



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

VYUŽITÍ POKROČILÝCH MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH TECHNIK PRO DETAILNÍ CHARAKTERIZACI PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ Z DOPLŇKU STRAVY

USE OF ADVANCED MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR DETAILED CHARACTERIZATION OF
PROBIOTIC BACTERIA FROM A DIETARY SUPPLEMENT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tereza Folwarczná

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1882/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Tereza Folwarczná**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Smetana, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití pokročilých molekulárně biologických technik pro detailní charakterizaci probiotických bakterií z doplňku stravy

Zadání diplomové práce:

Cílem diplomové práce je teoretická část věnována zejména konkrétním probiotickým druhům zastoupených v doplňcích stravy a které druhy se aplikují jako léčba některých onemocnění trávicího traktu. Dále se věnuje popisu molekulárně – biologických metod používaných k identifikaci probiotických bakterií. V experimentální části je izolována DNA probiotických bakterií z doplňku stravy deklarované na obalu výrobku, a následně je ověřena jejich přítomnost metodou vysokorozlišovací analýzou křivek tání.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Tereza Folwarczná
studentka

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce byl průkaz probiotických bakterií z probiotického doplňku stravy ve formě sirupu. Z komplexní matrice výrobku byla izolována DNA v dostatečné čistotě a kvalitě vhodné pro metodu PCR v reálném čase a následně PCR-HRM. K amplifikaci pomocí PCR v reálném čase a PCR-HRM byly použity specifické primery pro rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* a na úrovni druhu pro druhy *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* a *Streptococcus thermophilus*. Po optimalizaci podmínek pro specifické primery byly ve výrobku prokázány všechny deklarované bakterie.

ABSTRACT

The aim of the diploma thesis was the identification of probiotic bacteria from a probiotic food supplement in the form of syrup. DNA was isolated from the complex matrix of the product in sufficient purity and quality suitable for the real-time PCR method followed by PCR-HRM. Specific primers for the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Streptococcus* and at the species level for the species *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* and *Streptococcus thermophilus* were used for amplification by real-time PCR and PCR-HRM. After optimizing the conditions for specific primers, all declared bacteria were detected in the product.

KLÍČOVÁ SLOVA

probiotika, probiotický doplněk stravy, izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), PCR v reálném čase, HRM analýza

KEYWORDS

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

FOLWARCZNA, Tereza. *Využití pokročilých molekulárně biologických technik pro detailní charakterizaci probiotických bakterií z doplňku stravy* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148842>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jan Smetana.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce Mgr. Janovi Smetanovi, Ph.D. za ochotu a odborné vedení při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Fialové, Ph.D a Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za ochotu, cenné rady a pomoc, které mi byly vstřícně poskytnuty během zpracovávání této diplomové práce.

OBSAH

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD..... | 8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST..... | 9 |
| 2.1 | Probiotikum | 9 |
| 2.2 | Dělení probiotik..... | 9 |
| 2.2.1 | Rod <i>Lactobacillus</i> | 10 |
| 2.2.2 | Rod <i>Bifidobacterium</i> | 13 |
| 2.2.3 | Rod <i>Streptococcus</i> | 16 |
| 2.3 | Prebiotikum | 17 |
| 2.3.1 | Typy prebiotik | 18 |
| 2.4 | Symbiotika..... | 18 |
| 2.5 | Onemocnění..... | 19 |
| 2.5.1 | Průjmová onemocnění | 19 |
| 2.5.2 | Laktózová intolerance | 19 |
| 2.5.3 | Zánětlivé onemocnění střev | 20 |
| 2.5.4 | Syndrom dráždivého tračníku..... | 20 |
| 2.5.5 | Rakovina tlustého střeva..... | 20 |
| 2.5.6 | Další onemocnění trávicího traktu..... | 20 |
| 2.6 | Probiotické doplňky stravy..... | 20 |
| 2.6.1 | Bezpečnost..... | 21 |
| 2.7 | Metody identifikace DNA | 21 |
| 2.7.1 | Fenotypové metody | 21 |
| 2.7.2 | Morfologické metody | 21 |
| 2.7.3 | Biochemické a fyziologické metody | 21 |
| 2.7.4 | Molekulární metody | 22 |
| 2.7.5 | Gelová elektroforéza | 28 |
| 2.7.6 | Vysokorozlišovací analýza křivek tání..... | 29 |
| 3 | CÍL PRÁCE..... | 31 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 32 |
| 4.1 | Použitý vzorek doplňku stravy | 32 |
| 4.2 | Chemikálie a roztoky..... | 32 |
| 4.2.1 | Chemikálie..... | 32 |
| 4.2.2 | Roztoky..... | 33 |
| 4.3 | Přístroje | 34 |
| 4.4 | Použité mikroorganismy pro pozitivní kontrolu | 34 |
| 4.5 | Metody..... | 35 |
| 4.5.1 | Lyze bakteriálních buněk | 35 |
| 4.5.2 | Fenolová extrakce bakteriální DNA | 35 |
| 4.5.3 | Izolace bakteriální DNA pomocí Omni Bacterial DNA Purification kitu (Omni International)..... | 35 |
| 4.5.4 | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA ... | 36 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.5.5 | Příprava směsi pro PCR..... | 36 |
| 4.5.6 | Programy amplifikace PCR..... | 38 |
| 5 | VÝSLEDKY | 40 |
| 5.1 | Příprava hrubých lyzátů z doplňku stravy | 40 |
| 5.2 | Izolace DNA..... | 40 |
| 5.3 | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA | 40 |
| 5.4 | PCR v reálném čase s analýzou křivek tání (Melt analýza) | 41 |
| 5.4.1 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod <i>Lactobacillus</i> | 41 |
| 5.4.2 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus casei</i> | 44 |
| 5.4.3 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 47 |
| 5.4.4 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 50 |
| 5.4.5 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus plantarum</i> | 53 |
| 5.4.6 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus reuteri</i> | 56 |
| 5.4.7 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod <i>Bifidobacterium</i> . | 57 |
| 5.4.8 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i> | 60 |
| 5.4.9 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium breve</i> | 63 |
| 5.4.10 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 66 |
| 5.4.11 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium lactis</i> | 68 |
| 5.4.12 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium longum</i> | 70 |
| 5.4.13 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium infantis</i> | 72 |
| 5.4.14 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod <i>Streptococcus</i> | 73 |
| 5.4.15 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Streptococcus thermophilus</i> | 76 |
| 6 | DISKUSE..... | 78 |
| 6.1 | Izolace DNA..... | 78 |
| 6.2 | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA | 78 |
| 6.3 | PCR v reálném čase..... | 78 |
| 6.3.1 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod <i>Lactobacillus</i> | 79 |
| 6.3.2 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus casei</i> | 79 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6.3.3 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 79 |
| 6.3.4 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 79 |
| 6.3.5 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus plantarum</i> | 80 |
| 6.3.6 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus reuteri</i> | 80 |
| 6.3.7 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod <i>Bifidobacterium</i> . | 80 |
| 6.3.8 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i> | 80 |
| 6.3.9 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium breve</i> | 80 |
| 6.3.10 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 81 |
| 6.3.11 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium lactis</i> | 81 |
| 6.3.12 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium longum</i> | 81 |
| 6.3.13 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Bifidobacterium infantis</i> | 81 |
| 6.3.14 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod <i>Streptococcus</i> | 82 |
| 6.3.15 | PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh <i>Streptococcus thermophilus</i> | 82 |
| 7 | ZÁVĚR | 83 |
| 8 | REFERENCE | 84 |
| 9 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 96 |

1 ÚVOD

V posledních letech si probiotika získala popularitu pro svůj potenciál poskytovat četné zdravotní výhody. Tyto živé mikroorganismy lze nalézt v určitých potravinách a doplňcích stravy a při požití v dostatečném množství mohou pozitivně ovlivnit střevní mikrobiom.

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při požití v dostatečném množství poskytují zdravotní výhody. Tyto prospěšné bakterie často označované jako „dobré“ bakterie mohou pomoci vyvážit střevní mikrobiom. Střevní mikrobiom je komplexní ekosystém mikroorganismů, které sídlí v trávicím traktu a hrají zásadní roli při udržování celkového zdraví. Když je tato rovnováha ekosystému narušena, může to vést k různým zdravotním problémům, jako jsou zažívací problémy, dysfunkce imunitního systému, a dokonce i poruchy duševního zdraví.

Studie ukazují, že probiotika mohou pomoci obnovit rovnováhu ve střevním mikrobiomu, zlepšit trávení, posílit imunitní funkce, a dokonce snížit úzkost a depresi. Funguje tak, že zaplňují střeva dobrými bakteriemi, které pomáhají inhibovat růst bakterií a zlepšují celkové zdraví střev. Nacházejí se v některých potravinách, jako je jogurt, kefír a fermentovaná zelenina. Tyto potraviny jsou bohaté na dobré bakterie a jejich pravidelná konzumace může zlepšit zdraví vašich střev.

Jednou z nejoblíbenějších potravin bohatých na probiotika je jogurt, který obsahuje živé kultury *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Kefír, fermentovaný mléčný nápoj, je také dobrým zdrojem probiotik, včetně řady prospěšných bakterií a kvasinek. Kimchi se vyrábí nakládáním zeleniny, jako je čínské zelí, ve slaném nálevu obsahujícím dobré bakterie. Jeho konzumace může zlepšit zdraví střev a poskytnout mnoho dalších zdravotních výhod.

K dispozici jsou také některé probiotické doplňky, které zvyšují počet dobrých bakterií ve střevě. Tyto doplňky jsou obvykle kapsle, tablety nebo sirupy, které obsahují živé kultury prospěšných bakterií. Probiotické doplňky probiotik se dodávají v různých kmenech a koncentracích. Probiotika mohou být také prospěšná pro ty, kteří nedávno užívali antibiotika, která zabíjejí špatné i dobré bakterie ve střevech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotikum

Probiotika jsou malé živé organismy, které pozitivně i negativně ovlivňují činnost organismu. Nachází se v dutině nosní, ústní, hltanu, ve střevní mikroflóře a na kůži. Díky jejich rozmanitosti jejich nerovnováha přináší pro člověka mnoho potíží ústících do různých nemocí.

Probiotika jsou součástí lidského organismu od narození, kdy je získáváme z mateřského mléka jako například *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* a *Lactobacillus* spp.. V pozdějším věku jsou další druhy přijímány prostřednictvím běžné potravy a dalších potravinových doplňků. [1]

Mnoho studií dokazuje, že pozitivní modulace mikrobiálního složení pomocí externích přístupů, jako je například nutriční intervence s probiotiky, může mít nevídané zdravotní efekty pro hostitele. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které při požití v přiměřeném množství propůjčují hostiteli zdravotní přínos. Bylo zjištěno, že manipulace se střevní mikroflórou intervencí probiotiky má jak profylaktické, tak terapeutické účinky na střevní a imunitní zdraví hostitele. Nicméně, jak se používání a celková rozmanitost probiotických produktů rozšiřuje, výběr vhodného typu probiotik je náročný kvůli rozdílům v mechanismech účinku, bezpečnostním profilu, původu a účinnosti různých kmenů. Nedávný výzkum poukázal na to, že mnoho vlastností probiotik je specifických pro druh a ne všechna probiotika vykazují stejnou bezpečnost a účinnost. [2]

2.2 Dělení probiotik

Probiotické bakterie se dělí na množství rodů a druhů, největšími a nejpoužívanějšími rody, které lze nalézt nejen v potravinách jako jsou sýry, jogurty a další kysané produkty, ale i v potravinových doplňcích a také kosmetice jsou rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. V Tabulce 1. lze nalézt výčet několika druhů daného rodu a také dalších druhů jiné kategorie.

Tabulka 1 *Tabulka 1. Probiotické bakterie [3]*

| rod <i>Lactobacillus</i> | rod <i>Bifidobacterium</i> | Ostatní |
|------------------------------|----------------------------|--|
| <i>L. acidophilus</i> | | <i>Bacillus cereus</i> |
| <i>L. amylovorus</i> | | <i>Clostridium botyricum</i> |
| <i>L. brevis</i> | | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>L. casei</i> | | <i>Enterococcus faecium</i> |
| <i>L. rhamnosus</i> | | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>L. crispatus</i> | | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. |
| <i>L. delbureckii</i> subsp. | <i>B. adolescentis</i> | <i>cremoriss</i> |
| <i>bulgaricus</i> | <i>B. animalis</i> | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> |
| <i>L. fermentum</i> | <i>B. breve</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| <i>L. gasseri</i> | <i>B. bifidum</i> | subsp. <i>dextranicum</i> |
| <i>L. helveticus</i> | <i>B. infantis</i> | <i>Pediococcus acidilactici</i> |
| <i>L. johnsonii</i> | <i>B. lactis</i> | <i>Propionibacterium</i> |
| <i>L. lactis</i> | <i>B. longum</i> | <i>freudenreichii</i> |
| <i>L. paracasei</i> | | <i>Saccharomyces boulardii</i> |
| <i>L. plantarum</i> | | <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. |
| <i>L. reuteri</i> | | <i>thermophilus</i> |
| <i>L. salivarius</i> | | <i>Sporolactobacillus inulinus</i> |
| <i>L. gallinarum</i> | | |

2.2.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je skupina tvořící gram pozitivní anaerobní tyčinky, které tvoří spory. Jsou nejrozšířenější částí tvořící populaci mléčných bakterií. Tyto bakterie transformují cukry na kyselinu mléčnou a tím vytvářejí kyselé prostředí vhodné pro určité bakterie. V lidském organismu se bakterie rodu *Lactobacillus* nachází převážně v trávicí soustavě.

Laktobacily mohou být jak homofermentativní tak heterofermentativní. Jsou jediným rodem bakterií mléčného kvašení, které zahrnují homofermentativní i heterofermentativní organismy. U homofermentativních laktobacilů jsou hexózy metabolizovány pomocí glykolýzy přímo na laktát, který je hlavním koncovým produktem. U heterofermentativních laktobacilů jsou hexózy metabolizovány fosfoketolázovou cestou na laktát, CO₂, acetát a ethanol jako hlavní produkty. U laktobacilů je homofermentativní nebo heterofermentativní metabolismus sdílen všemi kmeny rodu. Většina laktobacilů je také aerotolerantní, což je závislé na přítomnosti manganu. Některé druhy také dýchají, a to v případě, kdy je v růstovém médiu přítomen hem a menachinon. [4, 5, 6, 7]

Komerčně se bakterie rodu *Lactobacillus* používají na výrobu kvašených produktů jako je například jogurt, sýr, kyselé okurky, víno a další. Díky vytvoření kyselého prostředí pomocí jejich metabolismu cukrů nejenže vytvoří přijatelné prostředí pro další potřebné bakterie k procesu zpracování, ale i zakonzervují daný produkt před některými nechtěnými organismy. [8]

2.2.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus je tyčinkovitá, grampozitivní, homofermentativní a anaerobní bakterie. Tento druh se nejčastěji vyskytuje u člověka. [9]

L. acidophilus je tyčinkovitá grampozitivní homofermentativní anaerobní bakterie, což znamená, že produkuje pouze kyselinu mléčnou jako konečný produkt fermentace. Fermentace může probíhat pouze z hexózy přes glykolýzu. *L. acidophilus* má v mléce pomalejší růst než v hostiteli kvůli omezenému množství dostupných živin. [9, 10]

Lactobacillus acidophilus má jednu fosfolipidovou dvojvrstvou membránu s buněčnou stěnou tvořená peptidoglykanem vně membrány. Buněčná stěna je protkána teichoovými kyselinami, povrchovými proteiny společně s aniontovými a neutrálními polysacharidy a také S-vrstvou, která lemuje vnější část buňky. Molekulová hmotnost proteinů v S-vrstvě se pohybuje od 40 do 200 kDa a jsou tvořeny homogenními proteinovými nebo glykoproteinovými podjednotkami. Prostřednictvím nekovalentních interakcí tyto proteiny pokrývají povrch bakteriální buňky a mají pomocí entropie tendenci uspořádat se do pravidelných krystalických řad. Proteiny S-vrstvy hrají klíčovou roli v biologických funkcích, a to zejména v adhezi bakterií k hostitelským buňkám. [11]

L. acidophilus roste přirozeně v ústní, střevní a vaginální dutině savců. Téměř všechny druhy laktobacilů mají speciální mechanismy pro tepelnou odolnost, která například zahrnuje zvýšení aktivity chaperonů. Pro *L. acidophilus* je důležité mít vlastnosti vhodné pro přežití v gastrointestinálním traktu. Je jednak vyžadována tolerance nízkého pH a vysoké úrovně toxicity. Tyto vlastnosti se liší a jsou specifické pro daný kmen. Tyto rozdíly v toleranci jsou na úrovni struktury buněčné stěny spolu s dalšími změnami v expresi proteinů. Dokonce se ukázalo, že změny koncentrace soli v prostředí ovlivňují životaschopnost *L. acidophilus*, ale pouze po vystavení o vyšší koncentraci soli. [12]

Výzkumy ukázaly, že přítomnost *L. acidophilus* může mít u lidí různé probiotické účinky. Mohou působit jako bariéra proti patogenům, podporují imunitní odpověď, napomáhá při trávení laktózy nebo také snižuje hladinu cholesterolu. Tyto účinky jsou nicméně podmíněny minimální koncentrací a to 10^5 - 10^6 c.f.u. (jednotky tvořící kolonie) na ml. [13]

2.2.1.2 *Lactiplantibacillus plantarum*

Z důvodu reklasifikace vybraných druhů laktobacilů, aby se zjištěná heterogenita genomu projevila v taxonomii byl *Lactobacillus plantarum* nově přejmenován na *Lactiplantibacillus plantarum*. [14]

Lactiplantibacillus plantarum je grampozitivní bakterie ve tvaru rovných tyčinek se zaoblenými konci. Velikostně jsou obecně 0,9–1,2 μm široké a 3–8 μm dlouhé a roste v rozmezí pH 3,4–8,8. Mohou se vyskytovat jednotlivě, v párech nebo v krátkých řetězcích. *L. plantarum* má jeden z největších známých genomů mezi bakteriemi mléčného kvašení a je velmi flexibilním druhem. [15, 16]

Lactiplantibacillus plantarum je homofermentativní a aerotolerantní bakterie, která produkuje oba izomery kyseliny mléčné. V přítomnosti hému a menachinonu mohou tyto bakterie také dýchat a dochází také k exprimování cytochromů. V případě jejich nepřítomnosti v růstovém médiu je kyslík spotřebováván NADH-peroxidázou, kdy vzniká peroxid vodíku jako meziprodukt a voda jako konečný produkt. [17, 18]

Lactiplantibacillus plantarum bylo zařazeno mezi probiotika s významnou antioxidační aktivitou a také pomáhá udržovat správnou střevní propustnost. Tím podporuje tvorbu mikrobiální rovnováhy a stabilizuje tak chování trávicích enzymů. Dále je schopen potlačit růst bakterií, které produkují plyn ve střevech a díky tomu může být velkým přínosem pro některé pacienty trpící syndromem dráždivého tračníku. [19, 20]

2.2.1.3 *Lactocaseibacillus casei*

Dříve znám pod názvem *Lactobacillus casei* je fakultativně anaerobní bakterie netvořící spory, je mikroaerofilní a tolerantní vůči kyselinám. Bakterie je grampozitivní a tyčinkovitého tvaru. Nachází v reprodukčním a trávicím traktu lidského těla [21, 14]

L. casei je klasifikován jako probiotikum. Jeho hlavní účinky jsou při zmírňování gastrointestinálních patogenních bakteriálních onemocnění. Studie ukázaly, že v kombinaci i s dalšími druhy měli pacienti při prevenci před průjmem, způsobeným antibiotiky a infekcí *Clostridium difficile*, jeho nižší výskyt bez nežádoucích účinků. Společně s dalšími studiemi z toho vyplývá, že *Lactocaseibacillus casei* je bezpečnou a účinnou formou léčby akutního i infekčního průjmu. [22, 23]

2.2.1.4 *Lactocaseibacillus rhamnosus*

Lactocaseibacillus rhamnosus s původním názvem *Lactobacillus rhamnosus* je grampozitivní homofermentativní fakultativně anaerobní bakterie ve tvaru krátké tyčinky, které nejčastěji tvoří řetězce. [24]

Lactocaseibacillus rhamnosus se vyskytuje ve zdravém ženském genitourinárním traktu. Někdy se využívá u kvašených mléčných výrobků jako nastartovací bakterie pro mléčnou fermentaci. [25]

Tento druh se řadí mezi probiotika, které se využívají zejména pro léčbu infekce ženského genitourinárního traktu a to například těžko léčené bakteriální vaginózy. *L. rhamnosus* účinkuje tak, že pomáhá znovu získat kontrolu nad dysbiotickým bakteriálním přerůstáním během aktivní infekce. Dále se využívají pro léčbu průjmu, akutní gastroenteritidy nebo povrchově na léčbu ekzému nebo atopické dermatitidy. [24]

2.2.1.5 *Limosilactobacillus reuteri*

Dříve znám pod jménem *Lactobacillus reuteri*. Řadí se mezi probiotika, které podporují zkrácení kojeneckých průjmových příhod, snížení hladiny celkového a LDL-cholesterolu u jedinců trpících hypercholestérolemií, fungují jako ochrana před infekcí *Helicobacterem pylori* nebo přispívá ke snížení střevního zánětu v různých experimentálních modelech kolitidy u hlodavců. [26]

Limosilactobacillus reuteri má imunoregulační vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou závislé od modulace rovnováhy mezi produkcí pro/protizánětlivých cytokinů kmenem až po modulaci funkce střevní bariéry pomocí snížení permeability sliznice. Probiotické vlastnosti *L. reuteri* závisí od jeho přítomnosti v tlustém střevě. [26]

Limosilactobacillus reuteri je znám pro své antimikrobiální účinky díky produkci reuterinu, reutericinu 6 a reutericyklinu. Z nejlépe probádaných účinků tohoto druhu je významné snížení délky symptomů u dětského průjmového onemocnění. Dokonce ve srovnání s dalšími druhy

probiotických druhů vyšel *Limosilactobacillus reuteri* jako nejúčinnější. Ve střevě snižuje motorické komplexy a střevní motilitu. [27, 28, 29]

2.2.2 Rod *Bifidobacterium*

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou gram pozitivní nepohyblivé anaerobní bakterie. Bakterie tohoto rodu jsou známy svou odolností ke žlučovým solím. Tato vlastnost je velmi výhodná zejména proto, že příznivé účinky probiotických bakterií mohou být produkovány za přítomnosti této tekutiny. Bakterie rodu *Bifidobacterium* spolu s dalšími pomáhají s léčbou různých typů průjmů jako je cestovatelský průjem nebo průjem zapříčiněný užíváním antibiotik a i jiných typů onemocnění spojených s trávicí soustavou. [8]

Rod *Bifidobacterium* má jedinečnou fruktózu-6-fosfátovou fosfoketolázovou dráhu používanou k fermentaci uhlovodíků. U bifidobakteriálních fylogrup nalezených u kojenců byla vyvinuta schopnost fermentovat mléčné oligosacharidy, nicméně u druhů nalezených v dospělé mikroflóře byla u těchto bakterií pozorována schopnost fermentovat rostlinné oligosacharidy. Tento poznatek ukazuje, že jsou tyto bifidobakterie schopny reagovat na prostředí, ve kterém se nachází. Vzhledem k tomu, že kojenci často trpí střevními shluky bakterií, kde převládají právě bifidobakterie, mnohé terapie se pokouší napodobit bifidogenní vlastnosti oligosacharidů mléka. Ty jsou široce klasifikovány jako od rostlin odvozené fruktooligosacharidy nebo galaktooligosacharidů odvozené od mléka, které jsou odlišně metabolizovány a odlišné od katabolismu oligosacharidu mléka. [30]

2.2.2.1 *Bifidobacterium animalis subsp. animalis*

Bifidobacterium animalis subsp. animalis jsou grampozitivní, anaerobní nepohyblivé bakterie ve tvaru tyčinky, které tvoří spory. Glukóza je fermentována pomocí charakteristického enzymu fruktóza-6-fosfát fosfoketolázy v tzv. Bifidus-shuntu. Fermentuje se dextrin, α -D-glukóza, maltóza, maltotrióza, D-rafinóza a sacharóza, škrob se ale nefermentuje. [31]

Nachází se v tlustém střevě savců. Tento druh je odolný vůči kyselému a oxidativnímu stresu, a proto se ve velké míře používá při fermentaci mléčných výrobků. Optimální teplota růstu je 39–41 °C. Na šikmých plochách inkubovaných na vzduchu nebo ve vzduchu obohaceném oxidem uhličitým nedochází k žádnému růstu stejně jako v mléce nebo v mléčných médiích nedochází k žádnému růstu. [31]

Bifidobacterium animalis subsp. animalis je zařazen mezi probiotika. Laboratorní studie identifikovaly řadu vlastností, které jsou klinicky relevantní, patří mezi ně například ovlivnění imunitního systému, adheze epitelu a zlepšení funkce střevní bariéry. Celkově tak posiluje imunitní odpověď u člověka [32]

2.2.2.2 *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*

Bifidobacterium animalis subsp. lactis je gram-pozitivní, nepohyblivá, nesporující, nepravidelné tyčinkovité anaeroby. Optimální teplota růstu je 39–42 °C. Na agarových plotnách vystavených vzduchu nedochází k žádnému růstu, ale je tolerováno 10% atmosférického kyslíku nad kapalným médiem. K růstu dochází v mléce nebo v mléčných médiích. [31]

Studie také potvrdily, že *B. animalis subsp. lactis* urychluje střevní průchod u člověka a poskytuje tak úlevu jedincům od běžných gastrointestinálními symptomů, syndromu dráždivého tračníku nebo zácpy. [32]

Taxonomické postavení *Bifidobacterium lactis* a *Bifidobacterium animalis* bylo zkoumáno pomocí polyfázového přístupu, kde byla zjištěna fenotypová podobnost obou taxonů. Oba druhy sdílí více než 70% DNA–DNA (76–100%), což potvrzuje závěry předchozích studií, ve kterých byly *B. lactis* a *B. animalis* považovány za jeden jediný druh. Nicméně výsledky proteinového profilování, BOX-PCR fingerprinting, fluorescenční amplifikovaný fragmentový délkový polymorfismus, atpD a groEL genová sekvenční analýza ukazují, že zástupci *B. animalis* a *B. lactis* tvoří dvě jasně oddělené podskupiny. Toto dělení bylo také fenotypově podpořeno na základě schopnosti růst v mléce. Důkazy genotypu, které byly nedávno publikované navrhuji, aby *B. lactis* a *B. animalis* byly stále považovány za dvě samostatné taxonomické entity, nikoli na úrovni druhu, ale na úrovni poddruhu. [31]

2.2.2.3 *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum je grampozitivní, anaerobní bakterie, která je pohyblivá a netvoří spory. Má tyčinkovitý tvar a žije buď ve shlucích, párech nebo dokonce samostatně. Většinou se nachází v tlustém střevě, dolním tenkém střevě, mateřském mléce nebo vaginální mikroflóře. [33, 34]

Pokud je nedostatek *B. bifidum* v lidském střevě, je narušena rovnováha střevní mikroflóry. Střevní flóra může být zlepšena tak, že je *B. bifidum* suplementován pomocí doplňků, které tento druh obsahují. Suplementace *B. bifidum* je taky uplatněna v případě terapie střevních a jaterních poruch, pro aktivaci imunitní reakce, anebo pro prevenci některých druhů rakoviny tlustého střeva. [35]

Bifidobacterium bifidum je řazeno mezi probiotika, které snižují pravděpodobnost akutního průjmu, riziko infekcí bakterií *Echereschia coli* a přispívá také k udržení vaginální homeostázy. [36, 37]

2.2.2.4 *Bifidobacterium longum subsp. infantis*

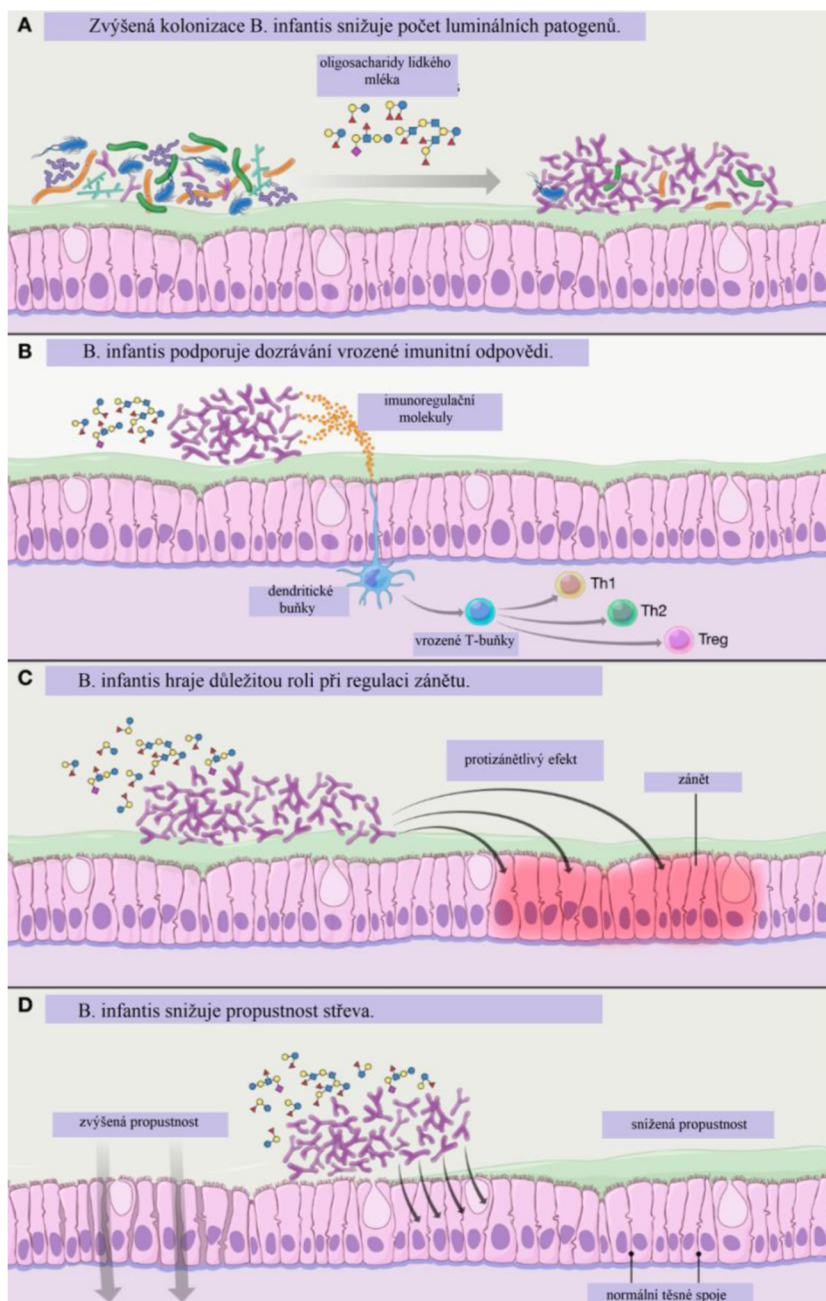
Bifidobacterium longum subsp. Infantis je grampozitivní, heterofermentativní, anaerobní bakterie s výrazným bifidním tvarem, to je ve tvaru Y. Nejdůležitější roli hraje tato bakterie v mateřském mléce a následně ve střevě kojence.

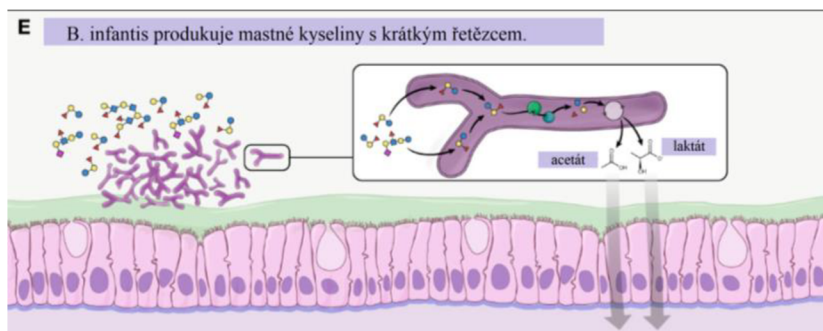
Ve srovnání s jinými druhy rodu *Bifidobacterium*, *B. infantis* usnadňuje kompletní trávení oligosacharidů lidského mléka, prostřednictvím exprese až 16 glykosylhydroláz, jako jsou α -fukosidázy, β -galaktosidázy, β -hexosaminadasy a α -sialidázy a poskytuje tak konkurenční výhodu oproti jiným střevním mikrobiálním organismům, a to včetně patogenů. [38, 39]

Jak je možno vidět na obrázku 1, *B. infantis* je vybavena enzymy, které jsou určeny pro metabolismus oligosacharidů v lidském mléce. Toto umožňuje zvýšenou kolonizaci a méně luminálních patogenů. Dále tento mikrob produkuje jisté exogenní látky, které podporují dozrávání vrozené imunitní reakce u kojenců. *B. infantis* má také protizánětlivé vlastnosti a prospívá tak epitelální vrstvě ve střevě. Snižuje také propustnost střev a pomáhá při tzv. děravém střevě. *B. infantis* produkuje mastné kyseliny s krátkým řetězcem, a to zejména acetát, který má příznivý účinek na hostitele. [38]

Oligosacharidy z mateřského mléka mají schopnost projít žaludkem a proximálním tenkým střevem kojenců, aniž by byly nějak pozměněny nebo spotřebovány. V distálním střevě tyto oligosacharidy selektivně konzumuje *B. infantis*, což způsobuje vznik mikroflóry, která je sice omezená ve své rozmanitosti, ale je spojena se zlepšeným růstem a reakcí na vakcíny

u donošených dětí a snižuje výskyt nekrotizující enterokolitidy u předčasně narozených dětí. Oligosacharidy mateřského mléka aktivují různé geny v *B. infantis*, které jí umožňují ovládnout střevní mikrobiotu a prospívají hostiteli tím, že urychlují dozrávání imunitní odpovědi, omezují nadměrný zánět, zlepšují střevní propustnost a zvyšují produkci acetátu. Tento symbiotický vztah je příkladem koevoluce dvou druhů s cílem dočasně chránit novorozence a vyživovat zdravou střevní mikroflóru před jeho odstavením. [39]





Obrázek 1 – (upraveno [38]) Mechanismus účinku *Bifidobacterium longum subsp. Infantis*

2.2.2.5 *Bifidobacterium longum subsp. longum*

Bifidobacterium longum subsp. longum je gram-pozitivní, anaerobní, kataláza-negativní tyčinka s nepravidelnou morfologií. Tento mikrob se ve vysoké míře vyskytuje v lidském střevě a jsou zvláště hojné ve střevech kojenců. Předpokládá se, že mají různé zdraví prospěšné účinky, i když je málo známo o přesném mechanismu působení takových aktivit. Tato mezera ve znalostech podnítila výzkumné úsilí, zejména zaměřené na srovnávací a funkční genomiku bifidobakterií. Tato bakterie je vysoce stabilní i v různých hotových výrobcích včetně práškové výživy, jogurtu a fermentovaného mléka. [2, 40]

Bifidobacterium longum subsp. longum produkuje převážně kyselinu L-mléčnou, zatímco produkce kyseliny D-mléčné je zanedbatelná. Kromě toho bylo prokázáno, že *B. longum* obsahuje enzym hydrolázu konjugované žlučové soli, který katalyzuje hydrolýzu žlučových solí. Je známo, že vysoké fyziologické hladiny některých sekundárních žlučových kyselin, zejména kyseliny deoxycholové a lithocholové, mohou způsobit poškození DNA a podporovat karcinogenezi tlustého střeva. [2]

2.2.2.6 *Bifidobacterium breve*

B. breve je dominantním druhem ve střevě kojených dětí a byl také izolován z lidského mléka. Druh *B. breve* se nacházejí také ve vagině zdravých žen. Jejich přítomnost v mimotělním prostředí je důsledkem fekální kontaminace a druh je užitečným indikátorem fekálního znečištění lidí a zvířat. Má antimikrobiální aktivitu proti lidským patogenům, nevykazuje znaky přenosné antibiotické rezistence, není cytotoxický a má imunostimulační schopnosti. [41]

B. breve, stejně jako jiné druhy rodu *Bifidobacterium*, mají řadu enzymů pro zpracování různých sacharidů. Tyto enzymy, užitečné pro adaptaci a soutěžení v prostředí s měnícími se nutričními podmínkami, jsou indukovatelné v přítomnosti specifických substrátů. Mezi ně patří například glykosidázy, neuraminidázy, glukosidázy, galaktosidázy a také extracelulární glykosidázy, které degradují oligosacharidy střevního mucinu a glykosfingolipidy. *B. breve* má také glukosidázu s β -D-fukosidázovou aktivitou užitečnou pro využití fukosilované oligosacharidy mateřského mléka. [41]

2.2.3 Rod *Streptococcus*

Streptokoky jsou gram pozitivní koky, které náleží do rodiny *Streptococcaceae*. Dělení buněk u streptokoků se formuje podél jedné osy, takže během růstu mají tendenci vytvářet páry nebo řetězce, které vypadají jako ohnuté nebo zkroucené. Tato charakteristika se liší od stafylokoků, které se dělí podél více os, čímž vytvářejí nepravidelné shluky podobné

hroznovému. Většina streptokoků jsou negativní jak na oxidázu, tak katalázu a mnoho z nich jsou fakultativně anaerobní. [42]

Druhy rodu *Streptococcus* jsou klasifikovány na základě jejich hemolytických vlastností. Alfa-hemolytické druhy způsobují oxidaci železa v molekulách hemoglobinu u červených krvinek, což mu dává nazelenanou barvu na krevním agaru. Beta-hemolytické druhy způsobují úplné prasknutí červených krvinek. Na krevním agaru se to projeví jako stejně široké oblasti bez krvinek, které jsou obklopeny bakteriálními koloniemi. Gama-hemolytické druhy nezpůsobují žádnou hemolýzu. [43]

2.2.3.1 *Streptococcus thermophilus*

Kmeny *Streptococcus thermophilus* jsou grampozitivní probiotika mléčného kvašení, která mají má obvykle kulový nebo kokovitý tvar a má tendenci žít v párech nebo řetězcích. Pomáhají při výrobě některých kvašených výrobků včetně jogurtu. Díky jeho trávicím schopnostem jako je odbourávání tuků a laktózy je *Streptococcus thermophilus* velice důležitou bakterií mikrobiomu. [44, 45]

Při rozmnožování je možno pozorovat, že má kolem sebe pruh, což ukazuje bod dělení dceřiné buňky nebo klonu. Jeho jedinečná struktura umožňuje snášet vysoké teploty, díky čemuž je užitečný v procesech mléčné fermentace, které zahrnují zvýšenou teplotu. Na rozdíl od svých patogenních členů rodiny, *Streptococcus thermophilus* nemá geny ani neexprimuje povrchovými proteiny, které by přilnuly k povrchu sliznice v gastrointestinálním traktu. Nemá ani virulentní funkce svých toxických členů rodiny. [45]

Streptococcus thermophilus je blízce příbuzný druhu *Lactobacillus lactis*, ale ještě příbuznější jsou mu streptokokové druhy, které zahrnují několik pro člověka smrtících patogenů jako jsou například *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*. Ty způsobují například zápal plic, bakteriální sepsi nebo meningitidu. *Streptococcus thermophilus* je také příbuzný *Streptococcus mutans*, nejdůležitějšímu patogenu zubního kazu. Nicméně *S. thermophilus* je obecně uznávaný jako bezpečný. [46]

Zatímco v genomu jiných buněk mléčného kvašení, jako je rod *Lactobacillus*, byla popsána určitá sekvence genů kódujících klíčové metabolické funkce například NADH oxidázu, laktát dehydrogenázu, pyruvát oxidázu, fumarát reduktázu, toto je zřídka pozorováno v genomu *Streptococcus thermophilus*. Například v biosyntéze aminokyselin, centrálním metabolismu a transkripčních regulátorech se předpovídá jen málo funkčních genových sekvencí. Zdá se však, že několik funkcí je kódováno více než jednou kopií genu, což s největší pravděpodobností ilustruje jejich důležitost v životním stylu *S. thermophilus*. [46]

2.3 Prebiotikum

Prebiotikum je neživotaschopná a nestravitelná složka potravy, která je selektivně metabolizovaná prospěšnými střevními bakteriemi - probiotiky. Dietní modulace střevní mikroflóry prebiotiky je navržena tak, aby zlepšila zdraví stimulací počtu nebo aktivity bifidobakterií a laktobacilů. Optimální střevní mikroflóra může zvýšit odolnost vůči patogenním bakteriím, snížit hladinu amoniaku v krvi, zvýšit stimulaci imunitní odpovědi a snížit riziko rakoviny. Příjmem potravy se dá ovlivnit skladba střevní mikroflóry. Prebiotický

substrát je využit pro podporu života prospěšných bakterií, nikoli pro podporu potenciálních patogenů. [47, 48]

Aby se daná látka mohla řadit mezi prebiotika, musí splňovat určitá kritéria jako je odolnost vůči žaludeční kyselosti, hydrolyze savčími enzymy a gastrointestinální absorpci, fermentace střevní mikroflórou a selektivní stimulace růstu nebo aktivity těch střevních bakterií, které přispívají ke zdraví a pohodě. V neposlední řadě by fermentace látky měla vyvolat prospěšné účinky pro hostitele. Účelem prebiotik je stimulovat určitou bakterii žijící ve střevní mikroflóře. Prebiotika se nachází ve formě karbohydrátů nejčastěji oligosacharidů. Ty jsou následně fermentovány domorodou střevní bakterií a tím plní svůj účel. [47, 49]

2.3.1 Typy prebiotik

2.3.1.1 *Fruktany*

Tato kategorie se skládá z inulinu a frukto-oligosacharidu nebo oligofruktózy. Dříve některé studie naznačovaly, že fruktany mohou selektivně stimulovat bakterie mléčného kvašení. V posledních letech však studie ukázaly, že délka řetězce fruktanů je důležitým kritériem pro určení, kterými bakteriemi mohou být fermentovány. [50]

2.3.1.2 *Galakto – oligosacharidy*

Galakto-oligosacharidy jsou produktem extenze laktózy, které se dělí do dvou podskupin. První skupina galakto-oligosacharidů je s přebytkem galaktózy a druhý typ jsou galakto-oligosacharidy vyrobené z laktózy prostřednictvím enzymatické transglykosylace. [51]

2.3.1.3 *Oligosacharidy odvozené od škrobu a glukózy*

Existuje druh škrobu, který je odolný vůči trávení horních střev, známý jako rezistentní škrob. Ten může podporovat zdraví pomocí produkce vysoké hladiny butyrátu. Díky tomuto byl zařazen mezi prebiotika. Polydextróza je oligosacharid odvozený od glukózy. Skládá se z glukanu s mnoha větvemi a glykosidickými vazbami. Existují určité důkazy, že by mohl stimulovat bifidobakterie, ale zatím toto tvrzení nebylo potvrzeno. [50]

2.3.1.4 *Jiné oligosacharidy*

Ačkoliv sacharidy splňují kritéria definice prebiotik, existují některé sloučeniny, které nejsou klasifikovány jako sacharidy, ale doporučuje se, aby byly klasifikovány jako prebiotika, jako jsou například flavanoly získané z kaka. Experimenty in vivo a in vitro ukazují, že flavanoly mohou stimulovat bakterie mléčného kvašení. [52]

2.4 Symbiotika

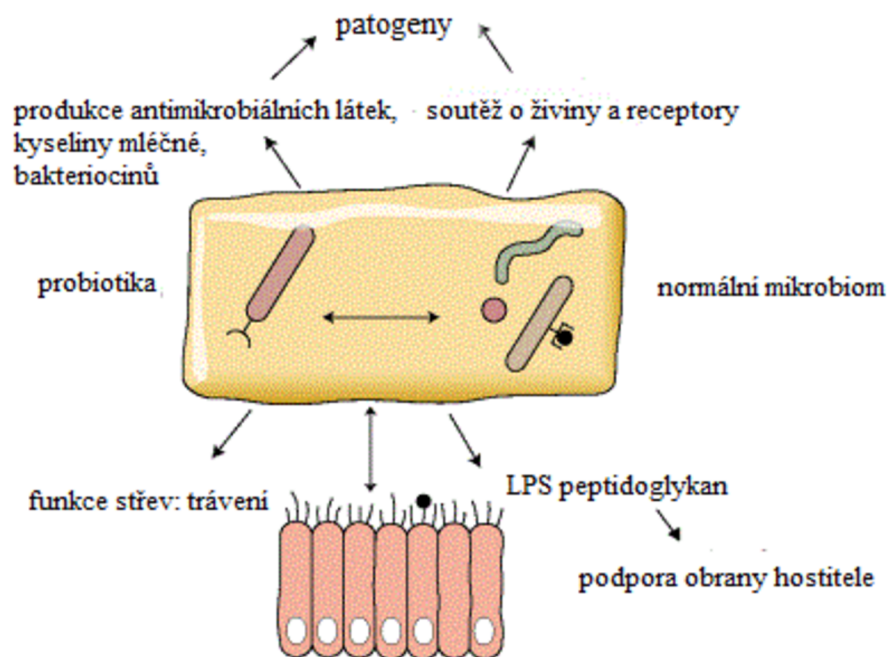
Symbiotika jsou sloučeniny, které obsahují jak probiotické bakterie tak prebiotika. Je to směs, ve které prebiotika podporují životaschopnost probiotik. Příklad symbiotika je směs bifidobakterie a oligofruktózy jako prebiotika. Nicméně prebiotikum musí být pro danou směs vybráno dle preferencí probiotika, protože například u směsi *Lactobacillus casei* a oligofruktózy se o symbiotikum nejedná. [53]

Při užívání symbiotik dochází k ovlivnění absorpce hořčíku a fosforu ve střevě kvůli zvýšenému vstřebávání vápníku. Mezi jiné pozitivní účinky symbiotik patří zvýšený počet

bifidobakterií, snížení krevního cholesterolu, kontrola glykemie, podpora vstřebatelnosti střev a stimulace imunitního systému. [54]

2.5 Onemocnění

Střevo ukrývá komplexní a dynamický mikrobiální ekosystém, který má několik hlavních funkcí. Mezi tyto funkce patří například metabolická aktivita, trofický efekt na střevní epitel nebo interakce s imunitním systémem hostitele. Mikroflóra, která se ve střevě nachází, také působí jako bariéra, která brání kolonizaci oportunních a patogenních mikroorganismů. [55]



Obrázek 2 – (upraveno [55]) Interakce zdravé mikroflóry a probiotiky s hostitelem při metabolických aktivitách. Tyto imunitní funkce zabraňují kolonizaci patogenních mikroorganismů.

2.5.1 Průjmová onemocnění

Průjmová onemocnění jsou způsobena infekční gastroenteritidou. Obecným příznakem je změna konzistence stolice a frekvence vyprazdňování. Nicméně je dokázáno, že užíváním určitých druhů probiotik se sníží vážnost, intenzita a délka akutního průjmového onemocnění. Nejúčinnější druhy probiotik používané právě pro léčbu průjmových onemocnění jsou *Lactobacillus rhamnosus* a *Saccharomyces boulardii*. [56]

2.5.2 Laktózová intolerance

Studie ukázaly, že osoby se špatným trávením laktózy lépe tráví a mají vyšší toleranci laktózy obsažené v jogurtu než laktózy obsažené v mléce. Byly prokázány 2 mechanismy, kdy trávení laktózy ve střevním lumen laktázou obsaženou v jogurtových bakteriích a došlo k pomalejšímu střevnímu zpracování a tím prodloužené době průchodu jogurtu ve srovnání s mlékem. Tedy jinými slovy nahrazení mléka jogurtem nebo jinými fermentovanými mléčnými výrobky umožňuje lepší trávení, snižuje průjem a další příznaky intolerance u jedinců s intolerancí na laktózu. [57]

2.5.3 Zánětlivé onemocnění střev

Mezi zánětlivé onemocnění střev patří Cronova choroba a ulcerózní kolitida. Výskyt zánětu v případě těchto onemocnění je největší v oblastech s nejvyšší koncentrací lumenálních bakterií. Crohnova choroba je relativně vzácné onemocnění. Je to zánět, který postihuje jakoukoliv část trávicí trubice a napadá celou tloušťku střevní stěny. Nejčastější místo tohoto typu zánětu je tenké střevo. Pro léčbu této nemoci jsou využívána probiotika *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus salivarius spp*, VSL#3 - kombinace 8 probiotických druhů probiotických bakterií nebo kvasnice (např. *Saccharomyces boulardii*) a *E. Coli*. [58]

2.5.4 Syndrom dráždivého tračníku

Syndrom dráždivého tračníku je nemoc postihující tlusté střevo. Příznaky tohoto syndromu jsou křeče, nadýmání, plynatost, průjem, zácpa nebo obojí. Léčba tohoto syndromu je dlouhodobá. Pozitivní účinky pro léčbu tohoto onemocnění mají bakteriální kultury rodu *Lactobacillus* jako jsou například *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus acidophilus*. Úleva testovaných pacientů přišla v podobě ustoupení bolesti v oblasti břicha a úlevě od průjmu či zácpy. [59]

Podle provedeného výzkumu včasným podáním VSL#3 se snižuje bolest útrobních orgánů tím, že je podpořena exprese cytokinu interleukinu 10. Ten ovlivňuje změnu u exprese podmnožin genů, které se právě podílí na přenosu bolesti a zánětů. [59]

2.5.5 Rakovina tlustého střeva

Endogenní flóra a imunitní systém hrají roli v modulaci karcinogeneze. Několik studií ukázalo, že některá probiotika mohou snižovat fekální koncentraci enzymů, mutagenů a sekundárních žlučových solí, které se mohou podílet na karcinogenezi tlustého střeva. Některé studie také naznačují, že konzumace fermentovaných mléčných výrobků může mít určitý ochranný účinek proti adenomům tlustého střeva nebo rakovině. [57]

2.5.6 Další onemocnění trávicího traktu

Helicobacter pylori jsou příčinou například chronické gastritidy nebo rakoviny žaludku. Léčba se skládá ze tří kroků za použití protonové pumpy spolu s clarithromycinem a amoxillinem nebo metronidazolem. Klinické studie ukázaly, že probiotika mají příznivý vliv na vyhubení *Helicobacteru pylori*. Přestože studie ukázaly potlačení růstu *Helicobacteru pylori* pomocí probiotik, nacházejí se jisté rozdíly v efektivitě mezi jednotlivými kmeny. Probiotika při této léčbě nejsou ještě zcela doporučována a dlouhodobý efekt pro trávicí systém ještě není znám a musí se podrobit ještě dalším studiím. [60]

2.6 Probiotické doplňky stravy

Výsledky různých studií naznačují, že probiotická suplementace u zdravého dospělého člověka může vést k přechodnému zlepšení koncentrace bakterií střevní mikroflóry specifických pro daný doplněk. Tyto studie také dokazují podpůrnou roli probiotik při zlepšování reakcí imunitního systému, konzistence stolice, pohybu střev a koncentrace vaginálních laktobacilů. Konzumace probiotik může u zdravých dospělých zlepšit imunitní systém, gastrointestinální systém a systém ženského reprodukčního zdraví. [61]

Doplňky stravy s probiotiky lze najít v mnoha formách od tobolek a prášků až po tekuté sirupy a roztoky. Každý doplněk obsahuje různé rody a kmeny probiotických bakterií, které

svým způsobem ovlivňují trávicí trakt. Výběr vhodné kombinace probiotik a tedy i správného doplňku závisí od uživatele. Ne všechny probiotické kombinace mohou vyhovovat každému jedinci. Pro přesnější určení vhodné kombinace probiotických kmenů mohou sloužit tzv. probiotika na míru. V tomto případě je proveden rozbor stolice a z něj pak určena správná koncentrace a složení probiotického doplňku.

2.6.1 Bezpečnost

Různé národy udržují různé zásady bezpečnosti potravinových doplňků a léčiv. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) považuje všechny běžné druhy probiotik za bezpečné pro běžnou populaci. Vzhledem k tomu, že probiotika je skupina exogenních mikrobů, očekávají se různé mechanismy interakcí a zdravotní účinky pro různé rody, druhy a kmeny u jednotlivých hostitelů. Kromě toho mohou rozdílné formulace, dávkování a způsoby podávání probiotik výrazně ovlivnit výsledky u individuálních konzumentů. [62]

Po požití mohou radikálně odlišná střevní mikroflóra a imunitní faktory vyvíjet selekční tlak na probiotické kmeny, aby se vyvinuly potenciální faktory virulence jako jsou adheziny, biogenní aminy (histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, fenylethylamin, spermin a spermidin), některé toxiny (hemolyziny) a škodlivé enzymy (glykosidázy, proteázy, mucinázy a želatinázy). Bakteriální genomy snadno podléhají přeskupení, aby se přizpůsobily měnícímu se prostředí. Tato genomická změna může vést ke vzniku nových kmenů, které jsou odolné vůči lékům. [62]

2.7 Metody identifikace DNA

2.7.1 Fenotypové metody

Fenotypizace je stále nejrozšířenější identifikační metodou v laboratořích potravinářské mikrobiologie. Metoda je založena na morfologické a fyziologické charakterizaci, fermentaci sacharidů a analýze proteinových profilů. Fyziologické testování je obvykle doplněno komerčními fermentačními metodami pro měření sacharidů. Přestože tyto metody byly široce používány, studie ukázaly jejich omezení. Patří mezi ně například nízká reprodukovatelnost nebo nízké taxonomické rozlišení. V tomto případě je identifikace možná pouze na úrovni bakteriálního rodu. [63]

2.7.2 Morfologické metody

Morfologické metody popisují bakterie podle jejich buněčné morfologie. Nejdůležitější a nejpoužívanější typy barvení jsou Gramovo barvení, barvení endospor a barvení kapslí, které se používají k rozlišení probiotických bakterií. Mikroskopická pozorování prováděná za specifických podmínek během růstu pak hodnotí velikost, tvar a uspořádání bakterií. Výsledkem postupu je identifikace bakteriálního rodu a čistoty. [64]

2.7.3 Biochemické a fyziologické metody

Probiotika lze na základě výsledků fermentace glukózy rozdělit do dvou skupin. První typ je homofermentativní, tato skupina bakterií přeměňuje glukózu na kyselinu mléčnou. V důsledku zpracování glukózy heterofermentativními bakteriemi, tzn. H. Druhým typem je kyselina mléčná, kyselina octová, ethanol a oxid uhličitý.

Biochemický test na úrovni API 50 CH obsahující 49 různých testů na uhlohydráty se používá ke studiu fermentace uhlohydrátů u probiotik. Tento test se běžně používá pro identifikaci biotypu, taxonomii a další studie související s identifikací. Je založen na očkování a považuje se za nejrychlejší a nejuniverzálnější detekční techniku jak z hlediska manipulace, tak interpretace výsledků. [64]

2.7.4 Molekulární metody

Molekulární metody jsou založeny na objevu a vytvoření specifických primerů cílených na 16S-23S rRNA ribozomální sekvenci. Tyto primery se používají pro specifické určení rodu a kmene. Sekvenování 16S rRNA je považováno za nejlepší standard používaný především pro taxonomické informace většinou na úrovni druhu. Molekulární metody jsou zvláště výhodné nejen z hlediska rychlosti a dostupnosti identifikace, ale také z hlediska ekonomické dostupnosti implementace. [65]

2.7.4.1 Izolace DNA pomocí fenol – chloroformové extrakce

Fenol-chloroformová extrakce je cenná technika izolace DNA široce používaná v různých vědeckých oborech. Jednou z takových oblastí je forenzní analýza a klinické diagnostické aplikace. Pro tyto typy analýz se běžně používá PCR amplifikace a fragmentová analýza polymorfních mikrosatelitních markerů. Pro metodu extrakce fenol-chloroform je čistota DNA stanovena měřením optické hustoty a poměr OD 260/280 1,8 až 2,0 ukazuje na dostatečnou čistotu. Vhodnost izolované DNA pro následné aplikace lze určit pomocí PCR amplifikace fragmentů DNA různých velikostí. PCR reakce a výsledky mohou být analyzovány na délku fragmentu pomocí kapilární elektroforézy. Celkově je extrakce fenol-chloroformem spolehlivá a účinná technika izolace DNA pro následné aplikace, jako je amplifikace PCR a analýza fragmentů. [66]

2.7.4.2 Izolace DNA pomocí magnetických nosičů

Tradiční metody extrakce DNA, jako je extrakce fenolem/chloroformem, jsou časově náročné a pracné, zejména při analýze více vzorků. Optimalizace izolace DNA pomocí technik založených na magnetických nosičích však může vést k efektivnější a rychlejší extrakci DNA. Magnetické částice se běžně používají při extrakci nukleových kyselin v pevné fázi (SPE). Zahrnuje čtyři hlavní kroky: buněčnou lýzu, adsorpci nukleových kyselin na adsorbent, odstranění nenavázaných molekul promytím a eluci nukleových kyselin. Magnetické částice modifikované oligonukleotidovými sondami nebo multivalentní magnetické částice modifikované povrchovými povlaky mohou interagovat s DNA pro sekvencně specifické separační aplikace. K usnadnění interakce DNA s magnetickými částicemi lze také indukovat kladně nabitě části. Amino-modifikovaný povrch poskytuje kladný náboj a usnadňuje elektrostatické interakce s DNA za kyselých podmínek. Hustota aminoskupin má pozitivní vliv na schopnost adsorbovat DNA a magnetické částice s drsným povrchem nebo aminem funkcionalizované mezoporézní magnetické částice oxidu křemičitého mohou zvýšit hustotu aminoskupin. Nukleová kyselina SPE využívá magnetický prášek, který je rychlý a účinný bez centrifugace. [67]

2.7.4.3 Izolace DNA pomocí komerčních kitů

Izolace DNA je kritickým krokem v molekulárním klonování, biomedicínském výzkumu a vysoce výkonném sekvenování. Komerční soupravy pro izolaci DNA získávají na popularitě díky snadnému použití, spolehlivosti a vysokým výtěžkům DNA. Jednou takovou komerčně dostupnou soupravou je souprava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Proces zahrnuje rozrušení bakterií, odstranění membránových lipidů, proteinů a genomové DNA, čištění DNA z objemových lyzátů a koncentraci DNA pro následné aplikace. Pro molekulární testování je velmi důležité vybrat správnou soupravu pro extrakci DNA. Studie ukázaly, že komerční kit je schopen PCR-amplifikovat 152 bp fragment genu β -globinu ve všech vzorcích s pozitivními výsledky. Pro extrakci DNA ze vzorků FFPE se doporučují komerční sady oxidu křemičitého, zatímco magnetické částicové materiály, jako jsou magnetické kuličky, jsou vhodnější pro separaci DNA na pevné fázi kvůli jejich větší vazebné kapacitě. [68, 69, 70]

2.7.4.4 Kvantifikace DNA pomocí spektrofotometrie Nanodrop

Nanodropová spektrofotometrie je široce používaná metoda pro kvantifikaci DNA díky své přesnosti a snadnému použití. Pro optimalizaci kvantifikace DNA pomocí spektrofotometrie Nanodrop je třeba vzít v úvahu různé faktory. Spektrofotometr NanoDrop 2000 je spolehlivým nástrojem pro kvantifikaci DNA. Sada PicoGreen Fluorescent Kit se používá k optimalizaci kvantifikace DNA pomocí spektrofotometrie Nanodrop. Fluorescenční vzorky by měly být uchovávány v jantarových nebo hliníkových zkumavkách kvůli jejich citlivosti na světlo. Absorbanční poměry A280/A260 a A260/A230 se používají ke stanovení čistoty DNA. Limit kvantifikace pro test Nanodrop byl definován jako 6-tinásobek standardní odchylky 10 skutečně negativních replikátů. U vzorků s měřením pod 17,5 ng/ μ l je reprodukovatelnost poměrových hodnot snížena a extrakční metoda využívající krok srážení v rámci čištění měla nejvyšší poměr extraktů s poměrem čistoty v přijatelném rozsahu 1,8 až 2.0 A260/A280. Souprava s magnetickými kuličkami poskytla nejvyšší koncentraci DNA ze tří komerčních metod, zatímco při srovnání metody s metodou varné lýzy byl výtěžek pouze 1,3krát vyšší než souprava s magnetickými kuličkami. Proto musí být tyto a další faktory pečlivě zváženy pro optimalizaci kvantifikace DNA pomocí spektrofotometrie Nanodrop. [71, 72, 73]

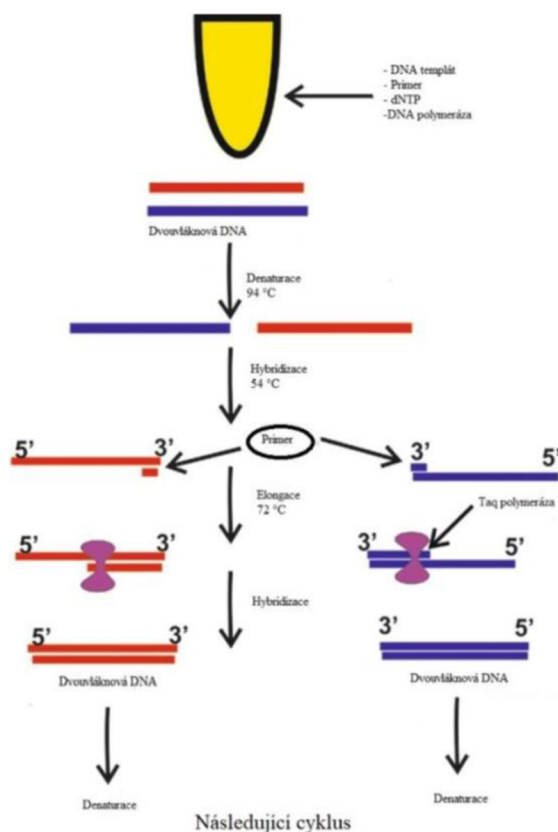
2.7.4.5 Kvantifikace koncentrace DNA pomocí fluorescenčních technik

Kvantifikace koncentrace DNA je důležitá v mnoha biologických a lékařských aplikacích. Bylo vyvinuto několik metod pro stanovení koncentrace DNA, včetně ultrafialové (UV) absorbance, fluorescenčního barvení a difenylaminové reakce. Srovnávací studie těchto metod ukazuje, že každá metoda má své výhody a nevýhody. Bylo zjištěno, že nejpresnější je metoda difenylaminové reakce s průměrnou chybou asi 10 % mezi naměřenými a skutečnými hodnotami, i když byla DNA smíchána s kontaminanty. UV absorbance je citlivá na různé nečistoty, a proto je méně spolehlivá při měření koncentrace DNA. Bylo zjištěno, že metoda barviva PicoGreen funguje nejlépe s degradovanými vzorky DNA nebo DNA extrahovanou ze zpracovaných produktů, ale je citlivá na tRNA a proteiny, což v některých případech snižuje přesnost. Studie také zjistila, že přesnost měření koncentrace pomocí těchto metod byla ovlivněna stupněm fragmentace DNA. Intenzivnější fragmentace DNA vede k nižším koncentracím měřeným pomocí fluorescenčních metod, ale spektrofotometrická měření koncentrace DNA nejsou ovlivněna úrovněmi fragmentace. Studie porovnávala různé metody

kvantifikace koncentrace DNA pomocí technik založených na fluorescenci, včetně testů s barvivem PicoGreen, měření absorbance při 260 nm a qPCR pomocí testů na bázi Alu. Fragmentace DNA může významně ovlivnit přesnost kvantifikace DNA, proto by při kvantifikaci fragmentované DNA měly být pro co nejspolehlivější výsledky použity podobně fragmentované standardy. [74, 75]

2.7.4.6 Polymerázová řetězová reakce

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je metoda pro amplifikaci malých množství DNA do více kopií. Tento široce používaný a jednoduchý test způsobil revoluci v mnoha oblastech výzkumu molekulární biologie. Proces zahrnuje optimalizaci a praktické aspekty a vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy. Zavedení reakce jsou krátké fragmenty DNA s definovanou sekvencí, která je komplementární k cílové DNA, která má být detekována a amplifikována. Určují přesný produkt DNA, který má být amplifikován a slouží jako pokračovací bod pro konstrukci DNA polymerázy. DNA polymeráza spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady a vytváří PCR produkt pomocí nukleotidů DNA adeninu, thyminu, cytosinu a guaninu (A, T, C, G). K získání dostatečných kopií pro analýzu je pro PCR zapotřebí pouze malé množství DNA. Produkty amplifikované DNA lze vizualizovat na agarózovém gelu pomocí barvení ethidium bromidem. PCR může kvantitativně indikovat množství specifické sekvence DNA, což z ní činí velmi citlivou techniku používanou k detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti známého patogenu nebo genu. PCR však může poskytnout zavádějící výsledky, pokud je vzorek kontaminován, byť malým množstvím cizorodé DNA a primery, použité v PCR, se mohou nespecificky vázat na podobné sekvence, které nejsou zcela identické s cílovou DNA. Přes tato omezení je PCR velmi citlivá metoda, která poskytuje rychlé výsledky a je základem mnoha laboratorních protokolů molekulární biologie. Otevřel nové cesty výzkumu a je základním kamenem projektu Human Genome Project. [76, 77, 78]



Obrázek 3 – (upraveno [79]) Mechanismus polymerázové řetězové reakce

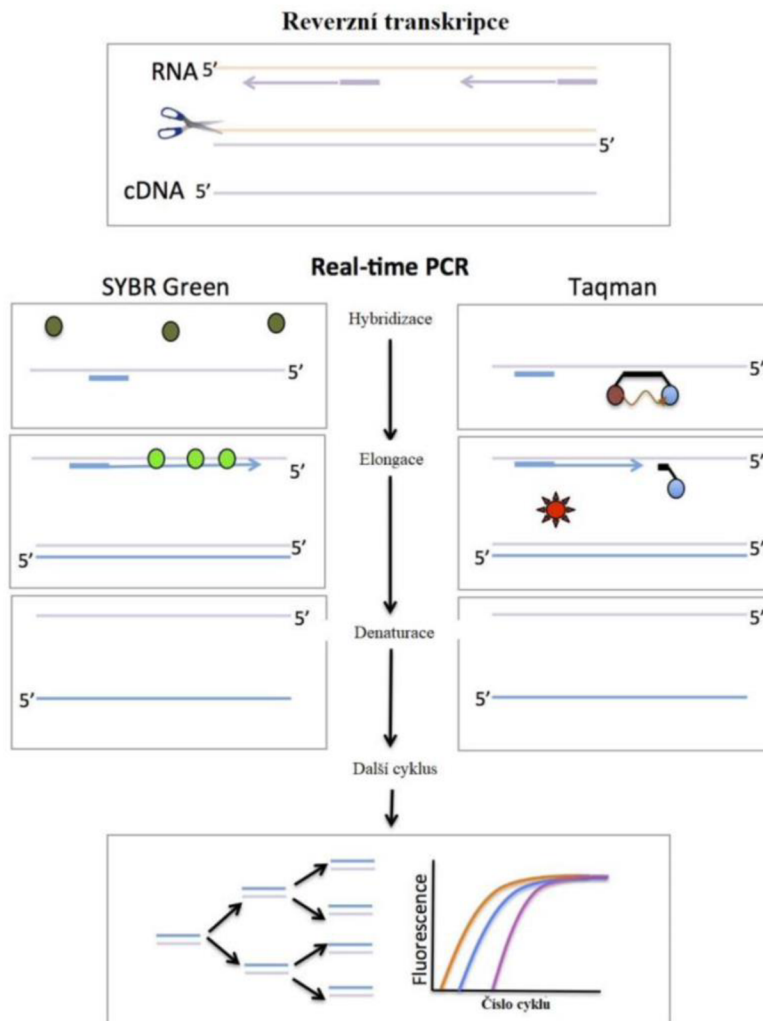
Polymerázová řetězová reakce (PCR) je široce používaná diagnostická metoda, která k úspěšnému fungování vyžaduje několik klíčových komponent. Dvě nejdůležitější složky jsou DNA polymeráza a primery. Taq polymeráza je termostabilní enzym používaný k amplifikaci sekvencí DNA v PCR. Primery, což jsou syntetické oligonukleotidové sekvence, definují sekvencí hranice cílové DNA a jsou nezbytné pro účinnou amplifikaci cílové DNA. Ionty hořčíku jsou také vyžadovány jako kofaktory pro aktivitu Taq polymerázy. Kromě toho vyžaduje PCR pro úspěšné provedení specifickou sekvencí DNA, dNTP (stavební bloky DNA) a specifické komponenty. Základními složkami požadovanými v PCR jsou primery, Taq polymeráza, dNTP, pufr, templátová DNA a termální cykly. PCR ve své nejjednodušší formě vyžaduje templát DNA, pár primerů, nukleotidy a enzym DNA polymerázu. PCR je široce používaná diagnostická metoda v laboratorní diagnostice onemocnění, protože je snadno použitelná a může kvantitativně ukázat specifickou sekvencí DNA. [80, 8, 82]

Ve výzkumu a diagnostice se používá několik metod PCR. Jednou takovou technikou je Nested PCR, která zahrnuje dvě sekvencí amplifikační reakce. V první amplifikační reakci se získá produkt, který se použije jako templát ve druhé PCR reakci. Nested PCR je účinná metoda pro amplifikaci dlouhých templátových segmentů, ale vyžaduje znalost cílové sekvence. Dalším typem PCR techniky je Real-Time PCR, která je považována za rychlou a přesnou platformu, která může poskytnout jak kvalitativní, tak kvantitativní výsledky. Jde o nově vznikající technologickou inovaci a hraje stále větší roli v klinických diagnostických

a výzkumných laboratořích. PCR se také používá pro rychlou detekci patogenů, včetně obtížně kultivovatelných patogenů. [83, 84, 85]

2.7.4.7 Real – Time PCR

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR) se stala široce používanou metodou v molekulárně biologickém výzkumu a klinické laboratorní diagnostice díky své citlivé a specifické detekci nukleových kyselin. Real-time PCR nahradila tradiční PCR díky svým mnoha výhodám, jako je snadnost a rychlost analýzy velkých sad vzorků, vysoká citlivost, vynikající specifita a přesnost při detekci cílů s malým počtem kopií, jako jsou mikroorganismy, vysoká genotypizace genů, replikační cíle a změny v genové expresi mezi pacienty a kontrolami nebo skupinami pacientů. PCR v reálném čase se skládá z termostabilní DNA polymerázy, oligonukleotidových primerů, fluoroforů konjugovaných s dsDNA nebo fluorescenčně značených oligonukleotidových sond, nukleotidů, MgCl₂, KCl a Tris-HCl. Real-time PCR umožňuje klonovat a manipulovat geny pro biomedicínský výzkum. PCR v reálném čase má široký dynamický rozsah pro detekci a kvantifikaci a logaritmický cíl má lineární vztah s periodou prahu detekce. Je považován za standard pro detekci a kvantifikaci nukleových kyselin. Použití technologie PCR v reálném čase umožnilo lépe porozumět chorobným procesům a je nyní základem diagnostiky a základního vědeckého výzkumu. Aplikace technologie fluorescenční kvantitativní PCR v reálném čase podpořila diagnostiku genetických, infekčních onemocnění a nádorových onemocnění. Očekává se, že v příštím desetiletí se fluorescenční kvantitativní PCR v reálném čase stane hlavní metodou genetické diagnostiky. Metoda PCR je široce používána v klinické laboratorní diagnostice pro svou senzitivitu a specifitu pro detekci nukleových kyselin. Amplifikované nukleové kyseliny byly použity pro genetickou typizaci mikrobiálních a savčích genetických polymorfismů, jako jsou polymorfismy histokompatibilního antigenu v transplantační medicíně. Technologie PCR v reálném čase zlepšuje PCR tím, že eliminuje potřebu analýzy produktu po PCR, čímž je proces efektivnější a přesnější. [86, 87]



Obrázek 2 – (upraveno [88]) Mechanismus amplifikace a detekce produktů pomocí markeru SYBR-green a Taqmanovy sondy

Pomocí PCR v reálném čase se data shromažďují během reakčního procesu. Toho je dosaženo kombinací ověření a detekce v jednom kroku. Detekce těchto dvou proměnných vyžaduje použití různých fluorescenčních chemikálií, které korelují koncentraci produktu PCR s intenzitou fluorescence. [89]

Obecný důvod pro měření genové exprese pomocí PCR v reálném čase je založen na fluorescenční detekci. V prvním kroku se vzorky umístí do správných jamek, následuje tepelná cyklizace podobná klasické PCR. Při PCR v reálném čase je však zařízení vystaveno zdrojům, jako je wolfram nebo halogeny, které způsobují fluorescenci markerů přidaných do vzorku. Nejčastěji používané značky v real-time PCR jsou ethidium bromid, YO-PRO-1, SYBR Green a Taqman sondy. Signál je pak zesílen podle počtu kopií DNA ve vzorku. Detektor zachytí vysílaný signál, převede jej na digitální signál a odešle jej do počítače. Signál lze detekovat poté, co dosáhne své prahové úrovně, nejnižší úrovně detekce detektoru. [89, 90]

Množství templátu lze určit pomocí PCR v reálném čase dvěma způsoby – relativní kvantifikací nebo absolutní kvantifikací. Relativní kvantifikace umožňuje popsat změnu

v abundanci cílové sekvence ve srovnání s matricí na stejné úrovni. Ačkoli absolutní kvantifikace 18 ukazuje přesné množství cílové nukleové kyseliny přítomné ve vzorku. Obecně platí, že relativní kvantifikace poskytuje dostatek informací a tato kvantifikace se snáze dále rozvíjí. [90]

2.7.5 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je technika pro separaci a monitorování proteinů během purifikace, hodnocení homogenity purifikovaných frakcí a jejich identifikaci. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) je běžně používaná metoda separace proteinů s vysokým rozlišením, která dokáže oddělit tisíce polypeptidů v jednom gelu. Běžně se používá ke stanovení molekulové hmotnosti proteinových podjednotek a složení podjednotek purifikovaných proteinů. Gelová elektroforéza se často používá v kombinaci s blotováním k poskytnutí výkonných prostředků pro analýzu proteinů, zatímco disková elektroforéza je metoda používaná pro separaci proteinů v mikrogramových množstvích proteinu. Zpočátku kondenzuje proteinové vzorky do extrémně ostré vrstvy a poskytuje ostré rozlišení jednotlivých hranic. Barvení mědí je nedávný vývoj v gelové elektroforéze, který umožňuje rychlé a citlivé barvení. PFGE hraje klíčovou roli v moderní genomice tím, že odděluje fragmenty DNA od 10 kb do 10 Mb pomocí pulzních elektrických polí ve dvou směrech. Je považován za standard pro charakterizaci patogenních organismů s vysokou rozlišovací schopností. Používá se při dohledu nad veřejným zdravím, klasifikaci bakteriálních subtypů a charakterizaci druhů ohniska. Dvourozměrná proteinová elektroforéza, další typ gelové elektroforézy používaný v proteomice, zahrnuje dva kroky: izoelektrickou fokusaci v prvním rozměru a SDS-PAGE ve druhém. Jeho výhodou je schopnost separovat intaktní proteiny a jeho snadná integrace s Western blottingem. Gelová elektroforéza je jednoduchá a levná technika, díky čemuž je vhodnou volbou pro bakteriální typizaci. [91, 92, 93]

K dispozici jsou různé typy technik gelové elektroforézy a každá technika má své výhody a nevýhody. Typy gelů lze modifikovat tak, aby splňovaly specifické cíle prováděné analýzy [6]. Článek zmiňuje, že v elektroforéze existují různé typy gelů, ale nespécifikuje typ gelové elektroforézy. Gelovou elektroforézou lze přizpůsobit různým typům elektroforetických separačních technik včetně vertikálních a horizontálních systémů. Pro provoz těchto systémů jsou k dispozici různé typy elektroforetických zařízení. Typ gelu, koncentraci gelu a složení lze měnit, aby se zlepšila gelová elektroforéza, což umožňuje větší flexibilitu a přizpůsobení podle konkrétní prováděné analýzy. Dvě nejčastěji používané techniky gelové elektroforézy jsou desková elektroforéza a kapilární elektroforéza. Desková elektroforéza je široce používaná technika, která zahrnuje použití ploché gelové matrice, zatímco kapilární elektroforéza je novější technika, která využívá úzké kapiláry k separaci molekul na základě velikosti a náboje. Obecně bude typ použité techniky gelové elektroforézy záviset na konkrétních cílech prováděné analýzy a povaze separovaných molekul. [94, 95]

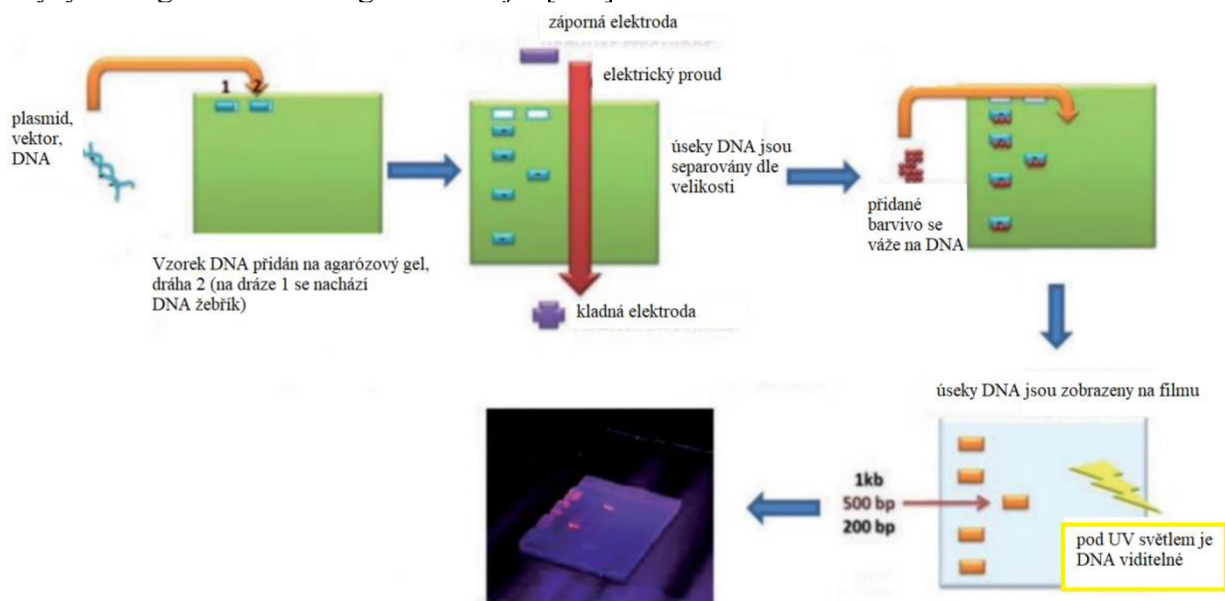
Gelová elektroforéza se stala důležitou technikou v molekulární biologii, genetice a biochemii, protože dokáže separovat a analyzovat biomolekuly na základě jejich velikosti, náboje a tvaru. Tento výkonný nástroj má širokou škálu aplikací, včetně genetického mapování, genetické diagnostiky a charakterizace proteinů. Kromě toho byla gelová elektroforéza použita ke studiu různých biomolekul, jako je DNA, RNA a proteiny. V dějinách molekulární biologie

nelze nezmínit gelovou elektroforézu, která sehrála důležitou roli v rozvoji poznání biomolekul pomocí izolace a vizualizace jednotlivých molekulárních struktur. Gelová elektroforéza také prošla dalšími vylepšeními, což vedlo k vývoji nových technik, jako je gradientní gelová elektroforéza s pulzním polem (PFGE), která dokáže oddělit neporušenou chromozomální DNA za vzniku molekulárních karyotypů, které značně usnadňují přiřazení genů. Technologie PFGE může být použita pro izolaci mikrobiálních chromozomů a vzdálené mapování savčích genů. Navíc lze gelovou elektroforézu použít ke stanovení velikosti a vzoru fragmentů DNA z různých zdrojů, identifikaci přítomnosti nebo nepřítomnosti barvení ve fragmentech DNA z různých zdrojů a vizualizaci fragmentů DNA. [96, 97, 98]

2.7.5.1 Agarosová gelová elektroforéza

K separaci fragmentů DNA podle molekulové hmotnosti se používá elektroforéza na agarózovém gelu. Menší kusy se pohybují rychleji, zatímco větší kusy se pohybují pomaleji. Vzdálenost, o kterou se daný fragment pohne, je nepřímě úměrná logaritmu jeho molekulové hmotnosti. Velikosti fragmentů se určují kalibrací gelu se standardy známé velikosti a poté porovnáním vzdálenosti uražené neznámým vzorkem. Způsob pak vyžaduje použití činidel, jako je agaróza, ethidium bromid a gelový pufr. [99]

Agaróza je lineární polymer získaný extrakcí řas. Po zahřátí a následném ochlazení v pufru využívá vodíkové vazby k vytvoření gelové struktury. Kvůli špatné mechanické pevnosti byly agarózové gely nality do průhledných plastových nádob. Poté se provádí elektroforéza s gelem těsně pod povrchem pufru a gelem prochází elektrický proud. Tenká vrstva pufru zabraňuje vysychání gelu a částečně gel ochlazuje. [100]



Obrázek 3 – (upraveno [101]) Princip agarosové gelové elektroforézy

2.7.6 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Analýza křivky tání DNA s vysokým rozlišením je všestranná technika, která umožňuje výzkumníkům studovat různé aspekty DNA, včetně skenování mutací a genotypování bez sond. Barviva vázající DNA, jako jsou barviva používaná při tavení s vysokým rozlišením, poskytují

výzkumníkům velké množství strukturních dat o biomolekulách obecně, zejména o DNA. Tavení s vysokým rozlišením lze použít ke studiu motorických proteinů pohybujících se podél DNA, poskytující hladké křivky pro danou sekvenci DNA, které lze použít k získání dalšího náhledu na umístění a strukturu DNA. Kromě toho lze tavení s vysokým rozlišením použít pro analýzu interakcí protein-DNA v celém genomu pomocí počítačových algoritmů, které poskytují obrazy jaderné topologie s vysokým rozlišením. Tavení s vysokým rozlišením také usnadňuje kvantifikaci standardní křivky DNA a analýzu mikrosatelitů pomocí kapilární elektroforézy a tavení s vysokým rozlišením. Flexibilita této techniky umožňuje manipulaci s DNA na úrovni celých chromozomů nebo dokonce celých genomů pro strukturální a funkční analýzu v různých aplikacích. Celkově je analýza křivky tání DNA s vysokým rozlišením výkonná technika, která může výzkumníkům poskytnout velké množství informací o struktuře, funkci a interakcích DNA.

[102, 103]

Analýza křivky tání DNA s vysokým rozlišením je technika používaná k identifikaci a diferenciaci bakteriálních druhů na základě jejich sekvence DNA. Proces zahrnuje zahřívání dvouřetězcové DNA, aby se roztavila na jednořetězcovou DNA, pak postupné ochlazování za současného sledování fluorescence vzorku a následné vykreslení fluorescence proti teplotě, aby se vytvořila křivka tání specifická pro sekvenci DNA. Rozdíly v sekvenci DNA různých bakteriálních druhů vedou k různým křivkám tání, což z této metody činí rychlý a nákladově efektivní způsob identifikace bakteriálních druhů na základě jejich sekvence DNA. Analýza HRM je rychlejší, přesnější a účinnější než elektroforetická analýza. Pro detekci polymorfismů SSR kukuřice byl vyvinut HRM systém, který lze použít k nahrazení elektroforézy po amplifikaci SSR PCR. Analýza HRM, schopná rozlišit nové genetické varianty v produktech PCR, je slibnou metodou pro rychlý screening BRCA1/2 španělských mutací.

HRM se také používá jako pre-screeningová metoda pro skenování genů, která dokáže detekovat heterozygotní mutace změnami tvaru křivky tání nebo monitorováním dHPLC, ale nemůže detekovat homozygotní mutace pouze podle tvaru křivky. HRMA má velký potenciál pro rychlé skenování mutací in vitro, snadnou detekci heterozygotů a delece 1 nebo 2 párů bází ve všech třídách jednonukleotidových polymorfismů (SNP). [104, 105, 106]

Analýza křivky tání s vysokým rozlišením (HRMA) má mnoho aplikací v analýze DNA. Jednou z takových aplikací je její použití k rozlišení sekvenčních rozdílů v amplikonech PCR bez potřeby experimentů s nástřikem DNA nebo heteroduplexů. HRMA je také vhodná pro genotypizaci s vysokým rozlišením pomocí analýzy tání amplikonu a detekci polymorfismů sekvence DNA na základě rozdílů teplot tání. Tradiční analýza křivky tání má omezenou schopnost rozlišovat sekvence, protože se spoléhá na fluorescenčně značené sondy. Naproti tomu HRMA dokáže rozlišit sekvence i bez značených sond. Kromě toho byl HRMA použit pro diferenciaci produktů analýzou křivky tání DNA a prokázal vysokou účinnost při detekci SSR, což z něj činí slibnou technologii pro zobecnění a aplikaci. Kromě toho se k detekci nízkourovňové metylované DNA s vysokou citlivostí používá analýza křivky tání DNA s vysokým rozlišením na metylaci. Navzdory různým aplikacím HRMA je pro zajištění přesných a spolehlivých výsledků důležité používat řadu standardů se známými teplotami tání. [107, 108]

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce byla izolace DNA bakterií rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* a druhů *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* a *Streptococcus thermophilus* z doplňku stravy ve formě sirupu a prokázat jejich přítomnost deklarované výrobcem. DNA těchto bakterií byla izolována pomocí dvou metod, a to metodou fenol – chloroformové extrakce a pomocí OMNI Bacterial DNA komerčního kitu. U izolované DNA byly stanoveny kvalitativní i kvantitativní parametry za použití přístroje NanoDrop 2000. Z těchto dvou metod byl vybrán nejčistší vzorek, který byl následně použit pro kvantifikaci a PCR-HRM analýzu na úrovni rodu a druhu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý vzorek doplňku stravy

Harmonelo Probio

Složení:

Rozpustná vláknina z kořene čekanky obecné (*Cichorium intybus*) na bázi fruktooligosacharidů, kyselina citrónová (regulátor kyselosti), inulin, tyndalizovaná probiotika – 12 kmenů (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus*), sorban draselný a benzoan sodný (konzervanty), aroma lesní plody, steviol-glykosid, xantanová guma.

4.2 Chemikálie a roztoky

4.2.1 Chemikálie

- Tris-báze (Serva, Heidelberg, SNR)
- Tris-HCl (Serva, Heidelberg, SNR)
- Hydroxid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- EDTA (Serva, Heidelberg, SNR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SNR)
- Proteináza K (100 µg/ml vody) (Sigma, St. Louis, USA)
- SDS (Sigma, St. Louis, USA)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- CIZ (chloroform:izoamylalkohol; 24:1) (Lachema, Brno, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Etanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- *Lactobacillus* MRS broth (Himedia®, India)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DLB pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- BB pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- CBH pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- DW pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- EB pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- Proteáza (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- PCR komponenty
- qPCR 2× SYTO-9 Master-mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Bacteria* (10 pmol/µl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)

- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, HradecKralové, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Streptococcus* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus plantarum* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus reuteri* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Lacticaseibacillus casei* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Bifidobacterium animalis* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Bifidobacterium infantis* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Bifidobacterium longum* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Bifidobacterium lactis* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Bifidobacterium breve* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Bifidobacterium bifidum* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Streptococcus thermophilus* (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)

4.2.2 Roztoky

1 M Tris -HCl

121,1 g Tris-HCl bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. pH bylo upraveno na 7,8. Roztok byl doplněn na objem 1000 ml a sterilizován po dobu 20 minut. při teplotě 121 °C.

0,5 M EDTA

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. pH bylo upraveno na 8,0. Roztok byl doplněn na objem 1000 ml a sterilizován po dobu 20 minut. při teplotě 121 °C.

20 % SDS

20g pevného SDS bylo za stálého míchání rozpuštěno v 80 ml destilované vody a roztok byl zahřát na teplotu 68 °C. hodnota pH byla upravena na 7,0 koncentrovanou HCl a objem doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

Lyzační roztok A

Bylo smícháno 0,5 ml 1 M EDTA (pH 8,0) a 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) a objem doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

Lyzační roztok B

Bylo smícháno 0,5 ml 1 M EDTA (pH 8,0), 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) a lysozymu tak, aby výsledná koncentrace lysozymu v roztoku byla 3 mg/ml.

Octan sodný (3 M)

40,81 g trihydrátu octanu sodného bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody a hodnota pH byla upravena na 5,2. Roztok byl následně doplněn na objem 100 ml a sterilovaný 20 min. při 121 °C.

TE pufr

Bylo smícháno 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 1 ml 1M Tris-HCl (pH 7,8) a objem doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

0,5× zředěný TBE pufr

V objemu 600 ml destilované vody bylo rozpuštěno 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité. Následně bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a roztok doplněn na objem 1 000 ml. Před použitím byl roztok 10× zředěn.

4.3 Přístroje

- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga miniSpin plus 14 500 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Omni DNA Mini kolony (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- Sběrné zkumavky (2 ml) (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Thermo-Shaker (TS-100C BioSan, Riga, Latvia)
- Nanodrop 2000c UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- DNA/RNA UV-Dekontaminační box (UVC/T-AR)
- Laboratorní sklo a pomůcky.
- Rotorgene 6000
- LightCycler® Nano Instrument (Roche, Basel, Švýcarsko)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Mikropipety Finnpiette F2 různých objemů (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

4.4 Použité mikroorganismy pro pozitivní kontrolu

DNA pozitivních kontrol, které byly dodány ve formě lyofilizátu z Masarykovy Univerzity, byla izolována pomocí kitu OMNI INTERNATIONAL.

Bifidobacterium animalis CCDM 4988^T

Bifidobacterium breve CCDM 7825^T

Lactocaseibacillus casei CCDM 7088^T
Lactocaseibacillus rhamnosus CCDM 118
Lactiplantibacillus plantarum CCDM 183
Limosilactobacillus reuteri CCDM 777
Bifidobacterium bifidum CCDM 309
Bifidobacterium animalis CCDM 107
Bifidobacterium longum CCDM 219
Bifidobacterium longum CCDM 232
Streptococcus thermophilus CCDM 1008
Lactobacillus acidophilus CCDM 4833^T

4.5 Metody

4.5.1 Lyze bakteriálních buněk

- 1,0 ml vzorku doplňku stravy bylo napipetováno do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky a zcentrifugován (5 min., 14 500 ot·min⁻¹).
- Poté byl slit supernatant a přidán 1 ml lyzačního roztoku A, promícháno a opět zcentrifugováno (5 min., 14 500 ot·min⁻¹).
- Opět byl slit supernatant a přidán roztok B, směs byla vortexována a inkubována při teplotě místnosti po dobu 30 minut.
- Poté bylo do směsi napipetováno 25 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K ((0,1 mg·ml⁻¹).
- Vzorky byly inkubovány 60 minut při 55 °C.

4.5.2 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- Do všech zkumavek s hrubým lyzátem buněk bylo napipetováno 700 µl fenolu.
- Směs byla kývavým pohybem promíchána po dobu 4 minut.
- Následně byla směs zcentrifugována (5 min., 14 500 ot·min⁻¹).
- Byla odebrána vodní fáze do čisté 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky.
- Ke všem vzorkům bylo přidáno 700 µl CIZ (chloroform:isoamylalkohol, 24:1).
- Směs byla opět kývavým pohybem promíchána po dobu 4 minut.
- Vzorky byly zcentrifugovány (5 min., 14 500 ot·min⁻¹).
- Vytvořená vodní fáze byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky (1,5 ml) a doplněna TE pufrem na 400 µl.

4.5.3 Izolace bakteriální DNA pomocí Omni Bacterial DNA Purification kitu (Omni International)

- Do Eppendorfovy zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku krému a 1 ml lyzačního roztoku B.
- Vzorky byly inkubovány 37 °C/ 10 min.
- Následně bylo přidáno 25 µl roztoku protázy a 100 µl DLB pufru.
- Zkumavka byla uzavřena, promíchána a inkubována na termobloku při teplotě 55 °C po dobu 60 min.
- Vzorky byly zcentrifugovány (2 min. 10 000 ot·min⁻¹).

- Byl odpipetován supernatant do nové sterilní 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky tak, aby se nenarušil pelet.
- Byl přidáno 220 μl BB pufru, promícháno a inkubováno při 65 °C/ 10 min.
- Ke vzorkům bylo přidáno 220 μl EtOH a důkladně byly promíchány.
- Omni DNA Mini kolonka byla vložena do 2 ml sběrné zkumavky a vzorky byly přepipetovány na kolonku včetně sraženin.
- Kolonky byly centrifugovány (1 min. 10 000 ot·min⁻¹).
- Byl odstraněn supernatant a bylo napipetováno na kolonku 500 μl CBH pufru.
- Vzorky byly centrifugovány (1 min. 10 000 ot·min⁻¹).
- Byl odstraněn supernatant a napipetováno na kolonku 700 μl DW pufru.
- Vzorky byly centrifugovány (1 min. 10 000 ot·min⁻¹).
- Byl odstraněn supernatant a kolonky byly opět zcentrifugovány (2 min. 10 000 ot·min⁻¹).
- Kolonka byla vložena do nové sterilní Eppendorfovy zkumavky a na ni bylo napipetováno 100 μl EB pufru předehřátého na 65 °C.
- Vzorky byly inkubovány po dobu 10 min. při laboratorní teplotě a následně zcentrifugovány (1 min. 10 000 ot·min⁻¹).

4.5.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

- Za použití přístroje NanoDrop 2000 byla proměřena absorbance izolované DNA proti TE pufru. Objem vzorku byl nanášen o objemu 2 μl .
- Absorbance byla proměřena pro vlnové délky 230 a 260 nm (minimální a maximální absorbance nukleových kyselin) a 280 nm (maximální absorbance proteinů).
- Z hodnoty absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace ve vzorku.
- Z poměru absorbancí A_{260}/A_{280} byla vypočtena čistota vzorku, která by neměla překročit rozmezí 1,8–2.
- Z NanoDrop 2000 byla také odečtena koncentrace vzorků.

4.5.5 Příprava směsi pro PCR

- Všechny komponenty byly rozmrazeny a promíchány.
- Jednotlivé komponenty byly přidány v objemech uvedených v Tabulce 5.
- Jako matrice byla použita DNA vyizolovaná pomocí fenolové extrakce a komerčního kitu.

Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software a Rotorgene 6000® software. Z důvodu přehlednosti byly ponechány původní názvy jednotlivých druhů bakterií, pod kterými jsou uvedeny na etiketě výrobku.

Tabulka 2 – Specifické primery pro druhy a rod *Lactobacillus*

| Specifická PCR | Primer | Sekvence primeru (5' - 3') | Reference |
|----------------------------------|-------------|-----------------------------|-----------|
| Rod <i>Lactobacillus</i> | F-lacto | GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC | [109] |
| | R-lacto | GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC | |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Aci-ITS.L | CCTTTCTAAGGAAGCGAAGGAT | [109] |
| | Aci-ITS.R | AATTCTCTTCTCGGTCGCTCTA | |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | Lfpr | GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT | [109] |
| | PlanII | TTACCTAACGGTAAATGCGA | |
| <i>Lactobacillus casei</i> | Cas-ITS.L | AAGCACCTAACGGGTGCGACT | [109] |
| | CasII | GCGATGCGAATTTCTTTTTC | |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Rhamnosus-F | GGCGTGCCTAATACATGCAA | [109] |
| | Rhamnosus-R | GTCCGCCACTCGTTCAAAA | |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | Lreu-1 | CAGACAATCTTTGATTGTTTAG | [110] |
| | Lreu-2 | GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC | |

Tabulka 3 – Specifické primery pro druhy a rod *Bifidobacterium*

| Specifická PCR | Primer | Sekvence primeru (5' - 3') | Reference |
|---|-----------|----------------------------|-----------|
| Rod <i>Bifidobacterium</i> | g-Bifid-F | CTCCTGGAAACGGGTGG | [111] |
| | g-Bifid-R | GGTGTTCTTCCCGATATCTACA | |
| <i>Bifidobacterium animalis subsp. animalis</i> | Bani-tF | TCACGACAAGTGGGTTGCCA | [111] |
| | Bani-tR | GTTGATCGGCAGCTTGCCG | |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | Bbif-tF | GTCAGGTGGGTGTCCCGCGT | [111] |
| | Bbif-tR | ATGCCGACGATCTCGACCGG | |
| <i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> | Binf-tF | ATCCGTCCGACCCAGACC | [111] |
| | Binf-tR | CTCGACATCCTCACGGCC | |
| <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> | Bani-tF | TCACGACAAGTGGGTTGCCA | [111] |
| | Bani-tR | GTTGATCGGCAGCTTGCCG | |
| <i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i> | BloF | GTATCCGTCCGACCCAGCAG | [111] |
| | BloR | GGTGACGGAGCCCGGCTTG | |

Tabulka 4 – Specifické primery pro druhy a rod *Streptococcus*

| Specifická PCR | Primer | Sekvence primeru (5' - 3') | Reference |
|-----------------------------------|--------|----------------------------|-----------|
| Rod <i>Streptococcus</i> | TI-F | GAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT | [112] |
| | TI-R | TGCCAGGGCATCCACC | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | ThI | ACGGAATGTACTTGAGTTTC | [112] |
| | ThII | TGGCCTTTCGACCTAAC | |

Tabulka 5 – Komponenty pro přípravu PCR směsi

| Krok | Komponenta | Objem (μl) |
|--------|---------------------------|------------|
| 1 | Voda pro PCR | 9,5 |
| 2 | qPCR 2x SYTO-9 Master Mix | 12,5 |
| 3 | Primer 1 (10pmol/μl) | 1,0 |
| 4 | Primer 2 (10pmol/μl) | 1,0 |
| 5 | Matrice DNA | 1,0 |
| Celkem | | 25,0 |

4.5.6 Programy amplifikace PCR

- Všechny komponenty byly promíchány a následně byly vloženy do termocykleru.
- Lightcycler a Rotorgene 6000 byl nastaven dle Tabulek 6 - 8.

Tabulka 6 – Programy použité pro rod *Lactobacillus* a druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*,

| Rod <i>Lactobacillus</i> | Počet cyklů | Druh <i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. plantarum</i> | Počet cyklů | Druh <i>L. casei</i> <i>L. reuteri</i> | Počet cyklů |
|-----------------------------|------------------------|---|------------------------|--|------------------------|
| | | 94 °C/5 min | | 94 °C/5 min | |
| | 30 | 94 °C/30 s | 30 | 94 °C/30 s | 30 |
| | | 58 °C/30 s | | 55 °C/30 s | |
| | | 72 °C/1 min | | 72 °C/1 min | |
| | | 72 °C/5 min | | 72 °C/5 min | |
| HRM | 50 °C/1 min | HRM | 50 °C/1 min | HRM | 50 °C/1 min |
| | 50–99 °C po 0,5/1 s | | 50–99 °C po 0,5/1 s | | 50–99 °C po 0,5/1 s |

Tabulka 7 – Programy použité pro rod *Bifidobacterium* a druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*,

| Rod <i>Bifidobacterium</i> | | Počet cyklů | Druh <i>B. animalis</i> <i>B. lactis</i> | Počet cyklů | Druh <i>B. longum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. bifidum</i> | Počet cyklů | Druh <i>B. breve</i> | Počet cyklů |
|----------------------------|---------------------|-------------|---|-------------|--|-------------|----------------------|-------------|
| 94 °C/5 min | | | 94 °C/5 min | | 94 °C/5 min | | 94 °C/5 min | |
| 94 °C/1 min | | 35 | 94 °C/30 s | 35 | 94 °C/30 s | 35 | 94 °C/20 s | 35 |
| 55 °C/1 min | | | 58 °C/30 s | | 55 °C/30 s | | 55 °C/20 s | |
| 72 °C/1 min | | | 72 °C/1 min | | 72 °C/1 min | | 72 °C/30 s | |
| 72 °C/5 min | | | 72 °C/5 min | | 72 °C/5 min | | 72 °C/5 min | |
| HRM | 50 °C/1 min | HRM | 50 °C/1 min | HRM | 50 °C/1 min | HRM | 50 °C/1 min | HRM |
| | 50–99 °C po 0,5/1 s | | 50–99 °C po 0,5/1 s | | 50–99 °C po 0,5/1 s | | 50–99 °C po 0,5/1 s | |

Tabulka 8 – Programy použité pro rod *Streptococcus* a druh *Streptococcus thermophilus*

| Rod <i>Streptococcus</i> | Počet cyklů | <i>S. thermophilus</i> | Počet cyklů |
|--------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| 95 °C/9 min | 30 | 95 °C/5 min | 30 |
| 94 °C/30 s | | 95 °C/1 min | |
| 60 °C/1 min | | 58 °C/1 min | |
| 72 °C/1 min | | 72 °C/1 min | |
| 72 °C/5 min | | 72 °C/5 min | |
| HRM | 50 °C/1 min | HRM | 50 °C/1 min |
| | 50–99 °C po 0,5/1 s | | 50–99 °C po 0,5/1 s |

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava hrubých lyzátů z doplňku stravy

Z doplňku stravy Harmonelo Probio bylo připraveno 8 vzorků hrubých lyzátů buněk podle kapitoly 4.5.1. Tyto hrubé lyzáty byly následně použity pro izolaci DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce.

5.2 Izolace DNA

Dle kapitoly 4.5.2 byla izolována DNA z hrubých lyzátů buněk izolované fenol- chloroformové extrakcí.

Dle kapitoly 4.5.3 byla provedena izolace DNA dle OMNI Bacterial DNA kitu.

5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Na přístroji NanoDrop 2000 byla proměřena absorbance vzorků izolovaných pomocí fenol chloroformové extrakce a pomocí komerčních kitu pro vlnové délky 220–320 nm. Výsledné hodnoty koncentrace a čistoty pro metodu fenol-chloroformové extrakce jsou uvedeny v Tabulce 9 a pro izolaci komerčním kitem v Tabulce 10.

Tabulka 9 – Spektrofotometrické stanovení DNA izolovanou fenol-chloroformovou extrakcí

| Vzorek | Koncentrace (ng/μl) | A ₂₆₀ | A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
|--------|---------------------|------------------|------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 83,2 | 1,67 | 0,86 | 1,93 | 1,84 |
| 2 | 63,1 | 1,26 | 0,73 | 1,73 | 1,49 |
| 3 | 265,9 | 5,32 | 2,65 | 2,00 | 1,87 |
| 4 | 103,3 | 2,07 | 1,11 | 1,87 | 1,83 |
| 5 | 66,0 | 1,32 | 0,73 | 1,80 | 1,70 |
| 6 | 61,0 | 1,22 | 0,67 | 1,81 | 1,41 |
| 7 | 97,4 | 1,95 | 1,03 | 1,90 | 1,75 |
| 8 | 120,7 | 2,41 | 1,28 | 1,88 | 1,86 |

Tabulka 10 - Spektrofotometrické stanovení DNA izolovanou OMNI Bacterial DNA kitem

| Vzorek | Koncentrace (ng/μl) | A ₂₆₀ | A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
|--------|---------------------|------------------|------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 53,5 | 1,07 | 0,68 | 1,57 | 0,9 |
| 2 | 140,7 | 2,81 | 2,38 | 1,18 | 0,92 |
| 3 | 34,0 | 0,68 | 0,56 | 1,21 | 0,85 |
| 4 | 31,3 | 0,63 | 0,53 | 1,19 | 0,88 |
| 5 | 82,6 | 1,65 | 1,41 | 1,17 | 0,88 |
| 6 | 85,1 | 1,70 | 1,44 | 1,18 | 0,85 |
| 7 | 58,1 | 1,16 | 0,99 | 1,16 | 0,93 |
| 8 | 53,5 | 1,07 | 0,68 | 1,57 | 0,90 |

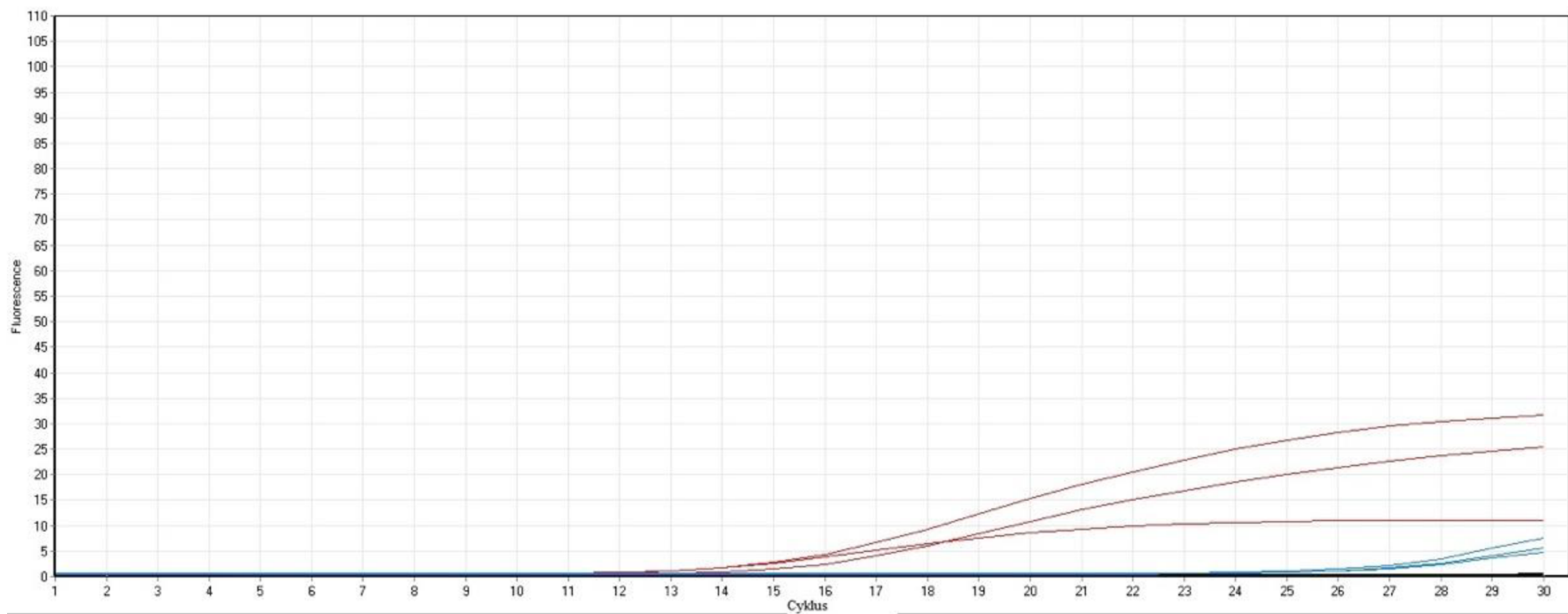
5.4 PCR v reálném čase s analýzou křivek tání (Melt analýza)

Pro identifikaci na úrovni rodu a druhu byla použita PCR v reálném čase. Použité programy byly optimalizovány dle rodově a druhově specifických primerů. Na základě spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty a následně agarosové gelové elektroforézy na genomové úrovni byl vybrán vzorek o nejvyšší koncentraci, čistotě a detekci DNA. Tento vzorek byl následně použit pro PCR v reálném čase. Vzorek splňující tyto kritéria je vzorek číslo 4 izolovaný fenol-chloroformovou extrakcí. Tento vzorek byl podroben amplifikaci pomocí specifické PCR dle bodu 4.5.7. Přítomnost specifických produktů byla ověřena pomocí Melt analýzy nastavené dle bodu 4.5.7.

5.4.1 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod *Lactobacillus*

Byla provedena PCR v reálném čase pro rod *Lactobacillus*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA radu *Lactobacillus casei* CCDM 7088^T. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 5. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

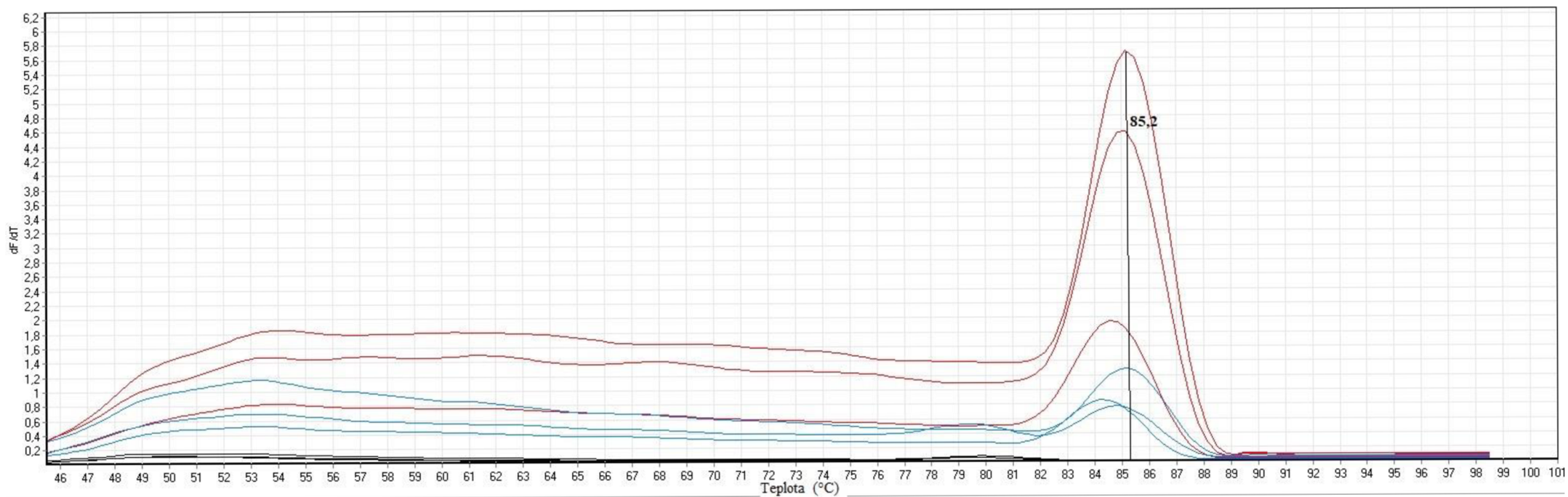
Při Melt analýze byl na křivce tání amplikonu pozitivní kontroly (*Lactobacillus casei* CCDM 7088^T) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 85,2 °C. Vrchol o podobné teplotě byl detekován i u vzorku (Obrázek 5). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Rotorgene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus casei* CCDM 7088^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.

Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 5 – Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro rod *Lactobacillus*



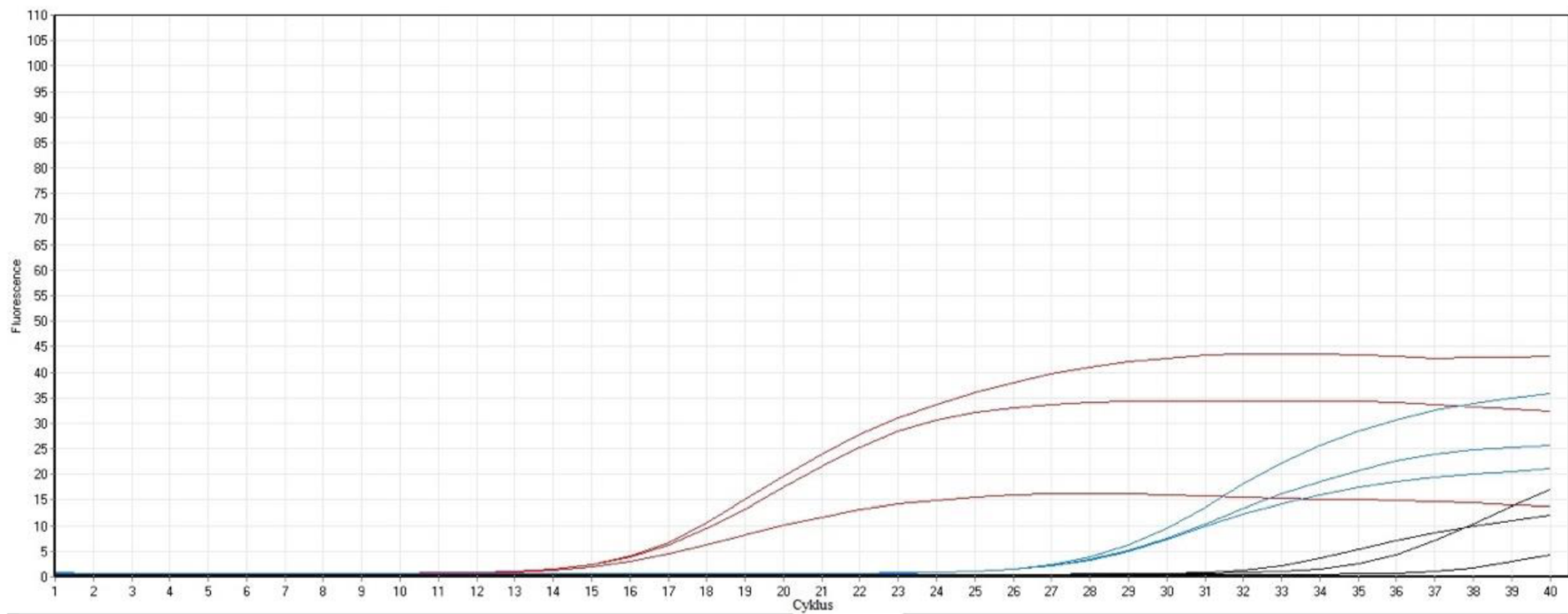
Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus casei* CCDM 7088^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 6 – Melt analýza PCR produktů pro rod *Lactobacillus*

5.4.2 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus casei*

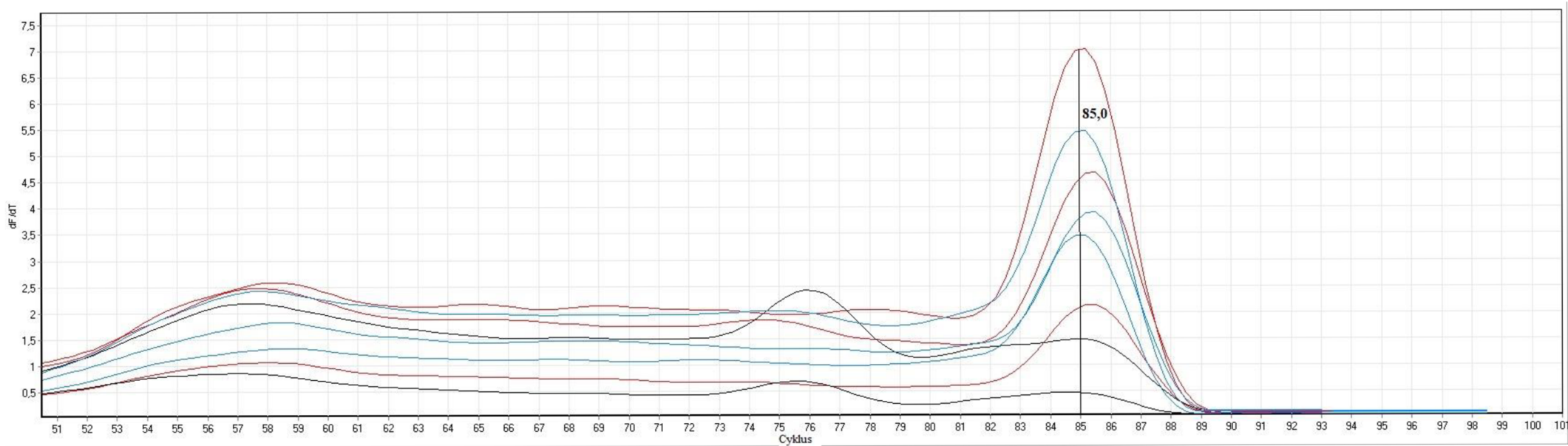
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus casei*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA radu *Lactobacillus casei* CCDM 7088^T. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 7. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Lactobacillus casei* CCDM 7088^T) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 85,0 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 8). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Rotorgene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus casei* CCDM 7088^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 7 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus casei*



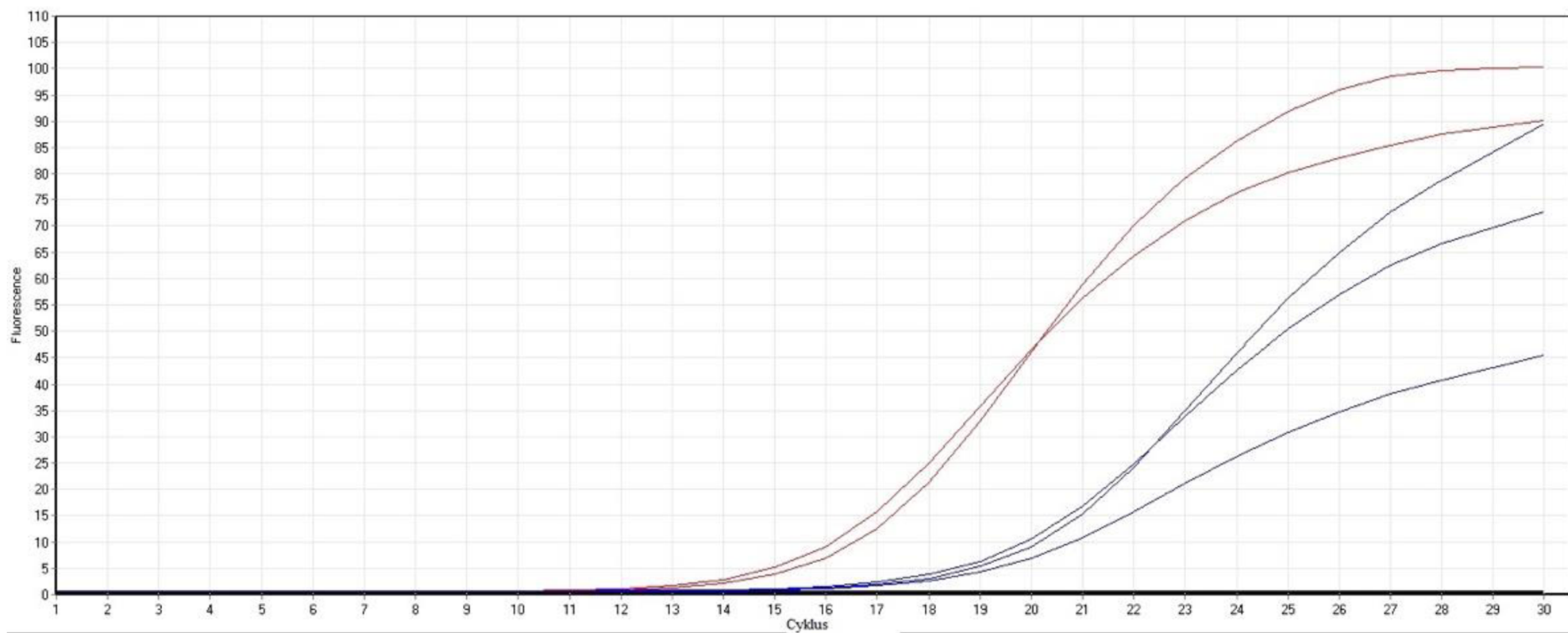
Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA Lactobacillus casei CCDM 7088^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 8 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Lactobacillus casei*

5.4.3 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus acidophilus*

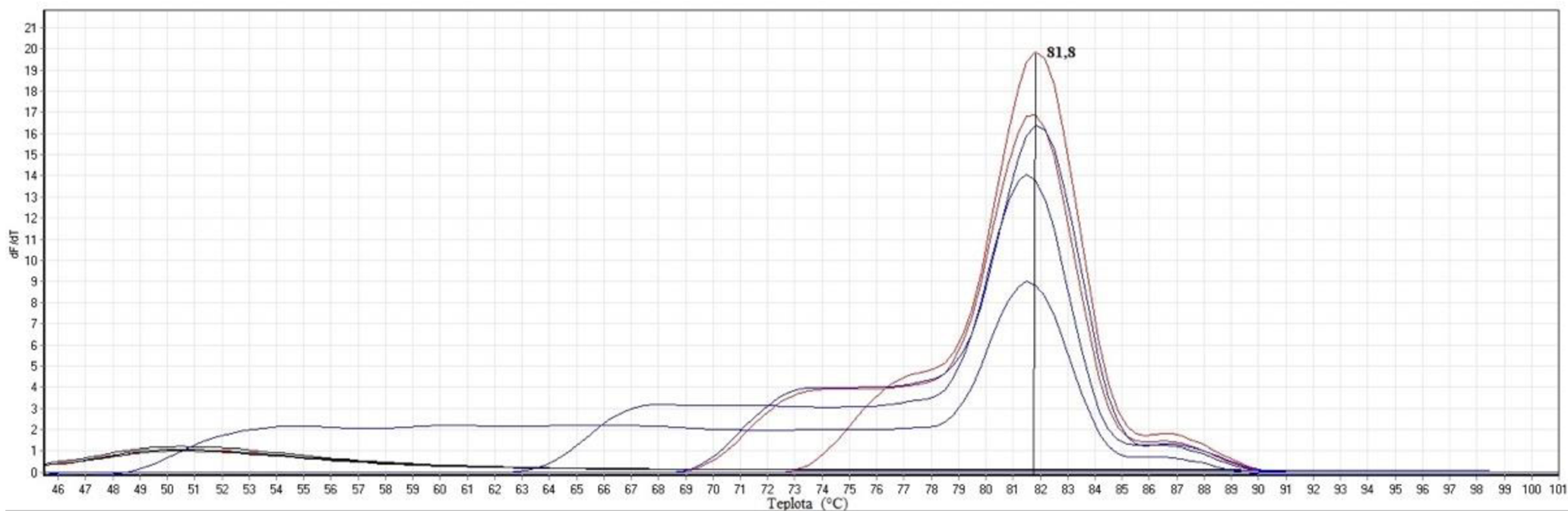
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus acidophilus*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Lactobacillus acidophilus* CCDM 74833^T. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 9. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Lactobacillus acidophilus* CCDM 74833^T) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 81,8 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 10). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Rotorgene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus acidophilus* CCDM 74833^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 9 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus acidophilus*



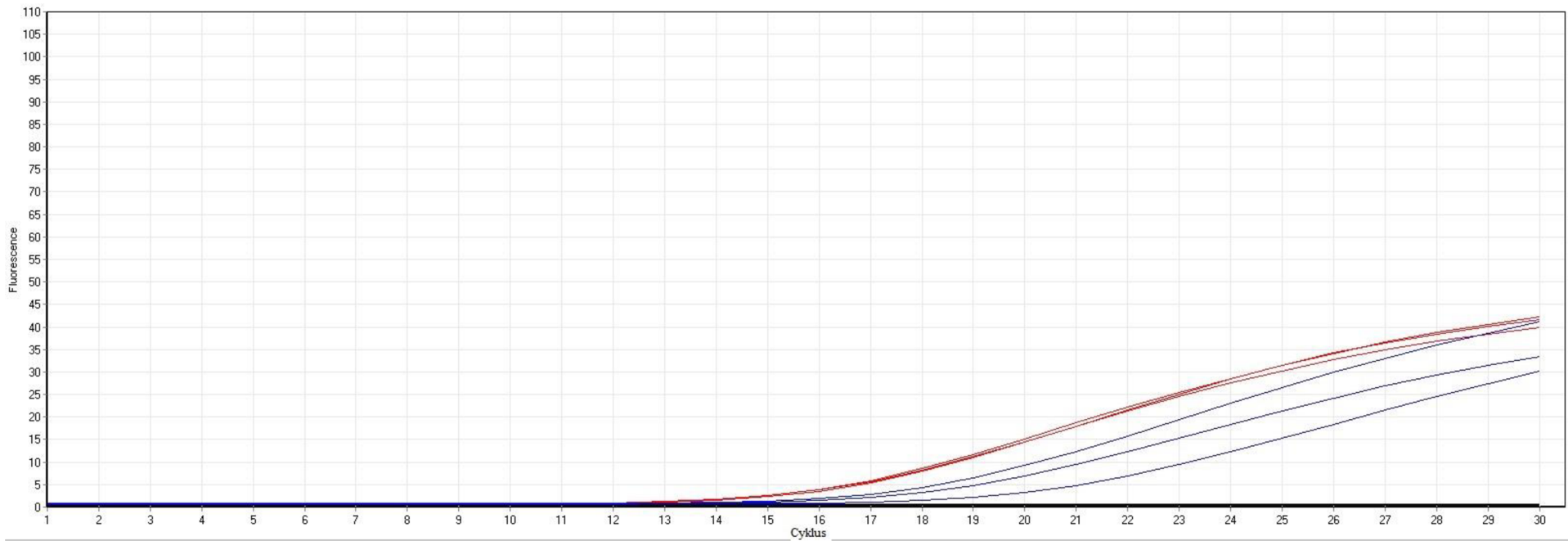
Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus acidophilus* CCDM 74833^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 10 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Lactobacillus acidophilus*

5.4.4 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

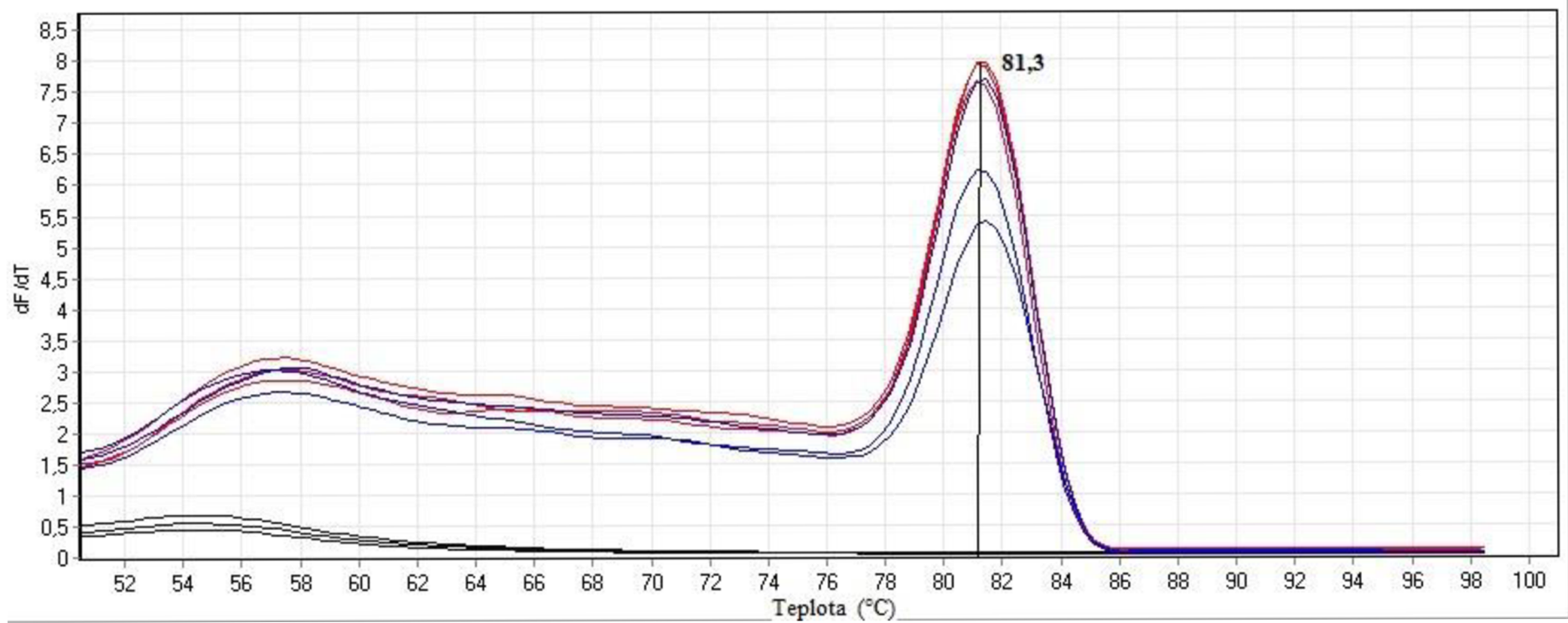
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus rhamnosus*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 118. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 9. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Lactobacillus rhamnosus* CCDM 183) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 81,3 °C. Vrchol odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 12). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru a RotorGene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 118), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 11 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus rhamnosus*



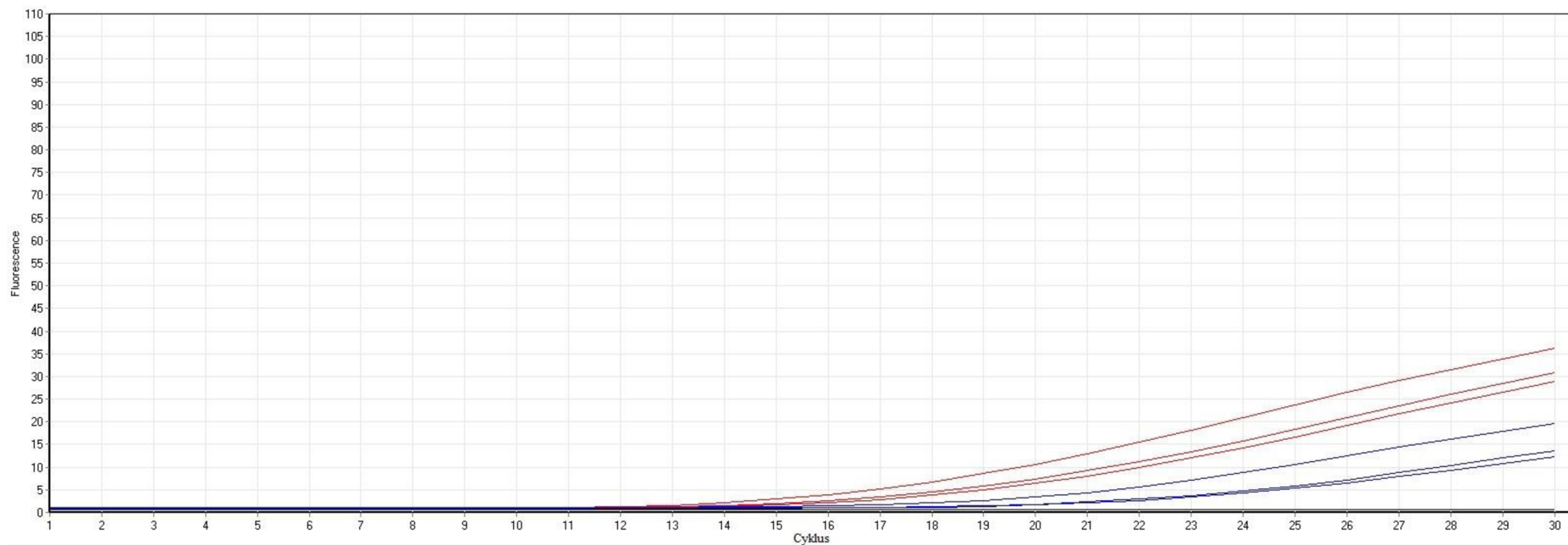
Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 118), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 12 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

5.4.5 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus plantarum*

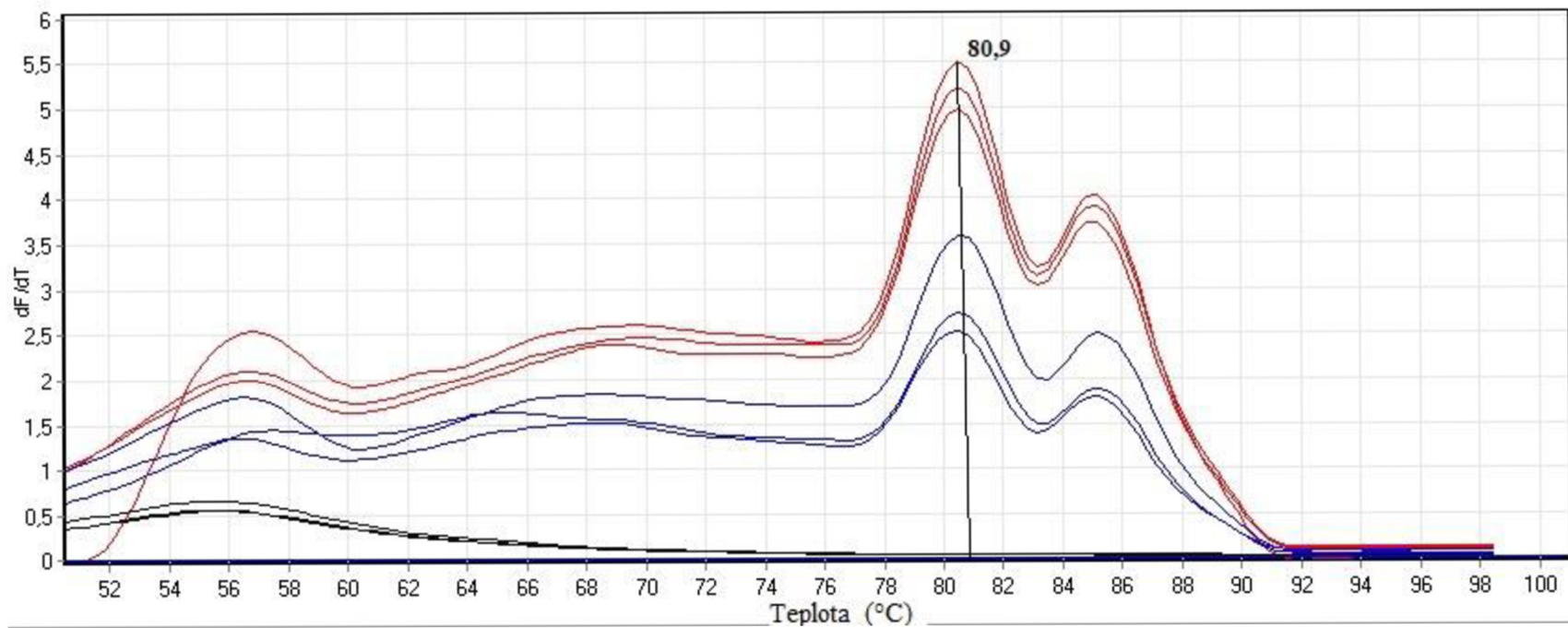
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus plantarum*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Lactobacillus plantarum* CCDM 183. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 13. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Lactobacillus plantarum* CCDM 183) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 80,9 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 14). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Rotorgene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus plantarum* CCDM 183), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 13 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus plantarum*

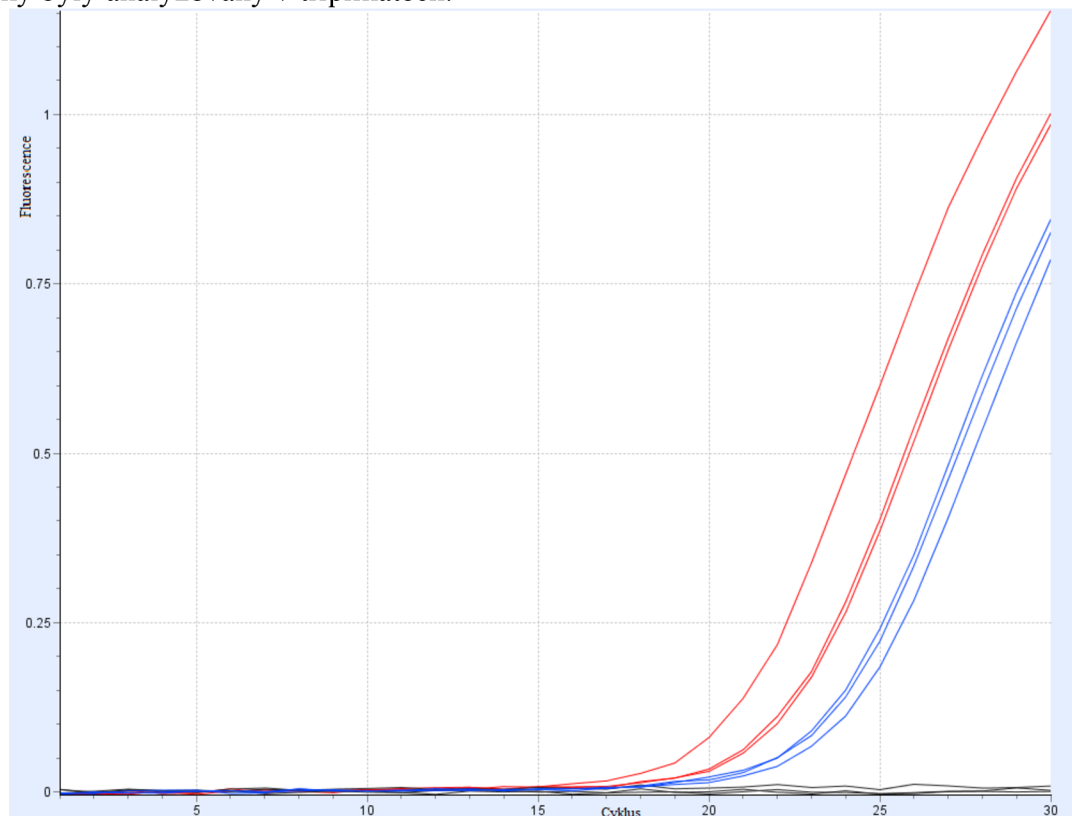


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 118), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 14 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Lactobacillus plantarum*

5.4.6 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus reuteri*

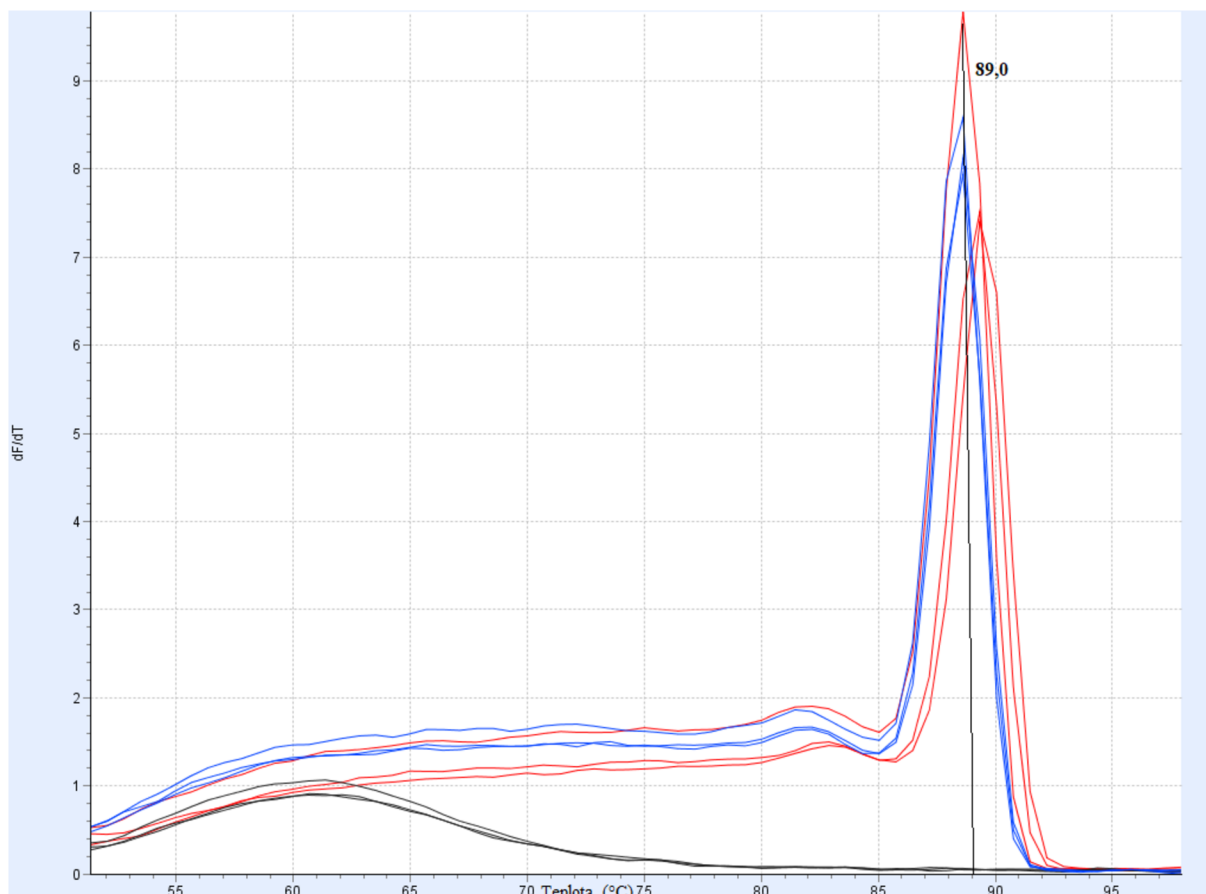
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus reuteri*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Limosilactobacillus reuteri* CCDM 777. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 15. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Limosilactobacillus reuteri* CCDM 777), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 15 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Lactobacillus reuteri*

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Limosilactobacillus reuteri* CCDM 777) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 89,0 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 16). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software.



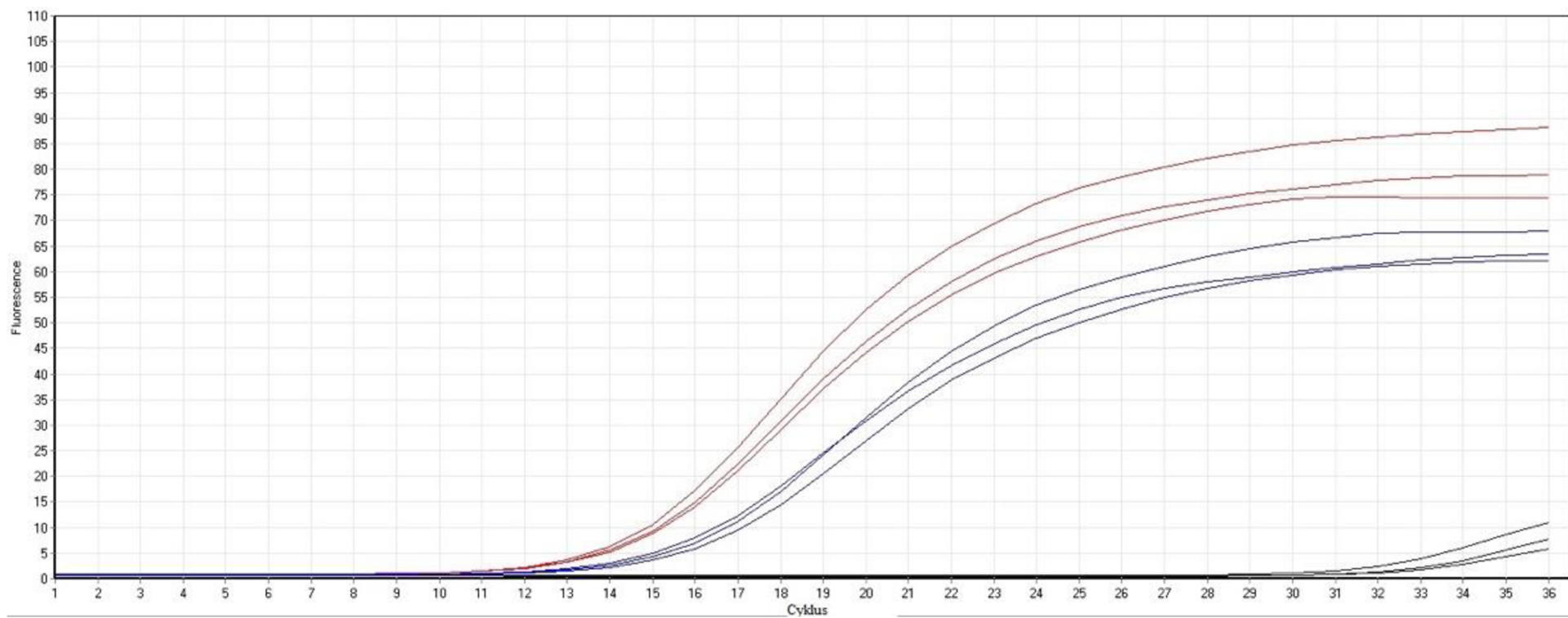
Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Limosilactobacillus reuteri* CCDM 777), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 16 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Lactobacillus reuteri*

5.4.7 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod *Bifidobacterium*

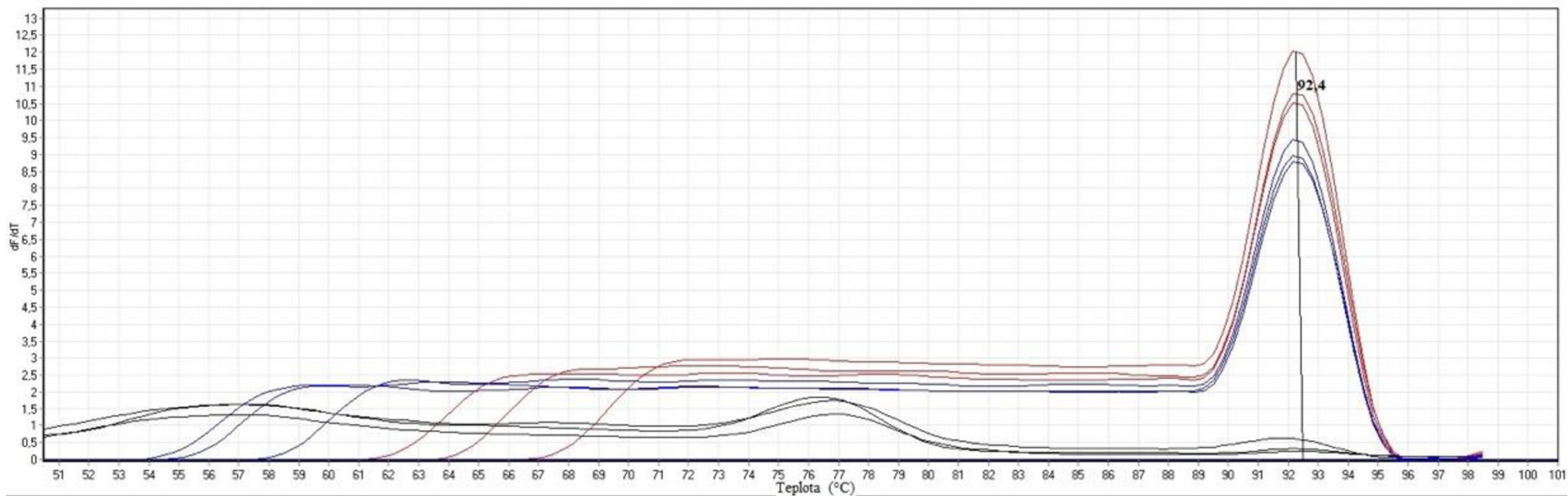
Byla provedena PCR v reálném čase pro rod *Bifidobacterium*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Bifidobacterium animalis* CCDM 4988^T. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 17. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

Při Melt analýze byl na křivce tání amplikonu pozitivní kontroly (*Bifidobacterium animalis* CCDM 4988^T) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 92,4 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 18). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Rotorgene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium animalis* CCDM 4988^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 17 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro rod *Bifidobacterium*



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium animalis* CCDM 4988^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí.

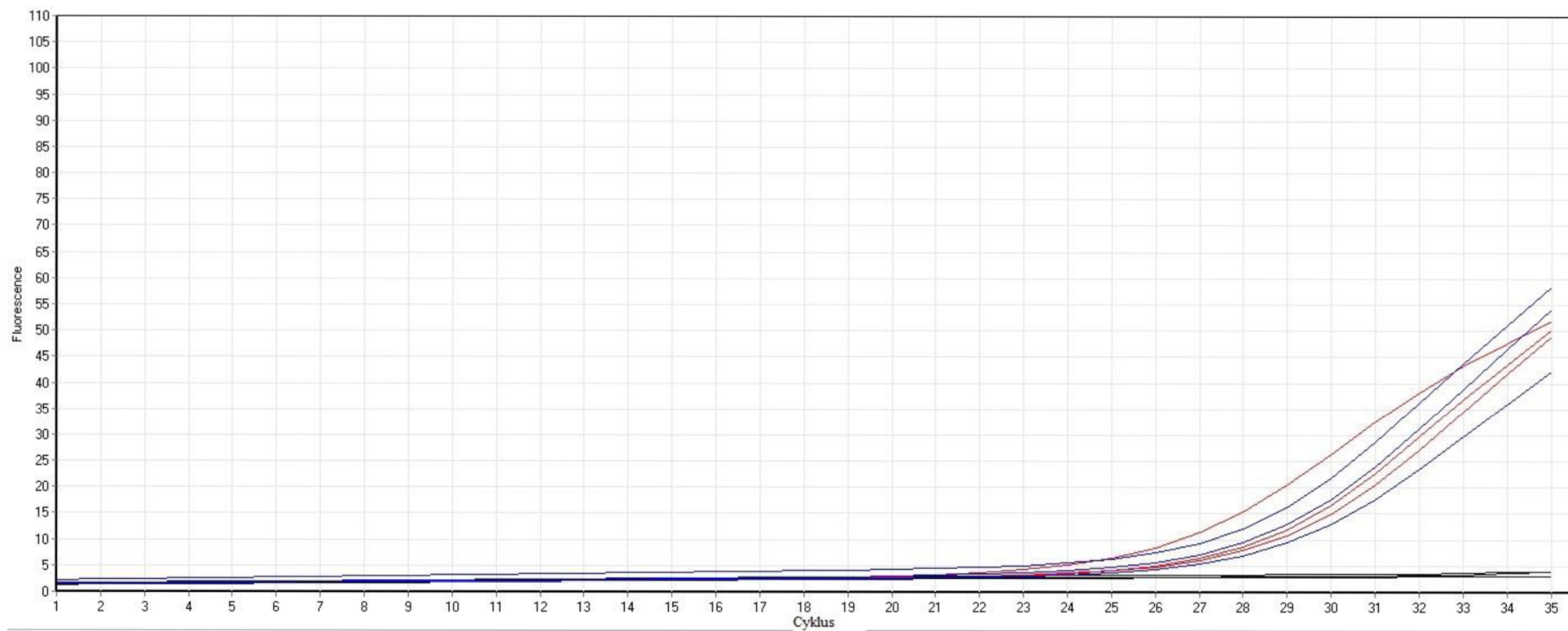
Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 18 – Melt analýza PCR produktů pro rod *Bifidobacterium*

5.4.8 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium animalis*

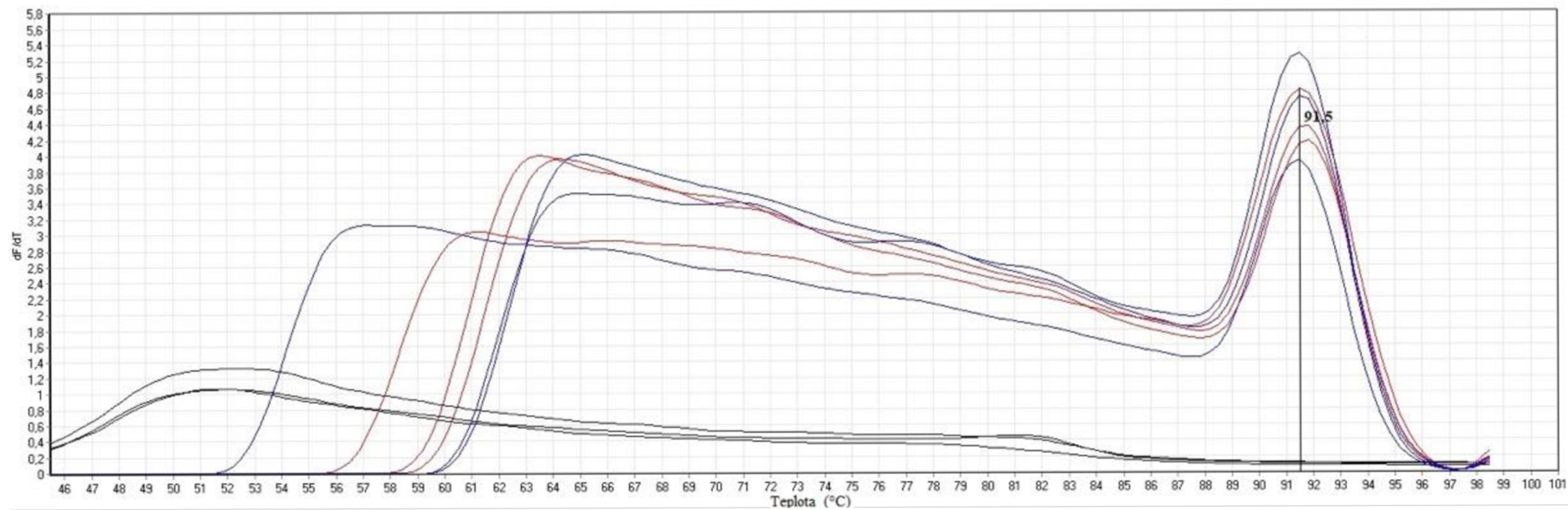
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium animalis*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Bifidobacterium animalis* CCDM 4988^T. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 19. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

Při Melt analýze byl na křivce tání amplikonu pozitivní kontroly (*Bifidobacterium animalis* CCDM 4988^T) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 91,5 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 20). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Rotorgene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium animalis* CCDM 4988^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 19 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium animalis*



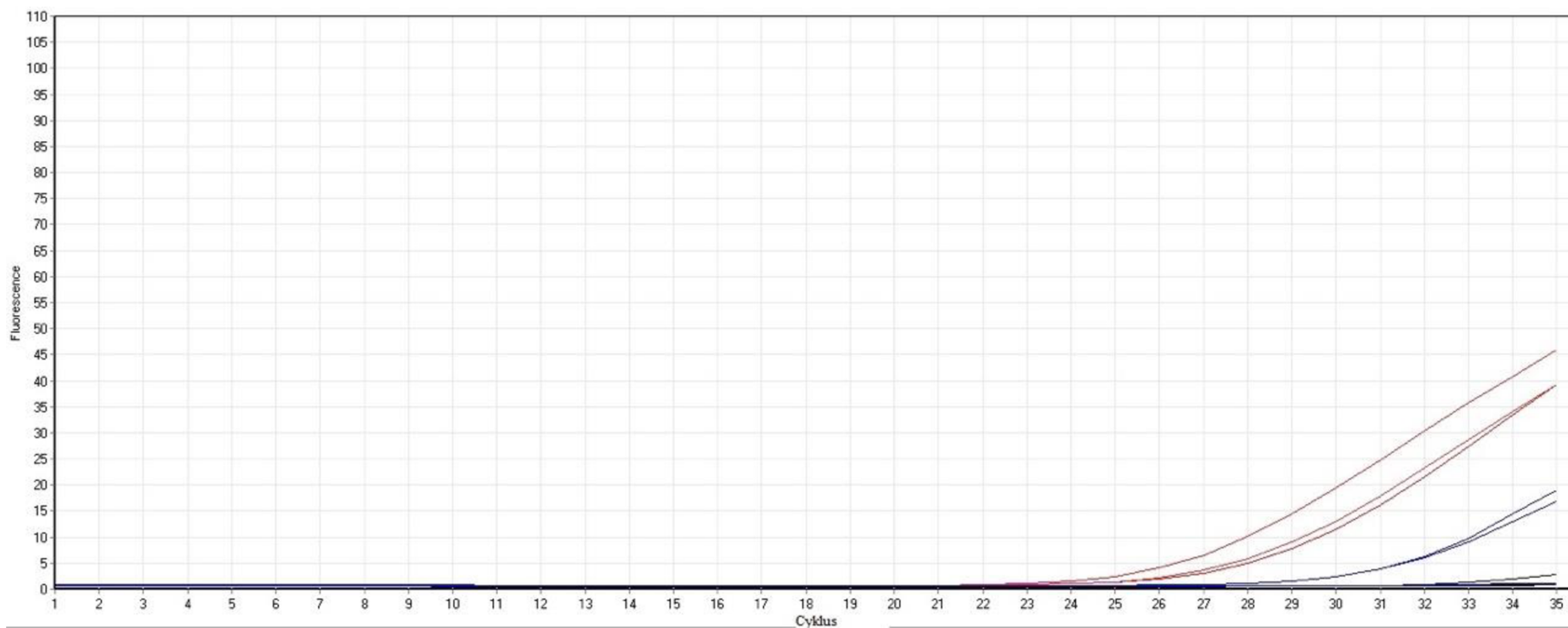
Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium animalis* CCDM 4988^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 20 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Bifidobacterium animalis*

5.4.9 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium breve*

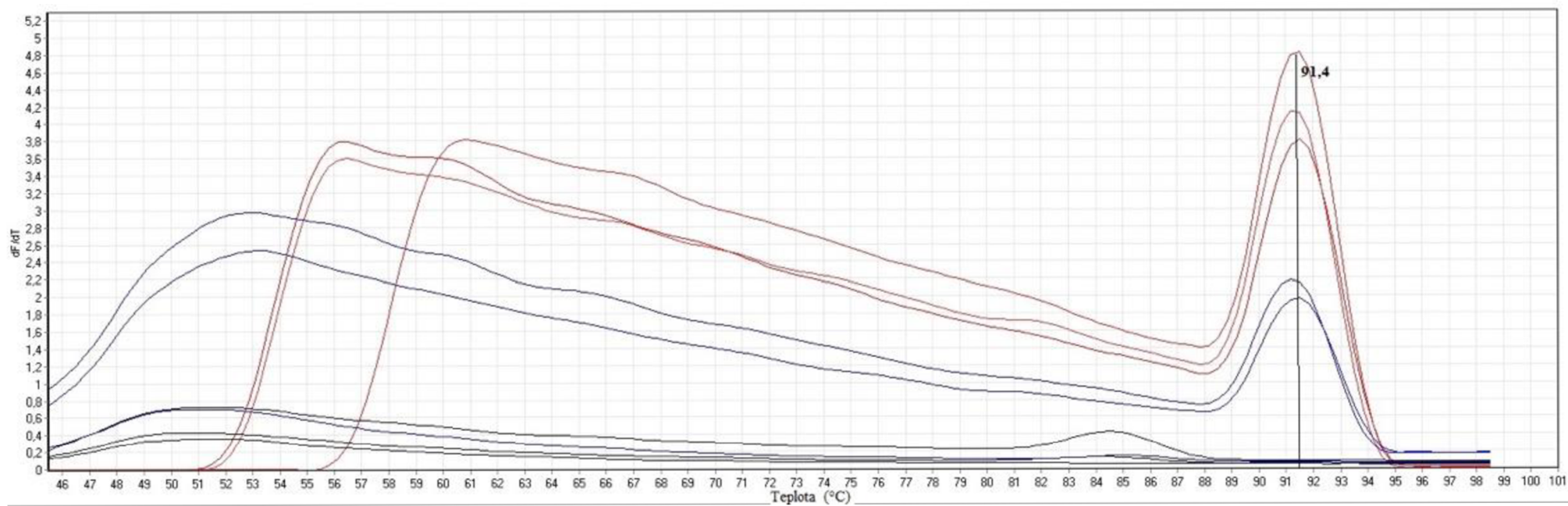
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium breve*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Bifidobacterium breve* CCDM 7825^T. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 21. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Bifidobacterium breve* CCDM 7825^T) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 91,4 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 22). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Rotorgene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium breve* CCDM 7825^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 21 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium breve*

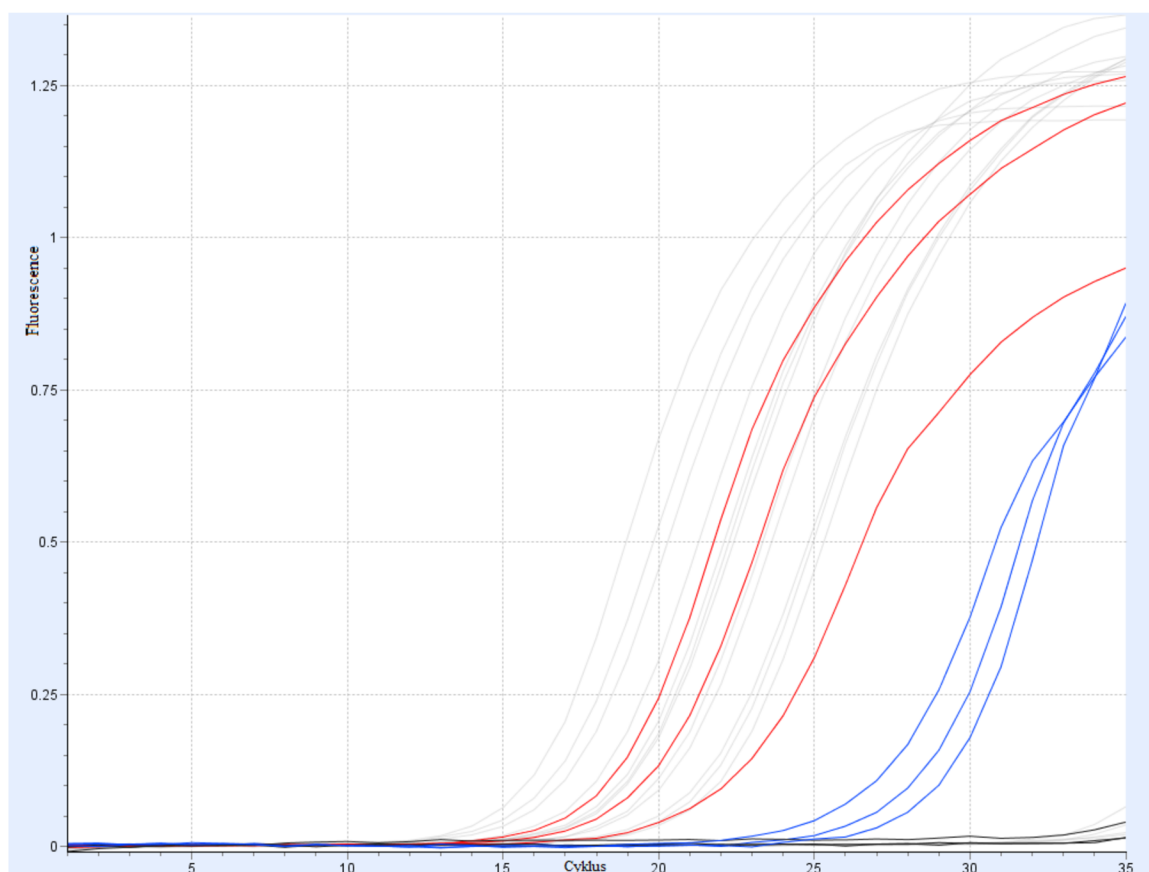


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA Bifidobacterium breve CCDM 7825^T), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 22 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Bifidobacterium breve*

5.4.10 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium bifidum*

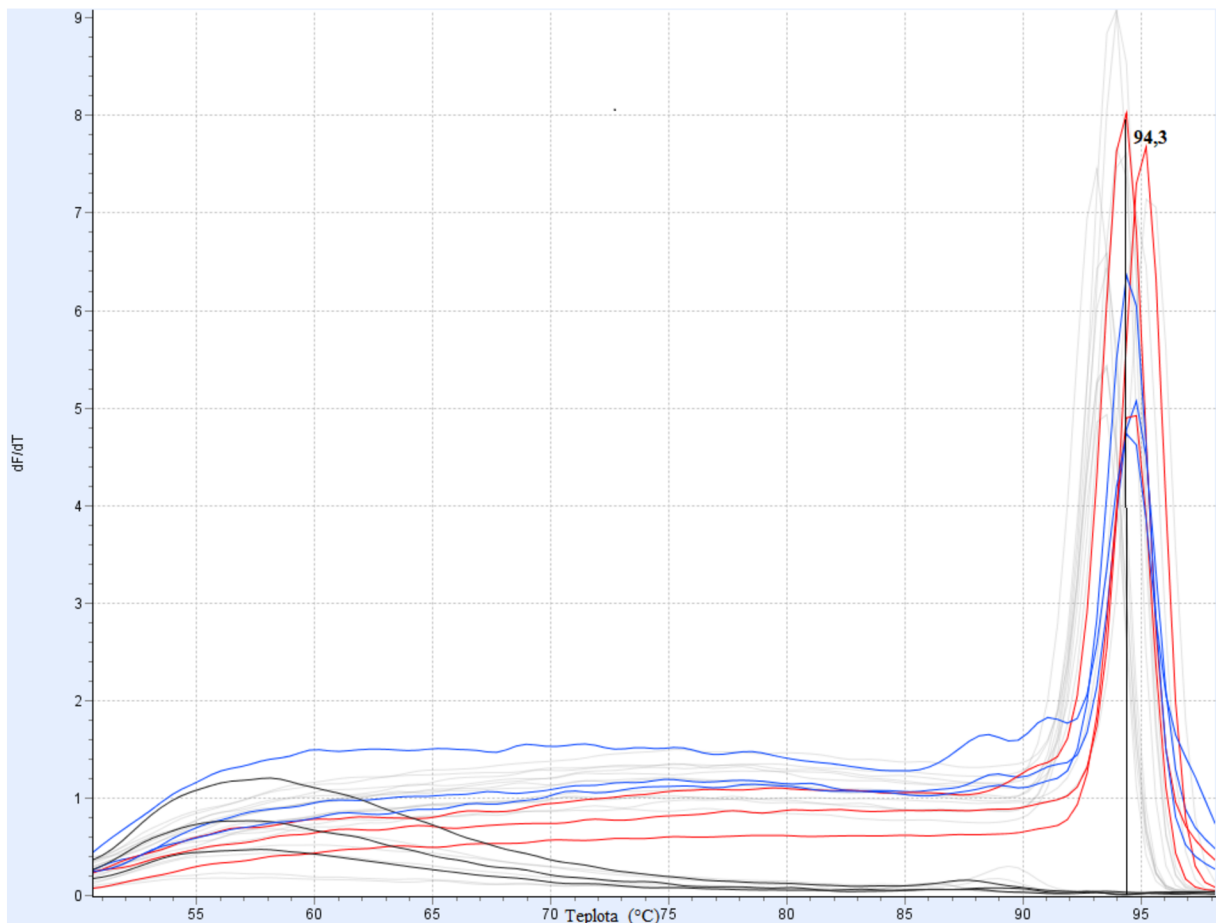
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium bifidum*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Bifidobacterium bifidum* CCDM 309. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 23. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium bifidum* CCDM 309), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 23 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium bifidum*

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Bifidobacterium bifidum* CCDM 309) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 94,3 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 24). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software.

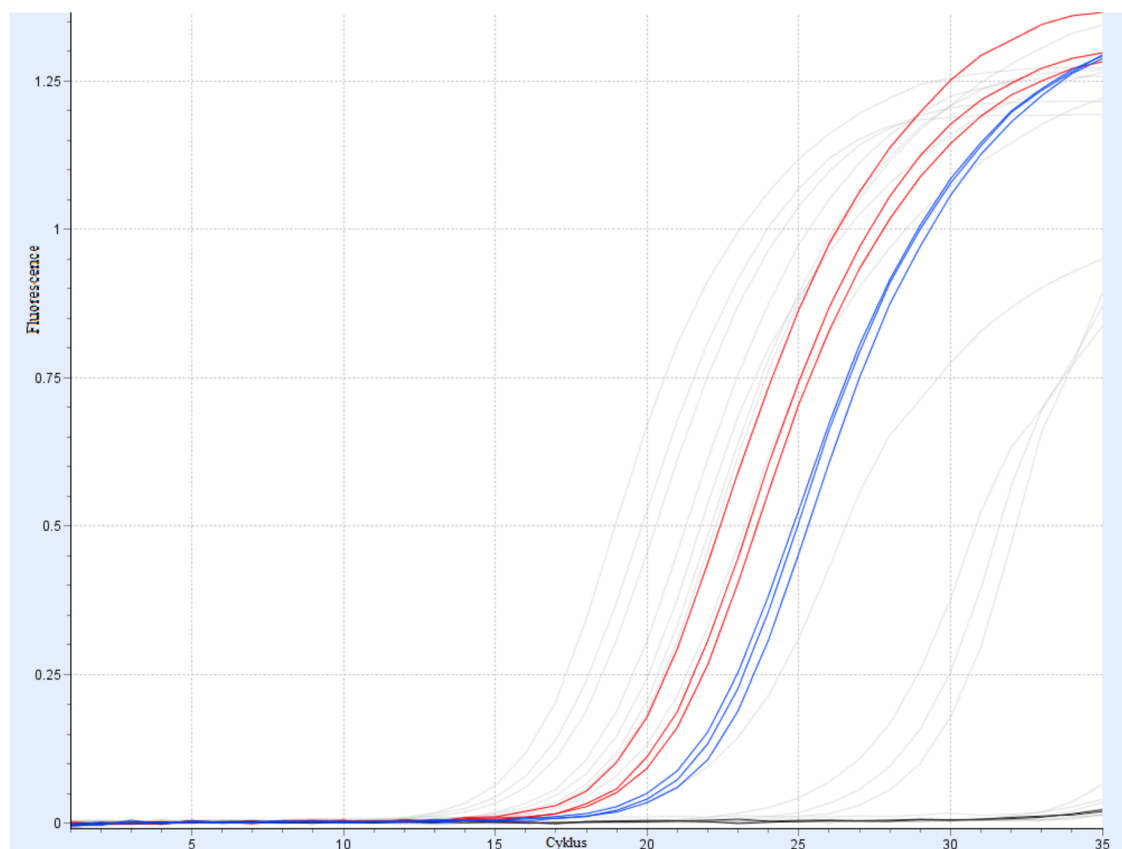


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium bifidum* CCDM 309), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 24 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Bifidobacterium bifidum*

5.4.11 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium lactis*

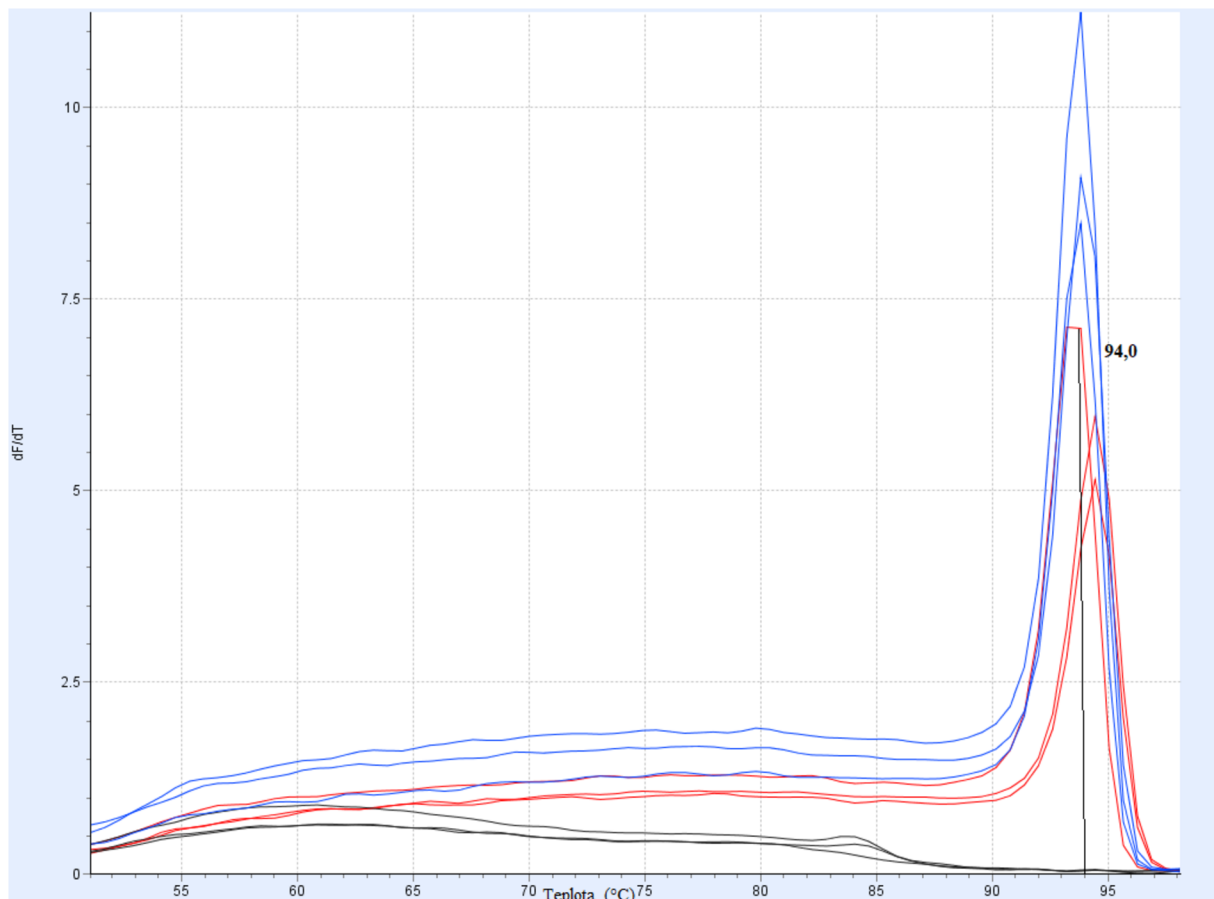
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium lactis*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Bifidobacterium animalis* CCDM 107. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 25. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium animalis* CCDM 107), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 25 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium lactis*

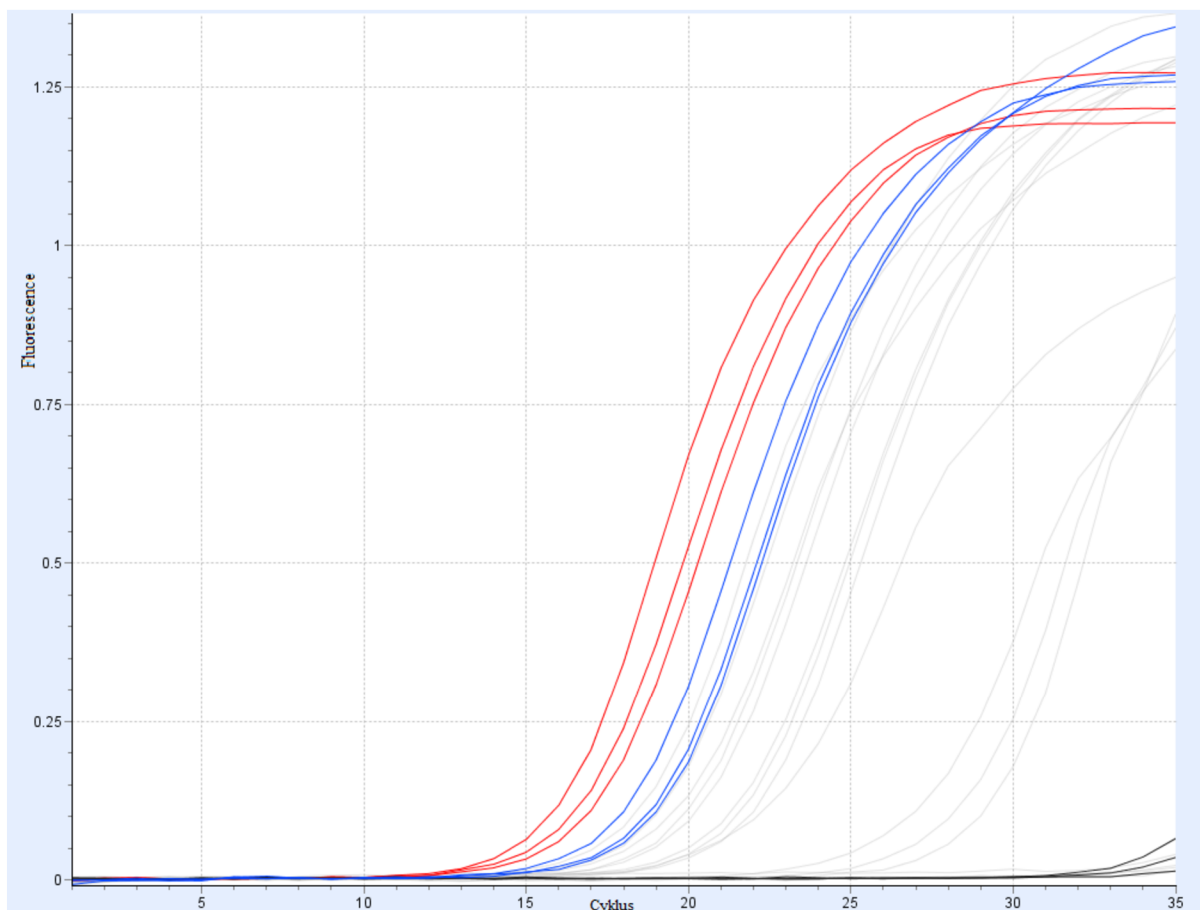
Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Bifidobacterium animalis* CCDM 107) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 94,0 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce piku (Obrázek 26). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium animalis* CCDM 107), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.
Obrázek 26 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Bifidobacterium lactis*

5.4.12 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium longum*

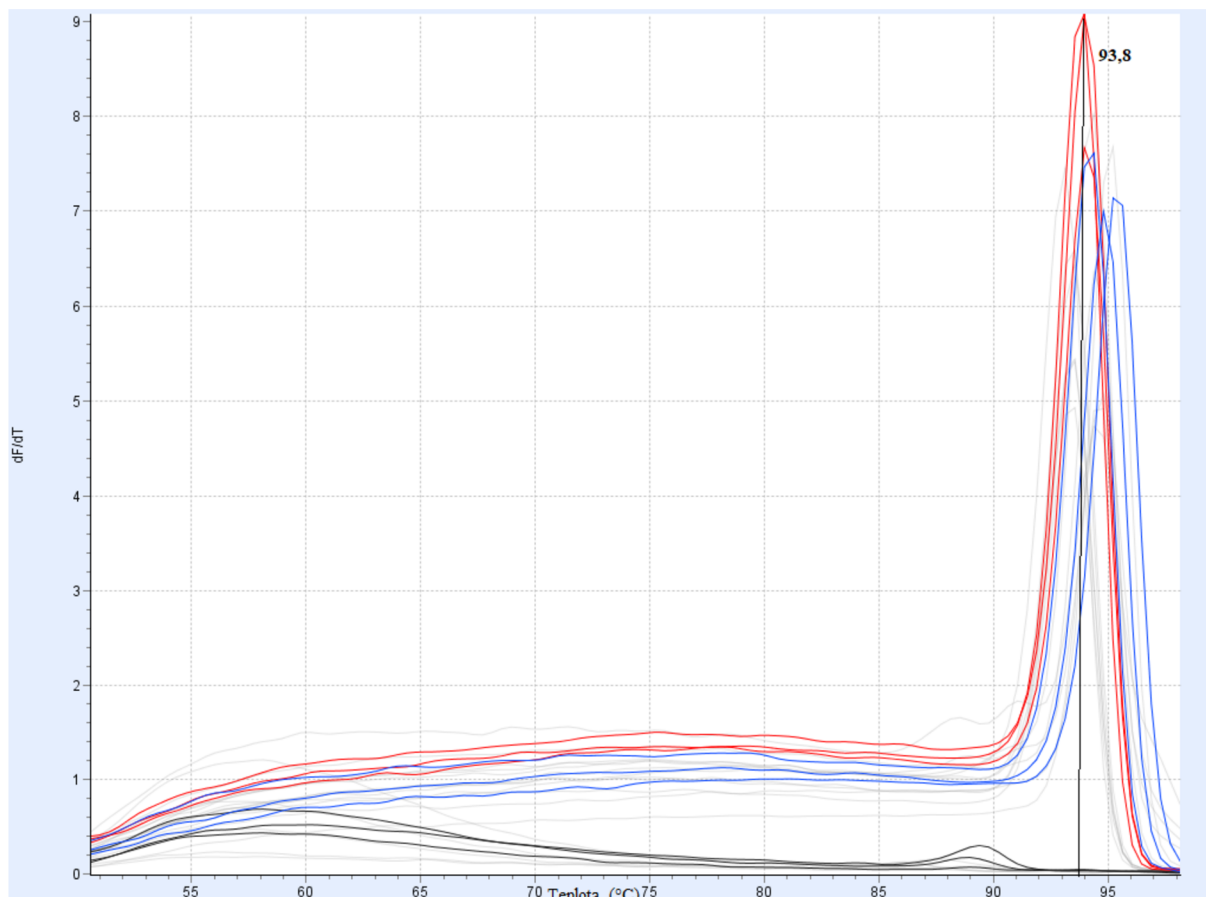
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium longum*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Bifidobacterium longum* CCDM 219. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 27. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium longum* CCDM 219), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 29 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium longum*

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Bifidobacterium longum* CCDM 219) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 93,8 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 28). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software.

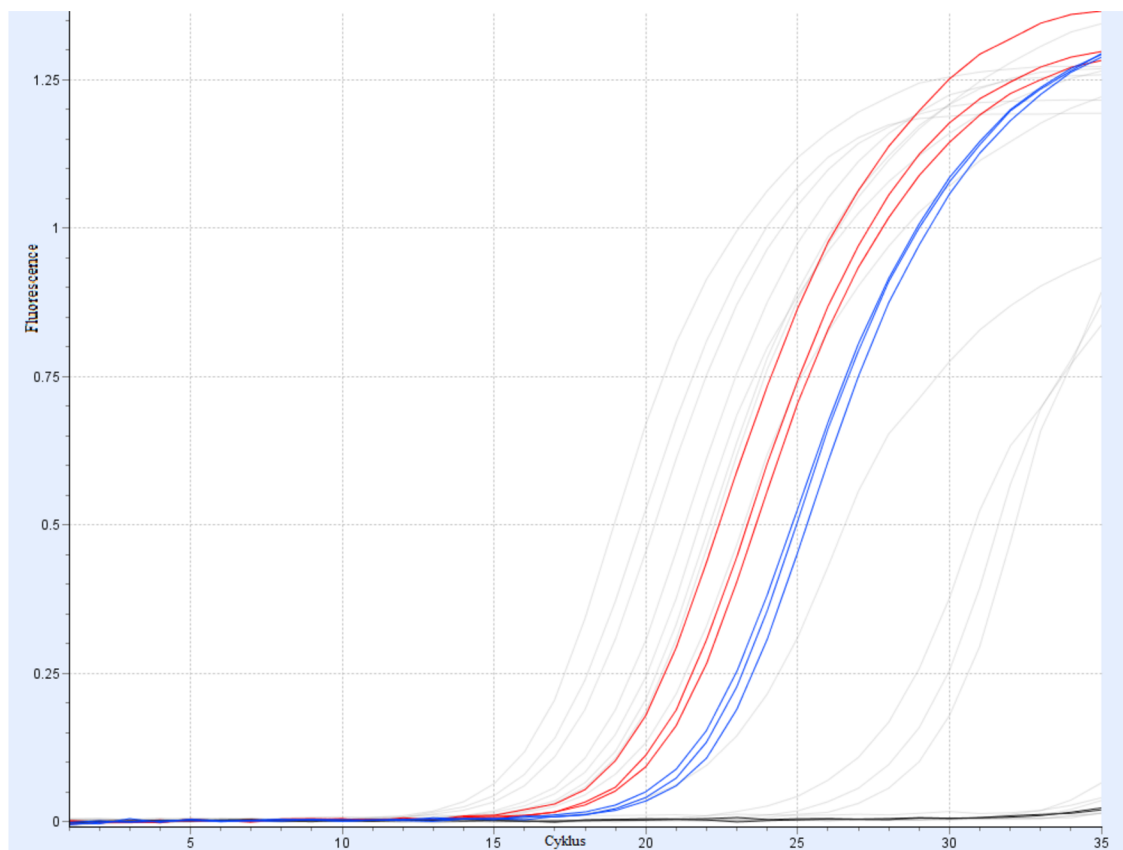


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium longum* CCDM 219), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 28 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Bifidobacterium longum*

5.4.13 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium infantis*

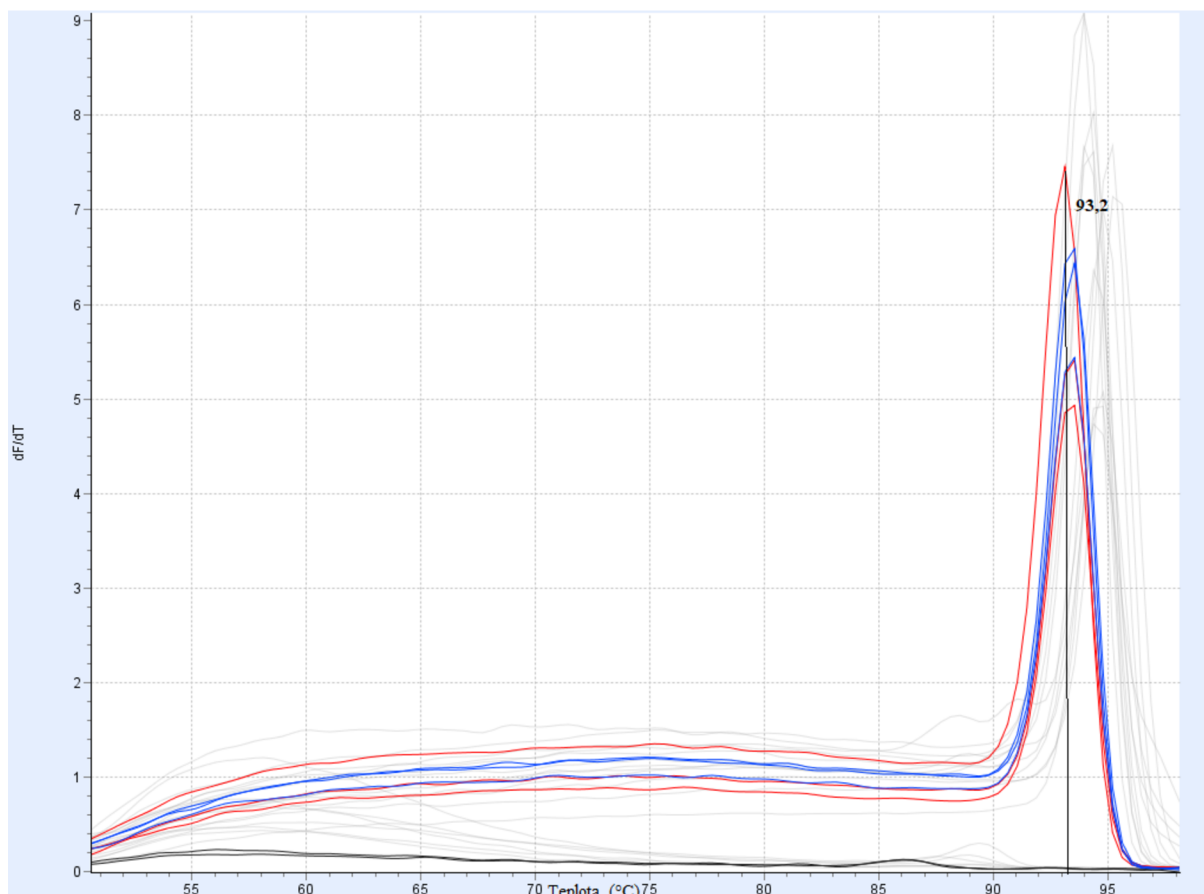
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium infantis*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Bifidobacterium longum* CCDM 232. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 29. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium longum* CCDM 219), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 29 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium infantis*

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Bifidobacterium longum* CCDM 232) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 93,2 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 30). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software.



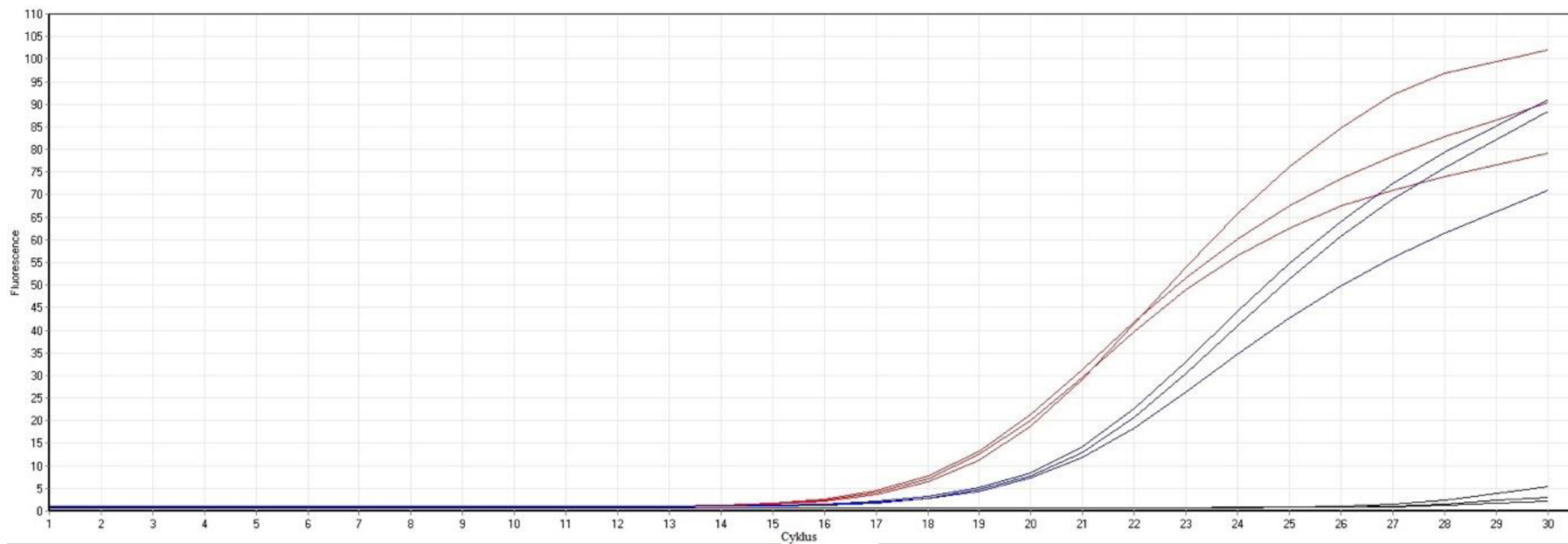
Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium longum* CCDM 232), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 30 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Bifidobacterium infantis*

5.4.14 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod *Streptococcus*

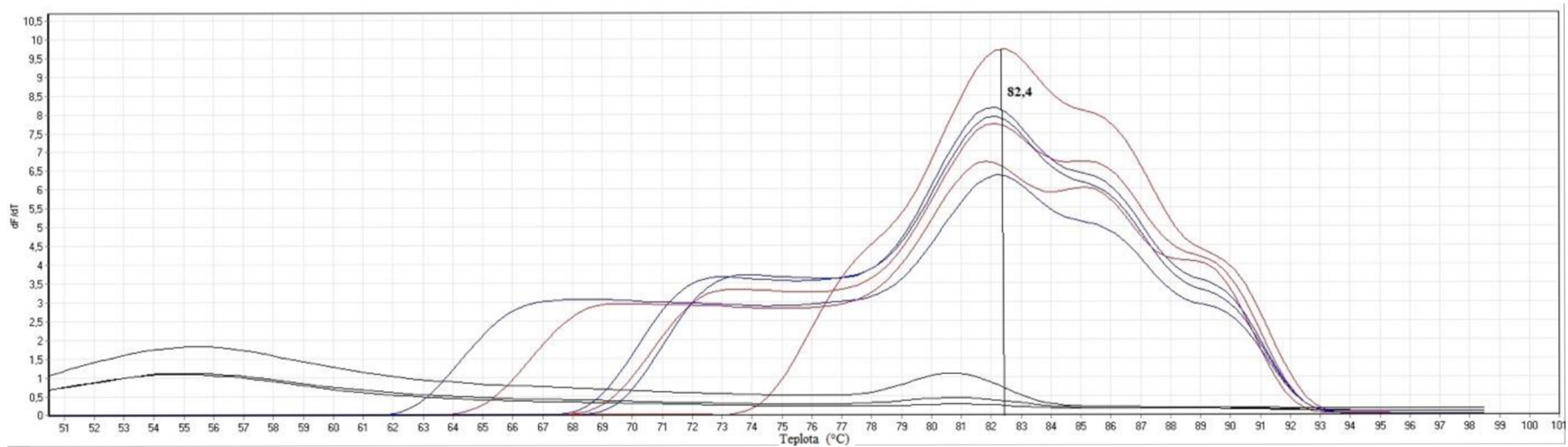
Byla provedena PCR v reálném čase pro rod *Streptococcus*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Streptococcus thermophilus* CCDM 1008. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 31. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Streptococcus thermophilus* CCDM 1008) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 82,4 °C. Vrchol o odpovídající teplotě s rozdíly desetín stupně byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 32). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Rotorgene 6000® Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Streptococcus thermophilus* CCDM 1008), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 31 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro rod *Streptococcus*

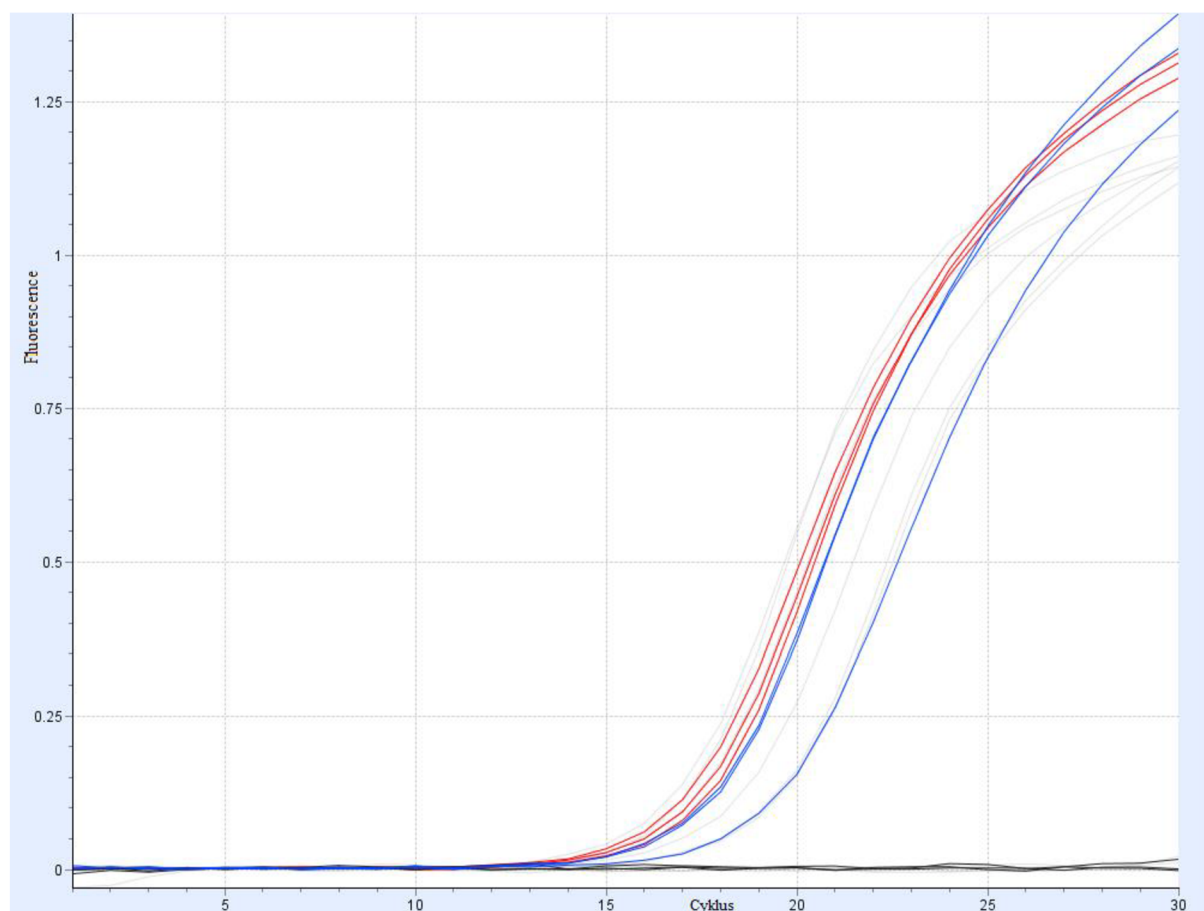


Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA Streptococcus thermophilus CCDM 1008), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 32 – Melt analýza PCR produktů pro rod Streptococcus

5.4.15 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Streptococcus thermophilus*

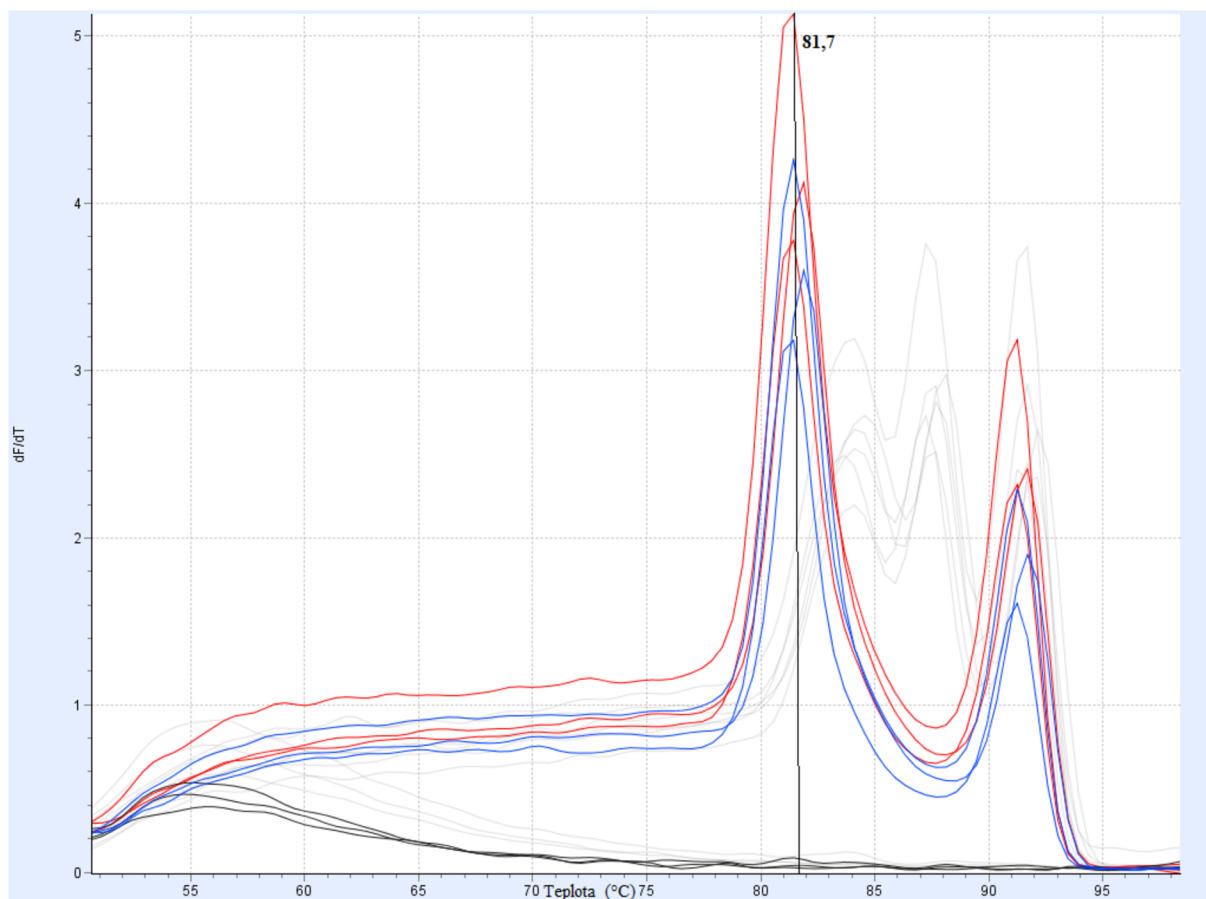
Byla provedena PCR v reálném čase pro druh *Streptococcus thermophilus*. V analýze byla použita DNA ze vzorku číslo 4 izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí z doplňku stravy Harmonelo. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Streptococcus thermophilus* CCDM 1008. Amplifikační křivky z provedené analýzy jsou uvedeny na Obrázku 33. Všechny výše uvedené vzorky byly analyzovány v triplikátech.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Streptococcus thermophilus* CCDM 1008), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 33 - Amplifikační křivky PCR v reálném čase pro druh *Streptococcus thermophilus*

Při Melt analýze byl na křivce tání ampliconu pozitivní kontroly (*Streptococcus thermophilus* CCDM 1008) detekován vrchol odpovídající teplotě tání (T_m) 81,7 °C. Vrchol o odpovídající teplotě byl detekován i u vzorku s intenzitou odpovídající výšce píku (Obrázek 34). Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software.



Značení křivek: červená – pozitivní kontrola (DNA *Streptococcus thermophilus* CCDM 1008), černá – negativní kontrola, modrá – DNA izolovaná fenolovou extrakcí. Testováno po třech vzorcích DNA.

Obrázek 34 – Melt analýza PCR produktů pro druh *Streptococcus thermophilus*

6 DISKUSE

6.1 Izolace DNA

Izolace metodou fenol – chloroformové extrakce i OMNI Bacterial DNA kitem byla ožita DNA přímo z výrobku doplňku stravy Harmonello. Proces izolace byl optimalizován tak, aby byly nejprve odstraněny doplňkové složky produktu, jako jsou inulin, rozpustná vláknina a steviol-glykosid. Následně byla stanovena čistota akoncentrace jednotlivých vzorků, z nichž byl vybrán jeden o nevyšší koncentraci a čistotě DNA, který byl přímo použit pro qPCR a PCR-HRM analýzy.

6.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pomocí přístroje Nanodrop 2000 byla proměřena absorbance jednotlivých vzorků izolovaných fenol-chloroformovou extrakcí a OMNI Bacterial DNA kitem v rozmezí vlnových délek 220–320 nm. Koncentrace vzorků izolovaných fenol-chloroformovou extrakcí se pohybovala v rozmezí 61,0–265,9 ng/μl a při izolaci OMNI Bacterial DNA kitem v rozmezí 34,0 – 140,7 ng/μl.

Poměr absorbancí vlnových délek 260 a 280 nm vykazuje čistotu vzorku, takže rozmezí poměru pro čistý vzorek se pohybuje mezi 1,8–2,0. Tento poměr je dodržen u vzorků izolovaných fenol-chloroformovou extrakcí, kdy se tento poměr absorbancí pohybuje mezi 1,73–2,00. Naopak u vzorků izolovaných OMNI Bacterial DNA kitem se tento poměr pohybuje v rozmezí 1,16–1,57. U hodnot nižších, než je standardní rozmezí čistoty, jsou vzorky zaneseny bílkovinami a částečnou kontaminací RNA. U poměru absorbancí vlnových délek 260 a 230 nm se hodnota u fenol-chloroformové extrakce pohybuje v rozmezí 1,41–1,87, což ukazuje, že izolovaná DNA neobsahuje nečistoty použitých organických extrakčních látek. U vzorků izolovaných OMNI Bacterial DNA kitem se hodnoty tohoto poměru nacházejí pod hranicí 1 a to v rozmezí 0,85–0,92. Hodnoty pod hodnotou 1 vykazují znečištění použitými sražedly komerčního kitu.

Na základě proměření čistoty a koncentrace byl vybrán vzorek číslo 4 izolován pomocí fenol-chloroformové extrakce. Tento vzorek nese nejvyšší koncentraci DNA o nejvyšší čistotě mezi ostatními vzorky. Tento vzorek byl používán během všech následujících analýz.

6.3 PCR v reálném čase

Pro rodovou a druhovou identifikaci byla použita PCR v reálném čase. Všechny programy qPCR byly optimalizovány dle použité dvojice primerů a rodové a druhové PCR. K identifikaci byly použity neředěný vzorek DNA číslo 4 o objemu 1 μl (viz Tabulku 11) izolované pomocí fenol-chloroformové extrakce. Konkrétně byla provedena PCR pro rod *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* a pro rody *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* a *Streptococcus thermophilus*. Přítomnost specifických produktů byla následně ověřena Melt analýzou.

6.3.1 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod *Lactobacillus*

Pomocí PCR v reálném čase byla potvrzena přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*. V prvních cyklech qPCR signal fluorescence je nízký díky malé četnosti amplifikované DNA. S přibývajícím cykly a tím s přibývajícím množstvím replikované DNA se postupně intenzita fluorescence zvyšuje. V bodě překročení prahové detekce je indikována cílová sekvence. Čím vyšší je počáteční koncentrace templátu v reakční směsi, tím dříve je detekována zvyšující se fluorescence produktu. Pozitivní kontrola byla o nejvyšší koncentraci, a tak se C_t (cycle threshold) vyskytuje od 12 cyklu, zatímco u vzorku až u cyklu 24.

Melt analýza potvrdila přítomnost rodu *Lactobacillus*, kdy nejvyšší pík křivky tání pozitivní kontroly se nacházel na T_m (85,2 °C). Píky vzorku se nacházely v jeho těsné blízkosti s rozdílem desetin stupně. Tyto odchylky mohly být způsobeny tím, že se jedná o biologických materiál, který může být nestabilní. Dále rozdíly teplot mohou být způsobeny špatným nasednutím primeru, odchylkou přístroje. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Tato analýza detailně potvrdila přítomnost rodu *Lactobacillus*.

6.3.2 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus casei*

Po provedení qPCR byla detekována přítomnost DNA druhu *Lactobacillus casei*. Práh cyklu (C_t) u pozitivní kontroly se nacházel u 12 cyklus a u vzorku u 25 cyklu. Zvyšující se negativní kontrola v konečných cyklech byla způsobena tvorbou dimerů primerů po překročení počtu doporučených cyklů pro daný primer.

Melt analýza potvrdila přítomnost druhu *Lactobacillus casei*, kdy vrchol křivky tání u pozitivní kontroly se nacházel při T_m (85,0 °C) a vrchol vzorku se nacházel v této oblasti s rozdíly desetin stupně. Tento bod tání pro *Lactobacillus casei* u HRM byl prokázán i v další studii. Tato analýza tedy potvrdila přítomnost druhu *Lactobacillus casei*. [113]

6.3.3 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Přítomnost DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* ve vzorku byla pomocí qPCR detekována od 15. cyklu analýzy. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly se nachází u 12. cyklu.

Nejvyšší bod křivky tání pozitivní kontroly se nachází na T_m (81,8 °C). Této teploty dosahují i vrcholy amplikonu vzorku s minimálním rozdílem. Rozdíl teplot mohl být způsoben nepřesným nasednutím primeru, odchylkou přístroje nebo koextrakcí nechtěných látek. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Analýze je podroben biologický materiál, který mohl projít neznámými změnami.

6.3.4 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Přítomnost DNA druhu *Lactobacillus rhamnosus* byla ověřena pomocí qPCR, kdy práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly je na 13. cyklu a vzorku na 15. cyklu.

Nejvyšší pík křivky tání se nachází při T_m (81,3 °C). Tohoto bodu dosahují i píky vzorku. Lze tedy konstatovat, že ve vzorku byla potvrzena přítomnost druhu *Lactobacillus rhamnosus*. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Tato teplota se obdobně objevila i v jiných analýzách tohoto druhu. [113]

6.3.5 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus plantarum*

DNA druhu *Lactobacillus plantarum* bylo podrobena qPCR, kdy práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly se objevilo na 11. cyklu analýzy a vzorku 13. cyklu analýzy.

Na křivce tání se nejvyšší bod pozitivní kontroly nachází na T_m (80,9 °C). Nejvyšší bod křivky vzorku se nachází u stejné teploty, proto lze říct, že byla potvrzena přítomnost druhu *Lactobacillus plantarum*. Další nižší pík mohl být způsoben nespecifickým nasedáním primerů nebo jejich dimery. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Podobné teploty bylo dosaženo i u jiných analýz tohoto druhu. [114]

6.3.6 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Lactobacillus reuteri*

Pomocí qPCR byla prokázána přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus reuteri*. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly se nachází u 15. cyklu a pro vzorek u 19. cyklu.

U křivky tání se nejvyšší bod nachází na T_m (89,0 °C). Píky křivek tání u vzorku se nachází v blízkosti této teploty s minimálními rozdíly. Byla tedy potvrzena přítomnost druhu *Lactobacillus reuteri* ve vzorku. Odchyly mohly být způsobeny odchylkou biologického materiálu, přístroje nebo koextrakcí nežádoucích látek. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Obdobné teplotě tání dosáhli i v jiné studii tohoto druhu. [115]

6.3.7 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod *Bifidobacterium*

Pomocí PCR v reálném čase byla potvrzena přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium*. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly se nachází na 11. cyklu a pro vzorek na 12. cyklu.

Pík křivky tání Melt analýzy se nachází na T_m (92,4 °C). Píky křivky vzorku se nachází v souladu s pozitivní kontrolou na stejné teplotě. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Tímto byla prokázána přítomnost rodu *Bifidobacterium* ve vzorku.

6.3.8 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium animalis*

DNA *Bifidobacterium animalis* byla prokázána pomocí PCR v reálném čase. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly se nachází u 22. cyklu azatímco vzorku na 21. cyklu.

Nejvyšší bod pozitivní kontroly se nachází při T_m (91,5 °C). Vrchol křivky tání vzorku se nachází na podobné teplotě s rozdíly desetín stupně. Tyto odchylky mohou být způsobeny nepřesností přístroje, primery, použitým biologickým materiálem nebo koextrakcí nežádoucích látek. Jak vrchol pozitivní kontroly u křivky tání, tak i číslo prahu cyklu (C_t) ukazuje, že se DNA tohoto druhu ve vzorku vyskytovala ve vyšší koncentraci než u pozitivní kontroly. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Dle dosažených výsledků lze potvrdit přítomnost druhu *Bifidobacterium animalis*.

6.3.9 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium breve*

Aplifikační křivky PCR v reálném čase ukazují, že práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly druhu *Bifidobacterium breve* se nachází na 23. cyklu a pro vzorek na 28. cyklu.

Vrchol křivky tání pozitivní kontroly je na T_m (91,4 °C). Vrchol vzorku se taktéž nachází při této teplotě s rozdílem desetín stupně. Odchyly může být způsobena biologickým materiálem, odchylkou přístroje, primery nebo koextrakcí nechťených látek. Vrcholy na začátku analýzy

jsou způsobeny nespecifickým nasedáním primerů. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Dle dosažených výsledků lze potvrdit přítomnost druhu *Bifidobacterium breve*.

6.3.10 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium bifidum*

Pomocí PCR v reálném čase byla potvrzena přítomnost probiotického druhu *Bifidobacterium bifidum*. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly se nachází u 15. cyklu a u vzorku u 23. cyklu.

Vrchol křivky tání se nachází při T_m (94,3 °C). Vrchol křivky tání vzorku se nachází u této teploty s rozdílem v desetínách stupně. Tyto rozdíly mohou být způsobeny nestálým biologickým materiálem, odchylkou přístroje nebo primery. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Dle dosažených výsledků lze potvrdit přítomnost druhu *Bifidobacterium bifidum*.

6.3.11 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium lactis*

DNA *Bifidobacterium lactis* byla prokázána pomocí PCR v reálném čase. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly se nachází při 15. cyklu a vzorku při 18. cyklu.

Vrchol pozitivní kontroly křivky tání se nachází při T_m (94,0 °C). Při této teplotě se nachází také vrcholy vzorku. Drobné odchylky mohly být způsobeny analyzovaným biologickým materiálem, odchylkou přístroje způsobem izolace nebo koextrakcí nežádoucích látek. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Tímto byla detailně prokázána přítomnost DNA druhu *Bifidobacterium lactis*.

6.3.12 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium longum*

Aplifikační křivky po analýze PCR v reálném čase prokázaly přítomnost druhu *Bifidobacterium longum*. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly se nachází při 13. cyklu a vzorku při 17. cyklu analýzy.

Pík pozitivní kontroly byl detekován při T_m (93,8 °C). Při této teplotě s drobnými odchylkami byl detekován pík vzorku. Mírné odchylky mohly být způsobeny analyzovaným biologickým materiálem nebo odchylkou přístroje, primery, způsobem izolace nebo koextrakcí nežádoucích látek. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Tímto byla detailně prokázána přítomnost DNA druhu *Bifidobacterium longum*.

6.3.13 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Bifidobacterium infantis*

Pomocí qPCR byla potvrzena přítomnost druhu *Bifidobacterium infantis*. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly pro tuto analýzu se nachází při 16. cyklu a vzorku při 18. cyklu.

Nejvyšší bod křivky tání pozitivní kontroly byl detekován při T_m (93,2 °C). U této teploty byl detekován i nejvyšší bod vzorku s odchylkou v desetínách stupně. Tyto odchylky mohly být způsobeny biologickým materiálem, primery, odchylkou přístroje, způsobem izolace nebo koextrakcí nežádoucích látek. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Dle provedené analýzy byla potvrzena přítomnost druhu *Bifidobacterium infantis*.

6.3.14 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro rod *Streptococcus*

Pomocí PCR v reálném čase byl detekován práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly rodu *Streptococcus* při 15. cyklu a vzorku při 17. cyklu.

Pomocí Melt analýzy byla detailně potvrzena přítomnost rodu *Streptococcus*. Nejvyšší bod křivky tání pozitivní kontroly byl detekován při T_m (82,4 °C). Vrcholy křivek tání vzorku byly detekovány s drobnými odchylkami o podobné teplotě. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Odchylky mohly být způsobeny odchylkou přístroje, primery, analyzovaným biologickým materiálem, způsobem izolace nebo koextrakcí nechtěných látek. Tímto byla detailně prokázána přítomnost DNA rodu *Streptococcus*.

6.3.15 PCR v reálném čase a Melt analýza specifická pro druh *Streptococcus thermophilus*

Amplifikační křivky qPCR analýzy pro druh *Streptococcus thermophilus* potvrdily přítomnost tohoto druhu ve vzorku. Práh cyklu (C_t) pozitivní kontroly byl detekován na 14. cyklu a vzorku na 15. a 18. cyklu.

Pomocí Melt analýzy byla detekována nejvyšší fluorescence při T_m (81,7 °C) u pozitivní kontroly. Této teploty dosáhly také křivky tání vzorku s odchylkami desetin stupně. Tyto odchylky mohly být způsobeny použitým biologickým materiálem, odchylkou přístroje, primery, způsobem izolace nebo koextrakce nežádoucích látek. Negativní kontrola bez produktu PCR vyloučila možnost nepravdivých pozitivních výsledků. Na základě provedených analýz byla potvrzena přítomnost druhu *Streptococcus thermophilus*.

7 ZÁVĚR

Teoretická část práce se věnovala jednotlivým probiotikům používaných v obecně doplňcích stravy a konkrátně v analyzovaném probiotickém doplňku stravy Harmonelo. Konkrétně se jedná o druhy rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Zároveň se zabývá nejčastěji vyskytujícími se onemocněními trávicího traktu a jejich léčbou za použití konkrétních probiotických druhů. Jsou zde popsány nejčastější metody izolace a purifikace DNA, metody stanovení její čistoty a koncentrace na základě předpokladu čistoty vzorků a následná identifikace konkrétních sekvencí DNA.

V experimentální části byla stanovena koncentrace a čistota vyizolované DNA z probiotického doplňku stravy Harmonelo pomocí fenol-chloroformové extrakce a OMNI Bacterial DNA kitem. Na základě výsledků ze spektrofotometrického stanovení čistoty a koncentrace DNA byl vybrán vzorek o nejvyšší kvalitě, který byl následně používán pro analýzu PCR v reálném čase a Melt analýzu. Následě byla provedena amplifikace PCR v reálném čase na úrovni rodu pro rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* a na úrovni druhu pro druhy *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* a *Streptococcus thermophilus*. Přítomnost jednotlivých rodů a druhů byla detekována pomocí amplifikačních křivek a teploty tání křivek tání u Melt analýzy.

8 REFERENCE

- [1] WILLIAMS, Nancy Toedter. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 2010, 67(6), 449-458 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1079-2082. Dostupné z: doi:10.2146/ajhp090168
- [2] WONG, Chyn Boon, Toshitaka ODAMAKI a Jin-zhong XIAO. Beneficial effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 on human health: Modulation of gut microbiome as the principal action. *Journal of Functional Foods* [online]. 2019, 54, 506-519 [cit. 2023-03-18]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2019.02.002
- [3] SONG, Danfeng, Salam IBRAHIM a Saeed HAYEK. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. *Probiotics. InTech*, 2012. DOI: 10.5772/50121. ISBN 978-953-51-0776-7.
- [4] ZHENG, Jinshui, Stijn WITTOUCK, Elisa SALVETTI, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2020, 70(4), 2782-2858 [cit. 2023-03-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.004107
- [5] GÄNZLE, Michael G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2015, 2, 106-117 [cit. 2023-03-09]. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2015.03.001
- [6] ARCHIBALD, F S a I FRIDOVICH. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* [online]. 1981, 146(3), 928-936 [cit. 2023-03-09]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.146.3.928-936.1981
- [7] WEINBERG, Eugene D. The *Lactobacillus* Anomaly: Total Iron Abstinence. *Perspectives in Biology and Medicine* [online]. 1997, 40(4), 578-583 [cit. 2023-03-09]. ISSN 1529-8795. Dostupné z: doi:10.1353/pbm.1997.0072
- [8] Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. National Center for Biotechnology Information [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4053917/>
- [9] HUANG, Zheng, Xingya ZHOU, Catherine STANTON, Reynolds Paul ROSS, Jianxin ZHAO, Hao ZHANG, Bo YANG a Wei CHEN. Comparative Genomics and Specific Functional Characteristics Analysis of *Lactobacillus acidophilus*. *Microorganisms* [online]. 2021, 9(9) [cit. 2023-03-10]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9091992
- [10] CRAWLEY, Alexandra B. a Rodolphe BARRANGOU. Conserved Genome Organization and Core Transcriptome of the *Lactobacillus acidophilus* Complex. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, 9 [cit. 2023-03-10]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.01834

- [11] KONG, Weimei, Junai GAN, Mi SU, et al. Identification and Characterization of Domains Responsible for Cell Wall Binding, Self-Assembly, and Adhesion of S-layer Protein from *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2022, **70**(40), 12982-12989 [cit. 2023-03-10]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.2c03907
- [12] HORACKOVA, Sarka, Kristina VESELA, Iveta KLOJDOVA, Marketa BERCIKOVA a Milada PLOCKOVA. Bile salt hydrolase activity, growth characteristics and surface properties in *Lactobacillus acidophilus*. *European Food Research and Technology* [online]. 2020, **246**(8), 1627-1636 [cit. 2023-03-10]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-020-03518-8
- [13] Prokaryotic DNA replication mechanisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* [online]. 1987, 317(1187), 395-420 [cit. 2023-03-11]. ISSN 0080-4622. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.1987.0068
- [14] ZHENG, Jinshui, Stijn WITTOUCK, Elisa SALVETTI, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2020, **70**(4), 2782-2858 [cit. 2023-03-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.004107
- [15] LANDETE, José María, Héctor RODRÍGUEZ, José Antonio CUIEL, Blanca DE LAS RIVAS, Félix López DE FELIPE a Rosario MUÑOZ. Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 387-396 [cit. 2023-03-11]. ISBN 9780123744203. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00043-7
- [16] E Giraud, B Lelong and M Raimbault. 1991. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36(1):96–99.
- [17] GÄNZLE, Michael G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2015, **2**, 106-117 [cit. 2023-03-11]. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2015.03.001
- [18] PEDERSEN, Martin B., Philippe GAUDU, Delphine LECHARDEUR, Marie-Agnès PETIT a Alexandra GRUSS. Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology* [online]. 2012, **3**(1), 37-58 [cit. 2023-03-11]. ISSN 1941-1413. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-food-022811-101255
- [19] BESTED, Alison C, Alan C LOGAN a Eva M SELHUB. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances. *Gut Pathogens* [online]. 2013, **5**(1) [cit. 2023-03-11]. ISSN 1757-4749. Dostupné z: doi:10.1186/1757-4749-5-3
- [20] BIXQUERT JIMÉNEZ, M. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: An etiopathogenic approach at last?. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* [online]. 2009, **101**(8) [cit. 2023-03-11]. ISSN 1130-0108. Dostupné z: doi:10.4321/S1130-01082009000800006

- [21] HILL, Daragh, Ivan SUGRUE, Conor TOBIN, Colin HILL, Catherine STANTON a R. Paul ROSS. The Lactobacillus casei Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, **9** [cit. 2023-03-11]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.02107
- [22] MCFARLAND, Lynne V. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile infections. *Anaerobe* [online]. 2009, **15**(6), 274-280 [cit. 2023-03-11]. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2009.09.002
- [23] VAN NIEL, Cornelius W., Chris FEUDTNER, Michelle M. GARRISON a Dimitri A. CHRISTAKIS. Lactobacillus Therapy for Acute Infectious Diarrhea in Children: A Meta-analysis. *Pediatrics* [online]. 2002, **109**(4), 678-684 [cit. 2023-03-11]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.109.4.678
- [24] DE VRESE, M., C. LAUE, E. PAPAZOVA, L. PETRICEVIC a J. SCHREZENMEIR. Impact of oral administration of four Lactobacillus strains on Nugent score – systematic review and meta-analysis. *Beneficial Microbes* [online]. 2019, **10**(5), 483-496 [cit. 2023-03-13]. ISSN 1876-2883. Dostupné z: doi:10.3920/BM2018.0129
- [25] LICITRA, Giuseppe, Stefania CARPINO a Catherine W. DONNELLY. The Microfloras and Sensory Profiles of Selected Protected Designation of Origin Italian Cheeses. *Microbiology Spectrum* [online]. 2014, **2**(1) [cit. 2023-03-13]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.CM-0007-2012
- [26] DIEZ-ECHAVE, Patricia, Izaskun MARTÍN-CABREJAS, José GARRIDO-MESA, et al. Probiotic and Functional Properties of Limosilactobacillus reuteri INIA P572. *Nutrients* [online]. 2021, **13**(6) [cit. 2023-03-13]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13061860
- [27] GANZLE, Michael G., Alexandra HOLTZEL, Jens WALTER, Günther JUNG a Walter P. HAMMES. Characterization of Reutericyclin Produced by Lactobacillus reuteri LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, **66**(10), 4325-4333 [cit. 2023-03-13]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.66.10.4325-4333.2000
- [28] SHORNIKOVA, AINO-VIENO, IVAN A. CASAS, HANNU MYKKÄNEN, EEVA SALO a TIMO VESIKARI. Bacteriotherapy with Lactobacillus reuteri in rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* [online]. 1997, **16**(12), 1103-1107 [cit. 2023-03-13]. ISSN 0891-3668. Dostupné z: doi:10.1097/00006454-199712000-00002
- [29] WANG, Bingxian, Yu-Kang MAO, Caroline DIORIO, Michael PASYK, Richard You WU, John BIENENSTOCK a Wolfgang A. KUNZE. Luminal administration ex vivo of a live Lactobacillus species moderates mouse jejunal motility within minutes. *The FASEB Journal* [online]. 2010, **24**(10), 4078-4088 [cit. 2023-03-13]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.09-153841
- [30] SCHELL, Mark A., Maria KARMIRANTZOU, Berend SNEL, et al. The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2002, **99**(22), 14422-14427 [cit. 2023-03-09]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.212527599

- [31] MASCO, Liesbeth, Marco VENTURA, Ralf ZINK, Geert HUYS a Jean SWINGS. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2004, **54**(4), 1137-1143 [cit. 2023-03-15]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.03011-0
- [32] QUIGLEY, E.M.M. *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis*. In: *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 127-130 [cit. 2023-03-15]. ISBN 9780128040249. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804024-9.00013-6
- [33] HOOVER, D.G. *Bifidobacterium*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 216-222 [cit. 2023-03-15]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00033-1
- [34] PALMER, Chana, Elisabeth M BIK, Daniel B DIGIULIO, David A RELMAN, Patrick O BROWN a Yijun RUAN. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biology* [online]. 2007, **5**(7) [cit. 2023-03-15]. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.0050177
- [35] MITSUOKA, Tomotari. *Bifidobacteria* and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology* [online]. 1990, **6**(4), 263-267 [cit. 2023-03-15]. ISSN 0169-4146. Dostupné z: doi:10.1007/BF01575871
- [36] SELLE, Kurt a Todd R. KLAENHAMMER. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2013, **37**(6), 915-935 [cit. 2023-03-15]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/1574-6976.12021
- [37] PIZZORNO, Joseph E., Michael T. MURRAY a Herb JOINER-BEY. Infectious diarrhea. In: *The Clinician's Handbook of Natural Medicine* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 473-484 [cit. 2023-03-15]. ISBN 9780702055140. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-5514-0.00050-6
- [38] CHICHLOWSKI, Maciej, Neil SHAH, Jennifer L. WAMPLER, Steven S. WU a Jon A. VANDERHOOF. *Bifidobacterium longum* Subspecies *infantis* (*B. infantis*) in Pediatric Nutrition: Current State of Knowledge. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(6) [cit. 2023-03-18]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12061581
- [39] UNDERWOOD, Mark A., J. Bruce GERMAN, Carlito B. LEBRILLA a David A. MILLS. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. *Pediatric Research* [online]. 2015, **77**(1-2), 229-235 [cit. 2023-03-18]. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1038/pr.2014.156
- [40] ODAMAKI, Toshitaka, Francesca BOTTACINI, Kumiko KATO, Eri MITSUYAMA, Keisuke YOSHIDA, Ayako HORIGOME, Jin-zhong XIAO a Douwe VAN SINDEREN. Genomic diversity and distribution of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* across the human

lifespan. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2023-03-18]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-18391-x

[41] BOZZI CIONCI, Nicole, Loredana BAFFONI, Francesca GAGGIÀ a Diana DI GIOIA. Therapeutic Microbiology: The Role of Bifidobacterium breve as Food Supplement for the Prevention/Treatment of Paediatric Diseases. *Nutrients* [online]. 2018, **10**(11) [cit. 2023-03-18]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10111723

[42] FACKLAM, Richard. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2002, **15**(4), 613-630 [cit. 2023-03-09]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.15.4.613-630.2002

[43] Patterson MJ. Streptococcus. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/>

[44] HARNETT, J., G. DAVEY, A. PATRICK, C. CADDICK a L. PEARCE. Lactic Acid Bacteria | Streptococcus thermophilus. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 143-148 [cit. 2023-03-20]. ISBN 9780123744074. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00268-5

[45] TANNOCK, G. W. *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. Wymondham, Norfolk, U.K.: Caister Academic Press, c2005. ISBN 978-1-904455-01-1.

[46] HOLS, Pascal, Frédéric HANCY, Laetitia FONTAINE, et al. New insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2005, **29**(3), 435-463 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1016/j.fmrre.2005.04.008

[47] MANNING, Thea Scantlebury a Glenn R GIBSON. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* [online]. 2004, **18**(2), 287-298 [cit. 2023-03-20]. ISSN 15216918. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpg.2003.10.008

[48] BINDELS, Laure B., Nathalie M. DELZENNE, Patrice D. CANI a Jens WALTER. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [online]. 2015, **12**(5), 303-310 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1759-5045. Dostupné z: doi:10.1038/nrgastro.2015.47

[49] ROBERFROID, Marcel. Prebiotics: The Concept Revisited¹. *The Journal of Nutrition* [online]. 2007, **137**(3), 830S-837S [cit. 2023-03-20]. ISSN 00223166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/137.3.830S

[50] DAVANI-DAVARI, Dorna, Manica NEGAHDARIPOUR, Iman KARIMZADEH, Mostafa SEIFAN, Milad MOHKAM, Seyed MASOUMI, Aydin BERENJIAN a Younes GHASEMI. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* [online]. 2019, **8**(3) [cit. 2023-03-20]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods8030092

- [51] HOLSCHER, Hannah D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* [online]. 2017, **8**(2), 172-184 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2017.1290756
- [52] TZOUNIS, Xenofon, Ana RODRIGUEZ-MATEOS, Jelena VULEVIC, Glenn R GIBSON, Catherine KWIK-URIBE a Jeremy PE SPENCER. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*[online]. 2011, **93**(1), 62-72 [cit. 2023-03-20]. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.110.000075
- [53] SCHREZENMEIR, Jürgen a Michael DE VRESE. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition,. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2001, **73**(2), 361s-364s [cit. 2023-03-23]. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/73.2.361s
- [54] FLESCHE, Aline Gamarra Taborda, Aline Kirjner POZIOMYCK a Daniel De Carvalho DAMIN. The therapeutic use of symbiotics. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)[online]. 2014, **27**(3), 206-209 [cit. 2023-03-23]. ISSN 0102-6720. Dostupné z: doi:10.1590/S0102-67202014000300012
- [55] SULLIVAN, A. a C. E. NORD. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine* [online]. 2005, **257**(1), 78-92 [cit. 2023-03-23]. ISSN 0954-6820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2796.2004.01410.x
- [56] GUANDALINI, S. a N. SANSOTTA. Probiotics Use in Infectious Disease (Respiratory, Diarrhea, and Antibiotic-Associated Diarrhea). In: *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*[online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 299-313 [cit. 2023-03-23]. ISBN 9780128040249. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804024-9.00033-1
- [57] MARTEAU, Philippe R, Michael de VRESE, Christophe J CELLIER a Jürgen SCHREZENMEIR. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics,. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2001, **73**(2), 430s-436s [cit. 2023-03-23]. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/73.2.430s
- [58] FEDORAK, Richard N. a Karen L. MADSEN. Probiotics and the Management of Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 2004, **10**(3), 286-299 [cit. 2023-03-23]. ISSN 1078-0998. Dostupné z: doi:10.1097/00054725-200405000-00018
- [59] DISTRUTTI, Eleonora, Sabrina CIPRIANI, Andrea MENCARELLI, Barbara RENGA a Stefano FIORUCCI. Probiotics VSL#3 protect against development of visceral pain in murine model of irritable bowel syndrome. *PLoS ONE* [online]. Public Library of Science (PLoS), 2013, **8**(5), e63893 [cit. 2023-03-23]. DOI: 10.1371/journal.pone.0063893. Dostupné z: <https://doaj.org/article/f2e7436de4334dc69a8855e6865adfea>
- [60] SULLIVAN, Å. a C. E. NORD. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine*[online]. Oxford, UK: Blackwell Science, 2005, **257**(1), 78-92 [cit. 2023-03-23]. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2004.01410.x. ISSN 0954-6820.
- [61] KHALESI, Saman, Nick BELLISSIMO, Corneel VANDELANOTTE, Susan WILLIAMS, Dragana STANLEY a Christopher IRWIN. A review of probiotic

supplementation in healthy adults: helpful or hype?. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2019, **73**(1), 24-37 [cit. 2023-03-23]. ISSN 0954-3007. Dostupné z: doi:10.1038/s41430-018-0135-9

[62] KOTHARI, Damini, Seema PATEL a Soo-Ki KIM. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2019, **111**, 537-547 [cit. 2023-03-23]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2018.12.104

[63] TEMMERMAN, Robin, Geert HUYS a Jean SWINGS. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2004, **15**(7-8), 348-359 [cit. 2023-04-01]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2003.12.007

[64] PATEL, Ami, Jb PRAJAPATI a Baboo M NAIR. Methods for isolation, characterization and identification of probiotic bacteria to be used in functional foods. *International Journal of Fermented Foods* [online]. 2012, **1**(1), 1-13 [cit. 2023-04-01]. ISSN 23193549.

[65] KUMAR, Rajesh, Sunita GROVER a Virender Kumar BATISH. Molecular Identification and Typing of Putative Probiotic Indigenous *Lactobacillus plantarum* Strain Lp91 of Human Origin by Specific Primed-PCR Assays. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* [online]. 2011, **3**(3-4), 186-193 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1867-1306. Dostupné z: doi:10.1007/s12602-011-9083-6

[66] TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, 2009, 1-10 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398

[67] KUDR, Jiri, Yazan HADDAD, Lukas RICHTERA, Zbynek HEGER, Mirko CERNAK, Vojtech ADAM a Ondrej ZITKA. Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials* [online]. 2017, **7**(9) [cit. 2023-04-21]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano7090243

[68] SENGÜVEN, Burcu, Emre BARIS, Tulin OYGUR a Mehmet BERKTAS. Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *International Journal of Medical Sciences* [online]. 2014, **11**(5), 494-499 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1449-1907. Dostupné z: doi:10.7150/ijms.8842

[69] LIM, Mi Young, Eun-Ji SONG, Sang Ho KIM, Jangwon LEE a Young-Do NAM. Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2018, **41**(2), 151-157 [cit. 2023-04-21]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/j.syapm.2017.11.008

[70] WANG, Xi, Ling ZHAO, Xiaoxing WU, et al. Development of a simplified and inexpensive RNA depletion method for plasmid DNA purification using size selection magnetic beads (SSMBs). *Genes & Diseases* [online]. 2021, **8**(3), 298-306 [cit. 2023-04-21]. ISSN 23523042. Dostupné z: doi:10.1016/j.gendis.2020.04.013

[71] GARCÍA-ALEGRÍA, Alejandro Monserrat, Iván ANDURO-CORONA, Cinthia Jhovanna PÉREZ-MARTÍNEZ, María Alba GUADALUPE CORELLA-MADUEÑO, María Lucila RASCÓN-DURÁN, Humberto ASTIAZARAN-GARCIA a Mohamed ABDEL-REHIM.

Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry*[online]. 2020, **2020**, 1-9 [cit. 2023-04-11]. ISSN 1687-8779. Dostupné z: doi:10.1155/2020/8896738

[72] DESJARDINS, Philippe a Deborah CONKLIN. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2010, (-1) [cit. 2023-04-11]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/2565

[73] OLSON, Nathan D a Jayne B MORROW. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes* [online]. 2012, **5**(1) [cit. 2023-04-11]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-5-668

[74] LI, Xiaofei, Yuhua WU, Li ZHANG, Yinglong CAO, Yunjing LI, Jun LI, Li ZHU a Gang WU. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Analytical Biochemistry*[online]. 2014, **451**, 18-24 [cit. 2023-04-11]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2014.01.016

[75] SEDLACKOVA, Tatiana, Gabriela REPISKA, Peter CELEC, Tomas SZEMES a Gabriel MINARIK. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online* [online]. 2013, **15**(1) [cit. 2023-04-11]. ISSN 1480-9222. Dostupné z: doi:10.1186/1480-9222-15-5

[76] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, **133**(3), 1-4 [cit. 2023-04-01]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.1

[77] WATERS, Daniel L. E. a Frances M. SHAPTER. The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. In: HENRY, Robert J. a Agnelo FURTADO, ed. *Cereal Genomics* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2014, 2014-10-31, s. 65-75 [cit. 2023-04-01]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-714-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-715-0_7

[78] BARTLETT, John M. S. a David STIRLING. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: BARTLETT, John M.S. a David STIRLING. *PCR Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 2003, s. 3-6 [cit. 2023-04-01]. ISBN 1-59259-384-4. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-384-4:3

[79] DEY, Pranab. Polymerase Chain Reaction: Principle, Technique and Applications in Pathology. In: DEY, Pranab. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2018, 2018-06-09, s. 201-211 [cit. 2023-04-01]. ISBN 978-981-10-8251-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-8252-8_20

[80] GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2018, **2018**(5) [cit. 2023-04-01]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095125

[81] GRUNENWALD, Haiying. Optimization of Polymerase Chain Reactions. In: BARTLETT, John M.S. a David STIRLING. *PCR Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 2003, s. 89-100 [cit. 2023-04-01]. ISBN 1-59259-384-4. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-384-4:89

- [82] RAHMAN, Md Tahminur, Muhammed Salah UDDIN, Razia SULTANA, Arumina MOUE a Muntahina SETU. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal* [online]. 2013, **4**(1), 30-36 [cit. 2023-04-01]. ISSN 2304-5701. Dostupné z: doi:10.3329/akmmcj.v4i1.13682
- [83] GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2018, **2018**(5) [cit. 2023-04-01]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095117
- [84] GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2019, **2019**(2) [cit. 2023-04-01]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095182
- [85] VALONES, Marcela Agne Alves, Rafael Lima GUIMARÃES, Lucas André Cavalcanti BRANDÃO, Paulo Roberto Eleutério de SOUZA, Alessandra de Albuquerque Tavares CARVALHO a Sergio CROVELA. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2009, **40**(1), 1-11 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1590/S1517-83822009000100001
- [86] KALTENBOECK, Bernhard a Chengming WANG. *Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics* [online]. In: . Elsevier, 2005, 2005, s. 219-259 [cit. 2023-04-01]. Advances in Clinical Chemistry. ISBN 9780120103409. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2423(05)40006-2
- [87] ISHMAEL, Faoud T. a Cristiana STELLATO. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*[online]. 2008, **101**(4), 437-443 [cit. 2023-04-01]. ISSN 10811206. Dostupné z: doi:10.1016/S1081-1206(10)60323-7
- [88] Real-time PCR | Functional genomics II. The European Bioinformatics Institute EMBL-EBI [online]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/training-beta/online/courses/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/real-time-pcr/>
- [89] WONG, Marisa L. a Juan F. MEDRANO. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* [online]. 2005, **39**(1), 75-85 [cit. 2023-04-01]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/05391RV01
- [90] MACKAY, I. M. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*[online]. **30**(6), 1292-1305 [cit. 2023-04-01]. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/30.6.1292
- [91] GARFIN, David E. Chapter 29 One-Dimensional Gel Electrophoresis. In: *Guide to Protein Purification, 2nd Edition*[online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 497-513 [cit. 2023-04-04]. Methods in Enzymology. ISBN 9780123745361. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(09)63029-9
- [92] GABRIEL, Othmar. [39] Analytical disc gel electrophoresis. In: *Enzyme purification and related techniques* [online]. Elsevier, 1971, 1971, s. 565-578 [cit. 2023-04-04]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121818852. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(71)22041-3

- [93] NASSONOVA, E. S. Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application. *Cell and Tissue Biology* [online]. 2008, **2**(6), 557-565 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1990-519X. Dostupné z: doi:10.1134/S1990519X08060011
- [94] LOPEZ-CANOVAS, Lilia, Maximo B. MARTINEZ BENITEZ, Jose A. HERRERA ISIDRON a Eduardo FLORES SOTO. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Analytical Biochemistry*[online]. 2019, **573**, 17-29 [cit. 2023-04-04]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2019.02.020
- [95] RABILLOUD, Thierry a Cécile LELONG. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*[online]. 2011, **74**(10), 1829-1841 [cit. 2023-04-04]. ISSN 18743919. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2011.05.040
- [96] CHIANG, Howard Hsueh-Hao. The Laboratory Technology of Discrete Molecular Separation: The Historical Development of Gel Electrophoresis and the Material Epistemology of Biomolecular Science, 1945–1970. *Journal of the History of Biology* [online]. 2009, **42**(3), 495-527 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0022-5010. Dostupné z: doi:10.1007/s10739-008-9169-5
- [97] SCHWARTZ, David C. a Charles R. CANTOR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* [online]. 1984, **37**(1), 67-75 [cit. 2023-04-04]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(84)90301-5
- [98] BENDICH, Arnold J. Structural Analysis of Mitochondrial DNA Molecules from Fungi and Plants Using Moving Pictures and Pulsed-field Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*[online]. 1996, **255**(4), 564-588 [cit. 2023-04-04]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1996.0048
- [99] DAVIS, Leonard G., Mark D. DIBNER a James F. BATTEY. Agarose Gel Electrophoresis. In: *Basic Methods in Molecular Biology*[online]. Elsevier, 1986, 1986, s. 58-61 [cit. 2023-04-01]. ISBN 9780444010827. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-01082-7.50022-9
- [100] GUILLIATT, Andrea M. Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: THEOPHILUS, Bimal D. M. a Ralph RAPLEY. *PCR Mutation Detection Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 2002, s. 001-011 [cit. 2023-04-01]. ISBN 1-59259-273-2. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-273-2:001
- [101] Gel Electrophoresis: Principles and Basics - Knihy Google. Knihy Google [online]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=gcqgDwAAQBAJ&lpg=PA33&ots=OgAZCz0b06&dq=gel%20electrophoresis%20principle&lr&hl=cs&pg=PA33#v=onepage&q&f=false>
- [102] LADBURY, John E. a Michael L. DOYLE, ed. *Biocalorimetry 2*[online]. Wiley, 2004 [cit. 2023-04-11]. ISBN 9780470849682. Dostupné z: doi:10.1002/0470011122
- [103] MARKAKI, Y., M. GUNKEL, L. SCHERMELLEH, et al. Functional Nuclear Organization of Transcription and DNA Replication: A Topographical Marriage between Chromatin Domains and the Interchromatin Compartment. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [online]. 2011, **75**, 475-492 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0091-7451. Dostupné z: doi:10.1101/sqb.2010.75.042

- [104] ŠIMENC, J. a U. POTOČNIK. Rapid differentiation of bacterial species by high resolution melting curve analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2011, **47**(3), 256-263 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:10.1134/S0003683811030136
- [105] DE JUAN, Inmaculada, Eva ESTEBAN, Sarai PALANCA, Eva BARRAGÁN a Pascual BOLUFER. High-resolution melting analysis for rapid screening of BRCA1 and BRCA2 Spanish mutations. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2009, **115**(2), 405-414 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0167-6806. Dostupné z: doi:10.1007/s10549-008-0073-7
- [106] AGHAEI, Afshar A, Y RASSI, I SHARIFI, H VATANDOOST, HR MOLLAIE, M.A OSHAGHI, MR ABAI a S RAFIZADEH. First report on natural Leishmania infection of Phlebotomus sergenti due Leishmania tropica by high resolution melting curve method in South-eastern Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*[online]. 2014, **7**(2), 93-96 [cit. 2023-04-11]. ISSN 19957645. Dostupné z: doi:10.1016/S1995-7645(14)60002-X
- [107] WISITTIPANIT, Nuttachat, Chaiwat PULSRIKARN, Saranya WUTTHIOSOT, Sitthisak PINMONGKHONKUL a Kritchai POONCHAREON. Application of machine learning algorithm and modified high resolution DNA melting curve analysis for molecular subtyping of Salmonella isolates from various epidemiological backgrounds in northern Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2020, **36**(7) [cit. 2023-04-11]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-020-02874-7
- [108] Etienne, Cédric LEFOL, Violaine BOURDON, et al. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. *Human Mutation* [online]. 2009, **30**(6), 867-875 [cit. 2023-04-11]. ISSN 10597794. Dostupné z: doi:10.1002/humu.20947
- [109] COLLADO, M.C., S. DELGADO, A. MALDONADO a J.M. RODRÍGUEZ. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2009, **48**(5), 523-528 [cit. 2023-04-19]. ISSN 02668254. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x
- [110] SONG, Yu-Li, Naoki KATO, Cheng-Xu LIU, Yoshiko MATSUMIYA, Haru KATO a Kunitomo WATANABE. Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2000, **187**(2), 167-173 [cit. 2023-04-19]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09155.x
- [111] SHEU, Sen-Je, Wen-Zhe HWANG, Yu-Cheng CHIANG, Wen-Hsin LIN, Hsin-Chih CHEN a Hau-Yang TSEN. Use of Tuf Gene-Based Primers for the PCR Detection of Probiotic Bifidobacterium Species and Enumeration of Bifidobacteria in Fermented Milk by Cultural and Quantitative Real-Time PCR Methods. *Journal of Food Science*[online]. 2010, **75**(8), M521-M527 [cit. 2023-04-19]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01816.x

- [112] VAŇÁTKOVÁ, Zuzana, Eva OKÉNKOVA, Leona BUŇKOVÁ, Vladimír DRÁB a Jan HRABĚ. Molecular diagnostic of streptococcus thermophilus. *Ecological Chemistry and Engineering A-Chemia i inzynieria ekologiczna A* [online]. 2009, vol. 16, iss. 12, s. 1627-1635. [cit. 2022-10-31]. ISSN 1898-6188. Dostupné z: <https://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.baztech-article-BPG8-0023-0021>.
- [113] IACUMIN, Lucilla, Federica GINALDI, Marisa MANZANO, et al. High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR. *Food Microbiology* [online]. 2015, **46**, 357-367 [cit. 2023-04-25]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2014.08.007
- [114] OGIY, Svetlana, Yaira CHEN, Ronit PASVOLSKY, Zwi G. WEINBERG a Moshe SHEMESH. High resolution melt analysis to confirm the establishment of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* from silage inoculants during ensiling of wheat. *Grassland Science* [online]. 2016, **62**(1), 29-36 [cit. 2023-04-25]. ISSN 17446961. Dostupné z: doi:10.1111/grs.12102
- [115] LIN, Xiaoxi B. a Michael G. GÄNZLE. Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2014, 186, 42-48 [cit. 2023-04-25]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.010

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|----------------|---|
| qPCR | polymerázová řetězová reakce v reálném čase |
| HRM | vysokorozlišovací křivky tání |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EDTA | kyselina etyléndiaminotetraoctová |
| TE | Tris/EDTA pufr |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| C _t | práh cyklu |
| T _m | teplota tání |