



# 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

# OPTIMALIZACE IZOLACE DNA JOGURTOVÝCH KULTUR A JEJÍ DETEKCE POMOCÍ RT-PCR

OPTIMIZATION OF DNA ISOLATION FORM YOGURT CULTURES AND THEIR DETECTION BY RT-PCR

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alice Šurková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1242/2017  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Alice Šurková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Optimalizace izolace DNA jogurtových kultur a její detekce pomocí RT-PCR

### Zadání diplomové práce:

Literární rešerše, izolace DNA jogurtových kultur, RT-PCR analýza.

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

-----  
Bc. Alice Šurková  
student(ka)

-----  
doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

V rámci práce byla optimalizována izolace DNA z čistých jogurtových kultur i z jogurtových výrobků. Izolovaná DNA byla následně podrobena analýze pomocí RT-PCR. V první části práce byla vyhodnocena izolace DNA z čistých jogurtových kultur pomocí komerčního kitu jako efektivnější než izolace fenolovou extrakcí a pomocí magnetických mikročástic. K posouzení kvality a kvantity získané DNA bylo použito spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty a qPCR. Pomocí komerčního kitu pak byla získána DNA v kvalitě vhodné pro PCR celkem z deseti čistých jogurtových kultur. V druhé části práce byla provedena izolace bakteriální DNA z jogurtových výrobků pomocí komerčního kitu s předchozím promytím vzorků lyzačním roztokem. Takto byla DNA izolována ze šesti jogurtových výrobků. Dále byly z těchto výrobků zaočkováním do mléka vyrobeny dvě várky domácích jogurtů, z nichž byla izolována DNA stejným způsobem. DNA získaná z jogurtů byla podrobena RT-PCR se šesti dvojicemi primerů (V3\_F a V3\_R, V6\_F a V6\_R, V1\_F a V1\_R, GroHRM\_F a GroHRM\_R, UPF a UPR, P1V1 a P2V1) a s DNA z čistých kultur jako pozitivními kontrolami. Z výsledků byla potvrzena přítomnost deklarovaných kultur v jednotlivých jogurtech a jejich schopnost množit se i po zaočkování do nového média (mléka).

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

PCR, PCR v reálném čase, amplifikace DNA, izolace DNA, jogurtové kultury

## **ABSTRACT**

The thesis has optimized DNA isolation from pure yoghurt cultures and yoghurt products. The isolated DNA was then subjected to RT-PCR analysis. In the first part of the thesis, DNA isolation from pure yoghurt cultures using a commercial kit was evaluated as more effective than isolation by phenol extraction and magnetic microparticles. To assess the quality and quantity of DNA obtained the spectrophotometric determination of concentration and purity and qPCR were used. DNA of a total of ten pure yoghurt cultures in a quality suitable for PCR was obtained using the commercial kit. In the second part of the thesis, bacterial DNA was isolated from yoghurt products using the same commercial kit with a previous sample washing by lysis solution. DNA of six yoghurt products was isolated this way. Furthermore, two packages of homemade yoghurt were made of each product, of which DNA was isolated in the same way. DNA obtained from yoghurts was subjected to RT-PCR using six pairs of primers (V3\_F a V3\_R, V6\_F a V6\_R, V1\_F a V1\_R, GroHRM\_F a GroHRM\_R, UPF a UPR, P1V1 a P2V1) and using the pure cultures DNA as a positive controls. The results confirmed the presence of cultures declared in each yoghurt and their ability to multiply after inoculation into a new medium (milk).

## **KEY WORDS**

PCR, real-time PCR, DNA amplification, DNA isolation, yoghurt cultures

ŠURKOVÁ, A. *Optimalizace izolace DNA jogurtových kultur a její detekce pomocí RT-PCR*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 65 s. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Václav Brázda, 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 studentky

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za odborné vedení, předané vědomosti a zkušenosti, za trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, partnerovi a přátelům za psychickou podporu.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Jogurty.....	9
2.1.1	Technologie výroby jogurtů .....	9
2.1.2	Používané kultury .....	10
2.1.3	Patogenní bakterie v jogurtech .....	10
2.1.4	Probiotické bakterie v jogurtech.....	11
2.1.5	Pozitivní význam probiotik .....	11
2.2	Izolace DNA.....	12
2.2.1	Struktura DNA .....	12
2.2.2	Metody izolace DNA.....	13
2.2.3	Význam izolace DNA .....	13
2.3	Detekce a analýza izolované DNA.....	14
2.4	PCR .....	14
2.4.1	Průběh.....	14
2.4.2	Komponenty .....	16
2.4.3	Provedení.....	17
2.4.4	Detekce produktu .....	17
2.5	RT-PCR.....	17
2.5.1	Průběh a složení směsi .....	17
2.5.2	Kvantifikace .....	18
2.5.3	Detekce produktu .....	19
3	CÍL PRÁCE.....	20
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
4.1	Materiál .....	21
4.1.1	Bakteriální kmeny pro kultivaci a izolaci DNA .....	21
4.1.2	Použité bakteriální kmeny pro izolaci DNA.....	21
4.1.3	Použité jogurtové výrobky .....	21
4.1.4	Chemikálie.....	21
4.1.5	Roztoky .....	22
4.1.6	Komponenty pro kultivační média .....	22
4.1.7	Komerční kit pro izolaci DNA .....	22
4.1.8	Magnetické nosiče .....	22
4.1.9	Komponenty pro PCR .....	22
4.1.10	Přístroje .....	23

4.2	Metody .....	24
4.2.1	Příprava živných médií.....	24
4.2.2	Kultivace bakterií .....	24
4.2.3	Izolace bakteriální DNA komerčním kitem .....	25
4.2.4	Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk .....	25
4.2.5	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk fenolovou extrakcí .....	25
4.2.6	Srážení DNA etanolem.....	25
4.2.7	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročástic.....	25
4.2.8	Výroba domácího jogurtu.....	26
4.2.9	Optimalizace izolace DNA bakteriálních kultur z jogurtových výrobků .....	26
4.2.10	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	27
4.2.11	Ředění DNA .....	27
4.2.12	Konvenční PCR.....	27
4.2.13	RT-PCR .....	29
4.2.14	Agarózová gelová elektroforéza.....	32
5	VÝSLEDKY .....	33
5.1	Izolace DNA čistých kultur .....	33
5.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z čistých kultur.....	33
5.3	Ředění DNA .....	34
5.4	PCR v reálném čase s DNA z čistých kultur.....	35
5.4.1	RT-PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i> .....	35
5.4.2	RT-PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	39
5.5	Konvenční PCR.....	42
5.5.1	Důkaz přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus casei</i> .....	42
5.5.2	Důkaz přítomnosti DNA druhu <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	43
5.5.3	Důkaz přítomnosti DNA druhu <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	44
5.6	Kultivace bakterií .....	45
5.7	Izolace DNA z vypěstovaných kultur.....	45
5.8	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z vypěstovaných kultur .....	45
5.9	Výroba domácího jogurtu.....	46
5.10	Izolace DNA jogurtových výrobků .....	46
5.11	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z jogurtových výrobků .....	46
5.12	RT-PCR s DNA z jogurtových výrobků .....	48
5.12.1	RT-PCR s primery V3_F, V3_R .....	48
5.12.2	RT-PCR s primery GroHRM_F, GroHRM_R .....	50
5.12.3	RT-PCR s primery V6_F, V6_R .....	51
5.12.4	RT-PCR s primery V1_F, V1_R .....	52

5.12.5	RT-PCR s primery P1V1, P2V1.....	53
5.12.6	RT-PCR s primery UPF, UPR.....	54
6	DISKUZE.....	55
6.1	Koncentrace a čistota DNA izolované z čistých kultur.....	55
6.2	PCR v reálném čase s DNA z čistých kultur.....	55
6.2.1	RT-PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i> .....	55
6.2.2	RT-PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	56
6.3	Konvenční PCR.....	57
6.3.1	Důkaz přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus casei</i> .....	57
6.3.2	Důkaz přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	57
6.3.3	Důkaz přítomnosti DNA bakterií druhu <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	57
6.4	Koncentrace a čistota DNA z vypěstovaných kultur.....	57
6.5	Koncentrace a čistota DNA získané z jogurtových výrobků.....	58
6.6	RT-PCR s DNA z jogurtových výrobků.....	58
7	ZÁVĚR.....	61
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	62
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	65

# 1 ÚVOD

Identifikace mikroorganismů pomocí analýzy jejich DNA je čím dál hojněji využívána. Pro svou jednoduchost a dostupnost je používána i v potravinářství, jednak za účelem ověření ne/přítomnosti patogenních mikroorganismů, jednak za účelem ověření přítomnosti žádoucích mikroorganismů. Takovými jsou např. bakterie, kvasinky a plísňe přítomné v biotechnologických produktech. Kromě alkoholických nápojů zajišťují výrobu řady jogurtových výrobků.

Získání DNA z komplexního materiálu, jakým je potravina, je metodicky náročnější, často vyžaduje důkladnější přípravu vzorku, aby byla získána DNA v dostatečné kvalitě a čistotě pro následující analýzy. To však díky moderním postupům, které umožňují získat koncentrovanou a čistou DNA v poměrně krátkém čase, není velký problém. Pro analýzu získané DNA byl velkým přínosem objev polymerázové řetězové reakce (PCR). Metoda, která umožňuje díky namnožení specifického úseku DNA určit doménu, rod i druh mikroorganismu, ze kterého DNA pochází, a to rychle a jednoduše. Její novější modifikace – PCR v reálném čase – pak přinesla další benefity, jako je možnost kvantifikace DNA a zrychlení analýzy díky možnosti detekce produktu již v průběhu reakce, bez nutnosti provádění gelové elektroforézy.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Jogurty

Součástí vyvážené stravy by dle doporučení Společnosti pro výživu měly být i mléčné výrobky, a to především u těhotných žen a malých dětí, ale i u seniorů pro doplnění vápníku [1]. V dnešní době není potřeba se omezovat jen na mléko samotné, ale k dispozici je i řada výrobků vytvořených z mléka biotechnologickými procesy. Takto vzniklé výrobky nejsou jen vhodným zdrojem vápníku, ale i probiotických bakterií podporujících trávení a imunitu.

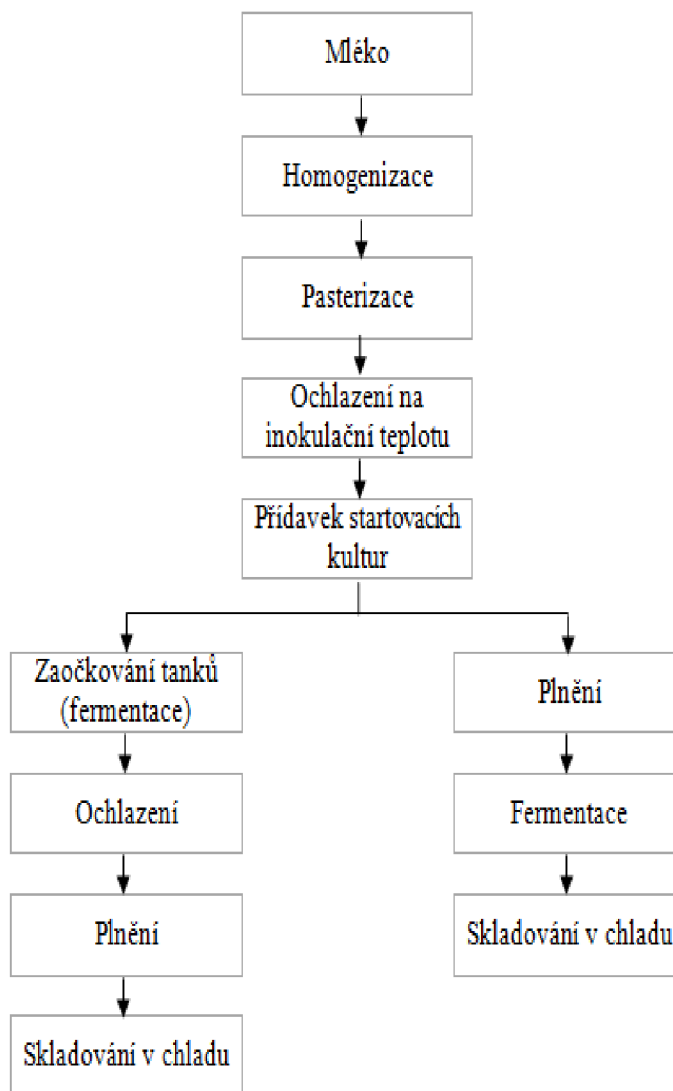
Typickým zástupcem této kategorie výrobků jsou jogurty. Na trhu je jich dostupné velké množství lišící se obsahem tuku, bílkovin, či příchutí. Tento rozmanitý výběr tak uspokojí široké spektrum lidí, ať už zastávajících dietní stravu, či trpících laktózovou intolerancí, jelikož po proběhnutí biotechnologického procesu je laktózy v jogurtech jen velmi málo. Nezbytné pro výrobu jogurtu jsou jogurtové kultury, které kompletně zajišťují přeměnu mléka v jogurt.

#### 2.1.1 Technologie výroby jogurtů

Jogurt je výrobek vzniklý činností bakterií mléčného kvašení v mléce procesem zvaným fermentace. Děj zahrnuje přeměnu mléčného cukru – laktózy na kyselinu mléčnou.

Nejčastěji používaným mlékem pro výrobu jogurtů je mléko kravské, může však být použito i ovčí či kozí. Ne každé mléko je však pro růst bakterií mléčného kvašení vhodné. Negativně v tomto směru působí např. obsah inhibičních látek v mléce, jako jsou antibiotika nebo přítomnosti bakteriofága, mléko od nevhodně krměných dojnic, nakyslé mléko, nebo mléko s nízkým obsahem tukuprosté sušiny [2, 3]. U mléka dochází nejprve ke standardizaci tuku a tukuprosté sušiny. Standardizace obsahu tuku se provádí přidávkem smetany nebo odtučněného mléka tak, aby byl získán produkt o požadovaném obsahu tuku, a to v rozmezí 0,5 – 3,5 %. Minimální povolený obsah tukuprosté sušiny u fermentovaných mlék je 8,2 %, jejího zvýšení lze dosáhnout odpařováním, přidávkem sušeného odtučněného mléka, nebo přidávkem mléčných koncentrátů. Přítomnost tukuprosté sušiny je podstatná pro zajištění přítomnosti bílkoviny kaseinu a bílkovin syrovátky [2, 4].

Před zahájením fermentace je mléko ještě zfiltrováno pro odstranění nerozpustných částic, odzdušněno pro zajištění vhodných podmínek k rychlému započatí růstu buněk



Obrázek 1: Schéma výroby jogurtů, upraveno podle [2]

a homogenizováno pro zdokonalení výsledné textury. Nezbytností je také tepelné ošetření mléka zahřátím na 85 – 85 °C po dobu 30 min v případě vsádkové kultivace, nebo na 90 – 95 °C na 10 min v případně kontinuální kultivace. V některých případech se používá i UHT zářev (Ultra High Temperature), tedy zahřátí na 133 °C na dobu 1 s. Tepelným ošetřením jsou zabity nejen patogenní bakterie v mléce se vyskytující, ale i bakterie, které nejsou patogenní, ale mohly by ovlivnit růst jogurtových kultur. Po tepelném ošetření je mléko ochlazeno na 30 – 45 °C a zaočkováno jogurtovými kulturami [3].

### 2.1.2 Používané kultury

Základními kulturami pro tvorbu jogurtu jsou *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*, které jsou označovány jako tzv. startovací kultury a panuje mezi nimi synergický vztah. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* uvolňuje z mléčných bílkovin aminokyseliny valin, glycin a histidin, které stimulují růst *Streptococcus thermophilus*. Ten naopak produkuje kyselinu mravenčí, která podporuje růst *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Optimální poměr těchto kultur v inokulu je 1 : 1, použité inokulum bývá 2%. Pro inokulaci si výrobci mohou vybrat z kultur tekutých, lyofilizovaných nebo koncentrovaných hluboko zmrazených [2, 3, 5].

Metabolické optimum pro tvorbu kyseliny mléčné je pro *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 45 °C a pro *Streptococcus thermophilus* 39 °C, smíšená kultura těchto mikroorganismů je tedy nejaktivnější při 40 – 42 °C, v tomto rozmezí se proto pohybuje i teplota inkubace. Ta je zahájena, jakmile je inokulum promícháno s kultivačním médiem, tedy mlékem, a to po dobu 3 – 4 h. Během této doby dochází k rychlému množení bakterií a k fermentaci laktosy za vzniku kyseliny mléčné. V průběhu fermentace je důležité kontrolovat teplotu, protože její výše ovlivňuje zastoupení startovacích kultur. Ukončení zrání se provádí rychlým ochlazením na 10 °C, a to po dosažení pH na hodnotu 4,6 – 5. Fermentace probíhá buď ve zracích tancích, odkud je jogurt po ochlazení distribuován do drobných spotřebitelských obalů (kelímek), nebo probíhá přímo v kelímcích, které jsou umístěny ve zracích místnostech se zajištěnou požadovanou teplotou a ve kterých je po přemístění do chladicích komor i skladován. Obrázek 1 ukazuje schématicky jednotlivé kroky výroby jogurtů [3, 6].

Nevýhodou jogurtového výrobku připraveného pomocí bakteriálních kultur *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* je, že pokud není fermentace včas přerušena účinným chlazením, dochází k „překysnutí“ a vzniká až kovová příchut'. Tomuto jevu někteří výrobci zabráňují nahrazením kultury *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* kulturou *Lactobacillus acidophilus*, kdy vzniká jogurt s nižší kyselostí [3].

### 2.1.3 Patogenní bakterie v jogurtech

Mléčné výrobky z mikrobiologického hlediska obecně patří mezi velmi bezpečné. Je to díky tepelnému ošetření mléka před zaočkováním, které vede ke zničení patogenní mikroorganismů. Po proběhnutí fermentace je navíc výrobek chráněn vzniklými organickými kyselinami, které snižují pH, což růst patogenů značně omezuje. Navíc jsou v dnešní době výrobci schopni zajistit aseptické zacházení v průběhu výroby a vzniklé výrobky dostatečně zabezpečit vhodnými obaly. V tomto ohledu příznivě působí i nízká teplota skladování, která růst většiny bakterií znemožňuje [4].

Navzdory tomu se zřídka mohou objevit bakteriální kontaminace. Jednou z bakterií kontaminujících jogurty je *Bacillus cereus*, jež dobře přežívá i nižší teploty a pokud stihne vyklíčit před zvýšením obsahu kyseliny mléčné, způsobí sladké sražení fermentované mléčné směsi, což se projeví nesouvislou sraženinou a chuťovými změnami [3]. Další patogenní bakterii kontaminující jogurty je *Listeria monocytogenes*, která je schopna růst v některých médiích používaných pro přípravu startovacích kultur. Její přežití však závisí na pH, kde platí čím nižší pH, tím nižší šance na přežití. Obecně se její schopnost přežití také snižuje s narůstající délkou skladování [5]. U jogurtů s vysokým počátečním obsahem cukru je riziko kontaminace patogenní bakterií *Staphylococcus*

*aureus*. Ta je schopna při fermentaci inhibovat růst jogurtových kultur a znehodnotit tak výsledný produkt, nepřežívá však následné skladování při nižších teplotách. Mezi další velmi ojediněle se vyskytující bakteriální kontaminanty patří *Escheirchia coli*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica* a *Aeromonas hydrophila* [2].

#### 2.1.4 Probiotické bakterie v jogurtech

Podle světové zdravotnické organizace (WHO) jsou probiotika živé mikroorganismy, které při podání ve vhodném množství přinášejí hostiteli zdravotní výhody. V současné době jsou dokumentovány specifické pozitivní účinky probiotik, např. při zmírňování chronických intestinálních zánětů, při prevenci a léčbě průjmů nebo při léčbě urogenitálních infekcí [4].

I když se v současné době rozšířil sortiment produktů s probiotickými mikroorganismy (sýry, tvarohy, ovocné šťávy, tabletové preparáty, ...), zůstávají fermentované mléčné výrobky nejdůležitějším prostředkem pro přenos probiotických bakterií do zažívacího traktu člověka. K nejčastěji používaným probiotickým bakteriím patří laktobacily *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, a bifidobakterie *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, či *Bifidobacterium longum*. Méně se setkáme se zástupci dalších rodů, jako jsou *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, z nichž nejčastěji zastoupeným je druh *Lactococcus lactis* [3, 4]. Tyto kmeny mají schopnost růst a produkovat organické kyseliny v mléce, mají potenciální pozitivní efekt na organismus člověka a zároveň negativně neovlivňují organoleptické vlastnosti výrobku.

Při tvorbě probiotických výrobků je třeba brát v potaz interakce probiotických kmenů a tradičních kyselinotvorných kultur. Ku příkladu laktobacily přežívají lépe díky vyšší toleranci ke kyslíku a nízkému pH než bifidobakterie. Bifidobakterie produkují až 0,4 g/l kyseliny octové, která negativně ovlivňuje senzorycké vlastnosti finálního produktu. U *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* byly prokázány stimulační účinky na bifidobakterie, a to produkcí aminokyselin valinu, glycinu a histidinu, současně však produkcí kyseliny mléčné a tím způsobeným snižováním pH růst bifidobakterií inhibuje [4]. Růst bifidobakterií však může podporovat i kmen *Lactobacillus acidophilus*, a to tvorbou štěpných produktů bílkovin, které stimulují růst bifidobakterií, takto vznikají tzv. acidofilní mléka [3]. Jelikož probiotické bakterie rostou v mléce hůře, používá se pro jejich aplikaci inokulum o vyšší koncentraci, a to 5 – 10 % [4].

#### 2.1.5 Pozitivní význam probiotik

Již delší dobu je známo, že lidské tělo v žádném případě není mikroorganismů prosté. V orgánech jako jsou střeva nebo ústa se nacházejí miliony bakterií. Ty se značnou měrou podílejí na lidské imunitě. Je-li tělo osídleno jemu vlastními bakteriemi, jako např. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* a mnoho dalších, mají patogenní bakterie (např. *Salmonella*) menší naději takový organismus kolonizovat [7].

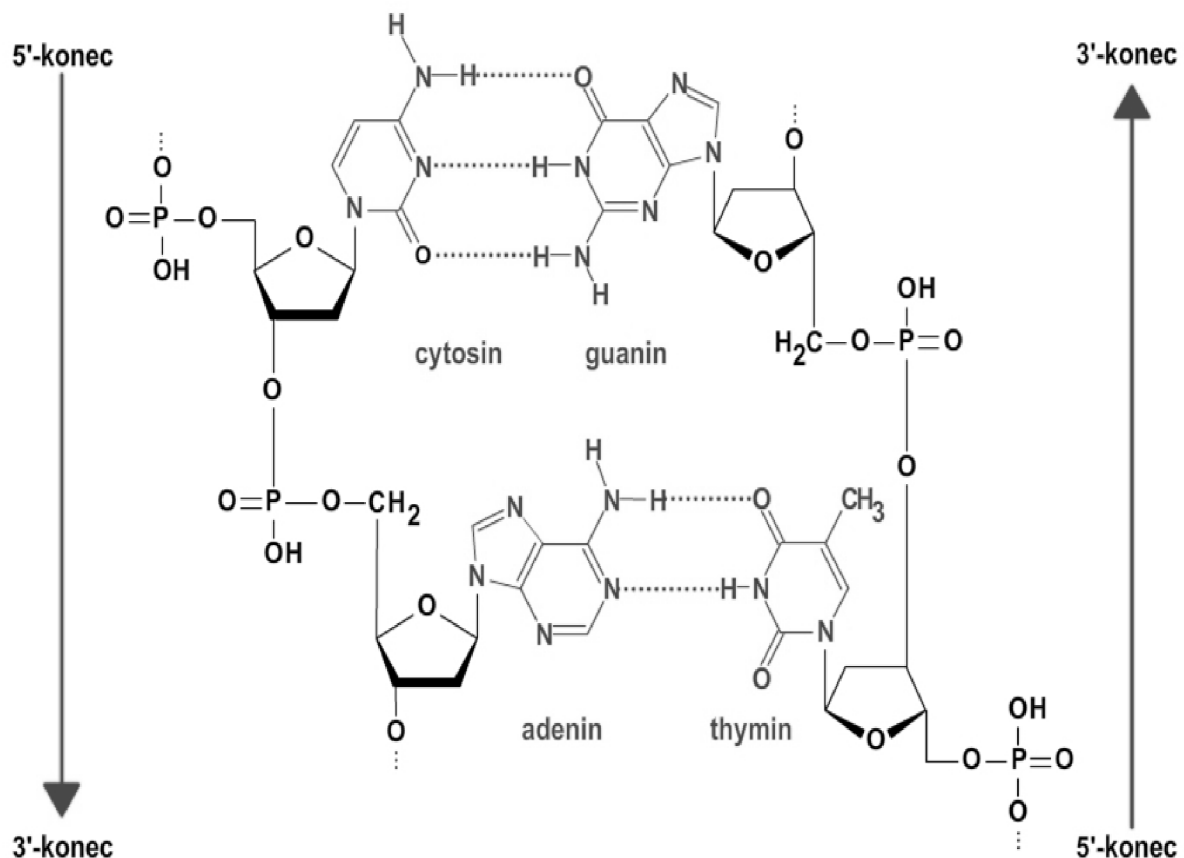
Obdobně důležitá jsou probiotika i pro živočichy, zvláště pak pro ty, jejichž maso či jiné produkty konzumujeme. *Clostridium perfringens* je patogen způsobující ptačí nekrotickou enteritidu drůbeže produkující  $\alpha$ -toxin. Druhy *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus fermentum* jsou schopny inhibovat růst *Clostridia* a také snižovat jeho schopnost produkovat  $\alpha$ -toxin a dokonce tento toxin degradovat [8]. Probiotika také pomáhají u dojných krav ke zvýšení množství získaného mléka a zvýšení obsahu imunoglobulinu G či lysozymu v něm. Zároveň potlačují některé patogenní bakterie, jako *Bacillus cereus* či *Cronobacter sakazakii* [9].

## 2.2 Izolace DNA

Pro identifikaci mikroorganismů pomocí nukleových kyselin je potřeba nejprve extrahovat a purifikovat DNA (případně RNA) z buněk. K tomu je popsáno mnoho postupů, přičemž kvalita a čistota získané DNA ovlivňuje výsledky navazujících postupů [10].

## 2.2.1 Struktura DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) sestává z jednotlivých nukleotidů. Každý nukleotid je tvořen pětiuhlíkatým monosacharidem 2-deoxy-β-D-ribózou, kyselinou fosforečnou a dusíkatou bází. Dusíkatá báze může být purinová (adenin, guanin), nebo pyrimidinová (thymin, cytosin). Připojením dusíkaté báze na C1' deoxyribózy N-glykosidovou vazbou vzniká nukleosid. Purinové báze se vážou prostřednictvím atomu N9, pyrimidinové prostřednictvím N1. Napojením kyseliny fosforečné na C5' deoxyribózy nukleosidu vzniká nukleotid. Nukleotidy jsou vzájemně propojené fosfodiesterovou vazbou vznikající na C5' jednoho nukleotidu a na C3' druhého nukleotidu. Takto je tvořen polynukleotidový řetězec, jenž je na jednom konci tvořen –OH skupinou na C3' (tzv. 3'-konec) a na druhém konci tvořen fosfátovou skupinou na C5' (tzv. 5'-konec). Dva polynukleotidové řetězce jsou vzájemně spojeny vodíkovými můstky, které se tvoří mezi purinovou a pyrimidinovou bází. Báze se spolu párují podle tzv. komplementarity bází, tedy adenin (A) se páruje s thyminem (T) a guanin (G) se páruje s cytosinem (C). Adenin s thyminem jsou spojeny dvěma vodíkovými vazbami, zatímco guanin s cytosinem jsou spojeny třemi. Spárované polynukleotidové řetězce jsou k sobě vždy antiparalelní, tedy jeden leží ve směru 3' – 5', druhý ve směru 5' – 3'. Takto tvořenou dvouvláknovou DNA ukazuje obrázek 2. Spojené antiparalelní řetězce společně vytvářejí pravotočivou dvoušroubovici [11].



Obrázek 2: Struktura DNA

### 2.2.2 Metody izolace DNA

Výběr způsobu získání DNA závisí na materiálu, ze kterého je získávána (jednotlivé prokaryotické nebo eukaryotické buňky, tkáně a orgány, viry, ...) a na jejím následném využití. Existuje mnoho způsobů získávání nukleových kyselin, mají však společné rysy. Vždy je nutné nejprve zpřístupnit DNA ve vstupním materiálu. Je tedy potřeba vyvolat lyzi buněk – rozrušení buněčné stěny a plazmatické membrány. Používá se k ní enzymů (lysozymu, celulasy) a detergentů (SDS), případně mechanického rozrušení. Vzniká tzv. hrubý lyzát, tedy směs zbytků buněčné stěny a plazmatické membrány, proteinů, lipidů, nukleových kyselin a dalších v roztoku [12]. Z hrubého lyzátu lze enzymaticky odstranit RNA působením RNasy a proteiny působením proteinasy K. Odstranění RNA není vždy nutné, pokud je získaná DNA následně použita např. pro PCR, není přítomnost RNA nijak na závadu, jelikož při PCR dojde k amplifikaci pouze specifického úseku DNA. Naproti tomu odstranění proteinů je velmi důležité, jelikož některé proteiny se váží na DNA a mohly by tak omezovat účinnost následujících analýz [10].

K získání DNA z hrubého lyzátu se používá metoda využívající rozdílné rozpustnosti nebo vazba na pevný nosič. První jmenovanou je fenol-chloroformová extrakce. K hrubému lyzátu se přidá směs fenol-chloroform a důkladně promíchá. Proteiny denaturují a vysráží se. Následnou centrifugací dojde k rozdělení vodné a organické fáze, přičemž tuky a proteiny zůstanou rozpuštěné v organické fázi, případně tvoří vrstvu na rozhraní obou fází, zatímco nukleové kyseliny zůstanou ve vodné fázi. Z vodného roztoku se následně DNA sráží etanolem. Fenol-chloroformová extrakce je metoda tradiční, účinná, levná, stále využívaná, nevýhodou je však přítomnost toxických výparů z fenolu a časová náročnost [12].

Novější metodou získání DNA z hrubého lyzátu je adsorpce na silikát. V přítomnosti vysokých koncentrací chaotropních solí se na silikát adsorbuje pouze DNA, ostatní látky hrubého lyzátu zůstanou v roztoku. Po jeho odstranění centrifugací je DNA ze silikátu vyplavena do vhodného pufru. Silikát pro izolaci se používá ve formě silikátových částic nebo membrán tvořených vrstvou silikagelu. Adsorpce DNA na silikát je sice dražší než fenol-chloroformová extrakce, na druhou stranu je to metoda podstatně rychlejší, kterou je možné provádět bez použití toxických rozpouštědel [13].

Další možností izolace DNA je separace pomocí magnetických mikročástic. DNA je navázána na částice s kovovým jádrem tvořeným oxidy železa, na povrchu částic je přírodní nebo syntetický polymer s navázanými funkčními skupinami umožňujícími vazbu DNA. Magnetické mikročástice s navázanou DNA jsou separovány v magnetickém poli, roztok je odstraněn a DNA je z částic eluována do vhodného pufru. Tato metoda izolace je poměrně rychlá a při volbě vhodných magnetických mikročástic i poměrně účinná [14]. Kromě uvedených metod existuje řada dalších postupů izolace DNA, které mohou být specificky zaměřené na plasmidovou DNA, mitochondriální DNA nebo na RNA.

### 2.2.3 Význam izolace DNA

V potravinářství má izolace DNA a její následná analýza velký význam. Kromě identifikace žádoucích či nežádoucích mikroorganismů umožňuje také ověření autenticity potravin a identifikaci GMO. K analýze DNA jsou využívány techniky založené na PCR a jejich modifikacích, hybridizační techniky a sekvenování [15].

Jako příklad lze uvést multiplex PCR, která umožňuje použití více dvojic primerů pro namnožení více specifických úseků DNA v jedné reakci. Využití nachází zejména při hledání patogenů v potravinách [16]. Dalším příkladem je SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), tedy metoda využívající druhově specifických diagnostických primerů k amplifikaci genomové DNA, za účelem rozlišení druhů. To má význam při odhalení falšování potravin, např. granátového jablka [17] nebo šafránu [18]. Další možností odhalení falšování potravin je PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Metoda umožňující enzymatické štěpení

PCR produktů, následně jsou srovnány délky jednotlivých štěpů. V potravinářství byla využita např. k ověření autenticity hovězího, skopového, vepřového, koziho a buvolího masa [19]. Z izolované DNA je možné také odlišit odrůdy rostlin použitých pro výrobu potravin, což nachází uplatnění zejména ve vinařství. To umožňují SSR (Simple Sequence Repeats), tedy krátké tandemově se opakující úseky DNA, které jsou amplifikovány. Následně je detekován polymorfismus délek a počtu repetitiv [20].

### 2.3 Detekce a analýza izolované DNA

Jako nejrychlejší metoda stanovení koncentrace a čistoty je používáno spektrofotometrické stanovení. K ověření intaktnosti DNA bývá využívána gelová elektroforéza. Pro amplifikaci a identifikaci DNA je hojně užívána PCR v různých modifikacích. Své uplatnění při analýze DNA nachází i restriční analýzy, DNA/DNA hybridizace či sekvenování.

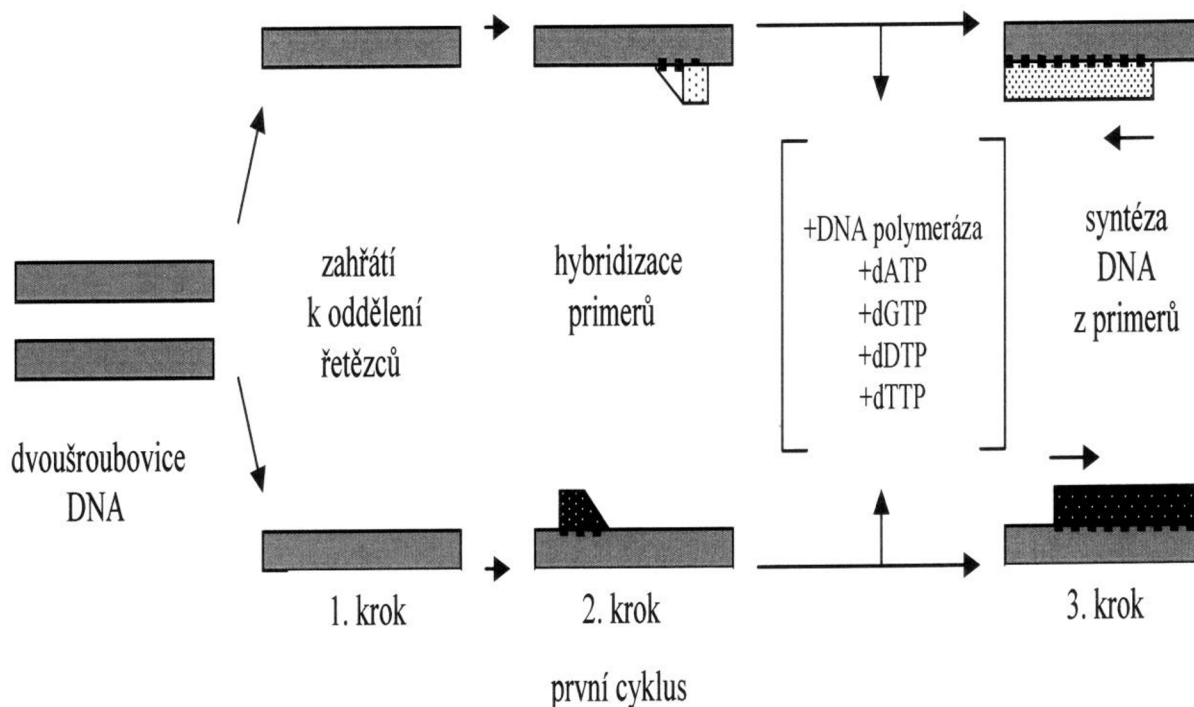
### 2.4 PCR

PCR je metodou molekulární biotechnologie, která slouží ke zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA *in vitro*. Jedná se o enzymovou metodu inspirovanou přirozeným dějem – replikací. Z velmi malého množství DNA určitého organismu, které nejsme schopni detekovat, tak lze získat mnohonásobně větší množství DNA, kterou již bude možné detekovat, a tak z ní získat informace o organismu, případně výrobku, ze kterého pochází.

#### 2.4.1 Průběh

K vybranému úseku komplementárních vláken denaturované molekuly DNA se navazují oligonukleotidy ohraničující požadovaný úsek DNA, od nichž se syntetizuje nový řetězec DNA ve směru 5' – 3'. Celá reakce je katalyzována enzymem DNA polymerázou. Celá reakce probíhá ve třech cyklicky se opakujících krocích, které se navzájem liší dobou trvání a reakční teplotou, jak ukazuje obrázek 3 [12].

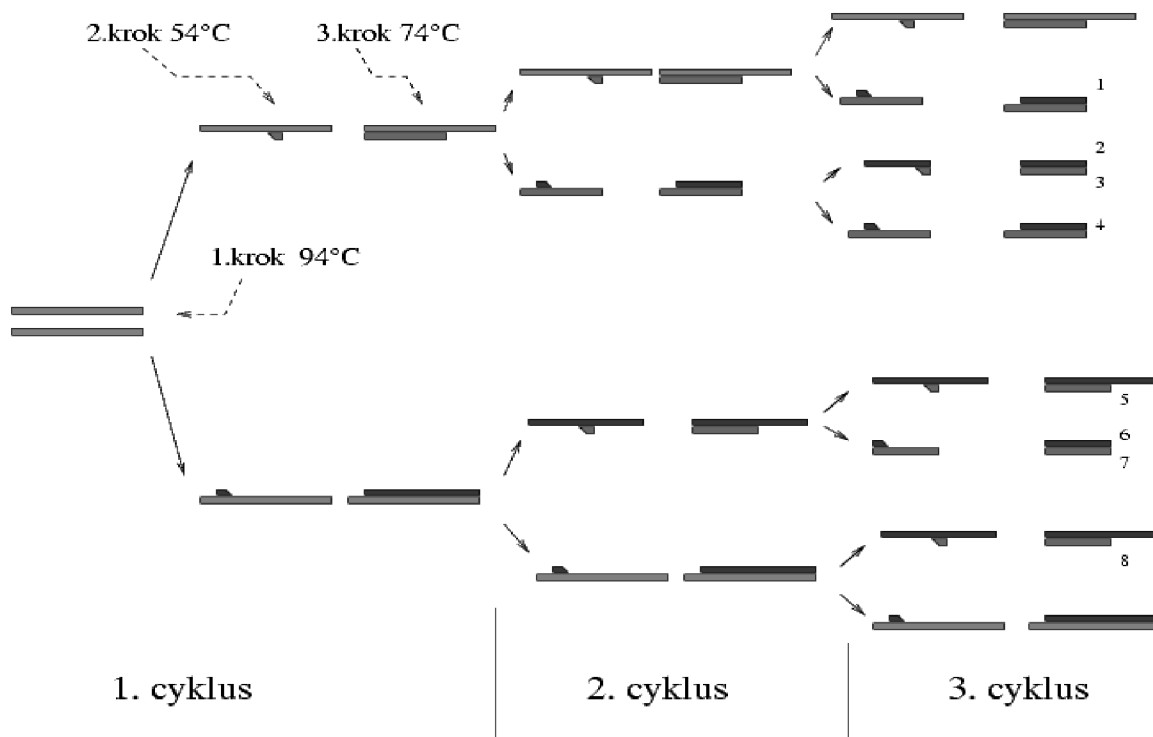
- 1 V prvním kroku dochází k denaturaci. Dvouřetězcová molekula DNA je působením zvýšené teploty rozložena na dvě jednořetězcové molekuly DNA. To je umožněno rozrušením vodíkových vazeb, které za normálních podmínek vážou vlákna molekuly DNA k sobě. Tento krok probíhá při teplotě okolo 95 °C a trvá zhruba 30 s. V prvním cyklu celé reakce je doba trvání tohoto kroku prodloužena na několik minut, za účelem úplné denaturace všech přítomných molekul DNA, v opačném případě by mohlo dojít k jejich rychlé renaturaci, což by zabránilo interakci se specifickými primery [2, 4].
- 2 Následuje připojení primerů, tento krok se nazývá hybridizace. Dva typy krátkých oligonukleotidů, tzv. primery se vážou ke komplementárním úsekům jednořetězcové molekuly DNA. To je umožněno snížením teploty na 50 – 65 °C na dobu 30 – 60 s, přičemž teplota tohoto kroku je velmi specifická, ovlivněná teplotou tání primerů. Při teplotě nižší než optimální může dojít ke spojení i ne zcela komplementárních úseků molekuly DNA s primerem, případně spojení primerů vzájemně, což má za následek vznik nespecifického produktu [3, 4].
- 3 Posledním krokem je prodlužování nového vlákna molekuly DNA ve směru 5' – 3', tzv. elongace. Pro její průběh je nezbytná katalýza termostabilní DNA polymerázou. Teplota tohoto kroku se pohybuje v rozmezí 65 – 75 °C, což je teplotní optimum pro práci termostabilní DNA polymerasy, a trvá 60 – 70 s, přičemž v posledním cyklu celé reakce se tento krok prodlužuje na několik minut, aby došlo k úplnému dosyntetizování nového řetězce molekuly DNA [3, 4].



Obrázek 3: Průběh jednoho cyklu PCR [23]

Celý cyklus se v rámci jedné reakce opakuje zhruba 30krát. Molekuly DNA vznikající v každém cyklu jsou použity jako matrice pro syntézu dalších molekul DNA v následujících cyklech. Množství kopií specifického úseku molekuly DNA, tzv. amplikonů, tedy roste během reakce exponenciálně a můžeme tak získat až  $10^9$  kopií požadovaného úseku DNA. Při větším počtu opakování se již snižuje aktivita DNA polymerázy [21].

Jak je vidět na obrázku 4, DNA polymeráza syntetizuje nová vlákna molekuly DNA od primeru až do konce matricové molekuly DNA, v prvním cyklu tedy vzniknou vlákna DNA z jedné strany ohraničená jedním typem primeru a z druhé strany delší, přesahující rozsah požadovaného úseku DNA. V dalším cyklu poslouží tato vlákna molekuly DNA jako matrice pro syntézu nových vláken, která již budou ohraničena z druhé strany druhým typem primeru a při syntéze komplementárního vlákna k takto ohraničeným úsekům budou již v následujících cyklech vznikat pouze specifické produkty. Rychlost přibývání specifických produktů je v průběhu reakce exponenciální, rychlost přibývání kopií DNA s přesahujícími vlákny je pouze lineární. Po proběhnutí dostatečného množství cyklů je tedy množství nespecifických produktů zcela zanedbatelné, oproti těm specifickým [10, 12].



Obrázek 4: Vznik specifických produktů PCR, upraveno podle [24]

## 2.4.2 Komponenty

Pro správný průběh polymerázové řetězové reakce je nutné, aby reakční směs obsahovala všechny potřebné komponenty.

- PCR voda, která se používá pro doplnění objemu, ve kterém bude reakce probíhat.
- PCR pufr, jehož úlohou je zajistit vhodné prostředí pro DNA polymerázu. Obsahuje především hořčnaté kationty, které tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytváří substrát, který polymeráza rozpozná, čímž zajišťuje udržení její enzymatické aktivity.
- dNTP – směs 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfátů, která obsahuje ekvimolární množství dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Ty slouží jako stavební kameny při syntéze nového řetězce molekuly DNA.
- Primery, tedy dva druhy synteticky připravených oligonukleotidů o délce 18 – 24 nukleotidů, které se komplementárně vážou na sekvence molekuly DNA ohraničující požadovaný úsek k amplifikaci. Primery by zároveň měly obsahovat vyvážený poměr A/T a G/C párů a neměly by být komplementární k sobě navzájem, aby se zamezilo vzniku dimerů.
- DNA polymeráza, která svou enzymatickou činností katalyzuje vznik nového řetězce molekuly DNA ve směru 5' – 3'. Pro svou teplotní stabilitu se používá polymeráza získaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, označovaná jako *Taq* DNA polymeráza. Díky její odolnosti vůči vysokým teplotám je možné polymerázu přidat do směsi pouze na začátku reakce bez obav o její přežití v prvním, nejteplejším kroku každého cyklu. Tím se celá reakce výrazně zjednodušuje, urychluje a omezuje se riziko kontaminace.
- DNA matrice, neboli templát, který slouží jako předloha pro syntézu nových molekul DNA. Obsahuje tedy cílová místa pro primery, přičemž optimální koncentrace této DNA ve vzorku je okolo 10 ng/μl, měla by být dostatečně čistá a neměla by obsahovat PCR inhibitory.

Celkový objem reakční směsi se pohybuje v rozmezí 25 – 30 μl [10, 12, 21, 22].



### 2.4.3 Provedení

PCR se odehrává v přístroji zvaném cykler, který po naprogramování sám střídá dané teploty po zvolenou dobu [21]. Ke správnému provedení PCR je potřeba získat DNA o dostatečné čistotě a koncentraci. Izolace takové DNA se provádí různými způsoby v závislosti na vzorku, ze kterého je získávána (čistě kultury, komplexní výrobky, ...). Koncentrace a čistota takto izolované DNA se ověřuje spektrofotometricky. Po získání DNA o vhodné koncentraci (okolo 10 ng/μl) a čistotě je namíchána směs pro PCR obsahující všechny komponenty uvedené v předchozím oddílu. Volbou vhodných primerů je možné určit specifitu reakce (rodová, druhová, ...) [12].

Současně bývá namíchána i pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrola slouží k ověření správné funkčnosti reakce. Jako DNA matrice se přidá vzorek DNA, u kterého je naprosto jistá její amplifikace. Pokud k amplifikaci dojde a u tohoto vzorku detekujeme produkt, je to důkaz správného namíchání směsi a provedení celé reakce, navíc lze velikost jejich specifických produktů použít pro porovnání s velikostmi produktů ze vzorků. V opačném případě, kdy by u pozitivní kontroly nebyl detekován žádný produkt, došlo pravděpodobně k chybě v průběhu reakce nebo již při přípravě směsi a výsledek celé reakce nelze považovat za důvěryhodný. Negativní kontrola slouží ke kontrole čistoty práce. Na místo DNA matrice se přidává stejné množství PCR vody. U takto připraveného vzorku by tak nemělo dojít k amplifikaci a neměl by být detekován žádný produkt. Pokud by se tak stalo, značí to kontaminaci některé z komponent pro PCR a výsledek celé reakce opět nelze považovat za důvěryhodný [10].

### 2.4.4 Detekce produktu

Produkt konvenční PCR bývá detekován agarózovou gelovou elektroforézou v plošném uspořádání, jelikož velikost produktu PCR se nejčastěji pohybuje v řádu stovek párů bází, v závislosti na použitých primerech. V průběhu elektroforézy záporně nabitě molekuly DNA migrují v elektrickém poli od záporného pólu ke kladnému, přičemž jsou rozděleny podle velikosti. V agarózovém gelu, který funguje jako trojrozměrné síto, doputují nejdále nejkratší z analyzovaných molekul, zatímco ty nejdelsí urazí nejkratší vzdálenost. Pro vizualizaci produktů separovaných podle velikosti se používá interkalační barvivo, nejčastěji ethidium bromidu. Při ozáření UV světlem na transiluminátoru dojde k intenzivnímu fluoreskovaní interkalačního barviva začleněného do dvouvláknové struktury DNA. Produkty PCR jsou srovnány s tzv. DNA standardem, který obsahuje fragmenty DNA o známé velikosti. Srovnáním polohy produktů PCR s polohou těchto fragmentů na gelu se určuje velikost produktů [12]. Nevýhodou detekce produktu pomocí gelové elektroforézy je nízká přesnost a nízká rozlišovací schopnost, jelikož vyhodnocení je provedeno pouze vizuálně, rovněž neumožňuje provedení kvantifikace produktu.

## 2.5 RT-PCR

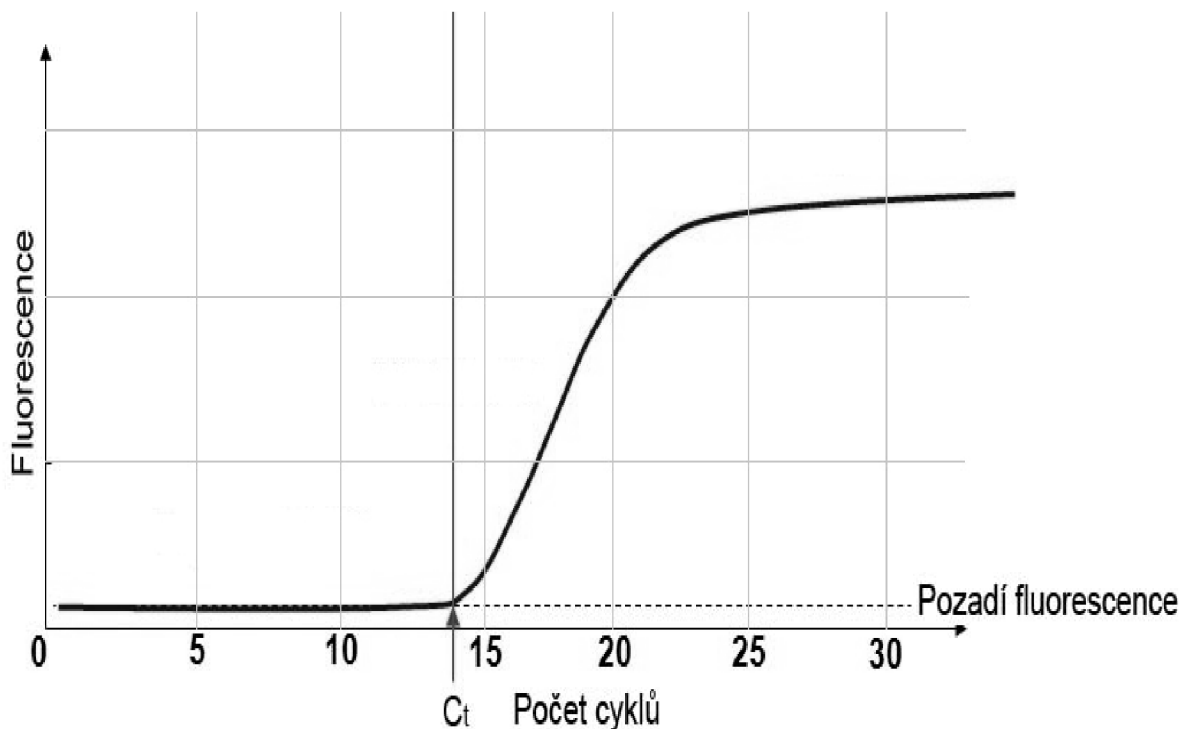
PCR v reálním čase (Real Time PCR) je novější modifikací konvenční PCR, na rozdíl od níž umožňuje detekci produktu již v průběhu reakce a současně je možné díky ní provést kvantifikaci původního množství DNA (proto bývá označována jako qPCR). To vše díky měření fluorescenčního signálu v průběhu reakce.

### 2.5.1 Průběh a složení směsi

PCR v reálním čase probíhá obdobně jako konvenční PCR, tedy ve třech cyklicky se opakujících krocích (denaturace, nasednutí primerů, prodloužení nového řetězce). Současně je na konci každého cyklu měřeno množství fluorescence.

Směs pro PCR v reálním čase je obohacena o fluorescenční molekuly. Nejčastěji se pro svou jednoduchost používají tzv. interkalační fluorescenční barviva, která při navázání na dvouvláknovou DNA vykazují podstatně větší množství fluorescence než samotná [25]. Se stoupajícím množstvím dvouvláknové DNA během reakce tak roste i množství fluorescence. To je zaznamenáváno

v závislosti na počtu proběhnutých cyklů a výsledkem je amplifikační křivka (obrázek 5). Na jejím esovitém tvaru lze rozlišit čtyři části. První se nazývá background, je to část reakce, kde množství DNA a tím pádem i fluorescence bylo tak malé, že se nacházelo pod mezí detekce zařízení. V druhé části nastává fáze exponenciálního růstu, kdy množství fluorescence (tedy i DNA) překročilo mez detekce přístroje a exponenciálně roste, ideálně podle  $2^n$ , kde  $n$  je počet cyklů. Cyklus, ve kterém pro daný vzorek začne být množství fluorescence detekovatelné, se nazývá prahový cyklus, z anglického threshold cycle ( $C_t$ ). Na tuto část navazuje lineární fáze, kdy množství DNA strmě roste, klesá však množství dostupné polymerázy. Reakce je zakončena plató fází, při níž dochází k saturaci systému, množství kopií DNA se nemění a fluorescence zůstává konstantní [25, 26].



Obrázek 5: Amplifikační křivka, upraveno podle [27]

### 2.5.2 Kvantifikace

Určení počáteční koncentrace DNA je umožněno právě stanovením hodnoty prahového cyklu. Platí, že čím vyšší je počáteční koncentrace DNA v reakci, tím dříve je překročen práh detekce pro daný vzorek a tím nižší je hodnota  $C_t$ . Kromě toho je možné stanovit přesné množství DNA matrice, a to metodou absolutní kvantifikace. V takovém případě je reakci podrobena i kalibrační řada vzorků o známé koncentraci. Z lineárního vztahu mezi logaritmem výchozí koncentrace DNA a příslušných  $C_t$  pak lze určit počáteční koncentrace DNA v neznámých vzorcích [28].

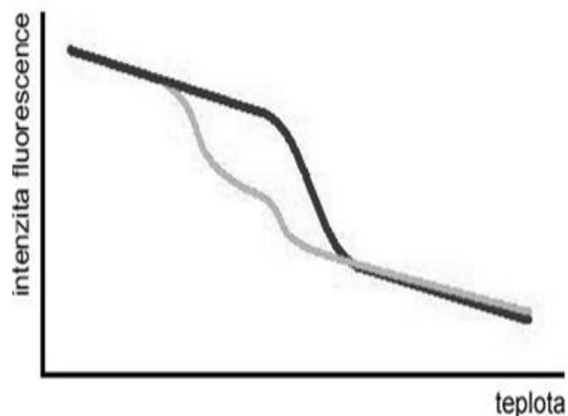
### 2.5.3 Detekce produktu

Produkt RT-PCR je díky použití fluorescenčních barviv detekován již v průběhu samotné reakce měřením fluorescence. Proto je provedení RT-PCR časově méně náročné než konvenční PCR, kdy je potřeba po proběhnutí reakce ještě provádět gelovou elektroforézu. K identifikaci produktů RT-PCR bývá používána melt analýza, tedy analýza křivek tání. Teplota tání ( $T_m$ ) DNA je taková teplota, při které dojde k rozvolnění právě poloviny dvouvláknové DNA na jednovláknovou. Je ovlivněna délkou řetězce, sekvencí a poměrem obsahu bází G-C v DNA. Po skončení reakce se vzorky postupně (s krokem asi  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  za sekundu) zahřívají na teplotu vyšší než je předpokládaná teplota tání produktů.

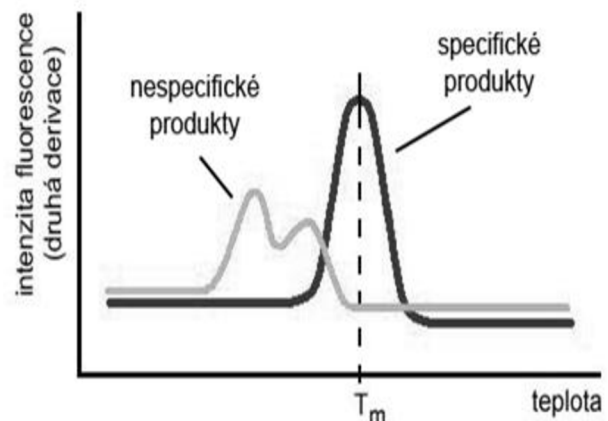
V průběhu je zaznamenávána fluorescence. Při dosažení teploty tání dojde k rozvolnění dvouvláknové DNA a tím k prudkému poklesu vykazované fluorescence. Vynesemím závislosti množství fluorescence na teplotě vzniká křivka tání. Teplota tání DNA je odečtena z inflexního bodu křivky tání, nebo lépe z píku derivované křivky tání (obrázek 6) [25, 28].

Vypělejší variantou analýzy křivek tání je vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRMA – High Resolution Melt Analysis). Liší se použitím plně saturačních barviv, která umožňují označení PCR produktu po celé jeho délce, takže všechny amplifikované oblasti mohou být detekovány. Po proběhnutí PCR se zvyšuje teplota s krokem zhruba 0,01 °C za sekundu, přičemž je vždy zaznamenána fluorescence. Jedná se tedy o metodu citlivější, než je klasická melt analýza [29, 30].

A: KŘIVKA TÁNÍ



B: DERIVACE KŘIVKY TÁNÍ



Obrázek 6: A: křivka tání, B: derivovaná křivka tání [31]

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla optimalizace izolace DNA jogurtových kultur jednak z čistých bakteriálních kultur, jednak z jogurtových výrobků. Pro izolaci DNA z čistých kultur nejprve ze čtyř kultur za použití komerčního kitu, fenolové extrakce a magnetických částic s následným vyhodnocením nejefektivnější metody, která byla následně použita k izolaci DNA z dalších sedmi čistých jogurtových kultur. Pro izolaci z DNA ze šesti jogurtů za pomoci komerčního kitu s různým počtem promytí vzorků před izolací. Optimalizovaný počet promytí vzorků byl použit i pro izolaci DNA z domácích jogurtů vyrobených z původních jogurtů. Dalším cílem práce bylo získanou DNA analyzovat pomocí PCR a PCR v reálném čase, za účelem kvantifikace a zjištění zastoupení kultur v jogurtových výrobcích.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální kmeny pro kultivaci a izolaci DNA

Čisté bakteriální kultury použité pro kultivaci a izolaci DNA byly získány z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR.

- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>
- *Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>
- *Streptococcus thermophilus* CCM 4757
- *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762
- *Bifidobacterium longum* CCM 3764
- *Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup>

#### 4.1.2 Použité bakteriální kmeny pro izolaci DNA

Bakteriální kultury použité pro izolaci DNA byly získány z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR, dodány Ing. Štěpánkou Trachtovou Ph.D.

- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>
- *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>
- *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>
- *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

#### 4.1.3 Použité jogurtové výrobky

- Activia bílá, Danone (Praha, ČR)
- Billa Naše bio bílý jogurt z čerstvého mléka (Říčany u Prahy, ČR)
- Choceňský smetanový jogurt bílý (Choceň, ČR)
- Selský jogurt bílý Hollandia (Karlovy Vary, ČR)
- Jogobella zahradní a lesní jahoda, Zott (Mertingen, Německo)
- Opočenský jogurt bílý, Bohemilk mlékárna Opočno (ČR)

Mléko pro výrobu domácího jogurtu: Tatra plnotučné mléko trvanlivé, Mlékárna Hlinsko (ČR)

#### 4.1.4 Chemikálie

- Agaróza pro gelovou elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard – 100 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Ethanol p. a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Nanášecí pufr Red load (Top-bio, Praha, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol – PEG 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báze (Serva, Heidelberg, SRN)

- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- SDS – dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- Citrát amonný (Lachema, Brno, ČR)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lachema, Brno, ČR)
- Tetrahydrát síranu hořečnatého (Lachema, Brno, ČR)

#### 4.1.5 Roztoky

- Roztok A (10 mM tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8)
- Roztok B (10 mM tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8; 3 mg/ml lysozymu)
- TE pufr (10 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM EDTA PH 8,0; destilovaná voda)
- TBE pufr (54 g Tris-HCl; 27,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 20 ml 0,5M EDTA pH 8,0; doplněno destilovanou vodou na 1 l a před použitím 20krát zředěno)
- Tris-HCl (1M: 12,1 g Tris-báze; doplněno destilovanou vodou na 100 ml, upraveno HCl na pH 7,8)

#### 4.1.6 Komponenty pro kultivační média

- Yeast extract (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Beef extract (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Pepton (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Glukóza (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Cystein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- LabLemco (OXOID CZ, s. r. o. Brno, ČR)
- Laktóza (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### 4.1.7 Komerční kit pro izolaci DNA

Pro izolaci DNA byla použita komerčně dostupná sada UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit, MO Bio Laboratories.

#### 4.1.8 Magnetické nosiče

Magnetické polymerní nosiče byly připraveny Ing. Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Jejich vlastnosti shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1: Vlastnosti použitých magnetických částic

Označení	Polymer	Fe (%hm)	-COOH (mM/g)	Průměr (μm)	PDI
Fkol 77 ox	PGMA	10,0	0,764	2,2	1,09
F79 lysine	-	69,8	-	6,2	1,37

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

#### 4.1.9 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr (Top-Bio, Praha, ČR)

- dNTP směs 10 mM (Top-Bio, Praha, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1 U/μl (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Bacteria*
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus*
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus casei*
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus*
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus plantarum*
- Primery pro RT-PCR:
  - GroHRM\_F a GroHRM\_R
  - P1V1 a P2V1
  - V1\_F a V1\_R
  - V3\_F a V3\_R
  - V6\_F a V6\_R
  - UPF a UPR
- qPCR 2× SYTO-9 Master Mix (2krát koncentrovaný 150mM Tris-HCl pH 8,8; 40mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 400 μM dATP; 400 μM dCTP; 400 μM dGTP; 400 μM dTTP; Taq DNA polymeráza (50 U/ml); monoklonální protilátka anti-Taq; SYTO-9; stabilizátory a aditiva), (Top-Bio, Praha, ČR)
- Mg<sup>2+</sup> (Top-Bio, Praha, ČR)
- Pozitivní kontroly (kmeny získané z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR, z nichž byla izolovaná DNA koncentrace 10 ng/μl dodána Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D.)
  - *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>
  - *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>
  - *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>
  - *Lactobacillus gasseri* RL22P

#### 4.1.10 Přístroje

- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL (Varšava, Polsko)
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Washington, USA)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Exikátor (KIF LAB)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer<sup>TM</sup>, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Transilluminátor TVR – 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Thermocycler Minicycler<sup>TM</sup> (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA, UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Špičky pro mikropipety z umělé hmoty
- Laboratorní sklo
- Očkovací box Fatran L-F
- Minicentrifuga SPECTAFUGE MINI
- Další běžné laboratorní vybavení (buničina, pinzeta, ochranné rukavice, ...)
- Výrobek jogurtů Guzzanti GZ 700 (Privest, Praha, ČR)

## 4.2 Metody

Následující postupy práce byly s úpravami převzaty ze skript k laboratornímu cvičení [12].

### 4.2.1 Příprava živných médií

- Byla připravena tekutá média MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) a YGLPB (Yeast, Glucose, Lactose, Peptone, Broth) navážením jednotlivých složek a doplněním vodou podle tabulky 2.
- Část MRS média byla odlita a byl do něj přidán cystein na výslednou koncentraci 0,5 g/l.
- Složení médií bylo převzato z České sbírky mikroorganismů.
- Z polovičního množství každého ze tří médií bylo přidavkem 15 g/l agaru připraveno tuhé médium.
- Všechna média byla sterilována při 115 °C po dobu 20 min.

Tabulka 2: Složení živných médií

MRS médium		YGLPB médium	
Složka	Množství	Složka	Množství
Yeast extract	5 g/l	Pepton	10 g/l
Beef extract	10 g/l	LabLemco	8 g/l
Pepton	10 g/l	Yeast extract	3 g/l
Glukóza	20 g/l	Glukóza	5 g/l
Tween 80	5 ml/l	Laktóza	5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g/l
Octan sodný	5 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g/l
Citrát amonný	2 g/l	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l	MgSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05 g/l	Destilovaná voda	500 ml
Destilovaná voda	500 ml		

### 4.2.2 Kultivace bakterií

Tabulka 3: Použitá média, způsob a doba kultivace bakterií

Kmen	Médium	Kultivace	Čas
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CCM 7190 <sup>T</sup>	MRS	aerobně	1 den
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 <sup>T</sup>	MRS	aerobně	1 den
<i>Lactococcus lactis</i> CCM 1877 <sup>T</sup>	MRS	aerobně	1 den
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCM 4757	YGLPB	aerobně	2 dny
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CCM 3762	MRS + cys	anaerobně	3 dny
<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 3764	MRS + cys	anaerobně	3 dny
<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 <sup>T</sup>	MRS + cys	anaerobně	3 dny



- Média použitá pro jednotlivé kultury, způsob a dobu kultivace ukazuje tabulka 3, dle doporučení České sbírky mikroorganismů, Brno.
- Z každého kmene byl vytvořen jeden křížový roztěr na pevné médium a jedno zaočkování do tekutého média.
- Z kultur narostlých na pevném médiu bylo znovu provedeno zaočkování do tekutého média.
- Všechny kultury narostlé v tekutém médiu byly centrifugovány 1800 ot.min<sup>-1</sup>, supernatant slit a kultury zamrazeny na -80 °C.

#### 4.2.3 Izolace bakteriální DNA komerčním kitem

Byl použit komerčně dostupný kit pro izolaci bakteriální DNA UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit, MO Bio Laboratories podle přiloženého návodu.

#### 4.2.4 Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk

- 1 ml každé kultury z tekutého média byl napipetován do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky.
- Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 3 minut při 10 000 ot./min.
- Supernatant byl opatrně a důkladně slit.
- Sediment byl rozsuspendován v 1 ml roztoku A.
- Vzorky byly centrifugovány po dobu 3 min při 15 000 ot./min, supernatant byl slit.
- Sediment byl rozsuspendován v 500 µl roztoku B.
- Takto vzniklý roztok byl hodinu inkubován při laboratorní teplotě.
- Po inkubaci bylo k roztoku přidáno 25 µl 20% SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml).
- Vše bylo důkladně promícháno a přes noc inkubováno při 55 °C.

#### 4.2.5 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk fenolovou extrakcí

- K 500 µl hrubého lyzátu každé z kultur byl přidán stejný objem fenolu.
- Roztoky byly kývavým pohybem promíchávány po dobu 4 min.
- Následně byly směsi centrifugovány při 15 000 ot./min po dobu 3 min.
- Do čistých Eppendorfových zkumavek byla odebrána vodná fáze.
- K vodné fázi bylo přidáno 700 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24 : 1.
- Směsi byly kývavým pohybem promíchávány po dobu 4 min.
- Následně byly centrifugovány 3 min při 10 000 ot./min.
- Do čistých Eppendorfových zkumavek byly odebrány vodné fáze.

#### 4.2.6 Srážení DNA etanolem

- Ke vzorkům DNA byla přidána 1/20 jejich objemu octanu sodného a směsi byly promíchány.
- Následně bylo přidáno 750 µl 96% etanolu a směsi byly opět promíchány.
- DNA byla ponechána ke srážení po dobu 15 min při -20 °C.
- Vzorky byly centrifugovány po dobu 15 min při 10 000 ot./min.
- Supernatant byl slit a sediment usušen v exsikátoru.
- Vysrážená DNA byla přes noc rozpuštěna ve 100 µl TE pufru.

#### 4.2.7 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročástic

- Směs pro izolaci DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročástic byla namíchána podle tabulky 4.
- Výsledná koncentrace PEG 6000 byla 16%, výsledná koncentrace NaCl 2M.
- Po smíchání všech složek v Eppendorfově zkumavce byla směs po dobu 10 min inkubována při laboratorní teplotě.
- Poté byla krátce stočena na minicentrifuze a umístěna do magnetického separátoru na dobu 5 min.

- Následně byl odebrán supernatant a vzorek byl promyt 1000  $\mu$ l 70% etanolu, promíchán a opět umístěn na magnetický separátor.
- Po odseparování částic byl etanol odebrán a vzorek ještě jednou promyt 500  $\mu$ l 70% etanolu.
- Zbylý etanol byl odpařen volně na vzduchu.
- Získaná DNA adsorbovaná na magnetické nosiče byla eluována do 50  $\mu$ l TE pufru.
- Po třech dnech byl eluát obsahující DNA odebrán do nových Eppendorfových zkumavek.

Tabulka 4: Složení směsi pro izolaci DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických nosičů

Krok	Složka	Objem [ $\mu$ l]
1	NaCl 5 M	400
2	DNA (hrubý lyzát)	100
3	PEG 600 40%	100
4	Magnetické částice 2 mg/ml	400

#### 4.2.8 Výroba domácího jogurtu

- Do 150 ml plnotučného mléka ošetřeného UHT záhřevem bylo zaočkováno 15 g jogurtového výrobku.
- Z každého výrobku byl vytvořen jeden domácí jogurt
- Po promíchání byla směs kultivována v jogurtovači Guzzanti po dobu 8 hodin.
- Po skončení kultivace byly vytvořené jogurty skladovány při 4 °C.
- Z každého z takto vyrobených domácích jogurtů (dále označovaných jako první várka) byl následně stejným způsobem vytvořen druhý domácí jogurt (druhá várka).

#### 4.2.9 Optimalizace izolace DNA bakteriálních kultur z jogurtových výrobků

##### 4.2.9.1 Bez promytí

- Z každého jogurtového výrobku byl dvakrát odebrán 1 g výrobku do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- Následně byl použit komerčně dostupný kit pro izolaci bakteriální DNA UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit, MO Bio Laboratories podle příloženého návodu.

##### 4.2.9.2 Promytí 3krát

- Z každého jogurtového výrobku byl dvakrát odebrán 1 g výrobku do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- Ke každému vzorku bylo přidáno 500  $\mu$ l roztoku A a řádně promícháno.
- Směsi byly centrifugovány při 14 000 ot./min po dobu 5 minut.
- Supernatant byl slit a ke každému vzorku bylo přidáno dalších 500  $\mu$ l lyzačního roztoku a řádně promícháno.
- Směsi byly opět centrifugovány při 14 000 ot./min po dobu 5 minut, supernatant byl slit.
- Promytí pak bylo ještě jednou zopakováno (celkem bylo promyto 3krát).
- Následně byla DNA izolována komerčním kitem UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio Laboratories) podle příslušného návodu.

##### 4.2.9.3 Promytí 7krát

- Z každého jogurtového výrobku byl dvakrát odebrán 1 g výrobku do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- Ke každému vzorku bylo přidáno 500  $\mu$ l roztoku A a řádně promícháno.

- Směsi byly centrifugovány při 14 000 ot./min po dobu 5 minut.
- Supernatant byl slit a ke každému vzorku bylo přidáno dalších 500  $\mu$ l lyzačního roztoku a řádně promícháno.
- Směsi byly opět centrifugovány při 14 000 ot./min po dobu 5 minut, supernatant byl slit.
- Promytí pak bylo ještě pětkrát zopakováno, vždy s důrazem na řádné odstranění supernatantu, dokud ve zkumavce nezůstaly jen na pohled čisté buňky.
- Následně byla DNA izolována komerčním kitem UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio Laboratories) podle příslušného návodu.

#### 4.2.10 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- Roztoky DNA o objemu 2  $\mu$ l byly nanесeny na čočku spektrofotometru NanoDrop 2000.
- Absorbance byla měřena v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm proti TE pufru (v případě DNA izolované komerčním kitem proti roztoku, do kterého se DNA eluuje v posledním korku).
- Z hodnoty absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace vzorku DNA.
- Z hodnoty  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  a  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  byla stanovena čistota vzorku DNA.

#### 4.2.11 Ředění DNA

- Vzorky byly ředěny TE pufrém na koncentraci DNA vhodnou pro PCR, tedy zhruba 10 ng/ $\mu$ l.
- Vzorky izolované fenolovou extrakcí byly zředěny i na 100 ng/ $\mu$ l a 1 ng/ $\mu$ l.

#### 4.2.12 Konvenční PCR

- Všechny komponenty pro PCR byly rozmrazeny, protřepány a krátce stočeny na minicentrifuze.
- Při přípravě jednotlivých směsí pro PCR byly použity primery specifické pro druh *Lactobacillus plantarum* (R plant, F plant) [32], pro druh *Lactobacillus rhamnosus* (Pr I, Rha II) [33] a pro druh *Lactobacillus casei* (F Casei, R Casei) [32]. Tabulka 5 ukazuje jejich sekvence.
- Dále byl z jednotlivých komponent kromě DNA matrice připraven master mix, který byl následně rozpipetován do jednotlivých zkumavek tak, že každá obsahovala určité objemy příslušné složky, tak jak ukazuje tabulka 6.
- Výsledný objem v jedné zkumavce byl 25  $\mu$ l.
- Jako DNA matrice byla použita DNA jednotlivých vzorků upravená na výslednou koncentraci zhruba 10 ng/ $\mu$ l a byla do směsi přidána jako poslední.
- Obdobným způsobem byla připravena pozitivní kontrola, sloužící ke kontrole preciznosti práce. Matrici DNA zde představovala DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l izolovaná ze sbírkových kmenů, dodána Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D. Pro PCR specifickou pro druh *Lactobacillus plantarum* se jednalo o kulturu *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, pro druh *Lactobacillus casei* se jednalo o kulturu *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup> a pro druh *Lactobacillus rhamnosus* se jednalo o kulturu *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>.
- Obdobně byla připravena i negativní kontrola, sloužící ke kontrole kontaminace komponent, kde matrice DNA byla nahrazena stejným množstvím PCR vody.
- Takto připravené PCR směsi byly promíchány, krátce stočeny na minicentrifuze a vloženy do cyklu.
- Na cyklu byl spuštěn příslušný program pro PCR podle tabulky 7.

Tabulka 5: Sekvence specifických primerů

Druh	Primery	Sekvence primeru (5' – 3')	Velikost produktů
<i>Lactobacillus plantarum</i>	R plant	TGT TCT CGG TTT CAT TAT GAA AAA ATA	144 bp
	F plant	TGG ATC ACC TCC TTT CTA AGG AAT	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Pr I	CAGACTGAAAGTCTGACGG	400, 200 bp
	Rha II	GCGATGCGAATTTCTATTATT	
<i>Lactobacillus casei</i>	F Casei	CTA TAA GTA AGC TTT GAT CCG GAG ATT T	132 bp
	R Casei	CTT CCT GCG GGT ACT GAG ATG T	

Tabulka 6: Složení směsi pro konvenční PCR

Krok	Složka	Objem [μl]		
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
1	PCR voda	19	19	15,5
2	Reakční pufr	2,5	2,5	2,5
3	dNTP směs 10 mM	0,5	0,5	1
4	Mg <sup>2+</sup>	-	-	2
5	Primer 1 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	1
6	Primer 2 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	1
7	Taq DNA polymeráza 1 U/μl	1	1	1
8	DNA matrice (10 ng/μl)	1	1	1
	<b>Celkem</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

Tabulka 7: Specifické amplifikační programy pro PCR

Krok	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<b>1. Prodloužená denaturace DNA</b>	95 °C/5 min	95 °C/5 min	95 °C/5 min
<b>2. Denaturace DNA</b>	95 °C/30 s	95 °C/30 s	95 °C/30 s
<b>3. Hybridizace primerů</b>	55 °C/30 s	55 °C/30 s	58 °C/30 s
<b>4. Syntéza nových řetězců DNA</b>	72 °C/60 s	72 °C/60 s	72 °C/60 s
<b>5. Dosyntetizování DNA</b>	72 °C/5 min	72 °C/5 min	72 °C/5 min
<b>Počet cyklů (krok 2 – 4)</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

#### 4.2.13 RT-PCR

- Všechny komponenty pro PCR byly rozmrazeny, protřepány a krátce stočeny na minicentrifuze.
- Z jednotlivých komponent pro PCR kromě DNA matrice byl v očkovacím boxu připraven master mix, který po rozpipetování do jednotlivých zkumavek obsahoval objemy jednotlivých složek, které ukazuje tabulka 8. Výsledný objem v každé zkumavce byl 25  $\mu$ l.

Tabulka 8: Složení směsi pro RT-PCR

Krok	Složka	Objem [ $\mu$ l]
1	SYTO-9	12,5
2	PCR voda	9,5
3	Primer 1 (10 pmol/ $\mu$ l)	1
4	Primer 2 (10 pmol/ $\mu$ l)	1
5	DNA matrice (10 ng/ $\mu$ l)	1
<b>Celkem</b>		<b>25</b>

- Jako DNA matrice byla použita DNA jednotlivých vzorků upravená na výslednou koncentraci 10 ng/ $\mu$ l a byla do směsi přidána jako poslední.
- Stejným způsobem byla připravena pozitivní kontrola, sloužící ke kontrole preciznosti práce.
- Obdobně byla připravena i negativní kontrola, sloužící ke kontrole kontaminace komponent, kde matrice DNA byla nahrazena stejným množstvím PCR vody.
- Takto připravené PCR směsi byly promíchány, krátce stočeny na minicentrifuze a vloženy do cyklu.
- Na cyklu byl spuštěn příslušný program pro RT-PCR.
- Po proběhnutí PCR byly vzorky na tomtéž přístroji podrobeny melt analýze.

##### 4.2.13.1 S DNA z čistých kultur

- Při přípravě jednotlivých směsí pro PCR byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F\_eub, R\_eub) [32], pro rod *Lactobacillus* (F\_allact, R\_allact) [32]. Sekvence primerů ukazuje tabulka 9.

Tabulka 9: Sekvence primerů pro RT-PCR s DNA z čistých kultur

	Primery	Sekvence primeru (5' – 3')	Velikost produktů
<b>Doména <i>Bacteria</i></b>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
<b>Rod <i>Lactobacillus</i></b>	F_allact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp
	R_allact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	

- Matrici DNA představovala DNA izolovaná z čistých kultur *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757.
- Matrici DNA pro pozitivní kontrolu představovala DNA o koncentraci 10 ng/μl izolovaná ze sbírkových kmenů, dodána Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D. Pro PCR specifickou pro rod *Lactobacillus* se jednalo o kulturu *Lactobacillus gasseri* RL22P.
- Z DNA kultury *Escherichia coli* (Sigma Aldrich) byla desítkovým ředěním připravena kalibrační řada v rozsahu 0,01 – 100 ng/μl, ze které byly vytvořeny směsi pro PCR, jež zároveň sloužily i jako pozitivní kontroly pro RT-PCR pro doménu *Bacteria*.
- Program pro RT-PCR s příslušnými primery byl spuštěn podle tabulky 10.

Tabulka 10: Programy pro RT-PCR s DNA z čistých kultur

Krok	Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i>
<b>1. Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu</b>	95 °C/5 min	95 °C/5 min
<b>2. Denaturace DNA</b>	95 °C/30 s	95 °C/30 s
<b>3. Hybridizace primerů</b>	55 °C/30 s	55 °C/30 s
<b>4. Syntéza nových řetězců DNA</b>	72 °C/30 s	72 °C/120 s
<b>5. Dosyntetizování DNA v posledním cyklu</b>	72 °C/5 min	72 °C/5 min
<b>Počet cyklů (krok 2 – 4)</b>	<b>30</b>	<b>35</b>
<b>6. Melt analýza</b>	50 °C/90 s 50 – 99 °C, po 1 °C/5 s	50 °C/90 s 50 – 99 °C, po 1 °C/5 s

#### 4.2.13.2 S DNA z jogurtových výrobků

- Sekvence použitých primerů ukazuje tabulka 11.
- Matrici DNA představovala DNA izolovaná z jogurtových výrobků.
- Matrici DNA pro pozitivní kontroly představovala DNA izolovaná z kmenů *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>, *Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium longum* CCM 3764, *Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup>.
- Program pro RT-PCR s příslušnými primery byl spuštěn podle tabulky 12.

Tabulka 11: Primery použité pro RT-PCR s DNA z jogurtových výrobků

Dvojice primerů	Sekvence primerů (5' – 3')	Citace
GroHRM_F	GTTTGATCGCGGCTATCTGA	[34]
GroHRM_R	CCTTGTTGMACGATTTCTTG	
P1V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC	[35]
P2V1	TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC	
V1_F	GYGGCGNACGGGTGAGTAA	[36]
V1_R	TTACCCCACTACTAGC	
V3_F	CCAGACTCCTACGGGAGGCAG	[36]
V3_R	CGTATTACCGCGGCTGCTG	
V6_F	GGAGCATGTGGTTTAATTCGA	[36]
V6_R	AGCTGACGACANCCATGCA	
UPF	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	[37]
UPR	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

Tabulka 12: Programy pro RT-PCR s DNA z jogurtových výrobků

Krok	Primery			
	GroHRM_F, R	P1V1, P2V1	V1_F, R V3_F, R V6_F, R	UPF, UPR
<b>1. Prodloužená denaturace DNA</b>	98 °C/1 min	95 °C/5 min	95 °C/5 min	95 °C/5 min
<b>2. Denaturace DNA</b>	95 °C/30 s	95 °C/30 s	95 °C/30 s	95 °C/10 s
<b>3. Hybridizace primerů</b>	59 °C/45 s	53 °C/30 s	60 °C/60 s	60 °C/30 s
<b>4. Syntéza nových řetězců DNA</b>	72 °C/45 s	72 °C/60 s	72 °C/ 60s	72 °C/ 10s
<b>5. Dosyntetizování DNA</b>	65 °C/5 min	72 °C/5 min	95 °C/30 s 28 °C/30 s 72 °C/5 min	72 °C/5 min
<b>Počet cyklů (krok 2 – 4)</b>	<b>45</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>45</b>
<b>6. Melt analýza</b>	50 °C/90 s	50 °C/90 s	50 °C/90 s	50 °C/90 s
	50 – 99 °C, po 0,5 °C/5 s	50 – 99 °C, po 0,5 °C/5 s	50 – 99 °C, po 0,5 °C/5 s	50 – 99 °C, po 0,5 °C/5 s

#### 4.2.14 Agarózová gelová elektroforéza

- Pro vyhodnocení produktu amplifikace byl namíchán 1,8% agarózový gel z 1,8 g agarózy a 100 ml  $0,5 \times$  TBE pufru. Roztok byl za občasného míchání nechán pětkrát přejít varem v mikrovlnné troubě.
- Poté byl roztok nalit do připravené formy a ponechán jednu hodinu tuhnout.
- Mezi tím bylo do vzorků amplifikované DNA přidáno 5  $\mu$ l nanášecího pufru Red load.
- Po zatuhnutí roztoku na gel byl vyjmut hřebínek a do vzniklých komůrek bylo pipetováno 20  $\mu$ l vzorku.
- Do jedné komůrky byl nanesen standard (100 bp) o objemu 5  $\mu$ l, dle doporučení výrobce.
- Takto připravený gel byl vložen do elektroforetické vany a přelit  $0,5 \times$  TBE pufrem zhruba 1 cm nad gel.
- Vana byla připojena ke zdroji napětí 80 V po dobu 2 hodin.
- Po ukončení elektroforézy byl gel přemístěn na 20 minut do roztoku ethidiumbromidu.
- Obarvený gel byl umístěn na transiluminátor a ozářen UV světlem o vlnové délce 305 nm.
- V tomto stavu byl gel fotograficky zdokumentován a vyhodnocen.



## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Izolace DNA čistých kultur

Z 1 ml každé z kultur *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 v tekutém médiu byl vytvořen hrubý lyzát podle bodu 4.2.4. Z každého lyzátu byla DNA izolována fenolovou extrakcí s následným srážením DNA etanolem (podle bodů 4.2.5 a 4.2.6) a pomocí magnetických částic Fkol 77 ox a F79 lysine (podle bodu 4.2.7). Z dalšího 1 ml každé z uvedených kultur byla izolována DNA pomocí komerčního kitu (bod 4.2.3) vždy ve dvou paralelách.

### 5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z čistých kultur

Podle bodu 4.2.10 byla pomocí přístroje NanoDrop 2000 v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm změřena absorbance vzorků DNA čistých kultur získané dle předchozího odstavce. Výsledky shrnuje tabulka 13. Jelikož při každém způsobu izolace bylo použito odlišné množství kultury, popř. hrubého lyzátu, ukazuje zmíněná tabulka i koncentraci DNA přepočtenou na 1 ml původní kultury a na eluci získané DNA do 50  $\mu$ l TE pufru, popř. roztoku, do kterého se DNA eluuje v posledním korku izolace komerčním kitem. Příslušné výpočty byly následující:

#### *DNA izolovaná pomocí komerčního kitu*

Výchozím objemem byl 1 ml kultury, DNA byla eluována do 50  $\mu$ l roztoku, proto:

$$c = c_s,$$

kde  $c_s$  – koncentrace stanovená spektrofotometricky a  $c$  – koncentrace přepočtená na 1 ml kultury a 50  $\mu$ l elučního roztoku.

#### *DNA izolovaná z hrubého lyzátu pomocí fenolové extrakce*

Bylo použito celých 500  $\mu$ l hrubého lyzátu získaného z 1 ml kultury, DNA byla eluována do 100  $\mu$ l TE pufru, proto:

$$c = 2 \cdot c_s$$

#### *DNA izolovaná z hrubého lyzátu pomocí magnetických částic*

Bylo použito 100  $\mu$ l hrubého lyzátu z 500  $\mu$ l získaných z 1 ml kultury, DNA byla eluována do 50  $\mu$ l TE pufru, proto:

$$c = 5 \cdot c_s$$

Tabulka 13: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA získané z čistých kultur

Způsob izolace	Druh	$c_s$ [ng/μl]	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	$c$ [ng/μl]
<b>Částice Fkol 77 ox</b>	<i>L. plantarum</i>	154,4	1,70	0,78	772,0
	<i>L. rhamnosus</i>	25,7	1,62	0,19	128,5
	<i>L. casei</i>	25,6	1,28	0,47	128,0
	<i>S. thermophilus</i>	124,6	1,82	0,92	623,0
<b>Částice F79 lysine</b>	<i>L. plantarum</i>	31,3	1,48	0,23	156,5
	<i>L. rhamnosus</i>	65,9	1,35	1,38	329,5
	<i>L. casei</i>	186,6	1,39	0,48	933,0
	<i>S. thermophilus</i>	131,8	1,79	0,84	659,0
<b>Komerční kit</b>	<i>L. plantarum</i> 1	10,9	1,80	0,19	10,9
	<i>L. plantarum</i> 2	9,2	1,72	0,42	9,2
	<i>L. rhamnosus</i> 1	30,9	1,57	0,20	30,9
	<i>L. rhamnosus</i> 2	31,0	1,66	0,17	31,0
	<i>L. casei</i> 1	11,1	1,45	0,41	11,1
	<i>L. casei</i> 2	12,8	1,64	0,20	12,8
	<i>S. thermophilus</i> 1	5,4	1,94	0,89	5,4
	<i>S. thermophilus</i> 2	10,0	1,86	0,39	10,0
<b>Fenolová extrakce</b>	<i>L. plantarum</i>	422,0	2,02	1,91	844,0
	<i>L. rhamnosus</i>	365,6	1,79	1,80	731,2
	<i>L. casei</i>	225,6	1,68	1,64	451,2
	<i>S. thermophilus</i>	560,6	1,87	1,94	1121,2

$c_s$  – koncentrace stanovená spektrofotometricky

$c$  – koncentrace přepočtená na 1 ml kultury

Byla získána DNA různých koncentrací a různé čistoty v závislosti na použité metodě izolace. Nejvyšší koncentrace i čistotu vykazovaly vzorky získané fenolovou extrakcí, u nichž se koncentrace pohybovaly v řádu stovek až tisíce ng/μl DNA z 1 ml kultury eluované do 50 μl roztoku. Poměry absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{230}$  se pohybovaly kolem optimálních hodnot, tedy 1,8 a 2,0. Dle hodnot těchto poměrů byla nejméně čistá DNA izolována pomocí magnetických částic. Nejnižší koncentrace izolované DNA bylo dosaženo izolací pomocí komerčního kitu. Získaná DNA je v kvalitě vhodné pro použití pro PCR.

### 5.3 Ředění DNA

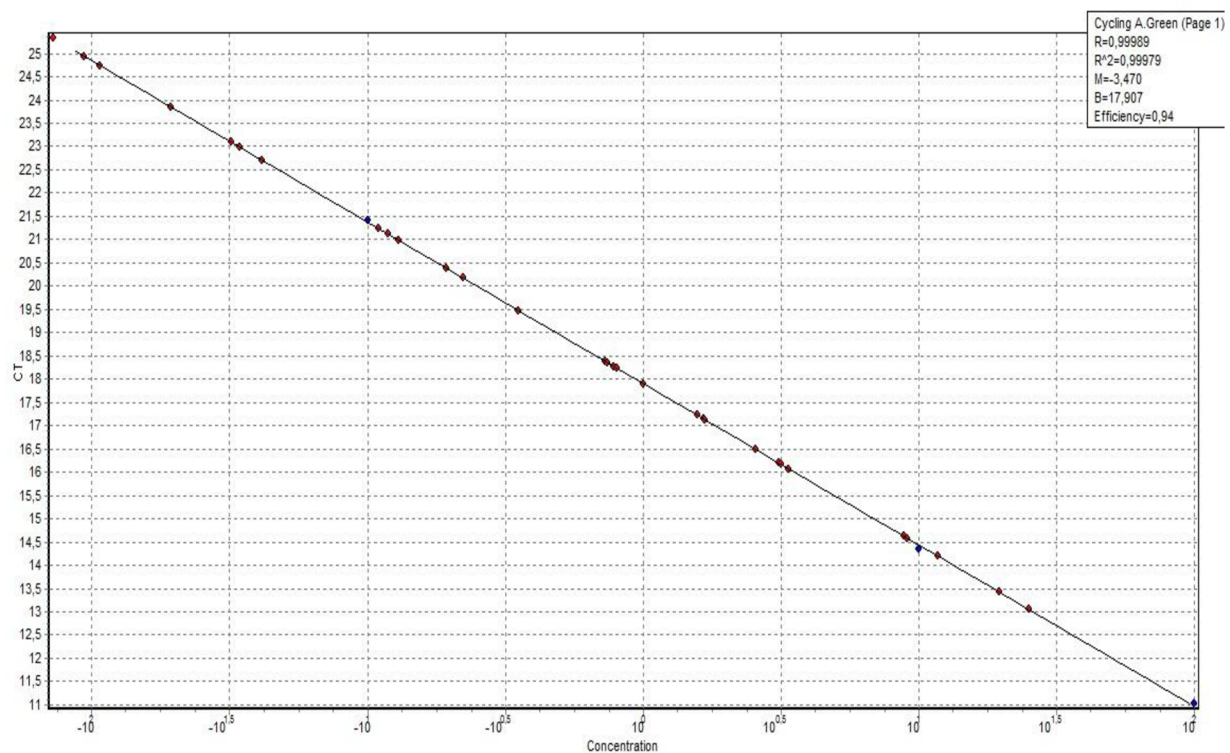
Vzorky DNA získané podle bodu 5.1 fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi byly ředěny na koncentraci vhodnou pro PCR (podle bodu 4.2.11), tedy zhruba 10 ng/μl. Vzorky získané fenolovou extrakcí byly ředěny i na 1 ng/μl a 100 ng/μl.

## 5.4 PCR v reálném čase s DNA z čistých kultur

S veškerou DNA získanou dle bodu 5.1 a ředěnou podle bodu 5.3 byla provedena PCR v reálném čase s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus* v přístroji Thermocycler Rotor-Gene 6000 (postup podle bodu 4.2.13). Produkt RT-PCR byl detekován také agarózovou gelovou elektroforézou (podle bodu 4.2.14).

### 5.4.1 RT-PCR specifická pro doménu *Bacteria*

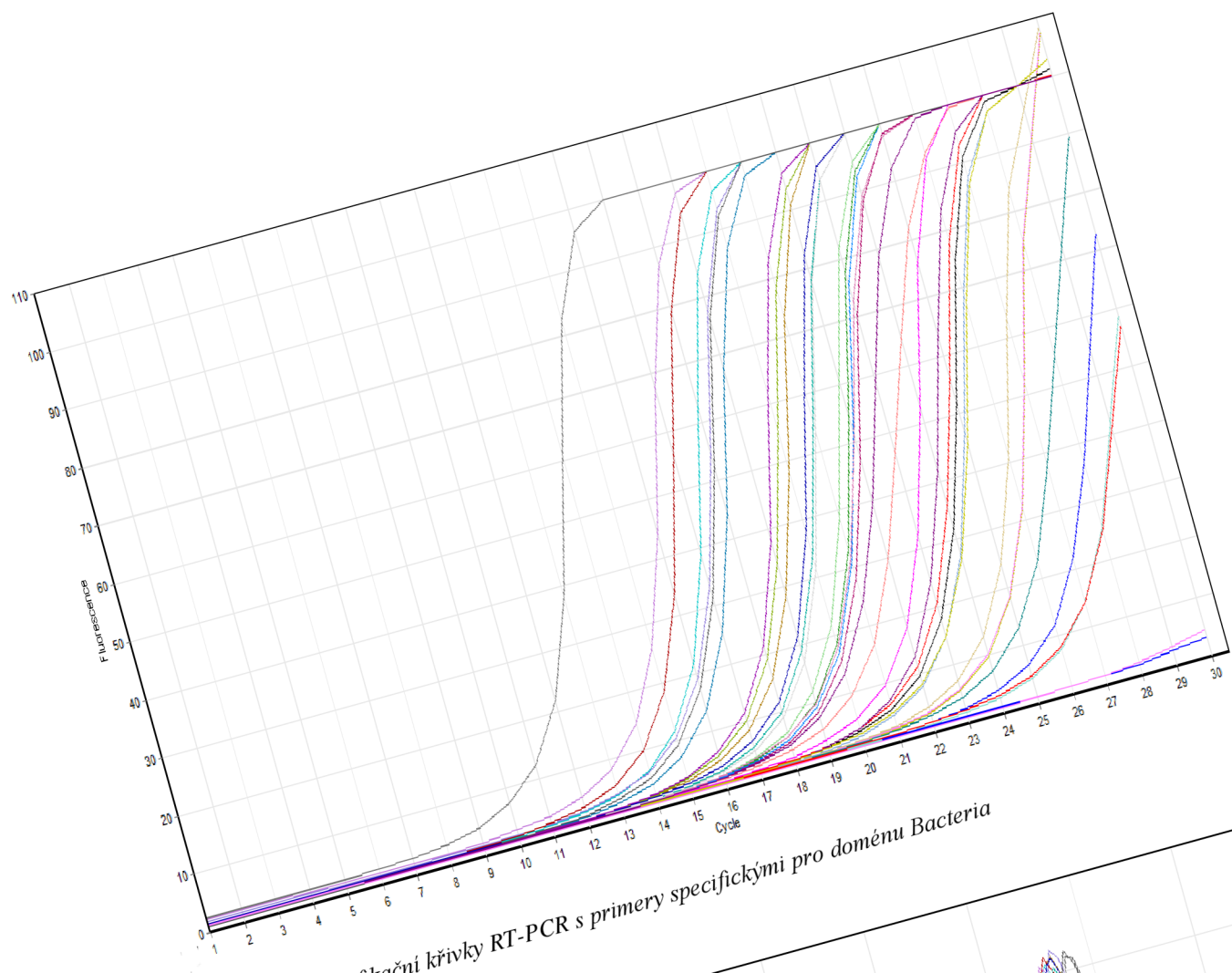
S veškerou DNA byla provedena PCR v reálném čase s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro doménu *Bacteria* označenými jako F\_eub a R\_eub. Současně byla RT-PCR podrobena i kalibrační řada připravená desítkovým ředěním DNA kultury *Escherichia coli*, která zároveň sloužila i jako pozitivní kontrola. S pomocí kalibrační řady a programu příslušejícímu k cyklu Rotor-Gene 6000 byla provedena kvantifikace DNA ve vzorcích metodou kalibrační řady (obrázek 7). Zjištěné hodnoty počáteční koncentrace DNA ve vzorcích ( $c_p$ ) shrnuje tabulka 14, stejně tak jako hodnoty prahových cyklů ( $C_T$ ). Výsledné amplifikační křivky vzorků ukazuje obrázek 8. Následně byla provedena analýza křivek tání. Křivky tání vzorků ukazuje obrázek 9, zjištěné teploty tání jsou zaznamenány ve výše zmíněné tabulce. Produkt RT-PCR byl detekován také agarózovou gelovou elektroforézou (obrázek 10) s očekávanou velikostí produktů 466 bp.



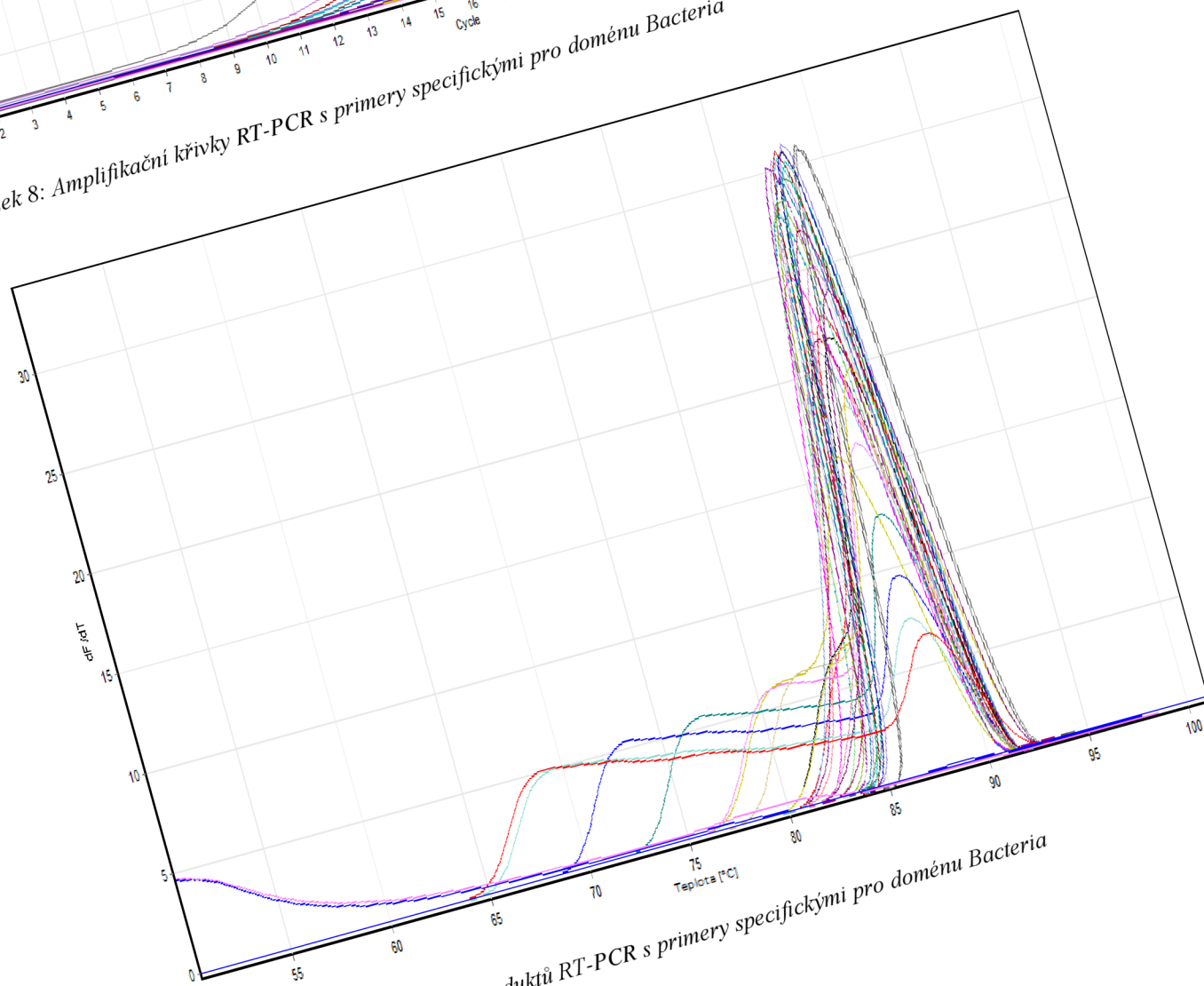
Modré – body kalibrační přímky, červené – body analyzovaných vzorků

Body řady o koncentraci 1 ng/μl, 10 pg/μl a 1 pg/μl byly zanedbány, jelikož zkreslovaly tvar přímky

**Obrázek 7: Kalibrační přímka získaná RT-PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria***






































Obrázek 8: Amplifikační křivky RT-PCR s primery specifickými pro doménu Bacteria



Obrázek 9: Analýza křivek tání produktů RT-PCR s primery specifickými pro doménu Bacteria

Tabulka 14: Charakteristiky vzorků získané pomocí RT-PCR s primery specifickými pro doménu Bacteria

Způsob izolace	Barva	Kmen	C <sub>t</sub>	c <sub>p</sub> [ng/μl]	T <sub>m</sub> [°C]
Částice Fkol 77 ox		<i>L. plantarum</i>	20,98	0,130	87,8
		<i>L. rhamnosus</i>	22,99	0,034	86,8
		<i>L. casei</i>	24,74	0,011	88,0
		<i>S. thermophilus</i>	20,39	0,193	87,5
Částice F79 lysine		<i>L. plantarum</i>	23,09	0,032	87,8
		<i>L. rhamnosus</i>	18,28	0,783	87,2
		<i>L. casei</i>	23,85	0,019	88,0
		<i>S. thermophilus</i>	19,48	0,352	87,2
Fenolová extrakce, 10 ng/μl		<i>L. plantarum</i>	18,24	0,802	88,0
		<i>L. rhamnosus</i>	20,17	0,222	87,0
		<i>L. casei</i>	21,12	0,118	88,0
		<i>S. thermophilus</i>	14,19	11,785	87,8
Fenolová extrakce, 1 ng/μl		<i>L. plantarum</i>	22,71	0,041	87,8
		<i>L. rhamnosus</i>	17,90	1,005	87,2
		<i>L. casei</i>	25,33	0,007	88,0
		<i>S. thermophilus</i>	21,24	0,109	87,0
Fenolová extrakce, 100 ng/μl		<i>L. plantarum</i>	14,62	8,873	88,2
		<i>L. rhamnosus</i>	13,05	25,143	87,5
		<i>L. casei</i>	18,36	0,740	88,0
		<i>S. thermophilus</i>	13,42	19,656	87,8
Komerční kit, 1. paralela		<i>L. plantarum</i>	16,48	2,571	88,0
		<i>L. rhamnosus</i>	16,16	3,182	87,3
		<i>L. casei</i>	17,12	1,683	88,2
		<i>S. thermophilus</i>	14,58	9,078	87,5
Komerční kit, 2. paralela		<i>L. plantarum</i>	17,14	1,666	88,0
		<i>L. rhamnosus</i>	16,08	3,372	87,3
		<i>L. casei</i>	18,39	0,728	88,0
		<i>S. thermophilus</i>	17,23	1,569	87,5
Body kalibrační přímky		Standard 100 ng/μl	11,03	96,192	89,0
		Standard 10 ng/μl	14,35	10,600	88,8
		Standard 1 ng/μl	-	-	88,7
		Standard 100 pg/μl	21,41	0,98	88,5
		Standard 10 pg/ μl	-	-	88,7
		Standard 1 pg/ μl	-	-	88,5
		Negativní kontrola	-	-	-

Nejnižší hodnoty prahových cyklů byly naměřeny u vzorků DNA získaných pomocí komerčního kitu a u vzorků získaných fenolovou extrakcí ředěných na 100 ng/μl. U stejných vzorků byla pomocí kalibrační řady zjištěna i nejvyšší počáteční koncentrace. Body 1 ng/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl kalibrační řady byly zanedbány, jelikož zkreslovaly její tvar.

Pomocí analýzy křivek tání produktů PCR byly u všech vzorků kromě negativní kontroly zjištěny píky určující teploty tání v rozmezí 86,8 – 88,8 °C. Nepřítomnost píku u negativní kontroly vyvrací kontaminaci komponent PCR cizorodou DNA. Produkty PCR byly detekovány i pomocí gelové elektroforézy, kde byl u všech vzorků detekován produkt přibližně očekávané velikosti 466 bp, čímž byla prokázána přítomnost DNA domény *Bacteria*. Produkt nebyl detekován u negativní kontroly a u bodu kalibrační řady o koncentraci 10 pg/μl.

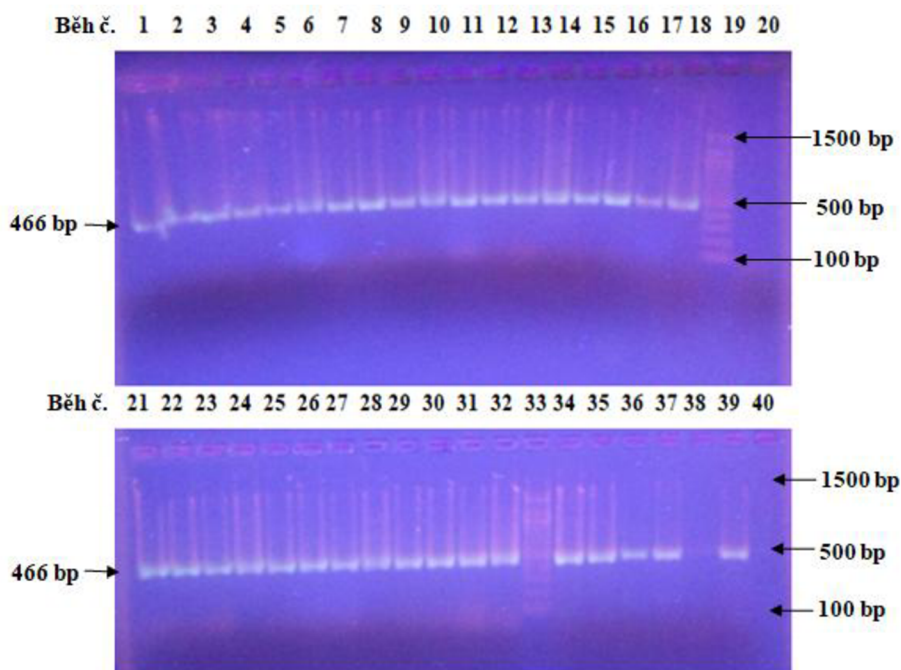


Schéma nanesení vzorků:

běhy č. 19 a 33 – DNA standard 100 bp

běh č. 20 – negativní kontrola

běhy č. 34 až 39 – vzorky kalibrační řady od nejvíce koncentrovaného k nejméně koncentrovanému

běhy č. 1až 4 – vzorky izolované pomocí magnetických částic Fkol 77 ox

běhy č. 5 až 8 – vzorky izolované pomocí magnetických částic F79 lysine

běhy č. 9 až 12 – vzorky izolované fenolovou extrakcí, ředěné na 10 ng/μl

běhy č. 13 až 16 – vzorky izolované fenolovou extrakcí, ředěné na 1 ng/μl

běhy č. 17, 18, 21, 22 – vzorky izolované fenolovou extrakcí, ředěné na 100 ng/μl

běhy č. 23 až 26 – vzorky izolované pomocí komerčního kitu, 1. paralela

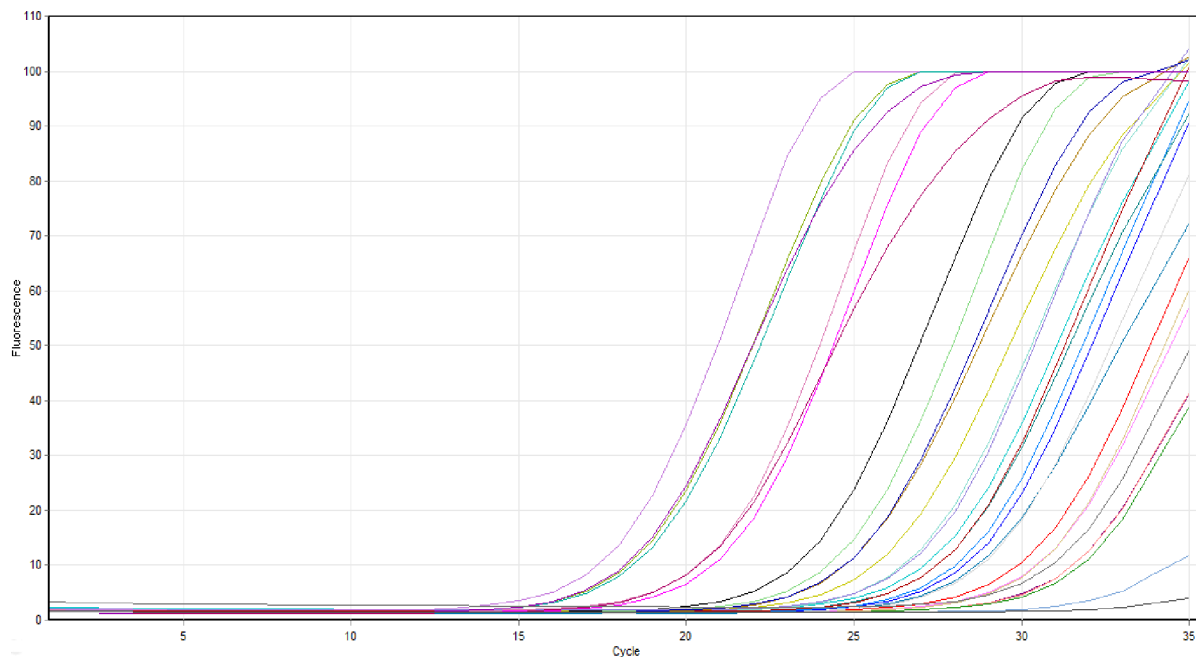
běhy č. 27 až 30 – vzorky izolované pomocí komerčního kitu, 2. paralela

Naneseno vždy v pořadí *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *S. thermophilus* v rámci každé izolace

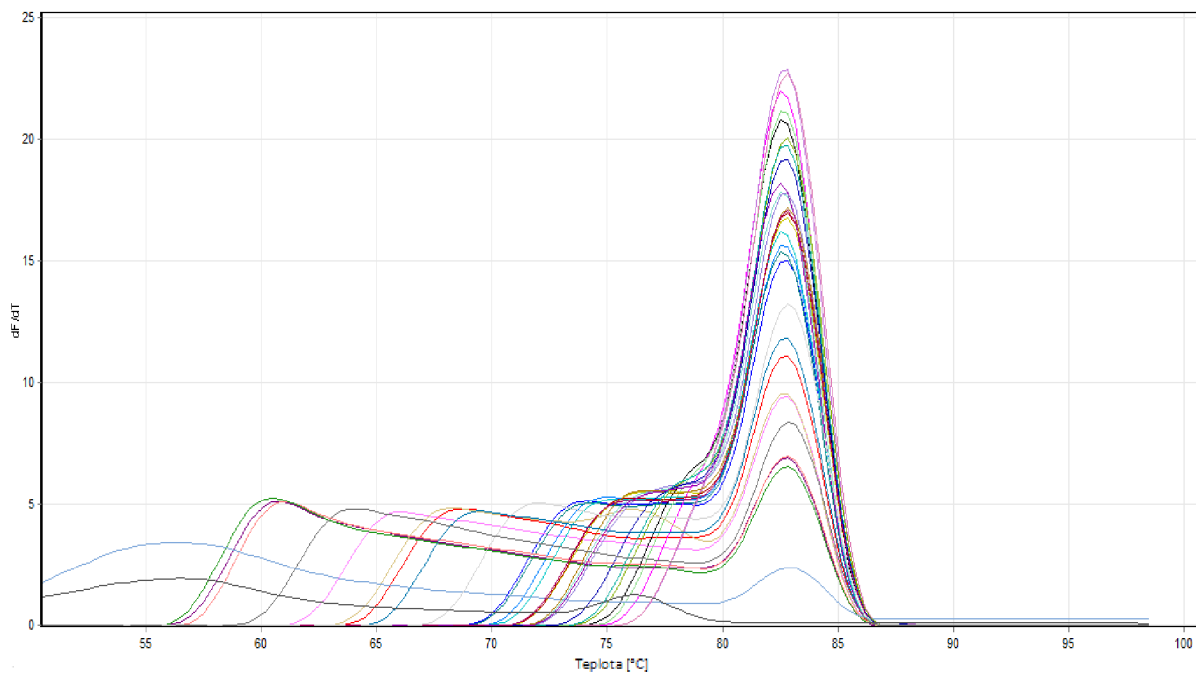
**Obrázek 10: Gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria***

### 5.4.2 RT-PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Vzorky byly podrobeny PCR v reálném čase a následné analýze křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* označenými F allact a R allact. Jako pozitivní kontrola byla použita kultura *Lactobacillus gasseri* RL22P. Výsledné amplifikační křivky jsou na obrázku 11. Hodnoty  $C_t$  jednotlivých vzorků shrnuje tabulka 15, stejně tak i teploty tání získané následnou analýzou křivek tání. Křivky tání vzorků ukazuje obrázek 12. Produkty RT-PCR byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou (obrázek 13). Očekávaná velikost produktů byla 92 bp.

































Obrázek 11: Amplifikační křivky RT-PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*



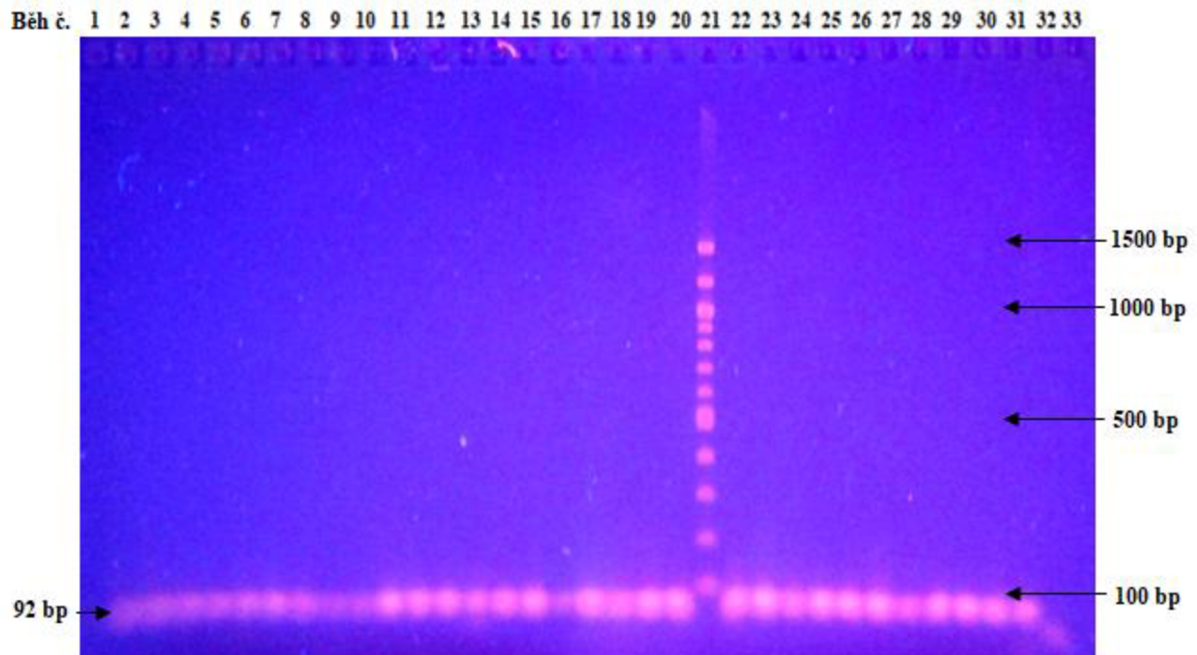
Obrázek 12: Analýza křivek tání pro produkty RT-PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Tabulka 15: Charakteristiky vzorků získané pomocí RT-PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Způsob izolace	Barva	Kmen	C <sub>t</sub>	T <sub>m</sub> [°C]
Částice Fkol 77 ox		<i>L. plantarum</i>	26,8	82,7
		<i>L. rhamnosus</i>	22,5	82,7
		<i>L. casei</i>	25,3	82,7
		<i>S. thermophilus</i>	27,9	82,7
Částice F79 lysine		<i>L. plantarum</i>	27,2	82,7
		<i>L. rhamnosus</i>	25,0	82,7
		<i>L. casei</i>	24,4	82,5
		<i>S. thermophilus</i>	27,9	82,8
Fenolová extrakce, 10 ng/μl		<i>L. plantarum</i>	28,1	82,8
		<i>L. rhamnosus</i>	18,0	82,5
		<i>L. casei</i>	20,4	82,5
		<i>S. thermophilus</i>	24,1	82,5
Fenolová extrakce, 1 ng/μl		<i>L. plantarum</i>	27,3	82,7
		<i>L. rhamnosus</i>	21,4	82,7
		<i>L. casei</i>	23,5	82,5
		<i>S. thermophilus</i>	28,7	82,8
Fenolová extrakce, 100 ng/μl		<i>L. plantarum</i>	23,7	82,7
		<i>L. rhamnosus</i>	14,7	82,7
		<i>L. casei</i>	17,7	82,8
		<i>S. thermophilus</i>	24,6	82,8
Komerční kit, 1. paralela		<i>L. plantarum</i>	21,6	82,8
		<i>L. rhamnosus</i>	15,3	82,8
		<i>L. casei</i>	15,5	82,7
		<i>S. thermophilus</i>	25,2	82,7
Komerční kit, 2. paralela		<i>L. plantarum</i>	21,7	82,7
		<i>L. rhamnosus</i>	15,1	82,5
		<i>L. casei</i>	17,1	82,8
		<i>S. thermophilus</i>	25,7	82,8
		Pozitivní kontrola ( <i>Lactobacillus gasseri</i> RL22P)	27,6	83,0
		Negativní kontrola		



Nejnižší hodnoty prahových cyklů byly naměřeny u vzorků DNA izolované pomocí komerčního kitu a pomocí fenolové extrakce ředěné na 100 ng/μl. Pomocí analýzy křivek tání byly zjištěny teploty tání produktů PCR u všech vzorků kromě negativní kontroly v rozmezí 82,5 – 82,8 °C. Při detekci produktů PCR agarózovou gelovou elektroforézou byl u všech vzorků kromě negativní kontroly detekován produkt o očekávané velikosti zhruba 92 bp, čímž byla prokázána přítomnost bakteriální DNA rodu *Lactobacillus*.



*Schéma nanesení vzorků:*

*běh č. 21 – DNA standard 100 bp*

*běh č. 33 – negativní kontrola Lactobacillus gasseri RL22P*

*běh č. 32 – pozitivní kontrola*

*běhy č. 1 až 4 – vzorky izolované pomocí magnetických částic Fkol 77 ox*

*běhy č. 5 až 8 – vzorky izolované pomocí magnetických částic F79 lysine*

*běhy č. 9 až 12 – vzorky izolované fenolovou extrakcí, ředěné na 10 ng/μl*

*běhy č. 13 až 16 – vzorky izolované fenolovou extrakcí, ředěné na 1 ng/μl*

*běhy č. 17 až 20 – vzorky izolované fenolovou extrakcí, ředěné na 100 ng/μl*

*běhy č. 22 až 25 – vzorky izolované pomocí komerčního kitu, 1. paralela*

*běhy č. 26 až 29 – vzorky izolované pomocí komerčního kitu, 2. paralela*

*Naneseno vždy v pořadí L. plantarum, L. rhamnosus, L. casei, S. thermophilus v rámci každé izolace*

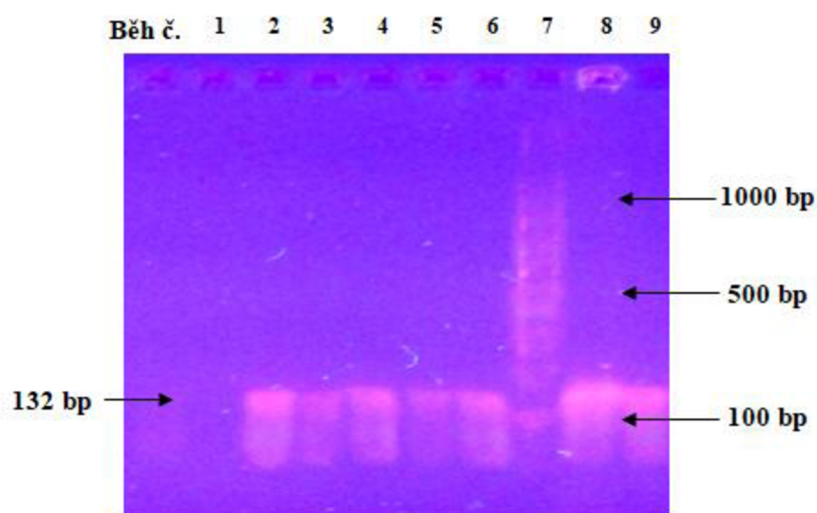
**Obrázek 13: Gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus***

## 5.5 Konvenční PCR

Vzorky získané podle bodu 5.1 (kromě *Streptococcus thermophilus*) a ředěné podle bodu 5.3 (kromě vzorků získaných fenolovou extrakcí ředěných na 1 ng/μl) byly podrobeny konvenční PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus plantarum* (podle bodu 4.2.12). Produkt PCR byl detekován gelovou elektroforézou (podle bodu 4.2.14).

### 5.5.1 Důkaz přítomnosti DNA bakterií druhu *Lactobacillus casei*

Vzorky pocházející z kmene druhu *Lactobacillus casei* byly podrobeny konvenční PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus casei* označenými F Casei a R Casei. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>. Produkt PCR detekovaný gelovou elektroforézou s očekávanou velikostí produktu 132 bp ukazuje obrázek 14. Ve všech vzorcích kromě negativní kontroly byl detekován produkt PCR o očekávané velikosti 132 bp, čímž byla prokázána přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus casei*.



Scéma nanesení vzorků:

Běh č. 1 – negativní kontrola

Běh č. 2 – DNA *Lactobacillus casei* izolovaná pomocí kitu 1

Běh č. 3 – DNA *Lactobacillus casei* izolovaná pomocí kitu 2

Běh č. 4 – DNA *Lactobacillus casei* izolovaná částicemi Fkol 77 ox

Běh č. 5 – DNA *Lactobacillus casei* izolovaná částicemi F79 lysine

Běh č. 6 – DNA *Lactobacillus casei* izolovaná fenolovou extrakcí, 10 ng/μl

Běh č. 7 – DNA standard 100 bp

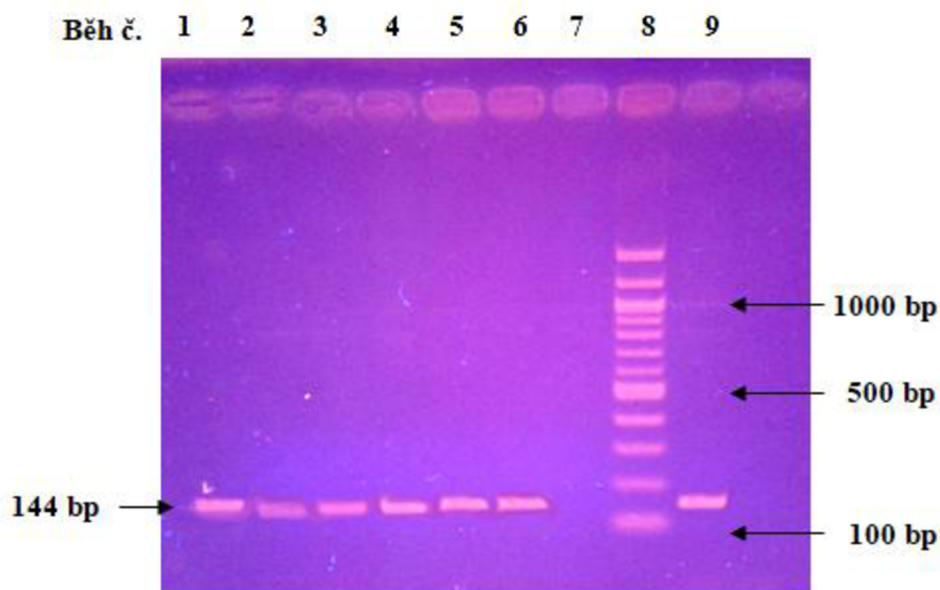
Běh č. 8 – DNA *Lactobacillus casei* izolovaná fenolovou extrakcí, 100 ng/μl

Běh č. 9 – pozitivní kontrola *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>

**Obrázek 14:** Gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus casei*

### 5.5.2 Důkaz přítomnosti DNA druhu *Lactobacillus plantarum*

Vzorky s DNA pocházející z kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> byly podrobeny konvenční PCR specifické pro druh *Lactobacillus plantarum* s primery označenými F plant a R plant. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>. Detekci produktu gelovou elektroforézou s očekávanou velikostí produktů 144 bp zachycuje obrázek 15. Ve všech vzorcích kromě negativní kontroly byl detekován produkt PCR o očekávané velikosti 144 bp, čímž byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus plantarum*.



Scéma nanesení vzorků:

Běh č. 1 – DNA *Lactobacillus plantarum* izolovaná pomocí kitu 1

Běh č. 2 – DNA *Lactobacillus plantarum* izolovaná pomocí kitu 2

Běh č. 3 – DNA *Lactobacillus plantarum* izolovaná částicemi Fkol 77 ox

Běh č. 4 – DNA *Lactobacillus plantarum* izolovaná částicemi F79 lysine

Běh č. 5 – DNA *Lactobacillus plantarum* izolovaná fenolovou extrakcí, 10 ng/ $\mu$ l

Běh č. 6 – DNA *Lactobacillus plantarum* izolovaná fenolovou extrakcí, 100 ng/ $\mu$ l

Běh č. 7 – negativní kontrola

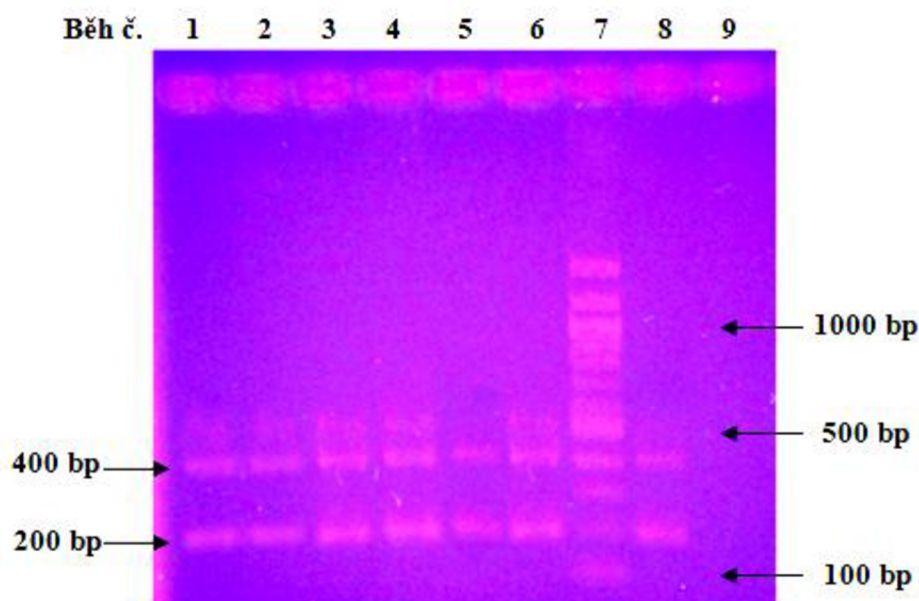
Běh č. 8 – DNA standard 100 bp

Běh č. 9 – pozitivní kontrola *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>

**Obrázek 15: Gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus plantarum***

### 5.5.3 Důkaz přítomnosti DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus*

Se vzorky DNA získané z kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> byla provedena konvenční PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus rhamnosus* označenými Pr I a Rha II. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. Produkt PCR byl detekován pomocí gelové elektroforézy, očekávány byly dva produkty o velikostech 200 a 400 bp. Výsledný gel je na obrázku 16. Ve všech vzorcích kromě negativní kontroly byly detekovány produkty PCR o očekávané velikosti 200 a 400 bp, čímž byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus*.



Scéma nanesení vzorků:

Běh č. 1 – DNA *Lactobacillus rhamnosus* izolovaná pomocí kitu 1

Běh č. 2 – DNA *Lactobacillus rhamnosus* izolovaná pomocí kitu 2

Běh č. 3 – DNA *Lactobacillus rhamnosus* izolovaná částicemi Fkol 77 ox

Běh č. 4 – DNA *Lactobacillus rhamnosus* izolovaná částicemi F79 lysine

Běh č. 5 – DNA *Lactobacillus rhamnosus* izolovaná fenolovou extrakcí, 10 ng/ $\mu$ l

Běh č. 6 – DNA *Lactobacillus rhamnosus* izolovaná fenolovou extrakcí, 100 ng/ $\mu$ l

Běh č. 7 – DNA standard 100 b

Běh č. 8 – pozitivní kontrola *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>

Běh č. 9 – negativní kontrola

**Obrázek 16:** Gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

## 5.6 Kultivace bakterií

Na živných médiích připravených dle bodu 4.2.1 byly kultivovány bakterie ze sbírkových kmenů České sbírky mikroorganismů *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>, *Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium longum* CCM 3764, *Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup> (bod 4.2.2). Každá kultura byla vypěstována na pevném a v tekutém médiu. Buňky narostlé na pevném médiu byly následně přeočkovány do tekutého média. Doba kultivace se pohybovala v rozmezí 1 – 3 dny, kdy nejdelší doba kultivace byla potřebná pro bakterie rodu *Bifidobacterium* a i po této době byl viditelný pouze spíše slabší zákal v médiu.

## 5.7 Izolace DNA z vypěstovaných kultur

Z 1 ml kultur vypěstovaných v tekutých médiích podle předchozího bodu byla izolována DNA pomocí komerčního kitu (bod 4.2.3), pro každý kmen byly provedeny dvě izolace.

## 5.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z vypěstovaných kultur

Pomocí přístroje NanoDrop 2000 byla v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm změřena absorbance (dle bodu 4.2.10) vzorků DNA izolované z kultur podle předchozího odstavce. Výsledky shrnuje tabulka 16. Byla získána DNA v kvalitě v hodné pro PCR o koncentracích v rozmezí 4,0 – 27,7 ng/μl. Nejnižší koncentrace byly získány z kmene *Bifidobacterium longum* CCM 3764, naopak nejvyšší koncentrace z kultur kmene *Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>. Poměr absorbancí  $A_{260/280}$  se u všech vzorků blížil ideální hodnotě 1,8, poměr  $A_{260/230}$  byl však u všech vzorků nižší než ideální hodnota 2,0.

Tabulka 16: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z vypěstovaných kultur

Název	c [ng/μl]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CCM 7190 <sup>T</sup>	17,9	1,82	1,12
	12,5	2,05	1,97
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 <sup>T</sup>	5,8	1,72	1,04
	20,6	1,74	1,16
<i>Lactococcus lactis</i> CCM 1877 <sup>T</sup>	27,7	1,76	1,37
	19,7	1,80	1,71
<i>Streptococcus thermophilus</i> CCM 4757	18,1	1,88	1,07
	18,0	1,94	1,30
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CCM 3762	5,6	1,77	0,58
	13,7	1,85	1,21
<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 3764	5,1	2,05	0,45
	4,0	1,80	0,60
<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 <sup>T</sup>	12,6	1,78	0,89
	14,0	1,93	1,54

## 5.9 Výroba domácího jogurtu

Z šesti jogurtových výrobků (Activia bílá, Billa Naše bio bílý jogurt, Chocoňský smetanový bílý jogurt, Selský jogurt bílý Hollandia, Jogobella zahradní a lesní jahoda a Opočenský jogurt) bylo zaočkováním do plnotučného mléka a následnou kultivací 8 hodin při 40 °C vyrobeno šest domácích jogurtů – z každého jogurtového výrobku jeden (podle bodu 4.2.8). Z takto vyrobených domácích jogurtů (první várka) byla následně opětovným zaočkováním do mléka a kultivací podle stejného postupu vyrobena druhá várka šesti domácích jogurtů – z každého jogurtu z první várky byl vyroben jeden jogurt druhé várky.

## 5.10 Izolace DNA jogurtových výrobků

Z každého z jogurtových výrobků (Activia bílá, Billa Naše bio bílý jogurt, Chocoňský smetanový bílý jogurt, Selský jogurt bílý Hollandia, Jogobella zahradní a lesní jahoda a Opočenský jogurt) byla izolována DNA, a to nejprve pouze pomocí komerčního kitu, poté s trojnásobným promytím roztokem A před izolací a nakonec se sedminásobným promytím roztokem A před izolací pomocí komerčního kitu podle bodu 4.2.9. Dále byla izolována DNA z každého z domácích jogurtů první i druhé várky, a to vždy den po výrobě a 7 dní po výrobě. Pro každý jogurtový výrobek byly provedeny dvě paralelní izolace DNA pomocí komerčního kitu, a to po sedminásobném promytí roztokem A (postup dle bodu 4.2.9.3).

## 5.11 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z jogurtových výrobků

Pomocí přístroje NanoDrop 2000 byla v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm změřena absorbance (dle bodu 4.2.10) vzorků DNA izolované z jogurtových výrobků podle předchozího odstavce. Výsledky stanovení ukazuje tabulka 17, 18 a 19. Při izolaci DNA z jogurtových výrobků bez promytí a po trojnásobném promytí roztokem A byla koncentrace získané DNA nízká a poměry absorbancí  $A_{260/280}$  a  $A_{260/230}$  ukazovaly na nízkou čistotu. Získaná DNA nebyla vhodná pro následnou analýzu pomocí PCR. Při izolaci po sedminásobném promytí byly koncentrace získané DNA dostatečné pro použití DNA pro PCR a poměry absorbancí  $A_{260/280}$  a  $A_{260/230}$  se více blížily ideálním hodnotám (1,8 a 2,0).

Tabulka 17: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z jogurtových výrobků

Jogurt	Bez promytí			Promyto 3x			Promyto 7x		
	c [ng/μl]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	c [ng/μl]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	c [ng/μl]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Activia bílá	28,0	2,38	0,48	6,2	1,2	0,32	7,1	1,85	1,28
	8,4	1,65	0,16	4,9	1,29	0,23	3,8	1,97	1,17
Billa Naše bio	0,7	1,22	0,08	6,2	1,26	0,29	10,4	2,19	1,19
	3,7	2,27	0,33	0,6	1,49	0,06	5,0	1,84	1,82
Chocoňský smetanový	1,1	0,88	0,1	-0,4	3,39	-0,5	13,0	2,19	1,46
	0,5	3,6	0,05	1,2	1,02	0,14	10,0	2,15	1,80
Selský Hollandia	0,8	1,54	0,1	4,8	1,39	0,35	6,9	1,70	1,34
	1,4	1,11	0,15	5,2	1,8	0,29	4,9	1,66	1,67
Jogobella jahoda	0,8	1,56	0,99	4,9	1,53	0,4	8,6	2,08	1,19
	1,4	1,55	0,77	0,6	0,69	0,11	1,0	2,18	1,97
Opočenský bílý	2,8	1,14	0,13	2,5	1,41	0,29	3,7	1,86	1,27
	0,4	1,07	0,07	-0,2	-3,34	-0,21	4,3	1,62	1,21

Tabulka 18: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z první várky domácích jogurtů den po výrobě a 7 dní po výrobě

Název původního jogurtu	1 den po výrobě			7 dní po výrobě		
	c [ng/μl]	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	c [ng/μl]	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
Activia bílá, Danone (Praha, ČR)	8,0	2,01	1,87	27,7	2,08	1,64
	6,5	1,97	2,24	68,7	2,07	1,59
Billa Naše bio bílý jogurt (Říčany u Prahy, ČR)	7,8	1,99	2,83	30,8	2,04	1,45
	9,8	1,83	1,00	95,2	1,95	1,32
Choceňský smetanový jogurt bílý (Choceň, ČR)	10,4	1,85	2,07	12,1	2,00	1,05
	8,0	1,85	1,76	8,1	2,14	1,02
Selský jogurt bílý Hollandia (Karlovy Vary, ČR)	6,6	1,77	1,34	25,5	2,02	1,31
	6,9	1,94	1,52	39,8	2,09	1,42
Jogobella zahradní a lesní jahoda, Zott (Mertingen, Německo)	11,0	1,87	1,71	53,2	2,05	1,19
	14,1	1,85	2,15	30,6	1,88	0,91
Opočenský jogurt bílý, Bohemilk mlékárna Opočno (ČR)	17,0	1,77	2,11	8,6	2,14	0,96
	9,2	1,78	1,29	32,9	2,04	1,47

Tabulka 19: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z druhé várky domácích jogurtů den po výrobě a 7 dní po výrobě

Název původního jogurtu	1 den po výrobě			7 dní po výrobě		
	c [ng/μl]	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	c [ng/μl]	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
Activia bílá, Danone (Praha, ČR)	3,8	2,07	0,78	7,3	1,72	0,43
	5,6	1,95	0,84	8,4	1,85	0,92
Billa Naše bio bílý jogurt (Říčany u Prahy, ČR)	7,7	1,84	0,80	48,7	1,96	1,13
	11,7	1,80	0,83	73,3	1,99	1,67
Choceňský smetanový jogurt bílý (Choceň, ČR)	6,1	1,89	0,20	49,4	1,99	1,83
	10,0	1,92	1,05	17,3	1,78	0,88
Selský jogurt bílý Hollandia (Karlovy Vary, ČR)	6,5	1,74	0,68	4,1	1,62	0,58
	4,0	1,64	0,62	7,4	1,56	0,67
Jogobella zahradní a lesní jahoda, Zott (Mertingen, Německo)	7,4	1,96	0,59	3,1	1,91	0,43
	6,9	1,65	0,73	4,4	1,81	0,12
Opočenský jogurt bílý, Bohemilk mlékárna Opočno (ČR)	14,9	1,96	1,24	32,7	1,89	1,33
	18,1	1,98	1,29	100,3	2,00	1,87

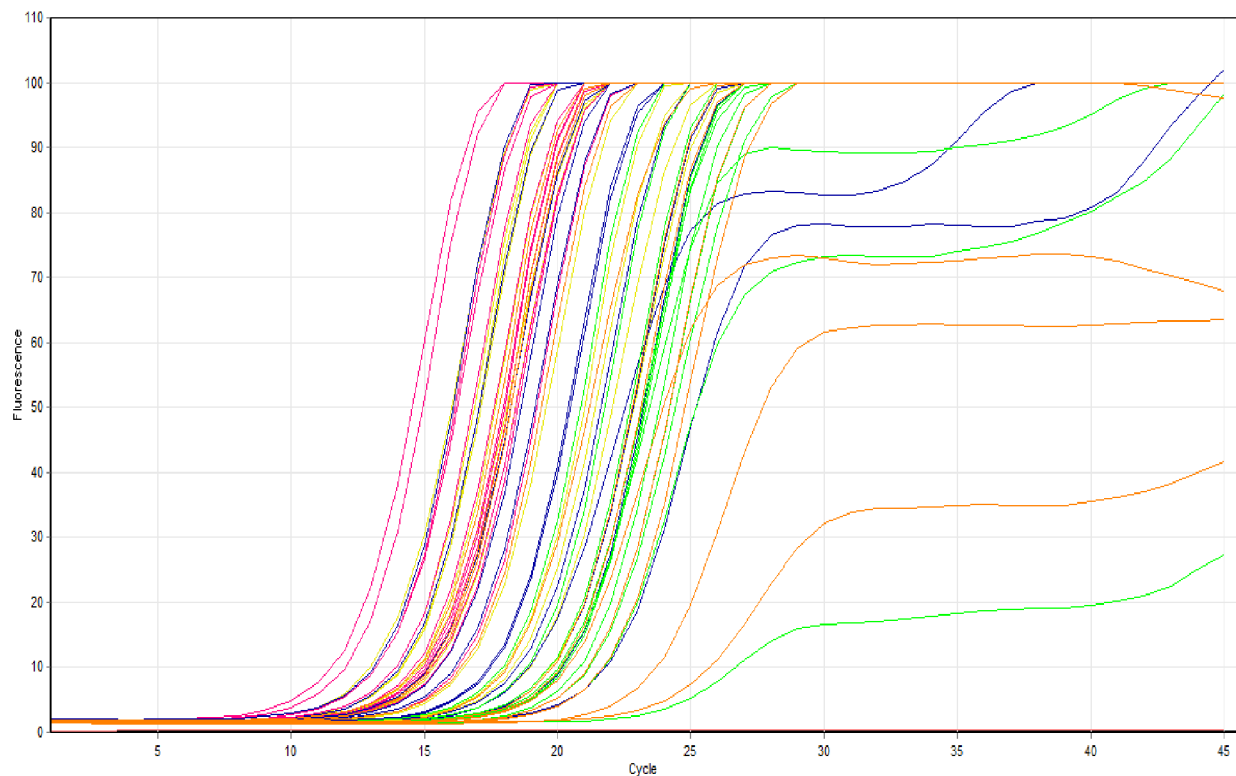
Ze všech domácích jogurtů byla izolována DNA v koncentraci i kvalitě vhodné pro následnou analýzu pomocí PCR. Získané koncentrace se pohybovaly v rozmezí 3,1 – 100,3 ng/μl. Poměr absorbancí A<sub>260/280</sub> se u většiny vzorků pohyboval v okolí ideální hodnoty 1,8. Poměr absorbancí A<sub>260/230</sub> se u první várky domácích jogurtů více blížil ideální hodnotě 2,0. U vzorků DNA izolované z druhé várky domácích jogurtů byly tyto poměry nižší.

## 5.12 RT-PCR s DNA z jogurtových výrobků

S DNA z jogurtových výrobků získanou v bodě 5.10, která byla podle bodu 5.11 v kvalitě vhodné pro PCR byla provedena RT-PCR s následnou analýzou křivek tání na přístroji Rotor-Gene 6000. Bylo provedeno šest reakcí se šesti dvojicemi primerů podle příslušných programů (postup podle bodu 4.2.13.2). Jako pozitivní kontroly byly použity vzorky DNA z čistých kultur získané dřívě.

### 5.12.1 RT-PCR s primery V3\_F, V3\_R

U všech vzorků došlo k amplifikaci DNA, u všech tedy byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA. Výsledné amplifikační křivky ukazuje obrázek 17. Ze získaných hodnot prahových cyklů byl vypočten průměr ze dvou paralelních stanovení. Následně byl vypočten rozdíl prahových cyklů mezi jednotlivými izolacemi DNA v rámci každé linie jogurtů (tedy mezi původním jogurtem a 1. izolací z 1. domácího jogurt, dále mezi 1. a 2. izolací z 1. domácího jogurtu, atd.). Výsledky ukazuje tabulka 20. Kladná čísla ukazují, že hodnoty prahových cyklů mezi jednotlivými izolacemi klesly, tedy počáteční koncentrace DNA rostla, záporné hodnoty ukazují, že hodnoty prahových cyklů stouply, tedy množství DNA ve vzorku kleslo.



Žlutě – DNA z původních jogurtů, růžově – DNA z 1. várky domácích jogurtů, 1. izolace, modře – DNA z 1. várky domácích jogurtů, 2. izolace, zeleně – DNA z druhé várky domácích jogurtů, 1. izolace, oranžově – DNA z 2. várky domácích jogurtů, 2. izolace

**Obrázek 17: Amplifikační křivky všech vzorků pro RT-PCR s primery V3\_F, V3\_R**

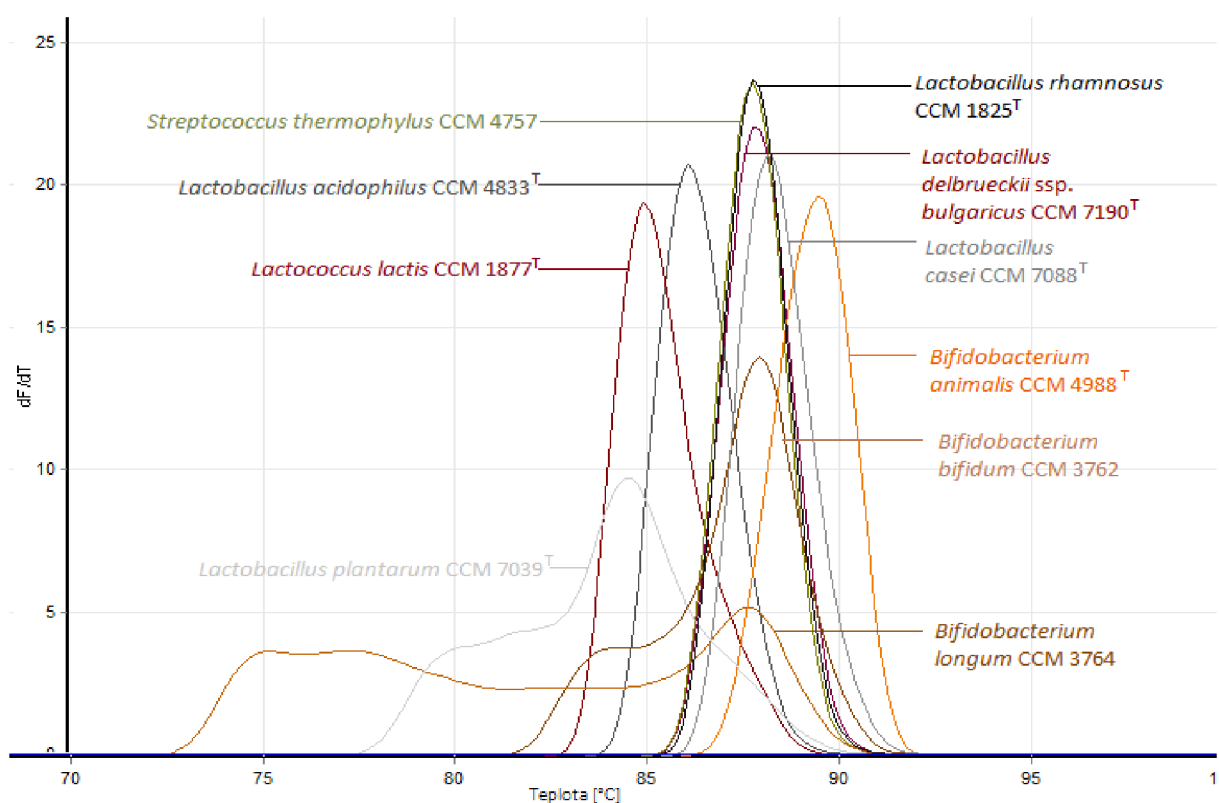


Tabulka 20: Rozdíly prahových cyklů mezi jednotlivými izolacemi získané RT-PCR s primery V3\_F, V3\_R

DNA jogurtu	$\Delta C_t$			
	P – 1.1.	1.1. – 1.2.	1.2. – 2.1.	2.1. – 2.2.
Activia bílá Danone	1,385	-1,13	-7,865	3,86
Billa Naše bio bílý jogurt	-0,605	0,64	-4,075	2,945
Choceňský smetanový jogurt bílý	-0,42	-4,34	-0,105	2,765
Selský jogurt bílý Hollandia	0,01	-2,05	-3,885	0,14
Jogobella zahradní a lesní jahoda Zott	2,895	-5,685	-1,605	-1,74
Opočenský jogurt bílý Bohemilk mlékárna Opočno	6,685	-5,775	-1,715	0,14

1.1. – 1. várka domácích jogurtů, 1. izolace, 1.2. – 1. várka domácích jogurtů, 2. izolace

2.1. – 2. várka domácích jogurtů, 1. izolace, 2.2. – 2. várka domácích jogurtů, 2. izolace, P – původní jogurt



Obrázek 18: Křivky tání DNA kmenů použitých jako pozitivní kontroly pro RT-PCR s primery V3\_F, V3\_R

Po provedení analýzy křivek tání po PCR s primery V3\_F, V3\_R bylo možné podle teploty odečtené z derivovaných křivek tání DNA rozeznat kmeny:

*Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>  $T_m=86,10$  °C,

*Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>  $T_m=84,90$  °C,

*Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>  $T_m=88,15$  °C,

*Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup>  $T_m=89,50$  °C,

*Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>  $T_m=84,50$  °C.

DNA ostatních kmenů (*Bifidobacterium longum* CCM 3764, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762) měla teplotu tání shodně 87,75 °C, tudíž nebylo možné je pomocí těchto primerů navzájem odlišit. Křivky tání kontrolních kmenů ukazuje obrázek 18. U všech vzorků DNA z jogurtových výrobků byl detekován jeden pík s jednoznačně stanovitelnou teplotou tání.

U všech původních jogurtů jsou výrobcem deklarovány jogurtové kultury (tedy *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*). U výrobku Activia bílá je navíc deklarována probiotická kultura s obchodním názvem Bifidus ActiRegularis<sup>®</sup>, u výrobku Hollandia selský výrobce deklaruje přítomnost bifidobakterií a kultury *Lactobacillus acidophilus*.

Kmeny *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 se pomocí těchto primerů nepodařilo odlišit od dalších tří kmenů, ani od sebe navzájem, přítomnost těchto kultur ve vzorcích tak nelze jednoznačně potvrdit nebo vyvrátit. Většina vzorků se však svou teplotou tání velmi blížila teplotě 87,75 °C, takže DNA těchto kultur pravděpodobně opravdu obsahují. Výjimku tvořil výrobek Activia bílá, kde se u vzorků DNA izolované z původního jogurtu blížila teplota tání (86,30 °C) spíše kmeni *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>, je tedy možné, že je zastoupen v deklarované kultuře s obchodním názvem Bifidus ActiRegularis<sup>®</sup>. U vyrobených domácích jogurtů z tohoto výrobku se však teploty tání získané DNA lišit od ostatních jogurtů přestávají. Další výjimku tvořil druhý domácí jogurt z výrobku Hollandia selský, u nějž byly detekovány teploty tání 86,20 °C. Tato teplota tání se nejvíce blíží kmeni *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>. Tato kultura je ve výrobku deklarována a výrobou domácích jogurtů pravděpodobně začala převažovat nad ostatními jogurtovými kulturami.

### 5.12.2 RT-PCR s primery GroHRM\_F, GroHRM\_R

S primery GroHRM\_F, GroHRM-R k amplifikaci došlo pouze u DNA kmenů *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. U zbývajících pozitivních kontrol ani u DNA izolované z jogurtových výrobků k amplifikaci nedošlo. Žádný ze vzorků z jogurtových výrobků tedy neobsahoval DNA žádné z uvedených amplifikovaných kultur.

### 5.12.3 RT-PCR s primery V6\_F, V6\_R

U všech vzorků byl zaznamenán vznikající produkt, u všech tedy došlo k amplifikaci DNA. Po provedení analýzy křivek tání po PCR s primery V6\_F, V6\_R bylo možné podle teploty odečtené z derivovaných křivek tání rozeznat DNA kmenů:

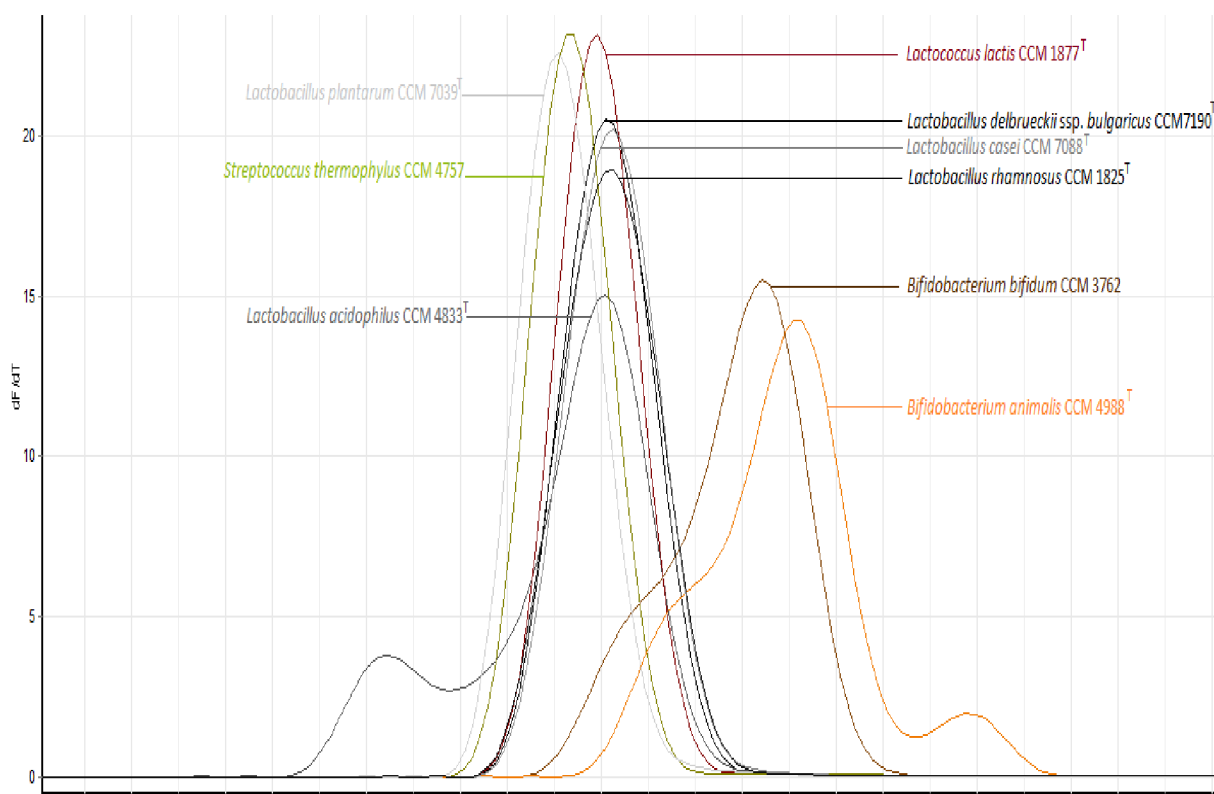
*Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup>  $T_m=86,20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

*Bifidobacterium bifidum* CCM 3762  $T_m=85,40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

*Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>  $T_m=81,90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

kmeny *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> měly velmi podobnou teplotu tání (81,35 a 81,10 °C). DNA ostatních kmenů měla teplotu tání shodně velmi blízkou 82,0 °C, proto není možné je pomocí těchto primerů odlišit. Vzorky kmene *Bifidobacterium longum* CCM 3764 byly zanedbány pro nedostatečnou výpovědní hodnotu křivky tání. Křivky tání DNA kmenů ukazuje obrázek 19. U všech vzorků z jogurtových výrobků byl detekován jeden pik s jednoznačně stanovitelnou teplotou tání.

Teploty tání většiny vzorků se pohybovaly v rozmezí 81,25 – 81,45 °C. Tato teplota je nejbližší teplotě tání kmene *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, všechny jogurtové výrobky by podle informací výrobců tuto kulturu měly obsahovat. Výjimkou byly teploty tání DNA z obou izolací obou domácích jogurtů z výrobku Jogobella, které se pohybovaly okolo 83,15 °C. Tato teplota tání neodpovídá žádné z pozitivních kontrol, ukazuje však na změnu zastoupení kultur výrobou domácích jogurtů.



Obrázek 19: Křivky tání DNA kmenů použitých jako pozitivní kontroly pro RT-PCR s primery V6\_F, V6\_R

#### 5.12.4 RT-PCR s primery V1\_F, V1\_R

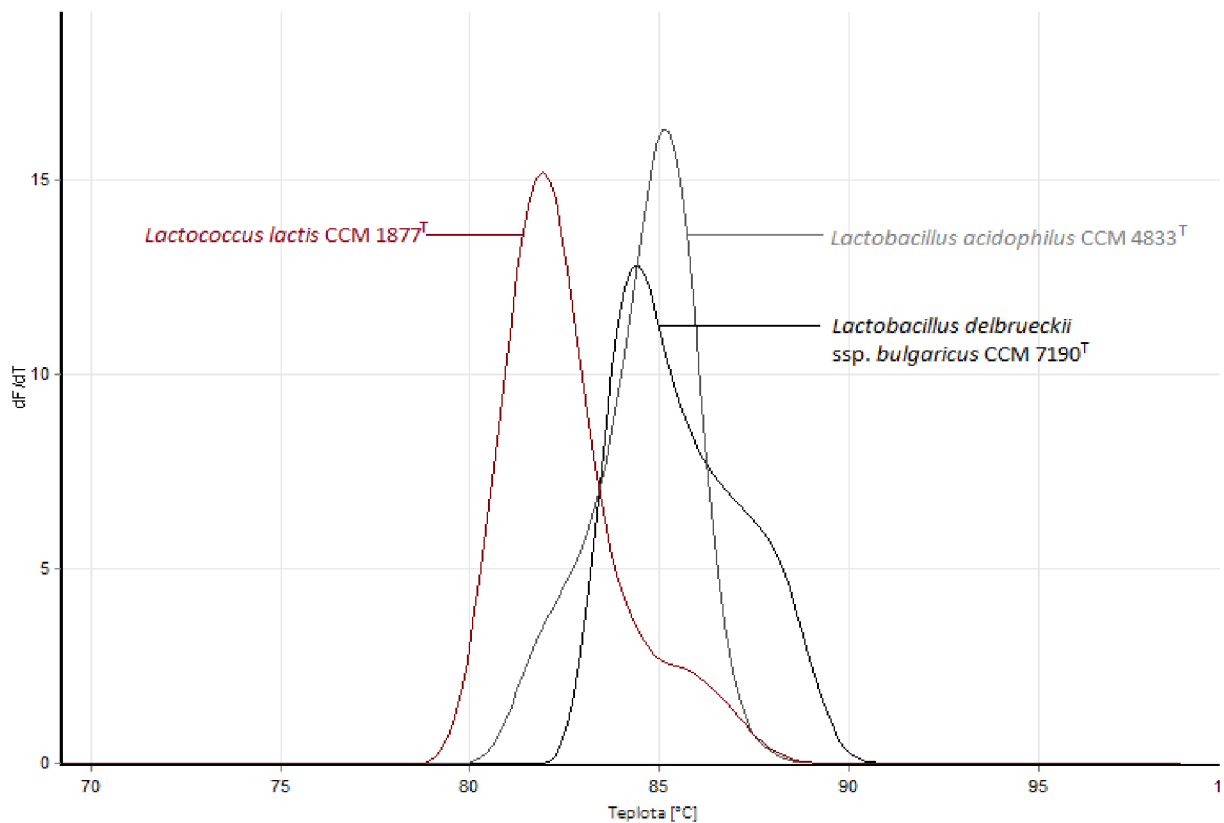
U všech vzorků byl zaznamenán vznikající produkt, u všech tedy došlo k amplifikaci DNA. Po provedení analýzy křivek tání po PCR s primery V1\_F, V1\_R bylo možné podle teploty odečtené z derivovaných křivek tání rozeznat DNA kmenů:

*Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>  $T_m=81,90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>  $T_m=84,40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

*Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>  $T_m=85,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Křivky tání DNA těchto kmenů ukazuje obrázek 20. Křivky tání DNA zbývajících kmenů nevykazovaly jednoznačný pík, tudíž nebylo možné odečíst jejich teplotu tání. U všech vzorků DNA z jogurtových výrobků byl detekován jeden pík s jednoznačně stanovitelnou teplotou tání, která se u všech shodně pohybovala v rozmezí 84,35 – 84,50 °C. Tato skutečnost u všech vzorků ukazuje na přítomnost kultury *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, která je výrobcí u všech výrobků deklarována.



Obrázek 20: Křivky tání DNA kmenů použitých jako pozitivní kontroly pro RT-PCR s primery V1\_F, V1\_R

### 5.12.5 RT-PCR s primery P1V1, P2V1

U všech vzorků byl zaznamenán vznikající produkt, u všech tedy došlo k amplifikaci DNA. Po provedení analýzy křivek tání po PCR s primery P1V1, P2V1 bylo možné podle teploty odečtené z derivovaných křivek tání rozeznat DNA kmenů:

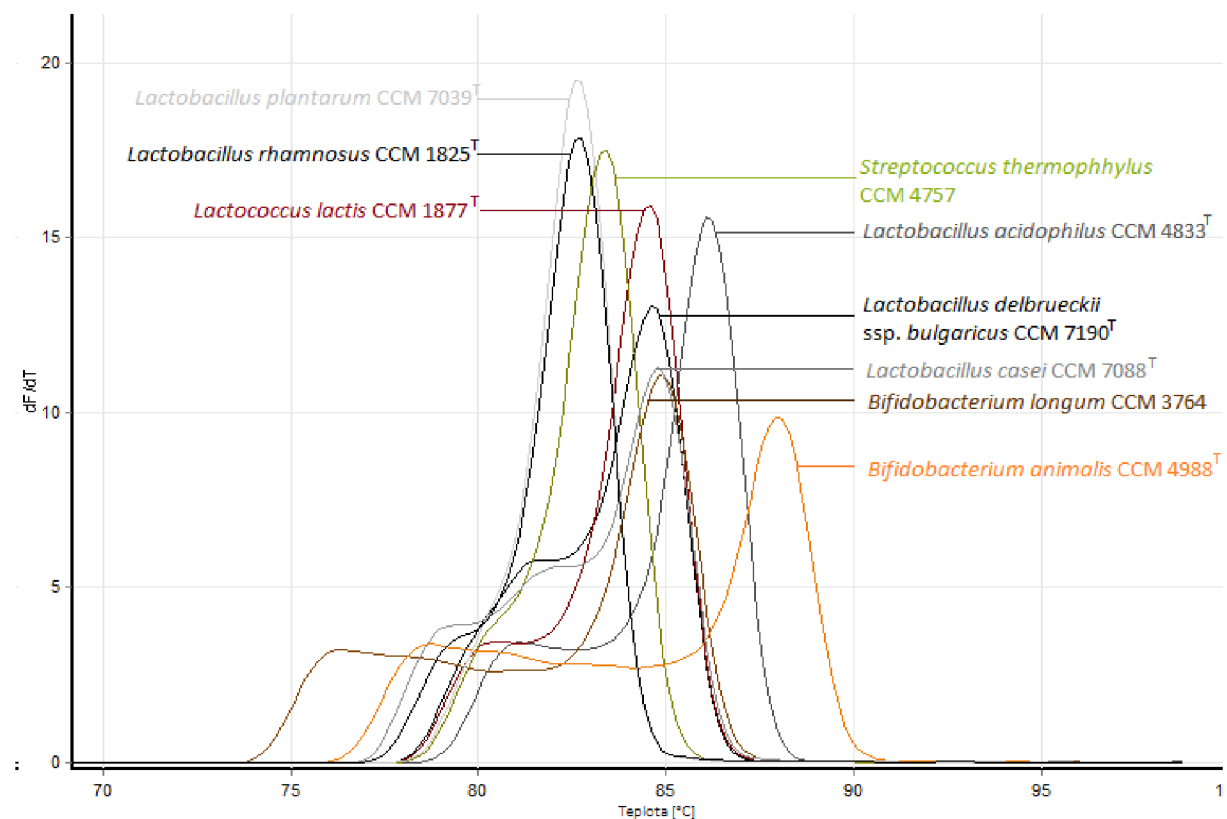
*Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>  $T_m=86,10\text{ }^\circ\text{C}$ ,

*Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup>  $T_m=88,00\text{ }^\circ\text{C}$ ,

*Streptococcus thermophilus* CCM 4757  $T_m=83,35\text{ }^\circ\text{C}$ .

Kmeny *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> měly teplotu tání DNA shodně  $82,65\text{ }^\circ\text{C}$ , tudíž je nebylo možné navzájem odlišit. Zbývající kmeny vykazovaly teplotu tání DNA  $84,65\text{ }^\circ\text{C}$ , tudíž nebylo možné je rozlišit. Křivky tání kmenů ukazuje obrázek 21. Vzorky kmene *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762 byly zanedbány pro nedostatečnou výpovědní hodnotu křivky tání.

U všech vzorků z jogurtových výrobků byl detekován jeden pík s jednoznačně stanovitelnou teplotou tání. Ta se u všech vzorků pohybovala kolem teploty  $83,35\text{ }^\circ\text{C}$ , tedy odpovídající teplotě tání *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, tato kultura je u všech výrobků výrobcí deklarována. Výjimkou byly domácí jogurty z výrobku Jogobella, kde u všech vzorků teplota tání vzrostla na zhruba  $85,00\text{ }^\circ\text{C}$ , což neodpovídá žádné z pozitivních kontrol, ukazuje však na změnu zastoupení kultur výrobou domácích jogurtů.



Obrázek 21: Křivky tání DNA kmenů použitých jako pozitivní kontroly pro RT-PCR s primery P1V1, P2V1

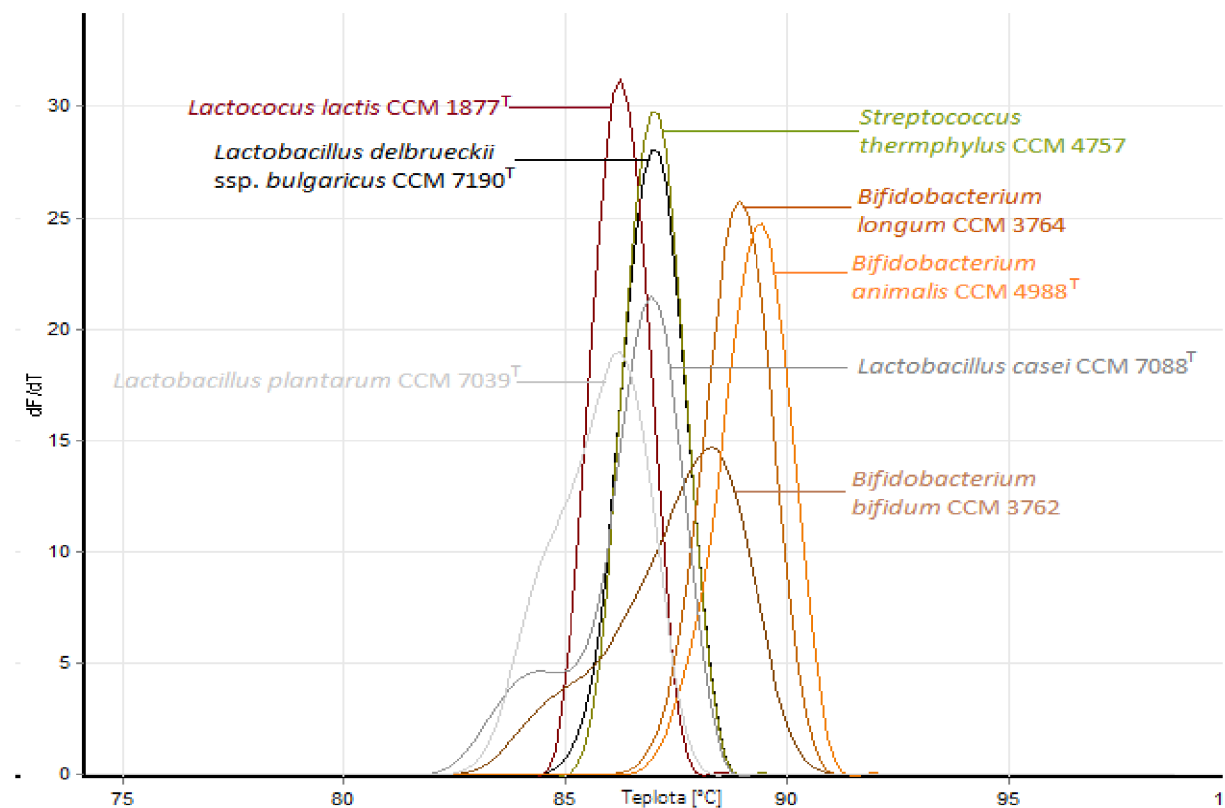
### 5.12.6 RT-PCR s primery UPF, UPR

U všech vzorků byl zaznamenán vznikající produkt, u všech tedy došlo k amplifikaci DNA. Po provedení analýzy křivek tání po PCR s primery UPF, UPR bylo možné podle teploty odečtené z derivovaných křivek tání rozeznat DNA kmenů:

<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 <sup>T</sup>	$T_m=89,35\text{ }^\circ\text{C}$ ,
<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 3764	$T_m=88,90\text{ }^\circ\text{C}$ ,
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CCM 3762	$T_m=88,25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Kmeny *Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup> a *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> měly teplotu tání DNA shodně 86,25 °C. DNA ostatních kmenů pak měla teplotu tání shodně 87,0 °C. Křivky tání ukazují obrázek 22. Vzorky s DNA kmenů *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup> byly zanedbány pro nedostatečnou výpovědní hodnotu křivek tání.

U všech vzorků z jogurtových výrobků byl detekován jeden pík s jednoznačně stanovitelnou teplotou tání. Pro většinu vzorků se tento pík nacházel v oblasti teploty tání okolo 87,0 °C, která však neumožňuje přiřazení k žádnému z rozeznávaných kmenů. Výjimku tvoří původní jogurty Hollandia selský a Activia bílá, u kterých byl detekovatelný i menší pík v oblasti teploty tání 89,0 °C. Ta se nejvíce blíží teplotě tání kmene *Bifidobacterium longum* CCM 3764, případně *Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup>. U výrobku Hollandia selský výrobce deklaruje přítomnost *Bifidobakterii*, u výrobku Activia bílá je deklarována kultura *Bifidus ActiRegularis*<sup>®</sup>, jejíž součástí by mohly být uvedené kmeny. U DNA z domácích jogurtů již však druhý pík nebyl detekován.



Obrázek 22: Křivky tání DNA kmenů použitých jako pozitivní kontroly pro RT-PCR s primery P1V1, P2V1

## 6 DISKUZE

### 6.1 Koncentrace a čistota DNA izolované z čistých kultur

Pomocí přístroje NanoDrop 2000 byla měřena absorbance DNA izolované z kultur *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm. Z absorbance při vlnové délce 260 nm byla přístrojem určena koncentrace DNA, z poměrů absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{230}$  byla stanovena čistota DNA. Z každé kultury byla DNA izolována pomocí komerčního kitu a po vytvoření hrubého lyzátu také pomocí fenolové extrakce a dvou druhů magnetických částic. Jelikož pro každou z těchto metod bylo použito odlišné výchozí množství kultur v tekutém médiu a DNA byla eluována do odlišného množství roztoku, byly pro porovnání hodnoty koncentrace DNA získané spektrofotometricky přepočteny na 1 ml výchozího množství kultury a 50  $\mu$ l elučního roztoku.

Po přepočtu se koncentrace DNA pohybovaly v rozmezí 5,4 – 1121,2 ng/ $\mu$ l. Nejvyšších koncentrací DNA bylo dosaženo pomocí fenolové extrakce, řádově však byly koncentrace srovnatelné s DNA izolovanou magnetickými částicemi. K obdobným závěrům dospěli i jiní autoři [14]. Naopak nejnižších koncentrací DNA bylo dosaženo pomocí komerčního kitu. Tento výsledek je nejspíše způsoben tím, že některý z roztoků, jež jsou součástí komerčního kitu, pravděpodobně obsahuje RNasy, izolovaná DNA pak neobsahuje příměsí RNA, která by falešně zvyšovala spektrofotometricky stanovenou koncentraci DNA. Při tvorbě hrubého lyzátu, ani při následné izolaci fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi RNasy použity nebyly. Ze dvou druhů použitých magnetických částic byla získána DNA lehce vyšší koncentrací částicemi F79 lysine. Tento výsledek lze odůvodnit vyšším obsahem železa u těchto částic, což mohlo být důvodem účinnější separace v magnetickém poli, obdobný jev lze pozorovat i v práci dalších autorů [38].

Ideální hodnota poměru absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  je 1,8. Nejvíce se této hodnotě blížila DNA získaná fenolovou extrakcí, což značí, že nebyla nijak významně kontaminována bílkovinami. Nejvzdálenější od ideální hodnoty byly poměry těchto absorbancí u DNA získané magnetickými částicemi F79 lysine, kde byly zjištěné hodnoty  $< 1,8$ , což ukazuje na kontaminaci DNA bílkovinami. Poměr absorbancí  $A_{260}/A_{230}$  by měl v ideálním případě nabývat hodnoty 2,0. Této podmínce se opět nejvíce přiblížila DNA izolovaná fenolovou extrakcí, která by tedy neměla být příliš kontaminována organickými rozpouštědly. Nejnižších hodnot tento poměr nabýval u DNA získané pomocí komerčního kitu, tato DNA tedy pravděpodobně byla kontaminována organickými rozpouštědly, dle informací výrobce však roztoky kitu neobsahují EDTA, která by mohla působit jako inhibitor PCR [39].

Podle spektrofotometrického stanovení se jako nejvhodnější z použitých metod izolace DNA k použití pro PCR jeví fenolová extrakce pro její vysokou výtěžnost i dobrou čistotu získané DNA. Pro použití pro PCR byla DNA získaná fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi ředěna na koncentraci 10 ng/ $\mu$ l. Pro vysoké výtěžky DNA získané fenolovou extrakcí byla tato ředěna i na 100 ng/ $\mu$ l a 1 ng/ $\mu$ l. Pro nízké výtěžky DNA získané pomocí komerčního kitu tato DNA ředěna nebyla.

### 6.2 PCR v reálném čase s DNA z čistých kultur

Pro ověření DNA získané z kultur *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 byla použita PCR v reálném čase specifická pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*.

#### 6.2.1 RT-PCR specifická pro doménu *Bacteria*

S veškerou DNA získanou z čistých kultur, všemi způsoby izolací a všemi ředěními byla provedena RT-PCR s primery F\_eub, R\_eub, které jsou specifické pro doménu *Bacteria*. Současně byla provedena i kvantifikace pomocí kalibrační řady, za účelem zjištění počáteční koncentrace DNA

ve vzorcích. Kalibrační řada současně sloužila i jako pozitivní kontrola reakce. Detekce produktu PCR proběhla pomocí analýzy křivek tání a agarózovou gelovou elektroforézou.

Hodnoty  $C_t$  zjištěné z amplifikačních křivek byly nejnižší pro vzorky DNA izolované pomocí komerčního kitu a pro DNA získanou fenolovou extrakcí následně ředěnou na 100 ng/μl. Tomu odpovídají i hodnoty zjištěných počátečních koncentrací, které byly pro tyto vzorky nejvyšší. Lze tedy usoudit, že spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA a následné vyhodnocení nejefektivnější metody izolace DNA bylo zkráceno. Zatímco DNA izolovaná pomocí komerčního kitu se jevila jako nejméně koncentrovaná, kvantifikace pomocí PCR v reálném čase ukázala, že obsahovaly nejvíce DNA. Vzorky získané fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi byly znečištěny pravděpodobně RNA, která mohla falešně zvýšit koncentrace zjištěné spektrofotometricky, ovšem při PCR nedochází k její amplifikaci, a tak je zjištěna koncentrace čisté DNA. Při spektrofotometrickém stanovení koncentrace byly proto ve vzorcích zjištěny koncentrace několikanásobně vyšší než při kvantifikaci v rámci RT-PCR. Z amplifikačních křivek vzorků získaných fenolovou extrakcí ředěných na 1 ng/μl je zřejmé, že i tak malé množství je dostačující pro analýzu pomocí PCR. Při detekci produktů u těchto vzorků byl detekován dostatečně vysoký pík u analýzy křivek tání. U gelové elektroforézy se svítivost pásů specifických produktů těchto vzorků příliš nelišila od ostatních vzorků.

Analýza křivek tání ukázala u všech vzorků kromě negativní kontroly teplotu tání v rozmezí 86,8 – 88,8 °C, což potvrzuje přítomnost DNA domény *Bacteria* ve všech vzorcích. Agarózová gelová elektroforéza provedená s produkty PCR poskytla u všech vzorků kromě negativní kontroly viditelný svítící pás detekující specifické produkty v oblasti 466 bp, což opět potvrzuje přítomnost DNA domény *Bacteria* ve všech vzorcích. Důkaz přítomnosti DNA domény *Bacteria* pomocí těchto primerů byl proveden i jinými autory [32]. Nepřítomnost píku teploty tání i svítícího pásu u gelové elektroforézy u negativní kontroly potvrzuje, že komponenty PCR nebyly kontaminovány cizorodou DNA.

### 6.2.2 RT-PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

S veškerou DNA získanou s čistých kultur, všemi způsoby izolací a všemi ředěními byla provedena RT-PCR s primery F allact, R allact, jež jsou specifické pro rod *Lactobacillus*. Jako pozitivní kontrola byla použita kultura *Lactobacillus gasseri* RL22P. Produkt byl detekován analýzou křivek tání a agarózovou gelovou elektroforézou.

Z hodnot  $C_t$  získaných z amplifikačních křivek vyplývá, že nejvyšší počáteční koncentrace DNA byla ve vzorcích izolovaných pomocí komerčního kitu a fenolovou extrakcí ředěných na 100 ng/μl. Potvrzuje se tak domněnka, že DNA izolovaná pomocí komerčního kitu se při spektrofotometrickém stanovení koncentrace jeví málo koncentrovaná, ovšem je velmi čistá, na rozdíl od DNA izolované fenolovou extrakcí či magnetickými částicemi.

Při následné analýze křivek tání byly u všech vzorků kromě negativní kontroly detekovány píky v oblasti teploty tání 82,5 – 82,8 °C. Tyto píky byly detekovány i u DNA získané z kultury *Streptococcus thermophilus*, což značí její kontaminaci rodem *Lactobacillus*. S produkty PCR byla provedena agarózová gelová elektroforéza, kde se u všech vzorků kromě negativní kontroly objevil svítící pás detekující specifické produkty v oblasti 92 bp. Obdobně byla prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* i jinými autory [32]. Přítomnost specifických produktů i u vzorků získaných z kultury *Streptococcus thermophilus* značí jejich kontaminaci rodem *Lactobacillus*. Ve všech vzorcích kromě negativní kontroly byla potvrzena přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*. Vzorky z kultury *Streptococcus thermophilus* tak lze označit za kontaminované a pro další použití byly vyřazeny. Na základě této zkušenosti byly v ostatních vzorcích ověřeny i konkrétní druhy.



### 6.3 Konvenční PCR

Pro ověření DNA kmenů *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup> a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> byla použita konvenční PCR se specifickými primery. Produkty byly detekovány agarózovou elektroforézou. Vzorky s DNA z kmene *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup> byly podrobeny PCR s primery F Casei R Casei, jež jsou specifické pro druh *Lactobacillus casei*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>. Gelovou elektroforézou byl detekován specifický produkt o očekávané velikosti 132 bp u všech vzorků kromě negativní kontroly. U všech vzorků DNA z kmene *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup> tak byla potvrzena přítomnost DNA druhu *Lactobacillus casei*. Stejným způsobem byla potvrzena přítomnost DNA tohoto druhu i v jiných publikacích [32]. Vzorky s DNA z kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> byly podrobeny PCR s primery F plant R plant, jež jsou specifické pro druh *Lactobacillus plantarum*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>. Gelovou elektroforézou byl detekován specifický produkt o očekávané velikosti 144 bp u všech vzorků kromě negativní kontroly. U všech vzorků DNA z kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> tak byla potvrzena přítomnost DNA druhu *Lactobacillus plantarum*, obdobně jako v publikaci [32]. Vzorky s DNA z kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> byly podrobeny PCR s primery Pr I a Rha II, jež jsou specifické pro druh *Lactobacillus plantarum*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. Gelovou elektroforézou byl detekován specifický produkt o očekávané velikosti 200 a 400 bp u všech vzorků kromě negativní kontroly. U všech vzorků DNA z kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> tak byla potvrzena přítomnost DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus*. Použitelnost těchto primerů byla potvrzena i v publikaci [33]. Pomocí konvenční PCR tak byly ověřeny vzorky DNA z kmenů *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup> a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup> na příslušnost konkrétních druhů. U všech vzorků byla detekována přítomnost DNA příslušného druhu *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*.

### 6.4 Koncentrace a čistota DNA z vypěstovaných kultur

Z kultur *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>, *Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup> pěstovaných na MRS médiu za aerobních podmínek, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 pěstované na YGLPB médiu za aerobních podmínek a *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium longum* CCM 3764, *Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup> pěstovaných na MRS médiu s přidavkem cysteinu anaerobně byla izolována DNA pomocí komerčního kitu. Pomocí přístroje NanoDrop 2000 byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota izolované DNA.

Koncentrace získané DNA se pohybovala v rozmezí 4,0 – 27,7 ng/μl. Nejnížší koncentrace DNA byly získány z kmene *Bifidobacterium longum* CCM 3764, což odpovídá pouze slabému zákalu pozorovanému v tekutém živném médiu s tímto kmenem. Nejvyšší koncentrace DNA byly naměřeny u vzorků z kmene *Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>, což odpovídá i nejvyššímu zákalu v tekutém živném médiu. Poměr absorbcí  $A_{260/280}$  se u všech vzorků blížil optimální hodnotě 1,8. Poměr  $A_{260/230}$  byl u všech vzorků nižší než ideální hodnota 2,0, což značí kontaminaci organickými rozpouštědly, navzdory tomu by izolovaná DNA měla být vhodná k použití pro PCR.

### 6.5 Koncentrace a čistota DNA získané z jogurtových výrobků

Z výrobků Activia bílá, Billa Naše bio bílý jogurt, Choceňský smetanový bílý jogurt, Selský jogurt bílý Hollandia, Jogobella zahradní a lesní jahoda a Opočenský jogurt byla izolována DNA. První izolace byla provedena pouze pomocí komerčního kitu. U většiny výrobků byla takto získaná DNA velmi nízké koncentrace (dle spektrofotometrického stanovení). Nízké hodnoty poměrů absorbcí  $A_{260/280}$  a  $A_{260/230}$  značí, že vzorky navíc obsahovaly bílkoviny a byly kontaminovány rozpouštědly. Tyto nevalné výsledky byly pravděpodobně způsobeny velkým množstvím balastních látek přítomných v jogurtech. Získaná DNA nebyla vhodná k použití pro PCR.

V dalším pokusu izolace DNA z jogurtových výrobků byly vzorky nejprve třikrát promyty roztokem A, tedy 10 mM tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8. Roztok by měl napomoci rozpuštění přebytečných tuků a bílkovin přítomných v jogurtech tak, aby po centrifugaci zůstaly v roztoku a mohly pak být odstraněny jako supernatant. Následně byla DNA izolována pomocí komerčního kytu. Koncentrace DNA získané tímto způsobem stanovené spektrofotometricky byly opět velmi nízké, v některých případech byly dokonce přístrojem označeny jako záporné. Špatnou kvalitu DNA naznačovaly i poměry absorbancí  $A_{260/280}$  a  $A_{260/230}$ , které byly významně nižší než hodnoty ideální. Ve vzorcích tedy pravděpodobně stále zůstávalo velké množství balastních látek bránící provedení izolace DNA. Získaná DNA opět nebyla vhodná k použití pro PCR.

Nakonec byly vzorky izolovány komerčním kitem po sedminásobném promytí roztokem A. Postup promytí vzorků lyzačním roztokem před izolací DNA byl popsán i dalšími autory [12]. Po promytí zůstaly ve zkumavkách jen na pohled čisté buňky. Spektrofotometricky stanovené koncentrace izolované DNA se pohybovaly v rozmezí 1 – 13 ng/μl. Hodnoty poměru absorbancí  $A_{260/280}$  se pohybovaly v rozmezí 1,66 – 2,19, což jsou hodnoty blízké ideální hodnotě 1,8. Poměry absorbancí  $A_{260/230}$  se pohybovaly v rozmezí 1,17 – 1,97, což jsou hodnoty nižší než ideální hodnota 2,0 ukazující na mírnou kontaminaci rozpouštědly. Získaná DNA tedy byla v kvalitě vhodné pro PCR. V literatuře se většinou vyskytují případy izolace DNA z komplexních výrobků až po vypěstování bakterií z výrobků na živném médiu [40], to však může mít za následek selektivní růst pouze některých druhů bakterií z výrobku. Případně je nutno použít více druhů médií pro umožnění růstu všech obsažených bakterií, což je časově náročné.

Ze dvou várek domácích jogurtů vyrobených z jogurtových výrobků zaočkováním výrobku do mléka byly provedeny vždy dvě izolace DNA optimalizovaným způsobem, tedy sedminásobným promytím roztokem A a následnou izolací komerčním kitem. Byla získána DNA, u níž byly spektrofotometricky stanoveny koncentrace v rozmezí 3,1 – 100,3 ng/μl. Hodnoty poměrů absorbancí  $A_{260/280}$  se u všech vzorků blížily 1,8, hodnoty poměru  $A_{260/230}$  byly opět nižší než 2,0, což značí kontaminaci rozpouštědly. Z každé várky v každé izolaci tak byla pro každý jogurt získána DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

## 6.6 RT-PCR s DNA z jogurtových výrobků

Se všemi vzorky DNA získané z jogurtových výrobků v kvalitě vhodné pro PCR byla provedena RT-PCR se šesti dvojicemi primerů s následnou analýzou křivek tání. Primery V3\_F a V3\_R, V6\_F a V6\_R, V1\_F a V1\_R obsahují sekvence z bakteriálního genu 16S rDNA. Ten zahrnuje devět „hypervariabilních“ oblastí, z nichž jmenované dvojice primerů využívají oblasti V1, V3 a V6 [36]. 16S rRNA hypervariabilní oblasti vykazují různé stupně sekvenční diverzity a žádná jediná hypervariabilní oblast tak není schopna rozlišit mezi všemi bakteriemi [41].

Při použití primerů V3\_F, V3\_R došlo k amplifikaci všech vzorků i pozitivních kontrol. Z hodnot prahových cyklů jednotlivých vzorků je možné pozorovat změnu množství DNA v jednotlivých jogurtech. U většiny jogurtů počáteční koncentrace DNA mezi původním jogurtem a 1. izolací z 1. domácího jogurtu vzrostla. Jogurty tedy pravděpodobně obsahovaly dostatek životaschopných buněk, které se po zaočkování do nového média (mléka) začaly množit. U jogurtů Billa Naše bio a Chocoňského smetanového počáteční koncentrace DNA klesla, tyto jogurty tedy nejspíš obsahovaly méně životaschopných buněk. Mezi 1. a 2. izolací z 1. domácího jogurtu počáteční koncentrace DNA u všech výrobků klesla, stejně tak mezi 2. izolací z 1. domácího jogurtu a 1. izolací z 2. domácího jogurtu. Počáteční koncentrace DNA ze 2. várky 2. domácího jogurtu oproti předchozí o něco vzrostla. Kultury se tedy po dobu sedmidenního skladování pravděpodobně ještě namnožily. Tyto výsledky mohou být zkresleny nedokonalým homogenizováním jogurtů před odebráním vzorků, nebo nedokonalým promytím před zahájením izolace DNA.

Po RT-PCR s primery V3\_F, V3\_R byla provedena analýza křivek tání. Podle shodné teploty tání DNA z jogurtových výrobků a kontrolních kmenů lze usuzovat na obsah kultur *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* nebo *Streptococcus thermophilus* ve všech analyzovaných jogurtech. Jelikož se jedná o základní jogurtové kultury, je jejich přítomnost ve vzorcích i velmi pravděpodobná. Výjimkou byl původní jogurt Activia bílá, teplota tání z něj získané DNA ukazuje na obsah kultury *Lactobacillus acidophilus*, která je pravděpodobně obsažena v deklarované kultuře s obchodním názvem Bifidus ActiRegularis®. U DNA z domácích jogurtů vyrobených z tohoto výrobku se však teploty tání již neliší. Kultura *Lactobacillus acidophilus* tedy pravděpodobně nebyla schopna přežít v novém prostředí v konkurenci základních jogurtových kultur. Výjimkou byla i teplota tání DNA z druhého domácího jogurtu z výrobku Hollandia selský, která rovněž ukazovala na přítomnost DNA kultury *Lactobacillus acidophilus*, která je v původním jogurtu výrobcem deklarována. Zde však pravděpodobně začala převažovat až s výrobou domácích jogurtů.

Při použití primerů V6\_F, V6\_R lze z teplot tání DNA vzorků jogurtových výrobků usuzovat na přítomnost DNA kultury *Streptococcus thermophilus*, která je součástí základních jogurtových kultur. Výjimkou byly vzorky získané z obou izolací obou domácích jogurtů z výrobku Jogobella, kde teplota tání DNA stoupla, nebyla srovnatelná s žádnou z pozitivních kontrol, ovšem ukazuje na změnu zastoupení kultur výrobou domácích jogurtů. Za použití primerů V1\_F, V1\_R byla u všech vzorků detekována teplota tání DNA shodná s teplotou tání kmene *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>. Jelikož se jedná o základní jogurtovou kulturu, ve všech výrobcích by přítomna být měla a její přítomnost nebyla ovlivněna ani přeočkováním a výrobou domácích jogurtů.

S použitím primerů P1V1, P2V1 byly teploty tání DNA vzorků jogurtových výrobků srovnatelné s teplotou tání kmene *Streptococcus thermophilus* CCM 4757. Tato kultura je součástí základních jogurtových kultur, její přítomnost nebyla jednoznačně potvrzena pouze u DNA izolované z domácích jogurtů výrobku Jogobella, kde byla teplota tání vyšší. Nelze ji srovnat s žádnou z pozitivních kontrol, je však znakem toho, že se zastoupení kultur výrobou domácích jogurtů změnilo. Sekvence primerů je vybrána z V1 oblasti genu 16S rDNA, možnost odlišení kultury *Streptococcus thermophilus* pomocí těchto primerů byla pozorována i jinými autory [42].

Při použití primerů s označením UPF, UPR byla u všech vzorků detekována teplota tání, která nebyla srovnatelná s žádným s kmenů, které se pomocí těchto primerů podařilo rozlišit. U vzorků DNA z původních jogurtů Activia bílá a Hollandia selský byl navíc detekován menší pík, který ukazuje na přítomnost kultur *Bifidobacterium longum* nebo *Bifidobacterium animalis*. U výrobku Hollandia selský jsou bifidobakterie deklarovány výrobcem, u výrobku Activia bílá mohou být tyto kultury součástí deklarované Bifidus ActiRegularis®. V obou jogurtech byla přítomnost bakterií rodu *Bifidobacteria* pozorována i jinými autory [43]. U DNA z domácích jogurtů se však tento pík vytratil, pravděpodobně tedy bifidobakteria nebyla schopna přežít přeočkování do nového prostředí.

Při použití primerů GroHRM\_F, GroHRM\_R došlo k amplifikaci pouze u DNA z kmenů *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. Žádný ze vzorků tedy uvedené kultury neobsahoval. Použité primery jsou navrženy pro amplifikaci krátké hypervariabilní oblasti (asi 150 bp) genu *groEL* bakterií rodu *Lactobacillus*, jinými autory byly použity pro rozlišení fylogeneticky příbuzných druhů z rodu *Lactobacillus*, a to *L. casei*, *L. paracasei* a *L. rhamnosus* [34].

Všechny jogurtové výrobky by tedy měly obsahovat kulturu *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, jejíž poměrné zastoupení neochabovalo ani výrobou domácích jogurtů ani jejich sedmidenním skladováním. Všechny také obsahovaly kulturu *Streptococcus thermophilus*, která rovněž bez problémů přežívala napříč domácími jogurty, s výjimkou těch vyrobených z jogurtu Jogobella. Podle doporučení výrobce výrobníku jogurtů by jogurtové kultury měly přežít až deset výrob domácích jogurtů v řadě [44]. Výrobek Activia bílá navíc v původním jogurtu obsahoval i

kultury *Bifidobacterium longum* nebo *Bifidobacterium animalis* a *Lactobacillus acidophilus*, jejich zastoupení však s výrobou domácích jogurtů vymizelo. Kultury *Bifidobacterium longum* nebo *Bifidobacterium animalis* byly navíc zaznamenány i u výrobku Hollandia selský, kde rovněž vymizely s výrobou domácích jogurtů. U vzorků 2. izolace z 2. domácího jogurtu tohoto jogurtu byla zaznamenána navíc kultura *Lactobacillus acidophilus*, která nejspíš výrobou domácích jogurtů začala převažovat.

Rozlišení kultur přítomných ve směsných vzorcích pomocí prumerů umožňujících rozlišení více druhů najednou pomocí melt analýzy nejspíše není zcela přesné a vyžaduje další optimalizaci. Ne vždy je u vzorků obsahujících více kultur detekováno také více pík na křivkách tání. Naopak často vzniká jeden pík, jehož teplota tání může být posunuta oproti teplotám tání čistých kultur vlivem příměsí dalších kultur.

## 7 ZÁVĚR

V experimentální části byla izolována DNA z čistých jogurtových kultur *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 pomocí fenolové extrakce, dvou druhů magnetických částic a komerčního kitu. Získaná DNA byla spektrofotometricky kvantifikována a kvalifikována, následně byla podrobena RT-PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*, kde byla rovněž provedena kvantifikace. Pomocí těchto postupů byla jako nejefektivnější metoda izolace DNA vyhodnocena izolace komerčním kitem. Rovněž byla u všech vzorků potvrzena přítomnost DNA domény *Bacteria*. Získaná DNA byla také ověřena pomocí PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* a rody *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus casei*. U veškeré získané DNA tak byl potvrzen její rod i druh, kromě DNA z kultury *Streptococcus thermophilus*, jejíž vzorky byly pro další použití vyřazeny.

Dále byly vypěstovány další jogurtové kultury na vhodných médiích *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>, *Lactococcus lactis* CCM 1877<sup>T</sup>, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium longum* CCM 3764, *Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup>. Pomocí komerčního kitu byla z těchto kultur izolována DNA. Spektrofotometricky byla potvrzena její vhodnost k použití pro PCR.

Z jogurtových výrobků Activia bílá, Danone (Praha, ČR), Billa Naše bio bílý jogurt z čerstvého mléka (Říčany u Prahy, ČR), Chocoňský smetanový jogurt bílý (Choceň, ČR), Selský jogurt bílý Hollandia (Karlovy Vary, ČR), Jogobella zahradní a lesní jahoda, Zott (Mertingen, Německo), Opočenský jogurt bílý, Bohemilk mlékárna Opočno (ČR) byla izolována DNA, a to nejprve pouze za použití komerčního kitu, dále s trojnásobným promytím lyzačním roztokem a následnou izolací komerčním kitem a nakonec se sedminásobným promytím lyzačním roztokem a následnou izolací komerčním kitem. Dle výsledků spektrofotometrického stanovení byla DNA v kvalitě vhodně pro PCR získána pouze po sedminásobném promytí vzorku před izolací. Dále byly z těchto výrobků zaočkováním do mléka vyrobeny domácí jogurty, z nich pak stejným způsobem další várka domácích jogurtů. Z každé várky pak byla dvakrát izolována DNA se sedmidenním odstupem.

Získaná DNA z jogurtových výrobků byla podrobena RT-PCR se šesti dvojicemi primerů (V3\_F a V3\_R, V6\_F a V6\_R, V1\_F a V1\_R, GroHRM\_F a GroHRM\_R, UPF a UPR, P1V1 a P2V1) s DNA z čistých kultur jako pozitivními kontrolami. Podle výsledků analýzy křivek tání byla u všech výrobků potvrzena přítomnost kultur *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* deklarovaných výrobcem. U obou byla také potvrzena jejich schopnost přežít v rámci výroby domácích jogurtů, kromě výrobku Jogobella, kde v domácích jogurtech kultura *Streptococcus thermophilus* nejspíše ubývala. U výrobku Activia bílá lze navíc usuzovat na přítomnost kultur *Bifidobacterium longum* nebo *Bifidobacterium animalis* a *Lactobacillus acidophilus*, které jsou pravděpodobně skryty pod výrobcem deklarovanou kulturou Bifidus ActiRegularis<sup>®</sup>, jejich zastoupení však s výrobou domácích jogurtů vymizelo. U výrobku Hollandia selský, kde výrobce deklaruje přítomnost *Bifidobacterii* a *Lactobacillus acidophilus* byly rovněž detekovány kultury *Bifidobacterium longum* nebo *Bifidobacterium animalis*. Kultura *Lactobacillus acidophilus* byla detekována až ve druhém domácím jogurtu. Rozlišování kultur pomocí primerů, které nejsou specifické pro určitý druh, ale umožňují pomocí analýzy křivek tání detekovat více druhů najednou je metoda rychlá, ovšem ne dostatečně přesná. Směsné kultury nemusejí být vzájemně odlišeny a zkreslují tak interpretaci výsledků.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky. *Společnost pro výživu* [online]. 2012. Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/vyzivova-doporuceni-pro-obyvatelstvo-ceske-republiky/>
- [2] FERNANDES, Rhea. *MICROBIOLOGY HANDBOOK*. Cambridge: Leatherhead Pub., and Royal Society of Chemistry, 2009. ISBN 9781905224623.
- [3] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiologie poživatin: principy mikrobiologie poživatin, potravinářsky významné mikroorganismy a jejich skupiny, mikrobiologie potravinářských výrob, ochorenia mikrobiálního povodu, kterých zárodky jsou přenášány poživatinami*. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.
- [4] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH, Michal VOLDŘICH a A KOL. *Technologie potravin: Přehled tradičních potravinářských výrob*. Ostrava-Přívov: KEY Publishing s.r.o., 2012. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [5] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [6] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH, Michal VOLDŘICH a A KOL. *Technologie potravin: Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Ostrava-Přívov: KEY Publishing s.r.o., 2013. ISBN 978-80-7418-163-4.
- [7] MUYYARIKKANDY, Muhammed Shafeekh a Mary Anne AMALARADJOU. Lactobacillus bulgaricus , Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus paracasei Attenuate Salmonella Enteritidis , Salmonella Heidelberg and Salmonella Typhimurium Colonization and Virulence Gene Expression In Vitro. *International Journal of molecular science* [online]. 2017. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms18112381](https://doi.org/10.3390/ijms18112381)
- [8] GUO, Shuangshuang, Dan LIU, Beibei ZHANG, Zhui LI, Yehan LI a Binying DING. Two Lactobacillus Species Inhibit the Growth and  $\alpha$ -Toxin Production of Clostridium perfringens and Induced Proinflammatory Factors in Chicken Intestinal Epithelial Cells in Vitro. *Frontiers in microbiology* [online]. 2017, roč. 8, č. October, s. 1–12. Dostupné z: [doi:10.3389/fmicb.2017.02081](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02081)
- [9] XU, Haiyan, Weiqiang HUANG, Qiangchuan HOU, Lai-yu KWOK, Zhihong SUN, Huimin MA, Feiyan ZHAO, Yuan-kun LEE a Heping ZHANG. The effects of probiotics administration on the milk production , milk components and fecal bacteria microbiota of dairy cows. *Science Bulletin* [online]. 2017, roč. 62, č. 11, s. 767–774. ISSN 2095-9273. Dostupné z: [doi:10.1016/j.scib.2017.04.019](https://doi.org/10.1016/j.scib.2017.04.019)
- [10] ŠMARDA, Josef, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTUČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [11] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie - díl první*. 1998. ISBN 80-902562-5-2.
- [12] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [13] TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA , RNA , and Protein Extraction : The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, s. 10. Dostupné z: [doi:10.1155/2009/574398](https://doi.org/10.1155/2009/574398)
- [14] TRACHTOVÁ, Štěpánka a Bohuslav RITTICH. *Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích*. B.m., 2011. Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně.
- [15] LO, Yat-tung a Pang-chui SHAW. DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chemistry* [online]. 2018, roč. 240, č. August 2017, s. 767–774. ISSN 0308-8146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.022](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.022)

- [16] TANG, J. Y. H., N. A. S. RAZALI, L. A. JALIL, Y. NAKAGUCHI, M. NISHIBUCHI a S. RADU. Special Issue. *Journal of fundamental and applied science* [online]. 2017. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v9i2s.43>
- [17] MARIESCHI, Matteo, Anna TORELLI, Deborah BEGHÉ a Renato BRUNI. Authentication of *Punica granatum* L.: Development of SCAR markers for the detection of 10 fruits potentially used in economically motivated adulteration. *FOOD CHEMISTRY* [online]. 2016, roč. 202, s. 438–444. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:[10.1016/j.foodchem.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.011)
- [18] TORELLI, Anna, Matteo MARIESCHI a Renato BRUNI. Authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) in different processed, retail products by means of SCAR markers. *Food Control* [online]. 2014, roč. 36, č. 1, s. 126–131. ISSN 0956-7135. Dostupné z: doi:[10.1016/j.foodcont.2013.08.001](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.001)
- [19] KUMAR, Deepak a S P SINGH. Authentication of beef, carabeef, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial cyt b gene. *Journal of Food science and Technology* [online]. 2014, roč. 51, č. November. Dostupné z: doi:[10.1007/s13197-012-0864-z](https://doi.org/10.1007/s13197-012-0864-z)
- [20] PEREIRA, Leonor a Paula MARTINS-LOPES. Molecular Markers for Assessing Must Varietal Origin. *Food analysing methods* [online]. 2012, roč. 5. Dostupné z: doi:[10.1007/s12161-012-9369-7](https://doi.org/10.1007/s12161-012-9369-7)
- [21] RUMML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko technologická, 2002. ISBN 80-7080-499-8.
- [22] CHEN, Bing-Yuan a Harry W. JANES. *PCR cloning protocols*. 2. vyd. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002. ISBN 08-960-3973-0.
- [23] *Polymerázová řetězová reakce* [online]. 2012. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/uni03/uni03.html>
- [24] *PCR expansion* [online]. 2012. Dostupné z: <http://robotika.cz/articles/gerda/pcr-expansion.png>
- [25] TEVFIK DORAK, M. *Real-time PCR*. BIOS Advan. Abingdon: Taylor, 2006. ISBN 02-039-6731-3.
- [26] HEID, Christian A, Junko STEVENS, Kenneth J LIVAK a P Mickey WILLIAMS. Real Time Quantitative PCR. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* [online]. 1994, s. 986–994. Dostupné z: doi:[10.1101/gr.6.10.986](https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986)
- [27] Real-time-curve. *Lab Guide* [online]. 2014. Dostupné z: <http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Real-time-curve.jpg>
- [28] ANDRADE, Manuel, Mikael KUBISTA, Kristina LIND, Radek SINDELKA, Robert SJO, Linda STRO a Anders STA. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* [online]. 2006, roč. 27, s. 95–125. Dostupné z: doi:[10.1016/j.mam.2005.12.007](https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007)
- [29] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA--its role and potential in food analysis. *Food chemistry* [online]. 2014, roč. 158, s. 245–54. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:[10.1016/j.foodchem.2014.02.111](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111)
- [30] ŠIMENC, Janez a Uros POTOČNIK. Rapid differentiation of bacterial species by high resolution melting curve analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2011, roč. 47, č. 3, s. 256–263. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:[10.1134/S0003683811030136](https://doi.org/10.1134/S0003683811030136)
- [31] Křivka tání DNA. *Detekce příčin rezistence protideštičkové léčby u rizikových pacientů* [online]. 2016. Dostupné z: <http://atelim.com/detekce-pin-rezistence-protidestikov-lby-u-rizikovch-pacient-d.html?part=3>
- [32] HAARMAN, Monique a Jan KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, roč. 72, č. 4, s. 2359–2365. Dostupné z: doi:[10.1128/AEM.72.4.2359](https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2359)

- [33] WALTER, J, G W TANNOCK, S RODTONG a D M LOACH. Detection and Identification of Gastrointestinal Lactobacillus Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, roč. 66, č. 1, s. 297–303.
- [34] KOIRALA, Ranjan, Valentina TAVERNITI, Silvia BALZARETTI, Giovanni RICCI, Maria GRAZIA a Simone GUGLIELMETTI. Melting curve analysis of a groEL PCR fragment for the rapid genotyping of strains belonging to the Lactobacillus casei group of species. *Microbiological Research* [online]. 2015, roč. 173, s. 50–58. ISSN 0944-5013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2015.01.001
- [35] KLIJN, Nicolette, Anton H WEERKAMP a Willem M D E 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, roč. 57, č. 11, s. 3390–3393.
- [36] YANG, Samuel, Padmini RAMACHANDRAN, Richard ROTHMAN, Yu-hsiang HSIEH, Andrew HARDICK, Helen WON, Aleksandar KECOJEVIC, Joany JACKMAN a Charlotte GAYDOS. 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* [online]. 2009, roč. 47, č. 7, s. 2252–2255. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00033-09
- [37] MARTINI, Marta, Serena MORUZZI, Paolo ERMACORA, Nazia LOI a Giuseppe FIRRAO. Quantitative real-time PCR and high-resolution melting (HRM) analysis for strain-specific monitoring of fluorescent pseudomonads used as biocontrol agents against soil-borne pathogens of food crops. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2015, roč. 46, č. 2, s. 277–285. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2015.10.017
- [38] CHLOPKOVÁ, Barbora a Bohuslav RITTICH. *MAGNETICKÉ NOSIČE A JEJICH PRAKTICKÉ VYUŽITÍ*. B.m., 2016. Brno University of Technology, Faculty of chemistry.
- [39] BIO LABORATORIES, MO. *UltraClean Microbial DNA Isolation Kit, Instruction manual* [online]. 2016. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=cda265c5-c1f0-4c99-acee-7282fc6aa371&lang=en>
- [40] DELAVENNE, Emilie, Rached ISMAIL, Audrey PAWTOWSKI, Jerome MOUNIER a Georges BARBIER. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* [online]. 2013, roč. 30, č. 1, s. 206–213. ISSN 0956-7135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.043
- [41] CHAKRAVORTY, Soumitesh, Danica HELB, Michele BURDAY, Nancy CONNELL a David ALLAND. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2007, roč. 69, s. 330–339. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005
- [42] COCOLIN, Luca, Nadia INNOCENTE, Marialuisa BIASUTTI a Giuseppe COMI. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, roč. 90, s. 83–91. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1605(03)00296-4
- [43] ŠPANOVÁ, Alena, Bohuslav RITTICH, Milan J BENEŠ a Daniel HORÁK. Ferrite supports for isolation of DNA from complex samples and polymerase chain reaction amplification ˇ. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, roč. 1080, s. 93–98. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.05.006
- [44] *Guzzanti Digitální jogurtovač GZ-700, návod k osluzce* [online]. nedatováno. Dostupné z: <https://www.zbozi.cz/vyrobek/guzzanti-gz-700/manual-navod/navod-k-osluzce/>



## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp – pár bází

CCM – Česká sbírka mikroorganismů

C<sub>t</sub> – threshold cyklus (prahový cyklus)

cys – cystein

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát

EDTA – etylendiamintetraacetát

GMO – geneticky modifikované organismy

HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání

MRS – de Man, Rogosa, Sharpe

PEG – polyethylenglykol

RNA – ribonukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

RT-PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase

SDS – dodecylsulfát sodný

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

TE pufr – Tris-EDTA pufr

T<sub>m</sub> – teplota tání

UHT záhřev – záhřev na vysokou teplotu (Ultra High Temperature)

UV – ultrafialové světlo

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

YGLPB – Yeast, Glucose, Lactose, Peptone, Broth