

# 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

PCR V REÁLNÉM ČASE A JEJÍ VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

BARBORA TOMANOVÁ

BRNO 2015



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

## PCR V REÁLNÉM ČASE A JEJÍ VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ

REAL-TIME PCR AND IT'S USE IN FOOD PROCESSING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

BARBORA TOMANOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0909/2014** Akademický rok: **2014/2015**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Barbora Tomanová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí práce: **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**  
Konzultanti: doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

### Název bakalářské práce:

PCR v reálném čase a její využití v potravinářství

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte experimentální výsledky a vyhodnotte je formou diskuse

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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

-----  
Barbora Tomanová  
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**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je hojně využívaná molekulárně diagnostická metoda. PCR v reálném čase neboli kvantitativní PCR (qPCR) je jednou z jejích modifikací, které díky svým výhodám nachází v současnosti stále širší využití. Uplatňuje se mimo jiné v potravinářství při poměrně přesné detekci, identifikaci a kvantifikaci žádoucích i nežádoucích složek potravin, což s sebou mnohdy přináší značné obtíže a vede intenzivnímu vývoji této metody.

V experimentální části byla izolována DNA z mléčného výrobku Bio Via Natur drink pro její další zpracování pomocí PCR a získání podrobnějších informací o bakteriálním složení pomocí PCR v reálném čase a HRM analýzy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR), PCR v potravinářství, HRM analýza, amplifikace DNA, izolace DNA

## **ABSTRACT**

Polymerase chain reaction (PCR) is a method abundantly used in molecular diagnostics. PCR in real time or quantitative PCR (qPCR) is one of its modifications and thanks to its advantages it finds still wider utilization nowadays. It finds its use in the food-processing industry too with relatively precise detection, identification, and qualification of both desirable and undesirable components in food, which often brings considerable difficulties and leads to an intensive development of this method.

In the experimental part a DNA was isolated from dairy product Bio Via Natur drink for its further processing by means of PCR and gain more detailed information about a bacterial composition using real-time PCR and HRM analysis.

## **KEYWORDS**

real time polymerase chain reaction (qPCR), PCR in food-processing industry, high resolution melt analysis (HRM), DNA amplification, DNA isolation

TOMANOVÁ, B. *PCR v reálném čase a její využití v potravinářství*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 42 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotu. Velký dík patří rovněž mojí rodině a přátelům za neustálou podporu.

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Polymerázová řetězová reakce.....	8
2.1.1	Optimalizace faktorů ovlivňujících PCR .....	8
2.1.2	Nevýhody PCR .....	10
2.1.3	Výhody PCR a její užití .....	11
2.1.4	Modifikace PCR.....	11
2.2	PCR v reálném čase .....	11
2.2.1	Průběh reakce, složení směsi qPCR a detekce produktu reakce .....	11
2.2.2	Kvantifikace produktu PCR v reálném čase .....	12
2.2.3	Analýza křivky tání (Melt analýza).....	14
2.2.4	Vysokorozlišovací analýza křivky tání (HRM) .....	15
2.2.5	Výhody PCR v reálném čase (oproti konvenční PCR) .....	15
2.3	Využití PCR v reálném čase v potravinářství .....	16
2.3.1	Analýza reálných vzorků.....	16
2.3.2	Zkoumání autenticity potravin .....	16
3	CÍL PRÁCE.....	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	20
4.1	Materiál .....	20
4.1.1	Vzorek mléčného výrobku s probiotickými kulturami .....	20
4.1.2	Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly.....	20
4.1.3	Čistá bakteriální DNA.....	20
4.1.4	Chemikálie .....	20
4.1.5	Roztoky .....	21
4.1.6	Magnetické nosiče.....	21
4.1.7	Komponenty pro PCR a qPCR.....	21
4.1.8	Pomůcky a přístroje.....	22
4.2	Metody .....	22
4.2.1	Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk.....	22
4.2.2	Fenolová extrakce bakteriální DNA.....	23
4.2.3	Srážení DNA ethanolem .....	23
4.2.4	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z mléčného výrobku pomocí magnetických mikročástic.....	23
4.2.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA .....	24
4.2.6	Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	24
4.2.7	Konvenční PCR.....	25
4.2.8	Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR .....	26
4.2.9	Kvantitativní PCR .....	27
4.2.10	PCR-HRM.....	28
4.3	Výsledky .....	29
4.3.1	Izolace a detekce DNA z mléčného výrobku.....	29
4.3.2	Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA.....	29
4.3.3	Konvenční PCR a detekce produktu PCR.....	30
4.3.4	Kvantitativní PCR .....	32
4.3.5	PCR-HRM.....	35
4.4	Diskuze .....	35

4.4.1	Izolace a detekce bakteriální DNA z mléčného výrobku.....	36
4.4.2	Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA.....	36
4.4.3	Konvenční PCR a detekce produktu PCR.....	36
4.4.4	Kvantitativní PCR.....	37
4.4.5	PCR-HRM.....	37
5	ZÁVĚR.....	38
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	42

## 1. ÚVOD

V průběhu posledních let je kladen stále větší důraz na nutnost vědomí o přesném složení potravin a potravinářských surovin. Informace o složení potravin jsou rozhodující jak pro jejich spotřebitele a kontrolní orgány na jedné straně, tak i pro výrobce a prodejce na straně druhé. Často však stanovení přesného složení a detekce případných nežádoucích složek či kontaminantů potravin představuje značně nelehký úkol.

Konvenční metody často nejsou schopny postihnout všechny požadavky, které jsou na analýzu potravin kladeny. Tato skutečnost se stala základem pro intenzivní rozvoj nových metod především v oblasti molekulární biotechnologie a genové exprese. Molekulárně diagnostické metody jsou moderní a v porovnání s jinými metodami obecně rychlejší, citlivější, přesnější a specifitější. Jednou z nejdůležitějších a nejpoužívanějších metod je polymerázová řetězová reakce (PCR) a metody na ní založené.

PCR je metoda, která nachází uplatnění jak v základním a aplikovaném výzkumu, tak i v praxi. Pochopení konvenční PCR je nezbytné pro pochopení jejích modifikací. PCR je založená na „*in vitro*“ amplifikaci cílových specifických sekvencí nukleových kyselin. Tímto způsobem lze syntetizovat až  $10^9$  kopií vybraného úseku DNA a to za poměrně krátkou dobu [2]. PCR byla zavedena v roce 1983 Kary Mullisem, za jejíž objev mu byla udělena Nobelova cena [6].

S rozvojem nových metod byla zavedena PCR v reálném čase (qPCR). První zmínka o PCR v reálném čase se objevila v roce 1992. Detekce pomocí PCR v reálném čase je charakteristická svojí rychlostí, citlivostí, přesností a specifícností. Využitím fluorescenčních molekul je umožněno monitorování a vyhodnocování produktu již v průběhu reakce, což eliminuje nutnost detekce produktu elektroforeticky až po skončení reakce. Díky možnostem qPCR je možné produkt rovněž kvantifikovat [6]. PCR v reálném čase tedy umožňuje velmi přesnou detekci, identifikaci a kvantifikaci žádoucích i nežádoucích složek potravin, což neustále zvětšuje rozsah jejích aplikací v potravinářství [15].



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Polymerázová řetězová reakce

Metoda polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace jsou v současnosti hojně využívané molekulárně diagnostické metody [1].

PCR je „*in vitro*“ metoda založená na amplifikaci požadovaných specifických sekvencí nukleových kyselin (především DNA). Během reakce dochází k cyklicky se opakující syntéze DNA, kdy se k opačným koncům vybraného úseku řetězců denaturované DNA hybridizují dva krátké oligonukleotidy (primery). Syntéza je katalyzována DNA-polymerázou a od primerů se následně začínají protisměrně utvářet nová vlákna na obou matricových řetězcích [2].

#### 2.1.1 Optimalizace faktorů ovlivňujících PCR

Na získání požadovaného produktu, specifčnosti a výtěžku má značný vliv koncentrace a výběr jednotlivých komponent reakční směsi. Pro konkrétní použití je rovněž třeba optimalizovat přesné reakční podmínky (teplotu, dobu trvání jednotlivých fází, počet cyklů) [2].

##### 2.1.1.1 Složky PCR směsi

Reakční směs musí obsahovat tyto komponenty:

- Matrice DNA – makromolekula izolované DNA (většinou dvouřetězová), obsahuje cílová místa pro primery. Nezbytné je použití neporušeného úseku DNA, který má být amplifikován [3]. Obvyklá množství bakteriální a plazmidové DNA ve směsi jsou 10 ng, 1 ng nebo 10 pg [1].
- Primery – jsou to dva syntetické oligonukleotidy. Návrh primerů je zásadní pro úspěšnost celé reakce. Jsou komplementární k okrajovým sekvencím vybraného úseku DNA a nesmí být vzájemně komplementární. Primery bývají složeny z 18–25 nukleotidů a nesmí obsahovat nspecifická vazebná místa na templátu. Páry bází jsou rovnoměrně zastoupeny. Jsou navrženy tak, aby nevznikaly vnitřní sekundární struktury ani dimery primerů. Teplota tání musí být alespoň 50 °C [2]. Optimální koncentrace každého primeru ve směsi bývá 0,1–0,5 μM [1].
- DNA-polymeráza – katalyzuje syntézu nového řetězce DNA. Existuje řada polymeráz, které se liší svými vlastnostmi a typem užití. V současnosti existují i komerčně dostupné směsi, které kombinují výhodné vlastnosti jednotlivých polymeráz. V PCR se používají termostabilní polymerázy, poněvadž musí odolávat vysokým teplotám při denaturaci DNA. Často používaná je např. *Taq* DNA-polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech [3].
- 3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) – stavební kameny pro syntézu nového řetězce DNA. Koncentrace dNTP bývá 20–400 μM [1].
- Mg<sup>2+</sup> ionty – tvoří rozpustný komplex s jednotlivými dNTP rozpoznávaný DNA-polymerázou. Jsou tedy nezbytné pro její aktivitu. Protože hořčičnaté ionty

interagují s mnoha složkami směsi, je třeba jejich koncentraci optimalizovat pro každou aplikaci zvlášť [2]. Toleranční rozpětí je 0,5–8 mM [1].

- PCR pufr – vytváří stálé a optimální pH prostředí. Standardní reakční pufr je tvořen 10 mM Tris-HCl (pH 8,3–8,8), 50 mM KCl a 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Do základního roztoku mohou být přidány další složky, například acetamid, želatina, albumin či Tween 20 [1].
- PCR voda – v případě potřeby doplňuje reakční směs na požadovaný objem. Používá se voda o odporu 18 mΩ nebo voda pro injekce ČSL 4 [1].

### 2.1.1.2 Průběh reakce a vznik PCR produktů

Jeden cyklus PCR zahrnuje 3 kroky, které jsou závislé na měnící se teplotě:

#### 1. Denaturace molekul DNA (94–97 °C)

Vlivem zvýšené teploty dochází k rozvolnění matricových řetězců. Je nutné, aby došlo k jejich úplnému oddělení. V opačném případě by molekuly DNA rychle renaturovaly a docházelo by tak k nespecifickým vazbám primerů a ke zkreslení výsledků. Z tohoto důvodu bývá denaturace templátové DNA v počátečním a konečném cyklu prodloužena na několik minut. V dalších cyklech probíhá tato fáze po dobu 15–45 s (s ohledem na poločas stability DNA-polymerázy) [2].

#### 2. Hybridizace primerů k odděleným řetězcům DNA (50–68 °C)

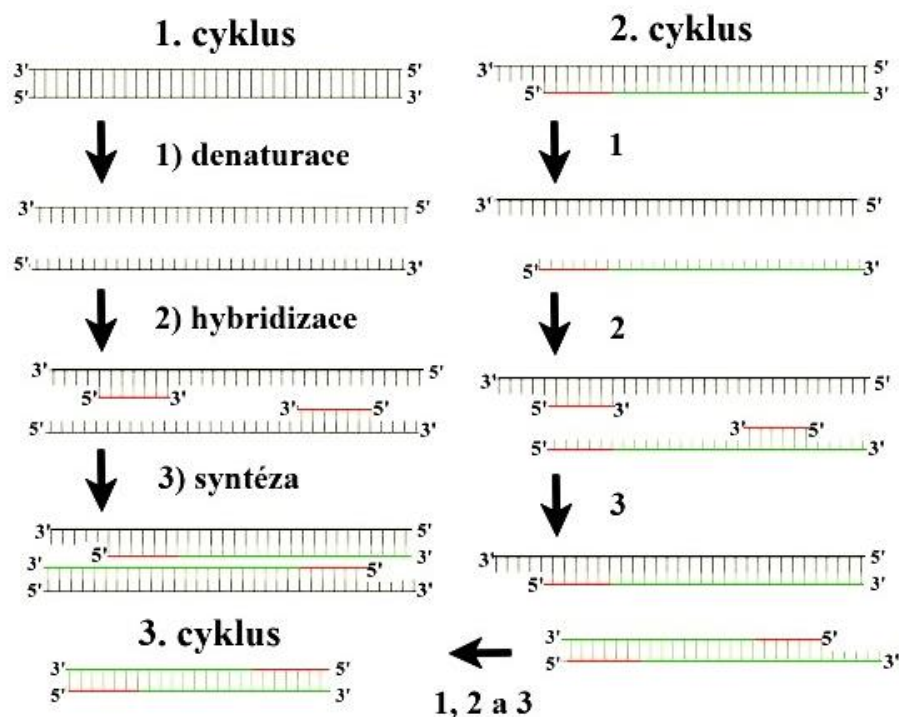
Reakční směs je ochlazená na požadovanou teplotu a primery jsou komplementárně připojeny k odděleným řetězcům DNA. Děj probíhá 30–60 s. Teplota vhodná pro hybridizaci závisí na teplotě tání primerů i DNA, na délce oligonukleotidů a na zastoupení párů bází (trojné vazby mezi G a C zvyšují stabilitu dvouřetězce a tím i denaturační teplotu) [2, 3].

#### 3. Syntéza nových komplementárních řetězců DNA (65–75 °C)

Za katalýzy DNA-polymerázou dochází k vytvoření nového vlákna DNA. Od 5' konce primeru jsou vázány nukleotidy komplementární k sekvenci původních řetězců DNA ve směru 5'→3'. Tato fáze probíhá 60–120 s. V posledním cyklu bývá též prodloužena na několik minut, aby se zajistilo kompletní syntetizování DNA [1]. Teplotní optimum se odvíjí od použité polymerázy. Syntéza DNA probíhá při teplotním optimu (v přítomnosti *Taq* DNA-polymerázy) rychlostí cca 60 bází/s [2].

Reakce probíhá v termocykleru. Postupným opakováním zmíněných tří kroků vznikají nová vlákna, která následně rovněž slouží jako templát pro další syntézu. Tímto procesem lze exponenciálně ( $2^n$ ,  $n$  – počet cyklů) syntetizovat až  $10^9$  kopií vybraného úseku DNA. Optimální počet cyklů se pohybuje v rozmezí 25–35 cyklů a odvíjí se od výchozí koncentrace templátové DNA. Při příliš vysokém počtu cyklů se snižuje účinnost DNA-polymerázy a dochází k významnému nárůstu počtu nespecifických produktů PCR [1, 2].

Průběh reakce PCR je uveden na Obrázku 1, který mimo jiné demonstruje vznik delších produktů (lineární růst) a vznik dvouřetězce požadované délky až ve třetím cyklu (exponenciální růst).



Obrázek 1: Průběh reakce PCR. Upraveno dle [5].

### 2.1.1.3 Detekce PCR produktu

Produktem PCR jsou amplicony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce párů bází (bp). Vzniklé amplicony se detekují a separují elektroforeticky (na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu) na základě jejich velikosti (resp. molekulové hmotnosti). Současně s PCR produktem se ponechá migrovat DNA standard, který obsahuje fragmenty o známé velikosti a na základě jejich porovnání je možné určit velikost ampliconu. Další možností je měření množství produktu v reálném čase (PCR v reálném čase) [2, 4].

### 2.1.2 Nevýhody PCR

Komplikací se může stát nutnost znalosti sekvence bází amplifikovaného úseku molekuly DNA nebo alespoň primerů [3]. Kvantifikace výsledků je obtížná a reakce tedy v některých případech postrádá potřebnou přesnost [2].

Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je teoreticky možné, že i jediná molekula cizorodé DNA může způsobit kontaminaci (během izolace DNA nebo při přípravě PCR směsi) a získá falešně pozitivních výsledků. Pro minimalizaci těchto chyb je žádoucí dodržovat určité standardní postupy. Kromě sterilních podmínek se jedná o oddělené skladování reakčních komponent, přípravu komponent i vzorků do alikvotních částí, přidání složky DNA až na závěr a použití pozitivních, negativních, případně vnitřních kontrol [1].

Získání falešně negativních výsledků hrozí především při práci s reálnými vzorky, které mohou obsahovat inhibitory PCR. V takových případech je vhodné nejprve provést hrubou extrakci vzorků, případně vzorky dostatečně naředit [1, 2].

### 2.1.3 Výhody PCR a její užití

PCR disponuje nespornými výhodami, mezi něž patří poměrně krátké trvání celého procesu, vysoká citlivost a specifita reakce, kromě toho lze DNA amplifikovat z velmi starého a degradovaného vzorku biologického původu. PCR nachází užití jak v základním a aplikovaném výzkumu, tak i v praxi. Využívá se při detekci a identifikaci mikroorganismů a virů v různých materiálech, při kontrole kvality výrobku, další uplatnění nachází např. v prenatální diagnostice, při určování identity v kriminalistice, při mapování genomů, při izolaci určitého genu či v archeologii [2].

### 2.1.4 Modifikace PCR

PCR je velmi rozšířená metoda a v současnosti existuje celá řada postupů na ní založených. Tyto modifikace jsou voleny podle charakteru zkoumaného vzorku a také podle požadavků kladených na průběh a výsledky reakce.

Dále bude rozebírána PCR v reálném čase. Další modifikace nejsou předmětem této bakalářské práce, a proto zde nebudou rozváděny.

## 2.2 PCR v reálném čase

PCR v reálném čase je rychle se rozvíjející metoda. Na rozdíl od konvenční PCR, kde je produkt detekován elektroforeticky až po ukončení reakce, je při PCR v reálném čase umožněno monitorování vznikajícího produktu PCR přímo během reakce v každém jednotlivém cyklu prostřednictvím fluorescenčního signálu. Další velkou výhodou je schopnost kvantifikace, tedy přesného určení výchozího množství požadované sekvence templátové DNA v analyzovaném vzorku (odtud též označení kvantitativní PCR – qPCR) [6].

### 2.2.1 Průběh reakce, složení směsi qPCR a detekce produktu reakce

Kromě optimalizace faktorů ovlivňujících konvenční PCR je v případě qPCR důraz kladen také na kinetiku reakce [2].

Průběh qPCR je obdobný jako u konvenční PCR. Základem je cyklicky se opakující denaturace templátu, hybridizace primerů a syntéza nových řetězců cílového úseku DNA. Z důvodu monitorování produktu již během reakce obsahuje qPCR směs, kromě komponent pro konvenční PCR, navíc fluorescenční molekuly. Fluorescence je měřena v každém cyklu, přičemž intenzita fluorescenčního záření je přímo úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi [6].

Fluorescenční látky jsou děleny do 3 charakteristických skupin [2]:

- Interkalační barviva vázající se na DNA – jedná se o fluorescenční barviva, mezi nejpoužívanější patří SYBR Green I. Samostatně v qPCR směsi jen zanedbatelně emituje záření, jakmile se však začlení do nově vzniklé dvoušroubovice DNA, dochází k výrazné fluorescenci, která se zvyšuje s rostoucí koncentrací produktu. Měření intenzity signálu probíhá na konci fáze elongace nebo průběžně. Hlavní nevýhodou fluorescenčních barviv je nemožnost rozlišení specifických a nespecifických produktů PCR z důvodu, že se mohou vázat do jakékoli dvoušroubovice DNA (např. dimery primerů). Kromě toho tato barviva nelze

použit u mnohonásobných reakcí tzv. Multiplex PCR. Naopak jejich předností je jednoduché použití a finanční dostupnost [2, 7].

- Fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část amplikonu – jedná se o oligonukleotidové sondy, např. TaqMan<sup>TM</sup> sondy nebo molekulární majáky. Jsou komplementární k jednomu z řetězců templátové DNA v místě mezi oběma primery, mají vyšší hodnotou teploty tání ( $T_m$ ) asi o 10 °C než je  $T_m$  primerů. Na 5'-konci obsahují fluorescenční látku a 3'-konci zhášec fluorochromu. Zhášec se nachází v blízkosti fluorochromu, a proto pohlcuje fluorescenci emitovanou fluorescenční látkou. Při syntéze komplementárního vlákna dochází 5'→3' aktivitou *Taq* DNA-polymerázy k odbourání sondy. Jakmile dojde k uvolnění jednotlivých složek sondy, je ukončeno zhášení barviva a dochází k emisi fluorescence. V průběhu PCR dochází ke zvyšování počtu volných molekul fluorochromu a tím k zesílení fluorescence [2, 6]. Sondy, na rozdíl od interkalačních barviv, detekují výhradně specifické produkty. Jejich hlavní nevýhodou je vysoká cena a komplikovaná optimalizace, nelze je užít při analýze křivky tání [7].
- Fluorescenčně značené primery – primery, jako např. AmpliFluor<sup>TM</sup> nebo technologie LUX, s vlásenkovou strukturou fungují na podobném principu jako sondy (k výrazné emisi dochází až při narušení struktury primeru během syntézy DNA u specifických produktů) [2].

PCR v reálném čase probíhá v cyklu, což je obdoba termocyklu. Kromě požadovaného teplotního cyklování však umožňuje vyhodnocení fluorescence v každém cyklu PCR [2]. Některé cykly pro qPCR jsou rovněž uzpůsobeny pro vysokorozlišovací analýzu křivky tání (HRM), tyto cykly jsou však poměrně nákladné [8].

### 2.2.2 Kvantifikace produktu PCR v reálném čase

Přesné určení výchozího množství požadované sekvence templátové DNA v analyzovaném vzorku je umožněno monitorováním fluorescence v každém cyklu. Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi [6]. Naměřená fluorescence je vynesena proti příslušnému cyklu, společně tvoří tzv. amplifikační křivky, jejichž matematickou analýzou dosáhneme kvantifikace produktu. Podle fluorescenční aktivity lze amplifikační křivku rozdělit na 3 části (Obrázek 2) [9]:

#### 1. Fáze pozadí (baseline)

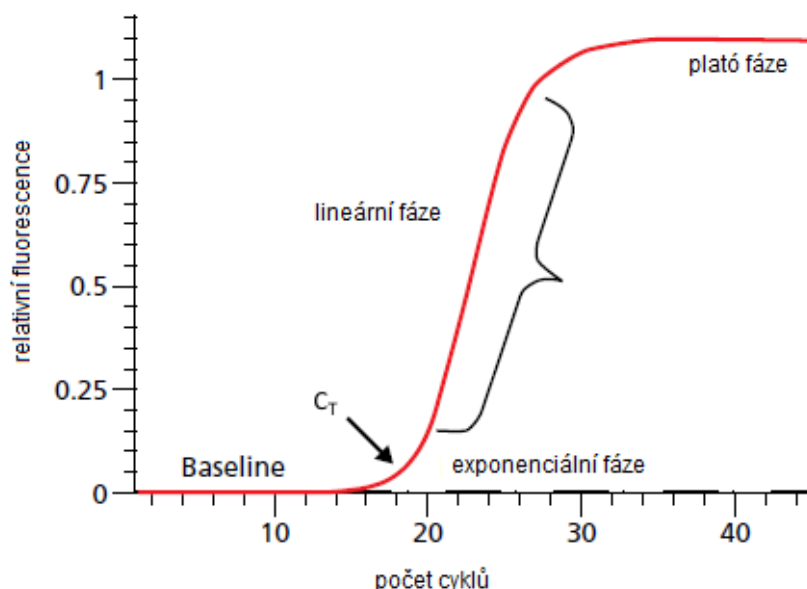
Koncentrace amplikonů je tak nízká, že je detekován pouze slabý fluorescenční signál, který ještě nelze měřit [6, 9].

#### 2. Exponenciální fáze

Dochází k exponenciálnímu růstu množství amplikonů a tím i fluorescence, fáze trvá asi 4–8 cyklů [9].

#### 3. „Plató“ fáze

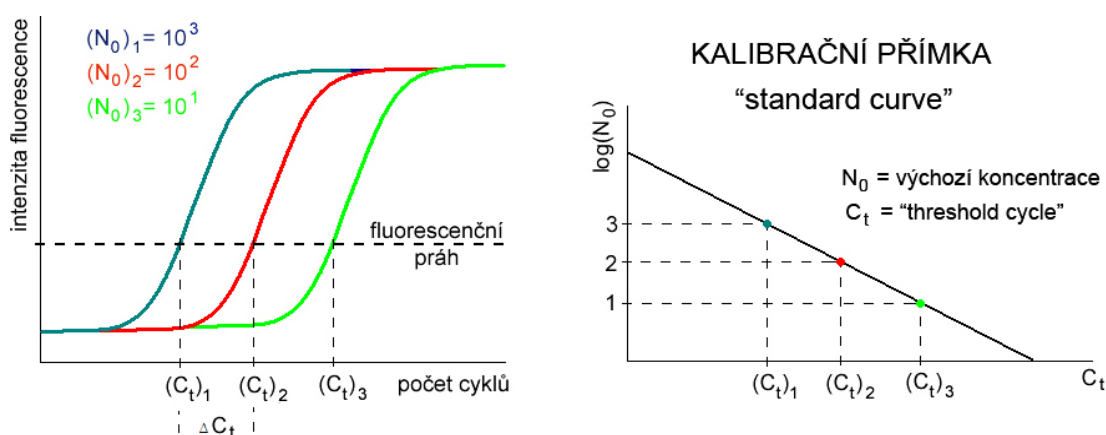
Systém je nasycen, množství amplikonů se dále nemění a intenzita fluorescence zůstává konstantní [9].



Obrázek 2: Standardní amplifikační křivka. Upraveno dle [9].

Nejdůležitějším bodem amplifikační křivky i celé qPCR je  $C_t$  („*threshold cycle*“), což je cyklus, ve kterém intenzita fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce [7]. Hodnota  $C_t$  je řazena do exponenciální fáze [9]. Platí, že čím vyšší je počáteční koncentrace templátu v reakční směsi, tím dříve je detekována zvyšující se fluorescence produktu a tím nižší je hodnota  $C_t$ . Parametr  $C_t$  je dobře reprodukovatelný [6].

Metoda absolutní kvantifikace, která se odvíjí od lineárního vztahu mezi logaritmem výchozího počtu templátových kopií  $N_0$  a hodnotou  $C_t$  příslušné amplifikační křivky, umožňuje přímé stanovení přesného výchozího počtu kopií cílové DNA. Výchozí koncentraci ve vzorku lze zjistit porovnáním s kalibrační přímkou, která je získána amplifikací série standardů o známé koncentraci spolu se vzorkem (Obrázek 3), (vzorek musí být relevantně naředěn) [9].



Obrázek 3: Grafické vyjádření principu metody absolutní kvantifikace – standardní amplifikační křivka, kalibrační přímka. Upraveno dle [9].

Prostřednictvím kalibrační přímky lze určit efektivitu, přesnost, citlivost a rozsah reakce:

- Reakční účinnost („*efficiency*“) – je určena sklonem křivek („*slope*“), v případě 100% účinnosti reakce se v každém cyklu zdvojnásobí fluorescence a sklon kalibrační křivky (M) bude mít hodnotu  $-3,333$  (Rovnice 1).

*Rovnice 1: Výpočet reakční účinnosti [9].*

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

$$\text{Efficiency} = 100\% = 10^{(-1/-3,333)} - 1$$

Optimální hodnota sklonu křivek by se měla pohybovat v rozmezí  $-3,9$  až  $-3,0$ , což odpovídá 80–110% účinnosti reakce [9].

- Korelační koeficient  $R^2$  – vyjadřuje přesnost reakce, výsledky lze považovat za spolehlivé, pokud je  $R^2 \geq 0,985$  [9].

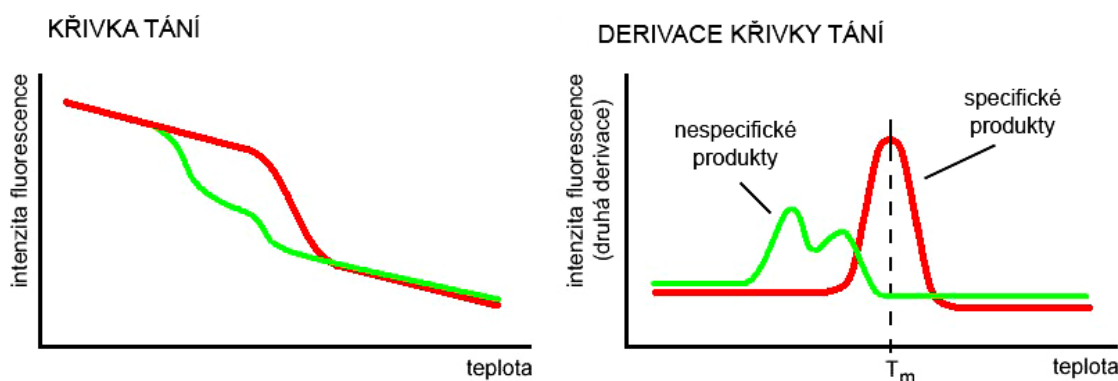
Při relativní kvantifikaci jsou porovnávány změny genové exprese v testovaném vzorku vzhledem k interní kontrole (kontrolnímu vzorku, „*housekeeping genu*“). Pro tyto geny je charakteristická jejich konstantní exprese v různých testovacích vzorcích [6].

### 2.2.3 Analýza křivky tání (Melt analýza)

Tato metoda se využívá k rozpoznání specifických produktů PCR od nespecifických.

Po ukončení reakce je možné sledovat teplotu tání produktu tak, že je roztok s dsDNA ochlazen, a poté postupně zahříván na teplotu vyšší, než je předpokládaná teplota tání  $T_m$  amplikonu, zároveň je zaznamenávána intenzita fluorescenčního signálu. Zvýšená teplota způsobí, že se vlákna DNA začnou oddělovat, fluorescenční barvivo se uvolňuje z molekul a fluorescence se snižuje. Vynesením intenzity fluorescence oproti příslušné teplotě vzniká křivka tání. Analýzou derivace křivky tání, lze z inflexního bodu stanovit  $T_m$  specifickou pro přítomné amplikony [7]. Teplota tání  $T_m$  a tvar křivky tání jsou ovlivněny délkou amplikonu, sekvencí a obsahem GC-párů v dsDNA [10]. Nespecifické produkty PCR mají hodnotu  $T_m$  obvykle nižší než specifické produkty. Pokud je přítomen pouze specifický produkt, křivka tání má jeden vrchol při předpokládané teplotě ( $50$ – $95$  °C). Pokud jsou přítomny i nespecifické produkty, křivka má více vrcholů (Obrázek 4).

Velká výhoda této metody spočívá v tom, že amplifikace i samotná analýza křivky tání probíhá ve stejné zkumavce bez potřeby další manipulace, což významně snižuje riziko kontaminace. Kromě toho je metoda nedestruktivní, což umožňuje další využití PCR produktu i po Melt analýze. Analýzu je možné provést jedině s využitím interkalačních barviv [8].



Obrázek 4: Analýza křivky tání. Upraveno dle [9].

#### 2.2.4 Vysokorozlišovací analýza křivky tání (HRM)

Vysokorozlišovací analýza křivky tání (HRM) představuje novou, citlivější verzi konvenční analýzy křivky tání. Je založena na detekci malých rozdílů v profilu křivek tání a v hodnotách teploty tání ( $T_m$ ) analyzovaných vzorků, které jsou charakteristické pro konkrétní záměnu na konkrétní pozici v sekvenci amplikonů. HRM analýza umožňuje detekci na úrovni jednonukleotidových záměn v sekvencích DNA a tím velmi přesnou specifikaci PCR produktu [11, 12].

Rozdíl oproti konvenční analýze křivky tání je v použití plně saturačního fluorescenčního barviva. Tím je eliminována redistribuce barviva během denaturace a je umožněno monitorování změn intenzity fluorescence ve vysokém rozlišení pomocí vhodných cyklerů s vysoce přesnou a stabilní kontrolou časového teplotního nárůstu (citlivost až  $0,01\text{ }^\circ\text{C/s}$ ) [10].

Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi senzitivní srovnávací analýzu, je třeba dbát na jednotnost analyzovaných vzorků. Pro spolehlivost metody je vhodné, aby měly vzorky stejný objem, stejnou koncentraci DNA, fluorescenčního barviva,  $\text{MgCl}_2$  atd. Vzorky různého stáří a způsobu izolace je třeba přechistit a rozpustit ve stejném pufru (kvůli stejnému iontovému složení). Senzitivitu a specificitu metody ovlivňuje také délka amplikonů (nejvhodnější jsou PCR produkty do 400 bp) [13].

#### 2.2.5 Výhody PCR v reálném čase (oproti konvenční PCR)

Velkou výhodou této metody je kvantifikace PCR produktu během reakce (v širokém rozsahu, v řádu 7–8 logaritmických dekád) a z toho plynoucí kvantifikace výchozího množství cílové sekvence templátu. Oproti konvenční PCR je qPCR také citlivější, specifičtější (sondy, analýza křivky tání), přesnější (standardní odchylka  $< 2\%$ ) a rychlejší, dále je možná i automatizace procesu [6, 9]. Vyhodnocování výsledků během reakce, eliminující post-PCR manipulace, rovněž významně snižuje rizika kontaminace analyzovaného vzorku [14].

PCR v reálném čase díky svým výhodám (oproti konvenční PCR) rozšiřuje oblast využití PCR. Široké spektrum aplikací qPCR bude dále demonstrováno na využití qPCR v potravinářství.



## **2.3 Využití PCR v reálném čase v potravinářství**

Díky své citlivosti, specificitě, přesnosti a rychlosti zažívá PCR v reálném čase velký boom a nachází v potravinářství stále širší rozsah aplikací [15]. Příklady různých aplikací budou dále podrobně rozebírány.

### **2.3.1 Analýza reálných vzorků**

Analýza potravin zahrnuje řadu komplikací, které jsou obecně spojeny se zpracováním komplexních reálných vzorků. Kromě obtíží v konkrétních případech zahrnují tyto problémy kvalitu analyzované DNA, která je často degradována teplotou a procesem zpracování, což limituje délku ampliconu. DNA může být rovněž depurinována působením kyselého pH a enzymů, čímž dochází k ovlivnění množství amplifikovatelné DNA a následně i detekce a kvantifikace. Velký problém spojený s analýzou potravin představuje značné množství inhibitorů PCR či látek znesnadňujících extrakci DNA, které je třeba odstranit [16]. Kontaminanty mohou představovat přímo složky potravin (polysacharidy, lipidy, proteiny, polyfenoly, ionty kovů nebo komplexy uhlovodíků) nebo látky spojené s manipulací se vzorkem (EDTA, SDS, NaCl, fenol či cizorodá DNA,...) [12, 17]. Velký problém může představovat také alespoň částečná znalost cílové sekvence DNA a návrh vhodných specifických primerů [18].

Přes uvedené obtíže zůstává PCR v reálném čase často nejúčinnější volbou analýzy potravin. Jejím prostřednictvím je možné analyzovat i vysoce degradovanou DNA (fragmenty délky 80–120 bp), a to i ve velmi malém množství. Vhodným řešením při odstraňování kontaminantů může být, kromě metody fenol-chloroformové extrakce, použití komerčně dostupných extrakčních kitů [19].

### **2.3.2 Zkoumání autenticity potravin**

Posuzování autenticity potravin vychází ze skutečnosti, že autentický produkt obsahuje v určitém množství charakteristické látky odpovídající použitým surovinám a technologickému postupu zpracování, což musí být dle legislativních nařízení jasně značeno [15]. Cílem analýzy je odhalení nedeklarovaných složek, které většinou souvisí se záměrným falšováním produktů či s nedbalostí výrobců [16]. Falšování je motivováno ekonomickými aspekty, tudíž se většinou jedná o falšování drahých potravin nebo potravin prodávaných ve velkých objemech. Náhrada suroviny levnější složkou, přítomnost nedeklarovaných složek, umělé zlepšování vlastností potravin, klamné značení původu výrobku nebo technologického postupu a další způsoby falšování zapříčiňují degradaci kvality produktu a klamání zákazníka. Tyto postupy jsou nepřijatelné z ekonomických, náboženských a zdravotních důvodů [15, 20]. Se zdokonalováním způsobů falšování potravin dochází k intenzivnímu vývoji PCR v reálném čase [16].

### **2.3.2.1 Detekce zvířecích druhů v masných produktech**

Masné výrobky představují jednu z nejvíce falšovaných potravinářských komodit. Pro ochranu důvěry a zdraví spotřebitele je kladen značný důraz na přesné stanovení masných složek potravin a krmiv [18].

V minulosti byly hlavním nástrojem stanovení živočišných druhů v potravě metody založené na imunochemické a elektroforetické analýze proteinů. Tyto metody však ztrácí potřebnou citlivost v případě vysoce zpracovaných potravin (např. při analýze paštiky z husích jater) a specifitu při rozlišení příbuzných živočišných druhů (např. kuřecí a krůtí) [16, 18]. PCR v reálném čase překonává tyto potíže, například v případě analýzy paštiky z husích jater s citlivostí detekce kolem 1 % kontaminace eliminuje přidávání levnějších náhražek kvůli finančnímu zisku [16]. Ve snaze analyzovat produkty obsahující několik druhů masa byly popsány metody specifické Multiplex PCR v reálném čase (například pro současnou detekci a kvantifikaci DNA z hovězího, vepřového, kuřecího, krůtího, koňského a skopového masa). Avšak výsledky těchto analýz je třeba interpretovat s opatrností vzhledem k různému obsahu tuku a tkání u podobných masných výrobků [18].

### **2.3.2.2 Detekce alergenů**

Vzhledem k tomu, že miliony lidí trpí alergickými reakcemi na potraviny (případně nesnášenlivostí vůči některým složkám), je dle legislativy EU nutné uvádět seznam potenciálních alergenů. Mezi nejběžnější alergeny patří mléko, vejce, různé druhy ořechů, ryby, koryši, sója a pšenice [18].

Široce rozšířenou metodou pro detekci alergenů je analýza s enzymem vázaným na imunosorbent, tzv. ELISA, která rovněž ztrácí účinnost při vyšetřování vysoce zpracovaných potravin. Také vzhledem k tomu, že někdy může i nepatrné množství alergenu vyvolat alergickou reakci, je vhodné provést PCR v reálném čase. Jako příklad citlivosti PCR v reálném čase je uváděna kvantitativní imuno-PCR pro detekci a kvantifikaci pšenice v bezpečnostních potravinách pro celiaky, která je 30krát citlivější než ELISA [16]. Stejně jako u masných výrobků jsou u analýzy alergenů prováděny pokusy Multiplex PCR v reálném čase pro současnou detekci více alergenů. Například společný test pro detekci arašídů, lískových oříšků, celeru a sóji vykazoval vysokou specifitu a citlivost až 0,01 %. Jiný test na detekci vajec, mléka, mandlí a sezamu vykazoval nižší citlivost pro mléko a vejce z důvodu nižšího obsahu DNA v těchto potravinách [18].

### **2.3.2.3 Detekce geneticky modifikovaných organismů**

S rozmachem produkce geneticky modifikovaných organismů (GMO) v poslední době vzrůstá požadavek na vystopovatelnost všech geneticky modifikovaných (GM) přísad. Dle legislativy EU musí být produkty obsahující GM složky jasně označeny. V případě, že je výrobek uváděn bez GM příměsí, může obsahovat maximálně 0,9 % náhodně kontaminujících GM variet, které jsou povoleny v EU. Pro variety neschválené v EU je tento limit nulový [16].

PCR v reálném čase je hojně využívaná metoda k testování potravin na přítomnost GMO. K intenzivnímu vývoji dochází taktéž na poli mnohonásobných reakcí [18]. Nejčastějším limitem bývá v některých případech obtížná dostupnost referenčních GM standardů [16]. V tomto ohledu je vhodné zmínit vývoji metody Multiplex PCR v reálném čase pro simultánní detekci a kvantifikaci DNA ze tří transgenních druhů rýže včetně konstrukce a aplikace umělého oligonukleotidu jako referenčního materiálu. Analýza vyhovovala potřebné specifitě a citlivost reakce se pohybovala v rozmezí 0,01–1 % [18].

#### **2.3.2.4 Výzkum mikrobiálního složení potravin**

V posledních dvou desetiletích došlo k výrazným změnám ve studiu mikrobiálních společenství v potravinách. Znalosti o složení mikrobiální komunity, její rozmanitosti, změnách a potenciálních mikrobiálních interakcích v potravinových maticích jsou zásadní pro zajištění produkce bezpečných a vysoce kvalitních potravin. Studium mikrobiálních populací umožňuje lepší pochopení a správu mikrobiálních procesů při zpracování (ovlivnění chuti, konzistence, výživové hodnoty), manipulaci a skladování potravin (prodloužení trvanlivosti) a tím zlepšování mikrobiologické bezpečnosti rychlým a přesným sledováním potenciálních patogenů [19]. Kromě toho je stále větší důraz kladen na kvantifikaci, například k určení množství přítomných mikroorganismů, které jsou škodlivé v případě patogenů nebo prospěšné v případě probiotik [16, 21].

Tradiční kultivační metody jsou nejen zdoluhavé, ale často je také obtížné prostřednictvím těchto metod kultivovat mikroorganismy oslabené nebo vyžadující selektivní obohacení, případně mohou být cílové mikroorganismy nedetekovatelné kvůli silnému nárůstu doprovodné mikroflóry. Tato omezení vedla k rozvoji metod založených na amplifikaci a detekci nukleových kyselin, jako je PCR v reálném čase [19]. Velký význam představuje rychlá, přesná a spolehlivá detekce patogenů, která je popsána například v testování široké škály potravin na přítomnost salmonel, které vyústilo ve spolehlivou identifikaci bakterií již během 28 hodin (v kontrastu s několika dny při kultivaci) [18]. Některé analýzy zjišťující přítomnost patogenů se pro svou důležitost staly komerčně dostupnými [16]. Omezení spolehlivosti PCR v reálném čase bývá způsobeno zejména tím, že analýza DNA nerozlišuje mezi živými a neživými buňkami a může tak generovat falešně pozitivní výsledky [16, 19]. Možné řešení situace představuje použití vhodných interkalačních barviv jako je propidium monoazid (PMA). PMA selektivně proniká pouze do mrtvých buněk s porušenou integritou buněčné membrány a po fotoindukci azidové skupiny se váže na DNA, která se tím stává nerozpustnou a je odstraněna v průběhu extrakce. Tyto chemikálie v současnosti podléhají intenzivnímu vývoji [19]. Pro analýzu širokých mikrobiálních komunit v komplexních potravinových maticích je velmi důležitý také vývoj metod Multiplex PCR v reálném čase [18].

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo podrobně pojednat o molekulárně diagnostických metodách PCR a PCR v reálném čase a o aplikaci PCR v reálném čase při analýze potravinových matric.

V rámci experimentální části byla izolována DNA z mléčného výrobku Bio Via Natur drink v patřičné kvalitě a množství. Pomocí PCR byla prokázána přítomnost mikroorganismů domény *Bacteria* a dále rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* s následným ověřením a upřesněním výsledků pomocí PCR v reálném čase a HRM analýzy.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Vzorek mléčného výrobku s probiotickými kulturami

Potravinářský výrobek Bio Via Natur drink vyroben firmou OLMA a. s. – jogurtový nápoj s probiotickými kulturami s příchutí jahody. Výrobek obsahuje bakterie *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* a *Bifidobacterium sp.*

#### 4.1.2 Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly

Čisté bakteriální kultury použité pro izolaci DNA byly získány z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (CCM) a z Kolekce průmyslových mikroorganismů, PL (LOCK).

- *Bifidobacterium brevis*
- *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935
- *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919

Izolovaná DNA (10 ng/μl) z uvedených bakteriálních kmenů byla dodána Ing. Trachtovou, Ph.D.

#### 4.1.3 Čistá bakteriální DNA

- *Escherichia coli* strain B D4889-5UN (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### 4.1.4 Chemikálie

Všechny roztoky byly připraveny ze sterilních roztoků.

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard (100 bp), (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecyl sulfát sodný – SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)

- Polyethylen glykol – PEG 6 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báze (Serva, Heidelberg, SRN)

#### 4.1.5 Roztoky

- Lyzační pufr I (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)
- Lyzační pufr II (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; 3 mg/ml lysozymu)
- Směs chloroformu a isoamylalkoholu – CIZ (v poměru 24:1)
- TBE pufr (54 g Tris-HCl; 27,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; doplněno na 1 l destilovanou vodou, před použitím 20krát naředěno)
- TE pufr (10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), destilovaná voda)
- Tris-HCl (1 M: 12,1 g Tris-báze; doplněno na 100 ml destilovanou vodou; upraveno HCl na pH 7,8)

#### 4.1.6 Magnetické nosiče

Magnetické polymerní nosiče PGMA byly připraveny Ing. Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze.

Tabulka 1: Specifikace magnetických nosičů

Značení	Polymer	Fe (% hm.)	Průměr nosiče (μm)	PDI	Dn	Dw	-COOH (mM/g)
Fkol B 100 ox	PGMA	5,36	0,7	1,16	0,70	0,81	0,67

PGMA – polyglycidyl methakrylát, PDI – index polydisperzity (poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti), Dn – počet částic průměrné velikosti, Dw – hmotnost částic průměrné velikosti

#### 4.1.7 Komponenty pro PCR a qPCR

- PPP Master Mix (2krát koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva), (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro rod *Bacteria* (F\_eub, R\_eub) [21]
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* (P1V1, P2V1) [23]
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* (R\_alllact, F\_alllact) [21]
- Primery specifické pro rod *Bifidobacteria* (Pbi F1, Pbi R2) [22]
- qPCR 2× SYTO-9 Master Mix (2krát koncentrovaný 150mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 400μM dATP, 400μM dCTP, 400μM dGTP, 400μM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva), (Top-Bio, Praha, ČR)
- Voda pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)

#### 4.1.8 Pomůcky a přístroje

- Běžné laboratorní sklo, umělohmotné a kovové pomůcky apod.
- Centrifuga FVL-2400N Combi-Spin/Vortex (bioSan, Riga, Litva)
- Centrifuga Mini Spin 14 500 ot/min (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Digitální fotoaparát Casio Exiilim (Casio Computer co.Ltd)
- Exikátor (KIF LAB)
- Illumina Eco Real-Time PCR system (Illumina, USA)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New jersey, USA)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Finnpiquette F2 různých objemů (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Mikropipety Discovery HTL různých objemů (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- Thermocycler Minicycler™ (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)

#### 4.2 Metody

Popsané postupy práce byly převzaty ze skript k laboratornímu cvičení [1] s úpravami podle Ing. Trachtové, Ph.D.

##### 4.2.1 Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk

- Byly odebrány 4 vzorky po 1 ml z mléčného výrobku do Eppendorfových zkumavek (1,5 ml).
- Vzorky byly centrifugovány při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- Supernatant byl jedním otočením zkumavky opatrně slit a sediment se nechal okapat.
- Sediment byl suspendován v 1 ml lyzačního pufri I.
- Suspenze byla znovu centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- Supernatant byl opět odstraněn a sediment byl suspendován v 1 ml lyzačního pufri II.
- Vzorky byly za občasného promíchání inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě.
- Dále bylo přidáno 100 µl 10% SDS a 50 µl proteinázy K (0,1 mg/ml) a vše bylo promícháno.
- Vzorky byly inkubovány 30 minut při 55 °C.

#### 4.2.2 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- Ke dvěma vzorkům buněčných lyzátů po 500  $\mu\text{l}$  bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  fenolu (předestilován; pH 7,8; obarven oxychynolinem).
- Roztoky byly 4 minuty kývavým pohybem opatrně promíchávány.
- Mikropipetou byla odebrána horní vodní fáze s DNA do čistých Eppendorfových zkumavek.
- Vzorky byly doplněny TE pufrem na objem 500  $\mu\text{l}$ .
- Bylo přidáno 700  $\mu\text{l}$  směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1).
- Roztoky byly opět 4 minuty promíchávány kývavým pohybem.
- Následně byly vzorky centrifugovány při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- Opět byla odebrána horní vodní fáze s DNA do čistých Eppendorfových zkumavek.

#### 4.2.3 Srážení DNA ethanolem

- Mikropipetou byl změřen objem získaného roztoku a vzorky byly doplněny TE pufrem na 400  $\mu\text{l}$ .
- Bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  3 M octanu sodného a vše bylo promícháno.
- Byl přidán 1 ml ethanolu (96 %) vychlazeného na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a obsah zkumavek byl promíchán.
- DNA byla srážena při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 minut.
- Vzorky byly centrifugovány při 14 500 ot/min po dobu 15 minut.
- Supernatant byl jedním otočením zkumavek opatrně slit a sediment se nechal okapat.
- Zkumavky se sedimentem byly ponechány 10 minut v exikátoru.
- Sediment byl suspendován v 200  $\mu\text{l}$  TE pufru a vzorky uchovány při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další práci.

#### 4.2.4 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z mléčného výrobku pomocí magnetických mikročástic

- K separaci pomocí magnetických mikročástic byly použity zbylé 2 vzorky hrubých lyzátů z mléčného výrobku.
- Byla připravena směs k izolaci DNA (Tabulka 2) o celkovém objemu 1 000  $\mu\text{l}$ .

Tabulka 2: Složení směsi k izolaci DNA pomocí magnetických mikročástic.

Pořadí přidaných komponent	Komponenty	Objem ( $\mu\text{l}$ )
1.	NaCl (5 M)	400
2.	hrubý lyzát buněk	100
3.	PEG 6 000 (40 %)	400
4.	magnetický nosič (2 mg/ml)	100

- Byl použit magnetický nosič Fkol B 100 ox (2 mg/ml).



- Výsledná koncentrace PEG 6 000 ve směsi byla 16 %, 2M NaCl.
- Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě.
- Dále byla směs umístěna do magnetického separátoru, kde byly magnetické částice separovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.
- Supernatant byl opatrně odpipetován.
- Zkumavka s magnetickým nosičem s navázanou DNA byla odstraněna z magnetického separátoru.
- Do Eppendorfových zkumavek se vzorky byl přidán 1 ml 70% ethanolu, vzorky byly promíchány a separovány v magnetickém separátoru po dobu 30 s při laboratorní teplotě.
- Supernatant byl opatrně odpipetován.
- Magnetické nosiče byly znovu 2krát promývány s 500  $\mu$ l 70% ethanolu a separovány po dobu 30 s, supernatant byl následně opět odstraněn.
- Eppendorfovy zkumavky byly vyjmuty z magnetického separátoru a zbytek ethanolu byl odpařen v exikátoru.
- DNA navázaná na magnetických částicích byla eluována do 50  $\mu$ l TE pufru.
- Druhý den byly v magnetickém separátoru separovány magnetické částice z roztoku po dobu 1 minuty a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých zkumavek.

#### 4.2.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

- Roztoky DNA v TE pufru o objemu 3  $\mu$ l byly naneseny na čočku Label Gard<sup>TM</sup> mikrolitrové kyvety NanoPhotometru<sup>TM</sup>.
- Byla změřena absorbance pro vlnové délky 230 nm (minimum absorbance pro DNA), 260 nm (maximum absorbance pro DNA), 280 nm (maximum absorbance pro proteiny) a 320 nm oproti TE pufru.
- Z hodnoty absorbance pro 260 nm byla vypočtena koncentrace DNA ve vzorku. Z hodnoty  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  byla určena čistota vzorku DNA.

#### 4.2.6 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Byl připraven 0,8% agarózový gel ze směsi 0,4 g agarózy a 50 ml 0,5krát koncentrovaného TBE pufru, která byla v několika fázích rozvařena v mikrovlnné troubě.
- Jakmile suspenze vychladla asi na 60 °C, byla promíchána a nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a gel byl ponechán k tuhnutí po dobu 1,5 hodiny.
- Hřebínek byl opatrně vyjmut a do vzniklých komůrek bylo nanášeno po 15  $\mu$ l DNA získané fenolovou extrakcí a pomocí magnetických nosičů smíchaných s 3  $\mu$ l 6krát koncentrovaného nanášecího pufru. Stejným způsobem byla nanesena pozitivní kontrola bakteriální DNA kmene *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935.
- Gel byl umístěn ve správné orientaci do elektroforetické vany.
- Vanička byla opatrně převrstvena 0,5 $\times$  TBE puftrem do výšky asi 1 cm nad gel.
- Elektroforéza byla spuštěna a probíhala při napětí 80 V po dobu 1 hodiny.

- Poté byl gel barven v lázni s ethidium bromidem po dobu 30 minut.
- Gel byl opláchnut v destilované vodě.
- Gel byl ozářen v transiluminátoru UV světlem o vlnové délce 305 nm, byl vyhodnocen a byla provedena fotografická dokumentace.

#### 4.2.7 Konvenční PCR

- Všechny komponenty PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány.
- Byla připravena směs pro PCR o celkovém objemu 25  $\mu$ l. Pořadí a objemy komponent pro PCR jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Složení směsi pro konvenční PCR.

Pořadí přidaných komponent	Komponenty	Objem ( $\mu$ l)
1.	voda pro PCR	9,5
2.	PPP Master Mix (Top-Bio)	12,5
3.	primer 1 (10 pmol/ $\mu$ l)	1,0
4.	primer 2 (10 pmol/ $\mu$ l)	1,0
5.	matrice DNA (10 ng/ $\mu$ l)	1,0

- Pro jednotlivé specifické PCR byly použity vhodné specifické primery (Tabulka 4).

Tabulka 4: Specifikace použitých primerů pro specifické PCR.

Specifická PCR	Primer	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR (bp)	Reference
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	[21]
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Rod <i>Lactobacillus</i>	F_alllact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92	[21]
	R_alllact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT		
Rod <i>Bifidobacterium</i>	Pbi F1	CCG GAA TAG CTC C	914	[22]
	Pbi R2	GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA		

- Jako DNA matrice byla použita purifikovaná DNA ze zmíněných vzorků (body 4.2.2–4.2.4), která byla zředěna na koncentraci 10 ng/ $\mu$ l. Do reakční směsi byla přidávána jako poslední.
- Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola. Matrice DNA byla nahrazena stejným objemem DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l izolované ze sbírkových

kmenů. Při PCR specifické pro doménu *Bacteria* [21] byla použita DNA *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935, při PCR specifické pro rod *Lactobacillus* [21] se jednalo o DNA *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919 a při PCR specifické pro rod *Bifidobacterium* [22] o DNA *Bifidobacterium brevis*.

- Negativní kontrola byla připravena nahrazením DNA matrice v PCR směsi stejným objemem vody pro PCR.
- Připravené PCR směsi byly promíchány, krátce centrifugovány a použity pro PCR.
- Byl spuštěn příslušný program pro PCR (Tabulka 5).

Tabulka 5: Amplifikační programy pro specifické PCR.

Číslo kroku	Krok	Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>
1	Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu	95 °C/5 min	95 °C/5 min	94 °C/5 min
2	Denaturace DNA	95 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/1 min
3	Hybridizace primerů	55 °C/30 s	58 °C/30 s	50 °C/1 min
4	Syntéza nových řetězců DNA	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/2 min
5	Dosyntetizování DNA v posledním cyklu	72 °C/5 min	72 °C/5 min	72 °C/5 min
<b>Počet cyklů (krok 2–4)</b>		30	30	30

#### 4.2.8 Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR

- Na agarózovou gelovou elektroforézu produktů PCR specifickou pro doménu *Bacteria* byl použit 1,6% gel, pro rod *Lactobacillus* byl použit 2% gel a pro rod *Bifidobacterium* byl použit 1,5% gel. Gely byly připraveny směsí vhodného množství agarózy a 0,5krát koncentrovaného TBE pufru. Suspenze byla v několika fázích rozvařena v mikrovlnné troubě. Bylo přidáno fluorescenční barvivo GoldView (1%, 5 µl/100 ml gelu).
- Jakmile směs vychladla asi na 60 °C, byla po promíchání nalita do elektroforetických vaniček s hřebínkem a nechána k zatuhnutí (1 hodina).
- Hřebínek byl opatrně vyjmut a do vzniklých komůrek bylo nanášeno po 15 µl PCR produktů smíchaných s 3 µl 6krát koncentrovaného nanášecího pufru. Na gely byl nanesen rovněž hmotnostní standard (100 bp žebříček).
- Gely byly umístěny ve správné orientaci do elektroforetických van.
- Vaničky byly opatrně převrstveny 0,5× TBE pufrem.
- Elektroforéza byla spuštěna a probíhala při napětí 80 V po dobu 1,5 hodiny.
- Gely byly ozářeny v transiluminátoru UV světlem o vlnové délce 305 nm, byly vyhodnoceny a byla provedena fotografická dokumentace.

#### 4.2.9 Kvantitativní PCR

- Všechny komponenty byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány.
- Byla připravena směs pro qPCR o celkovém objemu 25  $\mu\text{l}$ . Pořadí a objemy komponent jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Složení směsi pro PCR v reálném čase.

Pořadí přidaných komponent	Komponenty	Objem ( $\mu\text{l}$ )
1.	voda pro PCR	9,5
2.	qPCR 2 $\times$ SYTO-9 Master Mix (Top-Bio)	12,5
3.	primer 1 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1,0
4.	primer 2 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1,0
5.	matrice DNA (10 ng/ $\mu\text{l}$ )	1,0

- Pro qPCR byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* F\_eub a R\_eub [21] (Tabulka 4). Jako DNA matrice byla použita stejná DNA jako pro konvenční PCR (bod 4.2.7). Do reakční směsi byla přidávána jako poslední.
- Stejným postupem byla připravena negativní kontrola. Matrice DNA byla nahrazena stejným objemem vody pro PCR.
- Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola. Matrice DNA byla nahrazena stejným objemem DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu\text{l}$  izolované z kultury *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935.
- Ke každému vzorku byl připraven druhý paralelní vzorek.
- Následně byla desítkovým ředěním připravena kalibrační křivka z kultury bakterie *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) v rozsahu 100–0,001 ng/ $\mu\text{l}$  (desítkové ředění).
- Připravené směsi byly promíchány, krátce centrifugovány a použity pro qPCR.
- Na cykleru Rotor-Gene 6000 byl spuštěn příslušný program pro qPCR pro doménu *Bacteria* společně s Melt analýzou (Tabulka 7).

Tabulka 7: Amplifikační program qPCR včetně Melt analýzy.

Číslo kroku	Krok	Amplifikační program
1	Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu	95 °C/5 min
2	Denaturace DNA	95 °C/30 s
3	Hybridizace primerů	55 °C/30 s
4	Syntéza nových řetězců DNA	72 °C/30 s
5	Dosyntetizování DNA v posledním cyklu	72 °C/5 min
<b>Počet cyklů (krok 2–4)</b>		35
6	<b>Melt analýza</b>	95 °C/1 s
		55 °C/5 s
		72 °C/5 s

- Statistické vyhodnocení výsledků qPCR bylo provedeno pomocí softwaru cykleru Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87).
- Pro kvantifikaci byla použita metoda absolutní kvantifikace. Reakční účinnost byla vypočtena ze sklonu amplifikačních křivek (M). Spolehlivost metody byla odhadnuta z korelačního koeficientu lineární regrese ( $R^2$ ).

#### 4.2.10 PCR-HRM

- Směs pro PCR-HRM byla připravena obdobně jako pro kvantitativní PCR (bod 4. 2. 9) s rozdílem navýšení objemu DNA matrice o 1  $\mu$ l na úkor vody pro PCR.
- Byly použity primery specifické pro rod *Lactobacillus* P1V1 a P2V1 [23] (Tabulka 8).

Tabulka 8: Specifikace použitých primerů pro PCR-HRM.

Primer	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů qPCR (bp)	Reference
P1V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC	110	[23]
P2V1	TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC		

- Pro PCR-HRM bylo nanášeno po 10  $\mu$ l z připravené směsi do jamek platíčka cykleru Ilumina Eco Real-Time PCR system.
- Byl spuštěn qPCR program specifický pro rod *Lactobacillus* [10] společně s HRM analýzou (Tabulka 9).

Tabulka 9: Amplifikační program qPCR-HRM.

Číslo kroku	Krok	Amplifikační program
1	Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu	95 °C/5 min
2	Denaturace DNA	95 °C/30 s
3	Hybridizace primerů	52 °C/30 s
4	Syntéza nových řetězců DNA	72 °C/1 min
5	Dosyntetizování DNA v posledním cyklu	72 °C/5 min
<b>Počet cyklů (krok 2–4)</b>		35
6	<b>Analýza křivek tání (HRM)</b>	95 °C/15 s
		55 °C/15 s
		95 °C/15 s

- Statistické vyhodnocení výsledků PCR-HRM bylo provedeno pomocí softwaru Eco Software v5.0. Analýzou křivky tání byla zjištěna hodnota  $T_m$  specifická pro přítomné amplikony.

## 4.3 Výsledky

### 4.3.1 Izolace a detekce DNA z mléčného výrobku

Z mléčného výrobku byl připraven hrubý lyzát buněk. Dva vzorky hrubého lyzátu byly podrobeny izolaci DNA metodou fenolové extrakce a srážení v ethanolu, další dva vzorky byly podrobeny separaci DNA pomocí magnetických mikročastic Fkol B 100 ox.

Přítomnost izolované DNA ve všech vzorcích byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou. Ve všech vzorcích byla detekována izolovaná DNA.

### 4.3.2 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky. Veškeré výsledky stanovení jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Koncentrace izolovaných nukleových kyselin a hodnoty absorpance při různých vlnových délkách.

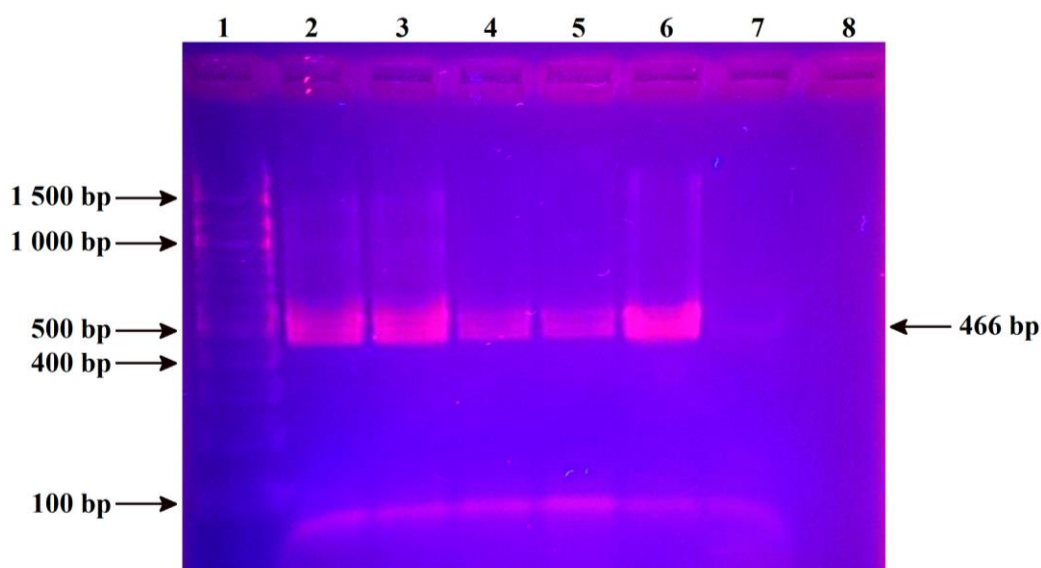
Metoda izolace vzorku	$A_{230}$	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{320}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/μl]
Fenolová extrakce 1	0,043	0,308	0,208	0,014	1,515	147
Fenolová extrakce 2	0,047	0,303	0,205	0,015	1,516	144
Magnetická separace 1	0,021	0,164	0,129	0,055	1,473	55
Magnetická separace 2	0,012	0,119	0,092	0,033	1,458	43

Celková koncentrace nukleových kyselin ve vzorcích se pohybovala v rozmezí 43–147 ng/μl. Poměr absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  se pohyboval pod optimálními hodnotami, což poukazuje na přítomnost proteinů.

#### 4.3.3 Konvenční PCR a detekce produktu PCR

Všechny vzorky izolované DNA zředěné na 10 ng/μl byly podrobeny amplifikaci DNA pomocí PCR specifické pro doménu *Bacteria* (primery F\_eub a R\_eub [21]), pro rod *Lactobacillus* (primery F\_allact a R\_allact [21]) a pro rod *Bifidobacterium* (primery Pbi F1 a Pbi R2 [22]).

Přítomnost specifických produktů PCR byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou. Výsledky elektroforéz a popisy gelů jsou znázorněny na následujících obrázcích (5–7).



*Schéma nanesení vzorků: 1 – žebříček, 2 a 3 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí, 4 a 5 – DNA izolovaná magnetickými nosiči, 6 – pozitivní kontrola (DNA Lactobacillus johnsonii CCM 2935, 10 ng/μl), 7 – negativní kontrola.*

*Obrázek 5: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro doménu Bacteria [21].*

Ve všech vzorcích z mléčného výrobku byl v různé intenzitě detekován specifický produkt PCR (466 bp), tím byla prokázána přítomnost bakteriální DNA.

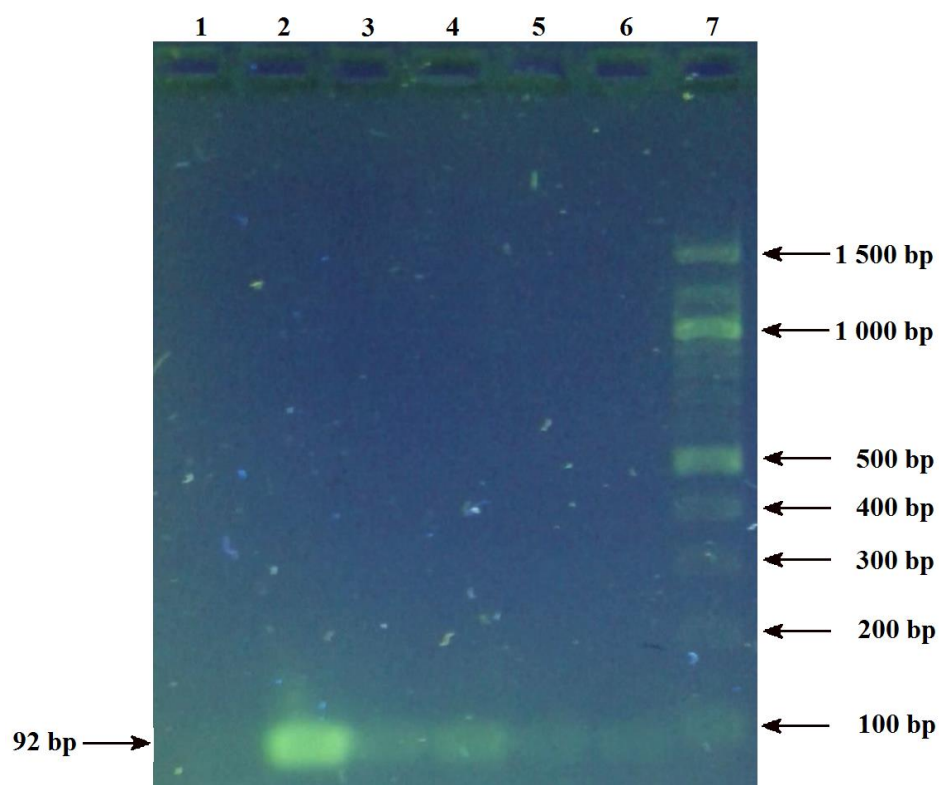


Schéma nanesení vzorků: 1 – negativní kontrola, 2 – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919, 10 ng/μl), 3 a 4 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí, 5 a 6 – DNA izolovaná magnetickými nosiči, 7 – žebříček.

Obrázek 6: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro rod *Lactobacillus* [21].

Ve všech vzorcích z mléčného výrobku byl v různé intenzitě detekován specifický produkt PCR (92 bp), tím byla prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*.



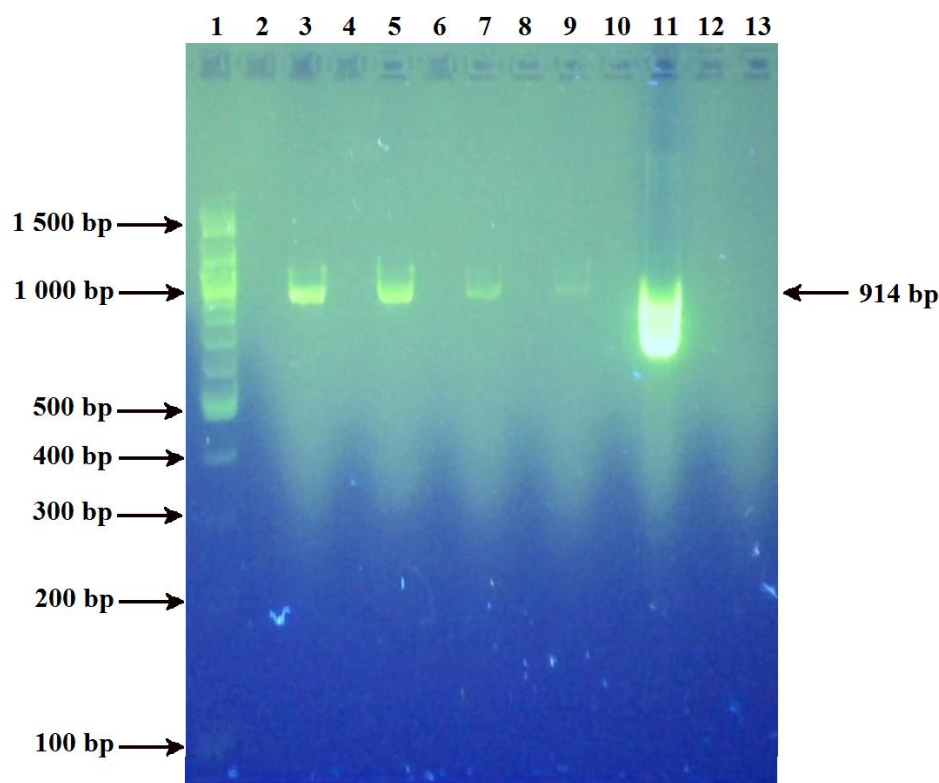


Schéma nanesení vzorků: 1 – žebříček, 3 a 5 – DNA izolovaná fenolovou extrakcí, 7 a 9 – DNA izolovaná magnetickými nosiči, 11 – pozitivní kontrola (DNA *Bifidobacterium brevis*, 10 ng/μl, kontrola je přetížená pravděpodobně kvůli špatnému naředění), 13 – negativní kontrola.

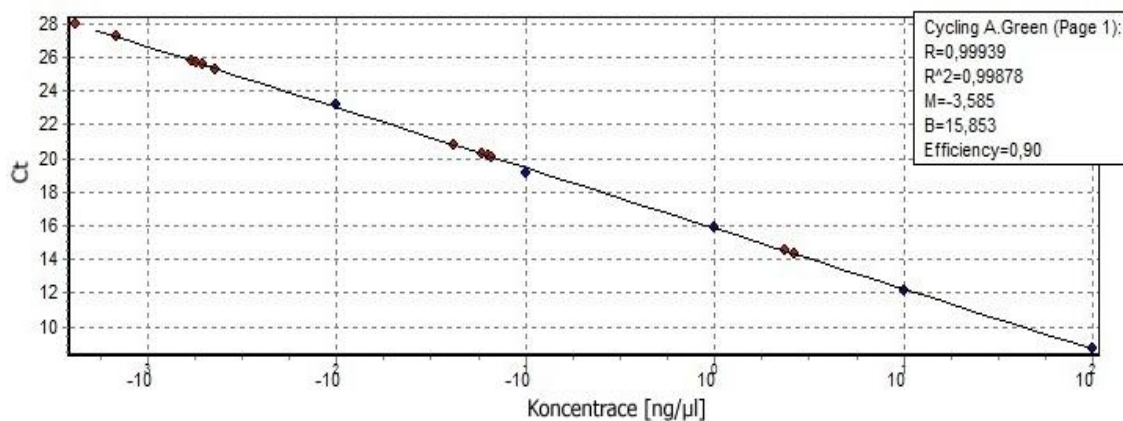
Obrázek 7: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro rod *Bifidobacterium* [22].

Ve všech vzorcích z mléčného výrobku byl v různé intenzitě detekován specifický produkt PCR (914 bp), tím byla prokázána přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium*.

#### 4.3.4 Kvantitativní PCR

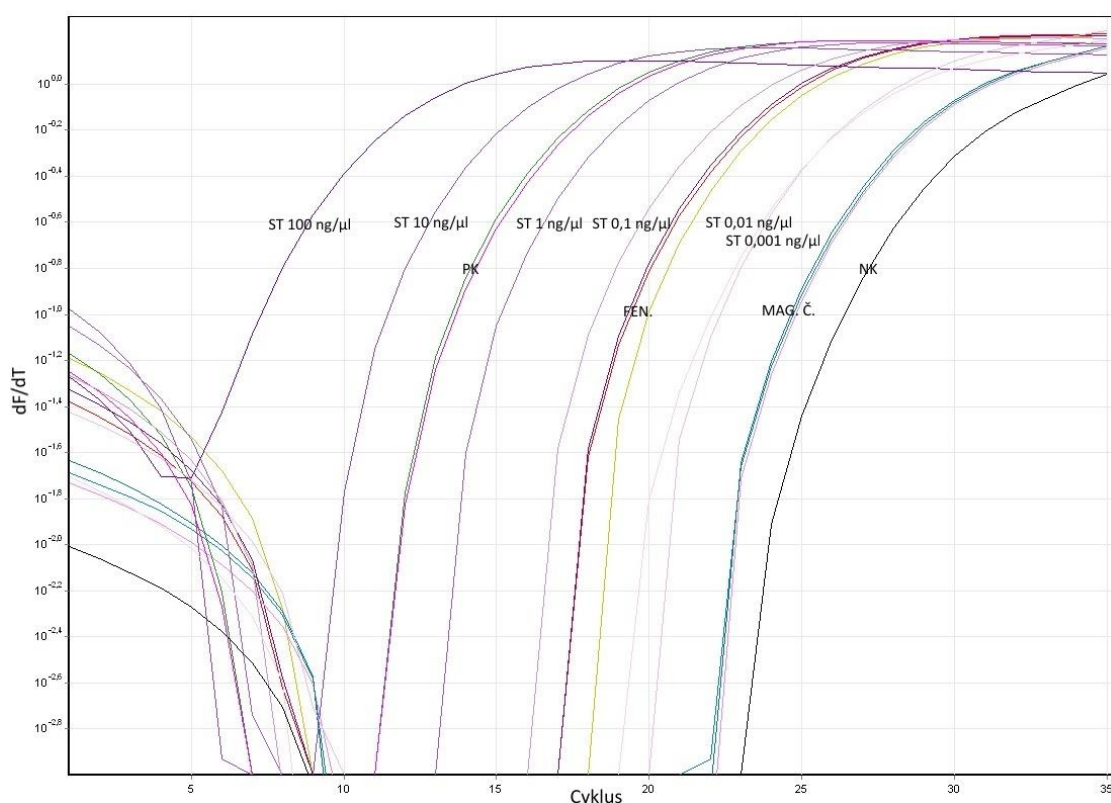
Byla provedena qPCR specifická pro doménu *Bacteria* (primery F\_eub a R\_eub [21]) pro zjištění přesné koncentrace bakteriální DNA ve vzorcích z mléčného výrobku metodou absolutní kvantifikace.

Ze závislosti hodnoty  $C_t$  na koncentraci ve srovnání s kalibrační křivkou (v rozsahu 100 ng/μl–1 pg/μl), (bod 1 pg/μl byl pro výpočet zanedbán) byla pomocí softwaru cykleru Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87) stanovena koncentrace cílové DNA ve vzorcích v rozmezí 0,002–0,066 ng/μl. Dále byla stanovena hodnota reakční účinnosti na 90 % (Efficiency) vypočítaná ze sklonu amplifikačních křivek (M). Spolehlivost reakce byla odhadnuta z korelačního koeficientu lineární regrese ( $R^2$ ) s hodnotou přibližně 0,999 (Obrázek 8).



Legenda: modré body – kalibrační křivka, červené body – analyzované vzorky

Obrázek 8: Závislost hodnoty  $C_t$  na koncentraci.

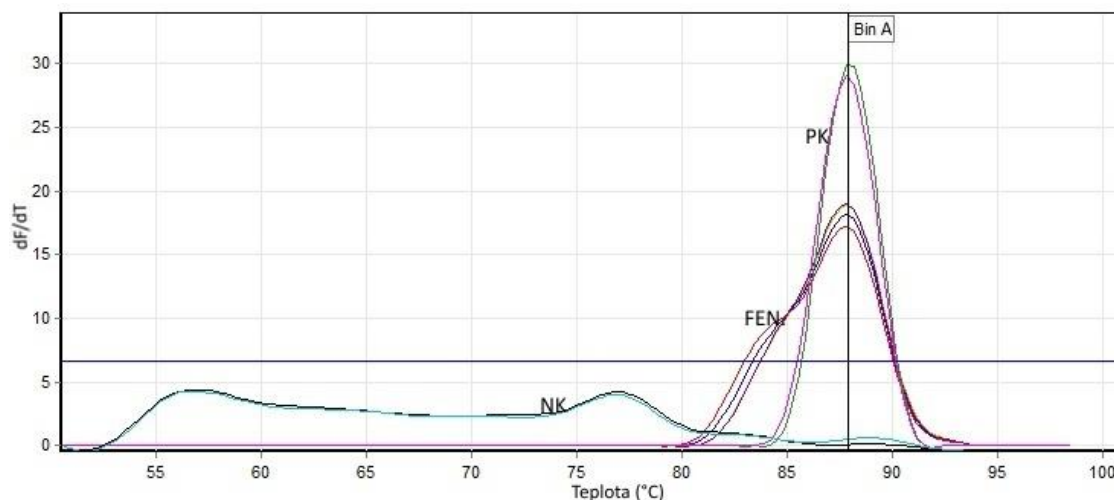


Značení křivek: ST – série standardů kalibrační křivky (bod ST 0,001 ng/μl byl zanedbán), PK – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935), NK – negativní kontrola, FEN. – vzorky získané fenolovou extrakcí, MAG. Č. – vzorky získané pomocí magnetických mikročástic.

Obrázek 9: Amplifikační křivky – závislost množství fluorescence na cyklu reakce.

Pro ověření přítomnosti specifického produktu PCR byla provedena Melt analýza. Byl detekován jeden vrchol na křivkách tání – PCR produkt o teplotě tání ( $T_m$ ) 87,8 °C (Obrázek 10). Stejné teploty tání dosahoval vrchol pozitivní kontroly (DNA *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935) i série standardů kalibrační křivky (standarty

spolu se vzorky separovanými magnetickými nosiči nejsou pro přehlednost uvedeny). Z výsledků vyplývá, že byla amplifikována DNA specifická pro doménu *Bacteria*.



Značení křivek: PK – pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935), NK – negativní kontrola, FEN. – vzorky získané fenolovou extrakcí.

Obrázek 10: Melt analýza – závislost množství fluorescence na teplotě.

Veškeré výsledky kvantifikace a Melt analýzy pro testované vzorky jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tabulka 11: Výsledky kvantifikace a Melt analýzy pro jednotlivé vzorky.

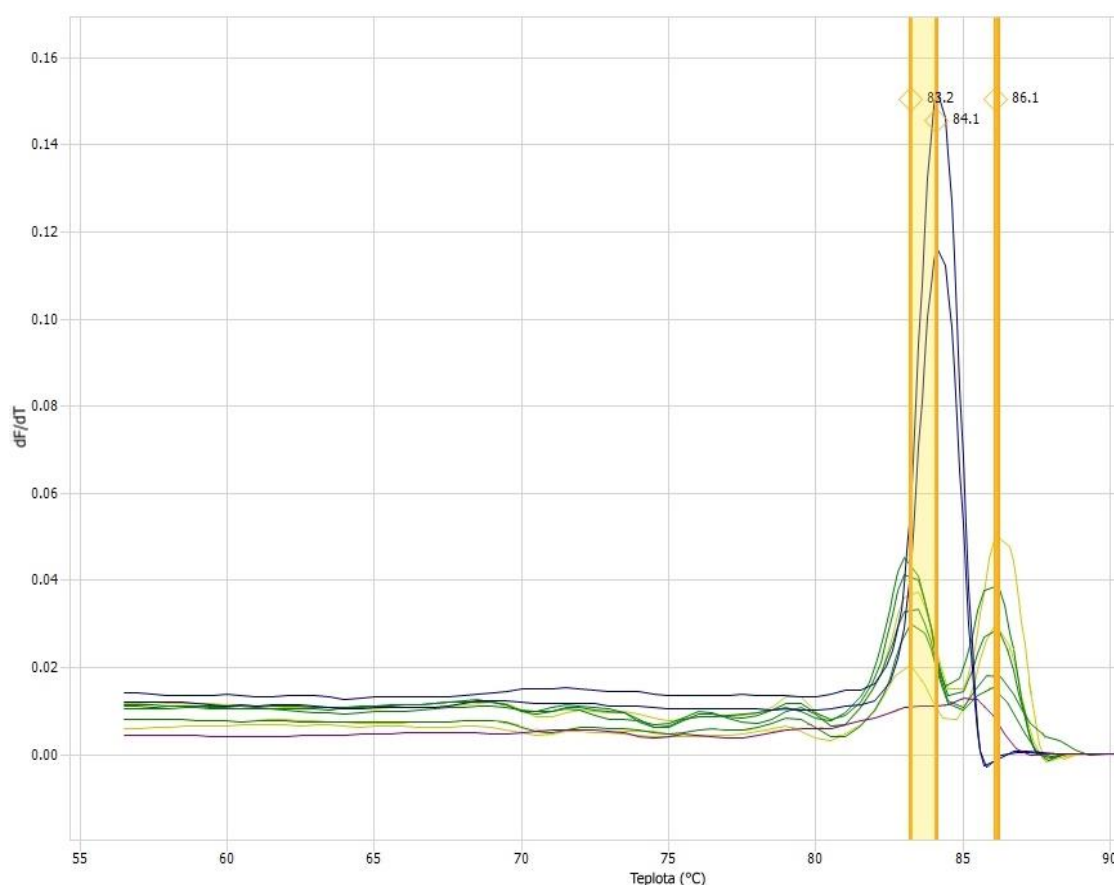
Vysvětlivky: N – hodnota  $T_m$  nebyla určena kvůli nízkým koncentracím vzorků.

Charakteristika vzorku	$C_t$	c [ng/μl]	$T_m$ (°C)
Vzorky z mléčného výrobku získané fenolovou extrakcí (10 ng/μl)	20,27	0,059	87,8
	20,79	0,042	
	20,09	0,066	
	20,13	0,064	
Vzorky z mléčného výrobku získané separací magnetickými mikročásticemi (10 ng/μl)	25,75	0,002	N
	25,66	0,002	
	25,56	0,002	
	25,31	0,002	
Pozitivní kontrola	14,34	2,640	87,8
	14,52	2,354	
Negativní kontrola	27,20	0,001	N
	27,96	0,000	
Standard 100 ng/μl	8,72	97,427	87,8
Standard 10 ng/μl	12,20	10,426	
Standard 1 ng/μl	15,94	0,945	
Standard 0,1 ng/μl	19,11	0,123	
Standard 0,01 ng/μl	23,19	0,009	

### 4.3.5 PCR-HRM

Pro bližší zařazení druhů přítomných v testovaném výrobku byla provedena HRM analýza produktů PCR za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* (primery P1V1 a P2V1 [23]), pro specifikaci produktů reakce byla zařazena HRM analýza.

U analyzovaných vzorků z mléčného výrobku byly detekovány dva vrcholy na křivkách tání ( $T_{m1} = 83,2 \text{ °C}$  a  $T_{m2} = 86,1 \text{ °C}$ ) značící zřejmě dva druhy mikroorganismů rodu *Lactobacillus* (Obrázek 11).



Křivky: světle zelená – DNA izolovaná fenolovou extrakcí, tmavě zelená – DNA izolovaná magnetickými nosiči, modrá – pozitivní kontrola, fialová – negativní kontrola.

Obrázek 11: PCR-HRM specifická pro rod *Lactobacillus* [23].

## 4.4 Diskuze

Molekulárně diagnostické metody založené na amplifikaci DNA „*in vitro*“, jako je konvenční PCR a její modifikace – PCR v reálném čase a PCR-HRM, nachází stále širší uplatnění v mnoha směrech, včetně potravinářství.

Kromě jejich nesporných výhod, které rozšiřují možnosti analýzy různých potravinových matric a umožňují generovat přesné a spolehlivé výsledky i tam, kde ostatní metody selhávají, je třeba brát v potaz některá omezení. Kromě opatrné manipulace se vzorkem a precizní přípravy na analýzu, PCR vyžaduje aspoň částečnou znalost cílové sekvence DNA (sekvence některých druhů jsou však v současnosti již dostupné). Pečlivost je nezbytná nejen při provádění PCR zkoušky, ale i při

interpretaci jejich výsledků. Velkou výzvou v současnosti představuje zejména vývoj vhodných mnohonásobných PCR reakcí, které výrazně usnadňují studium komplexních matic a také vývoj specifitějších přístupů, například pro identifikaci příbuzných druhů (HRM) či rozlišení živých a mrtvých organismů (PMA). Vývoj různých přístupů v rámci PCR v reálném čase je však výrazně motivován vzrůstající potřebou analýzy potravin (GMO, alergeny, patogeny, probiotika).

#### 4.4.1 Izolace a detekce bakteriální DNA z mléčného výrobku

Celková DNA byla izolována z hrubého lyzátu buněk mléčného výrobku fenolovou extrakcí a srážením v ethanolu a dále také metodou magnetické separace využívající magnetické mikročástice Fkol B 100 ox.

Metoda magnetické separace je vhodná zejména pro zpracování vzorků, které obsahují tzv. inhibitory PCR (např. vápenaté ionty). Metoda je rychlá, na vybavení a chemikálie nenáročná a je velmi šetrná ke zpracovávaným vzorkům. DNA izolovaná touto metodou by měla být čistší.

Přítomnost izolované DNA byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy. Kromě DNA byla detekována i RNA (bývají izolovány společně).

Izolovaná DNA byla následně použita jako DNA matrice pro specifické PCR a pro PCR v reálném čase. Správné zvládnutí metody izolace DNA je předpokladem úspěšnosti PCR.

#### 4.4.2 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Spektrofotometricky byly analyzovány izolované vzorky. Celková koncentrace nukleových kyselin se pohybovala v rozmezí 43–147 ng/μl (zjištěno z hodnoty  $A_{260}$ ). Koncentrace nukleových kyselin izolovaných metodou magnetické separace byla nižší než u vzorků izolovaných fenolovou extrakcí, což mohlo způsobit nabrání menšího množství magnetických mikročástic, ale především fakt, že metoda magnetické separace má obecně nižší účinnost. Vyšší koncentrace by bylo možné dosáhnout také např. zvýšením intenzity a doby centrifugace v předchozích krocích. Hodnota  $A_{230}$  vypovídá o obsahu fenolu, měla by být co nejnižší. Z výsledků měření dále vyplývá, že vzorky obsahovaly určité množství proteinů ( $A_{260}/A_{280} < 1,8$ ). Proteiny jsou nežádoucí, protože by mohly interferovat v PCR. Avšak pro PCR a PCR v reálném čase byla DNA naředěna (na 10 ng/μl), čímž byly naředěny i inhibitory PCR [1].

Z výše uvedeného bylo usouzeno, že byla izolována DNA v koncentraci i čistotě celkově vyhovující pro PCR.

#### 4.4.3 Konvenční PCR a detekce produktu PCR

Byla provedena specifická PCR pro doménu *Bacteria* (primery F\_eub a R\_eub [21]), následně pro rod *Lactobacillus* (primery F\_alllact a R\_alllact [21]) a pro rod *Bifidobacterium* (primery Pbi F1 a Pbi R2 [22]).

Ve všech vzorcích z mléčného výrobku byla prokázána přítomnost mikroorganismů domény *Bacteria* a následně bakterií rodu *Lactobacillus* i rodu *Bifidobacterium* v dostatečném množství, což je v souladu s deklarací výrobce.

#### 4.4.4 Kvantitativní PCR

Byla provedena qPCR specifická pro doménu *Bacteria* (primery F\_eub a R\_eub [21]) společně s Melt analýzou pro zjištění přesné koncentrace bakteriální DNA ve vzorcích z mléčného výrobku. Byla použita metoda absolutní kvantifikace.

Vyhodnocení výsledků proběhlo pomocí softwaru cykleru Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87) lineární regresní analýzou amplifikačních křivek na základě kalibrační křivky (v rozsahu 100–0,001 ng/μl) sestrojené za použití bakteriální DNA *Escherichia coli*. Pro analyzované vzorky byla zjištěna hodnota  $C_t$  představující prahový cyklus, ve kterém je detekován statisticky významný nárůst fluorescence. Tato hodnota je nepřímě úměrná původní koncentraci DNA ve vzorku. Následně byla podle hodnoty  $C_t$  ve srovnání s kalibrační křivkou určena původní koncentrace DNA ve vzorcích v rozmezí 0,002–0,066 ng/μl. Dále byla vyhodnocena reakční účinnost na 90 % (z hodnoty  $M$ ) a spolehlivost metody s hodnotou přibližně 0,999 ( $R^2$ ). Tyto hodnoty se pohybují v optimálním rozmezí (dle bodu 2. 2. 2), a tudíž lze výsledky kvantifikace považovat za spolehlivé.

Pomocí Melt analýzy byl detekován jeden vrchol na křivkách tání – PCR produkt o teplotě tání ( $T_m$ ) 87,8 °C. U vzorků získaných metodou magnetické separace nebylo možné stanovit  $T_m$  kvůli nízké koncentraci vzorků. Stejně teploty tání dosahoval vrchol pozitivní kontroly (DNA *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935) i série standardů kalibrační křivky. Z výsledků vyplývá, že byla amplifikována DNA specifická pro doménu *Bacteria*.

Hodnoty koncentrace stanovené spektrofotometricky odpovídají celkovému obsahu nukleových kyselin, tedy DNA i RNA naopak pomocí qPCR byla stanovována pouze cílová, tedy bakteriální dsDNA. To je důvod rozdílných hodnoty detekovaných spektrofotometricky a pomocí qPCR.

#### 4.4.5 PCR-HRM

Následně byla provedena PCR v reálném čase specifická pro rod *Lactobacillus* (primery P1V1 a P2V1 [23]) s HRM analýzou pro specifikaci produktů reakce, tedy pro rozlišení jednotlivých druhů mikroorganismů ve vzorcích. Metoda byla optimalizována zvýšením koncentrace DNA matrice v analyzovaných vzorcích a navýšením počtu cyklů reakce.

Vysokorozlišovací analýzou křivky tání byly u všech vzorků z mléčného výrobku detekovány dva vrcholy na křivkách tání ( $T_{m1} = 83,2$  °C a  $T_{m2} = 86,1$  °C) značící zřejmě dva specifické produkty, a tedy dva druhy mikroorganismů rodu *Lactobacillus*. Tyto výsledky se neshodují s tvrzením výrobce, které udává tři druhy rodu *Lactobacillus*, což je pravděpodobně způsobeno nízkou koncentrací jednoho z přítomných druhů mikroorganismů. Bližší identifikace jednotlivých druhů dosaženo nebylo, avšak bylo by možné jí dosáhnout společnou amplifikací a srovnáním s pozitivními kontrolami obsahujícími deklarované mikroorganismy.

## 5 ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce podrobně pojednává o metodách konvenční PCR a jejích modifikacích – PCR v reálném čase a PCR-HRM, které je možné využít při detekci, identifikaci, případně kvantifikaci mikroorganismů v potravinových matricích.

V experimentální části byla z mléčného výrobku Bio Via Natur drink izolována DNA metodou magnetické separace pomocí magnetických mikročastic Fkol B 100 ox a metodou fenolové extrakce. Získaná DNA byla použita jako matrice pro specifické PCR k detekci mikroorganismů domény *Bacteria* a následně rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Konkrétnější informace o analyzovaném vzorku byly získány pomocí PCR v reálném čase a PCR-HRM. Pomocí kvantitativní PCR byla určena přesná koncentrace bakteriální DNA matrice a PCR-HRM umožnila detekci dvou druhů mikroorganismů rodu *Lactobacillus*.

V uvedeném výrobku byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium* a dvou druhů bakterií rodu *Lactobacillus*. Přítomnost bakterií rodu *Streptococcus* nebyla ověřována.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [2] ŠMARDÁ, J., J. DOŠKAŘ, R. PANTŮČEK, V. RŮŽIČKOVÁ a J. KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [3] KRÁLOVÁ, B., L. FUKAL, P. RAUCH a T. RUMML. *Bioanalytické metody*. 3. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [4] RUMML, T., M. RUMLOVÁ a V. PAČES. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [5] *iGEM 2007 Wiki: International Genetically Engineered Machine Competition* [online]. 24 May 2007, at 16:01 [cit. 2014-12-27]. Dostupné z: <http://2007.igem.org/wiki/index.php/McGill/PCR>
- [6] DUDOVÁ, S. a R. HÁJEK. *Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu*. Klinická onkologie, Aps Brno: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2008, roč. 21, S1, s. 220-222. ISSN 0862-495X.
- [7] SIBLEY, C. D., G. PEIRANO a D. L. CHURCH. *Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology*. Infection, Genetics and Evolution. 2012, roč. 12, č. 3, s. 505-521. ISSN 15671348.
- [8] SIGMA-ALDRICH CO. qPCR Technical Guide. In: *Sigma-Aldrich®* [online]. 2008 [cit. 2014-12-28]. Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General\\_Information/qpcr\\_technical\\_guide.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/qpcr_technical_guide.pdf)
- [9] TRACHTOVÁ, Š. *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – úloha č. 4*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ZS 2014–2015.
- [10] PORCELLATO, D., H.M. ØSTLIE, K.H. LILAND, K. RUDI, T. ISAKSSON a S.B. SKEIE. Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in Norway cheese by high-resolution melt analysis. *Journal of Dairy Science* [online]. 2012, vol. 95, issue 9, s. 4804-4812 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.3168/jds.2012-5386. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212004948>
- [11] BLATNÝ, R.: Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) jako nástroj moderní diagnostiky. In *XV celostátní konference DNA diagnostiky, Praha, 24.–25. listopadu 2011* [online]. 2011 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: <http://dna2011.slg.cz/abstrakta/99>



- [12] TESAŘOVÁ Z., D. ŠÍDOVÁ, A. VRÁBLÍK, J. HODEK a J. OVESNÁ. *Metodika analýzy mléčných výrobků a jejich sójových analogů na přítomnost RoundUp Ready sóji*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2013. ISBN 978-80-7427-134-2.
- [13] ERALI, M. a C. T. WITWER. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* [online]. 2010, vol. 50, issue 4, s. 250-261 [cit. 2015-04-10]. Doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.013. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1046202310000289>
- [14] PEREIRA, F., J. CARNEIRO a A. AMORIM. Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* [online]. 2008, vol. 2, issue 3, s. 187-200 [cit. 2015-04-20]. DOI: 10.2174/187221508786241738. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/92869/article>
- [15] ČÍŽKOVÁ, H., R. ŠEVČÍK, A. RAJCHL, J. PIVOŇKA a M. VOLDŘICH. TRENDY V AUTENTICITĚ POTRAVIN A V PŘÍSTUPECH K DETEKCI FALŠOVÁNÍ. *Chemické listy* [online]. 2012, vol. 106, issue 10, s. 903-910 [cit. 2015-04-30]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_10\\_903-910.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_903-910.pdf)
- [16] LOGAN, J., K. EDWARDS a N. SAUNDERS. *Real-time PCR: Current Technology and Applications*. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2009. 284 s. ISBN: 978-1-904455-39-4.
- [17] Lees M. *Food Authenticity and Traceability*. Woodhead: CRC Press, 2003. 612 s. ISBN: 0849317630.
- [18] IWOBI, A., I. HUBER a U. BUSCH. *The Application of PCR-Based Methods in Food Control Agencies-A Review* [online]. INTECH Open Access Publisher, 2012 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.5772/38658. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/polymerase-chain-reaction/the-application-of-pcr-based-methods-in-food-control-agencies-a-review>
- [19] JUSTÉ, A., B.P.H.J. THOMMA a B. LIEVENS. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* [online]. 2008, roč. 25, č. 6, s. 745-761 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1016/j.fm.2008.04.009. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0740002008000786>
- [20] MEYER, R. a U. CANDRIAN. PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 1996, roč. 29, č. 1, s. 1-9 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1006/fstl.1996.0001. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0023643896900018#>

- [21] HERBEL, S. R., B. LAUZAT, M. NICKISCH-ROSENEGK, M. KUHN, J. MURUGAIYAN, L. H. WIELER a S. GUENTHER. Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2013, roč. 115, č. 6, s. 1402-1410 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1111/jam.12341. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1111/jam.12341/full>
- [22] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, vol. 72, issue 4, s. 2359–2365. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>
- [23] ROY, D. a S. SIROIS. Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the ldh gene. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, vol. 191, issue 1, s. 17–24. ISSN 03781097. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x>
- [24] KLIJN, N., A. H. WEERKAMP a W. M. DEVOS. Identification of mesophilic lactic-acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S ribosomal-RNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, vol. 57, issue 11, s. 3390–3393. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/57/11/3390.abstract?sid=c513e6d8-6e7d-452f-a290-8060811ee3fd>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp – pár bází

D<sub>n</sub> – počet částic průměrné velikosti

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfát

dsDNA – dvojitá DNA

D<sub>w</sub> – hmotnost částic průměrné velikosti

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová

ELISA – analýza s enzymem vázaným na imunisorbent

EU – Evropská unie

GM – geneticky modifikovaný

GMO – geneticky modifikovaný organismus

HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání

PCR – polymerázová řetězová reakce

PDI – index polydisperzity

PEG – polyetylen glykol

PGMA – polyglycidyl methakrylát

PMA – propidium monoazid

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecyl sulfát sodný

Tag DNA-polymeráza – termostabilní enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

TE pufr – Tris-EDTA pufr

UV – ultrafialové světlo