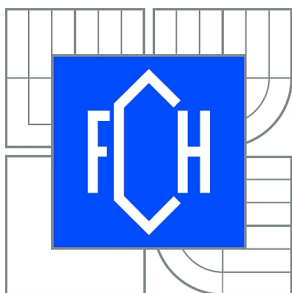




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## IZOLACE A IDENTIFIKACE DNA PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ V KOMPLEXNÍCH MATRICÍCH

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DNA FROM PROBIOTIC BACTERIA IN COMPLEX  
MATRICES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. PETRA BALOGOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2010



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0336/2009</b>	Akademický rok: <b>2009/2010</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Petra Balogová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Izolace a identifikace DNA probiotických bakterií v komplexních maticích

### Zadání diplomové práce:

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

### Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

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

-----  
Bc. Petra Balogová  
Student(ka)

-----  
doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

V současné době jsou v potravinářském průmyslu hojně využívány probiotické bakterie mléčného kvašení (BMK) a bifidobakterie. Uvedené mikroorganismy jsou přirozenou součástí gastrointestinálního traktu. Hostitelem mohou být rovněž přijímány ve formě potravinových doplňků. Nejnovější metody identifikace bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií jsou založeny na analýze DNA s využitím amplifikačních metod. Nejvíce se využívá polymerázová řetězová reakce (PCR).

Cílem diplomové práce bylo využití rodově a druhově specifických PCR pro identifikaci kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* v komplexních maticích (6 potravinových doplňků: Zenflo, Linex Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte, Pangamin Bifi Plus). K amplifikaci byla použita celková DNA izolovaná z tablet pomocí magnetických nosičů pokrytých karboxylovými skupinami. DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk. Při přípravě hrubých lyzátů bylo testováno množství lysozymu (3 mg/ml, 10 mg/ml) v lyzačním roztoku, délka inkubace s lysozymem při laboratorní teplotě (1,5 a 3 hod) a s proteinázou K a SDS při 55 °C (1, 3 a 18 hod). Izolovaná DNA byla detekována pomocí agarosové gelové elektroforézy a spektrofotometricky. Přítomnost bakteriální DNA byla ověřena pomocí PCR. K identifikaci byly použity specifické primery pro rod *Lactobacillus* – LbLMA-1, R16-1 a pro druhy *L. acidophilus*, *L. casei/paracasei*, *L. rhamnosus* a *L. plantarum*. Bakterie rodu *Bifidobacterium* byly identifikovány pomocí rodově specifické PCR (primery: Bif-164, Bif-662) a čtyř druhově specifických PCR (*B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*).

## ABSTRACT

Nowadays, probiotic lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria are plentifully exploited in food processing industry. LAB and bifidobacteria are important part of microflora of gastro intestinal tract (GIT). Probiotics (most often just lactobacilli and bifidobacteria) can be supplied to the GIT of the organism like food complements. Species identification is therefore very important. New methods of identification of LAB and bifidobacteria are based on analysis of DNA. Mostly exploited method is polymerase chain reaction (PCR).

In my diploma work, genus and species specific PCRs were used for identification of different species of bacteria of genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in complex matrices of six food supplements (Zenflo, Linex Forte, Probian, Nutra Bona, GS lactobacillus Forte, Pangamin Bifi plus). Total DNA was isolated from crude lysates of cells present in tablets by magnetic particles coated by carboxyl groups. The preparation of cell lysates was optimised. Different amounts of lysozyme (3 mg/ml, 10 mg/ml), time of incubation at laboratory temperature (1,5 hour, 3 hour) and time of incubation with SDS and proteinase K at 55 °C (1 hour, 3 hour, over all night) were tested. Isolated DNA was quantified and checked in PCR. Primers specific for genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and for species *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* and *Lb. plantarum* and *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* were used, respectively. All identified bacteria were in accord with the data declared by producer in 3 food supplements (Zenflo, Linex Forte and Pangamin Bifi Plus). The genus indentification was in accord with declaration of producer in other food products only (Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte).

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

baktérie mléčného kvašení a bifidobakterie, probiotické preparáty, DNA izolace, identifikace, PCR

## **KEYWORDS**

lactic acid bacteria and bifidobacteria, probiotic preparations, DNA isolation, identification, PCR

BALOGOVÁ, P. *Izolace a identifikace DNA probatických bakterií v komplexních matricích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 96 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto chci vyjádřit poděkování panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc a paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za čas, odbornou radu a pomoc, kterou mi věnovali při zpracování této práce.

Mé dík též patří kolegyním z laboratoře toho času na doktorském studiu a to Mgr. Kristýně Turkové, Ing. Janě Tvrdíkové a Ing. Barboře Ůrgeové.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická Část .....</b>	<b>14</b>
2.1	Bakterie .....	14
2.2	Bakterie rodu <i>Lactobacillus</i> .....	15
2.2.1	Taxonomie bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> .....	16
2.3	Bakterie rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	20
2.4	Bakterie mléčného kvašení a zdraví .....	21
2.4.1	Prebiotika .....	22
2.4.2	Probiotika .....	22
2.5	Identifikace bakterií mléčného kvašení s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR) .....	22
2.5.1	Polymerázová řetězová reakce .....	23
2.5.2	Princip PCR.....	23
2.5.3	Detekce PCR produktu pomocí gelové elektroforézy na agaróse .....	25
2.5.4	Provádění PCR .....	25
2.6	Magnetické nosiče pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR.....	25
<b>3</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Materiál.....</b>	<b>28</b>
4.1	Použité komplexní matrice .....	28
4.2	Použité bakteriální kultury a DNA .....	29
4.3	Chemikálie.....	30
4.4	Magnetické nosiče pro izolaci DNA.....	30
4.5	Roztoky .....	31
4.5.1	Kultivační média.....	31
4.5.2	Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk.....	31

4.5.3	Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetického nosiče.....	32
4.5.4	Roztoky pro agarósovou gelovou elektroforézu.....	32
4.6	Přístroje a pomůcky .....	33
<b>5</b>	<b>Metody.....</b>	<b>34</b>
5.1	Izolace bakteriální DNA .....	34
5.1.1	Lyze buněk .....	34
5.2	Izolace a purifikace DNA metodou fenolové extrakce.....	34
5.2.1	Fenolová extrakce.....	34
5.2.2	Srážení DNA 96 % ethanolem .....	35
5.3	Izolace DNA pomocí magnetických nosičů.....	35
5.3.1	Příprava směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů.....	35
5.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty na NanoPhotometru.....	36
5.4.1	Postup spektrofotometrického měření .....	36
5.5	Polymerázová řetězová reakce .....	37
5.5.1	Detekce PCR produktů pomocí agarosové gelové elektroforézy.....	37
5.5.2	Komponenty pro PCR.....	37
5.5.3	PCR pro doménu Bacteria s primery F eub a R eub.....	38
5.5.4	Rodově specifická PCR – <i>Lactobacillus</i> s primery LbLMA 1-rev a R16-1 .....	39
5.5.5	Druhově specifické PCR – <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> .....	39
5.5.6	Rodově specifická PCR – <i>Bifidobacterium</i> s primery Bif-164 a Bif-662 .....	41
5.5.7	Druhově specifické PCR – <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	41
5.5.8	Druhově specifická PCR – <i>Streptococcus thermophilus</i> s primery S.therm-1 a S.therm-2 .....	43



<b>6</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>44</b>
6.1	Kultivace čisté kultury buněk v tekutém médiu a na pevném agaru .....	44
6.1.1	Kultivace bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> .....	44
6.1.2	Kultivace bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	44
6.2	Příprava hrubého lyzátu buněk .....	45
6.3	Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	46
6.3.1	Rodově specifická PCR <i>Lactobacillus</i> s různým množstvím DNA matrice čisté bakteriální kultury .....	46
6.3.2	Druhově specifická PCR pro různé druhy <i>Lactobacillus</i> s různým množstvím DNA matrice čisté bakteriální kultury .....	47
6.3.3	Druhově specifická PCR <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	47
6.3.4	Druhově specifická PCR <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	48
6.3.5	Druhově specifická PCR <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	49
6.3.6	Druhově specifická PCR <i>Lactobacillus casei</i> .....	50
6.4	Rodově specifická PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i> .....	51
6.4.1	Rodově specifická PCR <i>Bifidobacterium</i> s různým množstvím DNA matrice izolované z čisté bakteriální kultury.....	51
6.4.2	Amplifikace druhově specifické PCR pro různé druhy <i>Bifidobacterium</i> s různým množstvím DNA matrice čisté bakteriální kultury .....	52
6.4.3	Druhově specifická PCR <i>Bifidobacterium longum</i> .....	52
6.4.4	Druhově specifická PCR <i>Bifidobacterium infantis</i> .....	53
6.4.5	Druhově specifická PCR <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	54
6.4.6	Druhově specifická PCR <i>Bifidobacterium animalis</i> .....	55
6.5	Druhově specifická PCR pro druh <i>Streptococcus</i> .....	56
6.5.1	Druhově specifická PCR <i>Streptococcus thermophilus</i> s různým množstvím DNA matrice čisté bakteriální kultury .....	56
6.6	Shrnutí všech citlivostí v rodově a druhově specifických PCR .....	57
6.7	Analyzované preparáty (komplexní matrice) s uvedeným množstvím buněk .....	58
6.8	Příprava hrubých lyzátů buněk a izolace DNA z vybraných výrobků metodou fenolové extrakce.....	59

6.9	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z vybraných výrobků.....	59
6.10	Optimalizace při přípravě hrubých lyzátů buněk – testování množství lysozymu.....	60
6.10.1	Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk s obsahem lysozymu 3 mg/ml .....	60
6.10.2	Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk s obsahem lysozymu 10 mg/ml .....	61
6.11	Optimalizace při přípravě hrubých lyzátů buněk – testování doby inkubace a izolace DNA fenolovou extrakcí a magnetickým nosičem .....	63
6.11.1	Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk – s proteinasou K a SDS při 55°C po dobu 1 hod.....	63
6.11.2	Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk – s proteinasou K a SDS při 55°C po dobu 3 hodin.....	64
6.11.3	Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk – s proteinasou K a SDS při 55°C po dobu 18 hodin.....	66
6.12	Shrnutí výsledků optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk z tablet .....	68
6.13	Příprava hrubých lyzátů buněk a izolace DNA z probiotických potravinových doplňků magnetickým nosičem.....	68
6.14	Ověření amplifikace DNA v doménově specifické PCR s DNA izolovanou z 6 výrobků potravinových doplňků pomocí magnetického nosiče .....	69
6.15	Rodově specifická PCR <i>Lactobacillus</i> s DNA izolovanou z výrobků potravinových doplňků magnetickými nosiči .....	70
6.16	Druhově specifická PCR <i>Lactobacillus</i> s DNA izolovanou z výrobků potravinových doplňků magnetickými nosiči .....	71
6.16.1	Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus acidophilus</i> s primery Aci16SI a 16SII.....	71
6.16.2	Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus rhamnosus</i> s primery PrI a PhaII .....	72
6.16.3	Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus casei</i> s primery PrI a CasII.....	73
6.16.4	Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus plantarum</i> s primery PlanI a PlanII.....	74
6.17	Rodově specifická PCR <i>Bifidobacterium</i> s DNA izolovanou z výrobků potravinových doplňků magnetickými nosiči .....	75

6.18	Druhově specifická PCR <i>Bifidobacterium</i> s DNA izolovanou z výrobků potravinových doplňků magnetickými nosiči .....	76
6.18.1	Druhově specifická PCR pro druh <i>Bifidobacterium longum</i> s primery BiLON-1 a BiLON-2 .....	76
6.18.2	Druhově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium infantis</i> s primery BiINF-1 a BiINF2 .....	77
6.18.3	Druhově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium bifidum</i> s primery BiBIF-1 a BiBIF-2 .....	78
6.18.4	Druhově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium animalis</i> s primery Ban F2 a Pbi F1 .....	79
6.18.5	Druhově specifická PCR pro <i>Streptococcus thermophilus</i> s primery S.therm 1 a S.therm 2 .....	80
6.18.6	Shrnutí výsledků rodově a druhově specifických PCR získaných po amplifikaci celkové DNA izolované z potravinových doplňků magnetickými nosiči .....	81
6.19	Výsledek analýzy potravinových doplňků na přítomnost probiotických bakterií .....	82
<b>7</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>83</b>
7.1	Kultivace bakterií.....	83
7.2	Množství lysozymu pro přípravu hrubých lyzátů buněk .....	84
7.3	Délka inkubace s proteinasou K a SDS při 55°C .....	84
7.4	Izolace DNA a spektrofotometrické stanovení.....	84
7.5	Fenolová extrakce vs. magnetické nosiče .....	85
7.6	Doménově specifická PCR.....	85
7.7	Rodově a druhově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	85
7.8	Rodově a druhově specifické PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i> .....	86
7.9	Druhově specifická PCR pro <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	87
7.10	Celkové hodnocení probiotických preparátů.....	87
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>89</b>
8.1	Zpracování tablety .....	89

8.2	Výsledky analýzy tablet na přítomnost probiotických bakterií.....	89
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratek a symbolů .....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>Seznam příloh .....</b>	<b>95</b>
	Příloha 1.....	96

# 1 ÚVOD

Mikroorganismy, mezi které se řadí i bakterie mléčného kvašení (BMK), hrají v přírodě a v životě člověka velmi významnou roli [1]. BMK se objevily přibližně před 3 miliardami let. Od roku 3000 před naším letopočtem jsou uvedené mikroorganismy využívány při výrobě fermentovaných potravin, jako jsou sýry, chléb a maso [2].

Bakterie jsou převážně heterotrofní mikroorganismy. K životu potřebují organické látky, které využívají na stavbu buňky, získání energie různými metabolickými drahami a další procesy. Produkty metabolismu mikroorganismů mohou být pro člověka nejen užitečné (ethanol, kyselina mléčná) ale i škodlivé (bakteriální toxiny, mykotoxiny) [3].

Mezi významné BMK patří hlavně laktobacily a bifidobakterie. Jde o živé bakterie [4] přijímané organismem jako součást potravin nebo ve formě potravinových doplňků [5]. Probiotické bakterie poskytují širokou škálu zdravotních výhod [6], kterými jsou:

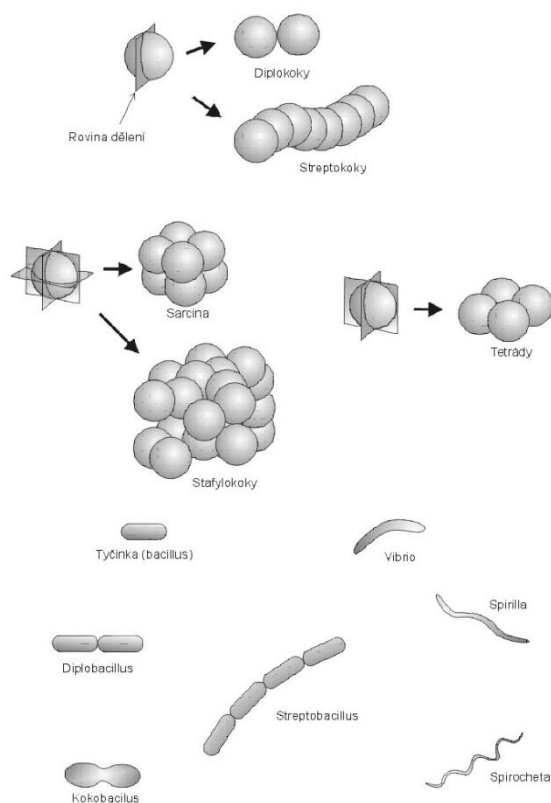
- ✓ pozitivní ovlivnění střevní mikroflóry
- ✓ snížení nesnášlivosti k laktose
- ✓ regulace množství cholesterolu
- ✓ prevence rakoviny tlustého střeva
- ✓ stimulace imunitního systému
- ✓ prevence vůči potravinovým alergiím

Probiotickým bakteriím a jejich využitím v potravinářském průmyslu je v současné době věnována významná pozornost.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické buňky, které nemají na rozdíl od eukaryotických buněk jádro oddělené od cytoplazmy membránou. [3] Přestože jsou po fyziologické stránce velmi rozmanité, po morfologické stránce nejsou mezi jednotlivými rody velké rozdíly. Tvar buněk bakterií je nejčastěji tyčinkovitý, méně často kulovitý (Obr. 1). Vlákňitý tvar se vyskytuje u poměrně rozsáhlé skupiny půdních bakterií patřících do řádu *Actinomycetales* a několika dalších rodů. [7]



**Obr. 1:** Základní tvary bakteriálních buněk [8]

Bakterie se rozmnožují dělením. Jejich růstové požadavky na vnitřní a vnější podmínky nebo na vlastnosti prostředí jsou velmi odlišné. Z hlediska jejich vztahu ke kyslíku se dělí na tři hlavní skupiny:

- obligátně aerobní** bakterie vyžadují k získání energie vzdušný kyslík. Mnohé z nich jsou mikroaerofilní - pro svůj růst a metabolismus také potřebují vzdušný kyslík, tolerují ale i jeho snížený parciální tlak.
- obligátně anaerobní** bakterie získávají energii výlučně fermentací. Vzdušný kyslík je pro ně toxický. Bakterie mléčného kvašení mají také anaerobní metabolismus, jsou ale aerotolerantní, což znamená, že rostou i za přítomnosti vzdušného kyslíku.

- c) **fakultativně anaerobní** bakterie rostou v nepřítomnosti i přítomnosti vzdušného kyslíku. Bez něho mohou svůj metabolismus převést na fermentaci [3].

## 2.2 Bakterie rodu *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* náleží do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*. [9] Většina druhů *Lactobacillus* fermentuje glukosu a laktosu na laktát a odtud pochází název tohoto rodu. [10]

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou katalasa negativní a nepohyblivé aerobní až fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie [11]. Tvoří robustní nesporulující gram-pozitivní tyčky, často řetízky. Na kultivační půdě tvoří kolonie [10]. Laktobacily upřednostňují mezofilní a mírně termofilní teploty. Některé kmeny druhů *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* rostou, i když pomalu, při nízkých teplotách blízkých k bodu mrazu, např. na chladném mase [3]. Mohou se množit i v kultivačním prostředí s hodnotou pH 5. Jestliže však pH poklesne pod 4, růst většiny laktobacilů se zastavuje [12]. Přehled bakterií tvořící pravidelné nesporulující gram-pozitivní tyčinky je uveden v Tabulce 1 [7].

Rod *Lactobacillus* je řazen do skupiny bakterií mléčného kvašení (BMK) [13]. Náleží sem druhy bakterií, které tvoří část přirozené mikroflóry úst člověka, gastrointestinálního traktu a vaginy [10, 14]. Protože kyselina mléčná vzhledem ke snížení pH zastavuje množení hnilobných bakterií, využívá se laktobacilů při konzervaci potravin, kvašení zelí, okurek a k silážování píce. V mlékárenství se používá např. druh *Lactobacillus delbueckii* ssp. *bulgaricus* k výrobě jogurtu, *Lactobacillus acidophilus* k přípravě acidofilního mléka nebo *Lactobacillus casei* při přípravě sýrů [10]. Druhy využívané v průmyslové výrobě patří do skupiny bakterií tzv. obecně pokládáných za bezpečné – GRAS (generaly regarded as safe) [15]. Některé laktobacily se vyskytují také jako nežádoucí kontaminace ve vinařství a pivovarnictví, kde způsobují chuťové vady výrobků, a v drožděrenství, což vede ke ztrátám výtěžnosti [7].

**Tabulka 1:** Přehled bakterií tvořící pravidelné nesporeující grampozitivní tyčinky – rozdělení bakterií podle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

rod	katabol. metabolismus	patogenita	výskyt	význam
<i>Lactobacillus</i>	anaerobní (mléčné kvašení)	velmi vzácná	velmi rozšířen v přírodě a na zkvasitelném materiálu	konzervace zeleniny a píce, pekařský kvásek, mléčné nápoje, sýrařství, kontaminanty v pivovarnictví, vinařství a lihovarství
<i>Erysipelothrix</i>	anaerobní (mléčné kvašení)	u obratlovců	velmi rozšířen	parazit savců (hlavně vepřů), ptáků, ryb, přenosný na člověka (kožní onemocnění)
<i>Brochothrix</i>	anaerobní (mléčné kvašení)	–	v masných produktech	kažení masných produktů
<i>Listeria</i>	anaerobní (mléčné kvašení)	někdy u obratlovců	velmi rozšířen na rozkládajícím se materiálu	<i>L. monocytogenes</i> způsobuje onemocnění lidí, přenášené též potravinami
<i>Kurthia</i>	aerobní (nekvasí)	–	ve fekáliích domácích zvířat, v masných produktech	kažení masa
<i>Caryophanon</i>	aerobní (nekvasí)	–	v kravském hnoji	
<i>Renibacterium</i>	aerobní (nekvasí)	u lososových ryb	v řekách a mořích	

### 2.2.1 Taxonomie bakterií rodu *Lactobacillus*

Na počátku dvacátého století (1919) rozdělil bakterie rodu *Lactobacillus* Orla-Jensen<sup>1</sup> do tří tradičních skupin (*Thermobacterium*, *Streptobacterium* a *Betabacterium*), které dnes nemají taxonomickou hodnotu, protože nepředstavují fylogeneticky definované skupiny. Většinu nově identifikovaných druhů laktobacilů bylo sice možné zařadit do těchto tradičních skupin, ale některé se zařadit nedaly [3].

Toto členění do tří podrodů (termobakterie, streptobakterie a betabakterie) bylo využíváno pro taxonomické účely až do sedmdesátých let dvacátého století [9]. Rozdělení na tyto tři podrody nebylo dostatečně přesné, a proto bylo provedeno na základě molekulárně biologických metod nové rozdělení laktobacilů do skupin I – III [16, 3].

<sup>1</sup> Profesor Orla Jensen v roce 1870 vydal knihu „Dairy bacteriology“, kde popsal své zkušenosti, které nabyly po 25 letech výzkumu v mléčném průmyslu v Dánsku a Švýcarsku [52]. Je též autorem mnoha článků týkajících se tohoto tématu.



## I. Skupina – Obligátně homofermentativní



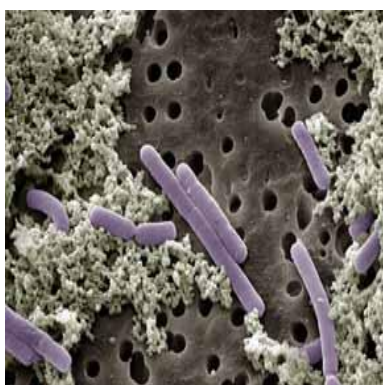
Fermentují hexosy (> 90%) na kyselinu mléčnou [3]. Pokud se vytváří kyselina mléčná jako jediný, hlavní produkt kvašení, pak mluvíme o homofermentativním mléčném kvašení [12]. Pentosy a glukonáty nefermentují. [3] Zástupci tohoto rodu jsou důležité pro výrobu sýrů [17], jogurtů a probiotických nápojů [18]. Zástupci obligátně homofermentativních laktobacilů a prostředí, ve kterém se vyskytují, jsou uvedeny v Tabulce 2 [3] a na Obr. 2.

Obr. 2: Morfologie buněk druhu *Lactobacillus acidophilus*.

Tabulka 2: Zástupci obligátně homofermentativních laktobacilů

Druh ssp.	Růst při		Prostředí, ve kterém se převážně vyskytují a další charakteristiky
	15 °C	45 °C	
<i>L. delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	–	+	rostlinný materiál fermentovaný při vyšších teplotách (40–50 °C)
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	–	+	jogurty a sýry
<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i>	–	+	kyselé mléko, sýry, lisované kvasnice, obilné zápary
<i>L. helveticus</i>	–	+	kyselé mléko, tvrdé sýry, ementálská kultura, maximum při 50–52 °C
<i>L. acidophilus</i>	–	+	GIT lidí a zvířat, ústní dutina
<i>L. salivarius</i>	–	+	ústní dutina a gastrointestinální trakt lidí
<i>L. farciminis</i>	+	–	masové výrobky, pekárenský kvas
<i>L. yamanashiensis</i>	+	–	jablečný mošt a víno, hroznový mošt

## II. Skupina – Fakultativně heterofermentativní



Fermentují hexosy (> 90%) na kyselinu mléčnou. Při nedostatku glukosy produkují některé druhy kyselinu octovou, ethanol a kyselinu mravenčí. Pentosy fermentují pomocí indukovatelné fosfoketolasy. Zástupci jsou uvedeni v Tabulce 3 [3] a na Obr. 3.

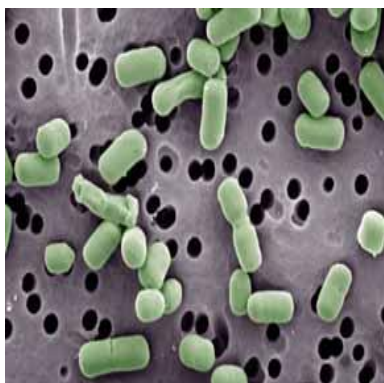
Obr. 3: Morfologie buněk druhu *Lactobacillus casei*.

**Tabulka 3:** Zástupci fakultativně heterofermentativních laktobacilů

Druh ssp.	Růst při		Prostředí, ve kterém se převážně vyskytují a další charakteristiky
	15 °C	45 °C	
<i>L. alimentarius</i>	+	–	marinované rybí produkty, masové produkty, pekárenský kvas, tvoří acetonin
<i>L. bavaricus (L. sake)</i>	+	–	kysané zelí, fermentované zelné listy, růst mezi 2–37 °C
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	+	+	mléko, sýry, mléčné produkty, pekárenský kvas, siláž, ústní dutina a GIT lidí
<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplantarum</i>	+	–	jako výše
<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	+	+	jako výše
<i>L. casei</i> ssp. <i>tolerans</i>	+	–	jako výše, přežívá pasterizaci (72 °C, 40 s)
<i>L. curvatus</i>	+	–	mléko, siláž, kravský hnůj, masové produkty, pekárenský kvas
<i>L. maltaromaticus</i>	+	–	mléčné produkty, siláž, pekárenský kvas, lidský GIT, ústní dutina
<i>L. plantarum</i>	+	–	mléčné produkty, siláž, pekárenský kvas
<i>L. sake (L. bavaricus)</i>	+	–	masové produkty, pekárenský kvas, růst při 2–4 °C

### III. Skupina – Obligátně heterofermentativní

Třetí skupina laktobacilů fermentující hexosy používá pouze dráhu závislou na fosfoketolase. [15]. Obligátně heterofermentativní druhy laktobacilů produkují kromě kyseliny mléčné ještě v menším množství např. kyselinu octovou a mravenčí, ethanol a oxid uhličitý [12]. Nacházejí se v gastrointestinálním traktu (GT) nebo zrajících sýrech [15]. Bakterie patřící do třetí skupiny se výrazně podílí na znehodnocování potravin. *Lactobacillus brevis* se podílí na kažení citrusových plodů, vína a piva. *Lactobacillus fructivirans*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus buchneri* napomáhají kažení majonézy [19]. Rozdělení obligátně heterofermentativních bakterií rodu *Lactobacillus* je uvedeno v Tabulce 4 [3] a na Obr. 4.



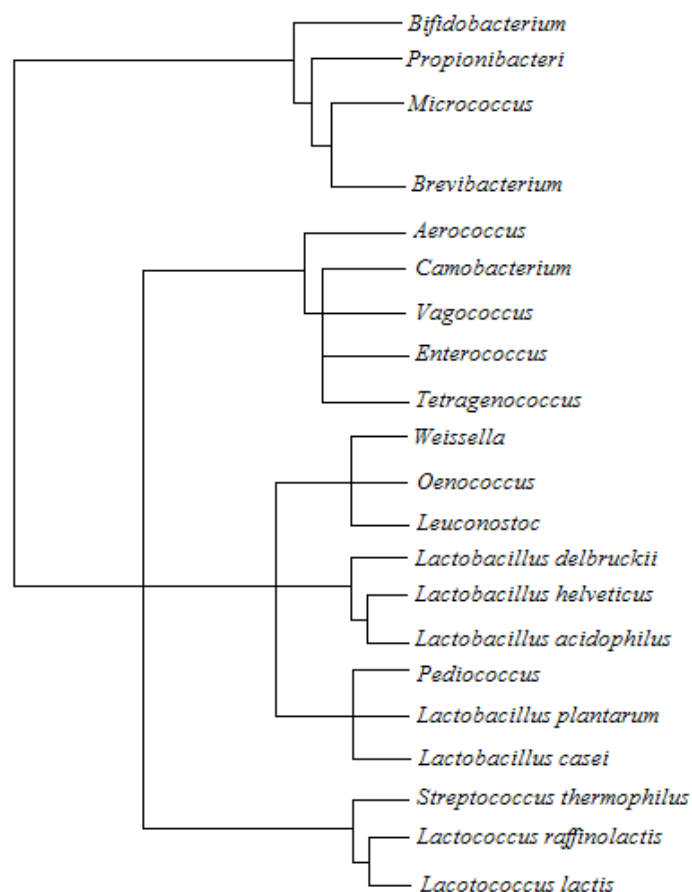
**Obr. 4:** Morfologie buněk druhu *Lactobacillus brevis*.

**Tabulka 4:** Rozdělení obligátně heterofermentativních bakterií rodu *Lactobacillus*

Druh ssp.	Růst při		Prostředí, ve kterém se převážně vyskytují a další charakteristiky
	15 °C	45 °C	
<i>L. bifermantas</i>	+	–	izolovaný z holandských sýrů s malými trhlinami
<i>L. brevis</i>	+	–	mléko, sýry, pekárenský kvas, siláž, lidský GIT a dutina ústní
<i>L. buchneri</i>	+	–	mléko, sýry, lidská dutina ústní
<i>L. confusus</i> ( <i>Weissella confusa</i> )	+	±	cukrová třtina, mrkvová šťáva, příležitostně v surovém mléku a slinách
<i>L. divergens</i> ( <i>Carnobacterium divergens</i> )	+	–	vakuově balené chlazené maso
<i>L. fermentum</i>	–	+	kvasnice, mléčné produkty, pekárenský kvas, kravský hnůj
<i>L. fructivorans</i>	+	–	kazící se majonéza, salátové dresingy, kazící se dezertní vína a aperitivy, upřednostňují pH 5,0–5,5
<i>L. halotolerans</i> ( <i>Weissella halotolerans</i> )	+	–	masové produkty
<i>L. kandleri</i>	+	–	produkce slizu ze sacharózy
<i>L. kefiri</i>	+	–	kefir
<i>L. reuteri</i>	–	+	masové produkty, humánní a zvířecí fekálie
<i>L. sanfranciscensis</i> (syn. <i>L. sanfrancisco</i> )	+	–	pekárenský kvas
<i>L. viridescens</i> ( <i>Weissella viridescens</i> )	+	–	nepřirozeně zbarvené masové produkty, pasterizované mléko

Klíčovou vlastností BMK je produkce kyseliny mléčné jako hlavního či jediného fermentačního produktu [20].

Vývoj a aplikace pokročilých molekulárně biologických technik přinesl nový pohled na taxonomii rodu *Lactobacillus*. Je založen a na obsahu G+C v jejich DNA v rozmezí 33–53 mol%. Mezi BMK řadíme ještě rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus* [15]. Původně sem byly řazeny i další rody s obsahem G+C o mnoho vyšším (*Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* a *Propionibacterium*). Rozdělení bakterií podle obsahu G+C je uvedeno na Obr. 5.



**Obr. 5:** Rozdělení bakterií mléčného kvašení podle obsahu G+C

### 2.3 Bakterie rodu *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* náleží do domény *Bacteria*, kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* [16]. Rod *Bifidobacterium*<sup>2</sup> jsou anaerobní nesporeující bakterie, které tvoří nepravidelné gram-pozitivní tyčky, které bývají na jednom z konců rozštěpené. Mohou tvořit i řetízky, nebo mají hvězdčovitě či nepravidelné uspořádání [3]. Patří k běžné flóře dutiny ústní a zažívacího traktu. Jako prokazatelně patogenní pro člověka byl zatím usvědčen pouze druh *Bifidobacterium dentium*, který participuje za vzniku zubního kazu. U druhů *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum* je patogenita zatím považována za nejistou [10]. Přehled bakterií tvořící nepravidelné nesporeující grampozitivní tyčinky je uveden v Tabulce 5 [7].

<sup>2</sup> V minulosti byly bifidobakterie zařazeny do rodu *Lactobacillus*, Bergey [3]

**Tabulka 5:** Přehled bakterií tvořící nepravidelné nesporulující grampozitivní tyčinky – rozdělení bakterií podle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

název	vztah k O <sub>2</sub>	morfologie	patogenita	výskyt	význam
<i>Corynebacterium</i>	fakult. anaerobní až aerobní	tyčinky, kyjovité nebo nepravidelné formy	některé pro lidi, zvířata nebo rostliny	rostlinný a živočišný materiál	nemoci, kvasná výroba aminokyselin
<i>Arhrobacter</i>	aerobní	cyklus tyčinky-koky	—	půda	kvasná výroba AK, vnitrobuněčných enzymů, provádění specifických reakcí při výrobě organických sloučenin
<i>Brevibacterium</i>	aerobní	cyklus tyčinky-koky	—	sýry, půda, lidská pokožka	nemoci
<i>Actinomyces</i>	fakult. anaerobní	tyčinky, vlákna, některá větvená	pro člověka a zvířata	živočišný materiál, půda	nemoci
<i>Cellulomonas</i>	fakult. anaerobní	nepravidelné tyčinky, též koky	—	půda, rozkládající se rostlinný materiál	zkvašování celulósových odpadů
<i>Propionibacterium</i>	anaerob. až aerotolerantní	nepravidelné tyčinky, větvené tvary i koky	některé pro člověka	mléčné výrobky, lidská pokožka	výroba propionové kyseliny, sýrů, mléčných nápojů
<i>Bifidobacterium</i>	anaerobní	velmi nepravidelné až větvené tyčinky	—	střevní trakt člověka a zvířat	výroba mléčných nápojů s diet. účinky
<i>Eubacterium</i>	anaerobní	pravidelné nebo nepravidelné tyčinky	některé pro člověka	živočišný a rostlinný materiál, půda, odpadní vody	

## 2.4 Bakterie mléčného kvašení a zdraví

Velký význam fyziologické mikroflóry pro zdraví člověka je všeobecně znám. V tlustém střevě přispívá normální mikroflóra aktivně k řádnému průběhu metabolických procesů a je též podstatnou součástí protiinfekčních mechanismů střeva [10, 21].

Dojde-li k porušení mikroflóry patogenním mikroorganismem, je důsledkem vznik zánětu. Bylo pozorováno, že *Lactobacillus rhamnosus* zkracuje trvání novorozeneckých průjmů a průjmů spojených s mikrobiální léčbou. Podobné účinky byly zaznamenány i u druhů *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium lactis*. BMK jsou dnes též využívány jako probiotikum k terapii gastrointestinálních poruch, které většinou vznikají jako přímý důsledek antimikrobiální léčby, která vede ke vzniku průjmů [19, 21].

Koncepce ovlivňování stavu mikroflóry a tím zdravotního stavu člověka je založena na využití probiotik a prebiotik [10, 21].

### 2.4.1 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné potravinové doplňky (nejčastěji inulin [22], jeho deriváty a fruktooligosacharidy), které selektivně stimulují růst anebo životní aktivitu probiotik ve střevě. Nízkomolekulární látky s vlastnostmi prebiotik se přirozeně vyskytují např. v cibuli, pórků, česneku, artyčoku [23] nebo čekance a v menší míře i v obilovinách. Dále jsou tyto oligosacharidy obsaženy v luštěninách. [10, 21].

### 2.4.2 Probiotika

Probiotika, hlavně bakterie mléčného kvašení (BMK) a bifidobakterie [6] jsou živé bakterie [4] dodávané organismu jako potraviny nebo potravinové doplňky [5], protože poskytují širokou škálu zdravotních výhod [6]. Jsou to nepatogenní a netoxigenní druhy bakterií, které přežívají v potravinách a vydrží průchod prostředím žaludku a tenkého střeva vzhledem ke složení bakteriální buněčné stěny [19, 24].

Kolonizace střeva probiotickými bakteriemi zastavuje růst škodlivých bakterií konkurenčním vyloučením a produkcí organických kyselin a antimikrobiálních sloučenin [25 - 27], čímž dochází ke snížení počtu klostridií na střevní sliznici. Snižují též možnost adheze enteropatogenních a enteroxigenních kmenů, např. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Yersinia pseudotuberculosis* [10].

Další pozitiva prisuzované probiotikům jsou anticholesterolová aktivita, zlepšené využití laktózy a antikarcinogenní aktivita [28, 29]. Probiotická kultura musí být přijata v dostatečném množství, jen tehdy dojde ke kladnému ovlivnění zdraví hostitele. Navrhovaná koncentrace pro probiotické bakterie je v rozmezí  $10^6$ – $10^7$  cfu/g produktu [30]. Mléčné výrobky, jako jsou kysané mléko a jogurt, jsou často využívány jako nositele probiotické kultury [31 - 33].

V současné době je též testováno uzavření probiotické matrice (enkapsulace) do vhodného obalu (např. alginát sodný a hydroxypropyl celulóza), který projde trávicím traktem a rozpadne se až v místě působení, tedy ve střevě. Enkapsulace zvyšuje stabilitu probiotických bakterií ve střevě [34].

## 2.5 Identifikace bakterií mléčného kvašení s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR)

Významné metody identifikace BMK jsou založeny na analýze DNA s využitím amplifikačních metod. Nejvíce se využívá polymerázová řetězová reakce. PCR (polymerase chain reaction) probíhá v podmínkách *in vitro*, tj. bez kultivace buněk. Pomocí této techniky může být rychle a vysoce selektivně namnožena konkrétní nukleotidová sekvence obsažená v jakékoliv DNA. Polymerázová řetězová reakce je v současné době velmi používána, například v diagnostice při analýze genetických chorob, infekčních onemocnění, při klonování genů či testování otcovství [21, 35] Velké využití má i v potravinářském průmyslu při analýze potravin [21].

### 2.5.1 Polymerázová řetězová reakce

Koncept amplifikace DNA poprvé navrhnul H. Gobind Khorana<sup>3</sup> v roce 1971. Až o patnáct let později Kary Mullis<sup>4</sup> metodu pojmenoval a uvedl ji do praxe. Zavedl metodu, kterou mohla být DNA namnožena během opakujících se cyklů s využitím termostabilní DNA polymerasy [21, 36].

DNA polymerasa se přirozeně vyskytuje v organismech. Při dělení v buňce syntetizuje duplikát DNA. Při amplifikaci byl tento enzym, nejprve izolovaný z *Escherichia coli*, použit ke klonování *in vitro*. Dvoušrobovice DNA byla denaturována při teplotě 96 °C. Takto vysokou teplotou byla DNA polymerasa *Escherichia coli* inaktivována a musela být po každé denaturaci doplněna. Proces amplifikace byl proto málo účinný. Jeho velká časová náročnost a velká spotřeba DNA polymerasy nebyla kompenzována výsledky [21,36]. Tyto problémy vyřešilo použití termostabilní DNA polymerasy z *Thermus aquaticus* (Taq polymerasa). [21]

### 2.5.2 Princip PCR

DNA je amplifikována termostabilní DNA polymerasou. Pro amplifikaci jsou potřeba chemicky syntetizované krátké jednořetězcové DNA fragmenty, které slouží jako primery pro syntézu DNA [21, 37]. Krátké oligonukleotidy (primery) se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA. Protože primery musí být chemicky syntetizovány, PCR může být použita pouze pro amplifikaci DNA, u které známe začáteční a koncovou nukleotidovou sekvenci. DNA-polymerasa nasyntetizuje obvykle několik miliard kopií požadované sekvence [21, 35].

Komponenty PCR jsou následující:

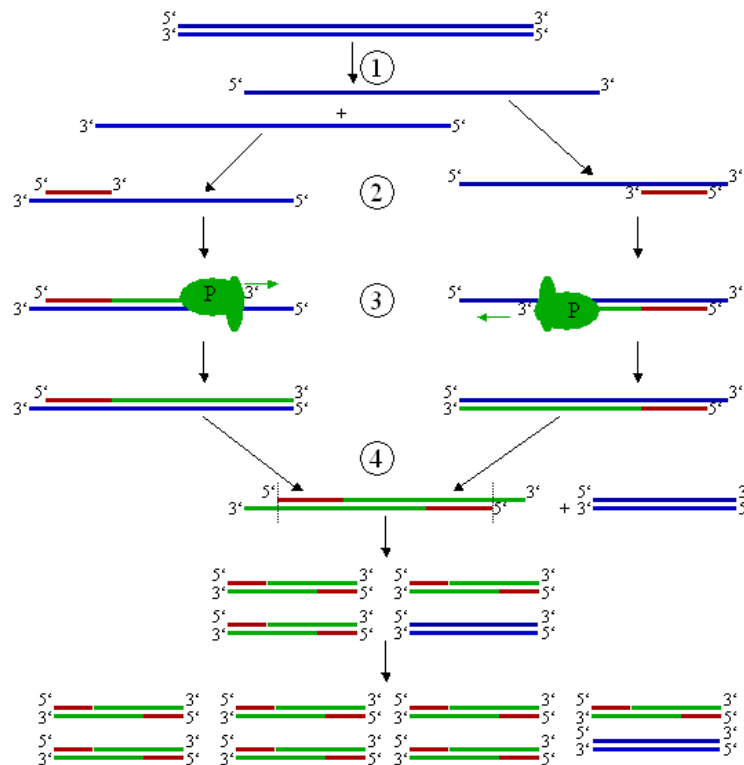
- DNA templát
- Dva primery (určují začátek a konec úseku DNA, který má být amplifikován)
- DNA polymerasa (termostabilní)
- Nukleotidy (DNA polymerasa je využívána při syntéze nové DNA)
- Pufř obsahující  $Mg^{2+}$  ionty a poskytující vhodné prostředí pro DNA polymerasu

PCR probíhá v přístroji nazývaném termocykler. Proces se skládá ze třiceti až čtyřiceti cyklů. Princip jednotlivých kroků PCR je uveden na Obr. 6 [21].

---

<sup>3</sup> H. Gobind Khorana se narodil roku 1922. V roce 1968 H. G. Khorana, Robert W. Holley (1922-1993) a Marshall W. Nirenberg (1927) dostali Nobelovu cenu za Fyziologii a Medicínu. [53]

<sup>4</sup> Kary Mullis (1944) získal v roce 1993 Nobelovu cenu za Chemii. [53]



**Obr. 6:** Princip jednotlivých kroků PCR

**- Denaturace DNA**

Rozpětí teploty 92 - 98 °C (optimum 95 °C). Pro fragmenty do 1 kbp obvykle po dobu 15 sekund. Pro větší fragmenty 0,5 – 1 minutu [38].

Před prvním cyklem reakce bývá denaturace prodloužena na 5 minut, aby se zvýšila pravděpodobnost, že se dlouhé molekuly templátové DNA úplně oddělí.

**- Připojení dvou primerů**

Hybridizace probíhá podle denaturační teploty dvouřetězcové templátové DNA s primerem snížené o 5 °C, obvykle mezi 50 a 55 °C. Nízká teplota podstatně snižuje specificitu reakce, vysoká teplota brání amplifikaci [38].

**- Syntéza nového řetězce**

Probíhá obvykle při teplotě 72 °C, což je optimální teplota pro *Taq* DNA polymerázu. Délka kroku je dána rychlostí syntézy. Pro fragmenty do 1 kbp 0,5 – 1 minuta, pro úseky 6 – 10 kbp až 15 minut [38].

Produkt třetího kroku se stává substrátem pro další cyklus.

PCR produkty (amplikony) se nejčastěji detekují pomocí gelové elektroforézy na agarose.



### 2.5.3 Detekce PCR produktu pomocí gelové elektroforézy na agaróse

PCR je metoda, která umožňuje identifikaci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že jí můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvením na gelu detegovat [35]. Velikost produktu PCR porovnáváme se standardem DNA (DNA žebříček), který obsahuje DNA fragmenty o známé velikosti [21].

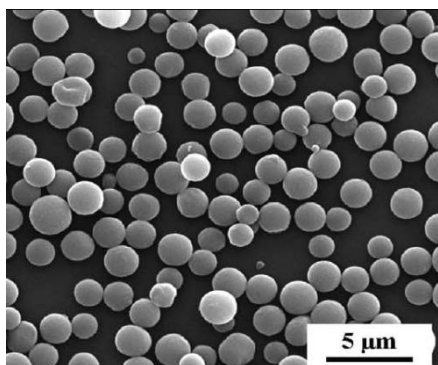
Gelová elektroforéza dělí fragmenty DNA podle velikosti. DNA se vzhledem k negativnímu náboji pohybuje směrem ke kladné elektrodě, přičemž delší fragmenty DNA se pohybují pomaleji, protože jsou v hustém gelu více zpomalovány. Po několika hodinách se fragmenty v gelu rozdělí podle velikosti [21].

DNA však není na agarosovém gelu možno vidět. Je proto nutné ji nějakým způsobem označit. Jednou z citlivých metod detekce je smíchání DNA s látkou (např. ethidium bromid), která po navázání na DNA fluoreskuje v ultrafialovém světle [21, 35].

### 2.5.4 Provádění PCR

PCR je velmi citlivá metoda. Musíme přijmout adekvátní opatření, abychom se vyhnuli kontaminaci jinými molekulami DNA vyskytujícími se v laboratorním prostředí (bakterie, viry, cizorodá DNA atd.). Míchání reakční směsi musí být prováděno ve speciálním boxu vyzářeném UV lampou za použití sterilních rukavic. Stejně tak musí být odděleny části laboratoře, v nichž se provádí izolace DNA, příprava směsí pro PCR a detekce produktů PCR. Vždy by měla být prováděna pozitivní a negativní kontrola pro odhalení případné kontaminace [21].

## 2.6 Magnetické nosiče pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR



**Obr. 7:** Magnetické mikročástice P(HEMA-co-GMA) [15]

Magnetické separační techniky jsou jednou z možností, jak urychlit nebo usnadnit některé běžně používané separační a purifikační techniky izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR, jakou je např. fenolová extrakce. Využívají malé magnetické částice [21, 38]. V naší práci byly používány mikročástice P(HEMA-co-GMA), které byly připraveny na Makromolekulárním ústavu Akademie věd ČR v Praze [21, 39]. Uvedené magnetické

mikročástice jsou zobrazeny na Obr. 7 pomáhají urychlit separaci DNA a snižují spotřebu toxických organických rozpouštědel [38].

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce byla izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR z komplexních matic probiotických preparátů a rodová a druhová identifikace bakterií, jejich přítomnost byla ve výrobku deklarována výrobcem.

Součástí práce bylo:

- ✓ Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk z preparátů
- ✓ Izolace celkové DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických nosičů
- ✓ Spektrofotometrické stanovení koncentrace izolované DNA
- ✓ Provedení PCR pro rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*
- ✓ Provedení PCR pro druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum* a *Streptococcus thermophilus*
- ✓ Srovnat výsledky identifikace mikroorganismů s údaji deklarovanými výrobcem

## 4 MATERIÁL

### 4.1 Použité komplexní matrice

Různé druhy tablet s probiotickým účinkem jsou uvedeny v Tabulce 6. Tablety byly zakoupeny v komerční síti.

**Tabulka 6:** Použité komplexní matrice s údaji deklarovanými výrobcem

Název	Druh	Probiotika	Pomocné látky
Zenflo	Potravinový doplněk	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	
Linex® Forte	Potravinový doplněk	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5) <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	dextrosa, inulin, mikrokrytalická celuloza (E 460), bramborový škrob, oligosacharidy, stearan hořečnatý (E 470b)
Probian	Potravinový doplněk	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	fruktooligosacharid, stearan hořečnatý, želatina, inulin
Nutra Bona	Potravinový doplněk	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	
GS Lactobacily FORTE	Potravinový doplněk	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	inulin, želatina, glycerol, rýžová mouka, protispěková látka (stearan hořečnatý, oxid křemičitý), potahovací látky (hydroxypropyl-methylceluloza, talek, barvivo (E 133)
Pangamin Bifi Plus	Potravinový doplněk	bifidobakterie a laktobacily	pivovarské kvasnice

## Pokračování Tabulky 6

Název	Druh	Probiotika	Pomocné látky
<b>Gyntima probiotika</b>	Vaginální tableta	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium</i> BB-12	laktosa, k. mléčná, proteosový pepton, k. folikum, extrakt z <i>Salvia officinalis</i> , PEG 32, PEG 20, polysorbát 20, chlorid sodný, sulfid hořečnatý
<b>Maldion</b>	Vaginální tableta	<i>Lactobacillus gasseri</i> EB01™ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB01™	bezvodá glukosa, laktitol monohydrát, kukuřičný škrob, oxid titaničitý, hydroxypolymethyl celuloza, stearan hořečnatý
<b>Fermalac vaginal</b>	Vaginální tableta	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 85% (47,6 mg) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 5% <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>termophilus</i> 10%	

## 4.2 Použité bakteriální kultury a DNA

- *Lactobacillus salivarius* CCDM 7274
- *Bifidobacterium bifidum* CCDM 3762

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z kmenů (izoláty byly získány od Mgr. Kristýny Turkové).

- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825
- *Lactobacillus plantarum* CCM 1904
- *Lactobacillus casei* CCM 4791
- *Bifidobacterium longum* CCM 4990
- *Bifidobacterium infantis* CCM 3764
- *Bifidobacterium bifidum* CCM 7274
- *Bifidobacterium animalis* CCM 7988
- *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

## 4.3 Chemikálie

### Chemikálie pro přípravu roztoků

- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- DNA standard (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR). Obsahuje fragmenty o délce: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Ethanol (Lachema, Brno, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg/ml) (EtBr) (Sigma, St. Lois, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol pH 7,8 (Sigma, St. Louis, USA)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid draselný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (HBO<sub>2</sub>) (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Renal, Budapešť, Maďarsko)
- Nanášecí pufr (2,5 % Ficoll 400) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PCR komponenty (Top. Bio, Praha, ČR)
- PEG 6000 (Sigma, St. Louis, USA)
- Proteinasa K (100 µg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
- RNaza A (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- SDS (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris base) (Amresco, Solon, USA)

## 4.4 Magnetické nosiče pro izolaci DNA

Ve své práci jsem využívala mikročástice poly-(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát (P(HEMA-*co*-GMA)) (1:1) o průměru částic 2,2 µm, s obsahem železa 6,5 % a obsahem COOH skupin 2,67 %. Částice byly připraveny na Makromolekulárním ústavu Akademie věd ČR v Praze [16] (Ing. D. Horák, CSc.).

## 4.5 Roztoky

### 4.5.1 Kultivační média

- M.R.S. médium

MRS médium připravit dle návodu od výrobce. V 1 000 ml destilované vody rozpustit 52 g MRS média, pH média upravit na hodnotu 6,2. Sterilovat v autoklávu (121 °C/15 minut).

- M.R.S. agar

MRS médium připravit podle návodu od výrobce. Přidat agarósu (15 g/l). Médium sterilovat v autoklávu (121 °C/15 minut). Poté bylo médium rozplněno do Petriho misek a uchovávat v ledničce.

### 4.5.2 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

202,2 g EDTA převést do 800 ml destilované vody, umístit na magnetickou míchačku. pH upravit přidáním asi 20 g NaOH v peletkách. Nejprve přidat 15 g a potom zbytek za kontroly pH. EDTA se rozpustí v pH 8,0. Doplnit destilovanou vodou do 1 l. Roztok je možné přefiltrovat. Sterilizovat v autoklávu (121 °C/15 min). Rozplnit do alikvotů.

- 1 M Tris-HCl (pH 7,8)

V 80 ml destilované vody rozpustit v 12,1 g Tris-base. Upravit pH pomocí koncentrované HCl. Doplnit destilovanou vodou do 100ml. Sterilovat v autoklávu (121 °C, 15 minut).

- Lyzační roztok A (10 mM Tris pH 7,8, 5 mM EDTA pH 8,0)

Sterilně smíchat 1 ml 1M Tris HCl (pH 7,8), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody. Přípravovat sterilně ze zásobních roztoků.

- Lyzační roztok B (10 mM Tris pH 7,8, 5 mM EDTA pH 8,0, lysozym 3 mg/ml)

Sterilně smíchat 1 ml 1M Tris HCl (pH 7,8) (Amresco, Solon, USA), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody. Před použitím do roztoku přidat lysozym. Přípravovat vždy čerstvý.

- SDS (10 %, 20 %)

10 (20) g SDS rozpustit v 90 (80) ml sterilní destilované vody. V případě pomalého rozpouštění zahřát na 68 °C. Upravit pH na 7,0 několika kapkami koncentrované HCl. Doplnit destilovanou vodou do 100 ml. Nemusí se sterilizovat. Při vážení práškového SDS je nutné používat ústenku.

- Proteinasa K (100 µg/ml)

100 µg proteináasy K rozpustit v 1 ml sterilní destilované vody. Rozplnit do alikvotů a uchovávat v - 20 °C.

- Fenol (pH 7,8)

- CIZ

Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1

- 1 M NaOH

40 g NaOH rozpustit v 800 ml destilované vody. Doplnit do 1 l. Rozplnit do alikvotů.

#### **4.5.3 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetického nosiče**

- 10 x TE pufr

Sterilně smíchat 1 ml 1 M Tris (pH 7,8) a 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody. Rozplnit do alikvotů. Před použitím se 10x zředí sterilní destilovanou vodou na výslednou koncentraci 0,01 M Tris a 0,001 M EDTA.

- 5 M NaCl

58,4 g NaCl rozpustit ve 150 ml destilované vody. Doplnit destilovanou vodou do 200 ml. Sterilizovat v autoklávu (121 °C/15 minut).

- 40 % PEG 6000

40 g PEG 6000 rozpustit v 60 ml sterilní destilované vody. Doplnit sterilní destilovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při 4 °C.

- 70 % ethanol

Smíchat 70 ml 96 % ethanolu a 26 ml destilované vody.

#### **4.5.4 Roztoky pro agarósovou gelovou elektroforézu**

- DNA standard (100 bp)

Obsahuje fragmenty o délce: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp

- 5 × TBE pufr

54 g Tris-base a 27,5 g kyseliny borité rozpustit v 600 ml destilované vody. Přidat 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Upravit pH na 8,0 pomocí 1 M NaOH. Doplnit destilovanou vodou do 1 l. Lze přefiltrovat a sterilizovat v autoklávu. Před použitím se 10 x naředí na výslednou koncentraci 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá a 1 mM EDTA.

- Agarosový gel

1,8%: 1,8 g agarosy rozvařit ve 100 ml 0,5 × koncentrovaného TBE pufru

- Ethidium bromid (0,5 µg/ml)

100 µl roztoku EtBr o koncentraci 2,5 mg/ml zředit 500 ml sterilní vody.



## 4.6 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min<sup>-1</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Fotoaparát Polaroid CD 34 na film T667 (Cambridge, Velká Británie)
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn, Německo)
- Magnetický separátor Invitrogen Dynal AS (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Discovery HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (Sencor, ČR)
- Minicentrifuga C1301 (Labnet international, Inc., USA)
- Minicycler PTC 150 (MJ Research, Watertown, USA)
- NanoPhotometr (Implen, Německo)
- Termocycler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Termostat – Mini incubator (Labnet, USA)
- Transluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí Lighting volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
  
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky.

## 5 METODY

Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé postupy provedeny podle návodů k laboratorním cvičením Speciální metody analýzy mikroorganismů I [40]

### 5.1 Izolace bakteriální DNA

#### 5.1.1 Lyze buněk

Sediment buněk byl resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A bez lysozymu. Suspenze byla důkladně promíchána.

Suspenze byla centrifugována při 15000 otáčkách po dobu 3 minut. Supernatant byl opatrně slit a sediment nechán okapat.

K sedimentu bylo přidáno 500  $\mu$ l lyzačního roztoku B [10 mM Tris HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysozym] a sediment byl důkladně rozsuspendován.

Vzorky byly inkubovány 1 hod při laboratorní teplotě za občasného promíchání. K suspenzi bylo přidáno 25  $\mu$ l 20 % SDS, 5  $\mu$ l proteinasy K (100  $\mu$ g/ml) a vše bylo důkladně promícháno.

Vzorky byly inkubovány přes noc při 55 °C.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk byla prováděna izolace DNA metodou fenolové extrakce a magnetickým nosičem. Vzorky byly uchovávány při -20 °C, aby se předešlo možné degradaci DNA.

### 5.2 Izolace a purifikace DNA metodou fenolové extrakce

#### 5.2.1 Fenolová extrakce

- K hrubým lyzátům buněk (500  $\mu$ l) bylo přidáno stejné množství fenolu (pH 7,8). Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchána po dobu 4 minut.
- Centrifugace 15 000 otáček/3 minuty.
- Odebrání horní vodní fáze s DNA do čisté ependorfovy zkumavky.
- K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700  $\mu$ l CIZ a směs byla promíchána kývavým pohybem po dobu 4 minut.
- Centrifugace 15 000 otáček/3 minuty.
- Horní vodní fáze byla odebrána do čisté ependorfovy zkumavky.

### 5.2.2 Srážení DNA 96 % ethanolem

- Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného a vzorek byl promíchán.
- Poté bylo přidáno 2,5 objemu 96 % ethanolu a směs byla důkladně promíchána.
- DNA byla ponechána srážet 1 hodinu při -20°C.
- Směs byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 15 minut.
- Supernatant byl slit a sediment byl sušen v exsikátoru (20 min).
- DNA byla rozpuštěna ve 100 µl TE pufru.

Takto izolovaná DNA byla použita pro spektrofotometrické měření a polymerázovou řetězovou reakci.

### 5.3 Izolace DNA pomocí magnetických nosičů

DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk připravených dle kapitoly 5.1. Byly využity magnetické částice (P(HEMA-*co*-GMA)), které jsou popsány v kapitole 4.4.

#### 5.3.1 Příprava směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů

Separční směs s nosiči byla připravována v eppendorfových zkumavkách. Pořadí přidávání jednotlivých komponent je uvedeno v Tabulce 7.

**Tabulka 7:** Příprava separačních směsí pro izolaci DNA magnetickým nosičem P(HEMA-*co*-GMA)

	<b>Komponenta</b>	<b>Objem (µl)</b>
1	NaCl (5 M)	400
2	DNA matrice	300
2	PEG (40 %)	200
3	Magnetické částice (2 mg/ml)	100
<b>Výsledný objem</b>		1000

- Komponenty byly smíchány v daném pořadí a byly ponechány inkubovat 15 min při laboratorní teplotě.
- Částice s navázanou DNA byly separovány pomocí magnetu po dobu 15 minut.
- Supernatant byl odpipetován a částice s DNA byly 2 × promyty 70 % etanolem.
- Supernatant byl odpipetován a částice byly sušeny v sušárně (55 °C) do odpaření veškerého ethanolu.
- Částice byly posléze resuspendovány ve 100 µl TE pufru a DNA ponechána eluovat při laboratorní teplotě přes noc.

- Druhý den byly částice odseparovány a eluát (s uvolněnou DNA) byl přenesen do čisté ependorfovy zkumavky.

## 5.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty na NanoPhotometru

Koncentrace DNA byla měřena na NanoPhotometru pomocí speciálních Label Gard kyvet. Měření bylo prováděno při laboratorní teplotě. Vzorky DNA vytemperované na laboratorní teplotu byly důkladně promíchány.

### 5.4.1 Postup spektrofotometrického měření

Byl vložen Label Guard<sup>TM</sup> (speciální kyveta) ve směru procházejícího světelného paprsku. Pro analýzu nukleových kyselin byl z předvolených metod zvolen postup:

- Label Gard Applications
- Nucleic acid
- ds DNA/ss DNA

Byl vybrán „lid“ dle předpokládané koncentrace DNA jak uvádí Tabulka 8.

**Tabulka 8:** Výběr víčka „lid“

Víčko	lid 5	lid 10	lid 50	lid 100
Optická dráha (nm)	2	1	0,2	0,1
Objem vzorku (μl)	6 - 10	3 - 5	0,7 - 4	0,7 - 3
Měřitelný rozsah DNA (ng/μl)	7 - 350	14 - 700	250 - 4000	500 - 8000

Do měřicího centra bylo napipetováno vhodné množství TE pufru sloužícího jako slepý vzorek. Byla provedena kalibrace přístroje.

Vzorky byly pipetovány ve stejném objemu jako slepý vzorek (obvykle 6 μl) a proměřeny. Koncentrace DNA (ng/μl) a hodnoty  $A_{230nm}$ ,  $A_{260nm}$ ,  $A_{280nm}$ ,  $A_{320nm}$ ,  $A_{260nm}/A_{280nm}$ ,  $A_{260nm}/A_{320nm}$  byly odečteny z displeje. Víčko bylo po každém měření očištěno ethanolem.

## 5.5 Polymerázová řetězová reakce

### 5.5.1 Detekce PCR produktů pomocí agarosové gelové elektroforézy

Agarosová gelová elektroforéza byla použita k ověření přítomnosti PCR produktů.

#### 5.5.1.1 Příprava agarosového gelu

- Na 1,8 % agarosový gel bylo naváženo 1,8 g agarosy ke které bylo přidáno 100  $\mu$ l TBE pufru.
- Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě za občasného míchání.
- Roztok byl nalit do vaničky s hřebínkem. Ta byla předem umístěna na vodorovné ploše.
- Gel byl ponechán tuhnout při laboratorní teplotě po dobu cca 30 minut.
- Před nanášením vzorku na gel byl opatrně vyjmut hřebínek a směs pro PCR směs byla nanášena do vzniklých komůrek.

#### 5.5.1.2 Nanášení vzorku na gel, gelová elektroforéza a barvení

- Před nanesením do komůrky gelu byla směs pro PCR smíchána s nanášecím pufrům v poměru 5:1 (25  $\mu$ l PCR směsi + 5  $\mu$ l nanášecího pufru).
- Poté byly vzorky nanášeny do komůrek gelu.
- Gel byl umístěn do elektroforetické vany, převrstven 0,5  $\times$  koncentrovaným TBE pufrům a připojen k stejnosměrnému proudu tak, aby záporně nabitá DNA putovala ke kladnému pólu.
- Elektroforéza byla spuštěna připojením zdroje nastaveného na 80 V. Separace DNA molekul probíhala cca 90 minut (do 2/3 gelu).
- Po skončení elektroforézy byl gel na 1/2 hodiny vložen do lázně s ethidium bromidem (0,5  $\mu$ g/ml).
- Obarvený gel byl opláchnut destilovanou vodou a prohlížen na transluminátoru v UV světle (305 nm) a vyfotografován digitálním fotoaparátem.

### 5.5.2 Komponenty pro PCR

- Voda pro PCR – voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská Lupča, SR)
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerasu 1.1 (10  $\times$  koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Složení: bromfenolová modř, xylen cyanol
- dNTP směs (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Oligonukleotidové primery (100 pmol/ $\mu$ l) (Biotech, Hradec Králové, ČR)
- *Taq* polymerasa 1.1 (1U/ $\mu$ l) (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA matrice

### 5.5.3 PCR pro doménu *Bacteria* s primery F eub a R eub

Pro doménu *Bacteria* byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 9. V Tabulce 10 je uvedeno složení PCR směsi a v Tabulce 11 amplifikační program.

**Tabulka 9:** Specifické primery pro doménu *Bacteria* [41]

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu (bp)
F eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466
R eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

**Tabulka 10:** Složení PCR směsi (25 μl)

Komponenta PCR	Objem (μl)
Voda pro PCR	14,5
10 × reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP	1,0
primer F eub (10 pmol/μl)	1,0
Primer E eub (10 pmol/μl)	1,0
Taq DNA polymerasa (1U/μl)	2,0
DNA matrice	3,0

**Tabulka 11:** Program použitý pro doménově specifickou PCR.

Doména	Počet
<i>Bacteria</i>	cyklů
94 °C/5 min	30
94 °C/30 s	
56 °C/30 s	
72 °C/1 min	
72 °C/5 min	

#### 5.5.4 Rodově specifická PCR – *Lactobacillus* s primery LbLMA 1-rev a R16-1

Pro rodově specifickou PCR byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 12. V Tabulce 13 je uvedeno složení PCR směsi a v Tabulce 16 amplifikační programy.

**Tabulka 12:** Specifické primery pro rod *Latobacillus*

Druh	Zdroj	
Primer	Sekvence primeru (5'-3')	PCR produkt (bp)
<i>Lbctobacillus</i>	[42]	
LbLMA 1-rev	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250
R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	
<i>Lbctobacillus</i>	[41]	
F allact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92
R allact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	

**Tabulka 13:** Složení PCR směsi (25 μl)

Komponenta PCR	Objem (μl)
Voda pro PCR	15,0
10 × reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP	0,5
2 × primer (10 pmol/μl)	2 × 0,5
Taq DNA polymerasa (1U/μl)	1,0
DNA matrice	5,0

#### 5.5.5 Druhově specifické PCR – *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*

Pro druhově specifickou PCR byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 14. V Tabulce 15 je uvedeno složení PCR směsi a v Tabulce 17 programy použité pro amplifikaci.

**Tabulka 14:** Druhově specifické primery

<b>Druh</b>	<b>Zdroj</b>	
Primer	Sekvence primeru (5'-3')	PCR produkt (bp)
<i>L. acidophilus</i> [43]		
Aci16SI	AGC TGA ACC AAC AGA TTC AC	800
16SII	ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC	
<i>L. rhamnosus</i> [43]		
Pr I	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G	410 a 200
Rha II	GCG ATG CGA ATT TCT ATT ATT	
<i>L. plantarum</i> [43]		
Plan I	GCC GCC TAA GGT GGG ACA GAT	500 a 250
Plan II	TTA CCT AAC GGT AAA TGC GA	
<i>L. casei</i> [43]		
Pr I	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G	400 a 200
Cas II	GCG ATG CGA ATT TCT TTT TC	

**Tabulka 15:** Složení PCR směsi (25 µl)

<b>Komponenta PCR</b>	<b>Aci16SI 16SII</b>	<b>Pr I Rha II</b>	<b>Plan I Plan II</b>	<b>Pr I Cas II</b>
Voda pro PCR	15,0	14,5	14,5	14,5
10 × reakční pufr kompletní směs dNTP	2,5 0,5	2,5 1,0	2,5 1,0	2,5 1,0
2 × primer (10 pmol/µl)	2 × 0,5	2 × 1,0	2 × 1,0	2 × 1,0
Taq DNA polymerasa (1U/µl)	1,0	1,0	1,0	1,0
DNA matrice	5,0	5,0	5,0	5,0

**Tabulka 16:** Programy použité pro rod *Lactobacillus*

<b>Rod</b> <i>Lactobacillus</i>	<b>Počet cyklů</b>	<b>Rod</b> <i>Lactobacillus</i>	<b>Počet cyklů</b>
94 °C/5 min	30	94 °C/5 min	30
94 °C/30 s		94 °C/30 s	
55 °C/30 s		58 °C/30 s	
72 °C/1 min		72 °C/1 min	
72 °C/5 min		72 °C/5 min	



**Tabulka 17:** Programy použité pro druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*

Druh <i>L. acidophilus</i>	Počet cyklů	Druh <i>L. plantarum</i>	Počet cyklů	Druh <i>L. casei</i>	Počet cyklů
<b><i>L. rhamnosus</i></b>					
94 °C/5 min		94 °C/5 min		94 °C/5 min	
94 °C/30 s	30	94 °C/30 s	30	94 °C/30 s	30×
58 °C/30 s		57 °C/30 s		55 °C/30 s	
72 °C/1 min		72 °C/1 min		72 °C/1 min	
72 °C/5 min		72 °C/5 min		72 °C/5 min	

### 5.5.6 Rodově specifická PCR – *Bifidobacterium* s primery Bif-164 a Bif-662

Pro rodově specifickou PCR byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 18. V Tabulce 19 je uvedeno složení PCR směsi a v Tabulce 22 amplifikační program.

**Tabulka 18:** Specifické primery pro rod *Bifidobacterium* [44]

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu (bp)
Bif-164	GGG TGG TAA TGC CGG ATG	523
Bif-662	CCA CCG TTA CAC CGG GAA	

**Tabulka 19:** Složení PCR směsi (25 μl)

Komponenta PCR	Objem (μl)
Voda pro PCR	15,0
10 × reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP	0,5
primer Bif-164 (10 pmol/μl)	0,5
primer Bif-662 (10 pmol/μl)	0,5
Taq DNA polymerasa (1U/μl)	1,0
DNA matrice	5,0

### 5.5.7 Druhově specifické PCR – *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*

Pro druhově specifickou PCR byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 20. V Tabulce 21 je uvedeno složení PCR směsi a v Tabulce 22 programy použité pro amplifikaci.

**Tabulka 20:** Druhově specifické primery

Druh	Zdroj	
Primer	Sekvence primeru (5'-3')	PCR produkt (bp)
<i>B. animalis</i> [45]		
Pbi R1	GCA CCA CCT GTG AAC CG	925
Ban F2	AAC CTG CCC TGT G	
<i>B. infantis</i> [46]		
BiINF-1	TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC	828
BiINF-2	GGA AAC CCC ATC TCT GGG AT	
<i>B. longum</i> [46]		
BiLON-1	TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC	831
BiLON-2	CGA AGG CTT GCT CCC AGT	
<i>B. bifidum</i> [46]		
BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	278
BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCAA	

**Tabulka 21:** Složení PCR směsi (25 µl)

Komponenta PCR	Objem (µl)
Voda pro PCR	15,0
10 × reakční pufr kompletní směs dNTP	2,5
2 × primer (10 pmol/µl)	0,5
Taq DNA polymerasa (1U/µl)	2 × 0,5
DNA matrice	1,0
	5,0

**Tabulka 22:** Programy použité pro rod *Bifidobacterium* a druhy *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* a *Bifidobacterium bifidum*

Rod <i>Bifidobacterium</i>	Počet cyklů	Druh <i>B. animalis</i>	Počet cyklů	Druh <i>B. longum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. bifidum</i>	Počet cyklů
94 °C/5 min	35	94 °C/5 min	35	94 °C/5 min	35
94 °C/1 min		94 °C/30 s		94 °C/20 s	
55 °C/1min		58 °C/30 s		55 °C/20 s	
72 °C/1 min		72 °C/1 min		72 °C/30 min	
72 °C/5 min		72 °C/5 min		72 °C/5 min	

### 5.5.8 Druhově specifická PCR – *Streptococcus thermophilus* s primery S.therm-1 a S.therm-2

Pro druhově specifickou PCR byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 23. V Tabulce 24 je uvedeno složení PCR směsí a v Tabulce 25 amplifikační program.

**Tabulka 23:** Druhově specifické primery

Druh	Zdroj	
Primer	Sekvence primeru (5'-3')	PCR produkt (bp)
<i>S. thermophilus</i> [47]		
S.therm-1	CAC TAT GCT CAG AAT ACA	968
S.therm-2	CGA ACA GCA TTG ATG TTA	

**Tabulka 24:** Složení PCR směsí (25 μl)

Komponenta PCR	Objem (μl)
Voda pro PCR	15,0
10 × reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP	0,5
primer S.therm-1 (10 pmol/μl)	0,5
primer S.therm-2 (10 pmol/μl)	0,5
Taq DNA polymerasa (1U/μl)	1,0
DNA matrice	5,0

**Tabulka 25:** Program použitý pro druhově specifickou PCR *Streptococcus thermophilus*.

Druh	Počet cyklů
<i>S. thermophilus</i>	
95 °C/5 min	30
95 °C/1 min	
58 °C/1min	
72 °C/1 min	
72 °C/5 min	

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Kultivace čisté kultury buněk v tekutém médiu a na pevném agaru

Bakteriální kmeny *Lactobacillus salivarius* CCDM 7274 a *Bifidobacterium bifidum* CCDM 3762 byly kultivovány v tekutém MRS médiu s přidavkem 0,05 % cysteinu a poté naočkovány pomocí křížového roztěru na plotny s tuhým MRS agarem s obsahem 0,05 % cysteinu.

#### 6.1.1 Kultivace bakterií rodu *Lactobacillus*

Kultura kmene *Lactobacillus salivarius* CCDM 7274 byla naočkována do tekutého MRS média s 0,05 % cysteinem a kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin.

Takto narostlé bakteriální kultury byly rozočkovány metodou křížového roztěru (Obr. 8) na pevném MRS médiu s obsahem 0,05 % cysteinu a kultivovány aerobně při 37°C po dobu 24 hodin.



**Obr. 8:** Křížový roztěr bakteriální kultury rodu *Lactobacillus*.

- ✓ Tekuté médium se zakalilo. Na miskách narostly kolonie bílého, neprůhledného a lesklého vzhledu. Kolonie byly stejného tvaru s pravidelným ohraničením.

#### 6.1.2 Kultivace bakterií rodu *Bifidobacterium*

Kultura kmene *Bifidobacterium bifidum* CCDM 3762 byla naočkována do tekutého MRS média s 0,05 % cysteinem a kultivovány anaerobně při 37 °C po dobu 3-4 dnů.

Takto narostlé bakteriální kultury byly rozočkovány metodou výsevu (Obr. 9) na pevném MRS médiu s obsahem 0,05 % cysteinu a kultivovány anaerobně při 37°C po dobu 3-4 dnů.



**Obr. 9:** Výsev bakteriální kultury rodu *Bifidobacterium*.

- ✓ Tekuté médium se zakalilo. Na miskách narostly kolonie stejného tvaru, bílého, neprůhledného a lesklého vzhledu.

## 6.2 Příprava hrubého lyzátu buněk

Hrubé lyzáty byly připraveny dle kapitoly 5.1.

Izolace DNA byla provedena metodou fenolové extrakce (viz. kapitola 5.2). Vzorke hrubých lyzátů buněk byly uchovávány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby se předešlo možné degradaci.

Přítomnost DNA byla stanovena spektrofotometricky. DNA byla naředěna na koncentraci  $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ .

- ✓ Množství izolované DNA bylo dostatečné pro PCR.

### 6.3 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

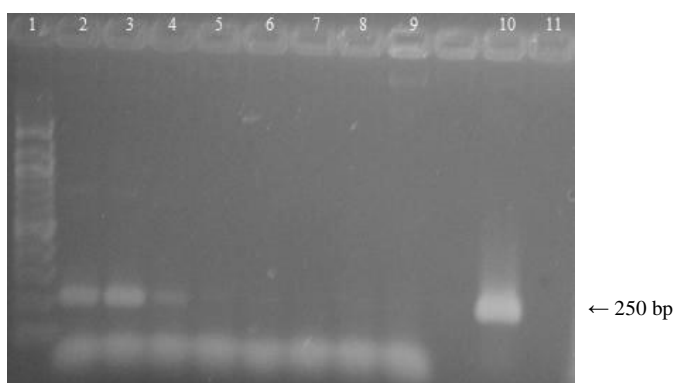
Byla provedena PCR s purifikovanou DNA izolovanou z čisté bakteriální kultury. DNA z hrubých lyzátů buněk byla izolována metodou fenolové extrakce. Do PCR směsi bylo použito různé množství DNA s cílem zjistit citlivost PCR.

#### 6.3.1 Rodově specifická PCR *Lactobacillus* s různým množstvím DNA matrice čisté bakteriální kultury

DNA izolovaná z čisté kultury *Lactobacillus salivarius* CCDM 7274 byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována v PCR s rodově specifickými primery LbLMA-1 a R 16-1 [42]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt 250 bp (Obr. 10).

**Obr. 10:** Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (250 bp) s primery LbLMA-1 a R16-1. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Lactobacillus salivarius* CCDM 7274.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	Standard	100 bp žebříček
2	10 ng/μl	+++
3	1 ng/μl	+++
4	100 pg/μl	+
5	10 pg/μl	–
6	1 pg/μl	–
7	100 fg/μl	–
8	10 fg/μl	–
9	1 fg/μl	–
10	PK	++++
11	NG	–



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lactobacillus salivarius* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 500 pg.

### 6.3.2 Druhově specifická PCR pro různé druhy *Lactobacillus* s různým množstvím DNA matrice čisté bakteriální kultury

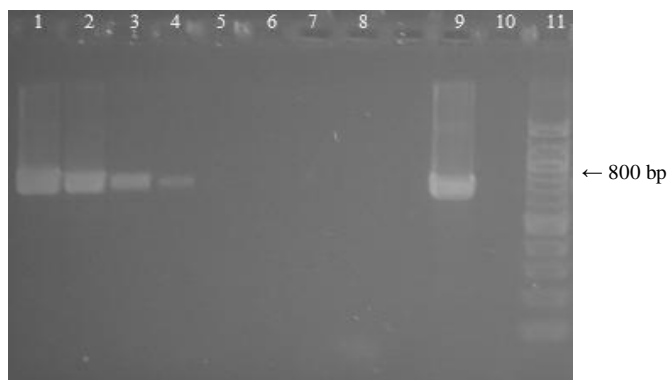
Byla testována druhově specifická PCR pro druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*. Do PCR byla použita čistá DNA sbírkových kmenů izolovaná metodou fenolové extrakce.

### 6.3.3 Druhově specifická PCR *Lactobacillus acidophilus*

DNA z čisté kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery Aci16SI a 16SII [43]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 800 bp (Obr. 11).

**Obr. 11:** Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (800 bp) s primery Aci16SI a 16SII. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	10 ng/μl	++++
2	1 ng/μl	+++
3	100 pg/μl	++
4	10 pg/μl	+
5	1 pg/μl	–
6	100 fg/μl	–
7	10 fg/μl	–
8	1 fg/μl	–
9	PK	++++
10	NG	–
11	Standard	100 bp žebříček



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lactobacillus acidophilus* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

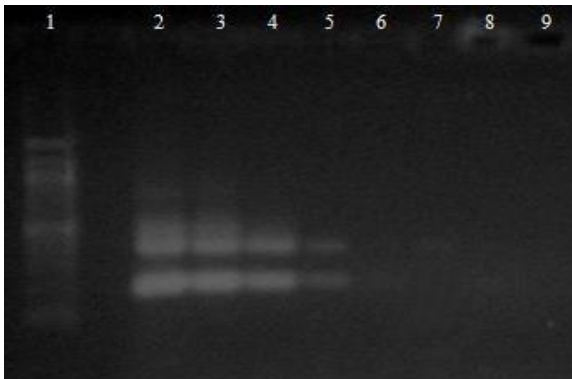
- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 50 pg.

### 6.3.4 Druhově specifická PCR *Lactobacillus rhamnosus*

DNA z čisté kultury *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825 byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery PrI a RhaII [43]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 200 a 400 bp (Obr. 12).

**Obr. 12:** Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (200 a 400 bp) s primery PrI a RhaII. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	Standard	100 bp žebříček
2	10 ng/μl	++++
3	1 ng/μl	+++
4	100 pg/μl	++
5	10 pg/μl	+
6	1 pg/μl	–
7	100 fg/μl	–
8	10 fg/μl	–
9	1 fg/μl	–



← 400 bp  
← 200 bp

PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lactobacillus rhamnosus* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 50 pg.




### 6.3.5 Druhově specifická PCR *Lactobacillus plantarum*

DNA z čisté kultury *Lactobacillus plantarum* CCM 1904 byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery PlanI a PlanII [43]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 300 a 550 bp (Obr. 13).

**Obr. 13:** Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (300 a 550 bp) s primery PlanI a Plan II. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 1904.

Běh.	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	Standard	100 bp žebříček
2	10 ng/μl	++++
3	1 ng/μl	++
4	100 pg/μl	+
5	10 pg/μl	–
6	1 pg/μl	–
7	PK	++++
8	NG	–



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lactobacillus plantarum* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 500 pg.

### 6.3.6 Druhově specifická PCR *Lactobacillus casei*

DNA z čisté kultury *Lactobacillus casei* CCM 4791 byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery PrI a CasII [43]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 200 a 450 bp (Obr. 14).

**Obr. 14:** Agarózová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (200 a 450 bp) s primery při a CasII. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Lactobacillus casei* CCM 4791.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	Standard	100 bp žebříček
2	10 ng/μl	++++
3	1 ng/μl	+++
4	100 pg/μl	++
5	10 pg/μl	+
6	1 pg/μl	–
7	PK	++++
8	NG	–



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lactobacillus casei* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 50 pg.

## 6.4 Rodově specifická PCR pro rod *Bifidobacterium*

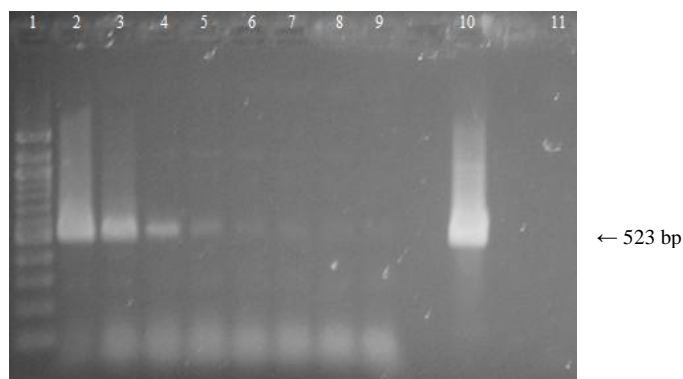
Byla provedena PCR s purifikovanou DNA izolovanou z čisté bakteriální kultury. DNA z hrubých lyzátů buněk byla izolována metodou fenolové extrakce. Do PCR směsi bylo použito různé množství DNA s cílem zjistit citlivost PCR.

### 6.4.1 Rodově specifická PCR *Bifidobacterium* s různým množstvím DNA matrice izolované z čisté bakteriální kultury

DNA izolovaná z čisté kultury *Bifidobacterium bifidum* CCDM 7274 byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s rodově specifickými primery Bif-164 a Bif-662 [44]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 523 bp (Obr. 15).

**Obr. 15:** Agarózová gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (523 bp) s primery Bif-164 a Bif-662. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Bifidobacterium bifidum* CCDM 7274.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	Standard	100 bp žebříček
2	10 ng/μl	++++
3	1 ng/μl	++++
4	100 pg/μl	++
5	10 pg/μl	+
6	1 pg/μl	–
7	100 fg/μl	–
8	10 fg/μl	–
9	1 fg/μl	–
10	PK	++++
11	NG	–



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bifidobacterium bifidum* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 50 pg.

## 6.4.2 Amplifikace druhově specifické PCR pro různé druhy *Bifidobacterium* s různým množstvím DNA matrice čisté bakteriální kultury

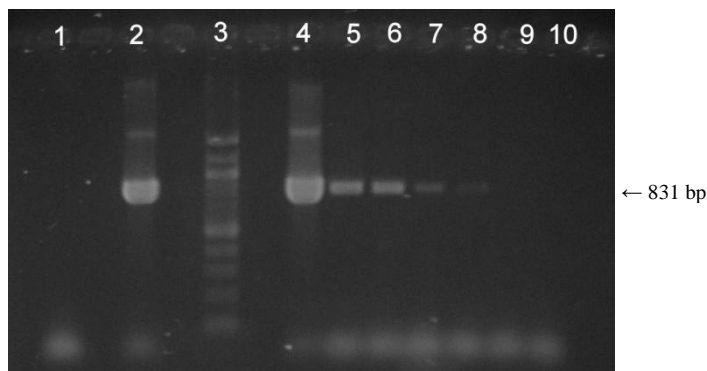
Byla testována druhově specifická PCR pro druhy *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*. Do PCR byla použita čistá DNA sbírkových kmenů izolovaná metodou fenolové extrakce.

### 6.4.3 Druhově specifická PCR *Bifidobacterium longum*

DNA z čisté kultury *Bifidobacterium longum* CCM 4990 byla naředěna TE puforem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery BiLON-1 a BiLON-2 [46]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 831 bp (Obr. 16).

**Obr. 16:** Agarózová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (831 bp) s primery BiLON-1 a BiLON-2. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Bifidobacterium longum* CCM 4990.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	NG	–
2	PK	++++
3	Standard	100 bp žebříček
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	–



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bifidobacterium longum* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

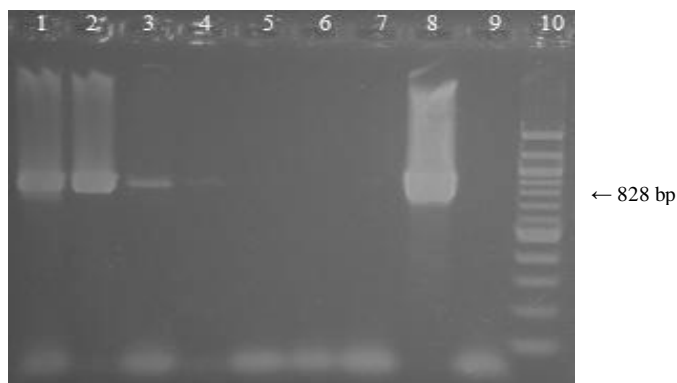
- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 5 pg.

#### 6.4.4 Druhově specifická PCR *Bifidobacterium infantis*

DNA z čisté kultury *Bifidobacterium infantis* CCM 3764 byla naředěna TE pufrům na koncentraci 100 pg/μl – 100 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery BiINF-1 a BiINF-2 [46]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 828 bp (Obr. 17).

**Obr. 17:** Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (828 bp) s primery BiINF-1 a BiINF-2. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Bifidobacterium infantis* CCM 3764.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	100 pg/μl	+++
2	10 pg/μl	+++
3	1 pg/μl	++
4	100 fg/μl	+
5	10 fg/μl	–
6	1 fg/μl	–
7	100 ag/μl	–
8	PK	++++
9	NG	–
10	Standard	100 bp žebříček



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bifidobacterium infantis* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 500 fg.

### 6.4.5 Druhově specifická PCR *Bifidobacterium bifidum*

DNA z čisté kultury *Bifidobacterium bifidum* CCM 7274 byla naředěna TE pufrům na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery BiBIF-1 a BiBIF-2 [46]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 278 bp (Obr. 18).

**Obr. 18:** Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (278 bp) s primery BiBIF-1 a BiBIF-2. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Bifidobacterium bifidum* CCM 7274.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	Standard	100 bp žebříček
2	10 ng/μl	+++
3	1 ng/μl	+++
4	100 pg/μl	++
5	10 pg/μl	–
6	1 pg/μl	–
7	100 fg/μl	–
8	10 fg/μl	–
9	1 fg/μl	–



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bifidobacterium bifidum* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

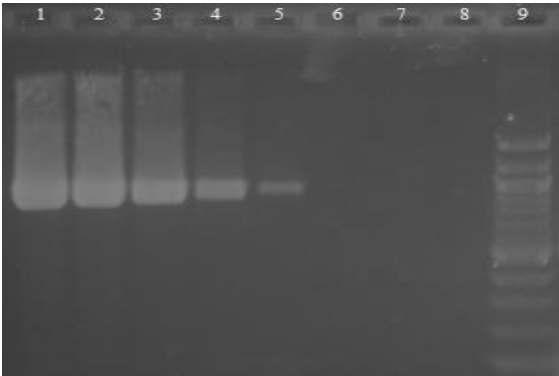
- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 500 pg.

#### 6.4.6 Druhově specifická PCR *Bifidobacterium animalis*

DNA z čisté kultury *Bifidobacterium animalis* CCM 4988 byla naředěna TE pufrem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery PbiR1 a BanF2 [45]. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 925 bp (Obr. 19).

**Obr. 19:** Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (925 bp) s primery PbiR1 a BanF2. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Bifidobacterium animalis* CCM 4988.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	10 ng/μl	++++
2	1 ng/μl	++++
3	100 pg/μl	++++
4	10 pg/μl	+++
5	1 pg/μl	++
6	100 fg/μl	–
7	10 fg/μl	–
8	1 fg/μl	–
9	Standard	100 bp žebříček



← 925 bp

PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě; – PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bifidobacterium animalis* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 5 pg.

## 6.5 Druhově specifická PCR pro druh *Streptococcus*

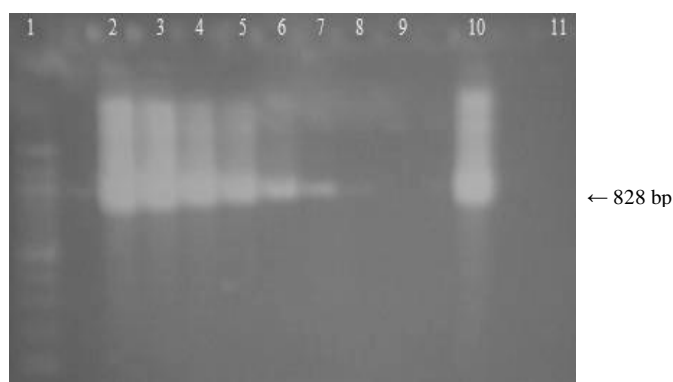
Byla testována druhově specifická PCR pro druh *Streptococcus thermophilus*. Do PCR byla použita čistá DNA sbírkových kmenů.

### 6.5.1 Druhově specifická PCR *Streptococcus thermophilus* s různým množstvím DNA matrice čisté bakteriální kultury

DNA z čisté kultury *Streptococcus thermophilus* CCDM 4757 byla naředěna TE puforem na koncentraci 10 ng/μl – 1 fg/μl a následně amplifikována s druhově specifickými primery S.therI a S.therII. Do PCR směsi bylo přidáno 5 μl DNA. Amplifikoval se PCR produkt délky 950 bp (Obr. 20).

**Obr. 20:** Agarosová gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (950 bp) s primery S.thermI a S.thermII. Amplifikováno bylo 5 μl DNA *Streptococcus thermophilus* CCDM 4757.

Běh	Koncentrace DNA	PCR produkt
1	Standard	100 bp žebříček
2	10 ng/μl	++++
3	1 ng/μl	++++
4	100 pg/μl	++++
5	10 pg/μl	++++
6	1 pg/μl	+++
7	100 fg/μl	++
8	10 fg/μl	+
9	1 fg/μl	–
10	PK	++++
11	NG	–



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Streptococcus thermophilus* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

- ✓ Nejnižší množství DNA amplifikované v PCR za vzniku PCR produktů dobře detegovatelných na gelu je 50 fg.



## 6.6 Shrnutí všech citlivostí v rodově a druhově specifických PCR

V Tabulce 26 jsou uvedeny nejnižší množství DNA, které se amplifikovaly v rodově a jednotlivých druhově specifických PCR za vzniku PCR produktů detekovatelných na gelu. Zároveň je uvedeno množství buněk, které odpovídá danému množství DNA.

**Tabulka 26:** Shrnutí detekce citlivostí ve všech rodově a druhově specifických PCR

	množství DNA/množství buněk				
	500 pg/2,5·10 <sup>5</sup> b	50 pg/2,5·10 <sup>4</sup> b	5 pg/2,5·10 <sup>3</sup> b	500 fg/2,5·10 <sup>2</sup> b	50 fg/25 b
Rod					
<i>Lactobacillus</i>	+				
<i>Lbc. plantarum</i>	+				
<i>Lbc. acidophilus</i>		+			
<i>Lbc. rhamnosus</i>		+			
<i>Lbc. casei</i>		+			
Rod					
<i>Bifidobacterium</i>		+			
<i>Bif. bifidum</i>	+				
<i>Bif. longum</i>			+		
<i>Bif. animalis</i>			+		
<i>Bif. infantis</i>				+	
<i>S. thermophilus</i>					+

+ nejnižší množství DNA/PCR směs

## 6.7 Analyzované preparáty (komplexní matrice) s uvedeným množstvím buněk

Použité komplexní matrice (tablety) s množstvím buněk jsou uvedeny v Tabulce 27. Podle množství buněk bylo spočítáno přibližné množství DNA/g výrobku. Hmotnost DNA v jedné buňce je asi 2 fg (Španová – osobní sdělení).

**Tabulka 27:** Použité komplexní matrice s údaji deklarovanými od výrobce

Výrobek	Druh	Probiotika	Mn. buněk	Mn. matrice	Mn. DNA/g
<b>Zenflo</b>	Potravin. doplněk	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	$1 \times 10^9$	485 mg	4 mg
<b>Linex® Forte</b>	Potravin. doplněk	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	$1 \times 10^9$		8 mg
		<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>Laris</i> (BB-12)	$1 \times 10^9$	250 mg	8 mg
<b>Probian</b>	Potravin. doplněk	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$1 \times 10^9$		
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>		250 mg	8 mg
		<i>Bifidobacterium longum</i>			
<b>Nutra Bona</b>	Potravinový doplněk	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$2 \times 10^8$	100 g	4 mg
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>			
		<i>Bifidobacterium bifidum</i>	$2 \times 10^8$	100 g	4 mg
		<i>Bifidobacterium longum</i>			
<b>GS Lactobacily FORTE</b>	Potravinový doplněk	<i>Lactobacillus acidophilus</i>			
		<i>Lactobacillus plantarum</i>			
		<i>Lactobacillus casei</i>			
		<i>Lactobacillus brevis</i>			
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$1 \times 10^9$	620 mg	320 ng
		<i>Bifidobacterium longum</i>			
		<i>Bifidobacterium infantis</i>			
		<i>Streptococcus thermophilus</i>			
<b>Pangamin Bifi Plus</b>	Potravin. doplněk	bifidobakterie a laktobacily		90 g	
<b>Maldion</b>	Vaginální tableta	<i>Lactobacillus gasseri</i> EB01™	$1 \times 10^8$	250 mg	800 ng
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB01™			
<b>Fermalac vaginal</b>	Vaginální tableta	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 85% (47,6 mg)	$1,6 \times 10^9$		12,8 mg
		<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 5%	$0,4 \times 10^9$	250 mg	3,2 mg
		<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>termophilus</i> 10%			
<b>Gyntima probiotika</b>	Vaginální tableta	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		250 mg	
		<i>Bifidobacterium</i> BB-12			

## 6.8 Příprava hrubých lyzátů buněk a izolace DNA z vybraných výrobků metodou fenolové extrakce

Tablety (Maldion, Fermalac vaginal, Gyntima probiotika, Zenflo, Pangamin Bifi Plus) byly sterilně odebrány a popřípadě rozdrceny. K 1 g tabletového prachu bylo přidáno 5 ml lyzačního roztoku B a vše bylo důkladně rozsuspendováno.

Vzorky byly inkubovány různou dobu (1,5 a 3 hod) při laboratorní teplotě za občasného promíchání.

K suspenzi (500  $\mu$ l) bylo přidáno 25  $\mu$ l 20 % SDS, 5  $\mu$ l proteinasy K (100  $\mu$ g/ml) a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly inkubovány různou dobu (1,5; 3 a 18 hod) při 55 °C.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk byla prováděna izolace DNA metodou fenolové extrakce (viz kapitola 5.2) a pomocí magnetických nosičů (viz kapitola 5.3). Vzorky byly uchovávány při -20 °C, aby se předešlo možné degradaci DNA.

## 6.9 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z vybraných výrobků

Absorbance DNA vyizolované pomocí fenolové extrakce (viz. kapitola 5.2) byla měřena na Nanophotometru. Byl použit Lid (Factor 5) (viz. kapitola 5.4). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 28.

**Tabulka 28:** Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.

Výrobek	A <sub>230nm</sub>	A <sub>260nm</sub>	A <sub>280nm</sub>	A <sub>320nm</sub>	A <sub>260nm/280nm</sub>	A <sub>260nm/230nm</sub>	c (ng/ $\mu$ l)	mn. vzorku ( $\mu$ l)	mn. DNA (ng)
Maldion	0,00	0,09	0,05	0,00	1,87	—	22	100	2 200
Fermalac vaginal	0,04	0,20	0,20	0,10	2,00	5,56	50	100	5 000
Gyntima probiotika	—	0,07	0,07	0,05	1,48	—	15	100	1 500
Zenflo	0,05	0,29	0,29	0,15	1,94	7,64	69	100	6 900
Pangamin Bifi Plus	0,06	1,23	1,23	1,23	1,83	1,92	290	100	29 000

- ✓ Ze všech výrobků byla izolovaná DNA v různém množství (od 1,5 do 29  $\mu$ g) a o různé koncentraci (15 ng/ $\mu$ l - 290 ng/ $\mu$ l).

## 6.10 Optimalizace při přípravě hrubých lyzátů buněk – testování množství lysozymu

Vzhledem k tomu, že se množství izolované DNA lišilo až 20 ×, byla provedena optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk.

Bylo testováno použití různého množství lysozymu (3 mg/ml a 10 mg/ml), různá doba působení lysozymu (1,5 a 3 hod) při laboratorní teplotě a různá doba působení SDS (1 %) a proteinasy K (500 µg/ml) (1, 3 a 24 hod) při 55°C pro přípravu hrubých lyzátů buněk z analyzovaných preparátů. Celková DNA izolovaná z pěti tablet metodou fenolové extrakce byla kvantifikována spektrofotometricky a použita pro amplifikaci v PCR specifické pro rod *Lactobacillus*.

### 6.10.1 Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk s obsahem lysozymu 3 mg/ml

Z tablet byl připraven hrubý lyzát buněk postupem popsaným v kapitole 6.8. Do lyzačního roztoku byly přidány 3 mg/ml lysozymu a doba působení byla 1,5 hod. Poté byla přidána proteinasa K a SDS, inkubace při 55 °C po dobu 18 hod.

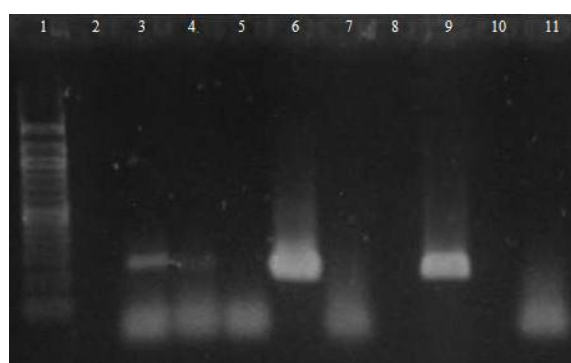
Z takto připravených hrubých lyzátů buněk byla prováděna izolace DNA metodou fenolové extrakce (viz. kapitola 5.2). Množství izolované DNA je uvedeno v Tabulce 29.

Ověření amplifikovatelnosti DNA bylo provedeno ve specifické PCR pro rod *Lactobacillus*. Byly použity rodově specifické primery pro bakterie rodu *Lactobacillus* – LBLMA1 a R16-1 (viz. kapitola 5.5.4). Do PCR směsi byl pipetován 1 µl nenaředené purifikované DNA izolované z tablet. Výsledný amplicon (250 bp) byl detegován na gelu (Obr. 21)

**Tabulka 29:** Množství DNA izolované z tablet metodou fenolové extrakce.

Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng/µl)	Celkové množství DNA (ng)
Maldion	22	2 200
Fermalac vaginal	50	5 000
Gyntima probiotika	15	1 500
Zenflo	69	6 900
Pangamin Bifi Plus	290	29 000

**Obr. 21:** Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (250 bp) s primery LbLMA-1 a R16-1. Byl amplifikován 1 µl purifikované DNA izolované z hrubých lyzátů buněk připravených z probiotických preparátů za použití 3 mg/ml lysozymu.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lbc. salivarius* 10 ng/µl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

← 250 bp

Běh	Výrobek	Množství DNA/ PCR směs (ng/µl)	PCR produkt
1	Standard		100 bp žebříček
2	Ø		
3	Maldion	22	++
4	Fermalac vaginal	50	+
5	Gyntima probiotika	15	–
6	Zenflo	69	++++
7	Pangamin Bifi Plus	290	–
8	Ø		
9	PK	10	++++
10	Ø		
11	NK		–

- ✓ PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus* se amplifikovaly u DNA izolované z výrobků Maldion, Fermalac vaginal a Zenflo.

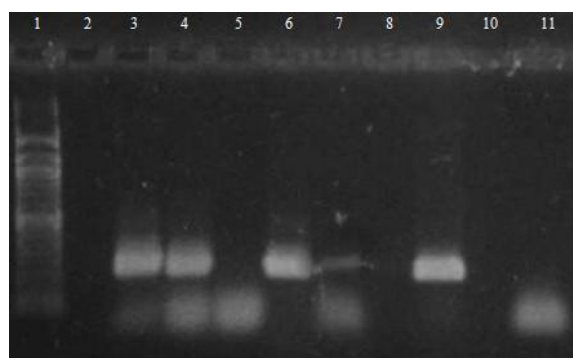
### 6.10.2 Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk s obsahem lysozymu 10 mg/ml

Z tablet byl připraven hrubý lyzát buněk postupem popsáním v kapitole 6.8. Do lyzačního roztoku bylo přidáno 10 mg/ml lysozymu a doba působení byla 1,5 hod. Poté byla přidána proteinasa K a SDS, inkubace při 55 °C po dobu 18 hod.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk byla prováděna izolace DNA metodou fenolové extrakce (viz. kapitola 5.2). Množství izolované DNA je uvedeno v Tabulce 29 (str. 59).

Ověření amplifikovatelnosti DNA bylo provedeno ve specifické PCR pro rod *Lactobacillus*. Byly použity rodově specifické primery pro bakterie rodu *Lactobacillus* – LBLMA1 a R16-1 (viz. kapitola 5.5.4). Do PCR směsi byl pipetován 1 µl nenaředitelné purifikované DNA izolované z tablet. Výsledný amplikon (250 bp) byl detegován na gelu (Obr. 22).

**Obr. 22:** Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (250 bp) s primery LbLMA-1 a R16-1. Byl amplifikován 1 µl purifikované DNA izolované z hrubých lyzátů buněk probiotických preparátů za použití 10 mg/ml lysozymu



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lbc. salivarius* 10 ng/µl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

← 250 bp

Běh	Výrobek	Množství DNA/ PCR směs (ng/µl)	PCR produkt
1	Standard		100 bp žebříček
2	Ø		
3	Maldion	39	+++
4	Fermalac vaginal	52	+++
5	Gyntima probiotika	15	–
6	Zenflo	59	+++
7	Pangamin Bifi Plus	263	+
8	Ø		
9	PK	10	++++
10	Ø		
11	NK		–

- ✓ PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus* se amplifikovaly u DNA izolované z výrobků Maldion, Fermalac vaginal, Zenflo a Pangamin Bifi Plus.
- ✓ Různé množství lysozymu ovlivňuje různé množství DNA uvolněné z lyzovaných buněk. Dále se pracovalo pouze s koncentrací lysozymu 10 mg/µl.

## 6.11 Optimalizace při přípravě hrubých lyzátů buněk – testování doby inkubace a izolace DNA fenolovou extrakcí a magnetickým nosičem

Z tablet byl připraven hrubý lyzát buněk postupem popsáním v kapitole 6.8. Do lyzačního roztoku bylo přidáno 10 mg/ml lysozymu. Inkubace byla po dobu 3 hod při laboratorní teplotě. Dále byla testována různá doba působení s 1% SDS a proteinázou K (500 $\mu$ g/ml) (1, 3 a 18 hod). Hrubé lyzáty buněk z šesti preparátů byly použity pro fenolovou extrakci (viz. kapitola 5.2) a pro izolaci DNA magnetickými částicemi (viz. kapitola 5.3). Koncentrace DNA byla proměřena spektrofotometricky (viz. kapitola 5.4), a následně amplifikována v PCR na rod *Lactobacillus*.

### 6.11.1 Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk – s proteinasou K a SDS při 55°C po dobu 1 hod

Hrubé lyzáty byly připraveny s množstvím 10 mg/ml lysozymu v lyzačním roztoku, doba působení byla 3 hod při laboratorní teplotě a s SDS a proteinázou K 1 hod/55°C.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk byla prováděna izolace DNA metodou fenolové extrakce a metodou magnetických nosičů (viz. kapitola 5.2). Množství izolované DNA je uvedeno v Tabulce 30.

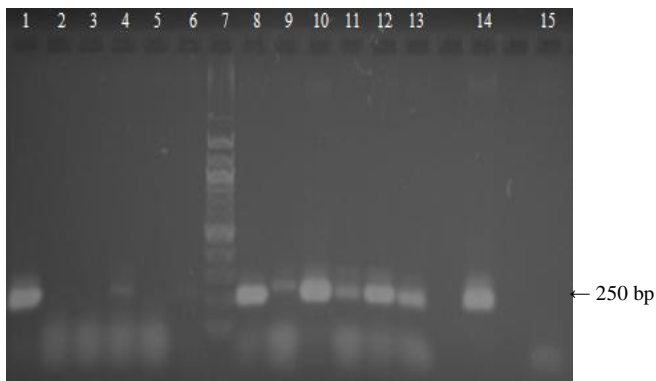
Ověření amplifikovatelnosti DNA bylo provedeno ve specifické PCR pro rod *Lactobacillus*. Byly použity rodově specifické primery pro bakterie rodu *Lactobacillus* – LBLMA1 a R16-1 (viz. 5.5.4). Do PCR směsi bylo pipetováno 5  $\mu$ l purifikované DNA izolované z tablet naředěné na 10 ng/ $\mu$ l. V termocykleru probíhalo 30 cyklů. Výsledný amplikon (250 bp) byl detekován na gelu (Obr. 23).

**Tabulka 30:** Množství DNA izolované z tablet metodou fenolové extrakce a magnetickými částicemi (55°C/1 hod)

	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng/ $\mu$ l)	Celkové množství DNA (ng)
Fenolová extrakce	Zenflo	600	60 000
	Linex Forte	1 245	124 500
	Probian	2 385	238 500
	Nutra Bona	558	55 800
	GS Lactobacilus	1 445	144 500
	Pangamin Bifi Plus	3 725	372 500
Magnetické částice	Zenflo	6,0	600
	Linex Forte	8,0	800
	Probian	5,5	550
	Nutra Bona	11,5	1 150
	GS Lactobacilus	7,0	700
	Pangamin Bifi Plus	10,0	1 000

**Obr. 23:** Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (250 bp) s primery LbLMA-1 a R16-1. Bylo amplifikováno 5 µl DNA (10 ng/µl) izolované z hrubých lyzátů buněk probiotických preparátů pomocí fenolové extrakce a magnetických nosičů.

Běh	Výrobek	PCR produkt
1	Zenflo	++++
2	Linex Forte	–*
3	Probian	–*
4	Nutra Bona	+
5	GS Lactobacilus	–*
6	Pangamin Bifi Plus	+
7	Standard	100 bp žebříček
8	Zenflo	++++
9	Linex Forte	+
10	Probian	++++
11	Nutra Bona	+
12	GS Lactobacilus	++++
13	Pangamin Bifi Plus	+++
14	PK	++++
15	NK	–



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lactobacillus salivarius* 10 ng/µl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

\* možná přítomnost inhibitorů PCR

- ✓ PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus* byly detegovány po amplifikaci DNA izolované ze všech výrobků magnetickými nosiči a po amplifikaci DNA izolované z 3 výrobků fenolovou extrakcí.

### 6.11.2 Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk – s proteinasou K a SDS při 55°C po dobu 3 hodin

Hrubé lyzáty byly připraveny s množstvím 10 mg/ml lysozymu v lyzačním roztoku, doba působení byla 3 hod při laboratorní teplotě a s SDS a proteinasou K 3 hod/55°C.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk byla prováděna izolace DNA metodou fenolové extrakce a metodou magnetických nosičů (viz. kapitola 5.2). Množství izolované DNA je uvedeno v Tabulce 31.

Ověření amplifikovatelnosti DNA bylo provedeno ve specifické PCR pro rod *Lactobacillus*. Byly použity rodově specifické primery pro bakterie rodu *Lactobacillus* – LBLMA1 a R16-1 (viz. 5.5.4). Do PCR směsi bylo pipetováno 5 µl DNA izolované z tablet naředěné na 10 ng/µl. V termocykleru probíhalo 30 cyklů. Výsledný amplicon (250 bp) byl detegován na gelu (Obr. 24).

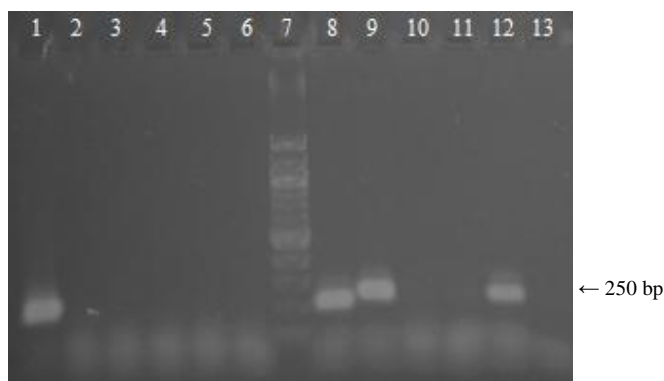


**Tabulka 31:** Množství DNA izolované z tablet metodou fenolové extrakce a magnetickými částicemi (55°C/3 hod)

	Výrobek	Množství DNA/PCR směs (ng/μl)	Celkové množství DNA (ng)
Fenolová extrakce	Zenflo	335	33 500
	Linex Forte	1 163	116 300
	Probian	1 058	105 800
	Nutra Bona	375	37 500
	GS Lactobacilus	2 115	211 500
	Pangamin Bifi Plus	4 622	462 200
Magnetické částice	Zenflo	6,0	600
	Linex Forte	5,5	550
	Probian	5,5	550
	Nutra Bona	4,0	400
	GS Lactobacilus	6,0	600
	Pangamin Bifi Plus	7,0	700

**Obr. 24:** Agarósová gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (250 bp) s primery LbLMA-1 a R16-1. Bylo amplifikováno 5 μl DNA (10 ng/μl) izolované z hrubých lyzátů buněk probiotických preparátů pomocí fenolové extrakce a magnetických nosičů.

Běh	Výrobek	PCR produkt
1	Zenflo	++++
2	Linex Forte	—*
3	Probian	—*
4	Nutra Bona	—*
5	GS Lactobacilus	—*
6	Pangamin Bifi Plus	—
7	Standard	100 bp žebříček
8	Zenflo	++++
9	Linex Forte	++++
10	Probian	—*
11	Nutra Bona	—*
12	GS Lactobacilus	++++
13	Pangamin Bifi Plus	—



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně;

+ slabě; — PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lactobacillus salivarius* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

\* možná přítomnost inhibitorů PCR

- ✓ PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus* byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze 2 výrobků magnetickými nosiči a po amplifikaci DNA izolované z 1 výrobku metodou fenolové extrakce.

### 6.11.3 Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk – s proteinasou K a SDS při 55°C po dobu 18 hodin

Hrubé lyzáty byly připraveny s množstvím 10 mg/ml lysozymu v lyzačním roztoku, doba působení byla 3 hod při laboratorní teplotě a s SDS a proteinasou K 18 hod/55°C.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk byla prováděna izolace DNA metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů (viz. kapitola 5.2). Množství izolované DNA je uvedeno v Tabulce 32.

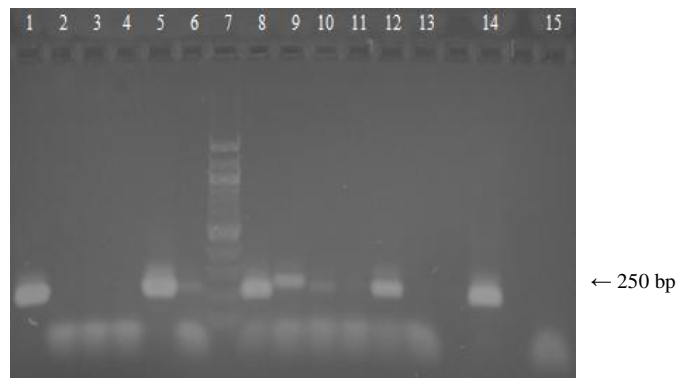
Ověření amplifikovatelnosti DNA bylo provedeno ve specifické PCR pro rod *Lactobacillus*. Byly použity rodově specifické primery pro bakterie rodu *Lactobacillus* – LBLMA1 a R16-1 (viz. 5.5.4). Do PCR směsi bylo pipetováno 5 µl DNA izolované z tablet naředěné na 10 ng/µl. V termocykleru probíhalo 30 cyklů. Výsledný amplikon (250 bp) byl detekován na gelu (Obr. 25).

**Tabulka 32:** Množství DNA izolované z tablet metodou fenolové extrakce a magnetickými částicemi (55°C/18 hod)

	Výrobek	Množství DNA v PCR směsi (ng)	Celkové množství DNA (µg)
Fenolová extrakce	Zenflo	198	19 800
	Linex Forte	61	6 100
	Probian	84	8 400
	Nutra Bona	59	5 900
	GS Lactobacilus	230	23 000
	Pangamin Bifi Plus	752	75 200
Magnetické částice	Zenflo	5,0	500
	Linex Forte	5,5	550
	Probian	5,0	500
	Nutra Bona	8,5	850
	GS Lactobacilus	5,5	550
	Pangamin Bifi Plus	6,0	600

**Obr. 25:** Agarósová gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (250 bp) s primery LbLMA-1 a R16-1. Bylo amplifikováno 5 µl DNA (10 ng/µl) izolované z hrubých lyzátů buněk probiotických preparátů pomocí fenolové extrakce a magnetických nosičů.

Běh	Výrobek	PCR produkt
1	Zenflo	++++
2	Linex Forte	–*
3	Probian	–*
4	Nutra Bona	–
5	GS Lactobacilus	++++
6	Pangamin Bifi Plus	+
7	Standard	100 bp žebříček
8	Zenflo	++++
9	Linex Forte	++
10	Probian	+
11	Nutra Bona	–*
12	GS Lactobacilus	+++
13	Pangamin Bifi Plus	–*
14	PK	++++
15	NK	–



PCR produkt detekován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně;

+ slabě; – PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lactobacillus salivarius* 10 ng/µl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

\* možná přítomnost inhibitorů PCR

- ✓ PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus* byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze 4 výrobků magnetickými nosiči a po amplifikaci DNA izolované z 3 výrobku metodou fenolové extrakce.

## 6.12 Shrnutí výsledků optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk z tablet

Byla testována amplifikace DNA s využitím DNA matrice z hrubých lyzátů buněk z probiotických tablet izolované fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi. Byly porovnány intenzity PCR produktů. Shrnutí výsledků přípravy hrubých lyzátů buněk je popsáno v Tabulce 33.

**Tabulka 33:** Shrnutí výsledků optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk

	1 hodina/lysozym (3 mg/ml)	3 hodiny/lysozym (10 mg/ml)	
<b>Inkubace s lysozymem při laboratorní teplotě</b>	+	+++	
++ dobrá detekce + slabá detekce specifického PCR produktu			
	<b>Fenolová extrakce</b>	<b>Magnetické částice</b>	
<b>Inkubace s proteinázou K a SDS při 55 °C</b>	<b>1 hodina</b>	+	+++
	<b>3 hodiny</b>	+	+
	<b>přes noc</b>	++	++
+++ velmi dobrá detekce, ++ dobrá detekce + slabá detekce specifického PCR produktu			

- ✓ Různé množství lysozymu a délka inkubace při 55 °C ovlivňují lyzi buněk a tudíž i množství izolované DNA. To má vliv na intenzitu PCR produktu. Intenzivnější PCR produkty se amplifikovaly s DNA izolovanou magnetickým nosičem.

## 6.13 Příprava hrubých lyzátů buněk a izolace DNA z probiotických potravinových doplňků magnetickým nosičem

Tablety (Zenflo, Linex Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte) byly sterilně odebrány (kapsle) a tableta Pangamin Bifid Plus byla rozdrcena. K 1 g tabletového prachu bylo přidáno 5 ml lyzačního roztoku B B [10 mM Tris HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysozym (10 mg/ml)] a vše bylo důkladně resuspendováno.

Vzorky byly inkubovány 3 hod při laboratorní teplotě za občasného promíchání. K suspenzi (500 µl) bylo přidáno 25 µl 20 % SDS, 5 µl proteinasy K (100 µg/ml) a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly inkubovány 1 hod při 55 °C.

Následně byly hrubé lyzáty přečištěny a 2 × zkoncentrovány. K 350 µl hrubého lyzátu bylo přidáno 17 µl 3M octanu sodného a 920 µl ethanolu (96 %). Vzorky byly ponechány 1 hod při -20 °C, poté 15 minut stočeny při 15000 otáčkách. Supernatant byl slit a sediment byl ponechán 20 min v exsikátoru. K sedimentu bylo přidáno 175 µl TE pufru. Vše bylo pováděno v deseti eppendorfkách pro získání většího množství hrubého lyzátu buněk.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk (300 µl) byla prováděna izolace DNA magnetickým nosičem (viz kapitola 5.3). Vzorky byly uchovávány při -20 °C, aby se předešlo možné degradaci DNA.

## 6.14 Ověření amplifikace DNA v doménově specifické PCR s DNA izolovanou z 6 výrobků potravinových doplňků pomocí magnetického nosiče

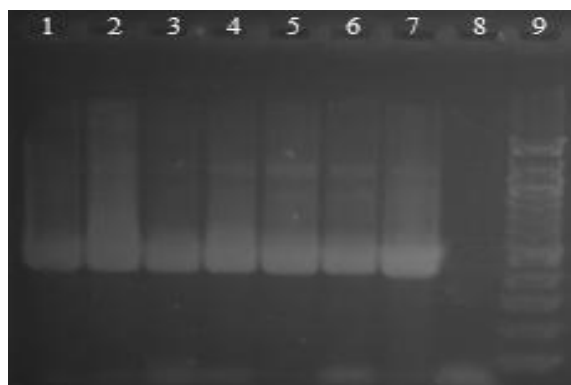
Pro izolaci byl proveden postup popsán v kapitole 6.13. Množství izolované DNA je uvedeno v Tabulce 34.

**Tabulka 34:** Množství DNA izolované z tablet pomocí magnetických částic.

Výrobek	Množství DNA (ng/μl)	Celkové množství DNA (ng)
Zenflo	11,5	1 150
Linex Forte	12,0	1 200
Probian	11,5	1 150
Nutra Bona	12,0	1 200
GS Laktobacily FORTE	12,0	1 200
Pangamin Bifi Plus	19,0	1 900

V PCR byly použity univerzální primery pro bakterie domény *Bacteria* – F eub a R eub (viz. kapitola 5.5.3). Do PCR směsi bylo pipetováno 5 μl DNA izolované z tablet pomocí magnetického nosiče. Výsledný amplikon (500 bp) byl detegován na gelu (Obr. 26).

**Obr. 26:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (500 bp) pro doménu *Bacteria*. Amplifikováno bylo 5 μl DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lbc. salivarius* 10 ng/μl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

← 500 bp

Běh	Výrobek	Mn. DNA [(g/μl)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	Zenflo	11,5	57,5	++++
2	Linex Forte	12,0	60,0	++++
3	Probian	11,5	57,5	++++
4	Nutra Bona	12,0	60,0	++++
5	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	++++
6	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	++++
7	PK	10,0	50,0	++++
8	NK			–
9	Standard			100 bp žebříček

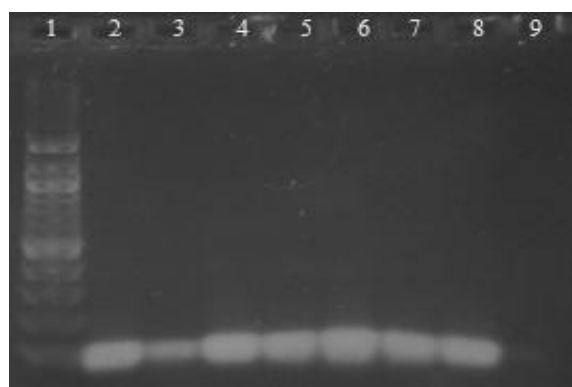
- ✓ Detekce specifického PCR produktu (500 bp) pro doménu Bacteria byl velmi zřetelný po amplifikaci DNA izolované ze všech testovaných preparátů magnetickými nosiči.

### 6.15 Rodově specifická PCR *Lactobacillus* s DNA izolovanou z výrobků potravinových doplňků magnetickými nosiči

Probiotické preparáty byly zpracovány dle postupu uvedeného v kapitole 6.8. Byla provedena rodově specifická PCR rodu *Lactobacillus* se všemi testovanými preparáty. Množství izolované DNA je uvedeno v Tabulce 34 (str. 69).

Byly použity rodově specifické primery pro bakterie rodu *Lactobacillus* – F alllact a R alllact (viz kapitola 5.5.4). Do PCR směsi bylo pipetováno 5 µl DNA izolované z tablet. Výsledný amplikon (92 bp) byl detegován na gelu (Obr. 27).

**Obr. 27:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (92 bp) pro rod *Lactobacillus*. Amplifikováno bylo 5 µl DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lbc. salivarius* 10 ng/µl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

Běh	Výrobek	Mn. DNA (ng/µl)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	Standard			100 bp žebříček
2	Zenflo	11,5	57,5	++++
3	Linex Forte	12,0	60,0	+++
4	Probian	11,5	57,5	++++
5	Nutra Bona	12,0	60,0	++++
6	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	+++++
7	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	++++
8	PK	10,0	50,0	++++
9	NK			–

- ✓ PCR produkty byly detegovány v různé intenzitě. Ve všech šesti výrobcích byla prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*.

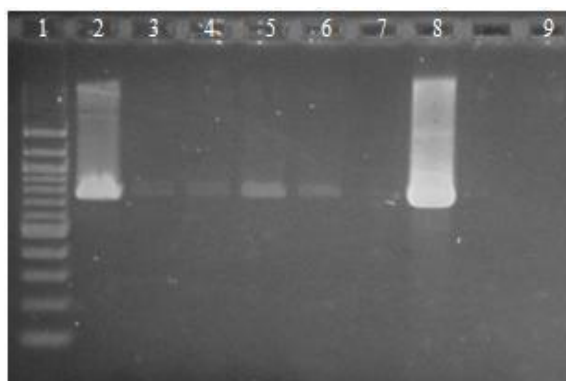
## 6.16 Druhově specifická PCR *Lactobacillus* s DNA izolovanou z výrobků potravinových doplňků magnetickými nosiči

Probiotické preparáty byly zpracovány dle postupu uvedeného v kapitole 6.8. Byly voleny a provedeny takové druhově specifické PCR, které byly deklarovány výrobcem tj. druhově specifická PCR *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*.

### 6.16.1 Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus acidophilus* s primery Aci16SI a 16SII

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Lactobacillus acidophilus* – Aci16SI a 16SII (viz kapitola 5.5.5). Do PCR směsi bylo pipetováno 5  $\mu$ l DNA izolované z tablet. Výsledný amplikon (750 bp) byl detegován na gelu (Obr. 28).

**Obr. 28:** Agarósová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (750 bp) pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Amplifikováno bylo 5  $\mu$ l DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lbc. acidophilus*

10 ng/ $\mu$ l

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

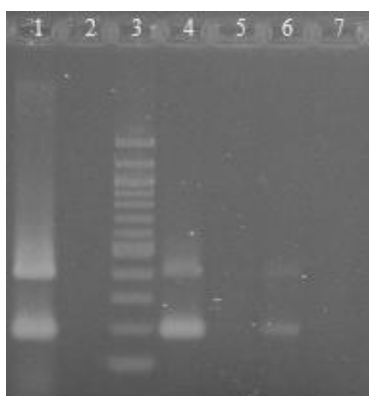
Běh	Výrobek	Mn. DNA (ng/ $\mu$ l)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	Standard			100 bp žebříček
2	Linex Forte	12,0	60,0	++++
3	Probian	11,5	57,5	+
4	Nutra Bona	12,0	60,0	+
5	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	++
6	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	+
7	Ø			
8	PK	10,0	50,0	++++
9	NK			–

- ✓ PCR produkty byly detekovány v různé intenzitě. Ve všech pěti výrobcích byla prokázána přítomnost DNA *Lactobacillus acidophilus*.

### 6.16.2 Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus rhamnosus* s primery PrI a PhaII

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Lactobacillus rhamnosus* – PrI a PhaII (viz kapitola 5.5.5). Do PCR směsi byly pipetovány 3  $\mu$ l DNA izolované z tablet. Amplifikovaly se dva PCR produkty (200 a 410 bp), které byly detegovány na gelu (Obr. 29).

**Obr. 29:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (200 a 400 bp) pro druh *Lactobacillus rhamnosus*. Amplifikovány byly 3  $\mu$ l DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lbc. rhamnosus* 10 ng/ $\mu$ l

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

← 410 bp

← 200 bp

Běh.	Výrobek	Mn. DNA (ng/ $\mu$ l)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	PK	10,0	50,0	+++
2	NK			–
3	Standard			100 bp žebříček
4	Probian	11,5	57,5	+++
5	Nutra Bona	12,0	60,0	–
6	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	+
7	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	–

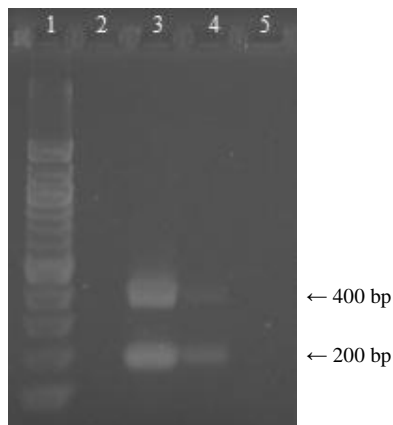
- ✓ PCR produkty specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus* byly detegovány u dvou výrobků (Probian a GS Laktobacily Forte).



### 6.16.3 Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus casei* s primery PrI a CasII

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Lactobacillus casei* – PrI a CasII (viz kapitola 5.5.5). Do PCR směsi bylo pipetováno 5  $\mu$ l DNA izolované z tablet. Amplifikovali se dva PCR produkty (200 a 400 bp), které byly detegovány na gelu (Obr. 30).

**Obr. 30:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (200 a 400 bp) pro druh *Lactobacillus casei*. Amplifikováno bylo 5  $\mu$ l DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Lbc. casei* 10 ng/ $\mu$ l

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

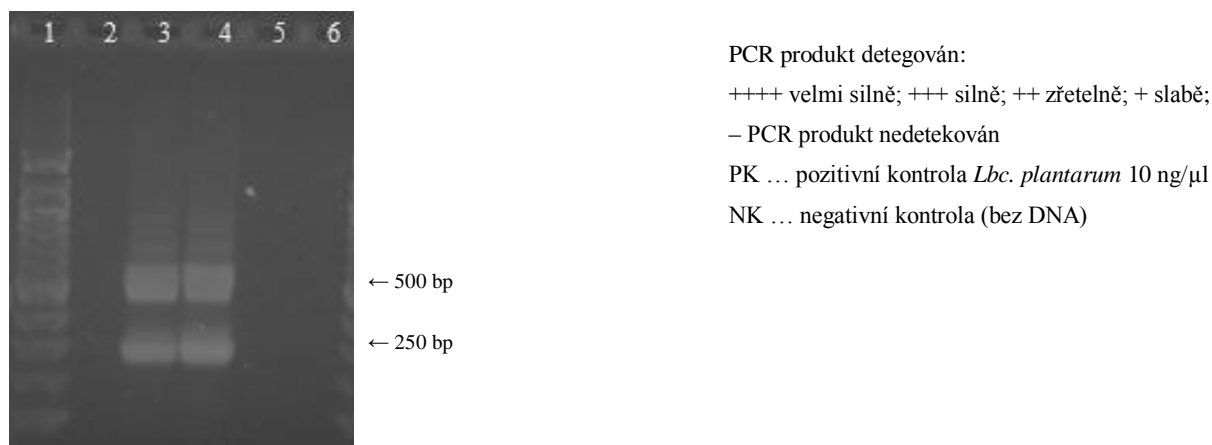
Běh	výrobek	Mn. DNA (ng/ $\mu$ l)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	Standard			100 bp žebříček
2	NK			–
3	PK	10,0	50,0	++++
4	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	++
5	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	–

- ✓ PCR produkty specifické pro druh *Lactobacillus casei* byly deklarovány ve výrobku GS Laktobacily Forte a nebyly prokázány ve výrobku Pangamin Bifi Plus.

#### 6.16.4 Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus plantarum* s primery PlanI a PlanII

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Lactobacillus plantarum* – PlanI a PlanII (viz kapitola 5.5.5). Do PCR směsi bylo pipetováno 5 µl DNA izolované z tablet. Amplifikovali se dva PCR produkty (250 a 500 bp), které byly detegovány na gelu (Obr. 31).

**Obr. 31:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (250 a 500 bp) pro druh *Lactobacillus plantarum*. Amplifikováno bylo 5 µl DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



Běh.	Výrobek	Mn. DNA (ng/µl)	Mn. DNA/ PCR směs [(g)]	PCR produkt
1	Standard			100 bp žebříček
2	NK			–
3	PK	10,0	50,0	++++
4	Zenflo	11,5	57,5	++++
5	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	–
6	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	–

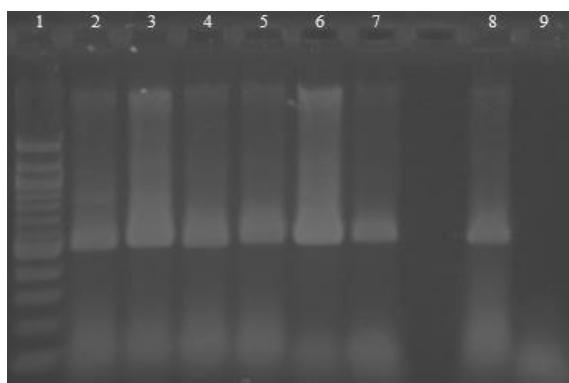
- ✓ Přítomnost DNA bakterií *Lactobacillus plantarum* byla prokázána ve výrobku Zenflo, ve výrobcích GS Laktobacily Forte a Pangamin Bifi Plus prokázána nebyla.

## 6.17 Rodově specifická PCR *Bifidobacterium* s DNA izolovanou z výrobků potravinových doplňků magnetickými nosiči

Probiotické preparáty byly zpracovány dle postupu uvedeného v kapitole 6.8. Byla provedena rodově specifická PCR rodu *Bifidobacterium* se všemi testovanými preparáty. Množství izolované DNA je uvedeno v Tabulce 34 (str. 69).

Byly použity rodově specifické primery pro bakterie rodu *Bifidobacterium* – Bif 164 a Bif 662 (viz kapitola 5.5.6). Do PCR směsi bylo pipetováno 5  $\mu$ l DNA izolované z tablet. Výsledný amplikon (523 bp) byl detegován na gelu (Obr. 32).

**Obr. 32:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (523 bp) pro rod *Bifidobacterium*. Amplifikováno bylo 5  $\mu$ l DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bif. bifidum* 10 ng/ $\mu$ l

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

Běh	Výrobek	Mn. DNA (ng/ $\mu$ l)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	Standard			100 bp žebříček
2	Zenflo	11,5	57,5	++++
3	Linex Forte	12,0	60,0	++++
4	Probian	11,5	57,5	++++
5	Nutra Bona	12,0	60,0	++++
6	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	++++
7	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	++++
8	PK	10,0	50,0	++++
9	NK			–

✓ Přítomnost bakterií *Bifidobacterium* byla detegována ve všech šesti výrobcích.

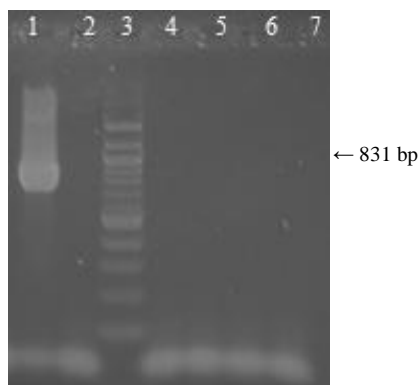
## 6.18 Druhově specifická PCR *Bifidobacterium* s DNA izolovanou z výrobků potravinových doplňků magnetickými nosiči

Probiotické preparáty byly zpracovány dle postupu uvedeného v kapitole 6.8. Byly voleny a provedeny takové druhově specifické PCR, které byly deklarovány výrobcem tj. druhově specifická PCR *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis* a *Bifidobacterium bifidum*.

### 6.18.1 Druhově specifická PCR pro druh *Bifidobacterium longum* s primery BiLON-1 a BiLON-2

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Bifidobacterium longum* – BiLON -1 a BiLON -2 (viz kapitola 5.5.7). Do PCR směsi bylo pipetováno 5  $\mu$ l DNA izolované z tablet. Výsledný amplikon (831 bp) byl detegován na gelu (Obr. 33).

**Obr. 33:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (831 bp) pro druh *Bifidobacterium longum*. Amplifikováno bylo 5  $\mu$ l DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bif. longum* 10 ng/ $\mu$ l

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

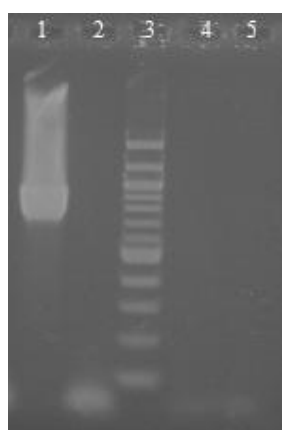
Běh	Výrobek	Mn. DNA (ng/ $\mu$ l)	Mn. DNA/ PCR směs [(g)	PCR produkt
1	PK	10,0	50,0	++++
2	NK			–
3	Standard			100 bp žebříček
4	Probian	11,5	57,5	–
5	Nutra Bona	12,0	60,0	–
6	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	–
7	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	–

- ✓ Specifický PCR produkt *Bifidobacterium longum* byl detegován v pozitivní kontrole a nebyl detegován ve 4 výrobcích, v nichž byla deklarována přítomnost bakterií *Bifidobacterium longum* výrobcem.

### 6.18.2 Druhově specifická PCR pro *Bifidobacterium infantis* s primery BiINF-1 a BiINF2

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Bifidobacterium infantis* – BiINF-1 a BiINF-2 (viz kapitola 5.5.7). Do PCR směsi bylo pipetováno 5  $\mu$ l DNA izolované z tablet. Výsledný amplikon (828 bp) byl detegován na gelu (Obr. 34).

**Obr. 34:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (828 bp) pro druh *Bifidobacterium infantis*. Amplifikováno bylo 5  $\mu$ l DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bif. infantis* 10 ng/ $\mu$ l

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

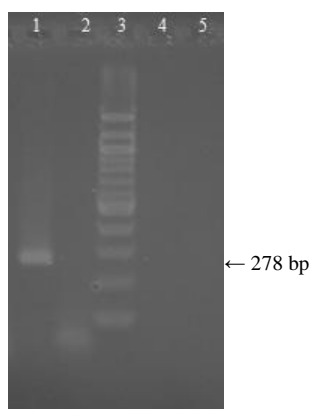
Běh	Výrobek	Mn. DNA (ng/ $\mu$ l)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	PK	10,0	50,0	++++
2	NK			–
3	Standard			100 bp žebříček
4	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	–
5	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	–

- ✓ Specifický PCR produkt *Bifidobacterium infantis* byl detegován v pozitivní kontrole a nebyl detegován ve 2 výrobcích, v nichž byla deklarována přítomnost bakterií *Bifidobacterium infantis* výrobcem.

### 6.18.3 Druhově specifická PCR pro *Bifidobacterium bifidum* s primery BiBIF-1 a BiBIF-2

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Bifidobacterium bifidum* – BiBIF 1 a BiBIF 2 (viz kapitola 5.5.7). Do PCR směsi bylo pipetováno 5 µl DNA izolované z tablet. Výsledný amplikon (278 bp) byl detegován na gelu (Obr. 35).

**Obr. 35:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (278 bp) pro druh *Bifidobacterium bifidum*. Amplifikováno bylo 5 µl DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bif. bifidum* 10 ng/µl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

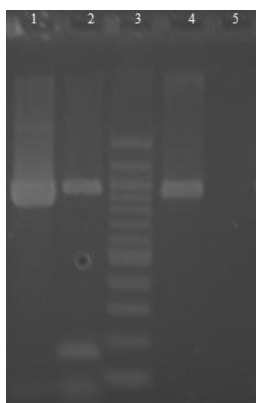
Běh	Výrobek	Mn. DNA (ng/µl)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	PK	10,0	50,0	++++
2	NK			–
3	Standard			100 bp žebříček
4	Nutra Bona	12,0	60,0	–
5	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	–

- ✓ Specifický PCR produkt *Bifidobacterium bifidum* byl detegován v pozitivní kontrole a nebyl detegován ve 2 výrobcích, v nichž byla deklarována přítomnost bakterií *Bifidobacterium bifidum* výrobcem.

#### 6.18.4 Druhově specifická PCR pro *Bifidobacterium animalis* s primery Ban F2 a Pbi F1

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Bifidobacterium animalis* – Ban F2 a Pbi F1 (viz kapitola 5.5.7). Do PCR směsi bylo pipetováno 5 µl purifikované DNA izolované z tablet. Výsledný amplicon (925 bp) byl detegován na gelu (Obr. 36).

**Obr. 36:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (925 bp) pro druh *Bifidobacterium animalis*. Amplifikováno bylo 5 µl DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola *Bif. animalis* 10 ng/µl

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

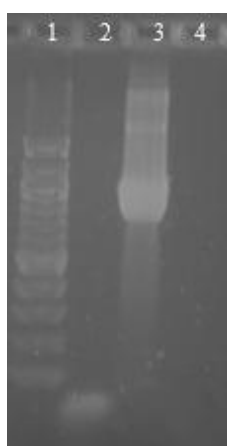
Běh	výrobek	Mn. DNA (ng/µl)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	Linex Forte	12,0	60,0	++++
2	Pangamin Bifi Plus	19,0	95,0	++
3	Standard			100 bp žebříček
4	PK	10,0	50,0	++++
5	NK			–

- ✓ Přítomnost specifických PCR produktů pro druh *Bifidobacterium animalis* byla detegována ve výrobku Linex Forte a Pangamin Bifi Plus.

### 6.18.5 Druhově specifická PCR pro *Streptococcus thermophilus* s primery S.therm 1 a S.therm 2

Byly použity druhově specifické primery pro bakterie druhu *Streptococcus thermophilus* – S.therm 1 a S.therm2 (viz kapitola 5.5.8). Do PCR směsi bylo pipetováno 5  $\mu$ l DNA izolované z tablet. Výsledný amplicon (968 bp) byl detegován na gelu (Obr. 37).

**Obr. 37:** Agarosová gelová elektroforéza specifických PCR produktů (968 bp) pro druh *Streptococcus thermophilus*. Amplifikováno bylo 5  $\mu$ l DNA izolované z probiotických preparátů magnetickým nosičem.



PCR produkt detegován:

++++ velmi silně; +++ silně; ++ zřetelně; + slabě;

– PCR produkt nedetekován

PK ... pozitivní kontrola 10 ng/ $\mu$ l

NK ... negativní kontrola (bez DNA)

Běh	Výrobek	Mn. DNA (ng/ $\mu$ l)	Mn. DNA/ PCR směs (ng)	PCR produkt
1	Standard			100 bp žebříček
2	GS Laktobacily Forte	12,0	60,0	–
3	PK	10,0	50,0	++++
4	NK			–

- ✓ Přítomnost PCR produktu specifického pro druh *Streptococcus thermophilus* byl detegován v pozitivní kontrole a nebyl detegován ve výrobku, v němž byla deklarována přítomnost bakterií *Streptococcus thermophilus* výrobcem.



### 6.18.6 Shrnutí výsledků rodově a druhově specifických PCR získaných po amplifikaci celkové DNA izolované z potravinových doplňků magnetickými nosiči

Detekce rodově a druhově specifických PCR produktů *Lactobacillus* (Tabulka 35), *Bifidobacterium* (Tabulka 36) a *Streptococcus* (Tabulka 37).

**Tabulka 35:** Shrnutí detekce PCR produktů při rodově i druhově specifické PCR pro rod *Lactobacillus*

Vzorek	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lbc. acidophilus</i>	<i>Lbc. rhamnosus</i>	<i>Lbc. plantarum</i>	<i>Lbc. casei</i>
Zenflo	+			+/+	
Linex® Forte	+	+			
Probian	+	+	+		
Nutra Bona	+	+	-		
GS Laktobacily Forte	+	+	+	-	+
Pangamin Bifi Plus	*/+	*/+	*/-	*/-	*/-

+ deklarovaná a prokázána přítomnost bakterií

- deklarována a neprokázána přítomnost bakterií

\* na obalu deklarovány jen laktobacily a bifidobakterie / prokázána „+“ nebo neprokázána „-“ přítomnost bakterií

**Tabulka 36:** Shrnutí detekce PCR produktů při rodově i druhově specifické PCR pro rod *Bifidobacterium*

Vzorek	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bif. longum</i>	<i>Bif. infantis</i>	<i>Bif. animalis</i>	<i>Bif. bifidum</i>
Linex® Forte	+			+	
Probian	+	-			
Nutra Bona	+	-			-
GS Laktobacily Forte	+	-	-		
Pangamin Bifi Plus	*/+	*/-	*/-	*/+	*/-

+ deklarovaná a prokázána přítomnost bakterií

- deklarována a neprokázána přítomnost bakterií

\* na obalu deklarovány jen laktobacily a bifidobakterie / prokázána „+“ nebo neprokázána „-“ přítomnost bakterií

**Tabulka 37:** Shrnutí detekce PCR produktu pro druh *Streptococcus thermophilus*.

Vzorek	<i>Str. thermophilus</i>
GS Laktobacily Forte	–

– deklarována a neprokázána přítomnost bakterií

## 6.19 Výsledek analýzy potravinových doplňků na přítomnost probiotických bakterií

V souladu s deklarovaným složením byly analyzovány výrobky **Linex<sup>®</sup> Forte**, **Pangamin Bifi Plus** a **Zenflo**. U všech třech byly potvrzeny deklarované rody i druhy.

U produktu **Probian** došlo k nesouladu u druhu *Bifidobacterium longum*, který nebyl prokázán. Důvodem může být nižší množství buněk, než jsme schopni detekovat v PCR tedy  $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk.

U produktu **Nutra Bona** došlo k nesouladu ve třech případech a to u druhů *Lactobacillus rhamnosus* ( $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium longum* ( $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk) a *Bifidobacterium infantis* ( $< 2,5 \cdot 10^2$  buněk), které nebyly prokázány.

U posledního z testovaných probiotických preparátů, tedy u **GS Laktobacily Forte** došlo k odchylce u 4 druhů. Nebyly prokázány druhy *Lactobacillus plantarum* ( $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium longum* ( $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium infantis* ( $< 2,5 \cdot 10^2$  buněk) a *Streptococcus thermophilus* ( $< 25$  buněk).

## 7 DISKUSE

Pozitivní účinek probiotických mikroorganismů je dobře znám. Pro člověka mohou mít MO ale i opačný dopad. [3]

Tato diplomová práce byla zaměřena na probiotické doplňky stravy, které mají pozitivně ovlivňovat zdraví konzumenta. Definice doplňků stravy je uvedena v zákoně o potravinách. Jde o potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu. Mají vysoký obsah vitamínů, minerálů nebo jiných látek s nutričním či fyziologickým účinkem. Doplněk stravy není léčivo, léčivý přípravek ani léčivá látka [48].

Morfologické a fenotypové metody nejsou z hlediska taxonomie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* spolehlivé, proto jsou v posledních letech využívány k identifikaci bakterií molekulárně-biologické metody. Rychlá a přesná identifikace je důležitá pro možné využití některých kmenů jako startovacích kultur nebo jako probiotických organismů [49].

Cílem této práce byla identifikace bakterií rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a druhů *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum* a *Streptococcus thermophilus* deklarovaných na obalu výrobcem s využitím DNA amplifikačních metod. Vybráno bylo šest volně prodejných probiotických preparátů. Bakterie byly identifikovány v přípravcích Zenflo, Linex<sup>®</sup> Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte a Pangamin Bifi Plus.

Nedílnou součástí práce byla optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk s cílem izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

### 7.1 Kultivace bakterií

Sbírkové kmeny rodu *Lactobacillus* byly kultivovány v MRS médiu s přidavkem 0,05 % cysteinu. Kultivace probíhala při 37°C po dobu 24 hod aerobně. Na miskách narostly kolonie bílého, neprůhledného a lesklého vzhledu, stejného tvaru s pravidelným ohraničením. Bakterie rodu *Lactobacillus* dobře rostou v MRS médiu. Půda však není selektivní a mohou na ní růst i jiné bakterie např. bakterie rodu *Bifidobacterium* [50].

Sbírkové kmeny rodu *Bifidobacterium* byly kultivovány v MRS médiu s 0,05% cysteinem. Kultivace probíhala při 37°C po dobu 3-4 dnů anaerobně v anaerostatu. Na miskách narostly kolonie stejného tvaru, bílého, neprůhledného a lesklého vzhledu.

Z buněk čistých kultur byla izolována DNA metodou fenolové extrakce, která byla použita ke stanovení citlivosti PCR, tedy minimálního množství DNA, které je možné detegovat na agarosovém gelu.

## 7.2 Množství lysozymu pro přípravu hrubých lyzátů buněk

Pro optimalizaci přípravy hrubých lyzátů buněk byly použity probiotické vaginální tablety Maldion, Fermlac vaginal, Gyntima probiotika a probiotické doplňky Zenflo, Pangamin Bifi Plus. Při optimalizaci různého množství lysozymu byly použity dvě koncentrace lysozymu – 3 mg/ml a 10 mg/ml. S použitím nižší koncentrace lysozymu (3 mg/ml), byla detekce specifického PCR produktu pro rod *Lactobacillus* (250 bp) [42] zřetelně slabší. PCR produkt pro rod *Lactobacillus* s vyšší koncentrací lysozymu (10 mg/ml) v hrubém lyzátu byl lépe vizuálně detekovatelný. Lépe se osvědčila delší doba inkubace (3 hodiny) při laboratorní teplotě. Dále bylo pracováno jen s koncentrací lysozymu 10 mg/ml a inkubací 3 hod.

## 7.3 Délka inkubace s proteinasou K a SDS při 55°C

Pro optimalizaci přípravy hrubých lyzátů buněk byly použity probiotické doplňky Zenflo, Linex<sup>®</sup> Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte a Pangamin Bifi Plus. Při přípravě hrubých lyzátů buněk bylo použito 25 µl 20 % SDS a 5 µl proteiny K (100 µg/ml). Vzorky byly inkubovány různou dobu (1,5; 3 a 18 hod) při 55 °C. Při použití inkubace 1 hod při 55 °C s SDS a proteinasou K (koncentrace lysozymu 10 mg/ml), poskytovala nejlepší výsledky detekce specifického PCR produktu pro rod *Lactobacillus* (250 bp) [42] s použitím DNA izolovanou pomocí magnetických částic. PCR produkt pro rod *Lactobacillus* s delší dobou inkubace v hrubém lyzátu (3 hodiny) byl nejhůře detekovatelný. S postupným přibýváním doby inkubace (18 hod) byla detekce lepší než po 3 hodinách inkubace, ale ne tak dobrá jako při inkubaci po dobu 1 hodiny.

## 7.4 Izolace DNA a spektrofotometrické stanovení

DNA z šesti probiotických preparátů (Zenflo, Linex<sup>®</sup> Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte a Pangamin Bifi Plus) byla připravena dle optimalizovaného postupu:

Tablety (Zenflo, Linex Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte) byly sterilně odebrány (kapsle) a tableta Pangamin Bifi Plus byla rozdrcena. K 1 g tabletového prachu bylo přidáno 5 ml lyzačního roztoku B B [10 mM Tris HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysozym (10 mg/ml)] a vše bylo důkladně resuspendováno. Vzorky byly inkubovány 3 hod při laboratorní teplotě za občasného promíchání. K suspenzi (500 µl) bylo přidáno 25 µl 20 % SDS, 5 µl proteiny K (100 µg/ml) a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly inkubovány 1 hod při 55 °C. DNA z hrubých lyzátů buněk byla izolována pomocí magnetických nosičů.

Pro zjištění koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno měření na NanoPhotometru. Čistota DNA byla vypočítána z poměru absorbancí  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  [51] a pohybovala se v rozmezí od 1,48 do 2,00. Pokud se výsledná hodnota pohybuje v rozmezí od 1,8 – 2,0 je DNA vhodná pro amplifikaci. Při hodnotě poměru absorbancí  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$

< 1,8 je DNA kontaminovaná proteiny. [51] Po změření koncentrace byla DNA naředěna na 10 ng/μl a dále použita v polymerázové řetězové reakci.

## 7.5 Fenolová extrakce vs. magnetické nosiče

Z testovaných izolačních postupů byly vhodnější magnetické částice [39] než fenolová extrakce. Tato skutečnost může být způsobena izolováním menšího množství doprovodných látek, které mohou inhibovat detekci specifického PCR produktu.

Magnetické separační techniky jsou jednou z možností, jak urychlit nebo usnadnit některé běžně používané separační a purifikační techniky jakou je např. fenolová extrakce. Využívají velmi malé magnetické částice [38]. V našem případě byly použity k izolaci DNA z lyzátů bakteriálních buněk mikročástice (P(HEMA-co-GMA), které byly připraveny na Makromolekulárním ústavu Akademie věd ČR v Praze [21, 39]. Magnetické částice vykazují své magnetické vlastnosti jen v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Nevykazují však reziduální magnetismus a proto, pokud nejsou v bezprostřední blízkosti magnetického pole, vytváří homogenní suspenzi [21, 38]. DNA byla s magnetickými nosiči eluována přes noc (18 hod), poté byly nosiče odseparovány a DNA byla jímána do čisté ependorfovy zkumavky.

## 7.6 Doménově specifická PCR

V PCR pro doménu Bacteria byl detekován specifický PCR produkt 466 bp [41] ve všech šesti vzorcích. Bylo tím potvrzeno, že všechny tablety obsahovaly bakteriální DNA amplifikovanou v PCR. Amplifikace byly prováděny jen s primery specifickými probakteriální rody a druhy deklarované výrobcem.

## 7.7 Rodově a druhově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

V PCR pro rod *Lactobacillus* byl detekován specifický PCR produkt 92 bp [41] u všech šesti testovaných preparátů (Zenflo, Linex<sup>®</sup> Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte a Pangamin Bifi Plus). Byla tím potvrzena přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* ve všech testovaných preparátech, což souhlasí s údaji deklarovanými na obalu.

Dále byly provedeny 4 druhově specifické PCR pro druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* [43].

Druh *Lactobacillus acidophilus* byl prokázán v tabletách Linex<sup>®</sup> Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte a Pangamin Bifi Plus, což odpovídá deklarovaným údajům. Pangamin Bifi Plus má deklarované jen laktobacily a bifidobakterie. Přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* byla v této tabletě prokázána.

Druh *Lactobacillus rhamnosus* byl prokázán u tablet Probian a GS Laktobacily Forte. Tím byla prokázána jejich deklarace. U produktu Nutra Bona přítomnost v našich

podmínkách prokázána nebyla. Zároveň byl testován i Pangamin Bifi Plus, u kterého nebyla přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus rhamnosus* prokázána. Nejnižší množství *Lactobacillus rhamnosus*, které je možné identifikovat v PCR je 50 pg ( $2,5 \cdot 10^4$  buněk) z čehož plyne, že v tabletě může být  $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk.

Druh *Lactobacillus casei* byl prokázán u produktu GS Laktobacily Forte. Tím byla prokázána jejich deklarace. Zároveň byl testován i Pangamin Bifi Plus, který má deklarované jen laktobacily a bifidobakterie. Přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus casei* nebyl v této tabletě prokázána.

Druh *Lactobacillus plantarum* nebyl prokázán u žádné z testovaných tablet (GS Laktobacily Forte a Pangamin Bifi Plus). Nejnižší množství *Lactobacillus plantarum*, které je možné identifikovat v PCR je 50 pg ( $2,5 \cdot 10^4$  buněk) z čehož plyne, že v tabletě může být  $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk.

Specifické PCR produkty z probiotických preparátů pro druhy *Lactobacillus* nebyly vždy amplifikovány, i když byl obsah těchto bakterií deklarován na obalu. Může to být způsobeno nižším množstvím přítomné DNA pro daný druh. Shrnutí detekce a nejnižšího množství DNA, které se amplifikuje v PCR za vzniku PCR produktů je uvedeno v Tabulce 38.

## 7.8 Rodově a druhově specifické PCR pro rod *Bifidobacterium*

V PCR pro rod *Bifidobacterium* byl detekován specifický PCR produkt 523 bp [44] u všech šesti testovaných preparátů (Zenflo, Linex<sup>®</sup> Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte a Pangamin Bifi Plus).

Byla tím potvrzena přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium* ve všech testovaných preparátech. V tabletách Zenflo není přítomnost bakterií pro rod *Bifidobacterium* deklarována na obalu, je deklarována přítomnost pouze pro druh *Lactobacillus plantarum*. I přes to, byla přítomnost rodu *Bifidobacterium* prokázána.

Byly provedeny 4 druhově specifické PCR pro druhy *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, [46] *Bifidobacterium animalis* [47].

Druh *Bifidobacterium longum* nebyl prokázán v tabletách Probian, Nutra Bona a GS Laktobacily Forte, což neodpovídá deklarovaným údajům. Zároveň byl testován i Pangamin Bifi Plus, u kterého nebyla přítomnost bakterií druhu *Bifidobacterium longum* prokázána. Nejnižší množství *Bifidobacterium longum*, které je možné identifikovat v PCR je 50 pg ( $2,5 \cdot 10^4$  buněk) z čehož plyne, že v testovaných tabletách může být  $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk.

Druh *Bifidobacterium infantis* nebyl prokázán u tablety GS Laktobacily Forte, což neodpovídá deklarovaným údajům. Zároveň byl testován i Pangamin Bifi Plus, u kterého nebyla přítomnost bakterií druhu *Bifidobacterium infantis* prokázána. Nejnižší množství *Bifidobacterium infantis*, které je možné identifikovat v PCR je 50 fg ( $2,5 \cdot 10^2$  buněk) z čehož plyne, že v testované tabletě může být  $< 2,5 \cdot 10^2$  buněk.

Druh *Bifidobacterium bifidum* nebyl prokázán u produktu Nutra Bona, což neodpovídá deklarovaným údajům. Zároveň byl testován i Pangamin Bifi Plus, u kterého nebyla přítomnost bakterií druhu *Bifidobacterium bifidum* prokázána. Nejnižší množství *Bifidobacterium bifidum*, které je možné identifikovat v PCR je 500 pg ( $2,5 \cdot 10^5$  buněk) z čehož plyne, že v testované tabletě může být  $< 2,5 \cdot 10^2$  buněk.

Druh *Bifidobacterium animalis* byl prokázán u testovaných tablet (Linex<sup>®</sup> Forte a Pangamin Bifi Plus). U produktu Linex<sup>®</sup> Forte tím byla prokázána deklarace. Zároveň byl testován i Pangamin Bifi Plus, který má deklarované jen laktobacily a bifidobakterie. Přítomnost bakterií druhu *Bifidobacterium animalis* byla prokázána i v této tabletě.

Specifické PCR produkty z probiotických preparátů pro druhy *Bifidobacterium* nebyly amplifikovány, i když byl obsah těchto bakterií deklarován na obalu. Může to být způsobeno nižším množstvím přítomné DNA pro daný druh. Shrnutí detekce a nejnižšího množství DNA, které se amplifikuje v PCR za vzniku PCR je uvedeno v Tabulce 38.

## 7.9 Druhově specifická PCR pro *Streptococcus thermophilus*

Druh *Streptococcus thermophilus* nebyl prokázán u tablety GS Laktobacily Forte, což neodpovídá deklarovaným údajům. Nejnižší množství *Streptococcus thermophilus*, které je možné identifikovat v PCR je 5 fg (25 buněk) z čehož plyne, že v testované tabletě může být < 25 buněk.

## 7.10 Celkové hodnocení probiotických preparátů

Celkové hodnocení rodově specifické PCR a druhově specifické PCR je uvedeno v Tabulce 38.

Druhové zastoupení bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a druhů deklarovaných na obalu se v testovaných preparátech shoduje u výrobků Linex<sup>®</sup> Forte, Pangamin Bifi Plus a Zenflo. U všech třech byly potvrzeny deklarované rody i druhy.

U produktu Probian došlo k nesouladu u druhu *Bifidobacterium longum*, který nebyl prokázán. Důvodem může být nižší množství buněk, než jsme schopni detekovat v PCR tedy <  $2,5 \cdot 10^4$  buněk.

U produktu Nutra Bona došlo k nesouladu ve třech případech a to u druhů *Lactobacillus rhamnosus* (<  $2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium longum* (<  $2,5 \cdot 10^4$  buněk) a *Bifidobacterium infantis* (<  $2,5 \cdot 10^2$  buněk), které nebyly prokázány.

U posledního z testovaných probiotických preparátů, tedy u GS Laktobacily Forte došlo k odchylce u 4 druhů. Nebyly prokázány druhy *Lactobacillus plantarum* (<  $2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium longum* (<  $2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium infantis* (<  $2,5 \cdot 10^2$  buněk) a *Streptococcus thermophilus* (< 25 buněk).

**Tabulka 38:** Shrnutí detekce PCR produktů a daných citlivostí

Vzorek	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. infantis</i>	<i>S. thermophilus</i>
	500 pg	500 pg	50 pg	50 pg	50 pg	50 pg	500 pg	50 pg	5 pg	50 fg	5 fg
	$2,5 \cdot 10^5$ b	$2,5 \cdot 10^5$ b	$2,5 \cdot 10^4$ b	$2,5 \cdot 10^4$ b	$2,5 \cdot 10^4$ b	$2,5 \cdot 10^4$ b	$2,5 \cdot 10^5$ b	$2,5 \cdot 10^4$ b	$2,5 \cdot 10^3$ b	$2,5 \cdot 10^2$ b	25 b
Zenflo	+										
Linex Forte	+		+			+			+		
Probian	+		+	+		+		-			
Nutra Bona	+		+	-		+	-	-			
GS Laktobacily Forte	+	+	+	+	-	+		-		-	-
Pangamin Bifi Plus	*/+	*/-	*/+	*/-	*/-	*/+	*/-	*/-	*/+	*/-	

+ deklarovaná a prokázána přítomnost bakterií

- deklarována a neprokázána přítomnost bakterií

\* na obalu deklarovány jen laktobacily a bifidobakterie / prokázána „+“ nebo neprokázána „-“ přítomnost bakterií



## 8 ZÁVĚR

### 8.1 Zpracování tablety

Byl vypracován postup pro izolace DNA z probiotických preparátů. Postup lze shrnout následovně:

Tablety (Zenflo, Linex Forte, Probian, Nutra Bona, GS Laktobacily Forte) byly sterilně odebrány (kapsle) a tableta Pangamin Bifi Plus byla rozdrcena. K 1 g tabletového prachu bylo přidáno 5 ml lyzačního roztoku B B [10 mM Tris HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysozym (10 mg/ml)] a vše bylo důkladně rozsuspendováno.

Vzorky byly inkubovány 3 hod při laboratorní teplotě za občasného promíchání. K suspenzi (500  $\mu$ l) bylo přidáno 25  $\mu$ l 20 % SDS, 5  $\mu$ l proteinázy K (100  $\mu$ g/ml) a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly inkubovány 1 hod při 55 °C.

Následně byly hrubé lyzáty přečištěny a 2  $\times$  zkoncentrovány. K 350  $\mu$ l hrubého lyzátu bylo přidáno 17  $\mu$ l 3M octanu sodného a 920  $\mu$ l etanolu (96 %). Vzorky byly ponechány 1 hod při -20 °C, poté 15 minut stočeny při 15000 otáčkách. Supernatant byl slit a sediment byl ponechán 20 min v exsikátoru. K sedimentu bylo přidáno 175  $\mu$ l TE pufru. Vše bylo pováděno zároveň v deseti eppendorfkách pro získání většího množství hrubého lyzátu buněk.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk (300  $\mu$ l) byla prováděna izolace DNA magnetickým nosičem. Vzorky byly uchovávány při -20 °C, aby se předešlo možné degradaci DNA.

### 8.2 Výsledky analýzy tablet na přítomnost probiotických bakterií

V souladu s deklarovaným složením byly analyzovány výrobky **Linex<sup>®</sup> Forte**, **Pangamin Bifi Plus** a **Zenflo**. U všech třech byly potvrzeny deklarované rody i druhy.

U produktu **Probian** došlo k nesouladu u druhu *Bifidobacterium longum*, který nebyl prokázán. Důvodem může být nižší množství buněk, než jsme schopni detekovat v PCR tedy  $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk.

U produktu **Nutra Bona** došlo k nesouladu ve třech případech a to u druhů *Lactobacillus rhamnosus* ( $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium longum* ( $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk) a *Bifidobacterium infantis* ( $< 2,5 \cdot 10^2$  buněk), které nebyly prokázány.

U posledního z testovaných probiotických preparátů, tedy u **GS Laktobacily Forte** došlo k odchylce u 4 druhů. Nebyly prokázány druhy *Lactobacillus plantarum* ( $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium longum* ( $< 2,5 \cdot 10^4$  buněk), *Bifidobacterium infantis* ( $< 2,5 \cdot 10^2$  buněk) a *Streptococcus thermophilus* ( $< 25$  buněk).

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] **Tvrđíková J.** *Izolace DNA z probiotických druhů bakterií mléčného kvašení v potravinových doplňcích.* Diplomová práce. Brno : Vysoké učení technické Brno. 2009.
- [2] **Champomier-Vergés M. CH., Maguin E., Mitsou M. Y., Anglade P., Chich J.** *Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives.* Els. Ltd. 2002. stránky 37-42
- [3] **Görner F., Valík L'.** *Aplikovaná mikrobiologie požívatin.* 1. vydání. Bratislava : Malé centrum, 2004. str. 528. ISBN 80-967064-9-7.
- [4] **Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J. P.,** *Numbers and strains of Lactobacilli in some probiotic product.* Int. J. Food Microbio. 19. April 2004. stránky 147-156.
- [5] **Heller K. J.** *Probiotic bacteria in fermented foods: produc characteristic and starter organisms.* Am. J. of Clin. Nutr. 2001. stránky 374-379.
- [6] **Ruiz-Moyano S., Martín A., Benito M. J., Nevado F. P., de Guía Córdoba M.** *Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potencial probiotic use in Iberian dry fermented sausages.* Els. Ltd. 10. March 2008. stránky 715-721.
- [7] **Šilhánková L.** *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology.* 2. vydání. Praha : Academia. 2002. ISBN 8-85605-71-6.
- [8] **VFU.** *Metody přímého průkazu infekčních agens.* Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 2010.
- [9] **Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G.** *Taxonomy and pysiology of probiotic lactic acid bacteria.* Int. J. Food Microbio. 1998.
- [10] **Voltava M., kolektiv.** *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno : Neptun, 2003. stránky 136-137.
- [11] **Merk K., Borelli C., Korting H. CH.** *Lactoacilli - bacteria- host interactions with special regard to the urogenital trakt.* Int. J. Food Microbio. 24. Novembre 2004. stránky 9-18.
- [12] **Klaban V.** *Svět mikrobů/Malý mikrobiologický slovník.* 1. vydání. Hradec Králové : Gaudeamus. 1999. str. 303. 80-7041-639-4.
- [13] **Espinoza Y. R., Gallardo-Navarro Y.** *Non-dairy probiotic products.* Scien. Dir. 17. July 2008. stránky 1-11.
- [14] **Tomás M. S. J., Nader-Macías M. E.** *Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage.* Els. Ltd. 28. January 2004. stránky 1-5.

- [15] **Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F.** *Encyklopedia of dairy sciences*. Acad. Els. Scien. Ltd. 2003.
- [16] **Sedláček I.** *Taxonomie prokariot*. Brno : Masarykova univerzita v Brně, 2007. 270s.
- [17] **Klayraung S., Viernstein H., Siriporn O.** *Development of tablets containing probiotics: Effect of formulation and processing parametres on bacterial viability*. Scien. Dir. 18. Novembre 2008. stránky 54-60.
- [18] **Shah N. P.** *Functional cultures and health benefits*. Int. D. J. 22. January 2007. stránky 1262-1277.
- [19] **Klesnilová L.** *Bakterie mléčného kvašení s probiotickými vlastnostmi a jejich identifikace*. Masarykova univerzita v Brně. 2003
- [20] **Pham L. CH., van Spanning R. J. M., Roling F. M., Prosperi A. C., Terefework Z.** *Effect of probiotic Lactobaillus salivarius W24 on the composition stability of oral microbial communities*. Scien. Dir. 20. September 2008. stránky 132-137.
- [21] **Balogová P.** *Identifikace bakterií mléčného kvašení v probiotických preparátech (tabletech) s využitím amplifikačních metod*. 2008. Bakalářská práce.
- [22] **Li D., Kim J. M., Jin Z., Zhou J.** *Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock*. Food Microbiol. Els. Ltd. 27. October 2007. stránky 29-34.
- [23] **Lopéz-Molina M. D., Navarro-Martínez D., Hiner A. N. P., Soledad CH., Rodríguez-López J. N.** *Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke*. Els. Ltd. June 2005. stránky 1476-1484.
- [24] **Schlezenmeir J., de Vrese M.** *Probiotic, prebiotic and symbiotic-approaching a definition*. Am. J. Clin. Nutr. 2001. stránky 361-364.
- [25] **Erkkilä S., Petäjä E.** *Screening of comercial meet starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potencial probiotic use*. Els. Ltd. Meat Scien. 2000. stránky 297-300.
- [26] **Fuller R.** *Probiotics in man and animals*. J. App.Bacteriol. 1989. stránky 365-378.
- [27] **Mogensen G.** *Realities and trends in probiotic attributes of lactic acid bacteria and their market impact*. Pres. Univ. Caen. Lact. acid bact. 1995. stránky 175-185.
- [28] **Jehresis G., Vogelsang H., Kiessling G., Schubert R., Bunte C., Hammes W. P.** *Influence of probiotic sausage (Lactobacillus paracasei) on blood lipids and immunological parametres of healthy volunteers*. Food Resear. Internat. 2002. stránky 133-138.
- [29] **O'Brien J., Crittender R., Ouwehand A. C., Salminen S.** *Safety evaluation of probiotic*. Tr. Food Scie. Technol. 1999. stránky 418-424.

- [30] **Salminen S., Deighton M., Gorbach S.** [autor knihy] Von Wrihr A. (Eds.) In Salminen A. *Lactic acid bacteria*. Mar. Dek. 1993. stránky 199-225.
- [31] **Erkkilä S., Suihlo M. L., Eerola S., Petäjä E., Mattila-Sandholm T.** *Dry sausages fermented by Lacobacillus rhamnosus strains*. Int. J. Food Microbio. 2001. stránky 205-210.
- [32] **Klingdberg T. D., Axelsson L., Naterstad K., Elsser D., Budde B. B.** *Identification of potencial probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages*. Int. J. Food Microbio. 2005. stránky 419-431.
- [33] **Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Kotzekidou P.** *Charakterization of lactic acid bacteria isolated a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties*. Meat Scien. 2003. stránky 859-867.
- [34] **Chan E. S., Zhang Z.** *Encapsulation of probiotic bacteria Lactobacillus acidophilus by direct compression*. Instit. Chem. Engin. June 2002. stránky 78-82.
- [35] **Bruce A., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem : Esperopublish, 1998. str. 630s. 80-902906-0-4.
- [36] **Biocrawler: encyclopedia.** *Polymerase chain reaction*. 22. duben 2010.
- [37] **Cambell N., Reece J. B.,** *Biologie*. 1. vydání. Brno : Computer Press, a.s. 2006. 1332s. ISBN 80-251-1178-4.
- [38] **Petrová K.** *Identifikace bakterií mléčného kvašení (BMK) v mléčných výrobcích s využitím metod amplifikace DNA*. Diplomová práce. Brno : Masarykova univerzita v Brně. 2004.
- [39] **Rittich B., Španová A., Horák D., Beneš M. J., Klesnilová L., Petrová K., Rybníkář A.** *Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles*. Scien. Dir. 7. May 2006. stránky 143-148.
- [40] **Španová A., Rittich B.** *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [41] **Haarman M., Knol J.** *Quantitative real-time PCR analysis of fecal Lactobacillus species in infants receiving a prebioic infant formula*. App. Environ. Microbio. 16January. 2006. stránky 2359-2365.
- [42] **Dubernet S., Desmaures N., Guégue M.** *A PCR-based method for identification of lactobacili at the genus level*. FEMS Microbiol. Lett. 2002. Sv. 214: 271-275.

- [43] **Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjärvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T.** *Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and specific PCR primers.* App. Environ. Microbio. 28. October 2000. Sv. 66: 297-303. stránky 297-303.
- [44] **Kok R. G., de Waal A. Shut F., Welling G. W., Weenk G., Hellinwerf K.J.** *Specific detection and analysis of probiotic Bifidobacterium strain in infant feces.* App. Environ. Microbio. 1996. Sv. 62: 3668-3672.
- [45] **Roy D., Sirois S.** *Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the ldh gene.* App. Environ. Microbio. 2000. Sv. 191: 17-24.
- [46] **Matsuki T., Watanebe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H.** *Polyphasic taxonomic analysis of Bifidobacterium animalis and B. lactis reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of B. animalis at B. animalis subsp. animalis subsp. nov and B. lactis as B. animalis subsp. lactis subsp. nov.* App. Environ. Microbio. 10. July 1999, Sv. 54: 1137-1143. stránky 4506-451
- [47] **Sonja L., Drescher K., Heller K. J.** *Survival of Lactobacillus delbuckeii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus in the terminal ileum of fistulated göttingen minipigs.* App. Environ. Microbio. 21. June 2001. stránky 4137-4143.
- [48] **Michaelová I.** *Doplňky stravy (Potraviny k doplnění jídelníčku).* Praha : Sdružení českých spotřebitelů, o.s. 2007. str. 35. 978-80-903930-1-1.
- [49] **Turková K.** *Identifikace rodu Lactobacillus s využitím amplifikačních metod.* Diplomová práce. Brno : Masarykova univerzita, 2009.
- [50] **Křížková J., Španová A., Rittich B.** *RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of Bifidobacterium species.* Folia Microbio. 2008. stránky 99-104.
- [51] **Sambrook J., Russel D. W.** *Molecular cloning: A laboratory manual (II).* 3. vydání. New York : Cold Spring Labor. Harb. Press. 2001.
- [52] **Mann A. R.** *Cornell University Library.* 22. duben 2010.
- [53] nobelprize.org. *The Official Web Site of Nobel Foundation.* [Online] [Citace: 26. Duben 2010.] <http://nobelprize.org/index.html>.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AK	aminokyselina
BMK	bakterie mléčného kvašení
bp	pár bází (base pair)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection Microorganismes)
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora (Czech Collection of Dairy Microorganismes)
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
FCH	fakulta chemické
G + C	guanin a cytosin
GIT	gastrointestinální trakt
MRS	Mann, Rogosa, Sharpe (MRS médium)
PCR	polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsulfát sodný
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA

## 11 SEZNAM PŘÍLOH

### Příloha 1:

✓ **Poster**

Výsledky byly publikovány na konferenci: *XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů* (20. – 21. 4. 2010) ve formě posteru.

# PŘÍLOHA 1



## ISOLACE A IDENTIFIKACE DNA PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ V KOMPLEXNÍCH MATRICÍCH

Balogerová Petra, Španová Alena, Růžičková Alena, Turková Kristýna, Tvrdoňová Jana

Výzkumné ústředí technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav potravinářské chemie a biotechnologie, Parkovna 228, 602 00 Brno

### 1 ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou přirozenou součástí střevní mikroflóry gastrointestinálního traktu a lysosylných mléčných výrobků<sup>1</sup>. Jedná se o žilné bakterie (nejčastěji Lactobacilli a Bifidobacterium), které mohou být do organismu dodávány ve formě potravinových doplňků. Nejnovější metody izolace BMK jsou založeny na analýze DNA a využití amplifikačních metod jako je polymerázová řetězová reakce (PCR)<sup>2</sup>.

### 2 CÍL

Cílem práce bylo izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z bakterií rodu Lactobacillus v Bifidobacterium z různých probiotických preparátů. Provést roztovou a druhovou identifikaci uvedených bakterií pomocí metody PCR.

### 3 METODY

Z hrubých lýtů buněk různých probiotických preparátů (tablet) byla izolována DNA metodou fenolové extrakce z následným očištěním 96 % etanolem a pomocí magnetických částic (P (HEMA-co-DMA)) akrylových karboxylovými skupinami.

Bylo testováno množství lysosylnu (3 mg/ml, 10 mg/ml) a délka vstřebání při laboratorní teplotě (1,5 a 3 hod). Při přípravě hrubých lýtů buněk.

K identifikaci byly použity roztově specifické primery pro rod Lactobacillus (LbUVA-1, R16-2)<sup>3</sup>, rod Bifidobacterium (Bif-164, Bif-662)<sup>4</sup> a druhově specifické primery pro druhy Lb. ruminantium, Lb. casei/pastorisi, Lb. rhamnosus a Lb. Plantarum, B. animalis, B. bifidus, B. infantis, B. longum a Streptococcus thermophilus<sup>5</sup>. PCR produkty byly detekovány pomocí agarózní gelové elektroforézy.

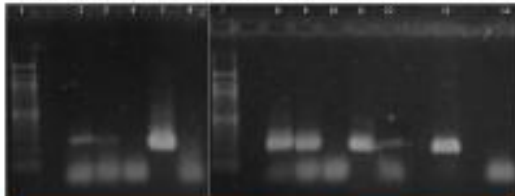
### 4 VÝSLEDKY

#### A. Optimalizace množství lysosylnu při přípravě hrubých lýtů buněk z přípravků

Při přípravě hrubých lýtů byla testována různá množství lysosylnu v lyačním roztoku (10 mM Tris HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysosyln (3 a 10 mg/ml), 0,2 g tablety byly přidány 5 ml lyačního roztoku B. Poté bylo ke vzorku přidáno 50 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (1 mg/ml). Vorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne. Faktoriální experiment hrubé lýtů byl použit pro fenolovou extrakci a následně pro amplifikaci v druhově specifické PCR pro rod Lactobacillus (Obr. 1).

DNA byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR. Výtinnost DNA rodu Lactobacillus byla prokázána ve 4 vzorcích při použití 10 mg/ml lysosylnu a inkubace 2 hodiny i SDS a proteinázou K.

Obr. 1. Agarózní gelové elektroforéza PCR produktů (200 bp) amplifikačních pomocí roztově specifických primerů Lactobacillus. Byl použit vzorek 1 z tab.



Tab.	Průběh	Optimalizace množství lysosylnu	Množství proteinázy K	CEL. PRŮ. (100 vzorků)
1	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
2	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
3	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
4	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
5	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
6	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
7	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
8	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
9	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
10	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
11	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
12	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
13	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
14	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
15	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
16	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000
17	3	10 mg/ml	100 µg/ml/30 min	21 000

### 5 ZÁVĚR

#### B. Výsledky druhově specifických PCR

DNA izolována magnetickými solemi byla použita pro druhově specifické PCR Lactobacillus. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1. Dále byla provedena PCR pro rod a druh Bifidobacterium a druh Streptococcus thermophilus (Tabulka 2). Cílem byla prokázat přítomnost DNA izolované z bakterií deklarovaných na obalu.

Shrnutí detekce probiotických bakterií v jednotlivých výrobcích a ohledem na přítomnost PCR je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 1. Druhově specifické PCR produkty při roztově i druhově specifické PCR pro rod Lactobacillus

	Lactobacillus	Bifidobacterium	Streptococcus	Staphylococcus	Agarózní elektroforéza
3erfla	+++	-	-	-	+++
3laxa/3arba	+++	+++	-	-	+++
3proba	+++	+++	-	-	+++
3kura/3kura	+++	+++	-	-	+++
3Lactobacillus	+++	+++	+++	+++	+++
3BITE	+++	+++	+++	+++	+++
3Pangasin	+++	+++	+++	+++	+++
3B Plus	+++	+++	+++	+++	+++

Tabulka 2. Druhově specifické PCR produkty při roztově i druhově specifické PCR pro rod Bifidobacterium a Streptococcus thermophilus

	Bifidobacterium	B. longum	B. infantis	B. animalis	B. bifidus	B. thermophilus
3erfla	+++	-	-	-	-	-
3laxa/3arba	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3proba	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3kura/3kura	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3Lactobacillus	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3BITE	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3Pangasin	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3B Plus	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tab. 3. Druhově specifické PCR produkty v agarózní elektroforéze

	Lactobacillus	Bifidobacterium	Streptococcus	Staphylococcus	Agarózní elektroforéza
Lactobacillus	+++	+++	+++	+++	+++
Lb. ruminantium	+++	+++	+++	+++	+++
Lb. casei	+++	+++	+++	+++	+++
Lb. plantarum	+++	+++	+++	+++	+++
B. animalis	+++	+++	+++	+++	+++
B. infantis	+++	+++	+++	+++	+++

+++ - detekce přítomnosti bakterií (prokázána přítomnost bakterií (+))  
 \* - nebyla detekována přítomnost bakterií

### 5 ZÁVĚR

Optimální příprava hrubých lýtů buněk: 10 mg/ml lysosylnu v lyačním roztoku (10 mM Tris HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysosyln (10 mg/ml)) po dobu 3 hod a, dále působení s proteinázou K (1 mg/ml) a přítomnosti 0,5 % SDS po dobu 1 hodiny a izolace DNA z hrubých lýtů buněk magnetickým solem.

Části rodu Lactobacillus byly detekovány ve všech výrobcích v souladu s údajem uvedeným na obalu. Z testovaných druhů nebyla shoda prokázána jen ve dvou případech. Části rodu Bifidobacterium byly též detekovány ve všech výrobcích i přes to, že v jednom z výrobků deklarována nebyla. Z testovaných druhů byla shoda prokázána jen u B. animalis.