



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

ANALÝZA DNA LACTOBACILLUS S VYUŽITÍM PCR V REÁLNÉM ČASE A HRM ANALÝZY

LACTOBACILLUS DNA ANALYSIS USING REAL-TIME PCR AND HRM ANALYSIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Dagmar Aksamitová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0964/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Dagmar Aksamitová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	

Název diplomové práce:

Analýza DNA Lactobacillus s využitím PCR v reálném čase a HRM analýzy

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma (za využití aktuální literatury).
2. Ověření kvality a koncentrace bakteriální DNA izolované z různých sbírkových kultur.
3. Amplifikace bakteriální DNA pomocí konvenční PCR.
4. Zavedení metody PCR-HRMA k analýze bakteriální DNA Lactobacillus.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Dagmar Aksamitová
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

K rychlé a přesné identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus*, které jsou významnou součástí běžné gastrointestinální mikroflóry a fermentovaných mléčných výrobků, jsou v současné době využívány především amplifikační metody.

Cílem práce bylo analyzovat možnost rozlišení vybraných bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus* pomocí metody polymerázové řetězové reakce v reálném čase v kombinaci s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (qPCR-HRM). Celkem bylo testováno 5 primerů navržených pro qPCR-HRM analýzu bakterií mléčného kvašení. Specifita použitých primerů byla současně ověřena i pomocí bioinformatické analýzy.

Na základě analýzy DNA byly pro rozlišení testovaných kmenů rodu *Lactobacillus* jako nejvhodnější vybrány primery P1V1/P2V2, V3F/V3R a V6F/V6R. Vhodnost primerů V3F/V3R a V6F/V6R byla ověřena i na komplexním vzorku doplňku stravy, ze kterého byla DNA izolována pomocí magnetických částic. U DNA z těchto vyizolovaných buněk byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání, pomocí které byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus*. Získané výsledky se shodovaly s údaji uvedenými výrobcem.

ABSTRACT

The rapid and accurate identification of the bacterium of the genus *Lactobacillus*, which are an important part of the normal gastrointestinal microflora and fermented dairy products are currently mainly used amplification methods. The aim of the study was to analyze the possibility of resolution of selected bacterial strains of the genus *Lactobacillus*, using the method of polymerase chain reaction in the real time combined with high resolution melting curve analysis (qPCR-HRM). It was tested five primers designed for qPCR-HRM analysis of lactic acid bacteria. The specificity of the primers was also verified simultaneously using bioinformatic analysis. On the basis of analysis of the DNA were selected as the most appropriate primers P1V1/P2V1, V3F/V3R and V6F/V6R. The suitability of the primers V3F/V3R and V6F/V6R was verified on a complex sample of food supplement from which the DNA was isolated using magnetic particles. The presence of bacteria of the genus *Lactobacillus* was performed using high resolving melting analysis curves. The obtained results were in agreement with the information given by the manufacturer.

KLÍČOVÁ SLOVA

vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRMA), rod *Lactobacillus*, polymerázová řetězová reakce (PCR), izolace DNA, identifikace laktobacilů, fluorescenční barvivo

KEYWORDS

high resolution melt analysis (HRMA), genus *Lactobacillus*, polymerase chain reaction (PCR), DNA isolation, lactobacilli identification, fluorescent dye

AKSAMITOVÁ, D. *Analýza DNA Lactobacillus s využitím PCR v reálném čase a HRM analýzy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 68 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

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 tímto upřímně poděkovala vedoucí práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu pomoci při zpracování této diplomové práce a také konzultantce doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za její praktické rady a informace.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Bakterie mléčného kvašení	8
2.1.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	8
2.1.2	Metabolismus bakterií mléčného kvašení	9
2.1.3	Taxonomie bakterií rodu <i>Lactobacillus</i>	9
2.1.4	Význam a využití bakterií rodu <i>Lactobacillus</i>	10
2.1.5	Probiotika	10
2.2	Deoxyribonukleová kyselina	11
2.2.1	Struktura DNA	11
2.2.2	Stabilita DNA.....	12
2.2.3	Denaturace (tání) DNA	14
2.2.4	Replikace DNA	14
2.3	Metody analýzy probiotických mikroorganismů	16
2.3.1	Tradiční fenotypová identifikace	16
2.3.2	Molekulárně diagnostická identifikace	16
2.4	Polymerázová řetězová reakce	17
2.4.1	Princip PCR.....	17
2.4.2	Detekce PCR produktu.....	18
2.4.3	Modifikace PCR.....	19
2.4.4	Inhibitory PCR	20
2.4.5	Výhody, nevýhody a využití metody PCR v praxi.....	20
2.5	Vysokorozlišovací analýza křivek tání	21
2.5.1	Princip HRMA	21
2.5.2	Saturační barviva.....	21
2.5.3	Analýza dat	23
2.5.4	Výhody HRMA.....	23
2.5.5	Důležité aspekty v rozvoji metody analýzy HRM.....	24
2.6	Bioinformatická analýza	25
2.6.1	Molekulárně biologické databáze	25
2.6.2	Vyhledávání podobností sekvencí nukleových kyselin.....	25
3	CÍL PRÁCE	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1	Materiál	28
4.1.1	Použité mikroorganismy	28

4.1.2	Testovaný výrobek	29
4.1.3	Chemikálie	30
4.1.4	Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk.....	30
4.1.5	Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických částic	31
4.1.6	Magnetické částice	31
4.1.7	Komponenty pro PCR.....	31
4.1.8	DNA standardy použité při agarózové gelové elektroforéze	31
4.1.9	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	32
4.2	Přístroje a pomůcky	32
4.3	Metody.....	32
4.3.1	Příprava hrubého lyzátu z tablety BIFOLAC	33
4.3.2	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických částic.....	33
4.3.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA.....	33
4.3.4	Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	34
4.3.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	34
4.3.6	Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR	35
4.3.7	qPCR-HRM analýza	35
4.3.8	Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů	37
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
5.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	38
5.2	Ředění DNA pro PCR.....	39
5.3	Stanovení citlivosti PCR.....	41
5.3.1	Stanovení citlivosti PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	41
5.3.2	Stanovení citlivosti PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	42
5.4	qPCR-HRM analýza pro rod <i>Lactobacillus</i> sbírkových kmenů	43
5.4.1	qPCR-HRM analýza s primery P1V1/P2V1	45
5.4.2	qPCR-HRM analýza s primery UPF/UPR	48
5.4.3	qPCR-HRM analýza s primery LAC1/LAC2	51
5.4.4	qPCR-HRM analýza s primery V3F/V3R	54
5.4.5	qPCR-HRM analýza s primery V6F/V6R	57
5.5	qPCR-HRM analýza pro rod <i>Lactobacillus</i> reálného vzorku	60
5.5.1	Stanovení koncentrace a čistoty DNA	60
5.5.2	qPCR-HRM analýza z komplexního vzorku doplňku stravy.....	60
6	ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ.....	63
7	ZKRATKY.....	64
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	65

1 ÚVOD

Bakterie rodu *Lactobacillus* se řadí mezi nejvýznamnější probiotické bakterie s prospěšnými účinky na zdraví. Pozitivně ovlivňují střevní mikroflóru, mají protizánětlivé účinky a jsou prevencí proti potravinovým alergiím.

Mezi mikroorganismy s probiotickými vlastnostmi jsou řazeny především zástupci bakterií mléčného kvašení (BMK). Bakterie mléčného kvašení jsou komerčně využívány v potravinářském průmyslu z důvodu tvorby chuti, vůně a prodloužení trvanlivosti fermentovaných výrobků. Jsou tvořeny fylogeneticky příbuznými rody s několika společnými biochemickými rysy. Z hlediska využití v potravinářských fermentacích jsou významné kromě rodu *Lactobacillus* i rody *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*. Jedním z hlavních cílů potravinářského průmyslu je hledání a výběr nejvhodnějších kmenů pro dosažení vysoké kvality výrobků. Před použitím kmenů v potravinách je nezbytná jejich spolehlivá identifikace a charakterizace. Pro tyto účely je důležité mít k dispozici vhodné a rychlé metody identifikace cílových mikroorganismů a jejich vlastností.

V současné době se za tímto účelem stále častěji používají molekulárně diagnostické metody, které jsou založeny na analýze DNA. Jednou z jejich hlavních předností je jejich rychlost a spolehlivost. Pomocí amplifikačních metod, nejčastěji polymerázové řetězové reakce (PCR), je vybraná část genomu bakterie zmnožena do takového množství, které je možno detekovat dalšími technikami např. elektroforézou a vysokorozlišovací analýzou křivek tání - HRM analýzou.

HRM analýza je vysoce specifická a citlivá metoda zavedená do praxe v roce 2003 (Universita of Utah a Idaho Technology, Inc Salt Lake City, UT), která umožňuje rozlišení jednotlivých PCR produktů na základě teplot tání. Metoda je schopna zjistit i malé sekvenční rozdíly v PCR fragmentech na základě jejich teplot tání. Křivky tání lze použít pro skenování mutací, párování sekvencí a multiplexní genotypování - analýzy, které dříve tradičně požadovaly zpracování produktů PCR. V dnešní době je analýza HRM využívána v mnohých oborech a odvětvích jak vědy, tak i v běžné průmyslové praxi, včetně potravinářství. Metody založené na analýze DNA hrají stále větší roli nejen při kontrole bezpečnosti potravin, ale také k detekci falšování potravin vzhledem k její stabilitě.

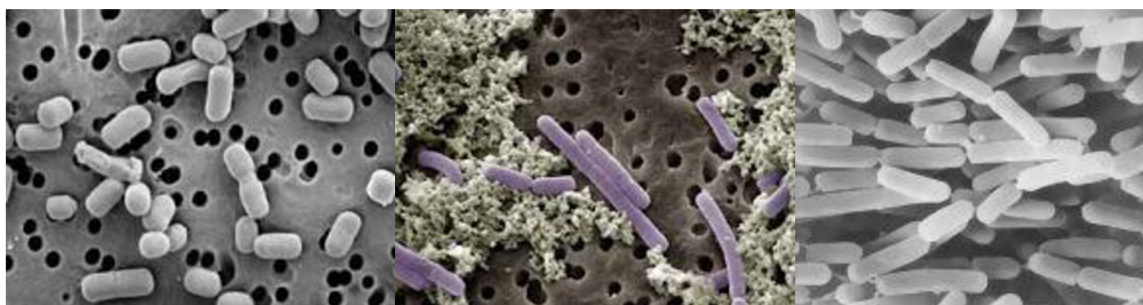
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakterie mléčného kvašení

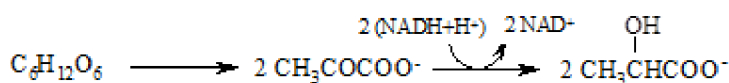
Mléčné bakterie představují početnou, morfologicky heterogenní skupinu mikroorganismů (Obr. 1). Vyznačují se komplexními nároky na výživu, které jsou charakteristické fermentací kyseliny mléčné (Obr. 2). Jsou velmi náročné na vitamíny, některé z nich vyžadují pro svůj růst až šest různých vitamínů. Koncentrace vitamínů potřebná pro dosažení maximálního růstu se u různých bakterií liší. [1,4]

Některé druhy BMK jsou po staletí používány k fermentaci nejrůznějších potravin, kde je využíváno jejich schopnosti produkovat kyselinu mléčnou. Během fermentačního procesu se např. v jogurtech zvyšuje koncentrace folátů, a tím i jejich nutriční hodnota.

Jsou nositeli statusu GRAS (Generally Recognized As Safe) tzn., že jsou považovány za zcela bezpečné. Řada druhů BMK je nejen proto využívána v mlékárenském průmyslu při výrobě jogurtů jako startovací kultury (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*) nebo při výrobě a zrání sýrů (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* a mnohé další). [2]



Obr. 1: *L. brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus* [10]



Obr. 2: Fermentace kyseliny mléčné [4]

2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Z potravinářského i biotechnologického hlediska je nejdůležitější mikroaerofilní rod *Lactobacillus*, který je v přírodě velmi rozšířený. Jeho druhy se vyskytují v mléce, kde vyvolávají přirozené kysání, dále v ústech a trávicím traktu savců, na travinách, obilí a jiných rostlinách a v půdě.

Laktobacily jsou řazeny do čeledi *Lactobacteriaceae*, jedná se o pravidelné grampozitivní, robustní, nesporulující tyčinky, tvořící často řetízky. Většina druhů je schopna růstu při teplotě 45 °C (*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* má při této teplotě optimum). [1,3]

Poměrná část laktobacilů získaných z klinických vzorků je mikroaerofilní, méně často jsou zastoupeny obligátní anaeroby. [3]

Většina druhů rodu *Lactobacillus* fermentuje glukózu a laktózu na laktát a odtud pochází jméno tohoto rodu. Patří sem druhy bakterií, které tvoří část přirozené mikroflóry úst člověka, gastrointestinálního traktu a dalších částí těla (tato směs laktobacilů bývá často nazývána Döderleinův laktobacil a jde např. o druh *Lactobacillus acidophilus*). Protože kyselina mléčná (laktát) díky snížení pH zastavuje množení hnilobných bakterií, využívá se laktobacilů ke konzervaci potravin a k silážování píce. Některé druhy laktobacilů se používají v mléčném průmyslu (výroba jogurtů, acidofilního mléka, sýrů). Takto připravené potraviny bývají pro obsah laktobacilů doporučovány pacientům trpícím střevní dysmikrobií, vzniklou z předchozího užívání širokospektálních antibiotik. [1,3]

2.1.2 Metabolismus bakterií mléčného kvašení

Podle produktů katabolického metabolismu rozdělujeme rod *Lactobacillus* do tří skupin:

- Skupina I - obligátně homofermentativní laktobacily
Zkvašují hexózy téměř výlučně na kyselinu mléčnou (>90 %). Tyto bakterie rostou spíše při vyšších teplotách kolem 45°C. Do této skupiny patří všechny termobakterie a další nově popsané druhy. Patří sem např. *L. delbrueckii ssp. delbrueckii*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. delbrueckii ssp. lactis*, *L. acidophilus*, *L. salivarius* a další [4,5].
- Skupina II - fakultativně heterofermentativní laktobacily
Hexózy jsou fermentovány hlavně na kyselinu mléčnou (>90 %). Při nedostatku glukózy produkují některé druhy kyselinu octovou, ethanol a kyselinu mravenčí. Pentózy zkvašují pomocí indukovatelné fosfoketolázy. Teplota růstu se pohybuje okolo 15°C. Patří sem například *L. plantarum*, *L. pseudoplantarum*, *L. casei ssp. casei*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus* a další.
- Skupina III - obligátně heterofermentativní laktobacily
Hexózy jsou fermentovány na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou (případně ethanol) a CO₂. Pentózy zkvašují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Teplota optimálního růstu se pohybuje většinou okolo 45°C. Tato skupina obsahuje v Orla-Jensenově pojetí heterofermentativní laktobacily tvořící plyn s původním pojmenováním betabakterie a jiné nově popsané druhy. Patří sem *L. bifermetas*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. confusus*, *L. divergens*, *L. fermentum* a další [4,5,6].

2.1.3 Taxonomie bakterií rodu *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou taxonomicky obtížně zařaditelné na úrovni druhu. Rozmanitost se odráží v značné fenotypové a genotypové variabilitě. Taxonomicky zařazené druhy rodu *Lactobacillus* viz jsou uvedeny v Tabulce 1. Srovnávací analýza 16S/23S rRNA genové sekvence odhalila fylogenetické vztahy mezi laktobacily. K jednoznačným a přesným taxonomickým účelům se využívá především molekulárně-biologických metod. [5,9]

Taxonomické zařazení laktobacilů [6]:

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

Tabulka 1: Taxonomicky zařazené druhy rodu *Lactobacillus* [12]

<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. collinoides</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. paralimentarius</i>
<i>L. acidifarinae</i>	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. paraplantarum</i>
<i>L. acidipiscis</i>	subsp. <i>coryniformis</i>	<i>L. ingluviei</i>	<i>L. pentosus</i>
<i>L. acidophilus</i>	subsp. <i>torquens</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. perolens</i>
<i>L. agilis</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. jensenii</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. algidus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. cypricasei</i>	<i>L. kalixensis</i>	<i>L. psittaci</i>
<i>L. amylolyticus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. kefiranofaciens</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. amylophilus</i>	subsp. <i>bulgaricus</i>	subsp. <i>kefiranofaciens</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. amylovorus</i>	subsp. <i>delbrueckii</i>	subsp. <i>kefirgranum</i>	<i>L. rogosae</i>
<i>L. animalis</i>	subsp. <i>indicus</i>	<i>L. kefiri</i>	<i>L. rossii</i>
<i>L. antri</i>	subsp. <i>lactis</i>	<i>L. kimchii</i>	<i>L. ruminis</i>
<i>L. arizonensis</i>	<i>L. diolivorans</i>	<i>L. kitasatonis</i>	<i>L. saerimneri</i>
<i>L. aviarius</i>	<i>L. durianis</i>	<i>L. kunkeei</i>	<i>L. sakei</i>
<i>L. aviarius</i>	<i>L. equi</i>	<i>L. leichmannii</i>	subsp. <i>carnosus</i>
subsp. <i>araffinosus</i>	<i>L. farciminis</i>	<i>L. lindneri</i>	subsp. <i>sakei</i>
subsp. <i>aviarius</i>	<i>L. ferintoshensis</i>	<i>L. malefermentans</i>	<i>L. salivarius</i>
<i>L. bifermantans</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. manihotivorans</i>	<i>L. sanfranciscensis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. fornicalis</i>	<i>L. mindensis</i>	<i>L. satsumensis</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. fructivorans</i>	<i>L. mucosae</i>	<i>L. sharpeae</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. frumenti</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. spicheri</i>
<i>L. cateniformis</i>	<i>L. fuchuensis</i>	<i>L. nagelii</i>	<i>L. suebicus</i>
<i>L. coleohominis</i>	<i>L. gallinarum</i>	<i>L. oris</i>	<i>L. suntoryeus</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. gasserii</i>	<i>L. panis</i>	<i>L. thermotolerans</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. gastricus</i>	<i>L. pantheris</i>	<i>L. trichodes</i>
subsp. <i>coryniformis</i>	<i>L. graminis</i>	<i>L. parabuchneri</i>	<i>L. ultunensis</i>
subsp. <i>torquens</i>	<i>L. hammesii</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. vaccinostercus</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. hamsteri</i>	subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. helveticus</i>	subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. versmoldensis</i>
<i>L. cypricasei</i>	<i>L. heterohiochii</i>	<i>L. paracollinoides</i>	<i>L. vitulinus</i>

2.1.4 Význam a využití bakterií rodu *Lactobacillus*

Z mikrobiologického hlediska je funkční význam bakterií rodu *Lactobacillus* pro technologii výroby potravin nepostradatelný:

- pozitivní význam
 - fermentované potraviny (přirozeně, startovací kultury)
 - probiotika
 - antibakteriální efekt (redukce pH, bakteriociny)
 - fermentace rostlinných zbytků v přírodě

Bakterie rodu *Lactobacillus* mohou také znehodnocovat potravinářské výrobky:

- negativní význam
 - kažení potravin (pivo, víno, ovoce, mléko, maso, ryby) [1,11,13]

2.1.5 Probiotika

Termínem probiotika jsou označovány živé mikroorganismy, které poskytují určité zdravotní benefity. Probiotika jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele. Jako probiotické kultury jsou obvykle používány bakterie, které přirozeně obývají lidský trávicí trakt. Nejpoužívanější probiotické mikroorganismy jsou zastoupeny převážně kmeny *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* (Tabulka 2). Příznivé účinky probiotických bakterií zahrnují tlumení alergií, imunostimulační účinky, prevenci kolorektálního karcinomu, zmírnění zácpy a prevenci a podpůrnou terapii zánětlivých střevních onemocnění a průjmů. [3,9,14,16]

Za normálních fyziologických podmínek, imunitní systém chrání jedince před většinou infekcí. Funkce imunitního systému může být, ale dočasně snížena v důsledku vnitřních či vnějších faktorů. Tato funkce být trvale oslabena například u starších pacientů nebo u kojenců, kdy ještě není plně vyvinuta. Dokonce i krátké období se sníženou imunitou, může ohrozit způsobilost

bojovat s infekcemi. Probiotika mají schopnost imunitní systém při jeho oslabení stimulovat. [14, 15,17]

Probiotikum musí splňovat několik kritérií. Bakteriální kmen musí být životaschopný, musí odolávat kyselině a žluči, být schopný setrvalost dlouho v zažívacím traktu, produkovat antimikrobiální látky k modulaci imunitní odpovědi a odolávat technologickým procesům.

Některá probiotika patří mezi bakteriální druhy, které jsou po staletí používány při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. [16,20]

Tabulka 2: Seznam nejpoužívanějších probiotických organismů [16,20]

Probiotické organismy		
druhy rodu <i>Lactobacillus</i>	druhy rodu <i>Bifidobacterium</i>	další mikroorganismy
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus rhamnosu</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Esterichia coli</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>		
<i>Lactobacillus reuteri</i>		
<i>Lactobacillus johnsonii</i>		

Biologické účinky probiotik jsou druhově i kmenově specifické a liší se nejen podle druhu mikroorganismů, ale účinky jsou rozdílné i mezi jednotlivými kmeny. Úspěch (nebo selhání) jednoho kmene nelze vztahovat na kmen jiný.

Jednoznačné identifikace lze dosáhnout zejména použitím molekulárně diagnostických metod založených na analýze nukleových kyselin (DNA). [14,15]

2.2 Deoxyribonukleová kyselina

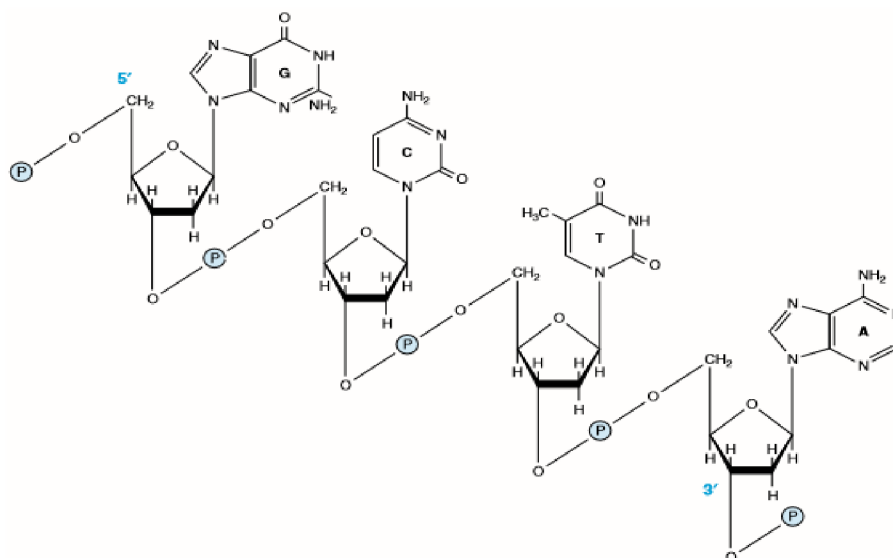
DNA je polymerní molekula a je chemickým základem dědičnosti.

Skutečnost, že DNA je nositelkou genetické informace, byla poprvé popsána v roce 1944 na základě série pokusů Averyho, MacLeoda a McCartyho. Tito vědci prokázali, že dědičnost spočívá v DNA a nikoli v proteinech. Autoři popisovali objevenou látku, dnes označovanou jako DNA, jako „transformační faktor“. Podobné pokusy byly provedeny s kvasinkami, se savčími kultivovanými buňkami, se zárodky hmyzu a hlodavců jako příjemci a klonovanou DNA jako dárce genetické informace. [18,19,20]

Bez nukleových kyselin život na naší planetě nemožný. DNA představuje genetický materiál všech buněk, eukaryotických i prokaryotických. [18,20]

2.2.1 Struktura DNA

DNA obsahuje 2-deoxy-D-ribosu a čtyři deoxyribonukleotidy adenin, guanin, cytosin a thymin. Tyto monomerní jednotky DNA jsou spojeny v polymerní formu pomocí 3',5'-fosfodiesterových vazeb, jak je znázorňuje Obr. 3. [18,21]



Obr. 3: Úsek řetězce DNA, ve kterém jsou purinové a pyrimidinové base adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G) napojeny N-glykosidovými vazbami na 2'-deoxyribosové zbytky spojované fosfodiesterovými vazbami v jeden řetězec. [18]

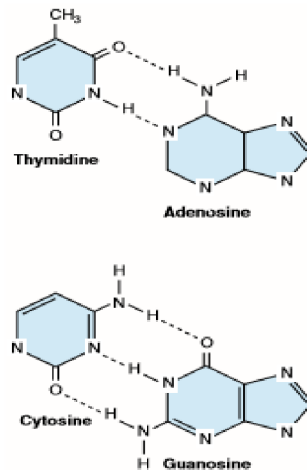
Nukleové kyseliny mají – stejně jako bílkoviny – primární a sekundární strukturu, ale také vyšší struktury. Podle rozdílných struktur, podle počtu a tvaru řetězců i podle hodnot molekulové hmotnosti (Mr) rozeznáváme několik typů nukleových kyselin, z nichž největší význam mají:

Jaderná DNA	DNA
Plasmidová DNA	csDNA
DNA dvouřetězcová (double strand)	dsDNA
DNA jednořetězcová (single strand)	ssDNA
DNA mitochondriální	mtDNA [21]

2.2.2 Stabilita DNA

Informační obsah DNA (genetický kód) je dán pořadím monomerů - purinových a pyrimidinových deoxyribonukleotidů. Popsaný polymer je polární; na jednom konci je 5'-hydroxylová nebo fosfátová skupina, zatímco na druhém konci je 3'-fosfát nebo hydroxylová skupina. Jelikož genetická informace je uložena v pořadí monomerních jednotek polymeru, existuje mechanismus, který reprodukuje nebo replikuje tuto specifickou informaci s vysokou přesností. Tento požadavek spolu s údaji z rentgenové difrakce molekuly DNA a se Chargaffovým pozorováním, že v molekule DNA je shodné množství deoxyadenosinových (A) a thymidinových nukleotidů (T) - (A = T) a shodné množství deoxyguanosinových (G) a deoxycytidinových nukleotidů (C) - (G = C), vedl na začátku padesátých let Watsona, Cricka a Wilkinse k návrhu modelu dvouřetězcové molekuly DNA. Dva řetězce DNA jsou spojeny vodíkovými můstky mezi purinovými a pyrimidinovými basemi do pravotočivé dvoušroubovice. Párování purinových a pyrimidinových nukleotidů opačných řetězců je velice specifické. Je dáno vodíkovými vazbami A s T a G s C (Obr. 4). Ve dvouřetězcové molekule je omezena rotace kolem fosfodiesterových vazeb. Oba řetězce, jejichž protější base jsou vázány vodíkovými vazbami, jsou svinuty kolem osy do dvoušroubovice. Dvouřetězcová DNA existuje v 6 formách (A až E a Z). Za fyziologických podmínek se DNA vyskytuje obvykle ve formě B (nízká koncentrace solí a vysoký stupeň

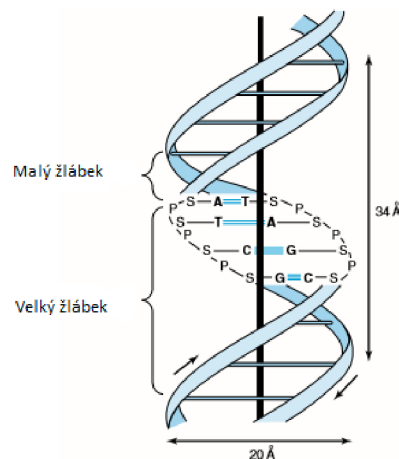
hydratace). Jedna otáčka B-formy DNA obsahuje 10 párů basí. Jedna otáčka měří 3,4 nm. Dvoušroubovice má průměr 2 nm. Jak ukazuje Obr. 4, deoxyguanositový a deoxycytidinový nukleotid jsou spojeny třemi, zatímco pár A-T dvěma vodíkovými vazbami. Pár G-C je asi o 50 % pevnější než A-T. Z tohoto důvodu, a též na základě hydrofobních interakcí mezi vrstvenými basemi, jsou úseky DNA bohaté na páry G-C mnohem odolnější k denaturaci než úseky bohaté na páry A-T. [18,19,20]



Obr. 4: Spárování deoxyadenosinu a thymidinu je umožněno 2 vodíkovými vazbami. Tři takové vazby vzniknou mezi deoxycytidinem a deoxyguanositinem. Přerušované čáry představují vodíkové vazby. Sacharidovou složkou DNA je 2-deoxyribosa [18]

V molekule DNA jsou žlábký, vždy jeden velký a jeden malý žlábek, které jsou podél molekuly paralelně s fosfodiesterovou páteří (Obr. 5). V žlábkách mohou proteiny specificky interagovat s dostupnými atomy nukleotidů (obvykle vodíkovými vazbami), a tak rozpoznávat specifické nukleotidové sekvence a navazovat se na ně, aniž by se porušilo párování basí dvoušroubovicové molekuly DNA. [18]

V neutrálním prostředí buňky se řetězec ionizuje na fosfátových zbytcích. Vzniklé záporné náboje molekulu stabilizují, neboť se vzájemně odpuzují a tím udržují řetězec extendovaný. Fosfodiesterová vazba je napadnutelná fosfodiesterasami; energetická bariéra proti této hydrolytické reakci je vysoká, a proto je polynukleotidový řetězec stálý – DNA lze dokázat i ve fosilích. [21,22]



Obr. 5: Watsonův a Crickův model dvoušroubovicové struktury DNA [18]

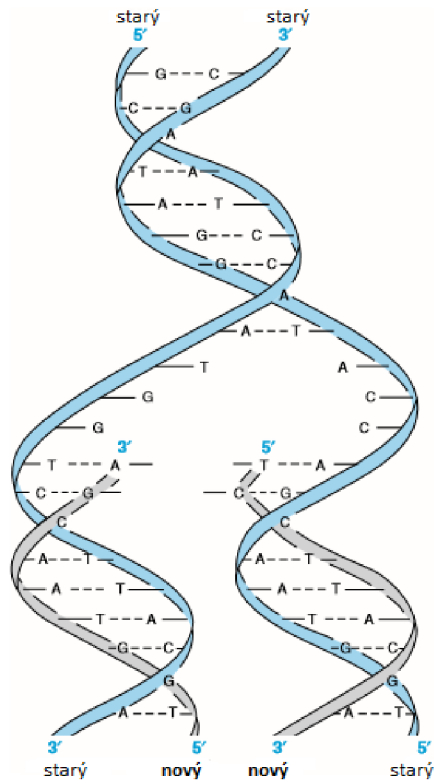
2.2.3 Denaturace (tání) DNA

Denaturace DNA se používá k analýze její struktury. Dvouřetězcová struktura DNA může být rozvolněna („tání“) ohřátím nebo zvýšením koncentrace soli. Rozpojí se páry basí a base se volněji pohybují v prostoru, i když zůstávají navázány na fosfodiesterovou páteř polymeru. Při této denaturaci se zvýší optická absorbance purinových a pyrimidinových basí. Jev se nazývá denaturační hyperchromicita. Díky interakcím naskládaných basí a vodíkovým vazbám mezi nimi je dvouřetězcová molekula DNA poměrně rigidní útvar a její roztok je viskosní. Viskosita se při denaturaci ztratí. Řetězce dané molekuly DNA se oddělují v závislosti na teplotě. Teplota, při které absorbance stoupne o polovinu celkového vzestupu, se nazývá bod tání neboli T_m . T_m je závislý na složení basí DNA a na koncentraci soli v roztoku. Desetinásobné zvýšení koncentrace jednomocných kationtů zvýší T_m o 16,6 °C. Formamid, který se běžně používá v pokusech s rekombinantní DNA, uvolňuje vodíkové vazby mezi basemi a snižuje T_m . To umožňuje oddělovat řetězce DNA a řetězce hybridů DNA-RNA při mnohem nižších teplotách, a tak se snižuje na minimum trhání řetězce, které je při vysokých teplotách časté. [18]

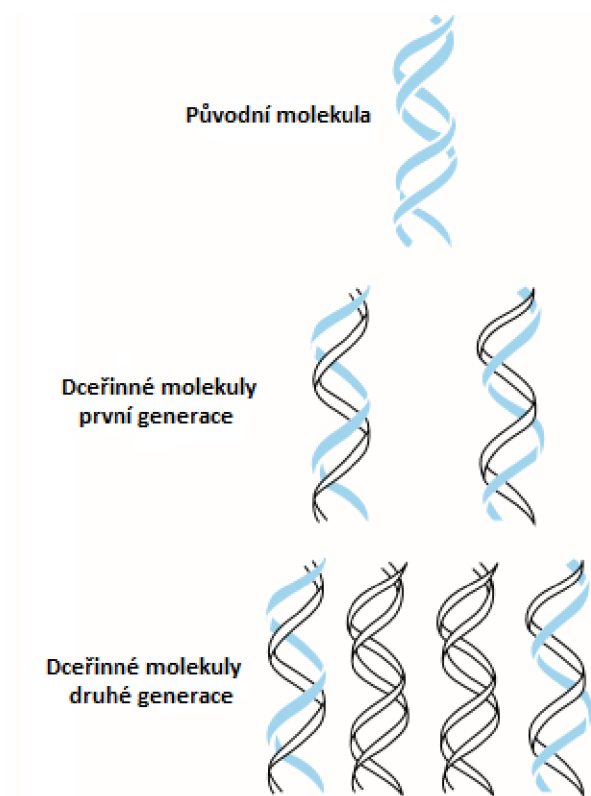
2.2.4 Replikace DNA

Genetická informace uložená v nukleotidové sekvenci DNA slouží dvěma účelům. Je zdrojem informace pro syntézu všech proteinů buňky a organismu a poskytuje informace děděné dceřinou buňkou nebo potomkem. K oběma těmito funkcím je třeba, aby DNA byla matricí (templátem) v prvním případě pro přepis (transkripci) informace do RNA a ve druhém případě pro replikaci informace do dceřiné molekuly DNA. Komplementarita modelu dvoušroubovicové DNA naznačuje, že replikace molekuly DNA probíhá semikonservativním způsobem. Když se při replikaci jeden řetězec dvouřetězcové mateřské molekuly DNA oddálí od svého komplementu, pak každý z obou řetězců poslouží jako matrice, na které je syntetizován nový komplementární řetězec (Obr. 6). Každá ze dvou nově vytvořených dvouřetězcových dceřiných molekul DNA obsahuje jeden původní a jeden nově syntetizovaný řetězec (Obr. 7). Po replikaci přejde každá z těchto DNA do jedné ze dvou dceřiných buněk, takže obě obsahují molekuly DNA s identickou informací, jako měla mateřská buňka, i když získané molekuly DNA vznikly semikonservativně.

Replikace DNA tedy musí být úplná a musí být provedena s vysokou přesností, aby se v organismu a uvnitř druhu zachovala genetická stabilita. Replikace DNA je složitý děj zahrnující mnoho buněčných funkcí a několik ověřovacích postupů, aby zmíněná přesnost byla zajištěna. [18,19]



Obr. 6: Dvoušroubovicová struktura DNA a templátová funkce starých řetězců, na kterých se syntetizují nové komplementární řetězce. [18]



Obr. 7: Replikace DNA je semikonservativní. Během každé replikace jsou oba řetězce DNA použity jako matrice pro syntézu nových, komplementárních řetězců. [18]

2.3 Metody analýzy probiotických mikroorganismů

Základem analýzy mikroorganismů, a to nejen v potravinových výrobcích, jsou mikrobiologické metody nebo metody molekulární biotechnologie, kde je cílem získat templátovou DNA, která je následně analyzována. [24]

2.3.1 Tradiční fenotypová identifikace

Tato metoda je založena převážně na morfologických charakteristikách buněk, ale jako spolehlivá metoda je často nedostatečná. Proto se v současné době používají převážně molekulárně diagnostické metody. [24]

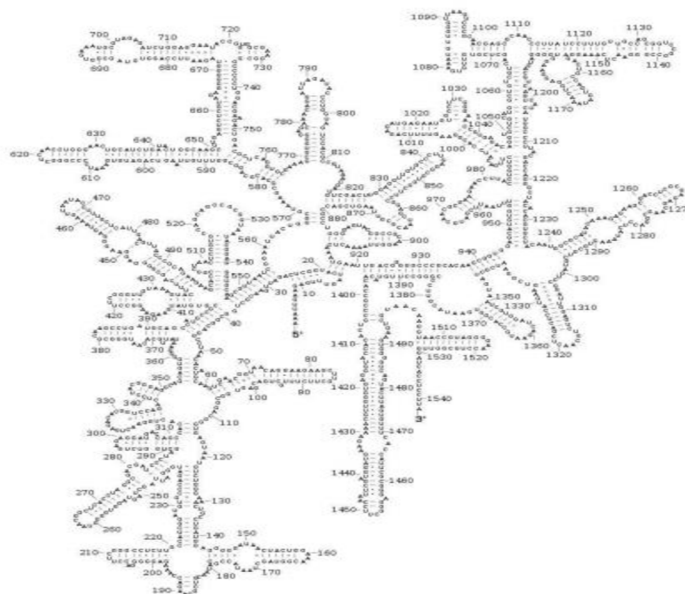
2.3.2 Molekulárně diagnostická identifikace

V dnešní době je pro rodovou a druhovou identifikaci bakterií k dispozici celá řada molekulárně diagnostických metod. U některých je potřeba velkého množství DNA či RNA ve vzorku, protože nedochází k amplifikaci (namnožení) cílových nukleových kyselin. Mezi tyto klasické metody řadíme např. southern blot a northern blot. Oproti tomu amplifikační metody (založené na polymerázové řetězové reakci) se vyznačují vysokou sensitivitou a specifitou a jsou dobře funkční i při nízkém množství cílových nukleových kyselin v analyzovaném vzorku. [25]

Velký rozvoj molekulárně – diagnostických technik přinesl značné změny v taxonomii bakterií a umožňuje spolehlivý způsob porovnání příbuznosti mezi jednotlivými rody, druhy i kmeny. Mezi prvními molekulárními diagnostickými metodami byly popsány: DNA/DNA hybridizace (a její fluorescenční varianta in situ hybridizace – FISH), sekvenční analýza genů pro 16S rRNA (Obr. 8) nebo 23S rDNA, hybridizace se specifickými sondami, RFLP analýza (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) nebo ribotypizace. [7,26]

Metoda, které byla použita v této diplomové práci je polymerázová řetězová reakce (PCR) s elektroforetickou detekcí fragmentů a PCR v reálném čase s analýzou vysokorozlišovacích křivek tání detekovaných fragmentů.

Základním požadavkem pro správnost molekulárních metod je izolace kvalitní DNA. [26]



Obr. 8: Struktura bakteriální 16S rRNA [39]

2.4 Polymerázová řetězová reakce

Rozvoj nové generace molekulárních metod předurčila právě polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction). [7] Polymerázová řetězová reakce (PCR) je enzymová metoda, která slouží k rychlé syntéze velkého množství definovaného úseku DNA in vitro. Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné PCR použít pro zjištění přítomnosti velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku. Základem úspěšné reakce je použití neporušeného úseku DNA, jenž má být amplifikovaný. [8,23]

2.4.1 Princip PCR

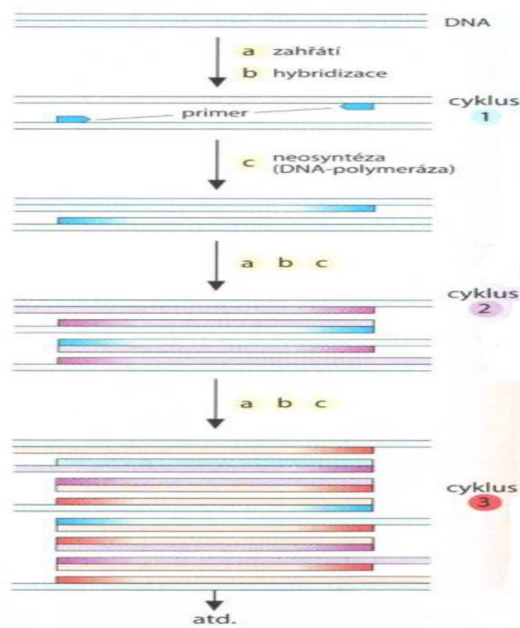
PCR je metoda zmnožení určité sekvence DNA. Její specifita je založena na použití dvou výchozích nukleotidových jednotek (primerů), které hybridizují do komplementárních sekvencí opačných vláken DNA a ohraničují žádanou sekvenci. Vzorek DNA je nejdříve zahříván, aby se oddělila obě vlákna, primery se nechají navázat na DNA a každé vlákno je kopírováno DNA-polymerázou počínajíc od primeru. Dvě vlákna DNA slouží pak jako matrice pro syntézu nové DNA ze dvou primerů. Opakování cyklů denaturace, připojení primerů k jejich komplementárním sekvencím a prodlužování připojených primerů DNA polymerázou vede k exponenciálnímu množení segmentů DNA o definované délce (viz Obr. 9).

Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat. Tyto kroky se 25x až 35x cyklicky opakují. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA. Nově vytvořená DNA se v dalším cyklu stává matricí (templátovou DNA). Celý proces amplifikace probíhá v přístroji termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. [18,23,25]

Aby byl zabezpečen správný průběh PCR, je potřeba připravit reakční směs (master mix) obsahující templátovou DNA, primery, dNTPs, reakční pufr, hořčičnaté kationty, PCR H_2O a DNA-polymerázu (nejčastěji se používá termostabilní Taq polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*). Výsledným produktem polymerázové řetězové reakce jsou amplikony, úseky DNA s definovanou délkou, o velikosti obvykle desítky až tisíce párů bází (bp). Koncentrace a množství jednotlivých komponent reakční směsi hraje rozhodující roli při tvorbě PCR produktu a stanovuje se empiricky.

První PCR reakce používaly DNA polymerázu *E. coli*, která však byla v každém denaturačním cyklu teplem nevratně zničena. Náhrada teplotně stabilní DNA-polymerázou z *Thermus aquaticus* - organismu, který žije a rozmnožuje se při 70 - 80 °C, tento problém odstranila a umožnila reakci automatizovat. Polymerázová reakce může nyní probíhat při 70 °C, kdy se také zlepšila specifita reakce a výtěžek DNA. [18,23,25]

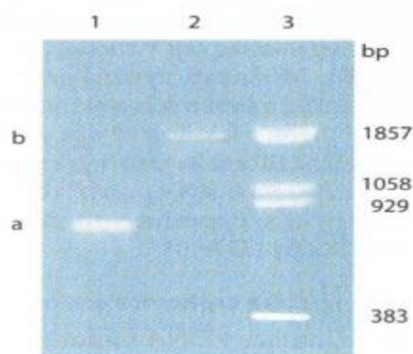
Správný průběh reakce se sleduje systémem kontrol. Ty nám mohou indikovat např. kontaminaci PCR komponent (negativní kontrola) nebo funkčnost všech složek reakce (pozitivní kontrola). Aby nedocházelo ke křížovým kontaminacím, je potřeba mít od sebe oddělené prostory pro izolaci DNA, přípravu reakční směsi (nejlépe laminární box) a manipulaci s PCR produkty, včetně samostatných pomůcek pro každou z těchto činností. Tyto místnosti by se měly pravidelně dekontaminovat UV světlem. [18,23,25]



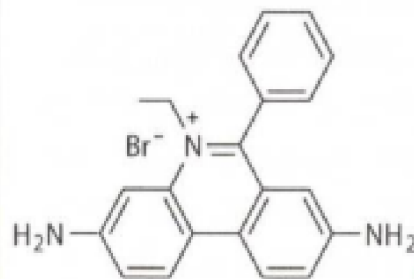
Obr. 9: Polymerázová řetězová reakce [23]

2.4.2 Detekce PCR produktu

K analýze produktů polymerázové řetězové reakce mohou být použity různé metody. Např. hybridizace, ELISA nebo sekvenční analýza. K rozdělení fragmentů DNA je pro svoji technickou jednoduchost a vysokou spolehlivost nejčastěji užívána tzv. gelová elektroforéza (ELFO). Pohyblivost molekul v elektrickém poli určité intenzity je závislá na jejich velikosti, tvaru a náboji. Na rozdíl od bílkovin, u nichž jsou všechny tři uvedené faktory variabilní, je u nukleových kyselin poměr hmotnosti a náboje konstantní, protože nukleotidy, které je tvoří, mají stejnou hmotnost a nesou vždy negativní náboj. Pokud provádíme elektroforézu v nosiči s velkými póry, který nerozděluje podle velikosti a tvaru, je pohyblivost molekuly závislá jen na její hmotnosti. Jako vhodný materiál pro nosič jsou v genové technologii využívány gely polysacharidu agarózy. Agarózové gely nejsou příliš stabilní a nalévají se horizontálně do plastové komory. K vizualizaci rozdělených fragmentů se gely po proběhlé reakci barví roztokem etidíumbromidu, Toto barvivo vydává po vazbě na DNA pod UV paprsky růžovou fluorescenci, ve vodném roztoku ale nefluoreskuje. Na ilustračním Obr. 10 lze pozorovat výsledek elektroforézy dvou rozdílných fragmentů (běh 1 a 2). Srovnání jejich profilů s dráhou polynukleotidu známé délky (běh 3), bp (páry bází) udává pro fragment 1 délku asi 800 bp a 1800 bp pro fragment 2. Pruhy lze po obarvení z gelu vypreparovat a v nich obsaženou DNA extrahovat a použít v dalších pokusech. [8,23]



Obr. 10: Výsledek elektroforézy DNA [23]



Obr. 11: Etidiumbromid [23]

Další detekční metodu lze použít vysokorozlišovací analýzu křivek tání (qPCR-HRMA), kdy pro rozlišení fragmentů je použito DNA saturujících barviv. Více o této metodě viz kapitola 2.5.

2.4.3 Modifikace PCR

Polymerázová řetězová reakce je používána ve více variantách, které jsou upraveny podle účelu analýzy.

Dnes velmi využívaným typem polymerázové řetězové reakce je **real-time PCR** (qPCR), která umožňuje přímou detekci a kvantifikaci PCR produktu „v reálném čase“ (v průběhu celé PCR reakce), nikoliv až po skončení reakce. Při stanovení PCR produktů se využívá sledování fluorescenčního signálu. Jeho intenzita je permanentně snímána a analyzována speciálním přístrojem, ve kterém zároveň probíhá PCR, tudíž se amplikony nemusí detekovat elektroforeticky. Tím je tato technika zjednodušena a urychlena. Stanovení množství molekul nukleových kyselin ve vzorku se využívá při studiu detekce patogenních mikroorganismů a virů. Předností metody qPCR je zejména rychlost - bez nutnosti detekce PCR produktu (výsledek do několika hodin), jednoduchost provedení, přesnost a citlivost.

K detekci vznikajícího PCR produktu lze využít fluorescenční barviva, fluorescenčně značené hybridizační sondy nebo fluorescenčně značené primery. [25]

- Interkalační barviva vázající se na DNA: jedná se o fluorescenční barviva. Mezi nejpoužívanější patří kyaninová barviva SYBR Green, která fluoreskují po vazbě na menší žlábek dsDNA. Fluorescence SYBR green I je po vazbě na DNA až 1 000x vyšší a fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR-produktu. Měření intenzity signálu probíhá na konci fáze elongace nebo průběžně. Hlavní nevýhodou fluorescenčních barviv je nemožnost rozlišení specifických a nespecifických produktů PCR z důvodu, že se mohou vázat do jakékoli dvoušroubovice DNA, např. dimery primerů.

Prvním interkalačním barvivem použitým pro qPCR byl ethidium bromid (EtBr – viz Obr. 11), který vydává fluorescenci po navázání na dsDNA. Z důvodu jeho mutagenních účinků a malé senzitivity se však dnes již téměř nepoužívá. Ve vyšších koncentracích se sice senzitivita EtBr zvyšuje, ale tyto koncentrace inhibují PCR reakci.

- Fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část amplikonu: např. sondy TaqManTM - jsou to oligonukleotidy a jsou komplementární k jednomu z řetězců templátové DNA v místě mezi oběma primery. Teplota tání (T_m) je asi o 10 °C vyšší než je T_m primerů. Sonda se váže na vnitřní část amplifikované sekvence a pokud vytváří homoduplex. Je rozložena 5' exonukleázovou aktivitou *Taq* DNA-polymerázy. To způsobí ukončení zhášení a emisi fluorescence. Sonda, na

rozdíl od interkalačních barviv detekují výhradně specifické produkty. Jejich hlavní nevýhodou je vysoká cena a komplikovaná optimalizace, nelze je užít při analýze křivky tání.

- Fluorescenčně značené primery: primery, jako např. AmpliFluor™ nebo technologie LUX, s vlásenkovou strukturou fungují na podobném principu jako sondy (k výrazné emisi dochází až při narušení struktury primeru během syntézy DNA u specifických produktů) [25,27,28,29].

2.4.4 Inhibitory PCR

Technika PCR umožňuje teoreticky detekovat jednu jedinou buňku či molekulu DNA. Správný průběh reakce ale může být narušen přítomností celé řady inhibitorů. Zejména potravinové matrice se vyznačují jejich velkým množstvím.

Za snížení citlivosti či úplné selhání reakce mohou být zodpovědné bakteriální enzymy (nukleázy, proteázy), polysacharidy, proteiny, lipidy a další složky potravin (např. ionty Ca^{2+} u mléčných výrobků, myoglobin u masných výrobků), složky kultivačních médií, detergenty, antibiotika, aj.

Již při izolaci nukleové kyseliny může dojít k selhání buněčné lýzy nebo degradaci templátové DNA či RNA. Poškozeny mohou být také primery (zejména ty s nižší teplotou tání), případně může dojít k obsazení jejich cílových míst. Termostabilní DNA-polymerázu mohou inhibitory inaktivovat. K inhibici dojde snáze, pokud je nízká koncentrace templátové nukleové kyseliny a pokud se tvoří dlouhý amplikon nebo amplikon s nižším obsahem G+C bází. U real-time PCR může být inhibován také fluorescenční signál. Tyto nežádoucí vlivy se mohou projevit jako falešně negativní výsledek. [25]

2.4.5 Výhody, nevýhody a využití metody PCR v praxi

Množit jde sekvence DNA o délce od 50-100 bp až do 2,5 kbp. Po dvaceti cyklech je stupeň namnožení $\sim 10^6$ a po třiceti cyklech $\sim 10^9$. Metoda dovoluje namnožit a analyzovat DNA z jediné buňky. [18]

Automatizovaná chemická syntéza středně dlouhých nukleotidů (-100 nukleotidů) s přesnou sekvencí je nyní rutinní laboratorní metodou. Má však i svá omezení. Její citlivost je tak vysoká, že u kontaminovaných vzorků se mohou vyskytnout falešně pozitivní reakce. Naopak v přítomnosti kontaminujících látek, které PCR inhibují, může dojít k falešně negativní reakci. V potravinářské mikrobiologii se polymerázová řetězová reakce využívá jednak k rychlé detekci alimentárních patogenů přímo ze vzorku, jako jsou *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, atd. Využití nachází také při rodové konfirmaci a druhové identifikaci mnoha bakterií (např. bakterie mléčného kvašení) a dále při průkazu genů kódujících faktory virulence, genů rezistence k antimikrobiálním látkám a genů zodpovědných za tvorbu enterotoxinů, biogenních aminů či bakteriocinů.

Ve vzorcích potravin se patogenní mikroorganismy vyskytují obvykle v nízkých počtech a při jejich průkazu standardními metodami je nutné je nejprve pomnožit, čímž se prodlužuje doba identifikace. Využití PCR tedy významně zkracuje potřebnou dobu stanovení. Na druhou stranu, stejně jako u jiných alternativních metod, musí být pozitivní výsledek (průkaz patogenního mikroorganismu přímo ve vzorku) potvrzen standardní kultivační metodou.

Každý syntetický cyklus trvá několik minut, takže celou molekulu lze připravit syntézou poměrně krátkých segmentů, které se pak navzájem spojí. Oligonukleotidy jsou nyní nepostradatelné pro sekvenování DNA, prohledávání GenBank, stanovení změn pohyblivosti DNA, v řetězové polymerázové reakci a v mnoha jiných aplikacích. [18]

2.5 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Kombinace PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (qPCR-HRM) je vysoce citlivá a rychlá metoda, kterou lze využívat k záchytu jedno- i více nukleotidových záměn v DNA, slouží jako nejjednodušší metoda pro stanovení genotypu, skenování mutace a odpovídající sekvence. Vysokého rozlišení je dosahováno použitím tzv. DNA saturujících barviv a pomocí přístrojů s vysoce přesnou a stabilní kontrolou časového teplotního gradientu. Během postupného zahřívání dochází k tavení dvoušroubovice DNA, čímž se z ní barvivo uvolňuje a dochází k poklesu fluorescence. Přítomnost heteroduplexu v analyzovaném amplikonu DNA mění tvar křivky tání, který je charakteristický pro konkrétní záměnu na konkrétní pozici daného amplikonu.

Analýza HRM se nevztahuje pouze na klinický výzkum a diagnostiku, ale je také účinným nástrojem při analýze potravin. Je velmi nákladově efektivní metodou s vysokou rozlišovací schopností pro identifikaci a diferenciaci kultivarů a blízkce příbuzných druhů mikroorganismů. [29,30]

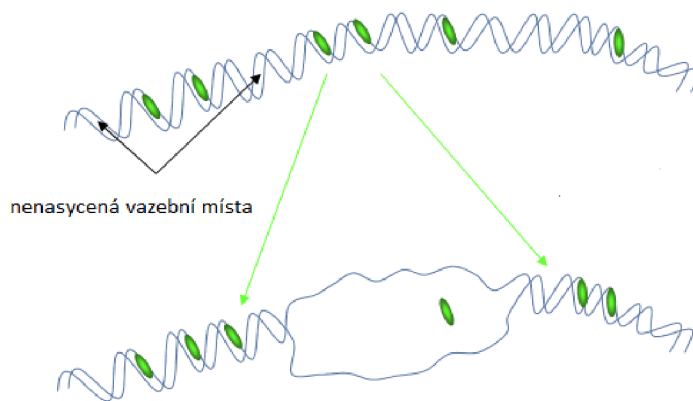
2.5.1 Princip HRMA

DNA s dvojitým řetězcem (dsDNA) je při pokojové teplotě velmi stabilní. S rostoucí teplotou ale řetězce začínají disociovat, dokud nejsou zcela odděleny. Teplota, při které je právě 50 % z DNA jednořetězcové (ssDNA), se nazývá teplota tání (T_m). T_m je závislá na délce párů bází guanin-cytosin (GC), obsah DNA fragmentu - GC páry bází jsou stabilnější než délka páru bází adenin-thymin (AT). Sekvence DNA s vysokým obsahem GC proto mají vyšší T_m než DNA sekvencí, které obsahují nízký počet GC párů bází. Analýza křivky tání je často používána s polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase (real-time PCR) za účelem ověření, zda byly vytvořeny správné produkty PCR (amplikony). Předpokladem pro provedení analýzy křivky tání je amplifikace templátu v přítomnosti dsDNA s navázaným saturovaným barvivem, např. SYTO-9. Ve vázaném stavu vykazuje vysokou fluorescenci.

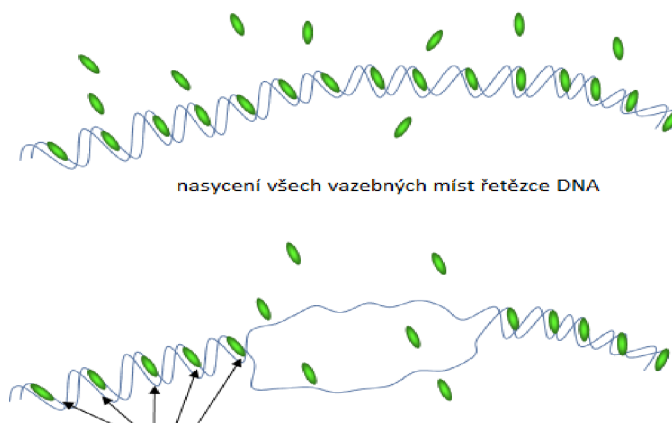
Vysokorozlišovací analýza křivek tání je založena na postupném zvyšování teploty po posledním cyklu PCR. Na začátku získáme vysoký fluorescenční signál vzhledem k vysokému počtu (dvouřetězcových) amplikonů přítomných v PCR zkumavce. Nicméně, při vyšší teplotě dsDNA disociuje, barvivo se uvolní a je pozorováno snížení fluorescenčního signálu. [29,30]

2.5.2 Saturací barviva

Fluorescenční barviva, která se běžně používají pro real-time PCR a analýzu tání např. SYBRGreen, PicoGreen, Etidiumbromid atd., nefungují dobře pro HRM analýzu. Důvodem je použití barviva v omezené koncentraci, vzhledem k toxicitě pro PCR a její následné inhibici. Z důvodu nižší koncentrace nesaturační barvivo nevyplní všechna vazebná místa v řetězci DNA. (Obr. 12) Pro HRM analýzu byla vyvinuta saturační barviva, která poskytují maximální fluorescenci (sytost). Saturační barviva jsou oproti fluorescenčním barvivům mnohem méně toxická, takže jejich vyšší koncentrace je bez rizika inhibice PCR. Barvivo vyplní všechna vazebná místa v řetězci DNA a nezanechá žádný volný prostor. [48, 49] (Obr. 13)



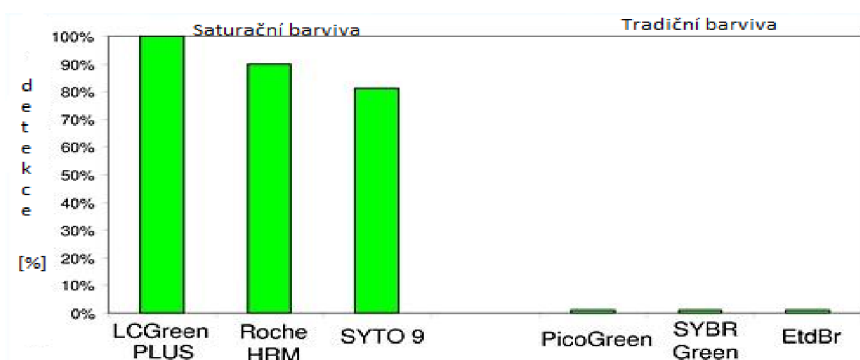
Obr. 12: Nesaturační barvivo [48]



Obr. 13: Saturační barvivo [48]

Nejdůležitější kritéria užitečného barviva je také schopnost detekovat nízké produkty T_m a heteroduplexů ve směsi DNA v jejím průběhu tavení.

Na Obr. 14 jsou znázorněny nejcitlivější barviva – seřazeny dle detekční citlivosti, která jsou využívány pro HRM analýzu. [47]

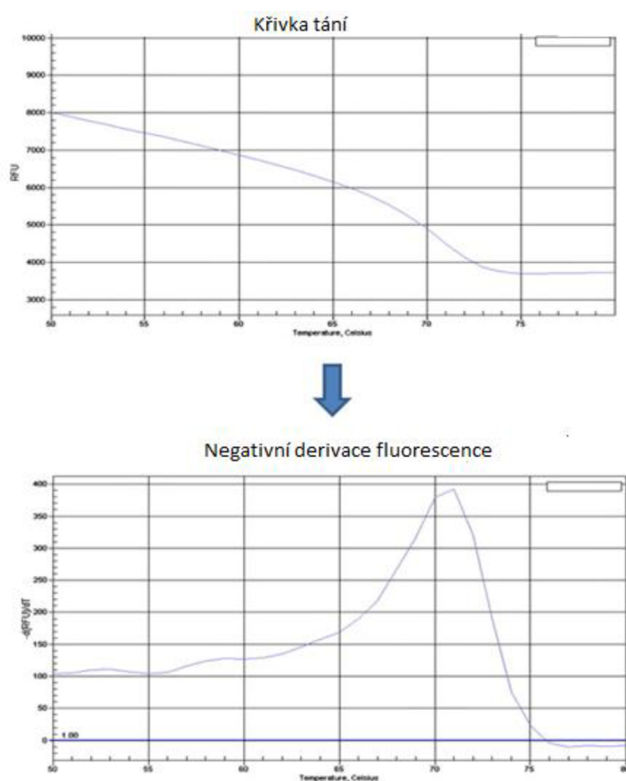


Obr. 14: Heteroduplexní detekční citlivost různých barev [47]

Fluorescenční DNA barvivo SYTO-9 obsažené v produktu qPCR 2x SYTO 9 Master Mix umožňuje amplifikaci delších fragmentů DNA (až do velikosti 1kbp) a je vhodné pro HRM („high resolution melting“) analýzu amplifikovaných úseků DNA. [45]

2.5.3 Analýza dat

Tavení amplikonu se provádí postupným zvyšováním teploty po posledním cyklu PCR (např. 0,1°C/2s). T_m amplikonu může být určena z inflexního bodu křivky tání nebo z tavného píku získaného vynesením negativní derivace fluorescence (F) nad teplotou ($-dF/dT$) proti teplotě (T) - (Obr. 15). Pro analýzu je vhodné mít ke každé sadě vzorků přiřazeny také referenční vzorky. [29,30,31]



Obr. 15: Analýza tavní křivky [29]

2.5.4 Výhody HRMA

Analýza HRM se provádí ve stejné zkumavce jako při amplifikačním kroku. Tím je analýza HRM rychlejší a méně pracná, a také bez použití nebezpečných chemikálií. Provedení analýzy v uzavřeném systému snižuje riziko kontaminace, a tím nedochází k ovlivnění přesnosti výsledku. Přestože analýza HRM je přesná a reprodukovatelná, je nutné použití známých referenčních kmenů jednotlivých druhů pro charakterizaci neznámých vzorků. HRM analýza je také méně nákladná než např. metody sekvenčních technik. Jelikož se jedná o nedestruktivní metodu je možná i následná analýza, např. gelové elektroforéza. [29,33]

Analýza HRM je velmi specifická, citlivá metoda. Např. u real-time PCR přístroje je možno získat pouze jeden datový bod na °C a sledování rozdílu teploty tání je $\gg 1$ °C, zatímco HRM analyzátor získá 200 datových bodů na °C a sledování rozdílu teploty tání je $< 0,5$ °C. Čím vyšší hustota dat, tím přesnější analýza. [47]

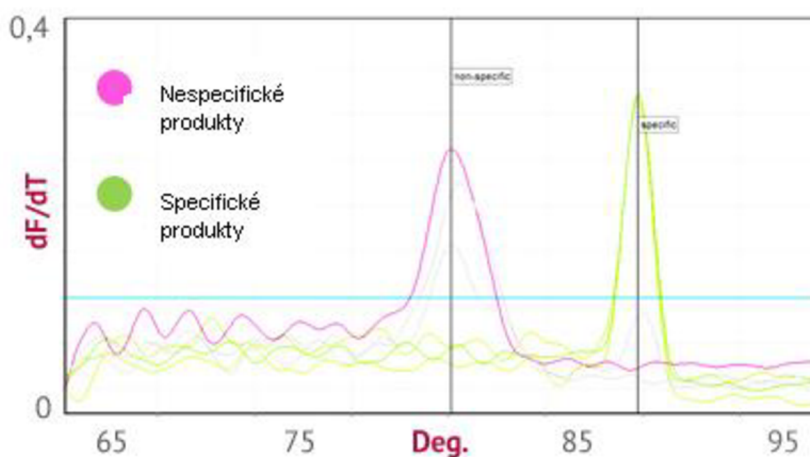
2.5.5 Důležité aspekty v rozvoji metody analýzy HRM

Analýza HRM zahrnuje amplifikaci templátu DNA v přítomnosti nasycení barviva pomocí PCR, dále následného tání amplikonů a nakonec analýzu a interpretaci dat.

Důležitými aspekty jsou kvalita a množství vzorku DNA. DNA by měla mít jak vysokou integritu, tak i vysokou čistotu a vzorky by se neměly významně lišit v množství DNA. Dále jedním z parametrů, které silně ovlivňují chování tání dsDNA je koncentrace $MgCl_2$.

Specifická a účinná amplifikace DNA je podmínkou pro získání spolehlivých a reprodukovatelných profilů tání.

DNA o nízké kvalitě se při analýze projeví výskytem nesespecifických produktů, viz Obr. 16. Jejich píky budou ve většině případů představovat kratší produkty o typicky nižší intenzitě, tudíž v grafu vykazují vzhledem k primárnímu produktu nižší teplotu tání. Tento jev nám často zkrusluje vyhodnocení HRM analýzy. [28, 29, 32]



Obr. 16: Teplotní profily amplifikačních produktů [44]

Návrh primerů, optimalizace podmínek PCR a kvalita DNA jsou proto významné kroky pro správnost metody. Při navrhování primerů je třeba klást důraz na zabránění vzniku nesespecifických produktů, např. dimery primerů. Vzhledem k tomu, že i délka amplikonu má vliv na citlivost následné analýzy HRM, tak by amplikony neměly obsahovat více než 300 párů bází (bp). Dlouhé amplikony mohou poskytovat několik hodnot T_m , což by mělo za následek poměrně složitý profil. Při navrhování cílových specifických primerů jsou využívány databáze z oblastí bioinformatické analýzy. [28,32]

2.6 Bioinformatická analýza

Mezi hlavní oblast bioinformatiky, která kombinuje prvky biologie a informatiky, patří studium širokého rozmezí biologických dat, zejména sekvencí nukleových kyselin a proteinů, genů a genových map, expresních profilů, organizace genomů a interakce proteinů nebo mechanismy fyziologických funkcí.

Cíle bioinformatiky můžeme rozdělit do tří skupin. V první řadě je to organizace velkého objemu bioinformačních dat, kde je umožněn přístup k již existujícím informacím a zveřejňování nových dat, pokud jsou produkovány. Dalším cílem je rozvoj nástrojů a zdrojů, které slouží jako pomůcky při analýze dat. Třetím cílem je použití těchto nástrojů a zdrojů k interpretaci výsledků biologicky významným způsobem.

Analýzy v bioinformatice se zaměřují na objasnění informačního obsahu biomakromolekul a porozumění, jak bioinformace ovlivňují vývoj a funkce u živých organismů. Metody bioinformatiky se stávají základem pro detekci systémového chování buněk a organismů. Důležitou stránkou bioinformatiky je přístup k publikované vědecké literatuře a k patentovým archivům. [12,35]

2.6.1 Molekulárně biologické databáze

K nejdůležitějším institucím zabývajícím se správou dat, vývojem nástrojů pro jejich analýzu a poskytováním informací patří:

- Evropský institut pro bioinformatiku (EBI)
- Národní centrum pro biotechnologické informace (NCBI)
- Centrum pro informační biologii (CIB) založené jako oddělení Národního genetického institutu (NIG)

V každém z těchto center je spravována genomová databáze sekvencí nukleových kyselin a odpovídajících, z nich přeložených proteinů. Orientace v databázích je umožněna existencí jednotných identifikačních čísel, která jsou sdílena všemi třemi hlavními databázemi. Po zařazení do databáze získává každý záznam přístupový kód a následně ještě číslo GI (GenBank Identifier). [12,36]

2.6.2 Vyhledávání podobností sekvencí nukleových kyselin

Pro stanovení sekvencí v nukleových kyselinách se používají softwarové nástroje. Nejčastěji jsou pro lokální seřazení sekvencí ve formátu FASTA (URL <http://www.ebi.ac.uk/fasta3/>) využívány algoritmy programů BLAST (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov//BLAST/>), hledající úseky sekvencí vykazujících nejvyšší stupeň podobnosti. Soubor všech sousedních x -merů (x je délka fragmentu sekvence) je postupně srovnáván s každou sekvencí v databázi. Ve všech sekvencích se pro znázornění jednotlivých nukleotidů používají znaky schválené organizací IUPAC [36], které jsou uvedeny v Tabulce. 3. Pro navrhování primerů ohraničujících cílovou sekvenci a ověřování jejich specifity byl vyvinut program Primer-BLAST. [12, 34]

Tabulka 3: IUPAC kódy pro zápis sekvencí nukleotidů [36]

kód	báze	kód	báze
A	adenin	W	A nebo T/U
C	cytosin	K	G,T nebo U (keto)
G	guanin	M	A nebo C (amino)
T	thymín	B	G, T nebo C
U	uracil	D	G, A nebo T
R	A nebo G (purín)	H	A, C nebo T/U
Y	C,T neboU (pyrimidin)	V	A, C nebo G
S	C nebo G	-, -	mezera

Posuzování více sekvencí a zjištění míry jejich vzájemné podobnosti je v praktické bioinformatice základním procesem. Jednotlivé nukleotidy nebo aminokyseliny jsou reprezentovány určitým znakem (například označením IUPAC), a to nám umožňuje nejen kvalitativně zjistit podobnost, ale ji i kvantitativně změřit, za předpokladu, že budeme respektovat vzájemné vztahy mezi jednotlivými aminokyselinami. Základním úkolem je tedy srovnání dvou nebo více sekvencí, které nejsou zcela identické, ale jsou si velmi blízké.

Množství důležitých molekulárně-biologických dat se velmi rychle rozrůstá a je nezbytné mít k dispozici prostředky, pomocí kterých můžeme k těmto datům snadno přistupovat. [34,36]

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo otestování možnosti využití a zavedení metody PCR v reálném čase s metodou vysokorozlišovací analýzy křivek tání (PCR-HRMA) za účelem analýzy DNA *Lactobacillus* na úrovni druhů.

Součástí práce bylo řešení následujících bodů:

- Spektrofotometrické ověření koncentrace sbírkových i vyizolovaných kmenů DNA
- Kontrola intaktnosti DNA
- Provedení rodově specifické PCR
- Provedení druhově specifické qPCR-HRM
- Ověření specifity použitých primerů pomocí bioinformatické analýzy

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Použité mikroorganismy

A) Sbíрка mlékařských mikroorganismů (CCDM) Laktoflora, Tábor

Kmen	Označení kmene
<i>L. helveticus</i>	CCDM 121
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	CCDM 213/06
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	CCDM 216/06
<i>L. helveticus</i>	CCDM 714/00-P
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	CCDM 664/00-P
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	CCDM 68/03-P

B) Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Brno

Kmen	Označení kmene
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	CCM 7088 ^T
<i>L. casei</i>	CCM 4791
<i>L. plantarum</i>	CCM 7039 ^T
<i>L. kefiry</i>	CCM 7086
<i>L. amylovarum</i>	CCM 4380
<i>L. delbrueckii</i>	CCM 7190 ^T
<i>L. gasseri</i>	CCM 7009 ^T
<i>L. acidophilus</i>	CCM 4833
<i>L. gasseri</i> K7	CCM 7009
<i>L. lactis</i>	CCM 741

C) Technical University of Lodz, Polsko (stolice plně kojených a zdravých dětí, izolát přečistil: Mikrobiologický ústav Akademie věd, ČR)

Kmen	Označení kmene
<i>L. casei</i>	LOCK 0919
<i>L. rhamnosus</i>	LOCK 0900
<i>L. rhamnosus</i>	LOCK 0908

D) prof. I. Rogelj (University of Ljubjana, Slovinsko)

Kmen	Označení kmene
<i>L. gasseri</i>	K7

E) V experimentech byly použity některé kmeny bakterií rodu *Lactobacillus* (*L.*), které byly využity v disertační práci Ing. Turkové (izolovaná a purifikovaná DNA bakterií rodu *Lactobacillus* ze stolice plně kojených a zdravých dětí, které poskytl prof. Ing. V. Rada, CSc. - ČZU Praha. [2])

<i>Lactobacillus</i> - kmen	druhová specifikace *
<i>L. sp.</i> RL1	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. sp.</i> RL7	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. sp.</i> RL10	<i>L. paracasei</i>
<i>L. sp.</i> RL11	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. sp.</i> RL12	<i>L. fermentum</i>
<i>L. sp.</i> RL14	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. sp.</i> RL19	<i>L. paracasei</i>
<i>L. sp.</i> RL2-P	<i>L. gasseri/johnsonii</i>
<i>L. sp.</i> RL4-P	<i>L. paracasei</i>
<i>L. sp.</i> RL8-P	<i>L. gasseri/johnsonii</i>
<i>L. sp.</i> RL12-PA	<i>L. fermentum</i>
<i>L. sp.</i> RL15-P	<i>L. salivarius</i>
<i>L. sp.</i> RL26-P	<i>L. plantarum</i>

* druhová specifikace r. *Lactobacillus* dle disertační práce Ing. Turkové [2]

4.1.2 Testovaný výrobek

V práci byl analyzován doplněk stravy s probiotickým účinkem. Jeho název, výrobce a deklarované složení je uvedené v Tab. 4. Doplněk stravy je ve formě kapslí a byl zakoupen v komerční síti. Byl vybrán takový výrobek, který obsahuje druhy rodu *Lactobacillus*.

Tabulka 4: Analyzovaný výrobek

Název	Výrobce	Mikroorganismy
BIFOLAC	Bifodan Dánsko	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , BB536.

4.1.3 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu DNA (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA standard (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Ethidiumbromid (EtBr) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA (Penta, Chrudim, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina octová (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan sodný p.a. (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- PEG 6000 (Lachema, ČR)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) (Penta, ČR)
- Ostatní chemikálie, které byly používány byly v čistotě p.a. a pocházely z běžně dostupných komerčních zdrojů.

4.1.4 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk

Roztoky byly připravené podle publikace doc. Španové a doc. Ritticha [24].

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)
(186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za současného zahřívání na 68 °C. pH bylo upraveno na 8,0. Roztok byl doplněný na objem 1 l destilovanou vodou a sterilizovaný v autoklávu 121°C/20 min).
- 1 M Tris-HCl (pH 7,8)
(12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 70 ml destilované vody. pH bylo upraveno na 7,8. Roztok byl doplněný destilovanou vodou na 100 ml a sterilizovaný v autoklávu 121°C/20 min).
- Roztok A (sterilně byl smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,8 s 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 a 98 ml destilované vody).
- Lyzační roztok B (k roztoku A byl přidán lysozym s výslednou koncentrací 3 mg/ml).
- Roztok SDS (20%)
(20 g SDS bylo rozpuštěno v 80 ml sterilní destilované vody. pH bylo upraveno na 7,8 a roztok byl doplněný destilovanou vodou do 100 ml).
- Proteináza K ((100 µg/ml)
(1 mg proteinázy K byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody, rozdělený do alikvotních částí a uchovávaný při teplotě -20°C).
- Destilovaná voda

4.1.5 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických částic

- 0,5 M NaCl
(58,4 g NaCl bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 200 ml a sterilizován v autoklávu 121°C/20 min).
- 40 % PEG 6000
(40 g PEG 6000 bylo rozpuštěno v 60 ml sterilní destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml a sterilizován v autoklávu 121°C/20 min).
- 70 % ethanol
- 1 x TE pufr
(roztok byl připraven sterilně ze zásobního roztoku 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Byl smíchán 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl EDTA (pH 8,0) a 98 ml sterilní destilované vody).

4.1.6 Magnetické částice

Magnetické částice byly syntetizovány ing. D. Horákem, CSc. z Makromolekulárního ústavu Akademie věd ČR, Praha. Poly-(glycidyl methakrylát) (P(GMA)) (1:1) byly pokryty karboxylovými skupinami. Průměr částic byl 2,2 µm s obsahem COOH skupin 2,67 mM/g a obsahem železa 6,5%. Údaje charakterizující použité částice jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Charakteristika magnetických částic [38]

částice	polymer	Fe [% hm]	-COOH [mM/g]	Průměr částice [µm]	PDI
Fkol 135 ox	P(GMA)	6,6	2,61	1,0	1,04

4.1.7 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Voda pro injekce ČSL 4, Biotika, Slovenská L'upča, SR)
- Reakční pufr kompletní pro Taq DNA polymerázu 1.1 (10x koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr nekompletní bez MgCl₂ (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP směs (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- MgCl₂ (25 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Oligonukleotidové primery (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/l) (Top-Bio, Praha, ČR)
- qPCR 2× SYTO-9 Master-mix (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.8 DNA standardy použité při agarózové gelové elektroforéze

- DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
(Obsahuje fragmenty: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp)

4.1.9 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- Tris-borát-EDTA (TBE) pufr (5 x koncentrovaný):
Tris-base54 g
Kyselina boritá..... 27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8,0).....20 ml
Všechny komponenty byly smíchány, doplněny destilovanou vodou do objemu 1000 ml a přefiltrovány. Před použitím byl koncentrovaný pufr zředěn 10 x destilovanou vodou a bylo zkontrolováno pH (pH = 7,8).
- Nanášecí pufr (Top-Bio, Praha, ČR)
- Ethidiumbromid (EtBr) (500 g/ml):
barvicí roztok EtBr byl zředěn na koncentraci 0,5 g/ml.
- Agarózový gel pro gelovou elektroforézu:
0,8 %: 0,8 g agarózy/100 ml 0,5 koncentrovaného TBE pufru
1,8 %: 1,8 g agarózy/100 ml 0,5 koncentrovaného TBE pufru

4.2 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹(Eppendorf, Hamburg, Německo.)
- ECOTM Real-time PCR system (Illumina, USA)
- Laboratorní váhy (Ohaus Corporation, USA)
- Magnetický separátor InvitrogenTM (Invitrogen Dyal AS, Oslo, Norsko)
- Mikropipety pro různé objemy (Labnet)
- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Proline, UK)
- Rotor-Gene 6000 (Corbett, Austrálie)
- Spektrofotometr Nanodrop 2000 (USA)
- Termocycler PTC 200
- Termostat BT 50 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)
- Transluminátor EB-20E (Ultra Lum, Paramount, USA)
- Vortex (MTA, Kutesz, Maďarsko)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model OSP-300 (Own Scientific, Woburn, USA)
- Zařízení pro elektroforézu OWL, model B1, B3 (Own Scientific, Woburn, USA)
- Zdroj elektrického napětí Elite-300 (Wealtec, Lakeside, USA)
- Laboratorní sklo, umělohmotné pomůcky, běžný laboratorní materiál a běžné vybavení laboratoře

4.3 Metody

Postup práce byl převzat ze skript doc. Španové a doc. Ritticha Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biotechnologie [24], s částečnými úpravami podle Ing. Štěpánky Trachtové, Ph.D.

Při analýze DNA byly pracovní plochy a pipety otřeny 70% roztokem etanolu. Pracovní plocha byla vystavena germicidnímu záření UV lampy podobu minimálně 15 minut.

4.3.1 Příprava hrubého lyzátu z tablety BIFOLAC

- Želatinová tableta byla sterilně odebrána, její obsah vysypán a zvážen
- k 0,30 g vzorku bylo přidáno 2,5 ml lyzačního roztoku B, směs byla resuspendovaná a inkubovaná při laboratorní teplotě 1 hodinu
- po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 50 μ l 20% SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ g/ml)
- vzorek byl inkubovaný v termostatu při teplotě 55 °C do druhého dne
- vzorek byl následně zmrazen

4.3.2 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických částic

- k izolaci DNA bylo použito 100 μ l hrubého lyzátu
- k izolaci bakteriální DNA byly použity magnetické částice o koncentraci 2 mg/ml v prostředí 16% polyetylén glykolu (PEG) a 2 M NaCl
- směs připravená podle Tab. 6 byla inkubovaná 15 minut při laboratorní teplotě

Tabulka 6: Složení separační směsi na izolaci DNA z doplňků stravy pomocí magnetického nosiče

pořadí komponent	komponenty	objem komponent [μ l]
1.	5 M NaCl	400
2.	hrubý lyzát buniek	100
3.	40% PEG 6 000	400
4.	magnetické částice (2 mg/ml)	100

Poté byly částice s navázanou DNA odseparovány pomocí magnetického separátoru při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Zkumavka byla ponechána v magnetickém pásu a supernatant byl opatrně odpipetován. Následně byl odstraněn ze separátoru magnetický pás a zkumavka obsahující nosič s navázanou DNA byla promyta 70% etanolem v objemu 1 ml. Částice byly odseparovány magnetem po dobu 2 minut při laboratorní teplotě a roztok etanolu by opatrně slit. Promytí 70% etanolem bylo opakováno ještě jednou objemem 500 μ l. Zkumavka pak byla ponechána v horizontální poloze a krátce usušena při laboratorní teplotě. DNA byla eluována do 500 μ l TE pufru při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Částice se odseparují 2 minuty při laboratorní teplotě a eluovaná DNA se napipetuje do čisté zkumavky.

4.3.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

- koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky za využití NanoDrop 2000.
- objem nanášených vzorků byl 2 μ l, jako referenční vzorek byl použit TE pufr
- absorbance byla měřena v rozmezí vlnových délek 230 až 320 nm
- koncentrace DNA byla stanovena z hodnoty absorbance při 260 nm
- čistota DNA byla následně stanovena z poměru hodnot absorbance při 260 nm a 280 nm ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$). Leží-li hodnota poměru absorbancí mezi 1,8 – 2,0 lze DNA považovat za čistou
- ze změřené hodnoty koncentrace a objemu květy (500 μ l) bylo stanoveno množství DNA ve vzorcích

Pro další použití byly vzorky naředěny na koncentraci 100 ng/ μ l a 10 ng/ μ l.

4.3.4 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

- byl připraven 0,8% agarózový gel (0,8 g agarózy, 100 ml 0,5 × TBE pufru), který následně tuhnul 30 minut
- bylo smícháno 20 µl DNA s 4 µl nanášecího pufru a směs byla nanášena na gel, vanička s gelem byla převrstvena 0,5 × TBE pufrem a byl zapnut zdroj napětí (80 V / 1 hodinu)
- po skončení elektroforézy byl gel ponechán v ethidiumbromidu (0,5 mikrogramů / ml) po dobu 30 minut
- gel byl opláchnut v destilované vodě, umístěný na transiluminátor (v UV světle o vlnové délce 305 nm)
- gel byl zdokumentován fotoaparátem Kodak EDAS 290

4.3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Konvenční PCR byla využita pro ověření zařazení analyzovaných bakteriálních kmenů do domény *Bacteria* a rodu *Lactobacillus*.

Pro PCR pro doménu *Bacteria* i rod *Lactobacillus* byla použita DNA o koncentraci 100 ng/µl. Sekvence primerů a velikosti specifických produktů PCR jsou uvedeny v Tabulce 7, složení směsi pro PCR v Tabulce 8 a amplifikační programy v Tabulce 9. Specifické produkty PCR byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Tabulka 7: Primery specifické pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Primer	Sekvence primeru -(5´-3´)	Velikost produktu PCR (bp)	Zdroj
F eub R eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466	[46]
F_alllact_IS R_alllact_IS	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	92	[46]

Tabulka 8: Složení PCR směsi (25 µl) - s primery F eub/R eub, F_alllact_IS/R_alllact_IS [46]

Komponenta PCR	Objem (µl)	
	F eub/R eub	F_alllact_IS/R_alllact_IS
PCR voda	16,5	19,0
10x reakční pufr	2,5	2,5
dNTP směs (10 mM)	1,0	0,5
primer F eub (10 pmol/µl)	1,01	0,5
primer R eub (10 pmol/µl)	1,0	0,5
Taq DNA polymeráza (1U/µl)	2,0	1,0
DNA matrice (100 ng/µl)	1,0	1,0

Eppendorfovy zkumavky byly stočeny a umístěny do termocyklu, kde proběhla PCR dle daného programu. U negativní kontroly bylo místo matrice DNA přidáno ekvivalentní množství vody. U pozitivní kontroly byla jako matrice DNA použita DNA ze sbírkového kmene příslušného rodu naředěná na 100 ng/µl. PCR směs byla následně vložena do cyklu a byl spuštěn příslušný program.

Tabulka 9: Amplifikační programy pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus*

	doména <i>Bacteria</i>	rod <i>Lactobacillus</i>
1. Denaturace DNA před prvním cyklem	94 °C / 5 min	94 °C / 5 min
2. Denaturace DNA	94 °C / 30 s	94 °C / 30 s
3. Hybridizace primerů	55 °C / 30 s	55 °C / 30 s
4. Syntéza vlákna DNA	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min
5. Dosyntetizování vlákna po posledním cyklu	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
Počet cyklů (krok 2 až 4)	30	30

4.3.6 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR

Pro všechny produkty PCR pro doménu *Bacteria* i rod *Lactobacillus* byly připraveny gely podle následujícího postupu:

- byl připraven 1,8% agarózový gel (1,8 g agarózy, 100 ml 0,5 × TBE pufri). Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě za vzniku homogenní směsi a roztok byl po zchladnutí na 60 °C nalit do elektroforetické vaničky. Gel následně tuhnul 30 minut při pokojové teplotě.
- směs 25 µl produktu PCR a 5 µl 6 × koncentrovaného nanášecího pufri byla nanesena na gel (poměr 5:1)
- na gel byl nanesen DNA standard 100 bp žebříček (100 – 1500 bp)
- vanička s gelem byla převrstvena 0,5 × TBE pufrem a byl zapnut zdroj napětí (80 V/1,5 hodiny)
- po skončení elektroforézy byl gel ponechán v roztoku ethidiumbromidu (0,5 ml / ml) po dobu 30 minut
- gel byl opláchnut v destilované vodě, umístěn na transiluminátor (v UV světle o vlnové délce 305 nm)
- byla provedena fotografická dokumentace.

4.3.7 qPCR-HRM analýza

Jako DNA matrice byla použita DNA zředěná na koncentraci 10 ng/µl. U negativní kontroly bylo místo matrice DNA přidáno ekvivalentní množství vody. U pozitivní kontroly byla jako matrice DNA použita DNA ze sbírkového kmene příslušného rodu naředěná na 10 ng/µl.

Tabulka 10: Primery pro qPCR-HRMA specifické pro rod *Lactobacillus*

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost produktu (bp)	Zdroj
P1V1 P2V1	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC	90 - 99	[40]
LAC1 LAC2	AGCAGTAGGGAATCTTCCA ATTCACCGCTACACATG	345	[42]
Univerzální (UPF) Univerzální (UPR)	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	467 - 470	[41]
V3F V3R	CCAGACTCCTACGGGAGGCAG CGTATTACCGCGGCTGCTG	204	[43]
V6F V6R	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA AGCTGACGACANCCATGCA	128	[43]

Obsah zkumavky byl promíchán převrácením a krátkým vortexováním a všechny položky byly krátce centrifugovány na stolní minicentrifuze.

Tabulka 11: Složení qPCR-HRMA směsi (25 µl) s primery P1V1/P2V1 [40], LAC1/ LAC2 [42], UPF/ UPR [41], V3F/ V3R [43], V6F/ V6R [43]

Komponenta PCR	Objem (µl)
PCR voda	9,5
qPCR 2x SYTO9	12,5
primer (forward)	1,0
primer (reverse)	1,0
DNA matrice (100 ng/µl)	1,0

PCR směs byla následně vložena do cycleru a byl spuštěn příslušný program pro qPCR-HRM analýzu uvedený v Tabulce 12, 13 a 14 dle jednotlivých primerů.

Tabulka 12: Programy použité pro qPCR-HRM pro rod *Lactobacillus* (část 1)

	Primery P1V1/P2V1	Primery LAC1/LAC2	Primery universální
1. Denaturace DNA před prvním cyklem	95 °C / 5 min	95 °C / 5 min	95 °C / 5 min
2. Denaturace DNA	95 °C / 30 s	95 °C / 30 s	95 °C / 30 s
3. Hybridizace primerů	55 °C / 30 s	55 °C / 30 s	55 °C / 30 s
4. Syntéza vlákna DNA	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min
5. Dosyntetizování vlákna po posledním cyklu	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
Počet cyklů	30	30	45

Tabulka 13: Programy použité pro qPCR-HRM pro rod *Lactobacillus* (část 2)

	Primery V3F/V3R	Primery V6F/V6R
1. Denaturace DNA před prvním cyklem	95 °C / 5 min	95 °C / 5 min
2. Denaturace DNA	95 °C / 30 s	95 °C / 30 s
3. Hybridizace primerů	60 °C / 1 min	60 °C / 1 min
4. Syntéza vlákna DNA	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min
5. Dosyntetizování vlákna po posledním cyklu	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
Počet cyklů	45	45

Tabulka 14: Teplotní profil samostatné HRM analýzy

krok	teplota/čas
1.	95°C/15 s
2.	55°C/15 s
3.	95°C/15 s
Doba trvání	9 min 20 s

Vyhodnocení výsledků qPCR-HRM analýzy bylo provedeno pomocí softwaru High Resolution Melt Software •ECO™ Real-time PCR system (Illumina, USA). Analýzou křivky tání byla zjištěna hodnota T_m specifická pro přítomné amplikony.

4.3.8 Agarozová gelová elektroforéza PCR produktů

Detekce PCR-produktů byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou. Byl připraven 1,8% agarozový gel (1,8 g agarózy, 100 ml 0,5 × TBE pufu). Suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě a po vychladnutí na teplotu cca 60 °C nalita do elektroforetické vany s hřebínkem a ponechána 0,5 hod. tuhnout. Po zatuhnutí byl hřebínek opatrně vyjmut a do vzniklých komůrek bylo nanášeno po 15 - 20 μ l PCR produktu smíchaného s 3 - 4 μ l 6krát koncentrovaného nanášecího pufu. Na gely byl nanesen rovněž hmotnostní standard (100 bp žebříček). Gel byl vložen do elektroforetické vany, převrstven 0,5x TBE pufrem do výšky 2 - 5 mm nad gel. Elektroforéza byla spuštěna a probíhala při napětí 80 V po dobu 1,5 hodiny.

Po skončení elektroforézy byly gely ozářeny v transiluminátoru UV světlem o vlnové délce 305 nm a vyhodnoceny. Byla také provedena fotografická dokumentace.

Výsledky agarózové gelové elektroforézy byly z fotografických záznamů také vyhodnoceny pomocí programu BioNumerics (Applied Math, Sint-MartensLatem, Belgie).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci byla použita kombinace technik PCR v reálném čase - amplifikaci variabilní oblasti v 16S rRNA s HRM analýzou pro rozlišení a identifikaci DNA *Lactobacillus* na úrovni rodu a druhu.

Přes mnohé výhody kombinací těchto metod, musíme brát na vědomí některé aspekty, které mohou ovlivnit výsledné hodnoty. Řadíme mezi ně zejména, přítomnost inhibitorů amplifikace DNA nebo látek ovlivňující fluorescenci, nevhodně navržené primery, případně chyby laboranta, jako je nepřesnost pipetování.

5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA byla ověřena spektrofotometricky pomocí NanoDropu 2000c (Thermo). Byly odečteny hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230 nm (absorpční maximum fenolu), 260 nm (absorpční maximum nukleových kyselin), 280 nm (absorpční maximum proteinů) a 320 nm (korekce pozadí). Dále byla stanovena čistota DNA (poměr absorbancí 260 nm/280 nm).

Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty neředěné DNA jsou uvedeny v Tabulce 15. Koncentrace vzorků byly pro další analýzu naředěny na 100 ng/μl a na 10 ng/μl. Z výsledků měření vyplývá, že všechny analyzované vzorky DNA byly v potřebné čistotě (hodnoty $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ se pohybovaly v rozmezí 1,8-2,0), nebyly tedy znečištěny proteiny ani RNA.

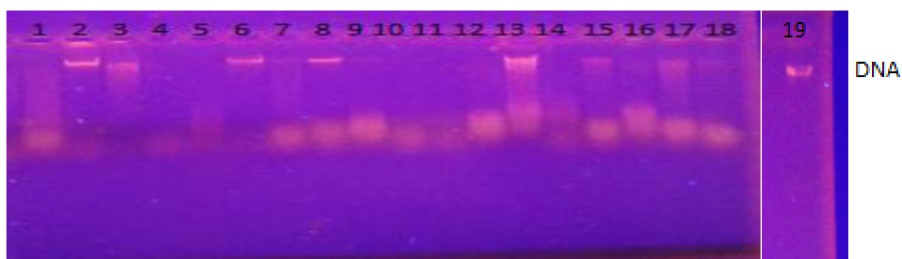
Tabulka 15: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

	DNA	Konc. (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230	
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	680,9	13,617	7,392	1,84	2,25	
2	<i>L. helveticus</i> CCDM 714/00-P	198	3,961	1,95	2,03	1,73	
3	<i>L. helveticus</i> CCDM 121	211,1	4,223	2,06	2,05	1,69	
4	<i>L. delbrueckii ssp. Lactis</i> CCDM 664/00-P	267,7	5,354	2,628	2,04	1,12	
5	<i>L. delbrueckii</i> CCM 7190T	304,3	6,086	3,116	1,95	1,67	
6	<i>L. delbrueckii ssp. Lactis</i> CCDM 68/03-P	148,2	2,964	1,469	2,02	0,89	
7	<i>L. gasseri</i> K7	700,8	14,017	7,315	1,92	2,13	
8	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	256,6	5,131	2,415	2,12	1,81	
9	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 213/06	439,2	8,784	4,29	2,05	2,16	
10	<i>L. paracasei spp. Paracase</i> CCDM 216/06	1275,6	25,512	12,136	2,1	2,28	
11	<i>L. casei</i> LOCK 0919	843,3	16,865	8,098	2,08	2,19	
12	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	219,7	4,394	2,097	2,1	2,38	
13	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	235,8	4,716	2,347	2,01	2,26	
14	<i>L. casei</i> CCM 7088T	411,6	8,231	4,024	2,05	1,83	
15	<i>L. casei</i> CCM 4791	357,6	7,153	3,608	1,98	1,88	
16	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	696,1	13,923	7,377	1,89	1,9	
17	<i>L. kefir</i> CCM 7086	481,7	9,634	4,797	2,01	1,82	
18	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	3275,4	65,509	31,099	2,11	2,26	
19	<i>L. lactis</i> CCM 7414	1614,7	32,295	16,083	2,01	2,49	
20	<i>L. rhamnosus</i>	RL1	738,9	14,778	8,241	1,79	1,62
21	<i>L. gasseri/johnsonii</i>	RL2P	1216,8	24,337	11,454	2,12	2,25
22	<i>L. paracasei</i>	RL4-P	1109,5	22,19	10,557	2,1	2,09
23	<i>L. vaginalis</i>	RL7	365,4	7,307	3,572	2,05	1,77
24	<i>L. gasseri/johnsonii</i>	RL8P	200	4,001	1,886	2,12	1,04
25	<i>L. paracasei</i>	RL10	564,6	11,291	6	1,88	1,63
26	<i>L. rhamnosus</i>	RL11	754,3	15,085	8,768	1,72	1,87
27	<i>L. fermentum</i>	RL12	584	11,68	6,39	1,83	1,75
28	<i>L. fermentum</i>	RL12-PA	1456,4	29,128	13,796	2,11	1,76
29	<i>L. rhamnosus</i>	RL14	1042,5	20,851	9,943	2,1	2,26
30	<i>L. salivarius</i>	RL15P	522,6	10,452	5,176	2,02	1,85
31	<i>L. paracasei</i>	RL19P	798	15,96	9,621	1,66	1,75
32	<i>L. plantarum</i>	RL26P	141,2	2,823	1,408	2	1,29

5.2 Ředění DNA pro PCR

Vzorky bakteriální DNA byly naředěny na 100 ng/μl. Pomocí elektroforézi na 0,8% agarózovém gelu byla ověřena intaktnost DNA.

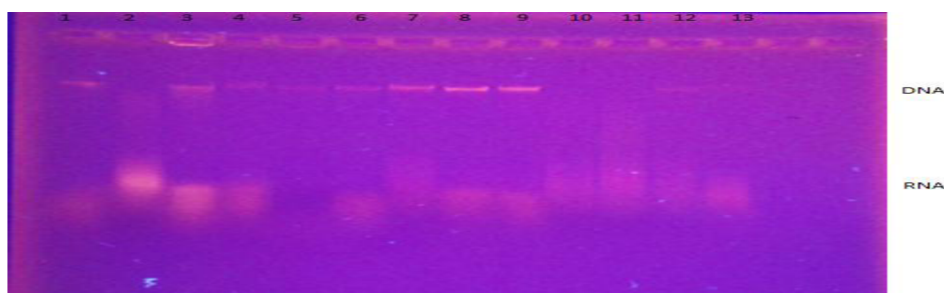
U většiny vzorků byla prokázána intaktní DNA. U některých vzorků byla jen částečná intaktnost. Agarózová gelová elektroforéza vyředité DNA je uvedena na Obr. 17 a 18.



běh	DNA	Detekce přítomnosti DNA	běh	DNA kmene	Detekce přítomnosti DNA
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833	+/-	11	<i>L. casei</i> LOCK 0919	+/-
2	<i>L. helveticus</i> CCDM 714/00-P	+	12	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	+/-
3	<i>L. helveticus</i> CCDM 121	+	13	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	+
4	<i>L. delbrueckii ssp. Lactis</i> CCDM 664/00-P	+/-	14	<i>L. casei</i> CCM 7088T	+/-
5	<i>L. delbrueckii</i> CCM 7190T	+/-	15	<i>L. casei</i> CCM 4791	+
6	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 68/03-P	+	16	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	+/-
7	<i>L. gasseri</i> K7	+/-	17	<i>L. kefir</i> CCM 7086	+
8	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	+	18	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	+
9	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 213/06	+/-	19	<i>L. lactis</i> CCM 7414	+
10	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 216/06	+/-			

+ ..DNA prokázána, +/-...DNA částečně prokázána

Obr. 17: Agarózová gelová elektroforéza DNA (gel č. 1)



běh	DNA		Detekce přítomnosti DNA	běh	DNA		Detekce přítomnosti DNA
1	<i>L. rhamnosus</i>	RL1	+	8	<i>L. gasseri/johnsonii</i>	RL12	+
2	<i>L. vaginalis</i>	RL2P	+/-	9	<i>L. paracasei</i>	RL12-PA	+
3	<i>L. paracasei</i>	RL4-P	+	10	<i>L. gasseri/johnsonii</i>	RL14	+/-
4	<i>L. rhamnosus</i>	RL7	+	11	<i>L. fermentum</i>	RL15P	+/-
5	<i>L. fermentum</i>	RL8P	+	12	<i>L. salivarius</i>	RL19P	+
6	<i>L. rhamnosus</i>	RL10	+	13	<i>L. plantarum</i>	RL26P	+/-
7	<i>L. paracasei</i>	RL11	+				

+ ..DNA prokázána, +/-...DNA částečně prokázána

Obr. 18: Agarózová gelová elektroforéza DNA (gel č. 2)

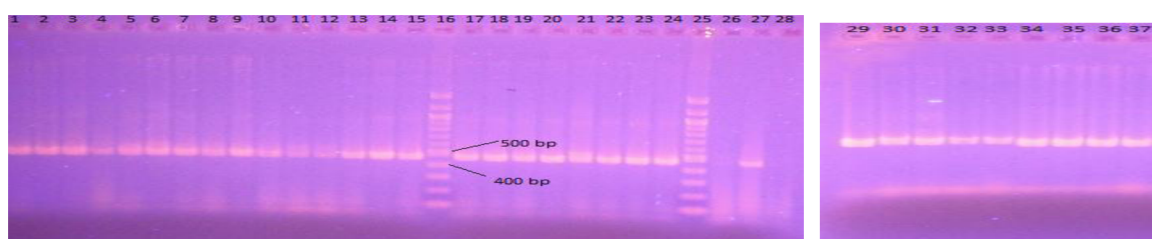
5.3 Stanovení citlivosti PCR

Vybrané vzorky bakteriální DNA byly podrobeny amplifikaci DNA pomocí konvenční PCR specifické pro doménu *Bacteria* (primery F_eub a R_eub) [7] a pro rod *Lactobacillus* (primery F_alllact a R_alllact) [7].

5.3.1 Stanovení citlivosti PCR pro doménu *Bacteria*

DNA byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce s primery F_eub a R_eub (citace). PCR reakce probíhala podle programu Eubacter (Tab. 9) a namíchání PCR směsi je zapsáno v Tab. 8

Po amplifikaci DNA byly pomocí agarózové gelové elektroforézy detekovány specifické produkty PCR o velikosti 466 bp ve všech testovaných vzorcích DNA. (Obr. 19).



	Vzorek	Detekce PCR produktu	běh	Vzorek	Detekce PCR produktu	
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	+++	20	<i>L. lactis</i> CCM 7414	+++	
2	<i>L. helveticus</i> CCDM 714/00-P	+++	21	RL1	<i>L. rhamnosus</i>	+++
3	<i>L. helveticus</i> CCDM 121	+++	22	RL2-P	<i>L. vaginalis</i>	+++
4	<i>L. delbrueckii ssp. Lactis</i> CCDM 664/00-P	++	23	RL4-P	<i>L. paracasei</i>	+++
5	<i>L. delbrueckii</i> CCM 7190T	+++	24	RL7	<i>L. rhamnosus</i>	+++
6	<i>L. delbrueckii ssp. Lactis</i> CCDM 68/03-P	+++	25	Standard - žebříček		100bp
7	<i>L. gasseri</i> K7	+++	26	negativní kontrola		-
8	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	+++	27	pozitivní kontrola		+
9	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> CCDM 213/06	+++	28	negativní kontrola		-
10	<i>L. paracasei ssp. Paracasei</i> CCDM 216/06	+++	29	RL8P	<i>L. fermentum</i>	+++
11	<i>L. casei</i> LOCK 0919	+	30	RL10	<i>L. rhamnosus</i>	+++
12	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	+	31	RL11	<i>L. paracasei</i>	+++
13	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	+++	32	RL12	<i>L. gasseri/johnsonii</i>	++
14	<i>L. casei</i> CCM 7088T	+++	33	RL12-PA	<i>L. paracasei</i>	++
15	<i>L. casei</i> CCM 4791	+++	34	RL14	<i>L. gasseri/johnsonii</i>	+++
16	Standard - žebříček	100bp	35	RL15P	<i>L. fermentum</i>	+++
17	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	+++	36	RL19P	<i>L. salivarius</i>	+++
18	<i>L. kefir</i> CCM 7086	+++	37	RL26P	<i>L. plantarum</i>	+++
19	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	+++				

+++ .. PCR produkt prokázán velmi zřetelně, ++ .. PCR produkt prokázán zřetelně, + ..PCR produkt prokázán, +/- ..PCR produkt prokázán velmi slabě

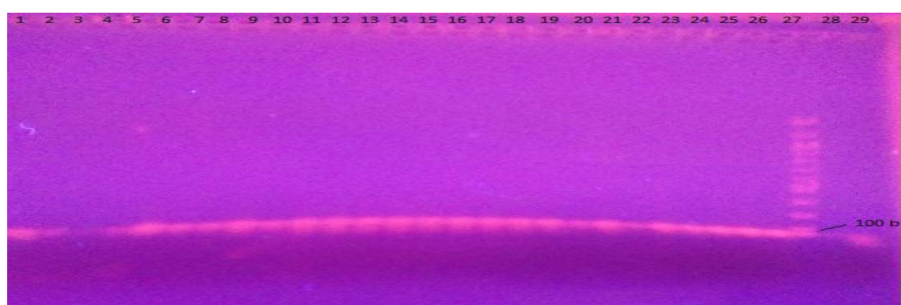
Obr. 19: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro doménu *Bacteria*

Ve všech vzorcích byl v různé intenzitě detekován specifický produkt PCR (466 bp), tím byla prokázána přítomnost bakteriální DNA.

5.3.2 Stanovení citlivosti PCR pro rod *Lactobacillus*

Vzorky bakteriální DNA, které prokazovaly zřetelnou přítomnost pro doménu *Bacteria* byly podrobeny amplifikaci DNA pomocí konvenční PCR specifické pro *Lactobacillus* (primery F_alllact a R_alllact) [7]. PCR reakce probíhala podle programu (Tab. 9) a namíchání PCR směsi je zapsáno v Tab. 8

Po amplifikaci DNA byly pomocí agarózové gelové elektroforézy detekovány specifické produkty PCR o velikosti 92 bp (Obr. 20).



běh	Vzorek	Detekce PCR produktu	běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	++	16	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	+++
2	<i>L. helveticus</i> CCDM 714/00-P	+	17	<i>L. kefiry</i> CCM 7086	+++
3	<i>L. helveticus</i> CCDM 121	-/+	18	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	+++
4	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 664/00-P	+	19	<i>L. lactis</i> CCM 7414	+++
5	<i>L. delbrueckii</i> CCM 7190T	+++	20	RL1	++
6	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 68/03-P	++	21	RL2-P	+++
7	<i>L. gasseri</i> K7	++	22	RL4-P	++
8	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	+++	23	RL7	+++
9	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 213/06	++	24	RL8-P	+++
10	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 216/06	+++	25	RL10	+++
11	<i>L. casei</i> LOCK 0919	+++	26	RL11	+++
12	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	+++	27	Standard - žebříček	100bp
13	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	+++	28	negativní kontrola	-
14	<i>L. casei</i> CCM 7088T	+++	29	pozitivní kontrola	++
15	<i>L. casei</i> CCM 4791	+++			

+++ .. PCR produkt prokázán velmi zřetelně, ++ .. PCR produkt prokázán zřetelně, + ..PCR produkt prokázán, +/- ..PCR produkt prokázán velmi slabě

Obr. 20: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro rod *Lactobacillus*

Ve všech vzorcích byl v různé intenzitě detekován specifický produkt PCR (92 bp), tím byla prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*.

5.4 qPCR-HRM analýza pro rod *Lactobacillus* sbírkových kmenů

Po ověření zařazení do domény *Bacteria* a rodu *Lactobacillus* byl vybraný vzorek podroben analýze qPCR-HRMA za použití specifických primerů V1P1/V2P1, UPF/UPR, LAC1/LAC2, V3F/V3R a V6F/V6R (Tabulka 10).

HRM analýza byla provedena pomocí analyzátoru ECOTM (Illumina, USA) s použitím počítačového programu High Resolution Melt Software •ECOTM Real time PCR systém. Měření byla provedena opakovaně.

Pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání PCR produktů s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* na analyzátoru ECOTM Real-time PCR systém bylo ověřováno, zda lze rozlišit bakteriální druhy rodu *Lactobacillus*. Citlivost analyzátoru ECOTM (Illumina, USA) má rozlišitelný teplotní profil na jedno desetinné místo, což nemusí být pro všechny analyzované druhy se specifickými primery dostačující. Analýza byla prováděna s jednotlivými primery s cílem zjistit, jaké druhy *Lactobacillus* jsme/nejsme na základě této analýzy schopni rozlišit.

Výsledky hodnot T_m specifických PCR produktů pro rod *Lactobacillus* s primery P1V1/P2V1, LAC1/LAC2, UPF/UPR, V3F/V3R a V6F/V6R jsou uvedeny v Tabulce 16. Výsledky ukazují, že za použití primerů P1V1/P2V1, V3F/V3R, V6F/V6R a částečně i u primerů UPF/UPR jsme na základě hodnot T_m schopni většinu vzorků druhů rodu *Lactobacillus* rozlišit. Hodnoty T_m (hodnoty T_m analyzátozem vyhodnoceny na jedno desetinné místo) získané pomocí primerů LAC1/LAC2 byly navzájem málo rozlišitelné a teplotní průběh vysokorozlišovacích křivek tání nebyl dostatečně diferencující. Výsledky měření, získané pomocí amplifikace DNA sbírkových kmenů za použití výše uvedených primerů, jsou souhrně uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16: Hodnoty T_m specifických PCR produktů HRM analýzy získaných pomocí všech testovaných pramerů P1V1/P2V1, LAC1/LAC2, UPF/UPR, V3F/V3R, V6F/V6R

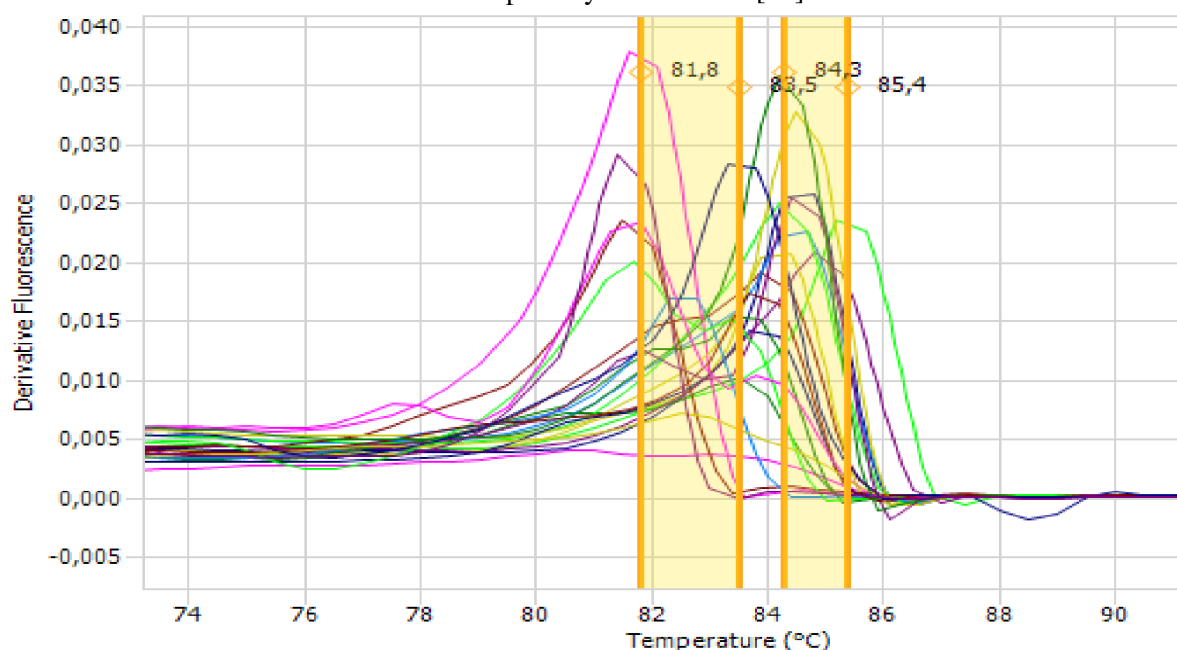
č.	Vzorek	T_m [°C] P1V1/P2V1	T_m [°C] LAC1/LAC2	T_m [°C] UPF/UPR	T_m [°C] V3F/V3R	T_m [°C] V6F/V6R
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	85,4	-	85,5	84,3	82,8
2	<i>L. delbrueckii</i> CCM 7190T	84,0	82,6	85,1	84,4	83,3
3	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 68/03-P	84,1	79,9	85,1	84,6	82,8
4	<i>L. gasseri</i> K7	84,2	70,0	85,0	84,3	83,2
5	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	83,5	81,9	86,7	86,1	82,7
6	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 213/06	84,6	81,3	85,1	85,4	83,4
7	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 216/06	84,9	82,3	86,7	86,1	82,9
8	<i>L. casei</i> LOCK 0919	84,5	-	86,0	86,2	82,8
9	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	84,3	81,7	85,9	86,1	82,7
10	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	81,6	82,0	86,9	86,2	83,0
11	<i>L. casei</i> CCM 7088T	81,8	82,5	86,4	86,2	82,5
12	<i>L. casei</i> CCM 4791	84,6	82,5	86,8	86,2	82,9
13	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	83,6	81,7	86,7	86,0	82,6
14	<i>L. kefir</i> CCM 7086	83,9	80,3	86,8	86,3	82,7
15	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	84,6	-	85,3	85,5	82,6
16	<i>Lactococcus lactis</i> CCM 7414	82,6	81,8	85,9	85,4	82,2
17	RL1 - <i>L. rhamnosus</i>	81,6	81,8	86,6	86,2	82,8
18	RL2-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	83,9	81,8	85,4	84,3	83,3
19	RL4-P - <i>L. paracasei</i>	81,6	81,6	86,7	86,3	82,9
20	RL7 - <i>L. vaginalis</i>	82,6	85,1	85,2	84,7	83,9
21	RL8-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	84,3	81,8	85,1	84,3	83,4
22	RL10 - <i>L. paracasei</i>	83,5	81,8	85,4	84,0	83,3
23	RL11 - <i>L. rhamnosus</i>	81,6	82,3	86,4	86,3	82,9

5.4.1 qPCR-HRM analýza s primery P1V1/P2V1

U každého vzorku byla provedena qPCR-HRM analýza s primery P1V1/P2V1 [40], použitý program qPCR je uveden v Tabulce 12, program pro HRMA je uveden v Tabulce 14 a složení PCR směsi je zapsán v Tabulce 11.

Ve všech analyzovaných vzorcích byl detekován specifický vrchol na křivce tání, který značí hodnotu T_m . Hodnoty T_m specifických PCR produktů HRM analýzy jsou uvedeny v Tabulce 16. Výsledky analýzy křivek tání pomocí ECOTM jsou uvedeny na Grafu 1 a 2 a popsány v Tabulce 17 a 18.

Graf 1: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro druhy rodu *Lactobacillus* - primery P1V1/P2V1 [40]



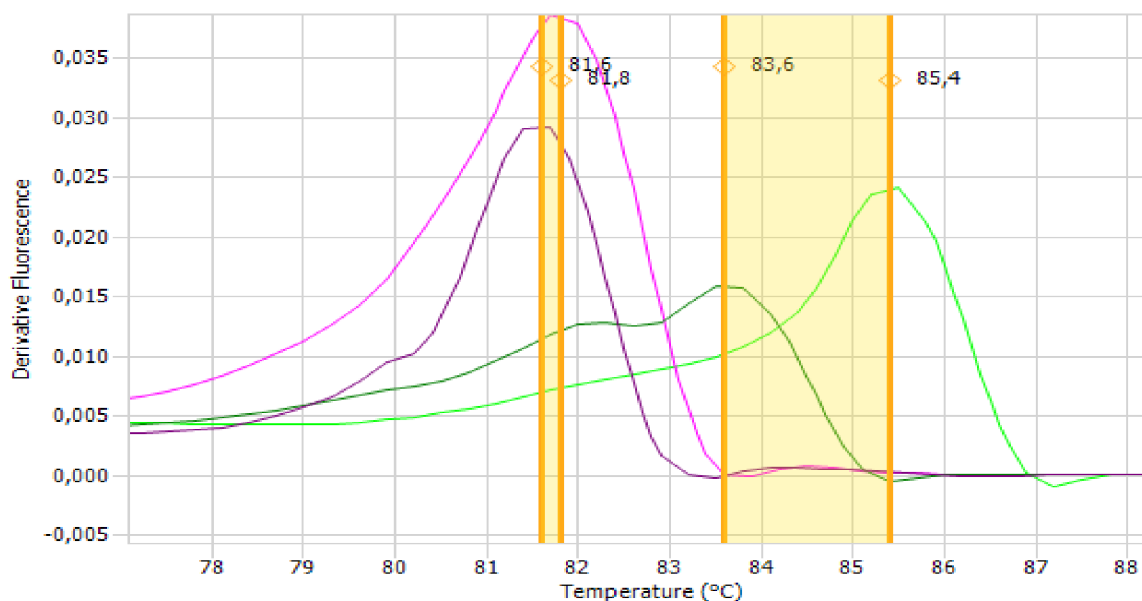
Tabulka 17: Hodnoty T_m specifických PCR produktů pro rod *Lactobacillus* - popis T_m vybraných druhů rodu *Lactobacillus* ke Grafu 1

DNA	T_m [°C]
RL 8P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	84,3
<i>L. casei</i> CCM 7088T	81,8
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	85,4
RL10 - <i>L. paracasei</i>	83,5

V Grafu 1 je uveden celkový teplotní profil všech námi testovaných 23 kmenů rodu *Lactobacillus*. Nejrozdílnější teploty tání ze všech testovaných vzorků jsou v Grafu 1 popsány a následně pro přehlednost přiřazeny k jednotlivým druhům rodu *Lactobacillus* v Tabulce 17.

Teplotní profil vysokorozlišovací analýzy křivek tání u většiny testovaných kmenů za použití primerů P1V1/P2V1 se jevil pro určité druhy *Lactobacillus* jako optimální s dostačující citlivostí pro analýzu (Graf 1). Např. se jednalo o kmeny RL 8P-*L. gasseri/johnsonii* s T_m 84,3 °C, *L. casei* CCM 7088T s T_m 81,8 °C, *L. acidophilus* CCM 4833T s 85,4 °C, RL10-*L. paracasei* s 83,5 °C. Hodnoty T_m všech analyzovaných vzorků znázorněných na Grafu 1 jsou uvedeny v Tabulce 16.

Graf 2: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* – primery P1V1/P2V1 - pro vybrané druhy rodu *Lactobacillus*.



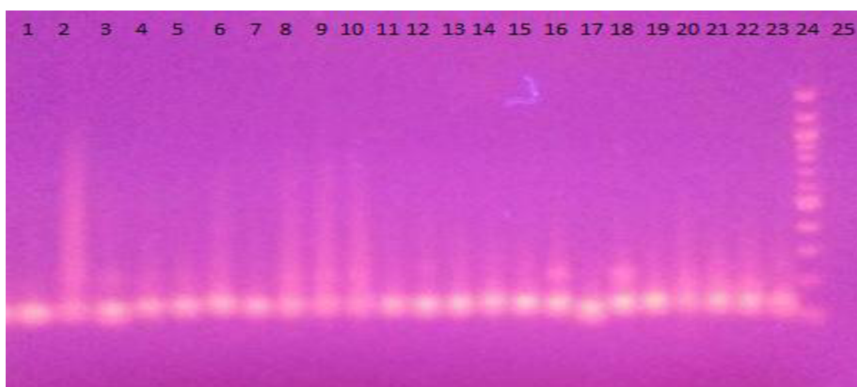
Tabulka 18: Identifikace vybraných druhů rodu *Lactobacillus* - popis ke Grafu 2

DNA	T _m [°C]
<i>L. casei</i> CCM 7088T	81,8
<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	83,6
RL11 - <i>L. rhamnosus</i>	81,6
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	85,4

V Grafu 2 jsou pro názornost vybrány ukázky křivek tání a jejich T_m u konkrétních kmenů rodu *Lactobacillus*, které mají správný průběh teplotního profilu (81,6 °C, 81,8 °C, 85,4 °C) ale i takové, které správný průběh teplotního profilu nemají (83,6 °C). Jejich popis je v Tabulce 18. Teplotní průběh profilu křivky tání s T_m 83,6 °C, kde se jedná o *L. plantarum* CCM 7039T uvedený na Grafu 2 a přiřazený v Tabulce 18, nemůžeme brát jako správně detekovaný při našich podmínkách, jelikož křivka tání nejeví dostatečný pík.

Pro bližší specifikaci jsme schopni dle Grafu 1 a 2 říct, že pomocí primerů P1V1/P2V1 lze na základě hodnoty T_m rozlišit větší část analyzovaných vzorků DNA rodu *Lactobacillus*. *L. acidophilus* jehož T_m je 85,4 °C, lze od všech ostatních analyzovaných druhů *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbruckii*, *L. gasseri*, *L. kefiry*, *L. amylovarum*, *Lactococcus lactis*, *L.gasseri/johnsonii*, *L. vaginalis*) zřetelně odlišit. Naopak nejsme schopni rozlišit RL2-P - *L.gasseri/johnsonii* (T_m=83,9 °C) od *L. kefiry* CCM 7086 (T_m=83,9 °C). Také nejsme schopni správně zařadit některé analyzované kmeny, které jeví nesprávný průběh teplotního profilu např. *L. plantarum* CCM 7039T.

Po analýze qPCR-HRM s primery P1V1/P2V1 [41] byla následně provedena agarózová gelová elektroforéza (Obr. 21).



č.	Vzorek	Detekce PCR produktu	č.	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	+	14	<i>L. kefiry</i> CCM 7086	+
2	<i>L. delbruckii</i> CCM 7190T	+	15	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	+
3	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 68/03-P	+	16	<i>Lactococcus lactis</i> CCM 7414	+
4	<i>L. gasseri</i> K7	+	17	RL1 - <i>L.rhamnosus</i>	+
5	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	+	18	RL2-P - <i>L.gasseri/johnsonii</i>	+
6	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 213/06	+	19	RL4-P - <i>L.paracasei</i>	+
7	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 216/06	+	20	RL7 - <i>L. vaginalis</i>	+
8	<i>L. casei</i> LOCK 0919	+	21	RL8-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	+
9	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	+	22	RL10 - <i>L. paracasei</i>	+
10	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	+	23	RL11 - <i>L. rhamnosus</i>	+
11	<i>L. casei</i> CCM 7088T	+	24	Standard - žebříček	100bp
12	<i>L. casei</i> CCM 4791	+	25	negativní kontrola	-
13	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	+			

+ ...PCR produkt prokázán -... PCR produkt neprokázán

Obr. 21: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro primery P1V1/P2V1 [41]

Agarózovou gelovou elektroforézou byla potvrzena přítomnost PCR produktů amplifikovatelnými s primery P1V1/P2V1. (Obr. 21) Délka produktu odpovídala 110 bp.

V databázi NCBI / Primer-BLAST byla ověřena délka produktu, která by měla odpovídat 91-110 bp.

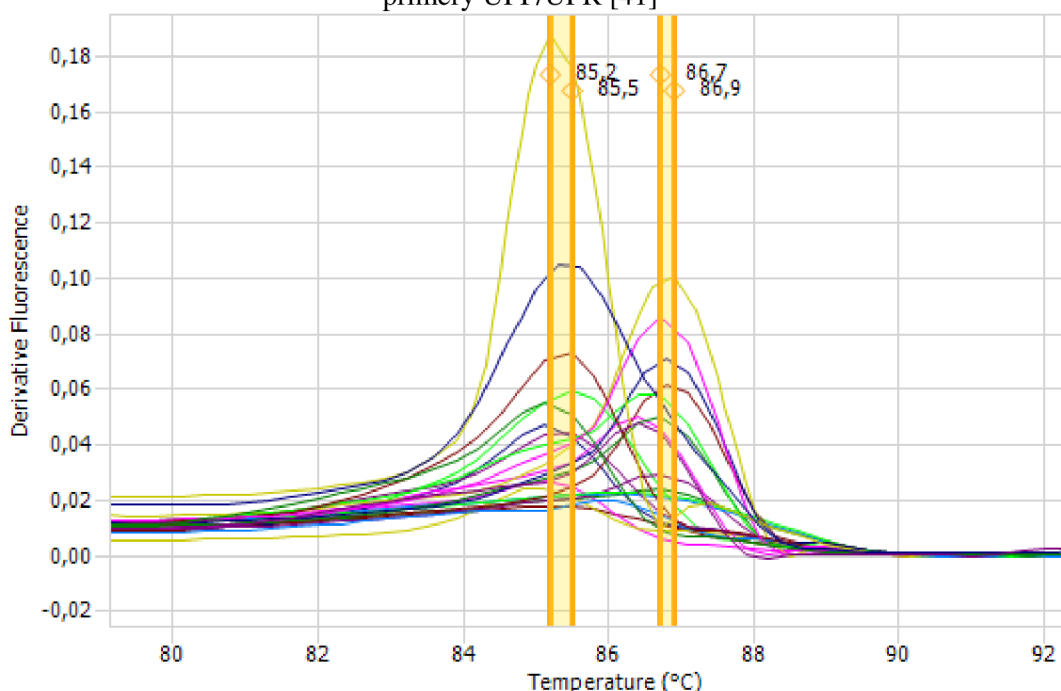
Jak uvádí literatura [40] i databáze Primer-BLAST [37] jsou tyto primery specifické nejen pro druhy *Lactobacillus*, ale i pro druhy *Lactococcus*, což potvrdila i naše analýza pomocí HRMA. Všechny naměřené hodnoty T_m viz Tabulka 16.

5.4.2 qPCR-HRM analýza s primery UPF/UPR

U každého vzorku byla provedena qPCR-HRM analýza s primery UPF/UPR [41], použitý program qPCR je uveden v Tabulce 12, program pro HRMA je uveden v Tabulce 14 a složení PCR směsi je zapsáno v Tabulce 11.

Ve všech analyzovaných vzorcích byl detekován specifický vrchol na křivce tání, který značí hodnotu T_m . Hodnoty T_m všech specifických PCR produktů HRM analýzy jsou uvedeny v Tabulce 16. Výsledky analýzy křivek tání pomocí přístroje ECOTM a primery UPF/UPR jsou uvedeny na Grafu 3 a 4 a popsány v Tabulce 19 a 20.

Graf 3: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro druhy rodu *Lactobacillus*. - primery UPF/UPR [41]



Tabulka 19: Hodnoty T_m specifických PCR produktů pro rod *Lactobacillus* - popis T_m vybraných druhů *Lactobacillus* ke Grafu 3

DNA	T_m [°C]
RL7 - <i>L. vaginalis</i>	85,2
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	85,5
RL4-P - <i>L. paracasei</i>	86,7
<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	86,9

V Grafu 3 je uveden celkový teplotní profil všech námi testovaných 23 kmenů rodu *Lactobacillus*. Jsou v něm také popsány nejrozdílnější teploty tání ze všech testovaných vzorků a následně pro přehlednost přiřazeny k jednotlivým druhům rodu *Lactobacillus* v Tabulce 19.

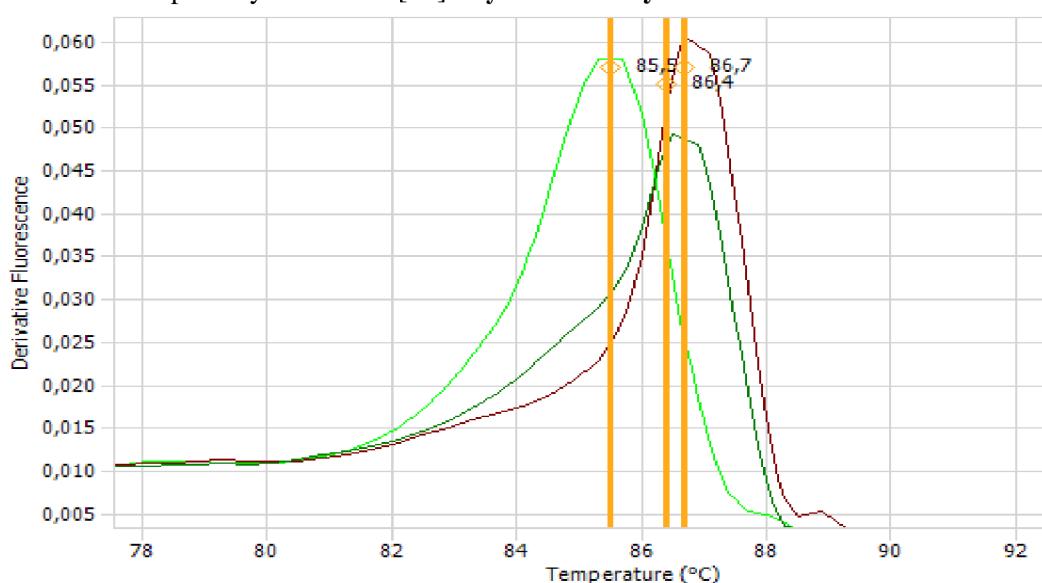
Teplotní profil vysokorozlišovací analýzy křivek tání u primerů UPF/UPR se jevil pro různé druhy *Lactobacillus* jako méně diferencující, pouze se dvěma výraznými vrcholy, což značí jen částečně dostačující citlivost a variabilitu námi testovaných vzorků, viz Graf 3 a 4. Konkrétně se jednalo o kmeny RL7-*L. vaginalis* s T_m 85,2 °C, *L. acidophilus* CCM 4833T s T_m 85,5 °C, RL4-P-

L. paracasei s T_m 86,7 °C, *L. rhamnosus* LOCK 0900 s T_m 86,9 °C.

Vzhledem k menší diferenciaci hodnot T_m u prumerů UPF/UPR bylo více vzorků DNA naměřeno se stejnou nebo velmi blízkou hodnotou T_m . Konkrétně se jednalo o kmeny *L. delbrückii* CCM 7190T, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* CCDM 68/03-P, *L. gasseri* K7, *L. paracasei* spp. *paracasei* CCDM 213/06, RL8-P- *L. gasseri/johnsonii* (se hodnota T_m rovnala 85,0-85,1 °C) a *L. casei* CCM 4791, *L. plantarum* CCM 7039T, *L. kefiry* CCM 7086, RL4-P - *L. paracasei*, *L. paracasei* spp. *paracasei* CCDM 216/06 (hodnota T_m se rovnala 86,7-86,8 °C).

Hodnoty T_m pro všechny znázorněné křivky tání znázorněné na Grafu 3 jsou uvedeny v Tabulce 16.

Graf 4: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* – primery UPF/UPR [41] - vybrané druhy rodu *Lactobacillus*



Tabulka 20: Identifikace vybraných druhů rodu *Lactobacillus* - popis ke Grafu 4

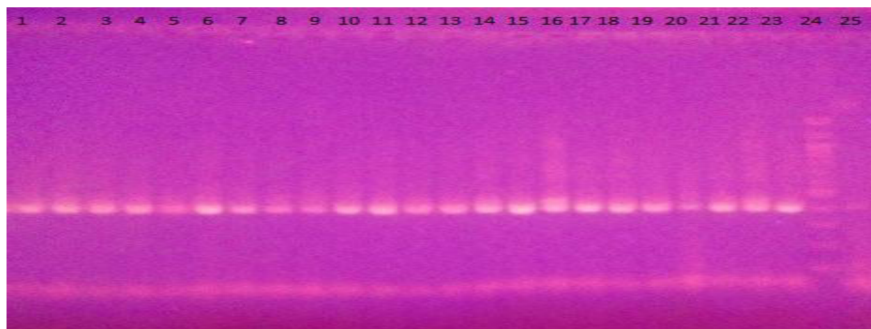
DNA	T_m [°C]
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	85,5
<i>L. casei</i> CCM 7088T	86,4
<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	86,7

V Grafu 4 jsou pro názornost vybrány ukázky křivek tání a jejich T_m u konkrétních kmenů rodu *Lactobacillus*. Jsou to křivky *L. acidophilus* CCM 4833T, *L. casei* CCM 7088T, *L. plantarum* CCM 7039T, popsány v Tab. 20, které mají správný průběh teplotního profilu, a také hodnota jejich T_m je dostatečně navzájem rozlišitelná.

Pro bližší specifikaci jsme schopni dle Grafu 3 a 4 říct, že pomocí prumerů UPF/UPR jsme schopni na základě hodnoty T_m rozlišit polovinu testovaných vzorků, např. *L. acidophilus* CCM 4833T, ($T_m=85,5^\circ\text{C}$), *L. casei* CCM 7088T ($T_m=86,4^\circ\text{C}$), *L. plantarum* CCM 7039T ($T_m=86,7$), RL7-*L. vaginalis* ($T_m=85,2$), *L. acidophilus* CCM 4833T ($T_m=85,5$), RL4-P - *L. paracasei* ($T_m=86,7$), *L. rhamnosus* LOCK 0900($T_m=86,9$), ale nejsme schopni dle naměřených T_m rozlišit *L. delbrückii* CCM 7190T, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* CCDM 68/03-P, *L. gasseri* K7, *L. paracasei*

spp. paracasei CCDM 213/06, RL8-P - *L. gasserijohnsonii* ($T_m=85,0-85,1^\circ\text{C}$) a *L. casei* CCM 4791, *L. plantarum* CCM 7039T, *L. kefiry* CCM 7086, RL4-P - *L. paracasei*, *L. paracasei spp. paracasei* CCDM 216/06 ($T_m=86,7-86,8^\circ\text{C}$). Hodnoty T_m všech analyzovaných vzorků viz Tabulka 16.

Po analýze qPCR-HRM s primery UPF/UPR [41] byla následně provedena agarózová gelová elektroforéza (Obr. 22).



č.	Vzorek	Detekce PCR produktu	č.	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	+	14	<i>L. kefiry</i> CCM 7086	+
2	<i>L. delbruckii</i> CCM 7190T	+	15	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	+
3	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 68/03-P	+	16	<i>Lactococcus lactis</i> CCM 7414	+
4	<i>L. gasserii</i> K7	+	17	RL1 - <i>L. rhamnosus</i>	+
5	<i>L. gasserii</i> K7 CCM 7009	+	18	RL2-P - <i>L. gasserijohnsonii</i>	+
6	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 213/06	+	19	RL4-P - <i>L. paracasei</i>	+
7	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 216/06	+	20	RL7 - <i>L. vaginalis</i>	+
8	<i>L. casei</i> LOCK 0919	+	21	RL8-P - <i>L. gasserijohnsonii</i>	+
9	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	+	22	RL10 - <i>L. paracasei</i>	+
10	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	+	23	RL11 - <i>L. rhamnosus</i>	+
11	<i>L. casei</i> CCM 7088T	+	24	Standard - žebříček	100bp
12	<i>L. casei</i> CCM 4791	+	25	negativní kontrola	-
13	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	+			

+ ... PCR produkt prokázán -... PCR produkt neprokázán

Obr. 22: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro primery UPF/UPR [41]

Agarózovou gelovou elektroforézou byla potvrzena přítomnost PCR produktů amplifikovatelnými s primery UPF/UPR/. (Obr. 22) Délka produktu odpovídala 400 bp.

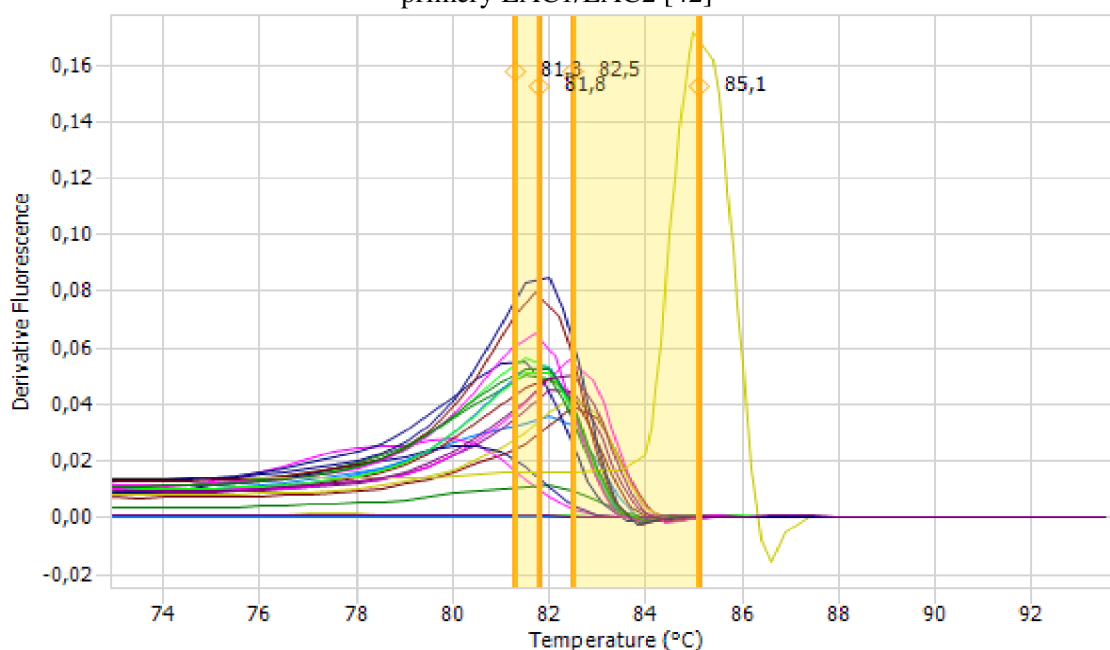
V databázi NCBI / Primer-BLAST byla ověřena délka produktu, která by měla odpovídat 400 - 470 bp. Jak uvádí literatura [41] i databáze Primer-BLAST [37] jsou tyto primery specifické nejen pro druhy *Lactobacillus*, ale i pro druhy *Lactococcus*, což ale naše analýza s primery UPF/UPR a analyzátozem ECOTM, za našich podmínek, vzhledem k nízké rozdílnosti hodnot T_m všech analyzovaných vzorků nepotvrdila. Všechny naměřené hodnoty T_m viz Tabulka 16.

5.4.3 qPCR-HRM analýza s primery LAC1/LAC2

U každého vzorku byla provedena qPCR-HRM analýza s primery LAC1/LAC2 [42], použitý program qPCR je uveden v Tabulce 12, program pro HRMA je uveden v Tabulce 14 a složení PCR směsi je zapsáno v Tabulce 11.

Ve všech analyzovaných vzorcích byl detekován specifický vrchol na křivce tání, který značí hodnotu T_m , pouze u vzorku č. 1, 8 a 15 hodnota T_m nebyla detekována. Hodnoty T_m všech specifických PCR produktů HRM analýzy jsou uvedeny v Tabulce 16. Výsledky analýzy křivek tání pomocí přístroje ECOTM a primerů LAC1/LAC2 jsou uvedeny na Grafu 5 a 6 a popsány v Tabulce 21 a 22.

Graf 5: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* – primery LAC1/LAC2 [42]



Tabulka 21: Hodnoty T_m specifických PCR produktů pro rod *Lactobacillus* - popis T_m vybraných druhů *Lactobacillus* ke Grafu 5

DNA	T_m [°C]
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 213/06	81,3
RL10 - <i>L. paracasei</i>	81,8
<i>L. casei</i> CCM 7088T	82,5
RL7 - <i>L. vaginalis</i>	85,1

V Grafu 5 je uveden celkový teplotní profil všech námi testovaných 23 kmenů rodu *Lactobacillus*. Nejrozdílnější teploty tání ze všech testovaných vzorků jsou popsány v Grafu 5 a následně pro přehlednost přiřazeny k jednotlivým druhům rodu *Lactobacillus* v Tabulce 21.

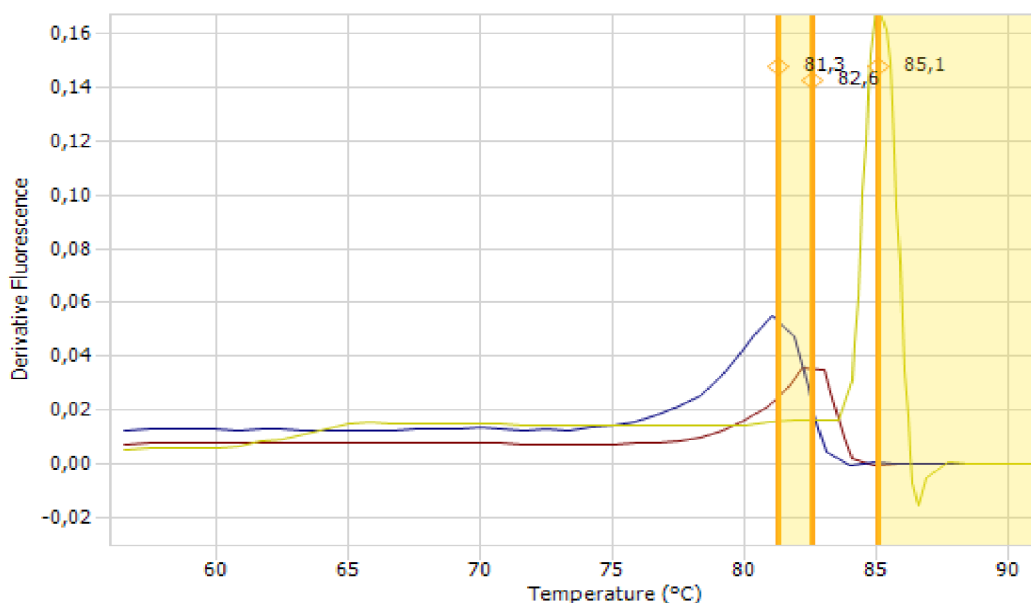
Teplotní profil vysokorozlišovací analýzy křivek tání DNA s primery LAC1/LAC2 se jevil pro různé druhy *Lactobacillus* jako méně diferencující. U většiny druhů rodu *Lactobacillus* je v Grafu 5 vidět nesprávný teplotní profil křivek tání, kdy pik s vrcholem T_m se jeví velmi nízký.

Na základě výsledků uvedených v grafu 5 můžeme říct, že HRM analýza proběhla úspěšně jen

u druhu *L. vaginalis* s T_m 85,1°C, který jediný se lišil svou velikostí píku i velikostí T_m , což nám následně potvrdila i agarózová gelová elektroforéza specifických PCR produktů viz Obr. 23.

Vzhledem k menší diferenciaci hodnot T_m u primerů LAC1/LAC2 bylo více vzorků DNA se stejnou nebo velmi blízkou hodnotou T_m . Konkrétně se jednalo o kmeny *L. plantarum* CCM 7039T, *L. rhamnosus* LOCK 0908, RL8-P-*L. gasseri/johnsonii*, RL10-*L. paracasei*, *Lactococcus lactis* CCM 7414, RL1-*L. rhamnosus*, RL2-P-*L. gasseri/johnsonii* (u všech se hodnota T_m rovnala 81,7 – 81,8°C). Hodnoty T_m všech analyzovaných vzorků jsou zaznamenány v Tabulce 16.

Graf 6: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* – primery LAC1/LAC2 [42] - vybrané druhy rodu *Lactobacillus*



Tabulka 22: Identifikace vybraných druhů rodu *Lactobacillus*- popis ke Grafu 6

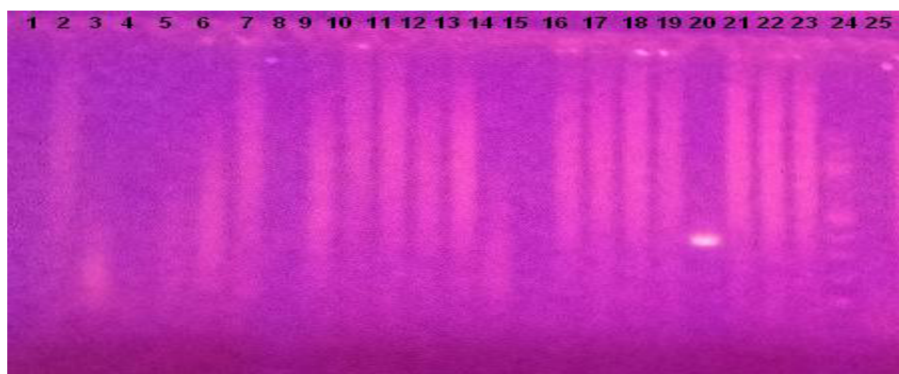
DNA	T_m [°C]
RL7 - <i>L. vaginalis</i>	85,1
<i>L. delbrückii</i> CCM 7190T	82,6
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 213/06	81,3

V Grafu 6 jsou pro názornost vybrány ukázky křivek tání s jejich hodnotami T_m u konkrétních kmenů rodu *Lactobacillus*, které mají správný průběh teplotního profilu (85,1°C), ale i takové, které nemají správný průběh teplotního profilu (81,3 °C, 82,6 °C). Jejich popis je v Tabulce 22. Teplotní průběh profilu křivek tání s T_m 82,6 °C a 81,3 °C, kde se jedná o *L. delbrückii* CCM 7190T a *L. paracasei* spp. *paracasei* CCDM 213/06 uvedený na Grafu 6 a přiřazený v Tabulce 22, nemůžeme brát jako správně detekovaný při našich podmínkách, jelikož křivky tání nejeví dostatečnou velikost píku. Naproti tomu teplotní průběh profilu křivky tání s T_m 85,1 °C (Graf 6), kde se jedná o RL7-*L. vaginalis* (Tabulka 22) se jeví jako pík s dostatečnou velikostí a je rozlišitelný a správný.

Pro bližší specifikaci jsme schopni dle Grafu 5 a 6 říct, že pomocí primerů LAC1/LAC2 [42] jsme schopni na základě hodnoty T_m splehlivě rozlišit druh RL7-*L. vaginalis* (T_m =85,5°C) od ostatních druhů rodu *Lactobacillus* např. *L. delbrückii* CCM 7190T (T_m =82,6°C), *L. paracasei*

spp. *paracasei* CCDM 213/06 ($T_m=81,3^\circ\text{C}$). U *L. acidophilus* CCM 4833T, *L. casei* LOCK 0919 a *L. amylovarum* CCM 4380 nebyla detekována žádná vysokorozlišovací křivka tání a žádná naměřená hodnota T_m . Hodnoty T_m všech analyzovaných vzorků jsou v Tabulce 16.

Po analýze qPCR-HRM s primery LAC1/LAC2 [42] byla následně provedena agarózová gelová elektroforéza (Obr. 23).



č.	Vzorek	Detekce PCR produktu	č.	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	-	14	<i>L. kefir</i> CCM 7086	-
2	<i>L. delbrueckii</i> CCM 7190T	-	15	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	-
3	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 68/03-P	-	16	<i>Lactococcus lactis</i> CCM 7414	-
4	<i>L. gasseri</i> K7	-	17	RL1 - <i>L. rhamnosus</i>	-
5	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	-	18	RL2-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	-
6	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 213/06	-	19	RL4-P - <i>L. paracasei</i>	-
7	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 216/06	-	20	RL7 - <i>L. vaginalis</i>	+
8	<i>L. casei</i> LOCK 0919	-	21	RL8-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	-
9	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	-	22	RL10 - <i>L. paracasei</i>	-
10	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	-	23	RL11 - <i>L. rhamnosus</i>	-
11	<i>L. casei</i> CCM 7088T	-	24	Standard - žebříček	100bp
12	<i>L. casei</i> CCM 4791	-	25	negativní kontrola	-
13	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	-			

+ ... PCR produkt prokázán -... PCR produkt neprokázán

Obr. 23: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro primery Lac1/Lac2 [42]

Agarózovou gelovou elektroforézou byla potvrzena přítomnost PCR produktu amplifikovatelným s primery LAC1/LAC2 u vzorku č. 20. (Obr. 23) Délka produktu odpovídala 350 bp. V databázi NCBI / Primer-BLAST byla ověřena délka produktu, která by měla odpovídat 345-350 bp.

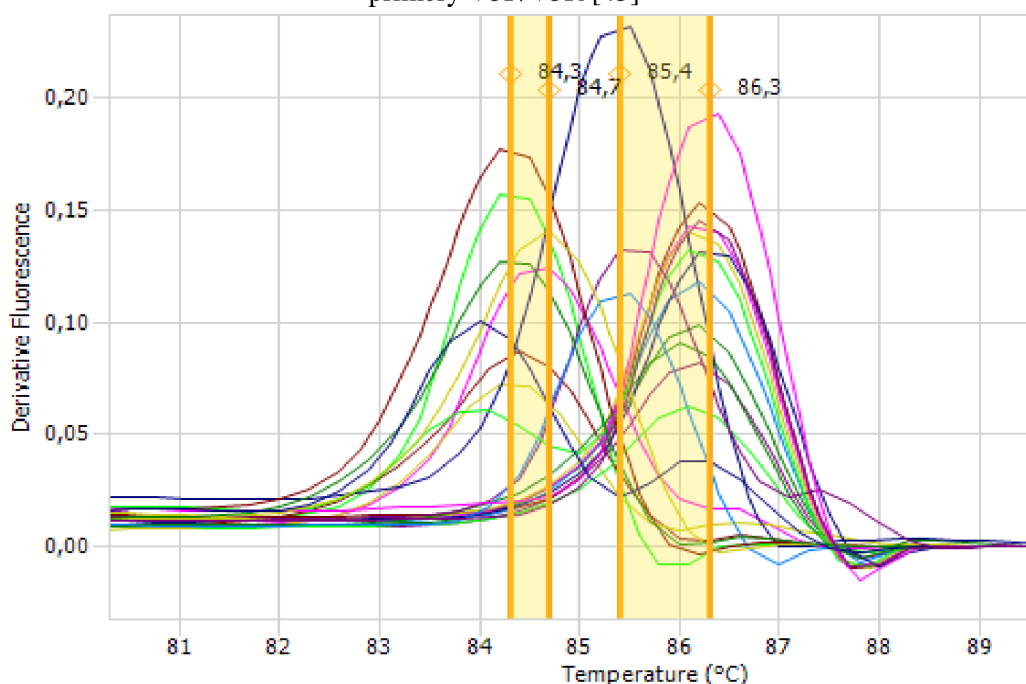
Spolehlivě byl s primery LAC1/LAC2 prokázán u HRM analýzy i u následné agarózové gelové elektroforézy pouze vzorek č. 20 (RL7-*L. vaginalis*). Jelikož u elektroforézy nebyl detekován žádný další PCR produkt, tak hodnota T_m u HRM analýzy pro ostatní vzorky je diskutabilní a nespolehlivá. Všechny hodnoty T_m viz Tabulka 16.

5.4.4 qPCR-HRM analýza s primery V3F/V3R

U každého vzorku byla provedena qPCR-HRM analýza s primery V3F/V3R [43], použitý program qPCR je uveden v Tabulce 13, program pro HRMA je uveden v Tabulce 14 a složení PCR směsi je zapsáno v Tabulce 11.

Ve všech analyzovaných vzorcích byl detekován specifický vrchol na křivce tání, který značí hodnota T_m . Hodnoty T_m specifických PCR produktů HRM analýzy jsou uvedeny v Tabulce 16. Výsledky analýzy křivek tání pomocí přístroje ECOTM a primerů V3F/V3R jsou uvedeny v Grafu 7 a 8 a popsány v Tabulce 24 a 25.

Graf 7: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* – primery V3F/V3R [43]



Tabulka 24: Hodnoty T_m specifických PCR produktů pro rod *Lactobacillus* - popis T_m vybraných druhů rodu *Lactobacillus* ke Grafu 7

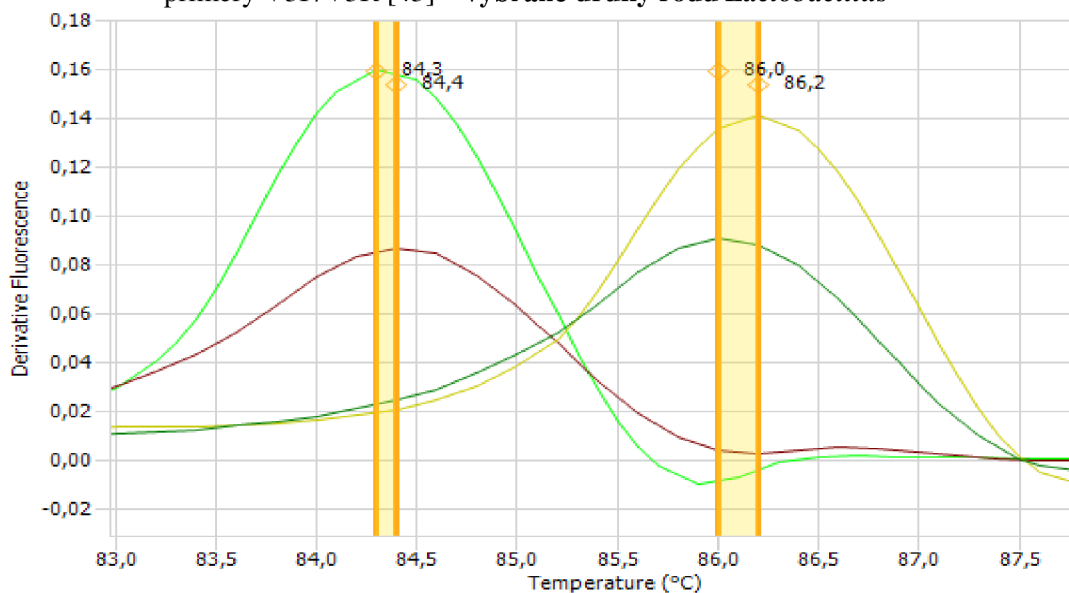
DNA	T_m [°C]
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	84,3
RL7 - <i>L. rhamnosus</i>	84,7
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 213/06	85,4
<i>L. kefir</i> CCM 7086	86,3

V Grafu 7 je uveden celkový teplotní profil všech námi testovaných 23 kmenů rodu *Lactobacillus*. Nejrozdílnější teploty tání ze všech testovaných vzorků jsou v Grafu 7 také popsány a následně pro přehlednost přiřazeny k jednotlivým druhům rodu *Lactobacillus* v Tabulce 24.

Teplotní profil vysokorozlišovací analýzy křivek tání u testovaných kmenů za použití primerů V3F/V3R se jevil pro určité druhy *Lactobacillus* jako optimální s dostačující citlivostí a diferenciací pro naši analýzu (Graf 7). Např. se jednalo o kmene *L. acidophilus* CCM 4833T

s T_m 84,3 °C, RL7-*L. rhamnosus* s T_m 84,7 °C, *L. paracasei* spp. *paracasei* CCDM 213/06 s T_m 85,4 °C, *L. kefiry* CCM 7086 s T_m 86,3 °C u kterých je vidět v Grafu 7 největší diferenciace a velikost teplotních profilů. Hodnoty T_m všech naměřených vzorků jsou uvedeny v Tabulce 16.

Graf 8: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* - primery V3F/V3R [43] – vybrané druhy rodu *Lactobacillus*



Tabulka 25: Identifikace vybraných druhů rodu *Lactobacillus* - popis ke Grafu 8

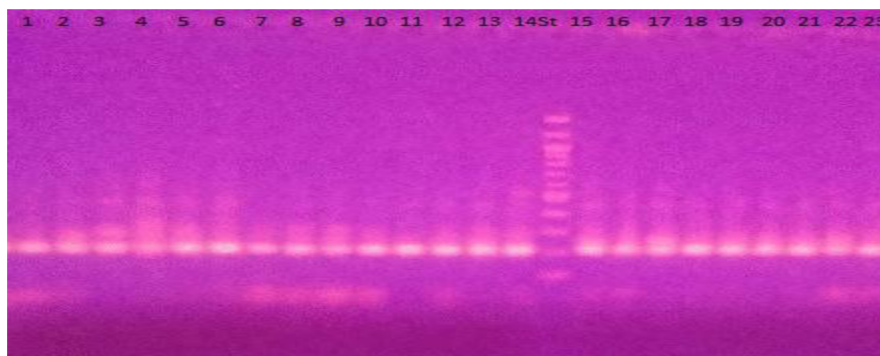
DNA	T_m [°C]
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	84,3
<i>L. delbruckii</i> CCM 7190T	84,4
<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	86,0
<i>L. casei</i> CCM 7088T	86,2

V Grafu 8 jsou pro názornost vybrány ukázky křivek tání s jejich hodnotami T_m u konkrétních kmenů rodu *Lactobacillus*, které mají různý průběh teplotního profilu a různé hodnoty T_m . Popis ke Grafu 8 viz Tabulka 25. Teplotní průběh křivek tání s T_m 84,3 °C a 86,2 °C má strmější průběh oproti vysokorozlišovacím křivkám tání s T_m 84,4 °C a 86,0 °C, které strmý průběh nemají - což může značit nesprávnost průběhu teplotního profilu.

Pro bližší specifikaci jsme schopni dle Grafu 7 a 8 říct, že pomocí primerů V3F/V3R lze na základě hodnoty T_m a profilů vysokorozlišovacích křivek tání rozlišit větší část analyzovaných vzorků DNA rodu *Lactobacillus*. Např. *L. acidophilus* jehož T_m je 84,3 °C, *L. plantarum* CCM 7039T (T_m =86,0°C), *L. delbruckii* CCM 7190T (T_m =84,4°C), *L. kefiry* CCM 7086 (T_m =86,3°C), RL7 - *L. rhamnosus* (T_m =84,7°C).

Naopak nejsme schopni rozlišit *L. acidophilus* CCM 4833T (T_m =84,3 °C) od *L. gasseri* K7 (T_m =84,3°C) a od RL2-P - *L.gasseri/johnsonii* (T_m =84,3°C). Hodnoty T_m všech analyzovaných vzorků viz Tabulka 16.

Po analýze qPCR-HRM s primery V3F/V3R [43] byla následně provedena agarózová gelová elektroforéza (Obr. 24).



č.	Vzorek	Detekce PCR produktu	č.	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	+	13	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	+
2	<i>L. delbrueckii</i> CCM 7190T	+	14	<i>L. kefir</i> CCM 7086	+
3	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 68/03-P	+	St.	Standard - žebříček	100 bp
4	<i>L. gasseri</i> K7	+	15	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	+
5	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	+	16	<i>L. lactis</i> CCM 7414	+
6	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 213/06	+	17	RL1 - <i>L. rhamnosus</i>	+
7	<i>L. paracasei spp. paracasei</i> CCDM 216/06	+	18	RL2-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	+
8	<i>L. casei</i> LOCK 0919	+	19	RL4-P - <i>L. paracasei</i>	+
9	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	+	20	RL7 - <i>L. vaginalis</i>	+
10	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	+	21	RL8-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	+
11	<i>L. casei</i> CCM 7088T	+	22	RL10 - <i>L. paracasei</i>	+
12	<i>L. casei</i> CCM 4791	+	23	RL11 - <i>L. rhamnosus</i>	+

+ ... PCR produkt prokázán

Obr. 24: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro primery V3F/V3R [43]

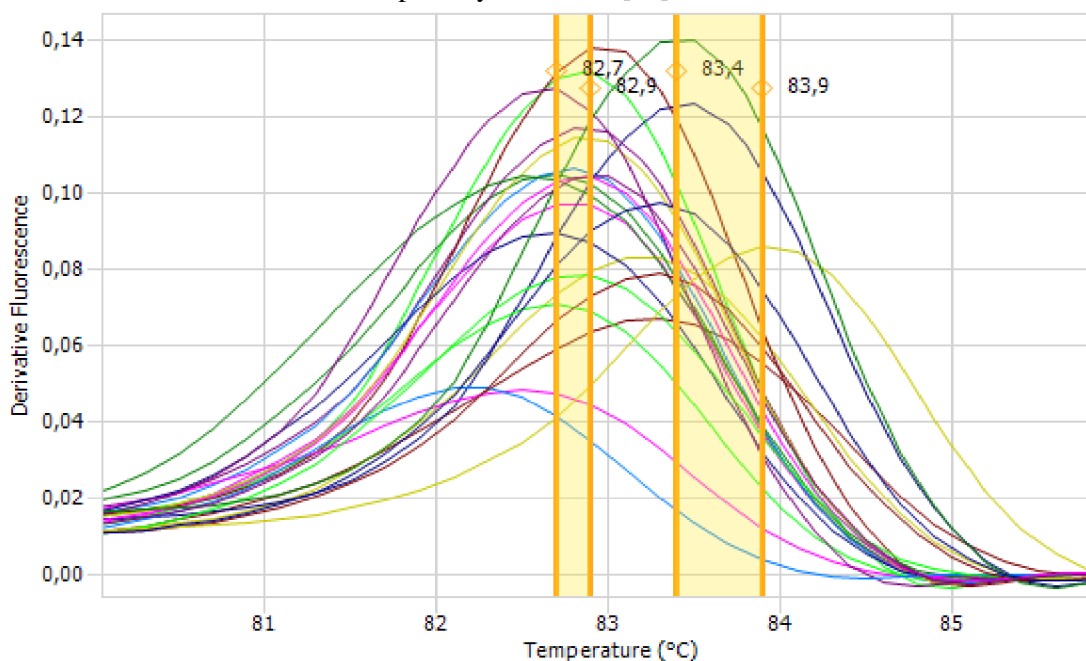
Agarózovou gelovou elektroforézou byla potvrzena přítomnost PCR produktů amplifikovatelnými s primery V3F/V3R. (Obr. 24) Délka produktu odpovídala 200 bp. Specifita použitých primerů byla ověřena v databázi NCBI/Primer-BLAST, přičemž byla také potvrzena velikost amoplikonu (204 bp).

5.4.5 qPCR-HRM analýza s primery V6F/V6R

U každého vzorku byla provedena qPCR-HRM analýza s primery V6F/V6R [43], použitý program qPCR je uveden v Tabulce 13, program pro HRMA je uveden v Tabulce 14 a složení PCR směsi je zapsáno v Tabulce 11.

Ve všech analyzovaných vzorcích byl detekován specifický vrchol na křivce tání, který značí hodnotu T_m . Hodnoty T_m všech specifických PCR produktů HRM analýzy jsou uvedeny v Tabulce 16. Výsledky analýzy křivek tání pomocí přístroje ECOTM a primerů V6F/V6R jsou uvedeny v Grafu 9 a 10 a popsány v Tabulce 26 a 27.

Graf 9: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* - primery V6F/V6R [43]



Tabulka 26: Hodnoty T_m specifických PCR produktů pro rod *Lactobacillus*- popis T_m vybraných druhů *Lactobacillus* ke Grafu 9

DNA	T_m [°C]
<i>L. kefir</i> CCM 7086	82,7
<i>L. casei</i> CCM 4791	82,9
RL8-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	83,4
RL7 - <i>L. rhamnosus</i>	83,9

V Grafu 9 je uveden celkový teplotní profil všech námi testovaných 23 kmenů rodu *Lactobacillus*. Nejrozdílnější teploty tání ze všech testovaných vzorků jsou v Grafu 9 také popsány a následně pro přehlednost přiřazeny k jednotlivým druhům rodu *Lactobacillus* v Tabulce 26.

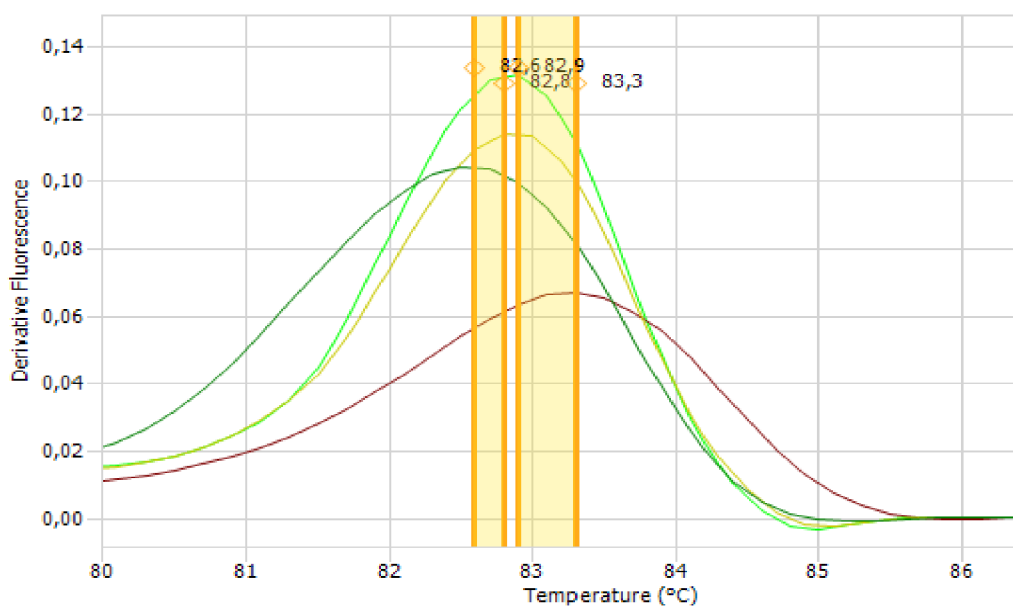
Teplotní profil vysokorozlišovací analýzy křivek tání u primerů V6F/V6R se jevil pro různé druhy *Lactobacillus* jako optimální s dostatečnou citlivostí pro naši analýzu (Graf 9). Křivky tání vykazují dostatečnou strmost i velikost v teplotním profilu a hodnoty T_m analyzovaných vzorků

jsou dostatečně rozdílné.

Jednalo se např. o kmeny *L. kefiry* CCM 7086 s T_m 82,7 °C, *L. casei* CCM 4791 s T_m 82,9 °C, RL8-P-*L. gasseri/johnsonii* s T_m 83,4 °C, RL7-*L. rhamnosus* s T_m 83,9 °C u kterých je na Grafu 9 vidět největší rozdílnost teplotních profilů.

Hodnoty T_m pro všechny křivky tání znázorněné v Grafu 9 jsou uvedeny v Tabulce 16.

Graf 10: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro *Lactobacillus* - primery V6F/V6R [43] - vybrané druhy rodu *Lactobacillus*



Tabulka 27: Identifikace vybraných druhů rodu *Lactobacillus* - popis ke Grafu 10

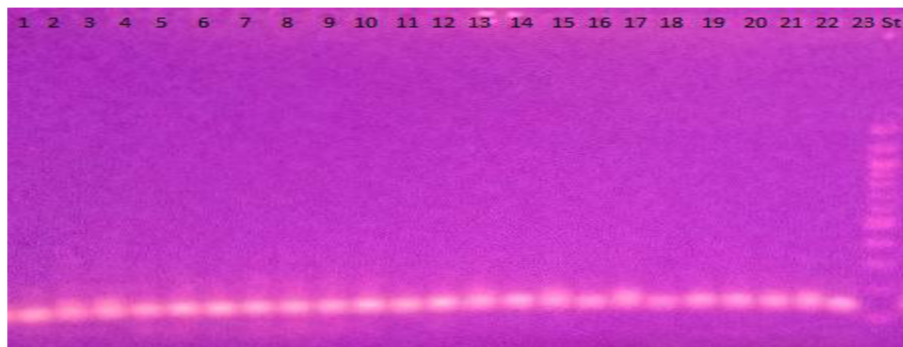
DNA	T_m [°C]
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	82,8
<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	82,6
<i>L. casei</i> CCM 4791	82,9
<i>L. delbrückii</i> CCM 7190T	83,3

V Grafu 10 jsou pro názornost vybrány pouze ukázky křivek tání s jejich hodnotami T_m u konkrétních kmenů rodu *Lactobacillus*, které mají různý průběh teplotního profilu a různé hodnoty T_m . Popis ke Grafu 10 viz Tabulka 27. Teplotní profil vysokorozlišovacích křivek tání s T_m 82,8 °C, 82,6 °C a 82,9 °C vykazuje strmější průběh, naproti tomu křivka tání s T_m 83,3 °C nejvíce dostatečný pík.

Pro bližší specifikaci jsme schopni dle Grafu 9 a 10 přesto říct, že pomocí primerů V6F/V6R lze na základě hodnoty T_m a profilů vysokorozlišovacích křivek tání rozlišit větší část analyzovaných vzorků DNA rodu *Lactobacillus*. Např. jsme schopni rozlišit *L. acidophilus* jehož T_m je 82,8 °C, *L. plantarum* CCM 7039T (T_m =82,6°C), *L. delbrückii* CCM 7190T (T_m =83,3°C), *L. casei* CCM 4791 (T_m =82,9°C), RL7-*L. rhamnosus* (T_m =83,9°C). Naopak nejsme schopni rozlišit *L. plantarum* CCM 7039T (T_m =82,6 °C) od *L. amylovarum* CCM 4380 (T_m =82,6 °C). Hodnoty T_m

všech analyzovaných vzorků viz Tabulka 16.

Po analýze qPCR-HRM s primery V3F/V3R [43] byla následně provedena agarózová gelová elektroforéza (Obr. 25).



č.	Vzorek	Detekce PCR produktu	č.	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	+	13	<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	+
2	<i>L. delbrueckii</i> CCM 7190T	+	14	<i>L. kefiry</i> CCM 7086	+
3	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> CCDM 68/03-P	+	15	<i>L. amylovarum</i> CCM 4380	+
4	<i>L. gasseri</i> K7	+	16	<i>L. lactis</i> CCM 7414	+
5	<i>L. gasseri</i> K7 CCM 7009	+	17	RL1 - <i>L.rhamnosus</i>	+
6	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> CCDM 213/06	+	18	RL2-P - <i>L.gasseri/johnsonii</i>	+
7	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> CCDM 216/06	+	19	RL4-P - <i>L.paracasei</i>	+
8	<i>L. casei</i> LOCK 0919	+	20	RL7 - <i>L. vaginalis</i>	+
9	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0908	+	21	RL8-P - <i>L. gasseri/johnsonii</i>	+
10	<i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900	+	22	RL10 - <i>L. paracasei</i>	+
11	<i>L. casei</i> CCM 7088T	+	23	RL11 - <i>L. rhamnosus</i>	+
12	<i>L. casei</i> CCM 4791	+	St.	Standard - žebříček	100bp

+ ... PCR produkt prokázán

Obr. 25: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR specifického pro primery V6F/V6R [43]

Agarózovou gelovou elektroforézou byla potvrzena přítomnost PCR produktů amplifikovatelnými s primery V6F/V6R [43]. (Obr. 25) Délka produktu odpovídala 120 bp. Specifita použitých primerů byla ověřena v databázi NCBI/Primer-BLAST, přičemž byla také potvrzena velikost amoplikonu (128 bp).

5.5 qPCR-HRM analýza pro rod *Lactobacillus* reálného vzorku

DNA z reálného vzorku (doplňek stravy s probiotickým účinkem) byla izolována a čištěná pomocí magnetických částic. Použití magnetických částic bylo oproti fenolové extrakci výhodné z důvodů vyšší rychlosti a jednoduchosti izolace DNA.

5.5.1 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pro zjištění koncentrace a čistoty izolované DNA byla spektrofotometricky změřena absorbance v rozsahu vlnových délek (220-320 nm) [24].

Tabulka 28: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA z reálného výrobku pomocí magnetické separace

Měření	DNA	Konc. DNA (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
1	Vzorek BIFOLAC	100,9	2,018	1,316	1,53	1,42
2	Vzorek BIFOLAC	109,0	2,181	1,43	1,52	1,3

Z výsledků měření vyplývá (vzorek byl měřen 2x), že poměr absorbancí A260nm/A280nm nepřekročil hodnotu 1,8 ($A_{260}/A_{280} < 1,8$). To značí znečištění bílkovinami. Je to způsobeno zřejmě tím, že tobolky probiotických výrobků neobsahují jen čistou kulturu, ale i další příměsi, plnidla atd. Jedná se tedy o komplexní vzorky. Proteiny jsou nežádoucí, protože by mohly interferovat v PCR. Pro qPCR- HRM analýzu byla DNA naředěna (na 10 ng/μl), čímž byly naředěny i inhibitory PCR. Bylo usouzeno, že izolovaná DNA v koncentraci i čistotě, kterou jsme získali je celkově vyhovující pro qPCR-HRM analýzu.

5.5.2 qPCR-HRM analýza z komplexního vzorku doplňku stravy

Byla provedena HRM analýza (analyzátor ECOTM, Illumina) produktů PCR u reálného vzorku za použití specifických testovaných primerů V3F/V3R, V6F/V6R [43], které byly vybrány na základě předchozí analýzy referenčních kmenů.

Současně byla provedena analýza všech výše uvedených sbírkových kmenů, viz Tabulka 16, které byly brány jako referenční vzorky. Výsledné hodnoty a grafy vysokorozlišovací analýzy křivek tání jsou uvedeny níže.

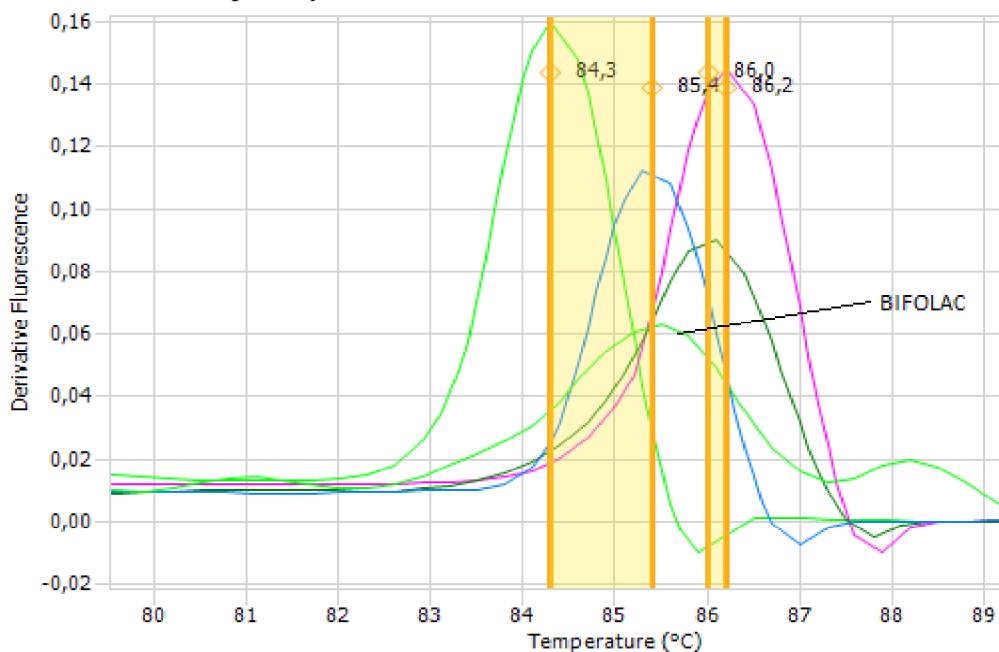
Tabulka 29: Hodnoty T_m specifických PCR produktů HRM analýzy DNA izolované z reálného vzorku BIFOLAC, získaných pomocí vybraných primerů V3F/V3R, V6F/V6R

vzorek BIFOLAC	T_m [°C] V3F/V3R	T_m [°C] V6F/V6R
	85,5	82,8

5.5.2.1 qPCR-HRM analýza s primery V3F/V3R

U vzorku byla provedena qPCR-HRM analýza s primery V3F/V3R [43] (použitý program qPCR je uveden v Tabulce 13, program pro HRMA je uveden v Tabulce 14 a složení PCR směsi je zapsáno v Tabulce 11), přičemž byl detekován specifický vrchol na křivce tání, který značí T_m . Výsledky analýzy křivek tání jsou uvedeny v Grafu 11 a v Tabulce 30.

Graf 11: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* - primery V3F/V3R [43] – vzorek BIFOLAC



Tabulka 30: Hodnoty T_m specifických PCR produktů – popis ke Grafu 11

DNA	T_m [°C]
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	84,3
<i>L. lactis</i> CCM 7414	85,4
<i>L. plantarum</i> CCM 7039T	86,0
<i>L. casei</i> CCM 4791	86,2
vzorek	85,5

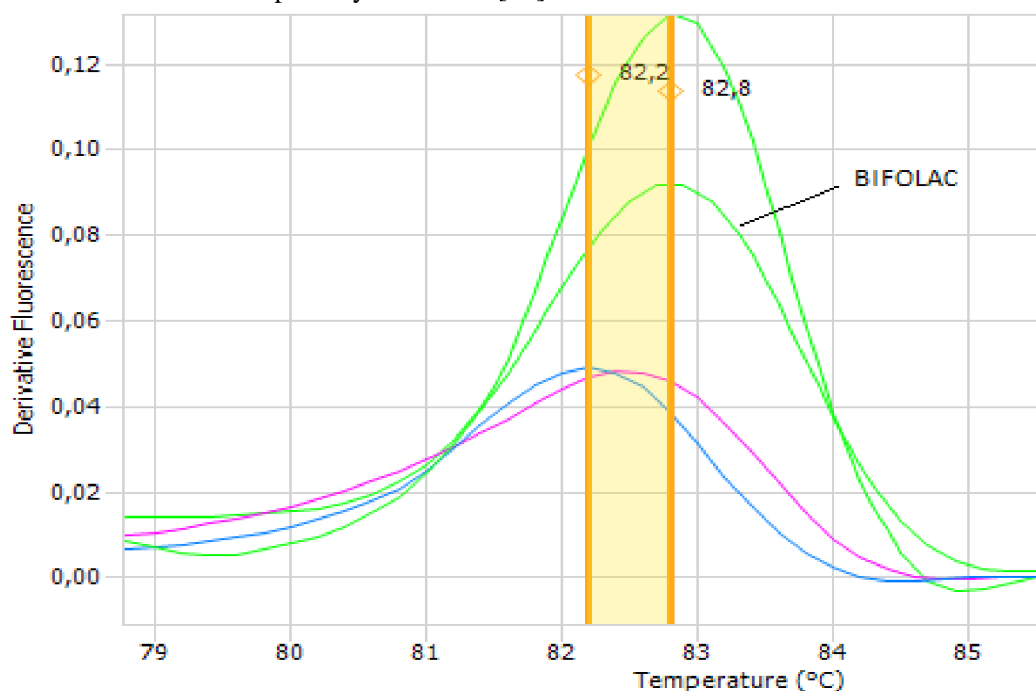
V Grafu 11 je uveden celkový teplotní profil námi testovaného reálného vzorku BIFOLAC a také vzorků referenčních, které jsme vybrali na základě složení reálného vzorku.

Při analýze DNA v reálném vzorku za použití primerů V3F/V3R byl detekován *L. lactis*, který měl s těmito primery při vysokorozlišovací analýze křivek tání nejvýraznější vrchol T_m 85,5 °C (blízká shoda T_m vzorku s referenčním vzorkem *L. lactis* CCM 7414 - Graf 13, Tabulka 30). Jako referenční vzorky byly vybrány ke znázornění v Grafu 11 *L. acidophilus* CCM 4833T, *L. lactis* CCM 7414, *L. plantarum* CCM 7039T, *L. casei* CCM 4791 (Tabulka 30).

5.5.2.2 qPCR-HRM analýza s primery V6F/V6R

U vzorku byla provedena qPCR-HRM analýza s primery V6F/V6R [43] (použitý program qPCR je uveden v Tabulce 13, program pro HRMA je uveden v Tabulce 14 a složení PCR směsi je zapsáno v Tabulce 11), přičemž byl detekován specifický vrchol na křivce tání, který značí T_m . Výsledky analýzy křivek tání jsou uvedeny na Grafu 12 a v tabulce 31.

Graf 12: Vysokorozlišovací analýza křivek tání s primery specifickými pro *Lactobacillus* – primery V6F/V6R [43] - vzorek BIFOLAC



Tabulka 31: Hodnoty T_m specifických PCR produktů – popis ke Grafu 12

DNA	T_m [°C]
<i>L. lactis</i> CCM 7414	82,2
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833T	82,8
vzorek	82,8

V Grafu 12 je uveden celkový teplotní profil námi testovaného reálného vzorku BIFOLAC a také vzorků referenčních, které jsme vybrali na základě složení reálného vzorku.

Při analýze DNA v reálném vzorku za použití primerů V6F/V6R byl detekován *L. acidophilus*, který měl s těmito primery při vysokorozlišovací analýze křivek tání nejvýraznější vrchol T_m 82,8°C (shoda T_m vzorku s referenčním vzorkem *L. acidophilus* - Graf 12, Tabulka 31). Jako referenční vzorky byly vybrány ke znázornění v Grafu 12 *L. lactis* CCM 7414, *L. acidophilus* CCM 4833T. (Popis viz Tabulka 31).

Na základě analýzy qPCR-HRM můžeme říct, že námi zjištěné druhy bakterií - *L. lactis*, *L. acidophilus* vzorek BIFOLAC obsahoval.

6 ZÁVĚREČNÉ SHRNU TÍ

Cílem této diplomové práce bylo prokázat možnost využití PCR v reálném čase a HRM analýzy pro rozlišení bakteriální DNA *Lactobacillus* na úrovni rodu i druhu.

V experimentální části byla analyzována DNA získaná ze sbírkových kmenů rodu *Lactobacillus*. K izolaci DNA z reálného vzorku byly použity magnetické částice. Koncentrace veškeré DNA byla stanovena spektrofotometricky. K identifikaci DNA byly použity primery pro specifickou DNA domény, rodu a druhu. PCR směs obsahovala různé množství DNA (100 a 10 ng/μl).

Amplifikovaný PCR produkt byl detekován i pomocí agaróзовé gelové elektroforézy.

Získané výsledky vhodnosti jednotlivých syntetických oligonukleotidů (primerů) byly porovnány s literárním zdrojem a s databází NCBI Primer-BLAST. Na základě této práce pak byla vyhodnocena jejich vhodnost/nehodnost.

Z výsledků analýzy DNA *Lactobacillus* s využitím PCR v reálném čase a HRM analýzy s primery V1P1/V2P1[40], UPF/UPR [41], LAC1/LAC2 [42], V3F/V3R [43] a V6F/V6R [43] lze říct, že:

- a) jako nejvíce vhodné při analýze DNA *Lactobacillus* v analyzátoru ECOTM (Illumina, USA) za použití Master Mix SYTO9 se podle grafického zhodnocení jeví primery V1P1/V2P1[40], V3F/V3R[43] i V6F/V6R [43], a to pro svou variabilitu a možnost rozlišení nejvíce druhů rodu *Lactobacillus*
- b) méně vhodné se dle naší analýzy jeví primery UPF/UPR [41], a to na základě zjištěných výsledků menší diferenciace hodnot T_m analyzovaných vzorků DNA
- c) u primerů LAC1/LAC2 [42] je podle grafického hodnocení a podle agaróзовé gelové elektroforézy zřetelné, že nebyl detekován žádný PCR produkt tak, abychom mohli od sebe druhy *Lactobacillus* na základě hodnot T_m spolehlivě rozlišit, a proto výsledky analýzy vzorků DNA jsou diskutabilní - z toho lze usuzovat, že tyto primery jsou za našich podmínek k analýze méně vhodné
- d) prokázané druhy bakterií v reálném vzorku s využitím analýzy qPCR-HRM s pomocí primerů V3F/V3R [43] a V6F/V6R [43] se dle naší analýzy DNA sbírkových kmenů, které byly brány jako referenční, shodovaly. Můžeme tedy říct, že DNA izolovaná z reálného probiotického výrobku byla podle výsledků hodnoty T_m zařazena do rodu *Lactobacillus* a *Lactococcus* druhu *L. acidophilus* a *L. lactis* a shodovala se s údaji uvedeným výrobcem.

Na základě těchto výsledků můžeme říci, že pro rozlišení bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* na úrovni druhů jsou nejvhodnější primery V1P1/V2P1[40], V3F/V3R[43] i V6F/V6R [43].

U primerů V3F/V3R[43] i V6F/V6R [43] byla tato vhodnost potvrzena i analýzou komplexního vzorku.

7 ZKRATKY

A	adenin
BLAST	základní vyhledávací nástroj pro lokální přiřazení
BMK	bakterie mléčného kvašení
bp	pár bází (base pair)
C	cytosin
CCM	česká sbírka mikroorganismů
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
G	guanin
GRAS	generally regarded as safe (obecně schváleny jako zdravotně nezávadné)
HRM	High resolution melting (Vysokorozlišovací analýza křivek tání)
LOCK	kolekce průmyslových mikroorganismů v Polsku
NCBI	národní centrum biotechnologických informací
NK	negativní kontrola
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEG	polyetylen glykol
PK	pozitivní kontrola
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodny
spp.	poddruh (subspecies)
T	thymin
Taq DNA	termostabilní enzym izolovaný z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	bod tání

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře*, 3. opravené vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6
2. TURKOVÁ, Kristýna. *Studium probiotických bakterií mléčného kvašení produkujících antimikrobiální látky*. 2014. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
3. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. Přerprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. 347 s. ISBN 80-86850-00-5.
4. VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*, 2. opravené vyd. Praha: Academia, 2002, dotisk 2007, 192 s. ISBN 80-200-0439-4
5. GOLDSTEIN, E. J. et al. *Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities*. [online] 2015 [cit. 2016-01-28] DOI: 10.1093/cid/civ072. ISBN 10.1093/cid/civ072. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/civ072>
6. BERNARDEAU, M. et al.: Beneficial lactobacilli in food and feed: long – term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. 2006. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 487 – 513
7. WARD, P., ROY, D. *Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria*. [online] 2005 [cit. 2016-01-28]. DOI: 10.1051/lait:2004024. ISBN 10.1051/lait:2004024. Dostupné z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:2004024>
8. KRÁLOVÁ, B., FUKAL, L., RAUCH, P. a T. RUML. : *Bioanalytické metody*, 3. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. 254 s. ISBN 978-807080-449-3
9. SUL, SU-YEON a HYUN-JOONG KIM. Rapid Identification of Lactobacillus and Bifidobacterium in Probiotic Products Using Multiplex PCR. *Microbiol Biotechnol.* [online] 2007, 490-495. [cit. 2016-01-28]. Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2007&vol=17&num=3&page=490>
10. *Lb. brevis, Lb. casei, Lb. acidophilus*. [online]. [cit. 2016-01-28]. Dostupné také z: <http://zenkefir.blogspot.cz/2011/02/so-what-is-milk-kefir.html>
11. GIRAFFA, Giorgio, Nina CHANISHVILI a Yantyati WIDYASTUTI. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*. 2010, 161(6), 480-487. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.03.001. ISSN 09232508. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250810000549>
12. ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
13. ŠVEC P et al. Taxonomie rodu *Lactobacillus*. *Česká sbírka mikroorganismů* [online]. [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/ccm/download/public/CSSM%20LAB%20z%20hemokultur%202005.pdf>
14. SEALE, J. V. a M. MILLAR. Probiotics: a new frontier for infection control. *Journal of Hospital Infection* [online]. 2013, 84(1), 1-4 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1016/j.jhin.2013.01.005. ISSN 01956701. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670113000352>
15. RIJKERS, G. T. et al. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *British Journal of Nutrition* [online]. 2011, 106(09), 1291-1296 [cit. 2016-02-

- 20]. DOI: 10.1017/S000711451100287X. ISSN 0007-1145. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S000711451100287X
16. RADA, V. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi.*, 2010, roč. 12, č. 2, s. 92 – 97
17. HEYMAN, M., S. MÉNARD. : Probiotic microorganisms: how They affect intestinal pathophysiology. *Cellular and molecular life sciences*. 2002, vol. 59, p. 1 - 15
18. MURRAY, R. K. *Harper's illustrated biochemistry*. 26th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, c2003. Lange medical book. ISBN 00-713-8901-6.
19. WATSON, J. D. *Molecular biology of the gene*. 6th ed. San Francisco: Pearson, c2008. ISBN 978-0-321-50781-5.
20. ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, c2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.
21. LEDVINA, M. et al. *Biochemie pro studující medicíny, I. a II. díl*. 2. vyd., Praha: Karolinum, 2009, 548 s., ISBN 978-80-246-1414-4
22. ALBERTS, B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902-9060-4.
23. KOOLMAN, J., K. H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
24. ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1.vyd. Brno: VUT,Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80- 214-4004-3.
25. BURSOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L. a M. DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-741-1.
26. KWON, H. S. et al. Rapid identification of probiotic Lactobacillus species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. [online] 2004, [cit. 2016-02-20]. 239(2), 267-275. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.08.049. ISSN 03781097. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/j.femsle.2004.08.049>
27. KALTENBOECK, B. et al. Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics. 219. [online]. [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1016/S0065-2423(05)40006-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242305400062>
28. VOSSEN, R. et al. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)-More than just sequence variant screening. *Human Mutation*. [online] 2009, [cit. 2016-02-22]. 30(6), 860-866. DOI: 10.1002/humu.21019. ISSN 10597794. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.21019>
29. DRUML, B. et al. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*. [online] 2014, [cit. 2016-02-25]. 158, 245-254. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.111. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614002969>
30. WITTEWER, T. C. et al. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49:6 853–860 (2003), [online] [cit. 2016-02-28]. Molecular Diagnostics and Genetics. Dostupné z: <http://hrm-dyes.gene-quantification.info/>
31. ER, T. K., G. CHANG. High-resolution melting: Applications in genetic disorders. *Clinica Chimica Acta*. [online] 2012, [cit. 2016-02-29]. 414, 197-201. DOI: 10.1016/j.cca.

- 2012.09.012. ISSN 00098981. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898112004470>
32. REED, G. H. et al.. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. [online] 2007, [cit. 2016-03-06]. 8(6), 597-608. DOI: 10.2217/14622416.8.6.597. ISSN 1462-2416. Dostupné z:
<http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/14622416.8.6.597>
 33. PORCELLATO, D., H. M. ØSTLIE, K. H. LILAND, K. RUDI, T. ISAKSSON a S.B. SKEIE. Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in Norvegia cheese by high-resolution melt analysis. *Journal of Dairy Science* [online]. 2012, 95(9), 4804-4812 [cit. 2016-03-27]. DOI: 10.3168/jds.2012-5386. ISSN 00220302. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212004948>
 34. YE, J., COULOURIS, G. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. [online] 2012, [cit. 2016-03-27]. 13(1), 134-. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134. ISSN 1471-2105. Dostupné z:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134>
 35. LUSCOMBE, N. M. et al. *What is bioinformatics? An introduction and overview*. New Haven, USA: Yale University. Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, 2001, s. 83-99. [online], [cit. 2016-04-03]. Dostupné z:
https://www.ebi.ac.uk/luscombe/docs/imia_review.pdf
 36. CVRČKOVÁ, F. *Úvod do praktické bioinformatiky*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1360-1.
 37. Databáze NCBI. [online] [2016-04-12] Dostupné z:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
 38. TRACHTOVÁ, Š. Studium reversibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných *nosičích*. Brno, 2011. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brne. Vedoucí práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
 39. Sekvence bakteriálního genu pro 16S rRNA [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: http://rna.ucsc.edu/rnacenter/xrna/xrna_gallery.html
 40. KLIJN N. et al. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57 (11):3390-3393. [online], [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183979/pdf/aem00064-0344.pdf>
 41. LIN, X. B. a M. G. GÄNZLE. Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, 186, 42-48. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.010. ISSN 01681605. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160514002943>
 42. PORCELLATO, D., H. GRØNNEVIK, K. RUDI, J. NARVHUS a S. B. SKEIE. Rapid lactic acid bacteria identification in dairy products by high-resolution melt analysis of DGGE bands. *Letters in Applied Microbiology*. 2012, 54(4), 344-351. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03210.x. ISSN 02668254. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2012.03210.x>
 43. YANG, S., RAMACHANDRAN, P., R. ROTHMAN, et al. Rapid Identification of Biothreat and Other Clinically Relevant Bacterial Species by Use of Universal PCR Coupled with High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009,

- 47(7), 2252-2255. DOI: 10.1128/JCM.00033-09. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00033-09>
44. Real-time PCR sondy vs. SYBR Green I. [online] [2016-04-12]. Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/sybr-green-vs-sondy/>
45. qPCR Master Mixy s fluorescenčním DNA barvivem. [online] [2016-04-12]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/m/qpcr-master-mixy-14.html>
46. HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative real – time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied of Environmental Microbiology*. 2006, 72, s. 2359-2365.
47. High-Resolution Melting. [online] [2016-04-12]. Dostupné z: https://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html
48. TRAEGER, T. *HRM – A Valuable Technology for Analysis of Genetic Differences*. Dr. Thorsten Traeger; QIAGEN GmbH; Hilden; Germany. [online] [2016-4-20]. Dostupné z: <http://www.qiagen.com/products/byapplication/genotyping>
49. MONIS P. T., et al. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry*. 2005, 340(1). [online] [2016-4-20]. DOI: 10.1016/j.ab.2005.01.046. ISSN 00032697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269705000904>