



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

## DNA ANALÝZA NEPATOGENNÍCH KLOSTRIDIÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

DNA ANALYSIS OF NONPATHOGENIC CLOSTRIDIA ISOLATED FROM CHEESES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MARIA CHROBOKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2009



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0348/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Maria Chroboková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**  
Konzultanti bakalářské práce:

### Název bakalářské práce:

DNA analýza nepatogenních klostridií izolovaných ze sýrů

### Zadání bakalářské práce:

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

### Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

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

-----  
Maria Chroboková  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Alena Španová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulárně genetická metoda, která umožňuje replikaci nukleových kyselin *in vitro*. Umožňuje identifikaci mikroorganismů nebo prokazování přítomnosti specifických genů v různých matricích biologického původu. Některé nepatogenní druhy rodu *Clostridium* způsobují vážná poškození sýrů, proto jejich identifikace a kvantifikace je tak důležitá v sýraštví. V této práci byly testovány specifické primery pro rod *Clostridium*. Byla zde použita bakteriální DNA sbírkových kmenů a kmenů vyizolovaných z poškozených sýrů. Pomocí specifických primerů byly metodou PCR amplifikovány charakteristické úseky DNA pro klostridie. PCR produkty (619 bp) byly detekovány použitím elektroforézy na 1,8% agarózovém gelu. Byla potvrzena rodová specifita testovaných primerů specifických pro rod *Clostridium*. Pro negativní kontrolu byla použita bakteriální DNA rodu *Lactobacillus*.

## ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is a molecular method which allows *in vitro* replication of nucleic acids. It allows the identification and quantification of microorganisms or to prove specific gene sequentions in different matrices of biological origin. Some nonpathogenic species of genus *Clostridium* cause damages of cheeses, so their identification and quantification is very important in cheesemaking. In this thesis, specific primers for genus *Clostridium* were tested. Bacterial DNA from culture collection strains and from strains isolated from damaged cheeses were used. Genus-specific region for *Clostridium* was amplified using specific primers. The PCR products (619 bp) were detected using electrophoresis in 1,8% agarose gel. Genus-specific character of primers was confirmed. DNA of *Lactobacillus* was used for negative control.

## KLÍČOVÁ SLOVA

nepatogenní klostridia, sýr, DNA analýza, polymerázová řetězová reakce, rodově specifické primery

## KEYWORDS

nonpathogenic clostridia, cheese, DNA analysis, polymerase chain reaction, genus specific primers

CHROBOKOVÁ, M. *DNA analýza nepatogenních klostridií izolovaných ze sýrů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 38 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
Chroboková Maria

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce, paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc., za poskytnutí cenných informací, odborné vedení a pomoc, které mi věnovala během zpracovávání této práce a Bc. Barboře Ůrgeové za ochotu, užitečné rady a pomoc při práci v laboratoři. Poděkování patří dále mé rodině za podporu při studiu.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>8</b>
2.1	Rod <i>Clostridium</i>	8
2.2	Klostridia a jejich význam při výrobě sýrů	8
2.2.1	Účinky pasterace	8
2.2.2	Účinky baktofugace	9
2.3	Anaerobní odbourávání glukózy za současného uvolňování vodíku	10
2.3.1	Pozdní duření	10
2.3.2	Tavení – využití vizuálně poškozených sýrů	12
2.4	Kvantitativní stanovení <i>Clostridium tyrobutyricum</i> pomocí PCR	12
2.5	Použití různých PCR primerů při analýze klostridií zodpovědných za tvorbu vodíku	13
2.6	<i>Clostridium</i> a výroba rozpouštědel	14
2.7	Fylogenetické členění vybraných zástupců rodu <i>Clostridium</i>	14
2.8	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction; PCR)	15
2.8.1	Princip PCR	15
2.8.2	Historie PCR	16
2.8.3	Komponenty PCR	16
2.8.4	Průběh PCR reakce	17
2.8.5	Faktory ovlivňující průběh PCR	18
2.8.6	Nejdůležitější vlastnosti PCR	18
2.9	Gelová elektroforéza – separace produktů PCR	19
2.9.1	Rychlost pohybu nukleových kyselin v agarózovém gelu	19
2.9.2	Vizualizace DNA na gelu	20
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>21</b>
3.1	Cíl práce	21
3.2	Materiál	21
3.3	Chemikálie	21
3.3.1	Komponenty pro PCR	21
3.3.2	Chemikálie pro gelovou elektroforézu a barvení gelu	22
3.4	Přístroje a vybavení	22
3.5	Metody	23
3.5.1	Příprava PCR směsi	23
3.5.2	Provedení PCR	23
3.5.3	Příprava agarózového gelu	24
3.5.4	Nanesení PCR produktů na gel	24
3.5.5	Gelová elektroforéza PCR produktů	24
3.5.6	Barvení PCR produktů	24
3.5.7	Dokumentace gelu	25
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>26</b>
4.1	Ověření kvality DNA	26
4.2	Použití rodově specifických primerů pro amplifikaci DNA sbírkových kmenů <i>Clostridium</i>	26

4.3 PCR s použitím rodově specifických primerů pro amplifikaci DNA kmenů <i>Clostridium</i> izolovaných ze sýrů.....	27
4.4 Shrnutí výsledků identifikace analyzovaných kmenů <i>Clostridium</i> .....	28
<b>5 Diskuze .....</b>	<b>29</b>
5.1 Ověření kvality DNA .....	29
5.2 Použití rodově specifických primerů pro amplifikaci DNA sbírkového kmene <i>Clostridium</i> .....	29
5.3 PCR s použitím specifických primerů pro amplifikaci DNA kmenů <i>Clostridium</i> izolovaných ze sýrů.....	29
<b>6 Závěr.....</b>	<b>30</b>
<b>7 Seznam použitých zdrojů.....</b>	<b>31</b>
<b>8 Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>33</b>
<b>9 Seznam příloh .....</b>	<b>34</b>
<b>10 Přílohy .....</b>	<b>35</b>

# 1 ÚVOD

Bakterie patří k lidskému životu a jsou všude kolem nás. Hned po narození dítěte bakterie obsažené ve vzduchu se dostávají na pokožku, začínají ji osidlovat, s prvním vdechnutím se dostávají na povrch sliznic dýchacích cest, s přijímanou potravou putují trávicím traktem a postupně vytvářejí střevní mikroflóru.

Nesmíme ale zapomenout, že existují také bakterie způsobující kažení potravin (*Clostridium butyricum*) a vážná onemocnění u lidí a zvířat (*Salmonella typhi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*).

Bakterie jsou také využívány v mnoha oblastech průmyslu, např. v oblasti spotřební chemie zabývající se výrobou rozpouštědel (aceton-butanol-ethanolové kvašení nepatogenního *Clostridium acetobutylicum*), v potravinářském průmyslu při výrobě kysaného zelí, sýrů, probiotických mléčných výrobků (*Lactobacillus acidophilus*), v technologii čištění vod a při biodegradaci závažných toxinů z ekosystému (sirné bakterie, *Clostridium acetobutylicum*), ve farmaceutickém průmyslu při výrobě léčiv (zástupci rodu *Penicillium*) a v mnoha dalších odvětvích průmyslu.

Trendem v posledních letech v biotechnologiích je výzkum bakterií pro využití a zpracování odpadních substrátů z různých odvětví průmyslu a vývoj metod pro výrobu bioplynu a jiných biopaliv. Je to důsledkem stále více diskutované energetické krize, nedostatku ropy a limitace fosilními palivy, globálního oteplování a ekologických problémů způsobených lidskou činností. Mnoho výzkumných projektů se proto zabývá studiem a vývojem metod pro využití různých zdrojů energie šetrných k životnímu prostředí. Jsou zaměřeny na využití slunečné, vodní, větrné a geotermální energie. V neposlední řadě i některá odvětví biologických věd zkoumají různé postupy, díky kterým lze získat paliva (metan, etanol, vodík aj.). Právě biologická výroba vodíku pomocí mikroorganismů je jedním z nejvíce ekologických postupů získávání energie. Spalování vodíku na čistou páru nepřispívá ke globálnímu oteplování, je velmi šetrné k životnímu prostředí a navíc je jedním z nejúčinnějších, alternativních a velmi jednoduše recyklovatelných biopaliv. Mezi mikroorganismy, které produkují bioplyn (vodík) patří i nepatogenní zástupci rodu *Clostridium*. Mají rovněž biotechnologický význam v potravinářském průmyslu a v chemickém průmyslu pro výrobu rozpouštědel (butanol, aceton, izopropanol).

Díky technickému vybavení dnešních biotechnologických a genetických laboratoří lze studovat genomy organismů, cíleně je měnit a využívat modifikovaných vlastností mikroorganismů. Nesmíme ale zapomenout na velké množství stále ještě nezodpovězených otázek v oblasti genetických modifikací – jejich nezávadnost pro lidský organismus a dopad na ekosystém i celou biosféru.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rod *Clostridium*

Název rodu pochází z řeckého slova *closter* (vřeten). Tento rod zahrnuje grampozitivní bakterie rostoucí při teplotě 20–40 °C. Z hlediska nároků klostridií na kyslík můžeme je zařadit do skupiny anaerobů – kyslík na ně působí toxicky, ale některé jsou aerotolerantní a mohou žít při sníženém obsahu plynného kyslíku. Pro rod *Clostridium* je charakteristická tvorba spor, přesněji endospor. Spora je umístěna centrálně (klostridiální typ) nebo terminálně. U centrálního umístění v místě, kde se vytvořila spora, bakteriální buňka je zduřelá. Lokalizace spor v buňce je jedním z mikroskopických identifikačních znaků [1]. Pokud se spory nacházejí v nepříznivých podmínkách pro život, nemohou klíčit a ani růst. V tomto stavu jsou vysoce odolné vůči zevním vlivům a vydrží v prostředí i desítky let. Ve vegetativní formě patogenní druhy klostridií produkují silné exotoxiny, které působí na savčí buňky letálně a způsobují tím vážná onemocnění např. u lidí, jako jsou tetanus, botulismus a plynatá sněť [2]. Kromě patogenních klostridií je známo více druhů nepatogenních klostridií.

Klostridia se nacházejí v trávicím ústrojí lidí i zvířat, v půdě, v povrchových a odpadních vodách, v siláži a v syrovém mléce. Existují i klostridia osidlující termální prameny a vulkanické systémy. Některé kmeny *Clostridium butyricum* jsou dokonce používány i jako probiotika – inhibují růst širokého spektra enteropatogenů [3].

### 2.2 Klostridia a jejich význam při výrobě sýrů

Nepatogenní druhy klostridií sice nezpůsobují onemocnění u lidí, ale často jsou velmi škodlivé v potravinářském průmyslu, zejména při výrobě sýrů. Poškozují sýry během zrání a takto poškozené sýry nelze pak distribuovat pro přímý konzum. Proto pasteurace a baktofugace jsou nejdůležitějšími kroky při zpracování syrového mléka.

#### 2.2.1 Účinky pasteurace

Většina sýrů se průmyslově vyrábí z pasterovaného mléka. *Pasterace* mléka je proces, který spočívá v jednorázovém zahřátí na teplotu do 100 °C. Tato teplota má zajistit zdravotní nezávadnost, průměrnou trvanlivost a technologickou použitelnost, přičemž mají být co nejvíce zachovány původní biologické, organoleptické a technologické vlastnosti mléka [4]. Při pasteuraci se usmrtí všechny nesporelující patogenní mikroorganismy, jež by v potravíně mohly být přítomny a ty mikroorganismy, které zkracují trvanlivost dané potraviny. U mléka se používá takový stupeň pasteurace, při němž ještě přežívají mléčné bakterie, jež brání rozvoji hnilobných mikroorganismů [5]. Konkrétní hodnoty teploty a času jsou určeny:

- požadavky na devitalizaci všech choroboplodných zárodků a tolika saprofytických bakterií, aby se maximálně zabezpečila trvanlivost a technologická použitelnost mléka,
- požadavky pro co největší uchování původních fyzikálních, chemických, výživových a senzorických vlastností.

Důležitým faktorem pro bezpečnost sýrů a jiných mléčných výrobků je přítomnost spor anaerobních bakterií z rodu *Clostridium* (zejména *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*), které nelze z mléka odstranit jednoduchou pasterací. Během zrání sýrů spory klíčí, bakterie se rozmnožují a způsobují tzv. *pozdní duření*. K dalším závažným druhům patří *C. sporogenes* (způsobující *bílou hnilobu*) a *C. pasteurianum*. Působením klostridií i jiných mikroorganismů může docházet k uvolňování plynů (oxidu uhličitého a vodíku). Přehled nejdůležitějších mikroorganismů (bakterií a kvasinek) zodpovědných za uvolňování plynů při růstu na různých substrátech udává následující tabulka (Tab. 1).

**Tab. 1:** Mikroorganismy odpovědné za uvolňování plynů (CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O) v sýrech

Mikroorganismus	Substrát	Plyn	
		CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	laktát	+	+
<i>Lactobacillus casei</i>	citrát	+	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	laktóza	+	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	močovina	+	-
Koliformní bakterie	laktóza	+	+
Kvasinky	laktóza	+	-
Laktokoky	citrát	+	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	laktóza/citrát	+	-
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	laktóza/citrát	+	-
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	laktát	+	-

+ ..... vytváří se

- ..... nevytváří se

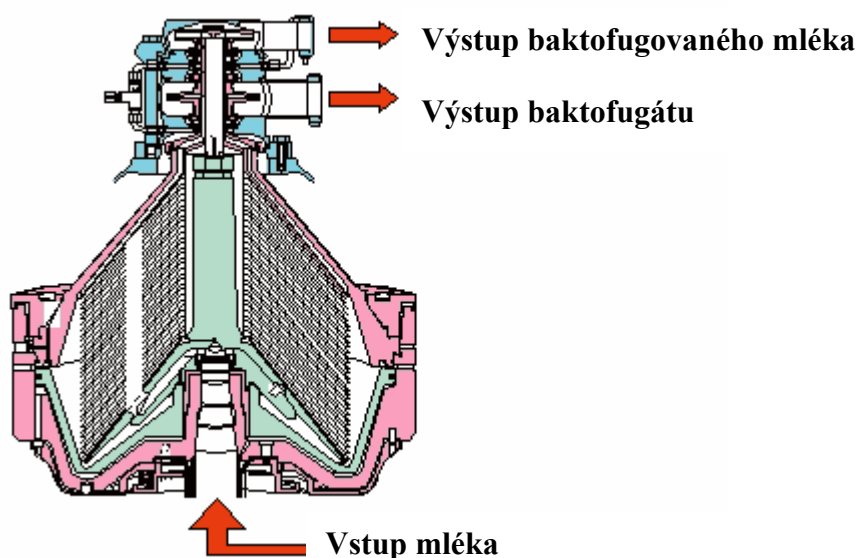
Pozdní duření v sýrech může být potlačeno minimalizací počtu spor v mléce, dodržováním přísných hygienických podmínek během výroby sýrů a omezením množství siláže jakožto hlavního krmiva [6]. Nedodržením požadovaných parametrů během silážování může dojít ke kontaminaci zpracovávaných surovin. Spory se s krmivem dostávají do těla dojníc a později do mléka. Nedostatečným ošetřením mléka spory v mléce zůstávají a dostávají se až do směsi pro výrobu sýrů, kde způsobují pozdní duření (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*) a bílou hnilobu (*C. sporogenes*). Mezi další zdroje kontaminace patří kontaminovaná voda pro napájení dojníc a nevhodné hygienické podmínky při jejich ustájení [7].

## 2.2.2 Účinky baktofugace

Spory druhů *Clostridium* se nedají z mléka jednoduše odstranit, proto pro výrobu sýrů je vhodné používat mléko od dojníc, kterým nebylo podáváno krmivo s větším obsahem těchto

bakterií, a to hlavně kontaminovaná siláž. Jednou z metod eliminace nežádoucích spor je *baktofugace*.

Jedná se o proces odstředování mléka v baktofuze při 15–20 tis. ot./min. a teplotě přibližně 60 °C, při kterém se odstraní asi 90 % spor. Baktofugace se opakuje a po druhém odstředění je odstraněno až 99,9 % spor. Při baktofugaci je třeba ale také brát v úvahu to, že odstředivkový kal (baktofugát) obsahuje mimo bakterií a jejich spor i velké množství bílkovin, o které se snižuje výtěžek a kvalita sýrů. Nové baktofugy jsou doplněny sterilizačním zařízením a sterilizovaný baktofugát se vrací do mléka pro výrobu sýrů [5]. Základní schéma baktofugy je zobrazeno na následujícím obrázku (Obr. 1).

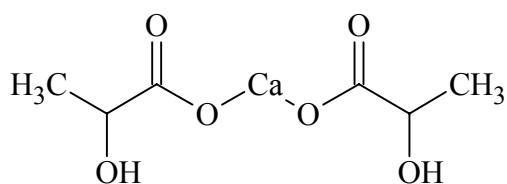


Obr. 1: Schéma baktofugy [8]

## 2.3 Anaerobní odbourávání glukózy za současného uvolňování vodíku

### 2.3.1 Pozdní duření

*Pozdní duření* se vyskytuje nejvíce u těch sýrů, u kterých sýřenina je zahřívána na 52–56 °C po dobu přibližně 45 minut. Předpokládá se, že za těchto teplot dochází k devitalizaci koliformních plynotvorných bakterií anebo ke snížení jejich vitality natolik, že nejsou schopny metabolismu. Laktóza je už většinou fermentovaná a vzniklá kyselina mléčná je většinou přítomna ve formě laktátu vápenatého (Obr. 2).

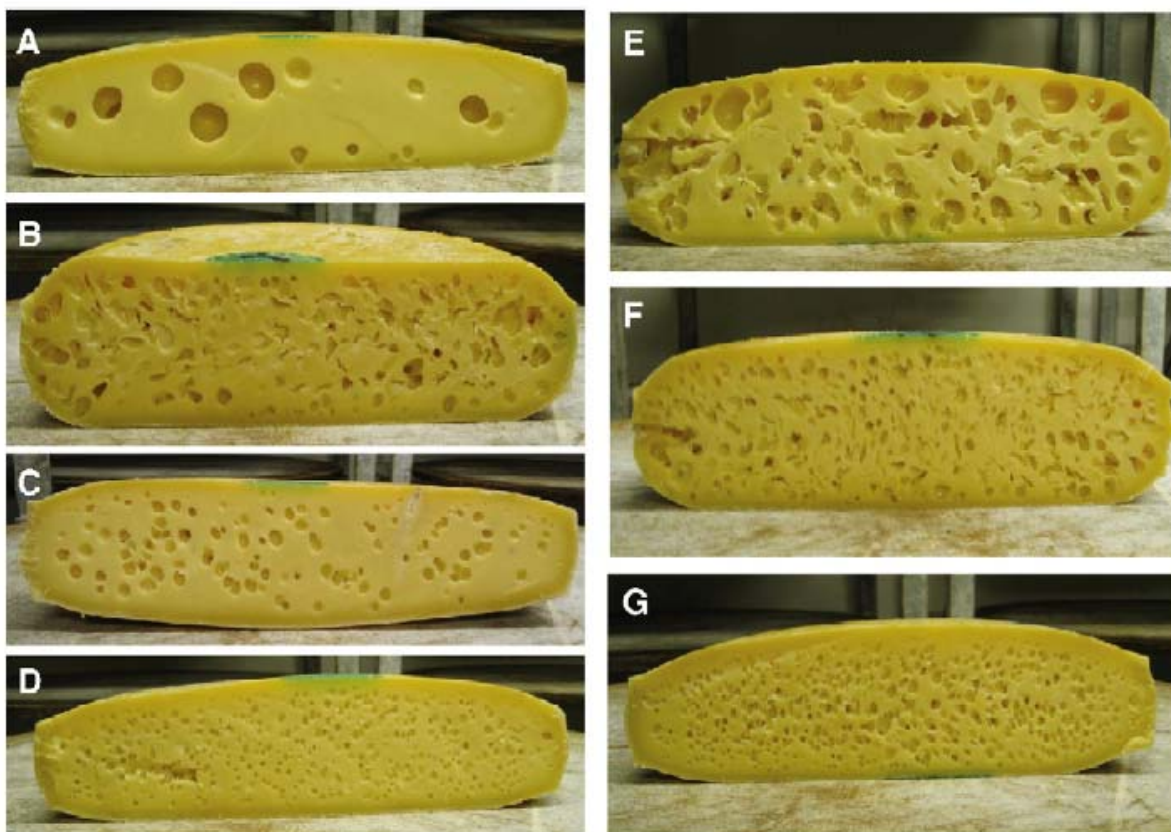


Obr. 2: Laktát vápenatý

Nežádoucími bakteriemi jsou v tomto případě plynotvorné anaerobní sporulující bakterie *Clostridium tyrobutyricum*, které mají schopnost fermentovat laktát za vzniku oxidu uhličitého a vodíku [5]. Mezi klostridie zodpovědné za tvorbu kyseliny máselné dále patří druhy *C. beijerinckii*, *C. butyricum* a *C. sporogenes*. Tyto druhy bakterií jsou nejčastější příčinou pozdního duření při zrání polotvrdých sýrů s vysokým pH (např. sýry typu Gouda a Edam) [9]. *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* a *C. sporogenes* byly izolovány ze siláže a nijak neopracovaného mléka. Pro potlačení aktivity nežádoucích mikroorganismů se používají klasické ochranné metody – výše zmíněná baktofugace, mikrofiltrace, přídavek dusičnanů, nisinu a lysozymů. K méně známým technikám patří přidávání mikrobiálních kultur – bakterií mléčného kvašení nezákysového původu. Přítomnost těchto fakultativně heterofermentativních laktobacilů byla prokázána ve většině polotvrdých sýrů. Převládají zde *Lactobacillus paracasei*, *L. casei* a *L. rhamnosus*. Antiklostridiální aktivita byla prokázána u *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* a *L. casei*. Množství bakterií mléčného kvašení nezákysového původu je kontrolováno a jejich účinnost musí být ještě detailněji prostudována [10].

Pozdní duření vzniká v sýrech později, protože bakterie způsobující toto znehodnocení jsou přítomny v mléce ve formě inaktivních spor. Pro fermentační aktivitu musí tyto spory vyklíčit na vegetativní formy. Podle podmínek uvnitř zrajícího sýru (pH,  $a_w$ ,  $E_h$ , obsah NaCl) může klíčení trvat i několik týdnů [5].

Duření se projevuje tvorbou velkých od sebe oddělených dutin s tenkou blankou a tvorbou jiných trhlin. Konzistence sýra bývá tuhá, chuť mdlá a sýry nepříjemně páchnou (off-flavours) [11]. Tento jev je výsledkem anaerobního odbourávání glukózy za vzniku vodíku, oxidu uhličitého a kyseliny máselné bakteriemi *Clostridium tyrobutyricum* a event. i dalšími klostridii. *C. tyrobutyricum* ze směsi laktátů preferuje D-laktát [6]. Nejčastěji se vyskytuje u tvrdých sýrů. Schéma anaerobního odbourávání glukózy u *Clostridium tyrobutyricum* je uvedeno v Příloha 1. Simulace zkažení sýrů kontaminovaných bakteriemi způsobujícími pozdní duření je znázorněna na Obr. 3.



**Obr. 3:** Simulace zkažení sýrů kontaminovaných nepatogenními klostridii; **A** – kontrolní zdravý sýr, **B** – inokulace druhem *C. tyrobutyricum*, **C** – *C. sporogenes*, **D** – *C. beijerinckii*, **E** – směs *C. tyrobutyricum* a *C. sporogenes*, **F** – směs *C. tyrobutyricum* a *C. beijerinckii*, **G** – směs *C. sporogenes* a *C. beijerinckii* [12]

### 2.3.2 Tavení – využití vizuálně poškozených sýrů

Surovinou pro výrobu tavených sýrů jsou takové tvrdé sýry, které mají chyby vzhledu snižující jejich hodnotu v přímé distribuci (např. slepé sýry bez vytvořených ok, sýry s trhlinami apod.). Do směsi na tavení se ještě donedávna používaly i sýry, které podlely působením nežádoucích bakterií pozdnímu duření (*Clostridium tyrobutyricum*) nebo bílé hnilobě (*Clostridium sporogenes*). Během výroby tavených sýrů se nedoporučovalo přidávat na tavení více než 15 % těchto sýrů [5].

Klíčení spor a růst vegetativních forem buněk mohou být inhibovány lysozimy nebo dusičnany, případně u tavených sýrů se využívají polyfosfáty. Baktofugace, mikrofiltrace, zvýšená koncentrace NaCl a snížené teploty zrání jsou spolehlivými faktory pro zabezpečení kvality výrobku, prevence a eliminace pozdního duření způsobeného bakteriemi *Clostridium tyrobutyricum* [6].

### 2.4 Kvantitativní stanovení *Clostridium tyrobutyricum* pomocí PCR

Jak už bylo zmíněno, *Clostridium tyrobutyricum* je hlavní příčinou pozdního duření u tvrdých a polotvrdých sýrů. Metoda kvantitativní Real-Time PCR (Q-PCR) je natolik citlivá,

že mohou být detekovány dokonce velmi nízké koncentrace spor bakterií v mléce (např. 25 spor *C. tyrobutyricum* v 25 ml syrového nebo UHT ošetřeného mléka).

Pro kvantitativní stanovení počtu *C. tyrobutyricum* byla v roce 2007 týmem vědců (López-Enríquez L. et al.; [7]) zveřejněna metoda – kvantitativní PCR v reálném čase pro identifikaci a kvantifikaci *C. tyrobutyricum*. V tomto případě se jednalo o amplifikaci druhově specifického genu pro flagelin (*fla* gen) kódujícího jeden z proteinů zajišťujících tvorbu bičičků na povrchu bakteriální buňky. Právě *fla* gen je jedním z nejlepších kvalitativních znaků pro kvantitativní stanovení *C. tyrobutyricum*. Celá sekvence pro *fla* gen (AJ242662) je 100% specifická pro *C. tyrobutyricum*. Pomocí primerů *CTflaF* a *CTflaR* lze naamplifikovat specifický fragment (83 bp) *fla* genu v oblasti mezi 539. a 621. nukleotidem (AJ242662).

Jednou z hlavních překážek zavedení metody Q-PCR do rutinní analýzy potravin jsou falešně negativní výsledky PCR reakcí, které jsou způsobeny přítomností PCR-inhibitorů ve vzorcích. Tento problém se řeší použitím vnitřní kontroly. Spolu s cílovou sekvencí je s využitím stejných primerů amplifikována další, necílová sekvence. Pokud PCR produkt pro amplifikovanou sekvenci pro *fla* gen byl negativní, nepřítomnost pozitivního amplikonu vnitřní kontroly ukazuje, že amplifikace byla neúspěšná. Nejsou-li ve vzorku amplifikované DNA přítomny inhibitory, je detekován PCR produkt vnitřní kontroly [7].

## **2.5 Použití různých PCR primerů při analýze klostridií zodpovědných za tvorbu vodíku**

Při studiu genomu klostridií pomocí PCR-DGGE se nejčastěji používají univerzální 16S rDNA PCR primery (UNIVER1392r, ACGGGCGGTGTGTAC). Během analýzy nastává pak ale problém, kdy se velmi těžce od sebe odlišují klostridie od jiných koexistujících anaerobů ve zkoumaném vzorku. V 2008 roce byla na základě dostupných rRNA genových sekvencí navržena sada specifických PCR primerů (*Chis150f* – AAAGGTAGATTAATACGCATAA; *Clost1r* – TTCTTCCTAATCTCTACGCA) pro rod *Clostridium*. Tyto primery byly testovány na čisté kultuře *Clostridium* a na lyzátu buněk z izolátu fermentačního rmutu po vodíkové fermentaci (dark fermentation sludge). Nejdůležitějším objevem bylo to, že díky nové sestavě primerů lze nejen rozeznávat koexistující klostridiální druhy, ale dokonce lze identifikovat zástupce rodu *Clostridium* vyskytující se ve fermentačním rmutu, které by nebylo možné identifikovat pomocí klasické sestavy PCR-DGGE primerů navržené pro rod *Clostridium*. Díky nově navrženým primerům je umožněn detailnější náhled do bakteriální skupiny rodu *Clostridium*, která je zodpovědná za vysoce účinnou vodíkovou fermentaci. Tato metoda by v budoucnu mohla posloužit pro navržení změn v genomu klostridií z podskupin Cluster I a Cluster II (Příloha 2, Příloha 3) pro pozdější průmyslovou výrobu vodíku jakožto nejekologičtějšího biopaliva vůbec.

Genové modifikace prováděné za účelem zvýšení podílu vyprodukovaného vodíku úzce souvisejí se změnami v enzymovém vybavení bakterií. Uvolňování vodíku je pro bakteriální buňku energeticky velmi nevýhodné, proto jakýkoli zásah do genomu za účelem zvýšení výtěžku vodíku narušuje optimální energetickou bilanci v buňce. Zvýšení podílu vyprodukovaného vodíku negativně ovlivňuje rychlost růstu a množení buněk.

Existuje více než 80 druhů rodu *Clostridium*, které byly identifikovány na základě fylogenetické analýzy sekvence 16S rDNA. Za uvolňování největšího množství vodíku jsou zodpovědné právě druhy z podskupiny Cluster I. Vysoká podobnost genů pro 16S rRNA je jedním z největších problémů při rozeznávání jednotlivých druhů, z tohoto důvodu používání univerzálních primerů 968f-1392r je pro identifikaci jednotlivých druhů pomocí PCR nedostačující. Proto byly navrženy nové primery (Chis150f-ClostI<sub>r</sub>), díky nimž je umožněna amplifikace jiné požadované oblasti genů společně pro podskupinu Cluster I. Pro studium vzorků rmutu po vodíkové fermentaci byly používány univerzální primery 968f-1392r. Tyto primery byly zároveň testovány i na čisté kultuře *Clostridium* sp. Pouze fragmenty šesti druhů z podskupin Cluster I a Cluster II se nenaamplifikovaly (*C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. thermobutyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. roseum*, *C. paraputrificum*). Správná volba směsi bakteriálních kultur pro výrobu vodíku je klíčovým krokem pro navržení výsledného systému s požadovaným výkonem. Právě PCR-DGGE analýza umožňuje sledovat skupinu klostridií zodpovědných za tvorbu vodíku během vodíkového kvašení [13].

## 2.6 *Clostridium* a výroba rozpouštědel

Třináct nových druhů klostridií izolovaných z půdy je schopno rozkládat mnoho polysacharidů z řady  $\alpha$ - a  $\beta$ -glykanů (např. škrob, xylan, pektin, inulin, celulóza) a oligosacharidů na monosacharidy. Mnoho odpadních produktů obsahuje právě tyto cukry, které se mohou stát výchozím substrátem pro další použití. Skupina vědců (Montoya et al.; [14]) zjistila, že právě tyto druhy klostridií, díky svému enzymovému aparátu, jsou schopny vytvářet velké množství rozpouštědel (tzv. ABE fermentace, aceton-butanol-etanolové kvašení).

Technologie ABE fermentace je známá již od dob první světové války. Z ekonomických důvodů byla v padesátých letech výroba rozpouštědel z přírodních zdrojů omezena a postupně se přešlo k výrobě rozpouštědel z ropných frakcí. V dnešní době se ale zase přechází zpět k nyní cenově výhodnějším bakteriálním fermentacím pro výrobu butanolu, a to hlavně z důvodu vysokého výtěžku butanolu při fermentaci. Mnoho různých odpadních produktů obsahuje polysacharidy, které *Clostridium butyricum* dokáže využívat dokonce v nízkých koncentracích. V průmyslových fermentorech výchozím substrátem jsou roztoky škrobu a melasy. Mezi klostridia zodpovědná za tvorbu rozpouštědel patří především tyto druhy: *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. acetobutylicum* a *C. butyricum* [14].

## 2.7 Fylogenetické členění vybraných zástupců rodu *Clostridium*

Všechna výše jmenovaná klostridia zodpovědná za tvorbu rozpouštědel patří do klostridiální skupiny Cluster I (Příloha 2) [13].

Během řazení klostridií zodpovědných za tvorbu rozpouštědel do fylogenetických skupin byly použity různé metody (popis buněčné membrány, biochemické, fyziologické zkoušky apod.), ale nejdůležitější z nich je řazení podle sekvence genů pro 16S rRNA [15]. Vyplývá to

z faktu, že gen pro 16S rRNA obsahuje vysoce konzervativní část. Gen pro 16S rRNA se dále skládá z konzervativní a vysoce variabilní oblasti [16]. V případě, že sekvence pro 16S rRNA jsou v 55 % homogenní, zkoumané mikroorganismy patří do stejné domény, v případě 97,5% homogenity – patří do stejného rodu [17].

V 2001 roce byly publikovány výsledky studia založeného na analýze DNA vybraných druhů klostridií [13]. Pomocí PCR byly amplifikovány úseky DNA pro gen 16S rRNA. U tří vybraných druhů byla kompletní sekvence pro gen 16S rRNA v 99,8 % identická s genovou sekvencí pro 16S rRNA u *C. butyricum* a *C. acetobutylicum*.

U třinácti druhů klostridií, u kterých bylo zjištěno největší množství vytvářených rozpouštědel, byla zkoumána ribosomální 16S genová sekvence pomocí RFLP makrorestrikčních fragmentů chromosomální DNA a jejich PFGE. Zkoumané druhy klostridií, u kterých byla prokázána schopnost vytvářet rozpouštědla, byly na genetické úrovni velice podobné *C. butyricum*, ale odlišovaly se fyziologickými vlastnostmi. Všechny mají schopnost růst na živné půdě obsahující různé polysacharidy a zároveň patří do sacharolytické skupiny klostridií Cluster I. V budoucnu možná budou v průmyslových fermentorech využívány směsi kultur: *C. butyricum* s hydrolytickými schopnostmi a nové druhy se schopností vytvářet rozpouštědla [14].

## 2.8 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction; PCR)

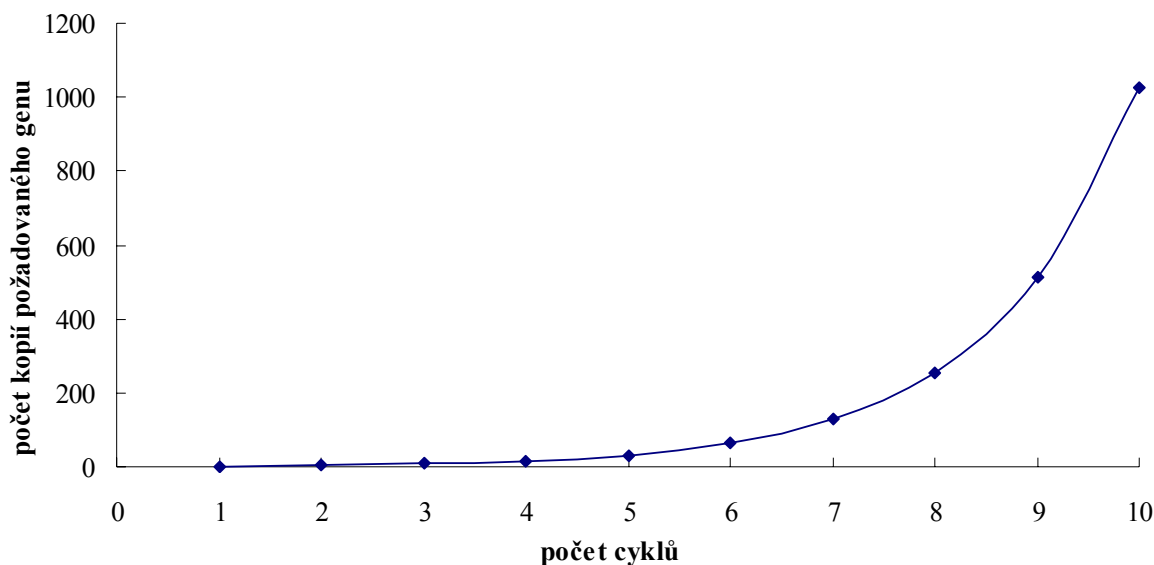
PCR se používá pro identifikaci mikroorganismů nebo prokazování přítomnosti specifických genů. Je to molekulárně genetická metoda založená na replikaci nukleových kyselin *in vitro*.

### 2.8.1 Princip PCR

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' pomocí DNA-polymerázy [18]. PCR je exponenciální reakce (Obr. 4) a teoreticky je možné z jediné molekuly DNA pomocí vhodných primerů naamplifikovat libovolné množství molekul DNA (amplikonů) [19].

Tato metoda umožnila analýzu DNA různých typů vzorků biologického původu a počet aplikací neustále vzrůstá. Nachází uplatnění při např.:

- detekci infekčních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě,
- kontrole výrobků (např. mikrobiologická kontrola jakosti potravin, zjišťování geneticky modifikovaných organismů a plodin),
- mapování genomů,
- charakterizaci genů,
- prokazování identity a otcovství (paternity),
- prenatální diagnostice dědičných chorob,
- analýze prehistorických DNA z fosilií.



**Obr. 4:** Grafické znázornění exponenciálně amplifikující se DNA

### 2.8.2 Historie PCR

Princip amplifikace DNA *in vitro* popsal již v roce 1970 Dr. Kjell Kleppe v práci *Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases*. O dnešní podobu PCR s využitím termostabilní DNA-polymerázy se zasloužil v roce 1985 Kary B. Mullis [20], který za tuto techniku v roce 1993 získal Nobelovu cenu [21]. Vypracoval postup, v němž byla DNA namnožena cyklicky se opakující enzymatickou reakcí za účasti termostabilní *Taq* DNA-polymerázy izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž proteiny denaturují (cca 95 °C).

### 2.8.3 Komponenty PCR

PCR se používá k amplifikaci přesně definovaných úseků vláken DNA. Mohou to být jednotlivé geny nebo pouze částí genů. Metodou PCR lze naamplifikovat pouze krátké fragmenty DNA (obvykle do 10 kb). K běžné PCR jsou potřebné:

- DNA templát (úsek DNA, který má být amplifikován),
- dva primery (krátké oligonukleotidy nezbytné pro činnost polymerázy),
- termostabilní *Taq* DNA-polymeráza (optimum při teplotě 72 °C; nezbytná pro syntézu DNA),
- deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP: dATP, dGTP, dCTP, dTTP ) (stavební kameny DNA),
- pufr obsahující  $Mg^{2+}$  ionty, který poskytuje vhodné prostředí pro účinnost polymerázy.

## 2.8.4 Průběh PCR reakce

Každá PCR reakce obsahuje tři kroky, které se opakují ve 20 až 40 cyklech [22]. PCR směs se obvykle připravuje ve sterilním boxu. Reakce je prováděna v termocykleru, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly (Tab. 2). Tuto závislost v případě ideální amplifikace vyjadřuje následující vzorec (Vzorec 1).

**Tab. 2:** Teoretická amplifikace cílového fragmentu DNA při zvyšujícím se počtu cyklů [18]

Číslo cyklu	Počet nasyntetizovaných molekul produktu	Číslo cyklu	Počet nasyntetizovaných molekul produktu
1	2	16	65 536
2	4	17	131 072
3	8	18	262 144
4	16	19	524 288
5	32	20	1 048 576
6	64	21	2 097 152
7	128	22	4 194 304
8	256	23	8 388 608
9	512	24	16 777 216
10	1 024	25	33 554 432
11	2 048	26	67 108 864
12	4 096	27	134 217 728
13	8 192	28	268 435 456
14	16 384	29	536 870 912
15	32 768	30	1 073 741 824

**Vzorec 1:** Matematické vyjádření amplifikující se DNA; funkčně závislá  $y$  vyjadřuje počet naamplifikovaných úseků DNA a proměnná  $n$  vyjadřuje počet cyklů

$$y = 2^n$$

Jak bylo uvedeno výše, PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi v 30 až 40 cyklech pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné reakce s odlišnými nároky na teplotu [18] (v krátkých časových úsecích dochází k zahřívání a chlazení reakční směsi na požadovanou teplotu). Jednotlivými kroky jsou:

### 1. Denaturace

Reakční směs se vzorkem *dsDNA* je zahřata na 94–96 °C, čím dojde k její denaturaci, tj. k oddělení jednotlivých vláken. Během denaturace zanikají vodíkové můstky, které spojují DNA vlákna. V prvním cyklu se doba zahřívání obvykle prodlužuje, čím se zajistí úplné oddělení jednotlivých řetězců DNA. Vzniklé řetězce slouží pak jako templáty pro další reakční cyklus. Tato fáze se obvykle nastavuje na dobu 1 minuty, v prvním cyklu až na 5 minut.

## 2. Hybridizace

Po oddělení jednotlivých vláken je teplota snížena na 45–60 °C a primery přítomné v reakční směsi se mohou hybridizovat s ssDNA. Teplota tohoto kroku se volí o 5 °C nižší než je teplota tání primerů. Nesprávná volba teploty pro připojení primerů může způsobit, že se primery nepřipojí na specifická místa templátu, což ovlivňuje specifitu reakce. Tato fáze trvá většinou 1 minutu [23].

## 3. Syntéza DNA

Po připojení primerů DNA-polymeráza syntetizuje nové vlákno, které je komplementární k templátu. Začíná prodloužením připojeného primeru. Polymeráza připojuje nukleotidy (první dNTP připojuje k primeru) komplementární k templátu na 3' konci primeru a postupuje tak po celé délce ssDNA. Teplota pro třetí fázi PCR reakce je obvykle 72 °C [22]. Je to teplota optimální pro činnost DNA-polymerázy. Doba trvání syntézy DNA se většinou pohybuje kolem 1–2 minut. Schéma PCR znázorňuje Příloha 4.

### 2.8.5 Faktory ovlivňující průběh PCR

PCR je plně automatizovaný proces, který využívá termostabilní DNA-polymerázu. Avšak i termostabilní DNA-polymeráza katalyzuje prodlužování primeru při laboratorní teplotě, což může být příčinou vzniku nespecifických produktů, zejména při nízkých koncentracích templátové DNA. Specifičnost, citlivost a výtěžek reakce významně ovlivňuje modifikace PCR označovaná jako „hot-start“ PCR, při které jsou určité složky reakční směsi odděleny od ostatních, dokud teplota ve zkumavce nepřekročí optimální teplotu pro připojení primeru (obvykle 55–65 °C). DNA-polymeráza je v této nekompletní reakční směsi nefunkční a proto nedochází k prodlužování nespecificky navázaných primerů dokud není této požadované teploty dosaženo [18].

### 2.8.6 Nejdůležitější vlastnosti PCR

Mezi nejdůležitější vlastnosti PCR patří:

- *specifita* – schopnost amplifikovat pouze úseky vymezené přesnou homologií s primery; nižší teploty hybridizace a vyšší koncentrace  $Mg^{2+}$  zpravidla specifitu snižují; může proto docházet k amplifikaci nespecifických fragmentů,
- *citlivost* – počet kopií matrice v analyzovaném vzorku, které je možné dokázat metodou PCR; teoreticky je možné amplifikovat jednu kopií; obvykle se amplifikuje více kopií a proto citlivost je vyšší než jedné matrice cílové DNA,
- *efektivnost* – určuje množství molekul matrice, které se amplifikují v jednotlivých cyklech; teoreticky se amplifikují všechny molekuly, prakticky je tato hodnota nižší,
- *fidelita* – určuje míru přesnosti sekvence PCR produktu v porovnání s templátem; závisí hlavně od použité polymerázy a poměru jednotlivých dNTP; fidelita je nepřímo úměrná počtu chybně inkorporovaných nukleotidů [19].

## 2.9 Gelová elektroforéza – separace produktů PCR

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem elektroforetické separace nukleových kyselin je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují ke kladně nabitě elektrodě – anodě [18]. Menší fragmenty DNA se pohybují rychleji, proto doputují od komůrky dále než delší fragmenty. Stanovení velikosti amplikonů nasyntetizovaných během PCR se provádí nejčastěji pomocí elektroforézy na agarósovém nebo polyakrylamidovém gelu.

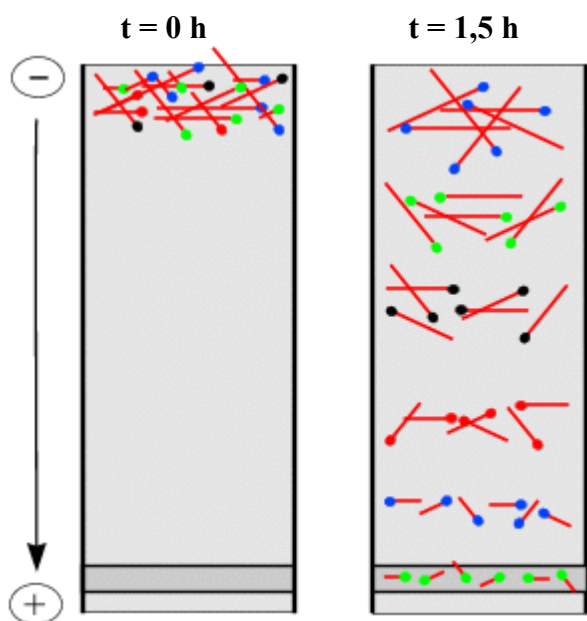
PCR produkty jsou srovnávány se standardem, který obsahuje směs DNA fragmentů o známé délce [23]. To umožňuje stanovit velikost naamplifikovaných DNA fragmentů [19]. Jednotkou velikostí jsou páry bází (bp).

### 2.9.1 Rychlost pohybu nukleových kyselin v agarózovém gelu

Rychlost pohybu nukleových kyselin v agarózovém gelu závisí na mnoha faktorech. Těmito faktory jsou:

- velikost nukleové kyseliny,
- konformace nukleové kyseliny,
- forma nukleové kyseliny,
- koncentrace gelu,
- elektroforetické napětí.

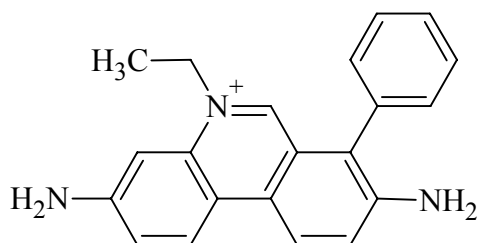
Při gelové elektroforéze DNA se do jednotlivých komůrek připraveného tuhého gelu nanese DNA standard a PCR produkty, ke kterým se přidá stanovené množství nanášecího pufru. Nejčastěji se používá 1,8% gel, ale koncentrace se může upravovat podle velikosti PCR produktů – pro větší produkty se volí řidší gel. Elektroforézu je vhodné provádět 1,5–2 hodiny při konstantním napětí (60–80 V) a proudu do 30 mA. Rozdělený vzorek standardu vytvoří tzv. žebříček, podle kterého se odhaduje velikost naamplifikovaných úseků DNA. Schéma rozdělení fragmentů DNA standardu během elektroforézy je uvedeno na následující obrázku (Obr. 5).



**Obr. 5:** Schéma rozdělení fragmentů DNA standardu během gelové elektroforézy; na začátku elektroforézy (vlevo) a po 1,5 hodině (vpravo) [22]

## 2.9.2 Vizualizace DNA na gelu

Samotná DNA je při separaci v gelu neviditelná. Zviditelňuje se použitím fluorescenčního barviva – ethidiumbromidu (EtBr; strukturní vzorec Obr. 6), který se včleňuje mezi jednotlivé báze DNA. Po ozáření UV světlem DNA fluoreskuje [19].



**Obr. 6:** Strukturní vzorec ethidiumbromidu

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Cíl práce

Cílem této části práce je testovat rodově specifické primery pro amplifikaci DNA izolované z bakteriálních buněk rodu *Clostridium* vyskytujících se ve zduřelých a jinak poškozených sýrech.

#### 3.2 Materiál

Pro testování rodově specifických primerů byla jako matrice pro PCR použita DNA izolovaná z bakteriálních buněk vyskytujících se v poškozených sýrech a dále byla použita DNA izolovaná z bakteriálních buněk ze sbírkových kmenů. Jednotlivé vzorky DNA a sekvence testovaných primerů jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 3, Tab. 4).

**Tab. 3:** Vzorky bakteriální DNA používaných pro testování rodově specifických primerů *Clostridium*

Použitá DNA bakteriálního kmene	Zdroj kmene	Koncentrace DNA (ng/μl)
<i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702	sbírkový kmen	10
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	sbírkový kmen	
<i>Clostridium sporogenes</i> CCM 4423	sbírkový kmen	
<i>Clostridium 89K25B</i>	izolát ze sýrů	
<i>Clostridium S18/2</i>	izolát ze sýrů	
<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 211/06	sbírkový kmen	

**Tab. 4:** Sekvence rodově specifických primerů používaných při amplifikaci DNA rodu *Clostridium* [16]

Označení primeru	Sekvence primeru	Velikost specifického produktu (bp)
S-G-Clos-0586-S-21 (F1)	CTCAACTTGGGTGCTGCATTT	619
S-G-Clos-1205-A-20 (F2)	ATTGTAGTACGTGTGTAGCCC	

#### 3.3 Chemikálie

##### 3.3.1 Komponenty pro PCR

Není-li uvedeno jinak, všechny PCR komponenty byly zakoupeny od firmy Top-Bio s. r. o., (Praha, ČR). Běžné chemikálie v čistotě p.a. byly získány z dostupných zdrojů.

- PCR voda (ultračistá voda 18M Ω·cm, ultrafiltrovaná, ze které byly odstraněny RNázy působením diethylpyrokarbonátu a autoklávováním)

- PCR reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA-polymerázu 1.1 (10 × PCR Blue buffer) (750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25 °C); 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 % Tween 20; 25 mM MgCl<sub>2</sub>)
- PCR dNTP mix (10 mM) (vodný roztok obsahující ultračistou směs každého ze čtyř dNTP: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP; pH 7,5)
- DNA primer F1 (10 pmol/μl)
- DNA primer F2 (10 pmol/μl)
- *Taq* DNA-polymeráza 1.1 (1U/μl) (DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus* o koncentraci 1 U/μl)
- DNA matrice ze sbírkových kmenů a z kmenů izolovaných z poškozených sýrů (10 ng/μl)

### 3.3.2 Chemikálie pro gelovou elektroforézu a barvení gelu

- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- TBE pufr (5 × koncentrovaný)

54 g Tris-báze (PENTA, Chrudim) a 27,5 g kyseliny borité (Lachema, ČR) rozpustit v 600 ml destilované vody. Přidat 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Upravit pH na 8,3 pomocí 1 M NaOH. Doplnit destilovanou vodou do 1 l. Možno sterilizovat v autoklávu. Před použitím roztok zředit 10 × destilovanou vodou na požadovanou koncentraci 0,5 × TBE)

- Nanášecí pufr (6 × koncentrovaný; 60 mM EDTA pH 8,0; 2,5 % Ficoll 400; 0,04 g bromfenolová modř)
- TE pufr (1 × koncentrovaný; 10 mM Tris pH 7,8; 1 mM EDTA pH 8,0)
- DNA standard Malamité – 100 bp žebříček; obsahuje fragmenty délky 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Roztok ethidiumbromidu (500 μg/ml) (Sigma, Praha, ČR)
- Destilovaná voda

### 3.4 Přístroje a vybavení

- Centrifuga mini Spin 13 400 min<sup>-1</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Fotoaparát Polaroid – CD 34 na film T667 (Cambridge, Velké Británie)
- Digitální fotoaparát KODAK (Kodak, Dánsko)
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn, Německo)
- Mikropipety o objemu 10 μl, 20 μl, 200 μl, 1000 μl – Discovery HTL (Polsko)
- Mikrovlnná trouba – SW 5020 (Sencor, ČR)
- Minicykler PTC 100 (MJ Research 200, USA)
- Transluminátor – TVR 3121 (Spectroline, USA)

- Očkovací box (Fatran, ČR)
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 7×10 cm (Hoefler, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (OWL Scientific, USA)
- Špičky umělohmotné
- Eppendorfové zkumavky
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný laboratorní materiál a pomůcky

### 3.5 Metody

#### 3.5.1 Příprava PCR směsi

Všechny komponenty pro PCR směs (Tab. 5) byly před použitím zkontrolovány, opatrně promíchány a krátce zcentrifugovány. PCR směs byla připravena ve sterilním boxu do 200  $\mu$ l eppendorfových zkumavek ve výsledném množství 25  $\mu$ l PCR směsi. Po každém přidání složky byla směs dobře promíchána. Komponenty pro PCR směs při použití rodově specifických primerů pro rod *Clostridium* jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5). Komponenty do PCR směsi byly smíchávány v tomtéž pořadí.

Jako kontrola kontaminace složek PCR byla použita PCR směs bez DNA matrice (místo DNA matrice byla do PCR směsi přidána voda pro PCR), pro negativní kontrolu byla použita PCR směs s DNA rodu *Lactobacillus*. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA matrice sbírkových kmenů rodu *Clostridium* (*Clostridium butyricum* DSMZ 10702, *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 2-1, *Clostridium sporogenes* CCM 211/06).

**Tab. 5:** Komponenty pro PCR směs při použití specifických primerů pro rod *Clostridium*

Komponenty	Množství ( $\mu$ l)
voda pro PCR	16,5
10 × reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	1,0
5' primer (F1 primer)	1,0
3' primer (F2 primer)	1,0
DNA-polymeráza 1.1 (1U/ $\mu$ l)	2,0
DNA matrice (10 ng/ $\mu$ l)	1,0
výsledný objem	25,0

#### 3.5.2 Provedení PCR

Vzorky obsahující všechny složky PCR směsi byly opatrně a dokonale promíchány a krátce zcentrifugovány. Vzorky byly umístěny do termocykléru. Na termocykléru byl nastaven a spuštěn program s definovanými časovými a teplotními intervaly. Každý cyklus obsahuje tři kroky. Jednotlivé kroky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 6).

**Tab. 6:** Naprogramované kroky v termocykléru

Krok	Fáze cyklu	Teplota	Doba
1.	denaturace <i>dsDNA</i>	94 °C	30 s
2.	hybridizace primerů	53 °C	30 s
3.	syntéza <i>dsDNA</i>	72 °C	60 s

Cykly byly opakovány 30 ×. Před prvním krokem byla provedena denaturace při 94 °C po dobu 5 minut, v posledním cyklu byla syntéza prodloužena o 8 minut. Po skončení PCR byl termocyklér nastaven na 10 °C pro bezpečné uchování vzorků s PCR produktem před agarózovou gelovou elektroforézou.

### 3.5.3 Příprava agarózového gelu

Koncentrace agarózového gelu závisí od účelu jeho použití. Množství agarózy i TBE pufru je závislé na výsledném množství a koncentraci gelu. Pro ověření kvality DNA byl zvolen gel o koncentraci 0,8 % hm., detekce PCR produktů byla prováděna na 1,8% hm. gelu.

Do čisté suché erlenmayerovy baňky bylo naváženo potřebné množství agarózy, k níž bylo přidáno 33 ml 0,5 × TBE pufru (0,27 g agarózy pro ověření kvality DNA; 0,6 g agarózy pro detekci PCR produktů). Vzniklá suspenze byla po krátkou dobu pětkrát povařena v mikrovlnné troubě a po každém povaření promíchána. Gel byl nalit do formy vaničky a do něj byl vložen hřebínek tak, aby byl umístěn svisle, asi 1 cm od okraje a aby jeho spodní hrany byly přibližně 1 mm ode dna formy. Gel byl ponechán tuhnout na rovné podložce při laboratorní teplotě.

### 3.5.4 Nanesení PCR produktů na gel

K PCR produktu v 200 µl eppendorfových zkumavkách bylo přidáno 5 µl nanášecího (stop) pufru. Tyto směsi byly důkladně promíchány a nanášeny mikropipetou do komůrek gelu vzniklých po odstranění hřebínku. Spolu s PCR produkty byl na gel do jedné komůrky nanesen velikostní standard 100 bp (fragменты DNA o délce 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp).

### 3.5.5 Gelová elektroforéza PCR produktů

Gel se vzorky byl umístěn do elektroforetické vany tak, aby záporně nabitá DNA migrovala ke kladně nabitě anodě. Gel byl opatrně zalit 0,5 × TE puftrem do svého převrstvení. Byla spuštěna elektroforéza. Gelová elektroforéza byla prováděna po dobu 1,5 hodiny při konstantním napětí 60 V.

### 3.5.6 Barvení PCR produktů

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) pro vizualizaci DNA. Roztok ethidium bromidu byl připraven z 500 ml destilované vody

a 500  $\mu$ l ethidium bromidu (500  $\mu$ g/ml). Tam byl ponechán po dobu 30–60 minut. Před fotografováním byl opláchnut destilovanou vodou.

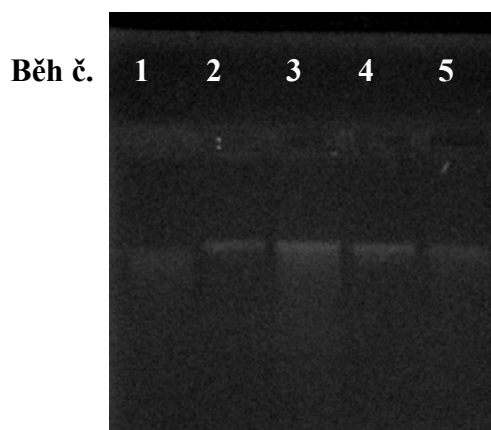
### **3.5.7 Dokumentace gelu**

Po obarvení byl gel přenesen na transluminátor. V UV světle DNA fluoreskovala. Pomocí Polaroid kamery byl gel vyfotografován na film Polaroid 667 a později převeden do elektronické podoby nebo přímo vyfotografován digitálním fotoaparátem KODAK.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Ověření kvality DNA

Byla ověřována kvalita DNA pro PCR. Byla provedena agarózová gelová elektroforéza všech vzorků bakteriální DNA na 0,8% gelu. Postup je uveden v kapitole 3.5. Výsledky agarózové gelové elektroforézy jsou uvedeny v Tab. 7 a na Obr. 7.



**Obr. 7:** Agarózová gelová elektroforéza DNA různých kmenů *Clostridium*. Na gel bylo nanášeno 30  $\mu$ l DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l.

**Tab. 7:** Nanesení vzorků DNA na gel a výsledky agarózové gelové elektroforézy bakteriální DNA

Běh č.	DNA	Detekce DNA
1	<i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702	+
2	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	++
3	<i>Clostridium sporogenes</i> CCM 4423	+++
4	<i>Clostridium</i> S18/2	++
5	<i>Clostridium</i> 89K25B	+

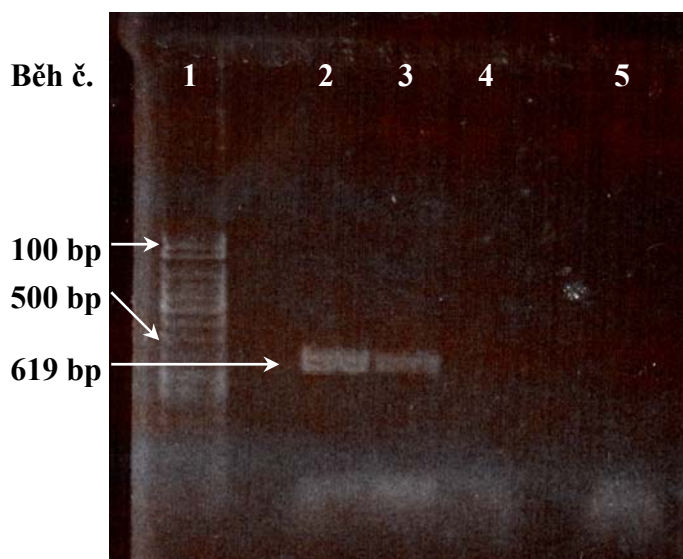
+, ++, +++ ..... detekováno malé, větší a velké množství DNA

- DNA všech testovaných kmenů *Clostridium* byla na gelu celkem dobře detekovaná. DNA byla relativně intaktní. Všechny vzorky DNA jsou vhodné pro PCR.

### 4.2 Použití rodově specifických primerů pro amplifikaci DNA sbírkových kmenů *Clostridium*

Byla ověřena rodová specifita primerů (F1 a F2) pro rod *Clostridium*. Pro PCR byla nejprve použita DNA sbírkových kmenů *Clostridium* (*Clostridium butyricum* DSMZ 10702, *Clostridium sporogenes* CCM 4423). Jako negativní kontrola byla použita DNA sbírkového kmene *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCDM 211/06. Další negativní kontrola obsahovala místo DNA PCR vodu. Byla provedena PCR s 1  $\mu$ l DNA matrice (10 ng/ $\mu$ l)

a 30 cykly v termocykleru. Naamplifikovaly se specifické produkty o velikosti 619 bp. Výsledky agarózové gelové elektroforézy jsou uvedeny níže (Obr. 8, Tab. 8).



**Obr. 8:** Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (619 bp). Byla amplifikována DNA (10 ng/μl) pomocí primerů specifických pro rod *Clostridium*.

**Tab. 8:** Nanesení PCR produktů na gel a výsledky agarózové gelové elektroforézy

Běh č.	DNA kmene	Množství PCR produktu (μl)	Detekce PCR produktu
1	DNA standard	-	100 bp žebříček
2	<i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702	25	+++
3	<i>Clostridium sporogenes</i> CCM 4423	25	+++
4	negativní kontrola – <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCDM 211/06	0	-
5	negativní kontrola – PCR voda	0	-

+++ ..... vysoká intenzita detekovaných PCR produktů

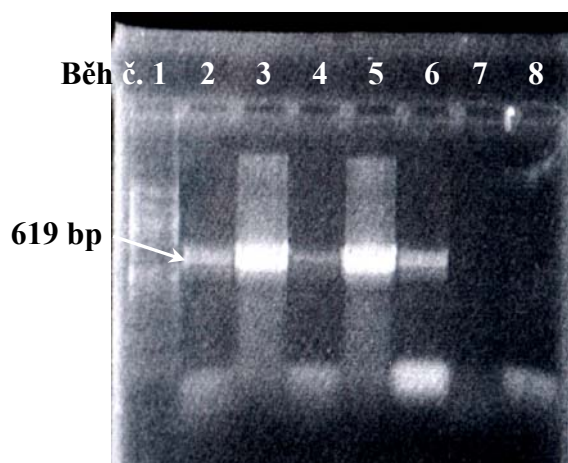
- ..... PCR produkty nedetekovány

- Byly detekovány specifické PCR produkty (619 bp) pro rod *Clostridium* naamplifikované pomocí specifických primerů F1 a F2. V negativních kontrolách nebyly amplikony detekovány.

#### 4.3 PCR s použitím rodově specifických primerů pro amplifikaci DNA kmenů *Clostridium* izolovaných ze sýrů

Pro PCR byla použita DNA kmenů izolovaných ze sýrů. Byla provedena PCR s 1 μl DNA matrice a 30 cykly v termocykleru. Naamplifikovaly se specifické produkty o velikosti 619 bp. Výsledky agarózové gelové elektroforézy jsou uvedeny v Tab. 9 a na Obr. 9. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA sbírkových kmenů *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 2-1, *Clostridium sporogenes* CCM 4423. Jako negativní

kontrola byla použita DNA sbírkového kmene *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* CCDM 211/06 a PCR směs bez DNA matrice (náhradou byla PCR voda).



**Obr. 9:** Agarósová gelová elektroforéza PCR produktů. Do směsi pro PCR byla použita DNA (10 ng) *Lactobacillus* a DNA *Clostridium*.

**Tab. 9:** Výsledky agarózové gelové elektroforézy

Dráha č.	DNA kmene	Množství PCR produktu (μl)	Detekce PCR produktu
1	DNA standard	-	100 bp žebříček
2	<i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702	25	++
3	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	25	+++
4	<i>Clostridium sporogenes</i> CCM 4423	25	+
5	<i>Clostridium</i> S18/2	25	+++
6	<i>Clostridium</i> 89K25B	25	++
7	negativní kontrola – <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> CCM 211/06	0	-
8	negativní kontrola – PCR voda	0	-

+, ++, +++ ..... detekovány PCR produkty různé intenzity

- ..... PCR produkty nedetekovány

- Byla amplifikována pouze DNA izolovaná z bakteriálních buněk zástupců rodu *Clostridium*.

#### 4.4 Shrnutí výsledků identifikace analyzovaných kmenů *Clostridium*

Všechny analyzované kmeny *Clostridium* byly pomocí rodově specifické PCR zařazeny do rodu *Clostridium*. Jedná se o tyto kmeny:

- *Clostridium butyricum* DSMZ 10702,
- *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 2-1,
- *Clostridium sporogenes* CCM 4423,
- *Clostridium* S18/2,
- *Clostridium* 89K25B.

## 5 DISKUZE

### 5.1 Ověření kvality DNA

Byla ověřována kvalita DNA izolované z poškozených sýrů a DNA získané ze sbírkových kmenů pomocí agarózové gelové elektroforézy. Na 0,8% agarózový gel byly nanášeny vzorky o koncentraci 10 ng/μl. Uvedená koncentrace DNA v gelu pro vizualizaci pomocí transluminátoru je nízká, avšak tato koncentrace je pro PCR postačující. Zároveň se ukázalo, že DNA není příliš degradovaná a pro PCR dostačující. Příliš degradovaná DNA by mohla být příčinou falešně negativních výsledků.

### 5.2 Použití rodově specifických primerů pro amplifikaci DNA sbírkového kmene *Clostridium*

Před analýzou vzorků DNA bakterií izolovaných ze sýrů byla ověřována specifita primerů pro amplifikaci DNA sbírkových kmenů *Clostridium*. Jednalo se o dva kmene různých druhů: *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 a *Clostridium sporogenes* CCM 4423. Po amplifikaci byla provedena agarózová gelová elektroforéza PCR produktů, které se amplifikovaly s 1 μl DNA matrice o koncentraci 10 ng/μl a 30 cykly v termocykleru. Ve shodě s údaji uvedenými v literatuře [16] byly detekovány specifické PCR produkty o velikosti 619 bp u obou vzorků, které právě obsahovaly DNA sbírkových kmenů klostridií. DNA sbírkového kmene *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* CCM 211/06 se nenaamplifikovala. Tím byla prokázána rodová specifita primerů S-G-Clos-0586-S-21 (F1) a S-G-Clos-1205-A-20 (F2) pro rod *Clostridium* [16]. Zároveň bylo prokázáno, že vzorky DNA neobsahují inhibitory ani kontaminanty PCR. Inhibitory PCR jsou překážkou pro rutinní analýzu vzorků [18].

### 5.3 PCR s použitím specifických primerů pro amplifikaci DNA kmenů *Clostridium* izolovaných ze sýrů

Byla provedena PCR s použitím specifických primerů pro rod *Clostridium* s DNA ostatních analyzovaných kmenů. Jak bylo předpokládáno, pomocí PCR s použitím rodově specifických primerů byly amplifikovány úseky DNA charakteristické pro rod *Clostridium* [16]. Na transluminátoru po barvení roztokem ethidiumbromidu byla provedena vizualizace specifických amplikonů o velikosti 619 bp. Negativní kontrola s DNA sbírkového kmene *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* CCM 211/06 potvrdila rodovou specifitu pouze pro rod *Clostridium*. Další negativní kontrola, ve které byla místo DNA použita PCR voda ukázala, že žádná komponenta PCR není kontaminovaná. Kontaminace bývají příčinou falešně pozitivních PCR reakcí [7]. V provedeném experimentálním uspořádání bylo kontaminacím zamezeno. Experimentální uspořádání bylo provedeno dle autorů Sambrook a spol. [24]. Dle předpokladů se veškerá DNA izolovaná z různých druhů rodu *Clostridium* amplifikovala v rodově specifické PCR. Bylo tak potvrzeno zařazení všech studovaných kmenů do rodu *Clostridium*.

## 6 ZÁVĚR

Na bezpečnost a kvalitu potravin se v dnešní době klade velký důraz. Nepatogenní klostridie neohrožují přímo člověka, ale způsobují velké škody v potravinářství – sýrašství. Některé druhy nepatogenních klostridií mohou sloužit při výrobě rozpouštědel z alternativních zdrojů a odpadních produktů. Klostridie mají také význam při produkci plynů, zejména vodíku. Vodík je velmi účinný a recyklovatelný bioplyn, který nezatěžuje životní prostředí. Voda je hlavním produktem spalování. Je jedním z hlavních produktů při mikrobiálním anaerobním odbourávání glukózy.

Molekulárně-genetické metody se stále vyvíjejí a nacházejí stále více aplikací v rutinních analýzách. PCR má velký význam v genetických i potravinářských laboratořích. Díky této metodě lze jednoduše a rychle stanovovat mikrobiální složení probiotických výrobků, probiotických doplňků a různých funkčních potravin, dále může být použita v mnoha molekulárně-genetických výzkumech. Pomocí PCR se relativně jednoduchým způsobem a rychle zkoumá a ověřuje rodová nebo druhová příslušnost bakteriálních kmenů. Polymerázová řetězová reakce je jednou z metod identifikace a kvantifikace nežádoucích bakterií přítomných např. ve zpracovávaném mléku. Jejimi největšími přednostmi jsou rychlost, přesnost a specifita.

V experimentální části této práce byly testovány rodově specifické primery S-G-Clos-0586-S-21 (F1) a S-G-Clos-1205-A-20 (F2). U těchto primerů byla prokázána specifita pro rod *Clostridium*. Pomocí rodově specifické PCR s využitím primerů F1 a F2 byly všechny analyzované druhy klostridií zařazeny do rodu *Clostridium*.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KLABAN, Vladimír. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. české vyd. Praha: Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [2] *Avian Services Center: DNA sexing and disease testing for all species of birds. : Clostridium* [online]. [1995] , 13. prosince 2008 [cit. 2009-02-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.avianbiotech.com/diseases/clostridium.htm>>.
- [3] NAKANISHI, Shusuke, et al. Rapid Species Identification and Partial Strain Differentiation of *Clostridium butyricum* by PCR Using 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Regions. *Microbiol. Immunol.* 2005, vol. 49, no. 7, pp. 613-621.
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha: Academia, 2002. 3. vydání. 363 s., ISBN 80-200-1024-6.
- [5] GÖRNER, Fridrich, VALÍK, L'ubomír. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin.* 1. vydání. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [6] FOX, Patrick F., et al. *Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology.* 3<sup>rd</sup> edition. 2004. 2 sv. (434, 617 s.). ISBN 0-12-263652-X.
- [7] LÓPEZ-ENRÍQUEZ, Lorena, RODRÍGUEZ-LÁZARO, David, HERNÁNDEZ, Marta. Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007, vol. 73, no. 11, pp. 3747–3750.
- [8] *OBRÁZEK: Schonende Bactofugierung bei niedrigen Energiekosten* [online]. 2001 [cit. 2009-01-31]. Dostupný z WWW: <[http://www.tetrapak-processing.de/produkte/images/bactofuge\\_funktion.gif](http://www.tetrapak-processing.de/produkte/images/bactofuge_funktion.gif)>.
- [9] INGHAM, Steven C., et al. Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology.* 1998, vol. 43, no. 3, pp. 173–183.
- [10] TŮMA, Štěpán, KUČEROVÁ, Kateřina, PLOCKOVÁ, Milada. Isolation of Anticlostridially Active Lactobacilli from Semi-hard Cheese. *Czech Journal of Food Sciences.* 2008, no. 26, s. 324-332.
- [11] ŠERÁ, Martina. Biotechnologické procesy při výrobě tvrdých sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou. Zlín, 2008. 53 s. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Bakalářská práce.
- [12] LE BOURHIS, Anne-Gaëlle, et al. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology.* 2007, no. 113, pp. 154–163.
- [13] HUNG, Chun-Hsiung, et al. Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. *International Journal of Hydrogen Energy.* 2008, no. 33, pp. 1588.

- [14] MONTOYA, D., et al. New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolysing a wide range of polysaccharidies, are closely related to *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2001, no. 27, p. 329.
- [15] KEIS, S., et al. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1995, vol. 45, no. 4, pp. 693–705.
- [16] REKHA, Rani, RIZVI, Moshahid Alam, JAISHREE, Paul. Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 9, no. 5, p. 508.
- [17] STACKEBRANDT, E., GOEBEL, B. M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994, vol. 44, no. 4, pp. 846–849.
- [18] ŠMARDÁ, Jan, et al. *Metody molekulární biologie*. Ilustrace Jana Koptíkové. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [19] BIOWEB – PCR [online]. 3. srpna 2007, [cit. 2008-11-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.bioweb.genezis.eu/index.php?cat=11&file=pcr>>.
- [20] The Official Web of the Nobel Foundation [online]. 2009 [cit. 2009-05-18]. Dostupný z WWW: <<http://nobelprize.org/index.html>>.
- [21] *Základy molekulární biologie* [online]. 2006, 7. listopadu 2006 [cit. 2008-11-12]. Dostupný z WWW: <<http://appendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio.htm>>.
- [22] *Principle of the PCR* [online]. 1999, 5. ledna 2004 [cit. 2008-11-20]. Dostupný z WWW: <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>.
- [23] *Polymerase Chain Reaction (PCR) for Lesson Plans & Science Fair Projects*: [online]. [2007], 20. srpna 2007 [cit. 2008-11-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.juliantrubin.com/encyclopedia/biochemistry/pcr.html>>.
- [24] SAMBROOK, Joseph, RUSSEL, David, W. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Press. New York. 2001. ISBN 978-087967. pp 577-584.
- [25] *OBRÁZEK: Základy moderní biologie – sylabus 2008* [online]. 2005, 13. ledna 2009 [cit. 2009-03-28]. Dostupný z WWW: <[http://appendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio\\_soubory/image008.jpg](http://appendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio_soubory/image008.jpg)>.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$a_w$ .....	vodní aktivita
ABE fermentace .....	aceton-butanol-etanolové kvašení
DNA .....	deoxyribonukleová kyselina
RNA .....	ribonukleová kyselina
rRNA .....	ribosomální RNA
16S rRNA .....	RNA malé ribosomální podjednotky u bakterií
RFLP .....	polymorfismus délky restričních fragmentů
PFGE .....	pulsní gelová elektroforéza
PCR .....	polymerázová řetězová reakce
Q-PCR .....	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
DGGE .....	elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu
bp .....	páry bází
dNTP .....	deoxyribonukleosidtrifosfát
EtBr .....	ethidiumbromid
UHT .....	zpracování mléka krátkodobým záhřevem na vysokou teplotu
DSMZ .....	Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur
UTMT .....	Ústav technologie mléka a tuků
CCM .....	Česká sbírka mikroorganismů
CCDM .....	Česká sbírka mlékařských mikroorganismů
Fd .....	ferredoxin
FdH <sub>2</sub> .....	redukováná forma ferredoxinu
NAD <sup>+</sup> .....	nikotinamidadenindinukleotid
NADH+H <sup>+</sup> .....	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu
HSCoA .....	koenzym A

## 9 SEZNAM PŘÍLOH

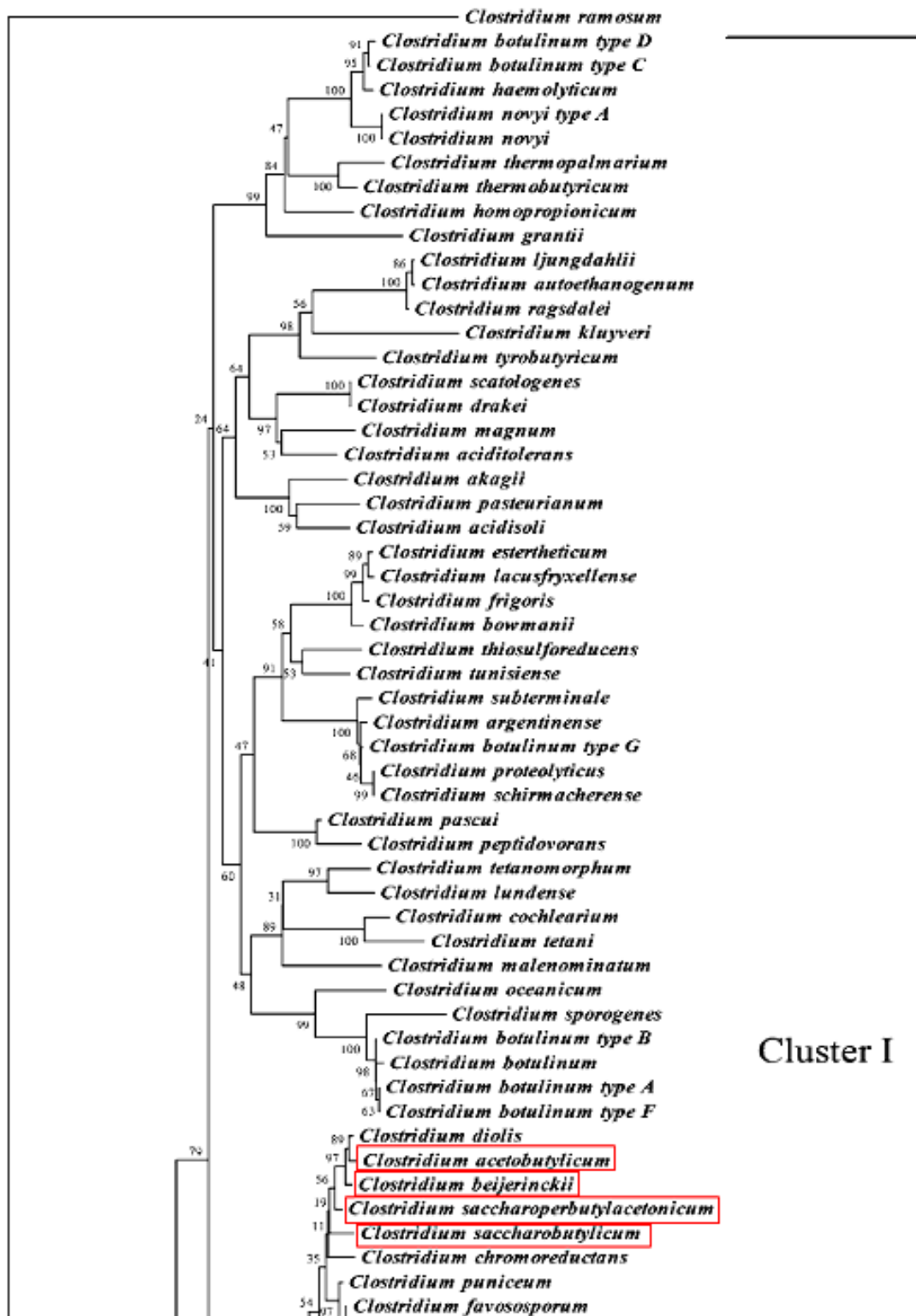
**Příloha 1:** Reakční schéma anaerobního odbourávání glukózy u *Clostridium tyrobutyricum*

**Příloha 2:** Fylogenetické rozčlenění rodu *Clostridium* na základě identifikace podle rRNA

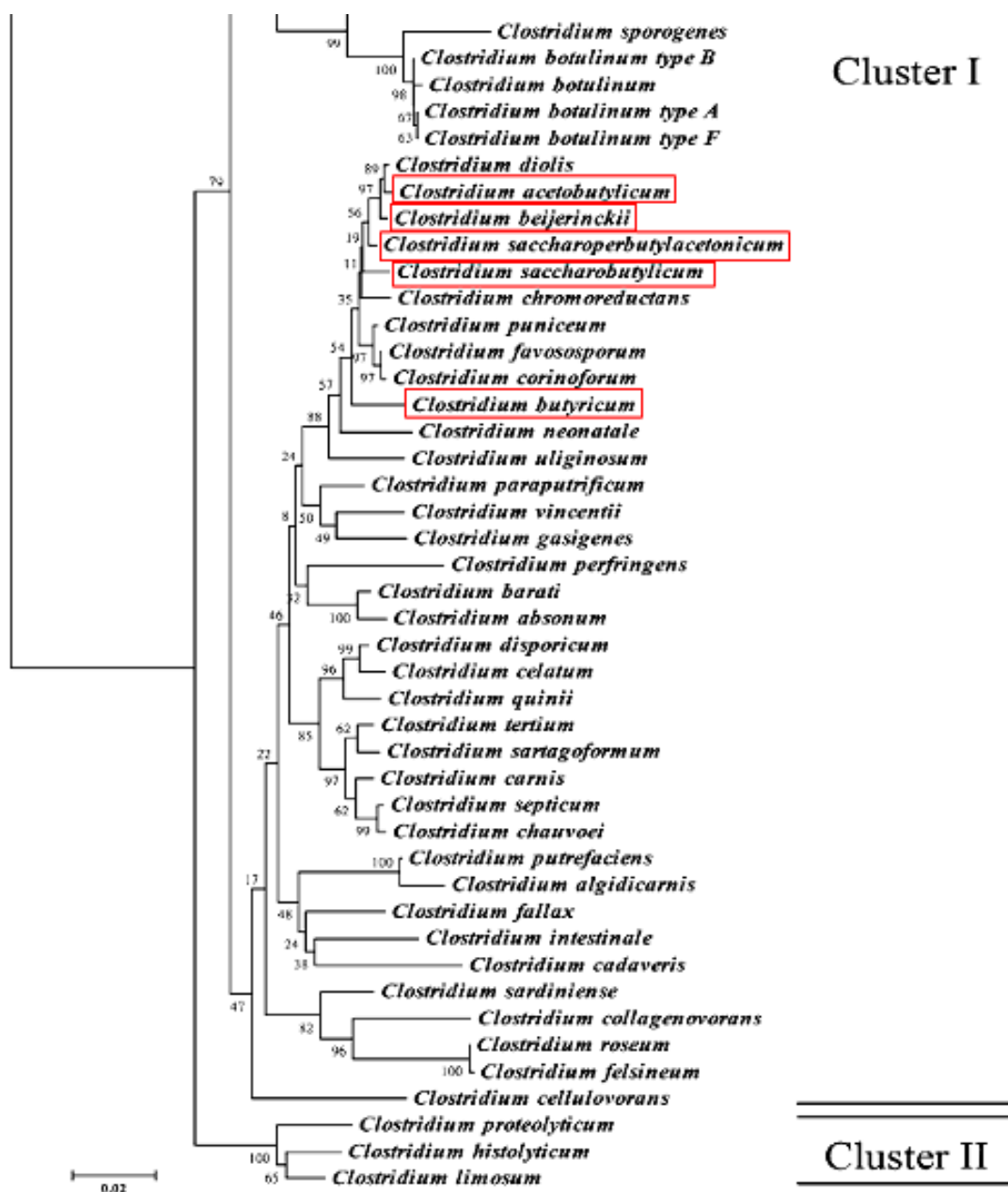
**Příloha 3:** Fylogenetické rozčlenění rodu *Clostridium* na základě identifikace podle rRNA  
pokračování Přílohy 2

**Příloha 4:** Schéma polymerázové řetězové reakce

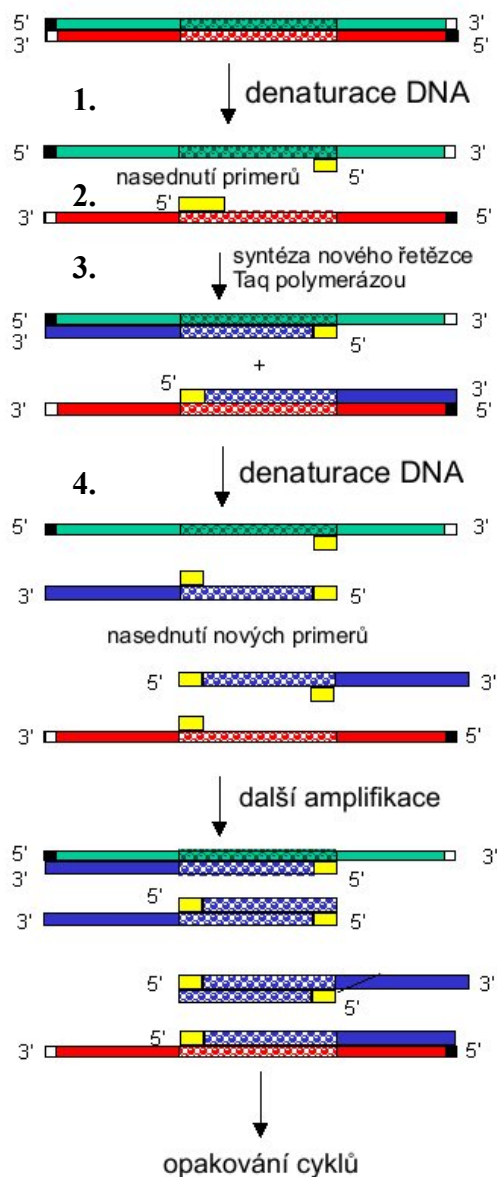




**Příloha 2:** Fylogenetické rozčlenění rodu *Clostridium* na základě identifikace podle rRNA [13]



**Příloha 3:** Fylogenetické rozčlenění rodu *Clostridium* na základě identifikace podle rRNA; pokračování Příloha 2 [13]



**Příloha 4:** Schéma polymerázové řetězové reakce; **1.** denaturace DNA, **2.** nasednutí primerů, **3.** syntéza nového řetězce DNA *Taq*-polymerázou podle matrice, **4.** nasyntetizované amplicony denaturují a vstupují do dalšího cyklu PCR, celý cyklus se opakuje; zeleně a červeně jsou znázorněny řetězce původní DNA, modře jsou znázorněny nově nasyntetizované řetězce DNA a žlutě jsou znázorněny primery; tečkovaná oblast odpovídá amplifikovanému úseku DNA [25]