

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DRUHU LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS V
PROBIOTICKÝCH VÝROBCÍCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

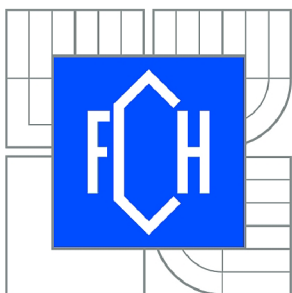
Bc. VERONIKA SZNAPKOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DRUHU LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS V PROBIOTICKÝCH VÝROBCÍCH

IDENTIFICATION OF BACTERIA OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS SPECIES IN PROBIOTIC PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. VERONIKA SZNAPKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

| | | |
|------------------------|--|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce: | FCH-DIP0606/2011 | Akademický rok: 2011/2012 |
| Ústav: | Ústav chemie potravin a biotechnologií | |
| Student(ka): | Bc. Veronika Sznepková | |
| Studijní program: | Chemie a technologie potravin (N2901) | |
| Studijní obor: | Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010) | |
| Vedoucí práce | doc. RNDr. Alena Španová, CSc. | |
| Konzultanti: | doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc. | |

Název diplomové práce:

Identifikace bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* v probiotických výrobcích

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: 11.5.2012

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

Bc. Veronika Sznepková
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Probiotické bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou významnou součástí především fermentovaných mléčných výrobků, farmaceutických preparátů a doplňků stravy. V současné době se k rychlé a přesné identifikaci bakterií využívají molekulárně biologické metody založené na amplifikaci DNA.

Cílem diplomové práce bylo nekultivačními postupy identifikovat bakterie rodu *Lactobacillus* a druhu *Lactobacillus acidophilus* v komplexních matricích celkem sedmi různých doplňků stravy. Celková DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk ve výrobcích s využitím magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA). Amplifikovatelnost DNA byla ověřena v PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*. Izolovaná DNA byla dále amplifikována s použitím primerů specifických pro rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus* s cílem prokázat přítomnost tohoto bakteriálního rodu a druhu, jež jsou deklarovány výrobci. Výsledky identifikace bakterií získané pomocí PCR byly porovnány s údaji deklarovanými výrobci.

ABSTRACT

Probiotic lactic acid bacteria (LAB) are an important part of fermented dairy products, pharmaceuticals and food supplements. At present, rapid and accurate identification of bacteria is carried out using molecular biological methods based on DNA amplification.

The aim of the thesis was to identify by non-cultivation bacteria of genus *Lactobacillus* and bacteria of species *Lactobacillus acidophilus* in complex matrices at total of seven different food supplements. Total DNA was isolated from crude cell lysates using magnetic carrier P(HEMA-co-GMA). Amplificability of DNA was verified by PCR using primers specific for the domain *Bacteria*. In next step isolated DNA was amplified using primers specific for the genus *Lactobacillus* and species *Lactobacillus acidophilus* to demonstrate the presence of this bacterial genus and species declared by the producers. The results of bacteria identification obtained by PCR were compared with declared specification given by the producers.

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotika, *Lactobacillus acidophilus*, izolace DNA, magnetické částice, polymerázová řetězová reakce

KEYWORDS

Probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, DNA isolation, magnetic microspheres, polymerase chain reaction

SZNAPKOVÁ, V. *Identifikace bakterií druhu Lactobacillus acidophilus v probiotických výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 98 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, 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 vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení diplomové práce a cenné rady.

Mé poděkování patří rovněž studentkám doktorského studia, zejména Mgr. Kristýně Turkové, za poskytnutí cenných rad a za pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 10 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 2.1 | Bakterie mléčného kvašení | 11 |
| 2.2 | Probiotika | 12 |
| 2.2 | Rod <i>Lactobacillus</i> | 14 |
| 2.2.1 | Charakteristika | 14 |
| 2.2.2 | Taxonomické zařazení bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> | 15 |
| 2.2.3 | Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 20 |
| 2.3 | Magnetické separační techniky | 21 |
| 2.3.1 | Magnetické neporézní částice a jejich příprava | 22 |
| 2.4 | Identifikace bakterií mléčného kvašení | 22 |
| 2.4.1 | Polymerázová řetězová reakce | 22 |
| 2.4.2 | Princip PCR | 23 |
| 2.4.3 | Komponenty PCR | 24 |
| 2.4.4 | Jednotlivé kroky v PCR | 25 |
| 2.4.5 | Citlivost PCR | 26 |
| 2.4.6 | Výhody a nevýhody PCR | 27 |
| 2.4.6.1 | Výhody PCR | 27 |
| 2.4.6.2 | Nevýhody PCR | 27 |
| 2.5 | Detekce produktů PCR | 27 |
| 2.5.1 | Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy | 28 |
| 3 | CÍL PRÁCE | 29 |
| 4 | MATERIÁL | 30 |
| 4.1 | Testované komplexní matrice doplňků stravy a jejich složení | 30 |
| 4.2 | Použité bakteriální kultury a jejich DNA | 36 |
| 4.3 | Chemikálie a roztoky | 36 |
| 4.3.1 | Roztoky pro lýzi buněk, izolaci DNA a její purifikaci | 37 |
| 4.3.2 | PCR komponenty | 38 |
| 4.3.3 | Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu | 39 |
| 4.4 | Magnetické nosiče pro izolaci bakteriální DNA | 40 |
| 4.5 | Přístroje a pomůcky | 40 |
| 5 | METODY | 42 |
| 5.1 | Izolace bakteriální DNA pomocí fenolové extrakce | 42 |
| 5.1.1 | Lyze buněk a příprava hrubého lyzátu | 42 |
| 5.1.2 | Fenolová extrakce | 42 |
| 5.1.3 | Přesrážení DNA ethanolem | 42 |
| 5.2 | Izolace DNA z doplňků stravy | 43 |
| 5.2.1 | Příprava hrubých lyzátů buněk z jednotlivých výrobků | 43 |
| 5.2.2 | Izolace DNA z hrubých lyzátů pomocí magnetického nosiče | 43 |
| 5.2.2.1 | Příprava separační směsi pro izolaci DNA magnetickými nosiči | 43 |
| 5.3 | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA | 44 |
| 5.4 | Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 44 |
| 5.4.1 | PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i> | 45 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.4.2 | Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 45 |
| 5.4.3 | Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 46 |
| 5.4.4 | Příprava PCR směsi pomocí mastermixů | 46 |
| 5.4.5 | Programy použité v PCR | 47 |
| 5.5 | Agarózová gelová elektroforéza..... | 47 |
| 5.5.1 | Příprava gelu pro agarózovou gelovou elektroforézu..... | 47 |
| 5.5.2 | Nanášení produktů PCR na gel..... | 48 |
| 5.5.3 | Průběh elektroforézy a barvení | 48 |
| 6 | VÝSLEDKY | 49 |
| 6.1 | Příprava hrubého lyzátu buněk a izolace DNA z čisté bakteriální kultury pro pozitivní kontroly a zjištění citlivosti amplifikace..... | 49 |
| 6.2 | Zpracování vzorků doplňků stravy | 49 |
| 6.3 | Příprava hrubých lyzátních buněk z doplňků stravy | 50 |
| 6.4 | Izolace DNA z doplňků stravy pomocí magnetického nosiče..... | 51 |
| 6.5 | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z doplňků stravy | 51 |
| 6.5.1 | Shrnutí množství DNA izolované z doplňků stravy | 56 |
| 6.6 | Stanovení citlivosti PCR s purifikovanou DNA | 57 |
| 6.6.1 | Citlivost PCR specifické pro doménu <i>Bacteria</i> | 57 |
| 6.6.2 | Citlivost rodově specifické PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 58 |
| 6.6.3 | Citlivost druhově specifické PCR pro <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 59 |
| 6.6.4 | Shrnutí citlivosti v PCR specifických pro doménu, rod a druh | 60 |
| 6.7 | PCR s DNA izolované z doplňků stravy pomocí magnetických nosičů | 60 |
| 6.7.1 | PCR s DNA maticí z výrobků první izolace | 60 |
| 6.7.1.1 | PCR pro doménu <i>Bacteria</i> | 61 |
| 6.7.1.2 | Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 62 |
| 6.7.1.3 | Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 63 |
| 6.7.2 | PCR s DNA maticí z výrobků druhé izolace..... | 64 |
| 6.7.2.1 | PCR pro doménu <i>Bacteria</i> | 64 |
| 6.7.2.2 | Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 65 |
| 6.7.2.3 | Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 66 |
| 6.7.3 | PCR s DNA maticí z výrobků třetí izolace | 67 |
| 6.7.3.1 | PCR pro doménu <i>Bacteria</i> | 67 |
| 6.7.3.2 | Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 68 |
| 6.7.3.3 | Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 69 |
| 6.7.4 | PCR s DNA maticí z výrobků čtvrté izolace..... | 70 |
| 6.7.4.1 | PCR pro doménu <i>Bacteria</i> | 70 |
| 6.7.4.2 | Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 72 |
| 6.7.4.3 | Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 73 |
| 6.7.5 | PCR s DNA maticí z výrobků páté izolace..... | 74 |
| 6.7.5.1 | PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i> | 74 |
| 6.7.5.2 | Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 75 |
| 6.7.5.3 | Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 76 |
| 6.7.6 | PCR s DNA maticí z výrobků z šesté izolace | 77 |
| 6.7.6.1 | PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i> | 77 |
| 6.7.6.2 | Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 78 |

| | | |
|---------|---|----|
| 6.7.6.3 | Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 79 |
| 6.8 | Souhrn výsledků PCR z jednotlivých izolací pro jednotlivé výrobky | 81 |
| 7 | DISKUZE | 85 |
| 7.1 | Izolace DNA z čisté bakteriální kultury pro pozitivní kontroly, zjištění citlivosti amplifikace | 85 |
| 7.2 | Stanovení citlivosti PCR s purifikovanou | 86 |
| 7.3 | Hrubé lyzáty buněk a izolace DNA z komplexních matric doplňků stravy | 86 |
| 7.4 | Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z komplexních matric doplňků stravy | 87 |
| 7.5 | PCR pro doménu <i>Bacteria</i> a ověření amplifikovatelnosti DNA | 87 |
| 7.6 | Rodově specifická PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> | 87 |
| 7.7 | Druhově specifická PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 88 |
| 7.8 | Souhrn výsledků PCR v rámci jednotlivých izolací..... | 88 |
| 8 | ZÁVĚR | 90 |
| 9 | SEZNAM LITERATURY | 91 |

1 ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení (BMK) a bifidobakterie jsou přirozenou součástí gastrointestinálního traktu člověka. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které pokud jsou aplikovány v přiměřeném množství, příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele. Mezi nejvýznamnější probiotické bakterie patří zejména některé druhy rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Vyznačují se prospěšnými účinky na zdraví. Zahrnují pozitivní ovlivnění střevní mikroflóry, antikarcinogenní účinky, protizánětlivé účinky, regulace množství krevního cholesterolu, prevence proti potravinovým alergiím, aj.

Významná pozornost je věnována uplatnění BMK a bifidobakterií komerčně v potravinářském průmyslu a farmaceutickém průmyslu. Již od dávné minulosti jsou uvedené mikroorganismy využívány pro své prospěšné vlastnosti při výrobě fermentovaných potravin, jako jsou sýry a jiné mléčné výrobky, chléb a maso. Podílí se na tvorbě charakteristické chuti, vůně a prodlužují trvanlivost fermentovaných produktů. Probiotické bakterie jsou rovněž významnou součástí doplňků stravy.

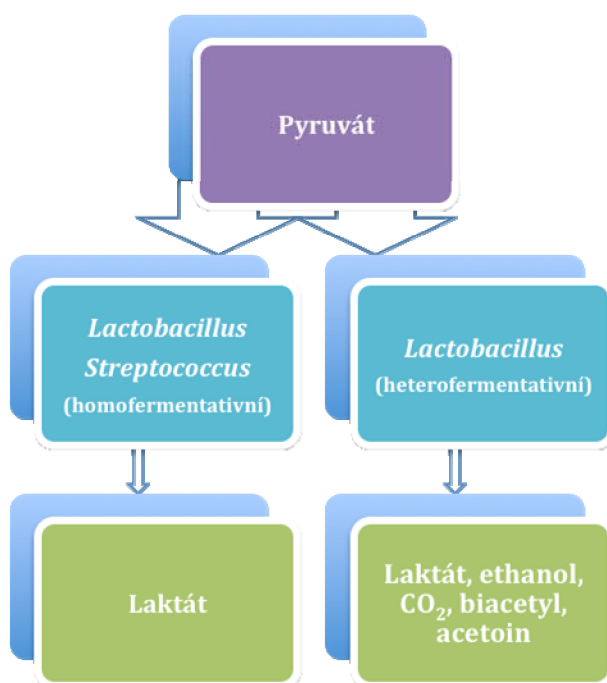
Na identifikaci bakterií jsou využívány molekulárně biologické metody, jež využívají všechny informace obsažené v genomu. Tyto metody se uplatňují při identifikaci BMK v doplňcích stravy s cílem porovnat přítomnost detekovaných bakterií s údaji deklarovanými výrobcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou heterogenní skupinou bakterií, jež mají podobné metabolické vlastnosti [57]. Jejich hlavní charakteristikou je, že fermentují různé druhy živin (cukrů) za vzniku kyseliny mléčné jako hlavního či jediného fermentačního produktu. Pyruvát je metabolizován u BMK na laktát (viz Obrázek 1). Cílem této přeměny je současná přeměna redukovaného kofaktoru - NADH na formu, jež je schopná dehydrogenovat další molekulu substrátu při glykolýze - NAD⁺ [75].

Obrázek 1: Schéma metabolické přeměny pyruvátu u BMK [75]



Skupina BMK zahrnuje většinou nepohyblivé, nesporulující, mikroaerofilní či anaerobní bakterie ve tvarech koků nebo tyčinek. Z rodů do skupiny BMK patří: r. *Aerococcus*, r. *Alloiococcus*, r. *Atopobium*, r. *Carnobacterium*, r. *Enterococcus*, r. *Lactobacillus*, r. *Lactococcus*, r. *Leuconostoc*, r. *Oenococcus*, r. *Paralactobacillus*, r. *Pediococcus*, r. *Streptococcus*, r. *Tetragenococcus*, r. *Vagococcus* a r. *Weissella*. Na základě podobných biochemických, fyziologických a ekologických vlastností a způsobu použití v potravinářském průmyslu do skupiny BMK bývají zahrnovány i r. *Bifidobacterium*, r. *Gardnerella*, r. *Scardovia* a r. *Parascardovia*, i když fylogeneticky se řadí do kmene *Actinobacteria* [58].

Jedná se o jednu z nejdůležitějších průmyslově využívaných skupin bakterií [1]. BMK se využívají jako startovací kultury při výrobě potravin, především fermentovaných mléčných výrobků [84, 42].

Dle fermentačních produktů se dělí BMK na homofermentativní a heterofermentativní. Při homofermentativním mléčném kvašení se tvoří prakticky jediný produkt – kyselina mléčná (90 %). Tomuto typu kvašení podléhají různé laktobacily i koky (např. *Streptococcus*). Glykolýzou vzniklý pyruvát je redukován pomocí redukovaného kofaktoru na laktát (především D-laktát) [75]. Homofermentativní mléčné bakterie jsou využívány pro kvasnou výrobu kyseliny mléčné. Samovolné mléčné kvašení se uplatňuje při konzervaci zelí a okurek, neboť zabraňuje rozvoji hnilobných bakterií. Primární využití je pro rychlou produkci kysaných mléčných nápojů (acidofilní mléko, kefir), sýrů a podílí se na vzniku příchutí, konzistenci a nutriční hodnotě výrobků [87].

Heterofermentativní mléčné bakterie neobsahují glykolytický enzym aldolázu, jež štěpí hexosa-1,6-bisfosfát na dva triosafosfáty [75]. Z toho důvodu odbourávají glukosu pomocí pentosového cyklu a částí glykolytického enzymu. Jen část glukosy se proto přemění na laktát a ze zbytku se vytvoří ethanol a oxid uhličitý či acetát a oxid uhličitý [87].

2.2 Probiotika

Pravděpodobně roku 1954 Ferdinand Vergin poprvé zavedl do literatury termín “probiotic” [4]. Vychází z řeckého základu slov pro - pro a bios – život, “*pro život*” [20]. Definice probiotik byla formulována a publikována v květnu roku 2002 expertní komisí FAO (Food and Agriculture Organisation) při Světové zdravotnické organizaci (FAO/WHO) a zní: “Živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány v přiměřených množstvích, mají prokazatelně příznivý vliv na zdraví hostitele/příjemce.” [35]. Probiotika se řadí do skupiny funkčních potravin, které kromě prosté výživové hodnoty mají i příznivý účinek na zdraví konzumenta [76].

Probiotika zahrnují nepatogenní a netoxigenní druhy bakterií [30, 72]. Jde o bioaktivní substance nepatřící k živinám [25], jež přežívají v potravinách a projdou živé přes žaludek a tenké střevo vzhledem ke složení jejich buněčné stěny a dalším vlastnostem [30, 72]. V dnešní době se testuje uzavření probiotických buněk pomocí enkapsulace do vhodného obalového materiálu (alginát sodný, hydroxypropyl celulóza), jež projde trávicím traktem a k rozpadu dojde až v místě působení. Enkapsulace tak zvyšuje stabilitu probiotických bakterií ve střevě [9]. Přijímají se buď ve formě tabletek (v lyofilizované formě) nebo jako součást potravin (mléčné a fermentované produkty) [44]. Probiotické kmeny jsou vybírány podle prospěšných vlastností a záměrně přidávány do potravin, doplňků stravy a farmaceutických preparátů [83]. Probiotika by měla být odolná vůči antimikrobiálním látkám používaných v klinické praxi, neměla by však přenášet geny pro rezistenci na jiné bakterie [11].

Stáří, léčba antibiotiky a potlačení imunity může přispět k narušení kolonizace prospěšnou bakteriální mikroflórou ve střevě [71]. Kolonizace střeva prospěšnými bakteriemi potlačuje růst patogenních bakterií prostřednictvím konkurenčního vyloučení a tvorbou organických kyselin (kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina máselná) a antimikrobiálních látek [17, 18, 48]. Rovněž potlačují případnou adhezi enteropatogenních a enterotoxigenních kmenů jako *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, atd. [89]. Prospívají tak trávení, vstřebávání vitaminů a minerálních látek, produkují vitaminy skupiny B a vitamin K, vyznačují se

anticholesterolovou aktivitou tím, že podporují vylučování žlučových kyselin z organismu. Dále udržují správnou acidobazickou rovnováhu, pomáhají obnovit normální střevní mikroflóru v období rekonvalescence (po antibiotické a radiační léčbě), působí imunostimulačně proti bakteriálním infekcím a preventivně proti karcinomu kolorekta a kvasinkovým infekcím, zlepšují využití laktózy [26, 51, 43, 25, 85]. Probiotika rovněž mohou mít preventivní účinek při vzniku alergií a můžou je dokonce i léčit [45]. Experimenty prokázaly, že podávání probiotik může změnit bakteriální enzymovou aktivitu. Po konzumaci fermentovaného mléčného výrobku obsahující *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus lactis* a *Streptococcus cremoris* třikrát denně po dobu tří týdnů byly u lidí prokázány nižší fekální koncentrace nitroreduktázy, azoreduktázy a β -glukuronidázy, na rozdíl od lidí, kterým byly podávány nefermentované mléčné produkty. Výše zmíněné enzymy jsou spojené s produkcí karcinogenů ve střevě [10].

Probiotickou kulturu je nezbytné přijmout v dostatečném množství pro kladné ovlivnění zdraví hostitele. Navrhovaná množství pro probiotické bakterie je v rozpětí 10^6 - 10^7 cfu/g (nebo ml) výrobku [69]. Japonští vědci prokázali, že k vyvolání zdraví prospěšného efektu postačí i neživé mikroorganismy nebo pouze část jejich buněk [52]. Mléčné výrobky (kysané mléko, jogurt) jsou obvykle využívány jako nositelé probiotických kultur [17, 31, 53].

Funkčnost probiotik je definována jako výsledná vlastnost vyjadřující efektivní účinky a použitelnost konkrétního probiotického výrobku. Výroba probiotik se řídí předpisy pro potraviny, neboť probiotikum nemá statut léčiva a ani Evropský orgán pro bezpečnost potravin (EFSA) probiotiku neschválil zdravotní tvrzení. Existuje doporučený postup pro výběr probiotických bakterií pro použití v potravinách [60]:

1. Kmen **identifikovat a charakterizovat** pomocí fenotypových a molekulárně biologických metod na úroveň rodu, druhu a kmene. Kmen je posléze uložen v mezinárodní sbírce mikroorganismů.
2. Otestovat **funkční charakteristiky** pomocí *in vitro* testů a testů na zvířatech.
3. Prokázat **bezpečnost kultury** pomocí *in vitro* testů, pokusem na zvířatech a aplikací lidským dobrovolníkům. Musí být vyloučeny faktory patogenity.
4. Následuje **výroba probiotické potraviny** se zohledněním na technologické vlastnosti, určují se podmínky skladování a koncentrace živých buněk v potravíně (doplňku stravy) [60].

K probiotickým mikroorganismům se řadí převážně BMK a bifidobakterie. Byly však popsány i jiné probiotické či potencionálně probiotické mikroorganismy, např. kvasinky či některé kmeny bakterií rodu *Bacillus* a *Escherichia* [52]. V Tabulce 1 jsou uvedeny jednotlivé probiotické mikroorganismy.

Tabulka 1: Probiotické mikroorganismy [87]

| | |
|---|--|
| Druhy <i>Lactobacillus</i> | <i>L. acidophilus, L. rhamnosus, L. gasseri, L. casei, L. reuteri, L. delbrückii ssp. bulgaricus, L. plantarum, L. johnsonii, L. lactis</i> |
| Druhy <i>Bifidobacterium</i> | <i>B. bifidum, B. longum, B. breve, B. infantis, B. lactis, B. adolescentis, B. animalis</i> |
| Ostatní druhy | <i>Bacillus cereus, Escherichia coli, Propionibacterium freundsreichii, Saccharomyces boulardii, Enterococcus faecalis, Streptococcus thermophilus</i> |

2.2 Rod *Lactobacillus*

2.2.1 Charakteristika

Z potravinářského a biotechnologického hlediska patří rod *Lactobacillus* mezi nejdůležitější představitele BMK [40, 75]. Jde o grampozitivní bakterie robustního tyčinkového tvaru tvořící řetízky nebo palisády. Na kultivační půdě vytváří kolonie [89]. Jsou fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní (nízké koncentrace kyslíku urychlují jejich rozmnožování), kataláza negativní, nesporulující a nepohyblivé. Na výživu jsou velmi náročné. Daří se jim na bohatých komplexních médiích [88, 21, 73, 75, 46]. Jako zdroj uhlíku a energie potřebují kromě sacharidů i nukleotidy, aminokyseliny a vitaminy a pro jejich růst je nutná kyselina pantothenová a nikotinová. Navíc pro růst heterofermentativních laktobacilů je důležitý vitamin thiamin [86]. Bakterie rodu *Lactobacillus* dávají přednost mezofilním a mírně termofilním teplotám. Některé druhy jako *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* rostou pomaleji při nízkých teplotách blízkých bodu mrazu, např. na chladném mase [21]. Množí se při hodnotě pH 5,5 – 6,5 [19]. Klesne-li pH pod 3,4 – 4,0, růst laktobacilů se zastaví [27, 86]. Převážné množství druhů *Lactobacillus* fermentuje glukosu a laktosu na laktát - odtud také pochází název tohoto rodu [89]. Je-li jako zdroj uhlíku použita pro růst těchto bakterií glukóza, nastávají dvě možnosti: buď se tvoří ve větším množství (více než 85 %) kyselina mléčná – jde o homofermentativní laktobacily (např. druhy *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*), nebo se tvoří směs kyseliny mléčné, oxidu uhličitého, ethanolu, kyseliny octové a kyseliny mravenčí – jde o heterofermentativní laktobacily (např. *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri*) [75, 5].

Do skupiny rodu *Lactobacillus* se řadí druhy, jež jsou součástí přirozené mikroflóry úst, gastrointestinálního traktu a vagíny [89]. Dále se vyskytuje na travnatých porostech, rostlinách, v obilí a půdě [75] a v tělech hmyzu [19]. Z důvodu nízkého pH kyseliny mléčné, jež potlačuje množení hnilobných bakterií, mají bakterie rodu *Lactobacillus* uplatnění při konzervaci potravin, kvašení zelí a okurek. V mlékárenství má široké využití druh *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* při výrobě jogurtu, *Lactobacillus acidophilus* při přípravě acidofilního mléka či *Lactobacillus casei* při přípravě sýrů [89]. Bakterie rodu *Lactobacillus* se vyznačují proteolytickou aktivitou a tvorbou aromatických sloučenin, bakteriocinů a exopolysacharidů, jež jsou důležité pro kvalitu a nutriční hodnotu konečných

výrobníků a významně rozšiřuje spektrum biotechnologických aplikací. Několik studií prokázalo vysoký potenciál bakteriocinů produkovaných laktobacily pro kontrolu růstu patogenních mikroorganismů v potravinách. Z tohoto hlediska jsou laktobacily produkující bakteriociny považovány za ochranné kultury ve fermentovaných mléčných výrobcích [41]. Převážná většina druhů rodu *Lactobacillus* náleží do skupiny bakterií obecně pokládaných za bezpečné – tzv. GRAS (generally regarded as safe) [66, 85]. Avšak některé druhy laktobacilů způsobují vady v chuti ve vinařství, pivovarnictví a droždářství a vystupují tedy jako nežádoucí kontaminace, jež vede ke ztrátám výtěžnosti [75].

2.2.2 Taxonomické zařazení bakterií rodu *Lactobacillus*

Fylogeneticky se rod *Lactobacillus* řadí do:

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

Rod *Lactobacillus* byl popsán na začátku 20. století a dánský mikrobiolog Orla-Jensen ho rozdělil na základě optimální teploty růstu a fermentace glukózy na tři podrody (*Thermobacterium*, *Streptobacterium* a *Betabacterium*) (viz Tabulka 2) [29].

Tabulka 2: Rozdělení bakterií rodu *Lactobacillus* do tří podrodů [29]

| <i>Podrod</i> | <i>Fermentace glukózy</i> | <i>Teplota růstu</i> |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <i>Thermobacterium</i> | Homofermentativní | 45 °C |
| <i>Streptobacterium</i> | Homofermentativní | 15 °C |
| <i>Betabacterium</i> | heterofermentativní | Žádné všeobecné pravidlo |

Díky molekulárně-biologickým metodám se zjistilo, že rozdělení na tři podrody není dostatečně přesné [29]. Z tohoto důvodu bylo podle výsledků molekulárně biologických metod vytvořeno nové členění do tří skupin na základě jejich metabolismu a to je používáno dodnes [58, 21, 73]. Dnešní rozdělení rodu *Lactobacillus* a jejich zástupci je následující:

I. skupina: obligátně homofermentativní laktobacily

Hexózy jsou fermentovány (> 90 %) na kyselinu mléčnou a naopak pentózy a glukonát fermentovány nejsou [21, 73]. Zástupci této skupiny jsou významné pro výrobu sýrů [28], jogurtů a probiotických nápojů [74]. Někteří zástupci obligátně homofermentativních

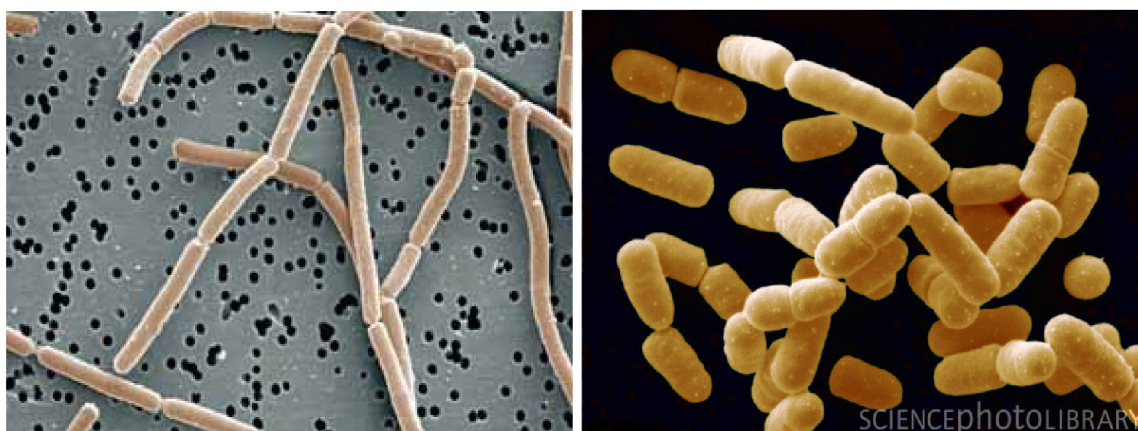
laktobacilů a jejich charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 3. Morfologie buněk dvou druhů je uvedena na Obrázku 2.

Zástupci: *L. delbrueckii ssp. delbrueckii*, *L. delbrueckii ssp. lactis*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*, aj. [73].

Tabulka 3: Zástupci skupiny I: obligátně homofermentativní laktobacily [21]

| Druh | Teplota růstu | Prostředí výskytu |
|--|---------------|---|
| <i>L. delbrueckii ssp. delbrueckii</i> | 45 °C | rostlinný materiál fermentovaný při vyšších teplotách |
| <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> | 45 °C | jogurty a sýry |
| <i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> | 45 °C | kyselé mléko, sýry, lisované kvasnice, obilné zápary |
| <i>L. helveticus</i> | 45 °C | kyselé mléko, tvrdé sýry, ementálská kultura |
| <i>L. acidophilus</i> | 45 °C | gastrointestinální trakt lidí a zvířat, dutina ústní |
| <i>L. salivarius</i> | 45 °C | dutina ústní a gastrointestinální trakt lidí |
| <i>L. farciminis</i> | 15 °C | masné výrobky, pekárenský kvas |
| <i>L. yamanashiensis</i> | 15 °C | jablečný mošt a víno, hroznový mošt |

Obrázek 2: *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* [36] a *L. salivarius* [39] – morfologie buněk



II. skupina: fakultativně heterofermentativní laktobacily

Hexózy jsou fermentovány (> 90 %) na kyselinu mléčnou či na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a ethanolu a pentózy jsou fermentovány pomocí indukovatelné fosfoketolasy na kyselinu mléčnou a octovou [21, 73]. Někteří zástupci fakultativně heterofermentativních laktobacilů a jejich charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 4. Morfologie buněk druhu *Lactobacillus plantarum* je uvedena na Obrázku 3.

Zástupci: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. acetotolerans*, *L. zaeae*, *L. rhamnosus*, aj. [73].

Tabulka 4: Zástupci skupiny II: fakultativně heterofermentativní laktobacily [21]

| Druh | Teplota růstu | Prostředí výskytu |
|--------------------------------------|---------------|--|
| <i>L. alimentarius</i> | 15 °C | marinované rybí produkty, masné produkty, pekárenský kvas, tvoří acetonin |
| <i>L. bavaricus (L. sake)</i> | 15 °C | kysané zelí, fermentované zelné listy |
| <i>L. casei ssp. casei</i> | 15 °C - 45 °C | mléko, sýry, mléčné produkty, pekárenský kvas, siláž, dutina ústní a gastrointestinální trakt lidí |
| <i>L. casei ssp. pseudoplantarum</i> | 15 °C | viz výše |
| <i>L. casei ssp. rhamnosus</i> | 15 °C - 45 °C | viz výše |
| <i>L. casei ssp. tolerans</i> | 15 °C | viz výše, přežívá pasterizaci |
| <i>L. curvatus</i> | 15 °C | mléko, siláž, kravský hnůj, masné produkty, pekárenský kvas |
| <i>L. maltaromaticus</i> | 15 °C | mléčné produkty, siláž, pekárenský kvas, lidský gastrointestinální trakt, dutina ústní |
| <i>L. plantarum</i> | 15 °C | mléčné produkty, siláž, pekárenský kvas |
| <i>L. sake (L. bavaricus)</i> | 15 °C | masné produkty, pekárenský kvas |

Obrázek 3: *L. plantarum* – morfologie buněk [2]



III. skupina: obligátně heterofermentativní laktobacily

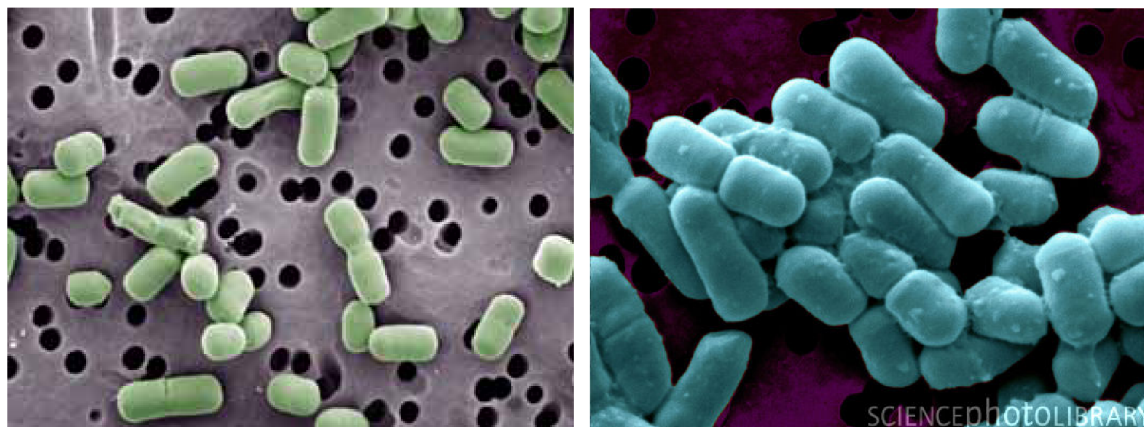
Při fermentaci hexóz používá tato skupina jen dráhu závislou na fosfoketoláze [66]. Hexózy jsou fermentovány na kyselinu mléčnou a v menším množství na kyselinu octovou, ethanol a oxid uhličitý a pentózy jsou fermentovány na kyselinu mléčnou a octovou [27, 73]. Nacházejí se v gastrointestinálním traktu nebo zrajících sýrech [66]. Bakterie III. skupiny se podílí na znehodnocování potravin. *Lactobacillus brevis* se účastní kažení citrusových plodů, vína a piva. *Lactobacillus fructivirans*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus buchneri* se podílejí na kažení majonézy [21]. Někteří zástupci obligátně heterofermentativních laktobacilů a jejich charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 5. Morfologie buněk dvou druhů je uvedena na Obrázku 4.

Zástupci: *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. gastricus*, *L. parabuchneri*, *L. composti*, *L. brevis*, *L. mucosae*, aj.

Tabulka 5: Zástupci skupiny II: obligátně heterofermentativní laktobacily [21]

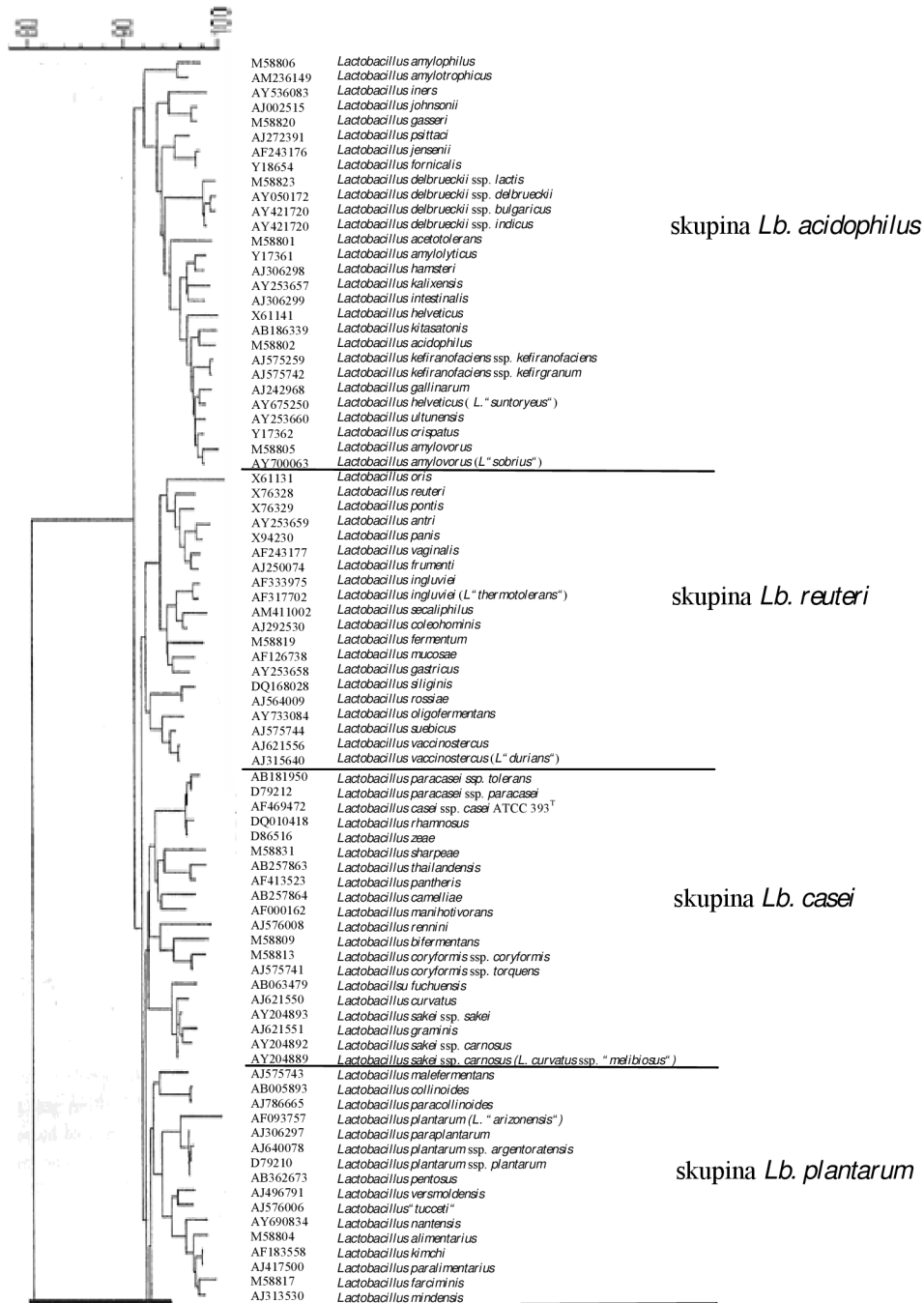
| Druh | Teplota růstu | Prostředí výskytu |
|---|---------------|---|
| <i>L. bifermantas</i> | 15 °C | izolovaný z holandských sýrů s malými trhlinami |
| <i>L. brevis</i> | 15 °C | mléko, sýry, pekárenský kvas, siláž, lidský gastrointestinální trakt a dutina ústní |
| <i>L. buchneri</i> | 15 °C | mléko, sýry, dutina ústní |
| <i>L. confusus</i> (<i>Weissella confusa</i>) | 15 °C | cukrová třtina, mrkvová šťáva, příležitostně v syrovém mléku a slinách |
| <i>L. divergens</i> (<i>Carnobacterium divergens</i>) | 15 °C | vakuově balené chlazené maso |
| <i>L. fermentum</i> | 45 °C | kvasnice, mléčné produkty, pekárenský kvas, kravský hnůj |
| <i>L. fructivorans</i> | 15 °C | kazící se majonéza, salátové dresingy, kazící se dezertní vína a aperitivy |
| <i>L. halotolerans</i> (<i>Weissella halotolerans</i>) | 15 °C | masné produkty |
| <i>L. kandleri</i> | 15 °C | produkce slizu ze sacharózy |
| <i>L. kefir</i> | 15 °C | kefir |
| <i>L. reuteri</i> | 45 °C | masné produkty, lidské a zvířecí fekálie |
| <i>L. sanfranciscensis</i> (syn. <i>L. sanfrancisco</i>) | 15 °C | pekárenský kvas |
| <i>L. viridescens</i> (<i>Weissella viridescens</i>) | 15 °C | nepřirozeně zbarvené masné produkty, pasterizované mléko |

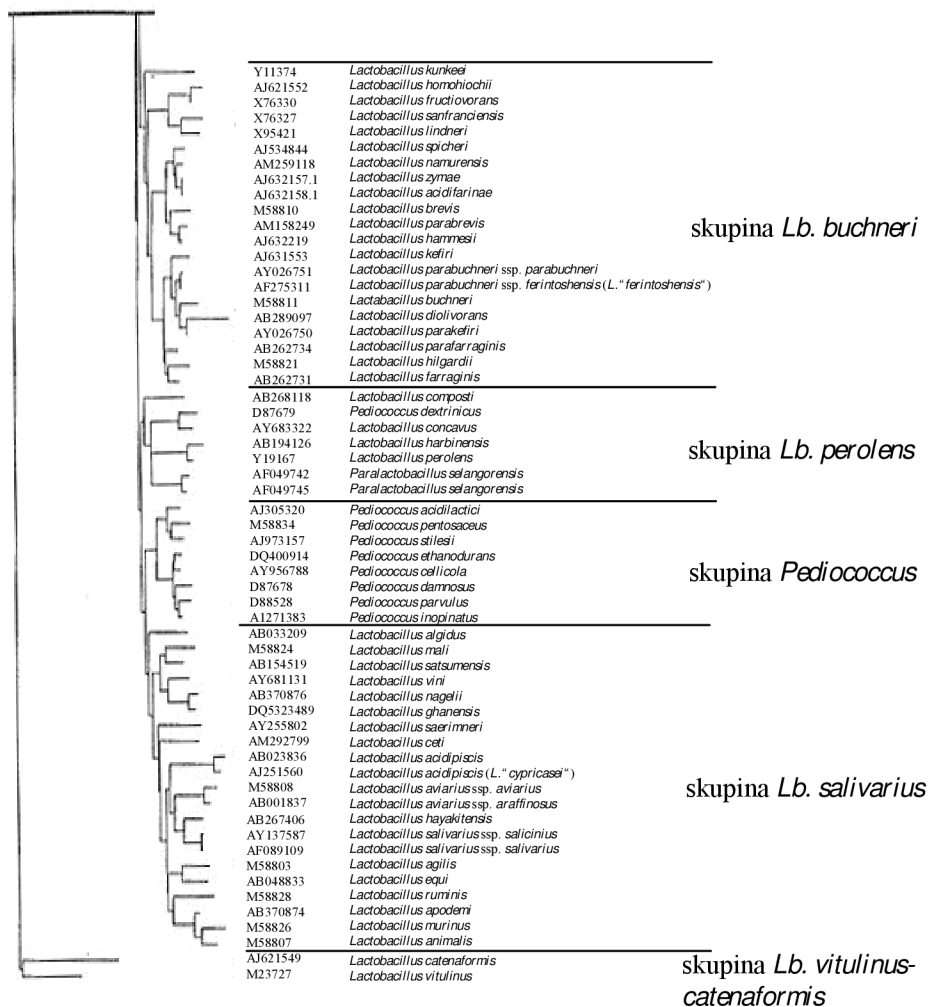
Obrázek 4: *L. brevis* [37] a *L. fermentum* [38] – morfologie buněk



Na Obrázku 5 je znázorněno schéma fylogenetické struktury rodu *Lactobacillus*.

Obrázek 5: Schématické znázornění fylogenetické struktury r. *Lactobacillus* [83]





Druhy rodu *Lactobacillus* jsou schopny se adaptovat na různé změny podmínek a podle toho tak měnit i svůj metabolismus. Tento fakt může vést k významným rozdílům ve složení konečných produktů fermentace [58].

Postupným vývojem a aplikací molekulárně-biologických metod se dospělo k novému pohledu na taxonomii rodu *Lactobacillus*, jež je nejvíce heterogenním rodem mezi BMK. Tato taxonomie je založena na obsahu G+C v DNA laktobacilů v rozmezí 33 – 55 % [5].

2.2.3 Druh *Lactobacillus acidophilus*

Nejvýznamnějším druhem laktobacilů komenzální mikroflóry na mukózním povrchu epitelu v intestinálním traktu lidí a zvířat je *Lactobacillus acidophilus* [21]. Řadí se do skupiny obligátně homofermentativních laktobacilů a pozitivně působí na střevní mikroflóru. Z tohoto důvodu má významnou roli v lidském zdraví a výživě [19]. Využívá se při mlékárenské výrobě jogurtů a acidofilního mléka, ve zdravotnictví a ve veterinární medicíně [89]. Pro obnovení normálního složení střevní mikroflóry po aplikaci antibiotik se využívají výrobky s obsahem *Lactobacillus acidophilus* [21]. Jde o poměrně robustní grampozitivní tyčinku, která

štěpí glykogen epitelu na kyselinu mléčnou, čímž snižuje hodnotu pH na 4,5 a zabraňuje tak v usídlení patogenních organizmů [89].

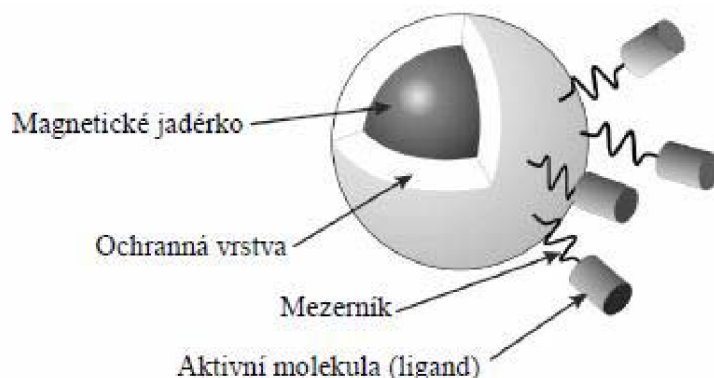
2.3 Magnetické separační techniky

Magnetické separace oddělující magnetické částice od nemagnetických ze směsi jsou v biotechnologiích využívány od 70. let minulého století [67]. Magnetické částice nacházejí stále větší využití v oblasti medicíny, biologie, chemie, biochemie, farmacie [63] a v rámci molekulárních metod v genomové analýze [64]. Magnetické separační techniky jsou možností, jak urychlit či usnadnit některé běžné separační a purifikační techniky izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR [3, 56]. Na rozdíl od jiných používaných metod je totiž práce s magnetickými částicemi rychlá, jednoduchá, citlivá, bezpečná a výtěžek DNA je vysoký a dostatečně čistý. Při použití magnetického nosiče není potřeba speciálního vybavení a usnadňuje automatizaci při rutinní purifikaci [64]. Důležitá je zmínka o menší spotřebě toxických organických rozpouštědel [56]

Magnetické nosiče vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Nevykazují reziduální magnetismus, tzn. že když částice nejsou v bezprostřední blízkosti magnetického pole, tak vytvářejí homogenní suspenzi (jsou tzv. paramagnetické) [67]. Na svém povrchu obsahují funkční iontové skupiny, jež jsou silně či slabě zásadité nebo kyselé, dále obsahují ligandy nebo cheláty přechodných kovů či vázanou složku příslušného afinitního páru. V průběhu magnetické separace nastávají různé typy interakcí - nespecifické (vazby hydrofóbní, iontové či vodíkové) vazby a specifické afinitní interakce (typu enzym-inhibitor, streptavidin-biotin, protilátka-antigen) [24].

Nejúčinnější částice pro magnetickou separaci jsou částice monodisperzní. Mají jednotné chemické a fyzikální vlastnosti a v roztocích neagregují tak snadno jako částice polydisperzní. V případě tvaru se v praxi osvědčila forma kuliček kvůli jejich výborným hydrodynamickým vlastnostem [24]. Podle způsobu využití se syntetizují v různých velikostech, i v nano nebo mikro měřítku [64]. Velikost se upřednostňuje v mikrometrech a menší částice tak mají větší specifický povrch, kde dochází k prichycení funkčních skupin či k imobilizaci biomolekul. Přesprášené malé částice jsou méně vhodné, protože může dojít k značnému oslabení jejich magnetické citlivosti [24]. Funkční magnetickou částici tvoří magnetické jádro, ochranné vrstvy a aktivní molekuly (specifické dle použití). Viz Obrázek 6.

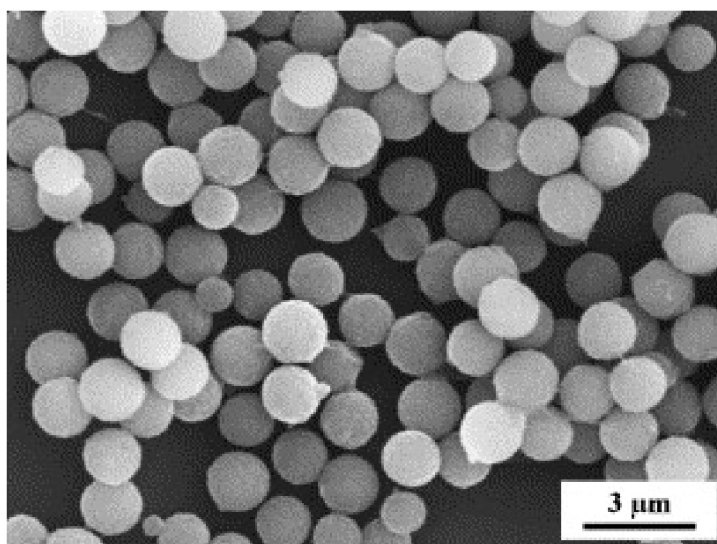
Obrázek 6: Obecná stavba magnetické částice [6]



2.3.1 Magnetické neporézní částice a jejich příprava

V rámci této práce byly k izolacím bakteriálních DNA využívány magnetické mikročástice Poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát) - P(HEMA-*co*-GMA) (viz Obrázek 7). Jde o hydrofilní nosič, vykazující netoxicitu, mechanickou stabilitu, biokompatibilitu a neinterferuje s prostředím [63]. Tyto magnetické neporézní mikročástice jsou pokryty karboxylovými skupinami, jež reverzibilně adsorbují DNA [65, 68]. K adsorpci dochází za podmínek kondenzace DNA, což umožňuje navázat záporně nabitou DNA na záporně nabitě karboxylové skupiny na povrchu nosiče. Pro navození kondenzace DNA je nezbytná přítomnost polyethylen glykolu (PEG 6000) a chloridu sodného [78]. Částice je možné připravit disperzní kopolymerizací 2-hydroxyethyl methakrylátu (HEMA) a glycidyl methakrylátu (GMA) za účasti koloidních částic magnetitu (Fe_3O_4) pokrytých kyselinou olejovou. Oxidy musí být obalené vhodnými vysoko- či nízko-molekulovými sloučeninami, aby nedocházelo k nežádoucím nescifickým interakcím s látkami v médiu [63]. Kopolymerizace je iniciována dibenzoyl peroxidem a stabilizován acetát-butyrátem celulózy. Hydroxylové skupiny mikročástic se oxidují 2% vodným roztokem manganistanu draselného v kyselině sírové [65].

*Obrázek 7: Magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) [34]*



2.4 Identifikace bakterií mléčného kvašení

BMK je možné prokázat kultivačně na vhodných médiích nebo nejnověji molekulárně-genetickými metodami [5, 78]. Identifikace BMK molekulárně-genetickými metodami je založena na analýze DNA s využitím amplifikačních metod.

2.4.1 Polymerázová řetězová reakce

Nejvyužívanější amplifikační metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase chain reaction). Metoda probíhá za podmínek *in vitro*, tj. bez kultivace buněk [8]. Její pomocí

může být jakákoliv nukleotidová sekvence obsažená v templátové DNA rychle a vysoce selektivně namnožena. Jde o jednoduchou enzymatickou reakci, jež se opakuje 30 až 40 krát během zhruba dvou hodin (54, 8) a cílový fragment DNA se naamplifikuje milionkrát i víckrát. PCR je v současné době velmi populární metodou, použití má v mnoha oblastech genetického výzkumu, například v diagnostice při analýze genetických onemocnění, infekčních onemocnění, při klonování genů či testování otcovství, ve forenzní medicíně a molekulární biotechnologii. PCR techniku objevil a uvedl do praxe Dr. Kary Mullis v roce 1983 a v roce 1993 získal za tento objev Nobelovu cenu za chemii [55, 8]. Samotný koncept amplifikace DNA však byl poprvé navržen v roce 1971 Har Gobind Khorana [61].

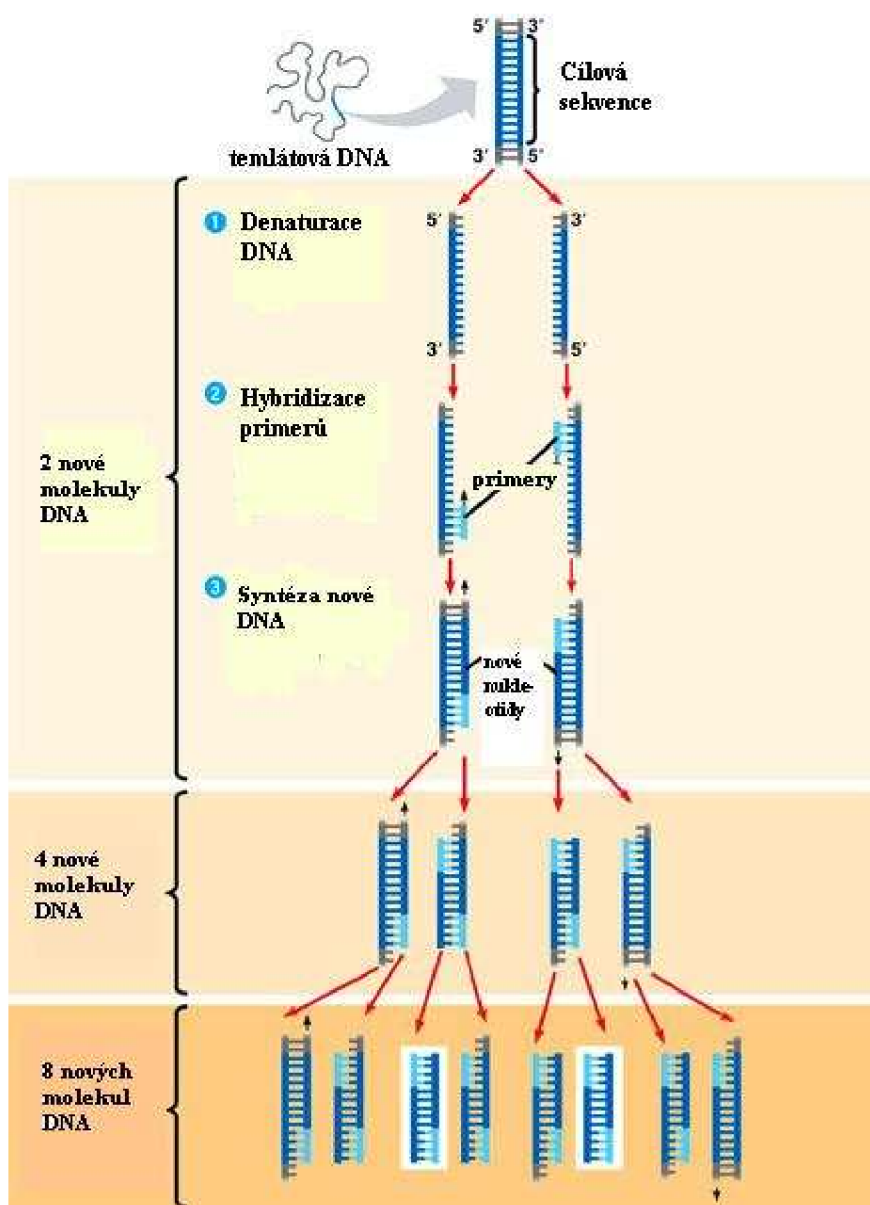
Vzhledem k vysoké citlivosti detekce se díky PCR může zjistit přítomnost velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku. Důležitou podmínkou úspěchu je použití neporušeného úseku DNA [33].

DNA polymeráza se přirozeně vyskytuje v organismech a účastňuje se procesu dělení v buňce, kde syntetizuje nové kopie DNA. Pro použití v amplifikačních technikách byl enzym nejprve izolován z bakterie *Escherichia coli*. DNA polymeráza *Escherichia coli* byla vysokou teplotou (96 °C), již byla DNA polymeráza denaturována, inaktivována. Po každé denuraci musela být DNA polymeráza doplněna. Proces amplifikace byl tak málo účinný, časově náročný a docházelo k velkým spotřebám DNA polymerázy [61]. Výše zmíněné problémy byly vyřešeny použitím termostabilní *Taq* DNA polymerázy z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při kterých DNA denaturuje. Syntéza DNA tak může probíhat opakovaně v průběhu [77].

2.4.2 Princip PCR

Podstatou PCR je tedy cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků templátové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím termostabilní DNA-polymerázy [77]. Vysokou teplotou se nejprve denaturuje původně dvouřetězcová molekula DNA na vlákna jednořetězcová [80]. Specifita reakce je založená na použití dvou výchozích krátkých nukleotidových sekvencí - primerů, jež jsou hybridizovány do komplementárních sekvencí opačných vláken DNA [49] a musí rozeznat sekvence hraničních úseků fragmentů, jež mají být amplifikovány [33]. Primery se tak párují s vybranými úseky komplementární DNA - jeden primer je komplementární k jednomu vláknu DNA na začátku amplifikovaného fragmentu a druhý primer je komplementární k druhému vláknu DNA na konci amplifikovaného fragmentu. Jelikož primery jsou chemicky syntetizovány, PCR může být aplikována pouze pro amplifikaci DNA se známou začáteční a koncovou nukleotidovou sekvencí. DNA/primer heteroduplex je primárním místem pro nasednutí DNA polymerasy, jež je zodpovědná za syntézu nového řetězce DNA. DNA-polymerasa nasyntetizuje obvykle až několik miliard kopií požadované sekvence [8, 80]. Výsledným produktem PCR jsou amplikony, úseky DNA definované délkou o velikosti deset až tisíc párů bází [78, 77]. Schéma průběhu PCR je uvedeno na Obrázku 8.

Obrázek 8: Průběh PCR [62]



2.4.3 Komponenty PCR

Reakční směs (nejčastěji o objemu 25 – 100 μ l) se skládá z následujících složek:

- **Matrice DNA** (DNA templát) - makromolekula DNA, podle níž se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Má cílová místa pro primery. Množství bakteriální DNA, jež je přidávána do reakce, je obvykle 10 až 1 ng.
- **Oligonukleotidové primery** - jsou připravené chemickou syntézou a komplementární k templátové DNA, která je amplifikována. Primery se vyznačují sekvenční specifitou. Obvykle jsou primery složeny z 18 – 30 nukleotidů a obsahují 40 – 60 % GC bází.

Teplota tání primerů se pohybuje v rozmezí 55 – 65 °C. Primery nemají být navzájem komplementární, především ne na 3´-konci, kde párování dvou nebo tří bází může vést ke vzniku dimerů primerů, např. při nadbytku primerů ve směsi pro PCR. Nutná koncentrace každého primeru pro jednu reakci je 0,1 – 0,5 μM. Aby PCR reakce proběhla správně, jsou zapotřebí správně navržené primery. Sekvence primerů musí souhlasit se sekvencemi ohraničující cílový úsek templátové DNA. Aby mohlo dojít k hybridizaci, každý primer musí být komplementární ke svému templátovému vlákně. Co se týká délky primerů, tak příliš krátke primery mohou hybridizovat i s jinými místy a naopak příliš dlouhé primery jsou při hybridizaci velmi pomalé. Dalším nezbytným krokem je správné stanovení teploty připojení primerů (tzv. hybridizační teplota), jež je důležitá pro přesnost reakce, a měla by být zhruba stejná pro oba primery. Při nízké teplotě dochází k nesprávné hybridizaci a při teplotě příliš vysoké k hybridizaci nedochází vůbec. Ideální teplotu určíme z teploty tání hybridu mezi primerem a templátem [7].

- **DNA-polymerasa** – je zodpovědná za syntézu nového řetězce DNA ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od 3'-konce primeru. V přítomnosti horčíku má rovněž 5' → 3' exonukleázovou aktivitu [12]. Jsou využívány různé termostabilní polymerasy, nejčastěji např. *Taq* DNA-polymerasa izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*.
- **2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP)** – (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – stavební kameny pro syntézu nové DNA. Optimální koncentrace je 200 μM a toleranční rozpětí je 20 – 400 μM. Vyšší koncentrace dNTP (od 4 mM výše) působí inhibičně, neboť vyvazují hořčičnaté ionty (Mg^{2+}).
- **Mg^{2+} ionty** – jsou důležité pro aktivitu DNA-polymerasy. Koncentrace Mg^{2+} musí být optimalizována pro každou dvojici primerů a DNA templátu. Nejčastěji se používá koncentrace 1,5 mM Mg^{2+} . Toleranční rozpětí je 0,5 – 8 mM. Vyšší koncentrace iontů snižuje specifitu PCR. Naopak u primerů bohatých na G a C báze je použití vyšší koncentrace Mg^{2+} vhodnější.
- **Pufr pro PCR** – tvoří optimální prostředí pro DNA-polymerasu. Standardní reakční pufr obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 – 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$. Navíc může ještě obsahovat acetamid, albumin, želatinu nebo Tween 20.
- **Voda pro PCR** – používá se na doplnění směsi pro PCR na žádoucí objem. Nejvhodnější je voda s odporem 18 mΩ nebo voda pro injekce ČSL 4 [78].

2.4.4 Jednotlivé kroky v PCR

PCR probíhá v přístroji nazývaném termocycler, kde se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři odlišné děje s různými nároky na teplotu. Kroky se cyklicky opakují, a tím exponenciálně vzrůstá počet kopií templátové DNA. Optimální počet cyklů je závislý na

výchozí koncentraci templátové DNA a nejčastěji se pohybuje v rozmezí 25 až 35 cyklů. Primerové sekvence a přesné dodržování teploty ve všech fázích cyklu mají zásadní význam při PCR [78, 7].

- DNA se nejprve smíchá v mikrozkuhavce se souborem komponent. Mikrozkuhavka se vloží do termocycleru, kde se směs inkubuje při různých teplotách. Teploty se střídají podle nastavení programu.
- **Denaturace DNA:** teplotní rozmezí je mezi 92 °C až 98 °C (optimum 95 °C). V průběhu denaturace jsou porušeny vodíkové můstky, které k sobě připojují dvě vlákna dvouřetězcové molekuly DNA a vznikají jednořetězcové molekuly templátové DNA [78, 7]. Před prvním cyklem reakce je denaturace prodloužena na 5 minut pro zvýšení pravděpodobnosti, že se dlouhé řetězce templátové DNA úplně oddělí [3].
- **Připojení primerů:** ochlazení na 50 až 60 °C, směs obsahuje nadbytek oligonukleotidů (primerů), které se rychle připojují na specifická místa s komplementárními sekvencemi k odděleným řetězcům DNA. Nízká teplota snižuje specifitu reakce, naopak vysoká teplota brání amplifikaci [78, 7, 3].
- **Syntéza nového řetězce DNA:** teplotní optimum pro *Taq* DNA polymerázu, která je součástí směsi, je 72 °C – 78 °C. Rychlost syntézy DNA je při této teplotě zhruba 2000 nukleotidů za minutu. *Taq* DNA polymeráza se připojí k jednomu konci každého z primerů a syntetizuje nová vlákna DNA komplementární k templátovým molekulám DNA. V posledním cyklu se většinou prodlužuje doba kroku až na trojnásobek (až na 10 minut), aby byla úplně dokončena amplifikace všech produktů [91, 78, 7].
- Zvýšení teploty na 94 °C: molekuly dvouřetězcové DNA obsahují jedno vlákno původní a druhé nové vlákno DNA denaturuje a zahajuje nový cyklus [78, 7].

2.4.5 Citlivost PCR

PCR je velmi citlivou metodou. Je proto důležité se vyhnout kontaminaci jinými molekulami DNA, jež se můžou vyskytovat v laboratorním prostředí (bakterie, viry, cizorodá DNA). Míchání reakční směsi se musí provádět ve speciálním boxu vyzářeném UV zářením a je nezbytné pracovat sterilně. Je žádoucí oddělit laboratoř na sektory, v kterých se provádí izolace DNA, příprava směsí pro PCR a detekce produktů PCR. Pro odhalení možné kontaminace musí být vždy prováděna pozitivní a negativní kontrola [3].

2.4.6 Výhody a nevýhody PCR

2.4.6.1 Výhody PCR

- **Vysoká specifita a citlivost** – spolu s moderními metodami izolace DNA umožňuje PCR vyšetřit jakýkoli materiál, přičemž k analýze většinou postačí jen jedna nebo několik molekul DNA.
- **Rychlost** – amplifikace trvá 3 až 4 hodiny (doba je závislá na délce amplifikovaného úseku a na požadovaném množství amplikonu).
- **Bezpečnost práce** – není potřeba používat radioaktivně značené nukleotidy.
- **Návaznost na ostatní analýzy** – produkty PCR je možné využít k dalším molekulárně biologickým analýzám.
- **Dobrá rozlišovací schopnost** – použitím PCR je možné zpravidla amplifikovat i silně degradovanou DNA (např. ze starších vzorků, atd.)
- **Možnost automatizace** – používají se cyclery, u nichž se zvolí vhodný program (zadání teploty, času, počet jednotlivých cyklů), a posléze se nechá proběhnout reakce bez osobní asistence [32].

2.4.6.2 Nevýhody PCR

- **Délka amplifikovaného úseku** – použitím PCR se nedají amplifikovat dlouhé sekvence DNA
- **Nutnost znalosti sekvencí ohraničující amplifikovaný úsek** – pro vhodné vybrání primerů
- **Nepřesnost replikace** – v průběhu syntézy DNA může dojít k chybnému zařazení nukleotidů a tím k mutaci, jež bude při následných cyklech PCR přenesena i do nově vznikajících amplikonů.
- **Možnost kontaminace cizorodou DNA** – způsobuje komplikace především při analýzách, kdy analyzovaná DNA může být kontaminována jinou DNA z okolního prostředí.
- **Kvantitativní stanovení amplifikovaného produktu** – kvantitativní stanovení umožňuje zavedené některých moderních modifikací jako kvantitativní PCR (Real-time PCR) [32].

2.5 Detekce produktů PCR

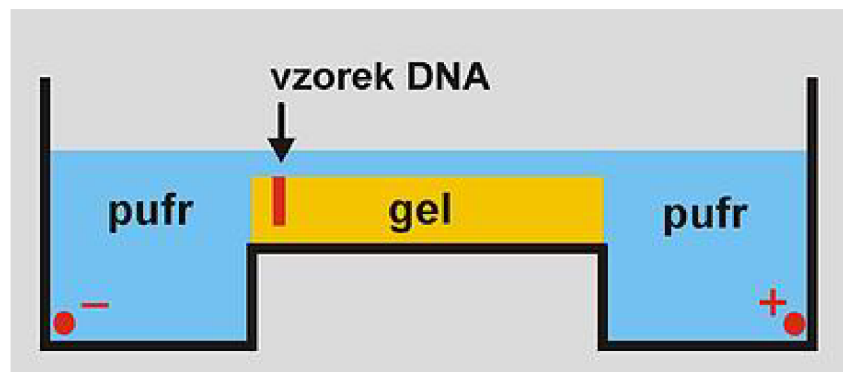
Mezi nejpoužívanější metody průkazu produktů PCR patří elektroforéza v agarózovém gelu [7].

2.5.1 Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy

PCR umožňuje identifikaci jedné kopie DNA ve vzorku tak, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že ji po separaci gelovou elektroforézou na agaróze a obarvením můžeme detegovat [8]. Touto metodou je možné detekovat velmi malé množství DNA – u bakterií v řádu fg [33]. Velikost produktu PCR je srovnávána se standardem DNA (DNA žebříček), jež obsahuje DNA fragmenty se známou velikostí [3].

Gelová elektroforéza je separační technika založená na migraci iontů a jiných nabitých molekul v elektrickém poli (viz Obrázek 9). Rychlost pohybu molekuly je přímo úměrná intenzitě vkládaného elektrického pole a celkovému náboji molekuly [78]. DNA a jiné nukleové kyseliny obsahují fosfátové skupiny a díky jejich negativnímu náboji se DNA pohybuje v jednosměrném elektrickém poli směrem ke kladné elektrodě - anodě [8, 78]. Při dělení na nosiči se kromě elektrostatických sil využívá i síťového efektu, čímž se rozdělí látky se stejným nábojem, ale různou velikostí molekuly [78], přičemž čím je molekula menší, tím rychleji se gelem pohybuje [7]. Delší fragmenty DNA jsou hustým gelem zpomalovány. Po určitém čase se fragmenty v gelu rozdělí podle velikosti [8].

Obrázek 9: Schématické znázornění elektroforetické vany [16]



Pro viditelnost DNA na gelu je nutné ji nějakým způsobem označit. Citlivou metodou detekce je smíchání DNA s interkalačním činidlem (např. ethidium bromid), které po navázání na DNA fluoreskuje v UV světle (260-360 nm) [3, 8]. V současnosti se v mnohých laboratořích používají nemutagenní barviva [7].

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zaprvé izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z komplexních matric sedmi doplňků stravy a zadruhé pomocí PCR identifikovat DNA bakterií rodu *Lactobacillus* a druhu *Lactobacillus acidophilus*

Součástí práce bylo:

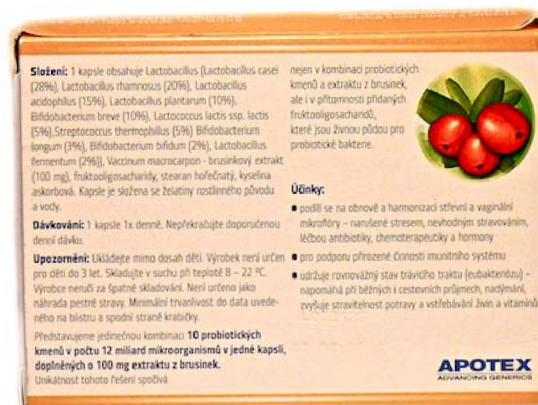
- Izolace celkové DNA z hrubých lyzátů buněk sedmi komplexních matric doplňků stravy pomocí magnetických nosičů.
- Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA.
- Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA pomocí PCR specifickou pro doménu *Bacteria*.
- Identifikace rodu *Lactobacillus* a druhu *Lactobacillus acidophilus* deklarovaných ve výrobcích pomocí rodově a druhově specifických PCR.
- Porovnat výsledky identifikace mikroorganismů s údaji deklarovanými výrobcí.

4 MATERIÁL

4.1 Testované komplexní matrice doplňků stravy a jejich složení

Bylo testováno sedm doplňků stravy s probiotickým účinkem. Jejich charakteristiky, výrobci a deklarované složení je uvedené v Tabulce 6-12. Doplnky stravy jsou ve formě kapslí a byly zakoupeny v komerční síti. Byly vybrány takové výrobky, jež obsahují druh *Lactobacillus acidophilus*.

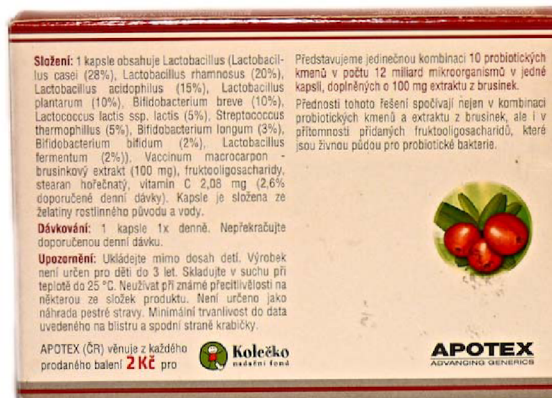
1. APO-Lactobacillus 10+



Tabulka 6: Deklarované složení doplňku stravy – 1. APO-Lactobacillus 10+

| Č. | Název | Výrobce | Složení (probiotické bakterie) | Deklar. množství | Přídavné látky | Datum expirace |
|-------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|---------------------|--|-------------------|
| 1 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | Profarma – Produkt, s.r.o., Jablonec n. Nisou. V licenci Inovo Biologic, Canada. | Lactobacillus casei | 28 % | Vaccinum macrocarpon - brusinkový extrakt (100mg), fruktooligosacharidy, stearan hořečnatý, vitamin C (2,08 mg), želatina rostlinného původu, voda | 28.02.2013 |
| | | | Lactobacillus rhamnosus | 20 % | | |
| | | | Lactobacillus acidophilus | 15 % | | |
| | | | Lactobacillus plantarum | 10 % | | |
| | | | Bifidobacterium breve | 10 % | | |
| | | | Lactococcus lactis ssp. | 5 % | | |
| | | | lactis | | | |
| | | | Streptococcus thermophilus | 5 % | | |
| | | | Bifidobacterium longum | 3 % | | |
| | | | Bifidobacterium bifidum | 2 % | | |
| Lactobacillus fermentum | 2 % | | | | | |

2. APO-Lactobacillus 10+



Tabulka 7: Deklarované složení doplňku stravy – 2. APO-Lactobacillus 10+

| Č. | Název | Výrobce | Složení (probiotické bakterie) | Deklar. množství | Přídavné látky | Datum expirace |
|-------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|---------------------|---|-------------------|
| 2 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | Profarma – Produkt, s.r.o., Jablonec n. Nisou. V licenci Inovo Biologic (Canada) | Lactobacillus casei | 28 % | Vaccinum macrocarpon - brusinkový extrakt (100 mg), fruktooligosacharidy, stearan hořčičný, vitamin C (2,08 mg), želatina rostlinného původu, voda | 11.01.2013 |
| | | | Lactobacillus rhamnosus | 20 % | | |
| | | | Lactobacillus acidophilus | 15 % | | |
| | | | Lactobacillus plantarum | 10 % | | |
| | | | Bifidobacterium breve | 10 % | | |
| | | | Lactococcus lactis ssp. lactis | 5 % | | |
| | | | Streptococcus thermophilus | 5 % | | |
| | | | Bifidobacterium longum | 3 % | | |
| | | | Bifidobacterium bifidum | 2 % | | |
| Lactobacillus fermentum | 2 % | | | | | |

3. Probiotika



Tabulka 8: Deklarované složení doplňku stravy - Probiotika

| Č. | Název | Výrobce | Složení (probiotické bakterie) | Deklar. množství | Přídavné látky | Datum expirace |
|----|-------------------|-------------------|---|---------------------|---|-------------------|
| 3 | <i>Probiotika</i> | Dietplus (USA) | Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus Faecum | 100 mg | Inulin, L-askorbová kyselina, Echinacea purpurea, maltodextrin, kyselina stearová (zvlhčovalo), oxid křemičitý (protispěková látka), želatina | 23.04.2013 |

4. Laktobacily "5"



Tabulka 9: Deklarované složení doplňku stravy – Laktobacily "5"

| Č. | Název | Výrobce | Složení (probiotické bakterie) | Deklar. množství | Přídavné látky | Datum expirace |
|----|-----------------|--|------------------------------------|---------------------|---|-------------------|
| 4 | Laktobacily „5“ | Swiss Herbal Remedies Ltd., Kanada | Lactobacillus rhamnosus HA-111 | 55 % | Maltodextrin, rostlinná kapsle, enterosolventní povlak, protispěková látka (stearát kořečnatý), stabilizátor (pektin), antioxidant (kys. Askorbová) | 10/2012 |
| | | | Bifidobacterium breve HA-129 | 20 % | | |
| | | | Lactobacillus casei HA-108 | 15% | | |
| | | | Lacobacillus acidophilus HA-122 | 5 % | | |
| | | | Bifidobacterium longum HA-135 | 5 % | | |

5. Acidophilus



Tabulka 10: Deklarované složení doplňku stravy - Acidophilus

| Č. | Název | Výrobce | Složení (probiotické bakterie) | Deklar. množství | Přídavné látky | Datum expirace |
|----|--------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------|--|-------------------|
| 5 | <i>Acidophilus</i> | Nature's Bounty (USA) | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 10 mg/tob. | Rýžový prášek, želatina, maltodextrin, látka protispěková (oxid titanický), stearát hořečnatý | 28.02.2013 |

6. *Lactobacillus acidophilus*



Tabulka 11: Deklarované složení doplňku stravy – *Lactobacillus acidophilus*

| Č. | Název | Výrobce | Složení (probiotické bakterie) | Deklar. množství | Přídavné látky | Datum expirace |
|----|----------------------------------|--|--|------------------------|--|-------------------|
| 6 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Institut Rosell Inc., Montreal, Kanada | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 2 miliardy CFU/tob. | Laktóza, stearan hořečnatý, kyselina askorbová | 20.02.2013 |

7. *Lactobacillus acidophilus*



Tabulka 12: Deklarované složení doplňku stravy – *Lactobacillus acidophilus*

| Č. | Název | Výrobce | Složení (probiotické bakterie) | Deklar. množství | Přídavné látky | Datum expirace |
|----|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------|---|-------------------|
| 7 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Mediate s.r.o., ČR Apotheke | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 1×10^9 | Bramborový škrob, inulin, stearan hořečnatý, želatinová kapsle | 08/2012 |

4.2 Použité bakteriální kultury a jejich DNA

Při práci byl používán bakteriální kmen *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T. DNA izolovaná z tohoto kmene sloužila jako pozitivní kontrola pro jednotlivé PCR a pro stanovení citlivosti amplifikací. Pochází z České sbírky mikroorganismů v Brně.

4.3 Chemikálie a roztoky

K přípravě médií a roztoků byly použity tyto chemikálie:

- Agaróza pro DNA elektroforézu [Top-Bio, Praha, ČR]
- Agaróza pro PCR [Top-Bio, Praha, ČR]
- Destilovaná voda [FCH VUT Brno, ČR]
- DNA standard (100 bp) [Malamité, Moravské prusy, ČR]

- Ethanol [Lachema, Brno, ČR]
- Ethidium bromid (5 mg/ml) (EtBr) [Sigma, St. Louis, USA]
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) [Serva, Heidelberg, SRN]
- Fenol [Lachema, Brno, ČR]
- Hydroxid sodný [Lachema, Brno, ČR]
- Chloroform [Lachema, Brno, ČR]
- Izoamylalkohol [Lachema, Brno, ČR]
- Kyselina boritá [Lachema, Brno, ČR]
- Kyselina chlorovodíková [Lachema, Brno, ČR]
- Lysozym [Serva, Heidelberg, SRN]
- Octan sodný [Lachema, Brno, ČR]
- PCR voda – voda pro injekce ČSL 4 [Biotika, Slovenská Lupča, SR]
- Proteináza K [Sigma, St. Louis, USA]
- RNáza A [Reanal, Budapešť, Maďarsko]
- SDS – Dodecylsulfát sodný [Sigma, St. Louis, USA]
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) [Amresco, Solon, USA]
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl) [Amresco, Solon, USA]
- Vkládací pufr pro PCR Yellow load [Top-Bio, Praha, ČR]
- Vkládací pufr pro PCR Red load [Top-Bio, Praha, ČR]

4.3.1 Roztoky pro lýzi buněk, izolaci DNA a její purifikaci

Následující postupy jsou převzaty z návodů skript k laboratorním cvičením (Španová, Rittich, 2010).

- **EDTA** (0,5 M, pH 8) – do destilované vody (800 ml) se kvantitativně přidalo EDTA (202,2 g) při stálém míchání magnetickou míchačkou. pH bylo upraveno na hodnotu 8,0 přidáním NaOH. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1000 ml a následně sterilizovaný v autoklávu (121 °C, 15 min).

- **Tris-HCl** (1 M, pH 7,8) – v destilované vodě (80 ml) byla rozpuštěna Tri-base (12,1 g). pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl. Následně byl roztok doplněn destilovanou vodou na 100 ml a nechal se sterilizovat v autoklávu (121 °C, 15 min).
- **Lyzační roztok A** – 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0)
- **Lyzační roztok B** – 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysozym (3 mg/ml)
- **CIZ** – směs chloroformu a izoamylalkoholu (24:1)
- **TE pufr** – 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA (pH 8,0)
- **SDS** (20 %) – ve sterilní destilované vodě (80 ml) bylo rozpuštěno SDS (20 g). V případě pomalého rozpuštění byl roztok zahřán na 68 °C. pH bylo upraveno na hodnotu 7 koncentrovanou HCl. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a nebyl sterilizován.
- **Proteináza K** – (1 mg/ml, 100 µg/ml) na analytických váhách bylo naváženo příslušné množství (10 mg, 1 mg) a doplněno destilovanou vodou na objem 10 ml. Teplota uchování proteinázy K je -20 °C.
- **Fenol** (pH 7,8) - destilovaný fenol nasycený v TE pufru.
- **Octan sodný** (3 M, pH 5,2), v destilované vodě (800 ml) byl rozpuštěn trihydrát octanu sodného (408,1 g). pH bylo upraveno na hodnotu 5,2 pomocí ledové kyseliny octové. Následně bylo doplněno destilovanou vodou na objem 1000 ml a sterilizováno autoklávováním (121 °C, 15 min).
- **Ethanol** – 96%

4.3.2 PCR komponenty

- **PCR voda** – voda pro injekce ČSL 4 [Biotika, Slovenská Lupča, SR]
- **PCR kompletní pufr** – reakční pufr 10x PCR Blue Buffer (s obsahem MgCl₂) pro Taq DNA polymerázu 1.1 [Top-Bio, Praha, ČR]
- **PCR pufr bez MgCl₂** – reakční pufr 10 PCR Blue Buffer (bez MgCl₂) pro Taq DNA polymerázu 1.1 [Top-Bio, Praha, ČR]
- **MgCl₂** (25mM) [Top-Bio, Praha, ČR]
- **dNTP směs** (10 mM) [Top-Bio, Praha, ČR]

- **primery** (10 pmol/μl) [Oligo-Biotech, Hradec Králové, ČR]; seznam všech použitých primerů je uveden v Tabulce 13.
- **Taq DNA polymeráza 1.1** (1U/μl) [Top-Bio, Praha, ČR]

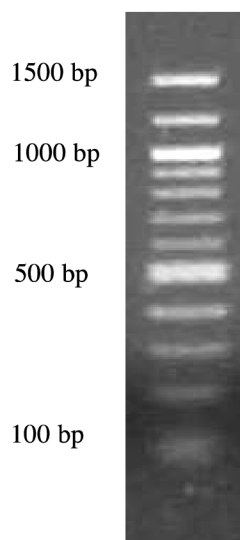
Tabulka 13: Seznam použitých primerů

| Specifita primerů | Název primerů | Teplota hybridizace (°C) | Velikost produktu PCR (bp) | Reference |
|--|-----------------------|--------------------------|----------------------------|-----------|
| Doména <i>Bacteria</i> | R_eub, F_eub | 55 | 466 | [22] |
| Rod <i>Lactobacillus</i> | LbLMA1-rev, R-16-1 | 55 | 250 | [15] |
| Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Aci16SI, 16SII | 58 | 800 | [90] |

4.3.3 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- **5 x TBE pufr** – rozpustit Tri-base (54 g) a kyselinu boritou (27,5 g) v destilované vodě (600 ml); přidat 0,5 M EDTA (pH 8) (20 ml) a pH upravit na 8 pomocí NaOH (1 N); doplnit do 1000 ml pomocí destilované vody. Takto připravený zásobní roztok se před použitím 10 x ředí pomocí destilované vody na konečnou koncentraci 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá a 1 mM EDTA
- **Agarózový gel** (1,8 %) – rozvařit agarózu (1,8 g) v 0,5 x koncentrovaném TBE pufru (100 ml)
- **vkládací PCR pufr Yellow load** [Top-Bio, Praha, ČR]
- **DNA standard používaný při agarózové gelové elektroforéze** - 100 bp žebříček (ladder) [Malamité, Moravské Prusy, ČR] obsahující fragmenty DNA o velikosti: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp. (viz Obrázek 10)

Obrázek 10: Fragmenty DNA ve standardu (100 bp žebříček) po rozdělení na agarózové gelové elektroforéze (1,5% gel, 0,5x TBE pufr)



- **Ethidium bromid** (0,5 µg/ml) – roztok ethidium bromidu (2,5 mg/ml) (100 µl) rozředit ve sterilní destilované vodě (500 ml)

4.4 Magnetické nosiče pro izolaci bakteriální DNA

V průběhu práce byly využívány magnetické částice (P(HEMA-co-GMA)) – poly-(2-hydroxyethylmetakrylát-co-glycidyl metakrylát) (1:1) (Fkol 135ox) s navázanými karboxylovými skupinami. Magnetické nosiče byly připraveny na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze [Ing. D. Horák, Csc., ÚMCHAV ČR, Praha]. Charakteristiky magnetického nosiče jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tabulka 14: Charakteristiky magnetického nosiče

| P(HEMA-co-GMA)-COOH | |
|----------------------------|--------|
| <i>Průměr částice</i> | 2,2 µm |
| <i>Obsah -COOH</i> | 2,6 % |
| <i>Obsah Fe</i> | 6,5 % |

4.5 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy
- Centrifuga [Eppendorf AG, Hamburg, Německo]
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ [Eppendorf, Hamburg, Německo]

- Digitální fotoaparát
- Exikátor typ N 86 KN.18 [KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN]
- Laboratorní váhy B0430 [Ohaus, USA]
- Magnetický separátor Invitrogen Dynal AS [Dynal Biotech, Oslo, Norsko]
- Mikropipety Discovery HTL (objem 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) [PZ HTL, Varšava, Polsko]
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 [Sencor, ČR]
- Minicentrifuga C1301 [Labnet international, Inc., USA]
- Minicycler PTC-100TM [MJ Research, Watertown, USA]
- NanoPhotometerTM [Implen, Německo]
- Očkovací box [Fatran, ČR]
- Termocycler PTC-200 [BIO-RAD Lab., USA]
- Termostat FTC 901 [VELP SCIENTIFICA, Miláno, Itálie]
- Termostat – Mini incubator [Labnet, USA]
- Transilluminátor TVR 3121 [Spectroline, Paramount, USA]
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 [Owl Scientific, USA]
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm [Hoefler, USA]
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting volt Power Supply, model OSP-300 [Owl Scientific, USA]
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a další laboratorní pomůcky.

5 METODY

Jednotlivé postupy byly provedeny podle návodů k laboratorním cvičením Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie (Španová, Rittich, 2010), není-li uvedeno jinak.

5.1 Izolace bakteriální DNA pomocí fenolové extrakce

5.1.1 Lyze buněk a příprava hrubého lyzátu

1. Sediment buněk byl resuspendován v 1 ml roztoku A – a to tak, že bylo nejdříve přidáno 100 μ l roztoku, pečlivě bylo promícháno a poté bylo přidáno zbylých 900 μ l. Suspenze byla opět promíchána.
2. Suspenze se nechala centrifugovat při 15 000 otáčkách/3 minuty, opatrně byl slit supernatant a sediment se nechal dobře okapat. K sedimentu bylo následně přidáno 500 μ l roztoku B a nechal se dokonale resuspendovat.
3. Vzorek se nechal inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny a občas byl promíchán.
4. K suspenzi bylo přidáno 25 μ l 10% SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ g/ml) a vše bylo pořádně promícháno.
5. Vzorek se nechal inkubovat při 55 °C do druhého dne a občas byl promíchán.
6. Takto byl připraven hrubý lyzát buněk

5.1.2 Fenolová extrakce

1. K hrubému lyzátu buněk (500 μ l) byl přidán stejný objem predestilovaného fenolu (pH 7,8) a směs byla kývavým pohybem míchána 4 minuty.
2. Proběhla centrifugace při 15 000 otáčkách/3 minuty.
3. Velmi opatrně byla odebrána horní vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky.
4. K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 μ l CIZ a 4 minuty byla směs kývavým pohybem promíchávána.
5. Proběhla centrifugace při 15 000 otáčkách/3 minuty.
6. Vodní fáze s DNA byla opět odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky.

5.1.3 Přesrážení DNA ethanolem

1. Ke vzorku DNA byla přidána 1/20 objemu 3M octanu sodného a obsah byl promíchán.
2. Bylo přidáno 800 μ l 96% ethanolu a obsah byl znovu dobře promíchán.
3. DNA se nechala vysrážet po dobu 1 hodiny při teplotě -20 °C.
4. Proběhla centrifugace při 15 000 otáčkách/15 minut.
5. Supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal pořádně okapat.

- Sediment s DNA se nechal usušit v exsikátoru po dobu asi 15 minut.
- DNA byla rozpuštěna přes noc ve 100 μ l TE pufru.
- Takto izolovaná a purifikovaná DNA byla následně použita při spektrofotometrickém měření a jako matrice pro PCR.

5.2 Izolace DNA z doplňků stravy

5.2.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z jednotlivých výrobků

- Kapsle byly sterilně odebrány, ořeny ethanolem a otevřeny.
- Jejich obsah se vysypal a pečlivě se zvážil.
- K 1 g prášku (cca 3 kapsle) bylo přidáno 5 ml lyzačního roztoku B s lysozymem (10 mg/ml).
- Vzorky byly důkladně rozsuspendovány a inkubovány při laboratorní teplotě do druhého dne.
- Po inkubaci bylo přidáno 25 μ l 20% SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ g/ml).
- Pečlivě bylo vše promícháno a necháno inkubovat přes noc při 55 °C.
- Vzniklé hrubé lyzáty byly uchovávány při -20 °C, aby se předešlo případné degradaci DNA.

5.2.2 Izolace DNA z hrubých lyzátů pomocí magnetického nosiče

DNA jednotlivých hrubých lyzátů buněk připravených dle kapitoly 5.2.1 byly izolovány pomocí magnetických nosičů (P(HEMA-co-GMA)).

5.2.2.1 Příprava separační směsi pro izolaci DNA magnetickými nosiči

Separací směsi byly připraveny v Eppendorfových zkumavkách. Pořadí a objemové množství všech komponent je uvedeno v Tabulce 15.

Tabulka 15: Pořadí a objemové množství všech komponent separační směsi

| Pořadí | Komponenta | Objem komponent (μ l) |
|--------|-----------------------------|----------------------------|
| 1 | NaCl (5M) | 400 |
| 2 | DNA matrice | 300 |
| 3 | PEG (40%) | 200 |
| 4 | Magnetické nosiče (2 mg/ml) | 100 |
| | Celkový objem | 1000 |

- Jednotlivé komponenty byly naneseny do sterilních Eppendorfových zkumavek v daném pořadí, promíchány a ponechány inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.
- Nosiče s navázanou DNA byly separovány za použití magnetu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.

3. Supernatant byl opatrně odpipetován a nosiče byly celkem dvakrát promyty 1000 μ l 70% ethanolu.
4. Nosiče s navázanou DNA byly separovány magnetem 2 minuty při laboratorní teplotě.
5. Ethanol byl opatrně odpipetován a zkumavky s nosiči byly sušeny v termostatu při teplotě 55 °C do úplného odpaření ethanolu.
6. DNA adsorbovaná na magnetických nosičích byla rozsuspendedovaná v 100 μ l TE pufru a nechána eluovat přes noc při laboratorní teplotě.
7. Následující den byly nosiče odseparovány magnetem 2 minuty při laboratorní teplotě a eluované DNA byly přepipetovány do čistých Eppendorfových zkumavek.
8. Byla připravená DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA byla měřena spektrofotometricky přístrojem NanoPhotometrTM pomocí speciálních kyvet Laber Gard. Před samotným měřením byly vzorky DNA vytemperovány na laboratorní teplotu a pečlivě promíchány. Jako referenční vzorek byl používán TE pufr. Po kalibraci přístroje byly proměřeny vzorky izolovaných DNA. Byla měřena absorbance v rozmezí vlnových délek 220 – 320 nm. Z displeje přístroje byly odečteny hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230 nm, 260 nm, 280 nm a 320 nm a jejich poměry $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ a $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$. Koncentrace DNA byla stanovena dle hodnoty absorbance při vlnové délce 260 nm (vlnová délka, při které dochází k maximální absorpci záření DNA). V závislosti na očekávané koncentraci DNA bylo zvoleno víčko s odpovídajícími parametry (viz Tabulka 16).

Tabulka 16: Parametry a volba víčka "lid" pro NanoPhotometr

| Typ víčka | Optická dráha [mm] | Virtuální zředění | Objem vzorku [μ l] | Měřitelný rozsah DNA [ng/ μ l] |
|---------------|--------------------|-------------------|-------------------------|------------------------------------|
| <i>Lid 10</i> | 1 | 1:10 | 3 – 5 | 15 – 700 |

Do spektrofotometru byla ve směru procházejícího světla vložena kyveta Laber GuardTM. Z předvolených metod bylo pro analýzu nukleových kyselin vybráno takto:

- Label Guard Applications
- Nucleic Acid
- ds DNA

Byly napipetovány 3 μ l TE pufru jako blanku. Posléze byly ve stejném objemu (3 μ l) napipetovány všechny DNA vzorky a proměřeny. Koncentrace DNA a hodnoty absorbancí byly odečteny z displeje NanoPhotometru a zaznamenány. Víčko bylo vždy po každém měření pečlivě otřeno ethanolem.

5.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Byla připravena PCR směs pro jednotlivé polymerázové reakce. Komponenty byly v daném pořadí a dle určených množství řádně promíchány a zcentrifugovány. Pro polymerázovou řetězovou reakci byla použita DNA izolovaná z doplňků stravy s využitím magnetického

nosiče a DNA izolovaná z čisté bakteriální kultury metodou fenolové extrakce následně použita pro pozitivní kontroly a ke stanovení citlivosti amplifikace.

5.4.1 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

Pro PCR specifickou pro doménu *Bacteria* byly použity DNA izolované z doplňků stravy o koncentraci 15 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 17. Složení PCR směsi je uvedeno v Tabulce 18.

Tabulka 17: Primery specifické pro doménu Bacteria

| Primer | Sekvence primeru | Velikost produktu PCR (bp) | Reference |
|--------------|------------------------------------|----------------------------|-----------|
| <i>F-eub</i> | TCC TAC GGG AGG CAG CAG T | 466 | [22] |
| <i>R-eub</i> | GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT | | |

Tabulka 18: Složení PCR směsi u PCR specifické pro doménu Bacteria

| Komponenta | Objem (μl) |
|------------------------------------|-------------|
| Voda pro PCR | 16,5 |
| 10x reakční pufr kompletní | 2,5 |
| dNTP směs (10 mM) | 1,0 |
| Primer F-eub (10 pmol/μl) | 1,0 |
| Primer R-eub (10 pmol/μl) | 1,0 |
| <i>Taq</i> DNA polymeráza (1 U/μl) | 2,0 |
| DNA matrice | 1,0 |
| Celkem | 25,0 |

5.4.2 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

Pro rodově specifické PCR byly použity DNA izolované z doplňků stravy o koncentraci 15 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 19. Složení PCR směsi je uvedeno v Tabulce 20.

Tabulka 19: Primery specifické pro rod Lactobacillus

| Primer | Sekvence primeru | Velikost produktu PCR (bp) | Reference |
|--------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------|
| <i>LbLMA 1-rev</i> | CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC | 250 | [15] |
| <i>R16-1</i> | CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA | | |

Tabulka 20: Složení PCR směsi u PCR pro rod Lactobacillus

| Komponenta | Objem (μl) |
|---------------------------------|-------------------|
| Voda pro PCR | 19,0 |
| 10x reakční pufr kompletní | 2,5 |
| dNTP směs (10 mM) | 0,5 |
| Primer LbLMA 1-rev (10 pmol/μl) | 0,5 |
| Primer R16-1 (10 pmol/μl) | 0,5 |
| Taq DNA polymeráza (1 U/μl) | 1,0 |
| DNA matrice | 1,0 |
| Celkem | 25,0 |

5.4.3 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Pro druhově specifické PCR byly použity DNA izolované z doplňků stravy o koncentraci 15 ng/μl. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 21. Složení PCR směsi je uvedeno v Tabulce 22.

Tabulka 21: Primery specifické pro druh Lactobacillus acidophilus

| Primer | Sekvence primeru | Velikost produktu PCR (bp) | Reference |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------|
| <i>Aci 16SI</i> | AGC TGA ACC AAC AGA TTC AC | 800 | [90] |
| <i>16SII</i> | ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC | | |

Tabulka 22: Složení PCR směsi

| Komponenta | Objem (μl) |
|------------------------------|-------------------|
| Voda pro PCR | 19,0 |
| 10x reakční pufr kompletní | 2,5 |
| dNTP směs (10 mM) | 0,5 |
| Primer Aci 16SI (10 pmol/μl) | 0,5 |
| Primer 16 SII (10 pmol/μl) | 0,5 |
| Taq DNA polymeráza (1 U/μl) | 1,0 |
| DNA matrice | 1,0 |
| Celkem | 25,0 |

5.4.4 Příprava PCR směsi pomocí mastermixů

1. Mastermix byl namíchan z jednotlivých komponent pro PCR, jejíž množství byla vynásobena počtem vzorků DNA
2. Následně byl mastermix důkladně promíchán, stočen a rozpipetován do sterilních Eppendorfových zkumavek (200 μl).
3. Každá Eppendorfova zkumavka byla doplněna příslušným množstvím DNA do celkového objemu 25 μl.
4. Obsah zkumavek byl důsledně promíchán, stočen a zkumavky byly umístěny do cycleru, kde následně proběhla PCR dle daného programu.
5. Jako kontrola byla použita PCR směs, kde byla DNA nahrazena PCR vodou.

5.4.5 Programy použité v PCR

V Tabulce 23 jsou uvedeny použité programy pro PCR specifickou pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*. Všechny programy sestávají z následujících kroků:

1. Denaturace DNA před zahájením prvního cyklu
2. Denaturace DNA
3. Připojení (hybridizace) primerů
4. Syntéza nového DNA řetězce
5. Příslušný počet cyklů
6. Dosyntetizování nového DNA řetězce v posledním cyklu
7. Zchlazení

Tabulka 23: Programy použité pro PCR

| Krok | Program | | |
|-----------|------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| | <i>Doména Bacteria</i> | <i>Rod Lactobacillus</i> | <i>Druh Lactobacillus acidophilus</i> |
| | DOMBAC | LBCROD | LBCRHAM |
| 1. | 94 °C/5 min | 94 °C/5 min | 94 °C/5 min |
| 2. | 94 °C/30 s | 94 °C/30 s | 94 °C/30 s |
| 3. | 56 °C/30 s | 56 °C/30 s | 58 °C/30 s |
| 4. | 72 °C/1 min | 72 °C/1 min | 72 °C/1 min |
| 5. | 29x ke kroku 2 | 29x ke kroku 2 | 29 x ke kroku 2 |
| 6. | 72 °C/5 min | 72 °C/5 min | 72 °C/5 min |
| 7. | 10 °C | 10 °C | 10 °C |

5.5 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza byla použita pro ověření přítomnosti DNA a pro detekci produktů PCR. Pro detekci přítomnosti bakteriální DNA byl připraven gel o hustotě 0,8 %. Pro detekci produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* a pro druh *Lactobacillus acidophilus* byl připraven gel o hustotě 1,5 % a pro detekci produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* byl připraven gel o hustotě 1,8 %.

5.5.1 Příprava gelu pro agarózovou gelovou elektroforézu

1. Dané množství agarózy bylo smícháno s TBE pufrem (100 ml, 0,5x koncentrovaný).
0,8% gel – 0,8 g agarózy/100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru
1,5% gel – 1,5 g agarózy/100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru
1,8% gel – 1,8 g agarózy/100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru
2. Směs se za občasného míchání několikrát přivedla k varu v mikrovlnné troubě za vzniku homogenní směsi.
3. Roztok byl po ochlazení přelit do elektroforetické vaničky s hřebínkem, jež byla umístěna ve vodorovné poloze.

4. Gel se nechal minimálně po dobu 30 minut zatuhnout při laboratorní teplotě.
5. Před samotným nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut a PCR směs byla nanášena komůrek.

5.5.2 Nanášení produktů PCR na gel

1. Produkty PCR (25 μ l) byly smíchány s nanášecím pufrem (5 μ l).
2. Směsi byly naneseny do jednotlivých komůrek gelu.
3. Na gel byl také nanesen DNA standard - 100 bp žebříček (100 – 1500 bp) (3 μ l).
4. Gel byl opatrně vložen do elektroforetické vany a převrstven 0,5x koncentrovaným TBE pufrem (zhruba do výšky 3 – 5 mm nad gel).

5.5.3 Průběh elektroforézy a barvení

1. Elektroforetická vana byla připojena ke stejnosměrnému proudu tak, aby záporně nabitá DNA migrovala ke kladně nabitému pólu.
2. Elektroforéza byla spuštěna zapnutím zdroje s napětím 80 V po dobu zhruba 1,5 až 2 hodiny, dokud nanášecí pufr nedomigroval zhruba do 2/3 délky agarózového gelu.
3. Po skončení elektroforézy byl gel obarven v lázni s ethidium bromidem po dobu minimálně ½ hodiny.
4. Obarvený gel byl opláchnut v destilované vodě a prohlížen v UV světle o vlnové délce 305 nm pod transluminátorem.
5. Obarvený gel byl dokumentován pomocí digitálního fotoaparátu.

6 VÝSLEDKY

6.1 Příprava hrubého lyzátu buněk a izolace DNA z čisté bakteriální kultury pro pozitivní kontroly a zjištění citlivosti amplifikace

Hrubý lyzát buněk z čisté bakteriální kultury kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T byl připraven dle kapitoly 5.1.1. Vzorek hrubého lyzátu buněk byl uchováván při -20 °C, aby se předešlo možné degradaci DNA. Izolace DNA byla provedena metodou fenolové extrakce (viz kapitola 5.1.2). Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky (478 ng/μl) (viz Tabulka 24). DNA byla před použitím v PCR naředěna.

Tabulka 24: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T

| DNA | c (ng/μl) | A _{230nm} | A _{260nm} | A _{280nm} | A _{320nm} | A _{260/280nm} | A _{260/230nm} | Objem vzorku (μl) | DNA (μg) |
|--|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------|
| <i>L. acidophilus</i> CCM 4833 ^T | 478 | 0,999 | 1,910 | 1,039 | 0,019 | 1,838 | 1,912 | 100 | 47,8 |

∴ Množství izolované DNA bylo dostatečné pro PCR.

6.2 Zpracování vzorků doplňků stravy

K izolaci DNA byly použity následující volně dostupné doplňky stravy ve formě kapslí:

- 1. APO – *Lactobacillus* 10+
- 2. APO – *Lactobacillus* 10+
- Probiotika
- Laktobacily “5”
- *Acidophilus*
- 1. *Lactobacillus acidophilus*
- 2. *Lactobacillus acidophilus*

Charakteristické znaky uvedených doplňků stravy různých výrobců jsou uvedeny v kapitole 4.1.

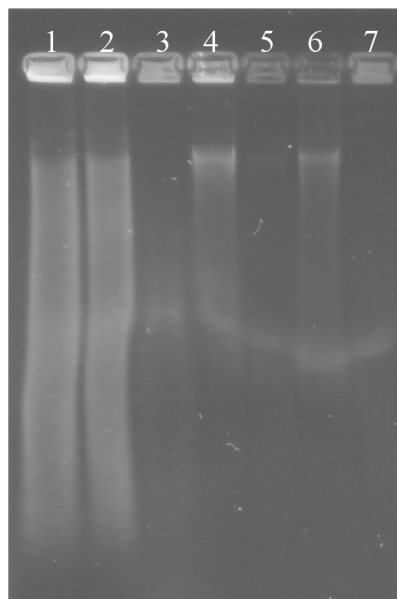
Kapsle byly sterilně odebrány, promyty v ethanolu a zváženy. Bylo naváženo vždy po 1 g prášku doplňku stravy (cca 3-4 kapsle).

∴ Komplexní vzorky doplňků stravy byly použity k přípravě hrubých lyzátů buněk.

6.3 Příprava hrubých lyzátů buněk z doplňků stravy

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 1 g komplexních matric doplňků stravy na 5 ml lyzačního roztoku dle postupu uvedeného v kapitole 5.2.1. V šesti opakováních bylo připraveno celkem šest hrubých lyzátů buněk z každého doplňku stravy. Hrubé lyzáty buněk sedmi výrobků byly podrobeny agaróзовé gelové elektroforéze, která je uvedena na Obrázku 11.

Obrázek 11: Detekce přítomnosti DNA v hrubých lyzátech buněk z 1 g doplňků stravy pomocí agaróзовé gelové elektroforéze. Na 0,8% gel bylo nanášeno 10 μ l hrubých lyzátů buněk a 2 μ l nanášecího pufu.



| <i>Běh</i> | <i>Hrubý lyzát buněk doplňku stravy</i> | <i>Přítomnost DNA</i> |
|------------|---|-----------------------|
| <i>1</i> | 1.APO-Lactobacillus 10+ | +++ |
| <i>2</i> | 2.APO-Lactobacillus 10+ | +++ |
| <i>3</i> | Probiotika | + |
| <i>4</i> | Laktobacily “5” | ++ |
| <i>5</i> | Acidophilus | + |
| <i>6</i> | 1.Lactobacillus acidophilus | ++ |
| <i>7</i> | 2.Lactobacillus acidophilus | + |

Vysvětlivky: (+), (++) , (+++) – intenzita DNA detekce

\therefore V hrubých lyzátech buněk doplňků stravy byla detekovaná přítomnost DNA v různých množstvích.

6.4 Izolace DNA z doplňků stravy pomocí magnetického nosiče

Z připravených hrubých lyzátů buněk výrobků byla DNA izolovaná pomocí magnetického nosiče (P(HEMA-co-GMA)). Na izolaci DNA bylo použito 300 μl hrubých lyzátů buněk. Ze stejného hrubého lyzátu buněk byla DNA izolována dvakrát pro kontrolu. Přítomnost izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky a po naředění použita k amplifikaci v PCR.

\therefore DNA byla eluovaná ve 100 μl TE pufu.

6.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z doplňků stravy

Bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA u šesti nezávislých izolací DNA z hrubých lyzátů buněk připravených z 1 g doplňků stravy. U každé DNA bylo měření provedeno dvakrát. Z naměřených hodnot koncentrací obou měření byl vypočítán průměr. Absorbance DNA byla změřena na NanoPhotometru za použití lid (Factor 10) a množství DNA 3 μl . Naměřené hodnoty jsou uvedeny v následujících Tabulkách 25-30.

Tabulka 25: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA (IZOLACE DNA Č. 1)

| Č | Výrobek | c (ng/ μl) | Průměr c (ng/ μl) | A _{230nm} | A _{260nm} | A _{280nm} | A _{320nm} | A _{260/280nm} | A _{260/230nm} | Objem vzorku (μl) | DNA (μg) |
|---|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 1.APO- Lactobacillus 10+ | 13,5 | 15 | 0,010 | 0,033 | 0,019 | 0,066 | 1,736 | 3,300 | 100 | 1,35 |
| | | 16,5 | | 0,052 | 0,170 | 0,142 | 0,065 | 1,797 | 3,269 | 100 | 1,65 |
| 2 | 2.APO- Lactobacillus 10+ | 20 | 21,25 | 0,048 | 0,069 | 0,053 | 0,011 | 1,302 | 1,438 | 100 | 2 |
| | | 22,5 | | 0,040 | 0,090 | 0,072 | 0,030 | 1,250 | 2,250 | 100 | 2,25 |
| 3 | Probiotika | 13,9 | 15,2 | 0,017 | 0,039 | 0,021 | 0,007 | 1,857 | 2,294 | 100 | 1,39 |
| | | 16,5 | | 0,330 | 0,066 | 0,059 | 0,026 | 1,919 | 2,000 | 100 | 1,65 |
| 4 | Lactobacily "5" | 14,6 | 15,45 | 0,005 | 0,014 | 0,008 | 0,029 | 1,750 | 2,800 | 100 | 1,46 |
| | | 16,3 | | 0,003 | 0,065 | 0,054 | 0,023 | 1,704 | 21,700 | 100 | 1,63 |
| 5 | Acidophilus | 39,1 | 44,2 | 0,131 | 0,166 | 0,121 | 0,069 | 1,372 | 1,267 | 100 | 3,91 |
| | | 49,3 | | 0,148 | 0,197 | 0,158 | 0,078 | 1,247 | 1,331 | 100 | 4,93 |
| 6 | 1.Lactobacillus acidophilus | 9,9 | 11,35 | 0,009 | 0,043 | 0,028 | 0,010 | 1,536 | 4,778 | 100 | 0,99 |
| | | 12,8 | | 0,018 | 0,051 | 0,043 | 0,014 | 1,686 | 2,833 | 100 | 1,28 |
| 7 | 2.Lactobacillus acidophilus | 15,7 | 16,1 | -0,083 | 0,072 | 0,039 | 0,033 | 1,846 | - | 100 | 1,57 |
| | | 16,5 | | -0,021 | 0,066 | 0,052 | 0,020 | 1,869 | - | 100 | 1,65 |

\therefore DNA byla izolována v koncentraci 9,9 ng/ μl až 49,3 ng/ μl (v množství 0,99 μg až 4,93 μg).

Tabulka 26: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA (IZOLACE DNA Č. 2)

| Č | Výrobek | c (ng/μl) | Průměr c (ng/μl) | A _{230nm} | A _{260nm} | A _{280nm} | A _{320nm} | A _{260/280} | A _{260/230} | Objem vzorku (μl) | DNA (μg) |
|---|---|-----------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------|
| 1 | 1.APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 13,5 | 15,25 | -0,009 | 0,027 | 0,012 | -0,002 | 2,250 | - | 100 | 1,35 |
| | | 17 | | 0,001 | 0,018 | 0,006 | -0,003 | 2,400 | 18,000 | 100 | 1,7 |
| 2 | 2.APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 15 | 19,5 | -0,012 | 0,018 | 0,007 | -0,003 | 2,171 | - | 100 | 1,5 |
| | | 24 | | 0,041 | 0,048 | 0,026 | 0,007 | 1,946 | 1,171 | 100 | 2,4 |
| 3 | Probiotika | 11,5 | 14,75 | -0,002 | 0,023 | 0,019 | 0,007 | 1,611 | - | 100 | 1,15 |
| | | 18 | | 0,012 | 0,036 | 0,023 | 0,007 | 1,565 | 3,000 | 100 | 1,8 |
| 4 | <i>Lactobacily</i> "5" | 10 | 14,5 | -0,006 | 0,016 | 0,006 | -0,002 | 1,667 | - | 100 | 1 |
| | | 19 | | 0,059 | 0,050 | 0,029 | 0,008 | 1,724 | 0,847 | 100 | 1,9 |
| 5 | <i>Acidophilus</i> | 31,5 | 33,75 | 0,015 | 0,026 | 0,015 | 0,004 | 1,933 | 1,733 | 100 | 3,15 |
| | | 36 | | 0,028 | 0,016 | 0,008 | 0,002 | 2,000 | 0,571 | 100 | 3,6 |
| 6 | 1. <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> | 27,5 | 28,25 | 0,011 | 0,018 | 0,011 | 0,000 | 1,636 | 1,636 | 100 | 2,75 |
| | | 29 | | -0,021 | 0,018 | 0,014 | -0,001 | 1,686 | - | 100 | 2,9 |
| 7 | 2. <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> | 34 | 35 | 0,024 | 0,068 | 0,018 | 0,017 | 1,417 | 2,833 | 100 | 3,4 |
| | | 36 | | 0,035 | 0,072 | 0,050 | 0,019 | 1,440 | 2,057 | 100 | 3,6 |

∴ DNA byla izolována v koncentraci 10 ng/μl až 36 ng/μl (v množství 1,0 μg až 3,6 μg).

Tabulka 27: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA (IZOLACE DNA Č. 3)

| Č | Výrobek | c (ng/μl) | Průměr c (ng/μl) | A _{230nm} | A _{260nm} | A _{280nm} | A _{320nm} | A _{260/280nm} | A _{260/230nm} | Objem vzorku (μl) | DNA (μg) |
|---|---|-----------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------|----------|
| 1 | 1.APO- Lactobacillus 10+ | 24 | 25,65 | 0,012 | 0,033 | 0,014 | 0,004 | 2,900 | 3,625 | 100 | 2,4 |
| | | 27,3 | | 0,013 | 0,033 | 0,011 | 0,000 | 3,000 | 2,538 | 100 | 2,73 |
| 2 | 2.APO- Lactobacillus 10+ | 18 | 15,25 | 0,018 | 0,034 | 0,014 | 0,002 | 2,667 | 2,000 | 100 | 1,8 |
| | | 12,5 | | 0,002 | 0,021 | 0,007 | 0,000 | 2,700 | 10,5 | 100 | 1,25 |
| 3 | Probiotika | 24,1 | 26,05 | -0,013 | 0,034 | 0,017 | 0,002 | 2,133 | - | 100 | 2,41 |
| | | 28 | | 0,071 | 0,072 | 0,047 | 0,020 | 1,926 | 1,020 | 100 | 2,8 |
| 4 | Lactobacily "5" | 13,5 | 14,5 | 0,041 | 0,030 | 0,016 | 0,005 | 2,273 | 0,694 | 100 | 1,35 |
| | | 15,5 | | 0,048 | 0,037 | 0,023 | 0,008 | 1,933 | 0,725 | 100 | 1,55 |
| 5 | Acidophilus | 29 | 30,15 | 0,008 | 0,030 | 0,017 | 0,008 | 2,444 | 3,750 | 100 | 2,9 |
| | | 31,3 | | 0,025 | 0,020 | 0,011 | 0,005 | 2,500 | 0,800 | 100 | 3,13 |
| 6 | 1.Lactobacillus acidophilus | 9 | 10,75 | 0,021 | 0,026 | 0,018 | 0,005 | 1,615 | 1,167 | 100 | 0,9 |
| | | 12,5 | | 0,006 | 0,013 | 0,004 | 0,000 | 1,750 | 2,167 | 100 | 1,25 |
| 7 | 2.Lactobacillus acidophilus | 12,5 | 14,5 | 0,008 | 0,042 | 0,029 | 0,013 | 1,813 | -5,800 | 100 | 1,25 |
| | | 16,5 | | -0,008 | 0,029 | 0,018 | 0,000 | 1,800 | - | 100 | 1,65 |

∴ DNA byla izolována v koncentraci 9 ng/μl až 31,3 ng/μl (v množství 0,9 μg až 3,13 μg).

Tabulka 28: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA (IZOLACE DNA Č. 4)

| Č | Výrobek | c (ng/μl) | Průměr c (ng/μl) | A _{230nm} | A _{260nm} | A _{280nm} | A _{320nm} | A _{260/280nm} | A _{260/230nm} | Objem vzorku (μl) | DNA (μg) |
|---|---------------------------------------|-----------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------|----------|
| 1 | 1.APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 15,5 | 18,25 | 0,017 | 0,031 | 0,018 | 0,003 | 1,722 | 1,824 | 100 | 1,55 |
| | | 21 | | -0,015 | 0,038 | 0,021 | 0,002 | 1,810 | - | 100 | 2,1 |
| 2 | 2.APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 22 | 21,75 | 0,030 | 0,044 | 0,028 | 0,005 | 1,571 | 1,467 | 100 | 2,2 |
| | | 21,5 | | 0,032 | 0,043 | 0,029 | 0,007 | 1,483 | 1,344 | 100 | 2,15 |
| 3 | Probiotika | 9 | 9 | 0,009 | 0,014 | 0,008 | 0,001 | 1,750 | 1,556 | 100 | 0,9 |
| | | 9 | | 0,010 | 0,014 | 0,007 | 0,001 | 1,800 | 1,400 | 100 | 0,9 |
| 4 | <i>Lactobacily "5"</i> | 16,5 | 16,75 | 0,045 | 0,033 | 0,023 | 0,011 | 1,435 | 0,723 | 100 | 1,65 |
| | | 17 | | 0,050 | 0,034 | 0,025 | 0,011 | 1,360 | 0,680 | 100 | 1,7 |
| 5 | <i>Acidophilus</i> | 22,5 | 24,75 | -0,023 | 0,012 | 0,008 | 0,004 | 1,500 | - | 100 | 2,25 |
| | | 27 | | -0,013 | 0,017 | 0,014 | 0,007 | 1,514 | - | 100 | 2,7 |
| 6 | 1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 16 | 16,75 | 0,042 | 0,032 | 0,023 | 0,011 | 1,791 | 0,762 | 100 | 1,6 |
| | | 17,5 | | 0,039 | 0,038 | 0,021 | 0,006 | 1,810 | 0,564 | 100 | 1,75 |
| 7 | 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 12 | 14,75 | 0,023 | 0,024 | 0,018 | 0,008 | 1,433 | 1,043 | 100 | 1,2 |
| | | 17,5 | | 0,042 | 0,035 | 0,023 | 0,009 | 1,522 | 0,833 | 100 | 1,75 |

∴ DNA byla izolována v koncentraci 9 ng/μl až 27 ng/μl (v množství 0,9 μg až 2,7 μg).

Tabulka 29: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA (IZOLACE DNA Č. 5)

| Č | Výrobek | c (ng/μl) | Průměr c (ng/μl) | A _{230nm} | A _{260nm} | A _{280nm} | A _{320nm} | A _{260/280nm} | A _{260/230nm} | Objem vzorku (μl) | DNA (μg) |
|---|---|-----------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------|----------|
| 1 | 1.APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 19,5 | 23 | 0,006 | 0,011 | 0,006 | 0,003 | 2,667 | 1,667 | 100 | 1,95 |
| | | 26,5 | | 0,065 | 0,048 | 0,034 | 0,014 | 1,700 | 1,767 | 100 | 2,65 |
| 2 | 2.APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 32,4 | 35,7 | 0,172 | 0,123 | 0,089 | 0,045 | 1,773 | 0,614 | 100 | 3,24 |
| | | 39 | | 0,092 | 0,065 | 0,045 | 0,017 | 1,714 | 0,640 | 100 | 3,9 |
| 3 | Probiotika | 8 | 10,35 | 0,064 | 0,061 | 0,049 | 0,023 | 1,462 | 1,927 | 100 | 0,8 |
| | | 12,7 | | 0,037 | 0,045 | 0,038 | 0,017 | 1,333 | 1,800 | 100 | 1,27 |
| 4 | <i>Lactobacily "5"</i> | 29 | 30,35 | 0,121 | 0,085 | 0,064 | 0,026 | 1,553 | 1,621 | 100 | 2,9 |
| | | 31,7 | | 0,110 | 0,082 | 0,062 | 0,024 | 1,526 | 1,532 | 100 | 3,17 |
| 5 | <i>Acidophilus</i> | 35,5 | 35,95 | 0,083 | 0,094 | 0,075 | 0,060 | 1,543 | 1,256 | 100 | 3,55 |
| | | 36,4 | | 0,066 | 0,045 | 0,091 | 0,026 | 0,495 | 1,382 | 100 | 3,64 |
| 6 | 1. <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> | 22 | 22,3 | 0,016 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 1,000 | 0,363 | 100 | 2,2 |
| | | 22,6 | | 0,067 | 0,042 | 0,035 | 0,013 | 1,318 | 0,537 | 100 | 2,26 |
| 7 | 2. <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> | 20 | 23,9 | 0,009 | 0,019 | 0,015 | 0,005 | 1,400 | 1,500 | 100 | 2,0 |
| | | 27,8 | | 0,031 | 0,048 | 0,022 | 0,017 | 2,182 | 1,548 | 100 | 2,78 |

∴ DNA byla izolována v koncentraci 8 ng/μl až 39 ng/μl (v množství 0,8 μg až 3,9 μg).

Tabulka 30: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA (IZOLACE DNA Č. 6)

| Č | Výrobek | c (ng/μl) | Průměr c (ng/μl) | A _{230nm} | A _{260nm} | A _{280nm} | A _{320nm} | A _{260/280nm} | A _{260/230nm} | Objem vzorku (μl) | DNA (μg) |
|---|---|-----------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------|----------|
| 1 | 1.APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 29,8 | 31,4 | 0,004 | 0,020 | 0,013 | 0,002 | 1,636 | 5,000 | 100 | 2,98 |
| | | 33 | | 0,074 | 0,069 | 0,050 | 0,018 | 1,594 | 0,911 | 100 | 3,3 |
| 2 | 2.APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 41,5 | 44,65 | 0,001 | 0,021 | 0,014 | 0,003 | 1,636 | 21,000 | 100 | 4,15 |
| | | 47,8 | | 0,081 | 0,074 | 0,051 | 0,019 | 1,719 | 0,887 | 100 | 4,78 |
| 3 | Probiotika | 10 | 12,65 | 0,026 | 0,005 | 0,006 | 0,001 | 1,800 | 0,192 | 100 | 1 |
| | | 15,3 | | 0,074 | 0,049 | 0,036 | 0,018 | 1,722 | 0,554 | 100 | 1,53 |
| 4 | <i>Lactobacily</i> "5" | 24 | 26,85 | -0,008 | 0,014 | 0,011 | 0,001 | 1,300 | - | 100 | 2,4 |
| | | 29,7 | | 0,018 | 0,019 | 0,016 | 0,004 | 1,250 | 1,071 | 100 | 2,97 |
| 5 | <i>Acidophilus</i> | 35,7 | 35,95 | -0,021 | 0,030 | 0,023 | 0,010 | 1,538 | - | 100 | 3,57 |
| | | 36,2 | | 0,006 | 0,035 | 0,045 | 0,021 | 1,778 | 5,833 | 100 | 3,62 |
| 6 | 1. <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> | 19,9 | 22,25 | 0,055 | 0,053 | 0,041 | 0,018 | 1,522 | 0,946 | 100 | 1,99 |
| | | 24,6 | | 0,043 | 0,023 | 0,022 | 0,016 | 1,445 | 0,535 | 100 | 2,46 |
| 7 | 2. <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> | 59,5 | 62 | 0,228 | 0,213 | 0,169 | 0,084 | 1,518 | 0,896 | 100 | 5,95 |
| | | 64,5 | | 0,046 | 0,091 | 0,070 | 0,028 | 1,500 | 3,500 | 100 | 6,45 |

∴ DNA byla izolována v koncentraci 10 ng/μl až 64,5 ng/μl (v množství 1 μg až 6,45 μg).

6.5.1 Shrnutí množství DNA izolované z doplňků stravy

V následující Tabulce 31 je shrnuto množství izolované DNA z analyzovaných výrobků v šesti opakováních.

Tabulka 31: Srovnání rozdílů v množstvích izolované DNA v šesti opakováních

| Č. | Výrobek | Průměr c (ng/μl)* | | | | | |
|----|-------------------------------------|-------------------|----|----|----|----|----|
| | | Izolace DNA č. | | | | | |
| | | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. |
| 1 | 1. APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 15 | 15 | 27 | 18 | 23 | 31 |
| 2 | 2. APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | 21 | 20 | 15 | 22 | 35 | 45 |
| 3 | Probiotika | 15 | 15 | 26 | 9 | 10 | 13 |
| 4 | <i>Lactobacily</i> "5" | 16 | 15 | 15 | 17 | 30 | 27 |
| 5 | <i>Acidophilus</i> | 44 | 34 | 30 | 25 | 36 | 36 |
| 6 | 1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 11 | 28 | 11 | 27 | 22 | 22 |
| 7 | 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 16 | 35 | 15 | 15 | 24 | 62 |

* zaokrouhleno

∴ DNA byla izolována v rozdílných množstvích.

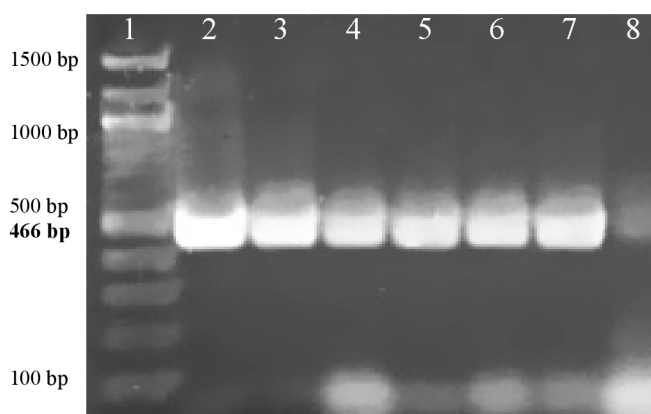
6.6 Stanovení citlivosti PCR s purifikovanou DNA

Byla provedena PCR s různým množstvím purifikované DNA pro stanovení citlivosti amplifikace. Byla použita čistá DNA matrice bakteriálního sbírkového kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T izolovaná metodou fenolové extrakce (viz kapitola 6.1), která byla naředěná pomocí TE pufru na koncentrace 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl a 1 fg/μl (desítkové ředění). DNA byla amplifikovaná v PCR specifické pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*.

6.6.1 Citlivost PCR specifické pro doménu *Bacteria*

Směs pro PCR byla připravena podle kapitoly 5.4.1 s DNA matricí *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T a amplifikována pomocí primerů specifických pro doménu *Bacteria* – F-eub a R-eub. Byl amplifikován produkt PCR o velikosti 466 bp (viz Obrázek 12).

Obrázek 12: Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR o velikosti 466 bp pro doménu *Bacteria*. Amplifikován byl 1 μl DNA sbírkového kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T.



| Běh | Koncentrace DNA | Množství DNA/PCR směs | Produkt PCR |
|-----|-----------------|-----------------------|-----------------|
| 1 | Standard | - | 100 bp žebříček |
| 2 | 10 ng/μl | 10 ng | ++++ |
| 3 | 1 ng/μl | 1 ng | ++++ |
| 4 | 100 pg/μl | 100 pg | +++ |
| 5 | 10 pg/μl | 10 pg | +++ |
| 6 | 1 pg/μl | 1 pg | +++ |
| 7 | 100 fg/μl | 100 fg | +++ |
| 8 | 10 fg/μl | 10 fg | + |

Vysvětlivky:

Detekce produktu PCR:

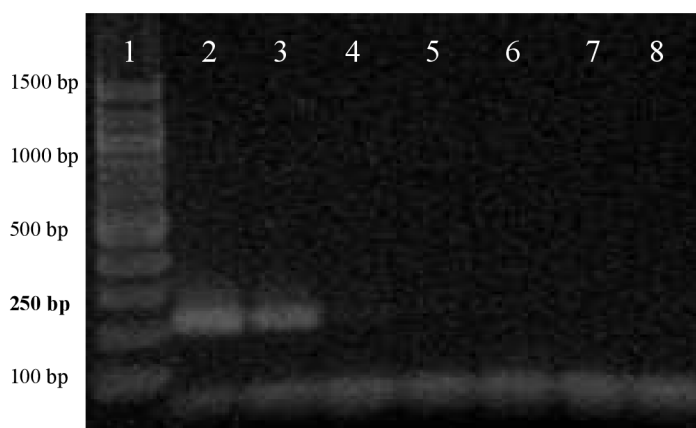
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Nejnižší množství DNA amplifikovatelné v PCR za vzniku produktů PCR specifických pro doménu Bacteria, jež jsou dobře detegovatelné na gelu, je 10 fg.

6.6.2 Citlivost rodově specifické PCR pro rod *Lactobacillus*

Směs pro PCR byla připravena dle kapitoly 5.4.2 s DNA matricí *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T a amplifikována s rodově specifickými primery LblMA-1 a R16-1. Byl amplifikován produkt PCR o velikosti 250 bp (viz Obrázek 13).

Obrázek 13: Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR o velikosti 250 bp pro rod *Lactobacillus*. Amplifikovány byly 3 μl DNA sbírkového kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T.



| <i>Běh</i> | <i>Koncentrace DNA</i> | <i>Množství DNA/PCR směs</i> | <i>Produkt PCR</i> |
|------------|------------------------|------------------------------|--------------------|
| <i>1</i> | Standard | - | 100 bp žebříček |
| <i>2</i> | 10 ng/μl | 30 ng | +++ |
| <i>3</i> | 1 ng/μl | 3 ng | ++ |
| <i>4</i> | 100 pg/μl | 300 pg | - |
| <i>5</i> | 10 pg/μl | 30 pg | - |
| <i>6</i> | 1 pg/μl | 3 pg | - |
| <i>7</i> | 100 fg/μl | 300 fg | - |
| <i>8</i> | 10 fg/μl | 30 fg | - |

Vysvětlivky:

Detekce produktu PCR:

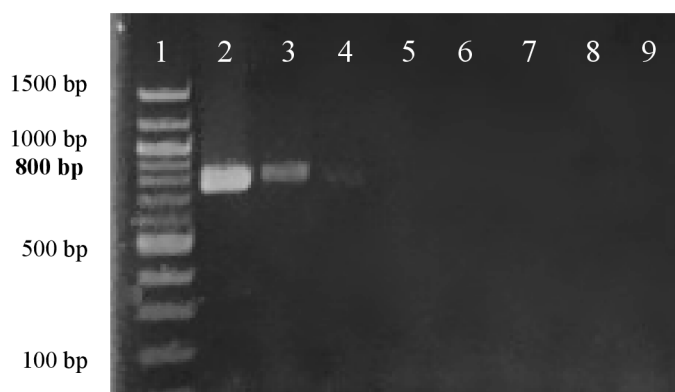
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Nejnižší množství DNA amplifikovatelné v PCR za vzniku rodově specifických produktů PCR, jež jsou dobře detegovatelné na gelu, je 3 ng.

6.6.3 Citlivost druhově specifické PCR pro *Lactobacillus acidophilus*

PCR směs byla připravena dle kapitoly 5.4.3 s DNA matricí *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T a amplifikována s druhově specifickými primery Aci16SI a 16SII. Byl amplifikován produkt PCR o velikosti 800 bp (viz Obrázek 14).

Obrázek 14: Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR o velikosti 800 bp pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Amplifikovány byly 3 μl DNA sbírkového kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T.



| <i>Běh</i> | <i>Koncentrace DNA</i> | <i>Množství DNA/PCR směs</i> | <i>Produkt PCR</i> |
|------------|------------------------|------------------------------|--------------------|
| <i>1</i> | Standard | - | 100 bp žebříček |
| <i>2</i> | 10 ng/μl | 30 ng | +++ |
| <i>3</i> | 1 ng/μl | 3 ng | ++ |
| <i>4</i> | 100 pg/μl | 300 pg | + |
| <i>5</i> | 10 pg/μl | 30 pg | - |
| <i>6</i> | 1 pg/μl | 3 pg | - |
| <i>7</i> | 100 fg/μl | 300 fg | - |
| <i>8</i> | 10 fg/μl | 30 fg | - |
| <i>9</i> | 1 fg/μl | 3 fg | - |

Vysvětlivky:

Detekce produktu PCR:

++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Nejnižší množství DNA amplifikovatelné v PCR za vzniku druhově specifických produktů PCR, jež jsou dobře detegovatelné na gelu, je 300 pg.

6.6.4 Shrnutí citlivosti v PCR specifických pro doménu, rod a druh

V Tabulce 32 je uvedeno shrnutí citlivosti PCR specifických pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*. Je zde rovněž uvedeno množství buněk, které přibližně odpovídá danému množství DNA. Jedna buňka obsahuje přibližně 2 fg DNA.

Tabulka 32: Shrnutí citlivosti amplifikace v PCR specifických pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*.

| PCR specifická pro | Množství amplifikované DNA/množství buněk/produkt PCR | | | | | | | |
|---|---|------------------|------------------|------------------|------------------|--------|-------|-------|
| Doména <i>Bacteria</i> | 10 ng | 1 ng | 100 pg | 10 pg | 1 pg | 100 fg | 10 fg | 1 fg |
| | $5 \cdot 10^6 b$ | $5 \cdot 10^5 b$ | $5 \cdot 10^4 b$ | $5 \cdot 10^3 b$ | $5 \cdot 10^2 b$ | 50 b | 5 b | 0,5 b |
| | + | + | + | + | + | + | + | |
| Rod <i>Lactobacillus</i> | 30 ng | 3 ng | 300 pg | 30 pg | 3 pg | 300 fg | 30 fg | 3 fg |
| | $1,5 \cdot 10^7$ | $1,5 \cdot 10^6$ | $1,5 \cdot 10^5$ | $1,5 \cdot 10^4$ | $1,5 \cdot 10^3$ | 150 b | 15 b | 1,5 b |
| | + | + | | | | | | |
| Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 30 ng | 3 ng | 300 pg | 30 pg | 3 pg | 300 fg | 30 fg | 3 fg |
| | $1,5 \cdot 10^7$ | $1,5 \cdot 10^6$ | $1,5 \cdot 10^5$ | $1,5 \cdot 10^4$ | $1,5 \cdot 10^3$ | 150 b | 15 b | 1,5 b |
| | + | + | + | | | | | |

Vysvětlivky: + ... produkt PCR detekován

∴ Pomocí jednotlivých PCR po amplifikaci různého množství DNA vznikl produkt PCR detekovatelný na gelu. Toto množství DNA odpovídá 5 až $5 \cdot 10^6$ buněk.

6.7 PCR s DNA izolované z doplňků stravy pomocí magnetických nosičů

DNA byla izolována z doplňků stravy (viz 6.4). Izolovaná DNA byla v případě vyšších koncentrací naředěna na koncentraci asi 15 ng/μl a použita v množstvích 1 až 3 μl pro amplifikaci v PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* a dále s rodově a druhově specifickými primery pro rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*. Tento druh je kromě jiných ve výrobcích deklarován výrobcem. PCR byla provedena s DNA maticí získanou ze všech šesti nezávislých izolací.

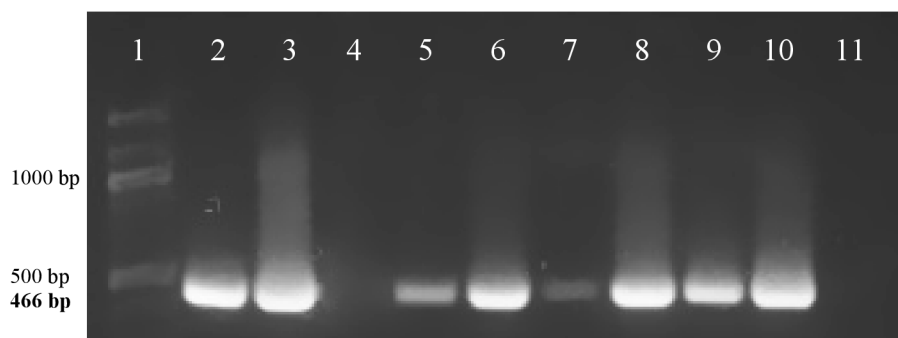
6.7.1 PCR s DNA maticí z výrobků první izolace

Byly provedeny PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*.

6.7.1.1 PCR pro doménu *Bacteria*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* - F-eub a R-eub podle programu DOMBAC. Byl detekován produkt PCR o velikosti 466 bp (viz Obrázek 15).

Obrázek 15: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 466 bp specifických pro doménu *Bacteria*. Amplifikováno bylo asi 15 ng (1 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|-------------------------------------|----------------|
| 1 | <i>Standard</i> | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 4 | - | - |
| 5 | <i>Probiotika</i> | ++ |
| 6 | <i>Laktobacily "5"</i> | ++++ |
| 7 | <i>Acidophilus</i> | + |
| 8 | 1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 9 | 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | +++ |
| 10 | <i>PK</i> | ++++ |
| 11 | <i>NK</i> | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

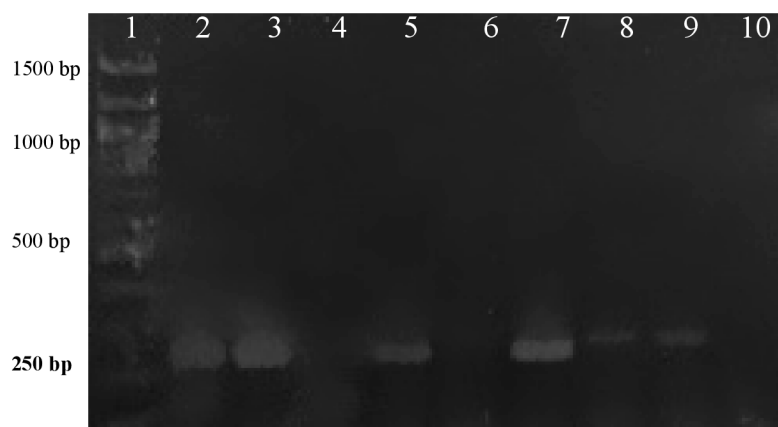
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro doménu *Bacteria* o velikosti 466 bp byly detekovány. Přítomnost amplifikovatelné DNA byla prokázána u všech testovaných vzorků doplňků stravy.

6.7.1.2 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití rodově specifických primerů LblMA-1 a R16-1 podle programu LCBROD. Byl detekován produkt PCR o velikosti 250 bp (viz Obrázek 16).

Obrázek 16: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 250 bp specifických pro rod *Lactobacillus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | +++ |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | +++ |
| 4 | Probiotika | - |
| 5 | Laktobacily "5" | +++ |
| 6 | Acidophilus | + |
| 7 | 1. Lactobacillus acidophilus | ++++ |
| 8 | 2. Lactobacillus acidophilus | ++ |
| 9 | PK | +++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

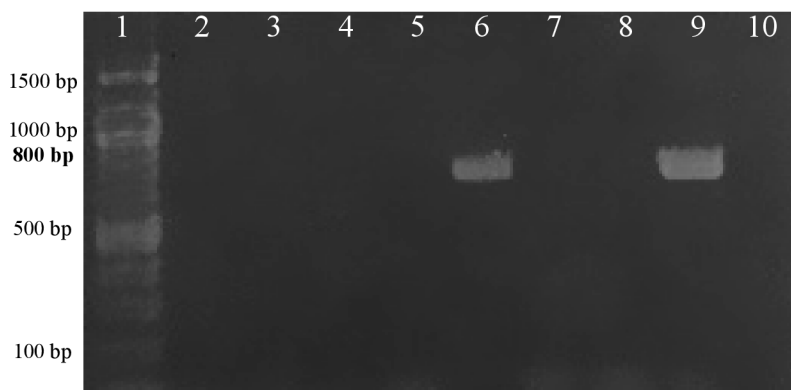
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detekovány v různé intenzitě. V běhu č. 4 výrobku Probiotika nebyl produkt PCR detekován. V běhu č. 6 výrobku Acidophilus byl produkt PCR detekován velmi slabě.

6.7.1.3 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy různých výrobců pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití druhově specifických primerů Aci16SI a 16SII podle programu LBCRHAM. Byl detekován produkt PCR o velikost 800 bp (viz Obrázek 17).

Obrázek 17: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 800 bp specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Amplifikovány byly asi 45 ng (3 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|-------------------------------------|----------------|
| 1 | <i>Standard</i> | 100bp žebříček |
| 2 | <i>1. APO-Lactobacillus 10+</i> | - |
| 3 | <i>2. APO-Lactobacillus 10+</i> | - |
| 4 | <i>Probiotika</i> | - |
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | - |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | +++ |
| 7 | <i>1. Lactobacillus acidophilus</i> | - |
| 8 | <i>2. Lactobacillus acidophilus</i> | - |
| 9 | <i>PK</i> | ++++ |
| 10 | <i>NK</i> | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

\therefore Produkt PCR specifický pro druh *Lactobacillus acidophilus* o velikosti 800 bp byl detekován v běhu č. 6 (výrobek *Acidophilus*).

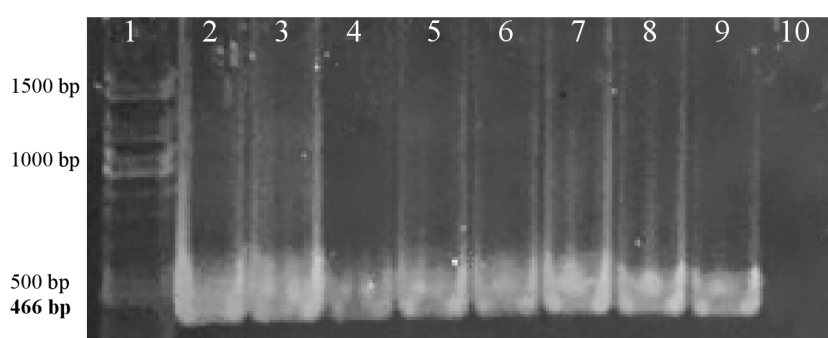
6.7.2 PCR s DNA matricí z výrobků druhé izolace

Byly provedeny PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*.

6.7.2.1 PCR pro doménu *Bacteria*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* - F-eub a R-eub podle programu DOMBAC. Byl detekován produkt PCR o velikosti 466 bp (viz Obrázek 18).

Obrázek 18: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 466 bp specifických pro doménu *Bacteria*. Amplifikováno bylo asi 15 ng (1 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 4 | Probiotika | ++++ |
| 5 | Laktobacily "5" | ++++ |
| 6 | Acidophilus | ++++ |
| 7 | 1. Lactobacillus acidophilus | ++++ |
| 8 | 2. Lactobacillus acidophilus | ++++ |
| 9 | PK | ++++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

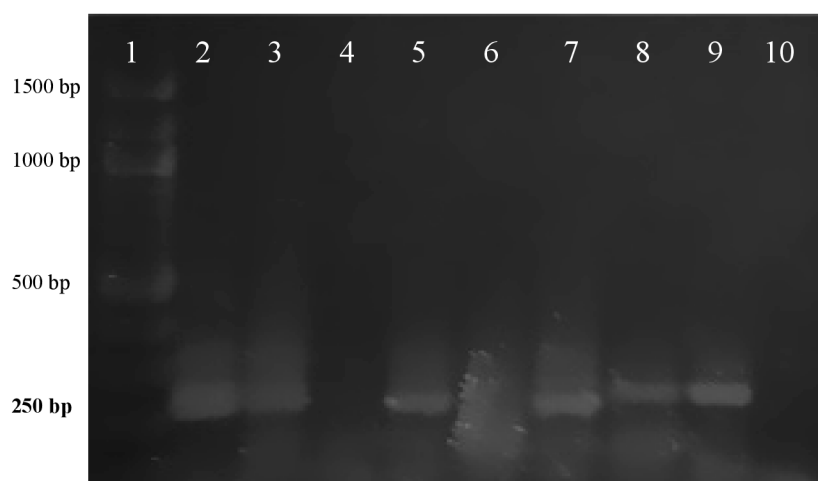
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro doménu Bacteria o velikosti 466 bp byly detekovány. Přítomnost amplifikovatelné DNA byla prokázána u všech testovaných vzorků doplňků stravy.

6.7.2.2 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití rodově specifických primerů LblMA-1 a R16-1 podle programu LBCROD. Byl detekován produkt PCR o velikosti 250 bp (viz Obrázek 19).

Obrázek 19: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 250 bp specifických pro rod *Lactobacillus*. Amplifikováno bylo asi 15 ng (3 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | +++ |
| 4 | Probiotika | - |
| 5 | Laktobacily "5" | ++++ |
| 6 | Acidophilus | - |
| 7 | 1. Lactobacillus acidophilus | ++++ |
| 8 | 2. Lactobacillus acidophilus | +++ |
| 9 | PK | ++++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

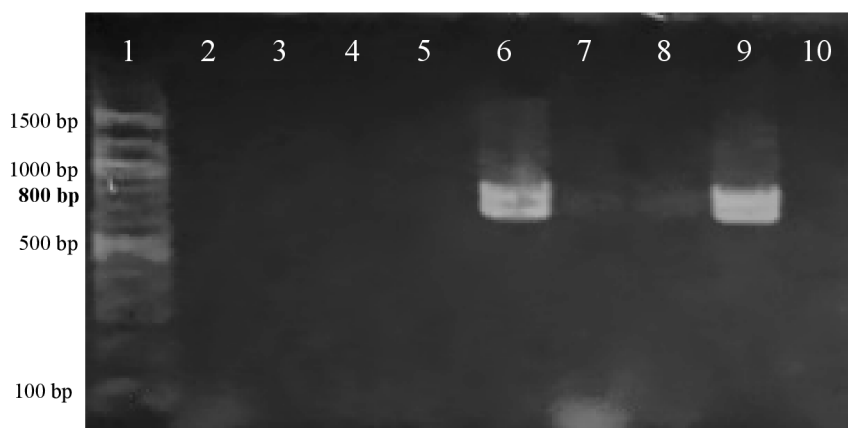
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detekovány po amplifikaci DNA z pěti výrobků. V běhu č. 4 výrobku Probiotika a běhu č. 6 výrobku *Acidophilus* nebyl produkt PCR detekován.

6.7.2.3 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy různých výrobců pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití druhově specifických primerů Aci16SI a 16SII podle programu LBCRHAM. Byl detekován produkt PCR o velikosti 800 bp (viz Obrázek 20).

Obrázek 20: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 800 bp specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 µl) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | - |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | - |
| 4 | Probiotika | - |
| 5 | Laktobacily "5" | - |
| 6 | Acidophilus | ++++ |
| 7 | 1. Lactobacillus acidophilus | + |
| 8 | 2. Lactobacillus acidophilus | + |
| 9 | PK | ++++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* o velikosti 800 bp byly detekovány v různé intenzitě u třech výrobků: v běhu č. 6 výrobku *Acidophilus* a v běhu č. 7 a č. 8 ve výrobcích 1. *Lactobacillus acidophilus* a 2. *Lactobacillus acidophilus*.

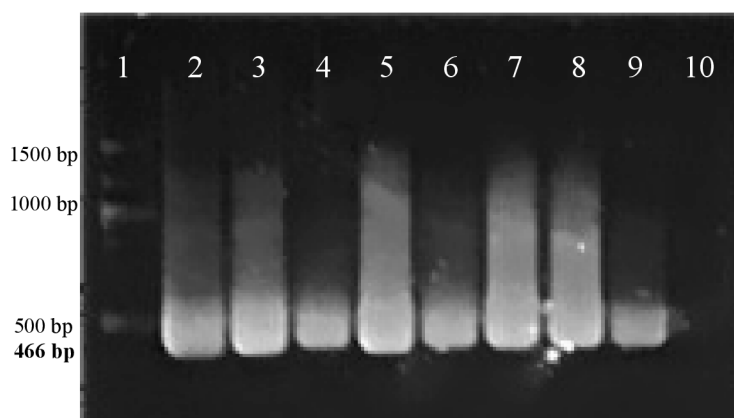
6.7.3 PCR s DNA matricí z výrobků třetí izolace

Byly provedeny PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*.

6.7.3.1 PCR pro doménu *Bacteria*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* - F-eub a R-eub podle programu DOMBAC. Byl detekován produkt PCR o velikosti 466 bp (viz Obrázek 21).

Obrázek 21: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 466 bp specifických pro doménu *Bacteria*. Amplifikováno bylo asi 15 ng (1 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|------------------------------------|----------------|
| 1 | <i>Standard</i> | 100bp žebříček |
| 2 | 1. <i>APO-Lactobacillus</i> 10+ | ++++ |
| 3 | 2. <i>APO-Lactobacillus</i> 10+ | ++++ |
| 4 | <i>Probiotika</i> | +++ |

| | | |
|----|-------------------------------------|------|
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | ++++ |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | +++ |
| 7 | 1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 8 | 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 9 | PK | +++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

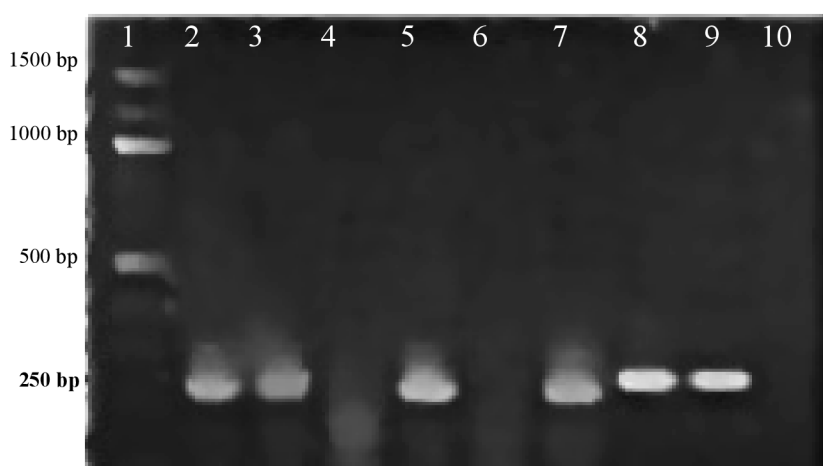
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro doménu Bacteria o velikosti 466 bp byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze všech testovaných doplňků stravy.

6.7.3.2 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití rodově specifických primerů LblMA-1 a R16-1 podle programu LBCROD. Byl detekován produkt PCR o velikosti 250 bp (viz Obrázek 22).

Obrázek 22: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 250 bp specifických pro rod *Lactobacillus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---|----------------|
| 1 | <i>Standard</i> | 100bp žebříček |
| 2 | <i>1. APO-Lactobacillus 10+</i> | ++++ |
| 3 | <i>2. APO-Lactobacillus 10+</i> | +++ |
| 4 | <i>Probiotika</i> | - |
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | ++++ |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | - |
| 7 | <i>1. Lactobacillus acidophilus</i> | +++ |
| 8 | <i>2. Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 9 | <i>PK</i> | ++++ |
| 10 | <i>NK</i> | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

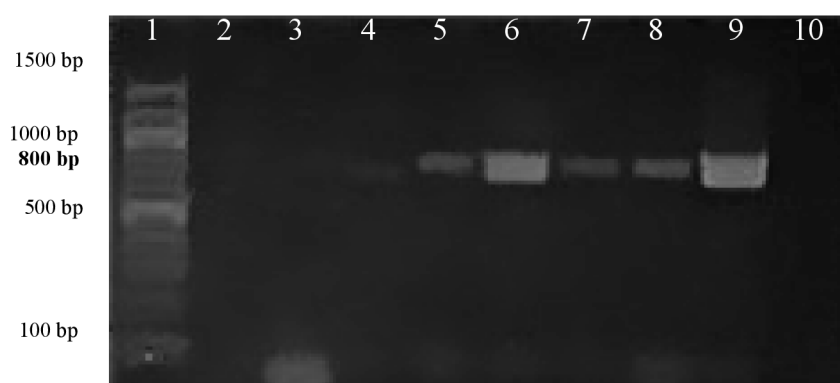
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly po amplifikaci DNA izolované z pěti výrobků detekovány. Ve dvou případech nebyl produkt PCR detekován (běh č. 4, DNA z výrobku *Probiotika* a běh č. 6, DNA z výrobku *Acidophilus*).

6.7.3.3 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy různých výrobců pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití druhově specifických primerů Aci16SI a 16SII podle programu LBCRHAM. Byl detekován produkt PCR o velikosti 800 bp (viz Obrázek 23).

Obrázek 23: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 800 bp specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 µl) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|------------|-------------------------------------|--------------------|
| 1 | <i>Standard</i> | 100bp žebříček |
| 2 | <i>1. APO-Lactobacillus 10+</i> | - |
| 3 | <i>2. APO-Lactobacillus 10+</i> | - |
| 4 | <i>Probiotika</i> | + |
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | +++ |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | ++++ |
| 7 | <i>1. Lactobacillus acidophilus</i> | ++ |
| 8 | <i>2. Lactobacillus acidophilus</i> | +++ |
| 9 | <i>PK</i> | ++++ |
| 10 | <i>NK</i> | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* o velikosti 800 bp byly detekovány v různé intenzitě po amplifikaci DNA z pěti výrobků. Produkty PCR nebyly detekovány v běhu č. 2 a č. 3 ve výrobcích 1. APO-Lactobacillus 10+ a 2. APO-Lactobacillus 10+.

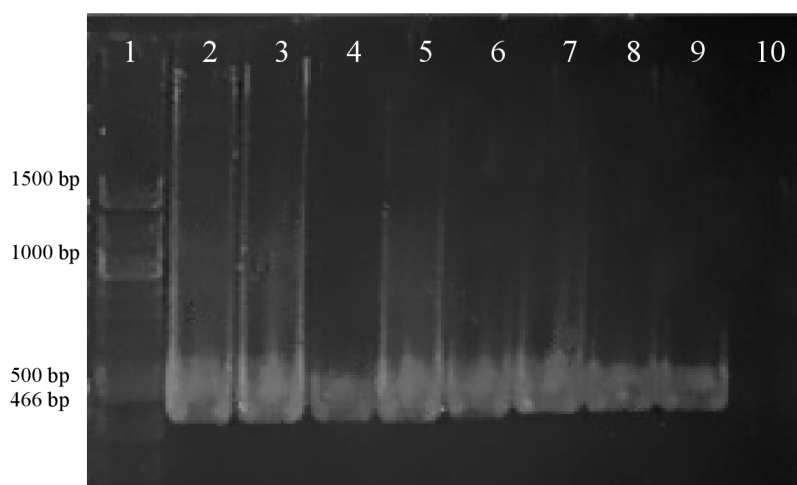
6.7.4 PCR s DNA matricí z výrobků čtvrté izolace

Byly provedeny PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*.

6.7.4.1 PCR pro doménu *Bacteria*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* - F-eub a R-eub podle programu DOMBAC. Byl detekován produkt PCR o velikosti 466 bp (viz Obrázek 24).

Obrázek 24: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 466 bp specifických pro doménu Bacteria. Amplifikováno bylo asi 15 ng (1 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 4 | Probiotika | ++++ |
| 5 | Laktobacily "5" | ++++ |
| 6 | Acidophilus | ++++ |
| 7 | 1. Lactobacillus acidophilus | ++++ |
| 8 | 2. Lactobacillus acidophilus | ++++ |
| 9 | PK | ++++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

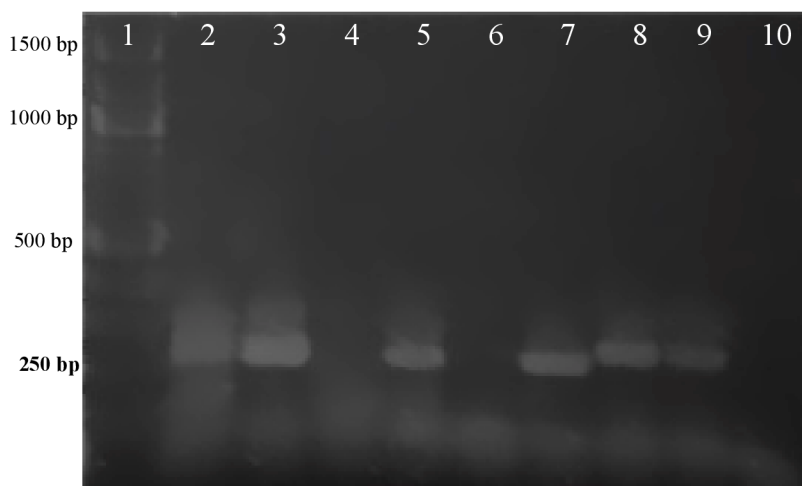
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro doménu Bacteria o velikosti 466 bp byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze všech testovaných doplňků stravy.

6.7.4.2 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití rodově specifických primerů LblMA-1 a R16-1 podle programu LBCROD. Byl detekován produkt PCR o velikosti 250 bp (viz Obrázek 25).

Obrázek 25: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 250 bp specifických pro rod *Lactobacillus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|-------------------------------------|----------------|
| 1 | <i>Standard</i> | 100bp žebříček |
| 2 | 1. <i>APO-Lactobacillus</i> 10+ | +++ |
| 3 | 2. <i>APO-Lactobacillus</i> 10+ | ++++ |
| 4 | <i>Probiotika</i> | - |
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | +++ |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | - |
| 7 | 1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 8 | 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 9 | <i>PK</i> | ++++ |
| 10 | <i>NK</i> | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

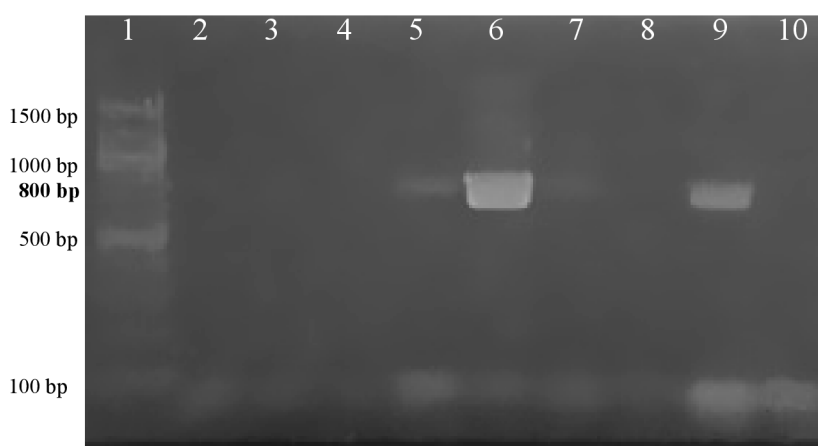
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detekovány po amplifikaci DNA z pěti výrobků. Po amplifikaci DNA ze dvou výrobků (běh č. 4 Probiotika a běh č. 6, *Acidophilus*) nebyl produkt PCR detekován.

6.7.4.3 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy různých výrobců pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití druhově specifických primerů Aci16SI a 16SII podle programu LBCRHAM. Byl detekován produkt PCR o velikosti 800 bp (viz Obrázek 26).

Obrázek 26: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 800 bp specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | - |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | - |
| 4 | Probiotika | - |
| 5 | Laktobacily "5" | + |
| 6 | Acidophilus | ++++ |
| 7 | 1. Lactobacillus acidophilus | + |
| 8 | 2. Lactobacillus acidophilus | - |
| 9 | PK | +++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* o velikosti 800 bp byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze tří výrobků (běh č. 6, výrobek *Acidophilus*, běh č. 5, výrobek Laktobacily “5” a běh č. 7, výrobek 1. *Lactobacillus acidophilus*).

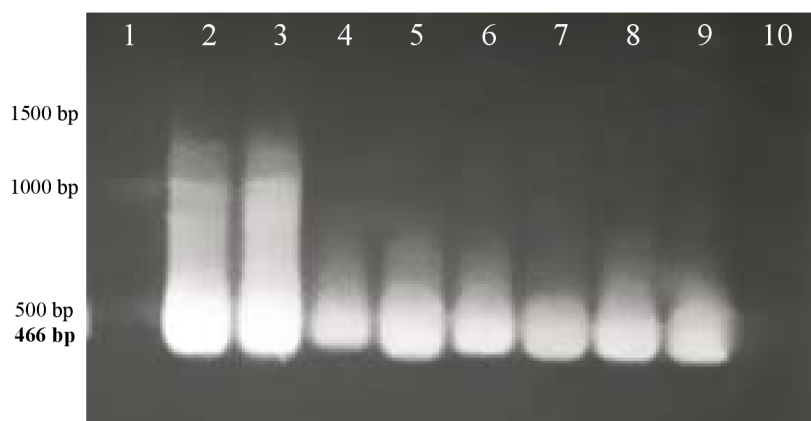
6.7.5 PCR s DNA matricí z výrobků páté izolace

Byly provedeny PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*.

6.7.5.1 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* - F-eub a R-eub podle programu DOMBAC. Byl detekován produkt PCR o velikosti 466 bp (viz Obrázek 27).

Obrázek 27: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 466 bp specifických pro doménu *Bacteria*. Amplifikováno bylo asi 15 ng (1 µl) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | ++++ |
| 4 | Probiotika | +++ |
| 5 | Laktobacily “5” | ++++ |
| 6 | Acidophilus | ++++ |
| 7 | 1. Lactobacillus acidophilus | ++++ |

| | | |
|----|-------------------------------------|------|
| 8 | 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 9 | PK | ++++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

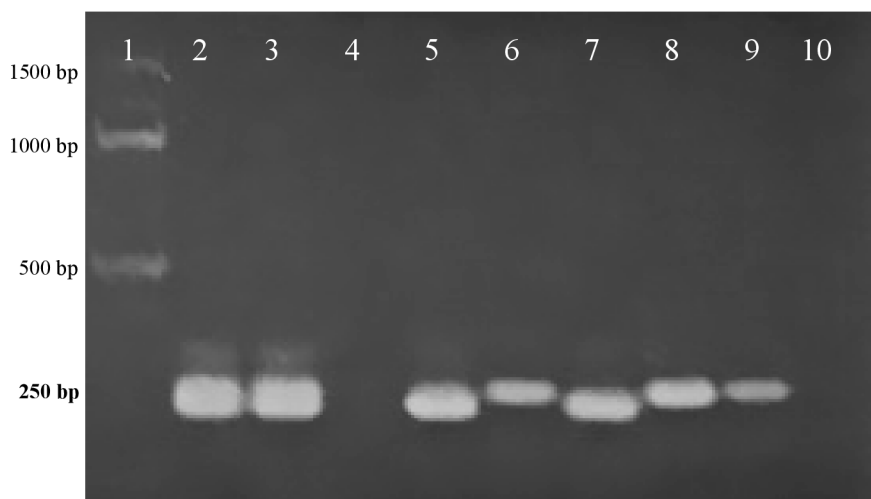
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro doménu Bacteria o velikosti 466 bp byly detekovány. Přítomnost amplifikovatelné DNA byla prokázána u všech testovaných vzorků doplňků stravy.

6.7.5.2 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití rodově specifických primerů LblMA-1 a R16-1 podle programu LBCROD. Byl detekován produkt PCR o velikosti 250 bp (viz Obrázek 28).

Obrázek 28: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 250 bp specifických pro rod *Lactobacillus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 µl) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|-------------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | ++++ |
| 3 | 2. APO- <i>Lactobacillus</i> 10+ | ++++ |
| 4 | Probiotika | - |

| | | |
|----|-------------------------------------|------|
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | ++++ |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | +++ |
| 7 | 1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 8 | 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++++ |
| 9 | PK | +++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

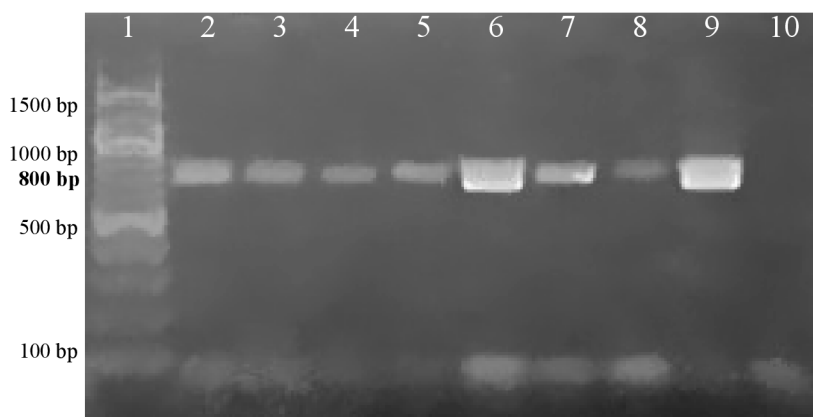
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze všech výrobků kromě jednoho detekovány (běh č. 4, vzorek Probiotika).

6.7.5.3 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy různých výrobců pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití druhově specifických primerů Aci16SI a 16SII podle programu LBCRHAM. Byl detekován produkt PCR o velikosti 800 bp (viz Obrázek 29).

Obrázek 29: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 800 bp specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 µl) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|--------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | +++ |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | ++ |

| | | |
|----|-------------------------------------|------|
| 4 | <i>Probiotika</i> | ++ |
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | ++ |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | ++++ |
| 7 | 1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | +++ |
| 8 | 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ++ |
| 9 | PK | ++++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* o velikosti 800 bp byly detekovány v různé intenzitě po amplifikaci DNA izolované ze všech výrobků.

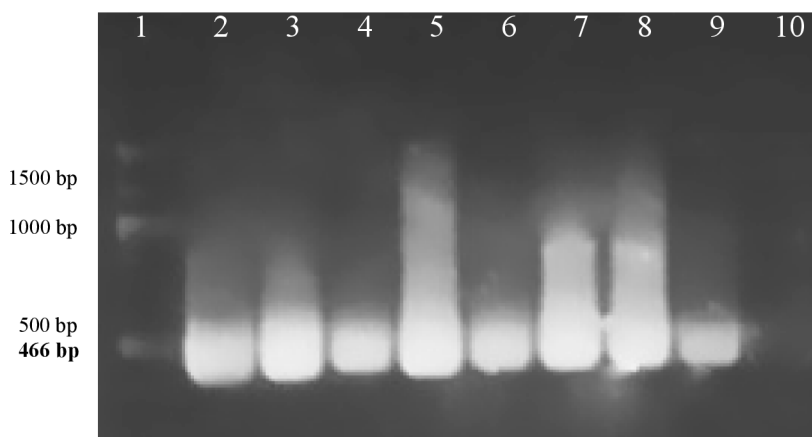
6.7.6 PCR s DNA matricí z výrobků z šesté izolace

Byly provedeny PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*.

6.7.6.1 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* - F-eub a R-eub podle programu DOMBAC. Byl detekován produkt PCR o velikosti 466 bp (viz Obrázek 30).

Obrázek 30: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 466 bp specifických pro doménu *Bacteria*. Amplifikováno bylo asi 15 ng (1 μ l) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---|----------------|
| 1 | <i>Standard</i> | 100bp žebříček |
| 2 | 1. <i>APO-Lactobacillus</i> <i>10+</i> | ++++ |
| 3 | 2. <i>APO-Lactobacillus</i> <i>10+</i> | ++++ |
| 4 | <i>Probiotika</i> | +++ |
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | ++++ |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | +++ |
| 7 | 1. <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> | ++++ |
| 8 | 2. <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> | ++++ |
| 9 | <i>PK</i> | +++ |
| 10 | <i>NK</i> | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

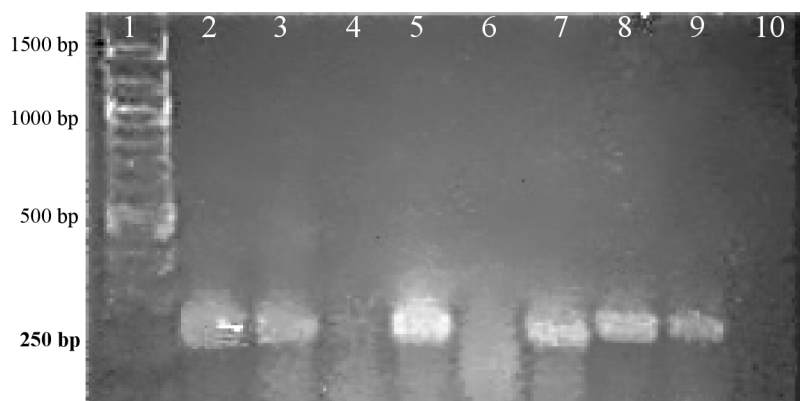
++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro doménu Bacteria o velikosti 466 bp byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze všech výrobků.

6.7.6.2 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití rodově specifických primerů LblMA-1 a R16-1 podle programu LBCROD. Byl detekován produkt PCR o velikosti 250 bp (viz Obrázek 31).

Obrázek 31: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 250 bp specifických pro rod *Lactobacillus*. Amplifikováno bylo asi 45 ng (3 µl) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|------------|---|--------------------|
| 1 | <i>Standard</i> | 100bp žebříček |
| 2 | <i>1. APO-Lactobacillus 10+</i> | ++++ |
| 3 | <i>2. APO-Lactobacillus 10+</i> | ++++ |
| 4 | <i>Probiotika</i> | - |
| 5 | <i>Laktobacily "5"</i> | ++++ |
| 6 | <i>Acidophilus</i> | - |
| 7 | <i>1. Lactobacillus acidophilus</i> | +++ |
| 8 | <i>2. Lactobacillus acidophilus</i> | +++ |
| 9 | <i>PK</i> | +++ |
| 10 | <i>NK</i> | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detekovány po amplifikaci DNA izolované z pěti výrobků. Po amplifikaci DNA izolovaných ze dvou výrobků nebyly produkty PCR detekovány (běh č. 4, výrobek Probiotika, běh č. 6, výrobek *Acidophilus*).

6.7.6.3 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

DNA izolovaná ze sedmi doplňků stravy různých výrobců pomocí magnetických nosičů byla amplifikována za použití druhově specifických primerů Aci16SI a 16SII podle programu LBCRHAM. Byl detekován produkt PCR o velikosti 800 bp (viz Obrázek 32).

Obrázek 32: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 800 bp specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Amplifikováno bylo vždy 45 ng (3 µl) DNA z každého ze sedmi doplňků stravy různých výrobců.



| Běh | Název výrobku | Produkt PCR |
|-----|---------------------------------|----------------|
| 1 | Standard | 100bp žebříček |
| 2 | 1. APO-Lactobacillus 10+ | ++ |
| 3 | 2. APO-Lactobacillus 10+ | ++ |
| 4 | Probiotika | +++ |
| 5 | Laktobacily "5" | +++ |
| 6 | Acidophilus | ++++ |
| 7 | 1. Lactobacillus acidophilus | +++ |
| 8 | 2. Lactobacillus acidophilus | ++ |
| 9 | PK | ++++ |
| 10 | NK | - |

Vysvětlivky:

NK – negativní kontrola (DNA nepřítomná, místo DNA PCR voda)

PK – pozitivní kontrola (DNA bakteriálního kmene *L. acidophilus* CCM 4833^T - 15 ng)

Detekce produktu PCR:

++++ velmi silně, +++ silně, ++ zřetelně, + slabě, - produkt PCR nebyl detekován

∴ Produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* o velikosti 800 bp byly detekovány v různé intenzitě po amplifikaci DNA izolované ze všech výrobků.

6.8 Souhrn výsledků PCR z jednotlivých izolací pro jednotlivé výrobky

Souhrnné výsledky jednotlivých PCR jsou zaznamenány v Tabulkách 33-39. V PCR směsích bylo amplifikováno 15 – 45 ng DNA. Je uvedena citlivost PCR (množství DNA a množství odpovídajících buněk)

1. APO-Lactobacillus 10+

Tabulka 33: Souhrn výsledků PCR pro výrobek 1. APO-Lactobacillus 10+

| Výrobek | Specifita PCR / detekce produktu PCR / přítomnost bakterií | | | | |
|--------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|--|--------------------|
| | Izolace DNA č. | Doména <i>Bacteria</i> | Rod <i>Lactobacillus</i> | Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | |
| 1. APO-Lactobacillus 10+ | 1 | ++++ | +++ | - | |
| | 2 | ++++ | ++++ | - | |
| | 3 | ++++ | ++++ | - | |
| | 4 | ++++ | +++ | - | |
| | 5 | ++++ | ++++ | +++ | |
| | 6 | ++++ | ++++ | ++ | |
| | Přítomnost bakterií | | + | + | + |
| | Množství amplifikované DNA | | 15 ng | 45 ng | 45 ng |
| | Odpovídající množství buněk | | $7,5 \cdot 10^6$ | $2,25 \cdot 10^7$ | $2,25 \cdot 10^7$ |
| | Citlivost PCR | | | | |
| | Množství DNA | | 10 fg | 3 ng | 300 pg |
| | Množství buněk | | 5 b | $1,5 \cdot 10^6$ b | $1,5 \cdot 10^5$ b |

2. APO-Lactobacillus 10+

Tabulka 34: Souhrn výsledků PCR pro výrobek 2. APO-Lactobacillus 10+

| Výrobek | Specifita PCR / detekce produktu PCR / přítomnost bakterií | | | | |
|--------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|--|--------------------|
| | Izolace DNA č. | Doména <i>Bacteria</i> | Rod <i>Lactobacillus</i> | Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | |
| 2. APO-Lactobacillus 10+ | 1 | ++++ | +++ | - | |
| | 2 | ++++ | +++ | - | |
| | 3 | ++++ | +++ | - | |
| | 4 | ++++ | ++++ | - | |
| | 5 | ++++ | ++++ | ++ | |
| | 6 | ++++ | ++++ | ++ | |
| | Přítomnost bakterií | | + | + | + |
| | Množství amplifikované DNA | | 15 ng | 45 ng | 45 ng |
| | Odpovídající množství buněk | | $7,5 \cdot 10^6$ | $2,25 \cdot 10^7$ | $2,25 \cdot 10^7$ |
| | Citlivost PCR | | | | |
| | Množství DNA | | 10 fg | 3 ng | 300 pg |
| | Množství buněk | | 5 b | $1,5 \cdot 10^6$ b | $1,5 \cdot 10^5$ b |

Probiotika

Tabulka 35: Souhrn výsledků PCR pro výrobek Probiotika

| Výrobek | Specifita PCR / detekce produktu PCR / přítomnost bakterií | | | | |
|------------|--|---------------------------|-----------------------------|--|--------------------|
| | Izolace DNA č. | Doména <i>Bacteria</i> | Rod <i>Lactobacillus</i> | Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | |
| Probiotika | 1 | ++ | - | - | |
| | 2 | ++++ | - | - | |
| | 3 | +++ | - | + | |
| | 4 | ++++ | - | - | |
| | 5 | +++ | - | ++ | |
| | 6 | +++ | - | +++ | |
| | Přítomnost bakterií | | + | $< 2,25 \cdot 10^7$ | + |
| | Množství amplifikované DNA | | 15 ng | 45 ng | 45 ng |
| | Odpovídající množství buněk | | $7,5 \cdot 10^6$ | $2,25 \cdot 10^7$ | $2,25 \cdot 10^7$ |
| | Citlivost PCR | | | | |
| | Množství DNA | | 10 fg | 3 ng | 300 pg |
| | Množství buněk | | 5 b | $1,5 \cdot 10^6$ b | $1,5 \cdot 10^5$ b |

Laktobacily "5"

Tabulka 36: Souhrn výsledků PCR pro výrobek Laktobacily "5"

| Výrobek | Specifita PCR / detekce produktu PCR / přítomnost bakterií | | | | |
|-----------------|--|---------------------------|-----------------------------|--|--------------------|
| | Izolace DNA č. | Doména <i>Bacteria</i> | Rod <i>Lactobacillus</i> | Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | |
| Laktobacily "5" | 1 | ++++ | +++ | - | |
| | 2 | ++++ | ++++ | - | |
| | 3 | ++++ | ++++ | +++ | |
| | 4 | ++++ | +++ | + | |
| | 5 | ++++ | ++++ | ++ | |
| | 6 | ++++ | ++++ | +++ | |
| | Přítomnost bakterií | | + | + | + |
| | Množství amplifikované DNA | | 15 ng | 45 ng | 45 ng |
| | Odpovídající množství buněk | | $7,5 \cdot 10^6$ | $2,25 \cdot 10^7$ | $2,25 \cdot 10^7$ |
| | Citlivost PCR | | | | |
| | Množství DNA | | 10 fg | 3 ng | 300 pg |
| | Množství buněk | | 5 b | $1,5 \cdot 10^6$ b | $1,5 \cdot 10^5$ b |

Acidophilus

Tabulka 37: Souhrn výsledků PCR pro výrobek Acidophilus

| Výrobek | Specifita PCR / detekce produktu PCR / přítomnost bakterií | | | |
|----------------|--|---------------------------|-----------------------------|--|
| | Izolace DNA č. | Doména <i>Bacteria</i> | Rod <i>Lactobacillus</i> | Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| Acidophilus | 1 | + | + | +++ |
| | 2 | ++++ | - | ++++ |
| | 3 | +++ | - | ++++ |
| | 4 | ++++ | - | ++++ |
| | 5 | ++++ | +++ | ++++ |
| | 6 | +++ | - | ++++ |
| | Přítomnost bakterií | + | + | + |
| | Množství amplifikované DNA | 15 ng | 45 ng | 45 ng |
| | Odpovídající množství buněk | $7,5 \cdot 10^6$ | $2,25 \cdot 10^7$ | $2,25 \cdot 10^7$ |
| | Citlivost PCR | | | |
| | Množství DNA | 10 fg | 3 ng | 300 pg |
| Množství buněk | 5 b | $1,5 \cdot 10^6$ b | $1,5 \cdot 10^5$ b | |

1. Lactobacillus acidophilus

Tabulka 38: Souhrn výsledků PCR pro výrobek 1. Lactobacillus acidophilus

| Výrobek | Specifita PCR / detekce produktu PCR / přítomnost bakterií | | | |
|------------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|--|
| | Izolace DNA č. | Doména <i>Bacteria</i> | Rod <i>Lactobacillus</i> | Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| 1. Lactobacillus acidophilus | 1 | ++++ | ++++ | - |
| | 2 | ++++ | ++++ | + |
| | 3 | ++++ | +++ | ++ |
| | 4 | ++++ | ++++ | + |
| | 5 | ++++ | ++++ | +++ |
| | 6 | ++++ | +++ | +++ |
| | Přítomnost bakterií | + | + | + |
| | Množství amplifikované DNA | 15 ng | 45 ng | 45 ng |
| | Odpovídající množství buněk | $7,5 \cdot 10^6$ | $2,25 \cdot 10^7$ | $2,25 \cdot 10^7$ |
| | Citlivost PCR | | | |
| | Množství DNA | 10 fg | 3 ng | 300 pg |
| Množství buněk | 5 b | $1,5 \cdot 10^6$ b | $1,5 \cdot 10^5$ b | |

2. *Lactobacillus acidophilus*

Tabulka 39: Souhrn výsledků PCR pro výrobek 2. Lactobacillus acidophilus

| Výrobek | Specifita PCR / detekce produktu PCR / přítomnost bakterií | | | |
|-------------------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|--|
| | Izolace DNA č. | Doména <i>Bacteria</i> | Rod <i>Lactobacillus</i> | Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| 2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 1 | +++ | ++ | - |
| | 2 | ++++ | +++ | + |
| | 3 | ++++ | ++++ | +++ |
| | 4 | ++++ | ++++ | - |
| | 5 | ++++ | ++++ | ++ |
| | 6 | ++++ | +++ | ++ |
| | Přítomnost bakterií | + | + | + |
| | Množství amplifikované DNA | 15 ng | 45 ng | 45 ng |
| | <i>Odpovídající množství buněk</i> | $7,5 \cdot 10^6$ | $2,25 \cdot 10^7$ | $2,25 \cdot 10^7$ |
| | Citlivost PCR | | | |
| | Množství DNA | 10 fg | 3 ng | 300 pg |
| <i>Množství buněk</i> | 5 b | $1,5 \cdot 10^6$ b | $1,5 \cdot 10^5$ b | |

∴ DNA byla amplifikována v různých PCR za vzniku produktů PCR různé intenzity, jež souvisely s citlivostí PCR.

7 DISKUZE

Význam prospěšných probiotických mikroorganismů byl dlouhou dobu opomíjen a hlavním zájmem byly patogenní mikroorganismy, jež jsou příčinou různých poruch trávicí soustavy. Je známo, že bakteriální aktivita v tlustém střevě člověka je zapojena do řady chorobných stavů [85]. Až během posledních let je značná pozornost věnována pozitivnímu vlivu bakterií na lidské zdraví. Prospěšné bakterie se snadno dostanou do zažívacího traktu potravou. Doplnky stravy jsou zvláštní kategorií potravin a jsou definovány Zákonem č. 110/1997 Sb. O potravinách a tabakových výrobcích a vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a obohacování potravin. Jde o potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu a jsou zdrojem vitaminů, minerálních látek nebo jiných látek s nutričním či fyziologickým účinkem a jsou určeny k přímé spotřebě v malých množstvích [13, 14]. Doplněk stravy není léčivo, léčivý přípravek či léčivá látka [47]. Probiotikům jako léčivům je však také věnována pozornost.

Pro kontrolu kvality výrobků je důležitá přesná identifikace probiotik. Molekulárně biologické metody jsou v posledních letech díky své rychlosti a přesnosti využívány k identifikaci bakterií stále častěji na úkor metod morfologických a fenotypových, jež jsou z hlediska taxonomie rodu *Lactobacillus* nespolehlivé [83, 82]. Z identifikačních molekulárně biologických metod byla v práci používána polymerázová řetězová reakce (PCR).

Práce byla zaměřena na identifikaci probiotických bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* a probiotického druhu *Lactobacillus acidophilus* deklarovaných na obalech doplňků stravy výrobcem pomocí DNA amplifikačních metod. Vybráno bylo sedm doplňků stravy z komerční sítě, konkrétně výrobky 1. APO – *Lactobacillus* 10+, 2. APO – *Lactobacillus* 10+, Probiotika, Laktobacily “5”, Acidophilus, 1. *Lactobacillus acidophilus* a 2. *Lactobacillus acidophilus*, jež byly podrobeny PCR specifických pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus*. Cílem práce bylo identifikovat probiotické bakterie v sedmi testovaných preparátech a srovnat s bakteriálním složením deklarovaným výrobcem na obale.

7.1 Izolace DNA z čisté bakteriální kultury pro pozitivní kontroly, zjištění citlivosti amplifikace

Bakteriální kultura kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T a z ní izolovaná a purifikovaná DNA metodou fenolové extrakce s následným přesrážením ethanolem byla používána jako pozitivní kontrola při práci s DNA izolovanou z komplexních matic. Dále sloužila ke stanovení citlivosti PCR - tedy minimálního množství DNA, které se amplifikuje v PCR za vzniku amplikonů, jež je možné detekovat na agarosovém gelu. Metoda fenolové extrakce je velmi náročná jak časově, tak pracovně, a používají se při jejím průběhu toxická rozpouštědla [78].

Spektrofotometricky byla zjištěna koncentrace a čistota izolované DNA změřením absorpance v rozsahu vlnových délek 220 - 320 nm [70]. Koncentrace izolované DNA byla 478 ng/μl.

Absorbance naměřená při vlnové délce 230 nm je menší než absorbance naměřená při vlnové délce 260 nm, což potvrzuje, že vzorek nebyl kontaminován fenolem. Poměr absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) je v rozmezí 1,8 až 2,0, vzorek je tedy dostatečně čistý a neobsahuje proteiny [78, 79]. Izolovaná DNA byla po fenolové extrakci naředěná na 15 ng/μl pro použití v PCR.

7.2 Stanovení citlivosti PCR s purifikovanou

Byla provedena PCR s různým množstvím (koncentrace desítkového ředění) purifikované DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T pro stanovení citlivosti amplifikace. V Tabulce 32 byla zvýrazněna všechna množství DNA amplifikovatelná v PCR specifických pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus* za vzniku produktů PCR dobře detekovatelných v agaróзовé gelové elektroforéze. Jednotlivé PCR se lišily ve své citlivosti. V PCR pro doménu *Bacteria* se amplifikoval detekovatelný ampikon i z 10 fg DNA (5 buněk), zatímco pro PCR rodu *Lactobacillus* bylo třeba 3 ng DNA. Toto množství lze přibližně vztáhnout na množství buněk $1,5 \cdot 10^6$.

7.3 Hrubé lyzáty buněk a izolace DNA z komplexních matric doplňků stravy

DNA ze sedmi reálných vzorků byla připravena dle optimalizovaných postupů. V šesti nezávislých opakováních bylo naváženo po 1 g prášku pro přípravu celkem šesti hrubých lyzátů buněk z každé komplexní matrice doplňku stravy pro porovnání množství DNA izolované z 300 μl hrubých lyzátů buněk připravených z 1 g prášku kapsle na 5 ml lyzačního roztoku. 1 g prášku je obsažen asi ve 3 – 4 kapslích, dohromady tedy bylo odebráno 18 – 24 kapslí z každého doplňku stravy. Použitím lysozymu a SDS detergentu byly porušeny stěny bakteriálních buněk a jejich membrán, čímž došlo k uvolnění buněčného obsahu [7]. Hrubé lyzáty sedmi vzorků připravené v 5 ml lyzačního roztoku byly podrobeny agaróзовé gelové elektroforéze. Bylo prokázáno, že buňky byly lyzovány a byla detekována přítomnost DNA, i když v některých vzorcích velmi slabě (výrobky Probiotika, Acidophilus a 2. Lactobacillus acidophilus).

Nutné bylo získat DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Z tohoto důvodu byla k izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk vybraných doplňků stravy použita metoda reverzibilní adsorpce DNA na pevné fázi s využitím povrchu hydrofilní magnetické neporézní mikročástice. Používán byl magnetický nosič P(HEMA-co-GMA) pokrytý karboxylovými skupinami. DNA byla izolována v přítomnosti PEG 6000 (16 %) a NaCl (2 M) [65]. DNA byla eluována v TE puftru. Izolaci DNA pomocí magnetického nosiče byla omezena kontaminace DNA inhibitory. Při identifikaci bakterií pomocí amplifikačních metod v reálných vzorcích je třeba kontrolovat vznik falešně negativních nebo pozitivních výsledků. Příčinou falešně pozitivního výsledku může být kontaminace exogenní DNA, protože PCR je metodou velmi citlivou [78]. Naopak příčinou falešně negativních výsledků může být právě přítomnost extracelulárních či intracelulárních inhibitorů ať už organické či anorganické povahy [59,79], jež následně

omezují účinnost DNA amplifikace [50].

7.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z komplexních matric doplňků stravy

Spektrofotometrickým měřením na přístroji NanoPhotometr byla zjištěna koncentrace a čistota izolované DNA změřením absorbancí v rozsahu vlnových délek 220 - 320 nm [70]. Koncentrace izolované DNA se pohybovala v rozmezí 8 – 64,5 ng/μl. Větší rozmezí koncentrací DNA mohlo být způsobeno nedokonalou lýzí buněčné stěny při izolaci DNA, protože buněčné stěny některých bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus* se obtížně lyzují [83], nebo přítomností inhibitorů.

Čistota DNA byla stanovena z poměru absorbancí při vlnových delkách 260 nm a 280 nm ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$). Nachází-li se výsledná hodnota v rozmezí 1,8 – 2,0, je DNA čistá a obvykle vhodná pro amplifikaci. Při poměru absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ menším než 1,8 je DNA kontaminovaná proteiny a naopak při poměru absorbancí větším než 2,0 obsahuje vzorek RNA [78, 79, 70]. DNA izolována pomocí magnetických nosičů bývá dostatečně čistá pro molekulárně biologické aplikace [81]. Významný vliv na výsledky PCR má i kvalita (relativní intaktnost) a kvantita izolované DNA [50]. Po změření koncentrace byla izolovaná DNA před použitím k amplifikacím v případě vyšších koncentrací naředěná na 15 ng/μl, protože větší množství DNA v PCR směsích vede k tvorbě nespecifických produktů [55].

7.5 PCR pro doménu *Bacteria* a ověření amplifikovatelnosti DNA

Pro ověření amplifikovatelnosti izolované DNA byly použity primery F-eub a R-eub specifické pro doménu *Bacteria*. Využitím agarózové gelové elektroforézy byly detekovány intenzivní specifické produkty PCR o velikosti 466 bp [22]. Spektrofotometricky naměřené koncentrace DNA izolované z doplňků stravy se pohybovaly v rozmezí 8 – 64,5 ng/μl. Množství izolované DNA, jež byla amplifikována v PCR, bylo asi 15 ng. Toto množství je dostačující, neboť v každém vzorku všech izolací se amplifikoval specifický produkt PCR velmi silné intenzity. Tím bylo potvrzeno, že DNA jak reálných vzorků izolovaná pomocí magnetického nosiče, tak DNA z čistého bakteriálního kmene izolovaná metodou fenolové extrakce je amplifikovatelná v PCR. DNA izolovaná ze všech reálných vzorků doplňků stravy obsahuje dostatečné množství bakteriální DNA.

7.6 Rodově specifická PCR pro rod *Lactobacillus*

DNA byla analyzována s využitím PCR specifické pro rod *Lactobacillus*. Pro rodové zařazení izolované DNA byly použity primery LblMA-1 a R16-1 specifické pro rod *Lactobacillus*. PCR směsi obsahovaly zhruba stejné množství DNA – 45 ng. Amplifikovaný produkt PCR byl detekovaný pomocí agarózové gelové elektroforézy s následným obarvením gelu ethidium bromidem. Byl detekován specifický produkt PCR o velikosti 250 bp [90] u šesti testovaných

doplňků stravy (1. APO – *Lactobacillus* 10+, 2. APO – *Lactobacillus* 10+, Laktobacily “5”, *Acidophilus*, 1. *Lactobacillus acidophilus* a 2. *Lactobacillus acidophilus*). Tímto byla potvrzena přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* v šesti výrobcích, kde jde o soulad s údaji deklarovanými na obalu.

U produktu Probiotika nebyla přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* za daných experimentálních podmínek prokázána. Nejnižší množství DNA rodu *Lactobacillus*, jež je možné detekovat v PCR, jsou 3 ng ($1,5 \cdot 10^6$ buněk). Je pravděpodobné, že v analyzovaném množství tohoto výrobku je méně než $1,5 \cdot 10^6$ buněk. Souvisí to s nízkou citlivostí PCR pro rod *Lactobacillus*. Výrobce u svého produktu Probiotika totiž kromě *Lactobacillus acidophilus* deklaruje i výskyt jiných probiotických bakterií (*Bifidobacterium bifidum* a *Enterococcus faecum*) v celkovém deklarovaném množství 100 mg.

7.7 Druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Pro konečnou identifikaci byla použita druhově specifická PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Proběhla s druhově specifickými primery Aci 16SI a 16SII. Primery byly navrženy Tilsala-Timisjavi a spol. [90]. PCR směsi obsahovaly zhruba stejné množství DNA – 45 ng. Produkt PCR o velikosti 800 bp byl detekován ve všech vzorcích, avšak při různých izolacích v různých intenzitách. Druh *Lactobacillus acidophilus* byl prokázán ve všech sedmi doplňcích stravy (1. APO – *Lactobacillus* 10+, 2. APO – *Lactobacillus* 10+, Probiotika, Laktobacily “5”, *Acidophilus*, 1. *Lactobacillus acidophilus* a 2. *Lactobacillus acidophilus*). Tím se prokázalo, že výrobek Probiotika obsahoval buňky rodu *Lactobacillus*, a že výše uvedené problémy byly způsobeny nízkou citlivostí PCR pro rod *Lactobacillus*. Podařilo se prokázat druh *Lactobacillus acidophilus* ve všech testovaných výrobcích.

7.8 Souhrn výsledků PCR v rámci jednotlivých izolací

V souladu s deklarovaným složením uváženým výrobcem na obalech produktů byly analyzovány doplňky stravy - 1. APO – *Lactobacillus* 10+, 2. APO – *Lactobacillus* 10+, Probiotika, Laktobacily “5”, *Acidophilus*, 1. *Lactobacillus acidophilus* a 2. *Lactobacillus acidophilus* na přítomnost BMK rodu *Lactobacillus* a druhu *Lactobacillus acidophilus*. U všech sedmi výrobků byl deklarovaný druh *Lactobacillus acidophilus* potvrzen. U jednoho výrobku (Probiotika) nebyl potvrzen deklarovaný rod *Lactobacillus*. Musí tam však být, jelikož byl u tohoto výrobku prokázán druh *Lactobacillus acidophilus*. Souvisí to s citlivostí PCR.

Přítomnost deklarovaných probiotických BMK rodu *Lactobacillus* a druhu *Lactobacillus acidophilus* nebyla prokázána ve všech nezávislých izolacích. Specifické produkty PCR z probiotických preparátů pro rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus* byly amplifikovány v každé ze šesti nezávislých izolací ve velmi rozdílných intenzitách nebo nebyly detekovány vůbec. Je tak pravděpodobné, že množství DNA izolované z 300 μ l hrubých lyzátů buněk připravených z 1 g prášku kapsle na 5 ml lyzačního roztoku, se liší. Může to být rovněž zapříčiněné tím, že se při izolaci magnetickým nosičem odseparovalo

velmi malé množství DNA. Jednou z příčin může být i technologie výroby. Bakteriální složení výrobků je vícedruhové. V 1 g některých výrobků má druh *Lactobacillus acidophilus* zastoupení pouze 5 %. Množství cílové DNA tak nebylo někdy ani detekovatelné. Shrnutí detekce jednotlivých výrobků v šesti izolacích, včetně nejnižšího množství DNA, které se amplifikuje v PCR za vzniku produktů PCR, je uvedeno v kapitole 6.8 v Tabulkách 33 - 39.

Analýza doplňků stravy v šesti opakováních prokázala, že množství a zastoupení bakteriálních druhů je v souladu s informací uvedené na obalu produktu [64]. V dnešní době je komerčně dostupné nepřeborné množství doplňků stravy a ve prospěch konzumentů je nutné odhalit takové doplňky, jejichž kvalita nesahá na požadovanou úroveň [44]. V Londýně testovali nejmenované doplňky stravy a zjistili, že u některých z nich je nesprávně popsáno bakteriální složení výrobku na obale, některé doplňky stravy obsahovaly výrazně nižší množství bakteriálního kmene, než bylo deklarováno, a na druhou stranu jiné zase obsahovaly bakteriální kmeny, jež nebyly výrobcem deklarovány [23]. V jiné belgické studii prokázali neshodu identifikovaných bakteriálních kmenů s deklarovaným složením u 47 % testovaných doplňků stravy [82]. Použité metody identifikace zatím nejsou dostatečně robustní pro rutinní využití. Experimenty na důkaz bakteriálních rodů a druhů v doplňcích stravy pomocí specifických PCR je žádoucí dále optimalizovat. Například navrhnout nové primery, použít jinou účinnější polymerázu nebo ji aplikovat ve větším množství. Klíčové je použití metod PCR, které umožňují detekovat amplikony po amplifikaci DNA z malého počtu buněk, tzn. použít dostatečně citlivé PCR.

8 ZÁVĚR

1. Specifické produkty PCR z probiotických preparátů pro rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus acidophilus* byly amplifikovány v každé ze šesti nezávislých izolací ve velmi rozdílných intenzitách nebo nebyly detekovány vůbec.
2. Množství DNA izolované z 300 µl hrubých lyzátů buněk (1 g prášku kapsle na 5 ml lyzačního roztoku) připravených v šesti nezávislých opakováních se lišilo.
3. DNA byla amplifikovatelná v PCR s různou intenzitou, která závisela na citlivosti PCR:
 - DNA domény *Bacteria* byla prokázána u všech výrobků v každém ze šesti nezávislých opakování.
 - DNA rodu *Lactobacillus* byla detekována u všech výrobků, ale ne ve všech šesti nezávislých opakováních. Výjimkou byl výrobek Probiotika, kde nebyla DNA rodu *Lactobacillus* detekována vůbec.
 - DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* byla detekována u všech výrobků, ale ne ve všech šesti nezávislých opakováních.
4. Byla prokázána shoda s údaji deklarovanými výrobcí.
5. Použitá metoda identifikace zatím není dostatečně robustní pro rutinní využití.

9 SEZNAM LITERATURY

1. ADAMS, M. R. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 1999, Vol. 68, pp. 171-178.
2. *Bacteria can drive the evolution of new species* [online]. [cit 2012-04-15]. Nature. Dostupné z WWW: <<http://www.nature.com/news/2010/101101/full/news.2010.575.html>>
3. BALOGOVÁ, P. *Izolace a identifikace DNA probiotických bakterií v komplexních matricích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 96 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
4. BARRONS, R., TASSONE, D. Use of Lactobacillus Probiotics for Bacterial Genitourinary Infections in Women: A Review. *Clinical Therapeutics*. 2008, Vol. 30, No. 3.
5. BERNARDEAU, M., GUEGUEN, M., VERNOUX, J. P. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006, Vol. 30, pp. 487 – 513.
6. BONCZEK, O. *Izolace DNA z probiotických výrobků s využitím pevných nosičů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 79 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
7. BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
8. BRUCE, A., BRAY, D., JOHNSON, A., et al. *Základy buněčné biologie*. Ústí n. Labem: Esperopublish, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.
9. CHANE, S., ZHANG, Z. Encapsulation of probiotic bacteria Lactobacillus acidophilus by direct compression. *Instit. Chem. Engin*, 2002. pp. 78 - 82.
10. COMMANE, D., HUGHES, R., SHORT, C. et al. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research*, 2005, Vol. 591, pp. 276 - 289.
11. DEL PIANO, M., MORELLI, L., STROZZI, G. P. et al. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 2006, pp. 248 - 255.
12. *DNA polymerázy* [cit 2012-04-15]. Top-Bio. Dostupné z WWW: <<http://www.top-bio.cz/>>
13. *Doplněk stravy* [online]. [cit 2012-04-15]. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Dostupné z WWW: <<http://www.mzd.cz/Verejne/Default.aspx>>
14. *Doplněk stravy* [online]. [cit 2012-04-15]. SZPI. Dostupné z WWW:

<www.szpi.gov.cz/ViewFile.aspx?docid=1005977>

15. DUBERNET, S., DESMASURES, N., GUÉGUEN, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, Vol. 214, pp. 271 - 275.
16. *Elektroforetická vana pro agarózovou gelovou elektroforézu* [online]. [cit 2012-04-15]. Biologie UPOL. Dostupné z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Elektroforetická%20vana.htm>>
17. ERKKILA, S., PETAJA, E. Screening of commercial meat starter strains at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Eur. J. Food Microbiol.* 2000, Vol. 55, pp. 297 - 300.
18. FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 1999, pp. 365 - 378.
19. GIRAFFA, G., CHANISHVILI, N., WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*. 2010, Vol. 161, pp. 480-487.
20. GISMONDO, M. R., DRAGO, L., LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1999, Vol. 12, pp. 287-292.
21. GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia potravín: princípy mikrobiológie potravín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané potravinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
22. HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR analysis of fecal Lactobacillus species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and environmental microbiology*. 2006, Vol. 72, pp. 2359-2365.
23. HAMILTON-MILLER, J. M. T., SHAH, S., WINKLER, J. T. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutrition*. 1999, Vol. 2, pp. 223 - 229.
24. HORÁK, D., BABIČ, M., MACKOVÁ, H. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *J. Sep. Sci.* 2007, Vol. 30, pp. 1751 - 1772.
25. HUDECOVÁ, D., MAJTÁN, V. *Mikrobiológia 1*, 1. vyd. Bratislava: STU, 2002. 189 s. ISBN 80- 227-1663-4.
26. JEHRESIS, G., VOGELSANG, H., KIESSLING, G., ET AL. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Resear. Internat.* 2002, pp. 133 - 138.

27. KLABAN, V. *Svět mikrobů - Malý mikrobiologický slovník*. 1. vydání. Hradec Králové: Gaudeamus, 1999, 303 s. ISBN 80-7041-639-4.
28. KLAYRAUNG, S., VIERNSTEIN, H., SIRIPORN, O. Development of tablets containing probiotics: Effect of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, Vol. 370, pp. 54-60.
29. KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., ET AL. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, Vol. 41, pp. 103-125.
30. KLESNILOVÁ, L. *Bakterie mléčného kvašení s probiotickými vlastnostmi a jejich identifikace*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, Fakulta přírodovědecká, 2003.
31. KLINGDBERG, T. D., AXELSSON, L., NATERSTAD, K. ET AL. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *Int. J. Food Microbio*. 2005, pp. 419 - 431.
32. KOČÁREK, E. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007. 218 s. ISBN 978 -80-7013-450-4.
33. KRÁLOVÁ, B., FUKAL, L., RAUCH, P., A KOL. *Bioanalytické metody*. 3. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. 254 s. ISBN 978-807080-449-3.
34. KŘÍŽOVÁ, J., ŠPÁNOVÁ, A., RITTICH, B. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1064, No. 2, 2005, pp. 247 – 253.
35. KUČHTA, M., PRUTINEC, P., A KOL. *Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne*. 1.vyd. Bratislava: Bonus CCS s.r.o., 2006. 163 s. ISBN 80-968491-7-4.
36. *Lactobacillus acidophilus* [online]. [cit 2012-04-15]. Biokult. Dostupné z WWW: <<http://biokult.org/page/2/>>
37. *Lactobacillus brevis* [online]. [cit 2012-04-15]. Microbe Wiki. Dostupné z WWW: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_brevis>
38. *Lactobacillus fermentum* [online]. [cit 2012-04-15]. Science photo. Dostupné z WWW: <<http://www.sciencephoto.com/media/12124/enlarge>>
39. *Lactobacillus Salivarius Bacteria* [online]. [cit 2012-04-15]. Science Photo. Dostupné z WWW: <<http://www.sciencephoto.com/media/12221/enlarge>>
40. LEE, Y. K., SALMEN, S. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd edition. New Jersey: John Wiley Sons, 2009. 595 s. ISBN 978-0-470-13544-0.
41. LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 2004, Vol. 15, pp.

67-78.

42. LJUNGH, Ä., WADSTRÖM, T., ET AL. *Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics*. Norfolk: Caister Academic Press, 2009, 205 s. ISBN 978-1-904455-41-7.
43. MACH, I. *Doplňky stravy*. 1. vyd. Praha: Svoboda Servis, 2004. 157 s. ISBN 80-86320-34-0.
44. MARTEAU, P., SEKSIK, P. Place des probiotiques dans la prévention et le □traitement des diarrhées post-antibiotiques. *Revue Française des Laboratoires*. 2004, pp. 73-76.
45. MARTEAU, P., SEKSIK, P., JIAN, R. Probiotics and health: new facts and ideas. □*Current opinion in Biotechnology*. 2002, Vol. 13, pp. 486 - 489.
46. MERK, K., BORELLI, C., KORTING, H. CH. Lactobacilli-bacteria-host interactions with special regard to the urogenital tract. *International Journal of Medical Microbiology*. 2005, Vol. 295, pp. 9-18.
47. MICHAELOVÁ, I. *Doplňky stravy (Potraviny k doplnění jídelníčku)*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, o.s. 2007. 35 s. ISBN 978-80-903930-1-1.
48. MOGENSEN, G. Realities and trends in probiotic attributes of lactic acid bacteria and □their market impact. *Pres. Univ. Caen. Lact. acid bact.* 1995, pp. 175 - 185.
49. MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., ET AL. *Harperova biochemie*. 4. české vyd. Nakladatelství H+H. 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
50. NAGY, B., BAN, Z., PAPP, Z. The DNA isolation method has effect on allele drop-out and on the results of fluorescent PCR and DNA fragment analysis. *Clinica Chimica Acta*. 2005, Vol. 360, pp. 128 - 132.
51. O'BRIEN, J., CRITTENDER, R., OUWEHAND, A. C. Safety evaluation of probiotic. *Tr. Food Scie. Technol.* 1999. pp. 418 - 424.
52. OUWEHAND, A. C., SALMINEM, S., ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effect. *Antonie van Leewenhoek*. 2002, Vol. 82, pp. 279 - 289.
53. PAPAMANOLI, E., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Characterisation of lactic acid bacteria isolated a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Scien.* 2003, pp. 859 - 867.
54. *PCR* [online]. [cit 2012-04-15]. DNA Learning Centre. Dostupné z WWW: <<http://www.dnalc.org/resources/animations/pcr.html>>
55. *PCR* [online]. [cit 2012-04-15]. PCR Station. Dostupné z WWW: <www.pcrstation.com>

56. PETROVÁ, K. Identifikace bakterií mléčného kvašení (BMK) v mléčných výrobcích s využitím metod amplifikace DNA. Brno: Masarykova univerzita v Brně, Fakulta přírodovědecká, 2004.
57. PFEILER, E. A., KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*. 2007, Vol. 15, No. 12, pp. 546 – 553.
58. POT, B., TSAKALIDOU, E. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. In: LJUNGH, Ä., WADSTRÖM, T., ET AL. *Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics*. Norfolk: Caister Academic Press, 2009, pp. 3 – 58. ISBN 978-1-904455-41-7.
59. PRODĚLALOVÁ, J., RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. *Journal of Chromatography A*. 2004, Vol. 1056, pp. 43 – 48.
60. RADA, V. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Medicina pro praxi*. 2011, Č. 8, str. 10 - 15.
61. RAINBOW, P. *Making PCR: A Story of Biotechnology*. Chicago: The University of Chicago, Press. 1996. 191 pp. ISBN 0-226-70147-6.
62. RIEGELOVÁ, K. *Molekulární identifikace vybraných druhů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií v doplňcích stravy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 73 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
63. RITICH, B., ŠPANOVÁ, A., HORÁK, D. Functionalised magnetic microspheres with hydrophilic properties for molecular diagnostic applications. *Food Research International*. 2009, Vol. 42, pp. 493 – 498.
64. RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A., HORÁK, D. Carboxyl-functionalized magnetic carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *J. Magn. Mat.* 2007, Vol. 311, pp. 247-254.
65. RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A., HORÁK, D., ET AL. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, Vol. 52, pp. 143 – 148.
66. ROGINSKI, H., FUQUAY, J. W., FOX, P. F. *Encyklopedia of dairy sciences*. Acad. Els. Scien. Ltd. 2003, ISBN: 978-0-12-227235-6.
67. ŠAFAŘÍK, I., ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Use of magnetic technique for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*. 1999, Vol. 722, pp. 33 – 53.
68. SAIYED, M. Z., RAMCHAND, C. N., TEALANG, S. D. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2008, Vol. 20, No. 20, 5 pp.

69. SALMINEM, S., DEIGHTON, M. A., GORBACH, S. *Lactic acid bacteria in health and disease*. In: SALMINEM, S., VON WRIGHT, A., ET AL. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker Inc. 1993, pp. 199 – 225.
70. SAMBROOK J., RUSSEL D.W. *Molecular cloning: A laboratory manual (II)*, 3rd ed. New York: Cold Spring Laboratory Harbor Press, 2001.
71. SANDERS, M. E. Consideration for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health. *The Journal of Nutrition*. 2000, Vol. 130, pp. 384 – 390.
72. SCHLEZENMEIR, J., DE VRESE, M. Probiotic, prebiotic and symbiotic-approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, pp. 361 - 364.
73. SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
74. SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 2007, Vol. 17, pp. 1262-1277.
75. ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
76. SIRÓ, I., KÁPOLNA, E., KÁPOLNA, B. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*. 2008, Vol. 51, pp. 456 – 467
77. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., A KOL. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
78. 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.
79. ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B., KARPIŠKOVÁ, R., ET AL. PCR identification of salmonella cells in food and stool samples after immunomagnetic separation. *Bioseparation*. 2001, Vol. 9, pp. 379-384.
80. Studijní materiál, PCR, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Biochemie II – seminář, 2008.
81. TEMMERMAN, R., POT, B., HUYS, G., ET AL. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, Vol. 81, pp. 1-10.
82. TEMMERMAN, R., SCHEIRLINCK, I., HUYS, G. Culture – Independent Analysis of Probiotic Products by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, Vol. 69, No. 1, pp. 220-226.
83. TURKOVÁ, K. *Využití metod amplifikace DNA při identifikaci bakterií rodu*

- Lactobacillus*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2009. 106 s.
84. VAUGHAN, E. E., HEILIG, H., BEN-AMOR, K. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, Vol. 29, pp. 477-490.
85. VERNAZZA, C.L., RABIU, B.A., GIBSON, G.R. Human Colonic Microbiology and the Role of Dietary Intervention: Introduction to Prebiotics. *Prebiotics: Development and Application*. 2006, John Wiley & Sons. Ltd. pp. 1-28.
86. VESELÁ, M. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 2004, 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
87. VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*, 2. opravené vyd. Praha: Academia, 2002, dotisk 2007, 192 s. ISBN 80-200-0439-4.
88. VOKURKA, M., HUGO, J. *Velký lékařský slovník*. 6. aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2006, 1017 s. ISBN 80-7345-105-0.
89. VOLTAVA, M., A KOL. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
90. WALTER, J., TANNOCK, G. W., TILSALA-TIMISJARVI, A. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, Vol. 66, pp. 297 - 303.
91. ZOVČÁKOVÁ, M. *Identifikace probiotických bakterií ve farmakách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 66 s.

10 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------------------------|---|
| BMK | Bakterie mléčného kvašení |
| bp | pár bazí (base pair) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | deoxyribonukleosidtrifosfát |
| EDTA | ethylendiaminotetraoctová kyselina |
| EtBr | ethidium bromid |
| FCH | Fakulta chemická |
| GRAS | všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognized as Safe) |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce |
| P(HEMA- <i>co</i> -GMA) | poly(2-hydroxyethyl methakrylát- <i>co</i> -glycidyl methakrylát) |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| TBE | Tris – borát – EDTA |
| TE | Tris - EDTA |