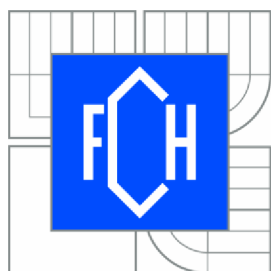


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA MIKROFLÓRY V SÝRECH POMOCÍ DGGE DGGE ANALYSIS OF MICROFLORA IN CHEESES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTERS THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. MARTINA ČAKAJDOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ, Ph.D.

KONZULTANT
CONSULTANT

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2015



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0895/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Martina Čakajdová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	

Název diplomové práce:

Analýza mikrobiologie v sýrech pomocí DGGE

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

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

Bc. Martina Čakajdová
Student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

Molekulárno-biologické metódy sú rýchlou a účinnou pomôckou pri identifikácii mikroorganizmov v reálnych vzorkách.

Cieľom tejto diplomovej práce bola analýza mikroflóry v kontrolných a kontaminovaných nezrejších syroch.

DNA izolovaná z analyzovaných vzoriek bola použitá pre optimalizáciu PCR s priméromi s GC svorkou pre rozdelenie amplikónov pomocou DGGE. Produkty DGGE boli po optimalizácii reamplifikované a pripravené pre sekvenáciu. DNA izolovaná z analyzovaných vzoriek bola použitá pre PCR v reálnom čase s analýzou kriviek topenia amplikónov s vysokým rozlíšením (HRMA). Pomocou DGGE a HRMA analýzy boli porovnané amplikóny syrov s bakteriálnymi kultúrami izolovanými kultivačne z týchto syrov. Porovnaním polohy amplikónov bolo zistené, že kontaminujúcimi mohli byť *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* a *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. Analýzou sekvencií amplikónov syrov a nálevov bola zistená prítomnosť *Bacillus* sp. a ďalších mikroorganizmov radených do piatich rodov. Z nich boli vykultivovaní zástupcovia troch rodov z Preto sa predpokladá kontaminácia *Bacillus* sp., alebo mikroorganizmy, ktoré neboli použitými metódami kultivovateľné.

Metóda je vhodná pre analýzu komplexnej mikroflóry v syroch a nálevoch po ďalšej optimalizácii.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

nezrejúce syry

mikroflóra

denaturačná gradientová gélová elektroforéza

vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia amplikónov

sekvenčná analýza DNA

ABSTRACT

Molecular biological methods are fast and efficient tool for the identification of microorganisms in real samples.

The aim of this diploma thesis was analysis of microflora in control and contaminated brined cheeses.

DNA isolated from analyzed samples was used to optimize the PCR course using primers with GC clamp on the distribution of amplicons using DGGE. DGGE products were reamplified after optimization and prepared for DNA sequencing. DNA isolated from analyzed samples was used in real-time PCR with high resolution melt analysis of the amplicons (HRMA). Samples of cheese and bacterial cultures isolated from cheeses were compared by DGGE and HRMA. Comparing the position of the amplicons was found that contaminants may be *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. Sequence analysis of cheese and pickles amplicons, the presence of *Bacillus* sp. and other microorganisms spree in five genera were detected. Representatives of the tree genera were cultured. It is considered contamination *Bacillus* sp., or microorganisms which are not culturable methods used.

The method is suitable for the analysis of complex microflora in cheese and pickles after further optimization.

KEYWORDS

brined cheese

microflora

denaturation gradient gel electrophoresis

high resolution melt analysis

DNA sequencing

ČAKAJDOVÁ, M. Analýza mikroflóry v sýrech pomocí DGGE. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015, 107 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Moje poďakovanie patrí vedúcej práce Ing. Štěpánke Trachtovej, Ph.D. a konzultantke doc. RNDr. Alene Španovej, CSc za ich odborné vedenie, čas a cenné rady, ktoré mi venovali pri spracovávaní zadanej témy diplomovej práce. Moje poďakovanie tiež patrí mojej rodine za neustálu podporu.

OBSAH

1 Úvod	9
2 Teoretická časť	10
3 Syry	10
3.1 Syry v soľnom náleve	10
3.1.1 Výroba syrov zrejúcich v soľnom náleve	10
3.1.2 Kontaminácia.....	10
4 Mikroflóra nezrejúcich syrov	11
4.1 Primárne (štartérové) kultúry	11
4.1.1 Mezofilné a termofilné kultúry	11
4.1.2 Ďalšie rozdelenie	11
4.2 Sekundárne (prídavné) kultúry.....	12
5 Identifikácia baktérií v potravinách	12
5.1 Fenotypové metódy	12
5.2 Genotypové metódy	12
5.2.1 16S rDNA sekvenovanie.....	13
5.2.2 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza	13
5.2.3 Vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia amplicónov.....	14
6 Ciele a úlohy bioinformatiky	15
6.1 Získavanie sekvencií DNA	15
6.1.1 454 sekvenovanie.....	16
6.1.2 Illumina.....	16
6.1.3 IonTorrent	17
6.1.4 Nanopore.....	17
6.2 Uverejňovanie sekvenčných dát.....	17
6.3 Orientácia v databázach	19
6.4 Používané formáty dátových súborov	19
6.4.1 Plain formát	20
6.4.2 FASTA formát.....	20
6.4.3 GenBank	21
6.4.4 EMBL formát.....	22
6.4.5 PHYLIP	22
6.4.6 NEXUS	22
6.5 Spracovanie sekvenčných dát	23
6.5.1 Posudzovanie podobnosti sekvencií	23
6.5.2 Prehľadávanie databáz podľa podobnosti so známou sekvenciou.....	24
6.5.3 Vyhľadávanie otvorených čítacích rámcov.....	25
6.5.4 Vyhľadávanie cieľových miest pre reštriktázy	25
6.5.5 Návrh primérov pre daný organizmus	25
6.5.6 Mnohopočetné priradenie	26
6.5.7 Štúdium príbuzenských vzťahov biologických sekvencií	26
7 Cieľ práce	28
8 Materiál	29

8.1	Bakteriálne bunky izolované zo syrov	29
8.2	Kontrolné bakteriálne kultúry a DNA	30
8.3	Magnetické častice	30
8.4	Pomôcky a prístroje	31
8.5	Chemikálie a roztoky	31
8.5.1	Použité chemikálie	31
8.5.2	Médiá pre kultiváciu mikroorganizmov	32
8.5.3	Zásobné roztoky pre lýzu buniek	32
8.5.4	Roztoky pre izoláciu DNA pomocou fenolovej extrakcie	33
8.5.5	Roztoky pre prečistenie DNA pomocou magnetických častíc	33
8.5.6	Komponenty pre PCR	33
8.5.7	Roztoky pre gélovú elektroforézu DNA	34
8.5.8	Roztoky pre DGGE (8% polyakrylamidový gél)	34
9	Metódy	35
9.1	Izolácia DNA	35
9.1.1	Príprava hrubého lyzátu buniek z lyofilizovanej štartérovej kultúry	35
9.1.2	Príprava hrubého lyzátu buniek z kontrolných kmeňov	35
9.1.3	Izolácia DNA z hrubého lyzátu buniek fenolovou extrakciou	35
9.2	Kontrola intaktnosti izolovanej DNA	36
9.3	Stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA	36
9.4	PCR s primérmí s GC svorkou pre DGGE	36
9.4.1	Optimalizácia PCR s primérmí s GC svorkou	37
9.5	DGGE produktov PCR s primérmí s GC svorkou	37
9.5.1	Príprava aparatúry	37
9.5.1.1	Príprava tlmivého systému	37
9.5.1.2	Montáž elektroforetickej kazety	38
9.5.1.3	Príprava elektroforetických skiel pre nalievanie gélu	38
9.5.2	Príprava gradientového gélu	38
9.5.3	Príprava zaostrovacieho gélu	38
9.5.4	Priebeh DGGE analýzy	39
9.5.5	Vizualizácia a vyrezávanie bendov	39
9.6	<i>In silico</i> analýza	39
9.7	Reamplifikácia produktov PCR-DGGE	40
9.7.1	Optimalizácia reamplifikácie s primérmí bez GC svorky	40
9.7.2	Stanovenie citlivosti PCR	40
9.8	Prečistenie amplikónov pomocou magnetických častíc	40
9.9	Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR	41
9.10	Vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia amplikónov	41
9.11	Sekvenčná analýza	43
10	Výsledky	44
10.1	Izolácia DNA z bakteriálnych buniek	44
10.2	Kontrola prítomnosti izolovanej DNA	44
10.3	Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	46

10.4	PCR s primérmí s GC svorkou pre DGGE.....	47
10.4.1	Optimalizácia PCR s primérmí s GC svorkou.....	49
10.5	DGGE produktov PCR s primérmí s GC svorkou	53
10.5.1	Porovnanie polohy amplikónov.....	55
10.6	<i>In silico</i> analýza.....	56
10.6.1	<i>In silico</i> analýza pre amplikóny získané PCR s primérmí F 357 GC a R 518..	56
10.6.2	<i>In silico</i> analýza pre amplikóny získané PCR s primérmí UPF a UPR	59
10.7	Reamplifikácia produktov PCR-DGGE	66
10.7.1	Optimalizácia reamplifikácie.....	67
10.7.2	Stanovenie citlivosti reamplifikácie	72
10.8	Vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia amplikónov	73
10.8.1	HRMA amplikónov s primérmí F357 a R518	73
10.8.2	HRMA amplikónov s primérmí UPF a UPR	74
10.9	<i>In silico</i> analýza sekvencií.....	74
10.10	Porovnanie identifikácie mikroorganizmov pomocou DGGE, HRMA a sekvenčnej analýzy	78
11	Diskusia	79
12	Záver.....	82
13	Zoznam použitej literatúry.....	83
14	Zoznam použitých skratiek a symbolov	86
15	Prílohy	88
15.1	Príloha 1: Denaturačná gradientová gélová elektroforéza.....	88
15.2	Príloha 2: Krivky topenia HRMA amplikónov s primérmí F357 a R518	89
15.3	Príloha 3: Krivky topenia HRMA amplikónov s primérmí UPF a UPR	97
15.4	Príloha 4: Konferencia Chemie je život	100
15.5	Príloha 5: Konferencia CECE	104
15.6	Príloha 6: Článok v Mlékářských listech	105

1 ÚVOD

Je známe, že dodnes bola izolovaná a charakterizovaná iba malá časť existujúcich baktérií. Existuje veľký rozdiel medzi počtom v laboratóriu kultivovateľných a počtom všetkých baktérií. Jedným z dôvodov týchto rozdielov môže byť nedostatok informácií o optimálnych kultivačných podmienkach, v ktorých baktérie rastú vo svojom prirodzenom prostredí. Pokiaľ nie sú navodené vhodné podmienky ku kultivácii konkrétneho mikroorganizmu, tento na živnom médiu nevyrastie.

K pochopeniu podmienok potrebných k rozvoju mikrobiálnej diverzity sa tradičné mikrobiologické postupy zdajú byť nedostatočné. Je preto nevyhnutné obohatiť tieto tradičné postupy o nové metódy. Ako vhodná sa k identifikácii a detekcii mikroorganizmov ukázala aplikácia molekulárne biologických metód.

Dobré výsledky majú molekulárne biologické metódy pri analýze zmesných kultúr v reálnych vzorkách. Takými sú napríklad voda, pôda, či potraviny. Pomocou molekulárne biologických metód je možné presnejšie charakterizovať mikrobiálny systém. Pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy a následnej analýzy sekvencií 16S rDNA (sekvenovanie, analýza kriviek topenia s vysokým rozlíšením) je možné preukázať prítomnosť bežne kultivovateľných aj doposiaľ neznámych druhov mikroorganizmov [1].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

Aplikácia molekulárne biologických metód nachádza uplatnenie v potravinárstve. Úspešne boli použité pri analýze komplexných vzoriek mliečnych výrobkov, vrátane syrov.

3 SYRY

Syr je bielkovinový koncentrát z mlieka. Vyrába sa okyslením alebo enzýmovým zrážaním za pôsobenia mikroorganizmov. Syr vzniká odstránením vody zo zrazeniny a vplyvom prítomných mikroorganizmov v ňom dochádza k fyzikálnym a chemickým zmenám. Fyzikálne a chemické zmeny majú vplyv na chuť a tiež predlžujú trvanlivosť v porovnaní s čerstvým mliekom.

Hlavnou bielkovinou v syre je kazeín, ktorý sa zráža pri syrení.

So srvátkou zo syra odchádza podstatná časť mliečneho cukru, vitamínov rozpustných vo vode, minerálne látky a srvátkové bielkoviny. Činnosťou MO vzniká veľa metabolitov, ktoré dodávajú syrom charakteristickú chuť [2].

3.1 Syry v soľnom náleve

V krajinách juhovýchodnej Európy (Bulharsko, Grécko, Turecko), Egypte, Izraeli a na Blízkom východe sa vyrábajú syry z ovčieho, kozieho a kravského mlieka, vyznačujúce sa vysokým obsahom soli. Obsah soli je 3-9 % v hmote syra, alebo 5-18 % v náleve. Samotné zrenie prebieha v soľných roztokoch, ktoré umožňujú zrenie za prítomnosti halotolerantných a halofilných baktérií. Soľ v náleve má konzervačné účinky, hlavne proti plesniam [3].

3.1.1 Výroba syrov zrejúcich v soľnom náleve

K výrobe syrov sa používa pasterizované mlieko. To sa pasterizuje krátkotrvajúcou pasterizáciou pri teplote 75°C po dobu 30 s. Následne je mlieko zaočkované mezofilným zákvasom obsahujúcim *Lactococcus lactis* a *Lactobacillus casei*. Nakoniec je mlieko zrážané syridlom. Ak je koagulum dostatočne pevné, po krátkom uležaní syroviny sa táto nakrája na menšie kúsky a nechá sa odpočívať 10-15 minút. Syrovina sa ešte mierne lisuje tlakom a rozdrobí sa, aby srvátka rýchlejšie odtiekla. Na konci lisovania je syrovina dostatočne spojená, dá sa dobre pokrájať a následne sa solí.

Solenie sa uskutočňuje v nasýtenom roztoku soli pri 14-16 °C po dobu 15-20 hodín. Po skončení solenia je mladý syr uložený do plechových nádob. Následne je syr zaliaty soľným roztokom s koncentráciou 10-12 % NaCl. V tomto náleve prebieha vlastné zrenie syrov, ktoré trvá pri teplote 10-14 °C asi 15-30 dní. Zrelé syry majú trvanlivosť asi 10 mesiacov pri teplote 4-8 °C [3].

3.1.2 Kontaminácia

Akosť takýchto syrov je závislá na viacerých faktoroch.

Prvým z faktorov je včasné nadúvanie. To je spôsobené plynotvornými baktériami, ktoré sú koliformné. Príčinou môže byť primárna a sekundárna kontaminácia z náradia, zariadenia, alebo mlieko so zvyškami antibiotík. Antibiotiká sa používajú hlavne na liečbu mastitídy vemien dojnic. Tejto chybe sa predchádza pridávaním dusičnanov do mlieka. Ich redukciou vznikajú dusitany, ktoré pôsobia inhibične na plynotvorné baktérie.

Ďalším faktorom je vznik nežiaduceho zafarbenia. S tým býva spojená aj zmena chuti a konzistencie syru. Príčinou môže byť oneskorené zrenie spôsobené príliš nízkou teplotou. Častejšie je ale nevhodné sfarbenie spôsobené pigmentujúcimi mikrokokmi. Občas vznikajú farebné škvrny syra aj stykom s obalovým materiálom, ktorý má nevhodné vlastnosti.

Nedostatočné kysnutie syroviny sa môže prejaviť mäknutím syra až jeho hnilobou. Príčinou môže byť netesný obal, z ktorého unikne nálev a umožní prístup vzdušnému kyslíku.

Neposlednou chybou takýchto syrov je ich horká chuť. Príčinou horknutia môže byť použitie nevhodnej soli s vysokým obsahom horčička. Ostrá až pálivá chuť sa vyskytuje u starých preležaných syrov a býva s ňou spojená aj drobná a pritvrdá konzistencia syra [3].

4 MIKROFLÓRA NEZREJÚCICH SYROV

4.1 Primárne (štartérové) kultúry

Mikroflóra je nevyhnutnou zložkou pri výrobe syra. Syr nie je možné vyrobiť bez prídavku baktérií mliečného kvasenia (BMK). Ich hlavnou funkciou je premena laktózy na kyselinu mliečnu, ktorá spôsobuje biochemické zmeny počas zrenia a pomáha rozvíjať charakteristickú chuť produkovaného syra. Takéto BMK sa nazývajú primárne alebo štartérové kultúry (ŠK). Tieto kultúry sú dôkladne vyberané a úmyselne aplikované do mlieka na začiatku procesu výroby. Výnimkou sú španielske a talianske syry, kde sa ŠK nepridávajú.

Medzi hlavné štartérové kultúry patria *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Lactobacillus helveticus*. Prvé dve menované sa používajú vo väčšine syrov, ďalšie sú špecifické pre určitý typ syra. Nie všetky kultúry sa používajú súčasne.

Vedľajším produktom ŠK je aj produkcia prchavých látok ako CO₂ a citrát, ktoré majú vplyv na zmenu štruktúry syra. Proteolytický systém štartérových kultúr má vplyv na rozvoj chuti a arómy v zrejúcom syre. Najčastejšie vplyvom znižovania pH a produkciou antimikrobiálnych zlúčenín, ktoré podporujú mikrobiálnu nezávadnosť syra [4].

4.1.1 Mezofilné a termofilné kultúry

Štartérové kultúry môžeme rozdeliť podľa optimálnej teploty rastu na mezofilné alebo termofilné.

Termofilné kultúry sú charakteristické pre talianske (Mozzarella) a švajčiarske syry (Emmentaler). Pri týchto typoch syrov sa používa vyššia teplota (48-52 °C) počas prvých fáz výroby syrov.

Mezofilné kultúry sa používajú v syroch, kde teplota počas prvých fáz produkcie nepresiahne 40 °C (Cheddar, Gouda).

Oba typy kultúr sa ale často používajú (a vyskytujú) spoločne napríklad v Mozzarelle a Cheddare [4].

4.1.2 Ďalšie rozdelenie

Častejšie sa ale klasifikácia ŠK zakladá na zložitosti kultúry.

Všetky dnes známe kultúry sú nejakým spôsobom odvodené z takzvaných prirodzených ŠK. Prirodzené ŠK nemajú presne definované zloženie – je to zmes rôznych druhov a kmeňov BMK. Môžeme ich rozdeliť do 2 tried:

- prirodzené srvátkové kultúry (hlavne *Lactobacillus helveticus*)
- prirodzené mliečne kultúry (hlavne *Staphylococcus thermophilus*).

Dnes sa ale častejšie používajú zmesné štartérové kultúry. Tie sa pripravujú za presne definovaných a kontrolovaných podmienok z jednotlivých kultúr. Majú širšie uplatnenie hlavne v Európe a poskytujú výhody definovaných kmeňov.

Prirodzené ŠK z definovaných kmeňov sú zložené z malého množstva kmeňov (3-5) a v mnohých procesoch výroby syrov nahrádzajú tradičné štartérové kultúry [4].

4.2 Sekundárne (prídavné) kultúry

Vo výrobe syrov majú uplatnenie aj ďalšie mikroorganizmy, ktoré sa nazývajú sekundárne kultúry. Tie neovplyvňujú produkciu kyseliny mliečnej, ale produkujú organoleptické a biochemické zmeny v syre, alebo na ňom. Patrí sem napríklad *Propionibacterium freudenreichii*, ktoré podporujú produkciu CO₂ v ementále. Radíme sem aj *Penicillium roqueforti* (syry rokfortského typu s modrou plesňou) a *P. camemberti* (Camembert).

Sekundárne kultúry sú z taxonomického a funkčného pohľadu rozmanitejšou skupinou ako štartérové kultúry. Radíme sem stafylokoky, kvasinky a plesne. Tieto majú výrazný vplyv na zmenu organoleptických vlastností a hlavnú úlohu hrajú počas zrenia syru. Na rozdiel od štartérových kultúr sa pridávajú v menšom množstve.

Tieto kultúry sa používajú pri výrobe zrejúcich syrov. U syrov nezrejúcich nemajú uplatnenie [4].

5 IDENTIFIKÁCIA BAKTÉRIÍ V POTRAVINÁCH

Identifikácia izolovaných baktérií je dôležitou úlohou mikrobiológie. Identifikácia prítomných baktérií je veľmi dôležitá aj v analýze potravín. Využitie má hlavne v identifikácii patogénov a kontaminujúcich baktérií v potravinových maticiach.

5.1 Fenotypové metódy

V dnešnej dobe stále prevládajú fenotypové metódy identifikácie baktérií. Často je nutná kultivácia, ktorá je časovo náročným procesom. Ku kultivácii je tiež nutné poznať vhodné kultivačné podmienky, ktoré je niekedy náročné zistiť [5].

K fenotypovej identifikácii baktérií sa používajú fenotypové znaky ako napríklad morfológia buniek, kultivačné a fyziologické vlastnosti, biochemická aktivita a chemické zloženie. Fenotypové metódy sú časovo náročné a zlyhávajú napríklad pri identifikácii Gram pozitívnych (G+) baktérií. Takáto identifikácia je dostatočná pre hrubú charakteristiku, ale pre jednoznačnú charakteristiku nepostačuje [6].

5.2 Genotypové metódy

Tieto metódy sú založené na štúdiu nukleových kyselín, hlavne na rozdieloch v jednotlivých DNA sekvenciách. Genotypové metódy umožňujú rýchlu a presnú analýzu a sú schopné oddeliť veľmi príbuzné organizmy [6]. Je možné pomocou nich identifikovať rody, druhy aj kmene.

Genotypové metódy sú založené najčastejšie na amplifikácii pomocou PCR. Amplifikovaná je určitá sekvencia DNA, Pre genotypovú analýzu sa najčastejšie používa DNA (napr. 16S rDNA – gén pre rRNA). Miesto DNA je možné použiť i RNA. Po

amplifikácii je možné amplifikovanú sekvenciu podrobnejšie analyzovať sekvenovaním (viď kapitola 5.2.1). Analýza môže prebiehať aj pomocou hybridizácie so sondou. Sondy pre hybridizáciu musia byť značené [7]. Využíva sa aj analýza kriviek topenia amplikónov.

Výhodou týchto metód je, že nie je nutná kultivácia pred analýzou. Genotypové metódy sú rýchlejšie a poskytujú presnejšie informácie ako metódy fenotypové.

5.2.1 16S rDNA sekvenovanie

16S rDNA sekvenovanie je účinným nástrojom k sledovaniu fylogenetických vzťahov medzi baktériami. Používa sa tiež k identifikácii baktérií z rôznych zdrojov. V laboratóriách klinickej mikrobiológie je to bežne používaná metóda. Využíva sa hlavne pre pomaly rastúce, netypické baktérie, baktérie náročné na kultiváciu ale aj pre baktérie ťažko rozoznateľné konvenčnými metódami [5].

16S rRNA gén je gén, ktorý sa vyskytuje vo viacerých kópiách. Obsahuje ako vysoko konzervatívne, tak aj hypervariabilné oblasti (V_1 - V_9). Väčšie množstvo kópií v genóme sa prejavuje vznikom polymorfizmu a intragenómnej heterogenity, čo umožňuje charakterizáciu a subtypizáciu na molekulárnej úrovni [8].

Veľký potenciál má 16S rDNA sekvenovanie hlavne pri identifikácii G+ baktérií a koryneformných baktérií. Pre sekvenovanie je možné použiť i ďalšie gény, napríklad gény pre 23S rDNA, *rpoB* (kóduje β podjednotku RNA polymerázy), *groEL* (kóduje heat-shock protein), *gyrB* (kóduje β podjednotku DNA gyrázy), *hsp65*, *ITS* a *recA* (kóduje recA proteín). Tieto gény sa nachádzajú prakticky vo všetkých baktériách. Všetky obsahujú konzervatívne sekvencie a vďaka tomu je možné ich použiť k identifikácii a k príprave univerzálnych primérov pre PCR [9].

5.2.2 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza

Denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE) je metóda skúmajúca rôznorodosť mikroorganizmov v komplexných vzorkách. Metóda DGGE sa používa na porovnanie mikrobiálnych komunit a monitorovanie dynamiky populácií. DGGE deteguje rozdiely v sekvenciách v úsekoch produktov PCR po amplifikácii DNA s univerzálnymi priméromi, napríklad pre 16 S rRNA gén.

Častou voľbou pre fingerprinting je vďaka svojej dĺžke a rôznorodosti V3 región (variabilná oblasť v oblasti 16 S rDNA). DGGE má tiež uplatnenie pri štúdiu rozmanitosti metabolicky aktívnych populácií [10].

DGGE je založená na znižujúcej sa elektroforetickej mobilite čiastočne denaturovanej dvojvláknovej DNA (double stranded DNA – dsDNA) na polyakrylamidovom géle s lineárnym denaturačným gradientom. Gradient u DGGE je zaistený rastúcou koncentráciou denaturačného činidla – zmesi formaldehydu a močoviny. Polyakrylamidový gél umožňuje oddelenie amplikónov s dĺžkou 200–700 bp [11, 12].

DGGE tiež vyžaduje pripojenie guanín-cytosínovej svorky (GC-svorky) k amplikónu o dĺžke 30–50 nukleotidov. GC-svorky zamedzujú úplnej denaturácii produktov PCR na jednotlivé vlákna počas elektroforézy.

Táto metóda dokáže oddeliť amplikóny s rovnakou dĺžkou, ale rozdielnymi sekvenciami na základe rozdielnych elektroforetických mobilit. Molekuly s rôznymi mobilitami sa zastavia

na rôznych miestach gélu. Molekula s vyšším počtom báz adenínu a tymínu (A a T) je denaturovaná rýchlejšie, preto sa v géle pohybuje menšou rýchlosťou ako nedenaturovaná molekula [13]. Elektroforetická mobilita závisí na dĺžke produktu, nukleotidovej sekvencii, ako aj na obsahu guanínu a citozínu. Za vhodne zvolených podmienok DGGE umožňuje sekvenčne špecifickú separáciu molekúl rovnakej dĺžky líšiacich sa jedinou bázou [13, 14].

Takto získané fragmenty môžeme následne použiť k presnému určeniu sekvencie DNA a pomocou bioinformatickej analýzy k určeniu konkrétneho druhu a rodu mikroorganizmu.

5.2.3 Vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia amplikónov

Vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia (High Resolution Melting Analysis– HRMA) analyzuje amplikóny, pričom využíva vzťah medzi teplotou a obsahom G a C. Denaturácia fragmentov DNA je definovaná krivkou topenia, ktorá má typicky sigmoidný charakter. Teplota topenia je potom vypočítaná z prvej derivácie vrcholu krivky topenia. Skúmané sú produkty PCR v reálnom čase a analýza prebieha vďaka fluorescenčnému farbivu (napríklad SYBR Green), ktoré sa viaže do DNA. HRMA analýza prebieha ako následný krok po PCR a vyhodnotenie umožňuje softvér zariadenia [15].

Už Real-Time cykléry tzv. prvej generácie využívajúce fluorescenčné farbivá umožňovali analýzu kriviek topenia a určenie teploty topenia, ich presnosť a rozlíšenie neboli tak vysoké. V súčasnosti sú vyvinuté nové špecifické fluorescenčné farbivá, ktoré umožňujú lepšie rozlíšenie a neinhibujú PCR. Tieto tzv. nasýtené farbivá môžu dokonca posilniť rozdiely v krivkách topenia dané rozdielnosťou sekvencií a tým umožňujú lepšiu analýzu amplikónov.

Medzi hlavné výhody použitia HRMA je nízka cena, využitie vybavenia bežne prítomného v mnohých laboratóriách a jednoduchosť prístupu. Najväčšími výhodami sú ale možnosť prevedenia analýzy v jednom kroku a uzavretej skúmavke.

Limitáciami HRMA môže byť prípadná nízka reproducibilita v prípade veľkých rozdielov v jednotlivých vzorkách a ich koncentráciách. Taktiež nemusí odhaliť všetky variácie sekvencií v analyzovanej DNA. K problémom často dochádza pri analýze fragmentov dlhších ako 200 bp [15].

HRMA analýza má okrem jednoduchosti použitia aj veľmi široké uplatnenie. HRMA analýzou ribozomálnych, prípadne iných vysoko konzervovaných génov je možné identifikovať mikroorganizmy na úrovni druhov. Využitelné sú tiež hypervariabilné fragmenty génov a je možné využiť HRMA ku genotypizácii vírusov. Umožňuje detekciu genetických variant vedúcich k antimikrobiálnej rezistencii, prípadne ľudských genetických variant významných k citlivosti alebo liečbe infekčných chorôb. HRMA nachádza uplatnenie aj pri identifikácii potravinársky významných mikroorganizmov

HRMA nemá rozlišovaciu schopnosť tak veľkú ako multilokusová sekvenácia (multilocus sequence typing – MLST) alebo celogenómové sekvenovanie, môže ale obe metódy predchádzať ako prvý fáza genotypizácie [15].

6 CIELE A ÚLOHY BIOINFORMATIKY

Bioinformatika je pomerne mladá vedná disciplína, ktorá sa zrodila približne v 80. rokoch 20. storočia. Ako interdisciplinárna metóda zahŕňa nielen informatiku, ale aj matematiku, štatistiku a inžinierstvo. Vyvíja metódy a softvérové nástroje, ktoré slúžia k pochopeniu biologických dát. Definícií bioinformatiky ako vedy je mnoho. V širšom pojatí je bioinformatika chápaná ako veda využívajúca informatické technológie k riešeniu biologických problémov [16]. V užšom pojatí je definovaná ako aplikácia informačných technológií k pochopeniu a organizácii informácií spojených s biomolekulami. Slúži k uchovaniu, spracovaniu a analýze informácií spojených s biologickými makromolekulami. Zaoberá sa hlavne informáciami o sekvenciách a štruktúre DNA a proteínov [16, 17]. Často býva termín bioinformatika chápaný tiež ako výpočtová metóda pre komparatívnu analýzu genómových dát [18].

Biologické dáta sú v dnešnej dobe produkované závratnou rýchlosťou. Na rozdiel od minulého storočia, kedy bolo možné nukleotidové sekvencie zapísať na papier a sekvenovať bez automatických sekvenátorov, vo februári 2015 obsahovala databáza GenBank 181336445 sekvencií. Preto bolo nevyhnutné vymyslieť systém na uloženie a spracovávanie biologických dát novým spôsobom. Preto boli položené základy bioinformatiky.

Ciele bioinformatiky môžeme rozdeliť do troch skupín. V prvom rade je to jednoduchá organizácia bioinformatických dát, ktorá umožňuje prístup k už existujúcim informáciám a uverejňovanie nových dát, ak sú produkované. Druhým cieľom je rozvoj nástrojov a zdrojov, ktoré slúžia ako pomôcky pri analýze dát. Tretím cieľom je použitie týchto nástrojov a zdrojov k interpretácii výsledkov biologicky významným spôsobom [17].

Medzi základné bioinformatické úlohy môžeme zaradiť:

- zostrojenie mapy úseku DNA: je možné zistiť prítomnosť reštrikčných miest a kódujúcich oblastí, prípadne navrhnúť podľa tejto mapy priméry pre PCR
- získanie sekvenčných, štruktúrnych a literárnych údajov o konkrétnom géne, alebo proteíne
- dohľadanie homológov známych sekvencií v študovanom materiáli
- porovnanie sekvencií vzájomne príbuzných génov a následná predikcia funkčných rozdielov medzi nimi
- posúdenie miery príbuznosti génov v rámci genómovej rodiny

Bioinformatika umožňuje analyzovať DNA, RNA a proteíny. V dnešnej dobe najčastejšou je bioinformatická analýza DNA. Preto sa v tejto práci budeme zaoberať hlavne analýzou DNA.

6.1 Získavanie sekvencií DNA

Primárnymi bioinformatickými dátami sú sekvencie DNA. K získaniu sekvencie DNA vedie viacero ciest. Vôbec prvou sekvenačnou metódou bola enzýmová metóda vyvinutá v roku 1977 Frederickom Sangerom [19]. Táto používa modifikované nukleotidy pre špecifickú termináciu syntézy komplementárneho reťazca DNA. Táto metóda bola postupne vylepšovaná a namiesto rádioaktívnych značiek sa dnes používajú značky fluorescenčné. Pomocou rôznych vylepšení Sangerovej metódy boli do roku 2005 sekvenované prakticky všetky dovtedy známe gény. Kvôli obmedzeniam ako bola časová náročnosť

a komplikovanosť metódy boli vyvinuté nové metódy. Tie umožňujú rýchlejšiu sekvenáciu väčšieho množstva sekvencií súčasne, pomocou automatických sekvenátorov [20].

Medzi modernejšie metódy označované ako sekvenovanie novej generácie (next generation sequencing) radíme metódy ako 454, Illumina alebo IonTorrent. Najmodernejšou metódou v dnešnej dobe je metóda Nanopore [19].

6.1.1 454 sekvenovanie

454 sekvenovanie je metóda komercionalizovaná americkou firmou Roche. K sekvenovaniu je možné použiť rôzne materiály. Sekvenciu je možné získať nielen z genómovej DNA, ale aj z produktov PCR, umelého bakteriálneho chromozómu alebo cDNA. K analýze stačí 500 ng prečistenej DNA.

Samotné sekvenovanie je zložené z dvoch krokov. Je to emulzná PCR (emPCR) a metóda pyrosekvenovania [20]. V prvom kroku dochádza k fragmentácii DNA. K nej sa následne enzýmom ligázou pripoja adaptorové sekvencie, ktoré slúžia k pripojeniu primérov. Emulzná PCR prebieha na syntetických guľôčkach v olejovej emulzii. Na guľôčkach sú pripravené sekvencie, ku ktorým sa fragmentovaná DNA pripojí. Na jednu guľôčku sa vždy pripojí jeden fragment DNA. V olejovej emulzii sa okolo guľôčky vytvorí kvapka, v ktorej prebieha PCR. Na konci reakcie je namnožených toľko nových úsekov DNA, že ku každej guľôčke je pripojených približne 10 miliónov kópií úseku DNA [21]. Tento proces sa označuje ako tvorba knižnice. Takto upravené guľôčky sú následne umiestnené do pikolitrových komôrok spolu s enzýmami dôležitými pre chemiluminiscenčnú reakciu.

Táto metóda sa nazýva pyrosekvenovanie. Jedna doštička obsahuje až 10^6 komôrok. V každej komôrke je iný fragment DNA a preto je možné v jednom kroku získať veľké množstvo sekvencií [21]. Takto pripravená doštička sa umiestni do prístroja, ktorý riadi prítok dNTP, a po naviazaní jednotlivých dusíkatých báz dochádza k emisii svetla rovnako, ako pri klasickom pyrosekvenovaní. Svetelné signály sú zaznamenávané počítačom z každej jamky zvlášť a primárny signál je spracovaný na sekvenciu DNA [22].

6.1.2 Illumina

Metóda Solexa/Illumina je založená na mostíkovej PCR a sekvenácii syntézou. Je využiteľná v genomike, transkriptomike i epigenomike, slúži k sekvenácii veľkého množstva vzoriek súčasne.

Táto metóda je na rozdiel od 454 sekvenovania založená na sekvenovaní syntézou (sequencing by synthesis), ktorá využíva fluorescenčne značené nukleotidy. Rovnako ako v prípade 454 je prvým krokom tvorba knižnice. Molekuly DNA určené k sekvenácii sú fragmentované pomocou nebulizéru, kde dochádza k fragmentácii tlakom. K fragmentom DNA sa ligáciou pripoja presne známe adaptorové sekvencie a jednovláknové fragmenty sú pomocou nich imobilizované. Za použitia špeciálneho enzýmu dochádza k ohybu fragmentov, preto sa aplikovaná PCR nazýva tiež mostíková (bridge PCR). Pomocou PCR dochádza k vytvoreniu až 1000 identických kópií každého fragmentu. Dochádza k tvorbe dvojitých vláknových fragmentov, ktoré sú následne denaturované. Fragmenty sú potom sekvenované za použitia fluorescenčne značených nukleotidov. V každom sekvenačnom cykle je pridávaný jeden typ značených dNTP a po každom cykle dochádza k laserovému snímaniu

prítomnosti fluorescenčného farbiva. Získané dáta sú následne analyzované softwarom zariadenia [23].

6.1.3 IonTorrent

Technológia Ion Torrent™ pomocou polovodičového čipu priamo prekladá chemické informácie (dusíkaté bázy) na digitálne informácie (nuly a jednotky). Výsledkom je jednoduchá, rýchla a pomerne lacná technológia s rozsahom väčším, ako iné dostupné metódy.

Príprava knižnice pre sekvenovanie je založená na rovnakom princípe ako pri 454 sekvenovaní. K fragmentom DNA sa ligázou pripoja adaptorové sekvencie, ktoré sú v emulznej PCR namnožené na syntetických guľôčkach. Samotné pripájanie dNTP potom prebieha ako v metóde firmy Illumina sekvenovaním syntézou. Pri pripojení nového nukleotidu do vlákna DNA pomocou polymerázy sa uvoľňuje vodíkový kation. Pri tom sa zmení napätie, ktoré je zaznamenávané čipom. V prípade inkorporácie dvoch rovnakých báz je napätie dvojnásobné.

Ion Torrent technológia používa sekvenáciu syntézou. Podľa templátového vlákna je za pomoci DNA polymerázy syntetizovaný komplementárny reťazec. Zmes obsahuje všetky potrebné komponenty pre syntézu DNA okrem dNTP, tie sa pridávajú postupne. V prípade, že sa dNTP nepripojí, nedochádza k uvoľneniu H^+ . Keď sa dNTP inkorporuje do dvojzávitnice DNA, uvoľní sa H^+ . Ten spôsobí zmenu pH roztoku, ktorá je zaznamenaná senzorom. Najmenší pH meter pre pevnú fázu používaný ako detektor zaznamená túto zmenu a premení chemický signál na digitálny. Získané dáta sú následne vyhodnocované softwarom zariadenia do formy použiteľnej pre biologickú interpretáciu [24].

6.1.4 Nanopore

Najnovšou z metód sekvenovania novej generácie je metóda Nanopore vyvíjaná firmou Oxford Nanopore Technologies. Používa jednomolekulovú technológiu, ktorá umožňuje štúdium interakcie nielen medzi DNA a proteínom, ale aj medzi dvoma proteínmi [25].

Táto technológia využíva zariadenia s veľmi malými otvory s umiestnenými elektródami. Pri prechode reťazca DNA každý zo 4 nukleotidov špecifickým spôsobom ovplyvňuje prúd elektrónov medzi elektródami, a je tak možné veľmi rýchlo určiť poradie prechádzajúcich nukleotidov [26].

Táto technológia umožňuje identifikáciu nielen molekúl DNA, ale aj RNA, proteínov polymérov a makromolekúl. Využíva sa nielen v akademických výskumoch, ale aj v priemysle. Je možné aplikovať ju pri monitoringu bezpečnosti potravín či pri pochopení zdravotných dôsledkov. Uplatnenie má ako v potravinárstve, tak v monitoringu životného prostredia, ochrane zdravia aj v poľnohospodárstve [25, 26].

6.2 Uverejňovanie sekvenčných dát

V dnešnej dobe sa vyžaduje, aby autori publikujúci sekvenčné dáta tieto dáta voľne sprístupnili odbornej verejnosti. V prípade DNA sú dáta sprístupnené v 3 vzájomne previazaných primárnych databázach konzorcia *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*. Toto konzorcium spája nasledujúce databázy:

- GenBank – americká databáza genetických sekvencií Národného centra pre biotechnologické informácie (dostupná z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)
- *European Molecular Biology Laboratory Data Library* (EMBL)– európska databáza so sídlom vo Veľkej Británii (dostupná z: <http://www.ebi.ac.uk/ena>)
- a *DNA DataBank of Japan* (DDBJ) Národného inštitútu genetiky v Japonsku (dostupná z: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) [27].

Tieto databázy si vzájomne vymieňajú informácie a neustále sa zálohujú. Kvôli exponenciálnemu nárastu sekvenčných dát je údržba takýchto databáz veľmi náročná. To kladie vysoké nároky na software a hardware. Kvôli veľkému objemu dát nemôžu byť databázy moderované, čo spôsobuje nepresnosti a výskyt i chybných informácií, ktoré môže odstrániť iba autor informácie.

Primárne databázy sú prístupné prostredníctvom webových rozhraní, ale celá databáza sa dá bezplatne získať a nainštalovať bezplatne v stave zodpovedajúcom určitému dátumu. Tieto databázy je možné každé 2 mesiace aktualizovať [27].

Najväčšou nevýhodou týchto databáz je, že musia byť nutne nemoderované. Preto neexistuje žiadna záruka, že sú tieto dáta kvalitné. Akékoľvek práva k správe sekvencie má iba autor, preto nie je možné chybné sekvencie odstrániť. S týmito dátami je preto nevyhnutné zaobchádzať opatrne, hlavne ak nie sú podložené žiadnou publikáciou [16].

V primárnych databázach môžeme nájsť rôzne typy záznamov. Najbežnejšími sú:

- štandardné originálne nukleotidové sekvencie získané kvalitným sekvenovaním genómovej DNA alebo cDNA získanej reverznou transkripciou mRNA
- čiastočné sekvencie koncov (expressed sequence tags – EST) inak necharakterizovaných cDNA s nižšou kvalitou
- doposiaľ nekompletované a neanotované surové sekvencie zo sekvenovania genómov (high throughput genome sequencing – HTGS)
- referenčné sekvencie kompletovaných a viacmenej anotovaných kompletných genómov
- sekvencie anotované inými než pôvodnými autormi.

Okrem primárnych existujú ďalšie desiatky verejných databáz špecializovanej povahy. Patria sem databázy odvodené od vírov, regulačných sekvencií, repetitívnych elementov a iné.

Okrem sekvenčných databáz je možné nájsť aj databázy biologických dát nesekvencnej povahy. Patria sem údaje o expresii génov, zostihu mRNA alebo posttranslačných úpravách proteínov [16].

Databázy môžeme rozdeliť na moderované a nemoderované.

Do nemoderovaných databáz môže prispievať ktokoľvek. Jedinou podmienkou je usporiadanie dát vo správnom strojovo čitateľnom formáte a dáta musia byť vhodného typu. Správca databázy do dát nezasahuje a nekontroluje ani kvalifikáciu a kompetenciu prispievateľov. Správca môže maximálne poskytnúť prispievateľovi nástroje na kontrolu bežných chýb (prítomnosť kontaminujúcich vektorových sekvencií). Medzi takéto databázy môžeme zaradiť všetky verejne dostupné zdroje dát.

Na rozdiel od predchádzajúcich, moderované databázy prijímajú dáta podľa kritérií stanovených správcom. Podmienkou môže byť napríklad predchádzajúce zverejnenie experimentálnych výsledkov v recenzovanom časopise, alebo správca vedie vlastné recenzné

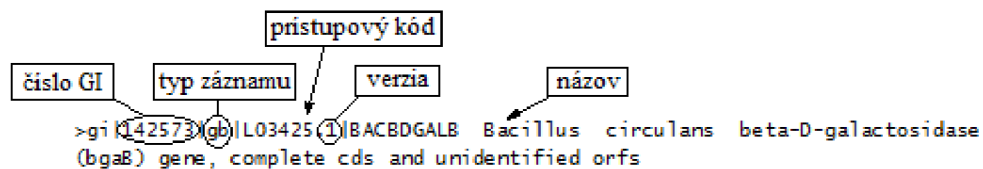
jednanie. Medzi takéto databázy patrí napríklad databáza proteínových sekvencií Swissprot [16].

6.3 Orientácia v databázach

Pohodlnú orientáciu v databázach umožňuje systém jedinečných identifikátorov, ktorý je jednotný pre databázy Veľkej trojky.

Každý záznam je po pridání do databázy označený prístupovým kódom (accession number). Ten je zložený z premenlivého počtu písmen a čísel a zostáva nezmenený po celú dobu existencie záznamu. Umožňuje tak kedykoľvek záznam vyhľadať. S prístupovým kódom získa záznam aj jedinečné číslo GI (GenBank identifier). Medzi týmito číslami nie je žiadny vzťah. Príklad identifikácie dátového záznamu je uvedený na obrázku 1.

Obrázok 1 Príklad identifikácie dátového záznamu



Autor záznamu môže svoj záznam kedykoľvek dodatočne upraviť. V databáze tak môžeme nájsť rôzne verzie danej sekvencie. Prvá verzia zaslaná do databázy sa uvádza ako rozšírenie prístupového kódu a je oddelená bodkou. Zmena verzie má vplyv na zmenu GI a prístupového kódu. Staršie verzie, aj keď v nich nie je možné vyhľadávať sa uchovávajú.

V GB môžeme získať informácie nielen o prístupovom kóde a počte verzií. Získame aj informácie o taxonomickom zaradení daného mikroorganizmu/sekvencie, o autorovu, publikácii, v ktorej bola sekvencia publikovaná a o počte referencií [16].

6.4 Používané formáty dátových súborov

Tak, ako existujú rôzne druhy databáz, existujú rôzne druhy formátov pre vkladanie sekvencií do databázy, aj pre výstupy z databáz

Pre vkladanie súboru sekvencií ako je časť populácie, fylogenetické štúdie alebo štúdie mutácií je možné zvoliť si aj iné formáty sekvencií. Súbor individuálnych sekvencií je možné vkladať aj vo formáte FASTA. Alternatívami akceptovanými softwarom Sequin sú ale aj formáty PHYLIP, MACAW a NEXUS Interleaved a Contiguous [28].

Pre výstupy z databáz sa používajú formáty FASTA, GenBank, EMBL, PIG a iné. Každá databáza z veľkej trojky ma svoj vlastný formát, existuje ale aj program na prepis z jedného formátu do iného. Ten je zdarma prístupný na stránke NCBI ako Sequence Format Converter (<http://genome.ncbi.nih.gov/tools/reformat.html>).

Vo všetkých sekvenciách sa pre znázornenie jednotlivých nukleotidov používajú znaky schválené organizáciou IUPAC [29], ktoré sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1 IUPAC kódy pre neúplné sekvencie nukleových kyselín

Symbol	Preklad	Symbol	Preklad
A	adenín	S	C alebo G
C	cytozín	W	A alebo T/U

G	guanín	B	G, T alebo C
T	thymín	D	G, A alebo T
U	uracil	H	A, C alebo T/U
Symbol	Preklad	Symbol	Preklad
R	A alebo G (purín)	V	A, C alebo G
Y	C, T alebo U (pyrimidín)	N	akákoľvek báza
K	G, T alebo U (keto)	.	medzera
M	A alebo C (amino)	-	medzera

6.4.1 Plain formát

Sekvencia získaná pomocou sekvenovania je uvedená v tomto formáte. Je to sled znakov IUPAC, bez čísel a iných popisov. Nie je teda možné pomocou Plain formátu presnejšie špecifikovať o akú sekvenciu sa jedná, ide iba o surové dáta. Takýto súbor obsahuje iba jednu sekvenciu, ostatné formáty umožňujú viac sekvencií v jednom súbore [29]. Príklad sekvencie je v Plain formáte je:

```
ACAAGATGCCATTGTCCCCGGCCTCCTGCTGCTGCTGCTCTCCGGGGCCACGGCCACCGCTGCCCTGCC
CCTGGAGGGTGGCCCCACCGGCCGAGACAGCGAGCATATGCAGGAAGCGGCAGGAATAAGGAAAAGCAGC
CTCCTGACTTTTCTCGCTTGGTGGTTTGAGTGGACCTCCAGGCCAGTGCCGGGGCCCCTCATAGGAGAGG
```

6.4.2 FASTA formát

Pre vkladanie sekvencií do databázy GenBank sa používa FASTA formát. V podstate sú to surové dáta získané po sekvenácii DNA, ktoré obsahujú navyše riadok s popisom. Prvý riadok FASTA formátu začína vždy znakom „>“, za ktorým nasleduje názov sekvencie (SeqID), jej identifikačný kód a titulok [29]. Názov sekvencie obsahuje maximálne 25 znakov bez medzier a musí byť originálny pre každú nukleotidovú sekvenciu. V priebehu zadávania sekvencie do databázy sa identifikačný kód sekvencie zamení za prístupový kód (accession number). V titulku môžeme uviesť aj ďalšie dôležité informácie. Software Sequin použije tieto informácie k vytvoreniu záznamu. Dôležité je, aby titulok tvoril jednoduchý jednoliaty text. Niektoré informácie majú obmedzené hodnoty alebo určené formáty. Napríklad pre molekulu je možné použiť iba označenie DNA alebo RNA [molekula = DNA]. Jednotlivé hodnoty a formáty sú uvedené v príručke pre Software Sequin [28]. Samotná sekvencia môže byť na rozdiel od prvého riadku rozdelená pomocou ENTER na jednotlivé riadky obsahujúce maximálne 80 znakov. V sekvencii sa používajú iba schválené znaky IUPAC, v prípade nejednoznačnosti sa používa znak N.

Existujú 3 typy sekvencií, ktoré môžu byť prezentované pomocou formátu FASTA. Sú to jednoduché súvislé sekvencie, segmentované sekvencie a sekvencie s medzerou. Jednoduchá sekvencia je v podstate sled nukleotidov v poradí, ako bola získaná po sekvenovaní. Jednoduchá sekvencia vyzerá takto:

```
>ABC-1 [organism=Saccharomyces cerevisiae][strain=ABC][clone=1]
ATTGCGTTATGGAAATTCGAAACTGCCAAATACTATGTCACCATCATTGA
```

Segmentovaná sekvencia je nesúvislá sekvencia s definovaným poradím a orientáciou. Môže to byť napríklad sekvencia obsahujúca medzi exónmi aj sprevádzajúce intróny, kde sekvencie intrónov neboli definované. Takto môže byť v jednom súbore uložených viac sekvencií, pričom informácie o organizme budú uložené iba v prvom riadku. V úplne prvom riadku pred prvou sekvenciou musí byť znak „[“, v riadku za poslednou sekvenciou musí byť uvedený znak „]“. Príklad segmentovanej sekvencie:

```
[
>m_gagei_seg1 [organism=Mansonia gagei] Mansonia gagei NADH dehydrogenase
ATGGAGCATACATATCAATATTCATGGATCATAACCGTTTGTGCCACTTCCAATTCCTATTTTA
>m_gagei_seg2
TCAAAAAGATATTAAGAGGGGTTTAGCCTATTCTACAATGTCCCAACTGGGTTATATGATGTT
GGTATGGGGTCTTATCGAGCCGCTTTATTTTCATTTGATTACTCATGCTTATTCGAAGGCATTG
>m_gagei_seg3
TCAATAAAACTATGGGGTAAAGAAGAACAAAAATAATTAACAGAAATTTTCGTTTATCTCCT
]
```

Ako novšia metóda pre zápis nesúvislej sekvencie sa používa sekvencia s medzerou. Tá vyžaduje iba identifikátory pre jednotlivé sekvencie. Medzera je prezentovaná riadkom, ktorý začína znakom „>?“, za ktorým bezprostredne nasleduje dĺžka medzery, ak je známa, alebo „unk100“ ak dĺžku nepoznáme. Známa sekvencia potom začína v nasledujúcom riadku. Tento formát sa používa s výhodou vtedy, ak poznáme dĺžku medzery, ktorú môžeme priamo špecifikovať.

```
>m_gagei [organism=Mansonia gagei] Mansonia gagei NADH dehydrogenase ...
TTGGACTCCTACTTTTTCCGACGGCAACAAAAATCTTCGTTCGTATGTGGGCTCTTCCCAATA
GTTAAGTATAGTTATGATTTTTTCGGTTCGATCTGTCCATTCAGCAAATAAATAAAAAGTTCTAT
>?200
GGTATAATAACAGTATTATTAGGGGCTACTTTAGCTCTTGC
>?unk100
TATTACGAGTTTTGGCTACAAGAAGGCTTTTTCTTATCCTCATGAATCGGATAATACTATGCT
ATGCTTATATTGGCTCTATTTACTTTTTTTGTTGGAGCCATAGCAATTCCTTTTAATCAAGAA
```

6.4.3 GenBank

Sekvencia vo formáte GenBank je základným formátom pre databázu GenBank aj DDBJ. Súbor môže na rozdiel od formátu Plain obsahovať viacero sekvencií. Každá sekvencia vo formáte GenBank začína slovom „LOCUS“ a anotačným riadkom, ktorý obsahuje základné informácie o sekvencii. V ďalšom riadku nasleduje definícia sekvencie, v nasledujúcom riadku je prístupový kód (accession number). Samotná sekvencia je zónačená slovom „ORIGIN“ a je ukončená znakom „//“. Jednotlivé znaky sekvencie sú rozdelené do skupín po 10 a oddelené medzerou. Každý riadok obsahuje 60 znakov a použitými znakmi sú znaky IUPAC [29]. Príklad takejto sekvencie je uvedený nižšie:

```
LOCUS      AB000263      368 bp      mRNA      linear      PRI 05-FEB-1999
DEFINITION Homo sapiens mRNA for prepro cortistatin like peptide, complete
```

```

                cds.
ACCESSION   AB000263
ORIGIN
    1 acaagatgcc attgtccccc ggccctcctgc tgctgctgct ctccgggggcc acggccaccg
    61 ctgccctgcc cctggagggt ggccccaccg gccgagacag cgagcatatg caggaagcgg
    121 caggaataag gaaaagcagc ctctgactt tctcgccttg gtggtttgag tggacctccc
    181 aggccagtgc cgggcccctc ataggagagg aagctcggga ggtggccagg cggcaggaag
//

```

6.4.4 EMBL formát

Základným formátom databázy EMBL je formát EMBL. Môže tiež obsahovať viacero sekvencií. Sekvencia začína znakom „ID“, za ktorým nasleduje anotačný riadok. V riadku označenom „DE“ sa vyskytujú informácie charakterizujúce sekvenciu. Začiatok sekvencie je označený znakom „SQ“, a sekvencia je rovnako ako u formátu GenBank ukončená znakom „//“. Rovnako ako u GenBank sú znaky sekvencie rozdelené do skupín po 10 a oddelené medzerou. Každý riadok obsahuje zhodne 60 znakov [29]. Sekvencia vo formáte EMBL je znázornená nižšie:

```

ID   AB000263 standard; RNA; PRI; 368 BP.
XX
AC   AB000263;
XX
DE   Homo sapiens mRNA for prepro cortistatin like peptide, complete cds.
XX
SQ   Sequence 368 BP;
    acaagatgcc attgtccccc ggccctcctgc tgctgctgct ctccgggggcc acggccaccg      60
    ctgccctgcc cctggagggt ggccccaccg gccgagacag cgagcatatg caggaagcgg      120
    caggaataag gaaaagcagc ctctgactt tctcgccttg gtggtttgag tggacctccc      180
//

```

6.4.5 PHYLIP

Mnoho programov používa formát PHYLIP ako výstup pre zoradené sekvencie jedného organizmu. V prvom riadku formátu je uvedený počet sekvencií a ich dĺžka. Nasledujúce riadky obsahujú identifikačné údaje sekvencií, ktoré sú nasledované samotnou sekvenciou [28]. Príklad formátu PHYLIP je uvedený nižšie:

```

    5      100
A-0V-1-A   TCACTCTTTG GCAACGACCC GTCGTCATAA TAAAGATAGA GGGGCAACTA
A-0V-2-A   TCACTCTTTG GCAAC---GC GTCGTCACAA TAAAGATAGA GGGGCAACTA

          AAGGAAGCTC TATTAGATAC AGGAGCAGAT GATACAGTAT TAGAAGAAAT
          AAGGAAGCTC TATTAGATAC AGGAGCAGAT GATACAGTAT TAGAAGAAAT

```

6.4.6 NEXUS

Mnoho programov ako výstup používa okrem formátu PHYLIP aj formáty NEXUS. Tie sú dva – NEXUS Interleaved a NEXUS Contiguous. V oboch prípadoch sa pre chýbajúce znaky používa znak „?“, pre medzeru sa používa označenie „-“. Prvých pár riadkov súboru obsahuje charakteristiku sekvencie, ďalšie riadky obsahujú identifikátor sekvencie spolu so samotnou sekvenciou. Oba formáty sú si veľmi podobné, líšia sa iba v maličkostiach [28]. Príklady oboch sú uvedené nižšie.

Príklad formátu NEXUS Interleaved:

```
#NEXUS

begin data;
  dimensions ntax=5 nchar=100;
  format datatype=dna missing=? gap=- interleave;
  matrix

A-0V-1-A   TCACTCTTTG GCAACGACCC GTCGTCATAA TAAAGATAGA GGGGCAACTA
A-0V-2-A   TCACTCTTTG GCAAC---GC GTCGTCACAA TAAAGATAGA GGGGCAACTA

A-0V-1-A   AAGGAAGCTC TATTAGATAC AGGAGCAGAT GATACAGTAT TAGAAGAAAT
A-0V-2-A   AAGGAAGCTC TATTAGATAC AGGAGCAGAT GATACAGTAT TAGAAGAAAT
```

Príklad formátu NEXUS Contiguous:

```
#NEXUS
BEGIN DATA;
DIMENSIONS NTAX=5 NCHAR=100;
FORMAT MISSING=? GAP=- DATATYPE=DNA ;
MATRIX

A-0V-1-A
TCACTCTTTGGCAACGACCCGTCGTCATAATAAAGATAGAGGGGCAACTAAAGGAAGCTCTA
TTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAAT

A-0V-2-A
TCACTCTTTGGCAAC---GCGTCGTCACAATAAAGATAGAGGGGCAACTAAAGGAAGCTCTA
TTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAAT
```

6.5 Spracovanie sekvenčných dát

Spracovanie sekvenčných dát umožňuje posúdiť podobné sekvencie, prehľadať databázy podľa podobnosti so známou sekvenciou i vyhľadávanie čítacích rámcov a cieľových miest pre reštrikčné enzýmy. Využíva sa tiež pri návrhu primérov a štúdiu príbuzenských vzťahov. Vďaka mnohým spôsobom využitia má široké uplatnenie a používa sa čím ďalej tým častejšie.

6.5.1 Posudzovanie podobnosti sekvencií

Posudzovanie viacerých sekvencií a zistenie miery ich vzájomnej podobnosti je v praktickej bioinformatike základným procesom.

O podobnosti má zmysel uvažovať iba v prípade, ak porovnáваме znaky, zastupujúce fyzické objekty. V prípade sekvencie nukleotidov, alebo aminokyselín je táto požiadavka splnená. Jednotlivé nukleotidy alebo aminokyseliny sú reprezentované určitým znakom (napríklad označením IUPAC). To nám umožňuje nielen kvalitatívne zistiť podobnosť, ale ju ak kvantitatívne zmerať, ak prijmeme určité predpoklady napríklad o vzájomných vzťahoch medzi jednotlivými aminokyselinami [16].

Základnou úlohou je teda porovnanie dvoch alebo viac sekvencií, ktoré nie sú úplne identické, ale sú si veľmi blízke (napríklad homologické sekvencie vzniknuté nedávnou evolučnou divergenciou). Od tohto postupu je potom možné postupovať k sekvenciám, ktoré sa líšia výraznejšie.

Modelový postup na stanovenie podobnosti vyžaduje v prvom kroku priloženie sekvencie

po celej dĺžke tak, aby identické pozície ležali pod sebou. Tento krok sa nazýva priradenie (alignment). V druhom kroku vypočítame celkovú hodnotu (score) podobnosti tak, že sčítame hodnoty podobnosti jednotlivých pozícií priradenia podľa vopred stanovených kritérií. V prípade nukleových kyselín, ktorý patrí k jednoduchším, identickej dvojici priradíme hodnotu 1 a neidentickým pozíciám hodnotu 0.

K takémuto posudzovaniu v dnešnej dobe existuje veľké množstvo algoritmov, ktoré v rôznych programoch používajú rôzne modifikácie tohto postupu [16].

V prípade rôzne dlhých, alebo výrazne odlišných sekvencií je samotné priradenie zložitým procesom. Aj napriek dostupným programom ale nie je možné všetky rozhodnutia pri analýze zveriť programu. To sa týka napríklad práce so sekvenciami, ktoré obsahujú oblasti vzdorujúce priradeniu (výrazné odlišnosti v sekvencii). Je len na nás, či sa rozhodneme o priradenie po celej dĺžke aj s prípadnými medzerami – globálne priradenie, alebo nám vyhovuje priradenie jednoznačných úsekov, a tam kde sa sekvencie rozchádzajú, priradenie ukončíme – lokálne priradenie.

Dobrou pomôckou pre určenie typu priradenia je bodový diagram – dotplot. Ten vyjadruje podobnosť dvoch sekvencií vytvorením matice. V súradnici X sa nachádza jedna, a v súradnici Y druhá sekvencia, a v prípade nálezu znakov zhodných v oboch sekvenciách ich označíme bodkou. Tak pokračujeme pre celé okno. Na konci si odfiltrujeme všetky bodky, ktoré nie sú súčasťou diagonály s dopredu určenou minimálnou hodnotou znakov [16].

Podobnosť sekvencií vidíme v diagrame ako diagonálu prerušenú v miestach nezhodnosti znakov. Takto pripravenú diagonálu následne rozširujeme po 1 zvyšku a v každom kroku vypočítame hodnotu podobnosti. Pokračujeme dotedy, kým hodnota podobnosti buď rastie, alebo klesá o menej než dopredu stanovený rozdiel.

Príkladom programu, ktorý používa tento postup je program BLAST2 dostupný online zadarmo na stránkach NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Na výber sú rôzne možnosti: priraďovanie nukleotidov, aminokyselín, alebo priraďovanie na základe preloženého nukleotidového dotazu. Stránka umožňuje i ďalšie špecializované vyhľadávanie užšie špecifikované pre konkrétne použitie.

6.5.2 Prehľadávanie databáz podľa podobnosti so známou sekvenciou

Na posudzovaní podobností jednotlivých sekvencií je založené aj prehľadávanie databáz. V tom prípade máme nejakú známu sekvenciu, a snažíme sa nájsť napríklad sekvencie najpodobnejšie tej našej.

V tomto prípade máme 2 možnosti vyhľadávania. Je možné využiť presný, alebo heuristický algoritmus [16].

Presný algoritmus prehľadáva celú databázu vyčerpávajúcim spôsobom aj v prípade, že je jasná výrazná odlišnosť prehľadávanej sekvencie od tej našej. Nevýhodou tohto vyhľadávania je nutnosť zostrojiť priradenie pre úplne všetky sekvencie v databáze. Z toho plynie výrazná pomalosť vzhľadom k objemu databáz a kvalitné softwarové i hardwarové vybavenie. Aj napriek tejto náročnosti ale existujú používané programy využívajúce presné algoritmy. Patrí sem napríklad SSEARCH, ktorý je určený k prehľadávaniu proteínových i nukleotidových databáz.

Na rozdiel od presného je heuristický algoritmus menej náročný na technické vybavenie.

Prehľadávanie je oveľa rýchlejšie a častejšie využívané i napriek možným malým nepresnostiam. Výhoda spočíva hlavne v tom, že heuristický program vylúči sekvencie, v ktorých je minimálna pravdepodobnosť dosiahnuť vysoké hodnoty podobnosti. Vynecháva zložitý krok konštrukcie a optimalizácie lokálnych priradení pre sekvencie, s nízkou pravdepodobnosťou podobnosti a môže sa venovať sekvenciám s vysokou podobnosťou. Nevýhodou heuristického algoritmu je prítomnosť falošne negatívnych, ale aj falošne pozitívnych výsledkov z dôvodu nie úplne presného prehľadávania [16].

6.5.3 Vyhľadávanie otvorených čítacích rámcov

ORF Finder je grafický analytický nástroj, ktorý vyhľadáva všetky otvorené čítacie rámce sekvencie s dopredu zadanou minimálnou veľkosťou. Možné je použiť ako sekvencie zverejnené v databáze, tak aj vlastné sekvencie. Všetky otvorené čítacie rámce sú identifikované za použitia štandardu, alebo alternatívnych genetických kódov. Získané sekvencie môžu byť uložené v rôznych formátoch a môžu tak podliehať ďalšej analýze napríklad pomocou programu BLAST [30].

6.5.4 Vyhľadávanie cieľových miest pre reštriktázy

K analýze reštrikčného profilu určitej sekvencie DNA *in silico* je možné použiť nástroj NEBcutter® [31].

Tento nástroj v sekvencii DNA vyhľadá neprekrývajúci sa otvorený čítací rámec s využitím genetického kódu *E. coli*. V databáze má prednastavené rozpoznávacie sekvencie reštrikčných enzýmov II. triedy a často používa i enzýmy III. triedy.

Program umožňuje v nami zadanej sekvencii alebo sekvencii získanej z databázy vyhľadať miesta, v ktorých enzým našu sekvenciu štiepi. Nástroj ukazuje, v ktorých miestach je možné danú sekvenciu štiepiť a udáva, ktorými enzýmami je to možné. Okrem definovaných enzýmov je možné definovať vlastné enzýmy. NEBcutter® umožňuje špecifické vyhľadávanie cieľových miest enzýmov, ktoré štiepia sekvenciu len v jednom, alebo v definovanom počte miest.

Nástroj dokáže taktiež výsledky transformovať do formy agarózovej gélovej elektroforézy štiepných produktov a tak predbežne ukázať výsledky reštrikčnej analýzy [31].

6.5.5 Návrh primérov pre daný organizmus

Výber vhodných primérov je pravdepodobne najdôležitejší faktor ovplyvňujúci PCR. K amplifikácii iba cieľových molekúl je nevyhnutné zostrojiť priméry špecifické výhradne pre cieľové molekuly. Nástroj Primer-BLAST bol vyvinutý ako pomôcka pre používateľov, ktorá slúži k výrobe primérov špecifických pre potreby konkrétneho užívateľa [32].

Proces prípravy primérov využíva dva kroky. Najskôr je to program Primer3 k návrhu primérov pre PCR a potom program BLAST a globálny algoritmus k overeniu potenciálnych cieľov. Program overí špecifitu primérov iba pre určité cieľové molekuly DNA, počet a pozíciu rovnakých báz, orientáciu primérov, dokonca dĺžku produktov PCR [32].

Spojenie oboch programov uľahčuje dizajn cieľovo špecifických primérov a umožňuje overenie ich špecifity v jednom kroku. Tento program je voľne prístupný na stránke <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

6.5.6 Mnohopočetné priradenie

Mnohopočetné priradenie slúži k potvrdeniu vzťahu medzi sekvenciami a k štúdiu príbuzenských vzťahov. Často sa používa pre porovnanie proteínových sekvencií za účelom vyhľadania konzervatívnych domén a evolučných analýz. Má však aj iné uplatnenie. Je to napríklad priradenie sekvencií DNA, ktoré slúži k stanoveniu dlhších fragmentov z primárnych sekvenčných dát. Je možné stanoviť dokonca celé genómové sekvencie. Mnohopočetné priradenie môžeme použiť aj pri predpovedaní štruktúry génov, ktorých transkript podlieha zostrihu [16].

K samotnému priradeniu môžeme použiť buď sekvencie vo formáte FASTA, vhodnejšie je ale použitie prísnejšie definovaných formátov, ktoré dokáže program pohodlnejšie spracovať. Medzi jednoduché patrí formát CLUSTAL. Líši sa iba definovanou dĺžkou názvov sekvencií a odstupom riadkov a hlavičkou. K úprave z formátu FASTA do CLUSTAL alebo iných vhodných formátov dnes existujú nástroje na konverziu.

Podmienkou k automatizácii mnohopočetného priradenia je tvorba vhodného algoritmu. Z dôvodu veľkej náročnosti na technické vybavenie nie je možné, aby algoritmy mali inú, ako heuristickú povahu. Jedným z takýchto heuristických programov je napríklad program Clustal W, ktorý je verejne dostupný na stránke <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Postup pre zostavenie mnohopočetného priradenia pomocou CLUSTAL vyžaduje v prvom kroku porovnanie všetkých možných dvojíc vložených sekvencií. Zostrojí maticu normalizovaných hodnôt vzdialenosti a pre vlastné stanovenie týchto hodnôt využíva 2 rôzne metódy. Prvá – score, je menej presná, ale rýchla, druhá je výrazne pomalšia, ale aj presnejšia. Tento krok je zo všetkých najpomalší. Na základe matice podobností prebehne zhuková analýza a dochádza k tvorbe dendrogramu, ktorý zhukuje sekvencie podľa miery podobnosti od najbližších, až po najvzdialenejšie. Nakoniec program zostrojí párové globálne priradenia sekvencií, ktoré sú v dendrograme bezprostredne vedľa seba. V ďalších krokoch potom priraduje ďalšie sekvencie podľa poradia v dendrograme [16].

Vzhľadom k tomu, že CLUSTAL umožňuje iba globálne priradenie, je vhodný len pre prácu so sekvenciami, ktoré sa dajú priradiť po celej dĺžke. Pre tie ale CLUSTAL dokáže pomerne rýchlo a jednoducho poskytnúť dôveryhodný výsledok [16].

6.5.7 Štúdium príbuzenských vzťahov biologických sekvencií

Analýzu štruktúry a funkcie génu aplikujeme hlavne na sekvencie genómovej DNA, kde analýza funkcie génu vypovedá o funkčnosti jednotlivých úsekov genómu. Dôležitá je hlavne pre overenie správnosti získaných dát, pretože čím kvalitnejšie máme dáta, tým presnejšie sú výsledky. Takto analyzovaná DNA má následne uplatnenie aj pri štúdiu príbuzenských vzťahov [16].

Štúdium príbuzenských vzťahov je v taxonómii veľmi dôležitou oblasťou. Umožňuje nám klasifikovať vzťahy medzi jednotlivými sekvenciami, určiť zmeny počas evolúcie alebo nájsť spoločného predka.

Tvorba fylogenetických stromov zo sekvencií DNA vyžaduje, aby sledované sekvencie boli homológne špeciálnym spôsobom. Vyžaduje sa, aby boli ortológne. Takéto gény sa vyskytujú v sekvencii iba raz, a u všetkých skúmaných organizmov vykonávajú tú istú funkciu. To býva problém u niektorých organizmov, u ktorých sa takéto oblasti v priebehu

vývoja duplikovali. K analýze sa v takomto prípade dajú použiť operačné taxonomické jednotky (operational taxonomic units – OTU).

Cieľom analýzy je zostrojenie genealogického stromu, alebo dendrogramu. Je to graf, ktorý spája OTU pomocou vetiev a uzlov, ktoré reprezentujú pravdepodobných spoločných predkov. Dĺžka vetiev odráža evolučnú vzdialenosť uzlov. Je to počet mutácií, ktorý oddeľuje 2 uzly [16].

Umiestnenie spoločného predpokladaného predka všetkých OTU (koreňa stromu) môže byť prakticky dosť náročné. Jednoduchšie je pracovať s dátami zapísanými pomocou štandardnej sady znakov v tzv. newickovskom formáte. Prácu s týmto formátom umožňuje väčšina fylogenetických programov.

Najjednoduchšou metódou zostrojenia dendrogramu z matice vzdialenosti podľa algoritmu UPGMA. V prvom kroku zostrojíme maticu vzdialenosti porovnaním všetkých dvojíc sekvencií. V matici určíme najnižšiu hodnotu – dvojicu, ktorá si je najbližšia. Tieto dve sekvencie spojíme pomocou dvoch vetiev a uzla – predpokladaného spoločného predka. V matici nahradíme dvojicu riadkov a stĺpcov prepojeného páru iba jedným riadkom a stĺpcom. Hodnoty vypočítame ako aritmetický priemer oboch hodnôt. Tak získame maticu o 1 riadok a stĺpec menšiu a postup opakujeme, až kým nespojíme všetky OTU [16].

7 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo:

- 1) previesť analýzu komplexných vzoriek pokazených syrov a ich nálevov s využitím metódy DGGE
- 2) ako kontrolu použiť neinfikované syry a nálevy a z nich vykultivované bakteriálne bunky
- 3) pripraviť amplikóny pre ich sekvenáciu
- 4) otestovať metódu PCR v reálnom čase s vysokorozlišovacou analýzou kriviek topenia amplikónov

8 MATERIÁL

8.1 Bakteriálne bunky izolované zo syrov

K izolácii DNA boli použité sedimenty buniek z infikovaných syrov a nálevov izolovaných firmou MILCOM. Tie boli následne použité ako referenčné kmene pre DGGE. DNA izolovaná z kontrolných syrov a nálevov a z kontaminovaných syrov a nálevov bola získaná od Ing. Tomáša Mohelského [33] z FCH, VUT v Brne.

Informácie o sedimentoch sú uvedené v tabuľke 2 a informácie o získanej DNA v tabuľke 3.

Tabuľka 2 Charakteristika vzoriek bakteriálnych kultúr

č.	označenie	kultúra
M 1	A9	<i>Bacillus</i> sp.
M 2	A12	<i>Bacillus licheniformis</i>
M 3	A25	<i>Bacillus</i> sp.
M 4	N7	<i>Kocuria varians</i>
M 5	N8	<i>Micrococcus luteus</i>
M 6	N11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
M 7	N26	<i>Serratia marcescens</i>
M 8	N 34	<i>Klebsiella oxytoca</i>
M 9	N35	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
M 10	N 48	<i>Staphylococcus warneri</i>
M 11	5T	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
M 12	11T	<i>Pseudomonas</i> sp.
M 13	2FB	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp. <i>cloacae</i>
M 14	CCDM 182	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M 15	CCDM 208	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
M 16	922	(16z) <i>Enterococcus faecium</i>
M 17	14CHF	<i>Escherichia coli</i>
M 18	10697-RCM-4P	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
M 19	10769-1	<i>Bacillus</i> sp.
M 20	10772-1	<i>Bacillus</i> sp.
M 21	MSA 17	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ssp. <i>saprophyticus</i>
M 22	MYP10C	<i>Bacillus cereus</i>
M 23	RCM17R	<i>Aeromonas</i> sp.
M 24	CCDM 154	<i>Lactobacillus fermentum</i>
M 25	S31	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , ssp. <i>cremoris</i> , ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>

Tabuľka 3 Charakteristika vzoriek DNA zo syrov a nálevov

č.	označenie	DNA	koncentrácia [ng/μl]	A260/280
KL 1	nálev 1	kontrola	74	1,28
KL 2	nálev 2		132	1,25
KL 3	nálev 3		84	1,28
L 1	nálev 1	infikované	122	1,54
L 2	nálev 2		138	1,62
L 3	nálev 3		196	1,68
L 4	nálev 4		194	1,72
L 5	nálev 5		125	1,55
L 6	nálev 6		120	1,57
KS 1	syr 1	kontrola	128	1,32
KS 2	syr 2		119	1,12
KS 3	syr 3		144	1,29
S 1	syr 1	infikované	126	1,02
S 2	syr 2		148	1,12
S 3	syr 3		140	1,07
S 4	syr 4		150	1,16
S 5	syr 5		117	1,15
S 6	syr 6		100	1,12

8.2 Kontrolné bakteriálne kultúry a DNA

Kontrolná DNA bola izolovaná z bakteriálnych buniek *Lactobacillus gasseri* K7 získaného zo zbierky mikroorganizmov, Chair of Dairy Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovinsko. Lyofilizovaná zmesná laktobacilová kultúra M25, používaná ako štartérová kultúra bola získaná od firmy Milcom.

8.3 Magnetické častice

Magnetické nosiče Fkol 135 ox P(GMA) boli pripravené Ing. D. Horákom, CSc. Z Ústavu makromolekulárnej chémie Akadémie vied ČR v Prahe.

Charakteristika magnetických častíc, typ polyméru, obsah Fe v jadre, priemer jadra a index polydispersity (pomer hmotnosti a počtu častíc o priemernej veľkosti – PDI) [34] sú uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 4 Charakteristika magnetických častíc

častice	polymér	Fe [%hm]	–COOH [mM/g]	priemer častice [μm]	PDI
Fkol 135 ox	P(GMA)	11,00	2,61	1,16	1,04

8.4 Pomôcky a prístroje

- Analytické váhy Kern ew (Novot', SK)
- Centrifúga MINI Spin Plus 14 500 min⁻¹, 14 000× g (Eppendorf, Nemecko)
- Digitálny fotoaparát Canon PowerShot A470 (Canon inc., USA)
- Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, California, USA)
- Elektroforetická vana Owl B3 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo Scientific Owl Separation Systems, USA)
- Elektronické pipety pre rôzne objemy (Eppendorf, Nemecko)
- INGENYphorU-2 zostava pre DGGE analýzu (Ingeny, Holandsko)
- Laboratórne váhy B0430 (Ohaus, USA)
- Magnetický separátor Dynal (Oslo, Norsko)
- Mikrovlnná rúra EMW 5 020 (SENCOR, ČR)
- Minicycler PTC-100 (MJ Research, Watertown, USA)
- NanoDrop 2 000, UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Termostat – Mini incubator (Labnet, USA)
- UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramount, USA)
- Zdroj elektrického prúdu Enduro Power Supplies (Labnet, USA)

8.5 Chemikálie a roztoky

Chemikálie a roztoky boli pripravené podľa publikácie doc. Španovej a doc. Ritticha [35].

8.5.1 Použité chemikálie

- 10×konc. LA PCR reakčný pufoer kompletný (Top-Bio, Praha, ČR)
- Agaróza pre elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Akrylamid (Serva, Heidelberg, SRN)
- Bisakrylamid (BIO-RAD, Richmond, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA štandard Malamité (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Etanol, 96 % (Penta, Chrudim, ČR)
- Etídiumbromid 50 ng/ml (Sigma, St. Louis, USA)
- Fenol (Sigma, St. Louis, USA)
- Formamid (Sigma, St. Louis, USA)
- Chlorid sodný (Sigma, St. Louis, USA)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA)
- LA DNA polymeráza, 5 U/μl (Top-Bio, Praha, ČR)
- Lyzozým p. a. (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Ľadová kyselina octová (Penta, Chrudim, ČR)
- Močovina (Sigma, St. Louis, USA)
- Na₂EDTA (Sigma, St. Louis, USA)
- Nanášací pufoer Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)

- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Peroxosíran amónny (Sigma, St. Louis, USA)
- Polyetylén glykol (PEG) 6 000, (Sigma, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- RNáza 10 mg/ml (Top-Bio, Praha, ČR)
- Sacharóza (Sigma, St. Louis, USA)
- Taq DNA polymeráza 1.1, 1 U/μl (Top-Bio, Praha, ČR)
- Tekuté MRS médium (de Man, Rogosa a Sharpe), (Oxford, Veľká Británia)
- Tetrametyletyléndiamín – TEMED (Amresco, Ohio, USA)
- Tris (trishydroxymetylaminometán) (Serva, Heidelberg, Nemecko)
- Tris-HCl (Penta, Chrudim, ČR)
- Zmes dNTP, 10 mM (Top-Bio, Praha, ČR)

8.5.2 Médiá pre kultiváciu mikroorganizmov

- Tekuté MRS médium
- Pevné MRS médium

8.5.3 Zásobné roztoky pre lýzu buniek

- Destilovaná voda
- Kyselina etyléndiamíntetraoctová, 0,5 M, pH 8,0
186,1 g EDTA bolo rozpustených v 800 ml destilovanej vody za súčasného zahrievania na 68 °C. pH bolo upravené na 8,0. Roztok bol doplnený na objem 1 l destilovanou vodou a sterilizovaný v autokláve (121°C/20 min).
- Tris-HCl, 1 M, pH 7,8
12,1 g Tris-bázy bol rozpustených v 70 ml destilovanej vody. pH bolo upravené na 7,8. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na 100 ml a sterilizovaný v autokláve (121°C/20 min).
- Modifikovaný roztok A (15 mM EDTA)
Sterilne bol zmiešaný 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) s 3 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 96 ml destilovanej vody.
- Lyzačný roztok B
K roztoku A bol pridaný lyzozým s výslednou koncentráciou 10 mg/ml.
- Dodecylsulfát sodný, 20%
20 g SDS bolo rozpustených v 80 ml sterilnej destilovanej vody. pH bolo upravené na 7,8 a roztok bol doplnený destilovanou vodou do 100 ml.
- Proteináza K p. a. (100 μg/ml)
1 mg proteinázy K bol rozpustený v 10 ml destilovanej vody, rozdelený do alikvotných častí a uchovávaný pri teplote -20°C.
- RNáza A (100 μg/ml)
RNáza bez DNáz z bovinného pankreasu, v koncentrácii 10 mg/ml, ~ 900 U/ml rozpustená v 10 mM Tris (pH 7,8), 15 mM NaCl.

8.5.4 Roztoky pre izoláciu DNA pomocou fenolovej extrakcie

- Fenol
Destilovaný fenol nasýtený v TE pufre, pH 7,8.
- CIZ
Zmes chloroformu a izoamylalkoholu v pomere 24:1.
- Octan sodný, 3 M (pH 5,2)
V 800 ml destilovanej vody bolo rozpustených 408,1 g octanu sodného. Kyselinou octovou bolo upravené pH na hodnotu 5,2. Roztok bol doplnený destilovanou vodou do 1 000 ml, rozdelený do alikvotných podielov a sterilizovaný v autokláve (121 °C, 20 minút).
- Etanol, 96 %
- Tris-EDTA pufor (TE pufor), pH 7,8
Roztok bol pripravený sterilne zo zásobných roztokov 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Bol zmiešaný 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl EDTA (pH 8,0) a 98 ml sterilnej destilovanej vody.

8.5.5 Roztoky pre prečistenie DNA pomocou magnetických častíc

- Polyetylén glykol 6 000, 40%
40 g PEG 6000 bolo rozpustených v 60 ml sterilnej destilovanej vody. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na 100 ml a sterilizovaný v autokláve (121°C/20 min).
- Chlorid sodný, 5 M
58,4 g NaCl bolo rozpustených v 150 ml destilovanej vody. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na 200 ml a sterilizovaný v autokláve (121°C/20 min).
- Etanol, 70%
Bol pripravený riedením z 96 % etanolu.
- Tris-EDTA pufor (TE pufor), pH 7,8
Roztok bol pripravený sterilne zo zásobných roztokov 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Bol zmiešaný 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl EDTA (pH 8,0) a 98 ml sterilnej destilovanej vody.

8.5.6 Komponenty pre PCR

- PCR voda
- LA pufor kompletný
zloženie: 500 mM Tris-HCl, pH 9,3 (pri 25 °C), 150 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 22,5 mM MgCl₂
- 2× qPCR SYTO-9 pufor
zloženie: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonálna protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditíva
- Zmes dNTP, 10 mM
- LA DNA polymeráza, 5 U/µl
- Priméry: F 357, F 357 GC, R 518 [36], UPF, UPR [37]

8.5.7 Roztoky pre gélovú elektroforézu DNA

- Agaróza pre elektroforézu
- 5× Tris-borát-EDTA pufor (TBE pufor)
54 g Tris-bázy a 27,5 g kyseliny boritej bolo rozpustených v 600 ml destilovanej vody. Následne bolo pridaných 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplnené destilovanou vodou do 1 l. Nariedenie roztoku pred použitím 10× na výslednú koncentráciu 0,5×TBE.
- Roztok etídiumbromidu
100 µl roztoku etídiumbromidu (50 ng/ml) bolo zriedených 500 ml destilovanej vody.
- DNA štandard Malamité
100 bp rebríček obsahujúci DNA fragmenty o veľkosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000 a 1 200 bp.
- Nanášací pufor Yellow load
6× koncentrovaný, roztok s vysokou hustotou a s obsahom farbiva Oranž G.

8.5.8 Roztoky pre DGGE (8% polyakrylamidový gél)

- 50× Tris-acetát-EDTA (TAE) pufor
Zmes 242 g 2 M Tris-bázy, 136 g octanu sodného (trihydrátu) a 18,5 g Na₂EDTA bola doplnená destilovanou vodou do 1 l [33].
- 0,5× TAE pufor
10 ml 50× TAE bolo doplnených do 1 l destilovanej vody.
- 20% peroxosíran amónny (APS)
200 mg peroxosíranu amónneho bolo rozpustených v 1 ml destilovanej vody. Roztok pripraviť tesne pred použitím. Roztok bol uchovávaný pri -20 °C.
- 40% akrylamid/bisakrylamid (37,5:1)
19 g akrylamidu a 1 g bisakrylamidu bolo rozpustených v 30 ml destilovanej vody. Roztok bol doplnený do 50 ml destilovanej vody. Roztok bol uchovávaný v tme pri 4 °C.
- 0% denaturant
7,5 ml 40% akrylamidu/bisakrylamidu a 500 µl 50× TAE pufu bolo doplnených do 50 ml destilovanej vody. Roztok bol uchovávaný v tme pri 4 °C.
- 100% denaturant
21 g močoviny, 20 ml formamidu, 7,5 ml 40% akrylamidu/bisakrylamidu a 500 µl 50× TAE pufu bolo doplnených do 50 ml destilovanej vody. Močovinu je nutné pred použitím rozpustiť pri 37 °C. Roztok bol uchovávaný v tme pri 4 °C.
- Nanášací pufor – 5× Brómfenolová modrá
0,25 g brómfenolovej modrej, 40 g sacharózy, 5 ml 20% SDS a 2 ml 0,5 M EDTA boli doplnené do 100 ml destilovanej vody. Pufor bol uchovávaný v chladničke.

9 METÓDY

Postup práce bol prevzatý zo skript doc. Španovej a doc. Ritticha [35], s čiastočnými úpravami podľa Ing. Štepanky Trachtovej, Ph.D.

9.1 Izolácia DNA

9.1.1 Príprava hrubého lyzátu buniek z lyofilizovanej štartérovej kultúry

- bol navážený 1 g lyofilizovanej laktobacilovej kultúry
- kultúra bola rozpustená v 4 ml sterilnej vody a suspenzia bola centrifugovaná pri 10 000 ot./3 min
- supernatant bol odliaty, sediment bol resuspendovaný v 1 ml sterilnej vody a suspenzia bola centrifugovaná pri 10 000 ot./3 min
- supernatant bol odliaty, sediment bol resuspendovaný v 1 ml modifikovaného roztoku A a suspenzia bola centrifugovaná pri 10 000 ot./3 min
- supernatant bol odliaty, k sedimentu bolo pridaných 500 µl modifikovaného lyzačného roztoku B (lyzozým 10 mg/ml), zmes bola resuspendovaná a inkubovaná pri laboratórnej teplote 1 hodinu
- po inkubácii bolo ku vzorku pridaných 75 µl 20% SDS a 10 µl proteínázy K (100 µg/ml)
- vzorky boli inkubované v termostate pri teplote 55 °C do druhého dňa
- po inkubácii bolo ku vzorku pridaných 10 µl RNázy (100 µg/ml) a vzorky boli inkubované pri 37 °C/30 min.

9.1.2 Príprava hrubého lyzátu buniek z kontrolných kmeňov

- 1 ml kultúry v tekutom živnom médiu bol sцентрифugovaný pri 15 000 ot./3 min
- supernatant bol odliaty a k sedimentu bol pridaný 1 ml roztoku A
- zmes bola resuspendovaná a centrifugovaná pri 15 000 ot./3 min
- supernatant bol odliaty, k sedimentu bol pridaný 1 ml lyzačného roztoku B, zmes bola resuspendovaná a inkubovaná pri laboratórnej teplote 1 hodinu
- po inkubácii bolo ku vzorku pridaných 50 µl 20% SDS a 5 µl proteínázy K (100 µg/ml)
- vzorky boli inkubované v termostate pri teplote 55 °C do druhého dňa

9.1.3 Izolácia DNA z hrubého lyzátu buniek fenolovou extrakciou

- k 500 µl hrubého lyzátu bolo pridaných 500 µl fenolu
- zmes bola kývavým pohybom premiešavaná 4 minúty a centrifugovaná pri 15 000 ot./3 min
- následne bola odobraná horná vodná fáza do čistej eppendorfky
- k vodnej fáze bolo pridaných 700 µl CIZ a zmes bola kývavým pohybom premiešavaná 4 minúty
- zmes bola centrifugovaná pri 15 000 ot./3 min
- vodná fáza bola odobraná do čistej eppendorfky
- ku vzorke bola pridaná 1/20 objemu 3 M octanu sodného a zmes bola premiešaná
- ku vzorke bolo pridaných 800 µl vymrazeného 96% etanolu a zmes bola

premiešaná

- DNA bola vyvrážaná 15 min pri -20 C
- zmes bola centrifugovaná pri 15 000 ot/3 min v chladenej centrifúge
- supernatant bol zliaty a skúmavky so sedimentom boli ponechané v horizontálnej polohe a sušené pri laboratórnej teplote do vyparenia etanolu
- DNA bola rozpustená do 50 μl TE pufru cez noc

9.2 Kontrola intaktnosti izolovanej DNA

- bol pripravený 0,8% agarózový gél (0,8 g agarózy, 100 ml $0,5\times$ TBE pufru), ktorý následne tuhol 30 minút
- bolo zmiešaných 10 μl DNA s 2 μl nanášacieho pufru a zmes bola nanesená na gél
- vanička s gélom bola prevrstvená $0,5\times$ TBE pufrom a bol zapnutý zdroj napätia (80 V/1 hodinu)
- po skončení elektroforézy bol gél ponechaný v etídiumbromide (0,5 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 30 minút
- gél bol opláchnutý v destilovanej vode, umiestnený na transiluminátor a vyfotografovaný

9.3 Stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky za využitia NanoDropu 2000. Objem nanášaných vzoriek bol 2 μl . Ako referenčná vzorka bol použitý TE pufor. Absorbancia bola meraná v rozmedzí vlnových dĺžok 230 až 320 nm. Koncentrácia DNA bola stanovená z hodnoty absorbancie pri 260 nm.

9.4 PCR s primérmí s GC svorkou pre DGGE

Zmes PCR komponent (Master-mix) pre PCR bola pripravená podľa tabuľky 5 [33].

Tabuľka 5 Zloženie zmesi komponent pre PCR s primérmí s GC svorkou (50 μl)

č.	komponent	objem [μl]
1.	voda pre PCR	24,6
2.	LA pufor kompletný	5
3.	zmes dNTP (10 mM)	4
4.	primér F357 GC (10 pmol/ μl)	2
5.	primér R518 (10 pmol/ μl)	2
6.	DMSO enhancer	2
7.	MgCl ₂ (25 mM)	8
8.	LA polymeráza Top Bio (5U/ μl)	0,4
9.	DNA matrica(100 ng/ μl)	2

Po pridaní každej zložky bola zmes dobre premiešaná. Výsledný objem zmesi pre PCR bol 50 μl . Rovnakým spôsobom bola pripravená zmes pre PCR s primérmí bez GC svorky. Sekvencie použitých primérov sú uvedené v tabuľke 6 [36].

Tabuľka 6 Priméry pre PCR

primér	sekvencia 5'–3'	veľkosť produktu PCR (bp)
F 357	CCTACGGGAGGCAGCAG	193
R 518	ATTACCGCGGCTGCTGG	
F 357 GC	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGG GGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCA GCAG	233
R 518	ATTACCGCGGCTGCTGG	

Ako DNA matrica bola použitá purifikovaná DNA zriedená na koncentráciu 100 ng/μl. Pre amplifikáciu bola použitá LA polymeráza. U negatívnej kontroly bolo namiesto matrice DNA pridané ekvivalentné množstvo vody. U pozitívnej kontroly bola ako matrica DNA použitá DNA zo zbierkového kmeňa príslušného rodu nariadená na 100 ng/μl. PCR zmes bola následne vložená do cykléru a bol spustený príslušný program [33] uvedený v tabuľke 7.

Tabuľka 7 Programy pre PCR s primérmí s GC svorkou

krok cyklu		teplota /čas
1.	denaturácia DNA pred prvým cyklom	95°C/5 min
2.	Denaturácia	95°C/60 s
3.	pripojenie primérov	50°C/45 s
4.	syntéza DNA	72°C/60 s
5.	dosyntetizovanie reťazca v poslednom kroku	72°C/10 min
	počet cyklov	30

9.4.1 Optimalizácia PCR s primérmí s GC svorkou

Z dôvodu veľkého množstva nešpecifických bendov bola optimalizovaná reakčná zmes pre PCR s primérmí s GC svorkou. V PCR s primérmí s GC svorkou bolo testované rôzne množstvo Mg²⁺ iónov, množstvo dNTP, primérov a DNA polymerázy. Zloženie jednotlivých zmesí pre PCR je uvedené v tabuľke 16 a 17. Tabuľky sú z dôvodu prehľadnosti umiestnené pri výsledkoch. Za optimálne bolo zvolené zloženie zmesi pre PCR s primérmí s GC svorkou uvedené v tabuľke 5.

9.5 DGGE produktov PCR s primérmí s GC svorkou

9.5.1 Príprava aparatury

Aparatúra bola zostavená podľa návodu k prístroju [38] s úpravami podľa [33].

9.5.1.1 Príprava tlmivého systému

- bolo skontrolované uzavretie výpustného ventilu

- nádrž prístroja bola po značku naplnená pufrom (17 litrov)
- systém bol zapojený do elektriny a bolo zapnuté napájanie
- stlačením SET a pomocou šípok bola nastavená teplota 60°C
- nádrž bola uzatvorená, aby sa predišlo vyparovaniu

9.5.1.2 Montáž elektroforetickej kazety

- kazeta bola umiestnená na vodorovnú plochu
- pozitívna koncovka (červená) bola napravo, negatívna (čierna) bola naľavo
- nylónové skrutky boli mierne zatiahnuté
- do kazety bol umiestnený U-akrylový nástavec pre rovnomerné rozloženie tlaku na sklo

9.5.1.3 Príprava elektroforetických skiel pre nalievanie gélu

- obe sklenené dosky a U-nástavec boli očistené 96% etanolom
- U-nástavec bol umiestnený na sklenenú dosku s tenším zárezom a naň bolo položené sklo s hrubším zárezom tak, aby v oblasti zárezu bola strana U-nástavca so širším madlom
- zostava skiel s U-nástavcom bola vložená do elektroforetickej kazety
- medzi sklá bol zavedený hrebienok
- všetky skrutky boli utiahnuté a kazeta bola pripravená na naliatie gélu

9.5.2 Príprava gradientového gélu

Bol pripravený gradientový gél v rozsahu 40 – 60 % (1)

- do dvoch skúmaviek (high concentration – HC a low concentration – LC) bola pripravená zmes denaturantov podľa tabuľky 8.

Tabuľka 8 Príprava gradientového gélu 40-60%

označenie	gradient	denaturant [ml]	
		0%	100%
LC	40%	20	13
HC	60%	13	20

- do každej skúmavky bolo pridaných 180 µl 20% APS a 6 µl TEMED
- do zmesného separátoru s označením HC bol naliaty roztok HC
- zmesný ventil bol pootočený k odvodu a bol zase uzatvorený
- do druhej časti separátoru bol naliaty roztok LC
- následne bol otvorený ventil a spustená pumpa
- do aparatury bol hadičkou privedený gél
- gél tuhol 1 hodinu.

9.5.3 Príprava zaostrovacieho gélu

Po zatuhnutí gradientového gélu bol pripravený zaostrovací gél. Bolo zmiešaných 10 ml 0% denaturantu, 150 µl 20% APS a 7µl TEMED. Roztok bol napipetovaný na gradientový gél a tuhol 10 minút.

9.5.4 Priebeh DGGE analýzy

- pred nanosením vzoriek boli komôrky gélu vypláchnuté TAE pufrom pre odstránenie vyzrážanej močoviny
- na gél bola nanášaná zmes 10 µl produktu PCR a 2 µl nanášacieho pufu
- pre prechod vzoriek zaostrovacím gélom bol spustený zdroj na 100 V po dobu 10 min
- následne prebiehala DGGE 22 hodín pri 60 V.

9.5.5 Vizualizácia a vyrezávanie bendov

- gél bol umiestnený do roztoku etídiumbromidu a bol farbený 1 hodinu
- gél bol prenesený na transiluminátor a vyfotografovaný
- označené bendy boli vyrezané a eluované v 50 µl TE pufu

9.6 *In silico* analýza

Pomocou bioinformatickej analýzy boli získané sekvencie DNA, ktoré odpovedali produktom PCR jednotlivých primérov. K získaniu sekvencií boli použité databáza GenBank, programy NEBcutter® a BLAST.

V prvom kroku boli v databáze GenBank vyhľadane 16S rDNA sekvencie bakteriálnej DNA jednotlivých bakteriálnych druhov (M1 – M25).

- na stránke <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> bola do vyhľadávacieho poľa oblasti Nucleotide vložený názov bakteriálneho druhu
- bola vyhľadaná zodpovedajúca sekvencia pre 16S rDNA

Pomocou programu NEBcutter® boli v druhom kroku vyhľadane oblasti vymedzené primérmí [36, 37].

- sekvencia pre 16S rDNA, alebo GI číslo bolo vložené do príslušného poľa na stránke <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
- všetky nastavenia okrem nastavenia použitých enzýmov zostali nezmenené
- v nastavení použitých enzýmov bolo pole „NEB enzymes“ nahradené „Only defined oligonucleotide sequences“
- boli definované použité oligonukleotidy (F a R sekvencie primérov)
- zadanie bolo potvrdené a boli vyhľadane miesta, kde je sekvencia vymedzená primérmí
- bola vybraná sekvencia, pozostávajúca iba z oblasti vymedzenej primérmí

Tieto sekvencie boli analyzované v programe BLAST a bolo zistené, či sú jednotlivé sekvencie špecifické iba pre konkrétny druh, alebo pre rôzne druhy.

- k analýze bol použitý program Nucleotide BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
- do vyhľadávacieho poľa bola vložená sekvencia ohraničená primérmí
- pri nezmenených nastaveniach bolo potvrdené vyhľadávanie
- výsledky boli porovnané

9.7 Reamplifikácia produktov PCR-DGGE

Zmes PCR komponentov pre PCR bola pripravená podľa tabuľky 5 [33].

Po pridaní každej zložky bola zmes dobre premiešaná. Výsledný objem zmesi pre PCR bol 25 μ l. Sekvencie použitých primérov F 357 a R 518 bez CG svorky sú uvedené v tabuľke 6 [36].

Ako DNA matrica boli použité amplikóny vyrezané z gélu. Pre amplifikáciu bola použitá LA polymeráza. U negatívnej kontroly bolo namiesto matrice DNA pridané ekvivalentné množstvo vody. U pozitívnej kontroly bola ako matrica použitá DNA zo zbierkového kmeňa *Lactobacillus gasseri* K7 nariadená na 100 ng/ μ l. PCR zmes bola následne vložená do cykléru a bol spustený príslušný program [33] uvedený v tabuľke 9. Zloženie jednotlivých zmesí pre PCR je uvedené v tabuľkách 20, 21 a 22. Tabuľky sú z dôvodu prehľadnosti umiestnené pri výsledkoch.

Tabuľka 9 Zloženie zmesi pre reamplifikáciu produktov PCR-DGGE (25 μ l)

č.	komponent	objem [μ l]
1.	voda pre PCR	13,4
2.	LA pufor kompletný	2,5
3.	zmes dNTP (10 mM)	0,5
4.	primér F357 (10 pmol/ μ l)	0,5
5.	primér R518 (10 pmol/ μ l)	0,5
6.	DMSO enhancer	1
7.	MgCl ₂ (25 mM)	6
8.	LA polymeráza Top Bio (5U/ μ l)	0,1
9.	DNA matrica (100 ng/ μ l)	0,5

9.7.1 Optimalizácia reamplifikácie s priméromi bez GC svorky

Z dôvodu tvorby nešpecifických produktov PCR hlavne po amplifikácii DNA izolovanej zo syrov bola optimalizovaná PCR s priméromi bez GC svorky. V PCR bolo testované rôzne množstvo dNTP, primérov, DNA polymerázy, Mg²⁺ iónov a množstvo pridanej templátovej DNA. Na viac bolo testované množstvo cyklov pre amplifikáciu.

Za optimálne bolo zvolené zloženie zmesi pre PCR s priméromi bez GC svorky uvedené v tabuľke 9.

9.7.2 Stanovenie citlivosti PCR

K stanoveniu citlivosti bola použitá DNA produktov PCR bez GC svorky o koncentrácii 100 ng – 100 fg pripravená desiatkovým riedením DNA z čistej bakteriálnej kultúry rodu *Lactobacillus gasseri* K7.

9.8 Prečistenie amplikónov pomocou magnetických častíc

- k prečisteniu DNA bol použitý magnetický nosič Fkol 135 ox (tabuľka 4) o koncentrácii 2 mg/ml v prostredí 16% polyetylén glykolu (PEG) a 2 M NaCl
- zmes pripravená podľa tabuľky 10 bola inkubovaná 15 minút pri laboratórnej teplote

Tabuľka 10 Zloženie zmesi na prečistenie amplikónov pomocou magnetického nosiča

č.	komponent	objem [μ l]
1.	PCR voda	57
2.	5 M NaCl	100
3	amplikón	18
4	40% PEG 6 000	100
5	F kol 135 ox (2 mg/ml)	25

- častice s naviazanou DNA boli odseparované pomocou magnetického separátora pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút
- supernatant bol odpipetovaný a magnet bol odstránený z magnetického pásu
- skúmavka s magnetickým nosičom a naviazanou DNA bola premytá 300 μ l 70 % etanolu
- častice s naviazanou DNA boli odseparované pomocou magnetického separátora pri laboratórnej teplote po dobu 1 minúty
- supernatant bol odpipetovaný a skúmavky boli ponechané v horizontálnej polohe a sušené pri laboratórnej teplote do vypychania etanolu
- DNA bola eluovaná do 50 μ l TE pufru s pH 7,8 pri laboratórnej teplote 1 hodinu
- častice boli odseparované pomocou magnetického separátora pri laboratórnej teplote po dobu 2 minút
- pomocou nanospektrofotometra bola zmeraná koncentrácia DNA

9.9 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

Pre všetky produkty PCR boli pripravené gély podľa nasledujúceho postupu:

- bol pripravený 1,8% agarózový gél (1,8 g agarózy, 100 ml 0,5 \times TBE pufru), ktorý následne tuhol 30 minút
- zmes 5 μ l produktu PCR, 10 μ l vody a 2 μ l 6 \times koncentrovaného nanášacieho pufru bola nanesená na gél
- vanička s gélom bola prevrstvená 0,5 \times TBE pufrom a bol zapnutý zdroj napätia (80 V/1,5 hodiny)
- po skončení elektroforézy bol gél ponechaný v roztoku etídiumbromidu (0,5 μ l/ml) po dobu 30 minút
- gél bol opláchnutý v destilovanej vode, umiestnený na transiluminátor a vyfotografovaný

9.10 Vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia amplikónov

Zmes PCR komponent pre PCR bola pripravená podľa tabuľky 11 [39].

Tabuľka 11 Zloženie zmesi pre PCR pre HRMA (10 μ l)

č.	komponent	objem [μ l]
1.	voda pre PCR	3,7
2.	2x qPCR SYTO-9 MasterMix	5
3.	primér F (10 pmol/ μ l)	0,4

č.	komponent	objem [μl]
4.	primér R (10 pmol/μl)	0,4
5.	DNA matrica (100 ng/μl)	0,5

Po pridaní každej zložky bola zmes dobre premiešaná. Výsledný objem zmesi pre PCR bol 10 μl. Pre HRMA analýzu produktov PCR-DGGE boli použité priméry pre PCR s GC svorkou – F357GC a R518 [36].

Ako DNA matrica bola použitá purifikovaná DNA alebo amplikóny v koncentrácii 150-200 ng/μl. Pre amplifikáciu bola použitá LA polymeráza. U negatívnej kontroly bolo namiesto matrice DNA pridané ekvivalentné množstvo vody. U pozitívnej kontroly bola ako matrica DNA použitá DNA *Lactobacillus gasserii* K7 nariedená na 100 ng/μl. PCR zmes bola následne vložená do cykléru a bol spustený príslušný program uvedený v tabuľke 12.

Tabuľka 12 Programy pre PCR s primérmí s GC svorkou

krok cyklu		teplota /čas
1.	denaturácia DNA pred prvým cyklom	95°C/5 min
2.	denaturácia	95°C/30 s
3.	pripojenie primérov	50°C/30 s
4.	syntéza DNA	72°C/30 s
5.	dosyntetizovanie reťazca v poslednom kroku	72°C/5 min
	počet cyklov	30

HRMA analýza prebehla následne i s primérmí UPF a UPR [37]. Sekvencie použitých primérov sú uvedené v tabuľke 13.

Tabuľka 13 Priméry pre PCR s HRMA analýzou

primér	sekvencia 5'–3'	veľkosť produktu PCR (bp)
UPF	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	460
UPR	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

Ako DNA matrica v tomto prípade bola použitá DNA izolovaná zo syrov, nálevov i sedimentov od firmy Milcom v koncentrácii 10 ng/μl. Pre amplifikáciu bola použitá LA polymeráza. U negatívnej kontroly bolo namiesto matrice DNA pridané ekvivalentné množstvo vody. U pozitívnej kontroly bola ako matrica DNA použitá DNA zo zbierkového kmeňa príslušného rodu nariedená na 10 ng/μl. PCR zmes bola následne vložená do cykléru a bol spustený príslušný program uvedený v tabuľke 14 [37].

Tabuľka 14 Programy pre PCR s primérmí UPF a UPR [37]

krok cyklu		teplota /čas
1.	denaturácia DNA pred prvým cyklom	95°C/5 min
2.	denaturácia	95°C/10 s
3.	pripojenie primérov	50°C/30 s
4.	syntéza DNA	72°C/10 s
5.	dosyntetizovanie reťazca v poslednom kroku	72°C/5 min
	počet cyklov	45

Analýza kriviek topenia prebehla po ukončení PCR. Vyhodnotená bola pomocou softvéru zariadeniaEco™ Real-Time PCR System.

HRM analýza prebiehala rozmedzí 55-95 °C s krokom 0,1 °C. pri každom kroku bola teplota udržiavaná po dobu 15 s.

9.11 Sekvenčná analýza

Reakčná zmes odoslaná k sekvenovaniu bola pripravená podľa nasledujúceho postupu:

- 25 µl produktu PCR bolo doplnených do 300 µl TE pufri
- bolo pridaných 15 µl octanu sodného a 750 µl 96% vymrazeného etanolu
- DNA sa zrážala 15 minút pri –20 °C a centrifugovaná 10 minút pri 15000 otáčkach
- Etanol bol odliaty a vysušený v exikátore
- DNA bola rozpustená v TE pufri cez noc
- bola zmeraná koncentrácia DNA
- v 200 µl skúmavkách bola pripravená zmes k sekvenácii
- do skúmavky bolo napipetovaných 5 µl DNA (25 – 45 ng/µl)
- takto pripravené skúmavky boli spolu s primérmí UPF a UPR [37] zaslané na sekvenáciu do firmy SEQme.

Získané sekvencie boli pomocou programu BLAST priradené k sekvenciám v databáze GenBank, a bolo zistené, pre ktoré mikroorganizmy sú tieto sekvencie špecifické.

10 VÝSLEDKY

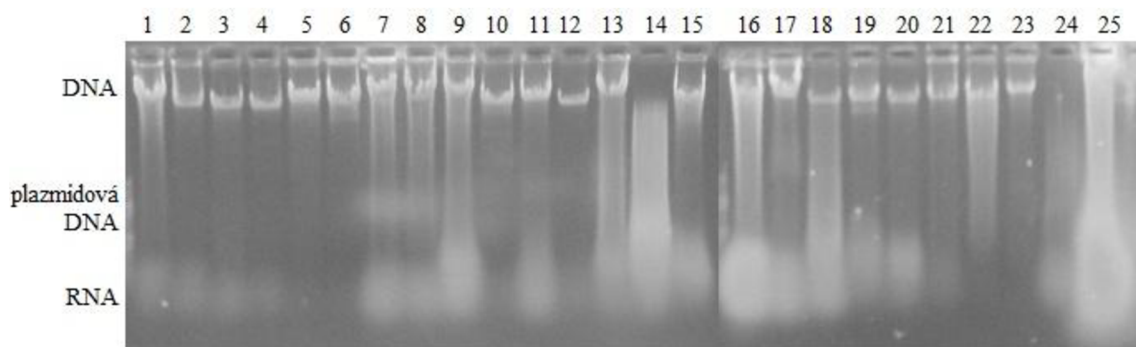
10.1 Izolácia DNA z bakteriálnych buniek

Z pokazených syrov a ich nálevov boli izolované bakteriálne kmene (tabuľka 2). Bunky boli kultivované vo firme Milcom a centrifugované. Zo sedimentov buniek boli pripravené hrubé lyzáty podľa postupu v kapitole 9.1.

10.2 Kontrola prítomnosti izolovanej DNA

Z 500 μ l hrubých lyzátov buniek bola pomocou fenolovej extrakcie izolovaná DNA (podľa postupu 9.1.3). DNA bola riedená na 100 ng/ μ l. DNA bola nanesená na 0,8% agarózový gél podľa postupu v kapitole 9.2 a bola sledovaná intaktnosť DNA. Výsledky kontroly intaktnosti sú pre neriedenú DNA uvedené na obrázku 2 a pre DNA riedenú na 100 ng/ μ l na obrázku 3.

Obrázok 2 Kontrola intaktnosti neriedenej DNA izolovanej z bakteriálnych buniek

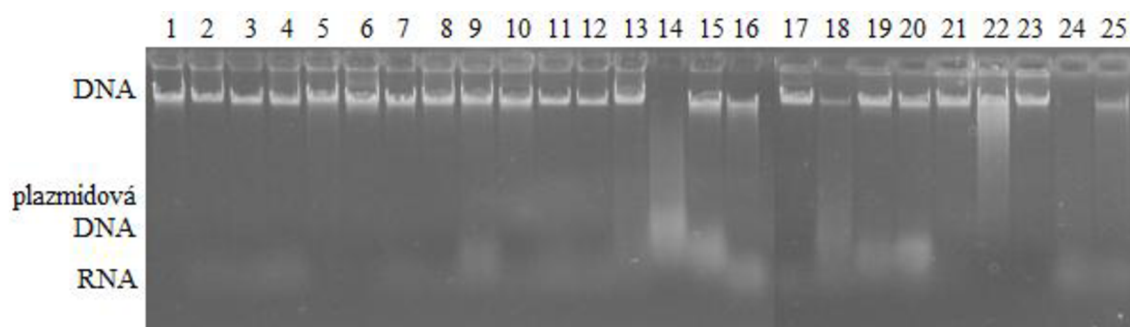


beh	DNA	množstvo DNA	intaktnosť DNA	prítomnosť RNA
1	M 1	+++	+	+
2	M 2	++	+	+
3	M 3	++	+	+
4	M 4	++	+	+
5	M 5	+++	+	-
6	M 6	+++	+	-
7	M 7	+++	+	++
8	M 8	+++	+	++
9	M 9	+++	+	+++
10	M 10	+++	+	-
11	M 11	+++	+	++
12	M 12	++	+	-
13	M 13	+++	+	++
14	M 14	+	-	+++
15	M 15	+++	+	+++
16	M 16	+++	+	+++
17	M 17	+++	+	++
18	M 18	+	+	++
19	M 19	++	+	++

beh	DNA	množstvo DNA	intaktnosť DNA	prítomnosť RNA
20	M 20	++	+	++
21	M 21	++	+	+
22	M 22	+++	+	–
23	M 23	+++	+	–
24	M 24	+	–	++
25	M 25	++++	–	+++

+, ++, +++ rôzna intenzita
– nebolo detegované

Obrázok 3 Kontrola intaktnosti DNA izolovanej z bakteriálnych buniek riedenej na 100 ng/μl



beh	DNA	množstvo DNA	intaktnosť DNA	prítomnosť RNA
1	M 1	++	+	–
2	M 2	++	+	+
3	M 3	++	+	–
4	M 4	++	+	+
5	M 5	++	+	–
6	M 6	++	+	–
7	M 7	++	+	+
8	M 8	++	+	–
9	M 9	++	+	++
10	M 10	++	+	–
11	M 11	++	+	+
12	M 12	++	+	+
13	M 13	++	+	+
14	M 14	+	–	++
15	M 15	++	+	++
16	M 16	++	+	++
17	M 17	++	+	+
18	M 18	+	+	+
19	M 19	++	+	++
20	M 20	++	+	++
21	M 21	++	+	–

beh	DNA	množstvo DNA	intaktnosť DNA	prítomnosť RNA
22	M 22	++	+	–
23	M 23	++	+	–
24	M 24	+	–	+
25	M 25	+	+	+

+, ++, +++ rôzna intenzita
– nebolo detegované

- ✓ Agarózová gélová elektroforéza preukázala intaktnosť všetkých vzoriek s výnimkou DNA M14 (*Lactobacillus plantarum*) a M24 (*Lactobacillus fermentum*) boli na géle degradované.

10.3 Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Koncentrácia a čistota DNA izolovanej fenolovou extrakciou bola overená spektrofotometricky pomocou NanoDropu 2000. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a čistoty neriedenej DNA a DNA nariadenej na 100 ng/μl sú uvedené v tabuľke 15.

Tabuľka 15 Koncentrácia a čistota riedenej a neriedenej DNA bakteriálnych kultúr

č.	DNA	koncentrácia [ng/μl]	A260/280	koncentrácia [ng/μl]	A260/280
M 1	<i>Bacillus</i> sp.	452	1,86	109	1,88
M 2	<i>Bacillus licheniformis</i>	235	1,85	97	1,93
M 3	<i>Bacillus</i> sp.	205	1,84	100	1,93
M 4	<i>Kocuria varians</i>	135	1,84	99	1,92
M 5	<i>Micrococcus luteus</i>	207	1,71	110	1,78
M 6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	342	1,70	112	1,75
M 7	<i>Serratia marcescens</i>	1305	1,83	112	1,88
M 8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1094	1,90	111	1,95
M 9	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	1212	1,92	117	1,97
M 10	<i>Staphylococcus warnereii</i>	216	1,79	110	1,86
M 11	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	656	1,93	99	2,03
M 12	<i>Pseudomonas</i> sp.	217	1,82	100	1,92
M 13	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp. <i>cloacae</i>	975	1,85	110	1,94
M 14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2112	2,01	100	2,09
M 15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i>	494	1,92	118	2,00
M 16	(16z) <i>Enterococcus faecium</i>	3619	2,04	114	2,09
M 17	<i>Escherichia coli</i>	2312	1,91	107	2,00
M 18	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	1043	1,91	99	1,98
M 19	<i>Bacillus</i> sp.	328	1,79	96	1,84

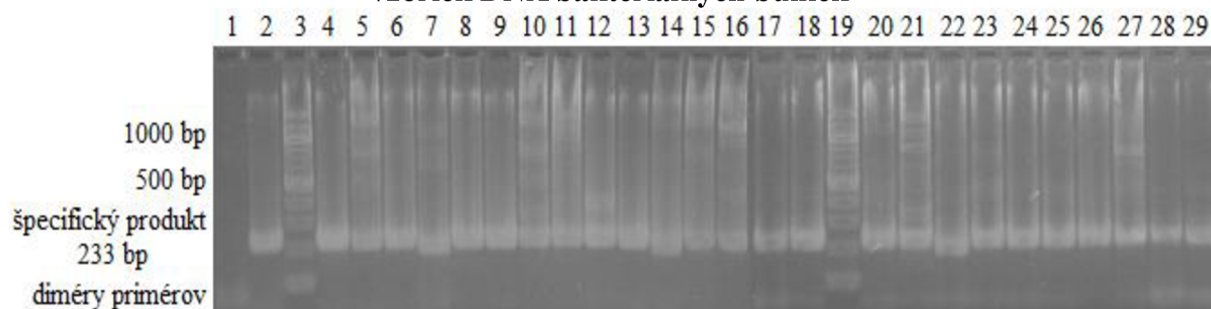
č.	DNA	koncentrácia [ng/μl]	A260/280	koncentrácia [ng/μl]	A260/280
M 20	<i>Bacillus</i> sp.	253	1,84	109	1,89
M 21	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ssp. <i>saprophyticus</i>	238	1,65	95	1,68
M 22	<i>Bacillus cereus</i>	274	1,66	108	1,68
M 23	<i>Aeromonas</i> sp.	219	1,68	103	1,72
M 24	<i>Lactobacillus fermentum</i>	548	1,78	103	1,80
M 25	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , ssp. <i>cremoris</i> , ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	2338	2,04	93	2,06

- ✓ Koncentrácia neriedenej DNA sa pohybovala v rozmedzí 135 – 3619 ng/μl. Koncentrácie nariedenej DNA sa pohybovali v rozmedzí 93 – 118 ng/μl. Pomer A260/A280 bol v rozmedzí 1,65-2,09.

10.4 PCR s primérmí s GC svorkou pre DGGE

PCR bola pripravená podľa postupov v kapitole 9.4. Pre PCR s primérmí s GC svorkou (priméry F 357 GC a R518) bola použitá DNA bakteriálnych kultúr (M1 – M25) a DNA syrov (KS1 – KS3, S1 – S6) a nálevov (KL1 – KL3, L1 – L6) zriedená na 100 ng/μl. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR sú uvedené na obrázku 4 a na obrázku 5. Okrem špecifických produktov PCR (233 bp) boli detegované aj nešpecifické produkty PCR.

Obrázok 4 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR s primérmí s GC svorkou vzoriek DNA bakteriálnych buniek



beh	DNA	množstvo DNA
1	negatívna kontrola	–
2	pozitívna kontrola	+++
3	DNA štandard 100 bp	
4	M 1	+++
5	M 2	+++
6	M 3	+++
7	M 4	+++
8	M 5	+++
9	M 6	+++
10	M 7	+++
11	M 8	+++

beh	DNA	množstvo DNA
12	M 9	+++
13	M 10	+++
14	M 11	+++
15	M 12	+++
16	M 13	+++
17	M 14	+++
18	M 15	+++
19	DNA štandard 100 bp	
20	M 16	+++
21	M 17	+++
22	M 18	+++
23	M 19	+++
24	M 20	+++
25	M 21	+++
26	M 22	+++
27	M 23	+++
28	M 24	++
29	M 25	+++

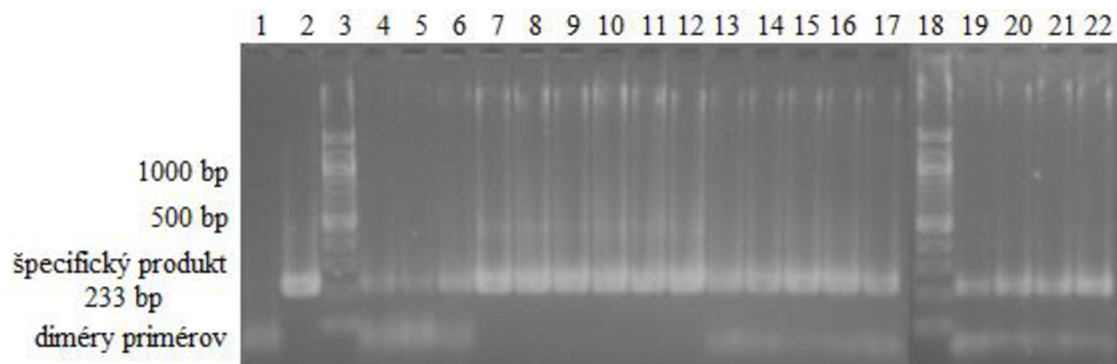
+, ++, +++

produkty PCR o rôznej intenzite

-

produkty PCR neboli detegované

Obrázok 5 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR s primérmí s GC svorkou vzoriek DNA syrov a nálevov



beh	DNA	množstvo DNA
1	negatívna kontrola	-
2	pozitívna kontrola	+++
3	DNA štandard 100 bp	
4	KL 1	+++
5	KL 2	+++
6	KL 3	+++
7	L 1	+++
8	L 2	+++

beh	DNA	množstvo DNA
9	L 3	+++
10	L 4	+++
11	L 5	+++
12	L 6	+++
13	KS 1	+++
14	KS 2	+++
15	KS 3	+++
16	S 1	+++
17	S 2	+++
18	DNA štandard 100 bp	
19	S 3	+++
20	S 4	+++
21	S 5	+++
22	S 6	+++

+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
 – produkty PCR neboli detegované

- ✓ DNA získaná zo syrov, nálevov aj z kultúr bola amplifikovateľná v PCR. Produkty PCR boli v intenzite dostatočnej pre ďalšiu prácu. Okrem špecifických produktov PCR (233 bp) boli detegované i nešpecifické produkty.

10.4.1 Optimalizácia PCR s primérmí s GC svorkou

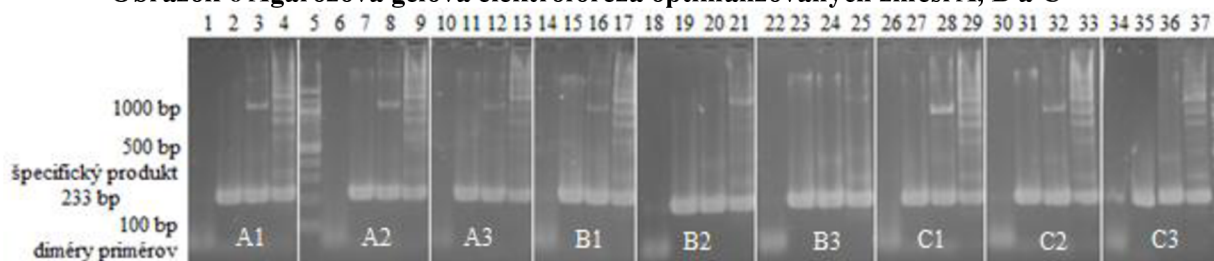
Z dôvodu veľkého množstva nešpecifických amplikónov v DGGE bola optimalizovaná reakčná zmes pre PCR s primérmí s GC svorkou. V tejto PCR bolo testované rôzne množstvo Mg^{2+} iónov, množstvo dNTP, primérov a DNA polymerázy. K testovaniu bola použitá DNA M16 a M17.

V zmesiach A bolo optimalizované množstvo primérov, v zmesiach B množstvo DNA polymerázy a v zmesiach C množstvo dNTP. Zloženie jednotlivých zmesí je uvedené v tabuľke 16 a 17. Výsledky gélovej elektroforézy sú uvedené na obrázku 6 a 7.

Tabuľka 16 Optimalizácia množstva primérov, dNTP a DNA polymerázy

č.	Komponent	objem [μ l]								
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
1.	voda pre PCR	25	26	27	25,2	25,4	25,6	26	25	24
2.	LA pufoer kompletný	5	5	5	5	5	5	5	5	5
3.	zmes dNTP (10 mM)	3	3	3	3	3	3	2	3	4
4.	primér F357 (10 pmol/ μ l)	2	1,5	1	2	2	2	2	2	2
5.	primér R518 (10 pmol/ μ l)	2	1,5	1	2	2	2	2	2	2
6.	DMSO enhancer	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7.	$MgCl_2$ (25 mM)	8	8	8	8	8	8	8	8	8
8.	LA polymeráza Top Bio (5 U/ μ l)	1	1	1	0,8	0,6	0,4	1	1	1
9.	DNA matrica(100 ng/ μ l)	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Obrázok 6 Agarózová gélová elektroforéza optimalizovaných zmesí A, B a C



beh	zn.	DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
1	A1	negatívna kontrola	–	–
2		pozitívna kontrola	+++	–
3		M 16	+++	++
4		M 17	+++	++
5	DNA štandard 100 bp			
6	A2	negatívna kontrola	–	–
7		pozitívna kontrola	+++	–
8		M 16	+++	++
9		M 17	+++	++
10	A3	negatívna kontrola	–	–
11		pozitívna kontrola	+++	–
12		M 16	+++	++
13		M 17	+++	++
14	B1	negatívna kontrola	–	–
15		pozitívna kontrola	+++	–
16		M 16	+++	+
17		M 17	+++	++
18	B2	negatívna kontrola	–	–
19		pozitívna kontrola	+++	–
20		M 16	+++	–
21		M 17	+++	++
22	B3	negatívna kontrola	–	–
23		pozitívna kontrola	+++	–
24		M 16	+++	–
25		M 17	+++	+
26	C1	negatívna kontrola	–	–
27		pozitívna kontrola	+++	–
28		M 16	+++	++
29		M 17	+++	++
30	C2	negatívna kontrola	–	–
31		pozitívna kontrola	+++	–
32		M 16	+++	++
33		M 17	+++	++

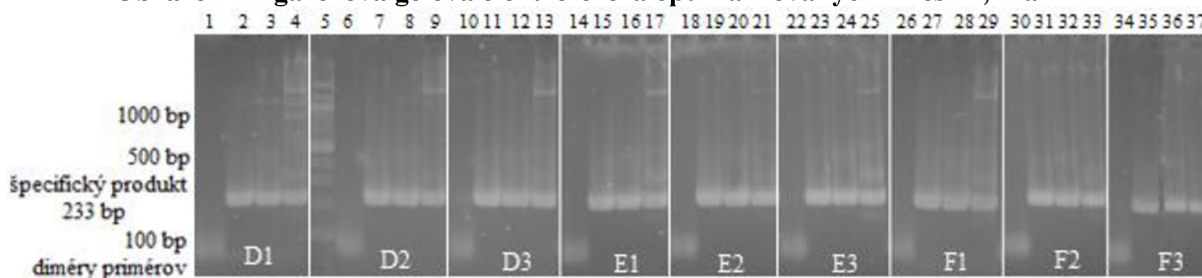
beh	zn.	DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
34	C3	negatívna kontrola	–	–
35		pozitívna kontrola	+++	–
36		M 16	+++	+
37		M 17	+++	++

+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
– produkty PCR neboli detegované

Tabuľka 17 Optimalizácia množstva dNTP a DNA polymerázy

č.	Komponent	objem [μl]								
		D1	D2	D3	E1	E2	E3	F1	F2	F3
1.	voda pre PCR	26, 2	25, 6	24, 2	26, 4	25, 4	24, 4	26, 6	25, 6	24,6
2.	LA pufoer kompletný	5	5	5	5	5	5	5	5	5
3.	zmes dNTP (10 mM)	2	3	4	2	3	4	2	3	4
4.	primér F357 (10 pmol/μl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
5.	primér R518 (10 pmol/μl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
6.	DMSO enhancer	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7.	MgCl ₂ (25 mM)	8	8	8	8	8	8	8	8	8
8.	LA polymeráza Top Bio (5U/μl)	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	0,4	0,4	0,4
9.	DNA matrica (100 ng/μl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Obrázok 7 Agarózová gélová elektroforéza optimalizovaných zmesí D, E a F



beh	zn.	DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
1	D1	negatívna kontrola	–	–
2		pozitívna kontrola	+++	–
3		M 16	+++	++
4		M 17	+++	++
5	DNA štandard 100 bp			
6	D2	negatívna kontrola	–	–
7		pozitívna kontrola	+++	–
8		M 16	+++	++
9		M 17	+++	++

beh	zn.	DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
10	D3	negatívna kontrola	–	–
11		pozitívna kontrola	+++	–
12		M 16	+++	++
13		M 17	+++	++
14	E1	negatívna kontrola	–	–
15		pozitívna kontrola	+++	–
16		M 16	+++	+
17		M 17	+++	++
18	E2	negatívna kontrola	–	–
19		pozitívna kontrola	+++	–
20		M 16	+++	–
21		M 17	+++	++
22	E3	negatívna kontrola	–	–
23		pozitívna kontrola	+++	–
24		M 16	+++	–
25		M 17	+++	+
26	F1	negatívna kontrola	–	–
27		pozitívna kontrola	+++	–
28		M 16	+++	++
29		M 17	+++	++
30	F2	negatívna kontrola	–	–
31		pozitívna kontrola	+++	–
32		M 16	+++	++
33		M 17	+++	++
34	F3	negatívna kontrola	–	–
35		pozitívna kontrola	+++	–
36		M 16	+++	+
37		M 17	+++	++

+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
– produkty PCR neboli detegované

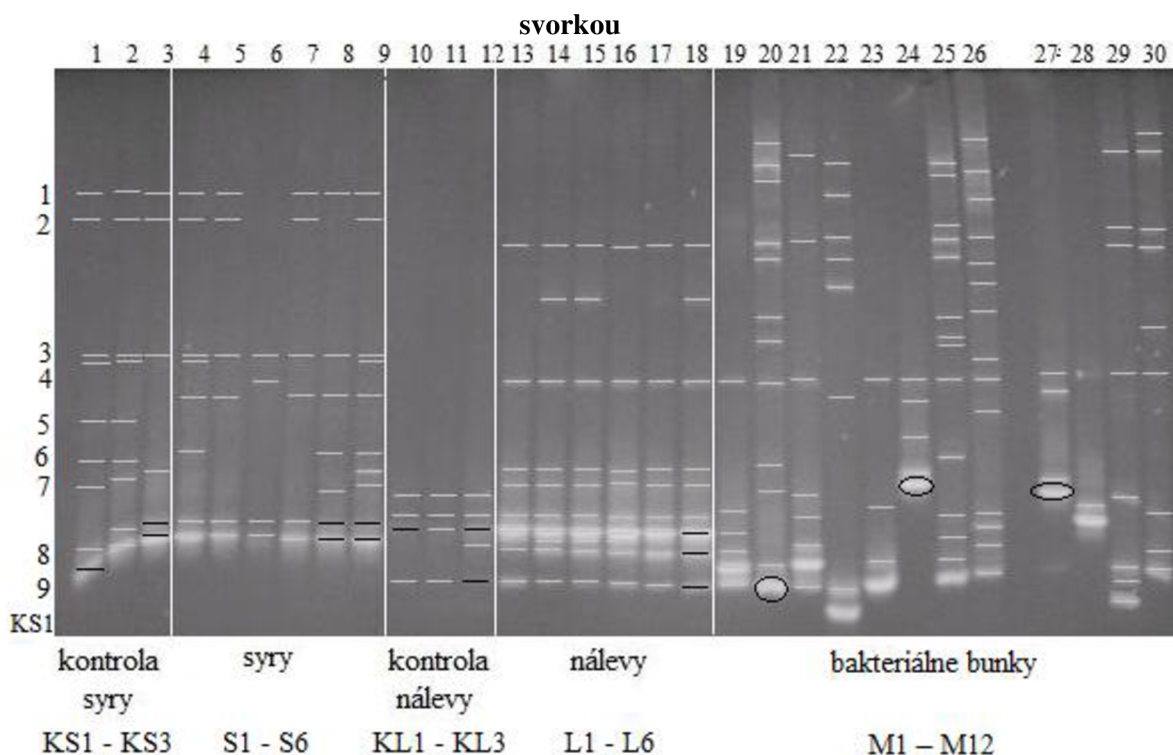
- ✓ Najmenšie množstvo nešpecifických produktov bolo viditeľné v zmesiach A3 (1 µl primérov), B3 (0,4 µl DNA polymerázy) a C3 (4 µl dNTP). Výsledky boli použité k ďalšej optimalizácii. Najmenšie množstvo nešpecifických produktov bolo viditeľné v zmesi F3 (0,4 µl DNA polymerázy a 4 µl dNTP). Optimalizovaná PCR zmes obsahovala 2 µl DMSO, 8 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl kompletného PCR pufru a 2 µl DNA matrice (100 ng/µl). Táto zmes bola zvolená ako optimálna pre PCR s primérmí s GC svorkou.

10.5 DGGE produktov PCR s primérmí s GC svorkou

Produkty PCR s GC svorkou (233 bp) boli prečistené pomocou magnetických častíc a analyzované pomocou DGGE. Produkty boli označené KS1 – KS3 (kontrolné syry), S1 – S6 (kontaminované syry), KL1 – KL3 (kontrolné nálevy), L1 – L6 (kontaminované nálevy), M1 – M25 (bakteriálne bunky, M25 lyofilizovaná štartérová kultúra). Na gél bolo nanesených vždy 10 µl produktu a 2 µl nanášacieho pufru. Výsledky sú uvedené na obrázku 8 a obrázku 9.

Na obrázku 9 bol detegovaný nižší počet fragmentov u amplikónov syrov a nálevov ako na obrázku 8. Rovnaký výsledok bol zistený i po viacnásobnom opakovaní. Oddelené fragmenty získané po DGGE analýze boli vyrezané z gélu a vložené do 100 µl TE pufru sa eluovali do druhého dňa. Príklad označenia fragmentov je uvedený na obrázku 8, v behu 1, 1-6. Vyrezané fragmenty, ktoré sú čiernou vyznačené (KS 1-6, KS 3-5, KS 3-6, S 5-6, S 5-7, S 6-9, S 6-10), boli použité pre ďalšiu analýzu. Výsledky DGGE analýz po opakovaní sú uvedené v prílohe 1

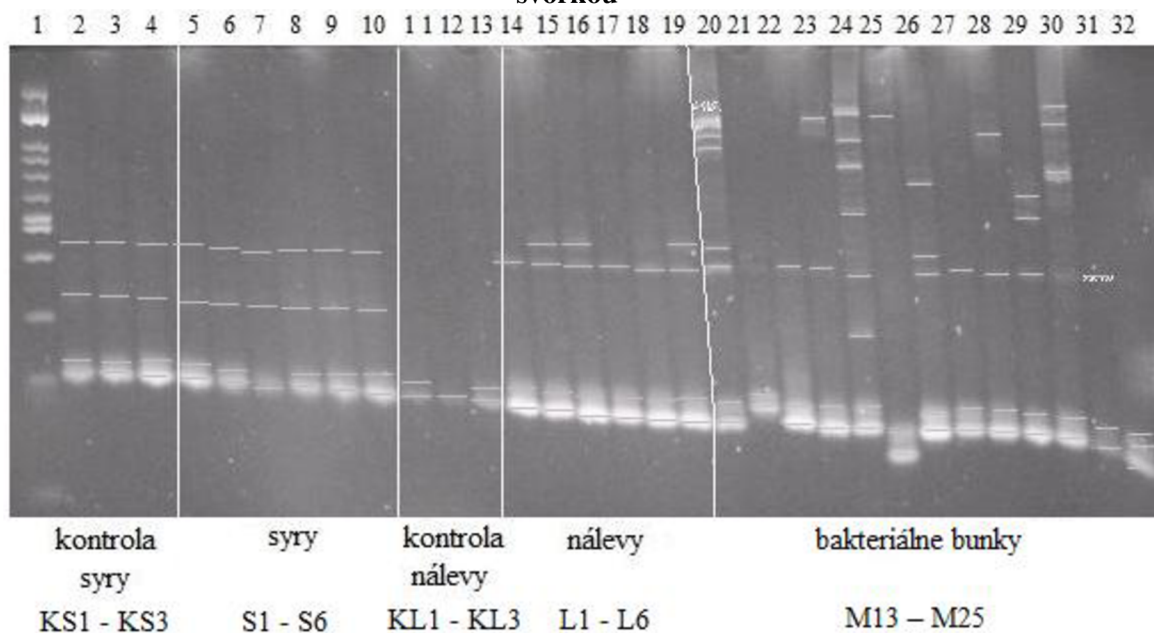
Obrázok 8 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza produktov PCR s primérmí s GC



beh	DNA	počet vyrezaných fragmentov	označenie fragmentov
1	KS 1	9	KS 1-1 až KS 1-9
2	KS 2	9	KS 2-1 až KS 2-9
3	KS 3	6	KS 3-1 až KS 3-6
4	S 1	8	S 1-1 až S 1-8
5	S 2	6	S 2-1 až S 2-6
6	S 3	4	S 3-1 až S 3-4
7	S 4	6	S 4-1 až S 4-6
8	S 5	7	S 5-1 až S 5-7
9	S 6	10	S 6-1 až S 6-10

beh	DNA	počet vyrezaných fragmentov	označenie fragmentov
10	KL 1	4	KL 1-1 až KL 1-4
11	KL 2	4	KL 2-1 až KL 2-4
12	KL 3	5	KL 3-1 až KL 3-5
13	L 1	8	L 1-1 až L 1-8
14	L 2	10	L 2-1 až L 2-10
15	L 3	10	L 3-1 až L 3-10
16	L 4	9	L 4-1 až L 4-9
17	L 5	8	L 5-1 až L 5-8
18	L 6	9	L 6-1 až L 6-9
19	M 1	6	M 1-1 až M 1-6
20	M 2	12	M 2-1 až M 2-12
21	M 3	8	M 3-1 až M 3-8
22	M 4	8	M 4-1 až M 4-8
23	M 5	4	M 5-1 až M 5-4
24	M 6	5	M 6-1 až M 6-5
25	M 7	14	M 7-1 až M 7-14
26	M 8	14	M 8-1 až M 8-14
27	M 9	4	M 9-1 až M 9-4
28	M 10	2	M 10-1 až M 10-2
29	M 11	8	M 11-1 až M 11-8
30	M 12	9	M 12-1 až M 12-9

Obrázok 9 Výsledky denaturačnej gélovej elektroforézy produktov PCR s primérmí s GC svorkou



beh	DNA	počet vyrezaných fragmentov	označenie fragmentov
1	DNA štandard 100 bp		
2	KS 1	4	KS 1-1 až KS 1-4
3	KS 2	4	KS 2-1 až KS 2-4
4	KS 3	4	KS 3-1 až KS 3-4
5	S 1	4	S 1-1 až S 1-4
6	S 2	4	S 2-1 až S 2-4
7	S 3	3	S 3-1 až S 3-3
8	S 4	4	S 4-1 až S 4-4
9	S 5	4	S 5-1 až S 5-4
10	S 6	4	S 6-1 až S 6-4
11	KL 1	2	KL 1-1 až KL 1-2
12	KL 2	1	KL 2-1
13	KL 3	2	KL 3-1 až KL 3-2
14	L 1	3	L 1-1 až L 1-3
15	L 2	4	L 2-1 až L 2-4
16	L 3	4	L 3-1 až L 3-4
17	L 4	3	L 4-1 až L 4-3
18	L 5	3	L 5-1 až L 5-3
19	L 6	4	L 6-1 až L 6-4
20	M 13	8	M 13-1 až M 13-8
21	M 14	2	M 14-1 až M 14-2
22	M 15	3	M 15-1 až M 15-3
23	M 16	4	M 16-1 až M 16-4
24	M 17	8	M 17-1 až M 17-8
25	M 18	3	M 18-1 až M 18-3
26	M 19	5	M 19-1 až M 19-5
27	M 20	3	M 20-1 až M 20-3
28	M 21	4	M 21-1 až M 21-4
29	M 22	5	M 22-1 až M 22-5
30	M 23	5	M 23-1 až M 23-5
31	M 24	3	M 24-1 až M 24-3
32	M 25	3	M 25-1 až M 25-3

- ✓ V prípade produktov PCR s primérmí s GC svorkou získaných amplifikáciou DNA izolovanej zo syrov, nálevov a bakteriálnych buniek došlo k oddeleniu väčšieho množstva fragmentov. Rozdiel bol v intenzite amplikónov po amplifikácii DNA z kontrolných nálevov (amplikóny slabej intenzity) a ostatných vzoriek.

10.5.1 Porovnanie polohy amplikónov

Jednotlivé amplikóny rozdelené pomocou DGGE boli následne porovnávané s cieľom určiť konkrétny bakteriálny druh prítomný v infikovaných syroch. Porovnávaná bola poloha výrazných amplikónov na géle. Porovnávané boli amplikóny zo syry a nálevy s amplikónmi

z bakteriálnych buniek.

Amplikóny v približne rovnakej polohe ako amplikóny zo syrov a nálevoch boli viditeľné v behoch 20, 24 a 29 prvého gélu (M1 – M12) na obrázku 8.

- ✓ Pravdepodobnými kontaminantmi preto mohli byť *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* a *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

10.6 In silico analýza

Pomocou *in silico* analýzy boli preskúmané všetky bakteriálne druhy (M1 – M25) uvedené v tabuľke 2. K analýze boli použité dve sady primérov – F357 a R518 [36], a UPF a UPR [37]. Pre všetky analyzované bakteriálne druhy boli nájdené sekvencie 16S rDNA.

10.6.1 In silico analýza pre amplikóny získané PCR s priméromi F 357 GC a R 518

Pre *in silico* analýzu boli použité sekvencie primérov F 357 a R 518 [36]. Získané sekvencie spolu s mikroorganizmami, sú uvedené v tabuľke 18.

Tabuľka 18 Sekvencie ohraničené priméromi F 357 a R 518

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
HQ154527.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. licheniformis</i> , <i>B. tequilensis</i> , <i>B. subtilis</i>	TC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCG CAATGGACGA AAGTCTGACG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA TGAAGGTTTT CGGATCGTAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA ACAAGTACCG TTCGAATAGG GCGGTACCTT GACGGTACCT AACCAGAAAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAAT
NR_114674.1 <i>Kocuria varians</i>	<i>Kocuria</i> sp., <i>K. varians</i> , <i>K. rhizophila</i> , <i>K. salsicia</i>	CCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGAAAG CCTGATGCAG CGACGCCGCG TGAGGGATGA CGGCCTTCGG GTTGTAACCT TCTTTCAGCA CGGAAGAAGC GAGAGTGACG GTACGTGCAG AAGAAGCGCC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT
NR_075062.2 <i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus</i> sp., <i>M. luteus</i> , <i>M. yunnanensis</i> , <i>M. endophyticus</i> , <i>M. antarcticus</i>	CCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGAAAGC CTGATGCAGC GACGCCGCGT GAGGGATGAC GGCCTTCGGG TTGTAAACCT CTTTCAGTAG GGAAGAAGCG AAAGTGACGG TACCTGCAGA AGAAGCACCG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CCGCGGTAAT
L37605.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. capitis</i>	CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AAACCTCTGTT ATTAGGGAAG AACAAATGTG TAAGTAACTA TGCACGTCTT GACGGTACCT AATCAGAAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAAT

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
AY498856.1 <i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia</i> sp., <i>S. marcescens</i> , <i>S. entomophila</i>	CCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGCAAGC CTGATGCAGC CATGCCGCGT GTGTGAAGAA GGCCTTCGGG TTGTAAAGCA CTTTCAGCGA GGAGGAAGGT GGTGAACCTA ATACGTTTCAT CAATTGACGT TACTCGCAGA AGAAGCACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CGCGGTAAT
FJ424514.1 <i>Klebsiela oxytoca</i>	<i>Klebsiela</i> sp., <i>K. oxytoca</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> <i>bacterium</i>	CCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGCAAG CCTGATGCAG CCATGCCGCG TGTATGAAGA AGGCCTTCGG GTTGTAAAGT ACTTTCAGCG GGGAGGAAGG GAGTGAGGTT AATAACCTTA TTCATTGACG GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT
JX290086.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>A. baumannii</i> , <i>A. calcoaceticus</i>	C CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGGGG AACCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGCCTT ATGGTTGTAA AGCACTTTAA GCGAGGAGGA GGTACTTTA GTTAATACCT AGAGATAGTG GACGTTACTC GCAGAATAAG CACCGGCTAA CTCTGTGCCA GCAGCCGCGG TAAT
L37603.1 <i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. warneri</i> , <i>S. pasteurii</i>	CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AAACCTCTGTT ATCAGGGAAG AACAAATGTG TAAGTAACTG TGCACATCTT GACGGTACCT GATCAGAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAAT
L08062.1 <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<i>Clostridium</i> sp., <i>C. tyrobutyricum</i>	CCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGAAAGC CTGATGCAGC AACGCCGCGT GAGTGATGAA GGTCTTCGGA TTGTAAAGCT CTGTCTTTTG GGACGATAAT GACGGTACCA AAGGAGGAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAAT
AB379690.1 <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. frederiksbergensis</i> , <i>P. tremae</i> , <i>P. syringae</i>	TCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGAAAG CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGTGTGAAGA AGGTCTTCGG ATTGTAAAGC ACTTTAAGTT GGGAGGAAGG GCATTTACCT AATACGTAAG TGTTTTGACG TTACCGACAG AATAAGCACC GGCTAACTCT GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT
KC990822.1 <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>E. cloacae</i> , <i>E. ludwigii</i> , <i>Klebsiela oxytoca</i>	CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGC ACAATGGGCG CAAGCCTGAT GCAGCCATGC CGCGTGTATG AAGAAGGCCT TCGGGTTGTA AAGTACTTTC AGCGGGGAGG AAGGTGTTGT GGTTAATAAC CACAGCAATT GACGTTACCC GCAGAAGAAG CACCGGCTAA CTCCGTGCCA GCAGCCGCGG TAAT

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
DI251184.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i>	CCTACG GGAGGCAGCA GTAGGGAATC TTCCACAATG GACGAAAGTC TGATGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGAAGAAG GGTTTCGGCT CGTAAAACTC TGTGTGTTAAA GAAGAACATA TCTGAGAGTA ACTGTTTCAGG TATTGACGGT ATTTAACCCAG AAAGCCACGG CTAACCTACGT GCCAGCAGCC GCGGTAAT
JQ658346.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Weissella</i> sp., <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> ,	CC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCAC AATGGGGCAA AGCCTGATGG AGCAACGCCG CGTGTGTGAT GAAGGGTTTC GGCTCGTAAA ACACGTGTTGT AAGAGAAGAA TGACATTGAG AGTAACTGTT CAATGTGTGA CGGTATCTTA CCAGAAAGGA ACGGCTAAAT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA AT
AB690254.1 <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> sp., <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. lactis</i>	CCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCGGCAA TGGACGAAAG TCTGACCGAG CAACGCCCGG TGAGTGAAGA AGGTTTTTCGG ATCGTAAAAC TCTGTTGTTA GAGAAGAACA AGGATGAGAG TAACTGTTCA TCCCTTGACG GTATCTAACCC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT
AB269763.1 <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>Klebsiela pneumoniae</i>	TCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCCTG ATGCAGCCAT GCCGCGTGTA TGAAGAAGGC CTTCGGGTTG TAAAGTACTT TCAGCGGGGA GGAAGGGAGT AAAGTTAATA CCTTTGCTCA TTGACGTTAC CCGCAGAAGA AGCACCGGCT AACTCCGTGC CAGCAGCCGC GGTAAT
D83371.2 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. succins</i> , <i>S. haemolyticus</i>	CCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGG CGAAAGCCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGG TTTCGGGCTCG TAAAACTCTG TTATTAGGGA AGAACAAACG TGTAAGTAAC TGTGCACGTC TTGACGGTAC CTAATCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAAT
GQ478254.1 <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. subtilis</i> ,	CCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC CGCAATGGAC GAAAGTCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGCT TTCGGGTCGT AAAACTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTGC TAGTTGAATA AGCTGGCACC TTGACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAAT
AB027544.2 <i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas</i> sp., <i>A. bestiarum</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>A. piscicola</i>	CCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGGGAAACC CTGATGCAGC CATGCCGCGT GTGTGAAGAA GGCCTTCGGG TTGTAAAGCA CTTTCAGCGA GGAGGAAAGG TTGGCGCCTA ATACGTGTCA ACTGTGACGT TACTCGCAGA AGAAGCACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CCGGTAAT

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
FJ462686.1 <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i>	C CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCA CAATGGGCGC AAGCCTGATG GAGCAACACC GCGTGAGTGA AGAAGGGTTT CGGCTCGTAA AGCTCTGTTG TTAAAGAAGA ACACGTATGA GAGTAACTGT TCATACGTTG ACGGTATTTA ACCAGAAAAGT CACGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AAT
HE805077.1 <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus</i> sp., <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. l.</i> ssp. <i>cremoris</i> ,	C CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCGG CAATGGACGA AAGTCTGACC GAGCAACGCC GCGTGAGTGA AGAAGGTTTT CGGATCGTAA AACTCTGTTG GTAGAGAAGA ACGTTGGTGA GAGTGGAAAG CTCATCAAGT GACGGTAACT ACCCAGAAAAG GGACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAAT

✓ Sekvencie nachádzajúce sa medzi primérmami sa pre rôzne mikroorganizmy líšili.

10.6.2 *In silico* analýza pre amplikóny získané PCR s primérmami UPF a UPR

Pre *in silico* analýzu boli použité sekvencie primérov F 357 a R 518 [36]. Získané sekvencie spolu s mikroorganizmami, pre ktoré sú špecifické sú uvedené v tabuľke 19.

Tabuľka 19 Sekvencie ohraňované primérmami UPF a UPR

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
HQ154527.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. licheniformis</i> , <i>B. tequilensis</i> , <i>B. subtilis</i>	TC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCG CAATGGACGA AAGTCTGACG GAGCAACGCC GCGTGAGTGA TGAAGGTTTT CGGATCGTAA AGCTCTGTTG TTAGGGAAGA ACAAGTACCG TTCGAATAGG GCGGTACCTT GACGGTACCT AACCAGAAAA GCCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA ATTATTGGGC GTAAAGGGCT CGCAGGCGGT TTCTTAAGTC TGATGTGAAA GCCCCGGCT CAACCGGGGA GGGTCATTGG AAACGGGGGA ACTTGAGTGC AGAAGAGGAG AGTGGGAATTC CACGTGTAGC GGTAAAATGC GTAGAGATGT GGAGGAACAC CAGTGCGGAA GGCGACTCTC TGGTCTGTAA CTGACGCTGA GGAGCGAAAG CGTGGGGAGC GAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCC

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
NR_114674.1 <i>Kocuria varians</i>	<i>Kocuria</i> sp., <i>K. varians</i> , <i>K. rhizophila</i> , <i>K. salsicia</i>	CTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGAAAAG CCTGATGCAG CGACGCCGCG TGAGGGATGA CGGCCTTCGG GTTGTA AAC TCTTTCAGCA CGGAAGAAGC GAGAGTGACG GTACGTGCAG AAGAAGCGCC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGCG CAAGCGTTGT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GAGCTCGTAG GCGGTTTTGTC GCGTCTGCTG TGAAGCCCG GGGCTTAACC CCGGTGTGC AGTGGGTACG GGCAGACTTG AGTGCAGTAG GGGAGACTGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGCAGA TATCAGGAAG AACACCGATG GCGAAGGCAG GTCTCTGGGC TGTTACTGAC GCTGAGGAGC GAAAGCATGG GGAGCGAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CC
NR_075062.2 <i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus</i> sp., <i>M. luteus</i> , <i>M. yunnanensis</i> , <i>M. endophyticus</i> , <i>M. antarcticus</i>	TCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGAAAAGC CTGATGCAGC GACGCCGCGT GAGGGATGAC GGCCTTCGGG TTGTA AACCT CTTTCAGTAG GGAAGAAGCG AAAGTGACGG TACCTGCAGA AGAAGCACCG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGGTGC GAGCGTTATC CGGAATTATT GGGCGTAAAG AGCTCGTAGG CGGTTTTGTCG CGTCTGTCGT GAAAGTCCGG GGCTTAACCC CGGATCTGCG GTGGGTACGG GCAGACTAGA GTGCAGTAGG GGAGACTGGA ATTTCCTGGTG TAGCGGTGGA ATGCGCAGAT ATCAGGAGGA ACACCGATGG CGAAGGCAGG TCTCTGGGCT GTA ACTGACG CTGAGGAGCG AAAGCATGGG GAGCGAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC C
L37605.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. capitis</i>	T CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AA ACTCTGTT ATTAGGGAAG AACAAATGTG TAAGTAACTA TGCACGTCTT GACGGTACCT AATCAGAAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTATCCGGAA TTATTGGGCG TAAAGCGCGC GTAGGCGGTT TTTTAAGTCT GATGTGAAAG CCCACGGCTC AACC GTGGAG GGTCA TTGGA AACTGGAAAA CTTGAGTGCA GAAGAGGAAA GTGGAATTCC ATGTGTAGCG GTGAAATGCG CAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT GGTCTGTAAC TGACGCTGAT GTGCGAAAGC GTGGGGATCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCC

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
AY498856.1 <i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia sp., S. marcescens, S. entomophila</i>	TCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGCAAGC CTGATGCAGC CATGCCGCGT GTGTGAAGAA GGCCTTCGGG TTGTAAAGCA CTTTCAGCGA GGAGGAAGGT GGTGAACCTTA ATACGTTCAT CAATTGACGT TACTCGCAGA AGAAGCACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGGAGGGTGC AAGCGTTAAT CGGAATTACT GGGCGTAAAG CGCACGCAGG CGGTTTGTTA AGTCAGATGT GAAATCCCCG GGCTCAACCT GGGAACTGCA TTTGAAACTG GCAAGCTAGA GTCTCGTAGA GGGGGGTAGA ATTCCAGGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATCTGGAGGA ATACCGGTGG CGAAGGCGGC CCCCCTGGACG AAGACTGACG CTCAGGTGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC C
FJ424514.1 <i>Klebsiela oxytoca</i>	<i>Klebsiela sp., K. oxytoca, Enterobacteriaceae bacterium</i>	TCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGCAAG CCTGATGCAG CCATGCCGCG TGTATGAAGA AGGCCTTCGG GTTGTAAAGT ACTTTCAGCG GGGAGGAAGG GAGTGAGGTT AATAACCTTA TTCATTGACG TTACCCGCAG AAGAAGCACG GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGGAGGGTG CAAGCGTTAA TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCACGCAG GCGGTCTGTC AAGTCGGATG TGAAATCCCC GGGCTCAACC TGGGAACTGC ATTCGAAACT GGCAGGCTGG AGTCTTGTAG AGGGGGGTAG AATTCCAGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA GATCTGGAGG AATACCGGTG GCGAAGGCGG CCCCCTGGAC AAAGACTGAC GCTCAGGTGC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CC
JX290086.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter sp., A. baumannii</i>	TC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGGGG AACCCTGATC CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGCCTT ATGGTTGTAA AGCACTTTAA GCGAGGAGGA GGCTACTTTA GTTAATACCT AGAGATAGTG GACGTTACTC GCAGAATAAG CACCGGCTAA CTCTGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACAGAG GGTGCGAGCG TTAATCGGAT TTACTGGGCG TAAAGCGTGC GTAGGCGGCT TATTAAGTCG GATGTGAAAT CCCCGAGCTT AACTTGGGAA TTGCATTCGA TACTGGTGAG CTAGAGTATG GGAGAGGATG GTAGAATTCC AGGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGAGATCTG GAGGAATACC GATGGCGAAG GCAGCCATCT GGCCTAATAC TGACGCTGAG GTACGAAAGC ATGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCC

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
L37603.1 <i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. warneri</i> , <i>S. pasteurii</i>	T CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AACTCTGT TATCAGGGAAG AACAAATGTG TAAGTAACTG TGCACATCTT GACGGTACCT GATCAGAAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTATCCGGAA TTATTGGGCG TAAAGCGCGC GTAGGCGGTT TTTTAAGTCT GATGTGAAAAG CCCACGGCTC AACCGTGGAG GGTCAATTGGA AACTGGAAAA CTTGAGTGCA GAAGAGGAAA GTGGAATTCC ATGTGTAGCG GTGAAATGCG CAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT GGTCTGTAAC TGACGCTGAT GTGCGAAAAGC GTGGGGATCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCC
L08062.1 <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<i>Clostridium</i> sp., <i>C. tyrobutyricum</i>	T CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGAGTG ATGAAGGTCT TCGGATCGTA AACTCTGT TATCAGGGAAG AACAAATGTG TAAGTAACTG TGCACATCTT GACGGTACCT GATCAGAAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTATCCGGAA TTATTGGGCG TAAAGCGCGC GTAGGCGGTT TTTTAAGTCT GATGTGAAAAG CCCACGGCTC AACCGTGGAG GGTCAATTGGA AACTGGAAAA CTTGAGTGCA GAAGAGGAAA GTGGAATTCC ATGTGTAGCG GTGAAATGCG CAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT GGTCTGTAAC TGACGCTGAT GTGCGAAAAGC GTGGGGATCA AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCC
AB379690.1 <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. frederiksbergensis</i> , <i>P. mugulae</i> ,	TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGAATATTG GACAATGGGC GAAAGCCTGA TCCAGCCATG CCGCGTGTGT GAAGAAGGTC TTCGGATTGT AAAGCACTTT AAGTTGGGAG GAAGGGCATT TACCTAATAC GTAAGTGTTT TGACGTTACC GACAGAATAA GCACCGGCTA ACTCTGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACAGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA ATTACTGGGC GTAAAGCGCG CGTAGGTGGT TCGTTAAGTT GGATGTGAAA TCCCCGGGCT CAACCTGGGA ACTGCATTCA AACTGTCTGA GCTAGAGTAT GGTAGAGGGT GGTGGAATTT CCTGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGATATAG GAAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGACCACC TGGACTGATA CTGACACTGA GGTGCGAAAAG CGTGGGGAGC AACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCC

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
KC990822.1 <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> sp., <i>E. cloacae</i> , <i>E. ludwigii</i> , <i>Klebsiela oxytoca</i>	TCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGCAAGC CTGATGCAGC CATGCCGCGT GTATGAAGAA GGCCTTCGGG TTGTAAAGTA CTTTCAGCGG GGAGGAAGGT GTTGTGGTTA ATAACCACAG CAATTGACGT TACCCGCAGA AGAAGCACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGGAGGGTGC AAGCGTTAAT CGGAATTACT GGGCGTAAAG CGCACGCAGG CGGTCTGTCA AGTCGGATGT GAAATCCCCG GGCTCAACCT GGGAACTGCA TTCGAAACTG GCAGGCTGGA GTCTTGTAGA GGGGGGTAGA ATTCCAGGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATCTGGAGGA ATACCGGTGG CGAAGGCGGC CCCCTGGACA AAGACTGACG CTCAGGTGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC C
DI251184.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i>	TCCTACG GGAGGCAGCA GTAGGGAATC TTCCACAATG GACGAAAGTC TGATGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGAAGAAG GGTTTCGGCT CGTAAACTC TGTGTAAA GAAGAACATA TCTGAGAGTA ACTGTTTCAGG TATTGACGGT ATTTAACCAG AAAGCCACGG CTAAC TACGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGTGGCA AGCGTTGTCC GGATTTATTG GGCGTAAAGC GAGCGCAGGC GGTTTTTTTAA GTCTGATGTG AAAGCCTTCG GCTCAACCGA AGAAGTGCAT CGGAAACTGG GAAACTTGAG TGCAGAAGAG GACAGTGGAA CTCCATGTGT AGCGGTGAAA TGCGTAGATA TATGGAAGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT GTCTGGTCTG TAACTGACGC TGAGGCTCGA AAGTATGGGT AGCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC
JQ658346.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Weissella</i> sp., <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> ,	TCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCAC AATGGGCGAA AGCCTGATGG AGCAACGCCG CGTGTGTGAT GAAGGGTTTC GGCTCGTAAA ACACTGTTGT AAGAGAAGAA TGACATTGAG AGTAACTGTT CAATGTGTGA CCGTATCTTA CCAGAAAGGA ACGGCTAAAT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTATGT TCCAAGCGTT ATCCGGATTT ATTGGGCGTA AAGCGAGCGC AGACGGGTTA TTTAGTCTGA GTGAAAGCCC TCATCTCAAC TGAGGAATTG CTTTGAAAC TGGATGACTT GAGTGCAGTA GAGGAAAGTG GAACTCCATG TGTAGCGGTG AATGCGTAGA TATATGGAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTTTCTGGAC TGTAAC T GAC GTTGAGGCTC GAAAGTGTGG GTAGCAAACA GGATTCAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCC

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
AB690254.1 <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> sp., <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. lactis</i>	TCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCGGCAA TGGACGAAAG TCTGACCGAG CAACGCCGCG TGAGTGAAGA AGGTTTTTCGG ATCGTAAAAC TCTGTTGTTA GAGAAGAACA AGGATGAGAG TAACTGTTCA TCCCTTGACG GTATCTAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTGT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTCTT AAGTCTGATG TGAAAGCCCC CGGCTCAACC GGGGAGGGTC ATTGGAAACT GGGAGACTTG AGTGCAGAAG AGGAGAGTGG AATTCATGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATATGGAGG AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTCTCTGGTC TGTAACCTGAC GCTGAGGCTC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CC
AB269763.1 <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>S. flexneri</i>	TCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCCTG ATGCAGCCAT GCCGCGTGTA TGAAGAAGGC CTTCGGGTTG TAAAGTACTT TCAGCGGGGA GGAAGGGAGT AAAGTTAATA CCTTTGCTCA TTGACGTTAC CCGCAGAAGA AGCACCGGCT AACTCCGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGG AGGGTGCAAG CGTTAATCGG AATTACTGGG CGTAAAGCGC ACGCAGGCGG TTTGTTAAGT CAGATGTGAA ATCCCCGGGC TCAACCTGGG AACTGCATCT GATACTGGCA AGCTTGAGTC TCGTAGAGGG GGGTAGAATT CCAGGTGTAG CCGTGAATG CGTAGAGATC TGGAGGAATA CCGGTGGCGA AGGCGGCCCC CTGGACGAAG ACTGACGCTC AGGTGCGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCC
D83371.2 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. succins</i> , <i>S. haemolyticus</i>	TCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGG CGAAAGCCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGG TTTCGGCTCG TAAAACCTG TTATTAGGGA AGAACAAACG TGTAAGTAAC TGTGCACGTC TTGACGGTAC CTAATCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTATCCGG AATTATTGGG CGTAAAGCGC GCGTAGGCGG TTTCTTAAGT CTGATGTGAA AGCCCACGGC TCAACCGTGG AGGGTCATTG GAAACTGGGA AACTTGAGTG CAGAAGAGGA AAGTGGAAAT CCATGTGTAG CCGTGAATG CGCAGAGATA TGGAGGAACA CCAGTGGCGA AGGCGACTTT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG ATGTGCGAAA GCGTGGGGAT CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCC

prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
GQ478254.1 <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. myccoides</i>	TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC CGCAATGGAC GAAAGTCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGCT TTCGGGTTCGT AAAACTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTGC TAGTTGAATA AGCTGGCACC TTGACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTATCCGG AATTATTGGG CGTAAAGCGC GCGCAGGTGG TTTCTTAAGT CTGATGTGAA AGCCCACGGC TCAACCGTGG AGGGTCATTG GAAACTGGGA GACTTGAGTG CAGAAGANGA AAGTGGAAAT CCATGGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT ATGGAGGAAC ACCAGTGGCG AANGCGACTT TCTGGTCTGT AACTGACACT GAGGCGCGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCC
AB027544.2 <i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas</i> sp., <i>A. hydrophila</i> , <i>A. bestiarium</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>Haemophilus piscium</i>	TCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGGGAAACC CTGATGCAGC CATGCCGCGT GTGTGAAGAA GGCCTTCGGG TTGTAAAGCA CTTTCAGCGA GGAGGAAAGG TTGGCGCCTA ATACGTGTCA ACTGTGACGT TACTCGCAGA AGAAGCACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGGAGGGTGC AAGCGTTAAT CGGAATTACT GGGCGTAAAG CGCACGCAGG CGGTTGGATA AGTTAGATGT GAAAGCCCCG GGCTCAACCT GGGAAATGCA TTTAAAACCTG TCCAGCTAGA GTCTTGTAGA GGGGGGTAGA ATTCCAGGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATCTGGAGGA ATACCGGTGG CGAAGGCGGC CCCCTGGACA AAGACTGACG CTCAGGTGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC C
FJ462686.1 <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i>	TC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCA CAATGGGCGC AAGCCTGATG GAGCAACACC GCGTGAGTGA AGAAGGGTTT CGGCTCGTAA AGCTCTGTTG TTAAAGAAGA ACACGTATGA GAGTAACTGT TCATACGTTG ACGGTATTTA ACCAGAAAGT CACGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG TGGCAAGCGT TATCCGGATT TATTGGGCGT AAAGAGAGTG CAGGCGGTTT TCTAAGTCTG ATGTGAAAGC CTTCGGCTTA ACCGGAGAAG TGCATCGGAA ACTGGATAAC TTGAGTGCAG AAGAGGGTAG TGGAACCTCA TGTGTAGCGG TGGAATGCGT AGATATATGG AAGAACACCA GTGGCGAAGG CGGCTACCTG GTCTGCAACT GACGCTGAGA CTCGAAAGCA TGGGTAGCGA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCC

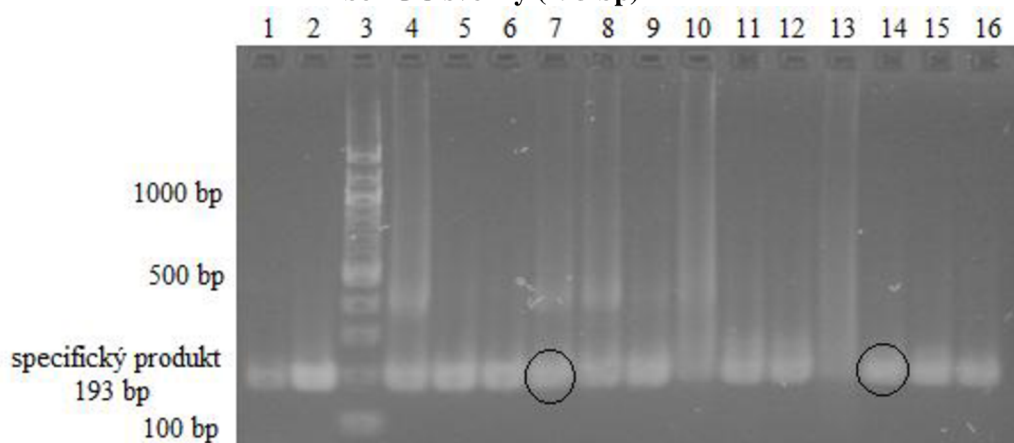
prístupové číslo	bakteriálne druhy	sekvencia
HE805077.1 <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus</i> sp., <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. l.</i> ssp. <i>cremoris</i>	TC CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCGG CAATGGACGA AAGTCTGACC GAGCAACGCC GCGTGAGTGA AGAAGGTTTT CGGATCGTAA AACTCTGTTG GTAGAGAAGA ACGTTGGTGA GAGTGAAAG CTCATCAAGT GACGGTAACT ACCCAGAAAG GGACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTCCCGAGCG TTGTCCGGAT TTATTGGGCG TAAAGCGAGC GCAGGTGGTT TATTAAGTCT GGTGTA AAAAG GCAGTGGCTC AACCATTGTA TGCATTGGAA ACTGGTAGAC TTGAGTGCAG GAGAGGAGAG TGGAAATCCA TGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGATATATGG AGGAACACCG GTGGCGAAAAG CGGCTCTCTG GCCTGTA ACT GACTGAGG CTCGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCC

- ✓ Komplementárne sekvencie k oboj sadám primérov boli nájdené u všetkých testovaných kmeňov. Sekvencie medzi primérami sa líšili.

10.7 Reamplifikácia produktov PCR-DGGE

Pre reamplifikáciu bolo vybraných 13 fragmentov, produktov PCR-DGGE syrov a nálevov (vyznačené čiernou farbou na obrázku 8), ktoré boli eluované v 100 µl TE pufu. Vybrané produkty PCR-DGGE boli reamplifikované s primérami bez GC svorky. Optimalizované zloženie PCR zmesi je uvedené v tabuľke 9 (kapitola 9.7). Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR po reamplifikácii sú uvedené na obrázku 10.

Obrázok 10 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR po reamplifikácii s primérami bez GC svorky (193 bp)



beh	DNA fragment	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
1	negatívna kontrola	–	–
2	pozitívna kontrola	+++	–
3	DNA štandard 100 bp		
4	KS 1-9	+++	++
5	KS 3-5	+++	–

beh	DNA fragment	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
6	KS 3-6	+++	-
7	S 5-6	+++	++
8	S 5-7	+++	++
9	S 6-9	+++	+
10	S 6-10	++	+
11	KL 1-3	+++	-
12	KL 3-3	+++	-
13	KL 3-5	++	-
14	L 6-7	+++	-
15	L 6-8	+++	-
16	L 6-9	+++	-

+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
 - produkty PCR neboli detegované

- ✓ Amplifikovaná bola DNA eluovaná z gélu s priméromi bez GC svorky. Okrem produktov PCR o veľkosti 193 bp boli amplifikované i nešpecifické produkty PCR.

10.7.1 Optimalizácia reamplifikácie

Z dôvodu tvorby nešpecifických produktov PCR hlavne po amplifikácii DNA izolovanej zo syrov a nálevov bola optimalizovaná PCR s priméromi bez GC svorky podľa postupu v kapitole 9.6.1. Pre optimalizáciu bola použitá DNA fragmentov S 5-6 a L 6-7. DNA bola pred optimalizáciou prečistená magnetickými časticami podľa postupu v kapitole 9.7.

Optimalizácia sa týkala množstva dNTP, primérov, počtu cyklov, množstva horečnatých iónov, LA polymerázy a DNA.

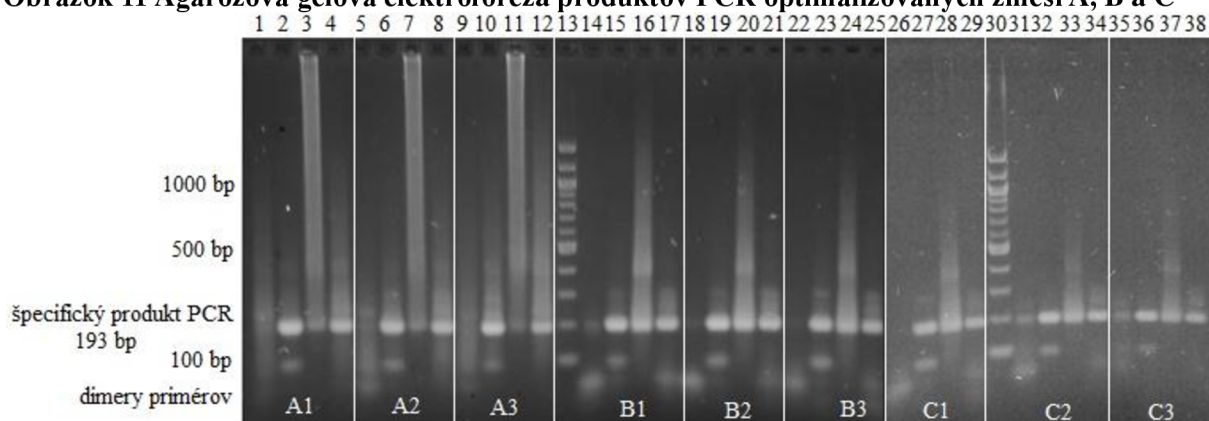
V zmesiach A a B bolo optimalizované množstvo dNTP a počet cyklov amplifikácie. V zmesiach C bolo optimalizované množstvo primérov v 30 cykloch. V zmesiach D bolo optimalizované množstvo DNA polymerázy, v zmesiach E množstvo Mg^{2+} iónov a v zmesiach F množstvo templátovej DNA. Najlepšie vyhodnotených výsledky z predchádzajúcich optimalizácií s najmenšou intenzitou nešpecifických produktov PCR boli použité v zmesi G, kde bolo znovu hodnotené množstvo templátovej DNA. Zloženie zmesi pre PCR je uvedené v tabuľke 20, 21 a 22. Výsledky gélovej elektroforézy pre zmesi A, B a C sú uvedené na obrázku 11, pre zmesi D, E a F na obrázku 12 a pre zmes G na obrázku 13.

Tabuľka 20 Zloženie optimalizovaných zmesí A-C pre PCR s priméromi bez GC svorky

č.	komponent	objem [μl]								
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
1.	voda pre PCR	12,3	12,8	13,3	12,8	13,3	13,8	13,8	14,3	14,8
2.	LA pufor kompletný	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
3.	zmes dNTP (10 mM)	2	1,5	1	1,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5
4.	primér F357 (10 pmol/μl)	1	1	1	1	1	1	1	0,75	0,5
5.	primér R518 (10 pmol/μl)	1	1	1	1	1	1	1	0,75	0,5

č.	komponent	objem [μl]								
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
6.	DMSO enhancer	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7.	MgCl ₂ (25 mM)	4	4	4	4	4	4	4	4	4
8.	LA polymeráza Top Bio (5 U/μl)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
9.	DNA matrica (100 ng/μl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Počet cyklov	40			30			30		

Obrázok 11 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR optimalizovaných zmesí A, B a C



beh	zn.	DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
1	A1	negatívna kontrola	-	-
2		pozitívna kontrola	+++	+
3		S 5-6	+	+
4		L 6-7	+++	+
5	A2	negatívna kontrola	-	-
6		pozitívna kontrola	+++	+
7		S 5-6	+	+
8		L 6-7	+++	+
9	A3	negatívna kontrola	-	-
10		pozitívna kontrola	+++	++
11		S 5-6	+	++
12		L 6-7	+++	++
13	DNA štandard 100 bp			
14	B1	negatívna kontrola	-	-
15		pozitívna kontrola	+++	++
16		S 5-6	++	++
17		L 6-7	+++	++
18	B2	negatívna kontrola	-	-
19		pozitívna kontrola	+++	++
20		S 5-6	++	++

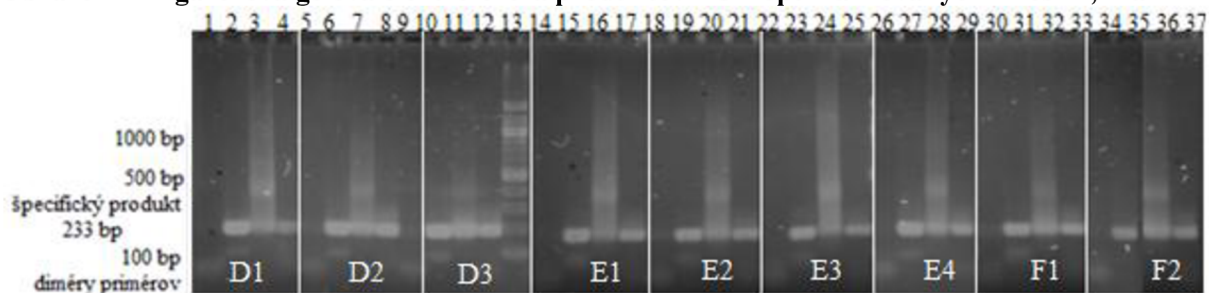
beh		DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
21		L 6-7	+++	++
22	B3	negatívna kontrola	-	-
23		pozitívna kontrola	+++	++
24		S 5-6	++	++
25		L 6-7	+++	++
26	C1	negatívna kontrola	-	-
27		pozitívna kontrola	+++	++
28		S 5-6	++	++
29		L 6-7	+++	++
30		DNA štandard 100 bp		
31	C2	negatívna kontrola	+	-
32		pozitívna kontrola	+++	-
33		S 5-6	++	+
34		L 6-7	+++	+
35	C3	negatívna kontrola	-	-
36		pozitívna kontrola	+	-
37		S 5-6	++	+
38		L 6-7	+++	+

+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
 - produkty PCR neboli detegované

Tabuľka 21 Zloženie optimalizovaných zmesí D-E pre PCR s priméromi bez GC svorky

č.	Komponent	objem [μl]								
		D1	D2	D3	E1	E2	E3	E4	F1	F2
1.	voda pre PCR	14,8	14,85	14,9	14,3	13,8	13,3	12,8	15,05	15,3
2.	LA pufor kompletný	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
3.	zmes dNTP (10 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
4.	primér F357 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
5.	primér R518 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
6.	DMSO enhancer	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7.	MgCl ₂ (25 mM)	4	4	4	4,5	5	5,5	6	4	4
8.	LA polymeráza Top Bio (5U/μl)	0,2	0,15	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
9.	DNA matrica (100 ng/μl)	1	1	1	1	1	1	1	0,75	0,5

Obrázok 12 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR optimalizovaných zmesí D, E a F



beh	zn.	DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
1	D1	negatívna kontrola	–	–
2		pozitívna kontrola	+++	–
3		S 5-6	++	++
4		L 6-7	+++	–
5	D2	negatívna kontrola	–	–
6		pozitívna kontrola	+++	–
7		S 5-6	+++	++
8		L 6-7	+++	+
9	D3	negatívna kontrola	–	–
10		pozitívna kontrola	+++	–
11		S 5-6	+++	++
12		L 6-7	+++	+
13	DNA štandard 100 bp			
14	E1	negatívna kontrola	–	–
15		pozitívna kontrola	+++	–
16		S 5-6	+	++
17		L 6-7	+++	–
18	E2	negatívna kontrola	–	–
19		pozitívna kontrola	+++	–
20		S 5-6	++	++
21		L 6-7	+++	–
22	E3	negatívna kontrola	–	–
23		pozitívna kontrola	+++	–
24		S 5-6	+	++
25		L 6-7	+++	–
26	E4	negatívna kontrola	–	–
27		pozitívna kontrola	+++	–
28		S 5-6	++	++
29		L 6-7	+++	–
30	F1	negatívna kontrola	–	–
31		pozitívna kontrola	+++	–
32		S 5-6	++	++

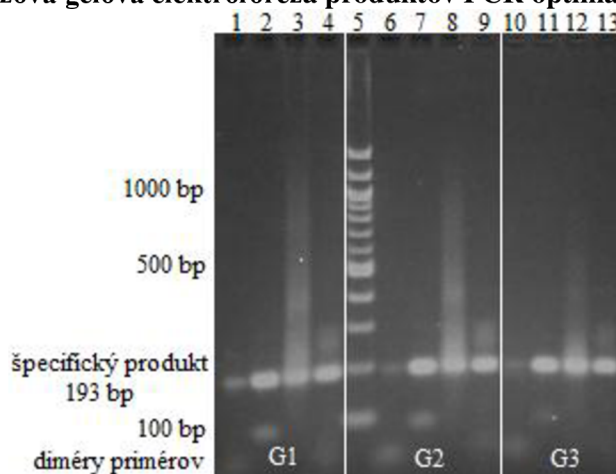
beh		DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
33		L 6-7	+++	+
34	F2	negatívna kontrola	-	-
35		pozitívna kontrola	+++	-
36		S 5-6	++	++
37		L 6-7	+++	-

+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
 - produkty PCR neboli detegované

Tabuľka 22 Zloženie optimalizovaných zmesí G pre PCR s priméromi bez GC svorky

č.	komponent	objem [μl]		
		G1	G2	G3
1.	voda pre PCR	12,9	13,15	13,4
2.	LA pufor kompletný	2,5	2,5	2,5
3.	zmes dNTP (10 mM)	0,5	0,5	0,5
4.	primér F357 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5
5.	primér R518 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5
6.	DMSO enhancer	1	1	1
7.	MgCl ₂ (25 mM)	6	6	6
8.	LA polymeráza Top Bio (5U/μl)	0,1	0,1	0,1
9.	DNA matrica (100 ng/μl)	1	0,75	0,5

Obrázok 13 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR optimalizovaných zmesí G



beh	zn.	DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
1	G1	negatívna kontrola	-	-
2		pozitívna kontrola	+++	-
3		S 5-6	++	+
4		L 6-7	+++	+
5	G2	negatívna kontrola	-	-
6		pozitívna kontrola	+++	-

beh		DNA	detekcia produktov PCR	prítomnosť nešpecifických produktov
7		S 5-6	+++	+
8		L 6-7	+++	+
9		DNA štandard 100 bp		
10	G3	negatívna kontrola	-	-
11		pozitívna kontrola	+++	-
12		S 5-6	+++	-
13		L 6-7	+++	-

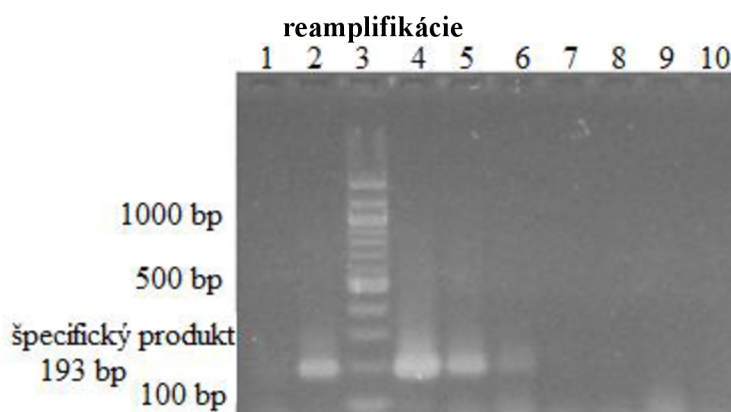
+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
 - produkty PCR neboli detegované

- ✓ Agarózová gélová elektroforéza preukázala, že najoptimálnejšie podmienky pre reamplifikáciu amplikónov boli v zmesiach B3 (0,5 µl dNTP) a C3 (0,5 µl DNA). 30 cyklov bolo pre analýzu vhodnejších ako 40. Najmenšie množstvo nešpecifických produktov PCR bolo viditeľné v zmesiach D3 (0,1 µl DNA polymerázy), E4 (6 µl Mg²⁺ iónov) a F2 (0,5 µl DNA). Najmenšie množstvo nešpecifických produktov PCR bolo viditeľné v zmesi G3 (0,1 µl DNA polymerázy, 6 µl Mg²⁺ iónov a 0,5 µl DNA (obsahujúcej 1 ng/µl a viac DNA, viď ďalej)). PCR zmes pozostávala z kompletného LA pufru (5 µl), dNTP (0,5 µl), primérov (0,5 µl), DMSO (1 µl), MgCl₂ (25 mM), LA polymeráza (5 U/µl), a DNA matrice (100 ng/µl).

10.7.2 Stanovenie citlivosti reamplifikácie

S cieľom stanoviť odhadom množstvo DNA v PCR zmesi prebehlo stanovenie najnižšieho množstva DNA, ktoré sa amplifikuje v PCR a poskytuje viditeľné produkty PCR na géle. Stanovenie citlivosti prebehlo za použitia primérov F357 GC a R518. K stanoveniu citlivosti reamplifikácie produktov PCR bola použitá DNA v množstve 100 ng – 100 fg riedená desiatkovým riedením. DNA bola izolovaná z bakteriálnej kultúry *Lactobacillus gasseri* K7. K stanoveniu citlivosti boli použité priméry F 357 a R 518 bez GC svorky. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR sú uvedené na obrázku 14.

Obrázok 14 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (193 bp) pre stanovenie citlivosti



beh	DNA	množstvo DNA	detekcia produktov PCR
1	negatívna kontrola		–
2	pozitívna kontrola	100 ng	++
3	DNA štandard 100 bp		
4	K 1	100 ng	+++
5	K 2	10 ng	++
6	K 3	1 ng	+
7	K 4	100 pg	–
8	K 5	10 pg	–
9	K 6	1 pg	–
10	K 7	100 fg	–

+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
– produkty PCR neboli detegované

- ✓ Pomocou použitej metódy je na agarózovom géle možné identifikovať produkty PCR získané po amplifikácii 1 ng a viac DNA v PCR zmesi.

10.8 Vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia amplikónov

Pre vysokorozlišovaciu analýzu kriviek topenia boli použité dve sady primérov. Prvými boli priméry F357 a R518 [36], pomocou ktorých boli reamplifikované vybrané fragmenty z DGGE (vyznačené na obrázku 8 a reamplifikované s primérmí bez GC svorky). Pre priméry UPF a UPR [37] bola ako DNA matrica použitá DNA izolovaná zo syrov, nálevov i bakteriálnych buniek riedená na 10 ng/μl (obrázok 2, tabuľka 15).

10.8.1 HRMA amplikónov s primérmí F357 a R518

Produkty PCR-DGGE boli reamplifikované s primérmí F357 a R518 pomocou cykléru pre PCR v reálnom čase, ktorý umožňuje analýzu kriviek topenia s vysokým rozlíšením. Zloženie reamplifikačnej zmesi je uvedené v tabuľke 11, použitý program pre PCR je uvedený v tabuľke 13 a program pre HRMA v tabuľke 14. Analyzované boli fragmenty po DGGE amplikónov po amplifikácii DNA syrov a nálevov (obrázok 8) a bakteriálnych buniek, ktoré pri DGGE vykazovali podobnú polohu (M1, M2, M5, M6, M7, M8, M9, M25). Pri všetkých vzorkách boli amplifikované a analyzované všetky fragmenty vyskytujúce sa v jednotlivom behu DGGE gélu. Krivky topenia fragmentov sú uvedené v prílohe 2.

V prípade väčšiny fragmentov sa hodnoty T_m pre jednotlivé fragmenty líšili od priemernej teploty o 0,2 °C. V prípade vzoriek M8 a M9 boli rozdiely teplôt väčšie. V prípade väčšiny fragmentov bol amplifikovaný jeden pík pri jednej teplote. Vo vzorkách M8-13 a M8-14 boli amplifikované dva píky.

- ✓ Pomocou HRMA analýzy produktov PCR-DGGE bolo zistené, že viaceré fragmenty prítomné v jednom behu majú rovnaké hodnoty T_m (s výnimkou L5, M8 a M9).

10.8.2 HRMA amplikónov s primérmí UPF a UPR

Kvôli overeniu zistených informácií prebehla PCR v reálnom čase s následnou HRMA analýzou aj s primérmí UPF a UPR [37]. Matricou bola DNA izolovaná zo vzoriek syrov, nálevov i bakteriálnych buniek. Produkty PCR kontrolných syrov, rovnako ako kontrolných nálevov a pokazených syrov i nálevov vykazovali 1, alebo 2 píky. Teploty topenia sú uvedené v tabuľke 21. Krivky topenia fragmentov sú uvedené v prílohe 3.

Pri porovnaní teplôt topenia bolo zistené že teplota topenia vzoriek kontrolných aj pokazených syrov je porovnateľná s teplotou topenia lyofilizovanej štartérovej kultúry. Teploty topenia kontrolných nálevov sa výrazne líšili od teplôt ostatných analyzovaných vzoriek.

Tabuľka 21 Teplota topenia amplikónov získaná HRMA analýzou produktov PCR (UPF a UPR priméry)

DNA	T _m [°C]	DNA	T _m [°C]	DNA	T _m [°C]	DNA	T _m [°C]	DNA	T _m [°C]
KS1	86,4	KL1	83,3	M1	87,8	M10	86,6	M19	87,5
KS2	86,4	KL2	83,2	M2	87,7	M11	87,1	M20	86,8
KS3	86,5	KL3	83,2	M3	87	M12	87,8	M21	87,1
S1	86,3	L1	86,2	M4	89,1	M13	88,1	M22	87,4
S2	86,4	L2	86	M5	87,6	M14	86,6	M23	87,3
S3	86,4	L3	86,1	M6	86,5	M15	85,9	M24	86,7
S4	86,4	L4	86,1	M7	87,9	M16	87,1	M25	86,3
S5	86,3	L5	86	M8	88,2	M17	87,7		
S6	86,2	L6	86,1	M9	86,4	M18	87,7		

- ✓ Porovnaním teplôt topenia syrov a nálevov so všetkými vzorkami bakteriálnych buniek bolo zistené, že porovnateľné teploty topenia majú aj vzorky M6 (*Staphylococcus epidermidis*) a M9 (*Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*). Tieto výsledky zodpovedajú aj výsledkom DGGE analýzy.

10.9 *In silico* analýza sekvencií

Fragmenty vyrezané z gélu po DGGE analýze a reamplifikované s primérmí bez GC svorky [36] (KS 2-1, KS 2-3, KS 2-8, KS3-1, S 1-1, S 1-2, S 1-3, S 1-5, S 1-7, M 25-1, M 25-2 a M 25-3) a produkty PCR po amplifikácii DNA s primérmí UPF a UPR [37] (KS3, S1, L3 a M25) boli podrobené sekvenčnej analýze. Dĺžka čitateľnej sekvencie bola pre amplikóny získané po DGGE 140 – 180 bp. Pre ostatné amplikóny bola dĺžka sekvencií 360 – 420 bp. Sekvencia primérov UPF a F 357 bola takmer zhodná. Priméry sa líšili iba prítomnosťou T na oboch koncoch sekvencie.

Získané sekvencie boli pomocou programu BLAST priradené k sekvenciám v databáze GenBank, a bolo zistené, pre ktoré mikroorganizmy sú tieto sekvencie špecifické.

Jednotlivé sekvencie a vyhládané špecifické mikroorganizmy môžete vidieť v tabuľke 22.

Tabuľka 22 *In silico* analýza sekvencií

fragment	primér	sekvencia	špecificita	pozn.
KS 2-1	F	CGGGCCCTCTTACTGGCAGTACGTCCTCAKACGTRCG SggccCRGGTCTTCKTACCCYGTAGTTTTAACCCWAAg ACCTTCTTCCTCGCCCCGTTGCCCGTTCAGACTTTCSTCCAT GGCCCCGGCTGCCCCYCCCGTACCCGRAAAMAA	–	
	R	CGTCAcCTTATATATAgTgSTAcGTCAcTTGCGTAgTGTCC AATGCAYCRGGTTCCTCKTATATGTCGGAGTTTAACAATCCGAA GACCTCTTCAStTCGCGCGGCTTgCTCGGTCAgAcTTTCSTCC ATTTGCCGGGCTGCCGCTCCCGTAcCCSSKRAAACA	–	
KS 2-3	F	GTCCATGTCCACTGGCGGTCCGTCCCGMKACTTTTGAA GGCCCRGGTCCTTCKTACCCCGTAgTTTGAACAAGCCWAAgA CCTTCTTCACTGCCCCGGTTCGCCCGTTCAGACTTTCSTCCAT GGCCGGCGCCCGCCGGCKTAcGSGWAAATPAACTTT	–	
	R	CAATCAcCTCGCAgATAgTgCTAcGTCACTTCGTGAgTGT CCAATGCTWTCRGGTTCCTCKCTCTGTGASTTTTAACAAcCC WAAgAcCTTCGTCAStTCGCGCGGCTTgCGCGGWCAGAcTTTC STCMATTCcCGARATGCCcCCCGCTGCCcCGKATTAcGCCCC TCACC	–	
KS 2-8	F	GACTCCCCCTTACTGGGACTACGTCACCTTCATCATTTCa ATCTCGTCRGGTTCCTCKTAcCYCGGAgTTTAcAACTTAA ACCTTCGTCACTAcCGCCGTTGCTCGGTCAgAcTTTCGTCC ATTMGCgARgAcGcCGCGYgCKRgAcGGTAAATPAAcSSySScCA CAcSGYAATPAA	<i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i> , <i>L. l. ssp. lactis</i>	*
	R	AAcGcATCTGAcTCTGTGAgGTgRCRTTGCgAAAcTGT McAMGCTWTCRgATcGKTcRcTATATGAgTTTTAAcAAcTGT TgGTAcCcATcGTCAAGcTCGcCGcGTTGCTCGcTTGAcTTTTcS TgGTTGcCGAcTAcGTGCcMKWGAcGGTATcSgScCGcWCAC GGTATAA	–	
KS 3-1	F	GTACTAgTCTcCTCGcGGcCGTCCTTCATTTTTgAAgGM CGTCRgGTgATTCAcTAcYcTgTTCCTTTAcAAcTCcGGTGCcT TcGTcGgAcAcCCcGGcGTTGcCGcGTcAcAgAcTTTCcATTTg GcGARRAcCCcYcGcGcCKgAcYcCYWgTAYTAgScCCcCCAcCC CTTAATAA	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>uncultured Vagococcus</i> sp.	**
	R	CAAcAcCCGcTAAcTCTgTSTgAgcTCRCCTTGCgTgAgTGA cSAAKgTTTTcGgATcGTTcWcCTCTGTGgARTTTTAAcAAcTCC TAGTAcCTTcGTcAMTCCTCGcGGcGTTgCTCGcGTTgAcCTTTCs TCCATTTGcGcSTAcGTGCcMgGcCTGAcCCGGTAAATAcGTCCCTC	–	
S 1-1	F	CGCCGTCCATGCACTGGTAgGAcGTCCcCGCTCGcTTCGS GCTCGTCRgGTCTTCKTAcCCGgAgTTTTAcAAcTCCGAaA AcCTTCCTTCAcGcCGcGcGcGcTTCGGTCAgAcTTTCGTCCM TTMcCGcGGcTgCCcGcSgCGTARgGSGTAgAA	<i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i> , <i>L. l. ssp. lactis</i> , <i>Bacillus</i> sp.	*
	R	GATTATgTCAcTCTcTgAgcTAcGTAcCCGcGTAgTTTTcC SgCTTWTCRgGTCCCTCGcTAcGTCCgAgTTTTAcAAcAYCCgAg RACCTTCCTCACTCGcGcGcGcGcTTCGTCAgAcTTTCSTGR TTGCCGGcGTGCCcCGcCKTCAgSTRATCTG	–	
S 1-2	F	GTAAcTCTCGTTCGgAgAcCGcTTCCTTgCTTAcTgTgAA GCTYgTCRgGTCTTCKTAcYcGgAgTTTTAcAAcTCCAAWAA cCTTCTTCGTAcGcCGcGcGcGcGcTTCGGTCAgAcTTTCGTTCGT TGGcGARgAcGcCGcYScCKTAcSgTAgTAcTAA	<i>Uncultured Vagococcus</i> sp., <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> <i>hortii</i>	** /***

	primér	sekvencia	špecifita	pozn.
	R	ACCAAGTCGCTCTCTGASCGACGTCRCTTGCGTGAGTGAC AAGCTTWTCTRGATCCTTCKCTAYGTCCGAGTTTACAATCCGA AAACCTTCGTCACCTCACGCGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCST GGTTGCCGACGACGTGCCCGCCCKTAAGGTATCAGCCCCCCCCAC	<i>Uncultured Bacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Vagococcus</i> sp., <i>Bacillus horti</i> , <i>Sporomusa</i> sp., <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bacillus</i> sp.	** /***
S 1-3	F	GTACCTATATCGACAGGCGTTACGTCTTGATAGCTTTCG AMGCTCGTCRGGTTCTTCKCTACCYCGGAGTTTACAATCCGA GKACCTTCTTCTCACGCGCGGTTGCTCGGTCAGACTTTCGT CCATTGCCGCGCCGCCCKTACSGSGTAGKACTAA	<i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i> , <i>L. l. ssp lactis</i>	*
	R	ATCAACTCGCTCTCTGTGCTACGTCACTTGCGWAGTTTCC ACGGTCWTCRGGTCTTCKCTACGTCCGAGTTTACAATCCGA AAACCTTCGTCACCTCACGCGCGGTTGCTCGGTCAGACTTTCGT CMATTACCGAGGCCGCGYGCCGCGWTGCGGTAATACAGCCCCC CAC	<i>Enterococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>B. horti</i> , <i>Vagococcus</i> sp., <i>Enterococcus casseliflavus</i>	** /***
S 1-5	F	GTCGCAAGATATTAGTGGGAGSACCGTCCCCTGAGCTTT CCAMGCTCGTCRGGTTCTTCKCTACCYCGGAGTTTACAATCC GAGTACCTTCTTCTCACGCGCGGTTGCTCGGTCAGACTTTC GTCCATTGCCGASGACGCCGCCSCKTACSGSGTAGTA	<i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i> , <i>L. l. ssp lactis</i>	*
	R	GAGTATGTCTCTCTCTGTGCTACGTACCGGCTACTGTCC SGCTTWTCTRGATTCTTCKCTACGTCCGAGTTTACAATCCTAG KACCTTCGTCACCTCTCGCGCGGTTGCTCGGTCAGACTTTCSTG GTTGCCGCSGACGCCGCCCKTGC GGTAATCGCTTG	<i>Enterococcaceae</i> , <i>Streptococcus mutant</i>	**
S 1-7	F	AACTCACACGATGTGGGAGTTACGTCTTGATCAGCTTTC GAATCTCGTCRGGTTCTTCTWCTACYCGGAGTTTACAATAAT AAACCTTCTTCACTCACGCGCGGTTGCTCGGTCAGACTTTCGT CCATTGGCGARGACGCCGYGSCKGACSGKGTGTACTAGCCCA C	<i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i> , <i>L. l. ssp lactis</i>	*
	R	AAACCGAGTCGACTCTGASTGACGTCRCTTGCGTGACTTT CCCTCTCWTCRGATTCTTCTWCTCTGTCCGAGTTTACAATCCT GGTACCTTCGTCAGGCTCGCGCGGTTGCTCGGTTGACTTTCRG GGTTGGCGACTACGTGC	—	
M 25-1	F	GCGAATACGATCTGGGCGGTCCGACGCCCTCGCAYTTTCGA ATGTCGTCKGGTTCTTCACTCTGCTGTTGTTAAGAACCRAA RACCTTCTTCACTCWCCGGCGTGGCTCGGTCACCTTCGTCCA TTGGCAARATTTCCCCCGGCSCCCCSGGGAKAAAA	—	
	R	CCGATCTCGTACTCGGTSSTAGGTCRCTGCGTGMGTGAC GAAKGTTCGATCCTTCTWCTCTGTTGGARTTAAACAACCCR AGKGCCTTTGTAARTCTCRGGCTTGCCGCGGTTACCTTMAAM GGATGGGCAAAATTTCCCCYGGCSCCCCGSKAATA	—	
M 25-2	F	CACATCCATCGATCTGGTAGTACGATCCCTCMCATTTTGG AATGTYGTCTGATTCTTCACTACYCTGTTGTTTGAATCCWA ATCCWAATGCTTTCTTCACTCWCCGGCGTTCGCTGCGCGGT CACTTTTCGTGGGGGGGAARATTTCCYCCCGCCCCSGKGA TATTA	—	
	R	GCTTAGTCGATCTCTGTSTTAGCTCRCTGCGTGYGTGAC CAAKGTTTTCGGATCCTTCTWCTCTGTTGGARTTAAASAACCTT AATGCCTTTGTARTCTCRGGCGTGC CGCGGTTACCTTMAA MGGGAGGGCWAARATTTCCCCMGGCSCCCCCYAAT	—	

fragment	primer	sekvencia	špecifita	pozn.
M 25-3	F	CCGTACTCGATCTGTTTGGTACGACACCTCGCAYTTTCGA ATGTTGTCTCRGGTTCTTCACTACGCTGTAGTTTACAATCCRAA CCTTCTTCACTCWCGCGGCGTGTCTCGGTCAGACTTTCGTCCA TTCCGARGATTCCCCCGGGTACCCCKGATAAAAA	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. horti</i> <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>E.</i> <i>faecalis</i> , uncultured <i>Vagococcus</i> sp.	** /***
	R	TCCTACGTCGTTCTCTGTGTGAGGTCRCCTGCGTGAGTGT CCAAKGTWTWCGGGTCTTCTCWCTCTGTTGGARTTAAACAACC SAAKGCCTTCGTCARTCTCGCGGCGTCCCGGGTTCCTTMAA MGGATTGGCAAARACCCCMGGCSYACGGKAAT	—	
KS3	F	TTTTTCTTCGCCTGGCGCCGGCAGCGCWGGTATMCAGYYC TTTCGCCSCGGKGGKSKCSRWATGKCVRGCTTWMAMCGGTAC AATGGAAATCCAATGAAAAGAGGCCTCTTCCACATTTCCRAG AGACATGGAAGACATCTATRGAATTTACARTGGGGTTA	—	
	R	TTTTTTGTTTTTTGGCCGGCAGCGCTGGTYTCAGCTCTT TCCCCGGKGRAATCGGATKSTCCTTTTTYCCSCTASSRTGGAA ATCCGCTCCGCTCCGGGCTTTCCACRTTTCATRCCACAAAT TGTTTAACCYTCTSTAGCGATTAACCMRCCCTAG	—	
S1	F	TTGTTTTCTTTTCTCCCCTCAGYKWCWGGYATAYRGCCRC TTTCGCCACCGGKGRWCCTCCRATTACATACCATTTCCCGCTAC CATGGAATTCCTACTCTCCTCTCCTGCCTCAATCTACCGTTTCC ATGCMTACATHHTTKAACCCCTKCCTTTTMMCCACTTWAEAC CCCCTTCGCTCCGGTTAACCCCAAAAATCCCGGAAAACCTSGG GCCAATAAACCGGCGGCGTTGRACRAAAAGCCGTCCTTTRGGG AGTGACGAACGTGAGAGAAMCCTCRCAGAASGAATCCAAAAA AGTTAAAAACGGAAAAGCGAACACGCGGGASGACATGAGGTC CAACGTGGGAAGTTS GAYAGTGCCGGGAGG	—	
	R	ATTCCTATTTTCTTTTTCYYGWCAGYKACWGGMRRRTAYS AGMARCCTTCGCCACCGGKGTMTCTCCATATATCTACCCATT TCACCGCTACCATGGAATTCCTACTCTCCTGCACTCAAGTCTAA CAGTTCAATGCATACMATGGTTGAACCACCTGCTTTTTCACCC CACTTAAAAAACCCCTGCACTCCCTTTTASCCCAAAAAACCC GGGAAACTCSGGGCTACAKAATAAACCGCGCKGCTGGCARTA TTAGRAACCCTTCAGGGAAGAGASGAATTGAGAGAATCCATCG CARAGGAATTGTAAAAAAGATGGTAAAACS GAAAATGGTCAT CAGCGGGAGGAAGYSAAGC	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> <i>agilis</i>	**
L3	F	TTCTTCTTCTCTCTTCGGTACGWCATGTTACSYAGAKAG WCRCTTCGCCACTGGTGTTCWTCCATAATCTACSTATTTC CCACTACACTARGAATTCCTACTCTCCTCTGTTACTCAAGAT AACCARTTCAAACSCARTCTGTCCGGTAAARCCGACACCTTTC MAGCTTRACTTTCTTAWCCACCRCTCCTACCCTTTACGCCAAT AATGCCAGAAAACCTTGGCTCCACMGATTACCGGGCRGCCRG GAATGATTAAGCAATTGTTCTTCAAAGGCCRAAGGAGGGAG WTTTATAGAAGSGGATTTCCCAAGGAAGATATAMAACKAA GAATTCTTCAYTCGGCGGAGTTGCTCCTCAGGTTTACCCAGGG GGAAAGATCCGAYTAAACCSGGTGGGT	<i>Halanaerobium</i> sp., uncultured organism	** *

	R	ATCCCTGTCTTCATCTTTTCTCYWCGTCATGTTACCYAGA DAGTRCCTTCGCCACTGGTGTTCWTCCTAATATCTACGTAAT TTCACCACACTACTARGAATTCCTACTCTCCTCTGTTACCTCAA GATAACCMRTTTCAAACSCARTCTGTGCGTTAAGCCGAACCTT TCMAGCTTGACTTTATTAASGACCTGGGGCCCTTTACGCCAAA AAATTCCAGGCACCTTRGCCGGAAGKATACGCGGTCCTGGAC GAGTTAAARTGGTCCCGAAGACTGARGGAGGACTAKAGACC GCGGTCTCCWAAGGAAGACTAACACCGAAGACGTCATCMTAG CGGGCTTGGTCCMTCAGGCATTACCCAGGGGGGAAGATCGGAC TGCTGCCGGTGGCSTT	—	
M25	F	TTTTCTTTCTTTCTCCYTGTGTCAGYTACGCGCYRAATRGM MRCTTTTCGCCACCGGKGWMMTCMATATATCTACCCATTTCCC GCTACACATGGAATTCCTACTCTCCTCTCCTGCACTCMARTCYA CCMRTTTCATGCATACAATGGTTGAACCAATTCCTATTACG GTCAATTTAAAAACCCCTGCCTCCGGTTTCCCCAAAAAAA TCCCGAAAASTTKGGGACWCAGATTTACGCGGCTGCTGGC AMGTATTAAGCCATCCGTTTCAGGGAAAGTTACCGACACTGAW RAGCATTCMRGAARAAGTTCTGTCTAAAAAARAGGRGAAA AAARGGAAAACCTTCGTCAACMGCGGSGAGGACGGTGAAGCRR KAAACWTGGGAAAAAACCGGACAGATCTGGGGAKG	<i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i> L. <i>l. ssp. lactis</i>	*
	R	TGAAAYGGTATCAAYTTTCYCTTGTGTCAGYTACGCGCYRAA TRGMARCKTTGCCACCGGTTCCTCCATATATCTACSCAT TTCACCGCTACACATGGAATTCCTACTCTCCTCTCCTGCACTCA ARTCGACAGTTTCCAATGCATACMATGGTTGAACCACTGCCT TTTACACCARACTTAATAAACACCTGCCCTCCCTTTACSCC MAAAAATCCGGGAAAAACTCGGGGACAKCATATACCRCGGG CGGCGGGAARAARTTAGCCRTCCCGTTTCAGGGAAGTTACCGMC ARTGARGAGCASGRARGKAAAGGAGGAAMS GTGTAAAAAAA GGGGAACRAGCRAAACMTCTGCCMTCWGGCGGGTGGCAGKY GAAGYTTYMWMCATGGGGAASATCCGGAAAGATGCCGGKAGGC AG	<i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i> L. <i>l. ssp. lactis</i>	*

* – štartérová kultúra

** – vykultivované z pokazených syrov a nálevov

*** – nevykultivované

10.10 Porovnanie identifikácie mikroorganizmov pomocou DGGE, HRMA a sekvenčnej analýzy

Porovnanie mikroorganizmov identifikovaných v kontrolných a pokazených syroch získaných pomocou použitých metód (DGGE, HRMA a sekvenovanie) je uvedené v tabuľke 23.

Tabuľka 23 Porovnanie identifikácie mikroorganizmov pomocou rôznych metód

DGGE	HRMA	sekvenovanie
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
		<i>Streptococcus</i> sp.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiela oxtoca</i>	<i>Vagococcus</i> sp.
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Halanaerobium</i> sp.

- ✓ Pomocou porovnania polohy bendov boli v syroch identifikované tri bakteriálne druhy. Porovnaním teplôt topenia boli HRM analýzou identifikované štyri bakteriálne druhy. *In silico* analýzou sekvencií získaných sekvenáciou bolo identifikovaných šesť druhov baktérií.

11 DISKUSIA

Zo sedimentov bakteriálnych buniek boli pripravené hrubé lyzáty buniek. DNA bola izolovaná z 500 µl hrubého lyzátu buniek. DNA bola následne izolovaná pomocou fenolovej extrakcie.

Gélovou elektroforézou bola overená intaktnosť izolovanej DNA. Na géle sa tvoril v prevažnej väčšine prípadov diskretný bend dostatočnej intenzity. Okrem DNA bola detegovaná i RNA, pretože bakteriálne bunky obsahujú veľké množstvo RNA [40]. Intenzita bendov DNA 14 a 24 bola veľmi nízka, ale pri overení amplifikovateľnosti pomocou PCR boli amplifikované všetky vzorky. Degradácia nemala vplyv na amplifikáciu, pretože sa amplifikovali krátke úseky DNA (193 a 233 bp).

Spektrofotometricky bola stanovená koncentrácia a overená čistota izolovanej DNA (pomer hodnôt A260/A280). Pomer absorbancií čistej DNA by sa mal pohybovať v rozmedzí 1,8 až 2,0. Ak by vzorka obsahovala proteíny, pomer by bol menší ako 1,8, v prípade obsahu RNA by bol pomer väčší ako 2,0 [35]. DNA izolovaná fenolovou extrakciou z buniek bola získaná v koncentrácii a čistote vhodnej pre PCR. Iba vo dvoch vzorkách bola DNA znečistená RNA (A260/A280 viac ako 2,0). Metóda fenolovej extrakcie je bežne používanou metódou pre izoláciu DNA z bakteriálnych buniek [40]. Pomocou fenolovej extrakcie bola izolovaná DNA v množstve, v koncentrácii a čistote vhodnej pre PCR.

V práci boli amplifikované DNA izolované zo syrov (3 kontrolné a 6 pokazených) a zo syrov (3 kontrolné a 6 pokazených). DNA bola amplifikovaná podľa [33]. Pre DGGE analýzu boli pripravené produkty PCR s GC svorkou [36]. Pre PCR s primérmí s GC svorkou bola použitá DNA zriedená na 100 ng/µl. Amplifikované produkty PCR boli približne rovnakej intenzity. Okrem špecifických produktov PCR (193, alebo 233 bp) boli detegované i ďalšie produkty PCR. Pomocou PCR s primérmí s GC svorkou boli pripravené produkty PCR v kvalite a množstve vhodnom pre DGGE analýzu.

Z dôvodu veľkého množstva nešpecifických produktov prítomných v produktoch PCR s primérmí s GC svorkou bola PCR zmes optimalizovaná. Optimalizované bolo množstvo Mg²⁺ iónov, množstvo dNTP, primérov a DNA polymerázy. Všetky tieto komponenty môžu ovplyvňovať výsledky PCR [41]. Vo všetkých zmesiach pre PCR (A1 – F3, viz tabuľka 20, 21 a 22) boli amplifikované špecifické amplikóny PCR o približne rovnakej intenzite. Jednotlivé zmesi sa líšili v množstve nešpecifických produktov PCR a v ich intenzite. Najviac nešpecifických produktov bolo po amplifikácii DNA v zmesiach A a C, najmenej v zmesiach E a F. Za najvhodnejšiu pre ďalšiu analýzu bola vybraná zmes F3. Po amplifikácii DNA s použitím tejto zmesi neboli na géle detegované významné nešpecifické produkty. V tejto zmesi bolo optimalizované ako množstvo dNTP, tak aj LA polymerázy.

DGGE produktov PCR zo syrov, nálevov a bakteriálnych buniek bola použitá pre porovnanie polohy amplikónov. Polohy amplikónov získaných po amplifikácii DNA zo syrov a nálevov boli porovnané s amplikónmi získanými po amplifikácii DNA z bakteriálnych kultúr. Použitou metódou boli od seba oddelené produkty PCR získaných amplifikáciou DNA z rôznych mikroorganizmov. To umožnilo porovnať amplikóny syrov a nálevov s amplikónmi kultúr získaných kultivačne. Informácie získané DGGE analýzou boli následne overované. Približne rovnakú polohu mali fragmenty M 2-12, M 6-5 a M 9-4, čo zodpovedalo druhom *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* a *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

Pomocou *in silico* analýzy boli za použitia bioinformatických programov (GenBank, NEBcutter®, BLAST) analyzované sekvencie 16S rDNA bakteriálnych druhov uvedených v tabuľke 2. V prípade väčšiny sekvencií boli tieto špecifické iba pre konkrétny bakteriálny druh. Iba 2 sekvencie boli špecifické pre viac, ako jeden druh (*Klebsiela* sp. a *Enterobacter* sp.). *In silico* analýzou bolo overené, že použité priméry [36, 37] boli dostatočne špecifické pre potreby našej práce. Medzi primérmí boli sekvencie rôzne.

Po amplifikácii DNA izolovanej zo syrov boli výrazne intenzívne iné pruhy ako v prípade nálevov. To poukazuje na väčšie množstvo mikroorganizmov prítomných v amplifikovaných nálevoch. Po amplifikácii DNA z pokazených syrov a hlavne nálevov bolo viditeľné väčšie množstvo pruhov, ako v kontrolných vzorkách. To vypovedá pravdepodobne o kontaminácii syrov aj nálevov mikroorganizmami, ktoré sa v pôvodných nepokazených syroch a nálevoch nevyskytovali.

V prípade DGGE uvedeného na obrázku 9 nedošlo ani po opakovaní k rovnakému rozdeleniu jednotlivých bendov. Z dôvodu prítomnosti veľkého počtu amplikónov v jednotlivých behoch DGGE nebolo možné presne zistiť, ktoré mikroorganizmy boli kontaminantmi. Prítomnosť viacerých amplikónov v jednom behu DGGE bola diskutovaná i v práci [49]. V tejto práci bolo preukázané, že niektoré baktérie vykazovali väčšie množstvo amplikónov, aj keď sa jednalo o čistú bakteriálnu kultúru. To bolo spôsobené prítomnosťou viacerých 16S rRNA génov [49]. Porovnaním amplikónov bakteriálnych buniek, syrov a nálevov boli ale zistené pravdepodobné kontaminanty.

Reamplifikácia produktov PCR-DGGE prebehla s použitím amplikónov vyrezaných z DGGE gélu. Amplikóny boli eluované v TE pufre a získaná DNA bola amplifikovaná s primérmí bez GC svorky. Získané boli produkty PCR v intenzite dostatočnej pre prečistenie a ďalšiu analýzu.

Z dôvodu tvorby nešpecifických produktov PCR podľa zmesi použitej pre priméry bez GC svorky bola PCR s primérmí bez GC svorky optimalizovaná.

V zmesiach A a B bolo ako optimálne zvolené množstvo dNTP 0,5 μ l a počet cyklov 30. Tieto výsledky boli zvolené pre ďalšiu optimalizáciu. Pri optimalizácii množstva primérov bolo za optimálne zvolené množstvo 0,5 μ l a optimalizácia pokračovala s týmito podmienkami. Najoptimálnejšie zloženie zmesi D a E bolo zvolené k ďalšej optimalizácii. Ako optimálne bolo zvolené zloženie zmesi G3, ktorého zloženie je uvedené aj v tabuľke v tabuľke 9.

Stanovenie citlivosti reamplifikácie ukázalo, že pomocou agarózovej gélovej elektroforézy nie je na agarózovom géle možné identifikovať DNA v koncentrácii nižšej ako 1 ng/ μ l.

Produkty PCR-DGGE boli následne reamplifikované s primérmí bez GC svorky. Analyzované boli všetky vzorky syrov a nálevov a vzorky sedimentov, ktoré pri DGGE vykazovali podobné fragmenty. Pri všetkých vzorkách boli amplifikované a analyzované všetky fragmenty vyskytujúce sa v jednotlivom behu. V prípade väčšiny vzoriek sa jednotlivé fragmenty líšili od priemernej teploty o 0,2 °C. V prípade vzoriek M8 a M9 boli rozdiely teplôt väčšie. Vo vzorkách M 8-13 a M 8-14 boli amplifikované 2 píky. Kvôli overeniu zistených informácií prebehla následne HRMA analýza aj s inými primérmí – UPF a UPR [37]. Matricou bola DNA izolovaná zo vzoriek syrov, nálevov i bakteriálnych buniek. V prípade väčšiny vzoriek bol amplifikovaný jeden pík pri jednej teplote. V prípade malého

počtu vzoriek softvér zariadenia identifikoval ďalší pík pri nízkej teplote. Vo všetkých prípadoch boli tieto píky veľmi nízke, čo poukazuje na veľmi nízku koncentráciu DNA s takouto teplotou topenia. Vzorky kontrolných syrov, rovnako ako kontrolných nálevov a pokazených syrov i nálevov vykazovali vždy 1 pík pri približne rovnakej teplote. Teploty topenia sú uvedené v tabuľke 21.

Pomocou HRMA analýzy produktov PCR-DGGE bolo zistené, že výskyt viacerých fragmentov prítomných jednom behu nie je spôsobený prítomnosťou rôznych bakteriálnych druhov. Pomocou HRMA analýzy s použitými primérami [36, 37] sa nepodarilo zistiť, ktoré mikroorganizmy boli kontaminantmi. Vďaka rovnakej teplote topenia vzoriek kontrolných i pokazených syrov bola ale preukázaná prítomnosť mikroorganizmov vyskytujúcich sa v lyofilizovanej štartérovej kultúre. Nakoľko v prácach zaoberajúcich sa HRM analýzou sa pri porovnaní čistých bakteriálnych kultúr s konkrétnymi vzorkami podarilo zistiť prítomné mikroorganizmy [37, 50], predpokladáme, že kontaminantom bol mikroorganizmus, ktorý sa nepodarilo kultivovať použitými kultivačnými metódami. Kontaminantom mohol byť tiež mikroorganizmus, ktorý patrí medzi eukaryotné organizmy – pravdepodobne kvasinka.

12 ZÁVER

Táto diplomová práca sa zaoberá použitím denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy a vysokorozlišovacej analýzy kriviek topenia amplikónov k analýze mikroflóry syrov. V teoretickej časti tejto práce boli charakterizované syry v solných nálevoch a ich mikroflóra. Boli tu tiež popísané fenotypové, i genotypové metódy slúžiace k analýze baktérií v potravinách. V rámci genotypových metód boli popísané použité metódy denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy, analýzy kriviek topenia a 16S rDNA sekvenácie. Posledná kapitola teoretickej časti je venovaná cieľom a úlohami bioinformatickej analýzy, ktorá je nevyhnutným krokom analýzy mikroorganizmov nasledujúcim po sekvenácii DNA.

V experimentálne časti sa táto práca zaoberá aplikáciou a optimalizáciou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy amplikónov získaných po amplifikácii DNA syrov v solnom náleve a ich nálevov. Optimalizované bolo zloženie zmesi pre PCR pred DGGE analýzou aj zloženie zmesi pre reamplifikáciu amplikónov. V oboch prípadoch bol optimalizovaný počet cyklov, množstvo dNTP, primérov, DNA polymerázy a množstvo DNA. Cieľom optimalizácie bolo odstránenie nešpecifických produktov. DNA bola amplifikovaná dvoma sadami primérov. Pomocou porovnania polohy fragmentov s fragmentmi získanými po amplifikácii bakteriálnych buniek izolovaných z analyzovaných vzoriek boli ako možné kontaminanty identifikované tri druhy mikroorganizmov.

Pomocou metódy HRMA amplikónov bola posúdená prítomnosť iba jedného z týchto druhov porovnaním sekvencií amplikónov *in silico* analýzou bolo identifikovaných päť druhov baktérií rôznych rodov.

Pomocou použitých metód bola v analyzovaných vzorkách overená prítomnosť *Lactococcus lactis*, ktorý slúžil ako štartérová kultúra. Ako kontaminant bol určené *Bacillus* sp., ktorého prítomnosť bola zistená pomocou všetkých použitých metód. Použité metódy sú po ďalšej optimalizácii vhodné pre analýzu komplexnej mikroflóry v syroch a nálevoch.

13 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] LEITE, A.M.O., et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*. 2012, vol. 31, issue 2, s. 215-221. DOI: 10.1016/j.fm.2012.03.011.
- [2] DRDÁK, M. Základy potravinárskych technológií spracovania rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 1996, 511 s. ISBN 80-967-0641-1.
- [3] GÖRNER, F., VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [4] FOX, P.F. et al. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 3rd ed. Editor Patrick F Fox. Amsterdam: Elsevier, 2004, xi, 617 s. ISBN 0-1226-3652-X1.
- [5] MIGNARD, S., FLANDROIS, J.P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, vol. 67, issue 3, s. 574-581. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.05.009.
- [6] AMMOR, S. et al. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages: A 30-month experiment. *Food Microbiology*. 2005, vol. 22, issue 5, s. 373-382. DOI: 10.1016/j.fm.2004.11.005.
- [7] OLIVE, D. B. a P. BEAN. Principles and Applications of Methods for rDNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of clinical microbiology*. 1999, č. 47, s. 1661-1669.
- [8] HELLBERG, Rosalee S., Keely G. MARTIN, Ashley L. KEYS, Christopher J. HANEY, Yuelian SHEN a R. Derike SMILEY. 16S rRNA partial gene sequencing for the differentiation and molecular subtyping of *Listeria* species. *Food Microbiology*. 2013, vol. 36, issue 2, s. 231-240. DOI: 10.1016/j.fm.2013.06.001.
- [9] SCHULLER, Margret. PCR for clinical microbiology: an Australian and international perspective. DOI: 978-90-481-9038-6.
- [10] RASTOGI, Gurdeep, Rajesh K. SANI. Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. *Microbes and Microbial Technology*. New York, NY: Springer New York, 2011, s. 29. DOI: 10.1007/978-1-4419-7931-5_2.
- [11] JUSTE, A, B THOMMA a B LIEVENS. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, issue 6, s. 745-761. DOI: 10.1016/j.fm.2008.04.009
- [12] MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. 1999, s. 317-323.
- [13] GÁBOR, M., MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A. Katedra genetiky a plemenárskej biológie. *Prehľad molekulárno-genetických metód používaných pri detekcii DNA polymorfizmu*. [Online] 2013. [Citace: 17. 10 2013.] Dostupné z: <http://kgpb.fapz.uniag.sk/subory/molgen1.pdf>.
- [14] ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [15] TONG, S. Y. C. a P. M. GIFFARD. Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012-10-12, vol. 50, issue 11, s. 3418-3421. DOI: 10.1128/JCM.01709-12.
- [16] CVRČKOVÁ, Fatima. *Úvod do praktické bioinformatiky*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2006, 148 s. ISBN 80-200-1360-1.

- [17] LUSCOMBE, N. M., GREENBAUM, D., GERSTEIN, M. *What is bioinformatics? An introduction and overview*. New Haven, USA : Yale University, 2001, stránky 83-99.
- [18] HOGEWEG, P., SEARLS, D. B. The Roots of Bioinformatics in Theoretical Biology. *PLoS Computational Biology*. 2011-3-31, vol. 7, issue 3, e1002021-. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002021.
- [19] HAGEMANN, I. S. Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. *Clinical Genomics*. Elsevier, 2015, s. 3. DOI: 10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0.
- [20] Lee-Jun C.W., Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders, *Mitochondrion*, Vol. 13, 2013, s. 379-387, ISSN 1567-7249, DOI: 10.1016/j.mito.2013.02.001.
- [21] HO, C.K.Y., et al. A comparison of 454 sequencing and clonal sequencing for the characterization of hepatitis C virus NS3 variants. *Journal of Virological Methods*. 2015, vol. 219. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.03.018.
- [22] ŽÁK, P. *Nové možnosti v sekvenování - sekvenátor GS-FLX*. Roche s.r.o., Diagnostics Division : Labor Aktuell, 2009.
- [23] Illumina Sequencing Technology. *Illumina*. [Online] 2010. [Citace: 25. 10 2014.] http://science.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.
- [24] Ion Torrent™ Next-Generation Sequencing Technology. *Life technologies*. [Online] 2014. [Citace: 8. 11 2014.] <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html>.
- [25] FENG, Y., ZHANG, Y. et al. Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology. *Genomics, Proteomics*. 2015, vol. 13, , s. 4-16. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.01.009.
- [26] Technologies. *Oxford Nanopore Technologies*. [Online] Oxford Nanopore Technologies, (c) 2015. [Citace: 10. 2 2015.] <https://www.nanoporetech.com/technology/fields-of-use/fields-of-use>.
- [27] GenBank Overview. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] 1. 4 2013. [Citace: 15. 10 2014.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- [28] Sequin for Database Submissions and Updates:A Quick Guide. *NCBI*. [Online] 21. 8 2007. [Citace: 24. 10 2014.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Sequin/QuickGuide/sequin.htm#NCBIDesktop>.
- [29] DNA Sequence formats. *Genomatix*. [Online] 1998-2014. [Citace: 25. 10 2014.] http://www.genomatix.de/online_help/help/sequence_formats.html#IG.
- [30] ORF Finder. *NCBI*. [Online] NCBI, (c) 2015. [Citace: 12. 2 2015.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>.
- [31] NEBcutter V2.0. *New England BioLabs Inc.* [Online] New England BioLabs Inc., (c) 2015. [Citace: 12. 2 2015.] <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>.
- [32] YE, J., et al. Primer-BLAST. *BMC Bioinformatics*. 2012, vol. 13, issue 1, s. 134-. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.
- [33] MOHELSKÝ, T. *Izolace DNA ze sýrů pro použití v polymerázové řetězové reakci*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Brno, 2013. Diplomová práce.

- [34] TRACHTOVÁ, Š. *Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích*. Vysoké učení technické v Brně. Brno: autor neznámý, 2011. Dizertační práce.
- [35] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analyza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [36] LIU, W., et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological Research*. 2012, vol. 167, issue 2, s. 110-115. DOI: 10.1016/j.micres.2011.05.001.
- [37] LIN, X. B., GÄNZLE, M. G. Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, vol. 186, s. 42-48. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.010.
- [38] INGENY phorU-2 Instruction manual. [Online] 2006. [Citace: 17. 10 2013.] http://www.ingeny.com/Manuals_files/INGENYphorU%20manual.pdf.
- [39] Real-Time (qPCR) Master Mixy: qPCR 2x SYTO-9 Master Mix. *Top-Bio*. [Online] (c) 2015. [Citace: 10. 2 2015.] <http://www.top-bio.cz/qpcr-master-mixy-14.html#breadCrumbs>.
- [40] SAMBROOK J., RUSSEL D.W. *Molecularcloning: A laboratorymanual (II)*. Vyd. 3. Cold Spring Laboratory Harbor Press, New York, 2001
- [41] ROSSEN, L., NØRSKOV, P., et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 1992, vol. 17, s. 37-45. DOI: 10.1016/0168-1605(92)90017-W.
- [42] LAHTINEN, S. J., et al. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiology*. 2006, vol. 23, issue 6, s. 571-577. DOI: 10.1016/j.fm.2005.09.001.
- [43] WANG, S., LEVIN, R. E. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, vol. 64, issue 1, s. 1-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.04.023.
- [44] BOGOSIAN, G., BOURNEUF, E. V. A matter of bacterial life and death. *EMBO reports*. 2001, vol. 2, issue 9, s. 770-774. DOI: 10.1093/embo-reports/kve182.
- [45] BREHM-STECHER, B. F., JOHNSON, E. A.. *Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004-09-07, vol. 68, issue 3, s. 538-559. DOI: 10.1128/MMBR.68.3.538-559.2004.
- [46] GARCÍA-CAYUELA, T., et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. *International Dairy Journal*. 2009, vol. 19, 6-7, s. 405-409. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.02.001.
- [47] AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2004, 244 s. ISBN 80-708-0534-X.
- [48] *MinElute® Handbook*. [Online] 3 2008. [Citace: 16. 10 2014.] <file:///C:/Users/Matuska/Downloads/EN-MinElute-Handbook.pdf>.
- [49] PIWAT, S., TEANPAISAN, R. 16S rRNA PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of Oral *Lactobacillus casei* Group and Their Phenotypic Appearances. *ISRN Microbiology*. 2013, vol. 2013, s. 1-6. DOI: 10.1155/2013/342082.
- [50] PORCELLATO, D. et al. Rapid Lactic acid bacteria identification in dairy products by high-resolution melt analysis of DGGE bands. *Letters in Applied Microbiology*. 2012, vol 54., s 344-351. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03210.x

14 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

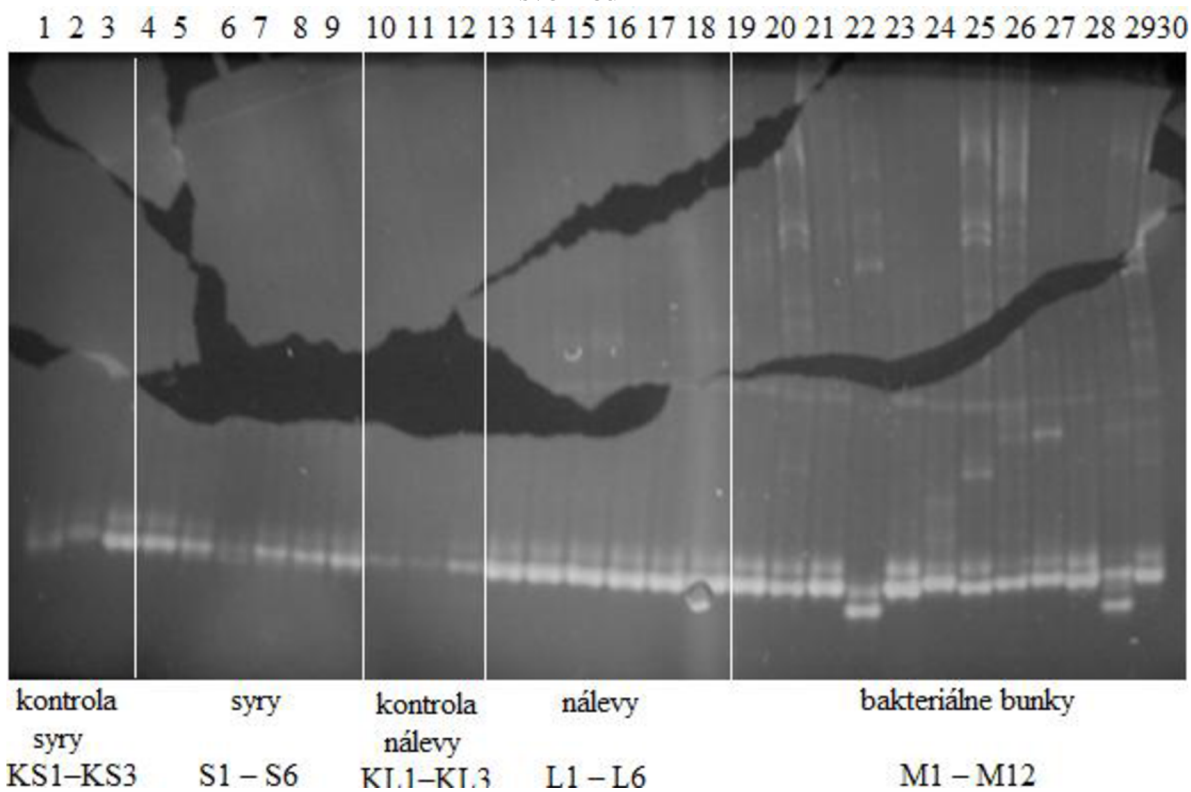
A	adenín
APS	peroxosíran amónny
BLAST	základný vyhľadávací nástroj pre lokálne priradenie
BMK	baktérie mliečneho kvasenia
bp	páry báz
C	cytozín
cDNA	komplementárna DNA
CIZ	zmes chloroform-izoamylalkohol 24:1
c _q	prahový cyklus
dATP	2'-deoxyadenozín-5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidín-5'-trifosfáty
DDBJ	Japonská DNA databanka
DGGE	denaturačná gradientová gélová elektroforéza
dGTP	2'-deoxyguanozín-5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxynukleotid-5'-trifosfát
dsDNA	dvojvláknová DNA
dTTP	2'-deoxytymidín-5'-trifosfáty
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
EMBL	Európska dátová knižnica molekulárnej biológie
emPCR	emulzná PCR
EST	čiasťčné sekvencie koncov
G	guanín
G+	gram pozitívne baktérie
GB	GenBank
GC-svorka	guanozín-cytozínová svorka
HC	vysoká koncentrácia
HRMA	analýza kriviek topenia s vysokým rozlíšením
HTGS	vysokovýkonné genómové sekvenovanie
IUPAC	medzinárodná únia čistej a aplikovanej chémie
kb	kilobázy
LA polymeráza	„Long and Accurate“ polymeráza, zmes 2 polymeráz
LC	nízka koncentrácia
MO	mikroorganizmus
MLST	multilokusová sekvenácia
MPN	metóda najpravdepodobnejšieho počtu
MRS médium	médium podľa de Mana, Rogosa a Sharpea
NCBI	národné centrum biotechnologických informácií
ORF	otvorený čítací rámec
OTU	operačná taxonomická jednotka
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PDI	index polydisperzity

PEG	polyetylénglykol
P(GMA)	poly(hydroxyetylmetakrylát-co-glycidylmetakrylát)
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina
S	sedimentačný koeficient, 1 S = 10 ⁻¹³ s
SDS	dodecylsulfát sodný
ŠK	štartérová kultúra
T	tymín
Taq DNA	termostabilný enzým izolovaný z baktérie <i>Thermus aquaticus</i>
TBE pufor	Tris-borát-EDTA pufor
TAE pufor	Tris-acetát-EDTA pufor
TEMED	tetrametyletyléndiamín
TE pufor	Tris-EDTA pufor
T _m	teplota topenia
U	jednotka enzýmovej aktivity v biochémií (jednotiek na mikroliter)
U	uracil

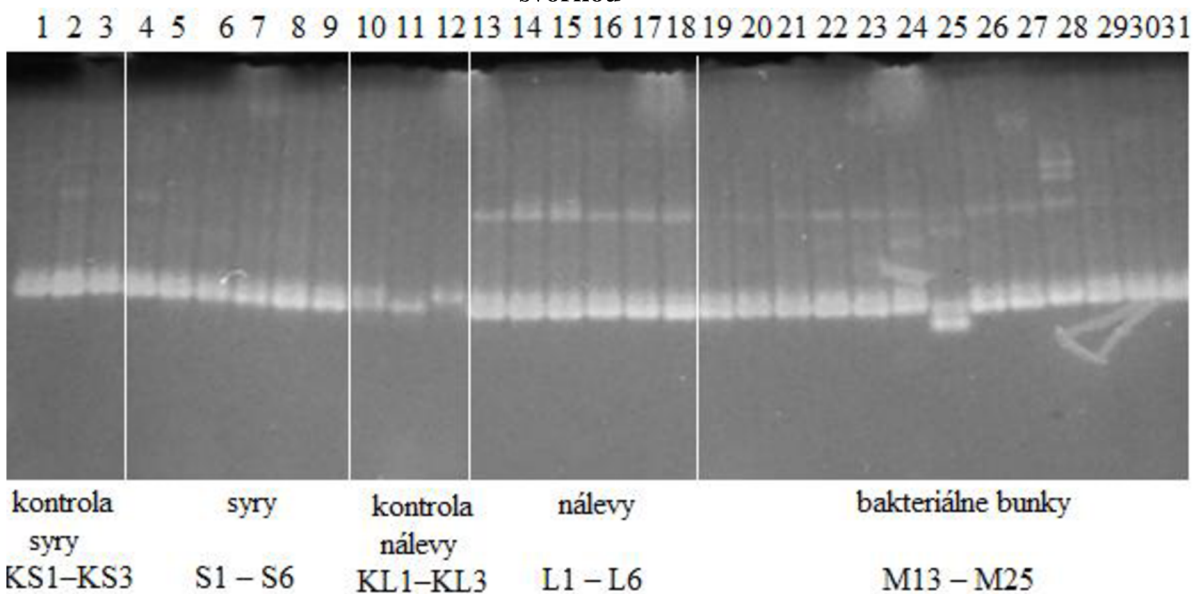
15 PRÍLOHY

15.1 Príloha 1: Denaturačná gradientová gélová elektroforéza

Obrázok 15 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza produktov PCR s primérmí s GC svorkou

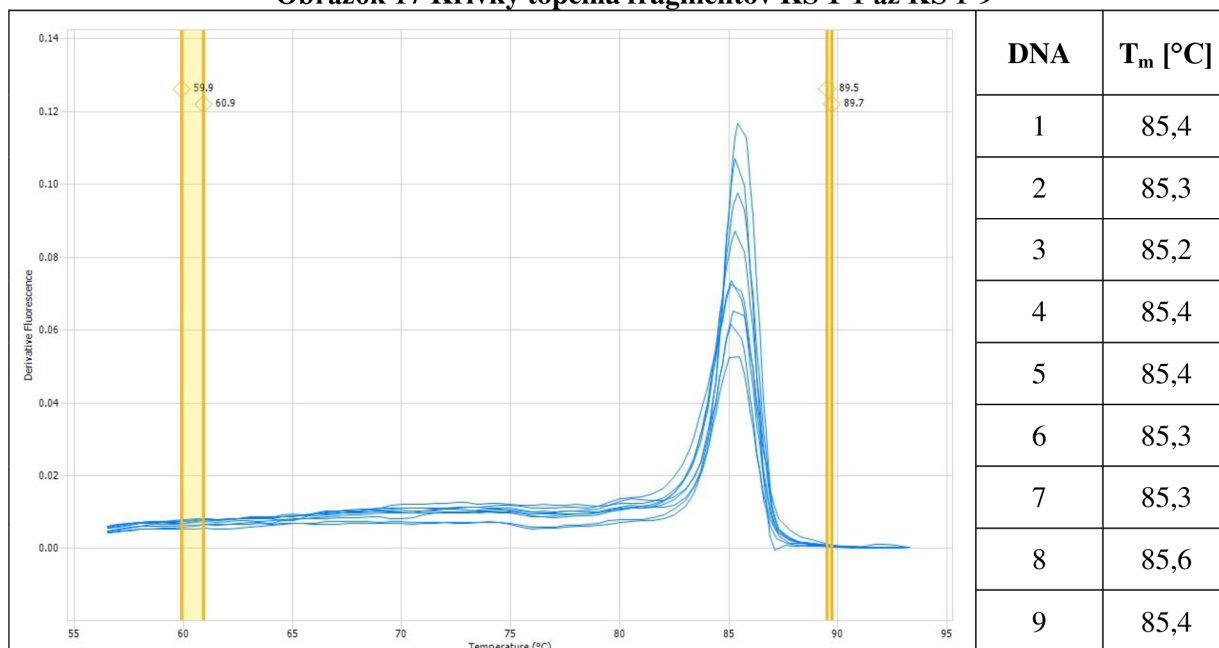


Obrázok 16 Denaturačná gradientová gélová elektroforéza produktov PCR s primérmí s GC svorkou

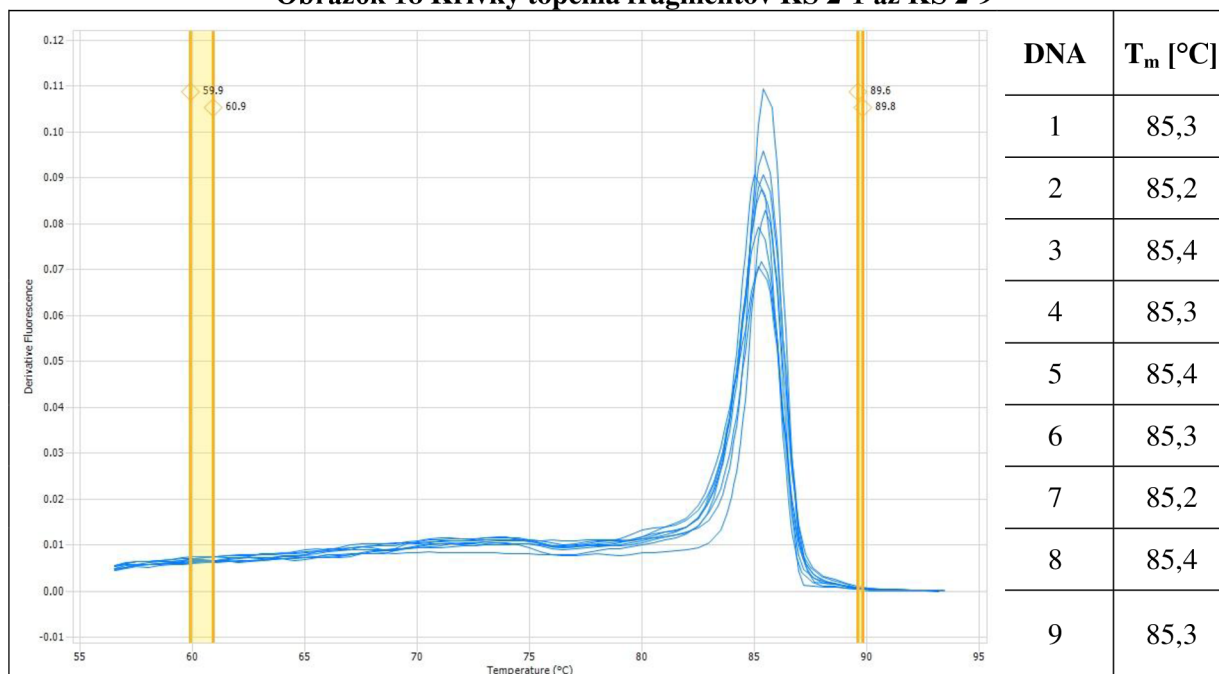


15.2 Príloha 2: Krivky topenia HRMA amplikónov s primérmí F357 a R518

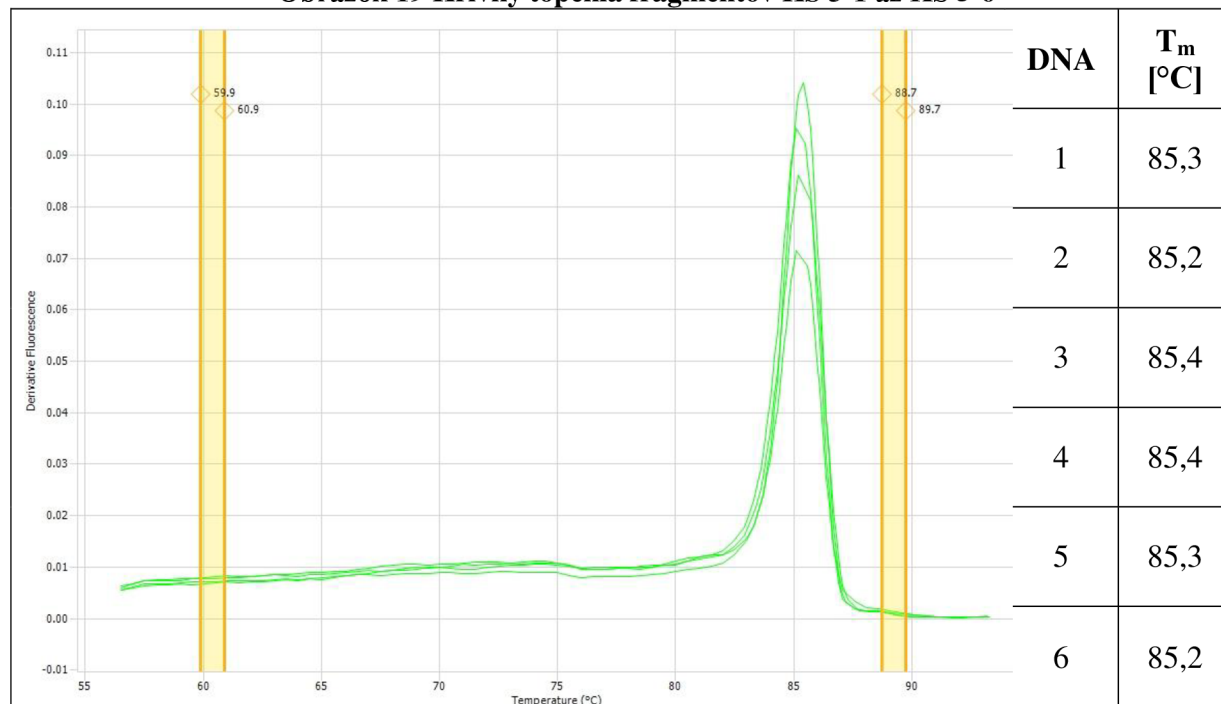
Obrázok 17 Krivky topenia fragmentov KS 1-1 až KS 1-9



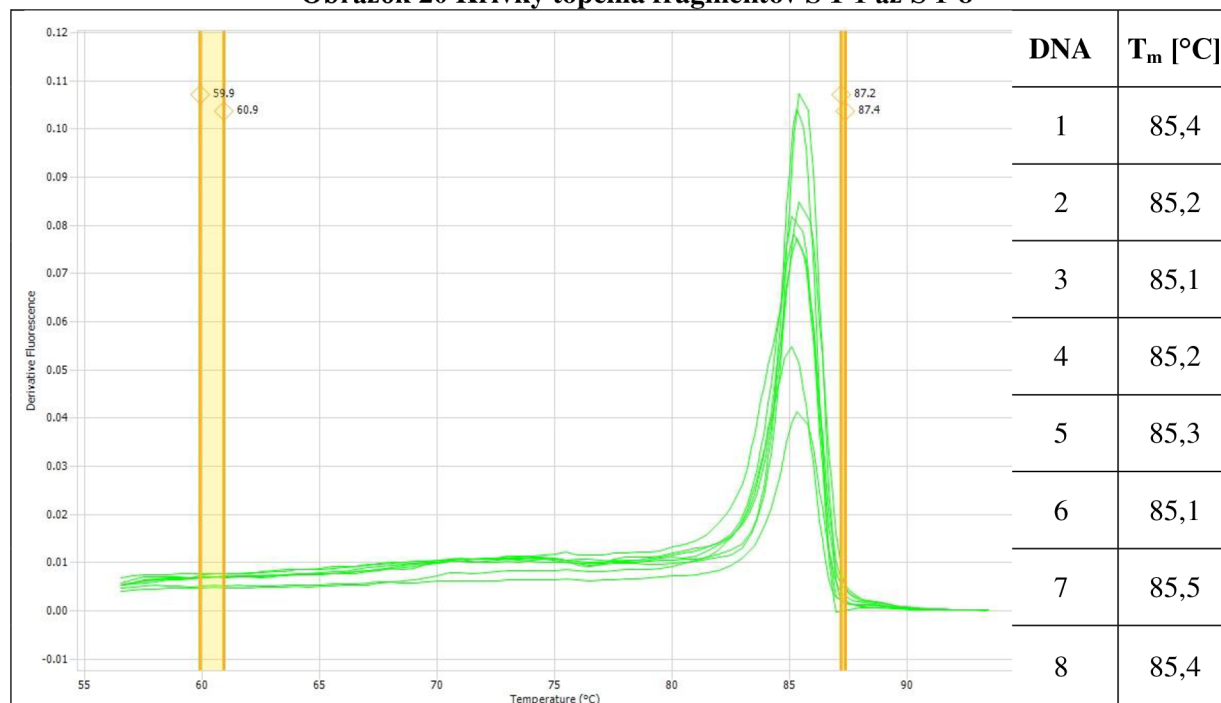
Obrázok 18 Krivky topenia fragmentov KS 2-1 až KS 2-9



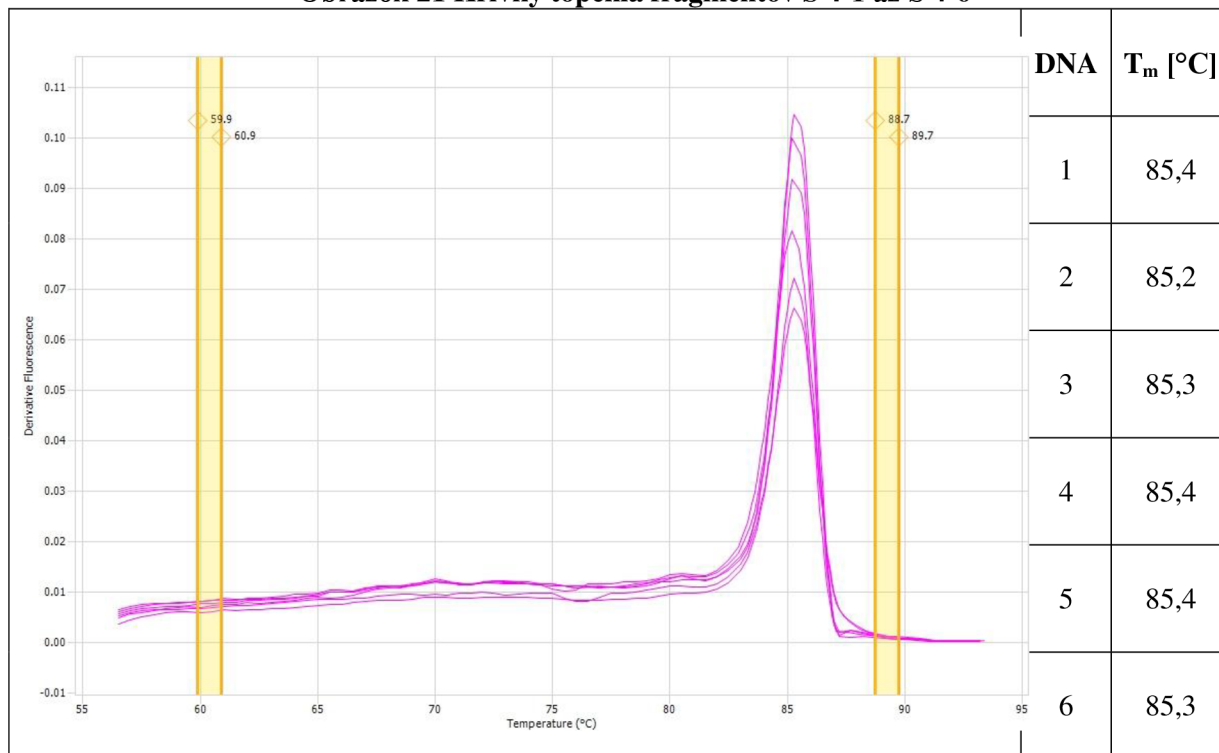
Obrázok 19 Krivky topenia fragmentov KS 3-1 až KS 3-6



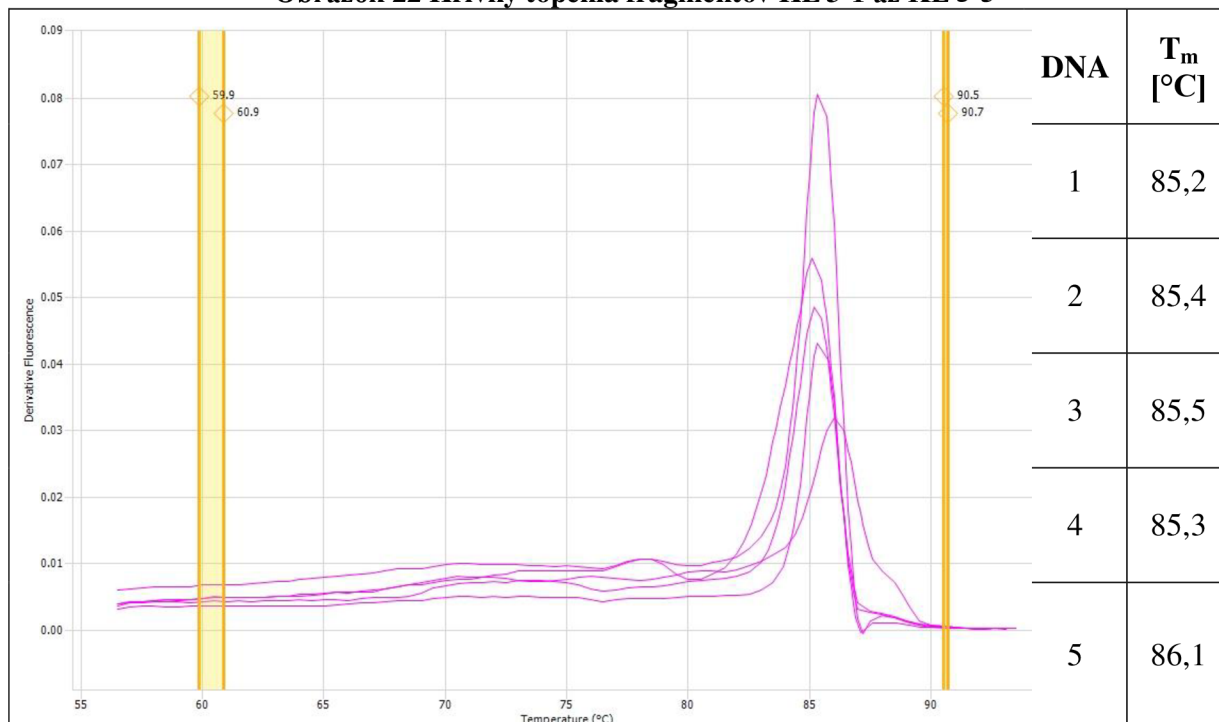
Obrázok 20 Krivky topenia fragmentov S 1-1 až S 1-8



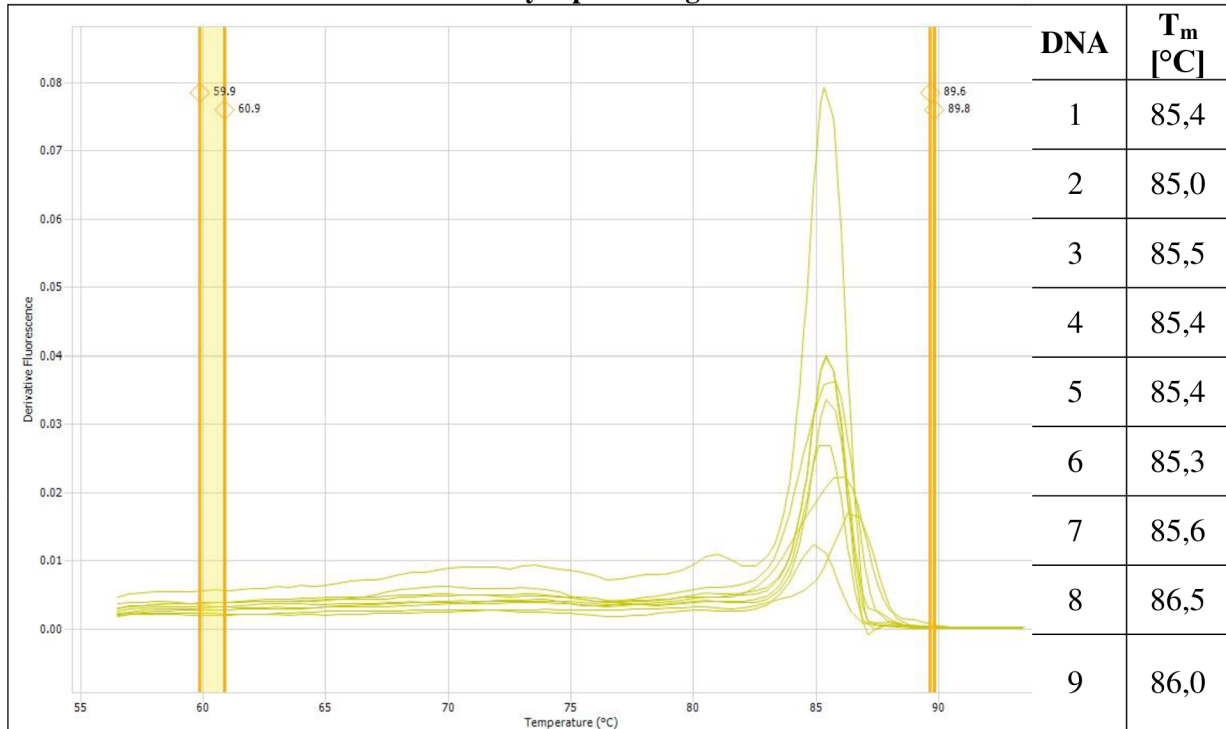
Obrázok 21 Krivky topenia fragmentov S 4-1 až S 4-6



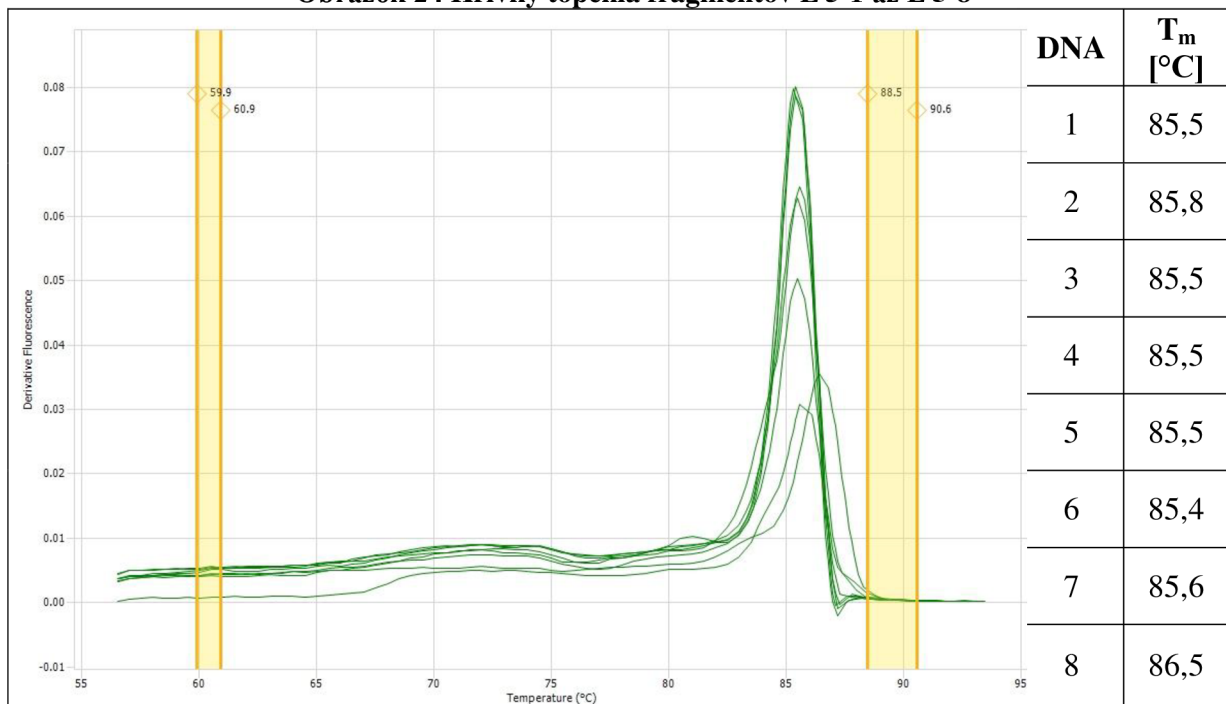
Obrázok 22 Krivky topenia fragmentov KL 3-1 až KL 3-5



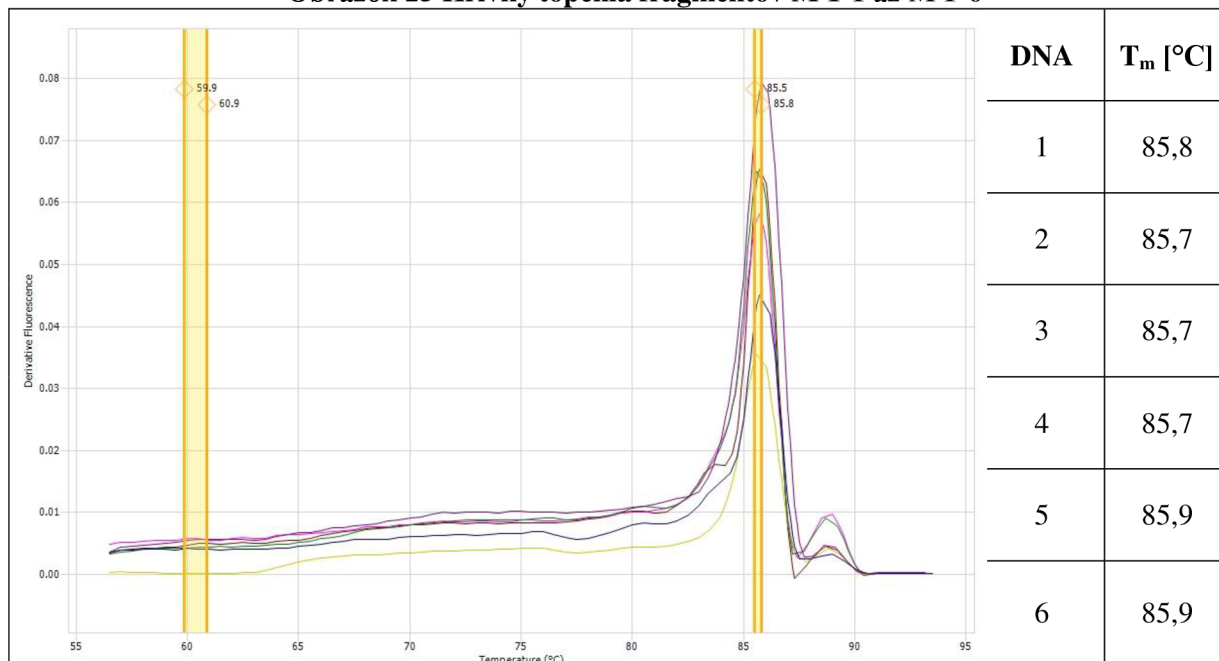
Obrázok 23 Krivky topenia fragmentov L 4-1 až L 4-9



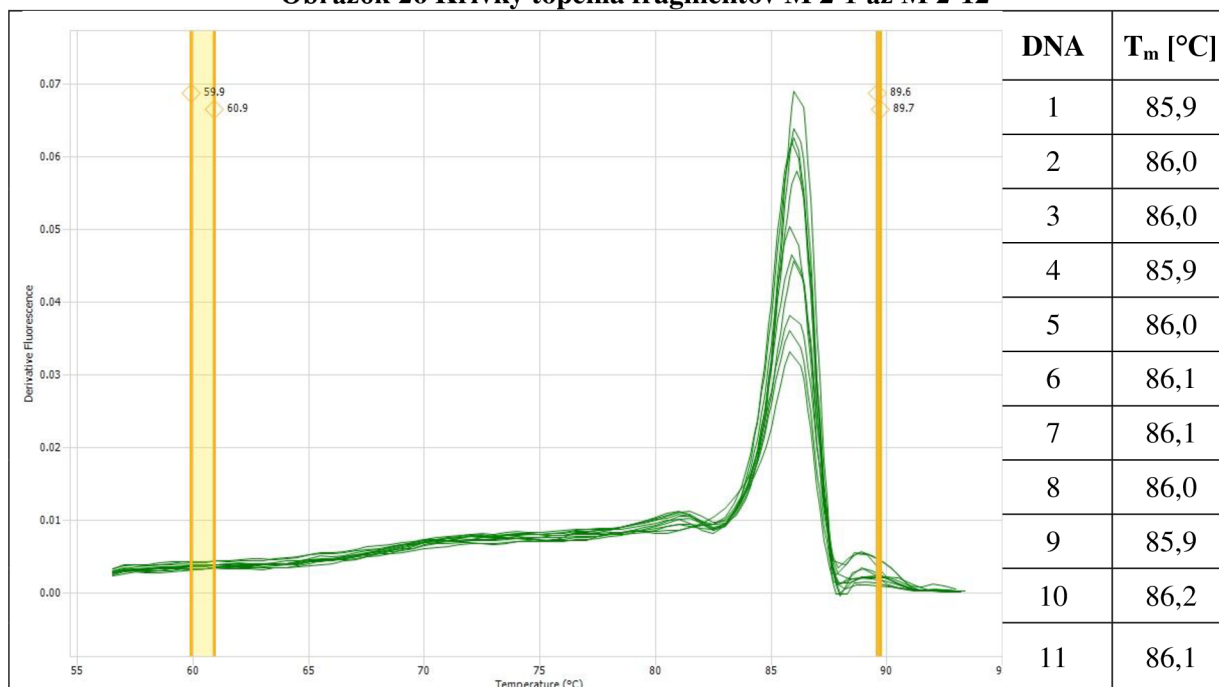
Obrázok 24 Krivky topenia fragmentov L 5-1 až L 5-8



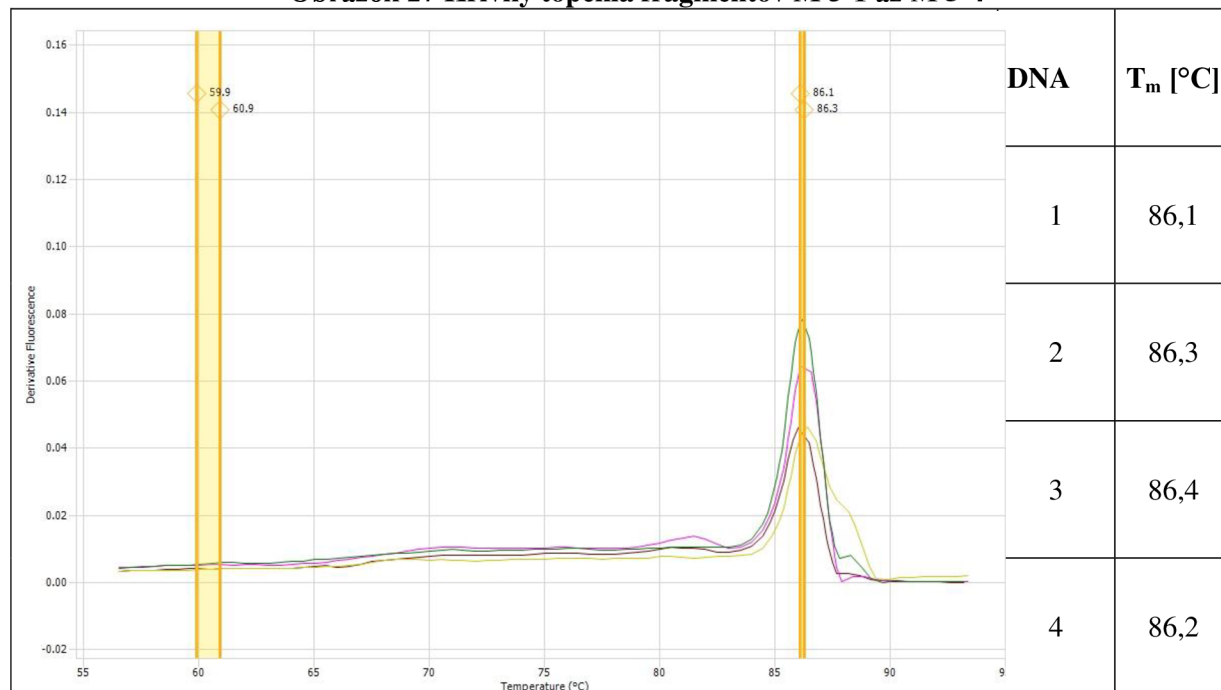
Obrázok 25 Krivky topenia fragmentov M 1-1 až M 1-6



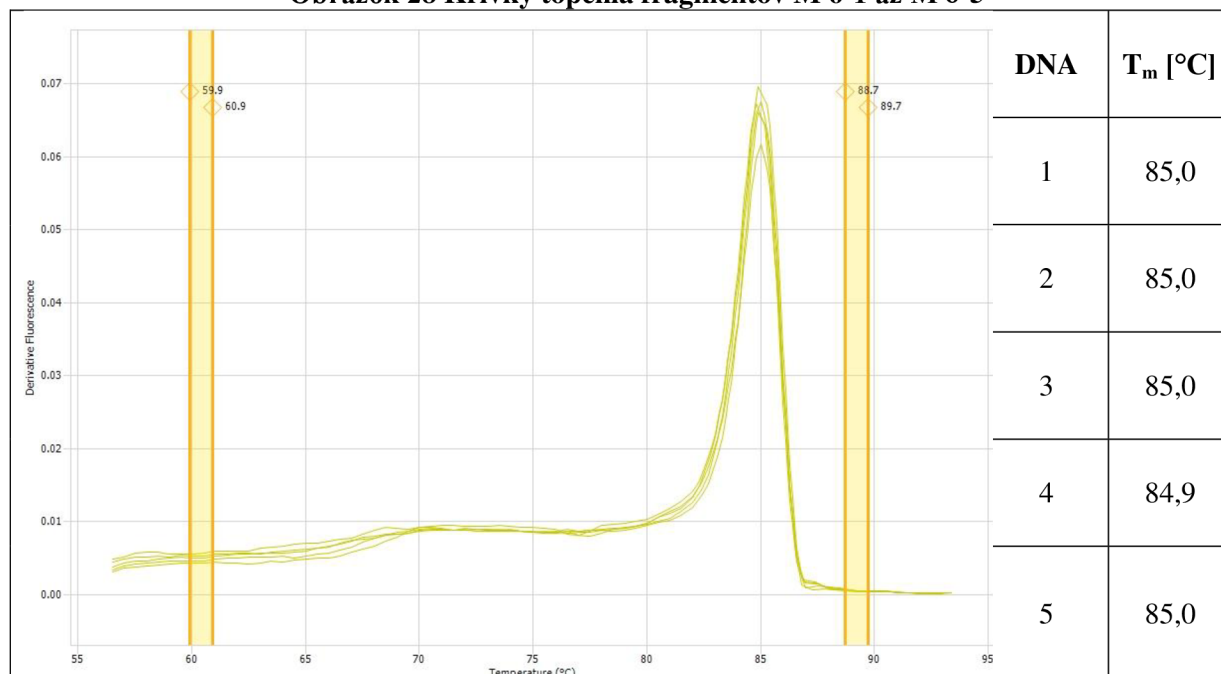
Obrázok 26 Krivky topenia fragmentov M 2-1 až M 2-12



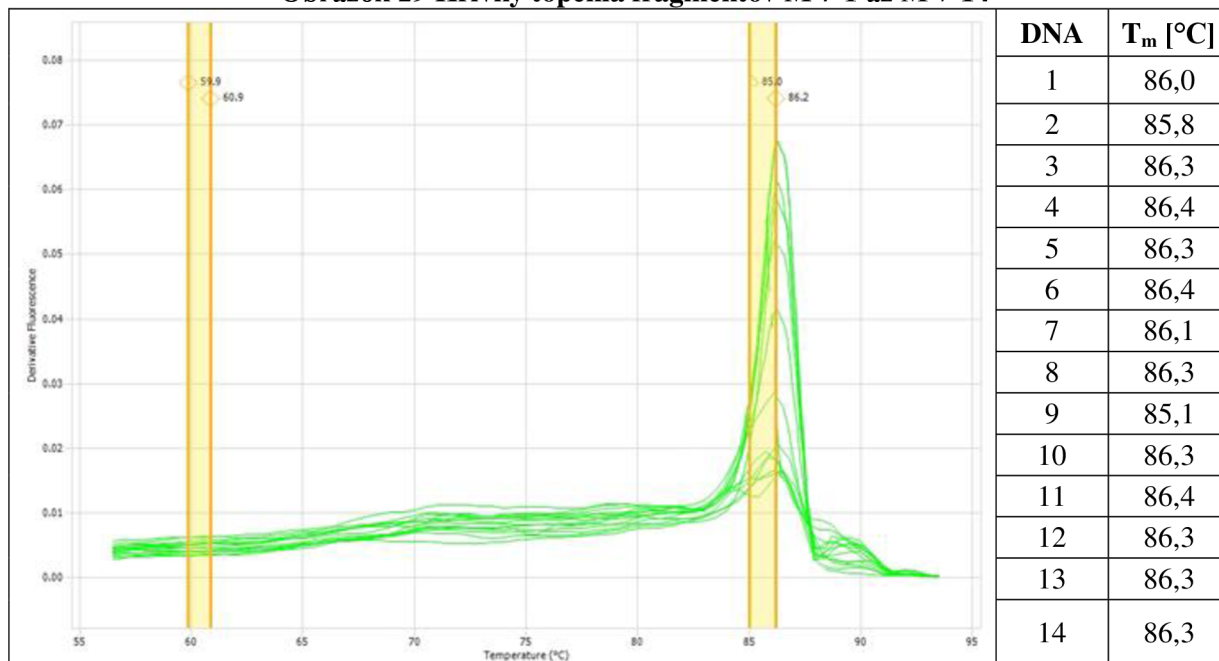
Obrázok 27 Krivky topenia fragmentov M 5-1 až M 5-4



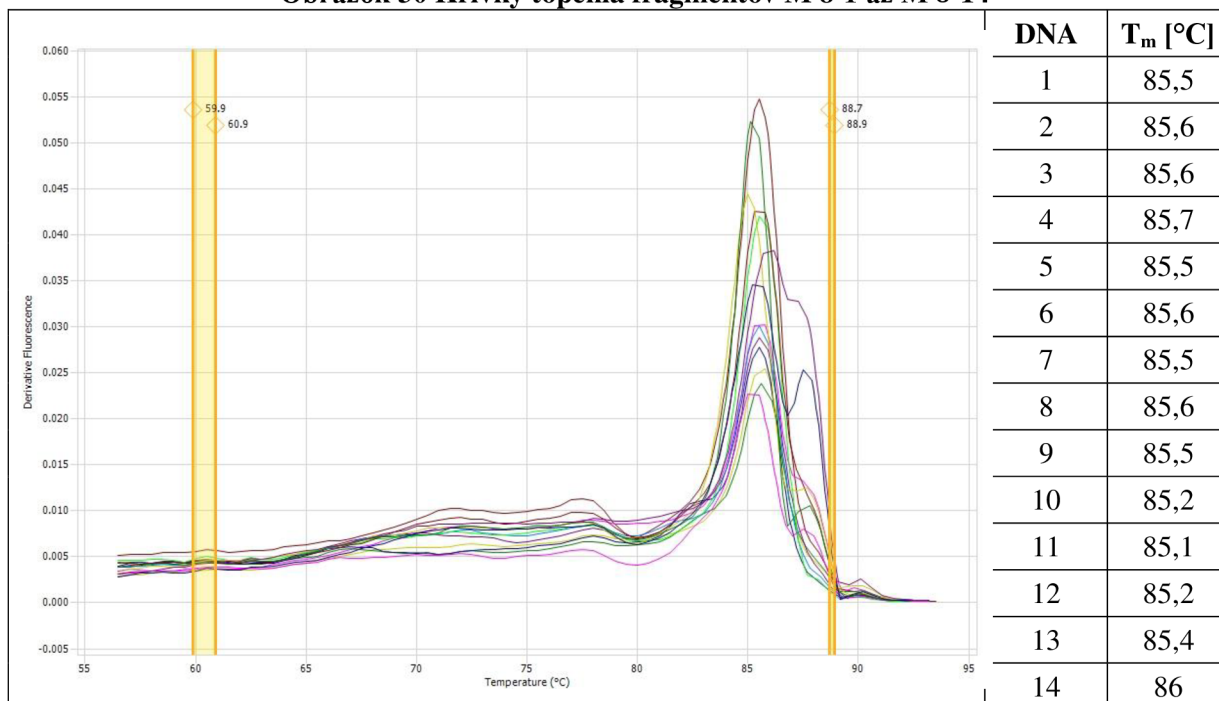
Obrázok 28 Krivky topenia fragmentov M 6-1 až M 6-5



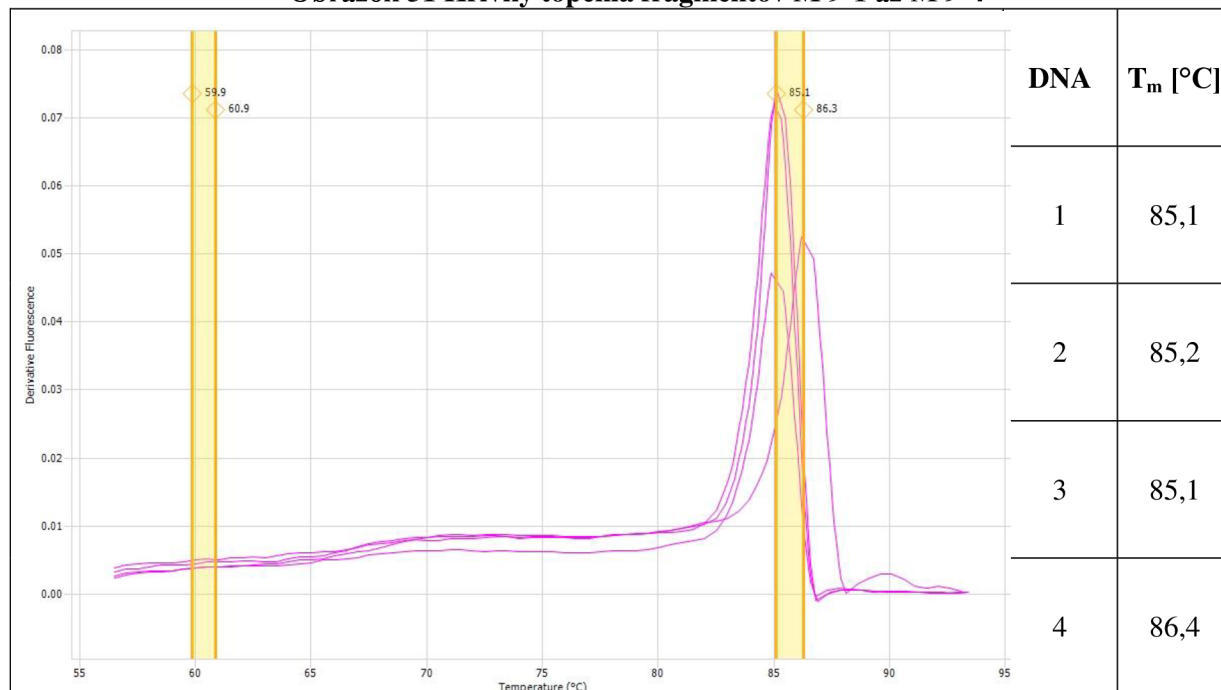
Obrázok 29 Krivky topenia fragmentov M 7-1 až M 7-14



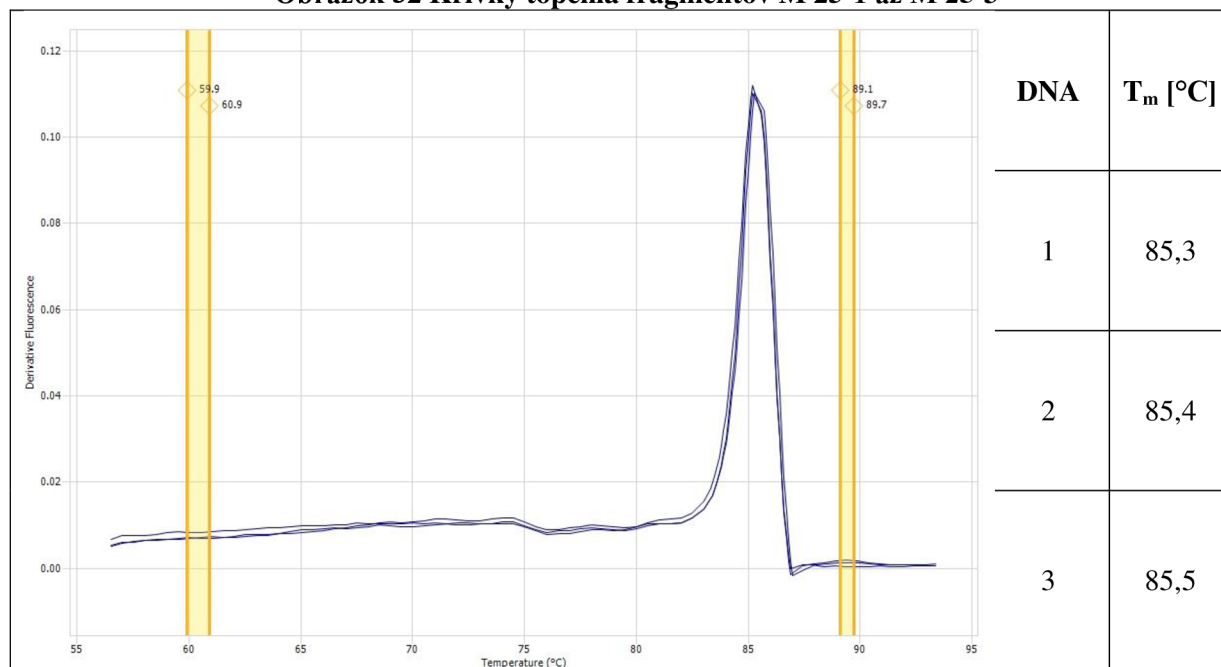
Obrázok 30 Krivky topenia fragmentov M 8-1 až M 8-14



Obrázok 31 Krivky topenia fragmentov M 9-1 až M 9-4

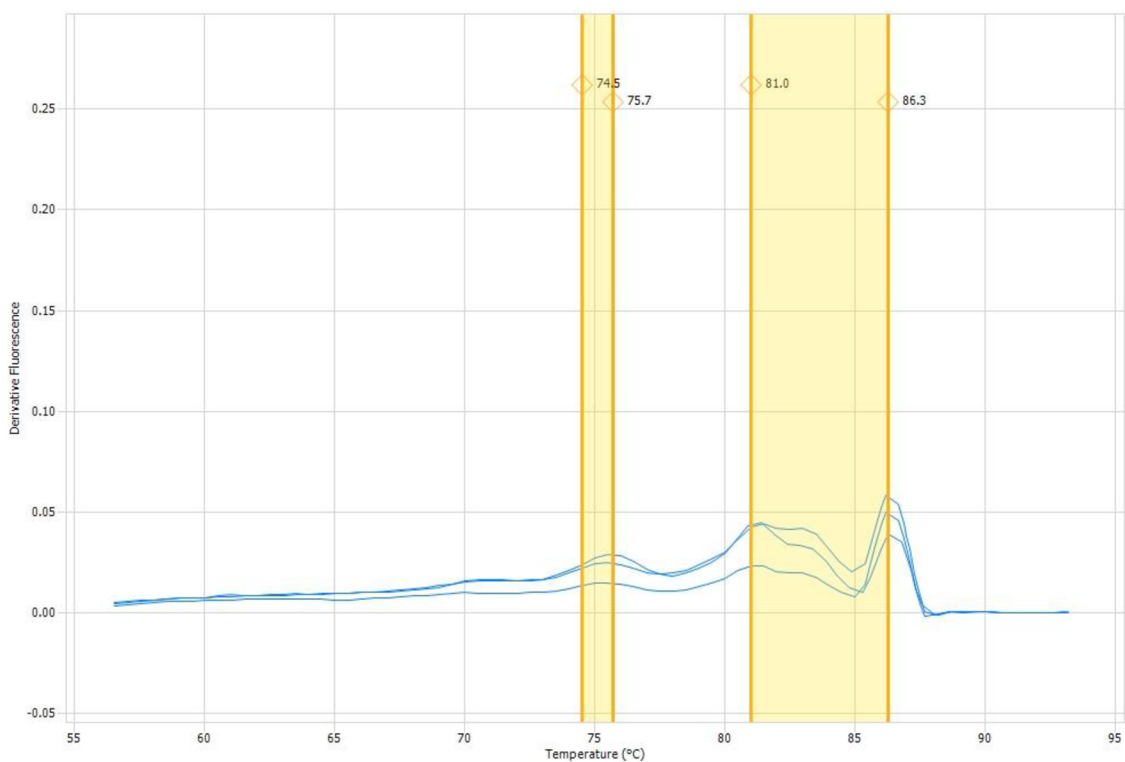


Obrázok 32 Krivky topenia fragmentov M 25-1 až M 25-3

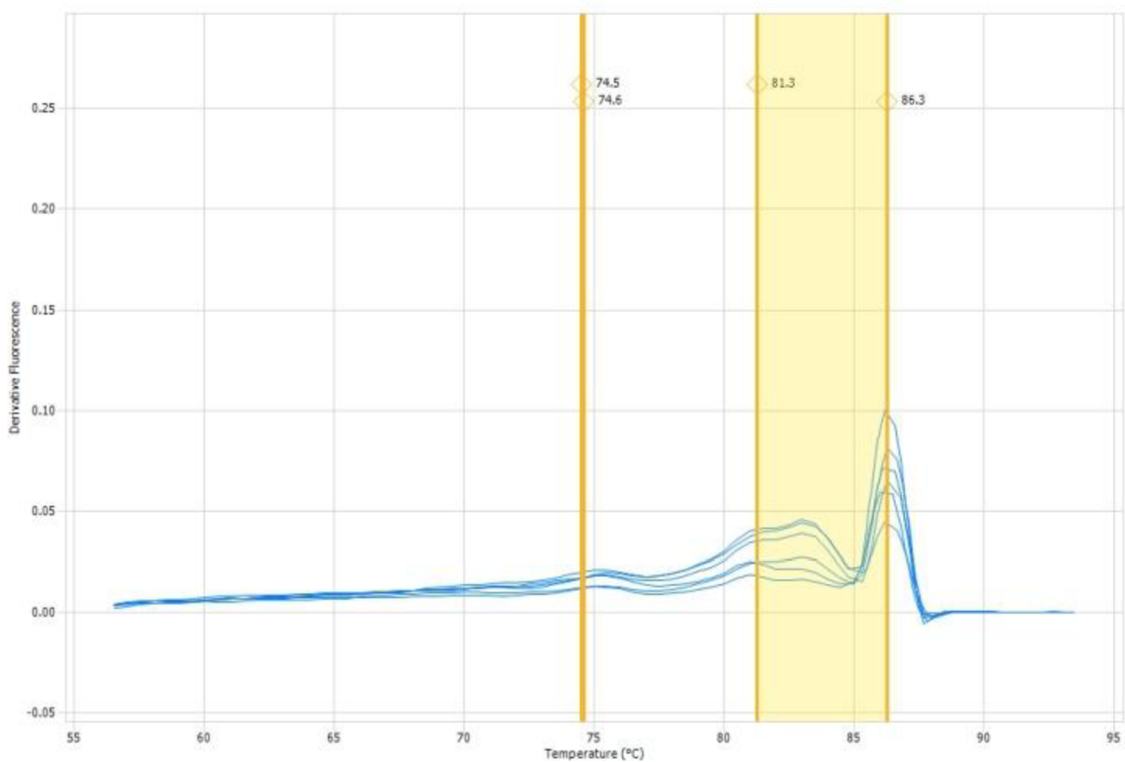


15.3 Príloha 3: Krivky topenia HRMA amplikónov s primérmí UPF a UPR

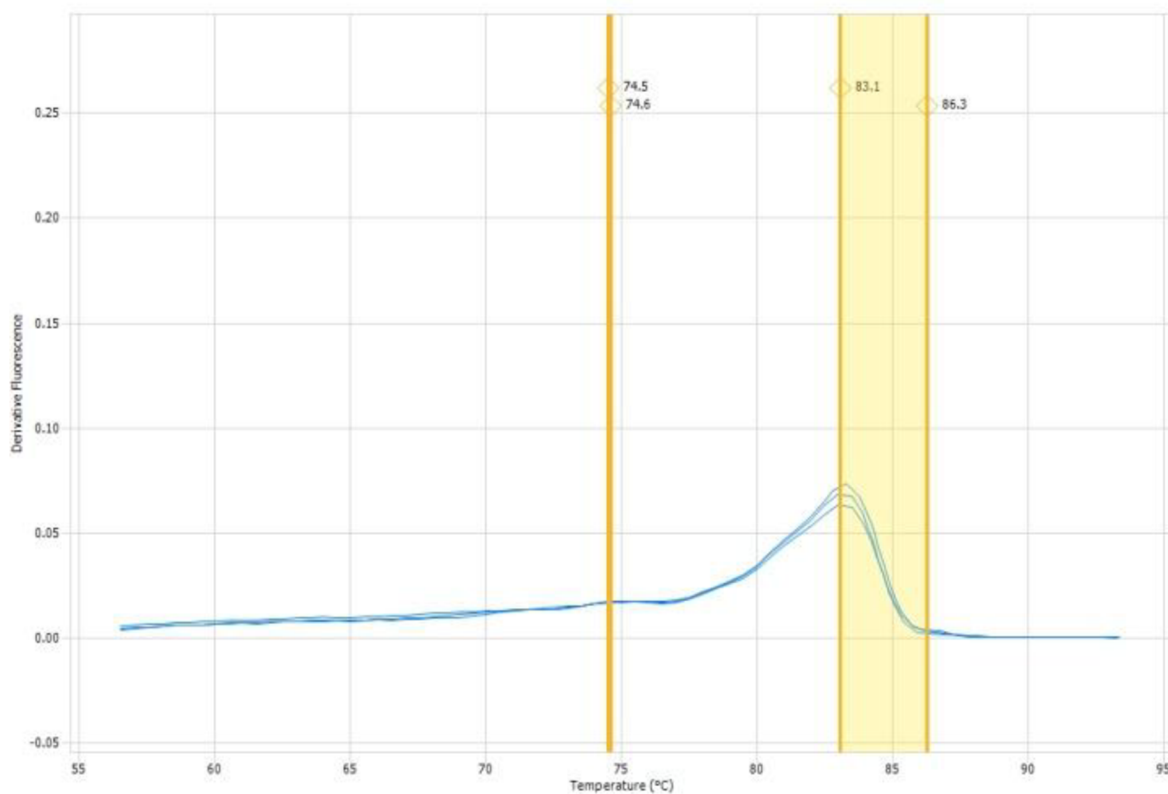
Obrázok 33 Krivky topenia amplikónov KS 1 až KS 3



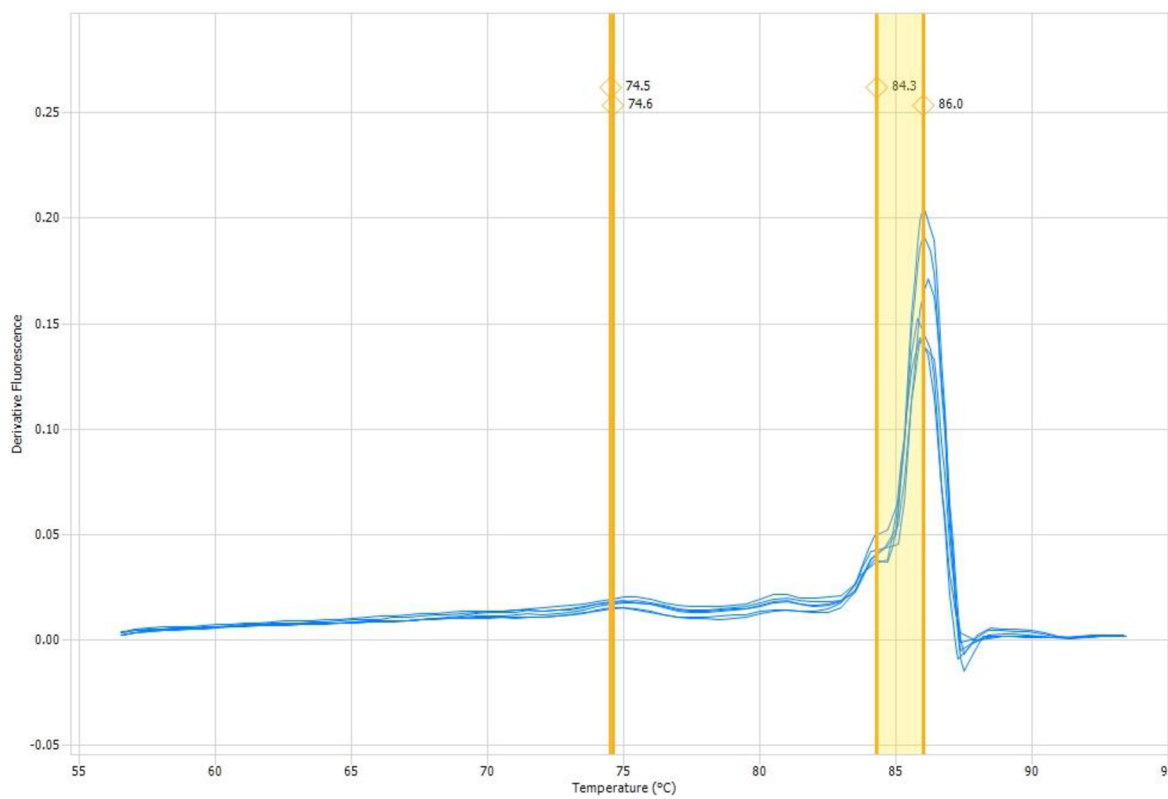
Obrázok 34 Krivky topenia amplikónov S 1 až S 6



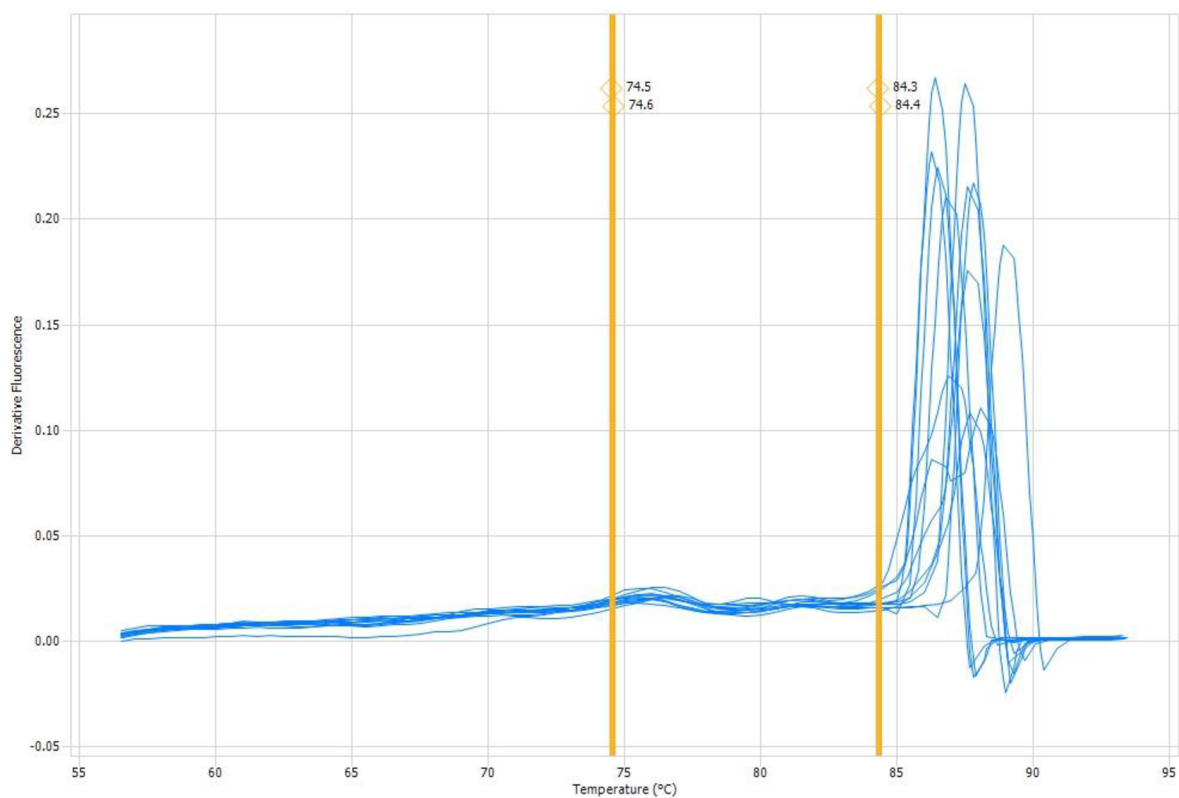
Obrázok 35 Krivky topenia amplikónov KL 1 až KL 3



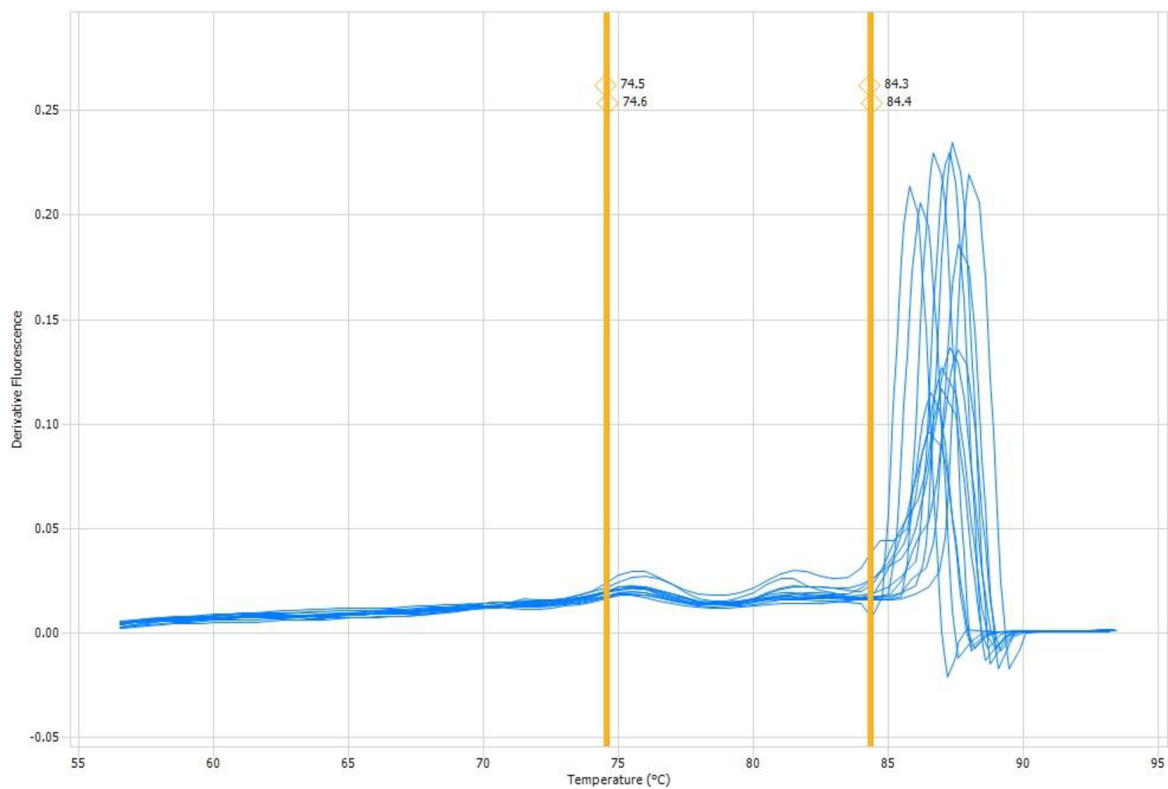
Obrázok 36 Krivky topenia amplikónov L 1 až L 6



Obrázok 37 Krivky topenia ampikónov M1 až M12



Obrázok 38 Krivky topenia ampikónov M13-M25



15.4 Príloha 4: Konferencia Chemie je život

Konferencia Chemie je život, fakulty chemickej, VUT v Brne:

Identifikácia baktérií v nezrejúcich syroch pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy

Martina Čakajdová

Štěpánka Trachtová, Tomáš Mohelský, Alena Španová, Bohuslav Rittich

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií

Purkyňova 464/118, 612 00, Brno

xccakajdova@fch.vutbr.cz

1 Úvod

K pochopeniu podmienok potrebných k rozvoju mikrobiálnej diverzity v syroch je nevyhnutné obohatiť tradičné mikrobiologické postupy o nové metódy. K identifikácii a detekcii mikroorganizmov sa ako vhodná ukázala aplikácia molekulárne biologických metód. Pomocou molekulárne biologických metód je možné presnejšie charakterizovať mikrobiálny systém. Jednou z takých metód je denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE). Pomocou tejto metódy a následného porovnávania amplikónov z oblasti 16S rDNA je možné preukázať prítomnosť rôznych druhov baktérií.

Cieľom práce bolo využitie metódy DGGE k identifikácii baktérií spôsobujúcich kontaminácie v syroch a ich nálevoch.

2 Experimentálna časť

Analyzovanými vzorkami boli biele syry zrejúce v soľnom náleve, spolu so svojimi nálevmi. Analyzované boli nepokazené aj pokazené syry a ich nálevy (KS1 – KS3, S1 – S6, KL1 – KL3, L1 – L6). Ďalej bolo použitých 12 čistých kultúr bakteriálnych druhov izolovaných z analyzovaných syrov a nálevov (M1 – M12). Čisté kultúry pripravila Dr. Němečková z firmy Milcom.

2.1 Materiál a metódy

DNA zo syrov, nálevov a kontrolných kmeňov bola izolovaná pomocou fenolovej extrakcie[39]. Koncentrácia a čistota DNA bola overená spektrofotometricky pri 260 nm³ na UV/VIS NanoPhotometri. Intaktnosť DNA bola overená agarózovou gélovou elektroforézou v 0,8% géle. Koncentrácia DNA a popis vzoriek je uvedený v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Charakteristika vzoriek a koncentrácia DNA

Vzorka č.	DNA	Koncentrácia DNA	
M 1	<i>Bacillus sp.</i>	109	
M 2	<i>Bacillus licheniformis</i>	97	
M 3	<i>Bacillus sp.</i>	100	
M 4	<i>Kocuria varians</i>	99	
M 5	<i>Micrococcus luteus</i>	110	
M 6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	112	
M 7	<i>Serratia marcescens</i>	112	
M 8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	111	
M 9	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	117	
M 10	<i>Staphylococcus warneri</i>	110	
M 11	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	99	
M 12	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	
KL 1		1	74
KL 2	kontrolný nálev	2	107

KL 3		3	84	
L 1		1	102	
L 2		2	118	
L 3	kontaminovaný nálev	3	116	
L 4		4	120	
L 5		5	105	
L 6		6	100	
KS 1		kontrolný syr	1	102
KS 2			2	100
KS 3	3		114	
S 1	Kontaminovaný syr	1	106	
S 2		2	108	
S 3		3	100	
S 4		4	110	
S 5		5	107	
S 6		6	100	

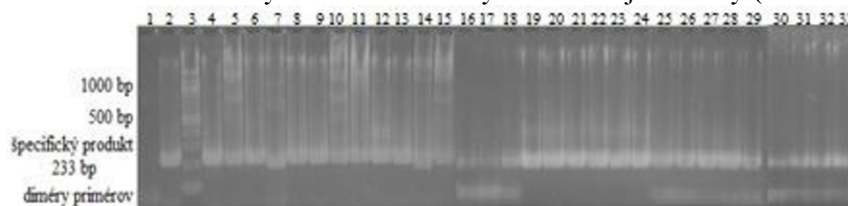
Amplifikácia DNA prebiehala pomocou PCR s univerzálnymi primérami F357 GC a R518 z V3 regiónu bakteriálnej 16S rDNA4. Špecifické produkty o veľkosti 233 bp boli detegované agarózovou gélovou elektroforézou v 1,8% géle (agaróza, 0,5× TBE pufoer).

Produkty PCR s GC svorkou boli prečistené pomocou magnetických poly(glycidylmetakrylátových) mikročastíc P(GMA)5 a analyzované denaturačnou gradientovnou gélovou elektroforézou. Na 40-60% gradientový gél bolo nanosených 10 µl produktu PCR. Zaostrovanie prebiehalo 10 minút pri 100 V, samotná analýza pri 60 V po dobu 22 hodín. Získaný gél bol farbený v etídiumbromide (0,5 µg/ml) a vyforografovaný.

2.2 Výsledky a diskusia

DNA z reálnych vzoriek bola izolovaná v kvalite a množstve vhodnom pre PCR. DNA bola k ďalšej práci riedená na 100 ng/µl.

Amplifikované boli produkty PCR s GC svorkou v intenzite dostatočnej pre ďalšiu analýzu. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR sú uvedené na Obrázku 1. Tri produkty PCR po amplifikácii DNA z kontrolných nálevov boli výrazne nižšej intenzity (beh 16-18).



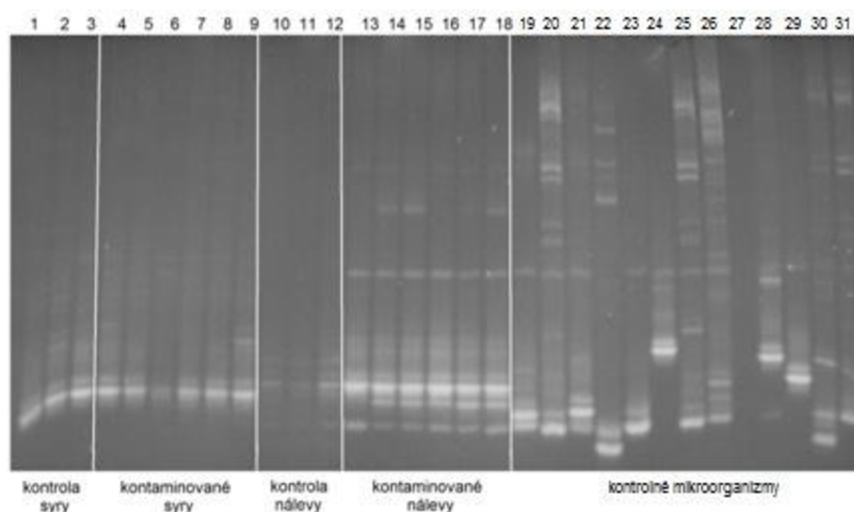
beh	DNA	detekcia PCR produktov
1	negatívna kontrola	-
2	pozitívna kontrola	+++
3	rebriček	
4	M 1	+++
5	M 2	+++
6	M 3	+++
7	M 4	+++
8	M 5	+++
9	M 6	+++
10	M 7	+++
11	M 8	+++
12	M 9	+++
13	M 10	+++
14	M 11	+++
15	M 12	+++

16	KL 1	+
17	KL 2	+
18	KL 3	+
19	L 1	+++
20	L 2	+++
21	L 3	+++
22	L 4	+++
23	L 5	+++
24	L 6	+++
25	KS 1	++
26	KS 2	+++
27	KS 3	+++
28	S 1	+++
29	S 2	+++
30	S 3	++
31	S 4	++
32	S 5	++
33	S 6	+++

+, ++, +++ produkty PCR o rôznej intenzite
 – produkty PCR neboli detegované

Obrázok 1 Agarózová gélová elektroforéza amplikónov s GC svorkou (233 bp)

Produkty PCR s GC svorkou boli ďalej analyzované pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy. V produktoch PCR získaných po amplifikácii DNA z kontrolných syrov a nálevov bolo detegovaných menej fragmentov nižšej intenzity. V produktoch PCR získaných po amplifikácii DNA z kontaminovaných syrov a nálevov bolo fragmentov viac. Výsledky DGGE sú uvedené na Obrázku 2.



Obrázok 2 Denaturačná gradientová elektroforéza produktov PCR-DGGE

Polohy amplikónov získaných zo syrov a nálevov boli porovnané s amplikónmi získanými po amplifikácii DNA z čistých bakteriálnych kultúr. Amplikóny v približne rovnakej polohe ako amplikóny zo syrov a nálevov boli viditeľné v behoch 20, 23, 25, 26, 28 a 29. Pravdepodobnými kontaminantmi preto mohli byť *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* a *Staphylococcus warneri*. Informácie získané DGGE analýzou budú následne overované pomocou sekvenovania.

Po amplifikácii DNA zo vzoriek syrov boli výrazne intenzívne iné pruhy ako v prípade nálevov. To poukazuje na iné druhy baktérií prítomných v nálevov. Po amplifikácii DNA zo vzoriek pokazených syrov a hlavne nálevov bolo viditeľné väčšie množstvo pruhov, ako v kontrolných vzorkách. To

vypovedá pravdepodobne o kontaminácii syrov aj nálevov baktériami, ktoré sa v pôvodných nepokazených syroch a nálevoch nevyskytovali.

4 Záver

V práci bolo zistené, že je možné použiť metódu PCR-DGGE k určeniu kontaminantov v syrárstve.

5 Literatúra

- 1 LIU, W., BAO, Q.; JIRIMUTU; QING, M.; SIRIGULENG; CHEN, X.; SUN, T.; LI, M.; Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological Research*. 2012, vol. 167, issue 2, s. 110-115. DOI: 10.1016/j.micres.2011.05.001
- 2 SAMBROOK J., RUSSEL D.W. (2001): Molecular cloning: A laboratory manual (II), 3rded. *Cold Spring Laboratory Harbor Press*, New York
- 3 SINDEN, R. R., DNA Structure and Function, *Academic Press*, San Diego, 1994, p. 34
- 4 LEITE, A.M.O., MAYO, B., RACHID, C.T.C.C., PEIXOTO, R.S., SILVA, J.T., PASCHOALIN, V.M.F., DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*. 2012, vol. 31, issue 2, s. 215-221. DOI: 10.1016/j.fm.2012.03.011
- 5 RITTICH B., ŠPANOVÁ A., ŠÁLEK P., NĚMCOVÁ P., TRACHTOVÁ Š., HORÁK D.: Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethyleneglykol)-NaCl water solutions. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009, vol. 321, 1667-1670

Podakovanie

Táto práca bola podporená grantom QJ1210300 Národnej agentúry pre poľnohospodársky výskum.

15.5 Príloha 5: Konferencia CECE

Konferencia CECE, 11th International Interdisciplinary Meeting of Bioanalysis, Brno:

Use of PCR-DGGE for control of bacteria in cheeses and their pickles

Čakajdová Martina¹, Trachtová Štěpánka¹, Mohelský Tomáš¹, Němečková Irena², Španová Alena¹, Rittich Bohuslav¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

²Diary Research institute s. r. o., Ke dvoru 12, 160 00 Praha 6

The aim of our study was to identify contaminant microorganisms in brain cheeses and their pickles by denaturation gradient gel electrophoresis.

Introduction

Brained cheeses are characterized by high content of salt. Salt is known by conservation effect. The application of molecular biological methods is useful for the understanding of microbial diversity. DGGE and 16S rDNA amplicons sequencing enable to detect culturable, uncultivable or unknown species of microorganisms in different complex samples [2].

Results and Discussion

DNAs from real samples of cheeses and their pickles were isolated in quality suitable for PCR. DNA was diluted to the concentration approximately 100 ng/μl.

In the next step, the amounts of Mg²⁺ ions, dNTP, primers and DNA polymerase were optimized in PCR mixtures. Results of the agarose gel electrophoresis of PCR products with GC clamp are shown in Figure 1. Efficiencies of amplicon purification by phenol extraction and by magnetic microspheres were compared. Higher concentration of PCR products was obtained after reamplification of DNA purified by magnetic microspheres. PCR products were amplified in intensities suitable for next analysis. Three PCR products had lower intensity. The PCR products with GC clamp (233 bp) were analyzed by DGGE. Results of the gradient gel electrophoresis are shown in Figure 2. There were fragments of approximately the same intensity in cheeses. The main difference in the number of fragments was among pickles. It reflects different bacterial composition of pickles with defect.

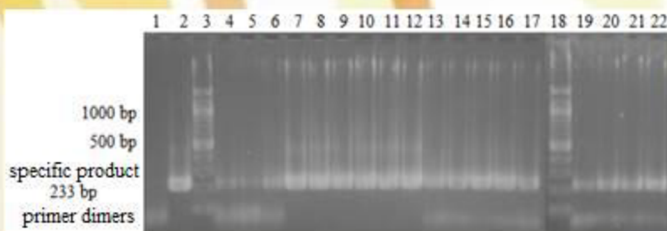


Figure 1: Agarose gel electrophoresis of PCR products from cheese and their pickles. Lane 1 - positive control, lane 2 - negative control, lane 3 - and 18 ladder, lanes 4-12 cheeses, lanes 13-22 pickles

Experimental

Analyzed samples were brained cheeses and their pickles. DNA was isolated by phenol chloroform extraction [3]. Concentration and purity of DNA was determined by UV spectrometry. The integrity of DNA was confirmed by agarose gel electrophoresis. PCR was performed with primers F357 GC and R518. Specific products were detected by agarose gel electrophoresis. The PCR products were purified by magnetic microspheres poly(glycidyl methacrylate) – PGMA [5] and by phenol chloroform extraction and reamplified [3]. PCR products with GC clamp (10 μl) were applied on 40-60% gradient gel and separated at 100 V for 10 minutes and at 60 V for 22 hours. The DNA was stained with ethidium bromide and photographed.

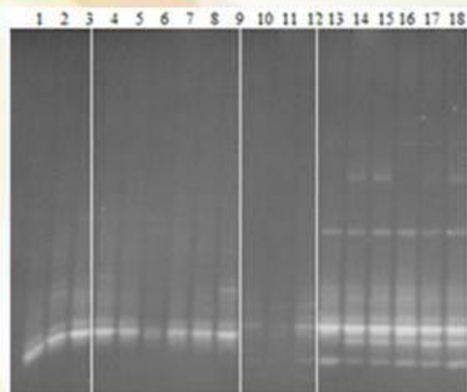


Figure 2: Denaturation gradient gel electrophoresis of PCR products from cheese and their pickles. Lanes 1-9 cheeses, lanes 10-18 pickles.

Conclusion

It has been shown that the method of PCR-DGGE is suitable for the control of bacteria in cheeses and their pickles.

Acknowledgement

- [1] GOLNER, F., VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiologie požívání. Bratislava: MALÉ CENTRUM, 2004. ISBN 80-967064-9-7.
[2] LIU, W., BAO, Q., JIRIMUTU, QING, M., SIRIGULENG, CHEN, X., SUN, T., LI, M., Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tareg in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological Research*. 2012, vol. 167, issue 2, s. 110-112. DOI: 10.1016/j.micres.2011.05.001.
[3] SAMBROOK, J., RUSSEL D.W. (2001): Molecular cloning: A laboratory manual (II), 3rd ed. Cold Spring Laboratory Harbor Press, New York.
[4] LEITE, A.M.O., MAYO, B., RACHID, C.T.C.C., PEIXOTO, R.S., SILVA, J.T., PASCHOALIN, V.M.F., DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*. 2012, vol. 31, issue 2, s. 215-221. DOI: 10.1016/j.fm.2012.03.011.
[5] RITTIK B., ŠPANOVÁ A., ŠÁLEK P., NĚMEČKOVÁ P., TRACHTOVÁ Š., HORÁK D.: Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethylene glycol)MeCl water solutions. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009, vol. 321, 1667-1670.
[6] MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 1999, 317-23.

15.6 Príloha 6: Článok v Mlékářských listech

Čakajdová M. a spol. 2014, Identifikácia baktérií v solných nálevoch nezrejších syrov pomocou DGGE, Mlékářské listy č.147.

Identifikácia baktérií v solných nálevoch nezrejších syrov pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy

Martina Čakajdová¹

Štěpánka Trachtová¹, Tomáš Mohelský¹, Irena Němečková,² Alena Španová,¹ Bohuslav Rittich¹

¹Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií Purkyňova 464/118, 612 00, Brno, xccakajdova@fch.vutbr.cz

²Výzkumný ústav mlékárenský s. r. o., Ke dvoru 12, 160 00 Praha 6

Súhrn

V práci bola optimalizovaná príprava zmesí pre PCR a amplifikácia bakteriálnej DNA v PCR s primérmí s GC svorkou (F357GC a R518). Získané produkty PCR boli analyzované pomocou DGGE. Amplikóny DNA izolovanej z nálevov sa líšia nielen polohou na géle, ale aj počtom. Väčší počet pásov rôznej intenzity bol detegovaný po amplifikácii DNA z kontaminovaných nálevov.

Abstract

The preparation of PCR mixtures and bacterial DNA amplification in PCR with primers with GC clamp ((F357GC a R518) were optimised. PCR products were analysed using DGGE. It was shown that amplicons of DNA isolated from pickles differ in positions and numbers. Larger number of bands of different intensities was detected after amplification of DNA isolated from contaminated pickles.

Kľúčové slová: solné nálevy, izolácia DNA, polymerázová a reťazová reakcia (PCR), denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE)

Keywords: pickles, DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

1. Úvod

Syry v solnom náleve z ovčieho, kozieho alebo kravského mlieka, sa vyznačujú vysokým obsahom soli. Soľ v náleve má konzervačné účinky, hlavne proti plesniam (Golner a Valík, 2004). Pri nedodržaní technologických postupov môže dochádzať ku kontaminácii nálevov nežiaducimi mikroorganizmami, ktoré môžu negatívne ovplyvniť kvalitu syrov. K identifikácii a detekcii mikroorganizmov sa ako vhodná ukázala aplikácia molekulárne biologických metód. Pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE), polymerázovej reťazovej reakcie (polymerase chain reaction - PCR) a následného porovnávania amplikónov z oblasti 16S rDNA je možné preukázať prítomnosť rôznych druhov mikroorganizmov, vrátane nekultivovateľných druhov mikroorganizmov (Liu a spol., 2012).

Cieľom práce bola identifikácia mikroorganizmov spôsobujúcich kontaminácie v syroch

a ich nálevoch.

2. Experimentálna časť

2.1. Chemikálie a bakteriálne kultúry

Boli použité nasledujúce chemikálie: agaróza pre elektroforézu DNA (Serva, Heidelber, SRN), dodecylsulfát sodný (SDS) (Serva, Heidelber, SRN), etídiumbromid (EtBr) (Sigma, St. Louis, USA), etyléndiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelber, SRN), MRS (de Man, Rogosa a Sharpe) médium (Oxoid, Veľká Británia), proteináza K (Sigma, St. Louis, USA). Priméry pre PCR boli syntetizované vo firme Generi-Biotech (Hradec Králové, ČR), TaqI DNA polymeráza bola od firmy Bio-Tech (Praha, ČR), DNA štandard 100 bp bol od firmy Malamité (Moravské Prusy, ČR). Magnetické poly(glycidyl metakrylát) P(GMA) mikročastice pokryté karboxylovými skupinami boli získané od D. Horáka (/stav makromolekulárnej chémie, AV, ČR v. v. i, Praha). Ostatné chemikálie boli čistoty p.a a pochádzali z bežných komerčných zdrojov. Analyzovanými vzorkami boli soľné nálevy bielych nezrejúcich syrov. Ako kontrola boli použité čisté kultúry bakteriálnych druhov izolovaných z analyzovaných nálevov kultivačnými postupmi.

2.2. Zariadenia

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA bola meraná na spektrofotometri NanoPhotometer (Implen, Mnichov, Nemecko). K amplifikácii zmesi pre PCR bol použitý programovateľný cyklátor Termocykler DNA Engine, PeltierThermal Cyclor-200 (Bio-Rad, Filadelfia, USA). Produkty PCR s GC svorkou boli použité k DGGE analýze na prístroji INGENYphorU (Goes, Holandsko). K identifikácii produktov PCR bol použitý transiluminátor TVR-312A (Apectroline, Albany, USA)

2.3. Metódy

DNA z nálevov a kontrolných kmeňov bola izolovaná pomocou fenolovej extrakcie (Sambrook a Russel, 2001). Koncentrácia a čistota DNA bola overená spektrofotometricky pri 260 nm (Sinden, 1994). Intaktnosť DNA bola overená agarózovou gélovou elektroforézou v 0,8 % géle. Charakteristika DNA a popis vzoriek je uvedený v Tab. 1.

Amplifikácia DNA prebiehala pomocou PCR s primérami F357 GC a R518 (Leite a spol., 2012) špecifickými pre doménu *Bacteria*. Sekvencie použitých primérov sú uvedené v Tab. 2, program amplifikácie je uvedený v Tab. 3. Špecifické produkty o veľkosti 233 bp boli detegované agarózovou gélovou elektroforézou v 1,8 % géle. Produkty PCR s GC svorkou boli prečistené pomocou magnetických poly(glycidyl metakrylát) P(GMA) mikročastíc podľa postupu publikovaného v práci Rittich a kol. (2009) a analyzované denaturačnou gradientovou gélovou elektroforézou. Na 40-60% gradientový gél bolo nanosených 10 μ L produktu PCR. Zaostrovanie prebiehalo 10 minút pri 100 V, samotná analýza pri 60 V po dobu 22 hodín. Získaný gél bol farbený v etídiumbromide (0,5 μ g/mL) a vyfotografovaný.

3. Výsledky a diskusia

DNA z reálnych vzoriek bola izolovaná v kvalite a množstve vhodnom pre PCR. DNA bola k ďalšej práci riedená na 100 ng/ μ L. Amplifikácia DNA prebehla pomocou PCR s primérami s GC svorkou. V zmesiach pre PCR bolo testované rôzne množstvo Mg^{2+} iónov, množstvo dNTP, primérov a DNA polymerázy. Ako optimálne bolo zvolené zloženie zmesi pre PCR uvedené v Tab. 4. Táto zmes bola použitá pri analýze všetkých DNA izolovaných z nálevov a kontrolných kmeňov. Amplifikované boli špecifické produkty PCR v intenzite

dostatočnej pre ďalšiu analýzu. Produkty PCR s GC svorkou boli ďalej analyzované pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy. V kontrolných nálevoch bolo detegovaných menej fragmentov než v kontaminovaných nálevoch. V kontrolných nálevoch boli viditeľné fragmenty o nižšej intenzite. Výsledky DGGE sú uvedené na Obr. 1.

Veľkosti amplicónov DNA izolovaných z nálevov boli porovnané s amplicónmi DNA izolovanými z kontrolných kmeňov. Môžeme konštatovať, že použitou metódou boli od seba oddelené produkty PCR rôznych mikroorganizmov. To umožnilo porovnať veľkosť amplicónov nálevov so sekvenciami kultúr získaných kultivačne. Podobné pásy boli viditeľné v behoch 20, 24 a 29 prečíslovať. Vo vzorkách pokazených nálevov bolo viditeľné väčšie množstvo pruhov, ako v kontrolných vzorkách. To vypovedá pravdepodobne o kontaminácii nálevov mikroorganizmami, ktoré sa v pôvodných nepokazených nálevoch nevyskytovali. Pravdepodobnými kontaminantmi preto mohli byť mikroorganizmy druhu *Bacillus slicheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* a *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. Pretože uvedená identifikácia mikroorganizmov je nedostačujúca a iba orientačná, získané pruhy boli vyrezané z gélu a v ďalšej práci budú podrobené sekvenácii.

4. Záver

V práci bolo zistené, že je možné použiť metódu PCR-DGGE k určeniu kontaminantov v syrárstve. Boli určené mikroorganizmy pravdepodobne sa vyskytujúce v nálevoch. Možnými kontaminantmi boli pravdepodobne *Bacillus slicheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* a *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. V ďalšej práci budú amplicóny podrobené sekvenácii.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená interným grantom FCH-S-14-2325 a grantom QJ1210300 Národnej agentúry pre poľnohospodársky výskum.

Literatúra

- GOLNER F., VALÍK L. (2004): Aplikovaná mikrobiológia požívateľov. Bratislava, Malé centrum, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- LEITE A.M.O., MAYO, B., RACHID, C.T.C.C., PEIXOTO, R.S., SILVA, J.T., PASCHOALIN, V.M.F., DELGADO, S. (2012): Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefirgrains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. Food Microbiol. 31, s. 215-221. DOI: 10.1016/j.fm.2012.03.011
- LIU W., BAO Q., JIRIMUTU Q. M., SIRIGULENG; C. X., SUN T., LI M. ZHANG J, YU J, BILIGE M, SUN T, ZHANG H. (2012): Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. Microbiol. Res. 167, s. 110-115. DOI: 10.1016/j.micres.2011.05.001
- SAMBROOK J., RUSSEL D.W. (2001): Molecularcloning: A laboratory manual (II), 3rded. New York, Cold Spring Laboratory Harbor Press, 2100 s. ISBN-13: 978-0879695774.
- SINDEN R. R. (1994): DNA Structure and Function, San Diego, Academic Press, s. 34. ISBN-10: 0-12-645750-6.
- RITTICH B., ŠPANOVÁ A., ŠÁLEK P., NĚMCOVÁ P., TRACHTOVÁ Š., HORÁK D (2009): Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethyleneglykol)-NaCl water solutions. J. Magn. Mater. 321, s. 1667-1670.