



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOLACE DNA Z PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ S VYUŽITÍM
PEVNÝCH NOSIČŮ

ISOLATION OF DNA FROM PROBIOTIC PRODUCTS USING SOLID CARRIERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. Ondřej Bonczek

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

BRNO 2011



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0456/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Ondřej Bonczek	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Izolace DNA z probiotických výrobků s využitím pevných nosičů

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

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

Bc. Ondřej Bonczek
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Mikrobiální DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk rodu *Lactobacillus* a z probiotických výrobků. Bylo využito reverzibilní adsorpce DNA na neporézní magnetické částice poly(2-hydroxyethyl methacrylát-*co*-glycidyl methacrylát) - P(HEMA-*co*-GMA) pokryté karboxylovými skupinami a nanočástice manganatého Perovskitu, pokrytého silikagelem. DNA byla adsorbována na povrch částic v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl. Adsorbovaná DNA byla z částic uvolněna v nízkoiontovém TE pufru (pH= 8,0). Kvalita a koncentrace izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky a amplifikací v PCR. Vzorčky DNA izolované magnetickými částicemi a metodou fenolové extrakce (kontrola) byly amplifikovány v PCR. DNA izolovaná z hrubých lyzátů buněk probiotických výrobků byla kvantifikována s využitím kvantitativní PCR v reálném čase.

ABSTRACT

Microbial DNA was isolated from lysed cells of *Lactobacillus* genus in probiotic products. Reversible adsorption DNA on the surface of carboxyl coated nonporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate-*co*-glycidyl methacrylate) (P(HEMA-*co*-GMA)) magnetic particles and silicagel coated manganese Perovskite nanoparticles. DNA was adsorbed on the surface of the particles in the presence of 16 % poly(ethyleneglycol) (PEG 6000) and 2 M sodium chloride (NaCl) concentrations. The adsorbed DNA was released from particles by low ionic strength TE buffer (pH= 8.0). The quality of isolated DNA was checked by spectrophotometric measurement and PCR amplification. DNA samples isolated using magnetic particles and phenol extraction method (control method) were PCR-ready. The DNA isolated from lysed cells of probiotic products was quantified in real-time qPCR.

KLÍČOVÁ SLOVA

rod *Lactobacillus*, probiotické výrobky, izolace DNA, magnetické částice, PCR, kvantitativní PCR v reálném čase.

KEYWORDS

genus *Lactobacillus*, probiotic products, DNA isolation, magnetic particles, PCR, real-time qPCR.

BONCZEK, O. *Izolace DNA z probiotických výrobků s využitím pevných nosičů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 79 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych chtěl poděkovat panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za odborné vedení diplomové práce.

Mé díky patří také Ing. Štěpánce Trachtové a Mgr. Kristýně Turkové, které mi ochotně poskytly své cenné rady a vytvořily příjemné zázemí při práci v laboratoři.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část	10
2.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	10
2.1.1 Negativní aspekty bakterií mléčného kvašení.....	11
2.1.2 Buněčná stěna.....	12
2.2 Probiotika.....	13
2.2.1 Význam a použití bakterií mléčného kvašení jako probiotik.....	13
2.2.2 Prebiotika a synbiotika	14
2.3 DNA	15
2.3.1 Struktura.....	15
2.3.2 Konformace.....	16
2.3.3 Denaturace	17
2.4 Magnetické částice	17
2.4.1 Příprava.....	18
2.4.2 Podmínky izolace DNA a výhody	19
2.5 Polymerázová řetězová reakce.....	19
2.5.1 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	20
3. Cíl práce	21
4. MATERIÁL.....	22
4.1 Bakteriální kmeny	22
4.2 Probiotické výrobky	22
4.3 Chemikálie	24
4.4 Roztoky.....	24
4.4.1 Kultivační média	24
4.4.2 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk	25
4.4.3 Roztoky pro izolaci DNA metodou fenolové extrakce	25
4.4.4 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů	26
4.4.5 Komponenty pro PCR	26
4.4.6 Komponenty pro real-time qPCR.....	26
4.4.7 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	26
4.5 Magnetické nosiče pro izolaci DNA	28
4.6 Přístroje a pomůcky.....	28
5. METODY	29
5.1 Kultivace buněk rodu <i>Lactobacillus</i>	29

5.1.1	Turbidimetrické stanovení zákalu buněk	29
5.2	Izolace bakteriální DNA	30
5.2.1	Lýze bakteriálních buněk kultivovaných kmenů	30
5.2.2	Příprava vzorků probiotických výrobků pro izolaci DNA.....	31
5.2.3	Lýze bakteriálních buněk probiotických výrobků.....	31
5.2.4	Fenolová extrakce bakteriální DNA	31
5.2.5	Srážení DNA ethanolem	31
5.3	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	32
5.3.1	Postup při spektrofotometrickém stanovení čistoty a koncentrace DNA	32
5.3.2	Interpretace naměřených výsledků	33
5.4	Agarózová gelová elektroforéza purifikované bakteriální DNA a DNA v hrubých lyzátech buněk.....	33
5.5	Polymerázová řetězová reakce.....	34
5.5.1	PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i>	34
5.5.2	PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i>	35
5.5.3	Program PCR pro doménu <i>Bacteria</i> a rod <i>Lactobacillus</i>	35
5.6	Real-time qPCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i> a rod <i>Lactobacillus</i>	36
5.6.2	Vyhodnocení real-time qPCR specifické pro doménu <i>Bacteria</i> a rod <i>Lactobacillus</i>	36
5.7	Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR a real-time qPCR.....	37
6	VÝSLEDKY.....	38
6.1	Kultivace bakteriálních kmenů	38
6.1.1	Vyhodnocení kultivace bakteriálních kmenů.....	38
6.1.2	Turbidimetrické stanovení zákalu buněk.....	38
6.1.3	Kontrola čistoty bakteriálních kultur	39
6.2	Izolace DNA metodou fenolové extrakce a její separace pomocí magnetických částic	40
6.2.1	Izolace DNA metodou fenolové extrakce.....	40
6.2.2	Spektrofotometrické stanovení čistoty DNA izolované metodou fenolové extrakce	41
6.2.3	Separace purifikované DNA pomocí magnetických částic F-kol 135 ox.....	41
6.2.4	Účinnost separace purifikované DNA magnetickými částicemi F-kol 135 ox....	43
6.3	Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované pomocí magnetických částic F-kol 135 ox v PCR	44
6.3.1	Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	44
6.3.2	Ověření citlivosti PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	45

6.3.3	Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	46
6.3.4	Ověření citlivosti PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	47
6.4	Srovnání účinnosti izolace DNA z hrubého lyzátu buněk čisté bakteriální kultury metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic	48
6.4.1	Srovnání množství izolované DNA jednotlivými metodami	48
6.4.2	Srovnání spektrofotometrického stanovení čistoty DNA izolované jednotlivými metodami	49
6.4.3	Srovnání účinnosti izolace DNA různými magnetickými částicemi	49
6.5	Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované metodou fenolové extrakce a různými druhy magnetických částic v PCR	50
6.5.1	Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	50
6.5.2	Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	51
6.6	Izolace DNA z probiotických výrobků	52
6.6.1	Lýze bakteriálních buněk v probiotických výrobcích	52
6.6.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	53
6.7	Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z probiotických výrobků v PCR	54
6.7.1	Ověření amplifikovatelnosti DNA z probiotických výrobků v PCR pro doménu <i>Bacteria</i>	54
6.7.2	Ověření amplifikovatelnosti DNA z probiotických výrobků v PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	56
6.8	Kvantifikace DNA z probiotických výrobků v real-time qPCR pro doménu <i>Bacteria</i>	58
6.8.1	Kalibrační křivka real-time qPCR (doména <i>Bacteria</i>)	58
6.8.2	Amplifikace DNA z probiotických výrobků v real-time qPCR (doména <i>Bacteria</i>)	60
6.8.3	Agarózová gelová elektroforéza produktů real-time qPCR pro doménu <i>Bacteria</i>	62
6.9	Kvantifikace DNA z probiotických výrobků v real-time qPCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	63
6.9.1	Kalibrační křivka pro real-time qPCR (rod <i>Lactobacillus</i>)	63
6.9.2	Amplifikace DNA z probiotických výrobků v real-time qPCR (rod <i>Lactobacillus</i>)	65
6.9.3	Agarózová gelová elektroforéza produktů real-time qPCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	67
7.	Diskuze	68
7.1	Kultivace buněk	68
7.2	Separace DNA, izolované metodou fenolové extrakce, magnetickými částicemi F-kol 135 ox	68

7.3 Amplifikace DNA v PCR pro doménu <i>Bacteria</i> , zjištění citlivosti.....	69
7.4 Amplifikace DNA v PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> , zjištění citlivosti	69
7.5 Srovnání účinnosti izolace DNA magnetickými částicemi a fenolovou extrakcí z hrubých lyzátů buněk.....	69
7.6 Izolace DNA z probiotických výrobků	70
7.7 PCR s DNA izolovanou z probiotických výrobků.....	71
7.8 Real-time qPCR pro doménu <i>Bacteria</i>	71
7.9 Real-time qPCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	72
8. Závěr	73
9. Seznam použité literatury.....	74
10. Použité zkratky	78
11. Příloha	79

1. Úvod

Lidstvo již odedávna využívá k výrobě potravin činnosti mikroorganismů. Jednou z nejznámějších skupin bakterií, která je k tomuto účelu používána, jsou tzv. bakterie mléčného kvašení. Některé druhy bakterií, řazené k této skupině, jsou označovány za probiotika, která jsou v dnešní době komerčně dostupná nejen ve formě např. fermentovaných mléčných výrobků, ale i jako doplňky stravy v tabletách či kapslích.

Studium ať už možných pozitivních, či negativních vlivů probiotických druhů bakterií na lidské zdraví, je v současné době velmi intenzivní. Pro svou mimořádnou složitost je nutné symbiotický vztah bakterií mléčného kvašení s lidským gastrointestinálním traktem (a nejen s ním) dále studovat. Nezastupitelnou roli v tomto procesu poznání mají metody molekulární biologie. Pro bezpečnost potravin je nutné, aby metody byly citlivé, reprodukovatelné a standardizované.

2. Teoretická část

2.1 Rod *Lactobacillus*

Druhy tohoto rodu jsou v přírodě velmi rozšířeny. Vyskytují se v mléce, v ústech a trávicím traktu savců, na travinách, obilí a na jiných rostlinách i v půdě. Biotechnologicky se využívají pro konzervaci zeleniny (kysání zelí, okurek) a krmiv (silážování jetelovin, řepných řízků). V mlékárenském průmyslu se laktobacily používají při výrobě sýrů, kysaného mléka, jogurtů aj. Jsou také součástí pekařského kvásku. Mohou být nežádoucí kontaminací ve vinařství, pivovarství (chuťové vady), droždářství (ztráta výtěžnosti) a při výrobě uzenin (nežádoucí zbarvení hotových výrobků) [1].

Baktérie, řazené do tohoto rodu, patří mezi nepohyblivé nesporulující fakultativně anaerobní popř. mikroaerofilní grampozitivní tyčinky (zpravidla rovné, občas kokobacily). Většina laktobacilů roste nejlépe při mezofilních teplotách s optimem růstu asi do 40 °C, některé druhy mohou však růst i při teplotách nižších jak 15 °C nebo i při 55 °C. Jsou chemoorganotrofní, kataláza negativní a vyžadují bohatá komplexní média s optimem pH obvykle mezi 4,5-6,4 [2].

Jejich metabolismus je fermentativní a na základě konečných produktů fermentace je lze rozdělit do tří skupin:

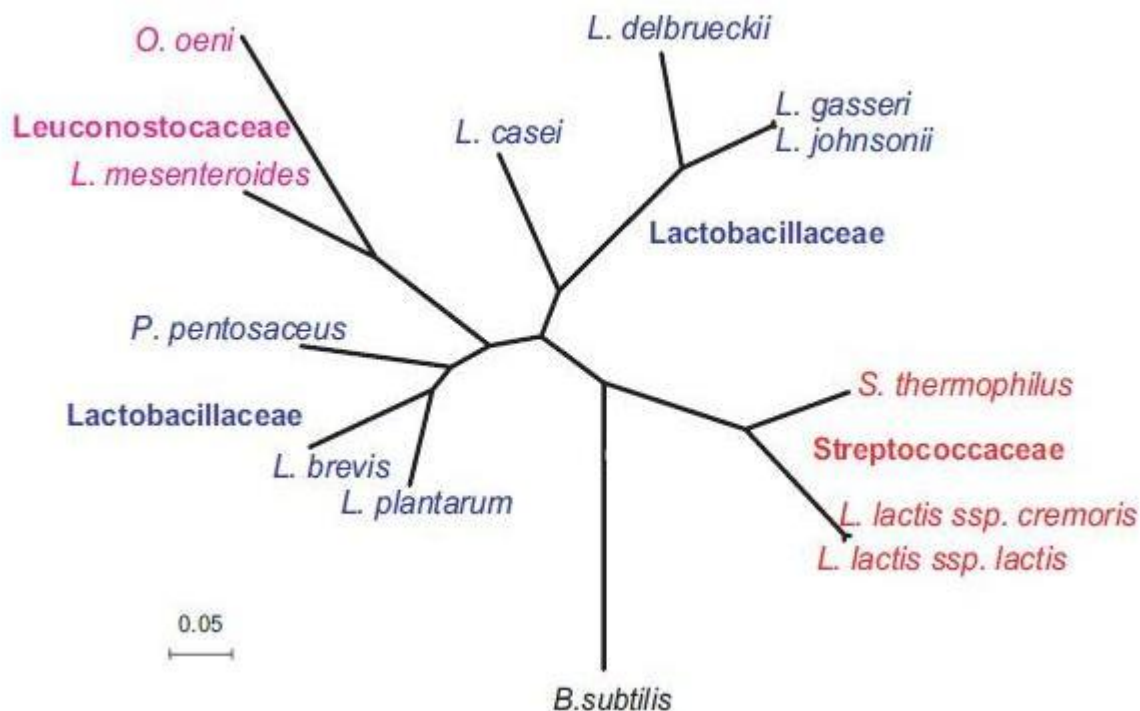
1. obligátně homofermentativní – hexózy fermentují výhradně na kyselinu mléčnou, pentózy ani glukonát nefermentují; např. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*.
2. fakultativně heterofermentativní – hexózy fermentují na kyselinu mléčnou, nebo na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu; pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou; např. *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*.
3. obligátně heterofermentativní – hexózy fermentují na kyselinu mléčnou, octovou (etanol) a CO₂; pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou; např. *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. kefir* [3].

Široké spektrum organických látek, které vzniká degradací sacharidů a proteinů při mikrobiální fermentaci se využívá v potravinářství, dodává potravinám typické sensorické vlastnosti, popř. potravinu konzervuje [4].

Obsah kyseliny mléčné v mléčných výrobcích bývá 0,5-1,0 %. Z tohoto množství je v jogurtech asi 54 % L-mléčné kyseliny, 76 % v sýrech typu Ementál, 96 % v kysané smetaně. V kysaném zelí bývá celkový obsah mléčné kyseliny 1,5-2,5 %, v kysaných okurkách 0,5-1,5 % a v mléčně kysaných zelených olivách 0,8-1,2 % [5].

Dnes je již známo 173 druhů a 27 poddruhů [6]. Z tohoto počtu je již kompletně sekvencovaných a ukončených 16 genomových projektů [7]. Rod je taxonomicky řazen pod doménu *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třídu *Bacilli*, řád *Lactobacillales* a čeleď *Lactobacillaceae*. Patří k tzv. bakteriím mléčného kvašení (BMK) s malým obsahem G+C [8]. Fylogenetický strom řádu *Lactobacillales*, který je vytvořen analýzou ribozomální 16S RNA, je uveden na Obr. 1. Modrá barva znázorňuje čeleď *Lactobacillaceae*, červená *Streptococcaceae* a fialová *Leuconostocaceae* [9].

Obr. 1 Fylogenetický strom řádu *Lactobacillales* (upraveno) [9]



V současné době se řadí k BMK následující čtyři čeledě – *Lactobacillaceae* (rod *Lactobacillus* a *Pediococcus*), *Leuconostocaceae* (rod *Oenococcus* a *Leuconostoc*), *Enterococcaceae* (rod *Enterococcus*) a *Streptococcaceae* (rod *Lactococcus* a *Streptococcus*) [10].

Pro studium evolučních vztahů mezi jednotlivými taxonomickými skupinami BMK se využívá identifikace a srovnávání vybraného souboru ortologních genů, což jsou geny získané od nejbližšího společného předka (tzv. COGs) [11].

2.1.1 Negativní aspekty bakterií mléčného kvašení

Přestože jsou BMK označovány za GRAS (všeobecně považované za bezpečné), zaměřuje se výzkum v posledních letech na možný přenos genů, zodpovědných za rezistenci k antibiotikům, z přirozené gastrointestinální mikroflóry na patogenní mikroorganismy. Rezistenci způsobující geny se mohou v bakteriální populaci objevit buď mutací endogenních genů, což je velmi náhodný a málo pravděpodobný způsob, nebo získáním externí genetické informace [12]. Ve společenství bakterií dochází k vertikálnímu a horizontálnímu šíření genů rezistence k antibiotikům. První zmíněný způsob spočívá v množení rezistentního kmene bakterií. Horizontální přenos se může uskutečnit třemi způsoby: transformací (přijetí volné DNA z extracelulárního prostředí), konjugací (přenos DNA, který je závislý na vzájemném buněčném kontaktu podmíněném plasmidy) a transdukcí (přenos DNA zprostředkovaný bakteriofágy). Nárůst počtu rezistentních druhů bakterií je zapříčiněn selektivním tlakem v důsledku nadměrného používání antibiotik. Byly nalezeny totožné geny pro rezistenci k antibiotikům u nepatogenních i patogenních druhů BMK [13].

2.2 Probiotika

Bakteriální osídlení trávicího traktu patří ontogeneticky i fyziologicky k tzv. zevnímu prostředí organismu a jedná se o specificky vyvážený mikrobiální ekosystém. Povrch lumina trávicího traktu obsahuje 10^{12-14} mikrobiálních buněk, přičemž metabolická kapacita bakteriální masy převyšuje dokonce jaterní parenchym. Mikroorganismy jsou řazeny mezi 400-500 bakteriálních druhů [18].

Historie probiotik je spjatá s ruským lékařem, nositelem Nobelovy ceny, Iljou Mečnikovem, který izoloval z fermentovaného mléka bakteriální buňky *Lactobacillus bulgaricus*, které podle něj byly příčinou dlouhověkosti bulharských rolníků [19]. Další významnou osobou je francouzský vědec Henry Tissier, který poprvé izoloval *Bifidobacterium* ze stolice kojenců a bakterii pojmenoval *Bacillus bifidus communis*. Tissier zjistil, že bifidobakterie mohou vytlačit proteolytické bakterie, které způsobují průjem u kojenců, a doporučil je jako prevenci proti tomuto symptomu. Pojem probiotika poprvé uvedli Daniel M. Lilly a Rosalie H. Stillwell v roce 1965 jako kontrast k antibiotikům, tzn. mikrobiální faktory, které stimulují růst jiných organismů [20]. Dnešní definice pojmu „probiotika“ byla definována dle FAO/WHO jako živé mikroorganismy, které když jsou podávány v přiměřeném množství, poskytují zdravotní prospěch svému hostiteli [21].

2.2.1 Význam a použití bakterií mléčného kvašení jako probiotik

Pozitivní účinky laktobacilů (BMK), považovaných za probiotika, můžeme rozdělit na mikrobiologické (produkce bakteriocinů, kompetice s patogeny o receptory a živiny atd.), fyziologické (produkce enzymů, vitamínů, mastných kyselin s krátkými řetězci, vliv na metabolismus žlučových kyselin atd.) a imunologický (protizánětlivé působení, imunostimulační atd.). V neposlední řadě probiotika zlepšují střevní bariéru a homeostázu [22].

Některá probiotika produkují enzymy (např. glutathion-S-transferázu, NADPH cytochrom P450 reduktázu, N-acetyltransferázu aj.), které inhibují proces aktivace prokarcinogenu v karcinogen (např. benzpyren, heterocyklické aminy, nitrosamin atd.) [23]. Studie provedená na estonských a švédských dvouletých dětech ukázala, že alergici měli menší zastoupení BMK ve střevní mikroflóře než zdravé děti, což by mohlo znamenat možný pozitivní vliv probiotik na vznik alergií [24].

Výrobky s životaschopnými probiotickými kmeny BMK jsou komerčně dostupné ať už jako lyofilizované preparáty, či fermentované potraviny [9]. Nejčastěji používané mikroorganismy v probiotických výrobcích jsou uvedeny v Tabulce 1. Nejdůležitější vlastnosti funkčního probiotika jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 1 Průmyslově využívané probiotické mikroorganismy (upraveno) [25]

rod <i>Lactobacillus</i>	rod <i>Bifidobacterium</i>	Ostatní BMK	Ostatní
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ^a	<i>Bacillus cereus</i> ^a
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freundenreichii</i> ^a
<i>L. gallinarum</i> ^a	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ^a	
<i>L. paracasei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

^aUžíváno především v krmivech pro zvířata

Tab. 2 Charakteristiky probiotika (upraveno) [26]

Mikrobiologické bezpečnostní požadavky
Přesné taxonomické zařazení
Humánní původ
Netoxické a nepatogenní
Geneticky stabilní
Schopnost přežít, růst a být metabolicky aktivní v trávicím ústrojí příjemce
Potencionálně resistantní proti antimikrobiálním složkám původní mikroflóry hostitele
Rezistence proti žaludeční kyselině a žlučovým kyselinám
Průmyslové parametry
Stabilita žádaných vlastností během výroby, transportu a skladování
Příznivé organoleptické vlastnosti

2.2.2 Prebiotika a synbiotika

Nestravitelné látky obsažené v potravinách, které selektivně podporují růst nebo aktivitu střevních bakterií a tím pozitivně podporují složení střevní mikroflóry, se nazývají prebiotika. Patří k nim např. inulin (fruktooligosacharid), laktulóza, galaktooligosacharidy aj. Synbiotikum v sobě funkčně spojuje probiotikum s prebiotikem pro něj specifickým (např. fruktooligosacharid s kmenem bifidobakterie) [26].

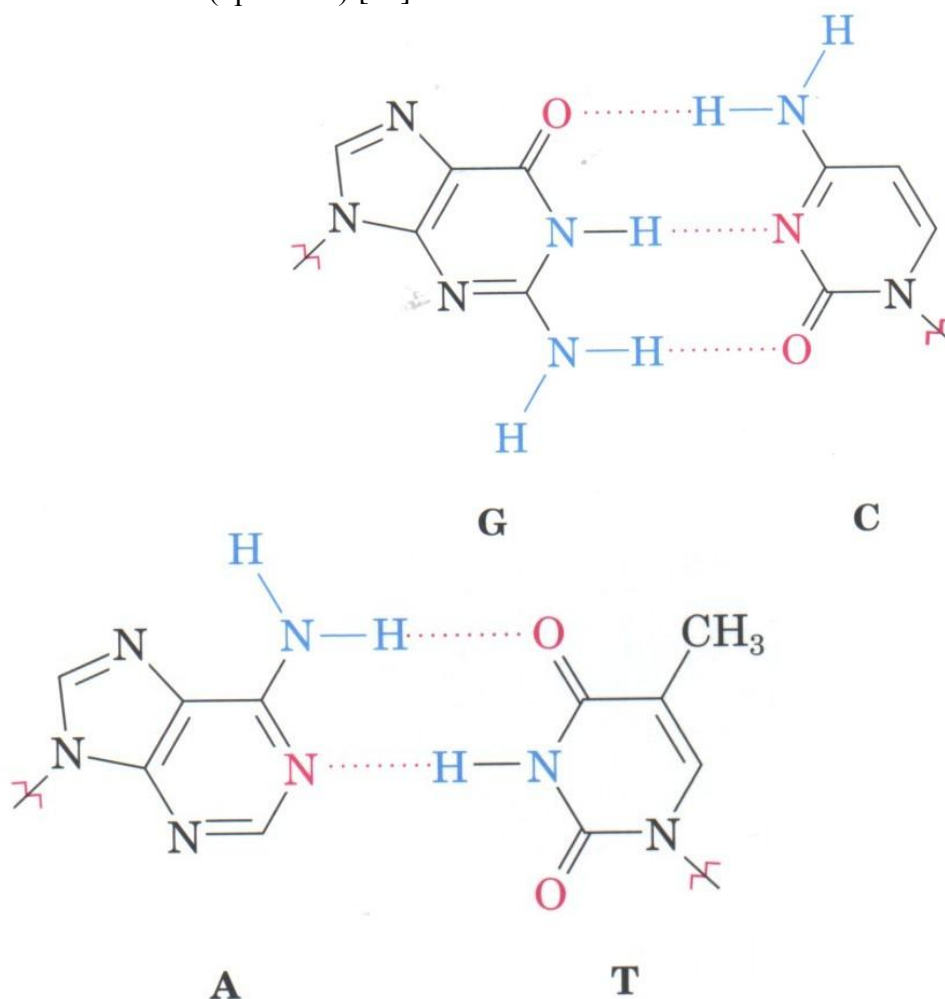
2.3 DNA

Už koncem 19. století bylo známo, že nukleové kyseliny jsou normálními složkami všech živých buněk. Hlavní poznatky o jejich struktuře byly nashromážděny převážně v 50. letech minulého století. Prvním zásadním zjištěním Averyho, MacLeoda a McCartyho z roku 1944 bylo, že molekuly DNA jsou nositelkami genetické informace. Vytvoření modelu molekulární struktury DNA Watsonem a Crickem, z něhož lze přímo vyvodit biologické funkce, však přichází až v roce 1953 [27].

2.3.1 Struktura

Molekula DNA je tvořena dvěma pravotočivými antiparalelními (tzn. v jednom řetězci 5'→3' a v druhém 3'→5') šroubovicemi. Kostru tvoří esterově vázané molekuly deoxyribózy a fosfátu. Fosfátové skupiny se zápornými náboji vyčnívají do prostoru, do nitra helixu jsou orientovány purinové a pyrimidinové báze. Plocha bází je kolmá k dlouhé ose molekuly DNA a plocha deoxyribózy je zhruba kolmá k ploše bází (tzn. je paralelní s osou molekuly DNA). Oba polynukleotidové řetězce jsou k sobě vázány vodíkovými vazbami mezi jednotlivými spárovanými bázemi – adenin (A) se páruje s tyminem (T) a cytosin (C) s guaninem (G) [28]. Tzv. komplementární párování bází je zobrazeno na Obr. 3.

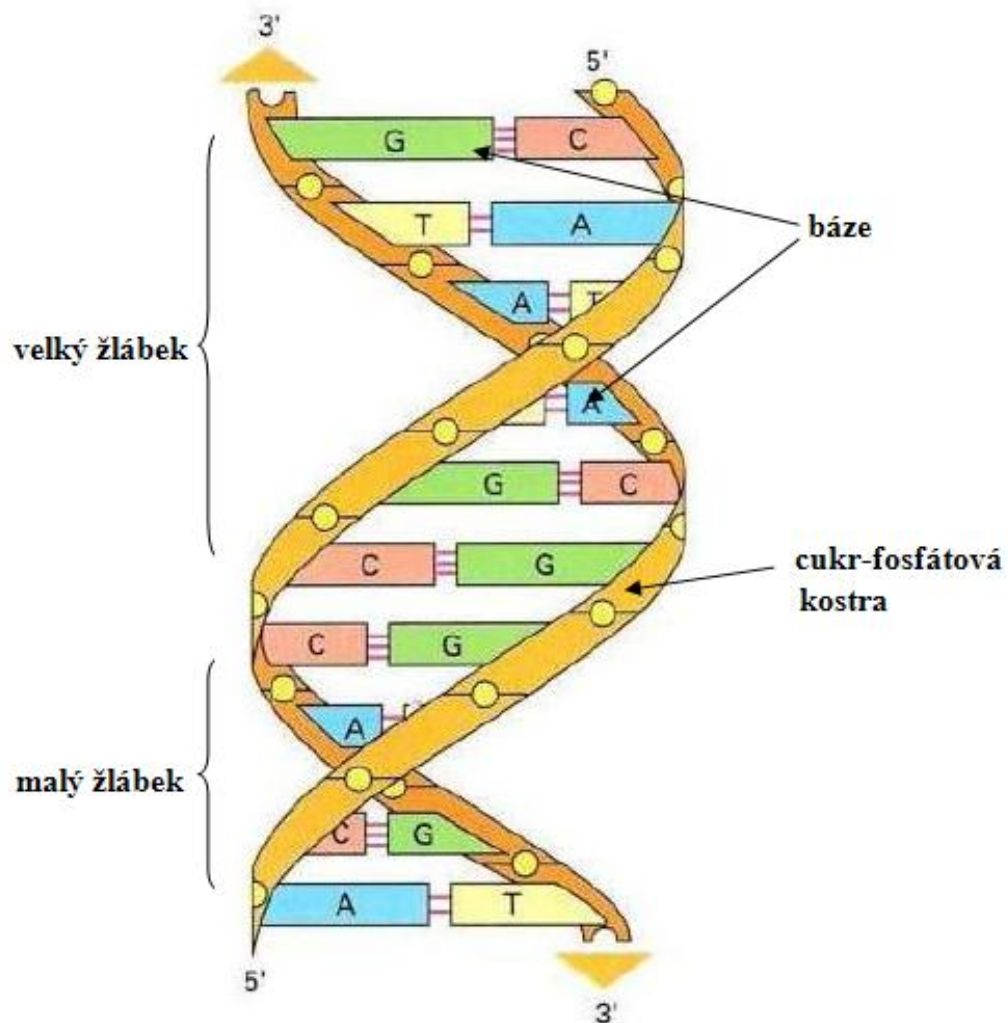
Obr. 3 Párování bází (upraveno) [29]



Zastoupení jednotlivých bází v DNA se řídí tzv. Chargaffovými pravidly, ze kterých vyplývá, že počet adeninových a thyminových zbytků je stejný ($A=T$), stejně jako je stejný počet guaninových a cytosinových zbytků ($C=G$). Erwin Chargaff také objevil, že zastoupení bází je charakteristické pro daný organismus a mezi různými organismy se značně liší (např. u bakterií kolísá mezi 25-75 % $G+C$) [30].

Obtočením dvou řetězců kolem sebe se vytváří na dvoušroubovici dva žlábký – velký a malý [31] (Obr. 4).

Obr. 4 Prostorový model molekuly DNA (upraveno) [31]



2.3.2 Konformace

Nativní forma, kdy vlákna DNA přijímají konformaci B-DNA, je stabilní při relativním obsahu vody 92 %. Pokud dojde ke snížení relativního obsahu vody na 75 %, přechází B-DNA vratně do konformačního uspořádání A. Třetí známou konformací je Z-DNA, která je jako jediná levotočivou šroubovicí. Funkce konformací A-DNA a Z-DNA *in vivo* nebyla prozatím objasněna [30]. Souhrn vlastností jednotlivých konformací DNA je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 3 Charakteristika jednotlivých konformací DNA [30]

Vlastnost	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Směr šroubovice	pravotočivý	pravotočivý	levotočivý
Průměr	~2,6 nm	~2,0 nm	~1,8 nm
Počet bp v 1 závitě	11	10	12 (6 dimerů)
Část dvoušroubovice připadající na 1 bp	33 °	36 °	60 ° (na dimer)
Stoupání závitu dvoušroubovice	260 pm	340 pm	370 pm
Velký žlábek	úzký a hluboký	široký a hluboký	plochý
Malý žlábek	široký a mělký	úzký a hluboký	úzký a hluboký

2.3.3 Denaturace

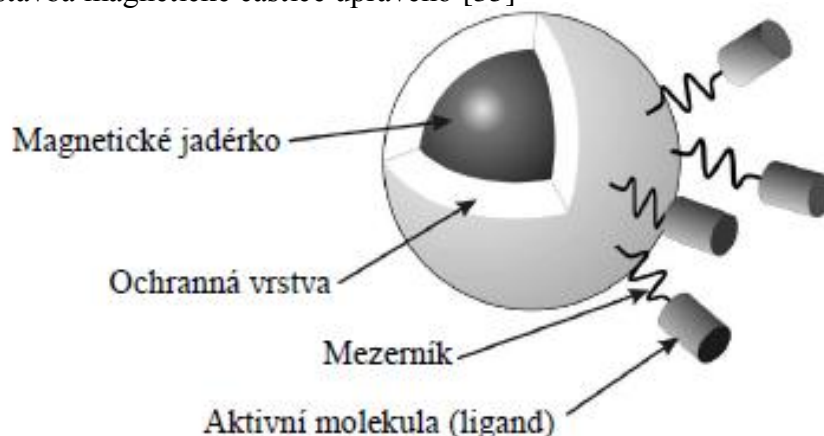
Při zvýšené teplotě (popř. za alkalických podmínek) dochází k přerušení vodíkových vazeb mezi komplementárními bázemi a vzniku samostatných polynukleotidových řetězců. Tento jev se nazývá denaturace. Rozmezí denaturačních teplot je asi 30-100 °C. Současně dochází k tzv. hyperchromnímu efektu, tj. ke zvýšení absorbance UV záření o vlnové délce 260 nm, což je způsobeno rozpadem na jednořetězce DNA, které absorbují silněji než dvouřetězcová molekula. Teplota tání, která se značí symbolem T_m , znamená stav, kdy zdenaturovalo 50 % dvoušroubovicových molekul. Hodnota T_m je lineárně závislá na obsahu G+C [32].

2.4 Magnetické částice

Separace, využívající magnetismu k oddělení magnetických částic od nemagnetických ze směsi, je aplikována v biotechnologiích již od 70. let minulého století. Tato inovativní technika je používána, často v kombinaci s tradičními metodami, pro izolaci nebo identifikaci buněk, buněčných organel nebo biologicky aktivních látek (např. nukleové kyseliny, proteiny, xenobiotika atd.) [33].

Princip izolace DNA spočívá v reverzibilní adsorpci na magnetizovatelné částice, které jsou pokryté karboxylovými skupinami, v prostředí vysoké koncentrace solí. Magnetické částice jsou schopny existovat v koloidní suspenzi a neagregovat, což je důležité pro jejich rovnoměrnou distribuci v reakční směsi [34]. Funkční magnetická částice je tvořena z magnetického jádřka, ochranné vrstvy (kvůli oxidaci kovu) a aktivní molekuly (specifické dle použití) Obr. 5 [35].

Obr. 5 Obecná stavba magnetické částice upraveno [35]



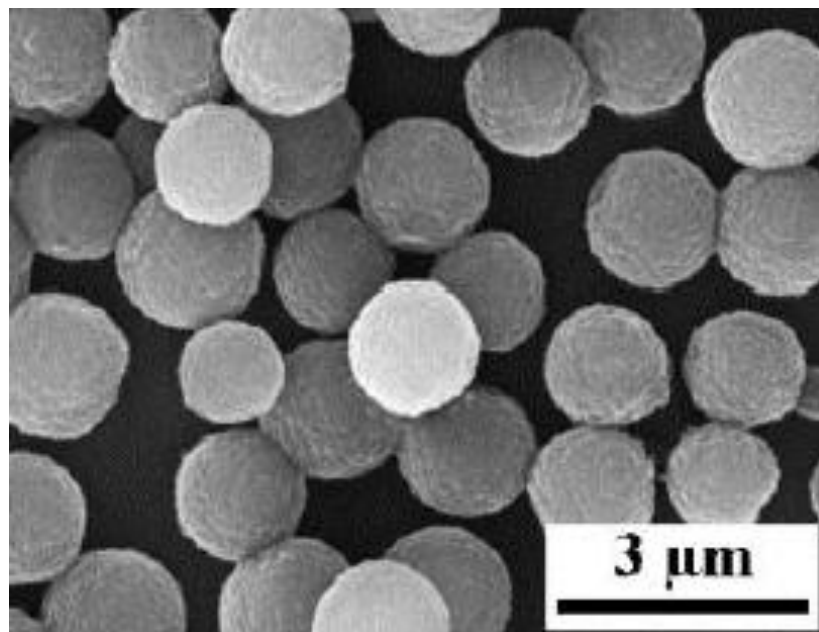
Jadérko je nejčastěji tvořeno magnetitem (Fe_3O_4), což je běžný minerál, který vykazuje feromagnetické vlastnosti, nebo maghemitem ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), který obsahuje železo v oxidačním stavu 3+ a je proto vhodný pro bioaplikace [35]. Ochrannou vrstvu jádérka mohou tvořit různé látky např. poly(glycidyl methakrylát) (PGMA), kopolymer poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát) (P(HEMA-*co*-GMA)) a nebo kopolymer poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-ethylen dimethakrylát) (P(HEMA-*co*-EDMA)) [36].

Rozdělení velikosti částic udává index polydisperzity (PDI). $\text{PDI} = D_w/D_n$, kde D_w je průměrná hmotnost částic a D_n je průměr částic, který je stanoven z měření nejméně 500 částic pomocí skenovacího elektronového mikroskopu [37].

2.4.1 Příprava

Magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) (Obr. 6) se připravují disperzní kopolymerací HEMA a GMA v prostředí toluenu a 2-methyl-propan-1-olu za přítomnosti koloidních částic magnetitu (Fe_3O_4) potažených vrstvičkou kyseliny olejové. Reakce je iniciována dibenzoylperoxidem a stabilizována acetát-butyrátem celulózy. Polymerizace probíhá při 70 °C 16 h. P(HEMA-*co*-EDMA) se připravují analogicky, rozdíl je pouze v přítomnosti maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). PGMA jsou vytvořeny polymerací GMA, která je iniciovaná azobisisobutyronitrilem za stabilizace poly(vinylpyrrolidonu) v prostředí ethanolu s koloidním Fe_3O_4 upraveným kyselinou chloristou. Na závěr jsou zoxidovány hydroxylové skupiny mikročástic 2% roztokem manganistanu draselného v kyselém prostředí 2M H_2SO_4 [38].

Obr. 6 Fotografie částic P(HEMA-*co*-GMA) pořízená elektronovým skenovacím mikroskopem [39]



2.4.2 Podmínky izolace DNA a výhody

DNA se nachází ve vodném roztoku o nízkém obsahu solí v hydratované šroubovicové formě (B-DNA) (viz kap. 2.3.2). V prostředí poly(ethylenglycolu) (PEG) kondenzuje do globulárního tvaru a přidání soli (NaCl) podporuje reverzibilní adsorpci na povrch magnetických částic pomocí vodíkových můstků. Obsah PEG a NaCl vede k redukci vodní aktivity a B-DNA přechází v A-DNA, což může zvyšovat adsorpci buněk. Po opětovné hydrataci relaxuje DNA do roztoku [37].

Klasická metoda izolace genomové DNA zahrnuje fenolovou extrakci a následné přesrážení ethanolem. Tato metoda je časově náročná, pracná a zachází se při ní se zdraví škodlivými chemikáliemi. Proto byla vyvinuta metoda lyze buněk a izolace DNA pomocí magnetických částic, která nepotřebuje žádná nákladná laboratorní zařízení, je rychlá a bez manipulace s toxickými chemikáliemi [39].

2.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) se docílí zmnožení úseku DNA, kdy se využívá enzymatické schopnosti DNA-polymerázy syntetizovat nové vlákno DNA komplementární k původnímu DNA templátu. Protože DNA-polymeráza není schopná syntézy od počátku jednořetězce, jsou do reakce přidány dva krátké (zpravidla nejméně 18 nukleotidové) úseky - primery, které jsou komplementární k daným řetězcům molekuly DNA a vymezují konkrétní úsek na DNA. Na primery nasedá DNA-polymeráza od 3' - konce a nové řetězce jsou tedy syntetizovány ve směru 5'→3'. Kvůli teplotnímu režimu celé reakce musí být DNA polymeráza termostabilní, využívá se např. *Taq*-DNA-polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* [40]. Kromě *Taq*-polymerázy a primerů obsahuje reakční směs jako kofaktor hořčičnaté ionty Mg^{2+} , které tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) rozpoznávaný DNA-polymerázou. Pro každou aplikaci je nutné stanovit optimální koncentraci Mg^{2+} , protože ionty mohou interagovat nejen s dNTP, ale i s templátovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly.

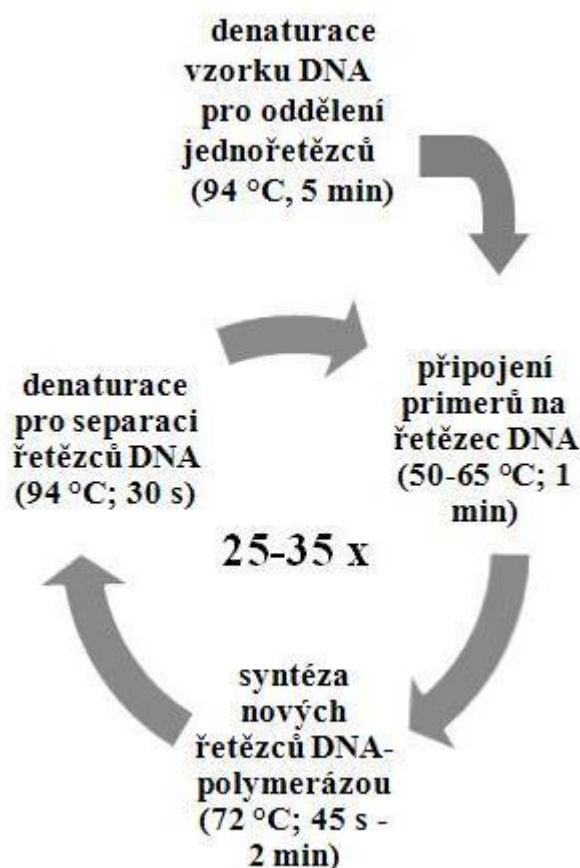
Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocykler, který dokáže v závislosti na čase automaticky měnit naprogramované teploty. Opakováním procesu dochází k exponenciálnímu růstu kopií (2^n , kde n je počet cyklů) vybraného úseku DNA.

Základní princip - tři kroky PCR jsou následující:

1. denaturace dvouřetězcových molekul DNA,
2. připojení primerů k odděleným řetězcům,
3. syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy [41].

Schéma celého průběhu PCR je uvedeno na Obr. 7

Obr. 7 Schéma teplotních režimů a doby trvání jednotlivých kroků PCR (upraveno) [41]



Výsledným produktem PCR jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti zpravidla desítky až tisíc párů bází (bp). Detekce jejich přítomnosti se provádí elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu [42].

2.5.1 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Metoda PCR v reálném čase (RT-PCR) je založena na on-line sledování fluorescenčního signálu, který je přímo úměrný množství vznikajícího PCR produktu. Aby bylo možné signál fluorescence snímat, je nutné vznikající PCR produkt označit. Existují tři obecné metody založené na použití interkalačního barviva, které se váže na DNA (např. SYBR Green I); fluorescenčně značené sondy a nebo fluorescenčně značené primery. V případě nespecifické vazby na DNA, jaká je např. u SYBR Green I, je možné použít analýzu křivek tání pro odlišení vznikajících specifických produktů od nespecifických produktů (např. dimerů primerů). Ta je založena na specifické teplotě tání (T_m) daného produktu PCR [43].

Oproti konvenční PCR má PCR v reálném čase řadu výhod, mezi které patří např. omezení kontaminace v průběhu detekce produktu PCR, rychlost a možnost přesné kvantifikace. Samozřejmě v sobě zahrnuje vysokou citlivost, specifickou a reprodukovatelnost jako konvenční PCR. Díky těmto výhodám je metoda vhodná např. pro diagnostiku patogenních mikroorganismů v potravinách a jejich kvantifikaci [44].

3. Cíl práce

Cílem diplomové práce byla izolace DNA pomocí tří druhů magnetických částic - (P(HEMA-*co*-GMA)) s různým obsahem karboxylových skupin, Perovskit a metodou fenolové extrakce s následným srážením DNA ethanolem (kontrolní metoda), dále pak porovnání jednotlivých magnetických částic ve vztahu k výsledné izolované DNA.

Jednotlivé dílčí úkoly byly rozděleny následovně:

- kultivace zvolených bakteriálních kmenů
- přečištění DNA izolované metodou fenolové extrakce magnetickými částicemi
- izolace DNA z hrubých lyzátů buněk čistých bakteriálních kmenů
- izolace DNA z hrubých lyzátů buněk probiotických výrobků
- ověření amplifikovatelnosti izolované DNA v PCR
- kvantifikace izolované DNA v real-time qPCR

4. MATERIÁL

4.1 Bakteriální kmeny

Lactobacillus gasseri K7 (kmen byl získán od prof. Ireny Rogelj, Institute of Dairy Science and Probiotics, Department of Animal Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia)

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* CCDM 212/06

Lactobacillus salivarius CCDM 216/06

4.2 Probiotické výrobky

Probiotické tablety, které byly použity v experimentech, byly zakoupeny v komerční prodejní síti. Následující informace o výrobcích pocházejí z příbalových letáků a popisů na obalech.

- **Apo-Lactobacillus 10+** (Profarma – Product, Jablonec nad Nisou, ČR)

Deklarované množství buněk: 12×10^9 v 1 kapsli (0,6 g)

Složení: *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*

Doprovodné látky: *Vaccinium macrocarpon* (brusinkový extrakt), fruktooligosacharidy, stearan hořečnatý, kyselina askorbová, (kapsle z želatiny rostl. původu)

Šarže, datum spotřeby: LOT3427, 11/01/2012

- **Biopron[®]9** (Valosun, Brno, ČR)

Deklarované množství buněk: $4,5 \times 10^9$ v 1 tobolce (0,2 g)

Složení: *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*

Doprovodné látky: fruktooligosacharidy, kyselina askorbová, stearan hořečnatý, barvivo E171, škrob, želatina

Šarže, datum spotřeby: 22366, 04/2011

▫ **GS Lactobacily FORTE s prebiotikami** (Green-Swan Pharmaceuticals, Praha, ČR)

Deklarované množství buněk: 10×10^9 v 1 kapsli (0,6 g)

Složení: *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *Bifidobacterium infantis*, *B. longum*, *Streptococcus thermophilus*

Doprovodné látky: inulín, rýžová mouka, želatina, glycerol, stearan hořečnatý, oxid křemičitý, hydroxypropylmethylcelulóza (potahovací l.), talek, barvivo E 133

Šarže, datum spotřeby: 09020702, 30/04/2011

▫ **Pangamin BIFIplus (pivovarské kvasnice)** (Rapeto, Bezručice, ČR)

Deklarované množství buněk: neuvedeno

Složení: bakteriální kultury laktobacilů a bifidobakterií

Doprovodné látky: sušené pivovarské kvasnice, sušené odtučněné mléko, pupalkový olej, inulín, vitamíny B1, B2, B6, B12, kys. pantotenová, pangamová a listová, niacin, biotin, cholin, Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, bílkoviny

Datum spotřeby: 30/09/2012

▫ **Probian** (GSN, New Jersey, USA)

Deklarované množství buněk: 10×10^9 v 1 tobolce (0,3 g)

Složení: *Lbc. rhamnosus*, *acidophilus*, *Bifidobacterium longum*

Doprovodné látky: fruktooligosacharidy – inulín, želatina, stearan hořečnatý

Šarže, datum spotřeby: 0150I8, 20/10/2010

4.3 Chemikálie

Agar (Lachema, Brno, ČR)
Agaróza (pro elektroforézu) (Serva, Heidelberg, SRN)
Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
Dodecyl sulfát sodný (SDS - $C_{12}H_{25}SO_4Na$)
Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
Ethidium bromid (EtBr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Ethyldiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
Fenol (pH=7,8-8,2) (Serva, Heidelberg, SRN)
Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)
Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
Isoamylalkohol (3-methyl-1-butanol)
Kyselina boritá (H_3BO_3) (Penta, Chrudim, ČR)
Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
Kyselina octová (Lachema, Brno, ČR)
Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
M.R.S. Broth (Oxoid, Londýn, Velká Británie)
Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
Polyethylen glykol (PEG) 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
RNáza A (Serva, Heidelberg, SRN)
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Serva, Heidelberg, SRN)

4.4 Roztoky

4.4.1 Kultivační média

- MRS médium (pH=6,5) (*l*)

13 g M.R.S. Broth média bylo rozpuštěno v 250 ml destilované vody (52 g/l), vzniklé médium bylo sterilizováno v autoklávu 15 min při teplotě 121 °C.

- MRS agar (*s*)

K MRS médiu byl přidán agar (15 g/l), vzniklé médium bylo sterilizováno v autoklávu 15 min při teplotě 121 °C, po sterilizaci bylo médium rozlito do Petriho misek a ponecháno ztuhnout při laboratorní teplotě a uchováváno v lednici.

4.4.2 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů buněk

▫ 0,5 M EDTA (pH= 8,0)

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Pomocí asi 20 g NaOH bylo upraveno pH (nejprve bylo přidáno 15 g NaOH, poté byl postupně přidán zbytek NaOH po jednotlivých peletkách za stálé kontroly pH). Rozpuštění probíhalo za stálého míchání na magnetické míchače. Výsledný roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1 l, rozdělen do alikvotních podílů a sterilizován 15 min při 121 °C.

▫ 1 M Tris-HCl (pH= 7,8; 8,0)

V 80 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12,1 g Tris-báze. K úpravě pH byla použita koncentrovaná HCl. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml a sterilizován 15 min při 121 °C,

▫ Lyzační roztok A

Ze zásobních roztoků byl sterilně smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl (pH= 7,8) s 1 ml 0,5 M EDTA (pH=8,0) a bylo přidáno 98 ml destilované vody.

▫ Lyzační roztok B

K lyzačnímu roztoku A byl přidán lyzozym, tak aby jeho výsledná koncentrace byla (dle potřeby) 2 mg/ml nebo 10 mg/ml. Lyzozym byl přidán těsně před použitím roztoku a byl připravován vždy čerstvý.

▫ 20% SDS

Za zahřívání (68 °C) bylo rozpuštěno 20 g dodecyl sulfátu sodného v 80 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na 7,0 koncentrovanou HCl. Roztok byl doplněn na objem 100 ml a rozdělen do alikvotních podílů.

▫ Proteináza K (1 mg/ml, 100 µg/ml)

Na analytických vahách bylo naváženo příslušné množství enzymu (10 mg, 1 mg), které bylo rozpuštěno v 10 ml sterilní destilované vody. Roztok, rozdělený do alikvotních podílů, byl uchováván při -20 °C.

▫ RNáza A

Potřebná navážka RNázy A (konečná koncentrace 100 µg/ml) byla rozpuštěna v 10 mM Tris-HCl (pH= 7,8) a 15mM NaCl. Výsledné alikvotní podíly byly uchovávány při -20 °C.

4.4.3 Roztoky pro izolaci DNA metodou fenolové extrakce

▫ CIZ

K 24 dílům chloroformu byl přidán 1 díl isoamylalkoholu.

▫ 3 M octan sodný

40,81 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. Ledovou kyselinou octovou bylo upraveno pH na hodnotu 5,2. Výsledný roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml, sterilizován 15 min při 121°C a rozplněn do alikvotních podílů

- TE pufr (pH=8,0)

1 ml 1 M Tris-HCl (pH= 8,0) byl smíchán s 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH= 8,0) a do 100 ml byl roztok doplněn sterilní destilovanou vodou. Výsledný roztok byl sterilně rozdělen do alikvotních podílů.

4.4.4 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů

- 5 M NaCl

29,2 g NaCl bylo rozpuštěno v 60 ml destilované vody a poté doplněno na objem 100 ml. Výsledný roztok byl sterilizován 15 min při 121 °C.

- 40% PEG 6000

40 g PEG 6000 bylo za zahřívání rozpuštěno v 60 ml sterilní destilované vody a doplněno sterilní destilovanou vodou na objem 100 ml.

- 70% Ethanol

Bylo smícháno 70 ml 96% ethanolu a 26 ml destilované vody.

- TE pufr (pH=8,0) viz 4.4.3

4.4.5 Komponenty pro PCR

Voda pro PCR – voda pro injekce (Braun, Melsungen, SRN)

10x PCR Blue Buffer (PCR reakční pufr kompletní, obsahující MgCl₂) (Top-Bio, Praha, ČR)

PCR dNTP mix (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)

Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)

Primery (10 pmol/μl) (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)

4.4.6 Komponenty pro real-time qPCR

Voda pro PCR – voda pro injekce (Braun, Melsungen, SRN)

SYTO-9 qPCR 2x M.Mix + Mg²⁺ (Top-Bio, Praha, ČR)

Primery (10 pmol/μl) (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)

4.4.7 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- 1 M NaOH

40 g NaOH bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, doplněno do 1 l a rozplněno do alikvotních podílů.

- 5x koncentrovaný TBE pufr

Bylo smícháno 54 g Tris-báze a 27,5 g H₃BO₃ a rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Dále bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH= 8,0), popř. bylo pH upraveno na hodnotu 8,0 pomocí

1 M NaOH. Před použitím byl roztok 10x zředěn (tzn. 0,5x konc. TBE) na výslednou koncentraci 45 mM Tris-báze, 45mM H₃BO₃ a 1 mM EDTA.

▫ Agarózový gel

1,8%: 0,9 g agarózy bylo rozvaženo v 50 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru

0,8%: 0,4 g agarózy bylo rozvaženo v 50 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru

▫ PCR Yellow load (nanášecí pufr) (Top-Bio, Praha, ČR)

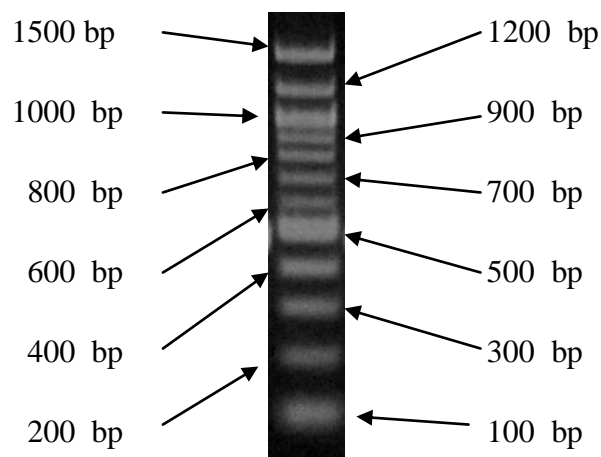
▫ Nanášecí stop pufr (6x koncentrovaný)

Byla rozpuštěna navážka 250 mg Ficoll 400 a 4 mg bromfenolové modře v 10 ml destilované vody. K roztoku byla přidána 0,5 M EDTA tak, aby výsledná koncentrace byla 50 mM EDTA. Výsledný roztok byl sterilně rozdělen do alikvotních podílů a uchováván při 4 °C.

▫ DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

Obsahuje fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp, dělení jednotlivých fragmentů je zobrazeno na Obr. 8

Obr. 8 100 bp žebříček – dělení fragmentů



▫ Ethidium bromid

Byl připraven roztok EtBr o koncentraci 500 µg/ml.

4.5 Magnetické nosiče pro izolaci DNA

Magnetické částice byly připraveny Ing. Danielem Horákem, CSc. z Makromolekulárního ústavu AV ČR v Praze. Vlastnosti použitých nosičů jsou uvedeny v Tabulce 4

Tabulka 4 Charakteristika použitých magnetických částic [45]

Název	Částice	m _{Fe} (%)	-COOH (mM/g)	Průměr (μm)	PDI
F-kol 77 ox	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	10,0	0,76	2,2	1,09
F-kol 135 ox	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	6,6	2,61	1,2	1,10

Magnetické manganaté částice Peroskvit (La_{0,75}Sr_{0,25}MnO₃) pokryté vrstvou silikagelu [46] byly připraveny doc. Ing. Emilem Pollertem, DrSc. z Fyzikálního ústavu AV ČR v Praze.

4.6 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy Pioneer PA 114 (Ohaus, New Jersey, USA)
Centrifuga Z216MK (Hermle Labortechnik, Wehingen, SRN)
Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, Riga, Litva)
Digitální fotoaparát μ Tough-3000 (Olympus, Hamburg, SRN)
Inkubátor FTC 90I (Velp, Usmate, Itálie)
Magnetický separátor DynaMag-2 (Invitrogen, Oslo, Norsko)
Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, ČR)
Mini Incubator 230V (Labnet, New Jersey, USA)
NanoPhotometr (Implen, Mnichov, SRN)
PCR box UVC/T-AR (Biosan, Riga, Litva)
Předvážky CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
PTC-100 MiniCycler (MJ Research, Watertown, USA)
Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie)
Spectrafuge Mini Centrifuge C1301-B (Labnet, New Jersey, USA)
Transiluminátor Spectroline TVR-312A/F (Spectronics, Westbury, USA)
Turbidimetr WPA CO 8000 Biowave (Biochrom, Cambridge, Velká Británie)
Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300V (Labnet, New Jersey, USA)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

5. METODY

Následující metody jsou zpracovány dle Španová A., Rittich, B. (2010) [42], pokud není uvedeno jinak.

5.1 Kultivace buněk rodu *Lactobacillus*

- Čistá bakteriální kultura narostlá v tekutém živném médiu byla přeočkována do tekutého MRS média (200 μ l/20 ml) a aerobně kultivována při teplotě 37 °C po dobu 24 h resp. 48 h.
- Po detegování zřetelného nárůstu buněk (sedimentu, zákalu) byla provedena kontrola čistoty bakteriální kultury křížovým roztěrem na misky s MRS agarem, které byly kultivovány při teplotě 37°C a po 48 h vyhodnoceny a vyfotografovány. Pro případnou kontrolu byly uchovány v lednici
- Bakteriální kultura narostlá v tekutém živném MRS médiu byla použita pro izolaci bakteriální DNA

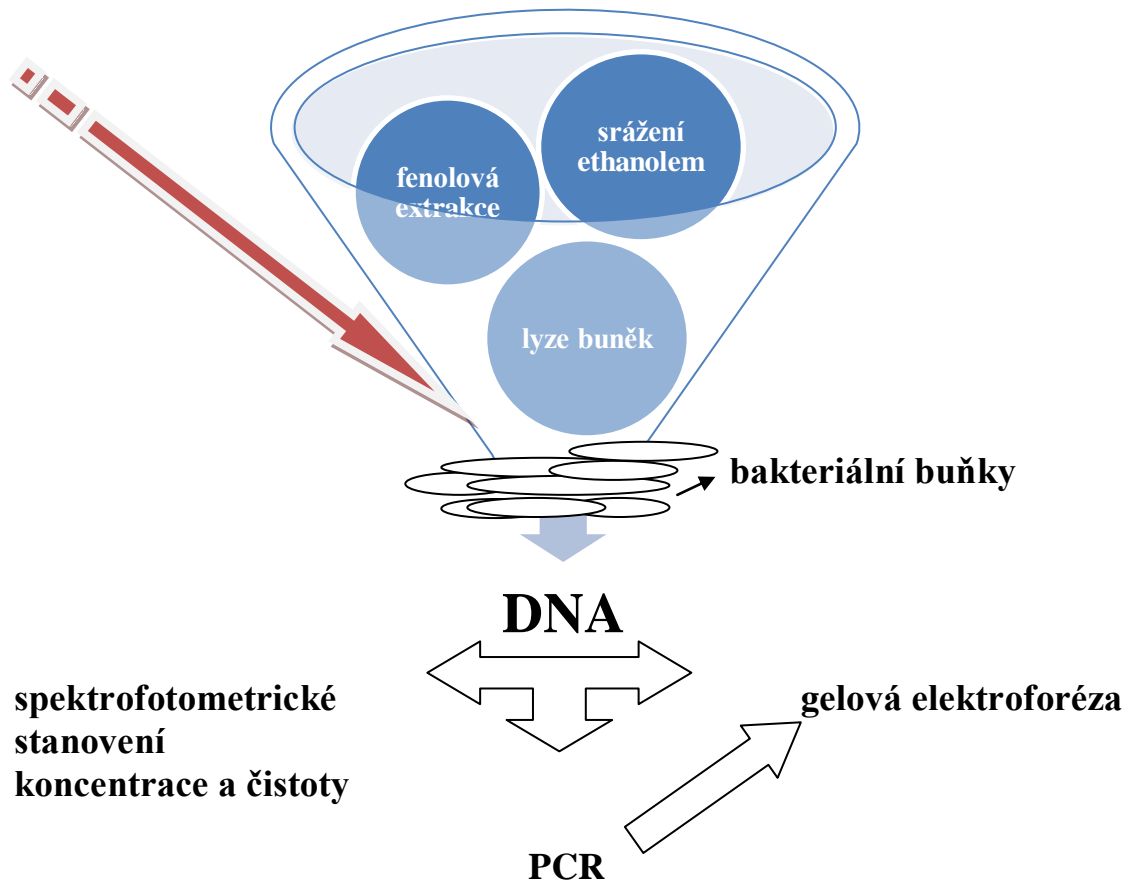
5.1.1 Turbidimetrické stanovení zákalu buněk

Aby byl dostatečný počet buněk pro izolaci DNA, hodnota $A_{600\text{ nm}}$ by měla být alespoň 2,00.

- Jako vzorek s nulovou absorbancí (blank) bylo použito MRS médium (l), ve kterém byly jednotlivé bakteriální kmeny kultivovány.
- Do kyvety bylo napipetováno celkově 2 ml vzorku, při hodnotě A_{600} vyšší jak 2,00 je nutné vzorek zředit (mez detekce přístroje).

5.2 Izolace bakteriální DNA

Obr. 9 Schéma postupu práce při izolaci DNA
magnetické částice



Obr. 9 ukazuje obecné schéma postupu práce s DNA. Prvním krokem k získání DNA je lýza buněk, čímž docílíme uvolnění cytoplasmy s DNA do roztoku. Dalšími procesy se izoluje čistá a intaktní DNA a to buď „klasickou“ metodou fenolové extrakce a srážením ethanolem, anebo s využitím magnetických nosičů. Takto připravenou purifikovanou DNA je možné použít v následujících bioanalytických metodách.

5.2.1 Lýza bakteriálních buněk kultivovaných kmenů

1. 1 ml buněčné kultury, která narostla v tekutém živném médiu MRS, byl přenesen do 1,5 ml zkumavek Eppendorf a centrifugován 3 min při 15 000 ot/min. Následně byl supernatant opatrně slit a sediment nechán dobře okapat.
2. Vzniklý sediment se resuspendoval v 1 ml lyzačního roztoku A (nejdříve bylo přidáno 100 μ l, promícháno a poté zbývajících 900 μ l a promícháno). Směs byla opět centrifugována 3 min při 15 000 ot/min, byl slit supernatant a sediment nechán okapat.
3. 500 μ l lyzačního roztoku B (lysozym 2 mg/ml) bylo přidáno k sedimentu, který byl připraven v kroku č. 2, a byl jím dokonale resuspendován. Vzorčky byly inkubovány 1 hod při laboratorní teplotě, občas byly promíchány
4. K suspenzi bylo nepipetováno 12,5 μ l 20% SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ g/ml), vše bylo dobře promícháno a inkubováno při 55 °C do druhého dne.

5. Po inkubaci bylo odebráno 20 μ l suspenze pro analýzu na gelové elektroforéze, popř. byly zkumavky uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (kvůli zamezení degradace DNA).
6. Ke zbývajícím vzorku bylo přidáno 10 μ l RNázy A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), promícháno a inkubováno při $37\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$.

5.2.2 Příprava vzorků probiotických výrobků pro izolaci DNA

- Probiotické kapsle byly sterilně odebrány a rozlomeny, popř. tablety byly rozdrčeny v hmoždíři. Do sterilní zkumavky byly odváženy 2 g daného výrobku.

5.2.3 Lyze bakteriálních buněk probiotických výrobků

1. K připravenému vzorku probiotického výrobku bylo přidáno 6 ml roztoku B (lysozym 10 mg/ml).
2. Směs byla za kontinuálního míchání inkubována při laboratorní teplotě 3 hod.
3. K suspenzi bylo přidáno 50 μ l 20% SDS a 5 μ l proteinázy K (1 mg/ml) a zkumavky byly inkubovány při $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ do druhého dne.
4. Takto připravené hrubé lyzáty buněk z probiotických tablet bylo možné použít pro fenolovou extrakci anebo pro separaci DNA pomocí magnetických částic. Vzorky byly uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (kap. upravena dle [47])

5.2.4 Fenolová extrakce bakteriální DNA

1. K hrubému lyzátu buněk, připraveném v kap. 5.2.1 nebo 5.2.2, bylo přidáno 500 μ l fenolu (předestilovaného, $\text{pH} = 7,8$) a směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána 4 min (čas byl měřen). Po určeném čase byla směs centrifugována 3 min při 15 000 ot/min.
2. Do čisté Eppendorfovy zkumavky byla odebrána vodní fáze s DNA (nesmělo dojít k neopatrnému odebrání proteinové mezivrstvy).
3. K vodní fázi bylo přidáno 700 μ l CIZ a směs se opět 4 min (čas byl měřen) kývavým pohybem promíchávala. Následně byly vzorky centrifugovány 3 min při 15 000 ot/min.
4. Horní vodní fáze byla odebrána do čisté zkumavky Eppendorf.

Pzn.: S toxickými těkavými látkami (fenol, chloroform) bylo manipulováno za dodržení správných pravidel bezpečnosti a ochrany zdraví.

5.2.5 Srážení DNA ethanolem

1. Ke vzorku DNA (kap. 5.2.3) byla přidána 1/20 objemu 3 M octanu sodného a promícháno.
2. Byl napipetován 2,5 násobek objemu ethanolu a DNA se nechala vysrážet 15 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Vysrážená DNA byla centrifugována 15 min při 15 000 ot/min, dále byl slit supernatant a sediment byl krátce usušen v termostatu při $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.
4. DNA byla rozpuštěna ve zvoleném množství TE pufru.

5.2.6 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických nosičů

Do sterilních zkumavek Eppendorf (1,5 ml) byla připravena separační směs (Tabulka 5). Pro úspěšnou izolaci bylo nutné dodržet pořadí jednotlivých komponent.

Tabulka 5 Složení separační směsi pro izolaci pomocí magn. nosičů

Pořadí komponent	Komponenta	Objem jednotlivých komponent (μl)	Výsledná koncentrace
1.	5 M NaCl	400	2 M
2.	Hrubý lyzát buněk (kap. 5.2.1, 5.2.2; popř. purifikovaná DNA)	100	100 μl/ml
3.	40% PEG 6000	400	16%
4.	Magn. částice (2 mg/ml)	100	0,2 mg/ml
Výsledný objem		1000	

- Takto připravená směs byla inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Následně byly částice s navázanou DNA separovány na magnetickém separátoru při laboratorní teplotě 15 min.
- Zkumavky byly ponechány v magnetickém separátoru a supernatant byl opatrně odpipetován
- Vzorky byly odstraněny z magnetického separátoru a promyty 70% ethanolem (1 ml), částice byly odseparovány na magnetickém separátoru 2 min při laboratorní teplotě a ethanol poté odpipetován. Postup promytí byl ještě jednou opakován.
- Eppendorfovy zkumavky byly krátce usušeny v termostatu při 55 °C, aby byly odstraněny zbytky ethanolu.
- Následně byla DNA z magnetických částic eluována do zvoleného množství TE pufru.

5.3 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

K určení koncentrace a posouzení kvality izolované DNA bylo využito UV spektrofotometrie.

5.3.1 Postup při spektrofotometrickém stanovení čistoty a koncentrace DNA

Hodnoty absorbance a koncentrace jednotlivých vzorků izolované DNA byly změřeny na přístroji NanoPhotometr. Z displeje bylo možné odečíst koncentraci (ng/μl) a hodnoty absorbance ($A_{230\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}}$, $A_{280\text{nm}}$, $A_{320\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}/320\text{nm}}$). Jako slepý vzorek (blank) sloužil TE pufr (TE pufr, ve kterém byla daná DNA eluována).

- Izolovaná DNA byla vytemperována na laboratorní teplotu a důkladně homogenizována (z důvodu reprezentativního výsledku).

- Přístroj byl zapnut a vložena speciální kyveta (Label Guard) ve směru procházejícího světelného paprsku.
- Na přístroji byl zvolen vhodný program pro měření (Label Guard Applications -> Nucleic Acid -> dsDNA) a byl nastaven parametr měření - víčka „Lid“ („Factor“ 5-50) dle předpokládané koncentrace DNA. (Tabulka 6)
- Nejprve bylo do měřicího prostoru kyvety nepipetováno potřebné množství slepého vzorku (TE pufru) a přiloženo víčko „Lid“ s odpovídajícím „Factor“ (5-50) (Tabulka 6), přístroj následně provedl kalibraci.
- Analogickým postupem jako u kalibrace přístroje byly proměřeny jednotlivé vzorky a odečteny hodnoty absorbance a koncentrace.
- Změřený vzorek byl vždy z kyvety odpipetován a víčko s měřícím prostorem kyvety byly otřeny etanolem. Při změně parametru víčka „Lid“ bylo nutné opětovné nastavení přístroje a kalibrace.

Tabulka 6 Parametry spektrofotometru

Víčko	Lid Factor 5	Lid Factor 10	Lid Factor 50
Délka optické dráhy (mm)	2	1	0,2
Objem vzorku (μl)	6-10	3-5	0,7-4
Měřitelný rozsah (ng/μl)	7-350	15-700	150-4000

5.3.2 Interpretace naměřených výsledků

- Hodnota $A_{230\text{nm}} \ll A_{260\text{nm}}$, v opačném případě je vzorek znečištěn stopami fenolu, ten má absorpční maximum právě při vlnové délce 230 nm.
- Nukleové kyseliny mají absorpční maximum při $A_{260\text{nm}}$.
- Maximum absorbance proteinů je při 280 nm.
- Hodnota absorbance při vlnové délce 320 nm by se měla blížit k nule a odečítá se od hodnot $A_{260\text{nm}}$ a $A_{280\text{nm}}$, určuje „pozadí“ vzorku.
- Z hodnoty $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ se určuje čistota DNA. Pokud je poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$, obsahuje vzorek proteiny, při $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} > 2,0$ obsahuje vzorek RNA, relativně čistý vzorek DNA má hodnotu poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8-2,0$.

5.4 Agarózová gelová elektroforéza purifikované bakteriální DNA a DNA v hrubých lyzátech buněk

- Z 0,8% agarózového gelu, připraveného v elektroforetické misce, byl opatrně vyjmut hřebínek.
- Na proužku polyethylenu bylo smícháno např. 20 μl DNA (hrubého lyzátu buněk) se 4 μl nanášecího stop pufru (6x koncentrovaný). Takto připravená směs byla nanesena do komůrky gelu.
- Gel byl přenesen do elektroforetické vaničky a převrstven 0,5x TBE pufrem.

- Elektroforéza probíhala 1-1,5 h při 70 V (vzdálenost jednotlivých vzorků od počátku lze kontrolovat podle modrého zbarvení nanášecího pufu).
- Po skončení elektroforézy byl gel obarven v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu ½-1 hod.
- Vzorky byly vizualizovány na transiluminátoru v UV světle a dokumentovány digitálním fotoaparátem.

5.5 Polymerázová řetězová reakce

Reakce byla prováděna v přístroji PTC-100 MiniCycler. DNA matrice byla nejčastěji zředěna na koncentraci 10 ng/µl. Komponenty PCR byly před použitím promíchány a krátce zcentrifugovány. Míchání reakčních směsí bylo prováděno v PCR boxu, který byl vždy před použitím vytřen ethanolem a vyzářen UV světlem. Směs PCR nebyla míchána pro každou zkumavku zvlášť, ale byl vytvořen tzv. master mix ze všech komponent PCR (kromě DNA matrice), jejichž množství bylo násobeno počtem vzorků. Následně byl tento master mix rozpipetován po 24 µl do mikrozkušavek a přidán 1 µl DNA matrice, popř. vody pro PCR (negativní kontrola). Jako pozitivní kontrola byla u všech vzorků použita DNA o koncentraci 10 ng/µl bakteriálního kmene *Lactobacillus gasser* K7, která byla získána od Ing. Štěpánky Trachtové (VUT v Brně, FCH).

5.5.1 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

Komponenty pro jednu reakční směs (25 µl), které byly sterilně smíchány v přesně definovaném pořadí, jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 PCR komponenty pro doménu *Bacteria*

Pořadí	Komponenta	Objem (µl)
1.	Voda pro PCR	17,5
2.	10x PCR Blue Buffer	2,5
3.	dNTP mix (10 mM)	1,0
4.	Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/µl)	1,0
5.	Primer F_eub (10 pmol/µl)	1,0
6.	Primer R_eub (10 pmol/µl)	1,0
7.	DNA matrice	1,0

Parametry specifických primerů o definované velikosti, které byly použity, jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8 Specifické primery pro doménu *Bacteria* [48]

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

5.5.2 PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Komponenty pro jednu reakční směs (25 µl), které byly sterilně smíchány v přesně definovaném pořadí, jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9 PCR komponenty pro rod *Lactobacillus*

Pořadí	Komponenta	Objem (µl)
1.	Voda pro PCR	19,0
2.	10x PCR Blue Buffer	2,5
3.	dNTP mix (10 mM)	0,5
4.	Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/µl)	0,5
5.	Primer LbLMA 1-rev (10 pmol/µl)	0,5
6.	Primer R16-1 (10 pmol/µl)	1,0
7.	DNA matrice	1,0

Parametry specifických primerů o definované velikosti, které byly použity, jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10 Specifické primery pro rod *Lactobacillus* [49]

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu PCR (bp)
LbLMA 1-rev	5' CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC 3'	250
R16-1	5' CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA 3'	

5.5.3 Program PCR pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Po promíchání a zcentrifugování PCR směsi byly mikrozkušavky vloženy do termocyklu a byl zvolen teplotní program uvedený v Tabulce 11.

Tabulka 11 Teplotní program pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Krok č.	Teplota/čas	Počet cyklů
1	95 °C/30 s	30
2	55 °C/30 s	
3	72 °C/30 s	

Při prvním cyklu byla denaturace DNA (krok č. 1) prodloužena na 5 min a v posledním cyklu byla syntéza DNA (krok č. 3) prodloužena na 10 min.

5.6 Real-time qPCR specifická pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Míchání směsí pro kvantifikační PCR v reálném čase probíhalo obdobně jako pro konvenční PCR (kap. 5.5), s tím rozdílem, že přidávaná testovaná DNA matrice byla v původních koncentracích a pro kalibrační křivku, nutnou pro kvantifikaci, byla DNA o známé koncentraci sériově nařaděna v požadovaném rozmezí koncentrací. Reakce probíhaly v přístroji Rotor Gene 6000.

Komponenty pro jednu reakční směs (25 μ l), byly sterilně smíchány v přesně definovaném pořadí, uvedeném v Tabulce 12, v chladícím stojánku pro mikrozkušavky. Teplotní programy jsou totožné s kap. 5.5.3.

Tabulka 12 PCR komponenty pro kvantifikaci DNA pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

doména <i>Bacteria</i>		
Pořadí	Komponenta	Objem (μ l)
1.	Voda pro PCR	9,5
2.	SYTO PCR SYBR Master mix	12,5
3.	Primer F_eub (10 pmol/ μ l)	1,0
4.	Primer R_eub (10 pmol/ μ l)	1,0
5.	DNA matrice	1,0
rod <i>Lactobacillus</i>		
Pořadí	Komponenta	Objem (μ l)
1.	Voda pro PCR	9,5
2.	SYTO PCR SYBR Master mix	12,5
3.	Primer LbLMA 1-rev (10 pmol/ μ l)	1,0
4.	Primer R16-1 (10 pmol/ μ l)	1,0
5.	DNA matrice	1,0

5.6.2 Vyhodnocení real-time qPCR specifické pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Kalibrační křivka nutná pro kvantifikaci DNA musí obsahovat minimálně tři body sériového ředění DNA o známé koncentraci, a aby bylo možné výsledky považovat za statisticky významné, data získané z takové kalibrační křivky musí splňovat kritéria uvedené v Tabulce 13.

Tabulka 13 Optimální parametry kalibrační křivky [50]

Parametry charakterizující kal. křivku	Optimální hodnoty
Korelační koeficient - R^2	>0,985
Sklon kalibrační křivky - M	-3,9 až -3,0
Účinnost (efficiency)	0,8-1,10

Hodnota C_t (threshold cycle) se rovná cyklu, kdy dosáhne hodnota fluorescence statisticky významnou hodnotu nad pozadím. Vyhodnocení probíhalo v programu Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.

5.7 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR a real-time qPCR

- Z 1,8% agarózového gelu, připraveného v elektroforetické misce, byl opatrně vyjmut hřebínek.
- Do mikrokumavky bylo k PCR produktu (25 μ l) přidáno 5 μ l Yellow load (vkládacího pufru). Takto připravená směs byla nanesena do komůrky gelu, nejčastěji 5 nebo 20 μ l. Do jedné komůrky gelu bylo naneseno 5 μ l DNA standardu 100 bp žebříček.
- Gel byl přenesen do elektroforetické vaničky a převrstven 0,5x TBE puftrem.
- Elektroforéza probíhala 1,5-2 h při 70 V (vzdálenost jednotlivých vzorků od počátku lze kontrolovat podle oranžového zbarvení nanášecího pufru).
- Po skončení elektroforézy byl gel obarven v roztoku ethidium bromidu (0,5 μ g/ml) po dobu ½-1 hod.
- Vzorky byly vizualizovány na transiluminátoru v UV světle a dokumentovány digitálním fotoaparátem.

6 VÝSLEDKY

6.1 Kultivace bakteriálních kmenů

Použité bakteriální kmeny (kap. 4.1) byly kultivovány dle kap. 5.1

6.1.1 Vyhodnocení kultivace bakteriálních kmenů

Bakteriální kmeny byly kultivovány 24 h resp. 48 h a byl sledován růst kultur. U *L. salivarius* CCDM 216/06 byl nárůst detegován až po 48 h, u ostatních již po 24 hod. Zákalené MRS médium bylo zaznamenáno pouze u *L. salivarius* CCDM 216/06. Výsledky vyhodnocení kultivace jsou v Tabulce 14.

Tabulka 14 Vyhodnocení kultivace bakteriálních kmenů

Kmen	Délka kultivace (h)	Teplota (°C)	Nárůst v MRS médiu	Množství sedimentu
<i>L. gasseri</i> K7	24	37	čirý supernatant	tenká vrstva
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	24	37	čirý supernatant	silná vrstva
<i>L. salivarius</i> CCDM 216/06	48	37	zákal	silná vrstva

Všechny 3 bakteriální kmeny byly kultivovány se zřetelným nárůstem buněk a za vzniku sedimentu.

6.1.2 Turbidimetrické stanovení zákalu buněk

Nárůst buněk byl stanoven pomocí turbidimetru (kap. 5.1.1). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15 Turbidimetrické měření zákalu buněk

Kmen	Ředění	$A_{600\text{nm}}$	$A_{600\text{nm}}$ celková
<i>L. gasseri</i> K7	2x	1,92	3,84
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	4x	1,63	6,52
<i>L. salivarius</i> CCDM 216/06	5x	1,43	7,15

Bakteriální buňky narostly do dostatečné koncentrace ($A_{600\text{nm}} = 3,84-7,15$).

6.1.3 Kontrola čistoty bakteriálních kultur

Na Obr. 10-12 jsou křížové roztěry, které slouží jako kontrola čistoty bakteriálních kultur. Po 48 hodinové kultivaci při teplotě 37 °C byly Petriho misky vyhodnoceny a vyfotografovány. U všech tří bakteriálních kmenů byly detegovány jednotlivé bílé, lesklé kolonie buněk kulovitého tvaru, bez známek kontaminace. Při otevření misek byl také cítit charakteristická „jogurtovo-mléčná“ vůně.

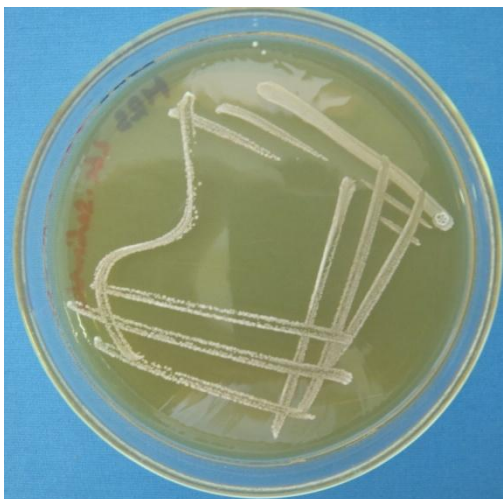
Obr. 10 *L. gasseri* K7



Obr. 11 *L. paracasei* subsp. *paracasei*
CCDM 212/06



Obr. 12 *L. salivarius* CCDM 216/06



Všechny 3 zaočkované bakteriální kmeny byly považovány za čisté a vhodné pro izolaci DNA.

6.2 Izolace DNA metodou fenolové extrakce a její separace pomocí magnetických částic

DNA, která byla izolovaná metodou fenolové extrakce z 500 μl hrubých lyzátů buněk jednotlivých bakteriálních kmenů (5.2.1), byla separována pomocí magnetických částic F-kol 135 ox.

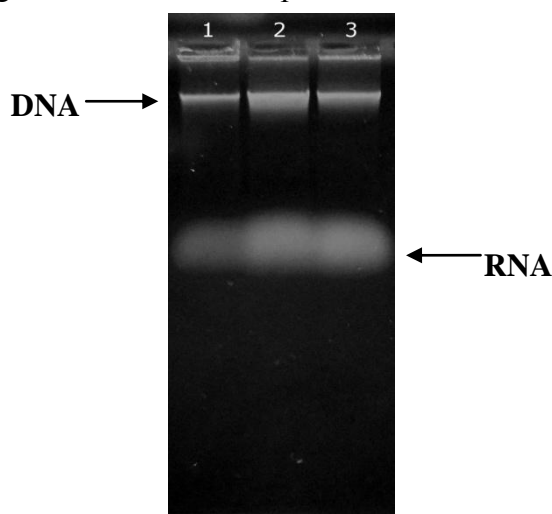
6.2.1 Izolace DNA metodou fenolové extrakce

Celková množství DNA, izolované z jednotlivých bakteriálních kmenů, stanovená spektrofotometricky, jsou uvedena v Tabulce 16. DNA byla rozpuštěna ve 150 μl TE pufru. Agarózová gelová elektroforéza DNA je uvedena na Obr. 10.

Tabulka 16 Celková množství DNA izolované metodou fenolové extrakce

Bakteriální kmen	c_{DNA} (ng/ μl)	Celkové množství DNA (ng)
<i>L. gasseri</i> K7	125	18750
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	249	37350
<i>L. salivarius</i> CCDM 216/06	128	19200

Obr. 10 Agarózová gelová elektroforéza purifikované DNA izolované metodou fenolové extrakce



Běh	Kmen	c_{DNA} (ng/ μl)	Množství DNA ve vzorku (ng)	Detekce DNA	Detekce RNA
1	<i>L. gasseri</i> K7	125	2500	+	+
2	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	249	4980	+	+
3	<i>L. salivarius</i> CCDM 216/06	128	2560	+	+

Na gel bylo nanášeno 20 μl vzorku. + DNA/RNA byla detegována

Ze všech bakteriálních kmenů byla izolována relativně intaktní DNA (Obr. 10) v koncentracích 125, 128 a 249 ng/μl.

6.2.2 Spektrofotometrické stanovené čistoty DNA izolované metodou fenolové extrakce

Na přístroji NanoPhotometr byly zjištěny hodnoty absorbance uvedené v Tabulce 17.

Tabulka 17 Hodnoty absorbance DNA izolované metodou fenolové extrakce (viz Tabulka 16)

DNA bakteriálního kmene	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	A _{260nm/280nm}
<i>L. gasseri</i> K7	0,265	0,509	0,282	0,010	1,853
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	0,553	1,006	0,568	0,010	1,785
<i>L. salivarius</i> CCDM 216/06	0,284	0,551	0,325	0,041	1,796

lid factor 5, objem vzorku 6 μl

DNA byla izolována relativně čistá, s mírným znečištěním proteiny.

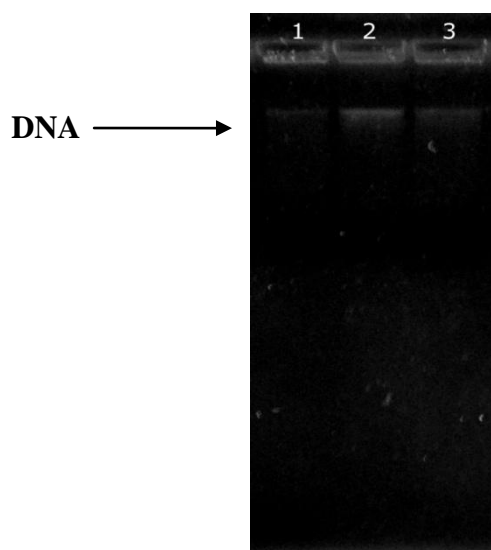
6.2.3 Separace purifikované DNA pomocí magnetických částic F-kol 135 ox

Bylo použito 100 μl purifikované DNA (kap. 6.2.1) do separační směsi s magn. částicemi F-kol 135 ox. Celková množství DNA, stanovená spektrofotometricky, jsou uvedena v Tabulce 18. DNA byla rozpuštěna v 50 μl TE pufru. Agarózová gelová elektroforéza DNA je uvedena na Obr. 11

Tabulka 18 Celková množství DNA izolované magn. částicemi F-kol 135 ox

DNA bakteriálního kmene	c _{DNA} (ng/μl)	Celkové množství DNA (ng)
<i>L. gasseri</i> K7	36	1800
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	51	2550
<i>L. salivarius</i> CCDM 216/06	26	1300

Obr. 11 Agarózová gelová elektroforéza purifikované DNA izolované magn. částicemi F-kol 135 ox



Běh	Kmen	c _{DNA} (ng/μl)	Množství DNA ve vzorku (ng)	Detekce DNA	Detekce RNA
1	<i>L. gasseri</i> K7	36	720	+	-
2	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	51	1020	+	-
3	<i>L. salivarius</i> CCDM 216/06	26	520	+	-

Na gel bylo naneseno 20 μl vzorku.

+ DNA byla detegována, - RNA nebyla detegována

Ze všech vzorků purifikované DNA byla separována DNA (Obr. 11) v koncentracích 36, 51 a 26 ng/μl.

6.2.4 Účinnost separace purifikované DNA magnetickými částicemi F-kol 135 ox

Aby byl výpočet účinnosti separace magn. částicemi F-kol 135 ox relevantní, musí být množství DNA izolovaného pomocí metody fenolové extrakce (Tabulka 16) přepočtena na množství DNA obsažené ve 100 μ l TE pufru (přidáváno do separační směsi pro magn. částice), abychom dostali srovnatelné hodnoty k Tabulce 18. Vypočtené hodnoty účinnosti jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19 Účinnost separace purifikované DNA magn. částicemi F-kol 135 ox

DNA bakteriálního kmene	Množství DNA přidávané do separační směsi (ng)	Množství DNA izolované magn. částicemi F-kol 135 ox (ng)	Účinnost (%)
<i>L. gasseri</i> K7	12500	1800	14,4
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	24900	2550	10,2
<i>L. salivarius</i> CCDM 216/06	12800	1300	10,2

Vypočítaná účinnost separace purifikované DNA magnetickými částicemi F-kol 135 ox byla 10, 2 a 14,4 %.

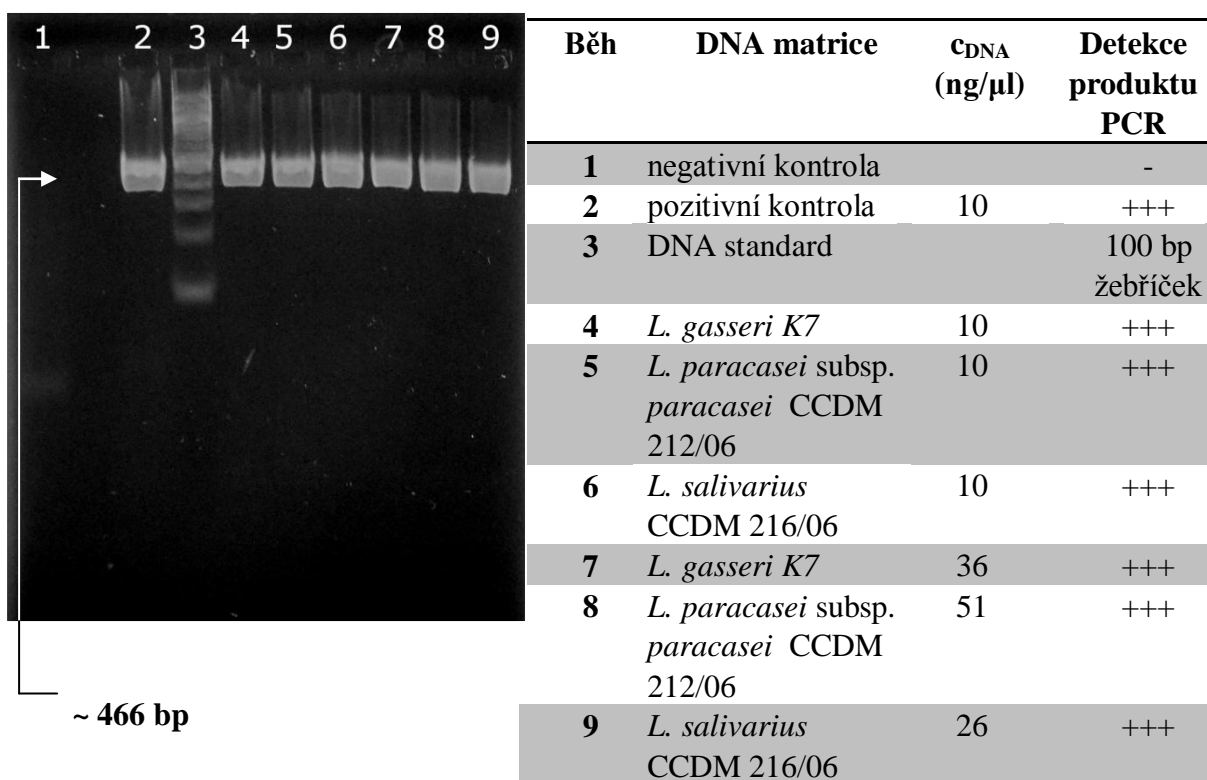
6.3 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované pomocí magnetických částic F-kol 135 ox v PCR

Do směsi pro PCR byla použita DNA izolovaná pomocí magnetických částic F-kol 135 ox v kap. 6.2.3.

6.3.1 Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro doménu *Bacteria*

Do směsi PCR byl nepipetován 1 μ l DNA o koncentracích uvedených v tabulce k Obr. 12. Na gel bylo nanášeno 5 μ l produktu PCR. Amplifikováno bylo různé množství DNA, výsledek je uveden na Obr. 12.

Obr. 12 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR - doména *Bacteria*



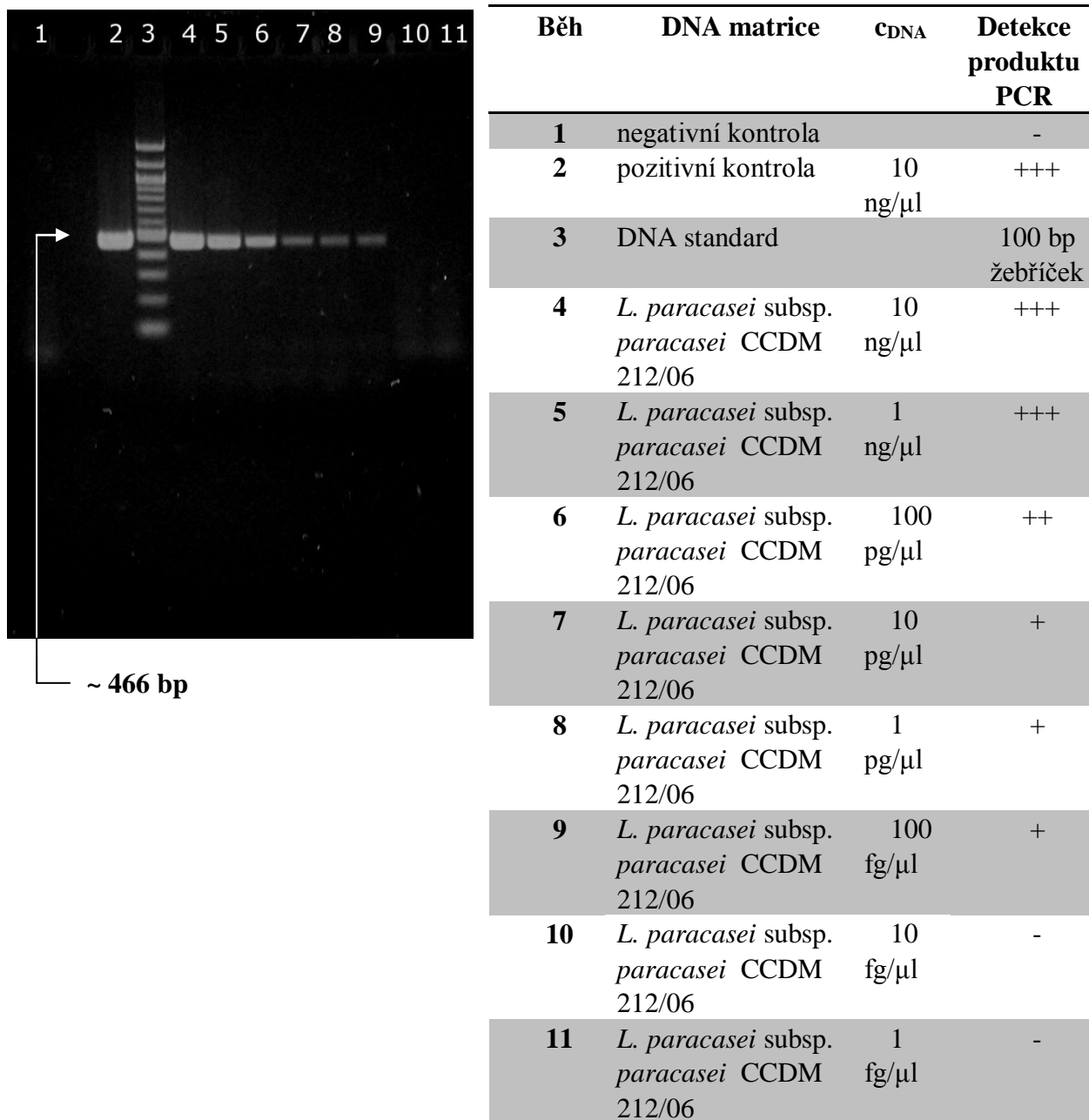
+++ detegován silný produkt PCR

U všech vzorků byl detegován amplikon o specifické velikosti asi 466 bp.

6.3.2 Ověření citlivosti PCR pro doménu *Bacteria*

Do směsi PCR byl nepipetován 1 μ l DNA o koncentracích uvedených v tabulce k Obr. 13 (10 ng-1 fg). Na gel bylo nanášeno 5 μ l produktu PCR, výsledek amplifikace je uveden na Obr. 13.

Obr. 13 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR - citlivost pro doménu *Bacteria*



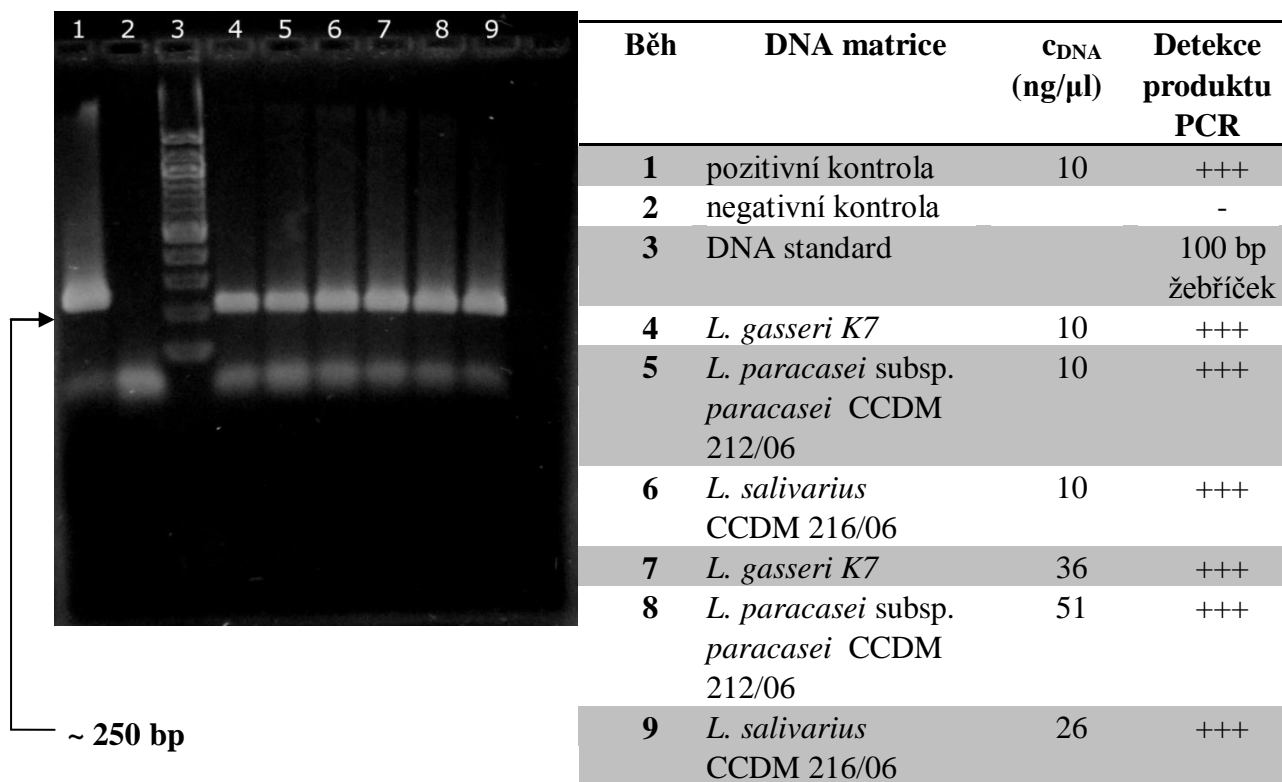
Detekce produktů PCR: +++ silně ++dobře +slabě

Množství DNA, které se amplifikovalo v PCR za vzniku ampliconu specifického pro doménu *Bacteria* a detegovatelného na gelu je 100 fg.

6.3.3 Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro rod *Lactobacillus*

Do směsi PCR byl nepipetován 1 µl DNA o koncentracích uvedených v tabulce k Obr. 14. Na gel bylo nanášeno 20 µl produktu PCR. Amplifikováno bylo různé množství DNA, výsledek je uveden na Obr. 14.

Obr. 14 Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro rod *Lactobacillus*



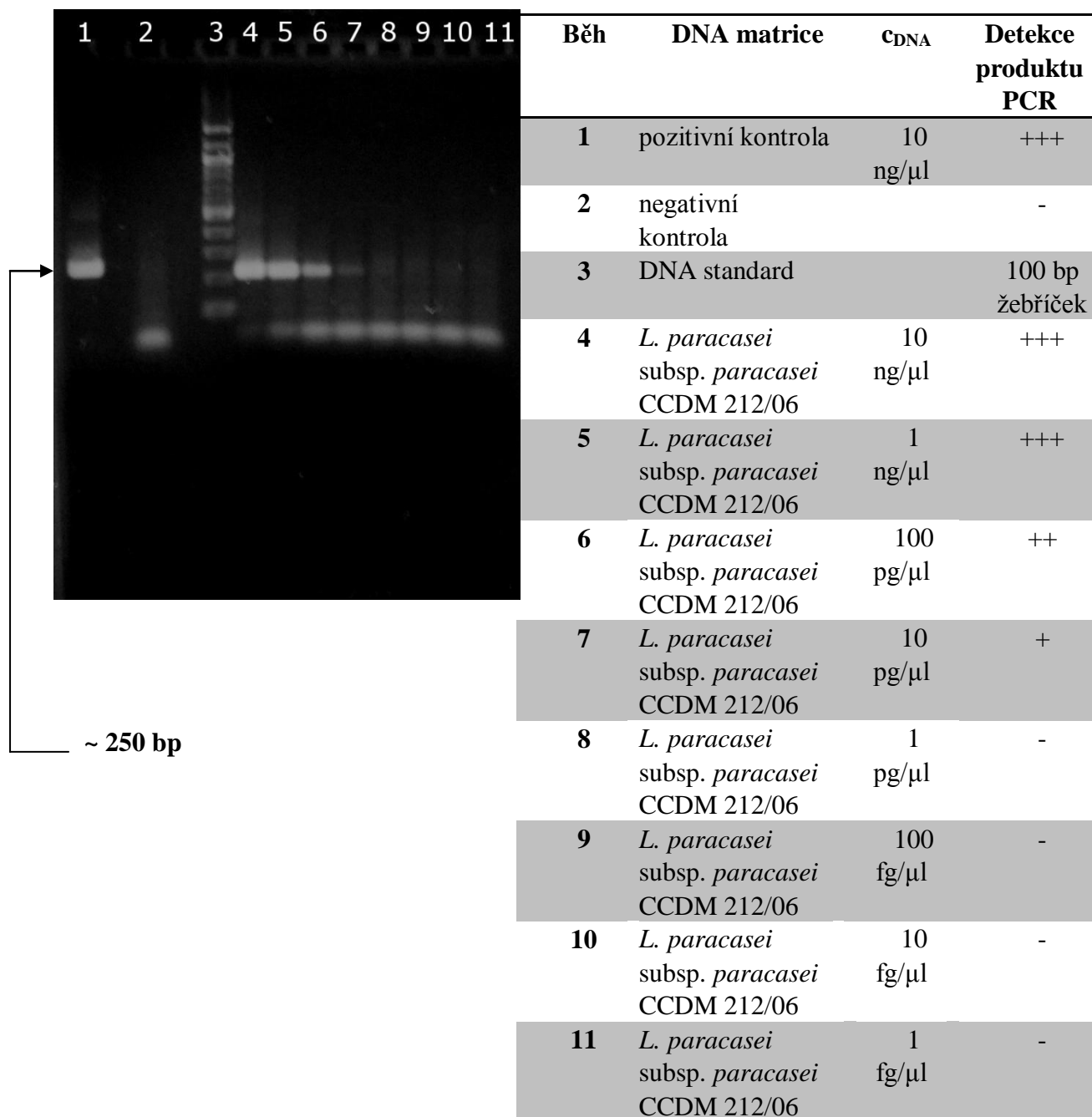
+++ detegován silný produkt PCR

U všech DNA byl detegován amplikon o specifické velikosti asi 250 bp.

6.3.4 Ověření citlivosti PCR pro rod *Lactobacillus*

Do směsi PCR byl nepipetován 1 μ l DNA o koncentracích uvedených v tabulce k Obr. 15 (10 ng-1 fg). Na gel bylo naneseno 20 μ l produktu PCR, výsledek amplifikace je uveden na Obr. 15.

Obr. 15 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR - citlivost pro rod *Lactobacillus*



Detekce produktů PCR: +++ silně ++dobře +slabě +/-velmi slabě

Množství DNA, které se amplifikovalo v PCR za vzniku ampliconu specifického pro rod *Lactobacillus*, bylo 10 pg.

6.4 Srovnání účinnosti izolace DNA z hrubého lyzátu buněk čisté bakteriální kultury metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic

DNA byla izolovaná metodou fenolové extrakce ze 100 μl hrubého lyzátu buněk (doplněných na objem 500 μl TE pufrem) bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* K7. Stejně množství hrubého lyzátu buněk stejného bakteriálního kmene (100 μl) bylo použito do separačních směsí magnetických částic (kap. 5.2.6) F-kol 135 ox, F-kol 77 ox a Perovskit.

6.4.1 Srovnání množství izolované DNA jednotlivými metodami

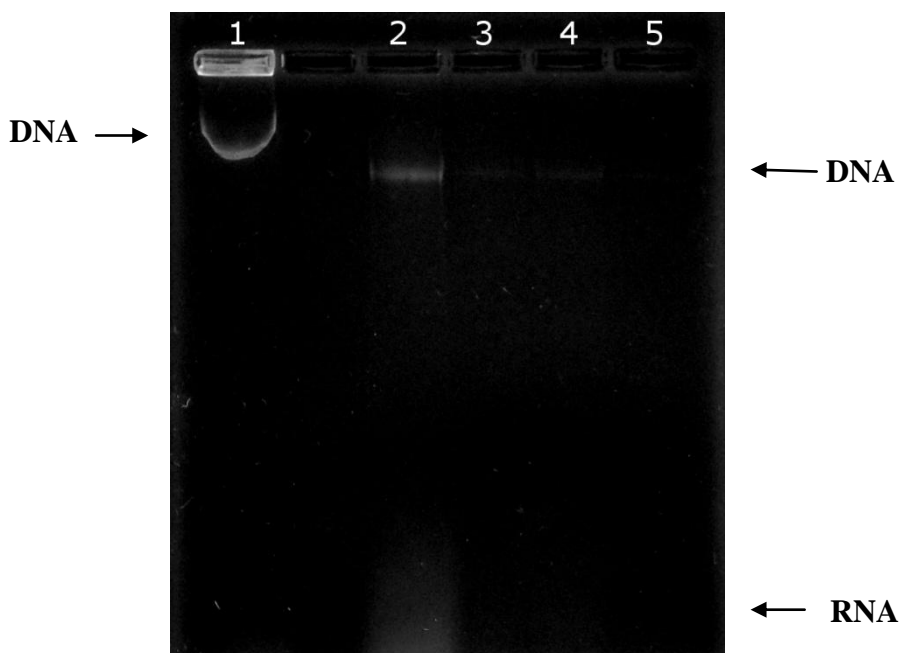
Celková množství DNA, izolovaná jednotlivými metodami, stanovená spektrofotometricky, jsou uvedena v Tabulce 20. DNA byla eluována do 50 μl TE pufrem.

Tabulka 20 Celková množství DNA izolované různými metodami

Metoda izolace	c_{DNA} (ng/ μl)	Celkové množství DNA (ng)
fenolová extrakce	200	10000
F-kol 135 ox	18	900
F-kol 77 ox	34	1700
Perovskit	25	1250

Na Obr. 16 je zobrazen výsledek agarózové gelové elektroforézy DNA v hrubém lyzátu buněk a DNA izolované metodou fenolové extrakce a jednotlivými druhy magnetických částic. Množství vzorku, nanesená na gel, jsou uvedena v tabulce k obrázku.

Obr. 16 Agarózová gelová elektroforéza purifikované DNA a DNA v hrubém lyzátu buněk



Tabulka k Obr. 16

Běh	DNA	c_{DNA} (ng/ μ l)	Množství vzorku na gelu (μ l)	Množství DNA na gelu (ng)	Detekce DNA	Detekce RNA
1	hrubý lyzát buněk		20		+	-
2	fenolová extrakce	200	15	3000	+	+
3	F-kol 135 ox	18	20	360	+	-
4	F-kol 77 ox	34	20	680		-
5	Perovskit	25	20	500	+	-

+ DNA/RNA byla detegována

- RNA nebyla detegována

Fenolovou extrakcí i různými magn. částicemi byla izolována relativně intaktní DNA (Obr. 16) v množství 900 - 10000 ng (Tabulka 20).

6.4.2 Srovnání spektrofotometrického stanovení čistoty DNA izolované jednotlivými metodami

Na přístroji NanoPhotometr byly zjištěny hodnoty absorbance uvedené v Tabulce 21.

Tabulka 21 Hodnoty absorbance DNA izolované různými metodami (viz Tabulka 20)

Metoda izolace	A_{230nm}	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{320nm}	$A_{260nm/280nm}$
fenolová extrakce	0,275	0,798	0,338	0,000	2,361
F-kol 135 ox	0,053	0,110	0,079	0,037	1,708
F-kol 77 ox	0,244	0,219	0,168	0,086	1,603
Perovskit	0,217	0,157	0,109	0,057	1,923

lid factor 5, objem vzorku 6 μ l

Izolovaná DNA byla relativně intaktní, mírně znečištěná RNA (fenolová extrakce) a proteiny (F-kol 135 ox, F-kol 77 ox).

6.4.3 Srovnání účinnosti izolace DNA různými magnetickými částicemi

Vypočítaná účinnost, jednotlivých magnetických částic, je vztažena na množství DNA izolované metodou fenolové extrakce, které bylo 10000 ng, a je uvedena v Tabulce 22.

Tabulka 22 Účinnost izolace DNA magn. částicemi

Magn. částice	Množství DNA (ng)	Účinnost (%)
F-kol 135 ox	900	9,0
F-kol 77 ox	1700	17,0
Perovskit	1250	12,5

Vypočítaná účinnost separace různými DNA magn. částicemi byla 9,0 – 17,0 %.

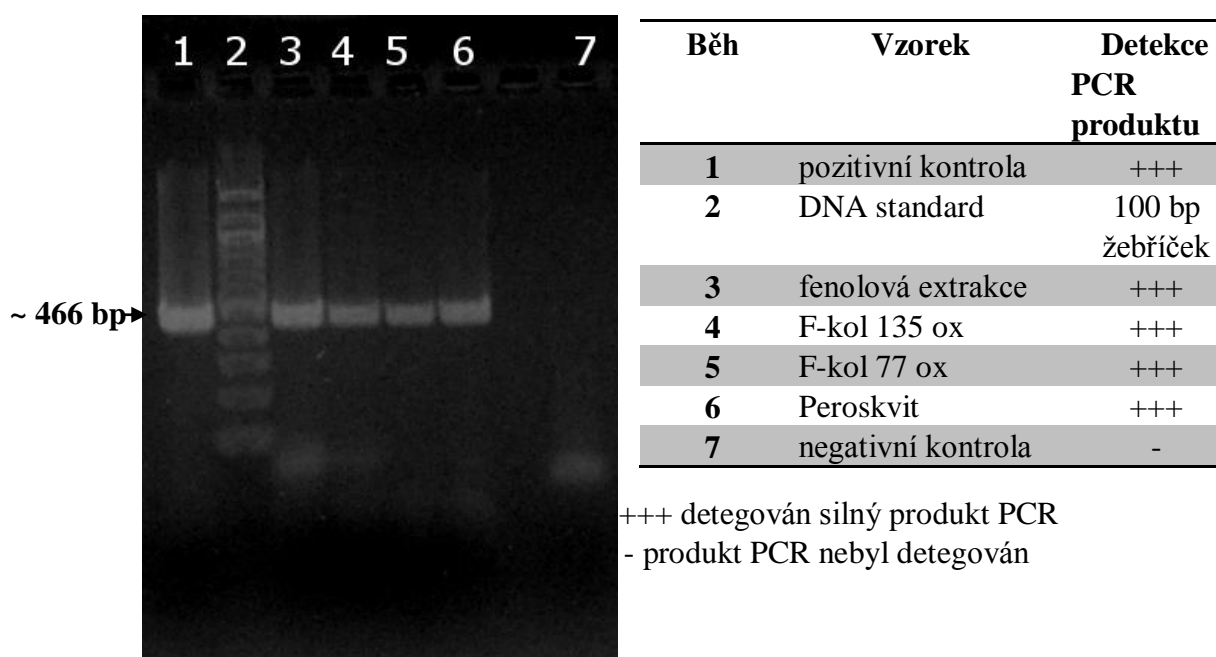
6.5 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované metodou fenolové extrakce a různými druhy magnetických částic v PCR

Do směsí PCR byla použita DNA izolovaná pomocí metody fenolové extrakce a magn. částicemi F-kol 135 ox, F-kol 77 ox a Perovskit v kap. 6.4. DNA byla zředěna na koncentraci 10 ng/ μ l.

6.5.1 Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro doménu *Bacteria*

Do směsí PCR byl nepipetován 1 μ l zředěné DNA. Na gel bylo nanášeno 5 μ l produktů PCR. Výsledek amplifikace je zobrazen na Obr. 17.

Obr. 17 Agarózová gelová elektroforéza amplifikace DNA pro doménu *Bacteria*

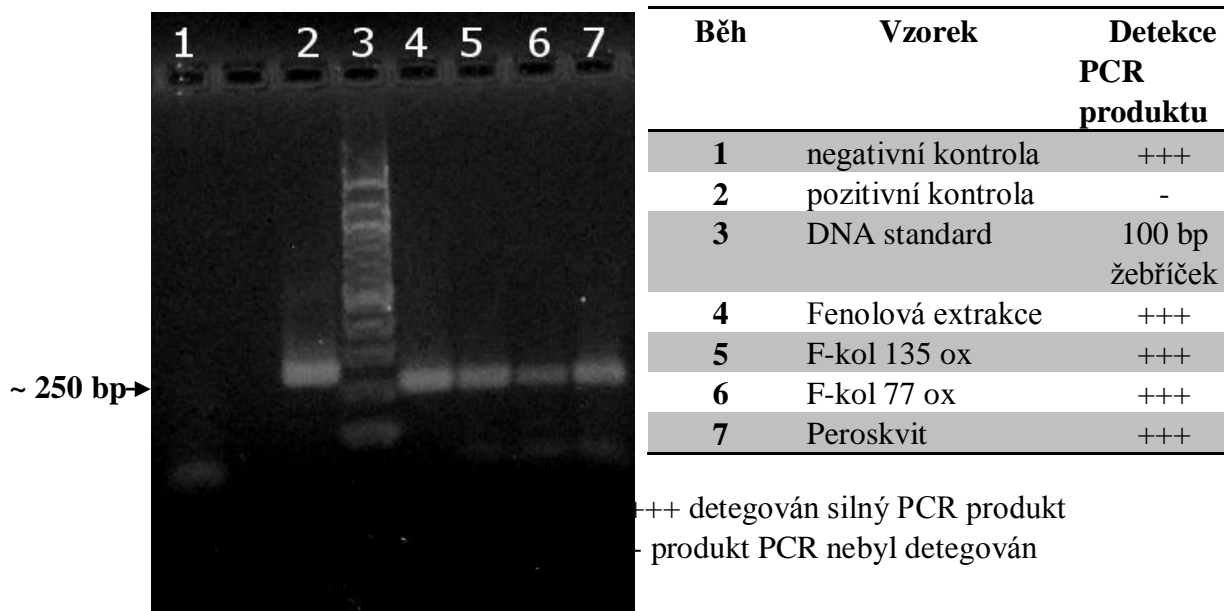


U všech DNA byl detegován amplikon o specifické velikosti asi 466 bp.

6.5.2 Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR pro rod *Lactobacillus*

Do směsí PCR byl nepipetován 1 μ l zředěné DNA. Na gel bylo nanášeno 20 μ l produktů PCR a výsledek amplifikované DNA je na Obr. 18.

Obr. 18 Agarózová gelová elektroforéza amplifikace DNA pro rod *Lactobacillus*



U všech DNA byl detegován amplikon o specifické velikosti asi 250 bp.

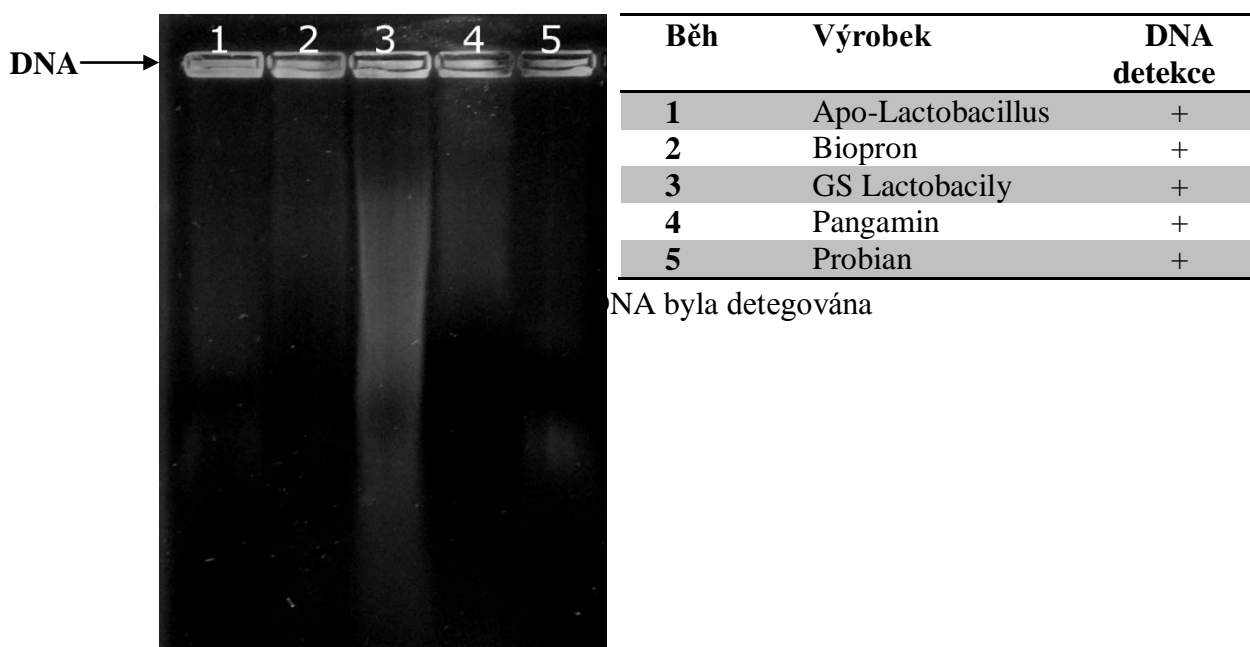
6.6 Izolace DNA z probiotických výrobků

Z výrobků Apo-Lactobacillus 10+, Biopron 9, GS Lactobacily FORTE s prebiotikami, Pangamin BIFIplus (pivovarské kvasnice) a Probian byla izolována bakteriální DNA metodou fenolové extrakce a třemi druhy magnetických částic - F-kol 135 ox, F-kol 77 ox a Perovskit.

6.6.1 Lýze bakteriálních buněk v probiotických výrobcích

Dle postupu v kap. 5.2.3 byly připraveny hrubé lyzáty buněk. Ověření uvolnění obsahu buněk (cytoplasmy s DNA) do roztoku bylo provedeno agarózovou gelovou elektroforézou hr. lyzátů buněk z výrobků, výsledek je zobrazen na Obr. 19. Na gel bylo nanášeno 20 μ l hrubého lyzátu buněk.

Obr. 19 Lýze buněk v probiotických výrobcích (agarózová gelová elektroforéza)



DNA byla detegována, pravděpodobně z důvodu velmi vysoké koncentrace DNA a „balastních“ látek, zůstala v komůrkách gelu.

6.6.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Na přístroji NanoPhotometr byly zjištěny hodnoty absorbance a koncentrace izolované DNA, které jsou uvedené v Tabulce 23. DNA byla eluována do 50 µl TE pufru.

Tabulka 23 Hodnoty koncentrace a absorbance izolované DNA z probiotických výrobků

Výrobek	Metoda izolace DNA	c _{DNA} (ng/µl)	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	A _{260nm/280nm}
Apo-Lactobacillus	fenolová extrakce	1018	0,350	0,496	0,279	0,039	1,696
	F-kol 135 ox	13	0,073	0,077	0,060	0,025	1,486
	F-kol 77 ox	9	-0,014	0,046	0,037	0,012	1,360
	Perovskit	22	0,192	0,152	0,124	0,064	1,467
Biopron	fenolová extrakce	1075	1,176	0,515	0,431	0,085	1,243
	F-kol 135 ox	55	0,069	0,355	0,513	0,134	0,583
	F-kol 77 ox	78	0,549	0,643	0,652	0,332	0,972
	Perovskit	89	0,554	0,658	0,564	0,302	1,359
GS Lactobacily	fenolová extrakce	375	0,172	0,175	0,135	0,025	1,296
	F-kol 135 ox	4	-0,039	0,018	0,013	0,001	1,417
	F-kol 77 ox	6	-0,049	0,030	0,025	0,006	1,263
	Perovskit	9	0,052	0,059	0,043	0,023	1,800
Pangamin	fenolová extrakce	2475	0,966	1,200	0,783	0,210	1,728
	F-kol 135 ox	2	0,018	0,006	0,010	-0,003	0,092
	F-kol 77 ox	11	0,024	0,058	0,046	0,013	1,364
	Perovskit	22	0,483	0,106	0,120	0,019	0,861
Probian	fenolová extrakce	1520	0,720	0,851	0,653	0,243	1,483
	F-kol 135 ox	33	0,243	0,217	0,167	0,084	1,602
	F-kol 77 ox	7	0,023	0,040	0,031	0,012	1,474
	Perovskit	31	0,288	0,217	0,175	0,094	1,519

Z probiotických výrobků byla izolována DNA o různých koncentracích a čistotě.

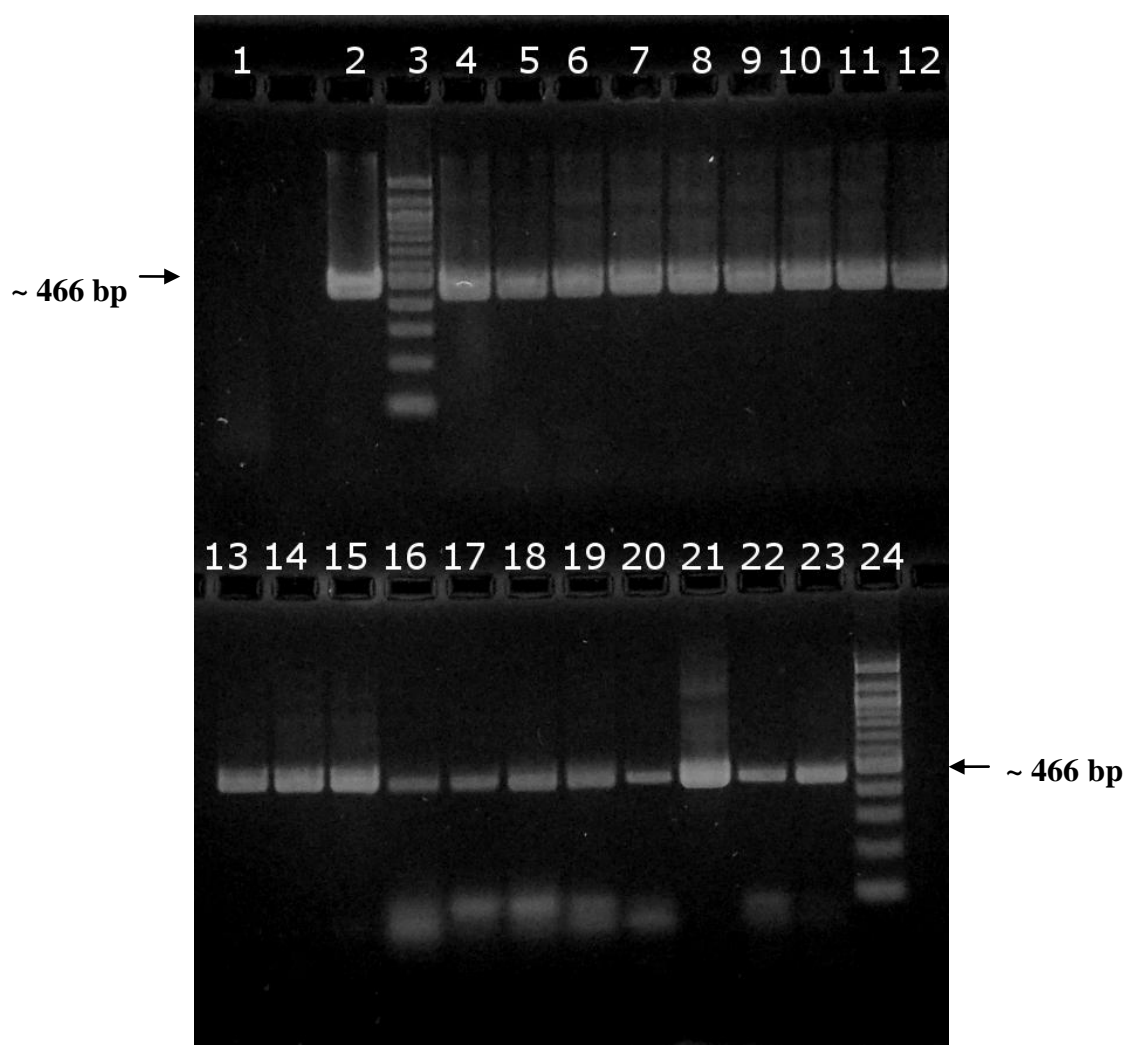
6.7 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z probiotických výrobků v PCR

Do směsí PCR byla použita DNA izolovaná z probiotických výrobků v kap. 6.6

6.7.1 Ověření amplifikovatelnosti DNA z probiotických výrobků v PCR pro doménu *Bacteria*

Do směsí PCR byl nepipetován 1 μ l DNA o koncentracích uvedených v Tabulce 23. Na gel bylo nanášeno 5 μ l produktu PCR. Výsledek amplifikace izolované DNA je na Obr. 20.

Obr. 20 Agarózová gelová elektroforéza DNA (z probiotických výrobků) amplifikace pro doménu *Bacteria*



Tabulka k Obr. 20

Běh	DNA matrice	Metoda izolace DNA	Množství DNA v PCR směsi (ng)	Detekce produktu PCR
1	Negativní kontrola			-
2	Pozitivní kontrola		10	+++
3	DNA standard			100 bp žebříček
4		F-kol 135 ox	13	+++
5	Apo-	F-kol 77 ox	9	+++
6	Lactobacillus	Perovskit	22	+++
7	Biopron	F-kol 135 ox	55	+++
8		F-kol 77 ox	78	+++
9		Perovskit	89	+++
10	GS	F-kol 135 ox	4	+++
11	Lactobacily	F-kol 77 ox	6	+++
12		Perovskit	9	+++
13	Pangamin	F-kol 135 ox	2	+++
14		F-kol 77 ox	11	+++
15		Perovskit	22	+++
16	Probian	F-kol 135 ox	33	+
17		F-kol 77 ox	7	+
18		Perovskit	31	++
19	Apo-Lactobacillus	fenolová extrakce	10	++
20	Biopron	fenolová extrakce	10	+
21	GS Lactobacily	fenolová extrakce	10	+++
22	Pangamin	fenolová extrakce	10	+
23	Probian	fenolová extrakce	10	++
24	DNA standard	fenolová extrakce		100 bp žebříček

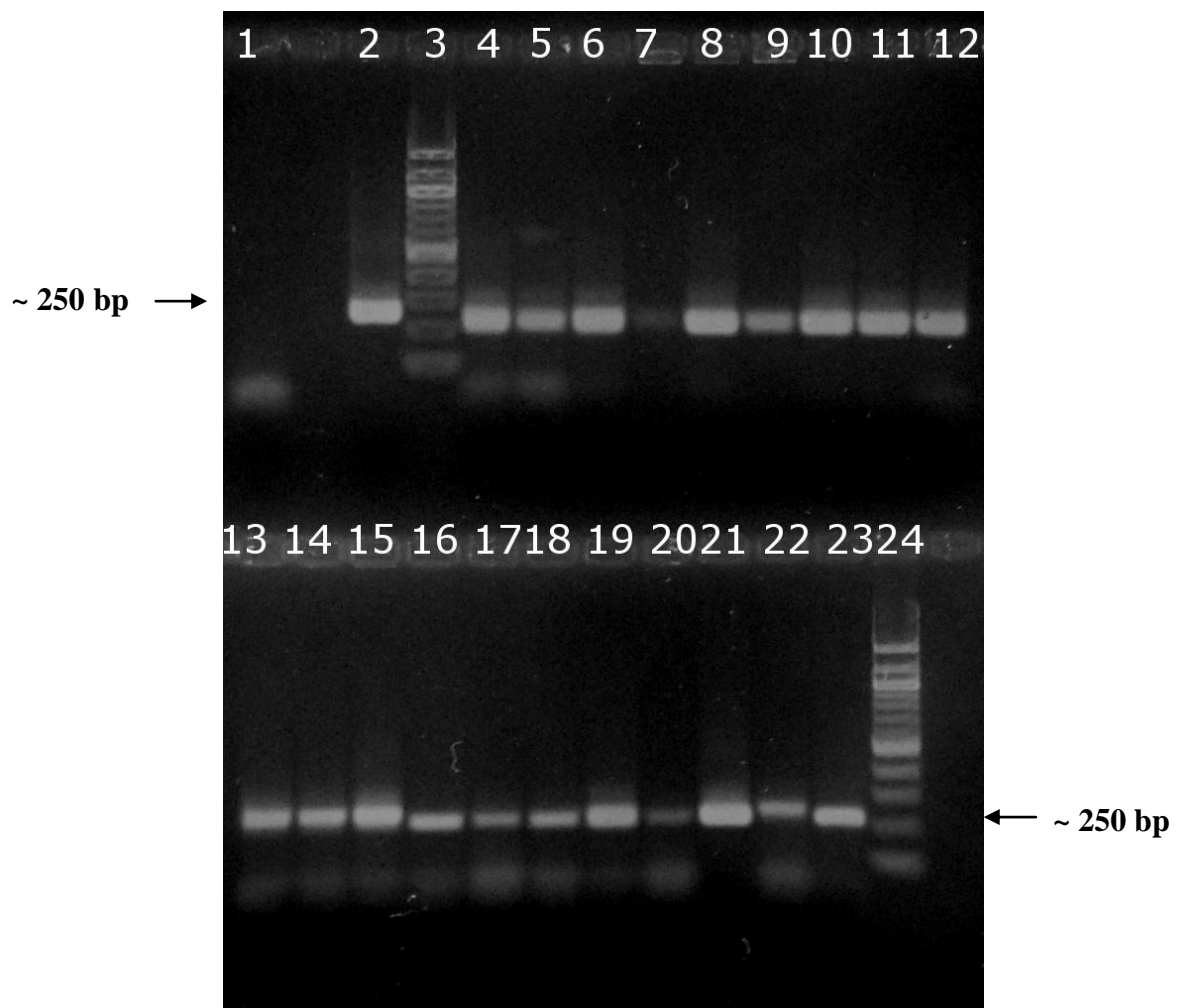
Detekce produktů PCR: +++ silně ++dobře +slabě +/-velmi slabě
 - produkt PCR nebyl detegován

U všech DNA byl detegován specifický amplikon o velikosti asi 466 bp o různé intenzitě.

6.7.2 Ověření amplifikovatelnosti DNA z probiotických výrobků v PCR pro rod *Lactobacillus*

Do směsi PCR byl nepipetován 1 μ l DNA o koncentracích uvedených v Tabulce 23. Na gel bylo nanášeno 20 μ l produktu PCR. Výsledek PCR je zobrazen na Obr. 21

Obr. 21 Agarózová gelová elektroforéza DNA (z probiotických výrobků) amplifikace pro rod *Lactobacillus*



Tabulka k Obr. 21

Běh	DNA matrice	Metoda izolace DNA	Množství DNA v PCR směsi (ng)	Detekce produktu PCR
1	Negativní kontrola			-
2	Pozitivní kontrola		10	+++
3	DNA standard			100 bp žebříček
4		F-kol 135 ox	13	+++
5	Apo-	F-kol 77 ox	9	++
6	Lactobacillus	Perovskit	22	+++
7	Biopron	F-kol 135 ox	55	+/-
8		F-kol 77 ox	78	+++
9		Perovskit	89	++
10	GS	F-kol 135 ox	4	+++
11	Lactobacily	F-kol 77 ox	6	+++
12		Perovskit	9	+++
13	Pangamin	F-kol 135 ox	2	++
14		F-kol 77 ox	11	++
15		Perovskit	22	+++
16	Probian	F-kol 135 ox	33	++
17		F-kol 77 ox	7	++
18		Perovskit	31	++
19	Apo-Lactobacillus	fenolová extrakce	10	+++
20	Biopron	fenolová extrakce	10	+
21	GS	fenolová extrakce	10	+++
22	Lactobacily	fenolová extrakce	10	++
23	Pangamin	fenolová extrakce	10	+++
24	DNA standard	fenolová extrakce		100 bp žebříček

Detekce produktů PCR: +++ silně ++dobře +slabě +/-velmi slabě
 - produkt PCR nebyl detegován

U všech DNA byl detegován specifický amplikon o velikosti asi 250 bp o různé intenzitě.

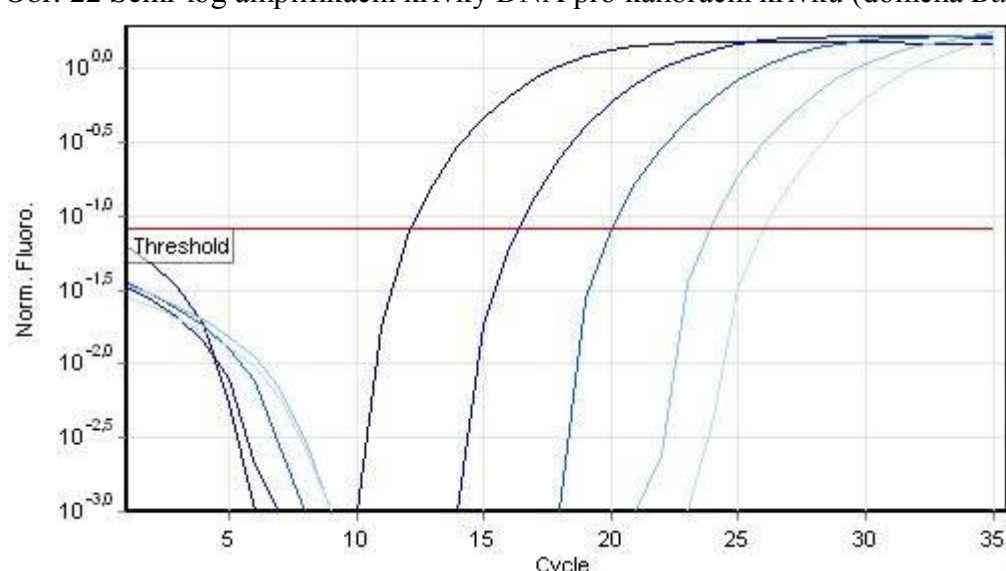
6.8 Kvantifikace DNA z probiotických výrobků v real-time qPCR pro doménu *Bacteria*






DNA, která byla izolována z probiotických výrobků v kap. 6.6, byla použita pro kvantitativní PCR v reálném čase specifickou pro doménu *Bacteria*.

6.8.1 Kalibrační křivka real-time qPCR (doména *Bacteria*)

Pro stanovení množství amplifikované DNA byla sestavena kalibrační křivka s DNA o známé koncentraci a s charakteristickými parametry (kap. 5.6.2). Do směsi pro qPCR bylo použito množství 10 ng-1 pg DNA. Amplifikační křivky kalibračních bodů jsou zobrazeny na Obr. 22. Analýza křivek tání je uvedena na Obr. 23 a výsledná vypočtená kalibrační křivka na Obr. 24 s konečnými parametry v Tabulce 24.

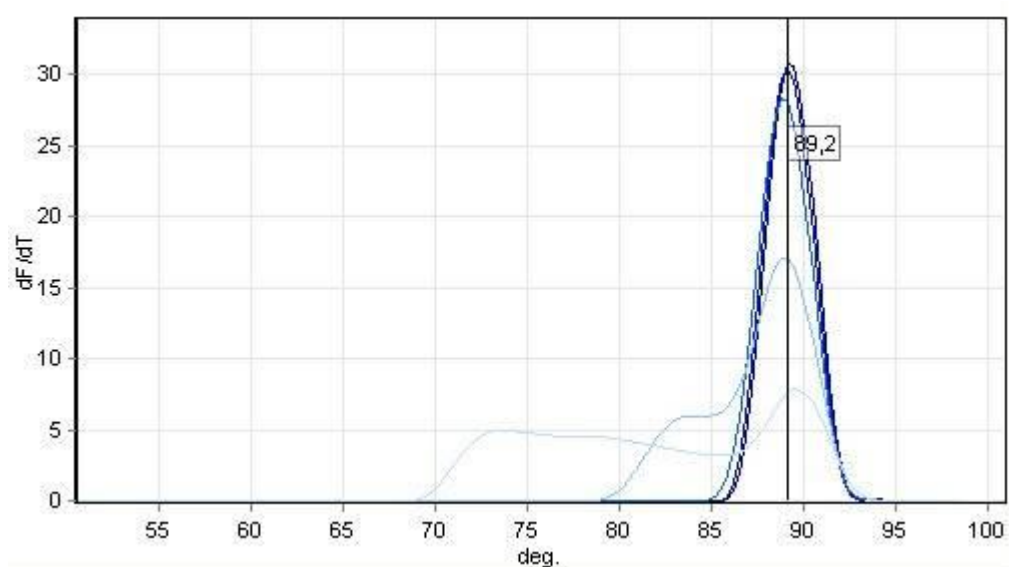
Obr. 22 Semi-log amplifikační křivky DNA pro kalibrační křivku (doména *Bacteria*)



Barva křivky	Množství DNA ve směsi pro qPCR	Hodnota C_t
	10 ng	12,12
	1 ng	16,32
	100 pg	20,02
	10 pg	23,85
	1 pg	26,01

Všechny DNA o různé koncentraci, použité pro kalibrační křivku, se amplifikovaly s různými hodnotami C_t (12,12-26,01).

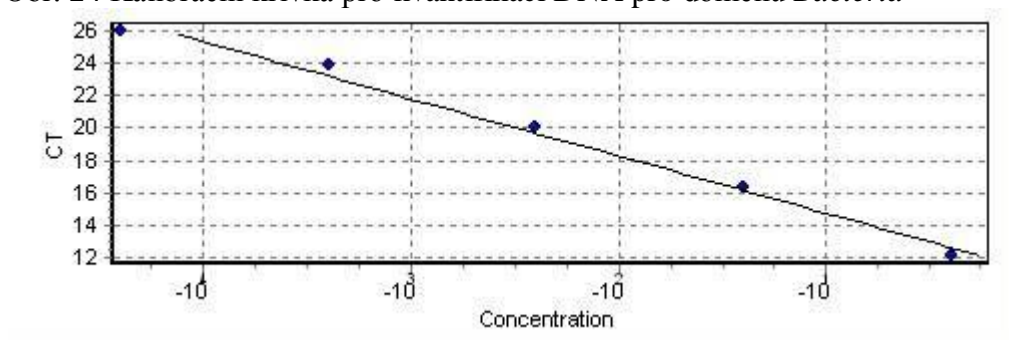
Obr. 23 Křivky tání ampliconů kalibrační křivky pro doménu *Bacteria*



Barva křivky	Množství DNA ve směsi pro qPCR	Hodnota C _t	Pík (T _m)
	10 ng	12,12	89,2
	1 ng	16,32	89,2
	100 pg	20,02	89,2
	10 pg	23,85	89,2
	1 pg	26,01	89,2

U všech produktů qPCR pro kalibrační křivku byl detegován pík o specifické T_m přibližně 89,2 °C.

Obr. 24 Kalibrační křivka pro kvantifikaci DNA pro doménu *Bacteria*



Tabulka 24 Parametry kalibrační křivky pro doménu *Bacteria*

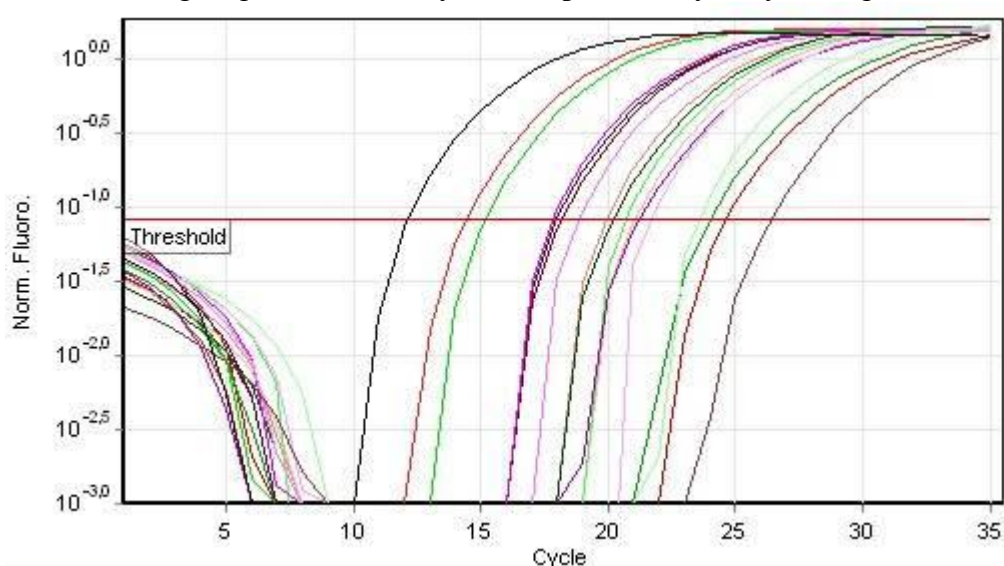
Účinnost reakce (efficiency)	0,91977
M	-3,53045
R ²	0,98934

Byla sestrojena kalibrační křivka s požadovanými parametry (Tabulka 24).

6.8.2 Amplifikace DNA z probiotických výrobků v real-time qPCR (doména *Bacteria*)

Do směsí qPCR byl použit 1 µl DNA izolované z probiotických výrobků. Kvantifikovaná koncentrace přidané DNA je uveden v tabulce k Obr. 25, který zobrazuje semi-log amplifikační křivky DNA jednotlivých výrobků. Na Obr. 26 jsou zobrazeny křivky tání jednotlivých amplikonů.

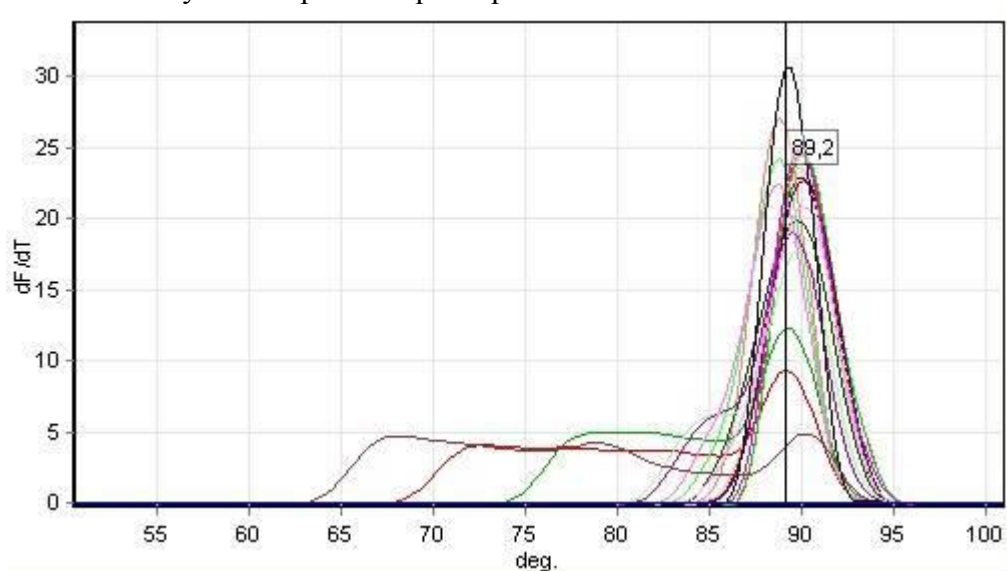
Obr. 25 Semi-log amplifikační křivky DNA z probiotických výrobků pro doménu *Bacteria*



Výrobek	Magn. částice	C _t	Výsledná koncentrace DNA ve směsi qPCR (ng/µl)
Apo-Lactobacillus	F-kol 135 ox	18,15	0,011
Biopron		24,60	0,000
GS Lactobacily		14,42	0,121
Pangamin		19,90	0,003
Probian		21,06	0,002
Apo-Lactobacillus	F-kol 77 ox	20,18	0,003
Biopron		23,96	0,000
GS Lactobacily		15,15	0,076
Pangamin		20,67	0,002
Probian		23,52	0,000
Apo-Lactobacillus	Perovskit	17,96	0,012
Biopron		21,21	0,001
GS Lactobacily		17,79	0,014
Pangamin		18,82	0,007
Probian		21,67	0,001
NK		26,38	0,000
PK		12,11	0,553

Všechny DNA byly amplifikovány s různými hodnotami C_t (tabulka k Obr. 25).

Obr. 26 Křivky tání ampliconů qPCR pro doménu *Bacteria*



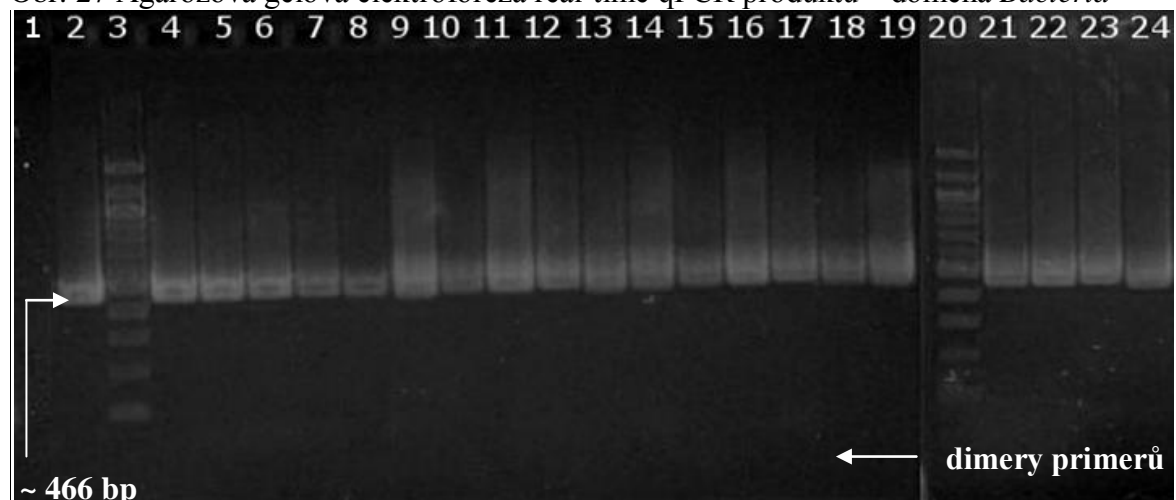
	Výrobek	Magn. částice	Pík (T_m)
	Apo Lactobacillus	F-kol 135 ox	89,2
	Biopron		89,2
	GS Lactobacily		89,2
	Pangamin		89,2
	Probian		89,2
	Apo Lactobacillus	F-kol 77 ox	89,2
	Biopron		89,2
	GS Lactobacily		89,2
	Pangamin		89,2
	Probian		89,2
	Apo Lactobacillus	Perovskit	89,2
	Biopron		89,2
	GS Lactobacily		89,2
	Pangamin		89,2
	Probian		89,2
	NK		
	PK		89,2

Všechny amplicony měly specifickou T_m přibližně 89,2 °C.

6.8.3 Agarózová gelová elektroforéza produktů real-time qPCR pro doménu *Bacteria*

Byla provedena detekce real-time qPCR produktů domény *Bacteria* na agarózovém gelu, výsledek je zobrazen na Obr. 27. Na gel bylo nanášeno 5 μ l produktu qPCR.

Obr. 27 Agarózová gelová elektroforéza real-time qPCR produktů – doména *Bacteria*



Běh	DNA matrice	Magn. částice	Detekce produktu qPCR
1	Negativní kontrola		-
2	Pozitivní kontrola		+++
3	DNA standard		100 bp žebříček
4	10 ng		+++
5	1 ng		+++
6	100 pg		+++
7	10 pg		+++
8	1 pg		+++
9	Apo-Lactobacillus		+++
10	Biopron		+++
11	GS Lactobacily	F-kol 135 ox	+++
12	Pangamin		+++
13	Probian		+++
14	Apo-Lactobacillus		+++
15	Biopron		+++
16	GS Lactobacily	F-kol 77 ox	+++
17	Pangamin		+++
18	Probian		+++
19	Apo-Lactobacillus	Perovskit	+++
20	DNA standard		100 bp žebříček
21	Biopron		+++
22	GS Lactobacily	Perovskit	+++
23	Pangamin		+++
24	Probian		+++

+++ byl detegován silný produkt PCR

- produkt PCR nebyl detegován

U všech DNA byly detegovány amplikony o specifické velikosti asi 466 bp.

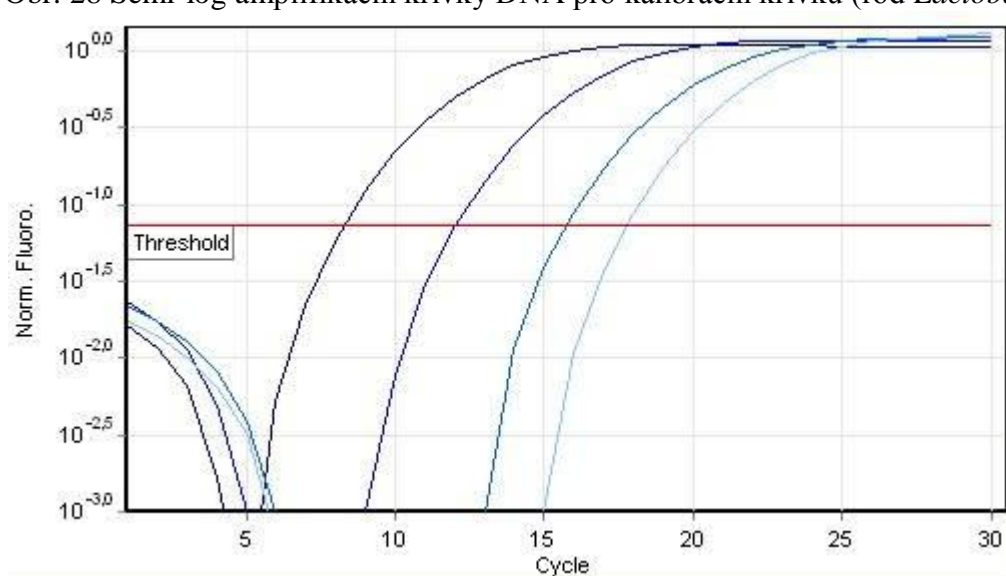
6.9 Kvantifikace DNA z probiotických výrobků v real-time qPCR pro rod *Lactobacillus*





DNA, izolovaná z probiotických výrobků, byla použita pro kvantifikaci v kvantitativní PCR v reálném čase.

6.9.1 Kalibrační křivka pro real-time qPCR (rod *Lactobacillus*)

Do směsi PCR pro kalibrační křivku bylo použito množství DNA 62 ng-62 pg. Amplifikační křivky použité DNA jsou na Obr. 28. Křivky tání jsou uvedeny na Obr. 29 a výsledná kalibrační křivka, která byla použita pro kvantifikaci DNA rodu *Lactobacillus* je zobrazena na Obr. 30 se svými parametry v Tabulce 25.

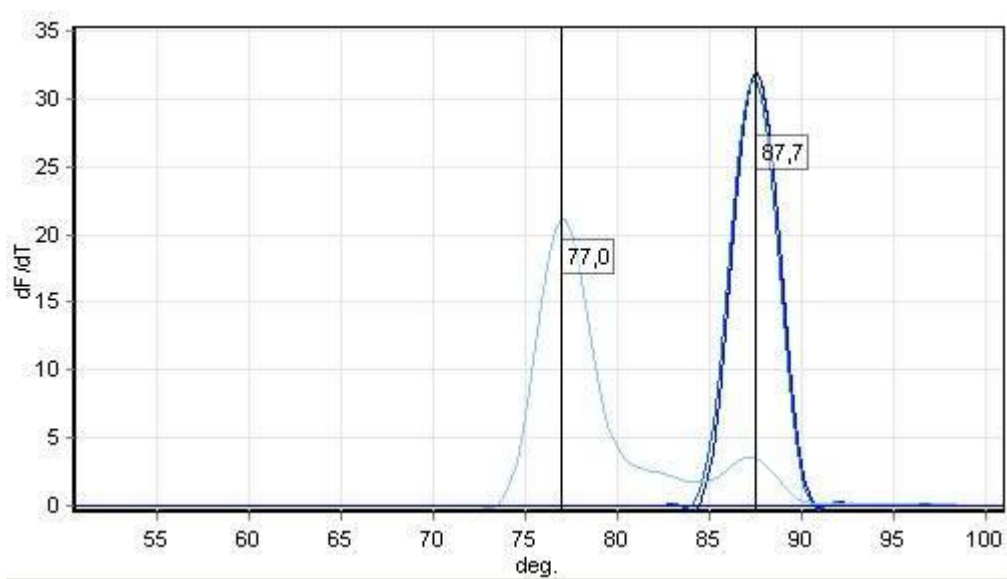
Obr. 28 Semi-log amplifikační křivky DNA pro kalibrační křivku (rod *Lactobacillus*)



Barva křivky	Množství DNA ve směsi pro qPCR	Hodnota C_t
	62 ng	8,28
	6,2 ng	12,00
	620 pg	15,73
	62 pg	17,74

Všechny DNA o různé koncentraci, použité pro kalibrační křivku, se amplifikovaly s různými hodnotami C_t (8,28-17,74).

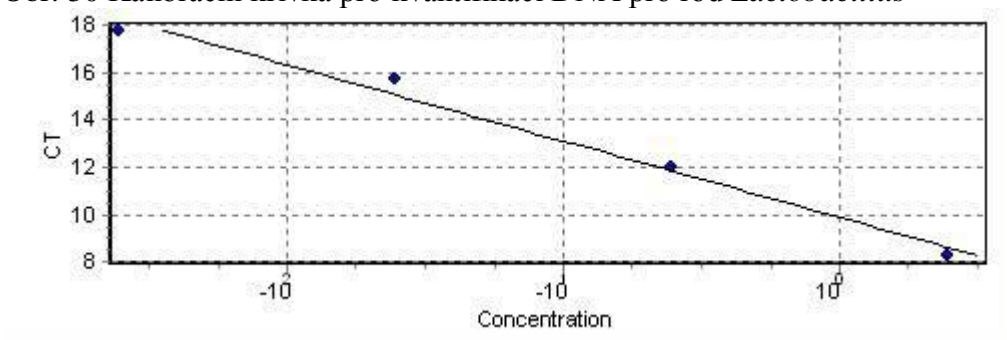
Obr. 29 Křivky tání amplikonů kalibrační křivky pro rod *Lactobacillus*



Barva křivky	Množství DNA ve směsi pro qPCR	Pík (T_m)
Black	62 ng	87,7
Dark Blue	6,2 ng	87,7
Blue	620 pg	87,7
Light Blue	62 pg	87,7; 77,0

U všech produktů qPCR pro kalibrační křivku byl detegován pík o specifické T_m přibližně 87,7 °C a u 62 pg DNA i nespecifický pík o T_m přibližně 77,0 °C.

Obr. 30 Kalibrační křivka pro kvantifikaci DNA pro rod *Lactobacillus*



Tabulka 25 Parametry kalibrační křivky pro rod *Lactobacillus*

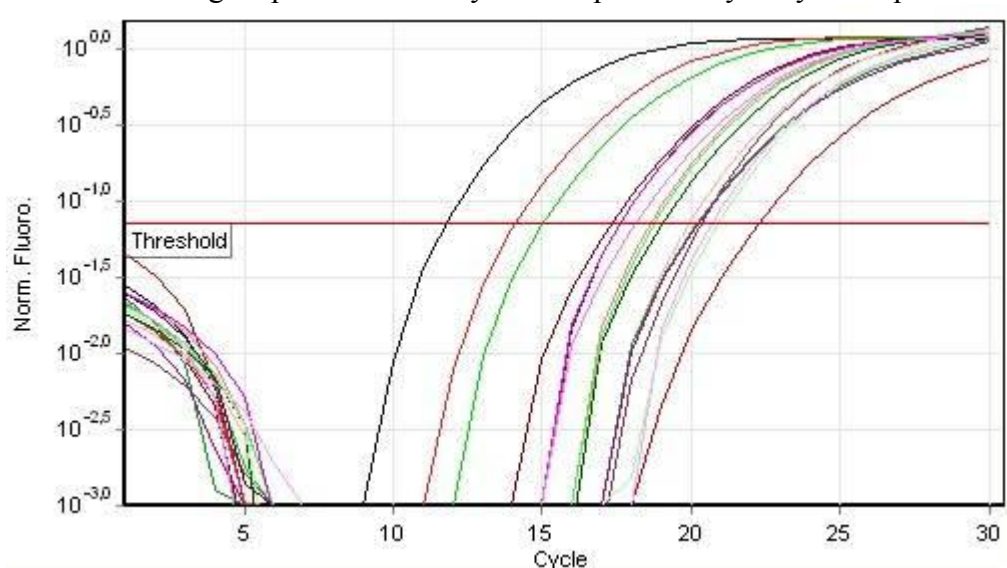
Účinnost reakce (efficiency)	1,04745
M	-3,21324
R^2	0,9852

Byla sestrojena kalibrační křivka s vhodnými parametry (Tabulka 25).

6.9.2 Amplifikace DNA z probiotických výrobků v real-time qPCR (rod *Lactobacillus*)

Do směsi qPCR byl použit 1 µl DNA izolované z probiotických výrobků, kvantifikovaná koncentrace přidané DNA je uvedena v tabulce k Obr. 31, který zobrazuje semi-log amplifikační křivky DNA rodu *Lactobacillus* jednotlivých výrobků. Na Obr. 32 jsou zobrazeny křivky tání jednotlivých specifických amplikonů.

Obr. 31 Semi-log amplifikační křivky DNA z probiotických výrobků pro rod *Lactobacillus*

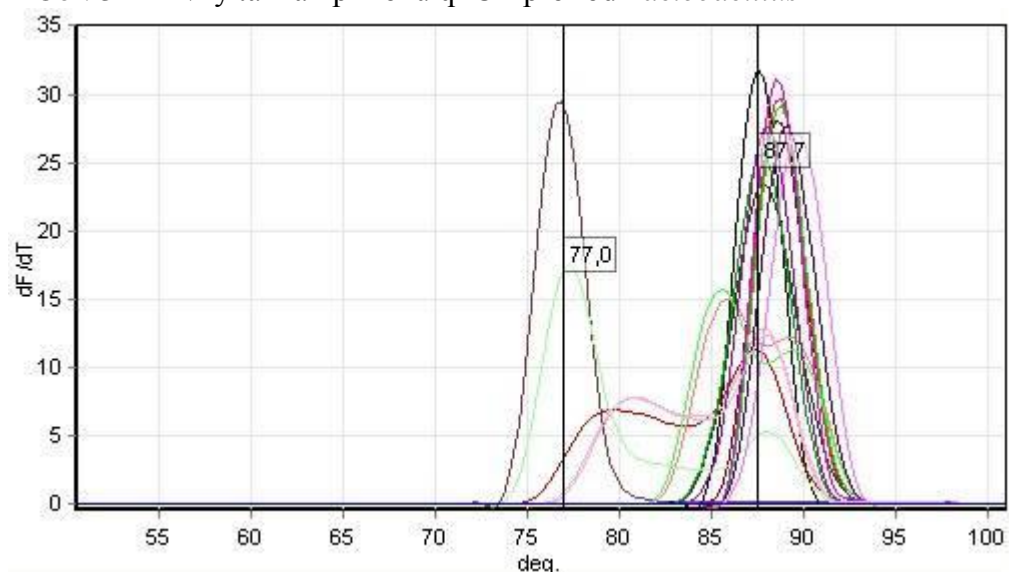


Výrobek	Magn. částice	C _t	Výsledná koncentrace DNA ve směsi qPCR (ng/µl)
NK		20,34	0,0006*
PK		11,76	0,2613
Apo-Lactobacillus	F-kol 135 ox	17,35	0,0047
Biopron		22,28	0,0001*
GS Lactobacily		14,13	0,0478
Pangamin		18,63	0,0019*
Probian		19,94	0,0007*
Apo-Lactobacillus	F-kol 77 ox	19,04	0,0014*
Biopron		20,20	0,0006*
GS Lactobacily		15,07	0,0243
Pangamin		18,76	0,0017*
Probian		20,90	0,0004*
Apo-Lactobacillus	Perovskit	17,62	0,0039
Biopron		20,24	0,0006*
GS Lactobacily		17,63	0,0039
Pangamin		18,15	0,0027
Probian		20,67	0,0004*

* hodnoty mimo poslední bod kalibrační křivky

Všechny DNA byly amplifikovány s různými hodnotami C_t (tabulka k Obr. 31).

Obr. 31 Křivky tání ampliconů qPCR pro rod *Lactobacillus*



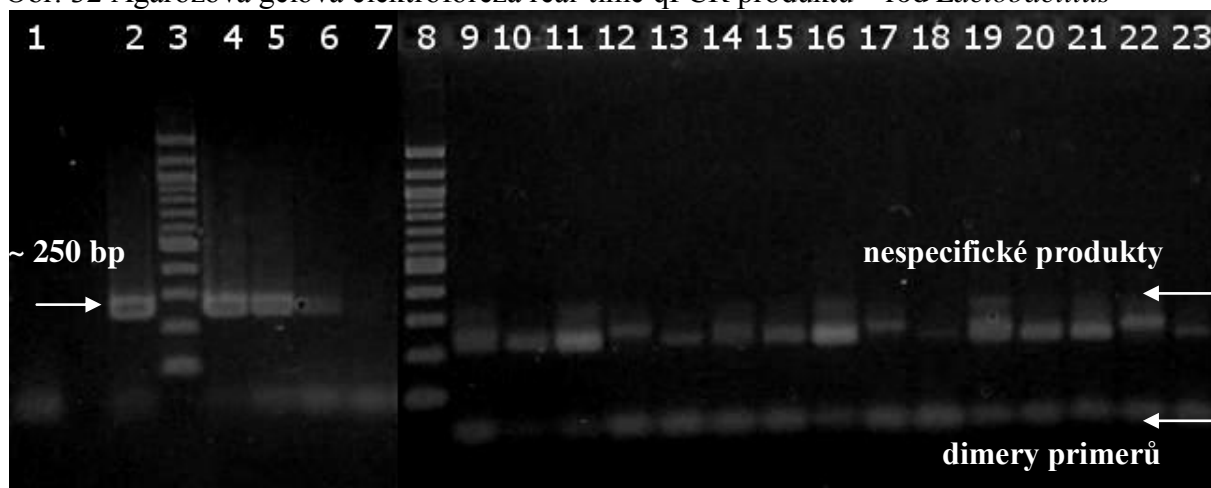
Výrobek	Magn. částice	Pík (T_m)
NK		77,0
PK		87,7
Apo-Lactobacillus		87,7
Biopron		87,7
GS Lactobacily	F-kol 135 ox	87,7
Pangamin		87,7
Probian		87,7
Apo-Lactobacillus		87,7
Biopron		87,7
GS Lactobacily	F-kol 77 ox	87,7
Pangamin		87,7
Probian		87,7
Apo-Lactobacillus		87,7
Biopron		87,7
GS Lactobacily	Perovskit	87,7
Pangamin		87,7
Probian		77,0; 87,7

Všechny amplicony měly specifickou $T_m = 87,7$ °C, u negativní kontroly a DNA z výrobku Probian (F-kol 77 ox) byl detegován nespecifický pík s hodnotou $T_m = 77,0$ °C.

6.9.3 Agarózová gelová elektroforéza produktů real-time qPCR pro rod *Lactobacillus*

Byla provedena detekce produktů real-time qPCR rodu *Lactobacillus* na agarózovém gelu, výsledek je zobrazen na Obr. 32. Na gel bylo nanášeno 5 μ l produktu qPCR.

Obr. 32 Agarózová gelová elektroforéza real-time qPCR produktů – rod *Lactobacillus*



Běh	DNA matrice	Magn. částice	Detekce produktu qPCR
1	Negativní kontrola		-
2	Pozitivní kontrola		+++
3	DNA standard		100 bp žebříček
4	10 ng		+++
5	1 ng		+++
6	100 pg		++
7	10 pg		+/-
8	DNA standard		100 bp žebříček
9	Apo-Lactobacillus		++
10	Biopron		++
11	GS Lactobacily	F-kol 135 ox	+++
12	Pangamin		+
13	Probian		+
14	Apo-Lactobacillus		++
15	Biopron		++
16	GS Lactobacily	F-kol 77 ox	+++
17	Pangamin		+
18	Probian		+
19	Apo-Lactobacillus		+++
20	Biopron		++
21	GS Lactobacily	Perovskit	++
22	Pangamin		++
23	Probian		+

Detekce produktů PCR: +++ silně ++dobře +slabě +/-velmi slabě
- PCR produkt nebyl detegován

U všech DNA byly detegovány specifické amplikony o různé intenzitě. Jsou vidět i nespecifické amplikony a dimery primerů.

7. Diskuze

7.1 Kultivace buněk

Zástupci rodu *Lactobacillus* vyžadují pro svůj růst média bohatá na živiny [2]. Růst sbírkových kmenů rodu *Lactobacillus* probíhal v tekutém MRS médiu. Kontrola čistoty bakteriálních kmenů byla provedena křížovými roztěry na Petriho misky s MRS agarem. Byl detegován nárůst v tekutém médiu za vytvoření zákalu a sedimentu. Na MRS agaru vyrostly jednotlivé kolonie buněk vybraných sbírkových kmenů, charakteristické pro rod *Lactobacillus* - bílé, kulovité s charakteristickým zápachem po mléčné kyselině.

Zvolené médium není selektivní a mohlo dojít k nárůstu morfologicky podobných bakterií mléčného kvašení, jako jsou např. *Bifidiobacterium* [51].

Přibližný počet buněk byl stanoven turbidimetricky. Turbidimetrie je metoda založená na detekci záření v ose paprsku, prošlého vzorkem, které je ochuzené o rozptýlenou složku záření. Toto stanovení je vhodné pro koncentrované vzorky. Výsledek měření značně záleží na podmínkách stanovení. Hlavní vliv na stanovené hodnoty má velikost a tvar obsažených částic. Důležitý je i faktor času, homogenost a míchání vzorku. Pro určení počtu částic je nutné vytvořit kalibrační křivku [52]. Bylo zjištěno, že hodnota $A_{600\text{nm}} = 5,7$ odpovídá asi $2,1 \times 10^9$ cfu/ml (Fričová VUT v Brně, FCH, ústní sdělení). Změřené hodnoty absorbance $A_{600\text{nm}} = 3,84-7,15$ by odpovídaly přibližně $1,41-2,63 \times 10^9$ cfu/ml.

7.2 Separace DNA, izolované metodou fenolové extrakce, magnetickými částicemi F-kol 135 ox

DNA byla izolována z kultivovaných bakteriálních kmenů metodou fenol-chloroformové extrakce s následným srážením DNA ethanolem [53]. Ze všech bakteriálních kmenů bylo izolováno dostatečné množství DNA (1,875-37,350 μg) pro následnou separaci pomocí magnetických částic F-kol 135 ox. Na agarózovém gelu byla detegována DNA i RNA.

Kvalita izolované DNA hraje velmi důležitou roli z hlediska jejího dalšího použití v molekulárně diagnostických metodách. DNA je doprovázena řadou chemických látek (RNA, proteiny, polyfenolické látky atd.), které mohou ovlivňovat (zkreslovat) výsledky nebo i inhibovat např. PCR. UV spektrofotometrie je široce využívanou, jednoduchou metodou pro kontrolu čistoty DNA (RNA). Obecně se zaznamenává průběh spektra v rozmezí vlnových délek 220-320 nm. Absorpční maximum pro nukleové kyseliny (DNA i RNA) se nachází při 260 nm. Hodnota absorbance je závislá na zastoupení jednotlivých párů bází (A-T(U), G-C) v molekule nukleové kyseliny. Koncentraci lze vypočítat dle známého Lambert-Beerova zákona. Z důvodu interference RNA je vhodné doplnit spektrofotometrické měření o stanovení intaktnosti izolované DNA gelovou elektroforézou [42].

DNA kmenů *L. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212/06 a *L. salivarius* CCDM 216/06 byla dle kap. 5.3.2 mírně znečištěna proteiny. Účinnost separace magnetických částic F-kol 135 ox byla 10,2-14,4 %. RNA nebyla na gelu detegována. Separovaná DNA byla následně použita pro PCR a určení citlivostí PCR.

7.3 Amplifikace DNA v PCR pro doménu *Bacteria*, zjištění citlivosti

Pro identifikaci veškerých bakteriálních DNA se využívá primerů F_eub a R_eub, kterými se docílí amplifikace specifického ampliconu o velikosti asi 466 bp [48].

Kvůli tzv. přetížení agarózového gelu bylo nanášeno jen 5 µl produktů PCR. U všech DNA izolovaných z vybraných kultivovaných bakteriálních kmenů byly detegovány na gelu specifické amplicony o dané délce párů bází (kap. 6.3.1).

Pro stanovení citlivosti PCR specifické pro doménu *Bacteria* bylo do reakčních směsí nepipetováno 10 ng-1 fg DNA. Nejmenší množství DNA, které ještě poskytovalo zřetelný specifický amplicon, bylo 100 fg (kap. 6.3.2).

Správnost průběhu PCR byla ověřena detekcí pozitivní a negativní kontroly.

7.4 Amplifikace DNA v PCR pro rod *Lactobacillus*, zjištění citlivosti

K identifikaci bakterií, řazených do rodu *Lactobacillus*, slouží primery LbLMA 1-rev a R-16, které vymezují specifickou délku ampliconu asi 250 bp [49].

Do směsi pro PCR bylo nanášeno různé množství DNA, přičemž došlo k intenzivní (silné) detekci produktů PCR na agarózovém gelu. Na gel bylo nanášeno 20 µl produktů PCR (kap. 6.3.3).

Nejmenší množství DNA, které tvořilo specifický amplicon a bylo detegováno na gelu, bylo 10 pg. DNA byla ověřována v množství 10 ng-1 fg (kap. 6.3.4).

Pozitivní i negativní kontrola byla správně detegována, což prokazuje čistotu práce a ověření účinnosti PCR [42].

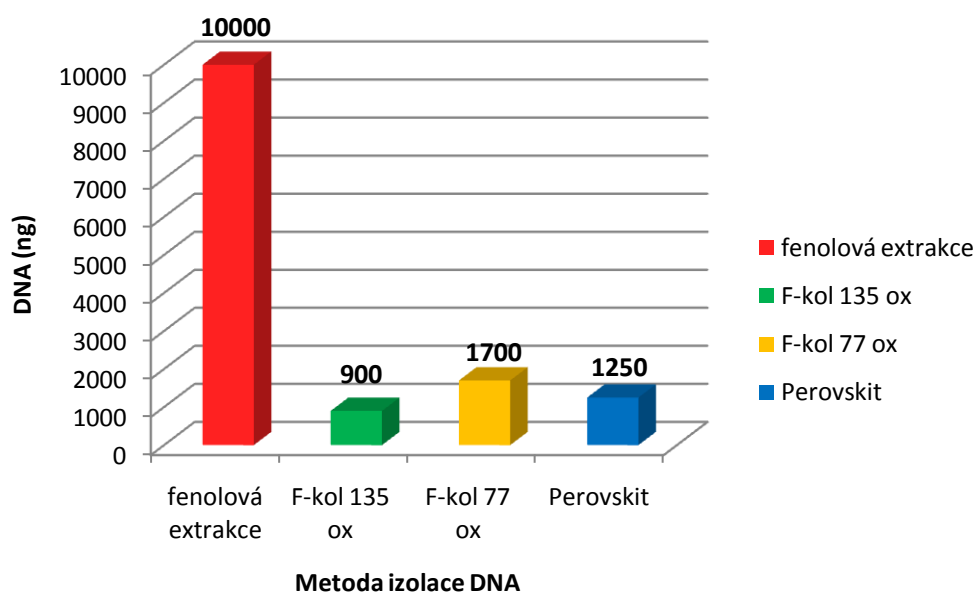
7.5 Srovnání účinnosti izolace DNA magnetickými částicemi a fenolovou extrakcí z hrubých lyzátů buněk

Z připraveného stejného množství (100 µl) hrubého lyzátu buněk bakteriálního kmene *Lactobacillus gasser* K7 byla souběžně izolována testovanými metodami DNA.

Účinnost separace magnetických částic byla vztažena na množství DNA izolované metodou fenolové extrakce (100 %). Nejvíce DNA bylo separováno částicemi F-kol 77 ox (1700 ng), což odpovídá 17% účinnosti, byla však mírně znečištěná proteiny. Z hlediska kvality DNA, která byla určena spektrofotometricky, byla nejlepší DNA izolovaná nanočásticemi Perovskit ($A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}} = 1,923$). Celková množství izolované DNA jsou zobrazeny na Obr. 33. Na gelu byla detegována DNA, u DNA izolované metodou fenolové extrakce i RNA.

Všechny DNA byly naředěny na koncentraci 10 ng/µl a použity k ověření amplifikovatelnosti v PCR pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*. Ve všech případech došlo k amplifikaci specifických ampliconů a detekci silného produktu PCR na gelu.

Obr. 33 Grafické zobrazení izolovaného množství DNA jednotlivými metodami



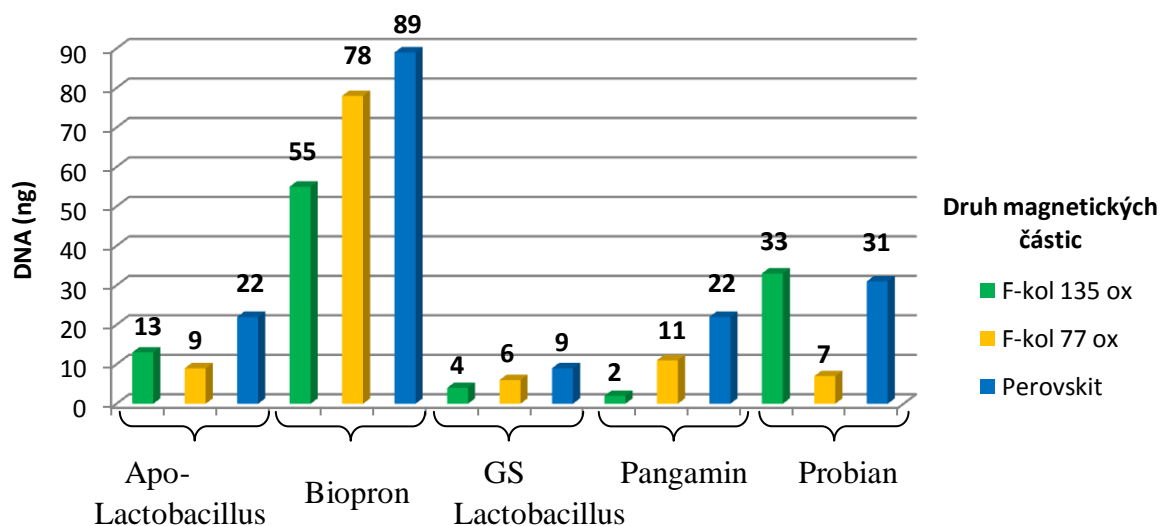
7.6 Izolace DNA z probiotických výrobků

Bakteriální buňky obsažené v probiotických výrobcích byly lyzovány dle kap. 5.2.3 a uvolnění jejich obsahu do roztoku bylo ověřeno na agarózovém gelu (Obr. 19).

K izolaci DNA byly použity magnetické částice F-kol 135 ox, F-kol 77 ox a Perovskit; jako kontrolní metoda byla použita fenolová extrakce s následným srážením DNA ethanolem.

Největší množství DNA bylo izolováno nanočásticemi Perovskit.

Obr. 34 Grafické zobrazení izolovaného množství DNA (v 1 μ l TE pufru) z probiotických výrobků



Na Obr. 34 jsou zobrazeny grafy jednotlivého množství izolované DNA z jednotlivých výrobků. Na kvalitu a množství izolované DNA mohlo mít vliv velké množství DNA a doprovodných látek, což mohlo ovlivnit separační vlastnosti částic.

7.7 PCR s DNA izolovanou z probiotických výrobků

DNA z probiotických výrobků izolovaná magnetickými částicemi a fenolovou extrakcí (kontrola) byla použita do PCR specifické pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*. Byl přidán vždy 1 μ l DNA s původní koncentrací, změřenou spektrofotometricky (Tabulka 23).

U všech DNA byly detegovány specifické produkty PCR s různou intenzitou, která přibližně odpovídala přidávanému množství DNA, pro dané identifikace.

7.8 Real-time qPCR pro doménu *Bacteria*

Byla sestrojena kalibrační křivka s pěti body (10 ng-1 pg) a vhodnými parametry (Tabulka 24), čímž bylo docíleno dostatečného rozpětí pro kvantifikaci DNA z probiotických výrobků. Srovnání množství DNA (různými metodami měření), které bylo přidáváno do směsi pro real-time qPCR je uvedeno v Tabulce 26.

Tabulka 26 Srovnání přidávaného množství DNA do směsi qPCR (1 μ l) určeného spektrofotometricky a kvantitativně (výsledek v real-time qPCR)

Výrobek	Magn. částice	$m_{DNA}(\text{spektrofotometricky})$ (ng)	$m_{DNA}(\text{qPCR})$ (ng)
Apo-Lactobacillus		13	0,27
Biopron		55	0,00
GS Lactobacily	F-kol 135 ox	4	3,02
Pangamin		2	0,09
Probian		33	0,04
Apo-Lactobacillus		9	0,07
Biopron		78	0,01
GS Lactobacily	F-kol 77 ox	6	1,89
Pangamin		11	0,05
Probian		7	0,01
Apo-Lactobacillus		22	0,31
Biopron		89	0,04
GS Lactobacily	Perovskit	9	0,34
Pangamin		31	0,17
Probian		22	0,03

Řádové rozdíly mezi zjištěným množstvím DNA danými metodami mohou být dány možnou interferencí RNA při spektrofotometrickém měření koncentrace DNA, což může nadhodnocovat koncentraci DNA. Nezanedbatelný je i možný vliv dalších doprovodných látek z probiotických výrobků na spektrofotometrické měření. Naopak snížené hodnoty kvantifikované DNA v real-time qPCR mohou být spojeny s inhibicí reakce zmíněnými doprovodnými látkami. Mezi jednotlivými metodami byl časový rozdíl (cca měsíc), čímž mohlo dojít k částečné degradaci uskladněné DNA před kvantifikací v real-time qPCR.

Analýza křivek tání prokázala specifickou T_m s hodnotou přibližně 89,2 °C. U negativní kontroly byl detegován nespecifický produkt, který nebyl vidět na agarózovém gelu. Ostatní

produkty qPCR jsou zřetelně viditelné. Detegované dimery primerů nejsou kvůli zhoršené kvalitě fotografií vidět.

7.9 Real-time qPCR pro rod *Lactobacillus*

Byla sestrojena kalibrační křivka se čtyřmi body (62 ng-62 pg) a vhodnými parametry (Tabulka 25), čímž bylo docíleno částečného rozpětí pro kvantifikaci DNA rodu *Lactobacillus* z probiotických výrobků. Některé koncentrace DNA byly mimo poslední bod kalibrační křivky, nemohlo tedy dojít ke spolehlivé kvantifikaci. Při analýze křivek tání produktů qPCR pro kalibrační křivku byl u hodnoty DNA 10 pg detegován i nespecifický produkt ($T_m = 77,0$), který ale nebyl následně detegován na agarózovém gelu. Množství DNA rodu *Lactobacillus*, které bylo kvantifikováno v přidávaném celkovém množství DNA do směsi pro qPCR, je uvedeno v Tabulce 27.

Tabulka 27 Množství přidávané DNA (1 μ l) rodu *Lactobacillus* ve směsi pro qPCR

Výrobek	Magn. částice	$m_{DNA(qPCR)}$ (ng)
Apo-Lactobacillus		0,119
Biopron		0,003*
GS Lactobacily	F-kol 135 ox	1,195
Pangamin		0,047*
Probian		0,019*
Apo-Lactobacillus		0,035*
Biopron		0,015*
GS Lactobacily	F-kol 77 ox	0,608
Pangamin		0,043*
Probian		0,009*
Apo-Lactobacillus		0,098
Biopron		0,015*
GS Lactobacily	Perovskit	0,097
Pangamin		0,067
Probian		0,011*

* hodnoty mimo rozsah kalibrační křivky.

DNA rodu *Lactobacillus*, která byla spolehlivě kvantifikována, byla izolována z výrobku Apo-Lactobacillus (magnetickými částicemi F-kol 135 ox a Perovskit), GS Lactobacily (magnetickými částicemi F-kol 135 ox, F-kol 77 ox a Perovskit) a Pangamin (magnetickými částicemi Perovskit).

Množství DNA rodu *Lactobacillus* je menší než u kvantifikace celkové DNA, protože jednotlivé probiotické výrobky obsahují pouze část z celkového deklarovaného počtu bakterií z tohoto rodu.

Při analýze křivek tání produktů qPCR u výrobku Probian (F-kol 77 ox) a u negativní kontroly byly detegovány nespecifické píky s hodnotou T_m přibližně 77,0 °C, které nebyly detegovány na gelu. Na agarózovém gelu byly detegovány dimery primerů a nespecifické produkty (Obr. 32).

8. Závěr

Byly kultivovány čisté bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus* – *L. gasseri* K7, *L. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212/06, *L. salivarius* CCDM 216/06. Z těchto kmenů byla izolována DNA fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi F-kol 135 ox. Přečištěná DNA byla použita pro stanovení citlivosti PCR pro doménu *Bacteria* - 100 fg a pro rod *Lactobacillus* - 10 pg.

Při izolaci DNA ze stejného množství hrubého lyzátu buněk bylo největší množství DNA izolováno magnetickými částicemi F-kol 77 ox. Nanočásticemi Perovskit byla separována nejkvalitnější DNA.

DNA z probiotických výrobků byla izolována všemi testovanými magnetickými částicemi. Nejvíce izolované DNA bylo získáno pomocí nanočástic Perovskit, čemuž přibližně odpovídala i intenzita produktů PCR pro doménu *Bacteria* rod *Lactobacillus*.

DNA, která byla izolována z probiotických výrobků, byla použita ke kvantifikaci v kvantitativní polymerázové řetězové reakci v reálném čase pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*. Nejlépe korelovaly hodnoty množství izolované DNA u výrobku GS Lactobacily (F-kol 135 ox a F-kol 77 ox).

Závěrem lze konstatovat, že magnetické částice jsou vhodné pro izolaci DNA z komplexních matic (probiotických výrobků – tablet). Do budoucna je nutné ověřit separační vlastnosti magnetických částic při různých koncentracích DNA (kapacitu magnetických částic).

9. Seznam použité literatury

1. Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
2. Görner, F., Valík, L.: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
3. Sedláček, I.: *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
4. Hugenholtz, J., Kleerebezem, M.: Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current opinion in biotechnology*, 1999, 10, pp. 492-497.
5. Velíšek, J., Hajšlová, J.: *Chemie potravin II*. 3.vyd. Tábor: Osis, 2009. 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
6. Euzéby, J.P.: List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, vol. 47, pp. 590-592. poslední revize 20.4.2011. [cit. 23.4.2011]. Dostupné z <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>>.
7. Entrez Genome Project [databáze online]. *National Center for Biotechnology Information*. [online] [cit. 23.4.2011]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>>
8. Lee Y.K., Salminen, S.: *Handbook of probiotics and prebiotics*. New Jersey: Wiley, 2009. ISBN 978-0-470-13544-0.
9. Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D.: Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2006, vol. 103 no. 42, pp. 15611-15616.
10. Zhang, Z., Ye, Z., Yu, L., Shi P.: Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, vol. 11, no. 1, pp. 1-12.
11. Makarova, K.S., Koonin, E.V.: Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2007, vol. 189 no. 4, pp. 1199-1208.
12. Liu, C., Zhang, Z., Dong, K., Yuan, J., Guo, X.: Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2009, vol. 22, pp. 401-412.
13. Mathur, S., Singh, R.: Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-review. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, vol. 105, pp. 281-295.
14. Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Dubernet, S., Guéguen, M.: Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 126, pp. 278-285 .
15. Rosypal, S., Hoďák, K., Rosypalová, A.: *Obecná mikrobiologie - biologie bakterií - I. díl*. 1. vyd. Brno: Universita J. E. Purkyně v Brně, 1972. 398 s.
16. Němec, M., Horáková, D.: *Základy mikrobiologie pro učitelské studium*. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 1993. 233 s. ISBN 80-210-0817-2.

17. Rosypal, S. a kol.: *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-7183-268-5.
18. Zbořil V., Prokopová L., Hertlová M.: *Mikroflóra trávicího traktu*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005. 153 s. ISBN 80-247-0584-2.
19. Frič, P.: Probiotics and prebiotics - renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine*, 2007, vol. 2, no. 3, pp. 237-270.
20. Guarner, F., Khan, A.G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Mair, T.: Probiotics and prebiotics.: *World Gastroenterology Organisation Practice Guideline*, 2008. [cit. 24.4.2011]. Dostupné z <http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics.pdf>.
21. WHO/FAO.: *Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Řím: WHO/FAO, 2006. ISBN 92-5-105513-0 ISSN 0254-4725.
22. Ljungh, Å., Wadström, T.: *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. 205 p. ISBN 978-1-904455-41-7.
23. Kenifel, W., Salminen, S.: *Probiotics and health claims*. West Sussex: Blackwell, 2011. ISBN 978-1-4051-9491-4.
24. Björkstén, B., Naaber, P., Sepp, E., Mikelsaar, M.: The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and Experimental Allergy*, 1999, vol. 29, no. 3, pp. 342-346.
25. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Veld, J.H.J.H.: Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 41, 1998, pp. 85-101.
26. Nevoral, J.: Probiotika, prebiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*, 2005, č. 2, s. 59-65.
27. Šicho, V., Vodrážka, Z., Králová, B.: *Potravinářská biochemie*. 2. vyd. Praha: SNTL/ALFA, 1981. 360 s. ISBN 04-815-81.
28. Musil, J., Nováková, O.: *Biochemie v obrazech a schématech*. 2. vyd. Praha: Avicenum, 1989. 396 s. ISBN 08-109-89.
29. McMurry, J.: *Organická chemie*. 1.vyd. Brno: Vutium, 2007. 1260 s. ISBN 978-80-214-3291-8.
30. Voet, D., Voetová, J.G.: *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
31. Alberts, B. a kol.: *Základy buněčné biologie Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
32. Rosypal, S.: *Úvod do molekulární biologie 1. díl*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1998. 300 s. ISBN 80-902-5620-1.
33. Šafařík, I., Šafaříková, M.: Use of magnetic technique for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*, 1999, vol. 722, pp. 33-53.
34. Saiyed, M. Z., Ramchand, C.N., Telang, S.D.: Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2008, vol. 20, no. 20, 204153 (5 pp.).
35. McBain, S.C., Yiu, H.H.P., Dobson, J.: Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 169-180.
36. Horák, D., Rittich, B., Španová, A., Beneš, M.J.: Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostic. *Polymer*, 2005, vol. 46, pp. 1245-1255.

37. Španová, A., Rittich, B., Beneš, M.J., Horák, D.: Ferrite supports for isolation of DNA from complex samples and polymerase chain reaction amplification. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1080, pp. 93-98.
38. Křížová, J., Španová, A., Rittich, B., Horák, D.: Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1064, pp. 247-253.
39. Rittich, B., Španová, A., Horák, D., M.J. Beneš, Klesnilová, L., Petrová, K., Rybníkář, A.: Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, vol. 52, pp. 143-148.
40. Klouda, P.: *Základy biochemie*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2005. 144 s. ISBN 80-86369-11-0.
41. Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J.: *Metody molekulární biologie*. 1 vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008. 189 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
42. Španová, A., Rittich, B.: *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
43. Wilhelm, J., Pingoud, A.: Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*, 2003, vol. 4, pp. 1120-1128.
44. Jordan, J.A.: Real-time detection of PCR products and microbiology. *New technologies for life science: A Trends Guide*, Dec. 2000, pp. 61-66.
45. Kubisz, P.: *Reverzibilní imobilizace DNA na nově syntetizovaných magnetických nosičích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2010. 43 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc..
46. Kaman, O., Pollert, E., Veverka, P., Veverka, M., Hadová, E., Knížek, K., Marysko, M., Kaspar, P., Klementová, M., Grünwaldová, V., Vasseur, S., Epherre, R., Mornet, S., Goglio, G., Duguet, E.: Silica encapsulated manganese perovskite nanoparticles for magnetically induced hyperthermia without the risk of overheating. *Nanotechnology*, 2009, vol. 20, no. 27, 275610 (7pp).
47. Zovčáková, M. *Identifikace prbiotických bakterií ve farmakách*. Brno: Vysoké učení technické v Brno, 2010. 66 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc..
48. Haarman, M. a Knol, J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal Bifidobacterium species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, vol. 71, no. 5, pp. 2318-2324.
49. Dubernet, S., Desmaures, N., Guéguen, M.: A PCR-based method for identification of lactobacili at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, vol. 214, pp. 271-275.
50. Sigma-Aldrich.: *qPCR Technical Guide*.: Sigma-Aldrich, 2008. [cit. 24.4.2011]. Dostupné z <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/qPCR_technical_guide.pdf>.
51. Křížová, J., Španová, A. Rittich, B.: RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of Bifidobacterium species. *Folia Microbiol (Praha)*, 2008, vol. 53, no. 2, pp. 99-104.
52. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
53. Sambrook, J., Russel, D.W.: *Molecular cloning: A laboratory manual (II)*. 3rd ed. New York: Cold Spring Laboratory Harbor Press, 2001. 2222 p. ISBN 0-87969-576-5.

54. Bernardeau, M., Guguen, M., Vernoux, J.Paul. Beneficial lactobacili on food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *Federation of European Microbiological Societes*, 2006, vol. 30, pp. 487-513.

10. Použité zkratky

BMK	baktérie mléčného kvašení
bp	pár bází (base pair)
CCDM	Česká sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora (Czech Collection of Dairy Microorganismes)
COGs	klastry ortologních genů (Clusters of Orthologous Genes)
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraocová kyselina
EtBr	ethidium bromid
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
G+C	guanin a cytozin
GMA	glycidyl methakrylát
GRAS	všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognized as Safe)
HEMA	2-hydroxyethyl methakrylát
MRS	Mann, Rogosa, Sharpe (MRS médium)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDI	index polydisperzity
PGMA	poly(glycidyl methakrylát)
P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	poly(2-hydroxyethyl methakrylát- <i>co</i> -glycidyl methakrylát)
P(HEMA- <i>co</i> -EDMA)	poly(2-hydroxyethyl methakrylát- <i>co</i> -ethylen dimethakrylát)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsulfát sodný
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

11. Příloha

Abstrakt k posteru k diplomové práci, který bude prezentován na konferenci Chemistry & Life 2011, 14-16th September 2011, Brno, Czech Republic.

ISOLATION OF DNA FROM PROBIOTIC PRODUCTS USING SOLID CARRIERS

**ONDŘEJ BONCZEK^a, ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ^a, BOHUSLAV RITTICH^{a,b},
ALENA ŠPANOVÁ^{a,b}**

^a*Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic*

^b*Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Tvrdeho 14, 602 00 Brno, Czech Republic*

Lactic acid bacteria are historically defined as a group of microaerophilic, Gram-positive organisms that ferment hexose sugars to produce primarily lactic acid¹. Bacteria of the genus *Lactobacillus* are important group of the lactic acid bacteria. In humans, *Lactobacillus* species are symbiotic and are found in normal gastrointestinal microflora². They play an important role in the food industry because they significantly contribute to the flavour, texture, and the nutritional value of food products.

Molecular methods such as PCRs are essential for correct identification *Lactobacillus* cells at the genus or species levels. Polymerase chain reaction (PCR) can be used for identification of probiotics in food products. The aim of this work was to isolate PCR-ready DNA. Bacterial DNA was isolated from lysed cells of *Lactobacillus* in probiotic products. Reversible DNA adsorption on the surface of solid particles. Carboxyl coated nonporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate-*co*-glycidyl methacrylate) (P(HEMA-*co*-GMA)) magnetic particles and silicagel coated manganese Perovskite (La_{0,75}Sr_{0,25}MnO₃) nanoparticles were used for this purpose. Classical procedure of phenol extraction and DNA precipitation with ethanol was used as control. DNA was adsorbed on the surface of the microspheres in the presence of 16 % poly(ethylenglycol) (PEG 6000) and 2 M sodium chloride (NaCl) concentrations³. The adsorbed DNA was released from the surface of particles by low ionic strength TE buffer (pH= 8.0). The quality of isolated DNA was checked by spectrophotometric measurement and PCR amplification.

All the DNA samples isolated using magnetic particles and phenol extraction procedure were PCR-ready. The DNA isolated from lysed cells of probiotic products was quantified in real-time qPCR.

REFERENCES

1. Carr F.J., Chill D., Maida N.: Crit. Rev. Microbiol. 28(4), 281-370 (2002)
2. Zhang Z., Ye Z., Yiu L., Peng S.: BMC Evol. Biol. 11,1 (2011).
3. Rittich B., Španová A., Šálek P., Němcová P., Trachtová Š., Horák D.: J. Magn. Magn. Mat. 321(10), 1667-1670 (2009).