



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

IMUNOMAGNETICKÁ SEPARACE BUNĚK BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ POMOCÍ MAGNETICKÝCH NOSIČŮ FUNKCIONALIZOVANÝCH PROTILÁTKOU

IMUNOMAGNETIC SEPARATION OF LACTIC ACID BACTERIA USING MAGNETIC
MICROPARTICLES FUNCTIONALISED BY ANTIBODIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JAKUB VAŇÁSEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0915/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jakub Vaňásek	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	

Název diplomové práce:

Imunomagnetická separace buněk bakterií mléčného kvašení pomocí magnetických nosičů funkcionalizovaných protilátkou

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

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

Bc. Jakub Vaňásek
Student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

Imunomagnetická separace je založena na vazbě protilátky s antigenem, kde protilátka je navázána na magnetickém nosiči. V této práci byly pro imunomagnetickou separaci bakterií mléčného kvašení použity částice magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium*. Metoda imunomagnetické separace byla nejprve optimalizována a následně byla ověřena účinnost a specifita navázaných protilátek na čistých bakteriálních kmenech a kvasinkách, které byly identifikovány pomocí metody polymerázové řetězové reakce. Účinnost imunomagnetické separace byla rovněž ověřena na masném probiotickém výrobku, ze kterého byly úspěšně izolovány bakterie rodu *Lactobacillus*. U DNA z těchto vyizolovaných buněk byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání, pomocí které byla prokázána přítomnost několika kmenů bakterií rodu *Lactobacillus*.

ABSTRACT

Immunomagnetic separation is based on binding of antibody with antigen, where antibody is bound to magnetic particle. In this thesis there were used particles of magnetic pearl cellulose with anti*Lactobacillus* and anti*Bifidobacterium* antibodies. Immunomagnetic separation method was optimized and verified for its efficiency and specificity with bacterial and yeast cells. These cells were identified by polymerase chain reaction. Efficiency of immunomagnetic separation was verified on probiotic meat product, where *Lactobacillus* cells were isolated. With DNA from isolated *Lactobacillus* cells the high resolution melting was performed. The results show presence of several bacterial strains of *Lactobacillus* species.

KLÍČOVÁ SLOVA

Imunomagnetická separace, magnetická perlová celulóza, protilátky, polymerázová řetězová reakce, HRM, *Lactobacillus*

KEYWORDS

Immunomagnetic separation, magnetic pearl cellulose, antibodies, polymerase chain reaction, high resolution melting, *Lactobacillus*

VAŇÁSEK, J. *Imunomagnetická separace buněk bakterií mléčného kvašení pomocí magnetických nosičů funkcionalizovaných protilátkou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 69 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval své vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení, velké množství cenných rad a skvělý přístup při vypracovávání této diplomové práce.

Obsah

Obsah	5
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Bakterie mléčného kvašení.....	10
2.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	10
2.1.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>	11
2.1.3 Probiotika	12
2.1.4 Prebiotika.....	13
2.2 Analýza probiotických mikroorganismů v potravinách	13
2.3 Izolace DNA.....	14
2.3.1 Lyze buněk	14
2.3.2 Extrakce nukleových kyselin.....	14
2.3.3 Srážení a purifikace nukleových kyselin	14
2.4 Polymerázová řetězová reakce	14
2.4.1 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	15
2.4.1.1 Vysokorozlišovací analýza křivek tání.....	16
2.5 Magnetické částice	17
2.6 Imunomagnetická separace	18
2.6.1.1 Magnetická perlová celulóza.....	18
2.6.2 Princip vazby protilátka-antigen.....	19
3 Cíle práce	21
4 Materiály a pomůcky	22
4.1 Sbírkové kmeny.....	22
4.2 Reálné vzorky potravin	22
4.3 Chemikálie a roztoky.....	22
4.3.1 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk	23
4.3.2 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů	23
4.3.3 Roztoky pro imuno-magnetickou separaci	24
4.3.4 Růstová média	24
4.3.5 Magnetické částice	24
4.3.5.1 Magnetické částice pro imunomagnetickou separaci	24
4.3.5.2 Magnetické částice pro izolaci DNA.....	24
4.3.6 Komponenty pro PCR	24
4.3.7 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	24
4.4 Přístroje a pomůcky	25

5	Metody	26
5.1	Kultivace buněk.....	26
5.1.1	Kultivace buněk rodu <i>Lactobacillus</i> a kontrola čistoty bakteriální kultury	26
5.1.2	Kultivace buněk rodu <i>Bifidobacterium</i>	26
5.1.3	Kultivace kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	26
5.2	Růstová křivka bakterií rodu <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919 a <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900.....	26
5.3	Izolace DNA z čistých kultur	26
5.3.1	Lyze buněk	26
5.3.2	Fenolová extrakce DNA	27
5.3.3	Srážení DNA ethanolem.....	27
5.3.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	27
5.4	Příprava reálných vzorků pro imunomagnetickou separaci	27
5.5	Imunomagnetická separace	27
5.5.1	Optimalizace množství přidaných magnetických částic a doba inkubace.....	28
5.5.2	Optimalizace doby promývání magnetických částic	28
5.5.3	Přečištění DNA získané po imunomagnetické separaci pomocí magnetických částic P(GMA)	28
5.5.4	Optimalizovaný postup IMS.....	28
5.5.4.1	IMS čistých bakteriálních kultur	28
5.5.4.2	IMS z reálných vzorků salámů	29
5.6	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
5.6.1	Komponenty pro PCR směs	29
5.6.2	Použité oligonukleotidové primery v PCR.....	30
5.6.3	Složení použitých PCR směsí.....	31
5.6.4	Programy pro metodu PCR	32
5.6.4.1	Program pro lyzi bakteriálních buněk	33
5.6.5	Gelová elektroforéza PCR produktů	33
5.6.6	Stanovení citlivosti použitých PCR metod.....	33
5.6.6.1	Citlivost PCR pro doménu <i>Bacteria</i> a rod <i>Lactobacillus</i>	33
5.6.6.2	Citlivost PCR pro celkové kvasinky, rod <i>Bifidobacterium</i>	33
5.6.7	Ověření specifity vybraných PCR programů.....	33
5.6.7.1	PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> s primery dle Haarmannové a Duberneta	33
5.6.7.2	PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i>	34
5.6.7.3	PCR pro celkové kvasinky	34

5.7	Provedení PCR a qPCR-HRM po imunomagnetické separaci	34
6	VÝSLEDKY.....	35
6.1	Mikrobiologické metody	35
6.1.1	Ověření čistoty použitých kultur pomocí křížového roztěru	35
6.1.2	Růstová křivka bakterií <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919 a <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900.	36
6.2	Spektrofotometrické stanovení čistoty DNA.....	38
6.2.1	Bakteriální DNA rodu <i>Lactobacillus</i>	38
6.2.2	Bakteriální DNA rodu <i>Bifidobacterium</i>	38
6.2.3	DNA z kvasinek rodu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	39
6.3	Stanovení citlivosti PCR	39
6.3.1	Stanovení citlivosti PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	39
6.3.2	Stanovení citlivosti PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	41
6.3.3	Stanovení citlivosti PCR specifické pro rod <i>Bifidobacterium</i>	42
6.3.4	Stanovení citlivosti PCR pro celkové kvasinky	43
6.4	Ověření rodové specifity testovaných bakteriálních kmenů <i>Lactobacillus</i> pomocí PCR	45
6.4.1	PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i> s primery dle Duberneta	45
6.5	Imunomagnetická separace buněk.....	46
6.5.1	Optimalizace metody imunomagnetické separace	46
6.5.1.1	Optimalizace množství přidaných částic magnetické perlové celulózy a doba inkubace	46
6.5.1.2	Optimalizace doby promývání magnetických částic	48
6.5.1.3	PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> s přečištěnou DNA po IMS pomocí magnetických částic P(GMA)	49
6.5.2	Imunomagnetická separace buněk.....	51
6.5.2.1	Ověření separace bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> výsevem na pevné MRS médium	51
6.5.2.2	Citlivost imunomagnetické separace s buňkami <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919... ..	52
6.5.3	IMS za využití magnetické perlové celulózy z čistých kultur.....	53
6.5.3.1	IMS buněk <i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990	54
6.5.3.2	IMS kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	55
6.5.4	IMS bakteriálních buněk z komplexního vzorku potravin	56
6.5.4.1	Vysokorozlišovací analýza křivek tání se specifickými PCR produkty pro rod <i>Lactobacillus</i>	58
6.5.4.2	Vysokorozlišovací analýza křivek tání ampliconů získaných po IMS-PCR z komplexního vzorku potravin.....	60

7	Diskuze	62
7.1	Ověření čistoty použitých sbírkových kultur pomocí křížového roztěru a stanovení počtu buněk při kultivaci	62
7.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace vyizolované DNA ze sbírkových kmenů	62
7.3	Citlivost polymerázové řetězové reakce	62
7.4	Ověření rodové specifity vyizolované DNA z buněk rodu <i>Lactobacillus</i> pomocí PCR	62
7.5	Imunomagnetická separace buněk	63
8	Závěr	64
9	Literatura	65
10	Použité zkratky	69

1 Úvod

V poslední době se věnuje velká pozornost probiotickým potravinám a výrobkům, které mají vliv na složení střevní mikroflóry a tím i na zlepšení zdravotního stavu hostitele [1]. Mezi nejvýznamnější probiotické kmeny patří rod *Lactobacillus* a rod *Bifidobacterium*, které jsou využívány v mnoha typech výrobků s probiotiky (tablety, prášky, mléko, sýr, jogurty). Se vzrůstajícím počtem těchto výrobků na trhu je snahou vyvinout nové metody identifikace přítomné mikroflóry. Jednou z možností je separace buněk pomocí magnetických částic a následná identifikace izolovaných buněk pomocí polymerázové řetězové reakce. Tyto nové metody mají za cíl zkrátit dobu trvání analýzy a zvýšit její citlivost a specifitu.

Předkládaná práce se zabývá izolací buněk bakterií mléčného kvašení pomocí magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium*. Pro identifikaci buněk bylo využito mikrobiologických metod a molekulárně biotechnologických metod (polymerázová řetězová reakce, polymerázová řetězová reakce v reálném čase s kombinací s vysokorozlišovací analýzou křivek tání). Výhodou použití magnetických částic pro izolaci buněk či nukleových kyselin je omezení použití chemikálií (především organických rozpouštědel při izolaci DNA) nebo rychlost separace. Při použití magnetických částic s navázanými protilátkami je umožněna specifická izolace buněk.

2 Teoretická část

2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení nacházejí v potravinářství uplatnění již od roku 3 000 př. n. l., kdy lidé začaly využívat tyto mikroorganismy na výrobu různých fermentovaných výrobků či jiných druhů potravin, jako chléb, sýr, ryby nebo maso. Dnes se tyto bakterie používají jako startovací kultury. Jsou přizpůsobeny tomu, aby byly v prostředí potravin udrženy v původní formě a zachovaly si tak pozitivní účinek na zdraví spotřebitele. V potravinářství nacházejí uplatnění zejména bakterie rodu *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconococ*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Mezi nejčastěji využívané rody, které patří mezi nejvýznamnější bakterie mléčného kvašení a zároveň jsou řazeny mezi probiotické kmeny, patří rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* [2].

2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* (Obrázek 1) patří mezi bakterie mléčného kvašení. Jsou to tyčinkovité bakterie, které vykazují růst až při 45 °C [3].

Taxonomické zařazení [4]:

- **Doména:** *Bacteria*
- **Kmen:** *Firmicutes*
- **Třída:** *Bacilli*
- **Řád:** *Lactobacillales*
- **Čeleď:** *Lactobacillaceae*
- **Rod:** *Lactobacillus*

Jednotlivé druhy rodu *Lactobacillus* se však od sebe mírně odlišují a dají se rozdělit do tří základních skupin [5]:

1. Striktně homofermentativní druhy. Do této skupiny patří např. *Lactobacillus delbrückii* nebo *Lactobacillus acidophilus*
2. Fakultativně heterofermentativní druhy, které produkují kyselinu mléčnou metabolizací glukózy přes Embden-Meyerhof-Parnasovu dráhu. Bakteriální druhy této skupiny jsou také schopny produkovat ethanol nebo kyselinu octovou. Mezi zástupce se řadí např. *Lactobacillus plantarum* nebo *Lactobacillus casei*.
3. Striktně heterofermentativní druhy. Jako finální metabolity jsou u této skupiny kyselina mléčná a kyselina octová. Do této skupiny řadíme např. *Lactobacillus brevis* nebo *Lactobacillus reuteri*.

Tyto bakterie byly izolovány z mnoha prostředí. Můžeme je nalézt na rostlinách, hnoji, odpadních vodách, ve fermentovaných potravinách nebo v zažívacím traktu zvířat i člověka. V potravinářství nacházejí uplatnění zejména při výrobě jogurtů nebo masných výrobků [6].



Obrázek 1 – *Lactobacillus acidophilus* [7]

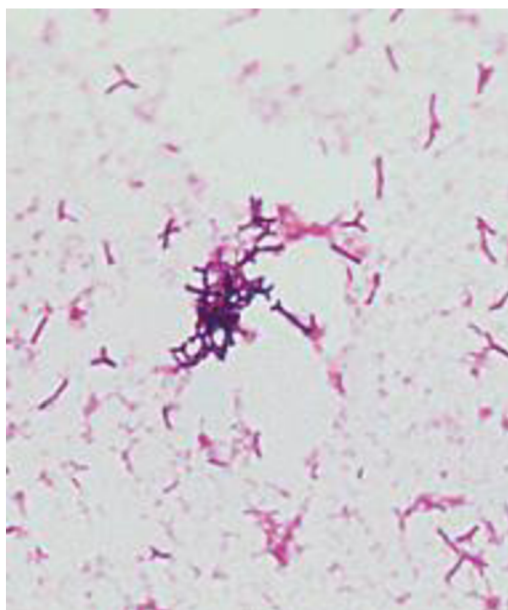
2.1.2 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou zastoupeny přibližně 30 druhy, které byly izolovány převážně z gastrointestinálního traktu lidí a zvířat. Jsou to nepohyblivé, nesporogenní tyčinky, které mohou být různě zakřivené a rozvětvené. Jedná se o anaerobní bakterie, avšak sensitivity jednotlivých bakteriálních druhů na kyslík se může lišit. Bifidobakterie mohou fermentovat glukózu, galaktózu a fruktózu, přičemž glukóza je fermentována na kyselinu mléčnou a octovou [8].

Taxonomické zařazení[4]:

- **Doména:** *Bacteria*
- **Kmen:** *Actinobacteria*
- **Třída:** *Actinobacteria*
- **Řád:** *Bifidobacteriales*
- **Čeleď:** *Bifidobacteriaceae*
- **Rod:** *Bifidobacterium*

Bakterie rodu *Bifidobacterium* (Obrázek 2) jsou hlavní složkou mikroflóry u kojenců krmených mateřským mlékem a ve velké míře jsou obsaženy i ve střevech zvířat i lidí. V roce 2002 byla bakterie *Bifidobacterium lactis* prohlášena úřadem pro kontrolu potravin a léčiv jako GRAS (Generally regarded as safe – obecně považován za bezpečný) [9].



Obrázek 2 – *Bifidobacterium bifidum*[10]

2.1.3 Probiotika

Termín probiotika pochází původně z řečtiny a lze ho přeložit jako „pro život“. V současné době dochází k jejich prudkému rozvoji, s čímž souvisí i vývoj přesné definice tohoto termínu. Aktuálně je jako probiotikum označován „živý mikroorganismus, který při podání v přiměřeném množství působí zdravotní přínos pro hostitele“ [1].

Probiotické mikroorganismy jsou obsaženy především v potravinách na bázi mléka (fermentované mléčné nápoje, sýry, jogurty, atd.). Dále se probiotika nacházejí v produktech jejichž základem je sója, ve výživných tyčinkách, cereáliích nebo sirupech. V souvislosti s jejich funkcí je na probiotika kladena celá řada nároků a výrobky, ve kterých jsou obsaženy, musí mít například vhodné pH nebo musí být speciálně baleny či skladovány. Další možnosti jak uchovat probiotické mikroorganismy v aktivní formě je mikroenkapsulace daného mikroorganismu, který se následně stává odolnější vůči prostředí [1].

Probiotika, která jsou používána jako doplněk stravy, často obsahují nejen bakterie, ale i kvasinky. Na trh se dodávají ve formě kapsulí, tablet, prášků, nebo jako součást fermentovaných výrobků. Probiotické produkty mohou obsahovat jeden probiotický mikroorganismus nebo jejich směs (Tabulka 1).

Tabulka 1 – Mikroorganismy používané jako probiotika [11]

Mikroorganismy používané jako probiotika	
bakterie	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Bifidobacterium breve</i>
	<i>Bifidobacterium animalis</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i>
	<i>Bifidobacterium lactis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	
kvasinky	<i>Saccharomyces boulardii</i>

2.1.4 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravin, které příznivě ovlivňují hostitele stimulací růstu a aktivity bakterií v tlustém střevě, čímž mohou zlepšovat zdraví hostitele [12]. Optimální mikroflóra ve střevech může zvyšovat rezistenci proti patogenním bakteriím nebo může snižovat risk vzniku rakoviny. Správným výběrem potravin můžeme regulovat složení střevní mikroflóry. Prebiotické substráty jsou selektivně využívány právě střevní mikroflórou, ale nepodporují růst patogenní mikroorganismy jako například *Clostridium* nebo *Escherichia coli* [13].

Aby výživový substrát mohl být označován jako prebiotikum, musí splňovat následující tři kritéria:

1. Substrát nesmí být hydrolyzován nebo absorbován v žaludku nebo tenkém střevě.
2. Substrát musí být selektivně prospěšný pro symbiotické bakterie v tlustém střevě (např. bifidobakterie, laktobacily).
3. Fermentace substrátu pomocí bakterií by měla vyvolat pozitivní účinky v hostitelském organismu [13].

2.2 Analýza probiotických mikroorganismů v potravinách

Základem analýzy živých mikroorganismů, nejen v potravinových výrobcích, jsou mikrobiologické metody nebo metody molekulární biotechnologie, kde je cílem získat templátovou DNA. Templátová DNA může být následně analyzována celou řadou metod jako například polymerázová řetězová reakce, polymerázová řetězová reakce v reálném čase nebo vysokorozlišovací analýza křivek tání.

2.3 Izolace DNA

Nukleové kyseliny jsou obsaženy uvnitř buněk v cytoplazmě, a proto je nutné jejich stěnu nejprve rozrušit. Izolace DNA probíhá ve třech krocích [14]:

1. Lyze buněk (rozrušení buněčné stěny)
2. Extrakce nukleových kyselin
3. Srážení a purifikace DNA

2.3.1 Lyze buněk

Pro uvolnění vnitřního obsahu buněk je nutné zlyzovat buněčnou stěnu. Bakteriální buňky se rozrušují lysozymem a současně s ním se využívají detergenty pro solubilizaci cytoplazmatické membrány (laurylsíran sodný) a chelatační činidla (např. EDTA), která inhibují DNázy a destabilizují vnitřní membrány. Často se využívá i mechanické nebo fyzikální (teplotní šok) rozrušení buněčné stěny [15].

2.3.2 Extrakce nukleových kyselin

Nejčastějším způsobem odstranění proteinů a extrakce nukleových kyselin z buněčných lyzátů je využití směsi fenolu a chloroformu. Při smíchání této směsi s buněčným lyzátem dojde k denaturaci proteinů a jejich vysrážení. Tato sraženina se centrifugací zakoncentruje do fázového rozhraní, které odděluje organickou fázi od fáze vodné. Pokud je fenol ekvilibrován na neutrální nebo alkalické prostředí, budou nukleové kyseliny přítomny ve vodné fázi [15].

2.3.3 Srážení a purifikace nukleových kyselin

Přečištění a převedení nukleových kyselin do malého objemu je možné zajistit precipitací alkoholem. Pro zvýšení účinnosti srážení, se mohou přidávat soli (2M NaCl, 3M octan sodný). Dobrému srážení také napomáhá snížení teploty na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při krátkodobém skladování je roztok DNA nejvhodnější uchovávat při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nižší teplota může způsobovat lámání lineární DNA) [15].

2.4 Polymerázová řetězová reakce

Objev polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) znamenal v biologických vědách velké změny v identifikaci mikroorganismů a DNA. PCR umožnila produkci velkého množství DNA. V současné době je metoda PCR široce využívána v mnoha výzkumných odvětvích (detekce patogenů, rychlé a citlivé genomické studie, identifikace zločinců v kriminalistice) [16]. Polymerázová řetězová reakce se v posledních desetiletích stala díky její selektivitě a jednoduchosti velice využívanou metodou také při identifikaci mikroorganismů [17].

Metoda je založena na amplifikaci DNA a je ovlivněna několika faktory (podmínky přípravy templátu DNA, podmínky polymerázové řetězové reakce, správnou selekcí primerů nebo přítomnost Mg^{2+} iontů) [18][15]. Pro správný průběh PCR reakce je nezbytný templát DNA, primery, DNA polymeráza a nukleotidy. Primery jsou oligonukleotidy, které jsou komplementární s templátovou DNA a jsou nezbytné pro vytvoření specifického PCR produktu. DNA polymeráza je klíčový enzym při syntéze PCR produktu (Obrázek 3).

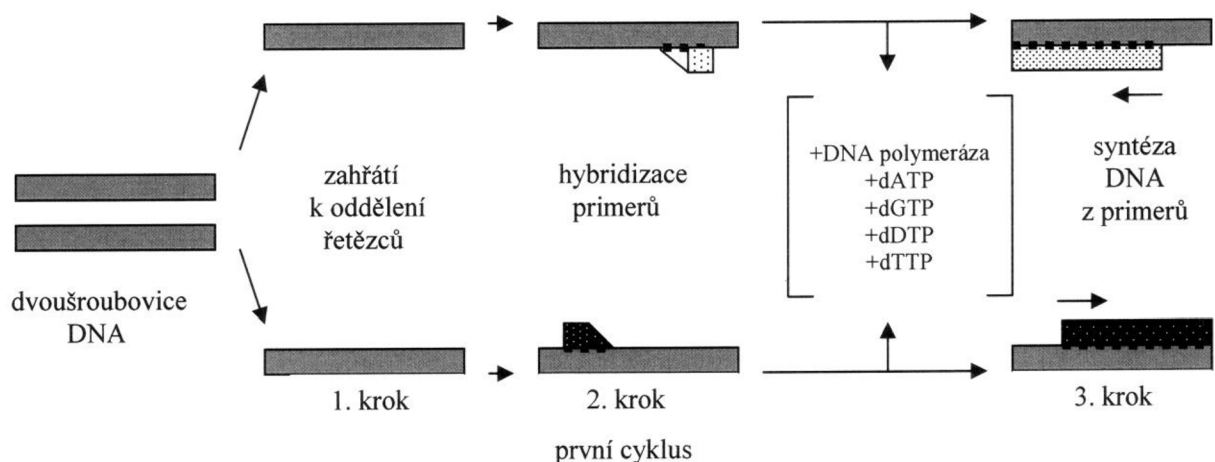
Nukleotidy jsou fosforylované nukleosidy, které jsou pomocí DNA polymerázy spojovány ve výsledný PCR produkt. Mezi nukleotidy, které jsou přítomny v deoxyribonukleové kyselině, řadíme adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G) [16].

Jak už bylo výše zmíněno, vybrané úseky DNA se syntetizují pomocí DNA-polymerázy a jejich syntéza probíhá v termocykleru ve třech opakujících se krocích [15]:

1. Denaturace dvouřetězcových molekul DNA (~95 °C) – dochází k rozpadu vodíkových můstků a následnému rozpadnutí dvoušroubovice.
2. Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA - Annealing (30-65 °C) – přibližná teplota hybridizace se vypočítá z teploty tání (T_m) primerů [19].

$$T_m = (G + C) \cdot 4 + (A + T) \cdot 2.$$
3. Syntéza nových řetězců DNA pomocí DNA-polymerázy (72 °C).

Tento postup se opakuje v cyklech (běžně 25-40) a během tohoto procesu roste počet kopií exponenciálně (2^n , n = počet cyklů). Výsledkem PCR je až miliarda kopií vybraného úseku DNA [15].



Obrázek 3 – průběh polymerázové řetězové reakce [20]

2.4.1 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR) je metoda, která funguje na principu detekce fluorescenčního záření. Fluorescence je měřena při průběhu reakce a tím umožňuje detekci i kvantifikaci výsledného PCR produktu [21]. Detekovat produkty PCR lze několika způsoby, a to pomocí interkalačního barviva, fluorescenčně značených sond nebo fluorescenčně značených primerů [15]. Jelikož je průběh PCR velmi závislý na použití specifických primerů, musí být jejich sekvence vždy publikována. Pro správnou funkci a pochopení qPCR je nutné zmínit několik základních faktorů, které ji ovlivňují [22]:

- Analytická citlivost – určuje minimální množství kopií vzorku, které může být detekováno přístrojem.
- Analytická specifita – určuje schopnost detekovat specifický produkt PCR oproti nespecifickému.

- Přesnost – poukazuje na rozdíly mezi experimentálně změřenými a skutečnými koncentracemi.
- Opakovatelnost – určuje schopnost opakovat experiment se stejnými vzorky ve stejném přístroji.
- Reprodukovatelnost – určuje schopnost opakovat experiment v různých laboratořích na různých přístrojích.

Real-time PCR může být také zkombinována s reverzní transkripcí, což umožňuje přepis RNA do cDNA [16].

Výhodou real-time PCR je i možnost provedení analýzy křivky tání [21]. Teplota tání úseku DNA určuje teplotu, při níž je 50 % vláken disociovaných [23]. Analýza křivky tání se využívá pro odlišení nespecifických produktů PCR a s její pomocí lze identifikovat jednotlivé genotypy organismů [21].

2.4.1.1 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Metoda HRM (High Resolution Melting) je jedna z nejefektivnějších metod pro rozlišení genových polymorfismů a mutací. Metoda je založena na stanovení teploty tání DNA řetězce, která je závislá na množství GC bází, nukleotidové sekvenci a stupni řetězcové komplementarity. Zároveň metoda vychází z toho, že vazbu mezi guaninem a cytosinem tvoří tři vodíkové můstky, zatímco mezi adeninem a thyminem jsou to pouze dva vodíkové můstky. Proto DNA, která obsahuje více GC párů, bude mít vyšší teplotu tání, než DNA s méně GC páry [24].

Pro správnou funkčnost HRM je nutné, aby při amplifikaci DNA templátu bylo přítomné fluorescenční barvivo (například SYBR Green, SYTO 9). Toto Interkalační barvivo se váže do dvouřetězcové DNA (dsDNA) a vykazuje vysoký fluorescenční signál. Analýza křivek tání je založena na postupném zvyšování teploty po posledním PCR cyklu. Na počátku analýzy vykazuje detektor vysoký fluorescenční signál, protože směs obsahuje velké množství dsDNA. S postupným zvyšováním teploty se dsDNA disociuje a interkalační barvivo se uvolňuje, čímž se snižuje fluorescenční signál. Teplota tání ampliconu se odvodí od inflexního bodu křivky tání [24].

Pro použití HRM metody je nutné mít navrženy specifické primery, které nebudou tvořit nespecifické produkty nebo dimery primerů. Velikost PCR produktu by pro HRM neměla přesáhnout 300 bp. Čím větší je velikost PCR produktu, tím menší jsou rozdíly v křivce tání jednotlivých genetických variací [24].

Pro analýzu HRM musí templátová DNA vykazovat vysokou celistvost a čistotu [24]. Díky HRM (Obrázek 4) je možné identifikovat polymorfismus jediného nukleotidu [25].

Metoda vysokorozlišovací analýzy křivek tání byla použita například při testování obsahu bovinního mléka v mléčných produktech. Právě metoda HRM umožňuje rychlou a přesnou identifikaci a díky tomu se využívá při testování mozzarella nebo produktů z bovinního mléka [26].



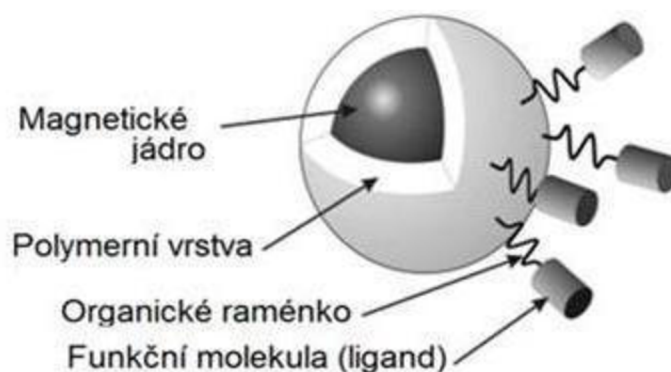
Obrázek 4 - Přístroj Eco Illumina pro HRM [27]

2.5 Magnetické částice

Díky velké poptávce po DNA diagnostice byly velice rychle vyvinuty jednoduché, rychlé a efektivní metody izolace DNA z mnoha bakteriálních zdrojů [28]. Separace buněk či biomolekul pomocí magnetických částic má výhodu v krátké době separace, lehké manipulaci a snížení potřeby chemických činidel [29].

V posledních letech se začaly magnetické částice (Obrázek 5) hojně využívat v biotechnologických aplikacích, jako jsou izolace buněk, purifikace nukleových kyselin nebo purifikace enzymů [30]. Částice se také využívají pro mapování lidského genomu a konstrukci forenzních databází DNA.

Magnetické částice jsou složeny z magnetického jádra, které je potaženo polymerním materiálem nebo kovovým povlakem. Nejčastější metodou přípravy magnetického jádra je spolusrážení, kdy spolu reagují železnaté a železité ionty v zásaditém prostředí [31]. Povlaky magnetických částic mohou být funkcionalizovány různými látkami nebo mohou být složeny z porézních polymerů [32]. K modifikaci povrchu částic se využívají zejména syntetické polymery, ale také anorganické a organické látky. Jejich povrch může být často s výhodou funkcionalizován některými biologicky aktivními látkami jako například funkční skupiny (-NH₂, -COOH nebo -SH). Další možností je navázání streptavidinu, který vykazuje vysokou afinitu proti biotinu (vitamín B₇ a vitamín H) nebo vybrané protilátce specifické pro určitou skupinu látek. Příkladem je využití protilátky anti*Lactobacillus*, která je na sebe schopna navázat antigen přítomný na povrchu bakteriálních buněk rodu *Lactobacillus*. Obecně platí, že funkcionalizovaná i nefunkcionalizovaná magnetická částice musí být biokompatibilní a nesmí podléhat mezičásticovým interakcím [31].

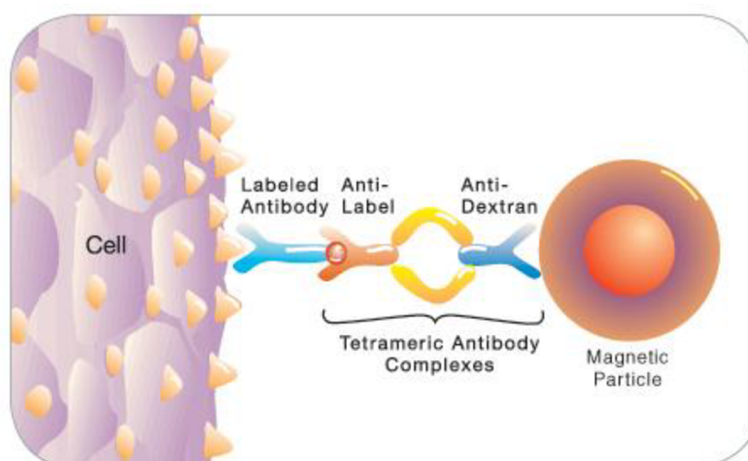


Obrázek 5 - Magnetická částice [33]

2.6 Imunomagnetická separace

Metody cílené separace biologicky aktivních látek využívají magnetické materiály imobilizované různými molekulami. Spojením magnetických nosičů s biologicky aktivní látkou lze mimo jiné dosáhnout unikátních separačních vlastností. Magnetické materiály v kombinaci s velkým povrchem nano- a mikročástic (řádově $100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) umožňují navázat velké množství biomolekul, díky čemuž je lze využít jako efektivní nosiče pro účinnou a rychlou imobilizaci a separaci celé řady biologicky aktivních látek [31].

Imunomagnetická separace (Obrázek 6) je založena na vazbě protilátky s antigenem. Používají se protilátky, které jsou specifické pro určitý mikroorganismus a díky tomu je možné od sebe oddělit jednotlivé mikrobiální druhy ze vzorků jídla nebo prostředí [34].



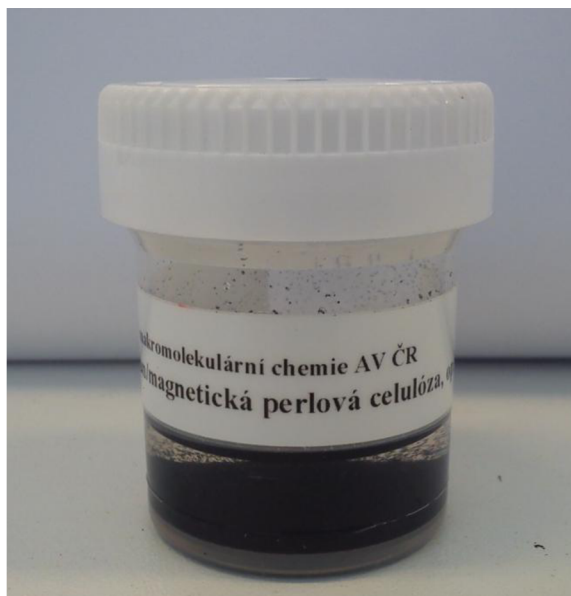
Obrázek 6 - Příklad imunomagnetické separace buněk [35]

2.6.1.1 Magnetická perlová celulóza

Magnetická perlová celulóza (Obrázek 7) je magnetický nosič o velikosti 100-250 μm . Jádro magnetické částice je tvořeno maghemitem (shlukem více malých částic). Tento nosič je pokrytý kyanuchloridem, který nese 3 chlóry. Jeden aktivní chlór je navázaný na magnetický nosič, druhý váže protilátku a třetí je neaktivní.

Pro tuto práci byly na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze týmem Dr. Lenfelda připraveny nosiče s navázanými protilátkami anti*Bifidobacterium* a anti*Lactobacillus*. Charakterizace použitých protilátek je následující:

- anti*Bifidobacterium*
 - fi. APRONEX
 - rabbit PAb (purified)
 - 1.0 mg
 - c(Ig) = 0,91 mg/ml
 - V = 1,1 ml
 - Lot R-066-A1-01
- anti*Lactobacillus*
 - rabbit PAb (purified)
 - 2.0 mg
 - c(Ig) = 1,310,91 mg/ml
 - V = 1,54 ml
 - Lot R-065-A1-01



Obrázek 7 – Magnetická perlová celulóza

2.6.2 Princip vazby protilátka-antigen

Protilátky jsou proteiny, které reagují na specifické molekuly (antigeny), které jsou přítomny například na povrchu mikroorganismů. Jsou tvořeny molekulami ve tvaru písmene Y se dvěma identickými vazebnými stranami, které jsou komplementární pro malé množství povrchových molekul antigenu. Vykazují obrovské množství antigenních vazebných míst, a to pouze záměnou délky a změnou sekvence aminokyselin [36].

Vazba protilátka-antigen se využívá právě při imunomagnetické separaci buněk, která je založena na použití vhodných imunomagnetických částic, na jejichž povrch jsou imobilizovány protilátky proti daným antigenům cílových buněk. Výhodou použití částic s navázanou protilátkou je separace mikroorganismů téměř z jakékoliv matrice (např.: voda,

výkaly, potraviny, kaly, apod.). Získané buňky se dále mohou analyzovat pomocí mikrobiologických nebo molekulárně biotechnologických metod (2.4) [37].

Imunomagnetická separace byla úspěšně použita například při mikrobiologické analýze patogenů v drůbežím mase (například identifikace bakterie *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* v čerstvém kuřecím mase [37]).

3 Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo prokázat účinnost magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium* při separaci buněk rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Účinnost částic byla ověřována mikrobiologickými metodami a metodami molekulární biotechnologie.

Součástí experimentální části diplomové práce bylo:

- Izolace DNA ze sbírkových kmenů
- Ověření citlivosti použitých PCR programů
- Optimalizace procesu imunomagnetické separace buněk pomocí magnetických částic
- Ověření účinnosti imunomagnetické separace buněk z čistých kultur i reálných vzorků pomocí metod PCR

4 Materiály a pomůcky

4.1 Sbírkové kmeny

Pro izolaci DNA a ověření účinnosti specifické separace buněk pomocí magnetických částic byly použity následující bakteriální kmeny, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) a z Kolekce průmyslových mikroorganismů v Polsku (LOCK):

- *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T
- *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762
- *Bifidobacterium longum* CCM 4990
- *Lactobacillus casei* LOCK 0919
- *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900
- *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908
- *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 (Kultura kvasinek byla získána od Mgr. Dany Vránové, Ph.D. z FCH VUT v Brně).

4.2 Reálné vzorky potravin

Byly analyzovány dva tepelně neopracované výrobky, které mají obsahovat probiotické kmeny [38], [39]:

- Ovčácká klobása (*Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a)
- Salám Orlík (*Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Debaryomyces hansenii*).

Salám Orlík i Ovčácká klobása byly získány od Bc. Romana Vašíčka.

4.3 Chemikálie a roztoky

Pro přípravu roztoků byly použity následující chemikálie:

- Agaróza pro elektroforézu DNA (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA standard (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Brno, ČR)
- Dodecyl síran sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Penta, Chrudim, ČR)
- Heptahydrát hydrogenfosforečnano sodného (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid draselný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Kvasničný extrakt (Oxoid, Anglie)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)

- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PEG 6000 (Sigma, St. Louis, USA)
- Proteináza K (100 mg/ml) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris - báze) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Trypton (Oxoid, Anglie)

4.3.1 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Za stálého míchání na magnetické míchačce bylo rozpuštěno 202,2 g EDTA v 800 ml destilované vody, pH bylo upraveno na hodnotu 8,0 pomocí NaOH a doplněno destilovanou vodou do 1000 ml. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C/15 minut).
- 1 M Tris-HCl (pH 7,8)
V 80 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12,1 g Tris-báze, pH bylo upraveno pomocí HCl na 7,8 a roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C/15 minut).
- Lyzační roztok A
Sterilně byl smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody
- Lyzační roztok B
Sterilně byl do lyzačního roztoku A přidán lysozym (3mg/ml).
- Roztok SDS (20%)
Bylo rozpuštěno 20 g SDS v 80 ml sterilní destilované vody. Pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na hodnotu 7,0 a roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml.
- Proteináza K
Bylo rozpuštěno 100 µg proteinázy K v 1 ml destilované vody. Objem byl rozpipetován do alikvotů. Roztok byl uchováván při -20 °C.

4.3.2 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů

- 0,5 M NaCl
Bylo rozpuštěno 58,4 g NaCl ve 150 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 200 ml. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C/15 minut).
- 40 % PEG 6000
Bylo rozpuštěno 40 g PEG 6000 v 60 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml. Roztok byl uchováván při 4 °C.
- 70 % ethanol
Bylo smícháno 70 ml 96 % ethanolu s 26 ml destilované vody.
- 1 x TE pufr
Bylo smícháno 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0). Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml.

4.3.3 Roztoky pro imuno-magnetickou separaci

- 1x PBS pufr

Bylo rozpuštěno 80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a 2,4 g KH_2PO_4 v 800 ml destilované H_2O . Před použitím se roztok naředí 10 x destilovanou vodou.

4.3.4 Růstová média

- MRS médium (de Man, Rogosa, Sharp)

Bylo rozpuštěno 52 g komerčně připraveného práškového média (Oxoid, Anglie) v 1000 ml destilované vody. Pro přípravu pevného média bylo před sterilizací přidáno 15 g agaru. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C/15 minut). Pro kultivaci bakterií rodu *Bifidobacterium* byl přidán do média cystein, jehož výsledná koncentrace byla 0,05 %.

- Pivovarská sladina

4.3.5 Magnetické částice

4.3.5.1 Magnetické částice pro imunomagnetickou separaci

- Částice byly syntetizovány na Makromolekulárním ústavu Akademie věd ČR v Praze týmem Dr. Lenfelda. Magnetické nosiče obsahovaly magnetické jádro, které bylo obaleno perlovou celulózou. Na částice byly navázány protilátky anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium* získané od Dr. H. Kozákové, CSc. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR v Novém Hrádku.

4.3.5.2 Magnetické částice pro izolaci DNA

- Částice byly syntetizovány ing. D. Horákem, CSc. z Makromolekulárního ústavu Akademie věd ČR, Praha. Poly-(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylát (P(HEMA-co-GMA)) (1:1) byly pokryty karboxylovými skupinami. Průměr částic byl 2,2 μm s obsahem COOH skupin 2,67 mM/g a obsahem železa 6,5%.

4.3.6 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- PPP Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- qPCR 2x SYTO 9 Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)

4.3.7 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- 5 x TBE pufr

Bylo rozpuštěno 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité v 600 ml destilované vody. Dále bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a pH bylo upraveno na hodnotu 8,0 pomocí 1M NaOH. Roztok byl doplněn do 1000 ml destilovanou vodou. Před použitím byl TBE pufr 10 x zředěn destilovanou vodou.

- 1,8 % agarózový gel

Bylo rozvařeno 1,8 g agarózy ve 100 ml 0,5 x koncentrovaného TBE pufru.

- Interkalační barvivo Gold view (SBS Genetech, Čína)
- Nanášecí pufr (Top-Bio, Praha, ČR)

4.4 Přístroje a pomůcky

- Běžné laboratorní sklo a laboratorní pomůcky
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo.)
- Exikátor typ N 86 KN. 18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN)
- ECOTM Real-time PCR system (Illumina, USA)
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn, Německo)
- Magnetický separátor InvitrogenTM (Invitrogen Dyal AS, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Bipette (Labnet international, Inc., USA)
- Mikropipety Discovery HTL (Discover HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, ČR)
- Minicycler PTC-150 (MJ Research, Inc., Watertown, USA)
- NanoPhotometrTM (Implen, Německo)
- Rotor-Gene 6000 (Corbett, Austrálie)
- Termocycler PTC-200 (BIO-RAD, Lab., USA)
- Termostat- Mini incubator (Labnet international, Inc., USA)
- Transluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí Enduro Power supplies, model E0303 (Labnet international, Inc., USA)

5 Metody

Jednotlivé metody a postupy byly provedeny podle skript pro laboratorní cvičení Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biotechnologie [40].

5.1 Kultivace buněk

5.1.1 Kultivace buněk rodu *Lactobacillus* a kontrola čistoty bakteriální kultury

Čisté kultury, které byly zamražené v roztoku glycerolu při $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly rozmrazeny a poté naočkovány do tekutého MRS (de Mann, Rosoa, Sharp) média. Buňky byly kultivovány za aerobních podmínek při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin. Z tekutého média byly křížovým roztěrem zaočkovány bakteriální kultury na Petriho misky s pevným MRS médiem. Tyto kultury byly rovněž kultivovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin. Narostlé kolonie na pevném médiu byly poté využity k ověření čistoty dané bakteriální kultury. Bakteriální kultura v tekutém živném médiu byla použita pro izolaci celkové DNA pomocí fenolové extrakce.

5.1.2 Kultivace buněk rodu *Bifidobacterium*

Čisté kultury, které byly zamražené v roztoku glycerolu při $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly rozmrazeny a poté naočkovány do tekutého MRS média (de Mann, Rosoa, Sharp) s 0,05% cysteinem. Buňky byly kultivovány za anaerobních podmínek při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin. Bakteriální kultura byla použita pro izolaci celkové DNA pomocí fenolové extrakce.

5.1.3 Kultivace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1

Čisté kultury, které byly zamražené v roztoku glycerolu při $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly rozmrazeny a poté naočkovány do pivovarské sladiny. Buňky byly kultivovány submerzní kultivací za aerobních podmínek při $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. Kvasinková kultura byla použita pro izolaci celkové DNA pomocí fenolové extrakce.

5.2 Růstová křivka bakterií rodu *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900.

Čisté kultury bakterií rodu *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 byly zaočkovány do 50 ml tekutého MRS média 1 % inokulací. Buňky byly kultivovány za aerobních podmínek při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Optická hustota byla změřena poprvé po 9 hodinách a následně byla měřena každou hodinu, až do stacionární fáze růstu.

5.3 Izolace DNA z čistých kultur

5.3.1 Lyze buněk

V 1,5 ml Eppendorfových zkumavkách byl centrifugován 1 ml buněčné kultury při 15 000 ot/min po dobu 5 minut. Poté byl slit supernatant a sediment se nechal dobře okapat. Sediment byl rozsuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A. Vzniklá suspenze byla opět

centrifugována při 15 000 ot/min po dobu 5 minut. K sedimentu byl přidán lyzační roztok B. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. K suspenzi bylo přidáno 12,5 µl 20 % SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml). Vzorky byly poté inkubovány při 55 °C. Z tohoto tzv. hrubého lyzátu byla izolována DNA.

5.3.2 Fenolová extrakce DNA

K 500 µl hrubého lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu. Směs byla kývavým pohybem promíchávána podobu 4 minut. Směs byla centrifugována při 15 000 ot/min po dobu 5 minut. Pomocí špičky byla odebrána vodná fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky. Vodní fáze s DNA byla doplněna TE pufrem na objem přibližně 500 µl a poté bylo přidáno 700 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1). Směs byla opět kývavým pohybem promíchávána po dobu 5 minut. Horní fáze s DNA byla odpipetována do čisté Eppendorfovy zkumavky.

5.3.3 Srážení DNA ethanolem

Ke vzorku byla přidána 1/20 objemu 3 M octanu sodného. Poté byl přidán 1 ml ethanolu (96 %), který byl vychlazen na -20 °C. DNA byla srážena při -20 °C po dobu 60 minut. Směs byla centrifugována při 15 000 ot/min po dobu 15 minut. Poté byl opatrně odlit supernatant. Sediment byl promyt 70 % ethanolem a opět byla směs centrifugována při 15 000 ot/min po dobu 15 minut. Sediment DNA byl vysušen v exikátoru. DNA byla rozpuštěna ve 100 µl TE pufru a byla stanovena její čistota a koncentrace.

5.3.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistoty byla měřena na přístroji Nanodrop. Roztok vyizolované DNA v TE pufru byl nakápnut na speciální spektrofotometrickou kyvetu. Pomocí přístroje byla měřena absorbance v rozmezí vlnových délek 220-320 nm. Jako blank byl použit TE pufr. Po změření byla odečtena hodnota absorbance při 230, 260, 280 a 320 nm. Z poměru hodnot A_{260}/A_{280} byla zjištěna čistota vyizolované DNA a následně byla odečtena i její koncentrace.

5.4 Příprava reálných vzorků pro imunomagnetickou separaci

Homogenizace byla provedena pomocí BagSystemu. Sterilně bylo naváženého 10 g vzorku salámu. Toto množství bylo vloženo do sterilního sáčku s membránou BagFilter, ke kterému byl přidán 2,5x násobek sterilní vody (25 ml). BagFilter byl vložen do stomacheru a vzorek byl homogenizován 15 min za občasného promíchání. Z prostoru za membránou bylo pipetou odsáto 1,5 ml homogenizátu a ten byl stočen při 10 000 ot/3 min. Supernatant byl slit a k sedimentu bylo přidáno dalších 1,5 ml zhomogenizovaného salámu a vzorek byl stočen při 10 000 ot/3 min. Celkem tak bylo zpracováno 3 ml homogenizátu a buněk v něm. Supernatant byl opět slit a byl přidán 1 ml vody (promyti), který byl následně stočen 10 000 ot/3 min. Postup byl optimalizován v souběžné diplomové práci Bc. Romana Vašíčka.

5.5 Imunomagnetická separace

Imunomagnetická separace bakteriálních buněk (IMS) pomocí magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* nebo anti*Bifidobacterium* byla optimalizován

s čistými bakteriálními kulturami a následně použita pro izolaci bakteriálních buněk z reálného vzorku.

5.5.1 Optimalizace množství přidaných magnetických částic a doba inkubace

Byla provedena IMS s buňkami rodu *Lactobacillus casei* LOCK 0919. K 50 µl čisté kultury bylo přidáno 25, 50 a 100 µl 10x zředěné magnetické perlové celulózy s protilátkou anti*Lactobacillus*. Tato směs byla následně inkubována po dobu 10, 30, 60 a 120 minut. Magnetické částice s navázanými buňkami byly separovány pomocí magnetického separátoru. Částice byly dvakrát promyty 800 µl PBS pufru po dobu 5 minut za neustálého míchání. Po promytí byly částice rozsuspendovány v 50 µl PBS pufru a zlyzovány v termocycleru při 99 °C po dobu 10 minut. Hrubý lyzát byl použit jako DNA matrice pro PCR.

5.5.2 Optimalizace doby promývání magnetických částic

Byla provedena IMS s buňkami druhu *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900. Do směsi bylo přidáno 50 µl částic a 50 µl buněčné kultury. Částice byly po navázání buněk dvakrát promývány 800 µl PBS pufru po dobu 0, 1, 5, 10 a 15 minut. Následně byly částice rozsuspendovány v 50 µl PBS pufru a byly zlyzovány v termocycleru při 99 °C po dobu 10 minut. Hrubý lyzát byl použit jako DNA matrice pro PCR.

5.5.3 Přečištění DNA získané po imunomagnetické separaci pomocí magnetických částic P(GMA)

Z hrubého lyzátu buněk připravených IMS za použití magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* (5.5.4) byl odpipetován supernatant a sediment DNA byl přečištěn pomocí magnetických částic P(GMA) (2 mg/ml) v prostředí 16% PEG a 2 M NaCl.

Použitá separační směs měla následující složení: 5 M NaCl (400 µl), hrubý lyzát buněk (100 µl), 40 % PEG (400 µl), částice 2 mg/ml (100 µl). Připravená směs byla inkubována po dobu 10 minut a poté byly částice odseparovány na magnetickém separátoru (10 minut). Supernatant byl pomalu odpipetován. Poté byla DNA promyta 1ml 70 % EtOH. Částice byly znovu odseparovány a znovu promyty 70 % EtOH. Ethanol byl odpipetován a DNA byla eluována do 50 µl TE pufru. Částice byly znovu odseparovány a eluovaná DNA byla přepipetována do čisté zkumavky a byla změřena její koncentrace (5.3.4).

5.5.4 Optimalizovaný postup IMS

Na základě optimalizace výše uvedených postupů byl navržen následující proces IMS, který byl použit pro izolaci buněk z čistých kultur a reálných vzorků

5.5.4.1 IMS čistých bakteriálních kultur

Pomocí magnetické perlové celulózy, na kterou byla navázána protilátka anti*Lactobacillus* nebo anti*Bifidobacterium* byla provedena imunomagnetická separace buněk bakteriálními kmenů (4.1).

K 50 μ l narostlé bakteriální kultury, která měla $5,9 \cdot 10^8$ /ml buněk, bylo přidáno 50 μ l 10x zředěné perlové magnetické celulózy. Tato směs byla poté 60 minut inkubována při laboratorní teplotě při stálém promíchávání. Magnetické částice s navázanými buňkami byly separovány pomocí magnetického separátoru. Částice byly dvakrát promyty 800 μ l PBS pufru po dobu 5 minut za neustálého míchání (Obrázek 8) Následně byly částice rozsuspendovány v 50 μ l PBS pufru a poté zlyzovány v termocycleru při 99 °C po dobu 10 minut. Hrubý lyzát byl použit jako DNA matrice pro PCR.



Obrázek 8 – Promývání magnetických částic PBS puftrem

5.5.4.2 IMS z reálných vzorků salámů

K připravenému homogenizovanému reálnému vzorku (5.4) bylo přidáno 100 μ l 10x zředěné magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus*. Separační směs byla inkubována 120 minut při laboratorní teplotě při stálém promíchávání. Navázané buňky na magnetických částicích byly separovány pomocí magnetického separátoru. Částice byly dvakrát promyty 800 μ l PBS pufru po dobu 5 minut za neustálého míchání. Částice byly rozsuspendovány v 50 μ l PBS pufru a poté zlyzovány v termocycleru při 99 °C po dobu 10 minut. Hrubý lyzát byl použit jako DNA matrice pro PCR a qPCR-HRM.

5.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

5.6.1 Komponenty pro PCR směs

Veškeré komponenty byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Před použitím byly komponenty rozmrazeny a krátce stočeny na centrifuze. Seznam komponent do PCR směsi je následující:

- PCR voda
- PPP master mix (Top-Bio, 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva)

- qPCR 2x SYTO-9 master mix (Top-Bio, 150mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40mM (NH₄)₂SO₄, 5mM MgCl₂, 400μM dATP, 400μM dCTP, 400μM dGTP, 400μM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva)
- Oligonukleotidové primery
- DNA matrice

5.6.2 Použité oligonukleotidové primery v PCR

Byly použity primery specifické pro specifickou polymerázovou řetězovou reakci (Tabulka 2 – Tabulka 7).

Tabulka 2 – Primery specifické pro doménu *Bacteria*

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Zdroj
R_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	[41]
F_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		

Tabulka 3 - Primery specifické pro rod *Bifidobacterium*

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Zdroj
Pbi F1	CCG GAA TAG CTC C	914	[42]
Pbi R2	GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA		

Tabulka 4 – Primery specifické pro rod *Lactobacillus*, dle Duberneta

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Zdroj
LbLMA	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250	[43]
R-16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		

Tabulka 5 - Primery specifické pro rod *Lactobacillus*, dle Haarmanové

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Zdroj
F_alllact_IS	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92	[41]
R_alllact_IS	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT		

Tabulka 6 – Primery specifické pro celkové kvasinky

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Zdroj
Oli_F	CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC	152	[44]
Oli_R	ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC		

Tabulka 7 – Primery pro HRM specifické pro rod *Lactobacillus*

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Zdroj
P1V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC	90	[45]
P2V1	TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC		

5.6.3 Složení použitých PCR směsí

Směsi pro PCR byly připraveny pomocí komerčních Master Mixů, v případě konvenční PCR (Tabulka 8) byl použit PPP master mix (Top-Bio) a pro PCR v reálném čase (Tabulka 9) qPCR 2x SYTO-9 master mix (Top-Bio). Dle doporučení výrobce byla PCR směs doplněna odpovídajícím množstvím PCR vody, specifických primerů (5.6.2) a DNA matrice (v případě negativní kontroly PCR voda).

Tabulka 8 – Složení směsí pro konvenční PCR

Program	doména <i>Bacteria</i> [41]	rod <i>Lactobacillus</i> [41], [43], [46]	rod <i>Bifidobacterium</i> [42]	celkové kvasinky [44]
Komponenty	Objem [μl]	Objem [μl]	Objem [μl]	Objem [μl]
PCR voda	9,5/8,5	9,5/8,5	9,5/8,5	9,5/8,5
PPP Master Mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer 1	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 2	1,0	1,0	1,0	1,0
DNA matrice	1,0/2,0	1,0/2,0	1,0/2,0	1,0/2,0
Celkem	25	25	25	25

* 2,0 μl DNA matrice byly použity po IMS buněk

Tabulka 9 – Program pro qPCR-HRM

Program	rod <i>Lactobacillus</i> [45]
Komponenty	Objem [μl]
PCR voda	9,5/8,5
qPCR SYTO 9 Master Mix	12,5
Primer 1	1,0
Primer 2	1,0
DNA matrice	1,0/2,0
Celkem	25

* 2,0 μl DNA matrice byly použity po IMS buněk

5.6.4 Programy pro metodu PCR

PCR reakce byla provedena na cycleru pomocí požadovaného programu. Použité programy pro konvenční PCR jsou uvedeny v Tabulce 10 a pro PCR-HRM v Tabulce 11. Kroky 2 – 4 byly zopakovány 30x.

Tabulka 10 – Programy pro konvenční PCR

	doména <i>Bacteria</i> [41]	rod <i>Lactobacillus</i> [41], [43]	rod <i>Bifidobacterium</i> [42]	celkové kvasinky [44]
1. Denaturace DNA před prvním cyklem	95 °C / 5 min	95 °C / 5 min	94 °C / 5 min	94 °C / 5 min
2. Denaturace DNA	95 °C / 30 s	95 °C / 30 s	94 °C / 1 min	94 °C / 1 min
3. Hybridizace primerů	55 °C / 30 s	55 °C / 30 s	50 °C / 1 min	51 °C / 30 s
4. Syntéza vlákna DNA	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min	72 °C / 2 min	72 °C / 1 min
5. Dosyntetizování vlákna po posledním cyklu	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min

Tabulka 11 – Program pro HRM

	rod <i>Lactobacillus</i> [45]
1. Denaturace DNA před prvním cyklem	95 °C / 5 min
2. Denaturace DNA	95 °C / 30 s
3. Hybridizace primerů	53 °C / 30 s
4. Syntéza vlákna DNA	72 °C / 1 min
5. Dosyntetizování vlákna po posledním cyklu	72 °C / 5 min
6. Analýza křivek tání/HRM	95 °C / 15 s 55 °C / 15 s 95 °C / 15 s

5.6.4.1 Program pro lyzi bakteriálních buněk

Tabulka 12 – program pro lyzi bakteriálních buněk

1. Lyze bakteriálních buněk	99 °C / 15 min
-----------------------------	----------------

5.6.5 Gelová elektroforéza PCR produktů

Na laboratorních vahách bylo do Erlenmayerovy baňky (250 ml) naváženo 1,8 g agarózy pro elektroforézu a přidáno 100 ml 0,5 x koncentrovaného TBE pufru. Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě. Po ochlazení bylo přidáno interkalační fluorescenční barvivo Gold view (0,5 µl/10 ml). Po vychladnutí byl gel nalit do vany na elektroforézu. Po přibližně 30-ti minutách byl gel připraven pro gelovou elektroforézu. Gelová elektroforéza byla provedena při napětí 80 V po dobu dvou hodin.

5.6.6 Stanovení citlivosti použitých PCR metod

5.6.6.1 Citlivost PCR pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Za účelem stanovení citlivosti PCR byla připravena PCR směs (kapitola 5.6.3) s primery specifickými pro doménu *Bacteria* (Tabulka 2) a rod *Lactobacillus* (Tabulka 4).

Stanovení citlivosti PCR bylo provedeno s DNA *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900, která byla izolovaná metodou fenolové extrakce a jejíž koncentrace byla stanovena spektrofotometricky. Následně byla vyředěna na koncentraci 10 ng/µl až 1 fg/µl (desítkové ředění). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Lactobacillus gasseri* K7 (10 ng/µl).

Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel).

5.6.6.2 Citlivost PCR pro celkové kvasinky, rod *Bifidobacterium*

Za účelem stanovení citlivosti PCR byla připravena PCR směs (kapitola 5.6.3) s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* (Tabulka 3), celkové kvasinky (Tabulka 6).

Stanovení citlivosti PCR bylo provedeno s DNA *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T a *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1, která byla izolována metodou fenolové extrakce. Koncentrace byla stanovena spektrofotometricky a DNA byla vyředěna na koncentraci 10 ng/µl až 1 fg/µl (desítkové ředění) Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T a *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 (10 ng/µl).

Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel).

5.6.7 Ověření specifity vybraných PCR programů

5.6.7.1 PCR pro rod *Lactobacillus* s primery dle Haarmanové a Duberneta

Byla připravena PCR směs (5.6.3) s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* (Tabulka 4, Tabulka 5). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei* LOCK 0919 (10 ng/µl). Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel).

5.6.7.2 PCR pro rod *Bifidobacterium*

Byla připravena PCR směs (5.6.3) s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* (Tabulka 3). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Bifidobacterium breve* (10 ng/μl). Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel).

5.6.7.3 PCR pro celkové kvasinky

Byla připravena PCR směs (5.6.3) s primery specifickými pro celkové kvasinky (Tabulka 6). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 (10 ng/μl). Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel).

5.7 Provedení PCR a qPCR-HRM po imunomagnetické separaci

Bakteriální buňky z čistých bakteriálních kultur navázané na magnetických částicích byly lyzovány při 99 °C v termocykleru po dobu 10 minut. Následně byla provedena specifická PCR a amplifikované produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel).

Bakteriální buňky z reálných vzorků navázané na částicích magnetické perlové celulózy byly lyzovány při 99 °C v termocykleru po dobu 10 minut. Následně byla provedena qPCR a vysokorozlišovací analýza křivek tání ampliconů (5.6.3).

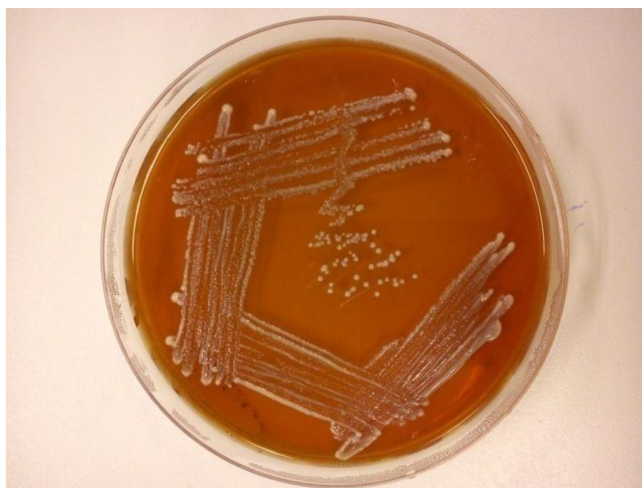
6 VÝSLEDKY

6.1 Mikrobiologické metody

Čistota použitých bakteriálních kultur byla ověřena metodou křížového roztěru. Stanovení počtu buněk používaných do imunomagnetické separace bylo provedeno pomocí růstové křivky buněk *Lactobacillus casei* LOCK 0919, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900.

6.1.1 Ověření čistoty použitých kultur pomocí křížového roztěru

Na Petriho misky s pevným MRS médiem byly nanešeny pomocí křížového roztěru bakteriální kultury (5.1.1) *Lactobacillus casei* LOCK 0919, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 Kultury byly kultivovány při 37 °C po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách byl pozorován nárůst jednotlivých kolonií (Obrázek 9, Obrázek 10, Obrázek 11). Ověření čistoty bylo provedeno u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1, kdy kultivace probíhala při 38 °C po dobu 24 hodin (snímek není uveden).



Obrázek 9 – Křížový roztěr *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a růst kolonií na MRS agaru



Obrázek 10 – Křížový roztěr *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 a růst kolonií na MRS agaru



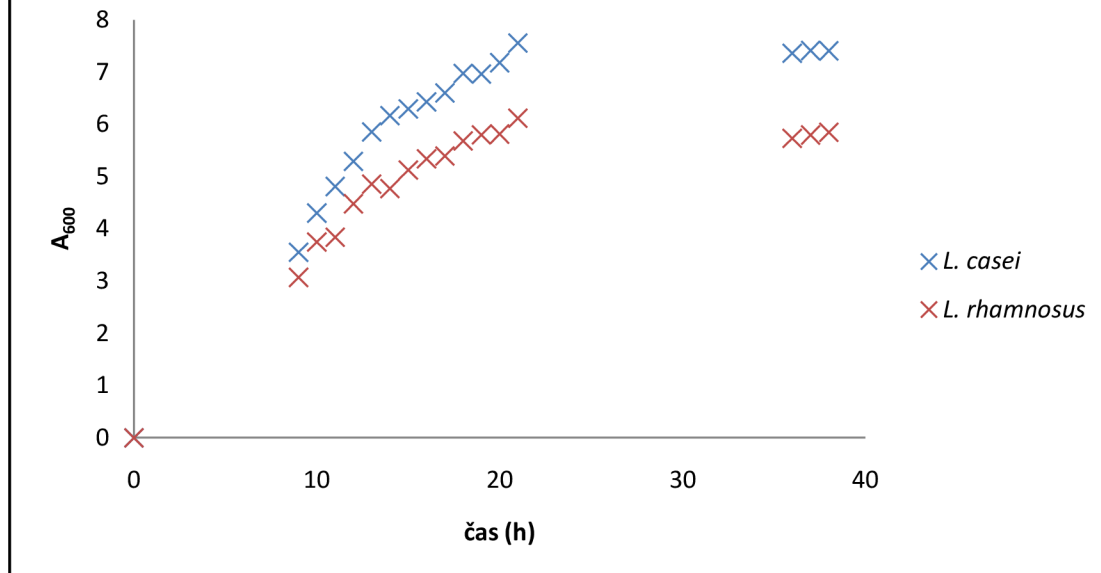
Obrázek 11 - Křížový roztěr *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 a růst kolonií na MRS agaru

- Křížovým roztěrem byla ověřena čistota bakteriálních kultur rodu *Lactobacillus* a kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1

6.1.2 Růstová křivka bakterií *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900.

Pomocí měřené optické hustoty během kultivace, byla experimentálně stanovena růstová křivka (Obrázek 12) bakteriálních buněk *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 (5.2).

Růstová křivka bakterií *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900.



čas [h]	A_{600}	
	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900
0	0	0
9	3,553	3,071
10	4,304	3,748
11	4,813	3,842
12	5,292	4,482
13	5,858	4,860
14	6,170	4,773
15	6,300	5,127
16	6,433	5,343
17	6,603	5,397
18	6,980	5,687
19	6,967	5,803
20	7,183	5,817
21	7,560	6,120
36	7,363	5,733
37	7,417	5,800
38	7,410	5,850

Obrázek 12 – Průběh růstové křivky bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus*

- Pomocí růstové křivky bylo stanoveno, že buňky dosahují stacionární fáze přibližně po 20 hodinách kultivace

6.2 Spektrofotometrické stanovení čistoty DNA

Koncentrace a čistota bakteriální DNA izolované ze sbírkových kultur metodou fenolové extrakce byla ověřena spektrofotometricky.

6.2.1 Bakteriální DNA rodu *Lactobacillus*

Čistota a koncentrace DNA byla změřena na Nanophotometru (5.3.4). Absorbance byla změřena u každého vzorku třikrát. V tabulce 13 jsou uvedeny průměrné hodnoty z těchto měření. Při izolaci DNA a měření koncentrace DNA byly provedeny 2 paralelní stanovení.

Tabulka 13 – Spektromotofetrické stanovení koncentrace izolované DNA

Vzorek	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	c (ng/μl)
<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	0,244	0,288	0,144	0,013	2,000	1,180	689
<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	0,183	0,286	0,144	0,012	1,986	1,563	684
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	0,108	0,232	0,114	0,005	2,035	2,148	571
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	0,161	0,295	0,143	0,005	2,063	1,832	726
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	0,111	0,197	0,101	0,008	1,950	1,775	473
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	0,123	0,249	0,117	0,006	2,128	2,024	568

- Vyizolovaná DNA z buněk uvedených v tabulce 15 měla koncentraci v rozmezí 473 – 726 ng/μl

6.2.2 Bakteriální DNA rodu *Bifidobacterium*

Čistota a koncentrace DNA byla změřena na Nanophotometru (5.3.4). Absorbance byla změřena u každého vzorku třikrát. V tabulce 14 jsou uvedeny průměrné hodnoty z těchto měření. Při izolaci DNA a měření koncentrace DNA byly provedeny 2 paralelní stanovení.

Tabulka 14 - Spektromotofetrické stanovení koncentrace izolované DNA

Vzorek	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	c (ng/μl)
<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990	0,138	0,298	0,152	0,003	1,961	2,159	148
<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990	0,090	0,182	0,093	0,001	2,022	1,957	91
<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 ^T	0,150	0,294	0,150	0,003	1,960	1,960	146
<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 ^T	0,159	0,245	0,130	0,001	1,884	1,541	123

- Vyizolovaná DNA z buněk uvedených v tabulce 16 měla koncentraci v rozmezí 91 - 148 ng/μl

6.2.3 DNA z kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1

Čistota a koncentrace DNA byla změřena na Nanophotometru (5.3.4). Absorbance byla změřena u každého vzorku třikrát. V tabulce 15 jsou uvedeny průměrné hodnoty z těchto měření. Při izolaci DNA a měření koncentrace DNA byly provedeny 4 paralelní stanovení.

Tabulka 15 - Spektromotofetrické stanovení koncentrace izolované DNA

Vzorek	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	c ^c (ng/μl)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	0,282	0,468	0,210	-0,006	2,229	1,659	210
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	0,076	0,287	0,128	-0,011	2,242	3,776	149
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	0,287	0,769	0,348	-0,009	2,210	2,679	389
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	0,130	0,394	0,174	-0,010	2,264	3,031	202

- Vyizolovaná DNA z buněk *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 měla koncentraci v rozmezí 149 – 389 ng/μl

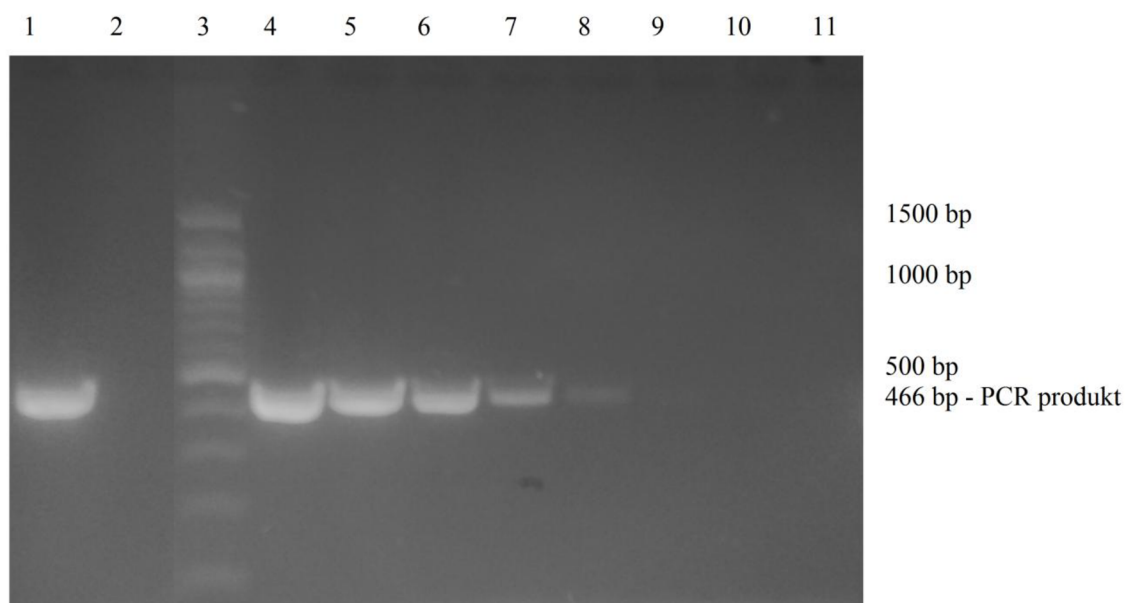
6.3 Stanovení citlivosti PCR

Za použití DNA v rozsahu o koncentraci 10 ng/μl až 1 fg/μl (desítkové ředění) bylo stanoveno nejnižší množství DNA, které se amplifikovalo v PCR. PCR produkty byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou.

6.3.1 Stanovení citlivosti PCR pro doménu *Bacteria*

Za použití DNA *Lactobacillus casei* LOCK 0919, která byla vyředěná desítkovým ředěním na koncentraci 10 ng/μl až 1 fg/μl, byla provedena PCR (5.6.5) specifická pro doménu *Bacteria*

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei* LOCK 0919 (10 ng/μl). Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 13).



Běh	DNA <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	Detekce PCR produktu
1	PK	+
2	NK	-
3	standard	100 bp
4	10 ng/μl	+
5	1 ng/μl	+
6	100 pg/μl	+
7	10 pg/μl	+
8	1 pg/μl	+
9	100 fg/μl	-
10	10 fg/μl	-
11	1 fg/μl	-

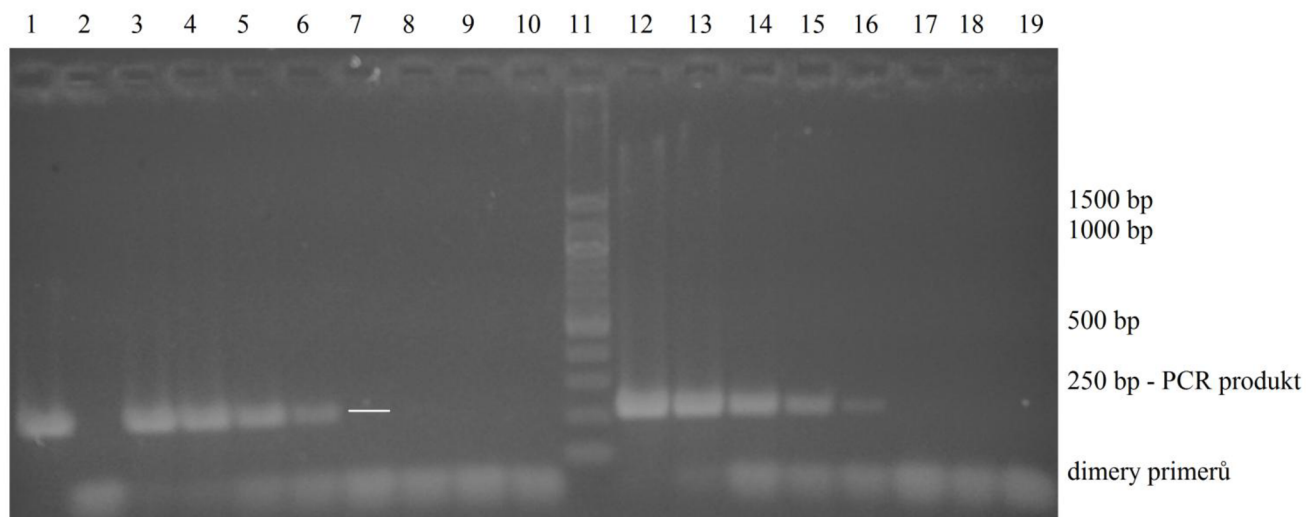
+ PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 13 - Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* [41]

- Nejnižší množství DNA, které se amplifikovalo při PCR specifické pro doménu *Bacteria* bylo 1 pg/μl.

6.3.2 Stanovení citlivosti PCR pro rod *Lactobacillus*

Za použití bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* v rozsahu 10 ng/μl až 1 fg/μl byla provedena PCR (5.6.5) specifická pro rod *Lactobacillus* [43]. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus gasseri* K7 (10 ng/μl). Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 14).



Běh	DNA <i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	Detekce PCR produktu	Běh	DNA <i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	Detekce PCR produktu
1	PK	+	11	Standard	100 bp
2	NK	-	12	10 ng/μl	+
3	10 ng/μl	+	13	1 ng/μl	+
4	1 ng/μl	+	14	100 pg/μl	+
5	100 pg/μl	+	15	10 pg/μl	+
6	10 pg/μl	+	16	1 pg/μl	+
7	1 pg/μl	+*	17	100 fg/μl	-
8	100 fg/μl	-	18	10 fg/μl	-
9	10 fg/μl	-	19	1 fg/μl	-
10	1 fg/μl	-			

+ PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován

* V běhu č. 9 byl na agarózovém gelu detekovaný slabý PCR produkt, který byl na obrázku zvýrazněn.

Obrázek 14 - Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [43]

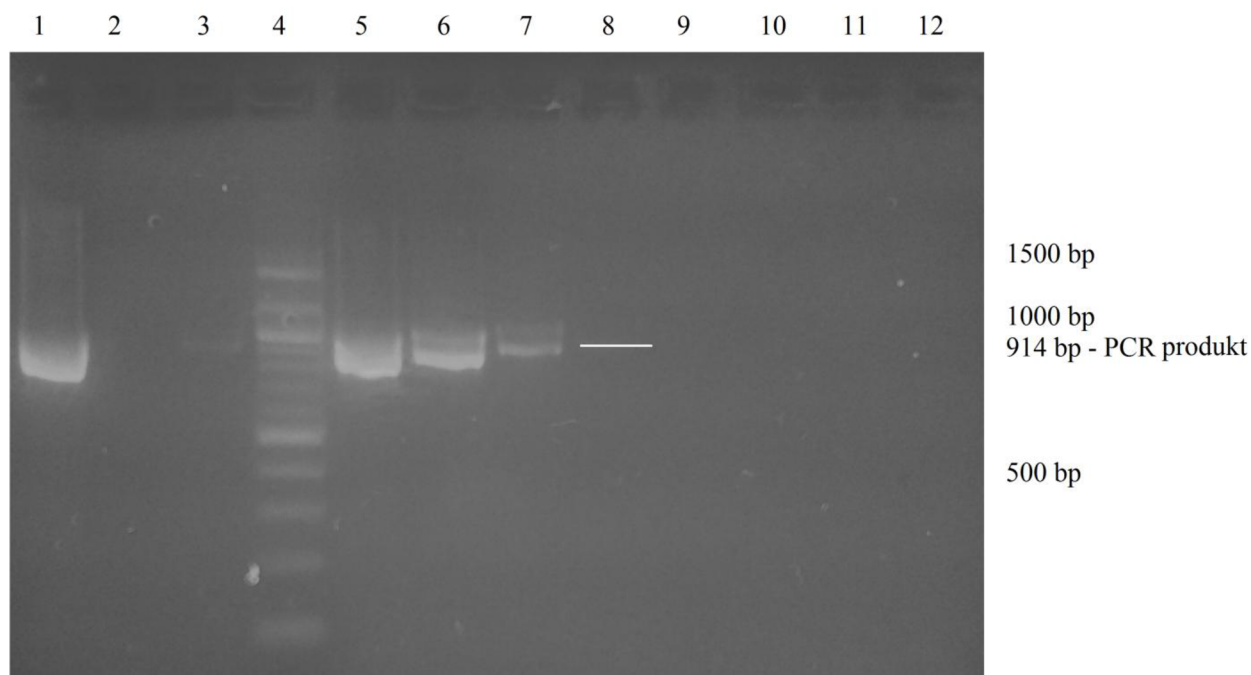
- Nejnižší množství DNA, které se amplifikovalo při PCR specifické rod *Lactobacillus* bylo 1 pg/μl.

6.3.3 Stanovení citlivosti PCR specifické pro rod *Bifidobacterium*

Bakteriální DNA v rozmezí koncentrací 10 ng/μl až 1 fg/μl, která byla izolována metodou fenolové extrakce z bakteriální kultury *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T, byla použita jako DNA matrice pro stanovení citlivosti PCR pro rod *Bifidobacterium* [42].

Byla provedena PCR (5.6.6.2) specifická pro rod *Bifidobacterium*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Bifidobacterium breve* (10 ng/μl).

Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 15).



Běh	DNA <i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 ^T	Detekce PCR produktu
1	PK	+
2	NK	-
3	TE pufr	-
4	standard	100 bp
5	10 ng/μl	+
6	1 ng/μl	+
7	100 pg/μl	+
8	10 pg/μl	+*
9	1 pg/μl	-
10	100 fg/μl	-
11	10 fg/μl	-
12	1 fg/μl	-

+ PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován

* V běhu č. 8 byl na agarózovém gelu detekovaný slabý PCR produkt, který byl na obrázku zvýrazněn.

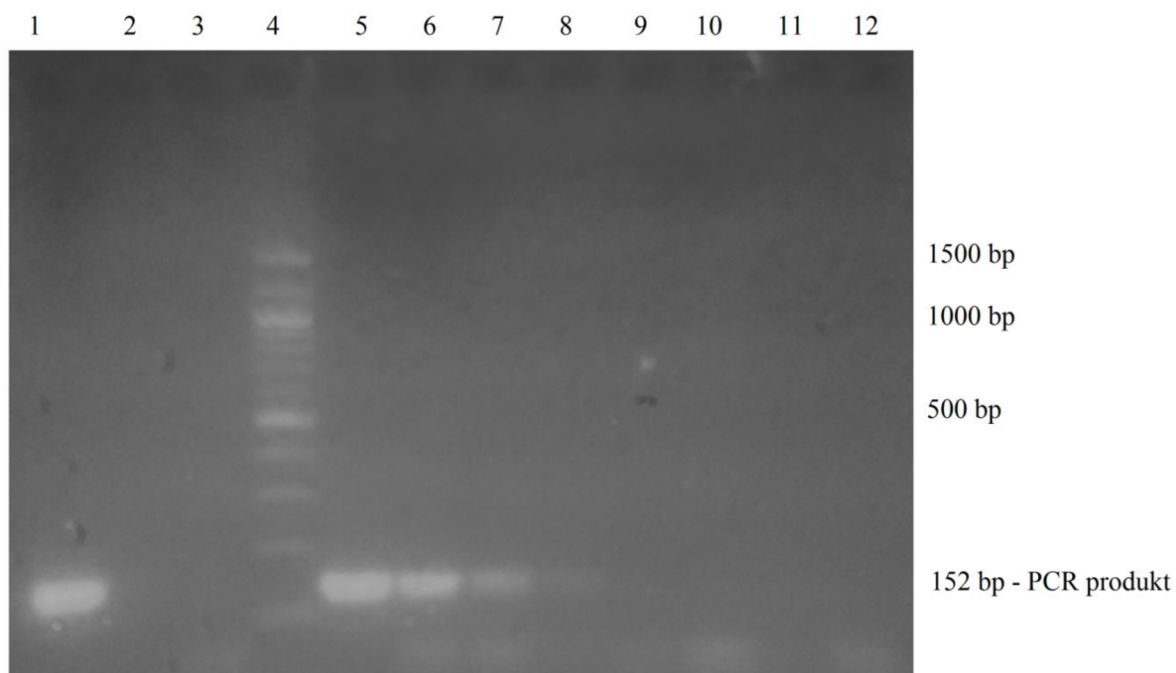
Obrázek 15 - Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* [42]

- Nejnižší množství DNA, které se amplifikovalo při PCR specifické pro rod *Bifidobacterium* bylo 10 pg/μl.

6.3.4 Stanovení citlivosti PCR pro celkové kvasinky

Bylo provedeno stanovení citlivosti PCR (5.6.6.2) specifické pro celkové kvasinky [44] za použití DNA *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 izolované metodou fenolové extrakce v rozmezí koncentrace 10 ng/μl až 1 fg/μl.

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 (10 ng/μl). Produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 16).



Běh	DNA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	Detekce PCR produktu
1	PK	+
2	NK	-
3	TE pufir	-
4	standard	100 bp
5	10 ng/μl	+
6	1 ng/μl	+
7	100 pg/μl	+
8	10 pg/μl	+
9	1 pg/μl	-
10	100 fg/μl	-
11	10 fg/μl	-
12	1 fg/μl	-

+ PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 16 - Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů s primery specifickými pro celkové kvasinky [44]

- Nejnižší množství DNA, které se amplifikovalo při PCR specifické pro celkové kvasinky, bylo 10 pg/μl.

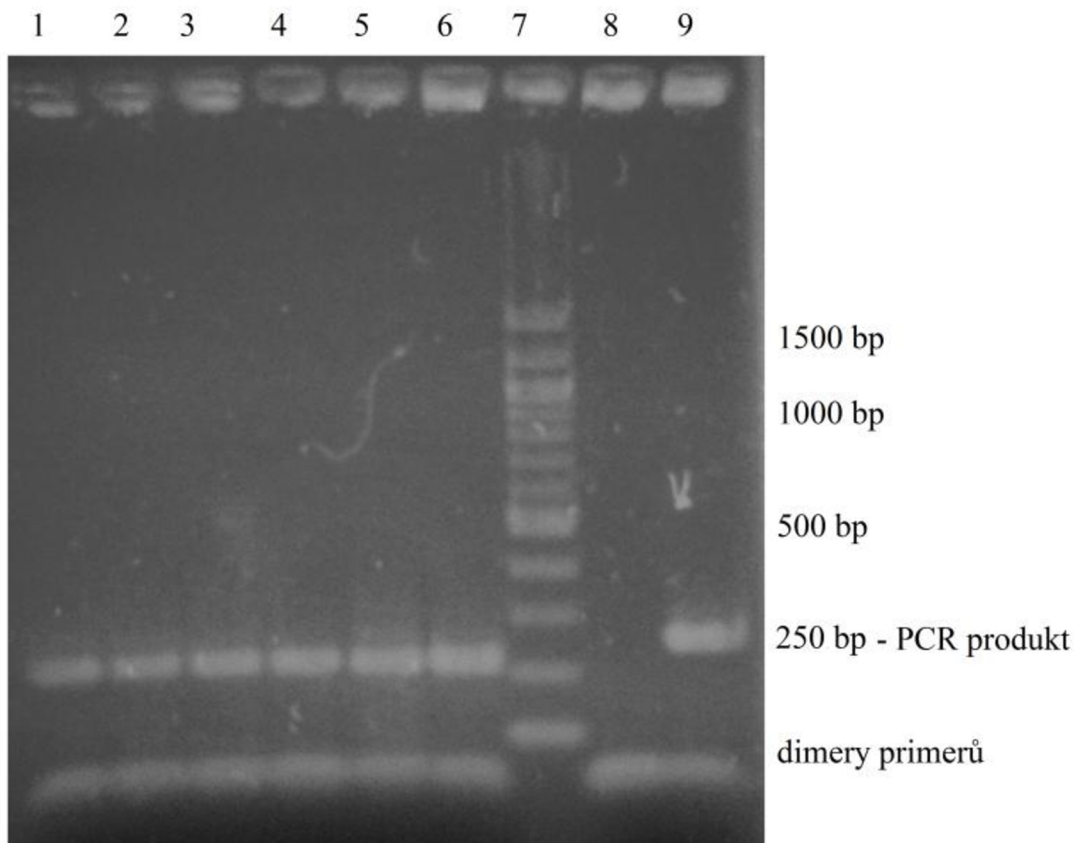
6.4 Ověření rodové specifity testovaných bakteriálních kmenů *Lactobacillus* pomocí PCR

Vyizolovaná DNA bakterií rodu *Lactobacillus* pomocí metody fenolové extrakce byla použita jako DNA matrice do PCR směsi (5.6.7), která byla specifická pro rod *Lactobacillus* [43]. Takto byla ověřena rodová specifita jednotlivých kmenů.

6.4.1 PCR specifická pro rod *Lactobacillus* s primery dle Duberneta

Pro určení rodové specifity buněk rodu *Lactobacillus* byla provedena PCR specifická pro rod *Lactobacillus* [43] s primery dle Duberneta (5.6.7) s DNA bakterií rodu *Lactobacillus casei* LOCK 0919, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900. Koncentrace použité DNA byla 10 ng/μl.

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus gasseri* K7 (10 ng/μl). Specifické PCR produkty o velikosti 250 bp byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 17).



Běh	DNA	Detekce PCR produktu
1	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
2	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	+
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	+
5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	+
6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	+
7	Standard	100 bp
8	NK	-
9	PK	+

+ PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 17 - Agarózová gelová elektroforéza (1,8 % agarózový gel) PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* [43]

- Ze všech DNA byly amplifikovány PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus*
- Ve všech vzorcích byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA *Lactobacillus*

6.5 Imunomagnetická separace buněk

Magnetická perlová celulóza s navázanými protilátkami anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium* byla využita pro separaci buněk bakterií mléčného kvašení a kvasinek z čistých kultur i reálných vzorků. Tato metoda byla nejprve optimalizována a následně využita v dalších experimentech.

6.5.1 Optimalizace metody imunomagnetické separace

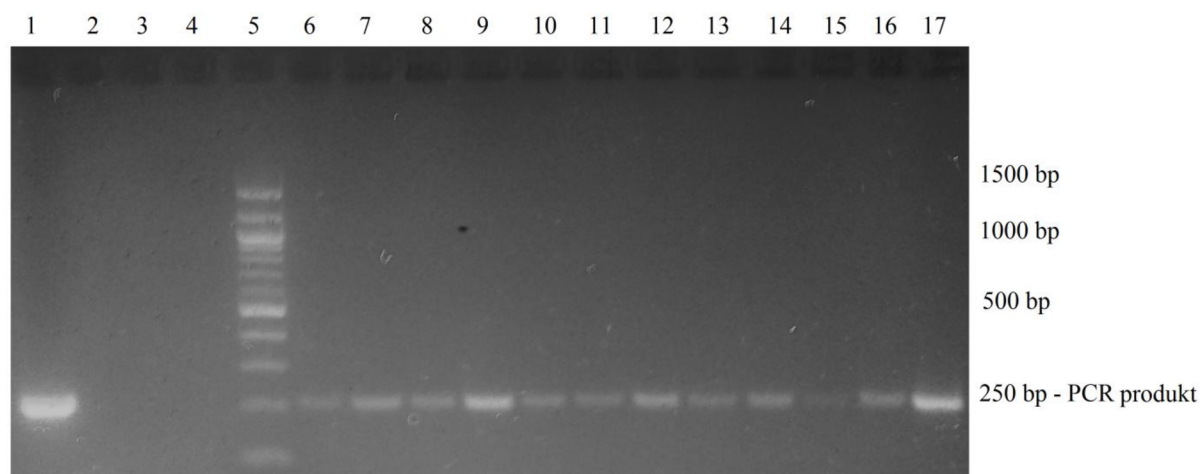
Byla provedena optimalizace podmínek separace bakteriálních buněk pomocí částic magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium*. Pozornost byla věnována zejména množství částic magnetické perlové celulózy v separační směsi, době inkubace magnetických částic s cílovými buňkami a době promývání magnetické perlové celulózy po navázání buněk nutné k odstranění separační směsi.

Výsevem magnetických částic perlové celulózy s navázanými buňkami na pevné MRS médium byla ověřena účinnost separace. Případný negativní vliv přítomnosti částic magnetické perlové celulózy na průběh PCR amplifikace byl sledován vložím dalšího separačního kroku (přečištěním hrubých lyzátů směsi buněk a částic perlové celulózy magnetickými částicemi P(GMA) do navrženého postupu).

6.5.1.1 Optimalizace množství přidaných částic magnetické perlové celulózy a doba inkubace

Byla provedena optimalizace množství částic magnetické perlové celulózy do separační směsi a doba inkubace magnetických částic s buněčnou kulturou (5.5.1). Po IMS byla provedena PCR pro rod *Lactobacillus* (5.6.7) s primery dle Duberneta [43].

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei* LOCK 0919 (10 ng/μl). Specifické PCR produkty o velikosti 250 bp byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 19).



Běh	Množství částic [μl]	Doba inkubace [minuty]	DNA	Detekce PCR produktu
1	-	-	PK	+++
2	-	-	NK	-
3	-	-	PBS pufr	-
4	-	-	magnetické částice	-
5	-	-	standard	100 bp
6	25	10	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
7	50	10	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++
8	100	10	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
9	25	30	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++
10	50	30	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
11	100	30	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
12	25	60	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++
13	50	60	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
14	100	60	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++
15	25	120	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
16	50	120	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++
17	100	120	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+++

+ PCR produkt byl slabě detekován; ++ PCR produkt byl zřetelně detekován; +++ PCR produkt byl silně detekován; - PCR produkt nebyl detekován

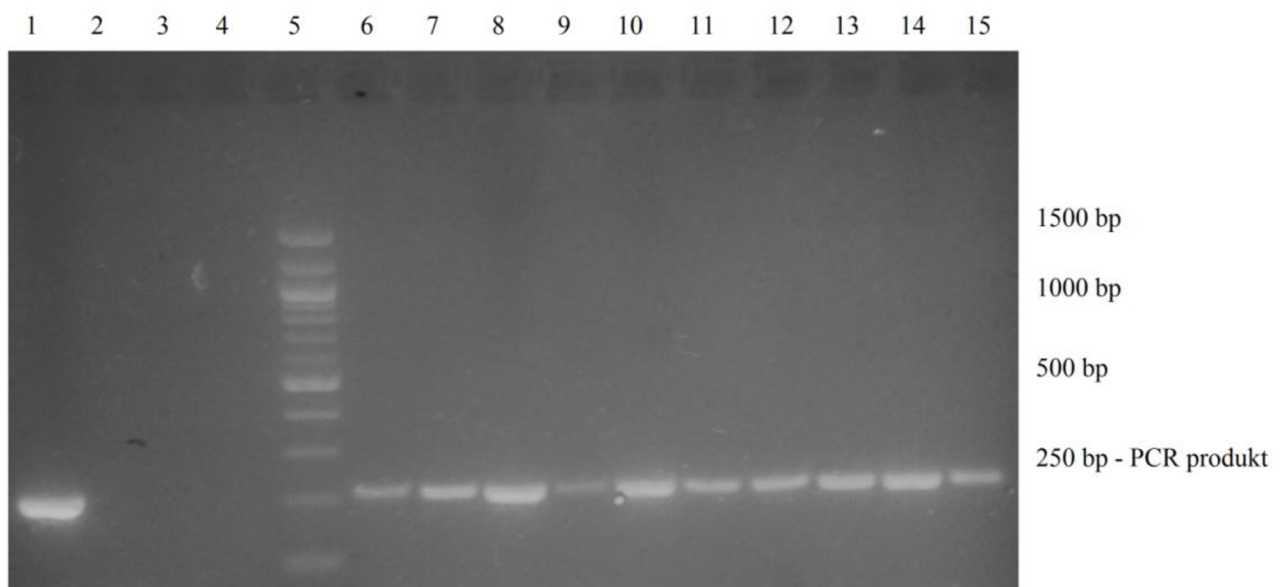
Obrázek 19 – Agarózová gelová elektroforéza (1,8 % agarózový gel) s PCR produkty specifickými pro rod *Lactobacillus* [43] po optimalizaci množství částic magnetické perlové celulózy v separační směsi a době inkubace

- U všech kombinací množství částic magnetické perlové celulózy a doby inkubace byly amplifikovány specifické PCR produkty.
- Nejméně intenzivní specifický PCR produkt byl amplifikován u kombinace 25 μ l mag. částic/inkubace 10 minut. Naopak nejintenzivnější specifický PCR produkt byl amplifikován u kombinace 100 μ l mag. částic/inkubace 120 minut.

6.5.1.2 Optimalizace doby promývání magnetických částic

Za účelem optimalizace postupu specifické izolace bakteriálních buněk byla provedena optimalizace doby promývání částic magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* (5.5.2) po navázání cílových buněk.

Následně byla provedena PCR pro rod *Lactobacillus* (5.6.7) s primery dle Duberneta [43]. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei* LOCK 0919 (10 ng/ μ l). PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 20).



Běh	Doba promývání [minuty]	DNA	Detekce PCR produktu
1	-	PK	+
2	-	NK	-
3	-	PBS pufr	-
4	-	mag. částice	-
5	-	standard	100 bp
6	0	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++
7	1	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++
8	5	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+++
9	10	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++
10	15	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+++
11	0	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	++
12	1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	++
13	5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	+++
14	10	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	+++
15	15	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	++

+ PCR produkt byl slabě detekován; ++ PCR produkt byl zřetelně detekován; +++ PCR produkt byl silně detekován; - PCR produkt nebyl detekován

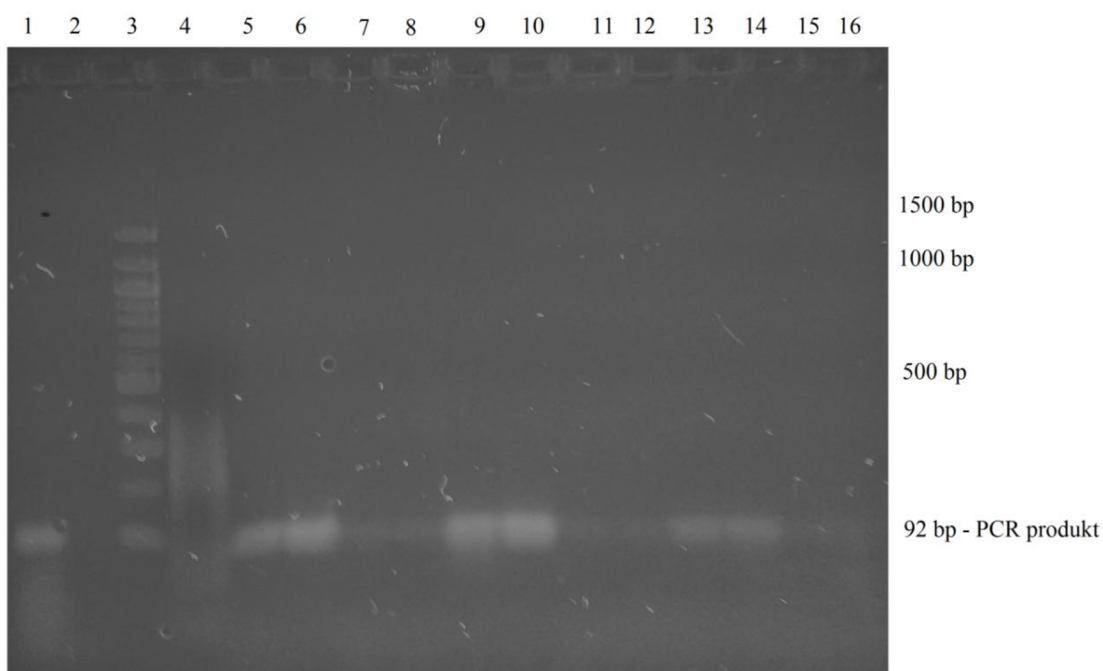
Obrázek 20 - Agarózová gelová elektroforéza (1,8 % agarózový gel) s PCR produkty specifickými pro rod *Lactobacillus* dle Duberneta [43] po optimalizaci doby promývání částic magnetické perlové celulózy po separaci cílových buněk

- Specifické produkty PCR byly detekovány pro všechny testované doby promývání částic a nebyla zjištěna závislost na době promývání

6.5.1.3 PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* s přečištěnou DNA po IMS pomocí magnetických částic P(GMA)

Po specifické separaci bakteriálních buněk *Lactobacillus* pomocí částic magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou *antiLactobacillus* byly buňky navázané na částicích lyzovány povařením. Připravený lyzát buněk ve směsi s částicemi perlové celulózy byl přečištěn pomocí magnetických částic P(GMA) (5.5.3).

Získaná DNA byla použita jako DNA matrice do PCR (5.6.7) s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* dle Haarmanové [41]. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA rodu *Lactobacillus casei* LOCK 0919 (10 ng/μl). Produkty PCR o velikosti 92 bp specifické pro rod *Lactobacillus* byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 21).



Běh	DNA	Detekce PCR produktu	Běh	DNA	Detekce PCR produktu
1	PK	++	9	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	++
2	NK	-	10	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	++
3	Standard	100 bp	11	přečištěná DNA <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	+
4	Standard 2	20 bp	12	přečištěná DNA <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	+
5	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++	13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	++
6	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	++	14	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	++
7	přečištěná DNA <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+	15	přečištěná DNA <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	+
8	přečištěná DNA <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+	16	přečištěná DNA <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	+

+ PCR produkt byl slabě detekován; ++ PCR produkt byl zřetelně detekován; - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 21 - Agarózová gelová elektroforéza produktů specifických pro rod *Lactobacillus* [41] připravených z DNA získané přečištěním hrubých lyzátů buněk po IMS použitím magnetických částic P(GMA)

- Specifické PCR produkty byly detekovány po amplifikaci všech DNA v různé intenzitě.
- U DNA, která byla přečištěná magnetickými částicemi P(GMA), byly detekovány PCR produkty slabší intenzity než u nepřečištěné DNA.

6.5.2 Imunomagnetická separace buněk.

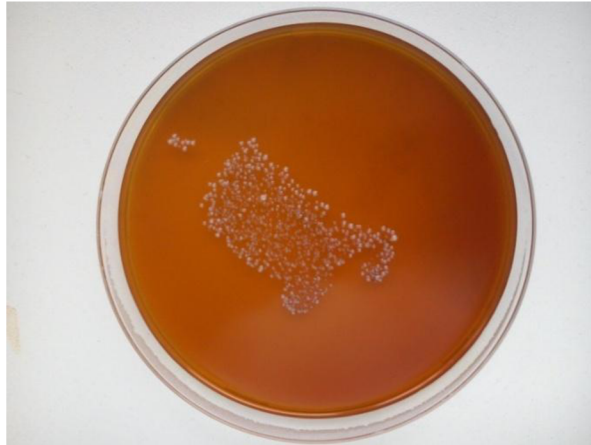
Byla ověřena účinnost a specifita separace částicemi magnetické perlové celulózy s navázanými protilátkami anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium* buněk čistých bakteriálních a kvasinkových kultur.

6.5.2.1 Ověření separace bakterií rodu *Lactobacillus* výsevem na pevné MRS médium

Účinnost imunomagnetické separace (buněk z čistých bakteriálních kultur *Lactobacillus casei* LOCK 0919, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 pomocí částic magnetické celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* byla ověřena mikrobiologicky, výsevem částic po separaci buněk na pevné MRS médium (Obrázek 22- 24)



Obrázek 22 – Výsev magnetických částic po separaci bakteriálních buněk *Lactobacillus casei* LOCK 0919



Obrázek 23 - Výsev magnetických částic po separaci bakteriálních buněk *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900



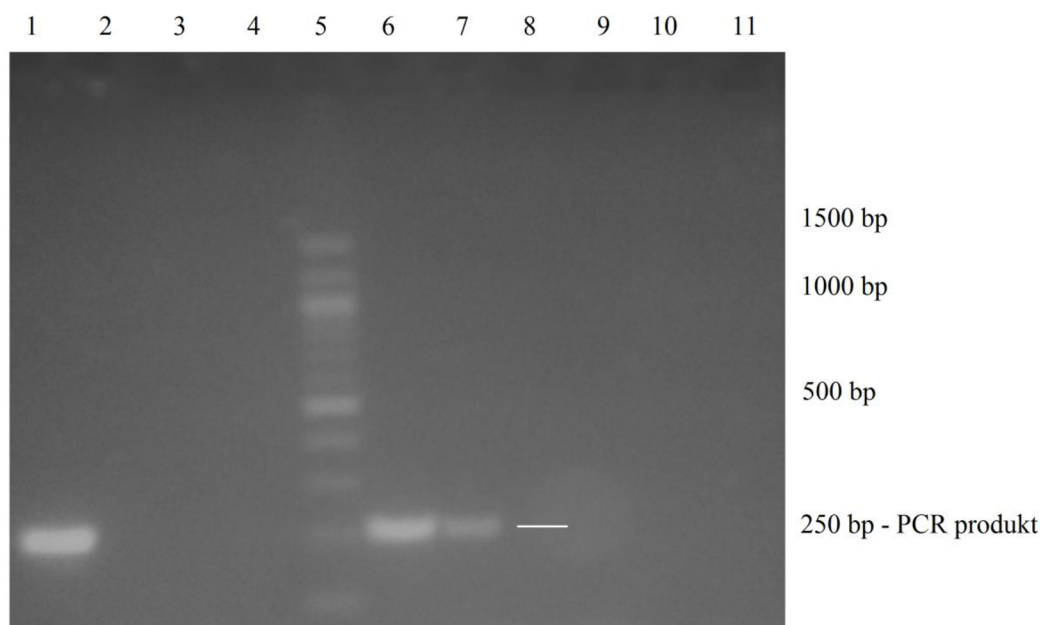
Obrázek 24 - Výsev magnetických částic po separaci bakteriálních buněk *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908

- Výsevem částic magnetické perlové celulózy na pevné MRS médium byla prokázána separace buněk. Na všech testovaných miskách byly detekovány narostlé kolonie.

6.5.2.2 Citlivost imunomagnetické separace s buňkami *Lactobacillus casei* LOCK 0919

Částice s naváznými buňkami *Lactobacillus casei* LOCK 0919 po IMS s různým počtem vstupních buněk (desítkové ředění) byly použity jako DNA matrice v PCR specifické pro rod *Lactobacillus* [43] (5.6.3).

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei* LOCK 0919 (10 ng/μl). Specifické produkty PCR o velikosti 250 bp byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 25).



Běh	Počet buněk	DNA	Detekce PCR produktu
1	-	PK	+
2	-	NK	-
3	-	PBS pufr	-
4	-	mag. částice	-
5	-	standard	100 bp
6	10^8	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
7	10^7	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+
8	10^6	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	+*
9	10^4	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	-
10	10^2	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	-
11	10^0	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	-

+ PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován

* V běhu č. 8 byl na agarózovém gelu detekovaný slabý PCR produkt, který byl na obrázku zvýrazněn.

Obrázek 25 - Agarózová gelová elektroforéza s produkty specifickými pro rod *Lactobacillus* [43] s DNA získanou z navázaných buněk na částicích magnetické perlové celulózy.

- Nejnižší množství použitých buněk do imunomagnetické separace s částicemi magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus*, které bylo pomocí PCR detekováno, bylo 10^7 buněk.

6.5.3 IMS za využití magnetické perlové celulózy z čistých kultur

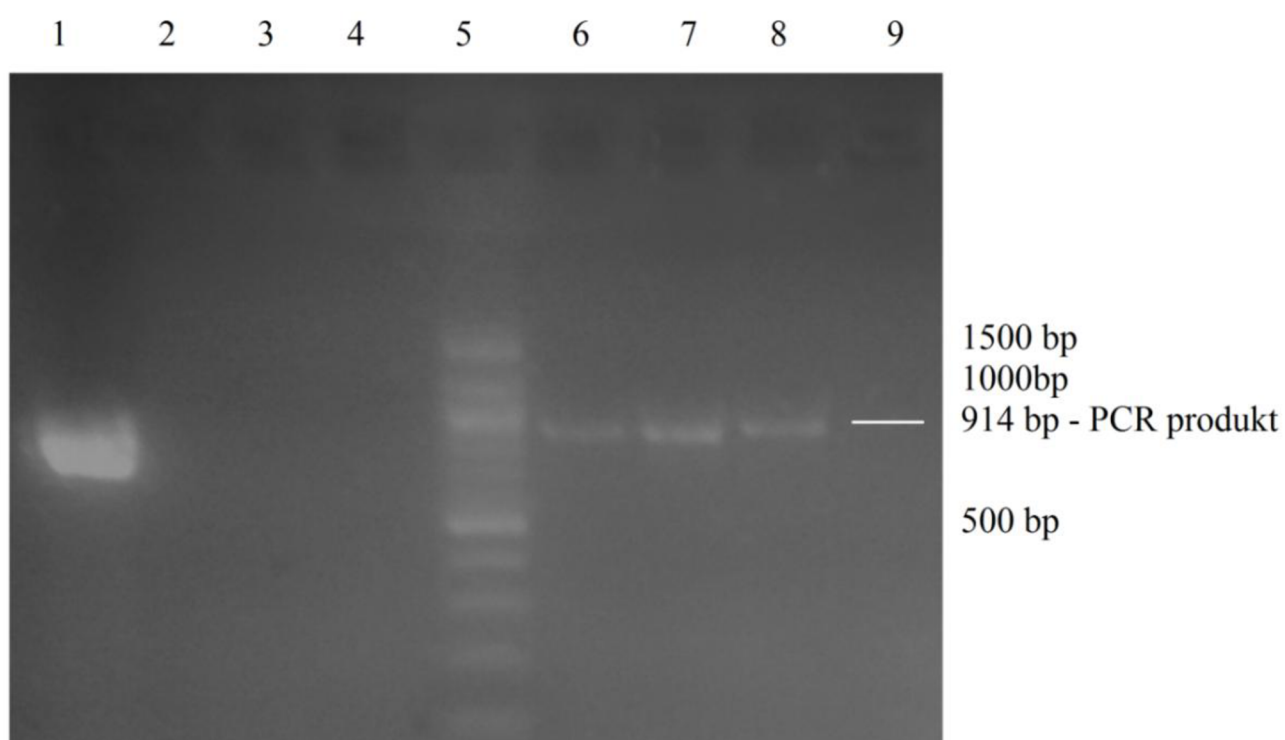
Navrženým postupem IMS pomocí částic magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium* byla ověřena specifita a účinnost

navázaných protilátek. Pro separaci byly použity čisté bakteriální kultury a kvasinková kultura.

6.5.3.1 IMS buněk *Bifidobacterium longum* CCM 4990

IMS buněk *Bifidobacterium longum* CCM 4990 pomocí částic magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium* byla provedena dle navrženého postupu uvedeného v kapitole 5.5.4. Účinnost izolace bakteriálních buněk byla ověřena metodou PCR (5.6.7.3) s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* [42].

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T (10 ng/μl). Specifické produkty PCR o velikosti 914 bp byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 26).



Běh	Magnetické částice	DNA	Detekce PCR produktu
1	-	PK	+
2	-	NK	-
3	anti <i>Lactobacillus</i>	magnetické částice	-
4	anti <i>Bifidobacterium</i>	magnetické částice	-
5	-	standard	100 bp
6	anti <i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990	+
7	anti <i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990	+
8	anti <i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990	+
9	anti <i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990	+*

+ PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován

* V běhu č. 9 byl na agarózovém gelu detekován slabý PCR produkt, který byl na obrázku zvýrazněn.

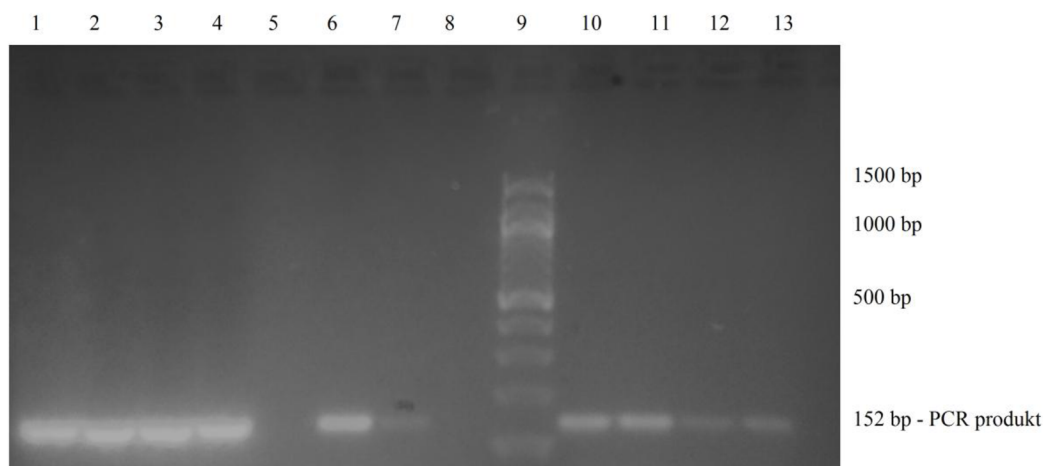
Obrázek 26 - Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* [42] po IMS buněk rodu *Bifidobacterium longum* CCM 4990 izolovaných částicemi anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium*

- Po IMS buněk *Bifidobacterium longum* CCM 4990 byly specifické PCR produkty detekovány u vzorků získaných izolací oběma typy částic (anti*Lactobacillus* i anti*Bifidobacterium*).

6.5.3.2 IMS kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1

IMS buněk *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 s částicemi magnetické perlové celulózy s navázanými protilátkami anti*Bifidobacterium* a anti*Lactobacillus* byla provedena dle optimalizovaného postupu v kapitole 5.5.4. Byla provedena PCR s primery specifickými pro kvasinky [44] (5.6.7.3).

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 (10 ng/μl). Specifické produkty PCR o velikosti 152 bp byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 27).



Běh	Magnetické částice	DNA	Detekce PCR produktu
1	-	PK 1	+++
2	-	PK 2	+++
3	-	PK 3	+++
4	-	PK 4	+++
5	-	NK	-
6	anti <i>Lactobacillus</i>	mag. částice	++
7	anti <i>Bifidobacterium</i>	mag. částice	+
8	-	PBS pufr	-
9	-	standard	100 bp
10	anti <i>Lactobacillus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	++
11	anti <i>Lactobacillus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	++
12	anti <i>Bifidobacterium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	+
13	anti <i>Bifidobacterium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21-48-1	+

+ PCR produkt slabě byl detekován; ++ PCR produkt byl zřetelně detekován; +++ PCR produkt byl silně detekován; - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 27 – Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR pro celkové kvasinky [44] s DNA získanou po IMS buněk *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1

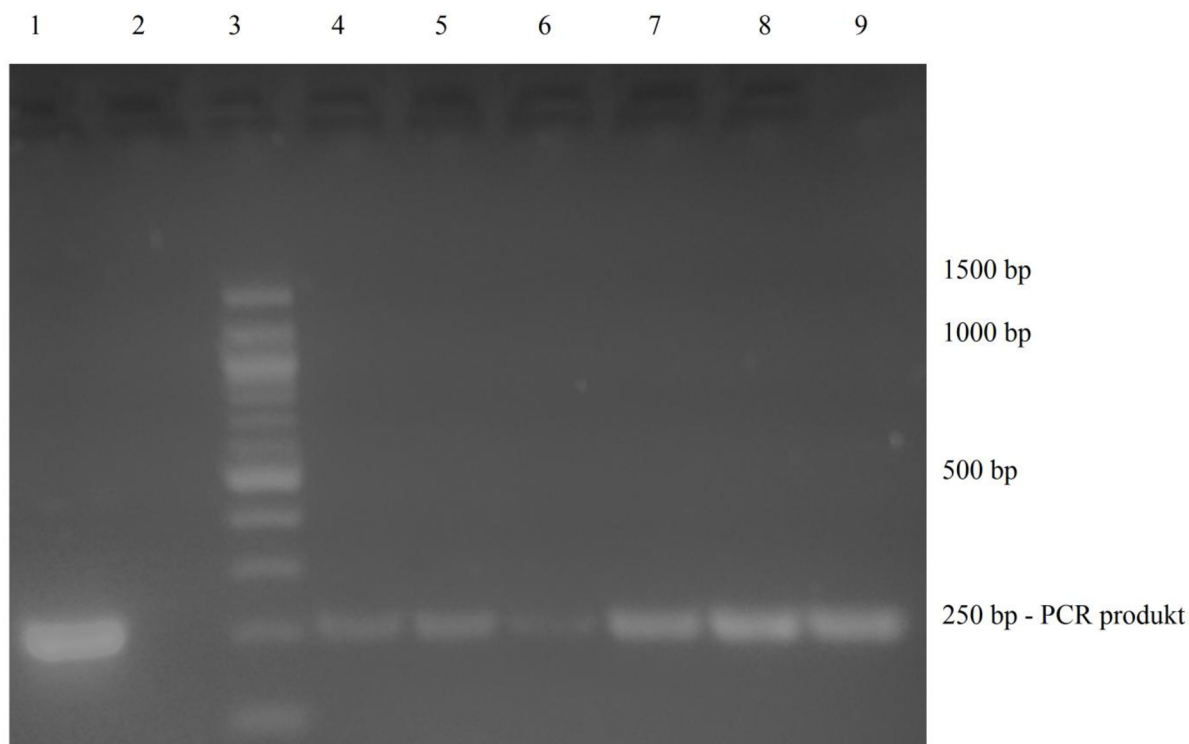
- Po IMS buněk *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 pomocí částic magnetické perlové celulózy s navázanými protilátkami anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium* byly detekovány PCR produkty po amplifikaci všech vzorků i u samotných magnetických částic, které byly použity jako DNA matrice.

6.5.4 IMS bakteriálních buněk z komplexního vzorku potravin

Částice magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* byly použity pro separaci buněk z komplexního vzorku potravin – Salám Orlik a Ovčácká klobása.

Částice byly použity jako DNA matrice v PCR specifické pro rod *Lactobacillus* (5.6.7) s primery dle Duberneta [43].

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei* LOCK 0919 (10 ng/μl). Specifické produkty PCR o velikosti 250 bp byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (1,8 % agarózový gel) (Obrázek 28).



Běh	DNA	Detekce PCR produktu
1	PK	+++
2	NK	-
3	standard	100 bp
4	Salám Orlík 1	+
5	Salám Orlík 2	+
6	Salám Orlík 3	+
7	Ovčácká klobása 1	+++
8	Ovčácká klobása 2	+++
9	Ovčácká klobása 3	+++

+ PCR produkt slabě byl detekován; +++ PCR produkt byl silně detekován; - PCR produkt nebyl detekován

Obrázek 28 – Agarózová gelová elektroforéza specifických PCR produktů po IMS buněk z reálných vzorků s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [43].

- Po imunomagnetické separaci buněk z reálných vzorků pomocí částic magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* a následné PCR s primery

specifickými pro rod *Lactobacillus* [43] byly po amplifikaci všech vzorků detekovány specifické PCR produkty.

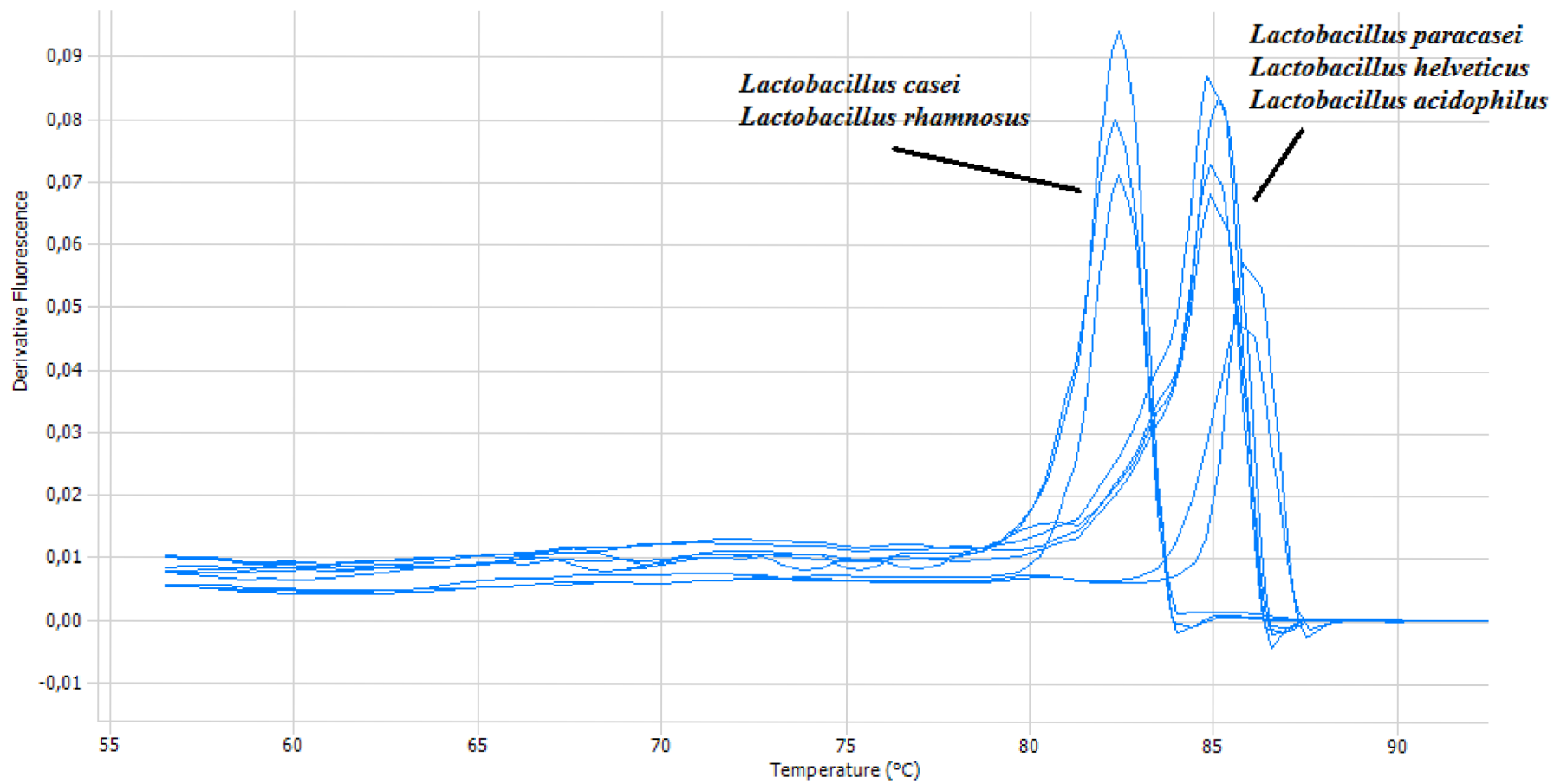
6.5.4.1 Vysokorozlišovací analýza křivek tání se specifickými PCR produkty pro rod *Lactobacillus*

Byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání se specifickými PCR produkty pro rod *Lactobacillus* [45]. Jako DNA matrice byla použita DNA sbírkových kmenů rodu *Lactobacillus*. Výsledky vysokorozlišovací analýzy křivek tání jsou uvedeny na obrázku 29 a v tabulce 16.

Tabulka 16 – Hodnoty T_m specifických PCR produktů pro rod *Lactobacillus*

Vzorek	Teplota tání [°C]
<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	82,4
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	82,2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908	82,3
<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 211/06	85,1
<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	85,0
<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 213/06	85,0
<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 216/06	85,0
<i>Lactobacillus helveticus</i> NCC 714	85,8
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T	86,0

- Pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání PCR produktů s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [45] bylo ověřeno, že lze rozlišit některé bakteriální druhy *Lactobacillus*.



Obrázek 29 – Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [45]

6.5.4.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání amplikonů získaných po IMS-PCR z komplexního vzorku potravin

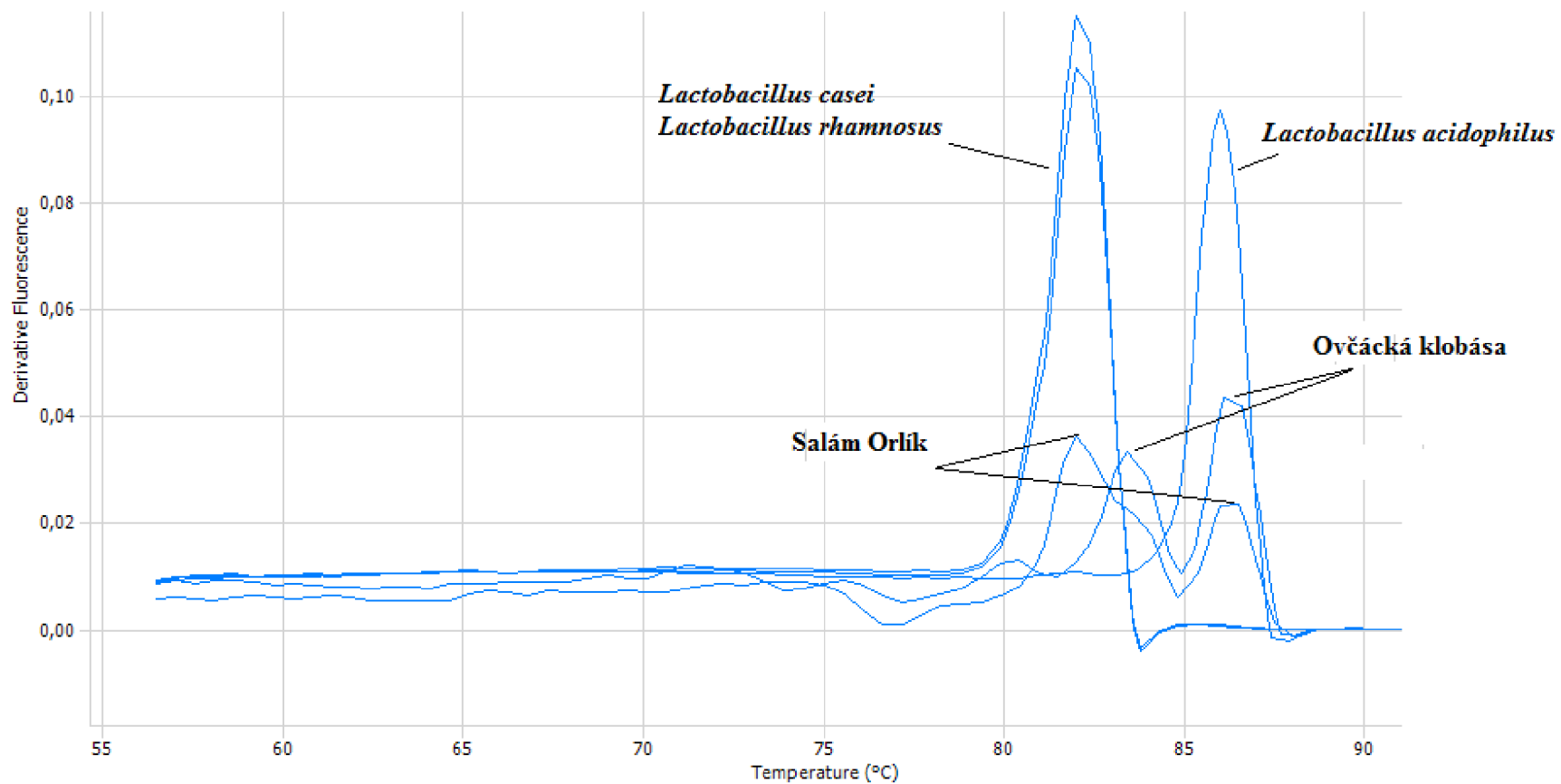
Částice s naváznými buňkami z reálných vzorků (5.4) byly použity jako DNA matrice v qPCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [45] a následné HRM.

Jako referenční vzorky byly použity DNA rodu *Lactobacillus casei* LOCK 0919, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 a *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T. Výsledky analýzy křivek tání jsou uvedeny na obrázku 30 a v tabulce 17.

Tabulka 17 – Hodnoty T_m produktů PCR rodu *Lactobacillus*

Vzorek	Teplota tání 1 [°C]	Teplota tání 2 [°C]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T	86,0	-
<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919	82,1	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900	82,0	
Salám Orlík	86,3	83,5
Ovčácká klobása	82,1	86,3

- Pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání lze určit, že teplota tání PCR produktů výrobku Ovčácká klobása se shoduje s teplotou tání produktu PCR druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* a *rhamnosus*. Teplota tání PCR produktů Salámu Orlík se shoduje s teplotou tání DNA produktu PCR druhu *Lactobacillus acidophilus*.



Obrázek 30 – Vysokorozlišovací analýza křivek tání PCR produktů s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [45] s DNA po IMS buněk z reálných vzorků

7 Diskuze

7.1 Ověření čistoty použitých sbírkových kultur pomocí křížového roztěru a stanovení počtu buněk při kultivaci

Při aerobní kultivaci buněk na pevném MRS médiu narostly u kultur *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 malé bílé kolonie kruhového tvaru. U druhu *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 byly na pevném médiu viditelné malé šedé kolonie kruhového tvaru. Z těchto výsledků lze usuzovat, že dané sbírkové kmeny jsou čisté a obsahují pouze jeden bakteriální druh. Čistota byla ověřena i u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1.

Měřením optické hustoty během kultivace bakterií rodu *Lactobacillus casei* LOCK 0919 a *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 byla stanovena růstová křivka (6.1.2). Z výsledné růstové křivky lze určit, že exponenciální fáze růstu nastává přibližně při 7-9 hodinách kultivace a stacionární fáze růstu začíná přibližně při 20 hodinách kultivace.

7.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace vyizolované DNA ze sbírkových kmenů

Pomocí metody fenolové extrakce byla vyizolována DNA, jejíž čistota a koncentrace byly změřeny na NanoPhotometru (6.2). Koncentrace vyizolované DNA ze sbírkových kmenů se pohybovala v rozmezí 91-726 ng/μl. Z těchto hodnot lze usuzovat, že byla izolována DNA o dostatečné koncentraci pro použití této DNA do polymerázové řetězové reakce.

Z poměrů absorbancí při vlnové délce 260 nm a 280 nm lze vyvodit, že vyizolovaná DNA rodu *Lactobacillus* (Tabulka 13) byla téměř ve všech případech mírně znečištěna RNA. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 (Tabulka 15) byla veškerá DNA výrazně znečištěná ribonukleovou kyselinou. U bakterií rodu *Bifidobacterium* (Tabulka 14) můžeme z poměru absorbancí říct, že vyizolovaná DNA byla čistá.

7.3 Citlivost polymerázové řetězové reakce

Citlivost PCR reakce byla stanovena v rozmezí koncentrace DNA 10 ng/μl až 1 fg/μl (desítkové ředění) (6.3). Nejvyšší citlivost byla stanovena pro PCR specifickou pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*, kdy nejnižší detekované množství DNA bylo 1 pg/μl. Nejnižší detekovatelné množství DNA v polymerázové řetězové reakci specifické pro rod *Bifidobacterium* a celkové kvasinky bylo stanoveno na 10 pg/μl.

7.4 Ověření rodové specifity vyizolované DNA z buněk rodu *Lactobacillus* pomocí PCR

Pro ověření rodové specifity vyizolované DNA buněk rodu *Lactobacillus* byla provedena PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* dle Duberneta [43].

Na agarózovém gelu byly detekovány PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus*. Tím byla ověřena přítomnost vyizolované DNA metodou fenolové extrakce z buněk rodu *Lactobacillus*.

7.5 Imunomagnetická separace buněk

Pomocí imunomagnetické separace byly pomocí magnetické perlové celulózy s navázanými protilátkami izolovány buňky rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Problém při práci s těmito částicemi je jejich velikost, velká shlukovatelnost a především nutnost sterilní práce, protože celulóza je přírodní materiál, který podléhá snadné kontaminaci.

V kapitole 6.5.1 byly jednotlivé kroky metody zoptimalizovány. Jako optimální se ukázalo použití 50 μ l kultury a 50 μ l magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou a doba separace 60 minut. Pro reálné vzorky bylo množství částic zvýšeno na 100 μ l a doba separace prodloužena na 120 minut, a to vzhledem k nejintenzivnějšímu PCR produktu při optimalizaci (6.5.1.1). Doba promývání částic byla stanovena na 5 minut (6.5.1.2). Krok přečištění získané DNA po imunomagnetické separaci byl vynechán z důvodů méně intenzivních PCR produktů a prodloužení doby pokusu o několik hodin (6.5.1.3).

Účinnost imunomagnetické separace buněk *Lactobacillus* částic magnetické perlové celulózy s protilátkou anti*Lactobacillus* byla prokázána výsevem na Petriho misky s pevným MRS médiem, kdy ve všech vzorcích byly detekovány narostlé kolonie. Následně bylo stanoveno minimálně množství buněk, které musí být použito do IMS pomocí metody PCR, na 10^7 buněk na mililitr média.

Specifita IMS byla ověřena separací buněk rodu *Bifidobacterium* a kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 pomocí částic magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium*. Buňky rodu *Bifidobacterium* se úspěšně vázaly na částice s protilátkou anti*Bifidobacterium*. Buňky rodu *bifidobacterium* byly ale prokázány i při separaci pomocí částic anti*Lactobacillus*. Tento výsledek poukazuje na to, že se buňky rodu *Bifidobacterium* se nespecificky vázaly na částice nesoucí protilátku anti*Lactobacillus*. Při IMS kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 21-48-1 bylo pomocí PCR prokázáno, že i částice bez přidaných buněk obsahují kvasinky. PCR produkty u vzorků, kde byla částicemi separována kultura kvasinek, mají stejnou intenzitu jako bez přidaných buněk. Z tohoto výsledku lze konstatovat, že částice magnetické perlové celulózy jsou kontaminovány kvasinkovou kulturou, ale neváží na sebe buňky kvasinek.

Částice magnetické perlové celulózy s navázanou protilátkou anti*Lactobacillus* byly použity pro separaci buněk rodu *Lactobacillus* z reálného vzorku. V konveční PCR byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* ve výrobku Salám Orlik i Ovčácká klobása.

Pro specifitější určení jednotlivých kmenů rodu *Lactobacillus* byla použita metoda vysokorozlišovací analýzy křivek tání, která byla nejprve otestována s referenční DNA několika kmenů rodu *Lactobacillus*. Zde bylo prokázáno, že s navrženými primery [45] a PCR programem lze rozlišit několik kmenů rodu *Lactobacillus*. Tato metoda se tedy využila i pro stanovení kmenů v reálných vzorcích. Bylo prokázáno, že Ovčácká klobása obsahuje kmen *Lactobacillus acidophilus*. Pro druhou teplotu tání PCR produktu nebyla přítomna referenční DNA. Ve výrobku Salám Orlik byla prokázána DNA rodů *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei/rhamnosus*. Z velikosti píků v grafech lze tvrdit, že izolována DNA měla nižší koncentraci než DNA referenčních kmenů (10 ng/ μ l).

8 Závěr

Cílem této práce bylo ověřit účinnost a specifitu imunomagnetické separace pomocí částic magnetické perlové celulózy s navázanými protilátkami anti*Lactobacillus* a anti*Bifidobacterium* a následně otestovat použití této metody pro izolaci bakteriálních buněk z komplexních vzorků vybraných potravin.

V rámci práce byla metoda imunomagnetické separace optimalizována, a to jak pro čisté bakteriální kultury, tak pro reálné vzorky, které představovaly dva vybrané masné výrobky s obsahem probiotických mikroorganismů. Byla potvrzena účinnost separace bakteriálních buněk na částice magnetické perlové celulózy nesoucí odpovídající protilátku a zároveň specifita vazeb pomocí metody PCR a PCR v kombinaci s HRM analýzou.

Výsledky potvrzují, že imunomagnetickou separaci buněk v kombinaci s metodou PCR-HRM lze použít pro identifikaci jednotlivých bakteriálních kmenů, nejen z čistých sbírkových kultur, ale také z komplexních potravinových vzorků obsahujících směsné kultury a u kterých lze zároveň předpokládat obsah inhibitorů PCR reakce.

9 Literatura

- [1] KECHAGIA, Maria, Dimitrios BASOULIS, Stavroula KONSTANTOPOULOU, Dimitra DIMITRIADI, Konstantina GYFTOPOULOU, Nikoletta SKARMOUTSOU, Eleni Maria FAKIRI. Health Benefits of Probiotics: A review. *ISRN Nutrition*. 2013, 7 str.
- [2] CHAMPOMIER-VERGÉS, Marie-Christine, Emmanuelle MAGUIN, Michel-Yves MISTOU, Patricia ANGLADE, Jean-Francois CHICH. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B*. 2002, 771, 329-342.
- [3] TODOROV, Svetoslav Dimitrov, Bernadette Dora Gombossy de Meo FRANCO. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in Food production. *Food Reviews International*. 2010, 26, s. 205-229.
- [4] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*, 1. vyd. Brno: Masarykova univ. 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [5] O. KANDLER, N. WAISS. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2; G. M. Ed. GARRITY, J. G. WILLIAMS a Co. WILKINS: Baltimore, 1986, s. 1209-1234
- [6] A. I. Vela, A. FERNANDEZ, A. ESPINOSADE los MONTEROS, J. GOYACHE, P. HERRAEZ, B. TAMES, F. CRUZ, L. DOMÍNIGUEZ a J. F. FERNANDÉZ-GARAYZÁBAL. *Lactobacillus ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Ziphius cavirostris*). *IJSEM*, 2008, 58, s. 891-894
- [7] Dostupné z www: <http://textbookofbacteriology.net/normalflora_2.html>
- [8] S. C. LEAHY, D. G. HIGGINS, G. F. FITZGERALD a D. van SINDEREN. A REVIEW: Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, 98, s. 1303-1315
- [9] ALOISIO, Irene, Cecilia SANTINI, Bruno BIAVATI, Giovanni DINELLI, Avrelija CENIČ, Walter CHINGWARU, Luca MOGNA a Diana Di GIOIA. Characterization of *Bifidobacterium* spp. strains. for the treatment of enteric disorders in newborns. *Applied Microbial And Cell Physiology*. 2012, 96, s. 1561-1576.
- [10] Dostupné z www: <<http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>>
- [11] WILLIAMS, Nancy Toedter. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2010, 67, s. 449-458
- [12] MACFARLANE, S., G.T. MACFARLANE, J.H. CUMMINGS a J.H. MACFARLANE. Review article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2006, 24, s. 701-714.
- [13] MANNING, Ts a Gr GIBSON. Prebiotics. *Best Practice & Research In Clinical Gastroenterology*. BAILLIERE TINDALL, 200404, 18, s. 287-298.
- [14] LEMARCHAND, K., F. BERTHIAUME, C. MAYNARD, J. MASSON, P. BROUSSEAU, P. HAREL, L. PAYMENT, R. BAYARDELLE a R. LEMARCHAND. Optimization of microbial DNA extraction and purification

- from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *Journal of Microbiological Methods*. 2005, 63, s. 115-126
- [15] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 188. ISBN 80-210-3841-1.
- [16] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*. 2013, 133
- [17] WITTWER, C a C WITTWER. Evolution of Polymerase Chain Reaction: Seminal Technology Continues to Be a Work in Progress. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 2011, 31, s. 38-39.
- [18] YE, J, G COULOURIS, I ZARETSKAYA, I CUTCUTACHE, S ROZEN a TI MADDEN. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *Bmc Bioinformatics*. BIOMED CENTRAL LTD, 2012, 13
- [19] ROUX, K H. Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research*. 1995, 4, s. 185-194.
- [20] Dostupné z www: <<http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/uni03/uni03.html>>
- [21] LEE, D, Pj CHEN a GB LEE. The evolution of real-time PCR machines to real-time PCR chips. *Biosensors & Bioelectronics*. ELSEVIER ADVANCED TECHNOLOGY, 2010, 25, s. 1820-1824
- [22] BUSTIN, SA, V BENES, Ja GARSON, J HELLEMANS, J HUGGETT, M KUBISTA, R MUELLER, T NOLAN, Mw PFAFFL, GI SHIPLEY, J VANDESOMPELE a CT WITTWER. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. AMER ASSOC CLINICAL CHEMISTRY, 2009, 55, s. 611-622
- [23] ELENITOBA-JOHNSON, Ksj, SD BOHLING, CT WITTWER a TC KING. Multiplex PCR by multicolor fluorimetry and fluorescence melting curve analysis. *Nature Medicine*. NATURE AMERICA INC, 2001, 7, s. 249-253.
- [24] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 2014, 158, s. 245-254
- [25] BOTEZATU, Irina V., Valentina N. KONDRATOVA, Valery P. SHELEPOV a Anatoly V. LICHTENSTEIN. DNA melting analysis: Application of the “open tube” format for detection of mutant KRAS. *Analytical Biochemistry*. 2011, 419, 2, s. 302-308.
- [26] SAKARIDIS, I, I GANOPOULOS, A ARGIRIOU a A TSAFTARIS. High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in pure water buffalo mozzarella and other buffalo dairy products. *International Dairy Journal*. ELSEVIER SCI LTD, 201301, 28, s. 32-35
- [27] Dostupné z www: <<http://www.hellotrade.com/medical-supply-company-ireland/illumina-eco-qpcr-machine.html>>
- [28] TAYLOR, James I, Carolyn D HURST, Martin J DAVIES, Niki SACHSINGER a Ian J BRUCE. Application of magnetite and silica–magnetite composites to the isolation of genomic DNA. *Journal of Chromatography A*. 2000, 890, s. 159-166

- [29] YOZA, B, M MATSUMOTO a T MATSUNAGA. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *Journal Of Biotechnology*. ELSEVIER SCIENCE BV, 2002, 94, s. 217-224
- [30] INTORASOOT, S, R SRIRUNG, A INTORASOOT a S NGAMRATANAPAIBOON. Application of gelatin-coated magnetic particles for isolation of genomic DNA from bacterial cells. *Analytical Biochemistry*. ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE, 2009, 386, s. 291-292
- [31] PEČOVÁ, Michaela, Ludmila ZAJONCOVÁ, Marek ŠEBELA, Kateřina POLÁKOVÁ, Jan ČUDA, Ivo ŠAFARÍK a Mirka ŠAFARÍKOVÁ. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy*. 2011, 105, s. 524-530.
- [32] MCBAIN, Stuart C., Humprey H.P. YIU a Jon DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2008, 3, s. 169-180
- [33] Dostupné z www: <<http://www.chempoint.cz/magneticke-nano-a-mikrocastice-probiotechnologicke-aplikace>>
- [34] PARK, Young Bin, Gwang Pyo KO, You-Hee CHO a Young Mee JEE. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, 74, s. 4226-4230.
- [35] Dostupné z www: <<http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/EasySep-Mouse-PE-Positive-Selection-Kit.aspx>>
- [36] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell: reference edition*. 5th ed. New York: Garland Science, 2008, s. 1601. ISBN 0-8153-4111-3.
- [37] ŠAFARÍK, I., ŠAFARÍKOVÁ M. Imunomagnetické techniky pro detekci mikroorganismů v drůbežích produktech. *Veterinářství*. 2011, 61, s. 199-202
- [38] Z našeho regionu - Výrobky - Uzeniny: ORLÍK SALÁM - ŽRUD-MASOKOMBINÁT PÍSEK. Dostupné z: WWW <<http://www.znasehoregionu.cz/?c=6&kt=1&pd=57&/jihocesky/orlik-salam---zrud-masokombinat-pisek>>
- [39] HOLKO, I., J. HRABĚ a RADA. The substitution of a traditional starter culture in mutton fermented sausages by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*. *Meat Science*. 2013, 94 (3)
- [40] ŠPANOVÁ, Alena, Bohuslav RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie / Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010. 86 s.: il. ISBN 978-80-214-4004-3
- [41] HAARMAN, Monique, Jan KNOL. Quantitative real – time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied of Environmental Microbiology*. 2006, 72, s. 2359-2365.
- [42] ROY, D.; SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett*. 2000, 191, s. 17-24.

- [43] DURBENT Ségolene., Nathalie DESMASURES, Micheline GUÉGEN. A PCR-based method for identification of *Lactobacillus* at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, 214, s. 217-275.
- [44] TOFALO, R. et al. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control*. 2012, 23, s. 356-362
- [45] KLIJN, N, A H WEERKAMP a W M DE VOS. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and environmental microbiology*. 1991, 57, s. 3390 - 3393
- [46] PORCELLATO, D., H.M. ØSTLIE, K.H. LILAND, K. RUDI, T. ISAKSSON a S.B. SKEIE. Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in Norwegian cheese by high-resolution melt analysis. *Journal of Dairy Science*. 2012, 95, s. 4804-481

10 Použité zkratky

A	adenin
bp	pár bází (base pair)
C	cytosin
CCM	česká sbírka mikroorganismů
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
G	guanin
GRAS	generally regarded as safe (obecně schváleny jako zdravotně nezávadné)
HRM	High resolution melting (Vysokorozlišovací analýza křivek tání)
IMS	imunomagnetická separace
LOCK	kolekce průmyslových mikroorganismů v Polsku
MRS	Mann, Rofosa, Sharpe (MRS médium pro kultivaci bakterií mléčného kvašení)
NK	negativní kontrola
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEG	polyetylenglykol
PK	pozitivní kontrola
Př. n. l.	před naším letopočtem
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodny
spp.	poddruh (subspecies)
T	thymin
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA