

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

IDENTIFIKACE VYBRANÝCH BAKTERIÍ V SÝRECH POMOCÍ PCR

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

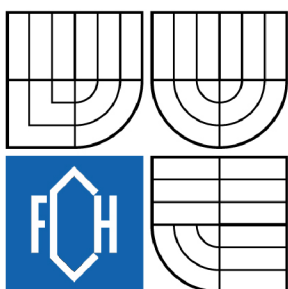
Bc. BARBORA ÜRGEOVÁ

BRNO 2009



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

IDENTIFIKACE VYBRANÝCH BAKTERIÍ V SÝRECH POMOCÍ PCR

PCR IDENTIFICATION OF SELECTED BACTERIA IN CHEESES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

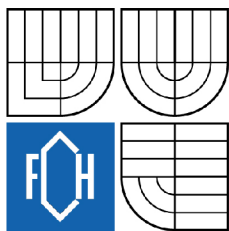
Bc. BARBORA ÜRGEOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0265/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Barbora Ůrgeová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Identifikace vybraných bakterií v sýrech pomocí PCR

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Barbora Ůrgeová
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Táto práca je zameraná na identifikáciu a druhovú špecifikáciu 44 kmeňov klostrídií pomocou molekulárne-genetických metód. Bola použitá DNA z baktérií vyizolovaných zo syrov s defektom neskorého durenia.

Amplifikovateľnosť prečistenej DNA nariadenej na 10 ng/μl bola overená pomocou PCR s univerzálnymi primermi. Rodová PCR využívajúca primery špecifické pre rod *Clostridium* potvrdila, že všetky vzorky patria práve do tohto rodu. Na základe druhovo špecifických PCR metód sa určila príslušnosť 7 kmeňov k druhu *Clostridium butyricum* a 12 kmeňov k druhu *Clostridium tyrobutyricum*. 15 vzoriek DNA bolo identifikovaných ako zmiešané kultúry, zvyšných 10 kmeňov nebolo zaradených do druhu.

Pomocou PCR boli hľadané kmene, ktoré nesú gén kódujúci hydrogenázu *hydA*. Z identifikovaného súboru boli špecifické PCR produkty pre tento gén detekované u 31 kmeňov. Intenzívny amplicon dávali všetky kmene druhu *C. butyricum*.

ABSTRACT

This work is focused on identification and species specification of a collection of 44 clostridial strains using molecular-genetic methods. DNA of bacteria isolated from late-blowing defected cheeses was used.

The purified DNA was diluted to 10 ng/μl and its ability to be amplified was verified by PCR with universal primers. By genus-specific PCR it was proved that DNA of all samples belongs to *Clostridium* genus. Based on species-specific PCR reactions, it was determined that 7 strains belong to *C. butyricum* and 12 strains belong to *C. tyrobutyricum*. 15 strains were positively detected in both species-specific PCRs and therefore identified as mixed cultures. Another 10 strains were not classified into tested species.

Strains with the gene encoding the enzyme hydrogenase *hydA* were searched using PCR. Specific PCR products for this gene were detected in 31 strains of the analysed collection. Especially intense were the amplicons by all strains belonging to *C. butyricum* species.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

neskoré durenie syrov, rod *Clostridium*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, PCR identifikácia hydrogenáz

KEYWORDS

late-blowing cheeses, *Clostridium* genus, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, PCR identification of hydrogenases

ÚRGEOVÁ, B. *Identifikace vybraných bakterií v sýrech pomocí PCR*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 71 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

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 využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Moje úprimné poďakovanie patrí najmä vedúcej diplomovej práce, doc. RNDr. Alene Španovej, CSc za odborné vedenie, cenné rady a pozitívny prístup. Ďakujem tiež Mgr. Ivanovi Gregušovi za jeho všestrannú pomoc a svojej rodine za podporu.

Táto práca bola podporovaná grantom 2B08070 Ministerstva školstva, telovýchovy a mládeže ČR.

OBSAH

Obsah	9
1 Úvod	13
1.1 Cieľ práce.....	13
2 Teoretická časť	14
2.1 Rod <i>Clostridium</i>	14
2.1.1 Taxonómia.....	14
2.1.2 Charakteristika.....	14
2.1.3 Metabolizmus.....	14
2.1.4 Výskyt.....	15
2.1.4.1 Prirodzený výskyt.....	15
2.1.4.2 Patogény.....	16
2.1.4.3 Potravinársky priemysel.....	16
2.1.5 Neskoré durenie syrov.....	16
2.1.5.1 Klostídie spôsobujúce neskoré durenie syrov.....	17
2.1.6 Priemyselné využitie.....	17
2.1.7 Zdraviu prospešný kmeň <i>Clostridium butyricum</i>	17
2.2 Analýza baktérií molekulárne-genetickými metódami.....	18
2.2.1 Polymerázová reťazová reakcia.....	18
2.2.1.1 Využitie PCR.....	18
2.2.1.2 Priebeh PCR reakcie.....	18
2.2.1.3 Hniezdová PCR.....	19
2.2.2 Gélová elektroforéza.....	19
2.3 Určovanie klostrídií molekulárne-genetickými metódami.....	20
2.3.1 Doména <i>Bacteria</i>	20
2.3.2 Rod <i>Clostridium</i>	20
2.3.3 Druh <i>C. butyricum</i>	20
2.3.4 Druh <i>C. tyrobutyricum</i>	21
2.3.5 Ďalšie metódy.....	21
2.4 Produkcia vodíka baktériami rodu <i>Clostridium</i>	21
2.4.1 Identifikácia klostrídií produkujúcich vodík.....	22
2.4.2 Hydrogenázy.....	22
3 Materiál a metódy	23
3.1 Bakteriálne kultúry.....	23
3.2 Chemikálie a roztoky.....	23
3.2.1 Roztoky pre izoláciu a purifikáciu DNA.....	23
3.2.2 Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu.....	24
3.2.3 PCR komponenty.....	24
3.3 Prístroje a pomôcky.....	24
3.4 Metódy.....	25
3.4.1 Kultivácia.....	25
3.4.2 Lýza buniek a izolácia DNA fenolovou extrakciou.....	25
3.4.3 Meranie koncentrácie DNA vzoriek.....	25
3.4.4 Polymerázové reťazové reakcie.....	26
3.4.4.1 Zloženie PCR zmesí.....	26

	3.4.4.2	Programy amplifikácie	26
	3.4.5	Gélová elektroforéza DNA na agaróze	27
4		Výsledky	28
	4.1	Izolácia DNA.....	28
	4.1.1	Gélová elektroforéza DNA.....	28
	4.1.2	Meranie koncentrácie DNA vzoriek	29
	4.1.3	Riedenie vzoriek.....	30
	4.2	Kultivácia zbierkového kmeňa <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	32
	4.2.1	Uchovávanie buniek	33
	4.2.2	Lýza buniek a izolácia DNA <i>C. tyrobutyricum</i> DSM 2637	33
	4.2.3	Meranie koncentrácie a riedenie DNA zbierkového kmeňa	33
	4.3	PCR s univerzálnymi primermi – overenie amplifikovateľnosti DNA.....	33
	4.3.1	Amplifikovateľnosť DNA s primermi podľa Haarmanovej.....	34
	4.3.2	Amplifikovateľnosť DNA vzoriek s primermi podľa Greisena	34
	4.3.3	Zhrnutie a porovnanie amplifikácie s univerzálnymi primermi	35
	4.4	Rodovo špecifická PCR pre rod <i>Clostridium</i>	36
	4.4.1	Testovanie prídavku MgCl ₂ na kvalitu PCR produktu.....	36
	4.4.2	Amplifikácia DNA analyzovaných kmeňov s rodovo špecifickými primermi	37
	4.5	Druhovo špecifická PCR – <i>Clostridium butyricum</i>	38
	4.5.1	Overenie špecificity primerov s DNA zbierkových kmeňov	38
	4.5.2	Optimalizácia druhovo špecifickej PCR pre <i>C. butyricum</i>	39
	4.5.2.1	Zmena koncentrácie DNA a citlivosť PCR.....	40
	4.5.2.2	Prídavok MgCl ₂ a skrátenie doby syntézy	41
	4.5.2.3	Zmena zloženia PCR zmesi znížením množstva komponent.....	41
	4.5.2.4	Optimalizácia teploty hybridizácie.....	42
	4.5.2.5	Druhovo špecifická PCR pre <i>C. butyricum</i> s inými polymerázami	44
	4.5.3	Súhrn optimalizácie druhovo špecifickej PCR pre <i>C. butyricum</i>	44
	4.5.4	Zaradenie analyzovaných kmeňov do druhu <i>C. butyricum</i>	45
	4.6	Hniezdová druhovo špecifická PCR – <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	46
	4.6.1	Testovanie špecificity primerov	46
	4.6.1.1	Prvá PCR v hniezdovej PCR.....	46
	4.6.1.2	Druhá PCR v hniezdovej PCR	47
	4.6.2	Optimalizácia druhovo špecifickej PCR pre <i>C. tyrobutyricum</i>	48
	4.6.2.1	Optimalizácia zloženia PCR zmesi	48
	4.6.2.2	Testovanie rôzneho množstva DNA	50
	4.6.2.3	Optimalizácia teploty hybridizácie.....	52
	4.6.3	Optimalizácia druhej reakcie v hniezdovej PCR.....	54
	4.6.3.1	Príprava PCR produktu pre ďalšiu manipuláciu	54
	4.6.3.2	Izolácia špecifických PCR produktov z gélu	55
	4.6.3.3	PCR s DNA špecifického PCR produktu vyizolovaného z gélu	55
	4.6.3.4	Stanovenie citlivosti druhej reakcie v hniezdovej PCR	56
	4.6.4	Zaradenie analyzovaných kmeňov do druhu <i>C. tyrobutyricum</i>	57
	4.7	Súhrn rodového a druhového zaradenia vzoriek	58
	4.8	Amplifikácia génov kódujúcich hydrogenázy.....	60

5	Diskusia	62
5.1	Vzorky DNA analyzovaných bakteriálnych kmeňov	62
5.2	Kultivácia zbierkového kmeňa <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	62
5.3	PCR s univerzálnymi primermi	62
5.4	Rodovo špecifická PCR pre rod <i>Clostridium</i>	62
5.5	Druhovo špecifická PCR – <i>Clostridium butyricum</i>	63
5.5.1	Overenie špecificity primerov s DNA zbierkových kmeňov	63
5.5.2	Optimalizácia druhovo špecifickej PCR pre <i>C. butyricum</i>	63
5.5.3	Zaradenie analyzovaných kmeňov do druhu <i>C. butyricum</i>	64
5.6	Druhovo špecifická PCR – <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	64
5.6.1	Testovanie špecificity primerov	64
5.6.2	Optimalizácia druhovo špecifickej PCR pre <i>C. tyrobutyricum</i>	64
5.6.3	Optimalizácia druhej reakcie v hniezdovej PCR	65
5.6.4	Zaradenie vzoriek DNA do druhu <i>C. tyrobutyricum</i>	65
5.7	Súhrn rodového a druhového zaradenia vzoriek	65
5.8	Hydrogenázy	66
6	Záver	67
7	Zoznam použitých zdrojov	68
8	Prílohy	71

1 ÚVOD

Technologickým problémom pri výrobe syrov býva prítomnosť baktérií rodu *Clostridium* a ich spór v mlieku. Vzhľadom k tomu, že pasterizácia mlieka pred vlastnou výrobou syrov nedokáže spóry inaktivovať, dochádza v priebehu zrenia k znehodnoteniu výrobku.

Pri fermentácii produkujú baktérie mliečného kvasenia kyselinu mliečnu, ktorá znižuje pH a vytvára tak vhodné podmienky pre vyklíčenie spór. Baktérie rodu *Clostridium* produkujú veľké množstvo plynov (vodík, oxid uhličitý) a spôsobujú tak defekt nazývaný neskoré durenie syrov. Prejavuje sa tvorbou plynových dutín v syre a vysokou koncentráciou kyseliny maslovej, ktorá dodáva výrobku nepríjemnú chuť po zvetranom masle. Problém sa týka predovšetkým syrov s nízkym pH, ako je gouda alebo syry ementálového typu.

Zatiaľ čo metódam rozpoznávania patogénnych druhov klostridií sa venuje veľká pozornosť, identifikácia nepatogénnych baktérií rodu *Clostridium* pomocou molekulárne biologických metód je pomerne málo prepracovaná.

Schopnosť niektorých klostridiálnych kmeňov produkovať plyny, najmä vodík, by sa dala využiť v energetickom priemysle, keďže sa neustále zvyšuje snaha získať energiu z obnoviteľných zdrojov. Ideálne by bolo nájsť kmeň, ktorý by bolo možné kultivovať na odpadových surovinách, napr. srvátke, s vysokou produkciou vodíka. Z dôvodu čo najvyššej efektivity hydrogenáz vychádza snaha o identifikáciu génov týchto enzýmov a mechanizmov ich expresie na úrovni DNA.

1.1 Cieľ práce

Cieľom práce bola analýza súboru 44 vzoriek DNA vyizolovaných zo syrov s defektom neskorého durenia, a to v nasledujúcich bodoch:

- stanoviť koncentráciu a kvalitu vyizolovanej DNA
- overiť amplifikovateľnosť DNA v PCR s univerzálnymi primermi pre doménu *Bacteria*
- zaviesť rodovo špecifickú PCR pre zaradenie kmeňov do rodu *Clostridium*
- zaviesť, optimalizovať a využiť druhovo špecifické PCR pre identifikáciu druhov *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum*
- využiť PCR pre detekciu génov kódujúcich hydrogenázy

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Rod *Clostridium*

2.1.1 Taxonómia

Taxonomické zaradenie klostrídií je nasledovné [1]:

Doména: *Bacteria*

Kmeň: *Firmicutes*

Trieda: *Clostridia*

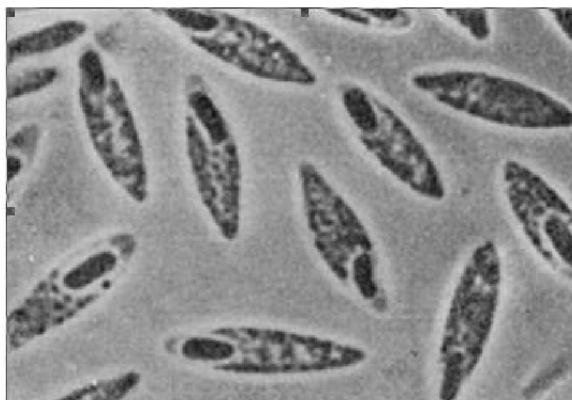
Rad: *Clostridiales*

Čeľaď: *Clostridiaceae*

Rod: *Clostridium*

2.1.2 Charakteristika

Baktérie rodu *Clostridium* tvoria grampozitívne sporujúce tyčinky (Obr. 1), ktoré sa môžu výrazne líšiť veľkosťou a tvarom. Sú to anaeróby, niektoré druhy extrémne citlivé na kyslík.



Obr. 1 *Clostridium butyricum* [2]

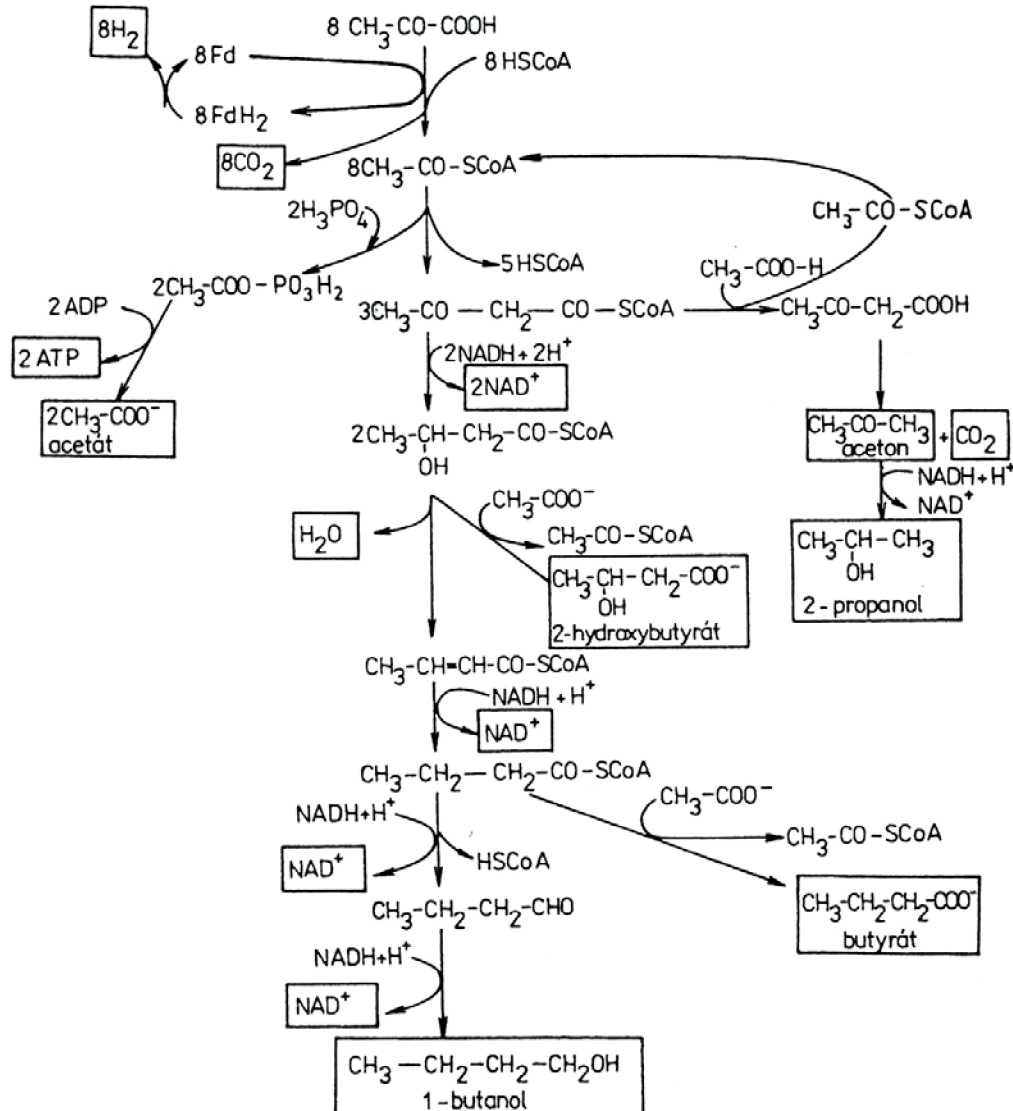
Niektoré druhy majú silné proteolytické vlastnosti (*C. sporogenes* – anaeróbny rozklad bielkovín), iné preukazujú silné sacharolytické schopnosti (štiepia oligosacharidy, škrob, celulózu), príp. ich kombináciu. Určité druhy sú schopné fixácie vzdušného dusíka. [3]

Niektoré druhy sú patogénne a nebezpečné v jedle (*C. botulinum*, *C. perfringens*), iné druhy spôsobujú kazenie potravín (*C. tyrobutyricum*, *C. saccharolyticum*, *C. laramie*). [4] Medzi baktériami rodu *Clostridium* sú však aj druhy s priemyselným využitím, či dokonca zdravotným prínosom pre človeka.

2.1.3 Metabolizmus

U baktérií rodu *Clostridium* prebieha zvláštny typ metabolizmu pyruvátu, kde sa pyruvát oxidačne dekarboxyluje za súčinnosti koenzýmu A. Túto reakciu katalyzuje oxidoreduktáza, ktorej kofaktorom je ferredoxin. Ten svojím nízkym redoxným potenciálom umožňuje tvorbu plynného vodíka. Kondenzáciou dvoch acetylkoenzýmov A a súborom ďalších reakcií vznikajú: butyrát, butanol, acetón, 2-propanol, β -hydroxymaslová kyselina a malé množstvo kyseliny octovej (viď Obr. 2). [3]

Kyselina maslová je nepríjemne a prenikavo páchnuca kvapalina, a preto sú klostrídie veľmi obávanou kontamináciou v syrárstve, kde môže navyše silnou tvorbou plynu (CO_2 a H_2) spôsobiť nežiaduce durenie syrov.



Obr. 2 Metabolizmus glukózy u rodu *Clostridium* [3]

2.1.4 Výskyt

2.1.4.1 Prírodný výskyt

Klostrídie sú súčasťou prírodnej mikroflóry gastrointestinálneho systému človeka. V ľudskom tráviacom trakte sa nachádza približne 10^{14-16} mikroorganizmov. Prevládajúcimi druhmi v tenkom čreve sú zástupcovia rodu *Lactobacillus* a *Enterococcus*, v hrubom čreve zase žijú rôzne druhy *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. [4]

Spolu s ďalšími anaeróbnymi baktériami sa klostrídie uplatňujú pri anaeróbnom čistení odpadových vôd a pri vyhnívání organického materiálu v bažinách a stojatých vodách. [3]

2.1.4.2 Patogény

Podľa databázy baktérii Bacterial Nomenclature Up-to-date vydávaného nemeckou zbierkou mikroorganizmov DSMZ existuje celkovo asi 200 rôznych druhov patriacich do rodu *Clostridium*. Z nich 37 je patogénnych, spadajú do rizikovej skupiny 2 podľa hodnotenia German Occupational Safety and Benefit Authority of the Chemical Industry. Ďalších 32 druhov je potenciálne patogénnych, u zvyšných druhov je pravdepodobnosť vyvolania choroby veľmi nízka. [5]

Patogénnymi druhmi rodu *Clostridium*, produkujúcimi nebezpečné toxíny (*C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* a ďalšie) sa táto práca nezaobrá.

2.1.4.3 Potravinársky priemysel

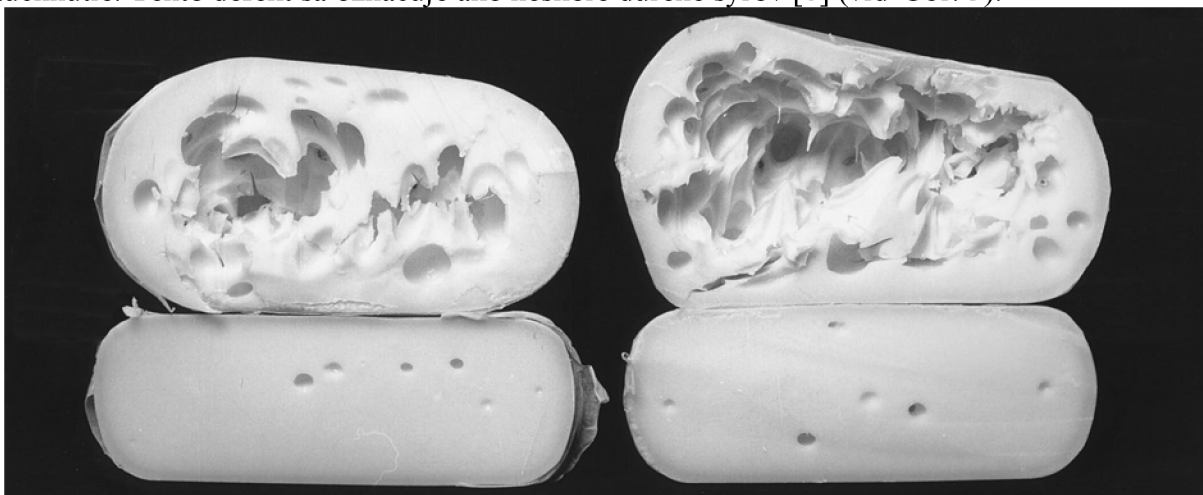
Pre potravinársky priemysel sú baktérie rodu *Clostridium* veľmi nežiaduce. Tvorba plynov anaeróbnou oxidáciou je nebezpečná predovšetkým v syrárstve, kde zapríčiňujú znehodnotenie výrobku poruchami chuti a vzhľadu.

Psychrofilné druhy rodu *Clostridium* sú schopné rásť aj pri teplotách nižších ako -1°C . Spóry dokážu klíčiť aj pri chladničkových teplotách. [4]

2.1.5 Neskoré durenie syrov

Rastom klostrídií býva spôsobené durenie syrov s nízkym pH, malým obsahom soli a relatívne vysokou aktivitou vody, akými sú napr. gouda, ementál, Provolone.

Do mlieka sa baktérie mliečneho kvasenia dostávajú s nečistotami a skrmovaním nevhodných krmív. Ich spóry prežijú pasterizáciu mlieka, počas zrenia syra vyklíčia a rastú v anaeróbnom prostredí, kde produkujú CO_2 , H_2 a kyselinu maslovú. Dochádza tým k tvorbe dutiniek rôznych veľkostí a znehodnoteniu chuti kyselinou maslovou spôsobujúcou zatuchnutie. Tento defekt sa označuje ako neskoré durenie syrov [6] (viď Obr. 3).



Obr. 3 Syry s defektom neskorého durenia spôsobeného maslovým kvasením (hore) a nepoškodené syry (dole)[7]

Ako biokonzervant na zabránenie tomuto problému sa používa nizín. [4] Antiklostridiálne účinky môžu mať aj niektoré druhy bakteriocín produkujúcich laktobacilov vyskytujúcich sa v samotných syroch, ako napr. *Lactobacillus paracasei* [8] alebo *Lactobacillus gasseri*. [9]

2.1.5.1 Klostrídie spôsobujúce neskoré durenie syrov

Defekty spôsobené rastom sporulujúcich baktérií počas zrenia polotvrdých syrov spôsobujú značné ekonomické straty syrárskeho priemyslu. Z tohto dôvodu bolo skúmané, ktoré mikroorganizmy sú za znehodnotenie syrov zodpovedné.

Pôvodne sa predpokladalo, že neskoré durenie syrov môžu spôsobovať rozličné druhy klostrídií. Na základe testov umelo vyvolávajúcich tento defekt kontamináciou mlieka spórami rôznych druhov však bolo preukázané, že jedine kmene *C. tyrobutyricum* dokážu durenie vyvolať. Syry kontaminované spórami *C. beijerinckii*, *C. butyricum* a *C. sporogenes* nejavili znaky maslového kvasenia. Je možné, že tieto druhy v syroch dokážu rásť, ale neprodukujú v nich kyselinu maslovú ani plyny. [7]

Aj pri ďalších experimentoch bola u všetkých syrov so stanoveným vysokým obsahom kyseliny maslovej potvrdená prítomnosť DNA *C. tyrobutyricum*. To naznačuje, že práve tento druh je zapojený do maslového kvasenia [10].

O niekoľko rokov neskôr však bolo zistené, že prítomnosť *C. beijerinckii* a *C. sporogenes* v syre spolu s *C. tyrobutyricum* významne zvyšuje tvorbu kyseliny maslovej oproti syrom, v ktorých sa nachádza len *C. tyrobutyricum*. Pravdepodobne je to spôsobené tým, že koncové produkty metabolizmu týchto druhov stimulujú rast a metabolickú aktivitu *C. tyrobutyricum*. [11]

Pre neskoré durenie syrov je teda podľa predpokladaných hypotéz bezpodmienečne nutná prítomnosť *C. tyrobutyricum*, miera tvorby kyseliny maslovej a plynov je však do značnej miery ovplyvnená aj prítomnosťou ďalších klostrídií.

2.1.6 Priemyselné využitie

Niektoré druhy klostrídií majú priemyselné využitie - napr. *C. butyricum* a *C. acetobutylicum* sa používajú pre kvasnú výrobu kyseliny maslovej využívanéj vo voňavkárstve. [3]

Pri zmene reakčných podmienok produkuje *C. acetobutylicum* acetón a butanol, ktoré slúžia na výrobu rozpúšťadiel. Efektivita biotechnologickej výroby butanolu je obmedzená jeho toxicitou pre baktérie, čo je hlavný problém produkcie. Výťažok sa dá zvýšiť použitím imobilizovaných mikroorganizmov. [12]

Vysokou produkciou organických rozpúšťadiel sa vyznačujú niektoré kmene blízko príbuzné druhu *C. butyricum*. Na úrovni DNA sú mimoriadne rovnorodé. Vďaka ich schopnosti rásť na rozmanitých polysacharidických substrátoch majú potenciál priamo fermentovať biomasu na rozpúšťadlá. [13]

Kvôli proteolytickým a sacharolytickým vlastnostiam sa niektoré druhy klostrídií používajú ako zdroj enzýmov na hydrolýzu sacharidov a proteínov v potravinárskom priemysle. [4]

2.1.7 Zdraviu prospešný kmeň *Clostridium butyricum*

Medzi baktériami rodu *Clostridium* bol objavený probiotický kmeň *Clostridium butyricum* MIYAIRI. Používa sa v protihnačkových farmaceutických prípravkoch v Japonsku a jeho pozitívne účinky na organizmus boli preukázané vo viacerých štúdiách. [14-16]

Bolo dokázané, že *Clostridium butyricum* MIYAIRI pôsobí efektívne pri liečení i prevencii antibiotikami vyvolanej hnačky u detí, a to vyrovnaním črevnej mikroflóry narušenej antibiotikami. [14] Podávaním tohto probiotického kmeňa spolu s liekmi zvyšuje

podiel anaeróbných baktérií a bráni poklesu bifidobaktérií v tráviacom trakte ľudí užívajúcich antibiotiká.

Ďalšími zdravotnými prínosmi môže byť potlačenie infekcie vyvolanej *Helicobacter pylori* vďaka baktericídnej účinku kyseliny maslovej.[15] Na myšiach bol potvrdený preventívny a terapeutický účinok kmeňa *C. butyricum* MIYAIRI 588 na infekciu enterohemoragickým kmeňom *Escherichia coli* O157:H7 [16]

2.2 Analýza baktérií molekulárne-genetickými metódami

2.2.1 Polymerázová reťazová reakcia

PCR prebieha v podmienkach in vitro a môžeme pomocou nej rýchlo a vysoko selektívne namnožiť konkrétnu nukleotidovú sekvenciu, nachádzajúcu sa v akejkoľvek DNA. Metóda je založená na využití termostabilnej DNA-polymerázy pre opakované kopírovanie templátovej molekuly DNA.

Syntéza DNA je riadená krátkymi oligonukleotidmi (primermi), ktoré sa párujú s templátovou DNA na začiatku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s iným vláknom pôvodnej dvojreťazcovej molekuly DNA. Keďže primery musia byť syntetizované chemicky, PCR sa môže použiť len pre klonovanie DNA, u ktorej poznáme aspoň začiatočnú a koncovú oligonukleotidovú sekvenciu.[17]

2.2.1.1 Využitie PCR

PCR nachádza uplatnenie pri syntéze fragmentov DNA na základe chromozomálnej DNA, a to napr. pri:[18]

- detekcii infekčných MO a vírusov v potravinách, vode a pôde
- kontrole výrobkov (získovanie GMO, mikrobiologická kontrola akosti)
- mapovaní genómu
- prenatalnej a preimplentačnej diagnostike
- dôkaze identity v kriminalistike, určovaní paternity
- analýze prehistorických DNA z fosílií
- značení DNA inkorporáciou značených nukleotidov – príprave DNA sond pre hybridizácie
- získavaní fragmentov DNA pre priame klonovanie úsekov DNA, klonovanie syntetických oligonukleotidov
- príprave veľkého množstva templátu, napr. pre sekvenovanie
- oligonukleotidovo riadenej mutagenéze

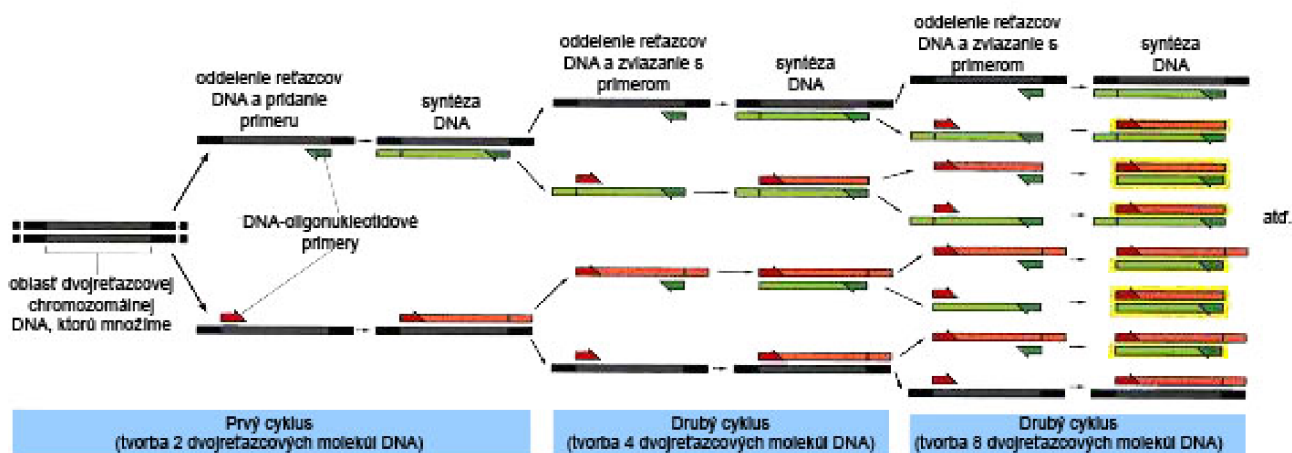
2.2.1.2 Priebeh PCR reakcie

Polymerázová reťazová reakcia sa skladá z opakujúcich sa cyklov troch po sebe nasledujúcich krokov. Prvý krok prebieha zvyčajne pri 95 °C a dochádza pri ňom k denaturácii dvojzávitnice DNA na dva samostatné reťazce. Pri druhom kroku sa teplota zníži na teplotu hybridizácie a na reťazce DNA sa naviažu primery. Tretím krokom je syntéza nových reťazcov DNA pri teplote 72 °C. Priebeh PCR reakcie je zobrazený na Obr. 4.

Pred prvý cyklus sa obvykle zaraďuje krok na denaturáciu reťazcov pri teplote 95 °C po dobu 5 min. V poslednom cykle býva syntéza reťazcov predĺžená na 10 min. Počet cyklov závisí od konkrétnej PCR, najčastejšie sa pohybuje okolo 30.

Teplota vhodná pre pripojenie primerov závisí od dĺžky oligonukleotidu a zastúpenia A-T a G-C párov (G-C sú fixované tromi vodíkovými mostíkmi, čo zvyšuje stabilitu a tým aj

denaturačnú teplotu). Túto teplotu udávajú priamo výrobcovia primerov, príp. je možné vypočítať ju.[19]



Obr. 4 Priebeh PCR reakcie[17]

2.2.1.3 Hniezdová PCR

Metóda hniezdovej PCR (označovanej tiež nested PCR) bola zavedená na zvýšenie citlivosti a špecifičnosti DNA amplifikácie.

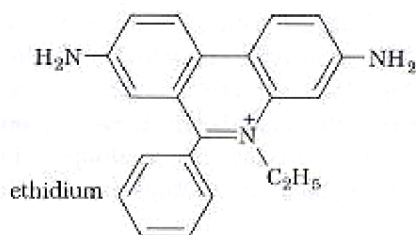
Hniezdová PCR pozostáva z dvoch po sebe nasledujúcich PCR reakcií s dvoma sadami primerov. Prvá reakcia obsahuje vonkajšie primery, zatiaľ čo primery použité v druhej reakcii majú väzbové miesto vnútri prvej amplifikovanej sekvencie. Väčší fragment amplifikovaný ako PCR produkt v prvej reakcii je použitý ako DNA templát do druhej reakcie.[20]

2.2.2 Gélková elektroforéza

Elektroforéza v agarózovom, príp. polyakrylamidovom géle sa používa na identifikáciu, separáciu a purifikáciu fragmentov DNA. Separácia molekúl je založená jednak na gélovej filtrácii, jednak na elektroforetickej pohyblivosti delených látok. Veľké molekuly sa oproti malým oneskorujú, pretože ťažšie prenikajú gélom.[21]

Fragmenty DNA sú delené v elektrickom poli v závislosti na ich veľkosti, podľa koncentrácie a rozmerov gélu sa dajú zaistiť vhodné podmienky pre delenie fragmentov rôznych molekulových hmotností v rozmedzí 0,5 až 25 kb. Rozdelené fragmenty sa môžu izolovať priamo z gélu a použiť pre ďalšiu prácu.

Na detekciu výsledkov sa používa farbenie ethidium bromidom (Obr. 5), čo je interkalačné činidlo viažuce sa medzi vlákna DNA. Po ožiarení UV svetlom o vlnovej dĺžke 260 – 360 nm komplex DNA a ethidium bromidu oranžovo fluoreskuje. [19]



Obr. 5 Ethidium [21]

2.3 Určovanie klostrídií molekulárne-genetickými metódami

Identifikácia bakteriálneho rodu *Clostridium* kultivačnými mikrobiologickými metódami je založená na tom, že tento rod tvorí endospóry, je obligátne anaeróbny a Gram pozitívny. Pre stanovenie celkového počtu sporotvorných klostrídií sa najčastejšie používa RCM médium a táto metóda nie je náročná.

Pri stanovení druhov sú však mikrobiologické metódy nepostačujúce a ani ich kombinácia s biochemickými metódami nie je vždy dostatočne presná. Tieto metódy vychádzajú z fenotypických vlastností mikroorganizmov, ktoré ale môžu byť značne odlišné medzi zbierkovými a terénnymi kmeňmi. [6]

Vzhľadom k nedostatočnej špecificite klasických mikrobiologických metód boli hľadané spôsoby identifikácie vychádzajúce z DNA, a to najčastejšie pomocou polymerázovej reťazovej reakcie. Molekulárne genetické metódy sú rýchlejšie, spoľahlivejšie a odhaľujú väčšiu diverzitu mikroorganizmov [22]. Zároveň umožňujú aj určovanie nekultivovateľných mikroorganizmov.

2.3.1 Doména *Bacteria*

Na identifikáciu bakteriálnej DNA boli navrhnuté tzv. univerzálne primery, ktoré amplifikujú oblasť génu pre 16S rRNA. Použitá je sekvencia zachovaná u väčšiny eubaktérií, PCR s týmito primermi teda umožňuje amplifikovať DNA organizmov patriacich do domény *Bacteria*.

V roku 1994 boli vytvorené univerzálne primery RW01 a DG74 [23] amplifikujúce DNA širokej škály fylogeneticky rozdielnych baktérií. Ďalšími univerzálnymi primermi sú R_eub a F_eub podľa Haarmanovej. [24]

2.3.2 Rod *Clostridium*

Navrhovanie primerov špecifických pre rod *Clostridium* vychádzalo z poznatku, že molekula 16S rRNA pozostáva z mozaiky úsekov, ktoré sú u rôznych kmeňov mikroorganizmov silne zachované, polo-zachované a vysoko variabilné. Vďaka tomu zvolením úseku s viac či menej konzervatívnou sekvenciou môžu byť vytvorené primery s rôznou úrovňou špecificity. [25]

V štúdií Rekha a kol. z roku 2006 [25] boli navrhnuté a validované rodovo špecifické primery pre mikroorganizmy črevného traktu ľudí, medzi nimi aj primery špecifické pre rod *Clostridium* označované v tejto práci ako F1 a F2.

2.3.3 Druh *C. butyricum*

Medzi *Clostridium butyricum* patria kmene s rozličnými, niekedy takmer protichodnými vlastnosťami. Boli popísané probiotické účinky niektorých kmeňov (viď 2.1.7), zatiaľ čo u niekoľkých kmeňov bola preukázaná patogenita. [26]

Pre identifikáciu bakteriálneho druhu *C. butyricum* boli v roku 2005 Nakanishim a kol. vyvinuté dve sady druhovo špecifických primerov – CBISF, CBISR a CB16F, CB23R. [26]

Druhovo špecifické primery pre 13 rôznych druhov klostrídií gastrointestinálneho traktu ľudí navrhli Kikuchi a kol. [27], medzi nimi primery CIBUT-F, CIBUT-R špecifické pre *C. butyricum*.

2.3.4 Druh *C. tyrobutyricum*

Z druhovo špecifických metód sa spomedzi klostrídií najväčšia pozornosť venuje druhu *C. tyrobutyricum*, zodpovednému za neskoré durenie syrov.

Najčastejšie používanou metódou identifikácie *C. tyrobutyricum* je hniezdová PCR popísaná Hermanom a kol. [28] s využitím primerov Ct1R a Ct1F v prvej reakcii a Ct2R a Ct2F v druhej reakcii. Týmto postupom je možné priamo detekovať spóry *C. tyrobutyricum* už v 100 ml surového mlieka.

Na špecifickú detekciu klostrídií zo syrov bola vyvinutá metóda PCR amplifikácie v kombinácii s hybridizáciou s druhovo špecifickou sondou. Na zvýšenie citlivosti boli tieto sondy použité v hniezdovej PCR. [7]

Kvantitatívna detekcia v mlieku a mliečnych výrobkoch je možná s využitím real-time PCR s primermi CTflaF, CTflaR navrhnutými podľa *fla*-génu špecifického pre *C. tyrobutyricum*[29].

2.3.5 Ďalšie metódy

Na identifikáciu a druhovú špecifikáciu baktérií rodu *Clostridium* boli okrem druhovo špecifických PCR použité aj ďalšie metódy.

Druhovú diferenciaciu umožňuje analýza pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy (DGGE) nasledujúcej po PCR s univerzálnymi primermi. Jej výhodou je to, že týmto spôsobom sa dá charakterizovať celkový bakteriálny profil v rámci jednej analýzy bez potreby zvláštneho setu primerov pre každý druh. Táto metóda je vhodná aj na priamu identifikáciu zmiešaných populácií. Na základe druhovo špecifických migračných charakteristík boli týmto spôsobom rozlíšené druhy *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii*. [22]

Na podobnom princípe je založená aj metóda teplotnej gradientovej gélovej elektroforézy (TTGE), ktorej predchádzala hniezdová PCR. Pomocou nej bol analyzovaný súbor baktérií rodu *Clostridium* zo syrov s neskorým durením [10]

Analýza polymorfizmu dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP) umožňuje rodovú, druhovú i kmeňovú diferenciaciu. Táto metóda sa používa pri taxonomickej klasifikácii, bola využitá napr. na analýzu prirodzene sa vyskytujúcich pôdnych klostrídií [30]

Vzhľadom k rozmanitým vlastnostiam rôznych kmeňov je občas nevyhnutné vedieť identifikovať nielen daný druh, ale aj jednotlivé kmene. Za týmto účelom boli vypracované viaceré postupy, predovšetkým tzv. fingerprintové metódy. Medzi ne patria okrem iného interrepetitívna PCR (rep-PCR), restrikčná analýza amplifikovanej ribozomálnej DNA (ARDRA) a polymorfizmus dĺžky restrikčných fragmentov (RFLP).

2.4 Produkcia vodíka baktériami rodu *Clostridium*

Používanie fosílnych palív je vzhľadom k ich spotrebovaniu v relatívne blízkej budúcnosti a k problémom súvisiacim s globálnym otepľovaním čoraz viac nahradzované alternatívnymi zdrojmi energie. Cieľom je nájsť čistý a obnoviteľný zdroj, akým môže byť napríklad vodík.

Biotechnologická produkcia vodíka je veľmi zaujímavou oblasťou výskumu, a to najmä kvôli možnosti získať tento plyn vo vysokých koncentráciách z obnoviteľných, či dokonca odpadových substrátov.[31]

Problémom pri mikrobiologickej produkcii vodíka v odpadových vodách je rast ďalších mikroorganizmov, ktoré spotrebovávajú buď substrát, alebo vytvorený vodík, čím znižujú

celkový výťažok výroby. Z tohto pohľadu sú nežiaduce hlavne metanogénne baktérie konvertujúce vodík na metán, ktorý má len 42 % energického obsahu vodíka.[32]

2.4.1 Identifikácia klostrídií produkujúcich vodík

Pri fermentácii glukózy dochádza u klostrídií k tvorbe butyrátu a acetátu, zároveň sa uvoľňuje významné množstvo vodíka. Produkcia vodíka bola dokázaná u druhov *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutyricum* a *C. beijerinckii*. [31], a taktiež u druhu *C. acidisoli*. [32]

Detailný rozbor komunity vodík produkujúcich klostrídií umožňuje metóda PCR-DGGE. Pre baktérie rodu *Clostridium* boli navrhnuté primery schopné rozlíšiť koexistujúce druhy a identifikovať v kaloch aj druhy, ktoré nie je možné detekovať pomocou univerzálnych primerov.[33]

Na kvantifikáciu *C. butyricum* v bioreaktoroch produkujúcich vodík bola zavedená metóda real-time PCR. Výsledky získané touto metódou poskytujú pohľad na štruktúru mikrobiálnej komunity a informácie pre kontrolu bioprosesov. Vhodným navrhnutím primerov sa dá táto analýza aplikovať na rôzne kmene a bioprosesy takmer s ľubovoľným požadovaným stupňom špecificity. [34]

Neustále sú objavované nové baktérie tvoriace vodík, často práve vďaka molekulárne-genetickým metódam založeným na analýze génov pre hydrogenázy. Schopnosť produkovať anaeróbnou fermentáciou vodík majú okrem klostrídií aj ďalšie baktérie, medzi nimi príslušníci čeľade *Flexibacteraceae* [32], určité druhy *Enterobacter* a mnohé iné.[35]

2.4.2 Hydrogenázy

Pre biologickú produkciu vodíka je nevyhnutná prítomnosť hydrogenáz v mikroorganizme. Sú známe dva typy týchto enzýmov, a to hydrogenázy NiFe obsahujúce nikel a železo, slúžiace na spotrebovanie vodíka a nachádzajúce sa zväčša vo vodík-oxidujúcich mikroorganizmoch. Druhým typom sú Fe hydrogenázy obsahujúce len železo, ktoré sa podieľajú na tvorbe vodíka.[36]

Pre výskum produkcie vodíka klostrídiami boli zavedené metódy PCR detekcie génu pre hydrogenázu A (*hydA*). Štúdium expresie tohto génu preukázalo, že intenzita produkcie vodíka u *C. butyricum* je priamo úmerná úrovni expresie *hydA*. [37] Pri reálnych vzorkách z kalov sa na zlepšenie intenzity amplikonu k PCR zmesi pridáva hovädzí albumín (BSA) v optimalizovanej koncentrácii.[38]

Na detekciu *hydA* génu a úrovne jeho transkripcie bola vyvinutá metóda kvantitatívnej PCR v reálnom čase. Expresia génu sa počas kontinuálnej kultivácie v bioreaktore mení, z čoho vyplýva, že jej sledovanie môže byť užitočným nástrojom monitorovania výkonnosti produkcie vodíka.[39]

Zvýšenie výťažku klostridiálnych hydrogenáz môže byť dosiahnuté rekombinantnými technikami, ako bolo dokázané u *C. acetobutylicum* s vysoko aktívnou hydrogenázou zo zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii*. [40]

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Bakteriálne kultúry

V práci boli použité vzorky DNA vyizolované fenolovou extrakciou z baktérií izolovaných z pokazených syrov a mlieka (vzorky č. 1 až 37). Ďalšie vzorky pochádzali zo zbierok, a to konkrétne vzorka 38 z nemeckej Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, vzorka 39 z dánskej The Royal Veterinary and Agricultural University, vzorky 40 a 41 zo Švédska zo Swedish Dairy Association, vzorky 42 a 43 z Prahy z Ústavu technológie mlieka a tuků, VŠCHT a vzorka 44 z Českej zbierky mikroorganizmov. K dispozícii sme mali vďaka pomoci doc. Rosenberga tiež zbierkový kmeň *C. tyrobutyricum* DSM 2637.

3.2 Chemikálie a roztoky

Pre prípravu médií a roztokov boli použité nasledujúce chemikálie:

- Agaróza pre elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Brno, ČR)
- Ethanol (Lachema, Brno, ČR)
- Ethidiumbromid (5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lyzozým (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PCR agaróza (Top-Bio, Praha, ČR)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- RCM médium (Reinforced Clostridial Medium)
- RNáza A (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- SDS (Sigma, St. Lois, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) (Amresco, Solon, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl) (Amresco, Solon, USA)

3.2.1 Roztoky pre izoláciu a purifikáciu DNA

Jednotlivé postupy boli prevzaté z návodov k laboratórnym cvičeniam Speciální metody analýzy mikroorganizmů I. (Španová a Rittich, 2006, nepublikované).

- Lyzačný roztok A: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0)
- Lyzačný roztok B: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lyzozým (3mg/ml)
- CIZ: zmes chloroformu a izoamylalkoholu v pomere 24:1.
- TE pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA (pH 8,0)

3.2.2 Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu

Prevzaté z návodov Speciální metody analýzy mikroorganizmů I. (Španová a Rittich, 2006, nepublikované), ak nie je uvedené inak.

- 5 x TBE pufr: 54 g Tris bázy, 27,5 g kyseliny boritej a 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) doplnené do 1000 ml destilovanou vodou, výsledné pH upravené pomocou 1 M NaOH na 8,3. Takto pripravený zásobný roztok sa pred použitím riedi 10krát destilovanou vodou na výslednú koncentráciu 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá a 1 mM EDTA.
- nanášací pufr (6× koncentrovaný)
- PCR vkladací pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA štandard Malamité 100 bp ladder (Moravské Prusy, ČR)
- 0,5 µg/ml ethidiumbromid: 100 µl roztoku EtBr (500µg/ml) sa zriedi 500 ml sterilnej destilovanej vody.

3.2.3 PCR komponenty

- PCR voda – voda pre injekcie ČSL 4 (Biotika, Slovenská Ľupča, SR)
- PCR pufr kompletný – reakčný pufr 10× PCR Blue Buffer (obsahujúci MgCl₂) pre Taq DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR pufr bez MgCl₂ – reakčný pufr 10× PCR Blue Buffer without MgCl₂ pre Taq DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, ČR)
- MgCl₂ (25mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP zmes (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- primery (10 pmol/µl) – vid'. Tab. 1 (Oligo-Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/µl) (Top-Bio, Praha, ČR)

Tab. 1 Zoznam použitých primerov

Špecifickosť primerov	Označenie primerov	Teplota hybridizácie (°C)	Veľkosť PCR produktu (bp)	Referencia
Univerzálne	R _{eub} , F _{eub}	55	470	Haarman, 2005 [24]
Univerzálne	DG74, RW01	58	370	Greisen, 1994 [23]
Rod <i>Clostridium</i>	F1, F2	53	619	Rekha, 2006 [25]
<i>C. butyricum</i>	CBISR, CBISF	55	262	Nakanishi, 2005 [26]
<i>C. tyrobutyricum</i>	Ct1R, Ct1F	60	233	Herman, 1995 [28]
hydrogenáza <i>hydA</i>	HGr, HGf	58	259	Wang, 2008 [37]

3.3 Prístroje a pomôcky

- Anaerostat OXOID (Oxoid, Hampshire, Veľká Británia)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Digitálny fotoaparát Dimage Z5 (Konica Minolta, USA)
- Exikátor typ N 86 KN.18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN)
- Fotoaparát Polaroid CD34 na film T667 (Ultra Lum, Polaroid, Cambridge, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Poľsko)
- Mikrovlnná rúra SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Laboratórne váhy B0430 (Ohaus, USA)
- Minicykler PTC-100TM (MJ Research, Watertown, USA)

- NanoPhotometerTM (Implen, Nemecko)
- Očkovací box (Fatran, ČR)
- Sáčky na anaeróbnú kultiváciu AnaeroGenTM (Oxoid, Hampshire, Veľká Británia)
- Termocykler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Termostat – Mini incubator (Labnet, USA)
- Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Miláno, Itálie)
- Transilluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm (Hofer, USA)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- Bežné laboratórne sklo, umelohmotný materiál a bežné laboratórne pomôcky

3.4 Metódy

3.4.1 Kultivácia

Baktérie rodu *Clostridium* boli kultivované v tekutom médiu alebo na Petriho miskách s pevným médiom RCM 0149. Kultivácia prebiehala za anaeróbných podmienok v anaerostate pri 34 °C po dobu 2 až 4 dní. Anaeróbná atmosféra bola navodená pomocou sáčkov AnaeroGen, ktoré po vložení do utesneného anaerostatu absorbujú vzdušný kyslík a zároveň produkujú oxid uhličitý.

3.4.2 Lýza buniek a izolácia DNA fenolovou extrakciou

Bunky boli zlyzované tak, že 1 ml bakteriálnej kultúry sa stočil pri 15 000 ot./3 min. Sediment bakteriálnych buniek bol resuspendovaný v 1 ml lyzačného roztoku A a suspenzia bola centrifugovaná pri 15 000 ot./3 min. K sedimentu sa pridalo 500 µl roztoku B a vzorky sa inkubovali pri laboratórnej teplote 1 hod. Následne sa k suspenzii pridalo 25 µl 10% SDS a 5 µl proteínázy K a inkubovalo sa pri 55 °C do druhého dňa. Z hrubého lyzátu bolo 20 µl uschovaných pre gélovú elektroforézu. K lyzátu sa pridalo 10 µl RNázy A a inkubovalo sa 30 minút pri 37 °C.

Fenolová extrakcia DNA začala tým, že k lyzátu buniek sa pridal rovnaký objem fenolu a vzorky sa premiešavali po dobu 4 min. Po centrifugácii pri 15 000 ot./3 min bola odobraná vodná fáza s DNA do čistej eppendorfky, kde sa k nej pridalo 700 µl CIZ. Po 4 minútovom miešaní boli vzorky centrifugované (15 000 ot./3 min) a vodná fáza s DNA opäť odobraná do čistej eppendorfky.

Pri prezrážaní DNA etanolom sa k DNA pridala 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 1 ml 96 % etanolu. DNA bola vyzrážaná pri -20 °C po dobu 15 min a následne 15 min centrifugovaná pri 15 000 ot. Supernatant sa zliat a DNA bola usušená v exikátore. Na záver bola DNA rozpustená vo vhodnom objeme TE pufru.

3.4.3 Meranie koncentrácie DNA vzoriek

Koncentrácia vzoriek bola meraná spektrofotometricky pomocou prístroja NanoPhotometerTM. Ako referenčná vzorka bol používaný TE pufr. Absorbanca sa merala v rozmedzí vlnových dĺžok 220 – 320 nm, pričom koncentrácia DNA bola stanovená z hodnoty absorbancie A_{260} pri 260 nm, a to na základe poznatku, že DNA o koncentrácii 50 ng/µl má pri tejto vlnovej dĺžke absorbanciu rovnú 1.

Z pomeru hodnôt A_{260}/A_{280} sa stanovila čistota DNA. Pomer absorpcií čistej DNA sa pohybuje v rozmedzí 1,8 – 2,0, ak vzorka obsahuje proteíny, je pomer menší ako 1,8, v prípade obsahu RNA je pomer väčší než 2,0.

3.4.4 Polymerázové reťazové reakcie

Všetky komponenty PCR reakcie boli pred použitím vždy skontrolované a krátko zcentrifugované. PCR zmes sa miešala v boxe vopred vysterilizovanom UV žiarením.

3.4.4.1 Zloženie PCR zmesi

Používané PCR zmesi sú uvedené v Tab. 2. V prípade optimalizácie danej PCR uvádza táto tabuľka výsledné zloženie PCR zmesi určené ako optimálne, s výnimkou zmesi *C. tyr1*, ktorá popisuje PCR zmes pre hniezdovú PCR *C. tyrobutyricum* pred optimalizáciou.

Tab. 2 Používané PCR zmesi

Zložka	Uni.H	Uni.G	rod Clost.	<i>C. but.</i>	<i>C. tyr.1</i>	<i>C. tyr.</i>	HydA
PCR voda	18,0 µl	14,5 µl	16,5 µl	19,0 µl	16,5 µl	18,0 µl	17,5 µl
PCR pufr kompletný	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl	1,0 µl	1,0 µl	0,5 µl	1,0 µl	0,5 µl	1,0 µl
5' primer (10 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	0,5 µl	1,0 µl	0,5 µl	1,0 µl
3' primer (10 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	0,5 µl	1,0 µl	0,5 µl	1,0 µl
DNA polymeráza (1U/µl)	1,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	1,0 µl	2,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
MgCl ₂	0 µl	2,0 µl	0 µl	0 µl	0 µl	1,0 µl	0 µl
DNA matrica (10 ng/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl

3.4.4.2 Programy amplifikácie

Programy amplifikácie používané v tejto práci sú zhrnuté v Tab. 3 (A,B), kde jednotlivé riadky znamenajú kroky:

1. Denaturácia DNA pred prvým cyklom
2. Denaturácia DNA
3. Hybridizácia primerov
4. Syntéza DNA reťazcov
5. Počet cyklov (opakovanie krokov 2 až 4)
6. Dosyntetizovanie reťazca v poslednom kroku

Tab. 3 Zoznam použitých amplifikačných programov

A	UNI.H	UNI.G	CLOST	C.BUT1	C.BUT2	C.BUT3
1	95 °C 5 min	95 °C 5 min	94 °C 5 min	95 °C 5 min	95 °C 5 min	95 °C 5 min
2	95 °C 30 s	95 °C 1 min	94 °C 30 s	95 °C 30 s	95 °C 30 s	95 °C 30 s
3	55 °C 30 s	58 °C 1 min	53 °C 30 s	55 °C 30 s	55 °C 30 s	60 °C 30 s
4	72 °C 30 s	72 °C 2 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 30 s	72 °C 30 s
5	30	40	30	30	30	30
6	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 8 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min

Pokračovanie Tab. 3 Zoznam použitých amplifikačných programov

B	C.BUT-GRAD	C.TYR1	C.TYR2	C.TYR-GRAD	GTG	HYD.A
1	95 °C 5 min	95 °C 5 min	95 °C 5 min	95 °C 5 min	94 °C 4 min	95 °C 7 min
2	95 °C 30 s	95 °C 1 min	95 °C 30 s	95 °C 30 s	94 °C 1 min	95 °C 30 s
3	50 - 60 °C 30 s	60 °C 1 min	60 °C 30 s	55 - 65 °C 30 s	50 °C 1 min	58 °C 30 s
4	72 °C 30 s	72 °C 1 min	72 °C 30 s	72 °C 30 s	72 °C 1 min	72 °C 30 s
5	30	30	30	20	35	40
6	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min

3.4.5 Gélová elektroforéza DNA na agaróze

V princípe sa jedná o tri na seba nadväzujúce kroky:

- Príprava agarózového gélu vhodnej hustoty (tak, aby bolo zabezpečené optimálne rozdelenie očakávaných fragmentov DNA)
- Nanesenie vzoriek DNA spolu s vkladacím pufrom do komôrok na géle a preliatie gélu TBE pufrom, delenie za napätia 60 V
- Farbenie ethidium bromidom s následnou vizuálnou detekciou fluorescencie pomocou UV transluminátora a fotografická dokumentácia

Pri gélovej elektroforéze vzoriek vysokomolekulárnej DNA bol použitý 0,8% agarózový gél. Pre elektroforézu PCR produktov sa zväčša pripravoval gél o hustote 1,8 %, v ostatných prípadoch je hustota daného gélu uvedená.

Ak nie je uvedené inak, na gél bolo nanesených 25 µl DNA, resp. PCR produktu spolu s 5 µl nanášacieho pufru Yellow load. Pri hniezdovej PCR reakcii druhovo špecifickej pre *C. tyrobutyricum* sa po prvom kroku nanášalo na gél len 20 µl PCR produktu a 4 µl nanášacieho pufru, keďže tento PCR produkt slúžil zároveň ako DNA templát v druhej PCR reakcii.

Ako DNA štandard sa používal štandard Malamité (100bp ladder) s DNA fragmentmi dĺžky 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp. Štandardu sa na gél dávalo 5 µl.

Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy boli dokumentované odfotoграфovaním gélu pomocou fotoaparátu Polaroid CD34 na film T667 alebo digitálnym fotoaparátom Konica Minolta Dimage Z5.

4 VÝSLEDKY

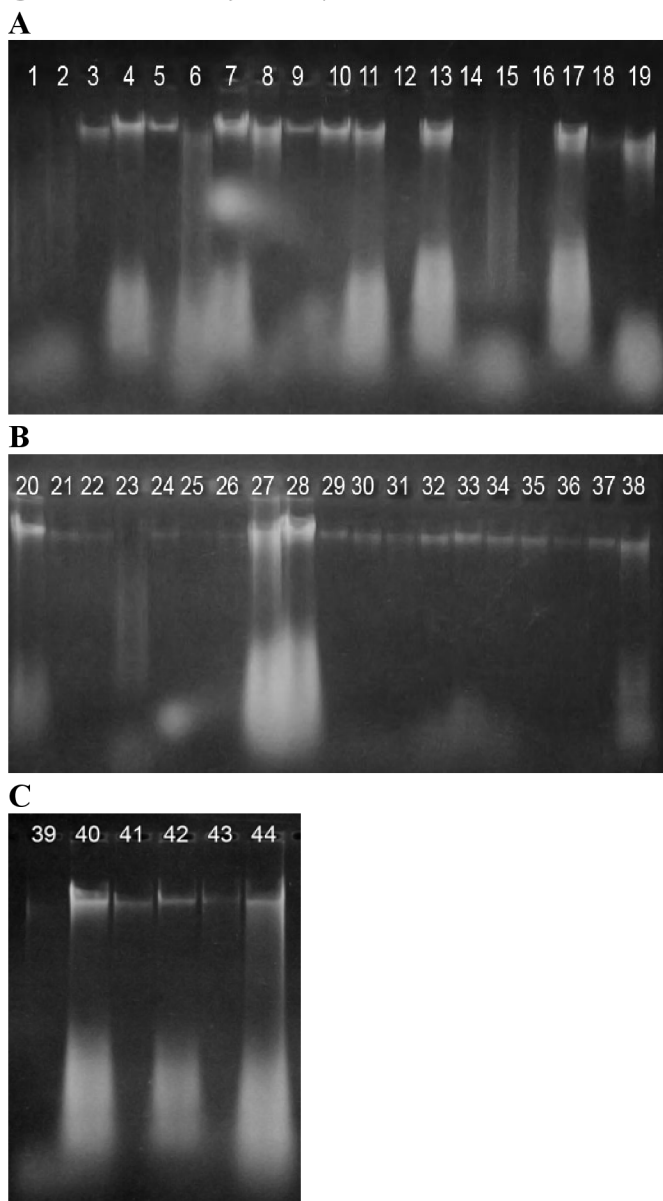
4.1 Izolácia DNA

Zo súboru baktérií rodu *Clostridium* vyizolovaných z pokazených syrov a mlieka bola metódou fenolovej extrakcie s následným prežrážaním etanolom vyizolovaná DNA.

4.1.1 Gélová elektroforéza DNA

Kvalita a intaktnosť DNA bola overená pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. Výsledky sú uvedené na Obr. 6 (A, B, C) a v Tab. 4 (viď 4.1.2).

Obr. 6 Gélová elektroforéza (0,8% gél) vyizolovanej DNA 44 kmeňov rodu Clostridium. Na gél bolo nanesených 10 μ l DNA. Číslo behu označuje číslo vzorky (viď Tab. 4 v 4.1.2).



Zo všetkých kmeňov bola vyizolovaná DNA, vo väčšine vzoriek intaktná. V siedmich vzorkách bola DNA degradovaná alebo izolovaná v malom množstve.

4.1.2 Meranie koncentrácie DNA vzoriek

Koncentrácia DNA vzoriek bola zmeraná spektrofotometricky pomocou prístroja NanoPhotometer, výsledky sú uvedené v Tab. 4.

Tab. 4 Vzorky DNA, ich detekcia po gélovej elektroforéze pred nariedením, pôvodná koncentrácia a hodnota pomeru A_{260}/A_{280}

Č. vzorky	Označenie druhu/kmeňa <i>Clostridium</i>	Detekcia DNA na géle	Poznámka	c [ng/μl]	A_{260}/A_{280}
1	9833 P	+/-	degradácia	345,7	2,051
2	9867 P	+/-	degradácia	186,0	2,039
3	9823 P	+	dobrá kvalita	78,0	1,675
4	9874 II	++	veľa RNA	247,7	2,077
5	9865	+	dobrá kvalita	68,7	1,919
6	9843	+	degradácia	606,3	2,108
7	9837	++	veľa RNA	308,0	2,058
8	9860 (O3B3)	++	čiasť. degradácia	133,7	2,028
9	9875 (O3B2)	+	dobrá kvalita	90,5	1,997
10	9829	+	RNA	121,3	1,963
11	31 P	++	veľa RNA	399,0	2,126
12	S18/1	-	nedetekované NK	111,3	1,970
13	S18/2	++	veľa RNA	511,0	2,110
14	S23	+/-	slabá detekcia	248,3	2,138
15	S21	+/-	degradácia	665,0	2,200
16	S29	-	nedetekované NK	168,3	2,058
17	S27	++	veľa RNA	575,0	2,125
18	S5	+	dobrá kvalita	156,0	1,974
19	E16A	++	veľa RNA	566,0	2,134
20	R26A	++	RNA	124,0	1,958
21	L2	+	dobrá kvalita	41,7	1,773
22	L3	+	dobrá kvalita	77,3	1,850
23	sp.	+/-	degradácia	272,3	2,044
24	580	+	RNA	55,7	1,909
25	581	+/-	dobrá kvalita	16,8	1,748
26	MM - D	+	dobrá kvalita	44,2	1,963
27	89K25B	+++	veľa RNA	591,3	2,081
28	1030	+++	veľa RNA	494,7	2,083
29	12-15-1A	+	dobrá kvalita	71,0	1,780
30	31-44-Rk-2A	+	dobrá kvalita	65,2	1,966
31	31-75-4A	+	dobrá kvalita	87,8	1,876
32	V51-RCM-3B	+	RNA	77,5	1,970
33	V51-RCM-3C	+	RNA	85,0	1,947
34	V62-45-3A	+	RNA	74,7	1,919
35	V62-45-3B	+	dobrá kvalita	36,7	1,788
36	V67-R3A	+	dobrá kvalita	62,3	1,748

Pokračovanie Tab. 4 Vzorky DNA, ich detekcia po gélovej elektroforéze pred nariedením, pôvodná koncentrácia a hodnota pomeru A_{260}/A_{280}

Č. vzorky	Označenie druhu/kmeňa <i>Clostridium</i>	Detekcia DNA na géle	Poznámka	c [ng/μl]	A_{260}/A_{280}
37	V69-120-R2A	+	dobrá kvalita	93,5	1,833
38	<i>butyricum</i> DSM 10702	+	degradácia	117,7	1,981
39	<i>beijerinckii</i> KVL M3	+/-	slabá detekcia	199,3	1,945
40	<i>tyrobutyricum</i> SMR 184	+++	veľa RNA	545,3	2,085
41	<i>tyrobutyricum</i> SMR 220	+	dobrá kvalita	63,5	1,885
42	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	++	veľa RNA	295,3	2,084
43	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	+	dobrá kvalita	94,7	2,022
44	<i>sporogenes</i> CCM 4423	++	veľa RNA	729,7	2,057

+/-, +, ++, +++.....rôzna intenzita DNA detekcie

-.....DNA nedetekovaná

DNA bola vyizolovaná v rôznych koncentráciách v rozmedzí od 17 do 730 ng/μl. Pomer absorbancií pri 260 a 280 nm pohybujúci sa v rozmedzí od 1,675 do 2,2 naznačuje, že niektoré vzorky obsahovali zvyšky proteínov (hodnota pod 1,8) a niektoré zase veľké množstvo RNA (pomer nad 2,0).

4.1.3 Riedenie vzoriek

DNA bola nariedená TE puffrom na 10 ng/μl. Gélová elektroforéza nariedených vzoriek je znázornená na Obr. 7 (A, B, C). Postup riedenia a detekcia po gélovej elektroforéze sú uvedené v Tab. 5.

Obr. 7 Gélová elektroforéza (0,8% géľ) vzoriek DNA nariedených na 10 ng/μl. Na géľ bolo nanášaných 15 μl DNA. Číslo behu označuje číslo vzorky.

A



B



C

39 40 41 42 43 44



Tab. 5 Riedenie vzoriek a detekcia DNA nariedených vzoriek po gélovej elektroforéze

Vzorka DNA č.	Pôv. c [ng/μl]	Riedenie na 10 ng/μl do objemu 100 μl		Detekcia DNA nariedených vzoriek
		ml vzorky	ml TE puftru	
1	345,7	2,9	97,1	-
2	186,0	5,4	94,6	-
3	78,0	12,8	87,2	++
4	247,7	4,0	96,0	++
5	68,7	14,6	85,4	++
6	606,3	1,6	98,4	-
7	308,0	3,2	96,8	++
8	133,7	7,5	92,5	+++
9	90,5	11,0	89,0	+
10	121,3	8,2	91,8	++
11	399,0	2,5	97,5	+
12	111,3	9,0	91,0	-
13	511,0	2,0	98,0	+
14	248,3	4,0	96,0	-
15	665,0	1,5	98,5	-
16	168,3	5,9	94,1	-
17	575,0	1,7	98,3	+
18	156,0	6,4	93,6	+/-
19	566,0	1,8	98,2	+/-
20	124,0	8,1	91,9	+++
21	41,7	24,0	76,0	+
22	77,3	12,9	87,1	+
23	272,3	3,7	96,3	+/-
24	55,7	18,0	82,0	+
25	16,8	59,4	40,6	+
26	44,2	22,6	77,4	+
27	591,3	1,7	98,3	+
28	494,7	2,0	98,0	++
29	71,0	14,1	85,9	+
30	65,2	15,3	84,7	+
31	87,8	11,4	88,6	+/-
32	77,5	12,9	87,1	+
33	85,0	11,8	88,2	+
34	74,7	13,4	86,6	+
35	36,7	27,3	72,7	+

Pokračovanie Tab. 5 Riedenie vzoriek a detekcia DNA nariedených vzoriek po gélovej elektroforéze

Vzorka DNA č.	Pôv. c [ng/μl]	Riedenie na 10 ng/μl do objemu 100 μl		Detekcia DNA nariedených vzoriek
		ml vzorky	ml TE pufru	
36	62,3	16,0	84,0	+
37	93,5	10,7	89,3	+
38	117,7	8,5	91,5	+
39	199,3	5,0	95,0	-
40	545,3	1,8	98,2	+
41	63,5	15,7	84,3	+
42	295,3	3,4	96,6	+
43	94,7	10,6	89,4	+/-
44	729,7	1,4	98,6	+

+/-, +, ++, +++.....rôzna intenzita DNA detekcie

-.....DNA nedetekovaná

U vzoriek, ktorých DNA bola degradovaná, nebola po nariedení DNA detekovaná. Všetky vzorky boli nariedené na 10 ng/μl, a teda pripravené na použitie do PCR.

4.2 Kultivácia zbierkového kmeňa *Clostridium tyrobutyricum*

Ako pozitívna kontrola pre druh *C. tyrobutyricum* bol použitý zbierkový kmeň *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637.

Bolo pripravené médium pre kultiváciu klostrídií RCM 0149 (Reinforced Clostridial Medium). Do skúmavky s médiom bola sterilne naočkovaná bakteriálna kultúra. Kultivovalo sa anaeróbne pri 34 °C po dobu 4 dní, pri preočkovaní už len 48 hodín. Tvorba plynu bola preukázaná vytlačením uzáveru skúmavky počas kultivácie.

Čistota kultúry bola overená krížovým rozterom (Obr. 8). Na Petriho miske boli pozorované okrúhle biele až svetložlté kolónie približne rovnakej veľkosti.



Obr. 8 Krížový rozter kultúry *C. tyrobutyricum* DSM 2637

Bola potvrdená mikrobiálna čistota kultúry *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637.

4.2.1 Uchovávanie buniek

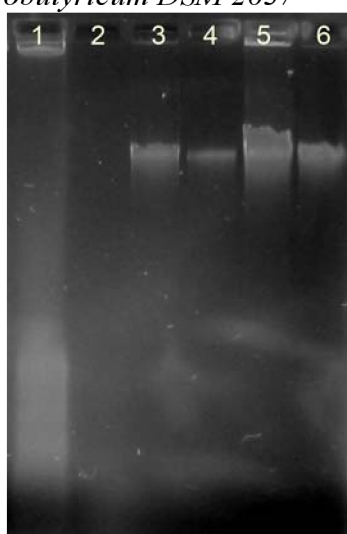
Pre dlhodobé uchovanie boli bunky zakonzervované zmrazením v 50% glycerole nariadenom bunecnou kultúrou v pomere 1:2 na výslednú koncentráciu 17 %.

Kultúra bola zmrazená pri -70 °C a môže tak byť dlhodobo uchovaná.

4.2.2 Lýza buniek a izolácia DNA *C. tyrobutyricum* DSM 2637

Z kultúry buniek v skúmavke bola lyzovaná a fenolovou extrakciou s následným prežraňaním etanolom vyizolovaná DNA. Výsledky gélovej elektroforézy sú na Obr. 9.

Obr. 9 Agarózová gélová elektroforéza hrubého lyzátu a 4 vzoriek purifikovanej DNA *C. tyrobutyricum* DSM 2637



Beh	Vzorka/ DNA	Detekcia DNA
1	hrubý lyzát	+++
2	—	—
3	<i>C. tyrobut.</i> DSM 2637 /1	+++
4	<i>C. tyrobut.</i> DSM 2637 /2	+++
5	<i>C. tyrobut.</i> DSM 2637 /3	+++
6	<i>C. tyrobut.</i> DSM 2637 /4	+++

+++.....DNA detekovaná

Bunky boli zlyzované a z lyzátu bola purifikovaná relatívne intaktná DNA.

4.2.3 Meranie koncentrácie a riedenie DNA zbierkového kmeňa

Koncentrácia vyizolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky na 218,7 ng/μl u prvej vzorky, 174,7 ng/μl u druhej, 261,7 ng/μl u tretej a 295 ng/μl u štvrtej vzorky. DNA bola nariadená TE pufrom na koncentráciu 10 ng/μl.

Nariadená DNA môže byť použitá ako matrica do PCR.

4.3 PCR s univerzálnymi primermi – overenie amplifikovateľnosti DNA

Kvalita vyizolovanej DNA a nariadenej DNA vzoriek bola overená gélovou elektroforézou, podľa ktorej sú niektoré vzorky čiastočne degradované. Z tohto dôvodu bolo potrebné overiť, či je DNA všetkých vzoriek amplifikovateľná v polymerázovej reťazovej reakcii. Na tento účel boli používané 2 rôzne sady primerov:

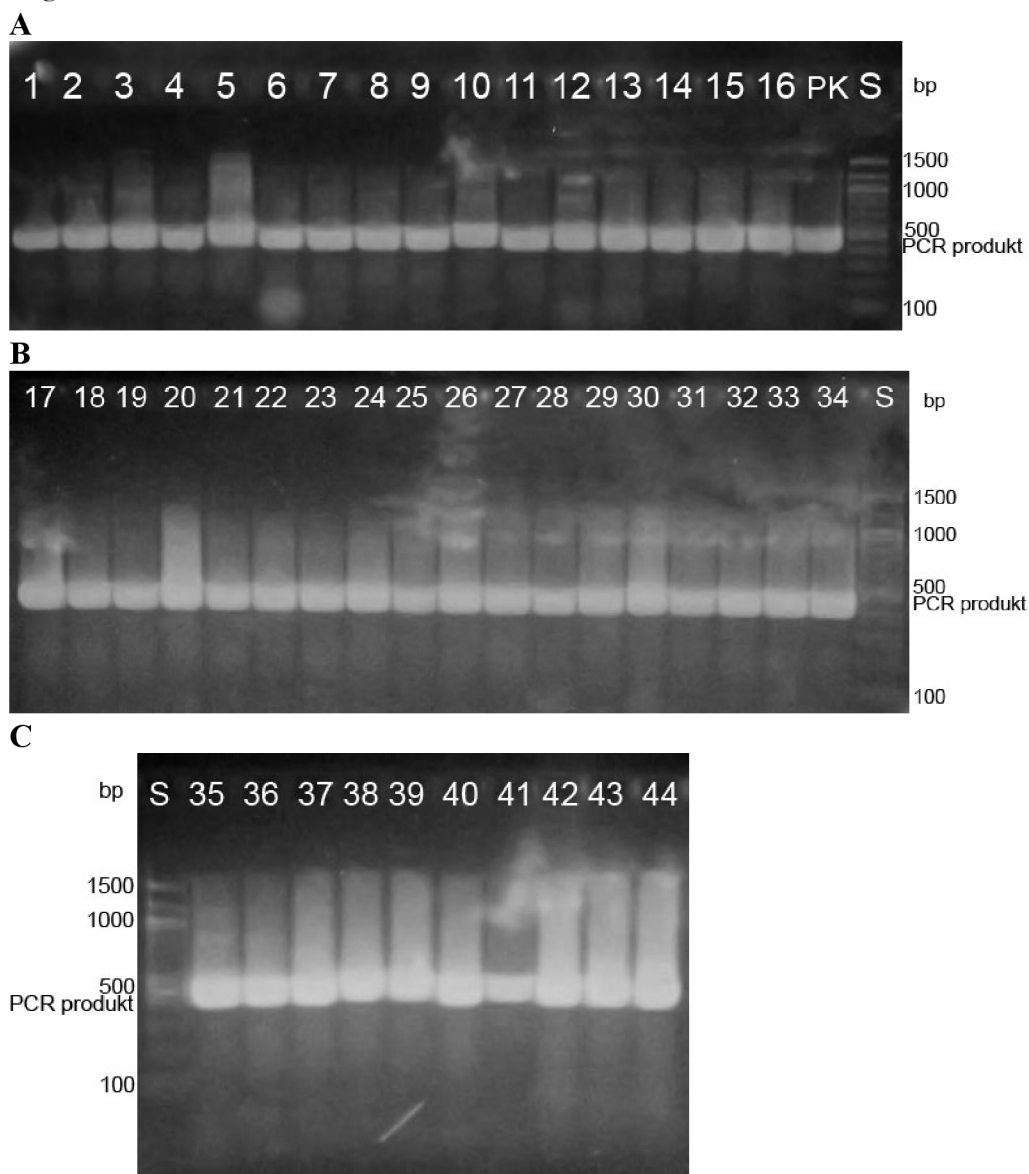
- podľa Haarmanovej (2005): F_eub, R_eub, T_m = 59 °C, veľkosť PCR produktu: 470 bp [24]
- podľa Greisena (1994): RW01, DG74, veľkosť PCR produktu: 370 bp [23]

Najskôr bola porovnaná amplifikácia pomocou oboch dvojíc primerov, a to pre vzorky č. 35 – 44 (viď. Tab. 4 v 4.1.2). Pri použití primerov podľa Greisena dochádzalo k amplifikácii i nešpecifických PCR produktov, zatiaľ čo pri primeroch podľa Haarmanovej boli detekované špecifické PCR produkty. Amplifikovateľnosť DNA bola overovaná u všetkých vzoriek pomocou oboch sád primerov.

4.3.1 Amplifikovateľnosť DNA s primermi podľa Haarmanovej

Amplifikovateľnosť DNA všetkých vzoriek bola overená s primermi R_eub, F_eub podľa Haarmanovej z roku[24]. PCR zmes bola namiešaná podľa Tab. 2 (Uni.H) a program prebehol tak, ako je uvedené v Tab. 3 (UNI.H). PCR produkty boli detekované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy (viď Obr. 10 A, B, C).

Obr. 10 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (470 bp) s univerzálnymi primermi podľa Haarmanovej. V PCR zmesi bolo 10 ng DNA matrice. Číslo vzorky sa zhoduje s číslom behu (viď Tab. 4), S je štandard a PK je pozitívna kontrola s DNA *C. sporogenes* CCM 4423.

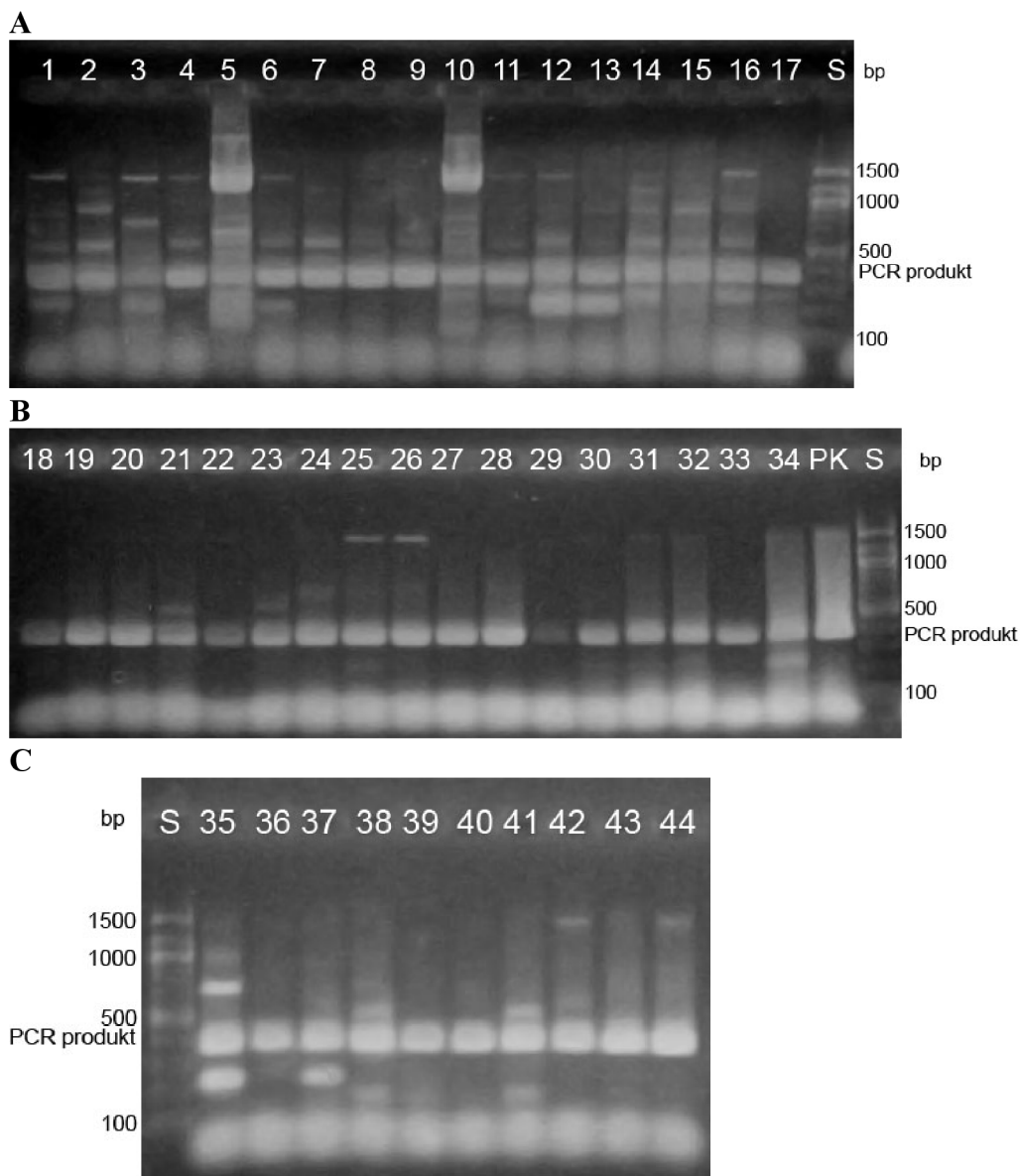


U všetkých vzoriek bol detekovaný intenzívny PCR produkt o veľkosti približne 470 bp

4.3.2 Amplifikovateľnosť DNA vzoriek s primermi podľa Greisena

Amplifikovateľnosť všetkých vzoriek bola overená aj s univerzálnymi primermi RW01, DG74 podľa Greisena z roku 1994[23]. Namiešaná PCR zmes je popísaná v Tab. 2 (Uni.G), použitý bol program UNI.G uvedený v Tab. 3. PCR produkty boli detekované po gélovej agarózovej elektroforéze (Obr. 11 A, B, C).

Obr. 11 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (370 bp) s univerzálnymi primermi podľa Greisena. V PCR zmesi bolo 10 ng DNA matrice. Číslo vzorky sa zhoduje s číslom behu (viď Tab. 4), S je štandard a PK pozitívna kontrola s DNA *C. sporogenes* CCM 4423.



Okrem špecifického PCR produktu odpovedajúcemu 370 bp u všetkých vzoriek boli vo väčšine prípadov detekované aj nešpecifické amplikony.

4.3.3 Zhrnutie a porovnanie amplifikácie s univerzálnymi primermi

Ako potvrdili testy s oboma sadami primerov, DNA všetkých kmeňov je amplifikovateľná. PCR produkty boli detekované po amplifikácii DNA u všetkých vzoriek, čo potvrdzuje ich zaradenie do domény *Bacteria*.

Vzhľadom k amplifikácii špecifických PCR produktov boli lepšie výsledky dosiahnuté použitím primerov podľa Haarmanovej, ktoré nevytvárali nešpecifické amplikony. Ich výhodou je tiež takmer polovičná dĺžka programu oproti metóde podľa Greisena, čo znamená výraznú úsporu času.

Výsledky detekcie PCR produktov po agarózovej gélovej elektroforéze s oboma sadami primerov sú uvedené na Obr. 10 a Obr. 11 a v Tab. 12 (viď 4.7).

4.4 Rodovo špecifická PCR pre rod *Clostridium*

Na zaradenie vzoriek do rodu *Clostridium* boli použité rodovo špecifické primery F1, F2 podľa Rekha (2006)[25] s PCR produktom veľkosti 619 bp. Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu CLOST (viď Tab. 3).

4.4.1 Testovanie prídavku $MgCl_2$ na kvalitu PCR produktu

Vzhľadom k zavádzaniu metódy bol najskôr testovaný vplyv prídavku horečnatých kationov do PCR zmesi, a to so vzorkami DNA č. 38 (*C. butyricum* DSM 10702) a č. 44 (*C. sporogenes* CCM 4423).

Boli použité tri spôsoby prípravy PCR zmesi s rôznym prídavkom $MgCl_2$ (zmes A, B, C), ako je uvedené v Tab. 6, amplifikačný program CLOST je popísaný v Tab. 3. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú znázornené na Obr. 12.

Tab. 6 Zloženie PCR zmesi pre rodovo špecifickú PCR rodu *Clostridium*

Zložka	Zmes A	Zmes B	Zmes C
PCR voda	16,5 μ l	16,0 μ l	15,5 μ l
PCR pufr kompletný	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l
dNTP (10 mM)	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l
5' primer (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l
3' primer (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l
DNA polymeráza (1U/ μ l)	2,0 μ l	2,0 μ l	2,0 μ l
$MgCl_2$	0 μ l	0,5 μ l	1,0 μ l
DNA matrica (10 ng/ μ l)	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l

Obr. 12 Agarózová gélová elektroforéza (1,3% gél) PCR produktov špecifických pre rod *Clostridium* (619 bp). V PCR zmesi bolo použité rôzne množstvo Mg^{2+} iónov.



Beh	DNA matrica v PCR zmesi/PCR zmes	Množstvo Mg ²⁺ (mM)	Detekcia PCR produktu
1	<i>C. butyricum</i> DSM 10702/A	1,5	++
2	<i>C. butyricum</i> DSM 10702/B	2,0	++
3	<i>C. butyricum</i> DSM 10702/C	2,5	++
4	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423/A	1,5	+++
5	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423/B	2,0	+++
6	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423/C	2,5	+++
7	štandard	0	100 bp rebriček
8	negatívna kontrola/A	1,5	-
9	negatívna kontrola /B	2,0	-
10	negatívna kontrola /C	2,5	-

+++ , ++.....PCR produkt detekovaný

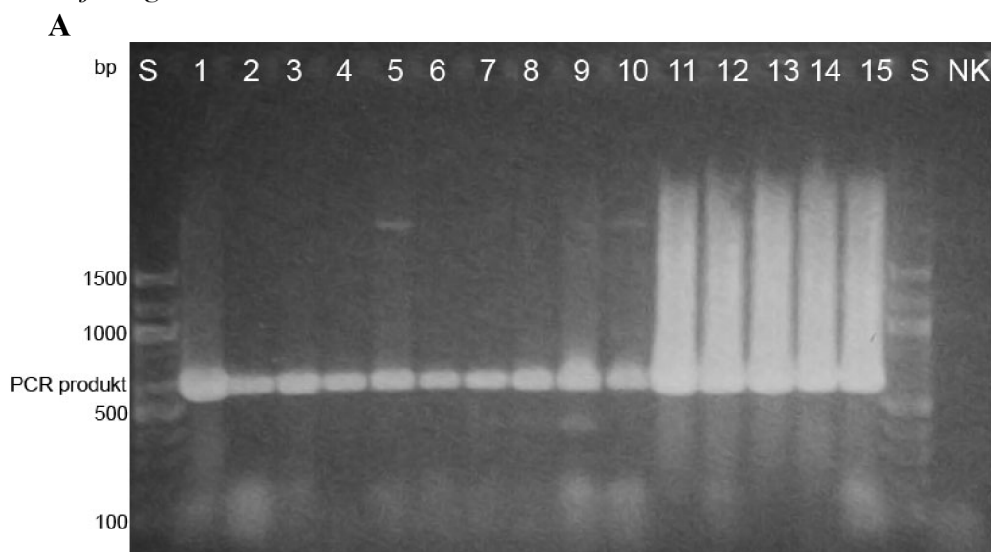
-PCR produkt nedetekovaný

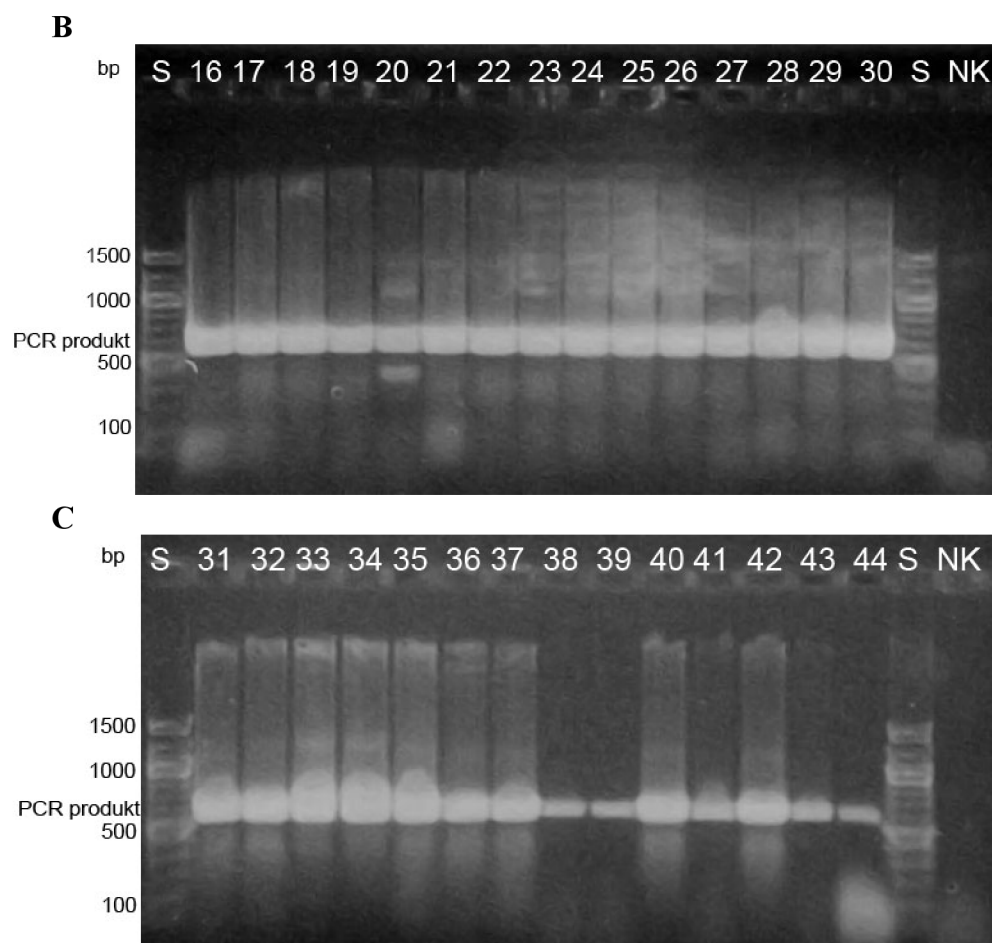
Vo všetkých prípadoch bol detekovaný špecifický PCR produkt dĺžky približne 600 bp. Vplyv prídavku MgCl₂ na intenzitu PCR produktu nebol výrazný.

4.4.2 Amplifikácia DNA analyzovaných kmeňov s rodovo špecifickými primermi

S využitím rodovo špecifických primerov bolo overované, či všetky vzorky patria do rodu *Clostridium*. PCR zmes bola namiešaná podľa postupu A z kapitoly 4.4.1 (Tab. 6), tzn. s obsahom 1,5 mM horečnatých iónov. Amplifikácia prebehla podľa programu CLOST (viď Tab. 3). Agarózová gélová elektroforéza amplifikovaných PCR produktov je zobrazená na Obr. 13 (A, B, C). Výsledky rodovo špecifickej PCR sú zahrnuté v Tab. 12 v kapitole 4.7.

Obr. 13 Agarózová gélová elektroforéza (1,3% gél) PCR produktov špecifických pre rod *Clostridium* (619 bp). Číslo behu označuje číslo vzorky (viď Tab. 4 v 4.1.2), S značí štandard a NK je negatívna kontrola s vodou namiesto DNA matrice.





Vo všetkých vzorkách bol detekovaný PCR produkt veľkosťou odpovedajúci 619 bp, a teda špecifický pre rod *Clostridium*. Amplikony sa len veľmi mierne líšia intenzitou (viď Tab. 12 v kapitole 4.7).

4.5 Druhovo špecifická PCR – *Clostridium butyricum*

Na zaradenie bakteriálnych kmeňov do druhu *Clostridium butyricum* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi pre *C. butyricum* CBISR, CBISF [26]. Tieto primery amplifikujú PCR produkt dlhý 262 bp.

4.5.1 Overenie špecificity primerov s DNA zbierkových kmeňov

Pri zavádzaní metódy druhovo špecifickej PCR bola overovaná špecificita používaných primerov s DNA nasledujúcich vzoriek:

- č. 38 = *C. butyricum* DSM 10702
- č. 40 = *C. tyrobutyricum* SMR 184
- č. 44 = *C. sporogenes* CCM 4423

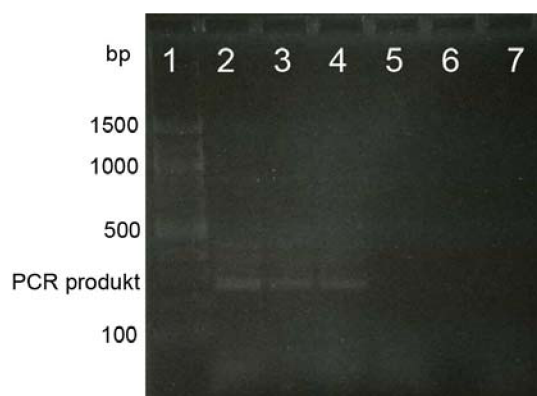
PCR zmes pre *C. butyricum* bola namiešaná dvoma spôsobmi (zmes A a zmes B), ktoré sa líšili množstvom použitých PCR komponent. Všetky ostatné vzorky boli pripravené podľa zmesi A, obsahujúcej vyšší objem jednotlivých komponent v porovnaní so zmesou B, tak ako je uvedené v Tab. 7. Amplifikácia prebehla podľa programu C.BUT1 (viď Tab. 3). Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú uvedené na Obr. 14.

Amplikon dĺžky 262 bp bol detekovaný s DNA kmeňa *C. butyricum* a s DNA *C. tyrobutyricum* SMR 184. Pri vzorke DNA *C. sporogenes* CCM 4423 nebol detekovaný PCR produkt.

Tab. 7 PCR zmes pre druhovo špecifickú PCR *C. butyricum*

Zložka	Zmes A	Zmes B
PCR voda	16,5 µl	19,0 µl
PCR pufr kompletný	2,5 µl	2,5 µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl	0,5 µl
CBISR (10 pmol/µl)	1,0 µl	0,5 µl
CBISF (10 pmol/µl)	1,0 µl	0,5 µl
DNA polymeráza (1U/µl)	2,0 µl	1,0 µl
DNA matrica (10 ng/µl)	1,0 µl	1,0 µl

Obr. 14 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. butyricum* (262 bp). PCR zmesi A a B obsahovali rôzne množstvo komponent, PCR zmes obsahovala 10 ng DNA matrice.



Beh	DNA matrica	PCR produkty	
		špecif.	nešpecif.
1	štandard	100 bp rebríček	
2	<i>C. butyricum</i> DSM 10702 – zmes A	++	+
3	<i>C. butyricum</i> DSM 10702 – zmes B	+	+
4	<i>C. tyrobut.</i> SMR 184	+	+
5	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423	-	-
6	—	—	
7	negatívna kontrola	-	-

++, +detekcia PCR produktu
 -PCR produkt nedetekovaný

DNA *C. butyricum* DSM 10702 bola amplifikovaná v oboch PCR zmesiach, pri vyššom množstve PCR komponent bol však amplikon intenzívnejší. Okrem špecifického PCR produktu veľkosti 262 bp sa amplifikovali aj nešpecifické amplikony.

4.5.2 Optimalizácia druhovo špecifickej PCR pre *C. butyricum*

Na géle boli detekované PCR produkty rôznej intenzity a okrem špecifického PCR produktu dĺžky 262 bp boli pozorované aj nešpecifické PCR produkty rôznych veľkostí. Vzhľadom k amplifikácii nešpecifických PCR produktov bola preto druhovo špecifická PCR pre *C. butyricum* optimalizovaná. Boli testované rôzne zloženia PCR zmesí a teploty hybridizácie.

4.5.2.1 Zmena koncentrácie DNA a citlivosť PCR

Pri optimalizácii bolo v PCR zmesi testované použitie rôzneho množstva DNA matrice. PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *C. butyricum* DSM 10702 (vzorka č. 38), ktorá bola vyriedená na 10 ng/μl, 5 ng/μl, 2,5 ng/μl, 1 ng/μl a 0,5 ng/μl. V PCR zmesi bolo použité menšie množstvo polymerázy (1 μl) oproti predchádzajúcim zmesiam (vid' Tab. 8). Bol použitý program C.BUT1 uvedený v Tab. 3. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy zobrazuje Obr. 15.

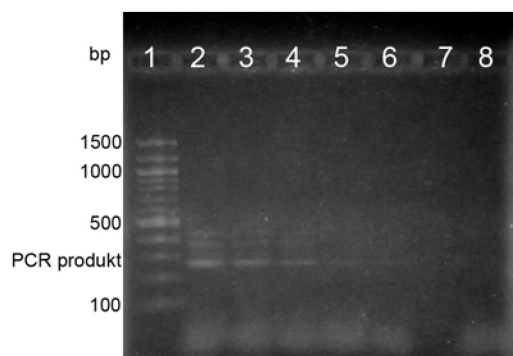
Testovaním rôznych koncentrácií DNA v PCR zmesi bola zistená citlivosť danej PCR, ktorá vyžaduje minimálne množstvo 0,5 až 1 ng DNA v PCR zmesi. S klesajúcou koncentráciou DNA klesá intenzita bandov, pri 2,5 ng DNA v PCR zmesi dostaneme ešte dobre viditeľný band. Pri 1 a 0,5 ng DNA v PCR zmesi je vzniknutý amplikon slabo, ale jednoznačne detekovateľný.

Tab. 8 Zmes pre optimalizáciu druhovo špecifickej PCR pre *C. butyricum*

Zložka	Objem
PCR voda	17,5 μl
PCR pufr kompletný	2,5 μl
dNTP (10 mM)	1,0 μl
CBISR (10 pmol/μl)	1,0 μl
CBISF (10 pmol/μl)	1,0 μl
DNA polymeráza (1U/μl)	1,0 μl
DNA matrica*	1,0 μl

*ako DNA matrica použitá DNA *C. butyricum* DSM 10702 o koncentráciách 10 ng/μl, 5 ng/μl, 2,5 ng/μl, 1 ng/μl a 0,5 ng/μl

Obr. 15 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. butyricum* (262 bp). V PCR boli amplifikované rôzne koncentrácie DNA kmeňa *C. butyricum* DSM 10702.



Beh	DNA v PCR zmesi (ng)	Detekcia PCR produktov	
		špecifických	nešpecif.
1	štandard	100 bp rebríček	
2	10,0	+++	++
3	5,0	++	+
4	2,5	++	+
5	1,0	+	+/-
6	0,5	+/-	+/-
7	-	-	
8	NK	-	-

+++ , ++ , + , +/-PCR produkty rôznej intenzity
 -PCR produkt nedetekovaný

Boli detekované PCR produkty veľkosti okolo 260 bp a nešpecifické amplikony dĺžky asi 300 až 500 bp.

4.5.2.2 Prídavok MgCl₂ a skrátenie doby syntézy

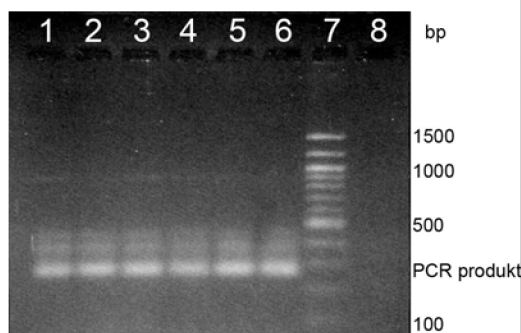
S cieľom znížiť množstvo nešpecifických produktov bol testovaný vplyv prídavku rôzneho množstva horečnatých iónov (zmesi A až E, vid' Tab. 9). Oproti predchádzajúcej optimalizácii došlo ku zmene v programe – pri 72 °C prebiehala syntéza 30 s namiesto pôvodnej 1 min (program C.BUT2, Tab. 3). Použitá bola DNA vzorky 38 (*C. butyricum* DSM 10702).

Ako vyplýva z výsledkov gélovej elektroforézy (vid' Obr. 16), prídavok horečnatých iónov nemá vplyv na kvalitu PCR produktu a nezamedzuje tvorbe nešpecifických PCR produktov.

Tab. 9 Zmesi pre PCR obsahujúce rôzne množstvo Mg²⁺ iónov :

Zložka	A	B	C	D	E	F
PCR voda	17,0 µl	16,5 µl	15,5 µl	14,5 µl	13,5 µl	12,5 µl
PCR pufr kompletný	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
CBISR (10 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
CBISF (10 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
DNA polymeráza (1U/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
MgCl ₂	0,5 µl	1,0 µl	2,0 µl	3,0 µl	4,0 µl	5,0 µl
DNA matrica (10 ng/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl

Obr. 16 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. butyricum* (262 bp). Amplifikovaná bola DNA kmeňa *C. butyricum* DSM 10702 v prítomnosti rôzneho množstva Mg²⁺ iónov.



Beh	Prídavok MgCl ₂ v PCR zmesi	Detekcia PCR prod.	
		špecif.	nešpecif.
1	0,5 µl	+++	++
2	1,0 µl	+++	++
3	2,0 µl	+++	++
4	3,0 µl	+++	++
5	4,0 µl	+++	++
6	5,0 µl	+++	++
7	štandard	100 bp rebríčok	
8	negatívna kontrola	-	-

+++ , ++.....PCR produkt detekovaný

-PCR produkt nedetekovaný

Boli detekované špecifické PCR produkty veľkosti okolo 260 bp a nešpecifické amplikony dĺžky asi 300 až 500 bp.

4.5.2.3 Zmena zloženia PCR zmesi znížením množstva komponent

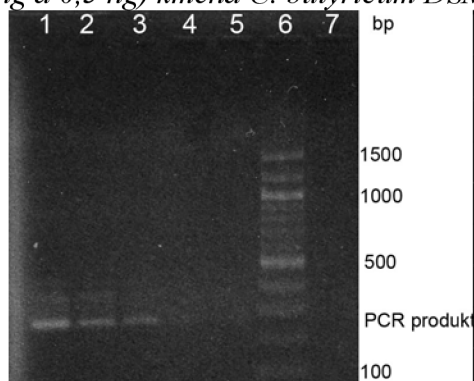
Reakčné zmesi boli namiešané s menším množstvom PCR komponent a s rôzne koncentrovanou DNA zbierkového kmeňa *C. butyricum* DSM 10702 (vzorka č. 38). DNA bola vyriedená na 10 ng/µl, 5 ng/µl, 2,5 ng/µl, 1 ng/µl a 0,5 ng/µl. Zloženie PCR zmesi uvádza Tab. 10, použitý bol program C.BUT2 z Tab. 3.

Tab. 10 PCR zmes pri testovaní menšieho množstva komponent:

Zložka	Objem
PCR voda	19,0 µl
PCR pufr kompletný	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
CBISR (10 pmol/µl)	0,5 µl
CBISF (10 pmol/µl)	0,5 µl
DNA polymeráza (1U/µl)	1,0 µl
DNA matrica*	1,0 µl

*ako DNA matrica použitá DNA *C. butyricum* DSM 10702 o koncentráciách 10 ng/µl, 5 ng/µl, 2,5 ng/µl, 1 ng/µl a 0,5 ng/µl

Obr. 17 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. butyricum* (262 bp). V PCR boli amplifikované rôzne množstvá DNA (10 ng, 5 ng, 2,5 ng, 1 ng a 0,5 ng) kmeňa *C. butyricum* DSM 10702.



Beh	DNA v PCR zmesi (ng)	Detekcia PCR produktov	
		špecifických	nešpecifických
1	10,0	+++	+
2	5,0	++	+/-
3	2,5	+	+/-
4	1,0	+/-	-
5	0,5	-	-
6	štandard	100 bp rebríček	
7	neg. kontrola	-	-

+++ , ++ , + , +/-PCR produkty rôznej intenzity
 -PCR produkt nedetekovaný

Bol detekovaný PCR produkt dĺžky cca 260 bp a len veľmi slabo pozorovateľné nešpecifické amplikony. S klesajúcou koncentráciou DNA matrice sa znižuje intenzita PCR produktu detekovaného na géle, dobre viditeľný je ešte band amplifikovaný z 2,5 ng DNA v PCR zmesi.

4.5.2.4 Optimalizácia teploty hybridizácie

Bola testovaná zmena teploty hybridizácie s cieľom nájsť optimálnu teplotu, pri ktorej by nedochádzalo k amplifikovaniu nešpecifických PCR produktov. K tomu bola využitá funkcia cyklieru GRADIENT s možnosťou nastaviť rozmedzie teplôt tak, aby sa v jednotlivých stĺpcoch prístroja dosiahli rôzne teploty v rámci jedného amplifikačného programu. Tým bolo zabezpečené, že pri jednotlivých vzorkách došlo k amplifikácii pri rôznych teplotách hybridizácie.

PCR zmes bola namiešaná tak, ako je uvedené v Tab. 10 (kapitola 4.5.2.3), ako DNA matrica sa použila vzorka č. 38, tzn. DNA *C. butyricum* DSM 10702 o koncentracii 10 ng/µl. Amplifikácia prebehla podľa programu C.BUT-GRAD (vid' Tab. 3) s gradientom 50 až 60 °C (vid' Prehľad gradientu 1), resp. 55 až 65 °C (vid' Prehľad gradientu 2). Výsledky gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 18 a Obr. 19.

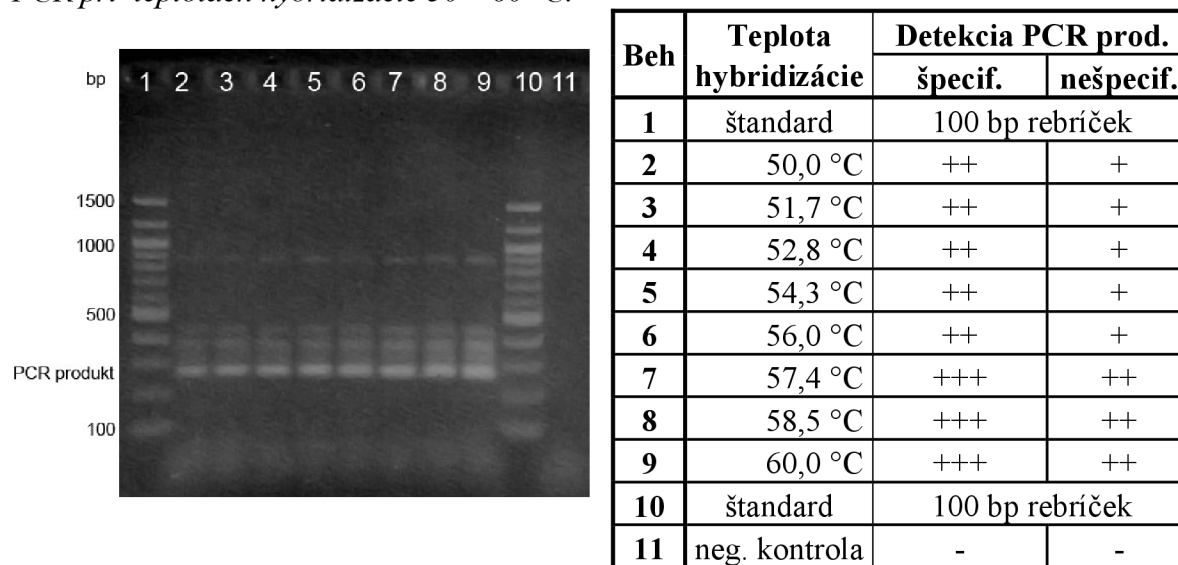
Prehľad gradientu 1:

Stúpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Teplota (°C)	50,0	50,3	50,9	51,7	52,8	54,3	56,0	57,4	58,5	59,3	59,8	60,0

Prehľad gradientu 2:

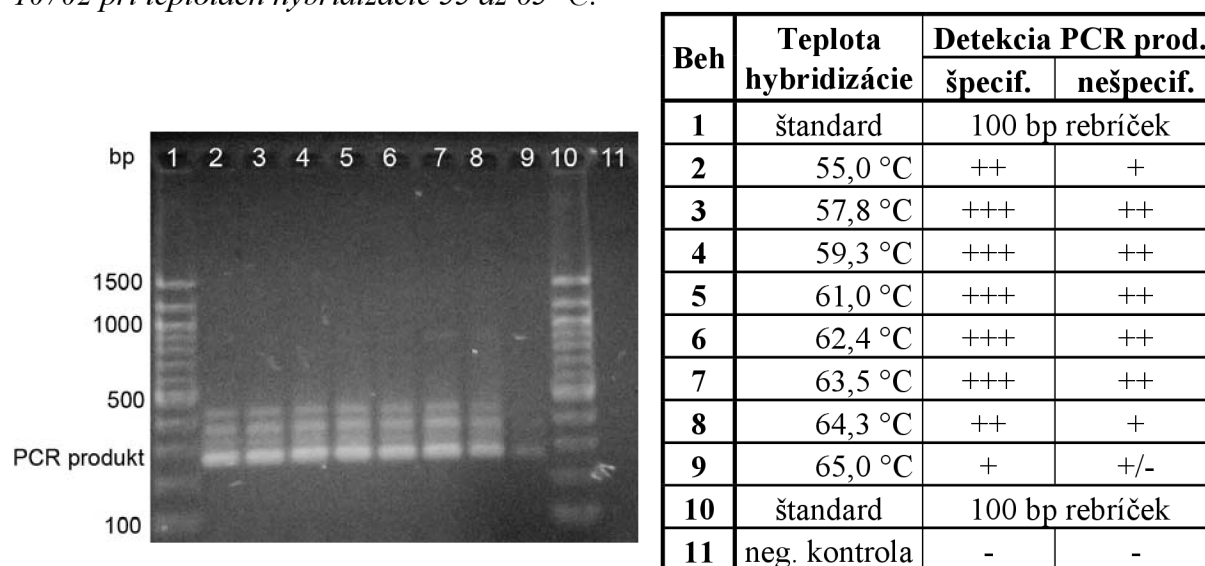
Stúpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Teplota (°C)	55,0	55,3	55,9	56,7	57,8	59,3	61,0	62,4	63,5	64,3	64,8	65,0

Obr. 18 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. butyricum* (262 bp). Amplifikovaná bola DNA kmeňa *C. butyricum* DSM 10702 v gradientovej PCR pri teplotách hybridizácie 50 – 60 °C.



+++, ++, +.....PCR produkty rôznej intenzity
 -PCR produkt nedetekovaný

Obr. 19 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. butyricum* (262 bp). V gradientovej PCR bola amplifikovaná DNA kmeňa *C. butyricum* DSM 10702 pri teplotách hybridizácie 55 až 65 °C.



+++, ++, +, +/-PCR produkty rôznej intenzity
 -PCR produkt nedetekovaný

PCR produkt odpovedajúci 262 bp sa amplifikoval u všetkých vzoriek, tzn. pri teplotách hybridizácie od 50 do 65 °C. Pri 65 °C bol PCR detekovaný slabý PCR produkt. Nešpecifické amplikony boli detekované pri všetkých teplotách.

4.5.2.5 Druhovo špecifická PCR pre *C. butyricum* s inými polymerázami

Amplifikáciu cieľovej sekvencie DNA je možné ovplyvniť použitou DNA polymerázou, preto boli v PCR otestované ďalšie druhy polymeráz. Amplifikácia DNA *C. butyricum* DSM 10702 (10 ng/μl) prebehla s troma rôznymi polymerázami (vyžadujúcimi rôznych PCR pufr, uvedený v zátvorke):

- Taq DNA pol. 1.1, 1U/μl (10x PCR Blue buffer complete)
- Fast Start Taq DNA pol. 5U/μl (Fast Start Taq DNA pol. PCR buffer s MgCl₂)
- Fast Start Taq DNA pol. GC-RICH (Fast Start Taq DNA pol. PCR buffer s MgCl₂)

PCR zmes bola namiešaná tak, ako je uvedené v Tab. 10 a pre amplifikáciu bol testovaný program C.BUT3 opísaný v Tab. 3. Výsledky gélovej elektroforézy PCR produktov sú uvedené na Obr. 20. Boli detekované PCR produkty rôznej intenzity.

Obr. 20 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. butyricum* (262 bp). V PCR bola amplifikovaná DNA kmeňa *C. butyricum* DSM 10702 s troma rôznymi polymerázami.



++, +, +/-PCR produkty rôznej intenzity
 -PCR produkt nedetekovaný

Najintenzívnejší PCR produkt bol získaný s Taq DNA polymerázou 1.1 (1U/μl).

4.5.3 Súhrn optimalizácie druhovo špecifickej PCR pre *C. butyricum*

Boli testované rôzne podmienky prevedenia PCR reakcie, hodnotili sa vplyvy zmien na kvalitu amplifikovaného PCR produktu. Výsledky optimalizácie sú zhrnuté v nasledujúcich bodoch:

- Citlivosť PCR bola stanovená na 0,5 ng DNA v PCR zmesi, aby ešte bolo možné PCR produkt detekovať. Pre intenzívnejší, a teda lepšie detekovateľný amplikon je potrebné väčšie množstvo DNA v PCR zmesi (2,5 ng).
- Prídavok horečnatých iónov nemá vplyv na špecifitu PCR produktu.
- Optimálne zloženie PCR zmesi je opísané v Tab. 10, obsahuje po 0,5 μl dNTP a primerov a 1 μl polymerázy.
- Pri PCR s gradientom teploty hybridizácie bolo preukázané, že k dobrej amplifikácii dochádza v širokom rozmedzí hybridizačných teplôt, a to od 50 až do 64 °C, ale vždy sa amplifikovali aj nešpecifické PCR produkty.

- Najlepšie výsledky detekcie PCR produktu boli dosiahnuté pri použití amplifikačného programu označeného ako C.BUT2 (viď Tab. 3).
- Ako najvhodnejšia polymeráza sa ukázala bežne používaná Taq 1.1 pol. 1U/μl.

Oproti pôvodným výsledkom sme po optimalizácii dosiahli relatívne výrazné zníženie počtu a intenzity nešpecifických amplikonov, avšak podmienky, pri ktorých by nevznikali vôbec, sa nepodarilo stanoviť.

4.5.4 Zaradenie analyzovaných kmeňov do druhu *C. butyricum*

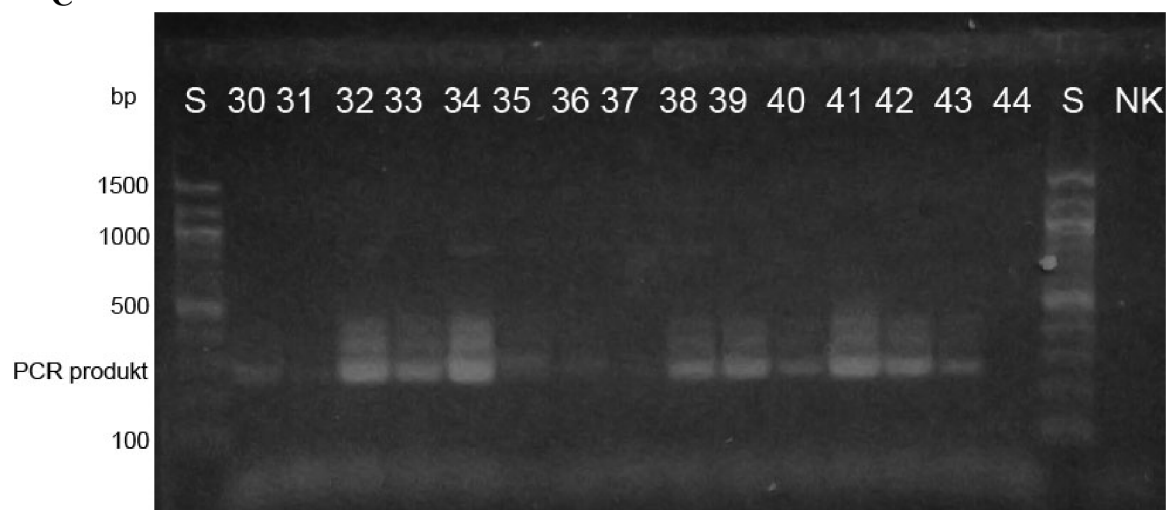
Druhovo špecifická PCR *C. butyricum* bola prevedená so všetkými 44 vzorkami analyzovaných kmeňov. Na amplifikáciu bola použitá PCR zmes A podľa Tab. 7 (kapitola 4.5.1) a program C.BUT1. Druhovo špecifická PCR s DNA vzoriek č. 30 až 44 bola vzhľadom k pôvodne najväčšiemu množstvu nešpecifických amplikonov opakovaná s optimalizovanou PCR zmesou uvedenou v Tab. 10 (viď 4.5.2.3) a programom C.BUT2 podľa Tab. 3.

Výsledky detekcie PCR produktov znázorňuje Obr. 21 (A, B, C), druhové zaradenie vzoriek je uvedené v Tab. 12 v kapitole 4.7.

Obr. 21 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. butyricum* (262 bp). Amplifikovaná bola DNA (10 ng v PCR zmesi) izolovaná zo 44 rôznych kmeňov *Clostridium*. Číslo behu označuje číslo vzorky, S značí štandard, PK je pozitívna kontrola s DNA *C. butyricum* DSM 10702 a NK negatívna kontrola s vodou namiesto DNA matrice.



C



PCR produkt veľkosti 262 bp bol detekovaný u 22 vzoriek (č. 1, 3, 12, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43).

4.6 Hniezdová druhovo špecifická PCR – *Clostridium tyrobutyricum*

Pre PCR určujúcu druh *Clostridium tyrobutyricum* bola podľa Hermana a kol. (1995) [28] popísaná metóda hniezdovej PCR s dvoma sadami primerov, a to Ct1R, Ct1F dávajúcimi PCR produkt o veľkosti 233 bp a Ct2R, Ct2F amplifikujúcimi produkt s dĺžkou 173 bp.

Pri zavádzaní tejto metódy bola testovaná špecifita primerov a metóda bola optimalizovaná.

4.6.1 Testovanie špecifity primerov

Na overenie špecifity primerov používaných v PCR pre *C. tyrobutyricum* bola použitá DNA vzoriek č. 37 až 44, kde vzorka 37 je izolát zo syrov, 38 – *C. butyricum* DSM 10702, 39 – *C. beijerinckii*, 40 až 43 – *C. tyrobutyricum*, 44 – *C. sporogenes* CCM 4423.

4.6.1.1 Prvá PCR v hniezdovej PCR

Zmes pre prvú PCR bola namiešaná tak, ako je uvedené v Tab. 2 pod označením *C.tyr1* a amplifikácia prebehla podľa programu C.TYR1 (vid' Tab. 3). Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú uvedené na Obr. 22.

Obr. 22 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. tyrobutyricum* (233 bp) s primermi Ct1R a Ct1F. PCR zmes obsahovala 10 ng DNA matrice.



Označenie behu	DNA kmeňa	Detekcia PCR produktov	
		špecifických	nešpecifických
S	štandard	100 bp rebríček	
37	V69-120-R2A	++	+
38	<i>butyricum</i> DSM 10702	-	-
39	<i>beijerinckii</i> KVL M3	-	-
40	<i>tyrobutyricum</i> SMR 184	++	+
41	<i>tyrobutyricum</i> SMR 220	+/-	-
42	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	++	+
43	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	-	-
44	<i>sporogenes</i> CCM 4423	-	-
S	štandard	100 bp rebríček	
NK	negatívna kontrola	-	-

++, +, +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity

-PCR produkt nedetekovaný

Po prvom kroku bol detekovaný PCR produkt odpovedajúci 230 bp u vzoriek 37, 40 a 42. Okrem špecifických PCR produktov boli detekované aj nešpecifické PCR produkty.

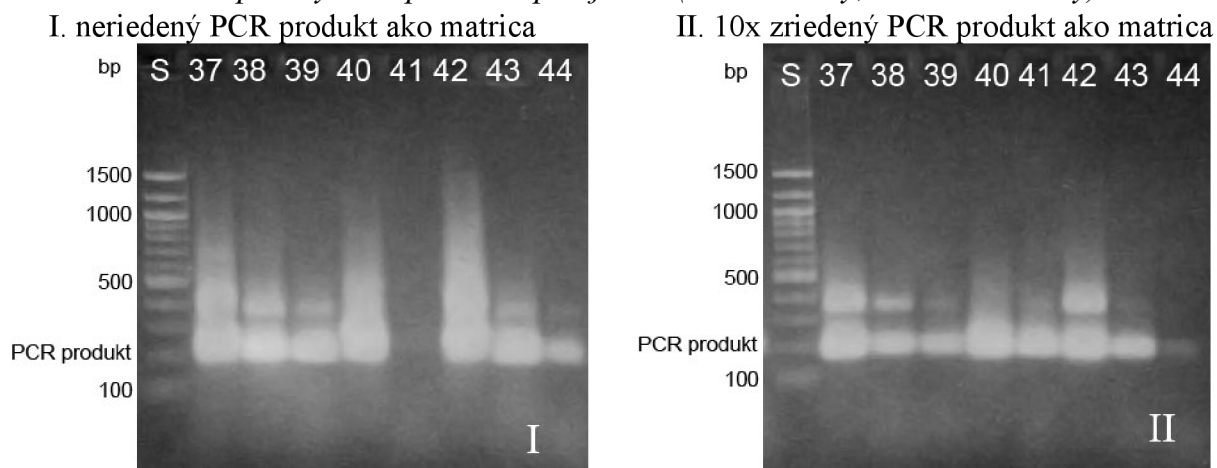
4.6.1.2 Druhá PCR v hniezdovej PCR

Do druhej reakcie hniezdovej PCR s primermi Ct2R, Ct2F bol ako DNA matrica použitý PCR produkt z prvej PCR. PCR produkt sa pridával v množstve 3 μ l, a to jednak v neriedenej forme a jednak 10x zriedený PCR vodou.

PCR zmes pre druhú PCR bola namiešaná rovnako ako v prvej PCR, s výnimkou väčšieho množstva DNA matrice (3 μ l) a tomu odpovedajúcemu zníženiu množstva vody do výsledného objemu 25 μ l. Použitý bol rovnaký program ako v prvej PCR, tzn. C.TYR1. Výsledky elektroforézy sú znázornené na Obr. 23 (I, II).

Druhá reakcia v hniezdovej PCR bola pre kontrolu opakovaná aj s použitím PPP master mixu. Dosiagnuté boli rovnaké výsledky.

Obr. 23 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov amplifikovaných v druhej časti hniezdovej PCR špecifickej pre druh *C. tyrobutyricum* (173 bp) s primermi Ct2R a Ct2F. Ako DNA matrica bol použitý PCR produkt z prvej PCR (I – neriedený, II – 10x zriedený)



Beh	DNA kmeňa	Detekcia PCR produktov			
		I		II	
		špecifických	nešpecif.	špecifických	nešpecif.
S	štandard	100 bp rebríček		100 bp rebríček	
37	V69-120-R2A	+++	+++	+++	+++
38	<i>butyricum</i> DSM 10702	+++	++	++	++
39	<i>beijerinckii</i> KVL M3	+++	++	++	+
40	<i>tyrobutyricum</i> SMR 184	+++	+++	+++	++
41	<i>tyrobutyricum</i> SMR 220	-	-	++	+
42	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	+++	+++	+++	+++
43	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	+++	++	++	+/-
44	<i>sporogenes</i> CCM 4423	++	+	+	-

+++ , ++ , + , +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity

-PCR produkt nedetekovaný

Po druhej reakcii hniezdovej PCR bol detekovaný produkt približnej veľkosti 173 bp u všetkých vzoriek. V tejto PCR boli amplifikované veľmi intenzívne PCR produkty aj pri použití 10-krát zriedenej DNA matrice.

4.6.2 Optimalizácia druhovo špecifickej PCR pre *C. tyrobutyricum*

Nešpecifické PCR produkty naamplifikované v prvej reakcii hniezdovej PCR môžu slúžiť ako DNA templát pre PCR v druhej reakcii, preto bolo žiaduce zoptimalizovať prvú PCR reakciu tak, aby sa amplifikoval len špecifický ampikon dĺžky 233 bp.

4.6.2.1 Optimalizácia zloženia PCR zmesi

Cieľom bolo optimalizovať predovšetkým prvú reakciu v hniezdovej PCR špecifickej pre *C. tyrobutyricum*. Optimalizácia bola prevedená so vzorkami 38 (*C. butyricum* DSM 10702), 40 (*C. tyrobutyricum* SMR 184) a 42 (*C. tyrobutyricum* UTMT 2-1).

Testovaný bol vplyv prídavku MgCl₂ a zmena zloženia PCR zmesi s menším objemom jednotlivých komponent oproti minulej zmesi (po 0,5 µl dNTP a primery, 1 µl polymerázy). Zloženie optimalizačných zmesí je uvedené v Tab. 11. Použitý bol program C.TYR2 (viď Tab. 3), a to upravený skrátením oproti C.TYR1 vzhľadom na veľmi výrazné ampikony v predchádzajúcom experimente. Pri každej teplote v jednotlivých cykloch prebiehal teda daný krok 30 s namiesto 1 min.

Do druhej reakcie hniezdovej PCR bol ako DNA matrica použitý 10x zriedený PCR produkt z prvej reakcie. PCR zmes bola namiešaná podľa zloženia B v Tab. 11 s primermi Ct2R, Ct2F a 3 µl DNA matrice. Použitý bol program C.TYR2.

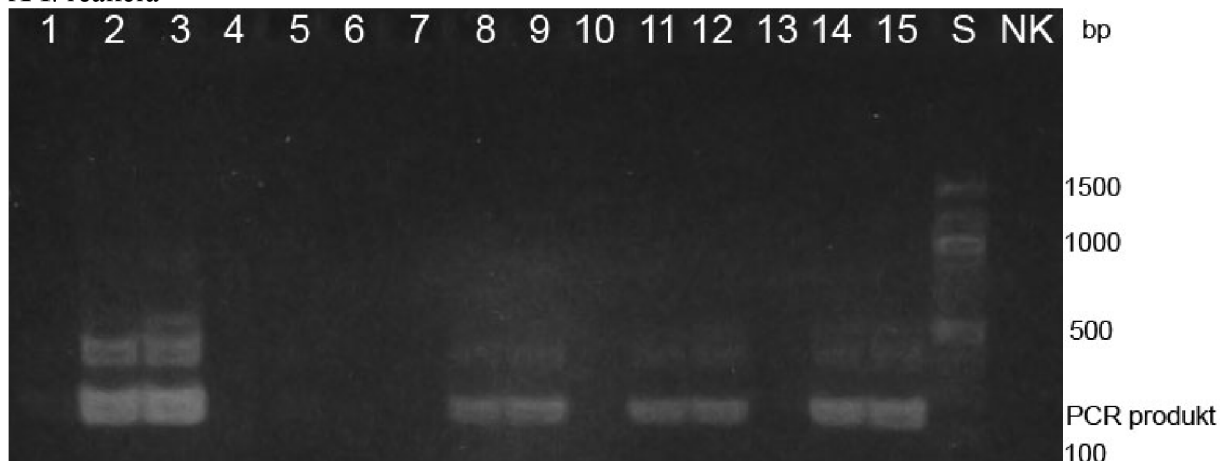
Výsledky obidvoch PCR reakcií sú uvedené na Obr. 24 (A, B). V prvej PCR bol detekovaný produkt nad 200 bp, v druhej pod 200 bp. Po prvej reakcii boli ampikony detekované len u vzoriek, ktoré boli označené ako *C. tyrobutyricum* (*C. butyricum* dávalo negatívny výsledok) bez ohľadu na použitú PCR zmes. V druhej reakcii boli PCR produkty detekované v závislosti od zloženia prvej PCR zmesi, v oboch reakciách sa stále objavovali nešpecifické bandy.

Tab. 11 Zloženie jednotlivých optimalizačných PCR zmesí v hniezdovej PCR:

Zložka	A	B	C	D	E
PCR voda	14,5 μ l	19,0 μ l	18,0 μ l	17,0 μ l	15,0 μ l
PCR pufr kompletný	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l
dNTP (10 mM)	1,0 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
Ct1R (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
Ct1F (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
DNA polymeráza (1U/ μ l)	2,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l
MgCl ₂	2,0 μ l	0 μ l	1,0 μ l	2,0 μ l	4,0 μ l
DNA matrica (10 ng/ μ l)	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l	1,0 μ l

Obr. 24 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov hniezdovej PCR špecifickej pre druh *C. tyrobutyricum*. Prvý gél (A) znázorňuje PCR produkty prvej reakcie (233 bp), druhý gél (B) produkty druhej reakcie (173 bp).

A I. reakcia



B II. reakcia



Beh	DNA vzorky č., použitá PCR zmes	Detekcia PCR produktov			
		A) I. reakcie		B) II. reakcie	
		špecifických	nešpecif.	špecifických	nešpecif.
1	38A	-	-	++	+
2	40A	+++	++	++	-
3	42A	+++	++	++	++
4	38B	-	-	-	-
5	40B	-	-	++	-
6	42B	-	-	++	+
7	38C	-	-	-	-
8	40C	++	+	+++	-
9	42C	++	+	+++	+++
10	38D	-	-	+/-	-
11	40D	++	+	+++	-
12	42D	++	+	+++	+++
13	38E	-	-	++	+
14	40E	++	+	+++	-
15	42E	++	+	+++	+++
S	štandard	100 bp rebríček		100 bp rebríček	
NK	negatívna kontrola	-	-	-	-

+++ , ++ , + , +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity

-PCR produkt nedetekovaný

Najlepšie výsledky, tzn. intenzívny špecifický PCR produkt a menej intenzívne nešpecifické PCR produkty, boli dosiahnuté v PCR so zmesami obsahujúcimi po 0,5 µl dNTP a primerov, 1 µl polymerázy a 1 alebo 2 µl MgCl₂.

4.6.2.2 Testovanie rôzneho množstva DNA

DNA matrica do prvej reakcie bola nariedená na 10 ng/µl, 1 ng/µl a 100 pg/µl. Optimalizácia bola testovaná so vzorkami 38 (*C. butyricum* DSM 10702), 40 (*C. tyrobutyricum* SMR 184) a 42 (*C. tyrobutyricum* UTMT 2-1).

Bol použitý postup D predchádzajúcej optimalizácie (vid' Tab. 11), t.j. zmes s prídavkom 2 µl MgCl₂. PCR prebehla podľa programu C.TYR2, ktorý je uvedený v Tab. 3. V druhej reakcii sa ako DNA matrica použil 10x zriedený PCR produkt z prvej reakcie, zmes bola namiešaná takisto ako v prvej reakcii, len s 3 µl DNA matrice, a naamplifikovaná v programe C.TYR2.

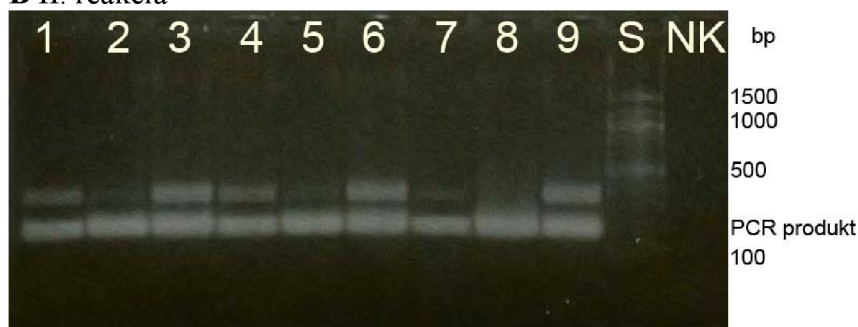
Výsledky sú uvedené na Obr. 25 (A, B). Po prvej reakcii boli amplikony detekované u vzoriek 40 a 42 s klesajúcou intenzitou odpovedajúcou znižujúcemu sa množstvu DNA v PCR zmesi. V druhej reakcii sa DNA naamplifikovala všade, bez rozdielu v intenzite PCR produktov.

Obr. 25 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov hniezdovej PCR špecifickej pre druh *C. tyrobutyricum*. Prvý gél (A) znázorňuje PCR produkty prvej reakcie (233 bp), druhý gél(B) produkty druhej reakcie (173 bp).

A I. reakcia



B II. reakcia



Beh	DNA vzorky č.	DNA v I.PCR zmesi	Detekcia PCR produktov			
			A) I. reakcie		B) II. reakcie	
			špecifických	nešpecif.	špecifických	nešpecif.
1	38	10 ng	-	-	+++	++
2	40	10 ng	+++	++	+++	+
3	42	10 ng	+++	++	+++	+++
4	38	1 ng	-	-	+++	++
5	40	1 ng	++	+	+++	+
6	42	1 ng	++	++	+++	+++
7	38	100 pg	-	-	+++	+
8	40	100 pg	+	+	+++	+
9	42	100 pg	+	+	+++	+++
S	štandard		100 bp rebríček		100 bp rebríček	
NK	negatívna kontrola		-	-	-	-

+++, ++, +, +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity

-PCR produkt nedetekovaný

Nešpecifické amplikony boli detekované v prvej aj druhej PCR reakcii hniezdovej PCR, a to i napriek prídavku $MgCl_2$ a nízkej koncentrácii templátovej DNA.

4.6.2.3 Optimalizácia teploty hybridizácie

Pomocou gradientovej funkcie PCR cycleru bola hľadaná optimálna teplota hybridizácie primerov, pri ktorej by nedochádzalo k amplifikácii nešpecifických PCR produktov v prvom kroku hniezdovej PCR. Bola použitá DNA vzoriek č. 40 (*C. tyrobutyricum* SMR 184) a 42 (*C. tyrobutyricum* UTMT 2-1), pri ktorých boli vo významnej miere detekované nešpecifické amplikony.

PCR zmes bola namiešaná podľa postupu C uvedeného v Tab. 11 (kapitola 4.6.2.1). Jednotlivé vzorky boli umiestnené do PCR cyclera tak, aby sa u nich dosiahla rôzna teplota hybridizácie v rozsahu 55 až 65 °C (vid' Prehľad gradientu 1), tzn. do stĺpcov č. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a 12. Amplifikácia prebehla podľa programu C.TYR-GRAD opísaného v Tab. 3. Výsledky gélovej elektroforézy sú uvedené na Obr. 26.

Vzhľadom k výsledkom tohto experimentu bola hľadaná optimálna teplota hybridizácie v gradiente od 58 do 63 °C (vid' Prehľad gradientu 2). Ako DNA matrica bola použitá DNA *C. tyrobutyricum* UTMT 2-1 o koncentrácii 10 ng/μl. Zmes bola miešaná rovnako ako pri prvej gradientovej PCR, program sa líšil len v teplote gradientu, ktorá bola 58 až 63 °C. Vzorky boli umiestnené do stĺpcov č. 5, 6, 7, 8, 9 a 10. Agarózová gélová elektroforéza je znázornená na Obr. 27.

Prehľad gradientu 1:

Stĺpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Teplota (°C)	55,0	55,3	55,9	56,7	57,8	59,3	61,0	62,4	63,5	64,3	64,8	65,0

Prehľad gradientu 2:

Stĺpec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Teplota (°C)	58,0	58,1	58,4	58,8	59,4	60,2	61,0	61,8	62,3	62,7	62,9	63,0

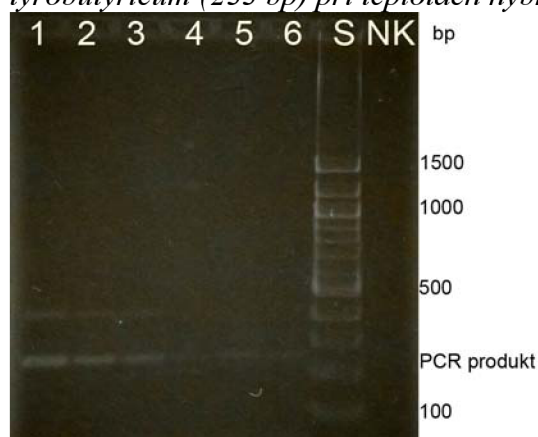
Obr. 26 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. tyrobutyricum* (233 bp) v gradientovej PCR pri teplotách hybridizácie 55 až 65 °C.



Označenie behu	DNA vzorky č.	Teplota hybridizácie (°C)	Detekcia PCR produktov	
			špecifických	nešpecifických
1	40	55,0	++	+
2	42	55,0	+++	+
3	40	56,7	++	+
4	42	56,7	+++	+
5	40	57,8	+++	+
6	42	57,8	+++	+
7	40	59,3	+++	+
8	42	59,3	+++	+
9	40	61,0	+	+/-
10	42	61,0	+	+/-
11	40	62,4	-	-
12	42	62,4	-	-
13	40	63,5	-	-
14	42	63,5	-	-
15	40	64,3	-	-
16	42	64,3	-	-
17	40	65,0	-	-
18	42	65,0	-	-
S	štandard		100 bp rebríček	
NK	neg.kon.	59,3	-	-

+++ , ++ , + , +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity
 -PCR produkt nedetekovaný

Obr. 27 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *C. tyrobutyricum* (233 bp) pri teplotách hybridizácie 58 až 63 °C.



Beh	Teplota hybridizácie	Detekcia PCR produktov	
		špecif.	nešpecif.
1	59,4 °C	+++	++
2	60,2 °C	++	+
3	61,0 °C	+	+
4	61,8 °C	+/-	+/-
5	62,3 °C	+/-	-
6	62,7 °C	+/-	-
7	štandard	100 bp rebríček	
8	NK	-	-

+++ , ++ , + , +/-PCR produkty rôznej intenzity
 -PCR produkt nedetekovaný

Najintenzívnejší PCR produkt bol detekovaný pri teplotách hybridizácie v rozmedzí 57 až 60 °C, pri prekročení teploty 62 °C nedochádza k amplifikácii PCR produktu. Nešpecifické amplikony sa detekovali u všetkých vzoriek s amplifikovaným špecifickým PCR produktom.

Pri zúžení teplotného gradientu na 58 až 63 °C bol dobre detekovateľný PCR produkt určený pri teplotách hybridizácie maximálne do 61 °C. Nešpecifické amplikony vznikajú pri všetkých teplotách vhodných pre amplifikáciu špecifického PCR produktu.

Najintenzívnejšie PCR produkty sú dosiahnuté pri pôvodnej teplote hybridizácie 60 °C.

4.6.3 Optimalizácia druhej reakcie v hniezdovej PCR

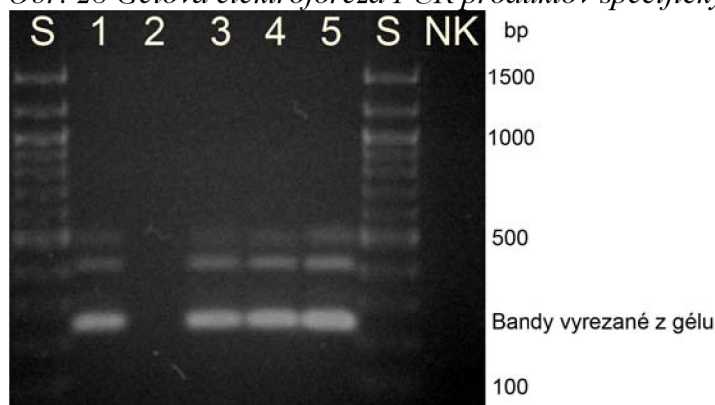
Keďže snaha o dosiahnutie len jedného špecifického amplikonu v prvej PCR nebola úspešná, v druhej PCR, kde sa ako DNA matrica používa PCR produkt z predchádzajúcej reakcie, sa tiež amplifikovali aj nešpecifické PCR produkty. Preto sa v ďalšom experimente po prvej reakcii nechali PCR produkty oddeliť pomocou gélovej elektroforézy, následne bol špecifický amplikon vyrezaný z gélu a bola z neho vyizolovaná DNA špecifického PCR produktu. Táto DNA bola potom použitá ako matrica do druhej reakcie.

4.6.3.1 Príprava PCR produktu pre ďalšiu manipuláciu

Pri príprave PCR produktu prvej reakcie hniezdovej PCR bola použitá PCR zmes podľa postupu D uvedeného v Tab. 11 (kapitola 4.6.2.1) a program C.TYR2 s teplotou hybridizácie 60 °C (vid' Tab. 3). PCR zmes bola namiešaná s DNA vzoriek č. 37, 38, 40 a 42 (10 ng/μl). Výsledky gélovej elektroforézy ukazuje Obr. 28.

Koncentrácie PCR produktov získaných z prvej PCR reakcie boli spektrofotometricky stanovené nasledovne: 450 ng/μl u vz. 37, 500 ng/μl u vz. 40 a 528 ng μl u vz. 42.

Obr. 28 Gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre *C. tyrobutyricum* (233 bp).



Označenie behu	DNA kmeňa <i>Clostridium</i>	Detekcia PCR produktov	
		špecifických	nešpecifických
S	štandard	100 bp rebríček	
1	V69-120-R2A	+++	++
2	<i>butyricum</i> DSM 10702	-	-
3	<i>tyrobutyricum</i> SMR 184	+++	++
4	<i>tyrobutyricum</i> SMR 184	+++	++
5	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	+++	++
S	štandard	100 bp rebríček	
NK	neg. kontrola	-	-

+++ , ++ , + , +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity

-PCR produkt nedetekovaný

Vedľa nešpecifických PCR produktov sa amplifikovali i PCR produkty veľkosťou odpovedajúce špecifickému PCR produktu (233 bp).

4.6.3.2 Izolácia špecifických PCR produktov z gélu

Pomocou skalpela boli z gélu vyrezané špecifické amplicony dĺžky 233 bp u vzoriek č. 37, 40 a 42. Petriho misky s kúskami gélu obsahujúcimi cieľovú DNA boli uložené do druhého dňa do mrazničky na -20 °C.

Zo zmrznutého gélu rozsekaného skalpelom na drobné kúsočky a preneseného do eppendorfiiek sa fenolovou extrakciou s následným prezrážaním etanolom vyizolovala DNA a rozpustila v 20 µl TE pufru. Takto pripravená DNA bola použitá ako matrica do druhej reakcie nested PCR.

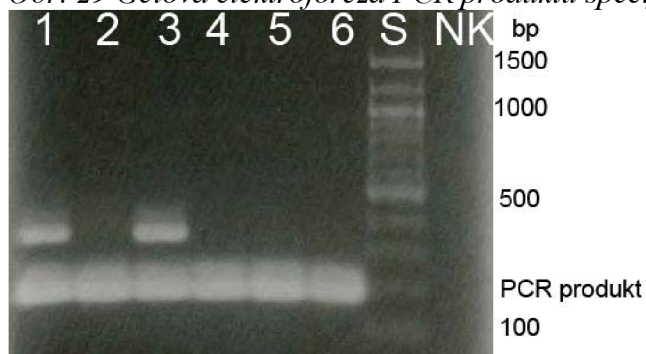
Koncentrácia vyizolovanej DNA bola podľa merania na nanodrope 65 ng/µl u vzorky č. 37 (kmeň V69-120-R2A), 32 ng/µl u vzorky č. 40 (*C. tyrobutyricum* SMR 184) a 22 ng/µl u vzorky č. 42 (*C. tyrobutyricum* UTMT 2-1).

Zo špecifických PCR produktov bola purifikovaná DNA o koncentrácii 22 až 65 ng/µl.

4.6.3.3 PCR s DNA špecifického PCR produktu vyizolovaného z gélu

DNA špecifického PCR produktu vyizolovaného z gélu bola použitá ako matrica pre druhú reakciu hniezdovej PCR. Zmes bola pripravená podľa postupu C z Tab. 11, s 1 µl DNA matrice. Pre porovnanie bola PCR prevedená aj s 10-krát riedeným PCR produktom prvej reakcie. Amplifikácia prebehla podľa programu C.TYR2, výsledky sú uvedené na Obr. 29.

Obr. 29 Gélová elektroforéza PCR produktu špecifického pre *C. tyrobutyricum* (173 bp).



Označenie behu	DNA vzorky č.	použitá DNA matrica	Detekcia PCR produktov	
			špecifických	nešpecifických
1	37	PCR produkt z I. reakcie	+++	++
2	40	PCR produkt z I. reakcie	+++	-
3	42	PCR produkt z I. reakcie	+++	++
4	37	DNA PCR produktu z gélu	+++	-
5	40	DNA PCR produktu z gélu	+++	-
6	42	DNA PCR produktu z gélu	+++	-
S	štandard		100 bp rebríček	
NK	negatívna kontrola		-	-

+++ , ++ , + , +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity

-PCR produkt nedetekovaný

Použitím PCR produktu vyizolovaného z gélu ako DNA matrice do druhej reakcie v hniezdovej PCR sa docieli amplifikácia len jedného špecifického ampliconu odpovedajúceho 173 bp.

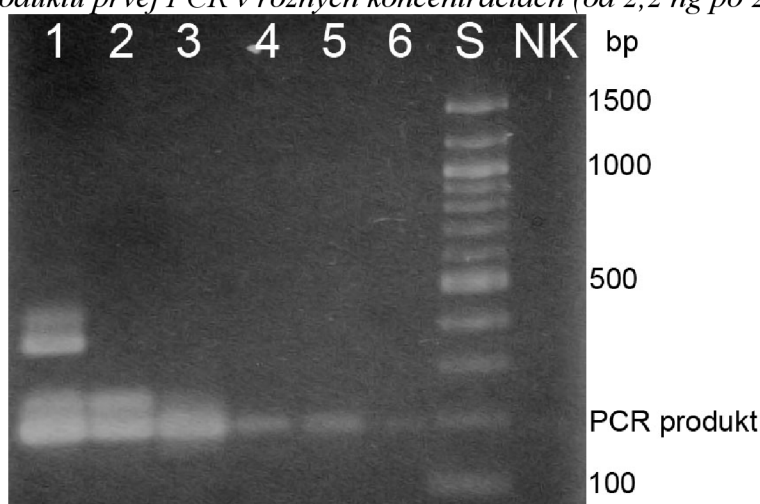
4.6.3.4 Stanovenie citlivosti druhej reakcie v hniezdovej PCR

Pre optimalizáciu druhej PCR bol špecifický PCR produkt z prvej reakcie získaný vyizolovaním z gélu nariadený desiatkovým riedením až po 100 000násobné zriedenie, a to u vzorky č. 42 (*C. tyrobutyricum* UTMT 2-1), takže rozmedzie množstva DNA v PCR zmesi bolo od 2,2 ng až po 220 fg.

PCR zmes a program boli rovnaké ako v predošlom prípade, tzn. postup C z Tab. 11 a program C.TYR2. Pre porovnanie bol do jednej PCR zmesi použitý ako DNA matrica neprečísťovaný PCR produkt amplifikovaný v prvej reakcii zriedený 1 000-krát (528 pg DNA v PCR zmesi).

PCR produkty po gélovej elektroforéze sú zobrazené na Obr. 30.

Obr. 30 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktu špecifického pre druh *C. tyrobutyricum* (173 bp). Ako DNA matrica bol použitý 1 µl prečisteného špecifického PCR produktu prvej PCR v rôznych koncentráciách (od 2,2 ng po 220 fg v PCR zmesi).



Beh	Použitý PCR produkt ako DNA matrica	Riedenie DNA matrice	množstvo DNA v PCR zmesi	Detekcia PCR produktov	
				špecifických	nešpecif.
1	celkový	1 000x	528 pg	+++	+++
2	špecifický vyizolovaný z gélu	10x	2,2 ng	+++	-
3		100x	220 pg	+++	-
4		1 000x	22 pg	++	-
5		10 000x	2,2 pg	++	-
6		100 000x	220 fg	+	-
7	štandard		—	100 bp rebríček	
8	negatívna kontrola		—	-	-

+++ , ++ , + , +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity

-PCR produkt nedetekovaný

S využitím prečisteného špecifického PCR produktu (po izolácii z gélu) ako DNA matrice do druhej reakcie hniezdovej PCR sa v tejto reakcii amplifikovali len špecifické PCR produkty.

Táto reakcia je veľmi citlivá, už pri použití 220 fg DNA matrice do PCR zmesi je PCR produkt dobre detekovateľný.

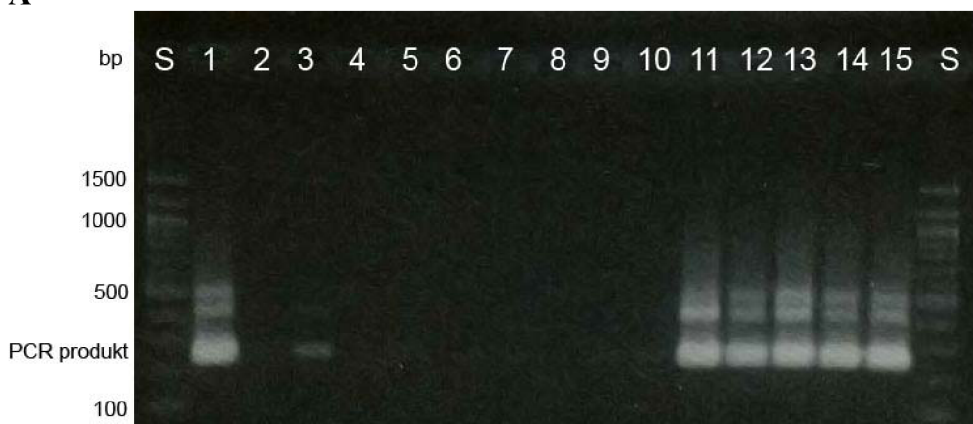
4.6.4 Zaradenie analyzovaných kmeňov do druhu *C. tyrobutyricum*

Na zaradenie kmeňov do druhu *C. tyrobutyricum* bola použitá prvá reakcia hniezdovej PCR podľa Hermana (tak, ako bolo opísané aj v ďalších publikáciách, napr.: Tůma a kol, 2008 [8]). Vychádzajúc zo skutočnosti, že v druhej reakcii sa amplifikujú aj nešpecifické PCR produkty prvej reakcie, poskytuje druhá reakcia falošne pozitívne výsledky, a preto bola druhová špecifikácia vykonaná len pomocou prvej PCR.

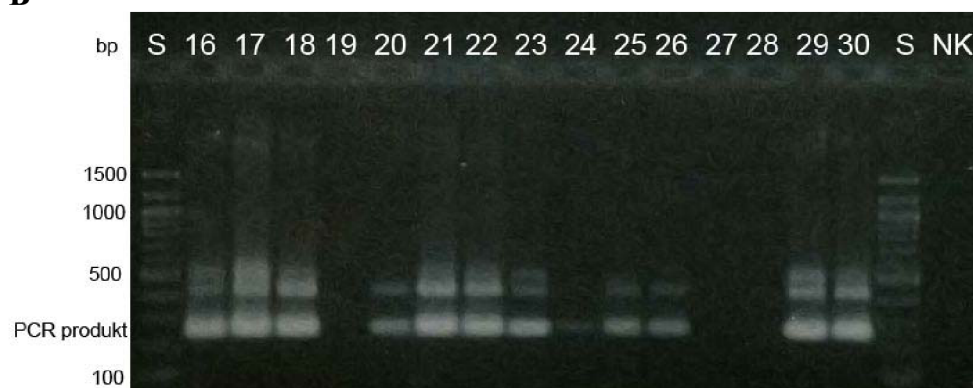
PCR zmes bola namiešaná podľa predchádzajúceho postupu (viď Tab. 11, zmes C), program zostal nezmenený (C.TYR2). Použitá bola DNA vzoriek 1 až 44 o koncentrácii 10 ng/μl. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy PCR produktov sú zobrazené na Obr. 31 (A, B, C), druhová špecifikácia je zhrnutá v Tab. 12 v kapitole 4.7.

Obr. 31 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh C. tyrobutyricum (233 bp). Číslo behu označuje číslo vzorky, S značí štandard a NK je negatívna kontrola s vodou namiesto DNA matrice.

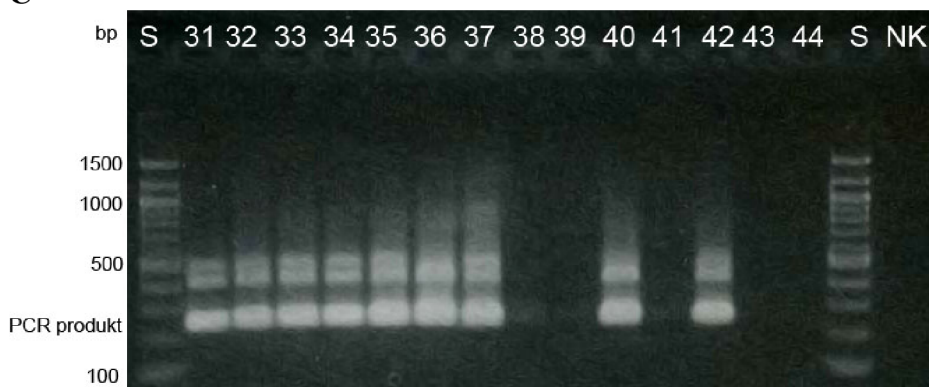
A



B



C



Na základe druhovo špecifickej PCR bolo 27 vzoriek zaradených do druhu *Clostridium tyrobutyricum*.

4.7 Súhrn rodového a druhového zaradenia vzoriek

Výsledky analýzy súboru 44 kmeňov baktérií rodu *Clostridium* a ich druhového zaradenia sú zhrnuté v Tab. 12.

Tab. 12: Identifikácia kmeňov na základe PCR produktov špecifických pre rod *Clostridium*, druhy *C. butyricum* a *C. tyrobutyricum*, pre gén pre hydrogenázu *hydA* a druhové zaradenie vzoriek

Vzor- ka DNA č.	Označenie druhu/kmeňa <i>Clostridium</i>	Detekcia PCR produktov (použité primery)					Druhová identifi- kácia
		doména <i>Bacteria</i> (RW01,DG74; F eub,R eub)	rod <i>Clostri- dium</i> (F1,F2)	<i>C.</i> <i>butyricum</i> (CBISR, CBISF)	<i>C. tyro- butyricum</i> (Ct1R, Ct1F)	<i>hydA</i> gén (HGf, HGr)	
1	9833 P	+++	+++	+	+++	+++	Z
2	9867 P	+++	++	-	-	+/-	?
3	9823 P	+++	++	++	+	+	Z
4	9874 II	+++	++	-	-	-	?
5	9865	+++	++	-	-	-	?
6	9843	+++	++	-	-	-	?
7	9837	+++	++	-	-	-	?
8	9860 (O3B3)	+++	++	-	-	-	?
9	9875 (O3B2)	+++	++	-	-	-	?
10	9829	+++	++	-	-	+/-	?
11	31 P	+++	+++	-	+++	+/-	<i>tyr</i>
12	S18/1	+++	+++	++	+++	++	Z
13	S18/2	+++	+++	-	+++	+/-	<i>tyr</i>
14	S23	+++	+++	-	+++	+	<i>tyr</i>
15	S21	+++	+++	-	+++	++	<i>tyr</i>
16	S29	+++	+++	-	+++	++	<i>tyr</i>
17	S27	+++	+++	-	+++	+/-	<i>tyr</i>
18	S5	+++	+++	-	+++	+/-	<i>tyr</i>
19	E16A	+++	+++	+++	-	+++	<i>but</i>

Pokračovanie Tab. 12: Identifikácia kmeňov na základe PCR produktov špecifických pre rod *Clostridium*, druhy *C. butyricum* a *C. tyrobutyricum*, pre gén pre hydrogenázu *hydA* a druhové zaradenie vzoriek

Vzor- ka DNA č.	Označenie druhu/kmeňa <i>Clostridium</i>	Detekcia PCR produktov (použité primery)					Druhovú identifi- kácia
		doména <i>Bacteria</i> (RW01,DG74; F _{eub} ,R _{eub})	rod <i>Clostri- dium</i> (F1,F2)	<i>C. butyricum</i> (CBISR, CBISF)	<i>C. tyro- butyricum</i> (Ct1R, Ct1F)	<i>hydA</i> gén (HGf, HGr)	
20	R26A	+++	+++	+/-	++	+/-	<i>tyr</i>
21	L2	+++	+++	+	+++	++	Z
22	L3	+++	+++	+	+++	+	Z
23	SP	+++	+++	-	++	+/-	<i>tyr</i>
24	580	+++	+++	+++	+/-	+++	<i>but</i>
25	581	+++	+++	+++	++	+++	Z
26	MM - D	+++	+++	+/-	++	+	<i>tyr</i>
27	89K25B	+++	+++	+++	-	+++	<i>but</i>
28	1030	+++	+++	-	-	+	?
29	12-15-1A	+++	+++	++	+++	+++	Z
30	31-44-Rk-2A	+++	+++	+	+++	+++	Z
31	31-75-4A	+++	+++	+/-	+++	++	<i>tyr</i>
32	V51-RCM-3B	+++	+++	+++	+++	+++	Z
33	V51-RCM-3C	+++	+++	++	+++	+++	Z
34	V62-45-3A	+++	+++	+++	+++	+++	Z
35	V62-45-3B	+++	+++	++	+++	+++	Z
36	V67-R3A	+++	+++	+	+++	+++	Z
37	V69-120-R2A	+++	+++	+/-	+++	+++	<i>tyr</i>
38	<i>butyricum</i> DSM 10702	+++	++	++	-	+++	<i>but</i>
39	<i>beijerinckii</i> KVL M3	+++	++	++	-	+++	<i>but</i>
40	<i>tyrobutyricum</i> SMR 184	+++	+++	+	+++	+++	Z
41	<i>tyrobutyricum</i> SMR 220	+++	++	+++	-	+++	<i>but</i>
42	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	+++	+++	++	+++	+++	Z
43	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	+++	++	+	-	+++	<i>but</i>
44	<i>sporogenes</i> CCM 4423	+++	++	-	-	+	<i>spor</i>

+++ , ++ , + , +/-detekcia PCR produktu rôznej intenzity

-PCR produkt nedetekovaný

Druhovú zaradenie: *but* = *C. butyricum*, *tyr* = *C. tyrobutyricum*, *spor* = *C. sporogenes*, Z = zmiešaná kultúra, ? = nezaradené

U všetkých vzoriek bol detekovaný PCR produkt charakteristický pre rod *Clostridium*, takže všetky vzorky patria práve do tohto rodu. Na základe druhovej identifikácie pomocou PCR bolo 22 vzoriek zaradených do druhu *C. butyricum* a 27 vzoriek do druhu *C. tyrobutyricum*.

4.8 Amplifikácia génov kódujúcich hydrogenázy

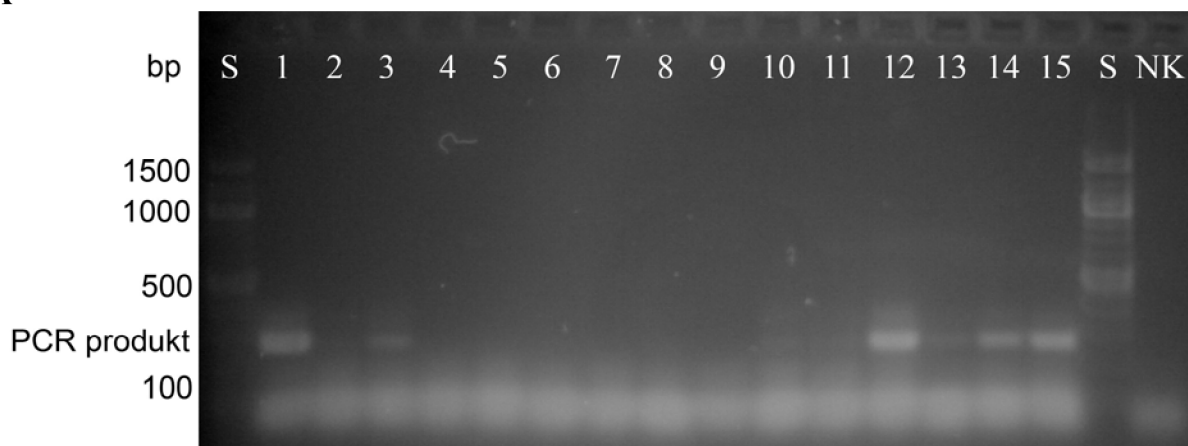
Bola zavedená metóda PCR pre detekciu génov kódujúcich enzým hydrogenáza *hydA* s použitím primerov HGf a HGr poskytujúcich PCR produkt veľkosti 259 bp.[37]

Najskôr bola vykonaná skúška pre vybrané kmene zaradené ako *C. butyricum* (č. 19, 27, 38 a 41). U všetkých týchto vzoriek bol detekovaný intenzívny PCR produkt odpovedajúci veľkosťou približne 260 bp. Následne bolo na hydrogenázový gén testovaných všetkých 44 analyzovaných kmeňov.

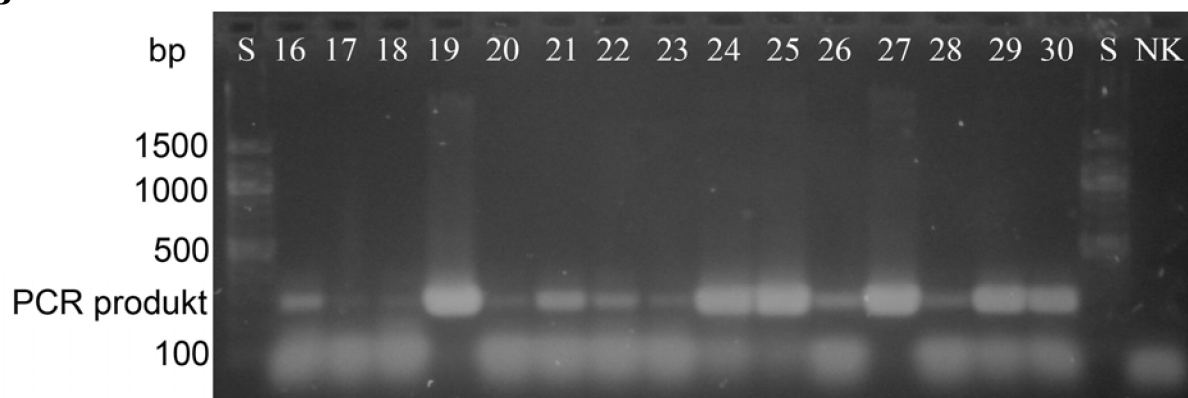
Zmes bola namiešaná podľa Tab. 2 (*HydA*) a naamplifikovaná programom HYD.A popísaným v Tab. 3. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú uvedené na Obr. 32 (A, B, C) a v Tab. 12 kapitole 4.7.

Obr. 32 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov charakteristických pre sekvenciu kódujúcu hydrogenázu *hydA* (259 bp). Číslo behu sa zhoduje s číslom vzorky, S značí štandard, NK negatívnu kontrolu a KP je kontrola pozitívna s *C.tyrobutyricum* DSM 2637.

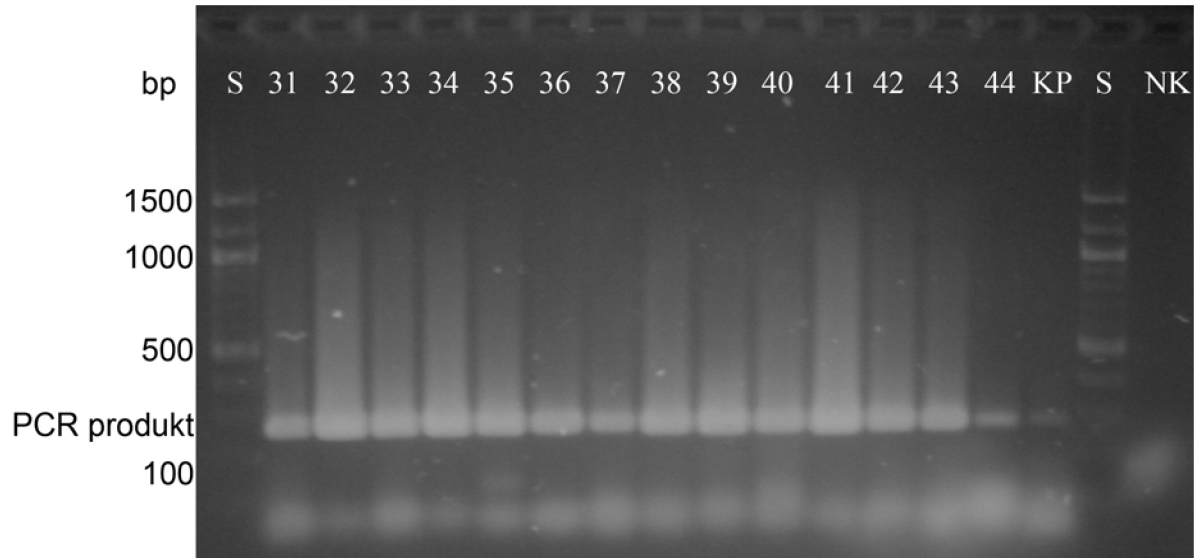
A



B



C



PCR produkt bol s rôznou intenzitou detekovaný u 31 kmeňov. U 6 kmeňov nebol PCR produkt detekovaný vôbec.

5 DISKUSIA

5.1 Vzorky DNA analyzovaných bakteriálnych kmeňov

Gélovou elektroforézou bolo zistené, že DNA vyizolovaná zo 44 vzoriek baktérií rodu *Clostridium* je rôznej kvality. V niektorých vzorkách bolo veľa RNA alebo boli nukleové kyseliny degradované, preto bolo potrebné overiť amplifikovateľnosť všetkých vzoriek pomocou PCR s univerzálnymi primermi. Degradovaná DNA sa nemusí amplifikovať v PCR, takisto ako DNA obsahujúca PCR inhibítory, čo vedie k falošne negatívnym výsledkom.[41]

Spektrofotometrickým stanovením podľa Sambrooka [42] bolo určené, že koncentrácia DNA vzoriek sa pohybovala v rozmedzí od 17 do 730 ng/μl. Z pomeru absorbancie pri 260 a 280 nm bolo zistené, že 6 vzoriek DNA obsahuje zvyšky proteínov a 20 vzoriek veľké množstvo RNA. U zvyšných 18 vzoriek bola čistota DNA určená pomerom absorbancií v požadovanom rozmedzí 1,8 až 2.

Vzhľadom na rôznu kvalitu izolovanej DNA sa mierne líšili aj detekcie nariadenej DNA. U niektorých vzoriek nebola po nariadení DNA na géle detekovaná, ale podľa spektrofotometrického stanovenia bola jej koncentrácia 10 ng/μl. Vzorky boli nariadením pripravené na použitie v PCR.

5.2 Kultivácia zbierkového kmeňa *Clostridium tyrobutyricum*

Zbierková kultúra baktérií *C. tyrobutyricum* DSM 2637 bola kultivovaná za anaeróbných podmienok, tak ako je publikované v literatúre [8]. Pre dlhodobé uchovanie bola bunečná kultúra zamrazená pri -70 °C v glycerole. Krížovým rozterom sa potvrdila čistota kultúry.

Pri kultivácii sa tvoril plyn, čo sa prejavilo odskočením uzáveru skúmavky. Tvorba plynu u klostridií bola popísaná nielen u druhu *Clostridium tyrobutyricum* [6], ale aj u ďalších, ako napr. *C. butyricum* [37], *C. beijerinckii* [31], *C. sporogenes*. [11]

Kultivované bunky boli zlyzované a bola z nich izolovaná DNA metódou podľa Sambrooka [42]. Kvalita DNA bola overená gélovou elektroforézou a na základe spektrofotometrického zmerania koncentrácie bola DNA nariadená na 10 ng/μl, aby bola pripravená na použitie v PCR.

5.3 PCR s univerzálnymi primermi

Boli použité dve nezávislé sady primerov amplifikujúcich univerzálne DNA ľubovoľných baktérií. Amplifikovateľnosť všetkých vzoriek bola potvrdená oboma PCR reakciami.

Tak ako uvádzajú autori primerov podľa Haarmanovej [24], bol detekovaný PCR produkt o veľkosti približne 470 bp, a to intenzívne u všetkých kmeňov. Pri primeroch podľa Greisena [23] bol vo všetkých vzorkách detekovaný intenzívny PCR produkt dĺžky 370 bp a u niektorých kmeňov boli detekované aj nešpecifické amplikony.

Bolo potvrdené, že DNA všetkých vzoriek je amplifikovateľná a všetky vzorky patria do domény *Bacteria*.

5.4 Rodovo špecifická PCR pre rod *Clostridium*

Na základe amplifikácie špecifického PCR produktu dĺžky 619 bp bolo preukázané, že všetkých 44 kmeňov patrí do rodu *Clostridium*. Veľkosť PCR produktu je v zhode s výsledkami autorov použitých primerov F1, F2 [25].

Testovaný bol vplyv prídavku $MgCl_2$ na kvalitu PCR produktu, pre vhodnú amplifikáciu postačuje množstvo Mg^{2+} prítomné v kompletnom PCR pufri (1,5 mM).

5.5 Druhovo špecifická PCR – *Clostridium butyricum*

Pre zaradenie vzoriek do druhu *Clostridium butyricum* boli použité druhovo špecifické primery CBISR a CBISF dávajúce PCR produkt veľkosti 262 bp navrhnuté Nakanishi a kol. v roku 2005 [26].

Keďže táto PCR bola zavádzaná ako nová metóda, bola overovaná amplifikácia s DNA maticou rôznych kmeňov.

5.5.1 Overenie špecificity primerov s DNA zbierkových kmeňov

Amplikon odpovedajúci dĺžkou cca 260 bp bol detekovaný nielen u vzoriek *C. butyricum* DSM 10702, ale aj *C. tyrobutyricum* SMR 184. Bolo preto potrebné zistiť, či ide o nešpecifitu primerov, alebo DNA mohla byť izolovaná zo zmiešanej kultúry. DNA *C. sporogenes* CCM 4423 sa v tejto PCR reakcii neamplifikovala.

Ako bolo ďalšími experimentmi preukázané, s najväčšou pravdepodobnosťou sa vo vzorke č. 40, označenej ako *C. tyrobutyricum* SMR 184, jedná o zmiešanú kultúru druhov *C. butyricum* a *C. tyrobutyricum*.

5.5.2 Optimalizácia druhovo špecifickej PCR pre *C. butyricum*

Druhovo špecifická PCR pre druh *C. butyricum* s využitím primerov CBISR a CBISF poskytujúcimi PCR produkt o veľkosti 262 bp bola optimalizovaná. Cieľom optimalizácie bolo nájsť také zloženie PCR zmesi a program, aby sa neamplifikovali nešpecifické PCR produkty.

Bolo preukázané, že táto PCR nie je veľmi citlivá. Množstvo DNA v PCR zmesi potrebné na získanie intenzívneho PCR produktu je relatívne veľké – 2,5 ng. Minimálne množstvo DNA v PCR zmesi na získanie detekovateľného amplikonu je 0,5 ng.

Po úprave zloženia PCR zmesi sa výrazne obmedzila tvorba nešpecifických PCR produktov. Pri overovaní tejto optimalizácie s viacerými vzorkami však stále nebola amplifikácia nešpecifických bandov potlačená úplne, preto boli testované rôzne teploty hybridizácie. S vyššou teplotou sa zvyšuje špecificita PCR, ovplyvňuje sa totiž hybridizácia s cieľovou sekvenciou DNA.[42]

V druhom kroku každého cyklu PCR (hybridizácia primerov) bol nastavený gradient v rozmedzí 50 až 60 °C, takže pri jednotlivých vzorkách sa dosiahli rôzne teploty hybridizácie. Vzhľadom na detekciu intenzívnych PCR produktov (a to ako špecifických, tak nešpecifických), bolo potrebné zvýšiť teplotu hybridizácie ešte viac (až do 65 °C), a to tak, aby sme našli maximum, po ktorom sa už PCR produkt neamplifikuje. V ideálnom prípade by bola určená teplota, pri ktorej je hybridizácia primerov natolko špecifická, že nedochádza k syntéze nešpecifických amplikonov.

PCR produkt odpovedajúci 262 bp bol detekovaný u všetkých vzoriek, s rastúcou teplotou hybridizácie bolo vidieť mierne sa zvyšujúcu intenzitu amplikonu až po teplotu približne 64 °C, kde došlo k zoslabeniu detekovaného PCR produktu a pri 65 °C už bol PCR produkt detekovaný len veľmi slabo. Teplotu hybridizácie sa teda nepodarilo optimalizovať, ani pri relatívne veľmi vysokej teplote nebola docielená amplifikácia len jedného PCR produktu.

Optimalizáciou bolo dosiahnuté zníženie intenzity nešpecifických PCR produktov, avšak snaha o ich úplné odstránenie nebola napriek množstvu vykonaných testov naplnená.

5.5.3 Zaradenie analyzovaných kmeňov do druhu *C. butyricum*

Táto PCR umožňuje zaradenie vzoriek DNA do druhu *C. butyricum*. Ako pozitívna kontrola bol použitý zbierkový kmeň *C. butyricum* DSM 10702 (vzorka č. 38), zatiaľ čo DNA zbierkového kmeňa *C. sporogenes* CCM 4423 (vzorka č. 44) sa neamplifikovala a mohla teda slúžiť ako negatívna kontrola.

Pozitívnu reakciu v druhovo špecifickej PCR *C. butyricum* dávalo 22 kmeňov. Amplikony boli detekované aj pri 4 vzorkách označených ako *C. tyrobutyricum*. Ich DNA bola pravdepodobne vyizolovaná zo zmiešanej kultúry. Ďalšou možnosťou je nedostatočná špecificita PCR primerov v našom experimentálnom usporiadaní.

5.6 Druhovo špecifická PCR – *Clostridium tyrobutyricum*

Pre druhové zaradenie kmeňov medzi *Clostridium tyrobutyricum* bola navrhnutá hniezdová PCR s primermi Ct1R, Ct1F v prvej reakcii a Ct2R, Ct2F v druhej reakcii. Túto metódu zaviedli Herman a kol v roku 1995 [28] a bola odvtedy použitá v mnohých ďalších prácach (napr. Burdychová, 2007 [6]).

5.6.1 Testovanie špecificity primerov

Zatiaľ čo v prvej reakcii sa amplifikovala len DNA vzoriek, ktoré boli predbežne zaradené do druhu *C. tyrobutyricum*, v druhej reakcii boli PCR produkty detekované u všetkých vzoriek. Vzhľadom k prítomnosti zbierkových kmeňov iných druhov medzi vzorkami je veľmi pravdepodobné, že druhá PCR dáva falošne pozitívne výsledky. Preto bolo prikróčené k optimalizácii hniezdovej PCR reakcie.

5.6.2 Optimalizácia druhovo špecifickej PCR pre *C. tyrobutyricum*

Pri optimalizácii sme vychádzali z predpokladu, že falošne pozitívne výsledky druhej reakcie v nested PCR sú spôsobené amplifikáciou nešpecifických PCR produktov v prvej reakcii, ktoré slúžia ako DNA templát pre druhú sadu primerov.

Prvotným cieľom preto bolo nájsť také zloženie PCR zmesi, aby nedochádzalo k syntetizovaniu nežiaducich PCR produktov v prvej reakcii. Prehľad optimalizačných PCR zmesí je vidieť v Tab. 11 (kapitola 4.6.2.1), ako najvhodnejšie sa ukázali zmesi obsahujúce po 0,5 μ l dNTP a primerov, 1 μ l polymerázy a 1 alebo 2 μ l $MgCl_2$.

Táto optimalizácia (zmes C) bola overovaná aj pre ďalšie vzorky, a to konkrétne vzorky 37 až 44 s očakávaním, že v druhej reakcii sa bude amplifikovať len DNA vzoriek označených ako *C. tyrobutyricum*, resp. že dosiahneme negatívny výsledok pri použití zbierkových kmeňov iných druhov. Výsledky elektroforézy PCR produktov po druhej reakcii však stále naznačovali falošne pozitívne výsledky.

Ďalšou optimalizáciou bola teda zmena programu, a to teploty hybridizácie. Pri využití gradientu 55 až 65 °C bolo zistené, že pri prekročení teploty 62 °C už nedochádza k amplifikácii PCR produktu, z dôvodu príliš vysokej teploty pre hybridizáciu primerov. Keďže bola možnosť, že pri niektorej teplote bude dochádzať k amplifikácii práve špecifického PCR produktu, bol rozsah gradientu zúžený na 58 až 63 °C. Dobre detekovateľný PCR produkt bol určený pri teplotách hybridizácie maximálne do 61 °C, pri teplotách od 61,8 °C do 62,7 °C bol PCR produkt z dôvodu príliš vysokej teploty pre hybridizáciu primerov len slabo alebo nejasne detekovateľný. Nešpecifické amplikony boli detekované u všetkých vzoriek so zreteľne amplifikovaným špecifickým PCR produktom.

Nakoniec sa nepodarilo nájsť amplifikačný program, ktorý by zabezpečil optimálnu teplotu hybridizácie pre amplifikáciu len špecifického PCR produktu. Nešpecifické PCR produkty v druhovo špecifickej PCR pre *C. tyrobutyricum* sú pozorované aj v ďalších prácach, ako napr. Kučerová, 2008 [43].

5.6.3 Optimalizácia druhej reakcie v hniezdovej PCR

Pri optimalizácii druhej reakcie bol najskôr pripravený PCR produkt prvej reakcie, ktorý slúži ako DNA matrica v druhej reakcii. Tento PCR produkt bol rozdelený na géle pomocou elektroforézy a metódou fenolovej extrakcie bola z gélu izolovaná DNA špecifického PCR produktu prvej PCR o veľkosti 233 bp.

Použitím takto prečisteného PCR produktu ako DNA matrice do druhej PCR sa docielila amplifikácia len jedného špecifického bandu odpovedajúceho 173 bp popísaného autormi Herman a kol (1995) [28]. Tým bolo potvrdené, že pri druhej PCR hniezdovej reakcii vznikajú nešpecifické amplikony z nešpecifických PCR produktov prvej PCR. Vzhľadom k príliš silne amplifikovanému produktu, ktorý by mohol byť identifikovaný ako dvojband, bolo potrebné zriediť DNA matricu do druhej PCR, pričom bola zároveň stanovená citlivosť tejto PCR.

Na získanie dobre detekovateľného PCR produktu stačí v PCR zmesi už 220 fg DNA matrice. Optimálne množstvo DNA matrice je asi 20 pg, pri ktorom vzniká jasne detekovateľný band definovanej veľkosti. Pre optimalizovanú druhú reakciu je potrebné, aby ako DNA matrica nebol použitý celkový PCR produkt prvej reakcie, ale len vyizolovaný špecifický amplikon.

Ďalším východiskom je nechať prebehnúť len niekoľko cyklov v prvej reakcii hniezdovej PCR, aby sa nešpecifické PCR produkty nestihli naamplifikovať. Táto možnosť zatiaľ nebola testovaná.

5.6.4 Zaradenie vzoriek DNA do druhu *C. tyrobutyricum*

S prihliadnutím k falošne pozitívnym výsledkom druhej PCR bolo rozhodnuté, že na zaradenie vzoriek DNA do druhu *C. tyrobutyricum* bude použitý výsledok prvej reakcie hniezdovej PCR so špecifickým PCR produktom dĺžky 233 bp. Rovnaký postup bol publikovaný i v ďalších prácach, napr. Tůma, 2008 [8].

Zo všetkých 44 kmeňov bolo do druhu *C. tyrobutyricum* zaradených práve 27.

5.7 Súhrn rodového a druhového zaradenia vzoriek

Ako vyplýva z výsledkov zhrnutých v Tab. 12 (viď kapitola 4.7), u všetkých kmeňov bola preukázaná amplifikovateľnosť DNA a príslušnosť do rodu *Clostridium*. Druhovú špecifikáciu určila 22 kmeňov ako *C. butyricum* a 27 kmeňov ako *C. tyrobutyricum*, z čoho 15 vzoriek sa prejavuje súčasne ako oba druhy. Pravdepodobne ide o zmiešané kultúry.

Z analyzovaného súboru bolo 7 kmeňov určených ako *C. butyricum*, a to vzorky označené č. 19, 24, 27, 38, 39, 41 a 43. Jednoznačne identifikované ako *C. tyrobutyricum* boli vzorky označené č. 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 23, 26, 31, a 37. Zvyšných 10 vzoriek nebolo priradených k ani jednému z uvedených druhov, môže sa jednať o druh *C. sporogenes*, príp. o iné druhy, ktoré bývajú izolované zo syrov s neskorým durením, napr. *C. beijerinckii*. [11]

5.8 Hydrogenázy

Významnou vlastnosťou klostrídií je schopnosť produkovať plyn. Za produkciu vodíka sú zodpovedné enzýmy hydrogenázy. U druhu *Clostridium butyricum* bol popísaný gén kódujúci hydrogenázu *hydA* [44]. Tento gén môže byť amplifikovaný v PCR.

Výsledky detekcie génov pre hydrogenázu *hydA* s primermi HGf a HGr popísanými autormi Wang a kol (2008) [37] ukázali, že tento gén je prítomný u väčšiny analyzovaných vzoriek. PCR produkt odpovedajúci veľkosťou 259 bp bol s rôznou intenzitou detekovaný u 31 kmeňov.

Všetky kmene identifikované ako *C. butyricum* vykazovali pozitívnu reakciu na prítomnosť hydrogenázy. Kmene charakterizované ako *C. tyrobutyricum* poskytovali PCR produkt menej intenzívny. U vzoriek so zmiešanými kultúrami sa detekcia PCR produktu líšila intenzitou. Vo väčšine nezaradených kmeňov nebol PCR produkt detekovaný.

Prítomnosť hydrogenáz bola v literatúre preukázaná aj u klostrídií nevyskytujúcich sa v syroch, napr. *C. acetobutylicum* [40].

6 ZÁVER

V práci bol analyzovaný súbor 44 kmeňov baktérií vyizolovaných zo syrov s defektom neskorého durenia. Cieľom bola rodová a druhová identifikácia DNA týchto kmeňov s využitím rôznych PCR metód. PCR bola využitá tiež pre detekciu génov kódujúcich hydrogenázy.

Intaktnosť DNA jednotlivých vzoriek bola overená gélovou elektroforézou. Vzorky DNA boli po spektrofotometrickom stanovení koncentrácie nariadené na 10 ng/μl, aby sa do PCR používalo definované množstvo DNA matrice.

Všetkých 44 kmeňov sa amplifikovalo v PCR s univerzálnymi primermi a tiež v PCR s rodovo špecifickými primermi, čím bola potvrdená amplifikovateľnosť všetkých vzoriek a ich príslušnosť do rodu *Clostridium*.

Na základe druhovo špecifických PCR reakcií boli kmene roztriedené do druhov. Celkovo bolo 7 kmeňov zaradených do druhu *C. butyricum* a 12 kmeňov do druhu *C. tyrobutyricum*. Ďalších 15 kmeňov z pôvodného súboru dávalo pozitívnu reakciu v oboch druhovo špecifických PCR, pravdepodobne sa jedná o zmiešané kultúry. Zvyšných 10 kmeňov nebolo priradených k ani jednému z uvedených druhov, medzi nimi zbierkový kmeň *C. sporogenes* CCM 4423.

Testovaním prítomnosti sekvencie pre hydrogenázu *hydA* bolo zistené, že v DNA 31 kmeňov sa tento gén nachádza. Intenzívny PCR produkt bol detekovaný u všetkých kmeňov určených ako *C. butyricum*.

Dosiahnuté výsledky môžu byť použité pre ďalšie skúmanie nepatogénnych klostrídií s eventuálnym priemyselným využitím v budúcnosti. Mohli by nájsť uplatnenie napr. pri biotechnologickej výrobe vodíka.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] NCBI Taxonomy Browser [online]. [2000] , Revised: February 4, 2009. [cit. 2009-04-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>>.
- [2] Grupa22: index [Mikrobiologia] [online]. 16. 1. 2009 [cit. 2009-04-29]. Dostupný z WWW: <<http://micro.org.pl/doku.php/grupa22:index>>.
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha : Academia, 2002.
- [4] RAY, B. *Fundamental food microbiology*. 3rd edition. CRC Press, 2004.
- [5] DSMZ - Microorganisms >Bacterial Nomenclature : Bacterial Nomenclature Up-to-Date [online]. Nemecko : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, c2004, April 2009 [cit. 2009-04-28]. Update lists are published every month. [Http://www.dsmz.de/download/bactnom/bactname.pdf](http://www.dsmz.de/download/bactnom/bactname.pdf).
- [6] BURDYCHOVÁ, R., SLÁDKOVÁ, P.: *Detection of Clostridium tyrobutyricum using cultivation and biochemical methods and polymerase chain reaction*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2007, LV, No. 5, 23—28
- [7] KLIJN, N., NIEUWENHOF, F., HOOLWERF, J., WAALS, C., WEERKAMP, A. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the Causative Agent of Late Blowing in Cheese by Species-Specific PCR Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, vol. 61, no. 8, 2919-2924.
- [8] TŮMA, Š., KUČEROVÁ, K., PLOCKOVÁ, M. Isolation of anticlostridially active lactobacilli from semi-hard cheese. *Czech Journal of food sciences*. 2008, vol. 26, no. 5 [cit. 2009-04-30], 324-332.
- [9] BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, B., KOMAN RAJŠP, M., PERKO, B., ROGELJ, I. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri* . *International Dairy Journal*. 2007, vol. 17, is. 2, 157-166.
- [10] LE BOURHIS, G., SAUNIER, K., DORE, J., CARLIER, J., CHAMBA, J., POPOFF, M., THOLOZAN, J. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, no. 1, 29-38.
- [11] LE BOURHIS, A., DORÉ, J., CARLIER, J., CHAMBA, J., POPOFF, M., THOLOZAN, J. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, no. 113, 154-163.
- [12] RENNEBERG, R. *Biotechnology for Beginners*. 2nd edition. Elsevier Academic Press, 2008.
- [13] MONTOYA, D., ARÉVALO, C., GONZALES, S., ARISTIZABAL, F., SCHWARZ, W.H. New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2001, no. 27, 329-335.
- [14] SEKI, H., SHIOHARA, M., MATSUMURA, T., MIYAGAWA, N., TANAKA, M., KOMIYAMA, A., KURATA, S. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatrics International*. 2003, vol. 45, no. 1, 86-90.
- [15] TAKAHASHI, M., TAGUCHI, H., YAMAGUCHI, H., OSAKI, T., KAMIYA, S. Studies of the effect of *Clostridium butyricum* on *Helicobacter pylori* in several test models including gnotobiotic mice . *Journal of Medical Microbiology*. 2000, vol. 49, 635-642.

- [16] TAKAHASHI, M., TAGUCHI, H., YAMAGUCHI, H., OSAKI, T., KOMATSU, A., KAMIYA, S. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2004, vol. 41, is. 3, 219-226.
- [17] ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 1998.
- [18] KRÁLOVÁ, B., FUKAL, L., RAUCH, P., RUMML, T. *Bioanalytické metody*. 3. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001.
- [19] RUMML, T., RUMLOVÁ, M., PAČES, V. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2007.
- [20] McPHERSON, M.J., TAYLOR, G.R., QUIRKE, P. *PCR: A practical approach*. 5th illustrated edition. Oxford University Press, 1991.
- [21] VOET, D., VOETOVÁ, J. *Biochemie*. Victoria Publishing, 1995.
- [22] COCOLIN, L., INNOCENTE, N., BIASUTTI, M., COMI, G. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, no. 90, 83-91.
- [23] GREISEN, K., LOEFFELHOLZ, M., PUROHIT, A., LEONG, D. PCR Primers and Probes for the 16S rRNA Gene of Most Species of Pathogenic Bacteria, Including Bacteria Found in Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinic Microbiology*. 1994, vol. 32, no. 2, 335-351.
- [24] HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative Real-time PCR Assays To Identify and Quantify Fecal *Bifidobacterium* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, no. 5, 2318-2324.
- [25] REKHA, R., RIZVI, M., JAISHREE, P. Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 9, no. 5.
- [26] NAKANISHI, S., KUWAHARA, T., NAKAYAMA, H., TANAKA, M., OHNISHI, Y. Rapid species identification and partial strain differentiation of *Clostridium butyricum* by PCR using 16S-23S rDNA intergenic spacer regions. *Microbiology and Immunology*. 2005, vol. 49, no. 7, 613-621.
- [27] KIKUCHI, E., MIYAMOTO, Y., NARUSHIMA, S., ITOH, K. Design of Species-Specific Primers to Identify 13 Species of *Clostridium* Harbored in Human Intestinal Tracts. *Microbiology and Immunology*. 2002, vol. 46, no. 5, 353-358.
- [28] HERMAN, LM, DE BLOCK, JH, WAES, GM. A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, vol. 61, no. 12 [cit. 2009-04-02], 4141-4146.
- [29] LÓPEZ-ENRÍQUEZ, L., RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., HERNÁNDEZ, M. Quantitative Detection of *Clostridium tyrobutyricum* in Milk by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, no. 11, s. 3747-3751.
- [30] JAIMES, C., ARISTIZÁBAL, F., BERNAL, M., SUÁREZ, Z., MONTOYA, D. AFLP fingerprinting of Colombian *Clostridium* spp strains, multivariate data analysis and its taxonomical implications. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, no. 67, 64-69.
- [31] LIN, P., WHANG, L., WU, Y., REN, W., HSIAO, C., LI, S., CHANG, J. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007, no. 32, 1728-1735.

- [32] OH, S.E., IYER, P., BRUNS, M.A., LOGAN, B.E. Biological Hydrogen Production Using a Membrane Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, vol. 87, is. 1, 119-127.
- [33] HUNG, C., CHENG, C., CHENG, L., LIANG, C., LIN, C. Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community . *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, vol. 33, no. 5, 1586-1592.
- [34] TOLVANENA, K., KOSKINENA, P., YLIKOSKIB, A., OLLIKKA, P., HEMMILÄ, I., PUHAKKA, J., KARP, M. Quantitative monitoring of a hydrogen-producing *Clostridium butyricum* strain from a continuous-flow, mixed culture bioreactor employing real-time PCR. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, no. 33, 542-549.
- [35] XING, D., REN, N., RITTMANN, B. Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H₂-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, vol. 74, no. 4, 1232-1239.
- [36] CHANG, J., CHEN, W., SHIH, S., YU, S., LAY, J., WEN, F., HUANG, C. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 2006, no. 70, 598-604.
- [37] WANG, M., TSAI, Y., OLSON, B., CHANG, J. Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, no. 33, 4730-4738.
- [38] WANG, M., OLSON, B., CHANG, J. Improving PCR and qPCR detection of hydrogenase A (hydA) associated with Clostridia in pure cultures and environmental sludges using bovine serum albumin. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 2007, no. 77, 645-656.
- [39] TOLVANEN, K., KOSKINEN, P., RAUSSI, H., YLIKOSKIB, A., HEMMILÄ, I., SANTALA, V., KARP, M. Profiling the hydA gene and hydA gene transcript levels of *Clostridium butyricum* during continuous, mixed-culture hydrogen fermentation . *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, vol. 33, is. 20, s. 5416-5421.
- [40] VON ABENDROTH, G., STRIPP, S., SILAKOV, A., CROUX, C., SOUCAILLE, P., GIRBAL, L., HAPPE, T. Optimized over-expression of [FeFe] hydrogenases with high specific activity in *Clostridium acetobutylicum*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, vol. 21, no. 33, 6076-6081.
- [41] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B., KARPIŠKOVÁ, R., ČECHOVÁ, L., ŠKAPOVÁ, D. PCR identification of salmonella cells in food and stool samples after immunomagnetic separation. *Bioseparation*, 2001, vol. 9, no. 6, 379-384.
- [42] SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd illustrated edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [43] KUČEROVÁ, K., TŮMA, Š., ROHACKÁ, H., PLOCKOVÁ, M. Metody detekce a identifikace *Clostridium tyrobutyricum*. In *Mikrobiologie potravin : Sborník referátů a abstraktů z Výroční konference Komise potravinářské mikrobiologie*. Praha : VŠCHT, 2008, 35-39.
- [44] CHEN, W., TSENG, Z., LEE, K., CHANG, J. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International journal of hydrogen energy*. 2005, vol. 30, no. 10, 1063-1070.

