



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

PCR IDENTIFIKACE NEPATOGENNÍCH BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

PCR IDENTIFICATION OF NONPATHOGENIC BACTERIA STRAINS IN CHEESES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. NELA JUREČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2010



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0371/2009** Akademický rok: **2009/2010**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Nela Jurečková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

PCR identifikace nepatogenních bakterií izolovaných ze sýrů

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

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

Bc. Nela Jurečková
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Různé druhy rodu *Bifidobacterium* jsou součástí běžné střevní flóry lidí i zvířat. Jsou známé pro svůj prospěšný vliv na zdraví a proto je lze využít v potravinách a farmaceutických produktech jako probiotika. Mimo jogurty a fermentovaná mléka lze nyní využít i sýr jako potravinový nosič probiotických bakterií. Tato diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci izolace bakterií rodu *Bifidobacterium*. K izolaci DNA byly použity magnetické částice (P(HEMA-co-GMA)) v přítomnosti 8% polyethylenglykolu PEG 6000 a 5 M chloridu sodného a metoda fenolové extrakce s následným přesrážením ethanolem. Izolovaná DNA pak byla použita v doménově, rodově i druhově specifických PCR. Metoda optimalizovaná pro průkaz bakterií rodu *Bifidobacterium* v tvrdých sýrech byla testována na experimentálně připravených probiotických sýrech, které obsahovaly potenciální probiotické bakterie ze sbírky Laktoflóra. Tyto bakterie byly zařazeny do druhu pomocí PCR s druhově specifickými primery. Ve všech vzorcích probiotických sýrů byla prokázána přítomnost bakterií druhu *Bifidobacterium animalis*.

ABSTRACT

Different species of genus *Bifidobacterium* are part of human and animal intestinal flora. These bacteria have benefit effects and therefore they are used in foods and pharmaceutical products as probiotics. Cheese is now suitable as a probiotic matrix except yoghurts and fermented milks. This diploma thesis was focused on optimization of DNA isolation from bacteria of genus *Bifidobacterium*. Magnetic microparticles (P(HEMA-co-GMA)) were used for DNA isolation in presence of 8% polyethyleneglycol PEG 6000 and 5 M sodium chloride. Phenol extraction was also used as an isolation method. Isolated DNA was used for amplification in domain, genus and species specific PCRs. Optimized method was tested for detection of bacteria of genus *Bifidobacterium* in experimentally prepared probiotic cheeses. These cheeses contained potential probiotic bacteria from Laktoflóra collection. Bacteria were identified into species using species specific PCR. Species *Bifidobacterium animalis* was identified in all samples of probiotic cheeses.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bifidobacterium, sýr, magnetické částice, izolace DNA, amplifikační metody (PCR)

KEY WORDS

Bifidobacterium, cheese, magnetic microparticles, DNA isolation, amplification methods (PCR)

JUREČKOVÁ, N. *PCR identifikace nepatogenních bakterií izolovaných ze sýrů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 87 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Mé upřímné poděkování patří paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce a věnovaný čas. Ráda bych poděkovala doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi za cenné rady a připomínky. Můj nemalý dík patří také kolegyni z laboratoře Mgr. Kristýně Turkové toho času studující doktorské studium.

1	ÚVOD	11
1.1	Rod <i>Bifidobacterium</i>	11
1.1.1	Historie	11
1.1.2	Charakteristika	11
1.1.3	Metabolismus	12
1.1.4	Taxonomie a fylogeneze	12
1.1.5	Výskyt a využití	13
1.2	Probiotické vlastnosti	14
1.2.1	Probiotika	14
1.2.2	Kritéria výběru probiotických mikroorganismů	14
1.2.3	Účinky probiotik na lidský organismus	16
1.3	Probiotické sýry	17
1.3.1	Výroba sýru	18
1.3.2	Technologické překážky a stabilita probiotických sýrů	18
1.3.3	Senzorické vlastnosti proiotických sýrů	20
1.4	Magnetické separační techniky	20
1.4.1	Výhody a využití magnetických částic	21
1.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	22
1.5.1	Princip a mechanismus PCR	22
1.5.2	Komponenty PCR a reakční podmínky	23
1.5.3	Inhibitory polymerázové řetězové reakce	25
2	CÍL PRÁCE	26
3	MATERIÁL A METODY	27
3.1	Bakteriální kultury	27
3.2	Vzorky sýra	27
3.3	Chemikálie	27
3.4	Magnetické nosiče	28
3.5	Kultivační médium	28
3.6	Roztoky	28
3.6.1	Zásobní roztoky	28
3.6.2	Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA	28
3.6.3	Roztoky pro izolaci DNA magnetickými nosiči	29
3.6.4	Roztoky na agarózovou elektroforézu	30
3.6.5	Komponenty pro PCR	31
3.7	Pomůcky a přístroje	32
3.8	Použité metody	32
3.8.1	Příprava hrubých lyzátů buněk čisté kultury	32
3.8.2	Příprava hrubého lyzátu buněk ze sýru	33

3.8.3	Příprava hrubých lyzátů buněk ze sýru s přídavkem <i>Bifidobacterium animalis</i> RB1-MP	33
3.8.4	Izolace DNA fenolovou extrakcí	33
3.8.5	Přesrážení DNA ethanolem	33
3.8.6	Přečištění magnetických částic EDTA	34
3.8.7	Příprava směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů	34
3.8.8	Izolace DNA s využitím magnetických nosičů	34
3.8.9	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	35
3.8.10	Polymerázová řetězová reakce	35
3.8.10.1	PCR s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	36
3.8.10.2	Rodově specifická PCR	36
3.8.10.3	Druhově specifická PCR	37
3.8.11	Agarózová elektroforéza PCR produktů	38
3.8.11.1	Příprava agarózového gelu	38
3.8.11.2	Nanášení vzorků na agarózový gel	38
3.8.11.3	Průběh gelové elektroforézy a vizualizace DNA	38
4	VÝSLEDKY	39
4.1	Kultivace bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i>	39
4.1.1	Kultivace <i>Bifidobacterium animalis</i> RB1-MP v pevném médiu a ověření jeho čistoty	39
4.1.2	Ředění tekuté kultury <i>Bifidobacterium animalis</i> RB1-MP a stanovení počtu buněk (cfu/ml)	40
4.2	Izolace DNA z kultury <i>Bifidobacterium animalis</i> RB1-MP	40
4.3	Ověření amplifikovatelnosti DNA a stanovení citlivosti PCR	41
4.3.1	Určení nejmenšího množství DNA amplifikované v rodově specifické PCR s primery Bif 164 a Bif 662	41
4.3.2	Určení nejmenšího množství DNA amplifikované v rodově specifické PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2	42
4.3.3	Určení nejmenšího množství DNA amplifikované v druhově specifické PCR <i>B. animalis</i> s použitím primerů Pbi R1 a Ban F2	43
4.3.4	Srovnání citlivosti provedených PCR	44
4.4	Příprava hrubých lyzátů buněk ze sýru s přídavkem <i>Bifidobacterium animalis</i> RB1-MP a izolace DNA metodou fenolové extrakce a pomocí magnetického nosiče	44
4.4.1	Příprava hrubého lyzátu buněk ze sýru s přídavkem <i>Bifidobacterium animalis</i> RB1-MP	45
4.4.2	Izolace DNA ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> RB1-MP metodou fenolové extrakce	46
4.4.3	Izolace bakteriální DNA ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> RB1-MP pomocí magnetických nosičů	46
4.4.4	Srovnání metod izolace DNA ze vzorku sýra s přídavkem <i>B. animalis</i> RB1-MP	47
4.5	Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	48
4.6	Rodově specifická PCR s primery Bif 164 a Bif 662	49
4.6.1	Amplifikace DNA izolované ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> fenolovou extrakcí	49
4.6.2	Amplifikace DNA izolované ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> magnetickými částicemi	50

4.6.3	Souhrn výsledků rodově specifických PCR s primery Bif 164 a Bif 662	51
4.7	Rodově specifická PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2	52
4.7.1	Amplifikace DNA izolované ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> fenolovou extrakcí.....	52
4.7.2	Amplifikace DNA izolované ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> magnetickými nosiči.....	53
4.7.3	Shrnutí výsledků rodově specifické PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2.....	53
4.8	Druhově specifická PCR <i>B. animalis</i> s primery Pbi R1 a Ban F2	54
4.8.1	Amplifikace DNA izolované ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> fenolovou extrakcí.....	54
4.8.2	Amplifikace DNA izolované ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> magnetickými částicemi ..	55
4.8.3	Shrnutí výsledků druhově specifické PCR s primery Pbi R1 a Ban F2.....	55
4.9	Zakoncentrování DNA izolované magnetickými částicemi	56
4.9.1	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	56
4.9.2	Amplifikovatelnost zakoncentrované DNA s primery pro doménu <i>Bacteria</i>	56
4.9.3	Rodově specifická PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i>	58
4.10	Příprava hrubých lyzátů z reálných vzorků probiotických sýrů typu eidam.....	59
4.11	Izolace DNA z probiotických sýrů metodou fenolové extrakce	60
4.12	Izolace DNA z probiotických sýrů pomocí magnetických nosičů	60
4.13	Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z probiotických sýrů s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	61
4.14	Rodově specifická PCR s primery Bif 164 a Bif 662.....	62
4.14.1	Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí.....	62
4.14.2	Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí – navýšení množství DNA v PCR směsi a cyklů PCR	63
4.14.3	Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů magnetickými částicemi	64
	obrázku 25.....	64
4.14.4	Souhrn výsledků rodově specifické PCR s primery Bif 164 a Bif 662.....	64
4.15	Rodově specifická PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2	65
4.15.1	Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí.....	65
4.15.2	Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů magnetickými nosiči.....	66
4.15.3	Souhrn výsledků rodově specifické PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2.....	66
4.16	Zařazení bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> do druhu s využitím druhově specifických PCR	67
4.16.1	Druhově specifická PCR <i>B. longum</i>	67
4.16.2	Druhově specifická PCR <i>B. infantis</i>	68
4.16.3	Druhově specifická PCR <i>B. bifidum</i>	69
4.16.4	Druhově specifická PCR <i>B. animalis</i>	70
4.16.5	Shrnutí výsledků druhově specifických PCR	71
4.17	Stanovení množství bakterií <i>B. animalis</i> v probiotických sýrech	71
4.17.1	Srovnání výsledků amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči.....	73
5	DISKUZE	74

5.1	Kultivace buněk	74
5.2	Izolace bakteriální DNA a spektrofotometrie	74
5.3	PCR s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	74
5.4	Rodově specifická PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i>	75
5.5	Druhově specifická PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	75
5.6	Zakoncentrování DNA izolované magnetickými částicemi	76
5.7	Doménově a rodově specifická PCR s zkoncentrovanou DNA.....	76
5.8	Příprava hrubých lyzátů buněk z reálných vzorků probiotických sýrů	76
5.9	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	77
5.10	Ověření amplifikace v doménově a rodově specifické PCR.....	77
5.11	Druhové zařazení bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> přítomných v probiotických sýrech.....	78
5.12	Stanovení množství cílové DNA.....	78
6	ZÁVĚR	79
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	80
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	86
9	PŘÍLOHY.....	87

1 ÚVOD

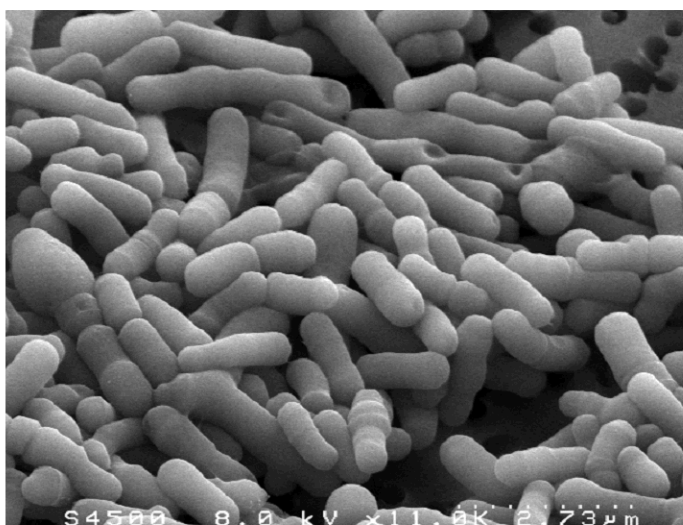
1.1 Rod *Bifidobacterium*

1.1.1 Historie

Bakterie rodu *Bifidobacterium* poprvé izoloval roku 1900 Tissier ze stolice kojenců a pojmenoval je jako *Bacillus bifidus*. V roce 1920 Holland zařadil tyto bakterie do čeledi *Lactobacillaceae* a pojmenoval jako *Lactobacillus bifidus*. V roce 1924 Orla-Jensen navrhl zařazení těchto bakterií do samostatného rodu *Bifidobacterium*. Na základě podobnosti s bakteriemi rodu *Lactobacillus* byly bifidobaktérie dlouho řazeny mezi laktobacily [1]. V roce 1957 byl pro ně vytvořený nový rod *Bifidobacterium*. K tomuto kroku vedly jeho charakteristické morfologické, fyziologické a biochemické vlastnosti [2].

1.1.2 Charakteristika

Bifidobakterie jsou gram-pozitivní a nesporulující [3], kataláza-negativní bakterie [2]. Jedná se o nepohyblivé tyčinky, mají velmi rozmanitý tvar, obvykle jsou mírně zakřivené a kyjovité a často zhuštělé či s náznaky větvení. Jsou uspořádané jednotlivě, po dvou ve „V“ seskupení, občas i v řetězcích, palisádách nebo růžicích. Příležitostně vykazují ztlustěné kokovité tvary [4]. Morfologicky jsou podobné některým druhům laktobacilů, proto byly také dříve k laktobacilům řazeny [5]. Morfologie *Bifidobacterium animalis* je uvedena na Obr. 1. Jedná se o anaerobní bakterie, některé druhy mohou tolerovat nízké koncentrace kyslíku [5], ale jen za přítomnosti CO₂ nebo biogenních faktorů. Na Petriho miskách za aerobních podmínek nerostou. Jejich optimální růst je v rozmezí 37 až 41°C, hraniční teploty jsou v rozmezí 25 až 28 °C (minimum) a 43 až 45 °C (maximum). Jejich optimální hodnota pH pro růst je 6,5 až 7,0. Nerostou při pH 4,5 až 5,0 a 8,0 až 8,5. Jejich kolonie jsou na tuhých médiích hladké, vypouklé s hladkými okraji, smetanově bílé, lesklé a měkké konzistence [2].



Obr. 1: *Bifidobacterium animalis* [6]

1.1.3 Metabolismus

Bifidobakterie jsou chemoorganotrofy, které aktivně fermentují řadu cukrů za produkce převážně kyseliny octové a mléčné v molárním poměru 3:2. Naopak CO₂, kyselinu máselnou ani propionovou netvoří [4]. Některé kmeny vykazují v mléku mírnou proteolytickou aktivitu [2]. Mohou také fermentovat laktózu, galaktózu a některé pentózy [5]. Klíčovým enzymem v jejich metabolismu je fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza, která štěpí fruktózo-6-fosfát na erytrózo-4-fosfát a acetyl fosfát [1].

1.1.4 Taxonomie a fylogeneze

Taxonomické zařazení bakterií rodu *Bifidobacterium* je následující [7].

Doména:	<i>Bacteria</i>
Oddělení:	<i>Firmicutes</i>
Třída:	<i>Actinobacteria</i>
Řád:	<i>Bifidobacteriales</i>
Čeleď:	<i>Bifidobacteriaceae</i>
Rod:	<i>Bifidobacterium</i>

Všechny druhy patřící do rodu *Bifidobacterium* byly identifikovány na základě analýzy genů pro 16S rRNA a 23S rRNA a tvoří nezávislou fylogenetickou větev [7]. Rod *Bifidobacterium* byl rozčleněn na 5 podskupin na základě analýzy genových sekvencí kódujících 16S rRNA (Obr. 2). Na základě ribotypizace byl tento rod rozčleněn do 9 klastřů, ze kterých je zřejmá mezidruhová genetická diverzita [8].

Rod *Bifidobacterium* zahrnuje v současné době 29 druhů, z nichž některé se dále člení do poddruhů nebo biotopů [9].

Tab. 1: Výskyt vybraných zástupců rodu *Bifidobacterium* [1].

Druh	Prostředí, ve kterém se vyskytují
<i>B. bifidum</i>	stolice dospělých lidí, kojenců a telat; vagína lidí
<i>B. breve</i>	stolice kojenců a telat; vagína lidí; odpadní vody
<i>B. dentium</i>	zubní kaz; ústní dutina; stolice dospělých lidí; apendix
<i>B. gallicum</i>	stolice lidí
<i>B. infantis</i>	stolice kojenců a telat
<i>B. lactis</i>	fermentované mléko
<i>B. longum</i>	stolice dospělých lidí, kojenců a telat; vagína lidí; odpadní vody
<i>B. suis</i>	stolice telat

Bifidobakterie mají antagonistický účinek proti různým střevním patogením mikroorganismům včetně druhů *Escherichia coli*, *Shigella dysenterie* a *Yersinia enterocolitica*. Patogenní mikroorganismy jsou eliminovány díky tomu, že bifidobakterie produkují velké množství kyselin a tak snižují okolní pH, čímž je růst patogenů potlačen [1]. Bifidobakterie jsou známé pro svůj pozitivní vliv na zdraví a jsou proto používány jako probiotika v potravinách a farmaceutických produktech [10]. Jako probiotika jsou používány hlavně *B. longum*, *B. infantis* a *B. bifidum* [12].

1.2 Probiotické vlastnosti

1.2.1 Probiotika

Termín pochází ze dvou řeckých slov pro a bios = pro život a je protikladem termínu antibiotikum, z řeckého anti = proti a bios = život. Navrhl ho Parker v roce 1974 a označil jím organismy i látky, které přispívají k mikrobiální rovnováze v trávicím ústrojí hospodářských zvířat. Později se tímto pojmem rozuměly živé mikroorganismy, které byly podávány nejen zvířatům, ale i lidem, s cílem optimalizovat prostředí v trávicím ústrojí [13].

Nyní jsou probiotika definovány jako živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány v dostatečném množství, mají pozitivní efekt na zdraví hostitele [14]. Probiotická potravina je definována jako zpracovaný produkt, který obsahuje živé probiotické mikroorganismy ve vhodné matici a dostatečné koncentraci [15]. Tedy jejich viabilita a metabolická aktivita musí být udržována během všech kroků výroby potraviny, od počátku výrobního procesu až po požití konzumentem a musí být schopny přežít v gastrointestinálním traktu [16].

1.2.2 Kritéria výběru probiotických mikroorganismů

Vliv probiotických kmenů na lidské zdraví musí být vědecky ověřen [17]. Všechny nové kmeny musí být testovány zvláště, nelze předpokládat vlastnosti na základě příbuznosti kmenů. Jsou testovány biochemické vlastnosti, využití kmene a další vlastnosti [18], které jsou testovány na laboratorních zvířatech jako jsou myši, popřípadě prase, nebo na dynamických modelech GIT traktu *in vitro* [19]. Výsledky musí být potvrzeny nezávislými vědeckými skupinami a publikovány ve vědecké literatuře [18].

Teoretický základ výběru probiotického mikroorganismu zahrnuje bezpečí, funkční a technologická hlediska [20]. Aspekty bezpečí zahrnují následující body :

- bakteriální druhy určené pro člověka jsou přednostně lidského původu
- bakterie jsou izolovány ze zdravého gastrointestinálního traktu člověka
- v minulosti nebyly patogenní
- v minulosti nebyly spojeny s infekční endokarditidou a poruchami GIT traktu
- nedekongugují žlučové soli (nekonjugované nebo dekarboxylované žlučové soli by mohly negativně působit v tenkém střevu [21])
- nejsou nositeli genu pro rezistenci antibiotik

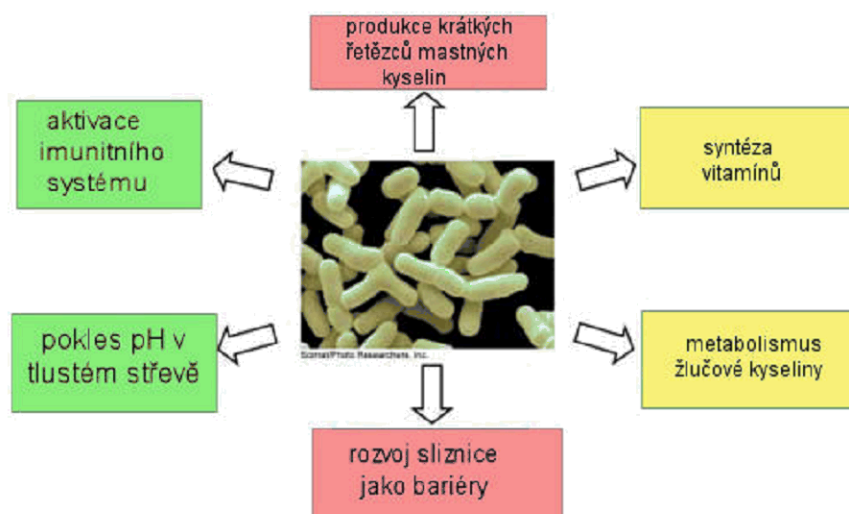
Funkční požadavky na probiotika by měly být stanoveny s použitím metod *in vitro* a výsledky těchto studií by měly být potvrzeny kontrolními studii. Při výběru vhodného probiotického druhu by mělo být zvaženo několik hledisek:

- tolerance ke kyselému prostředí GIT člověka
- tolerance ke žlučovým kyselinám (důležitá vlastnost pro přežití v tenkém střevě)
- adheze k buňkám střevního epitelu a persistence v GIT člověka
- imunostimulace, ale bez proinflamatorního efektu
- antagonistická aktivita vůči patogenům jako je *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* a *Clostridium difficile*.
- antimutagení a antikarcinogenní vlastnosti

Ačkoliv splňují probiotické druhy nezbytné vlastnosti jako je bezpečnost a funkční kritéria, jsou také velmi důležité další aspekty spojené s produkcí probiotik a s výrobou probiotických potravin. Při výběru probiotického druhu je potřeba brát v úvahu také některá technologická hlediska, jako jsou:

- dobré senzorycké vlastnosti; rezistence k fágům
- viabilita v průběhu celého procesu ; stabilita v produktu a během skladování

Dobrá viabilita a aktivita probiotik je považována za nutný předpoklad optimální funkčnosti. Nicméně několik studií prokázalo, že neviabilní probiotika mohou mít také příznivé účinky jako např. regulaci imunity a vázání karcinogenů v těle hostitele [22]. Některé účinky probiotických bakterií jsou uvedeny na Obr.3.



Obr.3: Vybrané účinky probiotických mikroorganismů [23]

1.2.3 Účinky probiotik na lidský organismus

Probiotické druhy mají prospěšný vliv na lidské zdraví [24] a jsou považovány za nepatogenní a bezpečné. Ovšem bylo zaznamenáno, že i tyto mikroorganismy mohou být infekční nebo mít nepříznivé účinky například pokud je intestinální funkce silně narušena u podvyživených dětí nebo dospělých pacientů, a u immunosupresivních pacientů [25]. Prospěšné účinky probiotik jsou následující:

- Snížení výskytu alergie – v průmyslových státech stoupá počet výskytu alergie. Alergie je nepřiměřená reakce imunitního systému na antigenní podnět. Léčba pomocí probiotik je účinná u novorozenců a malých dětí. Pozitivní výsledky nebyly zatím prokázány u starších dětí a dospívajících [26].
- Snížení výskytu rakoviny – hypotézou je, že probiotické kultury mohou snížit expozici chemickým karcinogenům detoxikací přijímaných karcinogenů; změnou intestinálního prostředí a tím pádem snížení populace nebo metabolické aktivity bakterií, které mohou produkovat karcinogení sloučeniny; produkcí metabolitů (např. butyrátu), který podporuje schopnost buněk odumřít v okamžiku, kdy mají umřít (proces známý jako apoptóza nebo programovaná buněčná smrt); produkcí látek, které inhibují růst buněčných tumorů nebo stimulací imunitního systému vedoucí k lepší obraně vůči rakovinovému bujení.
Vědci zkoumali vliv konzumace fermentovaného mléka, probiotických bakterií, bakteriálních látek nebo bakteriálního extraktu a přišli na to, že došlo ke:
 - snížení výskytu chemicky indukovaných tumorů u krys
 - snížení aktivity fekálních enzymů (β -glucuronidázy, azoreduktázy, nitroreduktázy a 7- α -dehydrogenázy), které podle předpokladů hrají roli u rakoviny tlustého střeva lidí a zvířat
 - degradaci nitrosoaminů
 - oslabení mutagení aktivity látek testovaných v laboratoři
 - prevenci poškození DNA v určitých buňkách tlustého střeva
 - vazbě mutagenů *in vitro* látkami z buněčné stěny probiotických bakterií
 - zlepšení činnosti imunitního systémuTyto výsledky naznačují, že probiotické kultury mohou pozitivně ovlivnit gastrointestinální prostředí a snížit riziko rakoviny [27]
- Snížení hladiny cholesterolu v séru – probiotické bakterie fermentují nestravitelné sacharidy a produkují krátké řetězce mastných kyselin ve střevě. Ty pak mohou způsobit snížení hladiny lipidů v krvi inhibicí syntézy cholesterolu v játrech a rozšíření cholesterolu z plasmy do jater [28]. Bifidobakterie mohou enzymaticky dekonjugovat žlučové kyseliny, čímž se reguluje hladina cholesterolu v krvi [29].
- Diarrhea – probiotika mají preventivní a léčebný účinek na několik typů diarehy různého původu [30].

- Hypertenze – výsledky vědeckých prací dokazují, že konzumace určitých laktobacilů nebo produktů z nich vytvořených mohou snižovat krevní tlak u mírně hypertenzních jedinců. Aby byl efekt účinný, není potřeba živé bakterie *Lactobacillus* [31].
- Snížení výskytu *Helicobacter pylori* – jedná se o bakterii, která kolonizuje žaludek a může způsobit žaludeční vředy a rakovinu žaludku. Laboratorní studie prováděné na zvířatech ukázaly, že antibakteriální látky včetně organických kyselin produkované některými laktobacily inhibují růst a přežívání tohoto patogenu [32].
- Zmírnění zánětlivých reakcí – probiotika upravující intestinální prostředí pomáhají v profylaxi a léčbě zánětlivých onemocnění jako jsou Crohnova choroba, pouchitida a další idiopatická střevní onemocnění [29]

1.3 Probiotické sýry

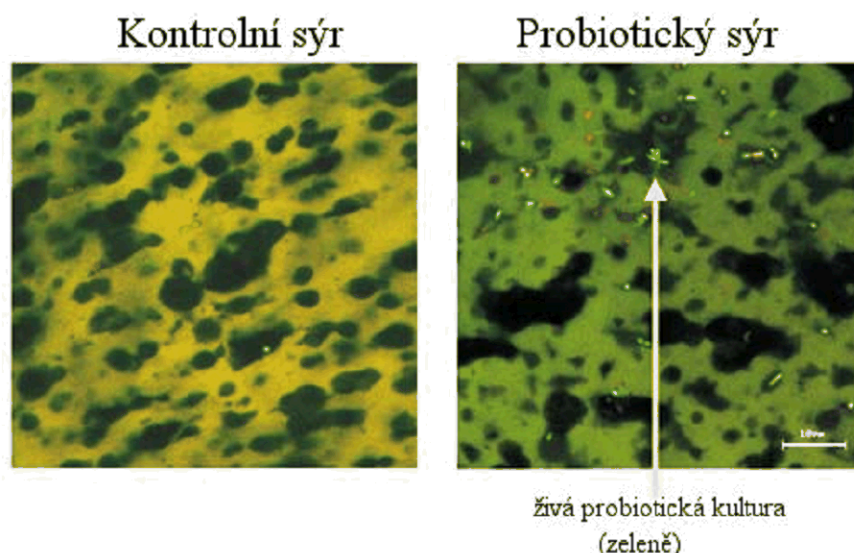
V současnosti jsou probiotické potraviny omezeny převážně na fermentované mléčné nápoje a jogurty obsahující prospěšné probiotické kultury jako jsou laktobacily a bifidobakterie, které jsou uváděny na trzích v Evropě, Japonsku, USA a Austrálii [33]. Množství studií zabývajících se kulturami a technologiemi spojenými s fermentovanými mléky a jogurty používanými jako potravinové nosiče probiotických bakterií ukazují, že tyto produkty nemusí být optimální pro udržení doporučeného množství bakteriálních druhů. Tuto skutečnost dokazuje slabá viabilita bifidobakterií v komerčních jogurtech. Sýr by mohl být alternativní potravinovou maticí, která by obsahovala probiotické bakterie v takovém dostatečném množství, že se projeví jeho příznivé účinky na hostitele [34]. Funkční potraviny lze produkovat s přidavkem probiotické kultury v sýru, pokud zůstává dostatečné množství živých bakterií během zrání sýru a jeho doby trvanlivosti. Také je důležité, aby přidavek probiotických bakterií neovlivnil chuť, texturu nebo vzhled sýru.

Probiotické bakterie přidané do sýru musí být schopny v lidském střevě růst a množit se, aby se projevil jejich pozitivní vliv na zdraví konzumenta. Proto by měly být schopny přežít průchod gastrointestinálním traktem (GIT) člověka, kde jsou vystaveny působení kyseliny chlorovodíkové v žaludku a žluči v tenkém střevě [35].

Ve skutečnosti je sýr vhodnou náhradní maticí pro přísun probiotických bakterií místo fermentovaného mléka nebo jogurtů vzhledem k následujícím potenciálním výhodám. Tvoří pufr (ochranu) vůči velmi kyselému prostředí gastrointestinálního traktu a tak tvoří příznivější prostředí s vyšším pH pro přežití bakterií v celém průchodu žaludkem. Navíc hustý matrix a relativně vysoký obsah tuku v sýru mohou přispět k ochraně bakterií v žaludku [36]. Tento objev byl potvrzen také Sharpem, McMahonem a Broadbentem [37].

Přítomnost prebiotik inulinu a oligofruktózy podporují rychlost růstu bifidobakterií a laktobacilů, navíc vzrůstá produkce laktátu a krátkých řetězců mastných kyselin v sýru [38].

Navíc k tomu, co už bylo řečeno, probiotické produkty musí účinně v kontrolních klinických testech prokázat, že probiotické vlastnosti nebyly pozměněny nebo ztraceny během technologických procesů spojené s výrobou probiotických potravin [35]. Ukázka probiotického sýru s přidavkem bifidobakterií po 1 měsíci zrání je uvedena na Obr.4.



Obr.4: Ukázka sýru čedar, ve kterém přežívají probiotické bakterie ve vysokém množství a který byl zkoumán mikroskopicky s využitím CSLM, probiotické bakterie byly v sýru identifikovány pomocí metody LIVE/DEAD [39].

1.3.1 Výroba sýru

Jelikož se mléko rychle kazí, sýr je v podstatě forma uchování mléka. Všechny sýry ať zrající nebo kyselé mohou být klasifikovány jako měkké, poloměkké (polotvrdé), tvrdé nebo velmi tvrdé v závislosti na obsahu vody. Ačkoliv je tato klasifikace libovolná a praktická, pomáhá systematicky seskupovat sýry s podobnými základními znaky a vlastnostmi jako je vlhkost, konzistence či kompaktnost sýru [40]. Pro výrobu sýru je nutná koagulace mléka, nejčastěji působením chymosinu na k-kasein, kdy dochází k porušení kaseinových micel. V tomto kroku dochází v podstatě k dehydrataci mléka v kombinaci s dalšími ochrannými procesy jako jsou kultivace, okyselení, solení, balení a chlazení [41]. Sýřené mléko je pak krájeno a homogenizováno s cílem vyloučení vody v procesu zvaném syneréza [42]. Tvaroh se později nechá odkapat, osolí se a balí se jako čerstvý sýr. Mnoho sýrů vyžaduje další čas, aby dosáhly svých specifických vlastností, zvláště chuti a aroma. Proto jsou uchovávány ve speciálních místnostech, kde jsou po určitou dobu kontrolovány podmínky prostředí. Takovému procesu se říká zrání a finální produkt se pak označuje jako zrající sýr [41].

1.3.2 Technologické překážky a stabilita probiotických sýrů

Hlavní problém spojený s použitím probiotických kultur ve výzkumu funkčních potravin je udržení jejich životaschopnosti v průběhu celého procesu. Probiotické mikroorganismy by měly být dostupné i pro inkorporaci do potravinových produktů, tak že pak zůstávají živé a účinné (v komerčním měřítku) i během konzumace. Probiotika by také měly být schopné přežít průmyslové metody, např. standardní mlékárenské zpracování nebo farmaceutické výrobní postupy, a být schopné růst a přežít ve velkém množství během doby skladování produktu. Navíc z pohledu výroby potravin je žádoucí, aby byly kmeny dostupné v širokém průmyslovém měřítku a mohly snést již zmiňované podmínky jako je lyofilizace nebo

sprejové sušení. Kromě toho by probiotické kmeny inkorporované do potravin měly mít GRAS status (generally regarded as safe) a neměly by vést k nežádoucím sensorickým změnám chuti, aroma, textury a dalších vlastnostech [35]. Technologické překážky ve výrobě probiotického sýru jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Technologické překážky ve výrobě probiotického sýru [43].

Krok	Problém	Možné řešení
Inokulace probiotickými bakteriemi	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Interakce probiotických bakterií a startovací kultury mohou mít negativní dopad ✓ Ztráta živých probiotických buněk v syrovátce během sušení 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Předběžné testy pro zjištění nejvhodnější kombinace probiotické a startovací kultury ✓ Používat druhy od stejného dodavatele ✓ Kontrolovat různé momenty přidavku probiotické kultury (sledování dopadu na konečné výtaje a přežití probiotik)
Solení	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Probiotické bakterie jsou citlivé k vysokým koncentracím solí 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mikroenkapsulace ✓ Výběr vhodného druhu (informace o druhu od dodavatele)
Balení	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Probiotické bakterie jsou citlivé na kyslík 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vybrat vhodný balicí systém: plastová fólie s nízkou propustností pro kyslík, vakuové balení nebo aktivní balení ✓ Inkubace buněk v sub-letálních podmínkách pro rozvoj odolnosti vůči solím ✓ Výběr vhodného druhu (informace o druhu od dodavatele)
Zrání	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Přežití probiotických bakterií během zrání sýra 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mikroenkapsulace ✓ Optimalizace podmínek zrání v předběžných testech
Podmínky skladování	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Neadekvátní skladovací podmínky ovlivňující přežití bakterií 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Přísná kontrola teploty skladování

Probiotické bakterie používané v potravinách, jako jsou *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp., mají mikroaerofilní nebo anaerobní metabolismus. Proto pro jejich přežití může kyslík představovat ohrožení. Obecně je *Bifidobacterium* spp. více senzitivní ke kyslíku než *L. acidophilus*, díky jeho přirozeným anaerobním vlastnostem, ačkoliv se tato citlivost mění podle předchozích generací mikroorganismů [44]. Další vlastnosti zahrnují stupeň acidity, schopnost dobře růst v mléčných médiích a rychle zkysnout mléko, zkrátit fermentační dobu a následně snížit riziko kontaminace během přípravy inokula.

Aby mohly být probiotické bakterie použity při výrobě sýrových produktů, může být někdy proces pozměněn a přizpůsoben požadavkům bakteriálního druhu. Tam, kde to není možné, mohou být použity jiné probiotické druhy nebo mohou vznikat úplně nové produkty [43]. Obecně by probiotické kmeny měly být technologicky kompatibilní s procesy výroby žádané potraviny. S ohledem na vývoj probiotických sýrů to znamená, že takové druhy by měly být kultivovány ve vysoké koncentraci buněk pro inokulaci sýru nebo by měly být schopné množit se během výroby a/nebo zrání [45]. Obecně by měl mít probiotický sýr stejné

parametry jako tradiční sýr, inkorporace probiotických bakterií by neměla vést ke ztrátě kvality produktu. V této souvislosti stupeň proteolýzy a lipolýzy musí být stejný nebo dokonce lepší než u sýru bez funkčních vlastností.

Kvůli výrobnímu procesu se čerstvý sýr zdá být ideální nosič probiotických bakterií, během skladování je vystaven chladným teplotám a jeho doba skladování je omezena. Bylo publikováno mnoho vědeckých prací zabývajících se čerstvým sýrem a probiotickými kulturami, které popisují vhodné množství živých buněk a jejich pozitivní vliv na texturu a sensorické vlastnosti sýrů. Obvykle je denně konzumováno okolo 100g sýra populace okolo 10^6 CFU/g vede příjmu 10^8 CFU/ v denní porci [43].

1.3.3 Sensorické vlastnosti proiotických sýrů

Probiotické kultury nemají sklon silně modifikovat sensorické vlastnosti produktů, do kterých byly přidány [46]. Nejvíce se to týká zrajících sýrů obsahujících bifidobakterie, jelikož produkují vysoké množství kyseliny octové podobně jako kyseliny mléčné v molárním poměru 2:3 při kvašení laktózy přes cestu fruktózo-6-fosfátu. V malém množství má kyselina octová pozitivní vliv na aroma probiotického sýru. Nicméně nadměrné koncentrace jsou nežádoucí, způsobují off-flavour [47]. Je důležité ověřit sensorické vlastnosti probiotického sýru, ve srovnání s produkty bez probiotických mikroorganismů, za účelem získat co nejpresnější výsledky vlastností produktů. Pokud je to možné, sensorický profil by měl být zjištěn s použitím vhodných sensorických technik jako deskriptivní kvantitativní analýza [48].

1.4 Magnetické separační techniky

Magnetické separační techniky, využívající částice mikroskopických rozměrů s vázanými afinitními ligandy, představují nový moderní trend v oblasti separačních technik [49]. Běžně používané separační a purifikační techniky lze urychlit použitím magnetické separace. Magnetické částice se staly oblíbenými hlavně pro využití v biologii a medicíně pro diagnózu a léčebné použití. V diagnostice, magnetické senzory a magnetická zobrazovací rezonance (MRI) používající superparamagnetické nanočástice směřují k odhalení jednotlivých rakovinových buněk v jejich počáteční fázi růstu. Mnohé další biomedicínské aplikace *in vivo* a *in vitro* zahrnují fixaci proteinů a enzymů, imunologické testy a separaci biomolekul z komplexních biologických směsí, jako jsou protilátky, peptidy, nukleové kyseliny, enzymy, buňky, bakterie a viry. Navíc jsou magnetické částice užitečné v genomových analýzách, ve kterých se molekulární metody stávají stále více důležité. Genomové analýzy zahrnují izolaci nukleové kyseliny, purifikaci, amplifikaci, značení a detekci značky. Mimo purifikaci nukleových kyselin jsou všechny procesy automatizované. Reverzibilní fixace pevné fáze na magnetických částicích s navázanými karboxylovými skupinami jsou velmi užitečné například pro izolaci DNA fragmentů. Ve srovnání s běžnými metodami je práce s magnetickými nosiči (částicemi) rychlá, jednoduchá, citlivá, bezpečná a DNA je získávána s vysokými výtěžky a čistotou. Navíc použití magnetických nosičů nevyžaduje speciální vybavení a usnadňuje mechanismus purifikace v běžné praxi. A proto SPRI slibuje dobré výsledky v identifikaci patogenních bakterií v potravinářském průmyslu [50]. Částice používané k izolaci DNA jsou superparamagnetické povahy, tedy v přítomnosti vnějšího magnetického pole vykazují magnetické vlastnosti [51].

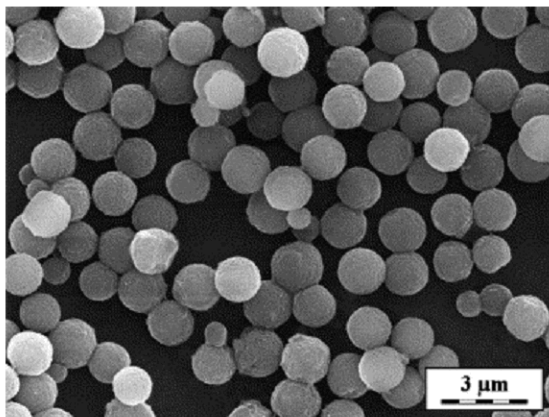
Velikost je primární proměnnou určující fyzikální vlastnosti (jak magnetické tak optické vlastnosti) a také chemické vlastnosti částic (jako jsou reaktivita a katalýza). Částice by měly být monodisperzní, tedy jejich fyzikální a chemické vlastnosti by měly být stále stejné. Velikost a polydisperzita se liší v závislosti na použité metodě pro přípravu magnetických částic. Metody obvykle zahrnují heterogenní polymerizaci jako je běžná a inverzní emulzní polymerizace, miniemulzní polymerizace, suspenzní polymerizace, disperzní/srážecí polymerizace nebo ATRP. Alternativou je *in situ* syntéza magnetických nanočástic uvnitř pórovitého polymeru částic [50].

V této práci byly použity magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát (P(HEMA-*co*-GMA)) (Obr. 5), které byly připraveny na Makromolekulárním ústavu Akademie věd ČR v Praze Ing. D. Horákem. Magnetické částice byly získány disperzní kopolymerací 2-hydroxymethakrylátu a glycidyl methakrylátu v prostředí toluenu/2-methylpropan-1-olu a kolidní olejové kyseliny, která pokrývala povrch magnetitu Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$), který tvoří magnetické jádro. Hydroxylové skupiny na povrchu mikročástic byly oxidovány 2 % vodným roztokem manganistanu draselného v kyselém prostředí (2 mol/l H_2SO_4) na karboxylové skupiny. Obsah karboxylových skupin je 2,6 mmol/l $-\text{COOH}/\text{g}$. Jako kontrola bylo použito komerčně dostupné magnetické sklo (2 mg/ml) [51].

1.4.1 Výhody a využití magnetických částic

Magnetické částice našly uplatnění v řadě aplikací jako např. v imobilizaci enzymů a jejich následném využití, zejména v laboratorních podmínkách je lze využít při odstraňování těžkých kovů a v magnetické imobilizaci léčiv a jejich následném využití k léčebným účelům. Magnetické částice se využívají k izolaci různých látek např. k izolaci enzymů a jejich inhibitorů, k izolaci protilátek a antigenů, k separaci organických xenobiotik jako jsou karcinogeny a mutageny. Uplatnění nachází také v buněčné separaci, kdy se separují cílové buňky z heterogenního prostředí, v imunopurifikaci a následně v imunologických testech a dalších [52]. V této práci byly magnetické částice využity k izolaci a purifikaci DNA.

Při izolaci DNA mají magnetické separace hned několik výhod: eliminují centrifugace a fenolové extrakce při izolaci DNA, kladnou vlastností částic je jejich stálost. Takto izolovaná DNA má vysokou kvalitu a lze ji použít ihned jako matrici do PCR. Magnetické separace jsou snadné a rychlé, doba separace trvá 10 minut [53].



Obr. 5: Elektronový mikrosnímek magnetických neporézních částic P(HEMA-*co*-GMA) [50].

1.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Zavedení polymerázové řetězové reakce (PCR) v roce 1985 Kary B. Mullisem mělo pro molekulární biologii velký přínos, stejný jako objev restrikčních endonukleáz nebo zavedení sekvencování DNA [54]. Za tento objev mu byla udělena v roce 1993 Nobelova cena. Metodou PCR lze syntetizovat z jedné molekuly DNA přibližně 100 miliard kopií a to za několik hodin [55]. Identifikace bakterií pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je rychlá a přesná metoda, která vyžaduje znalost specifických sekvencí nukleových kyselin. Cílová DNA bývá často v analyzovaných vzorcích přítomna ve velmi nízkých koncentracích a není ji možno po izolaci přímo detekovat. Proto je nutné zvýšit analytickou sensitivitu její mnohonásobnou replikací [56]. Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'-3' pomocí DNA – polymerázy [54].

Problémem v obvyklé identifikaci různých mikroorganismů v reálných vzorcích PCR je výskyt falešně negativních výsledků. Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny přítomností extracelulárních a intracelulárních PCR inhibitorů. Z tohoto důvodu byla velká pozornost soustředěna na vývoj rychlých a robustních metod izolace DNA [57]. Polymerázová řetězová reakce je nejčastěji používanou molekulárně-biologickou amplifikační technikou v diagnostice [56].

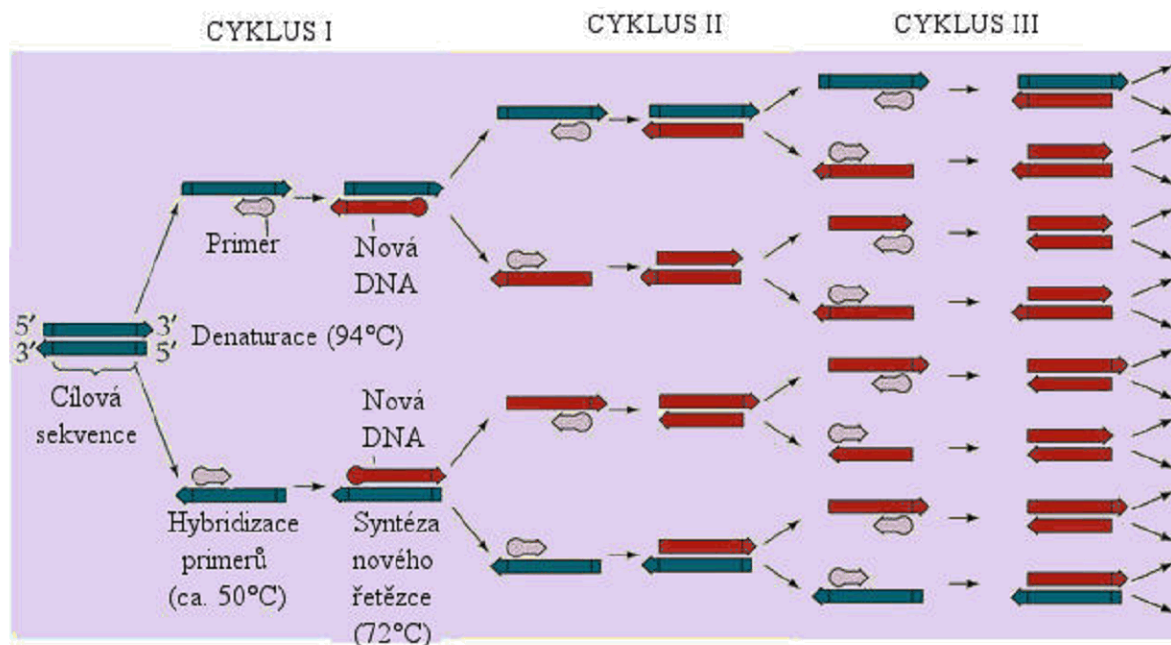
Reakce se provádí v termocykleru, v němž se teplota automaticky mění v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů) vytváří až miliarda kopií daného úseku cílové DNA [54].

1.5.1 Princip a mechanismus PCR

Polymerázová řetězová reakce umožňuje selektivní zmnožení (amplifikaci) určitého úseku DNA podobným způsobem jako *in vivo* při DNA replikaci, přičemž velikost amplifikovaného úseku ohraničují dva primery [53]. Jako primery se používají krátké oligonukleotidy, od jejichž 3'- konce dochází k syntéze nového polynukleotidového řetězce. Dvouvláknové řetězce DNA se poté od sebe znovu oddělí a slouží pro hybridizaci s primery a také jako templáty pro následující syntézu komplementárních řetězců DNA [58]. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů [54]. Princip metody PCR je uveden na Obr. 6. Amplifikace DNA v polymerázové řetězové reakci probíhá ve třech opakujících se krocích, které jsou charakterizovány různými požadavky na teplotu:

1. Denaturace dvouřetězcových molekul DNA: během tohoto prvního kroku dochází k oddělení jednotlivých vláken DNA templátu (matrice), na něž se poté hybridizují primery. Tato reakce probíhá při optimální teplotě 95°C [53]. Toleranční rozpětí teplot je 92 – 98°C. Pro fragmenty o velikosti do 1 kpb bývá zvolena doba denaturace 15 sekund, pro větší fragmenty bývá doba zvýšena na 0,5 – 1 minutu. Aby bylo zaručeno, že i dlouhá molekula DNA bude úplně denaturována, volí se doba denaturace v prvním cyklu reakce 5 minut [58].

2. Hybridizace primerů k denaturované templátové DNA: při hybridizaci se uplatňují vodíkové vazby mezi komplementárními bázemi (adenin – guanin, cytosin – thymin). Tato reakce probíhá při teplotě 40 – 72°C v závislosti na délce a sekvenci primerů [53]. Teplota hybridizace primerů s oddělenými řetězci DNA je kritická. Pokud je teplota příliš vysoká, primery hybridizují slabě a množství amplifikované DNA je malé. Naopak při nízké teplotě dochází k nespecifické hybridizaci primerů a k amplifikaci nežádoucích segmentů DNA. Teplota hybridizace primerů závisí na jejich teplotě tání a na teplotě tání templátové DNA [58].
3. Syntéza nového komplementárního řetězce: dochází k elongaci DNA vlákna, během kterého DNA polymeráza přikládá k 3'OH konci primeru nukleotidy, které se vážou (na nový řetězec) podle komplementární sekvence templátu. Tato reakce probíhá obvykle při teplotě 72°C, což odpovídá optimu pro *Taq* DNA polymerázu [53]. Rychlost syntézy nového DNA řetězce je asi 2000 nukleotidů za minutu. V posledním cyklu je tento krok prodloužen na 10 minut z důvodu dokončení syntézy všech ampliconů [58].



Obr. 6: Průběh PCR reakce [59, upraveno].

1.5.2 Komponenty PCR a reakční podmínky

Na provedení PCR je potřeba následujících komponent:

- Templátová DNA, která slouží jako matrice pro syntézu nových řetězců DNA. Do PCR se přidává v jednořetězcové nebo ve dvou řetězcové formě. Tato DNA obsahuje cílová místa pro primery. Lineární DNA sloužící jako templát je amplifikována s větší účinností než kružnicová DNA [55]. Do PCR reakce se přidává většinou 100 - 500 ng lidské genomové DNA, 1 – 10 ng bakteriální DNA a 0,1 - 1 pg plazmidové DNA [58].

- Primery jsou dva oligonukleotidy složené obvykle z 20 – 25 nukleotidů, jejichž sekvence odpovídá sekvencím na okrajích úseku DNA určeného k amplifikaci [53]. Důležitým faktorem pro návrh primerů je rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry. Primery by měly být specifické, na matricové DNA nesmí být nescifická vazebná místa [54]. Neměly by umožňovat tvorbu sekundárních struktur. Jednotlivé primery by se neměly lišit o více než 3 báze a neměly by být vzájemně komplementární, jelikož jsou v PCR přítomny ve velkém množství a mohlo by tedy dojít k tvorbě primerových dimerů [58].
- DNA polymeráza katalyzuje syntézu nového DNA řetězce ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od místa, kde je navázán primer až po jeho konec [58]. Zpočátku byly experimenty s PCR uskutečněné s Klenovým fragmentem DNA polymerázy I z bakterie *Escherichia coli*. Problémem však byla inaktivace tohoto enzymu při vyšších teplotách, proto bylo potřeba po každém cyklu (denaturačním kroku) přidat do reakce novou polymerázu. Navíc reakce probíhala při teplotě 37°C, což je optimální teplota Klenovy polymerázy a to vedlo k tvorbě nescifických produktů. Nyní se v PCR používají DNA polymerázy z různých termofilních bakterií [53]. Existuje celá řada polymeráz, které se dají pro PCR využít, lišících se ve výkonnosti, přesnosti a také schopnosti syntetizovat nový řetězec. Nejčastěji se používá termostabilní Taq polymeráza izolovaná z termofilního druhu *Archea Thermus aquaticus*, který žije v horkých pramenech. V současné době je syntetizována pomocí geneticky modifikovaného kmene *E. coli* s vloženým příslušným genem [60]. Její teplotní optimum je okolo 75 – 80°C, kdy je jedna molekula enzymu schopna k primeru přisyntetizovat asi 150 nukleotidů za sekundu. Při teplotách nad 90°C je se stává enzym inaktivní, nikoli však denaturovaný, proto při snížení teploty dochází k znovuobnovení její enzymatické aktivity [53]. Doporučená koncentrace DNA polymerázy je 1 – 2,5 jednotek na 100 μl reakční směsi. Pokud je koncentrace polymerázy příliš nízká, dochází k nedostatečné tvorbě produktů. Naopak vysoká koncentrace tohoto enzymu způsobuje syntézu nescifických DNA fragmentů [55]. (Ve standardní PCR směsi je obsaženo 2×10^{12} – 10×10^{12} molekul DNA polymerázy, která má obvykle koncentraci 0,5 – 2,5 jednotek na 25 – 50 μl PCR směsi) [58].
- 3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty zahrnující dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Jsou to základní složky (stavební kameny) pro syntézu nového řetězce DNA. Optimální koncentrace každého deoxynukleosidtrifosfátu by měla být 200 - 250 μM [58]. Zvýšená koncentrace dNTP působí inhibičně, protože dochází k vyvázání Mg^{2+} a naopak nízká koncentrace může způsobit nízký výtěžek produktu [55].
- Mg^{2+} ionty působící v reakční směsi jako kofaktor. Tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'- deoxyribonukleosid – 5'- trifosfáty (dNTP) rozpoznávaný DNA-polymerázou. Pro každou aplikaci je potřeba bývá potřeba stanovit optimální koncentraci Mg^{2+} empiricky, jelikož ionty interagují s dNTP, s primery, templářovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly [54]. Molární koncentrace hořčičných iontů musí převyšovat molární koncentraci fosfátových skupin v dNTP a primerech, protože tyto ionty bývají právě dNTP a oligonukleotidy vyvazovány. Jejich

koncentrace se stanovuje experimentálně [58]. Obvyklá koncentrace hořečnatých iontů v PCR je při použití Taq DNA polymerázy 1- 4 mM, přičemž změna jejich koncentrace může výrazně ovlivnit výsledek reakce [53]. Vysoké koncentrace Mg^{2+} snižují specifitu primerů a naopak nižší koncentrace mohou způsobit inaktivaci DNA polymerázy [55].

- PCR pufr zabezpečuje stálé pH prostředí. Jeho důležitou složkou jsou hořečnaté soli obvykle ve formě $MgCl_2$ nebo $MgSO_4$. Standardní reakční pufr obsahuje 10 mM Tris HCl (pH 8,3-8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ [58]. Do základního reakčního roztoku se někdy přidávají i další složky, které zlepšují činnost DNA polymerázy nebo destabilizují sekundární struktury [53]. Jako aditiva se do PCR přidávají např. formamid, dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, síran amonný, glutamát draselný a neionogenní a kationtové detergenty [55].
- PCR voda se používá pro doplnění PCR směsi. Nejvhodnější je voda o odporu 18 M Ω nebo voda pro injekce ČSL 4 [55].

Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a nejčastěji se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů. Pokud je zvoleno příliš mnoho cyklů, zvyšuje se tak množství vznikajících nespecifických PCR produktů [54].

1.5.3 Inhibitory polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce může být inhibována látkami, které pocházejí z živých buněk biologických vzorků nebo reagentů používaných k extrakci DNA [61]. Ty jsou pak zodpovědné za falešně negativní výsledky při PCR a způsobují značné problémy při analýze PCR z reálných vzorků. Inhibitory mohou ovlivňovat PCR několika způsoby jako např. degradují cílové nukleové kyseliny, vyvazují hořečnaté ionty nezbytné pro činnost DNA polymerázy nebo inhibují DNA polymerázu [62]. Inhibici DNA polymerázy způsobují lytické enzymy, protože silně interagují s DNA a proteiny, čímž zabrání vazbě s DNA polymerázou. Reakci mohou inhibovat také znemožněním dostatečné lýze buněk, tudíž nemusí dojít k uvolnění cílové DNA z buněk a její následná detekce se v PCR projeví jako falešně negativní [63]. Inhibice může být částečná nebo celková a může se projevit snížením citlivosti detekce nebo jako úplné selhání reakce, kdy není žádný PCR produkt detekován [64]. Tyto látky mohou být intracelulárního nebo extracelulárního původu. Intracelulární inhibitory jsou přítomny uvnitř bakteriálních buněk a patří sem endogenní nukleázy, proteinázy a polysacharidy. Extracelulární inhibitory se nacházejí mimo bakteriální buňku a patří sem komponenty komplexních vzorků jako je krev, močovina, potraviny a také některé složky kultivačních médií jako např. antibiotika, proteiny, detergenty, minerální oleje, ionty, žlučové kyseliny a jejich soli. Inhibitory působí komplexně v závislosti na fyzikálních, chemických a enzymatických podmínkách reakce [63].

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo prokázat přítomnost probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* v reálných vzorcích probiotických tvrdých sýrů typu eidam. Splnění cílů práce vyžadovalo následující kroky:

- Kultivace bakterií kmene *Bifidobacterium animalis* RB1-MP
- Izolace DNA ze sýru typu eidam s přidavkem různého množství buněk *Bifidobacterium animalis* RB1-MP metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů a stanovení její čistoty a koncentrace
- PCR s doménově specifickými primery
- PCR s rodově a druhově specifickými primery
- Stanovení citlivosti jednotlivých PCR

- Izolace DNA z reálných vzorků probiotických sýrů metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů
- Stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z probiotických sýrů
- PCR s doménově a rodově specifickými primery – ověření přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium*
- Druhové zařazení bakterií rodu *Bifidobacterium* přítomných v probiotických sýrech

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Bakteriální kultury

V práci byl použit bakteriální kmen *Bifidobacterium animalis* RB1-MP, který byl přidán k sýru eidam.

3.2 Vzorky sýra

- Eidamský sýr 30 % BUDGET 100g

Datum trvanlivosti: 26.12.2009 (vzorek byl odebrán před datem trvanlivosti)

Obsah sušiny 50 % hm, obsah tuku v sušině 30 % hm

Složení: mléko, jedlá sůl – max 2,5 %, syřidlo, sýrařské kultury

- Experimentálně připravené sýry typu eidam s přídavkem potenciálně probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* ze sbírky Laktoflóra:
Probiotické sýry PS 1, PS 8334, PS 8341 a PS 8346 (připravil Ing. Dráb, Milcom a.s, Tábor).

3.3 Chemikálie

Pro přípravu roztoků a médií byly použity následující chemikálie:

- Agar (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Ethanol (Lachema, Brno, ČR)
- Ethidium bromid (EtBr) (Sigma, St. Louis, USA)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Magnetické neporézní mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát (P(HEMA-*co*-GMA)) částice
- Hydroxid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (HBO₂) (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- MRS médium (Man, Rogosa, Sharpe)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PEG 6000 (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- SDS (sulfid dodecyl sulfát) (Sigma, St. Lois, USA)
- Tris(hydroxymethyl)báze (Amresco, Solon, USA)
- Tris acetát (Lachema, Brno, ČR)

Všechny chemikálie byly připraveny v čistotě p.a.

3.4 Magnetické nosiče

Byly používány magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát (P(HEMA-*co*-GMA), (1:1) o velikosti 1,2 μm a koncentraci 2mg/ml. Částice byly funkcionalizované COOH skupinami (2,61 mM/g). Magnetické částice byly syntetizovány na ÚMCH AV ČR v Praze Ing. D. Horákem, CSc.

3.5 Kultivační médium

Pro kultivaci bakterií rodu *Bifidobacterium* bylo použito MRS médium (Oxoid, England) s přídatkem cysteinu (0,05%).

- **Tekuté MRS médium s cysteinem**

MRS médium bylo připraveno dle návodu dodavatele. Poté bylo sterilizováno (121 °C, 20 min). Po sterilizaci byl do média přidán cystein (5%) na konečnou koncentraci 0,05%.

- **MRS agar s cysteinem**

K MRS médiu byl přidán agar v množství 12 g/l. Médium bylo sterilizováno (121°C, 20 min). Po vysterilizování byl přidán cystein (5%) na konečnou koncentraci 0,05%. Teplé médium bylo rozlito na Petriho misky.

3.6 Roztoky

Pro ředění roztoků byla použita destilovaná voda. Roztoky byly sterilizovány při 121°C po dobu 20 min.

3.6.1 Zásobní roztoky

- 1 M Tris HCl (pH 7,8)
- 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- 1 M NaOH
- 10% SDS

3.6.2 Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA

Jednotlivé postupy byly provedeny podle návodů k laboratorním cvičením Molekulární biotechnologie [69]. Roztoky byly připravovány sterilně.

0,5 M EDTA

202,2 g EDTA bylo kvantitativně přeneseno do 800 ml destilované vody a umístěno na magnetickou míchačku. pH bylo upraveno na 8,0 přidáním NaOH v peletkách. Destilovaná voda byla doplněna na konečný objem 1000 ml a roztok byl převeden do alikvotů. Nakonec byl sterilizován v autoklávu (121 °C, 15 min).

1 M Tris HCl (pH 7,8)

12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl a objem byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C, 15 min).

Lyzační roztok A:

- 10 mM Tris HCl (pH 7,8)
- 10 mM EDTA (8,0)

Roztok byl připraven smícháním 1 ml 1M Tris HCl (pH 7,8), 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 97 ml sterilní destilované vody.

Lyzační roztok B:

- lyzační roztok A s přídavkem lysozymu (10mg/ml)

Lysozym byl přidán těsně před použitím.

TE pufr:

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)

Roztok byl připraven smícháním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml 0,5 M EDTA a 98 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C, 15 min).

CIZ

Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1

10% SDS

V 90 ml sterilní destilované vody bylo rozpuštěno 10 g SDS. V případě malého rozpouštění byl roztok zahřát na 68 °C. pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 přidáním několika kapek koncentrované HCl a objem byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml.

Proteináza K (1 mg/ ml)

Na analytických vahách bylo naváženo 10 mg a doplněno sterilní destilovanou vodou do 10 ml a rozděleno do alikvotů. Proteináza K byla uchovávána při -20 °C.

3 M octan sodný (pH 5,2)

408,1 g trihydrátu octanu sodného bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, pH bylo upraveno pomocí kyseliny octové. Celkový objem byl doplněn destilovanou vodou na 1000 ml a rozdělen do alikvotů. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C, 15 min).

3.6.3 Roztoky pro izolaci DNA magnetickými nosiči

5 M NaCl

292,2 g NaCl bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, doplněno destilovanou vodou do 1000 ml a rozplněno do alikvotů. Roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 min).

PEG 40 % 6000

40 g PEG 6000 bylo rozpuštěno v 60 ml sterilní destilované vody a doplněno sterilní destilovanou vodou do 100 ml. Roztok byl sterilizován (121 °C, 20min) a byl uchováván při 4°C.

70 % ethanol

Bylo smícháno 73 ml 96 % ethanolu a 27 ml sterilní destilované vody.

3.6.4 Roztoky na agarózovou elektroforézu

DNA standard (100 bp)

(Malamité, Moravské Prusy, ČR)

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

DNA standard (50 bp)

(Malamité, Moravské Prusy, ČR)

Obsahuje fragmenty o délce: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 766, 914, 1350 bp

TBE pufr (5 x koncentrovaný)

- 54 g Tris-báze
- 27,5 g kyseliny borité
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Toto množství bylo doplněno destilovanou vodou na 1000 ml. Před použitím byl roztok 10 x zředěn destilovanou vodou na požadovanou koncentraci 0,5M TBE.

Nanášecí pufr (6x koncentrovaný)

0,25g Ficoll 400 a 0,004 g bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Roztok byl před použitím smíchán s vzorkem hrubého lyzátu v poměru 1:5.

Agarózový gel

Gel byl připravován ve 2 různých koncentracích:

- 0,8% 0,8 g agarózy bylo rozpuštěno ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru.
- 1,8% 1,8 g agarózy bylo rozpuštěno ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru.

Ethidium bromid 0,5 µg/ ml

100 µl barvicího roztoku EtBr (500 µg/ml) bylo zředěno v 500 ml sterilní destilované vody.

3.6.5 Komponenty pro PCR

- PCR voda – voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská Lupča, SR) - dále označovaná jako PCR voda
- reakčný pufr 10× PCR Blue Buffer (750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 25 mM MgCl₂.) pro Taq DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP směs (10 mM)
- DNA polymerasa Taq 1.1 (1U/μl), jedna jednotka Taq DNA polymerázy 1.1 je definována jako množství enzymu, které katalyzuje inkorporaci 10 nmol dTTP do materiálu precipitovatelného TCA za 30 min. při 72°C. (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery uvedené v Tab. 3.

Tab. 3 : Použité primery

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost ampliconu	Citace
Univerzální primery pro doménu Bacteria			
Feub	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	500 bp	[65]
Reub	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		
Rodově specifické primery pro rod <i>Bifidobacterium</i>			
Bif 164	GGGTGGTAATGCCGGATG	523 bp	[66]
Bif 662	CCACCGTTACACCGGGAA		
Pbi F1	GGGATGCTGGTGTGGAAGAGA	914 bp	[65]
PbiR2	TGCTCGCGTCCACTATCCAGT		
Druhově specifické primery			
<i>B. animalis</i>			
Pbi R1	GCA CCA CCT GTG AAC CG	925 bp	[67]
Ban F2	AAC CTG CCC TGT G		
<i>B. infantis</i>			
BiINF-1	TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC	828 bp	[68]
BiINF-2	GGA AAC CCC ATC TCT GGG AT		
<i>B. longum</i>			
BiLON-1	TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC	831 bp	[68]
BiLON-2	CGA AGG CTT GCT CCC AGT		
<i>B. bifidum</i>			
BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	278 bp	[68]
BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCAA		

3.7 Pomůcky a přístroje

- Laboratorní váhy (Kern & Sohn, Německo)
- Centrifuga mini Spin 14 500 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga mini Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exikátor (KIF LAB Freiburg, Německo)
- Fotoaparát Canon PowerShot 110 IS.
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 µl (Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Magnet s magnetickým pásem (DYNAL, Oslo, Norsko)
- Očkovací box (Fatran, ČR)
- NanoPhotometrTM (IMPLEN, Německo)
- Termostat – Mini incubator (Labnet, USA)
- Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Milano, Itálie)
- Minicycler PTC 100 (MJ Research, USA)
- Termocykler PTC 200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm (Hofer, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný laboratorní materiál a pomůcky

3.8 Použité metody

Popsané postupy byly prováděny podle skript Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie [69].

3.8.1 Příprava hrubých lyzátů buněk čisté kultury

1. Z čisté kultury kultivované anaerobně při 37 °C po dobu 2 dnů byl odebrán do eppendorfky 1 ml. Kultura byla centrifugována při 14000 ot/min po dobu 3 minut. Supernatant byl opatrně slit.
2. K sedimentu byl přidán 1 ml lyzačního roztoku A (nejdříve 100 µl a resuspendováno a poté bylo přidáno zbylých 900 µl). Vzorek byl opětovně centrifugován při 15000 ot/min po dobu 3 minut. Supernatant byl slit a sediment se nechal dobře odkapat.
3. K sedimentu bylo přidáno 500 µl roztoku B a byl dobře resuspendován. Vzorek byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 1,5 hodiny a občas promíchán.
4. K suspenzi bylo poté přidáno 50 µl 10 % SDS a 5 µl proteinázy K (100µg/ml) a vzorek byl promíchán.
5. Vzorek byl dále kultivován při teplotě 55 °C do druhého dne.
6. Z tohoto hrubého lyzátu buněk byla izolována DNA metodou fenolové extrakce.

3.8.2 Příprava hrubého lyzátu buněk ze sýru

1. K 1 g sýru, který byl sterilně nakrájen na drobné kousky skalpelem, byly přidány 2 ml lyzačního roztoku B a vzorek byl nesuspendován.
2. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 1,5 hodiny, poté bylo přidáno 50 μ l 10% SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ g/ml). Vzorky byly promíchány a inkubovány 6 hod při teplotě 55°C.
3. Z tohoto hrubého lyzátu byla izolována bakteriální DNA metodou fenolové extrakce. DNA sloužila jako kontrola

3.8.3 Příprava hrubých lyzátní buněk ze sýru s přidavkem *Bifidobacterium animalis* RB1-MP

1. Byl odebrán 1 g sýru, který byl nakrájen na malé kousky, přidány 2 ml lyzačního roztoku B a 0,1 ml ředěné kultury *Bifidobacterium animalis* RB1-MP a směs byla resuspendována.
2. Po 1,5 hodině inkubace při laboratorní teplotě bylo ke vzorku přidáno 50 μ l 10% SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ g/ml). Vzorky byly promíchány a inkubovány do druhého dne při teplotě 55°C.
3. Hrubé lyzáty buněk ze sýru s přidavkem buněk *B. animalis* byly použity pro izolaci DNA fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči. V případě potřeby byly uchovávány při -20°C.

3.8.4 Izolace DNA fenolovou extrakcí

1. K 500 μ l hrubého lyzátu buněk bylo přidáno 500 μ l fenolu (pH 7,8). Směs byla kývavým pohybem promíchána po dobu 4 minut. Poté byla směs centrifugována při 14000ot/ min po dobu 3 minut.
2. Vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté ependorfky. (Nesmí být odebrána proteinová mezivrstva).
3. K vodní fázi bylo přidáno 700 μ l CIZ (chloroform:izoamylalkohol 24:1) a směs byla opatrně kývavým pohybem promíchána po dobu 4 minut. Obsah byl centrifugován při 14000ot/ min po dobu 3 minut.
4. Vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté ependorfky.

3.8.5 Přesrážení DNA ethanolem

1. Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného a směs byla promíchána.
2. Poté byl přidán 1 ml ethanolu a opět byla směs promíchána.
3. DNA byla vysrážena při - 20°C po dobu 15 min. Směs byla centrifugována při 14000 ot/min po dobu 15 minut. Supernatant byl opatrně slit a sediment byl usušen v exikátoru.
4. K sedimentu bylo přidáno 500 μ l TE pufru. Eluovaná DNA byla uchovávána v ledničce.

Takto připravená DNA byla spektrofotometricky proměřena a byla použita v PCR.

3.8.6 Přečištění magnetických částic EDTA

Pro snížení přítomnosti inhibitorů iontů Fe²⁺ byly magnetické částice promyty 800 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a umístěny do magnetu. EDTA bylo odpipetováno a částice byly 5x promyty sterilní vodou.

3.8.7 Příprava směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů

Separační směs s nosiči byla připravena v 1 ml ependorfkových zkumavkách v celkovém objemu 200 µl nebo 1000 µl. Pořadí přidávaných komponent je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4: Příprava separační směsi o výsledné koncentraci PEG 6000 40% a NaCl 5M

Pořadí č.	Komponenta	V [µl]	
1.	Sterilní voda	200	-
2.	5 M NaCl	400	400
3.	DNA nebo hrubý lyzát buněk	100	300
4.	40% PEG	200	200
5.	Magnetické částice (2mg/ml)	100	100
výsledný objem [µl]		1000	1000

3.8.8 Izolace DNA s využitím magnetických nosičů

(reverzní imobilizace na pevné fázi – SPRI)

1. Jednotlivé komponenty byly smíchány podle Tab. 4 a byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.
2. Částice s navázanou DNA byly odseparovány pomocí magnetu při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Supernatant byl odpipetován a sediment se nechal dobře odkapat. Ependorfka s DNA navázanou na magnetické částice byla uvolněna z magnetu.
3. K nosiči s navázanou DNA byl přidán 1 ml 70 % ethanolu. Zkumavka byla umístěna do magnetu na 2 minuty při laboratorní teplotě. Ethanol byl použit na promytí částic s DNA. Po 2 minutách byla zkumavka z magnetu uvolněna a ethanol byl odpipetován. Podruhé byly částice s navázanou DNA promyty 500 µl 70 % ethanolu.
4. Zkumavka se zbývajícím ethanolem byla umístěna do termostatu na 55°C a byla ponechána v horizontální poloze do vyprchání ethanolu.
5. Poté byla DNA eluována do 100 µl nebo 300 µl TE pufru, tedy do stejného množství, kolik bylo přidáno hrubého lyzátu do separační směsi. Eluce probíhala při laboratorní teplotě do druhého dne.
6. Částice byly odseparovány na magnetu 2 minuty při laboratorní teplotě.
7. Eluovaná DNA byla přepipetována do čisté zkumavky a byla uchovávána při 8°C. Tato DNA byla poté použita do PCR.

3.8.9 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla měřena spektrofotometriky pomocí NanoPhotometru. Jako referenční vzorek byl použit TE pufr. Byla měřena absorbance vlnových délek 230, 260, 280 a 320 nm.

1. Do NanoPhotometru byla vložena speciální kyveta – Label Guard™ ve směru procházejícího světla.
2. Z předvolených metod byly zvoleny následující kroky: Label Gard Applications
Nucleic Acid
ds DNA
3. Podle předpokládané koncentrace byl zvolen „lid“. Jeho parametry jsou uvedeny v Tab.5.
4. Do měřicího centra byl nejprve pipetován TE pufr jako blank a poté byly proměřeny jednotlivé vzorky. Mezi jednotlivými měřeními bylo víčko očištěno ethanolem.

Tab.5: Parametry víčka lid 5

víčko	optická dráha [nm]	objem vzorku [μl]	měřitelný rozsah DNA [ng/μl]
lid 5	2	6-10	7 - 350

3.8.10 Polymerázová řetězová reakce

1. PCR byla míchána buď pro jednotlivé vzorky zvlášť do 200 μl eppendorfek nebo pokud se složení směsi nelišilo, byl připraven tzv. master mix smícháním jednotlivých komponent vynásobených počtem vzorků. Master mix byl připraven do 1,5 ml eppendorfky a po důkladném zcentrifugování byl rozpipetován do 200 μl eppendorfek.
2. Z každého vzorku bylo připraveno 25 μl PCR směsi.
3. Všechny komponenty PCR reakce byly po rozmrazení krátce centrifugovány.
4. Při každém přidání další složky byla směs dobře promíchána.
5. Eppendorfky se všemi složkami byly krátce zcentrifugovány, umístěny do termocykleru a byl spuštěn příslušný program.
6. Po skončení programu byly PCR směsi ihned použity k detekci PCR produktu pomocí gelové agarózové elektroforézy nebo byly uschovány při -20°C.

Pro ověření čistoty všech komponent byla použita negativní kontrola. Jedná se o PCR směs bez DNA matrice namísto které bylo přidáno stejné množství PCR vody. Jako druhá kontrola byla použita pozitivní kontrola pro kontrolu specifity PCR, která byla připravena smícháním PCR směsi s DNA matricí izolovanou z *Bifidobacterium animalis* (10 ng/μl) metodou fenolové extrakce.

Vzorky obsahující všechny složky PCR směsi byly krátce centrifugovány. Poté byly vzorky umístěny do cyklátoru, na kterém byl nastaven program LBC ROD. Po skončení PCR byly vzorky z cyklátoru vyjmuty a byly ihned použity na detekci PCR produktů pomocí gelové elektroforézy nebo uchovávány při -20°C.

3.8.10.1 PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Pro ověření aplikovatelnosti izolované DNA byla použita PCR s primery Feub a Reub pro doménu *Bacteria*. Jejich sekvence je uvedena v Tab. 3

Tab. 3. Amplifikoval se specifický PCR produkt 500 bp. PCR směs byla připravena dle Tab. 6. Na termocycleru byl zvolen předem nastavený program EUBACTER, jehož parametry jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 6: Složení PCR směsi a pořadí jednotlivých komponent přidávaných do PCR směsi (pro doménu *Bacteria*).

komponenta	objem [μ l]
Voda pro PCR	16,5
10 x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10mM)	1
Feub (10pmol/ μ l)	1
Reub (10pmol/ μ l)	1
Taq DNA polymeráza (1U/ μ l)	2
DNA matrice	1

Tab. 7: Program EUBACTER - počet cyklů 30

	94°C / 5 min
1. denaturace DNA	94°C / 30 s
2. hybridizace primerů	56°C / 30 s
3. syntéza řetězce	72°C / 1 min
	72°C / 5 min

3.8.10.2 Rodově specifická PCR

Pro detekci bakterií rodu *Bifidobacterium* byly použity 2 sady rodově specifických primerů a to Bif 164 a Bif 662 a Pbi F1 a Pbi R2 (Tab. 3), amplifikoval se specifický PCR produkt o velikosti 523 a 231 bp. Příprava PCR směsi je uvedena v Tab. 8 Pro amplifikaci DNA byl zvolen program BIFI 523, jeho parametry jsou popsány v Tab. 9 a program BIFI 914, který je uveden v Tab. 10.

Tab. 8: Složení PCR směsi pro rod *Bifidobacterium* a druhy *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis* a *B. animalis* s 1 nebo 5 μ l DNA matrice

komponenta	objem [μ l]
Voda pro PCR	19 (15)
10 x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10mM)	0,5
Primer 1 (10pmol/ μ l)	0,5
Primer 2 (10pmol/ μ l)	0,5
Taq DNA polymeráza (1U/ μ l)	1
DNA matrice	1 (5)

Tab. 9: Program BIFI 523 pro PCR s primery Bif 164 a Bif 662 – počet cyklů 30

	95°C / 5 min
1. denaturace DNA	95°C / 1 min
2. hybridizace primerů	55°C / 1 min
3. syntéza řetězce	72°C / 2 min
	72°C / 10 min

Tab. 10: Program BIFI 914 pro PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2 – počet cyklů 30

	94°C / 5 min
1. denaturace DNA	94°C / 1 min
2. hybridizace primerů	50°C / 1 min
3. syntéza řetězce	72°C / 2 min
	72°C / 10 min

3.8.10.3 Druhově specifická PCR

Pro zařazení bakterií do druhů byly použity 4 sady druhově specifických primerů a to BiLON 1 a BiLON 2, Pbi R1 a Ban F2, Bi INF 1 a Bi INF 2, Bi BIF 1 a Bi BIF 2 (Tab. 3). PCR směs byla míchána dle Tab. 8 a byly použity programy MATSUKI (Tab. 11) a program BANIM, který je uveden v Tab. 12.

Tab. 11: Parametry programu MATSUKI s primery BiLON 1 a BiLON 2, Bi INF 1 a Bi INF 2, Bi BIF 1 a Bi BIF 2 – počet cyklů 35

	94°C / 5 min
1. denaturace DNA	94°C / 20 s
2. hybridizace primerů	55°C / 20 s
3. syntéza řetězce	72°C / 30 s
	72°C / 10 min

Tab. 12: Parametry programu BANIM s primery Pbi R1 a Ban F2 – počet cyklů 35

	94°C / 5 min
1. denaturace DNA	94°C / 30 s
2. hybridizace primerů	58°C / 30 s
3. syntéza řetězce	72°C / 1 min
	72°C / 10 min

3.8.11 Agarózová elektroforéza PCR produktů

Pro detekci PCR produktů specifických pro doménu Bacteria (466 bp), specifických pro rod *Bifidobacterium* (523 a 914 bp) a PCR produktů specifických pro druhy *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis* a *B. animalis* byl připraven 1,8 % agarózový gel.

3.8.11.1 Příprava agarózového gelu

Agarózový gel byl připravován smícháním příslušného množství agarózy s 50 ml případně 100 ml (záleželo na velikosti gelu) 0,5x TBE pufru. Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě a nalita do připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem. Gel tuhl při laboratorní teplotě cca 30 minut. Před nanášením vzorků byl odstraněn hřebínek.

3.8.11.2 Nanášení vzorků na agarózový gel

K celkovému množství 25 μ l PCR produktů bylo přidáno 5 μ l nanášecího pufru (6x koncentrovaného). Tyto směsi byly naneseny mikropipetou do komůrek gelu. Gel byl vložen do elektroforetické vany tak, aby záporně nabitá DNA migrovala ke kladně nabitě anodě. Gel byl zalit 0,5x TE pufrem do svého převrstvení. Spolu s PCR produkty byl na gel nanesen velikostní standard 100 bp nebo 50 bp (100 bp nebo 50 bp žebříček, firma Malamité, Moravské Prusy).

3.8.11.3 Průběh gelové elektroforézy a vizualizace DNA

Gelová elektroforéza byla prováděna při napětí 80 V, dokud bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru nebo ve velikostním markeru (100bp ladder) nedoputovala do 2/3 agarózového gelu, což odpovídá cca 1,5 hodinám.

Po skončení elektroforézy byl gel obarven v lázni připravené z 500 ml sterilní vody a ethidium bromidu (výsledná koncentrace 0,5 μ g/ml) po dobu asi 30 min a opláchnut sterilní vodou.

Obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru v UV světle. Pro dokumentaci byl vyfotografován digitálním fotoaparátem Nikon S210 nebo Canon PowerShot 110 IS.

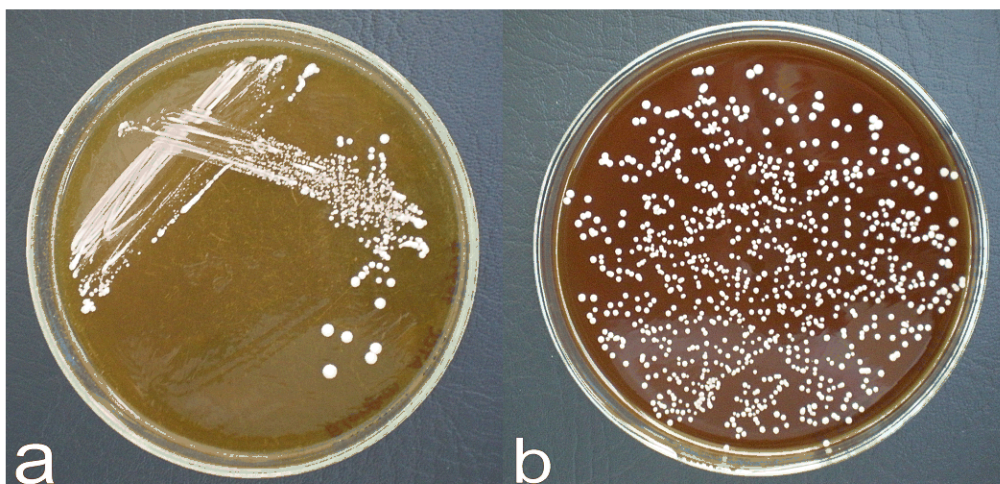
4 VÝSLEDKY

4.1 Kultivace bakterií rodu *Bifidobacterium*

Kmeny *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Bifidobacterium longum* CCM 4990 a *Bifidobacterium animalis* RB1-MP byly kultivovány anaerobně v anaerostatu v tekutém MRS médiu s přidavkem cysteinu při 37 °C po dobu 2 dnů. Tekutá média byla po kultivaci zakalena. V hustém zákalu narostl kmen *Bifidobacterium animalis* RB1-MP, který byl vybrán pro další práci.

4.1.1 Kultivace *Bifidobacterium animalis* RB1-MP v pevném médiu a ověření jeho čistoty

Kmen *Bifidobacterium animalis* RB1-MP byl kultivován v MRS médiu s cysteinem za anaerobních podmínek. Čistota bakteriálního kmene byla ověřena pomocí křížového roztěru na pevném MRS médiu. Kultivace probíhala po dobu 2 dnů při 37 °C v anaerobních podmínkách. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 7.



Obr. 7:

a) Křížový roztěr kultury *Bifidobacterium animalis* RB1-MP na MRS tuhém agaru. Kulturu kmene *B. animalis* RB1-MP můžeme považovat za čistou.

b) Kultura *Bifidobacterium animalis* RB1-MP naředěná na 10^{-5} v MRS tekutém médiu a vyseta na Petriho misku.

- Narostly jednotlivé kolonie kulatého tvaru, mléčné barvy, lesklé, hladké a neprůhledné.

4.1.2 Ředění tekuté kultury *Bifidobacterium animalis* RB1-MP a stanovení počtu buněk (cfu/ml).

Kmen *Bifidobacterium animalis* RB1-MP narostlý v tekutém médiu byl desítkově naředěn v MRS médiu (10^{-1} do 10^{-7}) a vyset na misky s MRS agarem. Po kultivaci byly počítány kolonie a stanoven počet kolonií/ml. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 13. Současně byla změřena optická hustota kultury naředěné na 10^{-1} . Hodnota OD byla 0,52.

Tab. 13: Počet kolonií narostlých na agarových plotnách

Ředění kultury	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
1. Petriho miska	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	509	83	9
2. Petriho miska	-	-	-	-	-	482	85	9
průměrné množství buněk v 0,1 ml	-	-	-	-	-	496	84	9
průměr cfu/ml	-	-	-	-	-	$5,0 \cdot 10^8$	$8,4 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^8$

- Bakteriální kultura *Bifidobacterium animalis* RB1-MP narostlá do hodnoty OD = 0,52 obsahovala asi $5 \cdot 10^6$ buněk / ml.

4.2 Izolace DNA z kultury *Bifidobacterium animalis* RB1-MP

Z kultury narostlé v tekutém médiu byl připraven hrubý lyzát buněk dle kap. 3.8.1 a DNA byla izolována metodou fenolové extrakce s následným přesrážením ethanolem. Izolovaná DNA sloužila jako pozitivní kontrola v PCR reakci a pro zjištění citlivosti rodově a druhově specifické PCR.

Koncentrace DNA byla vypočtena z hodnoty A_{260} , čistota DNA byla kontrolována pomocí poměru A_{260}/A_{280} (Tab.14).

Tab.14: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty celkové DNA *Bifidobacterium animalis* RB1-MP v objemu 500 μ l. Pro měření byl použit lid factor 5.

	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}	c [ng/ μ l]	celkové množství DNA [ng]
DNA <i>B.animalis</i>	0,008	0,059	0,039	0,013	1,769	11,500	5750

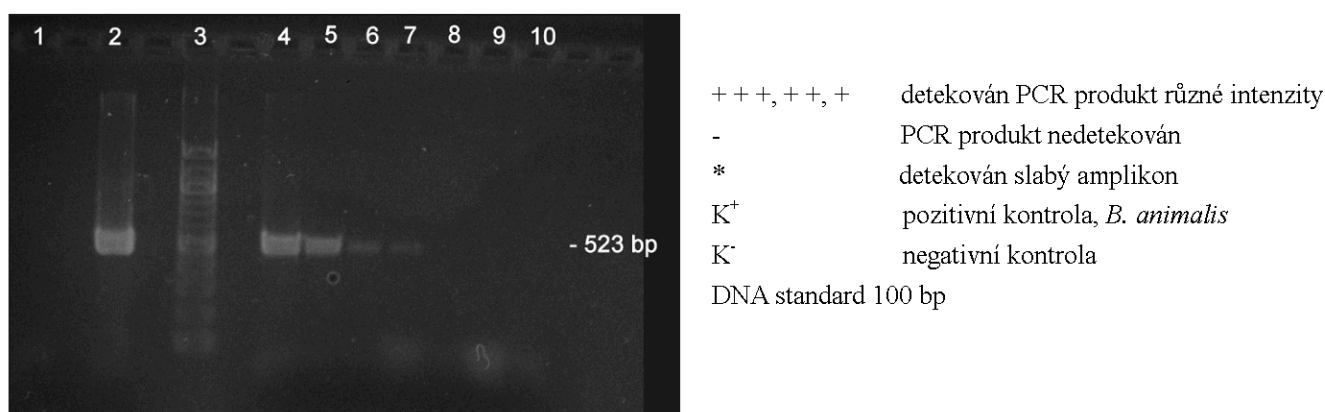
- Byla izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR o koncentraci 11,5 ng/ μ l.

4.3 Ověření amplifikovatelnosti DNA a stanovení citlivosti PCR

DNA čisté bakteriální kultury *Bifidobacterium animalis* RB1-MP izolovaná metodou fenolové extrakce byla použita pro zjištění citlivosti rodově a druhově specifické PCR. V rodově specifické PCR byly použity 2 sady primerů a to Bif 164 a Bif 662 [66] a primery Pbi F1 a Pbi R2 [65]. Jako pozitivní kontrola byla používána DNA naředěná na koncentraci 10 ng/μl.

4.3.1 Určení nejmenšího množství DNA amplifikované v rodově specifické PCR s primery Bif 164 a Bif 662

V rodově specifické PCR byly použity rodově specifické primery Bif 164 a Bif 662. V PCR směsi byl použit 1 μl DNA *Bifidobacterium animalis* RB1-MP, naředěné na koncentraci 10 ng/μl – 10 fg/μl. Gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (523 bp) je na Obr. 8.



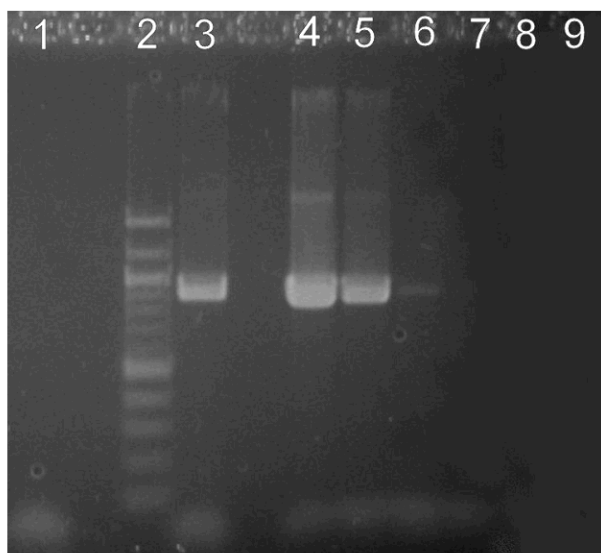
Běh	Množství DNA v PCR směsi	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-
2	K ⁺ [10 ng/μl]	+++
3	Standard	100 bp žebříček
4	10 ng	+++
5	1 ng	++
6	100 pg	+
7	10 pg	+
8	1 pg	+*
9	100 fg	-
10	10 fg	-

Obr. 8: Gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (523 bp) amplifikovaných z DNA *B. animalis* naředěné od 10 ng/μl do 10 fg/μl. Na gel bylo naneseno 25 μl PCR produktu.

- Nejmenší detekovatelné množství DNA *Bifidobacterium animalis* RB1-MP amplifikované v PCR za vzniku specifického PCR produktu dobře detekovatelného na gelu je 10 pg.

4.3.2 Určení nejmenšího množství DNA amplifikované v rodově specifické PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2

Nejmenší množství DNA amplifikované v rodově specifické PCR za vzniku specifického amplikonu bylo určeno také s použitím primerů Pbi F1 a Pbi R2. V PCR směsi byl použit 1 μ l DNA naředěné v rozmezí 10 ng/ μ l - 10 fg/ μ l a program Bifi 914 (Tab. 10). Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů je uveden na Obr. 9.



+++ , ++ , + detekován PCR produkt různé intenzity
 - PCR produkt nedetekován
 * detekován slabý amplikon
 K⁺ pozitivní kontrola, *B. animalis*
 K⁻ negativní kontrola
 DNA standard 100 bp

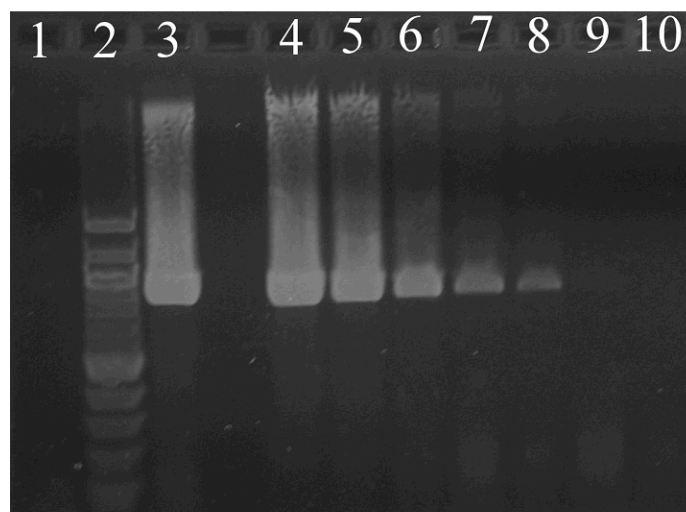
Běh	Množství DNA v PCR směsi	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-
2	Standard	100 bp žebříček
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	+++
4	10 ng	+++
5	1 ng	++
6	100 pg	+*
7	10 pg	-
8	1 pg	-
9	100 fg	-

Obr. 9: Gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (914 bp) amplifikovaných z DNA *B. animalis* naředěné od 10 ng/ μ l do 10 fg/ μ l. Na gel bylo naneseno 25 μ l PCR produktu.

- Nejmenší detekovatelné množství DNA *Bifidobacterium animalis* amplifikované v PCR s použitím primerů Pbi F1 a Pbi R2 za vzniku specifického PCR produktu dobře detekovatelného na gelu je 1 ng

4.3.3 Určení nejmenšího množství DNA amplifikované v druhově specifické PCR *B. animalis* s použitím primerů Pbi R1 a Ban F2

V druhově specifické PCR byl použit 1 μ l DNA, která byla naředěna v TE pufru na 10 ng/ μ l. Byly použity primery Pbi R1 a Ban F2 [67]. Gelová elektroforéza PCR produktů je zobrazena na Obr. 10.



+++ , ++ , + detekován PCR produkt různé intenzity
 - PCR produkt nedetekován
 K⁻ negativní kontrola
 K⁺ pozitivní kontrola, *B. animalis*
 * detekován slabý amplikon
 DNA standard 100 bp

Běh	Množství DNA v PCR směsi	Detekce PCR produktů
1	K ⁻	-
2	Standard	100 bp žebříček
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	+++
4	10 ng	+++
5	1 ng	+++
6	100 pg	++
7	10 pg	++
8	1 pg	+
9	100 fg	+*
10	10 fg	-

Obr. 10: Gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (925 bp) amplifikovaných z postupně ředěného množství DNA v rozmezí 10 ng/ μ l - 10 fg/ μ l. Na gel bylo nanášeno 25 μ l PCR produktu.

- Nejnižší množství DNA, které je amplifikovatelné v PCR při použití druhově specifických primerů za vzniku druhově specifického PCR produktu dobře detekovatelného na gelu je 1 pg

4.3.4 Srovnání citlivosti provedených PCR

Byla stanovena citlivost rodově specifických PCR pro rod *Bifidobacterium* a druhově specifické PCR pro druh *B. animalis*. Srovnání citlivosti jednotlivých PCR reakcí je uvedeno v Tab. 15. Výpočet množství buněk, které odpovídá nejmenšímu množství DNA amplifikované v PCR a detekované na gelu vychází z předpokladu, že 2 fg odpovídají chromosomální DNA v 1 buňce.

Tab. 15: Citlivosti použitých rodově a druhově specifických PCR.

Primery	Velikost ampliconu	Nejmenší množství amplifikované DNA	Odpovídající počet buněk
rodově specifická PCR			
Bif 164	523 bp	10 pg	$5 \cdot 10^3$
Bif 662			
Pbi F1	914 bp	1 ng	$5 \cdot 10^5$
Pbi R2			
druhově specifická PCR			
Pbi R1	925 bp	1 pg	$5 \cdot 10^2$
Ban F2			

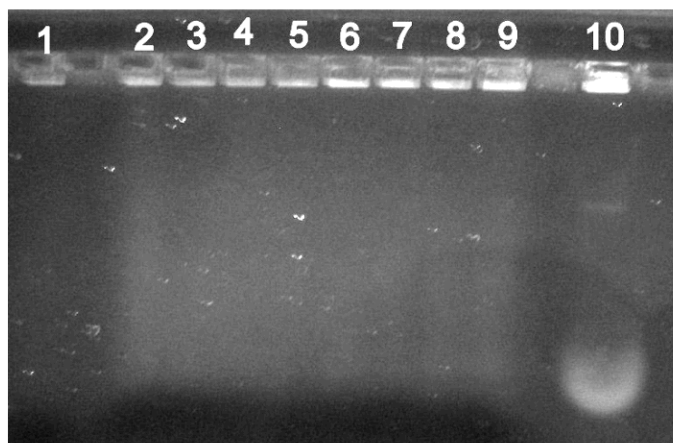
- Citlivost použitých rodově specifických PCR reakcí byla asi $5 \cdot 10^3$ až $5 \cdot 10^5$ buněk/PCR směs.
- Druhově specifická PCR s použitím primerů Pbi R1 a Ban F2 je nejcitlivější z provedených PCR reakcí. Nejnižší množství DNA, které je amplifikovatelné v této PCR za vzniku druhově specifického PCR produktu detekovatelného na gelu je 1 pg.

4.4 Příprava hrubých lyzátů buněk ze sýru s přídavkem *Bifidobacterium animalis* RB1-MP a izolace DNA metodou fenolové extrakce a pomocí magnetického nosiče

Nejprve byla testována lyze buněk a uvolnění DNA. K 1g Eidamského sýru 30 % BUDGET bylo přidáno 0,1 ml naředěné kultury *Bifidobacterium animalis* RB1-MP a 2 ml lyzačního roztoku B. Ze vzorků pak byla izolována DNA metodou fenolové extrakce a s využitím magnetických částic P(HEMA-co-GMA). DNA byla spektrofotometricky proměřena na NanoPhotometru a byla použita v PCR. Postupy jsou popsány v kap. 3.8.3, 3.8.4, 3.8.8 a 3.8.9.

4.4.1 Příprava hrubého lyzátu buněk ze sýru s přidavkem *Bifidobacterium animalis* RB1-MP

Z bakteriální kultury *Bifidobacterium animalis* RB1-MP a sýru s různým přidaným množstvím buněk *B. animalis* RB1-MP byly připraveny hrubé lyzáty buněk. Přítomnost DNA v hrubém lyzátu byla testována pomocí 0,8 % gelové elektroforézy na agaróze (Obr.11).



B. animalis hrubý lyzát z čisté kultury *Bifidobacterium animalis* RB1-MP
 + + +, + +, + detekována chromosomální DNA v různém množství

Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Množství buněk <i>B. animalis</i> přidaných k sýru [cfu/ml]	Detekce
1	Sýr	-	+
2	10^{-7}	9	+
3	10^{-6}	84	+
4	10^{-5}	496	+
5	10^{-4}	-	+
6	10^{-3}	-	++
7	10^{-2}	-	++
8	10^{-1}	-	++
9	1	-	++
10	<i>B. animalis</i>	-	+++

Obr.11: Gelová elektroforéza DNA s hrubými lyzáty. Na gel byla nanášeno 15 µl hrubých lyzátů buněk.

- Na 0,8 % gelu byla detekována chromosomální DNA u všech vzorků. Extrachromosomální DNA byla detekována u hrubého lyzátu čisté kultury *B. animalis* RB1-MP.

4.4.2 Izolace DNA ze séru s přídavkem *B. animalis* RB1-MP metodou fenolové extrakce

Z hrubých lyzátů buněk připravených dle kap. 3.8.3 byla bakteriální DNA izolovaná metodou fenolové extrakce s následným přesrážením ethanolem. Izolovaná DNA byla proměřena na NanoPhotometru. Spektrofotometricky byla změřena absorbance v rozmezí 220 – 320 nm u zředěných vzorků DNA *Bifidobacterium animalis* RB1-MP. Výsledky měření jsou zaznamenány v Tab. 16.

Tab. 16: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty celkové DNA v objemu 500 μ l (izolované ze séru a přídavkem *Bifidobacterium animalis* RB1-MP). Pro měření byl použit lid factor 5. DNA byla izolována metodou fenolové extrakce.

DNA ze séru s přídavkem <i>B. animalis</i> (ředění buněk)	Množství buněk [cfu/ml]	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	c [ng/ μ l]	celkové mn. DNA [μ g]
1	-	0,110	0,080	1,469	23,5	11,75
10^{-1}	-	0,152	0,108	1,494	33,3	16,65
10^{-2}	-	0,146	0,108	1,528	27,5	13,75
10^{-3}	-	0,159	0,113	1,460	36,5	18,25
10^{-4}	-	0,152	0,111	1,451	33,0	16,50
10^{-5}	496	0,114	0,082	1,444	26,0	13,00
10^{-6}	84	0,111	0,081	1,448	24,3	12,15
10^{-7}	9	0,101	0,070	1,517	22,8	11,40
Sýr	-	0,065	0,048	1,415	14,5	7,25

- Bylo izolováno od 7,25 do 18,25 μ g DNA. Hodnoty koncentrace DNA izolované fenolovou extrakcí se pohybovaly v rozmezí 14,5 ng/ μ l - 36,5 ng/ μ l. Tyto koncentrace DNA jsou vhodné pro použití v PCR.

4.4.3 Izolace bakteriální DNA ze séru s přídavkem *B. animalis* RB1-MP pomocí magnetických nosičů

Bakteriální DNA byla izolovaná z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA). Částice byly ještě před použitím promyty 0,5 M EDTA (kvůli vycytání možných Fe^{2+} iontů). Izolovaná DNA byla přes noc eluována do 100 μ l TE pufru. Čistota a koncentrace DNA izolované ze séru s přídavkem *B. animalis* RB1-MP byla zjištěna ze spektrofotometrického měření. Absorbance byla měřena proti TE pufru. Hodnoty jednotlivých absorbancí včetně koncentrace DNA jsou uvedeny v Tab. 17.

Tab. 17: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty celkové DNA eluované do 100 μ l. Byl použit Lid factor 5 a bylo nanášeno 6 μ l vzorku DNA. DNA byla izolována pomocí magnetického nosiče.

DNA ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> (ředění buněk)	Množství buněk [cfu/ml]	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	c [ng/ μ l]	celkové mn. DNA [ng]
1	-	0,015	0,009	2,200	2,8	275
10^{-1}	-	0,033	0,023	1,909	5,3	525
10^{-2}	-	0,032	0,018	2,273	6,3	625
10^{-3}	-	0,027	0,015	2,333	5,3	525
10^{-4}	-	0,037	0,025	1,857	6,5	650
10^{-5}	496	0,042	0,030	1,857	6,5	650
10^{-6}	84	0,043	0,031	1,800	6,8	675
10^{-7}	9	0,045	0,031	1,933	7,3	725
Sýr	-	0,045	0,032	1,929	6,8	675

- Byla izolována DNA v množství 275 ng - 725 ng a o koncentraci v rozmezí 2,75 - 7,25 ng/ μ l. Tyto koncentrace jsou vhodné pro použití v PCR.

4.4.4 Srovnání metod izolace DNA ze vzorku sýra s přídavkem *B. animalis* RB1-MP

DNA byla izolována ze sýru s přídavkem *B. animalis* pomocí dvou metod. Metodou fenolové extrakce bylo vyizolováno větší množství DNA. Množství DNA izolované magnetickými částicemi byl v porovnání s fenolovou extrakcí menší. Co se týká čistoty izolované DNA, pomocí magnetických částic byla vyizolována DNA poměrně vysoké čistoty (hodnoty poměru absorbancí A_{260}/A_{280} se pohybovaly mezi 1,8 – 2,0). Srovnání metod a porovnání získaného množství DNA je uvedeno v Tab. 18.

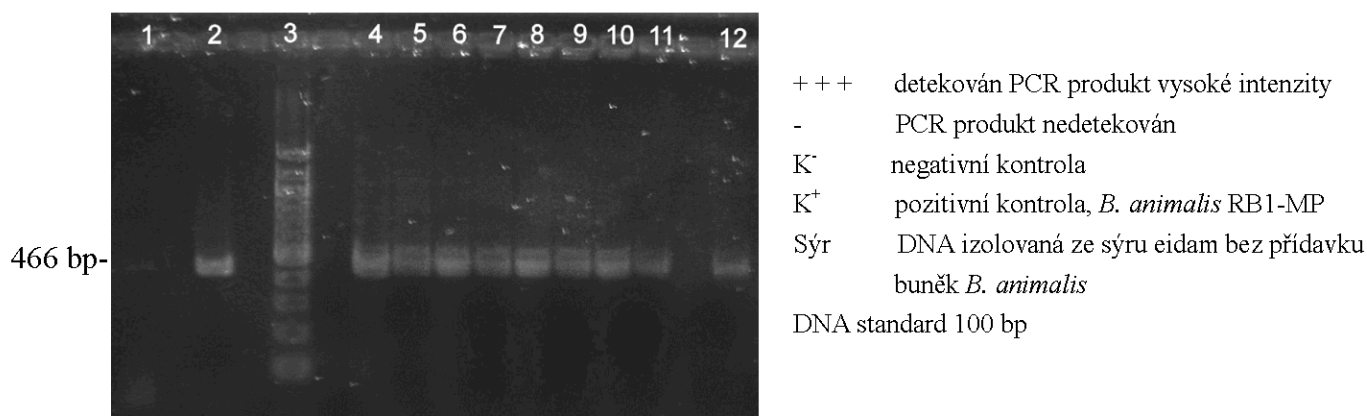
Tab. 18: Srovnání metod izolace DNA a získaných koncentrací

Izolace DNA	Objem hrubého lyzátu buněk [μ l]	Množství izolované DNA [μ g]	Množství izolované DNA [μ g] / 100 μ l hr. lyzátu buněk	Koncentrace DNA [ng/ μ l]
fenolová extrakce	500	7,3 – 18,3	1,5 – 3,7	14,5 – 36,5
magnetické nosiče	100	0,3 – 0,7	0,3 – 0,7	2,8 – 7,3

- Oběma metodami bylo izolováno dostatečné množství DNA pro použití v PCR. Množství DNA izolované fenolovou extrakcí bylo větší.

4.5 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované ze sýru s přídavkem *B. animalis* primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Amplifikovatelnost DNA izolované ze sýru s přídavkem různého množství buněk *Bifidobacterium animalis* RB1-MP byla ověřena s primery Feub a Reub podle Haarmanové s specifickým amplikonem o velikosti 466 bp [65]. PCR směs byla namíchána podle Tab. 6. Byl použit 1 µl DNA izolované fenolovou extrakcí a 30 cyklů PCR s programem EUBACTER. Výsledky gelové elektroforézy ampliconů jsou uvedeny na Obr. 12.



Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Množství buněk <i>B. animalis</i> přidaných k sýru [cfu/ml]	Množství DNA [µg] /PCR směs	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-	-	-
2	K ⁺ [10 ng/µl]	-	-	+++
3	Standard	-	-	100 bp žebříček
4	1	-	11,8	+++
5	10 ⁻¹	-	16,7	+++
6	10 ⁻²	-	13,8	+++
7	10 ⁻³	-	18,3	+++
8	10 ⁻⁴	-	16,5	+++
9	10 ⁻⁵	496	13,0	+++
10	10 ⁻⁶	84	12,2	+++
11	10 ⁻⁷	9	11,4	+++
12	Sýr	-	7,3	+++

Obr. 12: Gelová elektroforéza ampliconů (466 bp) po amplifikaci 1 µl DNA s doménově specifickými primery. DNA byla izolována ze vzorků sýru s přídavkem různého množství buněk *B. animalis*. Na gel byl nanesen 1 µl PCR směsi, 14 µl PCR vody a 3 µl vkladacího pufru.

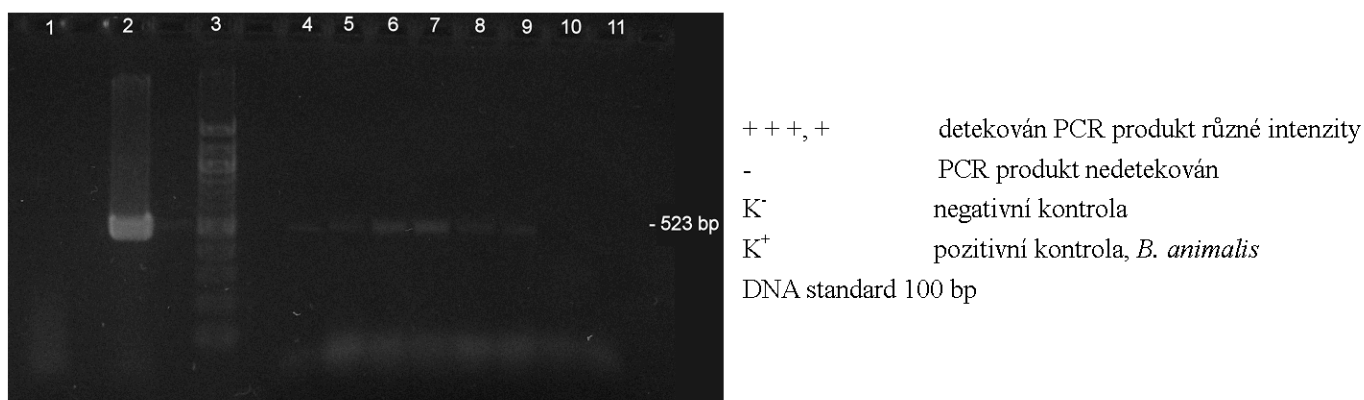
- U všech vzorků byl detekován amplicon o velikosti 466 bp. Byla ověřena přítomnost a amplifikovatelnost bakteriální DNA. Byly amplifikovány velmi intenzivní PCR produkty.

4.6 Rodově specifická PCR s primery Bif 164 a Bif 662

V rodově specifické PCR byla amplifikována DNA izolovaná ze sýru s přidavkem buněk *B. animalis*. Pro průkaz přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* byly použity rodově specifické primery Bif 164 a Bif 662 (PCR produkt o velikosti 523 bp) [66]. Amplifikace DNA probíhala s využitím programu Bifi 523 v 30 cyklech. PCR produkty byly identifikovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

4.6.1 Amplifikace DNA izolované ze sýru s přidavkem *B. animalis* fenolovou extrakcí

Pro amplifikaci s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* byl v PCR směsi použit 1 µl eluované DNA izolované fenolovou extrakcí a bylo použito 30 cyklů PCR. Gelová elektroforéza ampliconů je na Obr.13.



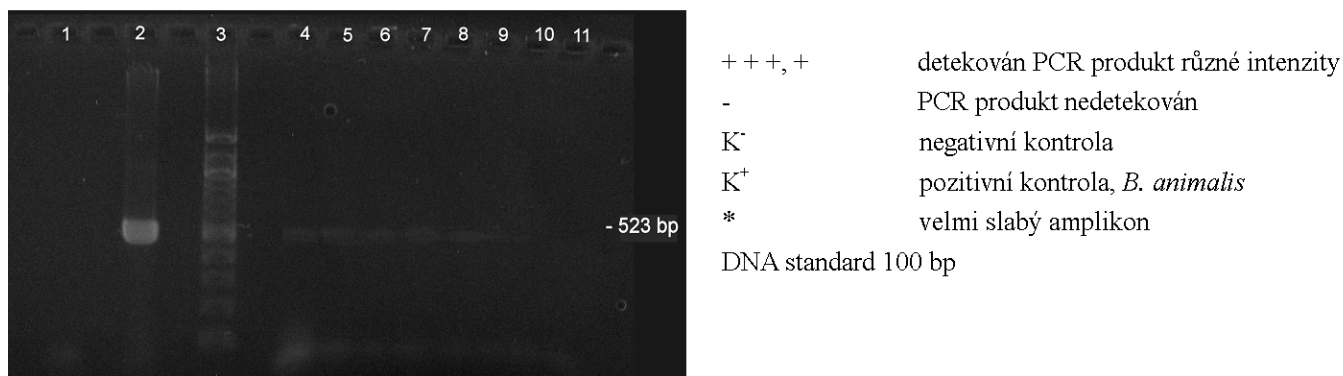
Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Množství buněk <i>B. animalis</i> přidaných k sýru [cfu/ml]	Množství DNA [µg] /PCR směs	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-	-	-
2	K ⁺ [10 ng/µl]	-	-	+++
3	Standard	-	-	100 bp žebříček
4	1	-	11,8	+
5	10 ⁻¹	-	16,7	+
6	10 ⁻²	-	13,8	+
7	10 ⁻³	-	18,3	+
8	10 ⁻⁴	-	16,5	+
9	10 ⁻⁵	496	13,0	+
10	10 ⁻⁶	84	12,2	-
11	10 ⁻⁷	9	11,4	-

Obr.13: Gelová elektroforéza PCR produktů po amplifikaci 1µl DNA v 30 cyklech PCR. Na gel bylo nanášeno 25 µl vzorku.

- PCR produkty specifické pro rod *Bifidobacterium* byly detekovány ve všech vzorcích sýru s výjimkou posledních 2, které obsahovaly nejmenší počet buněk *Bifidobacterium*.

4.6.2 Amplifikace DNA izolované ze sýru s přidavkem *B. animalis* magnetickými částicemi

V PCR směsi byl použit 1 μ l DNA izolované pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA). Výsledky gelové elektroforézy ampliconů jsou uvedeny na Obr. 14.



Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Množství buněk <i>B. animalis</i> přidaných k sýru [cfu/ml]	Množství DNA [ng] /PCR směs	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-	-	-
2	K ⁺ [10 ng/ μ l]	-	-	+++
3	Standard	-	-	100 bp žebříček
4	1	-	275	+
5	10 ⁻¹	-	525	+
6	10 ⁻²	-	625	+
7	10 ⁻³	-	525	+
8	10 ⁻⁴	-	650	+
9	10 ⁻⁵	496	650	+ *
10	10 ⁻⁶	84	675	-
11	10 ⁻⁷	9	725	-

Obr. 14: Gelová elektroforéza PCR produktů (523 bp) po amplifikaci 1 μ l DNA s rodově specifickým primery Bif 164 a Bif 662. DNA byla izolována ze vzorku sýru s přidavkem různého množství *B. animalis* magnetickými nosiči. Na gel bylo naneseno 25 μ l PCR směsi.

- PCR produkty specifické pro rod *Bifidobacterium* byly detekovány ve všech vzorcích sýru s výjimkou posledních 2, ke kterým byl přidán nejmenší počet buněk *Bifidobacterium*.

4.6.3 Souhrn výsledků rodově specifických PCR s primery Bif 164 a Bif 662

V rodově specifické PCR, kde byla použita DNA izolovaná magnetickými částicemi P(HEMA-co-GMA) a fenolovou extrakcí byly detekovány PCR produkty u všech vzorků sýru s přidaným různým množstvím buněk *B. animalis* mimo vzorky ředění buněk 10^{-6} a 10^{-7} , tyto vzorky obsahovaly nejmenší počet buněk *Bifidobacterium*. Metody izolace DNA byly srovnány a výsledky jsou uvedeny v Tab. 19.

Tab. 19: Srovnání metod izolace DNA použité v rodově specifické PCR

Izolace DNA	Počet přidaných buněk <i>Bifidobacterium</i>	Odpovídající množství DNA	DNA /PCR směs	Citlivost PCR reakce
fenolová extrakce	~ 500	1000 fg	13000 ng	10 pg
magnetické nosiče	~ 500	1000 fg	650 ng	

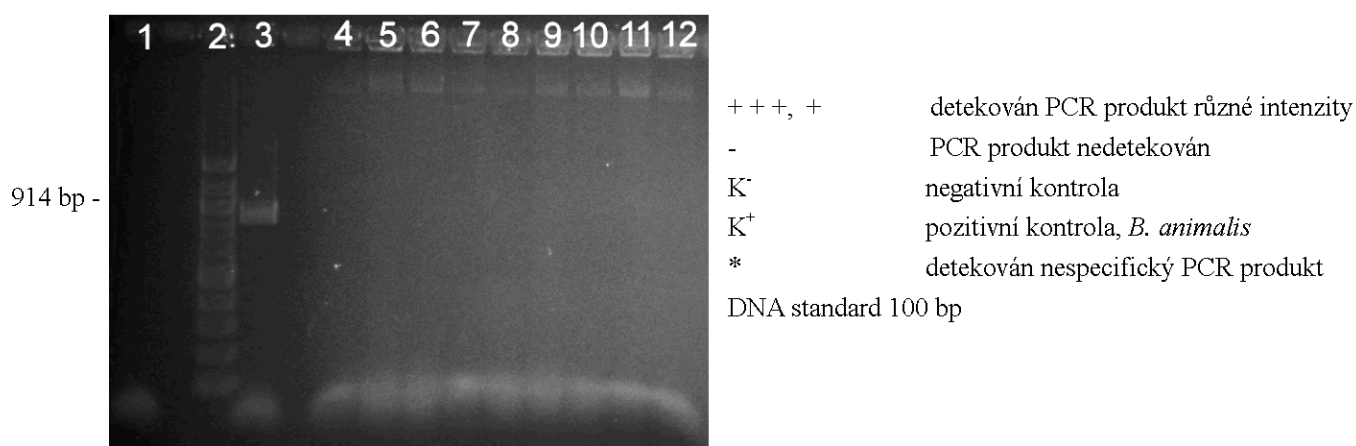
- Pomocí obou metod izolace DNA byla ve vzorcích sýru detekována přítomnost *Bifidobacterium* v pg množstvích, což odpovídá citlivosti PCR reakce.

4.7 Rodově specifická PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2

Přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium* bylo testováno také s druhou sadou rodově specifických primerů. DNA izolovaná fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi byla použita v rodově specifické PCR s rodově specifickými primery Pbi F1 a Pbi R2 s specifickým amplikonem o velikosti 914 bp [65]. Amplifikace DNA probíhala s využitím programu Bifi 914 v 30 cyklech. PCR produkty byly identifikovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

4.7.1 Amplifikace DNA izolované ze sýru s přídavkem *B. animalis* fenolovou extrakcí

Pro amplifikaci s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* bylo použito 5 μ l DNA izolované ze vzorku sýru s přídavkem různého množství buněk *B. longum* fenolovou extrakcí. Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů je na Obr. 15.

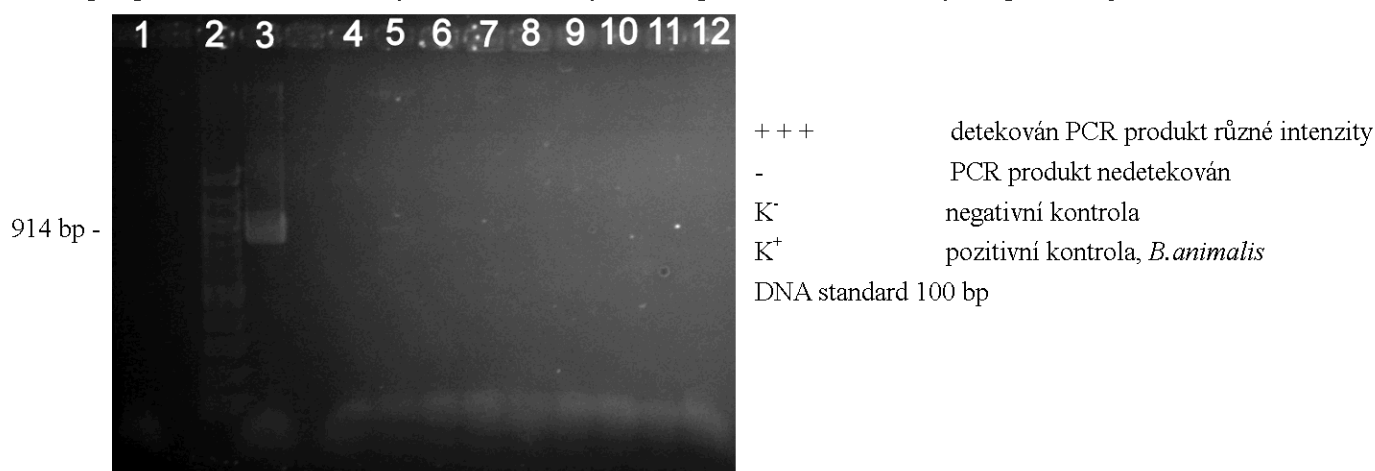


Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Množství buněk <i>B. animalis</i> přidaných k sýru [cfu/ml]	Množství DNA [μ g] /PCR směs	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-	-	-
2	Standard	-	-	100 bp žebříček
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	-	-	+++
4	1	-	11,8	+ *
5	10 ⁻¹	-	16,7	+ *
6	10 ⁻²	-	13,8	+ *
7	10 ⁻³	-	18,3	+ *
8	10 ⁻⁴	-	16,5	+ *
9	10 ⁻⁵	496	13,0	+ *
10	10 ⁻⁶	84	12,2	+ *
11	10 ⁻⁷	9	11,4	+ *
12	Sýr	-	-	+ *

Obr. 15: Gelová elektroforéza PCR produktů (914 bp) amplifikovaných z DNA izolované fenolovou extrakcí. Bylo použito 30 cyklů PCR.

4.7.2 Amplifikace DNA izolované ze sýru s přidavkem *B. animalis* magnetickými nosiči

V PCR směsi bylo použito 5 μ l DNA, která byla izolována pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA). Stejně jako u PCR s DNA izolovanou fenolovou extrakcí byl použit program Bifi 914 v 30 cyklech PCR. Výsledek gelové elektroforézy amplikonů je na Obr.16.



Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Množství buněk <i>B. animalis</i> přidanych k sýru [cfu/ml]	Množství DNA [ng] /PCR směs	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-	-	-
2	Standard	-	-	100 bp žebříček
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	-	-	+++
4	1	-	275	-
5	10 ⁻¹	-	525	-
6	10 ⁻²	-	625	-
7	10 ⁻³	-	525	-
8	10 ⁻⁴	-	650	-
9	10 ⁻⁵	496	650	-
10	10 ⁻⁶	84	675	-
11	10 ⁻⁷	9	725	-
12	Sýr	-	-	-

Obr.16: Gelová elektroforéza PCR produktů (914 bp) amplifikovaných z DNA izolované magnetickými nosiči. Na gel bylo naneseno 25 μ l PCR produktu.

4.7.3 Shrnutí výsledků rodově specifické PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2

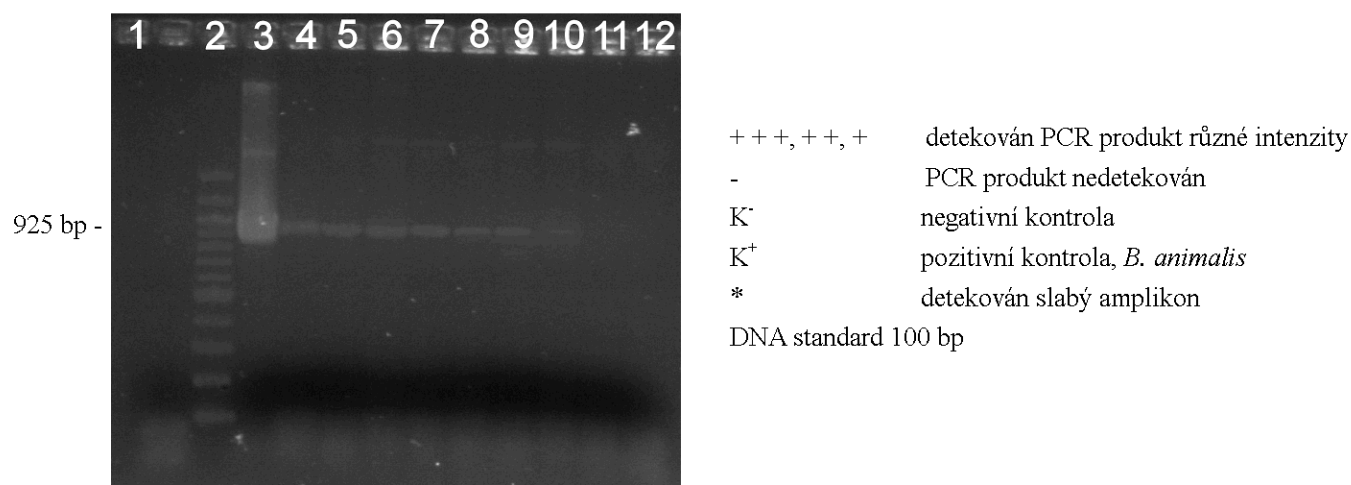
V PCR s rodově specifickými primery Pbi F1 a Pbi R2 byla použita DNA izolovaná ze sýru s přidavkem různého množství buněk *B. animalis* metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA) u všech vzorků. Citlivost této rodově specifické reakce je nízká v porovnání s rodově specifickou PCR s primery Bif 164 a Bif 662, nejspíš proto nebyly PCR produkty amplifikované z DNA detekovány.

4.8 Druhově specifická PCR *B. animalis* s primery Pbi R1 a Ban F2

DNA izolovaná z komplexu sýru s buňkami *B. animalis* fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi byla použita v druhově specifické PCR s druhově specifickými primery Pbi R1 a Ban F2 s specifickým amplikonem o velikosti 925 bp. Amplifikace DNA probíhala s využitím programu BANIM v 35 cyklech. K detekci PCR produktů byla použita gelová elektroforéza.

4.8.1 Amplifikace DNA izolované ze sýru s přídavkem *B. animalis* fenolovou extrakcí

Pro amplifikaci s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium animalis* bylo použito 5 μ l DNA izolované ze vzorku sýru s přídavkem různého množství buněk *B. animalis* fenolovou extrakcí. Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů je na Obr. 17.

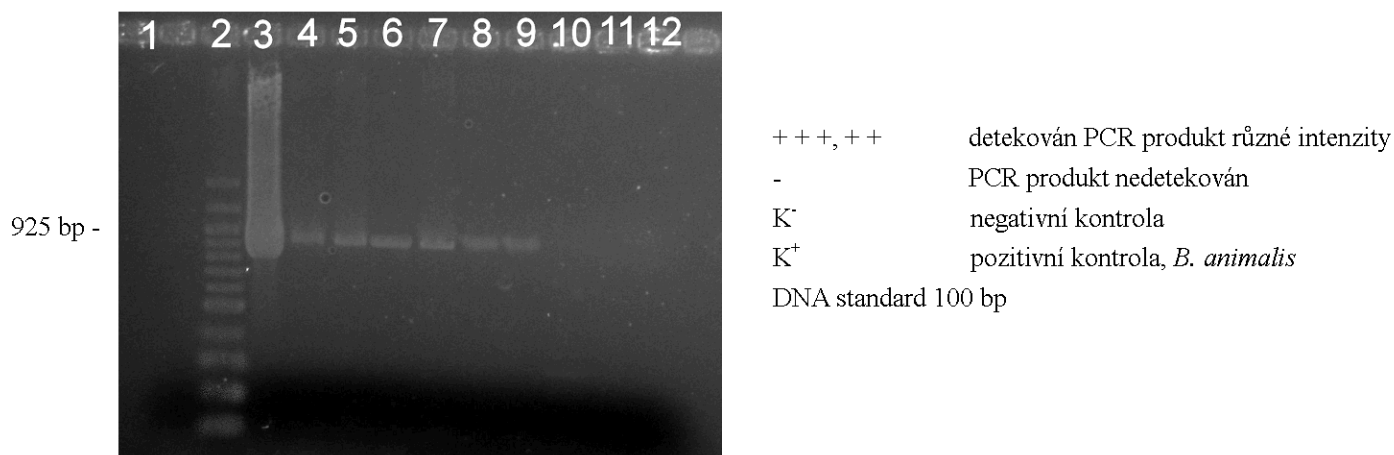


Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Množství buněk <i>B. animalis</i> přidaných k sýru [cfu/ml]	Množství DNA [μ g] /PCR směs	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-	-	-
2	Standard	-	-	100 bp žebříček
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	-	-	+++
4	1	-	11,8	++
5	10 ⁻¹	-	16,7	++
6	10 ⁻²	-	13,8	++
7	10 ⁻³	-	18,3	++
8	10 ⁻⁴	-	16,5	++
9	10 ⁻⁵	496	13,0	++
10	10 ⁻⁶	84	12,2	+*
11	10 ⁻⁷	9	11,4	-
12	Sýr	-	-	-

Obr. 17: Gelová elektroforéza PCR produktů (925 bp) amplifikovaných z DNA izolované ze sýru s přídavkem buněk *B. animalis* fenolovou extrakcí.

4.8.2 Amplifikace DNA izolované ze sýru s přidavkem *B. animalis* magnetickými částicemi

V PCR směsi bylo použito 5 μ l DNA, která byla izolována pomocí magnetických částic. Byl použit program BANIM v 35 cyklech PCR. Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů je na Obr. 18.



Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Množství buněk <i>B. animalis</i> přidaných k sýru [cfu/ml]	Množství DNA [ng] /PCR směs	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-	-	-
2	Standard	-	-	100 bp žebříček
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	-	-	+++
4	1	-	275	++
5	10 ⁻¹	-	525	++
6	10 ⁻²	-	625	++
7	10 ⁻³	-	525	++
8	10 ⁻⁴	-	650	++
9	10 ⁻⁵	496	650	++
10	10 ⁻⁶	84	675	-
11	10 ⁻⁷	9	725	-
12	Sýr	-	-	-

Obr. 18: Gelová elektroforéza PCR produktů (925 bp) amplifikovaných z DNA izolované ze sýru s přidavkem buněk *B. animalis* magnetickými nosiči. Na gel bylo nanášeno 25 μ l PCR produktu.

4.8.3 Shrnutí výsledků druhově specifické PCR s primery Pbi R1 a Ban F2

V PCR s druhově specifickými primery Pbi R1 a Ban F2 byla použita DNA izolovaná ze sýru s přidavkem různého množství buněk *B. animalis* metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA). PCR produkty amplifikované z DNA byly detekovány u všech vzorků sýru s výjimkou posledního (u DNA izolované fenolovou extrakcí) nebo posledních 2 (u DNA izolované magnetickými nosiči), ve kterých bylo nejmenší množství přidaných buněk *B. animalis*. U vzorku sýru eidam bez přidavku buněk nebyl PCR produkt detekován.

4.9 Zakoncentrování DNA izolované magnetickými částicemi

Bakteriální DNA byla izolována ze sýru s přídavkem *B. animalis* RB1-MP magnetickými částicemi P(HEMA-co-GMA) podle postupu uvedeného v kap. 3.8.8. DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru. DNA byla izolovaná z 300 μ l hrubého lyzátu buněk a následně spektrofotometricky proměřena a použita v PCR.

4.9.1 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Na NanoPhotometru byly změřeny následující hodnoty absorbancí vypovídající o čistotě DNA a její koncentrace. DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru. Údaje jsou uvedeny v Tab. 20.

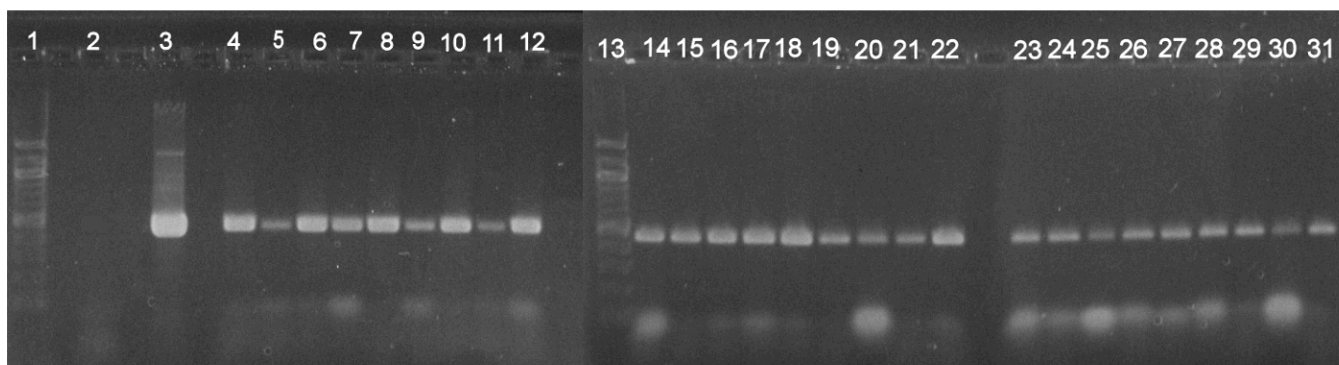
Tab. 20: Hodnoty absorbancí v rozpětí vlnových délek 230 – 320 nm. Pro měření byl použit lid factor 5. DNA byla izolována pomocí magnetických částic.

DNA ze sýru s přídavkem <i>B. animalis</i> (ředění buněk)	Množství buněk [cfu/ml]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	c [ng/ μ l]	celkové mn. DNA [ng]
1	-	0,038	0,062	8,3	413
10 ⁻¹	-	0,048	0,082	11,0	550
10 ⁻²	-	0,063	0,080	14,2	710
10 ⁻³	-	0,034	0,035	6,5	325
10 ⁻⁴	-	0,073	0,094	15,5	775
10 ⁻⁵	496	0,074	0,098	16,2	810
10 ⁻⁶	84	0,058	0,076	12,3	615
10 ⁻⁷	9	0,103	0,165	24,5	1225
Sýr	-	0,084	0,124	18,0	900

- Hodnoty koncentrací bakteriální DNA se pohybovaly v rozmezí 6,5 - 24,5 ng/ μ l a toto množství je dostatečné pro PCR.

4.9.2 Amplifikovatelnost zakoncentrované DNA s primery pro doménu *Bacteria*

DNA byla izolována pomocí magnetických nosičů a zakoncentrována elucí v menším množství TE pufru. Vzorčky se zakoncentrovanou DNA byly nejprve otestovány na doménu *Bacteria*. Do PCR směsi byl použit vždy 1 μ l zkoncentrované DNA, která byla naředěna v TE pufru v poměrech 1:1, 1:10 a 1:100, kvůli zjištění přítomnosti inhibitorů. PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy, která je uvedena na Obr. 19.



+++ , ++ , + detekován PCR produkt různé intenzity DNA standard 100 bp
 - PCR produkt nedetekován
 K⁻ negativní kontrola
 K⁺ pozitivní kontrola, *B. animalis*

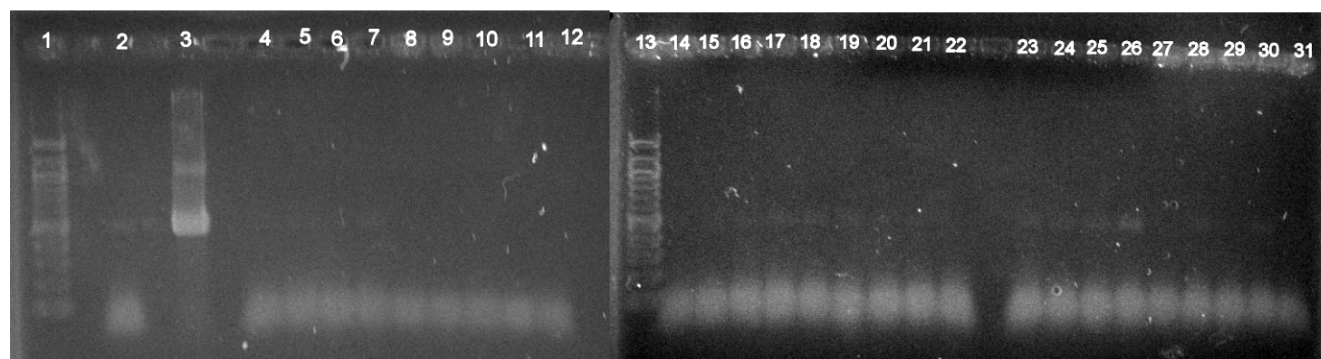
Běh	Vzorek/řede ní buněk <i>B. animalis</i>	Přídavek buněk <i>B. animalis</i>	Detekce PCR produkt u	Běh	Vzorek/řed ění buněk <i>B. animalis</i>	Přídavek buněk <i>B. animalis</i>	Detekce PCR produkt u
1	Standard	100 bp žebříček		13	Standard	100 bp žebříček	
2	K ⁻	-	-	14	1	-	++
3	K ⁺ [10 ng/μl]	-	+++	15	10 ⁻¹	-	++
4	1	-	++	16	10 ⁻²	-	++
5	10 ⁻¹	-	+	17	10 ⁻³	-	++
6	10 ⁻²	-	++	18	10 ⁻⁴	-	++
7	10 ⁻³	-	++	19	10 ⁻⁵	496	++
8	10 ⁻⁴	-	++	20	10 ⁻⁶	84	++
9	10 ⁻⁵	496	+	21	10 ⁻⁷	9	++
10	10 ⁻⁶	84	++	22	Sýr	0	++
11	10 ⁻⁷	9	+	23	1	-	++
12	Sýr	0	++	24	10 ⁻¹	-	++
				25	10 ⁻²	-	++
				26	10 ⁻³	-	++
				27	10 ⁻⁴	-	++
				28	10 ⁻⁵	496	++
				29	10 ⁻⁶	84	++
				30	10 ⁻⁷	9	++
				31	Sýr	0	++

Obr. 19: Gelová elektroforéza doménově specifických PCR produktů (466 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná pomocí magnetického nosiče neředěná, ředěná 10x a 100x.

- PCR produkty o velikosti 466 bp byly detekovány po amplifikaci neředěné, ředěné DNA 10x a 100x. Bakteriální DNA je tedy amplifikovatelná a může být dále použita v rodově specifické PCR. Různé intenzity PCR produktů odrážejí různé množství izolované DNA v PCR směsi.

4.9.3 Rodově specifická PCR pro rod *Bifidobacterium*

Zakonzentrovaná DNA izolovaná ze sýru s přídavkem buněk *B. animalis* byla testována na zařazení do rodu *Bifidobacterium*. V PCR směsi byl použit 1 μ l DNA, která byla ředěna v poměrech 1:1, 1:10 a 1:100. Výsledky gelové elektroforézy ampliconů jsou na **Obr. 20**.



+++ , ++ , + detekován PCR produkt různé intenzity DNA standard 100 bp
 - PCR produkt nedetekován * detekován slabý amplicon
 K⁻ negativní kontrola K⁺ pozitivní kontrola, *B. animalis*

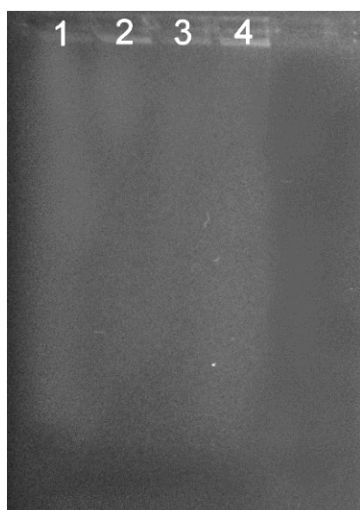
Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Přídavek buněk <i>B. animalis</i>	Detekce PCR produktu	Běh	Vzorek/ředění buněk <i>B. animalis</i>	Přídavek buněk <i>B. animalis</i>	Detekce PCR produktu		
1	Standard	100 bp žebříček		13	Standard	100 bp žebříček			
2	K ⁻	-	-	14	1	5. 10 ⁷	-		
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	-	+++	15	10 ⁻¹	5. 10 ⁶	-		
4	Ředění 1:1	1	5. 10 ⁷	-	16	10 ⁻²	5. 10 ⁵	+ *	
5		10 ⁻¹	5. 10 ⁶	-	17	10 ⁻³	5. 10 ⁴	+ *	
6		10 ⁻²	5. 10 ⁵	+ *	18	10 ⁻⁴	5000	+ *	
7		10 ⁻³	5. 10 ⁴	+ *	19	10 ⁻⁵	496	+ *	
8		10 ⁻⁴	5000	-	20	10 ⁻⁶	84	+ *	
9		10 ⁻⁵	496	-	21	10 ⁻⁷	9	+ *	
10		10 ⁻⁶	84	-	22	Sýr	0	-	
11		10 ⁻⁷	9	-	23	Ředění 1:100	1	5. 10 ⁷	+ *
12		Sýr	0	-	24		10 ⁻¹	5. 10 ⁶	+ *
					25		10 ⁻²	5. 10 ⁵	+ *
				26	10 ⁻³		5. 10 ⁴	+	
				27	10 ⁻⁴		5000	-	
				28	10 ⁻⁵		496	+ *	
				29	10 ⁻⁶		84	-	
				30	10 ⁻⁷		9	+ *	
				31	Sýr		0	-	

Obr. 20: Gelová elektroforéza PCR produktů amplifikovaných z zakonzentrované DNA izolované pomocí P(HEMA-co-GMA).

- Jen u některých vzorků ředěné DNA byly detekovány amplikony specifické pro rod *Bifidobacterium* (523 bp). Pravděpodobně spolu s zakoncentrováním DNA došlo ke zvýšení množství přítomných inhibitorů. Metoda zakoncentrování DNA izolované magnetickými částicemi P(HEMA-co-GMA) tedy není v našem experimentálním uspořádání vhodná. Nadále nebylo s zkoncentrovanou DNA pracováno.

4.10 Příprava hrubých lyzátů z reálných vzorků probiotických sýrů typu eidam

Byly zpracovány 4 vzorky sýrů PS 1, PS 8334, PS 8341 a PS 8346. Z probiotického sýru nakrájeného na drobné kousky byl připraven hrubý lyzát buněk dle kap.3.8.2 a následně byla izolována DNA metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA). Přítomnost DNA byla testována pomocí 0,8 % gelové elektroforézy. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 21.



Běh	Vzorek sýru	Detekce DNA
1	PS 1	+
2	PS 8334	+
3	PS 8341	+
4	PS 8346	+

+ detekována chromosomální DNA

Obr. 21: Gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk izolovaných z reálných vzorků probiotických sýrů. Na gel bylo naneseno 15 μ l hrubých lyzátů buněk.

- V hrubých lyzátech buněk bylo detekováno malé množství DNA, která byla částečně degradována.

4.11 Izolace DNA z probiotických sýrů metodou fenolové extrakce

Z hrubých lyzátů buněk připravených dle kap 3.8.2 byla DNA izolována metodou fenolové extrakce s následným přesrážením ethanolem popsané v kap.3.8.4 a 3.8.5. Izolovaná DNA byla proměřena na NanoPhotometru. Bylo nanášeno 6 μ l DNA eluované v 500 μ l TE pufru a použit lid factor 5. Spektrofotometricky byla změřena absorbance v rozmezí 220 – 320 nm. Výsledky měření jsou zaznamenány v Tab. 21.

Tab. 21: Výsledky spektrofotometrického měření DNA izolované ze sýrů fenolovou extrakcí.

Vzorek sýru	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	c [ng/ μ l]	Celkové mn. DNA [μ g]
PS 1	0,065	0,080	0,057	0,019	1,605	15,3	7,65
PS 8334	0,020	0,068	0,045	0,012	1,679	14,0	7,00
PS 8341	0,000	0,063	0,048	0,016	1,469	11,8	5,90
PS 8346	0,090	0,098	0,058	0,012	1,870	21,5	10,75

- Koncentrace celkové DNA izolované ze sýrů se pohybovala v rozmezí od 11,8 do 21,5 ng/ μ l. Byla izolována DNA v dostatečném množství pro PCR.

4.12 Izolace DNA z probiotických sýrů pomocí magnetických nosičů

Z hrubých lyzátů buněk byla bakteriální DNA izolovaná také pomocí magnetických nosičů P(HEMA-*co*-GMA) dle kap. 3.8.8. Izolovaná DNA byla proměřena na NanoPhotometru. Byl použit lid factor 5 a bylo nanášeno 6 μ l DNA eluované ve 100 μ l TE pufru. Spektrofotometricky byla změřena absorbance v rozmezí 220 – 320 nm. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 22.

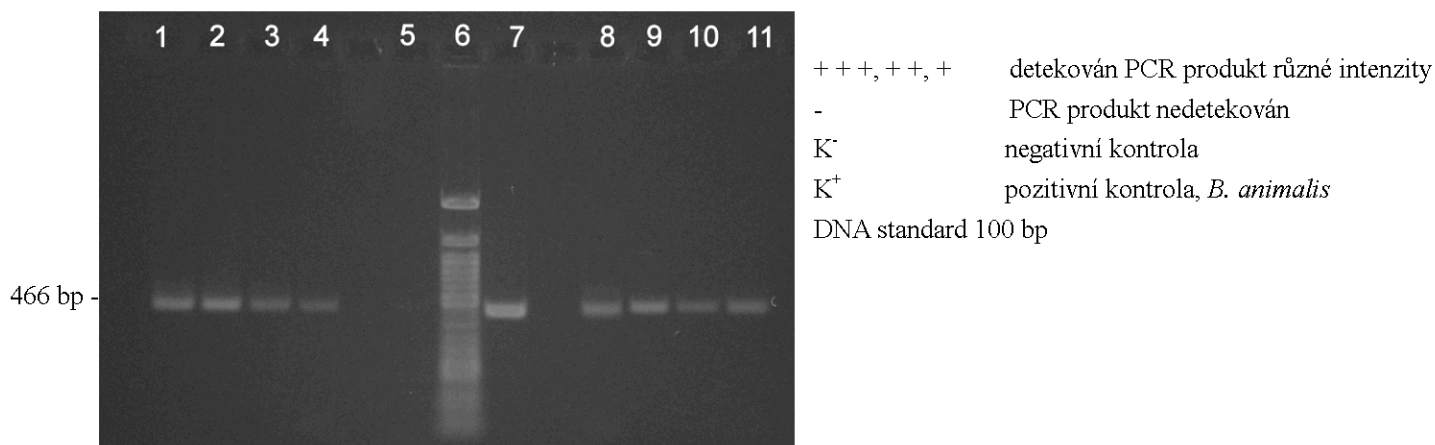
Tab. 22: Výsledky spektrofotometrického měření DNA izolované ze sýrů magnetickými nosiči.

Vzorek sýru	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	A ₂₆₀ / A ₂₃₀	c [ng/ μ l]	Celkové mn. DNA [μ g]
PS 1	0,070	0,069	0,041	0,016	2,120	0,981	13,3	1,33
PS 8334	0,058	0,042	0,025	0,011	2,214	0,660	7,8	0,78
PS 8341	0,037	0,029	0,022	0,010	1,583	0,704	4,8	0,48
PS 8346	0,135	0,030	0,023	0,007	1,437	0,180	5,8	0,58

- Koncentrace celkové DNA izolované ze sýrů magnetickými nosiči se pohybovaly v rozmezí od 4,8 do 13,3 ng/ μ l. DNA byla izolována v dostatečném množství pro použití v PCR.

4.13 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z probiotických sýrů s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Amplifikovatelnost DNA izolované z testovaných vzorků probiotických sýrů byla ověřena s primery Feub a Reub podle Haarmanové [65]. PCR směs byla namíchána podle Tab. 6. Byl použit 1 μ l DNA izolované fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči a 30 cyklů PCR s programem EUBACTER. Specifický amplikon byl o velikosti 466 bp [65]. Výsledek gelové elektroforézy amplikonů je uveden na Obr. 22.



Běh	Metoda izolace DNA	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	fenolová extrakce	PS 1	++
2		PS 8334	++
3		PS 8341	+
4		PS 8346	+
5	-	K ⁻	-
6	-	Standard	50 bp žebříček
7	-	K ⁺ [10 ng/ μ l]	+++
8	magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA)	PS 1	++
9		PS 8334	++
10		PS 8341	+
11		PS 8346	+

Obr. 22: Gelová elektroforéza amplikonů (466 bp) po amplifikaci 1 μ l DNA s doménově specifickými primery. DNA byla izolována ze vzorků probiotických sýrů fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči. Na gel byl nanesen 1 μ l PCR směsi, 14 μ l PCR vody a 3 μ l vkladacího pufu.

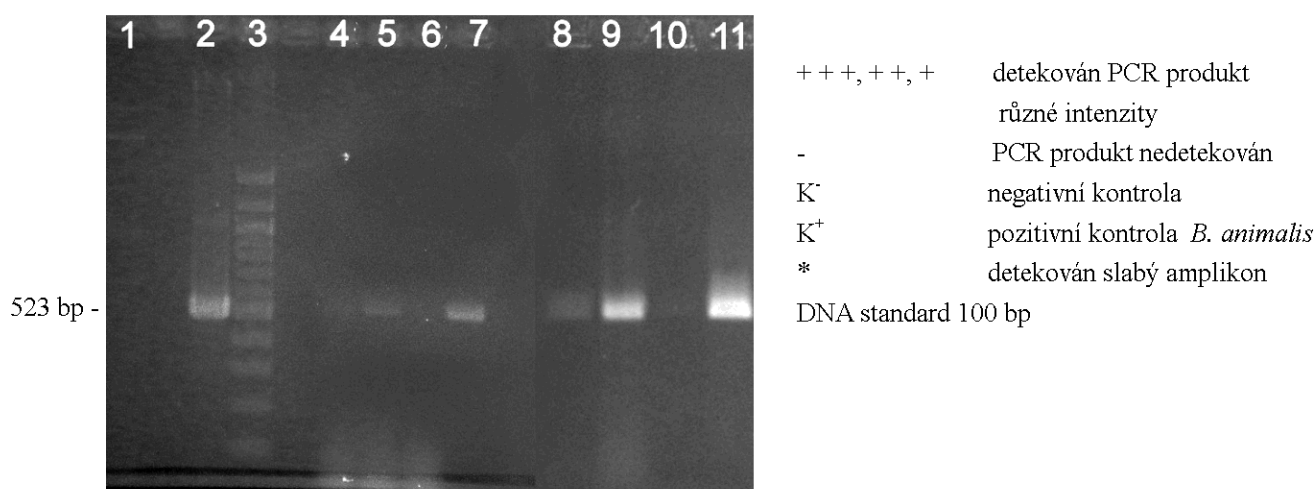
- Testem amplifikovatelnosti s primery Feub a Reub bylo ověřeno, že DNA izolovaná z probiotických sýrů je amplifikovatelná. PCR produkty byly detekovány u všech vzorků, což potvrzuje přítomnost DNA domény *Bacteria*.

4.14 Rodově specifická PCR s primery Bif 164 a Bif 662

Pro průkaz přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* byly použity rodově specifické primery Bif 164 a Bif 662 (PCR produkt o velikosti 523 bp) [66]. Amplifikace DNA probíhala s využitím programu Bifi 523. Gelová elektroforéza byla použita pro detekci ampliconů. Amplifikována byla DNA izolovaná fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči.

4.14.1 Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí

V PCR směsi byl použit 1 a 3 μ l DNA izolované z probiotických sýrů. DNA byla izolována metodou fenolové extrakce s následným přesrážením ethanolem. Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů je uveden na Obr. 23.



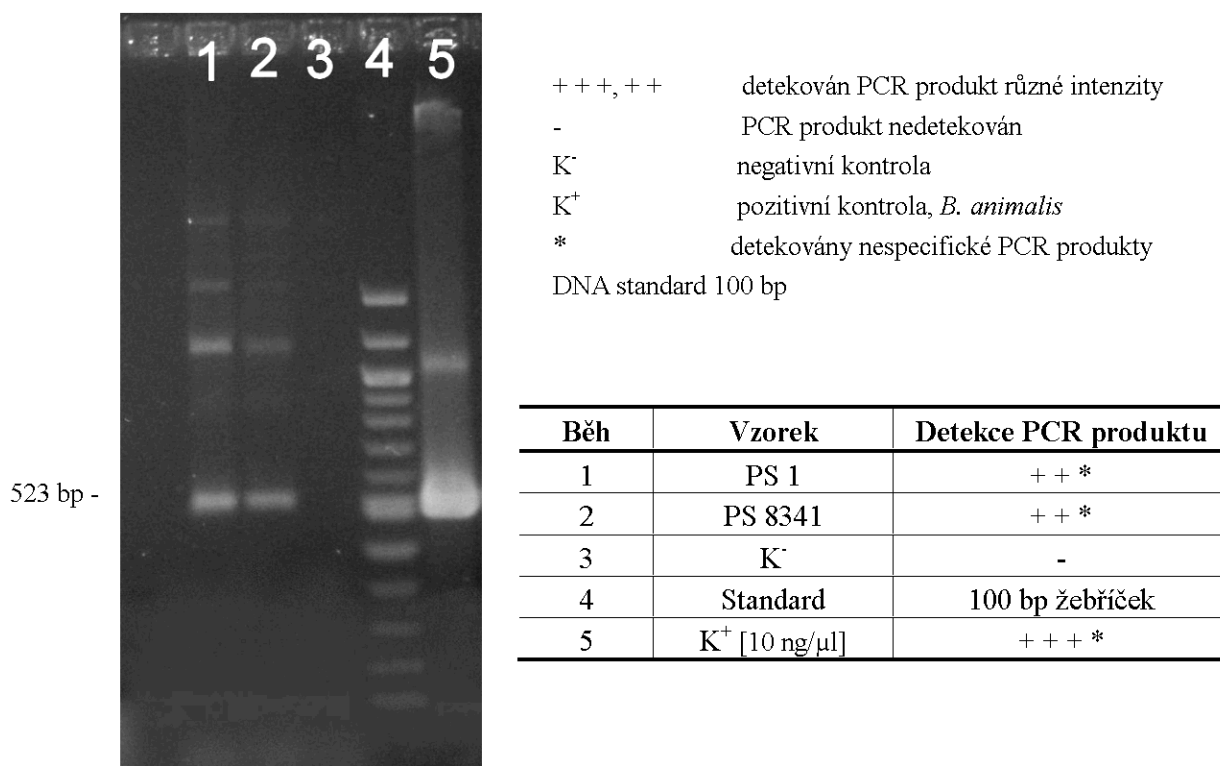
Běh	Vzorek	V _{DNA} v PCR směsi [μ l]	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-	-
2	K ⁺ [10 ng/ μ l]	1	+++
3	Standard	-	100 bp žebříček
4	PS 1	1	+ *
5	PS 8334	1	+
6	PS 8341	1	-
7	PS 8346	1	++
8	PS 1	3	+
9	PS 8334	3	++
10	PS 8341	3	+ *
11	PS 8346	3	+++

Obr. 23: Gelová elektroforéza PCR produktů (523 bp) amplifikovaných z DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí. V PCR směsi byl použit 1 μ l a 3 μ l DNA a 30 cyklů PCR. Na gel bylo naneseno 25 μ l PCR produktu.

- Při použití 1 µl DNA v PCR směsi byly detekovány amplikony vzorku PS 1, PS 8334 a PS 8346. U vzorku PS 8341 nebyl PCR produkt detekován. PCR produkty různé intenzity byly detekovány při amplifikaci 3 µl DNA všech vzorků.

4.14.2 Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí – navýšení množství DNA v PCR směsi a cyklů PCR

Jelikož v předchozí PCR reakci byly detekovány amplikony různé intenzity u vzorků PS 1 a PS 8341, byla provedena PCR s navýšeným množstvím DNA a cyklů. V PCR směsi bylo použito 5 µl DNA a 35 cyklů PCR. Gelová elektroforéza PCR produktů je uvedena na Obr. 24.

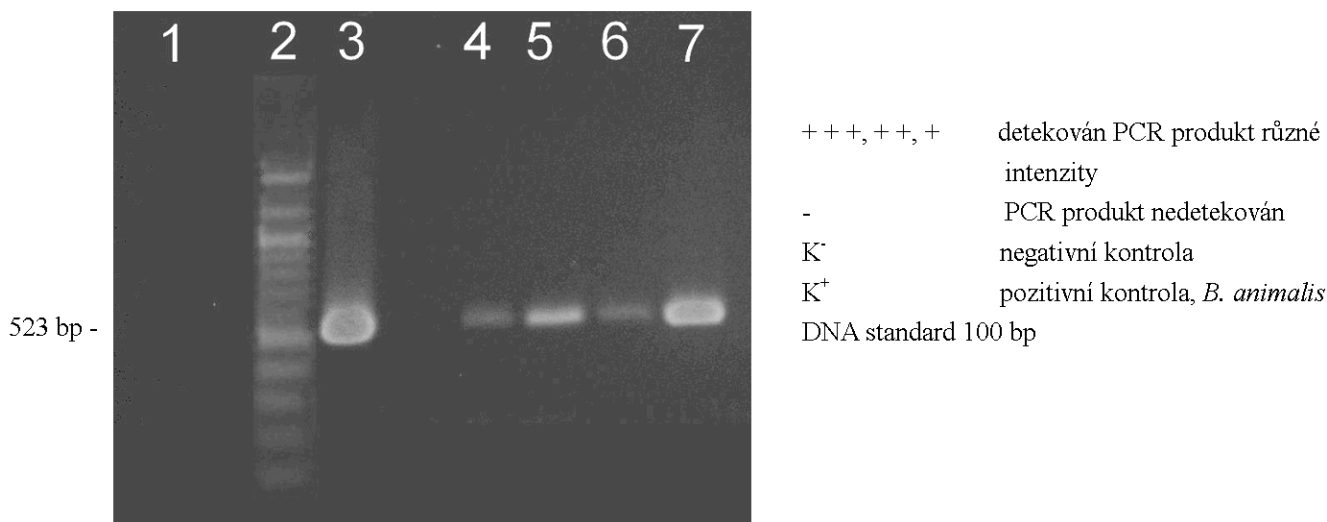


Obr. 24: Gelová elektroforéza PCR produktů (523 bp) amplifikovaných z DNA izolované z probiotických sýrů PS 1 a PS 8341 fenolovou extrakcí. V PCR směsi bylo použito 5 µl DNA. Na gel bylo nanášeno 25 µl PCR produktu.

- U vzorků DNA PS 1 a PS 8341 byly detekovány silnější amplikony při použití 5 µl DNA v PCR směsi a 35 cyklů PCR.

4.14.3 Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů magnetickými částicemi

V rodově specifické PCR s primery Bif 164 a Bif 662 bylo použito 5 μ l DNA izolované z probiotických sýrů pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA) a 30 cyklů PCR. Gelová elektroforéza PCR produktů (523 bp) je uvedena na Obr. 25.



Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-
2	Standard	100 bp žebříček
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	+++
4	PS 1	+
5	PS 8334	++
6	PS 8341	+
7	PS 8346	+++

Obr. 25: Gelová elektroforéza PCR produktů (523 bp) amplifikovaných z DNA izolované z probiotických sýrů magnetickými nosiči. V PCR směsi bylo použito 5 μ l DNA. Na gel bylo naneseno 25 μ l PCR produktu.

- Specifické PCR produkty rodu *Bifidobacterium* byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze všech probiotických sýrů.

4.14.4 Souhrn výsledků rodově specifické PCR s primery Bif 164 a Bif 662

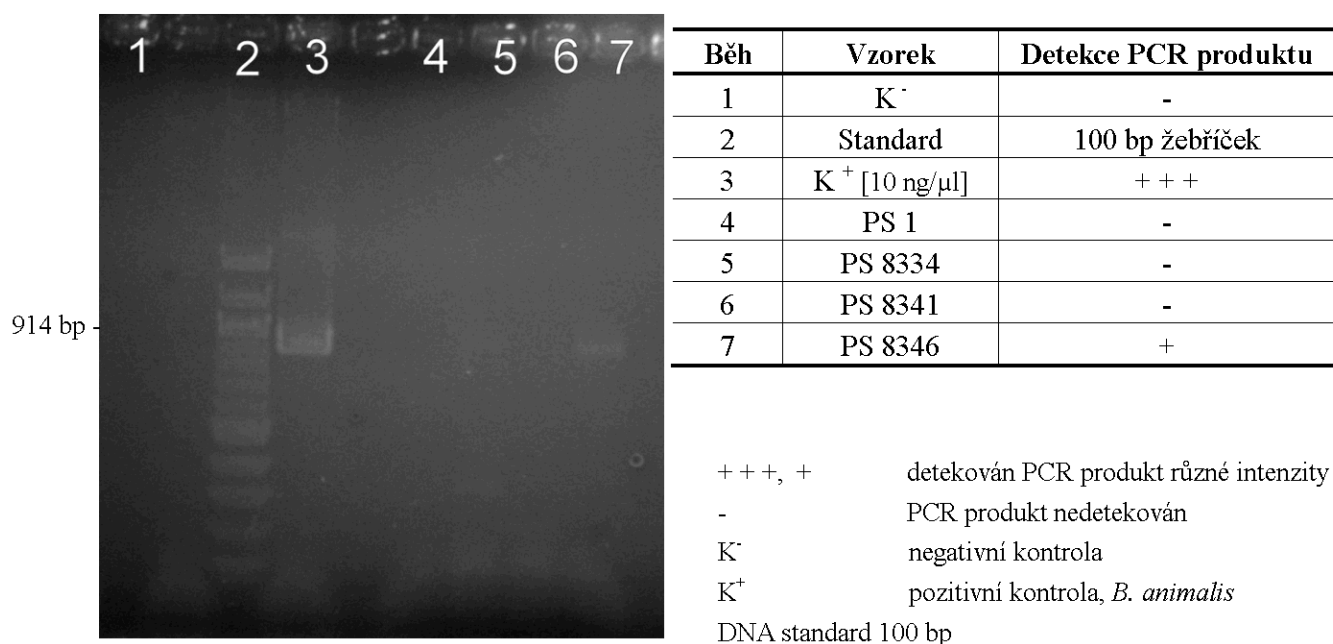
V rodově specifické PCR byla detekována DNA izolovaná z probiotických sýrů metodou fenolové extrakce i magnetickými částicemi. Byly detekovány specifické amplikony různé intenzity (523 bp). Množství DNA použité v PCR směsi se pohybovalo od 1 μ l do 5 μ l. DNA rodu *Bifidobacterium* byla prokázána ve všech vzorcích probiotických sýrů.

4.15 Rodově specifická PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2

DNA izolovaná z probiotických sýrů byla testována v rodově specifické PCR také s primery Pbi F1 a Pbi R2 [65] pro ověření přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium*. Pro amplifikaci cílové DNA byl zvolen program Bifi 914 a 35 cyklů PCR. PCR produkty byly vizualizovány na 1,8 % gelu. Amplifikována byla DNA izolovaná metodou fenolové extrakce a magnetickými nosiči.

4.15.1 Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí

V rodově specifické PCR bylo použito 5 μ l DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí a 35 cyklů PCR. Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů je uveden na Obr. 26.

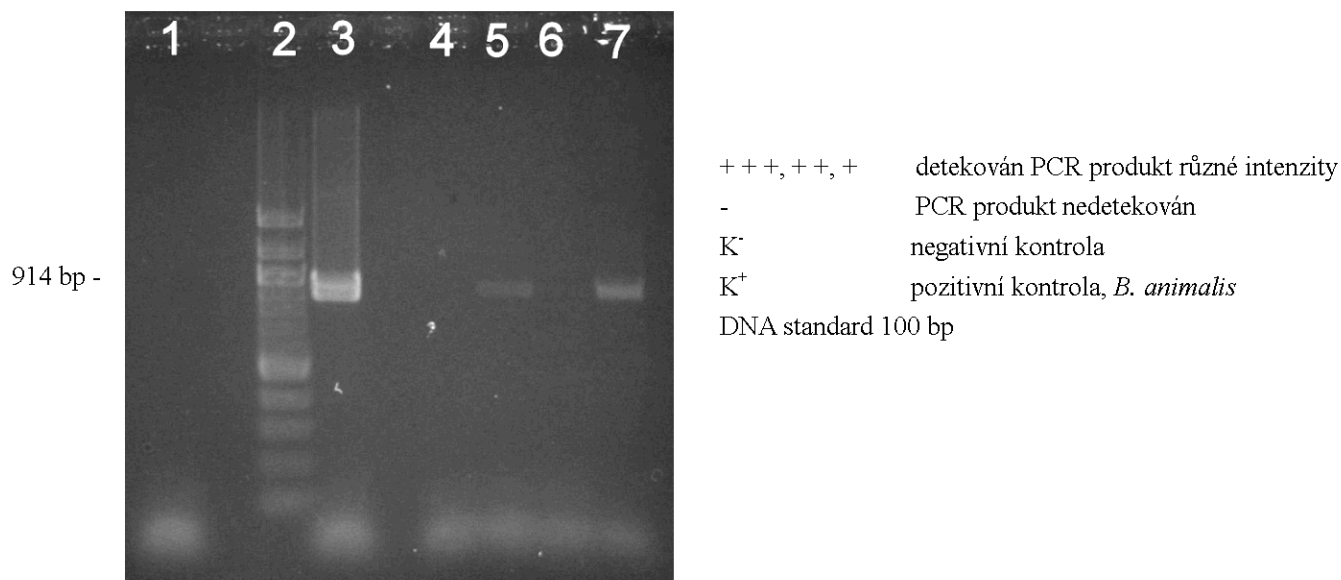


Obr. 26: Gelová elektroforéza PCR produktů (914 bp) amplifikovaných z DNA izolované fenolovou extrakcí z probiotických sýrů. Na gel bylo nanášeno 25 μ l PCR produktu.

- Specifický PCR produkt byl prokázán pouze po amplifikaci DNA izolované ze sýru PS 8346.

4.15.2 Amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů magnetickými nosiči

V PCR směsi bylo použito 5 μ l DNA izolované magnetickými nosiči P(HEMA-co-GMA) z probiotických sýrů. Bylo použito 35 cyklů PCR. Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů je uveden na Obr. 27.



Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	K ⁻	-
2	Standard	100 bp žebříček
3	K ⁺ [10 ng/ μ l]	+++
4	PS 1	-
5	PS 8334	+
6	PS 8341	-
7	PS 8346	++

Obr. 27: Gelová elektroforéza PCR produktů (914 bp) amplifikovaných z 5 μ l DNA izolované z probiotických sýrů magnetickými nosiči. Na gel bylo naneseno 25 μ l PCR produktu.

- Specifický PCR produkt byl detekován pouze po amplifikaci DNA izolované ze sýru PS 8334 a PS 8346.

4.15.3 Souhrn výsledků rodově specifické PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2

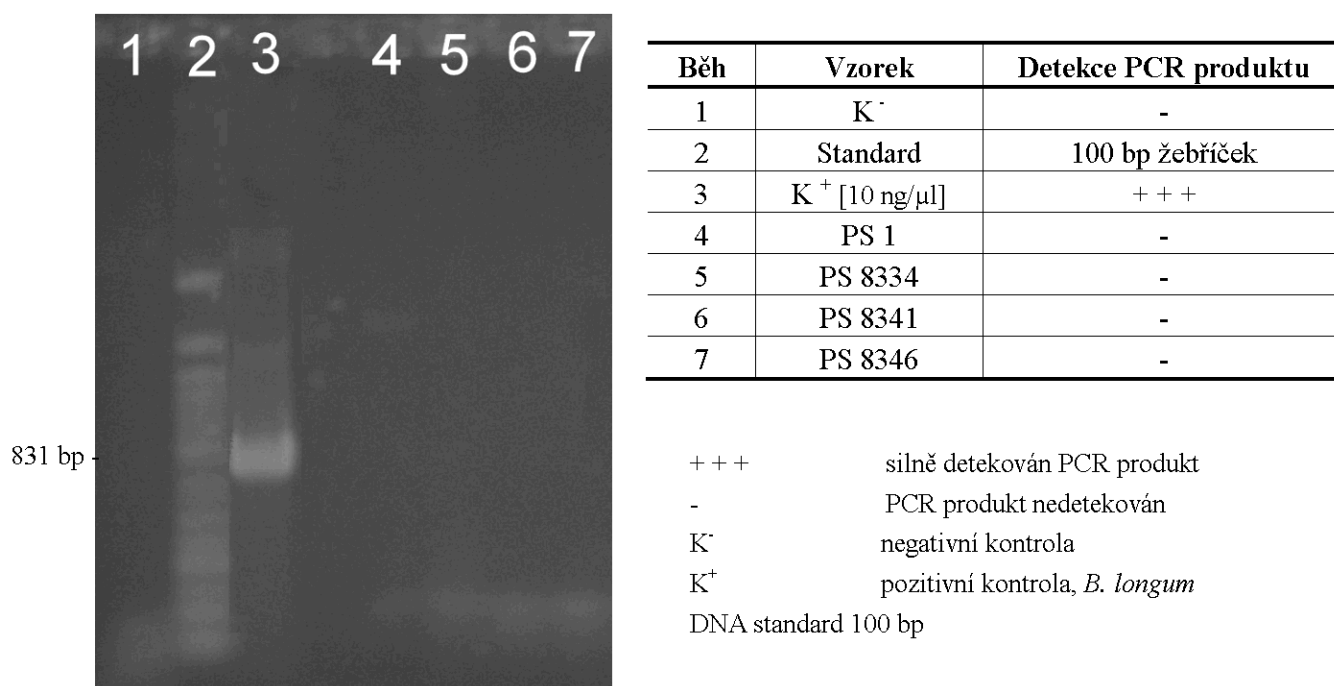
Pro ověření přítomnosti bakterií rodu *Bifidobacterium* byly zvoleny také primery Pbi F1 a Pbi R2, které byly použity pro amplifikaci 5 μ l DNA izolované z probiotických sýrů jak fenolovou extrakcí tak i pomocí magnetických nosičů. DNA rodu *Bifidobacterium* byla prokázána ve dvou vzorcích probiotických sýrů.

4.16 Zařazení bakterií rodu *Bifidobacterium* do druhu s využitím druhově specifických PCR

Pro druhové zařazení bakterií rodu *Bifidobacterium* byly provedeny 4 druhově specifické PCR reakce s druhově specifickými primery (Tab. 3). Byla amplifikována DNA izolovaná z reálných vzorků probiotických sýrů (PS 1, PS 8334, PS 8341 a PS 8346) metodou fenolové extrakce (Tab. 21).

4.16.1 Druhově specifická PCR *B. longum*

V PCR byly použity druhově specifické primery BiLON 1 a BiLON 2 [68], 1 µl DNA a 35 cyklů PCR v programu MATSUKI (Tab. 11). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z bakterií *Bifidobacterium longum* fenolovou extrakcí o koncentraci 10 ng/µl. Gelová elektroforéza PCR produktů je uvedena na Obr. 28.

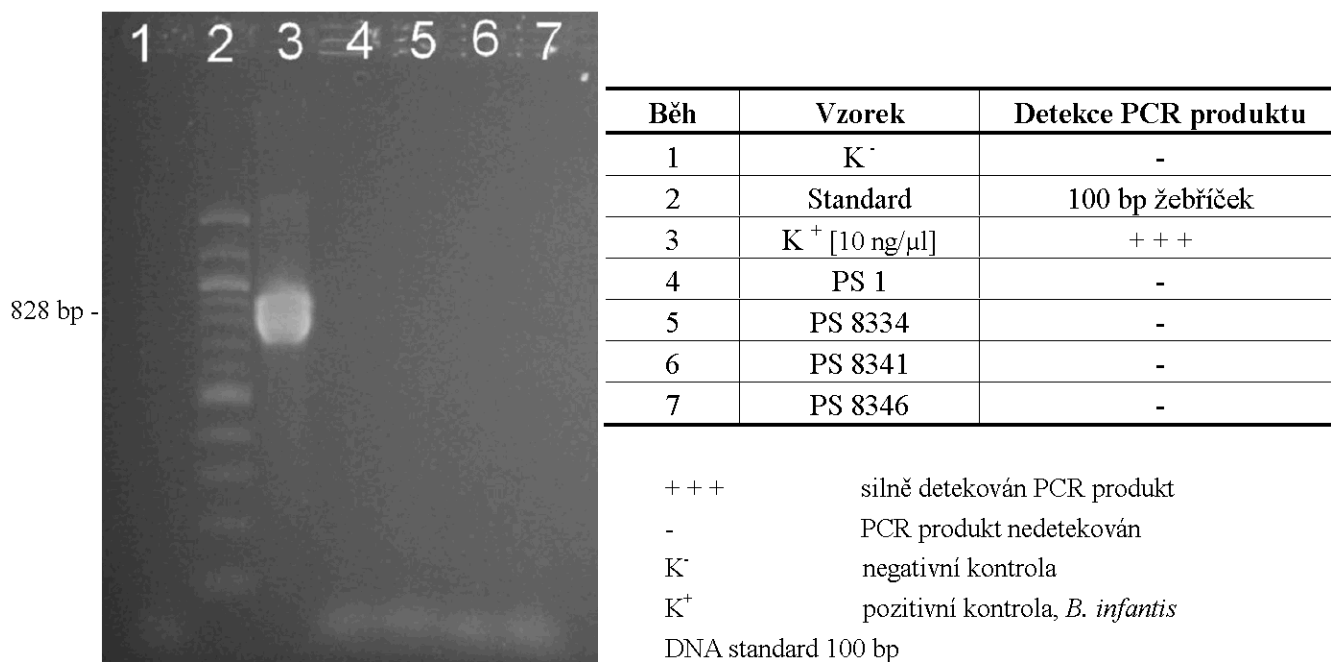


Obr. 28: Gelová elektroforéza PCR produktů (831 bp) amplifikovaných v druhově specifické PCR *B. longum*. Na gel bylo naneseno 25 µl PCR produktu.

- U žádného vzorku probiotického sýru nebyla prokázána přítomnost DNA druhu *Bifidobacterium longum*.

4.16.2 Druhově specifická PCR *B. infantis*

Byly použity druhově specifické primery BiINF-1 a BiINF-2 [68] a 35 cyklů PCR s použitím programu MATSUKI (Tab. 11). V PCR směsi byl použit 1 μ l DNA. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z bakterií *Bifidobacterium infantis* fenolovou extrakcí o koncentraci 10 ng/ μ l. Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů (828 bp) je uveden na Obr. 29.

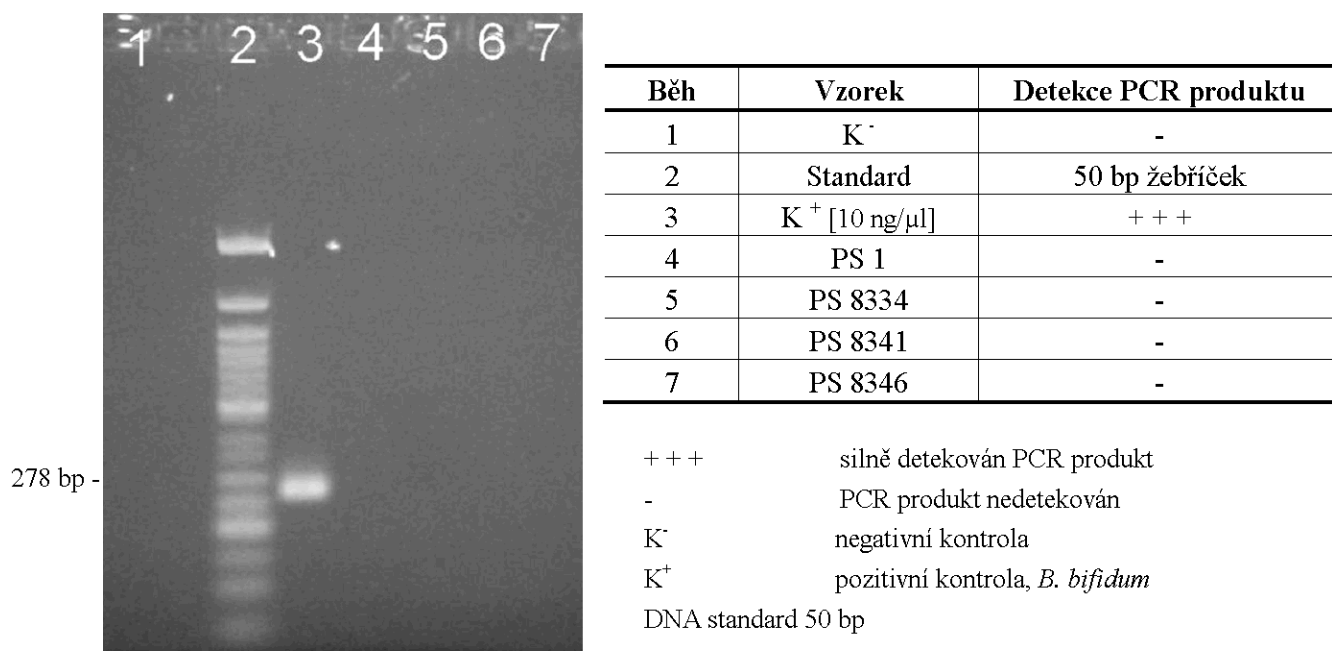


Obr. 29: Gelová elektroforéza PCR produktů (828 bp) amplifikovaných v druhově specifické PCR *B. infantis*. Na gel bylo nanášeno 25 μ l PCR produktu.

- U žádného vzorku probiotického sýru nebyly detekovány PCR produkty specifické pro druh *B. infantis*. DNA *B. infantis* nebyla ve vzorcích prokázána.

4.16.3 Druhově specifická PCR *B. bifidum*

V druhově specifické PCR byly použity primery BiBIF-1 a BiBIF-2 [68]. V PCR směsi byl použit 1 µl DNA izolované z probiotických sýrů a program MATSUKI (Tab. 11) a 35 cyklů PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z bakterií *Bifidobacterium bifidum* fenolovou extrakcí o koncentraci 10 ng/µl. Gelová elektroforéza PCR produktů (278 bp) je uvedena na Obr. 30.

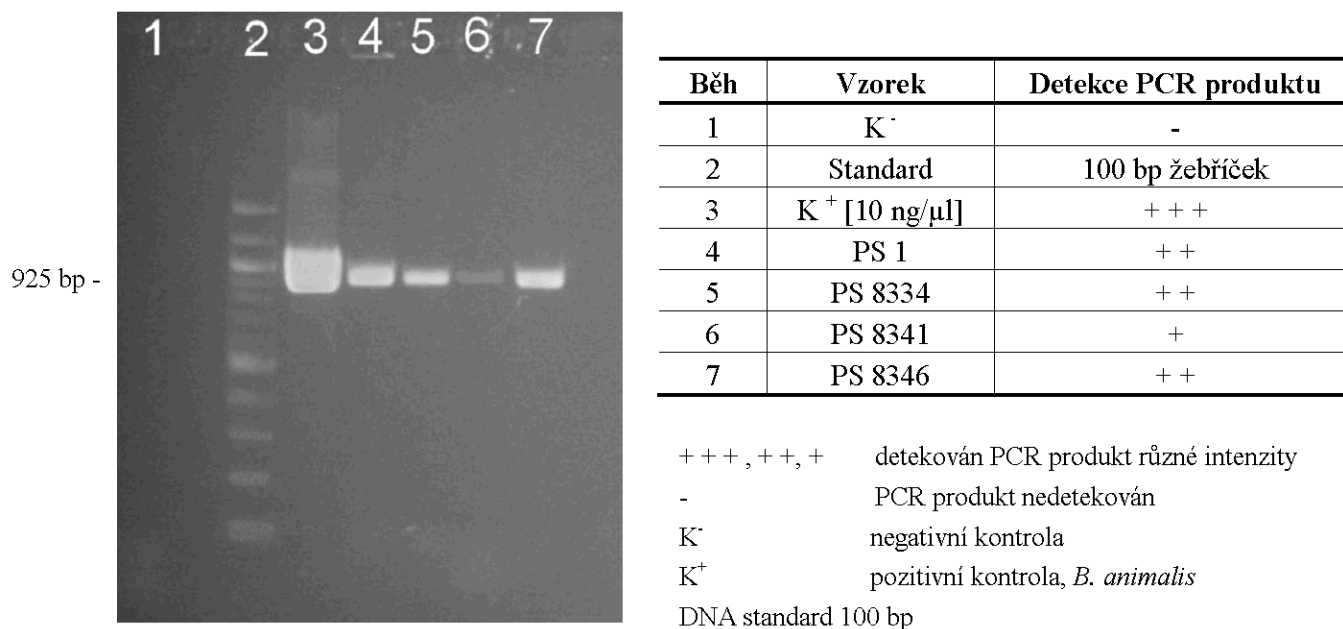


Obr. 30: Gelová elektroforéza PCR produktů (278 bp) amplifikovaných v druhově specifické PCR *B. bifidum*. Na gel bylo nanášeno 25 µl PCR produktu.

- U žádného vzorku probiotického sýru nebyla prokázána přítomnost DNA bakterií druhu *B. bifidum*.

4.16.4 Druhově specifická PCR *B. animalis*

V druhově specifické PCR pro druh *B. animalis* byly použity primery Pbi R1 a Ban F2 [67] s PCR produktem o velikosti 925 bp. Do PCR směsi byl pipetován 1 µl DNA. Byl zvolen program BANIM (Tab. 12) a 35 cyklů PCR. Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů je uveden na Obr. 31 .



Obr. 31: Gelová elektroforéza PCR produktů (925 bp) amplifikovaných v druhově specifické PCR *B. animalis*. Na gel bylo nanášeno 25 µl PCR produktu.

- U všech vzorků probiotických sýrů byla zjištěna přítomnost DNA *B. animalis*. PCR produkty (925 bp) byly detekovány v různé intenzitě.

4.16.5 Shrnutí výsledků druhově specifických PCR

Pro druhové zařazení bakterií rodu *Bifidobacterium* přítomných v probiotických sýrech byly použity celkem 4 druhově specifické PCR. Ve 3 druhově specifických PCR nebyly detekovány specifické PCR produkty. Pouze po amplifikaci DNA v druhově specifické PCR *B. animalis* byly detekovány specifické PCR produkty. Tím byla prokázána přítomnost bakterií druhu *B. animalis* ve všech analyzovaných vzorcích probiotických sýrů. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 23.

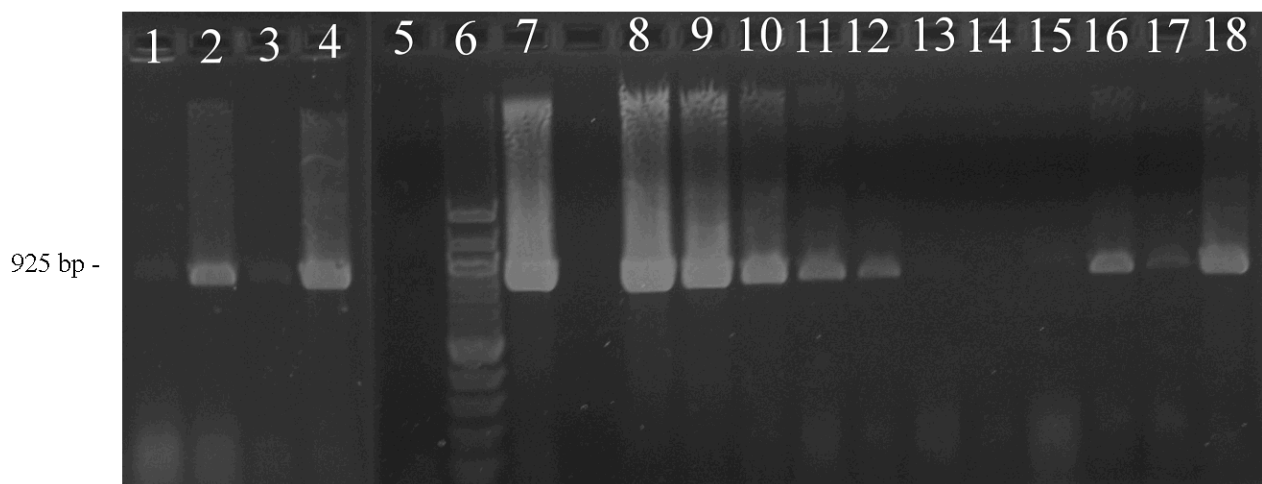
Tab. 23: Výsledek testování DNA izolované z probiotických sýrů v druhově specifických PCR

Vzorek sýru	Přítomnost DNA druhu <i>Bifidobacterium</i>			
	<i>B.longum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B.infantis</i>	<i>B. animalis</i>
PS 1	-	-	-	+
PS 8334	-	-	-	+
PS 8341	-	-	-	+
PS 8346	-	-	-	+

- Ve všech vzorcích probiotických sýrů byla zjištěna přítomnost bakterií *Bifidobacterium animalis*. Přítomnost bakterií druhu *B. longum*, *B. infantis* a *B. bifidum* nebyla prokázána.

4.17 Stanovení množství bakterií *B. animalis* v probiotických sýrech

Ve všech vzorcích probiotických sýrů byla prokázána přítomnost DNA bakterií *B. animalis*. Byly detekovány PCR produkty různé intenzity, což může odrážet různé množství DNA *Bifidobacterium animalis* ve vzorcích sýrů. Pro přibližné stanovení množství bakterií přítomných v sýrech byla provedena druhově specifická PCR s primery Pbi R1 a Ban F2. Na gel byly nanášeny PCR produkty amplifikované z DNA izolované ze sýrů metodou fenolové extrakce a magnetických nosičů a také amplifikované z purifikované DNA izolované z čisté kultury *B. animalis* fenolovou extrakcí naředěné od 10 ng/ μl po 10 fg/ μl. Gelová elektroforéza PCR produktů (925 bp) je uvedena na Obr. 32.



Běh	Metoda izolace DNA	Vzorek	Detekce PCR produktu	Množství DNA/PCR směs
1	fenolová extrakce	PS č.1	+ *	□ 1 pg
2		PS č. 8334	+	10 - 100 pg
3		PS č. 8341	+ *	□ 1 pg
4		PS č. 8346	+++	100 pg
5	-	K ⁻	-	-
6	-	Standard	100 bp žebříček	-
7	-	K ⁺	+++	10 ng
8	-	10 ng	+++	10 ng
9		1 ng	+++	1 ng
10		100 pg	++	100 pg
11		10 pg	++	10 pg
12		1 pg	+	1 pg
13		100 fg	-	100 fg
14		10 fg	-	10 fg
15	magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA)	PS č.1	+ *	□ 1 pg
16		PS č. 8334	+	10 pg
17		PS č. 8341	+ *	□ 1 pg
18		PS č. 8346	++	100 pg

+ + + , + + , + detekován PCR produkt různé intenzity K⁻ negativní kontrola
 - CR produkt nedetekován K⁺ pozitivní kontrola, *B. animalis*
 * detekován slabý amplicon 100 bp DNA standard

Obr. 32: Výsledek gelové elektroforézy PCR produktů (925 bp) amlifikovaných z DNA izolované z probiotických sýrů. Na gel bylo pro odhad množství DNA nanesena také naředěná DNA izolovaná z čisté kultury *B. animalis*. Na gel bylo naneseno 25 μl PCR produktu.

- Porovnáním intenzity PCR produktů bylo stanoveno přibližné množství DNA *B. animalis* přítomných v reálných vzorcích probiotických sýrů. Nejmenší množství cílové DNA o koncentraci nižší než 1 pg/ PCR směs bylo detekováno u vzorku sýru PS 1 a PS 8341. Srovnatelné množství DNA bylo detekováno po amplifikaci DNA izolované jak fenolovou extrakcí tak pomocí magnetických nosičů. U vzorku č. 8334 bylo detekováno množství DNA 10 pg/PCR směs po amplifikaci DNA izolované magnetickými nosiči a 10 – 100 pg/ PCR směs po amplifikaci DNA izolované fenolovou extrakcí. Největší množství DNA bylo detekováno u vzorku sýru č. 8346 a to okolo 100 pg/ PCR směs.

4.17.1 Srovnání výsledků amplifikace DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči

Amplifikací DNA izolované z reálných vzorků probiotických sýrů bylo prokázáno, že sýry obsahovaly různé množství DNA *B. animalis*. Nejvíce cílové DNA bylo obsaženo v sýru PS 8346, pak v PS 8334 a nejméně DNA *B. animalis* bylo přítomno ve vzorcích PS 8341 a PS 1. Stejně výsledky byly prokázány po amplifikaci DNA izolované oběma metodami, fenolovou extrakcí a pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA).

5 DISKUZE

5.1 Kultivace buněk

Bakterie *Bifidobacterium animalis* RB1-MP byly kultivovány v tekutém MRS médiu za anaerobních podmínek při 37 °C. Po 2 dnech kultivace bylo pozorováno zakalení média a buňky sedimentované na dně zkumavky. Podobný růst buněk byl popsán v literatuře [70]. Pro ověření čistoty kultury byl proveden křížový roztěr. Po 2 dnech narostly jednotlivé kolonie kulatého tvaru, mléčné barvy, lesklé, hladké a neprůhledné. Kulturu kmene *Bifidobacterium animalis* RB1-MP můžeme považovat za čistou. Pro odhadnutí množství buněk přidávaných v různém ředění k sýru eidam, byly naředěné kultury vysety na Petriho misky. Po 2 dnech kultivace v anaerobním prostředí byly kolonie spočítány a bylo určeno průměrné množství jednotek tvořících kolonie v 1 ml (cfu/ml).

5.2 Izolace bakteriální DNA a spektrofotometrie

Bakteriální DNA byla izolována ze vzorků sýrů s přidavkem buněk *B. animalis* metodou fenolové extrakce a magnetickými nosiči P(HEMA-co-GMA). Koncentrace DNA a její čistota byly stanoveny spektrofotometricky [69]. Absorbance DNA byla měřena při vlnových délkách v rozmezí 220 - 320 nm. U DNA izolované fenolovou extrakcí se koncentrace DNA pohybovala v rozmezí 14,5 ng/μl - 36,5 ng/μl. Z poměrů absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ je patrné, že všechny vzorky, mimo čistou kulturu *B. animalis*, obsahovaly malé množství proteinů (hodnoty pod 1,8).

Koncentrace DNA izolované magnetickými nosiči se pohybovala v rozmezí 1,0 - 10,2 ng/μl. Koncentrace DNA byla u všech vzorků nižší než u DNA izolované metodou fenolové extrakce. Podle poměru absorbancí při 260 a 280 nm, jejichž hodnoty se pohybovaly od 1,8 do 2,3 lze konstatovat, že byla izolována DNA poměrně vysoké čistoty (hodnoty poměru absorbancí A_{260}/A_{280} se pohybovaly u většiny vzorků mezi 1,8 – 2,0). Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky publikovanými v odborné literatuře [57], v nichž bylo prokázáno, že s využitím reverzibilní adsorpce DNA na různých typech pevných nosičů byla izolována DNA vhodná pro PCR. DNA izolována oběma typy metod byla použita v PCR.

5.3 PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Amplifikovatelnost DNA izolované ze všech vzorků byla ověřena a potvrzena v doménově specifické PCR. Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR je důležité zejména při izolaci DNA ze vzorků, které obsahují inhibitory PCR. Mezi takové patří vzorky potravin. Jak uvádí Španová a kol. [71], inhibitory PCR jsou obsaženy ve vzorcích mléčných výrobků a sýrů, ve velkém množství se vyskytují vápenaté ionty. Pro ověření amplifikovatelnosti izolované DNA byly použity primery Feub a Reub, které amplifikují DNA libovolných bakterií [65]. Ve všech případech byly detekovány specifické PCR produkty o velikosti 466 bp. Bylo potvrzeno, že DNA izolovaná ze všech vzorků patří do domény *Bacteria*.

5.4 Rodově specifická PCR pro rod *Bifidobacterium*

V rodově specifické PCR byly použity 2 sady primerů [66, 65], které byly navrženy pro identifikaci bakterií rodu *Bifidobacterium*. Byly také stanoveny citlivosti obou rodově specifických reakcí. Nejprve byly v PCR použity primery Bif 164 a Bif 662, které amplifikují specifický PCR produkt o velikosti 523 bp [66]. Množství DNA, které se amplifikovalo v PCR za vzniku amplikonu detekovatelného na gelu odpovídalo 10 pg/PCR směs. Když předpokládáme, že DNA 1 buňky *Bifidobacterium* má hmotnost asi 2 fg (Španová, ústní sdělení), tak toto množství odpovídá asi $5 \cdot 10^3$ buněk. Druhou sadou primerů byly primery Pbi F1 a Pbi R2, které amplifikují delší produkt PCR o velikosti 914 bp [65]. Nejnižší množství DNA, které se amplifikuje v PCR za vzniku amplikonu detekovatelného na gelu byl 1 ng/PCR směs, což odpovídá asi $5 \cdot 10^5$ buněk. Tato PCR reakce je v našem experimentálním uspořádání asi 100x méně citlivá než s použitím první sady primerů. Proto zřejmě nebyly detekovány žádné specifické amplikony. Naproti tomu v citlivější PCR reakci s primery Bif 164 a Bif 662 byly detekovány PCR produkty amplifikované ze všech vzorků DNA izolované ze sýru s přídatkem různého množství buněk *Bifidobacterium animalis* mimo vzorky ředění buněk 10^{-6} a 10^{-7} . Získané výsledky byly v souladu s předpokládanými výsledky.

5.5 Druhově specifická PCR pro druh *Bifidobacterium animalis*

V druhově specifické PCR byly použity primery Pbi R1 a Ban F2 se specifickým produktem PCR o velikosti 925 bp. Tyto primery byly popsány jako specifické pro druh *B. animalis* [67]. Nejprve byla stanovena citlivost PCR reakce. Nejmenší množství DNA amplifikované v druhově specifické PCR, které bylo po amplifikaci detekováno na gelu bylo 1 pg/PCR směs. Toto množství odpovídá asi $5 \cdot 10^2$ buněk. PCR produkty byly detekovány u všech vzorků eidamu s přídatkem kultury *B. animalis* mimo vzorky ředění buněk 10^{-7} (při použití fenolové extrakce jako izolační metody) a 10^{-6} a 10^{-7} (při použití magnetických nosičů jako izolační metody).

5.6 Zakoncentrování DNA izolované magnetickými částicemi

Pro zvýšení koncentrace DNA izolované ze sýru eidam s přídavkem buněk *B. animalis* byla testována metoda zakoncentrování DNA. K izolaci DNA z 300 μ l hrubého lyzátu buněk byly použity magnetické částice P(HEMA-co-GMA) a DNA byla eluována pouze do 50 μ l TE pufru. Znamená to, že DNA byla zakoncentrována. Využití magnetických nosičů k zakoncentrování DNA je jednou z výhod jejich použití [57]. Eluovaná DNA byla spektrofotometricky proměřena v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm. Hodnoty koncentrací DNA se pohybovaly v rozmezí 6,5 - 24,5 ng/ μ l. Množství izolované DNA bylo dostatečné pro PCR. Z poměrů absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ je patrné, že všechny vzorky sýrů s bakteriemi *B. animalis* byly kontaminovány proteiny (hodnoty byly < 1,8). Nejjednodušším způsobem, kterým lze snížit množství nežádoucích látek kontaminujících DNA je vyředění. DNA byla proto pro použití v doménově specifické a rodově specifické PCR naředěna 10x, 100x a 1000x.

5.7 Doménově a rodově specifická PCR s zakoncentrovanou DNA

Pro ověření amplifikovatelnosti DNA byla zakoncentrovaná a následně naředěná DNA použita jako DNA matrice v PCR s univerzálními primery Feub a Reub [65]. U všech vzorků sýru s buňkami *B. animalis* byl detekován PCR produkt různé intenzity o velikosti 466 bp. Tím byla potvrzena amplifikovatelnost bakteriální DNA a její zařazení do domény *Bacteria*. Všechna 3 ředění (10x, 100, 1000x) zakoncentrované DNA byla použita také jako DNA matrice v rodově specifické PCR. Pro tuto reakci byly zvoleny rodově specifické primery Bif 164 a Bif 662, které umožňují amplifikovat menší množství DNA a jsou v našem experimentálním uspořádání 100x citlivější než druhá sada primerů Pbi F1 a Pbi R2 [65]. Nejjntenzivnější PCR produkty byly detekovány při amplifikaci DNA 100x ředěné. Po amplifikaci neředěné DNA byly detekovány amplikony nízké intenzity. To může být dáno tím, že spolu s DNA byly zakoncentrovány i přítomné inhibitory PCR, které pak snižují citlivost PCR reakce [71]. Vzhledem k tomu metoda zakoncentrování DNA nebyla nadále používána.

5.8 Příprava hrubých lyzátní buněk z reálných vzorků probiotických sýrů

Probiotické sýry typu eidam (PS 1, PS 8334, PS 8341, PS 8346) byly připraveny s přídavkem různých kmenů probiotických bakterií vybraných ze sbírky Laktoflora. Cílem bylo izolovat celkovou DNA z těchto sýrů, prokázat v nich bakterie rodu *Bifidobacterium* a zařadit je do druhu – to vše s využitím specifických PCR. Z experimentálně připravených probiotických sýrů, které obsahovaly potenciálně probiotické bakterie rodu *Bifidobacterium* byly připraveny hrubé lyzáty dle kapitoly 3.8.2. Pro snížení přítomnosti Ca^{2+} iontů jako inhibitorů PCR byl připraven lyzační roztok A (10 mM Tris HCl (pH 7,8) a 5 mM EDTA (pH 8,0)) se zvýšeným množstvím EDTA, která Ca^{2+} vyvazuje. V lyzačním roztoku bylo místo 1 mM EDTA použito 5 mM EDTA (pH 8,0).

5.9 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Bakteriální DNA byla izolována z probiotických sýrů dvěma metodami a to fenolovou extrakcí s následným přesrážením ethanolem a magnetickými nosiči P(HEMA-co-GMA). Čistota a koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Hodnoty koncentrací DNA izolované fenolovou extrakcí byly v rozmezí 11,8 - 21,5 ng/μl a koncentrace DNA izolované magnetickými nosiči se pohybovala v rozmezí 4,8 - 13,3 ng/μl. Množství DNA bylo postačující pro použití v PCR. Z poměrů absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ můžeme říct, že DNA izolovaná ze sýrů PS 1, PS 8334 a PS 8341 fenolovou extrakcí je částečně znečištěná proteiny, hodnoty $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ se pohybovaly mezi 1,5 - 1,9. Co se týká čistoty DNA izolované magnetickými nosiči, byly hodnoty poměrů absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 1,4 - 1,6, což značí znečištění proteiny.

5.10 Ověření amplifikace v doménově a rodově specifické PCR

V PCR s univerzálními primery Feub a Reub byl použit 1 μl DNA izolované z testovaných probiotických sýrů fenolovou extrakcí a 1 μl DNA izolované magnetickými nosiči. Po amplifikaci byly detekovány specifické PCR produkty o velikosti 466 bp. Tím byla potvrzena amplifikovatelnost DNA a zároveň bylo potvrzeno, že DNA izolovaná ze všech vzorků patří do domény *Bacteria*.

Přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium* byla prokázána rodově specifickými PCR. V rodově specifické PCR byly použity 2 sady primerů. V PCR směsi s primery Bif 164 a Bif 662 amplifikující PCR produkt o velikosti 523 bp [66] bylo použito 1, 3 nebo 5 μl DNA izolované fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči. Amplikony nižší intenzity byly detekovány u vzorků sýrů PS 1 a PS 8341, které obsahovaly nižší množství cílové DNA v porovnání se zbylými dvěma vzorky. Jako optimální množství DNA v PCR směsi byla zjištěna hodnota 5 μl. Druhá sada primerů amplifikující specifický PCR produkt o velikosti 914 bp [65] byla použita v PCR směsi spolu s 5 μl DNA izolované oběma metodami. Počet cyklů byl z původních 30 navýšen na 35 cyklů. PCR produkty byly detekovány pouze u vzorku sýru PS 8334 a PS 8346, které obsahovaly nejvyšší množství cílové DNA. Jelikož je citlivost rodově specifické PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2 asi 100x nižší než s použitím první sady primerů, většina PCR produktů nebyla detekována. Jako vhodnější rodově specifické primery amplifikující DNA se tedy jeví v našem experimentálním uspořádání primery Bif 164 a Bif 662.

5.11 Druhové zařazení bakterií rodu *Bifidobacterium* přítomných v probiotických sýrech

Pro druhovou identifikaci bakterií rodu *Bifidobacterium*, které byly vybrány ze sbírky Laktoflora jako potenciálně probiotické bakterie a přidány do analyzovaných sýrů typu eidam, byly použity 4 druhově specifické PCR [67, 68]. Ty byly zvoleny na základě nejčastějších používaných druhů bifidobakterií, které mají probiotické účinky [29]. Byly testovány druhy *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* a *Bifidobacterium animalis*. V PCR směsi byl použit vždy 1 μ l DNA izolované metodou fenolové extrakce. Pomocí gelové elektroforézy byly detekovány produkty PCR specifické pouze pro druh *Bifidobacterium animalis*, které se amplifikovaly ze všech DNA izolovaných ze vzorků sýrů. Zbylé druhově specifické PCR byly negativní (žádné produkty PCR nebyly detekovány). Na základě těchto výsledků lze učinit závěr, že do probiotických sýrů byly přidávány pouze bakterie *Bifidobacterium animalis*. Zda se jedná o jeden kmen nebo více kmenů, bude potřeba rozlišit dalšími molekulárně-genetickými metodami např. metodou RAPD [72].

5.12 Stanovení množství cílové DNA

Ve všech vzorcích probiotických sýrů byla prokázána přítomnost bakterií druhu *B. animalis*. Pro semikvantitativní stanovení množství cílové DNA byla provedena druhově specifická PCR s primery Pbi R1 a Ban F2. Na gel byly nanášeny produkty PCR amplifikované z DNA, která byla izolována ze sýrů metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů, dále purifikovaná DNA, která byla izolována z čisté kultury *B. animalis* a zředěna na koncentraci 10 ng/ μ l - 10 fg/ μ l. Po amplifikaci byly detekovány PCR produkty pomocí agarózové gelové elektroforézy, porovnána jejich intenzita a odhadnuto množství DNA v PCR směsi. Nejvíce cílové DNA bylo stanoveno ve vzorku sýru PS 8346 a to asi 100 pg/PCR směs. Stejně množství bylo stanoveno jak u DNA izolované fenolovou extrakcí tak u DNA izolované magnetickými nosiči. U vzorku sýru PS 8334 bylo stanoveno 10 pg/PCR směs DNA při použití magnetických nosičů a 10 - 100 pg/PCR směs při použití fenolové extrakce jako izolační metody. U ostatních vzorků probiotického sýru byl stanoven 1 pg/PCR směs cílové DNA. Lze tedy učinit závěr, že do jednotlivých sýrů bylo přidáváno různé množství bifidobakterií. Přesná kvantifikace by byla možná s využitím PCR v reálném čase [73].

6 ZÁVĚR

Některé druhy bifidobakterií mají probiotické vlastnosti a působí prospěšně na lidské zdraví. Probiotické bakterie lze přidávat do různých potravinových matrix či farmaceutických výrobků. V této práci byl jako potravinový nosič zvolen sýr typu eidam s přidavkem probiotických bakterií. V práci byla nejprve optimalizována metoda izolace DNA ze sýru typu eidam s přidavkem bakterií rodu *Bifidobacterium* v kvalitě vhodné pro použití v PCR. Pro izolaci DNA byly zvoleny 2 metody a to fenolová extrakce s následným přesrážením ethanolem a adsorpce DNA na magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA). Bakterie *Bifidobacterium animalis* byly kultivovány anaerobně v MRS médiu s přidavkem 0,05 % cysteinu a byly naředěny v rozmezí 10^{-1} - 10^{-7} a poté byly přidány k vzorku sýru typu eidam. Množství DNA izolované ze sýru s přidavkem různého množství buněk *B. animalis* bylo stanoveno spektrofotometricky a použito v PCR. Amplifikovatelnost DNA byla nejprve ověřena v PCR s univerzálními primery. Zařazení bakterií do rodu *Bifidobacterium* bylo potvrzeno s rodově specifickými primery (Bif 164 a Bif 662). Byly testovány také rodově specifické primery Pbi F1 a Pbi R2, které byly méně vhodné vzhledem k nižší citlivosti PCR (v daném experimentálním uspořádání). V druhově specifické PCR bylo potvrzeno zařazení bakterií do druhu *Bifidobacterium animalis*.

V další části práce byla izolována DNA z experimentálně připravených probiotických sýrů s přidavkem probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium*. DNA byla izolována fenolovou extrakcí a pomocí magnetických nosičů. Zařazení bakterií do domény *Bacteria* a rodu *Bifidobacterium* bylo ověřeno v PCR s univerzálními primery a s rodově specifickými primery Bif 164 a Bif 662. Pro druhové zařazení bakterií byly testovány 4 různé druhově specifické PCR. Ve všech vzorcích probiotického sýru byla identifikována DNA bakterií druhu *Bifidobacterium animalis*. Množství cílové DNA bylo stanoveno semikvantitativně pomocí gelové elektroforézy srovnáním intenzity PCR produktů po amplifikaci různého množství purifikované DNA. Závěrem lze konstatovat, že pomocí optimalizovaných metod lze izolovat DNA kompatibilní s PCR z reálných vzorků sýrů typu eidam a prokázat v ní přítomnost DNA probiotických bakterií.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] **Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V.:** Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.* 2000, Vol 50, : 117-131
- [2] **Gorner F., Valík L.:** *Aplikovaná mikrobiológia potravín : princípy mikrobiológie potravín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané potravinami.* Vyd.1. Bratislava, MALÉ CENTRUM, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [3] **Simpson P. J., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Santon C.:** *Bifidobacterium prychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, Vol 54: 401-406.
- [4] **Sedláček, I.:** *Taxonomie prokaryot.* Vyd. 1. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9
- [5] **Bibek R.:** *Fundamental Food Microbiology-2nd cd.* In: CRC Press LLC, New York. 2000, ISBN 0-8493-0045-2.
- [6] **Probiotic News [online].** 2009 [cit. 2010-04-26]. Probioticsnews.co.uk. Dostupné z WWW:<http://www.probioticsnews.co.uk/_resources/media/documents/libraryimages/hires/bifidobacterium_animalis_2.jpg>.
- [7] **Ventura, M., Sinderen D., Fitzgerald G. F., Zink R.:** Insights into taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leewenhoek*, 2000, Vol 86: 205-223.
- [8] **Sakata S., Tonooka T., Ishizeki S., Takada M., Sakamoto M., Fukuyama M., Benno Y.:** Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, Vol 243: 417 -423.
- [9] **Masco L., Venture M., Zink R., Huys G., Swings J.:** Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, Vol 54: 1137-1143.
- [10] **Bechoux N., Delcenserie V., et al.** A PCR Method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods. *Journal of Microbiological Methods.* 2005, 61, s. 55-67.
- [11] **Holzappel W. H., Schillinger U.:** Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International.*, 2002, Vol 35: 109 – 116.

- [12] **Stile M.E., Holzappel W.H.:** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *J. Food Microbiol.*, 1997, Vol 36: 1-29
- [13] **Klaban V.:** *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Lubomír Houdek. Vyd. 1. Praha : Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [14] **Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. FAO/WHO.** Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a point FAO/WHO expert consultation, 2001, Córdoba, Argentina
- [15] **Saxelin M., Korpela R., Mayra-Makinen A.:** Introduction: classifying functional dairy products. In T. Mattila-Sandholm, & M. Saarela (Eds.), *Functional dairy products* (pp. 1-16). 2003, Boca Raton, LA, USA: CRC Press
- [16] **Sanz Z.:** Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 2007, Vol 17, 1284 – 1289
- [17] **Ouwehand A. C., Salminen S., Isolauri E.:** Probiotics: an overview of beneficial effect. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, Vol 82: 279 – 289.
- [18] **Salminen S., Deighton M. A., Benno Y., Gorbach S. L.:** Lactic acid bacteria in health and disease. Vyd. In Salminen S. : Lactic acid bacteria. *Microbiology and functional aspect*, Marcel Dekker, New York, 1998. 211 – 253 s.
- [19] **Rogelj I., Matijašič B. B., Majhenič A. Č., Stojkovič S.:** The survival and persistence of lactobacillus acidophilus LF 221 in different ecosystems. *International Journal of Microbiology*, 2002, Vol 76: 83 – 91.
- [20] **Adams M.R.:** Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 1999, Vol 68, 171–178.
- [21] **Marteau P., Gerhardt M.F., Myara A., Bouvier E., Trivin F., Rambaud J.C.:** Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in the human small intestine. *Microb. Ecol. Health Dis.* 1995, Vol 8, 151–157.
- [22] **Salminen S., Ouwehand A.C., Isolauri E.:** Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 1998a., Vol 8, 563–572.
- [23] **Healthy Fellow : Your Natural Health Critic** [online]. 2008-2010 [cit. 2010-04-20]. Prebiotics and Probiotics. Dostupné z WWW: <<http://www.healthyfellow.com/226/prebiotics-and-probiotics/>>.
- [24] **Muller C.M.O., Fritzen-Freire B.B., et al.:** The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. *Journal of Food Engineering*. 2010, Vol 96., 621 - 627.
- [25] **Servin A. L.:** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens . *FEMS Microbiology Reviews*. 2004, Vol 28, 405 - 440.

- [26] **Furie E.:** Probiotics and allergy. *The Proceedings of the Nutrition Society*. November 2005, Vol 64, 465-469
- [27] **Sanders M. E.:** *USPribiotics.org* [online]. 2007 [cit. 2010-04-26]. Probiotics Basics. Dostupné z WWW: <USPribiotics.org>.
- [28] **Gibson Gr; Pereira Di.:** Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans.. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2002, Vol 37, 259-281.
- [29] **Sanders M. E. :** Probiotics. *Food Technology*, 1999, Vol 53: 67 – 77.
- [30] **de Vrese M.; Marteau Pr.:** Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea.. *The Journal of Nutrition*. March 2007, Vol 137, 803S-811S.
- [31] **Liong Mt.:** Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemics, and perimenopausal treatments. *Nutrition Reviews*. July 2007, Vol 65, 316-328.
- [32] **Lesbros-Pantoflickova D; Corthésy-Theulaz I; Blum Al.:** Helicobacter pylori and probiotics. *The Journal of Nutrition*. March 2007, Vol 137, 808S-812S.
- [33] **Ross R. P., Fitzgerald G., Collins K., & Stanton C.:** Cheese delivering biocultures: probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2002, Vol 57(2), 71-78.
- [34] **Boylston T. D., Vinderola C. G., Ghoddusi H. B., & Reinheimer J. A.:** Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 2004, Vol 14, 375-387.
- [35] **Stanton C., Desmond C., Coakley M., Collins J. K., Fitzgerald G., & Ross R. P.:** Challenges facing development of probioticcontaining functional foods. In E. R. Farnworth (Ed.), *Handbook of fermented functional foods* (pp. 27-58). 2003, Boca Ranton, LA, USA: CRC Press.
- [36] **Bergamini C. V., Hynes E. R., Quiberoni A., Sua´rez V. B., & Zalazar C. A.:** Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*, 2005, Vol 38(5), 597-604.
- [37] **Sharp M. D., McMahon D. J., & Broadbent J. R.:** Comparative evaluation of yogurt and low-fat Cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Science*, 2008, Vol 73(7), M375-M377.
- [38] **Cardarelli H. R., Saad S. M. I., Gibson G. R., & Vulevic J.:** Functional petit-suisse cheese: measure of the prebiotic effect. *Anaerobe*, 2007, Vol 13(5-6), 200-207.

- [39] **Teagasc** [online]. 2009 [cit. 2010-04-28]. Application of Probiotic Bacteria to Functional Foods. Dostupné z WWW: <<http://www.teagasc.ie/aboutus/>>.
- [40] **Farke N. Y.:** Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, Vol 57(1), 91-98.
- [41] **Everett D. W., & Auty M. A. E.:** Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 2008, Vol 18(7), 759-773.
- [42] **Grundelius A. U., Lodaite K., O" stergren K., Paulsson M., & Dejmek P.:** Syneresis of submerged single curd grains and curd rheology. *International Dairy Journal*, 2000, Vol 10(7), 489-496.
- [43] **de Cruz A. G.; Buriti F. C. A.; de Souza C. H. B.** Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science Technology*. 2009, Vol 20, 344-354.
- [44] **Talwalkar A., Miller C. W., Kailasapathy K., & Nguyen M. H.:** Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 2004, Vol 39(6), 605-611.
- [45] **Ross R. P., Fitzgerald G., Collins K., & Stanton C.:** Cheese delivering biocultures: probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2002, Vol 57(2), 71-78.
- [46] **Champagne C. P., & Gardner N. J.:** Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 2005, Vol 45(1), 61-84.
- [47] **Grattepanche F., Miescher-Schwenninger S., Meile L., & Lacroix C.:** Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Science and Technology*, 2008, Vol 88(4-5), 421-444.
- [48] **Drake M.:** Sensorial analysis of dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 2008, Vol 90(11), 4925-4937.
- [49] **Janoszovská D.:** Identifikace bakterií rodu *Lactobacillus* s využitím nových postupů izolace genomové DNA. Masarykova univerzita, přírodovědecká fakulta, Brno, 2008. 73 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Španová A., CSc.
- [50] **Horák D., Rittich B., Španová A.:** Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2007, Vol 311, 249-254.
- [51] **Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M. J.:** Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *J. Sep. Sci.*, 2007, Vol 30, 1751 – 1772.

- [52] **Němcová P.:** Využití magnetických nosičů při izolaci genomové DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2006. 63 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [53] **Čikoš Š., Koppel J., Kantíková M.:** *Polymerázová řažová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike.* Košice, 2001. 203 s. ISBN 80-968618-0-8.
- [54] **Doškař J., Šmarda J., et al.:** *Metody molekulární biologie.* Jana Koptíková. Vyd. 1. Brno : Masarykova univerzita, 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [55] **Petrová K.:** Identifikace bakterií mléčného kvašení (BMK) v mléčných výrobcích s využitím metod amplifikace DNA. Brno, 2004., 117 s. Přf MU Brno. Vedoucí diplomové práce Španová Alena.
- [56] **Datový standard MZ ČR - verze 4** [online]. 2006, 25. března 2008 [cit. 2008-03-28]. Dostupný z WWW: <<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOILACI.htm>>.
- [57] **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, 93-98.
- [58] **Klesnilová L.:** *Identifikace bakterií rodu Bifidobacterium pomocí PCR s druhově specifickými primery.* Brno, 2005. 67 s. Přf MU Brno. Vedoucí diplomové práce Španová Alena.
- [59] **School of integrative biology** [online]. 2008 [cit. 2010-04-26]. Integrative Biology 335: Systematics of plant. Dostupné z WWW: <<http://www.life.illinois.edu/ib/335/PS3e-Fig-05-02-0.jpg>>.
- [60] **Mattarelli P., Bonaparte C., Pot B., Biavati B.:** Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. nov. and *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, Vol 58: 767-772.
- [61] **Krulová B.:** *Molekulární typizace bakterií mléčného kvašení rodu Bifidobacterium.* Brno, 2007. 86 s. Přf MU Brno. Vedoucí diplomové práce Španová Alena.
- [62] **Prodělalová J.:** *Molekulární diagnostika potravinářsky významných mikroorganismů,* 2004. Dizertační práce, Přf MU Brno.
- [63] **Němcová P.:** Využití magnetických nosičů při izolaci genomové DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Brno, 2006. 63 s. Přf MU Brno. Vedoucí diplomové práce Španová Alena.

- [64] **Wilson I. G.**, Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, Vol 63, 3741-3751.
- [65] **Haarman M., Knol J.**: Quantitative Real-Time PCR Assay To Identify and Quantify Fecal Bifidobacterium Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and environmental microbiology*. 2005, Vol 71, 2318 - 2324.
- [66] **Kok R. G., de Waal A. Shut F., Welling G. W., Weenk G., Hellinwerf K.J.** Specific detection and analysis of probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, Vol 62, 3668-3672.
- [67] **Roy D., Sirois S.**: Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, Vol 191, 17-24.
- [68] **Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H.**: Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-genetargeted species-specific primers. *Am. Soc. Microbiol.*, 1999, Vol 65, 4506-4512.
- [69] **Španová A.; Rittich B.**: *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd 1. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [70] **Sakata S., Tonooka T., Takada M., Sakamoto M., Fukuyama M., Benno Y.**: Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiology Letters*. February 2005, Vol 243, 417-423.
- [71] **Rittich B., Španová A., Šálek,P., Němcová P., Trachtová Š., Horák D.**: Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethylene glycol)–NaCl water solutions . *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. May 2009, Vol 321, 1667-1670 .
- [72] **Turková K.**: *Využití metod amplifikace DNA při identifikaci bakterií rodu Lactobacillus*. Brno , 2009. 106 s. Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie. Vedoucí diplomové práce Španová Alena.
- [73] **Vitali B., Candela M., Matteuzzi D., Brigidi P.**: Quantitative Detection of Probiotic Bifidobacterium Strains in Bacterial Mixtures by Using Real-time PCR . *Systematic and Applied Microbiology*. 2003, Vol 26, 269-276 .

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATTC	American Type Culture Collection
BMK	bakterie mléčného kvašení
bp	pár bází (base pair)
CCDM	Culture Collection of Dairy Microorganisms
CCM	Czech Collection of Microorganisms
cfu	colony forming units (počet jednotek tvořících kolonie)
CIZ	chloroform-izoamylalkohol
dATP	deoxyadenintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dGTP	deoxyguanintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dTTP	deoxythimintrifosfát
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
MRS	Mann, Rogosa, Sharpe (MRS médium pro kultivaci BMK)
ot/min	počet otáček za minutu
P(GMA)	poly(glycidyl metacrylate)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PS	probiotický sýr
OD	optical density (optická hustota)
SDS	dodecylsulfát sodný
ssp.	subspecies (poddruh)
TBE	pufř (Tris-borát-EDTA)
TE	pufř (Tris-EDTA)

9 PŘÍLOHY

Výsledky práce byly prezentované formou posteru na vědecké konferenci XIV. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů (21.-22. 4. 2010), Brno

Optimalizace metody pro průkaz bakterií rodu *Bifidobacterium* v tvrdých sýrech typu eidam.

Optimalizace metody pro průkaz bakterií rodu *Bifidobacterium* v tvrdých sýrech typu eidam

Jurečková Nela^a, Španová Alena^{a,b}, Rittich Bohuslav^{a,b}

^a Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ÚPCHB, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
^b Masarykova univerzita, ÚEB, Tvrďého 14, 602 00 Brno

Úvod

Různé druhy rodu *Bifidobacterium* jsou součástí běžné střevní flóry lidí i zvířat. Jsou známé pro svůj prospěšný vliv na zdraví a proto je lze využít v potravinách jako probiotika. Nejznámějšími příklady probiotických potravin jsou fermentovaná mléka a jogurty. Sýr je nyní jedním z nejuniverzálnějších potravinových produktů, zajímavý nejen svými chutěmi a lze ho využít jako nosič probiotické kultury. (Gomez a kol. 2009).

Cíl práce

Cílem práce bylo optimalizovat metodu rodově specifické PCR pro detekci bakterií rodu *Bifidobacterium*, které byly přidány do sýru typu eidam. Takto optimalizovaná metoda byla testována na experimentálně připravených probiotických sýrech. Cílem práce bylo tyto bakterie druhově zařadit. Bakterie, které byly přidány do sýru, byly vybrány ze sárky Laktiflora jako potenciální probiotické druhy rodu *Bifidobacterium*.

Materiál a metody

Kmen *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 byl kultivován v anaerobních podmínkách v MRS médiu s cysteinem při 37 °C po dobu 2 dnů. Narostlé buňky byly destičkou naseřeny v MRS médiu od 1 do 10⁻⁷ a byly přidány k 1 g tvrdého sýru typu eidam s cílem připravit hrubé lyzáty buněk. Byly připraveny také hrubé lyzáty buněk testovaného probiotického sýru s přidávkou bakterií rodu *Bifidobacterium* (připravil Ing. Dráb, Mileom a.s., Tábor). Celková DNA v kvalitě vhodné pro PCR byla izolována metodou fenolové extrakce a s použitím magnetických částic P(HEMA-co-GMA) (Rittich a kol. 2007). Byla ověřena amplifikovatelnost DNA s primery specifickými pro doménu Bacteria. DNA byla použita v rodově a druhově specifické PCR s použitím primerů uvedených v Tab. 1.

Tab. 1.: Přehled použitých primerů

PCR / primery	Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost ampliconu	Citace
Univerzální primery pro doménu Bacteria	Feub	TCCTACGGGAGGAGCAAGT	500 bp	(Barnum a kol. 2005)
	Reub	GGATACACAGGATCTAATCTCTTT		
Rodově specifické primery pro rod <i>Bifidobacterium</i>	Bif 164	GGGTGGTAATCGCGGATG	523 bp	(Kak a kol. 1996)
	Bif 662	CCACGTTTACACGGGAAA		
Druhově specifické primery	Pbi F1	GGGATCTCTGGTGGGAAGAGA	231 bp	(Barnum a kol. 2005)
	Pbi R2	TGCTCGGCTCATCTCAGT		
	Pbi R1	GCA CCA CCT GTG AAC CG	925 bp	(Roy D., 2000)
	Bif 162	AGC CTG CCG TGT G		
	Bif 164	TTC CAQ TTG ATC GCA TGG TC	828 bp	(Maroňá T., 2004)
	Bif 662	GGG AAK CCC ATC TGT GGG AT		
<i>B. longum</i>	BILON-1	TTC CAQ TTG ATC GCA TGG TC	831 bp	(Maroňá T., 2004)
	BILON-2	CGA AGG CTT GCT CCC AGT		
	BIBIF-1	CCG A TAT CCG ATG TAT TG		
	BIBIF-2	CCG AAG CTT TCC CAAA	278 bp	(Maroňá T., 2004)

Výsledky a diskuze

Stanovení citlivosti PCR a testování amplifikace DNA buněk *B. longum* přidávaných k sýru eidam

1) Stanovení citlivosti rodově a druhově specifické PCR s rodově a druhově specifickými primery (viz Tab. 1)

Byla stanovena citlivost rodově specifických PCR pro rod *Bifidobacterium* a druhově specifických PCR pro druh *B. longum*. Srovnání citlivosti jednotlivých PCR reakcí je uvedeno v Tab. 2. Výpočet množství buněk, které odpovídá nejmenšimu množství DNA amplifikované v PCR a detekované na gelu, vychází z hmotnosti chromosomální DNA v 1 buňce asi 2 fg. V PCR směsi byl použit 1 µl DNA *B. longum* ATCC 15707 izolované fenolovou extrakcí.

Tab. 2.: Citlivosti použitých rodově a druhově specifických PCR.

PCR reakce	primery použité v PCR reakci	nejmenší množství amplifikované DNA/PCR směs	odpovídající množství buněk/PCR směs
Rodově specifická PCR	Bif 164	10 pg	5 · 10 ⁶
	Bif 662		
Druhově specifická PCR	Pbi F1	1 ng	5 · 10 ⁸
	Pbi R2		

2) Testování DNA izolované ze sýru s přidávkou buněk *B. longum*

Různé množství buněk *B. longum* ATCC 15707 bylo přidáno k sýru eidam. DNA izolovaná fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči byla použita v rodově specifické PCR. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 3. V PCR směsi byl použit 1 µl DNA při použití primerů Bif 164 a Bif 662 a 30 cyklů PCR. Při použití primerů Pbi F1 a Pbi R2 bylo v PCR směsi použito 5 µl DNA a 35 cyklů PCR. Vyšší citlivosti bylo dosaženo po amplifikaci DNA izolované fenolovou extrakcí. Protože citlivost rodově specifické PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2 je 100krát menší než s použitím primerů Bif 164 a Bif 662, nebyly PCR produkty detekovány.

Tab. 3.: Výsledky gelových elektroforéz PCR produktů amplifikovaných z DNA *B. longum*

vzorek/řadí	řadí	K ⁻	K ⁺ [10ng/µl]	Standard	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Bif 164	FE	-	+++		+	+	+	+	+	+	+	+
Bif 662	MN	-	+++	100 bp žebříček	+	+	+	+	+	+	+	-
Pbi F1	FE	-	+++		-	-	-	-	-	-	-	-
Pbi R2	MN	-	+++		-	-	-	-	-	-	-	-

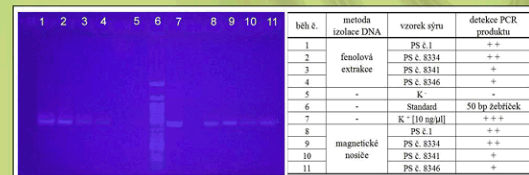
+++ , ++ , + : detekován PCR produkt různé intenzity
- : PCR produkt nedetekován
K⁻ : negativní kontrola
K⁺ : pozitivní kontrola, *B. animalis* [10 ng/µl]

FE : DNA izolovaná fenolovou extrakcí
MN : DNA izolovaná magnetickými nosiči
+ : DNA izolovaná magnetickými nosiči
- : vlna slabý amplicon

Testování přítomnosti bifidobakterií v experimentálně připravených probiotických sýrech

1) Ověření amplifikovatelnosti DNA s primery specifickými pro doménu Bacteria

Amplifikovatelnost DNA izolované z probiotických sýrů fenolovou extrakcí a magnetickými nosiči byla ověřena s primery Feub a Reub (Tab. 1). Výsledek gelové elektroforézy je na Obr. 1



Obr. 1: Gelová elektroforéza PCR produktů (500 bp) po amplifikaci 1 µl DNA s doménově specifickými primery, program EUBACTER v 30 cyklech PCR.

2) Testování DNA izolované z probiotických sýrů v rodově specifických PCR *Bifidobacterium*

Pro ověření přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* byla DNA izolovaná z probiotických sýrů testována v rodově specifických PCR (viz Tab. 4).

vzorek/řadí	detekce PCR produktů			
	rodově specifická PCR / primery / DNA izolace			
K ⁻ [10 ng/µl]	Bif 164 / Bif 662		Pbi F1 / Pbi R2	
	FE	MN	FE	MN
+++	+++	+++	+++	+++
Standard	100 bp žebříček			
PS 1	++	+	+	-
PS 8334	+++	++	-	++
PS 8341	++	+	-	-
PS 8346	+++	+++	-	+

Tab. 4: Shrnutí detekce rodově specifických PCR produktů amplifikovaných z 5 µl DNA izolované z probiotických sýrů. Při použití primerů Bif 164 a Bif 662 byly detekovány PCR produkty (523 bp) v všech vzorcích. Při použití primerů Pbi F1 a Pbi R2 byly detekovány PCR produkty jen u některých vzorků, citlivost rodově specifické PCR s těmito primery je nižší (Tab. 2).

3) Testování DNA izolované z probiotických sýrů v druhově specifických PCR

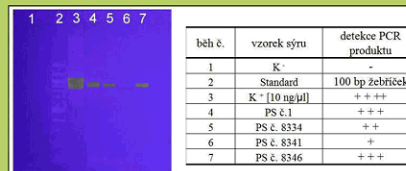
Pro zařazení bakterií rodu *Bifidobacterium* do druhu byly testovány 4 sady primerů (Tab. 1). V PCR směsi byl použit vždy 1 µl DNA izolované fenolovou extrakcí. Výsledky druhově specifických PCR jsou shrnuty v Tab. 5.

Tab. 5.: Testování DNA izolované z probiotických sýrů v druhově specifických PCR

vzorek	testovaný druh rodu <i>Bifidobacterium</i>			
	<i>B. bifidum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis</i>
PS 1	-	+	-	-
PS 8334	-	+	-	-
PS 8341	-	+	-	-
PS 8346	-	+	-	-

+ : detekovány PCR produkty
- : nedetekovány PCR produkty

Obr. 2: Gelová elektroforéza druhově specifických PCR produktů (925 bp) *B. animalis* amplifikovaných z DNA izolované z prob. sýru.



Závěr

Byla optimalizována metoda izolace celkové DNA ze sýru. DNA amplifikovatelná v PCR byla izolována jak fenolovou extrakcí tak i magnetickými nosiči. Bakterie rodu *Bifidobacterium* byly prokázány ve všech vzorcích experimentálně připravených sýrů. Ve všech vzorcích testovaných sýrů byla prokázána DNA *B. animalis* druhově specifickou PCR.

RETTICH, B.; ŠPANOVA, A.; HORAK, D. Carboxyl-functionalized magnetic microcapsule carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, Vol. 311, Issue 1, s. 249-254.
Gomez de Cruz A., Alonso Durán F. C., et al. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20, s. 344-354.