



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ METODY PCR-HRM ANALÝZY PRO IDENTIFIKACI BAKTERIÍ V POTRAVINÁCH A DOPLŇCÍCH STRAVY

APPLICATION OF THE METHOD PCR-HRM ANALYSIS TO IDENTIFY BACTERIA IN FOODS AND FOOD SUPPLEMENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Alice Šurková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1038/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Alice Šurková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Využití metody PCR-HRM analýzy pro identifikaci bakterií v potravinách a doplňcích stravy

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše zabývající se využitím metody polymerázové řetězové reakce v reálném čase v kombinaci s analýzou křivek tání s vysokým rozlišením (PCR-HRM) v potravinářství.
2. Demonstrace použití metody na vybraném vzorku potravin.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

Alice Šurková
Student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Teoretická část práce se věnuje potravinám a potravinovým doplňkům s obsahem mikroorganismů, především bakterií. Dále pojednává o metodách identifikace těchto bakterií, především o polymerázové řetězové reakci (PCR). Zahrnuje také PCR v reálném čase a zvláštní pozornost je věnována vysokorozlišovací analýze křivky tání (HRM).

V experimentální části byla z vybraného probiotického výrobku izolována DNA pomocí magnetických mikročastic. Byla stanovena její koncentrace a dále byla podrobena PCR s následnou detekcí agarózovou gelovou elektroforézou. Pro upřesnění výsledků byla provedena také HRM analýza.

ABSTRACT

Theoretical part of the thesis was focused on foods and food supplements containing microorganisms, especially bacteria. Furthermore, the thesis deals with methods for identification of the bacteria, primarily polymerase chain reaction (PCR). The thesis also includes real-time PCR and is specially focused on high resolution melting analysis (HRM).

During the experimental part, the DNA sample was isolated from a chosen probiotics product using magnetic microparticles. The concentration of the DNA sample was determinate and DNA was subjected to PCR with subsequent detection PCR products by agarose gel electrophoresis. To the results specify HRM analysis was then performed.

KLÍČOVÁ SLOVA

PCR, PCR v reálném čase, HRM analýza, amplifikace DNA, izolace DNA, identifikace bakterií v potravinářství

KEYWORDS

PCR, real-time PCR, HRM analysis, DNA amplification, DNA isolation, bacteria identification in food-processing industry

ŠURKOVÁ, A. *Využití metody PCR-HRM analýzy pro identifikaci bakterií v potravinách a doplňcích stravy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí Ing. Štěpánce Trachtové, PhD., za trpělivost, čas, který mi věnovala, předané vědomosti a zkušenosti. Dále bych chtěla poděkovat svým přátelům a rodině za psychickou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Potraviny a potravinové doplňky s obsahem mikroorganismů	8
2.1.1	Zdraví prospěšné mikroorganismy	8
2.1.2	Nežádoucí mikroorganismy v potravinách	10
2.2	Metody stanovení mikroorganismů v potravinách	10
2.2.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	11
2.2.2	PCR v reálném čase.....	13
2.2.3	Vysokorozlišovací analýza křivky tání (HRM)	14
3	CÍLE PRÁCE	18
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1	Materiál.....	19
4.1.1	Vzorek potravinového doplňku s probiotickými kulturami	19
4.1.2	Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly	19
4.1.3	Chemikálie	19
4.1.4	Roztoky	19
4.1.5	Magnetické nosiče	20
4.1.6	Komponenty pro PCR	20
4.1.7	Pomůcky a přístroje.....	20
4.2	Metody.....	21
4.2.1	Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk.....	21
4.2.2	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročástic	21
4.2.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	21
4.2.4	Konvenční PCR.....	22
4.2.5	Agarózová gelová elektroforéza.....	23
4.2.6	PCR-HRM.....	24
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	26
5.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	26
5.2	Důkaz přítomnosti DNA domény <i>Bacteria</i> pomocí konvenční PCR.....	26
5.3	Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> pomocí konvenční PCR	28
5.4	Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> pomocí konvenční PCR....	29
5.5	PCR-HRM	30
5.5.1	PCR-HRM za použití primerů V1-F, V1-R	30

5.5.2	PCR-HRM za použití primerů V3-F, V3-R	33
5.5.3	PCR-HRM za použití primerů P1V1, P2V1	35
6	ZÁVĚR.....	37
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	38
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	41

1 ÚVOD

V moderní době, kdy je všude potravy dostatek, hojně narůstají požadavky na její kvalitu a na trhu vládne souboj prodejců o nejlepší poměr ceny a kvality. Vzhledem k tomu, že potrava tvoří náš zásadní energetický příjem a do jisté míry nás utváří, je vhodné věnovat pozornost tomu, co vlastně jíme.

Kromě vizuální detekce a kontroly složení pomocí informací na obale je však dobré vědět, zda potrava neobsahuje i další složky v podobě mikroorganismů. Ať už se jedná o ty nežádoucí, nebo naopak ty s pozitivním účinkem na lidské zdraví, jejichž přítomnost je v některých potravinách vyžadována.

K posouzení mikrobiologického obsahu potravin by měly být používány metody co nejnávýspěšší, schopné detekovat i malé množství mikroorganismů, a zabránit tak třeba kontaminaci potravy patogenními mikroorganismy. Zároveň by u takové metody měl být kladen důraz na jednoduchost a rychlost z důvodu možnosti otestování co největšího množství vzorků v co nejkratším čase a nejlépe i za co nejméně peněz.

Mikrobiologické analýze potravin jistě v posledních letech byla velkým přínosem metoda polymerázové řetězové reakce, jež umožnila namnožení úseku DNA bez nutnosti zdlouhavé kultivace mikroorganismů, a to i z malého množství templátové DNA. Po tomto objevu následovala PCR v reálném čase. Tím došlo opět k urychlení procesu analýzy, protože již nebylo nutné elektroforetické vyhodnocování.

Vedle vývinu PCR v reálném čase se vyvíjejí i nové metody detekce produktu, jež by mohly ještě zvýšit její přesnost a účinnost. Takovou metodou by mohla být i vysokorozlišovací analýza křivky tání. Její výhodou by měla být právě vysoká citlivost a rychlost detekce. Samozřejmě každá metoda s sebou kromě výhod přináší i jistá úskalí. Záleží na jejím využití pro konkrétní případy a zhodnocení, zda výhody předčí nevýhody.

Vysokorozlišovací analýza křivky tání skrývá velký potenciál pro identifikaci bakterií v potravinách. Aktuálně může zvýšit komfort a kvalitu mikrobiologické analýzy potravin a do budoucna posloužit třeba jako inspirace k vývoji nové metody.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Potraviny a potravinové doplňky s obsahem mikroorganismů

Potraviny a potravinové doplňky konzumované v dnešní době nejsou, navzdory přísným hygienickým opatřením, ani zdaleka sterilní. Většinou obsahují rozsáhlá společenství mikroorganismů, které však nemusí nutně znamenat závadnost potravin, ba naopak, u některých výrobků jsou dokonce žádoucí a mají pozitivní vliv na lidské zdraví. Jiné potraviny s sebou přinášejí mikroorganismy, které nám sice neublíží, ale nevykazují žádný pozitivní účinek na lidské zdraví. Jsou to mikroorganismy pocházející z přirozeného prostředí, v němž se původně potravina nacházela, nebo se může jednat o přirozenou mikroflóru konzumovaných živočichů.

Výskyt mikroorganismů je samozřejmě z důvodu bezpečnosti ošetřen legislativně, konkrétně nařízením EU o mikrobiologické bezpečnosti potravin č. 2073/2005. Základní myšlenkou tohoto nařízení, které zahrnuje pouze ty mikroorganismy, u kterých je dokladováno reálné nebezpečí s ohledem na jejich výskyt a rozšíření, je, že potraviny nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví. Hlavní odpovědnost za plnění tohoto nařízení leží na provozovateli potravinářských zařízení – výrobcích potravin [1].

2.1.1 Zdraví prospěšné mikroorganismy

Kromě bakterií vykazujících především probiotické účinky jsou součástí některých potravin také plísně nebo kvasinky, jež jsou u daných výrobků nedílnou součástí výrobního procesu a nakonec i výrobku samotného.

Takto užívaným mikroorganismům byl udělen americký status GRAS (generally recognized as safe), což svědčí o jejich zdravotní nezávadnosti při konzumaci. Jedná se například o ušlechtilé plísně u plísňových sýrů, nebo u fermentovaných masných výrobků. Zástupcem těchto plísní je *Penicillium roqueforti*, plíseň používaná při zrání plísňových sýrů [2].

Zdravotně nezávadné jsou i mikroorganismy mající především biotechnologický význam, jsou tedy nezbytné pro proces výroby, i když ve výrobku samotném se nakonec nachází v podstatně menší míře, z důvodu jejich odstranění pro další využití. Mezi tyto mikroorganismy patří kvasinka *Sacharomyces cerevisiae*, nepostradatelná při výrobě piva, vína i lihu.

Tato kvasinka je využívána i pro výrobu droždí. To obsahuje velké množství zdraví prospěšných látek, kromě aminokyselin, proteinů a minerálů jsou to především vitaminy skupiny B [3].

I bakterie mají kromě probiotických účinků svůj technologický význam, a to třeba při výrobě octu, při jehož produkci je využívána bakterie *Acetobacter aceti* [4].

2.1.1.1 Potraviny s obsahem probiotik

Mikroorganismy s pozitivním účinkem na lidské zdraví jsou bezesporu probiotické mikroorganismy, neboli probiotika. Napomáhají obnovovat a udržovat přirozenou mikroflóru nejen trávicího traktu, ale i sliznic nebo dutiny ústní [5]. Řadí se mezi ně fermentované výrobky s přídavkem živých bakterií (rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*), které pozitivně ovlivňují zdraví člověka zlepšením mikrobiální rovnováhy trávicí soustavy [6]. Aby mohly být mikroorganismy označovány jako probiotické, musí vykazovat jisté vlastnosti. Nejdůležitější takovou vlastností je jejich pozitivní vliv na lidský organismus bez negativních vedlejších účinků [7]. Pro pozitivní účinek na zažívací trakt je nezbytné, aby

byly mikroorganismy životaschopné po dobu skladování výrobku a přežily při průchodu trávicí trubici, kde musí být schopny pomnožit se a kolonizovat zažívací trakt [5].

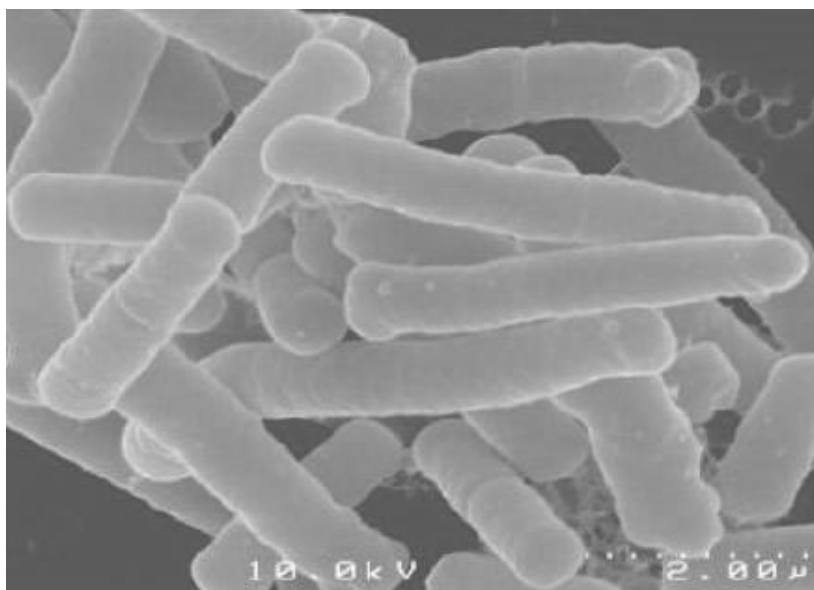
Pozitivních účinků probiotik na lidský organismus je hned několik. Zlepšením stavu střevní mikroflóry dochází k posílení imunity, snížení hladiny cholesterolu a omezení působení patogenů vyskytujících se ve střevech. U lidí s intolerancí na laktózu došlo při pravidelné konzumaci probiotik dokonce k umírnění symptomů této intolerance [8].

Jak již bylo řečeno, probiotika se vyskytují převážně ve fermentovaných mléčných výrobcích, jako je jogurt, kefir, acidofilní mléko a sýry. Za probiotické účinky těchto potravin vděčíme bakteriím mléčného kvašení. Do mléčných výrobků se přidávají z probiotických přípravků, jež se nejčastěji prodávají v kombinaci *Lactobacillus species* nebo *Bifidobacterium species*. Samozřejmě vícedruhové probiotické přípravky mohou mít za následek větší účinnost, jelikož vykazují aditivní účinky [9].

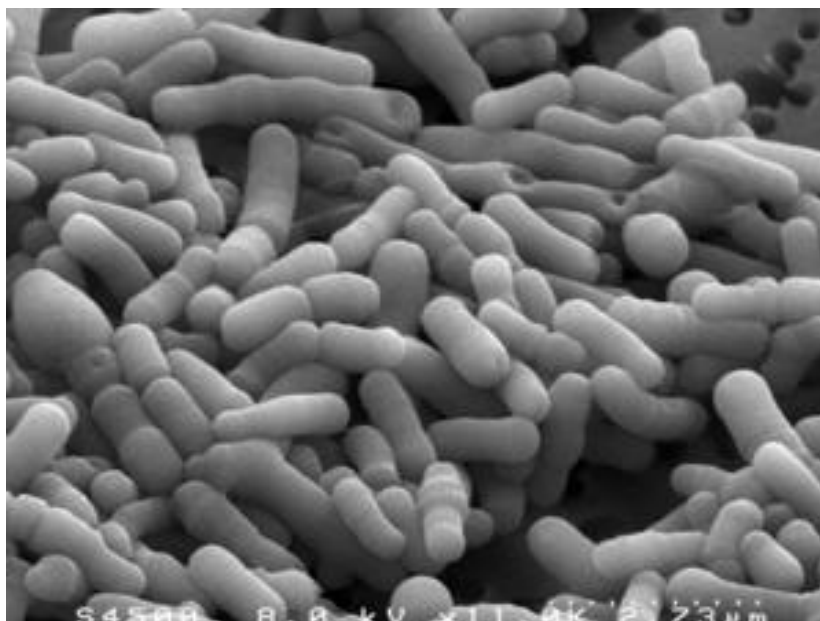
Kromě notoricky známých mléčných výrobků můžeme probiotické mikroorganismy nalézt také ve fermentovaných masných výrobcích, jež jsou také výsledkem mléčného kvašení. Dominantní postavení při fermentaci masných výrobků drží bakterie *Lactobacillus sake* a *Lactobacillus curvatus* [10]. U těchto produktů je však potřeba zvážit jejich pozitivní probiotický vliv na zdraví v porovnání s vlivem ostatních složek, jako je vysoký obsah tuku a soli.

Na druhou stranu více kladných účinků na zdraví má fermentovaná zelenina, v Evropě rozšířená je například fermentované zelí, dále třeba okurky nebo olivy. Pro fermentaci se používá zelenina pasterovaná, tedy zbavená všech mikroorganismů, během fermentace je pak obohacena o kultury *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus casei* a další [10].

Vyjma potravin majících kromě probiotických účinků i výživovou hodnotu mohou být při akutním nedostatku některých mikroorganismů užívány probiotické doplňky stravy. Ty obsahují velmi specifickou kombinaci mikroorganismů pro řešení konkrétních potíží. Lze je užívat například při nutnosti konzumace antibiotik pro obnovu přirozené mikroflóry nebo pro řešení akutních zánětlivých střevních potíží. Konkrétně pro tyto účely jsou používány probiotika s obsahem kultur *Lactobacillus acidophilus* (obrázek 1) a *Bifidobacterium animalis* (obrázek 2).



Obrázek 1: *Lactobacillus acidophilus* [11]



Obrázek 2: *Bifidobacterium animalis* [12]

2.1.2 Nežádoucí mikroorganismy v potravinách

Kromě mikroorganismů, které jsou pro lidské tělo prospěšné, se v potravinách mohou vyskytnout i mikroorganismy nežádoucí. Takovéto mikroorganismy se nazývají patogenní a způsobují různé infekce. Jejich přítomnost je způsobena špatným uskladněním produktu, nedostatečnou úpravou nebo ne zcela aseptickým zacházením. V případě, kdy nákaza potravy vznikla použitím již nemocných zvířat nebo produktů z nich, mluvíme o primární nákaze. Pokud k nákaze došlo až při přípravě, úpravě či uskladnění výrobků, jedná se o nákazu sekundární.

Nejčastější příčinou bakteriálních onemocnění z potravy jsou bakterie rodu *Salmonella* způsobující salmonelózu. Zdrojem bakterií je výhradně potrava živočišného původu, lze je však úspěšně zlikvidovat varem. Samotná nemoc se pak projevuje zvýšenou teplotou, průjmami a zvracením.

Velmi nebezpečnou může být nákaza bakteriemi *Clostridium botulinum*, jejíž přenos nastává při konzumaci konzervovaných potravin s nedostatečnou tepelnou úpravou. Těmito bakteriemi způsobená nemoc se nazývá botulismus, a mezi její příznaky patří bolesti hlavy, zvracení, obtíže při mluvení a polykání. Prevencí přenosu bakterií je dodržení technologického postupu při výrobě konzerv, a jejich správné uskladnění.

I kvůli patogenním mikroorganismům je potřeba co nejpřesnějších metod stanovení mikroorganismů, pro zajištění bezpečných potravin spotřebitelům.

2.2 Metody stanovení mikroorganismů v potravinách

Mikrobiologická analýza má při výrobě potravin velmi významnou roli. Mikroorganismy v potravinách nemusí být pouze nežádoucí, ale naopak i nezbytné při zpracování potravin, jako třeba při výrobě fermentovaných výrobků. Se vzrůstajícími požadavky na produkci bezpečných a kvalitních potravin vzrůstá i potřeba jednoduché, rychlé a spolehlivé detekce mikroorganismů [13].

- V hojně míře využívaným postupem především pro svou finanční nenáročnost je metoda kultivační. Spočívá v klasickém umístění analyzovaného vzorku na živné

médium a následné kultivaci. Výhodou metody je jednoduchost a možnost kvantitativního i kvalitativního stanovení. Nevýhodou je časová náročnost, detekce růstu vizuálně a někdy nezbytná kultivace i v několika živných médiích, zejména u patogenních mikroorganismů, což má za následek také vysokou pracnost [13]. Při kultivační metodě lze s výhodou použít chromogenní média. Ta dokážou rozlišit mikroorganismy nejen na úrovni rodů, ale i na úrovni druhů na základě specifické reakce se složkami média, která má za následek specifické zbarvení kolonií [14].

- Další významnou skupinou metod pro mikrobiální analýzu potravin jsou metody imunochemické, někdy také označovány jako imunologické. U těchto metod je k detekci využívána reakce mezi protilátkou a antigenem [14]. Antigen je molekula vyvolávající v živých organismech produkci specifických látek. Při analýze mohou jako antigen sloužit specifické části cílového mikroorganismu. Protilátky jsou proteiny produkované B-lymfocyty živočichů po jejich infekci cizí molekulou nebo mikroorganismem [13]. Tyto metody jsou užitečné zejména pro stanovení patogenních mikroorganismů nebo některých toxinů a mají řadu výhod, jako je specifita, rychlost, jednoduchost a nenáročnost na laboratorní vybavení. I tyto metody však mají svá úskalí, jako je doprovodná mikroflóra, která může inhibovat růst sledovaného mikroorganismu. Mikroorganismy mohou být také poškozeny technologií výroby, a proto neschopny dále růst [14].
- Nejmladšími metodami využívanými k identifikaci mikroorganismů v potravinách jsou metody molekulární biologie. Jsou schopny poskytnout přesné, objektivní, reprodukovatelné výsledky a umožňují identifikovat mikroorganismy bez nutnosti kultivace, čímž zkracují celkový čas k identifikaci potřebný. Metody molekulární biologie můžeme rozdělit na klasické, kde nedochází k amplifikaci nukleové kyseliny, a je proto vyžadováno velké množství DNA nebo RNA k vyizolování z analyzovaného vzorku. Druhým typem jsou metody amplifikační. Tyto metody jsou založeny především na polymerázové řetězové reakci, a tedy na znalosti genomu detekovaného organismu. V reakci se používají části genomu pro daný mikroorganismus charakteristické [13, 14].

2.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Zkratka PCR pochází z anglického výrazu Polymerase Chain Reaction. Tato metoda spočívá v namnožení neboli amplifikaci určitého úseku DNA za působení DNA polymerázy. Je inspirována přirozeným dějem – replikací.

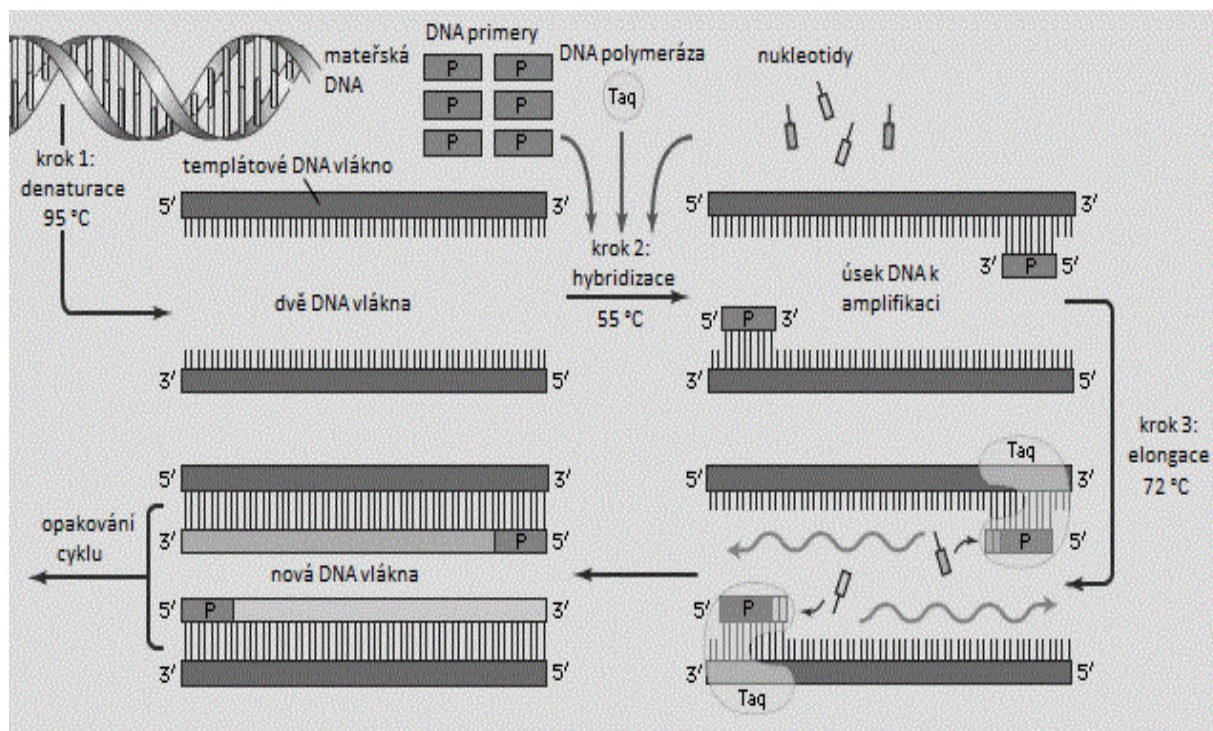
2.2.1.1 Průběh PCR

K vybranému úseku denaturované DNA se navazují oligonukleotidy, tzv. primery, od nichž se syntetizuje nový řetězec DNA ve směru 5' – 3' [15]. PCR probíhá ve třech cyklicky se opakujících krocích, které se navzájem liší reakční teplotou, jak ukazuje obrázek 3 [16].

1. V prvním kroku dochází k denaturaci. V molekule templátové dsDNA se rozruší vodíkové můstky mezi bázemi a vznikají dvě ssDNA. Tento krok probíhá při teplotě 95 °C. Je nutné, aby došlo k úplnému oddělení řetězců, aby se zabránilo jejich zpětné renaturaci. Za tímto účelem bývá tato fáze v prvním cyklu prodloužena i na několik minut. V dalších cyklech pak probíhá po dobu 15 – 45 s.
2. Ve druhém kroku probíhá hybridizace. Reakční směs je ochlazena na 50 – 65 °C v závislosti na teplotě tání primerů a DNA. V důsledku poklesu teploty jsou primery komplementárně připojeny na specifická místa ssDNA. Tato fáze trvá 30 – 60 s a její teplota je velmi specifická. Čím více se blíží teplotě tání (viz oddíl 2.2.3.1) daného řetězce, tím více komplementární spolu musí být připojovaný primer a daný úsek DNA matrice. Při

teplotách nižších může dojít k hybridizaci i ne zcela komplementárních úseků nukleových kyselin. Při příliš nízké teplotě nebo při neúplné denaturaci v prvním kroku by mohlo dokonce dojít ke spojení dvou primerů, a vznikly by tzv. dimery primerů.

- Ve třetím kroku zvaném elongace se prodlužuje nové vlákno DNA od primeru ve směru 5' – 3'. Tento krok probíhá při teplotě 65 – 75 °C po dobu 60 – 70 s za katalýzy termostabilní DNA polymerázou. V posledním cyklu bývá tato fáze opět prodloužena na několik minut, aby došlo ke kompletní syntéze řetězce DNA [15 – 17].



Obrázek 3: Schéma průběhu PCR, upraveno podle [16]

Optimální počet cyklů se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů. V každém cyklu vznikají nová vlákna, která lze opět použít jako templát pro další syntézu DNA, čímž lze vytvořit až 10^9 kopií požadovaného úseku DNA. Takto vzniklé kopie se nazývají amplikony a celému procesu se říká amplifikace [15].

Je zřejmé, že v prvním cyklu vzniknou vlákna delší, než je požadovaný úsek DNA, protože DNA polymeráza prodlouží řetězec od primeru až do konce templátové DNA. Ve druhém cyklu poslouží takto vzniklá DNA jako templát a po rozvolnění bude vlákno vzniklé v prvním cyklu již ohraničeno z jedné strany primerem, tudíž vlákno k němu nově nasyntetizované bude mít již požadovanou délku. V dalších cyklech budou podle vlákna požadované délky vznikat už jen vlákna stejně dlouhá. Výsledkem PCR tedy bude směs amplikonů požadované délky a amplikonů tuto délku přesahujících. Amplikony požadované délky budou v průběhu celé reakce přibývat exponenciálně, zatímco ty delší pouze lineárně, proto čím více cyklů proběhne, tím zanedbatelnější bude podíl delších řetězců [18].

Reakční směs pro PCR se skládá z následujících složek:

- PCR voda používaná pro doplňování objemu.
- PCR pufr, jenž vytváří optimální prostředí pro DNA polymerázu. Obsahuje především Mg^{2+} ionty, jež zajišťují udržení enzymatické aktivity Taq DNA polymerázy [15].

- dNTP – deoxynukleosidtrifosfáty, jež jsou nepostradatelné pro syntézu nového řetězce DNA. Zahrnuje ekvimolární množství dATP, dCTP, dGTP, dTTP [15, 17].
- Primery – synteticky připravené oligonukleotidy komplementární se sekvencemi ohraničujícími požadovaný úsek amplifikované DNA [17].
- DNA polymeráza zajišťující syntézu nového řetězce ve směru 5' – 3' od místa navázání primeru. Kvůli vysoké teplotě na začátku reakce se používá polymerázy izolované z termofilních organismů, nejčastěji bakterie *Thermus aquaticus*, odtud *Taq* DNA polymeráza. Díky tomu, že polymeráza snese i vysoké teploty, je možné celou reakci provést bez přerušení, což snižuje riziko kontaminace a vzniku chyb měření. Při vyšším počtu cyklů se účinnost polymerázy snižuje.
- DNA templát, jenž slouží jako matrice pro syntézu nových řetězců, obsahuje cílová místa pro primery [15].

Celkový objem reakční směsi je 25 – 30 μ l. Samotná reakce probíhá v zařízení zvaném termocykler, jenž po naprogramování sám střídá požadované teploty po zvolenou dobu.

2.2.2 PCR v reálném čase

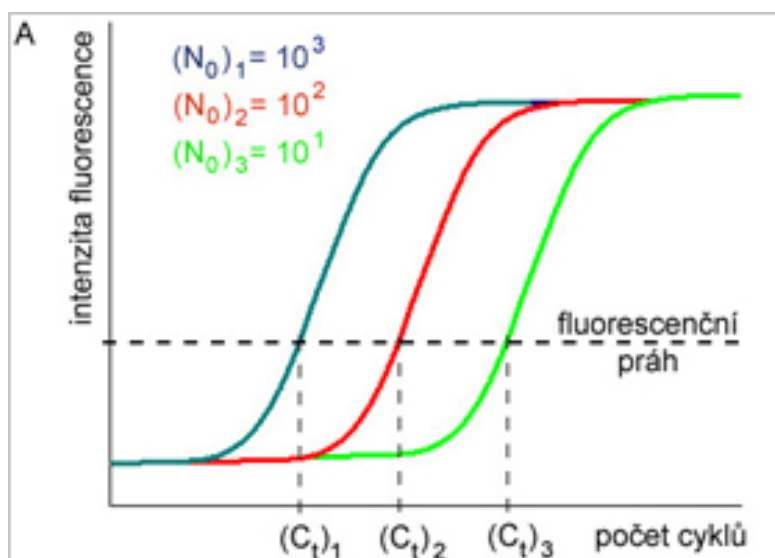
Při konvenční PCR je produkt detekován po ukončení reakce gelovou elektroforézou. Tato metoda má však omezenou specifitu, jelikož nemohou být rozlišeny různé molekuly o stejné molekulové hmotnosti. Navíc je pouze semikvantitativní. Při PCR v reálném čase je možné sledovat vznikající produkt již během reakce v každém cyklu, a to pomocí fluorescenčního signálu. Měření změn v intenzitě fluorescenčního signálu je možné určit progres v amplifikaci. PCR v reálném čase také umožňuje kvantifikaci produktu, tedy přesné určení výchozího množství daného úseku DNA v analyzovaném vzorku, proto je také označována jako qPCR [18].

Průběh qPCR je obdobný jako u konvenční PCR, stejně tak jako složení reakční směsi, ovšem s tím rozdílem, že reakční směs pro qPCR obsahuje fluorescenční molekuly. Díky těmto molekulám může být na konci každého cyklu měřena fluorescence, která odpovídá koncentraci produktu v reakční směsi [19]. Výsledkem měření je amplifikační křivka, jakou ukazuje obrázek 4. Je to závislost intenzity fluorescence na počtu cyklů, která má esovitý tvar a lze ji rozdělit na tři části. V první části je v reakční směsi jen velmi malé množství amplifikované DNA a intenzita fluorescenčního signálu je tak nízká, že se nachází pod mezí detekce zařízení, a nemůže proto být měřena. Tato fáze se nazývá background. Druhá fáze je fází exponenciálního růstu, kdy se množství produktu exponenciálně zvyšuje. Poslední fází je tzv. plató fáze, při níž dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a intenzita fluorescenčního signálu je stále stejná. Čím dříve nastává exponenciální fáze, tím více obsahoval vzorek na počátku templátové DNA.

Pro detekci produktu qPCR jsou užívány tři metody. Pro svou jednoduchost je nejhojněji využívána metoda interkalačního barviva vázajícího se na DNA [18]. Tato metoda využívá fluorescenčních barviv, která při navázání na dsDNA výrazně fluoreskují, zatímco při samovolné existenci v reakční směsi pro PCR emitují jen velmi malé množství záření. Jejich výhodou je jednoduchost a dobrá finanční dostupnost, nevýhodou je neschopnost rozlišit specifické a nespecifické produkty, tedy např. komplementárně spojené primery. Jako interkalační barvivo se nejčastěji používá SYBR Green I [19].

Mezi další možnosti detekce produktu qPCR patří použití fluorescenčně zhasených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu a fluorescenčně značených primerů.

PCR v reálném čase probíhá v zařízení podobném termocykleru s integrovaným fluorimetrem nazývaným se cykler [18]. Díky tomu, že amplifikace i indetifikace produktu probíhají v jednom zařízení, je omezena kontaminace vzorku a vznik dalších chyb.



Obrázek 4: Amplifikační křivka [20]

2.2.3 Vysokorozlišovací analýza křivky tání (HRM)

Zkratka HRM pochází z anglického výrazu High Resolution Melting, což do češtiny bývá překládáno jako vysokorozlišovací analýza křivky tání. Jedná se o novější formu detekce pomocí analýzy křivky tání [19]. Je to metoda velmi citlivá, založená na rozpoznání malých rozdílů ve tvaru křivky tání analyzovaných vzorků [21]. HRM je tedy vhodná i k rozlišení úseků DNA lišících se pouze o jednu bázi [22].

2.2.3.1 Princip HRM

Dvouřetězcová DNA je velmi stabilní při pokojové teplotě, ovšem při nárůstu teploty dochází k rozvolnění vláken až k jejich úplnému oddělení. Teplota, při které je právě 50 % DNA denaturováno, se nazývá teplota tání (T_m – z anglického výrazu melting temperature) [23]. Teplota tání závisí jak na délce DNA řetězce, tak na počtu párů bází guaninu a cytosinu. Jelikož guanin a cytosin jsou v antiparalelních řetězcích molekuly nukleové kyseliny vázány třemi vodíkovými můstky, zatímco adenin s thyminem pouze dvěma, je teplota tání řetězce tím vyšší, čím více obsahuje párů bází guaninu a cytosinu [22].

Analýza křivky tání bývá zařazována za qPCR v přítomnosti interkalačního barviva (SYBR Green I). Spočívá v postupném zvyšování teploty, jež má za následek rozdělení řetězců právě vytvořených amplikonů. Na začátku analýzy je tedy možné pozorovat výraznou fluorescenci způsobenou barvivou navázanými na dsDNA. Postupným oteplováním dochází k rozdělení řetězců dsDNA a uvolnění molekul barviva do roztoku, kde samy vykazují jen velmi nízkou fluorescenci. S narůstající teplotou tedy fluorescence postupně klesá a výsledkem je křivka závislosti klesající fluorescence na vzrůstající teplotě, známá jako křivka tání. Teplota tání se určí z bodu inflexe křivky tání, přesněji z píku křivky záporně vzaté derivace fluorescence podle teploty v závislosti na teplotě [22]. Teplota tání a tvar křivky tání jsou ovlivněny délkou amplikonu, sekvencí bází a množstvím obsažených párů bází guaninu a cytosinu [24].

Vyspělejší formou analýzy křivky tání je právě HRM analýza. Rozdíl spočívá ve využití saturačních barviv namísto interkalačních, která nepůsobí inhibičně na DNA polymerázu ani

ve vysoké koncentraci, např. LC Green PLUS, Eva Green nebo SYTO9. Tato barviva umožňují označení PCR produktů po celé jejich délce, takže všechny amplifikované oblasti mohou být detekovány [22].

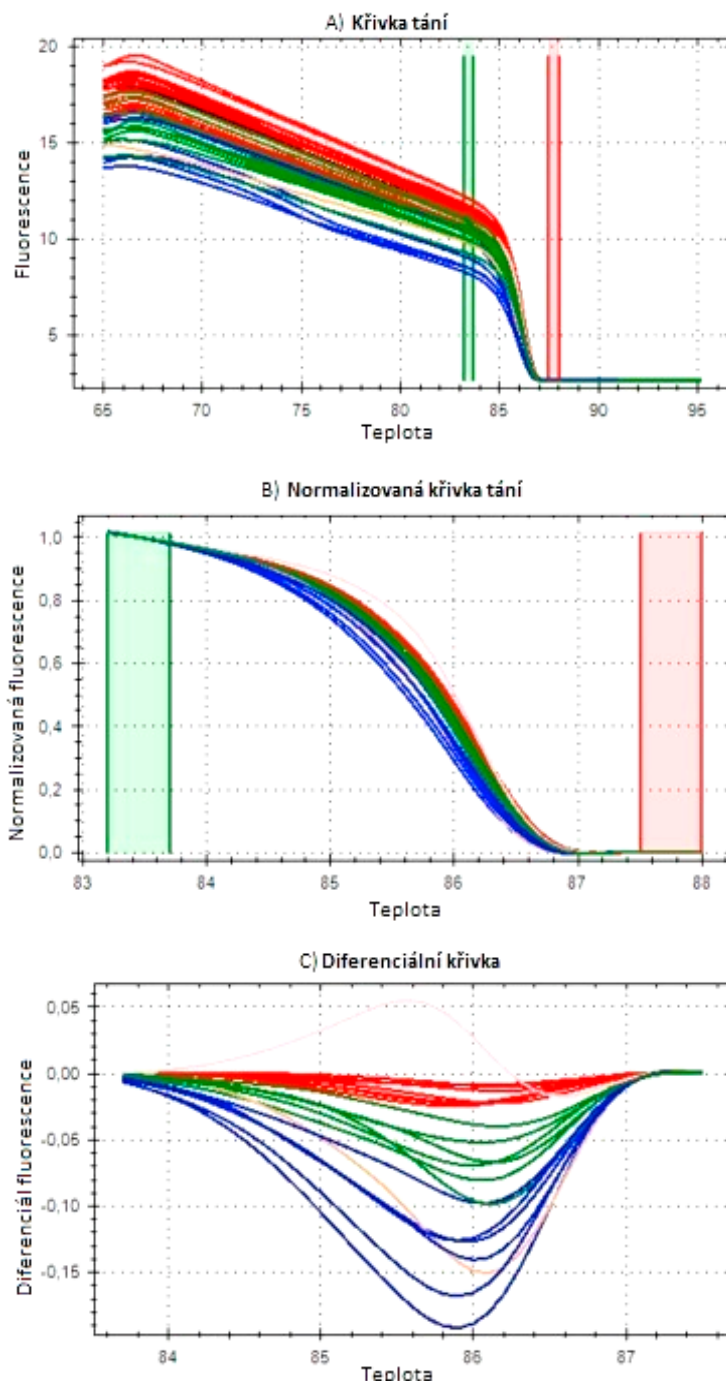
Při vytváření primerů pro PCR-HRM je zde kromě běžných požadavků kladen zvláštní důraz na to, aby spolu dvojice příslušných primerů netvořily nespecifické produkty, tedy dimery primerů. Vzniklé amplikony by neměly být příliš dlouhé (ideálně kolem 300 bp), protože čím delší amplikony vzniknou, tím menší budou rozdíly v jejich křivkách tání, což by mělo za následek pokles citlivosti analýzy [22]. Všechny DNA vzorky by měly být extrahovány použitím stejné metody s velkým důrazem na aseptickou práci, měly by mít stejný objem, stejnou koncentraci DNA i fluorescenčního barviva [19, 23].

2.2.3.2 Průběh HRM

Jelikož HRM analýza bývá téměř výhradně používána k identifikaci produktů qPCR, byly některé cykly uzpůsobeny i k této analýze [23]. Po proběhnutí cyklu polymerázové řetězové reakce dochází k postupnému zvyšování teploty, asi o 0,01 °C za sekundu, a při každé z těchto teplot přístroj zaznamenává intenzitu fluorescence [26]. Za pomoci vhodného softwaru jsou všechna data závislosti fluorescence na teplotě vynesena do grafu a vzniká křivka tání, jejíž ukázka je na obrázku 5 A).

Z důvodu lepší čitelnosti grafu se na místo fluorescence zavádí tzv. normalizovaná fluorescence. Celý rozsah fluorescence je nahrazen hodnotami od 0 do 1, přičemž oblasti počátku tání se přisuzuje hodnota 1 a oblasti konce tání hodnota 0. Takto upravený graf je na obrázku 5 B).

Rozdíly mezi tvary jednotlivých křivek jsou nejvíce patrné na diferenciální křivce, kde jsou křivky tání vzorků odčítány od křivky tání referenčního vzorku. Pokud se tyto dvě zcela překrývají, značí to úplnou shodu v sekvenci bází měřeného vzorku s referenčním. Rovněž lze



Obrázek 5: křivka tání, normalizovaná křivka tání a diferenciální křivka, upraveno podle [23]

využít křivky závislosti derivace fluorescence podle teploty na teplotě, které nabývají klasického tvaru normálního rozdělení a vzniklé píky odpovídají teplotám tání jednotlivých vzorků [27]. Vyhodnocení se potom provádí srovnáním teplot tání měřených vzorků se vzorky referenčními. Příklad těchto křivek je na obrázku 5 C).

Vzorky s velmi podobnými křivkami tání se pro větší přehlednost výsledného grafu slučují do skupin [22, 23].

2.2.3.3 Výhody a nevýhody použití PCR-HRM

Nezpochybnitelnou výhodou využití metody PCR je získání velkého množství ampliconů požadovaného úseku DNA o určené délce, a to v relativně krátkém čase [15]. V kombinaci s HRM analýzou pak jsme schopni získat informaci i o konkrétním druhu mikroorganismu, z něhož amplifikovaná DNA pochází [27]. Značnou výhodou PCR-HRM je také její vysoká citlivost, umožňuje odlišit úseky DNA lišící se jen o jednu bázi a rozpoznat drobné inserce a delece [22].

Poněkud limitující vlastností HRM analýzy je, že neumožňuje odhalit konkrétní rozdíly v úsecích DNA. Je obtížné detekovat změny, které neovlivňují procentuální obsah G a C. Schopnost analýzy zaznamenat změny v sekvenci párů bází, které ovlivňují procentuální obsah G a C, pak klesá s délkou řetězce. Nelze tak použít příliš dlouhé amplicony, ideální délka se pohybuje okolo 300 bp [28].

Kvůli vysoké specifitě a citlivosti PCR-HRM může dojít ke kontaminaci i velmi malým množstvím cizorodé DNA, např. při přípravě vzorku, a způsobit tak falešně pozitivní výsledek. Tomu lze zabránit standardními postupy, jako je používání sterilních roztoků, autoklávovatelného zařízení, UV světla pro odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše, odděleným skladováním reagentů pro PCR, přidáváním DNA do směsi jako poslední. Pro kontrolu čistoty práce je velmi vhodné použití negativních kontrol [18].

Jako výhoda PCR-HRM se uvádí její vysoká reprodukovatelnost, to však platí jen za předpokladu, že se mutace DNA nenachází již v počáteční matrici. Při opakování by pak bylo dosaženo rozdílných výsledků [28].

Vzhledem k tomu, že pro PCR-HRM se kromě speciálně upraveného cyklieru používá běžné laboratorní vybavení, nejedná se o metodu nikterak drahou. To jí kromě vyspělých laboratoří zajišťuje místo i v provozech s nižším rozpočtem [28].

2.2.3.4 Využití PCR-HRM v potravinářství

PCR je díky její vysoké citlivosti a rychlosti v hojné míře využívána k mikrobiologické analýze potravin. Při identifikaci druhů je v potravinářství výhodnější používat metody založené na identifikaci DNA, jelikož ta je velmi stabilní. Oproti tomu metody založené na identifikaci proteinů jsou pro jejich nestabilitu využitelné jen pro čerstvé nebo velmi málo upravené potraviny. V kombinaci s HRM analýzou je pak možné s větší jistotou v potravinách detekovat alergeny nebo patogenní bakterie, jelikož umožňuje odlišit i velmi příbuzné druhy organismů. Dále pak bývá využívána i k potvrzení autentičnosti složení udávaného výrobcem, jelikož v dnešní době výrobci často tíhnou k používání levnějších surovin, než jaké udávají na obale [22, 27].

Při identifikaci patogenních bakterií je PCR-HRM výhodná především pro svoji rychlost a spolehlivost oproti např. kultivačním metodám. Bratčikov a Mauricas představili v roce 2009 HRM analýzu pro sérotypizaci bakterií rodu *Salmonella*. Antolinos a kolektiv v roce 2012 použili HRM k odlišení tří druhů *Bacillus cereus*, jež často způsobují otravu jídlem [22].

V neposlední řadě je PCR-HRM využívána k rozpoznání geneticky modifikovaných potravin. Ty jsou sice v řadě zemí především mimo EU běžně prodávány, výrobci jsou však povinni je označit [29].

Použití PCR-HRM v potravinářství může nalézt svá úskalí v přítomnosti inhibitorů, které se v potravinách v hojné míře vyskytují. Na druhou stranu umožňuje amplifikovat a identifikovat i velmi malé množství DNA a překážkou není ani její značná degradace.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování literárního přehledu na téma možnosti využití metody PCR-HRM pro identifikaci bakterií přítomných v potravinách a potravinových doplncích.

V experimentální části byla z probiotického výrobku izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Následně byla prokázána přítomnost mikroorganismů domény *Bacteria*, konkrétně rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Výsledky byly potvrzeny a upřesněny pomocí HRM analýzy.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorek potravinového doplňku s probiotickými kulturami

Potravinový doplněk Linex[®] Forte vyrobený společností SANDOZ s.r.o., Praha – doplněk stravy s probiotiky a prebiotiky. Dle složení uváděného výrobcem obsahuje jedna tableta 10⁹ kolonií bakterií *Lactobacillus acidophilus* a 10⁹ kolonií bakterií *Bifidobacterium animalis* subs. *laris*.

4.1.2 Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly

Čisté bakteriální kultury použité pro izolaci DNA byly získány z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (CCM) a z Kolekce průmyslových organismů, PL (LOCK). Kmen *Lactobacillus gasseri* K7 byl získán od prof. Ireny Rogelj, University of Ljubljana, Slovenia.

- *Lactobacillus casei* CCM 4791
- *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T
- *Lactobacillus gasseri* K7
- *Lactobacillus plantarium* LOCK 7039^T
- *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T

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

4.1.3 Chemikálie

- Agaróza pro gelovou elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard – 100 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Ethanol p. a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Nanášecí pufr Red load (Top-bio, Praha, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol – PEG 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báze (Serva, Heidelberg, SRN)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- SDS – dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

4.1.4 Roztoky

- Roztok A (10 mM tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8)
- Roztok B (10 mM tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8; 3 mg/ml lysozymu)
- TE pufr (10 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM EDTA PH 8,0; destilovaná voda)
- TBE purf (54 g Tris-HCl; 27,5 g H₃BO₃; 20 ml 0,5M EDTA pH 8,0; doplněno destilovanou vodou na 1 l a před použitím 20krát zředěno)
- Tris-HCl (1M: 12,1 g Tris-báze; doplněno destilovanou vodou na 100 ml, upraveno HCl na pH 7,8)

4.1.5 Magnetické nosiče

Magnetické polymerní nosiče PGMA byly připraveny Ing. Horákem, CSc. Na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Jejich vlastnosti shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1: Vlastnosti magnetických částic

Označení	Polymer	Fe (%hm)	-COOH (mM/g)	Průměr (μm)	PDI
Fkol 77 ox	P(HEMA-co-GMA)	10,0	0,764	2,2	1,09
Fkol B 100ox	PGMA	5,36	0,67	0,70	1,16

(PGMA – polyglycidyl methakrylát, P(HEMA-co-GMA) - kopolymer hydroxyethylmethakrylátu a glycidylmethakrylátu, PDI – index polydisperzity – poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti)

4.1.6 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP směs 10 mM (Top-Bio, Praha, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1 U/μl (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Bacteria*
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus*
- Primery specifické pro rod *Bifidobacterium*
- qPCR 2× SYTO-9 Master Mix (2krát koncentrovaný 150mM Tris-HCl pH 8,8; 40mM (NH₄)₂SO₄; 5mM MgCl₂; 400 μM dATP; 400 μM dCTP; 400 μM dGTP; 400 μM dTTP; Taq DNA polymeráza (50 U/ml); monoklonální protilátka anti-Taq; SYTO-9; stabilizátory a aditiva) (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.7 Pomůcky a přístroje

- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL (Varšava, Polsko)
- NanoPhotometer (Implen, Mnichov, Německo)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- Ilumina Eco Real-Time PCR system (Ilumina, USA)
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer PufferTM, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Transiluminátor TVR – 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler MinicyclerTM (BIO-RAD Lab., USA)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA, UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Špičky pro mikropipety z umělé hmoty
- Laboratorní sklo
- Očkovací box Fatran L-F
- Minicentrifuga SPECTAFUGE MINI
- Další běžné laboratorní vybavení (buničina, pinzeta, ochranné rukavice, ...)

4.2 Metody

Postupy práce byly s úpravami převzaty ze skript k laboratornímu cvičení [15].

4.2.1 Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk

- Byly vytvořeny tři vzorky, na každý byl použit obsah jedné tobolky doplňku stravy Linex Forte.
- Obsah tobolky byl rozsuspendován v 1 ml roztoku A.
- Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 3 minut při 1300 ot./min.
- Supernatant byl opatrně a důkladně slit.
- Sediment byl opět rozsuspendován v 500 µl roztoku B.
- Takto vzniklý roztok byl hodinu inkubován při laboratorní teplotě.
- Po inkubaci bylo k roztoku přidáno 25 µl 20% SDS a 5 µl proteínasy K.
- Vše bylo důkladně promícháno a přes noc inkubováno při 55 °C.

4.2.2 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročastic

- Směs pro izolaci DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročastic byla namíchána podle tabulky 2. Na každý vzorek byly použity dva druhy magnetických mikročastic: Fkol 77 ox a Fkol B 100ox.

Tabulka 2: Složení směsi pro izolaci DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických nosičů

Krok	Složka	Objem [µl]
1	NaCl 5 M	400
2	DNA (hrubý lyzát)	100
3	PEG 600 40%	100
4	Magnetické částice 2 mg/ml	400

- Výsledná koncentrace PEG 6000 byla 16%, výsledná koncentrace NaCl 2M.
- Po smíchání všech složek v Eppendorfově zkumavce byla směs po dobu 10 min inkubována při laboratorní teplotě.
- Poté byla krátce stočena na minicentrifuze a umístěna do magnetického separátoru na dobu 5 min.
- Následně byl odebrán supernatant a vzorek byl promyt 1000 µl 70% etanolu, promíchán a opět umístěn na magnetický separátor.
- Po odseparování částic byl etanol odebrán, vzorek ještě jednou promyt 500 µl 70% etanolu a zbylý etanol byl odpařen volně na vzduchu.
- Získaná DNA adsorbovaná na magnetické nosiče byla eluována do 50 µl TE pufru.
- Po třech dnech byl eluát obsahující DNA odebrán do nových Eppendorfových zkumavek.

4.2.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- Roztoky DNA o objemu 3 µl byly nanесeny na čočku mikrolitrové kyvety Nano Photometru (Implen).
- Absorbance byla měřena pro tři vlnové délky proti TE pufru:
 - 230 nm – minimum absorbance pro DNA
 - 260 nm – maximum absorbance pro nukleové kyseliny
 - 280 nm – maximum absorbance pro proteiny

- Z hodnoty absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace vzorku DNA.
- Z hodnoty $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla stanovena čistota vzorku DNA.

4.2.4 Konvenční PCR

- Všechny komponenty pro PCR byly rozmrazeny, protřepány a krátce stočeny na minicentrifuze.
- Při přípravě jednotlivých směsí pro PCR byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub) [25], pro rod *Lactobacillus* (LbLMA1, R16-1) [30] nebo pro rod *Bifidobacterium* (Pbi F1, Pbi R2) [25]. Tabulka 3 ukazuje jejich sekvence.

Tabulka 3: Sekvence specifických primerů

	Primery	Sekvence primeru (5' – 3')	Velikost produktů PCR [bp]
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
Rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMA1	CTC AAA ATC AAA CAA AGT TTC	250
	R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	
Rod <i>Bifidobacterium</i>	Pbi F1	CCG GAA TAG CTC T	914
	Pbi R2	GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA	

- Dále byl z jednotlivých komponent připraven master mix, který byl následně rozpipetován do jednotlivých zkumavek tak, že každá obsahovala určité objemy příslušné složky, tak jak ukazuje tabulka 4. Výsledný objem v jedné zkumavce byl 25 μl .

Tabulka 4: Složení směsi pro konvenční PCR

Krok	Složka	Objem [μl]		
		Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>
1	PCR voda	18	18	19
2	Reakční pufr	2,5	2,5	2,5
3	dNTP směs 10 mM	0,5	0,5	0,5
4	Primer 1 (10 pmol/ μl)	1	1	0,5
5	Primer 2 (10 pmol/ μl)	1	1	0,5
6	Taq DNA polymeráza 1 U/ μl	1	1	1
7	DNA matrice (10 ng/ μl)	1	1	1
Celkem		25	25	25

- Jako DNA matrice byla použita DNA jednotlivých vzorků upravená na výslednou koncentraci 10 ng/μl a byla do směsi přidána jako poslední.
- Stejným způsobem byla připravena pozitivní kontrola, sloužící ke kontrole preciznosti práce. Matrici DNA zde představovala DNA o koncentraci 10 ng/μl izolovaná ze sbírkových kmenů. Pro PCR specifickou pro doménu *Bacteria* se jednalo o kulturu *Lactobacillus casei*, stejně tak pro rod *Lactobacillus*. Pro rod *Bifidobacterium* se jednalo o kulturu *Bifidobacterium breve*.
- Obdobně byla připravena i negativní kontrola, sloužící ke kontrole kontaminace komponent, kde matrice DNA byla nahrazena stejným množstvím PCR vody.
- Takto připravené PCR směsi byly promíchány, krátce stočeny na minicentrifuze a vloženy do cyklu.
- Na cyklu byl spuštěn příslušný program pro PCR podle tabulky 5.

Tabulka 5: Specifické amplifikační programy pro PCR

Krok	Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>
1. Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu	95 °C/5 min	95 °C/5 min	97 °C/5 min
2. Denaturace DNA	95 °C/30 s	94 °C/30 s	97 °C/20 s
3. Hybridizace primerů	55 °C/30 s	58 °C/30 s	55 °C/20 s
4. Syntéza nových řetězců DNA	72 °C/60 s	72 °C/60 s	72 °C/30 s
5. Dosyntetizování DNA v posledním cyklu	72 °C/5 min	72 °C/5 min	72 °C/5 min
Počet cyklů (krok 2 – 4)	30	30	30

4.2.5 Agarózová gelová elektroforéza

- Pro vyhodnocení produktu amplifikace byl namíchan 1,8% agarózový gel z 1,8 g agarózy a 100 ml 0,5 × TBE pufru. Roztok byl za občasného míchání nechán pětkrát přejít varem v mikrovlnné troubě.
- Poté byl roztok nalit do připravené formy a ponechán jednu hodinu tuhnout.
- Mezi tím bylo do vzorků amplifikované DNA přidáno 5 μl nanášecího pufru Red load.
- Po ztuhnutí roztoku na gel byl vyjmut hřebínek a do vzniklých komůrek bylo pipetováno 20 μl každého ze šesti vzorků.
- Do jedné komůrky byl nanesen standard (100 bp) o objemu 5 μl, dle doporučení výrobce.
- Takto připravený gel byl vložen do elektroforetické vany a přelit 0,5 × TBE pufrům zhruba 1 cm nad gel.
- Vana byla připojena ke zdroji napětí 80 V po dobu 2 hodin.
- Po ukončení elektroforézy byl gel přemístěn na 20 minut do roztoku ethidiumbromidu.
- Obarvený gel byl umístěn na transiluminátor a ozářen UV světlem o vlnové délce 305 nm.
- V tomto stavu byl gel fotograficky zdokumentován a vyhodnocen.

4.2.6 PCR-HRM

- Všechny komponenty pro qPCR byly rozmrazeny a protřepány.
- Byly připraveny tři druhy PCR směsí se třemi různými druhy specifických primerů, konkrétně byly použity dva druhy primerů specifických pro doménu *Bacteria* (V1-F, V1-R a V3-F, V3-R) [31] a primery specifické pro rod *Lactobacillus* (P1V1, P2V2) [25]. Jejich sekvence jsou v tabulce 6.

Tabulka 6: Primery použité pro PCR-HRM

	Primery	Sekvence primerů (5' – 3')
Doména <i>Bacteria</i>	V1-F	GYG GCG NAC GGG TGA GTA A
	V1-R	TTA CCC CAC CAA CTA GC
	V3-F	CCA GCA TCC TAC GGG AGG CAG
	V3-R	CGT ATT ACC GCG GCT GCT G
Rod <i>Lactobacillus</i>	P1V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC
	P2V1	TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC

- Z jednotlivých komponent pro PCR byl v očkovacím boxu připraven master mix, který po rozpipetování do jednotlivých zkumavek obsahoval objemy jednotlivých složek, které ukazuje tabulka 7. Výsledný objem v každé zkumavce byl 25 μ l.

Tabulka 7: Složení směsi pro PCR-HRM

Krok	Složka	Objem [μ l]
1	SYTO-9	12,5
2	PCR voda	9,5
3	Primer 1 (10 pmol/ μ l)	1
4	Primer 2 (10 pmol/ μ l)	1
5	DNA matrice (10 ng/ μ l)	1
Celkem		25

- Jako DNA matrice byla použita DNA jednotlivých vzorků upravená na výslednou koncentraci 10 ng/ μ l a byla do směsi přidána jako poslední.
- Stejným způsobem bylo pro každý primer připraveno pět pozitivních kontrol. Matici DNA zde představovala DNA o koncentraci 10 ng/ μ l izolovaná ze sbírkových kmenů. Jednalo se o kultury:
 - *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T
 - *Lactobacillus gasser* K7
 - *Lactobacillus plantarium* LOCK 7039^T
 - *Bifidobacterium brevis* CCM 7825^T
 - *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T.
- Ke každému vzorku i pozitivní kontrole byl připraven druhý paralelní vzorek, respektive kontrola.

- Takto připravené směsi byly krátce stočeny na mini centrifuze a vloženy do cykleru.
- Na cykleru byl spuštěn příslušný program pro PCR (tabulka 8).

Tabulka 8: Programy PCR pro HRM analýzu

Krok	Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i>
1. Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu	95 °C/5 min	95 °C/5 min
2. Denaturace DNA	95 °C/30 s	95 °C/30 s
3. Hybridizace primerů	60 °C/60 s	53 °C/30 s
4. Syntéza nových řetězců DNA	72 °C/60 s	72 °C/ 60s
5. Dosyntetizování DNA v posledním cyklu	95 °C/30 s 28 °C/30 s 72 °C/5 min	72 °C/5 min
Počet cyklů (krok 2 – 4)	45	30

- Po amplifikaci bylo z každého vzorku pipetováno 15 µl do jamky platíčka systému Illumina Eco Real-Time.
- Byla spuštěna HRM analýza:
 - 95 °C/15 s
 - 55 °C/15 s
 - 95 °C/15 s
- Výsledky byly následně vyhodnoceny pomocí programu Eco Software v5.0, kde byla zjištěna teplota tání T_m jednotlivých vzorků specifická pro přítomné amplikony.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pomocí přístroje NanoPhotometer byla v rozmezí vlnových délek 230 – 280 nm změřena absorbance vzorků DNA izolovaných z výrobku Linex[®] Forte. Výsledky shrnuje tabulka 9.

Tabulka 9: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Magnetický nosič	Vzorek	Koncentrace [ng/μl]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Fkol B 100ox	1	90,5	1,631	1,550
	2	62,5	1,761	1,628
	3	65,0	1,757	1,605
Fkol 77 ox	4	72,5	1,706	1,549
	5	91,5	1,664	1,565
	6	75,5	1,716	1,579

Touto metodou byla prokázána přítomnost DNA, stanovena její koncentrace a čistota.

Koncentrace nukleových kyselin ve vzorcích se pohybovala v rozmezí 62,5 – 91,5 ng/μl. Pro vzorky izolované pomocí magnetických částic označených jako Fkol 77 ox byla koncentrace v průměru lehce vyšší než u vzorků izolovaných pomocí částic Fkol B 100ox.

Podle poměru absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ lze všechny vzorky považovat za relativně čisté. Ideální hodnota tohoto poměru je 1,8, jeho nižší hodnota značí kontaminaci proteiny, které nejlépe absorbují právě při 280 nm. Všechny vzorky jsou tedy jen velmi lehce kontaminovány proteiny a čistota vzorků izolovaných různými magnetickými částicemi se nijak výrazně neliší.

Poměr absorbancí A₂₆₀/A₂₃₀ udává kontaminaci rozpouštědly použitými při izolaci nukleových kyselin, jako je EDTA, která nejlépe absorbuje právě při 230 nm. Ideální hodnota tohoto poměru se pohybuje okolo 2, naměřené hodnoty se pohybují v rozmezí 1,550 – 1,628, což značí u všech mírnou kontaminaci rozpouštědlem nezávisle na typu použitých magnetických částic.

5.2 Důkaz přítomnosti DNA domény *Bacteria* pomocí konvenční PCR

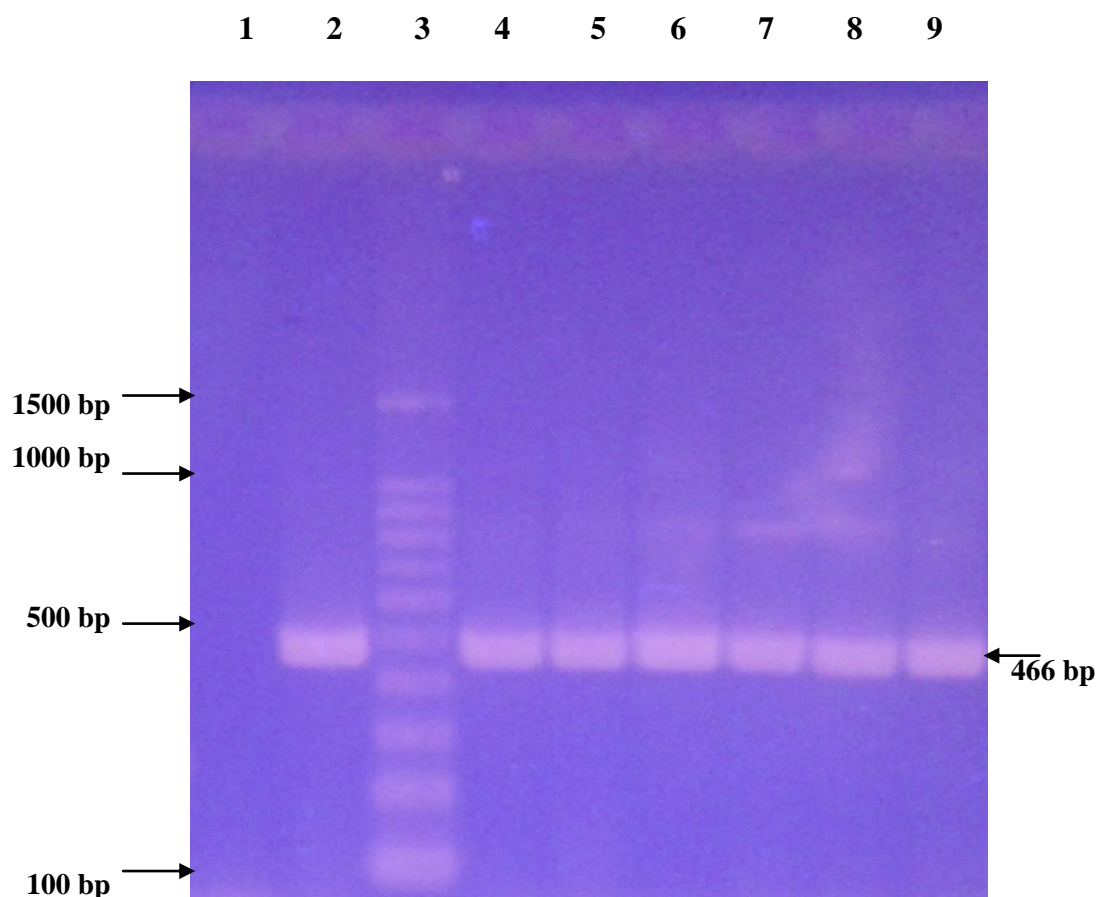
U všech vzorků DNA byla po zředění na koncentraci 10 ng/μl provedena konvenční PCR se specifickými primery pro doménu *Bacteria* (F_eub a R_eub). Jako pozitivní kontrola byla použita kultura *Lactobacillus casei* CCM 4791. Produkt PCR byl detekován agarózovou gelovou elektroforézou. Schéma nanesení vzorků na gel ukazuje tabulka 10 a výsledný gel obrázek 6. Velikost specifických produktů PCR byla 466 bp.

Všechny vzorky na gelu vykazovaly v oblasti 466 bp viditelné produkty PCR, stejně tak jako pozitivní kontrola, což dokazuje přítomnost DNA mikroorganismů domény *Bacteria* ve vzorcích. Intenzita produktů PCR byla u všech vzorků stejná, což je způsobeno naředěním všech vzorků na stejnou koncentraci 10 ng/μl. U negativní kontroly nebyl detekován žádný produkt PCR, což dokazuje, že žádná z komponent pro PCR nebyla kontaminována cizorodou DNA.

Tabulka 10: Schéma nanesení vzorků na gel pro doménu Bacteria s vyhodnocením intenzity produktů PCR.

Běh	Obsah	Intenzita
1	Negativní kontrola	-
2	Pozitivní kontrola (<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4791)	+++
3	DNA standard 100 bp	+++
4	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	+++
5	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	+++
6	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	+++
7	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	+++
8	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	+++
9	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	+++

+++ velmi intenzivní produkt PCR, ++ středně intenzivní produkt PCR, + špatně viditelný produkt PCR, - žádný produkt PCR



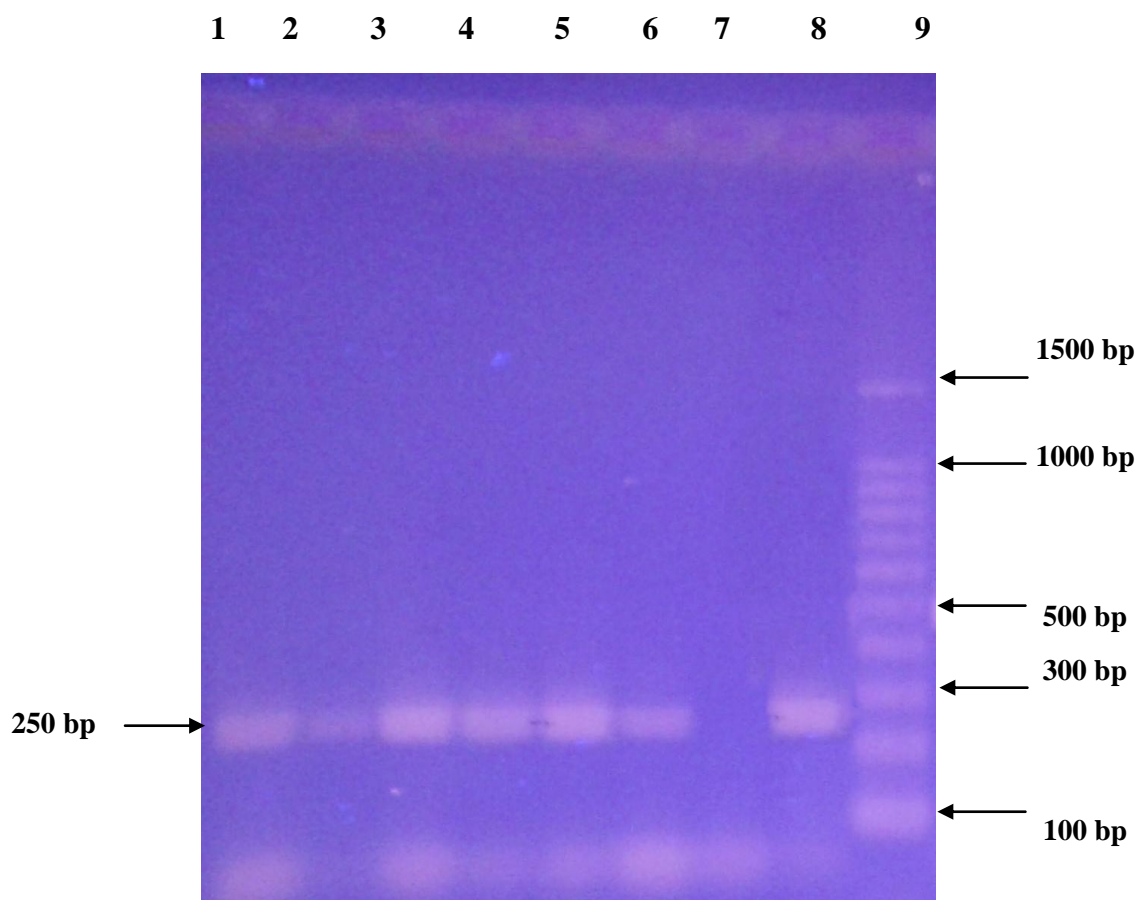
Obrázek 6: Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu Bacteria

5.3 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus* pomocí konvenční PCR

Tabulka 11: Schéma nanesení vzorků na gel pro rod *Lactobacillus* s vyhodnocením intenzity produktů PCR.

Běh	Obsah	Intenzita
1	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	++
2	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	++
3	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	+++
4	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	+++
5	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	+++
6	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	++
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola (<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4791)	+++
9	DNA standard 100 bp	+++

+++ velmi intenzivní produkt PCR, ++ středně intenzivní produkt PCR, + špatně viditelný produkt PCR, - žádný produkt PCR



Obrázek 7: Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus*

Pro důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus* byla provedena konvenční PCR se specifickými primery pro rod *Lactobacillus* (LbLMA1 a R16-1) s následnou detekcí agarózovou gelovou elektroforézou. Jako pozitivní kontrola byla použita kultura *Lactobacillus casei* CCM 4791. Schéma nanesení vzorků na gel ukazuje tabulka 11 a výsledný gel obrázek 7. Velikost specifických produktů PCR byla 250 bp.

Přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* byla u všech vzorků prokázána, jelikož všechny vykazovaly v oblasti 250 bp na gelu produkty PCR, stejně tak i pozitivní kontrola. Intenzita produktů PCR se mírně lišila, vzorky s méně intenzivními amplikony byly pravděpodobně mírně kontaminovány RNA, která sice byla u spektrofotometrického stanovení zahrnuta do celkové koncentrace nukleových kyselin, při PCR však k její amplifikaci nedochází. Díky absenci amplikonu u negativní kontroly byla opět prokázána čistota všech komponent pro PCR.

5.4 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Bifidobacterium* pomocí konvenční PCR

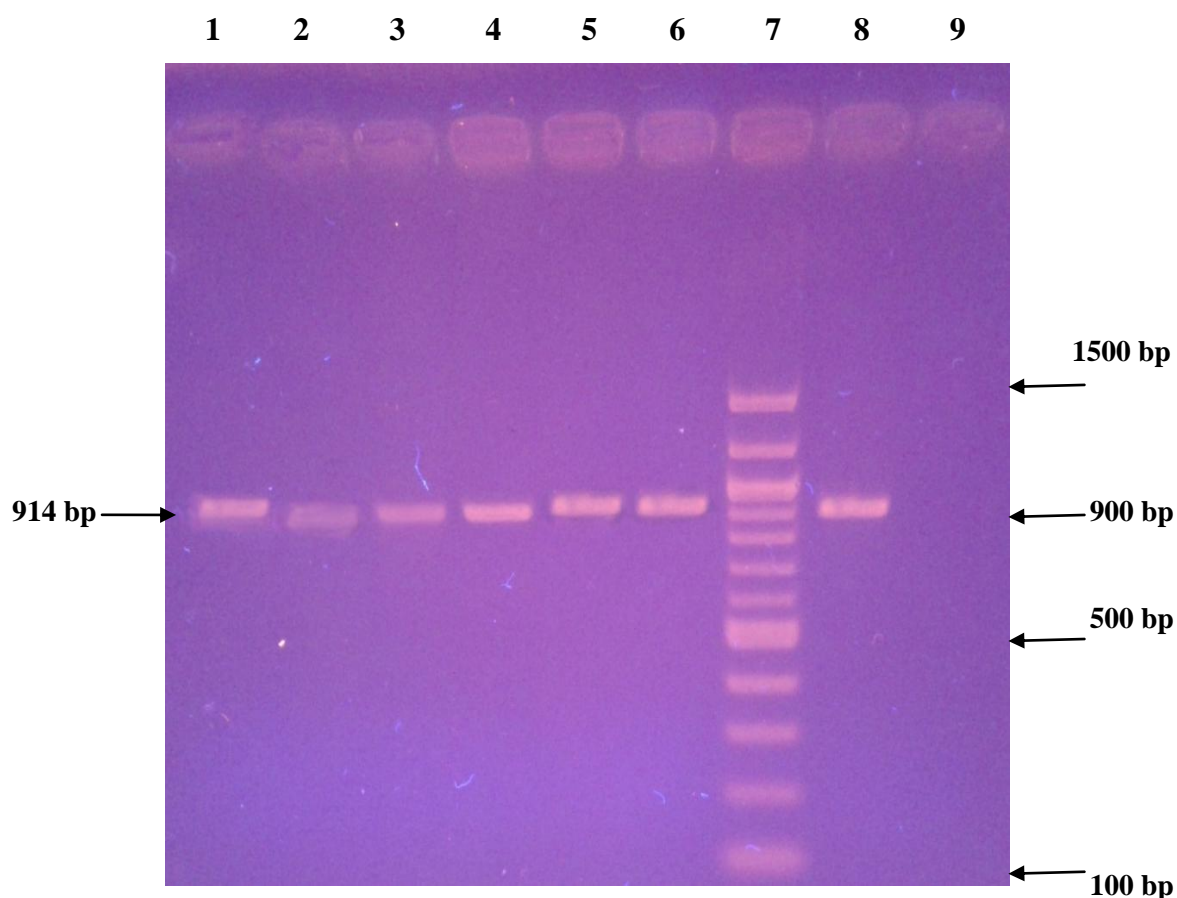
Všechny vzorky DNA byly podrobeny konvenční PCR specifické pro bakterie rodu *Bifidobacterium* pomocí primerů (Pbi F1 a Pbi R2). Jako pozitivní kontrola byl použit kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T. V produktu PCR byla přítomnost této DNA potvrzena agarózovou gelovou elektroforézou. Schéma nanesení vzorků na gel ukazuje tabulka 12 a výsledný gel obrázek 8. Velikost specifických produktů PCR byla 914 bp.

Podarilo se prokázat přítomnost DNA bakterií rodu *Bifidobacterium* u všech vzorků, jelikož všechny včetně pozitivní kontroly vykazovaly na gelu produkty PCR v oblasti 914 bp. Nižší intenzita některých amplikonů může být opět způsobena přítomností RNA v tomto vzorku. Negativní kontrola opět prokázala čistotu všech komponent použitých pro PCR.

Tabulka 12: Schéma nanesení vzorků na gel pro rod *Bifidobacterium* s vyhodnocením intenzity produktů PCR

Běh	Obsah	Intenzita
1	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	+++
2	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	++
3	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol B 100ox	++
4	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	+++
5	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	+++
6	DNA izolovaná magnetickými částicemi Fkol 77 ox	+++
7	DNA standard 100 bp	+++
8	Pozitivní kontrola (<i>Bifidobacterium breve</i>)	+++
9	Negativní kontrola	-

+++ velmi intenzivní produkt PCR, ++ středně intenzivní produkt PCR, + špatně viditelný produkt PCR, - žádný produkt PCR



Obrázek 8: Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium*

5.5 PCR-HRM

Všechny vzorky byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivky tání za použití tří druhů primerů, a to primerů specifických pro doménu *Bacteria* (V1-F, V1-R a V3-F, V3-R) a primerů specifických pro rod *Lactobacillus* (P1V1, P2V1). Jako referenční vzorky byly použity kmerny *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T, *Lactobacillus gasseri* K7, *Lactobacillus plantarium* LOCK 7039^T, *Bifidobacterium brevis* CCM 7825^T a *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T.

Zjištěné teploty tání jsou zaznamenány v tabulkách 13, 14 a 15, výsledné grafy derivovaných křivek tání pak na obrázcích 9, 10 a 11. Pro větší přehlednost jsou v grafech zobrazeny pouze vybrané křivky, které zastupují větší skupinu vzorků s velmi obdobnou teplotou tání. Některé křivky byly naopak vynechány pro jejich pochybný tvar a nedostatečnou výpovědní hodnotu.

5.5.1 PCR-HRM za použití primerů V1-F, V1-R

Touto metodou zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky a pozitivní kontroly ukazují tabulka 13, derivované křivky tání pak obrázek 9.

Z naměřených hodnot je zřejmé, že za použití těchto primerů se nepodařilo rozlišit kmerny *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T, *Lactobacillus gasseri* K7 a *Bifidobacterium brevis* CCM 7825^T, jejichž teplota tání byla stejná: 85,1 °C. Na základě teplot tání vzorků lze tvrdit,

že DNA některého z těchto kmenů obsahoval vzorek 5 ($T_m=85,1$ °C), případně i vzorek 1 ($T_m=85,2$ °C).

Pro kmen *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T byla naměřena teplota tání 85,0 °C, na základě čehož lze usoudit, že DNA tohoto kmene obsahoval vzorek 6 ($T_m=85,0$ °C).

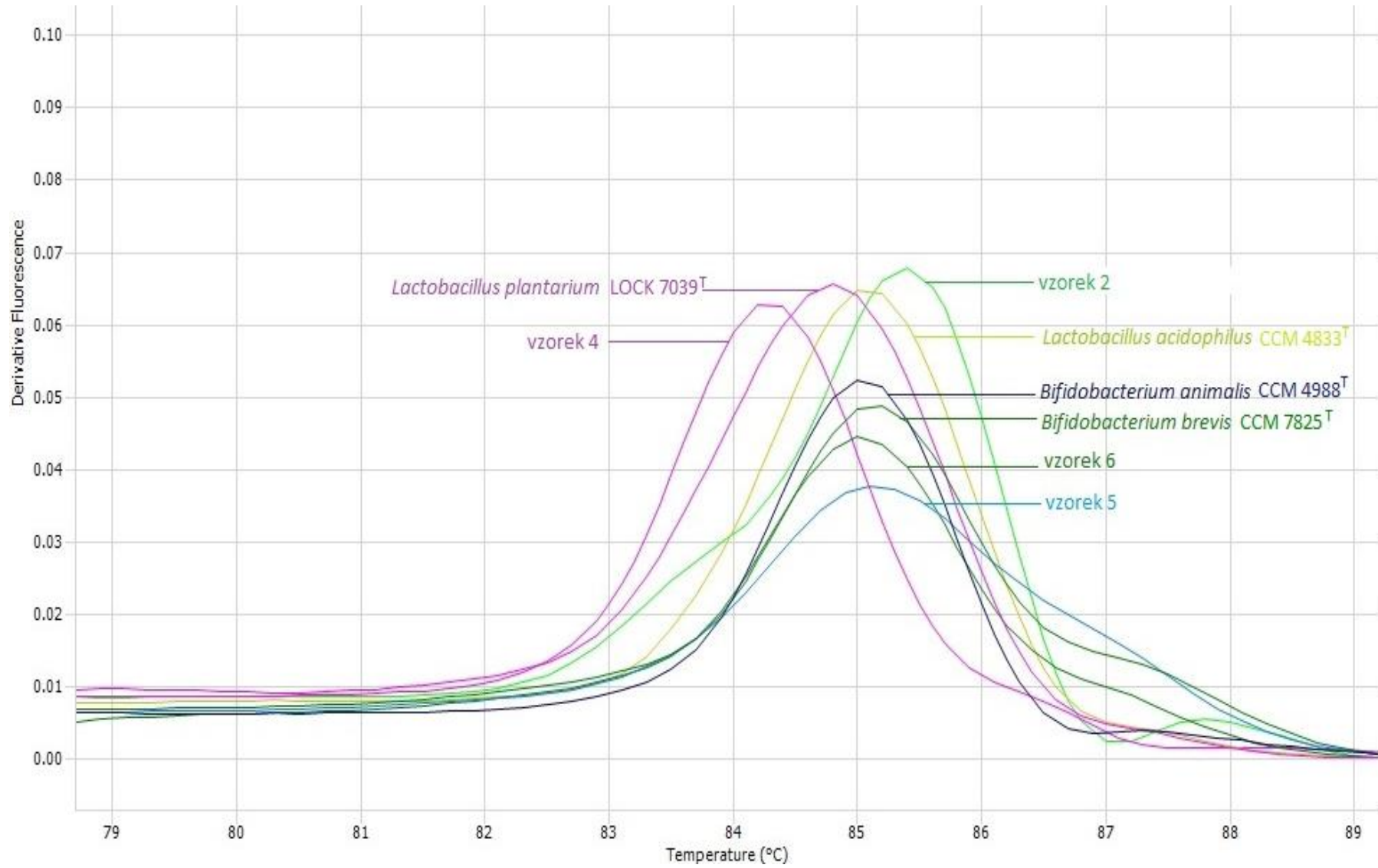
Z referenčních kmenů svou teplotou tání výrazně vybočoval kmen *Lactobacillus plantarium* LOCK 7039^T ($T_m=84,8$ °C), který se neshoduje s teplotou tání žádného ze vzorků.

Mezi vzorky svou teplotou tání vybočují vzorky 2, 3 a 4, u kterých tak nelze předpokládat výskyt DNA ani jednoho organismu z referenčních kmenů.

Použité primery V1-F, V1-R tedy evidentně nebyly vhodné pro rozlišení požadovaných referenčních kmenů. Podle informací výrobce by použitý probiotický výrobek měl obsahovat kolonie bakterií *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*. Toto tvrzení se ukázalo pravdivým u vzorku 6, který obsahoval DNA kmene *Bifidobacterium animalis*, případně i u vzorků 1 a 5, které mohly obsahovat DNA kmene *Lactobacillus acidophilus*. U ostatních vzorků se jejich obsah pomocí použitých primerů a referenčních kmenů nepodařilo identifikovat.

Tabulka 13: Teploty tání při PCR-HRM za použití primerů V1-F, V1-R

	Vzorek	T_m [°C]
Vzorky izolované magnetickými částicemi Fkol B 100ox	Vzorek 1	85,2
	Vzorek 2	85,4
	Vzorek 3	84,2
Vzorky izolované magnetickými částicemi Fkol 77 ox	Vzorek 4	84,3
	Vzorek 5	85,1
	Vzorek 6	85,0
Pozitivní kontroly	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T	85,1
	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	85,1
	<i>Lactobacillus plantarium</i> LOCK 7039 ^T	84,8
	<i>Bifidobacterium brevis</i> CCM 7825 ^T	85,1
	<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 ^T	85,0



Obrázek 9: PCR-HRM za použití primerů VI-F, VI-R

5.5.2 PCR-HRM za použití primerů V3-F, V3-R

Touto metodou zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky a pozitivní kontroly ukazuje tabulka 14, derivované křivky tání pak obrázek 10.

Při použití těchto primerů byla naměřena stejná teplota tání pro kmeny *Bifidobacterium brevis* CCM 7825^T a *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T, a to 84,2 °C, primery tedy nejsou vhodné k rozlišení těchto dvou kmenů. Stejná teplota tání byla naměřena u vzorků 1 a 3, lze u nich tedy předpokládat výskyt DNA výše jmenovaných kmenů. Podobná teplota tání (84,1 °C) byla naměřena u vzorků 2 a 6, i zde by se tedy mohla DNA uvedených kmenů vyskytovat.

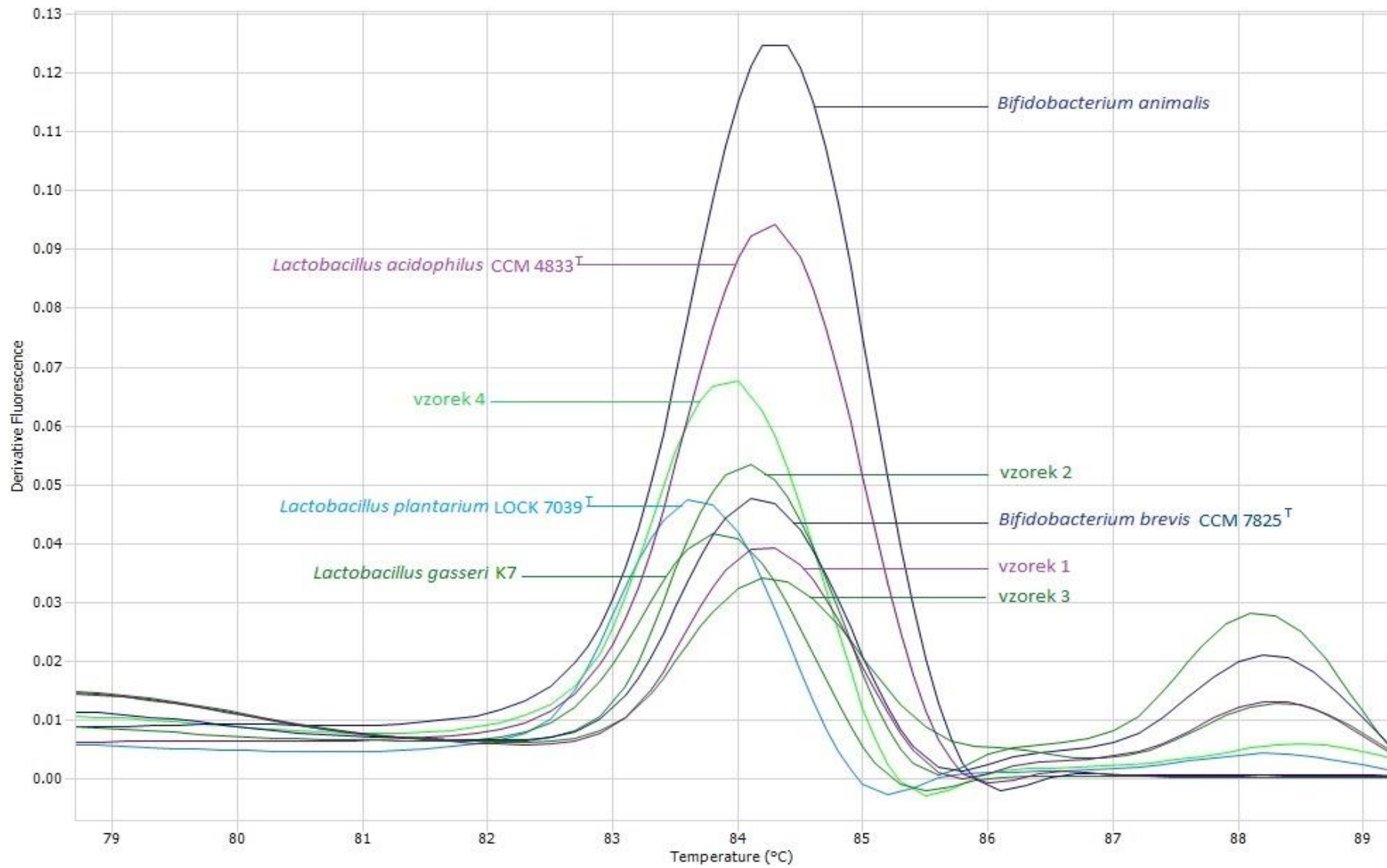
Pro kmen *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T byla naměřena teplota tání 84,3 °C a podobně pro vzorek 5, konkrétně 84,4 °C. V tomto vzorku tedy pravděpodobně byla přítomna DNA kmene *Lactobacillus acidophilus*. Stejně tak by se DNA tohoto kmene mohla vyskytovat i u vzorků 1 a 3, jelikož jejich teplota tání se také liší pouze o 0,1 °C.

DNA kmene *Lactobacillus gasseri* K7 ukázala teplotu tání 83,8 °C, ta se velmi blíží teplotě tání DNA u vzorku 4, tedy 83,9 °C.

Pomocí primerů V3-F, V3-R se tedy podařilo rozlišit jednotlivé druhy rodu *Lactobacillus* od rodu *Bifidobacterium* i od sebe navzájem. Druhy rodu *Bifidobacterium* se odlišit nepovedlo. Zjištěné informace zhruba odpovídají informacím od výrobce použitého probiotického výrobku. Vzorky 1, 2, 3 a 6 by mohly obsahovat výrobcem deklarovaný kmen *Bifidobacterium animalis*, vzorky 1, 3 a 5 by pak mohly obsahovat i druhý deklarovaný kmen *Lactobacillus acidophilus*. U vzorku 4 mohlo dojít ke kontaminaci bakteriemi kmene *Lactobacillus gasseri* a DNA kmene *Lactobacillus plantarium* se nevyskytovala v žádném ze vzorků.

Tabulka 14: Teploty tání při PCR-HRM za použití primerů V3-F, V3-R

	Vzorek	T _m [°C]
Vzorky izolované magnetickými částicemi Fkol B 100ox	Vzorek 1	84,2
	Vzorek 2	84,1
	Vzorek 3	84,2
Vzorky izolované magnetickými částicemi Fkol 77 ox	Vzorek 4	83,9
	Vzorek 5	84,4
	Vzorek 6	84,1
Pozitivní kontroly	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T	84,3
	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	83,8
	<i>Lactobacillus plantarium</i> LOCK 7039 ^T	83,7
	<i>Bifidobacterium brevis</i> CCM 7825 ^T	84,2
	<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 ^T	84,2



Obrázek 10: PCR-HRM za použití primerů V3-F, V3-R

5.5.3 PCR-HRM za použití primerů P1V1, P2V1

Touto metodou zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky ukazuje tabulka 15, derivované křivky tání pak obrázek 11.

Za použití primerů P1V1, P2V1 byla pro DNA kmenů *Lactobacillus plantarium* LOCK 7039^T, *Bifidobacterium brevis* CCM 7825^T a *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T naměřena stejná teplota tání: 85,8 °C. Výskyt DNA některého těchto kmenů je pravděpodobný u vzorku 6, jehož teplota tání byla 85,7 °C.

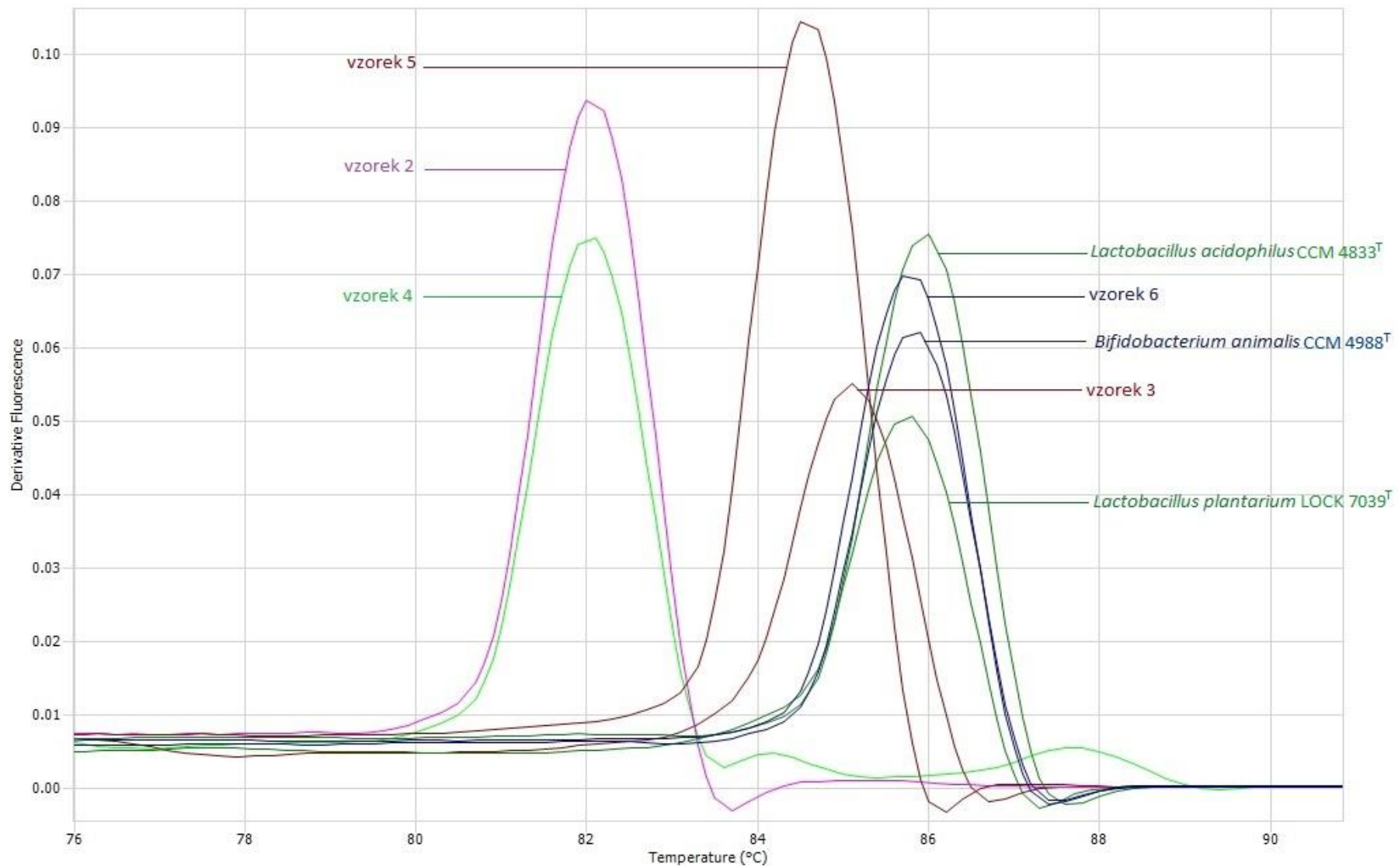
Ostatní vzorky nelze podle teploty tání DNA v nich obsažených zařadit k žádnému z referenčních kmenů. U vzorku 1 pravděpodobně došlo k chybě při míchání směsi, jelikož u něj nebyla zjištěna teplota tání.

Pomocí těchto primerů se povedlo rozlišit DNA kmenů *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T ($T_m=86,0$ °C) a *Lactobacillus gasseri* K7 ($T_m=85,9$ °C), nebyla však prokázána u žádného ze vzorků.

Tyto primery jsou tedy vhodné k odlišení kmenů *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus gasseri*. Informacím udávaným výrobcem použitého výrobku odpovídá pouze vzorek 6, u něhož by se mohla vyskytovat DNA kmene *Bifidobacterium animalis*.

Tabulka 15: Teploty tání při PCR-HRM za použití primerů P1V1, P2V1

	Vzorek	T_m [°C]
Vzorky izolované magnetickými částicemi Fkol B 100ox	Vzorek 1	-
	Vzorek 2	82
	Vzorek 3	85,1
Vzorky izolované magnetickými částicemi Fkol 77 ox	Vzorek 4	82,1
	Vzorek 5	84,6
	Vzorek 6	85,7
Pozitivní kontroly	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T	86,0
	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	85,9
	<i>Lactobacillus plantarium</i> LOCK 7039 ^T	85,8
	<i>Bifidobacterium brevis</i> CCM 7825 ^T	85,8
	<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 ^T	85,8



Obrázek 11: PCR-HRM za použití primerů P1V1, P2V

6 ZÁVĚR

Teoretická část pojednává o potravinách a doplňcích stravy, které obsahují mikroorganismy, především bakterie, a to buď žádoucí – probiotické, nebo nežádoucí – patogenní. Zmiňuje důležitost znalosti obsahu těchto mikroorganismů a s tím spojené metody, pomocí kterých je možné tyto mikroorganismy v potravinách identifikovat. Z těchto metod věnuje největší pozornost PCR, a to jak její konvenční podobě, tak i PCR v reálném čase, kdy se nejvíce zabývá vysokorozlišovací analýzou křivky tání (HRM).

V experimentální části byla z probiotických tablet Linex[®] Forte izolována DNA pro ověření přítomnosti bakterií deklarovaných výrobcem. Z tobolek výrobku byl vytvořen hrubý lyzát, z něhož byla následně izolována DNA pomocí dvou druhů magnetických mikročástic. U takto získané DNA byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota a byla použita jako matrice pro PCR s detekcí agarózovou gelovou elektroforézou. Ta potvrdila přítomnost mikroorganismů domény *Bacteria* a následně i konkrétních druhů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, což se shoduje s tvrzením výrobce použitých probiotických tablet. Pro bližší identifikaci druhů byla provedena HRM analýza se třemi druhy primerů pro posouzení jejich vhodnosti k rozlišení požadovaných druhů. Nejvhodnějšími se ukázaly primery V3-F, V3-R, které umožnily odlišení druhů rodu *Lactobacillus* od rodu *Bifidobacterium* i od sebe navzájem. Celkové výsledky o obsahu bakterií, které poskytla HRM analýza, se do značné míry shodovaly s informacemi deklarovanými výrobcem. U většiny vzorků tedy byla prokázána přítomnost DNA druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*.

Metoda polymerázové řetězové reakce s následnou vysokorozlišovací analýzou křivky tání se tedy ukázala jako velmi vhodná pro použití v potravinářství k identifikaci bakterií, a to i navzdory tomu, že tyto výrobky mohou obsahovat celou řadu PCR inhibitorů.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOMISE, Evropská. (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. 2005.
- [2] LE DRÉAN, Gwenola, Jean MOUNIER, Vasseur VASSEUR, Danielle ARZUR, Olivier HABRYLO a Georges BARBIER. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International journal of food microbiology* [online]. 2010, roč. 138, č. 1-2, s. 100–7. ISSN 1879-3460. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.013
- [3] ADAMS, Martin R. a Maurice O. MOSS. *Food microbiology*. Guildford: The Royal Society of Chemistry, 2008. ISBN 978-0-85404-284-5.
- [4] SAKURAI, Kenta, Shoko YAMAZAKI, Masaharu ISHII, Yasuo IGARASHI a Hiroyuki ARAI. Role of the glyoxylate pathway in acetic acid production by *Acetobacter aceti*. *Seibutsu-kogaku Kaishi* [online]. 2013, roč. 115, č. 1, s. 32–36. ISSN 09193758. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2012.07.017
- [5] FAO. *Probiotics in food*. B.m.: FAO and WHO, 2006. ISBN 92-5-105513-0.
- [6] ČIHÁK, R. *Anatomie 2*. 2. vyd. Praha: Grada, 2002. ISBN 80-247-0143-X.
- [7] SANDERS, Mary Ellen, Thomas TOMPKINS, James T. HEIMBACH a Sofia KOLIDA. Weight of evidence needed to substantiate a health effect for probiotics and prebiotics: Regulatory considerations in Canada, E.U., and U.S. *European Journal of Nutrition* [online]. 2005, roč. 44, č. 5, s. 303–310. ISSN 14366207. Dostupné z: doi:10.1007/s00394-004-0527-6
- [8] EJTAHED, Hosein S., Javad MOHTADI-NIA, Aziz HOMAYOUNI-RAD, Mitra NIAFAR, Mohammad ASGHARI-JAFARABADI, Vun MOFID a Ali AKBARIAN-MOGHARI. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of dairy science* [online]. 2011, roč. 94, č. 7, s. 3288–3294. ISSN 1525-3198. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2010-4128
- [9] CHAPMAN, Christopher M. C., Glenn R. GIBSON a Ian ROWLAND. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition* [online]. 2011, roč. 50, č. 1, s. 1–17. ISSN 1436-6207. Dostupné z: doi:10.1007/s00394-010-0166-z
- [10] CAPLICE, Elizabeth a Gerald F. FITZGERALD. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1999, roč. 50, č. 1-2, s. 131–149. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1605(99)00082-3
- [11] CO.LTD., Hopeland Bio-Tech. *Lactobacillus-Acidophilus-* [online]. 2010. Dostupné z: <http://www.probiotic-cn.com/ima/Lactobacillus-Acidophilus-.jpg>
- [12] UNIVERSITY OF ALBERTA. *Bifidobacterium animalis*. *Bacmap Genome Atlas* [online]. Dostupné z: http://bacmap.wishartlab.com/system/images/902/medium/Bifidobacterium_animalis.jpg?1319706489
- [13] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.

- [14] DEMNEROVÁ, Kateřina. MIKROBIOLOGICKÁ BEZPEČNOST POTRAVIN: SOUČASNÉ STRATEGIE PRO EFEKTIVNÍ KONTROLU. *Chemické listy* [online]. 2012, roč. 106. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_920-925.pdf
- [15] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [16] The three-step process of the polymerase chain reaction. *Encyclopaedia Britannica* [online]. [vid. 20. prosinec 2015]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/science/genetics>
- [17] CHEN, Bing-Yuan a Harry W. JANES. *PCR cloning protocols*. 2. vyd. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002. ISBN 08-960-3973-0.
- [18] ŠMARDA, Josef, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [19] TEVFIK DORAK, M. *Real-time PCR*. BIOS Advan. Abingdon: Taylor, 2006. ISBN 02-039-6731-3.
- [20] GENERI BIOTECH. Amplifikační krivka. *Gyn-test* [online]. 2016. Dostupné z: <http://www.gyn-test.cz/metody-provedeni-testu/img-kalibr-primka.gif>
- [21] MARIN, Muzzio S., Silvina QUINTANA, María R. LEUNDA, Margarita RECAVARREN, Inti PAGNUCO a Ernesto J. A. SPÄTH. A new method for simultaneous detection and discrimination of Bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) using real time PCR with high resolution melting (HRM) analysis. *Journal of Virological Methods*. 2016, roč. 227, s. 14–22.
- [22] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA--its role and potential in food analysis. *Food chemistry* [online]. 2014, roč. 158, s. 245–54. ISSN 0308-8146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111)
- [23] MARTINI, Marta, Serena MORUZZI, Paolo ERMACORA, Nazia LOI a Giuseppe FIRRAO. Quantitative real-time PCR and high-resolution melting (HRM) analysis for strain-specific monitoring of fluorescent pseudomonads used as biocontrol agents against soil-borne pathogens of food crops. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2015, roč. 46, č. 2, s. 277–285. ISSN 09242244. Dostupné z: [doi:10.1016/j.tifs.2015.10.017](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.017)
- [24] PORCELLATO, Davide, Hilde M. ØSTLIE, Knut RUDI, Tomas ISAKSSON a Siv B. SKEIE. Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in Norwegian cheese by high-resolution melt analysis. *Journal of dairy science* [online]. 2012, roč. 95, č. 9, s. 4804–12. ISSN 1525-3198. Dostupné z: [doi:10.3168/jds.2012-5386](https://doi.org/10.3168/jds.2012-5386)
- [25] ROY, Denis a Stephanie SIROIS. Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2000, roč. 191, č. 1, s. 17–24. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/191/1/17>
- [26] ŠIMENC, Janez a Uros POTOČNIK. Rapid differentiation of bacterial species by high resolution melting curve analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2011, roč. 47, č. 3, s. 256–263. ISSN 0003-6838. Dostupné z:

doi:10.1134/S0003683811030136

- [27] HJELMSØ, Mathis Hjort, Lars Hestbjerg HANSEN, Jacob BÆLUM, Louise FELD, William E. HOLBEN a Carsten Suhr JACOBSEN. High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, roč. 80, č. 12, s. 3568–3575. ISSN 10985336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.03923-13
- [28] TONG, Steven Y C a Philip M. GIFFARD. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2012, roč. 50, č. 11, s. 3418–3421. ISSN 00951137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01709-12
- [29] LOGAN, Julie, Kirstin EDWARDS a Nick SAUNDERS. *Real-time PCR: current technology and applications*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. ISBN 19-044-5539-5.
- [30] DUBERNET, Ségole'ne, Nathalie DESMASURES a Micheline GUÉGUEN. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. 2002, roč. 214, s. 271–275.
- [31] YANG, Samuel, Padmini RAMACHANDRAN, Richard ROTHMAN, Yu-hsiang HSIEH, Andrew HARDICK, Helen WON, Aleksandar KEKOJEVIC, Joany JACKMAN a Charlotte GAYDOS. Rapid Identification of Biothreat and Other Clinically Relevant Bacterial Species by Use of Universal PCR Coupled with High-Resolution Melting Analysis □ [online]. 2009, roč. 47, č. 7, s. 2252–2255. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00033-09

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A – adenin

bp – pár bází

C – cytosin

CCM – Česká sbírka mikroorganismů

ČR – Česká republika

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dATP – 2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát

dCTP – 2'-deoxycytidin-5'-trifosfát

dGTP – 2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát

dTTP – 2'-deoxythymosin-5'-trifosfát

dNTP – 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfát

dsDNA – dvouvláknová DNA

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EU – Evropská unie

G – guanin

HRMA – vysokorozlišovací analýza křivky tání

LOCK – Kolekce průmyslových organismů Polsko

NK – negativní kontrola

PCR – polymerázová řetězová reakce

PDI – index polydisperzity

PEG – polyetylen glykol

PGMA – polyglycidil metakrylát

PK – pozitivní kontrola

PL – Polsko

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – dodecylsulfát sodný

ssDNA – jednovláknová DNA

TBE – tris-borát-EDTA

TE – tris-EDTA

T – thymin

T_m – teplota tání

UV – ultrafialové záření