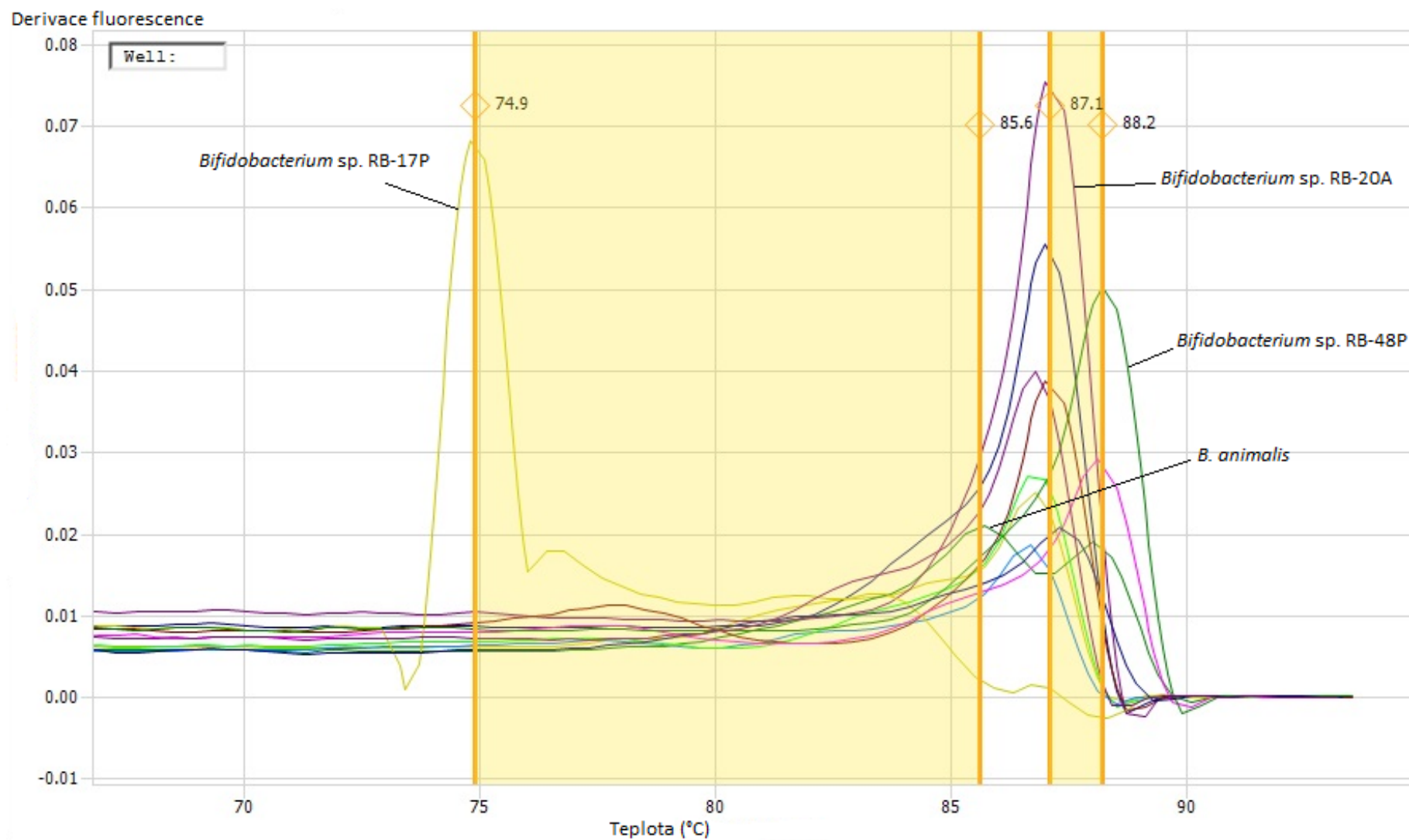
5.4.4 PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů V3F, V3R

Bylo provedeno několik měření. Byly použity primery vybrané z hypervariabilní oblasti V3, která byly lemována vysoce konzervativními sekvencemi genu 16S rRNA [39]. Výsledky byly vyhodnoceny na základě analýzy v cykleru ECO™ Real-time PCR system (Illumina) (Obr. 26).

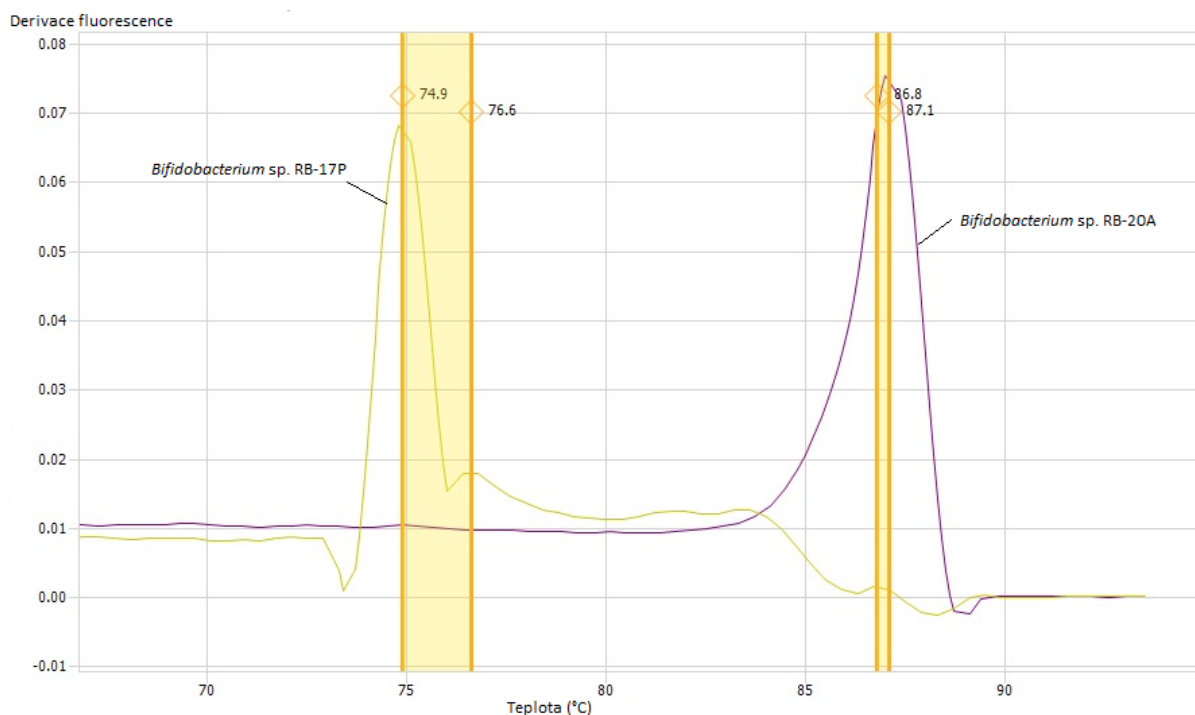
Teplotu tání Tm1 (Tabulka 15) analytický program cykleru přiřadil nejvýraznějšímu píku. Tato teplota odpovídá teplotě tání specifického produktu. Teploty tání Tm2 a Tm3 odpovídaly pravděpodobně teplotě tání nespecifických produktů (Obr. 27), protože při ověření gelovou agarózovou elektroforézou (Obr. 29) byl na gelu u vzorků detekován jeden specifický produkt. Nespecifické produkty nebyly na gelu detekovány. Nespecifické produkty mohly vzniknout z důvodu, že primery V3F, V3R nebyly zcela specifické pro rod *Bifidobacterium*.

Tabulka 15: Naměřené hodnoty Tm [°C] s použitím primerů V3F, V3R

Bakteriální kmen/primery	V3F, V3R		
	Tm1	Tm2	Tm3
<i>B. longum</i> CCM4990	86,7		
<i>B. animalis</i> CCM 4988T	85,6	88	
<i>B. infantis</i> CCDM 232	87		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	87,1		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	86,6		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	86,8		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	87,1	78	
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	88,1		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	74,9	76,6	86,8
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	88,2		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	87,4		
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	86,8		

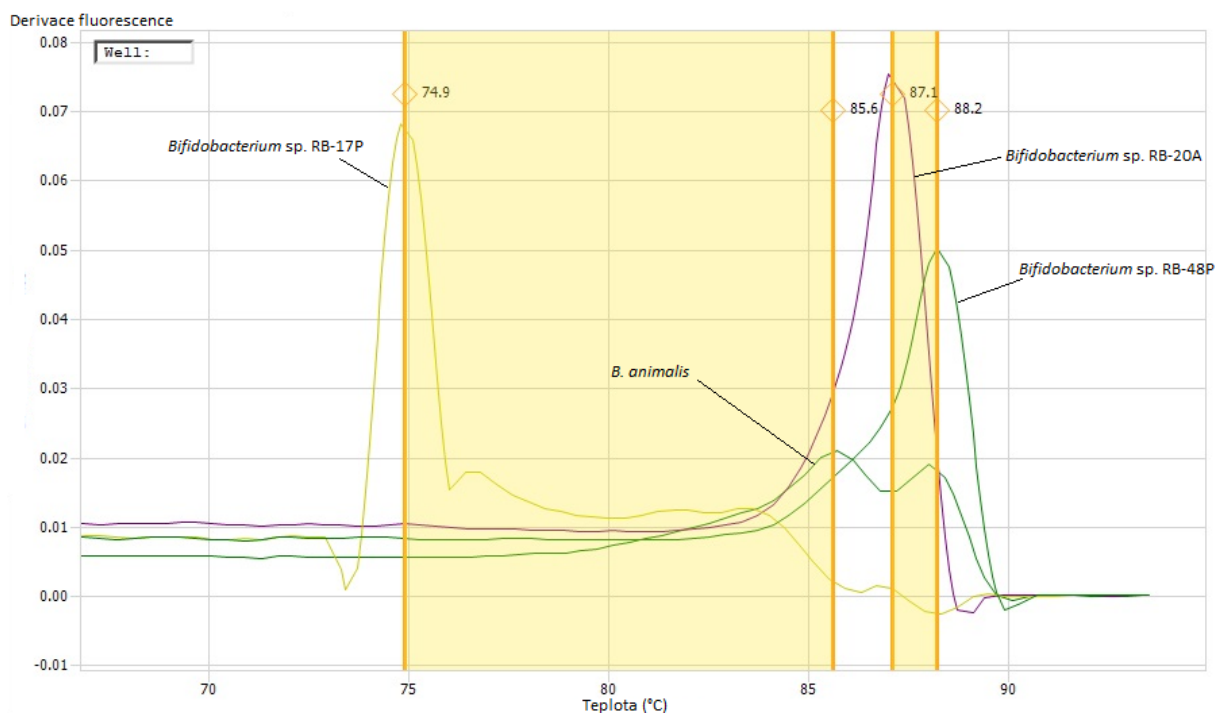


Obr. 26: HRM analýza křivek tání s použitím primerů V3F, V3R

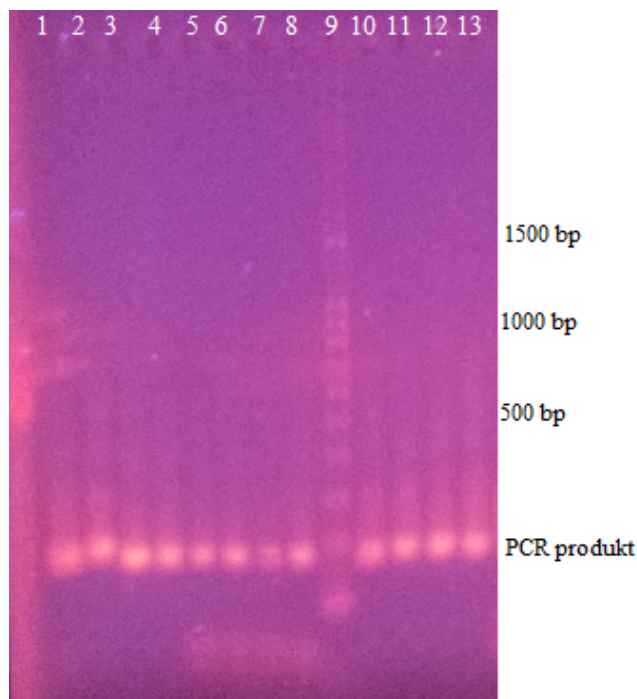


Obr. 27: Primery V3F, V3R – nespecifické produkty

S primery V3F, V3R by bylo možné rozlišit několik různých kmenů rodu *Bifidobacterium*, např. *B. animalis*, *Bifidobacterium* sp. RB-17P, *Bifidobacterium* sp. RB-48P, *Bifidobacterium* sp. RB-20A, u nichž byly teploty tání výrazně odlišné (Obr. 28).



Obr. 28: Primery V3F, V3R – rozlišitelné kmeny



Běh	Kmen	PCR produkt
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	++
2.	<i>B. animalis</i> CCM 4988T	++
3.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	++
4.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	++
5.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	++
6.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	++
7.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	+
8.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	++
9.	DNA standard (100 bp)	
10.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	++
11.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	++
12.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	++
13.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	++

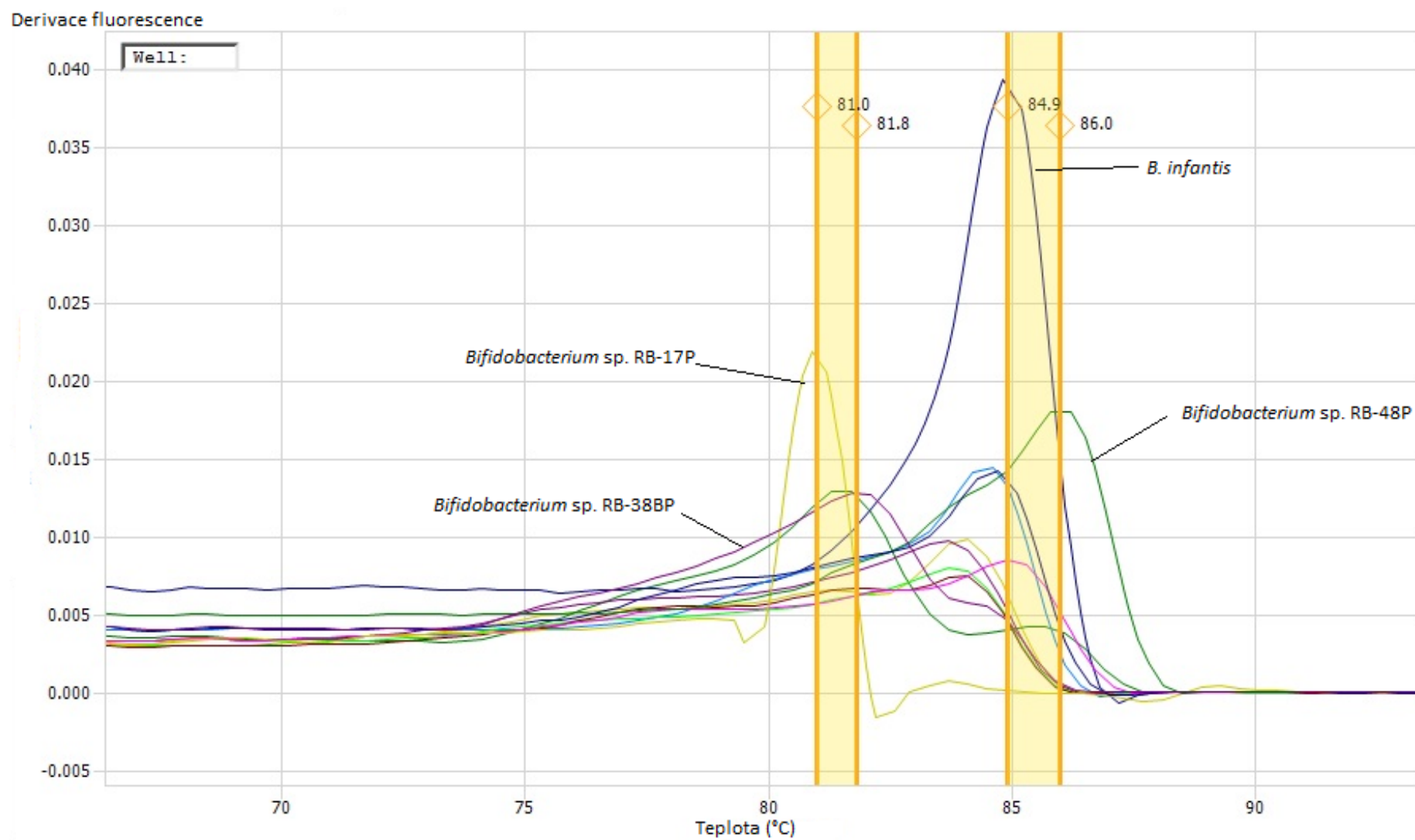
-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 29: Gelová agarózová elektroforéza PCR produktů po amplifikaci s použitím primerů V3F, V3R

5.4.5 PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání s použitím primerů V6F, V6R

Bylo provedeno několik měření. Byly použity primery vybrané z hypervariabilní oblasti V6, která byly lemována vysoce konzervativními sekvencemi genu 16S rRNA [39]. Výsledky byly vyhodnoceny na základě analýzy v cykleru ECO™ Real-time PCR system (Illumina) (Obr. 30).



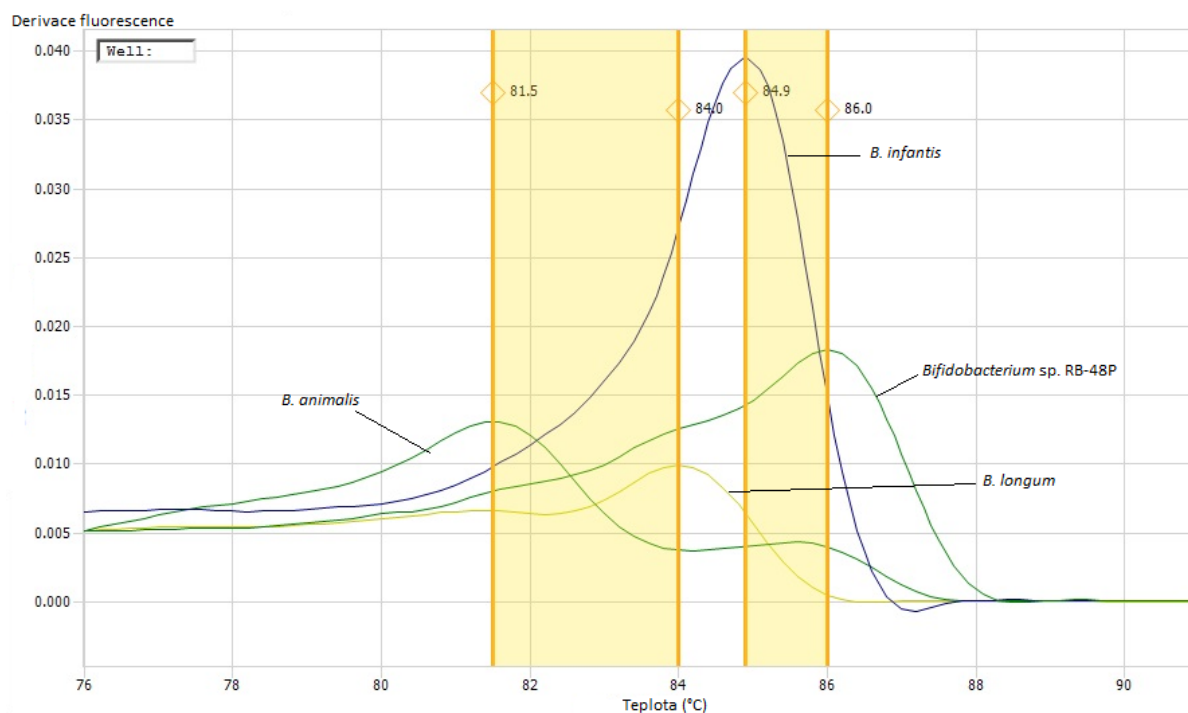
Obr. 30: HRM analýza křivek tání s použitím primerů V6F, V6R

S těmito primery byla naměřena pouze jedna teplota tání T_m1 (Tabulka 16). Nedošlo tedy ke vzniku nespecifických produktů, což bylo potvrzeno i agarózovou gelovou elektroforézou (Obr. 32), kterou byl u všech vzorků detekován pouze specifický produkt. Je vhodné, aby nedocházelo ke vzniku nespecifických produktů, protože mohou nepříznivě ovlivnit výsledek HRM analýzy.

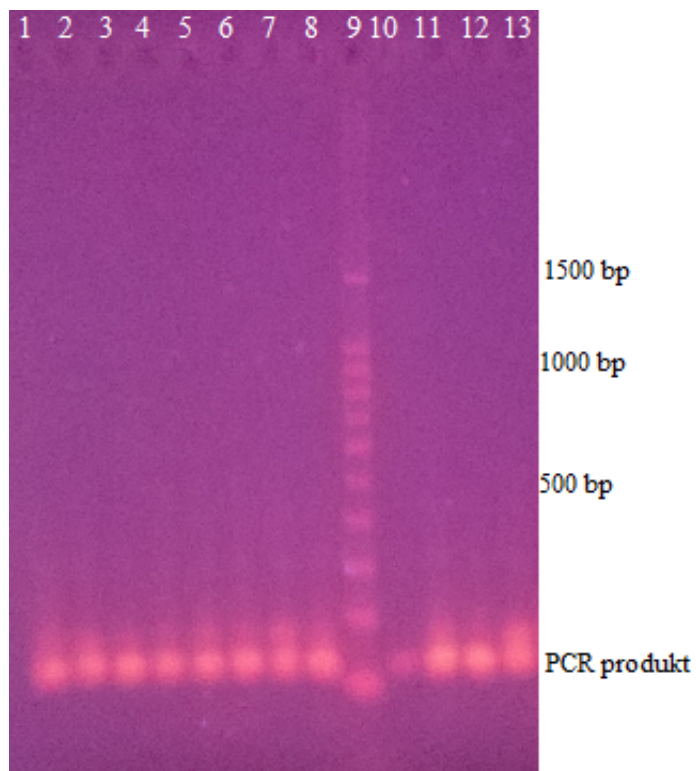
Tabulka 16: Naměřené hodnoty T_m [°C] s použitím primerů V6F, V6R

Bakteriální kmen/primery	V6F
	V6R
T _m	
<i>B. longum</i> CCM4990	84
<i>B. animalis</i> CCM 4988T	81,5
<i>B. infantis</i> CCDM 232	84,9
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	83,6
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	84,5
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	83,8
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	83,9
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	85
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	81
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	86
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	84,6
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	81,8

S primery V6F, V6R by bylo možné rozlišit několik různých kmenů rodu *Bifidobacterium*, např. *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, *Bifidobacterium* sp. RB-48P, u nichž byly teploty tání výrazně odlišné (Obr. 31).



Obr. 31: Primery V6F, V6R – rozlišitelné kmeny



Běh	Kmen	PCR produkt
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	++
2.	<i>B. animalis</i> CCM 4988T	++
3.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	++
4.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-20A VGA 06	++
5.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-19A MRS C6	++
6.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-50p MRS C6	++
7.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-14p MRS C6	++
8.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-39 AP	++
9.	DNA standard (100 bp)	
10.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	+
11.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-48P	++
12.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-40P	++
13.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	++

-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 32: Gelová agarózová elektroforéza PCR produktů po amplifikaci s použitím primerů V6F, V6R

5.4.6 PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání komplexního vzorku

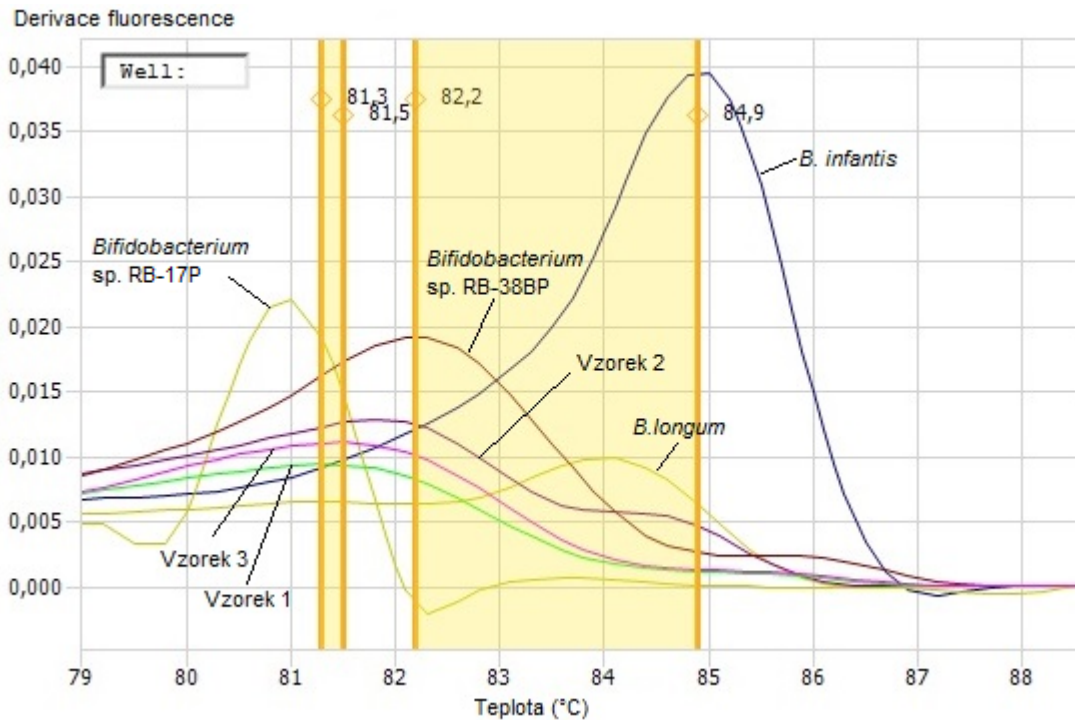
Bylo vyzkoušeno několik primerů vhodných pro bakterie mléčného kvašení. Na základě dosažených výsledků byly vybrány primery, které by mohly být vhodné pro rod *Bifidobacterium* a které by bylo vhodné dále zkoumat.

Pro analýzu mikrobiálního složení komplexního výrobku (doplňek stravy s obsahem probiotických bakterií) byly vybrány primery V6F, V6R. Výběr byl proveden na základě předchozí analýzy a podmíněn faktem, že u nich nedošlo ke vzniku nespecifických produktů, které mohou nepříznivě ovlivnit výsledek HRM analýzy. S těmito primery byla provedena PCR v reálném čase a HRM analýza křivek tání komplexního vzorku (Obr. 33) dle stejného postupu jako u vybraných sbírkových a typových kmenů rodu *Bifidobacterium*. Jako standard byla použita DNA vybraných sbírkových a typových kmenů *B. longum* CCM4990, *B. infantis* CCDM 232, *Bifidobacterium* sp. RB-17P, *Bifidobacterium* sp. RB-38BP. Před samotnou HRM analýzou bylo metodou konvenční PCR (kapitola 5.3.2) potvrzeno, že v komplexním vzorku je přítomna DNA rodu *Bifidobacterium*. Dle výrobce by měl výrobek obsahovat *B. longum*, *B. infantis*, *B. bifidum* (Tabulka 2).

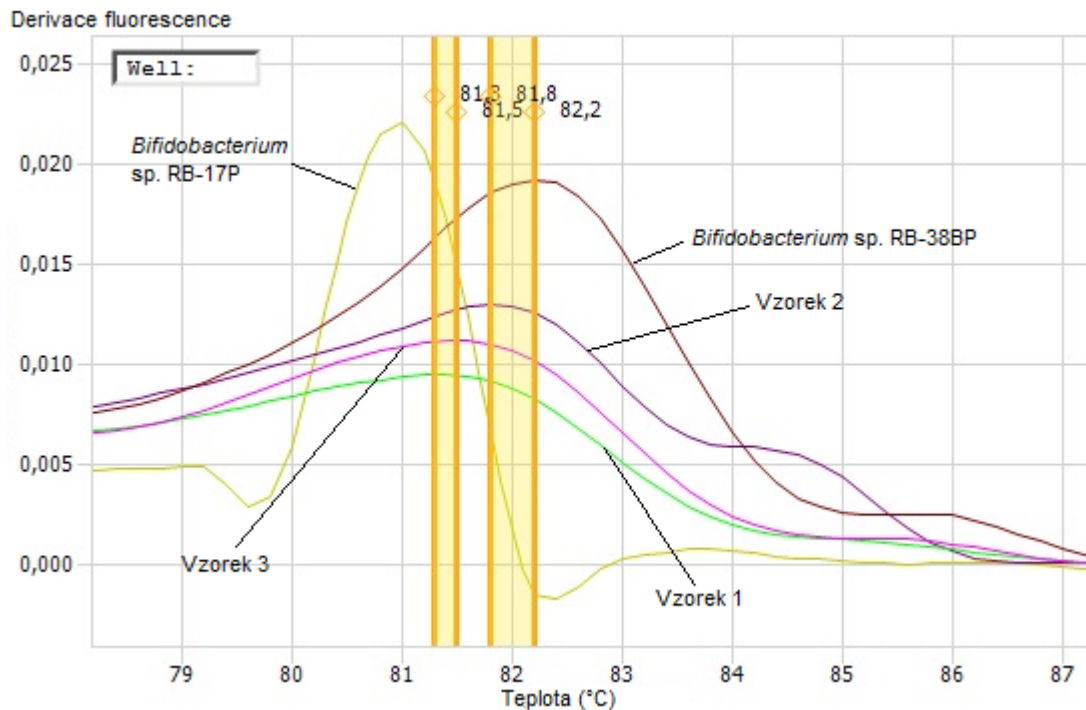
Tabulka 17: Naměřené hodnoty T_m [°C] s použitím primerů V6F, V6R u komplexního vzorku

Bakteriální kmen/primery	V6F
	V6R
	T_m
<i>B. longum</i> CCM4990	84
<i>B. infantis</i> CCDM 232	84,9
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	81
<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	81,8
Komplexní vzorek 1	81,3
Komplexní vzorek 2	82,2
Komplexní vzorek 3	81,5

Naměřené teploty T_m u komplexního vzorku (Tabulka 17) neodpovídají naměřeným teplotám u *B. longum* a *B. infantis*, ale mají podobné hodnoty jako jiné kmeny rodu *Bifidobacterium* - *Bifidobacterium* sp. RB-17P a *Bifidobacterium* sp. RB-38BP (Obr. 34), což mohlo znamenat, že vzorek obsahoval jiné kmeny rodu *Bifidobacterium*, než které byly použity jako standard.

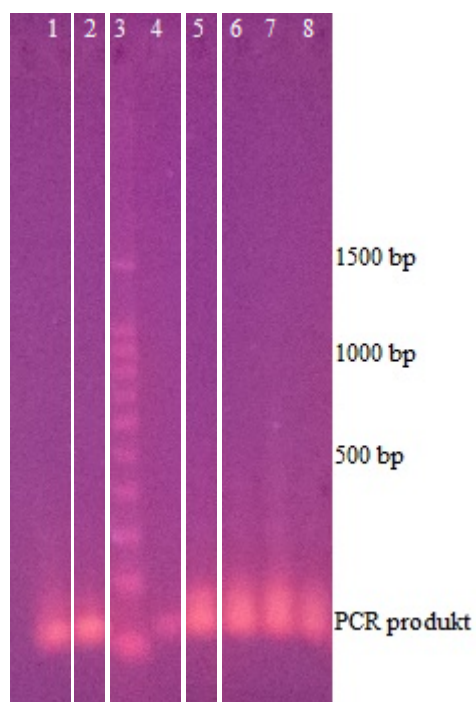


Obr. 33: HRM analýza křivek tání komplexního vzorku



Obr. 34: HRM analýza křivek tání komplexního vzorku – vybrané kmeny

Gelovou agarózovou elektroforézou byl detekován u standardů i u reálného vzorku PCR produkt (Obr. 35).



Běh	Kmen	PCR produkt
1.	<i>B. longum</i> CCM4990	++
2.	<i>B. infantis</i> CCDM 232	++
3.	DNA standard (100 bp)	
4.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-17P MRS C6	+
5.	<i>Bifidobacterium</i> sp. RB-38BP	++
6.	Komplexní vzorek 1	++
7.	Komplexní vzorek 2	++
8.	Komplexní vzorek 3	++

-/+,+,++,+++různá intenzita detekce produktu PCR

-.....produkt PCR nedetekován

Obr. 35: Gelová agarózová elektroforéza PCR produktů po amplifikaci s použitím primerů V6F, V6R u komplexního vzorku

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zavedení metody PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (PCR-HRMA) za účelem analýzy mikroflóry ve vybraném komplexním vzorku potravin (probiotický výrobek) obsahujícím směs mikroorganismů. Pozornost byla zaměřena na identifikaci bakterií rodu *Bifidobacterium*, jehož zástupci jsou řazeni mezi bakterie mléčného kvašení a probiotické mikroorganismy. Přesto doposud nebyly publikovány žádné vědecké práce, které by se věnovaly problematice rozlišení jednotlivých kmenů rodu *Bifidobacterium* pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání.

Dle publikací bylo vybráno několik primerů vhodných pro bakterie mléčného kvašení. DNA vybraných čistých bakteriálních kultur a DNA izolovaná z probiotického výrobku byla amplifikována pomocí konvenční PCR a PCR-HRMA. Metodou konvenční PCR byla ve všech vzorcích potvrzena přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium*. Metodou PCR-HRMA byla potvrzena účinnost primerů P1V1 a P2V1, LspUPF a LspUPR, V3F a V3R, V6F a V6R pro rod *Bifidobacterium* v čistých bakteriálních kulturách. Primery LAC1 a LAC2 nejsou pravděpodobně vzhledem k dosaženým výsledkům pro rod *Bifidobacterium* vhodné.

Po provedení PCR-HRMA s vybranými primery u komplexního vzorku lze předpokládat, že by po další optimalizaci byla metoda PCR-HRMA vhodná i pro kmeny rodu *Bifidobacterium*. Jako nejvhodnější primery byly pro rozlišení jednotlivých kmenů vybrány primery V6F a V6R z hypervariabilní oblasti V6, které jsou lemovány vysoce konzervativní sekvencí genu 16S rRNA. Za použití těchto primerů nebyl detekován nespecifický produkt PCR. A zároveň bylo dosaženo optimálního rozlišení hodnot teplot tání (T_m) jednotlivých testovaných kmenů rodu *Bifidobacterium*.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KLIJN, N, A H WEERKAMP a W M DE VOS. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and environmental microbiology*. 1991, 57, s. 3390 – 3393
- [2] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 2014, 158, s. 245-254
- [3] ANGMO, K., KUMARI, A., SAVITRI, BHALLA, T. CH.. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT – Food Science and Technology* 68, 2016, 428 - 435
- [4] S. C. LEAHY, D. G. HIGGINS, G. F. FITZGERALD a D. van SINDEREN. A REVIEW: Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, 98, s. 1303-1315
- [5] QUIGLEY E. M. M.: Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research* 61 (2010), 213-218
- [6] QUIGLEY E. M. M.: Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Curr Opin Pharmacol* 11, 2011, 593-603.
- [7] Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- [8] Dostupné z: <http://probioticsdb.com/probiotic-strains/bifidobacterium-infantis/>
- [9] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*, 3. vyd. Praha: Nakladatelství Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6
- [10] VENTURA, M., VAN SINDEREN, D., FITZGERALD, G.F. and ZINK, R.. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 2004a, 205–223.
- [11] SIMPSON, P.J., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F. and STANTON, C.. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from porcine caecum. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2004, 401–406.
- [12] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*, 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [13] <http://probioticsdb.com/probiotic-strains/lactobacillus-casei/>
- [14] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 188. ISBN 80-210-3841-1.
- [15] BROWN, T. A.: *Klonování genů a analýza DNA*, 1. české vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6
- [16] TRACHTOVÁ, Š. *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – úloha č. 2*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ZS 2014–2015.
- [17] YE, J, G COULOURIS, I ZARETSKAYA, I CUTCUTACHE, S ROZEN a TI MADDEN. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *Bmc Bioinformatics*. BIOMED CENTRAL LTD, 2012, 13: 134
- [18] DORAK, M. T.. *Real-time PCR*, 1. vyd. New York: Taylor & Francis Group, 2006, 333 s. ISBN 0-4153-7734-X (Print Edition)

- [19] KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2006), 95-125
- [20] RIRIE, K. M., RASMUSSEM, R. P., WITTEWER, C. T.. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 1997, s. 154-160.
- [21] VOSSEN, R. H.A.M., EMMELIEN, A., ROOS, A. and den DUNNEN, J.T.. High Resolution Melting Analysis (HRMA) - More Than Just Sequence Variant Screening. *Human Mutation, Vol. 30*, 2009, s. 1-7
- [22] REED, G.H., KENT, J.O. and WITTEWER, C.T.. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 2007, s. 598 - 607.
- [23] CHAKRAVORTY, S., D. HELB, M. BURDAY, N. CONNELL, and D. ALLAND. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 69, 2007, 330–339.
- [24] IACUMIN, L., GINALDI, F., MANZANO, M., ANASTASI, V., REALE, A., ZOTTA, T., ROSSI, F., COPPOLA, R., COMI, G.. High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR. *Food Microbiology* 46 (2015). 357 - 367
- [25] PORCELLATO, D., ØSTLIE, H.M., LILAND, K.H., RUDI, K., ISAKSSON, T., SKEIE, S.B.. Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in Norway cheese by high-resolution melt analysis. *J. Dairy Sci.* 95 (9), 2012b, 4804 - 4812.
- [26] TURKOVÁ, K.: Studium probiotických bakterií mléčného kvašení produkujících antimikrobiální látky. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 161 str. Vedoucí dizertační práce: doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
- [27] MONIS, P.T., GIGLIO S., SAINT Ch. P.. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry* 340 (2005), 24 – 34
- [28] Eco™ Real-Time PCR System User Guide, © 2010-2012 Illumina, Inc..
- [29] WONG, Y.P., CHUA K.H., THONG K.L.. One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection. *Journal of Microbiological Methods* 107 (2014), 133-137
- [30] WITTEWER, C. T.. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum. Mutat.* 30 (2009), 857-859
- [31] TONG, S.Y.C., GIFFARD, P.M.. Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, 2012, 3418-3421
- [32] ERALI, M., VOLKERDING, K. V., & WITTEWER, C. T.. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 2008, 50–58
- [33] MONTGOMERY, J. L., SANFORD, L. N., & WITTEWER, C. T.. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(2), 2010, 219–240.

- [34] ŠPANOVÁ, Alena, Bohuslav RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie / Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010. 86 s.: il. ISBN 978-80-214-4004-3
- [35] HAARMAN, Monique, Jan KNOL. Quantitative real – time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied of Environmental Microbiology*. 2006, 72, s. 2359-2365.
- [36] ROY, D.; SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 191, s. 17-24.
- [37] PORCELLATO, D. et al. Rapid Lactic acid bacteria identification in diary products by high-resolution melt analysis of DGGE bands. *Letters in Applied Microbiology*. 2012, vol 54., s 344-351.
- [38] LIN, X. B., GÄNZLE, M. G. Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, vol. 186, s. 42-48.
- [39] YANG, S. et al.. Rapid Identification of Biothreat and Other Clinically Relevant Bacterial Species by Use of Universal PCR Coupled with High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* vol.47, 2009, 2252-2255
- [40] Real-Time (qPCR) Master Mixy: qPCR 2x SYTO-9 Master Mix. *Top-Bio*. [Online] (c) 2016. [Citace: 2. 3. 2016.] <http://www.top-bio.cz/qpcr-master-mixy-14.html?qpcr-2x-syto-9-master-mix#breadCrumbs>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	adenin
bp	pár bází (base pair)
C	cytosin
CCM	česká sbírka mikroorganismů
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
G	guanin
HRM	High resolution melting (Vysokorozlišovací analýza křivek tání)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEG	polyetylen glykol
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
sp.	druh (species)
T	thymin
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	teplota tání